

(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2017-533952

(P2017-533952A)

(43) 公表日 平成29年11月16日 (2017. 11. 16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/675 (2006. 01)	A 6 1 K 31/675	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 13/10 (2006. 01)	A 6 1 P 13/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁)

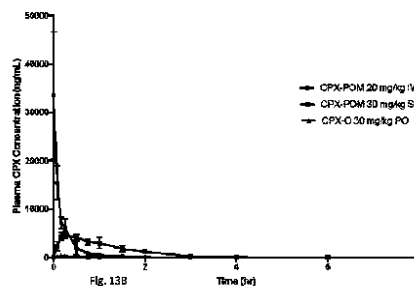
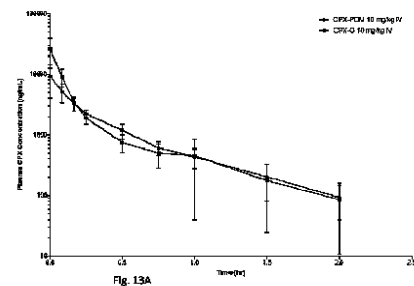
(21) 出願番号	特願2017-526594 (P2017-526594)	(71) 出願人	517164604 ザ ユニバーシティ オブ カンザス アメリカ合衆国, カンザス 66045, ローレンス, ジェイホーク プールバード 1450, ストロング ホール 240
(86) (22) 出願日	平成27年11月10日 (2015. 11. 10)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成29年7月11日 (2017. 7. 11)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/059955	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02016/077346	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成28年5月19日 (2016. 5. 19)	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(31) 優先権主張番号	62/078, 069		
(32) 優先日	平成26年11月11日 (2014. 11. 11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/134, 747		
(32) 優先日	平成27年3月18日 (2015. 3. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクスプロドラッグを用いる、膀胱癌の処置方法

(57) 【要約】

膀胱癌を処置する方法が提供される。膀胱癌を処置する方法は、シクロピロクス、又はシクロピロクスオラミン、又は本願で提供される式のいずれか1つの構造を有するシクロピロクス-POMプロドラッグ、又はそれらの誘導体、又はそれらの立体異性体、又はそれらの薬学的に許容し得る塩を有する医薬組成物を提供し；そして前記医薬組成物を、膀胱癌を罹患する対象に投与することを含み得る。シクロピロクス、又はシクロピロクスオラミン、又はシクロピロクス-POMプロドラッグは、治療有効量で投与され得る。



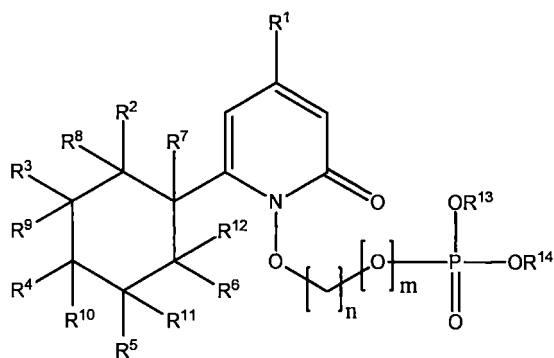
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

膀胱癌の処置方法であって：

シクロピロクス、又はシクロピロクスオラミン、又は式 1：

【化 1】



式 1

〔式中、

$R^1 \sim R^{12}$ は、各々独立して、1又は2以上の水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせを含む；

$R^{13} \sim R^{14}$ は、各々独立して、1又は2以上の陽イオン、ナトリウムイオン、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせを含む；

n は0～20であり、置換又は無置換であり；そして

m は0、1又は2である]

の構造を有するシクロピロクスーPOMプロドラッグ、又はそれらの立体異性体、又はそれらの薬学的に許容し得る塩を有する医薬組成物を提供し；そして

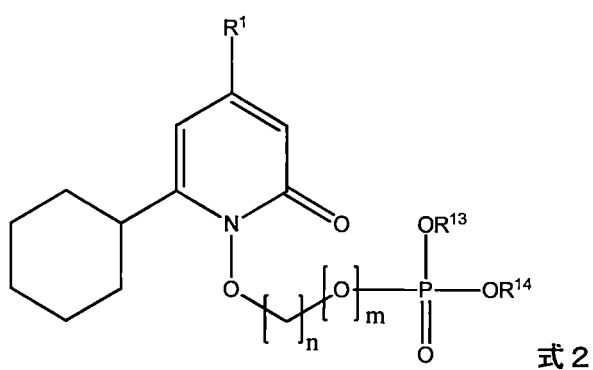
前記医薬組成物を、膀胱癌を罹患する対象に投与すること

を含む、方法。

【請求項 2】

前記化合物が、式 2：

【化 2】



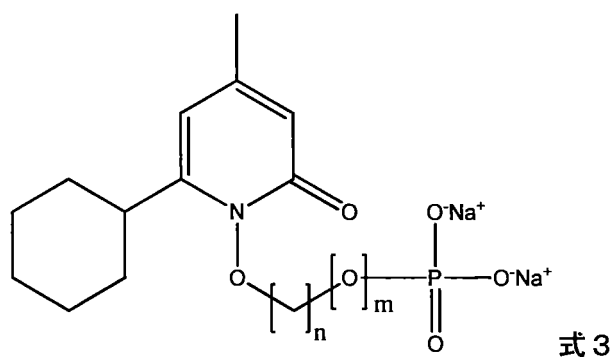
10

の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記化合物が、式 3：

【化 3】



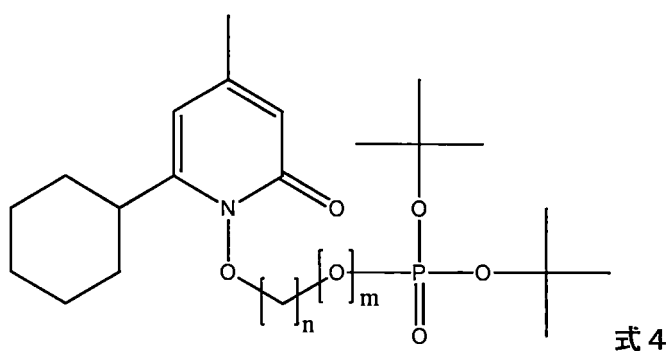
20

の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記化合物が、式 4：

【化 4】



40

の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し

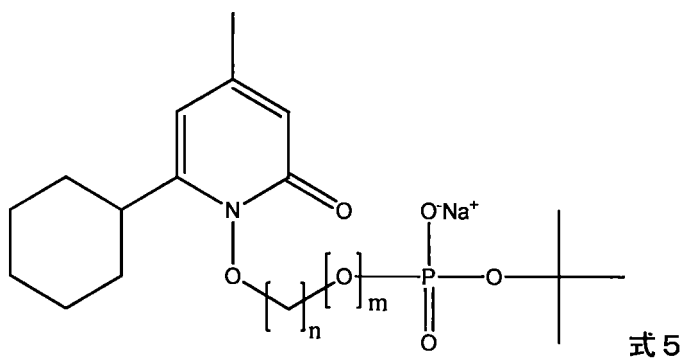
50

得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記化合物が、式 5：

【化 5】

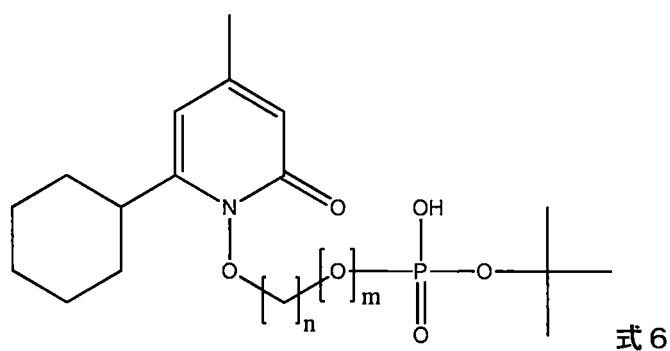


の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記化合物が、式 6：

【化 6】

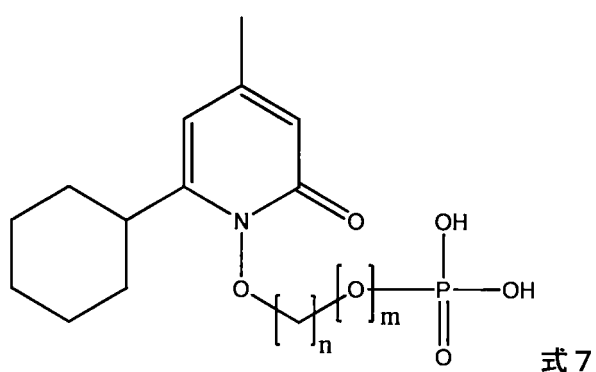


の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記化合物が、式 7：

【化 7】



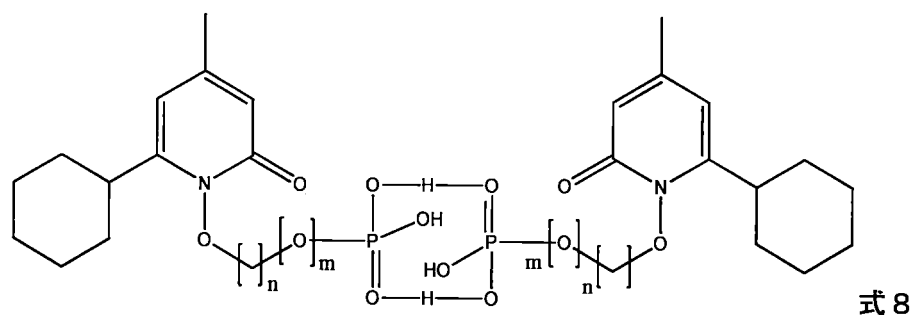
10

の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記化合物が、式 8：

【化 8】



20

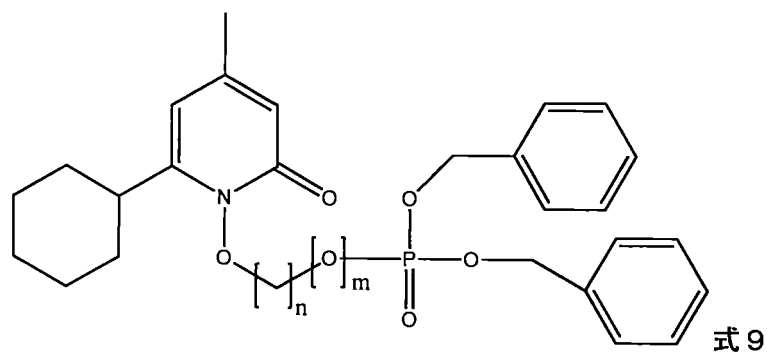
30

の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記化合物が、式 9：

【化 9】



40

の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し

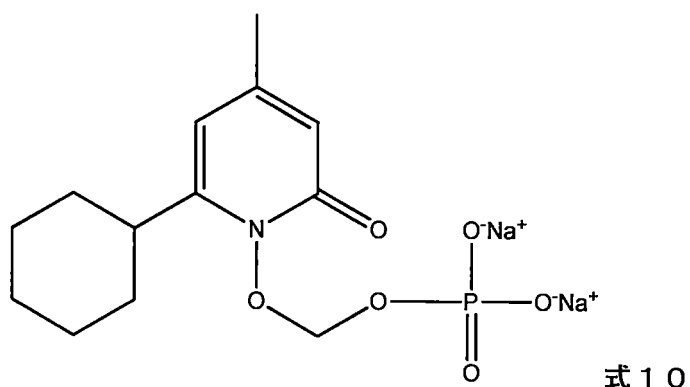
50

得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

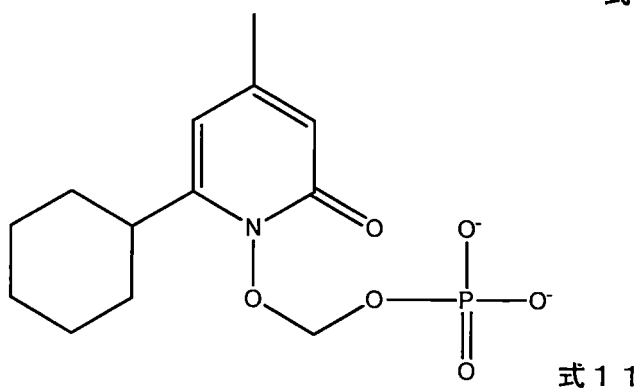
【請求項 10】

前記化合物が、式 10、11、12 又は 13：

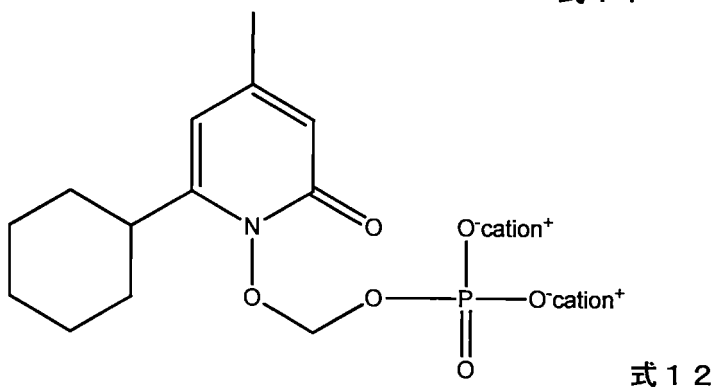
【化 10】



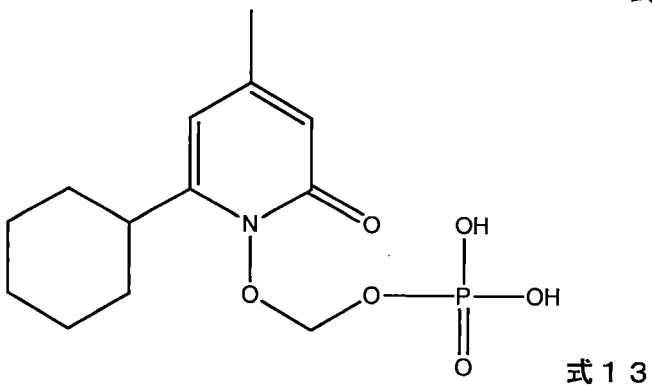
10



20



30



40

の構造によって表されるか、又はその立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

50

前記医薬組成物がシクロピロクスを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記医薬組成物がシクロピロクスオラミンを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記医薬組成物が、治療有効量の前記化合物と医薬上許容し得る担体とを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記医薬組成物が治療有効量で投与されて、治療有効量の 6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチルピリジン-2 (1H)-オンを提供する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記治療有効量は、NOTCH経路を阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記治療有効量は、TGF-β経路を阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記治療有効量は、STAT3経路を阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記治療有効量は、膀胱癌細胞の成長を阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記治療有効量は、DNA修復を阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記治療有効量は、リボヌクレオチドレダクターゼを阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記治療有効量は、膀胱癌幹細胞の成長を阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記治療有効量は、膀胱癌細胞の成長をS期で阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記治療有効量は、膀胱癌スフェロイドの形成を阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記治療有効量は、膀胱癌細胞の増殖を阻害するために十分である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記化合物が、式 1 0、1 1、1 2 又は 1 3：

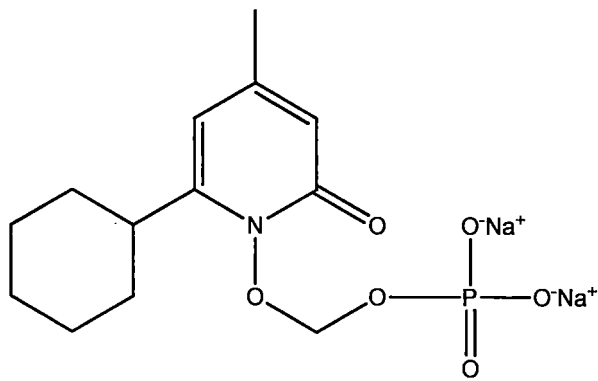
10

20

30

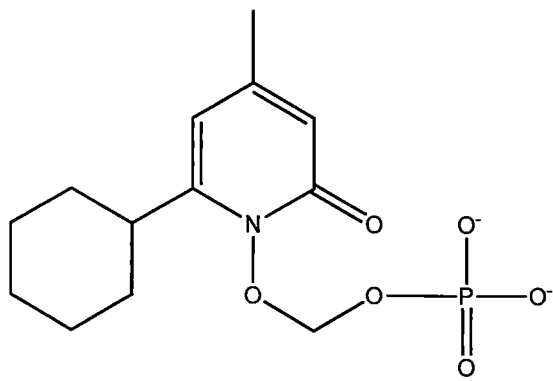
40

【化 1 1】



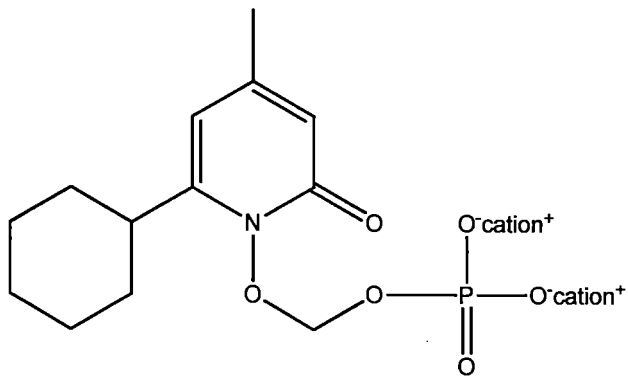
式 1 0

10



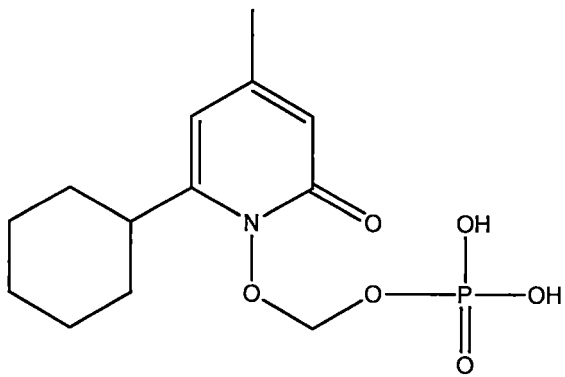
式 1 1

20



式 1 2

30



式 1 3

40

の構造によって表されるか、又はそれらの立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記膀胱癌が NMIBC（筋層非浸潤性膀胱癌）である、請求項 1 に記載の方法。

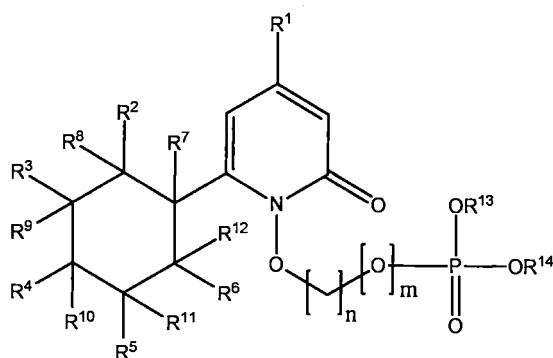
【請求項 2 7】

前記膀胱癌が MIBC（筋層浸潤性膀胱癌）である、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 28】

上部尿路における膀胱癌の処置方法であって：
シクロピロクス、シクロピロクスオラミン、又は式 1：
【化 1 2】



式 1

10

[式中、

$R^1 \sim R^{12}$ は、各々独立して、1又は2以上の水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせを含み；

20

$R^{13} \sim R^{14}$ は、各々独立して、1又は2以上の陽イオン、ナトリウムイオン、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせを含み；

30

n は0～20であり、置換又は無置換であり；そして

m は0、1又は2である]

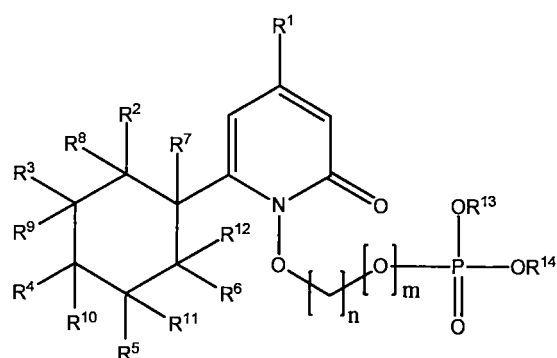
の構造によって表されるシクロピロクスプロドラッグ、又はそれらの立体異性体、又はそれらの薬学的に許容し得る塩を有する医薬組成物を提供し；そして

