(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2007-513118
(P2007-513118A)
(43)公表日　平成19年5月24日(2007.5.24)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 31/337	(2006.01)	A61K	31/337	4C084
A61K 45/06	(2006.01)	A61K	45/06	4C086
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61K 31/663	(2006.01)	A61K	31/663	
A61K 31/4196	(2006.01)	A61K	31/4196	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-541901 (P2006-541901)
(86)(22)出願日　平成16年12月2日 (2004.12.2)
(85)翻訳文提出日　平成18年8月1日 (2006.8.1)
(86)国際出願番号　PCT/EP2004/013728
(87)国際公開番号　WO2005/053709
(87)国際公開日　平成17年6月16日 (2005.6.16)
(31)優先権主張番号　0328040.1
(32)優先日　平成15年12月3日 (2003.12.3)
(33)優先権主張国　英国(GB)

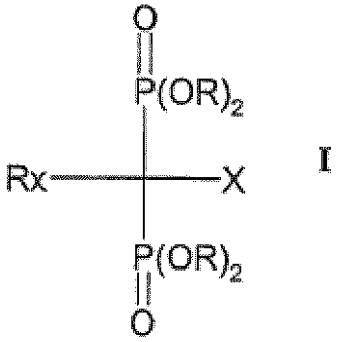
(71)出願人　598157421
ユニバーシティ・オブ・シェフィールド
Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｓｈｅｆｆｉｅｌｄ
イギリス、エス１０・２ティエヌ、シェフィールド、ウエスタン・バンク、ファース・コート
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100067035
弁理士　岩崎　光隆
(72)発明者　ロバート・エドワード・コールマン
英国エス１０・３エルゼット、シェフィールド、フルウッド、カーシック・ビュー・ロード８番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ビスホスホネートの医薬的使用

(57)【要約】
悪性疾患を有する患者の処置法であって、該患者に有効量のタキソール、その誘導体およびレトロゾールから成る群から選択される化学療法剤、その後連続して有効量のビスホスホネートを投与することを含む、方法。本発明はさらに、悪性疾患を有する患者を処置する方法であって、該患者に有効量のビスホスホネート、その後連続して有効量のＴＲＡＩＬを投与する方法を提供する。

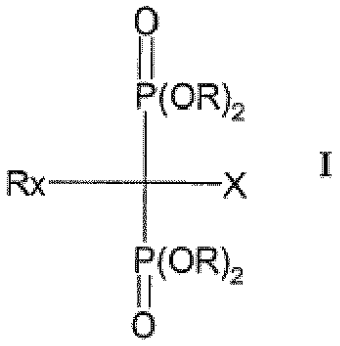
【特許請求の範囲】
【請求項１】
連続的使用のためのタキソール、その誘導体、およびアロマターゼ阻害剤およびＴＮＦ関連アポトーシス誘発性リガンド(ＴＲＡＩＬ)から成る群から選択される化学療法剤；およびビスホスホネートを含む、悪性物の処置用医薬製剤。
【請求項２】
ビスホスホネートがＮ－ビスホスホネートである、請求項１記載の医薬製剤。
【請求項３】
ビスホスホネートが式Ｉ
【化１】



Ｉ

〔式中、
Ｘは水素、ヒドロキシル、アミノ、アルカノイル、または$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{4}$アルキルもしくはアルカノイルで置換されたアミノ基であり；
Ｒは水素または$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{4}$アルキルであり、そして
Ｒｘは所望により置換されていてよいアミノ基を含む側鎖、または窒素含有ヘテロ環(芳香族性窒素含有ヘテロ環を含む)である。〕
の化合物、または薬学的に許容されるその塩もしくはその任意の水和物である、請求項１記載の医薬製剤。
【請求項４】
ビスホスホネートが２－(イミダゾル－１－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸(ゾレドロン酸)またはその薬理学的に許容される塩である、請求項１記載の製剤。
【請求項５】
化学療法剤がパクリタキセルまたはレトロゾールである、請求項１記載の医薬製剤。
【請求項６】
化学療法剤がＴＮＦ関連アポトーシス誘発性リガンドである、請求項１記載の医薬製剤。
【請求項７】
悪性疾患を有する患者の処置法であって、該患者に有効量のタキソールまたはその誘導体またはレトロゾールから選択される化学療法剤；その後連続して有効量のビスホスホネートを投与することを含む、方法。
【請求項８】
ビスホスホネートがＮ－ビスホスホネートである、請求項７記載の方法。
【請求項９】
ビスホスホネートが式Ｉ

【化２】



I

〔式中、
Ｘは水素、ヒドロキシル、アミノ、アルカノイル、または$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{4}$アルキルもしくはアルカノイルで置換されていてよいアミノ基であり；
Ｒは水素または$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{4}$アルキルであり、そして
Ｒｘは所望により置換されていてよいアミノ基を含む側鎖、または窒素含有ヘテロ環(芳香族性窒素含有ヘテロ環を含む)である。〕
の化合物、または薬学的に許容されるその塩もしくはその任意の水和物である、請求項７記載の方法。

【請求項１０】
ビスホスホネートが２－(イミダゾル－１－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸(ゾレドロン酸)またはその薬理学的に許容される塩である、請求項７記載の方法。

【請求項１１】
化学療法剤がパクリタキセルである、請求項７記載の方法。

【請求項１２】
化学療法剤がアロマターゼ阻害剤であり、かつレトロゾールである、請求項７記載の方法。

【請求項１３】
悪性疾患を有する患者の処置法であって、該患者に有効量のビスホスホネート、その後連続して有効量のＴＮＦ関連アポトーシス誘発性リガンドを投与することを含む、方法。

【請求項１４】
ビスホスホネートが２－(イミダゾル－１－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸(ゾレドロン酸)またはその薬理学的に許容される塩である、請求項１３記載の方法。

【請求項１５】
癌細胞増殖の阻害または癌細胞アポトーシスの誘発のための、タキソール、その誘導体、アロマターゼ阻害剤およびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤；およびビスホスホネートの連続的使用。

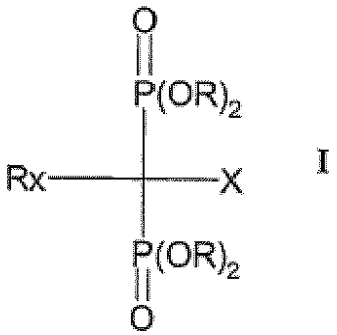
【請求項１６】
化学療法剤がパクリタキセルであり、かつビスホスホネートの前に送達する、請求項１５記載の方法。

【請求項１７】
化学療法剤がレトロゾールであり、かつビスホスホネートの前に送達する、請求項１５記載の方法。

【請求項１８】
化学療法剤がＴＲＡＩＬであり、かつビスホスホネートの後で連続的に送達される、請求項１５記載の方法。

【請求項１９】
タキソール、その誘導体、レトロゾールおよびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化

学療法剤を既に受けている患者における悪性物を処置するための医薬の製造における、ビスホスホネートの使用。
【請求項２０】
ビスホスホネートを既に受けている患者における悪性物の処置用医薬の製造のための、タキソール、その誘導体、レトロゾールおよびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤の使用。
【請求項２１】
化学療法剤がタキソール、その誘導体およびレトロゾールから成る群から選択され；かつビスホスホネートを化学療法剤の後に連続的に投与するものである、請求項１８または１９記載の使用。
【請求項２２】
化学療法剤がＴＲＡＩＬであり、かつＴＲＡＩＬをビスホスホネートの後に連続的に投与するものである、請求項１８または１９に記載の使用。
【請求項２３】
ビスホスホネートがＮ－ビスホスホネートである、請求項１５から２２のいずれかに記載の使用。
【請求項２４】
ビスホスホネートが式Ｉ
【化３】



Ｉ

〔式中、
Ｘは水素、ヒドロキシル、アミノ、アルカノイル、またはC_1－C_4アルキルもしくはアルカノイルで置換されたアミノ基であり；
Ｒは水素またはC_1－C_4アルキルであり、そして
Ｒｘは所望により置換されていてよいアミノ基を含む側鎖、または窒素含有ヘテロ環(芳香族性窒素含有ヘテロ環を含む)である。〕
の化合物、または薬学的に許容されるその塩もしくはその任意の水和物である、請求項１５から２２のいずれかに記載の使用。
【請求項２５】
ビスホスホネートが２－(イミダゾル－１－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸(ゾレドロン酸)またはその薬理学的に許容される塩である、請求項１５から２２のいずれかに記載の使用。
【請求項２６】
単位投与形態のビスホスホネートまたは薬学的に許容されるその塩、もしくはその任意の水和物、および単位投与形態のタキソール、その誘導体、アロマターゼ阻害剤およびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤を；悪性疾患の処置のための該化学療法剤と該ビスホスホネートの連続的単位用量投与のための指示書と共に含む、商業的包装物。

