

(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2009-539970  
(P2009-539970A)

(43) 公表日 平成21年11月19日(2009.11.19)

(51) Int.Cl.

**A61K 31/7048 (2006.01)**  
**A61P 35/00 (2006.01)**

F 1

A 61 K 31/7048  
A 61 P 35/00

テーマコード(参考)

4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2009-514986 (P2009-514986)  
 (86) (22) 出願日 平成19年6月12日 (2007.6.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年2月5日 (2009.2.5)  
 (86) 國際出願番号 PCT/IL2007/000706  
 (87) 國際公開番号 WO2007/144876  
 (87) 國際公開日 平成19年12月21日 (2007.12.21)  
 (31) 優先権主張番号 60/812,605  
 (32) 優先日 平成18年6月12日 (2006.6.12)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 508364783  
 ラモット アット テルーアビブ ユニバ  
 ーシティー リミテッド  
 イスラエル国 テルアビブ 69975,  
 ラマトーアビブ, ハイムレバノンストリー  
 ト 32  
 (74) 代理人 100096024  
 弁理士 柏原 三枝子  
 (74) 代理人 100125520  
 弁理士 高橋 剛一  
 (74) 代理人 100155310  
 弁理士 柴田 雅仁  
 (74) 代理人 100156339  
 弁理士 米村 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌の治療方法

## (57) 【要約】

結腸直腸癌、類腱腫、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択される癌の治療又は予防のための医薬の製造に用いるマクロライド抗生物質の使用であって、当該抗生物質が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上である。また、上記の癌の治療又は予防する薬学的組成物、及び上記癌の治療又は予防する方法、ほ乳類において突然変異 A P C 遺伝子を発現する癌を治療又は予防する方法を提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

結腸直腸癌、類腱腫、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択される癌の治療又は予防のための医薬製造のためのマクロライド抗生物質の使用において、マクロライド抗生物質が、  
 タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及び  
 スピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体の、1又はそれ以上であることを特徴とする、マクロライド抗生物質の使用。

## 【請求項 2】

10  
 結腸直腸癌、類腱腫、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択される癌の治療又は予防のための薬学的組成物であって、活性成分として治療上有効量の：  
 タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及び  
 スピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上のマクロライド抗生物質と、薬学的に許容し得るキャリアとを含むことを特徴とする、薬学的組成物。

## 【請求項 3】

20  
 突然変異 A P C 遺伝子を発現する癌の治療又は予防のために医薬製造するためのマクロライド抗生物質の使用において、マクロライド抗生物質が、  
 タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及び  
 スピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上であることを特徴とするマクロライド抗生物質の使用。

## 【請求項 4】

前記癌が、結腸直腸癌、類腱腫、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択されることを特徴とする、請求項 3 の使用。

## 【請求項 5】

30  
 前記マクロライド抗生物質が、タイロシン又はタイロシン酒石酸塩であることを特徴とする、請求項 1 又は 3 に記載の使用。

## 【請求項 6】

前記マクロライド抗生物質が、タイロシン又はタイロシン酒石酸塩であることを特徴とする、請求項 2 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 7】

ほ乳類の結腸直腸癌、類腱腫、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択される癌を治療又は予防する方法であって、

40  
 タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及び  
 スピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体の1又はそれ以上の治療上有効量のマクロライド抗生物質を前記ほ乳類に投与し、それにより前記癌を治療又は予防するステップを含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 8】

突然変異 A P C 遺伝子を発現するほ乳類における癌を治療又は予防する方法において、当該方法が：

タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；  
 オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及び

10

20

30

40

50

スピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；の1又はそれ以上の治療上有効量のマクロライド抗生物質をほ乳類に投与するステップを含むことを特徴とする方法。

#### 【請求項9】

A P C 遺伝子内の中途終止突然変異を抑制することによりほ乳類における癌を治療又は抑制する方法において、

タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；

エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；

オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及び

スピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；の1又はそれ以上の治療上有効量のマクロライド抗生物質をほ乳類に投与し；それによりA P C 遺伝子内の中途終止突然変異を抑制するステップを含むことを特徴とする方法。 10

#### 【請求項10】

前記癌が、結腸直腸癌、類腱腫、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択されることを特徴とする、請求項8又は9に記載の方法。

#### 【請求項11】

前記マクロライド抗生物質が、タイロシン又はタイロシン酒石酸塩であることを特徴とする、請求項7乃至9のいずれか1項に記載の方法。 20

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0001】

本発明は、癌の治療方法に関し、具体的には、結腸直腸癌、類腱腫、膀胱癌、胃癌、及び乳癌の治療方法に関する。 20

##### 【背景技術】

##### 【0002】

結腸直腸癌（C R C）は、大腸の癌であり、男性、女性ともに第三番目に多く、全癌の13%を示す。患者の約20%が、診断時に転移性疾患であり、全結腸直腸癌患者の約50%が転移に発展し、最後はこれらの疾患のため死亡する。米国だけで約131,000人が結腸直腸癌と診断され、56,000人が毎年死亡するようである。母集団における生涯のC R Cリスクは5%であるが、この数は年齢とともに劇的に上昇する。つまり70歳では西欧人の約半数にアデノーマ（腺腫）に発現する。全C R C例の85%近くが、起源が散発性（体細胞性C R C）であり、それ以外は、受け継いだ遺伝性変異（「遺伝性C R C」）の結果生じたものである。 30

##### 【0003】

結腸直腸癌は、アデノーマ（腺腫）から発生し、結腸直腸の異形性であるが、非悪性前駆病変である。カルシノーマ（細胞腫）への進行は、多くの体細胞変異を経て起こり、最終的には、悪性に形質転換し、浸潤性癌が形成される。C R Cへの進行で変異する最も重要な遺伝子は、腺腫性結腸ポリープ症（A P C）抑制遺伝子である。A P C変異は、アデノカルシノーマ配列の極めて最初に検出されるので、これは、A P Cタンパク質は結腸直腸癌発癌の門番として働くことを示唆しており、A P Cの機能喪失は、将来悪性腫瘍へ進行することと大変密接に関連していることを意味している。全ての散発性、遺伝性結腸直腸癌の約85%がA P C機能を喪失している。遺伝性、体細胞性結腸直腸癌におけるそれらの役割に加えて、A P Cにおける変異は、類腱腫（進行性線維腫症）（非特許文献9）、膀胱癌（非特許文献10）、胃癌（非特許文献11）及び乳癌（非特許文献12）などのその他のタイプの癌でも示されている。 40

##### 【0004】

A P Cは、多くの十分に特徴づけられた機能ドメインをもち、多くの他のタンパク質と相互作用をする大きなタンパク質（312 k D a）である。しかしながら、腫瘍化における決定的な役割は、W n tシグナル経路の負の制御因子として働く、-カテーニンの細胞内濃度の調整にあると思われる。A P Cが変異すると、W n tシグナル経路のエフェク 50

ターランパク質である - カテニンが蓄積し、核へ移動する。これが T c f / L E F 転写因子へ結合すると、広く様々な遺伝子の転写が開始する。 - カテニンの転写活性化ターゲットの下流は、サイクリン ( C y c l i n ) D 1 及び癌遺伝子 c - m y c を含む結腸直腸癌の発生と進行に関する多くの遺伝子を含んでいる。 W n t シグナル経路におけるその役割に加えて、 A P C 機能の喪失は、 A P C 欠損癌細胞において細胞間接着性に混乱を生じる。

#### 【 0 0 0 5 】

C R C における A P C 突然変異の大部分 ( 9 5 % ) は、ナンセンス変異又はフレームシフト変異であり、異常機能をもつ短縮タンパク質が生じる。 A P C 変異部位は、通常は、ランダムではなく、 A P C 短縮突然変異のために十分に特徴づけられたホットスポットがある。

10

#### 【 0 0 0 6 】

C R C におけるように、他のヒトの遺伝性疾患の多数が、変異遺伝子によりコード化されたタンパク合成の中途終了による変異により生じ、このような疾病を治療する1つの方法は、野生型の複製で変異遺伝子を補うことであろう。

