

(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2004-517056

(P2004-517056A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/4995	A 6 1 K 31/4995	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/573	A 6 1 K 31/573	
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 33/24	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-538946 (P2002-538946)	(71) 出願人	501440835
(86) (22) 出願日	平成13年11月6日 (2001.11.6)		ファルマ・マール・ソシエダード・アノニ マ
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月6日 (2003.5.6)		スペイン・E-28760・マドリード・ トレス・カントス・ポリゴノ・インデュス トリアル・デ・トレス・カントス・カージ エ・デ・ラ・カレラ・3
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/004902	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開番号	W02002/036135		弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成14年5月10日 (2002.5.10)	(74) 代理人	100108578
(31) 優先権主張番号	60/246, 233		弁理士 高橋 詔男
(32) 優先日	平成12年11月6日 (2000.11.6)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 渡邊 隆
(31) 優先権主張番号	60/248, 095	(74) 代理人	100101465
(32) 優先日	平成12年11月13日 (2000.11.13)		弁理士 青山 正和
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/345, 982		
(32) 優先日	平成13年10月19日 (2001.10.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 効果的な抗腫瘍治療

(57) 【要約】

本発明は、エクチナサイジン 7 4 3 (E T 7 4 3) を、アントラサイクリン、プラチナ抗腫瘍化合物、デキサメタゾンなどの他の薬剤と併用し、腫瘍治療に相乗効果を与える効果的な組合せ療法に関する。特に、本発明は、E T 7 4 3 を他の薬剤と共に用いる組合せ療法により腫瘍の効果的な治療を行うための医薬の調製における E T 7 4 3 の使用を提供するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ET 743 を他の薬剤と共に用いる組合せ療法により腫瘍の効果的な治療を行うための医薬の調製における ET 743 の使用。

【請求項 2】

ある薬剤を ET 743 と共に用いる組合せ療法により腫瘍の効果的な治療を行うための医薬の調製における前記薬剤の使用。

【請求項 3】

ET 743 と前記薬剤との組合せが相乗的である、請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 4】

ET 743 が同一の医薬の一部を形成する、あるいは前記薬剤と同時または異なる時点で投与される別個の医薬として提供される、請求項 1、2 または 3 記載の使用。

【請求項 5】

組合せ療法が ET 743 とアントラサイクリンとを用いる、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

組合せ療法が ET 743 とドキソルビシンとを用いる、請求項 5 記載の使用。

【請求項 7】

組合せ療法が ET 743 とプラチナ抗腫瘍化合物とを用いる、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

組合せ療法が ET 743 とシスプラチンとを用いる、請求項 7 記載の使用。

【請求項 9】

組合せ療法が ET 743 とデキサメタゾンとを用いる、請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 10】

ET 743、および腫瘍を有する患者に投与した際に ET 743 と相乗的な抗腫瘍薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は効果的な抗腫瘍治療に関する。エクチナサイジン (Ecteinascidin) 743、すなわち ET 743 は海産由来の抗ガン剤である。

【背景技術】

【0002】

ガン治療用の ET 743 の組成物および使用に関する情報については、2000年11月23日に公開された WO 00 69441 を参照。この文献を参照として含めることとする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の一つの態様によれば、エクチナサイジン 743 をベースとしてその他の薬剤を併用する効果的な組み合わせ療法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

前記その他の薬剤は、同一組成物の一部を形成してもよく、また、同時または異なる時点で投与される別個の組成物として提供されてもよい。当該その他の薬剤は特に限定されず、適切な候補としては以下のものを含む：

a) 抗有糸分裂剤、特に細胞骨格エレメントをターゲットとするものであって、タキサン剤 (タキソール、パクリタキセル、タキソテレ、ドセタキセルなど)、ポドフィロトキシ

10

20

30

40

50

ン、またはピンカルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン）などの微小管変性剤を含む；

b) 抗代謝剤、例えば5-フルオロウラシル、シタラビン、ゲムシタビン、プリン類似体、例えばペントスタチン、メトトレキサート）；

c) 窒素マスタードのようなアルキル化剤（シクロホスファミドまたはイフォスファミド）；

d) DNAをターゲットとする薬剤、例えばアントラサイクリン剤、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ファーモルピシンまたはエピルピシン；

e) エトポシドのような、トポイソメラーゼをターゲットとする薬剤；

f) ホルモンおよびホルモンアゴニストまたはアンタゴニスト、例えばエストロゲン、アンチエストロゲン（タモキシフェンとその関連化合物）、およびアンドロゲン、フルタミド、レウプロレリン、ゴセレリン、シプロトロンまたはオクトレオチド；

g) ヘルセプチンのような抗体誘導体を含む腫瘍細胞におけるシグナル伝達をターゲットとする薬剤；

h) プラチナ剤のようなアルキル化剤（シスプラチン、カーボンプラチン、オキサリプラチン、パラプラチン）またはニトロソウレア；

i) マトリックスメタロプロテイナーゼインヒビターののような腫瘍の転移に影響しうる薬剤；

j) 遺伝子治療およびアンチセンス剤；

k) 抗体療法剤；

l) 別の海産性の生物活性化合物、特にアブリジンのようなジデムニン；

m) ステロイドアナログ、特にデキサメタゾン；

n) 抗炎症剤、特にデキサメタゾン；および

o) 抗嘔吐剤、特にデキサメタゾン。

【0005】

この特許明細書の一部として、一連の実施例を含めた。それらについて以下に言及する。これらの実施例は、別の薬剤と組み合わせて使用した際のET 743の増大した有効性を示し、ET 743を用いた種々の組み合わせに関係する。

【0006】

実施例1は、無胸腺症マウスにおけるネズミおよびヒトの肉腫に対する腫瘍増殖阻害に関するET 743とドキソルビシンとの効果的な組み合わせに関する。

【0007】

実施例2は、柔組織肉腫系統HT 1080およびHS 18において、エクチナサイジン743（ET 743）とドキソルビシンとが相乗的な細胞傷害効果を生じることを示す。

【0008】

これら二つの例は、ET 743とアントラサイクリン（特にドキソルビシン）との組み合わせの相加的効果以上、すなわちヒト腫瘍に対して（これらの特定の試験の肉腫において）それぞれ単独のものより以上の効果を示し、この効果は投与の順とは独立して起こる。かかる結果は、患者の治療に明確な保証を示す。

【0009】

実施例3は、ET 743とシスプラチンとの相乗的な細胞傷害効果を示す。

【0010】

実施例4は、ヒト腫瘍細胞系統のパネルに対する、ET 743と化学療法剤との組み合わせ、特にET 743とドキソルビシン、タキソール、SN 38、シスプラチンおよびゲムシタビンとの組み合わせ、の順序による評価を示す。

【0011】

これら二つの例は、ET 743と、プラチナ抗腫瘍化合物（特にシスプラチン）、ヌクレオシド類似体ゲムシタビン、およびトポイソメラーゼIIのインヒビター（SN 38プロドラッグCPT 11から産生される活性剤、カンプトテシン群の薬剤）との組み合わせ

せの相加的効果以上を示す。これらの組み合わせは、ヒト腫瘍に対して（種々の腫瘍細胞：卵巣、結腸、肺、乳房、骨肉腫に対するこれらの特定の試験において）それぞれの薬剤単独より以上の効果を示し、この効果は一部の場合に投与の順序に依存していた。患者の治療に保証を示す。

【0012】

興味深いことに、相乗作用は、明らかに予測可能なものではなかった：実施例4は、試験したほとんどの組み合わせにおいて、相乗効果が観察されないことを示している（実際に、アンタゴニズム（拮抗）が一部のケースにおいて報告された）。

【0013】

実施例5は、ET 743と、ドキソルビシン、トリメトレキサート、またはパクリタキセルとの組み合わせの評価に関する。 10

【0014】

これは、ET 743とアントラサイクリン（特にドキソルビシン）との組み合わせの相加的効果以上、すなわちヒト腫瘍に対して（これらの特定の試験の肉腫において）それぞれ単独より以上の効果を示し、この効果は投与の順序とは独立して起こる。かかる結果は、患者の治療に明確な保証を示す。

【0015】

実施例6から8は、先の実施例を補強および補足するものであり、特にET 743とドキソルビシン、並びにET 743とシスプラチンの相乗効果を示す。

【0016】

実施例9は、本発明の組み合わせの異なる種類の有効性を示す。ここでは、高投与量のデキサメタゾン（E T 743）の肝細胞毒性から保護する。 20

【0017】

要約すると、本発明は、それゆえ、組成物、治療方法、組成物を調製する方法、および関連する実施態様を提供する。

【0018】

また、本発明は、治療方法における使用のための本発明の化合物、およびガンの治療のための組成物の調製における前記化合物の使用にまで広げられる。

【0019】

かくして、本発明は、ガンに罹患したあらゆる哺乳動物、特にヒトを治療する方法であって、罹患した個体（個人）に、治療に有効な量の本発明の化合物、またはその薬学的組成物を投与することを含む方法を提供する。 30

【0020】

また本発明は、薬学的に許容されるキャリアーを含む薬学的調製物であって、活性成分として本発明の化合物を含む調製物、並びにその調製方法にも関する。

【0021】

薬学的組成物の例は、組成物または経口、局所または非経口投与に適した、あらゆる固形状（タブレット、錠剤、カプセル、顆粒など）または液状（溶液、懸濁液またはエマルション）を含み、純粋な化合物を含むものでも、またはあらゆるキャリアーや他の薬学的に活性な化合物と組み合わせるものであってもよい。これらの組成物は、非経口投与される場合には、無菌である必要があるかもしれない。 40

【0022】

本発明の化合物または組成物の投与は、適切なあらゆる方法、例えば静脈注入、経口調製物、腹腔内および静脈内投与などによるものとすることができる。24時間までの注入時間を用いることが好ましく、より好ましくは2 - 12時間、最も好ましくは2 - 6時間である。病院で一晩滞在することなく治療を実施できる短い注入時間が特に望ましい。しかしながら、注入は、必要であれば12から24時間、もしくはそれより長くてもよい。注入は2から4週間の適切な間隔をあけて実施されてもよい。本発明の化合物を含む薬学的組成物は、リポソームまたはナノスフェアカプセルにより、持続放出性製剤として、または他の標準的な送達手段により送達されてもよい。 50

【0023】

当該化合物の正確な投与量は、特有の製剤化、適用形式、および治療される特有の位置、宿主および腫瘍により変化するであろう。年齢、体重、性別、食事、投与時間、排出速度、宿主の状態、薬剤の組み合わせ、反応感度および疾患の深刻さなどの別のファクターも考慮されるべきである。投与は、最大寛容投与量の範囲内で連続的または定期的に行うことができる。

【0024】

本発明の組み合わせは、難治性の患者に使用することができる。ET 743の投与スキームに関する情報、および本発明の組み合わせ療法における使用のその他の情報については、WO 00 69441を参照。