【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】

本発明は、ビスホスホネート、特にビスホスホネートの新規医薬的使用、およびそれを含む処置法に関する。

【０００２】

ビスホスホネートは、過剰なまたは不適切な骨再吸収が関与する様々な良性および悪性疾患の両方において、破骨細胞活性の阻害のために広く使用されている。これらのピロリン酸類似体は、骨格関連事象を減少させるだけでなく、また患者に臨床的利益および生存率の改善を提供する。ビスホスホネートはインビボで骨再吸収を予防できる；ビスホスホネートの治療的効果は、骨粗鬆症、骨減少症、骨ページェット病、腫瘍誘発高カルシウム血症(ＴＩＨ)および、より最近、骨転移(ＢＭ)および多発性骨髄腫(ＭＭ)の処置において証明されている(レビューのためにFleisch H 1997 Bisphosphonates clinical. In Bisphosphonates in Bone Disease. From the Laboratory to the Patient. Eds: The Parthenon Publishing Group, New York/London pp. 68-163参照)。ビスホスホネートが骨再吸収を阻害する機構はまだ完全には理解されておらず、試験するビスホスホネートにより変わるように見える。ビスホスホネートは、ヒドロキシアパタイト結晶と強く結合し、骨ターンオーバーおよび再吸収を阻害し、血中のヒドロキシプロリンまたはアルカリホスファターゼのレベルを減少させ、加えて、破骨細胞の形成、動員、活性化および活性を阻害することが示されている。

【０００３】

近年の試験は、また、いくつかのビスホスホネートが腫瘍細胞に直接の作用を有し得ることを示している。故に例えば相対的に高濃度の、ゾレドロネートを含むビスホスホネートが、乳房および前立腺癌腫および骨髄腫細胞のアポトーシスをインビトロで誘発することが判明している(Senaratne et al. Br. J. Cancer, 82:1459-1468, 2000;Lee et al., Cancer Res., 61:2602-2608, 2001, Shipman et al. Br. J. Cancer, 98:665-672 (1997))。

【０００４】

ある種のビスホスホネートをさらなる化学療法剤と組み合わせてインビトロで癌細胞の処置に使用したとき、ビスホスホネートまたは化学療法剤単剤と比較して、上昇した、そしてある場合相乗的な細胞増殖阻害が達成されることが、本発明により判明した。適当な化学療法剤は、タキソールまたはその誘導体、アロマターゼ阻害剤(例えばレトロゾール)、およびＴＮＦ関連アポトーシス誘発性リガンド(ＴＲＡＩＬ)を含む。特に、一般的に使用されている化学療法剤パクリタキセル(ＰＡＣ)と強力な抗再吸収剤ゾレドロン酸(ＺＯＬ)を連続的に投与したとき、レトロゾールとＺＯＬを連続的に投与したとき、およびＴＲＡＩＬとＺＯＬを連続的に投与したときの特定の組み合わせの、インビトロで乳房および前立腺癌細胞のアポトーシスを誘発する能力が、本発明により確立された。薬剤を投与する順番は、達成されるアポトーシスの最大レベルに著しく影響する。

【０００５】

本発明は、悪性疾患を有する患者を処置する方法であって、該患者に有効量のタキソールまたはその誘導体またはアロマターゼ阻害剤から成る群から選択される化学療法剤；その後連続して有効量のビスホスホネートを投与することを含む方法を提供する。

【０００６】

本発明は、さらに悪性疾患を有する患者を処置する方法であって、該患者に有効量のビスホスホネート、その後連続して有効量のＴＲＡＩＬを投与することを含む方法を提供する。

【０００７】

さらにまた本発明は、癌細胞増殖の阻害または癌細胞アポトーシスの誘発のための、タキソール、その誘導体、アロマターゼ阻害剤、およびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤；およびビスホスホネートの連続的使用を提供する。

【０００８】

さらには本発明は、タキソール、その誘導体、アロマターゼ阻害剤およびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤を既に受けている患者における悪性物を処置するため

の医薬の製造における、ビスホスホネートの使用を提供する。

【０００９】

さらにまた本発明は、ビスホスホネートを既に受けている患者における悪性物の処置用医薬の製造のための、タキソール、その誘導体、アロマターゼ阻害剤およびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤の使用を提供する。

【００１０】

従ってさらに別の局面において、本発明はまた連続的使用のためのタキソール、その誘導体、アロマターゼ阻害剤、およびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤；およびビスホスホネートを含む悪性物の処置用医薬製剤を提供する。

【００１１】

さらにまた本発明は、単位投与形態のビスホスホネートまたは薬学的に許容されるその塩、もしくはその任意の水和物、および単位投与形態のタキソール、その誘導体、アロマターゼ阻害剤およびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤を；悪性疾患の処置のための該化学療法剤と該ビスホスホネートの連続的単位用量投与のための指示書と共に含む、市販包装物を提供する。

【００１２】

さらにまた本発明は、単位投与形態のビスホスホネートまたは薬学的に許容されるその塩、もしくはその任意の水和物、および単位投与形態のタキソール、その誘導体、アロマターゼ阻害剤およびＴＲＡＩＬから成る群から選択される化学療法剤を；悪性疾患の処置のための該化学療法剤と該ビスホスホネートの連続的単位用量投与のための指示書と共に含む、キットを提供する。

【００１３】

本明細書において、“処置”なる用語は、予防的または防止的処置、ならびに、治癒的または疾患修飾的処置の両方を含み、該疾患に罹患する危険性のある患者または該疾患に罹患していることが疑われる患者、ならびに病気の患者の処置を含む。

【００１４】

本発明は、一般に、ビスホスホネート処置が指示される悪性疾患の処置に適用可能である。故に、典型的に該疾患は、骨転移の発症または過剰な骨再吸収と関連する悪性疾患である。このような疾患の例は、乳房および前立腺癌のような癌、多発性骨髄腫(ＭＭ)、腫瘍誘発高血圧(ＴＩＨ)ならびに類似の疾患および状態を含む。特に、本発明は、乳癌、肺癌、結腸癌または前立腺癌のような癌と関連する骨転移(ＢＭ)の処置に適用できる。

【００１５】

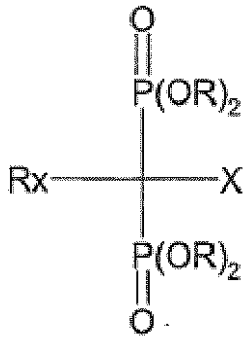
本発明の組成物および方法は、ビスホスホネートが骨転移の発症または過剰な骨再吸収の阻害のために使用され、かつ(本発明により発見された通り)ビスホスホネート処置がまた癌細胞増殖を阻害するかまたは癌細胞アポトーシスを誘発するものである、悪性疾患の既存の処置の改善を意味する。パクリタキセルまたはレトロゾールのような化学療法剤とおよびビスホスホネートの連続的使用は、癌細胞増殖阻害または癌細胞アポトーシスを、上昇した、または相乗的レベルにまでされ、増加させる。

【００１６】

本発明で使用するためのビスホスホネートは、好ましくはＮ－ビスホスホネートである。

本明細書の目的のために、Ｎ－ホスホネートは、特徴的ジェミナルビスホスホネート部分に加えて、窒素含有側鎖を有する化合物、例えば式Ｉ

【化１】



I

〔式中、
Ｘは水素、ヒドロキシル、アミノ、アルカノイル、または$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{4}$アルキルもしくはアルカノイルで置換されたアミノ基であり；
Ｒは水素または$Ｃ_{1}$－$Ｃ_{4}$アルキルであり、そして
Ｒｘは所望により置換されていてよいアミノ基を含む側鎖、または窒素含有ヘテロ環(芳香族性窒素含有ヘテロ環を含む)である。〕
の化合物、および薬学的に許容されるその塩もしくはその任意の水和物である。

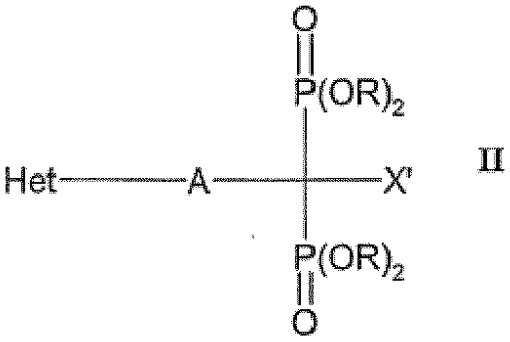
【００１７】

故に、例えば、本発明で使用するために適当なＮ－ビスホスホネートは、下記化合物または薬学的に許容されるその塩、またはその任意の水和物を含み得る：３－アミノ－１－ヒドロキシプロパン－１,１－ジホスホン酸(パミドロン酸)、例えばパミドロネート(ＡＰＤ)；３－(Ｎ、Ｎ－ジメチルアミノ)－１－ヒドロキシプロパン－１,１－ジホスホン酸、例えばジメチル－ＡＰＤ；４－アミノ－１－ヒドロキシブタン－１,１－ジホスホン酸(アレンドロン酸)、例えばアレンドロネート；１－ヒドロキシ－３－(メチルペンチルアミノ)－プロピリデン－ビスホスホン酸、イバンドロン酸、例えばイバンドロネート；６－アミノ－１－ヒドロキシヘキサン－１,１－ジホスホン酸、例えばアミノ－ヘキシル－ＢＰ；３－(Ｎ－メチル－Ｎ－ｎ－ペンチルアミノ)－１－ヒドロキシプロパン－１,１－ジホスホン酸、例えばメチル－ペンチル－ＡＰＤ(＝ＢＭ２１.０９５５)；１－ヒドロキシ－２－(イミダゾル－１－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸、例えばゾレドロン酸；１－ヒドロキシ－２－(３－ピリジル)エタン－１,１－ジホスホン酸(リセドロン酸)、例えばリセドロネート、ＮＥ－１０２４４またはＮＥ－１０４４６のようなそのＮ－メチルピリジニウム塩、例えばＮ－メチルピリジニウムアイオダイドを含む；３－[Ｎ－(２－フェニルチオエチル)－Ｎ－メチルアミノ]－１－ヒドロキシプロパン－１,１－ジホスホン酸；１－ヒドロキシ－３－(ピロリジン－１－イル)プロパン－１,１－ジホスホン酸、例えばＥＢ１０５３(Leo)；１－(Ｎ－フェニルアミノチオカルボニル)メタン－１,１－ジホスホン酸、例えばＦＲ７８８４４(藤沢)；５－ベンゾイル－３,４－ジヒドロ－２Ｈ－ピラゾール－３,３－ジホスホン酸テトラエチルエステル、例えばＵ－８１５８１(Upjohn)；および１－ヒドロキシ－２－(イミダゾ[１,２－ａ]ピリジン－３－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸、例えばＹＭ５２９。