#### 【 0 0 0 7 】

数年間にわたり、アミノグリコシド系抗生物質が、終止コドンの代わりにアミノ酸の取り込みを可能とすることにより疾病に付随する中途終止変異を抑制できることは公知となつてあり、このようにして、転写の正常終末まで翻訳が続くことを可能にしている。最近の研究は、アミノグリコシド類が機能性タンパク質の生理的に関連ある量を回復するレベルに、 in v i t r o 及び in v i v o 共に、ほ乳類の転写における中途終止変異を抑制できることを示した（非特許文献 1 ~ 5 ）。このアプローチの有用性は、常染色体性の劣勢疾病である囊胞性線維症 ( C F ) 及びナンセンス変異をもつデュシェンヌ型筋ジストロフィ ( D M D ) 患者で以前に明らかにされた。 C F 及び D M D ともに全例の 5 ~ 1 0 % のみが、コード配列におけるナンセンス変異に起因している。結腸直腸癌患者での比較においては、 A P C 遺伝子における中途終止コドンは、全例の約 8 5 % で見出されている（非特許文献 6 ）。しかしながら、機能性のある A P C タンパク質を欠く細胞に全長の A P C タンパク質の回復を目的とした研究は、今まで行われていない。

20

#### 【 0 0 0 8 】

ゲンタミシンなどのアミノグリコシド類は、重要な用量規定毒性があり、静脈内投与を要するので、それらを癌の長期治療とする魅力はない。

30

#### 【 0 0 0 9 】

終止コドン突然変異を抑制するアプローチは、重要な遺伝子（例えば、 A P T R 欠損、抗トロンビン III 、酸スフィンゴミエリン ( a c i d s p i n g u m y e l i a s ) 、ヘイリ - ヘイリ病を患っている患者については非特許文献 8 で総説されている。）の終止コドン突然変異により生じた疾病を患っている他の患者にとっては、有益になるはずである。

#### 【 0 0 1 0 】

近年、マクロライド系抗生物質が 5 0 S リボソームサブユニットを標的とし、原核生物系における終止コドンの読み過ごし（リードスル）を誘導することが示された（非特許文献 7 ）。特許文献 1 及び 2 は、ある種のマクロライド抗生物質を用いた癌治療方法に関する。

40

#### 【 0 0 1 1 】

以下は、先行技術のリストであり、これらは、本発明の分野における技術状態を記載に関連あると考えられている。本明細書におけるこれらの文献の確認は、以下のリストの括弧内の数字により指摘される。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 1 2 】

#### 【 特許文献 1 】米国特許第 5 , 3 2 4 , 7 2 0 号

50

【特許文献2】米国特許出願公開公報第US Publication No. 2005 / 0171032号

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Bedwell, D. M. 等(1997). Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat. Med.* 3 : 1280 - 1284.

【非特許文献2】Wilschanski, M., Yahav, Y., Yaacov, Y., Blau, H., Bentur, L., Rivlin, J., Aviram, M., Bdolah-Abram, T., Bebok, Z., Shushi, L., Kerem, B., 及びKerem, E. (2003). Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N. Engl. J. Med.* 348 : 1433 - 1441. 10

【非特許文献3】Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E. 及びSweeney, H. L. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* 104 : 375 - 38. 20

【非特許文献4】Politano, L., Nigro, G., Mgro, V., Pilloso, G., Papparella, S., Paciello, O., 及びComi, L. I. (2003). Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon: Preliminary results. *Acta Myol.* 24 : 15 - 21. 30

【非特許文献5】Kerem, E. (2004). Pharmacologic therapy for stop mutations: how much CFTR activity is enough? *Curr. Opin. Puim. Med.* 6 : 547 - 52.

【非特許文献6】Laurent-Puig, P., Beroud, C., 及びSoussi, T (1998). APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Research*, 26 : 269 - 270. 30

【非特許文献7】Thompson, J., Pratt, C. A., 及びDahlberg, A. E. (2004). Effects of a number of classes of 50S inhibitors on stop codon readthrough during protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother* 48 : 4889 - 4891. 40

【非特許文献8】Atkinson, J 及びMartin, R. (1994). Mutations to nonsense codons in human genetic disease: implications for gene therapy by nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Res.* 22 : 1327 - 1334.

【非特許文献9】Alman, B. A., Li, C., Pajerski, M. E., Diaz-Cano, S. 及びWolfe, H. J. (1997). Increased beta-catenin protein and somatic APC mutations in sporadic aggressive fibromatoses (desmoid tumors). *Am. J. Pathol.* 151 : 329 50

- 3 3 4 .

【非特許文献 10】Bohm, M., Kirch, H., Otto, T., Rubben, H. 及び Wieland, I. (1997). Deletion analysis at the DEL-27, APC and MTS1 loci in bladder cancer: LOH at the DEL-27 locus on 5p13-12 is a prognostic marker of tumor progression, hit. J. Cancer 74: 291-295.

【非特許文献 11】Oh, S. T., Yoo, N.J. 及び Lee, J. Y. (1999). Frequent somatic mutations for the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. Cancer Res. 59: 4257-4260. 10

【非特許文献 12】Willis, J. C. 等(2002). "Hot spots" can burn you, Am. J. Gastroenterology 97(3): 757-758.

【非特許文献 13】Fearnhead 等(2001). The ABC of APC. Hum. Mol. Genet. 10: 721-723.

【非特許文献 14】Crabtree 等(2003). Oncogene 22: 4257-4265. 17. Albuquerque 等(2002). Hum. Mol. Genet. 11: 1549-1560.

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0014】

本発明は、結腸直腸癌、類線維腫 (desmoid tumor)、膀胱癌、胃癌、乳癌から選択される癌の治療又は予防の医薬の製造のためのマクロライド抗生物質の使用に関し、そのマクロライド系構成物質が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上である。

#### 【0015】

本発明は、さらに、結腸直腸癌、結腸直腸癌、類線維腫 (desmoid tumor)、膀胱癌、胃癌、乳癌から選択される癌の治療又は予防のための薬学的組成物に関し、前記組成物は、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上の治療上有効量のマクロライド抗生物質を活性成分として；及び薬学的に許容できるキャリアを含む。 30

#### 【0016】

本発明は、さらに、突然変異 APC (腺腫性結腸ポリープ症) 遺伝子を発現する癌の治療又は予防の医薬の製造のためのマクロライド抗生物質の使用に関し、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上のマクロライド抗生物質を含む。 40

#### 【0017】

本発明は、ほ乳類の結腸直腸癌、類線維腫 (desmoid tumor)、膀胱癌、胃癌、乳癌から選択される癌の治療又は予防方法に関し、この方法が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上のである治療上有効量のマクロライド抗生物質をほ乳類に投与するステップ；それにより、 50

前記癌の治療又は予防をするステップを含む。

【0018】

本発明は、さらに、ほ乳類における突然変異A P C遺伝子を発現する癌を治療又は予防する方法に関し、その方法が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上である治療上有効量のマクロライド抗生物質をほ乳類に投与するステップを含む。

【0019】

さらに、本発明は、A P C遺伝子内の中途終止変異を抑制することにより、ほ乳類において癌を治療又は予防する方法に関し、この方法が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上の治療上有効量のマクロライド抗生物質をほ乳類に投与するステップを含み、それにより前記A P C遺伝子内の中途終止変異を抑制する。

10

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、A P C遺伝子における体細胞及び生殖細胞の突然変異のスペクトルを示す図である。コドン番号によるA P C遺伝子の体細胞（n = 829）及び生殖細胞（n = 915）突然変異の分布。データは、Thierry Soussi (1998)、A P C遺伝子：ヒト腫瘍及び培養細胞株における精力細胞及び体細胞突然変異のデータベースから得た。Nucleic Acids Research 26 (1) : 269 - 270。

20

【図2A】図2Aは、タイロシン誘導突然変異A P C終止コドン読み過ごしを示す図ある（A）。特定のA P C終止突然変異を読み過ごしする化合物をスクリーニングするために構築されたレポータプラスミドのスキームである。

【図2B】図2Bは、この構築物を用いて得られた結果を示す図であり、タイロシンが、A P Cホットスポット1061において、エリスロマイシンに比べて高レベルの読み過ごしを誘導することを示す。

30

【図2C】図2Cは、この構築物を用いて得られた結果を示す図であり、タイロシンが、A P Cホットスポット1554において、スピラマイシンに比べて高い読み過ごしレベルを誘導することを示す。