【実施例1】

【0025】

無胸腺症マウスにおけるネズミおよびヒトの肉腫に対する腫瘍増殖阻害に関するET 743とドキシソルピシンの効果的な組み合わせ

ET 743は、ドキシソルピシン(Dx)およびイソスファミドを含む以前の化学療法では難治性の軟および骨肉腫の患者において臨床活性が確認されている。ET 743とDxとを組み合わせた場合の可能性のある臨床的な値の観点から、ネズミ繊維肉腫UV 2237、そのmdr耐性亜系UV 2237/ADR、およびヒトの横紋筋肉腫異種移植片TE 671に対する当該組み合わせを調べた。ET 743とDxの両方が、単独でネズミのUV 2237繊維肉腫に有効であったが、UV 2237/ADRとTE 671の両方に対しては不活性もしくはほんのわずかに活性であるにすぎなかった。しかしながら、ET 743とDxとの組み合わせは、3つ全てのモデルにおいて有効であった。相乗効果は、特にヒトの横紋筋肉腫TE 671において顕著であり、薬剤の順または組み合わせとは独立しているようであった。

【0026】

腫瘍TE 671が約100mgである時に行った一回のi.v.処理の後で、腫瘍重量阻害(TWI)およびLog10細胞殺傷(LCK)の値はそれぞれ、ET 743(0.1mg/kg)単独の場合46%および0.132であり、Dx(10mg/kg)単独の場合50%および0.33であり、ET 743(0.1mg/kg)およびDx(10mg/kg)を同時に投与した場合77%および0.924、Dx(10mg/kg)の1時間前にET 743(0.1mg/kg)を投与した組み合わせでは82%および1.12、そしてDx(10mg/kg)の1時間後にET 743(0.1mg/kg)を投与した組み合わせでは75%および0.85であった。

【0027】

これらのデータは、ET 743とDxとの組み合わせが、これらの薬剤を単独で投与した場合には感受性でない、またはほとんど感受性でない腫瘍においても効果的であることを示唆しており、かくして、この組み合わせを使用する臨床的な調査に強力な理論的根拠を与える。

【実施例2】

【0028】

柔組織肉腫系統HT 1080およびHS 18において、エクチナサイジン743(ET 743)とドキシソルピシンの相乗的な細胞傷害効果を生じる。

二つの肉腫細胞系統、すなわちET 743に感受性(IC₅₀ = 10 pm)の繊維肉腫細胞系統HT 1080、およびET 743にほとんど感受性でない(IC₅₀ = 270 pm)脂肪肉腫細胞系統HS 18を、ドキシソルピシン、トリメトレキサートまたはパクリタゼルのいずれかと組み合わせた場合のET 743に対する毒性について評価した。ET 743を一定のモル比でこれらの薬剤のいずれかと組み合わせ用い、ChouとTalalayの方法に従って分析した場合、相乗効果がET 743 - ドキシソルピシンの組み合わせで得られた(72時間インキュベーション)が、ET 743とトリメトレキサートまたはパクリタキセルとの組み合わせでは得られなかった。細胞をET 743

10

20

30

40

50

に72時間曝し、ドキソルビシン、トリメトレキサートまたはタキソールのいずれかにインキュベーションの最後の48時間曝した場合、相乗効果が両方の肉腫細胞系統に対してドキソルビシンを用いた場合に得られた。興味深いことに、パクリタキセルの後にET 743の順で連続的に曝した場合、逆の順序の場合よりも効果的であった。これらの結果は、両方の薬剤がこの疾患に対して活性を示したので、柔組織肉腫を有する患者を治療するために、ET 743と組み合わせてドキソルビシンを臨床的に試すことを奨励するものである。

【実施例3】

【0029】

ET 743とシスプラチンの相乗的な細胞傷害効果

10

エクチナサイジン743 (ET 743) は、いくつかの臨床前システムにおいて著しい抗腫瘍活性および有望な臨床活性を示した。ET 743は浅いほうの溝のN2グアニンに結合し、転写の制御に影響する (Minuzzoら, PNAS, Vol. 97, 6780-84, 2000)。

【0030】

先の研究は、ミスマッチ修復 (MMR) に欠陥のある細胞が、熟達した (proficient) 細胞と同程度にET 743に敏感であることを示した。シスプラチンに非常に敏感なNER欠陥細胞は、ET 743に対して6-8倍感度が低い。ET 743およびシスプラチンの修復に関連した異なるメカニズムに基づいて、そして、この組合せに対する可能性のある臨床的興味のため、我々は、いくつかのヒト腫瘍細胞系統におけるET 743とシスプラチンの細胞傷害効果を評価する研究を行った。ヒト卵巣ガンIgrove 1細胞系統、ET 743に耐性の垂系統 (IG/PSC/ET)、ヒト結腸癌HCT116 (MMR欠陥) およびHCT116 (MMR熟達) 細胞系統を、この研究に用いた。

20

【0031】

細胞を、種々の濃度のET 743またはシスDDPで、単独または組み合わせて1または24時間処理し、細胞傷害性を、スルホローダミンB染色後に比色分析を用いて評価した。全ての細胞系統で、相乗効果が1時間または24時間曝露の両方に観察された。シスDDPに耐性のHCT116において興味深いことに、単独では殆ど効果的でないET 743の濃度においてさえ、ET 743は明らかに感受性を逆転させることができた。これらのデータを考慮すると、ET 743とシスDDPとを組み合わせる臨床的な研究を行う合理性が与えられる。

30

【実施例4】

【0032】

ET 743とドキソルビシン、タキソール、SN 38、シスプラチンおよびゲムシタピンとの組み合わせ

ET 743を、ヒト腫瘍細胞系統のパネルに対して、ドキソルビシン、タキソール、SN 38、シスプラチンおよびゲムシタピンと組み合わせて評価した。これらの研究は、ET 743と標準的な化学療法剤との間の薬剤-薬剤相互作用のタイプ、および抗腫瘍活性に対する連続曝露の影響を調べるように設計された。ET 743と標準的な細胞傷害剤との多重の組合せを、モデルフリーデザイン (Laskaら, Biometrics 50: 834, 1994) と共に用いて、薬剤-薬剤相互作用のタイプを記述した。これらの研究は、曝露に関係なく、薬剤-薬剤相互作用の添加パターンがほとんど典型的に観察されることを示唆する。

40

【0033】

ET 743を、非小細胞肺 (non small cell lung) (SN 38で事前曝露)、骨肉腫 (ET 743で事前曝露後にシスプラチン曝露)、乳ガン腫瘍細胞系統 (ET 743で事前曝露後にゲムシタピン曝露)、結腸腫瘍細胞系統 (ET 743で事前曝露後にSN 38で曝露、およびSN 38で同時曝露) に対して組み合わせた場合に、相乗的な薬剤-薬剤相互作用が観察された。薬剤-薬剤相互作用の相加的/相乗

50

的 (NSCL に対して ET 743 で事前曝露後に SN 38 で曝露 ; 結腸および NSCL に対して SN 38 に事前曝露 ; 骨肉腫に対してシスプラチンと同時曝露、そして NSCL 系統に対して SN 38 を用いた場合) パターンが観察された。二つの NSCL 系統に対してタキソールを同時に利用した場合、および横紋筋肉腫細胞系統に対してドキソルピシンを用いた場合に、アンタゴニズムの証拠が示された。

【0034】

これらの研究は、第二相臨床試験において、ET 743 が、広範囲の腫瘍タイプに対して種々の細胞傷害剤と組み合わせられることを示唆した。

【0035】

材料と方法

細胞培養 :

ヒト乳 (MDA 435、MDA 231、T 470)、非小細胞肺 (NCI H522、NCI H226、NCI H23)、結腸 (HCT 116、HT 29、Colo 320)、骨肉腫 (HOS、U 2、OS、SaOS 2)、横紋筋肉腫 (RH1、RH30、RD) の腫瘍細胞系統を、10% の胎児ウシ血清と 2 mM の L グルタミンを加えた RPMI 1640 において増殖させた。全てのストック培養物を、5% CO₂ - 95% 空気雰囲気加湿したインキュベーター中で、37 °C で、75 cm² フラスコに維持した。

【0036】

IC₅₀ 分析

予め調べた数の指数増殖腫瘍細胞を、96 ウェル組織培養プレートに接種し、24 時間安定化させた。その後、連続的に希釈された濃度の ET 743 または標準的な化学療法剤からなる薬剤プレートを、細胞に加えた。細胞を、3 日間の 24 時間曝露、その後 4 時間の MTT 添加としてインキュベートした。結果として生じるホルマジン結晶を酸 / アルコールで可溶化し、吸収 (570 nm テスト / 630 nm 基準) をマイクロプレートリーダーを用いて調べた。結果を、培地コントロールと比べたパーセント腫瘍細胞死として表した。

【0037】

組合せの研究

組合せの研究について、相互作用のタイプを決定するために使用された濃度 (個々の薬剤の IC₅₀ のパーセントとして表示) の概要を以下に示す。

【0038】

【表 1】

薬剤濃度 (IC ₅₀ のパーセントとして表示)	
ET-743	標準薬剤
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

【0039】

組合せ研究の統計分析

各テスト組合せ（75：25 - ET 743 / 標準薬）および終端（100：0 - ET 743 および 0：100 - 標準薬）を用いて、統計比較を行った。統計的に有意な観察は、組合せ（ET 743 と標準薬）吸収値と両方の終端値（ET 743 および標準薬のみ）との間に差異が存在することを必要とする。大多数（5つのうちの3）の値が統計学的にラインの上または下ならば、それぞれアンタゴニズムまたは相乗性が記載される。さもなければ、そのパターンはより相加的な相互作用に一致する。終端値を結ぶラインに顕著な傾きがある場合には、解釈が非常に困難である。個々の薬剤のIC₅₀ 曲線の傾きが同一（ありそうもないが）であれば、時として、相互作用のタイプを調べることができる。

【0040】

【表2-1】

ET-743と化学療法薬との連続的組合せ		
腫瘍 タイプ/細胞系統	曝露条件/薬剤	観察された薬剤-薬剤 相互作用
骨肉腫		
N O S	2 4 時間ET-743後にシスプラチンに2 4 時間曝露	相乗的
	2 4 時間シスプラチン後にET-743に2 4 時間曝露	相加的
	2 4 時間同時にET-743/シスプラチン曝 露	相加的
U 2 - O S	2 4 時間ET-743後にシスプラチンに2 4 時間曝露	相加的
	2 4 時間シスプラチン後にET-743に2 4 時間曝露	相加的
	2 4 時間同時にET-743/シスプラチン曝 露	相加的
S a 0 6	2 4 時間ET-743後にシスプラチンに2 4 時間曝露	相加的
	2 4 時間シスプラチン後にET-743に2 4 時間曝露	相加的
	2 4 時間同時にET-743/シスプラチン曝 露	相加的/相乗的
非小細胞肺ガン		
N C B - H 2 2 6	2 4 時間ET-743後にタキソールに2 4 時 間曝露	相加的
	2 4 時間タキソール後にET-743に2 4 時 間曝露	相加的
	2 4 時間同時にET-743/タキソール曝露	拮抗的
	2 4 時間ET-743後にSN38に2 4 時間曝露	相加的/相乗的
	2 4 時間SN-38後にET-743に2 4 時間曝 露	相加的/相乗的
	2 4 時間同時にET-743/SN-38曝露	相加的