【００１８】

一つの態様において、本発明での使用のために特に好ましいＮ－ビスホスホネートは、式II

【化２】



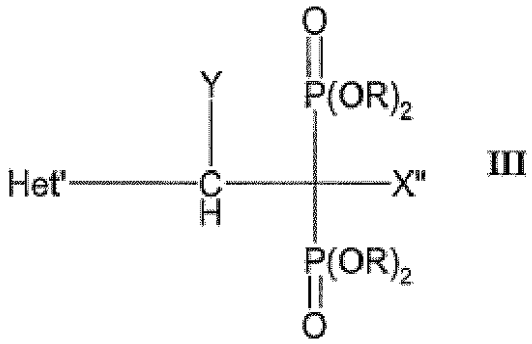
II

〔式中、
Ｈｅｔは、所望によりアルキル、アルコキシ、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボキシル、アミノ基(所望によりアルキルまたはアルカノイルラジカルで置換されていてよい)または所望によりアルキル、ニトロ、アミノもしくはアミノアルキルで置換されていてよいベンジルラジカルで置換されていてよいイミダゾール、オキサゾール、イソキサゾール、オキサジアゾール、チアゾール、チアジアゾール、ピリジン、１，２，３－トリアゾール、１，２，４－トリアゾールまたはベンゾイミダゾールラジカルであり；
Ａは１個から８個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖、飽和または不飽和炭化水素部分であり；
Ｘ'は、所望によりアルカノイルで置換されていてよい水素原子、または所望によりアルキルもしくはアルカノイルラジカルで置換されていてよいアミノ基であり、そして
Ｒは水素原子またはアルキルラジカルである。〕
の化合物、およびその薬理学的に許容される塩を含む。

【００１９】

さらなる態様において、本発明での使用のために特に好ましいビスホスホネートは、式III

【化３】



III

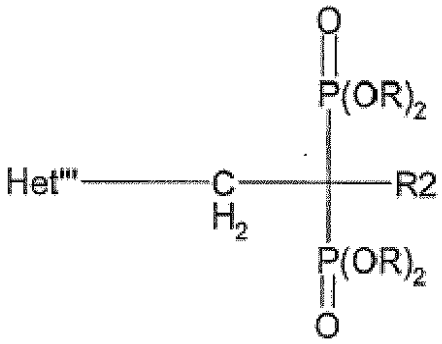
〔式中、
Ｈｅｔ'は、イミダゾリル、イミダゾリニル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、オキサゾリニル、チアゾリル、チアゾリニル、トリアゾリル、オキサジアゾリルおよびチアジアゾリルから成る群から選択される置換または非置換ヘテロ芳香族性５員環であって、ここで、該環は部分的に水素化されていてよく、ここで、該置換基は、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルコキシ、フェニル、シクロヘキシル、シクロヘキシルメチル、ハロゲンおよびアミノから選択され、かつ、ここで、Ｈｅｔの２個の隣接するアルキル置換基は、一体となって第２の環を形成でき；
Ｙは水素またはＣ$_1$－Ｃ$_4$アルキルであり；
Ｘ”は水素、ヒドロキシル、アミノ、または、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキルで置換されているアミノ基であり、そして
Ｒは水素またはＣ$_1$－Ｃ$_4$アルキルである。〕

ならびに薬理学的に許容されるその塩および異性体を含む。

【００２０】

さらに別の態様において、本発明での使用のために特に好ましいビスホスホネートは、式IV

【化４】



IV

〔式中、

Ｈｅｔ'''は、非置換であるか、または低級アルキル、低級アルコキシ、フェニル(これは、また低級アルキル、低級アルコキシおよび／またはハロゲンでモノ－またはジ－置換されていてよい)、ヒドロキシ、ジ－低級アルキルアミノ、低級アルキルチオおよび／またはハロゲンでＣ－モノ－またはジ－置換されており、かつ、置換可能なＮ－原子を低級アルキルまたはフェニル－低級アルキル(これは、またフェニル部分を低級アルキル、低級アルコキシおよび／またはハロゲンで置換されていてよい)でＮ－置換されているイミダゾリル、２Ｈ－１,２,３－、１Ｈ－１,２,４－または４Ｈ－１,２,４－トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリルまたはチアジアゾリルラジカルであり、そして

Ｒ２は水素、ヒドロキシ、アミノ、低級アルキルチオまたはハロゲン、７個まで(７個を含む)のＣ－原子を有する低級ラジカルである。〕

の化合物または薬理学的に許容されるその塩を含む。

【００２１】

本発明での使用のために特に好ましいＮ－ビスホスホネートの例は：

２－(１－メチルイミダゾル－２－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(１－ベンジルイミダゾル－２－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(１－メチルイミダゾル－４－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸；

１－アミノ－２－(１－メチルイミダゾル－４－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

１－アミノ－２－(１－ベンジルイミダゾル－４－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(１－メチルイミダゾル－２－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(１－ベンジルイミダゾル－２－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(イミダゾル－１－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(イミダゾル－１－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(４Ｈ－１,２,４－トリアゾル－４－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(チアゾル－２－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(イミダゾル－２－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(２－メチルイミダゾル－４(５)－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(２－フェニルイミダゾル－４(５)－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸；

２－(４,５－ジメチルイミダゾル－１－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸、および

２－(２－メチルイミダゾル－４(５)－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸、ならびに薬理学的に許容されるそれらの塩である。

【００２２】

本発明での使用に最も好ましいＮ－ビスホスホネートは、２－(イミダゾル－１－イル)－１－ヒドロキシエタン－１,１－ジホスホン酸(ゾレドロン酸)またはその薬理学的に許容される塩である。

【００２３】

上記の全てのＮ－ビスホスホン酸誘導体が文献から既知である。これは、それらの製造法(例えばＥＰ－Ａ－５１３７６０、pp.１３－４８参照)を含む。例えば、３－アミノ－１－ヒドロキシプロパン－１,１－ジホスホン酸は、例えばＵＳ特許３,９６２,４３２に記載の通りに、ならびに、二ナトリウム塩はＵＳ特許４,６３９,３３８および４,７１１,８８０に記載の通りに製造でき、そして１－ヒドロキシ－２－(イミダゾル－１－イル)エタン－１,１－ジホスホン酸は、例えばＵＳ特許４,９３９,１３０に記載の通りに製造できる。またＵＳ特許４,７７７,１６３および４,６８７,７６７を参照のこと。

【００２４】

該ビスホスホネートは異性体の形または適当であれば、異性体の混合物の形で、典型的にエナンチオマーまたはジアステレオマーのような光学異性体ならびに幾何異性体、典型的にｃｉｓ－ｔｒａｎｓ異性体として使用し得る。光学異性体は純粋アンチポードの形および／またはラセミ体として得られる。

【００２５】

該ビスホスホネートはまたそれらの水和物の形で使用でき、または、それらの結晶化に使用した他の溶媒を含み得る。

【００２６】

ビスホスホネートの薬理学的に許容される塩は、好ましくは塩基との塩、簡便にはアルカリ金属塩、例えばカリウムおよびとりわけナトリウム塩、またはアルカリ土類金属塩、好ましくはカルシウムまたはマグネシウム塩を含む元素周期律表のＩａ、Ｉｂ、IIaおよびIIb族由来の金属塩、およびまたアンモニアまたは有機アミンとのアンモニウム塩である。

【００２７】

ビスホスホネートのとりわけ好ましい薬学的に許容される塩は、ビスホスホン酸の１個、２個、３個または４個、とりわけ１個または２個の酸性水素が薬学的に許容されるカチオン、特にナトリウム、カリウムまたはアンモニウム、第一選択としてナトリウムで置換されているものである。

【００２８】

ビスホスホネートの薬学的に許容される塩の非常に好ましい群は、１個の酸性水素および１個の薬学的に許容されるカチオン、とりわけナトリウムを、いずれの場合もホスホン酸基に有することを特徴とする。

【００２９】

該ビスホスホネートは、好ましくは治療的有効量の活性成分を、所望により投与に適した無機または有機の、固体または液体の、薬学的に許容される担体と共にまたは混合して含む、医薬組成物の形で使用する。