【図2D】図2Dは、この構築物を用いて得られた結果を示す図であり、タイロシンが、A P Cホットスポット1450において、ゲンタミシンに比べて高い読み過ごしレベルを誘導することを示す。

【図3】図3は、タイロシンが、-カテニン/Tcfシグナリングを下方制御することを示す図である。対照又はタイロシン治療CX-1細胞は、pTOPFLASHを用いてトランسفェクトした。細胞は、トランسفェクト48時間後に採取し、ルシフェラーーゼ量を測定した。

40

【図4】図4は、タイロシン治療が、細胞の腫瘍形成能を抑制することを示す図である。5週齢ヌードマウスにHT-29 CRC細胞を注入した。注入2日後、0.4 μg / mlのタイロシンを治療群マウスの飲料水に加えた。この水は、2日毎に取り替えた。図4A～Dは、注入10日後で、タイロシン治療マウス（B、D）の腫瘍サイズは、対照群（A、C）のものに比べて小さいことを示す。図4Eはマウスを16日後に犠牲死させ、腫瘍を切りだし、秤量し、対照及びタイロシン治療マウスの平均腫瘍塊をグラム（g）で示すグラフである。

【図5】図5は、タイロシン治療が、腫瘍の組織学的特性が変化することを示す図である。腫瘍を対照及びタイロシン治療マウスから取り出し、腫瘍を固定した後、ヘマトキシリノ・エオシン染色剤（H & E）で染色したことを示す図である（図5A～図5F）。タイ

50

ロシン治療は、血液供給に影響を与えることなく腫瘍壊死させたことを示す（血管を矢印で示した）。3匹の異なるタイロシン治療マウス（図5D～図5F）と3匹の異なる対照マウス（図5A～図5C）の腫瘍の横断切片を示す。

【図6】図6は、タイロシン治療は、全長APCを発現させる図である。対照（「NT」）及びタイロシン治療（0.8mg/ml、0.4mg/ml）マウスから腫瘍を取り出した。腫瘍を溶解し、その物質を抗APC抗体で探査した。HCT116細胞は、サイズマーカとして役立つ野生型APCタンパク質を保有する。タイロシン処置では、全長APCが発現し、タイロシン濃度の上昇につれて、全長タンパク質の発現は増加した。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0021】

本発明は、タイロシン、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、スピラマイシン、ゲンタミシンのマクロライド系抗生物質の員が、APC遺伝子の中途終止コドン突然変異の読み過ごしを誘導できることの発見に基づく。

##### 【0022】

本発明者は、マクロライド抗生物質が、APC遺伝子の中途終止コドンの癌の原因となるホットスポットの読み過ごしをもたらし得る化合物として臨床使用できることを、今回見いだした。

##### 【0023】

本発明者らは、マクロライド類が、APCにおける癌を引き起こす中途終止コドン突然変異を読み過ごすことができるか否かを検討した。マクロライド系抗生物質の一員であるタイロシン、及びさらなるマクロライド化合物（エリスロマイシン、スピラマイシンなど）は、APC遺伝子の中途終止コドンの読み過ごしを誘導することを示す証拠を本明細書で提示する。本発見は、APCに対し終止コドン抑制遺伝子の効果を最大にし、副作用を最少にする臨床適用性を有する。

##### 【0024】

APC遺伝子内の中途終止突然変異を抑制する臨床上有用な方法を確認することは、CRCをもつ患者及び変異したAPCを発現する様々なタイプの癌を患う他の患者に利益がある。例えば、APC突然変異は、類線維腫（desmoid tumor）、膀胱癌、胃癌及び乳癌などの他の癌種においても見られる。

##### 【0025】

したがって、本発明の1つの態様によれば、結腸直腸癌、類線維腫（desmoid tumor）、膀胱癌、胃癌及び乳癌から選択される癌の治療又は予防のための医薬の製造用のマクロライド抗生物質の使用を提供し、マクロライド抗生物質は、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体の1又はそれ以上である。

##### 【0026】

本発明の別の態様によれば、結腸直腸癌、類線維腫（desmoid tumor）、膀胱癌、胃癌、乳癌から選択される癌の治療又は予防のための薬学的組成物を提供するものであって、この組成物は、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上の治療上有効量のマクロライド抗生物質を活性成分として、及び及び薬学的に許容できるキャリアを含む。

##### 【0027】

本発明のさらなる別の態様によれば、突然変異APC遺伝子を発現する癌の治療又は予防の医薬を製造するためのマクロライド抗生物質の使用を提供することにおいて、そのマクロライド系抗生物質が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬

10

20

30

40

50

学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上である。

## 【0028】

好みしい態様によれば、前記癌は、結腸直腸癌、類線維腫（desmoid tumor）、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択される。

## 【0029】

好みしくは、マクロライド抗生物質は、タイロシン又はタイロシン酒石酸塩である。

## 【0030】

本発明のさらなる態様によれば、ヒトの結腸直腸癌、類線維腫（desmoid tumor）、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択される癌を治療又は予防する方法が提供されており、その方法が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体であって、それにより前記癌を治療又は予防できる、1又はそれ以上の治療上有効量のマクロライドをほ乳類に投与するステップを含む。10

## 【0031】

本発明のさらなる態様によれば、ほ乳類において突然変異したAPC遺伝子を発現する癌を、治療又は予防する方法が提供されており、その方法が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体、の1又はそれ以上の治療上有効量のマクロライド抗生物質をほ乳類に投与するステップ、を含む。20

## 【0032】

本発明のさらなる態様によれば、APC遺伝子内の中途終止突然変異の抑制により、ほ乳類の癌を治療又は予防する方法が提供されており、この方法が、タイロシン、薬学的に許容できるその塩、その誘導体；エリスロマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；オレアンドマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；及びスピラマイシン、薬学的に許容できるその塩、及びその誘導体；の1又はそれ以上のマクロライド抗生物質をほ乳類に投与し、それによりAPC遺伝子内で中途突然変異を抑制するステップを含む。30

## 【0033】

本発明の好みしい態様によれば、前記癌は、結腸直腸癌、類線維腫（desmoid tumor）、膀胱癌、胃癌、及び乳癌から選択される。

## 【0034】

好みしくは、マクロライド抗生物質は、タイロシン又はタイロシン酒石酸塩である。

## 【0035】

マクロライド抗生物質は、単一の活性薬剤（即ち、単一のマクロライド抗生物質）又は2以上の活性薬剤の併用であり得る。

## 【0036】

本明細書で用いた用語「医薬」は、薬学的組成物を指す。具体的には、本発明に記載した少なくとも1つのマクロライド抗生物質が適切な薬学的に許容できるキャリア（例えば、賦形剤又は希釈剤）中に含まれている薬学的組成物を指し、様々な投与経路を要する様々な製剤をも指す。例えば、前記医薬は、経口投与用に製剤化でき、又は非経口投与用又は直腸投与用に製剤化できる。40

## 【0037】

本明細書で開示した薬学的組成物の活性成分は、少なくとも1つのマクロライド抗生物質、即ち、単一の活性薬剤（マクロライド抗生物質）、又は2又はそれ以上の活性薬剤を含む。

## 【0038】

本明細書で用いたように、用語「ほ乳類」は、哺乳類綱のいずれかの員を指し、ヒトを

含む。好ましくは本明細書の哺乳類は、ヒトである。

【0039】

本明細書で用いた、疾病又は疾患（結腸直腸癌、結腸直腸アデノーマとアデノカルシノーマ、類腫瘍、膀胱癌、胃癌、乳癌、上記の癌種の1つを伴うアデノーマとアデノカルシノーマ）の症状又は特性を「治療」又は「治療する」の用語は、次の1又はそれ以上のいずれかを含む：（1）疾病的予防、即ち、疾病にさらされるか、又は疾病になりやすい（例えば、体細胞又は生殖細胞での突然変異APC遺伝子を発現するほ乳類、又は疾病的家族歴を示すほ乳類）が、まだ疾病に罹患せず、症状や兆候が現れていないほ乳類を、臨床症状や兆候を進展させないようにすること；（2）疾病を阻止すること、即ち、疾病又は臨床症状又は兆候の進行を止めるか又は減少させること；（3）疾病を軽減すること、即ち、疾病又はその臨床症状、又はその兆候を部分的に又は完全に取り除くこと；（4）異なる臨床症状や兆候を包含する上記（1）、（2）又は（3）の組み合わせ。本明細書で用いた用語「治療する」又は「治療」は、根絶、除去、改善、又は原発、局所、若しくは転移癌組織の抑制；癌（結腸直腸癌など）の拡大（転移）の最小化又は遅延を含む。

