

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-513692
(P2014-513692A)

(43) 公表日 平成26年6月5日(2014.6.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/5355 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-510425 (P2014-510425)
 (86) (22) 出願日 平成24年5月9日 (2012.5.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月27日 (2013.11.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/037056
 (87) 国際公開番号 W02012/154809
 (87) 国際公開日 平成24年11月15日 (2012.11.15)
 (31) 優先権主張番号 61/483, 821
 (32) 優先日 平成23年5月9日 (2011.5.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501149684
 ユニバーシティ オブ バージニア パテ
 ント ファウンデーション
 アメリカ合衆国22902バージニア州シ
 ャーロッツビル、スウィート300、ウエ
 スト・メイン・ストリート250番
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌を治療するための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、癌、特に乳癌を治療するために有用な併用療法を提供する。本発明は、様々な実施形態において、癌を治療する方法を提供し、この方法は、癌に冒された患者に、モノクローナル抗体部分と、それに結合した第1の前アポトーシス薬部分とを含む免疫抱合体の有効量を投与することと、第2の前アポトーシス薬の有効量を患者に投与することとを含む。免疫抱合体のモノクローナル抗体部分は、HER2などのホルモン耐性乳癌細胞の受容体を標的とするよう作用することができる。通常の分子的機能によって作用する（垂直性調節）又は異なる分子的機構によって作用する（水平性調節）2つの前アポトーシス薬が、ホルモン耐性乳癌などの乳癌に冒された患者に投与される場合、相乗効果が認められ得る。

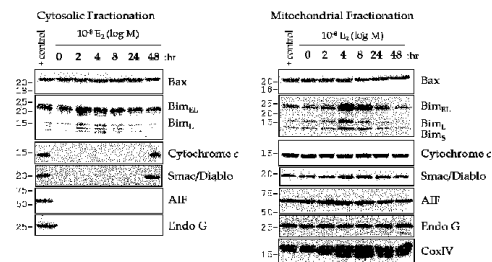


Fig. 1D

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌を治療する方法であって、癌に冒された患者に、モノクローナル抗体部分と、前記モノクローナル抗体部分に結合した第 1 の前アポトーシス薬部分と、を含む免疫複合体の有効量を投与する工程と、第 2 の前アポトーシス薬の有効量を前記患者に投与する工程と、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記第 1 の前アポトーシス薬部分が、前記モノクローナル抗体部分に共有結合されることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法において、前記癌が乳癌であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法において、前記乳癌が、アロマターゼ耐性乳癌であることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の方法において、前記乳癌が、タモキシフェン耐性乳癌であることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 3 に記載の方法において、前記乳癌が、E R + ホルモン不応性乳癌であることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の方法において、前記乳癌が、H E R 2 陽性乳癌であることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の方法において、前記乳癌が、H E R 2 陽性乳癌であることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の方法において、前記モノクローナル抗体部分が、H E R 2 に結合することを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法において、前記モノクローナル抗体部分が、トラスツズマブであることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法において、前記第 1 の前アポトーシス薬部分が、微小管脱重合化剤であることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法において、前記第 1 の前アポトーシス薬部分が、マイタンシノイド又はオーリスタチンであることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の方法において、前記モノクローナル抗体部分が、H E R - 2 に結合することを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の方法において、前記免疫複合体が、T - D M 1 であることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、前記第 1 の前アポトーシス薬部分によって及ぼされる細胞障害性の分子機構以外の分子機構によって、細胞毒性を及ぼすことを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法において、前記免疫複合体及び前記第 2 の前アポトーシス薬を投与

10

20

30

40

50

することが、相乗効果を有することを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 15 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、外因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤であることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、Fas 経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、c-FLIP 経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

10

【請求項 20】

請求項 17 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、CMH、E2、又は - トコトリエノールであることを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 15 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、内因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤であることを特徴とする方法。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、カスパーゼ非依存的経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 21 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、カスパーゼ依存的経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

20

【請求項 24】

請求項 21 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、E2、FTS、 - トコトリエノール、サリノマイシン、又はクルクミンであることを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 1 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス抗癌剤が、FTS、CMH、E2、TMS、 - トコトリエノール、サリノマイシン、又はクルクミンであることを特徴とする方法。

【請求項 26】

請求項 13 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、外因性経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

30

【請求項 27】

請求項 26 に記載の方法において、前記免疫抱合体及び前記第 2 の前アポトーシス薬を投与することが、相乗効果を有することを特徴とする方法。

【請求項 28】

請求項 26 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、CMH、E2、又は - トコトリエノールであることを特徴とする方法。

【請求項 29】

請求項 26 に記載の方法において、前記免疫抱合体が、T-DM1 であることを特徴とする方法。

40

【請求項 30】

請求項 13 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、内因性経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の方法において、前記免疫抱合体及び前記第 2 の前アポトーシス薬を投与することが、相乗効果を有することを特徴とする方法。

【請求項 32】

請求項 30 に記載の方法において、前記第 2 の前アポトーシス薬が、FTS であることを特徴とする方法。

50

【請求項 33】

請求項 30 に記載の方法において、前記免疫抱合体が、T - DM1であることを特徴とする方法。

【請求項 34】

アロマターゼ耐性、タモキシフェン耐性、又はER + ホルモン不応性の乳癌に冒された患者における治療を含む請求項 1 に記載の方法において、T - DM1の有効量と、FTS、CMH、E2、TMS、 γ -トコトリエノール、又はクルクミン、若しくはこれらの組み合わせの有効量と、を前記患者に投与する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 35】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法において、前記方法が、アジュバント療法であることを特徴とする方法。

10

【請求項 36】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法において、前記方法が、第 1 選択療法であることを特徴とする方法。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法において、前記方法が、第 2 選択療法であることを特徴とする方法。

【請求項 38】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法において、前記免疫抱合体と前記第 2 の前アポトーシス薬が、組み合わせ製剤として又は交互に投与されることを特徴とする方法。

20

【請求項 39】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法において、追加的抗癌剤を患者に投与する工程であって、前記追加的抗癌剤が、任意選択的に前記第 1 の前アポトーシス抗癌剤部分の分子機構とは異なり、かつ前記第 2 の前アポトーシス抗癌剤の前記分子機構とは異なる分子機構を介して効果を及ぼす前記工程、或いはX線、 γ 線、放射核種の放射、又は亜原子的粒子、若しくはこれらの組み合わせを含むイオン化放射線の前記患者への投与工程、を更に含むことを特徴とする方法。

【請求項 40】

治療用組成物であって、(a) 第 1 の前アポトーシス薬部分に結合したモノクローナル抗体部分を含む免疫抱合体と、(b) 第 2 の前アポトーシス薬と、を含むことを特徴とする治療用組成物。

30

【請求項 41】

請求項 40 に記載の組成物において、前記共有結合免疫抱合体が、T - DM1であることを特徴とする組成物。

【請求項 42】

請求項 40 に記載の組成物において、前記第 2 の前アポトーシス抗癌剤が、FTS、CMH、E2、TMS、 γ -トコトリエノール、又はクルクミンであることを特徴とする組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、癌を治療するための組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

2011年のヨーロッパ共同体における乳癌に関する予測死亡率は、75,688例の死亡であると推定される[1]。合衆国については、2010年の乳癌による死亡は、39,840例であることが予測された[2]。乳癌のおよそ70%において、エストロゲン受容体(ER)が腫瘍増殖の重要なプロモータであり、従って第1選択治療は、エストロゲン産生を遮断するタモキシフェン又はアロマターゼ阻害剤を通して、ERシグナル伝達を阻害することである[3]。しかしながら、これら阻害剤の効果に対する癌細胞の初

50

期（デノボ）又は後続（獲得）耐性は、生物学的再プログラム化を通しての癌細胞によるエストロゲンに対する感受性の増加の発現によって生じると考えられ、これら耐性は、多くの患者でエストロゲン降下剤の治療的有益性を制限する可能性がある。

【0003】

エストロゲン受容体（ER）陽性乳癌患者の女性の2/3が、ホルモン治療に反応し、これは卵巣の摘出によって、タモキシフェン又はアロマターゼ（エストロゲン合成）阻害剤の投与によって、並びにGnRHスーパーアゴニスト類似体と呼ばれる化合物の使用によって達成され得る。しかしながら、臨床観察によって、乳癌細胞が、エストラジオールに対する応答性の増強の発現によって、低エストラジオールの条件に適応できることが明らかになった。特に、エストラジオールの急激な欠乏の前には、200pg/mlのエストラジオールが、腫瘍増殖を刺激するために必要とされるが、一方12～18ヶ月の適応化の後には、10～15pg/mlのレベルが腫瘍増殖を引き起こすのに十分である。かかるホルモン耐性乳癌は、この時、アロマターゼの長期投与に不応性であり、これらホルモン耐性細胞を含む癌は、制御不能となり得る。

10

【0004】

培養における乳癌の増殖の研究は、野生型MCF-7細胞がエストロゲンを含まない培地中で長期間にわたって培養される場合、細胞は、最初のうちは増殖を停止するが、次いで数か月後には、細胞は適応し、エストラジオールで最大限に刺激された野生型MCF-7細胞と同様に急激に増殖することを示した。LTED（長期無エストロゲン下）細胞と呼ばれるこれら適応性培養細胞は、アロマターゼ阻害剤に対する乳癌の反応性の消失の原因となるために、「ホルモン耐性」又は「ホルモン不応性」細胞であり、ホルモン適応性に関する研究プロセスに使用されてきた。患者においてかかる細胞で突然変異が生じる場合、これは、これらの生存予想における重要な否定的な進展である。

20

【0005】

エストロゲン受容体HER2のアップレギュレーションは、ホルモン療法後に観察される。トラスツズマブ-マイタンシノイド抱合体、T-DM1は、マイタンシンの類似体である微小管阻害剤DMIに共有結合したHER2に特異的なヒト化抗体のトラスツズマブを含む抗体-薬剤抱合体である。この抱合体は、HER2陽性乳癌細胞を標的にすることが示されている。例えば、（非特許文献1）、（非特許文献2）、（非特許文献3）を参照されたい。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blattler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, Wong WL, Jacobson FS, Koeppe H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX, "Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DMI, an antibody-cytotoxic drug conjugate", Cancer Res, 2008, 68:9280~90

40

【非特許文献2】Junttila TT, Li G, Parsons K, Phillips GL, Sliwkowski MX, "Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer", Breast Cancer Res Treat, 2010, 128(2):347~56

【非特許文献3】Liu C and Chari R, "The development of antibody delivery systems to target

50

t cancer with highly potent maytansinoids”、Exp. Opin. Invest. Drugs、1997、6(2):169~172

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

新しい治療戦略が、耐性と戦うため並びにより持続性のある寛解を達成するために極めて必要である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、様々な実施形態では、癌の治療のための併用療法を目的とし、この癌は、限定されるものではないが、アナストロゾールなどのアロマターゼ阻害剤、タモキシフェンなどのエストロゲン受容体調節剤等の患者への投与などの第1選択治療にもはや反応しないものなどのホルモン耐性（ホルモン不応性）乳癌を含む。本発明は、様々な実施形態において、癌を治療する方法を含み、この方法は、癌に悩まされる患者に、モノクローナル抗体部分と、それに結合した第1の前アポトーシス薬部分とを含む免疫複合体の有効量を投与することと、第2の前アポトーシス薬の有効量を投与することとを含む。例えば、この癌は、アロマターゼ耐性乳癌、タモキシフェン耐性乳癌、ER+ホルモン不応性乳癌、又はその中でHER2発現がアップレギュレートされる癌細胞を含む乳癌、若しくはこの任意の組み合わせ等の乳癌であり得る。

【0009】

特定の実施形態では、免疫複合体は、リンカーを介して第1の前アポトーシス薬部分と結合したモノクローナル抗体部分を含む。様々な実施形態では、第1の前アポトーシス薬部分は、マイタンシノイド又はオーリスタチン等の微小管脱重合化剤である。例えば、第1の前アポトーシス薬部分は、マイタンシン類似体（マイタンシノイド）であり得、これはリンカー部分を介してモノクローナル抗体部分に結合される。より具体的には、この免疫複合体は、トラスツズマブ-マイタンシノイド複合体であり得、これは、非還元性リンカー部分を介してマイタンシノイド前アポトーシス薬部分に結合したトラスツズマブ（ハーセプチン（Herceptin）（登録商標））を含む（例えばT-DM1）。本発明者は、本明細書において、耐性細胞の増殖をただ単に阻害するよりはむしろ、耐性細胞を排除することによって、適応性再プログラム化のプロセスを消失することが、増殖阻害戦略に好ましいとして、前アポトーシス戦略を選択した。

【0010】

様々な実施形態では、第2の前アポトーシス薬は、第1の前アポトーシス薬によって及ぼされる細胞毒性の分子機構以外の分子機構によって、細胞毒性を及ぼす。

これは、本明細書では「水平性調節」と呼ばれ、単一の前アポトーシス経路内の2つ又はそれ以上のステップが標的とされる「垂直性調節」とは対照的に、「水平性調節」では、2の独立したアポトーシス経路が、最適治療計画によって活性化又は誘導される。本発明者は、本明細書で、例えば第2の前アポトーシス薬とのT-DM1の併用を使用する水平性調節が、ホルモン不応性乳癌細胞中のアポトーシスの誘導において相乗効果を示したことを開示する。

【0011】

いくつかの実施形態では、第2の前アポトーシス薬は、外因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤である。他の実施形態では、第2の前アポトーシス薬は、内因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤である。例えば、第2の前アポトーシス抗癌剤は、ファルネシル-チオサリチル酸（FTS）、4-(4-クロロ-2-メチルフェノキシ)-N-ヒドロキシブタンアミド（CMH）、エストラジオール（E2）、テトラメトキシスチルベン（TMS）、-トコトリエノール（-tocotrienol）、サリノマイシン、又はクルクミンであり得る。

【0012】

10

20

30

40

50

様々な実施形態では、本発明は、乳癌などの癌の治療のために、より具体的には、上記記載のようなホルモン耐性乳癌の治療のために、第1の前アポトーシス薬及び第2の前アポトーシス薬の併用に関する医薬用途を提供する。例えば、第1の前アポトーシス薬は、T-DMIなどの免疫抱合体であり得、第2の前アポトーシス薬は、これによって第1の前アポトーシス薬がその抗癌作用を及ぼすことができる分子機構とは異なる分子機構によって、癌においてアポトーシスを誘導する薬剤であり得る。

【0013】

様々な実施形態では、本発明は、乳癌などの癌の治療のための、より具体的には、上記記載のようなホルモン耐性乳癌の治療のための、モノクローナル抗体部分及び第1の前アポトーシス薬部分を含む免疫抱合体、並びに第2の前アポトーシス薬を含む治療用組成物を提供する。

10

【0014】

免疫抱合体のモノクローナル抗体部分は、ホルモン耐性乳癌細胞中のアップレギュレートされたHER2受容体を標的化するなどの第1の前アポトーシス薬のための標的化機構を提供することができる。抗癌剤のための標的化成分は、抱合体、例えば共有結合された部分の使用によって達成化され、この部分の一方は、標的化機構をもたらす、もう一方は細胞毒性又はアポトーシス効果をもたらす。かかる薬剤の1つであるT-DM1は、マイタンシノイドモノクローナル抗体トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））のマイクロ環状前アポトーシス細胞障害剤との共有結合抱合体である。T-DM1は、標的化部分として、前アポトーシス微小管阻害性薬剤DM1に共有結合したHER-2に特異的なヒト化抗体トラスツズマブを含む。例えば、オロウジェフ（Oroudjev）E、ロパス（Lopus）M、ウィルソン（Wilson）L、アウデッテ（Audette）C、プロベンザーノ（Provenzano）C、エリクソン（Erickson）H、コフタン（Kovtun）Y、チャリ（Chari）R、ジューダン（Jordan）MAら著、2010年、「モルキュラー・キャンサー・セラピー（Mol Cancer Ther）」、第9巻、p.2700~2713、「微小管重合化を抑制することによる核分裂停止を誘導するマイタンシノイド-抗体抱合体（Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule polymerization）」を参照されたい。驚くべきことに、本発明者は、本明細書において、T-DM1は、ファルネシル-チオサリチル酸（FTS、サリラシブ（Salirasib（登録商標）））、内因性ミトコンドリア死経路カスパーゼ依存性を標的化するRas阻害剤）、エストラジオール（E2、内因性ミトコンドリア死経路カスパーゼ依存性）、テトラメトキシステルベン（TMS、ミトコンドリア死経路カスパーゼ依存性）、4-（4-クロロ-2-メチルフェノキシ）-N-ヒドロキシブタンアミド（CMH、外因性アポトーシス経路）、トコトリエノール、サリノマイシン、又はクルクミン、若しくはこれらの組み合わせが挙げられる他の前アポトーシス抗癌剤との併用で、相乗的に作用し、非毒性アポトーシスを誘発し、インビトロで、ホルモン耐性（MCF-7；T47D）及びホルモン不応性（LTED；TamR）乳癌細胞を殺傷することを発見した。本明細書で開示されかつ主張される療法の評価で使用されるかかる細胞系は、癌に冒される患者における療法のインビボ使用において、治療の成功を高く予測する可能性があることは、当該技術分野で周知である。

20

30

40

【0015】

様々な実施形態では、本発明者は、本明細書において、特定の前アポトーシス薬の併用が、ホルモン耐性（ホルモン不応性）乳癌細胞において、アポトーシス、細胞死を相乗的に誘導するよう作用することができるという仮説を確認するために実施された実験の結果を開示する。例えば、本発明は、癌の治療の方法を提供し、この方法は、癌に悩まされる患者に、標的化モノクローナル抗体と、第1の前アポトーシス薬部分とを含む免疫抱合体の有効量を投与することと、患者に第2の前アポトーシス薬の有効量を投与することを含む。相乗的とは、治療的効果が、それぞれの薬剤の単独での投与によって達せられる個々

50

の治療的効果に関して、治療的効果が相加的効果を超えることを意味する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】図1A、1B、1D及び1Eは、細胞質ゾル及びミトコンドリア分画中のタンパク質のレベルにおける変化の検討によって、LTED細胞がFTSで処置された場合、示された前アポトーシスタンパク質のレベルによって得られた結果の概要を示す電気泳動ゲルオートラジオグラムであり、図1C及び1Fはその棒グラフである。

【図1B】図1A、1B、1D及び1Eは、細胞質ゾル及びミトコンドリア分画中のタンパク質のレベルにおける変化の検討によって、LTED細胞がFTSで処置された場合、示された前アポトーシスタンパク質のレベルによって得られた結果の概要を示す電気泳動ゲルオートラジオグラムであり、図1C及び1Fはその棒グラフである。

【図1C】図1A、1B、1D及び1Eは、細胞質ゾル及びミトコンドリア分画中のタンパク質のレベルにおける変化の検討によって、LTED細胞がFTSで処置された場合、示された前アポトーシスタンパク質のレベルによって得られた結果の概要を示す電気泳動ゲルオートラジオグラムであり、図1C及び1Fはその棒グラフである。

【図1D】図1A、1B、1D及び1Eは、細胞質ゾル及びミトコンドリア分画中のタンパク質のレベルにおける変化の検討によって、LTED細胞がFTSで処置された場合、示された前アポトーシスタンパク質のレベルによって得られた結果の概要を示す電気泳動ゲルオートラジオグラムであり、図1C及び1Fはその棒グラフである。

【図1E】図1A、1B、1D及び1Eは、細胞質ゾル及びミトコンドリア分画中のタンパク質のレベルにおける変化の検討によって、LTED細胞がFTSで処置された場合、示された前アポトーシスタンパク質のレベルによって得られた結果の概要を示す電気泳動ゲルオートラジオグラムであり、図1C及び1Fはその棒グラフである。

【図1F】図1A、1B、1D及び1Eは、細胞質ゾル及びミトコンドリア分画中のタンパク質のレベルにおける変化の検討によって、LTED細胞がFTSで処置された場合、示された前アポトーシスタンパク質のレベルによって得られた結果の概要を示す電気泳動ゲルオートラジオグラムであり、図1C及び1Fはその棒グラフである。

【図2A】図2Aは、野生型MCF-7細胞に及ぼすFTS及びクルクミンの併用の効果を表す経時変化棒グラフであり、図2Bは、FTP単独か又はクルクミンと併用されたMCF-7細胞の生存率に及ぼす効果を表す濃度曲線に対する細胞生存率である。

【図2B】図2Aは、野生型MCF-7細胞に及ぼすFTS及びクルクミンの併用の効果を表す経時変化棒グラフであり、図2Bは、FTP単独か又はクルクミンと併用されたMCF-7細胞の生存率に及ぼす効果を表す濃度曲線に対する細胞生存率である。

【図3A】図3Aは、MCF-7細胞に及ぼすサリノマイシンの効果を表す、経時変化棒グラフであり、図3Bは、その濃度曲線に対する細胞生存率を示す。

【図3B】図3Aは、MCF-7細胞に及ぼすサリノマイシンの効果を表す、経時変化棒グラフであり、図3Bは、その濃度曲線に対する細胞生存率を示す。

【図4A】非適応性細胞（示された組み合わせで5日間処理されたMCF-7細胞（a-c；上部のグラフ）及びT47D（d-f；下部のグラフ））の用量効果プロットのグラフ図である。

【図4B】非適応性細胞（示された組み合わせで5日間処理されたMCF-7細胞（a-c；上部のグラフ）及びT47D（d-f；下部のグラフ））の用量効果プロットのグラフ図である。

【図4C】非適応性細胞（示された組み合わせで5日間処理されたMCF-7細胞（a-c；上部のグラフ）及びT47D（d-f；下部のグラフ））の用量効果プロットのグラフ図である。

【図4D】非適応性細胞（示された組み合わせで5日間処理されたMCF-7細胞（a-c；上部のグラフ）及びT47D（d-f；下部のグラフ））の用量効果プロットのグラフ図である。

【図4E】非適応性細胞（示された組み合わせで5日間処理されたMCF-7細胞（a-

10

20

30

40

50

c ; 上部のグラフ) 及び T 4 7 D (d - f ; 下部のグラフ)) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 4 F】非適応性細胞 (示された組み合わせで 5 日間処理された M C F - 7 細胞 (a - c ; 上部のグラフ) 及び T 4 7 D (d - f ; 下部のグラフ)) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 5 A】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 5 B】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 5 C】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

10

【図 5 D】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 5 E】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 5 F】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 5 G】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 5 H】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

20

【図 5 I】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 5 J】適応性細胞系 (示された組み合わせで 5 日間処理された L T E D D 2 9) の用量効果プロットのグラフ図である。

【図 6 A】示されたように処理された非適応性 M C F - 7 細胞 (a - c ; 上部の 3 つのグラフ) 及び T 4 7 D (d - f ; 下部の 3 つのグラフ) の併用係数のグラフ図を示す。縦座標 - 併用係数 (C I) ; 横座標 - 分画効果。

【図 6 B】示されたように処理された非適応性 M C F - 7 細胞 (a - c ; 上部の 3 つのグラフ) 及び T 4 7 D (d - f ; 下部の 3 つのグラフ) の併用係数のグラフ図を示す。縦座標 - 併用係数 (C I) ; 横座標 - 分画効果。

30

【図 6 C】示されたように処理された非適応性 M C F - 7 細胞 (a - c ; 上部の 3 つのグラフ) 及び T 4 7 D (d - f ; 下部の 3 つのグラフ) の併用係数のグラフ図を示す。縦座標 - 併用係数 (C I) ; 横座標 - 分画効果。

【図 6 D】示されたように処理された非適応性 M C F - 7 細胞 (a - c ; 上部の 3 つのグラフ) 及び T 4 7 D (d - f ; 下部の 3 つのグラフ) の併用係数のグラフ図を示す。縦座標 - 併用係数 (C I) ; 横座標 - 分画効果。

【図 6 E】示されたように処理された非適応性 M C F - 7 細胞 (a - c ; 上部の 3 つのグラフ) 及び T 4 7 D (d - f ; 下部の 3 つのグラフ) の併用係数のグラフ図を示す。縦座標 - 併用係数 (C I) ; 横座標 - 分画効果。

40

【図 6 F】示されたように処理された非適応性 M C F - 7 細胞 (a - c ; 上部の 3 つのグラフ) 及び T 4 7 D (d - f ; 下部の 3 つのグラフ) の併用係数のグラフ図を示す。縦座標 - 併用係数 (C I) ; 横座標 - 分画効果。

【図 7 A A】図 7 A 及び 7 B は、示されるように処置した適応性細胞系、L T E D D 2 9 (a - i) 及び T a m R 細胞 (j - s) の併用係数のグラフ図を示す。

【図 7 A B】図 7 A 及び 7 B は、示されるように処置した適応性細胞系、L T E D D 2 9 (a - i) 及び T a m R 細胞 (j - s) の併用係数のグラフ図を示す。

【図 7 A C】図 7 A 及び 7 B は、示されるように処置した適応性細胞系、L T E D D 2 9 (a - i) 及び T a m R 細胞 (j - s) の併用係数のグラフ図を示す。

【図 7 A D】図 7 A 及び 7 B は、示されるように処置した適応性細胞系、L T E D D 2

50

のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 A】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 B】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 C】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 D】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 E】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 F】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 G】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 H 1】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 H 2】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【図 9 I】示されたように処置された適応性細胞系、L T E D D 2 9 細胞 (a - i) アイソログラム分析のグラフ図である。縦座標 - 用量 A ; 横座標 - 用量 B。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明を説明及び主張することにおいて、以下の専門用語は、以下に記載される定義に従って使用されるであろう。別に規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書に記載のものと同様又は等価な任意の方法又は材料が本発明の実行又は試験において使用され得るが、好ましい方法及び材料が本明細書に記載される。本明細書で使用するとき、以下の用語のそれぞれは、このセクションにおいてそれに関連した意味を有する。基、置換基、及び範囲に関する以下に列挙された特定かつ好ましい数値は、例示のためのものにすぎず、これらは、他の定義された数値若しくは基及び置換基に関して定義された範囲内の他の数値を除外するものではない。

【0018】

本明細書で使用するとき、「a」及び「an」は、1つ又は複数、即ち、物品の文法的対象物の少なくとも1つを指す。例として、「1つの要素 (a n e l e m e n t) 」とは、1つ又は複数の要素を意味する。

【0019】

本明細書で使用するとき、用語「約 (a b o u t) 」は、およそ、ほぼ、概略的に、又は近辺を意味する。用語「約 (a b o u t) 」が数値範囲と併せて使用される場合、これは、境界を述べられる数値よりも高く又は低く広げることによってその範囲を修正する。一般的に、用語「約 (a b o u t) 」は、数値を20%の変動によって、記述された値よりも高い及び低い数値に修正するよう本明細書で使用される。

【0020】

本明細書で使用するとき、用語「冒された細胞」とは、疾患又は障害を煩う被験体の細胞を指し、この冒された細胞は、疾患、病状又は障害を患っていない被験体に比べて変更された表現型を有する。

【0021】

細胞又は組織が、疾患、病状、又は障害を煩わない被験体における同一の細胞又は組織と比べて、変更された表現型を有する場合、細胞又は組織は、疾患又は障害に「冒されている」。

10

20

30

40

50

【0022】

本明細書で使用する時、「作動薬」とは、ヒトなどの哺乳類に投与される場合、関心の生物学的活性を増強するか又は拡大する物質の組成物である。かかる効果は、直接的又は間接的であってもよい。

【0023】

用語「拮抗薬」とは、ヒトなどの哺乳類に投与される場合、哺乳類の内因性化合物のレベル又は存在に寄与する生物学的活性を阻害するか又は妨害する物質の組成物である。かかる効果は、直接的又は間接的であってもよい。

【0024】

本明細書で使用する時、用語「アロマターゼ阻害剤」は、アンドロステジオンのエストロンへの転化及び/又はテストステロンのエストラジオールへの転化を遮断する組成物に関するものである。アロマターゼ阻害剤は、例えば、エキセメスタン、アナストロゾール及びレトロゾールを含む阻害剤のステロイド系及び非ステロイド系クラスの双方を含む。

【0025】

本明細書で使用する時、化学化合物の「類似体」とは、例として、構造では他のものに似ているが、必ずしも異性体であるというわけではない化合物である（例えば、5-フルオロウラシルは、チミンの類似体である）。

【0026】

用語「アポトーシス」とは、様々な手段によって誘導され得る生化学的経路によって仲介されるプログラム細胞死を指す。「前アポトーシス」剤又は薬剤とは、プログラム細胞死をもたらす生化学的効果を生じる生物活性剤又は薬剤である。本明細書に記載されるように、アポトーシスは、以下に更に記載されるような内因性又は外因性経路又は機構によって引き起こされ又は誘導され得る。「外因性」アポトーシス経路は細胞死受容体に関与し、この経路は、細胞死受容体に結合するリガンドによって活性化される。「内因性」アポトーシス経路は、アポトーシスを開始するミトコンドリア経路に関与する。水平性調節における「水平性」とは、複数の特異的経路に影響を与える刺激を指し、一方垂直性調節における「垂直性」とは、同一の経路において、いくつかのステップが関与することを意味する。

【0027】

本明細書で使用する時、用語「乳癌」は、乳房又は乳腺組織の多様なタイプ及びサブタイプの癌種のいずれかに関係する。

本明細書で使用する時、用語「癌」とは、その特徴的な形質 - 正常の制御が不能な形質が - 未制御の増殖、分化の欠如、局所組織浸潤、及び転移をもたらす細胞の増殖として定義される。例としては、限定されるものではないが、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌及び肺癌が挙げられる。

【0028】

本明細書で使用する時、「化合物」とは、一般的に、薬剤、又は薬剤としての使用のための候補物質、並びに上記の組み合わせ及びの混合物と考えられる任意のタイプの物質又は薬剤を指す。

【0029】

「抱合体」とは、少なくとも2つの「部分」、又はドメインを、互いに関連付けて組み合わせる分子実体である。「共有結合」抱合体とは、当該技術分野で周知であるものなどの共有化学結合の手段によって部分が結合されるところの抱合体である。例えば、モノクローナル抗体等のタンパク質は、共有結合を通してなど、薬剤などの有機化合物と共に抱合体を形成するよう起こり得る。タンパク質が抗体、例えばモノクローナル抗体である場合、生じる抱合体は、本明細書では「免疫抱合体」と呼ばれる。タンパク質（例えば、モノクローナル抗体）と有機化合物（例えば、薬剤）との間の共有結合は、「リンカー」又は「リンカー部分」を通して起こり得、このリンカー又はリンカー部分は、有機化合物とタンパク質の双方に共有結合される。例は、以下に説明される。

10

20

30

40

50

【0030】

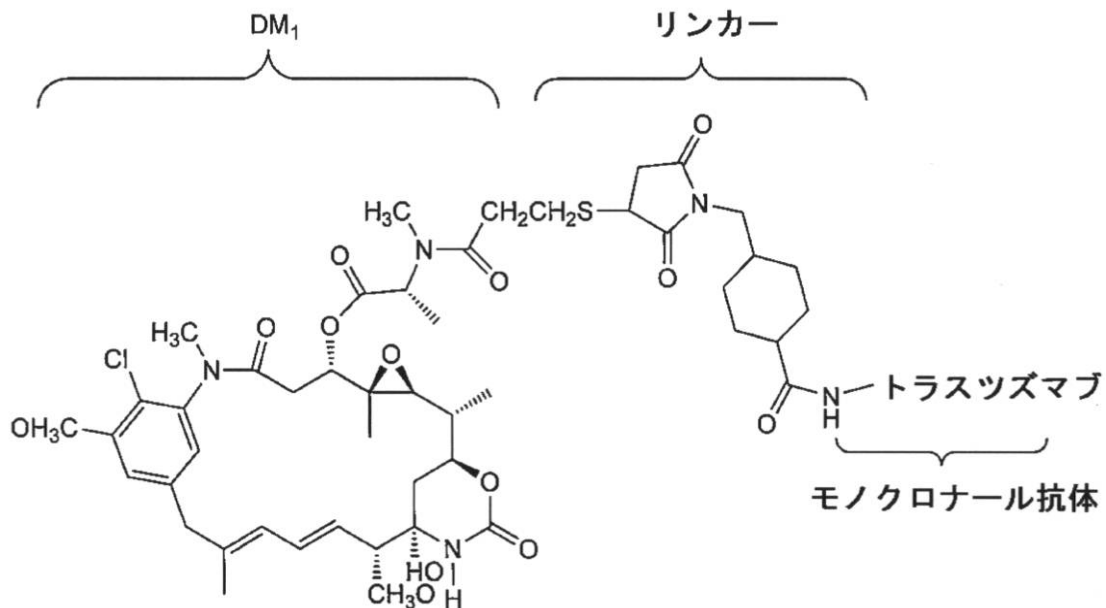
本明細書で使用するとき、用語「リンカー」又は「リンカー部分」とは、2つの他の分子部分を、共有結合的に、又は非共有結合的に（例えばイオン結合又は水素結合若しくはファンデルワールス相互作用）のいずれかで結びつける分子部分を指す。具体例は、以下に提供される。「リンケージ (linkage)」又は「リンカー」とは、2つの基の間の接続部位を指す。

【0031】

本明細書で使用される用語としての「部分」とは、より大きな分子の領域を指し、例えば、抱合体 T - DM1 においては、マイタンシノイド薬がリンカーを介してモノクローナル抗体に結合されることで、最終産物においてマイタンシノイド薬部分が、リンカー部分を介してモノクローナル抗体部分に結合される。かかる部分を含む抱合体の例が、分子実体 T - DM1 によって提供され、これは、モノクローナル抗体トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、及びマイタンシノイド大環状細胞障害性化合物との共有結合抱合体であり、この構造は以下に示される。

【0032】

【化1】



リンカーのトラスツズマブへのカップリングは、タンパク質トラスツズマブの側鎖アミノ酸残基（リジン残基等）の窒素原子へのリンカー部分の結合を介するものであると信じられている。当該技術分野で周知であるトラスツズマブの分子構造は、詳細には提供されていない。抗体と、マイタンシノイドなどの前アポトーシス薬等の免疫抱合体は、本明細書に記載された方法並びに参照により本明細書に組み込まれた文献に記載の方法によって調製され評価され得る。

【0033】

免疫抱合体は、1つ以上の生理活性分子に抱合された抗体を含む。上記に示されたような免疫抱合体 T - DM1 は、モノクローナル抗体に結合されたマイタンシノイド部分を含む。マイタンシノイドは、チューブリン重合化を阻害することによって、又は微小管脱重合化を誘導することによって作用する有糸分裂 (mitotic) 阻害剤である。当該技術分野で周知であるように、チューブリン重合化及び脱重合化は、有糸分裂、細胞分裂に關与する重要な事象である。細胞分裂の長期抑制は、有糸分裂抑制細胞中でアポトーシスを誘導可能な状態であると考えられる。

【0034】

マイタンシンは、まず初めに東アフリカの低木であるマイテヌス・セーラタ (Maytenus serrata) から単離された（米国特許出願公開第 3896111 号明細書）。引き続いて、特定の微生物がまた、マイタンシノール及び C - 3 マイタンシノール

エステルなどのマイタンシノイドを産生するが発見された（米国特許第 4, 151, 042 号明細書）。合成マイタンシノール並びにそれらの誘導体及び類似体が、例えば、米国特許第 4, 137, 230 号明細書、同第 4, 248, 870 号明細書、同第 4, 256, 746 号明細書、同第 4, 260, 608 号明細書、同第 4, 265, 814 号明細書、同第 4, 294, 757 号明細書、同第 4, 307, 016 号明細書、同第 4, 308, 268 号明細書、同第 4, 308, 269 号明細書、同第 4, 309, 428 号明細書、同第 4, 313, 946 号明細書、同第 4, 315, 929 号明細書、同第 4, 317, 821 号明細書、同第 4, 322, 348 号明細書、同第 4, 331, 598 号明細書、同第 4, 361, 650 号明細書、同第 4, 364, 866 号明細書、同第 4, 424, 219 号明細書、同第 4, 450, 254 号明細書、同第 4, 362, 663 号明細書及び同第 4, 371, 533 号明細書に開示されている。

10

【0035】

マイタンシノイド薬部分は、抗体-薬剤抱合体中で魅力的な薬剤部分であり、なぜなら、これらが (i) 発酵又は発酵産物の化学的修飾又は誘導体化によって調製することが比較的利用でき、(ii) 抗体への非ジスルフィド（非還元性）リンカーを通しての抱合に好適な官能基による誘導体化が容易であり、(iii) 血漿中で安定であり、並びに (iv) 多様な腫瘍細胞系に対して有効であるためである。

【0036】

マイタンシノイド薬部分としての使用に好適なマイタンシン化合物は、当該技術分野で周知であり、既知の方法に従って天然供給源から単離され得、又は遺伝子操作技術を使用して産生され得る（ユ-（Yu）ら著、2002年、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（PNAS）、第99巻、p. 7968~7973を参照されたい）。マイタンシノール及びマイタンシノール類似体はまた、既知の方法に従って合成的に調製され得る。

20

【0037】

マイタンシノイド薬部分としては、C-19-デクロロ（米国特許第 4, 256, 746 号明細書）（アンサマイトシン P2 の水素化アルミニウムリチウム還元によって調製）；C-20-ヒドロキシ（又は C-20-デメチル）+/- C-19-デクロロ（米国特許第 4, 361, 650 号明細書及び同第 4, 307, 016 号明細書）（ストレプトマイセス属（Streptomyces）又はアクチノマイセス属（Actinomyces）を使用する脱メチル化若しくは LAH を使用する脱塩素化によって調製）；及び C-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ（-OCOR）、+/- デクロロ（米国特許第 4, 294, 757 号明細書）（塩化アシルを使用するアシル化によって調製）、並びに他の位置で修飾を有するものなどの修飾芳香族環を有するものが挙げられる。