【００３０】

該ビスホスホネート医薬組成物は、例えば、経腸、例えば経腸、直腸、エアロゾル吸入または経鼻投与用組成物、非経腸、例えば静脈内または皮下投与用組成物、または経皮投与用組成物(例えば受動的またはイオン泳動的(iontophoretic))であり得る。

【００３１】

好ましくは、該ビスホスホネート医薬組成物は経口または非経腸(とりわけ静脈内、動脈内または経皮)投与用である。静脈内および経口、第一には静脈内投与量が、特に重要であると見なされる。好ましくは該Ｎ－ビスホスホネート活性成分は非経腸形態、最も好ましくは静脈内形態である。

【００３２】
特定の投与形態および投与量は、特定の患者、特に年齢、体重、ライフスタイル、活動レベルおよび疾患状態を適切に考慮して、担当医が選択し得る。最も好ましくは、しかしながら、該ビスホスホネートを静脈内に投与する。
【００３３】
本発明で使用するための該ビスホスホネートの投与量は、活性成分の有効性および作用の期間、投与の形態、温血動物種、および／または温血動物の性別、年齢、体重および個々の状態のような様々な因子に依存し得る。
【００３４】
タキソールは、化合物[２ａＲ－[２ａα,４β,４αβ,６β,９α(αＲ＊,βＳ＊),－１１α,１２α,１２ａα,１２ｂα]]－β－(ベンゾイルアミノ)－α－ヒドロキシベンゼンプロパン酸６,１２－ビス(アセチルオキシ)－１２(ベンゾイルオキシ)－２α,６,１２ｂ－ビス(アセチルオキシ)－１２－(ベンゾイルオキシ)－２α,３,４,４ａ,５,６,９,１０,１１,１２,１２ａ,１２ｂ－ドデカヒドロ－４,１１－ジヒドロキシ－４ａ,８,１３,１３－テトラメチル－５－オキソ－７,１１－メタの－１Ｈ－シクロデカ[３,４]ベンズ[１,２－ｂ]オキセト－９－イルエステル(別名パクリタキセルとして既知)であり、これは抗白血病および抗腫瘍剤であり、最初に、Pacific yew tree、Taxus brevifolia、Taxaceaeの樹皮から１－形として単離された。本発明での使用に適当なタキソールの誘導体は、タキソテール(すなわち化合物[２ａＲ－[２ａα,４β,４αβ,６β,９α(αＲ＊,Ｓ＊),－１１α,１２α,１２ａα,１２ｂα]]－β－[[(１,１－ジメチルエトキシ)カルボニル]－アミノ]－α－ヒドロキシベンゼンプロパン酸１２ｂ－(アセチルオキシ)－１２－(ベンゾイルオキシ)－２α,３,４,４ａ,５,６,９,１０,１１,１２,１２ａ,１２ｂ－ドデカヒドロ－４,６,１１－トリヒドロキシ－４ａ,８,１３,１３－テトラメチル－５－オキソ－７,１１－メタノ－１Ｈ－シクロデカ[３,４]ベンズ[１,２－ｂ]オキセト－９－イルエステル(別名ドセタキセルとして既知)、タキサン類、タキシン(例えばタキシンＩ、タキシンII、タキシンＡまたはタキシンＢ)または任意の他のタキソール誘導体を含む。タキソールおよび適当なその誘導体は、本発明においてビスホスホネートと組み合わせて使用し得る。パクリタキセル(ＰＡＣ)は、本発明での使用に好ましいタキソール誘導体である。該タキソールまたはタキソール誘導体医薬組成物は、例えば、経腸、例えば経口、直腸、エアロゾル吸入または経鼻投与用組成物、非経腸、例えば静脈内または皮下投与用組成物、または経皮投与用組成物(例えば受動的またはイオン泳動的(iontophoretic))であり得る。
【００３５】
本明細書で使用する“アロマターゼ阻害剤”は、エストロゲン産生、すなわち基質アンドロステンジオンおよびテストステロンからエストロンおよびエストラジオール各々への変換を阻害する化合物に関する。本用語は、ステロイド、とりわけアタメスタン、エキセメスタンおよびフォルメスタンおよび、特に、非ステロイド、とりわけアミノグルテチミド、ログレチミド、ピリドグルテチミド、トリロスタン、テストラクトン、ケトコナゾール、ボロゾール、ファドロゾール、アナストロゾールおよびレトロゾールを含むが、これらに限定されない。エキセメスタンは、例えば、商品名AROMASINで市販の形で、例えば投与できる。フォルメスタンは、例えば、商品名LENTARONで市販の形で、例えば投与できる。ファドロゾールは、例えば、商品名AFEMAで市販の形で、例えば投与できる。アナストロゾールは、例えば、商品名ARIMIDEXで市販の形で、例えば投与できる。レトロゾールは、例えば、商品名FEMARAまたはFEMARで市販の形で、例えば投与できる。アミノグルテチミドは、例えば、商品名ORIMETENで市販の形で、例えば投与できる。
【００３６】
本発明の好ましいアロマターゼ阻害剤は、レトロゾールである。レトロゾールは化合物４－[α－(４－シアノフェニル)－１－(１,２,４－トリアゾリル)メチル]－ベンゾニトリルである。レトロゾールは、例えば、商品名FEMARAまたはFEARで市販の形で、例えば投与でき、または任意の他の適当な手段、例えば経腸、例えば経口、直腸、エアロゾル吸入または経鼻投与、非経腸、例えば静脈内または皮下投与用組成物、または経皮投与用組成物

(例えば受動的またはイオン泳動的(iontophoretic))として投与できる。

【００３７】

本発明の薬剤(ａ.タキソールまたはその誘導体、レトロゾールまたはＴＲＡＩＬおよびｂ.ビスホスホネート)は、各々適切な治療的有効量の各活性成分を、所望により投与に適した無機または有機の、固体または液体の、薬学的に許容される担体と共にまたは混合して含む、別々の医薬製剤の形で使用する。

【００３８】

特定の投与形態および投与量は、特定の患者、特に年齢、体重、ライフスタイル、活動レベルなどを考慮して、担当医が選択し得る。

【００３９】

本発明の薬剤の投与量は、活性成分の有効性および作用の期間、投与の形態、温血動物種、および／または温血動物の性別、年齢、体重および個々の状態のような様々な因子に依存し得る。

【００４０】

本発明の薬理学的活性化合物は、その有効量を経腸または非経腸投与のいずれかに適した賦形剤または担体と共にまたは混合して含む医薬組成物の製造に有用である。好ましいのは、活性成分を、ａ)希釈剤、例えばラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび／またはグリシン；ｂ)滑剤、例えばシリカ、タルク、ステアリン酸、そのマグネシウムまたはカルシウム塩および／またはポリエチレングリコール；錠剤についてまたｃ)結合剤、例えばケイ酸アルミニウムマグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよび／またはポリビニルピロリドン；望ましいならばｄ)崩壊剤、例えばデンプン、寒天、アルギン酸またはそのナトリウム塩、または起沸性混合物；および／またはｅ)吸収剤、着色剤、香味剤および甘味剤と共に含む錠剤およびゼラチンカプセルである。

【００４１】

注射用組成物は、好ましくは水性等張溶液または懸濁液であり、坐薬は有利には脂肪エマルジョンまたは懸濁液から製造する。該組成物は滅菌してよくおよび／またはアジュバント、例えば防腐剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤、溶解促進剤、浸透圧調整用塩および／または緩衝剤を含んでよい。加えて、それらはまた他の治療的に価値のある物質を含み得る。該組成物は、慣用の混合、造粒またはコーティング法により各々製造し、約０．１から７５％、好ましくは約１から５０％の活性成分を含む。

【００４２】

錠剤は、当分野で既知の方法に従い、フィルムコーティングまたは腸溶性コーティングのいずれかを施されていてよい。

【００４３】

適当な経皮投与用製剤は、有効量の本発明の化合物と担体を含む。有利な担体は、宿主の皮膚を通る通過を助けるための吸収可能な薬理学的に許容される溶媒を含む。例えば、経皮デバイスは、裏打ち部材、該化合物を所望により担体と共に含む貯蔵部、所望により該化合物の宿主の皮膚への制御されかつ予定された速度での長期間にわたる送達のための速度制御バリア、および、該デバイスの皮膚への固定のための手段を含む、バンデージの形である。

【００４４】

例えば皮膚および眼への、適当な局所投与用製剤は、水性溶液、懸濁液、軟膏、クリーム、ゲルまたは、例えばエアロゾルでの送達のためのスプレー製剤などを含む。このような局所送達系は、皮膚適用に、例えば皮膚癌の処置のために、例えば、クリーム、ローションスプレーなどでの予防的使用に特に適当であろう。

【００４５】

他の経口投与可能医薬製剤は、ゼラチン製の乾燥充填カプセル、およびまた、ゼラチンとグリセロールまたはソルビトールのような可塑剤製の軟、密封カプセルである。乾燥充

填カプセルは、例えばラクトースのような増量剤、デンプンのような結合剤、および／またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムのような流動促進剤、および、適当であれば、安定化剤と混合された、顆粒の形の活性成分を含む。軟カプセルにおいて、活性成分は好ましくは脂肪油、パラフィン油または液体ポリエチレングリコールのような適当な液体に溶解または懸濁しており、安定化剤を添加することも可能である。

