

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5371426号  
(P5371426)

(45) 発行日 平成25年12月18日(2013.12.18)

(24) 登録日 平成25年9月27日(2013.9.27)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 31/366 (2006.01)** A 6 1 K 31/366  
**A 6 1 K 31/337 (2006.01)** A 6 1 K 31/337  
**A 6 1 K 31/4025 (2006.01)** A 6 1 K 31/4025  
**A 6 1 K 31/5377 (2006.01)** A 6 1 K 31/5377  
**A 6 1 K 31/7068 (2006.01)** A 6 1 K 31/7068

請求項の数 4 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-520226 (P2008-520226)  
(86) (22) 出願日 平成17年7月11日(2005.7.11)  
(65) 公表番号 特表2009-500408 (P2009-500408A)  
(43) 公表日 平成21年1月8日(2009.1.8)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2005/024429  
(87) 国際公開番号 W02007/008200  
(87) 国際公開日 平成19年1月18日(2007.1.18)  
審査請求日 平成20年7月11日(2008.7.11)  
(31) 優先権主張番号 60/586,687  
(32) 優先日 平成17年7月9日(2005.7.9)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 507007957  
プロロックス ファーマシューティカルズ  
コープ.  
アメリカ合衆国、85705 アリゾナ州  
、ツーソン、イースト 6番 ストリート  
221  
(73) 特許権者 505167532  
アリゾナ ボード オブ リージェンツ  
オン ビハーフ オブ ザ ユニバーシテ  
ィ オブ アリゾナ  
アメリカ合衆国 アリゾナ州 85721  
、ツーソン、ルーム 204、ノース ユ  
ークリッド アベニュー 888

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワートマニン類似体及び化学療法薬と組み合わせた同一物を使用する方法

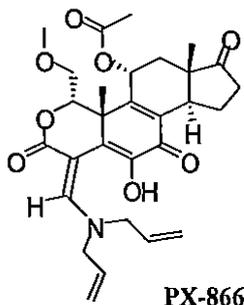
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌の治療に使用するための、

以下の化学式の構造の化合物の薬学的有効量を有する薬剤であって、

【化1】



前記薬剤は、さらに化学療法薬と組み合わせて使用されるものであり、

前記化学療法薬は、ゲムシタピン (gemcitabine)、パクリタキセル (paclitaxel)、シスプラチン (cisplatin)、ゲフィチニブ (gefitinib) 及びベバシズマブ (bevacizumab) から成る群より選択されるものである、薬剤。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の薬剤において、前記化学療法薬は、ゲムシタピン (gemcitabine)、パクリタキセル (paclitaxel)、及びシスプラチン (cisplatin) から成る群より選択される細胞障害剤である、薬剤。

## 【請求項 3】

請求項 1 記載の薬剤において、前記化学療法薬はゲフィチニブである、薬剤。

## 【請求項 4】

請求項 1 記載の薬剤において、前記化学療法薬はベバシズマブである、薬剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、「ワートマニン類似体及びその使用」という名称で、2004年7月9日付で提出された米国仮出願第60/586,687号に対して優先権を主張しており、その全体は本明細書に組み込まれるものである。

発明の開示

## 【背景技術】

## 【0002】

本発明はワートマニン類似体、及びPI-3-キナーゼ活性を阻害し、更に特定の悪性腫瘍及び他の癌を治療するために、それらの誘導体を単独又は化学療法薬と組み合わせて使用する方法に関する。ワートマニンは、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI-3-キナーゼ) 及び抗癌剤の強力な阻害剤として周知である。ワートマニンは、真菌アオカビワートマニンの培養液から単離される天然化合物であり、米国特許第5,480,906号明細書において示される基本構造を有するものである (前記引用はこの参照により本明細書に組み込まれる)。

20

この出願の発明に関連する先行技術文献情報としては、以下のものがある (国際出願日以降国際段階で引用された文献及び他国に国内移行した際に引用された文献を含む)。

【特許文献 1】米国特許第6,703,414号明細書

【特許文献 2】米国特許第3,668,222号明細書

## 【発明の開示】

30

## 【課題を解決するための手段】

## 【0003】

本発明の一観点によると、新規なワートマニン類似体、及び対象において癌を阻害する方法を提供するものであり、その方法はワートマニン類似体の薬学的有効量を対象に投与する工程を有するものである。

## 【0004】

本発明の別の観点によると、ワートマニン類似体の有効量を投与することにより哺乳類のPI-3-キナーゼ活性を阻害する方法が提供される。

## 【0005】

本発明の別の観点によると、抗癌 (抗腫瘍) 剤としての前記化合物使用、及び薬学的に許容可能な担体、受容体、又は希釈剤と組み合わせた前記化合物を含む薬学製剤が提供される。

40

## 【0006】

本発明の更なる観点によると、癌を治療するための化学療法薬と組み合わせたワートマニン類似体の使用が提供される。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0007】

本組成物及び方法を記載する前に、本発明が、記載される特定の工程、組成物、又は方法に限られず、変化することもあることが理解される。また、本記載において使用される専門用語は、特定の意味又は実施形態を説明する目的のみのものであり、添付の請求項の

50

みによって限定される本発明の範囲を制限することを意図しないことが理解される。

【0008】

その本明細書及び添付の請求項において使用される単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈で明確に別に示されていない限り、複数の言及を含む。従って、例えば、「繊維芽細胞」への言及は、1若しくはそれ以上の繊維芽細胞及び当業者に既知のその同等物に言及するなどである。他に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、当業者に一般的に理解される同一の意味を有する。本明細書において記載されるものと類似又は同等な任意の方法及び物質が本発明の実施形態の実践又は試験において使用される場合があるが、好ましい方法、装置、及び物質は以下に記載する。本明細書において記載する全公開物は、参照により全体が組み込まれる。本明細書は、本発明が先行技術の長所による開示に先立つ権利がないことの承認として解釈されるものではない。

10

【0009】

本明細書に記載する使用方法は、既存の病気の治療における治療的使用及び予防的使用を意図する。本明細書において使用されるように、「約」という用語は、使用されている数値の $\pm 10\%$ を意味する。従って、約50%は、45%~55%の範囲を意味する。

【0010】

治療手段と併せて使用する場合の「投与」は、全身に若しくは例えば直接標的細胞に又は標的細胞上に治療剤を投与するように局所的に投与すること、若しくは治療剤が標的とする組織に確実に影響を与えるように治療剤を患者に投与することを意味する。従って、本明細書において使用されるように、ワートマニン類似体と併せて使用する場合、「投与」という用語は、これに限定されないが、標的組織中又は標的組織上にワートマニン類似体を提供すること、治療薬が標的組織又は細胞に到達するように例えば静脈内注射により全身的に患者にワートマニン類似体を提供することを含む。組成物を「投与する」ことは、注射、局所的投与、経口投与により、若しくは他の方法単独で又は他の従来技術との組み合わせで達成される。そのような組み合わせ技術は、加熱、放射線照射、及び超音波を含む。

20

【0011】

本明細書において使用されるように、「治療的(therapeutic)」という用語は、患者の望ましくない状態又は病気を治療する、防止する、改善する、阻止する、又は向上させる薬剤を意味する。一部において、本発明の実施形態は、癌治療及び/又は癌症状の改善に関する。

30

【0012】

組成物の「治療的有效量」又は「有効量」は、望まれる効果、すなわち、細胞の活性、遊走、又は増殖を抑制、阻害、又は逆転させるなど効果を達成するために、或いは癌を効果的に治療する若しくは癌の症状を改善するために算出された所定量である。本発明のワートマニン類似体の治療的有效量は、生理的に許容な賦形剤組成物において投与される場合、血漿又は血清における有効濃度若しくは標的組織における局所的有效濃度に到達するのに十分である一般的な量である。本発明の化合物の有効量は、治療中の患者が経験する腫瘍サイズ、全身腫瘍組織量、又は症状における改善により測定することが可能である。本発明の方法により予期される活性は、適切な医学的治療剤及び/又は予防的治療の両者を含む。治療的及び/又は予防的効果を得るために本発明に従って投与される化合物の特定の投与量は、例えば、投与化合物、投与経路、及び治療する病気など含む特定の周囲状況により、当然、決定されるであろう。

40

【0013】

「抑制する」という用語は、症状を緩和し、疾病、状態、又は疾患を除去して症状の発現を防ぐための本発明の化合物の投与を含む。

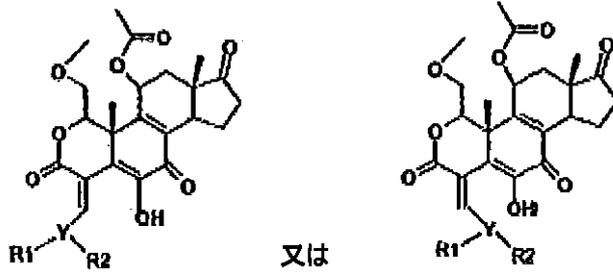
【0014】

本発明の一観点は、以下の一般的化学式のワートマニン類似体であり、

【0015】

50

## 【化6】



10

## 【0016】

ここで、Yはヘテロ原子であり、更にR1又はR2は不飽和アルキル、非直線アルキル、若しくは置換アルキルであり、分枝鎖又は環状アルキルを含む。好ましくは、ワートマニン類似体は、図16において示される化合物から成る群から選択される化学式と一致する。より好ましくは、R1又はR2は、PX-866及びPX-867等の二置換アルキルである。

## 【0017】

ワートマニンの生合成的な生成は当業者に既知であり、その類似体はワートマニンから合成される。米国特許第5,480,906号明細書において(これはこの参照により本明細書に完全に組み込まれる)、典型的な合成スキームが記載されている。一般的に、ワートマニンは、*Talaromyces*ワートマニン及び*Penicillium*ワートマニン、*Myrothecium roridum*、並びにフザリウム(*Fusarium*)等の以前に開示された多くの微生物のうちのいずれか1つの発酵により生成される。発酵後、ワートマニンは抽出され、既知の方法により精製される。好ましくはワートマニンは微生物合成され、発酵培養から実質的に精製された形態で単離される(そのような発酵培養の1つはA24603.1として特定される)。

20

## 【0018】

ワートマニンの回収可能な量が生産されるまで、適切な培地において水中酸素条件下で株を培養することにより、ワートマニンが生成される。ワートマニンは、当業者に既知のさまざまな単離及び精製手順を使用して回収することが可能である。

30

## 【0019】

培養株を増殖するために使用される培地は、多くの培地のいずれか1つであれば良い。しかしながら、生成、最適収量、及び生成物単離の簡便さにおける経済的理由から、大規模発酵において好ましい炭素源は、グルコース及び可溶性澱粉(トウモロコシ澱粉等)である。マルトース、リボース、キシロース、フラクトース、ガラクトース、マンノース、マンニトール、ジャガイモデキストリン、オレイン酸メチル、大豆油等の油等もまた、使用可能である。

## 【0020】

好ましい窒素源は、酵素加水分解カゼイン及び綿実小麦粉であるが、ペプシン分解された乳汁、消化された大豆食、魚粉、コーンステープリカー(corn steep liquor)、酵母エキス、酸性加水分解カゼイン、牛肉エキス等もまた、使用可能である。

40

## 【0021】

培養培地に組み入れることが可能な栄養源無機塩の中で、通常可溶性塩は、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、ナトリウムイオン、アンモニウムイオン、塩化物イオン、炭酸イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、亜鉛イオン等を生成することができる。生物の成長及び発育のために必要な必須微量元素もまた、培地中に含まれるようにすべきである。そのような微量元素は、一般的に、生物が成長するための必要条件に十分な量において培地の他の置換基の不純物として存在する。

50

## 【 0 0 2 2 】

相当量のワートマニンを生成するためには、攪拌したバイオリアクター中の水中好気性発酵が好まれる。少量のワートマニンは、振盪培養により得ることが出来る。大型バイオリアクターを生物の芽胞形成と接種するのに一般的に関連する生成のタイムラグのため、栄養接種を使用することが好ましい。栄養接種は、少量の培地を芽胞形成または菌糸断片と摂取することにより調整され、新鮮且つ活発に成長する生物体の培地が得られる。栄養接種培地は、より大規模発酵のために使用されるものと同一でも良いが、他の培地もまた適切である。

## 【 0 0 2 3 】

前述の生成後、ワートマニンは、当業者において使用される方法によって発酵培地から回収され得る。A 2 4 6 0 3 . 1 生物の発酵期間に生成されるワートマニンは、例えば、主に培養液中に発生する。

## 【 0 0 2 4 】

一般的に、ワートマニンはさまざまな技術によりバイオマスから回収することが可能である。好ましい技術は、セラミック濾過器により全発酵培養液を濾過することに関連する。濾液は、酢酸エチル等の有機溶媒で溶出し濃縮する。前記濃縮物は結晶化が起こるまでアルコール中に懸濁し、さらにその溶液を濾過し、洗浄し、更に乾燥させる。確認のために、結晶性物質を有機溶媒に溶解し、逆相シリカゲル吸収剤 (C<sub>8</sub> 又は C<sub>18</sub>) 上のクロマトグラフィーにかける。分画は、60%アセトニトリルなどの有機溶媒 - 水溶液緩衝液で溶出される。