10

【0040】

本明細書で用いたように、用語「予防する」又は「予防」は、患者における癌の再発、拡大、又は発症を含む。

【0041】

用語「予防する」又は「予防」は、上記で指摘したいずれの癌種にも関連するアデノーマ（腺腫）、及びアデノカルシノーマ（腺癌）の予防も含む。

20

【0042】

本発明の癌の治療又は予防は、中途終止突然変異を抑制するメカニズムに関与することができる。中途終止コドンは、短縮された（変異）タンパク質を生じる。

【0043】

本明細書で用いたように、用語「抑制」又は「抑制する」は、中途突然変異又は中途終止コドンに関連して用いるときは、突然変異対立遺伝子に存在するが、野生型遺伝子には存在しない終止コドンの読み過ごしのプロセスを意味する（例えば、APC遺伝子（Seq. ID. NO : 2））。

【0044】

本明細書で用いたように、用語「読み過ごし」は、翻訳経過に関連して使われるときは、「センス」コドン（即ち、アミノ酸をコードするコドン）として終止コドン（「ナンセンス」コドン）を読むこと、又は前記終止コドンを回避することを意味する。

30

【0045】

本明細書で用いたように、用語「中途」は、終止コドンとの関連で用いるときは、体細胞性、生殖細胞系列、又は散発性の変異（例えば、フレームシフト又はナンセンス変異）の結果、DNA（mRNA）鎖において生じるが、野生型DNA（mRNA）鎖には存在しない終止コドンを意味する。

【0046】

「治療上有効量」は、疾病（例えば、結腸直腸癌、結腸直腸アデノーマ（腺腫）、アデノカルシノーマ（腺癌））の治療のためにほ乳類へ投与したときに、疾病的部分的又は全体的治療又は予防に十分な効果のある化合物（本発明で記載したマクロライド抗生物質）の量を意味する。本明細書で用いたように、「治療上有効量」は、原発、局所、又は転移癌細胞又は組織を破壊、改善、抑制、又は取り除く；癌の拡散を遅延させるか又は最少にする；又は癌の治療又は取り扱いにおいて治療上の利点を提供するに十分な本発明の化合物の量も含む。「治療上有効量」は、癌細胞死をもたらすに十分な本発明の化合物の量も含む。

40

【0047】

「治療上有効量」は、さらに、APC遺伝子における中途終止突然変異の読み過ごしを誘導するに十分な本発明のマクロライド抗生物質の量をも含む。

【0048】

50

「治療上有効量」は、さらに、A P C 遺伝子内で中途終止突然変異の抑制に十分なマクロライド抗生物質の量をも含む。

【0049】

「治療上有効量」は、化合物、治療されるほ乳類の、疾病及びその状態又は重篤度、年齢、体重、他の医学的状態、などにより変動する。「治療上有効量」は、1又はそれ以上の過去に行った又は同時に行われる内科的、外科的又は放射線治療の介入により変動し得る。

【0050】

本明細書で用いたように、用語「薬学的に許容できる塩」は、毒性のない有機又は無機酸の1又はそれ以上の分子と本発明の化合物との反応生成物を意味する。適当な塩を形成する例示的な無機酸には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、およびリン酸、ならびにオルトリン酸一水素ナトリウムおよび硫酸水素カリウムなどの酸金属塩が含まれる。適当な塩を形成する実例となる有機酸には、モノ、ジ、およびトリカルボン酸が含まれる。このような酸の例は、例えば、酢酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、ケイ皮酸、サリチル酸、メタンスルホン酸、およびエタンスルホン酸である。

10

【0051】

例えば、「タイロシン、又はその誘導体」；「エリスロマイシン、又はその誘導体」；「オレアンドマイシン、又はその誘導体」；及び「スピラマイシン、又はその誘導体」などに用いた用語「誘導体」は、親化合物から得た化学的に修飾された化合物を意味する。これは、「治療する」又は「予防する」の用語で定義した親化合物と同じ又は近似する生物学的特性／活性（例えば、腫瘍サイズ、腫瘍塊の減少、A P C 遺伝子の中途終止コドンの読み過ごしの誘導）などを、この誘導体が有するように、（誘導体は、）置換基及び／又は／又は官能基が、1又はそれ以上の要素だけ、親化合物（例えば、タイロシン、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、スピラマイシン）と異なっている。

20

【0052】

誘導体の例としては、そのエステル又はアミドなどの親化合物のプロドラッグであり、それらは、ほ乳類に投与して、本発明の化合物又はその活性代謝物を（代謝過程によるなどにより）提供し得る。

30

【0053】

エリスロマイシン塩及び誘導体には、限定されないが、エリスロマイシンラクトビオン酸塩、エリスロマイシンエチルコハク酸塩、エリスロマイシンステアリン酸塩、エリスロマイシンエストレート、エリスロマイシンアシストラート、エリスロマイシングルセブタート、エリスロマイシンプロピオネート、エリスロマイシンサルナセジン、エリスロマイシンA、B、C、D又はE、ロキシスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ジリスロマイシン、フルリスロマイシン、並びに参照により全内容が本明細書に取り込まれている米国特許第6777543号、米国特許第6825171号、及び米国特許第5602106号及びWO2002/050093号に示す誘導体が含まれる。

40

【0054】

タイロシン誘導体の限定されない例としては、例えば、デスマコシン、タイロシンB、又は、それらの各々の全内容が本明細書に参照により取り込まれている米国特許第5602106号、第4092473号、第4205163号、及び第4268665号に記載されている誘導体などのタイロシン誘導体、をあげることができる。

【0055】

オレアンドマイシン塩及び誘導体の限定されない例としては、例えば、オレアンドマイシンリン酸塩（マトロマイシン）、オレアンドマイシン2'-O-リン酸塩、トロレアンドマイシン、及びトリアセチルオレアンドマイシン、及び、全内容が本明細書に取り込まれている米国特許第5602106号、第4429116号、第4124755号及び4064143号に記載されている誘導体などがある。

50

## 【0056】

マクロライド抗生物質「スピラマイシン」は、参照により本明細書に取り込まれているメルクインデックス(An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Eleventh Edition, 1989, paragraph 8708)に記載されている、化合物スピラマイシンI、II、又はIIIのいずれかの1つ、又はそれらのいずれかの組み合わせ(例えば、スピラマイシンI、II、又はIIIの併用)をも包含することは自明である。

## 【0057】

スピラマイシン誘導体の限定されないいくつかの例は、例えば、ネオスピラマイシン、ジハイドロスピラマイシン、及び全内容が参照により本明細書に取り込まれている米国特許第5602106号、及び第4174391号に記載の誘導体などである。 10

## 【0058】

本発明で記載した前記活性成分(マクロライド抗生物質)は、その溶媒和物も含むことは自明である。

## 【0059】

本明細書で用いられているように、用語「溶媒和物」は、溶質(この発明ではマクロライド抗生物質又はその塩又はその誘導体)と溶媒により形成された変動する化学量論的複合体)を意味する。本発明の目的に用いるこのような溶媒は、溶質の生物活性を妨げない。適当な溶媒の例としては、限定されないが、水、エタノール、及び酢酸を挙げられる。 20

## 【0060】

治療上有効量のマクロライド抗生物質が、好ましくは薬学的組成物でほ乳類に投与される。

## 【0061】

本明細書で用いたように、「薬学的組成物」は、薬学的に許容されるキャリアなどの他の不活性化学成分と共に本明細書に記載した1又はそれ以上の化合物(マクロライド抗生物質)の製剤を指す。薬学的組成物の目的は、ほ乳類へ活性成分の投与を容易にすることである。

## 【0062】

本明細書で用いられているように、用語「薬学的に許容できるキャリア」は、被験者(ほ乳類)に著しい刺激をもたらさない、投与した活性成分の生物活性及び特性を無効にしない無毒のキャリア又は希釈剤を指す。 30

