

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6218147号
(P6218147)

(45) 発行日 平成29年10月25日(2017.10.25)

(24) 登録日 平成29年10月6日(2017.10.6)

(51) Int.Cl.	F I			
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574	Z N A D		
G O 1 N 33/536 (2006.01)	G O 1 N 33/536	D		
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543	5 9 7		
A 6 1 K 31/52 (2006.01)	A 6 1 K 31/52			
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1		
請求項の数 18 (全 165 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2014-520227 (P2014-520227)	(73) 特許権者	399026731
(86) (22) 出願日	平成24年7月6日(2012.7.6)		スローン — ケタリング・インスティテ
(65) 公表番号	特表2014-527620 (P2014-527620A)		ュート・フォー・キャンサー・リサーチ
(43) 公表日	平成26年10月16日(2014.10.16)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 100
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/045864		65、ニューヨーク、ヨーク・アベニュー
(87) 国際公開番号	W02013/009657		1275
(87) 国際公開日	平成25年1月17日(2013.1.17)	(73) 特許権者	510243539
審査請求日	平成27年7月1日(2015.7.1)		コーネル ユニバーシティー
(31) 優先権主張番号	61/506,010		アメリカ合衆国 ニューヨーク、イサカ
(32) 優先日	平成23年7月8日(2011.7.8)		, パイン ツリー ロード 395,
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スイート 310, センター フォー テ
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標識されたHSP90阻害剤の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液のがんを有する患者がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 前記患者に由来するがん細胞および非がん細胞を含有する試料を、前記患者の前記がん細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する細胞透過性の蛍光標識されたHSP90阻害剤と接触させること；

(b) 前記試料中の前記がん細胞および非がん細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量を測定すること；ならびに

(c) 前記がん細胞に結合した前記蛍光標識されたHSP90阻害剤の量を、前記非がん細胞に結合した前記蛍光標識されたHSP90阻害剤の量と比較することを含み、前記がん細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量が前記非がん細胞よりも多い場合、前記腫瘍が前記HSP90阻害剤に応答する可能性があることを示し、前記蛍光標識されたHSP90阻害剤は蛍光標識されたPU-H71である方法。

【請求項2】

前記非がん細胞がリンパ球である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記測定がフローサイトメトリーにより行われる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

ステップ(b)で測定された前記腫瘍または前記腫瘍細胞に結合した蛍光標識されたH

10

20

S P 9 0 阻害剤の量と、前記非がん細胞に結合した前記蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤との比が大きくなるほど、前記H S P 9 0 阻害剤療法に応答する可能性の規模が大きくなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記血液のがんが白血病である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記白血病が慢性骨髄性白血病である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料が生細胞を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料が生物学的液体を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記生物学的液体が血液または骨髄である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記生物学的液体が血液である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記試料が破壊された腫瘍細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試料が凍結細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記試料が固定および透過処理された細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤が、療法として投与される蛍光標識された形態の前記H S P 9 0 阻害剤である、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

療法として投与される前記H S P 9 0 阻害剤がP U - H 7 1 である、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤がP U - H 7 1 - F I T C 2 である、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤がP U - H 7 1 - N B D 1 である、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤は、P U - H 7 1 - F I T C 1、P U - H 7 1 - N B D 3、P U - H 7 1 - F I T C 3、P U - H 7 1 - F I T C 4、P U - H 7 1 - F I T C 5、P U - H 7 1 - F I T C 6、またはP U - H 7 1 - テキサスレッドである、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2011年7月8日に出願された米国特許仮出願第61／506,010号の35U. S. C. § 119 (e) の下での利益を主張し、その内容は全て、その全体が参照によりここに組込まれる。

【背景】

【0002】

恒常性を維持するために、細胞は、明確に定義された機能を実行するようにプログラムされた数千ものタンパク質から構成される複雑な分子機構を用いる。タンパク質誤発現または突然変異による、これらの経路の脱調節は、悪性表現型を付与する生物学的利益をもたらし得る。そのような脱調節は、細胞レベルでは有益であってよいが（すなわち、生存

10

20

30

40

50

率の増加に有利に働く)、分子レベルでは、細胞は、これらのタンパク質の安定性および機能の維持にエネルギーをつぎ込む必要がある。これらのタンパク質を疑似安定状態に維持するため、がん細胞はH S P 9 0などの分子シャペロンを選出する(co-opt)と考えられる^{32、33}。

【0003】

この仮説を支持すれば、H S P 9 0は、形質転換された表現型の維持において重要な役割を果たすと認識される^{32、33}。H S P 9 0およびその関連するコシャペロンは、「クライアントタンパク質」と総称される細胞タンパク質の正確なコンフォメーション的折畳みを援助し、その多くは細胞増殖、分化、DNA損傷応答、および細胞生存を制御するシグナル伝達経路のエフェクターである。かくして、脱調節したタンパク質への腫瘍細胞依存(すなわち、突然変異、異常発現、不適切な細胞転移などによる)は、H S P 9 0に非常に依存するようになり得る³³。

10

【0004】

様々な形態のがんにおけるH S P 9 0療法の論拠は、標準的な療法に対して耐性である疾患におけるものなどの前臨床および臨床試験によって現在では十分に支持されている^{91~97}。例えば、H S P 9 0阻害剤に対する特定のH E R 2+腫瘍の顕著な感受性が、試験により示されている^{98、99}。これらの腫瘍においては、17-A A G(タネスピマイシンとも呼ばれる)および17-D M A G(アルベスピマイシン)は、特に、トラスツズマブ療法後に進行性疾患を有する患者において同等の応答を惹起した⁹⁸。他のH S P 9 0阻害剤、例えば、P U - H 7 1は、いくつかの三重陰性乳がんマウスモデルにおいて前臨床試験を行った場合、この難治性乳がんサブタイプにおいて未だ報告されていない最も強力な標的単剤抗腫瘍効果を送達した¹⁰⁰。

20

【0005】

これらのデータは、がんにおけるH S P 9 0阻害剤の使用を強く支持するが、現在のところ、H S P 9 0療法から利益を得る可能性が最も高い患者を同定する方法に関しては明確なコンセンサスがない^{101、102}。標的剤の開発成功のためには、薬剤を受容すべき患者亜集団(すなわち、タルセバについてはE G F R突然変異を有する腫瘍)を定義することが必須であることを知れば、これは特に問題が多い。そのような選択は、有効でない処置を受けている患者数を減らし、後期段階の臨床試験において失敗する驚異的な数の標的抗がん剤を減少させ得る。

30

【0006】

さらに、H S P 9 0標的阻害を非侵襲的に確認することができる臨床アッセイは存在しない。末梢血リンパ球の薬力学的モニタリングが、臨床試験におけるH S P 9 0阻害剤の*in vivo*での生物活性の容易に利用でき、再現可能な指標を提供したが、正常な組織における薬剤の効果は、腫瘍特異的活性を予測しない^{97、101、102}。薬力学的変化を測定するための生検の賢明な使用は、依然として標的調節をアッセイするための重要な方法であったが、この方法は、侵襲的アッセイと関連する論理的および倫理的問題のため依然として制限されている。別の方法として、腫瘍H E R 2のレベルおよびV E G Fレベルの変化が、E L I S A¹⁰⁵による患者血清中のジルコニウム89標識抗体^{103、104}および可溶性H E R 2細胞外ドメインレベルを用いて現在調査されているが、これらの試験はこれらのバイオマーカーを発現する乳房腫瘍のサブセットに限定される。

40

【0007】

したがって、H S P 9 0標的療法におけるバイオマーカーの強い必要性が存在する：多くのがん患者は、新規の実験的療法で処置され、多くの場合、特定の薬剤の作用機構、異なる疾患サブセットのための特定の処置の適切性における洞察は少なく、異なる悪性設定における治療剤の最適用量およびスケジューリングにおける知識は少ない。その最終的な結果は、治療手法が異なる臨床状況にとって最適である知識がなく、難治性悪性腫瘍を有する患者が様々な新規薬剤を用いて処置される経験的臨床調査である。

【0008】

H S P 9 0は、発がん性形質転換に関与するタンパク質を安定化し、折畳むその重要な

50

役割のため、がんにおいて高度に求められる標的である。いくつかの異なるがんタンパク質を分解し、複数のシグナリング経路に影響するその可能性を考慮して、H S P 9 0 阻害剤 (H S P 9 0 i) は、様々ながんにおいて活性であると仮定されている。初期臨床試験は、腫瘍サブセットにおけるこの手法の治療剤としての可能性を確認したが、がんおよび患者集団がそのような処置に対して最も感受性が高いことを予測するバイオマーカーの発見は困難であることがわかっている。そのような乏しい理解および十分な患者集団の選択は、ゆっくり進行するか、または開発を継続することができないH S P 9 0 がん治療剤の多数の出現をもたらしてきた。したがって、応答集団を同定し、H S P 9 0 療法のためのコンパニオン診断アッセイを開発する即時的努力が緊急に必要である。

【0009】

抗腫瘍効果を達成するのに必要とされる適切な用量およびスケジュールの設計もまた、H S P 9 0 療法においては理解が乏しい。血漿薬物動態は一般に、治療剤の投与の設計に関する有益なデータを提供し、血漿曲線下面積 (AUC) が全身薬剤曝露の測定基準であることが多い。しかしながら、H S P 9 0 阻害剤については、血中ではなく、腫瘍組織中の薬剤の濃度および保持期間が、その抗腫瘍効果を決定付ける^{106~109}。具体的には、多くのH S P 9 0 阻害剤は、血漿および正常組織からの迅速なクリアランスの非定型的な薬物動態プロファイルを特徴とするが、腫瘍中では比較的長い (すなわち、投与後12~48時間を超える) 薬剤保持性を示す。そのようなものとして、H S P 9 0 療法に対する腫瘍応答の臨床的理解は、応答が腫瘍用量よりも注入用量と相関する場合に依然として厳しく制限されている。血漿薬物動態の限界値および腫瘍応答のための腫瘍用量の重要性は、H S P 9 0 阻害剤に関する腫瘍薬物動態のアッセイの臨床開発にとっての必要性を示唆する。腫瘍H S P 9 0 の認証された、臨床的に実用的な非侵襲的アッセイは、治療剤の投与を、代用定常状態血漿濃度よりもむしろ、定常状態の腫瘍薬剤濃度の達成に集中させることができる。そのようなアッセイは、最大許容用量で、またはそれより下で、治療上有効な腫瘍内濃度を達成することができるかどうかを示唆し得る。逆の場合、患者は、臨床利益のない潜在的な薬剤毒性に曝露する必要をなくす代替的な処置を続行することができる。

【0010】

H S P 9 0 療法に関連するこれらの制限を克服するために、本発明者らはここで、本発明者らが最適な臨床実施、がんにおけるH S P 9 0 阻害剤の開発および使用を容易にする

【開示の概要】

【0011】

本発明は、H S P 9 0 阻害剤を用いるがん患者の処置を改善するための標識されたH S P 9 0 阻害剤の使用方法を提供する。

【0012】

本開示は、H S P 9 0 発現のみによっては決定されないこの特定の「発がん性H S P 9 0」種の存在量が、H S P 9 0 阻害療法に対する感受性を予測し、かくして、H S P 9 0 療法のためのバイオマーカーであることの証拠を提供する。本開示はまた、腫瘍中のこの発がん性H S P 9 0 種の存在量の同定および測定がH S P 9 0 療法に対する応答を予測することの証拠も提供する。「発がん性H S P 9 0」はここで、細胞ストレス特異的形態のシャペロン複合体であり、腫瘍細胞の状況において拡張され、構成的に維持され、および悪性表現型を維持するのに必要な機能を実行してもよいH S P 9 0 画分と定義される。そのような役割は、過剰発現された (すなわち、H E R 2)、突然変異した (すなわち、m B-R a f) またはキメラタンパク質 (すなわち、B c r-A b l) の折畳みを調節することだけでなく、異常に活性化されたシグナリング複合体 (すなわち、S T A T 5、B C L 6) に関与する分子の足場および複合体形成を容易にすることでもある。腫瘍はH S P 9 0-がんタンパク質のネットワーク上での生存に依存するようになるが、これらのタンパク質は機能および安定性のために「発がん性H S P 9 0」に依存するようになる。この共生的相互依存は、H S P 9 0 がんタンパク質への腫瘍の依存が「発がん性H S P 9 0」

への依存と同等であることを示唆している。後者の存在量の測定は、最初の読出しであり、したがって、本開示によれば、H S P 9 0 療法の富化のためのバイオマーカーである。

【0013】

さらに、本発明者らは、H S P 9 0 が悪性細胞中で生化学的に異なる複合体を形成することを示す。がん細胞H S P 9 0 の主要画分は、正常細胞と類似する「ハウスキーピング」シャペロン機能を保持するが、がん細胞中で富化されたか、または拡張された機能的に異なるH S P 9 0 プール（すなわち、「発がん性H S P 9 0」）は、腫瘍細胞生存、異常な増殖特性ならびに侵襲性および転移性挙動を維持するのに必要とされる発がん性タンパク質と特異的に相互作用する。

【0014】

腫瘍それぞれの様式で「発がん性H S P 9 0」の存在量を測定するために、本発明は、化学的手段も提供する。そのような手段は、蛍光標識された、およびA N C A 標識されたH S P 9 0 阻害剤、ビオチン化されたH S P 9 0 阻害剤ならびにこの腫瘍「発がん性H S P 9 0」種を特異的に同定し、それと相互作用する放射標識された阻害剤を含み、例えば、血液悪性腫瘍、固形腫瘍および液性腫瘍における、様々な種類の腫瘍、腫瘍細胞、腫瘍支援細胞および腫瘍関連生物学的構造中の「発がん性H S P 9 0」種の存在量を測定し、かくして、H S P 9 0 阻害療法に対する感受性を測定および予測するのが容易になる。これらのものは、限定されるものではないが、固形または液性腫瘍中のがん細胞、がん幹細胞、循環腫瘍細胞、腫瘍支援免疫細胞、エキソソームおよび腫瘍支援前駆細胞の形態にあってもよい。

【0015】

一側面において、本開示は、腫瘍がH S P 阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 腫瘍または腫瘍に由来する細胞を含有する試料を、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する検出可能に標識されたH S P 9 0 阻害剤と接触させるステップ；

(b) 腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたH S P 9 0 阻害剤の量を測定するステップ；および

(c) ステップ(b)で測定された腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたH S P 9 0 阻害剤の量を、参照に結合した標識されたH S P 9 0 阻害剤の量と比較するステップ

を含み、ステップ(b)で測定された腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたH S P 9 0 阻害剤の量が参照量と比較してより多い場合、腫瘍がH S P 9 0 阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0016】

一態様において、参照は腫瘍を有する同じ患者の細胞に由来するものである。参照は、がん患者に由来する正常細胞であってもよい。例えば、正常細胞は、血液腫瘍を有する患者に由来するリンパ球、循環腫瘍細胞を有する患者に由来する白血球または固形腫瘍の周囲の正常組織であってもよい。別の態様において、参照は、発がん性H S P 9 0 の発現がほとんどないか全くないがん患者に由来する腫瘍細胞または別の細胞である。別の態様において、参照は、腫瘍を有する患者とは異なる患者の細胞に由来する。例えば、参照は、健康な個体の細胞または測定しようとする腫瘍を有する患者以外のがん患者に由来する発がん性H S P 9 0 の発現がほとんどないか全くない細胞に由来するものであってもよい。

【0017】

一側面において、本開示は、腫瘍がH S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 腫瘍または腫瘍に由来する細胞を含有する試料を、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する第一の検出可能に標識されたH S P 9 0 阻害剤および腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に最小限に結合するか、または全く結合しない第二の検出可能に標識された阻害剤と接触させるステップ；

(b) 腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した第一の標識された阻害剤および第二の標識された阻害剤の量を測定するステップ；ならびに

(c) 腫瘍または腫瘍細胞に結合した第一の標識された阻害剤の量を、腫瘍または腫瘍細胞に結合した第二の標識された阻害剤の量と比較するステップ

を含み、腫瘍または腫瘍細胞に結合した第一の標識された阻害剤の量が、腫瘍または腫瘍細胞に結合した第二の標識された阻害剤と比較してより多い場合、腫瘍がH S P 9 0阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0018】

一態様において、標識されたH S P 9 0阻害剤は、細胞透過性であり、「発がん性H S P 9 0」に選択的に結合する蛍光標識されたか、またはA N C A標識された阻害剤である。例えば、固形または液性腫瘍、がん幹細胞、循環腫瘍細胞、腫瘍支援免疫細胞、エキソソームおよび腫瘍支援前駆細胞において見出されるか、またはそれから単離されるがん細胞のフローサイトメトリーにおける、およびその分析のための使用、ならびにいくつかの介入方法、例えば、生検、手術および微細針吸引生検により得られた試料の組織染色における使用のために最適化された、様々な蛍光標識された、およびA N C A標識された型のH S P 9 0阻害剤P U - H 7 1が提供される。

【0019】

1つのそのような態様において、本発明者らは、蛍光標識された阻害剤、例えば、P U - H 7 1 - F I T C 2（第5. 2. 1. 1. 節）を用いて、生検および外科的標本などの供給源から得られた組織における「発がん性H S P 9 0」の存在量を測定することができることを示す。別の態様において、本発明者らは、蛍光標識された阻害剤、例えば、P U - H 7 1 - F I T C 2を用いて、確立されたがん細胞系または一次がん細胞中の「発がん性H S P 9 0」の存在量を測定することができることを示す。さらに別の態様において、本発明者らは、蛍光標識された阻害剤を用いて、腫瘍などのがん標本から単離された細胞、がん幹細胞、循環腫瘍細胞および微細針吸引生検から得られたがん細胞中の「発がん性H S P 9 0」の存在量を測定することができることを示す。さらに他の態様において、本発明者らは、他の蛍光標識された、A N C A標識およびビオチン化されたH S P 9 0阻害剤が上記測定を実施するのに有用であることを示す。

【0020】

別の態様において、標識されたH S P 9 0阻害剤は、「発がん性H S P 9 0」に選択的に結合する放射標識された阻害剤である。例えば、様々な型の放射標識されたP U - H 7 1がP E T画像化のために最適化されている。特定の態様においては、ヨウ素1 2 4で放射標識された型のP U - H 7 1は、固形および液性腫瘍のP E T画像化のためのものである。放射標識された阻害剤を用いて、限定されるものではないが、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、白血病、骨髄腫、骨髄増殖性新生物ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんなどのいくつかの種類の原発性および転移性がんを画像化することができる。

【0021】

本開示は、限定されるものではないが、上記で列挙された腫瘍などの固形腫瘍および限定されるものではないが、リンパ腫、白血病、骨髄腫および骨髄増殖性新生物と関連するものなどの液性腫瘍における「発がん性H S P 9 0」の存在量を腫瘍それぞれの様式で測定する手段をさらに提供する。一態様において、本発明は、「発がん性H S P 9 0」と特異的に相互作用するヨウ素1 2 4標識されたH S P 9 0阻害剤の使用により、固形腫瘍および液性腫瘍において、非侵襲的にP E T画像化を使用し、患者における「発がん性H S P 9 0」を定量することができることを示す。

【0022】

一側面において、本開示は、血液のがん（例えば、白血病）などの血液悪性腫瘍を有す

10

20

30

40

50

る患者がH S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、患者に由来するがん細胞および参照非がん細胞を含有する試料を、患者のがん細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する細胞透過性の蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤と接触させること、試料中のがん細胞および非がん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量を測定すること、ならびにがん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量を、非がん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量と比較することを含み、非がん細胞よりもがん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量が多い場合、腫瘍がH S P 9 0 阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0023】

10

1つのそのような態様においては、参照正常細胞は、がん細胞と同じ患者に由来するものである正常細胞（例えば、リンパ球）である。別の態様においては、参照非がん細胞は、がん患者とは異なる患者から得られるものである。

【0024】

別の側面において、本開示は、固形腫瘍を有する患者がH S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、患者に由来するがん細胞および非がん細胞（例えば、標本中の周囲の間質、良性細胞または他の種類の正常細胞）を含有する、例えば、生検、手術、微細針吸引生検または他の介入手順から得られた試料を、患者のがん細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する細胞透過性の蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤と接触させること、試料中のがん細胞および非がん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量を測定すること、ならびにがん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量を、非がん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量と比較することを含み、非がん細胞よりもがん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量が多い場合、腫瘍がH S P 9 0 阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

20

【0025】

本開示はまた、固形腫瘍を有する患者がH S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、患者に由来する循環がん細胞および非がん細胞（例えば、白血球）を含有する試料を、患者のがん細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する細胞透過性の蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤と接触させること、試料中のがん細胞および非がん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量を測定すること、ならびにがん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量を、非がん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量と比較することを含み、非がん細胞よりもがん細胞に結合した蛍光標識されたH S P 9 0 阻害剤の量が多い場合、腫瘍がH S P 9 0 阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

30

【0026】

代替的な態様において、参照非がん細胞は、腫瘍を有する患者以外の患者から得られたものである。

【0027】

別の側面において、本開示は、H S P 9 0 阻害療法に対して感受性である患者を決定するために放射標識されたH S P 9 0 阻害剤を使用するための方法を提供する。

40

【0028】

1つのそのような態様において、本開示は、画像化できる腫瘍を有するがん患者がH S P 9 0 の阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

（a）患者に、腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する放射標識されたH S P 9 0 阻害剤を投与するステップ；

（b）ステップ（a）における投与後の1つ以上の時点での患者の腫瘍による放射標識されたH S P 9 0 阻害剤の取込みを測定するステップ；

（c）ステップ（a）における投与後の前記1つ以上の時点での患者の所定の健康な組

50

織または血液による放射標識されたH S P 9 0 阻害剤の取込みを測定するステップ；

(d) ステップ (b) における1つまたは複数の時点で測定された取込みと、ステップ (c) における同じ時点で測定された取込みとの比を算出するステップ；ならびに

(e) がん患者がH S P 9 0 の阻害剤を用いる療法に応答する可能性を決定するステップ

を含み、1つまたは複数の時点でステップ (d) において算出された比が2を超える場合、患者が応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0029】

別の態様において、本開示は、画像化できる腫瘍を有するがん患者がH S P 9 0 の阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

10

(a) 患者に、腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する放射標識されたH S P 9 0 阻害剤を投与するステップ；

(b) ステップ (a) における投与の4時間後の1つ以上の時点で患者の腫瘍による放射標識されたH S P 9 0 阻害剤の取込みを測定するステップ

を含み、腫瘍の周囲の健康な組織中での取込みと比較した前記1つ以上の時点での阻害剤の取込みが、患者がH S P 9 0 の阻害剤を用いる療法に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0030】

さらに別の態様において、本開示は、画像化できる腫瘍がH S P 9 0 の阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

20

(a) 患者に、腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する放射標識されたH S P 9 0 阻害剤を投与するステップ；

(b) ステップ (a) における放射標識されたH S P 9 0 阻害剤の投与後2時間以上の1つ以上の時点で、腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中の放射標識された阻害剤の取込みをPETにより視覚的に検査するステップ、

(c) 前記1つ以上の時点で、ステップ (b) で得られたPET画像を、腫瘍の周囲の健康な組織において得られたPET画像と比較するステップ

を含み、前記1つ以上の時点での腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中のPET画像における明るい領域の存在が、患者がH S P 9 0 阻害療法に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

30

【0031】

さらに別の態様において、本開示は、発がん性H S P 9 0 を発現する腫瘍を有する特定のがん患者が、規定用量のH S P 9 0 の阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 患者に、腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のH S P 9 0 に優先的に結合する放射標識された形態のH S P 9 0 阻害剤を投与するステップ；

(b) ステップ (a) における投与後の1つ以上の時点で患者の腫瘍による放射標識された形態のH S P 9 0 阻害剤の取込みを測定するステップ；

(c) 規定用量のH S P 9 0 阻害剤について、ステップ (b) における前記1つ以上の時点で測定された取込みに基づいて、前記1つ以上の時点のそれぞれにおいて患者の腫瘍中に存在するH S P 9 0 阻害剤の濃度を算出するステップ；ならびに

40

(d) 腫瘍の処置において有効であるH S P 9 0 阻害剤について、ステップ (c) で算出されたH S P 9 0 阻害剤の濃度を、前記1つ以上の時点で腫瘍中に存在する必要があるH S P 9 0 阻害剤の参照濃度と比較するステップ

を含み、ステップ (c) で算出されたH S P 9 0 阻害剤の濃度が、腫瘍を有効に処置するのに必要とされるH S P 9 0 阻害剤の濃度と等しいか、またはそれを超える場合、患者が規定用量のH S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答する可能性がある方法を提供する。

【0032】

別の側面において、本発明者らは、放射標識されたH S P 9 0 阻害剤を用いて、H S P 9 0 阻害剤の有効用量および投与スケジュールを決定することができることを示す。

50

【0033】

1つのそのような態様において、本開示は、発がん性HSP90を発現する腫瘍を有する特定のがん患者が、規定用量のHSP90の阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 患者に、腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する放射標識された形態のHSP90阻害剤を投与するステップ；

(b) ステップ(a)における投与後の1つ以上の時点で患者の腫瘍による放射標識された形態のHSP90阻害剤の取込みを測定するステップ；

(c) 規定用量のHSP90阻害剤について、ステップ(b)における前記1つ以上の時点で測定された取込みに基づいて、前記1つ以上の時点のそれぞれにおいて患者の腫瘍中に存在するHSP90阻害剤の濃度を算出するステップ；ならびに

(d) 腫瘍の処置において有効であるHSP90阻害剤について、ステップ(c)で算出されたHSP90阻害剤への腫瘍の曝露を、前記1つ以上の時点で腫瘍中に存在する必要があるHSP90阻害剤への参照曝露と比較するステップ

を含み、ステップ(c)で算出されたHSP90阻害剤への腫瘍曝露が、腫瘍を有効に処置するのに必要とされるHSP90阻害剤への腫瘍曝露と等しいか、またはそれを超える場合、患者が規定用量のHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性がある方法を提供する。

【0034】

さらなる態様は、画像化できる腫瘍を有する特定のがん患者について、HSP90の阻害剤を用いる療法に関する有効用量および投与頻度を決定するための方法；がん患者において画像化できる腫瘍中に存在するHSP90阻害剤の濃度を決定するための方法；ならびにがん患者における腫瘍のHSP90の阻害剤を用いる療法に対する応答性を決定またはモニタリングするための方法を含む。

【0035】

さらに別の態様において、本開示は、発がん性HSP90を発現する腫瘍を有する特定のがん患者について、HSP90の阻害剤を用いる療法に関する有効用量および投与頻度を決定するための方法であって、

(a) 患者に、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する放射標識された形態のHSP90阻害剤を投与するステップ；

(b) ステップ(a)における投与後の1つ以上の時点で患者の腫瘍による放射標識された形態のHSP90阻害剤の取込みを測定するステップ；ならびに

(c) ステップ(b)における前記1つ以上の時点で測定された取込みに基づいて、前記1つ以上の時点のそれぞれにおいて、腫瘍を処置するのに有効であるHSP90阻害剤の濃度を腫瘍中で維持するのに必要とされる用量および投与頻度を算出し、それによって、がん患者について、HSP90の阻害剤を用いる療法に関する有効用量および投与頻度を決定するステップを含む方法を提供する。

【0036】

さらに別の態様において、本開示は、発がん性HSP90を発現する腫瘍を有する特定のがん患者について、HSP90の阻害剤を用いる療法に関する有効用量および投与頻度を決定するための方法であって、

(a) 患者に、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する放射標識された形態のHSP90阻害剤を投与するステップ；

(b) ステップ(a)における投与後の1つ以上の時点での患者の腫瘍による放射標識された形態のHSP90阻害剤の取込みを測定するステップ；ならびに

(c) ステップ(b)で前記1つ以上の時点で測定された取込みに基づいて、処置期間にわたって、腫瘍を処置するのに有効であるHSP90阻害剤の平均腫瘍内濃度を腫瘍中で維持するのに必要とされる用量および投与頻度を算出し、それによって、がん患者について、HSP90の阻害剤を用いる療法に関する有効用量および投与頻度を決定するステ

10

20

30

40

50

ップ

を含む方法を提供する。

【0037】

さらなる側面において、本開示は、がん患者において発がん性HSP90を発現する腫瘍中に存在するHSP90の濃度を決定するための方法であって、

(a) 患者に、所定量のHSP90阻害剤と、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する、ある量の放射標識された形態のHSP90阻害剤とを同時投与するステップ；

(b) ステップ(a)における同時投与後の1つ以上の時点での患者の腫瘍による放射標識されたHSP90阻害剤の取込みを定期的に測定するステップ；および

(c) ステップ(b)で放射標識されたHSP90阻害剤の取込みの測定値に基づいて、任意のそのような時点で腫瘍中に存在するHSP90阻害剤の濃度を決定するステップを含む方法を提供する。

【0038】

さらに別の側面において、本開示は、がん患者において発がん性HSP90を発現する腫瘍のHSP90の阻害剤を用いる療法に対する応答性を決定するための方法であって、

(a) 腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する放射標識された形態のHSP90阻害剤を、患者が療法としてHSP90の阻害剤を受けている期間内の1つ以上の時点で患者に投与するステップ；

(b) ステップ(a)における投与後の前記1つ以上の時点で、患者の腫瘍中の放射標識されたHSP90阻害剤の濃度を測定するステップ；および

(c) ステップ(b)で測定された放射標識されたHSP90阻害剤の濃度を、腫瘍を有効に処置するのに必要とされるHSP90阻害剤の最小濃度と比較するステップを含み、腫瘍を処置するのに必要とされる最小濃度よりも測定された濃度が高い場合、患者がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0039】

別の側面において、本開示は、神経変性疾患に罹患する患者がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 脳を、患者の脳細胞中に存在する病原性形態のHSP90に優先的に結合する放射標識されたHSP90阻害剤と接触させるステップ；

(b) 試料中の脳細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を測定するステップ；および

(c) ステップ(b)で測定された試料中の脳細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を、参照量と比較するステップを含み、ステップ(b)で測定された脳細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量が参照量と比較して多い場合、患者がHSP90阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0040】

別の側面において、本開示は、HSP90阻害剤PU-H71を用いてHSP90依存性がんを処置する方法を提供する。特定の態様においては、PU-H71の特異的腫瘍曝露を達成するためにHSP90依存性がんを処置する方法が提供される。他の態様においては、PU-H71の新規投与レジメンが提供される。

【0041】

別の側面において、本開示は、患者中に存在するヒトがんがHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) HSP90タンパク質を単独で、またはそれに加えてHSP70タンパク質を発現する、患者のがんに由来する細胞を含有する試料を取得するステップ；

(b) ステップ(a)で得られた試料中に存在する細胞について、以下のパラメータ：活性化されたAKT経路、PTEN腫瘍抑制因子の機能もしくは発現における欠陥、活性化されたSTAT5経路、またはBcl-xLタンパク質発現のうちの少なくとも1つの

10

20

30

40

50

存在を評価するステップ；および

(c) H S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答した1人以上のがん患者に由来するヒトがん細胞について、ステップ(b)で得られた評価を、ステップ(b)で評価された同じパラメータまたは複数のパラメータの所定の参照評価と比較して、それにより患者のがんがH S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するステップを含む方法を提供する。

【0042】

一態様において、この特定の方法の使用のために現在相当興味深いヒトがんは、乳がん、膀胱がんおよび急性骨髄性白血病である。

【0043】

それぞれのパラメータを評価する方法は、当業界で周知であり、容易に利用可能である。しかしながら、これらの特定のパラメータの1つ以上と、H S P 9 0 阻害剤の効果の予測との相関は以前には示されていない。理論的には、当業者が任意の所与のH S P 9 0 阻害剤の効果の予測できるためには、単一のパラメータで十分であってよいが、効果の妥当な予測を行うためには、これらのパラメータのうちの少なくとも2つ、おそらくは少なくとも3つ以上またはさらには全部を考慮に入れる必要がある。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】PU-H71は、がん細胞中により豊富であるH S P 9 0 の限られた画分と優先的に相互作用する。(a)抗H S P 9 0 抗体であるH9010を用いる連続免疫精製ステップは、MDA-MB-468細胞抽出物中のH S P 9 0 を枯渇させる。溶解物=対照細胞抽出物。(b)MDA-MB-468抽出物に由来するH S P 9 0 を、連続化学精製および免疫精製ステップにより単離した。各プール中のH S P 9 0 の量を密度測定により定量し、値を内部標準に対して正規化した。(c)示された細胞中で ^{131}I -PU-H71を用いて飽和試験を行った。全ての単離された細胞試料を計数し、 ^{131}I -PU-H71の特異的取込みを決定した。これらのデータを、 ^{131}I -PU-H71の濃度に対してプロットして、飽和結合曲線を得た。4つの別々の反復物の代表的なデータを提示する(下側)。示された細胞中でのH S P 9 0 の発現を、ウェスタンブロットにより分析した(上側)。(d)一次AMLおよびCML、CD34+臍帯血細胞(CB)、またはK562細胞を、示された用量のPU-H71で24時間、予備処理した。処理後の細胞を、1 μM のPU-FITCで処理した。細胞へのPU-FITCの結合をフローサイトメトリーにより評価し、平均蛍光強度(MFI)として表す。TEG-FITCを、非特異的結合対照として示す。CD45対SSCゲーティングを用いて、一次標本に由来する芽球またはリンパ球への結合を区別した。(e)示された用量のPU-H71での処理後の一次AMLおよびCML、CD34+CBまたはK562細胞に関する未処理対照と比較した生存率(%)。処理の96時間後にアネキシンV/7-AAD染色により、細胞生存を評価した。データを、平均±SE (n=3)として提示する。

【図2】PU-H71は、H S P 9 0 に対して選択的であり、がんタンパク質およびコシャペロンとの複合体中でH S P 9 0 を単離する。(a)K562抽出物中のH S P 9 0 複合体を、H9010、非特異的IgGを用いる沈降により、またはPU-H71もしくは対照ビーズにより単離した。対照ビーズは、エタノールアミン、H S P 9 0 -不活性分子を含有する。プルダウン中のタンパク質を、ウェスタンブロットにより分析した。(b、c)示される通り、単一または連続免疫および化学沈降を、示された頻度および示された順序でH9010およびPU-ビーズを用いてK562抽出物中で行った。プルダウン中および残りの上清中のタンパク質を、WBにより分析した。NS=非特異的。(d)K562細胞を、ビヒクル(-)またはPU-H71(+)で24時間処理し、タンパク質をウェスタンブロットにより分析した。(e)Hsp70ノックダウン細胞中でのタンパク質の発現を、ウェスタンブロット(左側)により分析し、タンパク質レベルの変化を相対発光単位(RLU)で提示した(右側)。対照=スクランブルsiRNA。(f)示される通り、連続化学沈降を、示された頻度および示された順序でGM-、SNX-およびN

10

20

30

40

50

V P-ビーズを用いてK 5 6 2抽出物中で行った。プルダウン中および残りの上清中のタンパク質を、ウェスタンブロットにより分析した。(g) K 5 6 2細胞中のH S P 9 0は、異常なB c r-A b lと、正常なc-A b lタンパク質の両方との複合体中に存在する。H 9 0 1 0ではなく、P U-H 7 1は、結合したB c r-A b lがんタンパク質であるH S P 9 0集団を選択する。

【図3】(a、b) 乳がんおよびCML細胞抽出物(120 μ g)に由来するH S P 9 0を、示された通り、連続化学精製および免疫精製ステップを介して単離した。上清を単離して、使い残しのH S P 9 0を分析した。各画分中のH S P 9 0を、ウェスタンブロットにより分析した。溶解物=内因性タンパク質内容物; P U-、G M-および対照ビーズは、特定のビーズ上で単離されたタンパク質を示す。H 9 0 1 0およびI g Gは、特定のA bにより単離されたタンパク質を示す。対照ビーズは、H S P 9 0不活性分子を含有する。データは複数の反復実験から得られたものと一致する($n \geq 2$)。(c) P Eコンジュゲート化抗体対P U-H 7 1-F I T CのH S P 9 0結合。P U-H 7 1により単離された全細胞性H S P 9 0の%を、データバーの上に各細胞系について示す。(d) 末梢血白血球(P B L)抽出物(250 μ g)中で連続化学精製および免疫精製ステップを実施して、P U-H 7 1およびH 9 0 1 0特異的H S P 9 0種を単離した。全試料をウェスタンブロットにより分析した(上側)。P B L中でのH S P 9 0の結合を、H S P 9 0-P E抗体およびP U-H 7 1-F I T Cを用いるフローサイトメトリーにより評価した。F I T C-T E G=非特異的結合に関する対照(下側)。(e) P U-H 7 1-F I T C(1 μ M)のH S P 9 0への結合に関する相関および14種の白血病細胞系のパネルにおけるP U-H 7 1を用いる処理後の生存率(%): K a s u m i-1、K a s u m i-4、K C L-2 2、R E H、T F-1、K G-1、H L-6 0、O C I-A M L 3、K 5 6 2、M O L M-1 3、T U R、T H P-1、U 9 3 7およびM V 4-1 1。これらの細胞中の総H S P 9 0レベルは、ウェスタンブロットにより示される通り、類似する(示さず)。

【図4-1】(a) フローサイトメトリードットプロットは、芽球(C D 4 5 d i m、赤丸)および非悪性リンパ球(青丸)を区別するための一次慢性骨髄性白血病(CML)試料に用いられるゲーティング戦略を示す。(b) CML芽球と、(a)に示された一次CML患者試料に由来する正常リンパ球とのH S P 9 0へのP U-H 7 1-F I T C結合に関する比。(c) 示された時点および用量のP U-H 7 1を用いる処理後の(a)に示された一次CML試料の未処理対照と比較したCML芽球(赤色)または正常リンパ球(青色)の生存率(%)。

【図4-2】(d) フローサイトメトリードットプロットは、芽球(C D 4 5 d i m、赤丸)と非悪性リンパ球(青丸)を区別するため、および芽球ゲート(C D 4 5 d i m、赤丸)内のC D 3 4+細胞(赤四角)の結合を分析するための、一次慢性期CML(c p CML)試料に用いられるゲーティング戦略を示す。C D 4 5とS S Cのドットプロットに、7-A A D識別に基づいて生細胞上で予めゲートをかけた。(e) 慢性期CML(c p CML)C D 3 4+細胞と正常リンパ球におけるH S P 9 0へのP U-H 7 1-F I T C結合に関する比。(f) 1 μ MのP U-H 7 1-F I T CまたはT E G-F I T Cで48時間処理した後の未処理対照と比較したc p CML C D 3 4+細胞(赤色)および正常リンパ球(青色)の生存率(%)。(g) C D 3 4+細胞と正常臍帯血に由来するリンパ球、慢性期CML(c p CML)と急性転化期(b p CML)細胞におけるH s p 9 0へのP U-H 7 1-F I T C結合に関する比($n=5$)。(h) 未処理対照と比較した、P U-H 7 1(1 μ M)の芽球および慢性CML C D 3 4+細胞と、正常C D 3 4+細胞(臍帯血由来; C B)を用いる48時間の処理後の生存率(%)。パネルc、fおよびhにおける細胞生存は、アネキシンV/7-A A D染色により評価されたものである。データを平均 $\pm$ S E($n=3$)として提示する。

【図5】(a) 正常細胞内では、その適切な細胞内コンパートメント(「ハウスキーピング複合体」)に細胞タンパク質を折畳み、移行させるその進化的に保存されたハウスキーピング機能にとって、H S P 9 0の構成的発現が必要である。悪性形質転換の際に、細胞タンパク質は、突然変異、活動過剰、不正確な細胞内コンパートメント中での保持または

10

20

30

40

50

他の手段により無秩序になる。これらの機能的に変化したタンパク質の存在は、悪性表現型を開始させ、維持するのに必要であり、ストレスで修飾されたHSP90のサブセット（「発がん性複合体」）により特異的に維持されるのはこれらの発がん性タンパク質である。PU-H71は、発がん性タンパク質にシャペロン作用するHSP90の画分（「発がん性複合体」）に特異的に結合する。（b）HSP90およびその相互作用シャペロンを、PU-および対照ビーズ、ならびにH9010およびIgG-固定Abを用いてK562細胞抽出物中で単離した。対照ビーズは、HSP90不活性分子を含有する。（c）K562細胞抽出物に由来するHSP90を、H9010 HSP90特異的抗体を用いる3つの連続免疫精製ステップにより単離した。残りの上清を単離して、使い残しのタンパク質を分析した。各画分中のタンパク質を、ウェスタンブロットにより分析した。溶解物＝内因性タンパク質内容物。データは、複数の反復実験（ $n \geq 2$ ）から得られたものと一致する。

10

【図6】GMおよびPU-H71は異常タンパク質/HSP90種に対して選択的である。（a）一定容量のPU-H71ビーズ（80 μ L）を示された量のK562細胞溶解物でプロービングする実験（左側）、または一定量の溶解物（1 mg）を示された容量のPU-H71ビーズでプロービングする実験（右側）において、Bcr-Ab1およびAb1結合HSP90種をモニタリングした。（b）（左側）PU-およびGM-ビーズ（80 μ L）は、SKMe128メラノーマ細胞抽出物（300 μ g）中のHSP90突然変異B-Raf複合体を認識するが、正常な結腸線維芽細胞CCD18Co抽出物（300 μ g）中に見出されるHSP90-WT B-Raf複合体と相互作用することができない。H9010 HSP90 Abは、両方のHSP90種を認識する。（c）MDA-MB-468細胞抽出物（300 μ g）中で、PU-およびGM-ビーズ（80 μ L）はHER3およびRaf-1キナーゼと相互作用するが、非発がん性チロシンタンパク質キナーゼCSK、c-Src関連チロシンキナーゼ、およびp38とは相互作用しない。（d）（右側）PU-ビーズ（80 μ L）はv-Src/HSP90と相互作用するが、c-Src/HSP90種とは相互作用しない。c-Srcの検出を容易にするために、v-Src形質転換3T3細胞（250 μ g）と比較した場合、v-Srcよりも低い存在量のタンパク質、より多量のc-Src発現3T3細胞溶解物（1,000 μ g）を使用し、3T3細胞中で検出されるより高いHSP90レベルに関する説明を提供する（溶解物、3T3線維芽細胞対v-Src 3T3線維芽細胞）。溶解物＝内因性タンパク質内容物；PU-、GM-および対照ビーズは、特定のビーズ上で単離されたタンパク質を示す。HSP90 AbおよびIgGは、特定のAbにより単離されたタンパク質を示す。対照ビーズは、HSP90不活性分子を含有する。データは、複数の反復実験（ $n \geq 2$ ）から得られたものと一致する。

20

30

【図7】Bcr-Ab1発現CML細胞系（a）および一次CML細胞抽出物（b）中で、PU-および対照ビーズを用いて単一化学沈降を行った。プルダウン中のタンパク質を、ウェスタンブロットにより分析した。いくつかのBcr-Ab1切断産物を、報告⁹⁰のように一次CML試料中に注記する。N/A＝利用不可。

【図8】いくつかのHSP90阻害剤の構造。

【図9】PU-H71にコンジュゲートしたフルオレセインイソチオシアネート（FITC）、4-ニトロベンゾ[1,2,5]オキサジアゾール（NBD）または赤色シフト染料スルホローダミン101（テキサスレッド）のいずれかを含有する合成された熱ショックタンパク質90（HSP90）のための蛍光リガンド。

40

【図10】示された反応スキームのための試薬および条件：（a）FITC、Et₃N、DMF、rt、12時間、40%；（b）テキサスレッドスルホニルクロリド、DMF、0～10℃、12時間、61%；（c）DMF、rt、20時間、47%。

【図11】示された反応スキームのための試薬および条件：（a）FITC、Et₃N、DMF、rt、5時間、72%；（b）NBD-Cl、Et₃N、DMF、rt、12時間、40%。

【図12】示された反応スキームのための試薬および条件：（a）N-（3-ブロモプロ

50

ピル)ーフタルイミド、 Cs_2CO_3 、DMF、rt、34%；(b)ヒドラジン水和物、MeOH、 CH_2Cl_2 、rt、64%；(c)FITC、 Et_3N 、DMF、rt、12時間、74%；(d)NBD-Cl、 Et_3N 、DMF、rt、12時間、42%。

【図13】(A)MOLM-13細胞を、37℃で4時間、示されたPU-H71蛍光誘導体(1 μM)で処理し、生細胞(DAPI陰性)への結合をフローサイトメトリーにより測定した。結合の程度を平均蛍光強度(MFI)として示す。(B)MOLM-13細胞を、37℃で24時間、示されたPU-H71蛍光誘導体(1 μM)で処理した。それらの生存をDAPI排除により決定した。(C)MOLM-13細胞を、示されたPU-H71蛍光誘導体(1 μM)で24時間処理した。定常状態レベルのHSP90クライアントタンパク質mFLT3およびRaf-1を、ウェスタンブロットにより分析した。 β -
10
-アクチンを用いて、等しいタンパク質負荷について正規化した。

【図14-1】(A)PU-H71-FITC2で染色した白血病細胞の共焦点蛍光顕微鏡観察は、顕著な細胞内局在化を示す。

【図14-2】(B)一次急性骨髄性白血病試料を、示された用量のPU-H71またはビビクル(未処理)で24時間予備処理した。処理後の細胞を、1 μM のPU-H71-FITC2またはTEG-FITCで処理した。細胞へのPU-H71-FITC2およびTEG-FITCの結合をフローサイトメトリーにより評価し、平均蛍光強度(MFI)として表す。TEG-FITCを非特異的結合対照として示す。CD45対SSCゲーティングを用いて、一次標本に由来する芽球(悪性細胞)またはリンパ球(正常細胞)への結合を区別した。
20

【図15】正常細胞(左側)および乳がん細胞(右側)におけるPU-ANCAの蛍光放出スペクトル。乳がん細胞のスペクトル放出プロフィールは約530nmの波長での蛍光放出ピークをもたらし、結合したPU-H71-ANCAの代表的な蛍光放出であった。

【図16】(a)臍帯血およびCML芽球と、健康なドナー(臍帯血)ならびに慢性および急性転化期CML患者(それぞれ、cpCMLおよびbpCML)に由来する正常リンパ球とにおける、HSP90へのPU-H71-FITC結合に関する比。健康な患者に由来する臍帯血への有意な結合はなく、疾患進行と相関するCML中の結合が増加することに留意されたい。(b)未処理対照と比較した、急性転化期および慢性期CML CD34+細胞、ならびに正常CD34+細胞(臍帯血由来；CB)のPU-H71(1 μM)を用いる処理の48時間後の生存率(%)。細胞生存を、アネキシンV/7-AAD染色により評価した。データを、平均 $\pm$ SE(n=3)として提示する。(c)19個の一次AML患者試料セットにおける、HSP90へのPU-H71-FITC(1 μM)の結合と、500nMのPU-H71で48時間処理した後の生存率(%)との相関。各ドットは一次AML試料を表す。各実験を少なくとも2回実施した。これらの細胞は、類似する総HSP90レベルを発現する。
30

【図17】異種移植アッセイは、高いPU-FITC結合を有するAML試料のPU-H71処理に対するin vivoでの感受性を示唆する。(a)低いおよび高いPU-FITC取込みを示す2つの一次AML試料のin vitroでのPU-H71処理に関する48時間での生存率(%) (b)。生存率をアネキシン/7AADアッセイにより決定した。(b)異種移植された動物に由来する骨髓細胞(パネルaに示されたAML試料に関する)を、ヒト特異的抗体で染色して、PU-FITC結合を決定した。PU-FITC結合を、ヒト(白血病)/マウス(正常)細胞の比として表す。(c)75mg/kgのPU-H71で週3回、3週間にわたって処理された動物におけるCD34+腫瘍細胞(%)。
40

【図18】「発がん性HSP90」を検出および定量し、HSP90阻害剤に対する腫瘍細胞の感受性を予測するための標識されたPU-H71の使用。(A)HSP90へのPU-H71-FITC(1 μM)の結合と、膵臓がんおよび乳がん細胞系のパネルにおける48時間の1 μM PU-H71、SNX-2112またはNVP-AUY922を用いる処理後の生存率(%)との相関。結合を、それぞれのがん細胞中でのPU-FITCの取込みと、参照細胞であるHSP90耐性白血病細胞HL60中での取込みとの比とし
50

て測定する（パネルDを参照）。（B）総腫瘍HSP90の発現を、ウェスタンブロットにより測定し、PU-FITC結合に対してプロットした。（C）脾臓および乳がん細胞系のパネルにおける、 $1\mu\text{M}$ のPU-H71、SNX-2112またはNVP-AUY922を用いる48時間の処理後の生存率（%）を、総腫瘍HSP90の発現に対してプロットした。（D）低い結合および感受性（HL-60）および高い結合および感受性（MV4-11）のAML細胞系における、PEコンジュゲート化抗体とPU-H71-FITCとのHSP90結合。データを平均 $\pm$ SE（ $n=3$ ）として提示する。

【図19】腫瘍細胞と、参照HL-60白血病細胞との、PU-H71-FITC2結合の比。非応答性細胞に関する約1.23～約2.07以下と比較した、応答性細胞に関する約2.7～約5.87以上のPU-H71-FITC2への結合の比により、非応答性（生存率の50%未満の低下）細胞から、応答性（生存率の50%を超える低下）細胞を識別した。

10

【図20】EpCAM+循環腫瘍細胞中でのPU-H71-FITC2の蓄積：全血から単離されたPBMCを、PU-FITCまたは対照（PU-FITC9、DMSO、 $1\mu\text{M}$ / 2×10^6 細胞/ml、4時間）で予備処理した。次いで、細胞をCD45、CD14およびEpCAM抗体で染色した。（A）細胞にゲートをかけて死細胞を排除する。次いで、生細胞にゲートをかけて、EpCAM+対CD45+細胞を決定する。CD45+細胞、さらにFSC対CD14にゲートをかけることにより、単球を分析から排除する。

（B）CD45+CD14-細胞（青色）およびEpCAM+細胞（赤色）のPU-FITC中央蛍光強度（MFI）を示すヒストグラムプロット。DMSOおよびPU-FITC9対照（非特異的およびバックグラウンド結合を制御するために用いられる）の値を差し引いた後に、 $\text{MFI}_{\text{EpCAM+}}/\text{MFI}_{\text{CD45+CD14-}}$ （循環腫瘍細胞/白血球）の比として、EpCAM+細胞中の薬剤蓄積を算出する。

20

【図21】異なるLy1クローンによるPU-H71-FITC2の取込みを示し、中央蛍光強度として表す。HSP90阻害剤へのこれらの細胞の感受性は、標識されたPU-H71のその取込みと相関する。これらの腫瘍細胞中での総腫瘍HSP90の発現を、ウェスタンブロットにより測定した（差込み図）。

【図22】（a～c）脾臓がん細胞中でのPU-H71結合と毒性との相関。（A）生細胞中での結合；脾臓がん細胞（ 1×10^6 個の細胞）を、PU-FITC2（ $1\mu\text{M}$ ）または対照[TEG-FITC（ $1\mu\text{M}$ ）もしくはDMSO]で6時間処理した。細胞をFACSバッファー（PBS、0.05%FBS）で2回洗浄し、室温でFACSバッファー中の $1\mu\text{g/ml}$ のDAPI（Invitrogen）で染色した後、分析した。PU-H71蛍光誘導体結合を表す生細胞（DAPI陰性）に由来する蛍光強度を、フローサイトメトリー（LSR-II、BD Biosciences）により捕捉し、FlowJoソフトウェア（Tree Star, Ashland, OR）により分析した。値は、DMSOおよびTEG-FITC対照から差し引かれた平均蛍光強度である。（B）毒性；脾臓がん細胞（ 1×10^6 個の細胞）を、PU-FITC2（ $1\mu\text{M}$ ）で48時間処理した。細胞をFACSバッファー（PBS、0.05%FBS）で2回洗浄し、室温でFACSバッファー中の $1\mu\text{g/ml}$ のDAPI（Invitrogen）で染色し、フローサイトメトリー（LSR-II、BD Biosciences）により捕捉した。値は、DMSO対照に由来する値に対して正規化された生細胞（DAPI陰性）の%である。（C）相関分析；AおよびBから得られたMFIおよび毒性を、それぞれxおよびy軸上にプロットし、相関線形回帰分析を行った。

30

40

【図23-1】（A）白血病幹細胞（LSC、CD34+CD38-CD45dim）へのPUH71-FITC2の結合。一次AML試料を、 37°C で4時間、 $1\mu\text{M}$ のPU-H71-FITC2と共にインキュベートした。細胞をCD34、CD38、CD45および7-AADで染色した後、フローサイトメトリー分析を行った。LSCへのPU-H71の結合を、生細胞（7-AAD陰性）中での平均蛍光強度（MFI）として示す。

【図23-2】（B） $1\mu\text{M}$ のPUH71を用いる48時間の処理後の3つの一次AML試料に由来する未処理対照と比較したLSCの生存率（%）。細胞をCD45、CD34

50

およびCD38で染色した後、アネキシンVおよび7-AAD染色を行った。LSCの生存をフローサイトメトリーにより測定し、CD45dimCD34+CD38-ゲートのアネキシンV/7-AADの割合として決定した。

【図24】腫瘍は、その「発がん性HSP90」含量、すなわちHSP90療法に応答するその能力の差異を示す、異なる $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71取込みを有する。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71注入の24時間後の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PET画像を、乳がんを有する数人の患者において最大標準化取込み値(SUV_{max})として測定した。BC=乳がん。TNBC=三重陰性BC。

【図25】 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の投与後にPETにより決定された、HSP90阻害療法に応答する選択された患者数に関する腫瘍：筋肉SUV比。これらの患者においては、腫瘍：筋肉SUVは、時間と共に増加する。いくつかの陽性および陰性腫瘍について平均された値を提示する。

10

【図26】マントル細胞リンパ腫を有する患者のFDG/CTおよび $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PET/CT。患者は、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71注入後30分で病変の明確な可視化を示す。より後の時点(3.5~24時間以後)ではこの腫瘍中で $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71取込みは見られなかった。

【図27】2つの示されたリンパ節(LN)における再発乳がんを有する患者の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PET/CT。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71注入後のいくつかの時点(0.1、0.4、0.6、3.5および21.4時間)でのPET画像を定量し、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71について得られた SUV_{max} データを、 $10\text{mg}/\text{m}^2$ のPU-H71の投与用量あたりのHSP90i濃度に変換した。0~24時間の経時的なPU-H71への2つの腫瘍の曝露も算出し、曲線下面積(AUC)として表した。CT(左)、PU-PET/CT(中央)、およびFDG-PET/CT融合物(右)の横断画像は、疾患リンパ節の1つにおける $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71アビディティを示すが、他のものは、左気管気管支前角リンパ節(TAALN)中の病変が左気管気管支角LN(TALN)よりもHSP90療法に応答する可能性が低いことを示唆する。

20

【図28】三重陰性乳がん患者を、 ^{124}I -PU-H71 PETを用いて画像化した。注入後20分で、取込みは肺腫瘍(左矢印)および骨病変(右矢印)において顕著である(A)が、24時間の取込みは肺病変においてのみ見られる(B)。肺と骨腫瘍は両方とも、CTおよびFDGスキャンにより確認する(C)。患者は、HSP90阻害剤STA-9090を用いる処置を開始した。HSP90阻害剤処置の20日後、CTとFDG-PETの両方により示されるように、骨病変ではなく肺病変の大きさが顕著に低下する(D)。

30

【図29】気管傍リンパ節における転移性HER2乳がんを有する患者の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PET/CT。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71注入後または $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71と $10\text{mg}/\text{m}^2$ のPU-H71との同時注入後の示された時点でのPET画像を、最大標準化取込み値(SUV_{max})として測定した。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71について得られたSUVデータを、 $10\text{mg}/\text{m}^2$ のPU-H71の投与用量あたりのHSP90i濃度に変換した。0~48時間の経時的なPU-H71への腫瘍の曝露も算出し、曲線下面積(AUC)として表した。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETから見積もられたか、または $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71/PU-H71の同時注入後の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより決定されたPU-H71の腫瘍内濃度(マイクロモル濃度の値)は、同等である。

40

【図30】 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETは、HSP90阻害剤に関する非侵襲的アッセイである。(a)PU-H71および $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の化学構造。(b)MDA-MB-468腫瘍担持マウスにおける $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の代表的なPETスキャン。腫瘍の位置を赤色の矢印で示す。(c)投与後の示された時点での $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71腫瘍と臓器活性濃度との比。(d)MDA-MB-468腫瘍および血漿中の $[^{131}\text{I}]$ -PU-H71の生体内分布($n=5$)。腫瘍-Sおよび腫瘍-Lは、それぞれ小さい腫瘍および大きい腫瘍である。(差込み図)腫瘍からのPU-H71の2

50

4～140時間の遅延最終クリアランス期を、Graph Pad Prism中に実装された線形回帰曲線適合を用いて分析した。

【図31】 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETは、腫瘍中の治療上有効なPU-H71濃度の送達を正確に予測する。(a) $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより生成された平均%ID/gに基づく予測されたPU-H71腫瘍分布(下側)。示されたPU-H71用量の投与後(p. a.)の示された時点での予測された腫瘍内濃度(上側)。(b) $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより予測され、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71およびPU-H71の同時注入後にLC-MS/MSおよび $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより決定された、75mg/kgの薬剤の投与後の腫瘍PU-H71濃度(n=5)。(c、d)示された用量でPU-H71を投与し、投与後24時間で分析したMDA-MB-468腫瘍(c)および示された濃度のPU-H71で24時間処理されたMDA-MB-468(d)の代表的なウェスタンブロット分析。ブロット(n=3)を密度測定により定量し、タンパク質レベルの変化を、PU-H71の濃度に対してプロットした(右パネル)。(e、f)示された用量のPU-H71と混合した微量の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の同時投与後の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより予測された投与後24時間での標的占拠率。

【図32】 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETは、HSP90療法のための有効な用量レジメンの設計を予測する。(a) $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより誘導された平均腫瘍活性濃度(%ID/g)に基づく週3回(月曜-水曜-金曜、Sat/Sunは休み)のスケジュールでの示された用量で2週間にわたって投与した場合の予測されたPU-H71腫瘍分布。(差込み図)腫瘍中のPU-H71のAUCを、Graph Pad Prismを用いて算出した。(b)示された用量のPU-H71で48時間処理されたMDA-MB-468細胞の生存を、エチジウムブロマイド/アクリジンオレンジ染色により分析した(上側)。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより誘導された見積もられた腫瘍アポトーシスは、示された平均および最小PU-H71腫瘍内濃度を予測した。(c)MDA-MB-468腫瘍担持マウス(n=5)に、週3回のスケジュールで示された用量のPU-H71を腹腔内投与した。腫瘍体積およびマウス体重を、示された処置期間にわたってモニタリングした。(d)MDA-MB-468腫瘍担持マウス(n=5)に、週3回のスケジュールで示された用量のPU-H71を腹腔内投与した。腫瘍体積およびマウス体重を、示された処置期間にわたってモニタリングした。(e)週3回(月-水-金、土/日は休み)のスケジュールで示された用量で投与した場合の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより誘導された平均腫瘍活性濃度(%ID/g)に基づく予測されたPU-H71腫瘍分布。(f)最後の投与の投与後24時間の木曜に犠牲にした、ビヒクル(対照)およびPU-H71(5mg/kg)で処置された腫瘍のウェスタンブロット分析。LC-MS/MSにより決定された、PU-H71腫瘍内濃度を、それぞれの腫瘍について示す。(f)パネル(d)からのデータ(n=5)の分析。

【図33】 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETは、HSP90療法のための有効なスケジュールレジメンの設計を予測する。(a)示されたスケジュールで75mg/kgで投与された場合の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETにより誘導された平均腫瘍活性濃度(%ID/g)に基づく予測されたPU-H71腫瘍分布。(b)in vitro分析から予測された、示された平均および最小PU-H71腫瘍内濃度により誘導された見積もられた腫瘍アポトーシス。(c)MDA-MB-468腫瘍担持マウス(n=5)に、示されたスケジュールでPU-H71(75mg/kg)を腹腔内投与した。腫瘍体積およびマウス体重を、示された処置期間にわたってモニタリングした。(d)最後の投与の投与後24時間のThuおよび96時間のThuに犠牲にした週1回のスケジュールでのPU-H71(75mg/kg)で処置された腫瘍の(d)ウェスタンブロットおよび(e)LC-MS/MS分析。対照;ビヒクルのみで処置したマウス。

【図34】肺および示されたリンパ節への転移疾患を有する脾臓患者に関するPU-PETにより予測されたPU-H71への腫瘍曝露。腫瘍内濃度を、20mg/m²の投与用量に基づいて算出する。血漿曝露も赤色で示す。0～129時間の期間の算出されたAU

C ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) を、右側に一覧化する。

【図35】肺での再発疾患を有する膵臓がん患者の $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PET/CT。 $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ 注入後の示された時点でのPET画像（48および196時間、左パネル）を定量し、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ について得られたSVUデータを、PU-H71の示された投与用量あたりの腫瘍中のPU-H71濃度に変換した。週2回（火および金）のスケジュールならびに20、60および80mg/m²の投与用量での2週間の処置にわたる0～336時間の経時的な、一方は左肺および他方は右肺門LN中の2つの腫瘍の、PU-H71への曝露（上右および下パネル）も算出し、曲線下面積（AUC）として、および平均腫瘍内濃度として表した。

【図36】パネルAは、PU-PETから得られた乳がん患者の腫瘍における0～72時間にわたる $^{124}\text{I} - \text{PU-H71}$ の生体内分布を示す。このデータを用いて、週末休みで2週間にわたって週に2回、週末休みで2週間にわたって週に3回、週末休みで2週間にわたって週に1回および週末休みで2週間にわたって週に5回投与した場合の10mg/m²の投与用量への腫瘍曝露をシミュレートした。

【図37】 $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETは、HSP90療法に対する応答の規模を予測する。（a）示された用量および示されたスケジュールで投与された場合のPU-H71による腫瘍HSP90部位の予測された平均占拠率。（b、c）腫瘍HSP90占拠率と観察された抗腫瘍効果との相関を、GraphPad Prismにおいて分析した。

【図38-1】（a）有効な腫瘍内濃度、HSP90療法にふさわしい患者の選択を達成するのに必要とされるHSP90阻害剤の用量の決定と、有効用量およびスケジュールレジメンの設計；（b）腫瘍に送達される薬剤の実際の濃度のアッセイと、HSP90療法上での臨床転帰の予測ならびに

【図38-2】（c）「最大腫瘍用量」の決定における、HSP90阻害剤の臨床開発における $^{124}\text{I} - \text{PU-H71}$ PETアッセイの使用。CR＝完全な応答、PR＝部分的応答、NR＝応答なし。

【図39】MDA-MB-468異種移植TNBCマウスにおける $[^{124}\text{I}] - \text{PU-DZ13}$ および $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ の *in vivo*でのPET画像化。PET画像化を、R4またはFocus 120小動物専用PETスキャナー（Concord Microsystems, Inc., Knoxville, TN）上で行った；別々の解剖学的画像化を、特注生産された定位固定拘束装置を用いて、小動物専用CTスキャナー（ImTek, Inc., Oak Ridge, TN）上で行った。CTおよびPET画像データセットの最大値投影（MIP）を解剖学的に登録し、PETおよびCTデータのアルファ透明ブレンドを用いてオーバーレイ画像を作製した。

【図40-1】BCの事例は、PU-H71に対する用量依存的応答を示す。H&E染色されたスライドは、腫瘍がPU-H71に対して高感受性である場合、核濃縮型細胞（初期段階のアポトーシスを示す）と核崩壊型細胞（後期アポトーシスを表す）の両方を含有する有意なアポトーシス領域を示す。（A）示された濃度のPU-H71で48時間処理したTNBC標本におけるアポトーシス／細胞死を定量し、PU-H71の濃度に対してプロットした。アポトーシスおよび壊死性／後期アポトーシス細胞の両方を計数し、y軸上に示されたアポトーシス率（％）に加算した。3つの感受性群（最急降下、最も上の曲線、最も高感受性のLN15およびN16；中央の曲線、感受性のPT12、PT17、PT25、PT28およびLN10ならびに下側の曲線、低感受性のPT10、PT15、PT16およびPT30）における事例のクラスター化に留意されたい。興味深いことに、リンパ節転移は、等価用量の原発性腫瘍よりも高感受性を示した。PT＝原発性腫瘍、LN＝リンパ節。PU-H71に対して最も高感受性の腫瘍も、p-Aktに対して高く染色する。

【図40-2】（B）PU-H71で24または48時間処置したHER2+、TNBCおよびER+BC患者からの標本に関する（A）と同じもの。

【図41】HSP90阻害に対するアポトーシス感受性は、MEK経路ではなく、AKT

10

20

30

40

50

およびS T A T経路上での生存への細胞の依存と相関する。(A)、(B)代表的なA M L細胞を、示された濃度のH S P 9 0、A K T、J A KおよびM E K阻害剤と共に示された時間インキュベートし、アクリジンオレンジ／エチジウムブロマイド法を用いてアポトーシスを評価した。データは、複数の反復実験($n \geq 3$)から得られたものと一致する。点は平均；バーはs. d.である。(C) A K T i、M E K iおよびJ A K iのみで72時間処理した細胞に由来するアポトーシス(%)値をH S P 9 0阻害剤処理の際に得られたものに対してプロットし、P r i s m 4. 0中に実装された線形回帰分析を実施した。

【図42】p-S T A T 5のレベルが最も高いA M L一次細胞はまた、P U-H 7 1に対して最も高感受性である。(A)芽細胞(C D 4 5 d i mにゲートをかけた)におけるホスホ-S T A T 5レベルを、3つの異なる一次A M L試料に関する平均蛍光強度(M F I)として表した。(B)1 μ MのP U H 7 1を用いる48時間の処理後の3つの一次A M L試料に由来する未処理対照と比較したA M L芽球の生存率(%)。細胞をC D 4 5で染色した後、アネキシンVおよび7-A A Dで染色した。A M L芽細胞の生存能力をフローサイトメトリーにより測定し、A M L芽球に関するC D 4 5 d i m対S S CゲートのアネキシンV／7-A A D染色の割合として決定した。

【図43】8~10 m o 3 x T gマウスに、(A)75 m g / k gまたは(B)示された用量のH S P 9 0阻害剤P U-H Z 1 5 1を投与し、P Dマーカー、H S P 7 0を、投与後24時間で、このA Dのモデルにおいて罹患した脳領域である海馬中で測定した。H S P 7 0は、H S P 9 0が阻害された場合に誘導され、その誘導は、治療レベルのH S P 9 0阻害剤が対象の脳領域に送達されたことの指示因子である。(C)示された脳領域および血漿中のH S P 9 0阻害剤のレベルを、50 m g / k gのP U-H Z 1 5 1の投与後にL C-M S / M Sにより決定した。単回腹腔内注射後の様々な時点でのH s p 9 0阻害剤レベルを、マイクロモル濃度単位で示す。また、脳曝露を曲線下面積(A U C)として測定した。

【図44-1】P U-H 7 1はH S P 9 0に対して選択的である。(A)いくつかのH S P 9 0阻害剤ビーズプルダウンのクマシー染色ゲル。K 5 6 2溶解物(60 μ g)を、25 μ Lの示されたビーズと共にインキュベートした。示されたバッファーで洗浄した後、プルダウン中のタンパク質をS D S-P A G Eゲルに印加した。

【図44-2】(B)P U-H 7 1(10 μ M)を、359キナーゼに対してs c a n M A Xスクリーン(A m b i t)中で試験した。P U-H 7 1のT R E E s p o t(商標)相互作用マップを提示する。S N A R K(N U A KファミリーのS N F 1様キナーゼ2)(キナーゼツリー上の赤いドット)は、小分子の潜在的な低親和性キナーゼヒットとして現れる。

【詳細な説明】

【0045】

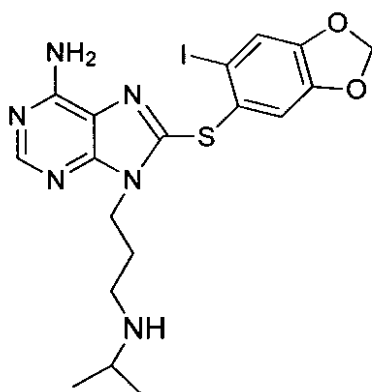
5. 1. 腫瘍特異的バイオマーカーとしての発がん性H S P 9 0

本開示は、H S P 9 0発現のみによっては決定されない、この特定の「発がん性H S P 9 0」種の存在量が、H S P 9 0阻害療法に対する感受性を予測し、かくして、H S P 9 0療法のためのバイオマーカーであることの証拠を提供する。本発明はまた、腫瘍中のこの発がん性H S P 9 0種の存在量の同定および測定が、H S P 9 0療法に対する応答を予測することの証拠も提供する。

【0046】

以下の節において、本発明者らは、H S P 9 0阻害剤P U-H 7 1が腫瘍富化されたH S P 9 0複合体を標的とし、H S P 9 0依存的発がん性クライアントタンパク質を親和性捕捉することを示す。化合物P U-H 7 1は米国特許第7, 834, 181号に開示されており、参照によりここに組込まれる。P U-H 7 1は、以下の化学構造：

【化 1】



PU-H71

10

【0047】

を有する。PU-H71を、遊離塩基として、または薬学的に許容される塩として投与することができる。

【0048】

さらに、本発明者らは、HSP90発現のみによっては決定されない、PU-H71により富化されたHSP90種の存在量が、PU-H71および他のHSP90阻害剤によるHSP90阻害に対する細胞の感受性を予測することを示す。

20

【0049】

5. 1. 1. がん細胞中での異種HSP90提示

小分子HSP90阻害剤と、腫瘍HSP90複合体との相互作用を調査するために、本発明者らはゲルダナマイシン (GM) またはPU-H71のいずれか (それぞれ、GMおよびPU-ビーズ) に共有結合させたアガロースビーズを利用した (図1、2)。GMとPU-H71は両方とも、化学的に異なる薬剤であり、そのN末端ドメイン調節ポケットへの結合によりHSP90と相互作用し、これを阻害する³⁵。比較のために、本発明者らは、抗HSP90抗体 (H9010) にカップリングさせたGタンパク質アガロースビーズも作製した。

30

【0050】

第一に、本発明者らは、乳がんおよび慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞溶解物中でのHSP90へのこれらの薬剤の結合を評価した。非特異的IgGではなく、H9010を用いる4つの連続免疫沈降 (IP) ステップは、これらの抽出物からHSP90を効率的に枯渇させた (図1a、4xH9010および示さず)。対照的に、PU-またはGM-ビーズを用いる連続プルダウンは、総細胞HSP90の画分のみを除去した (図1b、3a、3b)。具体的には、MDA-MB-468乳がん細胞中で、合わせたPU-ビーズ画分は、総細胞HSP90プールの約20~30%に相当し、新鮮なPU-ビーズのアリコートさらなる添加は溶解物中の残りのHSP90を沈降させることができなかった (図1b、PU-ビーズ)。このPU枯渇された、残りのHSP90画分は、小分子には近づき難いが、H9010に対する親和性を維持した (図1b、H9010)。このことから、本発明者らは、MDA-MB-468細胞抽出物中のHSP90の有意な画分がまだ天然のコンフォメーションにあったが、PU-H71と反応しなかったと結論付ける。

40

【0051】

細胞溶解物中のHSP90配置の変化が、抗体ではなく、固定されたPU-H71への結合のためにそれを利用できなくする可能性を排除するために、本発明者らは、無傷のがん細胞における放射標識された¹³¹I-PU-H71のHSP90への結合を分析した (図1c、下側)。¹³¹I-PU-H71およびPU-H71の化学構造は同一である: PU-H71は安定なヨウ素原子 (¹²⁷I) を含有し、¹³¹I-PU-H71は放射性ヨウ素

50

を含有する；かくして、アイソトープ標識された $^{131}\text{I}-\text{PU}-\text{H}71$ は、標識されていない $\text{PU}-\text{H}71$ と同一の化学的および生物学的特性を有する。いくつかのがん細胞系における $^{131}\text{I}-\text{PU}-\text{H}71$ の $\text{HSP}90$ への結合は、細胞あたりの明確に定義されているが異なる数の部位で飽和するようになった（図1c、下側）。本発明者らは、 $\text{MDA}-\text{MB}-468$ 細胞中の $\text{PU}-\text{H}71$ により結合した細胞性 $\text{HSP}90$ の画分を定量した。第一に、本発明者らは、 $\text{HSP}90$ がこれらの細胞中の総細胞タンパク質の2.66~3.33%に相当し、これが他の腫瘍細胞中の $\text{HSP}90$ の報告された存在量³³とほぼ一致する値であることを決定した。約 41.65×10^6 個の $\text{MDA}-\text{MB}-468$ 細胞を溶解したところ、 $3875 \mu\text{g}$ のタンパク質が得られ、そのうちの $103.07 \sim 129.04 \mu\text{g}$ が $\text{HSP}90$ であった。したがって、1個の細胞は、 $(2.47 \sim 3.09) \times 10^{-6} \mu\text{g}$ 、 $(2.74 \sim 3.43) \times 10^{-11} \mu\text{mol}$ または $(1.64 \sim 2.06) \times 10^7$ 分子の $\text{HSP}90$ を含有していた。 $\text{MDA}-\text{MB}-468$ 細胞中で、 $^{131}\text{I}-\text{PU}-\text{H}71$ は、多くても 5.5×10^6 個の利用可能な細胞結合部位に結合したが（図1c、下側）、これは総細胞 $\text{HSP}90$ の26.6~33.5%に達する $(5.5 \times 10^6 / (1.64 \sim 2.06) \times 10^7 \times 100)$ として算出される）。この値は、細胞抽出物中の $\text{PU}-\text{ビーズプルダウン}$ を用いて得られたものと非常に類似し（図1b）、 $\text{PU}-\text{H}71$ が総 $\text{HSP}90$ プールの約30%に相当する $\text{MDA}-\text{MB}-468$ 細胞中の $\text{HSP}90$ の画分に結合することを確認し、このプールを効率的に単離するための $\text{PU}-\text{ビーズ}$ の使用を正当化する。 $\text{K}562$ および他の確立された $\text{t}(9;22)+\text{CML}$ 細胞系においては、 $\text{PU}-\text{H}71$ は総細胞 $\text{HSP}90$ の10.3~23%に結合した（図1c、3b、3c）。

【0052】

次に、本発明者らは、いくつかの一次白血病細胞および正常血液細胞にまで本発明者らの試験を拡張した。これらのものは芽球（悪性細胞集団）とリンパ球（正常細胞集団）の両方を含有する一次慢性および急性転化期 CML ならびに急性骨髄性白血病（ AML ）試料、健康なドナーの臍帯血から単離された $\text{CD}34+$ 細胞、末梢血に由来する総単核細胞およびまた末梢血リンパ球（ PBL ）であった（図1c~e、3、4）。本発明者らは、フルオレセイン標識された $\text{PU}-\text{H}71$ （ $\text{PU}-\text{FITC}$ ）を用いた。この化学的手段は、細胞表面マーカーを用いて異なる細胞集団に結合する $\text{PU}-\text{H}71$ の、異種細胞集団中でのフローサイトメトリー分析、および $\text{PU}-\text{H}71$ に対する細胞の感受性の調査を可能にする。テトラエチレングリコール誘導体化 FITC （ $\text{FITC}-\text{TEG}$ ）を用いて、非特異的結合を制御した（図1d）。