## 【 0 0 2 5 】

ワートマニンを更に操作することにより本発明の化合物に達する。特定のワートマニン類似体の合成を以下に示したが、当業者であれば当業者に一般的である他の合成スキームによって本発明に従った化合物を合成することが可能であり、本明細書において説明される合成スキームが限定的であると考慮されるべきではない。

## 【 0 0 2 6 】

特定の兆候を治療的処置するために、本発明のワートマニン類似体は、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所的静脈投与、又は好ましくは経口投与のための単位投与量形態において、薬学的組成物として、或いは薬学的組成物と混ぜ合わせて処方することにより投与することが可能である。そのような薬学的組成物は、当業者に既知の方法で調製され、薬学的担体、及び本明細書を通して使用される用語「活性化化合物」から成る群より選択される少なくとも1つの活性化化合物を含み、前記「活性化化合物」という用語は、前記化学式の化合物から成る化合物から選択される少なくとも1つの化合物又はそれらの薬学的に許容な塩に言及する。

## 【 0 0 2 7 】

化合物は、広範囲な投与量において有効であり、例えば、通常一日の投与量は、0 . 0 0 1 ~ 1 0 の m g / k g までであり、より一般的には 0 . 0 1 ~ 1 m g / k g である。しかしながら、投与される有効量が、治療される条件、投与される化合物の選択、及び選択された投与経路を含む適切な状況に合わせて、医者により決定されることが理解され、従って上記の投与量範囲は本発明の範囲を限定する意図ではない。

## 【 0 0 2 8 】

そのような組成物において、活性化化合物は、「活性成分」として知られる。組成物を作る際に、活性成分は、カプセル、におい袋、紙、又は他のコンテナであっても良い担体と通常混合され、又は担体により希釈され、又は担体の中に包み込まれる。担体が希釈剤として役立つ場合、それは、活性成分のための媒体の賦形剤として作用する固体物質、半固体物質、又は液体物質である。このように、組成物は、錠剤、ピル、粉末、トローチ剤、カプセル、エリキシル剤、エマルジョン、溶液、シロップ、懸濁液、柔ゼラチンカプセル又は硬ゼラチン、注射可能な滅菌溶液、及びパック化滅菌粉末の形態であり得る。

## 【 0 0 2 9 】

適切な担体、賦形剤及び希釈剤のいくつかの実施例は、ラクトース、デキストロース、

10

20

30

40

50

スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウムアルギン酸塩、カルシウムサリシレート、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、トラガカンタ、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、メチル - 及びプロピルヒドロキシ安息香酸塩、滑石、ステアリン酸マグネシウム、水、及び鉱油を含む。製剤は加えて、平滑剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、保存料、甘味料、又は香料を含み得る。組成物は、当業者に既知の手順を使用することにより患者に投与後活性成分の即時、徐放性、又は遅延放出を提供する目的で調製される。

【 0 0 3 0 】

経口投与のために、化合物は担体及び希釈剤と混合され、錠剤に成型、又はゼラチンカプセルに封入することが可能である。前記混合物は選択的に 10% グルコース水溶液、等張食塩水、滅菌溶液等の液体中で溶解することが可能であり、静脈内又は注射により投与することが可能である。

10

【 0 0 3 1 】

「薬学的に許容可能な」とは、担体、希釈剤、又は賦形剤が製剤の他の成分と適合しなければならず、その受容体に対して有害であってはならないことを意味する。

【 0 0 3 2 】

活性化化合物を癌治療のために抑制量で局所的に送達することは、化合物を増殖部位に又はその近接位に投与する様々な技術によりなされ得る。局所的送達技術の例は限定することを意図しないが、利用可能な技術を例示する。それらの例は、局所的送達カテーテル、部位特異的担体、移植、直接注入、又は直接塗布を含む。カテーテルによる局所的送達によって、直接増殖部位に薬剤を投与することが可能である。

20

【 0 0 3 3 】

移植による局所的送達とは、薬剤を含むマトリックスを増殖病巣へ外科的配置することを表す。移植されたマトリックスは、拡散、化学反応、又は溶媒活性化剤により薬剤を放出する。

【 0 0 3 4 】

他の例は、ポリマーの腔内封着による薬剤の送達である。この技術は、ポリマー移植を内腔の内部表面に適用させるためにカテーテルを使用する。生分解性ポリマー移植に組み込まれた薬剤は、外科的部位において放出される。このような内容は、国際公報第 WO 90 / 0 1 9 6 9 号 ( S c h i n d l e r , A u g . 2 3 , 1 9 8 9 ) に記載される。

30

【 0 0 3 5 】

移植による局所的送達の最後の例は、小胞又は微粒子の増殖部位への直接注入によるものである。これらの微粒子は、タンパク質、脂質、炭水化物、又は合成ポリマー等の物質から成るものであっても良い。これらの微粒子は、微粒子覆うコーティング剤として又は微粒子を介して組み込まれた薬剤を有する。微粒子を組み込んでいる送達系は、L a n g e , S c i e n c e 2 4 9 : 1 5 2 7 - 1 5 3 3 ( S e p t e m b e r , 1 9 9 0 ) 及び M a t h i o w i t z , e t a l . , J . A p p . P o l y . S c i . , 2 6 : 8 0 9 ( 1 9 8 1 ) に記載される。

【 0 0 3 6 】

部位特異的担体による局所的送達とは、増殖部位に医薬品を導く担体に薬剤を接着することを表す。この送達技術の例は、タンパク質リガンド又は単クローン抗体等の担体の使用を含む。

40

【 0 0 3 7 】

直接塗布による局所的送達は、局所的塗布の使用を含む。直接塗布による局所的送達の例は、動脈腫瘍又は腫瘍の切除後残された部位への薬剤の塗布である。

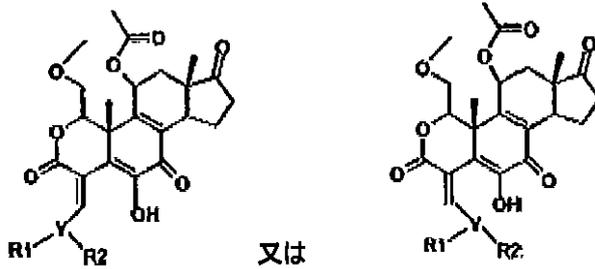
【 0 0 3 8 】

ワートマニン類似体の製剤は当業者に周知であり発酵工程によるものである。製剤又は合成スキームに関する包括的な詳細に入るより、本発明は以下の一般化学式の化合物を合成するためのそれらの一般的合成技術及び製剤技術を使用する当業者に依存しており、

【 0 0 3 9 】

50

## 【化7】



10

## 【0040】

ここにおいて、

Yはヘテロ原子であり、更にR1又はR2が不飽和アルキル、非直線アルキル、分枝鎖アルキル、置換アルキル、又は環状アルキルである。好ましくは、本発明は、図16において示される化合物から成る群より選択される化合物に対応する化学式を有する。

## 【0041】

ワートマニン類似体及びそれを含む薬学的組成物は、PI-3Kの阻害及び癌の治療及び/又は予防に役立つ可能性がある。

## 【0042】

本発明の別の観点によると、癌の治療及び/又は予防における化学療法薬と組み合わせたワートマニン類似体の使用が提供される。ワートマニン類似体は、化学療法薬の投与前、その最中、又はその後に投与される。化学療法薬は、細胞障害剤及び抗腫瘍標的化剤の両者を含む。例示的な細胞障害剤は、これに限定されるものではないが、ゲムシタピン（ジェムザール（登録商標））、パクリタキセル（タキソール（登録商標））、及びシスプラチン（プラチノール（登録商標））を含む。例示的な抗腫瘍標的化剤は、これに限定されるものではないが、ゲフィチニブ（イレッサ（登録商標））、エルロチニブ（タルセバ（登録商標））、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、セツキシマブ（エルピタックス（登録商標））、及びペバシズマブ（アバステン（登録商標））を含む。特定の実施形態において、薬学製剤は、ワートマニン類似体及び化学療法薬の組み合わせを含む。他の実施形態において、ワートマニン類似体及び化学療法薬は、他の薬剤の投与前、実質的に同時、又は後のいずれかの時に別々に投与される。

20

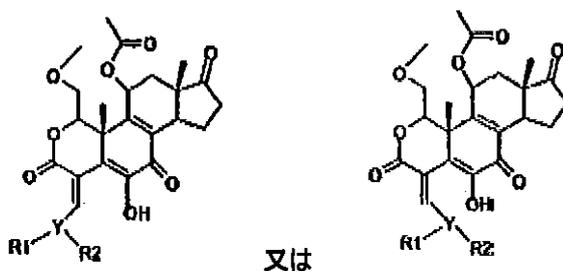
30

## 【0043】

本発明の別の観点において、以下の一般化学式のワートマニン類似体の治療的有効量を投与することによりPI-3Kを阻害する方法が提供され、

## 【0044】

## 【化8】



40

## 【0045】

ここにおいて、

Yはヘテロ原子であり、更にR1又はR2は分枝鎖アルキル又は環状アルキルを含む不飽和アルキル、非直線アルキル、置換されたアルキルである。好ましくは、前記ワートマニン類似体は、図16において示される化合物からなる群より選択される化学式と一致する。より好ましくは、R1又はR2は、二置換アルキルである。一実施形態において、前

50

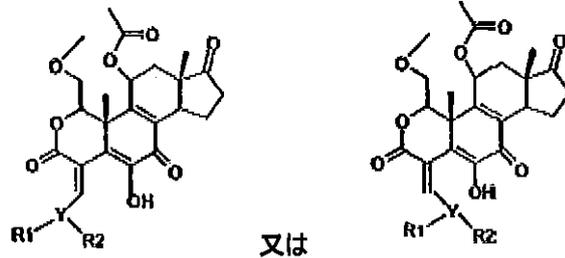
記ワートマニン類似体は P X - 8 6 6 及び P X - 8 6 7 である。前記ワートマニン類似体は、化学療法薬の投与の前、実質的に同時、又は後に投与される。

【 0 0 4 6 】

本発明の別の観点において、以下の一般化学式のワートマニン類似体の治療的有効量を投与することにより P I - 3 K を阻害する方法が提供され、

【 0 0 4 7 】

【 化 9 】



10

【 0 0 4 8 】

ここにおいて、

Y はヘテロ原子であり、更に R 1 又は R 2 は分枝鎖アルキル又は環状アルキルを含む不飽和のアルキル、非直線アルキル、置換されたアルキルである。好ましくは、前記ワートマニン類似体の R 1 又は R 2 は二置換アルキルであり、化学療法薬は、ゲムシタピン（ジェムザール（登録商標））、パクリタキセル（タキソール（登録商標））、及びシスプラチン（プラチノール（登録商標））から成る群から選択されるものである。例示的な抗腫瘍標的化剤は、これに限定されるものではないが、ゲフィチニブを（イレッサ（登録商標））、エルロチニブ（タルセバ（登録商標））、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、セツキシマブ（エルピタックス（登録商標））、及びペバシズマブ（アパスチン（登録商標））を含む。より好まれる実施形態において、前記方法は P X - 8 6 6 及びゲフィチニブを投与することを含む。また別の実施形態において、前記方法は P X - 8 6 7 及びゲフィチニブを投与することを含む。前記ワートマニン類似体は、化学療法薬の投与の前、実質的に同時に、又はその後に投与することが可能である。

20

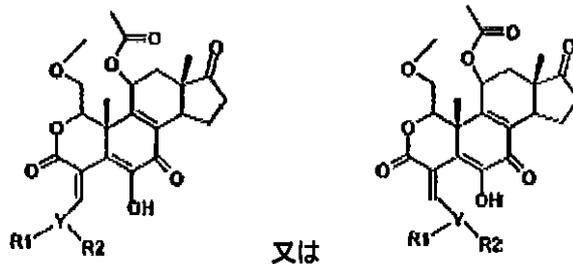
30

【 0 0 4 9 】

本発明の別の観点において、以下の一般化学式のワートマニン類似体の治療的有効量を投与することにより癌を治療又は予防する方法が提供され、

【 0 0 5 0 】

【 化 1 0 】



40

【 0 0 5 1 】

ここにおいて、

Y はヘテロ原子であり、更に R 1 又は R 2 は分枝鎖アルキル又は環状アルキルを含む不飽和アルキル、非直線アルキル、置換アルキルである。好ましくは、前記ワートマニン類似体は、図 1 6 において示される化合物からなる群より選択される化学式と一致する。より好ましくは、R 1 又は R 2 は二置換アルキルである。一実施形態において、前記ワート

50

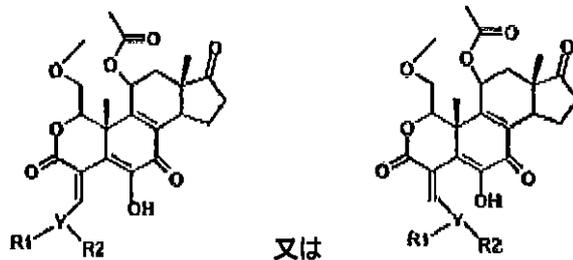
マニン類似体は P X - 8 6 6 及び P X - 8 6 7 である。前記ワートマニン類似体は、化学療法薬の投与の前、実質的に同時、又は後に投与することが可能である。