10

20

30

40

【 0 0 4 1 】

【 表 2 - 2 】

NCB-N522	24時間ET-743後にタキソールに24時間曝露	相加的	10
	24時間タキソール後にET-743に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/タキソール曝露	拮抗的	
	24時間ET-743後にSN38に24時間曝露	相加的/相乗的	
	24時間SN-38後にET-743に24時間曝露	相加的/相乗的	
	24時間同時にET-743/SN-38曝露	相加的	
NCB-N23	24時間ET-743後にタキソールに24時間曝露	相加的/拮抗的	20
	24時間タキソール後にET-743に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/タキソール曝露	拮抗的	
	24時間ET-743後にSN38に24時間曝露	相加的	
	24時間SN-38後にET-743に24時間曝露	相乗的	
	24時間同時にET-743/SN-38曝露	相加的/相乗的	
乳ガン			
MDA-435	24時間ET-743後にゲムシタビンに24時間曝露	相加的	30
	24時間ゲムシタビン後にET-743に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/ゲムシタビン曝露	相加的	
MDA-231	24時間ET-743後にゲムシタビンに24時間曝露	相加的	40
	24時間ゲムシタビン後にET-743に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/ゲムシタビン曝露	相加的	
T47-8	24時間ET-743後にゲムシタビンに24時間曝露	相加的	40
	24時間ゲムシタビン後にET-743に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/ゲムシタビン曝露	相加的	

【0042】

【表2-3】

結腸ガン			
MCT-116	24時間ET-743後にSN-38に24時間曝露	相乗的	
	24時間ET-743後にSN-38に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/SN曝露	相加的	
NT-29	24時間ET-743後にSN-38に24時間曝露	相加的	10
	24時間ET-743後にSN-38に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/SN曝露	相加的	
Colo-320	24時間ET-743後にSN-38に24時間曝露	相加的	
	24時間ET-743後にSN-38に24時間曝露	相加的/相乗的	
	24時間同時にET-743/SN曝露	相乗的	20
横紋筋肉腫			
RN1	24時間ET-743後にドキソルビシンに24時間曝露	相加的	
	24時間ドキソルビシン後にET-743に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/ドキソルビシン曝露	拮抗的	
RD	24時間ET-743後にドキソルビシンに24時間曝露	相加的	30
	24時間ドキソルビシン後にET-743に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/ドキソルビシン曝露	相加的/拮抗的	
RN30	24時間ET-743後にドキソルビシンに24時間曝露	相加的	
	24時間ドキソルビシン後にET-743に24時間曝露	相加的	
	24時間同時にET-743/ドキソルビシン曝露	拮抗的	40

【0043】

結果 - 概要

これらの研究は、ET 743と標準化学療法薬との間の曝露の順によらず、薬剤 - 薬剤相互作用の相加的パターンがほぼ通常的に観察されることを示唆する。

【0044】

相乗性の証拠が、NC1 H522およびNC1 H23 NSCL系統をSN 38で事前曝露した場合、HOS骨肉腫に対してシスプラチンで処理する前にET 743で事前

曝露した場合、T 470 乳細胞系統をゲムシタピンで処理する前にET 743で事前曝露した場合、HCT 116 結腸に対してSN 38で処理する前にET 743で事前曝露した場合、およびColo 320 結腸腫瘍細胞系統に対してSN 38で同時曝露した場合に、観察された。

【0045】

アンタゴニズムの証拠は、NC1 H226およびNC1 H23 NSCL細胞系統に対してタキソールを同時に使用した場合、およびRHI横紋筋肉腫腫瘍細胞系統に対してドキソルピシンを同時に使用した場合に、観察された。

【実施例5】

【0046】

Et 743と他の抗腫瘍薬との相互作用

ET 743は現在、ヒトのガンの臨床試験段階にあるが、ET 743の抗腫瘍活性のメカニズムは完全には解明されていない。この研究の目的は、ChouおよびTallalayaのコンビネーションインデックス(CI)法を用いて、ET 743と他の抗腫瘍薬(ドキソルピシン; DXR、トリメトレキサート; TMTX、およびパクリタキセル; タキソール)との間の相互作用の性質を評価することである。ET 743がどのように臨床的に用いられるかをよりよく理解するために、この研究は、SRBアッセイを用いて、種々の投与スケジュールで、二つの柔組織肉腫細胞系統HT 1080およびHS 18において、インビトロで、ET 743と他の三つの抗腫瘍剤とを組み合わせ得られる細胞傷害性を評価する。DXRは、ET 743と組み合わせた場合に、順序とは独立した相乗性をもたらす唯一の薬剤であった。ET 743とDXRの同時曝露は、両方の細胞系統において相乗的な相互作用をもたらした。

【0047】

このスケジュールのCI(平均)は、HT 1080細胞の50、75、90および95%細胞死において、それぞれ0.86、0.83、0.84および0.85であり、HS 18細胞の50、75、90および95%細胞死において、それぞれ0.89、0.74、0.64および0.60であった。DXRの前に24時間ET 743を用いる順序は、両方の細胞系統に対して最も有効な方法であった;これは両方の細胞系統について約90%までの細胞死レベルの一貫して低いCIを示した。ET 743の前にタキソールに曝露することも、効果的な方法であった。これらの結果は、ET 743とDXRとの組合せが、柔組織肉腫の治療における臨床試験においてさらに調査されるべきであることを示唆している。

【0048】

材料と方法

化学物質

ET 743は、Pharma Mar S.A (Tres Cantos, Madrid, Spain)から入手し、ジメチルスルホキシド中に2mMのストック溶液として調製した。パクリタキセルおよびDXRはSigma Chemical Co. (St. Louis, MO)から入手した。TMTXはWarner Lambert (Parke Davis, Ann Arbor, Mich)から提供された。

【0049】

細胞培養

柔組織肉腫細胞系統HT 1080およびHS 18を、10%胎児ウシ血清を含むRP < I 1640における単層培養として維持した。

【0050】

SRB細胞傷害アッセイ

薬剤に対する細胞傷害性を、記載されているように96ウェルマイクロタイタープレートで実施したSRB細胞傷害性アッセイにより調べた。細胞を二重にウェルにプレートし(5000細胞/ウェル)、種々の濃度で薬剤に曝露した。細胞を50%TCA溶液で1時間固定し、0.4%SRB(Sigma)を各ウェルに添加した。30分間インキュベーション

10

20

30

40

50

ヨンした後に、プレートを1%酢酸で洗浄し、BioWhittakerマイクロプレートリーダー2001で570nmで読みとった。薬剤を含まず細胞を含むウェルと、培地と薬剤を含むが細胞を含まないウェルを、それぞれ、ポジティブおよびネガティブコントロールとして用いた。

【0051】

ET 743およびDXR、TMTXまたはパクリタキセルに対する同時曝露細胞を、上述したように96ウェルプレートにまいた。細胞を、7つの異なる濃度の単独の薬剤または混合物を用いて、1:100 (ET 743:別の薬剤)モル比で処理した。72時間曝露した後に、増殖阻害をSRBアッセイを用いて測定した。

【0052】

ET 743およびDXR、TMTXまたはパクリタキセルに対する連続曝露
上記と同じ実験セットアップを用いて、細胞を、ET 743、DXR、TMTXおよびパクリタキセルのIC₂₅、IC₅₀、IC₇₅をそれぞれ示す3つの異なる濃度の薬剤に曝露した。ET 743または組合せ薬で24時間事前処理した後に、第二の薬剤を48時間各ウェルに添加した。増殖阻害をSRBアッセイを用いて調べた。

【0053】

細胞周期分析

指数増殖細胞を、薬剤を用いて、または用いずに数時間処理した。次いで細胞を回収し、氷冷70%メタノールで固定した。DNAを上述したようにプロピジウムヨードを用いて染色した。1万個の染色細胞を、Becton Dickinson 蛍光活性化セルソー

【0054】

相乗効果とアンタゴニズムの決定およびアイソボログラムの構築

CIを、有効性(DmまたはIC₅₀)と投与効果曲線の形状(m値)の両方を考慮したChou Talalayの式により計算した。古典的アイソボログラムの一般式(CI = 1)は以下によって与えられる:

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 \quad (A)$$

式中、分母の(Dx)₁と(Dx)₂は、X%阻害を与えるD₁(ET 743)とD₂(別の薬剤)単独の投与量(または濃度)であり、一方、分子の(D)₁と(D)₂は、X%阻害する(すなわち同等な)、組み合わせたET 743および別の薬剤の投与量である。CI < 1、CI = 1、CI > 1は、それぞれ相乗効果、相加効果、およびアンタゴニズムを示す。

【0055】

(Dx)₁または(Dx)₂は、ChouおよびChouらのメジアン効果式(median effect equation)から容易に算出できる。

$$Dx = Dm [fa / (1 - fa)]^{1/m} \quad (B)$$

ここで、Dmは、メジアン効果プロットのX切片の真数、X log(D)対Y log[fa / (1 - fa)]、またはDm = 10^{-(Y - 切片) / m}から得られるメジアン効果投与量であり、mはメジアン効果プロットの傾きである。ChouおよびChouのコンピュータソフトウェアは、m、Dm、Dx、およびCI値の自動計算を可能にする。(Dm)₁、(Dx)₂、およびD₁ + D₂から、式Aに基づいて自動的にアイソボログラムを構築することが容易になる。

【0056】

二つの薬剤の保守的な相互に排他的でないアイソボログラムについて、第三項、すなわち(D₁)(D₂) / (Dx)₁(Dx)₂が式Aに加えられる。

【0057】

簡便のために、第三項は通常省略され、かくして相互に排他的な仮定または古典的アイソボログラムが示される。結果2および3には、古典的な(相互に排他的な)計算から得られたCI値が与えられている。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

【 表 3 】

結果 1

HT-1080およびS18に対する4つの薬剤の細胞傷害性			
ヒトの柔組織肉腫細胞のIC ₅₀			
		HT-1080	HS-18
ET-743	(nM)	0.01	0.27
DXR	(nM)	25	225
TMTX	(nM)	6	70000
パクリタキセル	(nM)	1.3	10

10

【 0 0 5 9 】

この表は、HT 1080とS18細胞系統の両方が、他の抗腫瘍剤よりもET 743に対してより感受性であったことを示している。

【 0 0 6 0 】

【 表 4 】

20

HS-18細胞に対する細胞周期分布に与える各薬剤の効果 ほぼIC ₅₀ 投与量で処理してから24時間および72時間後					
薬剤	投与量	HR	%G1	%S期	%G2-M
コントロール			76.3	11.2	12.5
ET-743	270pM	24	32.4	47.6	20.0
		72	86.7	8.4	4.9
DXR	225nM	24	10.1	64.9	25.0
		72	1.3	63.8	34.9
TMTX	70uM	24	44.2	53.8	1.9
		72	35.5	57.6	7.0
パクリタキセル	10nM	24	32.8	52.5	15.5
		72	23.5	58.7	26.2

30

【 0 0 6 1 】

【 表 5 】

HT-1080細胞に対する細胞周期分布に与える各薬剤の効果 ほぼIC ₅₀ 投与量で処理してから24時間および72時間後					
薬剤	投与量	IIr	%G1	%S期	%G2-M
コントロール			47.5	35.8	16.7
ET-743	10pM	24	42.6	36.1	21.3
		72	83.1	10.2	6.7
DXR	25nM	24	36.1	17.5	46.4
		72	46.2	5.3	48.5
TMTX	6nM	24	31.9	56.8	11.3
		72	32.0	53.7	14.4
パクリタキセル	1.3nM	24	45.4	37.3	17.3
		72	86.0	9.0	5.0

