

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5354836号
(P5354836)

(45) 発行日 平成25年11月27日 (2013.11.27)

(24) 登録日 平成25年9月6日 (2013.9.6)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 33/22	(2006.01)	A 6 1 K 33/22	
A 6 1 K 31/198	(2006.01)	A 6 1 K 31/198	
A 6 1 K 31/704	(2006.01)	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1

請求項の数 49 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2004-551855 (P2004-551855)
(86) (22) 出願日	平成15年11月6日 (2003.11.6)
(65) 公表番号	特表2006-509746 (P2006-509746A)
(43) 公表日	平成18年3月23日 (2006.3.23)
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/035513
(87) 国際公開番号	W02004/043374
(87) 国際公開日	平成16年5月27日 (2004.5.27)
審査請求日	平成18年10月31日 (2006.10.31)
審判番号	不服2010-27456 (P2010-27456/J1)
審判請求日	平成22年12月3日 (2010.12.3)
(31) 優先権主張番号	60/424,363
(32) 優先日	平成14年11月6日 (2002.11.6)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	399052796
	ダイナ ファーバー キャンサー インス ティテュート、インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 2 1 5, ボストン, ブルックライン ア ベニュー 4 5 0
(74) 代理人	100078282
	弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409
	弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413
	弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアソームインヒビターを使用する癌を処置するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテアソームインヒビターに耐性の癌細胞の、化学療法薬に対する感受性を増大させるための、有効量の該プロテアソームインヒビターを含む、組成物であって、該プロテアソームインヒビターが P S - 3 4 1 であり、そして該化学療法薬が、ドキソルビシン、メルファラン、およびこれらの組合せからなる群より選択される、組成物。

【請求項 2】

前記癌細胞が前記化学療法薬に対して耐性である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記癌細胞が多発性骨髄腫細胞である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

被験体において癌を処置するためのパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬であって、該被験体の癌細胞は該プロテアソームインヒビターでの処置に耐性であり、癌が処置されるように、有効量の該プロテアソームインヒビターおよび有効量の化学療法薬、ならびに該プロテアソームインヒビターと該化学療法薬との組み合わせを使用するための使用説明書を含み、ここで該プロテアソームインヒビターが P S - 3 4 1 であり、そして該化学療法薬が、ドキソルビシン、メルファラン、およびこれらの組合せからなる群より選択される、パッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 5】

10

20

前記癌が多発性骨髄腫である、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 6】

前記癌の処置が、腫瘍増殖の阻害に起因する、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 7】

前記化学療法薬がドキソルビシンである、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 8】

前記化学療法薬がメルファランである、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

10

【請求項 9】

少なくとも1種のさらなるプロテアソームインヒビターまたは化学療法薬をさらに含む、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 10】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与の前に投与される、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 11】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与と同時に投与される、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

20

【請求項 12】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与の後に投与される、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 13】

前記プロテアソームインヒビターがNF- κ B活性を阻害する、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 14】

前記プロテアソームインヒビターが細胞接着に仲介される薬物耐性を無効にする、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 15】

30

有効量の前記プロテアソームインヒビターおよび有効量の前記化学療法薬の投与が、癌細胞死を生じる、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 16】

有効量の前記プロテアソームインヒビターおよび有効量の前記化学療法薬の投与が、癌細胞のアポトーシスを生じる、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 17】

有効量の前記プロテアソームインヒビターおよび有効量の前記化学療法薬の投与が、遺伝毒性ストレスに対する応答の調節を生じる、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

40

【請求項 18】

前記プロテアソームインヒビターが、DNA依存性プロテインキナーゼを調節する、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 19】

前記プロテアソームインヒビターおよび前記化学療法薬が静脈内に投与される、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 20】

前記プロテアソームインヒビターおよび前記化学療法薬が腹腔内に投与される、請求項4に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

50

【請求項 2 1】

前記プロテアソームインヒビターおよび前記化学療法薬が経口投与される、請求項 4 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 2 2】

被験体の癌を処置するためのパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬であって、該被験体の癌細胞が該プロテアソームインヒビターでの処置に耐性であり、癌が処置されるように、有効量の該プロテアソームインヒビターおよび有効量の化学療法薬、ならびに該プロテアソームインヒビターと該化学療法薬との組み合わせを使用するための使用説明書を含み、該プロテアソームインヒビターが約 0.001 mg/m^2 体表面積/日～約 4.0 mg/m^2 体表面積/日の用量で投与され、ここで該プロテアソームインヒビターが PS-341 であり、そして該化学療法薬が、ドキソルビシン、メルファラン、およびこれらの組合せからなる群より選択される、パッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

10

【請求項 2 3】

前記癌が多発性骨髄腫である、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 2 4】

前記癌の処置が、腫瘍増殖の阻害に起因する、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 2 5】

前記化学療法薬がドキソルビシンである、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

20

【請求項 2 6】

前記化学療法薬がメルファランである、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 2 7】

少なくとも 1 種のさらなるプロテアソームインヒビターまたは化学療法薬をさらに含む、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 2 8】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与の前に投与される、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

30

【請求項 2 9】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与と同時に投与される、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 3 0】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与の後に投与される、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 3 1】

前記プロテアソームインヒビターが NF- κ B 活性を阻害する、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

40

【請求項 3 2】

前記プロテアソームインヒビターが細胞接着に仲介される薬物耐性を無効化する、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 3 3】

有効量の前記プロテアソームインヒビターおよび有効量の前記化学療法薬の投与が、癌細胞死を生じる、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 3 4】

有効量の前記プロテアソームインヒビターおよび有効量の前記化学療法薬の投与が、癌細胞のアポトーシスを生じる、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒ

50

ピターおよび化学療法薬。

【請求項 3 5】

有効量の前記プロテアソームインヒビターおよび有効量の前記化学療法薬の投与が、遺伝毒性ストレスに対する応答の調節を生じる、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 3 6】

前記プロテアソームインヒビターが、DNA - 依存性プロテインキナーゼを調節する、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 3 7】

前記プロテアソームインヒビターおよび前記化学療法薬が静脈内に投与される、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

10

【請求項 3 8】

前記プロテアソームインヒビターおよび前記化学療法薬が腹腔内に投与される、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 3 9】

前記プロテアソームインヒビターおよび前記化学療法薬が経口投与される、請求項 2 2 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 4 0】

骨髄からプロテアソームインヒビターでの処置に耐性である癌細胞を除去するためのパッケージされた該プロテアソームインヒビターおよび化学療法薬であって、癌細胞が該骨髄から除去されるように、有効量の該プロテアソームインヒビターおよび有効量の化学療法薬、ならびに該プロテアソームインヒビターと該化学療法薬との組み合わせを使用するための使用説明書を含み、ここで該プロテアソームインヒビターが PS - 3 4 1 であり、そして該化学療法薬が、ドキソルビシン、メルファラン、およびこれらの組合せからなる群より選択される、パッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

20

【請求項 4 1】

癌細胞が除去された前記骨髄が、該骨髄を本来採取した被験体と同一の被験体に投与される、請求項 4 0 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 4 2】

癌細胞が除去された前記骨髄が、該骨髄を本来採取した被験体とは異なる被験体に投与される、請求項 4 0 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

30

【請求項 4 3】

前記骨髄が、多発性骨髄腫の被験体由来である、請求項 4 0 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 4 4】

前記化学療法薬がドキソルビシンである、請求項 4 0 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 4 5】

前記化学療法薬がメルファランである、請求項 4 0 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

40

【請求項 4 6】

少なくとも 1 種のさらなるプロテアソームインヒビターまたは化学療法薬をさらに備える、請求項 4 0 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 4 7】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与の前に投与される、請求項 4 0 に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項 4 8】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与と同時に投与される、請求項

50

40に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【請求項49】

前記プロテアソームインヒビターが、前記化学療法薬の投与の後に投与される、請求項40に記載のパッケージされたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2002年11月6日に出願された米国仮出願第60/424,363号の利益を主張するものであり、この仮出願はその全内容が、参照して本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

(政府による支援)

本発明に関する研究は、国立衛生研究所助成金番号、第RO-150947号および第PO-178378号による支援を受けている。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

世界中で、癌は主要な死因となっている。癌は、腫瘍細胞と、近接する正常細胞など、それらを囲む環境とのコミュニケーションが破壊したものと見ることもできる。増殖刺激シグナルおよび増殖阻害シグナルが、一つの組織の中の細胞間で日常的に交換されている。正常であれば、刺激シグナルがないか、阻害シグナルが存在するときには、細胞は分裂しない。癌または新生物の状態になると、細胞は、これらのシグナルを「無効にする」能力を獲得して、正常な細胞では増殖しない条件下で増殖する。

20

【0004】

現在のところ、多様な種類の癌を治療する治療法はほとんどない。その可能性のある治療法としては、腫瘍阻害性化合物の適用(化学療法)、放射線療法、および骨髄移植などがある。化学療法は、典型的には、化学治療剤を、該剤が患者の体内で治療効果を達成および維持するのに効果的な量となる投与量を選択して患者に適用することを含む。しかし、癌の治療に用いられる最もよく知られた化学療法薬は顕著な副作用を示す。すなわち、一般的な化学療法の短所は、使用される化合物が、その活性において非特異的であって毒性レベルにまで蓄積するため、腫瘍細胞だけでなく、増殖中の正常な細胞までも速やかに死滅させてしまうことにある。その上、最初はある患者に有効な化学治療剤も、しばしば、時間がたつうちに、その患者に対して効かなくなるか効きににくくなる。さらに、ある患者に対して、少なくとも当初はある患者に対して有効な治療剤であっても、別の患者にとっては全く効果がなかったり、かえって有害であったりすることもある。

30

【0005】

したがって、通常の化学療法に反応するよう癌細胞を感作して、ある化学療法薬の治療効果を最大にする化合物を同定することが役立つと考えられる。理想的には、そのような化合物は、化学療法薬の投薬量を減少させて、患者の副作用を少なくしうる。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の概要)

本発明は、少なくとも一部において、プロテアソームインヒビターが、癌細胞を化学療法薬に対し感受性にさせるという発見に基づくものである。さらに、本発明は、例えばPS-341などのプロテアソームインヒビターによる単剤治療の後再発した患者からのものであっても、プロテアソームインヒビターは癌細胞を化学療法薬に対し感受性にさせるという発見に基づくものである。また、本発明は、プロテアソームインヒビターが、細胞接着による薬剤耐性を無効化するという発見に基づくものである。したがって、本発明は

50

、例えばPS-341などのプロテアソームインヒビターが、治療薬に対する癌細胞の感受性を誘導および／または回復することができることを実証している。理論に縛られることを望むわけではないが、プロテアソームインヒビターは、アポトーシスインヒビターの発現を下方制御することによって、また遺伝毒性ストレス応答を阻害することによって、治療薬に対する癌細胞の感受性を誘導および／または回復することができると考えられている。

【0007】

したがって、一つの実施態様において、本発明は、被験体の癌を治療する組成物、または、例えば腫瘍細胞などの癌細胞が増殖するのを予防する組成物に関する。別の実施態様において、本発明は、治療に対して耐性になった被験体における癌を治療するか、癌細胞の増殖を予防するための治療用組成物に関する。本発明に係る組成物は、医薬上許容される担体に入れた有効量のプロテアソームインヒビターおよび有効量の治療用薬剤、例えば化学治療剤を包含する。一つの実施態様において、有効量のプロテアソームインヒビターとは、約0.001mg/m²体表面積/日から約4.0mg/m²体表面積/日である。

10

【0008】

本発明の別の態様は、パッケージに入ったプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬を含む。また、パッケージされた化合物および薬剤は、このプロテアソームインヒビターと化学療法薬の併用したものを、癌治療または癌細胞増殖の予防のために使用するための使用説明書も含む。

20

【0009】

別の実施態様において、本発明は、有効量のプロテアソームインヒビターおよび有効量の治療用薬剤、例えば化学治療剤を被験体に投与することによって、例えば腫瘍増殖を阻害するなどして、被験体の癌を治療するための方法に関する。本発明に係る方法は、例えば化学療法薬などの治療薬が有効となる量を減少させて、治療を受ける被験体において副作用が起こりにくくすることを可能にする。