【００４６】

非経腸製剤は、とりわけ静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、経皮または皮下のような様々な方法に有効な、注射可能流体である。このような流体は、好ましくは等張水性溶液または懸濁液であり、それは、使用前に、例えば活性成分を単独でまたは薬学的に許容される担体と共に含む凍結乾燥製剤から調製できる。該医薬製剤は、滅菌できおよび／または補助剤、例えば防腐剤、安定化剤、湿潤剤および／または乳化剤、可溶化剤、浸透圧調整用塩および／または緩衝剤を含んでよい。

【００４７】

適当な経皮投与用製剤は、有効量の活性成分と担体を含む。有利な担体は、宿主の皮膚を通る通過を助けるための吸収可能な薬理学的に許容される溶媒を含む。特徴的に、経皮デバイスは、裏打ち部材、該化合物を所望により担体と共に含む貯蔵部、所望により該化合物の宿主の皮膚への制御されかつ予定された速度での長期間にわたる送達のための速度制御バリア、および、該デバイスの皮膚への固定のための手段を含む、バンデージの形である。

【００４８】

下記実施例は本発明を説明することを意図し、それに限定されると解釈してはならない。

【００４９】

実施例

方法１：ＰＡＣおよびＺＯＬ

ＭＣＦ７細胞を播種し、プレインキュベートし、次いでＺＯＬおよび／またはＰＡＣで、下記の順番で処置する。ＰＡＣ、次いでＺＯＬの順番の場合、実験の一つでゲラニルグリセロール(ＧＧＯＨ、５０μＭ)を添加し、次いでＺＯＬと共に除去する。アポトーシスを、核形態学の評価により検定する。

【００５０】

実験１：

グループ１：２５μＭ　ＺＯＬ(１日目に１時間)、続いて２ｎＭ　ＰＡＣ(２日目に４時間)

グループ２：２ｎＭ　ＰＡＣ(１日目に４時間)、続いて２５μＭ　ＺＯＬ(２日目に１時間)

最後の薬剤暴露に続き、各グループの細胞を無薬剤培地で４８時間インキュベートする。

【００５１】

実験２：２ｎＭ　ＰＡＣ(１日目に４時間)、続いて１毎μＭ　ＺＯＬ(２日目に１時間)。最後の薬剤暴露に続き、各グループの細胞を無薬剤培地で４８時間インキュベートする。

【００５２】

実験３：２ｎＭ　ＰＡＣ(１日目に４時間)、続いて２５μＭまたは１μＭ　ＺＯＬ(２日目に１時間)を、ゲラニルゲラニオール(ＧＧＯＨ)５０μＭ(ＺＯＬと同時に添加および除去)有りまたは無し。最後の薬剤暴露に続き、各グループの細胞を無薬剤培地で４８時間インキュベートする。

【００５３】

結果

実験１結果：

ＰＡＣ前の２５μＭ　ＺＯＬ投与(グループ１)は、２.４％アポトーシスを誘発し、一方アポトーシスの最大誘発は、１日目にＰＡＣ、続いて２日目にＺＯＬ(２５μＭ)で処置

した細胞(グループ２)で見られる；(６．１％、ｐ＜０．００１、ＺＯＬまたはＰＡＣ単独と比較)。

これらの結果から、アポトーシスが相乗的形態で誘発されるが、薬剤暴露の順番が最大アポトーシスに重要であることが示される。

【００５４】

実験２結果：

高投与量を用いて、ＰＡＣ(１日目)、続いて１μＭ　ＺＯＬ(２日目)で処置されたＭＣＦ７細胞が、アポトーシスを相乗的形態で誘発し、ＰＡＣ単独(１．２５％、ｐ＝０．００４)および１μＭ　ＺＯＬ単独(０．２５％、ｐ＝０．００４)と比較して、組み合わせグループで４．１％であることが判明した。これらの結果は、臨床的に適切な用量のＺＯＬがアポトーシスの誘発に有用であることを証明する。ＺＯＬ輸液後、インビボピーク血漿濃度は、数時間１－２μＭである。

【００５５】

実験３結果：

ゲラニルゲラニオールは、ＺＯＬの作用を逆転し得るメバロン酸経路の媒介物である。ＭＣＦ７細胞のＰＡＣ、続いてゲラニルゲラニオール(ＧＧＯＨ、５０μＭ)と組み合わせたＺＯＬでの処置は、アポトーシス細胞細胞死の相乗的増加を、７０－８０％妨げる。これは、ＺＯＬが、ＭＣＦ７細胞のアポトーシスをＭＶＡ経路を介して誘導することを示す。

【００５６】

考察

ＺＯＬとＰＡＣの組み合わせ剤は、アポトーシスの誘発に相乗的作用を有することが示された。加えて、相乗効果は短いインキュベーション期間でかつＺＯＬの臨床的に適切な濃度で達成できることが判明した。アポトーシス細胞の最大誘発のために、最初にＰＡＣ、続いてＺＯＬに、好ましくは別の日に暴露すべきである。アポトーシスの暴露はＭＶＡ経路の阻害を介する。我々の結果は、ＰＡＣおよび臨床的に適切な用量のＺＯＬの組み合わせが、腫瘍細胞のアポトーシスを誘発し、薬剤の順番が組み合わせ処置の最大効果を得るために重要であることを示唆する。

【００５７】

方法２：ＺＯＬおよびＴＲＡＩＬ

乳癌系ＭＤＡ－ＭＢ－４２６およびＭＣＦ７ならびに前立腺癌細胞系ＰＣ３をＺＯＬ(２５μＭ)およびＴＲＡＩＬ(R & D systems, Abingdon, UKから購入；１０ng／ml)で、下記の通り様々なインキュベーション時間および順番で処置する：

グループ１：ＴＲＡＩＬを最初に２４時間、続いてＺＯＬを４８時間投与。

グループ２：ＺＯＬを最初に２４時間、続いてＴＲＡＩＬを２４時間投与。

グループ３：ＺＯＬおよびＴＲＡＩＬを同時に２４時間投与。

グループ４：ＴＲＡＩＬを最初に２４時間、次いでＺＯＬを４時間投与、続いて無薬剤培地で４８時間。

グループ５：ＺＯＬを最初に４時間投与し、次いで細胞を無薬剤培地に４８時間維持し、続いてＴＲＡＩＬを２４時間投与。

【００５８】

結果

ＺＯＬとＴＲＡＩＬの組み合わせは、乳癌細胞のアポトーシス死の誘発に相乗効果を示すが、薬剤を投与する順番が重要である。ＴＲＡＩＬのＺＯＬの前の投与(グループ１)はアポトーシスを１．７５％(ＴＲＡＩＬのみ)および０．５％(ＺＯＬのみ)から組み合わせグループの２．４％まで増加させる。同様に、ＺＯＬとＴＲＡＩＬの一緒の２４時間処置(グループ３)はアポトーシスレベルを１．７５％(ＴＲＡＩＬのみ)および０．７％(ＺＯＬのみ)から組み合わせグループの２．５％まで増加させる。細胞をＺＯＬで４８時間、続いてＴＲＡＩＬで処置したとき(グループ２)、該結果は２剤の相乗効果を示す。組み合わせグループにおいて、１４．６５％アポトーシスがあり、これはＺＯＬのみ(０．７％、ｐ＜０．０

０１)およびＴＲＡＩＬのみ(２.７％、ｐ＜０.００１)よりも有意に高い。同様の結果がＺＯＬとの短いインキュベーション時間(４時間)を使用したときでも得られ、明白な相乗効果はＺＯＬをＴＲＡＩＬの前に投与したときのみ得られる。前立腺癌細胞も、これらの細胞をグループ５に概説の通り処置したとき、ＺＯＬおよびＴＲＡＩＬの組み合わせに感受性である。

【００５９】

これらの結果は、ＺＯＬおよびＴＲＡＩＬの組み合わせは、腫瘍細胞のアポトーシスの誘発に相乗効果を有する。最大効果のために、ＺＯＬをＴＲＡＩＬ処置の前に投与しなければならない。

【００６０】

方法３：レトロゾール(ＬＥＴ)およびＺＯＬ

材料および方法：

乳癌細胞ＭＣＦ７Ｃａ(Dr. Chen, NY, USAから恵与)を使用する。レトロゾールおよびゾレドロン酸はNovartis AG, Basel, Switzerlandから提供される。

【００６１】

下記試験を行う：

１．ＭＣＦ７Ｃａ増殖に対するゾレドロン酸単独の効果
２．ＭＣＦ７Ｃａ増殖に対するレトロゾール単独の効果
３．ＭＣＦ７Ｃａアポトーシスおよび壊死に対するゾレドロン酸単独の効果
４．ＭＣＦ７Ｃａアポトーシスおよび壊死に対するレトロゾール単独の効果
５．ＭＣＦ７Ｃａのアポトーシスに対する組み合わせ処置(ゾレドロン酸およびレトロゾール一緒)の効果
６．ＭＣＦ７Ｃａのアポトーシスに対する連続的処置(ゾレドロン酸、続いてレトロゾール)の効果
７．ＭＣＦ７Ｃａのアポトーシスに対する連続的処置(レトロゾール、続いてゾレドロン酸)の効果
８．レトロゾール、続いてゾレドロン酸によりもたらされるアポトーシスのレベルに対するＧＧＯＨ添加の効果
９．無血清培地中の連続的および組み合わせ処置の効果