10

【0062】

結果2は、ET 743とDXR、TMTXまたはパクリタキセルのような抗腫瘍薬の一つに、1から100モル比の組合せの混合物で同時に曝されたHT 1080およびHS 18細胞をそれぞれ示す。細胞をET 743およびDXRで処理した場合、CI値は全て1以下であり、両方の細胞系統において相乗効果を示す。このスケジュールによるCI(平均)は、HT 1080細胞ではそれぞれ50、75、90および95%の細胞死で0.86、0.83、0.84および0.85であり、かつHS 18細胞ではそれぞれ50、75、90および95%の細胞死で0.89、0.74、0.64および0.60であった。この結果は、ET 743とDXRのど宇治処理が相乗的な細胞傷害効果を生じたことを示している。対照的に、細胞をET 743およびTMTXまたはパクリタキセルで処理した場合には、拮抗的な細胞傷害効果が観察された。

20

【0063】

CIプロットが、最初にET 743に24時間曝され、次いでDXRに48時間曝された両方の細胞系統から得られた。両方の細胞系統において、ET 743の後にDXRで処理したものは相乗的な細胞傷害効果を示し、80%の細胞死レベルにおけるHT 1080のCI値は0.64±0.12であり、HS 18の値は88%の細胞死レベルにおいて0.24±0.06であった。対照的に、DXRの後にET 743処理したものは(結果3a、下の図)、一見したところでは良いCI値を示したが、80%細胞死レベルでのHT 1080のCI値は1.00±0.03であり、二つの薬剤の効果が相加的であることを示し、さらに最も高いフラクションにおけるCIは、両方の細胞において、死んだ中程度のフラクションの値よりも悪かった。

30

【0064】

細胞をET 743の後にTMTXに曝した場合、HT 1080のCI値は、ほぼ1または1以上を示し、このことは二つの薬剤の効果が拮抗的または相加的であることを示唆している。対照的に、HS 18の値は全て0.6以下であり、このことはこれら二つの薬剤が相乗効果をもつことを示している。細胞をTMTXの後にET 743で処理した場合、相加的効果がHT 1080およびHS 18細胞系統の両方に観察された。

40

【0065】

パクリタキセルの後にET 743で処理することが、相乗的な細胞傷害効果を生じた。細胞をパクリタキセルの後にET 743に曝した場合、89%の細胞死レベルにおいてHT 1080のCI値は0.92±0.06であり、78%細胞死レベルにおけるHS 18のその値は0.38±0.13であった。

【0066】

概要

50

ET 743は、ヒトの柔組織肉腫細胞、特に悪性繊維肉腫細胞系統HT 1080、に対して高度に活性であった。

DXRは、ET 743と組み合わせた場合に順序とは独立の相乗効果をもたらしたが、ET 743後にDXRという順序が、両方の細胞系統に対してより効果的であった。パクリタキセルの後にET 743に曝露することも、ヒトの柔組織肉腫細胞に対して効果的な方法であったが、同時曝露は拮抗的であった。

【実施例6】

【0067】

固形腫瘍に対する化学療法薬とエクチナサイジン743 (Et 743) の *in vivo* における組合せ

Et 743について、DNAの浅いほうの溝に結合すること、グアニンのN2のアルキル化、MDR1遺伝子の転写阻害 (Jinら, PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzaら, PNAS 97, 6780, 2000)、および核レセプター-SXRの活性化の中和 (Synoldら, Nature Med 7, 584, 2001) を含む、いくつかの独特な作用メカニズムが記載されてきた。単独の薬剤として、Et 743は、*in vivo*での腫瘍増殖を阻害し、黒色腫 (MEXF 989)、NSCL (LXFL 529)、卵巣 (HOC 22)、および乳ガン (MX 1) を含むいくつかのヒトの腫瘍株 (Henricksら, Ann Oncol 10, 1233, 1999) に対して完全寛解 (CR) を達成する。別のメカニズムにより機能する薬剤と組み合わせたEt 743の効果は、各薬剤の毒性を低減する、あるいは耐性のあるまたは再発したガンにおける薬剤の効果を強化する機会を提供しうる。

【0068】

この評価のために、ドキソルビシン (DOX; 8 mg / Kg)、シスプラチン (DDP; 12 mg / Kg)、およびビンブラスチン (VINB; 6 mg / Kg) を、1時間事前処理、 $q d \times 5$ で、Et 743 (0.2 mg / Kg) の前/後に、以下の腫瘍: < 50% T / Cと定義された活性を有する軟骨肉腫 (CSHA)、骨肉腫 (OSA FH)、線維肉腫 (SW 684)、卵巣 (MRI H 1834)、NSCL (LX 1)、および腎 (MRI H 121) の一以上に投与した。中空繊維 (HF) モデルでは、DOX、1時間の事前Et 743の順序は、一貫して、Et 743単独より、軟骨肉腫 (6%対10%)、繊維肉腫 (33%対48%) および骨肉腫 (20%対34%) において、効果的であった。骨肉腫異種移植片も、17%対43%という同様の結果を示した。DDPを用いたHFの研究は、Et 743事前DDPが、Et 743単独よりも、卵巣 (28%対100%) および軟骨肉腫 (15%対19%) においてより効果的であること、および骨肉腫において同等の活性を有すること (36% T / C) を示した。異種移植片データは、Et 743事前DDPがEt 743単独よりも効果的であることを示した (35%対66%)。一つの例外はNSCLの場合であり、Et 743単独では活性ではないが (62% T / C)、しかしDDPの後にEt 743はCRを生じた (< 1% T / C)。腎の異種移植片では、Et 743単独は非常に活性 (22% T / C) であったが、Et 743の後にVINBもCRを生じた (< 1% T / C)。別個の研究が別の標準薬を用いて、乳、腎、黒色腫および胃の腫瘍異種移植片において進行中である。

【実施例7】

【0069】

ヒト横紋筋肉腫におけるエクチナサイジン743 (ET 743) およびドキソルビシン (DOX) の症状発現前の活性および生物学的分布 (biodistribution) ET 743は、抗腫瘍活性を示す新たなクラスの抗腫瘍剤の主剤である。ET 743は、DOXおよびイホスファミドに対して難治性の肉腫を有する患者において活性を示した。有効な薬剤としてのその能力という観点から、(1) ヒト横紋筋肉腫TE 671に対するET 743 / DOXの組合せの症状発現前の抗腫瘍活性、および(2) ノードマウスおよび腫瘍異種移植片における薬剤とその生物学的分布との間の可能性のある相互作用を調べた。

10

20

30

40

50

【0070】

in vitro : 各薬剤または1時間曝露後の組合せの効果を、試験管内腫瘍細胞感受性試験により評価した。ET 743またはDOX単独は、TE671細胞に対して抗腫瘍活性を示した。アイソログラム分析および組合せインデックス(Combination Index)によると、この組合せは、TE671を含むいくつかの腫瘍細胞系統において少なくとも相加的であった。

【0071】

in vivo : 一回の*iv*処理(ET 743, 0.1 mg/Kg; DOX, 10 mg/Kg)を、異種移植片の腫瘍が約100 mgの重さになったときに、ヌードマウスに投与した。腫瘍重量阻害/Log10細胞死値は、ETのみでは46%/0.132であり、DOXのみでは50%/0.33であり、ET 743とDOXを同時に投与した場合には77%/0.924であり、DOXの1時間前にET 743を投与した組合せの場合には82%/1.12であり、DOXの1時間後にET 743を投与した場合には75%/0.85であった。また、相乗効果が、ネズミの繊維肉腫UV2237およびその多剤耐性亜系UV2237/ADRに対して観察された。

10

【0072】

これらのデータは、ET 743/DOXの相乗効果を示し、これまで研究されたシナリオにおいて薬剤の順序または組合せとは独立しているように見える。DOXの血漿または腫瘍濃度のいずれも、DOXが単独またはET 743と組み合わせて投与された場合に、有意には相違しない。単独またはDOXと組み合わせたET 743の薬物動力学(PK)評価を実施中である。ET 743とDOXの組合せは*in vitro*では相加的であり、*in vivo*では横紋筋肉腫TE671において相乗的であるように見える。DOXのPKプロファイルは、ET 743を用いた並行処理により影響されない。これらのデータは、初期の臨床試験においてこの組合せを使用することの根拠を提供する。

20

【実施例8】

【0073】

ET 743およびシスプラチン(DDP)は、ヒトの肉腫および卵巣ガン細胞系統に対して*in vivo*および*in vitro*で相乗効果を示す。

ここでは、ET 743が*in vitro*および*in vivo*の両方でDDPの活性を増強することを示す。ヒトの腸管ガン(HCT116)、卵巣ガン(Igrov 1、A2780)、これらの耐性亜系(それぞれIgrov 1/PSC ETおよび1A9)、および横紋筋肉腫(TE671)を含むいくつかのガン細胞系統では、単独の薬剤として用いた低濃度のET 743が、DDP活性を少なくとも2倍増強することができた。ET 743のIC30/IC50に対応する濃度が、相加または相乗効果のいずれかをもたらした。これらの結果は、ET 743との有効な薬剤の組合せを調べるための、異種移植片モデルを用いた*in vivo*での研究を導いた。

30

【0074】

ET 743およびDDPに部分的に感受性である*sc*移植TE671において、これら二つの薬剤の組合せは、それら個々のMTDレベルで使用した各薬剤で達成される効果よりはるかに大きな抗腫瘍効果を生じた。通常、単独薬剤としてのET 743とDDPの両方に耐性な卵巣1A9腫瘍だが、組み合わせた場合、50%より大きな腫瘍増殖阻害を生じた。正常位に移植されたヒト卵巣ガンHOC8は、腹水を含む腹腔内に腫瘍小結節を生じ、ET 743に耐性であり、かつDDPに部分的に感受性であるが、組み合わせた場合には、0.05 mg/Kg(1/4 MTD)のET 743の投与量でさえ生存能に劇的な増大をもたらし、有意な毒性を何ら引き起こさなかった。0.15 mg/KgというET 743の投与量は、生存能を著しく増大させるが、重量低下により示される毒性の増大も存在し、それは各薬剤で処理した後に観察されるものよりも有意に高いものであった。

40

【0075】

これらの知見は、肉腫および卵巣ガンにおいてET 743およびDDPの組合せを用い

50

る臨床試験を設計する強力な根拠を提供する。i n v i t r o および i n v i v o 研究は、これらのガンのタイプにおいて E T 743 と D D P との間の相乗効果を強調するメカニズムを説明するために進行中である。

【実施例 9】

【0076】

高い投与量のデキサメタゾン (d e x) は、ラットにおいて、エクチナサイジン - 743 (E T 743) による肝毒性から保護する。

E T 743、すなわち海産の尾索類から得られた薬剤は、現在第二相臨床試験に入っている。これは肉腫に対する臨床活性を示し、予備データは乳ガンおよび卵巣ガンに対する活性を示唆している。しかしながら、可逆的なトランスアミニテイス (t r a n s a m i n i t i s) により特徴付けられる肝毒性は、処置された患者の殆どに生じ、胆汁うっ滞が少数に生じる。最も感受性のある動物種、すなわちラットでは、E T 743 の毒性は肝臓のネクロシスおよび胆管炎症により特徴付けされる。d e x の抗炎症活性という観点から、ラットにおける、E T 743 により誘導された肝臓損傷に与えるその効果を調べた。メスの W i s t a r ラットに、一回の E T 743 (40 μ g / k g) を i v で投与した。一部のラットを、E T 743 処理の 24 時間前に、それぞれ 1、5、10 または 20 m g / k g で、d e x の一回の経口投与により事前処理した。肝臓の病理および、アルカリホスファターゼ (A L P)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (G O T) および全ビリルビン (T B) の血漿濃度を、E T 743 投与後 3 日まで評価した。肝臓の慣例的な組織学的断面を、光学顕微鏡で調べた。