30

【0038】

例示的マイタンシノイド薬部分はまた、C-9-SH（米国特許第 4, 424, 219 号明細書）（ H_2S 又は P_2S_5 とのマイタンシノールの反応によって調製）；C-14-アルコキシメチル（デメトキシ/ CH_2OR ）（米国特許第 4, 331, 598 号明細書）；C-14-ヒドロキシメチル又はアシルオキシメチル（ CH_2OH 又は CH_2OAc ）（米国特許第 4, 450, 254 号明細書）（ノカルジア属（Nocardia）から調製）；C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ（米国特許第 4, 364, 866 号明細書）（ストレプトマイセス属（Streptomyces）によるマイタンシノールの転化によって調製）；C-15-メトキシ（米国特許第 4, 313, 946 号明細書及び同第 4, 315, 929 号明細書）（トレビア・ヌーディフロラ（Trewia nudiflora）から単離）；C-18-N-デメチル（米国特許第 4, 362, 663 号明細書及び同第 4, 322, 348 号明細書）（ストレプトマイセス属（Streptomyces）によるマイタンシノールの脱メチル化によって調製）；及び 4, 5-デオキシ（米国特許第 4, 371, 533 号明細書）（マイタンシノールの三塩化チタン/LAH 還元によって調製）等の修飾を有するものが挙げられる。

40

【0039】

50

本明細書で使用される用語としての「オーリスタチン」とは、ドラスタチン類及びオーリスタチン類等のペプチド性抗癌剤を指し、これらは微小管動力学、GTP加水分解、及び核及び細胞分裂を妨害し（ウォイケ（Woyke）ら著、2001年、「アンティマイクrobiアル・エージェント・アンド・ケモセラピー（Antimicrob. Agents and Chemother.）」、第45巻（12）、p.3580～3584）、並びに抗癌活性（米国特許第5,663,149号明細書）及び抗真菌活性（ペティット（Pettit）ら著、1998年、「アンティマイクrobiアル・エージェント・ケモセラピー（Antimicrob. Ag類似体ents Chemother.）」、第42巻、p.2961～2965）を有することが示された。例えば、米国特許第5,635,483号明細書及び同第5,780,588号明細書を参照されたい。

10

【0040】

「対照」被験体とは、同一のタイプの依存性等の試験被験体と同一の特性を有する被験体である。対照被験体は、例えば、試験被験体が処置又は検査される時間と正確に又は殆ど同一の時間で検査され得る。対照被験体はまた、例えば、試験被験体が検査される時間から離れた時間で検査されてもよく、対照被験体の検査の結果が記録されることで、記録された結果が試験被験体の検査によって得られた結果と比較されてもよい。

【0041】

「試験」被験体とは、処置される被験体である。

本明細書で使用するとき、化合物の「誘導体」とは、アルキル、アシル、又はアミノ基によるHの置き換えにおけるような、1つ以上のステップで、同様な構造の別の化合物から生成され得る化学化合物を指す。

20

【0042】

「疾患」とは、被験者がホメオスタシスを維持することができない、並びに疾患が軽減されない場合、次いで被験者の健康が悪化し続ける、被験者の健康の状態である。これとは対照的に、被験者における「異常」とは、被験者がホメオスタシスを維持することはできるが、被験者の健康の状態が、異常の不在下におけるよりも、より好ましくない健康の状態であるものである。

【0043】

疾患又は異常の症状の重篤性、かかる症状が患者によって経験される頻度が、又はこれらの双方が低減される場合、疾患、状態、又は異常は軽減される。

30

本明細書で使用するとき、「有効量」とは、疾患又は障害の症状を軽減するなどの選択された効果をもたらすのに十分な量を意味する。2つ又はそれ以上の化合物を投与することに関しては、別の化合物（複数可）と併用されて投与される場合、各化合物の量は、その化合物が単独で投与される場合とは異なることがある。

【0044】

本明細書で使用するとき、用語「エストロゲン」とは、エストロゲン応答性細胞において細胞増殖を誘導し及び/又は新しいタンパク質合成を開始する天然起源及び合成的に製造された化合物の部類に関するものである。天然起源エストロゲンとしては、エストロン（E1）、エストラジオール-17B（E2）、及びエストリオール（E3）が挙げられ、これら中で、エストラジオールが最も薬理的に活性である。合成エストロゲンは、天然には存在せず、内因性エストロゲンの活性をある程度まで複製又は擬似する化合物である。これら化合物は、ジエネストロール、ベンゼストロール、ヘキセストロール、メテストロール、ジエチルスチルベストロール（DES）、キネストロール（エストロビス（Estrovis））、クロロトリアニセン（Tace）、及びメタレネストリル（バレストリル（Vallestrial））によって例示される、多様なステロイド性及び非ステロイド性組成物を含む。

40

【0045】

本明細書で使用するとき、用語「エストロゲン拮抗薬」とは、エストロゲンと同時に投与される場合、エストロゲンの活性に及ぼす中和作用又は阻害効果を有する化合物に関するものである。エストロゲン阻害剤の例として、タモキシフェン及びトレミフェンが挙げ

50

られる。

【0046】

本明細書で使用するとき、「機能的分子」は、この分子がそれによって特性評価される特性又は活性を、呈する形態にある分子を指す。機能的酵素とは、例えば、この酵素がそれによって特性化される特徴的触媒活性を呈するものである。

【0047】

本明細書で使用するとき、「ホルモン遮断療法」とは、患者からホルモンの存在の作用をブロックするか、又はホルモンの存在を除去する（合成を妨害するか又はホルモンの分解を増強させるかのいずれかで）、患者の任意の治療に関するものである。乳癌の特定の場合には、ホルモン抑制療法は、エストロゲンの生合成を遮断することによる、又はHER2などのエストロゲン受容体に及ぼすエストロゲンの効果をブロックすることによる、エストロゲンの遮断を含み得る。

10

【0048】

本明細書で使用するとき、用語「ホルモン応答性細胞/組織」とは、例えばエストロゲン又はアンドロゲンに対して天然に応答性である非癌性細胞又は組織に関するものであり、この細胞又は組織は、このホルモンの存在下で新しいタンパク質合成を増大し及び/又は開始する。ホルモン応答性組織としては、乳腺、精巣、前立腺、子宮及び子宮頸部が挙げられる。エストロゲン又はアンドロゲンに対して正常に応答する組織は、このホルモンに対してその応答性を低下させる場合がある。従って、「ホルモン応答性組織」とは、本明細書で使用するとき、広範な用語であり、ホルモンに対して正常に応答するホルモン感受性及びホルモン非感受性組織の双方を包含する。「エストロゲン応答性細胞/組織」とは、エストロゲンに応答性であるものである。

20

【0049】

本明細書で使用するとき、用語「ホルモン応答性癌」とは、ホルモン応答性細胞/組織から誘導される細胞又は組織に関するものであり、並びに「適応性ホルモン応答性癌細胞」とは、対応するホルモン応答性細胞において応答を生じないホルモンのレベルに反応して増殖するホルモン応答性癌細胞である。

【0050】

上述のようにエストロゲン産生をブロックするアロマターゼ阻害剤、又はタモキシフェンなどのエストロゲン拮抗薬、若しくは同様なエストロゲンブロック効果の他の薬剤等の物質への曝露時に、乳癌で見出されるようなエストロゲン応答性癌細胞は、組織中でのエストロゲンのレベルの低減に対して耐性を発現することができる。かかる場合には、アロマターゼ阻害剤の使用は、乳癌を制御することにおいて、もはや有効ではない。かかる癌に関与する細胞は、本明細書では「長期無エストロゲン下」、「ホルモン耐性」、又は「ホルモン不応性」細胞と呼ばれ、巨視的疾患は、互換的には「ホルモン耐性」又は「ホルモン不応性」乳癌と呼ばれる。しかしながら、「ホルモン耐性」又は「ホルモン不応性」細胞及び癌は、他の機構を介しても十分に出現し得ることが理解される。

30

【0051】

本明細書で使用するとき、用語「適応性ホルモン応答」又は「適応性応答」とは、それによって、ホルモン応答性組織から誘導される細胞又は組織が、これら細胞中で以前には反応を生じなかったホルモンのレベルに反応することができるようになる（即ち、新しいタンパク質合成を増大し及び/又は開始する）プロセスに関するものである。

40

【0052】

本明細書で使用するとき、用語「阻害する」とは、用語「阻害する」が使用される文脈に基づいて、化合物又は任意の薬剤が、記載された機能、レベル、活性、合成、放出、結合等を低減又は妨害する能力を指す。好ましくは、阻害は、少なくとも10%まで、より好ましくは少なくとも25%まで、更により好ましくは少なくとも50%までの阻害であり、最も好ましくは、その機能が少なくとも75%まで阻害される。用語「阻害する」とは、「低減する」、及び「ブロックする」と互換的に使用される。

【0053】

50

本明細書で使用する時、用語「タンパク質を阻害する」とは、タンパク質の合成、レベル、活性、又は機能を阻害する任意の方法又は技術、並びに関心のタンパク質の合成、レベル、活性、又は機能の誘導又は刺激を阻害する方法を指す。この用語はまた、関心のタンパク質の合成、レベル、活性、又は機能を調節し得る任意の代謝経路又は調節経路を指す。この用語は、他の分子との結合及び複合体形成を含む。従って、用語「タンパク質阻害剤」とは、その適用が、タンパク質機能及びタンパク質経路機能の阻害をもたらす任意の薬剤又は化合物を指す。しかしながら、この用語は、これら機能のそれぞれ及びそのどれもが、同時に阻害されねばならないことを意味していない。「阻害剤」は、これらの機能のいずれか（例えば、それによってアロマターゼ酵素（タンパク質）が前駆体をエストロゲンに転化する生合成触媒活性をアロマターゼ阻害剤がブロックする）を実行することができる。

10

【0054】

本明細書で使用する時、用語「mTOR活性の阻害」とは、例えば、p70 S6K及びPHAS-Iを含むmTORの基質の1つ以上をリン酸化するためのmTORの能力における検出可能な低下に関するものである。mTOR阻害剤は、mTOR活性に及ぼす直接的阻害効果を有するものである（即ち、mTOR活性の阻害は、上流経路の酵素に及ぼす阻害効果を通して仲介されない）。

【0055】

本明細書で使用する時、「使用説明書」とは、本明細書に記載される種々の疾患又は障害の軽減をもたらすために、キット中の本発明の化合物の有用性を伝えるよう使用され得る刊行物、レコーディング、図表、又は任意の表現の他の媒体を含む。任意選択的に、又はこの代わりに、使用説明書は、被験者における疾患又は障害の軽減の1つ以上の方法を記載する場合がある。本発明のキットの使用説明書は、例えば、本発明の同定された化合物を収容する容器に添付されてもよく、又は同定された化合物を収容する容器と併せて出荷されてもよい。或いは、使用説明書は、使用説明書及び化合物がレシピエントと協同的に使用されるとの意図で、容器とは別個に出荷されてもよい。

20

【0056】

本明細書で使用时、「リガンド」とは、標的化合物又は分子に特異的に結合する化合物である。リガンドは、リガンドが、異種化合物の試料中の化合物の存在の決定因である結合反応において機能する場合、化合物と「特異的に結合する」又は「特異的に反応する」。

30

【0057】

「受容体」とは、リガンドに特異的に結合する化合物又は分子である。

本明細書で使用する時、用語「核酸」とは、RNA並びに単鎖及び二重鎖DNA及びcDNAを包含する。更に、用語「核酸」、「DNA」、「RNA」及び同様な用語もまた、核酸類似体、即ち、ホスホジエステル主鎖以外を有する類似体も含む。

【0058】

用語「ペプチド」とは、典型的には、短鎖ポリペプチドを指す。

「ポリペプチド」とは、ペプチド結合を介する天然起源の構造変異体及びその合成非天然起源の類縁体に関連する、天然起源の構造変異体、及びその合成非天然起源の類似体に関連するアミノ酸残基から構成されるポリマーを指す。合成ポリペプチドは、例えば、自動ポリペプチドシンセサイザーを使用して合成され得る。

40

【0059】

用語「タンパク質」とは、典型的には大きなポリペプチドを指す。

「組換えポリペプチド」とは、組換えポリヌクレオチドの発現時に産生されるものである。

【0060】

本明細書で使用する時、用語「適用毎」とは、被験体への薬剤又は化合物の投与を指す。

本明細書で使用する時、「薬学的に許容可能な塩」とは、リン酸塩緩衝生理食塩水溶

50

液、水、水中油型又は油中水型エマルジョン等の乳剤、並びに種々のタイプの湿潤剤などの標準薬学的担体のいずれかを含む。この用語はまた、合衆国連邦政府の規制機関によって承認された、又はヒトを含む動物における使用に米国薬局方で列挙された薬剤のいずれかを包含する。「薬学的許容可能な塩」とは、規制機関による承認又は米国薬局方中の列挙に関して薬学的に許容可能である酸性又は塩基性のいずれかの、対イオンとの塩の形態での分子実体を指す。

【0061】

本明細書で使用するとき、用語「生理学的に許容可能な」エステル又は塩とは、医薬組成物中の任意の他の成分と適合性があり、並びにこの組成物が投与される被験体に対して有害ではない活性成分のエステル又は塩形態を意味する。

10

【0062】

用語「予防する」とは、本明細書で使用するとき、何かが起こることを止めること、又は起こる可能性又は疑いがある何かに対する事前の処置を取ることを意味する。医学に関しては、「予防」とは、一般的に、疾患又はある状態になる機会を減少させるために行われる行為を指す。

【0063】

本明細書で使用するとき、末端アミノ基に関する「保護基」とは、その末端アミノ基が、ペプチド合成で従来から使用されている種々のアミノ末端保護基のいずれかに結合されるペプチドの末端アミノ基を指す。かかる保護基としては、例えば、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、トリフルオロアセチル、スクシニル、及びメトキシスクシニルなどのアシル保護基；ベンジルオキシカルボニルなどの芳香族ウレタン保護基；及び脂肪族ウレタン保護基、例えば、*t*-ブトキシカルボニル又はアダマンチルオキシカルボニルが挙げられる。好適な保護基に関しては、グロス (Gross) 及びマイエンホーファー (Mienhofer) 編集、「ザ・ペプチドス (The Peptides)」、第3巻、p. 3~88、「アカデミック・プレス (Academic Press)」、ニューヨーク、1981年を参照されたい。

20

【0064】

本明細書で使用するとき、末端カルボキシ基に関する「保護基」とは、その末端カルボキシ基が、種々のカルボキシ末端保護基のいずれかに結合されるペプチドの末端カルボキシ基を指す。かかる保護基としては、例えば、*t*-ブチル、ベンジル、又はエステル又はエーテル結合を通して末端カルボキシル基に結合する他の許容可能な基が挙げられる。

30

【0065】

本明細書で使用するとき、用語「精製された」及び類似する用語は、天然環境における分子又は化合物に通常結合した他の成分に対しての分子又は化合物の高濃度化を指す。用語「精製された」は、プロセス中に特定の分子の完全な純度が達成されたことを示す必要は必ずしもない。本明細書で使用するとき、「高度に精製された」化合物とは、90%を超えて純粋である化合物を指す。

【0066】

用語「調節する」とは、関心対象の機能又は活性を刺激するか又は阻害するかのいずれかを指す。

40

本明細書で使用するとき、「試料」とは、被験体からの生物学的試料を指し、限定されないが、正常組織試料、疾患組織試料、生検、血液、唾液、糞便、精液、涙液、及び尿が挙げられる。試料はまた、細胞、組織、又は関心対象の液体を含有する被験体から得られた材料の任意の他の供給源であり得る。

【0067】

本明細書で使用するとき、用語「特異的に結合する」とは、特異的分子を認識しかつそれに結合するが、試料中の他の分子を実質的に認識せず又はそれに結合しない分子を意味するか、若しくは、これは該分子がサンプル中の他の分子を実質的に認識しないか又はそれに結合しない場合の、細胞調節プロセスの部分におけるような2つ又はそれ以上の分子の間の結合を意味する。

50

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用するとき、用語「標準」とは、比較のために使用される何かを指す。例えば、これは、試験化合物を添加する場合、結果を比較するために投与され又は添加されかつ使用される既知の標準薬剤又は化合物であり得、若しくは、これは、パラメータ又は機能に及ぼす薬剤又は化合物の効果を測定する場合、対照値を取得するよう測定される標準パラメータ又は機能であり得る。標準とはまた、サンプルに既知量で添加される薬剤又は化合物等の「内部標準」を指すこともでき、これは、関心対象のマーカが測定される前に、サンプルが処理され若しくは精製又は抽出処理を受ける場合、精製率又は回収率などのかかる事項を決定する上で有用である。内部標準は、関心対象の精製されたマーカであることが多く、これは放射活性同位体などで標識化されていて、これが内因性マーカから識別されることを可能にする。

10

【 0 0 6 9 】

診断又は治療の「被験体」は、ヒトを含む哺乳類である。

本明細書で使用するとき、用語「症状」とは、患者によって経験される、任意の病的な現象若しくは構造、機能、又は感覚における正常な状態からの逸脱並びに疾患の示唆を指す。これとは対照的に、徴候 (s i g n) とは、疾患の客観的証拠である。例えば、鼻血は徴候である。これは患者、医者、看護師及び他の観察者に明らかなものである。

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用するとき、用語「治療する (t r e a t i n g) 」とは、特定の疾患、異常、又は状態の予防、又は特定の疾患、異常又は状態に関連する症状の軽減及び / 又は該症状の防止又は排除を含むことができる。「予防的」治療とは、疾患に関連する病理を発症するリスクを低減する目的で、疾患の徴候を呈してはいないか又は疾患の初期徴候のみを呈する被験体に施される治療である。「治療する (t r e a t i n g) 」は、本明細書では「治療 (t r e a t m e n t) 」と互換的に使用される。例えば、癌を治療することは、癌細胞の増殖及び / 又は分裂を防止又は緩慢化すること並びに癌細胞を致死させること及び / 又は腫瘍のサイズを低減させることを含む。癌の成功した治療の追加的徴候は、白血球細胞計数、赤血球細胞計数、血小板計数、赤血球沈降速度、及びトランスアミナーゼ及びヒドロゲナーゼ等の種々の酵素レベルなどの試験の正常化を含む。加えて、臨床医が、前立腺特異的抗原 (P S A) 等の検出可能な腫瘍マーカにおける減少を観察してもよい。

20

30

【 0 0 7 1 】

「治療的」処置とは、病理の徴候を呈する被験体に投与される処置で、これら徴候の減少又は排除を目的とするものである。

化合物の「治療的有効量」とは、この化合物が投与される被験体に有益な効果をもたらすのに十分である化合物の量である。

【 0 0 7 2 】

本発明の方法の様々な実施形態では、免疫抱合体は、上記で説明された免疫抱合体のいずれかであり得る。T - D M 1 の構造は、上記に提供されている。

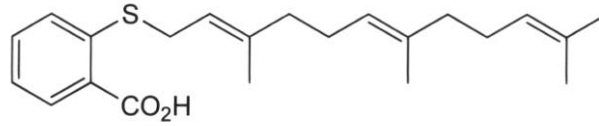
本明細書に記載される前アポトーシス薬は

【 0 0 7 3 】

40

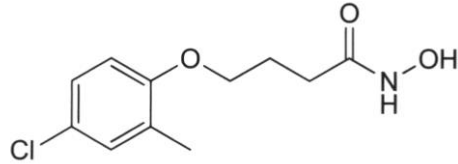
【化2】

FTS (サリラシブ®)



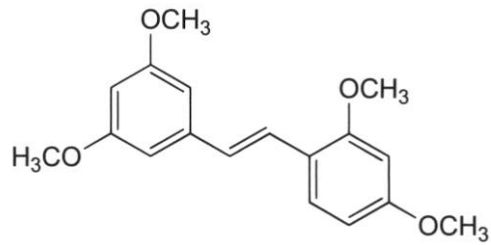
CMH (ドロキシノスタット)

10



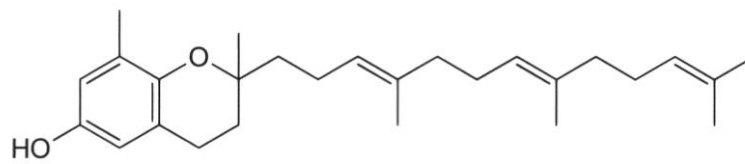
TMS (2',3,4',5-テトラメトキシスチルベン)

20



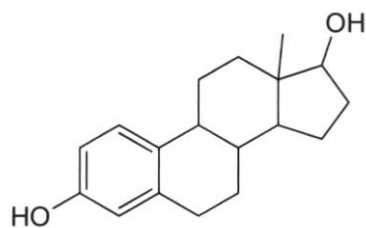
δ-トコトリエノール

30

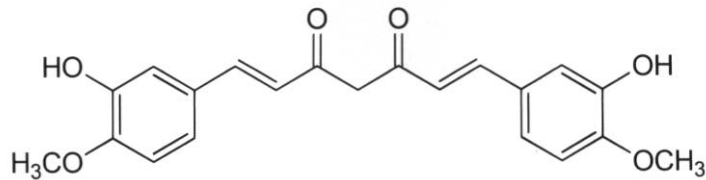


エストラジオール (E2)

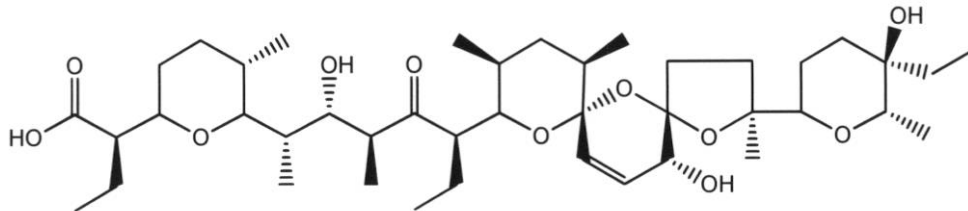
40



クルクミン



サリノマイシン



10

を含む。

【0074】

20

実施形態

本発明は、様々な実施形態では、本明細書に開示され主張されるような、細胞死（アポトーシス）を誘導する薬剤の相加的又は相乗的併用を使用する、癌細胞の耐性の発現が発生したか又は発生の可能性が高い場合の疾患状態に好適な抗癌療法の開発を目的とする。これら方法の使用によって、癌細胞による薬剤への耐性の発現は、単一の抗癌剤を使用する耐性発現の頻度に比べて減少され得、又は療法に対して適応性変異を既に起こした癌細胞において、耐性が克服され得る。様々な実施形態では、本発明の方法は、アナストラゾール等などのアロマターゼ阻害剤の使用、若しくはタモキシフェン等などのエストロゲン受容体調節剤又は拮抗剤の使用などの第一選択療法に癌がもはや応答しない場合のホルモン耐性乳癌の処置に有効であり得る。

30

【0075】

例えば、療法耐性癌は、アロマターゼ耐性乳癌、タモキシフェン耐性乳癌、ER+ホルモン不応性乳癌、又はその中でHER2発現がアップレギュレートされる癌細胞を含む乳癌（HER2-陽性乳癌）、若しくはこれらの組み合わせなどの乳癌であり得る。

【0076】

上記で説明の通りに、アロマターゼ阻害剤又はエストロゲン拮抗薬療法を受けた患者におけるエストロゲン応答性乳癌細胞などの長期無エストロゲン下の細胞は、乳房組織で通常見出されるものよりも十分に低いエストロゲンレベルへの応答性の増加した度合いを発現することができる。この作用は、HER2をコード化する遺伝子などのHER受容体をコード化する遺伝子のアップレギュレーション及び過発現の結果として起こり得る。アロマターゼ阻害剤又はエストロゲン拮抗薬などの第一選択療法剤で治療された乳癌患者においては、かかる細胞は、正常なエストロゲンレベルの非存在下で増殖することが可能であり、これら第一選択療法に対する耐性を発現した乳癌をもたらし、即ち、ホルモン耐性、又はホルモン不応性乳癌となる。かかる疾患状態では、第二選択療法の使用が、患者の生存に重要となる。様々な実施形態では、本発明は、かかる機構によって耐性を発現したこれら癌などのホルモン耐性乳癌の処置のための第二選択療法を提供する。

40

【0077】

前アポトーシス戦略が、単に耐性癌細胞の増殖を阻害するよりはむしろ、耐性癌細胞の排除によって標的細胞中の適応的変異の頻度を低減するための増殖阻害戦略に好ましいものとして、本明細書の本発明者によって選択された。本発明者はまた、水平的に作用する

50

、即ち、2つの異なる経路に作用する（「水平性調節」）（このそれぞれがアポトーシス及び細胞死をもたらし得る）少なくとも2つの前アポトーシス薬の使用が、アポトーシスの誘導における相加的又は相乗的効果をもたらし、この中で、耐性を発現する頻度が減少されることが見出されたことを本明細書で開示する。ホルモン耐性乳癌細胞の処置を必要とする第二選択療法では、この前アポトーシス戦略が、細胞死を誘導することによって、更なる適応性変異の可能性を低減することができる。水平性調節の更なる使用は、適応性変異によってアポトーシスを回避する細胞の可能性を更に低減するよう働くことができ、これは、複数のアポトーシス誘導機構が起動され得、単一の細胞中で、その細胞死の前に耐性を発現する2つの機構の可能性は、耐性を発現する単一の機構の可能性よりも低いためである。

10

【0078】

アポトーシスは、細胞死受容体経路（外因性経路）を通してか又はミトコンドリア仲介経路（内因性経路）によってのいずれかで発生することができる。本発明者は、本明細書で、別個の分子機構を介してアポトーシスを誘導するよう作用する、一組の前アポトーシス薬などの前アポトーシス抗癌剤の相加的及び相乗的併用を予期せず発見し、これは、ホルモン不応性乳癌のモデルのためのタモキシフェン耐性（TamR）及び長期無エストロゲン（LTED）細胞系、及び比較のための野生型MCF-7及びT47D細胞系などの十分に特性評価された細胞系においてホルモン適応性癌細胞を致死させることで有効である。相乗効果は、2つの前アポトーシス抗癌剤が異なる機構によってアポトーシスを誘導する場合、最も発生しやすいと考えられている。

20

【0079】

様々な実施形態では、本発明の処置の方法は、癌治療、特に乳癌の治療において相乗的な治療効果をもたらす。本出願は、乳癌細胞を治療する場合、薬剤の特定の併用が相乗的効果をもたらすという驚くべき結果を開示する。一実施形態では、FTS及びCMHを使用する併用治療が、相乗効果をもたらすことが見出された。一実施形態では、TMS及びCMHを使用する併用治療が、相乗効果をもたらす。従って、本発明は、FTS、TMS、及びCMHのみならず、同様の活性を有する薬剤もまた使用する併用療法を更に包含し、2つ又はそれ以上のかかる薬剤を併用しての投与が、乳癌、例えばホルモン不応性及びホルモン耐性乳癌の処置においてなどで、相乗的治療効果をもたらすことができる。例えば、FTS及びESを使用する併用は、驚くべき高い相乗効果をもたらす。

30

【0080】

いくつかの実施形態では、E2、FTS及びCMHのいずれかとのT-DM1の併用は、FTS又はCMHのいずれかとのT-DM1の併用が最強の相乗性を伴い、相乗効果をもたらす。以下の表1を参照されたい。

【0081】

本発明者は、本明細書で、治療の方法を開示し、この方法は、水平性調節を通して細胞に影響を及ぼす2つ又はそれ以上の前アポトーシス抗癌剤の乳癌などの癌に悩む患者への投与を含み、ここで2つの薬剤は、単一のアポトーシス経路における連続的ステップに作用する（垂直性調節）よりはむしろ、別個のアポトーシス経路に作用する。外因性経路は細胞死受容体に関与し、この経路が、細胞死受容体に結合するリガンドによって活性化される。内因性経路は、アポトーシスを開始させるミトコンドリア経路に関与する。水平性とは、2つ以上の特定の経路に影響を及ぼす刺激を指し、一方垂直性とは、同一の経路内にいくつかのステップが伴うことを意味する。様々な実施形態では、少なくとも2つの薬剤が水平性調節を達成する。様々な実施形態では、水平性調節は少なくとも2つの薬剤の相乗効果をもたらす。様々な実施形態では、少なくとも2つの薬剤を使用する本発明の併用療法は、非適応性乳癌細胞に及ぼす相乗効果を生じる。

40

【0082】

本発明の方法は、様々な実施形態では、癌を治療する方法を提供し、この方法は、癌に悩む患者に、モノクローナル抗体部分と、リンカー部分を介してこれに結合した第1の前アポトーシス薬部分とを含む免疫複合体の有効量を投与することと、この患者に、第2の

50

前アポトーシス薬の有効量を投与することを含む。例えば、以下に非常に詳細に説明するように、免疫抱合体は、これに共有結合した第1の前アポトーシス薬部部分を含むことができる。

【0083】

例えば、処置される癌は乳癌であり得る。より具体的には、この乳癌は、適応性変異を起こした長期無エストロゲン下細胞の増殖からの結果などの、ホルモン耐性（ホルモン不応性）乳癌であり得る。ホルモン耐性を生じさせる一部の適応性変異においては、乳癌はHER2耐性乳癌と呼ばれる。HER2耐性乳癌とは、その中で細胞が、分子実体及びHER2受容体とのそれらの相互作用を標的とする第一選択療法に耐性をもたらす適応性変異を起こした乳癌を意味する。ホルモン耐性を生じさせる一部の適応性変異においては、この乳癌は、アロマターゼ耐性乳癌と呼ばれる。アロマターゼ耐性乳癌とは、アロマターゼ療法に耐性を示すようになった乳癌を意味する。上述のように、アロマターゼは、エストロゲン生合成の重要なステップに關与する酵素である。

10

【0084】

様々な実施形態では、免疫抱合体の標的化部位は、HER2受容体に結合する。アロマターゼ又はエストロゲン拮抗薬療法に耐性となった癌細胞では、HER2受容体の過発現が原因であり得る。過発現が起こった場合、耐性細胞中では、受容体が選択的に細胞毎により大量になり、HER2に特異的なモノクローナル抗体標的化部位の存在下では、抗体-薬剤抱合体のより多くの分子が細胞毎に結合することができる。腫瘍細胞上に局在化した免疫抱合体によって、第1の前アポトーシス抗癌剤部分のより高い局所濃度が達成され得る。リユー（Liu）C及びチャリ（Chari）R著、「非常に強力なマイタンシノイドを有する癌を標的とするための抗体送達システムの開発（The development of antibody delivery system to target cancer with highly potent maytansinoids）」、エキスパート・オピニオン・オン・インベスティゲーショナル・ドラッグス、1997年、第6巻（2）、p.169~172を参照されたい。

20

【0085】

従って、様々な実施形態では、本発明の方法は、癌の処置で使用され得、この癌は乳癌である。より具体的には、この乳癌はアロマターゼ耐性乳癌であり得、又はこの乳癌はER+ホルモン不応性乳癌であり得、又はこの乳癌はHER2陽性乳癌であり得、若しくはこの乳癌は、その中でHER2発現がアップレギュレートされている癌細胞を含む。様々な実施形態では、上述のような免疫抱合体は、ホルモン耐性乳癌細胞などの乳癌細胞中で発現されるような受容体HER2に結合する。例えば、免疫抱合体のモノクローナル抗体は、HER2受容体に特異的であるとして既知のトラスツズマブであり得る。

30

【0086】

様々な実施形態では、第1の前アポトーシス抗癌剤部分は、マイタンシノイド又はオーリスタチンなどの微小管脱重合化剤であり得る。例えば、共有結合抱合体は、リンカーを介してマイタンシノイド前アポトーシス抗癌剤部分に共有結合したトラスツズマブから本質的になり得る。

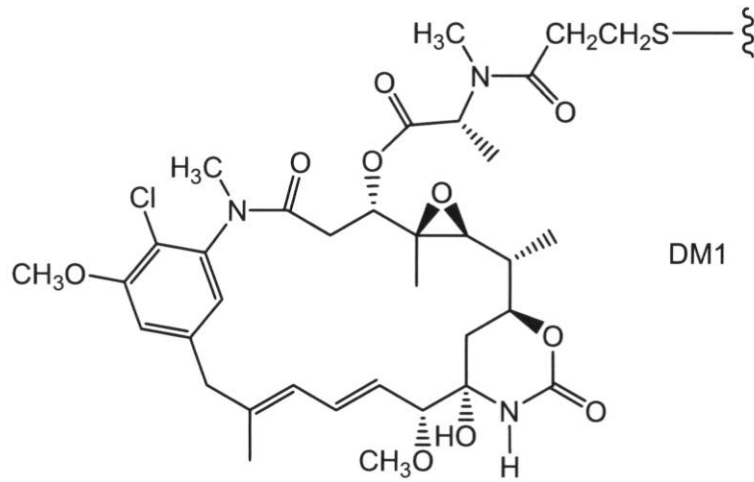
【0087】

モノクローナル抗体標的化部位と抱合され得るマイタンシノイド薬部分の例示的实施形態は、DM1、DM3、及びDM4を含み、これらは以下の構造を有する。

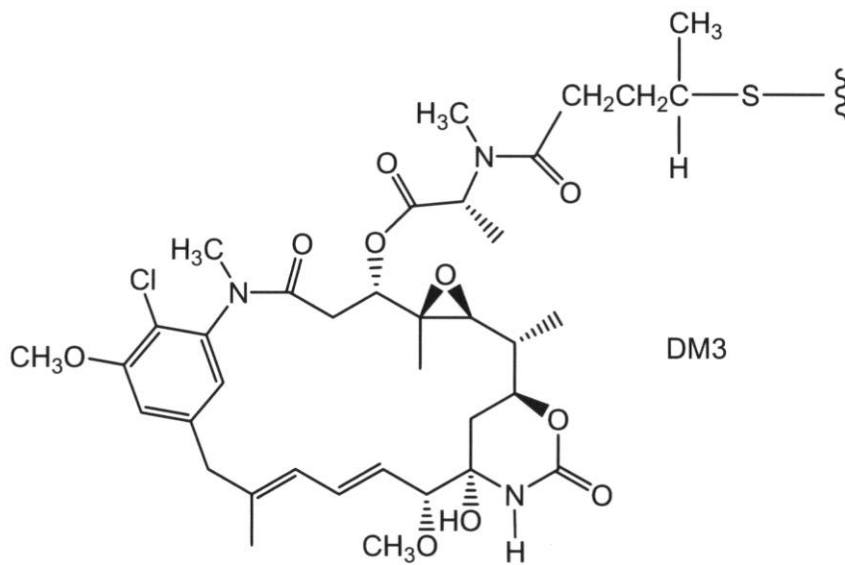
40

【0088】

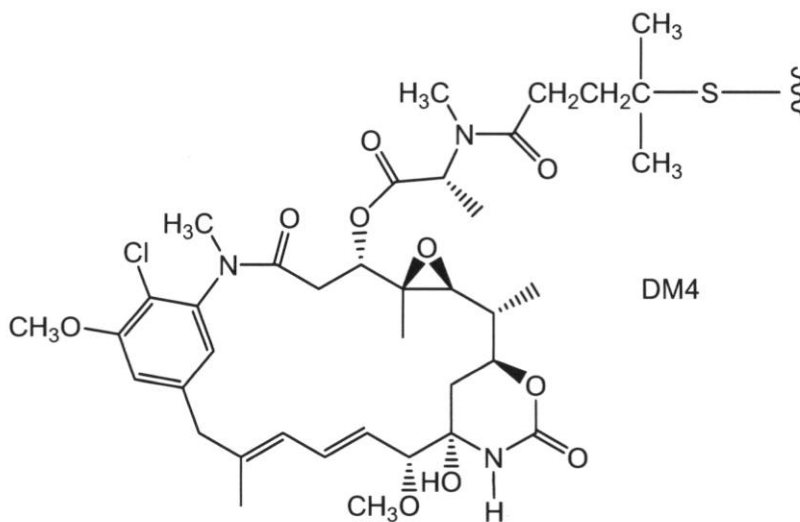
【化 3】



10



20



30

40

式中、波線は、抗体 - 薬剤抱合体のリンカー（L）への薬剤のイオウ原子の共有結合的結合を示す。SMCCによってDM1に結合するハーセプチン（HERCEPTIN）（登録商標）（トラスツズマブ）が報告されている（国際公開第2005/037992号パンフレット、米国特許出願公開第2005/0276812 A1号明細書）。

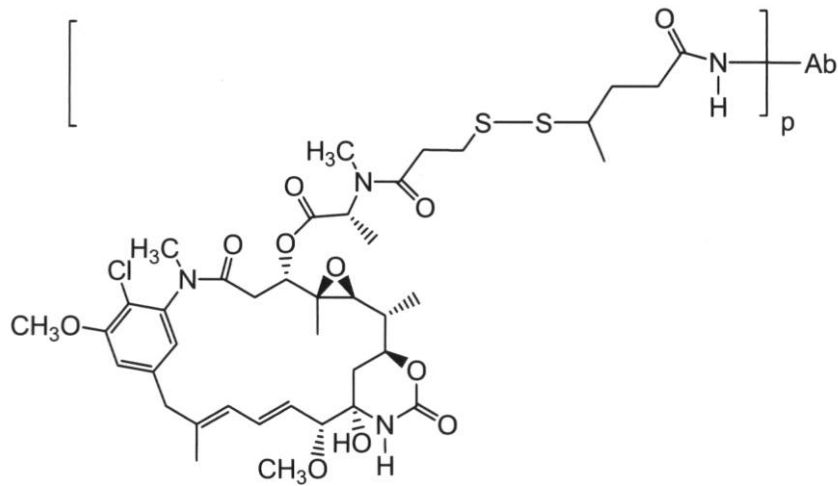
50

【 0 0 8 9 】

様々な実施形態では、共有結合免疫抱合体は、T - D M 1（上記に示した構造）であり、即ち、上記に示すような D M 1 は、トラスツズマブに共有結合する。他の実施形態では、共有結合免疫抱合体は、トラスツズマブに結合する D M 3 又は D M 4 などの別のマイタンシノイドであり得る。例えば、本発明の方法の実行で使用されるマイタンシノイド抗体 - 薬剤抱合体は、以下の構造及び略号を有することができる（式中 A b は抗体であり、p は 1 ~ 約 8 である）。