【0053】

$\text{PU}-\text{H}71$ は $\text{K}562$ 細胞中ならびに CML および AML 芽球中で $\text{HSP}90$ に効率的に結合し、その半数相対結合親和性（ EC_{50} ）はそれぞれ116、201および425 nMであった（図1d）。対照的に、正常血液細胞へのその親和性はより弱く、2,000 nMよりも高い EC_{50} であった（図1d、3d）。 $\text{HSP}90$ は、 $\text{HSP}90$ 抗体への実質的結合により示される通り、これらの正常血液細胞中で依然として高度に発現される（図3d）。

【0054】

$\text{PU}-\text{H}71$ に対する最も高いアビディティを有する細胞もまた、薬剤による殺傷に対して最も感受性が高かった（図1e、3e、4）。 CML および AML 細胞系および一次試料のパネル中で評価した場合、 $\text{HSP}90$ に結合する $\text{PU}-\text{H}71$ の能力と、これらの細胞に対して $\text{PU}-\text{H}71$ の細胞殺傷能力との有意な相関が見られた（図3e、4）。

【0055】

まとめると、これらのデータは、特定の $\text{HSP}90$ 阻害剤、例えば、 $\text{PU}-\text{H}71$ が、正常細胞中よりもがん細胞中により豊富である $\text{HSP}90$ 種のサブセットに優先的に結合することを示す（図5a）。 $\text{HSP}90$ 発現レベルのみによっては決定されない、この $\text{HSP}90$ 種の存在量は、 $\text{HSP}90$ 阻害に対する細胞の感受性を予測し、かくして、この腫瘍 $\text{HSP}90$ 種の存在量を用いて、 $\text{HSP}90$ 療法に対する応答性を予測するバイオマ

ーカーとして用いることができる。

【0056】

5. 1. 2. がんタンパク質および野生型タンパク質に結合したHSP90種はがん細胞中に同時に存在するが、PU-H71はがんタンパク質/HSP90種を選択する

これらのHSP90種と関連する生化学的機能を探索するために、本発明者らは、それぞれ、抗体ビーズおよびHSP90阻害剤ビーズを用いて免疫沈降（IP）および化学沈降（CP）を実施し、本発明者らは選択されたサブセットの既知のクライアントと共沈降するこれらの状況で結合したHSP90の能力を分析した。K562 CML細胞は異常なBcr-Ablタンパク質、構成的に活性なキナーゼ、およびその正常な対応するc-Ablを同時発現するため、この細胞系を最初に調査した。これらの2つのAbl種は分子量により明確に分離可能であり、かくして、ウェスタンブロットにより容易に識別可能であり（図2a、溶解物）、同じ細胞状況におけるHSP90がん性および野生型（WT）クライアントの分析を容易にする。本発明者らは、非特異的IgGではなく、H9010が、Bcr-AblとAblの両方との複合体中のHSP90を単離することを観察した（図2a、5c、H9010）。免疫沈降したBcr-AblおよびAbl（図2a、2b、左側、H9010）と、上清中に残存する各タンパク質の画分（図2b、左側、残りの画分）との比較により、抗体がK562細胞中の突然変異型またはWT型のAblに結合したHSP90を優先的に富化しないことが示された。

【0057】

対照的に、PU結合したHSP90は、Bcr-Ablタンパク質を優先的に単離した（図2a、2b、右側、PU-ビーズ）。HSP90/Bcr-Abl種のPU-ビーズ枯渇後（図2b、右側、PU-ビーズ）、H9010は残りのHSP90/Abl種を沈降させた（図2b、右側、H9010）。PU-ビーズは、実質的に飽和する条件（すなわち、過剰の溶解物、図6a、左側、およびビーズ、図6a、右側）でHSP90/Bcr-Abl種に対する選択性を保持していた。Bcr-Abl/HSP90種に対するPU-H71の生化学的選択性のさらなる確認として、Bcr-AblはAblよりもPU-H71による分解に非常により感受性があつた（図2d）。異常なAbl種に対するPU-H71の選択性は、他の確立されたt（9；22）+CML細胞系（図7a）、および一次CML試料（図7b）にまで拡張された。

【0058】

5. 1. 3. HSP90種に結合したWTタンパク質ではなくがんタンパク質は、HSP90によるクライアントタンパク質調節のためのコシャペロン動員に最も依存する

PU-H71と抗体に関連するHSP90画分とをさらに識別するために、本発明者らは、連続枯渇実験を実施し、2つの種のコシャペロン構成性を評価した³²。HSP90/Bcr-Abl複合体を含有するHSP90の画分は、Hsp70、Hsp40、HOPおよびHIPを含むいくつかのコシャペロンに結合した（図2c、PU-ビーズ）。また、PU-ビーズプルダウンは、いくつかのさらなるHSP90コシャペロン種について富化された。これらの知見は、PU-H71がコシャペロンに結合したHSP90を認識することを強く示唆している。HSP90/Abl種を含むことが示された、PU-ビーズにより枯渇された、残りのHSP90プールはコシャペロンと会合していなかったが（図2c、H9010）、その異常な発現は溶解物中で検出された（図2c、残りの上清）。しかしながら、コシャペロンは、総細胞抽出物中でH9010により単離される（図5b、5c）。

【0059】

これらの知見は、HSP90の異なるプールの存在が、CML細胞中でBcr-AblまたはAblのいずれかに優先的に結合したことを示唆している（図2）。H9010は、HSP90種を含有するBcr-AblとAblの両方に結合するが、PU-H71はBcr-Abl/HSP90種に対して選択的である。本発明者らのデータはまた、HSP90が正常（すなわち、Abl）タンパク質ではなく、異常（すなわち、Bcr-Abl）タンパク質の活性を調節する場合、古典的コシャペロンHsp70、Hsp40およ

びH O Pをより急性的に利用し、必要としてもよいことを示唆している（図5 a）。この仮説に従って、本発明者らは、B c r－A b lが、K 5 6 2細胞中で、H s p 7 0、H S P 9 0 コシャペロンのノックダウンに対してA b lよりも感受性が高いことを見出す（図2 e）。

【0060】

5. 1. 4. がんタンパク質／H S P 9 0種選択性およびP U－H 7 1の複合体捕捉能力は、全てのH S P 9 0阻害剤により共有されない

本発明者らは次に、合成阻害剤S N X－2 1 1 2およびN V P－A U Y 9 2 2、ならびに天然産物G M³⁵を含む、P U－H 7 1と同様の様式でH S P 9 0のN末端調節ポケットと相互作用する他の阻害剤が、類似するH S P 9 0種を選択的に単離することができるかどうかを評価した（図2 1）。S N X－ビーズはB c r－A b l／H S P 9 0に対する選択性を示したが、N V P－ビーズはH 9 0 1 0と同様に挙動し、B c r－A b l／H S P 9 0とA b l／H S P 9 0種とを区別しなかった（それぞれ、S N X－対N V P－ビーズを参照されたい；図2 f）。G M－ビーズも細胞溶解物中のH S P 9 0のサブ集団を認識したが（図3 a）、それらはB c r－A b lの共沈降においてP U－ビーズよりも効率性がずっと低かった（図2 f、G M－ビーズ）。H S P 9 0／クライアントタンパク質複体の捕捉におけるG Mの類似する無効性は、以前に報告されている³⁶。

【0061】

5. 1. 5. がんタンパク質／H S P 9 0種選択性およびP U－H 7 1の複合体捕捉能力は、B c r－A b l／H S P 9 0種に限定されない

がんタンパク質に対する選択性がB c r－A b lに限定されるかどうかを決定するために、本発明者らは、他の腫瘍細胞系においていくつかのさらなる明確に定義されたH S P 9 0クライアントタンパク質を試験した（図6 b～d）^{37、38}。K 5 6 2細胞における本発明者らの結果と一致して、H 9 0 1 0は、S K M e l 2 8メラノーマ細胞中で発現された突然変異B－R a fと、C C D 1 8 C o正常結腸線維芽細胞中で発現されたW T B－R a fの両方と複合体化したH S P 9 0を沈降させた（図6 b、H 9 0 1 0）。しかしながら、P U－およびG M－ビーズはH S P 9 0／突然変異B－R a fを選択的に認識し、H S P 9 0／W T B－R a fの認識をほとんど示さなかった（図6 b、P U－ビーズおよびG M－ビーズ）。しかしながら、K 5 6 2細胞の場合と同様、G M－ビーズは突然変異クライアントタンパク質の共沈降においてP U－ビーズよりも効率性が有意に低かった。他のH S P 9 0クライアントについても同様の結果が得られた（図6 c、6 d）。

【0062】

まとめると、P U－H 7 1は、C M Lにおける悪性表現型にとって不可欠であるシグナリング経路に関与するタンパク質の広い横断面を富化させる。P Uに結合したH S P 9 0と異常なC M Lシグナロソームとの相互作用は、一次C M L試料中で保持された。

【0063】

5. 1. 6. P U－H 7 1により同定されたタンパク質およびネットワークは、悪性表現型にとって重要なものである

本発明者らは、P U－ビーズプルダウン中のこれらのタンパク質の存在が機能的に有意であり、C M L細胞中の悪性シグナロソームを広く支援するH S P 9 0の役割を示唆すると仮定する。

【0064】

P U－ビーズにより同定されるネットワークがK 5 6 2における形質転換にとって重要であることを証明するために、本発明者らは次に、個々のネットワークの重要な節となるタンパク質（B c r－A b l、N F κ B、m T O R、M E KおよびC A M I I K）の阻害剤がK 5 6 2細胞の成長および増殖能力を低下させることを示した。

【0065】

次に、本発明者らは、C M Lにおいてはまだ役割を割り当てられていないP U－ビーズにより同定されたH S P 9 0相互作用因子も、形質転換された表現型に寄与することを示した。多くの遺伝子の転写コアクチベーター⁵⁷であるヒストン－アルギニンメチルトラン

スフェラーゼ CARM1 を、CML 細胞系および一次 CML 細胞に由来する PU-ベーズプルダウン中で実証した。これは、HSP90 と CARM1 との初めて報告される関連であるが、他のアルギニンメチルトランスフェラーゼ、例えば、PRMT5 は卵巣がん細胞における HSP90 クライアントであることが示された⁵⁸。CARM1 レベルの上昇は前立腺および乳がんの発達に参与するが、CML 白血病誘発における CARM1 の重要性に関してはほとんど知られていない⁵⁷。本発明者らは、CARM1 が PU-ベーズにより認識される HSP90 種により本質的に完全に捕捉され、PU-H71 による分解に対してより感受性であることも見出した。したがって、CARM1 は、CML における新規 HSP90 がんタンパク質であってもよい。実際、対照 shRNA ではなく CARM1 を用いるノックダウン実験は、正常な CD34+ 細胞中ではなく K562 中での生存能力の低下およびアポトーシスの誘導を示し（示さず）、この仮説を支持している。qPCR データにより、CARM1 mRNA レベルが 2 つの異なる shRNA により顕著に低下することが確認された（データは示さず）。

10

【0066】

PU-プルダウン中のタンパク質の存在がその異常な発現だけでなく、異常に活性化されたシグナリングへのその関与に起因することを証明するために、本発明者らは、K562 および膵臓がん細胞系である Mia-PaCa-2 に由来する PU-ベーズプルダウンを比較した。両細胞とも高レベルの STAT5 タンパク質を発現するが、STAT5 リン酸化および DNA 結合⁵⁹ により示されたように、STAT5 経路の活性化は K562 細胞においてのみ見られた。したがって、このタンパク質は K562 PU-ベーズプルダウンにおいてのみ同定された。対照的に、活性化された STAT3 は、K562 と Mia-PaCa-2 細胞抽出物の両方に由来する PU-HSP90 複合体において同定された。

20

【0067】

mTOR 経路は K562 と Mia-PaCa-2 細胞の両方において PU-ベーズにより同定され、実際、mTOR⁶⁰ の ATP ドメインを標的とする選択的阻害剤である PP242 によるその薬理的阻害は、両方の細胞に対して毒性的である。他方、Abl 阻害剤 Gleevec⁶¹ は、K562 細胞に対してのみ毒性的であった。両細胞は Abl を発現するが、K562 だけが発がん性 Bcr-Abl を有し、PU-ベーズは、Mia-PaCa-2 細胞中ではなく、K562 中で、Bcr-Abl として Abl を同定する。

【0068】

5. 1. 7. PU-H71 は発がん性 STAT 活性化の新規機構を同定する

PU-ベーズプルダウンは、CML 白血病誘発において構成的に活性化される Bcr-Abl⁴¹、CAMKII γ ⁵²、FAK⁵³、vav-1⁶² および PRKD2⁴⁸ などのいくつかのタンパク質を含有する。これらのものは、その安定状態レベルが HSP90 阻害時に低下するため、その安定性に関して HSP90 に依存する古典的な HSP90 調節性クライアントである^{32、33}。STAT3 および STAT5 の構成的活性化は、CML においても報告されている^{41、46}。しかしながら、STAT5 および STAT3 レベルが HSP90 阻害時に本質的に未変化のままであるため、これらのタンパク質は古典的 HSP90 クライアントタンパク質の基準に適合しない。PU-プルダウンはまた、活性シグナリング巨大複合体、例えば、mTOR、VSP32、VSP15 および Raptor の一部として潜在的に単離されたタンパク質も含有する⁴⁴。p-mTOR の細胞レベルにより測定される、mTOR 活性もまた、複合体成分よりも HSP90 阻害に対して感受性が高いと考えられる（すなわち、PU-H71 処理細胞中での p-mTOR および Raptor の相対的減少を比較する）。さらに、PU-HSP90 複合体は、アダプタータンパク質、例えば、GRB2、DOCK、CRKL および EPS15 を含有し、これらは K562 における複数の異常活性化されたシグナリング経路の重要なエフェクターに Bcr-Abl を結合させる^{30、41}。それらの発現も HSP90 阻害時に未変化のままである。したがって、本発明者らは、特定の発がん経路への HSP90 の寄与がその古典的折畳み作用を超えて拡張されるかどうかを知りたいと考えた。具体的には、本発明者らは、HSP90 が、以前に主張されたように^{40、63}、シグナリング複合体をその活性な配置に維持する足場分

30

40

50

子としても作用することを示す。

【0069】

5. 1. 8. HSP90はSTAT5に結合し、そのコンフォメーションに影響するこの仮説をさらに調査するために、本発明者らは、CML中で構成的にリン酸化される⁶⁴、STAT5に着目した。p-STAT5の全体的なレベルを、リン酸化および脱リン酸化事象の平衡により決定する。かくして、K562細胞中の高レベルのp-STATは、上流のキナーゼ活性の増加またはタンパク質チロシンホスファターゼ（PTPase）活性のいずれかの低下を反映してもよい。HSP90とp-STAT5の直接的相互作用は、p-STAT5の細胞レベルを調節することもできる。

【0070】

これらの潜在的な機構の相対的寄与を詳細に分析するために、本発明者らは、K562細胞中でSTAT5リン酸化を調節する主要なキナーゼおよびPTPaseに対するPU-H71の効果を最初に調査した。Bcr-Ablは、JAKリン酸化を要することなくSTAT5を直接活性化する⁶⁴。合致して、STAT5リン酸化はBcr-Abl阻害剤Gleevecの存在下で急速に低下した。HSP90はBcr-Abl安定性を調節し、HSP90阻害後の定常状態のBcr-Ablレベルの低下には3時間より多く必要である⁶⁵。実際、CRKLリン酸化の低下がないことにより示されるように、Bcr-Abl発現または機能の変化は、p-STATレベルを低下させる時間間隔でPU-H71に関して観察されなかった。また、Bcr-Ablでトランスフェクトされた32Dcl3細胞におけるSTAT5のキナーゼ活性化因子⁶⁶であるHCKの活性および発現の変化は見られなかった。

【0071】

かくして、0～90分間隔でのPU-H71によるp-STAT5リン酸化の低下は、Bcr-Ablまたは他のキナーゼの脱安定化によっては説明されない可能性がある。

【0072】

本発明者らはしたがって、PU-H71の存在下でのp-STAT5レベルの急速な低下はPTPase活性の増加によって説明されてもよいかどうかを試験した。また、主要な細胞質STAT5ホスファターゼ⁶⁷であるSHP2の発現および活性は、この時間間隔内では変化しなかった。同様に、STATシグナリングのスイッチを切る負のフィードバックループを形成する⁶¹SOC S1およびSOC S3のレベルは、PU-H71により影響されなかった。

【0073】

かくして、間隔0～90分でSTAT5に対する効果がないことは、HSP90阻害の際のSTAT5に対するキナーゼまたはホスファターゼ活性の変化に帰する可能性がある。代替的機構として、およびSTAT5ではなくp-STAT5の大部分がCML細胞中で結合したHSP90であるため、本発明者らは、活性化されたSTAT5の細胞レベルがHSP90への直接結合により微調整されると仮定した。

【0074】

STATの活性化／不活化サイクルは、異なる二量体コンフォメーション間のそれらの遷移を必要とする。STATのリン酸化は、リン酸化の際に平行二量体コンフォメーションを誘発する逆平行二量体コンフォメーション中で起こる。他方、STATの脱リン酸化には、広範囲の空間的再配列が必要であり、チロシンリン酸化されたSTAT二量体は平行から逆平行配置にシフトして、ホスファターゼのより良好な標的としてホスホチロシンを露出させなければならない⁶⁸。本発明者らは、STAT5が、HSP90に結合した場合にトリプシン切断に対してより感受性であることを見出し、これはHSP90の結合がSTAT5のコンフォメーション状態を直接調節し、脱リン酸化に好都合ではなく、および／またはリン酸化に好都合であるコンフォメーションにSTAT5を潜在的に維持することを示している。

【0075】

この可能性を調査するために、本発明者らは、非特異的PTPase阻害剤であるオル

10

20

30

40

50

トバナデート (Na_3VO_4) を細胞に添加して、STAT5 の脱リン酸化を遮断するパルスチェイス戦略を用いた。次いで、残留レベルの p-STAT5 を、いくつかの後の時点で決定した。PU-H71 の非存在下では、p-STAT5 は迅速に蓄積したが、その存在下では、細胞 p-STAT5 レベルは低下した。このプロセスの動態は、p-STAT5 定常状態低下の速度と同様であった。

【0076】

5. 1. 9. HSP90 は STAT5 を含有する転写複合体のすぐ内部で、STAT5 を活性コンフォメーションに維持する

STAT5 リン酸化および二量体化に加えて、STAT5 の生物学的活性には、その核移行およびその様々な標的遺伝子への直接結合が必要である⁶⁴、⁶⁸。本発明者らはしたがって、HSP90 が STAT5 遺伝子の転写活性化も容易にし、かくして、プロモーターと会合した STAT5 転写複合体に関与するかどうかを知りたいと考えた。ELISA に基づくアッセイを用いて、本発明者らは、STAT5 が K562 細胞中で構成的に活性であり、STAT5 結合コンセンサス配列 (5'-TTCCTGGAA-3') に結合することを見出した。STAT5 活性化および DNA 結合は、PU-H71 を用いる HSP90 阻害の際に、用量依存的様式で、部分的に無効化される。さらに、K562 細胞中での定量的 CHIP アッセイは、重要な STAT5 標的 MYC および CCND2 での HSP90 と STAT5 の両方の存在を示した。いずれのタンパク質も、遺伝子間制御領域には存在しなかった (示さず)。したがって、PU-H71 (1 μM) は、対照遺伝子 HPR1 および GAPDH の mRNA 存在量ではなく、STAT5 標的遺伝子 CCND2、MYC、CCND1、BCL-XL および MCL1⁶² の mRNA 存在量を減少させた。

【0077】

まとめると、これらのデータは、STAT5 活性が CML 細胞中で HSP90 により正に調節されることを示す。本発明者らの知見は、STAT5 に結合する HSP90 がタンパク質のコンフォメーションを調節し、この機構によって、それが STAT5 リン酸化/脱リン酸化動態を変化させ、p-STAT5 のレベルの上昇に向かうように平衡をシフトさせるシナリオと一致する。さらに、HSP90 は、STAT5 含有転写複合体のすぐ内部で、STAT5 を活性コンフォメーションに維持する。しかしながら、STAT5 経路の複雑性を考慮すると、他の機構の可能性も排除できない。したがって、タンパク質安定性の促進におけるその役割に加えて、HSP90 はクライアントタンパク質を活性コンフォメーションに維持することにより発がんを促進する。

【0078】

より広くは、データは、腫瘍細胞中での発がん性タンパク質機能の支援に最も深く関与するのは、細胞 HSP90 の PU-H71-HSP90 画分であること、および標識された PU-H71 を用いて、特定の腫瘍細胞中で悪性表現型を維持するのに必要とされるタンパク質経路の広い横断面に結合したこの腫瘍 HSP90 種を同定することができることを示している。

【0079】

5. 1. 10. HSP90 は腫瘍細胞中で 2 つの異なる形態で存在する

上記で提供された方法は、i) 発がん性クライアントタンパク質と会合する HSP90 の画分に優先的に結合し、ii) 発がん性クライアント結合配置に HSP90 をロックする、PU-H71 のいくつかの特性を利用する。

【0080】

腫瘍細胞の生存に必要とされる HSP90 クライアントの同定はまた、HSP90 療法から利益を得る可能性がある患者 (すなわち、発現またはリン酸化が HSP90 阻害の際に変化するクライアント) の選択のため、および臨床試験中の HSP90 阻害剤効果の薬力学的モニタリングのための腫瘍特異的バイオマーカーとしても役立ってもよい。腫瘍特異的 HSP90 クライアントプロファイリングは、腫瘍の個別治療標的化のための 1 つの手法を提供する。

【0081】

この研究は、K a m a lらの研究を実証し、有意に拡張するものであり、腫瘍中のH S P 9 0はその全体が多シャペロン複合体中に存在すると説明されるが、正常組織に由来するH S P 9 0は潜在的な非複合体化状態で存在する元のモデルのより洗練された理解を提供する³⁴。本発明者らは、H S P 9 0ががん細胞中で生化学的に異なる複合体を形成することを示す(図5 a)。この観点から考えると、がん細胞のH S P 9 0の主要画分は正常細胞と類似する「ハウスキーピング」シャペロン機能を保持するが、がん細胞中で富化されたか、または拡張された機能的に異なるH S P 9 0プールは、腫瘍細胞生存を維持するのに必要とされる発がん性タンパク質と特異的に相互作用する。おそらく、このH S P 9 0画分は、腫瘍細胞状況において拡張され、構成的に維持される細胞ストレス特異的形態のシャペロン複合体である。本発明者らのデータは、それが悪性表現型を維持するのに必要な機能を実行してもよいことを示唆する。1つのそのような役割は、突然変異型(すなわち、m B - R a f)またはキメラ型タンパク質(すなわち、B c r - A b l)の折り畳みを調節することである^{32, 33}。本発明者らはここで、さらなる役割に関する実験的証拠を提示する;すなわち、異常に活性化されたシグナリング複合体に関与する分子の足場および複合体形成を容易にする。ここで、本発明者らは、C M Lにおける構成的S T A T 5シグナリングの維持におけるH S P 9 0のそのような役割を記載する。これらのデータは、本発明者らが、B細胞リンパ腫細胞中のB C L 6発がん転写抑制因子により機能的転写抑制複合体を維持するためにはH S P 9 0が必要であることを示した以前の研究⁷⁰と一致している。

10

【0082】

20

H S P 9 0のP U結合画分と非P U結合画分とを区別するものは何であろうか?これは、依然として活発に調査されている非常に複雑な問題である。H S P 9 0 αとH S P 9 0 βアイソフォームは両方ともP U-H 7 1により認識されるが、本発明者らのデータは、B c r - A b l / H S P 9 0 (P U優先的)とA b l / H S P 9 0 (P U非優先的)シャペロン複合体との少なくとも1つの差異に関する証拠を提供する。すなわち、B c r - A b l / H S P 9 0シャペロン複合体は、いくつかのコシャペロンを含む(活発なシャペロニングプロセスが進行中であることを示唆し、H s p 7 0のサイレンシングに対するB c r - A b lの感受性によりさらに支持される)が、A b l / H S P 9 0複合体は会合したコシャペロンを欠く(隔離されているが、活発にシャペロニングされていないA b lである可能性があり、H s p 7 0ノックダウンに対するA b lの非感受性により支持される)(図2 eを参照)。さらに、本発明者らは、クライアントタンパク質により強く結合するように突然変異させたH S P 9 0がまた、野生型H S P 9 0よりもP U-ビーズにより強く結合することを観察した(原稿準備中)。最後に、本発明者らは、P U-H 7 1およびゲルダナマイシン結合に対するH S P 9 0リン酸化の示差的影響を観察した。これらの知見は、さらに追跡されているが、様々なH S P 9 0阻害剤がシャペロンに対する特異的翻訳後修飾によって独自に影響されてもよいことを示唆する。総合すれば、これらの予備的観察は、P U-H 7 1が活発なシャペロンサイクルに関与しているH S P 9 0画分を認識し、この特徴が他のH S P 9 0阻害剤によって必ずしも共有されているとは限らないことを示している。

30

【0083】

40

5. 2. 診断および予後適用のための標識されたH S P 9 0阻害剤

「発がん性H S P 9 0」の存在量を腫瘍それぞれの様式で測定するために、本開示は、診断および予後目的で用いることができるいくつかの化学的手段(5. 2. 1. および5. 2. 2. 節を参照されたい)を提供する。さらに、化学的手段は、腫瘍関連H S P 9 0の異種性における新しい洞察を提供し、腫瘍促進的生物学的経路およびタンパク質を調節する腫瘍特異的H S P 9 0を同定する特定のH S P 9 0阻害剤の生化学的特徴を利用する。そのような手段は、この腫瘍「発がん性H S P 9 0」種を特異的に同定し、これと相互作用する標識されたH S P 9 0阻害剤を含み、腫瘍中の異なるサブ集団中の「発がん性H S P 9 0」種の存在量を測定し、かくして、H S P 9 0阻害療法に対する感受性を測定および予測することが容易になる。さらに、「発がん性H S P 9 0」の存在量の測定は、腫

50

瘍がHSP90に依存するかどうかを決定するための手段を提供する。

【0084】

一側面において、本開示は、腫瘍がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 腫瘍または腫瘍に由来する細胞を含有する試料を、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する検出可能に標識されたHSP90阻害剤と接触させるステップ；

(b) 腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を測定するステップ；および

(c) ステップ(b)で測定された腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を、正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の参照量と比較するステップ

を含み、ステップ(b)で測定された腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量が参照量と比較してより多い場合、腫瘍がHSP90阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0085】

その方法は、HSP90療法のバイオマーカーとして、「発がん性HSP90」であるHSP90種の存在量を腫瘍中で測定することを含む。このHSP90種の存在量は、腫瘍中の総HSP90発現と必ずしも相関するとは限らない。本開示は、「発がん性HSP90」の存在量を測定するためのいくつかの解決法を提供する。1つのそのような態様においては、特定のHSP90阻害剤の標識された誘導体を、その存在およびその存在量を測定するための手段として用いることができる。

【0086】

さらに、この特定の方法において、ステップ(b)で測定された腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量と参照量との比が大きくなるほど、HSP90阻害剤療法に応答する可能性の規模が大きくなる。

【0087】

さらに、この特定の方法において、ステップ(a)で測定された腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量が大きくなるほど、HSP90阻害剤療法に応答する可能性の規模が大きくなる。

【0088】

この特定の方法の一態様においては、正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の参照量は、腫瘍に由来する細胞を含有する試料中の正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量である。

【0089】

別の態様において、正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の参照量は、参照試料中の正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の所定量である。

【0090】

別の側面において、本開示は、腫瘍がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 腫瘍または腫瘍に由来する細胞を含有する試料を、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する検出可能に標識されたHSP90阻害剤と接触と接触させるステップ；

(b) 腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を測定するステップ；および

(c) ステップ(b)で測定された腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を、参照と比較するステップ

を含み、ステップ(b)で測定された腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量が、参照量と比較してより多い場合、腫瘍がHSP90阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0091】

この特定の方法の一態様においては、参照試料は「発がん性HSP90」発現がないか、ほとんどないがん細胞である。別の態様においては、参照は「発がん性HSP90」にほとんど結合しないか全く結合しない相応に標識された化合物である。

【0092】

検出可能に標識されたHSP90阻害剤を任意の検出可能な標識で標識してもよく、多くのそのような標識が当業界で周知である。例えば、検出可能に標識されたHSP90阻害剤を、蛍光標識、ビオチン標識、ANCA標識または放射性標識してもよい。

【0093】

この特定の方法の実施において、腫瘍は、「発がん性HSP90」、例えば、エキソソームを含有する任意の腫瘍または腫瘍由来生物学的形成物であってもよい。例えば、「発がん性HSP90」を含有する腫瘍および他の細胞または腫瘍由来生物学的形成物は、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病および慢性骨髄性白血病を含む白血病、リンパ性白血病、多発性骨髄腫、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、骨髄増殖性障害、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択される任意のがんと関連する、それを示す、またはそれに由来するものであってもよい。

【0094】

この特定の方法の実施において、腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍関連細胞または生物学的形成物は、被験体中に存在するか、または被験体から単離されていてもよい。かくして、接触させようとする腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍関連細胞は、*in vivo*でそれ自体固形腫瘍の形態にあるか、または、例えば、組織試料中もしくは液性腫瘍もしくは生物学的液体；採血、骨髄吸引、生検、微細針吸引生検もしくは外科的手順の間に得られた試料；生物学的液体；血液もしくは骨髄内の結合した細胞の形態にあってもよい。標識されたHSP90阻害剤と接触させようとする細胞は、破壊された細胞、生細胞、凍結された細胞、固定および透過処理した細胞、またはホルマリン固定パラフィン包埋細胞などの任意の形態で存在してもよい。

【0095】

検出可能に標識されたHSP90阻害剤は、療法として投与される標識された形態のHSP90阻害剤であってもよく、または化学的に関連しないHSP90阻害剤を含む標識された形態の異なるHSP90阻害剤もしくは投与される標識された形態のHSP90阻害剤の類似体、相同体もしくは誘導体であってもよい。被験体にとっては、検出可能に標識されたHSP90阻害剤および十中八九は、対応する標識されていないHSP90阻害剤が、多くの腫瘍および腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合することが唯一の要件である。これに関連して、「優先的に」とは、HSP90阻害剤が、あるとすればそれが正常または非腫瘍細胞に特徴的なHSP90に結合する場合の親和性と比較して、実質的により高い親和性で腫瘍特異的形態のHSP90に結合することを意味する。

【0096】

現在、療法として投与される可能性が考えられる1つのHSP90阻害剤は、PU-H71またはPU-H71の類似体、相同体もしくは誘導体である。例示的HSP90阻害剤の説明については、例えば、米国特許第7,820,658B2号；第7,834,181B2号；および第7,906,657B2号（これらは全て、その全体が参照によりここに組込まれる）を参照されたい。

【0097】

一態様においては、HSP90阻害剤はPU-H71であり、検出可能に標識されたHSP90阻害剤は、PU-H71またはPU-H71の類似体、相同体、もしくは誘導体

10

20

30

40

50

の形態である。検出可能に標識されたH S P 9 0阻害剤であってもよいP U－H 7 1の形態の例としては、限定されるものではないが、 $[^{124}\text{I}]$ －P U－H 7 1、P U－H 7 1－F I T C 2もしくはP U－H 7 1－N B D 1、またはP U－H 7 1のビオチン化類似体、例えば、P U－H 7 1－ビオチン－5、P U－H 7 1－ビオチン－6、P U－H 7 1－ビオチン－8もしくはP U－H 7 1－ビオチン－9が挙げられ、以下に説明される。

【0098】

したがって、P U－H 7 1の標識された誘導体、例えば、放射標識された $[^{124}\text{I}]$ －P U－H 7 1、 $[^{131}\text{I}]$ －P U－H 7 1、 $[^{123}\text{I}]$ －P U－H 7 1、蛍光標識されたP U－H 7 1、ビオチン標識されたP U－H 7 1、またはA N C A標識された阻害剤を、腫瘍特異的H S P 9 0腫を同定および定量するための手段として用いることができる。この腫瘍H S P 9 0腫の存在量を、H S P 9 0療法に対する応答を予測するバイオマーカーとして用いることができる。

10

【0099】

5. 2. 1. 発がん性H S P 9 0を検出するための蛍光、ビオチン化およびA N C A標識されたプローブ

本開示は、がん細胞中の発がん性H S P 9 0を検出することができる蛍光標識された、ビオチン化プローブおよびA N C A標識されたプローブを提供する。5. 2. 1. 1. 節は、本開示に従って用いられる様々な種類のプローブの生成を説明する。5. 2. 1. 2. 節は、予後および診断アッセイにおけるそのようなプローブの使用を説明する。

20

【0100】

5. 2. 1. 1. プローブの生成

本開示は、細胞透過性であり、「発がん性H S P 9 0」に選択的に結合する、蛍光標識された、ビオチン化されたおよびA N C A標識された阻害剤を提供する。細胞透過性阻害剤は、細胞の細胞膜に浸透し、細胞の細胞質内のH S P 9 0に結合することができる。本発明の方法において有用であるためには、標識された阻害剤は当業者には公知の検出方法によって測定可能である量で細胞に浸透しなければならない。5. 2. 1. 1. 1. 節は、細胞透過性であり、「発がん性H S P 9 0」に選択的に結合することができる様々な蛍光標識されたプローブの開発を説明する。5. 2. 1. 1. 2. 節は、細胞透過性であり、「発がん性H S P 9 0」に選択的に結合することができる様々なビオチン化されたプローブの開発を説明する。5. 2. 1. 1. 3. 節は、細胞透過性であり、「発がん性H S P 9 0」に選択的に結合することができる様々なA N C A標識されたプローブの開発を説明する。

30

【0101】

5. 2. 1. 1. 1. 蛍光標識されたプローブ

H S P 9 0の蛍光標識された阻害剤は既に報告されており、ゲルダナマイシン (G M－F I T C¹³、G M－B o d i p s y¹³、G M－c y 3 b¹⁴) ならびにピラゾール1 (フルオレセイン類似体、V E R－0 0 0 4 5 8 6 4)¹⁵の類似体が、蛍光偏光アッセイにおけるリガンドとして用いられている (図8)。細胞を透過しないG M－F I T C誘導体を用いて、蛍光顕微鏡観察により細胞表面H S P 9 0を同定した¹⁶。しかしながら、H S P 9 0は主に細胞質タンパク質であり、細胞表面発現は特定の細胞中でのみ検出される^{1、2}。かくして、細胞内と細胞表面の両方のH S P 9 0を分析するためには、蛍光プローブが必要である。

40

【0102】

フローサイトメトリーによる細胞内抗原の検出に用いられる固定／透過処理方法は、異種集団中の細胞の特性評価のためのフローサイトメトリーにおいて有用な特性である「発がん性H S P 9 0複合体」ならびに細胞形態および表面免疫反応性の破壊をもたらしてもよい。ため、「発がん性H S P 9 0」と特異的に、また強く相互作用するH S P 9 0細胞透過性プローブは、この潜在的なバイオマーカーのフローサイトメトリー測定にとって好ましい。この問題を解決するために、本開示は、生細胞を透過し、標的に結合する蛍光標識されたH S P 9 0阻害剤の合成、特性評価および評価のための方法を提供する。

50

【0103】

本開示は、様々な新しい蛍光標識されたPU-H71の誘導体(2)、HSP90のプリン足場阻害剤(図8)を提供し、蛍光活性化フローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡観察によりHSP90を試験するためのプローブとしてのその生物学的適用を記載する。BIB021、MPC-3100、PU-H71およびDebio0932(以前はCUDC-305)などのプリン足場に基づくいくつかのHSP90阻害剤は現在、がんのための臨床開発中である¹⁸、¹⁹。

【0104】

PU-H71にコンジュゲートしたフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、4-ニトロベンゾ[1, 2, 5]オキサジアゾール(NBD)または赤色にシフトした染料スルホローダミン101(テキサスレッド)のいずれかを含む熱ショックタンパク質90(HSP90)のための蛍光リガンドを合成した(図9)。これらの化合物のうちの2つ、PU-H71-FITC2(9)およびPU-H71-NBD1(8)は、蛍光活性化フローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡観察にとって好適であることが示された。かくして、これらの分子は、異種生細胞集団中でHSP90を試験するための有用なプローブとして役立つ。

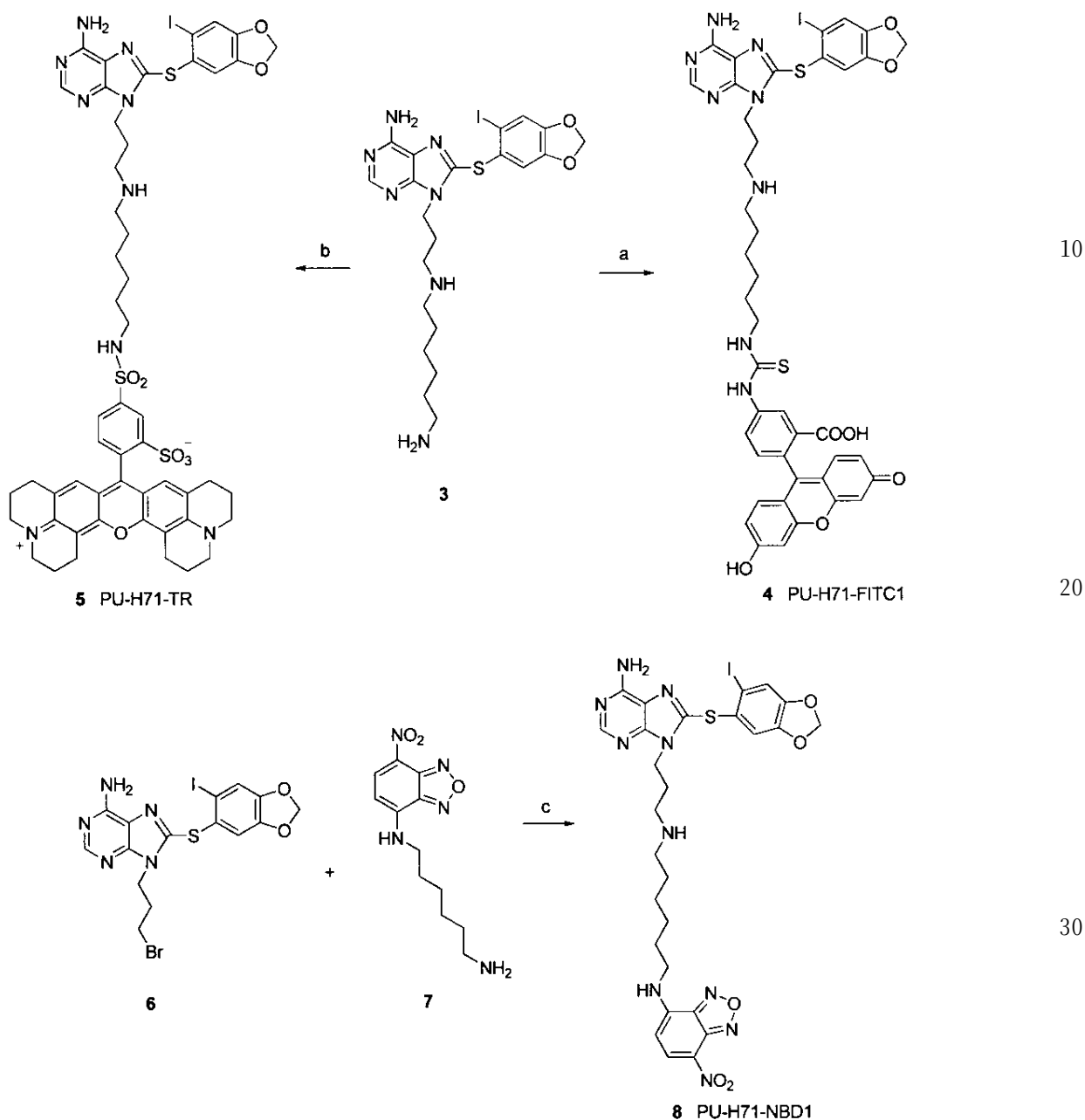
【0105】

染料標識された小分子リガンドの開発のために、最適なフルオロフォアとその結合部位の選択は関連する。特に、小分子においては、導入される染料はリガンドの生化学的および薬理学的特徴に大きく影響し得る。HSP90に結合したPU-H71(2)のX線結晶構造によれば²⁰、リガンドのN9-アルキルアミノ鎖は溶媒の方を向いている。この結果として、ならびに以前のSARの結果として、本開示において合成されるいくつかの化合物は、N9位置に結合した蛍光標識を含有する。特定の態様においては、以下に記載のように、異なるリンカーを含むPU-H71の誘導体を、FITC、NBDまたはテキサスレッド(TR)のいずれかで標識した(図1を参照されたい)。

【0106】

本開示の一態様においては、6個の炭素のスペーサーを、プリン足場に基づく阻害剤の構成アミンに付加し、それによって、化合物3を提供した(スキーム1および図10)。本発明者らは固相支持体にPU-H71を結合させるためにこのリンカーを以前に使用し、化合物3がHSP90に対する良好な親和性を保持することを示した²¹。スキーム1に記載されるように、化合物3を、DMF/Et₃N中でFITCと反応させて、HPLCによる精製後に40%の収率で化合物4(PU-H71-FITC1)を得た。

【化 2】



スキーム 1: PU-H71-FITC および PU-H71-NBD1 の合成

【0107】

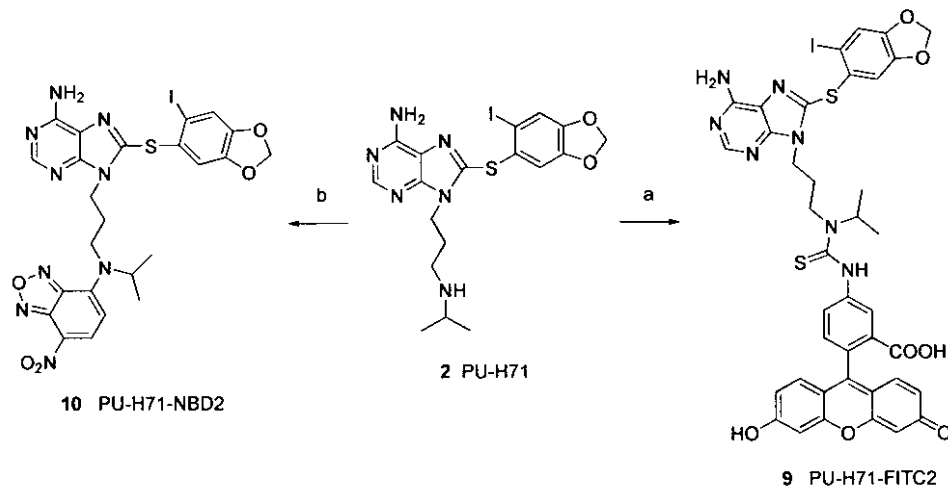
別の態様においては、DMF中で化合物3とスルホローダミン101スルホニルクロリドとの反応により、HPLCによる精製後に61%の収率で化合物5を得ることにより、PU-H71-テキサスレッド（化合物5；PU-H71-TR）を合成した（スキーム1）。NBD類似体の場合、ブロミド6をDMF中で化合物7と反応させて、47%の収率で化合物8（PU-H71-NBD1）を得た（スキーム1）。化合物6²¹およびNBD誘導体7²²を、以前に記載のように調製した。

【0108】

別の態様において、本発明者らは、PU-H71中に存在する第二級アミン²³を利用し、それをFITCまたはNBD-Clと直接反応させて、それぞれ、化合物9（PU-H71-FITC2）（72%）または化合物10（PU-H71-NBD2）（40%）を得た（スキーム2および図11）。アミンへの直接的な染料の結合は、イオン化可能な

アミン官能基の存在のため、細胞透過性のより高い類似体をもたらすと仮定された。さらに、水素の代わりにイソプロピル基を含有する誘導体（例えば、化合物 9 および化合物 10）は、化合物をより親油性にし、その細胞透過性を増強する。

【化 3】



10

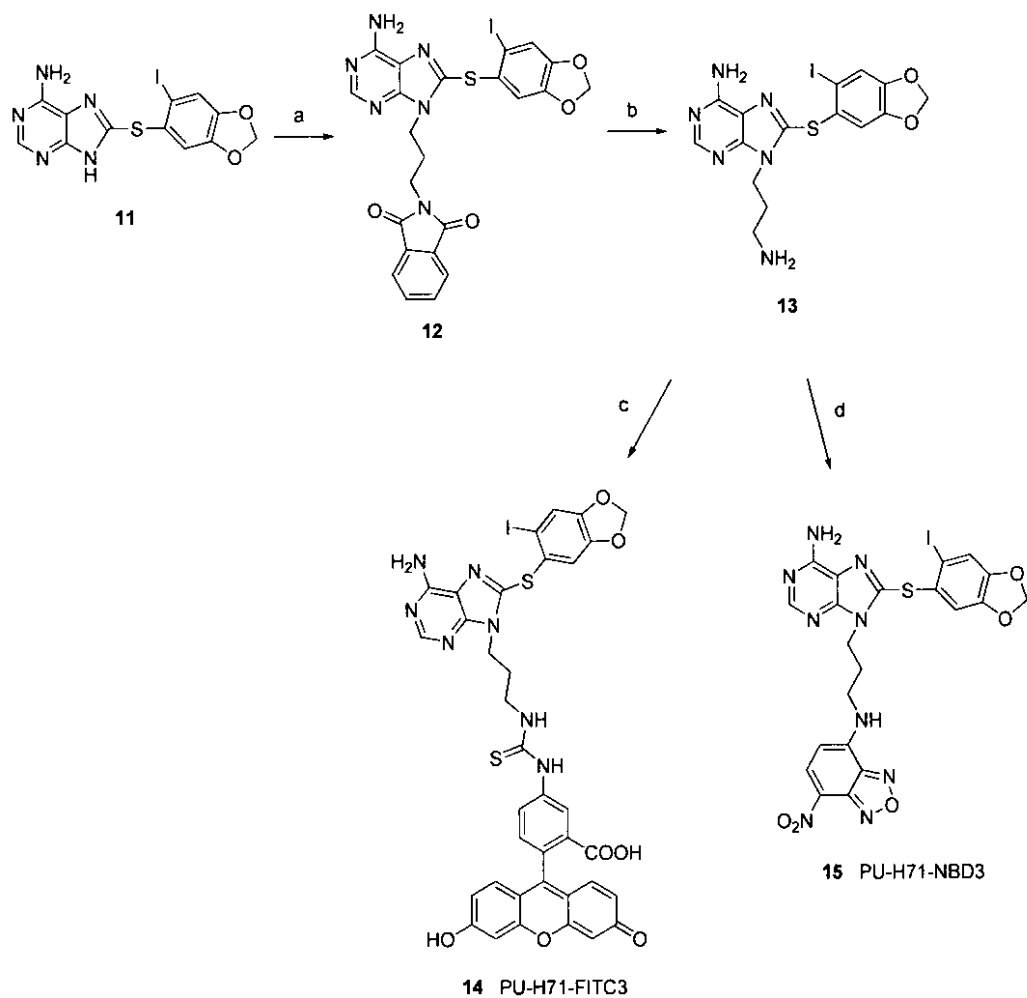
スキーム 2: PU-H71-FITC2 および PU-H71-NBD2 の合成

20

【0109】

さらに別の態様においては、スキーム 3 および図 12 に示されるように、デスイソプロピル-PU-H71（化合物 13）を FITC または NBD-Cl と反応させて、それぞれ、化合物 14（PU-H71-FITC3）（74%）または化合物 15（PU-H71-NBD3）（42%）を得た。N-（3-ブロモプロピル）-フタルイミドを用いる化合物 11 の N9-アルキル化およびその後のヒドラジンを用いるフタルイミドの除去により、化合物 13 を合成した（スキーム 3）。

【化 4】



スキーム 3: PU-H71-FITC3 および PU-H71-NBD3 の合成

【0110】

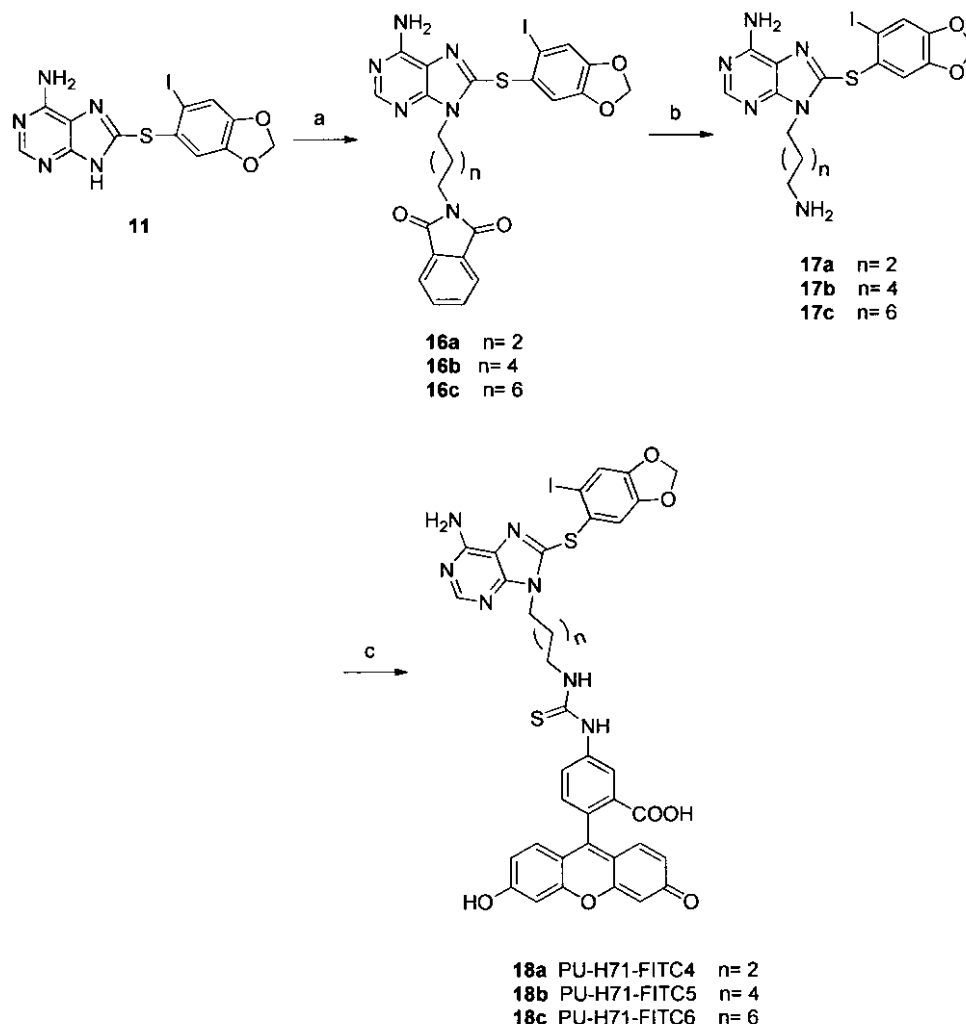
PU-H71-FITC3 (スキーム 3 に示される) と類似するが、異なる長さのリンカーを有するさらなる化合物を、スキーム 4 に示されるように調製した。

10

20

30

【化 5】



スキーム 4: PU-H71-FITC4、PU-H71-FITC5、および PU-H71-FITC6 の合成

【0111】

スキーム 1～4 で調製された化合物を、細胞を透過し、細胞内の HSP90 に結合するその能力について評価した。フローサイトメトリーによる細胞内抗原の検出のために用いられる固定／透過処理方法は、異種集団中の細胞の特性評価のためのフローサイトメトリーにおいて有用な特性である細胞形態および表面免疫反応性の破壊をもたらすことが多いため、細胞透過性プローブが好ましい。かくして、固定および透過処理ステップを必要とすることなく、生細胞中の標的と相互作用する細胞透過性リガンドを見出すことが特に興味深い。

【0112】

上記の合成された蛍光標識された PU-H71 誘導体が親化合物である PU-H71 の細胞透過性プロフィールを保持することを調査するために、本発明者らは、ヒト急性骨髄性白血病 (AML) 細胞系 MV4-11 および MOLM-13 中でこれらの HSP90 プローブの細胞透過性を検査した。スキーム 1～4 で調製された PU-H71 の 10 種の蛍光誘導体のうち、本発明者らは、PU-H71-FITC2 (9) および PU-H71-NBD1 (8) が細胞を透過し、HSP90 に結合する最も高い能力を有することを見出した (図 13)。具体的には、本発明者らは、これらの 2 つの誘導体による生細胞の効率的な染色 (図 13A) ならびに標的 (HSP90) 阻害を示すこれらの細胞中での生物学的活性 (図 13B、13C) を示す。特に、本発明者らは、PU-H71-FITC2 (

9)とPU-H71-NBD1(8)は両方とも、MOLM-13細胞の生存能力(図13B)、HSP90クライアントタンパク質、例えば、突然変異FLT3およびRaf-1の分解と関連する効果(図13C)を低下させることを示し、これは、これらのがん細胞中で細胞内HSP90阻害を示す^{1~3}。

【0113】

さらに、PU-H71-FITC2(9)で染色された白血病細胞の共焦点蛍光顕微鏡観察により、顕著な細胞内局在化が示された(図14A)。これらの実験においては、生細胞と非生細胞とを区別するための生細胞染料として、DAPIを用いた。この染料は試験濃度では生細胞中で非透過性であるが、非生細胞を透過し、DNAの特定の領域に結合する。DAPIはUVレーザーを含む多くの装置中で励起される。PU-H71-NBD1(8)に関しても同様のデータが生成された(示さず)。

10

【0114】

フローサイトメトリーは、特定のマーカーの使用により、正常および悪性造血中の異なる細胞集団を分離および区別するために一般的に用いられる。一例として、芽細胞はdimCD45染色(CD45dim)により定量および特性評価されることが多いが、それとは対照的に、循環中の非芽細胞集団はCD45染色について明るい(CD45hi)²⁴。本発明者らはここで、その同定マーカーの存在によりゲートをかけ分離したこれらの細胞を、PU-H71-FITC2を用いて標的であるHSP90について染色することもできることを示す(図14B)。PU-H71の腫瘍細胞HSP90への選択的結合を示す以前の報告²³と一致して、PU-H71-FITC2は、一次急性骨髄性白血病試料中の正常細胞(リンパ球)集団ではなく、悪性細胞(芽球)を優先的に染色した(図14B)。

20

【0115】

したがって、本発明者らは、PU-H71-FITC2(9)およびPU-H71-NBD1(8)が生細胞を透過し、標的に結合することを示す。具体的には、本発明者らは、PU-H71-FITC2およびPU-H71-NBD1が生細胞を染色し(図13A)、白血病細胞の生存能力を低下させ(図13B)、HSP90クライアントタンパク質の分解により示されるように細胞内HSP90を阻害し(図13C)、共焦点顕微鏡により示されるように細胞内に局在化し(図14A)、フローサイトメトリーにより示されるように腫瘍対正常細胞のHSP90に特異的に結合して(図14B)、これらのプローブが、PU-H71と同様、細胞を透過し、腫瘍HSP90標的に特異的に結合する豊富な証拠を提供する。図4、図15、図16および図18に提供される例はまた、PU-H71のこれらの蛍光誘導体が「発がん性HSP90」種と相互作用することを示し、さらに、広範囲のがん細胞においてこの種を定量するための手段を提供する。5.2.1.2.節で考察されるように、PU-H71のこれらの蛍光誘導体を、蛍光活性化フローサイトメトリーのためのプローブとして、または蛍光顕微鏡観察によるHSP90と標的との相互作用をリアルタイムでモニタリングするための手段として適用することができる。

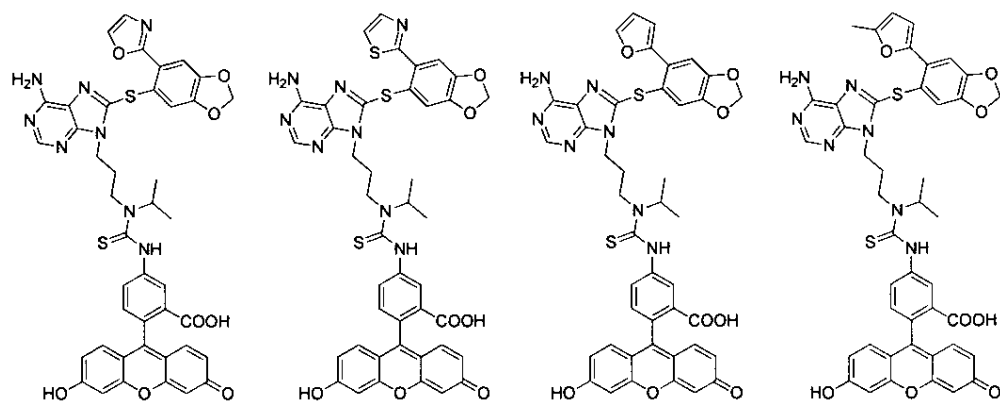
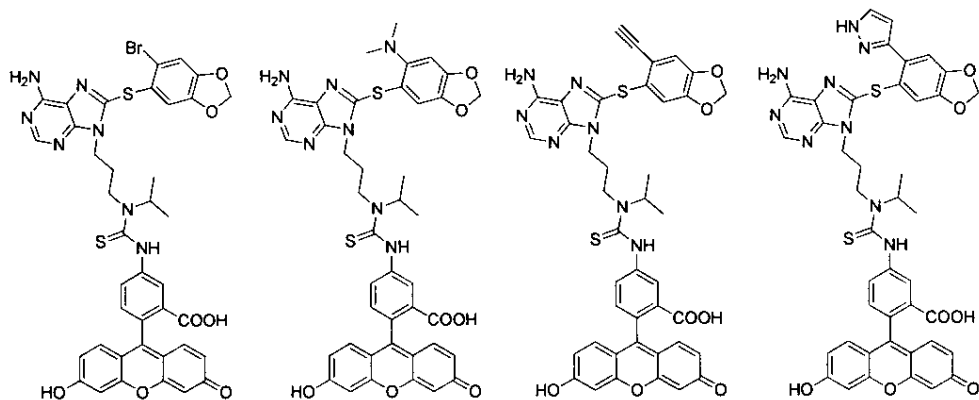
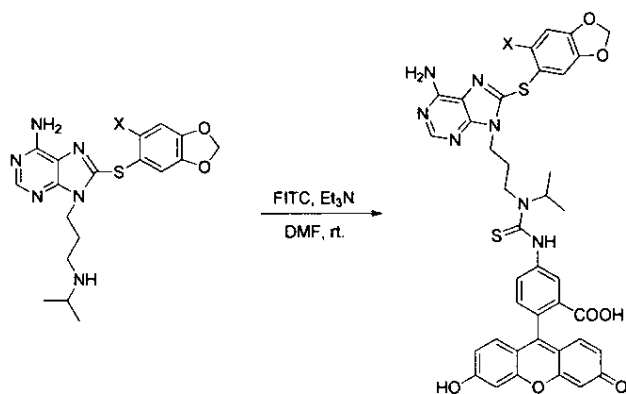
30

【0116】

上記で考察された結果に基づいて、本発明者らは、HSP90と相互作用することができ、かくして、診断的および/または予後的手段として用いることができる様々な他の細胞透過性プローブを設計した。一態様において、PU-H71-FITC2と類似するが、ベンゾ[d][1,3]ジオキソール環上に異なる置換基を有する化合物を、スキーム5に示されるように、PU-H71-FITC2と同様の様式で合成した。

40

10

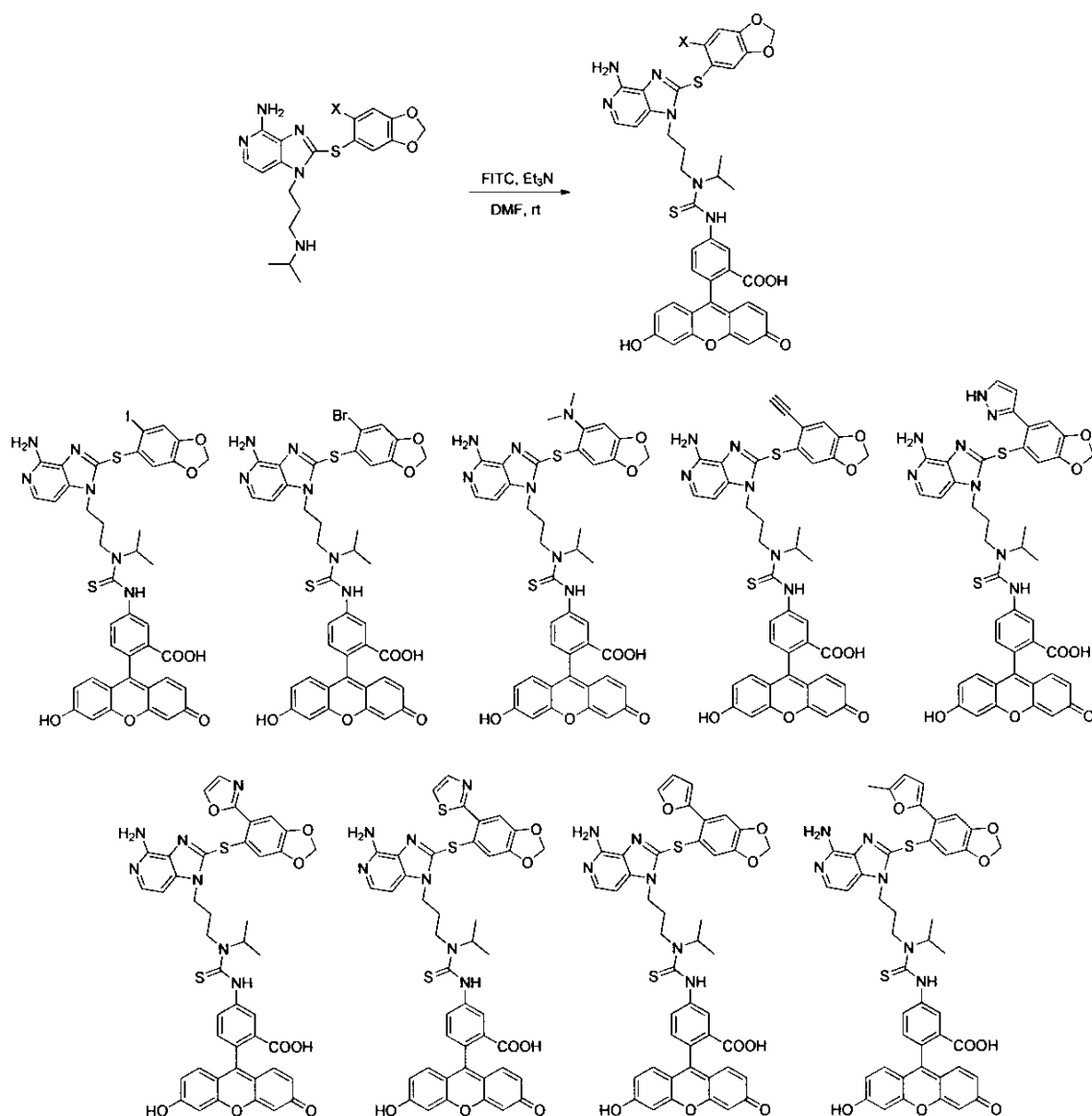


20

30

40

【化 7】

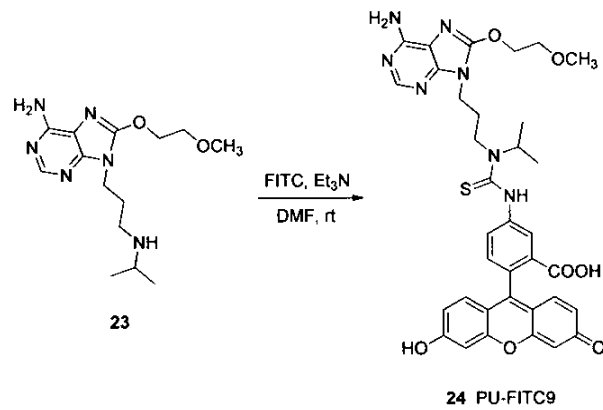


スキーム 6: PU-H71-FITC2 と類似する化合物の合成

【0118】

別の態様においては、化合物 PU-FITC7 を、スキーム 7 に示されるように調製する。

【化 1 0】



10

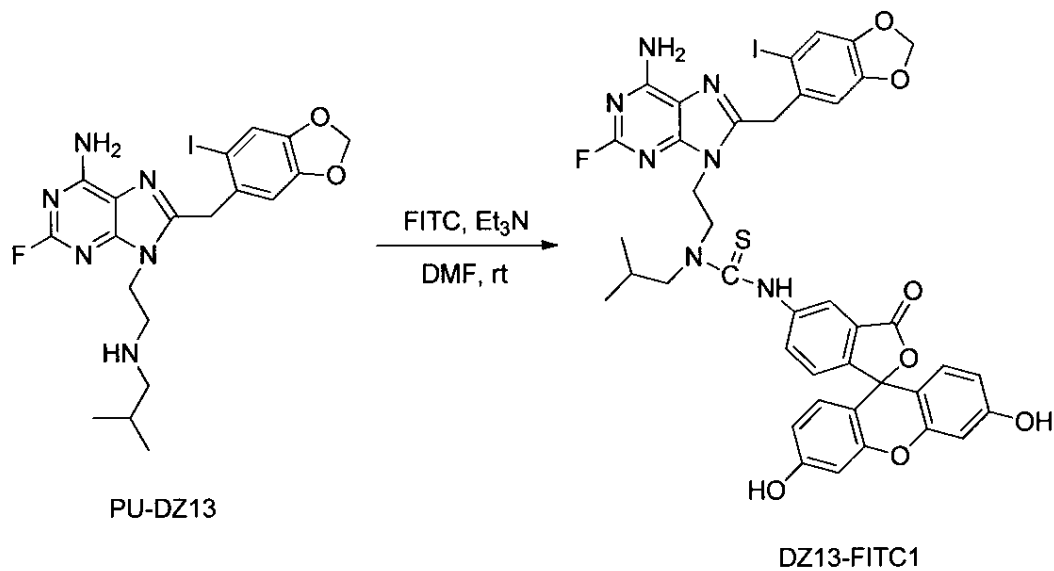
スキーム 9: PU-FITC9 の合成

【 0 1 2 1】

さらに別の態様においては、化合物 DZ13-FITC1 (PU-DZ13-FITC) を、スキーム 10 に示されるように調製する。

20

【化 1 1】



30

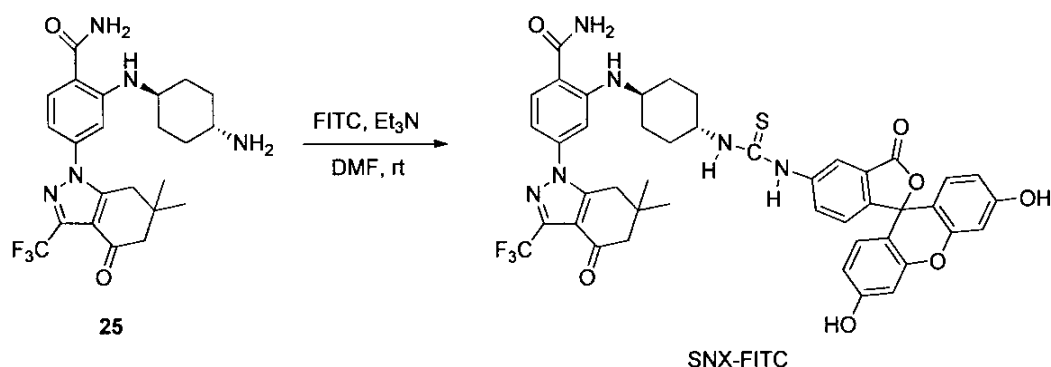
スキーム 10: 化合物 DZ13-FITC1 の合成

40

【 0 1 2 2】

さらに別の態様においては、化合物 SNX-FITC を、スキーム 11 に示されるように調製する。

【化 1 2】



10

スキーム 11: 化合物 SNX-FITC の合成

【0 1 2 3】

5. 2. 1. 1. 2. 発がん性HSP90を検出するためのビオチン化プローブの合成
PU-H71 (2) およびデスイソプロピル-PU-H71 (13) の一連のビオチン
化類似体を、細胞膜を透過し、生細胞中の細胞内HSP90に結合することができる化合物
を取得するために調製した。HSP90阻害剤13および2を、リンカーを介してビオ
チンにコンジュゲートさせた。リンカーの種類、ならびにその長さを体系的に変化させて
、生細胞中に透過し、HSP90に結合することができる化合物を同定した。

20

【0 1 2 4】

ビオチンタグは、その後のストレプトアビジンへの結合を介するプルダウン実験を可能
にする。リンカーは、HSP90およびストレプトアビジンへの同時的結合を可能にする
のに十分な長さのものであるべきである。

【0 1 2 5】

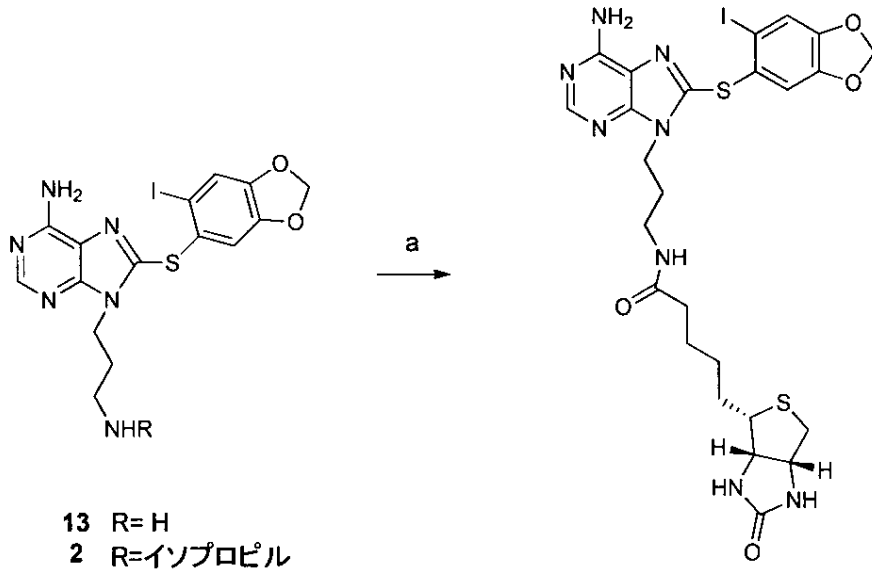
ビオチンタグはまた、標識されたストレプトアビジンまたはアビジン抗体を用いる検出
を可能にし、かくして、ビオチン化されたHSP90阻害剤は、「発がん性HSP90」
を検出するために組織を染色する際に有用であり得る。

30

【0 1 2 6】

化合物13および化合物2は、アミド結合の形成を介するビオチンおよびビオチン含有
リンカーの直接的結合を可能にするアミン官能基を含有する。一態様においては、ビオチ
ン化された分子を、リンカーを用いずに調製した（すなわち、ビオチンへの直接的結合）
。PU-H71-ビオチン2およびPU-H71-ビオチン3と呼ばれる、2つのそのよ
うな化合物の合成を、スキーム12に示す。この化合物を、超音波処理下でのD-ビオチ
ンとのDCCカップリングにより、それぞれ、化合物13または化合物2から調製しても
よい。

【化 1 3】



10

20

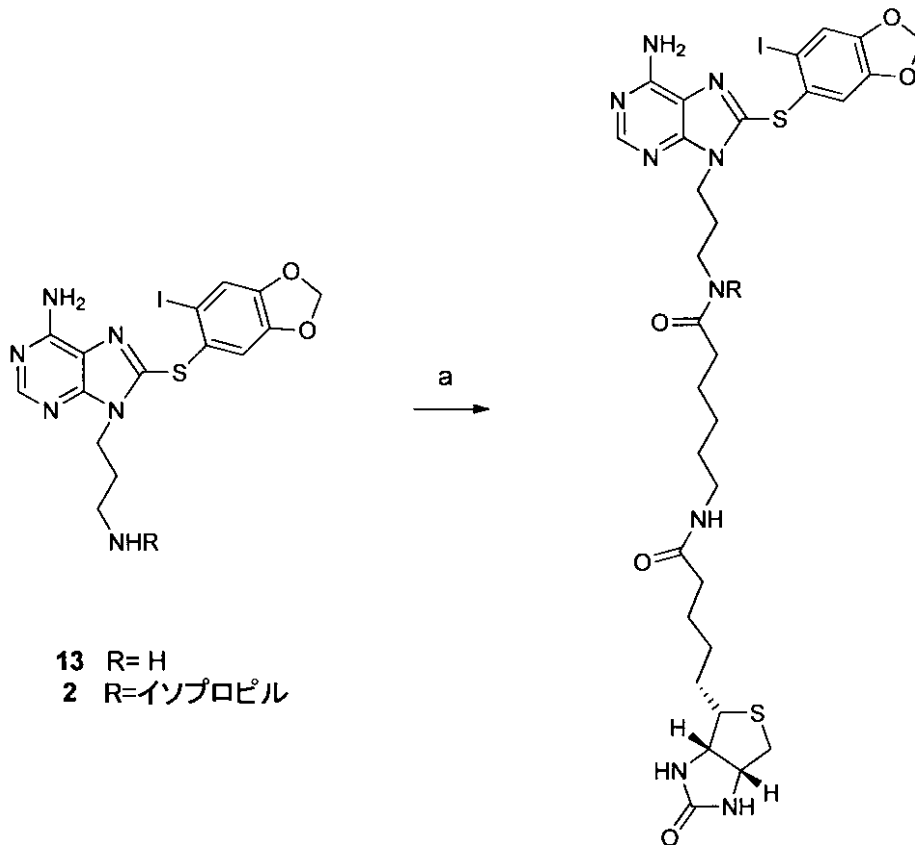
スキーム 12: PU-H71-ビオチン 2 および PU-H71-ビオチン 3 の合成

【0 1 2 7】

別の態様においては、スキーム 1 3 に示されるように、6-炭素鎖スペーサー基を介してビオチンに PU-H71 (2) またはデスイソプロピル-PU-H71 (13) を共有結合させることによりビオチン化された分子を調製して、PU-H71-ビオチン 4 または PU-H71-ビオチン 7 を生成した。化合物 13 または化合物 12 を、それぞれ、塩基の存在下で、EZ-Link (登録商標) NHS-LC-ビオチンと呼ばれる、ビオチン分子を含有する市販の N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルと反応させることにより、PU-H71-ビオチン 4 および PU-H71-ビオチン 7 を調製してもよい。