【0010】

別の実施態様において、本発明は、骨髄細胞をプロテアソームインヒビターおよび例えば化学治療剤などの治療用薬剤に曝露することによって、骨髄をパージする、すなわち、骨髄から癌を除去する方法に関する。そして、パージされた骨髄細胞を、その骨髄を取り出した被験体の体内に戻すか、別の被験体の体内に設置することができる。

30

【0011】

本発明のその他の特徴および長所は、詳細な説明および請求の範囲から明らかになる。本明細書に記載されている材料および方法と類似または同等のものを、本発明の実施または試験において利用することも可能であり、それらも本発明に包含されるものとする。

【0012】

(発明の詳細な説明)

本発明は、癌治療のために、例えば化学治療剤などの治療用薬剤と併用してプロテアソームインヒビターを使用することに関する。また、本発明は、有効量のプロテアソームインヒビターおよび有効量の治療用薬剤を被験体に投与することによって、被験体の癌を治療するための方法に関する。さらに、本発明は、骨髄細胞をプロテアソームインヒビターおよび例えば化学治療剤などの治療用薬剤に曝露することによって、骨髄をパージすることに関する。

40

【0013】

本発明をより容易に理解できるよう、一定の用語をまず定義する。それ以外の定義は、発明の詳細な説明全体に示されている。

【0014】

本明細書において「プロテアソームインヒビター」という用語は、プロテアソームのペプチダーゼのインヒビターを含むことを意図したものである。より具体的には、これらプロテアソームのペプチダーゼのインヒビターは、チオールプロテアーゼおよびセリンプロ

50

テアーゼに加えて、キモトリプシン様およびトリプシン様のプロテアソームのインヒビターを含む。初めに放線菌類から分離された抗生物質インヒビター (antibiotic inhibitor) 以外に、Siman et al. (W091/13904) に記載されているキモトリプシン様プロテアーゼのインヒビターなど、さまざまなペプチドアルデヒドが合成されている。さまざまなプロテアソーム複合体のインヒビターが報告されている。例えば、Dick, et al., Biochem. 30:2725 (1991); Goldberg, et al., Nature 357:375 (1992); Goldberg, Eur. J. Biochem. 203:9 (1992); Orłowski, Biochem. 29:10289 (1989); Rivett, et al., Archs. Biochem. Biophys. 218:1 (1989); Rivett, et al., J. Biol. Chem. 264:12, 215 (1989); Tanaka, et al., New Biol. 4:1 (1992)。プロテアソームインヒビターは、米国特許第5,693,617号でも検討されており、その開示内容は参照として本明細書に組み込まれる。

【0015】

背景として、プロテアソームは、蛋白質分解において重要な役割を果たす大型の多酵素複合体である。平均的なヒト細胞は、約30,000個のプロテアソームを含み、それぞれが、いくつかの蛋白質分解プロテアーゼを含む。これらの複合体は、転写、ウイルス感染、腫瘍形成、細胞周期、ストレス応答、リボソーム発生、異常な蛋白質代謝、神経および筋肉の変性、抗原プロセッシング、DNA修復、および細胞分化など、宿主全体の機能の調節を助ける。プロテアソーム活性は見事に調節されているため、それが過剰に作用しすぎる(必要以上に多くの蛋白質を分解する)か、作用が不振である(ある蛋白質を分解しない)と、病気になりやすい。細胞が蛋白質の分解を必要とするときには、大抵、ユビキチンと呼ばれる低分子のポリペプチド鎖で印を付ける。この構造体は、プロテアソームの閉ざされた蛋白質分解用の部屋の中に入る切符の役割をし、細胞が、E1、E2およびE3という3つの酵素活性を用いて、この切符にスタンプを押す。ATP-依存型E1酵素はユビキチンを活性化して、それをユビキチン結合酵素であるE2に連結させる。そして、ユビキチンリガーゼであるE3酵素が、ユビキチン分子を蛋白質に連結させる。このプロセスは、分解される蛋白質がユビキチン部分の長い鎖を引きずるようになるまでを繰り返され、ついには、プロテアソームが蛋白質を小さな断片に分解してしまう。このユビキチン-プロテアソーム経路は、細胞内のすべての異常な間違っ

【0016】

て折り畳まれた蛋白質のうちの90%と、短命な調節蛋白質のすべてを分解する。半減期が3時間よりも短い、これら短命な蛋白質は、全細胞蛋白質の10%から20%を占める。また、この経路は、長命な蛋白質の大部分も分解する。全部合わせると、ユビキチン-プロテアソーム経路は、全細胞蛋白質の80%から90%の分解に関与する。

既知のプロテアソームインヒビターに加えて、本発明は、プロテアソーム活性を阻害する能力を有するかを常にテストされうる他の分子も含む。このようなインヒビターを同定するためのさまざまな方法が当技術分野において例示されている。例えば、植物やもっと単純な生物由来の抽出物をしばしば含む低分子ライブラリーを、特異的なプロテアーゼ型を阻害する能力についてスクリーニングすることができる。あるいは、例えば、プロテアソーム構成要素の活性部位と相互作用するように特別に設計されたペプチドまたはペプチド模倣化合物を用いて、合理的な設計法を採用することも可能である(例えばSiman et al. (W091/13904); Poweres, et al., in Proteinase Inhibitors, Barrett, et al. (eds.), Elsevier, pp. 55-152 (1986) 参照)。インヒビターは、プロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害するZ-Gly-Gly-Leu-Hなどの触媒遷移状態の安定的アナログでもよい(Orłowski, Biochem. 29:10289 (1989)、また、Kennedy and Schultz, biochem. 18:349 (1979) 参照)。

【 0 0 1 7 】

また、文献で報告されているさまざまな天然および化学的なプロテアソームインヒビター、またはそのアナログが本発明に含まれるものとし、アルファ - ジケトンまたはアルファ - ケトンのエステルを含むペプチド、ペプチドクロロメチルケトン、イソクマリン、ペプチドスルホニルフルオリド、ペプチジルボロネート、ペプチドエボキシド、およびペプチジルジアゾメタンなどを含む。Angelastro, et al., J. Med. Chem. 33: 11 (1990); Bey, et al., EPO 363, 284; Bey, et al., EPO 363, 284; Bey, et al., EPO 364, 344; Grubb, et al., WO 88/10266; Higuchi, et al., EPO 393, 457; Ewoldt, et al., Mol. Immunol. 29(6): 713 (1992); Hernandez, et al., J. Med. Chem. 35(6): 1121 (1992); Vlasak, et al., J. Virol. 63(5): 2056 (1989); Hudig, et al., J. Immunol. 147(4): 1360 (1991); Odakc, et al., Biochem. 30(8): 2217 (1991); Vijayalakshmi, et al., Biochem. 30(8): 2175 (1991); Kam, et al., Thrombosis and Haemostasis 64(1): 133 (1990); Powers, et al., J. Cell. Biochem. 39(1): 33 (1989); Powers, et al., Proteinase Inhibitors, Barrett et al., Eds., Elsevier, pp. 55 - 152 (1986); Powers, et al., Biochem 29(12): 3108 (1990); Oweida, et al., Thrombosis Res. 58(2): 391 (1990); Hudig, et al., Mol. Immunol. 15 26(8): 793 (1989); Orłowski, et al., Arch. Biochem. and Biophys. 269(1): 125 (1989); Zunino, et al., Biochem. et Biophys. Acta 967(3): 331 (1988); Kam, et al., Biochem. 27(7): 2547 (1988); Parkes, et al., Biochem. J. 230: 509 (1985); Green, et al., J. Biol. Chem. 256: 1923 (1981); Angliker, et al., Biochem. J. 241: 871 (1987); Puri, et al., Arch. Biochem. Biophys. 27: 346 (1989); Hanada, et al., Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects, Katunuma, et al., Eds., Springer-Verlag pp. 25 - 36 (1983); Kajiwara, et al., Biochem. Int. 15: 935 (1987); Rao, et al., Thromb. Res. 47: 635 (1987); Tsujinaka, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1201 (1988).

Vinitzsky, et al. (Biochem. 31: 9421 (1992)、また、Orłowski, et al., Biochem. 32: 1563 (1993) 参照) によってプロテアソームのキモトリプシン様活性のインヒビターの可能性があるものとして試験された、P₁ 位に疎水性基を含むペプチドアルデヒドおよびペプチド・アルファ - ケトエステルも、本発明に含まれるものとする。文献に記載されている他のトリペプチドは、Ac - Leu - Leu - Leu - H、Ac - Leu - Leu - Met - OR、Ac - Leu - Leu - Nle - OR、Ac - Leu - Leu - Leu - OR、Ac - Leu - Leu - Arg - H、Z - Leu - Leu - Leu - H、Z - Arg - Leu - Phe - H、および Z - Arg - Ile - Phe - H などであるが、ここで、OR は、その前のアミノ酸残基のカルボニル基とともにエステル基を表し、これらも本発明に含まれるものとする。

【 0 0 1 8 】

10

20

30

40

50

Siman et al. (W091/13904) で開示されているキモトリプシン様プロテアーゼおよびそれらのインヒビターも本発明に含まれるものとする。これらのインヒビターは、R が水素か、またはN末端保護基であり、A4 が共有結合、アミノ酸またはペプチドであり、A3 が共有結合、D型アミノ酸であるPhe、Tyr、ValまたはValの保存的アミノ酸置換体であり、A2 が疎水性基またはリジンもしくはその保存的アミノ酸置換体であるか、またはA4 が2個以上のアミノ酸を含む場合にはA2はどのアミノ酸でもよく、そしてYが該プロテアーゼの活性部位との反応基である場合に、R - A4 - A3 - A2 - Yという化学式を有する。Powers (WO 92/12140) によって開示されている、ペプチドケトアミド、ケト酸、およびケトエステル、ならびにそれらをセリンプロテアーゼとシステインプロテアーゼの阻害に使用すること、また、Bar

10

【0019】

以下の化合物、またはそれらのアナログも、本発明においてプロテアソームインヒビターとして使用されることを想定している。カルパインインヒビターI、MG101、カルパインインヒビターII、エボキシマイシン(Epoxomicin)、フラクシオンI(FrI, Hela)、フラクシオンII(FII)、クラスト-ラクタシスチンβ-ラクトン、ラクタシスチン、MG-115、MG-132、NEDD8に対する抗血清、PA28アクチベーター、20Sプロテアソーム、プロテアソーム20Sα-タイプ1サブユニットに対するポリクローナル抗体、プロテアソーム26SサブユニットS2に対するポリクローナル抗体、プロテアソーム26SサブユニットS4に対するポリクローナル抗体、プロテアソーム26SサブユニットS5Aに対するポリクローナル抗体、プロテアソーム26SサブユニットS6に対するポリクローナル抗体、プロテアソーム26SサブユニットS6'に対するポリクローナル抗体、プロテアソーム26SサブユニットS7に対するポリクローナル抗体、プロテアソーム26SサブユニットS8に対するポリクローナル抗体、プロテアソームアクチベーターPA28アルファに対するポリクローナル抗体、プロテアソームアクチベーターPA28ガンマに対するポリクローナル抗体、プロテアソームアクチベーターPA700サブユニット10Bに対するポリクローナル抗体、26Sプロテアソームフラクシオン、プロテアソームインヒビターI、プロテアソームインヒビターII、プロテアソーム基質I(蛍光発光性)、プロテアソーム基質II(蛍光発光性)、プロテアソーム基質III(蛍光発光性)、プロテアソーム基質IV(蛍光発光性)、S-100フラクシオン、SUMO-1/セントリン-1(sentrin-1)(1-101)、SUMO-1/セントリン-1(1-97)、SUMO-1/セントリン-1に対する抗血清、Ubc10、Ubc5b、Ubc5c、Ubc6、Ubc7、Ubc9に対する抗血清、Ubc9、UbcH2/E2-14K、UbcH3/Cdc34、UbcH5a、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチンアルデヒド、ユビキチン結合酵素画分、ユビキチンC末端側ヒドロラーゼ、ユビキチンK48R、メチル化ユビキチン、GST-ユビキチン、(His)6ユビキチン、ユビキチン-AMC