【００６２】

使用した用量およびインキュベーション時間：

最初の用量応答試験に続き、連続的および組み合わせ処置を、１０μＭ　ゾレドロン酸および１００ｎＭ　レトロゾールを各２４時間、続いて２４時間までの無薬剤インキュベーション時間を使用して行う。いくつかの付加的試験において、１μＭ　ゾレドロン酸を１時間のみ使用する。

【００６３】

アポトーシス／壊死の測定：

アポトーシス／壊死腫瘍細胞死のレベルを、核形態学の評価、続くHoechstおよびヨウ化プロピジウムを使用した細胞染色により測定する。

【００６４】

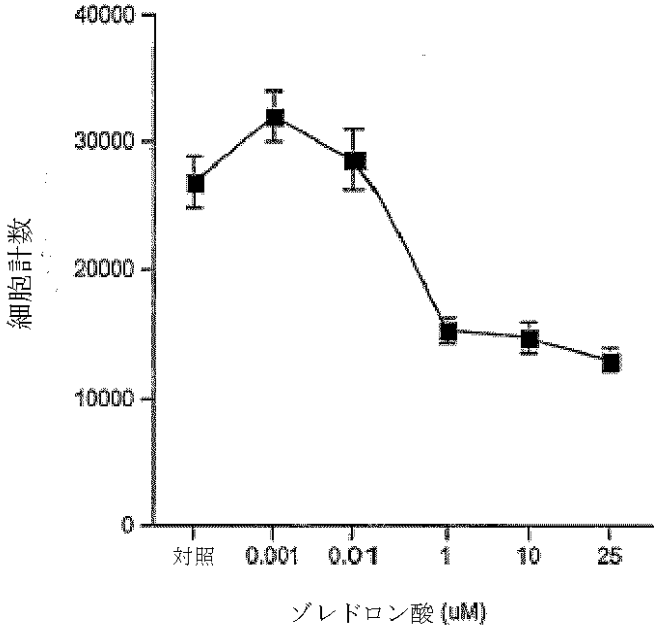
結果：

１)ＭＣＦ７Ｃａ細胞の増殖に対するゾレドロン酸の効果

ＭＣＦ７Ｃａ細胞を、漸増用量のゾレドロン酸に１時間暴露し、薬剤を除去し、細胞を無薬剤培地中７２時間までインキュベートする。細胞数を、コールター・カウンターを使用して計数する。

【００６５】

【表１】



１μＭを超えるゾレドロン酸の用量は、ＭＣＦ７Ｃａの数の減少をもたらし、一方低用量は細胞増殖に対して効果を有しない。１．２０および２５μＭ　ゾレドロン酸の間で効果の有意差は見られない。

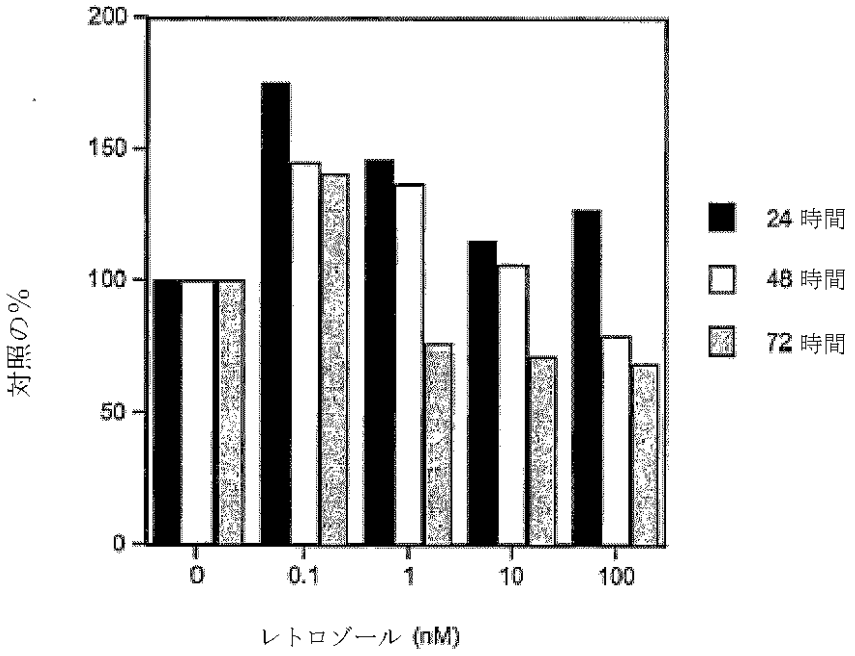
【００６６】

２)ＭＣＦ７Ｃａ細胞の増殖に対するレトロゾールの作用

ＭＣＦ７Ｃａ細胞を、漸増用量のレトロゾールに２４、４８および７２時間暴露する。２４時間および４８時間の時点で薬剤を除去し、細胞を無薬剤培地中７２時間までインキュベートする。細胞数を、コールター・カウンターを使用して計数する。

【００６７】

【表２】



細胞増殖に対するレトロゾールの効果は２相式であるように見える。細胞を０．１ｎＭレトロゾール(全時点)、１ｎＭ(２４および４８時間)で処置したとき細胞数の増加が計数される。１００ｎＭ　レトロゾールの存在下、７２時間インキュベーション後でさえ、

細胞増殖の阻害は中程度であり、対照と比較して細胞数の３１％減少がある。

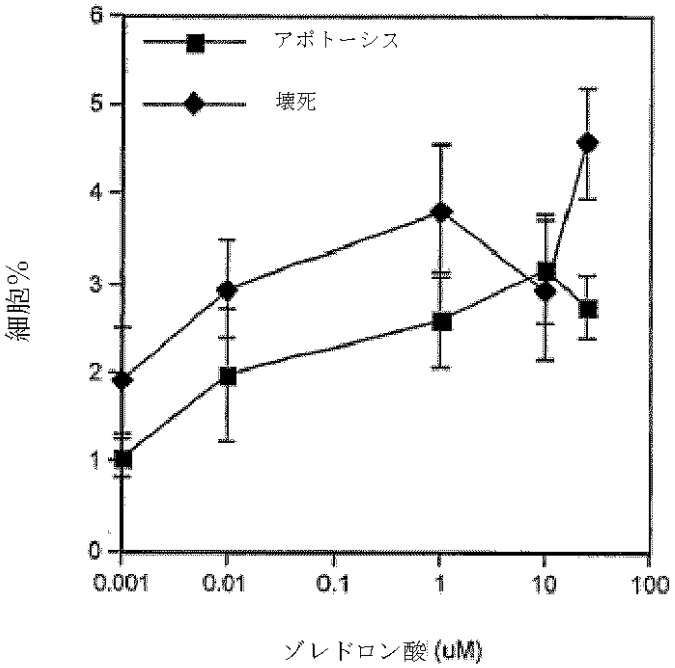
【００６８】

３)ＭＣＦ７Ｃａ細胞のアポトーシスおよび壊死に対するゾレドロン酸の効果

漸増用量のゾレドロン酸によりもたらされるアポトーシスおよび壊死を、細胞をゾレドロン酸に１時間暴露し、続いて無薬剤培地中で７２時間インキュベーションすることにより測定する。

【００６９】

【表３】



ＭＣＦ７Ｃａ細胞はゾレドロン酸に総体的に非感受性に見え、１００μＭに暴露後、３％未満のアポトーシス細胞が計数される。壊死細胞死のレベルも低く、最大で１００μＭに暴露後、４.５％である。