## 【0063】

限定されないが、キャリアの例は、ラクトース、シュクロース、水、有機溶媒及びポリエチレングリコールである。

## 【0064】

キャリアは、結合剤、崩壊剤、滑剤、表面活性化剤(界面活性剤)、乳化剤、保存剤及び香料などの更なる賦形剤を含むことがある。

## 【0065】

本発明の文脈で用いる薬学的組成物は、意図した目的達成のための有効量のその活性成分が含まれている組成物を含む。 40

## 【0066】

本発明の好ましい態様によれば、組成物の投与経路は、経口、非経口、又は直腸から選択される。

## 【0067】

非経口投与は、例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、腫瘍内、及び皮下投与であり得る。

## 【0068】

具体的態様は、経口経路の投与である。

## 【0069】

経口投与に適する活性薬剤(活性成分)の剤型は、例えば、固体、半固体、液体、又はガス状の型を含む。具体例には、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤、懸濁剤、シロ 50

ップ剤、及びエリキシル剤を含む。しかしながら、薬剤の型は、これらの型に限定されない。

【0070】

剤型は、抗癌活性薬剤（マクロライド抗生物質）の速放出、持続放出、パルス放出を提供するように設計し得る。

【0071】

その上、本発明の抗癌活性薬剤は、ガス状又は液体状のスプレイ剤と共に、液体又は微粉末の形で活性薬剤を装填して調製したエアロゾール又は吸入薬の剤型で投与でき、必要なら、膨張剤などの公知の助剤をエアロゾール容器又は噴霧器などの圧力をかけていない容器中に入れてもよい。スプレイ剤としては、例えば、ジクロロフルオロメタン、プロパン、又は窒素の圧縮ガスを使用することができる。

10

【0072】

注射剤は、本発明の抗癌活性成分を水性又は、植物油、合成樹脂酸のグリセリド、高級脂肪酸のエステル、又はプロピレングリコールなどの非水性の溶媒中に、公知の方法により、溶解、懸濁、又は乳化させることにより調製することができ、必要なら、通常用いられている可溶化剤、浸透圧調整剤、乳化剤、安定化剤、又は保存剤をさらに添加してもよい。

10

【0073】

直腸内投与では、坐薬を使用することができる。坐薬は、本発明の抗癌活性成分を、カーボンワックス、又はポリエチレングリコールなどの体温で溶けるが、室温では固体である賦形剤と混合し、その結果得られた物を公知の方法で成形することにより調製することができる。

20

【0074】

抗癌活性薬剤は、化学療法、放射線療法又は別の活性薬剤と同時に投与することができる。

【0075】

本発明の抗癌性活性成分の投与量は、投与剤型、投与経路、標的疾患の程度と状態、及びそれと同類なものによって、適切に設定又は調整することができる。例えば、結腸直腸癌の治療には、本発明の化合物の有効な投与比率の一般的な範囲は、 $2 \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$  体重 / 日であり得る。好ましくは、活性成分の経口投与では  $2 \sim 30 \text{ mg} / \text{kg}$  体重 / 日に設定することができるが、この用量はこれに限定されない。

30

【0076】

類線腫瘍（desmoid tumor）、膀胱癌、胃癌、及び乳癌などの他の癌種の治療では、この用量は、 $2 \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$  体重 / 日の範囲であり得る。好ましくは、活性成分の経口投与では用量を  $2 \sim 50 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  に設定することができるが、この用量はこれに限定されない。

30

【0077】

ほ乳類、特にヒトに投与する用量は、癌を予防し、発症を遅らせ、進行を遅らせるか（止める）に十分であるべきである。当業者は、投与量が、用いられる特定の化合物の強さ、並びに、ほ乳類の年齢、種、症状、体重を含む様々な要因に依存することを認識するであろう。投与量は、投与の経路、時期、頻度、並びに、特定の化合物の投与に伴うあらゆる副作用の存在、性質、程度、及び望ましい生理的効果により決定される。

40

【0078】

適切な投与量と投与計画は、当業者に公知である従来の濃度範囲決定手法により決定できる。一般的には、治療は、化合物の至適用量以下の少用量で開始される。その後、用量は、その環境下で至適効果に達するまで、少量ずつ用量を增量させる。

【0079】

有効な投与量と治療プロトコールは、実験動物において低用量で出発して、次いで、効果をみながら、用量を増加して、同様に体系的に投与計画を変更しながら、型どおりの従来の手法により決定することができる。動物試験、好ましくは、ほ乳類試験を、キログラ

50

ム体重あたりの生物活性剤の最大耐量（M T D）を決めるために通常用いる。当業者は、ヒトを含む多くの種において、毒性がなく有効性を示す量を、規定どおりに推定する。

#### 【0080】

したがって、上記により、治療の適用においては、本発明の活性薬剤の用量は、選択した用量に影響する他の要因の中で、活性薬剤、受け入れる患者の年齢、体重、及び臨床症状、及び治療を管理する臨床医又は開業医の経験と判断によって変動する。一般的には、用量は、腫瘍の増殖を遅延させ、好ましくは退縮させ、最も好ましくは癌の完全退縮をもたらすに十分であるべきである。活性成分（マクロライド抗生物質）の有効量は、臨床医又は他の資格のある観察者により指摘されるように客観的に確認できる改善がなされる量である。患者の腫瘍の退縮は、通常は腫瘍径を基準に測定される。腫瘍径の減少は、退縮を表している。退縮は、また治療を止めた後、腫瘍の再発がないことによっても表わせる。

10

#### 【0081】

投与は、1回又は2回以上の組み合わせでもよく、例えば、毎日、2日毎、1週間毎、毎月、又は、さもなければ、年齢、体重、疾病の重篤度、各投与の投与量などの要素を考慮して臨床医又は開業の判断による。

#### 【0082】

##### 実施例

##### 方法と材料

##### 細胞の培養

20

H C T 1 1 6 C R C 細胞（野生型 A P C を担持する対照細胞）を、10%仔牛胎児血清（F C S）及びペニシリン又はストレプトマイシン 100 ユニット / m l 添加ダルベッコ修正イーグル培地（D M E M）で培養した。細胞は、37°、5% C O<sub>2</sub>、加湿下で維持した。J e t P E I（P o l y P l u s T r a n s f e c t i o n）を用いて細胞をトランスクレクションした。記載した構築物の 0.5 μg で細胞をトランスクレクションし、48時間後にルシフェラーゼ定量キット（P r o m e g a、U S A）を用いて製造者の使用説明書にしたがってルシフェラーゼ量を測定した。

#### 【0083】

細胞は上記のように維持した。0.5 μg の p T O P F L A S H 及び 0.05 μg の R e n i l l a（P r o m e g a, U S A）で細胞をトランスクレクトした。48時間後、ルシフェラーゼ量をルシフェラーゼ測定キット（P r o m e g a, U S A）を用いて測定した。

30

#### 【0084】

##### インビボでのマウス試験

6 匹の雌ヌードマウス（S C I D）に  $1 \times 10^7$  個の H T - 2 9 細胞を注射した。14日間、治療群はマウス正常餌及び 0.4 m g / m l のタイロシンを含有飲料水で飼育した。対照群は通常の飲料水を与えた。14日後、マウスを犠牲死させ、腫瘍を取り出し秤量した。

40

#### 【0085】

対照及び治療マウスからの腫瘍切片は、H & E 染色剤で染色した。スライドを専門の病理学者が調べた。

#### 【0086】

対照及び治療マウスからの腫瘍を、溶解させて、S D S - P A G E ゲル上で泳動させ、ニトロセルロース膜上に移した。その膜を抗A P C抗体（癌遺伝子 A P C A B - 2）でインキュベイトした。

#### 【0087】

##### A P C 遺伝子中の体細胞及び生殖細胞突然変異のスペクトル

散発性及び遺伝性の A P C 突然変異の多くの部位を下記に示す。A P C 中の最も一般的な生殖細胞突然変異は、コドン 1 0 6 1 及び 1 3 0 9 で起こる。A P C 体細胞性突然変異の大部分は、コドン 1 3 0 9、1 4 5 0 及び 1 5 5 4 のホットスポットをもつM C R (m

50

mutation cluster region ; 多変異領域) 内に集まっている(図1)。それらのホットスポットの多くで突然変異をもつCRC細胞株(複数)は、商業上入手でき、研究室で増殖させた。