30

【化 1 4】



PU-H71-ビオチン 4 R=H

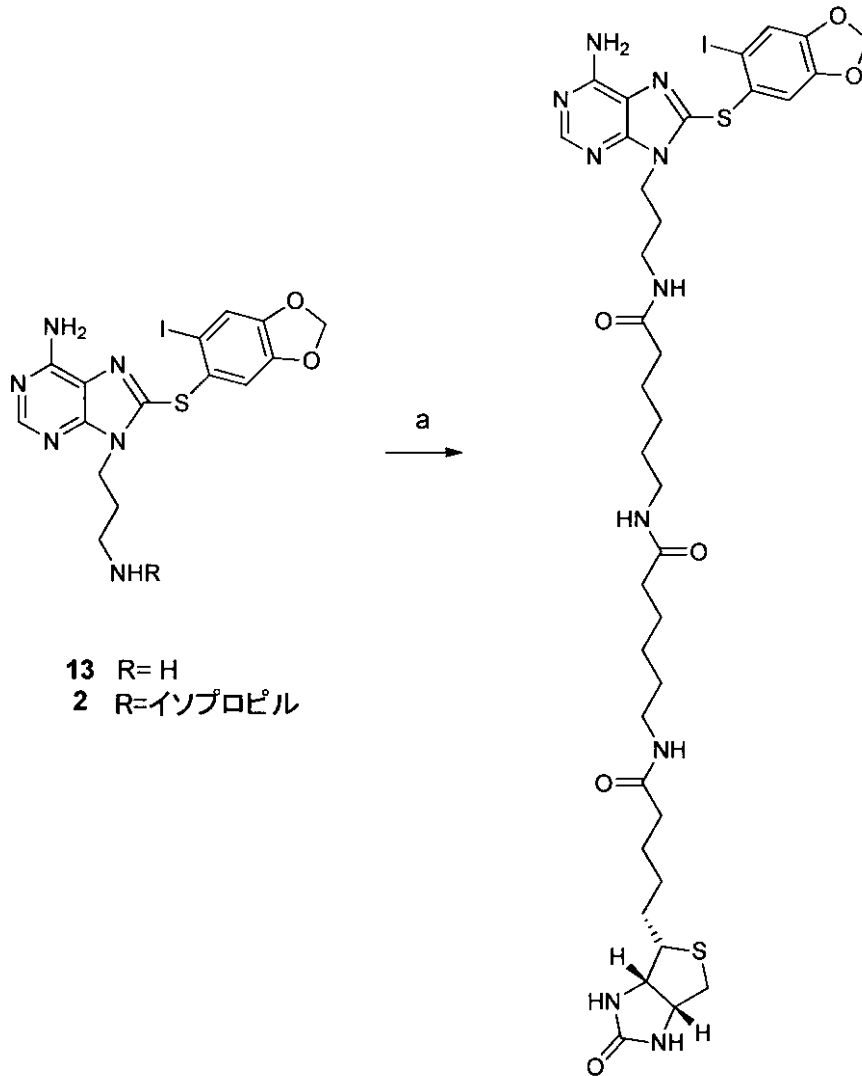
PU-H71-ビオチン 7 R=イソプロピル

スキーム 13: PU-H71-ビオチン 4 および PU-H71-ビオチン 7 の合成

【0128】

さらに別の態様においては、スキーム 14 に示されるように、長い炭素鎖スペーサー基を介してビオチンに PU-H71 (2) またはデスイソプロピル PU-H71 (13) を共有結合させることによりビオチン化された分子を調製して、PU-H71-ビオチン 5 または PU-H71-ビオチン 8 を生成した。化合物 13 または化合物 12 を、それぞれ、塩基の存在下で、EZ-Link (登録商標) NHS-LC-LC-ビオチンと呼ばれる、ビオチン分子を含有する市販の N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルと反応させることにより、PU-H71-ビオチン 5 および PU-H71-ビオチン 8 を調製してもよい。

【化 1 5】



PU-H71-ビオチン 5 R=H

PU-H71-ビオチン 8 R=イソプロピル

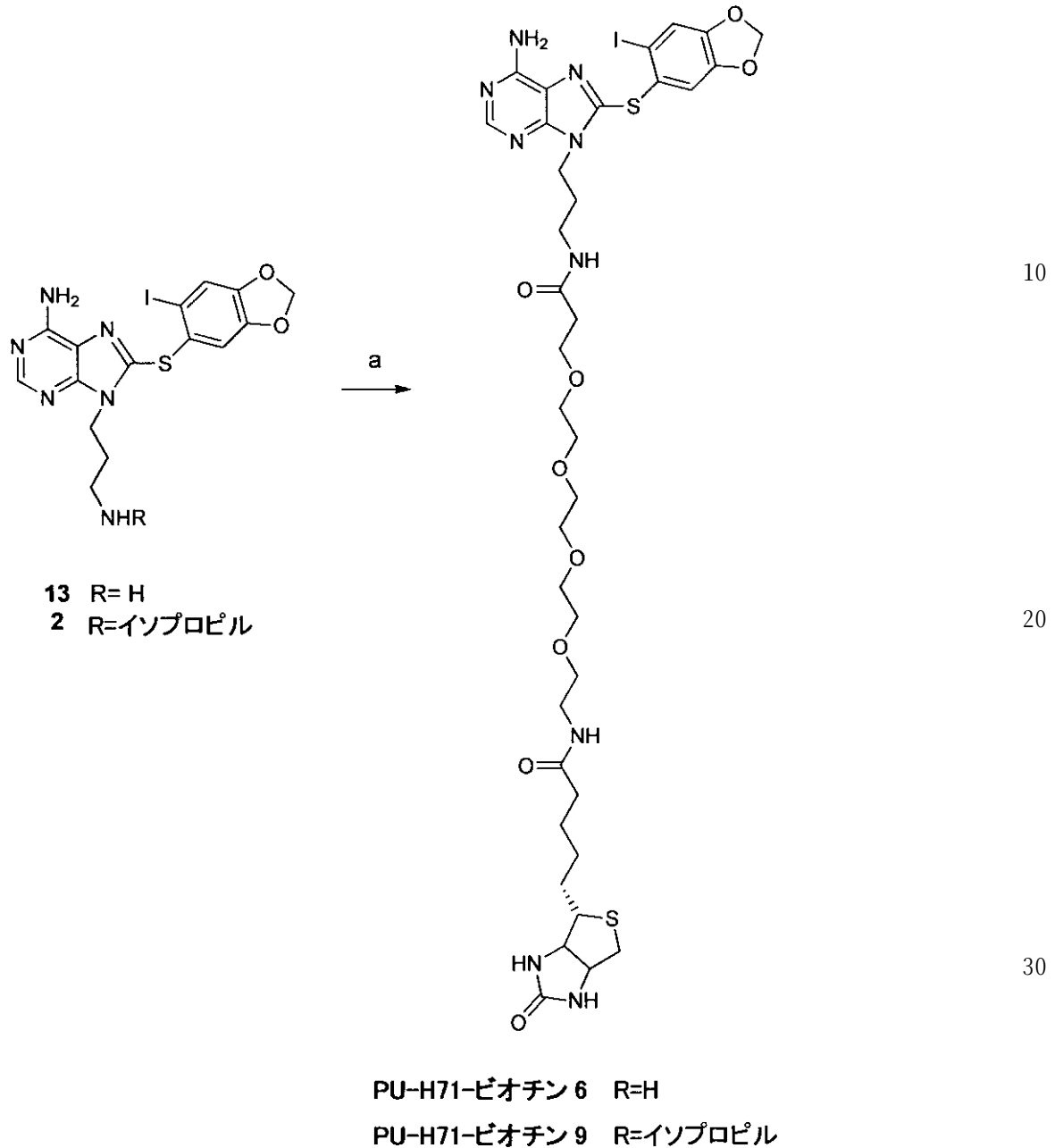
スキーム 14: PU-H71-ビオチン 5 および PU-H71-ビオチン 8 の合成

【0129】

さらに別の態様においては、スキーム 15 に示されるように、ポリエチレングリコール鎖を介してビオチンに PU-H71 (2) またはデスイソプロピル-PU-H71 (13) を共有結合させることにより、ビオチン化された分子を調製して、PU-H71-ビオチン 6 または PU-H71-ビオチン 9 を生成した。化合物 13 または化合物 12 を、それぞれ、塩基の存在下で、EZ-Link (登録商標) NHS-PEG₄-ビオチンと呼ばれる、ビオチン分子を含有する市販の N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルと反応させることにより、PU-H71-ビオチン 6 および PU-H71-ビオチン 9 を調製してもよい。

40

【化 1 6】



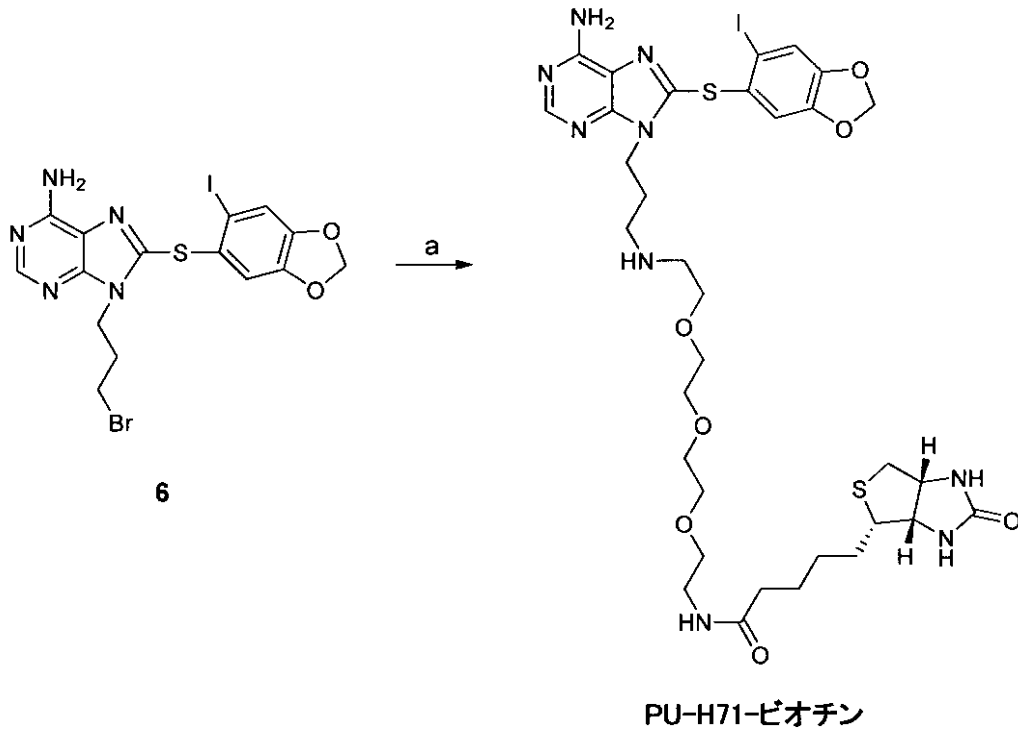
スキーム 15: PU-H71-ビオチン 6 および PU-H71-ビオチン 9 の合成

【0130】

スキーム 16 に示されるさらに別の態様においては、ブロミド化合物 6 と、E Z-L i n k（登録商標）アミン-PEO₃-ビオチンとの反応により、PU-H71-ビオチンと呼ばれる、アミン結合ビオチン類似体を合成した。

40

【化 1 7】



10

20

スキーム 16: PU-H71-ビオチンの合成

【0 1 3 1】

ビオチン化された化合物がH S P 9 0に対する親和性を依然として保持することを確保するために、S K B r 3がん細胞溶解物を用いる蛍光偏光アッセイにおいてそれらをそれぞれ評価した。見ての通り、それぞれの化合物はH S P 9 0に対する良好な親和性を保持し、そのI C₅₀は3 1 ~ 1 5 4 n Mの範囲である（表 1；P U - H 7 1、I C₅₀ = 2 5 n M）。

30

【表 1】

表 1 ビオチン化された化合物の特性

化合物	EC ₅₀ (nM); SKBr3 HSP90 結合アッセイ	K562 に関する HSP90-ストレプトアビジン結合 溶解物 細胞		MW	TPSA	ClogP
PU-H71	24.5	n.a.	n.a.	512	96.8	3.09
PU-H71-ビオチン	58.9	はい	いいえ	871.81	194.75	1.69
PU-H71-ビオチン2	153.5	いいえ	いいえ	738.66	146.24	3.12
PU-H71-ビオチン3	44.3	いいえ	いいえ	696.58	155.03	1.93
PU-H71-ビオチン4	34.8	いいえ	いいえ	809.74	184.13	3.49
PU-H71-ビオチン5	31.4	はい	はい	922.90	n.d.	n.d.
PU-H71-ビオチン6	66.2	はい	はい	943.87	n.d.	n.d.
PU-H71-ビオチン7	72.8	いいえ	いいえ	851.82	n.d.	n.d.
PU-H71-ビオチン8	76.9	はい	はい	964.98	n.d.	n.d.
PU-H71-ビオチン9	110.1	はい	はい	985.95	n.d.	n.d.

n.a.=適用せず

n.d.=決定せず;TPSA および ClogP 値は Chemdraw を用いて決定し、n.d.は所与の構造について値を決定することができなかったことを示す。

【0132】

2つの一般的な傾向を観察することができる。第一に、PU-H71類似体と比較して、デスイソプロピル類似体は、平均して約2倍高い親和性で結合する（すなわち、PU-H71-ビオチン3対-2、-4対-7、-5対-8、-6対-9）。第二に、リンカーに関して、炭素系はエチレングリコール系よりも強力である（すなわち、PU-H71-ビオチン4および-5対-6、-7および-8対-9）。まとめると、調製された全ての化合物がHSP90との良好な親和性を保持し、さらなる分析にとって好適であった。

【0133】

調製されたビオチン化された分子の各々がHSP90に対する良好な親和性を保持することが示されたので、本発明者らは次に、鎖の長さがHSP90およびストレプトアビジンへの同時的結合を維持するのに十分であるかどうかを決定しようとした。K562溶解物（500 μgのタンパク質）を、ストレプトアビジンビーズと100 μMの各化合物との混合物で一晩処理した。未結合の材料を除去するための十分な洗浄後、残存するビーズペレットをSDS-PAGEにより分析した。ゲルを洗浄し、クマシーブルーで1時間染色した。PU-H71-ビオチン-5、-6、-8、-9ならびにPU-H71-ビオチンは、約90 kDaにバンドを示し、これはHSP90およびストレプトアビジンへの同時的結合を示す。リンカーを含まない類似体（PU-H71-ビオチン2および-3）ならびに6-炭素スペーサー基を含む類似体（PU-H71-ビオチン4および-7）は、90 kDaにバンドを示さなかったが、これは、リンカーが短すぎることを示している。対照的に、長い炭素鎖スペーサー基を含有する化合物（PU-H71-ビオチン5および-8）ならびにポリエチレン鎖を含有する化合物（PU-H71-ビオチン6および-9）は、同時的結合を可能にするのに十分な長さのものであった。

【0134】

いくつかの分子がHSP90およびストレプトアビジンに同時に結合することが示されたので、本発明者らは次に、これを生細胞においても同様に達成することができるかどうか

かを調査した。この場合、 $100\text{ }\mu\text{M}$ のPU-H71-ビオチン-5、-6、-8、-9ならびにPU-H71-ビオチンで4時間処理した後、SDS-PAGEにより分析することにより、K562細胞中での結合を最初に決定した。評価した化合物のうち、PU-H71-ビオチンのみが生細胞中での結合を維持することができなかった。興味深いことに、PU-H71-ビオチンは、その透過性を制限するイオン化可能なアミンを含有し、その結合の失敗に関する主要な因子であってよい。対照的に、PU-H71-ビオチン-5、-6、-8、-9は、イオン化可能なアミンを含有し、細胞膜を透過することができる。活性化化合物を50、25および $10\text{ }\mu\text{M}$ で評価したところ、PU-H71-ビオチン-6および9が $10\text{ }\mu\text{M}$ でも良好な結合を維持することを示す。これらの2つの化合物を5、2.5および $1\text{ }\mu\text{M}$ でさらに評価したところ、最も低い濃度でも、約 90 kDa に偽バンドが依然として存在する。PU-H71-ビオチン-6はさらに、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ でも偽バンドを示し、これは、同時的結合が依然としてこの低濃度で維持されることを示している。

10

【0135】

長い炭素鎖スパーサー基を含有する化合物（PU-H71-ビオチン-5、-8）またはポリエチレングリコール鎖リンカーを含有する化合物（PU-H71-ビオチン-6、-9）は、13または2が結合するかどうかに関わらず、K562細胞の細胞膜を透過し、HSP90に結合した後、ストレプトアビジンビーズに結合することができると考えられる。さらに、ポリエチレングリコール鎖リンカーを含有する化合物（PU-H71-ビオチン-6、-9）が好ましいものであるかのように考えられる。

20

【0136】

5. 2. 1. 1. 3. ANCA標識されたプローブの合成

本開示は、阻害剤をアミノナフタレニル-2-シアノアクリレート（ANCA）で標識することにより発がん性HSP90を検出するためのプローブをさらに提供する。ANCAは、ヒト組織中のアミロイド斑に結合し、これを染色することができる蛍光プローブである。ANCAは、分子ローターと呼ばれることも多い。分子ローターは、蛍光量子収率が周囲の環境に依存するプローブである。分子ローターの構造モチーフは、大分子のすぐ近くに持って行った場合、内部分子回転が阻害され（剛性が増加する）、蛍光放出の変化をもたらす、すなわち、結合した、および未結合の分子ローターが異なる蛍光放出ピークを有するようなものである（図15を参照されたい）。「発がん性HSP90」に対する特異性を有する、PU-H71にコンジュゲートさせる場合、この物理的側面を活用することができる。PU-H71にコンジュゲートした分子ローターにより、がん細胞の異種集団中で、「発がん性HSP90」を含む細胞を識別することができ、介入、例えば、生検、手術または微細針吸引生検から得られた標本中に存在する細胞中でのそのような種の定量が可能になる。

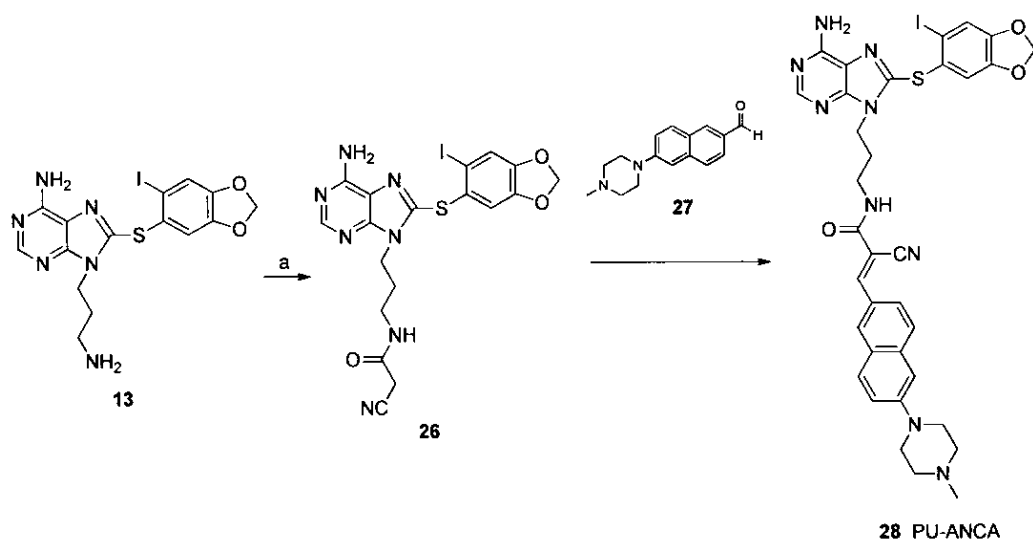
30

【0137】

一態様においては、デスイソプロピル-PU-H71（13）、PU-H71（2）または13もしくは2の化合物類似体を、スキーム17に示されるように、ANCAで標識してもよい。スキーム17において、デスイソプロピル-PU-H71（13）を、シアノ酢酸と反応させて、化合物26を生成する。次のステップにおいて、化合物26を、高温で化合物27と反応させて、化合物28（PU-ANCA）を得る。

40

【化 1 8】



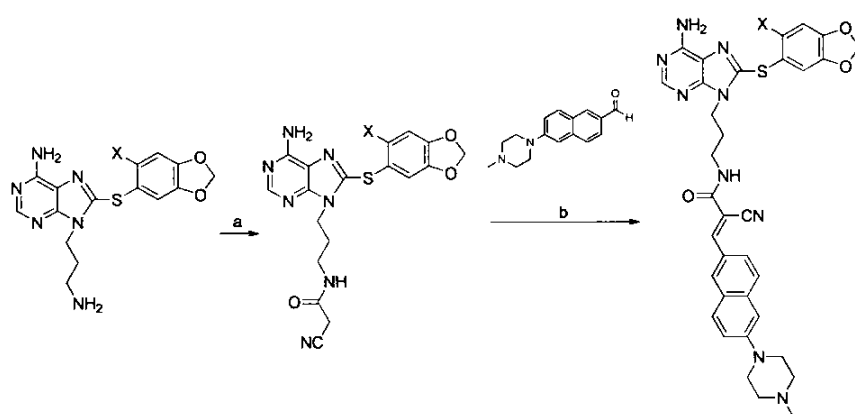
10

スキーム 17: PU-ANCA の合成

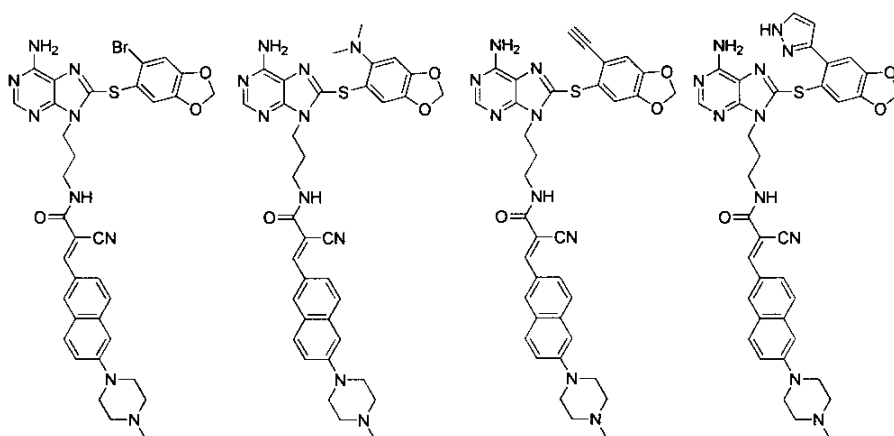
【 0 1 3 8】

さらに別の態様において、本発明において有用な A N C A 標識された H S P 9 0 阻害剤 20
、例えば、プリンに基づくものを、スキーム 1 8 に示す。

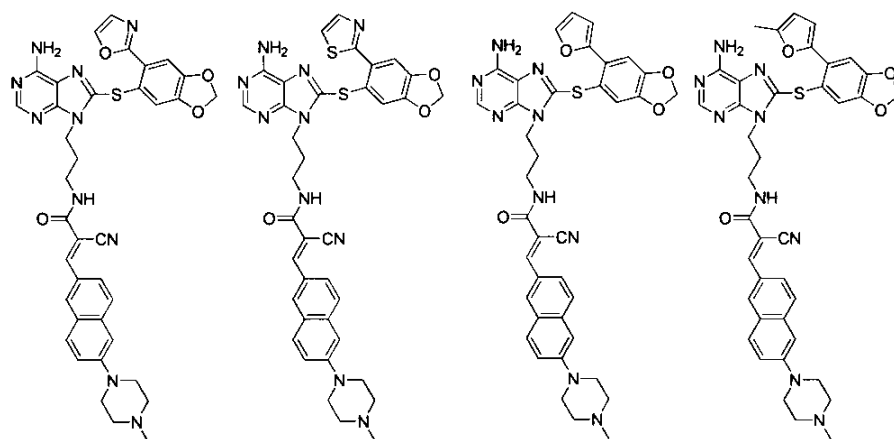
【化 1 9】



10



20



30

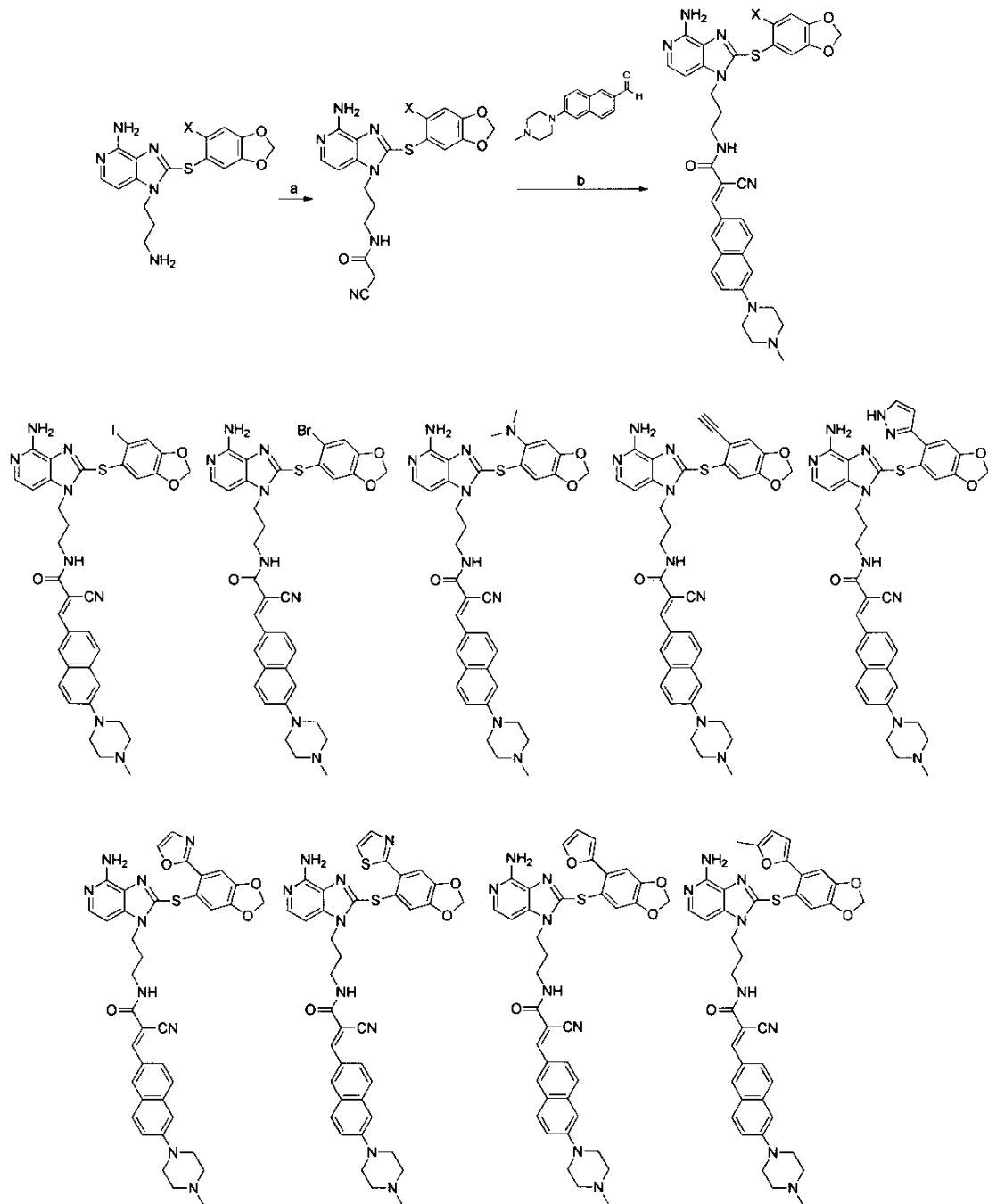
40

スキーム 18: プリンに基づく ANCA 標識された HSP90 阻害剤の合成

【0139】

さらに別の態様においては、本発明において有用な ANCA 標識された HSP90 阻害剤、例えば、イミダゾピリジンに基づくものを、スキーム 19 に示す。

【化 2 0】



スキーム 19: イミダゾピリジンに基づく ANCA 標識された HSP90 阻害剤の合成

【0140】

5. 2. 1. 2. がんの予後および処置におけるプローブの利用

5. 2. 1. 2. 1. 血液悪性腫瘍

5. 1 節で考察された試験は、特定の H S P 9 0 阻害剤が、正常細胞におけるよりもが

10

20

30

40

50

ん細胞においてより豊富である「発がん性HSP90」であるHSP90種のサブセットに優先的に結合することを確認するものである。この種の存在量は、単にHSP90発現の量によって決定されるものではなく、HSP90阻害に対する細胞の感受性を予測するものである。かくして、この「発がん性HSP90」、例えば、PU-H71を選択するタグ付けされた阻害剤への結合に利用可能である患者のがん細胞におけるHSP90集団の割合の決定は、診療所におけるHSP90阻害剤に対する感受性を予測し、がん細胞がHSP90に依存するレベルを示す。

【0141】

具体的には、本開示は、細胞透過性の蛍光標識されたHSP90阻害剤、例えば、PU-H71-FITC誘導体（例えば、PU-FITC；PU-H71-FITC2）が、
曝露の早くも1時間後には生細胞を標識し、24～48時間で白血病細胞の生存能力を低下させ、HSP90クライアントがんタンパク質の分解により示されるように細胞内腫瘍HSP90を阻害し、共焦点顕微鏡観察により示されるように細胞内に局在化し、フローサイトメトリーにより示されるように正常細胞のHSP90に対して腫瘍に特異的に結合することを示す。さらに、本開示の蛍光標識された化合物は、「発がん性HSP90」種に結合し、このプローブが、PU-H71と同様、細胞に透過し、腫瘍の「発がん性HSP90」標的に特異的に結合することの豊富な証拠を提供する。

10

【0142】

本開示の方法を用いて、血液悪性腫瘍（例えば、白血病）または骨髄増殖性障害を有する患者がHSP90阻害療法に応答するかどうかを決定してもよい。この方法を、限定されるものではないが、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病および慢性骨髄性白血病などの白血病、リンパ性白血病、多発性骨髄腫ならびに骨髄増殖性新生物および障害などの様々な血液悪性腫瘍に適用してもよい。

20

【0143】

本開示は、血液のがんを有する患者がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、患者に由来するがん細胞および非がん細胞（例えば、リンパ球）を含有する試料を、患者のがん細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する細胞透過性の蛍光標識されたHSP90阻害剤と接触させること、試料中のがん細胞および非がん細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量を測定すること、ならびにがん細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量を、非がん細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量と比較することを含み、がん細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量が非がん細胞よりも多い場合、腫瘍がHSP90阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。特定の態様においては、細胞透過性の蛍光標識されたHSP90阻害剤に結合する量は、フローサイトメトリーを用いて決定される。

30

【0144】

いくつかの態様においては、血液がん細胞と正常リンパ球との結合比率が約1.5以上である場合、がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。他の態様においては、血液がん細胞と正常リンパ球との結合比率が約2以上である場合、がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。さらに他の態様においては、血液がん細胞と正常リンパ球との結合比率が約2.5以上である場合、がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。さらに他の態様においては、血液がん細胞と正常リンパ球との結合比率が約3以上である場合、がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。さらに他の態様においては、血液がん細胞と正常リンパ球との結合比率が約4以上である場合、がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。さらに他の態様においては、血液がん細胞と正常リンパ球との結合比率が約5以上である場合、がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。

40

【0145】

HSP90阻害剤への曝露の際の細胞透過性の蛍光標識されたHSP90阻害剤（例えば、PUH71-FITC2）の結合と、*in vitro*での細胞生存能力との相関分

50

析を行うことにより、多数の確立された細胞系および一次腫瘍試料を調査した。細胞系および一次白血病試料のパネルへの P U H 7 1 - F I T C 2 結合を決定するために、本発明者らは、複数パラメータのフローサイトメトリー分析を用いた。本発明者らはまた、薬剤曝露の 48 時間後に生存能力アッセイを実施することにより、これらの細胞の H S P 9 0 阻害剤への感受性を試験した。

【0146】

蛍光活性化フローサイトメトリーは、依然として細胞を計数し、精製し、分析するための選別方法である^{9、10}。事実、多くの測定を現在フローサイトメトリーにより実施することができるが、最近の技術的進歩により、これらの測定を異種集団内の個々の細胞に対して同時に行うことができるようになってきている¹¹。そのような複数パラメータ分析は、少ない試料からより多くのデータを提供するため非常に強力であり、患者試料が限られる場合は重要な考慮となる。複数パラメータ分析はまた、いくつかの試薬に結合する望ましくない細胞を排除することにより、集団のより正確な同定を可能にする^{9、10}。かくして、この方法は、蛍光標識された場合、H S P 9 0 リガンドの異なる細胞集団への結合の分析にとって最適である。

【0147】

蛍光標識されたリガンドは、生物学および薬理学における様々な使用¹²、ならびに非標識リガンドの薬理学的特性を残す利点を歴史的に有してきた。リガンド-受容体結合の *i n v i t r o* での調査に加えて、小分子蛍光プローブは、例えば、フローサイトメトリーを用いる、生細胞集団中での標的とリガンドとの相互作用のリアルタイムで非侵襲的なモニタリングを可能にする。

【0148】

蛍光染料は特定の波長で光を吸収し、次いで、より高い波長でその蛍光エネルギーを放出する。それぞれの染料は異なる放出スペクトルを有し、フローサイトメトリーによる多色分析に活用することができる。最も用いられるのは、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C)、4-ニトロベンゾ [1, 2, 5] オキサジアゾール (N B D) または赤色にシフトした染料スルホローダミン 101 (テキサスレッド) である。F I T C および N B D は多くの装置上で F L 1 チャンネル中で検出され、蛍光顕微鏡観察のための良好な選択でもある (それぞれ 495 および 466 nM で励起され、519 および 539 nM で放出される) が、テキサスレッドは単一レーザー装置上で F L 3 中で検出される (589 nM で励起され、615 nM で放出される)。

【0149】

5. 1. 1. 節において、本発明者らは、いくつかの一次白血病細胞および正常血液細胞に関する試験を考察した。特に、本発明者らは、芽球 (悪性細胞集団) とリンパ球 (正常細胞集団) との両方、健康なドナーの臍帯血から単離された C D 3 4 + 細胞、末梢血に由来する総単核細胞およびまた末梢血白血球 (P B L) を含む、一次慢性および急性転化期 C M L ならびに急性骨髄性白血病 (A M L) 試料を分析した (図 1 c ~ e、3、4)。本発明者らは、異種細胞集団において、複数パラメータフローサイトメトリー分析を実施するための手段として蛍光標識された P U - H 7 1 (P U H 7 1 - F I T C 2) を用いた。図 4 a に示されるように、正常細胞集団 (リンパ球) と悪性細胞集団 (芽球) とを区別するためのゲーティング戦略を用いる。3 人の異なる患者に関するフローサイトメトリードットプロットを示す。図 4 b において、C M L 芽球中の H S P 9 0 に結合する P U - H 7 1 - F I T C 2 と、一次患者試料に由来する正常リンパ球との比を示す。

【0150】

図 4 d において、フローサイトメトリーを再度用いて、芽球と正常リンパ球とを区別し、芽球ゲート内の C D 3 4 + 細胞の結合を分析する。図 4 e および 4 g において、H D P 9 0 C D 3 4 + 芽球に結合する P U - H 7 1 - F I T C 2 と、6 人の白血病患者および 3 人の健康な患者中の正常リンパ球との比を決定した。9 人の患者を、P U - H 7 1 - F I T C 2 または対照 (T E G - F I T C) で処置した (図 4 f および 4 h)。図 4 h に示されるように、最も高い比を有する患者 (C M L 0 3 1 0 6、0 6 1 4 および 0 1 2 4 と

呼ぶ；図4 gで「b c C M L」として平均化された比）は、より低い比を有する患者（C M L 0 1 1 8、0 1 2 8および0 2 2 2と呼ぶ；図4 gで「c p C M L」として平均化された比）よりも感受性が高かった。健康な患者は1に近い比（図4 g）を有し、臍帯血中のそれらの細胞はP U - H 7 1に対する感受性が有意に低かった（図4 h、C B 1、2、3と呼ぶ）ことがわかる。図4 fに示される結果は、C D 3 4 + 芽球の生存能力は患者において有意に低下したが、正常リンパ球は影響されなかったことを示している。同様に、対照化合物（T E G - F I T C）は、C D 3 4 + 芽球または正常リンパ球のいずれかの生存能力を低下させなかった。

【0151】

一次試料中で、本発明者らは、同じ患者中の芽球集団と正常リンパ球との両方を分析した。本発明者らは、一次白血病細胞（一次慢性および急性転化期慢性骨髄性白血病（C M L）および急性骨髄性白血病（A M L）試料）、ならびに健康な血液細胞（C D 3 4 + 臍帯血細胞、および健康なドナーから単離された総末梢血単核細胞を含む）から構成されるパネルにおいて、P U H 7 1 - F I T C 2に対する最も高いアビディティを有する細胞もこの薬剤による殺傷に対して最も感受性が高いことを見出した（図1 6）。重要なことに、白血病の血液試料中に存在する正常リンパ球は、P U - F I T Cに対する低い結合を示し、P U - H 7 1により影響されなかった。かくして、本発明者らは、同じ患者中の正常リンパ球と比較した白血病細胞中でのP U - F I T Cの相対的結合の使用を、P U H 7 1 - F I T C 2結合を試料にわたって比較するための正規化された値として用いることができることを理論的に説明した。具体的には、C M L試料中で評価した場合、急性転化C M L（b c C M L）細胞がP U - F I T Cに対する最も高い結合を提示し（正常リンパ球と比較して4倍を超える）、慢性期（c p C M L）と比較した場合、P U - H 7 1処置に対する最も高い感受性を示した（図1 6）。対照的に、P U - H 7 1は、正常血液細胞においてH S P 9 0に弱く結合し（b c C M L中の約1 0 0 n Mに対して2, 0 0 0 n Mより高いI C₅₀値）、がん細胞に対して毒性的である濃度でこれらの細胞中で非毒性的であった（図1 d、eおよび1 6 B、C）。図1 6 Cは、1 9個の一次A M L試料中で芽球および正常リンパ球へのP U - H 7 1 - F I T C 2の結合を分析することにより得られた比（X軸上でP U結合倍数として報告される）と、P U - H 7 1で処置した場合の芽球の測定された生存率とを相関させるグラフを示す。非応答性（生存率が5 0 %未満低下した）腫瘍細胞から応答性（生存率が5 0 %を超えて低下した）腫瘍細胞を、それぞれ、約0. 6 5 ~ 約2. 2 2以下と比較して、約2. 3 1 ~ 約7. 4 3以上の比により区別することができる。

【0152】

さらに、1 4種の白血病細胞系のパネルにおいて、本発明者らは、P U - H 7 1 - F I T C 2結合（平均蛍光強度で提示される）と、P U - H 7 1によるH S P 9 0阻害に対するこれらの細胞の感受性との有意な相関にも注目した（図3 e）。

【0153】

1 9個の一次A M L標本について収集されたデータに基づいて、本発明者らは、感受性および耐性A M L標本を正確に同定するアッセイの確率を決定するための感受性および正確性曲線を算出した。本発明者らは、P U - F I T C結合に関する2以上の任意のカットオフ値（芽球／リンパ球）および予測される結果としての5 0 %未満の生存率を用いて分類性能分析を実施し、以下の値を観察した：正確性：8 3. 3 %（5 3. 2 ~ 9 3. 8 %；9 5 % C I）；感受性：9 1. 7 %（7 2. 8 ~ 9 9. 5 %；9 5 % C I）；負の予測値：8 0 %（3 4. 7 % ~ 9 8. 9 %；9 5 % C I）；F i s h e rの正確確率検定、p = 0. 0 2 2。これらの計算は、P U - F I T Cが良好な分類性能を有することを示唆する；この評価を、より正確で厳格な性能評価を得るためにより大きい試料コホートをを用いて繰り返す。実験的または装置の変動に起因するアッセイの差異を最小化するために、本発明者らは、以下のもの：（1）自動的性能調整を可能にし、毎日のサイトメーターの性能および一貫性を改善するためのB D C y t o m e t e r S e t u p & T r a c k i n g（C S T）ビーズを用いる。C S Tビーズは新しい実験設定の度に前に実行する

。(2)陽性対照MV411(高感受性細胞系—高結合)および陰性対照HL60(低感受性細胞系—低結合)をアッセイに含有させる。

【0154】

白血病細胞における*in vitro*での観察を動物前臨床モデルにおいて確認することができるかどうかを決定するために、本発明者らは、PU-H71に対する異なる感受性(高感受性および低感受性)を有する一次AML試料を用いて異種移植を設定し、*in vitro*で評価し、および/またはPU-FITC結合により予測した。一次AML細胞を、致死量未満で照射されたNOD/SCIDマウス($n=8$)に注入した。注入の3~4週間後、ヒト白血病細胞がマウスの骨髄(BM)中に生着した時、PU-H71またはビヒクル対照を用いる処置を開始し(75mg/kg、3週間)、4週間継続した。マウスを犠牲にし、抗ヒトCD45およびCD34を用いて白血病の生着を評価した。疾患を生じる生存細胞の能力を決定するために、本発明者らは、同数のヒト細胞を、致死量未満で照射されたNOD/SCIDマウスに移植した。この実験は、高い結合、*in vitro*で高感受性の細胞に関するPU-H71処置が、腫瘍開始をさらに防止するかどうかを決定するものである。もしそうだとしたら、それは、処置が再発の可能性を低下させることを示唆する。異種移植は白血病試料の生物学を変化させてもよいため、一次細胞へのPUH71-FITC2結合を、生着した細胞の注入前に評価した(移植の4週間後)。

10

【0155】

異種移植実験からの結果を、図17に示す。2つの一次AML試料(高感受性および低感受性、図17a)を用いる実験において、本発明者らは、高感受性試料が異種移植されたAML試料において低感受性試料よりも高いPUH71-FITC2結合を有し(図17b)、HSP90阻害剤を用いる処置により有意に良好に応答する(図17c)ことを見出した。さらに、本発明者らは、PU高感受性AMLに由来する細胞が、二次移植における有意に低下した生着を示すことを見出した($p=0.016$)。この結果は、疾患の類似する段階での患者の白血病細胞の生存および増殖におけるHSP90の関与が実質的に異なってもよいことを示す。さらに、HSP90阻害療法の効果を、本開示の蛍光標識されたプローブを用いて予測してもよい。

20

【0156】

5.2.1.2.2. 固形腫瘍および液性腫瘍

本開示の蛍光標識された、ANCA標識された、およびビオチン化されたプローブはまた、固形腫瘍およびリンパ腫および他の液性腫瘍関連がんのための予後および診断適用を有する。そのような腫瘍の例は、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択されるがん、特に、乳がん、胃がん、または膵臓がんに関連するものである。当業者であれば、例えば、腫瘍の生検または外科的切除から得られる組織スライスの一部である腫瘍細胞上で標識化を実施することができることを認識できる。この場合、腫瘍細胞は、間質の細胞、良性組織、血管および他の細胞、例えば、リンパ球、マクロファージにより囲まれている。分離させた腫瘍細胞、例えば、そのような腫瘍細胞を含有する組織から得られるものにおいて標識化を実施することもできる。腫瘍細胞、例えば、確立されたがん細胞系から得られるものにおいて標識化を実施することもできる。最後ではないが、腫瘍細胞、例えば、血漿および胸膜などのそのような腫瘍細胞を含有する生物学的液体から得られるものにおいて標識化を実施することもできる。一態様においては、腫瘍細胞および腫瘍関連細胞ならびに生体、例えば、がん患者の循環中に見出されるもの、微細針吸引生検またはがん細胞もしくは他の種類の細胞もしくは「発がん性HSP90」を含有する生物学的形成物を含有する生物標本をもたらす他の介入手順により得られる細胞において標識化を実施することもできる。さらに別の

30

40

50

態様においては、悪性形質転換と関連する他の細胞または発がん性HSP90を含む生体、例えば、腫瘍エキソソームにおいて標識化を実施することができる。例えば、6. 3. 8. 節は、外科的切除後の胃がんおよび乳がんを有する患者からの染色のための組織の単離を説明し、5. 2. 1. 2. 4. 節は、がん患者からの循環腫瘍細胞の単離を説明する。

【0157】

膵臓がんおよび乳がん細胞系における実験は、血液腫瘍において行われた分析が固形腫瘍およびリンパ腫においても有効であることを示す。かくして、標識された細胞透過性HSP90阻害剤は、固形腫瘍細胞またはリンパ腫細胞中に存在する「発がん性HSP90」を検出および定量することができる。さらに、阻害剤を用いて、HSP90阻害療法に対する固形または液体腫瘍細胞の感受性を予測することができる。当業者であれば、液性腫瘍が、限定されるものではないが、白血病、リンパ腫、骨髄腫および骨髄増殖性新生物と関連することを認識できる。そのような当業者であればまた、特定の液性腫瘍が固形腫瘍も形成し、血液に加えて、これらの疾患と関連するがん細胞がリンパ節、膵臓、肝臓、骨髄および他の部位に拡散し得ることを認識できる。

【0158】

一例において、膵臓がんおよび乳がん細胞のパネルを、(1)いくつかの異なるHSP90阻害剤、例えば、PU-H71、SNX-2112およびNVP-AUY922に対する感受性(図2を参照); (2) PU-H71-FITC2への結合; ならびに(3)これらの腫瘍細胞中での総HSP90の発現について試験した。図18は、PU-H71-FITC2結合と、これらの細胞のPU-H71、SNX-2112およびNVP-AUY922に対する感受性との有意な相関を示す(それぞれ図18Aの $r^2=0.59$ 、 0.62 および 0.61)。対照的に、HSP90阻害剤に対する感受性と、これらの細胞中の総腫瘍HSP90の発現との有意な相関は決定されなかった(図18C)。同様に、PU-FITCにより決定された「発がん性HSP90」の発現と、これらの細胞中での総腫瘍HSP90の発現との有意な相関を確立することができなかった(図18B)。HL-60白血病細胞はPU-H71および他のHSP90阻害剤に対して耐性であり、PU-FITCへの低い結合を示すか、結合を示さない。かくして、本発明者らは、HL-60と比較したがん細胞における標識されたHSP90阻害剤(例えば、PU-H71-FITC2)の相対的結合の使用を、試料および実験にわたってPU-FITC結合と比較するための正規化された値として用いることもできることを理論的に説明した(図18D)。図18は、いくつかの膵臓がんおよび乳がん細胞におけるそれぞれのがん細胞およびHL60に結合する標識されたPUH71(例えば、PU-H71-FITC2)の比を用いるそのような分析を示す。まとめると、これらのデータは、(1)PU-FITCが「発がん性HSP90」の存在量を測定するための好適な手段であること; (2)「発がん性HSP90」の存在量の測定がHSP90iに対する感受性を予測すること; および(3)総腫瘍HSP90の存在量がHSP90阻害剤に対する応答を予測するものではなく、それが標識されたPU-H71により測定された場合、「発がん性HSP90」の存在量と相関もしないことを示す。

【0159】

本開示の標識されたHSP90阻害剤を用いて、患者がHSP90阻害療法から利益を得るかどうかを決定することができる。一態様においては、患者の腫瘍細胞への標識されたHSP90阻害剤の結合を、対照細胞への結合と比較することができる。結合が対照と比較して増加した場合、患者がHSP90阻害療法を受け入れられることを示す。図19に示されるように、非応答性(生存率が50%未満低下した)腫瘍細胞から応答性(生存率が50%を超えて低下した)細胞を、非応答性細胞についての約1.23または約2.07以下と比較した、応答性細胞についての約2.7~約5.87以上の、腫瘍細胞に結合するPU-H71-FITC2と、参照HL60細胞との比により区別することができる。HSP90阻害剤に対する応答性を決定するためのこれらの比は、アッセイにおいて用いられる、標識されたHSP90阻害剤、参照標本(すなわち、血液中のHL60細胞

、正常白血球、CD45+CD14-細胞、または正常リンパ球) および/または対照誘導体(すなわち、非特異的/バックグラウンド結合を説明するために用いられるPUFITC9もしくはFITC-TEG)の性質に依存する。

【0160】

循環腫瘍細胞中の発がん性HSP90の標識における本発明のより詳細な説明は、5. 2. 1. 2. 4. に与えられる。図20は、発がん性HSP90に対する低い結合を有するか、結合を有さないように、かくして、非特異的/バックグラウンド結合を説明するように設計されたPU誘導体としてのPUFITC9の使用を示す。また、それは参照細胞(低い発がん性HSP90を有するか、それを有さない細胞)としての患者の白血球(CD45+CD14-細胞)の使用も示す。

10

【0161】

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)細胞における実験はまた、これらの細胞のHSP90阻害剤に対する感受性が、細胞中の総腫瘍HSP90の発現ではなく、標識されたPU-H71のその取込みと相関することを示す(図21)。具体的には、OCI-Ly7およびOCI-Ly1はHSP90阻害に対して高感受性である2つのDLBCL細胞である(Cerchiettiら、Nature Medicine 2009)。それらは両方とも親和性のPU-H71結合剤である。本発明者らは、治療濃度未満のHSP90阻害剤で長期間にわたってこれらの細胞を処理し、いくつかの試験したHSP90阻害剤、例えば、PU-H71、PU-DZ13および17DMAGに対する、親細胞よりも5~10倍低い感受性を示したクローンを選択することができた(図8)。図21は、これらのクローンは親Ly1細胞と同様の総腫瘍HSP90レベルを発現するが、それらは標識されたPU-H71の取込みにより測定された場合、より低い「発がん性HSP90」レベルを有することを示す。結合実験を、PSC833(2.5 μM)、P-gP阻害剤の存在下および非存在下で実行して、取込みの差異が異なる「発がん性HSP90」レベルの結果であり、薬剤ポンプにより媒介される流出の間接的尺度ではないことを示した。

20

【0162】

5. 2. 1. 2. 2. 1. 膵管腺がん

膵管腺がん(PDAC)は、米国においてがん関連死の4番目に最も一般的な原因である。5年生存率はあらゆるがんの中で最も低く、0.4~4%の範囲であると見積もられている。2009年には、PDACの見積もりで42,470件の新規事例が診断され、見積もりで35,240人の患者がその疾患の結果として死亡した。このがんの侵襲性、それを早期に診断できないこと、および結果を変える療法の現在の欠如のため、PDACに由来する死亡率は発生率を密接に反映する。PDACの唯一の潜在的に治癒的な処置は、外科的切除である。この疾患は一般的に診察時には進行しているため、治癒的切除に相応しいのは患者の10~20%に過ぎない。膵十二指腸切除術を受けるこれらの患者においては、5年生存率は依然として暗く、約20%である。PDACを処置するための有効な化学療法剤の開発は大いにやりがいがあった。伝統的な細胞傷害剤は、腫瘍増殖の制御、生活の質の改善および患者の生存期間の延長においてほとんど効果がない。

30

【0163】

異常な経路および分子の複雑な負荷を許容するために、PDACは生存のために分子シャペロンに依存するようになる。主なシャペロンである熱ショックタンパク質90(HSP90)は、PDACにおける悪性プロセス、例えば、増殖、生存および転移を誘導するがんタンパク質を補助し、唆し、がん表現型の発達を可能にする。さらに、HSP90は、アポトーシス閾値を増加させることにより、がん細胞が他の療法に対する耐性を生じるのを助ける。これらの包括的な生物学的機能は、PDACにおける抗HSP90標的化療法に関する重要な役割を提唱する。結果として、これらの腫瘍は、主要ながんシャペロンの1つであるHSP90の阻害剤を用いる処置のための適切な候補である。

40

【0164】

HSP90阻害剤、例えば、発がん性HSP90種に優先的に結合するPU-H71を

50

用いる膵臓がんの生存に必要とされる腫瘍HSP90種の存在量の同定は、HSP90療法から利益を得る、および腫瘍の治療的標的化を個別化する可能性がある患者の選択のための腫瘍特異的バイオマーカーとして役立つ。

【0165】

実際、HSP90阻害剤に対する膵臓細胞系の感受性は、フルオレセイン標識されたPU-H71 (PU-H71-FITC2) の細胞取込みにより測定された場合、腫瘍HSP90種の存在量と相関する (図22)。最も高い量のPU-H71-FITC2を取り込む細胞は、HSP90阻害剤に対して最も感受性であるものでもある。

【0166】

血液のがんに関する試験 (5. 2. 1. 2. 1. 節) と同様、参照誘導体または参照細胞 (例えば、HL60もしくは正常細胞) と比較して膵臓がん細胞における標識されたHSP90阻害剤 (例えば、PU-H71-FITC2) の相対的結合が高いほど、膵臓腫瘍または腫瘍細胞はHSP90阻害剤療法に感受性となる (図19)。いくつかの態様において、腫瘍細胞と参照細胞との結合の比が約2以上である場合、膵臓がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。他の態様においては、腫瘍細胞と参照細胞との結合の比が約2. 5以上である場合、膵臓がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。他の態様においては、腫瘍細胞と参照細胞との結合の比が約3以上である場合、膵臓がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。

【0167】

5. 2. 1. 2. 3. がん幹細胞

本開示は、正常細胞 (例えば、リンパ球) と比較したがん幹細胞 (CSC) 中の「発がん性HSP90」の量を決定し、それによって、CSCがHSP90阻害剤療法に応答するかどうかを決定する方法を提供する。最近の証拠は、がん幹細胞 (CSC) が多様な種類のがんについて疾患を生じさせ、維持することができることを示唆している。さらに、これらの細胞は一般的な化学療法剤に対して耐性であり、かくして、疾患の再発または転移をもたらす可能性がより高いことが示されている。したがって、より良好な治療結果を得るために、CSCを除去することができる療法を同定することが重要である。熱ショックタンパク質 (HSP) は、タンパク質の合成、維持および分解において重要な監視的役割を果たす。図23において、本発明者らは、CSC集団がHSP90阻害に対して感受性であり、標識されたPU-H71により認識されるように、感受性が発がん性腫瘍HSP90種の存在量と相関することを示す、急性骨髄性白血病 (AML) 幹細胞におけるデータを提供する。

【0168】

図23Aは、PU-FITCと白血病幹細胞 (LSC、CD34+CD38-CD45dim) およびリンパ球との結合の比を示す。一次AML試料を、37℃で4時間、1μMのPU-H71-FITC2と共にインキュベートした。細胞をCD34、CD38、CD45および7-AADで染色した後、フローサイトメトリー分析を行った。図23Bは、1μMのPU-H71を用いる48時間の処置後の、3つの一次AML試料に由来する未処理対照と比較したLSCの生存率 (%) を示す。細胞をCD45、CD34およびCD38で染色した後、アネキシンVおよび7-AADで染色した。LSCの生存能力を、フローサイトメトリーにより測定し、CD45dimCD34+CD38-ゲートのアネキシンV- / 7-AAD-の割合として決定した。注目すべきことに、PU-H71-FITC2により高く結合する細胞は、HSP90阻害剤を用いる処理に最も感受性があった。

【0169】

血液のがんに関する試験 (5. 2. 1. 2. 1. 節) と同様、同じ患者内で正常細胞 (例えば、リンパ球) と比較してCSC中の蛍光標識されたHSP90阻害剤 (例えば、PU-H71-FITC2) の相対的結合が高いほど、CSCはHSP90阻害剤療法に感受性となる。いくつかの態様においては、CSCと正常リンパ球との結合の比が1. 5以上である場合、がん患者がHSP90阻害療法に感受性があることを示す。他の態様にお

いては、C S Cと正常リンパ球との結合の比が2以上である場合、がん患者がH S P 9 0 阻害療法に感受性があることを示す。

【0170】

5. 2. 1. 2. 4. 循環腫瘍細胞

循環腫瘍細胞 (C T C) は、原発腫瘍から離れており、血流中に循環する細胞である。C T Cは、異なる組織中でのさらなる腫瘍のその後の増殖 (転移) のための種子を構成してもよい。図20は、H E R 2 + 転移性乳がんを有する患者から単離されたC T Cの標識化を示す。彼女の血漿から単離された腫瘍細胞は、同じく彼女の血漿から単離された白血球 (C D 4 5 + C D 1 4 - 細胞) よりも約84倍多くP U F I T Cに結合し、これは、これらの腫瘍細胞が高レベルの発がん性H S P 9 0を有し、H S P 9 0阻害剤を用いる療法がそれらの殺傷において有効であることを示している。実際、この患者が20mg/m²のP U - H 7 1を受けた24時間後、血液中のC T Cの数の6倍の低下が測定された。

【0171】

5. 2. 2. 発がん性H S P 9 0を検出するための放射標識プローブ

本開示は、がん細胞中で発がん性H S P 9 0を検出することができる放射標識プローブの使用を提供する。5. 2. 2. 1節は、本開示に従って用いられる様々な種類のプローブを記載する。5. 2. 2. 2節は、予後および診断アッセイにおけるそのようなプローブの使用を記載する。

【0172】

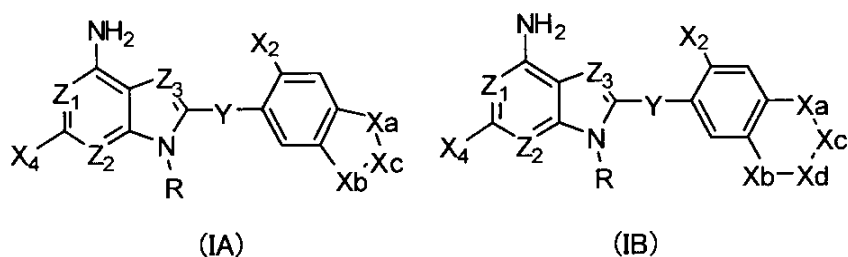
5. 2. 2. 1. 放射標識プローブ

阻害剤の親和性、選択性または生体内分布プロファイルを変化させることなく標識することができるH S P 9 0阻害剤は、予後および/または診断目的にとって理想的なプローブである。一態様において、プローブはヨウ素124放射標識型のH S P 9 0阻害剤である。別の態様において、プローブはヨウ素131放射標識型のH S P 9 0阻害剤である。別の態様において、プローブはヨウ素123放射標識型のH S P 9 0阻害剤である。別の態様において、プローブはヨウ素125放射標識型のH S P 9 0阻害剤である。

【0173】

一態様において、放射標識プローブは、以下の式：

【化21】



【0174】

の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

(a) Z₁、Z₂およびZ₃は、各々独立にCHまたはNであり；

(b) Yは、CH₂、O、またはSであり；

(c) X_a、X_b、X_cおよびX_dは、CH、CH₂、O、N、NH、S、カルボニル、フルオロメチレン、および価数を満たすように選択されたジフルオロメチレンから独立に選択され、ここでX基へのそれぞれの結合は、単結合または二重結合のいずれかであり；

(d) X₂は、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵Iまたは¹³¹Iであり；

(e) X₄は、水素またはハロゲンであり；

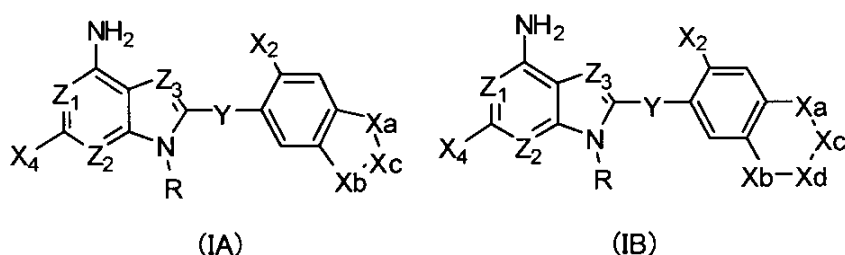
(f) Rは、直鎖状もしくは分枝状の置換もしくは無置換アルキル、直鎖状もしくは分枝状の置換もしくは無置換アルケニル、直鎖状もしくは分枝状の置換もしくは無置換アルキニル、または置換もしくは無置換シクロアルキルであり、ここで、R基は任意に、 $-S(O)N(R_A)-$ 、 $-NR_AS(O)-$ 、 $-SO_2N(R_A)-$ 、 $-NR_ASO_2-$ 、 $-C(O)N(R_A)-$ 、もしくは $-NR_AC(O)-$ により中断されていてもよく、および／またはR基は任意に、 $-S(O)NR_AR_B$ 、 $-NR_AS(O)R_B$ 、 $-SO_2NR_AR_B$ 、 $-NR_ASO_2R_B$ 、 $-C(O)NR_AR_N$ 、もしくは $-NR_AC(O)R_B$ により終結してもよく、ここで、 R_A および R_B はそれぞれ、水素、 $C_1\sim C_6$ アルキル、 $C_2\sim C_6$ アルケニル、 $C_2\sim C_6$ アルキニル、シクロアルキル、ヘテロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルアリール、アリールアルキル、アルキルヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、およびアルキルヘテロアリールアルキルから独立に選択される。

10

【0175】

別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化22】



20

【0176】

の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

(a) Z_1 、 Z_2 および Z_3 は、各々独立にCHまたはNであり；

(b) Yは、 CH_2 、O、またはSであり；

(c) X_a 、 X_b 、 X_c および X_d は、CH、 CH_2 、O、N、NH、S、カルボニル、フルオロメチレン、および価数を満たすように選択されたジフルオロメチレンから独立に選択され、ここでX基へのそれぞれの結合は、単結合または二重結合のいずれかであり；

30

(d) X_2 は、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I または ^{131}I であり；

(e) X_4 は、水素またはハロゲンであり；

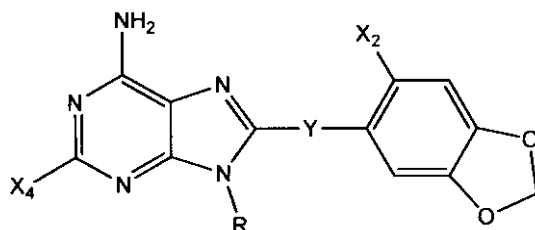
(f) Rは、 $-(CH_2)_m-N-R_{10}R_{11}R_{12}$ または $-(CH_2)_m-N-R_{10}R_{11}$ であり、ここで、mは2または3であり、 $R_{10}\sim R_{12}$ は水素、メチル、エチル、エテニル、エチニル、プロピル、ヒドロキシアルキル、イソプロピル、t-ブチル、イソブチル、シクロペンチル、窒素を含む3員環またはNおよび任意に、価数を満たすための置換基を有するさらなるヘテロ原子を含む6員環から独立に選択されるが、但し、 $R_{10}\sim R_{12}$ は全て、薬学的に許容される対抗イオンをさらに含む化合物を提供する。

40

【0177】

別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化 2 3】



【0178】

10

の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

Yは、CH₂またはSであり；

X₄は、Hまたはハロゲンであり；

X₂は、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵Iまたは¹³¹Iであり；

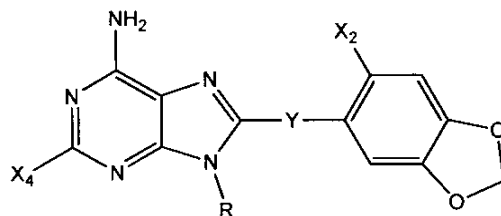
Rは、-(CH₂)_m-N-R₁₀R₁₁R₁₂または-(CH₂)_m-N-R₁₀R₁₁であり、ここで、mは2または3であり、R₁₀~R₁₂は水素、メチル、エチル、エテニル、エチニル、プロピル、ヒドロキシアルキル、イソプロピル、t-ブチル、イソブチル、シクロペンチル、窒素を含む3員環またはNおよび任意に、価数を満たすための置換基を有するさらなるヘテロ原子を含む6員環から独立に選択されるが、但し、R₁₀~R₁₂は全て、薬学的に許容される対抗イオンをさらに含む化合物を提供する。

20

【0179】

一態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化 2 4】



(1)

30

【0180】

の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

Yは、CH₂またはSであり；

X₄は、Hまたはハロゲンであり；

X₂は、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵Iまたは¹³¹Iであり；

Rは、2-エタンスルホン酸イソプロピルアミド、2-エタンスルホン酸エチルアミド、2-エタンスルホン酸メチルアミド、2-エタンスルホン酸アミド、2-エタンスルホン酸t-ブチルアミド、2-エタンスルホン酸イソブチルアミド、2-エタンスルホン酸シクロプロピルアミド、イソプロパンスルホン酸2-エチルアミド、エタンスルホン酸2-エチルアミド、N-2エチルメタンスルホンアミド、2-メチル-プロパン-2-スルホン酸2-エチルアミド、2-メチル-プロパン-2-スルフィニル酸2-エチルアミド、2-メチル-プロパン-1-スルホン酸2-エチルアミド、シクロプロパンスルホン酸2-エチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸イソプロピルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸エチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸メチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸アミド、3-プロパン-1-スルホン酸t-ブチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸イソブチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸シクロプロピルア

40

50

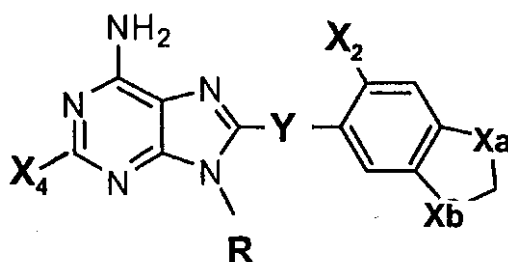
ミド、プロパン-2-スルホン酸3-プロピルアミド、エタンスルホン酸3-プロピルアミド、N-3-プロピルメタンスルホンアミド、2-メチル-プロパン-2-スルホン酸3-プロピルアミド、2-メチル-プロパン-2-スルフィン酸3-プロピルアミド、2-メチル-プロパン-1-スルホン酸3-プロピルアミド、シクロプロパンスルホン酸3-プロピルアミド、3-N-イソプロピルプロピオンアミド、3-N-エチルプロピオンアミド、3-N-メチルプロピオンアミド、3-プロピオンアミド、3-N-tert-ブチルプロピオンアミド、3-N-イソブチルプロピオンアミド、3-N-シクロプロピルプロピオンアミド、N-2-エチルイソブチルアミド、N-2-エチルプロピオンアミド、N-2-エチルアセトアミド、N-2-エチルホルムアミド、N-2-エチル2,2-ジメチル-プロピオンアミド、N-2-エチル3-メチルブチルアミド、またはシクロプロパンカルボン酸2-エチル-アミドである。

10

【0181】

別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化25】



20

【0182】

の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

XaおよびXbの一方はOであり、他方はCH₂であり；

Yは、CH₂またはSであり；

X₄は、Hまたはハロゲンであり；

X₂は、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵Iまたは¹³¹Iであり；

30

Rは、2-エタンスルホン酸イソプロピルアミド、2-エタンスルホン酸エチルアミド、2-エタンスルホン酸メチルアミド、2-エタンスルホン酸アミド、2-エタンスルホン酸tert-ブチルアミド、2-エタンスルホン酸イソブチルアミド、2-エタンスルホン酸シクロプロピルアミド、イソプロパンスルホン酸2-エチルアミド、エタンスルホン酸2-エチルアミド、N-2エチルメタンスルホンアミド、2-メチル-プロパン-2-スルホン酸2-エチルアミド、2-メチル-プロパン-2-スルフィン酸2-エチルアミド、2-メチル-プロパン-1-スルホン酸2-エチルアミド、シクロプロパンスルホン酸2-エチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸イソプロピルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸エチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸メチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸アミド、3-プロパン-1-スルホン酸tert-ブチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸イソブチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸シクロプロピルアミド、プロパン-2-スルホン酸3-プロピルアミド、エタンスルホン酸3-プロピルアミド、N-3-プロピルメタンスルホンアミド、2-メチル-プロパン-2-スルホン酸3-プロピルアミド、2-メチル-プロパン-2-スルフィン酸3-プロピルアミド、2-メチル-プロパン-1-スルホン酸3-プロピルアミド、シクロプロパンスルホン酸3-プロピルアミド、3-N-イソプロピルプロピオンアミド、3-N-エチルプロピオンアミド、3-N-メチルプロピオンアミド、3-プロピオンアミド、3-N-tert-ブチルプロピオンアミド、3-N-イソブチルプロピオンアミド、3-N-シクロプロピルプロピオンアミド、N-2-エチルイソブチルアミド、N-2-エチルプロピオンアミド、N-2-エチルアセタミド、N-2-エチルホルムアミド、N-2-エチル2,2-ジメチ

40

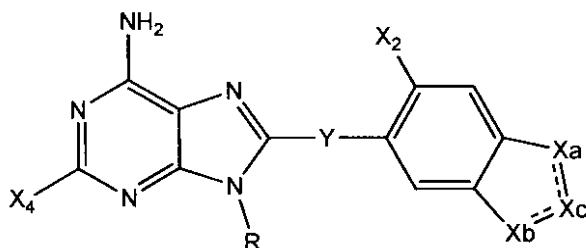
50

ループロピオンアミド、N-2-エチル2-メチルブチルアミド、またはシクロプロパンカルボン酸2-エチルアミドである。

【0183】

別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化26】



10

【0184】

の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

Xa-Xc-Xbは、CH₂-CH₂-CH₂、CH=CH-CH₂、またはCH₂-CH=CHであり；

Yは、CH₂またはSであり；

X₂は、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵Iまたは¹³¹Iであり；

20

Rは、2-エタンスルホン酸イソプロピルアミド、2-エタンスルホン酸エチルアミド、2-エタンスルホン酸メチルアミド、2-エタンスルホン酸アミド、2-エタンスルホン酸t-ブチルアミド、2-エタンスルホン酸イソブチルアミド、2-エタンスルホン酸シクロプロピルアミド、イソプロパンスルホン酸2-エチルアミド、エタンスルホン酸2-エチルアミド、N-2エチルメタンスルホンアミド、2-メチルプロパン-2-スルホン酸2-エチルアミド、2-メチルプロパン-1-スルホン酸2-エチルアミド、シクロプロパンスルホン酸2-エチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸イソプロピルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸エチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸メチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸アミド、3-プロパン-1-スルホン酸t-ブチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸イソブチルアミド、3-プロパン-1-スルホン酸シクロプロピルアミド、プロパン-2-スルホン酸3-プロピルアミド、エタンスルホン酸3-プロピルアミド、N-3-プロピルメタンスルホンアミド、2-メチルプロパン-2-スルホン酸3-プロピルアミド、2-メチルプロパン-2-スルフィン酸3-プロピルアミド、2-メチルプロパン-1-スルホン酸3-プロピルアミド、シクロプロパンスルホン酸3-プロピルアミド、3-N-イソプロピルプロピオンアミド、3-N-エチルプロピオンアミド、3-N-メチルプロピオンアミド、3-プロピオンアミド、3-N-t-ブチルプロピオンアミド、3-N-イソブチルプロピオンアミド、3-N-シクロプロピルプロピオンアミド、N-2-エチルイソブチルアミド、N-2-エチルプロピオンアミド、N-2-エチルアセタミド、N-2-エチルホルムアミド、N-2-エチル2,2-ジメチルプロピオンアミド、N-2-エチル2-メチルブチルアミド、またはシクロプロパンカルボン酸2-エチルアミドである。

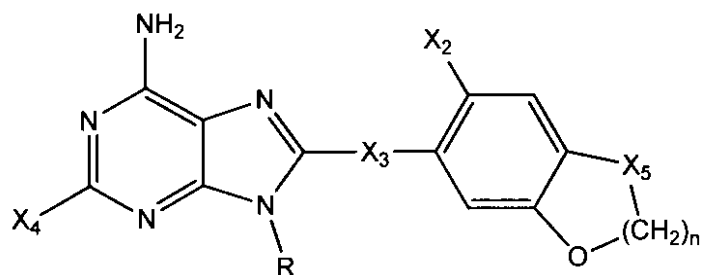
30

40

【0185】

別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化 2 7】



10

【0186】

の化合物またはその薬学的に許容される塩であり、式中、

X_3 は、 CH_2 、 CF_2 、S、SO、 SO_2 、O、NH、または NR^2 であり、ここで、 R^2 はアルキルであり；

X_2 は、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I または ^{131}I であり；

X_4 は、水素またはハロゲンであり；

X_5 は、Oまたは CH_2 であり；

Rは、3-イソプロピルアミノプロピル、3-(イソプロピル(メチル)アミノ)プロ
 ピル、3-(イソプロピル(エチル)アミノ)プロピル、3-((2-ヒドロキシエチル)
 (イソプロピル)アミノ)プロピル、3-(メチル(プロパー2-イニル)アミノ)プ
 ロピル、3-(アリル(メチル)アミノ)プロピル、3-(エチル(メチル)アミノ)プ
 ロピル、3-(シクロプロピル(プロピル)アミノ)プロピル、3-(シクロヘキシル(
 2-ヒドロキシエチル)アミノ)プロピル、3-(2-メチルアジリジン-1-イル)プ
 ロピル、3-(ピペリジン-1-イル)プロピル、3-(4-(2-ヒドロキシエチル)
 ピペラジン-1-イル)プロピル、3-モルホリノプロピル、3-(トリメチルアンモニ
 オ)プロピル、2-(イソプロピルアミノ)エチル、2-(イソブチルアミノ)エチル、
 2-(ネオペンチルアミノ)エチル、2-(シクロプロピルメチルアミノ)エチル、2-
 (エチル(メチル)アミノ)エチル、2-(イソブチル(メチル)アミノ)エチル、また
 は2-(メチル(プロパー2-イニル)アミノ)エチルであり；