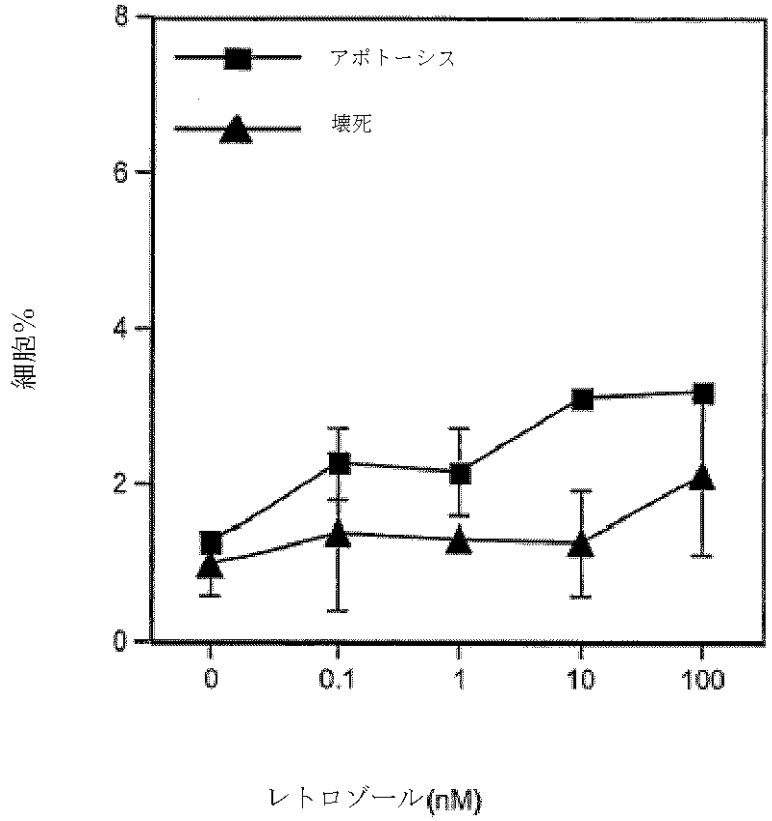
【００７０】

４)ＭＣＦ７Ｃａ細胞のアポトーシスおよび壊死に対するレトロゾールの効果

漸増用量のレトロゾールによりもたらされるアポトーシスおよび壊死を、細胞をレトロゾールに７２時間暴露後に測定する。

【００７１】

【表４】



培養物の壊死およびアポトーシス細胞死のレベルは低く、試験した最高用量(１００ｎＭ)で４％未満の壊死および３％未満のアポトーシスをもたらす。

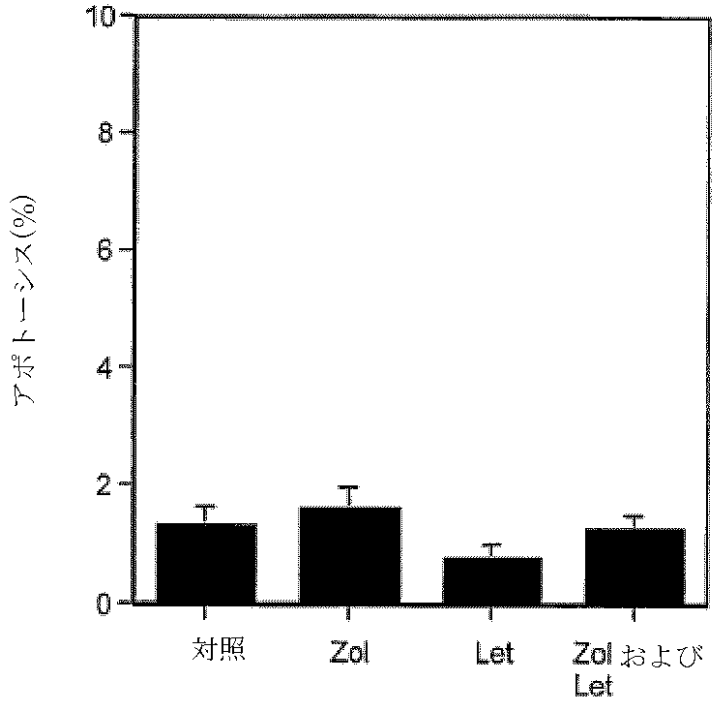
【００７２】

５)ＭＣＦ７Ｃａ細胞のアポトーシスに対するレトロゾールおよびゾレドロン酸を使用した組み合わせ処置の効果

細胞を１００ｎＭ　レトロゾールおよび１０μＭ　ゾレドロン酸の組み合わせで２４時間処置し、アポトーシス細胞死を、無薬剤培地でさらに４８時間インキュベーション後に測定する。

【００７３】

【表５】



この組み合わせ処置後、アポトーシスレベルに統計学的に有意な増加はない。

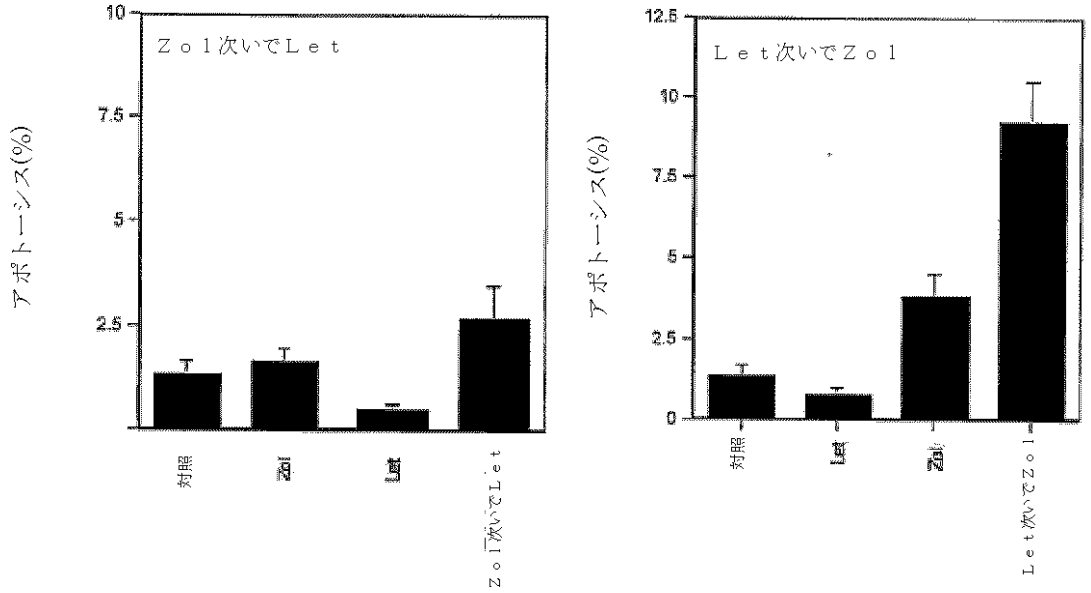
【００７４】

６)ＭＣＦ７Ｃａ細胞のアポトーシスに対するレトロゾールおよびゾレドロン酸を使用した連続的処置の効果

この一連の実験において、細胞を１０μＭ　ゾレドロン酸に２４時間暴露し、洗浄し、連続的に１００ｎＭ　レトロゾールで２４時間処置する。アポトーシス細胞死のレベルを、無薬剤培地でさらに２４時間インキュベーション後に測定する。

【００７５】

【表６】



細胞をゾレドロン酸、続いてレトロゾールで処置したとき、アポトーシス細胞死のレベルの有意な上昇は観察されない。細胞がゾレドロン酸の前にレトロゾールで暴露されるよ

うに順番を逆にしたとき、我々は、培養物中のアポトーシス細胞の数の有意な増加を観察する。

【００７６】

７)レトロゾール、続いてゾレドロン酸を使用した連続的処置によりもたらされるアポトーシスに対するゲラニルゲラニオール(ＧＧＯＨ)の効果

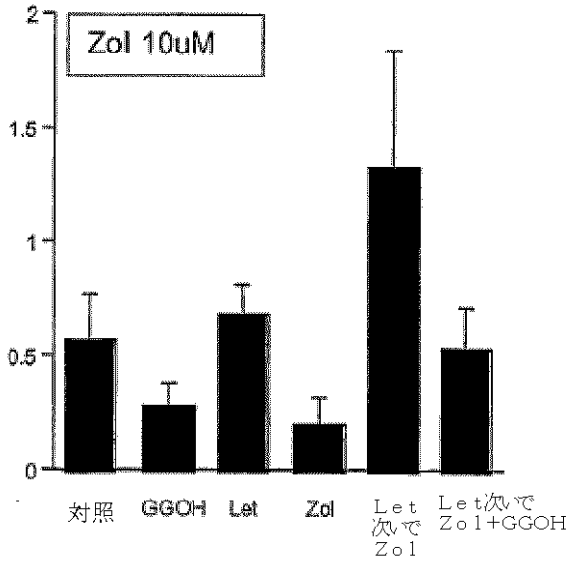
レトロゾールおよびゾレドロン酸での連続的処置後に観察されるアポトーシスの増加のどの程度までがゾレドロン酸によるものであるかを測定するために、細胞をゾレドロン酸と同時に添加する５０μＭ　ＧＧＯＨで処置する実験を行う。(ＧＧＯＨはメバロン酸経路の媒介物であり、この経路のゾレドロン酸阻害の逆転に一般的に使用される)。この一連の実験で、細胞を１００ｎＭ　レトロゾールで２４時間、続いて１時間１０μＭ　ゾレドロン酸＋５０μＭ　ＧＧＯＨで処置する。アポトーシスのレベルを、７２時間目に測定する。

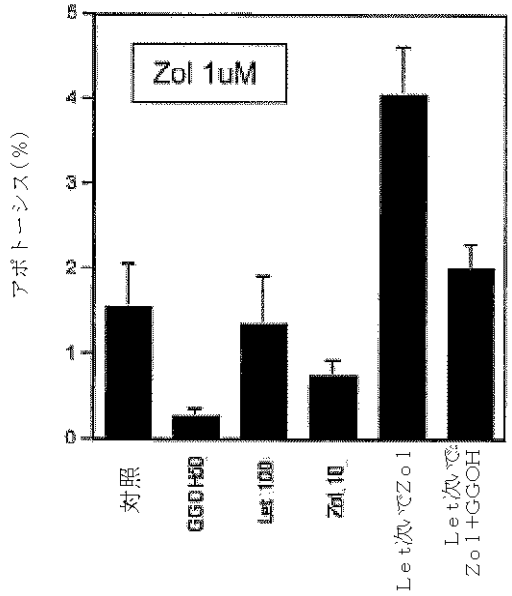
【００７７】

全グループとも、レトロゾール次いでゾレドロン酸(ｐ＜０.０５)より有意に低く、一方、レトロゾール次いでゾレドロン酸＋ＧＧＯＨのグループは、ｌｅｔ次いでｚｏｌグループより有意に低いアポトーシス(ｐ＝０.０５)のレベルを有する。