20

30

40

【0020】

好適なプロテアソームインヒビターの種類は「PS-341」で、ボロン酸ジペプチドプロテアソームインヒビターである。PS-341は、転写因子NF-κBの活性化を阻害する。また、PS-341は、いくつかのアポトーシスインヒビターの発現を下方制御し、薬剤耐性多発性骨髄腫(MM)細胞株および患者細胞のカスパーゼ依存型アポトーシスを誘発し、MM細胞が骨髄間質細胞(BMSC)に結合するのを阻害し、また、骨髄環境においてMM増殖因子および生存因子の産生を阻害する。マウスの形質細胞腫モデルにおいて、PS-341は、用量依存的な態様で腫瘍増殖を阻害して、宿主の生存期間を延長する。再発した難治性MM患者におけるPS-341の第II相多施設臨床試験におい

50

て、いくつかの完全寛解を含む、客観的な奏効が見られた。

【0021】

本明細書において「薬剤」および「治療薬」という用語は、治療プロトコールにおいて腫瘍細胞などの癌細胞を曝露することが可能なものであると広義に定義される。本発明との関連では、このような薬剤は、例えばAra AC、5-FUおよびメトトレキサートなどの代謝アンタゴニスト、例えばタキソール(TAXOL)、インブラスチン(inblastine)およびビンクリスチンなどの抗分裂剤、例えばメルファラン、BCNUおよびナイトロジェン・マスタードなどのアルキル化剤、例えばVW-26、トポテカン、およびブレオマイシンなどのトポイソメラーゼIIインヒビター、例えばドキソルビシンおよびDHADなどの鎖開裂剤(strand-breaking agent)、例えばシスプラチンおよびCBDCAなどの架橋剤、放射線および紫外光などの化学療法薬であるが、これらに限定されるものではない。

10

【0022】

本明細書において「化学療法薬」という用語は、その細胞または組織の増殖が好ましくないときに、増殖型細胞または組織の増殖を阻害する化学試薬を含むものである。化学療法薬は、当技術分野において周知されており(例えば、Gilman A.G., et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Sec 12:1202-1263(1990)参照)、典型的には、腫瘍性疾患を治療するために使用される。化学療法において一般的に使用される化学療法薬を以下の表Iに示す。

20

【0023】

(表I)

【0024】

【表 1 - 1】

クラス	薬剤のタイプ	一般名 (別名)
アルキル化剤	ナイトロジェンマスタード	メクロレミタン (HN_2) シクロホスファミド イホスファミド メルファラン (L-サルコリシン) クロラムブシル
		ヘキサメチルメラミン チオテバ
	アルキルスルホネート	ブスルファン
アルキル化剤	ニトロソウレア	カルムスチン (BCNU) ロムスチン (CCNU) セムスチン (メチル-CCNU) ストレプトゾシン (ストレプトゾトシン)
		デカルバジン (DTIC ; ジメチル トリアゼノイミダゾールカルボ キサミド)
	アルキル化剤	シス-ジアミンジクロロ白金II (CDDP)
代謝拮抗剤	葉酸のアナログ	メトトレキサート (アメトプテリン)
	ピリミジン アナログ	フルオロウラシル (5-フルオロウラシル ; 5-FU) フロクスウリジン (フルオロデ オキシウリジン ; FUdR) シタラビン (シトシンアラビノ シド)
	プリンアナログ および関連インヒビター	メルカプトプリン (6-メルカプトプリン ; 6-MP) チオグアニン (6-チオグアニン ; TG) ペントスタチン (2'-デオキ シコホルマイシン)

【表 1 - 2】

クラス	薬剤のタイプ	一般名(別名)
天然産物	ビンカアルカロイド	ビンブラスチン(VLB)
		ビンクリスチン
	トポイソメラーゼ インヒビター	エトポシド
		テニポシド
		カンプトテシン
		トポテカン
		9-アミノ-カンプトテシン CPT-11
	抗生物質	ダクチノマイシン (アクチノマイシンD)
		アドリアマイシン (ドキソルビシン)
		ダウノルビシン (ダウノマイシン; ルビドマイシン)
		ドキソルビシン
		ブレオマイシン
		プリカマイシン (ミトラマイシン)
		ミトマイシン (ミトマイシンC)
		タキソール
		タキソテール
その他薬剤	酵素	L-アスパラギナーゼ
	生物反応修飾物質	インターフェロン α
		インターロイキン2
	白金配位錯体	シス-ジアミンジクロロ白金II (CDDP)
		カルボプラチン
	アントラセンジオン	ミトキサントロン
	置換尿素	ヒドロキシウレア
	メチルヒドラジン誘導体	プロカルバジン (N-メチルヒドラジン、 (MIH))
	副腎皮質抑制剤	ミトタン(<i>o,p'</i> -DDD)
		アミノグルテチミド

10

20

30

【表 1 - 3】

クラス	薬剤のタイプ	一般名（別名）
ホルモンおよび アンタゴニスト	副腎皮質ステロイド	プレドニゾン デキサメタゾン
	プロゲステリン	カプロン酸ヒドロキシプロゲステ ロン 酢酸メドロキシプロゲステロン 酢酸メゲストロール
	エストロゲン	ジエチルスチルベストロール エチニルエストラジオール
	抗エストロゲン	タモキシフェン
	アンドロゲン	プロピオン酸テストステロン フルオキシメステロン
	抗アンドロゲン	フルタミド
	ゴナドトロピン放出 ホルモンアナログ	ロイプロリド

10

本発明に係る方法で使用される化学療法薬は単剤であっても併用剤であってもよい。好適な併用剤は、例えば、抗分裂剤をアルキル化剤と併用したものなど、異なった作用機作をもつ薬剤が含まれよう。特に好適な実施態様において、本発明に係る方法で使用される化学療法薬はドキソルビシン（アドリマイシン）である。別の特に好適な実施態様において、本発明に係る方法で使用される化学療法薬はメルファランである。

20

【0027】

本明細書において「癌」という用語は腫瘍を包含し、インビトロの腫瘍および被験体の器官または身体の一部に形成されるインビボの腫瘍をともに含む。本発明に包含しようとする腫瘍の典型的な種類は、乳癌、皮膚癌、骨癌、前立腺癌、肝臓癌、肺癌、脳の癌、喉頭、胆嚢、膵臓、直腸、副甲状腺、甲状腺、副腎、神経組織、頭頸部、結腸、胃、気管支、腎臓などの癌に伴う腫瘍などである。具体的には、本発明によってその増殖速度が阻害される腫瘍は、基底細胞癌、潰瘍性および乳頭状の扁平上皮癌、転移性皮膚癌、骨肉腫、ユーイング肉腫、細網肉腫、骨髄腫、巨細胞腫、小細胞肺癌、胆石、膵島細胞腫、原発性脳腫瘍、急性および慢性のリンパ腫および顆粒球腫、毛様細胞腫、腺腫、過形成、髄様癌、褐色細胞腫、粘膜神経腫、小腸神経節性神経腫、過形成性角膜神経腫瘍、マルファン症候群様体質腫瘍（marfanoid habitus tumor）、ウィルムス腫瘍、セミノーマ、卵巣腫瘍、平滑筋腫瘍、子宮頸部形成異常および上皮内癌、神経芽細胞腫、網膜芽腫、軟部肉腫、悪性カルチノイド、局所的皮膚病変、菌状息肉腫、横紋筋肉腫、カポジ肉腫、骨原性およびその他の肉腫、悪性増殖、腎細胞腫瘍、赤血球増加症、腺癌、多形性膠芽腫、白血病、リンパ腫、悪性黒色腫、類表皮癌、およびその他の癌腫および肉腫に伴う腫瘍を含む。

30

【0028】

好適な実施態様において、腫瘍は多発性骨髄腫である。本明細書において「多発性骨髄腫」という用語は、癌性の形質細胞が制御不能に増殖して腫瘍を作る悪性の骨髄を意味する。これらの腫瘍が多数の部位で増殖すると多発性骨髄腫と呼ばれる。正常ならば、形質細胞は、骨髄中の構成細胞の5%未満であるが、多発性骨髄腫を患う人々では、10%から90%を超えるまでになる。骨髄における悪性の形質細胞の異常増殖は、身体全体にいくつが深刻な問題を惹き起す。時間がたつとともに、異常細胞が骨の内部に浸透して、骨皮質（外層）を浸食しうる。これら弱くなった骨は、特に脊椎、頭蓋骨、肋骨および骨盤における骨折に対して感受性が強くなる。

40

【0029】

本明細書において「癌細胞」という用語は、腫瘍細胞を含もうとするものであり、異常な（高い）速度で分裂する細胞を意味する。癌細胞は、扁平上皮癌、基底細胞癌、汗腺癌、脂腺癌、腺癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、未分化癌、気管支癌、黒色腫、腎細胞癌

50

、肝癌 - 肝細胞癌、胆管癌、胆管癌、乳頭腺癌、移行上皮癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、乳癌、消化器癌、結腸癌、膀胱癌、前立腺癌、および頭頸部の扁平上皮癌などの癌腫；線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、軟骨肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、滑膜肉腫および中皮肉腫などの肉腫；顆粒球性白血病、単球性白血病、リンパ性白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、細網肉腫、またはホジキンズ病などの白血病またはリンパ腫；および神経膠腫、髄膜腫、髄芽腫、神経鞘腫、またはエピディモーマ (e p i d y m o m a) などの神経系の腫瘍などであるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 3 0 】

本明細書において「癌細胞の増殖を阻害する」という用語は、望ましくないまたは不適切な細胞増殖を阻害することを含もうとするものである。この阻害は、急激な増殖を含む増殖の阻害を含もうとするものである。また、「癌細胞の増殖を阻害する」という用語は、被験体における腫瘍の増殖を防止すること、または被験体に既に存在する腫瘍の増殖を低下させることを含む、腫瘍増殖阻害を含もうとするものである。また、この阻害は、腫瘍が一つの部位から別の部位に転移することの阻害ということでもよい。癌の症状が少なくとも一つ緩和、終了、減速、または予防されれば、癌は「阻害された」ことになる。また、本明細書においては、癌の再発または転移が軽減、減速、遅延、または予防されても、癌は「阻害された」ことになる。

【 0 0 3 1 】

治療薬と接触した結果、該治療薬との接触がない場合の増殖と比較して、癌細胞の増殖速度が抑制されれば、癌細胞はその化学療法薬に対して「感受性」である。治療薬に対して感受性であるという性質は、異なった条件下で所定の治療薬に対して異なった程度の「感受性」を示すさまざまな癌細胞によって変動するものである。

【 0 0 3 2 】

治療薬と接触した結果、該治療薬との接触がない場合の増殖と比較して、癌細胞の増殖速度が抑制されないか、非常に低い程度に抑制される場合、癌細胞はその化学療法薬に対して「耐性」である。治療薬に対して耐性であるという性質は、異なった条件下で所定の治療薬に対して異なった程度の「耐性」を示すさまざまな癌細胞によって大きく変動するものである。

【 0 0 3 3 】

患者が、ある治療薬および/またはプロトコールに対して「感受性」であるか「耐性」であるかは、医師(「主治医」)が当業者として、既知の技術を用いて簡単に判定することができる。例えば、主治医が、関係する具体的な癌；具体的な治療薬の薬力学的特徴；患者の大きさ、年齢、および一般的な健康状態；癌の程度、関与または重篤度；投与される具体的な化合物；投与方式；およびその他関連する状況などであるが、これらに限定されない、いくつかの要素を考慮する

「投与する」という用語は、プロテアソームインヒビターおよび/または治療薬が、癌を治療するかまたは癌細胞増殖を阻害するという目的とされた機能を発揮することを可能にする投与経路を含もうとするものである。利用することのできる投与経路の例は、注射(皮下、静脈内、非経口、腹腔内、髄膜内など)、経口、吸入および経皮などである。注射は、ボーラス注射でもよいし、持続注入でもよい。投与経路に応じて、プロテアソームインヒビターまたは治療薬を、目的とする機能を発揮する能力に有害な影響を与える可能性のある自然条件から保護するために、選ばれた材料でコートするか、またはその中に置くことができる。プロテアソームインヒビターおよび/または治療薬は、単独で投与することもでき、または、医薬的に許容可能な担体とともに投与することもできる。さらに、プロテアソームインヒビターおよび/または治療薬は、プロテアソームインヒビターおよび/または治療薬の混合剤として投与することもでき、また、医薬的に許容可能な担体とともに同時投与することもできる。また、プロテアソームインヒビターおよび/または治療薬は、インビボで活性型に変化するプロドラッグとして投与することもできる。