前記医薬組成物を、上部尿路における膀胱癌を罹患する対象に投与することを含む、方法。

【請求項 29】

膀胱癌の処置のための医薬を製造するための化合物の使用であって、前記化合物は、シクロピロクス、シクロピロクスオラミン、又は式 1：

【化 1 3】



式 1

10

〔式中、

$R^1 \sim R^{12}$ は、各々独立して、1又は2以上の水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせ

20

を含み；
 $R^{13} \sim R^{14}$ は、各々独立して、1又は2以上の陽イオン、ナトリウムイオン、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせを含み；

n は0～20であり、置換又は無置換であり；そして

m は0、1又は2である〕

の構造を有するシクロピロクスプロドラッグ、又はそれらの立体異性体、又はそれらの薬学的に許容し得る塩を含む、使用。

30

【請求項30】

前記膀胱癌がNMIBC（筋層非浸潤性膀胱癌）である、請求項29に記載の使用。

【請求項31】

前記膀胱癌がMIBC（筋層浸潤性膀胱癌）である、請求項29に記載の使用。

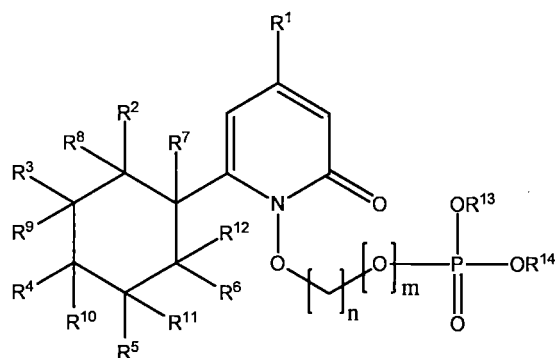
【請求項32】

膀胱癌の処置のための組成物であって、

膀胱癌の処置のための治療有効量のシクロピロクス、シクロピロクスオラミン、又は式1

40

【化 1 4】



10

〔式中、

$R^1 \sim R^{12}$ は、各々独立して、1又は2以上の水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせ

20

を含み；
 $R^{13} \sim R^{14}$ は、各々独立して、1又は2以上の陽イオン、ナトリウムイオン、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせを含み；

n は0～20であり、置換又は無置換であり；そして

m は0、1又は2である〕

の構造によって表されるシクロピロクスプロドラッグ、又はそれらの立体異性体、又はそれらの薬学的に許容し得る塩を含む、組成物。

30

【請求項 3 3】

前記膀胱癌がNMIBC（筋層非浸潤性膀胱癌）である、請求項 3 2に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記膀胱癌がMIBC（筋層浸潤性膀胱癌）である、請求項 3 2に記載の組成物。

【請求項 3 5】

n が1～4であり、 m が1である、請求項 3 2に記載の組成物。

【請求項 3 6】

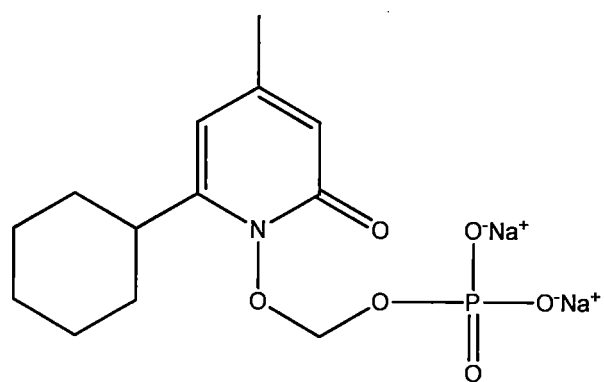
n が1であり、 m が1である、請求項 3 2に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記シクロピロクスプロドラッグが、式 1 0、1 1、1 2又は1 3：

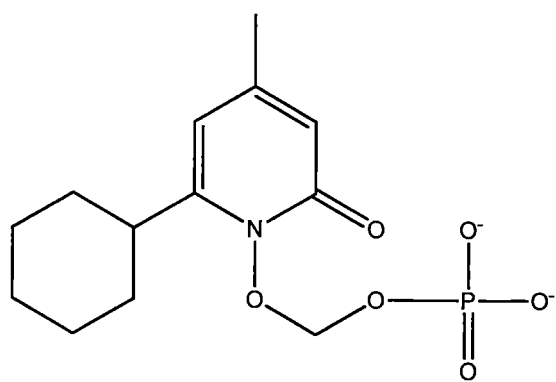
40

【化 1 5】



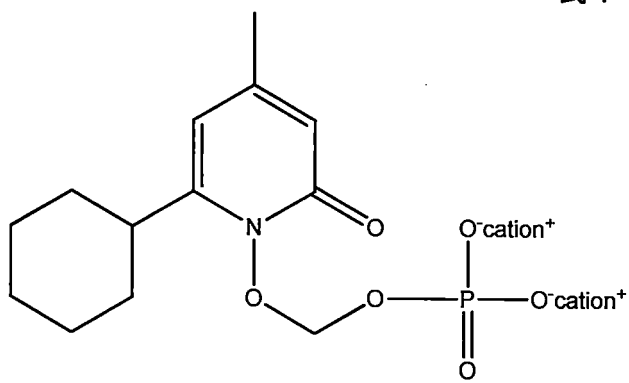
式 1 0

10



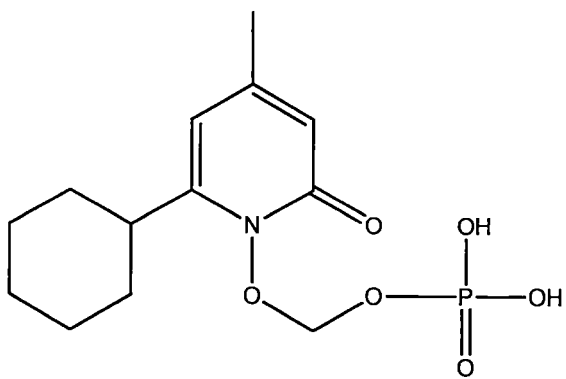
式 1 1

20



式 1 2

30



式 1 3

40

の構造によって表されるか、又はそれらの立体異性体であるか、又はそれらの薬学的に許容し得る塩である、請求項 3 2 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

50

本特許出願は、2015年3月18日に出願された米国仮特許出願第62/134,747号に基づく優先権を主張する。本特許出願はまた、2014年11月11日に出願された米国仮特許出願第62/078,069号に基づく優先権を主張する。上記の仮出願は、その全体において本明細書において具体的な参照により組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

シクロピロクスとしても知られている、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチルピリジン-2(1H)-オン分子は、市販の外用抗真菌剤である。シクロピロクスは表在性真菌症及び癬風の治療に使用されている。市販の外用製剤はシクロピロクスのオラミン塩を含有する。ヒトへの経口投与の後、シクロピロクスオラミンは完全に吸収され、続いて迅速且つ完全な薬物排泄が起こる。ヒトにおけるシクロピロクスオラミンの経口生物学的利用能は報告されていない。しかし、動物においては、経口によるシクロピロクスオラミンの絶対的生物学的利用能は低い。シクロピロクスのオラミン塩の反復的な経口投与は、動物及びヒトの両方において、胃腸毒性と関連付けられている。最後に、シクロピロクスのオラミン塩は注射用製剤としての製剤形態に必要な水溶性を有していない。したがって、注射による薬剤投与のために、水溶性が向上するようにシクロピロクスを構成することは有益であろう。

10

【0003】

膀胱癌は米国において5番目に多い癌診断である。患者は再発及び進行の危険性が高いため、膀胱癌は患者生存期間あたりの計算で治療に最もコストがかかる癌である。その発生率及び罹患率にもかかわらず、膀胱癌の研究は資金が非常に不足しており、その結果、膀胱癌治療の改善はほとんど進展していない。膀胱癌は、歴史的には「表在性膀胱癌」と称される筋層非浸潤性膀胱癌(NMIBC)、及び筋層浸潤性膀胱癌(MIBC)の、一連の2つの疾患である。NMIBCは、内視鏡的切除、並びに膀胱内注入(膀胱内投与)によって投与される局所的なワクチン及び薬剤処置で治療可能である。MIBCは、通常は根治的膀胱切除及び/又は全身化学療法で、より積極的な介入を必要とする。非浸潤性乳頭状癌(Ta)、固有層の腫瘍浸潤(T1)、及び上皮内癌(Tis)という、3種のNMIBC病変が存在する。Ta腫瘍及びT1腫瘍は低悪性度腫瘍及び高悪性度腫瘍に分類される。高悪性度のTa腫瘍及びT1腫瘍、並びにTis腫瘍は、MIBCに進行する中度から高度のリスクを伴って、より高い再発率を有する。NMIBCの50%は内視鏡的切除及び膀胱内療法の後、12ヵ月以内に再発する。NMIBCの5年再発率又は新規発生率は、外科、免疫療法及び化学療法による治療介入を受けても、腫瘍型及び腫瘍悪性度に依存して、31~78%の範囲である。したがって、NMIBC治療を改善して、再発及びMIBCへの進行を防止することは有益であろう。

20

30

【発明の概要】

【0004】

一実施形態において、膀胱癌を治療する方法が提供される。膀胱癌を治療する方法は、シクロピロクス、又はシクロピロクスオラミン、又は本明細書において提供される式のうちの1つの構造を有するシクロピロクス-POMプロドラッグ、又はそれらの誘導体、又はそれらの立体異性体、又はそれらの薬学的に許容し得る塩を有する医薬組成物を提供し；そして、膀胱癌を罹患する対象へ前記医薬組成物を投与すること、を含み得る。シクロピロクス又はシクロピロクスオラミン又はシクロピロクス-POMプロドラッグは治療有効量で投与され得る。一態様において、治療有効量は、NOTCHシグナル経路、 γ -セクレターゼ複合体、並びにNotch下流標的タンパク質であるサイクリンD1及びc-Mycの阻害に十分な量である。一態様において、治療有効量はTGF β シグナル経路の阻害に十分な量である。一態様において、治療有効量は膀胱癌細胞の成長(growth)の阻害に十分な量である。一態様において、治療有効量はDNA修復の阻害に十分な量である。一態様において、治療有効量はリボヌクレオチド還元酵素の阻害に十分な量である。一態様において、治療有効量は膀胱癌幹細胞の成長の阻害に十分な量である。一態様において、治

40

50

療有効量はS期における膀胱癌細胞の成長の阻害に十分な量である。一態様において、治療有効量は膀胱癌スフェロイド形成の阻害に十分な量である。一態様において、治療有効量は膀胱癌細胞の増殖 (proliferation)の阻害に十分な量である。

【0005】

一実施形態において、シクロピロクスを全身送達することによる、上部尿路における膀胱癌疾患を治療する方法が提供される。前記方法は、シクロピロクス、シクロピロクスオラミン、又は本明細書において提供されるいずれかの式の構造で表されるシクロピロクスプロドラッグ、又はそれらの誘導体、又はそれらの立体異性体、又はそれらの薬学的に許容し得る塩を有する医薬組成物を提供し；そして、上部尿路に膀胱癌疾患を有する対象へ前記医薬組成物を投与することを含み得る。

10

【0006】

上記及び下記の情報ならびに本開示の他の特徴は、付随する図面と組み合わせた以下の説明及び添付の請求の範囲から、より完全に明らかとなるであろう。これらの図面は、単に本開示に従う幾つかの実施形態を表わすものであり、したがってその範囲を限定するものとは見なされないと理解される。本開示は、付随する図面の使用を通してさらに具体的に且つ詳細に説明されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチルピリジン-2 (1H)-オンを調製する方法の模式的説明を示す。それは、本明細書においてシクロピロクス (Cyclopirox) と呼ばれる (スキーム1)。

20

【図2】図2は、ジ-tert-ブチル (クロロメチル) ホスフェートを調製する方法の模式的説明を示す (スキーム2)。

【図3】図3は、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチルピリジン-2 (1H)-オンのプロドラッグを調製する方法の模式的説明を示す (スキーム3)。

【図3A】図3Aは、スキーム3Aとして同定される副反応プロセスの模式的説明を示す。それは図3のスキーム3の副次的プロセスであり得る。

【図3B】図3Bは、図3Aのスキーム3Aの反応生成物を示す質量分析のクロマトグラフを示す。

【図3C】図3Cは、((6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1 (2H)-イル)オキシ)メチルジハイドロゲンホスフェートの遊離酸形態の存在を示す質量分析のクロマトグラフを示す。

30

【図3D】図3Dは、シクロピロクス-POMプロドラッグの2量体型形態を示す。

【図3E】図3Eは、図3Dのシクロピロクス-POMプロドラッグの2量体型形態の質量分析のクロマトグラフを示す。

【図4】図4は、((6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1 (2H)-イル)オキシ)メチルホスフェートの2ナトリウム塩を得るために、((6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1 (2H)-イル)オキシ)メチルジハイドロゲンホスフェートを塩にする模式的説明を示す (スキーム4)；しかし、最終的には合成は当該化合物の薬学的に許容し得る任意の他の塩とし得る。

40

【図4A】図4Aは、図4の((6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1 (2H)-イル)オキシ)メチルホスフェートの2ナトリウム塩の存在を示す質量分析クロマトグラフを示す。

【図5】図5は、ジベンジル (クロロメチル) ホスフェートを製造する方法の模式的説明を示す (スキーム5)。

【図6】図6は、ジベンジル(((6-シクロヘキシル-4-メチル-2-オキソピリジン-1 (2H)-イル)オキシ)メチル)ホスフェートを製造する方法の模式的説明を示す (スキーム6)。

【図7】図7は、((6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1 (2H)-イル)オキシ)メチルホスフェートの2ナトリウム塩を製造する方法の模式的説明を示す (スキーム7)。

50

ム7)。

【図8】図8は、POM試薬であるジベンジル（クロロメチル）ホスフェートを製造する方法の模式的説明を示す（スキーム8）。

【図9】図9は、シクロピロクス（CPX）が小さな濃度範囲に亘ってNMIBC（T24）膀胱癌細胞増殖を阻害することを示すグラフを含む。

【図10】図10は、CPXが膀胱癌スフェロイド形成を阻害することを示す画像を含む。

【図11】図11は、シクロピロクス（CPX）がより大きな濃度範囲に亘ってNMIBC（T24）及びMIBC（253JBV）膀胱癌細胞増殖を阻害することを示すグラフを含む。

10

【図12A】図12Aは、処置群 時点あたりの6匹のマウスへの10mg/kg 静脈内（IV）シクロピロクスオラミン（CPX-O）、10mg/kg IV CPX-POM、30mg/kg 経口（PO）CPX-O及び30mg/kg PO CPX-POMの投与後の、平均血漿中シクロピロクス（CPX）濃度－時間の直線的プロファイルを示す。

【図12B】図12Bは、処置群あたり、時点あたりの3匹のマウスへの10mg/kg IV及び50mg/kg IP CPX-POMの投与後の、平均血漿中シクロピロクス（CPX）濃度－時間の直線的プロファイルを示す。

【図13A】図13Aは、処置群あたり6匹のラットへの10mg/kg IV CPX-POM及びCPX-Oの投与後の、平均血漿中シクロピロクス（CPX）濃度－時間の片対数プロファイルを示す。

20

【図13B】図13Bは、処置群あたり6匹のラットへの20mg/kg IV CPX-POM、30mg/kg 皮下（SQ）CPX-POM、及び30mg/kg CPX-Oの投与後の、平均血漿中シクロピロクス（CPX）濃度－時間の直線的プロファイルを示す。

【図14】図14は、4匹の雄ビーグル犬への3mg/kg IV CPX-POM及びCPX-Oの投与後の、平均血漿中シクロピロクス（CPX）濃度－時間の直線的プロファイルを示す。

【図15】図15は、4匹の雄ビーグル犬への3mg/kg 静脈内（IV）CPX-POM、9mg/kg 皮下（SQ）CPX-POM、及び9mg/kg 経口（PO）CPX-Oの投与後の、平均血漿中シクロピロクス（CPX）濃度－時間の直線的プロファイルを示す。

30

【図16】図16は、CPXからの、T24膀胱癌細胞のアポトーシスを示すウエスタンブロットを含む。

【図17】図17は、CPXからの、T24膀胱癌細胞のアポトーシスを示すウエスタンブロットを含む。

【図18】図18は、インキュベーション時間と比較した、CPX-POMからの、CPX形成を示すグラフを含む。

【図19】図19は、対照と比較した、CPXの存在下におけるT24細胞の細胞成長の差異を示す画像を含む。

40

【図20】図20は、対照と比較した、CPXの存在下における253JBV細胞の細胞成長の差異を示す画像を含む。

【図21】図21は、CPXが253JBV細胞株及びT24細胞株の両方においてスフェロイド形成を阻害することを示すグラフを含む。

【図22】図22は、CPXがT24膀胱癌細胞株において細胞死を誘導することを示す画像を含む。

【図23A】図23Aは、CPXがT24膀胱癌細胞においてNotch、Wnt、及びHedgehog細胞内シグナル経路を阻害することを示すグラフを含む。

【図23B】図23Bは、CPXがT24膀胱癌細胞においてNotch、Wnt、及びHedgehog細胞内シグナル経路を阻害することを示すグラフを含む。

50

【図 2 3 C】図 2 3 C は、C P X が T 2 4 膀胱癌細胞において N o t c h、W n t、及び H e d g e h o g 細胞内シグナル経路を阻害することを示すグラフを含む。

【図 2 4】図 2 4 は、W T T 2 4 細胞及び N C I D 過剰発現 T 2 4 細胞における細胞増殖、並びに N o t c h 1 及びアクチンのレベルに対する C P X の影響を示すグラフ及び画像を含む。

【図 2 5 A】図 2 5 A は、膀胱癌細胞に対する C P X の影響を示すグラフを含む。

【図 2 5 B】図 2 5 B は、膀胱癌細胞に対する C P X の影響を示すグラフを含む。

【図 2 5 C】図 2 5 C は、膀胱癌細胞に対する C P X の影響を示すグラフを含む。

【図 2 5 D】図 2 5 D は、膀胱癌細胞に対する C P X の影響を示すグラフを含む。

【図 2 6 A】図 2 6 A は、C P X - P O M による処置あたりの膀胱重量を示すグラフを含む。

【図 2 6 B】図 2 6 B は、C P X - P O M 投与による処置あたりの腫瘍の病期を示すグラフを含む。

【図 2 7 A】図 2 7 A は、C P X - P O M がインビボにおいて N o t c h 1 シグナル伝達及び γ -セクレターゼ複合体タンパク質を阻害することを示す画像を含む。

【図 2 7 B】図 2 7 B は、C P X - P O M が B B N 誘導膀胱腫瘍モデルにおいて N o t c h 下流標的タンパク質であるサイクリン D 1 及び c - M y c を阻害することを示す画像を含む。

【図 2 8】図 2 8 は、C P X - P O M がインビトロ及びインビボの両方において増殖性細胞核抗原 (P C N A) を阻害することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

詳細な説明

以下の詳細な説明において、本明細書の一部を形成する添付の図面への参照がなされる。図面において、文脈が他を指示しない限り、類似の記号は典型的には類似の成分を同定することを意味しない。本明細書において提示される主題の精神又は範囲から逸脱することなく、他の実施形態を利用することができ、他の変更を行ってもよい。本明細書において一般的に記載され、図面において説明される本開示の態様を、多種多様な異なる構造において配置し、置換し、組み合わせ、分離し、及び設計することができ、これらの全てが本明細書において明示的に企図されることが、容易に理解されるであろう。