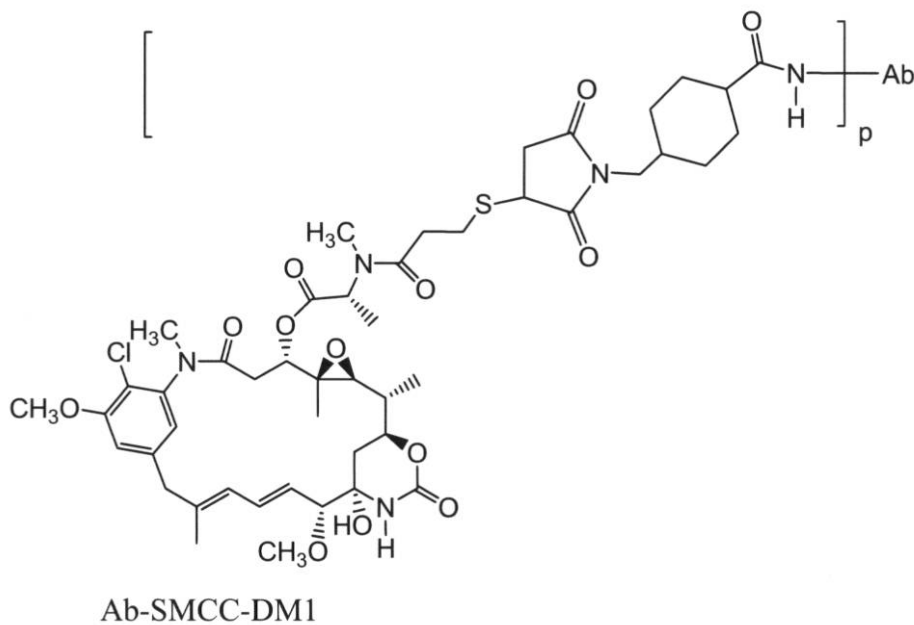
【 0 0 9 0 】

【 化 4 】



10

20



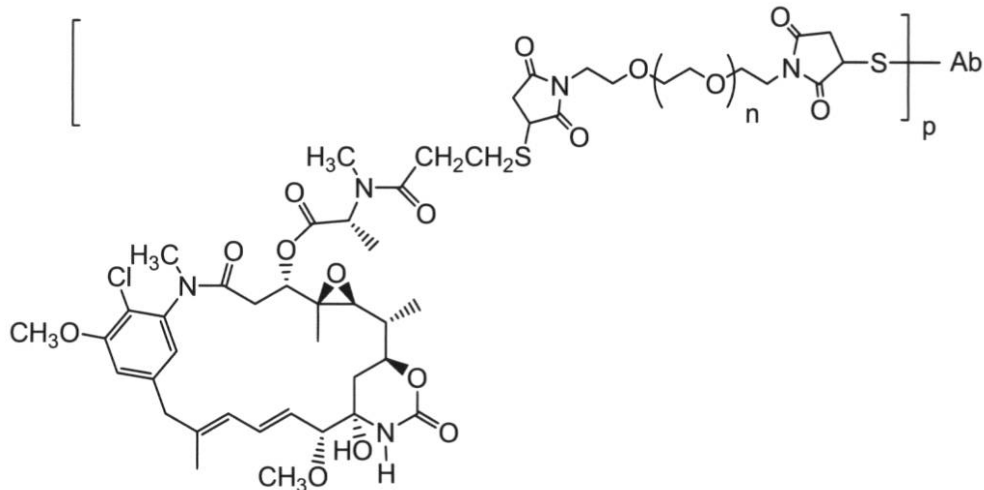
30

40

B M P E O リンカーを介して、D M 1 が抗体のチオール基に結合する例示的抗体 - 薬剤抱合体は、以下の構造及び略号を有し

【 0 0 9 1 】

【化5】



10

式中、Abは抗体であり、nは0、1、又は2であり、pは1、2、3、又は4である。

【0092】

マイタンシノイドを含有する免疫抱合体、この製造法、並びにこれらの治療的用途が、例えば、これらの開示が参照により明白に本明細書に組み込まれる、米国特許第5,208,020号明細書、同第5,416,064号明細書、米国特許出願公開第2005/0276812 A1号明細書、及び欧州特許第0425235 B1号明細書に開示されている。リュウ(Liu)ら著、「プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ 米国(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」、第93巻、p.8618~8623、1996年、は、DM1と名づけられたマイタンシノイドを含有する免疫抱合体が、ヒト結腸直腸癌に対して向けられるモノクローナル抗体C242に結合したことを記載している。この抱合体は、培養された結腸癌細胞に対して高い細胞毒性であることが認められ、インビボ腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。チャリ(Chari)ら著、「キャンサー・リサーチ(Cancer Research)」、第52巻、p.127~131、1992年、は、その中でマイタンシノイドが、ジスルフィドリンカーを介して、ヒト結腸癌細胞系上の抗原に結合するネズミ抗体A7に抱合され、又はHER2/neuオンコジンに結合する別のネズミモノクローナル抗体TA.1に抱合されたことを記載している。TA.1-マイタンシノイド抱合体の細胞毒性は、細胞当たり 3×10^5 個のHER2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞系SK-BR-3でインビトロにおいて試験された。この薬剤抱合体は、遊離マイタンシノイド薬と同様な細胞毒性の程度を達成し、これは、抗体分子当たりのマイタンシノイド分子の数の増加に伴って増大されることができた。A7-マイタンシノイド抱合体は、マウスにおいては低い全身的細胞毒性を示した。

20

30

【0093】

抗体-マイタンシノイド抱合体は、抗体又はマイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性も著しく減少させることなく、抗体をマイタンシノイド分子に化学的に結合することによって調製される。例えば、米国特許第5,208,020号明細書(この開示は参照により本明細書に明白に組み込まれる)を参照されたい。トキシノ/抗体の1つの分子であっても、裸抗体の使用にわたって細胞毒性を強化することが予想されるが、抗体当たり平均で3~4個のマイタンシノイド分子が抱合されたものは、抗体の機能又は溶解度に悪影響を及ぼすことなく、標的細胞の細胞毒性を増強することでの有効性を示した。マイタンシノイドは当該技術分野で周知であり、既知の技術によって合成され得るか、又は天然供給源から単離され得る。好適なマイタンシノイドは、例えば、米国特許第5,208,020号明細書及び他の特許文献並びに上記で参照された非特許文献刊行物で開示されている。好ましいマイタンシノイドは、マイタンシノール並びに様々なマイタンシノールエ

40

50

ステルなどのマイタンシノール分子の芳香族環又は他の位置で修飾されたマイタンシノール類似体である。

【0094】

抗体-マイタンシノイド抱合体を生成するための当該技術分野で既知の多くの結合基があり、これらは、例えば、これらの開示が、参照により明白に本明細書に組み込まれる、米国特許第5,208,020号明細書又は欧州特許第0425235 B1号明細書；チャリ(Charli)ら著、「キャンサー・リサーチ(Cancer Research)」、第52巻、p.127~131、1992年；及び米国特許出願公開第2005/016993 A1号明細書に開示されたものが挙げられる。リンカー成分SMCCを含む抗体-マイタンシノイド抱合体は、米国特許出願公開第2005/0276812 A1号明細書、「抗体-薬剤抱合体及び方法(Antibody-drug conjugates and Methods)」で開示されたように調製され得る。上記で特定された特許文献で開示されたように、このリンカーは、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチド不安定性基、又はエステル-ゼ不安定性基を含む。追加的リンカーは、本明細書に記載され例示される。

10

【0095】

様々な実施形態では、共有結合抱合体は、体内に侵入後に、酵素作用、酸加水分解、塩基加水分解等で結合が破壊され、次いで2つの別個の化合物が形成されるように選択されるリンカー部分を含む。他の実施形態では、リンカー部分は、トラスツズマブ等のモノクローナル抗体などの標的化部分になお係留すると同時に前アポトーシス抗癌剤部分が細胞毒性効果を及ぼすことができる、生物学的条件下での安定性に関して選択される。

20

【0096】

当該技術分野内の以前の構造-活性相関(SAR)研究からのデータが、どの化合物を使用するか、並びに化合物の有効性及び選択性を高く維持するように、テザーに結合するための分子上の最適な位置又は位置(複数)を決定するための指針として使用され得る。このテザー又はリンカー部分は、生活性分子と一緒に結合するための有用性が立証されたものの中から選択される。本明細書に開示されるものは、異なる組み合わせで一緒に結合されて、ヘテロ二価性治療用分子を形成することができる代表的化合物である。

【0097】

抗体及びマイタンシノイドの抱合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHClなど)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベラートなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス-(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トルエン2,6-ジイソシアネートなど)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)などの多様な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して生成され得る。特定の実施形態では、ジスルフィド結合をもたらすための、カップリング剤は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)(カールソン(Carlsson)ら著、「バイオケミカル・ジャーナル(Biochem.J.)」、第173巻、p.723~737、1978年)、又はN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)である。

30

40

【0098】

リンカーは、結合のタイプに応じて、様々な位置でマイタンシノイド分子に結合されてもよい。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技術を使用するヒドロキシル基との反応によって形成され得る。この反応は、ヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で起こる可能性がある。一実施形態では、この結合は、マイ

50

タンシノール又はマイタンシノール類似体の C - 3 位で形成される。

【0099】

本発明の治療の方法及び用途の様々な実施形態において使用され得るような免疫抱合体は、上述のようなマイタンシノイドなどの微小管脱重合化剤に抱合された標的化モノクローナル抗体を含むことができ、又は第1の前アポトーシス抗癌剤部分として、ドラスタチン又はドラスタチンペプチド性類似体若しくは誘導体（例えばオーリスタチン（米国特許第5,635,483号明細書、同第5,780,588号明細書を参照））を含み得る。ドラスタチン及びオーリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解、並びに核及び細胞分裂を妨害することが示され（ウォイケ（Woyke）ら著、「アンティマイクロビアル・エージェント・アンド・ケモセラピー（Antimicrob. Agents and Chemother.）」、第45巻（12）、p.3580~3584）、並びに抗癌活性（米国特許第5,663,149号明細書）及び抗真菌活性（ペティット（Pettit）ら著、「アンティマイクロビアル・エージェント・ケモセラピー（Antimicrob. Agents Chemother.）」、第42巻、p.2961~2965）を有することが示された。ドラスタチン又はオーリスタチン薬剤部分は、ペプチド性薬剤部分N（アミノ）末端又はC（カルボキシル）末端を通して抗体に結合されてもよい（国際公開第02/088173号パンフレット）。

10

【0100】

例示的オーリスタチン実施形態は、N末端結合モノメチルオーリスタチン薬部分D_E及びD_Fを含み、これは、その開示が、その全体で参照により本明細書に明白に組み込まれる、センター（Senter）ら著、「プロシーディングス・オブ・ザ・アメリカン・アソシエーション・フォア・キャンサー・リサーチ（Proceedings of the American Association for Cancer Research）」、第45巻、アブストラクト番号623、2004年3月28日提出に開示されている。例は以下に示す。

20

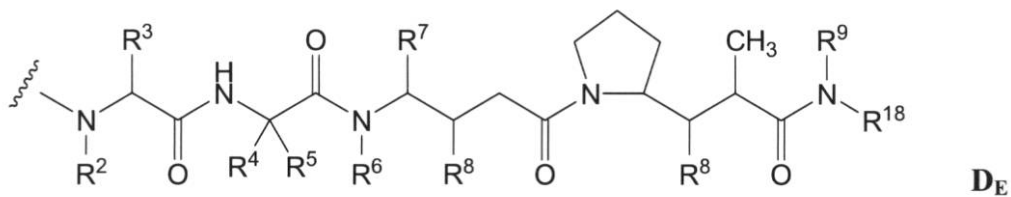
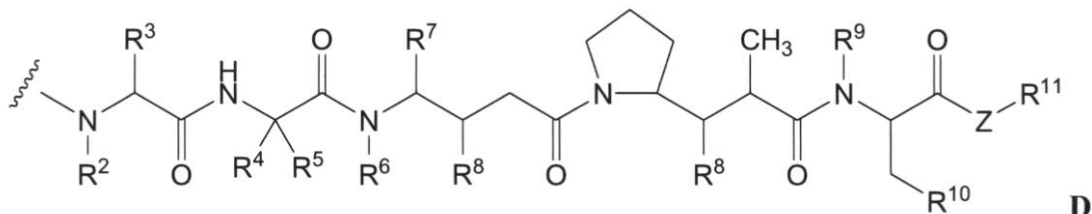
【0101】

オーリスタチン - 類似性前アポトーシス抗癌剤部分は、以下の式D_E及びD_Fから選択され得る。

【0102】

【化6】

30

D_E

D

F

40

式中、D_E及びD_Fの波線は、抗体又は抗体 - リンカー成分への共有結合的結合部位を示し：

R²は、H及びC₁ - C₈アルキルから選択され；

R³は、H、C₁ - C₈アルキル、C₃ - C₈炭素環、アリール、C₁ - C₈アルキル - アリール、C₁ - C₈アルキル - (C₃ - C₈炭素環)、C₃ - C₈ヘテロ環及びC₁

50

- C₈ アルキル - (C₃ - C₈ ヘテロ環) から選択され;
 R⁴ は、H、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、アリール、C₁ - C₈ アルキル
 - アリール、C₁ - C₈ アルキル - (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ ヘテロ環及び C₁
 - C₈ アルキル - (C₃ - C₈ ヘテロ環) から選択され;
 R⁵ は、H 及びメチルから選択され;
 又は、R⁴ 及び R⁵ は、共同で炭素環式環を形成し、式 - (C R^a R^b)_n - を有し (式中、R^a 及び R^b は独立して、H、C₁ - C₈ アルキル及び C₃ - C₈ 炭素環から選択され、n は 2、3、4、5 及び 6 から選択される);
 R⁶ は、H 及び C₁ - C₈ アルキルから選択され;
 R⁷ は、H、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環、アリール、C₁ - C₈ アルキル
 - アリール、C₁ - C₈ アルキル - (C₃ - C₈ 炭素環)、C₃ - C₈ ヘテロ環及び C₁
 - C₈ アルキル - (C₃ - C₈ ヘテロ環) から選択され;
 各 R⁸ は、独立して、H、OH、C₁ - C₈ アルキル、C₃ - C₈ 炭素環及び O - (C
 1 - C₈ アルキル) から選択され;
 R⁹ は、H 及び C₁ - C₈ アルキルから選択され;
 R¹⁰ は、アリール又は C₃ - C₈ ヘテロ環から選択され;
 Z は、O、S、NH、又は NR¹² であり、式中 R¹² は C₁ - C₈ アルキルであり;
 R¹¹ は、H、C₁ - C₂₀ アルキル、アリール、C₃ - C₈ ヘテロ環、- (R¹³ O
)_m - R¹⁴、又は - (R¹³ O)_m - CH (R¹⁵)₂ から選択され;
 m は 1 ~ 1000 の範囲の整数であり;
 R¹³ は、C₂ - C₈ アルキルであり;
 R¹⁴ は、H 又は C₁ - C₈ アルキルであり;
 R¹⁵ の各存在は、独立して H、COOH、- (CH₂)_n - N (R¹⁶)₂、- (C
 H₂)_n - SO₃H、又は - (CH₂)_n - SO₃ - C₁ - C₈ アルキルであり;
 R¹⁶ の各存在は、独立して H、C₁ - C₈ アルキル、又は - (CH₂)_n - COOH
 であり;
 R¹⁸ は、- C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂ - アリール、- C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂
 - (C₃ - C₈ ヘテロ環)、及び - C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂ - (C₃ - C₈ 炭素環)
 から選択され、並びに
 n は、0 ~ 6 の範囲の整数である。
- 【0103】
 一実施形態では、R³、R⁴ 及び R⁷ は、独立してイソプロピル又は sec - ブチルで
 あり、R⁵ は、- H 又はメチルである。例示的实施形態では、R³ 及び R⁴ は、それぞれ
 イソプロピルであり、R⁵ は - H であり、並びに R⁷ は sec - ブチルである。
- 【0104】
 更に別の実施形態では、R² 及び R⁶ は、それぞれメチルであり、R⁹ は - H である。
 なお別の実施形態では、R⁸ の各存在は - OCH₃ である。
 例示的实施形態では、R³ 及び R⁴ は、それぞれイソプロピルであり、R² 及び R⁶ は
 、それぞれメチルであり、R⁵ は - H であり、R⁷ は sec - ブチルであり、R⁸ のそれ
 ぞれの存在は - OCH₃ であり、並びに R⁹ は - H である。
- 【0105】
 一実施形態では、Z は - O - 又は - NH - である。
 一実施形態では、R¹⁰ はアリールである。
 例示的实施形態では、R¹⁰ は - フェニルである。
- 【0106】
 例示的实施形態では、Z が - O - である場合、R¹¹ は - H、メチル又は t - ブチルで
 ある。
 一実施形態では、Z が - NH である場合、R¹¹ は - CH (R¹⁵)₂ であり、式中 R¹⁵
 は、- (CH₂)_n - N (R¹⁶)₂ であり、R¹⁶ は、- C₁ - C₈ アルキル又は
 - (CH₂)_n - COOH である。

10

20

30

40

50

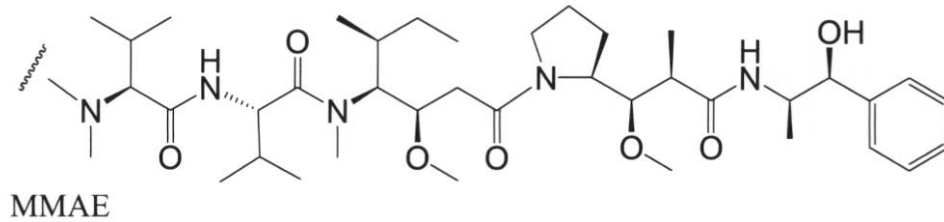
【0107】

別の実施形態では、Zが-NHである場合、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、式中 R^{15} は、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ である。

式D_Eの例示的オーリスタチン実施形態はMMAEであり、式中、波線は、抗体-薬剤抱合体のリンカー(L)への共有結合的結合を示す。

【0108】

【化7】

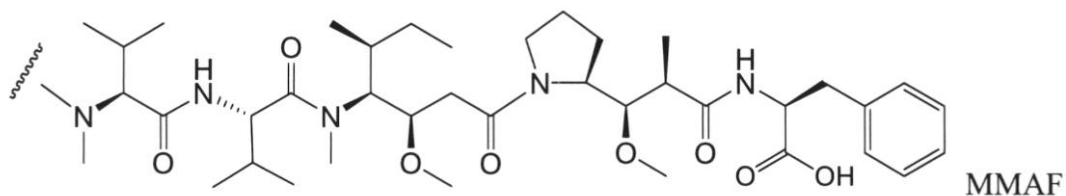


10

式D_Fの例示的オーリスタチン実施形態はMMAFであり、式中、波線は、抗体-薬剤抱合体のリンカー(L)への共有結合的結合を示す(米国特許出願公開第2005/0238649号明細書及びドロニナ(Doronina)ら著、2006年、「バイオコンジュゲート・ケミストリー(Bioconjugate Chem.)」、第17巻、p.114~124を参照されたい)。

【0109】

【化8】



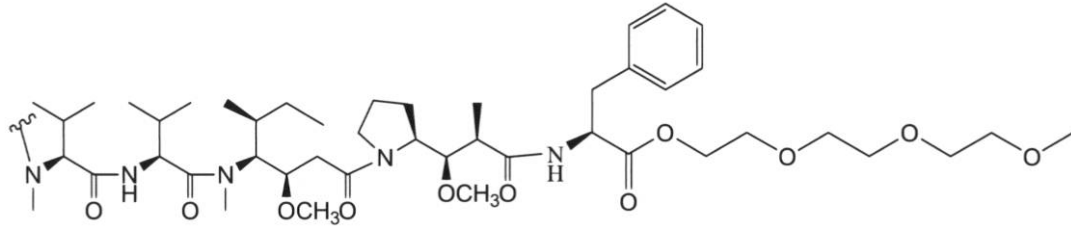
20

他の薬剤部分としては、以下のMMAF誘導体が挙げられ、式中、波線は、抗体-薬剤抱合体のリンカー(L)への共有結合的結合を示す。

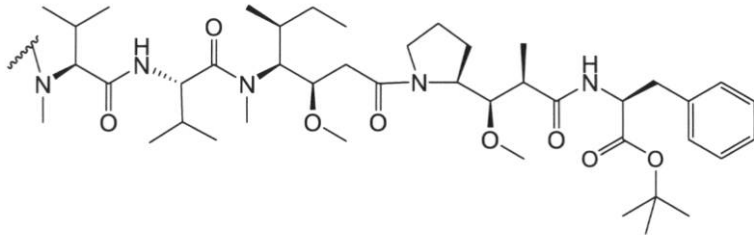
【0110】

30

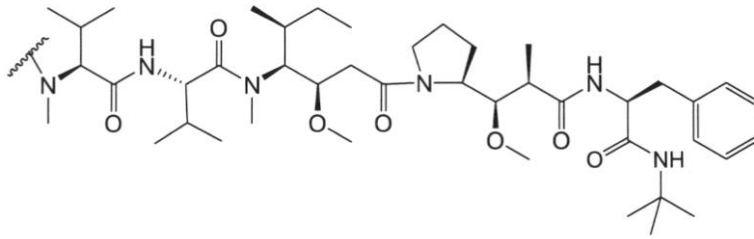
【化 9】



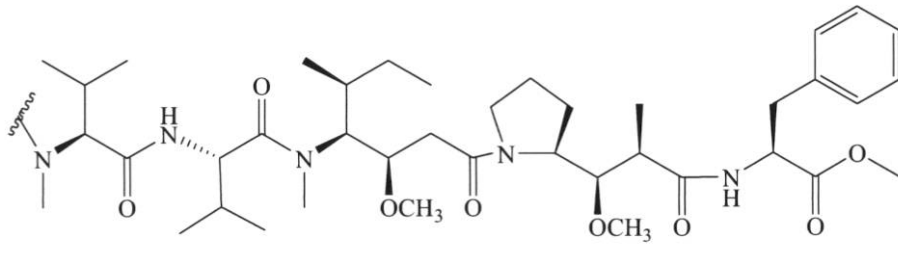
10



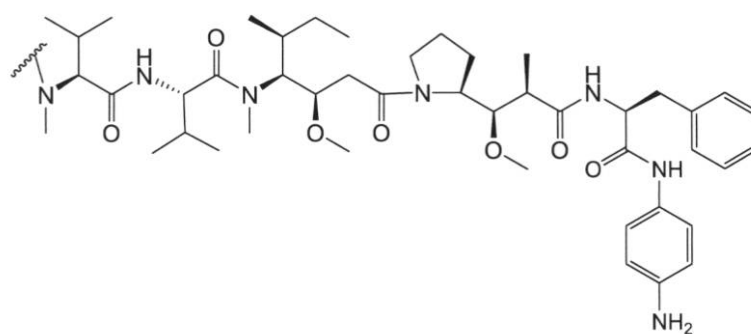
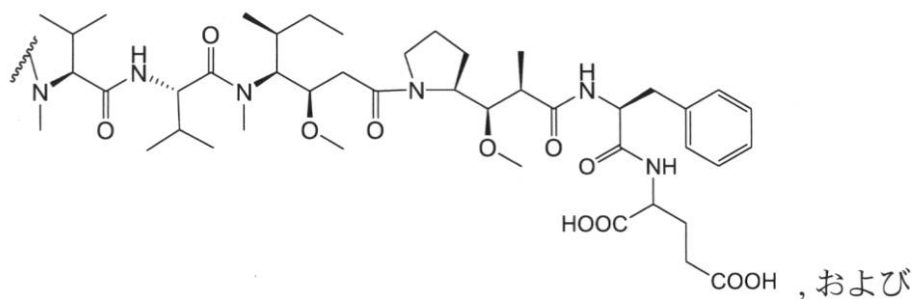
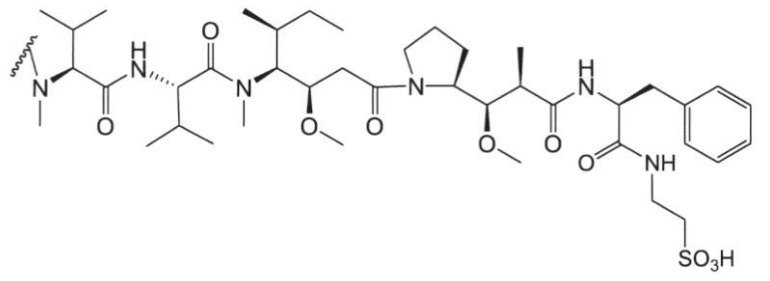
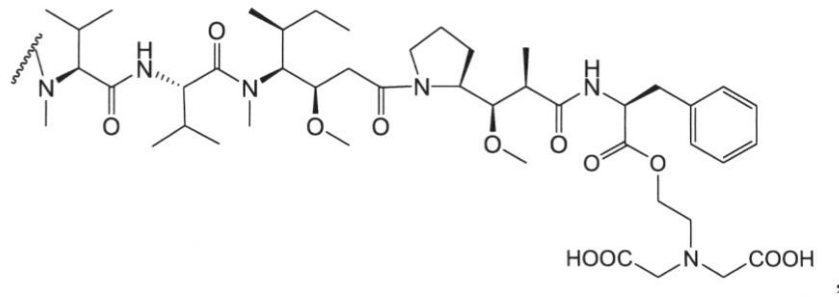
20



30



40



一態様では、親水性基としては、限定されるものではないが、上記に示されたようなトリエチレングリコールエステル (TEG) が挙げられ、これは R^{11} で薬剤部分に結合され得る。いずれかの特定の理論によって束縛されるものではないが、親水性基は、薬剤部分の内在化及び非塊状化において補助する。

【0111】

オーリスタチン/ドラスタチン又はこれらの誘導体を含む式 I の ADCs の例示的实施形態は、参照により本明細書に明白に組み込まれる、米国特許出願公開第 2005-0238649 A1 号明細書及びドロニナ (Doronina) ら著、2006 年、「バイオコンジュゲート・ケミストリー (Bioconjugate Chem.)」、第 17 巻、p. 114 ~ 124 で記載されている。MMAE 又は MMAF 及び様々なリンカー成分を含む式 I の ADCs の例示的实施形態は、以下の構造及び略号を有する (式中、「Ab」は抗体、例えばトラスツズマブであり、p は 1 ~ 約 8 であり、「Val-Cit」は

10

20

30

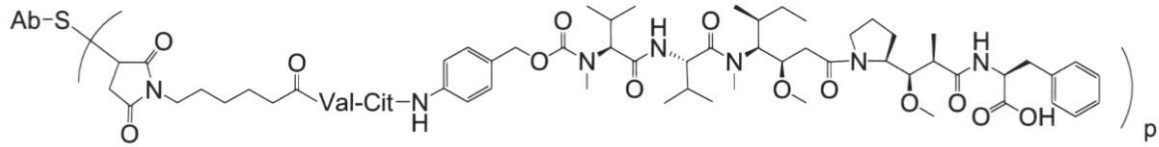
40

50

バリリン - シトルリンジペプチドであり、「S」はイオウ原子である)。

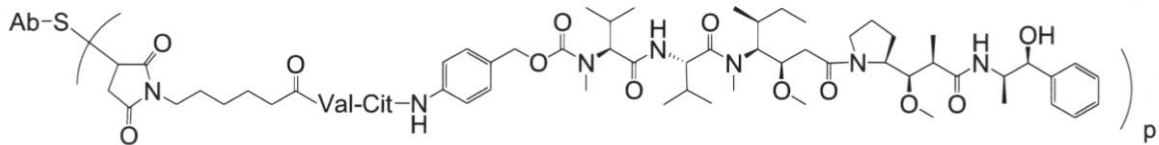
【0112】

【化10】



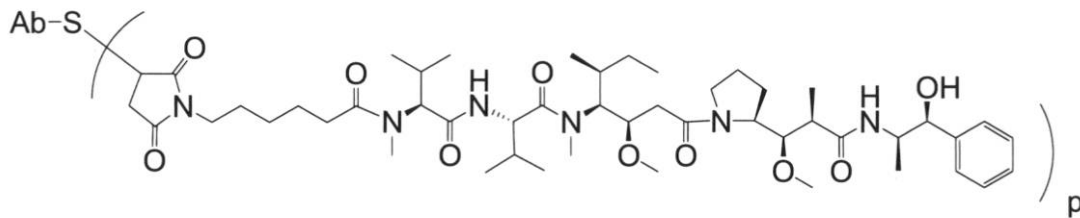
Ab-MC-vc-PAB-MMAF

10



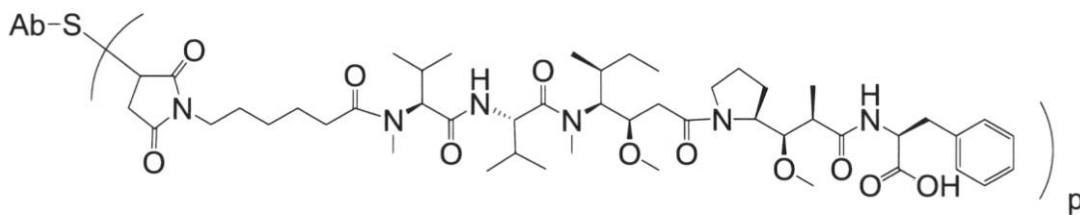
Ab-MC-vc-PAB-MMAE

20



Ab-MC-MMAE

30



Ab-MC-MMAF

MMAF及び様々なリンカー成分を含む式IのADCsの例示的实施形態は、Ab-MC-PAB-MMAF及びAb-PAB-MMAFを更に含む。興味深いことに、タンパク質分解的に切断可能ではないリンカーによって抗体上に結合されたMMAFを含む免疫複合体は、タンパク質分解的に切断可能なリンカーによって抗体に結合されたMMAFを含む免疫複合体に匹敵する活性を有することが示された。ドロニナ(Doronina)ら著、2006年、「バイオコンジュゲート・ケミストリー(Bioconjugate Chem.)」、第17巻、p.114~124を参照されたい。かかる場合には、薬剤放出は、細胞中の抗体分解(Id(イディオタイプ))によって影響を受けると考えられる。

40

【0113】

典型的には、ペプチド系薬剤は、2つ又はそれ以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片の間のペプチド結合を形成することによって調製され得る。かかるペプチド結合は、例えば、液相合成法(ペプチド化学分野で周知である、E.シュローダー(Schroeder

50

r) 及び K. リュブケ (Luebke) 著、「ザ・ペプチズ (The peptides)」、第 1 巻、p. 76 ~ 136、1965 年、アカデミック・プレス (Academic Press を参照) に従って調製され得る。オーリスタチン/ドラスタチン薬剤部分は、米国特許出願公開第 2005-0238649 A1 号明細書；米国特許第 5,635,483 号明細書；同第 5,780,588 号明細書、ペティット (Pettit) ら著、1989 年、「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (J. Am. Chem. Soc.)」、第 111 巻、p. 5463 ~ 5465；ペティット (Pettit) ら著、1998 年、「アンティ・キャンサー・ドラッグ・デザイン (Anti-Cancer Drug Design)」、第 13 巻、p. 243 ~ 277；ペティット (Pettit)、G. R. ら著、「シンセシス (Synthesis)」、1996 年、p. 719 ~ 725；ペティット (Pettit) ら著、1996 年、「ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティ・パーキン・トランスアクションズ 1 (J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1)」、第 5 巻、p. 859 ~ 863；及びドロニナ (Doronina) 著、2003 年、「ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotechnol.)」、第 21 巻 (7)、p. 778 ~ 784 の方法に従って、調製されてもよい。

10

【0114】

特に、MMAF 及びその誘導体などの式 D_F のオーリスタチン/ドラスタチン薬剤部分は、米国特許出願公開第 2005-0238649 A1 号明細書及びドロニナ (Doronina) ら著、2006 年、「バイオコンジュゲート・ケミストリー (Bioconjugate Chem.)」、第 17 巻、p. 114 ~ 124 で記載される方法を使用して調製され得る。MMAE 及びその誘導体などの式 D_E のオーリスタチン/ドラスタチン薬剤部分は、ドロニナ (Doronina) ら著、2003 年、「ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotechnol.)」、第 21 巻 (7)、p. 778 ~ 784 で記載される方法を使用して調製され得る。薬剤-リンカー部分 MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、及び MC-vc-PAB-MMAE は、例えば、ドロニナ (Doronina) ら著、2003 年、「ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotech.)」、第 21 巻 (7)、p. 778 ~ 784、及び米国特許出願公開第 2005/0238649 A1 号明細書で記載されるような慣用的方法によって都合よく合成され得、次いで関心対象の抗体に抱合される。

20

30

【0115】

科学文献に報告されたリンカーの例としては、メチレン (CH₂)_n リンカー (ハッセー (Hussey) ら著、ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (J. Am. Chem. Soc.)、2003 年、第 125 巻、p. 3692 ~ 3693；タミズ (Tamiz) ら著、「ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.)」、2001 年、第 44 巻、p. 1615 ~ 1622)、ナルトレキサミンを他のオピオイド、式 -NH-(COCH₂NH)_nCOCH₂CH₂CO (NHCH₂CO)_nNH のグリシンオリゴマー (オピオイド拮抗薬及び作動薬と一緒に結合するために使用される) を結合するよう使用されるオリゴエチレンオキシド (-CH₂CH₂O-) _n 単位 ((a) ポルトゲス (Portoghese) ら著、「ライフ・サイエンス (Life. Sci.)」、1982 年、第 31 巻、p. 1283 ~ 1286、(b) ポルトゲス (Portoghese) ら著、「ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.)」、1986 年、第 29 巻、p. 1855 ~ 1861)、オピオイドペプチドと一緒に結合するよう使用される親水性ジアミン (ステピンスキー (Stepinski) ら著、「インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプチド & プロテイン リサーチ (Internat. J. of Peptide & Protein Res.)」、1991 年、第 38 巻、p. 588 ~ 92)、強固な二重鎖 DNA スペーサ (パール (Paar) ら著、「ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.)」、2002 年、第 169 巻、p. 856 ~ 864) 並びに生体分解性リンカーポリ (L-乳酸) (クロック (Klok) ら著、「マクロモリキュールズ

40

50

(Macromolecules)」、2002年、第35巻、p.746~759)が挙げられる。テザーの化合物への結合は、好ましい結合配向を達成する化合物をもたらすことができる。リンカーそれ自体は、生体分解性であってもそうでなくともよい。リンカーはプロドラッグの形態を取ってもよく、結合した薬剤の最適な放出運動学に同調可能であってもよい。リンカーは、その長さ全体を通して立体構造的に柔軟であってもよく、それともテザーのセグメントが立体構造的に制限されるよう設計されてもよいかのいずれかである(ポルトゲス(Portoghese)ら著、「ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(J. Med. Chem.)」、1986年、第29巻、p.1650~1653)。

【0116】

10

例示的リンカー

リンカーは、1つ以上のリンカー成分を含んでもよい。例示的リンカー成分としては、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」又は「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-ヨード-アセチル)アミノベンゾエート(「SIAB」)が挙げられる。様々なリンカー成分は、当該技術分野で既知であり、その一部が以下に記載される。

20

【0117】

リンカーは、細胞中で薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよい。例えば、酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾン)、プロテアーゼ感受性(例えば、ペプチダーゼ感受性)リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(チャリ(Charli)ら著、「キャンサー・リサーチ(Cancer Research)」、第52巻、p.127~131、1992年;米国特許第5,208,020号明細書)が使用されてもよい。

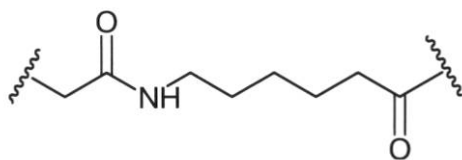
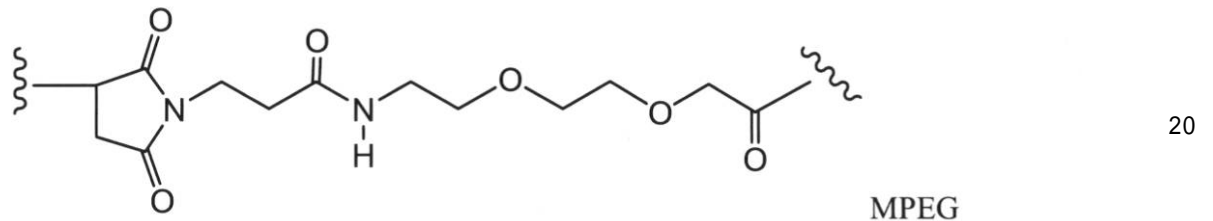
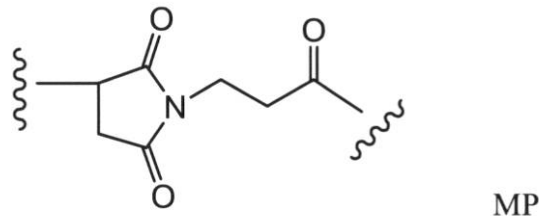
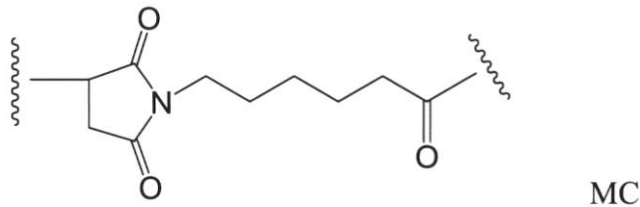
【0118】

いくつかの実施形態では、リンカー成分は、抗体を別のリンカー成分又は薬剤部分に結合させる「ストレッチャ単位」を含んでもよい。例示的ストレッチャ単位が、以下に示される(式中、波線は、抗体への共有結合的結合の部位を示す)。