【 0 0 5 2 】

本発明の別の観点において、以下の一般化学式のワートマニン類似体の治療的有効量を他の化学療法薬との組み合わせで投与することにより癌を治療又は予防する方法が提供され、

【 0 0 5 3 】

【 化 1 1 】



10

【 0 0 5 4 】

ここにおいて、

Y はヘテロ原子、更に R 1 又は R 2 は分枝鎖アルキル又は環状アルキルを含む不飽和アルキル、非直線アルキル、置換アルキルである。好ましくは、ワートマニン類似体の R 1 又は R 2 は二置換アルキルであり、化学療法薬は、ゲムシタピン（ジェムザール（登録商標））、パクリタキセル（タキソール（登録商標））、及びシスプラチン（プラチノール（登録商標））から成るグループから選択される。例示的な抗腫瘍標的化剤は、これに限定されるものではないが、ゲフィチニブを（イレッサ（登録商標））、エルロチニブ（タルセバ（登録商標））、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、セツキシマブ（エルピタックス（登録商標））、及びベバシズマブ（アバスチン（登録商標））を含む。より好ましい実施形態において、前記方法は、P X - 8 6 6 及びゲフィチニブの投与を含む。別のより好ましい実施形態において、前記方法は、P X - 8 6 7 及びゲフィチニブの投与を含む。前記ワートマニン類似体は、前記化学療法薬の投与前、実質的に同時に、又はその後

20

30

【 0 0 5 5 】

更なる実施形態において、ワートマニン類似体の活性代謝産物を含む化合物及びその使用方法が提供される。好ましい実施形態において、前記活性代謝産物は、ワートマニン類似体のカルボニル還元物、及びカルボニル還元脱アセチル化物から成る群より選択されるものである。より好ましい実施形態において、前記活性代謝産物は、カルボニル還元 P X - 8 6 6 及びカルボニル還元脱アセチル化 P X - 8 6 6 から成る群より選択されるものである。

【 0 0 5 6 】

増大した細胞生存は癌細胞の基本的特性であり、癌治療の効果を制限する。多くの癌における増大した細胞生存の重要なメカニズムは、受容体及び発癌性タンパク質チロシンキナーゼにより活性化されるホスファチジルイノシトール - 3 - キナーゼ（P t d I n s - 3 - キナーゼ）/ A k t（タンパク質キナーゼ B）情報伝達系により媒介される。8種類の哺乳類の P t d I n s - 3 - キナーゼは、3つの主なクラスに分類される。分類 I の P t d I n s - 3 - キナーゼのリン酸化メンブレン P t d I n s は、そのプレクストリン相同（pH）ドメインに結合することにより細胞質セリン/トレオニンキナーゼ A k t を入れる P t d I n s（3, 4, 5）P 3 を与える。細胞膜に関連した A k t は、細胞膜に関連したホスホイノシチド依存性キナーゼ - 1（P D K 1）による S e r 4 7 3 リン酸化及び不十分に特徴づけられた第 2 の P D K 2 による T h r 3 0 8 リン酸化により活性化される。活性化された A k t は、原形質膜から脱離し、細胞質及び核に移動し、そこにおいて

40

50

一連の標的をリン酸化して死滅遺伝子 ( death genes ) の発現を防ぎ、細胞生存を誘導する。P t d I n s - 3 - キナーゼ活性は、人間の小細胞肺癌、卵巣癌、頭頸部癌、泌尿器癌、大腸癌、及び子宮頸部癌において増加される。腫瘍抑制タンパク質 P T E N ( ホスファターゼ及びテンシンホモログが欠失した第 10 番染色体上 )、二重特異性チロシン - トレオニン / P t d I n s - 3 - ホスファターゼは、P t d I n s ( 3 , 4 , 5 ) P 3 の蓄積を防ぎ、及び P t d I n s - 3 - キナーゼ情報伝達 ( 9 ) を減らす。P T E N は、進行前立腺癌、進行子宮体癌、進行腎臓癌、進行グリア癌、進行メラノーマ、進行小細胞肺癌を含むヒトのさまざまな癌において突然変異化している又は欠失している。P X - 8 6 6 は、ゲフィチニブ抗腫瘍活性を強化する。プロテインキナーゼファミリーは、受容体タンパク質チロシンキナーゼがその中においてしばしば癌治療の標的になる 8 0 0 10 より多くのヒトメンバーを有する。その細胞外ドメインへのリガンド結合により活性化される際に 3 つの他のファミリーメンバー E r b B - 2 ( H E R 2 )、E r b B - 3 ( H E R 3 )、及び E r b B - 4 ( H E R 4 ) の任意とホモ 2 量体化又はヘテロ 2 量体化し、細胞質の C 末端チロシン残基の自動リン酸化を引き起こす上皮細胞成長因子受容体 ( E G F R、E r b B - 1、H E R 1 ) をそれらは、含む。これらのリン酸化は、ラス癌遺伝子 - M E K M A P K 経路、S T A T 経路、及び P t d I n s - 3 - キナーゼ / A k t 生存経路を含む情報伝達経路の活性化を導くシグナルトランスデューサを入れる。E G F R は、それが腫瘍進行に重要な役割を果たすと考えられている広範囲のヒトの癌において増幅される又は過剰発現する。非小細胞癌において、E G F R 発現は、減少した患者生存と相関する。E G F R 単クローン抗体と同様数多くの小分子 E G F R キナーゼの阻害剤は、開発 20 中である又は臨床使用のために承認される。ゲフィチニブ ( Z D 1 8 3 9 イレッサ ( 登録商標 ) ) は、再発した n s c 肺癌患者に投与される際に 1 0 ~ 2 0 % の応答率を示しており、他の 2 0 ~ 3 0 % の患者においてその疾病を安定化させた。しかしながら、未治療の n s c 肺癌患者においてゲフィチニブの化学療法への添加は、全体の生存率、進行時間、応答率に関し、何ら効果がなかった。全てではないが、単一ゲフィチニブ剤に応答する大多数の n s c 肺癌患者は、E G F R チロシンキナーゼドメインの未知機能の重大な体細胞突然変異を含む。しかしながら、E G F R 受容体突然変異体を持たない n s c 肺癌患者でゲフィチニブ及び他の E G F R 阻害剤から利点を得る患者もまた存在する。さらに、E G F R の突然変異を活性化することは、ヒトの結腸直腸癌及び神経膠芽腫において稀であるが、これらの腫瘍は、E G F R 阻害剤に 30 応答する。最近の研究により、ゲフィチニブが細胞増殖を阻害し E r b B - 3 発現を伴う n s c 肺癌細胞系において P t d I n s - 3 - キナーゼ情報伝達を下方制御するように P X - 8 6 6 は、ゲフィチニブ抗腫瘍活性を強化するということが示された。これは、P t d I n s - 3 - キナーゼが E r b B - 3 にカップリングし、野生型又は E G F R 受容体突然変異体的一方及び E r b B - 3 を有する n s c 肺癌細胞系においてのみ P t d I n s - 3 - キナーゼ / A k t 情報伝達活性化を導く故である。ゲフィチニブは、E r b B - 3 への P t d I n s - 3 - キナーゼの結合を阻害し、このようにこれらの細胞系において P t d I n s - 3 - キナーゼ / A k t 活性化を防ぐことが可能である。ゲフィチニブへの応答を決定する際に働く P t d I n s - 3 - キナーゼの中心的役割は、E r b B - 3 を発現しない抗 n s c 肺癌腫瘍において P t d I n s - 3 - キナーゼの阻害剤がゲフィチニブの抗腫瘍活性を増す方法を提供する可能性があること 40 を示唆する。P X - 8 6 6 は、現在臨床前の試行開発段階にある P t d I n s - 3 - キナーゼの新しい阻害剤である。E r b B - 3 を発現せず、ゲフィチニブに耐性がある活性 N r a s 突然変異体を有する A - 5 4 9 ヒト n s c 肺癌細胞系が使用された。A - 5 4 9 腫瘍異種移植片において、ゲフィチニブが P t d I n s - 3 - キナーゼ / A k t 情報伝達を阻害せず、P X - 8 6 6 の静脈内 ( i v ) 又は経口 ( p o ) 投与がゲフィチニブの抗腫瘍活性を顕著に強化したことが見出された。P X - 8 6 6 の長期投与の毒性は、それがインスリン感受性の減少に関連した血糖値を増すことを示す。

【 0 0 5 7 】

使用される方法及び物質を図示している本発明及び実施例は、以下の非制限実施例の参照により更に理解される。

10

20

30

40

50

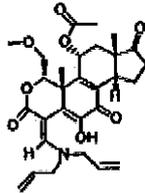
## 【実施例 1】

## 【0058】

酢酸 4 - ジアリルアミノメチレン - 6 - ヒドロキシ - 1 - - メトキシメチル - 10 , 13 - ジメチル - 3 , 7 , 17 - トリオキソ - 1 , 3 , 4 , 7 , 10 , 11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 16 , 17 - ドデカヒドロ - 2 - オキサ - シクロペンタ [ ] フェナントレン - 11 - イル - エステル ( d j m 2 - 166 ) 。

## 【0059】

## 【化 12】



10

## 【0060】

新たに調製した  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の 0.2 M ジアリルアミン原液 ( 138  $\mu\text{L}$  , 27.5  $\mu\text{mol}$  ) を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( 125  $\mu\text{L}$  ) 中のワートマニン溶液 ( 10.7 mg , 25.0  $\mu\text{mol}$  ) に添加した。その反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。溶媒及び過剰アミンを真空中で除去し、 $\text{SiO}_2$  ( ヘキサン / 酢酸エチル , 1 : 9 ) のクロマトグラフィーを用いて生成物を精製することにより、オレンジ油として d j m 2 - 166 ( 9.0 mg , 17  $\mu\text{mol}$  , 68% ) が得られた： [ ]  $D = 630$  (  $c_0.0015$  ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  , 23 C ) ; IR ( KBr ) 3391 , 1743 , 1695 , 1685 , 1622 , 1569 , 1222 , 1111 , 1100  $\text{cm}^{-1}$  ;  $^1\text{H NMR}$  8.20 ( s , 1 H ) , 6.81 ( s , 1 H ) , 6.06 ( dd , 1 H ,  $J = 7.4 , 4.8 \text{ Hz}$  ) , 5.85 ( br s , 1 H ) , 5.62 ( br , 1 H ) , 5.44 ~ 5.04 ( m , 4 H ) , 4.48 ( dd , 1 H ,  $J = 7.2 , 1.9 \text{ Hz}$  ) , 4.05 ~ 3.60 ( m , 4 H ) , 3.26 ( s , 3 H ) , 3.27 ~ 3.20 ( m , 1 H ) , 3.16 ( dd , 1 H ,  $J = 10.9 , 7.2 \text{ Hz}$  ) , 3.00 ~ 2.90 ( m , 2 H ) , 2.59 ( dd , 1 H ,  $J = 19.4 , 8.6 \text{ Hz}$  ) , 2.40 ( dd , 1 H ,  $J = 14.4 , 7.7 \text{ Hz}$  ) , 2.35 ~ 2.07 ( m , 2 H ) , 2.07 ( s , 3 H ) , 1.83 ( dd , 1 H ,  $J = 14.4 , 4.7 \text{ Hz}$  ) , 1.54 ( s , 3 H ) , 0.86 ( s , 3 H ) ;  $^{13}\text{C NMR}$  217.0 , 178.5 , 169.6 , 164.8 , 156.3 , 151.5 , 139.0 , 136.9 , 132.2 , 131.3 , 127.7 ( 2 C ) , 119.2 , 89.0 , 81.9 , 73.1 , 67.6 , 59.1 , 50.9 ( 2 C ) , 48.9 , 42.3 , 42.2 , 37.5 , 36.0 , 24.6 , 22.2 , 20.8 , 16.1 ; MS ( EI )  $m/z$  ( rel. 強度 ) 525 (  $M^+$  , 11 ) , 466 ( 17 ) , 391 ( 15 ) , 350 ( 14 ) , 323 ( 13 ) , 266 ( 17 ) , 239 ( 17 ) , 60 ( 100 ) ; HRMS ( EI )  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_8$  の計算値は 525.2363 であり、実測値は 525.2386 であった。

20

30

40

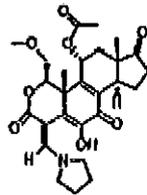
## 【実施例 2】

## 【0061】

酢酸 6 - ヒドロキシ - 1 - - メトキシメチル - 10 , 13 - ジメチル - 3 , 7 , 17 - トリオキソ - 4 - ピロリジン - 1 - イル - メチレン - 1 , 3 , 4 , 7 , 10 , 11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 16 , 17 - ドデカヒドロ - 2 - オキサ - シクロペンタ [ ] フェナントレン - 11 - イル ( d j m 2 - 167 ) 。