【0009】

概して、本発明は、シクロピロクスとしても知られている 6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチルピリジン-2 (1H)-オン、及びそのプロドラッグに関する。本明細書に記載のシクロピロクス及びシクロピロクスプロドラッグは、本明細書のデータによって裏付けられるように、膀胱癌の治療で使用する事ができる。シクロピロクスプロドラッグは、水溶性及び注射による薬剤投与性の向上による、活性部分であるシクロピロクスの標的作用部位への送達のために、ホスホリルオキシメチル (POM) 部分を含み得る。本発明のシクロピロクス-POMプロドラッグはまた、POMプロドラッグ部分を含むシクロピロクスの誘導体を含むこともあり、この誘導体プロドラッグは、概してシクロピロクス-POMという表現で参照されるか、又は、具体的にシクロピロクス-POM誘導体と称され得る。本発明のシクロピロクス-POMプロドラッグは、本明細書に記載されるもの等の、伝統的な化学手法で調製することができる。シクロピロクスは膀胱癌治療においてはシクロピロクスオラミンとして使用され得る。

【0010】

シクロピロクス-POMプロドラッグは、シクロピロクスの水溶性を向上させることで、シクロピロクス-POMの注入による、有意濃度のシクロピロクスを尿路全体に選択的に送達する機会を得ることが示されている。生物学的に活性なシクロピロクスを尿路全体に送達することにより、薬剤が尿管、集尿系、及び腎臓を含む上部尿路に送達されることから、注入によるシクロピロクス-POMプロドラッグの投与は、膀胱内注入を介した局

10

20

30

40

50

所送達の制限を克服する。したがって、シクロピロクスーPOMプロドラッグは、シクロピロクス、又はシクロピロクスオラミンのようなシクロピロクス塩等のシクロピロクスの他の形態の製剤及び／又は送達経路に伴う制限を克服する。シクロピロクスーPOMプロドラッグの溶解性の向上は、注入により有効量のシクロピロクスを投与するための、医薬組成物の改善を可能にし得る。医薬組成物は、静脈内、皮下、及び筋肉内等の注射可能な投与経路に適するように製剤化され得る。

【0011】

生物学的に活性な元の親薬剤であるシクロピロクスを生成するために、シクロピロクスーPOMプロドラッグは、POM部分がホスファターゼ酵素により切断されるように構成される。シクロピロクスーPOMの生物学的に活性なシクロピロクスへの代謝的変換は迅速且つ完全である。したがって、シクロピロクスーPOMは、生体対象に投与された後、対象の身体内で酵素的に処理されて生理活性シクロピロクスになり得る。対象は通常ヒトであるが、シクロピロクスーPOMプロドラッグは、種々様々な動物、例えば哺乳類、鳥類、爬虫類、又は同種のもの、に適していると判明され得る。

【0012】

シクロピロクスは伝統的に局所性抗真菌剤として使用されてきたが、本発明のシクロピロクスーPOMプロドラッグに使用可能な異なる製剤は、シクロピロクス処置に適していると示されている、又はシクロピロクス処置に適するよう生じ得る、他の疾患に治療有効量のシクロピロクスを与え得る。したがって、シクロピロクスーPOMプロドラッグは、以下の治療で使用され得る：真菌の阻害、治療及び／又は予防；癌（例えば、膀胱癌等）の治療、予防、及び／又は制御；皮膚炎の阻害、治療及び／又は予防；表在性真菌症の阻害、治療及び／又は予防；炎症の阻害、治療及び／又は予防（例えば、抗炎症、又はNSAIDとして）；足白癬、股部白癬、及び体部白癬、紅色白癬菌（*Trichophyton rubrum*）、毛瘡白癬菌（*Trichophyton mentagrophytes*）、有毛表皮糸状菌（*Epidermophyton floccosum*）、及びイヌ小孢子菌（*Microsporum canis*）、カンジダ症（モニリア症）、カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）、癬風、又は癬風菌（*Malassezia furfur*）のうちの一つ又は複数の阻害、治療及び／又は予防、並びにHIVを含むウィルス感染の阻害、治療及び／又は予防。現在、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクスプロドラッグ等のシクロピロクスが、膀胱癌の治療で使用できることが分かっている。すなわち、前記作用剤は、プロドラッグ部分無しで、又は、プロドラッグとしてプロドラッグ部分有りで、使用可能である。シクロピロクスのそのような使用は、本明細書に記載のように施行され得る。また、シクロピロクスは、膀胱内注入を介して膀胱癌に直接送達される局所送達系に含まれ得る。CPXが、HIV-1によるウィルス感染を選択的に除去し、シクロピロクス、シクロピロクスーPOMプロドラッグ、又はシクロピロクスオラミンとして送達可能であることも分かっている。

【0013】

シクロピロクスーPOMプロドラッグは、シクロピロクスへの全身及び尿路暴露の増加が達成されるように、プロドラッグの溶解性を向上させる。すなわち、より多くのシクロピロクスが、対象の全体にわたって、及び対象の個々の細胞内で、利用可能であり得る。利用可能なシクロピロクスの量の増加は、生理活性及び治療可能性を向上させ、細胞プロセスを調節する能力も向上させる。したがって、シクロピロクスーPOMプロドラッグは、細胞におけるDNA修復、細胞分裂、又は核内輸送を乱すために使用され得る。さらに、シクロピロクスーPOMを使用することで、Notchシグナル伝達を阻害して、幹細胞性に影響を与えること、並びに、膀胱癌の浸潤及び転移を促進すること、が可能である。前記細胞はインビボ、エキソビボ、又はインビトロであってよい。したがって、シクロピロクスーPOMは、細胞におけるDNA修復、細胞分裂、又は核内輸送を乱すことにより、Notchシグナル伝達を阻害することにより、及び、本明細書に記載の他のあらゆる生物学的経路を阻害することにより、広範囲の癌系統に対して使用され得る。

【0014】

シクロピロクスプロドラッグが記載されてきたが、かかるプロドラッグは、利用可能なヒドロキシル及び／又はアミノ基を用いて形成される通常のエステル、例えば塩基の存在下で活性化された酸のアシル化によって形成されるエステルに限定されてきた。記載されてきたエステルは、フェニルエステル、脂肪族 (C_8-C_{24}) エステル、アシルオキシメチルエステル、カルバメート、及びアミノ酸エステルを有するプロドラッグを含み得る (WO 2010/048712 を参照：それはその全体において本明細書において具体的な参照により組み込まれる)。

【0015】

さらに、2級及び3級アミン含有薬物を含む化合物について、可溶性が増大したプロドラッグが創製されてきた。かかるプロドラッグの例は、N-ホスホリロキシメチル (N-phosphoryloxymethyl) (POM) プロドラッグを含む。ここで、POM部分のメチル基が2級及び3級アミンにカップリングされている (US 5, 985, 856 を参照：それはその全体において本明細書において具体的な参照により組み込まれる)。

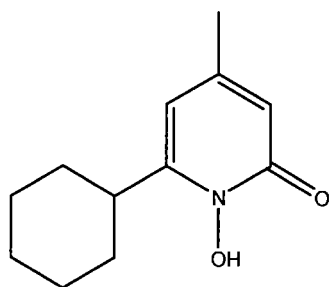
10

【0016】

代替的な化学技術により、現在では、本発明のシクロピロクス-POMプロドラッグを形成するためにPOMプロドラッグ体をシクロピロクスへカップリングできることが見出されている。化学合成プロトコルにより、以下に示されるシクロピロクスを、2級及び3級アミンを介してよりも、そのヒドロキシル基を介して複合体化させることができる。シクロピロクスは環窒素を含むが、かかる窒素がPOMへ連結することは、当該窒素に連結したヒドロキシル基又は酸素がシクロピロクスの生物学的活性のために重要である可能性があるために、望ましくないことが見出されている。したがって、本発明は、POM部分を、シクロピロクスの環窒素に連結したヒドロキシル基へ複合体化させるための化学技術を提供する。

20

【化1】



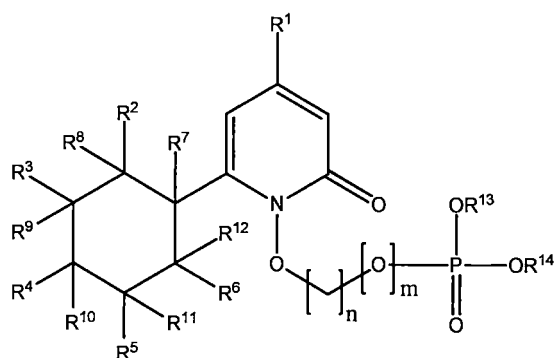
シクロピロクス

30

【0017】

一実施形態において、本発明は、シクロピロクスプロドラッグ又はその誘導体を含む。当該プロドラッグは、式1の構造又はその誘導体、又はそれらの立体異性体、並びにそれらの薬学的に許容し得る塩を含み得る。

【化 2】



式 1

10

【0018】

当該式中、 $R^1 \sim R^{14}$ は、各々独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、それらの誘導体、置換若しくは無置換体、又はそれらの組み合わせ、ならびに他の周知の化学置換基を含み得る。 R^{13} 及び／又は R^{14} は、化合物が塩を形成するように、ナトリウムイオンなどの陽イオンであり得る。また、 R^{13} 及び／又は R^{14} は、独立して、プロドラッグと塩形成するために陽イオンを含み得、あるいは、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、直鎖脂肪族、分枝状脂肪族、環状脂肪族、置換脂肪族、無置換脂肪族、飽和脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、多環芳香族、置換芳香族、ヘテロ芳香族、アミン、1級アミン、2級アミン、3級アミン、脂肪族アミン、カルボニル、カルボキシル、アミド、エステル、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド又はそれらの組み合わせの1又は2以上を含み得る。所望の場合、 n が約0～20、より好ましくは1～10、最も好ましくは1～4であり得るように、メチルリンカーを、置換又は無置換のより大きな脂肪族基に拡大し得る。リンカーはまた、 m が0、1又は2であり得るように、1又は2個の酸素原子を有してもよい。本明細書に示される全ての式に関して、 n は1～4であり得、且つ m は1であり、あるいは n 及び m がいずれも1であり得る。

20

30

【0019】

一実施形態において、 R^{13} 及び／又は R^{14} は、独立して、種々の陽イオンのいずれか1つであってもよい。一例において、 R^{13} 及び／又は R^{14} は、独立して、+1の正の電荷を有するイオンを含み得る。 R^{13} 及び／又は R^{14} は、アルカリ金属であり得る。また、 R^{13} 及び／又は R^{14} は、独立して、ナトリウムイオンなどの第1族のイオンであり得る。したがって、酸素と R^{13} 及び／又は R^{14} との間の結合は、共有結合又はイオン結合であり得る。

40

【0020】

一実施形態において、 R^{13} 及び／又は R^{14} は、独立して、保護基であり得る。保護基の例は、tert-ブチル及びベンジルを含み得る。しかし、他の有機ベースの保護基が使用され得る。これらの保護基は、投与のためにプロドラッグ上に残されても良いし、投与の前に除去されても良い。

【0021】

一実施形態において、 R^1 は、メチル又は他のアルキルなどの短い脂肪族である。

【0022】

一実施形態において、 $R^2 \sim R^{12}$ は、全て水素である。

【0023】

一実施形態において、 R^{13} 及び／又は R^{14} は、各々独立して水素である。

50

【0024】

一実施形態において、 R^{13} 及び／又は R^{14} は、各々独立して、ベンジル又はtert-ブチルである。

【0025】

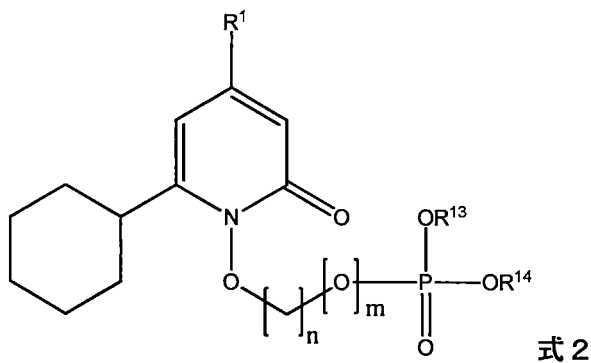
一実施形態において、 R^{13} 及び／又は R^{14} は、シクロピロクス-POMを含み得、且つ他方は水素である。それは以下の式10において示される。

【0026】

一実施形態において、本発明は、式2の構造を有する化合物、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。 n 、 m 、 R^1 、ならびに R^{13} 及び／又は R^{14} は、式1について上で記載されたものと同一であり得る。

10

【化3】

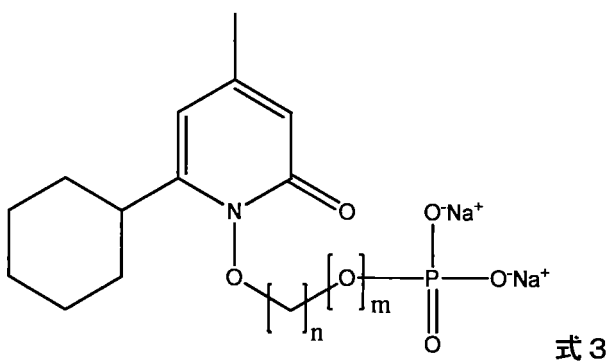


20

【0027】

一実施形態において、化合物は、式3の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。 n 、 m 、 R^1 、ならびに R^{13} 及び／又は R^{14} は、式1について上で記載されたものと同一であり得る。

【化4】



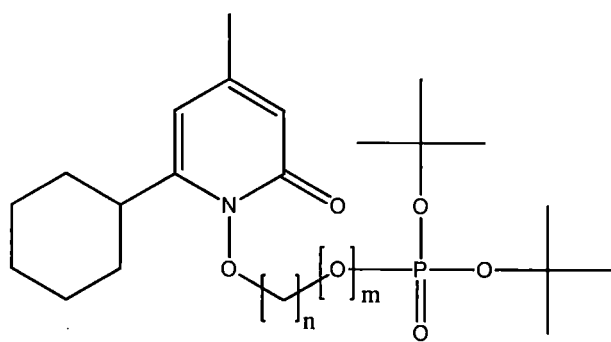
30

40

【0028】

一実施形態において、化合物は、式4の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。 n 及び m は、式1について上で記載されたものと同一であり得る。

【化 5】



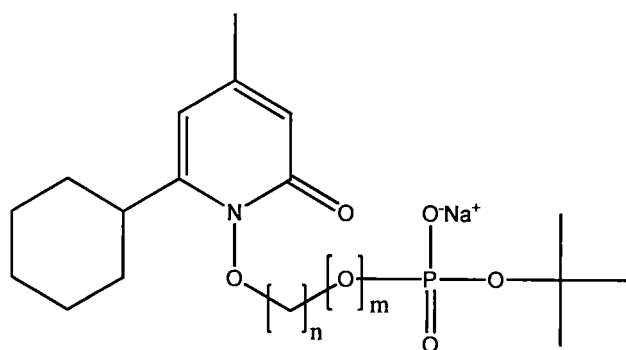
式 4

10

【0029】

一実施形態において、化合物は、式 5 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。n 及び m は、式 1 について上で記載されたものと同一であり得る。

【化 6】



式 5

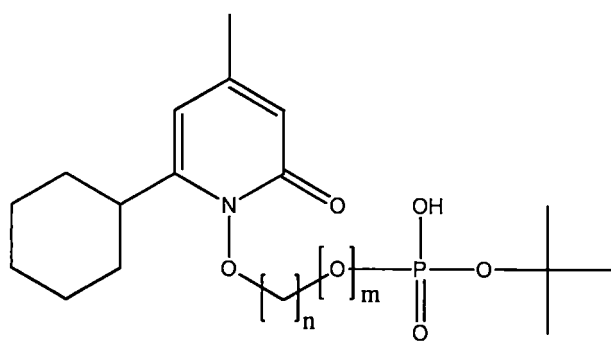
20

30

【0030】

一実施形態において、化合物は、式 6 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。n 及び m は、式 1 について上で記載されたものと同一であり得る。

【化 7】



式 6

40

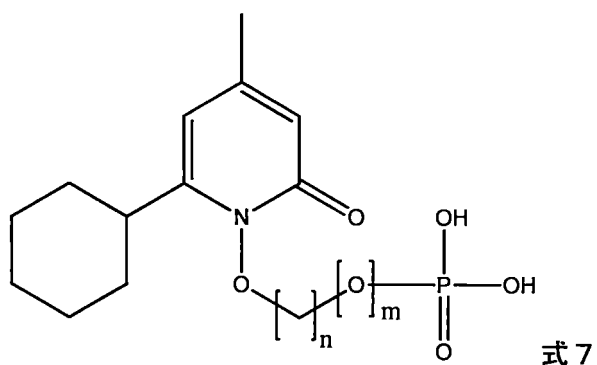
【0031】

一実施形態において、化合物は、式 7 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性

50

体を含み得る。n 及び m は、式 1 について上で記載されたものと同一であり得る。

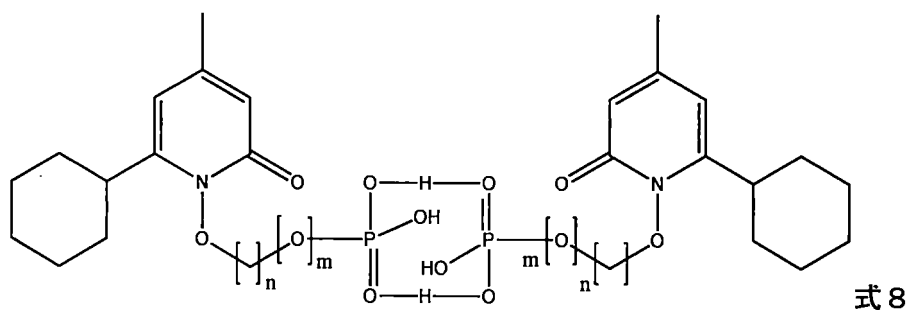
【化 8】



【0032】

一実施形態において、化合物は、式 8 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。n 及び m は、式 1 について上で記載されたものと同一であり得る。

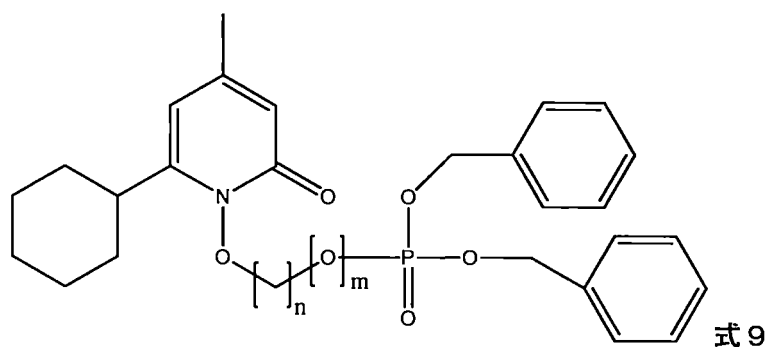
【化 9】



【0033】

一実施形態において、化合物は、式 9 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。n 及び m は、式 1 について上で記載されたものと同一であり得る。

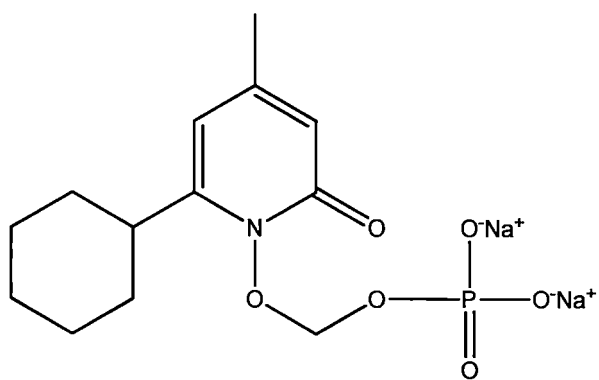
【化 10】



【0034】

一実施形態において、化合物は、式 10 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。

【化 1 1】



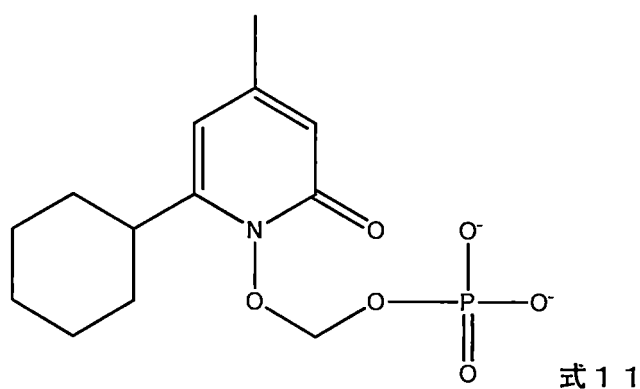
10

【0 0 3 5】

一実施形態において、化合物は、式 1 1 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。ここで、化合物は、塩、例えば薬学的に許容し得るあらゆる塩、を形成するように陽イオンとイオン結合可能な、負電荷を有する 2 個の酸素原子を有する。