30

【0119】

【化 1 1】



いくつかの実施形態では、リンカー成分は、アミノ酸単位を含んでもよい。かかる実施形態の1つでは、アミノ酸単位は、プロテアーゼによるリンカーの切断を可能にし、これによって、リソソーム酵素などの細胞内プロテアーゼへの曝露時の免疫抱合体からの薬剤の放出を容易にする。例えば、ドロニナ (Doronina) 著、2003年、「ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotechnol.)」、第21巻、p. 778 ~ 784 を参照されたい。例示的アミノ酸単位としては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、及びペンタペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。例示的ジペプチドとしては、バリン - シトルリン (vc 又は val - cit)、アラニン - フェニルアラニン (af 又は ala - phe)、フェニルアラニン - リジン (fk 又は phe - lys)、又は N - メチル - バリン - シトルリン (Me - val - cit) が挙げられる。例示的トリペプチドとしては、グリシン - バリン - シトルリン (gly - val - cit) 及びグリシン - グリシン - グリシン (gly - gly - gly) が挙げられる。アミノ酸単位は、天然起源であるアミノ酸残基、並びにシトルリンなどのマイナーなアミノ酸で非天然起源のアミノ酸類似体であるアミノ酸残基を含んでもよい。アミノ酸単位は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシン B、C、D、又はプラズミンプロテアーゼによる酵素的切断に関するそれらの選択性において設計かつ最適化され得る。

【0120】

いくつかの実施形態では、リンカー成分は、直接的に又はストレッチャ単位及び/又はアミノ酸単位を経由して抗体を薬剤に結合させる「スペーサ」単位を含んでもよい。スペーサ単位は、「自壊性」又は「非自壊性」であってもよい。「非自壊性」スペーサ単位は、スペーサ単位の一部又は全てが、ADCの酵素的(例えばタンパク質分解的)切断時に

、薬剤部分に結合されたままであるものである。非自壊性スペーサ単位の例としては、グリシンスペーサ単位及びグリシン-グリシンスペーサ単位が挙げられるが、これらに限定されない。配列特異的酵素的切断に感受性が強いペプチドスペーサの他の組み合わせもまた考えられる。例えば、腫瘍細胞関連プロテアーゼによるグリシン-グリシンスペーサ単位を封じ込めるADCの酵素的切断は、ADCの残部からのグリシン-グリシン-薬剤部分の放出をもたらすと考えられる。1つのかかる実施形態では、グリシン-グリシン-薬剤部分は、次いで腫瘍細胞中の別個の加水分解ステップを受け、従ってグリシン-グリシンスペーサ単位を薬剤部分から切断させる。

【0121】

「自壊性」スペーサ単位は、スペーサ加水分解ステップなしに、薬剤部分の放出を可能にする。特定の実施形態では、リンカーのスペーサ単位は、p-アミノベンジル単位を含む。1つのかかる実施形態では、p-アミノベンジルアルコールが、アミド結合を介してアミノ酸単位に結合され、カルバメート、メチルカルバメート、又はカルボネートが、ベンジルアルコールと細胞障害剤との間に生成される。例えば、ハマン(Hamann)ら著、2005年、「エキスパート・オピニオン・オン・セラピューティック・パテント(Expert Opin. Ther. Patents)」、2005年、第15巻、p. 1087~1103を参照されたい。一実施形態では、スペーサ単位は、p-アミノベンジルオキシカルボニル(PAB)である。特定の実施形態では、p-アミノベンジル単位のフェニレン部分は、Q_m(式中、Qは-C₁-C₈-アルキル、-O-(C₁-C₈-アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ又は-シアノであり、mは0~4の範囲の整数である)で置換される。自壊性スペーサ単位の例としては、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(ハイ(Hay)ら著、1999年、「バイオオーガニック&メディシナル・ケミストリー・レターズ(Bioorg. Med. Chem. Lett.)」、第9巻、p. 2237)及びオルト-又はパラ-アミノベンジルアセタールなどの、p-アミノベンジルアルコールと電子的に類似する芳香族化合物(例えば、米国特許出願公開第2005/0256030 A1号明細書を参照)を更に含むが、これらに限定されない。スペーサは、置換及び非置換の4-アミノ酪酸アミド(ロドリゲス(Rodrigues)ら著、「ケミストリー・バイオロジー(Cheistry Biology)」、1995年、第2巻、p. 223)、適当な置換ピシクロ[2.2.1]及びピシクロ[2.2.2]環系(ストーム(Storm)ら著、「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ(J. Amer. Chem. Soc.)」、1972年、第94巻、p. 5815)、及び2-アミノフェニルプロピオン酸アミド(アムスベリー(Amsberry)ら著、「ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(J. Org. Chem.)」、1990年、第55巻、p. 5867)などのアミド結合加水分解時に、環化を実行するよう使用され得る。グリシンのα-位で置換されているアミン含有薬剤の除去(キングズバリ(Kingsbury)ら著、「ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(J. Med. Chem.)」、1984年、第27巻、p. 1447)もまた、ADCsで有用な自壊性スペーサの例である。

【0122】

一実施形態では、スペーサ単位は、以下に示されるような分岐状のビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)単位であり、これは複数の薬剤を組み込みかつ放出するために使用され得る。

【0123】

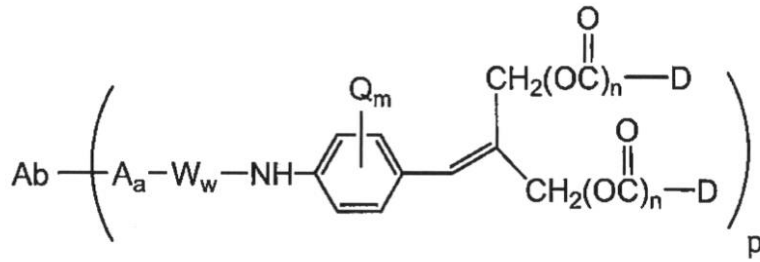
10

20

30

40

【化 1 2】



酵素的切断



2つの薬剤

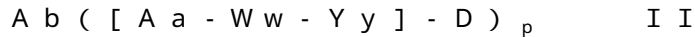
10

式中 Q は、 $-\text{C}_1 - \text{C}_8$ - アルキル、 $-\text{O} - (\text{C}_1 - \text{C}_8 - \text{アルキル})$ 、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ 又は $-\text{シアノ}$ であり、 m は $0 \sim 4$ の範囲の整数であり、 n は 0 又は 1 であり、 p は、 $1 \sim$ 約 20 の範囲にわたる。

【0124】

リンカーは、上記リンカー成分のいずれか1つ以上を含んでもよい。特定の実施形態では、リンカーは、以下のADC式II中のカッコ内で示されるものである。

20



式中、 A はストレッチャ単位であり、 a は $0 \sim 1$ の整数であり、 W は、アミノ酸単位であり、 w は $1 \sim 12$ の整数であり、 Y はスペーサ単位であり、 y は $0, 1$ または 2 であり、かつ Ab 、 D および p は上記式Iについて定義された通りである。かかるリンカーの例示的实施形態は、参照により本明細書に明白に組み込まれる、米国特許出願公開第 $2005 - 0238649$ A1号明細書に記載されている。

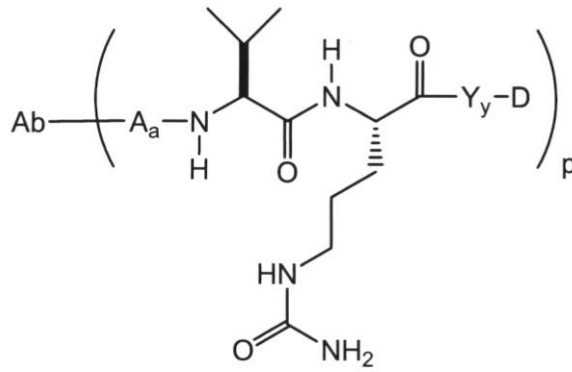
【0125】

例示的リンカー成分及びこれらの組み合わせは、式IIのADCsとともに以下に示される。

30

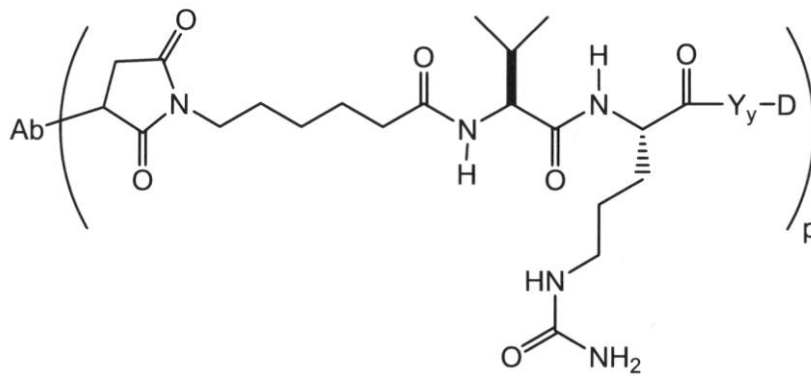
【0126】

【化 1 3】



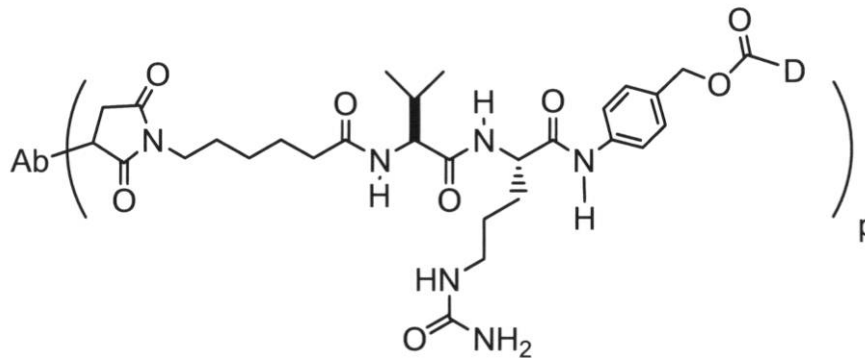
Val-Cit または VC

10



MC-val-cit

20



MC-val-

30

cit-PAB

ストレッチャ、スペーサ、及びアミノ酸単位を含有するリンカー成分は、米国特許出願公開第 2005-0238649 A 1 号明細書に記載されるものなど、当該技術分野で既知の方法によって合成され得る。

40

【0127】

本発明の治療の方法は、様々な実施形態において、上述のような水平性調節をもたらす治療的方法を提供し、ここでは、第 2 の前アポトーシス薬が、第 1 のアポトーシス抗癌剤部分によって及ぼされた細胞障害性の分子機構とは異なる分子機構によって、アポトーシスを含める細胞障害性を及ぼす。水平性調節は、第 1 の前アポトーシス抗癌剤部分と第 2 の前アポトーシス抗癌剤が、それぞれが別個にアポトーシスに導く異なる生化学的カスケード又はプロセスに作用する場合に達成される。例えば、以下の表 2 に示すように、マイタンシノイド又はオーリスタチンなどの第 1 の前アポトーシス抗癌剤部分は、微小管脱重

50

合化などの内因性アポトーシス機構を介して動作することができ、第2の前アポトーシス抗癌剤は、当該技術分野で周知のように、Fas経路又はc-FLIP経路などの外因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤であり得る。或いは、第1の前アポトーシス抗癌剤部分が、外因性経路を介してその効果を及ぼす場合、第2の前アポトーシス抗癌剤は、カスパーゼ非依存的経路などの内因性経路を介して、又はカスパーゼ依存的経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤であり得る。

【0128】

結果的に、様々な実施形態では、第2の前アポトーシス薬は、外因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤であり；例えば、第2の前アポトーシス薬は、Fas経路を介してアポトーシスを誘導するか、又は第2の前アポトーシス薬は、c-FLIP経路を介してアポトーシスを誘導する。より具体的には、第2の前アポトーシス薬は、CMH、E2、又は-トコトリエノールであり得る。

10

【0129】

他の実施形態では、第2の前アポトーシス薬は、内因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤であり；例えば、第2の前アポトーシス薬は、カスパーゼ非依存的経路を介してアポトーシスを誘導し得るか、或いは、第2の前アポトーシス薬は、カスパーゼ依存的経路を介してアポトーシスを誘導し得る。より具体的には、第2の前アポトーシス薬は、E2、FTS、-トコトリエノール、サリノマイシン、又はクルクミンであり得る。

【0130】

従って、様々な実施形態では、第2の前アポトーシス抗癌剤は、FTS、CMH、E2、TMS、-トコトリエノール、サリノマイシン、又はクルクミンである。様々な実施形態では、免疫抱合体はT-DM1であり、第2の前アポトーシス薬はFTS、CMH、E2、TMS、-トコトリエノール、又はクルクミンである。免疫抱合体がT-DM1である場合、第2の前アポトーシス薬は、E2、FTS、-トコトリエノール、又はTMSであり得、若しくは、より具体的には、免疫抱合体がT-DM1であり、第2の前アポトーシス薬はFTSである。

20

【0131】

本発明は、免疫抱合体及び第2のアポトーシス薬を投与することが、相乗的效果を有する方法を提供する。いくつかの実施形態では、この相乗性は、水平性調節の使用によって達成される。

30

【0132】

しかしながら、2つの前アポトーシス抗癌剤が垂直性調節で作用する場合でも、相乗的又は相加的效果は達成され得る。更には、水平性調節が達成されるために、2つの抗癌剤が経路内の同一のプロセスで両者共に動作しない限り、2つの抗癌剤が外因性又は内因性経路を介して両者共に動作することがなお可能であり得、ここでは薬剤耐性をもたらすための適応性変異は、耐性をもたらすための2つの同時変異を介してなお発生する必要があると考えられる。

【0133】

様々な実施形態では、本発明は、癌の治療の方法を提供し、この方法は、トラスツズマブ-DM1(T-DM1)の癌患者への投与を含み、このT-DM1は、リンカー部分を介して第1の前アポトーシス抗癌剤部分であるマイタンシノイドansamクロライドに結合された標的化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))の上述の共有結合抱合体の実施形態である。この抱合体T-DM1は、本明細書で本発明者によって、併用療法レジメンにおいて、第2の前アポトーシス抗癌剤としてファルネシル-チオサリシレート(FTS)を使用することが、驚くべきことに高い相乗効果をもたらすことが見出されることが開示されている。更に別の態様では、E2及びT-DM1の併用療法も、驚くべきことに、高い相乗効果をもたらす。更に別の態様では、CMH及びT-DM1の併用療法も、驚くべきことに、高い相乗効果をもたらす。

40

【0134】

T-DM1の上記例では、マイタンシンの類似体に近いものである第1の前アポトーシ

50

ス抗癌剤部分は、リンカー部分を介して、トラスツズマブ (t r a s t u m u z a b) (ハーセプシン) に結合する。このリンカーは、ジスルフィド結合を組み込まず、従って、本明細書の用語の意味に従って、非還元性リンカー部分であると考えられ、即ち、容易に還元可能なジスルフィド結合は存在しない。結果的に、様々な実施形態では、本発明は、非還元性リンカーを介して第 1 の前アポトーシス抗癌剤部分と共有結合されたモノクローナル抗体部分から本質的になる共有結合抱合体を提供し、ここで非還元性とは、ジスルフィド結合又はその中で生物学的条件下での還元が発生する可能性が高いと考えられる他の基が存在しないことを指す。

【 0 1 3 5 】

以下の表 1 では、相加的及び相乗的効果を示す様々な併用の結果を示す。

【 0 1 3 6 】

【表 1】

表 1

細胞系	アポトーシス薬	比	用量効果パラメータ				併用係数値				相互作用
			Dm	m	r	ED50	ED75	ED90	ED95		
MCF-7	TMS + FTS	TMS:FTS (1µM:1µM)	4.806	1.74598 ± 0.07883	0.9939	0.988	0.939	0.898	0.865	0.865	相乗性
	TMS + CMH	TMS:CMH (1µM:10µM)	5.839	1.17019 ± 0.07844	0.9933	0.321	0.343	0.368	0.386	相乗性	
	FTS + CMH	FTS:CMH (1µM:1µM)	17.402	1.39405 ± 0.10368	0.9891	0.351	0.399	0.454	0.495	相乗性	
T47D	TMS + FTS	TMS:FTS (1µM:1µM)	16.046	1.552969 ± 0.13846	0.9888	2.408	1.839	1.443	1.246	拮抗性	
	TMS + CMH	TMS:CMH (1µM:10µM)	4.885	1.02624 ± 0.15858	0.9769	0.242	0.328	0.452	0.568	相乗性	
	FTS + CMH	FTS:CMH (1µM:1µM)	16.447	1.3291 ± 0.11190	0.9895	0.730	0.658	0.602	0.571	穏やかな相乗性	
L1210	TMS+FTS	TMS:FTS (1µM:1µM)	5.891	0.76939 ± 0.01125	0.9995	0.911	0.889	0.869	0.858	穏やかな相乗性	
	TMS+CMH	TMS:CMH (1µM:10µM)	0.088	0.55289 ± 0.04221	0.9942	0.391	0.223	0.177	0.206	相乗性	
	TMS+E2	TMS:E2 (1µM:10µM)	1.025	.74308 ± 0.0681	0.9836	0.322	0.566	1.009	1.498	相乗性	
	TMS+T-DM1	TMS: T-DM1 (1µM:1ng)	7.337	0.134089 ± 0.16995	0.9843	1.034	1.024	1.015	1.010	相乗性	
	FTS+CMH	FTS:CMH (1µM:1µM)	20.964	1.20938 ± 0.10418	0.9855	0.811	0.763	0.719	0.682	穏やかな相乗性	
	FTS+E2	FTS:E2 (10µM:1µM)	14.082	0.78722 ± 0.12684	0.9408	0.784	0.609	0.491	0.429	相乗性	
	FTS+T-DM1	FTS:T-DM1 (1µM: 10 ng)	63.540	1.01308 ± 0.05397	0.9944	0.400	0.266	0.178	0.135	強い相乗性	
	E2+CMH	E2:CMH (1µM:10µM)	21.759	1.27183 ± 0.05093	0.9976	1.002	0.753	0.684	0.663	相乗性	
E2+T-DM1	E2:T-DM1 (1µM:10 ng)	1.349	0.64658 ± 0.00913	0.9996	0.421	0.329	0.299	0.295	相乗性		
CMH+T-DM1	CMH:T-DM1 (1µM: 10 ng)	33.937	1.22358 ± 0.02137	0.9995	0.144	0.123	0.115	0.113	強い相乗性		

F T S 及び C M H との T - D M 1 の併用において、強い相乗性が観察される。相乗性の程度を決定するよう使用された方法、及び様々な試験の結果が以下に記載され、図のグラ

10

20

30

40

50

フ形式で表示される。

【0137】

他の実施形態では、第1の前アポトーシス薬部分は、還元性リンカーを介して第1の前アポトーシス薬部分に共有結合され得る。「還元性」結合とは、かかるリンカーが、生物学的条件下で発生することが可能な還元性プロセス、即ち、ジスルフィド結合の還元によって切断される可能性が高いことが考えられ又は予想されることを意味する。かかる抱合体では、ホルモン耐性乳癌の場合、標的化部位、例えば、モノクローナル抗体は、第1の前アポトーシス薬部分を、所望の標的、例えば、HER2又は関連する受容体に搬送し、これによって、標的化部分からの薬剤の切断が起こり、薬剤がより容易に組織を通して拡散でき、細胞膜等を通過することができるように、薬剤を遊離する。

10

【0138】

様々な実施形態では、本発明の癌の治療の方法は、この癌が乳癌である場合、使用され得る。乳癌とは、乳房組織を冒し得る多数のタイプの癌のいずれかを意味する。他の実施形態では、他のタイプの癌も同時に処置され、即ち、このことは過発現受容体などのそのタイプの癌のエピトープ特性に特異的な標的化部位の使用によってなされ、ここでは、選択されるモノクローナル抗体又は他の標的化部分は、第1の前アポトーシス薬に共有結合され、生じた抱合体が第2の前アポトーシス薬と併せて投与される。これら実施形態ではなお、水平性調節アプローチが、標的化癌細胞による耐性の発現の低い可能性をもたらすと考えられる。

20

【0139】

癌細胞における前アポトーシス機構

本発明の治療的方法で使用され得る特異的前アポトーシス薬が、以下に非常に詳細に記載される。

【0140】

F T S

本発明者は、本明細書において、アポトーシスの内因性経路の重要な成分であるMOMP(ミトコンドリア外膜孔)形成に影響を及ぼすタンパク質の部類をまず初めに検討した。Bax、Bim、及びBakなどの前アポトーシス膜は、ミトコンドリアからのシトクロームcの放出を促進するが、一方、Bcl-2及びMcl-1などの抗アポトーシス膜は、放出を抑制する。従って、前アポトーシス及び抗アポトーシスBcl-2タンパク質のバランスが、細胞の運命に影響を及ぼす。LTED細胞を、サイトゾル分画の試験を使用して、75 μMのF T Sで、0、4、8、16、24及び48時間処置した(図1A)。アポトーシスシグナル伝達が、24時間までにMcl-1での減少及びBimでの増加をもたらしたが、Bcl-2は変化しなかった。ホスホJNKは48時間にわたって増加し、p21は、4時間から始まり48時間の時点まで続く安定した減少を示した(図4A)。サバイピンは、8時間から始まり16時間まで減少し、24時間及び48時間では検出不能なレベルに到達したが、XIAPは、変化しなかった(図1A)。

30

【0141】

BaxがF T S処置LTED細胞において活性化されたかどうかを確認するために、Bcl-2を免疫沈降させて、次いでBim及びBaxについて探査した(図1Bを参照)。探査された細胞抽出物を、立体構造的な変化を受けたBaxタンパク質のみを認識する抗体の使用で探査した。図1Bに示すように、BaxはF T S処置細胞中で立体構造的変化を実行し、これがMOMPを促進すると考えられる。Bimの前アポトーシス効果は、主としてBcl-2の生存促進性機能を除去するBcl-2へのその結合を通してのものである[16、17]。図1Bに示すように、BimとBcl-2との間の相互作用は増加するが、一方BaxとBcl-2との間の相互作用は減少することを我々は見出した。ミトコンドリア膜孔を経てのタンパク質の脱出の証拠として、サイトゾル中のシトクロームc及びSmacレベルは、24時間と48時間で増加し、その時点でMcl-1は減少し、Bimは増加した(図1A)。別の重要な細胞死成分であるアポトーシス誘導因子(AIF)は、サイトゾル中で48時間のみに出現した。MOMPに及ぼすこれらの効果を

40

50

示した後に、アポトーシスに關与する他の重要な因子を検討した。

【0142】

F T S は、非乳房組織においてカスパーゼ活性を通して細胞死を実行することが報告されている [1 8 - 2 0]。F T S が、カスパーゼの活性化によって乳癌細胞の死を促進しているかどうかを解決するために、L T E D 細胞をビヒクル、F T S、又は増大する濃度のパン - カスパーゼ阻害剤 *v - V A D - f m k* の存在下の F T S のいずれかで処置した (図 1 C の上部パネルを参照)。 *z - V A D - f m k* が F T S - 誘導アポトーシスをブロックすることが認められた。以前の報告は、他の癌において、カスパーゼ - 8 における増加によって証明されたように、F T S は細胞死受容体を通してアポトーシスを誘導することを示唆した [1 8 - 2 0]。乳癌細胞では、この細胞死受容体経路は、関連して出現せず、これは実質的なカスパーゼ - 8 の変化が起こらなかったためである (図 1 C の下部パネルを参照)。カスパーゼ - 8 活性は、増加するようには見えないが、しかしながら、これは *Z - I E T D - F M K* によっては阻害されない。(図 2 A) 経時変化棒グラフ (2 A) 及び野生型 M C F - 7 細胞に及ぼす組み合わせられた F T S 及びクルクミンの効果を表す濃度曲線に対する細胞生存率 (2 B)、並びに (図 2 B) M C F - 7 細胞生存率に及ぼす F T S 単独又はクルクミンとの併用の効果を示す図 2 を参照されたい。

10

【0143】

エストラジオール

如何なる前アポトーシス因子が、L T E D 細胞中のエストラジオール誘導アポトーシスに重要であるかを検討した。細胞を、エストラジオールで、0、2、4、8、24 及び 48 時間処置し、サイトゾル分画を調製した。 *B i m_EL* 及び *B i m_L* は、初期の時点で増加した (図 1 D、4、8 時間を対照と比較されたい) が、 *B a x* は増加しなかった。ミトコンドリア分画 (図 1 D、右側パネル) は、 *B i m* イソ型における増加を確認した。48 時間の時点までに、シトクローム *c* 及び *S m a c / D i a b l o* がサイトゾルに放出され、このことは、エストラジオールアポトーシスの成分が、ミトコンドリア経路を介して仲介されることを裏付けている。 *B i m* がエストラジオール仲介アポトーシスに重要なものとして出現したために、我々は、 *E 2* の滴定を行い、 *B i m* について探査し、これが経時的に増加することを見出した (図 1 E を参照)。 *B i m* ノックダウンもまた、アポトーシスをブロックした (図 1 F)。アポトーシスの上流調節物質を検討し、 *J N K* のリン酸化型が増加することを見出した (図 1 E を参照)。前アポトーシスタンパク質である *B o k* もまた、濃度依存的様式で増加した (図 1 E を参照)。抗アポトーシス因子 *M c 1 - 1* は、エストロゲンの添加によって減少するが、 *X I A P* 又は *サバイピン* は減少しないことが認められた。

20

30

【0144】

以前に公開されたデータは、エストラジオール誘導アポトーシスにおける外因性細胞死受容体経路を間接的に示唆している。これら先行データは、エストラジオールが L T E D 細胞において *F A S* - リガンドのレベルを増加させること、 *F A S* が存在すること、及びこの経路がアポトーシスを刺激する *F A S* に対するモノクローナル抗体によって活性化されることを立証した。ここで、 *F a s* - リガンドに対する *s i R N A* がエストラジオール誘導アポトーシスを部分的に無効にすることを立証することによって、 *F A S / F A S* - リガンド関与の直接証拠が提供される (図 1 F)。結果的に、エストラジオールは、外因性及び内因性経路活性化の双方によって、アポトーシスを開始する。

40

【0145】

過去及び現在の結果並びに文献の再検討に基づいて、ミトコンドリア仲介アポトーシスに及ぼす薬剤のそれぞれの作用及び外因性細胞死受容体仲介アポトーシスの作用が、以下の表 2 に概説されている。

【0146】

サリノマイシン

サリノマイシンは、アルカリイオンに対する厳密な選択性及びカリウムに対する強い嗜好性を有するイオノフォアとして、細胞質及びミトコンドリア膜を含む異なる生物学的膜

50

で作用するために、ミトコンドリア及び細胞のカリウム排出を促進し、並びにミトコンドリアの酸化的リン酸化を阻害する。最近の研究は、サリノマイシンが、異なる起源のヒト癌細胞において、アポトーシスを誘導し、アポトーシス耐性を克服することが示された。まず初めに、グプタ (Gupta) らによって使用されたものよりも低い用量でのサリノマイシンが、急性 T - 細胞白血病を有する患者から単離された CD 4 + T - 細胞白血病細胞において大規模なアポトーシスを誘導することが立証された。 http://www.scitopics.com/New_mission_for_salinomycin_in_cancer.html を参照されたい。サリノマイシンは、内因性のカスパーゼ依存的経路によって作用し、アポトーシスを誘導すると考えられる。サリノマイシンは、癌細胞において、細胞周期阻止によっては達成されない、並びに腫瘍抑制タンパク質 p 5 3、カスパーゼ活性化、CD 9 5 / D C 9 5 リガンド系及び 2 6 S プロテアーゼに依存的である、アポトーシスの別個の特殊な経路を活性化する。このことは、サリノマイシンがヒト癌細胞における薬剤及びアポトーシス耐性の複数の機構を克服することができる 1 つの理由であり得る。多くの癌細胞は、p 5 3 の損失並びに増強したタンパク質分解活性を有する B c l - 2、P - 糖タンパク質又は 2 6 S プロテアソームの過発現によって仲介されるアポトーシス耐性の複数の機構を宿し又は獲得する。しかしながら、サリノマイシンは、薬剤及びアポトーシス耐性のこれらの機構を克服できるように思われる。経時変化棒グラフ (3 A) 及び M C F - 7 細胞に及ぼすサリノマイシンの効果を表す濃度曲線に対する生存率 (3 B) を示す図 3 を参照されたい。

【 0 1 4 7 】

【 表 2 】

表 2 : 選択された前アポトーシス薬の作用の分子機構

アポトーシス薬	内因性死経路	外因性死経路
CMH/ドロキシノスタット	無	有 c-FLIP を遮断
E ₂	有 カスパーゼ依存的	有 Fas 経路
FTS (サリラシブ)	有 カスパーゼ依存的	無
T-DM1	有 カスパーゼ依存的	無
δ-トコトリエノール	有 カスパーゼ依存的 カスパーゼ非依存的	有 Fas 経路
TMS	有 カスパーゼ非依存的	無

様々な実施形態では、本発明は上述のような治療の方法を提供し、ここでは第 2 の前アポトーシス抗癌剤は、FTS、CMH、E₂、TMS、δ-トコトリエノール、クルクミン、又はサリノマイシンである。これら化合物の構造、上記に記載されるものの選択の理論的根拠が以下に提供される。サリノマイシン及びクルクミンなどのこれら薬剤のいくつかは、幹細胞に作用することができる。

【 0 1 4 8 】

クルクミン

香辛料ウコン (クルクマ・ロンガ・リン (Curcuma longa Linn)) からの活性成分であるクルクミンは、強力な抗酸化剤及び抗炎症剤である。これは、別個の

化学的予防活性を有することが最近立証された。しかしながら、癌細胞におけるアポトーシスの誘導が十分に可能な解釈であり得るとみなされたが、クルクミンのかかる抗癌特性の基礎をなす分子機構は未だ理解されないままである。最近の研究では、核DNAの細胞周期相の分布のフローサイトメトリー分析及びオリゴヌクレオゾーム分画化からの証拠として、クルクミンは、腫瘍細胞中のアポトーシスの誘導によってエールリッヒ腹水癌（EAC）の細胞数を減少させることが見出された。EAC細胞のアポトーシスへと導く分子シグナルへの更なる探索によって、我々は、クルクミンがプロト腫瘍性タンパク質Baxのアップレギュレーション、ミトコンドリアからのサイトクロームcの放出、及びカスパーゼ-3の活性化によって、腫瘍細胞死を起こしていることを観察した。Bcl-2の状態は、EAC中では変化しないままであり、このことは、クルクミンが、Bcl-2のチェックポイントを迂回しアポトーシスに及ぼすその保護的効果を無効にしていることを意味する。従って、クルクミンは、内因性のカスパーゼ依存的経路を介してアポトーシスを誘導することができると考えられる。<http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/11676493>を参照されたい。

10

【0149】

併用パートナーの選択に関する理論的解釈

細胞死の複数の形態を実行する薬剤が選択されたことで、水平性調節が本発明の併用療法的方法で達成され得た。FTS（サリラシブ）は、ミトコンドリア細胞死経路を通して、癌細胞においてカスパーゼ依存的細胞死を実行する[11、12]。FTSは、MCF-7細胞及び腫瘍異種移植片においてアポトーシスを促進する[13]。CMHは、細胞性FLICE（FADD様IL-1変換酵素）-阻害タンパク質（c-FLIP）の小分子阻害剤であり、CMHは、c-FLIPを阻害することによって、カスパーゼ-8及びカスパーゼ-10を活性化する[14、15]。CMHの細胞を細胞死リガンドに感作する能力の機構の一部は、HDAC3、HDAC6、及びHDAC8を阻害するその能力を経るものである[15]。TMSは、微小管阻害を介してのミトコンドリア細胞死経路を通して、カスパーゼ依存性細胞死を主として実行する薬剤である[16、17]。TMSは、TamR耐性乳癌腫瘍異種移植片の増殖を低減することに有効である[17]。エストラジオールは、ミトコンドリア細胞死経路を通して[18、19]、更にFas細胞死受容体経路を通しても[19]、長期エストロゲン下細胞のアポトーシスを誘導することが示された。先行研究は、エストラジオールが、インビトロで[18-22]、異種移植片モデルにおいて[23、24]並びに患者において[25]、長期エストロゲン下細胞のアポトーシスを誘導することを立証した。マイタンシノイド-抗体抱合体が、微小管脱重合化を通して有糸分裂前中期/中期において乳癌細胞を停止させることによって、細胞増殖を阻害することが示されている[26]。

20

30

【0150】

細胞が細胞周期中に長期にわたって停止される場合、このことがアポトーシスを誘導することができる[27、28]。トラスツズマブ-DM1（マイタンシン誘導体）の薬剤抗体抱合体であるT-DM1は、HER2発現異種移植片に有効であり[29]、並びにHER2進行乳癌を有する患者で有効であること[30]が示された。アロマターゼ阻害剤レトロゾールの投与によって、異種移植片モデルにおいてインビボでエストロゲンを奪取された乳癌細胞系は、HER2シグナル伝達のアップレギュレーションへと至った[31、32]。更に、HER2は、乳がん患者において、アロマターゼ阻害剤での処置中にアップレギュレートされることを示した[33]。従って、長期のエストロゲン奪取を受けた乳癌細胞は、HER2のレベルを増加し、このことがこれら細胞をT-DM1に感受性にした。

40

【0151】

相乗性分析

併用療法における相乗効果の分析は、3つの細胞系、MCF-7、T47D、及びLTEDに焦点を合わせた。MCF-7及びT47D細胞系は、非適応性乳癌のモデルを表現する。LTED（長期エストロゲン下）細胞系は、長期エストロゲン下後の内分泌耐性を

50

表現する。以下の薬剤を、非適応性細胞系で使用した：ファルネシルチオサリチル酸（FTS、サリラシブ）、4-（4-クロロ-2-メチルフェノキシ）-N-ヒドロキシブタンアミド（CMH）、及び2,4,3',5'-テトラメトキシスチルベン（TMS）。適応性細胞については、エストラジオール（E₂）及びトラスツズマブ-DM1（T-DM1）も含まれた。

【0152】

腫瘍増殖の重要な成分としての幹細胞の細胞集団の出現によって、クルクミンの効果をインビトロ系において検討した。クルクミンは、非乳癌試験で、コロニー形成及び幹細胞球形成の用量及び時間依存的阻害を誘導する。このような理由で、我々は、乳癌長期エストロゲン下（LTED）細胞において、この薬剤の効果の初期試験を開始した。我々は用量応答様式でのクルクミンの効果を検討した。この薬剤は、250 nMで観察された初期効果で、細胞数の減少において極めて強力であった。後期試験は、125 nMで効果を示した。次いで、我々は、FTSと併用してクルクミンを検討した。FTSの用量は、ピヒクル、25、50、75、及び100 μMを含んだ。FTS単独は、対照の14%まで細胞数を減少させた。125 nMでのクルクミン単独は、同様な程度まで細胞数を減少させた。クルクミンの高精度の有効性のために、FTSがこれら実験で相加的效果又は相乗的效果のいずれかを起こしたかを判定することは不可能であった。

10

【0153】

サリノマイシンは、幹細胞を殺傷することで有効であることが示された別の薬剤である。この薬剤は、クルクミンよりも効力が劣り、MCF-7細胞上、2 μMで50%の阻害効果を呈した。図3を参照されたい。以前にインビボでアポトーシスを受けることが示されていたMCF-7-5C細胞を使用して、E₂、T-DM-1単独及びこれら細胞の組み合わせの効果を検討するために、試験を実施した。E₂及びT-DM-1の双方がアポトーシスを誘導した。中間用量では、E₂に加えてT-DM-1の併用が、いずれかの薬剤単独よりもより有効であると思われた。

20

【0154】

我々は、これら薬剤のいくつかを、非適応性細胞系（図4、6、8を参照）及び適応性細胞系（図5、7、9を参照）の双方で検討した。乳癌細胞を、増加濃度の個々の薬剤で処置し、続いてそれらの併用で試験した。薬剤によって殺傷された細胞の数（影響を受けた分画、fa）及び影響を受けなかった細胞の数（影響されなかった分画、fu）を決定した（図4を参照）。次いで用量効果曲線を、 $y = \log(fa/fu)$ 対 $x = \log(D)$ である場合の半有効プロットによってそれらの対応する一次形式に変換する[8、34]。半有効プロットから、併用係数(CI)が決定され得る。この方法が平均及び標準偏差値を算定し、並びに信頼区間を表示するために、我々はCIグラフをプロットするためにモンテカルロ選択(Monte Carlo option)を使用した（図6、7を参照）。

30

【0155】

併用係数が1に等しい(CI=1)場合、これは2つの薬剤が相加的様式で共に作用することを意味する。併用係数が1未満(CI<1)の場合、この時、薬剤は個々の合計よりも更に効果的であり、これらは相乗性を表す。併用係数が1未満(CI<1)の場合、この時、2つの薬剤は共に、個々に投与された場合よりも効力が劣り、従って拮抗性を表す。次いで有効用量1(D1)がx軸上にプロットされ、有効用量2(D2)がy軸上にプロットされた。有効用量(ED)のプロットは、Faが0.5、0.75、0.9及び0.95に等しいと行うことができる。これがアイソボグラムを作成する。我々は、これら2つの方法、併用係数(図6、7)及びアイソボグラム(図8、9)を使用して、薬剤の異なる併用が使用される場合、相乗性があるかどうかを判定した。結果の概要は、上記の表1に示されている。