10

20

【0077】

E T 743 処理から 2 日後に、E T 743 単独を投与されたラットの肝臓は胆管炎症、胆管上皮細胞の著しい変性、および肝臓のネクロシスの領域を示した。A L P および G O T の血漿レベルは、2 日後に有意に上昇した。胆汁うっ滞は、E T 743 の 2 日後に開始された血漿 T B 濃度の劇的な増大により反映された。E T 743 が誘導した組織病理学的変化および血漿 A L P、G O T および T B の上昇は、10 または 20 m g / k g の d e x で事前処理したラットにおいて全体的に排除された。

【0078】

1 m g / k g の d e x は殆ど保護を示さないが、5 m g / k g は適度に保護的であった。E T 743 の投与前の 3 日間にわたって毎日 d e x (50 m g / k g) を投与されたラットの E T 743 の血漿レベルは、E T 743 のみを投与されたラットと比べて低減されなかった。さらに、マウスに移植された B 16 黒色腫に対する E T 743 の活性は、デキサメタゾンにより妨げられなかった。これらの知見は、E T 743 に高投与量のデキサメタゾンを加えることが、ガン患者における肝毒性を緩和しうることを示唆する。

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/36135 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K 35/00**,
45/06, 31/495
- (21) International Application Number: PCT/GB01/04902
- (22) International Filing Date:
6 November 2001 (06.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/246,233 6 November 2000 (06.11.2000) US
60/248,095 13 November 2000 (13.11.2000) US
60/345,982 19 October 2001 (19.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
PHARMA MAR, S.A. [ES/ES]; Calle de la Calera,
3, Poligono Industrial de Tres Cantos, Tres Cantos,
E-28760 Madrid (ES).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **TAKAHASHI,
Naoto** [JP/US]; Memorial Sloan Kettering 1275 York
Avenue, New York, NY 10021 (US). **WEITMAN, Steve**
[US/US]; Institute for Drug Development, Cancer Ther-
apy and Research Center (CTRC), 14960 Omicron, San
Antonio, TX 78245-3217 (US). **D'INCALCI, Maurizio**
[IT/IT]; Istituto de Recherch Farmacologiche Mario Ne-
gri, I-Milan (IT). **FAICLOTH, Glyn, Thomas** [US/US];
PharmaMar USA, Inc., 320 Putnam Avenue, Cambridge,
MA 02139-4616 (US). **GIAMAZZI, Raffaella** [IT/IT];
Istituto de la Recherch Farmacologiche Mario Negri, I-
Milan (IT). **GESCHER, Andreas** [DE/GB]; 7 Swithland
Court, Brand Hill, Woodhouse Eaves LE12 8SS (GB).
- (74) Agent: **RUFFLES, Graham, Keith**; Marks & Clerk,
57-60 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LS (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/36135 A2

(54) Title: EFFECTIVE ANTITUMOUR TREATMENTS

(57) Abstract: ET-743 is used in the preparation of a medicament for an effective treatment of a tumour by combination therapy employing ET-743 with another drug.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

1

Effective Antitumour Treatments

The present invention relates to effective antitumour treatments.

Ecteinascidin 743, ET743, is an anticancer agent derived from a marine source.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The reader is referred to WO0069441 published 23 November 2000 for information on compositions and uses of ET743 for treating cancer. This text is incorporated by reference.

SUMMARY OF THE INVENTION

In accordance with one aspect of this invention, we provide effective combination therapies based on ecteinascidin 743, using other drugs.

PREFERRED EMBODIMENTS

The other drugs may form part of the same composition, or be provided as a separate composition for administration at the same time or a different time. The identity of the other drug is not particularly limited, and suitable candidates include:

- a) drugs with antimetabolic effects, especially those which target cytoskeletal elements, including microtubule modulators such as taxane drugs (such as taxol, paclitaxel, taxotere, docetaxel), podophylotoxins or vinca alkaloids (vincristine, vinblastine);
- b) antimetabolite drugs such as 5-fluorouracil, cytarabine, gemcitabine, purine analogues such as pentostatin, methotrexate);

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

2

- c) alkylating agents such as nitrogen mustards (such as cyclophosphamide or ifosfamide);
- d) drugs which target DNA such as the anthracycline drugs adriamycin, doxorubicin, pharmonubicin or epirubicin;
- e) drugs which target topoisomerases such as etoposide;
- f) hormones and hormone agonists or antagonists such as estrogens, antiestrogens (tamoxifen and related compounds) and androgens, flutamide, leuprorelin, goserelin, cyprotrone or octreotide;
- g) drugs which target signal transduction in tumour cells including antibody derivatives such as herceptin;
- h) alkylating drugs such as platinum drugs (cis-platin, carbonplatin, oxaliplatin, paraplatin) or nitrosoureas;
- i) drugs potentially affecting metastasis of tumours such as matrix metalloproteinase inhibitors;
- j) gene therapy and antisense agents;
- k) antibody therapeutics;
- l) other bioactive compounds of marine origin, notably the didemmins such as aplidine;
- m) steroid analogues, in particular dexamethasone;
- n) anti-inflammatory drugs, in particular dexamethasone; and
- o) anti-emetic drugs, in particular dexamethasone.

As part of this patent specification, we include a series of examples and now refer to them. These examples demonstrate the increased effectiveness of ET-743 when used in combination with other drugs and are concerned with different combinations using ET-743.

Example 1 relates to effective combinations of ET-743 and doxorubicin for tumour growth inhibitions against marine and human sarcomas in athymic mice.

Example 2 shows ecteinascidin 743 (ET-743) and doxorubicin produce synergistic cytotoxic effects in soft tissue sarcoma lines HT-1080 and HS-18.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

3

These two examples show more than additive effects of the combination of ET-743 with anthracyclines (in particular doxorubicin) which is more effective than either alone against human tumours (in these specific experiments sarcoma), which effects occur independent of sequence of administration. Such results show clear promise for treatment of patients.

Example 3 shows a synergistic cytotoxic effect of ET-743 and cisplatin.

Example 4 provides a sequencing evaluation of ET-743 in combinations with chemotherapy agents against a panel of human tumour cell lines, in particular ET743 combinations with doxorubicin, taxol, SN-38, cisplatin, and gemcitabine.

These two show more than additive effects of the combination of ET-743 with platinum antitumour compounds, (in particular Cis-platin) with the nucleoside analogue gemcitabine, and with an inhibitor of topoisomerase II (SN38, which is the active agent produced from pro-drug CPT-11, a drug of the camptothecin group). Again these combinations are more effective than either drug alone against human tumours (in these specific experiments against a variety of tumour cells: ovarian, colon, lung, breast, bone sarcoma), which effects were dependent on sequence of exposure in some cases. Again there is promise for treatment of patients.

Interestingly, synergistic action was clearly not predictable: Example 4 indicates that in most combinations tested, no synergy was observed (in fact, antagonism was reported in some cases).

Example 5 relates to evaluation of combinations of Et-743 with doxorubicin or trimetrexate or paclitaxel.

It shows more than additive effects of the combination of ET-743 with anthracyclines (in particular doxorubicin) which is more effective than either alone against human tumours (in these specific experiments sarcoma), which effects occur independent of sequence of administration. Such results show clear promise for treatment of patients.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

4

Examples 6 to 8 reinforce and complement the previous examples, and especially show the synergy of ET-743 and doxorubicin and also ET-743 with cisplatin.

Example 9 demonstrates a different kind of effectiveness of the combinations of this invention, where high-dose dexamethasone protects against the hepatotoxicity of ecteinascidin-743 (ET-743).

In summary, this invention therefore provides compositions, methods of treatment, processes for preparing compositions and related embodiments.

The present invention also extends to the compounds of the invention for use in a method of treatment, and to the use of the compounds in the preparation of a composition for treatment of cancer.

Thus, the present invention provides a method of treating any mammal, notably a human, affected by cancer which comprises administering to the affected individual a therapeutically effective amount of a compound of the invention, or a pharmaceutical composition thereof.

The present invention also relates to pharmaceutical preparations including a pharmaceutically acceptable carrier, which contain as active ingredient a compound or compounds of the invention, as well as the processes for their preparation.

Examples of pharmaceutical compositions include any solid (tablets, pills, capsules, granules, etc.) or liquid (solutions, suspensions or emulsions) with suitable composition or oral, topical or parenteral administration, and they may contain the pure compound or in combination with any carrier or other pharmacologically active compounds. These compositions may need to be sterile when administered parenterally.

Administration of the compounds or compositions of the present invention may be by any suitable method, such as intravenous infusion, oral preparations, intraperitoneal and intravenous administration. We prefer that infusion times of up to 24 hours are used, more preferably 2-12 hours, with 2-6 hours most preferred. Short infusion times which

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

5

allow treatment to be carried out without an overnight stay in hospital are especially desirable. However, infusion may be 12 to 24 hours or even longer if required. Infusion may be carried out at suitable intervals of say 2 to 4 weeks. Pharmaceutical compositions containing compounds of the invention may be delivered by liposome or nanosphere encapsulation, in sustained release formulations or by other standard delivery means.

The correct dosage of the compounds will vary according to the particular formulation, the mode of application, and the particular *situs*, host and tumour being treated. Other factors like age, body weight, sex, diet, time of administration, rate of excretion, condition of the host, drug combinations, reaction sensitivities and severity of the disease shall be taken into account. Administration can be carried out continuously or periodically within the maximum tolerated dose.

The combinations of this invention can be used on refractory patients. The reader is referred to WO0069441 for information on dosing schemes for ET-743 and other information of use in the combination therapy of this invention.

EXAMPLES OF THE INVENTION

Example 1

Effective Combinations Of Et-743 And Doxorubicin For Tumor Growth Inhibitions Against Murine And Human Sarcomas In Athymic Mice

ET-743 has confirmed clinical activity in patients with soft and bone sarcoma refractory to previous chemotherapy including Doxorubicin (Dx) and Isosfamide. In view of the potential clinical value in combining ET-743 with Dx we have investigated this combination against the murine fibrosarcoma UV2237, its mdr-resistant subline UV2237/ADR and the human rhabdomyosarcoma xenograft TE671. Both ET743 and Dx alone were effective against murine UV2237 fibrosarcoma whereas each was inactive or marginally active against both UV2237/ADR and TE671. However, the combination of ET743 and Dx was effective in all 3 models. The synergism was particularly marked in the

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

6

human rhabdomyosarcoma TE671 and appeared independent of drug sequence or combination.

After single i.v. treatments performed when the tumor TE671 was approximately of 100 mg tumor weight inhibition (IWI) and Log 10 Cell Kill (LCK) values were respectively 46% and 0.132 for ET-743 (0.1 mg/kg) alone, 50% and 0.33 for Dx (10 mg/kg) alone, 77% and 0.924 for ET-743 (0.1 mg/kg) and Dx (10 mg/kg) given simultaneously, 82% and 1.12 for the combination of ET-743 (0.1 mg/kg) given 1 hour before Dx (10 mg/kg) and 75% and 0.85 for the combination of ET-743 (0.1 mg/kg) given 1 h after Dx (10 mg/kg).

These data suggest that the combination of ET-743 and Dx can also be effective in tumors that are not sensitive or marginally sensitive to these drugs given alone, thus providing a strong rationale for clinical investigations using this combination.