【 0 0 3 4 】

「有効量」という言葉は、プロテアソームインヒビターおよび治療薬と一緒に使われるときには、癌を治療するか、例えば、望ましくない細胞増殖を防止するなど、癌細胞の増殖を阻害するか、または、被験体の体内で既存の良性細胞塊または悪性腫瘍のサイズを低下させるのに必要または十分な量のことである。有効量は、治療または阻害すべき細胞増殖のタイプ、使用される治療薬のタイプ、具体的なプロテアソームインヒビター、被験体の大きさ、または癌細胞増殖または腫瘍の重篤度などの要素によって変動しうる。例えば、併用剤を構成する各個別薬剤（プロテアソームインヒビターまたは化学療法薬）の選択が、何が「有効量」を構成するかということに影響を与えるかもしれない。当業者は、上記の要素を調べて、過度な実験を要することなく、プロテアソームインヒビターまたは治療薬を併用したものの有効量についての決定を行うことができるだろう。

10

【0035】

例えば、インビトロアッセイ法を用いて、プロテアソームインヒビターまたは化学療法薬を併用したものの「有効量」を決定することができる。当業者は、上記のインビトロアッセイ法で使用するために併用剤中の各個別の薬剤の適当量を選択するだろう。細胞の生き残った画分を用いて、その特定併用剤について、選択した量が「有効量」であるか否かを決定することができる。例えば、そのアッセイ内で使用された選択量は、好ましくは、細胞の50%以上、より好ましくは75%、最も好ましくは95%以上を死滅させなければならない。好適な実施態様において、プロテアソームインヒビターおよび治療薬の有効用量は低毒性（subtoxic）用量である。本明細書において低毒性という用語は、約10%未満の細胞の死滅をもたらす用量を意味する。一つの実施態様において、プロテアソームインヒビターの有効用量は、約0.001 mg/m²体表面積/日から約4.0 mg/m²体表面積/日である。別の実施態様において、プロテアソームインヒビターの有効用量は、約0.001 mg/m²体表面積/日から約0.01 mg/m²体表面積/日である。別の実施態様において、プロテアソームインヒビターの有効用量は、約0.001 mg/m²体表面積/日から約0.1 mg/m²体表面積/日である。さらなる実施態様において、プロテアソームインヒビターの有効用量は、約0.1 mg/m²体表面積/日から約2.0 mg/m²体表面積/日である。なおさらなる実施態様において、プロテアソームインヒビターの有効用量は、約0.1 mg/m²体表面積/日から約1.7 mg/m²体表面積/日である。

20

【0036】

投薬計画も、何が有効量を構成するかに影響することがありうる。プロテアソームインヒビターは、治療薬を投与する前、それと同時に、またはその後に投与することができる。さらに、いくつかに分割した投薬量、および不均一な投薬量（staggregated dose）を毎日または連続的に投与するか、または、投与量を継続して注入することができる。さらに、治療状況に必要な条件によって示されたところにしたがって、投薬量を均等に増減させることもできる。

30

【0037】

「投薬計画」という用語は、プロテアソームインヒビターおよび/または治療薬が癌を治療するかまたは癌細胞増殖を阻害するという目的の機能を発揮することを可能にする、プロテアソームインヒビターおよび治療薬を投与するタイミングおよび投与の流れを意味する。例えば、プロテアソームインヒビターおよび/または治療薬を投与するタイミングおよび/または流れなどの投薬計画は、使用されるプロテアソームの薬物動力学、使用される治療薬の薬物動力学、治療または阻害される細胞増殖のタイプ、被験体の大きさ、癌細胞増殖または腫瘍の重篤度、または有効用量などの要素に応じて変動しうる。併用剤を構成する各薬剤（プロテアソームインヒビターおよび/または治療薬）のそれぞれを選択することが、「投薬計画」の構成に影響を与えうる。例えば、細胞を治療薬と接触させた後にプロテアソームインヒビターと接触させることが望ましい場合には、ゆっくりした薬理動態を有するプロテアソームインヒビターを、治療薬を投与する前に投与して、プロテアソームインヒビターが、治療薬に接触した後の細胞に接触するようにすることも可能である。速い薬理動態を有するプロテアソームインヒビターは、治療薬の後に投与して、プ

40

50

ロテアソームインヒビターが、治療薬に接触した後の細胞に接触するようにすることも可能である。当業者は、過度の実験を要することなく、プロテアソームインヒビターおよび／または治療薬の適当な投薬計画を決定するときに、上記の要素と既知のプロテアソーム阻害研究を概観することができよう。

【 0 0 3 8 】

本明細書において「被験体」という用語は、温血動物み、好ましくは、ヒトなどの哺乳動物を含む。好適な実施態様において、被験体は霊長類である。さらにより好適な実施態様において、被験体はヒトである。

【 0 0 3 9 】

(I . 本発明の方法)

本発明に係る方法は、被験体において、癌を治療するか、腫瘍増殖など癌細胞の増殖を予防するための治療用および予防用の組成物に関する。本発明に係る組成物は、有効量のプロテアソームインヒビター、および有効量の治療薬、例えば化学療法薬を、例えば、医薬上許容されうる担体に入れたものを含む。本発明の別の態様は、パッケージ化されたプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬を含む。また、パッケージ化された化合物および薬剤は、癌を治療するか、または癌細胞の増殖を予防するためにプロテアソームインヒビター／化学療法薬の併用剤を使用するための説明書も含む。

【 0 0 4 0 】

別の態様において、本発明は、有効用量のプロテアソームインヒビター、および有効量の、例えば化学療法薬などの治療薬を被験体に投与することによって、被験体において、例えば、腫瘍増殖を阻害するなど、癌を治療するための方法に関する。本発明に係る方法は、有効に作用するのに必要となる、例えば化学療法薬などの治療薬の量を低減させることができ、治療を受ける被験体に副作用が起こりにくくする。

【 0 0 4 1 】

さらに別の態様において、本発明は、骨髄細胞をプロテアソームインヒビターおよび例えば化学治療剤などの治療用薬剤に曝露することによって、骨髄をパージする、すなわち、骨髄から癌を除去する方法に関する。そして、パージされた骨髄細胞を、その骨髄を取り出した被験体の体内に戻すか、別の被験体の体内に設置することができる。

【 0 0 4 2 】

一般的に、本発明に係る方法は、プロテアソームインヒビターおよび例えば化学治療剤などの治療用薬剤の併用剤であって、アポトーシスまたは細胞死を促進するために有効なものを癌細胞と接触させるステップを含む。一つの実施態様において、プロテアソームインヒビターと治療薬はパッケージ化されている。別の実施態様において、プロテアソームインヒビターの有効用量は、約 $0.001 \text{ mg} / \text{m}^2$ 体表面積 / 日から約 $4.0 \text{ mg} / \text{m}^2$ 体表面積 / 日である。

【 0 0 4 3 】

本明細書において、「細胞死」という用語は、哺乳動物の細胞が死ぬか、最終分化するプロセスを含む。このようなプロセスは、壊死および最終細胞分化だけでなく、アポトーシス（可逆的および不可逆的）およびアポトーシスに関係すると考えられるプロセス（例えば細胞老化）も含む。本明細書において、「細胞死」は、無核細胞（例えば赤血球細胞、血小板など）の死または切迫死だけでなく、有核細胞（例えばニューロン、ミオサイト、肝細胞など）の死または切迫死も意味する。細胞死は、典型的には、原形質膜の外葉上に、細胞内膜のリン脂質であるホスファチジルセリン（PS）が露出することによって明らかになり、当技術分野において認められている方法によって検出することができる。

【 0 0 4 4 】

本明細書において、「アポトーシス」という用語は、当技術分野において既知の技術を用いて検出することもできるプログラム細胞死を含む。例えば、アポトーシスによる細胞死は、例えば、最終的には細胞の断片化をもたらす細胞の萎縮、膜泡形成（membrane blebbing）およびクロマチン凝縮などによって特徴づけられる。また、アポトーシスを起こしている細胞は、ヌクレオソーム間DNA損傷の特徴的なパターンも示

10

20

30

40

50

す。アポトーシスは、Fas 介在型シグナルの存在下または不在下で測定することができる。一つの実施態様において、例えば形質細胞アポトーシスなどの細胞アポトーシスの過程でのミトコンドリアからのチトクロムC放出を検出することができる(例えば、Bossy-Wetzel, E., et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322: 235-42 に記載されている)。別のアッセイ法は、無細胞系において誘導される核アポトーシスの細胞蛍光定量法(例えば、Lorenzo, H.K., et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322: 198-201 に記載されている); アポトーシス・ヌクレアーゼアッセイ法(例えば、Hughes, F.M. (2000) *Methods in Enzymol.* 322: 47-62 に記載されている); フローおよびレーザー走査サイトメトリーによって、例えば、アポトーシスを起こした形質細胞などのアポトーシス細胞を分析すること(例えば、Darzynkiewicz, Z., et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322: 18-29 に記載されている); アネキシンV 標識によるアポトーシス検出(例えば、Bossy-Wetzel, E., et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322: 15-18 に記載されている); 細胞死遺伝子の一過性形質転換アッセイ(例えばMiura, M., et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322: 480-92 に記載されている); および例えば、アポトーシスを起こした形質細胞などのアポトーシス細胞においてDNA 切断を検出するアッセイ法(例えばKaufman, S.H., et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322: 3-15 に記載されている)などである。また、プロピジウムアイオダイド染色によって、またはTUNELアッセイによってアポトーシスを測定することも可能である。

【0045】

別の態様において、本発明は、癌細胞をプロテアソームインヒビターおよび治療薬と接触させることによって癌細胞の増殖を阻害する方法を特徴とする。一般的に、この方法は、癌細胞を、プロテアソームインヒビターおよび癌細胞の増殖を低下させるのに効果的な治療薬と接触させるステップを含む。癌細胞の増殖が低下したことは、以下の生物活性の少なくとも一つによって、当技術分野において既知の方法を用いて検出できる: (1) 固形腫瘍細胞の増殖低下、(2) 細胞周期のDNA 合成期(S 期)にある細胞画分の減少、(3) 分化関連マーカーの発現上昇、(4) Ki-67 (MIB-1) などの増殖関連マーカーの発現低下、例えば、Ki-67 の発現が約30~50% 低下する。発現の変化は、蛋白質またはmRNA のレベルで起こりうる。

【0046】

本方法は、培養細胞に対して、例えばエキスピボで実施するか、または、被験動物に存在する細胞に対して、例えば、インピボでの治療プロトコールの一部として実施することができる。ヒトまたは被験動物に対して治療計画を実施することも可能である。

【0047】

本発明に係る方法は、例えば化学療法薬などの治療薬で効果を示すのに必要とされる量を減らして、治療を受ける被験体が副作用を起こしにくくすることができる。

【0048】

一つの実施態様において、処理される細胞は多発性骨髄腫細胞である。例えば、本方法を実施して、多発性骨髄腫の細胞腫瘍の増殖を防止することができる。本明細書において、「多発性骨髄腫」という用語は、癌性の形質細胞が制御を失って増殖して腫瘍を形成する骨髄の悪性腫瘍を意味する。これらの腫瘍が多数の部位で増殖すると、多発性骨髄腫と呼ばれる。

【0049】

化学療法薬の具体例は、以下のような抗腫瘍物質などである。ビンブラスチンなどの分裂抑制剤; シスプラチン、カルボプラチン、およびシクロホスファミドなどのアルキル化剤; 5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、ヒドロキシウレア、またはN-[5-[N-(3,4-ジヒドロ-2-メチル-4-オキソキナゾリン-6-イルメチル)-