40

【0156】

非適応性細胞系結果

非適応性細胞を検討したときに（図4、6、8）、我々は、TMS及びFTSの併用係

50

数が MCF-7 細胞系では相加的であり (図 6 a、図 8 a)、T47D 細胞では拮抗的である (図 6 d、図 8 d) ことを見出した。FTS 及び CMH の併用は、MCF-7 細胞系ではこの併用に関する相乗性を表したが (図 6 b、8 b)、T47D 細胞系では穏やかな相乗性にすぎなかった (図 6 e、8 e)。TMS 及び CMH の併用は、MCF-7 (図 6 c、8 c) 及び T47D (図 6 f、8 f) の双方において相乗性を示した。

【0157】

適応性細胞系結果

TMS との併用を変化させた。TMS が CMH と併用された場合、LTED 細胞系で相乗性があり、タモキシフェン耐性細胞系では穏やかな相乗性があった。TMS が FTS、E2、又は T-DM1 のいずれかと併用された場合、これらの併用は、LTED 及び TamR 細胞の双方に関して本質的に相加的であった (図 7 a、c-d、j、l-m)。FTS の CMH との併用は、LTED 及び TamR 細胞の双方で穏やかな相乗性を示した (図 7 e、n)。しかしながら、FTS 及び T-DM1 の併用並びに FTS 及び E2 の併用は、タモキシフェン耐性細胞系 (図 7 o、p) に比べて、LTED 細胞においてより強い相乗性を示した (図 7 f、g)。E2 の CMH との併用は、両細胞系で相加的であった (図 7 e、q)。最も有効な組み合わせは、LTED 細胞系においては、CMH 及び T-DM1 の併用であった (図 7 i)。我々は、タモキシフェン耐性細胞系では、これらの併用による穏やかな相乗性を観察した (図 7 s)。これは、タモキシフェン耐性細胞が、低エストロゲン環境中で培養されたことが少なく、従って低いレベルの HER2 を発現するという事実に起因する可能性がある。

10

20

【0158】

更に図 9 を参照すると、これは、適応性細胞系のアイソログラム分析のグラフ図を示す。

結果概要

上記表 1 は、結果概要を示し、相乗性をもたらした併用が強調されている。我々が観察した最強の相乗性は、LTED 細胞系に供給された T-DM1 と CMH との併用から起こった。これは、この併用が内因性ミトコンドリア細胞死経路並びに外因性細胞死受容体経路の双方を標的とする、即ち水平性調節が達成されたためである可能性が高い。T-DM1 は、LTED 細胞の表面上の過発現された HER2 を標的化することが可能であり、DM1 剤は、内因性ミトコンドリア経路を通して細胞死を行う。CMH は、c-FLIP を調節し、外因性細胞死受容体経路を活性化する [14、15]。HER2 に対する T-DM1 の効力及び標的化の双方は、観察される相乗性に重要であるように思われる。試験された TMS との全ての併用は、本質的に相加的であった (図 6 ~ 9 を参照)。FTS との併用は、非適応性 LTED 細胞系と比べて適応細胞系でより弱かった (図 6 b、d、e を図 7 e、f、g と、更に図 8 b、d、e を図 9 e、f、g と比較)。

30

40

【0159】

投与及び組成物

本発明は、併用薬剤療法と併せて使用され得る補助的療法を更に提供する。様々な実施形態では、その中でアポトーシス誘導の異なる分子機構が発生する併用などの前アポトーシス抗癌剤の併用が、X線、γ線、放射核種放射、及び亜原子的粒子曝露などの放射線療法、近接照射療法、並びに前アポトーシスそれ自体であるか若しくは細胞増殖阻害剤又は細胞複製阻害剤である追加的抗癌剤の使用を含む、当該技術分野で周知のような他の治療的アプローチと組み合わせて使用され得る。これら組み合わせを評価するため並びに結果を解析するための方法は、当該技術分野で既知である。

【0160】

複数の経路を標的とする有効な投薬治療の組み合わせは、癌を標的化するための薬物療法の開発に新しい領域を開く。本明細書に開示されたように、本発明の併用療法は、カスパーゼ依存的細胞死を誘導すること、細胞性 FLICE を阻害すること、カスパーゼを活性化すること (カスパーゼの間接的活性化を含む)、HDAC3、HDAC6、及び HDAC8 を阻害すること、カスパーゼ依存的細胞死を誘導すること、ミトコンドリア細胞死

50

及び Fas 細胞死受容体経路を調節すること、並びに微小管構造を破壊することが挙げられるがこれらに限定されない、異なる / 複数の経路を標的化することに基づいている。

【0161】

本発明は、様々な実施形態において、第2のアポトーシス抗癌剤と「併せた」第1の前アポトーシス抗癌剤の投与のための方法を提供する。互いに併せて投与される2つ又はそれ以上の薬剤が、同時に又は等しい用量で投与されねばならないことが必ずしも必要でないことを当業者であれば理解されるであろう。一態様では、薬剤併用療法の一部として投与される化合物は、別個に投与される。別の態様では、第1の化合物は、第2の化合物が投与される前に投与される。更に別の態様では、第1の化合物と第2の化合物は、ほぼ同時に投与される。他の態様では、第1の化合物は、第2の化合物の投与後に引き続いて投与される。それぞれの薬剤は、医療従事者の知識及び技能に基づいて選択され得る投与の頻度、及び投与期間にわたって、投与量で複数回投与され得る。

10

【0162】

本発明は、本発明の化合物を含む医薬組成物を更に提供する。この医薬組成物は、本発明の1つ以上の化合物、並びに生物学的に活性な類似体、相同体、誘導體、修飾体、及びその薬学的に許容可能な塩、並びに薬学的に許容可能な担体を含んでもよい。一実施形態では、この化合物は、医薬組成物として投与される。

【0163】

投与のルートは、投与される化合物のタイプに応じて異なり得る。一態様では、化合物は、経口、局所、経直腸、筋肉内、粘膜内、鼻腔内、吸入、眼、静脈内などのルートを紹介して投与される。

20

【0164】

本発明は、制御放出製剤としての本発明の化合物の投与の方法を更に提供する。

一実施形態では、2つ又はそれ以上の化合物の併用で被験体を処置する結果は、化合物のいずれかを単独で使用する効果と比較して相加的である。一態様では、2つ又はそれ以上の化合物を使用する場合に見られる効果は、この化合物のいずれかを単独で使用する場合よりも大きい。

【0165】

本組成物は、任意選択的に、患者に適切な投与のための形態をもたらすように、好適な量の薬学的に許容可能なピヒクルを含むことができる。

30

本組成物はまた、行動療法又は相互作用と組み合わせて、被験体に投与され得る。

【0166】

本発明の範囲内に包含されるものは、様々な個々のアノマー、ジアステレオマー及び鏡像異性体並びにこれらの混合物である。加えて、本発明の化合物は、例えば、ナトリウム及びカリウムなどのアルカリ金属塩；アンモニウム塩；モノアルキルアンモニウム塩；ジアルキルアンモニウム塩；トリアルキルアンモニウム塩；テトラアルキルアンモニウム塩、及びトロメタミン塩のいずれかの薬学的に許容可能な塩も含む。この化合物の水和物及び他の溶媒和物も本発明の範囲内に含まれる。

【0167】

初期投与量が有効でない場合、この時、併用療法の1つ以上の化合物の投与量が増加され得る。初期投与量が上記率よりも更に急激な体重減少をもたらす場合、少なくとも2つの化合物の1つ以上の投与量が低減され得る。

40

【0168】

薬学的に許容可能な塩基添加塩は、無機及び有機塩基から調製され得る。無機塩基由来の塩は、例に過ぎないが、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム及びマグネシウム塩が挙げられる。有機塩基に由来の塩としては、アルキルアミン、ジアルキルアミン、トリアルキルアミン、置換アルキルアミン、ジ(置換アルキル)アミン、トリ(置換アルキル)アミン、アルケニルアミン、ジアルケニルアミン、トリアルケニルアミン、置換アルケニルアミン、ジ(置換アルケニル)アミン、トリ(置換アルケニル)アミン、シクロアルキルアミン、ジ(シクロアルキル)アミン、トリ(シクロアルキル)

50

アミン、置換シクロアルキルアミン、二置換シクロアルキルアミン、三置換シクロアルキルアミン、シクロアルケニルアミン、ジ(シクロアルケニル)アミン、トリ(シクロアルケニル)アミン、置換シクロアルケニルアミン、二置換シクロアルケニルアミン、三置換シクロアルケニルアミン、アリールアミン、ジアアリールアミン、トリアアリールアミン、ヘテロアリールアミン、ジヘテロアリールアミン、トリヘテロアリールアミン、ヘテロ環式アミン、ジヘテロ環式アミン、トリヘテロ環式アミン、アミン上の置換基の少なくとも2つが異なり、これらがアルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロ環式等からなる群から選択される混合されたジアミン及びトリアミンなどの第一級アミン、第二級アミン及び第三級アミンの塩が挙げられるが、これらに限定されない。更に含まれるものは、2つ又は3つの置換基がアミノ窒素と共に、ヘテロ環式基又はヘテロアリール基を形成するアミンである。好適なアミンの例としては、例示に過ぎないが、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリ(イソプロピル)アミン、トリ(n-プロピル)アミン、エタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、トロメタミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、N-アルキルグルカミン、テオプロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、モルホリン、N-エチルピペリジン等が挙げられる。例えば、カルボキサミド、低級アルキルカルボキサミド、ジアアルキルカルボキサミド等を含むカルボン酸アミドなどの他のカルボン酸誘導体も本発明の実施で有用であることも理解されるべきである。

10

20

【0169】

薬学的に許容可能な酸付加塩は、無機及び有機酸から調製され得る。無機酸由来の塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の塩が挙げられる。有機酸由来の塩としては、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等の塩が挙げられる。

【0170】

一実施形態では、本発明の組成物は、本発明の1つの化合物を含んでよい。別の実施形態では、本発明の組成物は、本発明の複数の化合物を含んでもよい。一実施形態では、他の疾患を治療するために有用な追加的な薬剤又は化合物もこの組成物の一部であり得る。一実施形態では、1つのみの本発明の化合物を含む組成物が、少なくとも1つの本発明の他の化合物を含む別の組成物と同時に投与されてもよい。一実施形態では、異なる組成物が、互いに異なる時間に投与されてもよい。本発明の組成物が、1つのみの本発明の化合物を含む場合、少なくとも1つの追加的化合物を含む追加的組成物が使用されるべきである。

30

【0171】

本発明を実施するために有用な医薬組成物は、例えば、1ng/kg/日と100mg/kg/日との間の用量を送達するよう投与され得る。

本発明の方法において有用である医薬組成物は、例えば、経口固形製剤で全身的に投与されても、又は点眼薬、坐剤、エアロゾル剤、局所製剤又は同様のその他の製剤として投与されてもよい。適切な化合物に加えて、かかる医薬組成物は、薬剤投与を増強しかつ容易にするとして知られる薬学的に許容可能な担体及び他の成分を含有してもよい。ナノ粒子、リポソーム、再接合赤血球、及び免疫ベースのシステムなどの他の可能な製剤もまた、本発明の方法に従って、適切な化合物、又は類似体、修飾体、若しくはこれらの誘導体を投与するよう使用されてもよい。

40

【0172】

本明細書に記載された方法のいずれかを使用して同定された化合物は、製剤化され、本明細書に開示された疾患の治療に対して、被験体に投与され得る。当業者であれば、これら方法が、他の疾患、障害、及び病状に同様に有用であることを認識されるであろう。

50

【0173】

「プロドラッグ」とは、インビボで親薬物へと転化される薬剤を指す。プロドラッグは、ある状況において、これらが親薬物よりも投与することが容易である場合があるために、しばしば有用である。例えば、これらは経口投与によって生物学的に利用可能となり得る一方で、親薬物はそうではない。プロドラッグはまた、医薬組成物中で親薬物を超える改善された溶解性を有し得るか、又は風味の増加を示し若しくは製剤化が容易であり得る。プロドラッグの限定的ではない例としては、エステル（「プロドラッグ」）として投与される本発明の化合物があり、これは水溶解性が移動性に悪影響を及ぼす細胞膜を横断する場合には伝達を容易にし、水溶解性が有利である細胞の内部に一旦入ると、次いでこれが活性実体であるカルボン酸に代謝的に加水分解される。プロドラッグの更なる例は、ペプチドが代謝されて活性部分をもたらす酸基に結合された短鎖ペプチド（ポリアミノ酸）であり得る。

10

【0174】

本発明は、本明細書で開示される疾患の治療に、活性成分として有用な化合物を含む医薬組成物の調製及び使用を包含する。かかる医薬組成物は、被験体に投与するために好適な形態での活性成分単独からなってもよく、又は医薬組成物は、活性成分及び1つ以上の薬学的に許容可能な担体、1つ以上の追加的成分、若しくはこれらのいくつかの組み合わせを含んでもよい。活性成分は、当該技術分野で周知のように、生理学的に許容可能なカチオン又はアニオンと組み合わされてなど、生理学的に許容可能なエステル又は塩の形態で、医薬組成物中に存在してもよい。

20

【0175】

本明細書に記載の医薬組成物の製剤は、薬剤学の分野で既知の又は今後開発される任意の方法によって調製され得る。一般的に、かかる調製法は、活性成分を担体又は1つ以上の他の補助成分と結合するようにすることと、次いで、必要であるか所望する場合、製品を所望の単一又は複数の用量単位に形作る又は包装することを含む。

【0176】

本明細書に提供される医薬組成物の記載は、ヒトへの倫理的な投与に好適である医薬組成物を主として目的としているが、かかる組成物は、一般的に全ての種類の動物への投与に好適であることが当業者であれば理解されるであろう。多様な動物への投与に好適な医薬組成物にするために、ヒトへの投与に好適な医薬組成物を修正することは十分に理解され、当該技術分野の知識を有する獣医薬理学者であれば、たとえあったとしても、単に普通の実験のみでかかる修正を設計しかつ実施することができる。本発明の医薬組成物の投与が企図される被験体としては、ヒト及び他の霊長類、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、及びイヌなどの商業上妥当な哺乳類、並びにニワトリ、アヒル、ガチョウ、及びシチメンチョウなどの商業上妥当な鳥類を含む鳥類が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0177】

本発明の方法によって包含される投与の1つのタイプは、非経口投与であり、これは、組成物の注射による医薬組成物の投与、外科的切開を通しての組成物の供給によるもの、組織貫通非外科的創傷を通しての組成物の供給によるもの等が挙げられるが、これらに限定されない。特に、非経口投与は、限定されないが、皮下、腹腔内、筋肉内、及び胸骨内注射、並びに腎臓透析注入技術が挙げられる。

40

【0178】

本発明の方法において有用である医薬組成物は、経口、経直腸、経膈、非経口、局所、肺投与、鼻腔内、吸入、口腔内、眼用、クモ膜下投与又は別の投与経路に好適な製剤で調製され、包装され、又は販売される。他の企図される製剤としては、投影型ナノ粒子、リポソーム調製物、活性成分を含有する再接合赤血球、免疫学系製剤が挙げられる。

【0179】

本発明の医薬組成物は、単回単位用量、又は複数の単回単位用量として、バルクで調製され、包装され、又は販売される。本明細書で使用するとき、「単位用量」とは、予め決められた量の活性成分を含む医薬組成物の別個の量である。活性成分の量は、一般的に、

50

被験体に投与される活性成分の投与量、又は、例えばかかる投与量の1/2又は1/3などのかかる投与量の好都合な分画に等しい。

【0180】

活性成分、医薬組成物中の薬学的に許容可能な担体、及び任意の追加的成分の相対的量は、処置される被験体の個性、寸法、状態に依存して、更に組成物が投与されるべきルートに依存して変化するのであろう。例として、この組成物は、0.01%～100% (w/w)の間の活性成分を含んでもよい。

【0181】

活性成分に加えて、本発明の医薬組成物は、1つ以上の追加的薬学的に活性な薬剤を更に含んでもよい。特に企図される追加的薬剤としては、抗催吐剤並びにシアニド及びシアネート排出薬などの排出薬が挙げられる。

10

【0182】

本発明の医薬組成物の制御放出性又は徐放性の製剤は、従来技術を使用して製造され得る。

経口投与に好適な本発明の医薬組成物の製剤は、限定されるものではないが、それぞれが予め決められた量の活性成分を含有する錠剤、硬質又は軟質カプセル、カシュ剤、トローチ、又はロゼンジ剤が挙げられるが、別個の固形用量の形態で調製され、包装され、又は販売され得る。経口投与に好適な他の製剤としては、粉末又は顆粒製剤、水性又は油性の懸濁液、水性又は油性の液剤、若しくは乳剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0183】

20

本明細書で使用するとき、「油性」液体とは、炭素含有液体分子を含むもので、水よりも小さな極性を呈するものである。

活性成分を含む錠剤は、例えば、任意選択的に1つ以上の追加的成分と共に、活性成分を圧縮し又は成形することによって製造され得る。圧縮錠剤は、好適な装置内で、任意選択的に、結合剤、滑沢剤、賦形剤、表面活性剤、及び分散剤の1つ以上と混合されて、粉末又は顆粒調製物などの自由流動形態で、活性成分を圧縮することによって調製され得る。成形錠剤は、好適な装置内で、活性成分の混合物、薬学的に許容可能な担体、及び混合物を湿らすのに少なくとも十分な液体を成形することによって製造され得る。錠剤の製造で使用される薬学的に許容可能な賦形剤としては、不活性希釈剤、造粒及び崩壊剤、結合剤、及び滑沢剤が挙げられるが、これらに限定されない。既知の分散剤としては、馬鈴薯デンプン及びデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。既知の界面活性剤としては、ラウリル硫酸ナトリウムが挙げられるが、これに限定されない。既知の希釈剤としては、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、微結晶セルロース、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、及びリン酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。既知の造粒及び崩壊剤としては、トウモロコシデンプン及びアルギン酸が挙げられるが、これらに限定されない。既知の結合剤としては、ゼラチン、アラビアゴム、前糊化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、及びヒドロキシメチルセルロースが挙げられるが、これらに限定されない。既知の滑沢剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、シリカ、及びタルクが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0184】

錠剤は、非コーティングであってもよく、又は被験体の異腸管内の遅延崩壊を達成するために、既知の方法を使用してコーティングされてもよく、これによって、活性成分の徐放性及び吸収をもたらす。例として、一ステアリン酸グリセリル又は二ステアリン酸グリセリルなどの材料が、錠剤をコーティングするために使用され得る。更に例として、錠剤は、米国特許第4,256,108号明細書、同第4,160,452号明細書及び同第4,265,874号明細書に記載される方法を使用してコーティングされ、浸透圧的に制御された放出錠剤を形成してもよい。錠剤は、薬学的にエレガントで口当たりがよい調製物をもたらすために、甘味剤、風味剤、着色剤、防腐剤、又はこれらのいくつかの組み合わせを更に含んでもよい。

50

【0185】

活性成分を含む硬質カプセルは、ゼラチンなどの生理学的に分解可能な組成物を使用して製造され得る。かかる硬質カプセルは、活性成分を含み、更に、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、又はカオリンなどの不活性固体希釈剤を含む追加的成分を含むことができる。

【0186】

活性成分を含む軟質カプセルは、ゼラチンなどの生理学的に分解可能な組成物を使用して製造され得る。かかる軟質カプセルは、水若しくはピーナッツ油、液体パラフィン、又はオリーブ油などの油性媒体と混合され得る活性成分を含むことができる。

【0187】

ラクチュロースもまた、遊離食用充填剤として使用され得、これは、本発明の化合物がカプセル形態で調製される場合有用である。

経口投与に好適である本発明の医薬組成物の液体製剤は、液体形態又は使用前に水又は別の好適なビヒクルとの再構成を意図される乾燥製品の形態のいずれかで、調製され、包装され、及び販売され得る。

【0188】

液体懸濁液は、従来の方法を使用して調製され、水性又は油性ビヒクル中の活性成分の懸濁液を達成することができる。水性ビヒクルとしては、例えば、水又は等張生理食塩水が挙げられる。油性ビヒクルとしては、例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、ラッカセイ油、オリーブ、ゴマ、又はココナッツ油などの植物油、分画植物油、及び液体パラフィンなどの鉱油が挙げられる。液体懸濁液は、懸濁剤、分散又は湿潤剤、乳化剤、緩和剤、防腐剤、緩衝剤、塩、風味剤、着色剤、及び甘味剤が挙げられるがこれらに限定されない1つ以上の追加的成分を更に含んでもよい。油性懸濁液は、増粘剤を更に含んでもよい。既知の懸濁剤としては、ソルビトールシロップ、水素添加食用脂肪、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、アラビアゴム、並びにカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、及びヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。既知の分散又は湿潤剤としては、レシチンなどの天然型ホスファチド、酸化アルキレンと脂肪酸との、長鎖脂肪族アルコールとの、脂肪酸とヘキシトールに由来の部分的エステル誘導体との、又は脂肪酸とヘキシトール無水物に由来の部分的エステルとの縮合生成物（例えば、それぞれ、ステアリン酸ポリオキシエチレン、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、ソルビトールモノオレイン酸ポリオキシエチレン、及びソルビタンモノオレイン酸ポリオキシエチレン）が挙げられるが、これらに限定されない。既知の乳化剤としては、レシチン及びアラビアゴムが挙げられるが、これらに限定されない。既知の防腐剤としては、メチル、エチル、またはパラヒドロキシ安息香酸プロピル、アスコルビン酸、ソルビン酸が挙げられるが、これらに限定されない。既知の甘味料としては、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、スクロース、及びサッカリンが挙げられるが、これらに限定されない。油性懸濁液のための既知の増粘剤としては、例えば蜜蝋、硬質パラフィン、及びセチルアルコールが挙げられる。

【0189】

一態様では、シロップ又はエリキシル剤の形態での、又はドロップの形態での調製物は、甘味剤と共に活性成分を含むことができ、この甘味剤は、カロリーフリーであることが好ましく、この調製物は、殺菌剤としてのメチルパラベン又はプロピルパラベン、風味剤及び好適な着色剤を更に含んでもよい。

【0190】

水性又は油性溶媒中の活性成分の液体溶液は、液体懸濁液と実質的に同様な方法で調製され得、主たる相違点は、活性成分が溶媒中に懸濁されるよりはむしろ溶解されることである。本発明の医薬組成物の液体溶液は、液体懸濁液に関して記載された成分のそれぞれを含むことができる。懸濁剤が、溶媒中の活性成分の溶解を必ずしも助けるというわけではないことが理解されるべきである。水性溶媒としては、例えば、水及び等張生理食塩水

10

20

30

40

50

が挙げられる。油性溶媒としては、例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、ラッカセイ油、オリーブ、ゴマ、又はココナツ油などの植物油、分画化植物油、及び液体パラフィンなどの鉱油が挙げられる。

【0191】

本発明の医薬調製物の粉末化又は顆粒化製剤は、既知の方法を使用して調製され得る。かかる製剤は、例えば、錠剤を成形するため、カプセルを充填するため、又はそれに水性又は油性ビヒクルをそれに添加することによって水性又は油性懸濁液若しくは溶液を調製するために使用されて、被験体に直接的に投与されてもよい。これら製剤のそれぞれは、分散又は湿潤剤、懸濁剤、及び防腐剤の1つ以上を更に含む。充填剤及び甘味剤、風味剤、又は着色剤などの追加的な賦形剤もまた、これら製剤中に含まれてもよい。

10

【0192】

本発明の医薬組成物は、水中油型エマルジョン又は油中水型エマルジョンの形態で、調製され、包装され、又は販売され得る。油性相は、オリーブ油又はラッカセイ油などの植物油、液体パラフィンなどの鉱油、又はこれらの組み合わせであってもよい。かかる組成物は、アラビアゴム又はトラガカントゴムなどの天然型ゴム、ダイズ又はレシチンホスファチドなどの天然型ホスファチド、モノオレイン酸ソルビタンなどの脂肪酸及びヘキシル無水物の組み合わせに由来のエステル又は部分的エステル、並びにかかる部分的エステルとソルビタンモノオレイン酸ポリオキシエチレンなどの酸化エチレンとの縮合生成物を含む1つ以上の乳化剤を更に含んでもよい。これら乳剤はまた、例えば、甘味剤又は風味剤を含む追加的な成分を含有してもよい。

20

【0193】

本発明の医薬組成物は、経直腸投与に好適な製剤で、調製され、包装され、又は販売されてもよい。かかる組成物は、例えば坐剤、滞留浣腸剤、及び直腸又は結腸灌注のための溶液の形態であり得る。

【0194】

坐剤は、活性成分を、通常室温（即ち、約20℃）で固体であり、被験体の直腸の温度（即ち、健康なヒトでは約37℃）で液体である非刺激性の薬学的に許容可能な賦形剤と組み合わせることで製造され得る。好適な薬学的に許容可能な賦形剤としては、ココアバター、ポリエチレングリコール、及び種々のグリセリドが挙げられるが、これらに限定されない。坐剤は、酸化防止剤及び防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない種々の追加的成分を更に含んでもよい。

30

【0195】

直腸又は結腸灌注用の滞留浣腸調製物又は溶液は、活性成分を薬学的に許容可能な担体と組み合わせることによって製造され得る。当該技術分野で周知のように、浣腸調製物は、被験体の直腸構造に適合された送達装置を使用して投与され得、又はこの中に包装され得る。浣腸調製物は、酸化防止剤及び防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない種々の追加的成分を更に含んでもよい。

【0196】

本発明の医薬組成物は、腔内投与に好適な製剤で、調製され、包装され又は販売され得る。かかる組成物は、例えば、坐剤、タンポン、灌注調製物、若しくは腔灌注用のゲル又はクリーム又は溶液などの含浸処理された又はコーティングされた腔挿入可能な材料の形態であり得る。

40

【0197】

材料を化学的組成物で含浸処理又はコーティングするための方法は、当該技術分野で既知であり、化学的組成物を表面に付着又は結合させる方法、材料（即ち、生理学的分解可能な材料）の合成中に化学的組成物を材料の構造に組み込む方法、及び水性又は油性溶液若しくは懸濁液を吸収性材料に吸収させ、続いて乾燥させるか乾燥させない方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0198】

腔灌注のための灌注調製物又は溶液は、活性成分を薬学的に許容可能な液体担体と組み

50

合わせることで製造され得る。当該技術分野で周知であるように、灌注調製物は、腔の構造に適合された送達装置を使用して投与され得、並びにその中に包装され得る。灌注調製物は、酸化防止剤、抗菌剤、抗真菌剤、及び防腐剤が挙げられるがこれらに限定されない種々の追加的成分を更に含んでもよい。

【0199】

本明細書で使用するとき、医薬組成物の「非経口投与」とは、被験体の組織の物理的裂け目 (breaching) によって特徴付けられる投与のいずれかのルート及び組織内のその裂け目を通しての医薬組成物の投与を含む。従って、非経口投与としては、組成物の注射による、外科的切開を通して組成物の供給による、組織貫通性非外科的損傷を通しての組成物の供給による等の組成物の投与が挙げられるが、これらに限定されない。特に非経口投与としては、皮下、腹腔内、筋肉内、胸骨内注射、及び腎臓透析注入技術が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0200】

非経口投与に好適な医薬組成物の製剤は、無菌水又は無菌等張生理食塩水などの薬学的に許容可能な担体と組み合わされた活性成分を含む。かかる製剤は、ポーラス投与又は連続的投与に好適な形態で、調製され、包装され、又は販売され得る。注射可能な製剤は、アンプル又は防腐剤を含有する複数回用量容器などの単位用量形態で調製され、包装され、又は販売され得る。非経口投与のための製剤としては、懸濁液、液剤、油性又は水性ビヒクル中の乳剤、ペースト、及び埋め込み可能な徐放性又は生体分解可能な製剤が挙げられるが、これらに限定されない。かかる製剤は、懸濁剤、安定化剤、又は分散剤が挙げられるがこれらに限定されない1つ以上の追加的成分を更に含んでもよい。非経口投与のための製剤の一実施形態では、再構成組成物の非経口投与の前には、活性成分が、好適なビヒクル (例えば、無菌のピロジェンフリーの水) とともに再構成のための乾燥 (即ち、粉末又は顆粒状の) 形態で提供される。

20

【0201】

医薬組成物は、無菌の注射可能な水性又は油性懸濁液又は溶液の形態で、調製され、包装され、又は販売される。この懸濁液又は溶液は、既知の技術に従って製剤化され得、活性成分に加えて、本明細書に記載の分散剤、湿潤剤、又は懸濁剤などの追加的成分を含んでもよい。かかる無菌注射可能な製剤は、例えば水又は1, 3-ブタンジオールなどの非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤又は溶媒を使用して調製され得る。他の許容可能な希釈剤及び溶媒としては、リンガー溶液、等張塩化ナトリウム溶液、及び合成モノ-又はジ-グリセリドなどの固定油が挙げられるが、これらに限定されない。有用である他の非経口的に投与可能な製剤としては、微結晶性形態で、リポソーム調製物で、又は生体分解性ポリマー系の成分として活性成分を含むものが挙げられる。徐放性又は埋め込みのための組成物は、エマルジョン、イオン交換樹脂、難溶性ポリマー、又は難溶性塩などの薬学的に許容可能なポリマー材料又は疎水性材料を含んでもよい。

30

【0202】

局所投与に好適な製剤としては、リニメント、ローションなどの液体又は半液体調製物、クリーム、軟膏又はペーストなどの水中油型又は油中水型の乳剤、並びに溶液又は懸濁液が挙げられるが、これらに限定されない。局所投与製剤は、例えば、約1%~約10% (w/w) の活性成分を含んでもよいが、活性成分のこの濃度は、溶媒中の活性成分の溶解限界と同じほど高い場合がある。局所投与のための製剤は、本明細書に記載の追加的成分の1つ以上を更に含んでもよい。

40

【0203】

本発明の医薬組成物は、口腔を介しての肺投与に好適な製剤で、調製され、包装され、又は販売され得る。かかる製剤は、乾燥成分を含み、約0.5~約7ナノメートルの範囲、好ましくは約1~約6ナノメートルの範囲の直径を有する乾燥粒子を含むことができる。かかる組成物は、そこに推進剤の流れが向けられ粉末を分散させる乾燥粉末リザーバを含む装置を使用して、又は密封された容器内で低沸点推進剤中に溶解され又は懸濁された活性成分を含む装置などの自動推進式の溶媒/粉末分配容器を使用しての投与のために、

50

好都合な乾燥粉末の形態である。好ましくは、かかる粉末は、粒子を含み、その中で粒子の少なくとも98重量%が、0.5ナノメートルを超える直径を有し、粒子の数で少なくとも95%が7ナノメートル未満の直径を有する。より好ましくは、少なくとも95重量%の粒子が、1ナノメートルを超える直径を有し、粒子の数で少なくとも90%の粒子が6ナノメートル未満の直径を有する。乾燥粉末組成物は、好ましくは、糖などの固体微粉末希釈剤を含み、単位用量形態で好都合に提供される。

【0204】

低沸点推進剤は、一般的には、大気圧で65°F(18.3°C)以下の沸点を有する液体推進剤を含む。一般的には、推進剤は、約50%~約99.9%(w/w)の組成を構成してもよく、活性成分は、約0.1%~約20%(w/w)の組成を構成することができる。推進剤は、液体非イオン性又は固体アニオン性界面活性剤若しくは固体希釈剤(好ましくは、活性成分を含む粒子と同一のオーダの粒径を有する)などの追加的成分を更に含んでもよい。

10

【0205】

肺送達用に製剤化される本発明の医薬組成物はまた、溶液又は懸濁液の液滴の形態で活性成分を提供してもよい。かかる製剤は、活性成分を含む、任意選択的に無菌の水性若しくは希アルコール溶液又は懸濁液として調製され、包装され、又は販売され得、任意の霧状化又は噴霧化装置を使用して好都合に投与され得る。かかる製剤は、サッカリンナトリウムなどの風味剤、揮発性油、緩衝剤、界面活性剤、又はメチルヒドロキシベンゾエートなどの防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない1つ以上の追加的成分を更に含んでもよい。投与のこのルートによって提供される液滴は、約0.1~約200ナノメートルの範囲の平均径を有する。

20

【0206】

肺送達に有用な本明細書に記載される製剤はまた、本発明の医薬組成物の鼻腔内送達にも有用である。

鼻腔内投与に好適な別の製剤は、活性成分を有し、約0.2~約500マイクロメートルの平均粒子を有する粗粉末である。かかる製剤は、吹入されるような方法、即ち、鼻孔の近くに保たれた容器から鼻の経路を通して急速に吸入することにより投与される。

【0207】

鼻腔投与に好適な製剤は、例えば、わずか約0.1%(w/w)から約100%(w/w)までもの活性成分を含んでもよく、本明細書に記載の追加的成分の1つ以上を更に含んでもよい。

30

【0208】

本発明の医薬組成物は、口腔内投与に好適な製剤で調製され、包装され、又は販売され得る。かかる製剤は、例えば、従来の方法を使用して製造された錠剤又はロゼンジの形態であり得、例えば、約0.1%~約20%(w/w)の活性成分、経口的に溶解可能な又は分解可能な組成物を含む残部、任意選択的に、本明細書に記載の1つ以上の追加的成分を含むことができる。或いは、口腔内投与に好適な製剤は、活性成分を含む粉末若しくはエアロゾル化又は霧状化溶液又は懸濁液を含んでもよい。かかる粉末化、エアロゾル化、又は霧状化製剤は、分散される場合、好ましくは約0.1~約200ナノメートルの範囲の平均粒径または液滴径を有し、本明細書に記載の追加的成分の1つ以上を更に含んでもよい。

40

【0209】

本発明の医薬組成物は、眼用投与に好適な製剤で調製され、包装され、又は販売され得る。かかる製剤は、例えば、点眼剤の形態であってもよく、この点眼剤は、例えば、水性又は油性液体担体中の活性成分の0.1%~1.0%(w/w)の溶液又は懸濁液であり得る。かかる点眼剤は、緩衝剤、塩、または本明細書に記載の1つ以上の他の追加的成分を更に含んでもよい。有用である他の眼用投与可能な製剤としては、微結晶性形態又はリポソーム調製物で活性成分を含むものが挙げられる。

【0210】

50

本発明の医薬組成物は、粘膜内投与に好適な製剤で調製され、包装され、又は販売され得る。本発明は、粘膜を横断する化合物の経路又は吸収を可能にする化合物の粘膜内投与を提供する。かかるタイプの投与は、経口（歯肉、舌下、頬粘膜等）、直腸、膣、肺、鼻腔等の吸収に有用である。

【0211】

いくつかの態様では、舌下投与は、場合によっては経口投与されるとき、活性成分が肝臓を通して実質的な初回代謝及び酵素的分解にさらされ、迅速な代謝をもたらし、並びに分子を不活性代謝物に転化する肝臓酵素の活性に関する治療的活性の損失、又はこの生体転化のために減少される活性を生じることに対し、活性成分に関する利点を有する。

【0212】

場合によっては、投与の舌下ルートは、頬粘膜の相当な透過性又は血管新生のために、迅速な作用の開始をもたらすことができる。更に、舌下投与はまた、経口投与後に胃粘膜又は消化管粘膜のレベルで通常は吸収されない活性成分、或いは、例えば錠剤の摂取後に酸性媒体中に部分的に又は完全に分解される活性成分の投与を可能にする。

【0213】

先行技術から既知である舌下錠剤調製技術は、活性成分と、希釈剤、結合剤、崩壊剤及びアジュバントなどの圧縮のための賦形剤とを含む粉末の混合物の直接圧縮によって通常調製される。調製の代替法では、活性成分及び圧縮賦形剤が、事前に乾式造粒化又は湿式造粒化される。一態様では、活性成分が錠剤の質量全体に分配される。国際公開第00/16750号パンフレットは、迅速に崩壊し、その中で活性成分がマイクロ粒子の形態で存在する（このマイクロ粒子が、活性マイクロ粒子に対する支持を構成している実質的にサイズが大きい水溶性粒子の表面に接着する）規則混合物と粘膜付着性の薬剤を含む化合物とを含む舌下錠用途のための錠剤を記載する。国際公開第00/57858号パンフレットは、吸収を促進するよう意図された発泡性系、及びpH-調節剤にも組み合わされた活性成分を含む舌下用途のための錠剤を記載する。

【0214】

本発明の化合物は、粘膜全体の吸収を可能にする又は増強する投与に適切な製剤又は医薬組成物で調製され得る。粘膜吸収増強剤としては、胆汁酸塩、脂肪酸、界面活性剤、又はアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、浸透増強剤はコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸、グリコール酸ナトリウム、ジメチルスルホキシド又はエタノールであり得る。他の実施形態では、本発明の化合物は、化合物の送達を容易にするために、粘膜浸透強化剤と共に製剤化され得る。この製剤はまた、溶解性、薬剤安定性、及び鼻腔粘膜、口腔粘膜、膣粘膜、呼吸器、及び腸粘膜などの粘膜を通しての吸収を最適化したpHで調製され得る。

【0215】

本発明の範囲内の医薬品の粘膜送達を更に増強するために、活性成分を含む製剤はまた、基剤又は賦形剤として親水性低分子量化合物を含有してもよい。かかる親水性低分子量化合物は、それを通して、生理学的に活性なペプチド又はタンパク質などの水溶性活性薬剤が、基剤から活性薬剤が吸収される身体表面に拡散する通過媒体を提供する。親水性低分子量化合物は、任意選択的に、粘膜又は投与雰囲気から水分を吸収し、水溶性活性ペプチドを溶解する。親水性低分子量化合物の分子量は、一般的に10000以下であり、好ましくは3000以下である。例示的親水性低分子量化合物としては、スクロース、マンニトール、乳糖、L-アラビノース、エリトロース、D-リボース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、ラクチュロース、セロビオース、ゲンチビオース、グリセリン、及びポリエチレングリコール等のオリゴ糖類、二糖類及び単糖類などのポリオール化合物が挙げられる。本発明の範囲内の担体として有用な親水性低分子量化合物の他の例としては、N-メチルピロリドン、及びアルコール（例えば、オリゴビニルアルコール、エタノール、エチレングリコール、プロピレングリコール等）が挙げられる。これら親水性低分子量化合物は、単独で、又は互いに組み合わされて、若しくは他の活性又は不