## 【0062】

## 【化13】



## 【0063】

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中のピロリジン (7.0  $\mu\text{L}$ , 84  $\mu\text{mol}$ ) を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200  $\mu\text{L}$ ) 中のワートマニン溶液 (30.0 mg, 70.0  $\mu\text{mol}$ ) に添加した。その反応混合物を室温で1時間撹拌した。溶媒及び過剰チオールを真空中で除去し、 $\text{SiO}_2$  (ヘキサン/酢酸エチル 9:1, 結果1:1) のクロマトグラフィーによって生成物を精製することにより、オレンジ油として d j m 2 - 167 (30.0 mg, 60.6  $\mu\text{mol}$ , 86%) が得られた。: [ ]<sub>D</sub> - 390 (c 0.0073,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 23C) ; IR (KBr) 3337, 1740, 1684, 1617, 1570, 1261, 1221, 1099, 1018  $\text{cm}^{-1}$ ; . sup. <sup>1</sup>H NMR 8.29 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.07 (dd, 1H, J = 6.9, 4.8 Hz), 4.47 (dd, 1H, J = 7.0, 1.9 Hz), 3.80 ~ 3.70 (m, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.25 ~ 3.14 (m, 2H), 3.02 ~ 2.90 (m, 2H), 2.69 (br s, 1H), 2.58 (dd, 1H, J = 19.1, 8.4 Hz), 2.39 (dd, 1H, J = 14.6, 7.8 Hz), 2.32 ~ 2.08 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.99 ~ 1.95 (m, 5H), 1.84 (dd, 1H, J = 14.5, 4.2 Hz), 1.56 (s, 3H), 0.86 (s, 3H); . sup. <sup>13</sup>C NMR 217.5, 178.9, 169.9, 164.9, 153.9, 151.3, 137.6, 137.1, 129.2, 89.4, 82.1, 73.3, 67.7, 59.3, 55.2, 49.2 (2C), 42.6, 42.4, 37.8, 36.3, 25.6 (2C), 24.5, 22.4, 21.0, 16.3; MS (EI) m/z (rel. 強度) 499 (M. sup. +, 1), 439 (2), 365 (7), 167 (35), 149 (100); HRMS (EI)  $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_8$  の計算値は 499.2206 であり、実測値は 196 であった。

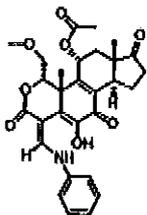
## 【実施例3】

## 【0064】

酢酸 4 - [ (ベンジルメチルアミノ) メチレン ] - 6 - ヒドロキシ - 1 - メトキシメチル - 10 - ジメチル - 3, 7, 17 - トリオキソ - 1, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 - ドデカヒドロ - 2 - オキサ - シクロペント [ ] フェナントレン - 11 - イル - エステル (d j m 2 - 181)。

## 【0065】

## 【化14】



## 【0066】

新たに調製した  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の 0.2 M の N - メチルベンジルアミン溶液 (185  $\mu\text{L}$ , 37.0  $\mu\text{mol}$ ) を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (125  $\mu\text{L}$ ) 中のワートマニン溶液 (10.

10

20

30

40

50

7 mg、25.0  $\mu\text{mol}$ ) に添加した。その反応混合物を室温で2時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、 $\text{SiO}_2$  (ヘキサン/酢酸エチル、1:9) のクロマトグラフィーによって前記生成物を精製することにより、オレンジ油として d j m 2 - 1 8 1 (13.3 mg、24.2  $\mu\text{mol}$ 、97%) が得られた: [ ]<sub>D</sub> - 835 (c 0.0014,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 23°C); IR (neat) 1742, 1685, 1618, 1589, 1575, 1224  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR 8.36 (br s, 1H), 7.36~7.27 (m, 5H), 6.60 (bs s, 1H), 6.10~6.00 (m, 1H), 4.68~4.63 (m, 1H), 4.53~4.47 (m, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.25~3.11 (m, 2H), 2.99~2.84 (m, 2H), 2.71 (br, 2H), 2.55 (dd, 1H,  $J=19.5, 8.9$  Hz), 2.38 (dd, 1H,  $J=14.4, 7.6$  Hz), 2.32~2.05 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.85 (bs s, 1H), 1.80 (dd, 1H,  $J=14.5, 4.7$  Hz), 1.52 (s, 3H), 0.82 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR 217.3, 178.9, 169.9, 164.7, 158.3, 151.7, 138.8, 137.1, 134.9, 129.0 (3C), 128.6, 128.1 (2C), 88.7, 82.2, 73.4, 67.9, 64.3, 59.4, 49.1, 42.7, 42.5, 37.8 (2C), 36.3, 25.2, 22.5, 21.1, 16.3; MS (EI)  $m/z$  (rel. 強度) 549 ( $M^+$ , 14), 489 (37), 415 (15), 120 (23), 91 (100); HRMS (EI)  $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{NO}_8$  の計算値は 549.2363 であり、実測値は 549.2340 であった。

10

20

## 【実施例4】

## 【0067】

様々なワートマニン類似体の薬力学を試験した。特に、PX-866、PX-867、及びPX-881の投薬効果を、HT-29異種移植片リン光体-Aktの阻害の下で測定した。図1Aは、前記ワートマニン類似体の投薬量が増加するにつれて阻害が増加したことを図示している。PX-866は、最も大きい阻害活性を呈するよう見えた。また、時間経過に伴うPX-866の阻害活性への投与経路の効果を測定した。腹腔内、静脈内、及び経口でPX-866を投与した。図1Bに示すように、特に、PX-866の経口製剤は、より長期間に亘って、より一貫した阻害を提供するよう見えた。

## 【0068】

インビボでのPX-866の静脈内、腹腔内、及び経口投与の薬物動態学を測定したものを図2に図示する。前述に基づく、PX-866の半減期は約16時間であると思われる。

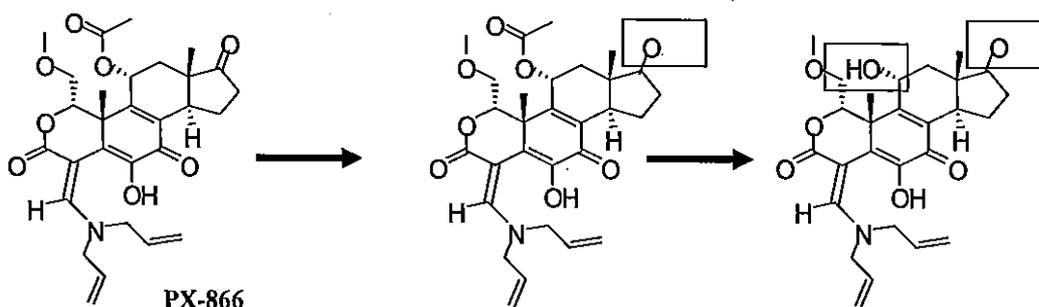
30

## 【0069】

下記の経口投与でのPX-866の代謝を観察した。以下に図示されるように、通常、PX-866はカルボニル還元物に代謝され、カルボニル還元物は脱アセチル化代謝産物に代謝される。

## 【0070】

## 【化15】



40

## 【0071】

図3に示すように、最も多い成分はPX-866であり、続いてカルボニル還元代謝産

50

物、更にカルボニル還元物、脱アセチル化代謝産物である。しかし、投与の約40分後、カルボニル還元されたPX-866は、更にカルボニル還元され、脱アセチル化された代謝産物に代謝されたように見えた。前述に基づくと、主要な代謝産物のT<sub>1/2</sub>は、少なくとも約3時間である。

【実施例5】

【0072】

NCIヒト腫瘍細胞株パネルにおいて、ワートマニン類似体の活性を測定した。具体的には、ワートマニン、PX-889、PX-868、PX-866、及びPX-881の活性を、白血病、NSC肺、大腸、CNS、メラノーマ、卵巣、腎臓、前立腺、及び乳癌細胞株においてIC<sub>50</sub>で測定した。結果は図4に図示した。

10

【実施例6】

【0073】

HT-29大腸癌細胞のホスホ-Aktの阻害を、PX-866及びPX-867を投与することによってパーセントコントロールで測定した。結果は図5に図示した。

【実施例7】

【0074】

ワートマニン類似体の抗腫瘍活性を測定した。下記の表1に示すように、前記類似体はインビボにおいて、腫瘍由来の卵巣、大腸、及び肺に対する抗腫瘍活性を示した。

【0075】

【表1】

20

表1

腫瘍	最初の腫瘍体積 (mm <sup>3</sup> )	化合物	mg/kg/日	ルート	スケジュール	T/C <sup>a</sup> % (日)	成長遅延 (日)	対数細胞死	p
OvCaR-3	120	ワートマニン	0.75	腹腔内	QID x 9	47 (40)	5	0.5	*
卵巣	120	PX-866	8	腹腔内	QID x 9	30 (40)	12	1.2	*
	120	PX-867	13	腹腔内	QID x 9	41 (40)	6	0.6	*
	120	PX-881	12	腹腔内	QID x 9	52 (40)	8	0.8	*
HT-29 大腸	180	ワートマニン	0.75	腹腔内	QID x 9	36 (16)	5	0.3	*
	170	PX-866	12	腹腔内	QID x 9	39 (16)	6	0.4	*
	170	PX-867	13	腹腔内	QID x 9	80 (16)	0	0	
A-549 肺	170	PX-881	12	腹腔内	QID x 9	62 (16)	2	0.2	
	65	PX-866	6	腹腔内	QID x 9	62 (32)	4	0.2	
	65	PX-866	9	腹腔内	QID x 9	26 (32)	8	0.4	*
	60	PX-866	12	静脈内	QID x 9	45 (21)	5	0.7	*
	60	PX-866	4	経口	QID x 9	47 (21)	6	0.9	*

<sup>a</sup>T/C = %としての最適試験/コントロール、またカッコ内は日数；

非薬剤処理コントロール腫瘍成長比率と比べて p<0.05

30

【実施例8】

【0076】

図6に示すように、放射線を単独で、PX-866を単独で、若しくは放射線と組み合わせた抗腫瘍活性を、マウスのOvCar-3ヒト卵巣異種移植片において測定した。5日間に亘って毎日放射線を照射し、5日間毎日に亘る8及び12.5mg/kgのPX-866の腹腔内投与、若しくは放射線との組み合わせとを比較した。結果は腫瘍体積の平均で測定した。

40

【実施例9】

【0077】

様々な細胞毒性薬の抗腫瘍活性を単独若しくはPX-866と組み合わせて測定した。細胞毒性剤には、ゲムシタピン、タキソール、及びシスプラチンが含まれていた。下記の表2に示すように、PX-866は、脾臓、卵巣、肺、及び大腸癌細胞株における前記細胞毒性剤を単独で処理したときの腫瘍成長阻害及び成長遅延に対するパーセントを著しく増加させた。

【0078】

【表2】

表2

腫瘍	大きさ mm <sup>3</sup>	薬剤	ルート	投薬量 mg/kg	スケジュー ール	TGI %	単独 成長 遅延 日数	対数 細胞 死	組み合わせ		
									TGI %	成長 遅延 日数	対数 細胞 死
P-anc-1 腺癌	75	ゲムシタピン	腹腔内	150	Q3D x 3	38	7	0.2	49	8	0.2
		PX-866	静脈内	15	Q3D x 3	16	4	0.1			
		PX-866	経口	5	Q3D x 3	14	0	0			
OvCar-3 卵巣	110	タキソール	腹腔内	12	Q2D x 5	58	13	1.0	83	20	1.5
		PX-866	静脈内	12	Q2D x 5	58	12	0.9			
		PX-866	経口	4	Q2D x 5	53	11	0.82			
A-549 肺	300	シスプラチン	腹腔内	1	QD x 5	16	1	0.1	58	10	1.0
		PX-866	腹腔内	6	QD x 5	27	3	0.30			
HT-29 大腸	150	シスプラチン	腹腔内	2.5	Q2D x 3	11	0	0	56	6	0.5
		PX-866	静脈内	10	Q2D x 3	11	0	0.3			
		PX-866	経口	2.5	Q2D x 3	29	1	0.1			

TGI (腫瘍成長阻害) = 100 - T/C%

## 【実施例10】

## 【0079】

材料及び方法

化合物

PX-866 (酢酸(1S, 4E, 10R, 11R, 13S, 14R) - [4-ジアリルアミノメチレン-6-ヒドロキシ-1-メトキシメチル-10, 13-ジメチル-3, 7, 17-トリオキソ-1, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-ドデカヒドロ-2-オキサ-シクロペンタ[a]フェナントレン-11-イル-エステル)を前述したように合成した(21)。マウスへの静脈内投与では、PX-866を0.9% NaCl中の5%エタノールに10mg/mlで溶解し、経口投与では、水中の5%エタノールに5mg/mlで溶解した。ゲフィチニブをAstraZeneca(英国, Macclesfield)から入手し、経口投与のために水中の0.1% Tween 20に7.5mg/mlで懸濁した。ウサギから精製した抗ホスホSer473-Akt抗体、抗Akt抗体、抗ホスホTyr1086-EGF受容体抗体、及び抗EGFR抗体をCell Signaling Technology(マサチューセッツ州, Beverly)から入手した。ヒト組換えp110/p85、p110/p85、p120、及びp110/p85 PtdIns-3-キナーゼをUpstate(バージニア州, Charlottesville)から入手した。塩酸メトホルミンをSpectrum Chemical(カリフォルニア州, Gardena)から、塩酸ピオグリタゾン及び組換えヒトインスリンをSigma Chemical(St. Louis)から入手した。