#### 【0088】

APCホットスポット及び周辺配列

野生型APCタンパク質配列の全長(SEQ ID No: 1)、及び野生型APCDNA配列全長が提供されている。

#### 【0089】

次に示す表は、APC遺伝子の終止コドン及びAPC遺伝子の突然変異ホットスポット部位のそれらの周辺の配列を明示している。ホットスポット1061、1450及び1554でのフレームシフト又は形成されたナンセンス終止コドンは、TGAであり、ホットスポット1309における終止コドンはTGAであることに注目すべきである(参照表1)。

10

20

30

変異部位	野生型配列	変異した配列
1061	GAA ATA AAA CAA AGT GAG CAA (SEQ. ID. NO: 3)	GAA ATA AAG <b>TGA</b> GCA A (SEQ. ID. NO: 4)
1309	ATA AAA <b>GAA AAG</b> ATT GGA ACT AGG (SEQ. ID. NO: 5)	ATA AAA GAT TGG AAC <b>TAG G</b> (SEQ. ID. NO: 6)
1450	ACC AAG <b>C</b> GA GAA GTA (SEQ. ID. NO: 7)	ACC AAG <b>TGA</b> GAA GTA (SEQ. ID. NO: 8)
1554	GAA AAA <b>A</b> CT ATT GAT (SEQ. ID. NO: 9)	GAA AAA AAC TAT <b>TGA T</b> (SEQ. ID. NO: 10)

表1. この表は、ホットスポットで突然変異により生じた終止コドン及び周辺配列を示す。変異部位1061及び1309では、長方形で囲んだ部分は5-bpの欠失を生じた突然変異部位を示しており、欠失直後の下流で終止コドンが形成されている。コドン1450では、長方形で囲んだ部分は、終止コドン(ナンセンス変異)を生じるミスセンス変異部位を示している。コドン1554の直後の三角形は、アデニンの挿入部位を示しており、終止コドンの下流形成を導いている。全てのケースで、太字のコドンは、ナンセンス又はフレームシフト突然変異により形成された終止コドンを表している。

#### 【0090】

実施例1

タイロシン-誘導突然変異APC終止コドン読み過ごし

以下の試験で用いたタイロシンは、シグマ化学、イスラエル(カタログNo. T6134)から購入した市販のタイロシン酒石酸塩；スピラマイシンは、シグマ化学、イスラエル(カタログNo. S-9132)から；及びエリスロマイシンは、フルカ(Fukuka)、スイス(カタログNo. 45673)から購入した。オレアンドマイシンは、シグマ化学、イスラエル(カタログNo. T6514)から購入することができる。

#### 【0091】

デュアルルシフェラーゼレポータープラスマドシステムを用いて、結腸直腸癌組織培養細胞でAPCホットスポットコドン変異の読み過ごしに対するタイロシンの効果を測定し

40

50

た。このシステムでは、レニラルシフェラーゼレポータ遺伝子は、ホットスポットの上流に位置し、ホタルルシフェラーゼレポータ遺伝子は、APC野生型又は変異配列の下流に位置し、両遺伝子は、APCプロモータの転写制御下にある(図2a)。両酵素の翻訳は、同じ翻訳開始シグナルから開始するため、レニラルシフェラーゼレポータ遺伝子は、トランسفエクション効率、mRNAの量、及び翻訳開始レベルに対する内部標準として役立つ。標準化に統いて、ホタルルシフェラーゼ活性における差異は、終止コドン読み過ごし頻度を反映する。野生型又はAPCホットスポットコドン1061又は1554コドンでのAPC変異配列のいずれかを含む構築物を、種々の濃度のマクロライド系抗生物質存在下で培養したHCT116結腸直腸癌細胞中にトランسفエクトした。データは、細胞を種々の濃度(4~80μg/ml)のタイロンで処置したときに、有意なレベルのAPC終止コドン読み過ごしを示している(図2b、2c)。スピラマイシン、エリスロマイシン、ゲンタミシン(アミノグリコシド抗生物質)は、より緩やかなレベルで終止コドン読み過ごしを誘導した(図2d、2e、2f)。

10

20

30

40

50

## 【0092】

## 実施例2

タイロシンは、-カテニン/Tcf-シグナルの下方制御をもたらす

結腸直腸細胞株は、Wntシルナル経路の過剰な活性化をもたらす変異に起因する、高レベルの-カテニン/Tcf-介在の転写を示している。-カテニン/Tcf-介在転写量に及ぼすタイロシンの影響を測定するため、Tcf及び-カテニン(ルシフェラーゼに結合した多量体を形成したTcf-結合部位を含むpTOPFLASH)の転写活性の測定に広く用いられているルシフェラーゼレポータプラスミド、pTOPFLASHで、APCホットスポット1554中に終止変異を含むCX-1CRC細胞をトランسفエクトした。このデータは、タイロシン8μg/mlでCX-1CRC細胞の処置が、-カテニン/Tcf/LEF転写シグナルを約50%減少させたことを示す(図3)。同様な結果が、コドン1450でAPCホットスポット変異を含むSW1417細胞で示された(結果は示していない)。

20

## 【0093】

## 実施例3

タイロシン治療は、細胞の腫瘍形成能を抑制する

APCの切断は、腫瘍形成に関連する(非特許文献13)。本発明者は、切断されたAPCのみを含む細胞株での機能的な全長APCタンパク質の回復は、腫瘍形成能の減少をもたらすであろうことを予測した。APCのコドン1554にホットスポット突然変異を含む $1 \times 10^7$ 個のHT-29CRC細胞を12匹のSCIDヌードマウスに注入した。治療マウス群(マウス6匹)は、0.4μg/mlタイロシンを含む飲料水を摂取した。腫瘍の成長を監視し、対照マウスとタイロシン治療マウスの間で腫瘍サイズに有意な差が見られた。治療マウスは、対照マウスに比べて腫瘍サイズが減少した(図4a)。タイロシンを含むまたは含まない飲料水を14日間摂取した後、マウスを犠牲死させ、腫瘍を取り出した。腫瘍を秤量し、タイロシン治療マウスの腫瘍塊は、対照群のそれより平均で約40%小さかった(図4b)。

## 【0094】

## 実施例4

腫瘍の組織学的特性は、対象マウスとタイロシン治療マウス間で相違する

対照およびタイロシン治療マウスからの腫瘍切片を、組織切片用に規定通りに用いられている染色剤であるヘマトキシリントロハイン(HE)染色剤を用いて染色し、専門の病理学者が検査した。この染色は、タイロシン治療は、腫瘍細胞の壊死と細胞死をもたらすことを示し(図5)、治療マウスにおいて腫瘍サイズがより小さいことを説明できる。腫瘍への血液供給が影響を受けていないにもかかわらず、タイロシン治療マウスでの腫瘍壊死が生じたことは、タイロシンが腫瘍に到達して、細胞死をもたらすことを示唆する。

## 【0095】

## 実施例 5

### 寿命に対するマクロライド抗生物質の効果

A P C の 1 5 5 4 コドンにホットスポット突然変異を含む  $1 \times 10^7$  個の H T - 2 9 C R C 細胞を 10 匹の 3 週齢 S C I D ヌードマウスに注入した。治療マウスは、 0 . 3 ~ 0 . 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のタイロシン、スピラマイシン、エリスロマイシン、又はオレアンドマイシンを含む飲料水を与えた。10 匹の対照マウスは、抗生物質を含まない飲料水を摂取した。治療マウスの平均寿命と対照マウスの寿命を比較した。

#### 【 0 0 9 6 】

さらに、A P C 中に終止突然変異をもち、自然発生的に腫瘍が発生し、最後に死亡する、A p c <sup>-1</sup> マウス、C 5 7 B L / 6 J - A p c <sup>M i n</sup> / J (Jackson Laboratory, Stock No. 002020) を、マクロライド抗生物質の各々で治療した。治療したマウスの寿命を無治療対照マウスの寿命と比較した。