10

20

30

40

50

活性の鼻腔内製剤の成分と共に使用され得る。

【0216】

本発明の制御放出医薬調製物が親水性基剤を更に含む場合、多くの選択肢が含有物に使用可能である。ポリエチレングリコール及びポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、D-ソルビトール及びキシリトールなどの糖アルコール、スクロース、マルトース、ラクチュロース、D-フルクトース、デキストラン、及びグルコースなどの糖類、ポリオキシエチレン-水素付加ヒマシ油、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレングリコール、及びポリオキシエチレン・ソルビタン高脂肪酸エステルなどの界面活性剤、塩化ナトリウム及び塩化マグネシウムなどの塩、クエン酸及び酒石酸などの有機酸、グリシン、アラニン、及びリジン塩酸などのアミノ酸、並びにメグルミンなどのアミノ糖類は、親水性基剤の例として提供される。ポリエチレングリコール、スクロース、及びポリビニルピロリドンが好ましく、ポリエチレングリコールは更に好ましい。2つ又はそれ以上の親水性基剤の1つ又は組み合わせが、本発明で使用され得る。

10

【0217】

本発明は、吸入器を通しての肺、鼻孔、又は経口投与を企図する。一実施形態では、吸入器からの送達は、投与量計量式であり得る。

吸入器は、本発明の少なくとも1つの化合物の患者の自己投与のための装置であり、本発明の少なくとも1つの化合物と薬学的に許容可能な分散剤とのエアロゾル噴霧剤を含有する噴霧式吸入器（例えば、鼻腔、経口、又は肺噴霧式吸入器）を含む。一態様では、この装置は本発明によって包含される疾患又は障害を治療するのに有効な本発明の少なくとも1つの化合物の用量を封じ込めるスプレーを形成することによって、ある量のエアロゾル製剤を分散するよう計量される。分散剤は、限定されないが、ポリオキシエチレン・脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン・脂肪酸アルコール、及びポリオキシエチレン・ソルビタン・脂肪酸エステルなどの界面活性剤であり得る。リン脂質系界面活性剤もまた使用されてもよい。

20

【0218】

他の実施形態では、エアロゾル製剤は、その中で本発明の化合物が微細粉末として存在する乾燥粉末エアロゾル製剤として提供される。乾燥粉末製剤は、乳糖、ソルビトール、スクロース、及びマンニトールなど（これらに限定されない）の増量剤を更に含むことができる。

30

【0219】

別の特定の実施形態では、エアロゾル製剤は、液体エアロゾル製剤であり、これは、無菌水、生理食塩水、緩衝生理食塩水及びデキストロース溶液など（これらに限定されない）の薬学的に許容可能な希釈剤を更に含む。

【0220】

他の実施形態では、エアロゾル製剤は、本発明の少なくとも1つの追加的化合物を更に含み、この追加的化合物は、装置によって分散される計量された量のエアロゾル製剤が、本発明の少なくとも第1又は第2の化合物と組み合されて使用される場合、本明細書で開示される疾患又は障害の症状を軽減するのに有効である計量された量で追加的化合物の用量を含有するような濃度にて含まれる。

40

【0221】

従って、本発明は、アルコール依存症疾患又は障害などの薬物依存性疾患又は障害の外來患者治療のための自己投与法を提供する。かかる投与は、自己投与のために非医療関係者によって、病院内、診療所内、若しくは病院外又は診療所外で使用され得る。

【0222】

本発明の化合物は、鼻腔投与に適切な製剤又は医薬組成物で調製されるであろう。他の実施形態では、本発明の化合物は、薬剤の送達を容易にするための粘膜侵入増強剤と共に製剤化され得る。この製剤は、溶解性、薬剤安定性、鼻腔粘膜を通しての吸収性、及び他の留意点に関して最適化されたpHで調製され得る。

【0223】

50

吸入器又は吹入器での使用のためのカプセル、プリスター、及びカートリッジは、本明細書で提供される医薬組成物の粉末混合物を含有するよう製剤化されてもよく、この粉末混合物は、乳糖又はデンプンなどの好適な粉末基剤、及び1-ロイシン、マンニトール、又はステアリン酸マグネシウムなどの性能改質剤を含む。乳糖は、無水物又は一水和物の形態であってもよい。他の好適な賦形剤としては、デキストラン、グルコース、マルトース、ソルビトール、キシリトール、フラクトース、スクロース、及びトレハロースが挙げられる。吸入/鼻腔内投与のための本明細書に提供される医薬組成物は、メントール及びレボメントールなどの好適な風味剤、サッカリン又はサッカリンナトリウムなどの甘味剤を更に含んでもよい。

【0224】

吸入による投与については、本発明の方法による使用のための化合物は、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の好適なガスなどの好適な推進剤の使用を伴い、加圧パック又は噴霧器からのエアロゾルスプレー製品として好都合に供給される。加圧エアロゾルの場合、計量された量を送り込むためのバルブを備えることによって投与量単位を決めることができる。吸入器又は吹入器での使用のため、例えばゼラチンのカプセル及びカートリッジは、薬剤と、乳糖又はデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含有するよう製剤化され得る。

【0225】

本明細書で使用するとき、「追加的成分」とは、限定されるものではないが、以下の1つ以上を含む：賦形剤；界面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；造粒及び崩壊剤；結合剤；滑沢剤；甘味剤；風味剤；着色剤；防腐剤；ゼラチンなどの生理学的に分解可能な組成物；水性ビヒクル及び溶媒；油性ビヒクル及び溶剤；懸濁剤、分散又は湿潤剤；乳化剤；粘滑剤；緩衝剤；塩；増粘剤；充填剤；乳化剤；酸化防止剤；抗菌剤；抗真菌剤；安定化剤；及び薬学的に許容可能なポリマー又は疎水性材料。本発明の医薬組成物中に含まれ得る他の「追加的成分」は、当該技術分野で既知であり、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、ゲナロ(Genaro)編集、1985年、「レミントンの薬学科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、Mack出版社(Mack Publishing Co.)、イーストン、ペンシルバニアで記載されている。

【0226】

典型的には、動物、好ましくはヒトに投与され得る本発明の化合物の投与量は、動物の体重のキログラム当たり約 $1.0 \mu\text{g}$ ～約 100g の量の範囲である。投与される正確な投与量は、限定されないが、処置される動物のタイプ及び疾患状態、動物の年齢並びに投与のルートを含む多くの要素に応じて変化するであろう。好ましくは、この化合物の投与量は、動物の体重のキログラム当たり約 1mg ～約 10g で変化するであろう。より好ましくは、投与量は、動物の体重のキログラム当たり約 10mg ～約 1g で変化するであろう。

【0227】

この化合物は、被験体に毎日数回程度投与されてもよく、又はこれは、一日1回、週一回、二週間毎に1回、一ヶ月に1回などのより低い頻度で、若しくは数ヶ月に1回又は更に一年に1回又はそれより少ないなど更に少ない頻度で投与されてもよい。投与の頻度は、当業者には明らかであろうし、限定されるものではないが、処置される疾患のタイプ及び深刻度、並びに動物のタイプ及び年齢などの多くの要素に依存するであろう。

【0228】

本発明はまた、本発明の化合物と、化合物の投与を説明する使用説明書とを備えるキットを含む。別の実施形態では、このキットは、哺乳類に化合物を投与する前に、本発明の化合物を溶解又は懸濁させるために好適な(好ましくは無菌の)溶媒を備える。

【0229】

本明細書で使用するとき、「使用説明書」とは、本明細書に記載された種々の疾患又は

10

20

30

40

50

障害の軽減をもたらすために、キット内の本発明の化合物の有用性を伝えるよう使用され得る刊行物、レコーディング、図表、又は任意の表現の他の媒体を含む。任意選択的に、又はこの代わりに、使用説明書は、疾患又は障害の軽減の1つ以上の方法を記載する場合がある。本発明のキットの使用説明書は、例えば、本発明の同定された化合物を収容する容器に添付されてもよく、又は同定された化合物を収容する容器と併せて出荷されてもよい。或いは、使用説明書は、使用説明書及び化合物がレシピエントと協同的に使用されるとの意図で、容器とは別個に出荷されてもよい。

【0230】

更に説明しなくても、当業者であれば、前述の記載及び下記例示的实施例を用いて、本発明の化合物を製造しかつ利用し、主張された方法を実行することができると思じる。従って、以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を具体的に指摘するものであり、本開示の後段部分を何ら限定するものとして解釈されるものではない。

10

【実施例】

【0231】

材料及び方法

薬剤及び薬品

Ras 阻害剤として既知のS-トランス、トランス-ファルネシルチオサリチル酸 (FTS、サリラシブ) は、コンコルディア (Concordia) 製薬 (フロリダ州フォート・ローダーデール (Fort Lauderdale)) から入手した。4-(4-クロロ-2-メチルフェノキシ)-N-ヒドロキシブタナミド (CMH) (5809354) 及びその不活性類似体 4-(4-クロロ-2-メチルフェノキシ)-N-(3-エトキシプロピル)ブタナミド (CMB) (6094911) は、ケンブリッジ社 (ChemBridge Corporation) (カリフォルニア州サンディエゴ市) から購入した。TMS は、以前記載されたように合成した (キム (Kim) S、コー (Ko) H、パーク (Park) J E、ジュング (Jung) S、リー (Lee) S K、チャン (Chun) Y) 著、「強力かつ選択的なヒトシトクローム P450 1B1 阻害剤としての新規なトランス-スチルベン類似体の設計、合成及び発見 (Design, synthesis, and discovery of novel trans-stilbene analogues as potent and selective human cytochrome P450 1B1 inhibitor)」、*ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J Med Chem)*、2002年、第45巻、p. 160~164)。17-エストラジオールは、ステラロイド社 (Steraloids, Inc.) (ロードアイランド州ニューポート市) から入手した。T-DM1 は、ジェネンテック社 (Genentech)、カリフォルニア州サンフランシスコ市から寄贈された。タモキシフェン及び-トコトリエノールは、シグマ-アルドリッチ社 (Sigma-Aldrich Co.) (ミズーリ州セントルイス市) から購入した。

20

30

【0232】

細胞培養条件

親株 MCF-7 を 5% の FBS を含む IMEM 中で増殖させた。T47D 細胞は、10% の FBS を含む RPMI 160 中で増殖させた。タモキシフェン耐性閉経後細胞は、5% の DCC を含むフェノールフリーの IMEM 中で増殖させて、タモキシフェン (10^{-7} M) で 1 年を超える期間にわたり処置した [5]。長期無エストロゲン細胞は、5% の DCC を含むフェノールフリーの IMEM 中で増殖させた [6]。アロマターゼを過発現する LTEDaro 細胞を、チェン (Chen) 博士 [7] から賜り、10% の DCC、100 mg/L のビルビン酸ナトリウム、2 mM の L-グルタミン、及び 200 mg/L の G418 を補充したフェノール-レッドフリーの MEM 中で増殖させた。

40

【0233】

増殖阻害及び薬剤相互作用アッセイ

細胞を、各ウェル当たり 60,000 細胞の密度で 6 ウェルプレートに播種した。2 日後に、細胞を、図の説明中に記載されたように三通りで処置した。処置の終わりに、細胞

50

を生理食塩水で2回濯いだ。1 mLのHEPES - MgCl₂溶液(0.01モル/LのHEPESと1.5ミリモル/LのMgCl₂)及び0.1 mLのZAP溶液[3%の氷酢酸(v/v)中0.13モル/Lのエチルヘキサデシルジメチルアンモニウムブロマイドの連続的追加]によって核を調製し、コールターカウンター(ベックマンコールター社(Beckman Coulter, Inc.)、カリフォルニア州フラートン市)を使用して計測した。用量反応曲線を三通りの試料から取得し、半数有効量(D_m)を、CompuSynソフトウェアを使用して算定した[8、9]。併用係数及び平均及び標準偏差による値を、バイオソフト(BioSoft)(ケンブリッジ市、英国)のCalcuSynコンピュータソフトウェアを使ったモンテカルロ・シミュレーションを使用して算定した[10]。

10

【0234】

免疫沈降法

100 mmの培養皿内で増殖された細胞を、冷PBSで洗浄し、1 mLの細胞溶解緩衝液(50 mMのTris-HCl、150 mMのNaCl、5 mMのEDTA、25 mMのNaF、2 mMのNaVO₄、5%のグリセロール、1%のTriton X-100、10 µg/mLのロイペクチン、アプロチニン、及びペプスタチン)で抽出した。試料を氷上で30分間インキュベートし、超音波処理し、4において14,000 rpmで10分間遠心分離した。0.5 mgの総タンパク質を含有する上澄み液を、40 µLのタンパク質Gビーズ(インビトロゲン(Invitrogen))の添加の前に、標的タンパク質に対する抗体と共に、4で一晩インキュベートし、4で2時間インキュベーションを続けた。免疫複合体を有するタンパク質Gビーズを、14,000 rpmで20秒間遠心分離した。上澄み液を注意深く除去した。ビーズを1 mLの緩衝液II(20 mMのMOPS、2 mMのEGTA、5 mMのEDTA、25 mMのNaF、40 mMのグリセロリン酸、10 mMのピロリン酸ナトリウム、2 mMのNaVO₄、0.5%のTriton X-100、1 mMのPMSF、10 µg/mLのロイペクチン、アプロチニン、及びペプスタチン)で2回洗浄し、次いで50 µLの2×レムリ(Laemmli)の緩衝液中で煮沸した。試料を10%のSDSポリアクリルアミドゲル中で電気泳動にかけて、その後イムノプロットングした。

20

【0235】

併用係数及びアイソボログラム分析

薬剤間の相互作用の性質を、チョウ-タラレイ(Chou and Talalay)の併用係数方法[8、9]によって評価した。この方法は、半有効原理:

30

$$f_a / f_u (D / D_m)^m \quad (1)$$

に基づいており、ここで、Dは用量であり、D_mは50%の増殖阻害を生じる用量であり、f_aは用量Dによって影響を受けた細胞フラクションであり、及びf_uは影響を受けないフラクションであり、並びにmは半有効量曲線のシグモイド曲線性を定義する計数である。この関係及び質量作用の法則が複数の阻害剤の相互作用に関する一般式に導く:

$$(f_a)_{A, B} / (f_u)_{A, B} = (f_a)_A / (f_u)_B + (f_a)_B / (f_u)_B + (f_a)_A (f_a)_B / (f_u)_A (f_u)_B \quad (2)$$

ここで、(f_a)_A、(f_u)_B及び(f_a)_{A, B}は、薬剤AおよびB単独で、並びにAおよびBの組み合わせで、影響を受けたフラクションである。式1及び2から、併用係数(CI)は;

40

$$CI = (D)_A / (D_x)_A + (D)_B / (D_x)_B + (D)_A (D)_B / (D_x)_A (D_x)_B \quad (3)$$

のように誘導され得る。

ここで、Dは、x%の増殖阻害を生じる用量であり、相互排他的薬剤については = 0 であり、相互非排他的薬剤については = 1 である。CalcuSynソフトウェアによって計算され画定された相乗性はCI < 1 であり、相加性はCI = 1 であり、並びに拮抗性はCI > 1 である[10]。

【0236】

50

統計的分析

併用係数の平均及び標準偏差値を、CalcuSynプログラム内のモンテカルロ・アルゴリズムを使用して算定した[10]。

【0237】

本発明の実施形態

1. 癌を治療する方法であって、癌に冒された患者に、モノクローナル抗体部分とそれに結合した第1の前アポトーシス薬部分とを含む免疫抱合体の有効量を投与することと、第2の前アポトーシス薬の有効量を同患者に投与することと、を含むことを特徴とする方法。

【0238】

2. 実施形態1に記載の方法において、第1の前アポトーシス薬部分が、モノクローナル抗体部分に共有結合することを特徴とする方法。

3. 実施形態1又は2に記載の方法において、癌が乳癌であることを特徴とする方法。

【0239】

4. 実施形態3に記載の方法において、乳癌が、アロマターゼ耐性乳癌であることを特徴とする方法。

5. 実施形態3に記載の方法において、乳癌が、タモキシフェン耐性乳癌であることを特徴とする方法。

【0240】

6. 実施形態3に記載の方法において、乳癌が、ER+ホルモン不応性乳癌であることを特徴とする方法。

7. 実施形態3に記載の方法において、乳癌が、HER2陽性乳癌であることを特徴とする方法。

【0241】

8. 実施形態5に記載の方法において、乳癌が、HER2陽性乳癌であることを特徴とする方法。

9. 実施形態3に記載の方法において、乳癌が、その中でHER2発現がアップレギュレートされる癌細胞を含むことを特徴とする方法。

【0242】

10. 実施形態1～9に記載のいずれか1つの方法において、免疫抱合体が、HER2に結合することを特徴とする方法。

11. 実施形態9に記載の方法において、モノクローナル抗体部分が、トラスツズマブであることを特徴とする方法。

【0243】

12. 実施形態1～11のいずれか1つに記載の方法において、第1の前アポトーシス薬部分が、微小管脱重合化剤であることを特徴とする方法。

13. 実施形態12に記載の方法において、第1の前アポトーシス薬部分が、マイタンシノイド又はオーリスタチンであることを特徴とする方法。

【0244】

14. 実施形態1～12のいずれか1つに記載の方法において、免疫抱合体が、リンカーを介してマイタンシノイド前アポトーシス薬部分に共有結合したトラスツズマブであることを特徴とする方法。

【0245】

15. 実施例14に記載の方法において、免疫抱合体が、T-DM1であることを特徴とする方法。

16. 実施形態1～15のいずれか1つに記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、第1の前アポトーシス薬部分によって及ぼされる細胞障害性の分子機構以外の分子機構によって、細胞毒性を及ぼすことを特徴とする方法。

【0246】

17. 実施形態1～16のいずれか1つに記載の方法において、免疫抱合体及び第2の

10

20

30

40

50

前アポトーシス薬を投与することが、相乗効果を有することを特徴とする方法。

18．実施例16に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、外因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤であることを特徴とする方法。

【0247】

19．実施形態18に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、Fas経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

20．実施形態18に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、c-FLIP経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

【0248】

21．実施形態18に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、CMH、E2、又は - トコトリエノールであることを特徴とする方法。

22．実施形態16に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、内因性経路を介してアポトーシスを誘導する薬剤であることを特徴とする方法。

【0249】

23．実施形態22に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、カスパーゼ非依存的経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

24．実施形態22に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、カスパーゼ依存的経路を介してアポトーシスを誘導することを特徴とする方法。

【0250】

25．実施形態22に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、E2、FTS、又は - トコトリエノールであることを特徴とする方法。

26．実施形態1～25のいずれか1つに記載の方法において、第2の前アポトーシス抗癌剤が、FTS、CMH、E2、TMS、 - トコトリエノール、又はクルクミンであることを特徴とする方法。

【0251】

27．実施形態1～26のいずれか1つに記載の方法において、免疫抱合体がT-DM1であり、第2の前アポトーシス抗癌剤が、FTS、CMH、E2、TMS、 - トコトリエノール、又はクルクミンであることを特徴とする方法。

【0252】

28．実施形態27に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、E2、FTS、 - トコトリエノール、又はTMSであることを特徴とする方法。

29．実施形態27に記載の方法において、第2の前アポトーシス薬が、FTSであることを特徴とする方法。

【0253】

30．実施形態27に記載の方法において、免疫抱合体及び第2の前アポトーシス薬を投与することが、相乗効果を有することを特徴とする方法。

31．実施形態1～30のいずれか1つに記載の方法において、免疫抱合体の投与後に、リンカー部分が、HER-2耐性乳癌細胞内においてインビボで切断されることを特徴とする方法。

【0254】

32．アロマターゼ耐性乳癌に冒された患者におけるアロマターゼ耐性乳癌の治療を含む実施形態1に記載の方法において、FTS、CMH、E2、TMS、 - トコトリエノール、又はクルクミン、若しくはこれらの任意の組み合わせの有効量と併せてT-DM1の有効量を患者に投与することを含むことを特徴とする方法。

【0255】

33．実施形態1～32のいずれか1つに記載の方法において、この方法が、アジュバント療法であることを特徴とする方法。

34．実施形態1～32のいずれか1つに記載の方法において、この方法が、第1選択療法であることを特徴とする方法。

【0256】

10

20

30

40

50

35. 実施形態1～32のいずれか1つに記載の方法において、この方法が、第2選択療法であることを特徴とする方法。

36. 実施形態1～35のいずれか1つに記載の方法において、免疫抱合体と第2の前アポトーシス薬が、組み合わせ製剤として又は交互に投与されることを特徴とする方法。

【0257】

37. 実施形態1～36のいずれか1つに記載の方法において、患者に追加的抗癌剤を投与する工程であって、前記追加的抗癌剤が、任意選択的に第1の前アポトーシス抗癌剤部分の分子機構とは異なり、かつ第2の前アポトーシス抗癌剤の分子機構とは異なる分子機構を介して効果を及ぼす前記工程、或いはX線、 γ 線、放射核種の放射、又は重原子の粒子、若しくはこれらの任意の組み合わせを含むイオン化放射線の患者への投与工程、を更に含むことを特徴とする方法。

10

【0258】

38. 治療用組成物であって、(a)第1の前アポトーシス薬部分に結合したモノクローナル抗体部分を含む免疫抱合体と、(b)第2の前アポトーシス薬を含むことを特徴とする組成物。

【0259】

39. 実施形態38に記載の組成物において、共有結合免疫抱合体が、T-DM1であることを特徴とする組成物。

40. 実施形態38に記載の組成物において、第2の前アポトーシス抗癌剤が、FTS、CMH、E2、TMS、 α -トコトリエノール、又はクルクミンであることを特徴とする組成物。

20

【0260】

本明細書で引用されたそれぞれの及び全ての特許、特許出願、公開物の開示は、その全体が、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

表題は参照のために並びに特定のセクションを確認する際に補助するために、本明細書に含まれる。これら表題は、その中で記載される概念の範囲を限定するよう意図されるものではなく、これら概念は、明細書の全体を通して他のセクションにおける適応性を有し得る。

【0261】

本発明が特定の実施形態を参照して開示されてきたが、本発明の真の精神及び範囲から逸脱することなく、本発明の他の実施形態及び変種が当業者によって考案され得ることは明白である。

30

【0262】

【表 3】

参考文献一覽

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010, 60: 277-300.
2. Malvezzi M, Arfe A, Bertuccio P, Levi F, La VC, Negri E: European cancer mortality predictions for the year 2011. *Ann Oncol* 2011.
3. Musgrove EA, Sutherland RL: Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2009, 9: 631-643. 10
4. Kim S, Ko H, Park JE, Jung S, Lee SK, Chun YJ (2002) Design, synthesis, and discovery of novel trans-stilbene analogues as potent and selective human cytochrome P450 1B1 inhibitors. *J Med Chem* 45:160-164
5. Fan P, Yue W, Wang JP, Aiyar S, Li Y, Kim TH, Santen RJ (2009) Mechanisms of resistance to structurally diverse antiestrogens differ under premenopausal and postmenopausal conditions: evidence from in vitro breast cancer cell models. *Endocrinology* 150:2036-2045 20
6. Jeng MH, Shupnik MA, Bender TP, Westin EH, Bandyopadhyay D, Kumar R, Masamura S, Santen RJ (1998) Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology* 139:4164-4174
7. Chen S, Masri S, Hong Y, Wang X, Phung S, Yuan YC, Wu X (2007) New experimental models for aromatase inhibitor resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 106:8-15 30
8. Chou TC (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58:621-681
9. Chou TC (2008) Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leuk Lymphoma* 49:2059-2080
10. Chang TT, Chou TC (2000) Rational approach to the clinical protocol design for drug combinations: a review. *Acta Paediatr Taiwan* 41:294-302 40
11. Blum R, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, Kloog Y (2006) Suppression of survivin expression in glioblastoma cells by the Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid promotes caspase-dependent apoptosis. *Mol Cancer Ther* 5:2337-2347

12. Charette N, De SC, Lannoy V, Horsmans Y, Leclercq I, Starkel P (2010) Salirasib inhibits the growth of hepatocarcinoma cell lines in vitro and tumor growth in vivo through ras and mTOR inhibition. *Mol Cancer* 9:256
13. Santen RJ, Lynch AR, Neal LR, McPherson RA, Yue W (2006) Farnesylthiosalicylic acid: inhibition of proliferation and enhancement of apoptosis of hormone-dependent breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 17:33-40
14. Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, Huang S, Murphy MP, Safa AR (2010) 4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-N-hydroxybutanamide (CMH) targets mRNA of the c-FLIP variants and induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 342:133-142 10
15. Wood TE, Dalili S, Simpson CD, Sukhai MA, Hurren R, Anyiwe K, Mao X, Suarez SF, Gronda M, Eberhard Y, MacLean N, Ketela T, Reed JC, Moffat J, Minden MD, Batey RA, Schimmer AD (2010) Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands. *Mol Cancer Ther* 9:246-256 20
16. Aiyar SE, Park H, Aldo PB, Mor G, Gildea JJ, Miller AL, Thompson EB, Castle JD, Kim S, Santen RJ (2010) TMS, a chemically modified herbal derivative of resveratrol, induces cell death by targeting Bax. *Breast Cancer Res Treat* 124:265-277
17. Park H, Aiyar SE, Fan P, Wang J, Yue W, Okouneva T, Cox C, Jordan MA, Demers L, Cho H, Kim S, Song RX, Santen RJ (2007) Effects of tetramethoxystilbene on hormone-resistant breast cancer cells: biological and biochemical mechanisms of action. *Cancer Res* 67:5717-5726 30
18. Lewis JS, Meeke K, Osipo C, Ross EA, Kidawi N, Li T, Bell E, Chandel NS, Jordan VC (2005) Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J Natl Cancer Inst* 97:1746-1759
19. Song RX, Mor G, Naftolin F, McPherson RA, Song J, Zhang Z, Yue W, Wang J, Santen RJ (2001) Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17beta-estradiol. *J Natl Cancer Inst* 93:1714-1723 40
20. Jordan VC, Lewis-Wambi JS, Patel RR, Kim H, Ariazi EA (2009) New hypotheses and opportunities in endocrine therapy: amplification of oestrogen-induced apoptosis. *Breast* 18 Suppl 3:S10-S17
21. Santen RJ, Allred DC (2007) The estrogen paradox. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:496-497

22. Song RX, Santen RJ (2003) Apoptotic action of estrogen. *Apoptosis* 8:55-60
23. Lewis JS, Meeke K, Osipo C, Ross EA, Kidawi N, Li T, Bell E, Chandel NS, Jordan VC (2007) Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J Natl Cancer Inst* 97:1746-1759
24. Shim WS, Conaway M, Masamura S, Yue W, Wang JP, Kmar R, Santen RJ (2000) Estradiol hypersensitivity and mitogen-activated protein kinase expression in long-term estrogen deprived human breast cancer cells in vivo. *Endocrinology* 141:396-405 10
25. Ingle JN, Ahmann DL, Green SJ, Edmonson JH, Bisel HF, Kvols LK, Nichols WC, Creagan ET, Hahn RG, Rubin J, Frytak S (1981) Randomized clinical trial of diethylstilbestrol versus tamoxifen in postmenopausal women with advanced breast cancer. *N Engl J Med* 304:16-21
26. Oroudjev E, Lopus M, Wilson L, Audette C, Provenzano C, Erickson H, Kovtun Y, Chari R, Jordan MA (2010) Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability. *Mol Cancer Ther* 9:2700-2713 20
27. Esteve MA, Carre M, Braguer D (2007) Microtubules in apoptosis induction: are they necessary? *Curr Cancer Drug Targets* 7:713-729
28. Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4:253-265 30
29. Jumbe NL, Xin Y, Leipold DD, Crocker L, Dugger D, Mai E, Sliwkowski MX, Fielder PJ, Tibbitts J (2010) Modeling the efficacy of trastuzumab-DM1, an antibody drug conjugate, in mice. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 37:221-242
30. Burris HA, III, Rugo HS, Vukelja SJ, Vogel CL, Borson RA, Limentani S, Tan-Chiu E, Krop IE, Michaelson RA, Girish S, Amler L, Zheng M, Chu YW, Klencke B, O'Shaughnessy JA (2011) Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. *J Clin Oncol* 29:398-405 40
31. Sabnis G, Brodie A (2010) Understanding resistance to endocrine agents: molecular mechanisms and potential for intervention. *Clin Breast Cancer* 10:E6-E15

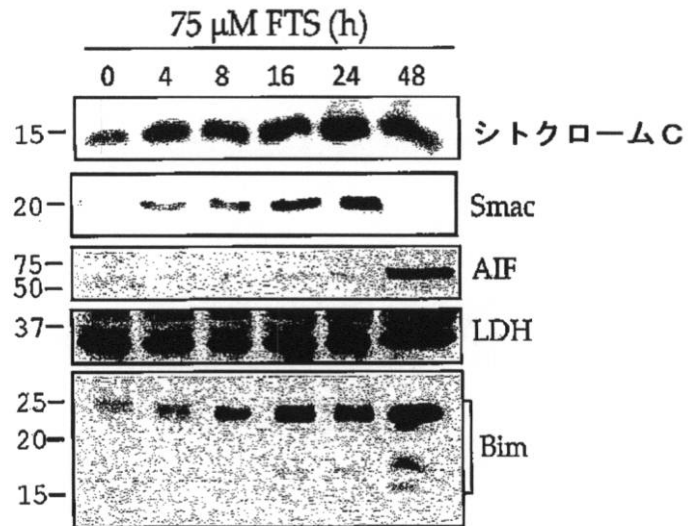
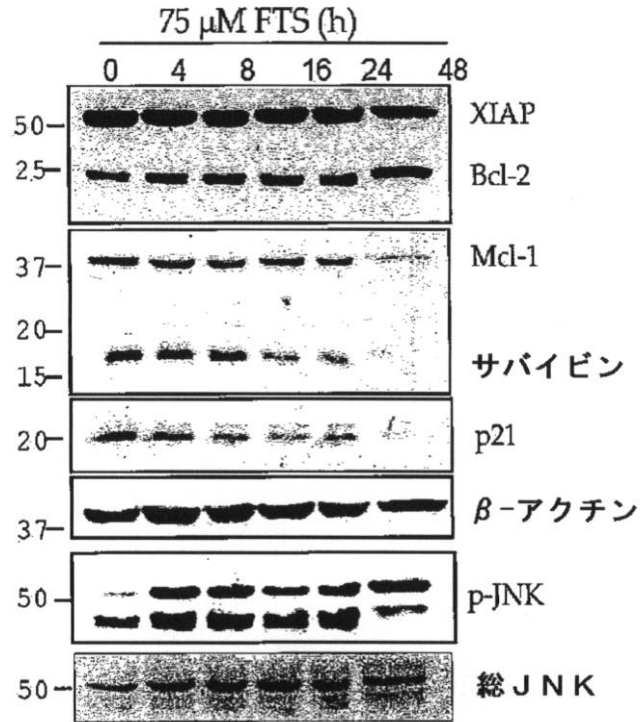
32. Sabnis G, Brodie A (2010) Adaptive changes results in activation of alternate signaling pathways and resistance to aromatase inhibitor resistance. *Mol Cell Endocrinol*

33. Flageng MH, Moi LL, Dixon JM, Geisler J, Lien EA, Miller WR, Lonning PE, Mellgren G (2009) Nuclear receptor co-activators and HER2/neu are upregulated in breast cancer patients during neo-adjuvant treatment with aromatase inhibitors. *Br J Cancer* 101:1253-1260