Example 2

Ecteinascidin 743 (et-743) and Doxorubicin Produce Synergistic Cytotoxic Effects in Soft Tissue Sarcoma Lines HT-1080 and HS-18.

Two sarcoma cell lines, HT 1080, a fibrosarcoma cell line sensitive to ET-743 ($IC_{50} = 10\text{pm}$) and HS-18, a liposarcoma cell line, less sensitive to ET-743 ($IC_{50} = 270\text{pm}$) were evaluated for toxicity to ET-743 in combination with either doxorubicin, trimetrexate or paclitaxel. When ET-743 was used in combination with each of these drugs at a constant molar ration, and analysed by the method of Chou and Talalay, synergistic effects were obtained (72 hr incubation) with the ET-743-doxorubicin combination, but not with the combination of ET-743 with trimetrexate or paclitaxel. When cells were exposed to ET-743 for 72 hr, and either doxorubicin, trimetrexate or taxol for the last 48 hrs of incubation, synergistic effects were also obtained with doxorubicin against both sarcoma cell lines. Of interest, the sequence paclitaxel followed by ET-743 was more effective than the opposite sequence. These results encourage clinical trials of doxorubicin in combination with ET-743 to treat patients with soft tissue sarcoma, as both of these drugs have shown activity against this disease.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

7

Example 3

Synergistic Cytotoxic Effect Of Et-743 And Cisplatin

Ecteinascidin 743 (ET-743) has shown striking antitumor activity in several preclinical systems and promising clinical activity. ET-743 binds N2 guanines in the minor groove and affects the regulation of transcription (Minuzzo et al., PNAS, Vol. 97,6780-84, 2000).

Previous studies have indicated that mismatch repair (MMR) deficient cells are equally sensitive to ET-743 as proficient cells. NER deficient cells very sensitive to cisplatin are 6-8 times less sensitive to ET-743. On the basis of the different mechanisms involved in the repair of ET-743 and cisplatin and because of the potential clinical interest in this combination we have performed studies to evaluate the cytotoxic effects of ET-743 and cisplatin in several human tumor cell lines. Human ovarian cancer Igrove-1 cell line, a subline resistant to ET-743 (IG/PSC/ET), human colon cancer HCT 116, (MMR deficient) and HCT11-ch3 (MMR proficient) cell lines were used in this study.

The cells were treated for 1 or 24 h with different concentrations of ET-743 or cisDDP, alone or in combinations, and the cytotoxicity was evaluated by using a colorimetric assay after sulforodhamine B staining. In all the cell lines a synergistic effect was observed both with 1 h or 24 h exposure. Interestingly in HCT116 resistant to cisDDP ET-743 was apparently able to reverse sensitivity even at concentrations of ET-743 which alone were marginally effective. Taken together the data provide a rationale for undertaking clinical studies combining ET-743 with cisDDP.

Example 4

Et743 Combinations With Doxorubicin, Taxol, Sn-38, Cisplatin, And Gemcitabine

ET-743 was evaluated in combination with doxorubicin, taxol, SN-38, cisplatin, and gemcitabine against a panel of human tumor cell lines. These studies were designed to determine the type of drug-drug interaction between ET-743 and standard chemotherapy agents and the influence of sequence of exposure on antitumor activity. Multiple combinations of ET-743 with standard cytotoxic agents were used with a model-free design (Laska, *et al. Biometrics* 50:834, 1994) to describe the type of drug-drug interaction. These studies suggest that regardless of exposure, an additive pattern of drug-drug interaction is most typically observed.

A synergistic drug-drug interaction was observed when ET-743 was combined against non-small cell lung (pre-exposure to SN-38), osteosarcoma (pre-exposure with ET-743 followed by cisplatin), breast (pre-exposure to ET-743 followed by gemcitabine), colon (pre-exposure with ET-743 followed by SN-38 and concurrent exposure with SN-38) tumor cell lines. An additive/synergistic (pre-exposure to ET-743 followed by SN-38 against NSCL; pre-exposure to SN-38 against colon and NSCL; concurrent exposure with cisplatin against osteosarcoma, and with SN-38 against NSCL lines) pattern of drug-drug interaction was observed. Evidence of antagonism was noted when taxol was utilized concurrently against two NSCL lines, and doxorubicin against a rhabdomyosarcoma cell line.

These studies suggest that ET-743 which is in Phase II clinical trials, could be combined with several cytotoxic agents against a broad-range of tumor types.

Material And Methods

Cell culture:

Human breast (MDA-435, MDA-231, T-470), non-small cell lung (NCI-H522, NCI-H226, NCI-H23), colon (HCT-116, HT-29, Colo-320), osteosarcoma (HOS, U-2, OS, SaOS-2), rhabdomyosarcoma (RH1, RH30, RD) tumor cell lines were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 2mM L-glutamine. All stock cultures were maintained in 75 cm² flasks at 37°C in humidified incubators with a 5% CO₂-95% air atmosphere.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

9

IC₅₀ Analysis:

A pre-determined number of exponentially growing tumor cells were inoculated in 96-well tissue culture plates and allowed to stabilize for 24 hours. Afterwards, a drug plate consisting of serial diluted concentrations of ET-743 or standard chemotherapy agents was added to the cells. Cells were incubated as a 24-hour exposure for three days followed by the addition of MTT for 4 hours. Resultant formazan crystals were then solubilized with acid/alcohol, with absorbance (570 nm-test/630 nm-reference) determined using a microplate reader. Results were expressed as percent tumor cell kill compared to media controls.

Combination Studies:

For the combination studies, the concentration (expressed as a percent of the individual agent's IC₅₀) schema used to characterize the type of interaction is shown below:

Drug Concentration (Expressed as a percent of the IC ₅₀)	
ET-743	Standard agents
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

Statistical Analysis of Combination Studies:

Statistical comparisons are made with each test combination (75:25-ET-743/standard agents) and the endpoints (100:0-ET-743 and 0:100-standard agents). A statistically significant observation requires that a difference exists between the combination (ET-743 and standard agents) absorbance value and both endpoint values (ET-743 and standard

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

10

agents alone). If the majority of (≥ 3 of 5) the values are statistically above or below the line then antagonism or synergy is described, respectively. Otherwise the pattern is more consistent with an additive interaction. Interpretation is very difficult if there is considerable slope to the line connecting the endpoints. If the slope of the IC₅₀ curves for the individual agents are identical (unlikely) then you can, at times, determine the type of interaction.

Sequencing Combination of ET-743 with Chemotherapy Agents		
Tumor Type/Cell Line	Exposure Conditions/Agents	Drug-Drug Interactions Observed
<u>Osteosarcoma</u>		
NOS	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to cisplatin	Synergistic
	24 hour cisplatin followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-743/cisplatin exposure	Additive
U2-OS	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to cisplatin	Additive
	24 hour cisplatin followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-743/cisplatin exposure	Additive
Sa06	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to cisplatin	Additive
	24 hour cisplatin followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-743/cisplatin exposure	Additive/Synergistic
<u>Non-Small Cell Lung</u>		
	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to taxol	Additive

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

11

NCB-H226	24 hour taxol followed by 24 hour exposure to ET-734	Additive
	24 hour concurrent ET-743/taxol exposure	Antagonistic
	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN38	Additive/Synergistic
	24 hour SN-38 followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive/Synergistic
	24 hour concurrent ET-743/SN-38 exposure	Additive
NCB-N522	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to taxol	Additive
	24 hour taxol followed by 24 hour exposure to ET-734	Additive
	24 hour concurrent ET-743/taxol exposure	Antagonistic
	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN38	Additive/Synergistic
	24 hour SN-38 followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive/Synergistic
	24 hour concurrent ET-743/SN-38 exposure	Additive
NCB-N23	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to taxol	Additive/Antagonistic
	24 hour taxol followed by 24 hour exposure to ET-734	Additive
	24 hour concurrent ET-743/taxol exposure	Antagonistic
	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN38	Additive
	24 hour SN-38 followed by 24 hour exposure to ET-743	Synergistic
	24 hour concurrent ET-743/SN-38	Additive/Synergistic

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

12

	exposure	
Breast		
MDA-435	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to gemcitabine	Additive
	24 hour gemcitabine followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-473/gemcitabine	Additive
MDA-231	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to gemcitabine	Additive
	24 hour gemcitabine followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-473/gemcitabine	Additive
T47-8	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to gemcitabine	Additive
	24 hour gemcitabine followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-473/gemcitabine	Additive
Colon		
MCT-116	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN-38	Synergistic
	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN-38	Additive
	24 hour concurrent ET-743/SN exposure	Additive
NT-29	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN-38	Additive
	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN-38	Additive
	24 hour concurrent ET-743/SN exposure	Additive
Colo-320	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN-38	Additive
	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure to SN-38	Additive/Synergistic
	24 hour concurrent ET-743/SN exposure	Synergistic

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

13

<u>rhabdomyo- sarcoma</u>		
RN1	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure doxorubicin	Additive
	24 hour doxorubicin followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-743/doxorubicin exposure	Antagonistic
RD	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure doxorubicin	Additive
	24 hour doxorubicin followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-743/doxorubicin exposure	Additive/Antagonistic
RN30	24 hour ET-743 followed by 24 hour exposure doxorubicin	Additive
	24 hour doxorubicin followed by 24 hour exposure to ET-743	Additive
	24 hour concurrent ET-743/doxorubicin exposure	Antagonistic

Conclusions-Summary

These studies suggest that regardless of sequence of exposure between ET-743 and standard chemotherapy agents, an additive pattern of drug-drug interaction is most typically observed.

Evidence of synergy was observed when NCI-H522 and NCI-H23 NSCL lines were pre-exposed to SN-38, pre-exposure to ET-743 with cisplatin against HOS osteosarcoma, T-470 breast cell line with gemcitabine, SN-38 against HCT-116 colon, and concurrent exposure with SN-38 against Colo-320 colon tumor cell line.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

14

Evidence of antagonism was observed when taxol was utilized concurrently against the NC1-H226 and NC1-H23 NSCL cell line and doxorubicin against the RHI rhabdomyosarcoma tumor cell line.

Example 5

Interaction Between ET-743 And Other Antineoplastic Agents

Although ET-743 is presently in clinical trials from human cancers, the mechanisms of antitumor activity of ET-743 have not been completely elucidated. The aim of this study was to assess the nature of the interaction between ET-743 and other antineoplastic agents (doxorubicin; DXR, trimetrexate; TMTX and Paclitaxel; Taxol) using the combination index (CI) method of Chou and Talalay. To better understand how ET-743 might be used clinically, the present study used SRB assays to examine the cytotoxicity resulting from combining ET-743 with three other antineoplastic agents in the different administration schedules in two soft tissue sarcoma cell lines, HT-1080 and HS-18, in vitro. DXR was the only agent that resulted in sequence-independent synergy when combined with ET-743. Concurrent exposure of ET-743 with DXR resulted in synergistic interactions in both cell lines.

The CIs (mean) with the schedule were 0.86, 0.83, 0.84 and 0.85 at 50, 75, 90 and 95% cell kill, respectively, in HT-1080 cells and 0.89, 0.74, 0.64 and 0.60 at 50, 75, 90 and 95% cell kill, respectively, in HS-18 cells. Sequencing with ET-743 for 24 h prior to DXR was the most effective regimen against both cell lines; it resulted in consistently low CI of up to the about 90% cell kill level for both cell lines. Exposure to Taxol prior to ET-743 was also an effective regimen. These results suggest that the combination of ET-743 and DXR should be explored further in clinical trials in the treatment of soft tissue sarcoma.