## 【0080】

細胞

A-549非小細胞肺癌細胞をAmerican Tissue Type Collection(メリーランド州, Rockville)から入手した。前記細胞を、10%ウシ胎児血清(fbs)を追加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)において37、加湿95%空気、5%CO<sub>2</sub>で培養した。全細胞株を、PCR ELISA kit(Roche Diagnostics Inc., インディアナ州, Indianapolis)を使用して、マイコプラズマがなくなるように試験した。

## 【0081】

PtdIns-3-キナーゼの測定

組換えウシp110/p85及び組換えヒトp110/p85、p120、及びp110/p85を阻害するPX-866の能力を、Stirdivantらが報告したようにPtdInsの[32P](-ATP依存リン酸化によって測定した(22))。前述したように、細胞性PtdIns-3-キナーゼの阻害を、ウェスタンブロッティングで測定される総Aktに対するホスホSer473-Aktの割合として測定し

10

20

30

40

50

た。

【0082】

抗腫瘍研究

対数細胞成長において、およそ $10^7$ 個のA-549nsc肺癌細胞を、重症複合免疫不全(scid)マウスの脇腹に、0.2mlのリン酸緩衝生理食塩水で皮下注射した。前記腫瘍が $100$ 若しくは $600\text{mm}^3$ に達したときに、前記マウスを、平均とほぼ等しい腫瘍体積を有する8匹の集団に階層にし、薬剤投与を始めた。投薬は、 $75\text{mg/kg}$ のゲフィチニブを経口投与で、4、9、若しくは $12\text{mg/kg}$ のPX-866を静脈内投与で、1、2.5、及び $3\text{mg/kg}$ のPX-866を静脈内投与で、若しくはゲフィチニブ投与の4時間前にPX-866を、1日おきに行った。動物の体重を毎週測定し、腫瘍直径を週に2回、電子キャリパーで直角(dショート及びdロング)に測定し、腫瘍体積を計算式、 $\text{体積} = (\text{dショート})^2 \times (\text{dロング})$ によって算出した。腫瘍が $2,000\text{mm}^3$ 若しくはそれ以上に達したとき、或いは壊死したときに、前記動物を安楽死させた。

10

【0083】

薬力学的研究

$10^7$ 個のA-549nsc肺癌細胞を雄のscidマウスの脇腹に皮下注射し、およそ $300\text{mm}^3$ まで成長させることができた。マウスに、 $12\text{mg/kg}$ のPX-866を静脈内投与で、 $3\text{mg/kg}$ のPX-866を経口投与で、また $75\text{mg/kg}$ のゲフィチニブを静脈内投与で、5日間に亘って1日おきに投与した。腫瘍を最後の投薬の24時間後に除去し、すぐに液体窒素で凍結させた。アッセイのために、前記腫瘍を50mM HEPES緩衝液、pH7.5、50mM NaCl、1%ノニデットP40、及び0.25%デオキシコール酸ナトリウムで均質化し、抗ホスホSer473-Akt及び抗Akt抗体を使用してウェスタンブロッティングを行った。腫瘍Akt活性を、総Aktに対するホスホ-Ser473-Aktの割合として表した。

20

【0084】

毒性研究

雄のscidマウスに、 $10\text{mg/kg}$ のPX-866を静脈内投与で、若しくは3及び $1.5\text{mg/kg}$ のPX-866を経口投与で1日おきに14投薬分投与した。C57Bl/6マウスに、 $3\text{mg/kg}$ のPX-866を経口投与で1日おきに15投薬分投与した。最後の投薬から24時間後に前記マウスを殺し、体重、血液リンパ球、好中球、赤血球、血小板数、血清グルコース、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)、及びアミノアラニトランスフェラーゼ(ALT)の変化を測定した。

30

【0085】

糖耐性研究

雌のC5781/6マウスを一晩絶食させ、1回量のD(+)グルコース( $1\text{mg/kg}$ )を0.1g/ml溶液として経口で投与した。0、10、20、30、60、90、120、及び180分の血液を採取し、血漿グルコース濃度曲線下面積(AUC<sub>0-180分</sub>)を得るために、血漿グルコースを血糖キット(Sigma Chemical Co., ミズーリ州, St. Louis)を使用して測定した。マウスに、1回量として $10\text{mg/kg}$ のPX-866を経口投与し、4時間後にグルコースを投与し、若しくは $3\text{mg/kg}$ のPX-866を経口で1日おきに20投薬分投与し、最後の投薬から24時間後及び8日後にグルコースを投与した。 $250\text{mg/kg}$ のメトホルミンを5日間毎日経口投与し(24)、前記グルコース投与前に $10\text{mg/kg}$ のピオグリタゾンを経口投与で7日間毎日投与した(25)。 $0.075\mu\text{g/kg}$ のヒト組換えインスリンを、グルコース投与と同時に腹腔内投与で投与した(26)。

40

【0086】

骨髄コロニー形成

屠殺後、マウスの骨髄を各々の大腿骨から抽出し、赤血球を0.2%の低張NaClで溶解させ、続いて1.6%の高張NaClを添加した。Iscoveの最小必須培地、1

50

5 % f b s、1 %ウシ血清アルブミン、10 μg / ml 組換えヒトインスリン、200 μg / ml ヒトトランスフェリン、10 mM β-メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミン、50 ng / ml r m幹細胞因子、10 ng / ml 組換えマウスインターロイキン-3、10 ng / ml 組換えヒトインターロイキン-6、及び3 units / ml 組換えエリスロポエチンに1 %メチルセルロースを含む1 mlのMethocult (商標) GF M3434 (Stemcell Technologies Inc, カナダ、ブリティッシュコロンビア州、Vancouver) に、およそ20,000の細胞を蒔いた。細胞を3重に蒔き、記録する前に14日間、湿潤環境で37℃及び5% CO<sub>2</sub>で培養した。コロニー (>40セル/コロニー) 若しくはクラスター (3~40細胞) を記録し、コロニー-形成ユニット顆粒球、赤血球、マクロファージ、巨核球 (CFU-GEMM) ; パースト-形成ユニット-赤血球 (BFU-E)、コロニー形成ユニット顆粒球マクロファージ (CFU-GM) の成長を、標準的な基準を用いて算定した。単一細胞のバックグラウンドレベルで定性的観察を行った。

10

【0087】

結果

PtdIns-3-キナーゼ阻害

組換えPtdIns-3-キナーゼを阻害するPX-866の能力をワートマニンによる阻害と比較して表3に示した。PX-866及びワートマニンは、p110、p120、及びp110の強力な阻害剤であるが、PX-866はp110の弱い阻害剤である点でワートマニンとは異なる。

20

【0088】

【表3】

表3. PX-866及びワートマニンによるPtdIns-3-キナーゼの阻害

PtdIns-3-キナーゼ	PX-866 IC <sub>50</sub> (nm)	ワートマニン IC <sub>50</sub> (nm)
p110α/p85α	5.5	4.0
p110β/p85α	>300	0.7
p120γ	9.0	9.0
p110δ/p85α	2.7	4.1

30

【0089】

細胞培養研究

PX-866は、25 nMのIC<sub>50</sub>で、10% f b sを含む培地中のA-549ヒト乳癌細胞のホスホ-Aktを阻害した。ゲフィチニブは、24時間血清飢餓にされ、25 ng / mlのEGFで刺激され、10% f b sを有する培地中にはない細胞中のホスホ-Aktのみを阻害した。これは、PtdIns-3-キナーゼ経路が、EGFに加えて、血清中の成育因子によって刺激されることを示唆する。細胞増殖阻害研究は、A-549細胞が1.1 μMのIC<sub>50</sub>を有するゲフィチニブによる増殖阻害に耐性であるという過去の報告を裏付けた。最高100 nMの濃度のPX-866は、ゲフィチニブによる増殖阻害を高めなかった。

40

【0090】

インビボでの抗腫瘍の研究

100 mm<sup>3</sup>のA-549ヒトnsc肺癌異種移植片を有するマウスに、1日おきに75 mg / kgのゲフィチニブを経口投与すると、投薬期間の最後に、51%のT/Cを有する異種移植片成長が阻害された (図7)。PX-866は、静脈内投与で与えられるよりも経口投与で与えられたときに抗腫瘍剤としておよそ4倍強力であり、投薬量は適宜調整された (表4)。雌のscidマウスの脇腹の皮下に、10<sup>7</sup>個のA-549ヒトnsc肺癌細胞を埋め込んだ。14投薬分の1日おきの薬物療法が始まる前に、腫瘍を100

50

mm<sup>3</sup>の平均体積まで成長させた。抗腫瘍活性を、投薬期間の最後に処理腫瘍/コントロール腫瘍(T/C%)の%体積として表した。各々のグループには8匹のマウスがあり、全ての相違はp<0.01であった。

【0091】

【表4】

表4. ゲフィチニブと組み合わせたPX-866の抗腫瘍活性

処理及びルート	投薬量 mg/kg	スケジュール	腫瘍 T/C%	ゲフィチニブの4時間前のPX-844の腫瘍 T/C%
ゲフィチニブ 経口	75	QOD x 14	50.8	-
PX-866 静脈内	4	QOD x 14	65.3	20.5
PX-866 静脈内	9	QOD x 14	31.5	22.3
PX-866 経口	1	QOD x 14	54.8	40.8
PX-866 経口	2.5	QOD x 14	40.8	18.1

10

【0092】

100mm<sup>3</sup>のA-549腫瘍異種移植片を有するマウスに単独で投与するとき、PX-866は、9mg/kgの静脈内投与では31%のT/C、2.5mg/kgの経口投与では41%のT/Cを有する腫瘍成長を阻害した。予備研究は、ゲフィチニブとスケジュールを交互に組み合わせたPX-866が、ゲフィチニブの24時間後よりむしろ4時間後に投与したときにより活性化すると示した(図示せず)。ゲフィチニブの4時間前にPX-866を投与するとき、その組み合わせは、9mg/kgのPX-866を静脈内投与したときは22%のT/Cを、2.5mg/kgのPX-866を経口投与したときは18%のT/Cを与えた。腫瘍成長は、PX-866の処理期間の最初の半分は定常期を保持し、その後、前記期間の終わりに向かってゆっくり増加し始めた(図7)。増加した組み合わせの抗腫瘍活性はまた、非常に大きな600mm<sup>3</sup>のA-549腫瘍異種移植片にも見られた(図7B)。

20

【0093】

腫瘍EGFR及びPtdIns-3-キナーゼ情報伝達の阻害

30

A-549腫瘍異種移植片を有するマウスへ、1日おきに5日間、75mg/kgのゲフィチニブを経口投与すると、腫瘍ホスホ-EGFRを43%阻害したが、腫瘍ホスホ-Aktには顕著な効果を奏さなかった(図8)。1日おきに5日間、12mg/kgの静脈内投与、若しくは3mg/kgのPX-866の経口投与は、腫瘍ホスホ-EGFRに顕著な効果を有さなかったが、腫瘍ホスホ-Aktをそれぞれ51%及び48%阻害した。ゲフィチニブ及びPX-866の組み合わせは、腫瘍ホスホ-EGFR及び腫瘍ホスホ-Aktの両者を阻害した。同様の効果は、図9に図示するように、第2の研究にも見られた。このように、A-549腫瘍異種移植片において、EGFR及びPtdIns-3-キナーゼ経路は、個別に機能し、それぞれゲフィチニブ及びPX-866によって選択的に阻害されるように思われる。

40

【0094】

長期間のPX-866投与の毒性

scidマウスに対する長期間のPX-866投与の毒性を表5に要約した。値は、1グループにつき4匹のマウスの平均±SEのものである。

【0095】

【表5】

表5. 長期間に亘るPX-866投与の毒性

処理群	ALT U/l	AST U/l	グルコー ス mg/dl	WBC K/μl	Ne K/μl	LY K/μl	MO K/μl	RBC M/μl	Hb g/dl	Plt K/μl	体重 変化 g
コントロール	52.6 ± 13.6	142.9 ± 46.6	46.9 ± 5.1	8.9 ± 1.0	6.9 ± 0.8	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.1	11.0 ± 0.3	15.4 ± 0.2	1427 ± 60	4.7 ± 0.3
PX-866 10 mg/Kg 静脈内	35.5 ± 11.7	105.2 ± 19.2	76.2 ± 3.6	14.6 ± 4.2	14.0 ± 2.7	1.8 ± 0.5	1.1 ± 0.2	10.6 ± 0.0	14.4 ± 0.1	1390 ± 43	3.9* ± 0.2
PX-866 3 mg/Kg 経口	47.6 ± 16.8	152.0 ± 47.2	113.5* ± 23.4	67.8* ± 19.7	53.6** ± 10.7	5.2 ± 3.9	9.2 ± 3.6	10.4 ± 0.3	14.7 ± 0.4	1665 ± 227	1.3** ± 0.5
PX-866 1.5 mg/Kg 経口	65.6 ± 27.5	140.5 ± 35.2	100.1** ± 10.9	16.6* ± 2.4	12.5* ± 1.9	3.1* ± 0.6	1.8* ± 0.2	1030 ± 0.3	14.6 ± 0.3	1221* ± 18	3.9 ± 0.6