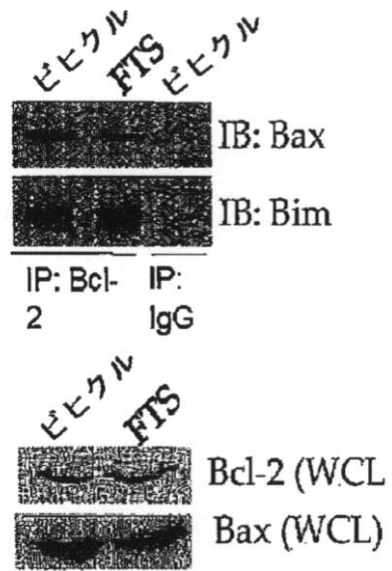
10

34. Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27-55

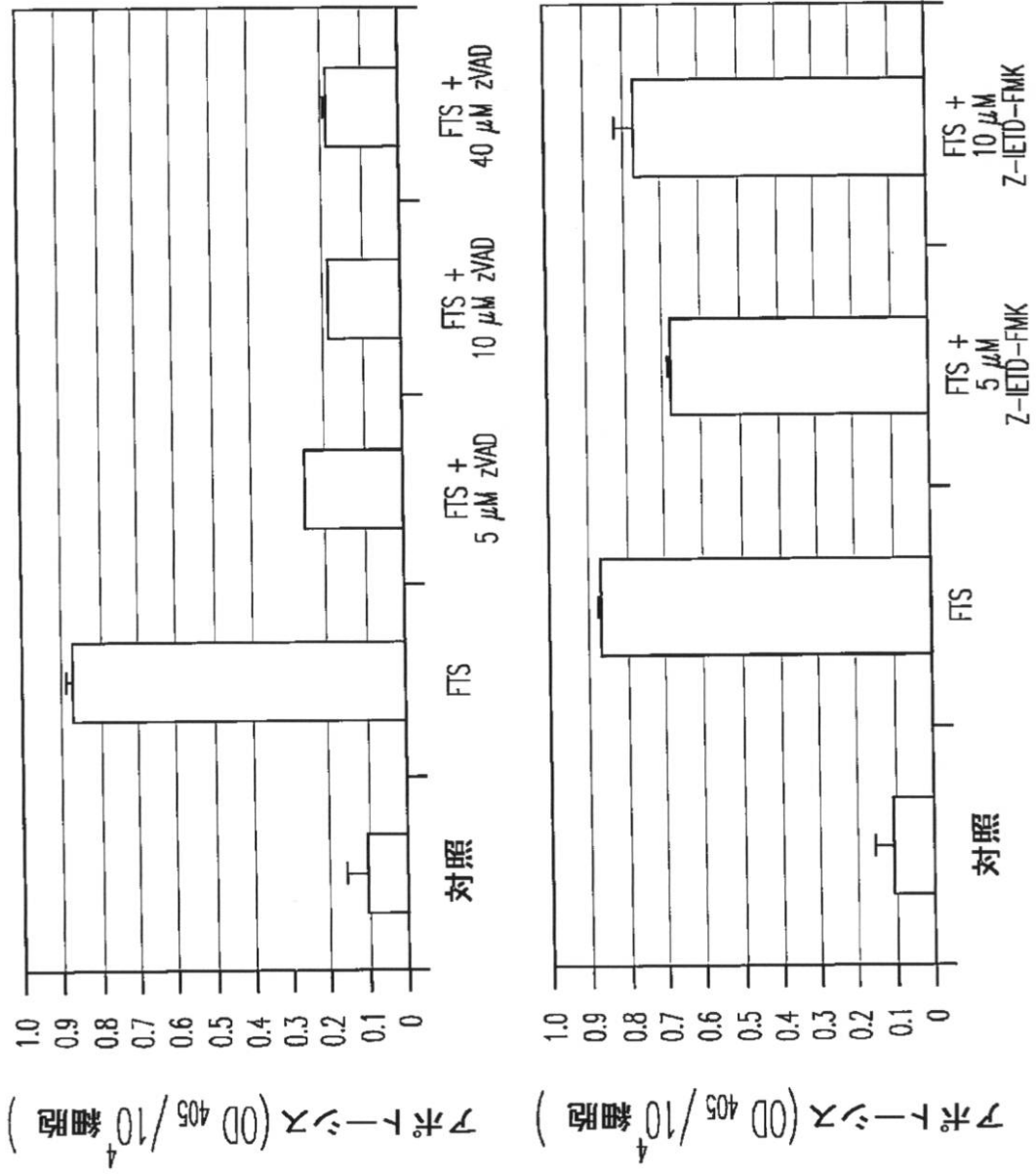
【 図 1 A 】



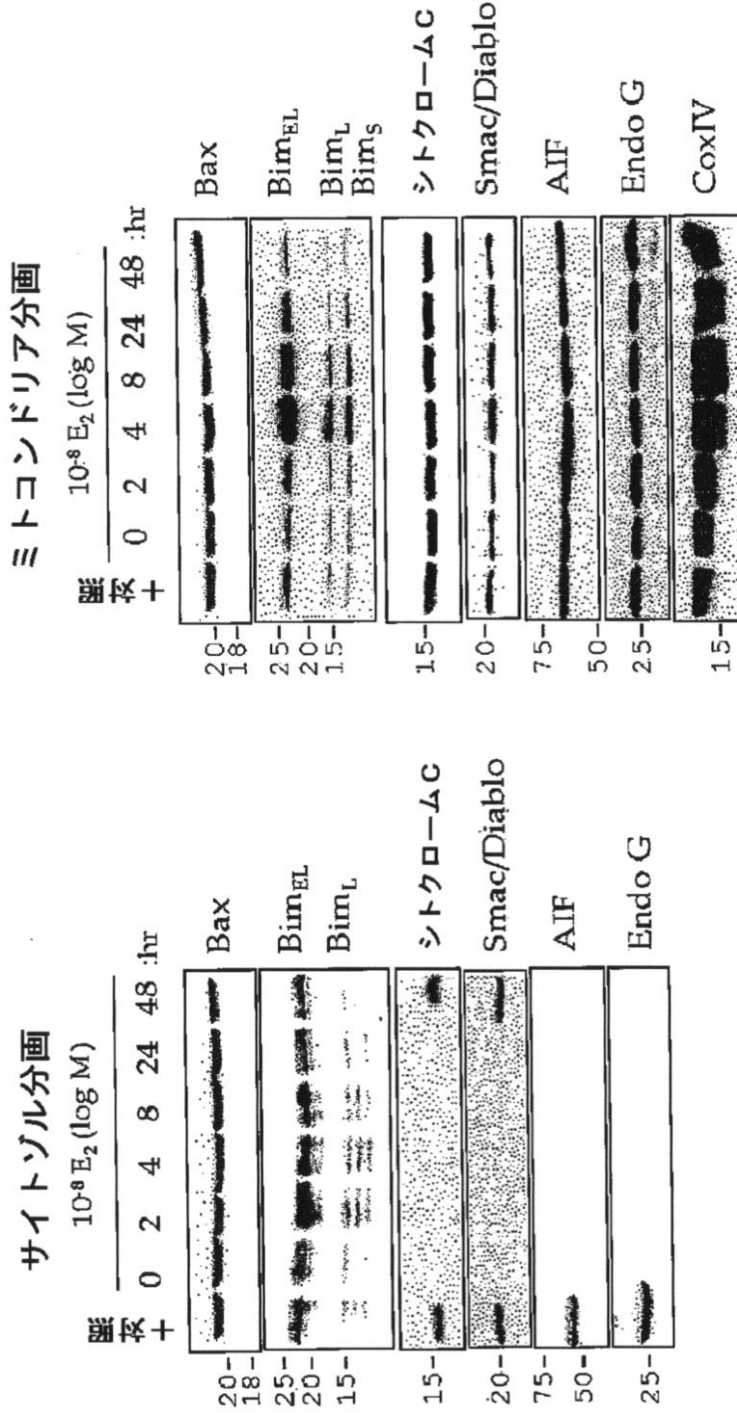
【 図 1 B 】



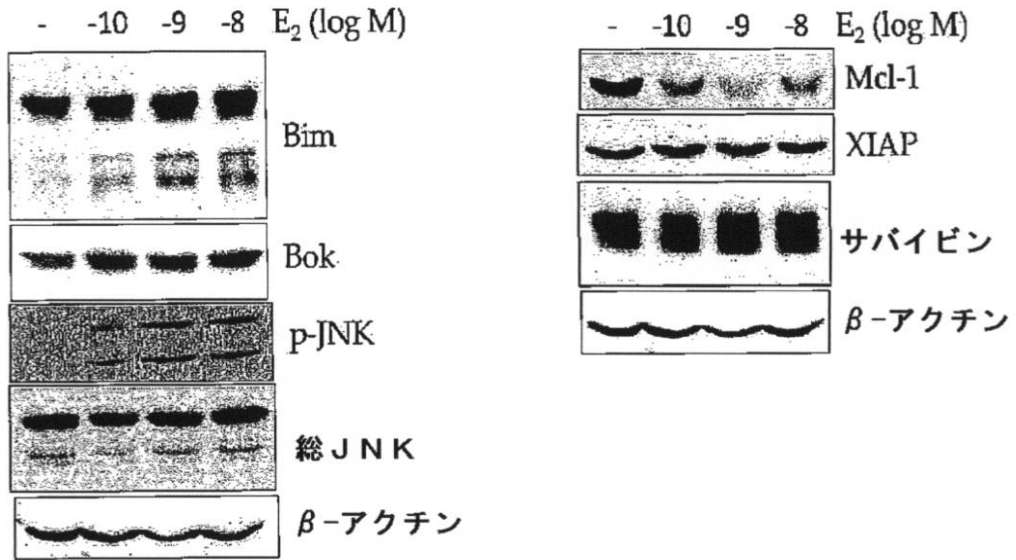
【図1C】



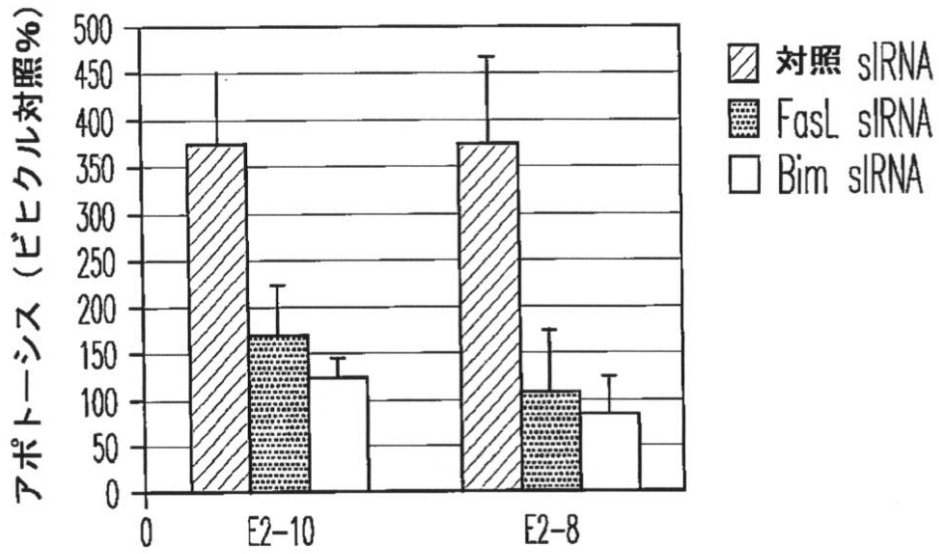
【 図 1 D 】



【 図 1 E 】

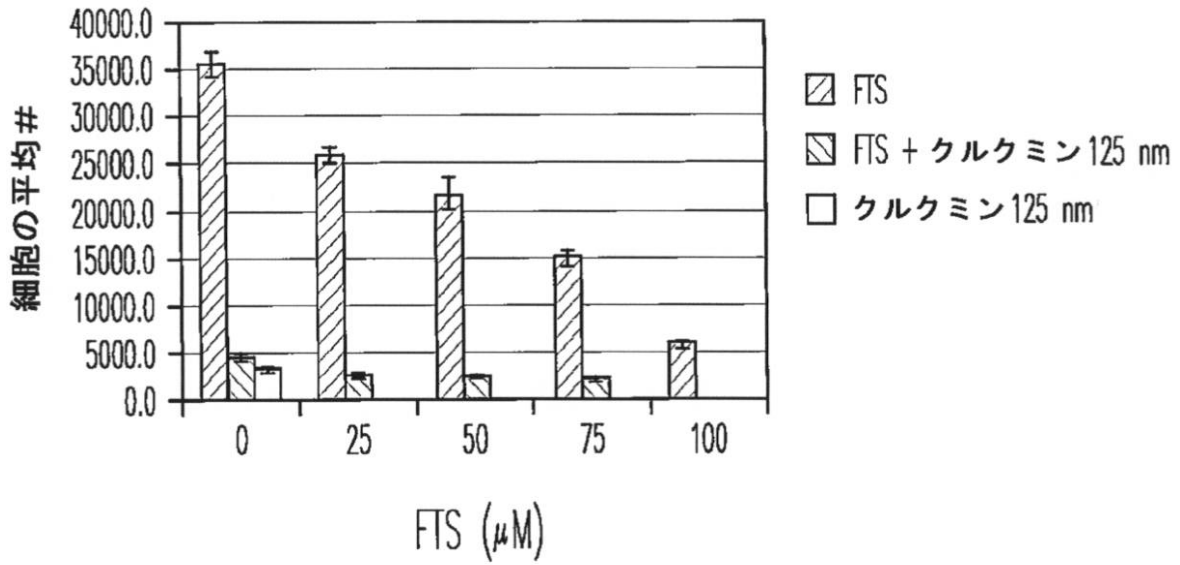


【 図 1 F 】



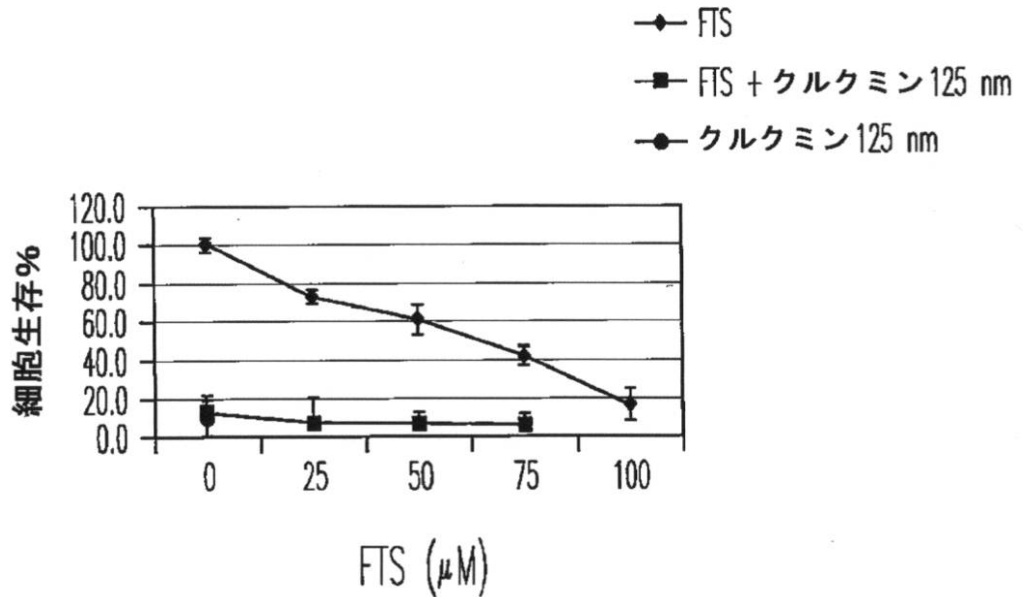
【図 2 A】

示されたように5日間処置されたMCF-7細胞

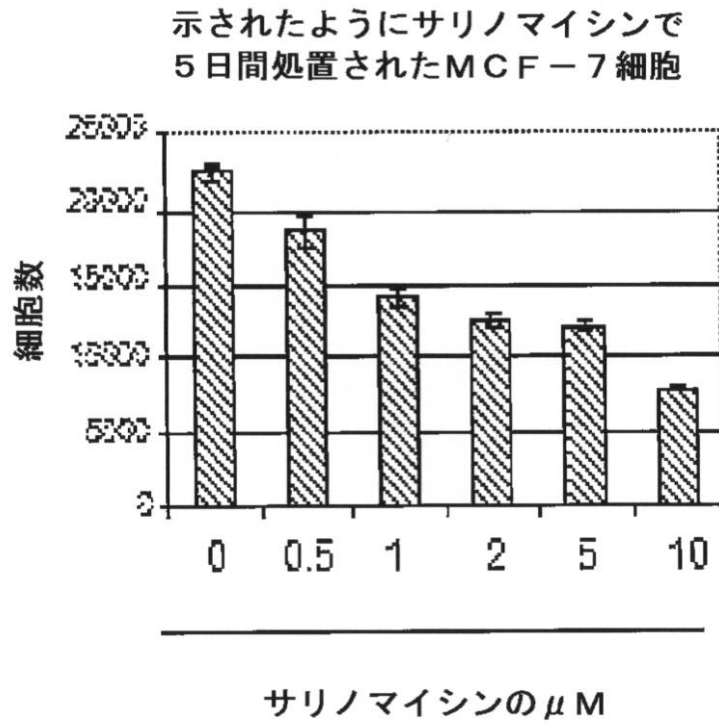


【図 2 B】

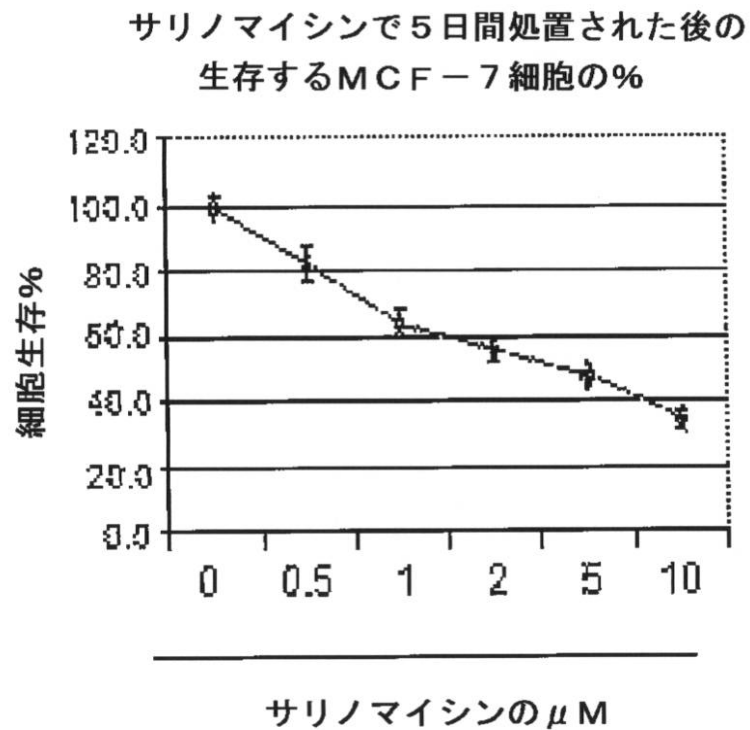
示されたように5日間処置されたMCF-7細胞



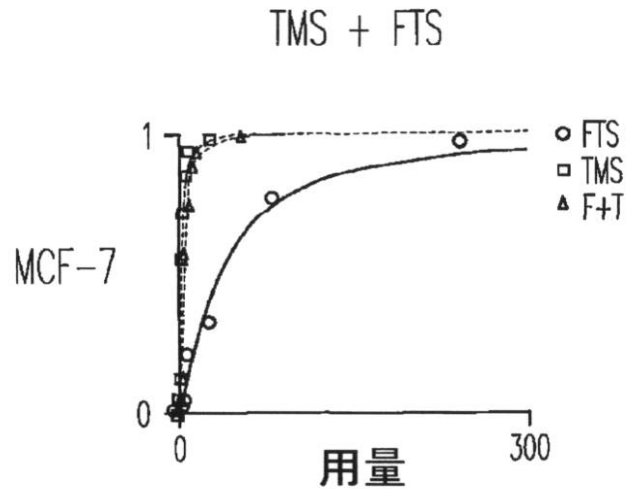
【図3A】



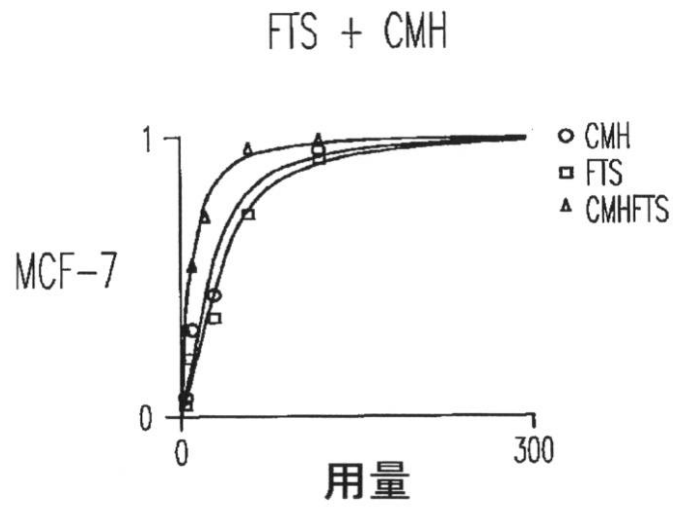
【図3B】



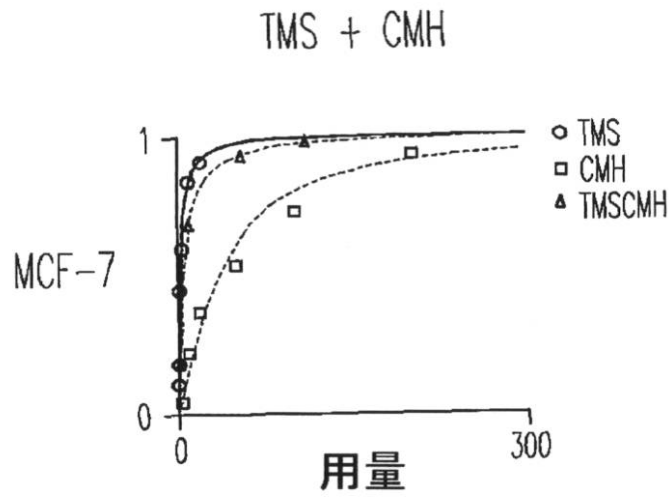
【 図 4 A 】



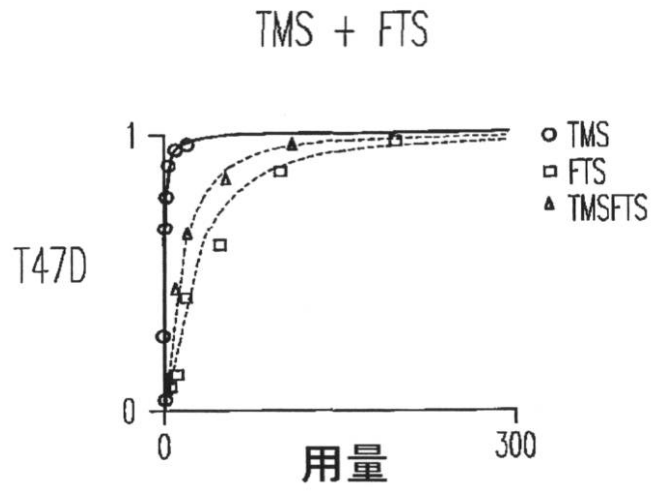
【 図 4 B 】



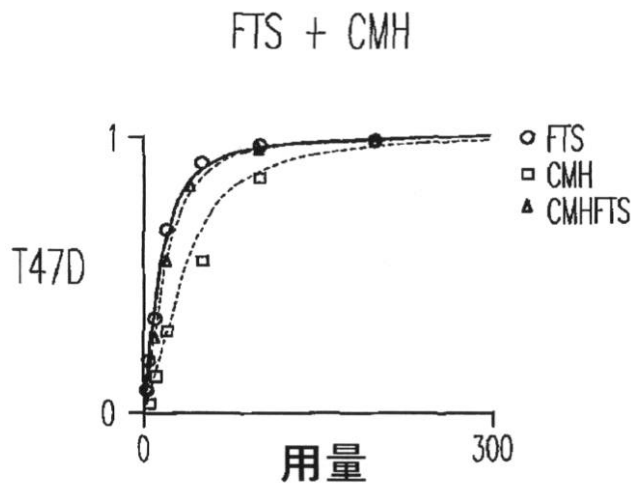
【 図 4 C 】



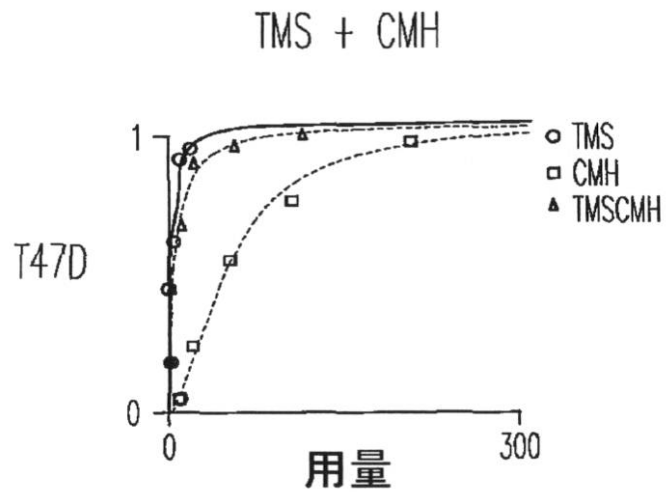
【 図 4 D 】



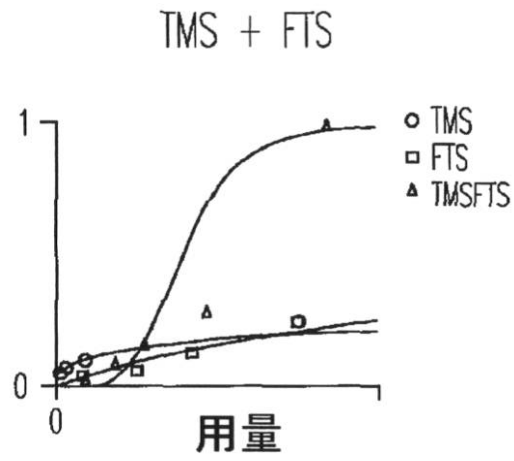
【 図 4 E 】



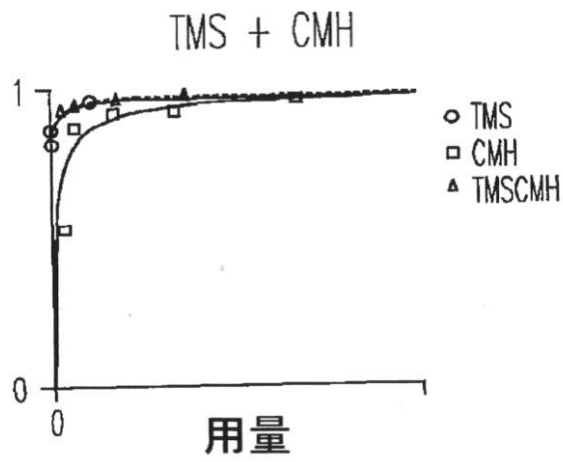
【 図 4 F 】



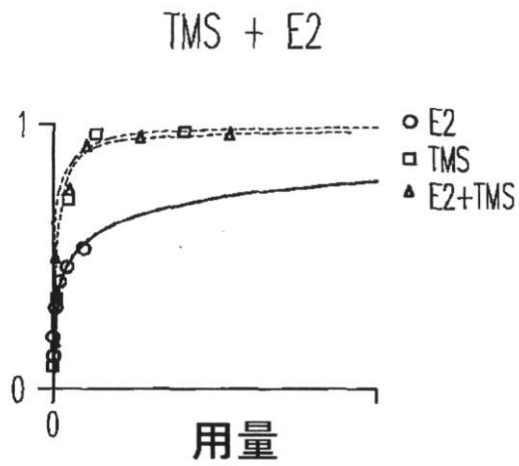
【 図 5 A 】



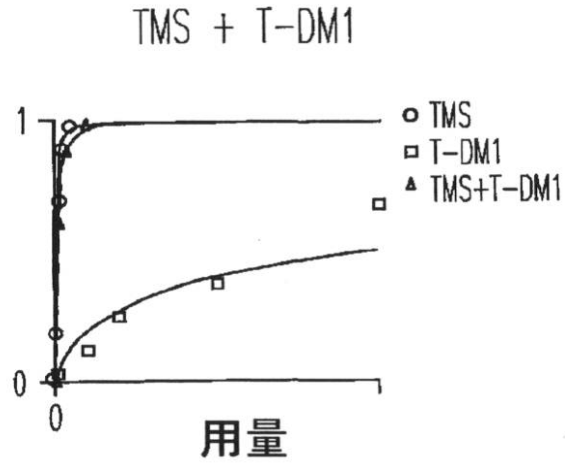
【 図 5 B 】



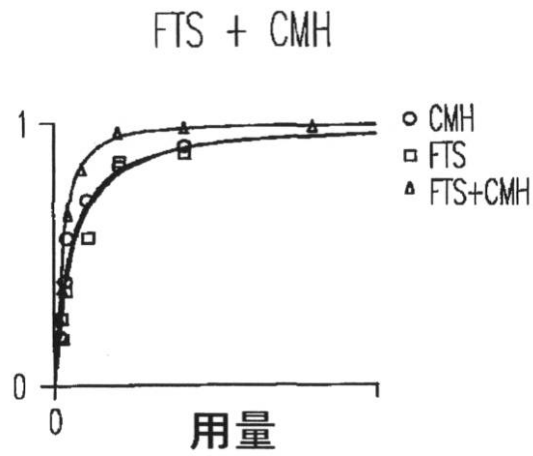
【 図 5 C 】



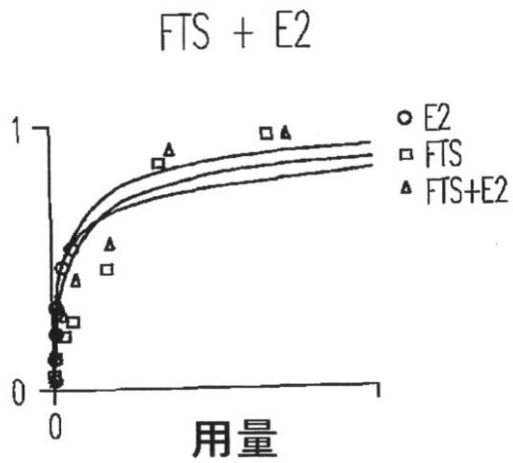
【 図 5 D 】



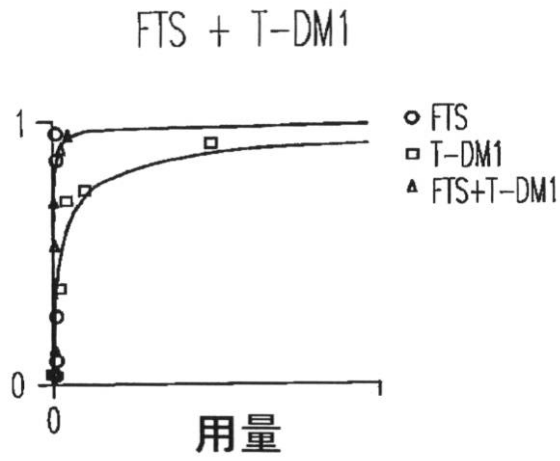
【 図 5 E 】



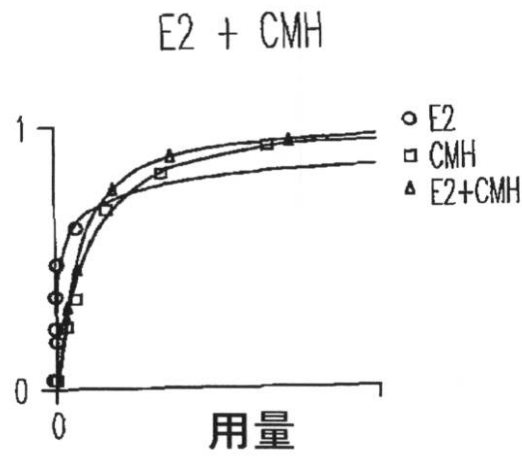
【 図 5 F 】



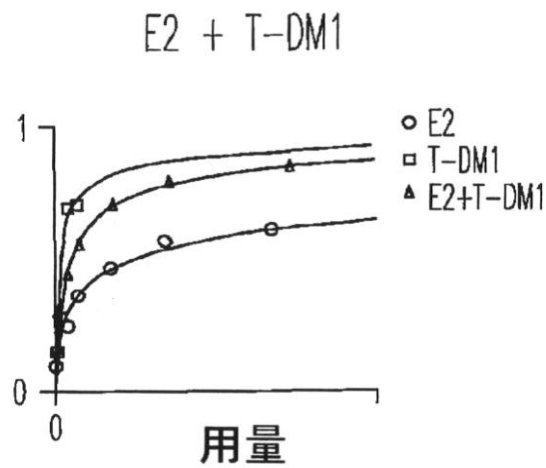
【 図 5 G 】



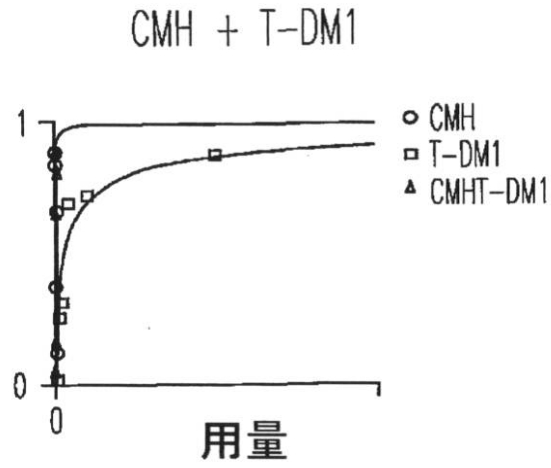
【 図 5 H 】



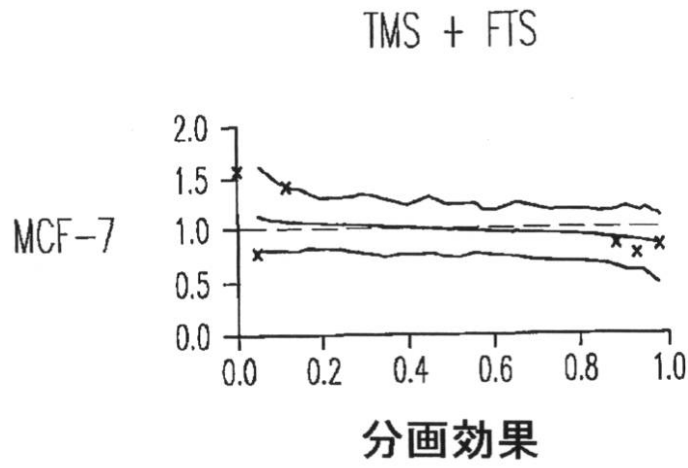
【 図 5 I 】



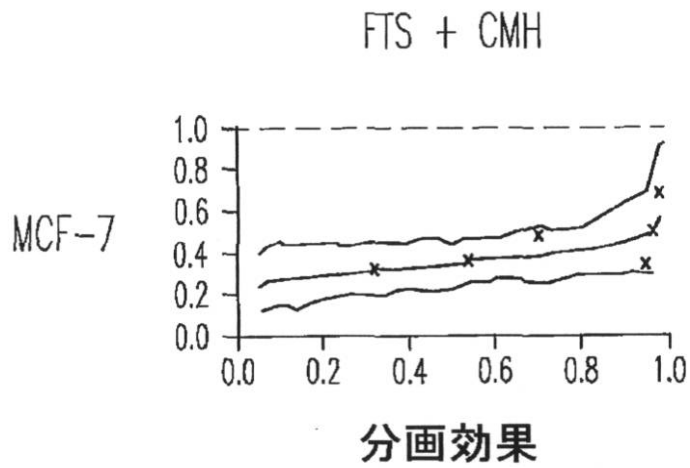
【 図 5 J 】



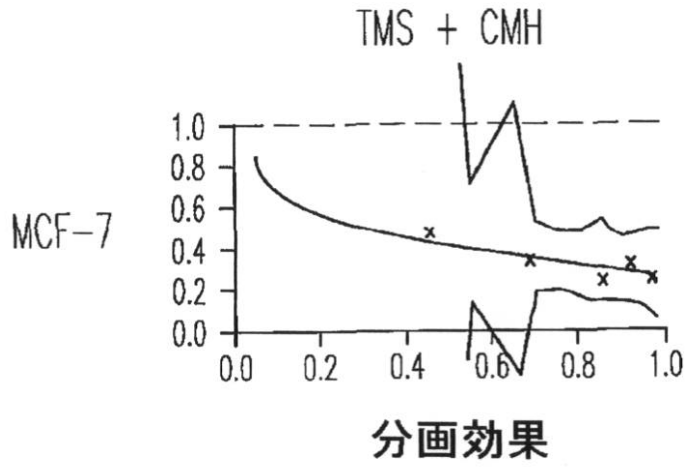
【 図 6 A 】



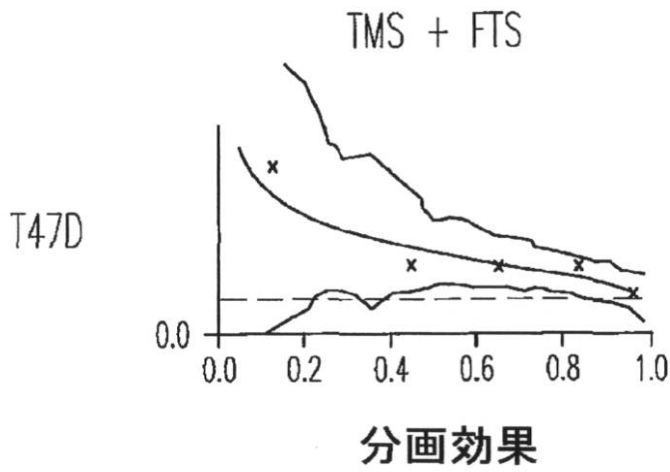
【 図 6 B 】



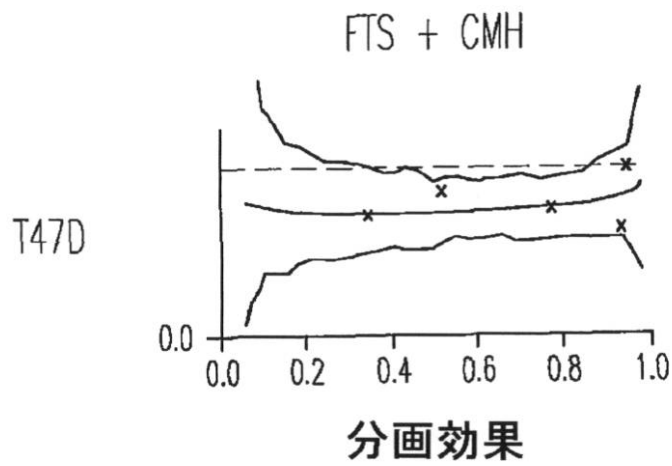
【 図 6 C 】



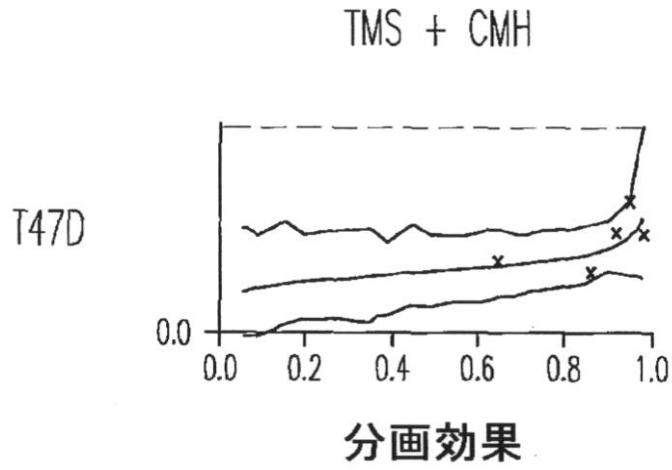
【 図 6 D 】



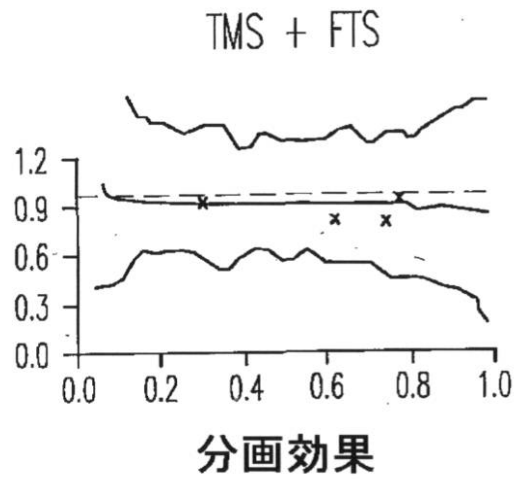
【 図 6 E 】



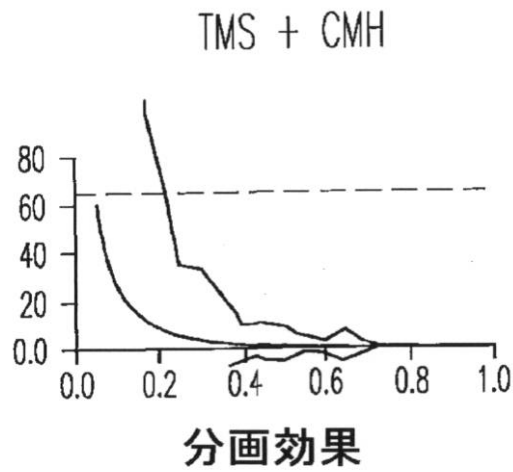
【 図 6 F 】



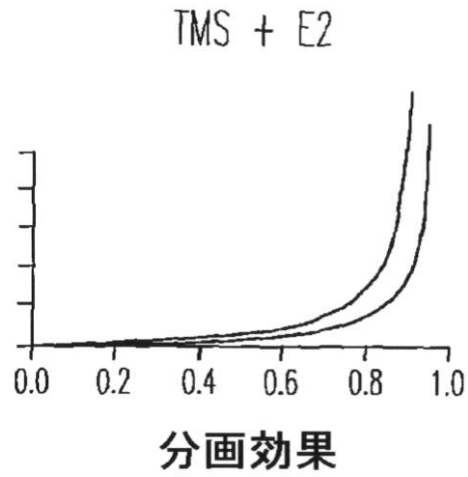
【 図 7 A A 】



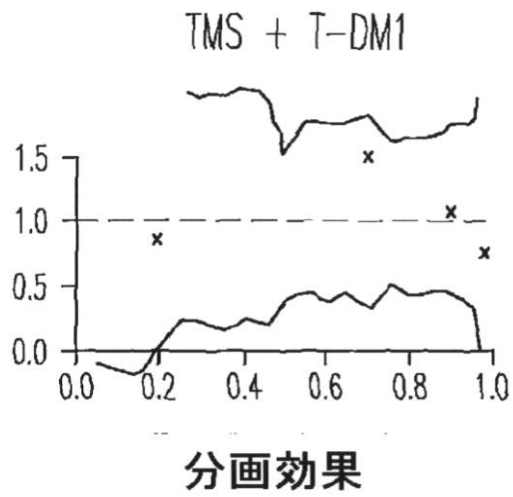
【 図 7 A B 】



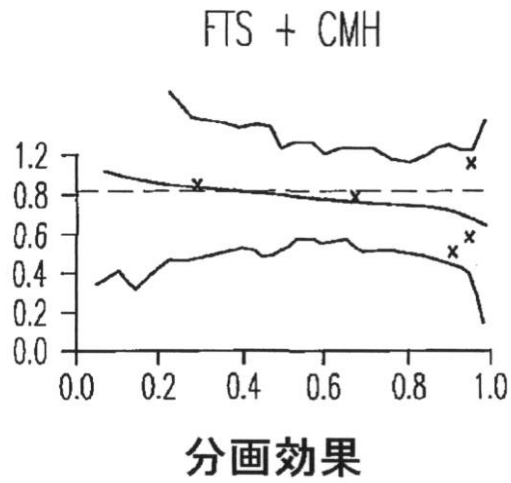
【図7AC】



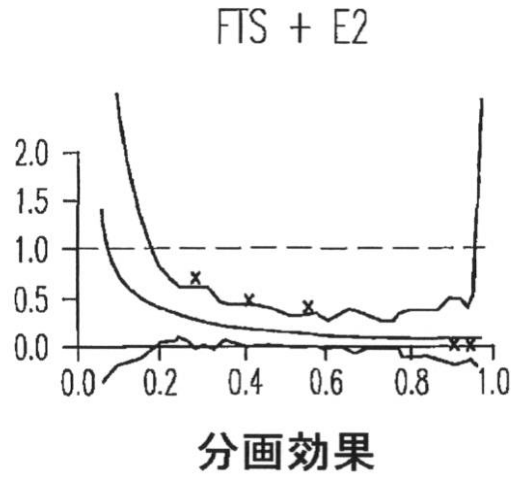
【図7AD】



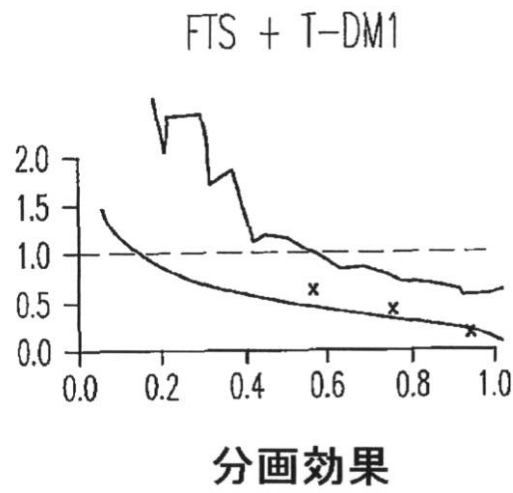
【図7AE】



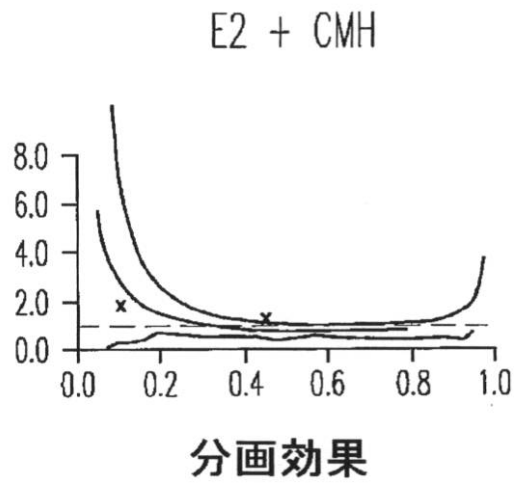
【図7AF】



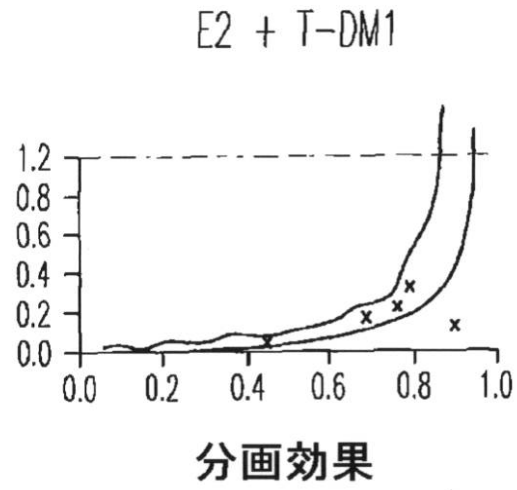
【図7AG】



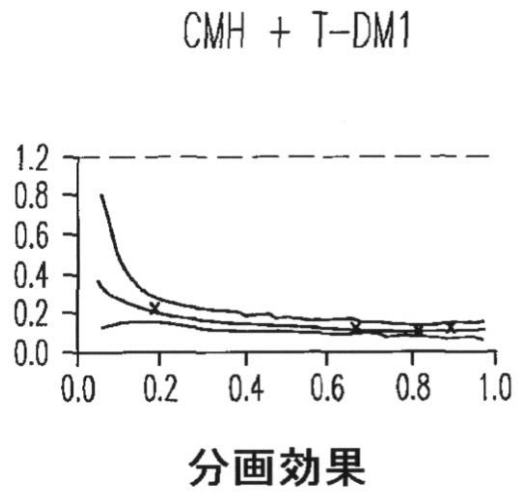
【図7AH1】



【 図 7 H 2 】

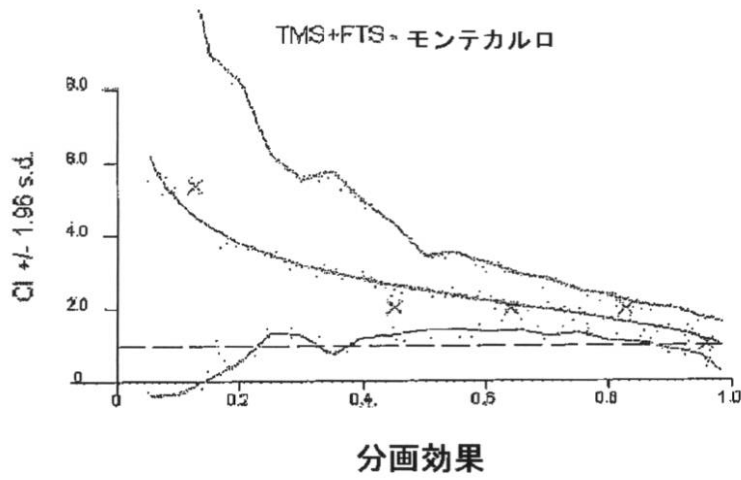


【 図 7 A I 】



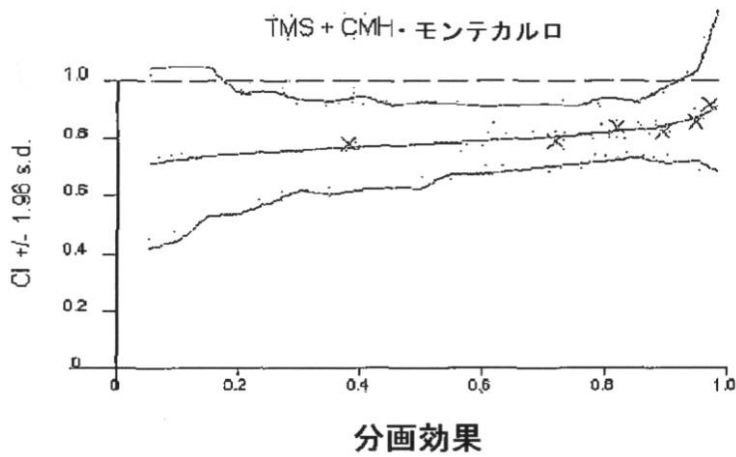
【 図 7 B J 】

j. TMS + FTS



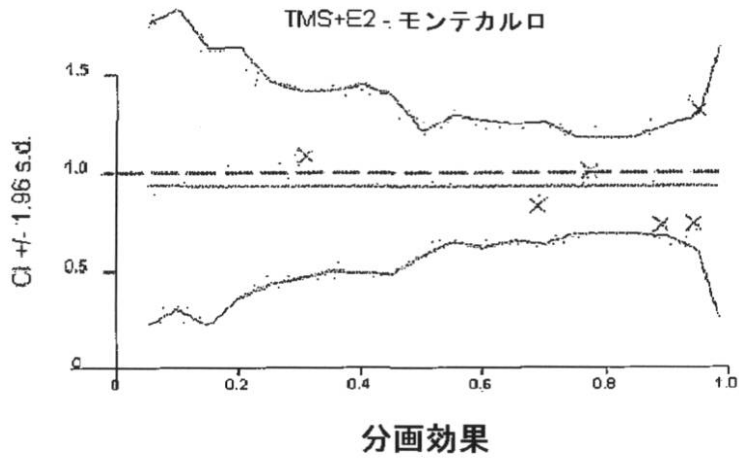
【 図 7 B K 】

k. TMS + CMH



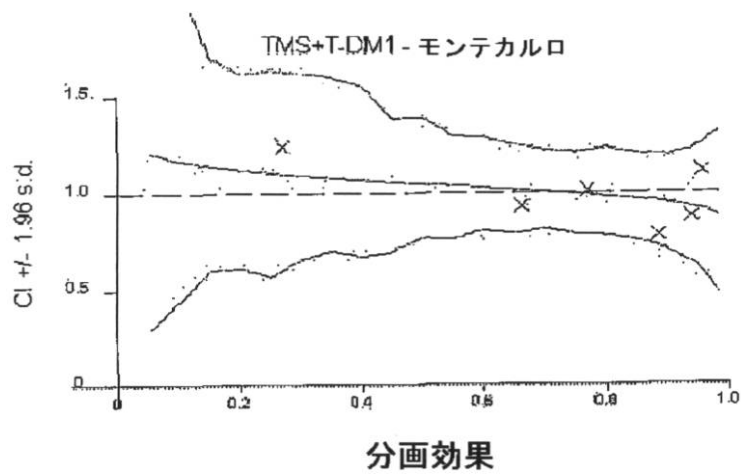
【 図 7 B L 】

I. TMS + E2



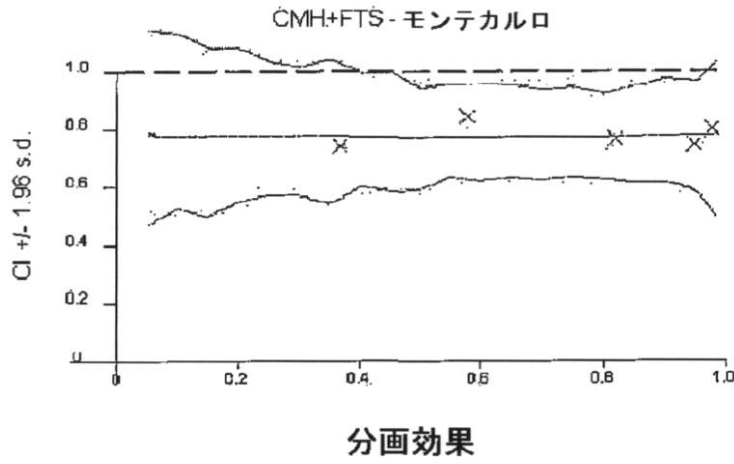
【 図 7 B M 】

m. TMS + T-DM1



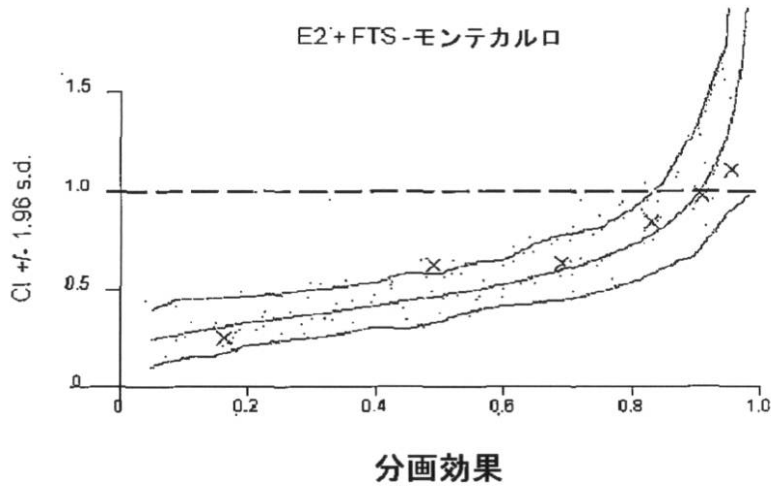
【 図 7 B N 】

n. FTS + CMH



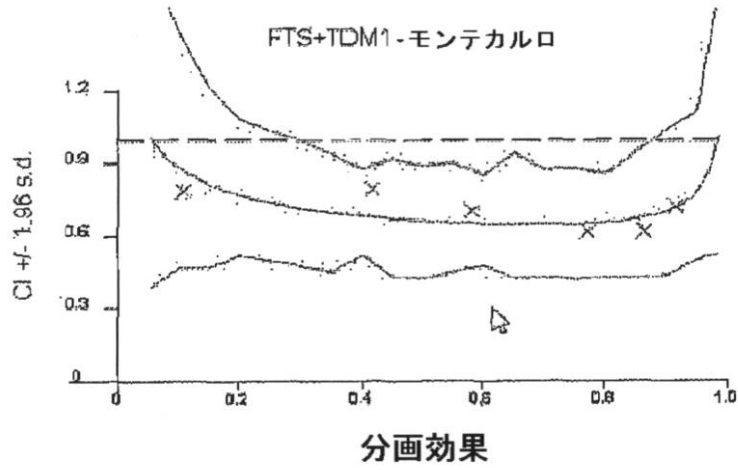
【 図 7 B O 】

o. FTS + E2



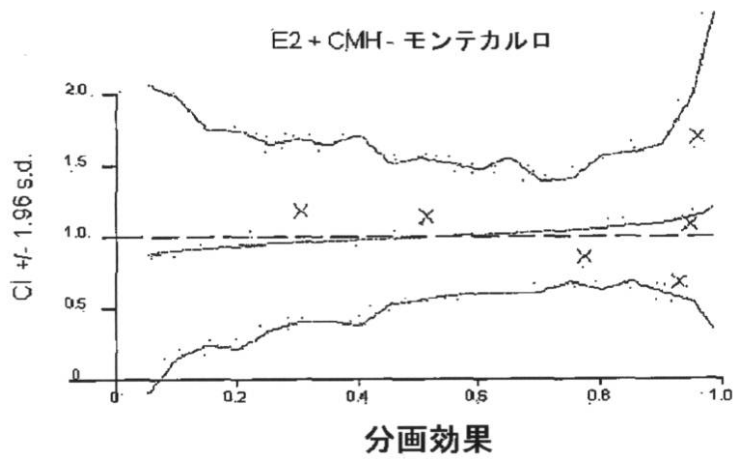
【図7BP】

p. FTS + T-DM1



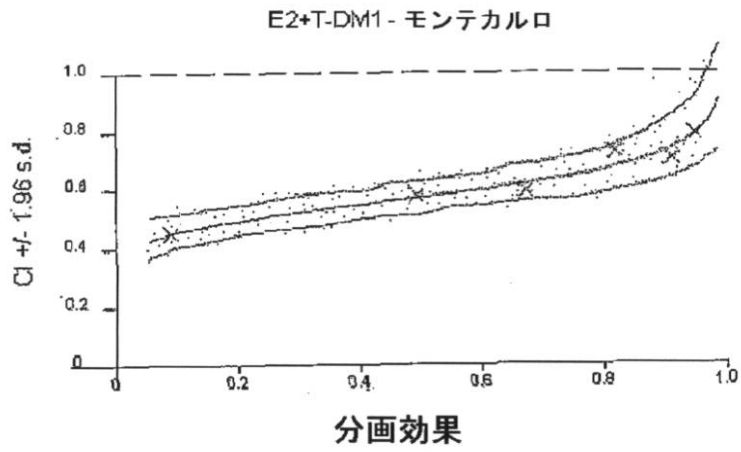
【図7BQ】

q. E2 + CMH



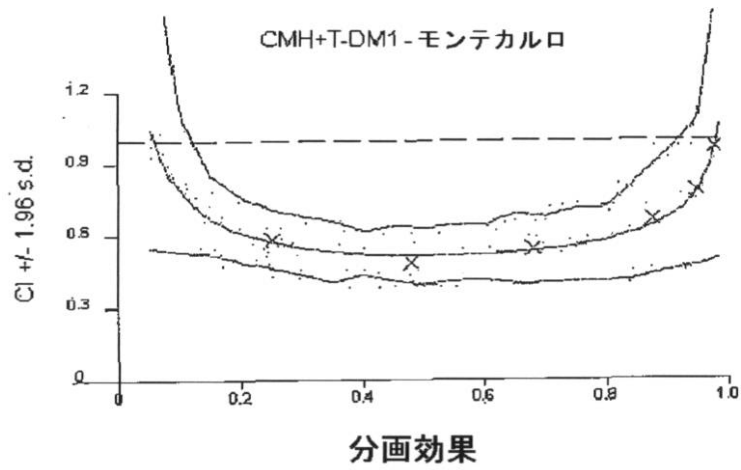
【 図 7 B R 】

r. E2 + T-DM1



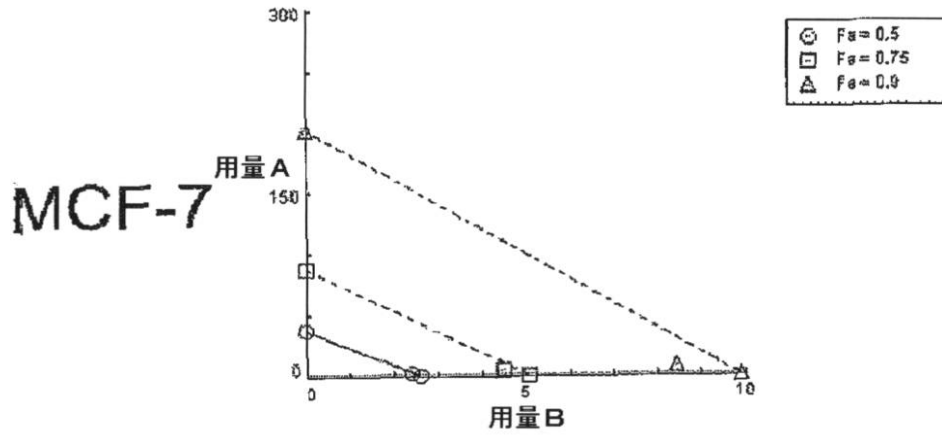
【 図 7 B S 】

s. CMH + T-DM1



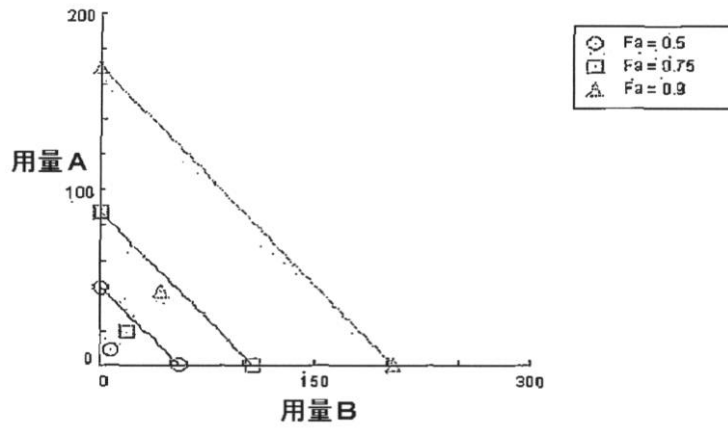
【 図 8 A 】

a. TMS + FTS



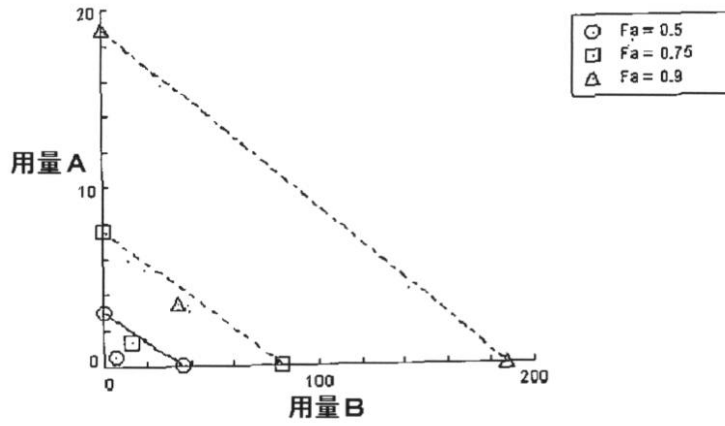
【 図 8 B 】

b. FTS + CMH



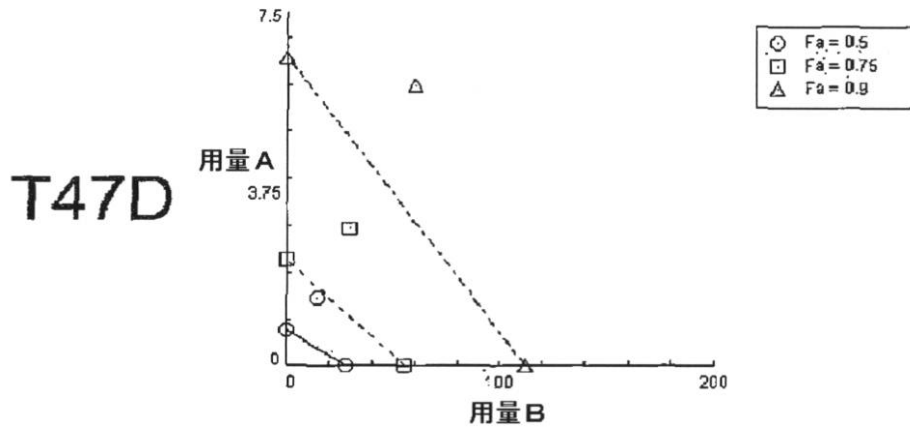
【 図 8 C 】

c. TMS + CMH



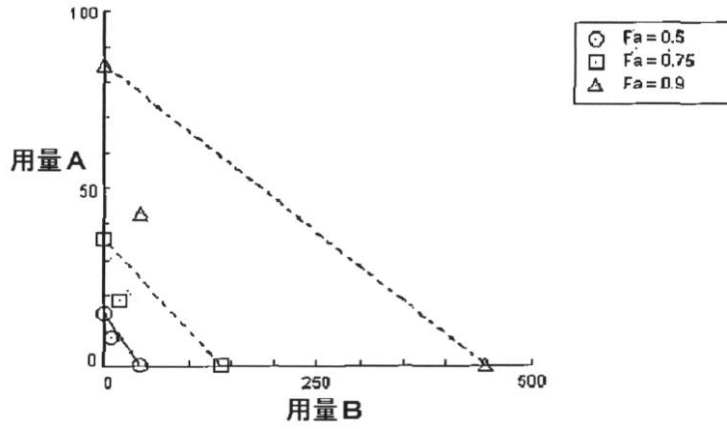
【 図 8 D 】

d. TMS + FTS



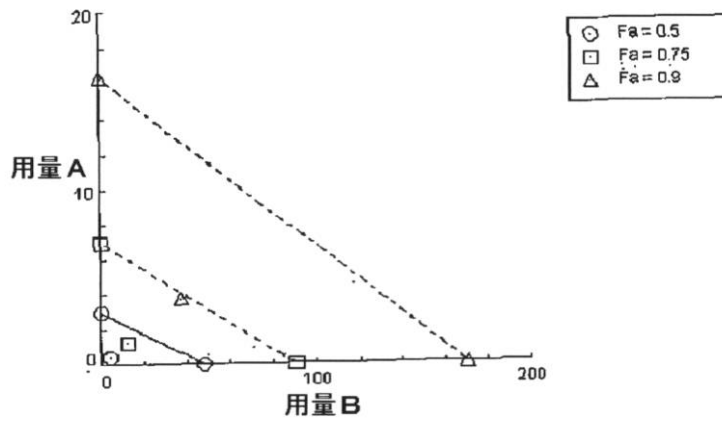
【 図 8 E 】

e. FTS + CMH



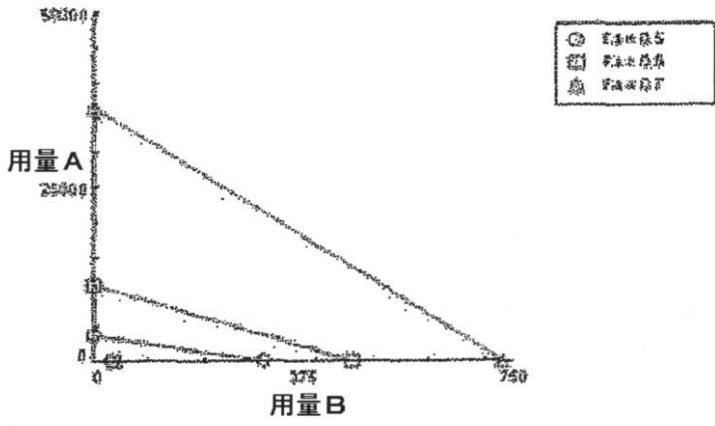
【 図 8 F 】

f. TMS + CMH



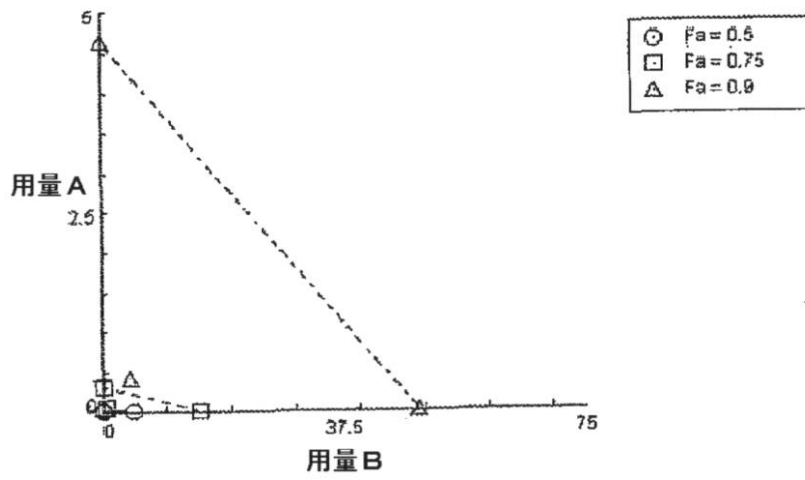