20

30

nは1または2である。

【0187】

別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

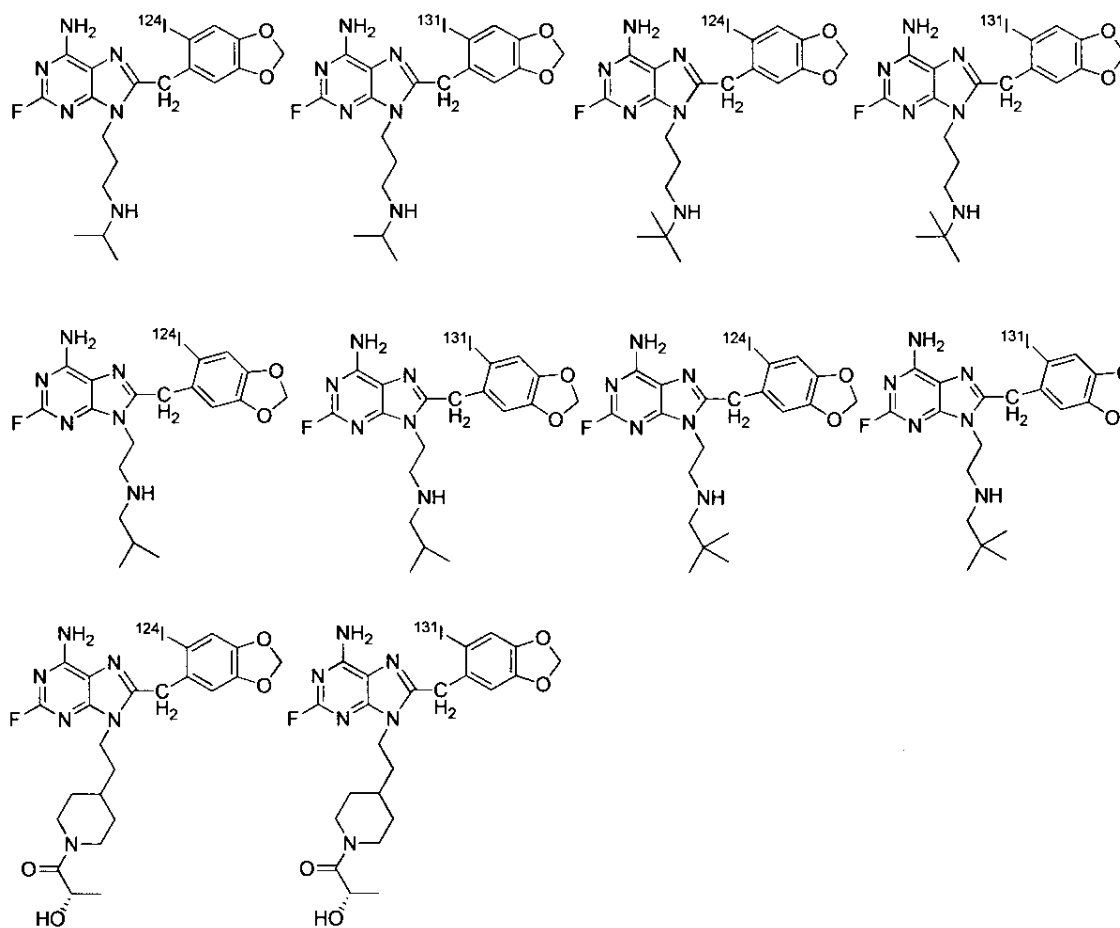
【 0 1 8 8 】

【 0 1 8 9 】

別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：



【化 2 9】



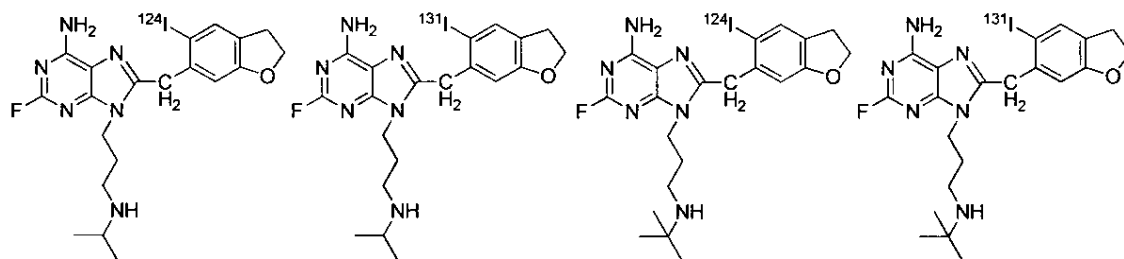
【0190】

を有する化合物から選択される。

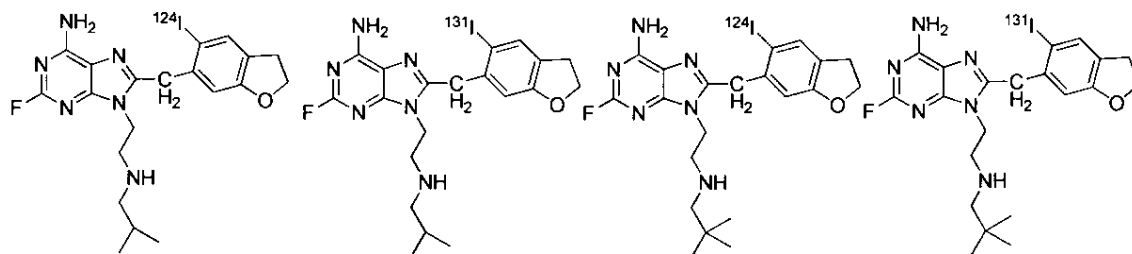
【0191】

さらに別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

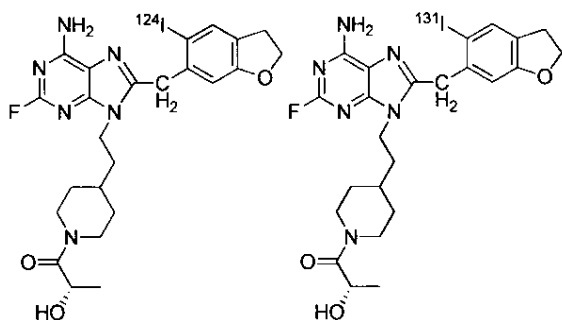
【化 3 0】



10



20



【0192】

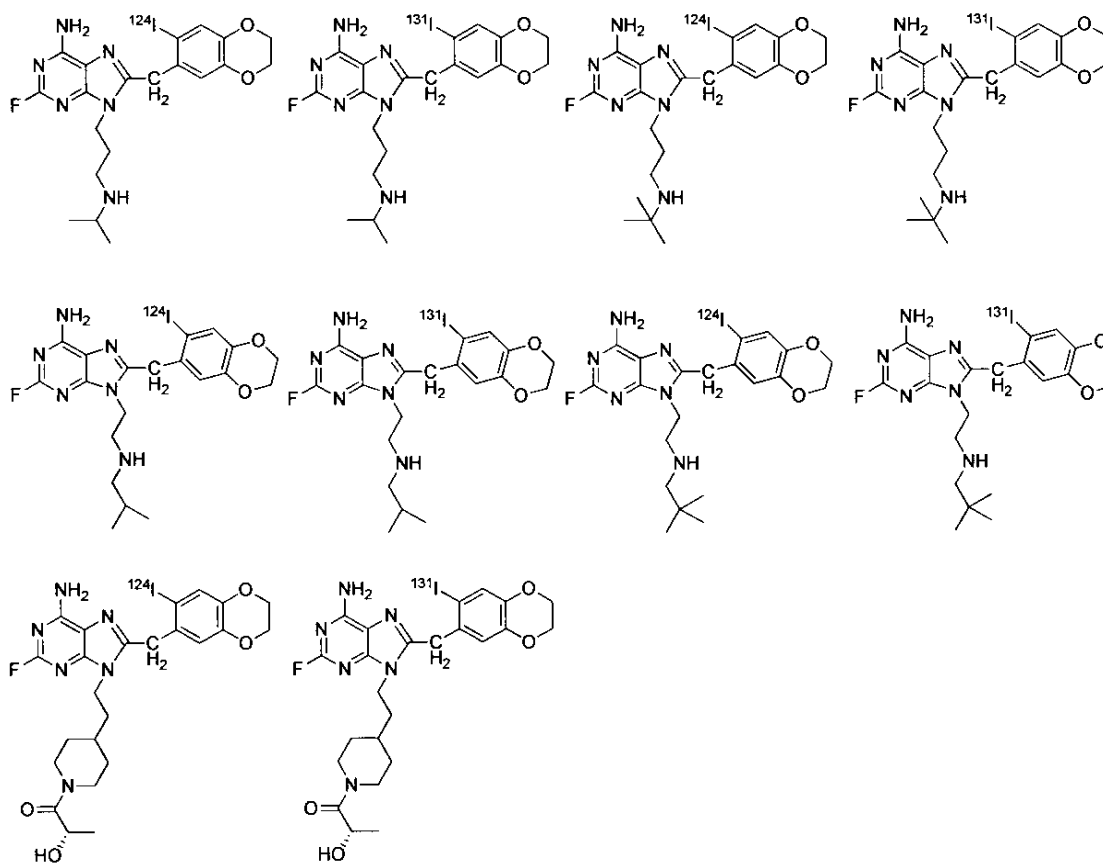
を有する化合物から選択される。

30

【0193】

さらに別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化 3 1】



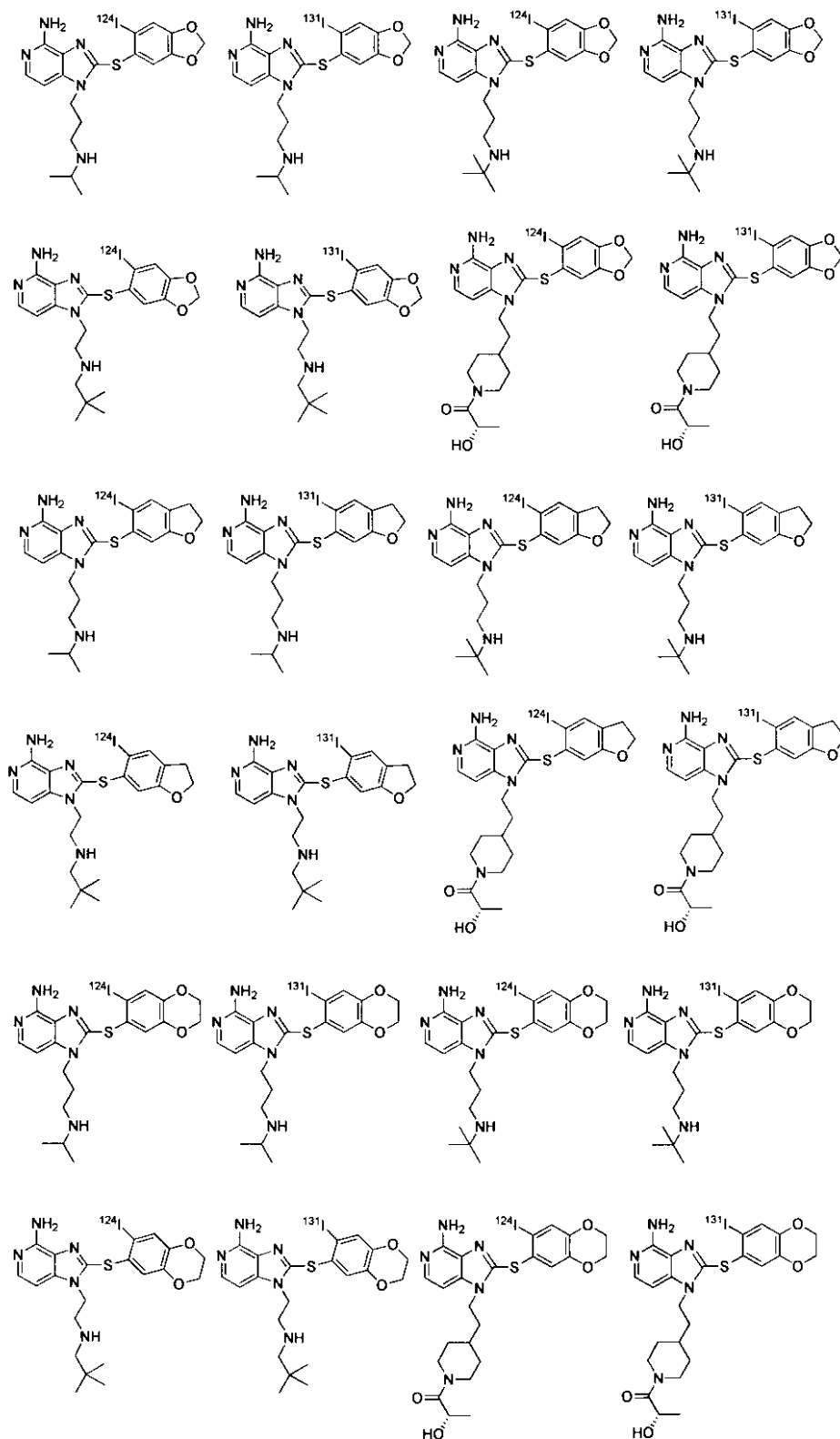
【0194】

を有する化合物から選択される。

【0195】

さらに別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化 3 2】



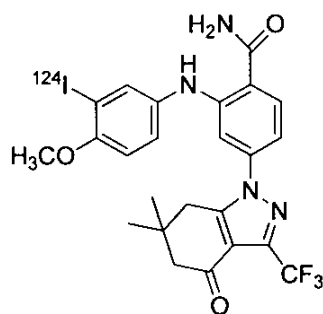
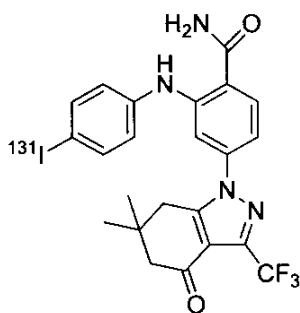
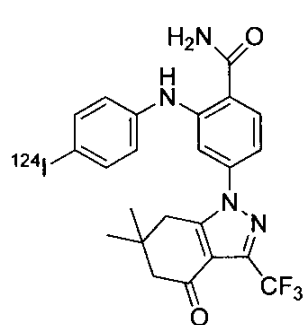
【0196】

を有する化合物から選択される。

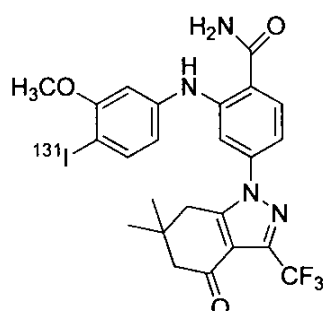
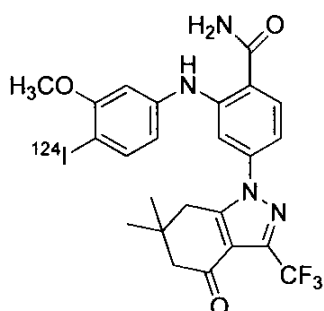
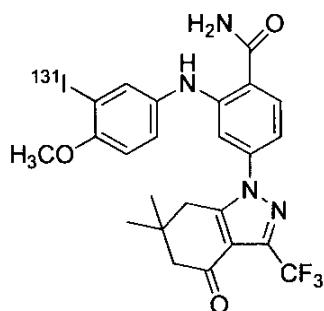
【0197】

さらに別の態様においては、放射標識プローブは、以下の式：

【化 3 3】



10



20

【0198】

を有する化合物から選択される。

【0199】

上記態様における放射性トレーサを合成する方法は、例えば、米国特許第7,834,181号、WO2011/044394、WO2008/005937およびPCT出願第PCT/US2012/032371号に見出すことができ、それらの内容は全て、その全体が参照によりここに組込まれる。放射標識プローブの特定例は、5.2.2.1.節および5.2.2.2.節に記載される。

30

【0200】

5.2.2.2. がん処置における放射標識プローブの利用

HSP90腫瘍種（「発がん性HSP90」）の発現を非侵襲的に測定し、HSP90に対する腫瘍の依存性を決定し、標的阻害を確認するために、がん細胞中の「発がん性HSP90」に選択的に結合するHSP90特異的阻害剤に基づくポジトロン放出断層撮影（PET）アッセイが用いられる。いくつかの説得力のある理由から、ポジトロン放出断層撮影（PET）は、個々の患者における腫瘍中の薬剤の薬物動態および保持を測定するのに非常に適している^{110~113}。PETは、他の形態の核画像化よりも高い解像度および感受性を有する定量方法である。それは非侵襲的三次元画像化を可能にし、体内でのその深さに関わらず、腫瘍および正常臓器中の投与された放射標識化合物の組織濃度（例えば、 μCi または1グラムあたりの注入用量の%（%ID））の信頼できる見積もりが得られる^{110~113}。したがって、PETは、空間的および時間的に分解された腫瘍取込み、濃度およびクリアランス、ならびにトレーサの全身分布を提供することができる。PETは必ずしも詳細な解剖学的情報を提供するとは限らないため、PETアッセイはCATスキャンと組み合わせられることが多い。CATスキャンは、身体の構造解剖学の包括的表示を提供する。PETスキャン像をCATスキャンの上に重ねて、放射標識された阻害剤が体内のどこに行くかを正確に決定することができる。PETスキャンとCATスキャンの組み合わせの使用は、ここではPET/CTと呼ばれる。

40

【0201】

50

PET以外の検出および定量方法を用いてもよい。一態様において、SPECT画像化（単一光子放射断層撮影）トレーサ、例えば、ヨウ素131、ヨウ素123、およびヨウ素125を用いることができる。特定の態様においては、 $^{131}\text{I}-\text{PU}-\text{H}71$ 、 $^{123}\text{I}-\text{PU}-\text{H}71$ または $^{125}\text{I}-\text{PU}-\text{H}7$ を、SPECT画像化のための放射標識阻害剤として用いることができる。

【0202】

本開示の方法は、画像化してもよい任意の腫瘍に適用可能であり、固形および液性腫瘍またはリンパ腫に対して最も明確な適用性がある。そのような腫瘍の例は、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄増殖性新生物ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択されるがん、特に、乳がん、胃がん、または膵臓がんに関連するものである。以下に考察されるように、本発明者らは、放射標識されたHSP90阻害剤（例えば、 $^{124}\text{I}-\text{PU}-\text{H}71$ ）への腫瘍の取込みおよび曝露が、HSP90療法に対する応答を予測し、PU-H71または他のHSP90療法に対する好ましいか、または好ましくない治療応答のいずれかを有する可能性がある患者を区別する様式で変化することを示す。具体的には、放射標識されたHSP90阻害剤（例えば、 $^{124}\text{I}-\text{PU}-\text{H}71$ ）の最小の取込みおよび／または迅速なクリアランスを示す腫瘍は、PU-H71または他のHSP90阻害剤に対して接近できないか、または耐性であってよい。あるいは、そのような腫瘍は、生存のためにHSP90に依存しなくてもよく（すなわち、「低存在量の発がん性HSP90」）、HSP90療法を不適切なものにする。逆に、放射標識されたHSP90阻害剤の高い取込みおよび長い保持を有する腫瘍（例えば、より後の時点での高い腫瘍と血液との比または0～24もしくは48時間以上の間隔に関する高い腫瘍AUC）は、HSP90阻害剤による標的化に対してより感受性が高いと予測される。PETにより予測されるような、有効腫瘍内濃度を達成するのに必要とされる治療用量およびスケジュールが非常に高い毒性をもたらす場合（例えば、有効用量が最大許容用量（MTD）よりも高いか、または15～100%の「発がん性HSP90」がMTDよりも高い用量によってのみ占められる場合）、患者の選択をさらに指導することができる。

【0203】

放射標識された阻害剤の取込みにより測定された場合のHSP90発がん性複合体（すなわち、「発がん性HSP90」）の存在量は、HSP90阻害に対する腫瘍の感受性を反映する。かくして、本開示の一側面によれば、腫瘍中の「発がん性HSP90」の存在量は、HSP90阻害に対する応答のバイオマーカーとして用いられる。上記で考察された通り、PETは、腫瘍および正常臓器中に放射標識化合物の組織濃度の非侵襲的な信頼できる見積もりを可能にする。かくして、 $^{124}\text{I}-\text{PU}-\text{H}71$ およびHSP90発がん種に優先的に結合する他のHSP90阻害剤を用いて、蛍光標識されたPU-H71の上記の使用と同様、「発がん性複合体HSP90」の定量を可能にする特徴である、その腫瘍取込みを非侵襲的に測定することができる。かくして、放射標識された阻害剤の高い腫瘍取込みは、HSP90阻害剤に応答する可能性が最も高い腫瘍を有する患者を同定する。腫瘍中のPU-H71トレーサ蓄積は、当業者には公知の技術を用いてPET像から定量される。PU-H71トレーサの腫瘍蓄積は、単一の時点または複数の時点での腫瘍トレーサ濃度の分析から定量することができる。トレーサ濃度とは、特定の体積の組織中に存在するトレーサの量を指す。当業者には広く公知のトレーサ濃度の表現のための様々な数学的形式が存在する。トレーサ量および／または組織体積をそれぞれ、参照値の分数として表してもよい。例えば、一般的に用いられる標準化された取込み値、SUVは、トレーサ量を、患者に投与された総トレーサ用量の分数として表したものであり；組織体積を、身体の参照値（例えば、体重または体表面積）の分数として表したものである。

【0204】

本開示において、本発明者らは、がん患者が「発がん性HSP90」に選択的に結合する放射標識された阻害剤に対する可変的「アビディティ」（取込みおよび保持）を示すことを示す。類似する種類およびステージのがんを有するがん患者は、放射標識された阻害剤の実質的に異なる取込みを有してもよく、これはがん細胞の生存および増殖におけるHSP90の改善のレベルが異なることを示す。一例として、12人の乳がん患者を、24時間後の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の取込みについて評価した。これらの研究の結果を、図24に示す。グラフ上の各バーは、PETにより決定された、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の最大標準化取込み値（ SUV_{max} ）を示す。 SUV_{max} は、患者間で有意に変化し、これは患者の腫瘍中の「発がん性HSP90」の量が異なることを示す。より高い SUV_{max} 値を有する患者は、HSP90阻害療法に対して応答する可能性がより高い。例えば、放射性トレーサの投与の24時間後に測定した場合、約0.25以上の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の SUV_{max} を有する患者は、HSP90阻害療法のための潜在的な候補である。化合物の投与の24時間後に測定した場合に約0.75以上の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の SUV_{max} を有する患者は、HSP90阻害療法のための強力な候補である。化合物の投与の24時間後に測定した場合に約1.5以上の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の SUV_{max} を有する患者は、HSP90阻害療法のための非常に強力な候補である。

10

【0205】

がん患者が特定のHSP90阻害剤（すなわち、「発がん性HSP90」に優先的に結合するもの）に対する可変的アビディティを示すという本発明者らの知見に基づいて、放射標識されたHSP90阻害剤を用いて、HSP90阻害療法に応答する可能性がある患者を、応答する可能性がない患者から区別することができる。したがって、本開示は、腫瘍がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、腫瘍または腫瘍に由来する細胞を含有する試料を、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する検出可能に標識されたHSP90阻害剤と接触させること、腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を測定すること、および腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を、参照量と比較することを含む方法を提供する。腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量が参照量と比較して多い場合、腫瘍がHSP90阻害剤に応答する可能性があることを示す。

20

30

【0206】

腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量の測定を、いくつかの異なる方法で行ってもよい。例えば、一態様においては、上記で考察された通り、放射標識された化合物の SUV_{max} （または SUV_{avg} ）を、特定の時点で算出する。例えば、 SUV を、放射標識された阻害剤の投与後4時間以上の時点で算出してもよい。いくつかの態様においては、 SUV を、放射標識された阻害剤の投与後8時間以上の時点で算出してもよい。特定の態様においては、 SUV を、放射標識された阻害剤の投与後16時間以上の時点で算出してもよい（例えば、16時間、20時間、24時間、48時間、72時間、192時間）。 SUV を、2つの前記値のいずれかを境界とする範囲で、例えば、8時間～16時間、16時間～24時間、16時間～48時間などの範囲の時点で算出してもよい。

40

【0207】

SUV を、正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の参照量と比較してもよい。一態様においては、参照 SUV は、特定の時点で、健康な個体から、または対照集団中のがん患者の正常細胞および組織上での測定値から取られた平均レベルであってもよい。5.1節で考察された通り、正常細胞は、最少の「発がん性HSP90」を有するか、またはそれを有さない。したがって、健康な個体の細胞またはがん患者の健康な組織もしくは臓器中の「発がん性HSP90」に特異的な放射標識された阻害剤の取込みは最少である。標識された阻害剤が血液循環を消失した時点での測定が好ましいことが当業者によって理解される。また、測定を任意の正常組織中で実施することができるが、標識された阻

50

害剤の代謝およびクリアランスに関与しないものが好ましいことも、当業者によって理解される。一態様においては、そのような好ましい測定は、骨格筋、骨または心臓血液プールから選択される1つ以上の領域に由来する。

【0208】

別の態様においては、患者の腫瘍中での放射標識された阻害剤の最大取込み（すなわち、 SUV_{max} ）（ここでは「腫瘍SUV」と呼ぶ）を、患者の健康な細胞中での放射標識された阻害剤の取込みと比較してもよい。例えば、一態様においては、特定の時点で取られた患者の腫瘍からのSUVデータを、血液または患者の骨もしくは筋肉に由来する選択された領域からのSUVと比較してもよい。用語「血液SUV」とは、PETアッセイから誘導された心臓の内容物の平均SUVを指す。用語「筋肉SUV」とは、PETアッセイから誘導された患者の骨格筋組織の平均SUVを指す。心臓および骨格筋組織は腫瘍部位を取り囲む「バックグラウンド」活性を代表するため、それらを選択した。

10

【0209】

患者の選択および処置のためのPETアッセイの使用

本発明者らは、HSP90に依存する腫瘍を有する患者において、PETから誘導される腫瘍：筋肉および腫瘍：血液SUV比が、「発がん性HSP90」に特異的に結合する放射標識された阻害剤（例えば、 $[^{124}I]-PU-H71$ ）の注入後、時間依存的様式で増加することを見出した。これらの患者において、腫瘍：筋肉および腫瘍：血液SUV比は一般的に、放射標識された阻害剤の注入後1：1に近づき、その比は時間と共に増加する。HSP90阻害療法に応答する様々な種類の固形腫瘍および液性腫瘍を有する選択された数の患者に関するPETから誘導されるデータを、図25に示す。それぞれの患者について、 $[^{124}I]-PU-H71$ の投与後の複数の時点で、最大腫瘍SUV（ SUV_{max} ）および平均筋肉SUVを、PETアッセイから取得した。図25は、がん患者に関する平均腫瘍：筋肉SUV比および標準偏差値を示す。腫瘍：筋肉SUV比は、0～48時間増加する。

20

【0210】

固形腫瘍に加えて、その方法により、PU-PETにより画像化できる巨大脾腫を提示した、辺縁帯リンパ腫およびステージIVの慢性リンパ球性白血病と診断された患者の場合と同様、液性腫瘍の画像化が可能になった。

【0211】

このデータの蓄積に基づいて、本発明者らは、「発がん性HSP90」に特異的に結合するHSP90阻害剤の投与後に2を超える腫瘍：筋肉SUVおよび／または腫瘍：血液SUV比を有するがん患者は、HSP90阻害療法に応答する可能性があることと決定した。この比は、好ましくは、放射標識された阻害剤の投与の4時間を超えた後の1つ以上の時点で算出される。例えば、比を、放射標識された阻害剤の投与後8時間、16時間、24時間または48時間の時点で算出してもよい。特定の態様においては、放射標識された阻害剤の投与後24時間の時点での腫瘍：筋肉または腫瘍：血液SUV比が2.5以上である場合、患者がHSP90阻害療法に応答する可能性があることを示す。他の態様においては、放射標識された阻害剤の投与後24時間の時点での腫瘍：筋肉または腫瘍：血液SUV比が4以上である場合、患者がHSP90阻害療法に応答する可能性があることを示す。さらに他の態様においては、放射標識された阻害剤の投与後24時間の時点での腫瘍：筋肉または腫瘍：血液SUV比が5以上である場合、患者がHSP90阻害療法に応答する可能性があることを示す。これらの態様においては、腫瘍におけるSUVは SUV_{max} であり、筋肉または血液におけるSUVは平均SUV（すなわち、 SUV_{avg} ）である。

30

40

【0212】

別の態様においては、腫瘍中で得られたPET画像を、患者の健康な（すなわち、非がん性）組織と比較する。好ましくは、この態様においては、参照PETスキャンを、腫瘍と同じ臓器中で取得する。例えば、患者が脊椎中に腫瘍を有する場合、脊椎腫瘍を正常脊椎骨と比較する。腫瘍がHSP90に依存する場合、健康な組織よりも腫瘍中により高濃度の放射標識された阻害剤が見出される。放射標識された阻害剤の量を、PETスキャン

50

を用いて定量的に決定することができる。腫瘍のSUV値を、放射標識された阻害剤の注入後の特定の時点で、または複数の時点で、健康な周囲の組織のSUVと比較することができる。あるいは、腫瘍に由来するPET画像と健康な組織に由来するPET画像とを、目視検査により比較することができる。腫瘍が放射標識された阻害剤を保持する場合、PET像上で視覚的に、腫瘍は「点灯」し、「ホットスポット」のように見える（例えば、図26および図27を参照されたい）。

【0213】

本発明者らは、放射標識された阻害剤の投与後の特定の時点での「ホットスポット」または「複数のホットスポット」の存在が、患者のがんにおけるHSP90の関与を包含し、患者がHSP90阻害療法を受け入れられるとの示唆を提供することを決定した。PET像におけるホットスポットの存在は、好ましくは放射標識された阻害剤の投与後少なくとも1.5時間の時点で決定される。例えば、ホットスポットを、放射標識された阻害剤の投与後2時間、4時間、6時間、8時間、16時間、24時間、48時間、72時間、165時間または192時間で検出してもよい。ホットスポットの存在を、2つの上記値のいずれかを境界とする範囲の範囲の間で、例えば、2時間～4時間、4時間～8時間、16時間～24時間などの範囲の範囲の範囲で検出してもよい。2時間未満の時点での患者の腫瘍中のホットスポットの存在が、必ずしも、患者がHSP90阻害療法のための良好な候補であることを示すとは限らない。例えば、図26（右パネル）は、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ 注入の30分後に取得されたマントル細胞リンパ腫を有する患者の $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ PET/CTを示す。PETスキャンは、30分後に明確な可視化を示す。しかしながら、より後の時点（3.5～24時間）では、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ の取込みは観察されなかった。したがって、患者は、HSP90療法のための相応しい候補ではない。

【0214】

また、本開示のPETアッセイを用いて、どの転移性または原発性固形腫瘍および液性腫瘍がHSP90阻害療法により感受性があるかを決定してもよい。例えば、図27は、2つの示されたリンパ節（LN）における再発乳がんを有する患者の $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ PET/CTを示す。 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ 注入後の示された時点でのPET画像を定量し、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ に関して得られたSUVデータを、 $10\text{ mg}/\text{m}^2$ のPU-H71の仮定された投与用量あたりのHSP90阻害剤濃度に変換した。0～24時間の時間にわたるPU-H71への2つの腫瘍の曝露も算出し、曲線下面積（AUC）として表した。図27の下側パネルにおいて、CT（左）、PU-PET/CT（中央）、およびFDG-PET/CT融合物（右）横断画像は、一方のリンパ節においては $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ アビディティを示したが、他方においては示さなかった。PU-PET画像は、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ 注入後24時間でのものである。興味深いことに、PU-アビディティはこの事例においては、FDG-アビディティと重複しない。これは珍しい事例ではなく、分析された患者のいくらかにおいては、FDG-およびPU-アビディティは、全てではないが、いくつかの腫瘍について相関した。腫瘍の位置は矢印で示される。 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ 注入後の示された時点でのPET画像を、最大標準化取込み値（ SUV_{max} ）として測定した。PETアッセイからの結果は、左気管気管支角リンパ節は、左気管気管支前角リンパ節の病変よりもHSP90阻害療法に感受性があると予想されることを示す。

【0215】

本発明の別の側面においては、HSP90療法のための候補であると同定された患者を、薬学的に有効な量のHSP90阻害剤で処置する。本発明者らは、HSP90阻害療法に対する候補であると決定されたがん患者がHSP90阻害療法に非常に好ましく応答すると決定した。患者が複数の腫瘍を有する場合、放射標識されたHSP90阻害剤に対する十分なアビディティを有するこれらの腫瘍だけが、HSP90阻害療法に応答すると予想される。例えば、図28は、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ PETを用いて画像化され、次いで、HSP90阻害剤で処置された、肺および骨転移を有する48歳の乳がん患者に

ついて観察された画像を示す。具体的には、患者を $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETを用いて画像化した場合、スキャンは、脊椎転移ではなく、主要な右肺転移においてHSP90標的化を示した。患者がPU-H71とは化学的に異なるHSP90阻害剤であるSTA9090（ガネテスピブ）を用いるHSP90療法を続けた場合、初期部分応答は脊椎病変ではなく肺腫瘍中でのFDG PET-CT研究により示され（図28）、これは $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETによる予測と一致していた。リンパ腫、膵臓がんを有する患者および神経芽細胞腫患者においても同様の結果が得られた。

【0216】

用量決定のためのPETアッセイの使用

本開示は、HSP90の阻害剤を用いる療法の有効用量および投与頻度を決定する方法であって、患者に、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する放射標識された形態のHSP90阻害剤を投与すること、1つ以上の時点での患者の腫瘍による放射標識された形態のHSP90阻害剤の取込みを測定すること、ならびにそれぞれの時点で腫瘍を処置するのに有効なHSP90阻害剤の濃度を腫瘍中で維持するのに必要とされる用量および投与頻度を算出することを含む方法を提供する。放射標識された形態のHSP90阻害剤の取込みを、上記で考察されたようなPETアッセイを用いて決定することができる。この方法を、限定されるものではないが、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、白血病、骨髄腫および骨髄増殖性新生物ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんなどのいくつかの種類の固形および液性腫瘍に適用することができる。

【0217】

本開示の一態様においては、PETから誘導された放射標識された阻害剤のSUVを、以下の式：

【数1】

$$[\text{HSP90 阻害剤腫瘍}]_t = \text{HSP90 阻害剤(用量)} \times \frac{[A_{\text{腫瘍}}]_t}{100\%} \times \frac{1}{W} \times \frac{1}{MW}$$

【0218】

に従って、腫瘍中の薬剤のモル濃度に変換することができる。

【0219】

上記の式において、 $[\text{HSP90 阻害剤}]_t$ は、放射標識された阻害剤の注入後の時間 t での腫瘍中の阻害剤のモル濃度である。HSP90阻害剤（用量）の項は、注入される治療用量である。W項は、腫瘍水分容積である。MW項は、注入される薬剤の分子量である。 $[A_{\text{腫瘍}}]_t$ 項は、時間 t での腫瘍中の注入された放射標識された用量%であり、これはPET画像から得られるSUVから得られる値である。具体的には、 $[A_{\text{腫瘍}}]$ 項は、以下の式：

$$[A_{\text{腫瘍}}] / 100\% = \text{SUV}_{\text{腫瘍}} / [\text{体重 (g)}]$$

により腫瘍（ SUV_{max} ）中のSUVから誘導することができる。上記の式において、 $[\text{体重}]$ は、患者の体重を指す。

【0220】

一側面において、本開示は、がん患者における画像化できる腫瘍中に存在するHSP90阻害剤の濃度を決定するための方法を提供する。放射標識された阻害剤の溶液（ここでは「ホット」薬剤とも呼ばれる）を、薬剤を同時に注入することなく患者に注入することができる（すなわち、非放射標識された形態の薬剤、ここでは「コールド」薬剤とも呼ば

れる)。そのような場合、薬剤〔H S P 9 0 阻害剤_{腫瘍}〕 t の濃度を、上記の式を用いて決定することができる。一態様においては、放射標識された阻害剤（「ホット薬剤」）は、標識された形態の注入される薬剤（「コールド薬剤」）である。例えば、放射標識された阻害剤は $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ であってもよく、投与される薬剤は $\text{PU} - \text{H}71$ であってもよい。別の態様においては、放射標識された阻害剤は、注入される薬剤とは異なっている。腫瘍〔H S P 9 0 阻害剤_{腫瘍}〕 t 中の薬剤の濃度の決定は、放射標識された阻害剤および治療剤の注入後の単一の時点または複数の時点で決定することができる。腫瘍〔H S P 9 0 阻害剤_{腫瘍}〕 t 中の薬剤の濃度を、前臨床試験から得られた既知の有効用量（例えば、半数阻害濃度（ IC_{50} ））と比較することにより、当業者は投与される用量が有効であるかどうかを決定することができる。次いで、医師はそれに従って用量を調整し、望ましい量の薬剤が腫瘍中に入ることを確保することができる。

10

【0221】

放射標識された阻害剤が、患者に投与される放射標識された形態の薬剤である態様においては、腫瘍〔H S P 9 0 阻害剤_{腫瘍}〕 t 中の薬剤の濃度を、コールド薬剤を実際に投与することなく決定することができる。そのような場合、PETアッセイからの〔A_{腫瘍}〕 t の決定後、様々な仮定された注入用量値（ D ）を上記の式中で代入（impute）して、腫瘍〔H S P 9 0 阻害剤_{腫瘍}〕 t 中の薬剤の濃度を決定することができる。したがって、腫瘍〔H S P 9 0 阻害剤_{腫瘍}〕 t 中の薬剤の濃度を、上記で考察されたように前臨床試験から得られた既知の有効用量と比較することにより、有効用量を決定することができる。さらに、5. 2. 1. 2. 1. 節で詳細に考察されたように、その方法を用いて、H S P 9 0 療法のための有効な投与レジメンを設計することができる。

20

【0222】

本発明者らは、ホット薬剤の投与の直後の腫瘍内濃度または薬剤曝露（例えば、 AUC ）の算出およびH S P 9 0 阻害剤の仮定量の入力により、コールドおよびホット薬剤が同時投与される実験と同様の結果が得られると決定した。一例として、図29は、2つの方法により得られた画像の経時的な（0～72時間）疾患気管傍リンパ節中の $\text{PU} - \text{H}71$ の濃度を示す。この2つの方法により、顕著に類似する腫瘍内濃度およびかくして $\text{PU} - \text{H}71$ への腫瘍曝露が測定される（ $\text{AUC}_{0 \sim 48\text{h}} 24.9$ 対 $22.3 \mu\text{M} \cdot \text{h}$ ）。

【0223】

本開示はまた、腫瘍中で発がん性H S P 9 0 受容体を飽和させるのに必要とされるH S P 9 0 阻害剤の用量を決定する方法も提供する。上記の通り、放射標識されたH S P 9 0 阻害剤（すなわち、ホット薬剤）と特定量の治療剤（すなわち、コールド薬剤）の同時注入により、PETアッセイを行うことができる。注入される薬剤の用量が腫瘍中の「発がん性H S P 9 0」の多くまたは全部を占拠するのに十分に高い場合、放射標識された阻害剤の取込みは抑制される。放射標識された阻害剤の取込みが抑制される点を用いて、阻害剤の標的飽和用量を決定することができ、これは単回用量の薬剤が送達することができる「最大腫瘍用量」または薬剤の最大有効単回用量でもある。以下の5. 2. 2. 2. 1. 節の式（4）に示されるように、H S P 9 0 阻害剤により占拠される腫瘍部位の数を算出し、占拠率（％）に変換することができる。H S P 9 0 阻害剤がH S P 9 0 部位の完全な占拠に近い量で送達される場合、さらなる薬剤は効果レベルの増加を提供すると予想されない。したがって、その方法は、腫瘍中の発がん性H S P 9 0 の多くまたは全部を占拠することができる阻害剤の用量を決定する手段を提供する。5. 2. 2. 2. 1. 節により詳細に考察されるように、上記方法は、従来の最大許容用量（ MTD ）よりもむしろ、PET由来最大有効腫瘍内濃度に基づくより合理的で有効な投与戦略を提供する。この手法は用量の上昇を回避し、薬剤に伴う毒性の問題を制限する。

30

40

【0224】

5. 2. 2. 2. 1. $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$

本開示の一側面において、PET画像化のために用いられる放射標識されたH S P 9 0 阻害剤は、放射標識された形態の $\text{PU} - \text{H}71$ 、例えば、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ である。以下に考察されるように、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ を用いるPET画像化を用いて

50

、がん患者がHSP90療法に対して感受性であるかどうかを医師に知らせることができる。さらに、 $[^{124}\text{I}]$ －PU－H71を用いるPET画像化から得られた結果を用いて、特定のがん患者に投与すべきHSP90阻害剤の用量を決定することができる。さらに、 $[^{124}\text{I}]$ －PU－H71を用いるPET画像化から得られた結果を用いて、HSP90阻害剤の投与スケジュールを決定することができる。療法として投与されるHSP90阻害剤は、PU－H71またはPU－H71の類似体、相同体、もしくは誘導体である。

【0225】

潜在的な非侵襲的腫瘍HSP90アッセイとしての $[^{124}\text{I}]$ －PU－H71 PETアッセイ

HSP90阻害剤の1つであるPU－H71が内因性のヨウ素原子、天然の安定なアイソトープであるヨウ素－127 (^{127}I) を含有するため、HSP90阻害剤の非侵襲的アッセイへのPETの導入が実現可能である(図30a)¹¹⁴。これをPETのために、4日の物理的半減期を有するアイソトープである、長半減期ポジトロン放射体ヨウ素－124 (^{124}I) とアイソトープ置換することができる(図30a)。そのようなアイソトープ標識は、この化合物の親和性、選択性または生体内分布プロファイルを変化させない。事実、PET放射性医薬品、 $[^{124}\text{I}]$ －PU－H71は治療化合物、PU－H71と同じ分子であり、したがって、その薬物動態を予測するはずである。微量(マイクログラム)の放射標識された薬剤の単回投与もまた、生物学的に完全に非摂動的であり、複数の日数にわたって組織トレーサ濃度をモニタリングするための連続PET画像化を可能にする。

【0226】

^{124}I の相対的に長い半減期は、それが投与後最大で1週間にわたる十分な定量的PET画像化を可能にするため、HSP90阻害剤の報告された長い腫瘍薬物動態をモニタリングするのに理想的である。さらに、 ^{124}I は米国では現在市販されており、その半減期は $[^{124}\text{I}]$ －PU－H71を世界中の医療センターで利用できるようにすることを確保する。

【0227】

したがって、 $[^{124}\text{I}]$ －PU－H71は、PU－H71の真の「トレーサ」として、および他のHSP90阻害剤のための標的バイオマーカーとしての使用にとって非常に適している。

【0228】

HSP90阻害剤は、有望なクラスの標的化がん療法であるが、その最適な臨床開発には、HSP90標的に特異的な薬効評価アッセイの同時開発が必要である。その内因性ヨウ素のため、本発明者らは、ポジトロン放射断層撮影に基づく腫瘍HSP90の今までに類を見ない非侵襲的な画像化アッセイを開発するためにHSP90阻害剤PU－H71を使用する。本発明者らは、乳がんのマウスモデルにおいて、 $[^{124}\text{I}]$ －PU－H71が親薬剤の腫瘍内薬物動態および薬力学のための真のトレーサであることを示す。本発明者らは、有効な腫瘍内濃度を達成するのに必要とされるHSP90阻害剤の用量の決定、腫瘍に送達される薬剤の実際の濃度のアッセイならびに有効な用量およびスケジュールレジメンの設計におけるその使用を証明する。アッセイはまた、腫瘍標的飽和用量に関する情報を提供し、従来の最大許容用量を超えてHSP90療法を誘導するのを約束する。この研究に基づいて、本発明者らは、このアッセイが、治験の充実化(trial enrichment)のため、ならびに個々の患者に対する薬剤用量およびスケジュールを調整する改善された能力を医師に提供することを提唱し、満たされない臨床必要性を満たし、HSP90標的剤を用いる臨床決定の作製に正に影響することを約束する。

【0229】

$[^{124}\text{I}]$ －PU－H71の生体内分布およびクリアランスはPU－H71のものを反映する

PU－H71および他のHSP90阻害剤のin vivoでの動態プロファイルの予測およびモニタリングにおける $[^{124}\text{I}]$ －PU－H71の使用を評価するために、本発

明者らは、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ を生成し、腫瘍担持マウス（ヒト乳がんMDA-MB-468異種移植片）の連続小動物PET画像化研究を実施し、腫瘍および様々な正常組織に関する時間-活性（すなわち、 $\% \text{ID} / \text{g}$ 対投与後の時間）曲線を誘導した。注入後の選択された時間に動物のコホートを犠牲にし、腫瘍および選択された正常組織を収獲し、ガンマ計測することにより、 $[^{131}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ または $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ の協働的生体内分布試験を実施した（図30b～c）。静脈内（i. v.）または腹腔内（i. p.）投与の後、薬剤は組織に迅速に分布し（図30b；1～2時間）、その後血液および他の正常組織から速やかに消失した（図30b；4～100時間）。投与後（p. a.）後4時間で、それは、それぞれ、脳、骨、筋肉、脾臓および心臓中よりも腫瘍中に40倍、9倍、18倍、6倍および10倍高い濃度で存在していた（図30c）。24時間までに、腫瘍と正常組織との比は、脳、筋肉、脾臓、心臓および血液について50～100に増加した。小さい方（体積約100mm³）と大きい方（体積約200mm³）の両方の腫瘍における取込み（ $\% \text{ID} / \text{g}$ ）は類似していた（図30d）。

【0230】

$[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ は双指数関数様式で腫瘍から消失した（図30d）。血液による活性のクリアランスに帰する初期の急性期（図30b、d）の後、特異的腫瘍保持に帰する遅い最終クリアランス期（半減期約60時間）があり（図30d、差込み図）、これは、 $\text{PU} - \text{H}71$ に関する以前に報告された直列液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS/MS）に基づく腫瘍薬物動態データと一致していた^{100、115～118}。これらのデータは、腫瘍内で、治療型および放射性トレーサ型の薬剤が同一に挙動するという概念を支持する。

【0231】

腫瘍と対照的に、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ は単一指数関数様式で全身から迅速に消失し、血漿タンパク質結合の証拠はなかった（図30b～d）。肝胆汁経路および泌尿器経路により、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ の排出が起きた（図30b）。肝臓活性は全身活性よりもゆっくりと消失し、これはおそらく、肝臓薬剤代謝および肝胆汁性排出に起因するものであった。肝臓領域における活性は、肝細胞中の $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ ではなく、胆道系中の無傷のトレーサと代謝物の両方に相当する可能性があり、これは無傷の $\text{PU} - \text{H}71$ がマウス肝臓から迅速に消失するという以前に報告された知見^{100、117}と一致する。胃腸管における活性は、投与された活性の50%以上を占めていた（図30b）が、活性はほぼ完全に排出された（示さず）。

【0232】

非胃腸管および非尿生殖器（すなわち、腎臓、尿管および膀胱）における活性は、投与された活性の約1%を占めていた。残りの49%（胃腸臓器における50%-尿生殖器における1%）は、おそらく尿管を介して排出された。この観察は、マウス全体を囲み、投与された活性の40～50%のみを占める対象領域（ROI）を用いて誘導される4時間のin vivoでの $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ PETデータ（図30b）により支持される。マウスにおける腸管輸送時間は通常4時間より長いため119、投与された活性の平衡（すなわち、4時間の全身ROI中になく40～50%）は尿管を介して排出されたと考えられる。

【0233】

マウスが放射性トレーサの投与前に飽和用量のヨウ化カリウムを受けた場合に抑制される甲状腺領域中で放射活性を可視化したところ（図30b）、in vivoで遊離放射性ヨード（すなわち、放射性ヨウ素）の生成が示された。ヨウ化カリウムを受けなかったマウスにおいては、注入後4～28時間の最大甲状腺活性は、投与された活性の0.4%未満であった。正常なマウスの甲状腺は、投与された放射性ヨードの最大約4～7%を蓄積する^{120、121}。かくして、0.4%未満の甲状腺による取込みは、in vivoで $[^{124}\text{I}] - \text{PU} - \text{H}71$ から放出された遊離放射性ヨードの量が少ない（投与された活性の約5～10%）ことを示唆する。少量の遊離放射性ヨードの放出は放射性ヨードトレーサとしては珍しくなく、臨床実務においては、甲状腺による取込みは日常的であり、放射

性トレーサ投与の前のヨウ化カリウムの飽和溶液の経口投与を用いて効率的に遮断される。

【0234】

$[^{124}\text{I}]$ - PU-H71 は PET による明確な腫瘍 HSP90 可視化を可能にする

腫瘍担持マウスにおける $[^{124}\text{I}]$ - PU-H71 の *in vivo* での PET 画像化は、注入の2時間後から、明確な腫瘍可視化、かくして、潜在的な腫瘍 HSP90 標的化および腫瘍中での保持を提供した（図30b、矢印）。ROI 分析から得られた平均（±標準偏差）取込み値（%ID/g）は、4、24、48、72および100時間で、それぞれ 0.35 ± 0.07 、 0.083 ± 0.02 、 0.058 ± 0.02 、 0.031 ± 0.01 および 0.024 ± 0.008 であり、これは生体内分布試験において得られた値と一致し（図30d）、*in vivo* での PU-H71 の非侵襲的モニタリングおよびその時間依存的腫瘍内濃度の信頼性の高い定量が $[^{124}\text{I}]$ - PU-H71 PET により可能であることを確認する。

10

【0235】

薬学的に有効な PU-H71 腫瘍内濃度を達成するために必要とされる PU-H71 の用量を決定するための $[^{124}\text{I}]$ - PU-H71 PET 画像化の使用

上記のように、腫瘍および血液中の $[^{124}\text{I}]$ - PU-H71、およびしたがって標識されていない PU-H71 の薬物動態は顕著に異なる：腫瘍薬剤濃度は、腫瘍血液プールからの薬剤クリアランスに大きく起因する初期の迅速な指數的クリアランス後、注入後約24時間までに安定化した。対照的に、血中薬剤レベルは、迅速で連続的な指數的クリアランスを示した（図30b、30d）。 $[^{124}\text{I}]$ - PU-H71 の腫瘍と血液の活性濃度比は、注入後約12時間までに約10以上の値に達した（図30c）。かくして、PU-H71 の積分された血中レベル（すなわち、血液時間-活性濃度曲線下面積、 $\text{AUC}^{\text{PU-H71}}_{\text{血液}}$ ）は、PU-H71 の腫瘍レベルの信頼できる代用物ではなかった。実際、腫瘍時間-活性濃度曲線下面積、 $\text{AUC}^{\text{PU-H71}}_{\text{腫瘍}}$ は、 $\text{AUC}^{\text{PU-H71}}_{\text{血液}}$ よりも15倍大きい（図30d、それぞれ、腫瘍および血液について、11.4対0.78%ID/g-h）。したがって、血液薬物動態は、患者特異的な治療上有効な腫瘍内濃度を達成するための投与レジメンの設計にとって信頼できるものではない。

20

【0236】

したがって、本発明者らは、選択された期間にわたって治療上有効な腫瘍内濃度を達成および維持するのに必要とされる投与された PU-H71 用量を予測する $[^{124}\text{I}]$ - PU-H71 PET の能力を調査した。PU-H71 の投与された用量（mg での PU-H71 用量）について、投与後の時間 t での腫瘍水分容積（平均水分容積、 $W = 0.8 \text{ mL/g}$ を用いる）中の薬剤濃度（mg/mL または g/L）、 $[\text{PUH71 腫瘍}]_t$ は、平衡での腫瘍中の PET 由来 $[^{124}\text{I}]$ - PU-H71 活性濃度（%ID/g）、 $[\text{A 腫瘍}]_t$ から算出され、投与後の時間 t で達成される：

30

【数2】

$$[\text{PU-H71 腫瘍}]_t = \text{PU-H71 用量} \cdot \frac{[\text{A 腫瘍}]_t}{100\%} \cdot \frac{1}{W} \quad (1)$$

40

【0237】

したがって、投与後の時間 t での、腫瘍水分容積中の薬剤濃度（ μM ）、 $[\text{PU-H71 腫瘍}]_t$ は、

【数 3】

$$[\text{PU-H71 腫瘍}]_t = \text{PU-H71 用量} \cdot \frac{[\text{A 腫瘍}]_t}{100\%} \cdot \frac{1}{0.8} \cdot \frac{1 \times 10^6}{512} \mu\text{M} \quad (1a)$$

【0238】

であり、ここで、係数 512 は、PU-H71 の分子量であり、係数 1×10^6 は濃度を μM に変換する。

10

【0239】

逆に、選択された治療上有効な腫瘍 PU-H71 濃度を達成するためには、個々の患者について投与すべき PU-H71 の必要な用量 (mg) は、投与後の時間 t での腫瘍中の彼または彼女の PET 由来活性濃度に基づいて算出することができる：

【数 4】

$$\text{PU-H71 用量} = [\text{PU-H71 腫瘍}]_t \cdot 0.8 \cdot \frac{100\%}{[\text{A 腫瘍}]_t} \cdot \frac{512}{1 \times 10^6} \quad (2)$$

20

【0240】

図 30d 中の腫瘍－活性データを用いて、1、5、25、50 および 75 mg/kg の PU-H71 (20 g のマウスについて 0.02、0.1、0.5、1 および 1.5 mg) の投与用量について、投与後 (p. a.) 0～160 時間の腫瘍中の時間依存的 PU-H71 濃度を算出するために、式 (1a) を用いた (図 31a、下パネル)。確立されたがん細胞における PU-H71 に関する前臨床試験から、HSP90 阻害剤へのいくつかの確立された乳がん細胞の 72 時間の曝露が、細胞型に応じて、0.05～0.25 μM の記録された半数阻害濃度 (IC_{50}) で細胞増殖阻害を誘導することが公知である¹⁰⁰。かくして、投与後 72 時間で腫瘍中の治療上有効な濃度を達成するために、 $[\text{I}^{124}\text{I}]$ －PU-H71 PET により、それぞれの上記用量レベルでの単回用量を予測した (図 31a、上パネル)。5、25、50 および 75 mg/kg の PU-H71 の投与された用量ならびに約 $0.14 \pm 0.05\% \text{ID/g}$ の $[\text{A 腫瘍}]_{t=24\text{h}}$ 値について (図 31d)、式 (1a) は、それぞれ、0.37、1.83、3.67 および 5.51 μM の PU-H71 の腫瘍内濃度をもたらし、これは LC-MS/MS によりこれらの腫瘍中で測定された濃度と一致する (図 31b および示さず)。1 mg/kg の用量は、48 時間以上で 0.05 μM 未満の腫瘍内濃度をもたらし (図 31a)、かくしておそらく、この腫瘍モデルにおける治療上有効用量に関する下限である。

30

【0241】

$[\text{I}^{124}\text{I}]$ －PU-H71 PET は腫瘍中の治療上有効な PUH71 濃度の送達を正確に予測する

40

PET が 5～75 mg/kg の PU-H71 の注入後に達成される腫瘍内濃度を正確に予測したこと、およびこれらの濃度が *in vivo* で治療上有効であったことを実証するために、本発明者らは、これらの用量と関連する薬力学的効果を調査した (図 31c、31d)。薬学的に有効な PU-H71 の腫瘍内濃度の送達を示唆する上記知見によれば、MDA-MB-468 腫瘍を担持するマウスへの 5～75 mg/kg の PU-H71 の投与は、PARP 切断により示されるように、Akt および Raf-1 の下方調節および／または阻害ならびにアポトーシスの誘導をもたらした (図 31c、*in vivo*)。これらの薬力学的変化は、組織培養において観察されたものと類似し、ここで、HSP90 依存的がんタンパク質 (すなわち、Raf-1、Akt) の用量依存的枯渇により示されるように、0.1 μM を超える PU-H71 濃度への 24 時間にわたる MDA-MB-

50

468細胞の曝露はHSP90阻害をもたらした（参考文献100および図31d、*in vitro*）。がん性クライアントタンパク質分解をもたらすと*in vitro*で決定された半数阻害濃度（ $EC_{50}^{Raf-1} = 0.13 \pm 0.02 \mu M$ および $EC_{50}^{Akt} = 0.15 \pm 0.02 \mu M$ ；図31d）は、腫瘍中にあると $[^{124}I] - PU-H71$ PETにより決定されたものと類似し、測定された薬力学的効果（ $EC_{50}^{Raf-1} = 0.24 \pm 0.03 \mu M$ および $EC_{50}^{Akt} = 0.09 \pm 0.08 \mu M$ ；図31c）をもたらす。

【0242】

まとめると、LC-MS/MS測定およびウェスタンブロット薬力学的分析により実証されたPET予測された腫瘍内濃度の一致は、 $[^{124}I] - PU-H71$ PETアッセイが、治療上有効な腫瘍内濃度を達成するのに必要とされるこのHSP90阻害剤の投与される用量の選択を知らせる能力および正確性を証明する。

10

【0243】

トレーサ用量の $[^{124}I] - PU-H71$ は、腫瘍中の最大標的飽和までのある範囲の用量にわたる $PU-H71$ 腫瘍内濃度を正確に予測する

トレーサ、微量の $[^{124}I] - PU-H71$ の薬物動態は、肉眼的治療用量のものと相関しなくてもよい。高用量の $PU-H71$ では、腫瘍中でのHSP90標的飽和、異なる血漿タンパク質結合プロフィールまたは肝臓代謝酵素の潜在的阻害に起因する薬剤代謝の変化などの因子が、薬剤の薬物動態を変化させてもよい。

【0244】

したがって、本発明者らは、潜在的な飽和用量で、 $PU-H71$ 濃度のPETに基づく予測が、LC-MS/MSにより実験的に決定されたものと相関するかどうかを試験した（図31b）。MDA-MB-468腫瘍への $75 mg/kg$ の $PU-H71$ の投与は、腫瘍の退縮および治癒をもたらし¹⁰⁰、かくして、この治癒的用量で、腫瘍HSP90標的の飽和または治療上有意な数の標的分子の少なくとも占拠がおそらく達成される。 $[^{124}I] - PU-H71$ PET研究または $[^{131}I] - PU-H71$ 生体内分布試験から誘導された腫瘍内濃度に基づいて、 $75 mg/kg$ の阻害剤の腫瘍担持マウスへの投与は、投与後24、48、72、96および120時間で、それぞれ、 5.51 ± 1.78 、 3.50 ± 0.27 、 2.18 ± 1.78 、 1.29 ± 0.29 および $0.69 \pm 0.25 \mu M$ の腫瘍内濃度をもたらした（図31b）。これらの値は、LC-MS/MSにより測定された実際の $PU-H71$ 腫瘍内濃度と良好に一致し（図31b、LC-MS/MS）、最大有効標的阻害をもたらすものまでのある範囲の用量にわたるPETアッセイ予測の信頼性を証明する（図31c）。

20

30

【0245】

HSP90療法のための患者選択における $[^{124}I] - PU-H71$ の使用

$PU-H71$ の生体内分布をモニタリングし、 $PU-H71$ の腫瘍薬物動態に関する情報を提供するための臨床的に実用的なPETに基づく手法を提供することに加えて、前記アッセイは、 $PU-H71$ または他のHSP90療法に対する好ましいか、または好ましくない治療応答のいずれかを有する可能性がある患者を識別する、患者スクリーニングのための手法を示唆する。

【0246】

40

具体的には、 $[^{124}I] - PU-H71$ の最少の取込みおよび／または迅速なクリアランスを示す腫瘍は、 $PU-H71$ または他のHSP90阻害剤に接近できなくてもよい。あるいは、そのような知見はまた、腫瘍が生存のためにHSP90に依存せず、かくして、HSP90療法が適切ではないことを示してもよい^{93、97}。逆に、 $[^{124}I] - PU-H71$ の高い取込みおよび長い保持を有する腫瘍（例えば、より後の時点で、高い腫瘍と血液との比に対応する、図30）は、HSP90阻害剤による標的化に対してより感受性が高いと予測される。 $[^{124}I] - PU-H71$ PETにより予測される、有効な腫瘍内濃度を達成するのに必要とされる治療用量が、非常に高い毒性をもたらす（例えば、有効用量が最大許容用量よりも高い）場合、患者選択をさらに指導することができる。

【0247】

50

結論として、長期間にわたってHSP90阻害剤を有効濃度で保持し、非毒性的阻害剤用量でそのような濃度を達成する腫瘍の能力は、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETにより確実に測定することができるHSP90療法エントリーのための2つの重要な基準である。

【0248】

PETによりPU-H71腫瘍内濃度をアッセイするための治療用量のPU-H71と同時に注入される微量の $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ の使用

$[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETは有効腫瘍内濃度をもたらすのに必要とされるHSP90阻害剤の用量を良好に見積もるが、本発明者らは、治療量のPU-H71 (5 mg/kg ~ 75 mg/kg または 5,000 ng/g ~ 75,000 ng/g) と同時投与された微量 (約 6.5 ng/g) の $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ が、腫瘍に本質的に送達されたPU-H71の量を確実にアッセイすることができるかどうかを調査した (図31b、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ およびPU-H71の同時注入後のPET)。薬剤活性の組織中での薬剤曝露を測定する能力は、潜在的な応答を予測するための重要な情報を提供することができる (例えば、どの濃度が腫瘍に送達されたか、およびそれが顕著な薬力学的応答にとって十分なものであるかどうか)。処置時間にわたる連続的測定を、腫瘍生物学およびかくして応答性が変化したかどうかの指示因子として用いることもできる (例えば、腫瘍に送達された濃度の低下は、HSP90阻害剤に対する耐性の潜在的発生を示唆し得る)。

【0249】

放射性トレーサ $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ および非放射性PU-H71は約1:10,000の比で注入されるため、本発明者らは、後者が本質的には腫瘍中の唯一の有意な形態の薬剤であると合理的に推測することができる。かくして、PU-H71 (mgで表したPU-H71_{用量})と微量の $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ との同時投与用量について、腫瘍水分容積中の薬剤濃度 (再び、平均水分容積、 $W = 0.8 \text{ mL/g}$ および512のMWを用いる)は、

【数5】

$$[\text{PU-H71 腫瘍}] = \text{PU-H71 用量} \cdot \frac{[A_{\text{腫瘍}}]_t}{100\%} \cdot 2.44 \times 10^3 \mu\text{M} \quad (3)$$

【0250】

である。

【0251】

5、25、50および75 mg/kg (20 gのマウスについて0.1、0.5、1および1.5 mg)のPU-H71用量について式(3)を解くと、HSP90阻害剤の実際の腫瘍内濃度が得られる (図31b、75 mg/kgについてののみ示される)。これらの値は、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETおよび $[^{131}\text{I}] - \text{PU-H71}$ トレーサ生体内分布により見積もられ、LC-MS/MSにより実証されたPU-H71腫瘍内濃度と良好に相関する (図31bおよび示さず)。

【0252】

まとめると、これらのデータは、微量の $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETアッセイにより、特定の腫瘍内濃度をもたらすのに必要とされるPU-H71の用量と、腫瘍に送達された治療的PU-H71の実際の濃度との両方を得ることができることを示す。

【0253】

最大腫瘍用量、HSP90薬剤による腫瘍標的飽和を送達する用量をアッセイするための $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ の使用

同時に注入された $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ およびPU-H71の $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETは、HSP90阻害剤による腫瘍HSP90標的の占拠を潜在的に評価するこ

とができる。例えば、所与の治療用量のHSP90阻害剤が $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の腫瘍取込みを完全に、または有意に抑制することのPETによる証明は、その治療用量が腫瘍HSP90標的を飽和させ、投与された用量が、単回用量の薬剤が送達することができる「最大腫瘍用量」を送達することを示してもよい。この標的飽和用量を、薬剤の最大有効単回用量と呼んでもよい。

【0254】

この可能性を調査するために、本発明者らは、PU-H71の治療用量（5～75 mg/kgまたは5,000～75,000 ng/g）、PU-H71用量と同時投与された微量（約6.5 ng/g）の $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71について、腫瘍1グラムあたりのPU-H71により占拠された腫瘍HSP90部位数（HSP90部位/g腫瘍）を算出した。これは、式：

10

【数6】

$$(\text{Hsp90 部位/g 腫瘍}) = \frac{[A_{\text{腫瘍}}]_t}{100\%} \cdot \text{PU-H71用量} \cdot \frac{1}{W} \text{ nmol/g} \quad (4)$$

【0255】

を用いて得られた。

【0256】

PUH71の非放射性用量、5、25、50および75 mg/kg（それぞれ、5,000、25,000、50,000および75,000 ng/g）のPU-H71用量の同時投与された用量について式（4）を解くと、腫瘍1グラムあたりに結合したPU-H71分子数（molで表される）が得られる。1分子のリガンドは1個のHSP90分子のポケットを占拠し、それに結合するため^{97、109}、式（4）により、PU-H71/g腫瘍により占拠される腫瘍HSP90部位の数（nmolで表される）も得られる（図31e）。

20

【0257】

注入後24時間での結合曲線の分析は、利用可能なHSP90部位の占拠が75 mg/kgのPU-H71用量で飽和に近く、1グラムの腫瘍が最大 160.7×10^{-3} nmolのHSP90を含有し（図31e、BMAX）、 960×10^{11} 個のHSP90分子に相当することを示唆する。この値を用いて、本発明者らは次に、異なる投与用量のPU-H71により占拠される腫瘍HSP90部位の割合を算出し、5、25、50および75 mg/kgのPU-H71の投与が、それぞれ、12.1、57.7、88.7および92.7%の利用可能なHSP90腫瘍部位をもたらし、阻害剤により占拠されると決定した（図31f）。腫瘍取込みのほぼ完全な飽和が、75 mg/kgの単回治療用量のPU-H71により達成されたので、その用量は多くの利用可能な腫瘍HSP90部位を占拠し、したがって、用量の増加が腫瘍中に局在化する薬剤の量の増加をもたらしとはさらに予想されないが、全身薬剤曝露および潜在的な患者毒性を増加させるであろう。

30

【0258】

まとめると、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETによりここで示されたように、「最大腫瘍用量」の分析は、「最大許容用量」よりも試験設計においてより価値がある情報を提供する。具体的には、それは、投与された単回用量について、最大腫瘍（全身ではない）曝露をもたらし用量が、投与された単回用量に関連する毒性を最小化しながら、実現し得る最高の高腫瘍効果をもたらしことを示すであろう。さらに、それは、一度、最大腫瘍用量が同定されたら、治療投与頻度を最大許容頻度（従来の最大許容用量、MTDよりもむしろ）の終点まで増加させ、それによって一時的に腫瘍曝露を最大化することができる、治療投与頻度の選択のための新しい手法を示唆する。

40

【0259】

HSP90療法のための有効な用量レジメンを設計するための $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETの使用

50

上記の結果は、 $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PETを用いて、単回のPU-H71投与後の選択された期間にわたって特定の腫瘍内濃度を達成および維持するのに必要とされる用量を予測することができることを証明した。腫瘍はPU-H71の長い保持を示すため、十分な頻度でのPU-H71の反復投与は、それぞれの連続的用量について、PU-H71のより高い累積腫瘍内濃度を潜在的にもたらす。用いた用量およびスケジュールに特異的な定常状態の腫瘍PU-H71濃度が最終的に達成される。したがって、データは、定常状態の血漿濃度を達成することに対する投与の指導における血漿薬物動態の使用と同様、PUH71投与設計の指導における腫瘍薬物動態の $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ PET画像化の潜在的な役割を示唆する。

【0260】

これを探索するために、本発明者らは、週末は休みで週あたり3回の投与のスケジュール（3x週；月曜／水曜／金曜）で5、25、50および75mg/kgのPU-H71の投与をもたらすPU-H71の腫瘍内濃度を見積もった（図32a）。このスケジュールおよび示された用量で投与された場合のPU-H71の腫瘍内濃度を決定するために、シミュレーションを実施した（図32a）。このスケジュールおよびこれらの用量で得られた腫瘍AUC、PU-H71の平均および最少腫瘍内濃度（それぞれ、 $[\text{PU-H71}]_{\text{avg}}$ および $[\text{PUH71}]_{\text{min}}$ ）も決定した（図32a、差込み図）。5～75mg/kgの投与用量について、腫瘍中の予測されたPU-H71濃度は、それぞれ、 $[\text{PU-H71}]_{\text{min}} = 0.17 \sim 2.54 \mu\text{M}$ および $[\text{PU-H71}]_{\text{avg}} = 0.49 \sim 7.45 \mu\text{M}$ の範囲であった（図32aの差込み図を参照）。

【0261】

記載のように、より低いPU-H71濃度（0.05～1μM）へのMDA-MB-468乳がん細胞の*in vitro*での曝露は、強力な細胞増殖阻害をもたらし、その報告された IC_{50} は60～100nMである¹⁰⁰。より高いPU-H71濃度（2μMを超える）で、およびこれらの細胞を48時間、薬剤に曝露した場合、アポトーシスによる大規模ながん細胞殺傷が見られた（すなわち、70%を超える細胞がアポトーシスを受ける）（図32b）。これらの*in vitro*での分析を考慮すると、週3回スケジュールで、5～75mg/kgのPU-H71の用量の投与は、主に腫瘍阻害効果（5mg/kg）から強力な腫瘍アポトーシス（75mg/kg）を予測する値に広がる治療上有効な腫瘍薬剤濃度をもたらすと予測される（図32b）。実際、MDA-MB-468異種移植腫瘍を担持するマウスを上記のようにPU-H71で処置した場合、PU-H71で処置された腫瘍において用量依存的応答が観察された（図32c）。7週間の処置期間後、有意な腫瘍応答が見られ、それぞれ5、25および50mg/kg用量に対して63、82および99%の腫瘍増殖阻害（TGI）が観察され、75mg/kg用量では100%の退縮が観察された（図32c）。

【0262】

本発明者らは、対照群の腫瘍が本発明者らのInstitutional Animal Care and Use Committee（IUCAC）により許容された最大サイズに達するまで処置を継続し（図32d）、火曜日（用量を投与した最後の水曜日の24時間後）にマウスを犠牲にした。5mg/kg群の動物のみがウェスタンブロットおよびLC-MS/MSによる分析にとって十分に大きい腫瘍を担持したが（腫瘍体積： $139 \pm 66 \text{ mm}^3$ ）、ビヒクルのみで処置されたもの（腫瘍体積： $1126 \pm 396 \text{ mm}^3$ ）よりも有意に小さかった（図32d）。

【0263】

5mg/kgのPU-H71の投与用量について、腫瘍中の $[^{124}\text{I}] - \text{PU-H71}$ に関する測定された腫瘍-活性データを用いて式（1a）を解くと（図30d）、処置期間にわたるPU-H71腫瘍内濃度が得られる（図32e）。本発明者らのシミュレーションは、犠牲にした時点でのPU-H71の腫瘍内濃度は0.43μM（図32e）であるはずであり、これはLC-MS/MSによりこれらの腫瘍中で決定された $0.52 \pm 0.13 \mu\text{M}$ の実際の濃度と顕著に類似することを示唆する（図32f、32g）。さらに

、観察された薬力学的効果、すなわち、腫瘍中での有意なA k t分解（57%低下； $P=0.0017$ ；図32fおよび図32g、左パネル）およびPARP切断（図32f）により示されるHSP90阻害は、この時点での腫瘍中の治療上有効なPU-H71濃度と一致していた（図32g、右パネル）。これらの知見は、PU-H71の腫瘍取込みが12週間の処置にわたって依然として変化しなかったことを示し、これはPU-H71に対するこれらの腫瘍の永続的な応答性と一致し（図32dおよび参考文献100）、 $[^{124}\text{I}]-\text{PUH71-PET}$ を用いて、応答持続性または逆に、HSP90療法に対する獲得された耐性の可能性をモニタリングしてもよいことを示す。

【0264】

HSP90療法のための有効なスケジュールレジメンを設計するための $[^{124}\text{I}]-\text{PUH71-PET}$ の使用

10

腫瘍によるPU-H71の長い保持を考慮して、本発明者らは、薬剤の低頻度の投与がその有効性を維持するかどうかを求めた。臨床設定において、これは、毒性を経験する患者においてより低用量で療法を継続するか、または投与スケジュールの設計において用量と投与頻度とを合理的に平衡を保つための論拠として有用であってよい。

【0265】

週あたり3回（月曜－水曜－金曜）、2回（月曜および金曜）または1回（月曜）の投与のスケジュール上で75mg/kgで投与されたPU-H71についてシミュレーションを実施した（図33a）。これらの計算は、腫瘍が、週3回、週2回および週1回のスケジュールで、それぞれ、7.45、5.41および2.88μMの $[\text{PU-H71}]_{\text{腫瘍}}$ $_{\text{avg}}$ に曝露されることを示唆し（図33a）、これは低頻度の投与スケジュールが腫瘍に対して治療上有効濃度を依然として送達するはずであることを示している（図33b）。実際、週1回のスケジュールで有意な腫瘍増殖阻害が得られたが、週2回の投与は5週間の処置にわたって腫瘍の退縮をもたらした（図33c）。評価可能な腫瘍において（すなわち、対照および5mg/kg処置群）、マウスを最後の投与用量の24および96時間後に犠牲にした時、薬力学的マーカーの変化を分析した。

20

【0266】

がんタンパク質の有意な、およびほぼ完全な枯渇（95%レベルの低下、24時間および96時間で、それぞれ、 $P=0.0021$ および $P=0.0025$ ）が両時点で観察され（図33d）、標的飽和PU-H71濃度（2μMを超える）がこれらの時点で腫瘍中に存在するはずであることを示唆する。これらの腫瘍中では、PU-H71のPETにより予測された腫瘍内濃度は、24時間および96時間で、それぞれ、5.5.1および2.18μMであり（図33a、週1回のパネル）、LC-MS/MSにより測定された、それぞれ、 5.53 ± 0.26 および 3.09 ± 1.40 の実際の腫瘍内濃度と厳密に一致する（図33e）。

30

【0267】

上記方法は、ヒト患者に容易に適用できる。一例は、図34および図35に示される。図34は、肺および隣接するリンパ節への疾患転移を有する再発膀胱がんを有する患者の $[^{124}\text{I}]-\text{PUH71-PET/CT}$ を示す。 $[^{124}\text{I}]-\text{PUH71}$ 注入後のいくつかの時点（4、24、48および192時間）でのPET画像を定量し、 $[^{124}\text{I}]-\text{PUH71}$ について得られたSUVデータを、20mg/m²のPU-H71の投与用量あたりの濃度に変換した。これらの腫瘍は、非常に良好な $[^{124}\text{I}]-\text{PUH71}$ の取込みを示し、192時間（投与後8日）でも保持および可視化を示す。 $[^{124}\text{I}]-\text{PUH71-PET/CT}$ は、この患者がHSP90療法に応答する可能性があることを予測する。192時間（8日）を超える時間にわたる腫瘍中でのPU-H71の保持は、図30に示されるように、マウス実験によっては予測されず、 $^{124}\text{I}-\text{PUH71}$ は投与後150時間までにMDA-MB-468腫瘍から消失した。0～192時間の様々な時点でのPU-H71濃度の算出はまた、曲線下腫瘍面積（AUC）の算出も可能にする。図34において、様々な肺結節およびリンパ節（LN）の曲線下面積は、0～192時間まで算出される。

40

50

【0268】

PU-PETにより決定されるように、PU-H71へのこれらの腫瘍の曝露は、この患者を処置するための最適な用量およびスケジュールの決定を可能にする。具体的には、週2回（火曜および金曜）のスケジュールで 20 mg/m^2 の用量を投与した場合の2週間の処置レジメンの経時的な、一方は左肺および他方は右肺門LN中の2つの特徴的な腫瘍のPU-H71への曝露を算出し、曲線下面積（AUC）として、および平均腫瘍内濃度として表した（図35、上パネル）。腫瘍は良好な薬剤曝露を示し、AUC値はそれぞれ 190 および $499\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{h}$ であり、Hsp90阻害剤の平均腫瘍内濃度はそれぞれ 0.71 および $1.57\text{ }\mu\text{M}$ を示す。膵臓がんの前臨床モデルにおいて、そのような濃度は、増殖の阻害、その侵襲および転移能力の低下、ならびに膵臓がん細胞中でのアポトーシスの誘導において有効であったが、これは、週2回のスケジュール（火曜－金曜）で与えられた 20 mg/m^2 の用量が患者にとって有益である可能性があることを示唆する。

10

【0269】

また図35（下パネル）に示されるように、週2回（火曜および金曜）のスケジュールで 40 mg/m^2 および 80 mg/m^2 の用量で同様のシミュレーションを実施した。PU-PET予測により最も最適な用量は、週2回のスケジュール（火曜日および金曜日）で与えられる 80 mg/m^2 の用量であり、 $0\sim 336$ 日にわたる腫瘍曝露および平均腫瘍内濃度は、それぞれ、 760 および $1998\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ならびに 2.8 および $6.3\text{ }\mu\text{M}$ （図35、下パネル）より上に達した。これらの値は、有意な退縮および治癒をもたらすと前臨床試験（図32および33）により予測される。

20

【0270】

図36は、肺に転移した疾患を有するHER2+乳がん患者に関する同様の計算を示す。上のパネルは、 $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ を用いるPETアッセイの結果を示す。中央および下のパネルは、 10 mg/m^2 の投与されたPU-H71用量に基づく様々な時点でのPU-H71の腫瘍内濃度を示す。薬力学的データは、 0 もしくは 336 時間の腫瘍中のPU-H71のAUCまたはその期間にわたる腫瘍中の薬剤の平均濃度を単位として報告される。PU-PETデータは、2週間にわたって週に2回与えられた場合、 10 mg/m^2 の用量は $103\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の腫瘍 $\text{AUC}_{0\sim 336\text{h}}$ を送達し、 $0.59\text{ }\mu\text{M}$ の平均腫瘍内濃度を維持し、かくして、このスケジュールでは、 $80\sim 100\text{ mg/m}^2$ 以上の用量が好ましい応答にとって必要であると予測する。2週間にわたって週に3回与えられた場合、 10 mg/m^2 の用量は $140.8\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の腫瘍 $\text{AUC}_{0\sim 336\text{h}}$ を送達し、 $0.71\text{ }\mu\text{M}$ の平均腫瘍内濃度を維持し、かくして、このスケジュールでは、 60 mg/m^2 以上の用量が好ましい応答にとって必要である。2週間にわたって週に1回与えられた場合、 10 mg/m^2 の用量はわずかに $54\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の腫瘍 $\text{AUC}_{0\sim 336\text{h}}$ を送達し、 $0.41\text{ }\mu\text{M}$ の平均腫瘍内濃度を維持し、かくして、このスケジュールでは、 200 mg/m^2 以上の用量が好ましい応答にとって必要である。2週間にわたって週に5回（週末は休みで毎日）与えられた場合、 10 mg/m^2 の用量は $189.8\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の腫瘍 $\text{AUC}_{0\sim 336\text{h}}$ を送達し、 $0.81\text{ }\mu\text{M}$ の平均腫瘍内濃度を維持し、かくして、このスケジュールでは、 50 mg/m^2 以上の用量が好ましい応答にとって必要である。