コントロール値と比較して\*p<0.5, \*\* p<0.01

10

【0096】

4週間に亘る静脈内投与での10mg/kg、及び経口投与での3mg/kgのPX-866処理は、体重の増加を減少させ、コントロール体重増加のそれぞれ83%及び28%まで減少させた(p=0.05)。主に、増加した好中球数に起因して、PX-866の経口投与に続いて白血球数の顕著な増加があった。体重、血漿グルコース、及び血球数の全ての変化は、処理停止後9日で正常値に戻った。体重の減少及び血糖の増加は、scidマウスを使用した2つの追加の研究において裏付けられたが、血球数の増加はこれらの研究ではあまり顕著ではなかった(図示せず)。

【0097】

PX-866及び糖耐性

PX-866による血漿グルコースの増加の機構の更なる見識を得るために、絶食C57Bl/6マウスへの1gグルコース/kgの経口投与に続いて、インスリンレベル及び糖耐性について研究を行った(図10)。1回量として10mg/kgのPX-866の経口投与によって、最高5時間の血漿インスリンレベルの増加が生じた。PX-866はまた、前記マウスにおいて糖耐性を減少させ、特にグルコース投与の1時間後の時点で、血漿グルコースの増加を導き、その時点では、血漿グルコースが非処理マウスでは減少していたが、PX-866処理マウスでは増加していた。全ての糖耐性研究のAUC<sub>0-180分</sub>の結果を以下の表6に示した。値は、1グループにつき4匹のマウスの平均±SEである。

20

30

【0098】

【表6】

表6. マウスの糖耐性へのPX-866の効果

処理	AUC <sub>0-180分</sub> (mg.min.ml <sup>-1</sup> )	AUC <sub>0-180分</sub> (mg.min.ml <sup>-1</sup> )
PX-866 10 mg/kg 経口		
薬剤なし	369 ± 25	533 ± 17 <sup>a</sup>
インスリン 0.075 μ/kg 腹腔内	64 ± 25	64 ± 5
メホルミン 250 mg/kg 腹腔内 QD x 5	367 ± 46	537 ± 4 <sup>b</sup>
ピオグリタゾン 10 mg/kg 腹腔内 QD x 7	274 ± 3	340 ± 39 <sup>c</sup>
PX-866 3 mg/kg 経口 QOD x 20		
		520 ± 14 <sup>a</sup>
8日回復		343 ± 14
ピオグリタゾン 10 mg/kg 腹腔内 QD x 7		405 ± 26 <sup>d</sup>

- a 未処理コントロールと比較して p<0.05
- b PX-866以外の薬剤処理コントロールと比較して p<0.05
- c 単独のPX-866と比較して p<0.05
- d 慢性的な単独のPX-866と比較して p<0.05

40

【0099】

高用量でのインスリン処理は、PX-866によって生じる血漿グルコースの増加を克服し、コントロール及びPX-866処理マウスの両者においてグルコースAUC<sub>0-180分</sub>を顕著に減少させた。血糖降下薬メホルミンは、PX-866による血糖の増加に効果を有さなかったが、血糖降下チアゾリジンジオン薬ピオグリタゾンは、ほぼ完全に

50

前記増加を抑止した(図10及び表6)。1日おきに15投薬分の、9mg/kgのPX-866の静脈内投与での長期に亘る処理は、非絶食時のグルコースレベル(±S.E.、n=4)をコントロールマウスでの133.7±16mg/dlからPX-866処理マウスでの269.4±27.8mg/dl(p<0.05)まで増加させた。前記処理はまた、PX-866の最後の投薬から24時間後、血漿グルコースAUC<sub>0-180分</sub>を増加させたが、これは最後の投薬から8日後にコントロール値に戻った(表4)。ピオグリタゾン、長期に亘るPX-866処理の最後の投薬から24時間後に、グルコースAUC<sub>0-120分</sub>をコントロールと著しく異なる値まで顕著に減少させた(表4)。

#### 【0100】

PX-866及び増加した好中球

C57Bl/6マウスに3mg/kgのPX-866を1日おきに15投薬分、経口投与するとき、コントロールマウスでの1.2±0.3K/μlからPX-866処理マウスでの3.7±1.8K/μlまでの好中球数(±S.E.、n=4)の顕著な増加があったが、他のいかなる血液成分には顕著な変化はなかった。骨髄コロニー形成ユニットは、赤血球系統CFU-GEMM、BFU-E、若しくはCFU-Eでは顕著な変化を示さず、骨髄CFU-GM(±S.E.、n=4)では、コントロールマウスでの蒔かれた60,000骨髄細胞につき388±52コロニーからPX-866処理マウスでの168±59コロニー(p<0.05)へ、小さいが顕著な減少を示した。同時に、PX-866処理マウスからの培養物において、個々の白血球数の増加があり、細胞接着が変化したことを示唆した。

#### 【0101】

考察

ゲフィチニブによる増殖阻害に対するnsc肺癌細胞株の感受性は、EGFに刺激されたEGFRの自己リン酸化の阻害、細胞表面EGFRの発現低下、ERK1/2の発現低下、及びPtdIns-3-キナーゼ/Akt情報伝達の阻害と関連する。PtdIns-3-キナーゼ/Akt経路は、癌細胞生存のための重要な経路である。Ono等による研究において、ゲフィチニブは、ホスホ-Aktレベルを測定することによって、ほとんど全てのnsc肺癌細胞株においてEGF起因性PtdIns-3-キナーゼ/Akt情報伝達を阻害したが、数株(3/11)だけが、血清刺激増殖条件下でホスホ-Aktの阻害を示した。これらの結果は、EGF以外の多くのnsc肺癌細胞株因子がPtdIns-3-キナーゼ/Akt情報伝達の活性化に關与することを示唆する。この表現型を有する腫瘍細胞は、EGFRインヒビターの細胞増殖抑制性活性、及び/若しくは細胞毒性活性に、限定的な反応を示す可能性がある。最近、Engelman等は、ErbB-3がEGFR情報伝達をPtdIns-3-キナーゼ/Aktの活性化とつなげること、及びゲフィチニブが、野生型若しくは変異体のどちらかのEGFRとErbB-3とを発現しているnsc肺癌細胞株においてのみ、ホスホ-Akt及び細胞増殖を阻害することを報告した。しかし、強制的にErbB-3を発現させると、ゲフィチニブ感受性のnsc肺癌細胞が生み出されず、これはEGFR以外の経路がErbB-3不完全細胞においてPtdIns-3-キナーゼ/Akt情報伝達を活性化することに違いないことを示唆している。ErbB受容体ファミリーの他の因子はまた、PtdIns-3-キナーゼを活性化し、癌の表現型を促進するために、ErbB-3と結びつける可能性がある。我々は、PtdIns-3-キナーゼの阻害が、ゲフィチニブ耐性nsc肺癌細胞株においてゲフィチニブの抗腫瘍活性を強化するための合理的な戦略を提供できると推論した。

#### 【0102】

本研究では、ゲフィチニブに対して最も耐性のあるnsc肺癌株の中で、ErbB-3を発現していないA-549nsc肺癌細胞株を選択した。PTEN欠失はまた、恐らくPtdIns-3-キナーゼ/Akt情報伝達の構成的な活性化を通して、細胞をゲフィチニブ増殖阻害に対して耐性にすることができる。しかし、PTENの遺伝的異常は、肺癌及びA-549細胞において比較的まれであり、大部分のnsc肺癌細胞株と同様に、

10

20

30

40

50

野生型 P T E N と構成的ではないホスホ - A k t の活性レベルとを有する。P t d I n s - 3 - キナーゼを阻害するために、我々は、腫瘍ホスホ - A k t を下方制御すること、及び静脈内若しくは経口のどちらかで投与されるときに、多くのヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて抗腫瘍活性を呈することを示している P X - 8 6 6 を使用した。

#### 【 0 1 0 3 】

静脈内若しくは経口のどちらかで投与された P X - 8 6 6 が、ゲフィチニブと同程度に効果的に s c i d マウスの A - 5 4 9 n s c 肺腫瘍異種移植片の成長を阻害したことが判明した。5 0 % 前後の腫瘍 T / C を与える、長期間に亘る投与をするとき、両者の薬剤は最も活性的に見えた。しかし、ゲフィチニブと共に P X - 8 6 6 を投与したとき、処理の前半の間は、A - 5 4 9 腫瘍成長は定常状態を保っているように見え、処理の後半の間は僅かに増加したように見えた。これは、1 0 0 m m <sup>3</sup> の腫瘍と大きく進行した 6 0 0 m m <sup>3</sup> の腫瘍との両者で見られた。ゲフィチニブは、A - 5 4 9 腫瘍異種移植片のホスホ - A k t を阻害できなかった。A - 5 4 9 細胞培養試験において、ゲフィチニブはまた、血清刺激増殖条件下ではホスホ - A k t 細胞を阻害せず、E G F に刺激された無血清の A - 5 4 9 細胞においてのみ抑制的であった。対照的に、P X - 8 6 6 は、血清刺激増殖条件下、及び A - 5 4 9 ヒト腫瘍異種移植片において、A - 5 4 9 細胞のホスホ - A k t を阻害した。ゲフィチニブは、A - 5 4 9 ヒト腫瘍異種移植片においてホスホ - E G F R を阻害したが、P X - 8 6 6 は阻害しなかった。このように、P X - 8 6 6 は、非常に大きな A - 5 4 9 腫瘍異種移植片に対してさえゲフィチニブの抗腫瘍活性を強化し、処理の初期段階において完全な腫瘍成長調節を与えた。腫瘍成長の阻害は、P X - 8 6 6 による P t d i n s - 3 - キナーゼ / A k t 情報伝達の阻害と関連し、またゲフィチニブ単独では観察されなかった。

#### 【 0 1 0 4 】

過去の研究は、臨床開発に限られた可能性を有する、比較的有毒かつ非特異的 P t d I n s - 3 - キナーゼインヒビターである静脈内投与された L Y 2 9 4 0 0 2 が、野生型と活性化 E G F R に由来する変異腫瘍とで共発現する 6 ~ 1 0 0 m m <sup>3</sup> の小さな U 8 7 : ) E G F R ヒトグリオーマ細胞異種移植片に対して、ゲフィチニブの抗腫瘍活性を強化すると報告している。この研究において、ゲフィチニブも L Y 2 9 4 0 0 2 も単独では抗腫瘍活性を示さなかった。

#### 【 0 1 0 5 】

P X - 8 6 6 の長期投与の主な毒性は、高血糖症であり、薬剤投与を停止したときに逆転する糖耐性を減少させた。成長シグナルが P t d I n s - 3 - キナーゼ p 1 1 0 によって中継されると同時に、インスリンシグナルは、P t d I n s - 3 - キナーゼアイソフォーム p 1 1 0 だけでなく p 1 1 0 によっても中継される。P X - 8 6 6 は、ワートマニンより強力な P t d I n s - 3 - キナーゼ p 1 1 0 インヒビターであるが、P X - 8 6 6 は、P t d I n s - 3 - キナーゼ p 1 1 0 のインヒビターの弱いインヒビターである点でワートマニンとは異なる。マウスに対して P X - 8 6 6 を急性投与すると、血漿インスリンレベルが増加したと同時に、糖耐性が減少し、これはインスリン感受性の減少を示唆している。これは、著しい高血糖症、高インスリン血、及び血糖を低下させるインスリンの損なわれた能力を含む A k t 2 アイソフォームを欠くマウスの表現型に類似する。本研究において、インスリンを大量投与することによって、P X - 8 6 6 により引き起こされる血糖の増加を克服することができた。第 2 型糖尿病の高血糖症の治療のために広く使用される薬物であるメトホルミンは、脂肪酸酸化を増加させるために、またトリグリセリド合成、肝性グルコース産生、及びグルコース利用を減少させるために、P t d I n s - 3 - キナーゼの下流の A M P - 活性タンパク質キナーゼ ( A M P K ) を刺激することによって血糖を低下させる。A M P K は、原形質膜へのグルコース輸送担体 4 ( G L U T - 4 ) の移動によるグルコース取込みの刺激を媒介する。P t d I n s - 3 - キナーゼ等の薬剤、若しくはグルコース利用を悪化させる A k t インヒビターと一緒に使用する場合、メトホルミン等の A M P K アクチベーターが腫瘍細胞の生存を強化する可能性があることが示唆されている。メトホルミンは、P X - 8 6 6 によって生じる減少した糖耐性に影

響しないことがわかった。活性インスリン受容体へのC b 1プロトオンコジーンの補充によって媒介される並列の経路はまた、インスリンによるグルコースの取込みを増加させる点に留意する必要がある。