Materials And Methods

Chemicals

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

15

ET-743 was provided by Pharma-Mar S.A (Tres Cantos, Madrid, Spain), and was prepared as a 2 mM stock solution in dimethyl sulfoxide. Paclitaxel and DXR were obtained from Sigma chemical Co. (St. Louis, MO). TMTX was supplied by Warner-Lambert (Parke-Davis, Ann Arbor, Mich).

Cell Culture

Soft tissue sarcoma cell lines, HT-1080 and HS-18 were maintained as monolayer cultures in RP<I-1640 containing 10% fetal bovine serum.

SRB Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity to drugs was determined by SRB cytotoxicity assay carried out in 96-well microtiter plates as described. Cells were plated in duplicate wells (5000 cells/well) and exposed to drugs at different concentrations. Cells were fixed with 50% TCA solution for 1 h and 0.4% SRB (Sigma) was added to each well. After a 30 min incubation, the plate was washed with 1% acetic acid and read at 570 nm on a Biowhitaker microplate reader 2001. The wells with cells containing no drugs and with medium plus drugs but no cells were used as positive and negative controls, respectively.

Concurrent Exposure to ET-743 and DXR, TMTX or Paclitaxel

Cells were seeded into 96-well plates, as described previously. Cells were treated with seven different concentrations of the single drugs or combinations mixture at 1:100 (ET-743 : the other drugs) molar ratio. After 72 h exposure, growth inhibition was measured using the SRB assay.

Sequential Exposure to ET-743 and DXR, TMTX or Paclitaxel

Using the same experimental setup described above, we exposed cells to three different concentrations of drugs which represents the IC_{25} , IC_{50} , IC_{75} of ET-743, DXR, TMTX and paclitaxel, respectively. After 24 hours pre-treatment with ET743 or the combination

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

16

drug, the second drugs were added to the respective wells for 48 h. Growth inhibition was determined using the SRB assay.)

Cell Cycle Analysis

Exponentially growth cells were treated with or without drugs for several hours. Cells were then collected and fixed with ice-cold 70% methanol. DNA was stained with propidium iodide as described previously. Ten thousand stained cells were analyzed on a Becton Dickinson fluorescence-activated cell sorter (FACS).

Determination of Synergism and Antagonism and Construction of Isobolograms

The CI was calculated by the Chou-Talalay equation, which takes into account both potency (D_m or IC_{50}) and the shape of the dose effect curve (the m value). The general equation for the classic isobologram ($CI = 1$) is given by:

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 \quad (A)$$

where $(Dx)_1$ and $(Dx)_2$ in the denominators are the doses (or concentrations) for D_1 (ET-743) and D_2 (another drug) alone that give $X\%$ inhibition, whereas $(D)_1$ and $(D)_2$ in the numerators are doses of ET-743 and another drug in combination also inhibited $X\%$ (ie isoeffective). $CI < 1$, $CI = 1$, $CI > 1$ indicated synergism, additive effect and antagonism, respectively.

The $(Dx)_1$ or $(Dx)_2$ can be readily calculated from the median-effect equation of Chou and Chou et al:

$$Dx = Dm [fa / (1 - fa)]^{1/m} \quad (B)$$

where Dm is the median-effect dose that is obtained from the anti-log of the X-intercept of the median-effect plot, $X - \log(D)$ versus $Y - \log[fa / (1 - fa)]$ or $Dm = 10^{-(X-intercept)/m}$, and m is the slope of median-effect plot. Computer software of Chou and Chou allows automated calculation of m , Dm , Dx , and CI values. From $(Dm)_1$, $(Dx)_2$, and $D_1 + D_2$, it becomes easy to construct isobolograms automatically based on Eq. A.

For conservative mutually nonexclusive isobolograms of two agents, a third term,

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

17

(D1) (D2) / (DX)₁ (DX)₂

(C)

is added to Eq. A.

For simplicity, the third term is usually omitted, and thus the mutually exclusive assumption or classic isobologram is indicated. In Result 2 and 3, the CI values obtained from the classic (mutually exclusive) calculation are given.

Result 1

Cytotoxicity of four drugs on HT-1080 and S18			
IC ₅₀ for human soft tissue sarcoma cells			
		HT-1080	HS-18
ET-743	(nM)	0.01	0.27
DXR	(nM)	25	225
TMTX	(nM)	6	70000
Paclitaxel	(nM)	1.3	10

This table showed that both HT-1080 and S18 cell lines were more sensitive to ET-743 than other antineoplastic agents.

Effect of each agent on cell cycle distribution against HS-18 cells 24 h and 72 h after treatment with approximate IC ₅₀ dose					
Drugs	Dose	HR	%G1	%S Phase	%G2-M
Control			76.3	11.2	12.5
ET-743	270 pM	24	32.4	47.6	20.0
		72	86.7	8.4	4.9
DXR	225 nM	24	10.1	64.9	25.0
		72	1.3	63.8	34.9
TMTX	70 uM	24	44.2	53.8	1.9
		72	35.5	57.6	7.0
Paclitaxel	10 nM	24	32.8	52.5	15.5

		72	23.5	58.7	26.2
--	--	----	------	------	------

Effect of each agent on cell cycle distribution against HT-1080 cells 24 h and 72 h after treatment with approximate IC ₅₀ dose					
Drugs	Dose	Hr	%G1	%S phase	%G2-M
Control			47.5	35.8	16.7
ET-743	10 pM	24	42.6	36.1	21.3
		72	83.1	10.2	6.7
DXR	25 nM	24	36.1	17.5	46.4
		72	46.2	5.3	48.5
TMTX	6 nM	24	31.9	56.8	11.3
		72	32.0	53.7	14.4
Paclitaxel	1.3 nM	24	45.4	37.3	17.3
		72	86.0	9.0	5.0

Result 2 shows the CI for HT-1080 and HS-18 cells, respectively, which were simultaneously exposed to ET-743 and one of antineoplastic drugs, such as DXR, TMTX or paclitaxel, at 1 to 100 molar ratio combination mixture. When cells were treated with ET-743 and DXR, the CI values were all below 1, indicating synergism effect in both cell lines. The CI (mean) with this schedule were 0.86, 0.83, 0.84 and 0.85 at 50, 75, 90 and 95% cell kill, respectively, in HT-1080 cells and 0.89, 0.74, 0.64 and 0.60 at 50, 75, 90 and 95% cell kill, respectively, in HS-18 cells. This result showed that concurrent treatment of ET-743 and DXR produced synergistic cytotoxic effect. In contrast, when cells were treated with ET-743 and TMTX or paclitaxel, antagonism cytotoxic effect was observed.

The CI plot was obtained from both cell lines which were initially exposed to ET-743 for 24 h, followed by DXR for 48 h. In both cell lines, ET-743 followed by DXR treatment showed synergistic cytotoxic effect, the CI value of HT-1080 at 80% cell kill level was 0.64 ± 0.12 and that of HS-18 at 88% cell kill level was 0.24 ± 0.06 . In contrast, DXR followed by ET-743 treatment (Result 3a, lower figure) demonstrated the good CI value at first sight however, the CI value of HT-1080 at 80% cell kill level was 1.00 ± 0.03 , indicating that the

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

19

effect of the two agents were additive, in addition, the CI at highest fraction killed was worse than that at middle fraction killed in both cells.

When cells were exposed to ET-743 followed by TMTX, the CI values of HT-1080 showed nearly one or over one, indicating that the effect of the two agents are antagonism or additive. In contrast, those of HS-18 were all under 0.6, demonstrating that these two drugs have synergy effect. When cells were treated with TMTX followed by ET-743, additive effect was observed in both HT-1080 and HS-18 cell lines.

Paclitaxel followed by ET-743 treatment produced synergistic cytotoxic effect. When cells were exposed to paclitaxel followed by ET-743, the CI value of HT-1080 at 89% cell kill level was 0.92 ± 0.06 and that of HS-18 at 78% cell kill level was 0.38 ± 0.13 .

Summary

ET-743 was highly active against human soft tissue sarcoma cells, especially against the malignant fibrosarcoma cell line HT-1080.

DXR resulted in sequence-independent synergy when combined with ET-743, however, sequencing with ET-743 followed by DXR was more effective against both cell lines.

Exposure to paclitaxel followed by ET-743 was also an effective regimen against human soft tissue sarcoma cells, while concomitant exposure was antagonistic.

Example 6

In vivo combinations of chemotherapeutic agents with Ecteinascidin 743 (Et743) against solid tumors.

Several unique mechanisms of action have been described for Et743 including binding to the minor groove of DNA, alkylation of the N2 of guanine, transcriptional inhibition of MDR1 gene (Jin et. al., PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzo et. al., PNAS 97, 6780, 2000) and

counteracting the activation of nuclear receptor SXR (Synold et. al., Nature Med 7, 584, 2001). As a single agent, Et743 inhibits *in vivo* tumor growth achieving complete remissions (CR) against several human tumor strains (Hendriks et. al., Ann Oncol 10, 1233, 1999) including melanoma (MEXF 989), NSCL (LXFL 529), ovary (HOC 22) and breast carcinoma (MX-1). The effectiveness of Et743 in combination with drugs that work by alternate mechanisms may provide opportunities to reduce the toxicities of either drug or to potentiate the effectiveness of a drug in resistant or relapsed cancers.

For this evaluation several agents including doxorubicin (DOX; 8 mg/Kg), cisplatin (DDP; 12 mg/Kg) and vinblastine (VINB; 6 mg/Kg) were administered before/after Et743 (0.2 mg/Kg) with 1 hour pretreatment, qdx5, in one or more of the following tumors: chondrosarcoma (CSHA), osteosarcoma (OSA-FH), fibrosarcoma (SW684), ovary (MRI-H-1834), NSCL (LX-1) and renal (MRI-H-121) with activity defined as < 50% T/C. In the hollow fiber (HF) model, the sequence of DOX, 1 hr pre-Et743 was consistently more effective than Et743 alone in chondrosarcoma (6% vs. 10%), fibrosarcoma (33% vs. 48%) and osteosarcoma (20% vs. 34%). Osteosarcoma xenografts produced similar results of 17% vs. 43%. HF studies with DPP showed that Et743 pre-DDP was more effective than Et743 alone in ovary (28% vs. 100%) and chondrosarcoma (15% vs. 19%) and equivalent activities in osteosarcoma (36% T/C). Xenograft data confirms the sequence of Et743 pre-DDP as more effective than Et743 alone (35% vs. 66%). The one exception was in NSCL where Et743 alone was not active (62% T/C) but DPP followed by Et743 produced CR (<1% T/C). In renal xenografts Et743 alone was very active (22% T/C) but Et743 followed by VINB also produced CR (<1% T/C). Separate studies are underway with other standard agents in breast, renal, melanoma and gastric tumor xenografts.

Example 7

Preclinical activity and biodistribution of Ecteinascidin 743 (ET-743) and Doxorubicin (DOX) combinations in human rhabdomyosarcoma.

ET-743 is the first of a new class of antitumor agents that exhibits anti-tumor activity. ET-743 has shown activity in patients with sarcoma refractory to DOX and ifosfamide. In

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

21

view of its potential as an effective drug, we investigated (1) the preclinical anti-tumor activity of ET-743/DOX combination against the human rhabdomyosarcoma TE 671 and (2) possible interactions between the drugs and their biodistribution in nude mice and tumor xenografts.