【化 1 2】

20

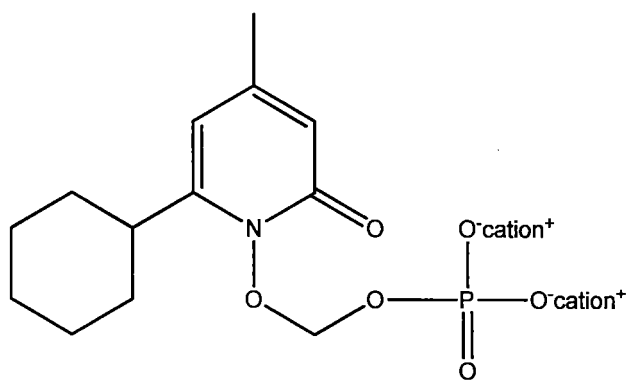


30

【0 0 3 6】

一実施形態において、化合物は、式 1 2 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。ここで、化合物は、塩、例えば薬学的に許容し得るあらゆる塩、を形成するように陽イオンと結合した、2 個の酸素原子を有する。

【化 1 3】



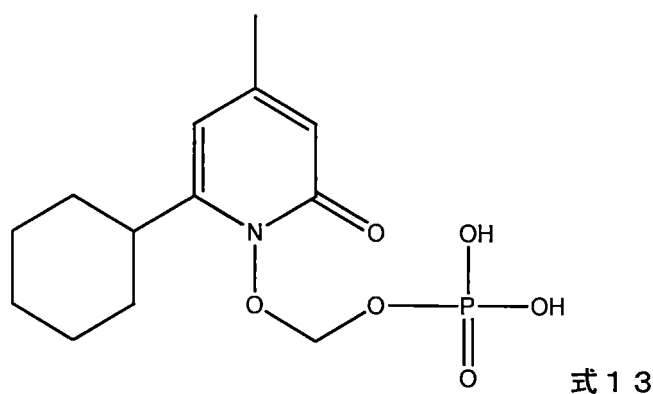
10

【0037】

一実施形態において、化合物は、式 1 3 の構造、又はその誘導体、又はそれらの立体異性体を含み得る。ここで、化合物は、水素を失った後に、塩、例えば薬学的に許容し得るあらゆる塩、を形成するように陽イオンとイオン結合可能な、2 個の酸素原子を有する。

【化 1 4】

20



30

【0038】

前記化合物のいずれも、可能ならば薬学的に許容し得る塩として調製され得る。薬学的に許容し得る通常のあらゆる塩イオンが使用され得る。そのような塩の例としては、アルカリ及びアルカリ土類金属塩、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、及びその水和物；より好ましくは、ナトリウム、マグネシウム、カルシウム、及びその水和物；さらにより好ましくは、マグネシウム、カルシウム及びその水和物、を挙げることができる。前記塩は、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、酒石酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、シュウ酸等の種々の有機酸の対応する塩、及び塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸等の種々の無機酸の対応する塩も包含し得る。他のいかなる塩も好適であり得る。

40

【0039】

さらに、本明細書に記載され、前記化学式で表される化合物のいずれも、以下から成る群から選択される置換基から独立して選択される R 基 ($R^1 \sim R^{14}$) のいずれかを有し得る：水素、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{24}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{24}$ アルキニル、 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、 $C_6 \sim C_{24}$ アルカリル、 $C_6 \sim C_{24}$ アラルキル、ハロ、ヒドロキシル、スルフヒドリル、 $C_1 \sim C_{24}$ アルコキシ、 $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルオキシ、 $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルオキ

50

シ、 $C_5 \sim C_{20}$ アリールオキシ、アシル（例えば $C_2 \sim C_{24}$ アルキルカルボニル（ $-\text{CO}-$ アルキル）及び $C_6 \sim C_{20}$ アリールカルボニル（ $-\text{CO}-$ アリール））、アシルオキシ（ $-\text{O}-$ アシル）、 $C_2 \sim C_{24}$ アルコキシカルボニル（ $-(\text{CO})-\text{O}-$ アルキル）、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールオキシカルボニル（ $-(\text{CO})-\text{O}-$ アリール）、ハロカルボニル（ $-\text{CO}-\text{X}$ 、式中 X はハロ）、 $C_2 \sim C_{24}$ アルキルカルボナト（ $-\text{O}-(\text{CO})-\text{O}-$ アルキル）、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールカルボナト（ $-\text{O}-(\text{CO})-\text{O}-$ アリール）、カルボキシ（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシラト（ $-\text{COO}^-$ ）、カルバモイル（ $-(\text{CO})-\text{NH}_2$ ）、一（ $C_1 \sim C_{24}$ アルキル）置換カルバモイル（ $-(\text{CO})-\text{NH}(C_1 \sim C_{24}\text{アルキル})$ ）、二（ $C_1 \sim C_{24}$ アルキル）置換カルバモイル（ $-(\text{CO})-\text{N}(C_1 \sim C_{24}\text{アルキル})_2$ ）、一置換アリールカルバモイル（ $-(\text{CO})-\text{NH}-$ アリール）、チオカルバモイル（ $-(\text{CS})-\text{NH}_2$ ）、カルバミド（ $-\text{NH}-(\text{CO})-\text{NH}_2$ ）、シアノ（ $-\text{C}\equiv\text{N}$ ）、イソシアノ（ $-\text{N}^+\equiv\text{C}^-$ ）、シアナト（ $-\text{O}-\text{C}\equiv\text{N}$ ）、イソシアナト（ $-\text{O}-\text{N}^+\equiv\text{C}^-$ ）、イソチオシアナト（ $-\text{S}-\text{C}\equiv\text{N}$ ）、アジド（ $-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$ ）、ホルミル（ $-(\text{CO})-\text{H}$ ）、チオホルミル（ $-(\text{CS})-\text{H}$ ）、アミノ（ $-\text{NH}_2$ ）、一及び二（ $C_1 \sim C_{24}$ アルキル）置換アミノ、一及び二（ $C_5 \sim C_{20}$ アリール）置換アミノ、 $C_2 \sim C_{24}$ アルキルアミド（ $-\text{NH}-(\text{CO})-\text{アルキル}$ ）、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールアミド（ $-\text{NH}-(\text{CO})-\text{アリール}$ ）、イミノ（ $-\text{CR}=\text{NH}$ 、式中 R は水素、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、 $C_6 \sim C_{24}$ アルカリル、 $C_6 \sim C_{24}$ アラルキル等）、アルキルイミノ（ $-\text{CR}=\text{N}$ （アルキル））、式中 $\text{R}=\text{水素}$ 、アルキル、アリール、アルカリル、アラルキル等）、アリールイミノ（ $-\text{CR}=\text{N}$ （アリール））、式中 $\text{R}=\text{水素}$ 、アルキル、アリール、アルカリル等）、ニトロ（ $-\text{NO}_2$ ）、ニトロソ（ $-\text{NO}$ ）、スルホ（ $-\text{SO}_2-\text{OH}$ ）、スルホナト（ $-\text{SO}_2-\text{O}^-$ ）、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキルスルファニル（ $-\text{S}-$ アルキル；「アルキルチオ」とも称される）、アリールスルファニル（ $-\text{S}-$ アリール；「アリールチオ」とも称される）、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキルスルフィニル（ $-(\text{SO})-\text{アルキル}$ ）、 $C_5 \sim C_{20}$ アリールスルフィニル（ $-(\text{SO})-\text{アリール}$ ）、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキルスルホニル（ $-\text{SO}_2-\text{アルキル}$ ）、 $C_5 \sim C_{20}$ アリールスルホニル（ $-\text{SO}_2-\text{アリール}$ ）、ホスホノ（ $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ）、ホスホナト（ $-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2$ ）、ホスフィナト（ $-\text{P}(\text{O})(\text{O}-)$ ）、ホスホ（ $-\text{PO}_2$ ）、ホスフィノ（ $-\text{PH}_2$ ）、これらの誘導体、及びこれらの組合せ。

【0040】

医薬組成物

一実施形態において、シクロピロクスーPOMプロドラッグは医薬組成物中に含まれ得る。医薬組成物は、静脈内、皮下、及び筋肉内等の注射可能な投与経路に適するように製剤化され得る。投与は、腎臓内、又は膀胱内、又は尿道内、又はそのあらゆる血管の上流への投与であり得る。

【0041】

一実施形態において、シクロピロクス又はシクロピロクスオラミンは医薬組成物中に含まれ得る。医薬組成物は、静脈内、皮下、及び筋肉内等の注射可能な投与経路に適するように製剤化され得る。一例では、シクロピロクス又はシクロピロクスオラミン又はCPX-POMは、膀胱癌又はその近接にデポ剤として投与され得る高分子担体等の局所送達系に含まれ得る。高分子担体は、局所部位に送達可能であるナノ粒子、微小粒子、ヒドロゲル、又は他のものであり、シクロピロクス又はシクロピロクスオラミン又はCPX-POMが膀胱内注入を介して膀胱癌細胞に局所的に送達されることを可能にし得る。送達系は、生分解性送達系であるか、又はそれからの作用剤の拡散を可能にし得る。

【0042】

一実施形態において、医薬組成物は、本明細書において記載されるようなシクロピロクスーPOMプロドラッグを含み得る。例えば、医薬組成物は、薬学的に許容し得る担体を含み得る。シクロピロクスーPOMプロドラッグは高度に水溶性であるため、薬学的に許容し得る担体は、水を含み得る。しかし担体は、シクロピロクスーPOMプロドラッグを投与するために、それが投与されるヒト又はその細胞などの対象の水性環境に到達するように、十分であり得る。

【0043】

一実施形態において、医薬組成物は、約0.77%超の、より好ましくは約1%超の、又は最も好ましくは約2%超の量で存在する、シクロピロクス、又はシクロピロクスオラミン、又はシクロピロクスーPOMプロドラッグを含み得る。

【0044】

一実施形態において、医薬組成物は水を担体として含み得る。

【0045】

一実施形態において、シクロピロクス、又はそのオラミン、又はシクロピロクスーPOMプロドラッグは、シクロピロクス、又はそのオラミンの既知の送達法に従って送達され得る。しかし、膀胱癌細胞への直接的な局所投与が有利であり得る。同様に、注射による投与経路、例えば静脈内、皮下及び筋肉内投与が好適であり得る。

10

【0046】

本明細書において記載される組成物は、対象に投与することができる薬学的に許容し得る組成物の調製のための既知の方法により調製され得る。その結果、有効量の活性物質が薬学的に許容し得るビヒクルとの混合物において組み合わせられる。好適なビヒクルは、例えばRemington's Pharmaceutical Sciencesにおいて記載される。これに基づいて、当該組成物は、必ずしもではないが、1又は2以上の薬学的に許容し得るビヒクル又は希釈剤と組み合わせられた、そして好適なpH及び生理液との等張性を有する緩衝化溶液中に含まれた、当該物質の溶液を含む。

【0047】

20

一実施形態において、シクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクスーPOMプロドラッグの有効量は、対象の体重1kgあたり約0.01～約200mgの範囲内である。一態様において、シクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクスーPOMプロドラッグの有効量は、体重1kgあたり約0.5～約50mgの範囲内である。シクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクスーPOMプロドラッグは、約1mg～約1000mgのシクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクスーPOMプロドラッグを含む注射用投与形態へと調製することができる。一態様において、組成物は、対象の体重1kgあたり約1mg～約200mgのシクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクスーPOMプロドラッグを含み得、液体の投与形態、又は注射可能な投与量へと製剤化することができる。しかし、他の量が使用され得る。例えば、当該薬物は、広範囲の用量で投与され得、例えば、 $0.5\text{ mg/m}^2 \sim 300\text{ mg/m}^2$ 、 $1\text{ mg/m}^2 \sim 200\text{ mg/m}^2$ 、 $5\text{ mg/m}^2 \sim 150\text{ mg/m}^2$ 、 $10\text{ mg/m}^2 \sim 75\text{ mg/m}^2$ 又は任意の好適な量で投与され得る。

30

【0048】

一実施形態において、本発明は、白血病性障害 (leukemic disorder) の処置のために設計された医薬組成物を含み得る。かかる組成物は、経口で、又は静脈内注射、皮下注射若しくは筋肉内注射によって投与され得る、有効量のシクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクスーPOMプロドラッグを含み得る。

【0049】

医薬組成物は、限定することなく、凍結乾燥粉末、又は水性若しくは非水性の無菌の注射可能溶液若しくは懸濁液を含み、それはさらに、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び、組成物を意図されるレシピエントの組織又は血液と実質的に適合性にする溶質を含んでもよい。かかる組成物中に含まれ得る他の成分は、例えば水、界面活性剤（例えばTween（登録商標））、アルコール、ポリオール、グリセリン及び植物油を含む。即時型注射溶液及び懸濁液は、無菌の粉末、顆粒、錠剤、又は濃縮溶液若しくは懸濁液から調製されてもよい。組成物は、例えば、限定するものではないが、患者への投与の前に無菌の水又は食塩水を用いて再構成される凍結乾燥粉末として供給されてもよい。

40

【0050】

好適な薬学的に許容し得る担体は、本質的に化学的に不活性であり非毒性の組成物であって、医薬組成物の生物学的活性の有効性に干渉しないものを含む。好適な薬学的担体の

50

例は、限定されないが、水、食塩水溶液、グリセロール溶液、エタノール、N-（1（2，3-ジオレイルオキシ）プロピル）N，N，N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）、ジオレシル-ホスホチジール-エタノールアミン（DOPE）及びリポソームを含む。かかる組成物は、患者への直接投与のための形態を提供するために、化合物の治療有効量を、担体の好適な量と共に含むべきである。

【0051】

本明細書において記載される、シクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクス-POMプロドラッグ組成物は、例えば、非経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、眼窩内投与、眼内投与、脳室内投与、関節内投与、脊髄内投与、大槽内投与、腹腔内投与、鼻内投与、エアロゾル投与、経皮投与又は経口投与により、投与することができる。一般的な担体又は賦形剤を、かかる投与の経路のために設計された医薬組成物を調製するために使用し得る。

【0052】

別の態様は、本明細書において記載される組成物と、それと組み合わせて、本明細書において記載されるもののようなシクロピロクスが有効である障害の処置のためのその使用のための説明書とを含む、市販用パッケージを提供する。例えば、パッケージは、かかる処置を必要とする対象において急性骨髄性白血病又は急性リンパ性白血病などの白血病性障害を処置するために好適な量を含み得る。別の実施形態において、市販用パッケージは、慢性骨髄性白血病、リンパ腫又は多発性骨髄腫の処置のための投与及び／又は治療計画についての説明書を含み得る。別の実施形態は、本明細書において記載される組成物と、それと組み合わせて、白血病細胞などの白血病性障害細胞において、細胞死を引き起こす、及び／又は生存活性若しくは生存レベルを阻害するための説明書とを含む、市販用パッケージを提供する。これはまた、シクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクス-POMプロドラッグを用いる、膀胱癌の処置と共に提供され得る。

【0053】

一実施形態において、組成物は、オラミンを含まない。実際、プロドラッグはオラミンを含まなくてもよい。したがって、当該組成物は、シクロピロクスオラミン又はその誘導体を含まなくてもよい。一実施形態において、組成物は、プロドラッグ部位を欠くシクロピロクスを含まなくてもよい。

【0054】

一実施形態において、シクロピロクス、シクロピロクスオラミン又はシクロピロクス-POMプロドラッグは、治療としての使用のための治療有効量で存在し得る。例えば、治療有効量は、以下の1又は2以上のために十分であり得る：真菌の処置における使用のため；癌（膀胱癌又は他の癌）の処置における使用のため；皮膚炎の処置における使用のため；DNA修復、細胞分裂又は細胞における核内輸送の妨害のため；表在性真菌症の処置における使用のため；抗炎症剤としての使用のため；足白癬、股部白癬及び体部白癬、紅色白癬菌、毛瘡白癬菌、有毛表皮糸状菌及びイヌ小胞子菌、カンジダ症（モニリア症）、カンジダ・アルビカンズ、癬風（秕糠疹）又は癬風菌の1又は2以上の処置における使用のため；急性骨髄性白血病又は急性リンパ性白血病；慢性骨髄性白血病、リンパ腫又は多発性骨髄腫、又は他の処置における使用のため；並びに、HIVを含むウィルス感染の阻害、処置及び／又は予防のため。同様に、当該処置は、任意の好適な癌、例えば膀胱癌の処置に使用され得る。

【0055】

合成

一般的に、シクロピロクスが得られた後に、当該シクロピロクスは、シクロピロクス-POMプロドラッグを製造するために本明細書に記載される反応プロトコルを通して反応され得る。同様に、シクロピロクス誘導体得られた後に、当該シクロピロクス誘導体は、本明細書に記載される合成プロトコルに従って反応され得る。ここで、シクロピロクス誘導体試薬は、対応するシクロピロクス-POM誘導体プロドラッグをもたらす。一部の場合において、シクロピロクス又はその誘導体は、オラミン塩などの塩として得ることが

できる。したがって反応スキームは、POMプロドラッグ部分と複合体化する前にシクロピロクスを脱塩することを含み得る。

【0056】

化学反応及び対応する反応物の図面及び関連する以下の説明において、化学物質を記載するために略語を用い、これらの略語は、以下のとおり定義される：EDACは、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩であり；DIADは、ジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり；BBDIは、1-tert-ブトキシ-2-tert-ブトキシカルボニル-1, 2-ジヒドロイソキノリンであり；DICDは、ジイソプロピルカルボジイミドであり；DBPは、ジベンジルホスフェートである。

【0057】

一実施形態において、本発明は、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチルピリジン-2(1H)-オンを調製するための方法を提供し、当該方法は、図1において示すような反応スキーム1を含み得る。スキーム1の反応は、シクロピロクスを、そのオラミン塩から調製する。簡単に述べると、シクロピロクスを得るために、シクロピロクスオラミン(5g、18.6mmol)を、2NのHCl中に溶解し、EtOAcで抽出し、ヘキサンで沈殿させることができる(約84%の収率)。

【0058】

一実施形態において、本発明は、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチルピリジン-2(1H)-オンのプロドラッグの調製における使用のための試薬を調製する方法を提供し、当該方法は、図2において示すような反応スキーム2を含み得る。反応スキーム2は、POMプロドラッグ部分の試薬の調製のための試薬を提供し、これは、ジ-tert-ブチル(クロロメチル)ホスフェートである。簡単に述べると、ジ-tert-ブチルホスフェートを形成させるために、カリウムジ-tert-ブチルホスフェート(5g、20mmol)を、最少量の冷水中に溶解し、沈殿を形成させるために6NのHClを一滴ずつ添加し、次いで、沈殿物を冷水で洗浄し、これを次いで、濾過して真空中で乾燥させる。ジ-tert-ブチルホスフェート(4g、19mmol)を、次いで、約100mLのアセトン中で、pHが約7に達するまでテトラメチルアンモニウムヒドロキシドを一滴ずつ添加しながら溶解し、次いで、溶媒を除去して真空中で乾燥させ、テトラメチルアンモニウムジ-tert-ブチルホスフェートを生成する。テトラメチルアンモニウムジ-tert-ブチルホスフェート(5.11g、18mmol)を、次いで、約150mLのDME中でヨードクロロメタン(CH_2ClI)(25g、142mmol、7.88当量)と反応させ、約2時間還流し、その後、濾過して沈殿物を除去し、溶媒を除去し、次いで、EA/H中に溶解し、次いで、シリカ床を通して濾過し、溶媒を除去し、生成物を乾燥して、ジ-tert-ブチル(クロロメチル)ホスフェートを得る。生成物を確認するために、TLCを示す。