30

【0271】

まとめると、これらのデータは、HSP90療法の個別化された臨床使用のための有効な用量および用量－スケジュールレジメンの設計に関して情報を提供する際の $[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ PETの有用性を証明している。

40

【0272】

$[^{124}\text{I}]\text{-PU-H71}$ PETにより決定された場合のPU-H71への腫瘍曝露は、HSP90療法に対する抗腫瘍応答を確実に予測する

治癒をもたらす処置時間にわたる阻害を必要とする標的部位数の理解は、依然として標的化療法における大きな課題である。したがって、本発明者らは、上記で調査したいくつかの用量およびスケジュールレジメンについて、処置期間にわたる阻害剤によるHSP90部位の占拠をシミュレートした（図37a）。次いで、本発明者らは、腫瘍HSP90

50

占拠と観察された抗腫瘍応答との相関分析を行うことを試みた（図37b）。

【0273】

PU-H71を治療用量（マウスにおいて5～75mg/kgまたは5,000～75,000ng/g）で投与された場合の、腫瘍1グラムあたりのPU-H71により占拠される腫瘍HSP90部位数（HSP90部位/g）を、式（4）を用いて得ることができる。1グラムのMDA-MB-468腫瘍は最大 160.7×10^{-3} nmolのHSP90を含有するため（図31d、BMAX）、および100%を超える部位の占拠は不可能であることを考慮して、本発明者らは、各用量およびスケジュールレジメンに関して処置時間にわたるHSP90部位の占拠をシミュレートすることができた（図37a）。

【0274】

処置時間にわたってPU-H71により占拠および認識された平均%HSP90部位（（HSP90部位占拠率%）_{avg}）（図37b）、処置時間にわたって記録されたPU-H71の平均腫瘍内濃度（[PU-H71]_{腫瘍avg}；図37c）ならびに腫瘍AUCにより算出された処置時間にわたる腫瘍曝露として測定された標的占拠は、観察された抗腫瘍効果の規模と有意に良好に相関した（それぞれ、 $r^2=0.7559$ 、 0.8162 および 0.8188 ）。本発明者らの分析は、処置時間にわたって平均化された腫瘍HSP90部位の80%を超える占拠率（図37b）、または5μMのHSP90阻害剤の平均腫瘍内濃度の維持（図37c）が、MDA-MB-468腫瘍退縮および治癒にとって必要であることを示唆する。しかしながら、平均15%以上の占拠部位により得られたか、または0.5μM以上の処置時間にわたる平均腫瘍内濃度を維持することにより達成された、より低い占拠は、依然として部分的応答をもたらしてもよい（図37b、37c）。

【0275】

考察

上記分析に基づいて、本発明者らは、HSP90阻害剤の臨床開発における使用可能性を有する初めての非侵襲的なPETに基づくアッセイを設計および開発した。本発明者らは、親薬剤の腫瘍内薬物動態および薬力学の決定、有効腫瘍内濃度を達成するのに必要とされるHSP90阻害剤の用量の決定、腫瘍に送達される薬剤の実際の濃度のアッセイ、ならびに最大許容用量（MTD）ではなく標的調節効率に基づく有効用量およびスケジュールレジメンの設計におけるその使用を証明する。本発明者らはまた、HSP90標的化に対する腫瘍応答を有する可能性が最も高い患者の選択におけるその使用も証明する。

【0276】

炭素11-、フッ素18-および窒素13-標識された薬剤、例えば、N-[¹¹C]-メチルイマチニブ¹²²、3-N-メチルおよび4-カルボニル-[¹¹C]-テモゾロミド¹²³、N-[2-(ジメチルアミノ)エチル]アクリジン-4-カルボキサミド（[¹¹C]DACA）¹²⁴、[¹⁸F]5-FU¹²⁴、ダサチニブの[¹⁸F]フッ素誘導体¹²⁵および[¹³N]シスプラチン¹²⁶が、半減期がスキャン中の総サンプリング時間よりも有意に短い薬剤に関してPET薬物動態パラメータにより評価するのに有用であることが、前臨床または臨床試験において他者によって示された。HSP90阻害剤については、その腫瘍半減期（すなわち、24時間を超える）はこれらのアイソトープにより許容されるサンプリング期間よりも長く（すなわち、¹¹C、¹³Nおよび¹⁸Fについて、それぞれ10分、20分および110分）、これらの放射性アイソトープを用いるPET薬物動態評価は不適切である。¹²⁴Iの比較的長い半減期のため、[¹²⁴I]-PU-H71 PETアッセイはかくして、HSP90阻害剤の腫瘍薬物動態を非侵襲的および定量的にモニタリングすることができる初めて報告されるアッセイである（図38）。

【0277】

さらに、[¹²⁴I]-PU-H71 PETアッセイは、医用画像化のための放射標識された生物学的に不活性な微量の標的治療剤を用いる標的療法に関する標的画像化の概念の真の具体化である¹²⁷⁻¹³¹。この概念は、薬剤開発の将来のために明確に認識され、高度に支持されており、個別化医療に向かう道を開くが、その薬剤作用に最も応答する患者を選択し、その投与用量のスケジュールに関して忠告する造影剤としてのがん小分子治療

剤の使用に関しては先例がない。PU-H71の天然構造におけるヨウ素の存在およびしたがって放射性ヨウ素標識の取込みによるその構造的および生物学的挙動の任意の摂動の非存在のため、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETアッセイは、本発明者らの知る限り、初めてのそのようなアッセイの1つである。具体的には、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の観察された生体内分布プロファイル、すなわち、非腫瘍組織からの迅速なクリアランスを示す腫瘍保持は、治療剤PU-H71のそれを反映する。さらに、薬剤代謝物の形成はPETへの標識された薬剤の適用を制限するが⁴¹、本発明者らのデータは、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETアッセイが微量と治療用量レベルの両方において腫瘍PU-H71濃度を正確に測定することを示し、これは、PU-H71代謝物がPETにより測定された腫瘍活性に有意に寄与しないことを示している。要するに、これらの知見は、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71がPU-H71の真のin vivoでの「トレーサ」としての使用にとって非常に適していることを示唆する。

10

【0278】

標的がん療法の開発において、臨床試験には有効腫瘍内濃度が達成されるかどうか、および標的が適切に調節されるかどうかに関する知識が必要であることがよく理解されている。本発明者らのデータは、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETアッセイが腫瘍HSP90阻害剤の薬物動態を定量的に測定し、注入用量または血漿薬物動態との従来の腫瘍応答相関よりも多くの情報を提供する腫瘍用量-腫瘍応答相関を可能にすることを示している。本発明者らのデータはまた、PU-H71について、腫瘍薬物動態は腫瘍薬力学を反映し、両パラメータの非侵襲的測定として $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETを同定することも示している。かくして、標的占拠をも示す、腫瘍薬物動態は、HSP90阻害剤処置レジメンに対する即時的応答（すなわち、1回用量の阻害剤後の標的調節）と長期的応答（すなわち、設計されたスケジュールにわたる標的調節）の両方を理解する際の予測力を有する。さらに、HSP90療法について考慮される個々の患者における $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71腫瘍薬物動態を評価することにより、当業者はHSP90処置から利益を得る可能性が最も高い患者を同定し、結果として、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の腫瘍取込みおよびクリアランスに基づいて、治療用量およびスケジュールを調整してもよい（図38a）。

20

【0279】

本発明者らはまた、アッセイが、抗腫瘍効果およびHSP90療法の経過にわたる結果を予測する能力を有する、腫瘍HSP90標的化の程度およびHSP90阻害剤治療用量によるその飽和の画像化バイオマーカーとしての、PET由来腫瘍HSP90薬物動態に基づく個別化投与レジメンの開発を指導することができることも示す（図38b）。これらの特徴のため、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETアッセイは、HSP90処置に対する腫瘍応答を理解し（図38a）、潜在的には、それを予測する（図38b）ための薬効評価手段としてのHSP90阻害剤臨床試験における使用にとって最適である。

30

【0280】

$[^{124}\text{I}]$ -PU-H71データはまた、従来の最大許容用量（MTD）よりもむしろPET由来最大有効腫瘍内濃度に基づくHSP90標的化療法におけるより合理的で有効な投与戦略を提供する。この手法は、PETにより可視化されるように、腫瘍標的が薬剤によりほぼ飽和される最適用量レベルである最大腫瘍用量を達成する新しい投与目標に向かうものである（図38c）。この手法は、抗腫瘍効果ではなく患者に対する毒性を増加させるだけであってよいさらなる用量上昇を回避する。最大許容用量（MTD）未満の治療用量で腫瘍飽和が観察される場合（例えば、用量漸増試験により決定される）、投与戦略は、PETにより決定された飽和最大有効腫瘍内濃度での投与の最大許容頻度を見出すことを追求してもよい。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETは、投与頻度の選択をさらに情報提供するために最大有効腫瘍用量後に腫瘍飽和の持続期間を探索してもよい。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETを同様に用いて、他のHSP90阻害剤の用量および頻度選択を指導してもよい。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71トレーサにより腫瘍標的化を競合的に阻害する治療用量のHSP90標的化剤の能力は、腫瘍薬剤飽和の指標を提供してもよい。

40

50

HSP90阻害剤の臨床開発のために、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETを用いて、一般的に適用可能な投与戦略を誘導するために第1/2相臨床試験集団から腫瘍薬物動態データを収集するか、またはそれを真に「個別化された」用量スケジュール選択のために個々の患者ベースで用いてもよい。PU-H71 PET画像化は、本発明者らは考えているが、これらの仮説を試験するのに非常に適した臨床手段である。現在行われている $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71の第0相微量試験、およびMemorial Sloan-Kettering Cancer CenterでのPU-H71の次の第1相臨床試験に含まれる $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETアッセイに関して、この概念は臨床設定において間もなく評価されるであろう。

【0281】

10

結論として、腫瘍HSP90の標的化アッセイとしての $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETは、HSP90標的化療法における分子標的のレベルでの患者選択、用量選択、腫瘍診断および腫瘍応答の評価を劇的に、また合理的に前進させてもよい。そのようなものとして、新規 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETアッセイは、HSP90の合理的、費用効果的、および最適な臨床開発ならびにがんにおけるその使用を容易にするはずである。 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71 PETの使用は、HSP90阻害剤の臨床試験の設計における主要な前進であり、他の標的化治療剤の開発のための標的画像化薬効評価のパラダイムを促進する。

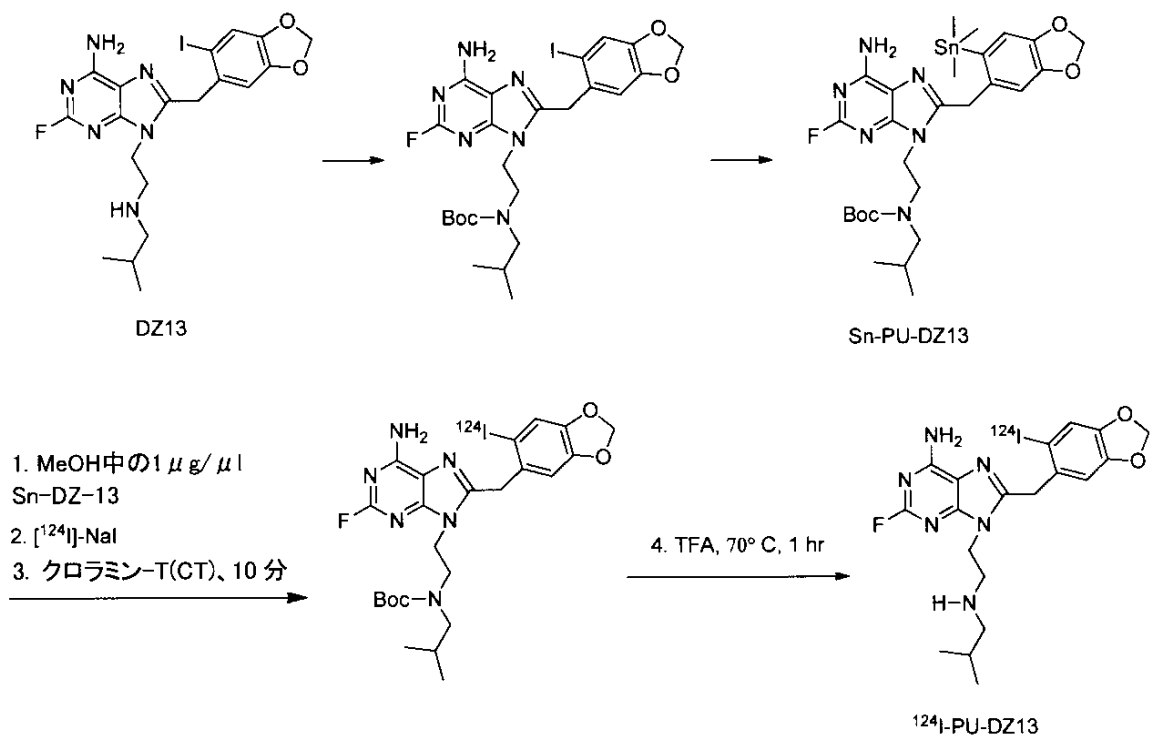
【0282】

5. 2. 2. 2. $[^{124}\text{I}]$ -PU-DZ13および $[^{124}\text{I}]$ -PU-HZ151

20

内因性ヨウ素を含む他のHSP90阻害剤を、HSP90 PETアッセイにおいて働くその能力について評価した。2つのそのような化合物としては、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-DZ13および $[^{124}\text{I}]$ -PU-HZ151が挙げられ、これらをスキーム16および17に示されるように合成した。

【化34】

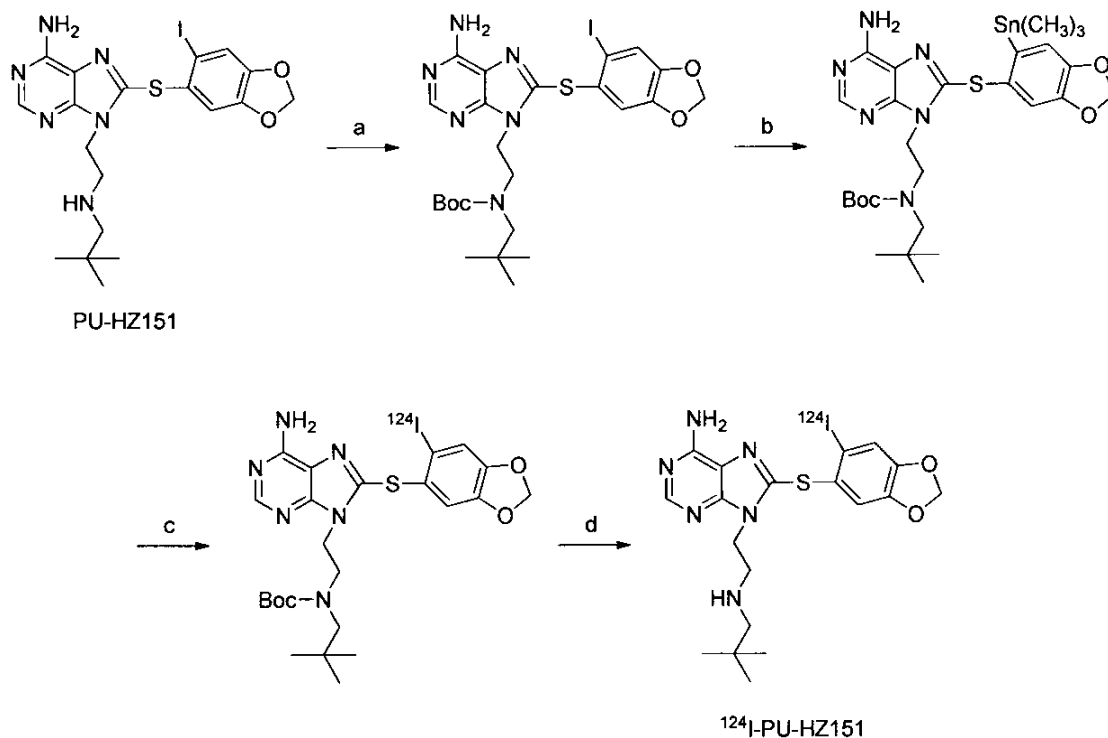


30

40

スキーム 16: $[^{124}\text{I}]$ -PU-DZ13 の合成

【化 3 5】



スキーム 17: ^{124}I -PU-HZ151 の合成。試薬および条件: a. Et_3N 、 $(\text{Boc})_2\text{O}$ 、 CH_2Cl_2 、rt; b. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 、ヘキサメチルジチン、ジオキサン、 90°C ; c. ^{124}I -NaI、クロラミン-T、rt、10 分; d. TFA、 70°C 、60 分。

【0283】

これらの化合物の放射化学的収率は $36.96 \pm 12.97\%$ (^{124}I -PU-DZ13)、 $36.45 \pm 15.75\%$ (^{124}I -PU-HZ151) および $45.33 \pm 15.76\%$ (^{124}I -PU-H71) であった; 放射化学的純度 (98% を超える) は HPLC により確認された。比活性は、 $63.3 \text{ mCi}/\mu\text{mol}$ (^{124}I -DZ13)、 $57.6 \text{ mCi}/\mu\text{mol}$ (^{124}I -HZ151) および $100.0 \text{ mCi}/\mu\text{mol}$ (^{124}I -H71) であった。

【0284】

^{124}I -PU-H71 および ^{124}I -PU-DZ13 の *in vitro* での安定性を評価するために、化合物を 37°C で 5 日間にわたってヒト血清中でインキュベートし、脱ハロゲン化が起こったかどうかを決定するために ITLC により分析した。 ^{124}I -PU-H71 と ^{124}I -PU-DZ13 の両方が 5 日間 (120 時間) にわたって安定である (98% を超える) と決定された。

【0285】

^{131}I -PU-DZ13 が IV と IP 経路の両方により投与された場合、腫瘍はそれを保持するが、腫瘍保持は IV によってより高く、統計的に有意である ($P < 0.05$) (投与後 24 時間、腹腔内対静脈内経路)。C57BL/6J 非腫瘍担持マウスにおいて、 ^{131}I -PU-DZ13 は心臓血から迅速に消失し ($\% \text{ID/g}$ は 2 分で 3.33 ± 0.13 および投与後 24 時間までに 0.013 ± 0.00 であった)、胃および腸による最大の取込みを有する ($3 \sim 8\% \text{ID/g}$)。肝臓および脾臓は有意に異ならず ($P < 0.05$)、これは細網内皮系 (RES) の改善を示唆している。しかしながら、 ^{131}I -PU-DZ13 の腎臓による取込みは、尿クリアランスを意味する ($\% \text{ID/g}$)

10

20

30

40

50

gは2分での 5.53 ± 0.34 （データは示さず）から投与後24時間までに 0.06 ± 0.01 に低下した）。MDA-MB-468 TNBCマウスモデルにおいては、 $[^{131}\text{I}]$ -PU-DZ13は、腹腔内経路と比較して静脈内経路により投与された場合により長く腫瘍によって保持された。IV投与により、 $[^{131}\text{I}]$ -PU-DZ13の腫瘍取込み（1時間で $1.47 \pm 0.22\%$ ID/g）は72時間（ $0.05 \pm 0.00\%$ ID/g）にわたってゆっくりと減少した（% ID/g = 0.56 ± 0.14 、4時間； 0.40 ± 0.03 、12時間； 0.09 ± 0.03 、24時間）。非腫瘍担持マウスと同様、 $[^{131}\text{I}]$ -PU-DZ13の胃腸およびRESによる取込み、ならびに腎クリアランスはMBA-MD-468においても見られた。25 mg/kgでPU-DZ13と同時に投与した場合、 $[^{131}\text{I}]$ -PU-DZ13のin vivoでの生体内分布（投与後24時間、腹腔内対静脈内経路）は、PU-PETにより予測された腫瘍内濃度がLCMS-MSにより決定された値と都合良く同等であることを示す。

10

【0286】

in vivoでのPET画像化は、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71および $[^{124}\text{I}]$ -PU-DZ13 HSP90阻害剤を含むMDA-MB-468腫瘍を検出した。図39は、いずれかの阻害剤（ $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71または $[^{124}\text{I}]$ -PU-DZ13）を全身的に注入したマウスの注入後48時間でのPET画像化の結果を示す。両方の放射性ヨウ化HSP90阻害剤は、それぞれの時点でPETを用いて腫瘍を検出した。2つの阻害剤の取込み% ID/gは腫瘍量において有意に異ならなかったが、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-DZ13は定性的に低い非特異的腹部取込みを有すると考えられた。

20

【0287】

$[^{124}\text{I}]$ -PU-DZ13および $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71と違って、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-HZ151は、おそらく肝臓によるその迅速な代謝のため、マウス中の腫瘍を検出できなかった。

【0288】

5.3. PU-H71を用いるがん患者の処置

5.2.1. 節に記載の方法は、放射標識されたHSP90阻害剤、例えば、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71を用いて、HSP90阻害剤療法に応答する可能性がある患者を同定し、個々の患者のための最適化された投与レジメンを設計することができることを示す。投与レジメンは、阻害剤の腫瘍曝露および阻害剤によるHSP90の占拠などの因子に基づく。これらの薬物動態パラメータは本開示の放射標識された阻害剤を用いて容易に評価される。薬物動態データを大量の個々のがん患者から容易に得ることができるという事実のため、本発明者らは、HSP90阻害剤を過剰投与することにより引き起こされる毒性学的問題を伴うことなく特定のHSP90阻害剤の効果の望ましいレベルを達成するのに適している薬物動態パラメータの範囲を決定する能力を有する。

30

【0289】

したがって、本開示は、特定の薬物動態プロフィールを達成するために、HSP90阻害剤、特に、PU-H71を用いて、固形腫瘍、血液悪性腫瘍、およびリンパ腫を有する患者を処置する方法をさらに提供する。本開示はまた、特定の用量レベルおよび/または特定の投与スケジュールで阻害剤を投与することによる、HSP90阻害剤、特に、PU-H71を用いて固形腫瘍、血液悪性腫瘍、およびリンパ腫を処置する方法も提供する。特定の態様においては、HSP90阻害剤を用いて処置される腫瘍は、「HSP90依存的腫瘍」である。上記で考察された通り、HSP90依存的腫瘍は、生理学がHSP90を用いる腫瘍である。HSP90依存的腫瘍は、正常なハウスキーピングHSP90と比較して有意な量の「発がん性HSP90」を含有する。この節に記載される方法を適用して、限定されるものではないが、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌および腺がんを含む肺がん、あらゆるサブタイプの乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、他の形質

40

50

細胞障害を含む多発性骨髄腫、白血病、骨髄増殖性新生物ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんなどのいくつかの種類のがんに適用することができる。

【0290】

一態様において、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有するヒト患者を処置する方法であって、薬剤の投与後の約16時間～約24時間の少なくとも1つの時点で、患者の腫瘍中の発がん性HSP90の15%以上の占拠率、患者の腫瘍中の発がん性HSP90の30%以上の占拠率、患者の腫瘍中の発がん性HSP90の50%以上の占拠率、または患者の腫瘍中の発がん性HSP90の60%以上の占拠率を提供するのに十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。例えば、PU-H71の投与は、薬剤の投与後16～24時間の少なくとも1つの時点で、患者における少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または100%の発がん性HSP90の占拠率を提供することができる。1つの特定の態様においては、PU-H71の投与は、薬剤の投与後約24時間で、患者における少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または100%の発がん性HSP90の占拠率を提供することができる。別の態様においては、PU-H71の投与は、薬剤の投与後15時間～24時間の全範囲で、患者における少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または100%の発がん性HSP90の占拠率を提供することができる。PU-H71を投与して、薬剤の投与後の約16時間～約24時間の少なくとも1つの時点またはその間の全範囲で、2つの前記値のいずれかを境界とする発がん性HSP90の占拠率、例えば、約20%～約80%の占拠率、約30%～約80%の占拠率、約40%～約80%の占拠率、約40%～約90%の占拠率、約50%～約80%の占拠率、約50%～約90%の占拠率、約60%～約80%の占拠率、約60%～約99%の占拠率、約50%～約99%の占拠率、約50%～約99.9%の占拠率、約70%～約99.9%の占拠率などを提供することができる。別の態様においては、PU-H71は、発がん性HSP90の100%の占拠率を達成する最少用量で投与される。5.2.1.1.節で考察された通り、上記の発がん性HSP90占拠率を提供するためのPU-H71の投与は、PU-H71の有効用量をもたらす。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

【0291】

別の態様においては、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有する患者を処置する方法であって、約0.3 μM～約7.5 μMの範囲の投与後24時間での腫瘍内濃度を提供するのに十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。例えば、PU-H71の投与の約24時間後の腫瘍中のPU-H71濃度は、0.3 μM、1 μM、3 μM、5 μMまたは7 μMであってもよい。2つの上記値のいずれかの間の約24時間後の薬剤の腫瘍内濃度、例えば、約1 μM～約3 μMの腫瘍内濃度、約1 μM～約5 μMの腫瘍内濃度、約3 μM～約5 μMの腫瘍内濃度、約3 μM～約7 μMの腫瘍内濃度などを提供するために、PU-H71を投与することができる。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

【0292】

別の態様においては、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有する患者を処置する方法であって、約0.05 μM～約3.5 μMの範囲の投与後約48時間での腫瘍内濃度を提供するのに十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。例えば、PU-H71の投与後約48時間での腫瘍中のPU-H71濃度は、約0.5 μM、約1 μM、約1.5 μM、約2 μMまたは約3 μMであってもよい。2つの

上記値のいずれかの間の約48時間後の薬剤の腫瘍内濃度、例えば、約 $1\mu\text{M}$ ～約 $2\mu\text{M}$ の腫瘍内濃度、約 $1\mu\text{M}$ ～約 $3\mu\text{M}$ の腫瘍内濃度、約 $0.5\mu\text{M}$ ～約 $2\mu\text{M}$ の腫瘍内濃度、約 $0.25\mu\text{M}$ ～約 $2\mu\text{M}$ の腫瘍内濃度などを提供するために、PU-H71を投与することができる。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

【0293】

別の態様においては、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有する患者を処置する方法であって、約 $0.3\mu\text{M}$ ～約 $7.5\mu\text{M}$ の範囲の投与後約24時間での腫瘍内濃度および約 $0.05\mu\text{M}$ ～約 $3.5\mu\text{M}$ の範囲の投与後約48時間での腫瘍内濃度を提供するのに十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

【0294】

5.2.1.1.節で考察された通り、放射標識アッセイは、PU-H71の腫瘍曝露を決定する都合の良い手段を提供する。様々な薬物動態パラメータ、例えば、腫瘍におけるAUCおよび特定の期間にわたる薬剤の平均腫瘍内濃度を用いて、腫瘍曝露を測定することができる。いくつかの固形腫瘍を有する患者上で収集された大量の薬物動態データに基づいて、本発明者らは、特定の処置期間（例えば、2週間）にわたるAUCおよび平均腫瘍内濃度の測定が、薬剤の効果および毒性に関する重要情報を提供することを決定した。上記で考察された通り、用語「腫瘍AUC」とは、薬剤の投与から別の時点までの期間にわたる薬剤の累積細胞内濃度を指す。例えば、0時間～336時間の期間にわたる腫瘍の水分容積中のAUCは、ここでは腫瘍 $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ と呼ばれる。「0」時点は、新規処置サイクルの開始時に薬剤が初めて投与される時間を指してもよい。あるいは、「0」時点は、薬剤が処置サイクルの中央に投与される時点を示してもよい。複数の用量の薬剤を0時点～336時間の時点の様々な時間に投与することができることが理解される。以下に考察されるように、特定の範囲内にある腫瘍AUC値および平均腫瘍内濃度は、有効用量を提供する。

【0295】

一態様においては、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有する患者を処置する方法であって、約 $150\sim4,000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ を提供する十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。例えば、PU-H71の腫瘍 $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ は、約 $300\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $500\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $800\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $1200\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $1500\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $2000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $3000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ または約 $4000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ であってもよい。2つの上記値のいずれかの間の腫瘍 $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、例えば、約 $300\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $800\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、約 $500\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $800\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、約 $500\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $1000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、約 $1000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $1500\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、約 $1000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $2000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、約 $1500\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $2000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、約 $2000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $3000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、約 $2000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $4000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ 、約 $3000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $4000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の範囲の $\text{AUC}_{0\sim336\text{h}}$ などを提供するために、PU-H71を投与することができる。一態様においては、「0」時点は、新規処置サイクルの開始時である。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

【0296】

別の態様においては、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有する患者を処置する方法であって、約 $75\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ～約 $2,000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ の $\text{AUC}_{0\sim168\text{h}}$ を提供する十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。例えば、PU-H71の腫瘍 $\text{AUC}_{0\sim168\text{h}}$ は、約 $75\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $250\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $400\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $600\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $750\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $1000\mu\text{M}\cdot\text{h}$ 、約 $1500\mu\text{M}\cdot\text{h}$

または約2000 $\mu\text{M}-\text{h}$ であってもよい。2つの上記値のいずれかの間の腫瘍AUC_{0~168h}、例えば、約150 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約400 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}、約250 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約400 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}、約200 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約500 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}、約500 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約750 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}、約500 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約1000 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}、約750 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約1000 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}、約1000 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約1500 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}、約1000 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約2000 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}、約1500 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約2000 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~168h}などを提供するためにPU-H71を投与することができる。一態様においては、「0」時点は、新規処置サイクルの開始時である。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

10

【0297】

別の態様においては、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有する患者を処置する方法であって、約10 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約300 $\mu\text{M}-\text{h}$ のAUC_{0~48h}を提供する十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。例えば、PU-H71の腫瘍AUC_{0~48h}は、約15 $\mu\text{M}-\text{h}$ 、約20 $\mu\text{M}-\text{h}$ 、約25 $\mu\text{M}-\text{h}$ 、約30 $\mu\text{M}-\text{h}$ 、約40 $\mu\text{M}-\text{h}$ 、約50 $\mu\text{M}-\text{h}$ 、約80 $\mu\text{M}-\text{h}$ 、約100 $\mu\text{M}-\text{h}$ 、約150 $\mu\text{M}-\text{h}$ または約200 $\mu\text{M}-\text{h}$ であってもよい。2つの上記値のいずれかの間の腫瘍AUC_{0~48h}、例えば、約10 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約100 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~48h}、約10 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約80 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~48h}、約15 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約80 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~48h}、約15 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約50 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~48h}、約20 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約50 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~48h}、約20 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約40 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~48h}、約20 $\mu\text{M}-\text{h}$ ~約30 $\mu\text{M}-\text{h}$ の範囲の腫瘍AUC_{0~48h}などを提供するためにPU-H71を投与することができる。一態様においては、「0」時点は、新規処置サイクルの開始時である。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

20

【0298】

別の態様においては、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有する患者を処置する方法であって、約0.5 μM ~約7.5 μM の0~336時間のPU-H71の平均腫瘍内濃度（ここでは「PU-H71」_{avg}と呼ぶ）を提供する十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。例えば、0~336時間の「PU-H71」_{avg}は、約1 μM 、約3 μM 、約5 μM 、または約7 μM であってもよい。2つの上記値のいずれかの間の「PU-H71」_{avg}、例えば、約1 μM ~約5 μM 、約3 μM ~約7 μM 、約3 μM ~約5 μM などの範囲の「PU-H71」_{avg}（0時間~336時間に測定される）を提供するためにPU-H71を投与することができる。一態様においては、「0」時点は、新規処置サイクルの開始時である。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

30

【0299】

別の態様においては、本開示は、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有する患者を処置する方法であって、約0.25 μM ~約3.75 μM の0~168時間のPU-H71の平均腫瘍内濃度（「PU-H71」_{avg}）を提供する十分な量のPU-H71を患者に投与することを含む方法を提供する。例えば、0~168時間の「PU-H71」_{avg}は、約0.5 μM 、約1.5 μM 、約2.5 μM 、または約3.5 μM であってもよい。2つの上記値のいずれかの間の「PU-H71」_{avg}、例えば、約0.5 μM ~約2.5 μM 、約1.5 μM ~約3.5 μM 、約1.5 μM ~約2.5 μM などの範囲の「PU-H71」_{avg}（0時間~168時間に測定される）を提供するためにPU-H71を投与することができる。一態様においては、「0」時点は、新規処置サイクルの開始時である。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存的腫瘍を有するヒト患者である。

40

【0300】

50

当業者によって理解されるように、所望の「発がん性HSP90」占拠率、腫瘍AUCまたは $[PU-H71]_{avg}$ を達成するために投与する必要があるPU-H71の総量は、投与経路と投与スケジュールの両方に依存する。PU-H71を、静脈内、皮下、筋肉内および腹腔内などの様々な注入可能な経路により投与することができる。あるいは、PU-H71を経口投与することができる。

【0301】

本開示の一態様においては、PU-H71は、週1回、週2回、週3回、週4回または週5回から選択される投与スケジュールに従って、約 5 mg/m^2 ～約 250 mg/m^2 の範囲の用量で、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有するヒト患者に静脈内投与される。特定の態様においては、PU-H71は、週1回、週2回、週3回、週4回または週5回から選択される投与スケジュールに従って、約 20 mg/m^2 ～約 60 mg/m^2 の範囲の用量で、ヒト患者に静脈内投与される。特定の態様においては、PU-H71は、週1回、週2回、週3回、週4回または週5回から選択される投与スケジュールに従って、約 50 mg/m^2 ～約 250 mg/m^2 の範囲の用量で、ヒト患者に静脈内投与される。他の態様においては、PU-H71は、週1回、週2回、週3回、週4回または週5回から選択される投与スケジュールに従って、約 50 mg/m^2 ～約 100 mg/m^2 の範囲の用量で、ヒト患者に静脈内投与される。他の態様においては、PU-H71は、週1回、週2回、週3回、週4回または週5回から選択される投与スケジュールに従って、約 75 mg/m^2 ～約 200 mg/m^2 の範囲の用量で、ヒト患者に静脈内投与される。さらに他の態様においては、PU-H71は、週1回、週2回、週3回、週4回または週5回から選択される投与スケジュールに従って、約 75 mg/m^2 ～約 150 mg/m^2 の範囲の用量で、ヒト患者に静脈内投与される。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存性腫瘍を有するヒト患者である。

【0302】

好ましい態様においては、PU-H71は、週1回、週2回または週3回の投与スケジュールに従って、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有するヒト患者に静脈内投与される。特定の態様においては、PU-H71は、週2回の投与スケジュールに従って、約 50 mg/m^2 ～約 150 mg/m^2 または約 70 mg/m^2 ～約 125 mg/m^2 の範囲の量で静脈内投与される。別の特定の態様においては、PU-H71は、週3回の投与スケジュールに従って、約 20 mg/m^2 ～約 100 mg/m^2 または約 40 mg/m^2 ～約 80 mg/m^2 の範囲の量で静脈内投与される。別の態様においては、PU-H71は、週1回の投与スケジュールに従って、約 90 mg/m^2 ～約 190 mg/m^2 または約 100 mg/m^2 ～約 250 mg/m^2 の範囲の量で静脈内投与される。1つの特定の態様においては、腫瘍を有する患者は、HSP90依存性腫瘍を有するヒト患者である。

【0303】

一態様においては、PU-H71は、2週間にわたって週1回または週2回、次いで、1週間休みの投与スケジュールに従って、固形腫瘍、リンパ腫または血液悪性腫瘍を有するヒト患者に静脈内投与される。別の特定の態様においては、PU-H71は1週間にわたって週1回または週2回、次いで、1週間休みの投与スケジュールで投与される。あるいは、PU-H71は間に週単位の休みをとらずに週1回または週2回投与することができる。

【0304】

5. 4. 予後および診断適用のためのHSP90に依存する経路およびがんタンパク質の評価

5. 1. 節で考察された通り、がん細胞における「発がん性HSP90」と正常HSP90との比に関する情報を用いて、がん細胞の生存および増殖におけるHSP90の寄与を決定することができる。さらに、本発明者らは、生存のためにHSP90に依存することが多い特定のタンパク質および経路を同定した。患者のがん細胞中でのこれらのタンパク質および/またはこれらの経路の発現レベルの同定は、特に、HSP90療法に応答した患者に対して評価した場合、患者のがんにおけるHSP90タンパク質の役割に関する

重要な情報を提供することができる。したがって、本開示は、患者に存在するヒトがんが H S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、(a) 患者のがんから、H S P 9 0 タンパク質を発現する細胞を含有する試料を取得するステップ；(b) 以下のパラメータ：活性化された A K T 経路、P T E N 腫瘍抑制因子の機能もしくは発現の欠陥、活性化された S T A T 5 経路、または B c l 2 ファミリーメンバー、例えば、B c l - x L のタンパク質発現のうちの少なくとも 1 つの存在を、試料中に存在する細胞について評価するステップ；および(c) H S P 9 0 阻害剤を用いる療法に応答した 1 人以上のがん患者に由来するヒトがん細胞について、ステップ(b) で得られた評価を、同じパラメータまたはステップ(b) で評価されたパラメータの所定の参照評価と比較して、それにより患者のがんが H S P 9 0 阻害剤を用いる療法に
10 応答する可能性があるかどうかを決定するステップを含む方法を提供する。特定の態様においては、細胞は、乳がん細胞または急性骨髄性白血病(A M L)細胞である。

【0305】

毎年、多数の潜在的な新薬が臨床評価に入るにも拘らず、登録に達するのは 5 % ~ 8 % に過ぎない。特に懸念されるのは、第 3 相における高い失敗率であり、見積もりで 5 0 % の抗がん剤が開発停止になる。そのような失敗は特に費用が高くつき、多くの患者がより有効な処置を受ける可能性が奪われる。これらの厳しい統計は、患者選択および臨床試験濃縮のための予測的バイオマーカーを発見し、実現する必要性を明確に物語っている。

【0306】

本発明者らが標的化剤に関してここ数年で得られた結果から学んだことは何か？いかなるバイオマーカーによっても選択されていない試験集団において単一の薬剤として、または化学療法に加えて新しい薬剤を投与した場合、多くの臨床試験は陰性の結果をもたらしたが、少数の事例では、統計的に有意な利益が証明された。しかしながら、この利益は、最良でも、全生存の小さいか、または中程度の絶対的延長からなっていた。他方、バイオマーカーにより誘導される患者選択に基づく標的化剤の使用と共に得られるより高い絶対的利益の例は定常的に増加する。バイオマーカーは、特定の機構に基づく療法を用いる効果の正確な予測因子を統合するために腫瘍および患者の特徴を用いる可能性を提供し、それぞれ個々の患者のための処置の選択を指導する。特に、実証された予測マーカーは、特定の処置から正の臨床転帰を有する可能性がある個体を予測的に同定することができる。
20

【0307】

本開示は、これらの問題を認識し、がんの処置への H S P 9 0 阻害剤の実装におけるバイオマーカーにより誘導された患者選択および臨床試験濃縮のためのバイオマーカーの開発および実証を認識する。
30

【0308】

5. 4. 1. 乳がんにおける H S P 9 0 に対するアポトーシス感受性を予測するマーカー

腫瘍の遺伝的作製に応じて、細胞増殖抑制または細胞毒性効果が B C における H S P 9 0 阻害から生じてよい。しかしながら、診療所においては、処置に対して細胞増殖抑制性ではなく高度にアポトーシス性の応答が最も望ましい。かくして、P U - H 7 1 および他の H S P 9 0 阻害剤でチャレンジした場合にアポトーシスを受ける可能性がより高い乳
40 がん腫瘍を同定するために、本発明者らは、細胞系中での予備試験を行って、H S P 9 0 阻害の際に最も高いアポトーシス応答を伴う分子的病変を同定した。

【0309】

これらの試験は、活性化された A k t ならびに上昇した B c l - x L および／または B c l 2 および／または M c l - l a s 主要エレメントの H S P 9 0 により指令される調節が H S P 9 0 阻害に対する腫瘍のアポトーシス感受性(すなわち、応答を予測するバイオマーカー)を付与することを提唱する。当業者であれば、活性化された A k t 経路の測定には、この経路と関連する 1 つ以上のタンパク質、例えば、限定されるものではないが、A k t、S 6、P R A S 4 0、B c l 2、m T O R、I K K、N F κ B の発現および／またはリン酸化状態を測定することが必要であってもよいことを理解できる。A k t 経路お
50

よびその活性化に関する詳細な情報は、KEGG PATHWAYデータベース；および National Cancer Institute's Nature Pathway Interaction Database中にオンライン上で見出してもよい。また、Cell Signaling Technology, Beverly, Mass.；BioCarta, San Diego, Calif.；およびInvitrogen/Life Technologies Corporation, Clarksbad, Calif.のウェブサイトも参照されたい。この経路は、限定されるものではないが、1-ホスファチジル-D-ミオ-イノシトール4, 5-ビスホスフェート、14-3-3、14-3-3-Cdkn1b、Akt、BAD、BCL2、BCL2L1、CCND1、CDC37、CDKN1A、CDKN1B、シトルリン、CTNNB1、EIF4E、EIF4EBP1、ERK1/2、FKHR、GAB1/2、GDF15、グリコーゲンシンターゼ、GRB2、Gsk3、Ikb、Ikb-Nfkb、IKK（複合体）、ILK、インテグリン、JAK、L-アルギニン、LIMS1、MAP2K1/2、MAP3K5、MAP3K8、MAPK8IP1、MCL1、MDM2、MTOR、NANOG、Nfkb（複合体）、一酸化窒素、NOS3、P110、p70S6k、PDPK1、ホスファチジルイノシトール-3, 4, 5-トリホスフェート、PI3Kp85、PP2A、PTEN、PTGS2、RAF1、Ras、RHEB、SFN、SHC1（EG：20416を含む）、SHIP、Sos、THEM4、TP53（EG：22059を含む）、TSC1、Tsc1-Tsc2、TSC2、YWHAEから構成される。

10

【0310】

20

当業者であれば、1つ以上のBcl-2ファミリーの抗アポトーシス分子、例えば、Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1の発現の測定がこの抗アポトーシスファミリーの寄与を理解するのに必要であってよいことを理解できる。

【0311】

確立されたBC細胞における試験はHSP90療法に応答する可能性がより高いBCに関する価値ある情報を提供するが、培養細胞は現実の臨床疾患を完全に要約することはできない。乳がんの実験モデルは非常に少数の細胞系を包含し、これは数十年も前に開発されたものである。いくつかの細胞系は多くの元の特徴を保持しているが、本発明者らは患者試料と細胞系との、HSP90のレベルおよび他の特徴における相違を見出したが、これは部分的には、培養ストレスの結果であり得る。さらに、培養細胞系は、環境が腫瘍細胞に対して有する効果を要約しない。同時に、本発明者らは、初代移植片は腫瘍の特徴と類似し、細胞系よりも忠実に処置に対して応答することができると考えている。

30

【0312】

かくして、「HSP90療法に対して最も感受性が高いBC腫瘍の範囲は何か？」という疑問に取り組むために、本発明者らの試験は、脱同定された病理的廃棄物から得られた臨床乳がん腫瘍標本中でのPU-H71の評価を含む。

【0313】

これらの試料中で、本発明者らは、HSP90阻害剤に対するBC腫瘍の感受性と、選択されたバイオマーカーの発現との相関関係を確立した。以降の段階は、次の臨床試験における患者選択のためにこれを前進させ、提唱することである。一度、スコアリング系が定義、実証されたら、最終的にはFFPEまたはCTC上で患者選択を行って、対象のマーカーを、予測された応答と相関させることができる。次いで、そのような診断尺度を、HSP90療法に応答する可能性がより高いBC腫瘍の選択における一般的な実務として導入することができ、HER2-スコアリングと同じ様式で、トラスツズマブ療法のための患者選択を指導するために用いられる。

40

【0314】

PU-H71に対するBC試料の感受性のex vivoでの試験。BC患者腫瘍の新鮮な組織切片を、ex vivoでPU-H71に曝露して、がん細胞の全体的感度および正常細胞（すなわち、切片中に存在する場合、血管、良性の管）に対する効果を評価する。PU-H71の濃度および曝露時間は、この薬剤を用いる予めのin vitroと

50

*in vivo*との両方でのPK分析に基づくものであり、最大でマイクロモル濃度のPU-H71が投与後24時間および48時間で腫瘍中に送達され、そこで保持されることが決定された。応答は1つまたは2つの尺度により決定される：1. アポトーシスを示す形態学的変化を示す細胞のH&E染色試料中での定量および2. TUNEL陽性細胞の定量。

【0315】

患者組織の調達：HSP90阻害剤臨床試験の間の脱同定された試料および針生検からの病理的廃棄物を、Institutional Review Boardの指針および認可に従って取得する。新鮮に調達された組織をすぐに用いる。

【0316】

*ex vivo*での感受性試験：乳腺切除標本の外科的除去の直後に、組織を、Tissue Procurement Services (TPS) area of the Pathology suiteに輸送する。一度、病変を置いたら、組織を滅菌条件下で収穫する。評価のために除去された標本サイズは、典型的には5~10mm x 5~10mmである。最も生存能力のある領域をサンプリングするためにあらゆる努力を払う。病変から遠くの、正常乳房上皮組織を代表する同等のサイズの標本を除去する。両標本を1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む最少必須培地(MEM)中に入れる。病変の小部分および正常乳房上皮組織の全小片は、WBによる将来の分子の評価のために「簡易」凍結を受ける。残りの部分の病変(乳房切除)を、病理学的評価のために加工する。全ての病変について、病理は、受容体状態、増殖マーカー、上皮マーカーおよび非標準バイオマーカー(例えば、pAKT、BclxL、HSP90およびHsp70)についてさらに評価される10個の非染色を伴うヘマトキシリン/エオシン(H&E)染色されたスライドのためのIHCを提供する。

【0317】

予備分析から、本発明者らは、新鮮な組織スライスが一次細胞単離よりもHSP90阻害評価のための迅速でより有効な*ex vivo*での方法を提供することを学んだ。さらに、それは周囲の組織の内因的環境中のがん細胞を保存する。間質細胞と腫瘍細胞との相互作用はがんの増殖および進行において主要な役割を果たすことが知られているため、これは重要である。この方法では、組織(すなわち、病変)を、プラスチック型に入れ、6%アガロース中に埋込む。次いで、アガロースに埋込まれた組織をVibratomeのステージ上に載せ、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むMEMを含有する冷却された容器(組織保存用)中に沈める。次いで、組織を金属刃を用いてスライスし、200μmの厚さの病変の連続切片を作製する。それぞれの切片(周囲のアガロース埋込み培地を除く)を、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むMEMを含有する24穴組織培養プレート中にすぐに入れる。5mm x 5mmの組織小片から、約25個の切片が作製される。これにより、最少4回用量のHSP90阻害剤およびビヒクルのみを含むもので処理された組織切片の分析を繰り返すことができる。一度、組織切片がジスパーゼへの簡単な曝露により酵素的解離を受けたら、反復物を、IHCおよび生存能力アッセイ(自動化プレートリーダーまたはサイトスピン調製)の両方によりアッセイすることができる。

【0318】

現在まで、全てのBCサブタイプを包含する42個の標本が獲得されている。これらのうち、9個は受容体状態陰性のものであった。200μmの厚さの「新鮮な組織切片」を増加用量のPU-H71に曝露させた、原発腫瘍(PT)とリンパ節転移(LN)(存在する場合)の両方を評価した。PU-H71を用いる三重陰性浸潤性腺管がん(IDC)の処置は、用量依存的様式で、原発腫瘍とリンパ節転移の両方のアポトーシスを達成した。興味深いことに、LN転移(met)は、対応するPTよりもPU-H71に対してより感受性が高いと考えられる。最も重要なことに、正常(例えば、血管、リンパ球)および良性(例えば、管、小葉)組織は、PU-H71への48時間の曝露後にも未変化のままであった。データは、4つの異なる感受性群におけるTNBC事例のクラスタリングを示

す：非常に高感受性、0.5 μ MのPU-H71に見られる100%のアポトーシス（上の曲線、図40A）、1 μ MのPU-H71で100%のアポトーシスを示す感受性（中央の曲線、図40A）、1～2.5 μ Mで見られる約50%のアポトーシスを示す部分的耐性（下の曲線、図40A）および耐性（PT#14、試験濃度のいずれでも見られるアポトーシスなし、示さず）。

【0319】

図40Bに見られるように、いくつかの腫瘍は、細胞系上で生成された予備データから予測されるよりもHSP90阻害に対する感受性が高い。具体的には、MDA-MB-468は最も感受性が高い乳がん細胞系の1つであるが（Caldasら、PNAS 2009）、本発明において提示される試験は、PU-H71に対してはるかに感受性が高い腫瘍細胞をヒト乳がん患者から得られた一次標本中に見出すことができることを示す。具体的には、MDA-MB-468細胞の約50%がアポトーシスを受けることを観察するためには、その細胞中で0.5 μ MのPU-H71の48時間の処理が必要であるが、本発明者らは、いくつかのHER2+、三重陰性およびER+乳がんについて、0.05 μ Mほどの濃度が類似する効果を誘導することを見出す。さらに、MDA-MB-468細胞の約100%がアポトーシスを受けることを観察するためには、その細胞中で約5 μ MのPU-H71の48時間の処理が必要であるが（図32b）、本発明者らは、いくつかのHER2+、三重陰性およびER+乳がんについて、0.5 μ Mほどの濃度が類似する効果を誘導することを見出す。そのような試験は、治療効果をもたらすと予想されるPU-H71の必要な腫瘍内濃度に関する情報を提供する。

【0320】

GIおよび臓器がんにおける調査は同様の知見をもたらした。

【0321】

5.4.1.1. IHCおよびWBによる提唱されたバイオマーカーの発現の調査、ならびにバイオマーカー発現による試料のスコア化

IHCは、HSP90、Hsp70、p-Akt/AktおよびBcl-xLの低い～高い発現に基づいて試料をスコア化する。HSP90、p-Akt/Akt、Bcl-xLおよびHsp70染色強度は、0～3のスケールでそれぞれの標本についてスコア化され（2回）、0は陰性、1は弱い陽性、2は中程度の陽性、および3は強い陽性の染色を表す。スコアリングは非常に主観的であることが多いため、IHC単独ではいくらか問題が多いが、ウェスタンブロットなどの第二の方法と同時的なその使用はIHCを「訓練」および実証して、ex vivoとの、および患者応答における相関を作る。得られたタンパク質の量が古典的な膜-WBにとって十分なものでない場合、超高感度キャピラリーWB技術が用いられる。典型的な針生検標本により、20～40mgの組織が得られ、これは提唱されるIHCにとって、および潜在的にはキャピラリーWB分析にとって十分なものである。この情報を臨床応答の状況で分析し、提唱されたスコアリング方法の妥当性を示すことができる。すなわち、本発明者らは、臨床応答を、バイオマーカー評価により予測された応答と相関させる能力を有する。一度、スコアリング系が定義および実証されたら、最終的にはFFPE上で患者選択を行って、対象のマーカーを予測された応答と相関させることができる。次いで、そのような診断尺度を、HSP90療法に応答する可能性がより高いTNBC腫瘍の選択における一般的な実務として導入することができ、HER2-スコアリングと同じ様式で用いて、トラスツズマブ療法のための患者選択を指導するために用いる。

【0322】

いくらかの患者については、腫瘍に到達できない（深い内部転移）か、または同意が得られないため、生検が可能でなくてもよい。これらの事例については、本発明者らは、血液から収穫された循環腫瘍細胞（CTC）が情報的価値があるかどうかを精査するつもりである。疾患の段階に応じて、進行したがん患者については、本発明者らはこの技術を用いて1,000～10,000個のBC細胞を回収することを期待する。この細胞数は、タンパク質のキャピラリー-WB分析（または必要に応じて、リアルタイムqPCR分

析) にとって、ならびに免疫磁氣的濃縮、次いで、フローサイトメトリーによるHSP90、Hsp70、p-AktおよびBcl-xL発現のスコアリングにとって十分なものである。

【0323】

図40は、ホスホ-Akt、Ser473を用いる高い染色により示されるように、活性化されたAktを有する乳がん腫瘍も、HSP90阻害に対して非常に高感受性であることを示すものである。

【0324】

5. 4. 2. 急性骨髄性白血病(AML)におけるHSP90阻害に対するアポトーシス感受性の決定因子

白血病細胞においてアポトーシスを誘導するために設計された標的化療法は、最も有望な抗白血病戦略である。本発明者らは、AMLにおける熱ショックタンパク質90(HSP90)療法に対するアポトーシス感受性を予測するバイオマーカーを探索した。本発明者らは、遺伝的に異なるAML細胞系のパネルへのHSP90阻害剤の添加が、細胞増殖を強力に阻害し、いくつかのAML細胞特異的がんタンパク質、例えば、突然変異FLT3、TEL-TRKC、AML1-ETO、突然変異c-KITおよび突然変異JAK2の分解を誘導した。注目すべきことに、これらの細胞がHSP90阻害の際にアポトーシスを受ける傾向は、かなり変化した。最も感受性が高い細胞系はMOLM-13、MV-4-11およびM0-91細胞であり、これらの細胞系のそれぞれについて、本発明者らはHSP90阻害剤処理の48〜72時間後に初期細胞集団のほぼ100%の殺傷を観察した。対照的に、これらの条件下で、HELおよびHL-60細胞においてはわずかに20%の細胞死が見られた。本発明者らは次に、AML中で脱調節されることが知られる公知の発がんシグナリング経路の特異的阻害剤を利用して、HSP90阻害に対するAML細胞のアポトーシス感受性がPI3K-AktおよびSTAT5活性化と相関するが、Raf-MAPK経路の活性化とは相関しないことを証明した。重要なことに、細胞系、異種移植モデルおよび同系細胞系システムにおいて、類似する結果が観察された。本発明者らはまた、Bcl-xL過剰発現の状況下でも、これらの2つの経路の二重活性化が、HSP90が阻害された場合にAMLのアポトーシス閾値を低下させることも見出した。総合すれば、本発明者らの知見は、AktおよびSTAT5シグナリングが活性化されたAML患者が、HSP90阻害剤療法から利益を得る可能性が最も高く、これらの重要なシグナリング経路が特異的に活性化された患者を臨床試験に登録することを目標にすべきであることを示唆する。

【0325】

重要なことに、AMLを有する患者の50〜70%は、AktのThr308とSer473の両方のリン酸化を示す。この分子は、AMLにおける増殖、生存および薬剤耐性に寄与し、有害な転帰と関連する。総合すれば、本発明者らの知見は、AKTおよびSTAT5シグナリングが活性化されたAML患者がHSP90阻害剤療法から利益を得る可能性が最も高く、これらの重要なシグナリング経路が特異的に活性化された患者を臨床試験に登録することを目標にすべきであることを示唆する。

【0326】

5. 4. 2. 1. HSP90阻害はAML細胞系における細胞型特異的殺傷を誘導するいくつかの化学的に異なる小分子HSP90阻害剤が報告されており、いくつかは臨床または後期前臨床調査中である(Chiosisら、2008)。これらのうち、アンサマイシン天然産物誘導体17-AAGおよび17-DMAG、ならびに合成化合物CNF-2024(BIIB021)およびPU-H71は全て臨床評価中であり、PU-H71の近い誘導体であるPU-DZ13は前臨床開発中である。

【0327】

HSP90阻害剤に対するAML細胞系の感受性範囲を評価するため、およびその遺伝的背景と、HSP90療法によるアポトーシスの誘導との可能な関係を調査するために、本発明者らは、変化した細胞パネルを利用した。具体的には、本発明者らは、AML1-

10

20

30

40

50

ETO融合物および突然変異c-KIT (N822K) タンパク質を含有する細胞系であるKasumi-1およびSKNO-1; MLL-AF9融合タンパク質とFLT3-ITD突然変異の両方を含有する、MDSから進化したAML再発患者の末梢血から確立されたヒト細胞系であるMOLM-13; TEL-TRKC融合タンパク質を含有し、構造的に活性化されたSTAT5も担持するM0-91; ならびに最後に、JAK2-V617F突然変異を含有するHELを選択した。HSP90阻害剤は、用量および細胞依存的様式で、それぞれの試験されたAML細胞系の増殖を強力に阻害し、細胞殺傷も誘導し、細胞系間で顕著な差異が観察された。最も感受性が高いのは、72時間後に初期細胞集団の100%の殺傷が見られたMOLM-13およびM0-91細胞、次いで、50~80%の殺傷が見られたKasumi-1およびSKNO-1、ならびに20%の殺傷が見られたHELであった。正常な末梢血白血球は同様の濃度で影響されなかった。

10

【0328】

異なるHSP90阻害剤がAML細胞系を殺傷する能力は類似しており、これは、化合物の細胞毒性が共通の作用機構、すなわち、HSP90阻害を介して生じることを示唆している。

【0329】

5.4.2.2. HSP90阻害はAML細胞中でアポトーシスを誘導する

かくして、HSP90阻害剤によるAML細胞殺傷を担う機構をさらに調査するために、PU-H71を選択した。アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド二重染色、PARP切断およびカスパーゼ3、7の活性化により証明されるように、AMLにおけるPU-H71の細胞毒性は主にアポトーシスの誘導を介して生じた。PU-H71を用いる処理の72時間後にアポトーシスを受ける細胞の数は、MOLM-13およびM0-91については100%、SKNO-1およびKasumi-1については50~60%、ならびにHELについては30%に近づき、その値は観察された細胞殺傷と良好に一致していた。MOLM-13およびM0-91においては10倍、ならびにKasumi-1およびSKNO-1においては2倍の、カスパーゼ3、7活性化の増加が、早くも24時間で観察された。HSP90阻害剤処理の48時間後にはM0-91細胞系について本質的に生細胞は検出されなかった。最も感受性の高い細胞であるMOLM-13およびM0-91においては、アポトーシスは抗アポトーシス分子Bcl-xLの下方調節と関連していた。

20

30

【0330】

5.4.2.3. HSP90の阻害は重要なAMLがんタンパク質を枯渇させるが、この効果はアポトーシス感受性とは相関できない

HSP90阻害剤に対するAML細胞系の異なるアポトーシス感受性は、特定の細胞系においては有効なHSP90阻害に起因するが、他のものにおいては無効であり得る。この仮説を試験するために、本発明者らは、多くのがんにおいてHSP90依存的であることが証明された2つのタンパク質、RAF-1およびAKTキナーゼに対するPU-H71の効果を評価した。HSP90阻害剤は、全ての試験した細胞中のこれらのタンパク質の定常状態レベルを用量依存的および顕著に低下させた。これは、HSP90ががん細胞中でのこれらのキナーゼの安定性および機能にとって必要とされる確立された機構と一致する。

40

【0331】

これらの「脾臓がん」HSP90クライアントタンパク質に加えて、PU-H71はまた、特異的白血病誘発因子、例えば、MOLM-13における突然変異FLT3、M0-91におけるTEL-TRKC、Kasumi-1およびSKNO-1におけるAML1-ETOおよび突然変異cKIT、ならびにHELにおける突然変異JAK2 (AML細胞特異的HSP90がん性クライアント) の分解をもたらした。突然変異FLT3、cKITおよびJAK2、ならびに融合タンパク質AML1-ETOは、AMLまたは他の形質転換細胞中でのHSP90阻害に対して感受性が高いことが以前に報告された。しかしながら、融合タンパク質TEL-TRKCは、M0-91細胞系中でのPU-H71によ

50

るTEL-TRKCの強力な分解を示す本発明者らの知見により示されるように、HSP90の新規クライアントである。

【0332】

まとめると、本発明者らの知見は、HSP90阻害剤が、AML細胞から、白血病誘発にとって必須の事象であると主張される「2ヒット」を含む重要な悪性腫瘍誘導タンパク質を枯渇させることを示すが、この効果と、HSP90阻害剤がAML細胞中でアポトーシスを誘導する能力との相関は明らかではない。

【0333】

5. 4. 2. 4. HSP90、PI3K/AKTおよびJAK/STAT経路の阻害に対するアポトーシス感受性はAML細胞中で重複する

10

遺伝子組成とHSP90阻害に対するアポトーシス感受性との関係は明らかではないため、潜在的な答えは、抗アポトーシス表現型をもたらす機能的な差異またはこれらの細胞間での特定の抗アポトーシス分子の示差的発現にあり得る。3つの主要な経路がAMLにおけるアポトーシスの調節と関連している：PI3K/AKT/NFκB、JAK/STATおよびras/MAK経路。より重要なことに、HSP90はこれらの経路に沿ういくつかの重要な分子を調節し、HSP90の阻害はこれらの分子、例えば、p-AKT、p-STATおよびp-ERKの組合せ阻害を誘導することができる。

【0334】

AML細胞系におけるアポトーシスに対する個々の経路の有意性を精査するために、本発明者らは、特定の小分子、例えば、Akt阻害剤VILI、Akt1/Akt2活性を強力および選択的に阻害するキノキサリン化合物(AKTi)、MAKキナーゼMEK阻害剤PD98059(MEKi)およびpan-Jak阻害剤2-(1,1-ジメチルエチル)-9-フルオロ-3,6-ジヒドロ-7H-ベンザ[h]-イミダザ[4,5-f]イソキノリン-7-オン(JAKi))を用いた。本発明者らはまた、3つのさらなる系：mycがん遺伝子発現について陽性の広く研究されている前骨髄性細胞系であるHL-60、単球性AMLを有する1歳男児の末梢血に由来する細胞系であるTHP-1、ならびに4;11転座およびFLT3-ITD突然変異を含む細胞系であるMV4-11の添加によりAML細胞プールを拡張した。

20

【0335】

AKT、JAKおよびMEK阻害剤(AKTi、JAKiおよびMEKi)ならびにHSP90阻害剤PU-H71を用いる処置の際のアポトーシス細胞の数を、特定の阻害剤の添加後24、48および72時間で定量した。MEK阻害剤の添加時に少ないか、またはほんのわずかなアポトーシスの誘導が生じた。他方、AKTおよびJAK阻害剤は、アポトーシスに対する可変的であるが、強力な効果を有していた。アポトーシスの分析は、AKTiに対して感受性である細胞が、HSP90が阻害された場合にアポトーシスする可能性が最も高いものでもあることを示し(勾配=0.9023±0.09572)、これは、HSP90阻害に対するアポトーシス感受性がAML中でのPI3K/AKT経路阻害に対する感受性と潜在的に相関することを示唆している。JAK/STAT経路とHSP90阻害との相関もまた良好であった(勾配=0.8245±0.1490)が、2つの細胞系、MV4-11およびTHP-1は明らかに線から外れていた。これらの知見は、PI3K/AKTとJAK/STAT経路のいずれか、またはその両方への生存のためのAML細胞依存が、HSP90阻害に対するアポトーシス感受性と相関し、それに潜在的に影響することを示唆する。

30

40

【0336】

5. 4. 2. 5. AKTのin vivoでの阻害およびSTAT5-SHP90阻害の動態および効力は腫瘍アポトーシスと相関する

本発明者らは次に、マウスに異種移植されたHELとM0-91腫瘍の両方におけるHSP90阻害の薬力学的効果を分析した。培養細胞と違って、in vivoモデルの使用により、HSP90依存的経路阻害のリアルタイムモニタリングが可能になる。HSP90に最も依存する経路はまた、その薬理的阻害に対して最も感受性が高いため、それ

50

らは依然として腫瘍中で最も長い時間、PU-H71により阻害される。したがって、上昇したp-AKTおよびp-STAT5を担持し、両経路の活性化に依存すると考えられるM0-91腫瘍において、PU-H71は顕著なアポトーシスを誘導した。M0-91におけるアポトーシスはPU-H71の1回用量の投与後96時間持続し、これはAKTとSTATの両方の強力な阻害を反映する。最も高いレベルの切断されたPARPは、PU-H71投与後12~72時間の間隔で、p-AKTとp-STAT5レベルの両方が初期レベルの70~100%低下した時に観察された。PARPに対するPU-H71の効果は96時間までに低下し、その時、p-STAT5ではなくp-AKTがベースラインレベルまで回復した。

【0337】

HEL異種移植腫瘍は、PU-H71によるアポトーシス誘導に対してM0-91腫瘍よりも感受性が低かった。培養条件下では、HEL細胞は上昇したp-STAT5を発現し、JAKiまたはPU-H71によるJAK/STAT経路の阻害は、20~30%の細胞にアポトーシスを受けさせる。他方、AKTiはこれらの細胞における効果がほとんどないか、または全くない。したがって、限定されたPARP切断およびカスパーゼ3活性化が、これらの細胞においてHSP90阻害時に見られる。

【0338】

それにも拘らず、また組織培養とは対照的に、ヌードマウス中に異種移植した場合、HEL細胞は低レベル~中レベルのp-AKT発現を示す。AKT活性は環境、例えば、サイトカインによりAML細胞中で刺激され得ることが報告されているため、これは驚くべきことではなく、腫瘍組織に対して独自のストレス要因、例えば、低酸素、酸性および異常な血管形成のため、*in vivo*での腫瘍は、生存のためにAKT活性により多く依存してもよい。PU-H71は培養HEL細胞中によりHEL腫瘍中で顕著により高いアポトーシスを誘導するため、異種移植されたHEL細胞中でのAKT活性の上昇が腫瘍生存にとって必要であると考えられる。M0-91腫瘍に関して、最も高いレベルの切断されたPARPは、p-AKTとp-STAT5レベルの両方がPU-H71によって初期レベルの70~100%低下した時（PU-H71投与後12~48時間の間隔で）に観察された。PARPの切断は、p-STAT5ではなくp-AKTがベースラインレベルに回復した時（72時間）に有意に低下した。

【0339】

まとめると、本発明者らのデータは、AML中のHSP90阻害剤のアポトーシス活性は、活性化されたp-AKTおよびp-STAT5種の下方調節と相関し、その尺度である。p-Akt [すなわち、Ser473]の他に、Akt経路の活性化状態を、PU-H71処置によっても下方調節される、S6、s6kまたはmTORのリン酸化状態の尺度として決定することができる。この観察はまた、AKTおよびSTAT経路活性化へのAML細胞の付加的依存もまた、それらをHSP90阻害に対してより感受性にすることを暗示する。

【0340】

5. 4. 2. 6. HSP90阻害は、生存のためにPI3K/AKTおよびJAK/STAT経路に依存した細胞においてアポトーシスを誘導する

この仮説を証明するために、本発明者らは、FL5.12同系細胞系を利用した。FL5.12は、機能的JAK/STAT経路を含むインターロイキン-3（IL-3）依存的細胞系として誘導されたものであり、それは初期のリンパ球前駆細胞の特有の特徴を有する。親細胞とトランスフェクト細胞は両方とも、Ser473上でのAKTリン酸化およびTyr694上でのSTAT5リン酸化により示されるように、それぞれ中程度のレベルの活性AKTおよびSTAT5を発現する。p-AKTではなくp-STAT5のレベルは、IL-3の存在に依存する。ドキシサイクリン（DOX）誘導性プロモーターの制御下での構成的に活性化されたミリスチル化形態のAKT（mAkt）の導入により、これらの細胞中でのp-AKTレベルの調節がさらに可能になる。一緒になって、これらの細胞は、活性化されたAKTおよびSTAT5経路へのHSP90阻害剤アポトーシ

10

20

30

40

50

ス感受性の依存性を評価するための良好な同系モデルである。

【0341】

mAKTでトランスフェクトされた細胞をAKTiで処理した場合、5～7%から15～20%のアポトーシス細胞の増加が見られた。この値は、これらの細胞の生存に対する内因性p-AKTの寄与を反映する。AKT活性をDOXの添加により増加させた場合、細胞は生存のためにAKTにより依存するようになり、AKTiは30%のアポトーシス細胞をもたらした(P=0.015)。

【0342】

mAKTでトランスフェクトされた細胞をHSP90阻害剤で処理した場合、約35～40%のアポトーシス細胞が検出された。この値は、これらの細胞の生存に対する内因性p-AKTおよびp-STAT5の組合せた寄与を反映する。DOXによるp-AKTレベルのさらなる増加は、PU-H71依存時に35～40%から50%のアポトーシス細胞の増加をもたらした。

【0343】

総合して、これらの知見は、HSP90阻害剤に対するAML細胞のアポトーシス感受性が、AKTおよびSTAT経路への生存のための細胞の依存を反映することを示す。

【0344】

5.4.2.7. Bcl-xL過剰発現はAMLにおけるHSP90阻害のアポトーシス効果を阻害することができない

構成的に高レベルのBcl-xLは、様々なカテゴリーの化学療法剤に対する白血病細胞の耐性と関連していた。したがって、本発明者らは、Bcl-xLの導入がAKTおよびSTATへの生存のためのFL5.12トランスフェクト細胞の依存性を克服するかどうか、PU-H71によるこれらの経路の阻害に対してそれらを耐性にするかどうかを調査した。この仮説を調査するために、本発明者らは、アポトーシス阻害剤Bcl-xLを含有する発現ベクターで安定にトランスフェクトされたFL5.12.mAKT細胞を利用した。これらの細胞は、*in vitro*で増殖のためにIL-3に依然として依存する。これらの細胞中では、M0-91細胞と同様、STAT5およびAKT経路の同時的活性化ならびにBcl-xLの過剰発現が観察される。M0-91の場合と同様、PU-H71によるHSP90阻害は、これらのタンパク質の活性および定常状態レベルの低下をもたらし、そのアポトーシス効果を保持した。

【0345】

5.4.2.8. 考察

毎年、多数の潜在的な新薬が臨床評価に入るにも拘らず、登録に達するのは5%～8%に過ぎない。特に懸念されるのは、第3相における高い失敗率であり、見積もりで50%の抗がん剤が開発停止になる。そのような失敗は特に費用が高くつき、多くの患者がより有効な処置を受ける可能性が奪われる。これらの厳しい統計は、患者選択および臨床試験濃縮のための予測的バイオマーカーを発見し、実現する必要性を明確に物語っている。本発明者らの研究は、AMLにおけるこの問題に取り組むものであり、HSP90阻害に対するアポトーシス感受性が抗アポトーシスの役割を有するシグナリング経路への生存のための累積的依存と相関することを示す。本発明者らは、これに関して主要な経路として活性化されたAktおよびSTATを同定する。

【0346】

AKTシグナリングは急性AML患者の芽球中で活性化されることが多く、これらの細胞の増殖、生存および薬剤耐性に強く寄与する。AMLを有する患者の50～70%が、Thr308とSer473 AKTの両方のリン酸化を示す。AKT活性化を示す患者の無病生存期間と全生存期間は両方とも、AKT活性化を示さない患者と比較して有意に短かったが、これは、AKT不活化がAMLにおける強力な戦略であってよいことを全体的に示唆する。HSP90は、同様に形質転換依存的様式で、この経路およびその重要なエレメントのいくつかを調節する。したがって、一次急性骨髄性白血病(AML)細胞中のHSP90の発現とpAKTの発現との有意な相関が観察されたが、これは、活性の

増加およびA K T経路への細胞の依存を緩衝するために、H S P 9 0過剰発現がA M L細胞にとって必要であることを示唆している。

【0347】

構成的なS T A T活性化はまた、約70%のA M L試料中で起こる。A M L細胞中でのS T A T活性化は、限定されるものではないが、F L T 3 I T DおよびI L - 6の自己分泌刺激と関連していた。しかしながら、S T A T経路の他の上流のモジュレーターもまた、S T A Tの活性化において役割を果たしていてもよい。実際、K I T突然変異はJ A K / S T A T経路を活性化することも見出されている。高いS T A T 5およびF L T 3リン酸化を示すA M Lの事例は、一般的に、同時的S T A T 5リン酸化を示さないA M L芽球と比較して、より低い割合の同時的アポトーシスを示した。J A K / S T A T遺伝子を含む転座は、S T A T活性化と白血病誘発との別の関連を提供する。T E L遺伝子の重合化ドメインとJ A K 2の触媒ドメインとを組み合わせるt (9 ; 12)転座は、リンパ球と骨髄性白血病の両方に見出されている。この転座は、下流のエフェクター、例えば、S T A T 5を構成的に活性化し、トランスフェクションモデルにおけるサイトカイン非依存的増殖を誘導する。以前に報告され、またここで示されたように、これらのS T A T活性化タンパク質のいくつかは、その異常な活性を容易にするためにH S P 9 0を必要とする。

【0348】

総合すれば、いくつかの活性化経路および分子、例えば、A K TおよびS T A T 5への侵襲性A M Lクローンの生存のための依存は、それらをH S P 9 0に最も依存させる。かくして、H S P 9 0阻害は、これらの細胞を殺傷するのに最も有効になる。本発明者らの知見はまた、A K TおよびS T A T 5が活性化された状況下での抗アポトーシスB c l - x Lの同時的過剰発現が、H S P 9 0に対するこれらの細胞の感受性を有意に変化させないことを示唆している。B c l - x L過剰発現は、A M Lにおける薬剤耐性への主要な寄与因子である。B c l - 2ファミリーの抗アポトーシスタンパク質 (B c l - 2、B c l - x (L)) の過剰発現は、122種の「標準的な」化学療法剤に対する薬剤耐性を引き起こし、A M L患者におけるより悪い臨床転帰と関連する。

【0349】

結論として、本発明者らの知見は、A K TおよびS T A T 5シグナリングが活性化されたA M L患者がH S P 9 0阻害剤療法から利益を得る可能性が最も高く (図41および42を参照)、これらの重要なシグナリング経路の特異的活性化を示す患者を臨床試験に登録することを目標にすべきであることを示唆する。本発明者らの知見はまた、H S P 9 0阻害剤の導入が、そのアポトーシス閾値を低下させるための手段として、B c l - x Lを過剰発現するA M Lにおける他の処置と共に正当化されることも示唆する。

【0350】

5. 5. H S P 9 0阻害療法に感受性がある神経変性疾患患者を選択するための放射標識されたH S P 9 0阻害剤の使用

H S P 9 0阻害療法に感受性がある患者を選択するための放射標識されたH S P 9 0阻害剤の使用は、5. 2. 1. 節に記載された。同様の方法を用いて、H S P 9 0療法に応答する可能性がある神経変性疾患に罹患する患者を同定することができる。したがって、本開示は、神経変性疾患に罹患する患者がH S P 9 0阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 脳を、患者の脳細胞中に存在する病原性形態のH S P 9 0に優先的に結合する放射標識されたH S P 9 0阻害剤と接触させるステップ；

(b) 試料中の脳細胞に結合した標識されたH S P 9 0阻害剤の量を測定するステップ；および

(c) ステップ(b)で測定された試料中の脳細胞に結合した標識されたH S P 9 0阻害剤の量を、参照量と比較するステップ

を含み、ステップ(b)で測定された脳細胞に結合した標識されたH S P 9 0阻害剤の量が参照量と比較して多い場合、患者がH S P 9 0阻害剤に応答する可能性があることを示す方法を提供する。