【 図 9 A 】

a. TMS + FTS



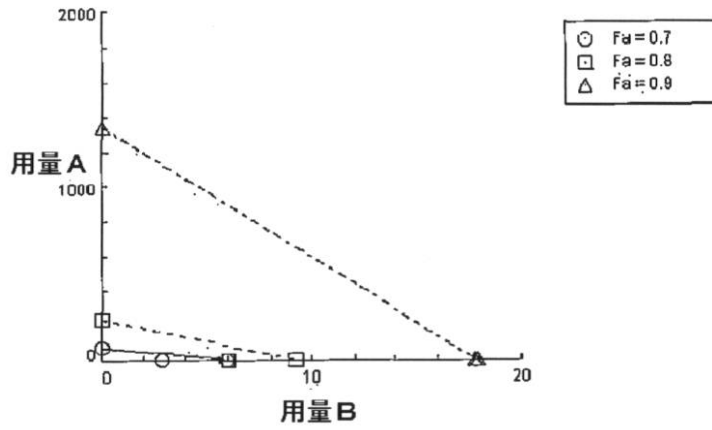
【 図 9 B 】

b. TMS + CMH



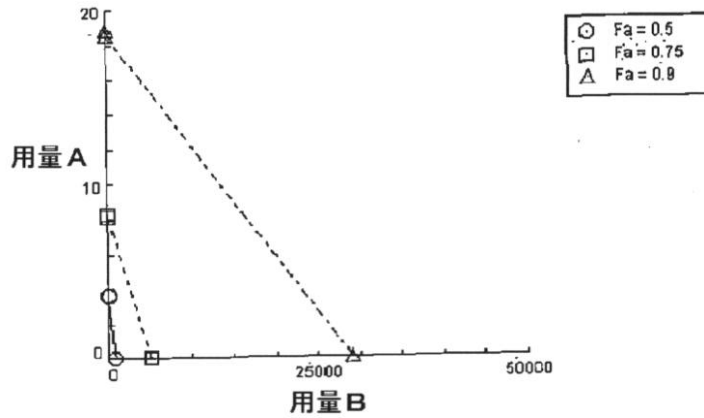
【 図 9 C 】

c. TMS + E2



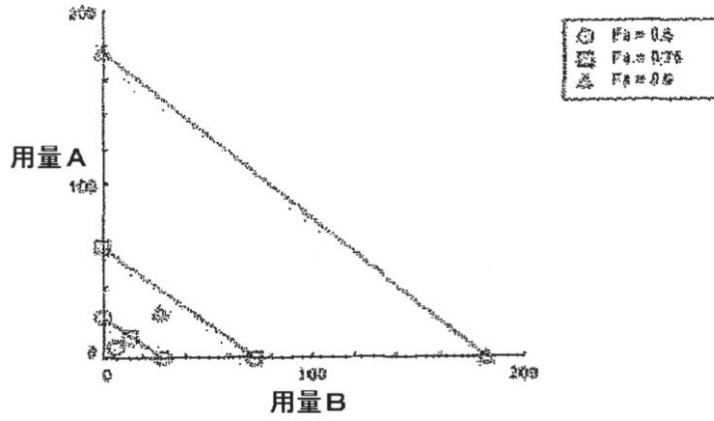
【 図 9 D 】

d. TMS + T-DM1



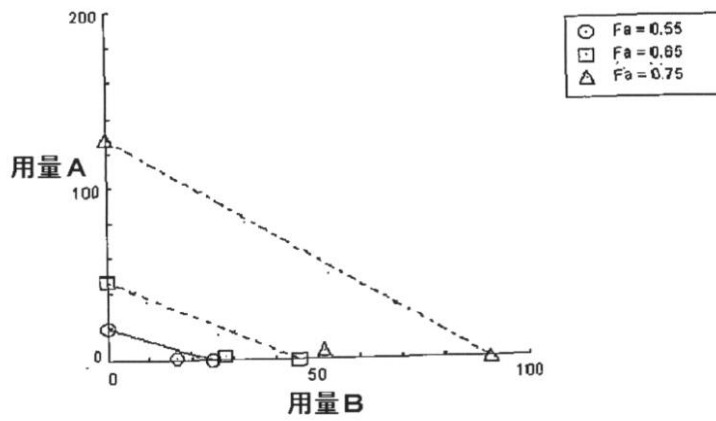
【 図 9 E 】

e. FTS + CMH



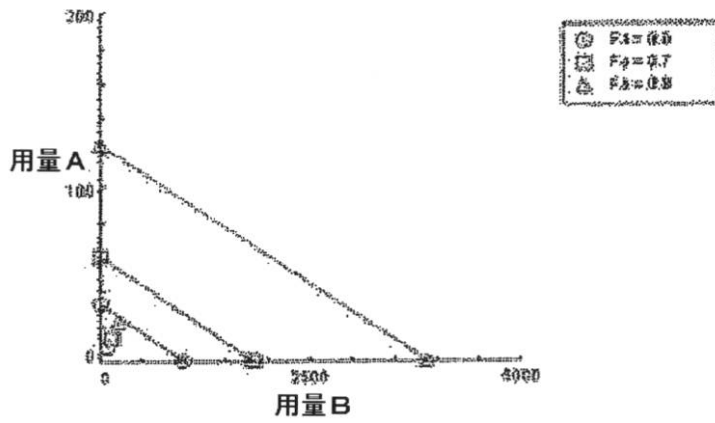
【 図 9 F 】

f. FTS + E2



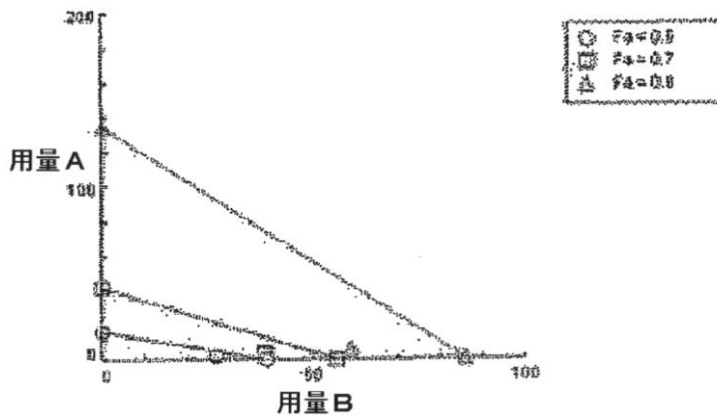
【 図 9 G 】

g. FTS + T-DM1



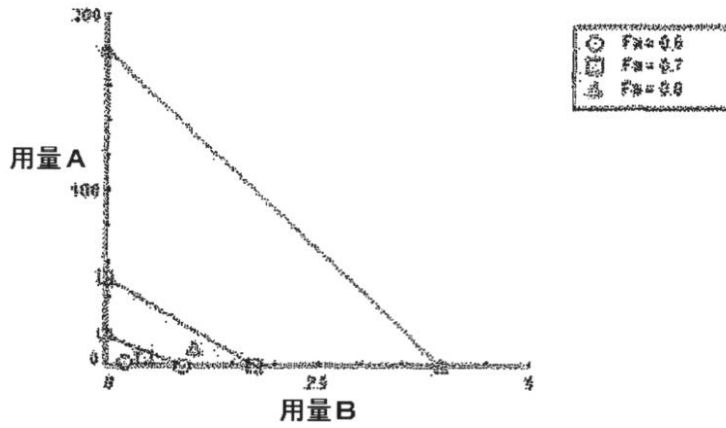
【 図 9 H 1 】

h. E2 + CMH



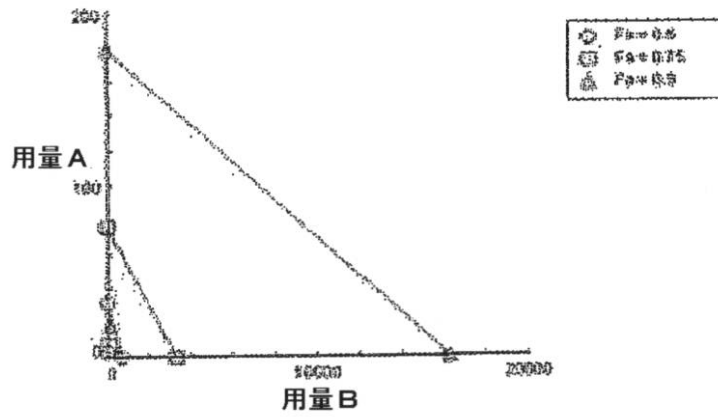
【 図 9 H 2 】

h. E2 + T-DM1



【 図 9 I 】

i. CMH + T-DM1



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/37056
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00; C07K 16/00; C07K 1/00 (2012.01) USPC - 424/178.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 424/178.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/391.1, 530/402 (text search, see term below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DialogClassic and Google Patent: Immunocon?, maytansin?, estradiol 2, her2 positive, synergy, maytansin?, methoxyestradiol, farnesyl, aromatase refractory, resistant, tamoxifen, tocotrienol, estrogen receptor hormone refractory, multi-drug or hormone resistance, chemotherapy resistant, trastuzumab, extrinsic pathway, fas pathway, c-flip pathway, crn		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2004/0241174 A1 (Amphlett et al.) 02 Dec. 2004 (02.12.2004) para [0015]-[0017], [0021], [0023], [0029], [0039], [0043]-[0045], [0047]; claims 1, 4, 8, 27, 45, 53	1-3, 7, 9-14, 35-37/(1-3,7,9-14), 39/(1-3,7,9-14) 4-6, 8, 15-34, 35-37/(4-6,8,15-34), 38, 39/(4-6,8,15-34), 40-42
Y	US 2003/0158166 A1 (Thurlimann et al.) 21 Aug. 2003 (21.08.2003) para [0210]-[0212]; claims 1,2,5	4, 5, 8, 34, 35-39/(4,5,8,34)
Y	US 2008/0004233 A1 (Malafa et al.) 3 Jan. 2008 (03.01.2008) para [0100]	15, 34, 35-37/(15,34), 38/(1-34), 39/(15,34), 40-42
Y	US 2010/0316640 A1 (Sundaram et al.) 16 Dec. 2010 (16.12.2010) para [0172], [0185]; claim 45	6, 34, 35-39/(6,34)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 Jul. 2012 (23.07.2012)		Date of mailing of the international search report 31 JUL 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/37056

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2008/0166378 A1 (Schimmer et al.) 10 Jul. 2008 (10.07.2008) para [0010], [0095], [0110], [0118], [0172], [0185], [0388], [0416], [0420]	16-34, 35-39/(16-34)
A	US 2010/0316639 A1 (Lackner et al.) 16 Dec. 2010 (16.12.2010) entire document	1-42
A	US 2011/0268722 A1 (Siegelin et al.) 3 Nov. 2011 (03.11.2011) entire document	1-42
A	US 2009/0068110 A1 (Shang et al.) 12 Mar. 2009 (12.03.2009) entire document	1-42
A	US 2006/0013819 A1 (Kelsey et al.) 19. Jan. 2006 (19.01.2006) entire document	1-42

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/192 (2006.01)	A 6 1 K 31/5355	
A 6 1 K 31/164 (2006.01)	A 6 1 K 31/192	
A 6 1 K 31/09 (2006.01)	A 6 1 K 31/164	
A 6 1 K 31/355 (2006.01)	A 6 1 K 31/09	
A 6 1 K 31/565 (2006.01)	A 6 1 K 31/355	
A 6 1 K 31/121 (2006.01)	A 6 1 K 31/565	
	A 6 1 K 31/121	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72) 発明者 サンテン、リチャード ジェイ .

アメリカ合衆国 2 2 9 4 5 バージニア州 アイビー ターナー マウンテン ロード 1 1 8 7

(72) 発明者 アイヤー、サラ イー .

アメリカ合衆国 3 3 6 4 7 フロリダ州 タンパ ハンターズ キー サークル 8 6 6 4

F ターム(参考) 4C084 AA20 MA02 NA05 NA06 ZB26 ZC75

4C085 AA14 AA26 BB01 CC23 EE03

4C086 AA01 AA02 BA09 CB22 DA09 MA02 MA04 NA05 NA06 ZB26 ZC75

4C206 AA01 AA02 CA27 CB14 DA17 HA01 MA02 MA04 NA05 NA06 ZB26 ZC75