【0059】

一実施形態において、本発明は、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチルピリジン-2(1H)-オンのプロドラッグ(すなわち、((6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1(2H)-イル)オキシ)メチルホスフェートの2ナトリウム塩)を調製するための方法を提供し、当該方法は、図3において示されるような反応スキーム3を含み得る。反応スキーム3は、シクロピロクスを、ジ-tert-ブチル(クロロメチル)ホスフェートと反応させて、2ナトリウム塩を含むシクロピロクス-POMを形成する。簡単に述べると、シクロピロクス(0.257g、1.25mmol)及びジ-tert-ブチル(クロロメチル)ホスフェート(0.450g、1.74mmol)を、5mL中に溶解し、60%のNaH(0.62g、154mmol)と、0℃で30分間、次いで室温で2時間反応させ、その後、水でクエンチし、次いで、溶媒を除去し、分離カラムを通してEA/H(1:1)で処理し、ジ-tert-ブチル(((6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1(2H)-イル)オキシ)メチル)ホスフェートを得、これをTLCで確認した。ジ-tert-ブチル(((6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1(2H)-イル)オキシ)メチル)ホスフェートを、次いで、10mLのTHF

10

20

30

40

50

／ CH_2Cl_2 （3：1）中で溶解し、室温で2時間インキュベートし、その後、溶媒を除去し、RPHPLCを介して精製し、水／ ACN 中の等モルの Na_2CO_3 を添加し、凍結乾燥して、（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルジハイドロゲンホスフェート（14mg、0.044mmol）及び（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルホスフェートの2ナトリウム塩（15.89mg）を得た。これを、本明細書において、一次（primary）シクロピロクス-POMプロドラッグと呼ぶ。

【0060】

図3Aは、スキーム3Aとして同定される副反応プロセスを示し、これは、スキーム3の副次的プロセスであり得る。スキーム3Aは、ジ-tert-ブチル（（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチル）ホスフェートが、tert-ブチル（（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチル）ハイドロゲンホスフェートへと変換することを示し、これは、（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルジハイドロゲンホスフェートへと変換する。図3Bは、これらの化学物質の実体の存在を示す質量分析クロマトグラフを示す。

10

【0061】

シクロピロクス-POMプロドラッグの遊離酸形態（すなわち、（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルジハイドロゲンホスフェート）をまた、図3Cにおいて示すように、RPHPLCにより精製した。精製した生成物は、図3Cにおいて示される質量分析クロマトグラフを有することが示された。

20

【0062】

さらに、シクロピロクス-POMプロドラッグの別の2量体型形態を、図3Dにおいて示すように作製した。シクロピロクス-POMの2量体プロドラッグを、図3Eにおいて示すように、質量分析クロマトグラフにより確認した。

【0063】

図4は、スキーム4を説明し、これは、（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルホスフェートの2ナトリウム塩（これは、図4Aにおいて示すとおり質量分析クロマトグラフにより確認される）を得るために、（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルジハイドロゲンホスフェートを、ナトリウムイオンで塩にするプロセスである。

30

【0064】

一実施形態において、本発明は、図5の反応スキーム5において示されるように、POM試薬であるジベンジル（クロロメチル）ホスフェートを調製する方法を含み得る。簡単に述べると、ジベンジル（クロロメチル）ホスフェートを得る（これは、TLCを介して確認される）ために、 CH_2ClI （5mL；68.6mmol）を、約25mLのトルエン中で、銀ジベンジルホスフェート（2g、52mmol）と反応させ、約1時間還流し、その後、溶媒を除去して、分離カラムを通して1/1EA/Hにより処理する。

【0065】

一実施形態において、本発明は、図6のスキーム6により示されるように、プロドラッグであるジベンジル（（（6-シクロヘキシル-4-メチル-2-オキソピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチル）ホスフェートを調製する方法を提供する。簡単に述べると、ジベンジル（（（6-シクロヘキシル-4-メチル-2-オキソピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチル）ホスフェートを得るために（これは、示されるとおり、TLCにより確認される）、シクロピロクス（0.431g、2.08mmol）を、10mLのDMF中で、ジベンジル（クロロメチル）ホスフェート（0.920g、2.81mmol）及び60%の NaH （0.096g、2.38mmol）と共に溶解し、0℃で30分、次いで室温で1時間インキュベートし、その後水でクエンチする。次いで溶媒を除去して、分離カラムを通してEA/H（1：1）で処理する。

40

【0066】

50

一実施形態において、図7のスキーム7に示すとおり、ジベンジル（（（6-シクロヘキシル-4-メチル-2-オキソピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチル）ホスフェートを、（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルホスフェートの2ナトリウム塩へと変換する。簡単に述べると、ジベンジル（（（6-シクロヘキシル-4-メチル-2-オキソピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチル）ホスフェートを、25 mLのTHF中で、100 mgのPd/Cの存在下において、水素（H₂）下において室温で3時間かけて溶解し、その後溶媒を除去して、生成物をACN中で溶解する。次いでNa₂CO₃水溶液を添加して、凍結乾燥する。生成物は微量の（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルジハイドロゲンホスフェート（約0.273 g、0.86 mmol）であり、主な生成物は（（6-シクロヘキシル-4-メチルピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチルホスフェート2ナトリウム塩（0.310 g）と決定し、これを、示すとおりTLCを介して確認した。

10

【0067】

一実施形態において、図8の反応スキーム8において示すとおり、POM試薬であるジベンジル（クロロメチル）ホスフェートを調製する別の方法である。簡単に述べると、ジベンジルホスフェート（10.6 g；38.08 mmol）及びクロロメチルスルホクロリデート（chloridate）（7.52 g、456.6 mmol / 120 mLのCH₂Cl₂）を、320 mLの水及び200 mLのCH₂Cl₂中で、NaHCO₃（12.80 g、152.32 mmol）及びn-Bu₄NHSO₄（12.94 g、38.08 mmol）と共に、0℃から室温まで一晩かけて溶解し、次いで、分離カラムを通して1/2のEA/H、EAで処理する。この反応は、約48%のジベンジル（クロロメチル）ホスフェート（6 g）を生じ、これは、示すとおりTLCで確認される。

20

【0068】

一実施形態において、本発明は、プロドラッグであるジベンジル（（（6-シクロヘキシル-4-メチル-2-オキソピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチル）ホスフェートを調製する別の方法を提供し、これは、図6のスキーム6により示される。簡単に述べると、67%のジベンジル（（（6-シクロヘキシル-4-メチル-2-オキソピリジン-1（2H）-イル）オキシ）メチル）ホスフェート（1.616 g）を得るために、シクロピロクス（1 g、4.82 mmol）を、20 mLのDMF中で、ジベンジル（クロロメチル）ホスフェート（2 g、6.12 mmol）及び60%のNaH（0.375 g）と共に溶解し、0℃で30分、次いで室温で1時間インキュベートし、その後水でクエンチする。次いで溶媒を除去し、生成物をEtOAc中で溶解し、水で洗浄し、溶媒を除去し、分離カラムを通してEA/H（1：2）で、及びRPHPLCで処理する。

30

【実施例】

【0069】

現在、本発明の化合物が、膀胱癌の治療に有用であることが分かっている。膀胱癌はNMIBC（筋層非浸潤性膀胱癌）及びMIBC（筋層浸潤性膀胱癌）、並びに他の膀胱癌を包含し得る。図9～28を参照されたい。化合物（式10）は抗膀胱癌活性を有することが示されている。全身注射（例えば、静脈内、筋肉内、皮下等）によりプロドラッグを与えることで、活性な、臨床的に意義のある濃度（例えば、有意濃度）のシクロピロクス活性薬剤の、尿路全体への選択的送達をもたらされる。これにより筋層非浸潤性膀胱癌又は表在性膀胱癌が治療され得る。

40

【0070】

プロドラッグは、膀胱癌内の幹細胞を効果的に抑制し、Notch-1シグナル経路を特異的に標的とする活性シクロピロクス化合物に変換する。前記化合物の存在下において、シグナル伝達が有意に抑制されること、及び、前記化合物がこの機構を通じて膀胱癌に影響を与えていること、が示されている。Notchの抑制は、膀胱癌及びNotchシグナル伝達が活性な他の癌（例えば結腸がん、骨肉腫）を阻害する、前記化合物の顕著な活性である。

50

【0071】

NMIBCは、尿路（例えば、尿と接触する内壁）の外膜（尿路上皮）の癌から始まり、外膜上の癌細胞は膀胱の筋肉内への内向きの浸潤を開始し、その後、前記がんは身体中に拡散する。しかし、シクロピロクスの活性及びプロドラッグとしての送達、前記薬剤がこの特定の癌の浸潤性に関連する経路を阻害することを可能にする。

【0072】

一実施形態において、プロドラッグは、白血病、リンパ腫、結腸直腸癌、肝細胞腫、横紋筋肉腫、及び乳癌細胞系統、並びに他の癌、例えば、限定はされないが、膀胱癌、腎（renal）細胞癌、造血器腫瘍、子宮頸癌、骨髄腫、及び可能性のある他の癌、を治療するシクロピロクスの抗癌活性を与えるために投与され得る。

10

【0073】

シクロピロクスーPOMプロドラッグは、シクロピロクスの活性に基づいて、オートファジーの誘導、mTORの阻害、サイクリンA、B1、D1及びE並びにCDK2及びCDK4、並びに他の活性の下方制御のためにも使用され得る。

【0074】

プロドラッグで膀胱癌を治療する方法は、膀胱癌の治療のためにシクロピロクスーPOMプロドラッグ（例えば、プロドラッグ）を全身投与することを含み得るが、これは、本明細書に記載されるもの等の驚くべき且つ予想外の結果を提供する。

【0075】

シクロピロクスーPOMプロドラッグの全身投与は、臨床的に有意な濃度の活性なシクロピロクス（遊離酸）抗癌剤の尿路全体への選択的送達をもたらすことが分かっている。

20

【0076】

筋層非浸潤性膀胱癌（NMIBC、以前は表在性膀胱癌と称された）の現在の治療法は膀胱内注入を介したものである。膀胱内注入以外のいずれかの経路によって投与される、NMIBCに対する薬物療法は現在のところ存在しない。抗癌剤の膀胱内注入は、患者が膀胱内に液体を保持可能な期間（例えば、2時間）、膀胱癌を抗癌剤に暴露するのみである。第二に、膀胱内注入は、解剖学的に膀胱の上部に位置する尿路全体、すなわち尿管、集尿系、及び腎臓、に薬剤を送達しない。NMIBC患者の10%以下が上部尿路疾患を有する。それと異なり、本発明は、活性薬剤を尿路全体に与える全身送達（例えば、注射）を含む。しかし、治療薬は膀胱内注入（bladder installation）によって送達されてもよい。

30

【0077】

膀胱癌は2つの疾患、NMIBC及び筋層浸潤性膀胱癌（MIBC）、として現れる。新たに診断された膀胱癌患者のおよそ3/4はNMIBCを呈する。NMIBCは、膀胱筋内に浸潤する際、MIBCになる。MIBCはしばしば転移し、化学療法薬剤の全身投与を必要とする。驚くべきことに、そして予想外に、シクロピロクスがNMIBC及びMIBC膀胱癌において抗癌活性を有しており、シクロピロクスーPOMプロドラッグの全身送達がこれらの膀胱癌細胞にシクロピロクスを与えることが、現在示されている。シクロピロクスーPOMプロドラッグ送達由来のシクロピロクスは、特徴がはっきりしたNMIBC及びMIBC細胞株における、細胞増殖、コロニー形成、及びスフェロイド形成を阻害する。シクロピロクスの殺真菌活性は鉄をキレート化し、鉄依存性の細胞内プロセスを妨げる能力を介したものであるが、シクロピロクスのインビトロ抗癌活性は市販の鉄キレート剤に非依存である。シクロピロクスがNotch-1シグナル経路を阻害することが初めて示されたが、このNotch-1シグナル経路は、浸潤性膀胱癌において過剰発現されていると最近特定された経路であり、いくつかの癌にわたって癌幹細胞において過剰発現される経路である。したがって、シクロピロクスーPOMプロドラッグは、膀胱癌の全ての形態の治療で、及びNotchシグナル経路が活性である多くの様々な癌の癌幹細胞において、使用することができる。

40

【0078】

シクロピロクスーPOMプロドラッグは尿路全体に臨床的有意濃度のシクロピロクスを

50

選択的に送達する。

【0079】

以下を実証する、マウス、ラット及びイヌにおける一連の薬物動態研究を行った。シクロピロクスーPOMプロドラッグは全身投与後に迅速且つ完全に血漿から消失する。シクロピロクスーPOMプロドラッグの全身投与後のシクロピロクスの生物学的利用能は優れており、マウス、ラット及びイヌにおいて77～137%の範囲である。シクロピロクスーPOMプロドラッグの全身投与後、この用量(dose)は、シクロピロクス及びシクロピロクスのグルクロニド代謝産物(CPX-G)の腎クリアランスにより身体から排泄される。薬剤排泄はシクロピロクスオラミン(CPX-O)について報告されたものと一致する。最大耐用量を十分に下回るシクロピロクスーPOMプロドラッグの用量において、NMIBC細胞株及びMIBC細胞株において決定されたインビトロIC50値を超える、シクロピロクスの尿中濃度が認められる。

10

【0080】

マウス、ラット及びイヌにおいて薬物動態研究が行われ、シクロピロクスーPOMプロドラッグが迅速且つ完全に代謝されてシクロピロクスが形成されることが示された。シクロピロクスーPOMプロドラッグの迅速な代謝がインビボで起こると、シクロピロクスが形成される。マウス、ラット、及びイヌにおいて、シクロピロクスーPOMプロドラッグは、IV投与後に血漿中にも尿中にも検出されない。マウス、ラット及びイヌにおいて、血漿中シクロピロクス濃度はIVボラス投与直後(5分以内)に最大となり、その後下降する。POM部分が血液中を循環するホスファターゼによって代謝されることは、十分に理解されることである。シクロピロクスーPOMプロドラッグの完全な代謝により、シクロピロクスが形成される。シクロピロクスオラミンのIVボラス投与との比較において、マウスへのシクロピロクスーPOMプロドラッグのIV投与後、シクロピロクスは完全な生物学的利用能を有する。

20

【0081】

マウスにおけるクロピロクス(Clopirox)ーPOMプロドラッグ薬物動態

【0082】

試験208-02：マウスにおけるシクロピロクスーPOMプロドラッグの経口投与後及び静脈内投与後のシクロピロクスの生物学的利用能

シクロピロクスーPOMプロドラッグの薬物動態学的な原理証明を、マウスにおいて、処置群あたり、時点当たり6匹のマウスへの、それぞれ30mg/kg及び10mg/kgの用量で経口的及び静脈内に与えられたシクロピロクスーPOMプロドラッグ及びシクロピロクスオラミンの投与後に、決定した。この試験の目的は、さらなる癌原理証明試験の支持として、CPX-POM代謝の速度及び程度を特徴付け、経口投与されたシクロピロクスーPOMプロドラッグの実行可能性を評価することであった。

30

【0083】

シクロピロクスーPOMプロドラッグの経口投与及びIV投与後、プロドラッグは血漿中に検出されなかった。さらに、シクロピロクスーPOMプロドラッグのIV投与後のシクロピロクスのAUCは、シクロピロクスオラミンのIV投与との比較で137%であった。これは、おそらくは血漿中ホスファターゼによるプロドラッグのシクロピロクスへの代謝が、迅速なだけでなく完全であることを示している。シクロピロクスオラミン(21%)及びシクロピロクスーPOMプロドラッグ(12%)の投与後のシクロピロクスの経口生物学的利用能は低く、これは、この投与経路に関連した初回通過効果が著しいことを示している。

40

【0084】

図12Aは、10mg/kg IV シクロピロクスオラミン(CPX-O)、10mg/kg IV シクロピロクスーPOMプロドラッグ(CPX-POM)、30mg/kg PO CPX-O及び30mg/kg PO CPX-POMの投与後の、平均血漿中シクロピロクス(CPX)濃度-時間の直線的プロファイルを示している。表1Aは得られた薬物動態データの要約である。

50

【表 1】

表 1 A : I V 及び経口的な CPX-O 及び CPX-POM の単回投与後の、雄 C57/B16 マウスにおける血漿中 CPX 薬物動態パラメータ

処置	CPX-O IV	CPX-POM IV	CPX-O 経口	CPX-POM 経口
平均体重(kg)	0.020	0.020	0.020	0.020
CPX用量 (mg/kg) ^b	10	10	30	30
C ₀ (ng/mL)	11338			
C _{max} (ng/mL)		8005	548	520
T _{max} (hr)		0.083	0.25	0.25
K _{e1} (hr ⁻¹)	1.136	1.890	0.549	0.496
T _{1/2} (hr)	0.610	0.367	1.26	1.40
AUC ₀ ∫ ⁿ (ng*hr/mL)	1533	2183	821	476
AUC ₀ ∫ [∞] (ng*hr/mL)	1544	2213	957	575
AUMC ₀ ∫ ⁿ (ng*hr ² /mL)	358			
AUMC ₀ ∫ [∞] (ng*hr ² /mL)	401			
MRT (hr)	0.259			
Cl (mL/hr/kg)	6475			
Vd _z (mL/kg)	5700			
V _{ss} (mL/kg)	1680			
F (%) ^d		137	20.6	12.4

^a 処置あたり、時点当たり N=6 のマウス^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-O は 2.0 mg/mL CPX の強度で 50 mM Captisol (登録商標) を含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7) 中で製剤化され; CPX-POM ニナトリウム塩は 2.69 mg/mL の強度で 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7) 中で製剤化された^c C₀ はノンパラメトリックな薬物動態データ解析から得られた I V ボーラス投与後の y 切片値と一致する^d 参照処置として CPX-O I V を用いて決定された絶対生物学的利用能

【0085】

試験 11177: マウスにおける I P 投与後のシクロピロクス-POM プロドラッグの絶対生物学的利用能

【0086】

マウスにおいて、シクロピロクス-POM プロドラッグ (CPX-POM) の 10 mg/kg I V 投与後及び 50 mg/kg I P 投与後に、シクロピロクス (CPX) の血漿中及び尿中薬物動態を特徴付けした。この試験の目的は、I P 投与後のシクロピロクス-POM プロドラッグの絶対生物学的利用能を特徴付けして、膀胱癌の有効モデルにおける前臨床原理証明試験での I P 投与を支持することであった。さらに、CPX-POM の I P 投与後の CPX への尿路暴露を説明するために、CPX 及びシクロピロクスグルクロニド (CPX-G) の尿中排泄を特徴付けした。それぞれ 30 匹の C57BL/6 マウスから成る 2 つの処置群を CPX-POM で処置した。投与に先立ち、及び投与後 6 時間に亘って、それぞれ選択された血漿採取時点において、3 匹の動物を屠殺した。生物分析用に血液 (血漿) を心穿刺により採取した。血漿を各時点においてプールした。さらに、それぞれ 6 匹のマウスから成る 2 つの群に、10 mg/kg I V 及び 50 mg/kg I P CPX-POM を投与して、尿中薬物動態を特徴付けした。マウスを代謝ケージ内に入れ、投与後 24 時間に亘って尿を採取した (0~8 時間及び 8~24 時間の尿採取間隔)。血漿と同様に、6 匹の動物から採取した尿試料を生物分析用にプールした。