N - メチルアミノ] - 2 - テノイル] - L - グルタミン酸などの代謝拮抗剤；例えばアドリアマイシンおよびブレオマイシンのような、インターカレートする抗生物質；アスパラギナーゼなどの酵素；エトポシドなどのトポイソメラーゼインヒビター；例えば、抗腫瘍応答を促進するための生物学的反応修飾物質抗腫瘍物質で、インターフェロンなど；アクチノマイシン D などのアポトーシス剤；および、例えばタモキシフェンなどの抗エストロゲン、または例えば 4' - シアノ - 3 - (4 - フルオロフェニルスルホニル) - 2 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 3' - (トリフルオロメチル) プロピオンアニリドなどの抗アンドロゲンなどの抗ホルモン。化学療法薬のその他の例は、表 1 に列挙されたものなどである。

【 0 0 5 0 】

治療上有効な量のプロテアソームインヒビター、および治療上有効な量の、例えば化学療法薬などの治療薬の決定は、医師（「主治医」）が当業者として、既知の技術を用いて、および同じような状況下で得られた結果を観察して簡単に判定することができる。投薬量は、主治医の判断における患者の要件、治療される症状の重篤さ、および使用される具体的な化合物に応じて変動する。治療上有効な量ないし用量を決定する際に、主治医に寄って考慮される多くの要素は、関係する具体的な過形成細胞 / 新生細胞；具体的な薬剤の薬力学的特徴ならびに投与の方式および経路；治療の所望の経時変化；哺乳動物の種；その大きさ、年齢、および一般的な健康状態；関与する特定の疾患；その疾患の関与の程度または重篤度；各患者の反応；投与される具体的な化合物；投与方式；投与される調剤の生物利用可能性の特徴；選択された投薬計画；併用療法の種類；およびその他関係のある状況などであるが、これらに限定されるものではない。例えば、米国特許第 5, 427, 916 号には、各患者における抗腫瘍療法の有効性を予測する方法が記載されており、また、本発明の治療プロトコールと一緒に使用できる一定の方法が示されている。

【 0 0 5 1 】

治療は、その化合物の最適な用量よりも少ない、少なめの投薬量で開始することができる。その後、その状況下で最適な効果が得られるまで少しずつ投薬量を増やして行くべきである。便宜上、一日分の全量を分割して、必要があれば、1日の間に何回かに分けて投与することも可能である。

【 0 0 5 2 】

プロテアソームインヒビターの治療上有効な用量は、1日当たり体表1平方メートルにつき約 0.001 ミリグラム (mg / m^2 体表面積 / 日) から約 $4 \text{ mg} / \text{m}^2$ 体表面積 / 日と予想される。化学療法薬の治療上有効な用量は、当技術分野において認知されている方法を用いて決定されているか、決定することができる。

【 0 0 5 3 】

プロテアソームインヒビターと化学療法薬を具体的に併用したものの癌を治療する上での有効性は、抗癌治療を受けている患者から採取した2つ以上のサンプルを比較することによって監視することができる。一般的には、治療を開始する前に患者から第一のサンプルを採取し、治療中に一つ以上のサンプルを採取することが好ましい。そのような使用方法においては、治療前の癌細胞の発現の基準量を決定してから、その癌細胞の発現の基準量の変化を治療中監視する。あるいは、治療中に採取した2つ以上の連続したサンプルを、治療前の基準サンプルを必要とせずに使用することもできる。そのように使用する場合、被験体から得た第一のサンプルを、癌細胞の発現が増加したか減少したかを判定するための基準として使用する。

【 0 0 5 4 】

一般的に、治療処置の有効性を観察するときには、患者から得た2つ以上のサンプルを試験する。好ましくは、少なくとも一つの治療前サンプルを含む、3つ以上の連続して得られたサンプルを使用する。

【 0 0 5 5 】

(II . 医薬組成物)

別の態様において、本発明は、治療上有効な量のプロテアソームインヒビターおよび /

または例えば化学療法薬などの治療薬を含む組成物であって、１種類以上の医薬上許容されうる担体（添加剤）および／または希釈剤と一緒に製剤された組成物を提供する。以下で詳しく説明するように、本発明に係る医薬組成物は、固形状または液体状にして投与するために特別に製剤することができ、以下に適合するものなどがある。（１）例えば、水薬（水性または非水性の溶液または懸濁液）、錠剤、ポーラス、粉剤、顆粒剤、ペースト剤などの経口投与；（２）例えば、滅菌した水溶液または懸濁液として、例えば皮下、筋肉内または静脈内に注射することによる非経口投与；（３）例えば、皮膚に塗布されるクリーム、軟膏、またはスプレーなどの局所投与；（４）例えば、ペッサリー、クリームまたは泡として腔内または直腸内、または（５）例えば、化合物を含む水性エアロゾル、リボソーム製剤、または固形粒子としてのエアロゾル。

10

【 0 0 5 6 】

本明細書において、「治療上有効な量」という語句は、ある動物において、医学的処置に適用することができる合理的な効果／リスク比で、例えば、増殖を阻害することによって、および／または細胞の少なくとも一つの部分集団の分化を誘導することによって、プロテアソームインヒビターおよび化学療法薬の併用剤の量、または、何らかの所望の治療効果を生じるのに有効な、プロテアソームインヒビターおよび化学療法薬を併用したものを含む組成物の量を意味する。

【 0 0 5 7 】

本明細書において用いられる「医薬上許容されうる」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、またはその他の問題または合併症を起こすことなしに、合理的な効果／リスク比と釣り合うようにしてヒトおよび動物の組織に接触させて使用するのに適している、プロテアソームインヒビターおよび化学療法薬の併用剤、物質、組成物、および／または剤形を意味する。

20

【 0 0 5 8 】

本明細書において、「医薬上許容されうる担体」という語句は、対象となる化学物質がある器官または身体の一部から別の器官または身体の一部に運搬または輸送することに関与する、液状または固形の充てん剤、希釈剤、賦形剤、溶剤または封入材料など、医薬上許容されうる材料、組成物または媒体を意味する。各担体は、製剤の残りの成分と適合していて、患者に有害ではないという意味で「許容されうる」ものでなければならない。医薬上許容されうる担体として利用できる材料の例には、（１）ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖類；（２）コーンスターチおよびポテトスターチなどのデンプン；（３）セルロース、および、その誘導体である、カルボキシメチル・セルロース・ナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなど；（４）トラガカント粉末；（５）麦芽；（６）ゼラチン；（７）タルク；（８）ココアバターおよび坐薬用ワックスなどの賦形剤；（９）ピーナッツオイル、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油などの油類；（１０）プロピレングリコールなどのグリコール；（１１）グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどの多価アルコール類；（１２）オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルのなどのエステル；（１３）寒天；（１４）水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；（１５）アルギン酸；（１６）発熱物質を含まない水；（１７）等張食塩水；（１８）リンゲル液；（１９）エチルアルコール；（２０）リン酸緩衝溶液；および（２１）医薬用製剤に使用される、その他の非毒性の適合物質などである。

30

40

【 0 0 5 9 】

「医薬上許容されうる担体」という用語は、本発明に含まれるプロテアソームインヒビターおよび／または化学療法薬の比較的非毒性の無機酸および有機酸の付加塩を意味する。これらの塩は、プロテアソームインヒビターまたは化学療法薬の最終的な単離精製の間に、または、精製したプロテアソームインヒビターまたは化学療法薬を遊離塩基の形にして、適当な有機酸または無機酸と別々に反応させ、このようにして形成された塩を単離することによって、インサイチューで調製することができる。代表的な塩は、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミ

50

チン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプタン酸、ラクトピオン酸、およびラウリルスルホン酸塩などである。(例えば、Berge, et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照。)

別の場合には、本発明に係る方法において有用なプロテアソームインヒビターまたは化学療法薬は1つ以上の酸性官能基を含み、そのため、医薬上許容されうる塩基と医薬上許容されうる塩を形成することができる。これらの例において、「医薬上許容されうる塩」という用語は、プロテアソームインヒビターまたは化学療法薬の比較的非毒性の無機塩基および有機塩基の付加塩を意味する。これらの塩も、同様に、プロテアソームインヒビターまたは化学療法薬の最終的な単離精製の間に、または、精製したプロテアソームインヒビターまたは化学療法薬を遊離酸の形にして、医薬上許容されうる金属カチオンの水酸化物、炭酸、重炭酸など、適当な塩基と、アンモニアと、または医薬上許容されうる有機性の一級、二級または三級のアミンと反応させて、インサイチューで調製することができる。代表的なアルカリまたはアルカリ性土類塩は、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウムの塩などである。塩基付加塩の形成に有用な有機アミンの代表的なものは、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどである(例えば、Berger, et al., 前掲参照)。

【0060】

ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなどの湿潤剤、乳化剤、および潤滑剤、ならびに着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味料、着香料および芳香剤、保存剤ならびに酸化防止剤も組成物中に入れることができる。

【0061】

医薬上許容されうる酸化防止剤の例は、(1)アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウムなどの水溶性酸化防止剤；(2)アスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなどの油溶性酸化防止剤；および(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤などである。

【0062】

本発明に係る方法において有用な製剤は、経口、経鼻、局所(口腔および舌下など)、直腸、膣、エアロゾル、および/または非経口の投与に適した製剤などである。これらの製剤は、適宜、単位投薬形態で存在することも可能であるし、製薬学の技術分野で周知の方法によって調製することも可能である。一つの剤形を作り出すために担体材料と併用できる活性成分の量は、治療される宿主、および具体的な投薬方法によって変動する。一つの剤形を作り出すために担体材料と併用できる活性成分の量は、一般的には、治療効果を生じさせる化合物量である。一般的に、100パーセント中、この量は、約1パーセントから約99パーセントまでの範囲であり、好ましくは、約5パーセントから約70パーセントであり、もっとも好ましくは、約10パーセントから約30パーセントである。

【0063】

これらの製剤または組成物を調製する方法は、プロテアソームインヒビターまたは化学療法薬を、担体、および選択的には、1種類以上の補助成分と結合させるステップを含む。一般的に、プロテアソームインヒビターまたは化学療法薬を、均一および密接に液体担体、または微粉化された固形担体、またはその両方と結合させ、次に、必要であれば、生成物の形を整えることによって、製剤を調製する。

【0064】

経口投与に適した製剤は、それぞれが、活性成分として所定量のプロテアソームインヒビターまたは化学療法薬を含む、カプセル剤、カシェ剤、ピル、錠剤、トローチ剤(風味付けされた基剤、通常はスクロースおよびアカシアまたはトラガカントを用いる)、粉末

10

20

30

40

50

剤、顆粒剤の形になっているか、または、水性または非水性の液体中に溶液または懸濁液として、または、油中水または水中油の液体乳剤として、またはエリキシル剤もしくはシロップ剤として、またはトローチ剤（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤を用いる）および／またはうがい薬の形にすることができる。化合物は、ポーラス、舐剤またはペーストとして投与することも可能である。

【0065】

経口投与のための固形剤形（カプセル、錠剤、ピル、ドラジェー、粉末、顆粒など）において、活性成分を、クエン酸ナトリウムまたは第二リン酸カルシウムなど、1種類以上の医薬上許容されうる担体と、および／または以下のいずれかと混合する。（1）デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸などの充てん剤または増量剤；（2）例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、および／またはアカシアなどの結合剤；（3）グリセロールなどの保湿剤；（4）寒天、炭酸カルシウム、ポテトまたはタピオカのデンプン、アルギン酸、一定のケイ酸、および炭酸ナトリウムなどの崩壊剤；（5）パラフィンなどの緩染剤；（6）四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤；（7）例えばアセチルアルコールおよびグリセロール・モノステアレートなどの湿潤剤；（8）カオリンおよびベントナイトクレイなど吸収剤；（9）タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびこれらの混合物などの潤滑剤；および（10）着色剤。カプセル、錠剤およびピルの場合、医薬組成物は、緩衝剤を含むことも可能である。また、同様のタイプの固形組成物を、ラクトースまたは乳糖、およびに高分子量のポリエチレングリコールなどの賦形剤を用いるソフトカプセルまたはハードフィルカプセルの充てん剤として使用することも可能である。