10

#### 【 0 0 9 7 】

## 実施例 6

### 結腸直腸癌モデルにおけるマクロライド塩および誘導体による治療

雌 S C I D ヌードマウスを、A P C のコドン 1 5 5 4 にホットスポット突然変異を含む  $1 \times 10^7$  個の H T - 2 9 C R C 細胞又は A P C のコドン 1 4 5 0 にホットスポット突然変異を含む  $1 \times 10^7$  個の S W 1 4 1 7 C R C 細胞を注入した。14 日間、治療マウス群は、正常マウスの餌と、タイロシンの塩又は誘導体；エリスロマイシンの塩又は誘導体；スピラマイシンの塩又は誘導体；オレアンドマイシンの塩又は誘導体の中の 1 つを、0 . 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を含む飲料水を与えた。対照群にも、 $1 \times 10^7$  個の H T - 2 9 C R C 細胞又は S W 1 4 1 7 C R C 細胞を注入し、マクロライド抗生物質の誘導体又は塩を含まない飲料水と同じ餌を与えた。全てのマウスを犠牲死させ、腫瘍を取り出し、秤量した。10 匹の対照マウスは、タイロシンの塩又は誘導体；エリスロマイシンの塩又は誘導体；スピラマイシンの塩又は誘導体；オレアンドマイシンの塩又は誘導体の各々で治療した各群 10 匹のマウスからの腫瘍切片と同様に、H & E 染色剤で染色して、専門の病理学者が検査した。病理学者は、腫瘍壊死の腫瘍切片を検査する。投与量は、試験化合物、及び達成すべき所望の効果により変動する。

20

#### 【 0 0 9 8 】

加えて、上記と同様の試験を C 5 7 B L / 6 J - A p c <sup>M i n</sup> / J マウスについて、(癌をもたらす細胞の条件なしに)マクロライド抗生物質の治療又は治療しない(対照)マウスで行う。

30

#### 【 0 0 9 9 】

## 考察

結腸直腸癌は、西欧諸国では、癌死の主要な原因の 1 つである。結腸大腸癌の進行は、治療薬及び診断薬の潜在的な標的を提供する分子変動に密接に関連している。結腸直腸癌のユニークな特徴は、単一の遺伝子における突然変異が多くの癌でみられることがある。大腸腺腫症 (A P C) タンパク質をコードする遺伝子における切断変異が、散発性直腸癌腫瘍の 8 0 % 以上に見られており、これは、結腸直腸癌の遺伝型である、家族性大腸腺腫症 (F A P) の原因でもある。A P C タンパク質機能の喪失は、殆どの散発性結腸直腸腫瘍発生の極めて初期の事象であり、アデノーマの前駆体であるポリープ形成の前に生じる。このことは、A P C タンパク質が、腸管及び結腸直腸上皮の維持に必須であり、その発現は、しかるべき研究目的を提供することができる。

40

#### 【 0 1 0 0 】

A P C 遺伝子は、W n t - シグナル経路及び細胞間接着において重要な役割を演じる大きな多ドメインタンパク質をコードする。切断されている生殖系列変異の大部分 (95 %) が、ナンセンス又はフレームシフト突然変異であり、それは異常機能をもつ切断タンパク質産物を生じる。多くの共通する生殖細胞系列突然変異は、コドン 1 0 6 1 と 1 3 0 9 で起こり、その間で全ての生殖細胞系列突然変異の第 3 位を占める(図 1)。

#### 【 0 1 0 1 】

50

ホットスポット 1061 と 1309 での突然変異は、フレームシフト及びナンセンス型の両方であること分かっている。したがって、1つの対立遺伝子が、コドン 1061 又は 1309 にフレームシフトを含むことがあり、また、その対立遺伝子は、コドン 1061 又は 1309 でナンセンス（中途終止）突然変異であることがある（非特許文献 14、15）。同様に、ホットスポット 1554 での突然変異は、フレームシフト又はナンセンスタイプのいずれかである。しかしながら、これまでのところ、ナンセンス突然変異のみが、1450 では確認されている。

#### 【0102】

5mm 以下のアデノーマ（腺腫）を含む、結腸直腸アデノーマ（腺腫）、カルシノーマ（腺癌）の体細胞突然変異が、大半に見られる。APC の全ての体細胞突然変異の 60% 以上が、コドン 1286 と 1513 の間に位置する遺伝子のコード配列の 10% 以下の範囲内で生じ、この領域は、突然変異クラスタ領域（MCR）と呼ばれている。MCR 内では、コドン 1309、1450 及び 1554 に、体細胞突然変異の 3 つのホットスポットがある（図 1）。Wnt - シグナルにおける APC の役割は、結腸直腸癌の発癌となる役割に関与すると考えられている。突然変異 APC は、細胞間接着と細胞骨格の安定性を混乱させ、両者は、癌の進行の一部を演じる。コドン 1307 での別の APC 突然変異は、結腸直腸癌や乳癌をもつ人、並びに、メラノーマ、皮膚癌、及び膀胱癌を 2、3 人に見られる（非特許文献 12）。

10

#### 【0103】

結腸直腸癌と同様に、ヒト遺伝性疾患の多く（例えば、囊胞性線維症（CF）、デュシェンヌ型筋ジストロフィ（DMD）（非特許文献 8））は、突然変異遺伝子によりコードされるタンパク質の合成の中途末端をもたらす突然変異に起因しており、これらの疾病を治療する 1 つの方法は、野生型の複製でその細胞を補うことであろう。

20

#### 【0104】

ここ数年、アミノグリコシド抗生物質が、ナンセンス終止コドンの代わりにアミノ酸の取り込みを許すことにより疾病に伴う中途終止突然変異を抑制でき、それにより、転写の正常終了に続き、翻訳を許容していることが公知になっており、終止コドン抑制の感受性は、終止コドンのタイプ及び終止コドンを取り巻く局所配列の状況に依存する。UGA 及び UAG は、UAA に比べてより高い翻訳読み過ごしを示す。終止コドンの配列並びに、APC 遺伝子の突然変異ホットスポットにおけるそれを取り巻く配列が、明示されている。表 1 からわかるように、リストに掲げた APC ホットスポットに形成された中途終止コドンのタイプは、TGA 又は TAG である。

30

#### 【0105】

このアプローチの有用性は、常染色体上の劣性遺伝子病、囊胞性線維症（CF）およびナンセンス変異をもつデュシェンヌ（DMD）患者の小集団において以前に示された。CF と DMD の両患者では、全例の 5 から 10% のみがコード配列中のナンセンス突然変異に起因している。相対的に、結腸直腸腫瘍患者では APC 遺伝子に中途終止コドンは、全例の約 85% に見つかっている。正確な数はわかっていないが、結腸直腸癌例の 80% より少ない例が、ナンセンス突然変異のみをもち、他の例では、個体は、フレームシフト変異をもつ 1 の対立遺伝子と、ナンセンス変異をもつ他の対立遺伝子をもつ。

40

#### 【0106】

機能的な APC タンパク質をもたない細胞中へ全長 APC タンパク質の回復を目的とした研究は、今までのところ行われていない。しかしながら、ゲンタミシンのようなアミノグリコシド類は、厳しい用量規定毒性があり、現在は、静脈内投与をしなければならず、したがって、このようなタイプの疾患にとって魅力のない長期間投与となっている。本発明者は、APC 遺伝子にある癌源性終止コドンを読み過ごすことができ、機能性のない切断された APC タンパク質産物を含んでいる結腸直腸癌細胞に機能的な全長 APC タンパク質を発現させる他の化合物をスクリーニングした。

#### 【0107】

中途 APC 終止突然変異を読み過ごしできる化合物をスクリーニングするために、本発

50

明者は、特定の中途 A P C 終止コドンの読み過ごしレベルに対する様々な化合物の効果を効率良く迅速に測定できるレポーターアッセイシステムを構築した。その結果は、以前に、原核生物の終止コドン読み過ごしのみを示していたマクロライド系抗生物質の一員である、タイロシンが、特定の A P C ホットスポット突然変異読み過ごしができることを示している。

#### 【 0 1 0 8 】

W n t シグナル伝達レベルが、C R C 細胞の腫瘍原性の特性のマーカーであるため、本発明者は、C R C 細胞でみられる高レベルの W n t シグナル伝達をタイロシンが、減少させることができるかどうかを先ず試験した。その結果は、タイロシン処置が、被験 C R C 細胞内で T c f / - カテニン - 依存転写レベルを減少させることを示した。10