【0087】

C P X - P O M の $10 \text{ mg} / \text{kg}$ I V 及び $50 \text{ mg} / \text{kg}$ I P 単回投与量は耐容性良好であった。I P C P X - P O M の絶対的生物学的利用能は 65% であった。先の薬物動態学的な原理証明試験と一致して、C P X - P O M はいずれの処置後も血漿中 $25 \text{ ng} / \text{mL}$ の B Q L において検出不可であった。図 1 2 B に示されるように、C P X - P O M の I V 及び I P 投与後に、C P X への広範囲全身暴露が達成される。C P X - P O M の $10 \text{ mg} / \text{kg}$ I V ボーラス投与の後、インビトロ I C 5 0 値を数倍超える、 $8,098 \text{ ng} / \text{mL}$ ($39 \mu \text{M}$) のピーク血漿中 C P X 濃度値が認められた。 $50 \text{ mg} / \text{kg}$ C P X - P O M の I P 投与後、投与の 0.25 時間後に、 $4,127 \text{ ng} / \text{mL}$ ($10.0 \mu \text{M}$) の C m a x 値が認められた。筋層非浸潤性膀胱癌細胞株及び筋層浸潤性膀胱癌細胞株における $2 \mu \text{M}$ ($414 \text{ ng} / \text{mL}$) のインビトロ I C 5 0 値を前提として、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$ I P C P X - P O M は I C 5 0 より 5 倍高い C P X の C m a x 値を達成する。

【0088】

得られた血漿中薬物動態データを表 2 A に要約する。先の 2 0 8 - 0 2 試験と一致して、I P 投与の C P X の見掛けの消失速度は迅速であり、平均血漿中終末相半減期は 1 時間未満 (0.88 時間) である。この試験での C P X - P O M の I V 投与の後、C P X の全身クリアランスは、マウスにおいて $7,605 \text{ mL} / \text{hr} / \text{kg}$ であった。C P X - P O M の I V 投与後の C P X の分布容積はマウスにおいて中程度であり、先のマウス試験よりもまた大きい、およそ $9.0 \text{ L} / \text{kg}$ であった。図 1 2 B は、処置群あたり、時点あたりの 3 匹のマウスへの $10 \text{ mg} / \text{kg}$ I V 及び $50 \text{ mg} / \text{kg}$ I P C P X - P O M の投与後の、平均血漿中シクロピロクス (C P X) 濃度-時間の直線的プロファイルを示す。

【表 2】

表 2 A : CPX-POMの単回 IV 及び IP 投与後の、C57/B16 マウスにおける血漿中 CPX 薬物動態パラメータ

処置 ^a	IV	IP
平均体重 (kg)	0.021	0.020
CPX用量 (mg/kg) ^b	10	50
C ₀ (ng/mL) ^c	8098	
C _{max} (ng/mL)		4127
T _{max} (hr)		0.25
K _{e1} (hr ⁻¹)	0.544	0.785
T _{1/2} (hr)	1.27	0.88
AUC ₀₋₆ (ng*hr/mL)	1273	3981
AUC _{0-∞} (ng*hr/mL)	1328	4124
AUMC ₀₋₆ (ng*hr ² /mL)	544	
AUMC _{0-∞} (ng*hr ² /mL)	861	
MRT (hr)	0.649	
Cl (mL/hr/kg)	7605	
V _z (mL/kg)	13981	
V _{ss} (mL/kg)	4887	
F (%)		64.8

^a 処置あたり、時点当たり N=3 のマウス^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POM ニナトリウム塩は 2.69 mg/mL の強度で 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7) 中で製剤化された^c C₀ はノンパラメトリックな薬物動態データ解析から得られた IV ボーラス投与後の y 切片値と一致する

【0089】

10 mg/kg IV 及び 50 mg/kg IP CPX-POM の後にマウスにおいて得られた尿中 CPX 薬物動態パラメータを以下の表 3 A にまとめる。CPX-POM の単回 IV 及び IP 投与後、用量の 1% 未満が CPX として排泄される。しかし、尿中 CPX 濃度は 2 μM のインビトロ IC₅₀ 値を数倍超えていた。IV 投与経路とは対照的に、IP 投与後の投与後 24 時間の全体に亘って顕著な尿中 CPX 濃度が認められた。CPX-POM 用量の 23%~26% がシクロピロクスの不活性なグルクロニド代謝産物として排泄された。

10

20

30

【表 3】

表 3 A : I V 及び I P CPX-POM の単回投与後の、雄 C 5 7 / B 1 6 マウスにおける尿中 CPX^c 及び CPX-G^c 薬物動態パラメータ

処置 ^a	CPX-POM IV	CPX-POM IP
平均体重 (kg)	0.021	0.022
CPX 用量 (mg/kg) ^b	10	50
U _{CPX} (ng/mL) 0~4hr	1420	4740
U _{CPX} (ng/mL) 4~8hr	3300	3690
U _{CPX} (ng/mL) 8~24hr	0	7050
U _{CPX} (μM) 0~4hr	6.86	22.9
U _{CPX} (μM) 4~8hr	15.9	17.8
U _{CPX} (μM) 8~24hr	0	34.1
Xe _{CPX} (μg) 0~24hr	0.57	7.75
Fe _{CPX} (%)	0.27	0.60
Xe/dt _{CPX} (ng/hr) 0~4hr	37.3	104
Xe/dt _{CPX} (ng/hr) 4~8hr	58.0	80.9
Xe/dt _{CPX} (ng/hr) 8~24hr	0	415
Cl _r (mL/hr)	0.44	
Cl _r (mL/hr/kg)	21.5	
Fe _{CPX-G} (%)	25.9	22.6

^a 処置あたり N = 6 のマウス^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POM ニナトリウム注射用製剤は 50 mM Captisol (登録商標) を含む 25 mM リン酸塩 (pH 7) 中 5 mg/mL の CPX を含有した^c シクロピロクス (CPX) ; シクロピロクスグルクロニド (CPX-G)

【0090】

試験 11206 : マウスにおける単回及び反復 IP 投与後のシクロピロクス-POM プロドラッグの尿中薬物動態

【0091】

それぞれ 6 匹のマウスからなる 3 つの別々の群への 50、100、及び 200 mg/kg シクロピロクス-POM プロドラッグ (CPX-POM) の単回 (1 日目) 及び反復 (10 日目) 投与 (1 日 1 回を 10 日間連続) 施行後のマウスにおいて、尿中シクロピロクス (CPX) 薬物動態を特徴付けした。以下の表 3 B に要約される。この試験は、一連の一日一回の IP 投与後の CPX-POM プロドラッグの投与後の尿におけるシクロピロクス暴露を実証することによって、膀胱癌の有効モデルにおけるインビボ前臨床原理証明試験を裏付けるために行われた。50、100、及び 200 mg/kg の CPX-POM の単回及び反復 IP 投与後、用量の 1% 未満が 24 時間に亘って CPX として排泄された。しかし、シクロピロクスとしての用量回収率 (dose recovery) が低いパーセントであるにもかかわらず、尿中 CPX 濃度は全用量範囲に亘って 2 μM のインビトロ IC₅₀ 値を数倍超過した。この試験で採取されたいかなる尿試料にも CPX-POM は検出されず、このことは、プロドラッグの完全な代謝を示唆している。全用量範囲に亘って、投与された用量のかなりの部分が不活性なシクロピロクスグルクロニド代謝産物として排泄された。これらのデータに基づき、100 mg/kg 及び 200 mg/kg のシクロピロクス-POM プロドラッグの亜慢性 IP 投与計画を、後の膀胱癌の有効モデルにおける原理証明試験用を選択した。

【表 4】

表 3 B : CPX-POMの単回及び一日一回反復 IP 投与後の、雄 C 5 7 / B 1 6 マウスにおける尿中 CPX[°] 及び CPX-G[°] 薬物動態パラメータ

処置 ^a	50mg/kg IP		100mg/kg IP		200mg/kg IP	
	1日目	10日目	1日目	10日目	1日目	10日目
平均体重 (kg)	0.021	0.023	0.020	0.022	0.020	0.022
CPX用量 (mg) ^b	1.1	1.1	2.1	2.2	4.0	4.4
U _{CPX} (ng/mL) 0~8hr	5975	7855	5595	15000	8165	19350
U _{CPX} (ng/mL) 8~24hr	2215	8220	4180	5555	5540	8740
U _{CPX} (ng/mL) 0~24hr	2871	8142	4700	8010	6315	12149
U _{CPX} (μM) 0~8hr	29	38	27	72	39	93
U _{CPX} (μM) 8~24hr	11	50	20	27	27	42
U _{CPX} (μM) 0~24hr	14	39	23	39	30	59
Xe _{CPX} (μg) 0~24hr	2.72	4.12	6.44	3.03	2.91	2.51
Fe _{CPX} (%)	0.25	0.36	0.31	0.14	0.07	0.06
Xe _{CPX-G} (mg) 0~24hr	7.46	5.24	18.69	22.73	28.42	15.57
Fe _{CPX-G} (%) ^d	61.1	41.6	80.2	93.0	63.5	32.1

^a 処置群あたり N = 6 のマウス^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POM ニナトリウム注射用製剤は 50 mM Captisol (登録商標) を含む 25 mM リン酸塩 (pH 7) 中 20 mg/mL の CPX を含有し、10 日間連続一日一回 IP 投与された[°] シクロピロクス (CPX) ; シクロピロクスグルクロニド (CPX-G)^d CPX-G として排泄された用量の割合は分子量に対して補正された

【0092】

ラットにおけるシクロピロクス-POM プロドラッグ薬物動態

【0093】

試験 10954 : ラットにおけるシクロピロクス-POM プロドラッグの静脈内投与後のシクロピロクスの生物学的利用能

ラットにおいて、10 mg/kg のシクロピロクスオラミン (CPX-O) 及びシクロピロクス-POM プロドラッグ (CPX-POM) の IV 投与後に、シクロピロクス (CPX) の血漿中及び尿中薬物動態を特徴付けした。この種 (species) における IV シクロピロクス-POM プロドラッグの後のシクロピロクスの生物学的利用能の特徴付けにおいて、静脈内シクロピロクスオラミンを基準として用いた。CPX-O 及び CPX-POM の投与後のマウスにおいて認められた CPX の低い経口生物学的利用能を鑑みて、この試験ではこの投与経路を検討しなかった。

【0094】

IV CPX-POM 及び CPX-O の投与後の得られた平均血漿シクロピロクス濃度-時間プロファイルを、図 13A に示す。血漿中シクロピロクス濃度は両方の処置の IV 投与後に速やかに下降し、見掛けの排出半減期は 1 時間未満であった。得られた血漿中シクロピロクス薬物動態パラメータを表 4A にまとめる。

【0095】

CPX-POM の IV 投与の後、CPX の全身アベイラビリティはシクロピロクスオラミンの静脈内投与との比較で 77 % であった。IV ボーラス投与の数分以内に採取された少数の血液試料においてプロドラッグの血漿中濃度が認められたが、採取された大部分の試料で CPX-POM は検出されなかった。CPX-POM は採取されたいかなる尿試料中にも検出されなかった。10 mg/kg CPX-POM の IV 投与後に CPX への広

範囲の全身暴露が達成され、I V ボーラス投与直後の平均初期血漿中シクロピロクス濃度は $9,310 \text{ ng/mL}$ である。筋層非浸潤性膀胱癌細胞株及び筋層浸潤性膀胱癌細胞株における $2 \mu\text{M}$ (414 ng/mL) のインビトロ IC50 値を前提として、 10 mg/kg I V C P X - P O M は IC50 よりおよそ 20 倍高い Cmax 値を達成する ($C_{\text{max}} = 45 \mu\text{M}$)。図 13 A は、処置群あたり 6 匹のラットへの 10 mg/kg I V C P X - P O M 及び C P X - O の投与後の、平均血漿中シクロピロクス (C P X) 濃度-時間の片対数プロファイルを示す。

【表 5】

表 4 A : C P X - P O M 及び C P X - O の単回 I V 投与後の雄スプライングドリーラットにおける血漿中 C P X 薬物動態パラメータ

処置 ^a	C P X - P O M	C P X - O
平均体重 (kg)	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01
C P X 用量 (mg/kg) ^b	9.12 ± 0.05	10.00 ± 0.06
C ₀ (ng/mL)	$9,310 \pm 5,251$	$25,883 \pm 13,321$
K _{e1} (hr ⁻¹)	1.580 ± 0.286	1.453 ± 0.634
T _{1/2} (hr)	0.452 ± 0.087	0.615 ± 0.404
AUC ₀ ∫ ⁿ (ng*hr/mL)	$2,121 \pm 501$	$3,077 \pm 427$
AUC ₀ ∫ [∞] (ng*hr/mL)	$2,161 \pm 477$	$3,141 \pm 349$
AUMC ₀ ∫ ⁿ (ng*hr ² /mL)	827 ± 275	947 ± 608
AUMC ₀ ∫ [∞] (ng*hr ² /mL)	950 ± 229	$1,291 \pm 1,206$
MRT (hr)	0.455 ± 477	0.446 ± 0.474
Cl (mL/hr/kg)	$4,060 \pm 399$	$3,225 \pm 374$
Vd _z (mL/kg)	$2,664 \pm 670$	$2,983 \pm 2,319$
V _{ss} (mL/kg)	$1,853 \pm 899$	$1,563 \pm 1,853$
F (%)	77.0	

^a 処置あたり N = 6 のラット

^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、C P X - P O M ニナトリウム注射用製剤は 50 mM C a p t i s o l (登録商標) を含む 25 mM リン酸塩 (pH 7) 中 5 mg/mL の C P X を含有した

^c C₀ はノンパラメトリックな薬物動態データ解析から得られた y 切片値と一致する

【0096】

10 mg/kg I V C P X - O 及び C P X - P O M の後のラットにおいて得られた尿中 C P X 薬物動態パラメータを以下の表 5 A にまとめる。C P X - P O M 及び C P X - O の単回 I V 投与後、用量の 1 % 未満が C P X として排泄される。しかし、尿中 C P X 濃度は $2 \mu\text{M}$ のインビトロ IC50 値を超過した。

【表 6】

表 5 A : I V C P X - P O M 及び C P X - O の単回投与後の雄スプライングドリーラットにおける尿中 C P X ° 及び C P X - G ° 薬物動態パラメータ

処置	CPX-POM	CPX-O
平均体重 (kg) ^a	0.252 ± 0.006	0.238 ± 0.006
CPX用量 (mg/kg) ^b	9.06 ± 0.02	9.98 ± 0.07
U _{CPX} 0~8hr (ng/mL)	1,182 ± 498	921 ± 112
U _{CPX} 8~24hr (ng/mL)	198 ± 172	118 ± 45
U _{CPX} 0~8hr (μM)	4.45 ± 0.54	8.79 ± 2.41
U _{CPX} 8~24hr (μM)	1.22 ± 0.32	2.64 ± 1.13
dXe/dt _{CPX} 0~8hr (μg/hr)	0.23 ± 0.09	0.76 ± 0.26
dXe/dt _{CPX} 8~24hr (μg/hr)	0.07 ± 0.01	0.13 ± 0.04
Xe _{CPX} (μg)	2.88 ± 0.78	8.18 ± 2.90
Fe _{CPX} (%)	0.13 ± 0.03	0.34 ± 0.12
Clr (mL/hr)	1.27	2.60
Clr (mL/hr/kg)	5.04	0.92
Fe _{CPX-G} (%)	27.75 ± 10.02	17.58 ± 2.46

^a 完全な、非無作為化的な、クロスオーバー様式で3つ全ての処置を受けたN=4のラット

^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POMニナトリウム注射用製剤は50 mM Captisol (登録商標)を含む25mMリン酸塩 (pH7) 中5mg/mLのCPXを含有した

^c シクロピロクス (CPX) ; シクロピロクスグルクロニド (CPX-G)

【0097】

試験11428:ラットにおけるシクロピロクス-POMプロドラッグの皮下投与後及び経口シクロピロクスオラミンの後のシクロピロクスの生物学的利用能

ラットにおいて、20mg/kgのシクロピロクス-POMプロドラッグ (CPX-POM) のIV投与後、30mg/kgのCPX-POMの皮下 (SQ) 投与後、及び30mg/kgのシクロピロクスオラミン (CPX-O) の経口投与後に、シクロピロクス (CPX) の血漿中及び尿中薬物動態を特徴付けした。この種におけるSQシクロピロクス-POMプロドラッグの後のシクロピロクスの生物学的利用能の特徴付けにおいて、静脈内CPX-POMを基準として用いた。注射用CPX-POMと、オラミン局所的抗真菌性生成物の裏付けとして行われた登録研究を通じてHoechst AGにより作成された前臨床安全性データとの間の薬物動態学的な「橋渡し (bridge)」を確立するために、オラミン塩の投与後のCPXの経口生物学的利用能を決定した。

【0098】

IV及びSQ CPX-POM及び経口投与されたシクロピロクスオラミンの投与後の得られた平均血漿シクロピロクス濃度-時間プロファイル、図13Bに示す。10954試験と一致して、血漿中シクロピロクス濃度はCPX-POMのIV投与後に速やかに下降し、見掛けの排出半減期は1時間未満であった。SQ CPX-POMから得られた血漿中シクロピロクス濃度-時間プロファイルはIV CPX-POMと大きく異なっていた。シクロピロ (c i c l o p i r o) のオラミン塩の経口投与後の血漿中シクロピロクス濃度は、比較上かなり低かった。得られた血漿中シクロピロクス薬物動態パラメータを表6Aにまとめる。

【0099】

SQ CPX-POMは、80%において、IV CPX-POMと比較して優れた生

物学的利用能を示した。IV及びSQ投与されたCPX-POMは、2 μ MのインビトロIC50値を数倍超過した血漿中シクロピロクス濃度をもたらした。オラミン塩の経口投与後のシクロピロクスの血漿中シクロピロクス濃度はかなり低かった。経口投与されたこの塩形態の絶対的生物学的利用能は、IV CPX-POMとの比較において4.6%であった。CPX-POMはこの試験で採取されたいかなる血液試料にも尿試料にも検出されなかった。図13Bは、処置群あたり6匹のラットへの20 mg/kg IV CPX-POM、30 mg/kg皮下(SQ) CPX-POM、及び30 mg/kg CPX-Oの投与後の、平均血漿中シクロピロクス(CPX)濃度-時間の直線的プロファイルを示す。

【表7】

10

表6A: IV CPX-POM、SQ CPX-POM、及び経口CPX-Oの単回投与後の雄スプラグドーリーラットにおける血漿中CPX薬物動態パラメータ

処置 ^a	CPX-POM IV	CPX-POM SQ	CPX-O 経口
平均体重 (kg)	0.314 $\pm$ 0.012	0.315 $\pm$ 0.007	0.314 $\pm$ 0.013
CPX用量 (mg/kg) ^b	19.98 $\pm$ 0.10	30.02 $\pm$ 0.06	30.17 $\pm$ 0.16
C ₀ (ng/mL)	33,568 $\pm$ 13,124 ^c		
C _{max} (ng/mL)		5,005 $\pm$ 808	373 $\pm$ 158
T _{max} (hr)		0.264 $\pm$ 0.122	0.250 $\pm$ 0.129
K _{e1} (hr ⁻¹)	1.529 $\pm$ 0.680	1.039 $\pm$ 0.253	1.234 $\pm$ 0.742
T _{1/2} (hr)	0.537 $\pm$ 0.238	0.700 $\pm$ 0.163	0.801 $\pm$ 0.558
AUC ₀ $\int^{\infty}$ (ng*hr/mL)	5,449 $\pm$ 756	6,548 $\pm$ 1007	211.2 $\pm$ 84.5
AUC ₀ $\int^{\infty}$ (ng*hr/mL)	5,496 $\pm$ 756	6,633 $\pm$ 1,019	378.0 $\pm$ 140.4
AUMC ₀ $\int^{\infty}$ (ng*hr ² /mL)	1,534 $\pm$ 457		
AUMC ₀ $\int^{\infty}$ (ng*hr ² /mL)	1,687 $\pm$ 478		
MRT (hr)	0.285 $\pm$ 0.092		
Cl (mL/hr/kg)	3,695 $\pm$ 531		
Vd _z (mL/kg)	2,874 $\pm$ 1451		
V _{ss} (mL/kg)	1,167 $\pm$ 467		
F (%)		80.3	4.56

^a 処置あたりN=6のラット

^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POM二ナトリウム注射用製剤は50 mM Captisol (登録商標)を含む25 mMリン酸塩(pH7)中5 mg/mLのCPXを含有した