【0066】

錠剤は、選択的には1種類以上の補助成分とともに、圧縮または成形によって作ることができる。圧縮錠剤は、結合剤（例えばゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、錠剤分解物質（例えばデンプングリコール酸ナトリウム、または架橋したカルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤または分散剤を用いて調製することができる。成形錠剤は、粉末ペプチドまたはペプチド模倣剤を不活性液体希釈剤で湿らせたものを適当な成型機の中で成形して製造することができる。

【0067】

錠剤、およびその他のドラジェー、カプセル、ピルおよび顆粒などの固形剤形は、選択的に、腸溶コーティングおよびその他薬剤製剤分野で周知のコーティングなど、コーティングや殻によって分割または調製することも可能である。また、例えば、所望の放出パターンを提供するためのさまざまな割合にしたヒドロキシプロピルメチルセルロース、その他のポリマー基質、リポソームおよび／または小球体を用いて、活性成分の持続的または抑制的な放出ができるようにそれらを製剤することも可能である。それは、例えばバクテリア保持フィルターによる濾過によって、または、滅菌水に溶かすことができる滅菌された固形組成物の形になった滅菌剤を取り込むか、使用直前に別の滅菌注射媒体を取り入れることによって滅菌することが可能である。また、これらの組成物は、選択的に乳白剤を含むこともでき、また、胃腸管の特定の部位でのみ、またはそこで選択的に活性成分を、選択的には遅延されるように放出する組成物であってもよい。使用することができる包埋組成物の例は、ポリマー物質およびワックスなどである。活性成分は、適当な場合であれば、上記の賦形剤を1種類以上用いたマイクロカプセル形にすることも可能である。

【0068】

経口投与用の液体剤形は、医薬上許容されうるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシルなどである。活性成分に加えて、液体剤形は、例えば、水またはその他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油類（特に、綿実油、ラッカ

セイ油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油、およびゴマ油)、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、および、ソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物など、当技術分野において広く使用されている不活性型希釈剤を含むことが可能である。

【0069】

不活性型希釈剤以外に、経口組成物は、湿潤剤、乳化および懸濁剤、甘味料、着香料、着色料、芳香剤および保存剤などのアジュバントを含むこともできる。

【0070】

活性プロテアソームインヒビターおよび/または化学療法薬に加えて、懸濁液は、例えばエトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウム・メタヒドロキシド、ベントナイト、寒天およびトラガカント、ならびにそれらの混合物などの懸濁剤を含むことも可能である。

10

【0071】

直腸または膣に投与するための製剤は坐薬として提供され、1種類以上のプロテアソームインヒビターおよび/または化学療法薬を、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐薬用ワックスまたはサリチル酸を含む、1種類以上の適当な非刺激性賦形剤または担体であって、室温では固体であるが、体温では液体となるため、直腸または膣の中で溶けて活性成分を放出する賦形剤または担体と混合して調製することができる。

【0072】

20

また、膣に投与するのに適した製剤には、当技術分野において適当であることが知られている担体を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、泡剤、またはスプレー剤などもある。

【0073】

局所投与または経皮投与するためのプロテアソームインヒビターおよび/または化学療法薬の剤形は、粉剤、スプレー剤、軟膏、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、溶液、貼布、および吸入剤などである。活性成分は、滅菌条件下で医薬上許容されうる担体と、また、必要とされるかもしれない保存剤、緩衝剤、または推進剤と混合することができる。

【0074】

30

軟膏、ペースト、クリーム、およびゲルは、プロテアソームインヒビターおよび/または化学療法薬以外に、動物性および植物性の脂肪、油類、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、および酸化亜鉛、またはそれらの混合物などの賦形剤を含むことができる。

【0075】

粉末およびスプレーは、プロテアソームインヒビターおよび/または化学療法薬以外に、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤を含むことができる。スプレーは、クロロフルオロハイドロカーボン、および、ブタンおよびプロパンなどの揮発性の非置換型ハイドロカーボンなど、通常の推進剤をさらに含むことも可能である。

40

【0076】

あるいは、プロテアソームインヒビターおよび/または化学療法薬は、エアロゾルによって投与することも可能である。これは、化合物を含む水性エアロゾル、リポソーム製剤、または固形粒子を調製して得ることができる。非水性の(例えばフルオロカーボン推進剤)懸濁液を用いることもできよう。薬剤を化合物の分解をもたらすような剪断に曝すことを最少にするので、超音波ネブライザーが好適である。

【0077】

普通、水性エアロゾルは、薬剤の水性溶液または懸濁液を、通常の医薬上許容されうる担体または安定化剤とともに処方して作成される。担体および安定化剤は、具体的な化合

50

物の条件によって変わるが、典型的には、非イオン性界面活性剤（Tweens、Pluronic、またはポリエチレングリコール）、血清アルブミンなどの無害な蛋白質、ソルビタンエステル、オレイン酸、レシチン、グリシンなどのアミノ酸、緩衝剤、塩、糖または糖アルコールなどである。エアロゾルは、通常、等張溶液から調製される。

【0078】

経皮貼布には、プロテアソームインヒビターおよび/または化学療法薬を身体に抑制的に輸送できるという、さらなる長所がある。このような剤形は、薬剤を適当な媒体に溶解または分散して作成することができる。また、吸収促進剤を用いて、ペプチド模倣薬が皮膚を通過して流動するのを増加させることができる。速度調節膜を備えるか、ペプチド模倣薬をポリマー基質またはゲルに分散させることによって、このような流動の速度を調節

10

【0079】

点眼製剤、眼用の軟膏剤、粉末、溶液なども、本発明の範囲内にあるものと考えられる。

【0080】

非経口投与に適した本発明の医薬組成物は、1種類以上のプロテアソームインヒビターおよび1種類以上の化学療法薬を、1種類以上の医薬上許容されうる滅菌された等張性の水性または非水性の溶液、分散液、懸濁液または乳液、または、使用直前に滅菌した注射溶液または分散液に再構成できる滅菌粉末剤であって、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、想定されているレシipientの血液と等張な製剤にする溶質、または懸濁剤もしくは増粘剤を含むことができるものと一緒に含む。

20

【0081】

本発明に係る医薬組成物で使用することが可能である、適当な水性および非水性の担体は、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびこれらを適当に混合したもの、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射できる有機エステルなどである。例えば、レシチンなどのコーティング材料を用いて、または、分散液の場合には必要とされる粒子サイズを維持することによって、また、界面活性剤を使用することによって、適正な流動性を維持することができる。

【0082】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含むこともできる。例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸など、さまざまな抗細菌剤および抗真菌剤を含ませることによって、微生物の作用を確実に防止することができる。また、糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含ませることが望ましいかもしれない。また、注射用医薬剤形の持続的吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなど、吸収を遅延させる薬剤を含ませることによって生じさせることができる。

30

【0083】

場合によっては、薬剤の効果を持続させるために、皮下注射液または筋肉内注射液からの薬剤吸収を持続させることが望ましい。これは、水溶性が低い結晶性もしくは非結晶性の物質の液体懸濁物を使用することによって実現することができる。そして、薬剤吸収速度は溶解速度に依存し、次に、溶解速度は、結晶の大きさおよび結晶の形に依存しうる。あるいは、非経口投与される剤形の遅延吸収は、薬剤を油性媒体に溶解または懸濁することによっても達成される。

40

【0084】

注射用の持続性薬剤形は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生物分解性ポリマー中にプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬のマイクロカプセル基質を形成させることによって作成される。ポリマーに対する薬剤の比率、および使用される具体的なポリマーの性質に応じて、薬剤の放出速度を調節することができる。別の生物分解性ポリマーの例は、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）などである。また、持続性の注射用

50

製剤は、薬剤を、身体組織に適合するリポソームまたはマイクロエマルジョンに捕捉させることによって調製する。

【 0 0 8 5 】

本発明に係るプロテアソームインヒビターおよび化学療法薬を医薬品としてヒトまたは動物に投与する場合、それらだけで、または、医薬上許容されうる担体とともに、例えば 0 . 1 から 9 9 . 5 % (より好ましくは 0 . 5 から 9 0 %) の活性成分を含む医薬組成物として投与することができる。

【 0 0 8 6 】

本発明に係る医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量は、患者に対して毒性となることなく、具体的な患者、組成物、および投与方法によって所望の治療反応を達成するのに効果的な活性成分の量が得られるよう変動させることができる。

10

【実施例】

【 0 0 8 7 】

(実施例)

材料および方法の項で述べる以下の方法を、以下に示すインビトロおよびインビボの実施例全体にわたって使用した。

【 0 0 8 8 】

(材料および方法)

(組織培養)

ヒトMM細胞株は、MM . 1 S、RPMI - 8 2 2 6 / S、ならびにそのドキシソルピシン (Dox 4 0) およびメルファラン (LR 5) - 耐性の亜細胞株 (sub - lines) である ARP - 1、S 6 B 4 5、NCI - H 9 2 9 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) および INA 6 (Renate Burger, University of Erlangen - Nuernberg, Germany から贈与) を含んでいた。腫瘍細胞は、MM患者の骨髄から新たに単離した。

20

【 0 0 8 9 】

(症例報告)

難治性の Ig G ラムダ MM を再発した 5 8 歳の女性は、以前、メルファランとプレドニゾ ; ピンクリスチン、アドリマイシン (ドキシソルピシン)、デキサメタゾン (VAD) とシクロホスファミド ; 高用量のメルファランおよび自家幹細胞移植 ; アルファ - インターフェロン ; およびサリドマイドによる治療を受けていた。インフォームドコンセントを受けた後、施設内倫理委員会 (IRB) が承認したプロトコールにしたがって、1 . 3 m g / m² のサイクリック PS - 3 4 1 を 2 週間は週に 2 回投与し、1 週間休みをおいて 静脈内に (IV) 投与した。PS - 3 4 1 を 3 サイクル投与した後、血清中のパラプロテインは 5 . 1 g m / d L から 3 . 3 g m / d L に低下したが、患者が、疲れるようになって既往の神経障害を悪化させた。そのため、PS - 3 4 1 の用量を 1 m g / m² に減らして、4 サイクルの治療を終了した。パラプロテイン (5 . 0 g m / d L) および循環形質細胞 (circulating plasma cells) の増加によって示された進行性疾患のため、デキサメタゾン (各サイクルにつき 2 週間に 4 0 m g を 週 2 回) を加えた。腫瘍によって産生されるモノクローナル蛋白質 (M - 成分) の末梢血中レベルを測定して評価すると、この患者の全身腫瘍組織量は 4 . 7 g m / d L へと僅かに減少し、循環形質細胞が一時的に除去されたが、彼女は、急速に進行性の疾患を発症して、6 サイクル後には 4 8 % の循環形質細胞をもつにいたり、PS - 3 4 1 プロトコールによる治療を中断した。その後、静脈内への (IV) シクロホスファミド ; サリドマイド ; サリドマイド単独、およびデキサメタゾンおよびピアキシ (bia xin) ; ならびに、サリドマイドおよびデキサメタゾンとともにドキシル (Doxil) (リポソーム状ドキシソルピシン) によって治療したが効果はなかった。この時点で、骨髄 (BM) 穿刺によって MM 細胞を単離し、以前記載したようにして精製した (Mitsuiades, C . S . , et al . , Blood 9 8 : 7 9 5 , 2 0 0 1) 。

30

40

50

【0090】

(材料)

PS-341は、Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA) によって提供された。MTT、デキサメタゾン、ドキソルビシン、およびメルファランは、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から入手した。

【0091】

Ku 70および80の抗体は、Lab Vision Corporation (Fermont, CA) から入手した。

【0092】

(方法)

RNA単離、遺伝子発現プロファイリング、およびデータ解析は、以前記載したとおりに行った。PS-341処理細胞のシグナル伝達状態のハイスループット・グローバル・プロテオミクス解析は、例えば、以前に記載されている (Mitsuiades, N. et al., Blood 2003 Mar 15; 101(6): 2377-80 および Mitsuiades, C. S., et al., Semin Oncol. 2003 Apr.; 30(2): 156-60) KPKS-1.0 および KPSS-1.0 プラットフォームを用いた多重免疫プロットティング (multiplex-immunoblotting) アッセイ法によって実施した。免疫プロットティング解析、および、3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウム・プロミドによる細胞生存率の定量 (MMT) アッセイを以前記載したとおりに実施した。