#### 【0106】

メトホルミンとは対照的に、チアゾリジンジオン高血糖性薬物ピオグリタゾンは、糖耐性への急性及び慢性のP X - 8 6 6投与の抑制効果を逆転させた。脂肪組織に高レベルで存在するペロオキシソーム増殖因子活性化受容体 - ( P P A R ) 転写因子のリガンドとして作用することによって、チアゾリジンジオンは、身体のインスリンの代謝効果の感受性を増加させる。P P A R はまた、腫瘍細胞の分化を誘発し、ピオグリタゾンによるP P A R 活性化は、s c i dマウスのA - 5 4 9 n s c肺腫瘍異種移植片の成長を阻害すると報告されている。P t d I n s - 3 - キナーゼによるインスリン情報伝達の全詳細、及びメトホルミン及びピオグリタゾン等のグルコース低下薬物の効果が依然として不明である一方で、P X - 8 6 6によるP t d I n s - 3 - キナーゼ阻害によって生じる高血糖症が、インスリンとP X - 8 6 6の臨床用途に重要であるピオグリタゾンとに応答するように思われた。p 1 1 0 及びp 1 1 0 の両者を阻害するワートマニンとは異なり、p 1 1 0 と相対的なp 1 1 0 のインヒビターとしてのP X - 8 6 6の選択性はまた、P X - 8 6 6のより明白な成長阻害効果と、P X - 8 6 6起因性高血糖症を逆転するインスリン及びピオグリタゾンの能力とを説明できる可能性がある。

10

#### 【0107】

P X - 8 6 6投与の他の薬理効果は、循環好中球の増加に加えて、骨髄C F U - G M コロニー形成の減少である。P X - 8 6 6によって誘導されるC F U - G Mの減少は、p 8 5 - / - ノックアウトマウスのマクロファージ由来の骨髄において観察される顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F ) 感受性の減少と一致する。P X - 8 6 6による循環好中球の増加は、末梢循環への前駆細胞の流動の増加を反映している可能性があり、おそらくp 8 5 - / - ノックアウトマウスにおいて見られるような細胞接着の減少と関連している。

20

#### 【0108】

要約すると、p 1 1 0 と対比するp 1 1 0 の選択性を示すP t d i n s - 3 - キナーゼインヒビターP X - 8 6 6は、治療の初期段階での実質的に完全な腫瘍成長調節を有する大きなA - 5 4 9 n s c肺癌異種移植片に対してさえE G F Rインヒビターゲフィチニブの抗腫瘍活性を強化するように見える。P X - 8 6 6のこの治療効果は、ゲフィチニブ単独では見られない腫瘍A k tリン酸化の阻害と関連していた。慢性的なP X - 8 6 6の主な毒性は、減少したインスリン感受性に起因した糖耐性の可逆的減少を有する標的 - 関連高血糖症であった。減少した糖耐性は、A M P Kインヒビターであるメトホルミンに反応しないが、インスリン及びP P A R アクチベーターであるピオグリタゾンによって逆転した。長期間に亘るP X - 8 6 6によっても、明らかに血管流動に起因する好中球数の増加が生じた。従って、P t d I n s - 3 - キナーゼ / A k t情報伝達の阻害によるP X - 8 6 6は、E G F Rインヒビターによる治療に応答しないn s c肺癌を有する患者においてのゲフィチニブ等のE G F Rインヒビターに対する応答を増加する際に臨床的有用性を有する可能性がある。

30

40

#### 【実施例11】

#### 【0109】

P X - 8 6 6及びゲフィチニブの投与の効果の更なる研究を下に図示した。本実施例では、高投与量でのP X - 8 6 6及びゲフィチニブ ( イレッサ ( 登録商標 ) ) の組み合わせの効果を図示した。図11に示すように、A 5 4 9小細胞肺異種移植片において、P X - 8 6 6をイレッサ ( 登録商標 ) 投与より4時間前に ( 図11Aを参照 ) 、ゲフィチニブ投与の24時間後に ( 図11Bを参照 ) 投与した。加えて、図12に示すように、A - 5 4 9小細胞肺異種移植片において、P X - 8 6 6をゲフィチニブと実質的に同時に投与した。

#### 【0110】

50

また、HT-29大腸癌においてのゲフィチニブを伴うPX-866の抗腫瘍活性も測定した。図13に示すように、PX-866はゲフィチニブの抗腫瘍効果を増加させた。75mg/kgのゲフィチニブを単独で経口投与し、2mg/kgのPX-866を単独で経口で、若しくはゲフィチニブ投与の4時間前に投与した。

【実施例12】

【0111】

ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))を伴うPX-866の投与の抗腫瘍効果を測定した。PX-866を、単独で、3日ごとに静脈内又は経口で、投薬を変化させて投与し、若しくはベバシズマブと組み合わせて投与した。図14に示すように、複合治療は、ベバシズマブの抗腫瘍活性を顕著に増加させた。

10

【実施例13】

【0112】

図15に、単独で若しくはゲフィチニブとの組み合わせでの、マウス皮膚におけるリン光体-AktのPX-866阻害を表した。

【0113】

本明細書に記載された実施例及び実施形態は、説明の目的のみに用いられ、またその観点からの様々な改良若しくは変更は、当業者に示唆されるものであり、本出願と添付の特許請求の範囲との精神及び範囲内に含まれると理解される。本明細書において引用された全ての公報、特許、及び特許出願は、全ての目的のために、引用することによりその全体が本明細書に組み込まれるものである。

20

【図面の簡単な説明】

【0114】

本発明の本質及び利点をより十分に理解するために、添付した図面と関連した付属する図面との関連で以下の詳細記載に添付されなければならない。

【図1A】図1Aは、本発明のワートマニン類似体によるHT-29の異種移植片ホスホ-Aktのパーセントコントロールの投与量依存性のグラフである。

【図1B】図1Bは、本発明のワートマニン類似体PX-866によるHT-29の異種移植片リン光体-Aktのパーセントコントロールの経路依存性のグラフである。

【図2】図2は、静脈、腹腔内、及び経口投与後のマウス血漿中のPX-866(ng/ml)の濃度のグラフである。

30

【図3】図3は、マウス血漿のPX-866及び代謝物の濃度(ng/ml)のグラフである。

【図4】図4は、IC<sub>50</sub>により測定されるNCIヒト腫瘍細胞系パネルにおける本発明のワートマニン類似体の活性を示したものである。

【図5】図5は、本発明のワートマニン類似体によるHT-29の大腸癌細胞ホスホ-Aktの阻害を示したグラフである。

【図6】図6は、OvCar-3ヒト卵巣異種移植片におけるPX-866、本発明のワートマニン類似体を単独又は放射線照射との組み合わせで処理した後の平均腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)のグラフである。

【図7】図7は、PX-866によるゲフィチニブの抗腫瘍活性の増強を図示したグラフである。

40

【図8】図8は、A-549非小細胞肺癌異種移植片におけるゲフィチニブ及びPX-866によるEGFR及び蛍光体-Aktの阻害を図示した棒グラフである。

【図9】図9は、PX-866を単独で(静脈内又は経口的)又はゲフィチニブを単独で投与したA549肺癌異種移植片におけるホスホAkt及びホスホ-EGFRパーセントコントロールの棒グラフである。

【図10】図10は、血漿インスリン及びグルコース耐性に関するPX-866の効果を示したグラフである。

【図11A】図11Aは、A549小細胞肺癌異種移植片におけるPX-866、本発明のワートマニン類似体、及び4時間後のイレッサで処理した後の平均腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)

50

のグラフである。

【図11B】図11Bは、A549小細胞肺臓異種移植片におけるPX-866、本発明のワートマニン類似体、イレッサ(Iressa)との組み合わせで処理した後の平均腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)のグラフである。

【図12】図12は、A549ヒト肺腫瘍異種移植片におけるPX-866、本発明のワートマニン類似体を単独で、又はイレッサの投与前に処理した後の平均腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)のグラフである。

【図13】図13は、HT-29大腸癌細胞におけるPX-866、本発明のワートマニン類似体を単独で、又はイレッサの投与前に処理した後の平均腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)のグラフである。

【図14】図14は、A549ヒト肺臓異種移植片におけるPX-866、本発明のワートマニン類似体を単独で又はイレッサの投与前に処理した後の平均腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)のグラフである。

【図15】図15は、PX-866、イレッサ、又はその組み合わせを投与した後のマウス皮膚におけるpAkt-陽性の毛嚢のパーセントを示した棒グラフである。

【図16A】図16は、本発明のワートマニン類似体である。

【図16B】図16は、本発明のワートマニン類似体である。

【図1A】

HT-29異種移植片ホスホ-Aktの阻害

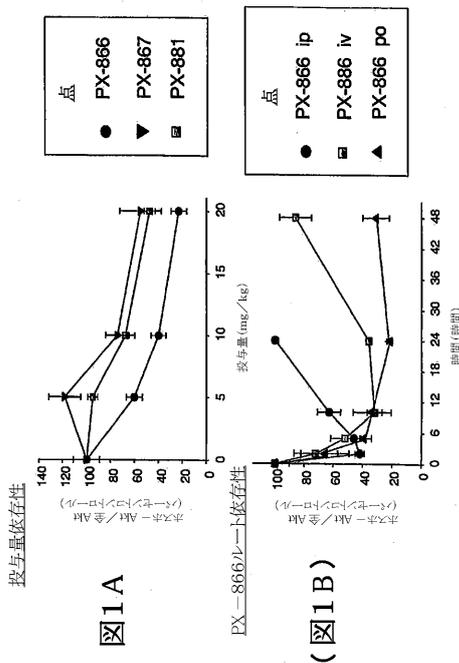
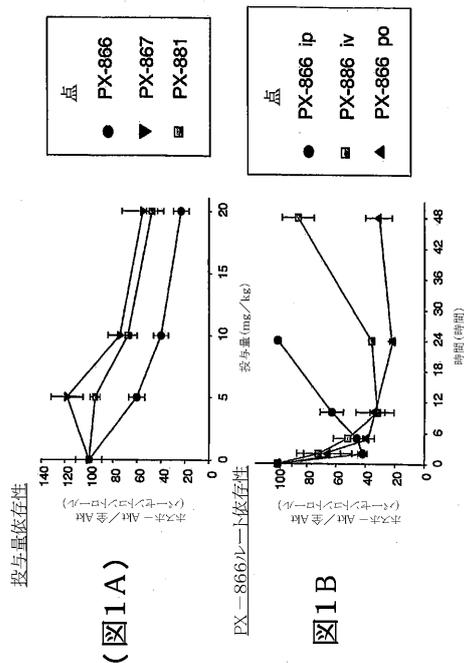


図1A

(図1B)

【図1B】

HT-29異種移植片ホスホ-Aktの阻害



(図1A)

図1B

【 図 2 】

マウス血漿におけるPX-866薬物動力学

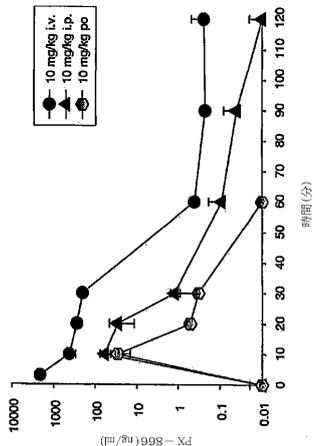


図2

【 図 3 】

マウスにおける経口的PX-866の代謝

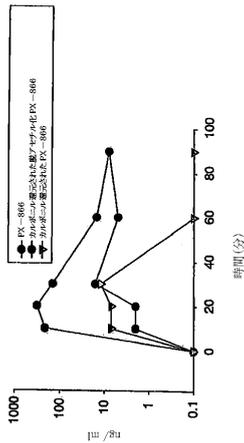


図3

【 図 4 】

NC1Eト腫瘍細胞株パネルにおける合成ヒジンの活性

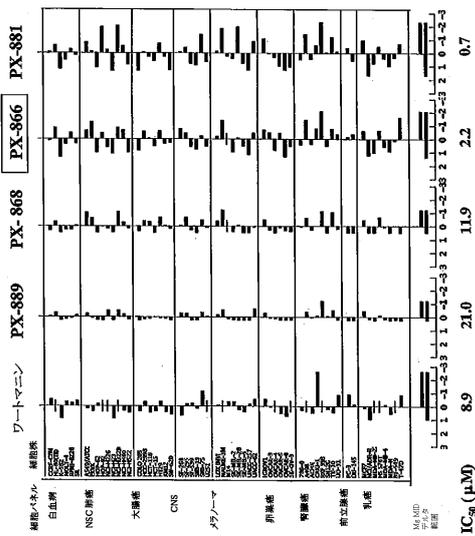


図4

【 図 5 】

HT-29大腸癌細胞ホスホ-Aktの阻害

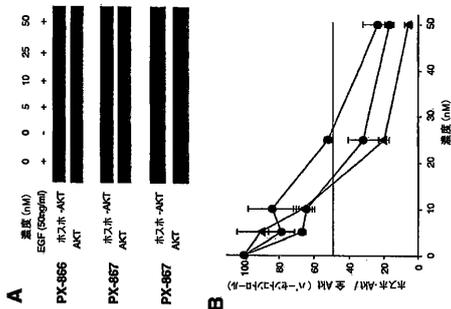


図5

【 図 6 】

OvCar-3ヒト卵巣異種移植片に対するPX-866及び放射線照射

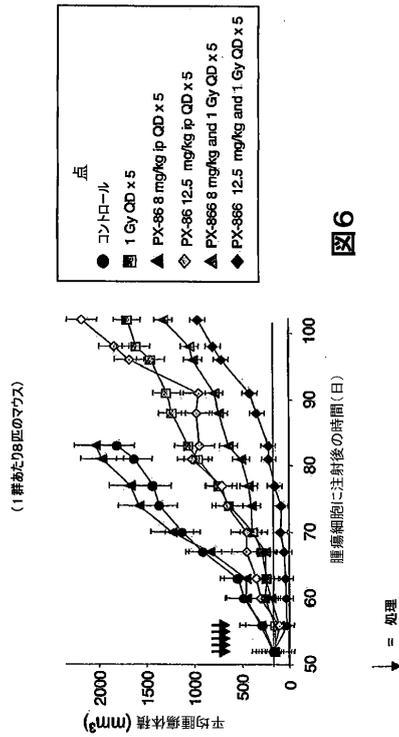
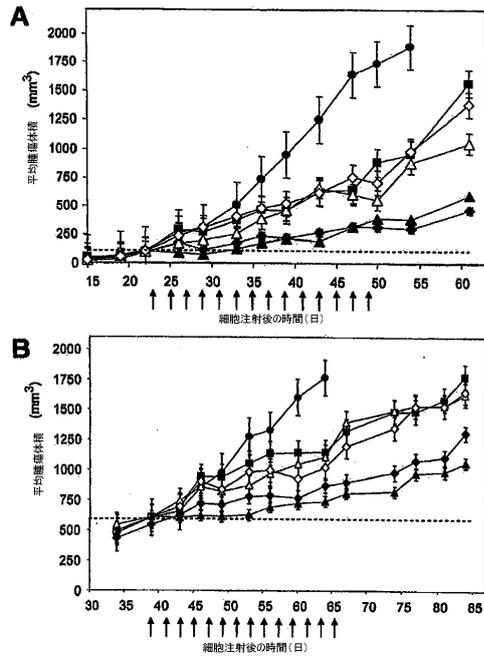