^c C₀はノンパラメトリックな薬物動態データ解析から得られたy切片値と一致する

20

30

20 mg/kg IV CPX-POM、30 mg/kg SQ CPX-POM、及び30 mg/kg 経口CPX-Oの後のラットにおいて得られた尿中CPX薬物動態パラメータを以下の表7Aにまとめる。IV及びSQ CPX-POM投与は、経口投与されたCPX-Oと比較して、より高い尿中シクロピロクス濃度をもたらした。IV及びSQ CPX-POM投与はこれらの動物において耐容性良好であり、インビトロIC50値を数倍超過した尿中シクロピロクス濃度をもたらした。SQ CPX-POMはシクロピロクスの顕著な全身及び尿路暴露をもたらした。

40

【表 8】

表 7 A : I V CPX-POM、SQ CPX-POM、及び経口 CPX-O の単回投与後の雄スプラグドーリーラットにおける尿中 CPX[°] 及び CPX-G[°] 薬物動態パラメータ

処置 ^a	CPX-POM IV	POX-POM SQ	CPX-O 経口
平均体重 (kg)	0.276 ± 0.008	0.293 ± 0.007	0.289 ± 0.010
CPX用量 (mg/kg) ^b	20.02 ± 0.07	29.97 ± 0.08	30.44 ± 0.18
U _{CPX} (ng/mL) 0~24hr	20,623 ± 11,948	5,931 ± 5689	1,711 ± 1,427
U _{CPX} (μM) 0~24hr	99.63 ± 57.72	28.65 ± 27.48	8.28 ± 6.89
Xe _{CPX} (mcg) 0~24hr	190.5 ± 103.0	85.44 ± 65.89	22.30 ± 16.65
Fe _{CPX} (%)	3.46 ± 1.90	0.98 ± 0.76	0.25 ± 0.18
Xe/dt _{CPX} (μg/hr) 0~8hr	18.36 ± 11.6	6.22 ± 6.50	0.63 ± 0.16
Xe/dt _{CPX} (μg/hr) 8~24hr	2.76 ± 1.79	2.22 ± 2.76	1.08 ± 1.11
Cl _r (mL/hr)	34.6		
Cl _r (mL/hr/kg)	126		
Fe _{CPX-G} (%)	9.37 ± 9.08	13.73 ± 8.83	9.13 ± 4.28

^a 完全な、非無作為的な、クロスオーバー様式で3つ全ての処置を受けたN=4のラット

^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POMニナトリウム注射用製剤は50 mM Captisol (登録商標)を含む25 mMリン酸塩 (pH7) 中5 mg/mLのCPXを含有した

^c シクロピロクス (CPX) ; シクロピロクスグルクロニド (CPX-G)

【0100】

イヌにおけるシクロピロクス-POMプロドラッグ薬物動態

試験10953: イヌにおけるシクロピロクス-POMプロドラッグの静脈内投与後のシクロピロクスの生物学的利用能

ラットにおいて、10 mg/kgのシクロピロクスオラミン (CPX-O) 及びシクロピロクス-POMプロドラッグ (CPX-POM) のIV投与後に、シクロピロクス (CPX) の血漿中及び尿中薬物動態を特徴付けした。この種におけるIVシクロピロクス-POMプロドラッグの後のシクロピロクスの生物学的利用能の特徴付けにおいて、静脈内シクロピロクスオラミンを基準として用いた。CPX-O及びCPX-POMの投与後のマウスにおいて認められたCPXの低い経口生物学的利用能を鑑みて、この試験ではこの投与経路を検討しなかった。

【0101】

図14は、4匹の雄ビーグル犬への3 mg/kg IV CPX-POM及びCPX-Oの投与後の、平均血漿中CPX濃度-時間プロファイルを示す。

【0102】

CPX-POMのIV投与の後、CPXの全身アベイラビリティは85%であった。血漿中CPX-POM濃度がIVボラス投与後の数分以内に採取されたほんの少数の血液試料において検出されたが、プロドラッグはアッセイされた大部分の血漿試料中に検出されなかった。CPX-POMはいかなる尿試料中にも検出されなかった。IV CPX-POMの後の活性薬剤シクロピロクスの絶対的生物学的利用能は良好であり、IV CPX-Oを基準として85%の値を有していた。プロドラッグの3 mg/kg IV投与は、14 μMに相当する、2,907 ng/mLの平均初期血漿中シクロピロクス濃度を達成した。筋層非浸潤性膀胱癌細胞株及び筋層浸潤性膀胱癌細胞株における2 μM (414 ng/mL) のインビトロIC50値を所与として、実測平均Cmax値はIC50よりもおよそ7倍高い。図14は、4匹の雄ビーグル犬への3 mg/kg IV CPX-POM及びCPX-Oの投与後の、平均血漿中シクロピロクス (CPX) 濃度-時間の直線的プ

ロファイルを示す。

【表 9】

表 8 A : CPX-POM及びCPX-Oの単回 I V 投与後の雄ビーグル犬における血漿中 CPX 薬物動態パラメータ

処置	CPX-POM	CPX-O
平均体重 (kg) ^a	9.65 ± 0.38	9.64 ± 0.34
IV CPX用量 (mg/kg) ^b	2.82 ± 0.01	3.10 ± 0.02
C ₀ (ng/mL) ^c	2,970 ± 969	5,996 ± 1,387
K _{e1} (hr ⁻¹)	0.242 ± 0.030	0.185 ± 0.019
T _{1/2} (hr)	2.90 ± 0.329	3.77 ± 0.40
AUC _{0-∞} (ng*hr/mL)	2,571 ± 436	3,314 ± 655
AUC _{0-∞} (ng*hr/mL)	3,075 ± 591	4,008 ± 802
AUMC _{0-∞} (ng*hr ² /mL)	5,485 ± 1,293	7,293 ± 1,520
AUMC _{0-∞} (ng*hr ² /mL)	11,680 ± 3,682	16,665 ± 3,972
MRT (hr)	3.74 ± 0.58	2.20 ± 0.09
Cl (mL/hr/kg)	1,006 ± 209	777.2 ± 192.5
Vd _z (mL/kg)	4,133 ± 363	4,253 ± 1,266
V _{ss} (mL/kg)	3,686 ± 431	3,218 ± 810
F (%)	85.1 ± 9.69	

^a 完全なクロスオーバー法における両方の処置を受けたN=4のイヌ、動物をそれぞれの処置前に重量測定して投与用の用量体積を決定したため、それぞれの処置において体重にわずかな差異がある

^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POM二ナトリウム注射用製剤は50 mM Captisol (登録商標)を含む25mMリン酸塩 (pH7) 中5mg/mLのCPXを含有した

^c C₀はノンパラメトリックな薬物動態データ解析から得られたy切片値と一致する

【0103】

3mg/kg IV CPX-O及びCPX-POMの後のイヌにおいて得られた尿中CPX薬物動態パラメータを以下の表9Aにまとめる。CPX-POM及びCPX-Oの単回IV投与後、用量の1%未満がCPXとして排泄される。しかし、尿中CPX濃度は、CPX-POM及びCPX-Oの両方の3mg/kg IV投与において、2µMのインビトロIC50値を超過した。不活性なシクロピロクスグルクロニド代謝産物が、尿に排出される主要物質種の代表であった。

10

20

30

【表 10】

表 9 A : CPX-POM及びCPX-Oの単回 I V 投与後の雄ビーグル犬における尿中 CPX 薬物動態パラメータ

処置	CPX-POM	CPX-O
平均体重 (kg) ^a	9.65 ± 0.38	9.64 ± 0.34
CPX用量 (mg/kg) ^b	2.82 ± 0.01	3.10 ± 0.02
U _{CPX} 0~8hr (ng/mL)	838 ± 149	1,006 ± 370
U _{CPX} 8~24hr (ng/mL)	112.0 ± 56.1	72.5 ± 54.5
U _{CPX} 0~8hr (μM)	4.04 ± 0.72	4.86 ± 1.79
U _{CPX} 8~24hr (μM)	0.541 ± 0.271	0.350 ± 0.263
dXe/dt _{CPX} 0~8hr (μg/hr)	9.88 ± 0.3.89	12.58 ± 5.61
dXe/dt _{CPX} 8~24hr (μg/hr)	0.97 ± 0.19	0.43 ± 0.42
Xe _{CPX} (μg)	94.5 ± 32.6	107.5 ± 39.9
Fe _{CPX} (%)	0.345 ± 0.111	0.358 ± 0.123
Clr (mL/hr)	31.90 ± 18.25	26.43 ± 9.63
Clr (mL/hr/kg)	3.284 ± 1.810	2.730 ± 0.916
Fe _{CPX-G} (%)	51.11 ± 5.31	62.67 ± 12.15

^a 完全なクロスオーバー法における両方の処置を受けたN=4のイヌ、動物をそれぞれの処置前に重量測定して投与用の用量体積を決定したため、それぞれの処置において体重にわずかな差異がある

^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POM二ナトリウム注射用製剤は50 mM Captisol (登録商標)を含む25mMリン酸塩 (pH7) 中5mg/mLのCPXを含有した

【0104】

試験11429: イヌにおけるシクロピロクス-POMプロドラッグの皮下投与後及び経口シクロピロクスオラミンの後のシクロピロクスの生物学的利用能

イヌにおいて、3mg/kgのシクロピロクス-POMプロドラッグ (CPX-POM) の I V 投与後、9mg/kgのCPX-POMの皮下 (SQ) 投与後、及び9mg/kgのシクロピロクスオラミン (CPX-O) の経口投与後に、シクロピロクス (CPX) の血漿中及び尿中薬物動態を特徴付けした。この種におけるSQシクロピロクス-POMプロドラッグの後のシクロピロクスの生物学的利用能の特徴付けにおいて、静脈内CPX-POMを基準として用いた。注射用CPX-POMと、オラミン局所的抗真菌性生成物の裏付けとして行われた登録研究を通じてHoechst AGにより作成された前臨床安全性データとの間の薬物動態学的な「橋渡し」を確立するために、オラミン塩の投与後のCPXの経口生物学的利用能を決定した。

【0105】

イヌへの I V 及び SQ CPX-POM及び経口投与されたシクロピロクスオラミンの投与後に得られた平均血漿シクロピロクス濃度-時間プロファイルを、図15に示す。10953試験と一致して、血漿中シクロピロクス濃度はCPX-POMの I V 投与後に速やかに下降し、見掛けの排出半減期は1時間未満であった。SQ CPX-POMから得られた血漿中シクロピロクス濃度-時間プロファイルは I V CPX-POMと大きく異なっていた。シクロピロ (ciclopiro) のオラミン塩の経口投与後の血漿中シクロピロクス濃度は、比較上かなり低かった。得られた血漿中シクロピロクス薬物動態パラメータを表10Aにまとめる。

【0106】

SQ CPX-POMは、106%において、 I V CPX-POMと比較して優れた

生物学的利用能を示した。IV及びSQ投与されたCPX-POMは、2 μ MのインビトロIC50値を数倍超過した血漿中シクロピロクス濃度をもたらした。オラミン塩の経口投与後のシクロピロクスの血漿中シクロピロクス濃度はかなり低かった。経口投与されたこの塩形態の絶対的生物学利用能は、IV CPX-POMとの比較において17.4%であった。CPX-POMはこの試験で採取されたいかなる血液試料にも尿試料にも検出されなかった。図15は、4匹の雄ビーグル犬への3 mg/kg IV CPX-POM、9 mg/kg SQ CPX-POM、及び9 mg/kg 経口CPX-Oの投与後の、平均血漿中シクロピロクス (CPX) 濃度-時間の直線的プロファイルを示す。

【表11】

10

表10A: IV CPX-POM、SQ CPX-POM、及び経口CPX-Oの単回投与後の雄ビーグルにおける血漿中CPX薬物動態パラメータ

処置 ^a	CPX-POM IV	CPX-POM SQ	CPX-O 経口
平均体重 (kg)	9.58 $\pm$ 0.49	9.91 $\pm$ 0.81	9.48 $\pm$ 0.64
CPX用量 (mg/kg) ^b	3.10 $\pm$ 0.02	9.28 $\pm$ 0.09	9.39 $\pm$ 0.04
C ₀ (ng/mL)	3,770 $\pm$ 1280 ^c		
C _{max} (ng/mL)		1,988 $\pm$ 374	1,017 $\pm$ 271
T _{max} (hr)		0.264 $\pm$ 0.122	0.250 $\pm$ 0.129
K _{e1} (hr ⁻¹)	0.153 $\pm$ 0.072	0.137 $\pm$ 0.031	0.126 $\pm$ 0.009
T _{1/2} (hr)	5.54 $\pm$ 2.92	5.27 $\pm$ 1.18	5.52 $\pm$ 0.39
AUC ₀ $\int^{\infty}$ (ng*hr/mL)	3,622 $\pm$ 255	11,518 $\pm$ 2,632	1,901 $\pm$ 650
AUC ₀ $\int^{\infty}$ (ng*hr/mL)	5,262 $\pm$ 1243	19,614 $\pm$ 6161	2,697 $\pm$ 1013
AUMC ₀ $\int^{\infty}$ (ng*hr ² /mL)	8,836 $\pm$ 1,186		
AUMC ₀ $\int^{\infty}$ (ng*hr ² /mL)	38,965 $\pm$ 29,492		
MRT (hr)	6.76 $\pm$ 3.76		
Cl (mL/hr/kg)	615 $\pm$ 145		
Vd _z (mL/kg)	4,486 $\pm$ 1366		
V _{ss} (mL/kg)	3,776 $\pm$ 1,266		
F (%)		106 $\pm$ 22.3 ^d	17.4 $\pm$ 5.65 ^d

20

^a 非無作為化完全クロスオーバー様式で3つすべての処置を受けたN=4のイヌ

^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POM二ナトリウム注射用製剤は50 mM Captisol (登録商標)を含む25 mMリン酸塩 (pH7) 中5 mg/mLのCPXを含有した

^c C₀はノンパラメトリックな薬物動態データ解析から得られたy切片値と一致する

^d AUC₀ $\int^{\infty}$ の28%、39%、及び29%が外挿AUCを含むと仮定した、AUC₀ $\int^{\infty}$

ⁿを用いて決定された絶対生物学利用能

30

【0107】

3 mg/kg IV CPX-POM、9 mg/kg SQ CPX-POM、及び9 mg/kg 経口CPX-Oの後のイヌにおいて得られた尿中CPX薬物動態パラメータを以下の表11Aにまとめる。IV及びSQ CPX-POM投与は、経口投与されたCPX-Oと比較して、比較的より高い尿中シクロピロクス濃度をもたらした (用量調節)。IV及びSQ CPX-POM投与はこれらの動物において耐容性良好であり、インビトロIC50値を数倍超過した尿中シクロピロクス濃度をもたらした。SQ CPX-POMはシクロピロクスの顕著な全身及び尿路暴露をもたらした。

40

【表 1 2】

表 1 1 A : I V CPX-POM、SQ CPX-POM、及び経口CPX-Oの単回投与後の雄ビーグル犬における尿中CPX^d 及びCPX-G^d 薬物動態パラメータ

処置 ^a	CPX-POM IV	CPX-POM SQ ^c	CPX-O 経口
平均体重 (kg)	9.58 ± 0.49	9.91 ± 0.81	9.48 ± 0.64
CPX用量 (mg/kg) ^b	3.10 ± 0.02	9.28 ± 0.09	9.39 ± 0.04
U _{CPX} (ng/mL) 0~24hr	957 ± 508	2,530 ± 958	1,602 ± 750
U _{CPX} (μM) 0~24hr	4.62 ± 2.45	12.2 ± 4.6	7.74 ± 3.62
Xe _{CPX} (μg) 0~24hr	208 ± 117	339 ± 206	299 ± 208
Fe _{CPX} (%)	0.70 ± 0.38	0.38 ± 0.24	0.32 ± 0.21
Xe/dt _{CPX} (μg/hr) 0~8hr	19.8 ± 15.2	23.0 ± 16.6	31.6 ± 26.2
Xe/dt _{CPX} (μg/hr) 8~24hr	3.10 ± 3.33	9.67 ± 9.49	2.90 ± 1.70
Cl _r (mL/hr)	43.2 ± 33.6		
Cl _r (mL/hr/kg)	4.51 ± 3.51		
Fe _{CPX-G} (%)	49.2 ± 34.4	43.0 ± 19.7	37.0 ± 18.7

^a 非無作為化完全クロスオーバー様式で3つすべての処置を受けたN=4のイヌ^b 投与されたシクロピロクス遊離酸の用量、CPX-POM二ナトリウム注射用製剤は50 mM Captisol (登録商標)を含む25mMリン酸塩 (pH7) 中5mg/mLのCPXを含有した^c N=3^d シクロピロクス (CPX) ; シクロピロクスグルクロニド (CPX-G)

【0108】

膀胱癌患者の尿におけるシクロピロクスグルクロニドのインビトロ安定性

シクロピロクスグルクロニド (CPX-G) は、CPX-POM及びシクロピロクス (cicloporix) のオラミン塩の投与後のマウス、ラット、イヌ及びヒトにおいて観察される主な尿中代謝産物である。CPX-Gは抗膀胱癌剤としての活性は無い。CPX-Gはβ-グルクロニダーゼにより代謝されて活性シクロピロクスを形成し、実際には、活性抗膀胱癌剤を再活性化する。ヒト排泄データ [Kellner et al, Arzneimittel-Forschung. 31 (8A): 1337-1353]、及び、膀胱癌患者が尿中に増加したグルクロニダーゼ活性を有するという証拠 [Paigen, K., Peterson, J., Paigen B. (1984) Role of urinary β-glucuronidase activity in human bladder cancer. Cancer Res 44: 3620-3623] に基づき、健常人から採取された対照尿と比較して、膀胱癌患者から得られた尿 (150 μMの濃度) 中のシクロピロクスグルクロニドの安定性を特徴付けるためのインビトロ代謝試験を行った。

【0109】

6人のNMIBC患者から得られたプールされた患者尿中でのCPX-Gの6時間のインキュベーションに亘って、膀胱癌患者尿中での150 μM CPX-Gの加水分解によって、7.9 μMシクロピロクスの形成 (5%の形成率) が生じた。シクロピロクス形成の程度は、健常人から得られた検体を用いた尿中インキュベーションと比較して、膀胱癌患者尿においておよそ11.6倍高かった。シクロピロクスグルクロニドのβ-グルクロニダーゼ介在性加水分解の割合は、対照尿と比較して、プールされた膀胱癌患者尿において5.6~11.5倍の範囲でより高かった。尿中β-グルクロニダーゼ活性は、それぞれNMIBC患者及び健常人から得られた尿において、69.5 U/mL及び1.39 U/mLであった (膀胱癌患者尿中での118倍より高い酵素活性)。膀胱癌患者尿中での

C P X－Gの選択的加水分解は、活性抗癌剤シクロピロクスの再活性化をもたらす。

【0110】

シクロピロクス－P O MプロドラッグのI V投与後のシクロピロクスのヒト尿中濃度の予測

ヒトに経口投与されたシクロピロクスオラミン（C P X－O）は、迅速且つ完全に尿に排泄され、用量の87%が6時間以内に排泄され、用量のおよそ95%が薬剤投与の12時間以内に排泄される[Kellner et al, Arzneimitte l－Forschung, 31（8A）：1337－1353]。尿において回収される用量の95%のうち、83%はシクロピロクス（4%）及びシクロピロクスグルクロニド（79%）と同定された。C P Xグルクロニドはインビトロにおいて活性を有さない。

10

【0111】

尿中シクロピロクス（C P X）濃度－時間データを以下の前提に基づいてシミュレートした： 32 mg/m^2 シクロピロクス－P O Mプロドラッグ（C P X－P O M）の静脈内投与は耐容性良好である（なお、 80 mg/m^2 の経口C P X－Oは一日一回投与された場合に耐容性良好であった）； 10 mg C^{14} C P X－Oの単回経口投与量の投与後の尿に排泄されたC P Xのパーセントと同様に、 32 mg/m^2 C P X－P O Mの静脈内投与の4%がシクロピロクスとして排泄される；膀胱癌患者の尿においてC P X－Gの5%がC P Xに加水分解される；及び、新たに診断された膀胱癌患者に典型的な尿生産速度は 1 mL/hr/kg である。図18は、患者（patient）尿及び対照尿におけるプロドラッグからのシクロピロクスの形成を示している。また図19～20も参照されたい。