【0351】

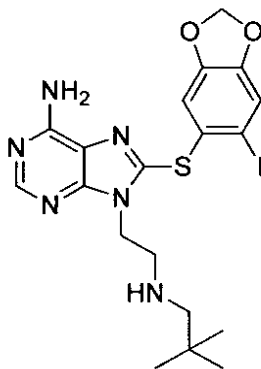
一態様において、参照は、神経変性疾患を有する同じ患者の細胞に由来する。例えば、本発明者らは、正常ニューロンが「病原性HSP90」をほとんど有さないか、または全く有しないと決定した。したがって、患者として罹患していない脳領域中の正常ニューロンを用いて、参照量を決定することができる。別の態様においては、参照は、健康な個体の細胞に由来するものであってもよい。別の態様においては、参照量を、健康な個体の試験集団から測定することができる。

【0352】

悪性形質転換も神経変性も、アルツハイマー病、パーキンソン病、前頭側頭認知症および他の認知症、球脊髄性筋萎縮症において起こる通り、特定のタンパク質の異常な発現、翻訳後修飾、およびプロセッシングを特徴とする複雑で長い多段階のプロセスである。これらの脱調節されたプロセスの蓄積を維持し、可能にするため、および疾患表現型の段階的進化を容易にするために、細胞は代償性調節機構を選出しなければならない。がんにおいては、この役割は熱ショックタンパク質90（HSP90）に起因してきた。この意味で、表現型レベルでは、HSP90は多様な腫瘍に特徴的ないくつかのがん特異的病変のための生化学的緩衝材として働くと考えられる。同様の役割が神経変性においてHSP90のために存在し、かくして、5.2.1.節に記載のPETアッセイを用いて、疾患を有する脳における「病原性HSP90」を同定することができる。神経変性疾患における「病原性HSP90」は、がんにおける「発がん性HSP90」と同様の役割を果たす。神経変性疾患の処置におけるHSP90阻害剤の使用は、米国特許出願公開第2009/0298857号に記載されており、これは参照によりここに組込まれる。

【0353】

HSP90阻害剤PU-HZ151は神経変性脳に対する高い結合親和性を示し、HSP90は、HSP70レベルを強く誘導することができ、脳に透過性であると見積もられているので、本発明者らは、さらなる*in vivo*での評価のためにそれを選択した。PU-HZ151は、WO2008/005937に記載されており、以下の化学構造：
【化36】



PU-HZ151

【0354】

を有する。

【0355】

実際、3xTg ADマウスに腹腔内投与した場合、PU-HZ151は、海馬におけるHSP70誘導により示されたように、有意な標的調節をもたらした（図43A）。その効果は用量依存的であり（図43B）、10mg/kgの投与用量でもHSP70の有意な誘導が検出された。

【0356】

本発明者らは次に、3 x T g A Dマウスの脳および血漿中で、これらの薬力学的効果と関連するH S P 9 0阻害剤レベルを決定した(図4 3 C)。3 x T gマウスに5 0 m g / k gで腹腔内投与した場合、皮質中でのP U - H Z 1 5 1レベルは、投与後4時間で3 . 3 ± 0 . 9 μ g / g (約5 , 0 0 0 n M)、1 2時間で0 . 0 5 ± 0 . 0 8 μ g / g (約1 7 0 n M)、2 4時間で0 . 0 2 ± 0 . 0 3 μ g / g (約6 0 n M)および4 8時間で0 . 0 2 ± 0 . 0 2 μ g / g (約5 3 n M)に達した。それと比べて、同様の用量(7 5 m g / k g)で投与された、あまり有効でないH S P 9 0阻害剤であるP U - Z 2 8は、投与後4時間でわずかに0 . 3 5 μ g / g (約7 0 0 n M)および1 2時間で0 . 2 μ g / g (約3 9 0 n M)の脳濃度に達し、投与後2 4時間までに皮質中で検出されなくなった。

10

【0 3 5 7】

血漿中では、P U - H Z 1 5 1は、4時間で2 . 1 ± 0 . 1 μ g / g (約4 , 0 0 0 n M)に達したが、8時間を超えると検出不可能であった。曲線下面積(A U C)により測定された、0 ~ 4 8時間の間隔にわたるP U - H Z 1 5 1への皮質の曝露は、血漿のものよりも2 . 5倍高かった(1 7 . 5対7 . 1 μ M - h)。小脳(このモデルにおける疾患に罹患していない脳領域)中のレベルは、皮質(このモデルにおける疾患を有する脳領域)中で記録されたものよりも近く血漿のものと同等であった。この観察はまた、この脳領域中での投与後4 8時間を超える阻害剤P U - H Z 1 5 1の保持の延長によっても支持され、これは、腫瘍における、このクラスの阻害剤、例えば、P U - H 7 1に関して観察されたものと類似する知見である。

20

【0 3 5 8】

したがって、¹²⁴I - P U - H Z 1 5 1および他の放射標識されたH S P 9 0阻害剤を用いて、H S P 9 0依存的神経変性疾患に罹患した患者を選択し、そのような療法から利益を得る可能性がより高い患者を同定することができる。それを、がんにおいてP U - H 7 1と同様の様式で用いて、H S P 9 0阻害剤への病源性脳曝露を決定し、最適な用量および投与スケジュールを決定することもできる。

【0 3 5 9】

当業者であれば、がんにおけるP U - H 7 1に関する本発明により記載された使用を、同様に放射標識された脳透過性H S P 9 0阻害剤を用いて神経変性疾患において達成することができることを理解できる。

30

【0 3 6 0】

6. 材料および方法

6. 1. 合成方法

6. 1. 1. 蛍光標識されたプローブの合成

B r u k e r 5 0 0または6 0 0 M H z装置上で¹H N M Rスペクトルを記録した。内部標準としてのT M Sから下方へ化学シフトをδ値(p p m)で報告する。¹Hデータを以下のように報告する: 化学シフト、多重性(s = 一重線、d = 二重線、t = 三重線、q = 四重線、b r = ブロード、m = 多重線)、カップリング定数(H z)、積分。高解像度質量スペクトルを、W a t e r s L C T P r e m i e rシステム上で記録した。低解像度質量スペクトルを、電子スプレーイオン化およびS Q検出器を備えたW a t e r s A c q u i t y U l t r a P e r f o r m a n c e L C上で取得した。高速液体クロマトグラフィー分析を、P D A、M i c r o M a s s Z Q、およびE L S D検出器ならびに方法A (a) H₂O + 0 . 1 % T F Aおよび(b) C H₃C N + 0 . 1 % T F A、5 ~ 9 5 % b、1 . 2 m L / 分で1 3分; 方法B (a) H₂O + 0 . 1 % T F Aおよび(b) C H₃C N + 0 . 1 % T F A、5 ~ 9 5 % b、1 . 2 m L / 分で1 3分の勾配を用いる逆相カラム(W a t e r s X - B r i d g e C 1 8、4 . 6 x 1 5 0 m m、5 μ m)を備えたW a t e r s A u t o p u r i f i c a t i o nシステム上で実施した。2 3 0 ~ 4 0 0 メッシュのシリカゲル(E M D)を用いてカラムクロマトグラフィーを実施した。全反応をアルゴン保護下で実施した。フルオレセインイソチオシアネート(F I T C)、スルホローダミン1 0 1スルホニルクロリド(テキサスレッド-C 1)および4 -

40

50

クロロ-7-ニトロ-1, 2, 3-ベンゾキサジアゾール (NBD-Cl) を、Aldrichから購入した。

【0361】

PU-H71-FITC1 [4] (スキーム1)。DMF (0.2 mL) 中の化合物 3²¹ (15 mg、0.0263 mmol)、FITC (11.3 mg、0.0289 mmol) および Et₃N (0.1 mL) を、rt で12時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣をHPLCにより精製したところ、10.1 mg (40%) の化合物4が得られた。¹H NMR(500MHz, MeOH-d₄) δ 8.17(s, 1H), 8.05(s, 1H), 7.93(s, 1H), 7.65-7.74(m, 1H), 7.40(s, 1H), 7.08-7.16(m, 2H), 6.76-6.89(m, 2H), 6.66(s, 2H), 6.50-6.59(m, 2H), 6.02(s, 2H), 4.35(t, J=6.9Hz, 2H), 3.96(t, J=6.4Hz, 2H), 3.78(br s, 2H), 3.62(br s, 2H), 2.31(m, 2H), 1.77(m, 2H), 1.69(m, 2H), 1.45(m, 4H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₄₂H₄₀IN₈O₇S₂, 959.1506; 実測値: 959.1530; HPLC(方法A) R_t=4.52(96%)。 10

PU-H71-テキサスレッド [5]。DMF (0.25 mL) 中の化合物 3²¹ (4.6 mg、0.008 mmol) を、氷/水浴により0℃に冷却した。次いで、スルホロダミン101スルホニルクロリド (3 mg、0.005 mmol) を添加し、溶液を12時間攪拌し、温度を0℃から10℃までゆっくり上昇させた。反応混合物をHPLCにより直接精製したところ、暗紫色の固体として3.4 mg (61%) の化合物5が得られた。¹H NMR(500MHz, MeOH-d₄) δ 8.56(d, J=1.4Hz, 1H), 8.31(s, 1H), 8.16(dd, J=1.6, 7.9Hz, 1H), 7.48(s, 1H), 7.46(d, J=7.9Hz, 1H), 7.28(s, 1H), 6.58(s, 2H), 6.08(s, 2H), 4.47(t, J=6.8Hz, 2H), 3.56(t, J=5.4Hz, 4H), 3.52(t, J=5.6Hz, 4H), 3.15(t, J=7.6Hz, 2H), 3.08(m, 4H), 3.01(t, J=7.7Hz, 2H), 2.93(t, J=6.7Hz, 2H), 2.68(m, 4H), 2.35(m, 2H), 2.11(m, 4H), 1.90-2.00(m, 4H), 1.66(m, 2H), 1.27-1.45(m, 6H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₅₂H₅₇IN₉O₈S₃, 1158.2537; 実測値: 1158.2534; HPLC(方法B) R_t=9.40(99%)。 20

【0362】

PU-H71-NBD1 [8] (スキーム1)。化合物 6²¹ (12.2 mg、0.0229 mmol) および化合物 7³² (32 mg、0.1145 mmol) をDMF (0.4 mL) 中に溶解し、rt で20時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、得られる残渣を分取TLC (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、10:1) により精製したところ、7.9 mg (47%) の化合物8が得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl₃/MeOH-d₄) δ 8.32(d, J=8.8Hz, 1H), 8.00(s, 1H), 7.21(s, 1H), 6.89(s, 1H), 6.04(d, J=8.8Hz, 1H), 5.89(s, 2H), 4.13(t, J=6.9Hz, 2H), 3.32(m, 2H), 2.51(t, J=6.9Hz, 2H), 2.47(t, J=7.4Hz, 2H), 1.94(m, 2H), 1.63(m, 2H), 1.36-1.45(m, 2H), 1.21-1.35(m, 4H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₂₇H₃₀IN₁₀O₅S, 733.1166; 実測値: 733.1171; HPLC(方法B) R_t=8.80(98%)。 30

PU-H71-FITC2 [9] (スキーム2)。DMF (0.2 mL) 中の化合物 2²³ (16.7 mg、0.0326 mmol)、FITC (14.0 mg、0.0359 mmol) および Et₃N (0.1 mL) を、rt で5時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣をHPLCにより精製したところ、21.2 mg (72%) の化合物9が得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ 8.15(s, 1H), 7.86(s, 1H), 7.77(d, J=7.9Hz, 1H), 7.34(s, 1H), 7.09(d, J=7.9Hz, 1H), 7.01(s, 1H), 6.63-6.71(m, 4H), 6.51(d, J=7.3Hz, 2H), 6.02(s, 2H), 5.53(br s, 2H), 4.30(br s, 2H), 3.64(br s, 2H), 2.85(br s, 1H), 2.27(m, 2H), 1.23(d, J=6.2Hz, 6H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₃₉H₃₃IN₇O₇S₂, 902.0928; 実測値: 902.0942; HPLC(方法B) R_t=9.90(99%)。 40

PU-H71-NBD2 [10]。DMF (0.35 mL) 中の化合物 2²³ (25.4 mg、0.050 mmol)、NBD-Cl (10.0 mg、0.05 mmol) および Et₃N (7.6 μL、0.055 mmol) を、rt で12時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣を分取TLC (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、25:1) により精製したところ、13.4 mg (40%) の化合物10が得られた。¹H NMR(6 50

00MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) δ 8.25(d, $J=8.9\text{Hz}$, 1H), 8.06(s, 1H), 7.18(s, 1H), 6.85(s, 1H), 6.07(d, $J=8.9\text{Hz}$, 1H), 5.87(s, 2H), 4.24(t, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 3.74(m, 2H), 3.18(m, 1H), 2.12(m, 2H), 1.22(d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H); HRMS(ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{IN}_9\text{O}_5\text{S}$, 676.0588; 実測値: 676.0593; HPLC(方法B) $R_t=10.37(99\%)$.

2-(3-(6-アミノ-8-(6-ヨードベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イルチオ)-9H-プリン-9-イル)プロピル)イソインドリン-1,3-ジオン[12](スキーム3)。50mg(0.121mmol)の化合物11²³を、DMF(2mL)中に溶解した。43.4mg(0.1331mmol)の Cs_2CO_3 および162mg(0.605mmol)のN-(3-ブロモプロピル)-フタルイミドを添加し、混合物をrtで30分間攪拌した。次いで、さらなる Cs_2CO_3 (8mg、0.0242mmol)を添加し、混合物を30分間攪拌した。次いで、さらなる Cs_2CO_3 (8mg、0.0242mmol)を添加し、混合物を30分間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を分取TLC(CH_2Cl_2 :MeOH:AcOH、15:1:0.5)により精製したところ、25mg(34%)の化合物12が得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl_3) δ 8.25(s, 1H), 7.85(dd, $J=3.0, 5.5\text{Hz}$, 2H), 7.74(dd, $J=3.0, 5.4\text{Hz}$, 2H), 7.11(s, 1H), 6.80(s, 1H), 6.10(br s, 2H), 6.00(s, 2H), 4.27(t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 3.77(t, $J=6.7\text{Hz}$, 2H), 2.15(m, 2H); HRMS(ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値: $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{IN}_6\text{O}_4\text{S}$, 601.0155; 実測値: 601.0169; HPLC(方法A) $R_t=7.74$.

9-(3-アミノプロピル)-8-(6-ヨードベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-イルチオ)-9H-プリン-6-アミン[13](スキーム3)。MeOH/ CH_2Cl_2 (0.7:0.1mL)中の化合物12(34mg、0.0566mmol)の懸濁液に、ヒドラジン水和物(41 μ L、42.5mg、0.849mmol)を添加し、混合物をrtで一晩攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を分取TLC(CH_2Cl_2 :MeOH- NH_3 (7N)、10:1)により精製したところ、17mg(64%)の化合物13が得られた。¹H NMR(500MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$) δ 8.22(s, 1H), 7.38(s, 1H), 7.06(s, 1H), 6.05(s, 2H), 4.31(t, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 2.76(t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.05(m, 2H); HRMS(ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{IN}_6\text{O}_2\text{S}$, 471.0100; 実測値: 471.0086; HPLC(方法A) $R_t=5.78$.

PU-H71-FITC3[14](スキーム3)。DMF(0.2mL)中の化合物13(8.4mg、0.0179mmol)、FITC(7.7mg、0.0196mmol)および Et_3N (0.1mL)を、rtで12時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣をHPLCにより精製したところ、11.4mg(74%)の化合物14が得られた。¹H NMR(600MHz, MeOH- d_4) δ 8.23(s, 1H), 8.11(s, 1H), 7.68(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.35(s, 1H), 7.20(s, 1H), 7.09(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 6.63-6.70(m, 4H), 6.50(d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 5.97(s, 2H), 4.34(t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 3.61(m, 2H), 2.21(t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H); MS(ESI) m/z 860.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS(ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値: $\text{C}_{36}\text{H}_{27}\text{IN}_7\text{O}_7\text{S}_2$, 860.0458; 実測値: 860.0451; HPLC(方法B) $R_t=9.48(96\%)$.

PU-H71-NBD3[15](スキーム3)。DMF(0.2mL)中の化合物13(7.2mg、0.0153mmol)、NBD-Cl(3.1mg、0.0213mmol)および Et_3N (2.3 μ L、0.0168mmol)を、rtで12時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣を分取TLC(CH_2Cl_2 :MeOH- NH_3 (7N)、20:1)により精製したところ、4.1mg(42%)の化合物15が得られた。¹H NMR(600MHz, DMF- d_7) δ 9.54(br s, 1H), 8.53(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 8.22(s, 1H), 7.51(br s, 2H), 7.28(s, 1H), 6.76(s, 1H), 6.42(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 6.10(s, 2H), 4.47(t, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 3.67(m, 2H), 2.35(m, 2H); HRMS(ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{IN}_9\text{O}_5\text{S}$, 634.0118; 実測値: 634.0130; HPLC(方法B) $R_t=9.57(99\%)$.

テトラエチレングリコール-FITC(TEG-FITC)の合成。DMF(0.4mL)中のFITC(20mg、0.051mmol)、テトラエチレングリコール(49.9mg、0.257mmol)および Et_3N (0.1mL)を、rtで12時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣をHPLCにより精製したところ、17.3m

10

20

30

40

50

g (58%) の T E G - F I T C が得られた。¹H NMR(600MHz, MeOH-d₄) δ 7.53-8.25(m, 2H), 7.14(d, J=8.2Hz, 1H), 6.72-6.91(m, 4H), 6.65(d, J=6.8Hz, 2H), 4.60(br s, 2H), 3.77(m, 2H), 3.31-3.63(m, 12H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₂₉H₃₀NO₁₀S, 584.1590; 実測値: 584.1570; HPLC(方法B) R_t=8.97(99%)。

2 - (4 - (6 - アミノ - 8 - ((6 - ヨードベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール - 5 - イル) チオ) - 9 H - プリン - 9 - イル) ブチル) イソインドリン - 1, 3 - ジオン (16a) (スキーム4)。200mg (0.484mmol) の化合物11を、DMF (8mL) 中に溶解した。466mg (1.43mmol) の Cs₂CO₃ および 683mg (2.42mmol) の N - (4 - ブロモブチル) フタルイミドを添加し、混合物を30分超音波処理した。31.5mg (0.097mmol) の Cs₂CO₃ を添加し、混合物を再度30分超音波処理した。これを、2時間の総反応時間にわたってさらに2回繰り返した。DMFを除去し、得られた残渣を分取TLC (CH₂Cl₂:MeOH:AcOH、15:1:0.5) により精製したところ、134mg (45%) の化合物16aが得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ 8.18(s, 1H), 7.84(dd, J=5.5, 3.1Hz, 2H), 7.72(dd, J=5.5, 3.1Hz, 2H), 7.22(s, 1H), 6.89(s, 1H), 6.76(br s, 2H), 5.99(s, 2H), 4.23(t, J=7.1Hz, 2H), 3.69(t, J=7.0Hz, 2H), 1.67-1.83(m, 4H); MS(ESI) m/z 615.2 [M+H]⁺。

9 - (4 - アミノブチル) - 8 - ((6 - ヨードベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール - 5 - イル) チオ) - 9 H - プリン - 6 - アミン (17a) (スキーム4)。2mLのMeOH/CH₂Cl₂ (7:1mL) 中の化合物16a (38.9mg、0.063mmol) の懸濁液に、ヒドラジン水和物 (46μL、0.950mmol) を添加し、混合物をrtで12時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を分取TLC (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、10:1) により精製したところ、18mg (59%) の化合物17aが得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl₃/MeOH-d₄) δ 8.22(s, 1H), 7.38(s, 1H), 7.04(s, 1H), 6.05(s, 2H), 4.23(t, J=7.4Hz, 2H), 2.78(t, J=7.1Hz, 2H), 1.82-1.91(m, 2H), 1.55-1.63(m, 2H); MS(ESI) m/z 485.0 [M+H]⁺。

P U - H 7 1 - F I T C 4 (18a) (スキーム4): DMF (0.2mL) 中の化合物17a (9.7mg、0.020mmol)、FITC (8.57mg、0.022mmol) および Et₃N (0.1mL) を、rtで3時間攪拌した。反応混合物をHPLCにより直接精製したところ、5.2mg (30%) の化合物18aが得られた。¹H NMR(600MHz, MeOH-d₄) δ 8.22(s, 1H), 8.00(s, 1H), 7.61(d, J=7.6Hz, 1H), 7.37(s, 1H), 7.19(s, 1H), 7.06(d, J=8.2Hz, 1H), 6.58-6.67(m, 4H), 6.48(dd, J=8.7, 2.0Hz, 2H), 5.97(s, 2H), 4.30(t, J=7.0Hz, 2H), 3.58(br s, 2H), 1.90-2.00(m, 2H), 1.61-1.70(m, 2H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₃₇H₂₉IN₇O₇S₂, 874.0615; 実測値: 874.0610; HPLC R_t=9.57(98%)。

2 - (6 - (6 - アミノ - 8 - ((6 - ヨードベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール - 5 - イル) チオ) - 9 H - プリン - 9 - イル) ヘキシル) イソインドリン - 1, 3 - ジオン (16b) (スキーム4)。200mg (0.484mmol) の化合物11を、DMF (8mL) 中に溶解した。466mg (1.43mmol) の Cs₂CO₃ および 751mg (2.42mmol) の N - (6 - ブロモヘキシル) フタルイミドを添加し、混合物を2時間超音波処理した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を分取TLC (CH₂Cl₂:MeOH:AcOH、15:1:0.5) により精製したところ、100mg (32%) の化合物16bが得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ 8.26(s, 1H), 7.83(dd, J=5.4, 3.1Hz, 2H), 7.70(dd, J=5.4, 3.0Hz, 2H), 7.26(s, 1H), 6.87(s, 1H), 6.36(br s, 2H), 5.96(s, 2H), 4.18(t, J=7.5Hz, 2H), 3.66(t, J=7.2Hz, 2H), 1.70-1.79(m, 2H), 1.60-1.68(m, 2H), 1.32-1.43(m, 4H); MS(ESI) m/z 643.2 [M+H]⁺。

9 - (6 - アミノヘキシル) - 8 - ((6 - ヨードベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール - 5 - イル) チオ) - 9 H - プリン - 6 - アミン (17b) (スキーム4)。4mLのMeOH/CH₂Cl₂ (7:1mL) 中の化合物16b (97mg、0.1511mmol) の懸濁液に、ヒドラジン水和物 (110μL、2.27mmol) を添加し、混合物

を r t で 1 2 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を分取 T L C (C H ₂ C l ₂ : M e O H - N H ₃ (7 N) 、 1 0 : 1) により精製したところ、 4 7 m g (6 1 %) の 1 7 b が得られた。¹H NMR(500MHz, C D C l ₃) δ 8.32(s, 1H), 7.31(s, 1H), 6.90(s, 1H), 5.99(s, 2H), 5.84(br s, 2H), 4.20(t, J=7.5Hz, 2H), 2.67(t, J=6.5Hz, 2H), 1.72-1.84(m, 2H), 1.31-1.45(m, 6H); MS(ESI) m/z 513.0 [M+H]⁺.

P U - H 7 1 - F I T C 5 (化合物 1 8 b) (スキーム 4) 。 D M F (0 . 2 m L) 中の化合物 1 7 b (9 . 7 m g 、 0 . 0 1 8 9 4 m m o l) 、 F I T C (8 . 1 1 m g 、 0 . 0 2 0 8 m m o l) および E t ₃ N (0 . 1 m L) を、 r t で 3 時間攪拌した。反応混合物を H P L C により直接精製したところ、 8 . 0 m g (4 7 %) の化合物 1 8 b が得られた。¹H NMR(600MHz, M e O H - d ₄) δ 8.23(s, 1H), 8.09(s, 1H), 7.65(d, J=7.9Hz, 1H), 7.35(s, 1H), 7.16(s, 1H), 7.08(d, J=8.3Hz, 1H), 6.71(d, J=8.8Hz, 2H), 6.67(d, J=2.2Hz, 2H), 6.53(dd, J=8.8, 2.2Hz, 2H), 5.96(s, 2H), 4.24(t, J=7.1Hz, 2H), 3.50(br s, 2H), 1.79-1.88(m, 2H), 1.52-1.61(m, 2H), 1.31-1.42(m, 4H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₃₉H₃₃IN₇O₇S₂, 902.0928; 実測値: 902.0939; HPLC R_t=10.02(99%).

2 - (8 - (6 - アミノ - 8 - ((6 - ヨードベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) チオ) - 9 H - プリン - 9 - イル) オクチル) イソインドリン - 1 , 3 - ジオン (1 6 c) (スキーム 4) 。 2 0 0 m g (0 . 4 8 4 m m o l) の化合物 1 1 を、 D M F (8 m L) 中に溶解した。 4 6 6 m g (1 . 4 3 m m o l) の C s ₂ C O ₃ および 8 1 9 m g (2 . 4 2 m m o l) の N - (8 - ブロモオクチル) フタルイミドを添加し、混合物を 1 . 5 時間超音波処理した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を分取 T L C (C H ₂ C l ₂ : M e O H : A c O H 、 1 5 : 1 : 0 . 5) により精製したところ、 1 2 0 m g (3 4 %) の化合物 1 6 c が得られた。¹H NMR(500MHz, C D C l ₃) δ 8.29(s, 1H), 7.84(dd, J=5.5, 3.1Hz, 2H), 7.70(dd, J=5.5, 3.1Hz, 2H), 7.28(s, 1H), 6.87(s, 1H), 6.29(br s, 2H), 5.96(s, 2H), 4.18(t, J=7.5Hz, 2H), 3.67(t, J=7.3Hz, 2H), 1.62-1.77(m, 4H), 1.25-1.36(m, 8H); MS(ESI) m/z 671.3 [M+H]⁺.

9 - (8 - アミノオクチル) - 8 - ((6 - ヨードベンゾ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル) チオ) - 9 H - プリン - 6 - アミン (1 7 c) 。 4 m L の M e O H / C H ₂ C l ₂ (7 : 1 m L) 中の化合物 1 6 c (9 0 . 1 m g 、 0 . 1 3 4 5 m m o l) の懸濁液に、ヒドラジン水和物 (9 8 μ L 、 2 . 0 1 7 m m o l) を添加し、混合物を r t で 1 2 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を分取 T L C (C H ₂ C l ₂ : M e O H - N H ₃ (7 N) 、 1 0 : 1) により精製したところ、 2 5 m g (3 4 %) の 1 7 c が得られた。¹H NMR(500MHz, C D C l ₃) δ 8.33(s, 1H), 7.31(s, 1H), 6.90(s, 1H), 5.99(s, 2H), 5.72(br s, 2H), 4.20(t, J=7.5Hz, 2H), 2.66(t, J=7.1Hz, 2H), 1.70-1.80(m, 2H), 1.36-1.45(m, 2H), 1.21-1.35(m, 8H); MS(ESI) m/z 541.1 [M+H]⁺.

P U - H 7 1 - F I T C 6 (化合物 1 8 c) の合成 (スキーム 4) 。 D M F (0 . 2 m L) 中の化合物 1 7 c (1 5 . 0 m g 、 0 . 0 2 8 m m o l) 、 F I T C (1 1 . 9 m g 、 0 . 0 3 1 m m o l) および E t ₃ N (0 . 1 m L) を、 r t で 4 時間攪拌した。反応混合物を H P L C により直接精製したところ、 1 6 . 9 m g (6 6 %) の化合物 1 8 c が得られた。¹H NMR(600MHz, M e O H - d ₄) δ 8.22(s, 1H), 8.11(s, 1H), 7.68(d, J=7.8Hz, 1H), 7.34(s, 1H), 7.12(s, 1H), 7.09(d, J=8.2Hz, 1H), 6.72(d, J=8.7Hz, 2H), 6.67(d, J=2.0Hz, 2H), 6.53(dd, J=8.7, 2.0Hz, 2H), 5.96(s, 2H), 4.20(t, J=7.1Hz, 2H), 3.50(br s, 2H), 1.74-1.81(m, 2H), 1.52-1.59(m, 2H), 1.23-1.35(m, 8H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₄₁H₃₇IN₇O₇S₂, 930.1241; 実測値: 930.1231; HPLC R_t=10.60(96%).

P U - F I T C 7 (化合物 2 0) の合成 (スキーム 7) 。 D M F (0 . 3 m L) 中の化合物 1 9 (1 5 . 0 m g 、 0 . 0 2 5 m m o l) 、 F I T C (1 0 . 7 m g 、 0 . 0 2 7 5 m m o l) および E t ₃ N (0 . 1 m L) を、 r t で 8 時間攪拌した。反応混合物を H P L C により直接精製したところ、 2 3 . 5 m g (9 5 %) の P U - F I T C 7 が得られた。¹H NMR(600MHz, M e O H - d ₄, 2 回転異性体) δ 8.18-8.22(m, 1H), 7.75-7.87(m, 4H), 7.53-7.58(m, 1H), 7.19-7.23(m, 1H), 7.05(d, J=8.2Hz, 1H), 6.98(s, 0.15H), 6.95(

s, 0.85H), 6.57-6.75(m, 4H), 6.46-6.55(m, 2H), 6.05(s, 0.3H), 6.00(s, 1.7H), 3.95-4.05(m, 2H), 3.55-3.64(m, 1.7H), 2.86-2.92(m, 0.3H), 2.03-2.12(m, 1.7H), 1.93-2.00(m, 0.3H), 1.18(d, J=6.5Hz, 0.9H), 1.13(d, J=6.5Hz, 5.1H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₄₇H₃₆F₆N₇O₇S₂, 988.2022; 実測値: 988.2005; HPLC R_t=11.00(99%).

P U - F I T C 8 (化合物 2 2) の合成 (スキーム 8)。DMF (0.4 mL) 中の化合物 1 9 (19.4 mg、0.050 mmol)、F I T C (21.4 mg、0.055 mmol) および Et₃N (0.1 mL) を、rt で 14 時間攪拌した。反応混合物を H P L C により直接精製したところ、34.3 mg (88%) の P U - F I T C 8 が得られた。¹H NMR(600MHz, MeOH-d₄) δ 8.35(s, 1H), 7.97(s, 1H), 7.69(dd, J=8.2, 1.9Hz, 1H), 7.20(dd, J=8.1, 1.9Hz, 1H), 7.14-7.18(m, 2H), 6.91(d, J=8.0Hz, 1H), 6.76-6.85(m, 4H), 6.59-6.65(m, 2H), 6.01(s, 2H), 4.40(t, J=6.7Hz, 2H), 3.82(t, J=7.4Hz, 2H), 2.35-2.43(m, 2H), 1.31(d, J=6.7Hz, 6H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₃₉H₃₄N₇O₇S₂, 776.1961; 実測値: 776.1978; HPLC R_t=10.13(98%).

P U - F I T C 9 (化合物 2 4) の合成 (スキーム 9)。DMF (0.3 mL) 中の化合物 2 3 (10.0 mg、0.032 mmol)、F I T C (13.9 mg、0.036 mmol) および Et₃N (0.1 mL) を、rt で一晩攪拌した。反応混合物を H P L C により直接精製したところ、18.3 mg (82%) の P U - F I T C 9 が得られた。¹H NMR(600MHz, MeOH-d₄) δ 8.33(s, 1H), 7.92(s, 1H), 7.66(dd, J=8.1, 1.8Hz, 1H), 7.15(d, J=8.2Hz, 1H), 6.73-6.83(m, 4H), 6.58-6.65(m, 2H), 4.73-4.76(m, 2H), 4.23(t, J=6.5Hz, 2H), 3.81-3.85(m, 2H), 3.74-3.81(m, 2H), 3.41(s, 3H), 2.28-2.37(m, 2H), 1.30(d, J=6.6Hz, 6H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₃₅H₃₆N₇O₇S, 698.2397; 実測値: 698.2399; HPLC R_t=9.20(99%).

D Z 1 3 - F I T C 1 の合成 (スキーム 1 0)。DMF (0.3 mL) 中の P U - D Z 1 3 (20.8 mg、0.0406 mmol)、F I T C (17.4 mg、0.0447 mmol) および Et₃N (0.1 mL) を、rt で 12 時間攪拌した。反応混合物を H P L C により直接精製したところ、33.7 mg (92%) の D Z 1 3 - F I T C 1 が得られた。¹H NMR(500MHz, DMF-d₇) δ 9.46(s, 1H), 8.05(dd, J=7.0, 1.8Hz, 1H), 7.76-7.82(m, 1H), 7.44(s, 1H), 7.26(d, J=7.3Hz, 1H), 6.90(s, 1H), 6.78(m, 2H), 6.67-6.72(m, 4H), 6.11(s, 2H), 4.59(t, J=6.0Hz, 2H), 4.42(s, 2H), 4.39(t, J=6.0Hz, 2H), 3.53(d, J=6.9Hz, 2H), 2.17-2.28(m, 1H), 0.92(d, J=6.7Hz, 6H); HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺の計算値: C₄₀H₃₄FIN₇O₇S, 902.1269; 実測値: 902.1293; HPLC R_t=11.77(98%).

S N X - F I T C の合成 (スキーム 1 1)。DMF (0.2 mL) 中の化合物 2 5 (9.5 mg、0.0205 mmol)、F I T C (8.8 mg、0.0225 mmol) および Et₃N (0.1 mL) を、rt で 4 時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣を H P L C により精製したところ、13.5 mg (77%) の橙色の固体が得られた。RMS(ESI) m/z [M+HH]⁺の計算値: C₄₄H₄₀F₃N₆O₇S, 853.2631; 実測値 853.2630.

6. 1. 2. ビオチン化された化合物の合成

P U - H 7 1 - ビオチン 3。CH₂Cl₂ (1 mL) 中の化合物 1 3 (9.1 mg、0.0193 mmol)、D - ビオチン (7.1 mg、0.0290 mmol)、D C C (8 mg、0.0386 mmol) および触媒量の DMA P を、5 時間超音波処理した。反応混合物を減圧下で濃縮し、得られた残渣を分取 T L C (CH₂Cl₂: MeOH-NH₃ (7 N)、10:1) により精製したところ、7.5 mg (56%) の P U - H 7 1 - ビオチン 3 が得られた。¹H NMR(600MHz, CDCl₃/MeOH-d₄) δ 7.97(s, 1H), 7.17(s, 1H), 6.86(s, 1H), 5.84(s, 2H), 4.23-4.27(m, 1H), 4.05-4.09(m, 1H), 4.03(t, J=7.2Hz, 2H), 3.02(t, J=6.4Hz, 2H), 2.90-2.97(m, 1H), 2.67(dd, J=4.9, 12.8Hz, 1H), 2.49(d, J=12.8Hz, 1H), 2.01(t, J=7.5Hz, 2H), 1.75-1.83(m, 2H), 1.34-1.54(m, 4H), 1.18-1.27(m, 2H); MS(ESI): m/z 697.1 [M+H]⁺.

P U - H 7 1 - ビオチン 2。CH₂Cl₂ (1 mL) 中の化合物 2 (30 mg、0.0593 mmol)、D - ビオチン (19 mg、0.078 mmol)、D C C (24 mg、0.117 mmol) および触媒量の DMA P を、9 時間超音波処理した。反応混合物を

減圧下で濃縮し、得られた残渣を分取TLC (CH_2Cl_2 : $\text{MeOH}-\text{NH}_3$ (7N)、10:1) により精製したところ、43.2mg (99%) のPU-H71-ビオチン2が得られた。 ^1H NMR(600MHz, CDCl_3 , 2回転異性体) δ 8.22(s, 1H), 7.22(s, 0.6H), 7.21(s, 0.4H), 6.87(s, 0.6H), 6.76(s, 0.4H), 6.25(br s, 0.6H), 6.16(br s, 0.4H), 5.88-5.96(m, 2H), 5.85(br s, 0.6H), 5.78(br s, 0.4H), 4.54-4.63(m, 0.6H), 4.32-4.45(m, 1.6H), 4.21-4.25(m, 0.4H), 4.11-4.19(m, 1.4H), 4.00-4.07(m, 0.6H), 3.88-3.95(m, 0.4H), 2.97-3.22(m, 2.4H), 2.78-2.84(m, 1H), 2.69-2.77(m, 0.6H), 2.62-2.68(m, 1H), 2.22-2.27(m, 0.6H), 1.94-2.05(m, 1.4H), 1.74-1.89(m, 1.4H), 1.43-1.72(m, 3H), 1.16-1.40(m, 3.6H), 1.00-1.06(m, 4H), 0.97(d, $J=6.7\text{Hz}$, 2H); MS(ESI): m/z 739.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10

PU-H71-ビオチン4。DMF (0.5mL) 中の化合物13 (16.9mg、0.0359mmol)、EZ-Link (登録商標) NHS-LC-ビオチン (17.9mg、0.0394mmol)、およびDIEA (9.3mg、12.5 μL 、0.0718mmol) を、rtで1時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、得られた残渣を分取TLC (CH_2Cl_2 : $\text{MeOH}-\text{NH}_3$ (7N)、10:1) により精製したところ、20.8mg (72%) のPU-H71-ビオチン4が得られた。 ^1H NMR(500MHz, CDCl_3) δ 8.22(s, 1H), 7.52(t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 7.36(s, 1H), 7.03(s, 1H), 6.66(t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H), 6.25(br s, 2H), 6.03(s, 2H), 4.47-4.52(m, 1H), 4.28-4.33(m, 1H), 4.25(t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 3.17-3.25(m, 4H), 3.11-3.17(m, 1H), 2.90(dd, $J=5.0$, 12.9Hz, 1H), 2.63-2.79(m, 1H), 2.24(t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 2.13-2.19(m, 2H), 1.94-2.02(m, 2H), 1.58-1.74(m, 6H), 1.48-1.56(m, 2H), 1.31-1.46(m, 4H); MS(ESI): m/z 810.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

20

PU-H71-ビオチン7。DMF (0.5mL) 中の化合物2 (15mg、0.0292mmol)、EZ-Link (登録商標) NHS-LC-ビオチン (14.6mg、0.0321mmol)、およびDIEA (7.5mg、10.2 μL 、0.0584mmol) を、35 $^\circ\text{C}$ で6時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、得られた残渣を分取TLC (CH_2Cl_2 : $\text{MeOH}-\text{NH}_3$ (7N)、10:1) により精製したところ、10.3mg (41%) のPU-H71-ビオチン7が得られた。さらに、6.9mgの未反応の化合物2を回収したところ、77%の実際の収率が得られた。 ^1H NMR(500MHz, CDCl_3 , 2回転異性体) δ 8.26-8.29(m, 1H), 7.29(s, 0.4H), 7.28(s, 0.6H), 6.87(s, 0.4H), 6.85(s, 0.6H), 6.76(br s, 0.4H), 6.74(br s, 0.6H), 6.51-6.63(br s, 2H), 5.96-6.00(m, 2H), 5.68(br s, 0.4H), 5.58(br s, 0.6H), 4.56-4.64(m, 0.4H), 4.45-4.52(m, 1H), 4.28-4.36(m, 1H), 4.20-4.27(m, 2H), 4.01-4.09(m, 0.6H), 3.08-3.32(m, 5H), 2.86-2.94(m, 1H), 2.69-2.76(m, 1H), 2.31-2.37(m, 1H), 1.96-2.22(m, 4H), 1.89-1.96(m, 1H), 1.30-1.80(m, 12H), 1.10-1.16(m, 4H), 1.04-1.09(m, 2H); MS(ESI): m/z 852.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

30

PU-H71-ビオチン5。DMF (0.5mL) 中の化合物13 (16.6mg、0.0352mmol)、EZ-Link (登録商標) NHS-LC-LC-ビオチン (22.0mg、0.0387mmol)、およびDIEA (9.1mg、12.3 μL 、0.0704mmol) を、rtで1時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、得られた残渣を分取TLC (CH_2Cl_2 : $\text{MeOH}-\text{NH}_3$ (7N)、10:1) により精製したところ、27.8mg (86%) のPU-H71-ビオチン5が得られた。 ^1H NMR(500MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_4$) δ 8.12(s, 1H), 7.60(m, 1H), 7.30(s, 1H), 7.09(m, 1H), 6.98(s, 1H), 5.97(s, 2H), 4.38-4.44(m, 1H), 4.20-4.24(m, 1H), 4.17(t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.04-3.18(m, 7H), 2.83(dd, $J=5.0$, 12.9Hz, 1H), 2.64(d, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 2.16(t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.03-2.12(m, 4H), 1.88-1.96(m, 2H), 1.18-1.66(m, 18H); MS(ESI): m/z 923.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

40

PU-H71-ビオチン8。DMF (0.5mL) 中の化合物2 (15mg、0.0292mmol)、EZ-Link (登録商標) NHS-LC-LC-ビオチン (18.2mg、0.0321mmol)、およびDIEA (7.5mg、10.2 μL 、0.0584mmol) を、35 $^\circ\text{C}$ で6時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、得られた残

50

渣を分取TLC (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、10:1) により精製したところ、8.2mg (29%) のPU-H71-ビオチン8が得られた。さらに、9.6mgの未反応の化合物2を回収したところ、81%の実際の収率が得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl₃/MeOH-d₄, 2回転異性体) δ 8.18(s, 0.4H), 8.16(s, 0.6H), 7.31(s, 1H), 6.98(s, 0.6H), 6.95(s, 0.4H), 6.80-6.90(m, 2H), 5.98(s, 2H), 4.47-4.55(m, 0.4H), 4.41-4.47(m, 1H), 4.23-4.27(m, 1H), 4.16-4.22(m, 2H), 3.95-4.03(m, 0.6H), 3.31-3.34(m, 0.6H), 3.19-3.24(m, 1.4H), 3.07-3.17(m, 5H), 2.82-2.89(m, 1H), 2.64-2.70(m, 1H), 2.25-2.32(m, 1H), 1.94-2.16(m, 7H), 1.18-1.70(m, 18H), 1.09(d, J=6.7Hz, 4H), 1.03(d, J=6.8Hz, 2H); MS(ESI): m/z 965.5 [M+H]⁺.

PU-H71-ビオチン6。DMF (0.5mL) 中の化合物13 (17.6mg、0.0374mmol)、EZ-Link (登録商標) NHS-PEG₄-ビオチン (24.2mg、0.0411mmol)、およびDIEA (9.7mg、13μL、0.0704mmol) を、rtで1時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、得られた残渣を分取TLC (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、10:1) により精製したところ、31.0mg (88%) のPU-H71-ビオチン6が得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ 8.29(s, 1H), 7.51(t, J=5.8Hz, 1H), 7.32(s, 1H), 7.03(t, J=5.3Hz, 1H), 6.90(s, 1H), 6.79(s, 1H), 6.57(br s, 2H), 6.01(s, 2H), 5.97(s, 1H), 4.48-4.53(m, 1H), 4.25-4.35(m, 3H), 3.79(t, J=6.1Hz, 2H), 3.59-3.68(m, 12H), 3.57(t, J=5.1Hz, 2H), 3.40-3.46(m, 2H), 3.18-3.24(m, 2H), 3.12-3.18(m, 1H), 2.90(dd, J=5.0, 12.8Hz, 1H), 2.75(d, J=12.7Hz, 1H), 2.54(t, J=6.0Hz, 2H), 2.20(t, J=7.4Hz, 2H), 1.40-2.01(m, 2H), 1.59-1.79(m, 4H), 1.38-1.48(m, 2H); MS(ESI): m/z 944.4 [M+H]⁺.

PU-H71-ビオチン9。DMF (0.5mL) 中の化合物2 (15mg、0.0292mmol)、EZ-Link (登録商標) NHS-PEG₄-ビオチン (18.9mg、0.0321mmol)、およびDIEA (7.5mg、10.2μL、0.0584mmol) を、35℃で6時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、得られた残渣を分取TLC (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、10:1) により精製したところ、9.3mg (32%) のPU-H71-ビオチン9が得られた。さらに、9.0mgの未反応の化合物2を回収したところ、81%の実際の収率が得られた。¹H NMR(500MHz, CDCl₃/MeOH-d₄, 2回転異性体) δ 8.18(s, 0.4H), 8.16(s, 0.6H), 7.30-7.32(m, 1H), 6.98(s, 0.6H), 6.96(s, 0.4H), 5.98(s, 2H), 4.49-4.56(m, 0.4H), 4.39-4.46(m, 1H), 4.22-4.27(m, 1H), 4.15-4.21(m, 2H), 3.99-4.07(m, 0.6H), 3.66-3.71(m, 2H), 3.51-3.61(m, 12H), 3.45-3.50(m, 2H), 3.29-3.38(m, 2H), 3.16-3.25(m, 2H), 3.07-3.12(m, 1H), 2.81-2.88(m, 1H), 2.63-2.68(m, 1H), 2.57-2.63(m, 1.2H), 2.41-2.47(m, 0.8H), 1.98-2.18(m, 4H), 1.52-1.70(m, 4H), 1.32-1.41(m, 2H), 1.08(d, J=6.7Hz, 4H), 1.02(d, J=6.8Hz, 2H); MS(ESI): m/z 986.5 [M+H]⁺.

PU-H71-ビオチン。DMF (0.2mL) 中の化合物6 (4.2mg、0.0086mmol) およびEZ-Link (登録商標) アミン-PEO₃-ビオチン (5.4mg、0.0129mmol) を、rtで24時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、残渣をクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、5:1) にかけたところ、1.1mg (16%) のPU-H71-ビオチンが得られた。¹H NMR(CDCl₃) δ 8.30(s, 1H), 8.10(s, 1H), 7.31(s, 1H), 6.87(s, 1H), 6.73(br s, 1H), 6.36(br s, 1H), 6.16(br s, 2H), 6.00(s, 2H), 4.52(m, 1H), 4.28-4.37(m, 3H), 3.58-3.77(m, 10H), 3.55(m, 2H), 3.43(m, 2H), 3.16(m, 1H), 2.92(m, 1H), 2.80(m, 2H), 2.72(m, 1H), 2.66(m, 2H), 2.17(t, J=7.0Hz, 2H), 2.04(m, 2H), 1.35-1.80(m, 6H); MS(ESI): m/z 872.2 [M+H]⁺.

6. 1. 3. ANCA標識された化合物の合成

N-(3-(6-アミノ-8-((6-ヨードベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)チオ)-9H-プリン-9-イル)プロピル)-2-シアノアセタミド (化合物26) の合成 (スキーム17)。CH₂Cl₂ (4mL) 中の化合物13¹ (120.3mg、0.256mmol) に、シアノ酢酸 (26mg、0.307mmol) およびDC

C (63 mg、0.307 mmol) を添加し、rt で5時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、クロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、100:1~50:1) により精製したところ、131 mg (95%) の化合物 26 が得られた。¹H NMR(600MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ 8.25(s, 1H), 7.40(s, 1H), 7.08(s, 1H), 6.07(s, 2H), 4.27(t, J=5.9Hz, 2H), 3.57(s, 2H), 3.27(t, J=5.1Hz, 2H), 1.98-2.06(m, 2H); MS(m/z): [M+H]⁺ 538.0.

PU-ANCA (化合物 28) の合成 (スキーム 17)。DMF (1 mL) 中の化合物 326 (44 mg、0.0825 mmol) に、化合物 27 (19 mg、0.075 mmol) およびピペリジン (10 μL) を添加し、70 °C で24時間加熱した。反応混合物を濃縮し、分取 TLC (CH₂Cl₂:MeOH-NH₃ (7N)、12.5:1) により精製したところ、橙色の固体として24.3 mg (42%) の化合物 28 が得られた。¹H NMR(600MHz, DMF-d₇): δ 8.73(t, J=5.8Hz, 1H), 8.38(d, J=1.1Hz, 1H), 8.36(s, 1H), 8.29(s, 1H), 8.18(dd, J=8.8, 1.7Hz, 1H), 7.95(d, J=9.2Hz, 1H), 7.92(d, J=8.8Hz, 1H), 7.56(dd, J=9.2, 2.5Hz, 1H), 7.52(br s, 2H), 7.49(s, 1H), 7.34(d, J=2.2Hz, 1H), 6.95(s, 1H), 6.16(s, 2H), 4.40(t, J=6.9Hz, 2H), 3.44-3.47(m, 4H), 3.38-3.43(m, 2H), 2.53-2.58(m, 4H), 2.30(s, 3H), 2.09-2.15(m, 2H); ¹³C NMR(150MHz, DMF-d₇): δ 161.5, 156.0, 153.5, 151.7, 151.5, 151.2, 149.5, 148.8, 144.4, 137.2, 133.6, 130.3, 129.2, 127.4, 127.0, 126.5, 125.2, 120.1, 119.3, 118.9, 117.4, 111.0, 108.5, 103.0, 102.9, 89.4, 54.9, 47.9, 45.6, 41.3, 40.5, 37.2; HRMS(ESI) m/z [M+H]⁺ の計算値: C₃₄H₃₃IN₉O₃S, 774.1472; 実測値: 774.1473.

6. 1. 4. 放射標識された化合物の合成

PU-H71、PU-HZ151 および PU-DZ13 の親化合物を、放射性ヨウ素化にとって好適なものとして合成した (すなわち、Sn-前駆体)。放射性ヨウ素化のために、合成はスキーム 19 に示される反応に従う。簡単に述べると、PU-化合物をメタノール中で溶媒和し (25 μg の PU-H71 および PU-HZ151; 15 μg の PU-DZ13)、NaI (5~10 μL) に添加し (画像化については [¹²⁴I] アイソトープ、生体内分布については [¹³¹I])、次いで、酸性媒体中でクロラミン T (CT、10 μL、10 分) で酸化した (酢酸中の 2 mg/mL)。ホット (放射性標識された) 化合物をアミン保護基 BOC (tert-ブチルオキシカルボニル) を用いて合成し、これをそれぞれの化合物について酸性条件下 (例えば、トリフルオロ酢酸 (TFA)、塩酸 (HCl)) で除去し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した。PU-DZ13 および PU-HZ151 前駆体を、15 μL のメタノール (MeOH) を溶媒和まで用いて放射標識し、放射標識の添加後、CT 中、室温 (RT) で10分インキュベートした後、50 μL の TFA を添加し、70 °C で1時間インキュベートした。PU-H71 前駆体を、放射標識の添加の直後、20 μL の MeOH および 15 μL の CT で放射標識した後、溶液を 50 °C で5分加熱し、次いで、2分冷却させた。その後、10 μL のメチオニンメチルエステル (H₂O 中の 0.5 g/mL から調剤) および 10 μL の濃 HCl を添加した後、50 °C (1時間) でインキュベートした。放射標識された生成物を採取し、回転式蒸発装置を用いて減圧下で溶媒を除去した。 [¹²⁴I] -PU-H71 の比活性は約 1000 mCi/μmol であり、これはこのクラスの [¹²⁴I] 化合物に関する本発明者らの以前の経験と一致していた。in vivo での投与については、 [¹²⁴I] -PU-化合物を、滅菌した 0.9% 塩溶液中で調剤した。

【0363】

6. 2. がん細胞における HSP90 の役割の評価

本節に記載される方法は、5. 1. 節の開示と関連する。

【0364】

細胞系および一次細胞: CML 細胞系 K562、Kasumi-4、MEG-01 および KU182、三重陰性乳がん細胞系 MDA-MB-468、HER2+乳がん細胞系 SKBr3、メラノーマ細胞系 SK-Mel-28、前立腺がん細胞系 LNCaP および DU145、膵臓がん細胞系 Mia-PaCa-2、結腸線維芽細胞、CCCD18Co 細

胞系を、American Type Culture Collectionから取得した。CML細胞系KCL-22を、Japanese Collection of Research Bioresourcesから取得した。NIH-3T3線維芽細胞を、以前に記載のようにトランスフェクトした⁶⁵。細胞を、10%FBS、1%L-グルタミン、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加したDMEM/F12 (MDA-MB-468、SKBr3およびMia-PaCa-2)、RPMI (K562、SK-Mel-28、LNCaP、DU145およびNIH-3T3) またはMEM (CCD18Co) 中で培養した。Kasumi-4細胞を、20%FBS、10ng/ml顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) および1xPen/Strepを添加したIMDM中で維持した。PBL (ヒト末梢血白血球) (n=3) および臍帯血 (n=5) を、New York Blood Centerから購入した患者の血液から取得した。35mlの細胞懸濁液を、15mlのFicoll-Plaque plus (GE Healthcare) 上で溶解した。試料を4℃で40分、2,000rpmで遠心分離し、白血球界面を採取した。細胞を10%FBSを含むRPMI培地中に播種し、示されたように用いた。一次ヒト慢性期および急性転化期CMLおよびAML細胞を、インフォームド Consent と共に取得した。標本の操作および分析は、University of Rochester, Weill Cornell Medical CollegeおよびUniversity of Pennsylvania Institutional Review Boardsにより認可された。単核細胞を、Ficoll-Plaque (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 密度勾配分離を用いて単離した。細胞を、Iscoveの改変Dulbecco培地 (IMDM)、40%ウシ胎仔血清 (FBS)、および10%ジメチルスルホキシド (DMSO) からなる凍結培地中またはCryoStor (商標) CS-10 (Bioline) 中で凍結保存した。培養した場合、細胞を37℃で5%CO₂の加湿雰囲気中で保持した。

10

20

【0365】

化学および免疫沈降のための細胞溶解：1μg/μLのプロテアーゼ阻害剤 (ロイペチンおよびアプロチニン) を添加したFelts Buffer (HEPES 20mM、KCl 50mM、MgCl₂ 5mM、NP40 0.01%、新鮮に調製されたNa₂MoO₄ 20mM、pH7.2~7.3) 中に細胞を採取した後、3回の連続的凍結 (ドライアイス中) および解凍ステップを行うことにより、細胞を溶解した。総タンパク質濃度を、製造業者の説明書に従ってBCAキット (Pierce) を用いて決定した。

30

【0366】

免疫沈降：Hsp90抗体 (H9010) または正常IgG (Santa Cruz Biotechnology) を、10μLの容量で示された量の細胞溶解物に40μLのタンパク質Gアガロースビーズ (Upstate) と共に添加し、混合物を4℃で一晩インキュベートした。ビーズをFelts溶解バッファーで5回洗浄し、SDS-PAGEにより分離した後、標準的なウェスタンブロッティング手順を行った。

【0367】

化学沈降：HSP90阻害剤ビーズまたはアガロースビーズにコンジュゲートさせたHSP90不活性化化合物 (エタノールアミン) を含有する対照ビーズを、溶解バッファー中で3回洗浄した。別途指摘しない限り、その後ビーズコンジュゲート (80μL) を示された量の細胞溶解物 (120~500μg) と共に4℃でインキュベートし、溶解バッファーで容量を200μLに調整した。インキュベーション後、ビーズコンジュゲートを溶解バッファーで5回洗浄し、ブルダウン中のタンパク質をウェスタンブロットにより分析した。枯渇試験のために、2~4回の連続的化学沈降を実施した後、示された場合、免疫沈降ステップを行った。

40

【0368】

試薬：HSP90阻害剤、固相固定誘導体およびフルオレセイン標識誘導体を、以前に報告されたように合成した^{75~77}。本発明者らは、LC Laboratoriesから

50

Gleevecを、SelleckからAS703026を、TocrisからKN-93を、ならびにSigmaからPP242、BMS-345541およびバナジウム酸ナトリウムを購入した。全ての化合物をDMSO保存物として用いた。

【0369】

ウェスタンブロットニング：細胞をPU-H71またはDMSO（ビヒクル）で24時間処理し、ロイペプチン（Sigma Aldrich）およびアプロチニン（Sigma Aldrich）を添加した50mM Tris、pH7.4、150mM NaClおよび1%NP40溶解バッファー中で溶解した。タンパク質濃度をBCAキット（Pierce）を用いて製造業者の説明書に従って決定した。タンパク質溶解物（15~200μg）をSDS-PAGEにより電気泳動分解し、ニトロセルロース膜に移し、HSP90（1:2000、SMC-107A/B; StressMarq）、Bcr-Ab1（1:75、554148; BD Pharmingen）、PI3K（1:1000、06-195; Upstate）、mTOR（1:200、Sc-1549; Santa Cruz）、p-mTOR（1:1000、2971; Cell Signaling）、STAT3（1:1000、9132; Cell Signaling）、p-STAT3（1:2000、9145; Cell Signaling）、STAT5（1:500、Sc-835; Santa Cruz）、p-STAT5（1:1000、9351; Cell Signaling）、RICKTOR（1:2000、NB100-611; Novus Biologicals）、RAPTOR（1:1000、2280; Cell Signaling）、P90RSK（1:1000、9347; Cell Signaling）、Raf-1（1:300、Sc-133; Santa Cruz）、CARM1（1:1000、09-818; Millipore）、CRKL（1:200、Sc-319; Santa Cruz）、GRB2（1:1000、3972; Cell Signaling）、FAK（1:1000、Sc-1688; Santa Cruz）、BTK（1:1000、3533; Cell Signaling）、A-Raf（1:1000、4432; Cell Signaling）、PRKD2（1:200、sc-100415、Santa Cruz）、HCK（1:500、06-833; Millipore）、p-HCK（1:500、ab52203; Abcam）およびβ-アクトチン（1:2000、A1978; Sigma）に対する一次抗体を用いてプロービングした。次いで、膜を1:3000倍希釈の対応する西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と共にインキュベートした。ECL-Enhanced Chemiluminescence Detection System（Amersham Biosciences）を用いて製造業者の説明書に従って検出を実施した。

【0370】

密度測定：ゲルをAdobe Photoshop 7.0.1中でスキャンし、Un-Scan-It 5.1ソフトウェア（Silk Scientific）を用いて定量的密度測定分析を実施した。

【0371】

放射性アイソトープ結合試験およびHSP90定量試験：飽和試験を、 ^{131}I -PU-H71および細胞（K562、MDA-MB-468、SKBr3、LNCaP、DU-145、MRC-5およびPBL）を用いて実施した。簡単に述べると、3つの細胞試料を、1μMの非標識PU-H71を含むか、または含まない増加量の ^{131}I -PU-H71と混合した。溶液をオービタルシェーカー中で振とうし、1時間後、Brandel細胞収穫装置を用いて細胞を単離し、氷冷Tris緩衝生理食塩水で洗浄した。全ての単離された細胞試料を計数し、 ^{131}I -PU-H71の特異的取込みを決定した。これらのデータを ^{131}I -PU-H71の濃度に対してプロットして、飽和結合曲線を得た。PUに結合したHSP90の定量のために、 9.2×10^7 個のK562細胞、 6.55×10^7 個のKCL-22細胞、 2.55×10^7 個のKU182細胞および 7.8×10^7 個のMEG-01細胞を溶解して、それぞれ、6382、3225、1349および3414μ

gの総タンパク質を得た。HSP90の割合を算出するために、HeLa細胞(Stressgen #ADI-SPP-770)から精製された組換えHSP90から作製した標準曲線を用いることにより、細胞性HSP90発現を定量した。

【0372】

パルスーチェイス。K562細胞を、示されたように、PU-H71 (5 μ M)を含むか、または含まないNa₃VO₄ (1 mM)で処理した。細胞を、示された時間で採取し、50 mM Tris pH7.4、150 mM NaClおよび1%NP-40溶解バッファー中で溶解した後、ウェスタンブロッティング手順にかけた。

【0373】

トリプシン消化：K562細胞を、ビヒクルまたはPU-H71 (50 μ M)で30分処理した。細胞を採取し、50 mM Tris pH7.4、150 mM NaClおよび1%NP-40溶解バッファー中で溶解した。STAT5タンパク質を、抗STAT5抗体(Santa Cruz、sc-835)を用いて500 μ gの総タンパク質溶解物から免疫沈降させた。タンパク質Gアガロースビーズに結合したタンパク質沈降物をトリプシンバッファー(50 mM Tris pH8.0、20 mM CaCl₂)で洗浄し、33 ngのトリプシンを各試料に添加した。試料を37℃でインキュベートし、示された時点でアリコートを採取した。タンパク質アリコートをSDS-PAGEにかけ、STAT5についてプロットした。

【0374】

活性化STAT5 DNA結合アッセイ：STAT5aおよびSTAT5bのDNA結合能力を、ELISAに基づくアッセイ(TransAM、Active Motif、Carlsbad、CA)により、製造業者の説明書に従ってアッセイした。簡単に述べると、5 x 10⁶個のK562細胞を、PU-H71 1および10 μ Mまたは対照で24時間処理した。10マイクログラムの細胞溶解物を、予め吸着させたSTATコンセンサスオリゴヌクレオチド(5'-TTC CCG GAA-3')を含有するウェルに添加した。対照処理された細胞のために、野生型または突然変異型STATコンセンサス結合部位を含む20 pmolの競合オリゴヌクレオチドの非存在下または存在下でアッセイを実施した。インターフェロンで処理されたHeLa細胞(5 μ g/ウェル)を、アッセイのための陽性対照として用いた。インキュベーションおよび洗浄の後、ウサギポリクローナル抗STAT5aまたは抗STAT5b抗体(1:1000、Active Motif)を各ウェルに添加した後、HRP-抗ウサギ二次抗体(1:1000、Active Motif)を添加した。HRP基質の添加後、655 nmの参照波長を用いて吸光度を450 nmで読み取った(Synergy4、Biotek、Winooski、VT)。このアッセイにおいては、吸光度は試料中に存在するDNA結合転写因子の量に正比例する。実験を4回繰り返して実行した。結果を、SEMと共に平均吸光度値から任意単位(AU)として表した。

【0375】

定量的クロマチン免疫沈降(Q-ChIP)：Q-ChIPを、以前に記載のものに改変を加えて行った⁸³。簡単に述べると、10⁸個のK562細胞を1%ホルムアルデヒドで固定し、溶解し、超音波処理(Branson sonicator、Branson)を行った。STAT5 N20(Santa Cruz)およびHSP90(Zymed)抗体を、予め透明化した試料に添加し、4℃で一晩インキュベートした。次いで、タンパク質AまたはGビーズを添加し、試料をビーズから溶出させた後、脱架橋させた。PCR精製カラム(Qiagen)を用いてDNAを精製した。ChIP生成物の定量を、Fast SYBR Green(Applied Biosystems)を用いる定量的PCR(Applied Biosystems 7900HT)により実施した。STAT結合部位を含有する標的遺伝子を、以下のプライマー：CCND2(5-GTT GTTCTGGTCCCTTTAATCGおよび5-ACCTCGCATACCCAGAGA)、MYC(5-ATGCGTTGCTGGGTATTTTおよび5-CAGAGCGTGGGATGTTAGTG)を用いて、遺伝子間制御領域については(5-CCA

10

20

30

40

50

CCTGAGTCTGCAATGAGおよび5-CAGTCTCCAGCCTTTGTTCC)を用いて検出した。

【0376】

リアルタイムQPCR:RNeasy Plusキット(Qiagen)を用いて製造業者の説明書に従って、PU-H71処理された、および対照のK562細胞からRNAを抽出した。High Capacity RNA-to-cDNAキット(Applied Biosystems)を用いて、cDNAを合成した。本発明者らは、以下のプライマー:MYC(5-AGAAAGAGCATCTTCCGCATCおよび5-CCTTTAAACAGTGCCCAAGC)、CCND2(5-TGAGCTGCTGGCTAAGATCAおよび5-ACGGTACTGCTGCAGGCTAT)、BCL-XL(5-CTTTTGTGGAACCTCTATGGGAACAおよび5-CAGCGGTTGAAGCGTTCCT)、MCL1(5-AGACCTTACGACGGGTGTGGおよび5-ACATTCTCTGATGCCACCTTC)、CCND1(5-CCTGTCTCTACTACCGCCTCAおよび5-GGCTTCGATCTGCTCCTG)、HPRT(5-CGTCTTGTCTCGAGATGTGATGおよび5-GCACACAGAGGGCTACAAATGTG)、GAPDH(5-CGACCACTTTGTCAAGCTCAおよび5-CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT)、RPL13A(5-TGAGTGAAAGGGAGCCAGAAAGおよび5-CAGATGCCCCCACTCAACAAGA)を用いて特定の遺伝子を増幅した。転写物の存在量を、Fast SYBR Green条件(95℃で20secの初期ステップ、95℃で1secの40サイクルおよび60℃で20sec)を用いて検出した。ハウスキーピング遺伝子(RPL13A)の C_T 値を、対象の対応遺伝子から差し引いた(ΔC_T)。差異の標準偏差を、 C_T 値の標準偏差から算出した(反復)。次いで、PU-H71処理された細胞の ΔC_T 値を、 $\Delta \Delta C_T$ 法を用いてその対応する対照処理された細胞と比較して表した。対照処理された細胞と比較した薬剤で処理された細胞における各遺伝子の発現倍数を、式: $2^{-\Delta \Delta C_T}$ により決定する。結果を、反復物に関する平均の標準誤差と共に発現倍数として表した。

【0377】

HSP70ノックダウン。エレクトロポレーション(Amaxa)およびNucleofactor Solution V(Amaxa)により、製造業者の説明書に従ってトランスフェクションを実行した。HSP70ノックダウン試験を、HSP70のオープンリーディングフレーム(HSPA1A;受託番号NM_005345)に対して以前に報告されたように⁸⁴設計されたsiRNAを用いて実施した。陰性対照細胞を、逆転対照siRNA配列(HSP70C;Dharmacon RNA技術)を用いてトランスフェクトした。試験のために用いたHSP70に対する活性配列は、HSP70A(5'-GGACGAGUUUGAGCACAAAG-3')およびHSP70B(5'-CCAAAGCAGACGCAGAUUU-3')である。対照の配列は、HSP70C(5'-GGACGAGUUUGUAGCACAAAG-3')である。2mLの培地(1%L-グルタミン、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加したRPMI)中の300万個の細胞を、0.5μMのsiRNAを用いて製造業者の説明書に従ってトランスフェクトした。トランスフェクト細胞を6穴プレート中で維持し、84時間で溶解し、標準的なウェスタンブロット手順を行った。

【0378】

キナーゼスクリーン⁸⁵(図44)。多くのアッセイについて、キナーゼタグ付T7ファージ株を、BL21株に由来する大腸菌宿主中、24穴ブロック中で同時に増殖させた。大腸菌を対数期まで増殖させ、凍結保存物からT7ファージに感染させ(感染多重度=0.4)、溶解まで32℃で振とうしながらインキュベートした(90~150分)。溶解物を遠心分離し(6,000xg)、濾過し(0.2μm)、細胞破片を除去した。残りのキナーゼをHEK-293細胞中で生成させた後、qPCR検出のためにDNAでタグ付けした。ストレプトアビジン被覆磁気ビーズを、室温で30分間、ビオチン化小分子リガンドで処理して、キナーゼアッセイのための親和性樹脂を作製した。リガンド付ビーズ

を過剰のビオチンで遮断し、ブロッキングバッファー (SeaBlock (Pierce)、1% BSA、0.05% Tween 20、1mM DTT) で洗浄して、未結合のリガンドを除去し、非特異的ファージ結合を減少させた。1x 結合バッファー (20% SeaBlock、0.17x PBS、0.05% Tween 20、6mM DTT) 中でキナーゼ、リガンド付親和性ビーズ、および試験化合物を混合することにより、結合反応物を作った。試験化合物を、100% DMSO 中の 40x 保存液として調製し、アッセイ中に直接希釈した。全ての反応物を、0.04ml の最終容量でポリプロピレン 384 穴プレート中で実施した。アッセイプレートを振とうしながら 1 時間、室温でインキュベートし、親和性ビーズを洗浄バッファー (1x PBS、0.05% Tween 20) で洗浄した。次いで、ビーズを溶出バッファー (1x PBS、0.05% Tween 20、0.5 μ m の非ビオチン化親和性リガンド) 中に再懸濁し、浸透しながら 30 分間、室温でインキュベートした。溶出液中のキナーゼ濃度を、qPCR により測定した。KINOMEscan の選択性スコア (S) は、化合物選択性の定量的尺度である。それは、化合物に結合するキナーゼの数を、突然変異体を除く試験した異なるキナーゼの総数で除算することにより算出される。TREESpot (商標) は、KINOMEscan⁸⁵ により開発された商標で守られたデータ可視化ソフトウェアである。結合することがわかったキナーゼを図 44 において丸で印を付け、ここで大きい方の丸はより高い親和性結合を示す。キナーゼデンドログラムを適合させ、Science and Cell Signaling Technology, Inc. からの許諾を以て再現する。

【0379】

レンチウイルスベクター、レンチウイルス生成および K562 細胞の形質導入。CARM1 の shRNA ノックダウンのレンチウイルス構築物を、Openbiosystem の TRC レンチウイルス shRNA ライブラリーから購入した: pLKO.1-shCARM1-KD1 (カタログ番号: RHS3979-9576107) および pLKO.1-shCARM1-KD2 (カタログ番号: RHS3979-9576108)。対照 shRNA (shRNA スクランブル) は、Addgene プラスミド 1864 であった。GFP をクローニングして、選択マーカーとしてピューロマイシンと置きかえた。レンチウイルスを、以前に記載されたプロトコル⁸⁶ のように 293T の一過的トランスフェクションにより生成させた。ウイルス上清を採取し、0.45 μ m フィルターを通して濾過し、濃縮した。K562 細胞を、8 μ g/ml のポリブレン (Aldrich) の存在下で高力価レンチウイルス濃縮懸濁液に感染させた。形質導入された K562 細胞を、トランスフェクションの 72 時間後に緑色蛍光 (GFP) について選別した。

【0380】

RNA 抽出および定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)。qRT-PCR のために、RNeasy ミニキット (QIAGEN、Germany) を用いて 10⁶ 個の細胞から総 RNA を単離した後、ランダムヘキサマー (SuperScript III キット、Invitrogen) を用いる逆転写にかけた。ABI 7500 配列検出システムを用いて、リアルタイム PCR 反応を実施した。Sybr green I 化学または TaqMan 法 (PE Applied Biosystems、Norwalk、CT) を用いて、PCR 産物を検出した。リアルタイム PCR アッセイに関する詳細は、他の場所に記載されている⁸⁷。CARM1 qPCR のためのプライマー配列は、TGATGGCCAAAGTCTGTCAAG (フォワード) および TGAAGCAACGTCAACCAAG (リバーズ) である。

【0381】

細胞生存、アポトーシス、および増殖アッセイ。CARM1 shRNA またはスクランブルでトランスフェクトされていないか、またはトランスフェクトされた K562 細胞における生存評価を、Trypan Blue を用いて実施した。この発色団は負に荷電しており、膜が損傷していない限り細胞と相互作用しない。したがって、この染料を含まない細胞は全て、生存している。2 μ L のアクリジンオレンジ (100 μ g/mL)、2 μ L のエチジウムブロマイド (100 μ g/mL)、および 20 μ L の細胞懸濁液を混合

することにより、蛍光顕微鏡を用いてアポトーシス分析を評価した。少なくとも5つの無作為の視野で最少で200個の細胞が計数された。特有の核および細胞質での蛍光に基づいて細胞形態の変化を検査することにより、死んだアポトーシス細胞、壊死細胞および正常細胞から生きているアポトーシス細胞を識別した。生細胞は無傷の形質膜（緑色）を示すが、死んだ細胞は損傷した形質膜（オレンジ色）を示す。収縮、ヘテロクロマチン凝縮、および核脱顆粒などの超微形態的变化の出現は、アポトーシスおよび壊死を含む破壊された細胞膜とより一致する。アポトーシス細胞の割合（アポトーシス指数）を、アポトーシス細胞（%）＝（アポトーシス核を有する細胞の総数／計数した細胞の総数）×100として算出した。増殖アッセイのために、 5×10^3 個のK562細胞を、96穴黒色プレート（Corning）上に播種した。アッセイを製造業者の説明書（Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay、Promega）に従って実施した。全ての実験を3回繰り返した。示された場合、Alamar blueアッセイを用いて増殖阻害試験を実施した。この試薬は、細胞培養中での細胞生存能力の迅速で客観的な尺度を提供し、それは細胞の代謝能力を測定するための指示染料レサズリンを使用し、細胞生存能力の指示薬である。簡単に述べると、指数増殖期の細胞をマイクロタイタープレート（Corning #3603）中に播種し、37℃で示された時間インキュベートした。薬剤を示された濃度で3回添加し、プレートを72時間インキュベートした。レサズリン（55 μM）を添加し、Analyst GT（蛍光強度モード、励起530 nm、放出580 nm、ダイクロイックミラー560 nm）を用いて6時間後にプレートを読み取った。Softmax ProおよびGraph Pad Prismソフトウェアを用いて結果を分析した。処理された細胞と対照細胞から得られた蛍光読み取り値を比較することにより、細胞増殖阻害率を算出した。細胞増殖を50%阻害する薬剤濃度としてIC₅₀を算出した。

【0382】

mTORとHSP90阻害剤との相乗作用の定量的分析：pp242（mTOR阻害剤）とPU-H71（HSP90阻害剤）との薬剤相互作用を決定するために、Chou-Talalayの組合せ指数（CI）アイソボログラム法を、以前に記載のように用いた^{88、89}。この方法は、質量作用の法則の中央効果原理に基づくものであり、コンピュータシミュレーションにより、それぞれの薬剤の機構とは無関係に、2つ以上の薬剤の相乗作用または拮抗作用を定量するものである。アルゴリズムに基づいて、コンピュータソフトウェアは、中央効果プロット、組合せ指数プロットおよび正規化アイソボログラムを示す（非一定的な比率の組合せの2つの薬剤を用いる場合）。PU-H71（0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.0125 μM）およびpp242（0.5、0.125、0.03125、0.0008、0.002、0.001 μM）を、記載の濃度の単一の薬剤として、または非一定の比率で組み合わせて用いた（PU-H71：pp242；1：1、1：2、1：4、1：7.8、1：15.6、1：12.5）。Fa（殺傷された細胞の画分）を、式 $Fa = 1 - Fu$ を用いて算出した；Fuは、影響されていない細胞の画分であり、コンピュータソフトウェア（Compusyn、Paramus、New Jersey、USA）を用いて用量効果分析のために用いた。

【0383】

6. 3. 細胞アッセイにおける蛍光標識されたプローブ

6. 3. 1. 蛍光-PU-H71結合のフローサイトメトリー分析

ヒト急性骨髄性白血病（AML）細胞系MOLM-13およびMV4-11細胞は、Dr. Stephen D. Nimer, MSKCCからの贈り物であり、10%ウシ胎仔血清（FBS）および1xPen/Sterpを添加したRPMI1640中、37℃で5%CO₂の加湿雰囲気中で維持した。細胞を 5×10^5 個の細胞/mLの密度で6穴プレート中に播種し、37℃で4時間、示された誘導体（1 μM）で処理した。生細胞中でのHSP90結合の検出のために、細胞をFACSバッファー（PBS、0.05%FBS）で2回洗浄し、分析の前に、室温でFACSバッファー中、1 μg/mLのDAPI（Invitrogen）で染色した。PU-H71-蛍光誘導体結合を表す生細胞に由来

10

20

30

40

50

する蛍光強度（DAPI陰性）をフローサイトメトリー（LSRII、BD Biosciences）により捕捉し、FlowJoソフトウェア（Tree Star、Ashland、OR）により分析した。固定された細胞中でのHSP90結合の評価のために、細胞を洗浄し、BD Cytifixバッファ（BD、Biosciences、San Jose、CA）を用いて30分固定した後、BD Permバッファ（BD Biosciences、San Jose、CA）を用いて氷上で30分透過処理した。完全な細胞透過処理を、DAPIを用いて決定した。細胞を上記のようにフローサイトメトリーにより分析した。競合試験のために、 2×10^6 細胞/mlの密度の一次AML試料を、 $1 \mu\text{M}$ の非コンジュゲート化PU-H71で4時間処理した後、 $1 \mu\text{M}$ のPU-H71-FITCで1時間処理した。細胞を採取し、2回洗浄し、CD45について染色して、 4°C で30分インキュベートされた正常リンパ球から芽球を識別し、洗浄し、FACSバッファ中の7-AADで染色し、フローサイトメトリーにより分析した。