図 6

【 図 7 】

図 7



【 図 8 】

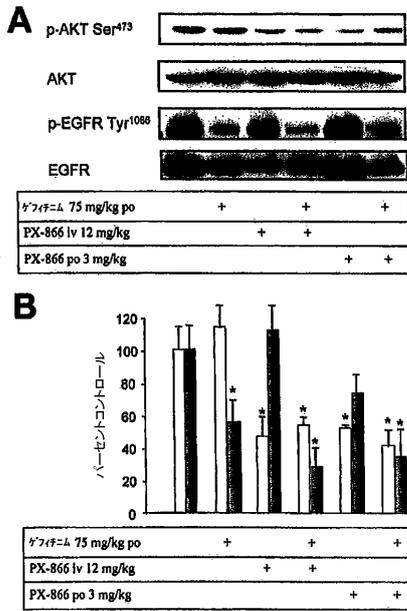


図 8

【 図 9 】

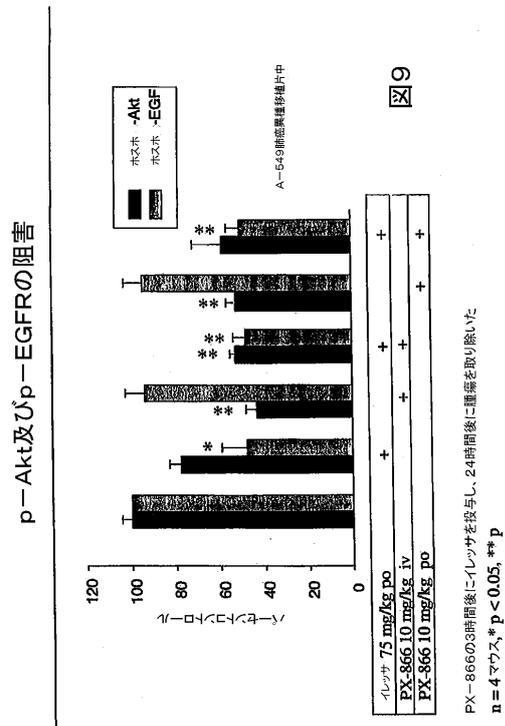


図 9

A-549卵巣異種移植片中  
 p-Akt及びp-EGFRの阻害  
 PX-866の3時間後にレツサを投与し、24時間後に腫瘍を取り除いた  
 n=4マウス,\* p<0.05,\*\* p

【 図 1 0 】

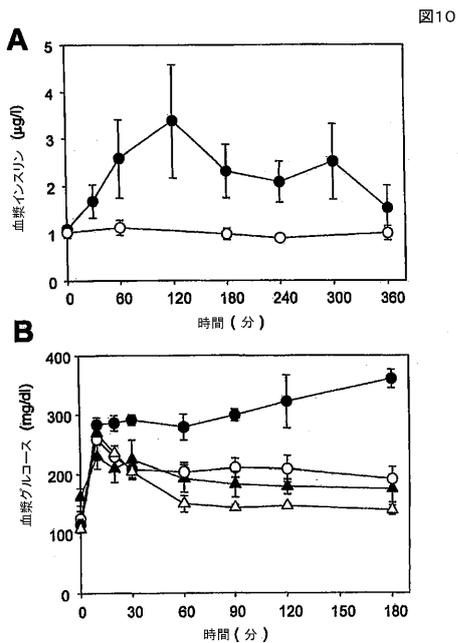


図10

【 図 1 1 A 】

1レツサ前後のPX-866のスケジュールリング

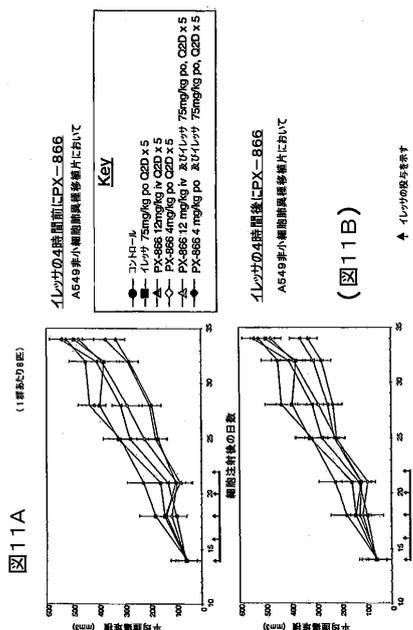


図11A

【 図 1 1 B 】

1レツサ前後のPX-866のスケジュールリング

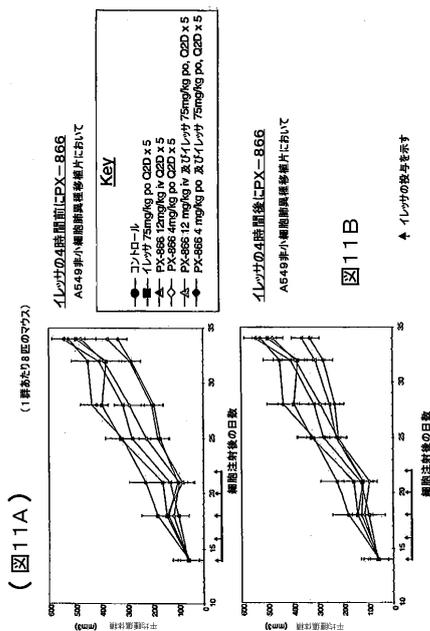


図11B

【 図 1 2 】

A549と肺癌種移植片における1レツサを伴うPX-866

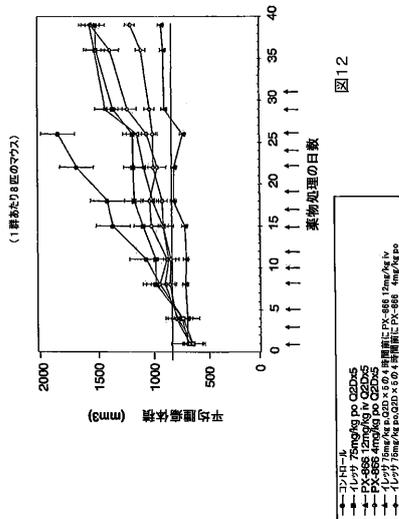


図12

【 図 1 3 】

HT-29大腸癌におけるイレツガを併用PX-866

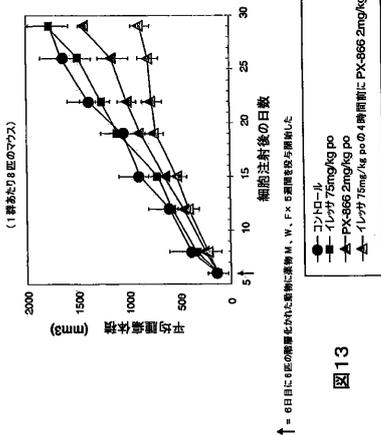


図13

【 図 1 4 】

A-673横紋筋肉腫種移植片におけるアバチンを併用PX-866

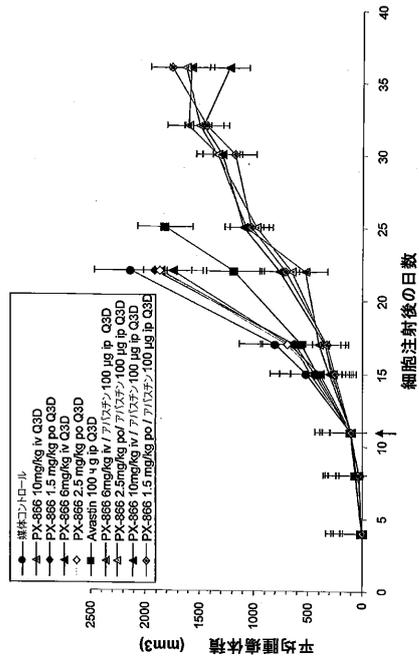


図14

【 図 1 5 】

PX-866がマウス皮膚におけるホスホ-AKTを阻害する

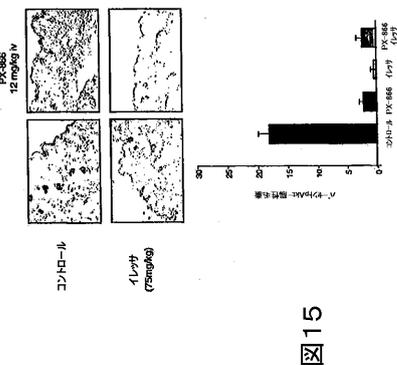


図15

【 図 1 6 A 】

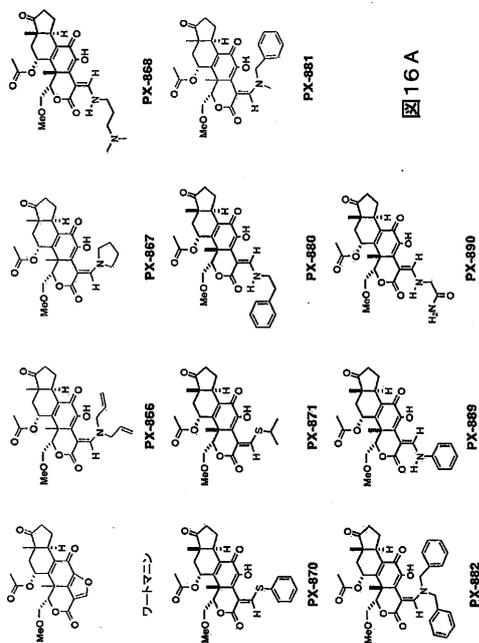
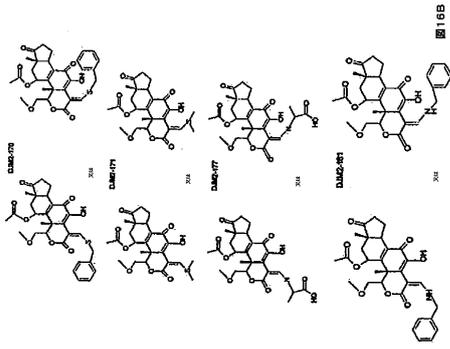


図16A

【 16 B】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 K 33/24 (2006.01) A 6 1 K 33/24  
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(73)特許権者 504279968

ユニバーシティ オブ ピッツバーグ - オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイ  
ヤー エデュケーション

アメリカ合衆国 1 5 2 6 0 ペンシルバニア州、ピッツバーグ、サッカレイ アンド オハラ  
ストリート、ガードナー スティール コンファレンス センター 2 0 0

(74)代理人 100104411

弁理士 矢口 太郎

(72)発明者 カークパトリック、リン

アメリカ合衆国、8 5 7 5 0 アリゾナ州、ツーソン、イー アベニダ デ シャパロン 6 1 6  
5

(72)発明者 ボイス、ガス

アメリカ合衆国、8 5 7 5 0 アリゾナ州、ツーソン、イー アベニダ デ シャパロン 6 1 6  
5

(72)発明者 ウィフ、ピーター

アメリカ合衆国、1 5 2 1 3 ペンシルバニア州、ピッツバーグ、テックビュー テラス 1 3 5

審査官 春日 淳一

(56)参考文献 特表2005-507880(JP,A)

国際公開第2004/103274(WO,A2)

国際公開第2004/045593(WO,A2)

国際公開第2004/045523(WO,A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K , A 6 1 P