【００７８】

【表７】





ＧＧＯＨをゾレドロン酸と同時に添加することにより、培養物中のアポトーシスのレベルは、レトロゾール単独を使用したときに観察されるのと同じレベルまで減少する。これらの結果は、アポトーシス作用のほとんどがゾレドロン酸によるものであることを示唆する。

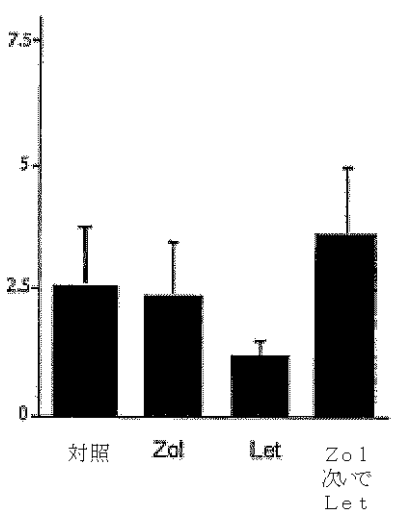
【００７９】

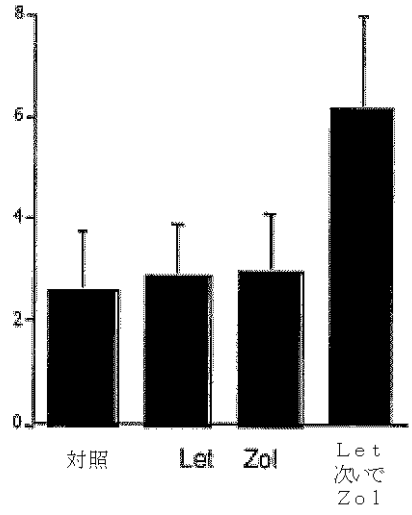
８)無血清培地中の連続的および組み合わせ処置の効果

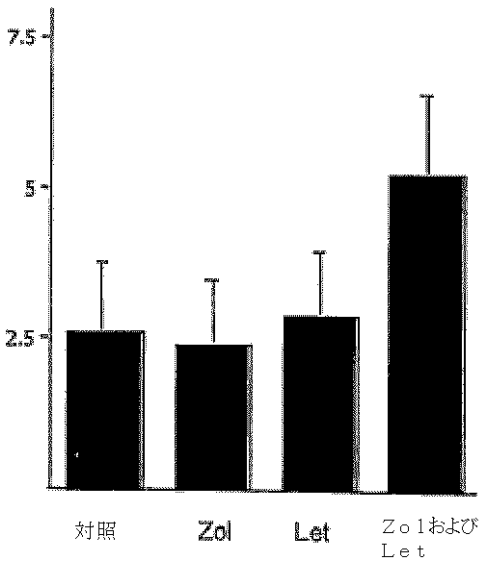
これらの実験は、ゾレドロン酸およびレトロゾールの作用が、細胞を、それらを無血清条件で処置することによる飢餓により影響するかを測定するために行う。

【００８０】

【表８】







細胞を無血清条件で処置したとき、最初にレトロゾール、続いてゾレドロン酸で処置した細胞で、アポトーシス細胞死の統計学的に有意な相乗的増加が観察される。

【００８１】

結論：

ゾレドロン酸およびレトロゾールは、ＭＣＦ７Ｃａを独立して各薬剤で処置したとき、有意なレベルのアポトーシス細胞死を誘発しない。

【００８２】

アポトーシスの相乗的誘導が可能であるが、薬剤順依存性である。ゾレドロン酸のレトロゾールの前または同時の投与は、２．６９％および１．２７％アポトーシスを各々誘発し、一方‘レトロゾール次いでゾレドロン酸’で処置した細胞は、９．２１％アポトーシスを誘発する(ｐ＜０．０５、各薬剤単独と比較)。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/013728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/663 A61K31/337 A61K31/4196 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	ALGUR E ET AL: "Synergistic cytotoxic effects of zoledronic acid and radiation in human prostate cancer and myeloma cell lines" INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION: ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS, PERGAMON PRESS, US, vol. 61, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 535-542, XP004749602 ISSN: 0360-3016 page 539, column 2, paragraph 1 -/--	1-5, 7-11,15, 16, 19-21, 23-26

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 September 2005	26 10. 2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Skjöldebrand, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/013728

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/035081 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; GREEN, JONATHAN; LIPTON, ALLAN; WIT) 1 May 2003 (2003-05-01) the whole document	1-5, 7-11,15, 16, 19-21, 23-26
X	JAGDEV S P ET AL: "THE BISPHOSPHONATE, ZOLEDRONIC ACID, INDUCES APOPTOSIS OF BREAST CANCER CELLS: EVIDENCE FOR SYNERGY WITH PACLITAXEL" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 8, no. 84, 2001, pages 1126-1134, XP008001603 ISSN: 0007-0920 abstract	1-5, 7-11,15, 16, 19-21, 23-26
P,X	WO 2004/012728 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; BHATNAGAR, AJAY, S; EVANS, DEAN, BR) 12 February 2004 (2004-02-12) the whole document	1-5, 7-10,12, 15,17, 19-21, 23-26
X	KOKUFU I ET AL: "'A case of effective bisphosphonate therapy of sequential pamidronate and incadronate for bone metastases from breast cancer!" GAN TO KAGAKU RYOHO. CANCER & CHEMOTHERAPY. AUG 2000, vol. 27, no. 9, August 2000 (2000-08), pages 1425-1428, XP002345936 ISSN: 0385-0684 abstract	1-5, 7-10,12, 15,17, 19-21, 23-26
X	HARVEY H A: "ISSUES CONCERNING THE ROLE OF CHEMOTHERAPY AND HORMONAL THERAPY OF BONE METASTASES FROM BREAST CARCINOMA" CANCER, AMERICAN CANCER SOCIETY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 80, no. 8, SUPPL, 1997, pages 1646-1651, XP000929334 ISSN: 0008-543X abstract	1-5, 7-10,12, 15,17, 19-21, 23-26
X	HARVEY H A: "Therapeutic use of bisphosphonates in breast cancer: Studies with zoledronic acid" AMERICAN JOURNAL OF CANCER 2003 NEW ZEALAND, vol. 2, no. SUPPL., 2003, pages 19-25, XP009054127 ISSN: 1175-6357 abstract	1-5, 7-10,12, 15,17, 19-21, 23-26

-/—

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/013728

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FREYER G ET AL: "Palliative hormone therapy, low dose chemotherapy and bisphosphonate in breast cancer patients with bone marrow involvement and pancytopenia; report of pilot experience" EUROPEAN JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, ELSEVIER, AMSTERDAM,, NL, vol. 11, 2000, pages 329-333, XP002257266 ISSN: 0953-6205 abstract	1-5, 7-10,12, 15,17, 19-21, 23-26
X	NEVILLE-WEBBE HL, EVANS CA, COLEMAN RE, HOLEN I: "THE COMBINATION OF ZOLEDRONIC ACID (ZOL) AND TRAIL (TUMOR NECROSIS FACTOR RELATED APOPTOSIS INDUCING LIGAND) HAS POTENTIAL SYNERGISTIC ACTION IN BREAST CANCER CELLS (BCC)" CLINICAL ONCOLOGY, vol. 15, September 2003 (2003-09), pages S28-S29, XP009054117 abstract	1-4,6, 13-15, 18-20, 22-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/013728

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 7-17 and 21-25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [X] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2004/013728

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5, 7-11, 15-16, 19-21, 23-26 (in part)

Taxol and a bisphosphonate for sequential use in the treatment of malignancies.

---

2. claims: 1-5, 7-10, 12, 15, 17, 19-21, 23-26 (in part)

An aromatase inhibitor and a bisphosphonate for sequential use in the treatment of malignancies.

---

3. claims: 1-4, 6, 13-15, 18-20, 22-26 (in part)

TRAIL and a bisphosphonate for sequential use in the treatment of malignancies.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/013728

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03035081 A	01-05-2003	BR 0213410 A	03-11-2004
		CA 2461085 A1	01-05-2003
		EP 1443942 A1	11-08-2004
		HU 0402061 A2	28-02-2005
		JP 2005506371 T	03-03-2005
		NO 20042056 A	18-05-2004
WO 2004012728 A	12-02-2004	AU 2003250190 A1	23-02-2004
		BR 0313081 A	12-07-2005
		CA 2494345 A1	12-02-2004
		EP 1534265 A1	01-06-2005

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00　１０５	
		Ａ６１Ｐ	43/00　１２１	

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

(72)発明者　イングン・ホレン
英国エス３５・０エイチエイ、シェフィールド、オーティブリッジ、ラングセット・ロード・サウス１４０番
(72)発明者　ヘレン・ネビルーウェブ
英国エス１０・３ピージー、シェフィールド、フルウッド、トム・レイン１５４番
(72)発明者　キャサリン・アリソン・エバンズ
英国エス１７・３ピーディ、シェフィールド、ドア、アビーデイル・パーク・ライズ４２番

Ｆターム(参考)　4C084 AA23 MA02 NA05 ZB21 ZB26
4C086 AA01 AA02 BA02 BC60 DA34 MA03 MA04 NA05 ZB21 ZB26
ZC75