10

【0384】

6. 3. 2. フローサイトメトリー、CD34単離

CD34 MicroBead Kitおよび自動化磁気細胞選別装置autoMACSを用いて、製造業者の説明書に従って（Miltenyi Biotec、Auburn、CA）、CD34+細胞単離を実施した。生存能力アッセイ-CML細胞系を、 5×10^5 細胞/mlの密度で48穴プレート中に播種し、示された用量のPU-H71で処理した。細胞を24時間毎に採取し、アネキシンV-V450（BD Biosciences）およびアネキシンVバッファ（ 10mM HEPES/NaOH、 0.14M NaCl、 2.5mM CaCl_2 ）中の7-AAD（Invitrogen）で染色した。細胞生存能力を、フローサイトメトリー（BD Biosciences）により分析した。患者試料について、一次急性転化期CML細胞を、 2×10^6 細胞/mlで48穴プレート中に播種し、示された用量のPU-H71で最大96時間処理した。細胞をFACSバッファ（PBS、 0.05% FBS）中、 4°C で30分、CD34-APC、CD39-PE-CY7およびCD45-APC-H7抗体（BD Biosciences）で染色した後、アネキシンV/7-AAD染色を行った。PU-H71結合アッセイ-CML細胞系を、 5×10^5 細胞/mlの密度で48穴プレート中に播種し、 $1 \mu\text{M}$ のPU-H71-FITCで処理した。処理後4時間で、細胞をFACSバッファで2回洗浄した。生細胞中でのPU-H71-FITC結合を測定するために、細胞を室温で10分、FACSバッファ中の7-AADで染色し、フローサイトメトリー（BD Biosciences）により分析した。PU-H71-FITC処理後48時間および96時間で、細胞をアネキシンV-V450（BD Biosciences）およびアネキシンVバッファ中の7-AADで染色し、フローサイトメトリーにかけて、アネキシンV/7-AAD二重陰性ゲートにより決定された生存能力を測定した。白血病患者試料へのPU-H71-FITCの結合を評価するために、一次bpまたはcpCML細胞を 2×10^6 細胞/mlで48穴プレート中に播種し、 $1 \mu\text{M}$ のPU-H71-FITCで処理した。処理後24時間で、細胞を2回洗浄し、 4°C で30分、FACSバッファ中のCD34-APC（またはCD34-PECy7）、CD38-PE-CY7（またはCD38-PE）およびCD45-APC-H7抗体で染色した後、7-AAD染色した。処理後48時間および96時間で、細胞をCD34-APC（またはCD34-PECy7）、CD38-PE-CY7（またはCD38-PE）およびCD45-APC-H7抗体で染色した後、アネキシンV-V450および7-AAD染色を行って、芽球、リンパ球およびCD34+細胞集団中の細胞生存能力を測定した。競合試験のために、 5×10^5 細胞/mlの密度のCML細胞系または 2×10^6 細胞/mlの密度の一次CML試料を、 $1 \mu\text{M}$ の非コンジュゲート化PU-H71で4時間処理した後、 $1 \mu\text{M}$ のPU-H71-FITCで1時間処理した。細胞を採取し、2回洗浄し、FACSバッファ中の7-AADについて染色し、フローサイトメトリーにより分析した。HSP90染色細胞を 4°C で30分、固定バッファ（BD Biosciences）で固定し、氷

20

30

40

50

上で30分、Perm Buffer III (BD Biosciences) 中で透過処理した。細胞を抗HSP90フィコエリトリンコンジュゲート (PE) (F-8 クローン、Santa Cruz Biotechnologies; CA) で60分間染色した。細胞を洗浄した後、フローサイトメトリーにより分析した。正常マウス IgG2a-PE を、アイソタイプ対照として用いた。

【0385】

6. 3. 3. PU-H71-FITC2 (9) 結合の蛍光顕微鏡分析

MV4-11細胞を 5×10^5 細胞/ml の密度で48穴プレート中に播種し、 $1 \mu\text{M}$ のPU-H71-FITC2またはPU-H71-NBD1で処理した。処理後24時間で、細胞を室温で30分、3% BSA/FACSバッファーで遮断し、室温で30分、3% BSA/FACSバッファー中、 Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ 抗体 (Novus Biologicals) と共にインキュベートした。細胞をFACSバッファーで3回洗浄し、室温で20分、3% BSA/FACSバッファー中のヤギ抗ウサギAlexa Fluor 568 (Invitrogen) と共にインキュベートした。次いで、細胞をFACSバッファーで3回洗浄し、FACSバッファー中の $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のDAPIと共に10分インキュベートし、スライド上に載せ、共焦点顕微鏡 (Zeiss) 下で観察した。

【0386】

ウェスタンブロットティング：細胞を、蛍光PU-H71誘導体、TEG-FITCまたはDMSO (ビヒクル) で24時間処理し、ロイペプチン (Sigma Aldrich) およびアプロチニン (Sigma Aldrich) を添加した50mM Tris、pH 7.4、150mM NaCl および1% NP40 溶解バッファー中で溶解させた。BCAキット (Pierce) を用いて製造業者の説明書に従ってタンパク質濃度を決定した。タンパク質溶解物 ($50 \mu\text{g}$) をSDS-PAGEにより電気泳動分解し、ニトロセルロース膜に移し、Raf-1 (1:300、Sc-133; Santa Cruz)、FLT3 (1:1000、sc-480; Santa Cruz) および β -アクチン (1:2000、A1978; Sigma) に対する一次抗体を用いてプロービングした。次いで、膜を1:3000希釈率の対応する西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と共にインキュベートした。ECL-Enhanced Chemiluminescence Detection System (Amersham Biosciences) を用いて製造業者の説明書に従って検出を実施した。

【0387】

6. 3. 4. 腫瘍幹細胞アッセイ

PU-H71結合アッセイ—一次試料を 2×10^6 細胞/ml で48穴プレート中に播種し、 $1 \mu\text{M}$ のPU-H71-FITC2またはTEG-FITCで処理した。処理後4時間で、細胞をFACSバッファー (PBS、0.05% FBS) で1回洗浄し、4℃で30分、FACSバッファー (PBS+0.5% FBS) 中のCD34-APC、CD38-PE-CY7およびCD45-APC-H7抗体 (BD Biosciences) で染色した後、7-AAD (Invitrogen) で染色した。結合したPU-H71-FITC2のMFIをBD-LSR IIフローサイトメーター中で評価し、TEG-FITCに対して正規化した。値を、リンパ球 (CD45^{hi}対SSCゲート) と比較したLSC (CD45^{dim}、CD34⁺、CD38⁻ゲート) 中でのPU-H71-FITCの結合の比として表した。

【0388】

幹細胞生存能力アッセイ—一次細胞を 2×10^6 細胞/ml で48穴プレート中に播種し、 $1 \mu\text{M}$ のPU-H71で48時間処理した。細胞を4℃で30分、FACSバッファー (PBS、0.05% FBS) 中のCD34-APC、CD38-PE-CY7およびCD45-APC-H7抗体 (BD Biosciences) で染色した後、アネキシンV-V450 (BD Biosciences) およびアネキシンVバッファー (10mM HEPES/NaOH、0.14M NaCl、2.5mM CaCl_2) 中の7

10

20

30

40

50

－A A Dで染色した。細胞生存能力を、未処理の細胞に対して正規化したアネキシンV－
／7－A A D－細胞の割合として決定した。

【0389】

統計分析。別途指摘しない限り、Graph Pad Prism（バージョン4；Graph Pad Software）中に実装された対応のない両側t検定によりデータを分析した。0.05未満のP値を、有意であると考えた。別途注記しない限り、データは2回または3回の反復の平均±SDまたは平均±SEMとして提示される。エラーバーは、平均のSDまたはSEMを表す。単一のパネルが提示される場合、データは2または3つの個別の実験の代表である。

【0390】

6. 3. 5. 一次白血病試料中ならびに白血病および固形腫瘍細胞系中でのPU－FITC結合の評価

手順：白血病患者からの末梢血（PB）または骨髄（BM）単核細胞を、Ficoll密度勾配を用いて新鮮な試料から、または生きたまま凍結されたアリコートから単離する。細胞を1 μ MのPU－FITCで処理し、処理後4時間で、細胞を洗浄し、抗体で染色して、異なるサブ集団（芽球（CD45dim対SSCゲート）およびリンパ球（CD45hi対SSCゲート）を同定するためのCD45－APC－H7）を識別し、7－A A Dで染色して死んだ細胞を識別する。PU－FITC結合を、BD LSR－II装置を用いて評価する。装置を実験前にCSTビーズを用いて設定する。様々な蛍光強度で標識された市販のビーズ（Quantum Alexa Fluor 488キット）を用いる較正曲線を、PU－FITC結合に関するAF488／FITC蛍光強度の定量的ために用いる。リンパ球への結合を用いて、それぞれの患者試料に関するPU－FITCのバックグラウンド結合を決定する。PU－FITC結合を、リンパ球と比較した芽球の平均蛍光強度（MFI）の倍数差として評価する。非特異的対照（TEG－FITC）を用いて、非特異的結合を決定する。本発明者らは、少なくとも100個の一次白血病試料を評価することを提唱する。それぞれのアッセイについて、本発明者らは、最少で900,000個の総単核細胞を使用する。本発明者らは、分析のために少なくとも50,000の事象を収集する。分析を、FlowJoソフトウェアを用いて実施する。市販の細胞系（リンパ腫、多発性骨髄腫、乳がん、前立腺がん、膵臓がんおよび肺がん細胞系）のより大きいパネルへのPU－FITCの結合を評価することができる。細胞系はそれ自身、内部対照を有さないため、本発明者らはPUFITCから差し引いたTEG－FITCの計算されたデルタMFI（蛍光ビーズを用いて実施された較正曲線を用いて定量される）または上記のようなHL－60への結合を使用する。

【0391】

Hsp90阻害剤に対する感受性の評価：PU－FITC結合について評価された全試料の感受性を決定するために、細胞を96穴プレート中に播種し、増加用量のPU－H71で処理した。細胞系および選択された一次試料サブセットにおいて、十分な材料が利用可能である場合、他の化学的に異なるHsp90i（17－AAG、NVP－AUY922およびSTAT9090または現在臨床評価中の他のHSP90i）に対するその感受性も試験する（5）。48時間後に細胞を採取し、CD45－APC－H7で染色して、芽球と正常リンパ球（一次細胞について）とを識別する。次いで、細胞を洗浄し、アネキシンV－V450およびアネキシンVバッファー（10mM HEPES／NaOH、0.14M NaCl、2.5mM CaCl₂）中の7－A A Dで染色する。細胞生存能力をフローサイトメトリーにより分析する。

【0392】

統計的考慮：主な目標は、PU結合倍数に関する本発明者らのアッセイがHsp90i応答者と非応答者とを最良に識別するように、それを評価することである。これらの実験を、一次試料および細胞系を含む150個の試料を用いてin vitroで行う。50%を超える細胞が生きている場合、応答が定義される。受信者操作特性（ROC）曲線下面積を算出して、応答と非応答とを識別する際のPU結合倍数の能力を評価する。本発明

10

20

30

40

50

者らの目的のために、本発明者らは、0.87以上のAUC（0.75のヌルAUCと比較）を、PU結合倍数が非応答者からHsp90i応答者を識別することができることを示すと定義する。150個の試料について、および応答率が30%であると仮定すると、本発明者らは、5%のI型誤差で0.75~0.87のAUCの差異を検出する80%の力を有するであろう。応答率が減少するにつれて、力も低下する。一例として、本発明者らが20%の応答率を仮定する場合、本発明者らは5%のI型誤差で0.75~0.89のAUCの差異を検出する80%の力を有するであろう。

【0393】

6.3.6. p g p 阻害剤の存在下または非存在下での生腫瘍細胞系におけるPU-FITC結合の測定

付着性がん細胞系を播種し、37℃、5%CO₂で一晩接着させる。細胞を、p g p 阻害剤（PSC833、Tocris BiosciencesもしくはReversan、Tocris Biosciences）またはDMSOビヒクルで2時間予備処理（5μM）した後、1μMのDMSO、PU-FITC9（陰性PU-FITC対照）およびPU-FITC2（FITCに標識付けられたPU-H71薬剤）を含有する培地を添加する。細胞をFITC薬剤または対照コンジュゲートと共にさらに4時間、37℃、5%CO₂でインキュベートする。次いで、細胞をトリプシン化し、1XFACSバッファ（1XPBS+0.5%FBS）で2回洗浄し、ペレットを、細胞生存染料（1μg/mlのDAPI）を含有する500μlの1XFACSバッファ中に再懸濁する。試料をBD LSRIIFローサイトメーター上で泳動し、10~20,000の事象を収集する。それぞれの実験泳動の前に、レーザーをCSTビーズ（BD Biosciences）を用いてLSRII上で正規化する。FITC中央蛍光強度（MFI）を測定することによりDAPI-ve生細胞中で腫瘍細胞中でのPU-FITCの結合を決定する。FITC9およびDMSO対照に由来する非特異的FITCシグナルを、PU-FITCシグナルから差し引く。

【0394】

6.3.7. 腫瘍細胞および循環腫瘍細胞の解離

腫瘍細胞の解離およびPU-FITC結合の測定—マウスから得たEGFR+腫瘍を、製造業者のプロトコルに従って解離した（組織解離キット、Millipore）。簡単に述べると、1gの新鮮な組織を、外科用メスを用いて小片（例えば、組織1gあたり約10~20ピース）に切断する。細分した組織をPBS中で2回洗浄し、穏やかに攪拌しながら37℃で50分、解離溶液に移す。解離後、細胞を洗浄し、篩を用いて濾し、解離しなかった組織断片を廃棄する。解離した組織を、プロテアーゼ阻害剤を含む1X解離バッファを含有する新鮮なチューブに移す。細胞を、プロテアーゼ阻害剤を含有する解離バッファ中で2回洗浄する。細胞を、培地中で1x10⁶細胞/mlに再懸濁する。試料を3つのチューブに等量に分割し、細胞を1μM（1x10⁶細胞/mlあたり）のDMSO、PU-FITC9（陰性FITC対照）およびPU-FITC2（FITCに標識付けられたPU-H71薬剤）で37℃、5%CO₂で4時間処理する。血液バンクから得られた解凍されたPBMCと混合した対照EGFR+細胞系〔Aspc1（低結合）；BxPc3（高結合）〕を、上記のように解離された腫瘍細胞と同時に染色する。細胞を1XFACSバッファ（1XPBS+0.5%FBS）で2回洗浄し、氷上で30分、抗ヒトEGFR-PE（BD Biosciences）、抗ヒトCD14-APC-Cy7（ebiosciences）またはCD14-PE-テキサスレッド（invitrogen）および抗ヒトCD45-APC（ebiosciences）で染色する。次いで、細胞を1XFACSバッファ（1XPBS+0.5%FBS）で2回洗浄し、ペレットを、細胞生存染料（1μg/mlのDAPI）を含有する500μlの1XFACSバッファ中に再懸濁する。試料をBD LSRIIFローサイトメーター上で泳動し、100~200,000の事象を収集する。レーザーを、それぞれの実験泳動の前にCSTビーズ（BD Biosciences）を用いてLSRII上で正規化する。EGFR+細胞（EGFR+CD45-）およびEGFR-細胞（EGFR-CD4

5 + CD14-) 中の FITC 中央蛍光強度 (MFI) を測定することにより、腫瘍細胞中での PU-FITC の薬剤蓄積を決定する。PU-FITC9 および DMSO 対照に由来する非特異的 FITC シグナルを差し引く。値を、腫瘍の MFI (EGFR + CD45 - CD14-) : EGFR - CD45 + CD14- 細胞の MFI の比として算出する。患者間の MFI 値を正規化するために、Quantum FITC 標準化ビーズ (Bangs laboratories) を各試料と共に泳動し、標準曲線を作製する。これにより、同等の可溶性蛍光色素 (MESF 単位) の分子中での FITC 蛍光強度の定量が可能になる。標準曲線から生成された値を外挿することにより、試料間で各試料中での PU-FITC2 蓄積を定量することができる。

【0395】

PBMC 中での EpCAM + 循環腫瘍細胞への PU-FITC 結合の測定：全ての実験的血液サンプリング手順を、Memorial Sloan Kettering Cancer Center で Institutional Review Board に認可されたプロトコルの下で実施した。8ml の末梢血を、PU-H71 臨床試験に登録したがん患者から抗凝固剤 EDTA チューブ中に引き出す。PBMC を Ficoll 勾配上で単離し、細胞を計数し、生存能力をトリパンブルー色素排除アッセイにより決定する。PBMC を沈降させ、 2×10^6 細胞/ml に再懸濁する。試料を3つのチューブに等量に分割し、37℃、5% CO₂ で4時間、1 μM (2×10^6 細胞/ml あたり) の DMSO、PU-FITC9 (陰性 FITC 対照) および PU-FITC2 (FITC に標識付けられた PU-H71 薬剤) で処理する。対照 EpCAM + 細胞系 [Aspc1 (低結合) ; BxPc3 (高結合)] を、血液バンクから得られた新鮮に解凍された PBMC と混合し、上記のように患者の PBMC と同時に染色した。細胞を 1X FACS バッファー (1X PBS + 0.5% FBS) で2回洗浄し、氷上で30分、抗ヒト EpCAM-PE (miltenyi biotech)、抗ヒト CD14-APC-Cy7 (ebiosciences) または CD14-PE-テキサスレッド (invitrogen) および抗ヒト CD45-APC (ebiosciences) で染色した。次いで、細胞を 1X FACS バッファー (1X PBS + 0.5% FBS) で2回洗浄し、ペレットを、細胞生存能力染料 (1 μg/ml の DAPI) を含有する 500 μl の 1X FACS バッファー中に再懸濁する。試料を BD LSRII フローサイトメーター上で泳動し、100~200,000 の事象を収集する。それぞれの実験泳動の前に、レーザーを CST ビーズ (BD Biosciences) を用いて LSRII 上で正規化する。EpCAM + 細胞 (EpCAM + CD45-) および EpCAM-細胞 (EpCAM - CD45 + CD14-) 中での FITC 中央蛍光強度 (MFI) を測定することにより、腫瘍細胞中の PU-FITC の結合を決定する。FITC9 および DMSO 対照に由来する非特異的 FITC シグナルを差し引く。値を、腫瘍 (EpCAM + CD45 - CD14-) の MFI : EpCAM - CD45 + CD14- 細胞の MFI の比として算出する。患者間の MFI 値を正規化するために、Quantum FITC 標準化ビーズ (Bangs laboratories) を各患者試料と共に泳動し、標準曲線を作製する。これにより、同等の可溶性蛍光色素 (MESF 単位) の分子中での FITC 蛍光強度の定量が可能になる。標準曲線から生成された値を外挿することにより、試料間で各試料中での PU-FITC2 結合を定量することができる。

【0396】

プロトコルの改変：患者から得られた PBMC を、2つのチューブに分割する。両方とも上記のように PU-FITC で染色し、EpCAM-PE またはアイソタイプ対照および CD14-PE-テキサスレッド および CD45-APC で染色する。試料を上記のように加工する。閾値比値を、PBMC と混合した PU-FITC 低および高蓄積細胞系を用いて決定する。

【0397】

6. 3. 8. 組織中での PU-H71 結合の分析

ex vivo での腫瘍組織源を用いる HSP90 阻害剤に対する胃がん患者腫瘍標本

10

20

30

40

50

の感受性の検査およびPU-H71-FITC染色との相関：胃切除術標本の外科的除去の直後、組織をTissue Procurement Services (TPS) area of the Pathology suiteに輸送する。一度、病変を置いたら、組織を滅菌条件下で収穫する。評価のために除去される標本サイズは、典型的には、5～10mm x 5～10mmである。最も生存能力のある領域をサンプリングするためにあらゆる努力を払う。病変から遠くの、正常胃上皮組織を代表する同等のサイズの標本を除去する。両標本を1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む最少必須培地(MEM)中に入れる。病変の小部分および正常胃上皮組織の全小片は、WBによる将来の分子的评价のために「簡易」凍結を受ける。残りの部分の病変(胃切除)を、病理学的评价のために加工する。全ての病変について、病理は、増殖マーカー、上皮マーカーおよびフルオレセイン標識されたPU-H71 (PU-FITC)での染色についてさらに評価される10個の非染色を伴うヘマトキシリン/エオシン(H&E)染色されたスライドのためのIHCを提供する。ホルマリン固定されたパラフィン包埋切片または凍結切片を、PUH71-FITC2染色について分析する。同時に、組織の一部を、PU-H71に対する腫瘍の感受性のex vivoでの分析のために調製する。予備分析から、本発明者らは、新鮮な組織スライスが周囲の組織の内因的環境中にごん細胞を保存することを学んだ。この方法では、組織(すなわち、病変)を、プラスチック型に入れ、6%アガロース中に埋込む。次いで、アガロースに埋込まれた組織をVibrotomeのステージ上に載せ、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むMEMを含有する冷却された容器(組織保存用)中に沈める。次いで、組織を金属刃を用いてスライスし、200μmの厚さの病変の連続切片を作製する。それぞれの切片(周囲のアガロース埋込み培地を除く)を、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むMEMを含有する24穴組織培養プレート中にすぐに入れる。5mm x 5mmの組織小片から、約25個の切片が作製される。これにより、最少4回用量のHsp90阻害剤およびビヒクルのみを含むもので処理された組織切片の分析を繰り返すことができる。一度、組織切片がジスパーゼへの簡単な曝露により酵素的解離を受けたら、反復物を、IHCならびに生存能力アッセイ(自動化プレートリーダーまたはサイトスピン調製)の両方によりアッセイすることができる。次いで、これらの胃腫瘍スライス中でPU-H71により誘導されるアポトーシスの程度を、PU-H71-FITC染色と相関させる。PU-H71の取込み(PU-H71-FITC染色のIHCスコアリングにより測定される)は、Hsp90阻害に対するこれらの腫瘍の感受性と相関する。同様のプロトコルが、乳がんおよび膵臓がんのために開発されている。

【0398】

6. 4. 細胞アッセイにおけるANCA標識プローブ

蛍光プローブ処理：付着性細胞を、70%集密になった時に、標準的な組織培養条件下で1時間、5μMのPUH71-ANCAで処理した。処理後、培地を吸引し、スライドをPBSで3回洗浄した後、完全培地を継ぎ足した。

【0399】

蛍光放出スペクトル：倒立型蛍光共焦点顕微鏡(Leica SP₅)を用いて、5nmの増分で400nm～600nmでチャンバースライド上でがんおよび非がん細胞を走査して、蛍光放出を決定した。

【0400】

共焦点顕微鏡観察：処理後、倒立型蛍光共焦点顕微鏡(Leica SP₅)を用いて、細胞の蛍光を観察した。結合した高親和性種の適切な蛍光放出ピーク(約530nm)で共焦点画像を獲得した。NIH ImageJソフトウェア中に画像をアップロードした。いくつかの無作為の視野からの個々の細胞の蛍光強度を測定し、バックグラウンドについて補正した。

【0401】

応答モデリング：IC₅₀対蛍光密度インテグリティ(integrity)の標準曲線を、12種の乳がん細胞系および2種の正常乳房細胞系について確立した。細胞系をマルチウェル

10

20

30

40

50

プレート上で増殖させ、5個のウェルは応答について分析し（ビヒクルのみ、0.25 μ M、0.50 μ M、1.0 μ Mおよび2.5 μ MのPUH71処理）、1個のウェルは結合した（PUH71-ANCA処理）の蛍光強度について分析した。全ての細胞系のIC₅₀をy軸上にプロットし、密度インテグリティ（蛍光強度）をx軸上にプロットした。この標準曲線を用いて、HSP90療法に対する、乳がん標本、例えば、生検、手術または微細針吸引生検から得られたものの応答をモデリングし、予測する。

【0402】

がん生検における応答測定：一度得られたら、患者生検を滅菌塩水に入れ、Tissue Procurement area of the Pathology Departmentにすぐに配達する。病変の一部を、Vibratome（Leica VT1000）上で実施される新鮮な組織切片化のために取得する。200 μ mの厚さの切片を切断し、増殖因子および抗生物質を含む最少必須培地中、マルチウェルプレートにすぐに入れ、一定の湿度の空気-5%CO₂雰囲気中、37℃に入れる。次いで、切片をPUH71-ANCAで45分～1時間処理する。処理後、切片をPBSで2回洗浄し、次いで、OCT包埋する（新鮮に凍結する）。次いで、OCT包埋された標本をいくつかの4 μ mの厚さの切片に切断し、荷電したスライドに移す。次いで、核対抗染色、DAPIをスライドに印加する。次いで、スライドを共焦点顕微鏡（Leica SP₅）上で観察し、530 nmの蛍光放出ピークで分析して、発がん性HSP90種に対するプローブに結合したものの割合を決定する。

【0403】

6. 5. 放射標識されたHSP90阻害剤を用いる試験

試薬。[¹³¹I]-PU-H71および[¹²⁴I]-PU-H71を、以前に報告されたように合成および精製した¹³²。

【0404】

細胞系。MDA-MB-468ヒト乳がん細胞系を、American Type Culture Collectionから取得した。細胞を、10%FBS、1%L-グルタミン、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加したDME-HG中で日常的に培養した。

【0405】

in vitro試験。全ての動物試験を、MSKCC's Institutional Animal Care and Use Committee（IACUC）の指針に従って行った。メスの無胸腺nu/nuマウス（NCRNU-M、20～25 g、6週齢）を、Harlan Laboratoriesから取得し、MSKCC生態動物園で1週間慣れさせた後、腫瘍を埋込んだ。マウスに食餌および水を自由に提供した。PBSと、再構成された基底膜（BD MatrigelTM、Collaborative Biomedical Products Inc.、Bedford、MA）との1:1 v/v混合物の200 μ L細胞懸濁液中、1x10⁷個の細胞の皮下（s.c.）注入により、マウスの前肢上にMDA-MB-468腫瘍異種移植片を確立した。投与前に、PU-H71の溶液をPBS（pH7.4）中で製剤化した。

【0406】

in vivo生体内分布試験。急性in vivo生体内分布試験のために、前肢上にMDA-MB-468乳房腫瘍異種移植片を有するマウス（n=5）に、200 μ Lの塩水中の0.93～1.1 MBq（25～50 μ Ci）の[¹²⁴I]-PU-H71または[¹³¹I]-PU-H71を、尾静脈中に静脈内注入した。用量評価実験のために、マウスの群（n=5）に、5、25、50または75 mg/kgのマウス体重に相当するPU-H71を含有する滅菌溶液中に希釈した[¹²⁴I]-PU-H71または[¹³¹I]-PU-H71を注入した。投与前後の注射筒内の活性を、用量校正装置（CRC-15R；Capintec）中でアッセイして、各動物に投与された活性を決定した。動物（1群あたりn=4）を、トレーサの投与後の様々な時点でCO₂窒息により安楽死させ、腫瘍を含む臓器を収穫し、計量した。さらなる生化学的および組織学的分析のために、腫瘍

組織の一部を収穫後すぐに凍結した。400～600 keVのエネルギーウィンドウを用いるシンチレーションγカウンタ（Perkin Elmer 1480 Wizard 3 Auto Gamma counter、Waltham、MA）中で¹²⁴Iを測定した。計数データを注入時点に対してバックグラウンドおよび遅延補正し、測定された較正係数を用いることにより、それぞれの組織試料に関する1グラムあたりの注入用量パーセント（%ID/g）を算出して、計数率を活性に変換し、活性を、注入された活性に対して正規化して、%ID/gで活性濃度を得た。

【0407】

小動物PET画像化。小動物画像化試験のために、前肢上にMDA-MB-468乳がん異種移植片を有するマウスを用いた。画像化を、小動物専用PETスキャナ（Focus 120 microPET; Concord Microsystems、Knoxville、TN）を用いて実施した。全走査期間に2 L/分で酸素中の2%イソフルラン（Baxter Healthcare、Deerfield、IL）麻酔下でマウスを維持した。好適な事例では、トレーサの代謝から生じる遊離ヨウ素の甲状腺取込みを低下させるために、マウスはトレーサ投与の48時間前に開始してその飲用水中に0.01%のヨウ化カリウム溶液を受けた。PET画像化のために、それぞれのマウスに尾静脈を通して9.25 MBq（250 μCi）の¹²⁴I]-PU-H71を投与した。トレーサ投与後の様々な時点で、それぞれの動物について連続リストモード収集データ（10～30分）を取得した。420～580 keVのエネルギーウィンドウおよび6 nsの一致タイミングウィンドウを用いた。得られたリストモードデータを、フーリエリビニングにより2次元ヒストグラムに選別した；横断面画像を、フィルタ補正逆投影（FBP）により再構築した。画像データを、スキャナ応答の非均一性、応答待ち時間計数ロス、および注入時間に対する物理的遅延について補正した。減衰、散乱または部分容積平均化に適用された補正はなかった。Focus 120の測定された再構築空間分解能は、視野の中心において1.6 mm FWHMである。再構築された画像のROI分析を、ASIP Proソフトウェア（Concord Microsystems、Knoxville、TN）を用いて実施し、それぞれの組織／臓器のROIについて最大ピクセル値を記録した。¹⁸Fを含有するマウスサイズ水充填シリンダの再構築画像から誘導されたシステム較正係数（すなわち、μCi/mL/cps/voxel）を用いて、¹²⁴Iボクセル計数率を活性濃度に変換した（¹²⁴Iポジロン分岐比について調整後）。次いで、得られた画像データを投与された活性に対して正規化して、%ID/gを単位としてマイクロPET画像をパラメータ化した（注入時間に対する遅延について補正）。

【0408】

LC-MS/MS分析。凍結組織を乾燥、計量した後、アセトニトリル/H₂O（3：7）中でホモジェナイズした。PU-H71を塩化メチレン中に抽出し、有機層を分離し、減圧下で乾燥した。試料を移動相中で再構成させた。組織または結晶中のPU-H71の濃度を、高速LC-MS/MSにより決定した。PU-H71-d₆を、内部標準として添加した¹³³。化合物分析を、陽イオン電子スプレーイオン化を用いる多反応モニタリング（MRM）モードで6410 LC-MS/MSシステム（Agilent Technologies）上で実施した。組織試料については、Zorbax Eclipse XDB-C18カラム（2.1 x 50 mm、3.5 μm）をLC分離のために使用し、0.4 mL/分の流量で3分間、イソクラチック条件（80% H₂O + 0.1% HCOOH：20% CH₃CN）下で分析物を溶出させた。血漿試料については、Zorbax Eclipse XDB-C18カラム（4.6 x 50 mm、5 μm）をLC分離のために使用し、0.35 mL/分の流量で勾配条件（H₂O + 0.1% HCOOH：CH₃CN、95：5～70：30）下で分析物を溶出させた。

【0409】

薬力学的分析。タンパク質分析のために、腫瘍をSDS溶解バッファ（50 mM Tris、pH 7.4、2% SDS）中でホモジェナイズし、ウェスタンブロット分析にかけた。タンパク質濃度を、製造業者の説明書に従ってBCAキット（Pierce）を用

10

20

30

40

50

いて決定した。タンパク質溶解物（20～100 μg）をSDS/PAGEにより電気泳動分解し、ニトロセルロース膜に移し、示された一次抗体：マウス由来抗Hsp90（1：500、SPA-830；Stressgen）、ウサギ由来抗Akt（1：500、9272；Cell Signaling）、ウサギ由来抗ホスホ-Akt（Ser473）（1：500、9271S；Cell Signaling）、ウサギ由来抗PARP（p85断片）（1：250、G7341；Promega）を用いてプロービングした。次いで、膜を1：5,000希釈のペルオキシダーゼコンジュゲート対応二次抗体と共にインキュベートした。等量のタンパク質試料を、β-アクチンに関する平行ウェスタンブロット（1：5,000、ab8227-50；Abcam）により確認した。ECL Enhanced Chemiluminescence Detection System（Amersham Biosciences）を製造業者の説明書に従って用いて、検出を実施した。

10

【0410】

密度測定。ゲルをAdobe Photoshop中でスキャンし、Un-Scanner It 5.1を用いて定量密度測定分析を実施した。

【0411】

効果試験。100～150 mm³の体積に達するMDA-MB-468腫瘍を担持するマウス（n=5）を、示されるような様々な用量およびスケジュールを用いて腹腔内（i.p.）処置した。腫瘍体積をVernierカリパスを用いる測定により決定し、腫瘍体積をその長さ×幅²×0.4の積として算出した。腫瘍体積を、マウス群について示された中央腫瘍体積±SDとして示された日に表現した。腫瘍増殖阻害率値（%）を、ビヒクル処置されたマウスと比較して薬剤処置されたマウスについて試験の最終日に測定し、 $100 \times \{1 - [(処置_{最終日} - 処置_{1日目}) / (対照_{最終日} - 対照_{1日目})]\}$ として算出した。所与の処置群について、処置を開始した時点での中央腫瘍体積と、試験の最終日での中央腫瘍体積との比を算出することにより、腫瘍退縮値を決定した。腫瘍退縮率（%）は、 $100 \times [1 - (処置_{最終日} / 処置_{1日目})]$ である。

20

【0412】

アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド細胞生存能力アッセイ。Easycount ViaSureキット（Immunocon）をEasycountシステムと共に用いて、死細胞と生細胞を自動的に計数した。ViaSure Staining Reagentは、すぐに使用できる核酸染料、アクリジンオレンジおよびエチジウムブロマイドの混合物を使用して、単一の試験において、それぞれ、生細胞と死細胞を同定する。アクリジンオレンジは、生細胞と非生細胞の両方により取り込まれ、二本鎖核酸（DNA）中に挿入された場合は緑色蛍光、または一本鎖核酸（RNA）に結合した場合は赤色蛍光を放出する。エチジウムブロマイドは非生細胞によってのみ取り込まれ、DNA中への挿入により赤色蛍光を放出する。生細胞は組織化された構造を含む均一な緑色の核を有する。初期アポトーシス細胞（まだ無傷の膜を有するが、DNA切断を受け始めている）は緑色の核を有するが、核周囲クロマチン凝縮は明るい緑色のパッチまたは断片として見える。後期アポトーシス細胞は凝縮したか、または断片化されたクロマチンを含むオレンジ色から赤色の核を有する。壊死細胞は、組織化された構造を含む均一にオレンジ色から赤色の核を有する。条件あたり合計少なくとも200個の細胞を計数した。

30

40

【0413】

シミュレーション。二重指数関数 $x(t) = \alpha_1 \exp(-\beta_1 t) + \alpha_2 \exp(-\beta_2 t)$ を、測定に適合させた。一般に、指数の和を用いて、薬力学的データを分析した¹²³。R統計的言語（[www.r-project.org](http://cran.rproject.org/web/package/gnm/index.html)）における一般化非線形モデルパッケージ（<http://cran.rproject.org/web/package/gnm/index.html>）を用いて、モデルをデータに適合させた。最初は数回の適合が求められ、最良なものを、様々な薬剤投与シナリオのさらなるシミュレーションのために用いた。Rにおけるスクリプトを開発した。

【0414】

50

統計分析。別途指摘しない限り、データを、Graph Pad Prism (バージョン4; Graph Pad Software) 中に実装された対応のない両側 t 検定により分析した。0.05未満のP値を有意であると考えた。別途注記しない限り、データは2回または3回の反復物の平均±標準偏差 (SD) または平均±平均の標準誤差 (SEM) として提示する。エラーバーは平均のSDまたはSEMを表す。単一のパネルが提示される場合、データは2つまたは3つの個々の実験の代表である。

【0415】

ヒトにおける試験。1日1回用量のヨウ化カリウム溶液 (SSKI) を、注入の前日から開始して14日間投与する。単回トレーサ注入 (4~11.0mCi; 100µg未満) を、ゆっくりした末梢IVボラスにより投与する。患者は0時間 (動的スキャン)、3~4時間、24時間および40~80時間および/または160~200時間 (静的スキャン) で非侵襲的PETに基づくアッセイを受ける。本発明者らのPU-PETパイロット試験においては、患者の動員における困難性または「脱落」なしに、より厳しいスケジュールが患者によって良好に許容された。時点を、本発明者らのヒト¹²⁴I-PUH71 PKデータに基づいて選択する:

(1) ¹²⁴I-PUH71は、双指数関数様式で、血液循環から迅速に消失し (迅速なクリアランス (血液 $t_{1/2}$ 約20分))、次いで、無視できるほど低い血中レベルでゆっくりと消失した;

(2) PET画像化による腫瘍PUH71トレーサ濃度は可変的であり、バックグラウンド組織トレーサレベルよりも量的に多いか、または同等であり、トレーサの示差的取込みおよび/または保持が、トレーサ注入後4~24時間または48時間および72時間以後で明らかである;

(3) PUH71親和性腫瘍内濃度は数日間にわたって持続したか、または単指数関数型クリアランスを示した。

【0416】

本発明者らは、強固な計数統計を確保するために本発明者らの¹²⁴I-PUH71 PET画像収集プロトコルを最適化した。研究専用PET/CTスキャナー (GE Discovery DST) は、減衰、崩壊および散乱補正ならびにシステム感度のための調整と共に定量的生体内分布画像を取得する。減衰補正のためのCTスキャンおよび解剖学的同時登録を、トレーサ注入の前に実施し、体重に対して拡大する (81kg以上については最大85mA)。放射線曝露を最小化しながら、トレーサーシグナルの解剖学的局在化および減衰補正を満足させるようにCTプロトコルを設計する。静脈内または経口X線造影剤は投与しない。標準的な逐次部分期待値最大化反復アルゴリズムを用いてPETデータを再構成する。放出データを、散乱、減衰および崩壊について補正する。

【0417】

PU-腫瘍アビディティは、任意の時点で、参照血液プールまたは臓器バックグラウンドよりもかなり高いと判定された腫瘍トレーサシグナルとして、PET画像の目視上で定義される二値の結果 (binary outcome) である。(1) 任意の時点での最も高い腫瘍標準化取込み値 (SUV); および (2) 最初と最後のPET時点間のPU-H71注入後の時点の関数としての腫瘍SUVの積分により、PETデータから定量的に腫瘍PU-H71濃度を評価する (すなわち、PU-PET SUV_{max}読み取り値またはそのようなSUV読み取り値から算出されたモル濃度を、PU投与後の時間とAUC値の関数としてグラフ化し、Hsp90阻害剤の平均腫瘍内濃度を図27に示されるように算出する)。

【0418】

次いで、これらのパラメータ (または定義された他のもの) を、HSP90阻害剤を用いる治療試験に対する応答と相関させる。これらの試験の際に、腫瘍あたりおよび患者あたりの腫瘍応答を評価する。腫瘍応答評価のタイミングを、療法試験プロトコル通りに作った。腫瘍応答評価は、第1サイクルの終わりにもっと近い時点で実施した臨床画像化に由来する (1サイクルは、典型的には3~5週間である)。腫瘍応答を、CTもしくはMRIのためにはRECIST1.1および/またはFDG PET-CTのためにはPE

10

20

30

40

50

R C I S T 1. 0により定義する（36、37）。一致しない場合、より好ましい応答を用いる。臨床応答を、がん特異的療法試験応答基準に従って判定する。

【0419】

P E T画像に関する腫瘍 P U H 7 1 アビディティデータを、2つの方法で二分する：

（1）腫瘍の定性的／視覚的判定の二値の結果を「親和性」または「非親和性」として用いることによる（上記で考察）；

（2）クラスター化したデータについて算出された R O C 曲線を用いることにより、腫瘍応答と非応答とを識別する際の最良操作特性を有する腫瘍アビディティのための切断点を算出することができる（40）。

【0420】

両二分化について、感受性、特異性および他の分類尺度を、患者応答を真実として用いて算出する。各患者が単一の腫瘍を有する場合、40人の患者の試料サイズは0.324の最大幅の両側信頼区間をもたらす。患者あたりの腫瘍数が増加するにつれて、信頼区間幅は一般的には全体として減少する。全体的な R E C I S T 患者レベル応答と最良に相関する腫瘍アビディティに関する患者レベルの要約統計量を発見するために設計された予備分析を実施する。調査されるアビディティに関する患者レベルの要約統計量は、1）最も高い腫瘍 S U V および／または A U C ならびに 2）全ての腫瘍 S U V および／または A U C の平均を含む。この患者レベルデータを用いて、Y o u d e n 指数に基づく患者要約腫瘍アビディティに関する R O C 曲線およびカットオフを構築し、（0、1）に最も近い点を算出する。

【0421】

前臨床試験において、特定の時点で、またはある期間にわたっての取込みおよび保持を、観察された応答と最良に相関させる。予備データは、A U C により測定された長時間の腫瘍保持（24～48時間にわたる）および腫瘍曝露の両方が H s p 9 0 阻害療法に対する腫瘍応答を予測するために適正なパラメータであることを示唆する。具体的には、M D A - M B - 4 6 8 腫瘍における予備調査において、いくつかのパラメータ、例えば、腫瘍曲線下面積（A U C）、P U - H 7 1 の平均および最小腫瘍内濃度、処置時間にわたる P U - H 7 1 により占拠および認識された平均 % H s p 9 0 部位（（% 占拠 H s p 9 0 部位）_{avg}）として測定される標的占拠率を算出した。本発明者らは、処置時間にわたって記録された P U - H 7 1 の平均腫瘍内濃度、腫瘍 A U C および % 「発がん性 H s p 9 0」占拠率が、観察された抗腫瘍効果の規模と有意に良好に相関することを見出した（それぞれ、 $r^2 = 0.8162$ 、 0.8188 および 0.7559 ）（図37）。これらのことは、H s p 9 0 i に対する応答を予測するための最も好適なパラメータが、時間依存的曝露、すなわち、取込みおよび保持を測定するものであることを示唆する。

【0422】

6. 6. 乳がんおよび A M L における H S P 9 0 に対するアポトーシス感受性を予測するマーカーを同定するための試験

細胞：K a s u m i - 1、S K N O - 1、M O L M - 1 3、M 0 - 9 1、H E L、H L - 6 0、T H P - 1、M V 4 - 1 1 を、10 mM H E P E S、4.5 g/L グルコース、1.5 g/L 重炭酸ナトリウム、1 mM ビルビン酸ナトリウム、10% F B S、および 1% ペニシリン／ストレプトマイシンを添加した R P M I 培地中で増殖させた。F L 5. 1 2 の安定なトランスフェクタントは以前に記載されている（18 - K a r n a u s k a s 2003）。簡単に述べると、F L 5. m A K T の作製のために、ミリストイル化された A K T を、ドキシサイクリン誘導性ベクター p R e v T R E (C l o n t e c h) 中にクローニングした（このクローンを m A K T と命名する）。対照として、細胞をベクターのみでトランスフェクトした（このクローンを V e c t o r と命名する）。F L 5. m A k t. B c l - x L の作製のために、ヒト B c l - x L c D N A を、p B a b e P u r o ベクターの E c o R I 部位中にクローニングし、記載のように F L 5. m A k t 3 中にトランスフェクトした（18）（このクローンを m A K T. B c l - x L と命名する）。これらの系を、10 mM H E P E S、1 mg/ml のゲネチシン（G 4 1 8）（S i

10

20

30

40

50

gma #G9516) および1または2 ng/mLのIL-3 (RD Systems #403 ML) を含有する10% FBS培地を添加したDME-HG培地を用いて以前に記載のように培養した。

【0423】

PBL (ヒト末梢血白血球) を、New York Blood Centerから購入した患者血液から単離した。35 mlの細胞懸濁液を、15 mlのFicoll-Plus (GE Healthcare) 上に重ねた。試料を4℃で40分、2,000 rpmで遠心分離し、白血球界面を採取した。細胞を10% FBSを含むRPMI培地中に播種し、次の日、示された時間、適切な濃度のPU-H71で処理した。

【0424】

試薬: Hsp90阻害剤を以前に報告されたように合成した。本発明者らは、Calbiochemから、Akt Inhibitor VIII、Isozyme-Selective、Akti-1/2 (#124018)、PD98059 MEK阻害剤 (#513000) およびpan-JAK阻害剤I (#420099) を購入した。これらの化合物を、販売会社により示された濃度で使用して、その標的経路の阻害をもたらした。in vivoでの試験を除いて、全ての化合物をDMSO保存液として用いた。

【0425】

増殖阻害: 増殖阻害試験を、Alamarブルーアッセイを用いて実施した。この試薬は、細胞培養物中での細胞生存能力の迅速な客観的尺度を提供し、それは、細胞生存能力の指示因子である細胞の代謝能力を測定するために指示染料レサズリンを用いる。簡単に述べると、指数増殖するAML細胞系を、マイクロタイタープレート (Corning #3650) 中、 2×10^4 細胞/ウェルで播種し、示された時間、37℃でインキュベートした。薬剤を示された濃度で3回添加し、プレートを72時間インキュベートした。レサズリン (55 μM) を添加し、Analyst GT (蛍光強度モード、励起530 nm、放出580 nm、ダイクロイックミラー560 nm) を用いて6時間後にプレートを読み取った。結果を、Softmax Proソフトウェアを用いて分析した。細胞増殖阻害のパーセンテージを、処理された細胞と初期細胞集団を構成する対照細胞 (0時間) から得られた蛍光読み取り値を比較することにより算出した。IC₅₀を、細胞増殖を50%阻害する薬剤濃度として算出した。

【0426】

アポトーシスアッセイ: 細胞を、示されたようにビヒクル (DMSO) または阻害剤で24、48または72時間処理した。アクリジンオレンジおよびエチジウムブロマイド (100 g/mLの1:1混合物) で染色した後、細胞を蛍光顕微鏡 (Zeiss Axiovert 40 CFL) で可視化し、計数した。アポトーシス細胞の割合を、各群において計数された200~300個の細胞から決定した。アポトーシス細胞のパーセンテージを、%アポトーシス細胞 = (アポトーシス核を有する細胞の総数 / 計数された細胞の総数) x 100として算出した。アクリジンオレンジは、生細胞と非生細胞の両方により取り込まれ、二本鎖核酸 (DNA) 中に挿入された場合は緑色蛍光を、または一本鎖核酸 (RNA) に結合した場合は赤色蛍光を放出する。エチジウムブロマイドは非生細胞によってのみ取り込まれ、DNAへの挿入により赤色蛍光を放出する。生細胞は組織化された構造を含む均一な緑色の核を有する。初期アポトーシス細胞 (まだ無傷の膜を有するが、DNA切断を受け始めている) は緑色の核を有するが、核周囲クロマチン凝縮は明るい緑色のパッチまたは断片として見える。後期アポトーシス細胞は凝縮したか、または断片化されたクロマチンを含むオレンジ色から赤色の核を有する。壊死細胞は、組織化された構造を含む均一にオレンジ色から赤色の核を有する。

【0427】

キャスパーゼ3、7活性化アッセイ: 細胞を、増殖阻害アッセイの節に記載のように播種、処理した。Hsp90阻害剤への細胞の24時間または48時間の曝露後、10 mM HEPES、pH 7.5、2 mM EDTA、0.1% CHAPS、0.1 mg/mL PMSF、完全プロテアーゼ阻害剤ミックス (#1697498; Roche)、およ

10

20

30

40

50

び25 μ Mのキャスパーゼ基質Z-DEVD-R110 (#R22120; Molecular Probes)を含有する100 μ Lのバッファーを、各ウェルに添加した。プレートオービタルシェーカー上に置き、細胞溶解および反応を促進させた。各ウェルの蛍光シグナルを、Analyst GT (Molecular Devices) マイクロプレートリーダー (励起485 nm; 放出530 nm) 中で測定した。キャスパーゼ3、7活性の増加パーセンテージを、処理細胞と対照細胞とから得られた蛍光読み取り値の比較により算出した。全ての実験データを、SOF Tmax Pro 4.3.1を用いて分析し、Prism 4.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA)を用いてプロットした。

【0428】

10

ウェスタンブロット：細胞を60～70%集密まで増殖させ、示された時間、阻害剤またはビヒクルで処理した。タンパク質溶解物を、50 mM Tris pH 7.4、150 mM NaClおよび1% NP-40溶解バッファー中で調製した。タンパク質濃度を、BCAキット (Pierce)を用いて製造業者の説明書に従って測定した。タンパク質溶解物 (10～100 μ g)をSDS-PAGEにより分解し、ニトロセルロース膜に移し、示された一次抗体と共にインキュベートした。AKTを活性化するために、FL5.12由来細胞系を、1 μ g/mlのDoxで18時間予備処理した後、阻害剤で処理した。

【0429】

抗体：ウサギ由来抗Akt (1:500、9272; Cell Signaling)、ウサギ由来抗ホスホ-Akt (Ser473) (1:500、9271S; Cell Signaling)、ウサギ由来抗RAF-1 (1:300、sc-133; Santa Cruz Biotechnology)、ウサギ由来抗PARP (p85断片) (1:250、G7341; Promega)、ウサギ由来抗Bcl-xL (1:1,000、2762; Cell Signaling)、ウサギ由来抗JAK2 (1:500、3773; Cell Signaling)、マウス由来抗c-KIT (1:1,000、3308; Cell Signaling)、ウサギ由来抗AML1 (1:500、4334; Cell Signaling)、ウサギ由来抗FLT3 (1:1,000、3462; Cell Signaling)、ウサギ由来TRKC (1:1,000、ab43078; Abcam)、マウス由来STAT5、p-STAT5、p-ERKおよび抗 β -アクチン (1:3,000、ab8227-50; Abcam)。次いで、膜を1:3,000希釈のペルオキシダーゼコンジュゲート対応二次抗体と共にインキュベートし、タンパク質をECL-Enhanced Chemiluminescence Detection System (Amersham Biosciences)により検出した。

20

30

【0430】

薬力学的試験：4～6週齢のnu/nu無胸腺メスマウスを、Taconic Farmsから取得した。実験をInstitutional Animal Care and Use Committeeに認可されたプロトコルの下で実行し、研究における動物の適正で人道的な使用のための制度指針に従った。HELおよびM0-91細胞を、20ゲージの針を用いてマウスの右脇腹に皮下的に埋込み、成長させた。投与前に、PU-H71 HClの溶液を滅菌PBS中で調剤した。このアッセイのために、腫瘍を直径6～8 mmに到達させた後、処置した。M0-91およびHEL腫瘍を担持するマウスに、75 mg/kgのPU-H71を腹腔内 (i. p.) 投与した。PU-H71の投与後、12、24、48、72および96時間でCO₂安楽死により動物を犠牲にした。腫瘍をホモジェナイズし、上記のようにウェスタンブロットによりタンパク質を分析した。

40

【0431】

密度測定。ゲルをAdobe Photoshop 7.0.1中でスキャンし、Un-Scan-It 5.1を用いて定量的密度測定分析を実施した。

【0432】

50

統計。本発明者らは、Prism 4.0 (GraphPad Software) を用いて統計分析およびグラフプロットングを実施した。本発明者らは、全てのデータを平均±s.d.として提示した。0.05未満のP値を有意と考えた。

【0433】

Stat 5 ホスホフロー一次細胞を、4℃で30分、FACSバッファー中のCD34-APC、CD38-PE-CY7およびCD45-APC-H7抗体(BD Biosciences)で染色した。細胞を1回洗浄し、室温で30分、4%パラホルムアルデヒドで固定し、氷上で10分、PBS/0.1% Triton X-100で透過処理した。細胞を4℃で一晩、p-Stat 5-PEまたはアイソタイプ対照(BD Biosciences)で染色した。次いで、細胞をPBSで1回洗浄し、BD-LSRI 10
I フローサイトメーター(BD Biosciences)を用いるフローサイトメトリ分析にかけた。p-Stat 5染色のMFIを、アイソタイプ対照に対して正規化した。

【0434】

幹細胞生存能力アッセイ一次細胞を、 2×10^6 細胞/mlで48穴プレート中に播種し、 $1 \mu\text{M}$ PU-H71で48時間処理した。細胞を、4℃で30分、FACSバッファー(PBS、0.05% FBS)中のCD34-APC、CD38-PE-CY7およびCD45-APC-H7抗体(BD Biosciences)で染色した後、アネキシンV-V450(BD Biosciences)およびアネキシンVバッファー(10mM HEPES/NaOH、0.14M NaCl、2.5mM CaCl_2) 20
中の7-AADで染色した。細胞生存能力を、未処理細胞に対して正規化した。

【0435】

6. 7. HSP90阻害療法に感受性である神経変性疾患患者を同定するための試験
ヒトAPP_{swe}、PS1M146VおよびtauP301Lを発現するADのトランスジェニックモデル(3xTg-AD)は、疾患関連脳領域中で年齢依存的様式でAベータとタウ病変の両方を進行的に発症する(Billingsら、2005; Oddoら、2005; Oddoら、2003)。このマウスモデルは、PS1M146ノックインマウス胚へのAPPおよびタウcDNA構築物の同時注入により確立される。これらのマウスは、アミロイド斑沈着に先立って細胞内Aβを生じ、これは軽度認識障害(MCI)を有する患者およびダウン症候群を有する患者における観察と一致している。それらはまた 30
、もつれ形成の前に細胞外Aベータ沈着も生じ、これにより本発明者らはこれらの2つのAD発達段階に関与する事象を試験することができる。タウ病変は、最初は海馬のCA1領域の錐体細胞中で明白であり、皮質中に進行し、ヒトAD脳における分布パターンを模倣する(Mesulam、2000)。したがって、AD 3xtgマウスモデルは、ヒトADとの多くの類似性を示し、病的に影響された脳領域および正常脳領域中でのHsp90阻害剤の効果および保持を試験する機会を提供する。

【0436】

脳および血漿薬剤濃度の決定。HCl塩としての化合物PU-HZ151の水溶液を、示された用量で3xTg ADマウス(35gの平均体重)に腹腔内投与した。MSKCC Institutional Animal Care and Use Committeeにより認可されたプロトコルに従って処置した後、様々な時点でCO₂安楽死により、マウスを殺傷した。半脳を皮質辺縁領域と皮質下領域に分離し、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で保存した。血漿を、氷中で冷却した1.5mLのEppendorfチューブ中に採取し、遠心分離にかけた血液から取得した。凍結脳組織を乾燥し、計量した後、アセトニトリル/H₂O(3:7)中でホモジェナイズした。混合物を塩化メチレンで抽出し、有機層を分離し、減圧下で乾燥した。血漿(50μL)をアセトニトリル(0.25mL)と混合し、遠心分離した。得られた上清を減圧下で乾燥した。試料を移動相中で再構成させた。脳および血漿中の化合物の濃度を、高速LC/MS/MSにより決定した。内部標準としてハロペリドールを添加した。化合物分析を、陽イオン電子スプレーイオン化を用いる多反応モニタリング(MRM)モードで6410 LC-MS/M 40
50

Sシステム (Agilent Technologies) 上で実施した。Zorbax Eclipse XDB-C18カラム (2.1 x 50 mm、3.5 μm) をLC分離のために使用し、分析物をイソクラチック条件 (65 % H₂O + 0.1 % HCOOH : 35 % CH₃CN) 下、0.35 ml / 分の流量で5分間溶出させた。

【0437】

薬力学的分析：タンパク質分析のために選択された脳領域 (海馬) をSDS溶解バッファー (50 mM Tris pH 7.4、2 % SDS) 中でホモジェナイズし、ウェスタンブロット分析にかけた。タンパク質のレベルを、抗Hsp70およびHsp90抗体を用いる免疫ブロッティングにより分析した。

【0438】

10

7. 態様

本発明を、以下の番号付段落に列挙される以下の態様により例示することができる。

【0439】

1. 腫瘍がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 腫瘍または腫瘍に由来する細胞を含有する試料を、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する検出可能に標識されたHSP90阻害剤と接触させるステップ；

(b) 腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量を測定するステップ；および

20

(c) ステップ (b) で測定された腫瘍または試料中の腫瘍細胞に結合した標識HSP90阻害剤の量を、正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の参照量と比較するステップ

を含み、ステップ (b) で測定された腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量が参照量と比較してより多い場合、腫瘍がHSP90阻害剤に応答する可能性があることを示す方法。

【0440】

2. ステップ (b) で測定された腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量と参照量との比が大きくなるほど、HSP90阻害剤療法に応答する可能性の規模が大きくなる、態様1に記載の方法。

30

【0441】

3. ステップ (a) で測定された腫瘍または腫瘍細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量が大きくなるほど、HSP90阻害剤療法に応答する可能性の規模が大きくなる、態様1に記載の方法。

【0442】

4. 正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の参照量が、腫瘍に由来する細胞を含有する試料中の正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の量である、態様1に記載の方法。

【0443】

5. 正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の参照量が、参照試料中の正常細胞に結合した標識されたHSP90阻害剤の所定量である、態様1に記載の方法。

40

【0444】

6. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤が蛍光標識される、態様1に記載の方法。

【0445】

7. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤がビオチン標識される、態様1に記載の方法。

【0446】

8. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤が放射性標識される、態様1に記載の方法。

【0447】

50

9. 腫瘍が、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病および慢性骨髄性白血病を含む白血病、多発性骨髄腫、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、骨髄増殖性障害、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択されるがんに関連する、態様1に記載の方法。

【0448】

10. がんが乳がんである、態様9に記載の方法。

10

【0449】

11. がんが白血病である、態様9に記載の方法。

【0450】

12. 白血病が慢性骨髄性白血病である、態様11に記載の方法。

【0451】

13. がんが胃がんである、態様9に記載の方法。

【0452】

14. がんが膵臓がんである、態様9に記載の方法。

【0453】

15. 腫瘍細胞が腫瘍幹細胞である、態様1に記載の方法。

20

【0454】

16. ステップ(a)において、腫瘍が接触され、被験体中に存在する、態様1に記載の方法。

【0455】

17. ステップ(a)において、腫瘍細胞を含有する試料が接触され、組織試料である、態様1に記載の方法。

【0456】

18. 組織試料が、生検、微細針吸引生検または外科的手順の間に得られた試料である、態様1に記載の方法。

【0457】

19. ステップ(a)において、試料が接触され、生物学的液体を含む、態様1に記載の方法。

30

【0458】

20. 生物学的液体が血液または骨髄である、態様19に記載の方法。

【0459】

21. ステップ(a)において、試料が接触され、破壊された腫瘍細胞を含む、態様1に記載の方法。

【0460】

22. ステップ(a)において、試料が接触され、生細胞を含む、態様1に記載の方法。

40

【0461】

23. ステップ(a)において、試料が接触され、凍結細胞を含む、態様1に記載の方法。

【0462】

24. ステップ(a)において、試料が接触され、固定された、および透過処理された細胞を含む、態様1に記載の方法。

【0463】

25. ステップ(a)において、試料が接触され、ホルマリン固定、パラフィン包埋細胞を含む、態様1に記載の方法。

【0464】

50

26. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤が、療法として投与される標識された形態のHSP90阻害剤である、態様1に記載の方法。

【0465】

27. 療法として投与されるHSP90阻害剤がPU-H71またはPU-H71の類似体、相同体もしくは誘導体である、態様1に記載の方法。

【0466】

28. HSP90阻害剤がPU-H71である、態様27に記載の方法。

【0467】

29. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤が、PU-H71またはPU-H71の類似体、相同体もしくは誘導体の形態である、態様1に記載の方法。

10

【0468】

30. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤が、PU-H71の形態である、態様1に記載の方法。

【0469】

31. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤が、 $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71である、態様30に記載の方法。

【0470】

32. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤が、PU-H71-FITC2またはPU-H71-NBD1である、態様30に記載の方法。

【0471】

20

33. 検出可能に標識されたHSP90阻害剤が、PU-H71のビオチン化された類似体である、態様30に記載の方法。

【0472】

34. PU-H71のビオチン化された類似体が、PU-H71-ビオチン-5、PU-H71-ビオチン-6、PU-H71-ビオチン-8またはPU-H71-ビオチン-9である、態様33に記載の方法。

【0473】

35. 画像化できる腫瘍を有するがん患者がHSP90の阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 患者に、腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する放射標識されたHSP90阻害剤を投与するステップ；

30

(b) ステップ(a)における投与後の複数の時点での患者の腫瘍による放射標識されたHSP90阻害剤の取込みを測定するステップ；

(c) ステップ(a)における投与後の同じ複数の時点での患者の所定の健康な組織による放射標識されたHSP90阻害剤の取込みを測定するステップ；

(d) ステップ(b)における複数の時点で測定された取込みと、ステップ(c)における同じ時点で測定された取込みとの比を算出するステップ；ならびに

(e) がん患者がHSP90の阻害剤を用いる療法に応答する可能性を決定するステップ

を含み、複数の時点でステップ(d)において算出された比が2を超える場合、患者が応答する可能性があることを示す方法。

40

【0474】

36. 腫瘍が、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択されるがんに関連する、態様35に記載の方法。

【0475】

37. がんが乳がん、リンパ腫、神経芽細胞腫、胃がん、または膵臓がんである、態様

50

36に記載の方法。

【0476】

38. 放射標識されたHSP90阻害剤が、療法として投与される放射標識された形態のHSP90阻害剤である、態様35に記載の方法。

【0477】

39. 療法として投与されるHSP90阻害剤が、PU-H71またはPU-H71の類似体、相同体もしくは誘導体である、態様36に記載の方法。

【0478】

40. 放射標識されたHSP90阻害剤が、放射標識された形態のPU-H71である、態様35に記載の方法。

【0479】

41. 放射標識された形態のPU-H71が $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71である、態様40に記載の方法。

【0480】

42. 画像化できる腫瘍を有するがん患者が所定の用量のHSP90の阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 患者に、腫瘍中または腫瘍の腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する放射標識されたHSP90阻害剤を投与するステップ；

(b) ステップ(a)における投与後の複数の時点での患者の腫瘍による放射標識されたHSP90阻害剤の取込みを測定するステップ；

(c) 所定の用量のHSP90阻害剤について、ステップ(b)におけるそのような複数の時点で測定された取込みに基づいて、そのような複数の時点のそれぞれでの患者の腫瘍中に存在するHSP90阻害剤の濃度を算出するステップ；および

(d) 腫瘍を処置するのに有効であるHSP90阻害剤について、ステップ(c)で算出されたHSP90阻害剤の濃度を、そのような複数の時点で腫瘍中の存在する必要があるHSP90阻害剤の参照濃度と比較するステップ

を含み、ステップ(c)で算出されたHSP90阻害剤の濃度が、腫瘍を有効に処置するのに必要とされるHSP90阻害剤の濃度と等しいか、またはそれを超え、患者に対して毒性的でない場合、患者が所定の用量のHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性がある方法。

【0481】

43. 腫瘍が、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択されるがんに関連する、態様40に記載の方法。

【0482】

44. がんが乳がん、リンパ腫、神経芽細胞腫、胃がん、または膵臓がんである、態様43に記載の方法。

【0483】

45. 療法として投与されるHSP90阻害剤がPU-H71またはPU-H71の類似体、相同体もしくは誘導体である、態様42に記載の方法。

【0484】

46. 放射標識されたHSP90阻害剤が放射標識された形態のPU-H71である、態様42に記載の方法。

【0485】

47. 放射標識された形態のPU-H71が $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71である、態様46に記載の方法。

【0486】

10

20

30

40

50

48. 画像化できる腫瘍を有する特定のがん患者について、HSP90の阻害剤を用いる療法に関する有効用量および投与頻度を決定するための方法であって、

(a) 患者に、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する放射標識された形態のHSP90阻害剤を投与するステップ；

(b) ステップ(a)における投与後の複数の時点での患者の腫瘍による放射標識された形態のHSP90阻害剤の取込みを測定するステップ；ならびに

(c) ステップ(b)におけるそのような時点で測定された取込みに基づいて、そのような複数の時点のそれぞれにおいて、腫瘍を処置するのに有効であるHSP90阻害剤の濃度を腫瘍中で維持するのに必要とされる用量および投与頻度を算出し、それによって、がん患者について、HSP90の阻害剤を用いる療法に関する有効用量および投与頻度を決定するステップを含む方法。

10

【0487】

49. 腫瘍が、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含むリンパ腫、ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択されるがんに関連する、態様48に記載の方法。

20

【0488】

50. がんが乳がん、リンパ腫、神経芽細胞腫、胃がん、または膵臓がんである、態様49に記載の方法。

【0489】

51. 放射標識されたHSP90阻害剤が療法として投与される放射標識された形態のHSP90阻害剤である、態様48に記載の方法。

【0490】

52. 療法として投与されるHSP90阻害剤がPU-H71またはPU-H71の類似体、相同体もしくは誘導体である、態様48に記載の方法。

【0491】

53. 放射標識されたHSP90阻害剤が放射標識された形態のPU-H71である、態様48に記載の方法。

30

【0492】

54. 放射標識された形態のPU-H71が $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71である、態様53に記載の方法。

【0493】

55. がん患者における画像化できる腫瘍中に存在するHSP90阻害剤の濃度を決定するための方法であって、

(a) 患者に、所定量のHSP90阻害剤と、腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する、所定量の放射標識された形態のHSP90阻害剤とを同時投与するステップ；

40

(b) ステップ(a)における同時投与後の1つ以上の規定の時点で患者の腫瘍による放射標識されたHSP90阻害剤の取込みを定期的に測定するステップ；および

(c) ステップ(b)における放射標識されたHSP90阻害剤の取込みの測定値に基づいて、任意のそのような時点で腫瘍中に存在するHSP90阻害剤の濃度を決定するステップを含む方法。

【0494】

56. 腫瘍が、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門が

50

んを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫を含むリンパ腫、ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択されるがんに関連する、態様 54 に記載の方法。

【0495】

57. がんが乳がん、リンパ腫、神経芽細胞腫、胃がん、または膵臓がんである、態様 56 に記載の方法。

【0496】

58. 放射標識された H S P 90 阻害剤が療法として投与される放射標識された形態の H S P 90 阻害剤である、態様 55 に記載の方法。

【0497】

59. 療法として投与される H S P 90 阻害剤が P U - H 7 1 または P U - H 7 1 の類似体、相同体もしくは誘導体である、態様 55 に記載の方法。

【0498】

60. 放射標識された H S P 90 阻害剤が放射標識された形態の P U - H 7 1 である、態様 55 に記載の方法。

【0499】

61. 放射標識された形態の P U - H 7 1 が $[^{124}\text{I}]$ - P U - H 7 1 である、態様 60 に記載の方法。

【0500】

62. がん患者における画像化できる腫瘍の H S P 90 の阻害剤を用いる療法に対する応答性を決定するための方法であって、

(a) 腫瘍または腫瘍細胞中に存在する腫瘍特異的形態の H S P 90 に優先的に結合する放射標識された形態の H S P 90 阻害剤を、患者が療法として H S P 90 の阻害剤を受けている期間内の複数の時点で患者に投与するステップ；

(b) ステップ (a) における投与後のそのような複数の時点で、患者の腫瘍中の放射標識された H S P 90 阻害剤の濃度を測定するステップ；および

(c) ステップ (b) において測定された放射標識された H S P 90 阻害剤の濃度を、腫瘍を有効に処置するのに必要とされる H S P 90 阻害剤の最小濃度と比較するステップ

を含み、腫瘍を処置するのに必要とされる最小濃度よりも測定された濃度が高い場合、患者が H S P 90 阻害剤を用いる療法に応答する可能性があることを示す方法。

【0501】

63. 腫瘍が、結腸直腸がん、膵臓がん、甲状腺がん、基底細胞がん、メラノーマ、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、乳がん、神経芽細胞腫、消化管間質腫瘍、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆嚢がん、肛門がんを含む消化管がん、グリオーマを含む脳腫瘍、濾胞性リンパ腫およびびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫を含むリンパ腫、ならびに卵巣がん、子宮頸がん、および子宮内膜がんを含む婦人科がんからなる群から選択されるがんに関連する、態様 62 に記載の方法。

【0502】

64. がんが乳がん、リンパ腫、神経芽細胞腫、胃がん、または膵臓がんである、態様 63 に記載の方法。

【0503】

65. 放射標識された H S P 90 阻害剤が療法として投与される放射標識された形態の H S P 90 阻害剤である、態様 62 に記載の方法。

【0504】

66. 療法として投与される H S P 90 阻害剤が P U - H 7 1 または P U - H 7 1 の類似体、相同体もしくは誘導体である、態様 62 に記載の方法。

【0505】

67. 放射標識された H S P 90 阻害剤が放射標識された形態の P U - H 7 1 である、態様 62 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0506】

68. 放射標識された形態のPU-H71が $[^{124}\text{I}]$ -PU-H71である、態様67に記載の方法。

【0507】

69. 患者中に存在するヒトがんがHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) HSP90タンパク質を単独で、またはそれに加えてHSP70タンパク質を発現する、患者のがんに由来する細胞を含有する試料を取得するステップ；

(b) ステップ(a)において得られた試料中に存在する細胞について、以下のパラメータ：活性化されたAKT経路、PTEN腫瘍抑制因子の機能もしくは発現における異常、活性化されたSTAT5経路、またはBcl-xLタンパク質発現のうちの少なくとも1つの存在を評価するステップ；および

(c) HSP90阻害剤を用いる療法に応答した1人以上のがん患者に由来するヒトがん細胞について、ステップ(b)において得られた評価を、ステップ(b)で評価された同じパラメータまたは複数のパラメータの所定の参照評価と比較して、それにより患者のがんがHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するステップ

を含む方法。

【0508】

70. ヒトがんが乳がんである、態様69に記載の方法。

【0509】

71. がん細胞が急性骨髄性白血病と関連する、態様69に記載の方法。

以下に、出願当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[1]

血液のがんを有する患者がHSP90阻害剤を用いる療法に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 前記患者に由来するがん細胞および非がん細胞を含有する試料を、前記患者の前記がん細胞中に存在する腫瘍特異的形態のHSP90に優先的に結合する細胞透過性の蛍光標識されたHSP90阻害剤と接触させること；

(b) 前記試料中の前記がん細胞および非がん細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量を測定すること；ならびに

(c) 前記がん細胞に結合した前記蛍光標識されたHSP90阻害剤の量を、前記非がん細胞に結合した前記蛍光標識されたHSP90阻害剤の量と比較することを含み、前記がん細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量が前記非がん細胞よりも多い場合、前記腫瘍が前記HSP90阻害剤に応答する可能性があることを示す方法。

[2]

前記非がん細胞がリンパ球である、[1]に記載の方法。

[3]

前記測定がフローサイトメトリーにより行われる、[1]または[2]に記載の方法。

[4]

ステップ(b)で測定された前記腫瘍または前記腫瘍細胞に結合した蛍光標識されたHSP90阻害剤の量と、前記非がん細胞に結合した前記蛍光標識されたHSP90阻害剤との比が大きくなるほど、前記HSP90阻害剤療法に応答する可能性の規模が大きくなる、[1]～[3]のいずれか一に記載の方法。

[5]

前記血液のがんが白血病である、[1]～[4]のいずれか一に記載の方法。

[6]

前記白血病が慢性骨髄性白血病である、[5]に記載の方法。

[7]

前記試料が生細胞を含む、[1]～[6]のいずれか一に記載の方法。

10

20

30

40

50

- [8]
前記試料が生物学的液体を含む、[1] ~ [7] のいずれかに記載の方法。
- [9]
前記生物学的液体が血液または骨髄である、[8] に記載の方法。
- [1 0]
前記生物学的液体が血液である、[8] に記載の方法。
- [1 1]
前記試料が破壊された腫瘍細胞を含む、[1] に記載の方法。
- [1 2]
前記試料が凍結細胞を含む、[1] に記載の方法。 10
- [1 3]
前記試料が固定および透過処理された細胞を含む、請求項に記載の方法。
- [1 4]
前記蛍光標識されたH S P 9 0阻害剤が、療法として投与される標識された形態の前記H S P 9 0阻害剤である、[1] ~ [1 3] のいずれかに記載の方法。
- [1 5]
療法として投与される前記H S P 9 0阻害剤が、P U - H 7 1またはP U - H 7 1の類似体、相同体もしくは誘導体である、[1 4] のいずれかに記載の方法。
- [1 6]
前記H S P 9 0阻害剤がP U - H 7 1である、[1 5] に記載の方法。 20
- [1 7]
前記蛍光標識されたH S P 9 0阻害剤がP U - H 7 1の形態またはP U - H 7 1の類似体、相同体、もしくは誘導体の形態である、[1] ~ [1 6] のいずれかに記載の方法。
- [1 8]
前記蛍光標識されたH S P 9 0阻害剤がP U - H 7 1の形態である、[1] ~ [1 7] のいずれかに記載の方法。
- [1 9]
前記蛍光標識されたH S P 9 0阻害剤がP U - H 7 1 - F I T C 2である、[1] ~ [1 8] のいずれかに記載の方法。 30
- [2 0]
前記蛍光標識されたH S P 9 0阻害剤がP U - H 7 1 - N B D 1である、[1] ~ [1 8] のいずれかに記載の方法。

【 0 5 1 0 】

8. 参考文献

- Whitesell, L.; Lindquist, S. L., HSP90 and the chaperoning of cancer. Nat. Rev. Cancer 2005, 5, 761-772.
- Workman, P.; Burrows, F.; Neckers, L.; Rosen, N., Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007, 1113, 202-216. 40
- Luo, W.; Sun, W.; Taldone, T.; Rodina, A.; Chiosis, G., Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. Mol. Neurodegener. 2010, 5:24.
- Taldone, T.; Gozman, A.; Maharaj, R.; Chiosis, G., Targeting HSP90: small-molecule inhibitors and their clinical development. Curr. Opin. Pharmacol. 2008, 8, 370-374.
- Janin, Y. L., ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, second season. Drug Discovery Today 2010, 15, 342-353.
- Kamal, A.; Thao, L.; Sensintaffar, J.; Zhang, L.; Boehm, M. F.; Fritz, L. C.; Burrows, F. J., A high-affinity conformation of HSP90 confers tumour selectivity on HSP90 inhibitors. Nature 2003, 425, 407-410. 50