In vitro: The effect of each drug or combination after 1 hr exposures was evaluated by clonogenic assay. ET-743 or DOX alone showed anti-tumor activity against TE 671 cells. The combination according to isobologram analysis and Combination Index, was at least additive in several tumor cell lines including TE 671.

In vivo: Single iv treatments (ET-743, 0.1mg/Kg; DOX, 10mg/Kg) were administered in nude mice when xenograft tumors weighed approximately 100 mg. Tumor weight inhibition/Log10 Cell Kill values were 46%/0.132 for ET alone, 50%/0.33 for DOX alone, 77%/0.924 for ET-743 and DOX given simultaneously, 82%/1.12 for the combination of ET-743 given 1h before DOX, and 75%/0.85 when ET-743 was given 1h after DOX. A synergistic effect has also been observed against the murine fibrosarcoma UV2237 and against its multidrug resistant subline UV2237/ADR.

These data show a synergistic effect of ET-743/DOX and appears to be independent of drug sequence or combination in the scenarios studied thus far. Neither the plasma nor the tumor concentrations of DOX are significantly different when DOX was given alone or in combination with ET-743. The pharmacokinetic (PK) evaluation of ET-743 given alone or in combination with DOX is underway. The combination of ET-743 and DOX appears additive in vitro yet synergistic in vivo in rhabdomyosarcoma TE 671. The PK profile of DOX is not influenced by concomitant treatment with ET-743. These data provide a rationale for using this combination in early clinical trials.

Example 8

ET-743 and cisplatin (DDP) show in vitro and in vivo synergy against human sarcoma and ovarian carcinoma cell lines.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

22

We show here that ET-743 enhances the activity of DDP both *in vitro* and *in vivo*. In several cancer cell lines including human intestinal carcinoma (HCT116), ovarian carcinoma (Igrov-1, A2780), their resistant sublines (Igrov-1/PSC-ET and 1A9, respectively), and rhabdomyosarcoma (TE671), lower concentrations of ET-743 used as a single agent could potentiate DDP activity by at least 2-fold. Concentrations corresponding to IC30/IC50 of ET-743 resulted in either additive or synergistic effects. These results have led to *in vivo* studies using xenograft models to study effective drug combinations with ET-743.

In sc transplanted TE671, partially sensitive to either ET-743 and DDP, the combination of the two drugs produced an antitumor effect much greater than that achieved with either drug used at their respective MTD levels. The ovarian 1A9 tumor that is normally resistant to both ET-743 and DDP as single agents, in combination produced a tumor growth inhibition greater than 50%. Orthotopically transplanted human ovarian carcinoma HOC8, producing tumor nodules in the peritoneal cavity with ascites, which is resistant to ET-743 and partially sensitive to DDP, in combination resulted in a dramatic increase in survival even at the dose of ET-743 of 0.05 mg/Kg (1/4 MTD) and did not cause any significant toxicity. An ET-743 dose of 0.15 mg/Kg markedly increased survival, but there was also an increase in toxicity as indicated by a weight loss, that was significantly higher than that observed after treatment with each drug.

These findings offer a strong rationale to design clinical trials using the combination of ET-743 and DDP in sarcomas and ovarian cancers. *In vitro* and *in vivo* studies are in progress to elucidate the mechanisms underlining the synergism between ET-743 and DDP in these cancer types.

Example 9

High-Dose Dexamethasone (dex) Protects Against the Hepatotoxicity of Ecteinascidin-743 (ET-743) in the Rat

ET-743, an agent derived from a marine tunicate, is currently in phase II clinical trial. It has shown clinical activity against sarcomas, and preliminary data suggests activity against

breast and ovarian carcinoma. However, hepatotoxicity characterized by reversible transaminitis occurs in most treated patients and cholestasis in a minority. In the most sensitive animal species, the rat, toxicity of ET-743 is characterized by hepatic necrosis and bile duct inflammation. In the light of the antiinflammatory activity of dex, we investigated its effect on liver damage induced by ET-743 in the rat. Female Wistar rats received a single *iv* dose of ET-743 (40 µg/kg). Some rats were pretreated with a single oral dose of dex either at 1, 5, 10 or 20 mg/kg 24 h prior to ET-743 treatment. Liver pathology and plasma concentrations of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (GOT) and total bilirubin (TB) were assessed up to 3 days *post* ET-743 administration. Conventional histological sections of the livers were examined by light microscopy.

At 2 days *post* ET-743 treatment, livers from rats that received ET-743 alone showed bile duct inflammation, striking degenerative changes in biliary epithelial cells and zones of hepatic necrosis. Plasma levels of ALP and GOT were significantly elevated after 2 days. Cholestasis was reflected by a dramatic increase in plasma TB concentrations, which commenced on day 2 after ET-743. ET-743-induced histopathological changes and elevation of plasma ALP, GOT and TB were totally abrogated in rats pre-treated with 10 or 20 mg/kg dex.

Whilst dex at 1 mg/kg showed little protection, 5 mg/kg was moderately protective. Plasma levels of ET-743 in rats which received dex (50 mg/kg) daily for 3 days prior to ET-743 were not decreased compared to those in rats on ET-743 alone. Furthermore, the activity of ET-743 against B16 melanoma implanted into mice was not impeded by dexamethasone. These findings suggest that the addition of high-dose dexamethasone to the ET-743 regimen may ameliorate its hepatotoxicity in cancer patients.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

24

CLAIMS

1. The use of ET-743 in the preparation of a medicament for an effective treatment of a tumour by combination therapy employing ET-743 with another drug.
2. The use of a drug in the preparation of a medicament for an effective treatment of a tumour by combination therapy employing the drug with ET-743.
3. The use according to claim 1 or 2, where the combination of ET-743 and the drug is synergistic.
4. The use according to claim 1, 2 or 3, where the ET-743 forms part of the same medicament, or is provided as a separate medicament for administration at the same time or a different time as the drug.
5. The use according to any preceding claim, wherein the combination therapy employs ET-743 and an anthracycline
6. The use according to claim 5, wherein the combination therapy employs ET-743 and doxorubicin.
7. The use according to any of claims 1 to 4, wherein the combination therapy employs ET-743 and a platinum antitumour compound.

WO 02/36135

PCT/GB01/04902

25

8. The use according to claim 7, wherein the combination therapy employs ET-743 and cisplatin.

9. The use according to any preceding claim, wherein the combination therapy employs ET-743 and dexamethasone.

10. ET-743, and an anti-tumour drug synergistic with the ET-743 upon administration to a patient with a tumour.

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/036135 A3(51) International Patent Classification: A61K 45/06,
31/495, A61P 35/00Istituto de la Recherche Farmacologiche Mario Negri, I-
Milan (IT); GESCHER, Andreas [DE/GB]; 7 Swithland
Court, Brand Hill, Woodhouse Eaves LE12 8SS (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/04902

(74) Agent: RUFFLES, Graham, Keith; Marks & Clerk,
57-60 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3LS (GB).(22) International Filing Date:
6 November 2001 (06.11.2001)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GI, GH,
GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/246,233 6 November 2000 (06.11.2000) US
60/248,095 13 November 2000 (13.11.2000) US
60/345,982 19 October 2001 (19.10.2001) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).(71) Applicant (for all designated States except US):
PHARMA MAR, S.A. [ES/ES]; Calle de la Calera,
3, Poligono Industrial de Tres Cantos, Tres Cantos,
11-28760 Madrid (ES).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TAKAHASHI,
Naoto [JP/US]; Memorial Sloan Kettering 1275 York
Avenue, New York, NY 10021 (US); WEITMAN, Steve
[US/US]; Institute for Drug Development, Cancer Ther-
apy and Research Center (CTRC), 14960 Omicron, San
Antonio, TX 78245-3217 (US); D'INCALCI, Maurizio
[IT/IT]; Istituto de Rechercher Farmacologiche Mario Negri,
I- Milan (IT); FAICLOTH, Glynn, Thomas [US/US];
PharmaMar USA, Inc., 320 Putnam Avenue, Cambridge,
MA 02139-4616 (US); GIAYAZZI, Raffaella [IT/IT];Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
10 April 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/036135 A3

(54) Title: COMPOSITIONS FOR ANTI-TUMOUR TREATMENT CONTAINING ECTHINASCIDIN 743

(57) Abstract: IT-743 is used in the preparation of a medicament for an effective treatment of a tumour by combination therapy employing IT-743 with another drug.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 01/04902
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K45/06 A61K31/495 A61P35/00		
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) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 256 663 A (SAKAI RYUICHI ET AL) 26 October 1993 (1993-10-26)	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* 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 document 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 claim 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 ** 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 December 2002		Date of mailing of the international search report 09/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3078		Authorized officer Stienon, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 01/04902

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5256663	A	26-10-1993	US 5089273 A	18-02-1992
			US 5149804 A	22-09-1992
			AT 69234 T	15-11-1991
			AU 589282 B2	05-10-1989
			AU 7581987 A	11-01-1988
			DE 3774435 D1	12-12-1991
			EP 0309477 A1	05-04-1989
			FI 885726 A	09-12-1988
			JP 2562162 B2	11-12-1996
			JP 1502749 T	21-09-1989
			WO 8707610 A2	17-12-1987
			AT 159022 T	15-10-1997
			AU 650829 B2	30-06-1994
			AU 9176491 A	25-06-1992
			DE 69127905 D1	13-11-1997
			DE 69127905 T2	28-05-1998
			DK 559838 T3	18-05-1998
			EP 0559838 A1	15-09-1993
			ES 2111631 T3	16-03-1998
			GR 3025837 T3	30-04-1998
JP 6503579 T	21-04-1994			
JP 3098029 B2	10-10-2000			
WO 9209607 A1	11-06-1992			

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 A 6 1 P 43/00 A 6 1 P 43/00 1 2 1

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100094400

弁理士 鈴木 三義

(74) 代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74) 代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72) 発明者 高橋 直人

アメリカ合衆国・ニューヨーク・10021・ニューヨーク・メモリアル・スローン・ケターリン
 グ・1275・ヨーク・アヴニュー

(72) 発明者 スティーヴ・ウェイトマン

アメリカ合衆国・テキサス・78245-3217・サン・アントニオ・オミクロン・14960
 ・キャンサー・セラピー・アンド・リサーチ・センター・(シーティーアールシー)・インスティ
 テュート・フォー・ドラッグ・ディヴェロップメント

(72) 発明者 マウリッツィオ・ディンカルシ

イタリア・アイ・ミラン・(番地なし)・インスティテューテ・デ・レシエルチェル・ファルマコ
 ロジチェ・マリオ・ネグリ

(72) 発明者 グリン・トーマス・フェアクローズ

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02139-4616・ケンブリッジ・パットナム・アヴェ
 ニュー・320・ファルマ・マール・ユーエスエー・インコーポレイテッド

(72) 発明者 ラファエッラ・ギャバッジー

イタリア・アイ・ミラン・(番地なし)・インスティテューテ・デ・ラ・レシエルチェル・ファルマ
 コロジチェ・マリオ・ネグリ

(72) 発明者 アンドレアス・ゲッシャー

イギリス・ウッドハウス・イーヴズ・LE12-8SS・ブランド・ヒル・スウィスランド・コー
 ト・7

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 CB22 DA10 EA10 HA12 HA28 MA02 MA04 NA05
 ZB26 ZC75