【0093】

実験はすべて3回以上繰り返し、各実験条件を少なくとも4回反復用ウェルで繰り返した。代表的な実験結果を示す。LD50値は、SPSS-11.0統計用パッケージを用いて計算した。統計的有意性を二元配置分散分析法と、その後でダンカンの事後検定を行って試験した。すべての解析において、 $P < 0.05$ を統計的に有意と考えた。

【0094】

(実施例1: PS-341の低毒性濃度は、化学療法薬に対する癌細胞の感受性を促進する)

MM-1S細胞をドキソルビシン (40 nM)、メルファラン (1 μ M) またはデキサメタゾン (0.5 μ M) で24時間前処理してから、PS-341 (2 nM) をさらに24時間加えた。図1Aに示すように、PS-341は、低毒性濃度で、低毒性濃度のドキソルビシンおよびメルファランに対するMM-1S細胞の感受性を顕著に促進した (どちらの場合も $P < 0.001$) (黒棒: PS-341無添加、白棒: PS-341添加)。すなわち、PS-341は、DNA損傷化学療法薬に対し、MM-1S細胞を感作した。しかしながら、低毒性濃度のPS-341は、デキサメタゾンの抗-MM作用を強化しなかった ($P < 0.05$)。したがって、PS-341とデキサメタゾンの間には相加的な細胞毒性のみが存在する。

【0095】

(実施例2: PS-341は、ドキソルビシンのLD50を低下させる)

PS-341 (2 nM) 存在下と不在下でMM-1S細胞に対するドキソルビシンの効果について、用量応答解析を実施した。図1Bに示すように、MM-1S細胞におけるドキソルビシンに対するLD50は、PS-341不在下で150 nM、PS-341 (2 nM) 存在下で26 nMであった。すなわち、PS-341は、ドキソルビシンに対するLD50を150 nMから26 nMに低下させる。患者の血清中でのPS-341の濃度は10~30 nMであり、最大が100 nMであるが、これは、インビボで共同作用を達成するのに十分である。

【0096】

(実施例3: ドキソルビシンおよびPS-341の連続投与は、相乗的抗MM作用に影響を与える)

ドキソルビシンおよびPS-341の連続投与が、それらの相乗的抗MM作用に影響を与えるか否かを調べた。以下の実験を行った。MM-1S細胞を、(a)ドキソルビシン(50 ng/ml)で24時間前処理してからPS-341(2 nM)をさらに24時間加えるか、または(b)PS-341で24時間前処理してからドキソルビシンをさらに24時間加えるか、または、(c)PS-341およびドキソルビシンで24時間処理した。図1Cに示すように、これらの条件下では、PS-341とドキソルビシンを併用したときの方が、どちらの薬剤単独で処理したときよりも強力であった(すべての場合で $P < 0.05$)が、最も顕著な相乗効果は、MM細胞をドキソルビシンで前処理した後PS-341で処理したときに観察された。このように、すべての場合に相乗作用が見られるが、もっとも強い相乗作用は、細胞をドキソルビシンで前処理した後PS-341で処理したときに見られる。

10

【0097】

(実施例4: PS-341は、MM細胞株のすべてを化学療法に対して感作する)

PS-341がMM細胞株のすべてを化学療法に対して感作するか否かを調べた。RPMI-8226/S細胞、ARP-1細胞、S6B45細胞、NCI-H929細胞およびINA6細胞を、ドキソルビシン(50 ng/ml)で24時間前処理してからPS-341(2 nM)でさらに24時間処理した。図1Dに示すように、PS-341は、すべてのMM細胞株を化学療法に対して感作する。

【0098】

(実施例5: PS-341は、患者の初代MM細胞をドキソルビシンに対して感作する)

20

PS-341が、PS-341を投与されることがない患者由来の初代MM細胞を感作するか否かを調べた。PS-341を投与されることがない患者由来の初代MM細胞を、ドキソルビシン(50 ng/ml)で24時間前処理してから、PS-341(2 nM)でさらに24時間処理した。図1Eに示すように、PS-341は、患者の初代MM細胞をドキソルビシンに対して感作する。

【0099】

(実施例6: PS-341は、ドキソルビシン薬剤感受性および薬剤耐性のMM細胞の両方において、化学療法剤感受性を高める)

PS-341が、ドキソルビシンに対する耐性について選択された細胞を感作するか否かを調べた。ドキソルビシン耐性RPMI-Dox40細胞を、ドキソルビシン(800 ng/ml)か、またはドキソルビシンなしで24時間前処理してから、PS-341(2-10 nM)でさらに24時間処理した。図1Fに示すように、PS-341は、ドキソルビシンに対してRPMI-Dox40細胞を感作する。したがって、重要なことは、ドキソルビシンに対する耐性について選択された細胞においても同一の感作作用が観察されたことであって、PS-341が、薬剤感受性および薬剤耐性のMM細胞における化学療法剤感受性を高める。

30

【0100】

(実施例7: PS-341は、メルファラン薬剤感受性および薬剤耐性のMM細胞の両方において、化学療法剤感受性を高めることを示している)

40

PS-341が、メルファランに対する耐性について選択された細胞を感作するか否かを調べた。ドメルファラン耐性LR5細胞を、メルファラン(5 μ M)か、またはメルファランなしで24時間前処理してから、PS-341(2 nM)でさらに24時間処理した。図1Gに示すように、PS-341は、メルファランに対してLR5細胞を感作する。したがって、重要なことは、メルファランに対する耐性について選択された細胞においても同一の感作作用が観察されたことであって、さらに、PS-341が、薬剤感受性および薬剤耐性のMM細胞における化学療法剤感受性を高めることを示している。

【0101】

(実施例8: PS-341と化学療法との間の相乗作用は、化学療法薬に対する耐性を逆転させる)

50

インターフェロン- γ 治療、サリドマイド単独、または細胞傷害性薬剤もしくはステロイドと併用したもの、リポソームドキソルビシン、およびPS-341単独、またはデキサメタゾンと併用したものなどの従来からの高用量化学療法後に再発した患者から単離した初代MM細胞の化学療法剤感受性に対するPS-341の効果を調べた。PS-341による治療後再発した患者から単離したMM細胞を、ドキソルビシン(100 ng/ml)か、またはドキソルビシンなしで24時間前処理してから、さらにPS-341(5-20 nM)で24時間処理した。これらの患者からのMM細胞は、インビトロでは、PS-341(PS-341感受性患者のMM細胞におけるIC50<5 nMと比較して、IC50が>50 nM)またはドキソルビシンによる単剤治療のいずれに対しても感受性が低かった。しかし、図1Hに示すように、ドキソルビシンによる前処理は、PS-341に対する細胞の耐性を克服し、かつ、ドキソルビシンとPS-341の併用によって、有意なMM細胞死をもたらした。したがって、PS-341と化学療法の相乗作用は、どちらの薬剤単独に対する耐性も逆転することができる。

10

【0102】

(実施例9: PS-341は、細胞接着による薬剤耐性(CAM-DR)を無効化する)

PS-341が、細胞接着による薬剤耐性(CAM-DR)を無効化するか否かを調べた。MM-1S細胞を、フィブロネクチン(FN)で、またはフィブロネクチンなしでコートされたウェルの中で、ドキソルビシン(100-200 ng/ml)によって24時間処理した。PS-341(10 nM)を加えて、さらに24時間置いた。すべての場合で、細胞生存率(%) (平均値 $\pm$ SD)はMTTによって定量されている。すべての実験を少なくとも3回繰り返し、各実験条件を少なくとも4回反復用ウェルで繰り返した。

20

【0103】

ドキソルビシンに対するMM細胞の感受性は、腫瘍細胞が細胞外マトリックス成分、特にフィブロネクチンに結合すると低下する。この細胞接着による薬剤耐性(CAM-DR)は、細胞死レセプターであるFasに結合し、また、カスパーゼ-8の活性化を低下させるためにカスパーゼインヒビターであるFLIPの利用可能性が上昇することと関係している。PS-341は、FLIP発現を低下させ、Fas-依存型のカスパーゼ-8活性化を促進する。図1Iに示すように、MM-1S細胞は、フィブロネクチンが存在しないときよりも、存在するときの方がドキソルビシンに対する感受性が低い。PS-341は、この抗アポトーシス作用を完全に克服する($P < 0.05$)。したがって、PS-341は、細胞接着による薬剤耐性(CAM-DR)を無効化する。

30

【0104】

(実施例10: PS-341による化学療法薬感受性化のメカニズム)

PS-341は、Bcl-2、A1、cIAP-2、XIAPおよびFLIPの発現を低下させる。NF- κ Bがこれらのアポトーシスインヒビターを下方制御し、ドキソルビシンに対してMM細胞を感作するため、これらの効果は、少なくともその一部が、PS-341によるNF- κ B活性化が原因である可能性がある。PS-341による化学療法薬感受性化のメカニズムさらに調べるために、オリゴヌクレオチド-マイクロアレイ解析を用いてPS-341で処理されたMM-1S細胞と対照細胞の転写プロファイルを検出した(図2A)。PS-341は、アポトーシス、細胞増殖、プロテアソーム機能、および熱ショック応答に関係する転写産物の変化を惹き起す。化学療法に応答した転写産物に対するPS-341の効果を特異的に調べた。その結果、PS-341(100 nM, 1~8時間)によって引き起こされる転写の変化には、遺伝毒性ストレスに対する応答に関与する分子の機能的な集団の下方制御が含まれる。具体的には、PS-341は、遺伝毒性ストレスに対する防御的細胞応答のエフェクターに対応する転写産物を下方制御する。すなわち、複製、転写および細胞分裂の際にDNAのねじれを緩和し、ミトキサントロン、ドキソルビシン、およびエトポシドによって阻害される(Hazlehurst, L. A., et al. Blood 98:1897, 2001)トポイソメラーゼII β ; p5320と共同してゲノムの完全性と安定性の維持に関与するブルーム症候群遺伝子産

40

50

物；塩基除去修復および酸化的DNA損傷からの防御に關与する8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼおよびウラシルDNAグリコシラーゼ(Rosenquist, T A, et al. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 94:7429, 1997)；ミスマッチ修復(Sixma, T. K. Curr. Opin. Struct. Biol 11:47, 2001)に關与するmutSホモログ2および6；生理的な酸化反応、V(D)J組換え、イオン化、放射線照射、および化学療法薬によって起こるDNAの二本鎖切断の修復において機能するDNA依存型蛋白質キナーゼの触媒サブユニットおよびKu自己抗原(Featherstone, C. and Jackson, S. P. Curr Biol 9:R759, 1999)；損傷特異的DNA結合蛋白質2；およびヌクレオチド除去および組換え修復に關与するRAD1ホモログ。

10

【0105】

選ばれた変化を、さらに蛋白質レベルで確認した。プロテオミクス解析を検出する、PS-341で処理したMM-1S細胞のシグナル伝達状態のプロテオミクス解析によって、PS-341と8時間インキュベートした後にDNA依存型蛋白質キナーゼの下方制御が確認された(図2B~2C)。さらに、常法による免疫ブロッティングによって、PS-341によって引き起こされるKuサブユニット(80および70kD)の時間依存的な下方制御が確認された(図2D)。

【0106】

再発した難治性MM患者におけるPS-341の第II相多施設臨床試験において、いくつかの完全寛解を含む、顕著な抗腫瘍活性が示されている。プロテアソームインヒビターによって、毒性を高めることなく、抗癌治療に対する顕著な感作が行われることは、機能的なp53状態とは無関係に、別の動物モデルにおいても示されている。

20

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1A】図1A~1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Aでは、MM-1S細胞を、ドキソルビシン(40nM)、メルファラン(1μM)またはデキサメタゾン(0.5μM)で24時間前処理してから、PS-341(2nM)を加えてさらに24時間置いた(黒棒：PS-341無添加、白棒：PS-341添加)。