7. Dickey, C. A.; Kamal, A.; Lundgren, K.; Klosak, N.; Bailey, R. M.; Dunmore, J.; Ash, P.; Shoraka, S.; Zlatkovic, J.; Eckman, C. B.; Patterson, C.; Dickson, D. W.; Nahman, N. S.; Hutton, M.; Burrows, F.; Petrucelli, L., The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 648-658.
8. Chiosis, G.; Neckers, L., Tumor selectivity of HSP90 inhibitors: the explanation remains elusive. *ACS Chem. Biol.* 2006, 1, 279-284.
9. Peters, J. M.; Ansari, M. Q., Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2011, 135, 44-54.
10. Covey, T. M.; Cesano, A., Modulated multiparametric phosphoflow cytometry in hematological malignancies: technology and clinical applications. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2010, 23, 319-331.
11. Jennings, C. D.; Foon, K. A., Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997, 90, 2863-2892.
12. Leopoldo, M.; Lacivita, E.; Berardi, F.; Perrone, R., Developments in fluorescent probes for receptor research. *Drug Discov. Today* 2009, 14, 706-712.
13. Llauger-Bufi, L.; Felts, S. J.; Huez, H.; Rosen, N.; Chiosis, G., Synthesis of novel fluorescent probes for the molecular chaperone HSP90. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003, 13, 3975-3978.
14. Moulick, K.; Clement, C. C.; Aguirre, J.; Kim, J.; Kang, Y.; Felts, S.; Chiosis, G., Synthesis of a red-shifted fluorescence polarization probe for HSP90. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006, 16, 4515-4518.
15. Howes, R.; Barril, X.; Dymock, B. W.; Grant, K.; Northfield, C. J.; Robertson, A. G.; Surgenor, A.; Wayne, J.; Wright, L.; James, K.; Matthews, T.; Cheung, K. M.; McDonald, E.; Workman, P.; Drysdale, M. J., A fluorescence polarization assay for inhibitors of HSP90. *Anal Biochem.* 2006, 350, 202-213.
16. Tsutsumi, S.; Scroggins, B.; Koga, F.; Lee, M. J.; Trepel, J.; Felts, S.; Carreras, C.; Neckers, L., A small molecule cell-impermeant HSP90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. *Oncogene* 2008, 27, 2478-2487.
17. Taldone, T.; Chiosis, G., Purine-scaffold HSP90 inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2009, 9, 1436-1446.
18. Patel, H. J.; Modi, S.; Chiosis, G.; Taldone, T., Advances in the discovery and development of heat-shock protein 90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin. Drug Discov.* 15 Mar 2011 (doi: 10.1517/17460441.2011.563296).
19. Papac, D. I.; Patton, J. S.; Reeves, L.; Bulka, K.; DeMie, L.; Roman, O.; Bradford, C.; Kim, S.-H.; Tangallapally, R.; Trovato, R.; Markovitz, B.; Bajji, A.; Wettstein, D.; Baichwal, V.; Mather, G., Comparative in vitro and in vivo metabolism of MPC-3100, an oral HSP90 inhibitor, in rat, dog, monkey and human. 102nd AACR annual meeting, abstract number 3233. Orlando, FL, April 2-6, 2011.
20. Immormino, R. M.; Kang, Y.; Chiosis, G.; Gewirth, D. T., Structural and quantum chemical studies of 8-aryl-sulfanyl adenine class HSP90 inhibitors. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 4953-4960.
21. Taldone, T.; Zatorska, D.; Patel, P. D.; Zong, H.; Rodina, A.; Ahn, J. H.; Moulick, K.; Guzman, M. L.; Chiosis, G., Design, Synthesis and Evaluation of Small Molecule HSP90 Probes. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 2603-2614.
22. Taliani, S.; Simorini, F.; Sergianni, V.; La Motta, C.; Da Settimo, F.; Cosimelli, B.; Abignente, E.; Greco, G.; Novellino, E.; Rossi, L.; Gremigni, V.; Spinetti, F.; Chelli, B.; Martini, C., New fluorescent 2-phenylindolglyoxylamide derivatives as probes targeting the peripheral-type benzodiazepine receptor: design

10

20

30

40

50

- n, synthesis, and biological evaluation. *J Med Chem.* 2007, 50, 404-407.
23. He, H.; Zatorska, D.; Kim, J.; Aguirre, J.; Llauger, L.; She, Y.; Wu, N.; Im mormino, R. M.; Gewirth, D. T.; Chiosis, G., Identification of potent water so luble purine-scaffold inhibitors of the heat shock protein 90. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 381-390.
24. Vial, J. P.; Lacombe, F., Immunophenotyping of acute leukemia: utility of C D45 for blast cell identification. *Methods Cell Biol.* 2001, 64, 343-358.
25. Ley, T.J. et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome *Nature* 456, 66-72 (2008).
26. Parsons, D.W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma 10 multiforme. *Science* 321, 1807-1812 (2008).
27. Hanash, S. & Taguchi, A. The grand challenge to decipher the cancer proteo me. *Nat. Rev. Cancer* 10, 652-660 (2010).
28. Kolch, W. & Pitt, A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase sign alling pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 618-629 (2010).
29. Nomura, D.K., Dix, M.M. & Cravatt, B.F. Activity-based protein profiling f or biochemical pathway discovery in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 630-638 (201 0).
30. Brehme, M. et al. Charting the molecular network of the drug target Bcr-Ab l. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 7414-7419 (2009). 20
31. Ashman, K. & Villar, E.L. Phosphoproteomics and cancer research. *Clin. T ransl. Oncol.* 11, 356-362 (2009).
32. Zuehlke, A. & Johnson, J.L. HSP90 and co-chaperones twist the functions o f diverse client proteins. *Biopolymers* 93, 211-217 (2010).
33. Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. & Rosen, N. Drugging the cancer chap erone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tu mor stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113, 202-216 (2007).
34. Kamal, A. et al. A high-affinity conformation of HSP90 confers tumour sele ctivity on HSP90 inhibitors, *Nature* 425, 407-410 (2003).
35. Janin, Y.L. ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, second season. *Dru g Discov. Today* 15, 342-353 (2010). 30
36. Tsaytler, P.A., Krijgsveld, J., Goerdayal, S.S., Rudiger, S. & Egmond, M.R. Novel HSP90 partners discovered using complementary proteomic approaches. *Cel l Stress Chaperones* 14, 629-638 (2009).
37. da Rocha Dias, S. et al. Activated B-Raf is an HSP90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cance r Res.* 65, 10686-10691 (2005).
38. Grbovic, O.M. et al. V600E B-Raf requires the HSP90 chaperone for stabili ty and is degraded in response to HSP90 inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA* 103, 57-62 (2006). 40
39. Taldone, T. & Chiosis, G. Purine-scaffold HSP90 inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 1436-1446 (2009).
40. Dezwaan, D.C. & Freeman, B.C. HSP90: the Rosetta stone for cellular protei n dynamics? *Cell Cycle* 7, 1006-1012 (2008).
41. Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous l eukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 5, 172-183 (2005).
42. Burke, B.A. & Carroll, M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutati on in chronic myelogeneous leukemia. *Leukemia* 24, 1105-1112 (2010).
43. McClellan, A.J. et al. Diverse cellular functions of the HSP90 molecular c haperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131, 121-135 (2007). 50

44. Carayol, N. et al. Critical roles for mTORC2- and rapamycin-insensitive mTORC1-complexes in growth and survival of BCR-ABL-expressing leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 12469-12474 (2010).
45. Nobukuni, T., Kozma, S.C. & Thomas, G. hVps34, an ancient player, enters a growing game: mTOR Complex1/S6K1 signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 135-141 (2007).
46. McCubrey, J.A. et al. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia* 22, 708-722 (2008).
47. Hacker, H. & Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE.* 2006(357):re13. 10
48. Mihailovic, T. et al. Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor kappaB by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ human myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 64, 8939-8944 (2004).
49. Hendriks, R.W. & Kersseboom, R. Involvement of SLP-65 and Btk in tumor suppression and malignant transformation of pre-B cells. *Semin. Immunol.* 18, 67-76 (2006).
50. Mahajan, S. et al. Transcription factor STAT5A is a substrate of Bruton's tyrosine kinase in B cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31216-31228 (2001).
51. Oda, A., Wakao, H. & Fujita, H. Calpain is a signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 and STAT5 protease. *Blood* 99, 1850-1852 (2002). 20
52. Si, J. & Collins, S.J. Activated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIgamma is a critical regulator of myeloid leukemia cell proliferation. *Cancer Res.* 68, 3733-3742 (2008).
53. Salgia, R. et al. Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene* 11, 1149-1155 (1995).
54. Le, Y. et al. FAK silencing inhibits leukemogenesis in BCR/ABL-transformed hematopoietic cells. *Am. J. Hematol.* 84, 273-278 (2009).
55. Sawyers, C.L. The role of myc in transformation by Bcr-Abl. *Leuk. Lymphoma* 11, 45-46 (1993). 30
56. Naka, K. et al. TGF-beta-FOXO signaling maintains leukemia-initiating cells in chronic myeloid leukemia. *Nature* 463, 676-678 (2010).
57. Bedford, M.T. & Clarke, S.G. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* 33, 1-13 (2009).
58. Maloney, A. et al. Gene and protein expression profiling of human ovarian cancer cells treated with the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.* 67, 3239-3253 (2007).
59. Jaganathan, S., Yue, P. & Turkson, J. Enhanced sensitivity of pancreatic cancer cells to concurrent inhibition of aberrant signal transducer and activator of transcription 3 and epidermal growth factor receptor or Src. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 373-381 (2010). 40
60. Apsel, B., et al. Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nature Chem. Biol.* 4, 691-699 (2008).
61. Deininger, M.W. & Druker, B.J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev.* 55, 401-423 (2003).
62. Katzav, S. Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer Lett.* 255, 241-254 (2007). 50

63. Pratt, W.B., Morishima, Y. & Osawa, Y. The HSP90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *J. Biol. Chem.* 283, 22885-22889 (2008).
64. de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Jove, R. & Koenderman, L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 94, 1108-1112 (1999).
65. An, W.G., Schulte, T.W. & Neckers, L.M. The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210bcr-abl and v-src proteins before their degradation by the proteasome. *Cell Growth Differ.* 11, 355-360 (2000). 10
66. Klejman, A. et al. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J.* 21, 5766-5774 (2002).
67. Xu, D. & Qu, C.K. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front. Biosci.* 13, 4925-4932 (2008).
68. Lim, C.P. & Cao, X. Structure, function and regulation of STAT proteins. *Mol. Biosyst.* 2, 536-550 (2006).
69. Paukku, K. & Silvennoinen, O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 435-455 (2004).
70. Cerchietti, L.C. et al. A purine scaffold HSP90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nat. Med.* 15, 1369-1376 (2009). 20
71. Horn, T., Sandmann, T. & Boutros, M. Design and evaluation of genome-wide libraries for RNA interference screens. *Genome Biol.* 2010;11(6):R61.
72. Rix, U. & Superti-Furga, G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat. Chem. Biol.* 5, 616-624 (2009).
73. Trinkle-Mulcahy, L. et al. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell. Biol.* 183, 223-239 (2008).
74. Dierov, J., Dierova, R. & Carroll, M. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* 5, 275-85 (2004). 30
75. Taldone, T. et al. Design, Synthesis and Evaluation of Small Molecule HSP90 Probes. *Publ.ID: BMC9085* (2011).
76. Taldone, T. et al. Synthesis and Evaluation of Fluorescent HSP90 Probes for Use in Flow Cytometry. *BMCL* (2011).
77. He, H. et al. Identification of potent water soluble purine-scaffold inhibitors of the heat shock protein 90. *J. Med. Chem.* 49, 381-390 (2006).
78. Winkler, G S. et al. Isolation and mass spectrometry of transcription factor complexes. *Methods* 26, 260-269 (2002). 40
79. Erdjument-Bromage, H. et al. Micro-tip reversed-phase liquid chromatographic extraction of peptide pools for mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* 826, 167-181 (1998).
80. Trinkle-Mulcahy, L., et al. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J. Cell. Biol.* 183, 223-239 (2008).
81. Munday, D. et al. Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus. *Mol. Cell Proteomics* 9, 2438-2459 (2010).
82. Andersen, J.N. et al. Pathway-Based Identification of Biomarkers for Target 50

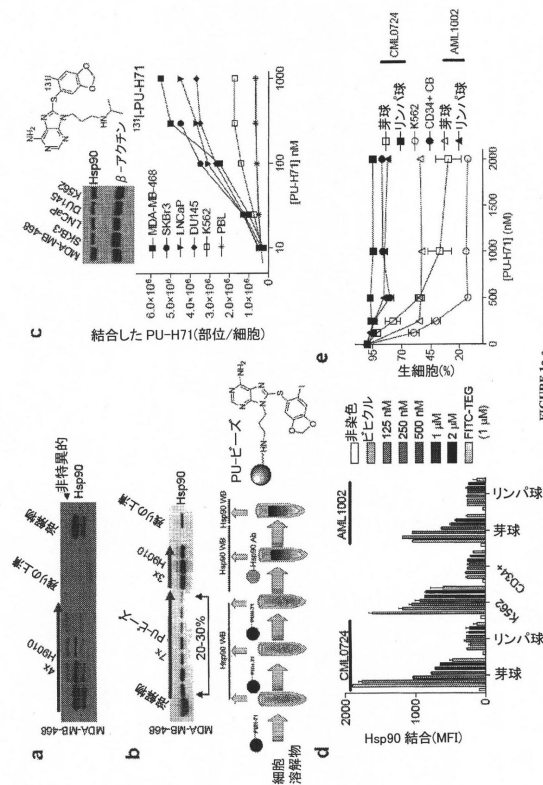
- ted Therapeutics: Personalized Oncology with PI3K Pathway Inhibitors. *Sci. Transl. Med.* 2, 43ra55 (2010).
83. Cerchietti, L.C. et al. A purine scaffold HSP90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nat. Med.* 15, 1369-1376 (2009).
84. Powers, M.V., Clarke, P.A., Workman, P. Dual targeting of Hsc70 and Hsp72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell* 14, 250-262 (2008).
85. Fabian, M.A. et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 23, 329-336 (2005). 10
86. Moffat, J. et al. A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* 124, 1283-1298 (2006).
87. Zhao, X. et al. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev.* 22, 640-653 (2009).
88. Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* 58, 621-681 (2006).
89. Chou, T.C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27-55 (1984). 20
90. Dierov, J., Dierova, R. & Carroll, M. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* 5, 275-85 (2004).
91. Beliakoff, J. & Whitesell, L. HSP90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 15, 651-662 (2004).
92. Calderwood, S.K. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment? *Int. J. Hyperthermia* 26, 681-685 (2010).
93. Pick, E. et al. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.* 67, 2932-2937 (2007).
94. Stravopodis, D.J., Margaritis, L.H. & Voutsinas, G.E. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the HSP90 chaperone complex. *Curr. Med. Chem.* 14, 3122-3138 (2007). 30
95. Pashtan, I., Tsutsumi, S., Wang, S., Xu, W. & Neckers, L. Targeting HSP90 prevents escape of breast cancer cells from tyrosine kinase inhibition. *Cell Cycle* 7, 2936-2941 (2008).
96. Citri, A., Kochupurakkal, B.S. & Yarden, Y. The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the HSP90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle* 3, 51-60 (2004).
97. Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. & Rosen, N. Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1113, 202-216 (2007). 40
98. Modi, S., et al. Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study. *J. Clin. Oncol.* 25, 5410-5417 (2007).
99. Murphy, C.G. & Fornier, M. HER2-positive breast cancer: beyond trastuzumab. *Oncology (Williston Park)* 24, 410-415 (2010).
100. Caldas-Lopes, M.E., et al. Heat shock protein 90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8368-8373 (2009).
101. Tan, D.S., et al. Biomarker-driven early clinical trials in oncology: a pa 50

- radigm shift in drug development. *Cancer J.* 15, 406-420 (2009).
102. Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 537-549 (2010).
103. Holland, J.P., et al. Measuring the Pharmacodynamic Effects of a Novel HSP 90 Inhibitor on HER2/neu Expression in Mice Using ⁸⁹Zr-DFO-Trastuzumab. *PLoS ONE* 5(1): e8859 (2010).
104. Nagengast, W.B., et al. ⁸⁹Zr-bevacizumab PET of early antiangiogenic tumor response to treatment with HSP90 inhibitor NVP-AUY922. *J. Nucl. Med.* 51, 761-767 (2010).
105. Zhang, H., et al. Identification of new biomarkers for clinical trials of HSP90 inhibitors. *Mol. Cancer. Ther.* 5, 1256-1264 (2006). 10
106. Vilenchik, M., et al. Targeting wide-range oncogenic transformation via PU 24FCl, a specific inhibitor of tumor HSP90. *Chem. Biol.* 11, 787-797 (2004).
107. Chandarlapaty, S., et al. SNX2112, a synthetic heat shock protein 90 inhibitor, has potent antitumor activity against HER kinase-dependent cancers. *Clin. Cancer Res.* 14, 240-248 (2008).
108. Eccles, S.A., et al. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 68, 2850-2860 (2008).
109. Patel, H., Modi, S., Chiosis, G. & Taldone, T. Advances in the discovery and development of HSP90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin. Drug Discovery* 6, 559-587 (2011). 20
110. Gambhir, S.S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat. Rev. Cancer* 2, 683-693 (2002).
111. Mankoff, D.A. Molecular imaging to select cancer therapy and evaluate treatment response. *J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 53, 181-192 (2009).
112. Visionsi, A. & Kim, J. Positron emission tomography for benign and malignant disease. *Surg. Clin. North Am.* 91, 249-266 (2011).
113. Pentlow, K.S., et al. Quantitative imaging of iodine-124 with PET. *J. Nucl. Med.* 37, 1557-1562 (1996). 30
114. Taldone, T. & Chiosis, G. Purine-scaffold HSP90 inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 1436-1446 (2009).
115. Cerchietti, L.C., et al. A purine scaffold HSP90 inhibitor destabilizes BCL6 and has specific anti-tumor activity in BCL6 dependent DLBCLs in vitro and in vivo. *Nat. Med.* 15, 1369-1376 (2009).
116. Marubayashi, S., et al. HSP90 as a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Invest.* 120, 3578-3593 (2010).
117. Breinig, M., et al. Targeting the heat shock protein HSP90 with non-quinone inhibitors: A novel chemotherapeutic approach in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 50, 102-112 (2009). 40
118. Rodina, A., et al. Selective compounds define HSP90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer. *Nat. Chem. Biol.* 3, 498-507 (2007).
119. Li, Z.S., Schmauss, C., Cuenca, A., Ratcliffe, E. & Gershon, M.D. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J. Neurosci.* 26, 2798-2807 (2006).
120. Zuckier, L.S., et al. Kinetics of perrhenate uptake and comparative biodistribution of perrhenate, pertechnetate, and iodide by NaI symporter-expressing tissues in vivo. *J. Nucl. Med.* 45, 500-507 (2004). 50

121. Lundh, C., Lindencrona, U., Schmitt, A., Nilsson, M. & Forssell-Aronsson, E. Biodistribution of free ²¹¹At and ¹²⁵I- in nude mice bearing tumors derived from anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Biother. Radiopharm.* 21, 591-600 (2006).
122. Chopra A. [N-¹¹C-methyl]-[4-[(4-Methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridyl)-2-pyrimidinyl]amino]phenyl]benzamide. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2010.
123. Rosso, L., et al. A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients. *Cancer Res.* 69, 120-127 (2009). 10
124. Saleem, A., Aboagye, E.O., Matthews, J.C. & Price, P.M. Plasma pharmacokinetic evaluation of cytotoxic agents radiolabelled with positron emitting radioisotopes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61, 865-873 (2008).
125. Leung K. ¹⁸F]-N-(2-Chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-fluoroethyl)piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2010.
126. Ginos, J.Z., et al. [¹³N]cisplatin PET to assess pharmacokinetics of intra-arterial versus intravenous chemotherapy for malignant brain tumors. *J. Nucl. Med.* 28, 1844-1852 (1987). 20
127. Higgins, L.J. & Pomper, M.G. The evolution of imaging in cancer: current state and future challenges. *Semin. Oncol.* 38, 3-15 (2011).
128. Marik, J. & Junutula, J.R. Emerging role of immunoPET in receptor targeted cancer therapy. *Curr. Drug Deliv.* 8, 70-78 (2011).
129. Bhojani, M.S., Van Dort, M., Rehemtulla, A. & Ross, B.D. Targeted imaging and therapy of brain cancer using theranostic nanoparticles. *Mol. Pharm.* 7, 1921-1929 (2010).
130. Yang, D.J., Kim, E.E. & Inoue T. Targeted molecular imaging in oncology. *Ann. Nucl. Med.* 20, 1-11 (2006). 30
131. Workman, P., et al. Minimally invasive pharmacokinetic and pharmacodynamic technologies in hypothesis-testing clinical trials of innovative therapies. *J. Natl.Cancer Inst.* 98, 580-598 (2006).
132. Pillarsetty, N., et al. Radiosynthesis of the iodine-124 labeled HSP90 inhibitor PUH71. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* xx, (2011).
133. Taldone, T., Zatorska, D., Kang, Y. & Chiosis, G. A facile and efficient synthesis of d6-labeled PU-H71, a purine-scaffold HSP90 inhibitor. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 53, 47-49 (2010).

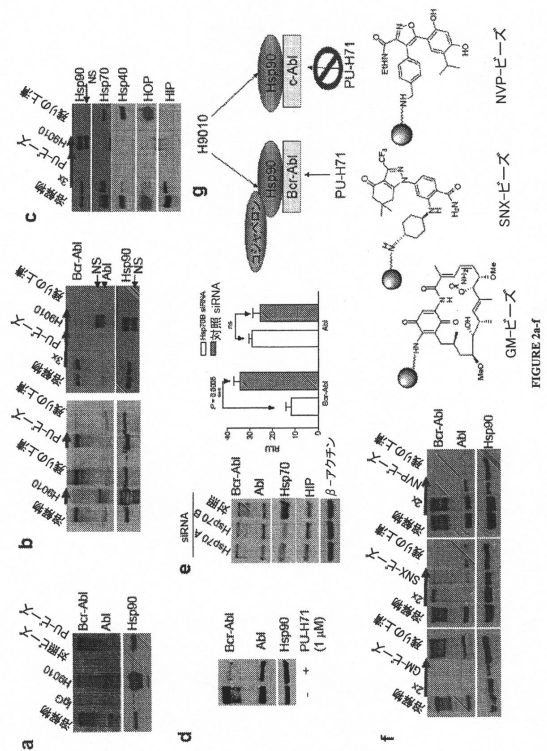
【図 1】

図 1a-e



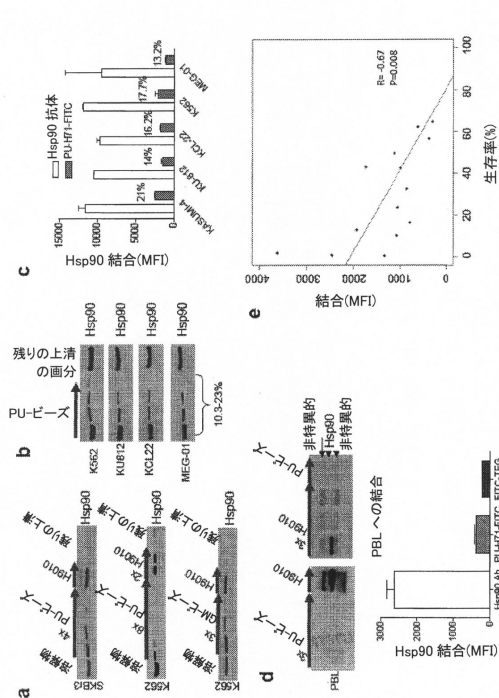
【図 2】

図 2a-f



【図 3】

図 3a-c



【図 4 - 1】

図 4a-c

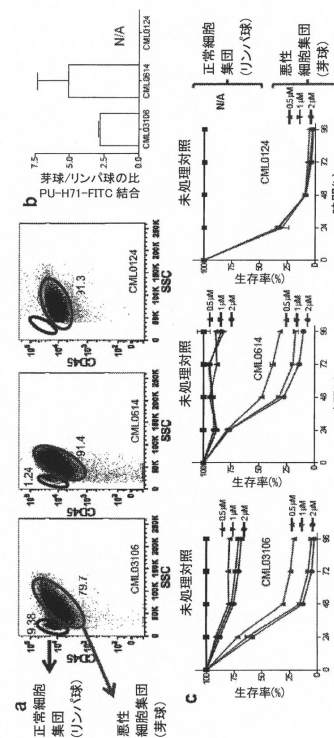


FIGURE 4a-c

【図 4 - 2】

図 4d-h

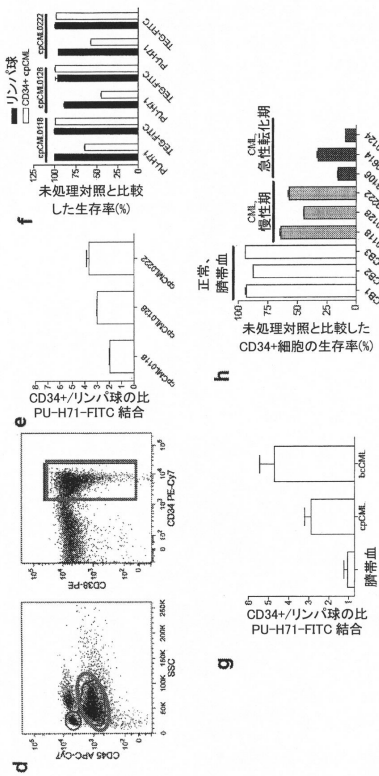


FIGURE 4d-h

【図 5】

図 5a-c

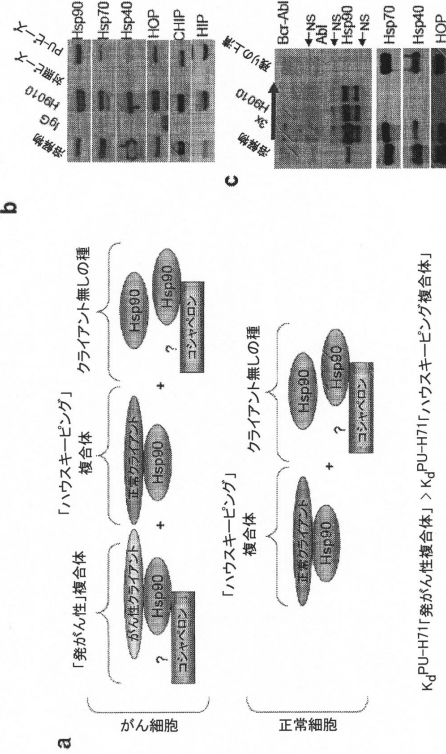


FIGURE 5a-c

【図 6】

図 6a-d

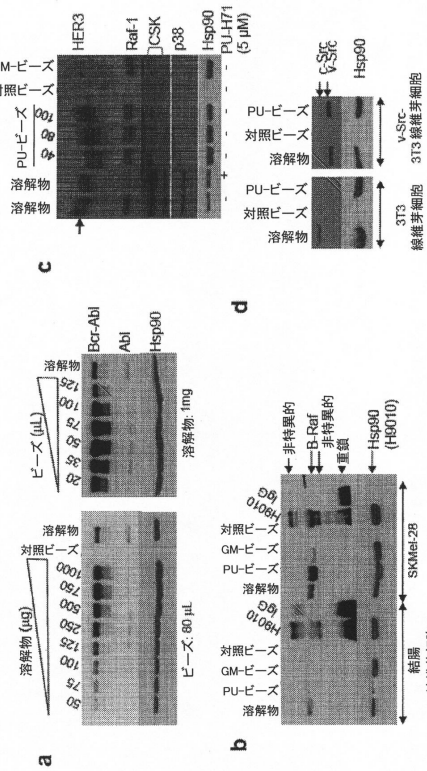


FIGURE 6a-d

【図 7】

図 7a-b

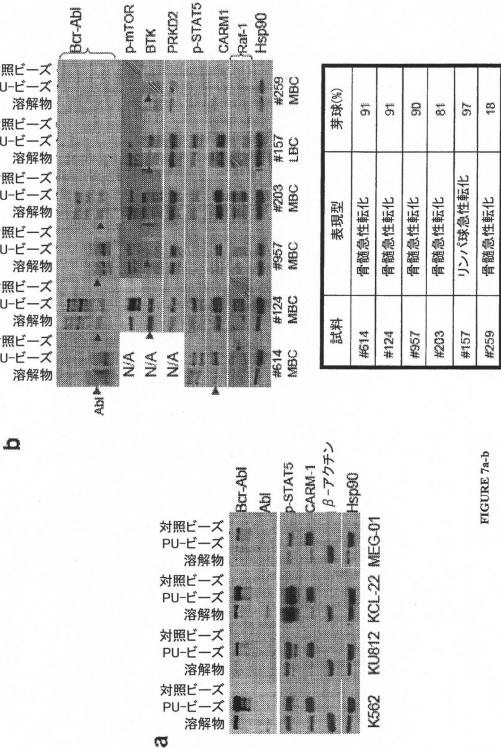


FIGURE 7a-b

【図 8】

図 8

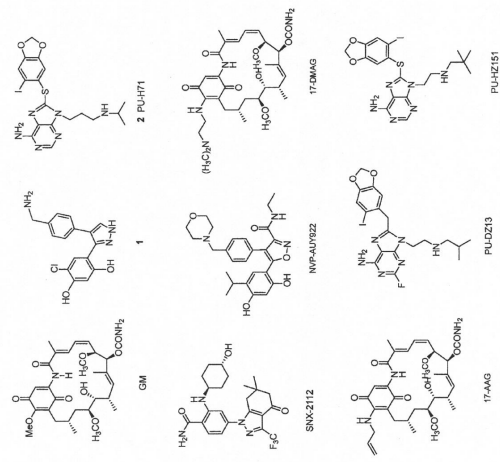


FIGURE 8

【図 9】

図 9

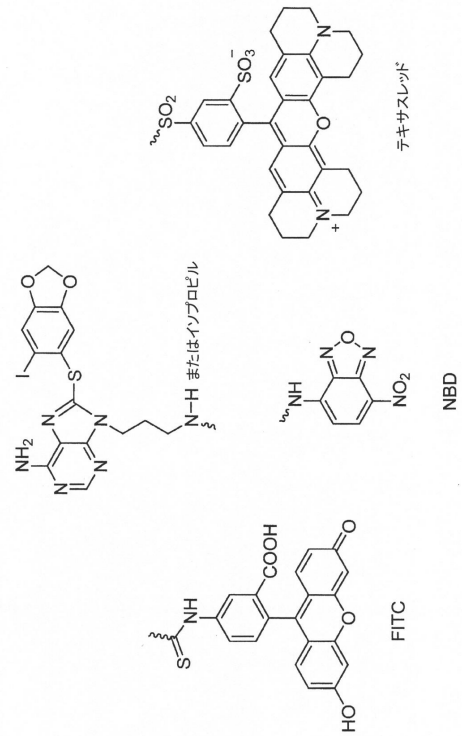


FIGURE 9

【図 10】

図 10

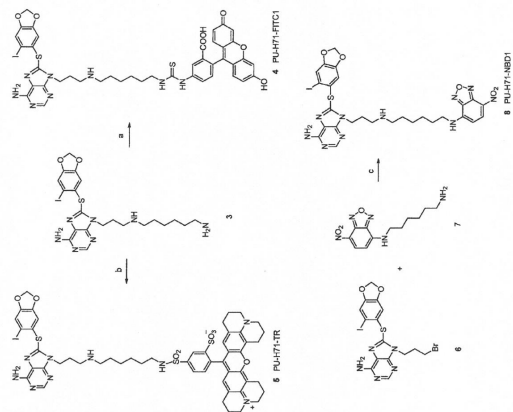


FIGURE 10

【図 11】

図 11

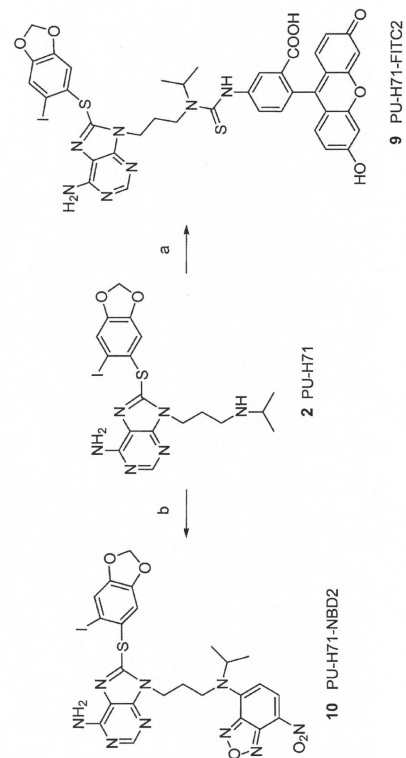


FIGURE 11

【図 1 2】

図 12

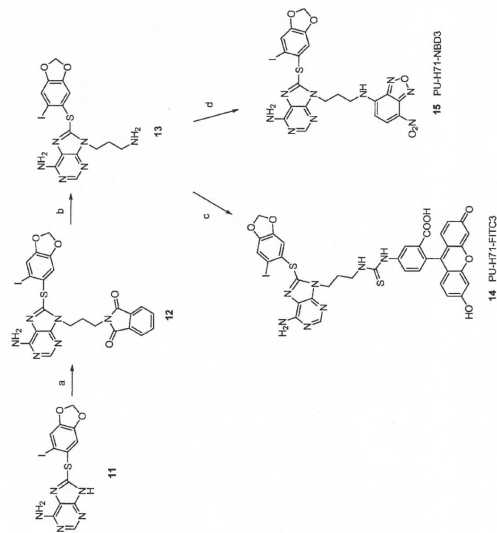


FIGURE 12

【図 1 3】

図 13A-C

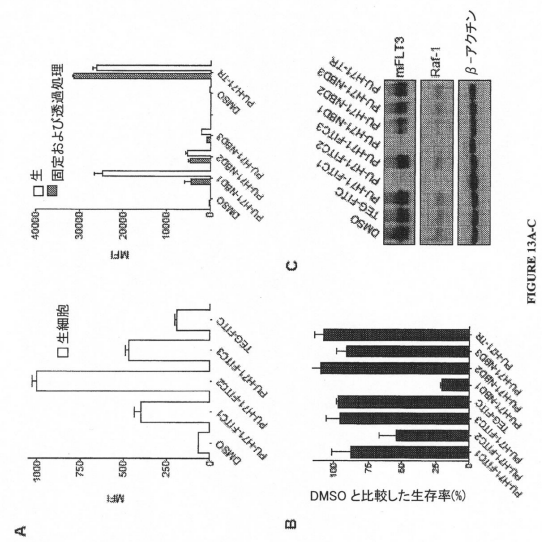


FIGURE 13A-C

【図 1 4 - 1】

図 14A

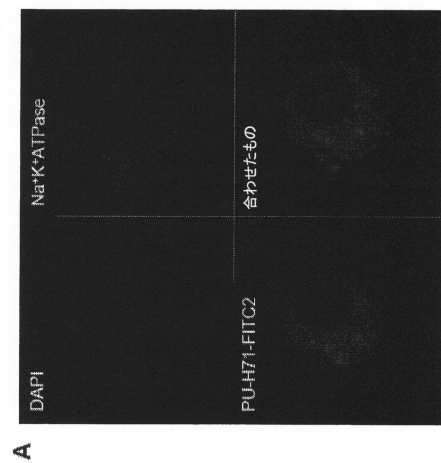


FIGURE 14A

【図 1 4 - 2】

図 14B

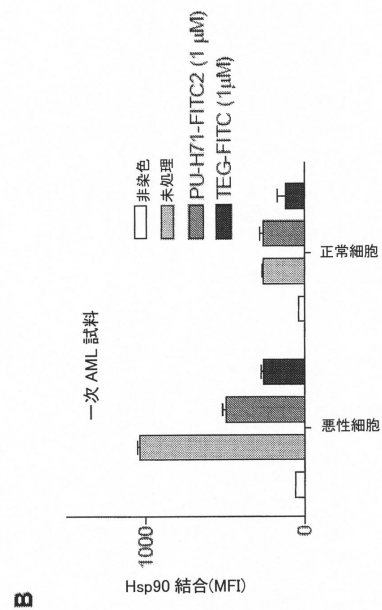
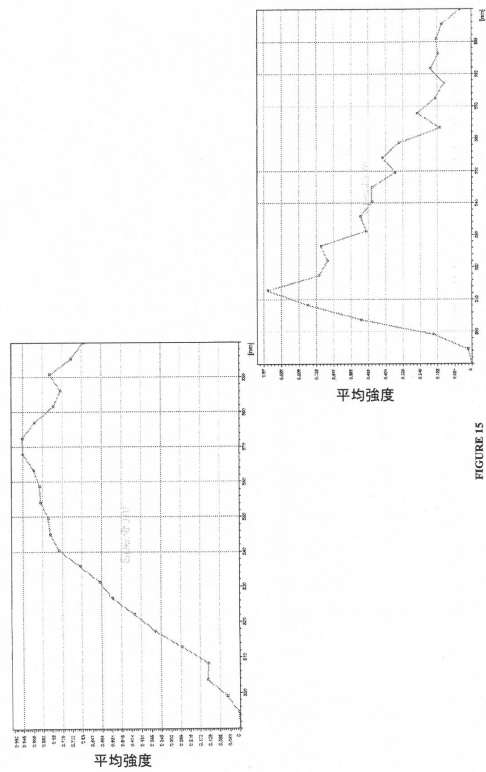


FIGURE 14B

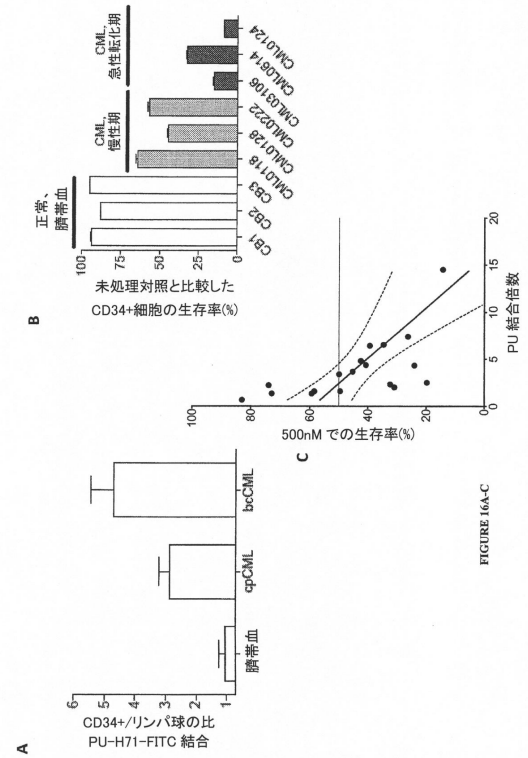
【図 15】

図 15



【図 16】

図 16A-C



【図 17】

図 17a-c

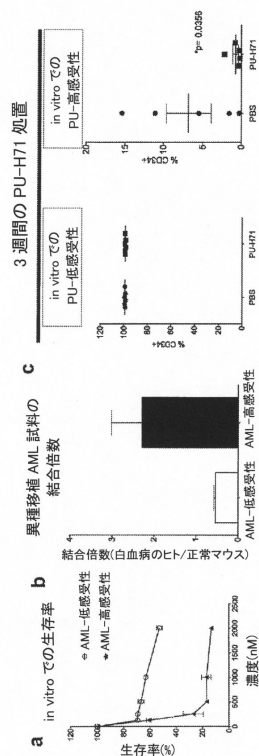


FIGURE 17a-c

【図 18】

図 18A-D

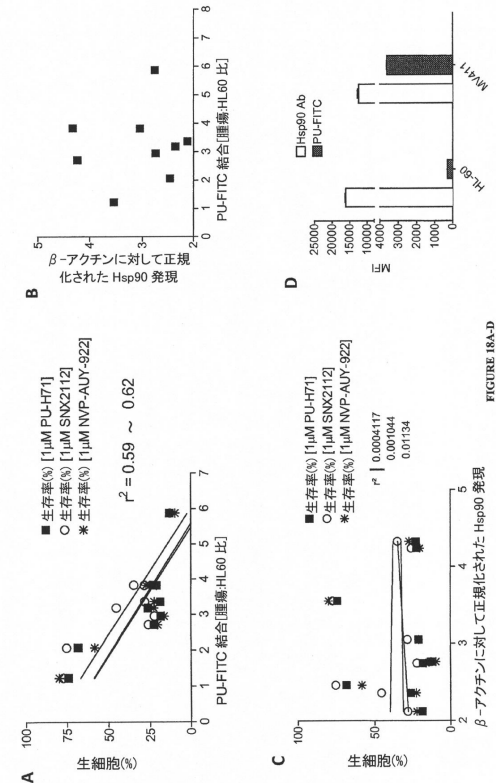


FIGURE 18A-D

【図 19】

図 19

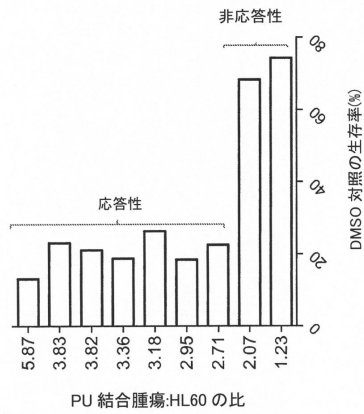


FIGURE 19

【図 20】

図 20A-B

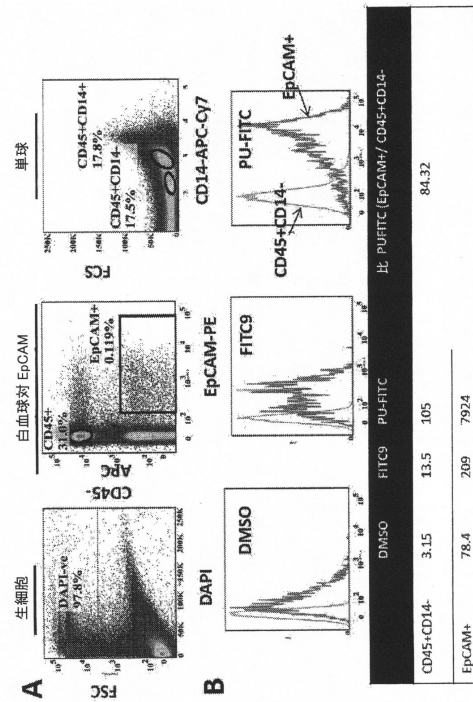


FIGURE 20A-B

【図 21】

図 21

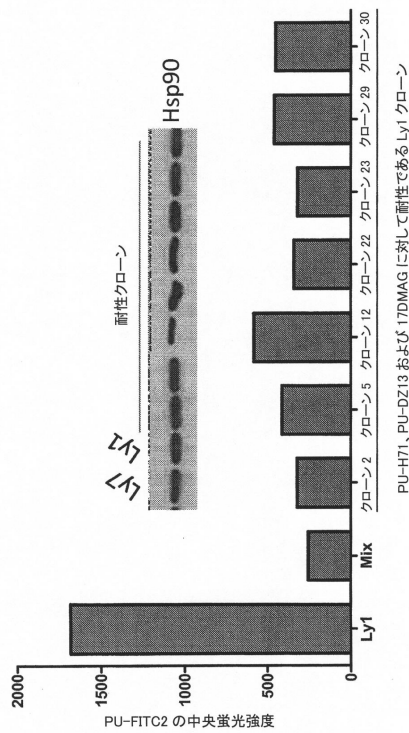


FIGURE 21

【図 22】

図 22A-C

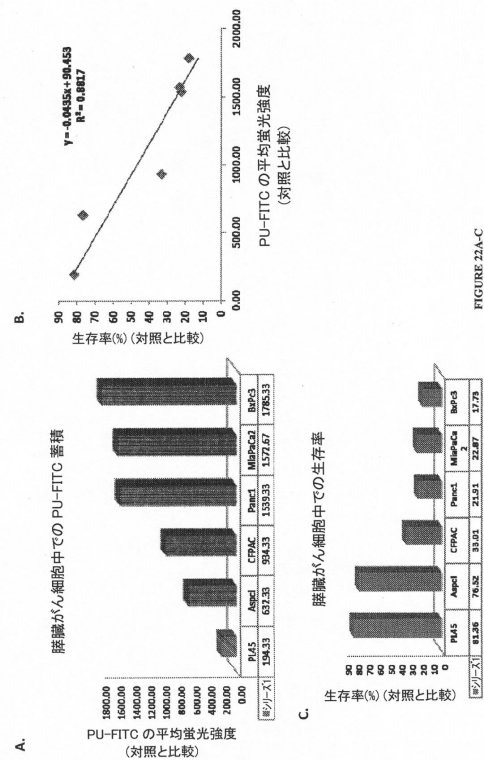
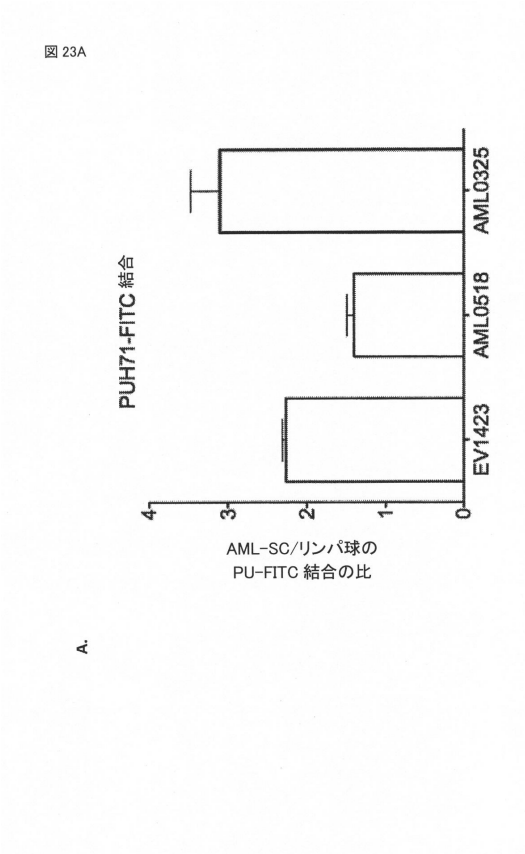
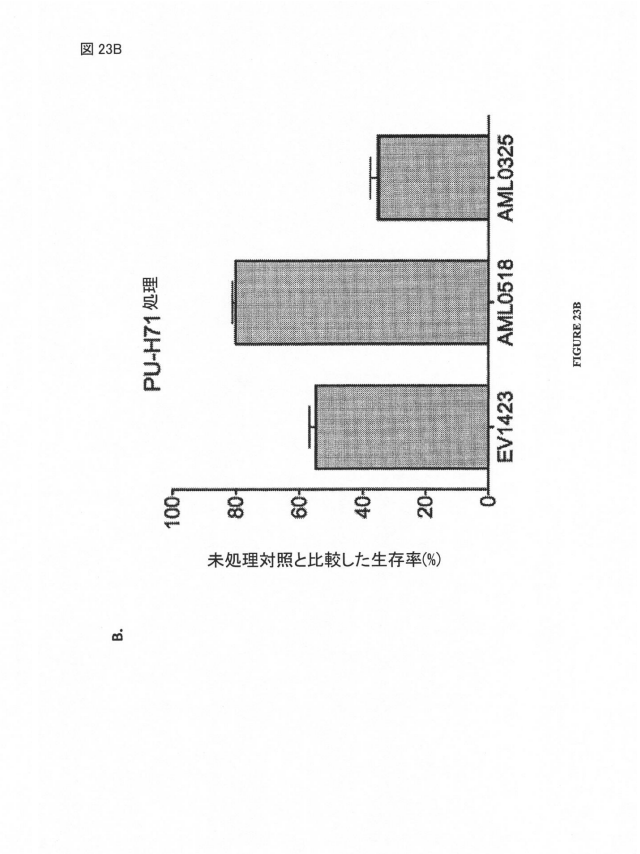


FIGURE 22A-C

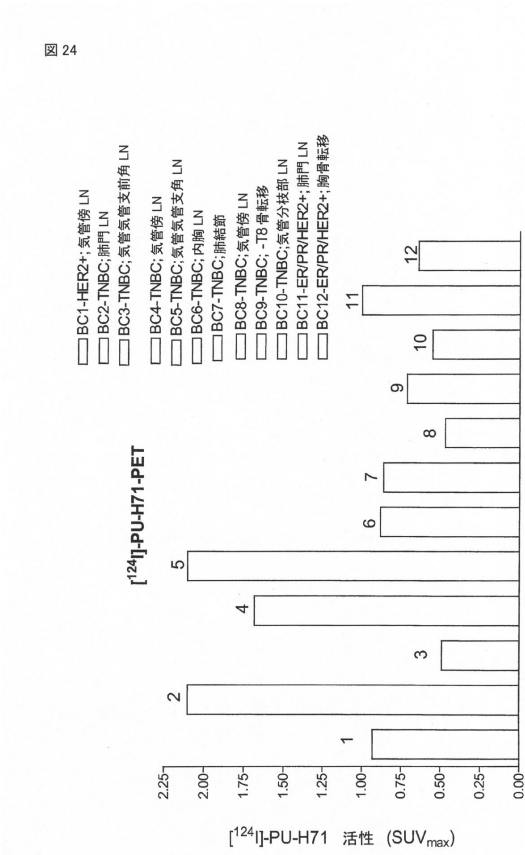
【図 2 3 - 1】



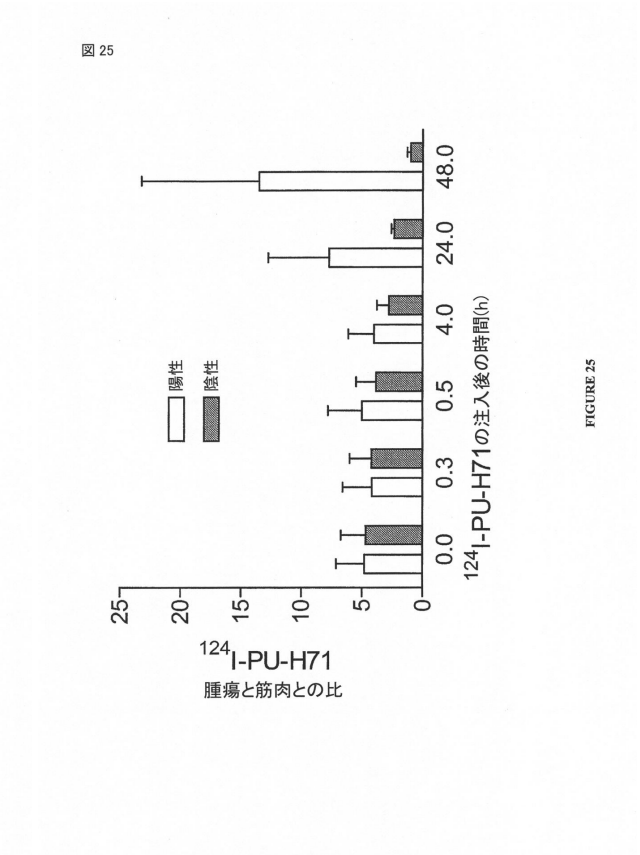
【図 2 3 - 2】



【図 2 4】



【図 2 5】



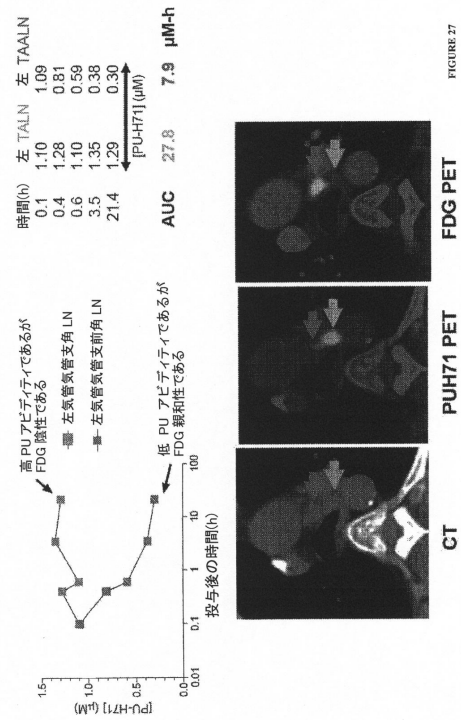
【図 26】

図 26



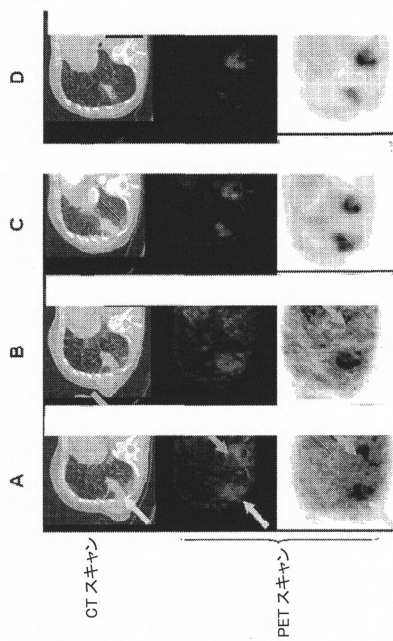
【図 27】

図 27



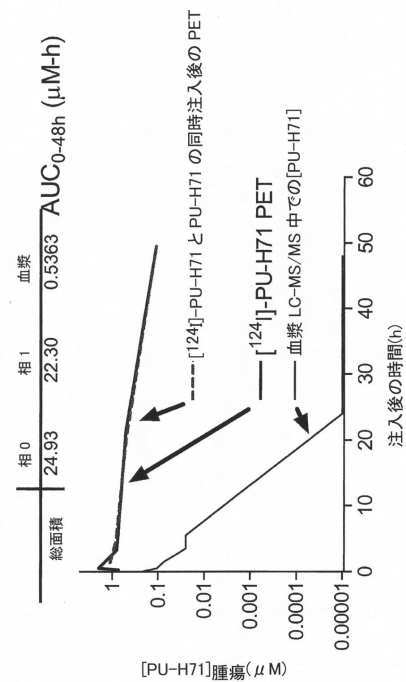
【図 28】

図 28A-D



【図 29】

図 29



【図 30】

図 30a-d

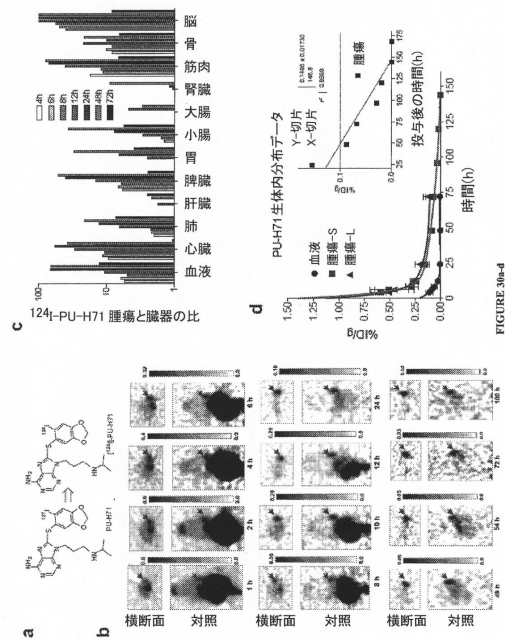


FIGURE 30a-d

【図 31】

図 31a-f

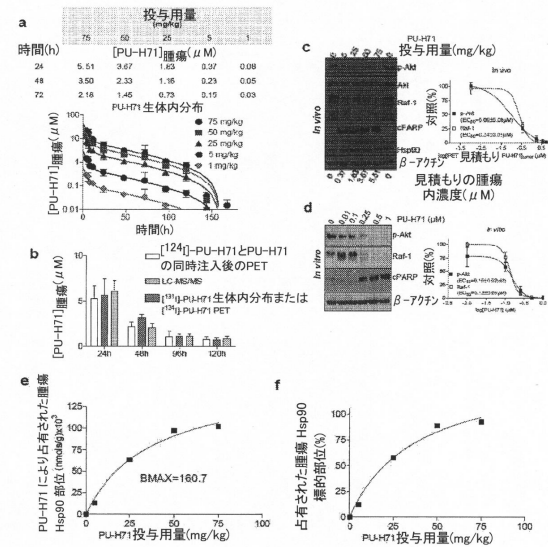


FIGURE 31a-f

【図 32】

図 32a-g

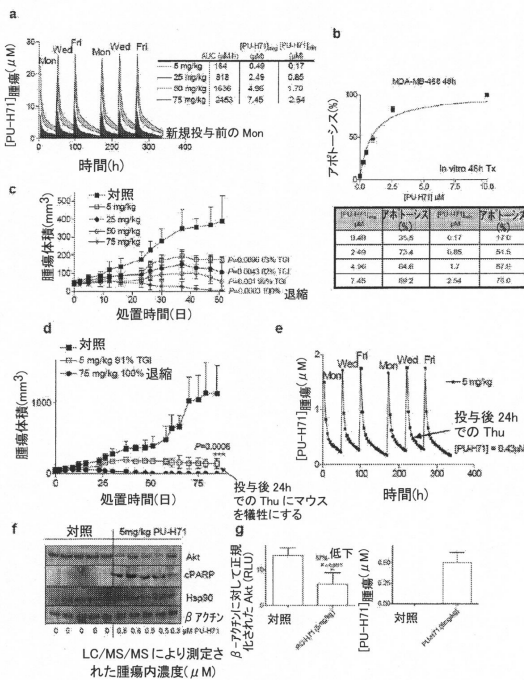


FIGURE 32a-g

【図 33】

図 33a-e

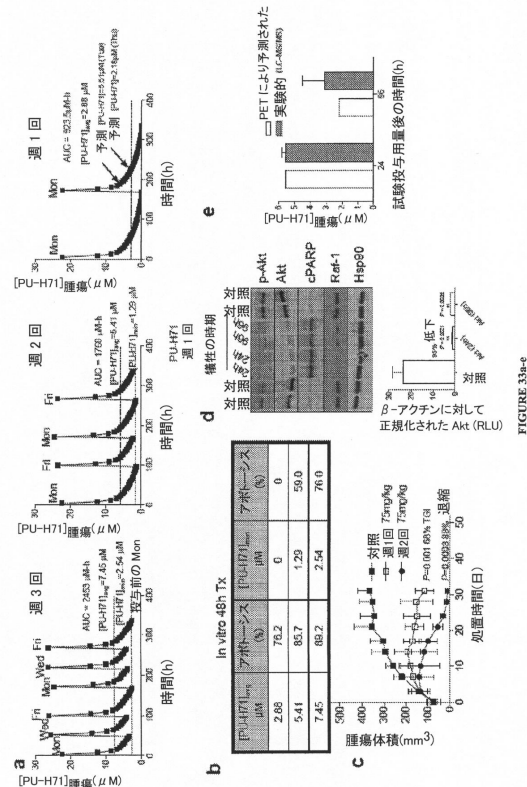


FIGURE 33a-e

【図 3 4】

図 34

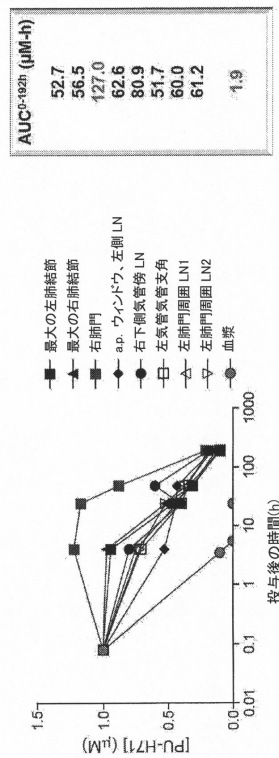


FIGURE 34

【図 3 5】

図 35

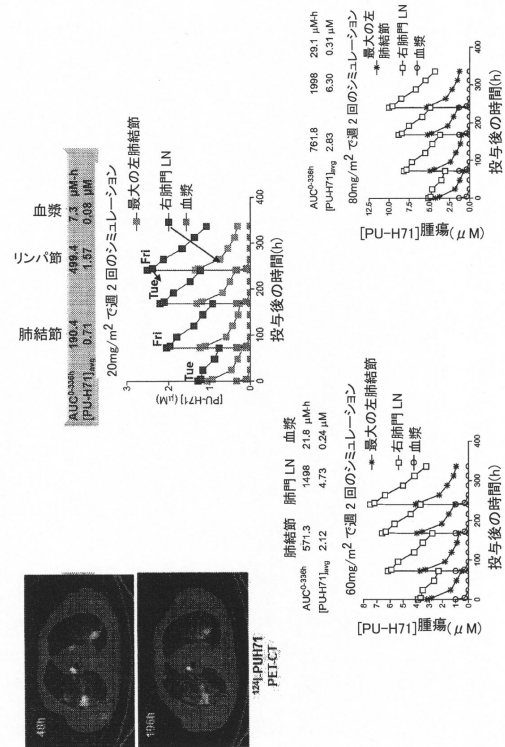


FIGURE 35

【図 3 6】

図 36A-E

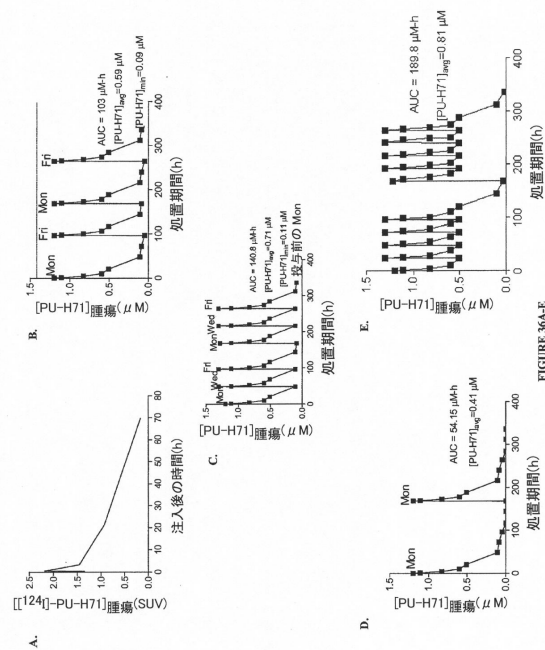


FIGURE 36A-E

【図 3 7】

図 37a-c

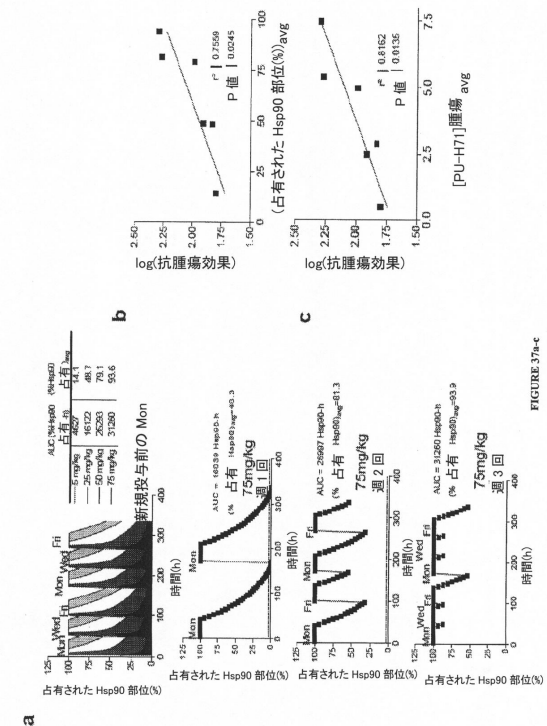
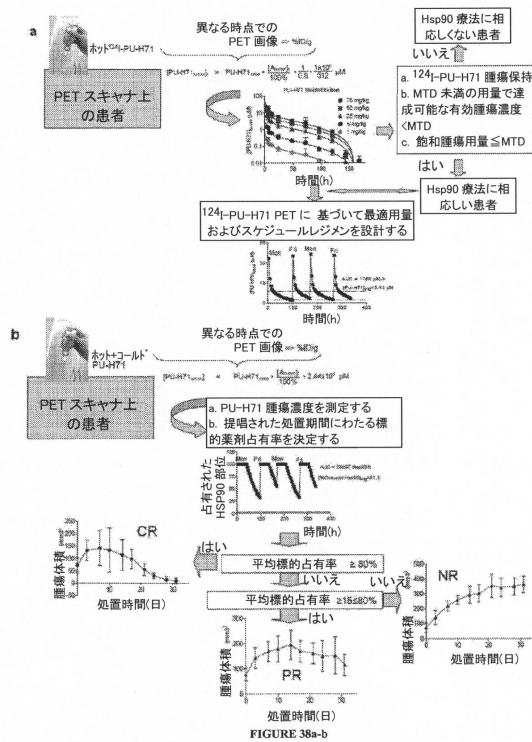


FIGURE 37a-c

【図 38-1】

図 38a-b



【図 38-2】

図 38c

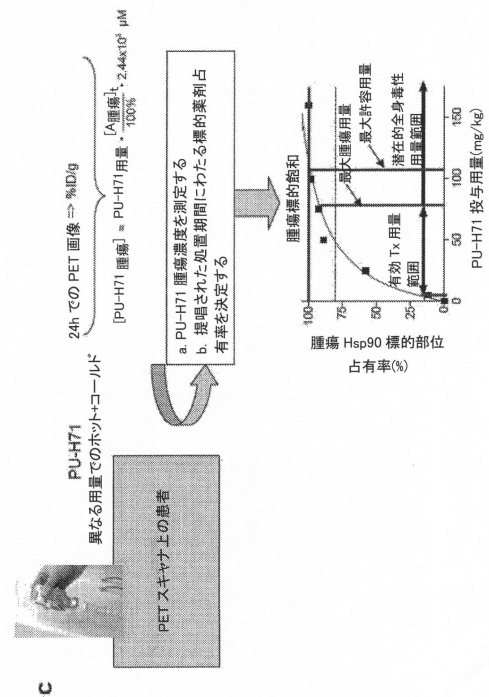


FIGURE 38c

【図 39】

図 39

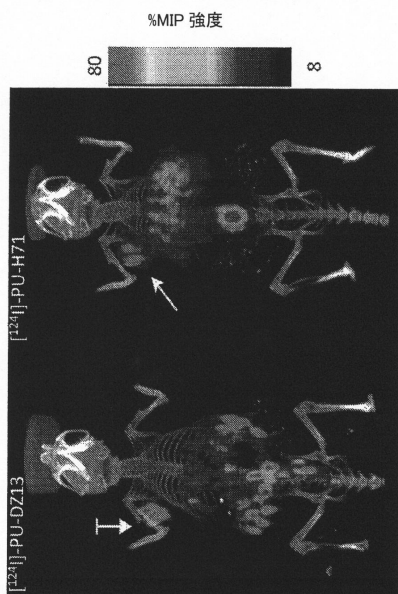


FIGURE 39

【図 40-1】

図 40A

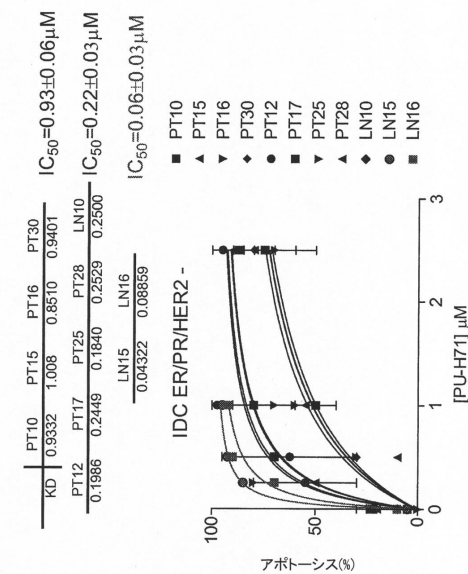


FIGURE 40A

【図 40-2】

☒ 40B

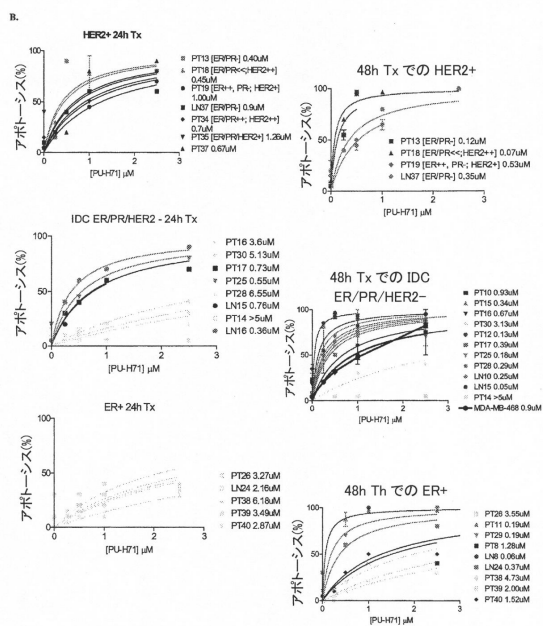


FIGURE 40B

【図 4 1】

☒ 41A-C

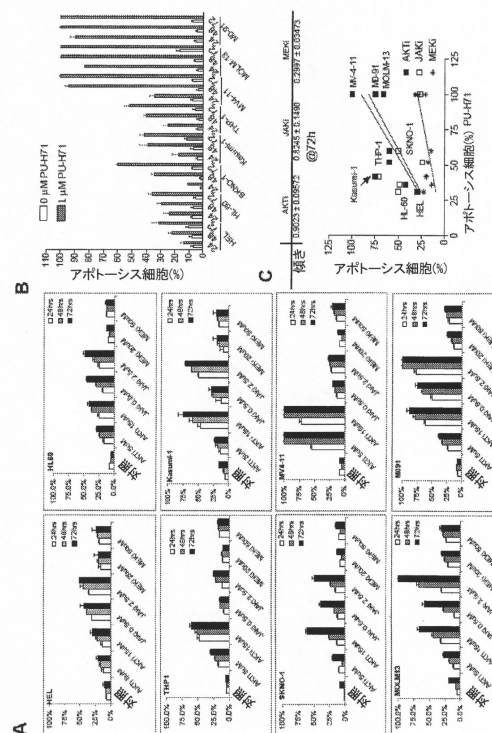


FIGURE 41A-C

【図 4 2】

☒ 42A-B

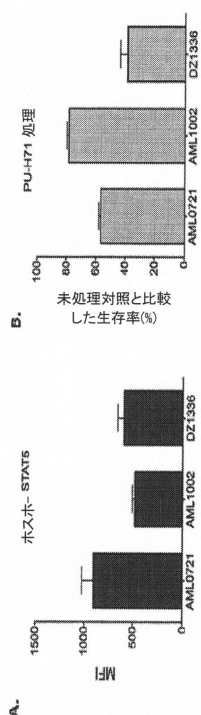


FIGURE 42A-B

【図 4 3】

☒ 43A-C

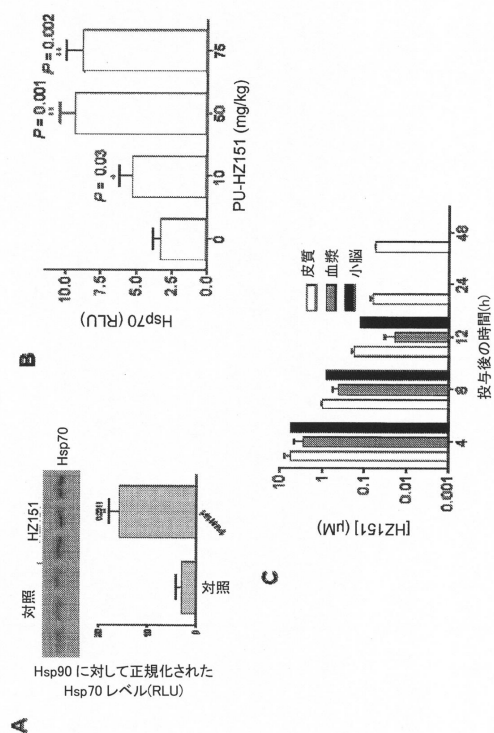
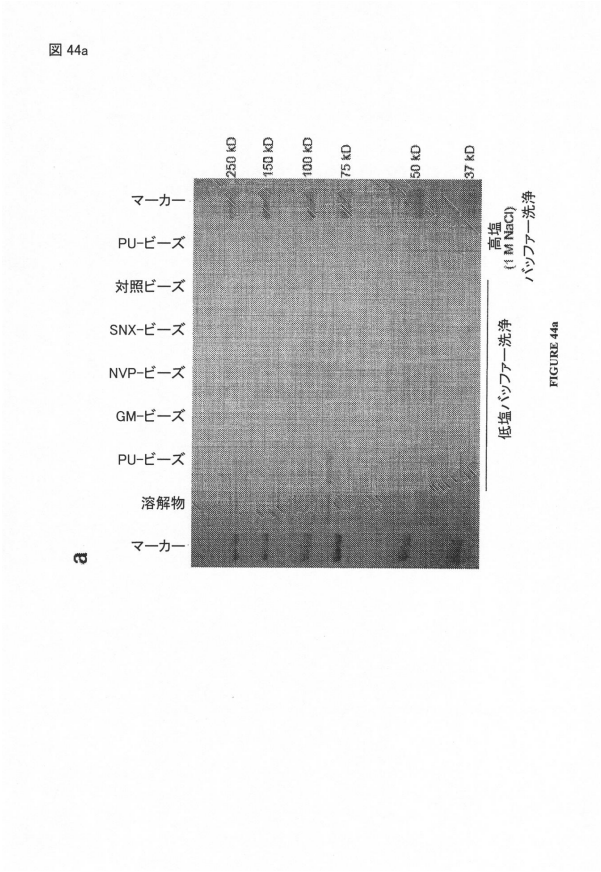
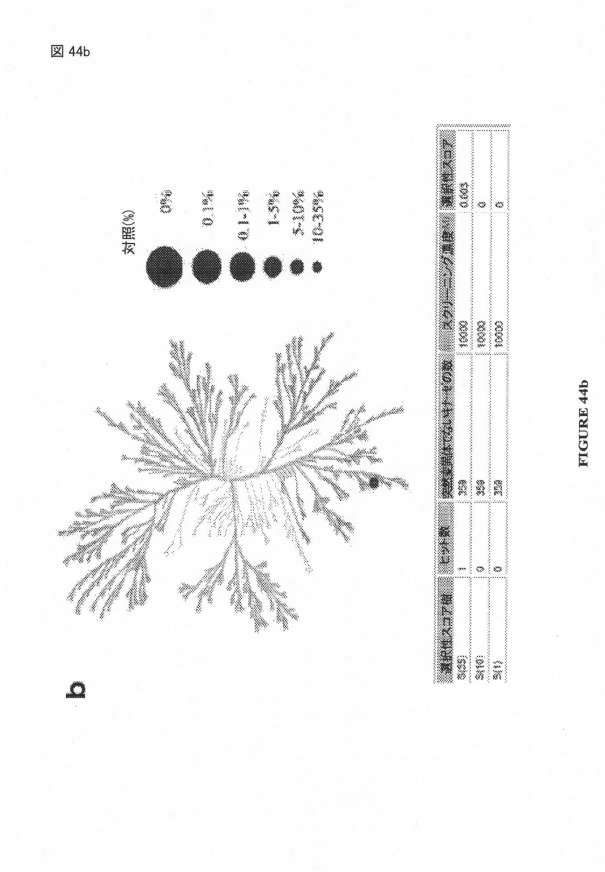


FIGURE 43A-C

【図 4 4 - 1】



【図 4 4 - 2】



【配列表】

0006218147000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 Q 1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100108855
弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克

(72)発明者 チオシス、ガブリエラ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 2 2、ニューヨーク、イー 6 0 ストリート 3 0 3、
アパートメント 3 4 ジー

(72)発明者 タルドネ、トニー
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 4 4、ニューヨーク、メイン・ストリート 4 2 5、ア
パートメント 1 2 エフ

(72)発明者 アルボーグ、メリー・エル.
アメリカ合衆国、ニュージャージー州 0 7 6 6 6、ティーネック、ファーラント・テラース 3
0 1

(72)発明者 ゴメスーダガマ、エリカ・エム.
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 8 0 4、ニュー・ロッチェル、アムハースト・ドライブ
5 9

(72)発明者 グズマン、モニカ・エル.
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 6 5、ニューヨーク、イー・シックスティースード・ス
トリート 4 5 0、アパートメント 1 1 エー

(72)発明者 ゾン、ホンリャン
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 4 4、ニューヨーク、メイン・ストリート 4 6 5、ア
パートメント 1 0 ジェイ

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特表 2 0 0 5 - 5 2 0 7 9 5 (JP, A)
特表 2 0 1 1 - 5 0 0 6 0 1 (JP, A)
米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 7 8 5 3 7 (US, A1)
米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 1 2 9 8 2 9 (US, A1)
国際公開第 0 3 / 0 5 0 2 9 5 (WO, A2)
国際公開第 2 0 0 9 / 0 4 9 1 8 4 (WO, A2)
Javier BRIONES, Targeted therapy of BCL6-dependent diffuse large B-cell lymphomas by h
eat-shock protein 90 inhibition, Expert Review of Hematology, 米国, 2 0 1 0 年, vol. 3
no. 2, 157-159

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

A 6 1 K 3 1 / 5 2

A 6 1 P 3 5 / 0 2

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 0 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)