#### 【 0 1 0 9 】

次のステップでは、本発明者は、タイロシンがインビボで腫瘍の進展を減少させることができると否かを検討した。この目的のために、A P C ホットスポット突然変異（コドン 1554）を含む H T 2 9 - C R C 細胞をヌードマウスに注入した。治療マウス群は、飲料水中のタイロシンを摂取した。データは、タイロシン治療によって、対照群に比べ、腫瘍サイズと塊を減少させたことを示す。さらに、タイロシン治療は、微小血管に影響を与えることなく腫瘍細胞死を強めた。

#### 【 0 1 1 0 】

中途終止コドンの読み過ごしは、初期の結腸直腸癌の患者又はこのタイプの癌の発生に遺伝的な背景をもつ患者にとって、可能性のある代替的治療である。まとめると、この結果は、タイロシン及び他のマクロライド抗生物質が、結腸直腸癌患者の圧倒的多数において変異している A P C 遺伝子におけるこの疾患の原因となっている中途終止コドンの読み過ごしをもたらすことを示している。この新しいアプローチは、重要なコード配列中の中途終止コドンから生じる結腸直腸癌及びその他の遺伝的なヒト疾患の臨床治療において新しい道を開くことができる。20

#### 【 0 1 1 1 】

#### 実施例 7

乳癌、膀胱癌、胃癌、及び類腫瘍モデルにおけるマクロライド抗生物質及びそれらの塩及び誘導体による治療

雌 S C I D ヌードマウスに、マウスモデルで乳癌をもたらすことが知られている A P C ホットスポットに変異を含む細胞を注入した。14日間、治療群は、タイロシン又はタイロシンの塩又は誘導体；エリスロマイシン又はエリスロマイシンの塩又は誘導体；スピラマイシン、又はスピラマイシンの塩又は誘導体；オレアンドマイシン、又はオレアンドマイシンの塩又は誘導体、の中の1つを 0.3 ~ 0.8 μg / m l 含む飲料水と通常マウスの餌を与える。対照群は、同様に同じ乳癌細胞を注入し、マクロライド抗生物質又はマクロライド抗生物質の塩又は誘導体を含まない飲料水と同じ餌を与える。全マウスを犠牲死させ、腫瘍を取り外し、秤量する。対照マウス及びタイロシン、又はエリスロマイシン、又はスピラマイシン、又はオレアンドマイシン、又はマクロライド抗生物質の塩又は誘導体の各々で治療したマウスの腫瘍切片を H & E 染色剤で染色し、病理学者が各腫瘍切片を腫瘍壞死の検査をする。30

#### 【 0 1 1 2 】

それぞれの癌のマウスモデルを誘導する適切な細胞を治療群及び対照群に注入する点を除き、乳癌についての上記方法を繰り返して、膀胱癌、胃癌、及び類腫瘍癌について試験薬剤の効果を決定した。40

#### 【 0 1 1 3 】

#### 実施例 8

子宮内での細胞の腫瘍原性に対するマクロライド抗生物質の効果

胎児をもつ 10 匹の妊娠 A P C - 1 - マウスに飲料水中に 0.3 ~ 0.8 μg / m l のタイロシン、スピラマイシン、エリスロマイシン、又はオレアンドマイシンを与えた。10 匹の対照妊娠マウスは、抗生物質を含まない飲料水を与える。出産後、治療群の新生仔

10

20

30

40

50

マウスは、飲料水中の同じマクロライド抗生物質を摂取し続け、対照の新生仔マウスは、抗生物質を含まない飲料水を摂取する。誕生 8 週間後、その若いマウスを犠牲死させ、胃腸管から腫瘍を取り出して、秤量した。対照群の若いマウスの腫瘍塊を、若いマウスのタイロシン、スピラマイシン、エリスロマイシン、又はオレアンドマイシン治療群（子宮内及び誕生後の両方でマクロライドにさらした）の腫瘍塊と比較する。

## 【0114】

## 実施例 9

腫瘍の組織学的特徴は対照マウス及びマクロライド抗生物質投与マウス間で異なる

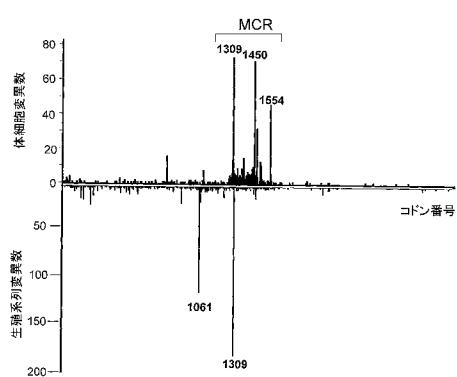
上記試験での対照マウス及びマクロライド抗生物質 - 治療マウスの腫瘍切片を、組織切片用に規定通りに用いている染色剤であるヘマトキシリン及びエオシン（H & E）染色剤で染色し、専門の病理学者が検査した。染色した切片を 0 検査して、マクロライド治療が、腫瘍の壊死及び腫瘍細胞死を導いたか否かを決定する。

## 【0115】

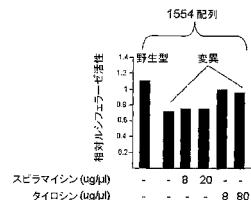
本明細書で述べた全ての公開、特許及び特許出願は、各個別の公開、特許又は特許出願が、具体的に及び個別に参照により本明細書中に取り込まれたのと同程度に、それらの全内容が本明細書中へ参照により取り込まれている。

10

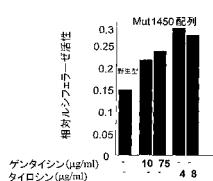
【図 1】



【図 2 C】



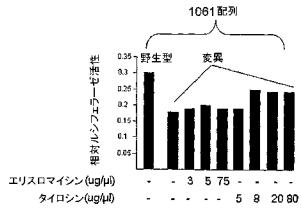
【図 2 D】



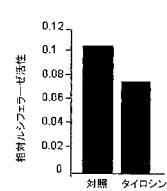
【図 2 A】



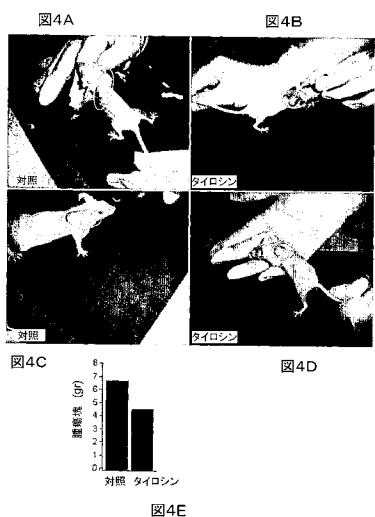
【図 2 B】



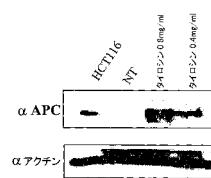
【図 3】



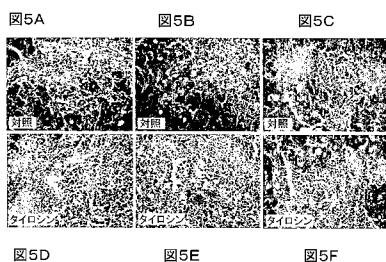
【図4】



【図6】



【図5】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IL2007/000706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K31/7048 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)  
A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/018049 A1 (GODEK DENNIS M [US] ET AL) 23 January 2003 (2003-01-23) paragraph [0071]; claim 1	1-11
A	WO 2006/016167 A (BIOTICA TECH LTD [GB]; GREGORY MATTHEW ALAN [GB]; MARTIN CHRISTINE JAN) 16 February 2006 (2006-02-16) page 27, paragraph 3; claim 1	1-11
P,X	LIGHTFOOT ET AL: "Treatment of postoperative ileus after bowel surgery with low dose intravenous erythromycin" UROLOGY, vol. 69, 2007, - 2007 pages 611-615, XP002453950 abstract	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family 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
8 October 2007	22/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epp nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Cattell, James

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/IL2007/000706

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003018049	A1 23-01-2003	NONE	
WO 2006016167	A 16-02-2006	AU 2005270989 A1 CA 2575582 A1 KR 20070052784 A NO 20070686 B	16-02-2006 16-02-2006 22-05-2007 25-04-2007

---

フロントページの続き

(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,LV,MC,MT,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ロジン - アベスフェルド , リーナ

イスラエル国 ヘルツェリヤ 46364 , ザルマンシュナーストリート 7

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA13 MA01 MA04 NA14 ZB26