【図1B】図1A~1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Bは、PS-341(2nM)の存在下(四角)または不在下(ひし形)でのMM-1S細胞に対するドキソルビシンの効果に關する用量応答解析を示しており、PS-341によってドキソルビシンのLD50が150から26nMに低下することを明らかにしている。

30

【図1C】図1A~1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Cは、MM-1S細胞を、ドキソルビシン(50ng/ml)で24時間前処理してからPS-341(2nM)をさらに24時間加える(a)か、PS-341で24時間前処理してからドキソルビシンをさらに24時間加える(b)か、または、PS-341とドキソルビシンを一緒にして24時間処理した(c)実験を示している(黒棒：対照、白棒：ドキソルビシン単独、網目棒：PS-341、灰色棒：ドキソルビシン+PS-341)。

40

【図1D】図1A~1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Dは、RPMI-8226/S細胞、ARP-1細胞、S6B45細胞、NCH-H929細胞およびINA6細胞を、ドキソルビシン(50ng/ml)で24時間前処理してからPS-341(2nM)でさらに24時間処理した実験を示している(黒棒：対照、白棒：ドキソルビシン単独、網目棒：PS-341、灰色棒：ドキソルビシン+PS-341)。

【図1E】図1A~1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Eは、PS-341を投与されることがない患者由来の初代MM細胞をドキソルビシン(50ng/ml)で24時間前処理して

50

から、PS-341 (2 nM) でさらに24時間処理した実験を示している。(黒棒：対照、白棒：ドキソルピシン単独、網目棒：PS-341、灰色棒：ドキソルピシン+PS-341)。

【図1F】図1A～1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Fは、ドキソルピシン耐性RPMI-Dox40細胞を、ドキソルピシン(800 ng/ml)で(白棒)、またはドキソルピシンなし(黒棒)で24時間前処理してから、さらにPS-341(2-10 nM)で24時間処理した実験を示している(黒棒：PS-341無添加、白棒：PS-341添加)。

【図1G】図1A～1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Gは、メルファラン耐性LR5細胞を、メルファラン(5 μ/ml)で、またはメルファランなしで24時間前処理してから、さらにPS-341(2 nM)で24時間処理した実験を示している。

【図1H】図1A～1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Hは、PS-341による治療後再発した患者から単離したMM細胞を、ドキソルピシン(100 ng/ml)で(白棒)、またはドキソルピシンなし(黒棒)で24時間前処理してから、さらにPS-341(5-20 nM)で24時間処理した実験を示している)。

【図1I】図1A～1Iは、PS-341が、多発性骨髄腫(MM)細胞をDNA損傷化学療法に対して感作することを示している。図1Iは、MM-1S細胞を、フィブロネクチン(FN)で(白棒)、またはフィブロネクチンなし(黒棒)でコートされたウェルの中で、ドキソルピシン(100-200 ng/ml)で24時間前処理した実験を示している。PS-341(10 nM)を加えて、さらに24時間置いた。すべての場合で、細胞生存率(%) (平均値±SD)はMTTによって定量されている。

【図2A】図2A～2Dは、PS-341が、遺伝毒性ストレス応答経路を阻害することを示している。図2Aは、PS-341で処理したMM-1S細胞におけるオリゴヌクレオチド-マイクロアレイ解析によって検出された転写プロファイルを示している。PS-341(100 nM、1～8時間)によって引き起こされる転写上の変化には、遺伝毒性ストレスに対する応答に関与する機能的な分子群の下方制御が含まれていた。彩度は、各対照との違いの程度に比例している。

【図2B】図2A～2Dは、PS-341が、遺伝毒性ストレス応答経路を阻害することを示している。図2Aは、PS-341で処理したMM-1S細胞におけるオリゴヌクレオチド-マイクロアレイ解析によって検出された転写プロファイルを示している。図2Bは、PS-341処理したNN-1S細胞のシグナル伝達状態のプロテオミクス解析結果を示しており、PS-341によるインキュベートして8時間後のプロテオミクス解析でDNA PKが下方制御されていることを示している(各矢印によって示す)。

【図2C】図2A～2Dは、PS-341が、遺伝毒性ストレス応答経路を阻害することを示している。図2Aは、PS-341で処理したMM-1S細胞におけるオリゴヌクレオチド-マイクロアレイ解析によって検出された転写プロファイルを示している。図2Cは、PS-341処理したNN-1S細胞のシグナル伝達状態のプロテオミクス解析結果を示しており、PS-341によるインキュベートして8時間後のプロテオミクス解析でDNA PKが下方制御されていることを示している(各矢印によって示す)。

【図2D】図2A～2Dは、PS-341が、遺伝毒性ストレス応答経路を阻害することを示している。図2Dは、PS-341が、Ku80とKu70の蛋白質発現を低下させることを確認する免疫プロットを示している。

10

20

30

40

【図 1 A】

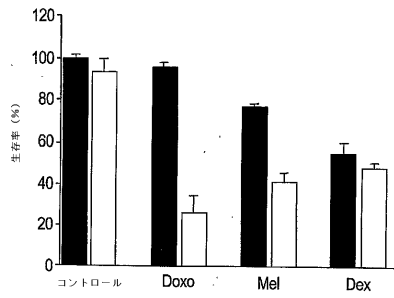


Fig. 1A

【図 1 C】

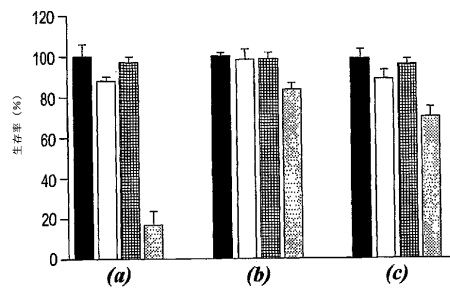


Fig. 1C

【図 1 B】

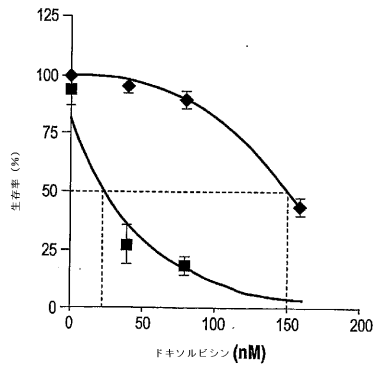


Fig. 1B

【図 1 D】

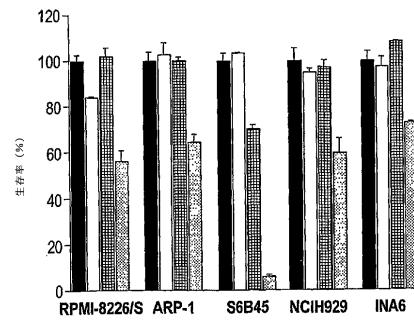


Fig. 1D

【図 1 E】

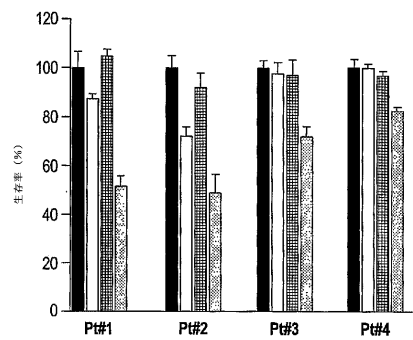


Fig. 1E

【図 1 G】

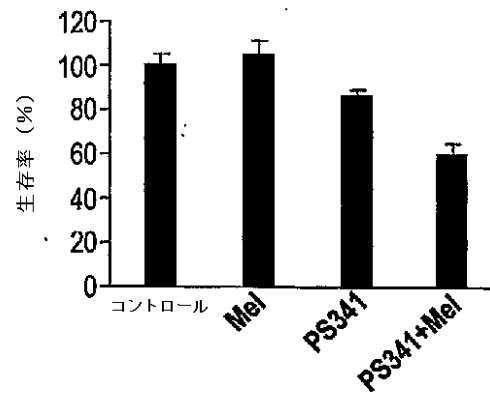


Fig. 1G

【図 1 F】

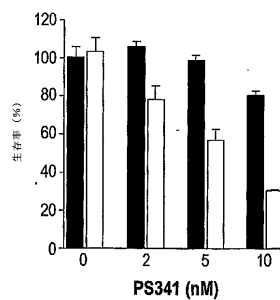


Fig. 1F

【図 1 H】

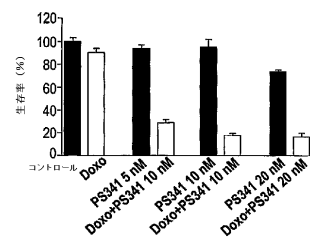


Fig. 1H

【図 1 I】

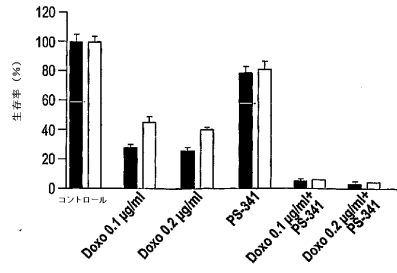


Fig. 1I

【図 2 A】

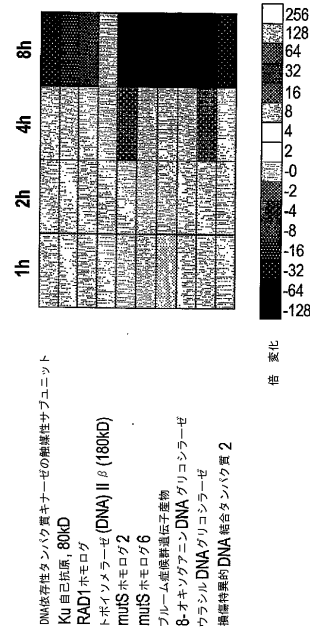


Fig. 2A

【図 2 B】

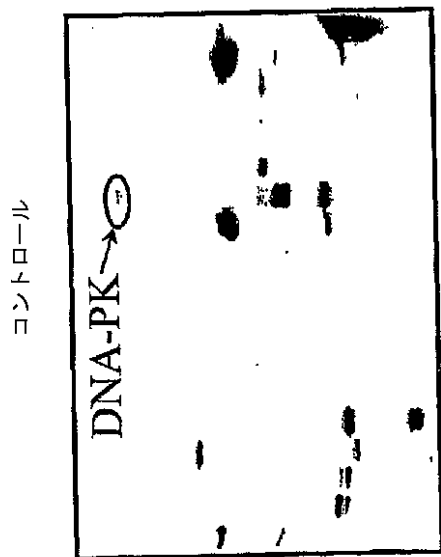


Fig. 2B

【図 2 C - D】

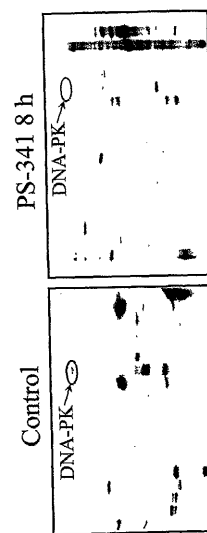


Fig. 2C

Fig. 2B

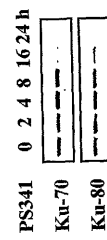


Fig. 2D

フロントページの続き

- (72)発明者 アンデルソン, ケネス シー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02482, ウェルズリー, ウェストン ロード 264
- (72)発明者 ヒデシマ, テル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックライン, フランシーズ ストリート 72
- (72)発明者 ミツツィアデス, コンスタンティン エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02215, ボストン, ブルックライン アベニュー 400, ナンバー11イー
- (72)発明者 ミツツィアデス, ニコラス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02131, ロズリンドル, ピンハースト ストリート 24, ナンバー2

合議体

審判長 川上 美秀
審判官 天野 貴子
審判官 前田 佳与子

- (56)参考文献 国際公開第00/47230/(WO,A1)
特開2007-224053号(JP,A)
HIDESHIMA T.et al,Cancer Res,2001年,Vol.61,
No.7,p.3071-6
MA M.H.et al,Blood,2001年,Vol.98, No.11,p.473a
THORNTON J.D.et al,Surgical Forum,2001年,Vol.52,p.200-201
MCCONKEY D.J.et al,Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting,2001年,Vol.42,p.229-230

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

A61K 33/22
A61P 35/00
CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS/STN