20

【0112】

シクロピロクス－P O Mプロドラッグの全身投与はC P Xを尿路全体に選択的に送達するこれらの前提に基づいて、シクロピロクス－P O Mプロドラッグ（C P X－P O M）のI V及びS Q投与が、筋層非浸潤性膀胱癌細胞株においてインビトロI C 50値を数倍超過する尿中C P X濃度をもたらすことが予測される。

【0113】

C P X－P O Mの注射用投与経路は、胃腸毒性及び乏しい経口生物学的利用能を回避するために、経口投与よりも好ましい。一日4回投与の経口シクロピロクスオラミン（C P X－O）によって用量制限胃腸毒性が引き起こされることが分かっている（Mind en et al, Am J Hematol 89（4）：363－368, 2014）。

30

【0114】

N M I B C及びM I B Cの治療における有効な新規治療薬としてのシクロピロクスの役割を理解するために、インビトロ試験を行った。十分に特徴付けされたヒトN M I B C細胞株及びM I B C細胞株として、それぞれ253 J B V及びT 24を研究した。細胞培地はC P X－P O Mをシクロピロクス（C P X）に代謝するために必要な酵素（ホスファターゼ）を欠いているため、C P X－Oを細胞培地に添加して膀胱癌細胞株をC P Xに暴露することにより、作用機序研究を行った。

【0115】

40

T 24（M I B C）細胞及び253－J B V（N M I B C）細胞における膀胱癌細胞増殖に対するC P Xの影響を決定するために、ウェルあたり5,000個の細胞を96ウェルプレート上に播種し、一晚増殖させた。次に細胞を、10% F B S含有R P M I培地中の漸増用量のC P Xで処理した。処理期間後の細胞増殖の分析は、ヘキソサミニダーゼアッセイによって評価された。簡潔に説明すると、培地を除去し、クエン酸緩衝液（p H 5）（7.5 mM）中のヘキソサミニダーゼ基質溶液、p－ニトロフェノール－N－アセチル－ β －D－グルコサミニダーゼ（シグマ・アルドリッチ社）を $75\text{ }\mu\text{L}$ /ウェルで添加した。プレートを100%湿度中37℃で30分間インキュベートした。5 mMのE D T Aを含有する112.5 μL の50 mMグリシン（p H 10.4）で反応を止めた。吸光度を405 nmで測定した。実験はn = 6で行い、その後少なくとも3回繰り返した。デ

50

ータを対照のパーセントとして解析し、ここで、対照ウェルは等量のDMSO単独で処理した。 IC_{50} 算出において、薬剤濃度及びヘキソサミニダーゼ活性間のプロットを作成し、そのデータを直線的又は指数関数的に当てはめた。最良当てはめをさらなるデータ処理に使用した。処理の48時間後に50%の細胞死をもたらす化合物濃度を決定することにより、 IC_{50} を得た。

【0116】

シクロピロクスはNMIBC及びMIBCにおいて抗癌活性を示す：

シクロピロクス(CPX)は膀胱癌細胞増殖を阻害することが分かった。図9、10、及び11は、CPXが膀胱癌細胞株の増殖を阻害することを示している。細胞は、表示用量の化合物と一緒に72時間までインキュベートされた。CPX処理は、T24細胞及び253JBV細胞の両方において、細胞増殖の有意な用量及び時間依存的減少をもたらした。図9及び図11に示される、この実験から得られた結果は、CPXが用量及び時間依存的に両細胞株の増殖を有意に抑制したことを示している。この効果は24時間以内に観察され、その後48時間に亘って残り続けた。化合物の IC_{50} 値は、253JBV細胞及びT24細胞それぞれについて、48時間において2 μ M及び4 μ Mであると決定された。

【0117】

シクロピロクスは2次元及び3次元モデル系において膀胱癌の成長を阻害する：

次に、細胞増殖性アッセイを用いて膀胱癌細胞に対するシクロピロクス(CPX)の長期的効果を決定した。このアッセイでは、6ウェルプレートに500個の生細胞を播種し、一晚増殖させた。次に、細胞を種々の濃度(1及び5 μ M)のCPXの存在下又は非存在下で48時間インキュベートした。次に、CPXを含有する培地を除去し、細胞をPBS中で洗浄し、完全培地中でさらに10日間インキュベートした。各処理は3連で行った。得られたコロニーをPBSで洗浄し、10%ホルマリン中で室温で10分間固定し、次いでPBSで洗浄した後、クリスタルバイオレットで染色した。コロニーを未処理細胞と比較した。

【0118】

図19～20に示されるように、CPXは対照と比較してコロニーの数及びサイズを抑制したが、このことは、前記化合物との細胞の短期間のインキュベーションが、細胞の生存率に対して長期間の阻害効果を有していたことを示唆している。図19～20はCPXが膀胱癌細胞の成長を阻害することを示している。T24及び253JBV膀胱癌細胞を播種し、 IC_{50} 濃度のCPX(表示用量)で48時間処理した。新鮮な培地に交換し、10日間増殖させた。コロニーをクリスタルバイオレットで染色し、未処理細胞と比較した。

【0119】

シクロピロクスは膀胱癌スフェロイドを抑制する：

最近の研究において腫瘍内の不均一性が示され、ごく一部の幹細胞が自己複製能を伴って腫瘍内に生じ、分化した子孫を生み出す能力を有することが示された。3Dアッセイと称されることもあるスフェロイドアッセイは、インビトロで上皮幹細胞を増殖させる方法として開発されたものであり、現在では、幹細胞活性の標準的な代替レポーターとなっている。前記アッセイ(この場合、ブラドスフェアアッセイ(bladdosphere assay)と称される)は、他の細胞がアノイキスによって死ぬ一方、膀胱癌内に存在するユニークな未分化細胞は浮遊培養において生存するという仮定に基づいている。したがって、ブラドスフェアアッセイにおいてシクロピロクス(CPX)の作用を特徴付けた。ここでは、癌細胞が超低結合性プレート内に播種され、得られたスフェロイドが、幹細胞からの成長を表すと考えられる。

【0120】

スフェロイドの形成において、細胞を、20 ng/mL bFGF(インビトロジェン社)、500 mL当たり10 mLの50X B27 supplement(インビトロジェン社)、EGF 20 ng/mL(インビトロジェン社)及び抗生物質及び抗真菌剤

溶液を添加したRPMI 1640（メディアテック社（Mediatech））中で培養した。細胞を6ウェル低接着プレート内に低密度（5000細胞/mL）で播種した。細胞を漸増濃度のCPX（細胞増殖アッセイから算出されたIC₅₀（253JBVは2 μM、T24は4 μM）の0.5倍、1倍、及び2倍）で処理した。7日後、スフェロイドを撮影した（I世代）。二次スフェロイド成長（II世代）、続く三次スフェロイド発生（III世代）のために、対照スフェロイド及びCPX（1×IC₅₀）で処理したスフェロイドを収集、トリプシン処理、及び再播種した。

【0121】

図21はCPXが膀胱癌スフェロイドを抑制することを示している。細胞を超低接着プレート内に播種し、CPXで処理し、表示用量の化合物と共にインキュベートした。CPX処理は、T24及び253JBV膀胱癌細胞の両方によって形成されるスフェロイド（I世代）のサイズ及び数の有意な減少をもたらした。CPX処理は二次及び三次スフェロイドの成長も有意に減少させた。図21に示される、この実験から得られた結果は、細胞がCPXで処理された場合に、T24及び253JBV膀胱癌細胞スフェロイドのスフェロイドサイズ及び数に、有意な減少があったことを示している。二次及び三次スフェロイドの発生はCPX処理によって有意に阻害された。これらのデータは、前記化合物が膀胱癌内の癌幹細胞に影響を与えることを示唆している。図10も参照されたい。

【0122】

シクロピロクスは細胞周期のS期で細胞を停止させる：

T24細胞における細胞周期進行に対するシクロピロクス（CPX）の影響を決定するために、フローサイトメトリーに基づく細胞周期分析試験を行った（データ未記載）。試験により、CPXがS期細胞周期停止を誘導することが示された（データ未記載）。1×IC₅₀及び2×IC₅₀の濃度において、CPXは細胞をG₀/G₁期に停止させる。細胞をCPXで処理し、フローサイトメーターに基づく分析を行った。CPX処理はS期及びG₀/G₁期で停止される細胞の割合を有意に増加させた。

【0123】

CPXによってアポトーシスが誘導されることが確定された。次に、前記化合物がアポトーシス経路を介して細胞死を誘導し得るかどうかを決定した。このために、T24膀胱癌細胞をCPX（4 μM）で処理し、細胞をFITC結合型アネキシンVで標識して、アポトーシス細胞を検出した。結果を図22に示すが、これは、CPX処理がCPX誘導性細胞死を意味する高レベルのFITC+細胞を有していたことを示している。図22は、CPXが膀胱癌細胞株において細胞死を誘導することを示している。細胞は、表示用量の化合物と一緒に48時間までインキュベートされた。CPX処理は、アネキシンV-FITC標識細胞の増加から明らかであるように、T24細胞における細胞死の有意な増加をもたらした。

【0124】

シクロピロクスは癌幹細胞シグナル経路に影響を与える：

シクロピロクス（CPX）によって影響を受ける経路を特定するための予備的研究としてRT-PCRアレイ解析を行った。RT² Profiler（商標）PCR Arrays（SAバイオサイエンス社（SA Biosciences）、米国メリーランド州フレデリック）を製造業者の取扱説明書にしたがって用いて、発現解析を行った。Human signal transduction pathway finder polymerase chain reaction（PCR）array（カタログ番号PAHS-014ZA）を使用した。簡潔に説明すると、TRIzol試薬を用いてT24細胞から単離した全RNAを、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー（全てインビトロジェン社製、カリフォルニア州カールズバッド）の存在下において、Superscript II逆転写酵素で逆転写した。相補DNA（2 μg）を1,275 μLのRT² SYBR Green qPCR Master Mix（PA-010；SAバイオサイエンス社）と混合して、2,550 μLの総体積にした。各ウェルに25 μLのこの混合物（mix）を加えた。SAバイオサイエンス社が推奨する検出プロトコルにしたがってバイオ

ラド社製CFX装置上でqPCRを行った。mRNA発現における変化は対照に対する倍率変化として表した。

【0125】

図23A～23CはCPXがCSCシグナル経路を阻害することを示している。CPX処理はNotch及びその下流シグナル伝達タンパク質のmRNA発現を有意に減少させた。さらに、CPXはT24細胞におけるWntシグナル経路及びHedgehogシグナル経路に關与する遺伝子の発現を阻害した。図23A～23Cに示すように、CPX処理はNotch、Wnt及びHedgehog等のCSCシグナル経路に關与する遺伝子の発現(mRNAレベル)を有意に減少させた。

【0126】

シクロピロクスはNotchシグナル経路に影響を与える：

シクロピロクス(CPX)によって影響を受ける経路を特定するためのRT-PCRアレイ解析を行った。予備的研究によって、CPX処理がNotchシグナル経路に影響を与えることが特定された。リガンドが隣接細胞上のnotch膜貫通受容体と相互作用した際に、Notchシグナル伝達は惹起される。これにより、 γ -セクレターゼ介在性タンパク質分解によるNotch細胞内ドメイン(NICD)の放出が開始され、これが次に、細胞の核内に移行し、その転写補助因子CBF1/RBPJと相互作用し、標的遺伝子をトランス活性化して、増殖及び転移の増加をもたらす。Notchシグナル伝達は癌幹細胞の自己複製において決定的な役割を果たすことが示されており、以前の研究によって、notch経路阻害が幹細胞に基づく治療のための優れた機構になり得ると示唆された。

【0127】

以前の研究によって、高レベルのNotch1活性が膀胱癌の腫瘍進行と関連していること、及び、Notch1が膀胱癌治療のための有望な治療標的であり得ることが示された。ウエスタンブロット研究を行って、Notchシグナル経路に關与するタンパク質の発現に対するCPXの影響を検出した。細胞可溶化物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、Immobilonポリフッ化ビニリデン膜(ミリポア社、米国マサチューセッツ州ベッドフォード)上にプロットングした。抗体をセル・シグナリング・テクノロジー社(Cell Signaling Technology)(米国マサチューセッツ州ベバリー)、アブカム社(Abcam Inc.)(米国マサチューセッツ州ケンブリッジ)及びサンタクルーズバイオテクノロジー社(Santa Cruz Biotechnology Inc.)(米国カリフォルニア州サンタクルーズ)から購入し、特異的タンパク質を増強化学発光システム(GEヘルスケア社、米国ニュージャージー州ピスカタウェイ)によって検出した。膀胱癌細胞株におけるCPX処理は、プレセニン1、ニカストリン、APH-1及びPEN-2等の γ -セクレターゼ複合体タンパク質の発現を有意に阻害し、それにより、切断活性化型Notch細胞内ドメイン(NICD1)の減少をもたらした。CPXはNotch受容体のリガンドであるJagged1も減少させた。さらに、Hes1及びサイクリンD1を含む前記経路の下流標的のレベルもCPX処理後に有意に阻害された。これらのデータは、CPXがNotch細胞内シグナル伝達経路のタンパク質を有意に阻害し、それによりCSC成長を阻害することを示唆している。図16～17を参照されたい。

【0128】

図16～17は、CPXがNotch1シグナル伝達及び γ -セクレターゼ複合体タンパク質を阻害することを示している。CPX処理はNotch1活性化及びそのリガンドJagged1を有意に減少させた。また、CPX処理は、下流標的タンパク質であるHes-1及びサイクリンD1を減少させた。さらに、CPXは、T24細胞における、 γ -セクレターゼ複合体タンパク質であるプレセニン1、ニカストリン、APH-1及びPEN-2の発現を阻害した。右側にNotchシグナル経路が示される。

【0129】

シクロピロクスは γ -セクレターゼ複体の不活性化を介して細胞の成長を阻害する：NICDの異所性発現が細胞増殖のシクロピロクス(CPX)介在性阻害を逆行させる

かどうかを決定した。この研究のために、T24細胞にNotch-1細胞内ドメイン (NICD) をコードするプラスミドEF. hICN1. CMV. GFP又は空ベクターEF. v-CMV. GFP (アドジェン社 (Addgene Inc.)) を形質移入し、その後CPX (4 μ M) で処理した。ヘキソサミニダーゼ (hexoaminidase) アッセイを用いて細胞増殖を検出した。ウエスタンブロット解析によって、T24細胞株におけるNICDの異所性発現後のNotch-1の発現増加が示された。NICDの異所性発現は細胞増殖のCPX介在性阻害を逆行させた。これらのデータは、CPXが γ -セクレターゼ複合体を阻害することによりNotchシグナル伝達に影響を与えることを示唆している。

【0130】

Notch-1発現は腫瘍進行に関連しており、浸潤性膀胱移行細胞癌の発癌及び進行に関与している (J Clin Oncol 30, 2012 (suppl 5; abstr 299))。Notch-1は膀胱癌の治療のための治療標的であると示されている (Oncogene (2008) 27, 5132-5137)。Notch-1シグナル伝達はまた、NMIBCからMIBCへの進行の有望な診断マーカーであり得る (J Clin Oncol 30, 2012 (suppl 5; abstr 299))。我々の研究室で作成されたデータは、CPXが、Notch-1シグナル経路を抑制することにより、インビトロにおいて膀胱癌の成長を阻害することを示唆している。

【0131】

図24は、CPXが γ -セクレターゼ複合体タンパク質の不活性化を通じて細胞の成長を阻害することを示している。NICDを発現する細胞をCPXで処理した後、増殖を測定した。NICDの異所性発現は細胞増殖のCPX介在性阻害を低減した。

【0132】

シクロピロクス-POMプロドラッグ (CPX-POM) 又はシクロピロクスグルクロニド (CPX-G) はインビトロにおいて非常に低い抗癌活性を示す：

【0133】

増殖アッセイを行って、インビトロにおいて、CPX、CPX-POM及びCPX-グルクロニドの影響を決定し、CPXとCPX-POM及びCPX-グルクロニドとで比較した。T24 (MIBC) 細胞及び253-JBV (NMIBC) 細胞における膀胱癌細胞増殖に対するCPX、CPX-POM及びCPX-グルクロニドの影響を決定するために、ウェルあたり5,000個の細胞を96ウェルプレート上に播種し、一晚増殖させた。次に細胞を、10% FBS含有RPMI培地中の漸増用量のCPX、CPX-POM及びCPX-グルクロニドで処理した。処理期間後の細胞増殖の分析は、ヘキソサミニダーゼアッセイによって評価された。簡潔に説明すると、培地を除去し、クエン酸緩衝液 (pH 5) (7.5 mM) 中のヘキソサミニダーゼ基質溶液、p-ニトロフェノール-N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ (シグマ・アルドリッチ社) を75 μ L/ウェルで添加した。プレートを100%湿度中37°Cで30分間インキュベートした。5 mMのEDTAを含有する112.5 μ Lの50 mMグリシン (pH 10.4) で反応を止めた。吸光度を405 nmで測定した。

【0134】

実験はn=6で行い、その後少なくとも3回繰り返した。データを対照のパーセントとして解析し、ここで、対照ウェルは等量のDMSO単独で処理した。IC₅₀算出において、薬剤濃度及びヘキソサミニダーゼ活性間のプロットを作成し、そのデータを直線的又は指数関数的に当てはめた。処理の48時間後に50%の細胞死をもたらす化合物濃度を決定することにより、IC₅₀を得た。

【0135】

この実験から得られた結果は、CPXが両方の細胞株 (T24及び253-JBV) の増殖を用量及び時間依存的に有意に抑制することを示している (T24細胞及び253-JBV細胞それぞれにおいて、IC₅₀ = > 4 μ M及び3 μ M)。CPX-POMは増殖に対して非常に小さな影響を示す (T24細胞及び253-JBV細胞それぞれにおいてIC₅₀ = > 45 μ M及び48 μ M) が、CPX-グルクロニドは両方の細胞において処置の72時間までいかなる有意な影響も全く示さなかった。この要約の時点で、CPX-POMがイ

ンビトロでC P Xを形成するかどうかを評価するための、細胞培養液中でのC P X－P O Mの化学安定性を評価する実験が進行中である。

【0136】

ヒト尿における予想C P X濃度は十分な抗癌活性を示す：

【0137】

ヒト尿における予想C P X濃度が抗癌活性をもたらすのに十分であるかどうかを決定した。膀胱内の環境を模倣するために正常な尿（K U M Cの生物検体貯蔵所から入手）の存在下で細胞をC P X処理した。一方、パーセンテージ用量曲線（percentage dose curve）を行って、細胞に対して無毒である、さらなる試験に使用可能な尿の割合を決定した（図25A）。図25Aは細胞に対する正常尿の影響を示している。253JBV細胞を表 10
示割合の正常尿と一緒に72時間までインキュベートした。20%未満の尿中濃度は細胞に対して無毒であることが分かっている。

【0138】

253JBV細胞を完全R P M I培地中で種々の割合の尿と一緒に12時間までインキュベートした。12時間後、培地を100%完全R P M I培地と交換した。細胞を72時間まで増殖させた。ヘキソサミニダーゼアッセイを行って、異なる時点（24時間、48時間及び72時間）における尿の影響を決定した。所与の期間（12時間）細胞に対して有毒でないことが分かったため、20%の正常尿がさらなる試験に使用可能であると判定される。

【0139】

ヒト尿中の予想C P X濃度が抗癌活性をもたらすのに十分であるかどうかを決定するために、N M I B C細胞を正常な尿（完全R P M I培地中20%の正常尿）中でC P Xと一緒にインキュベートした。細胞は50 μ M C P Xに2時間暴露され、次に25 μ M C P Xに2時間暴露され、次に12.5 μ M C P Xに2時間暴露され、次に6.25 μ M C P Xに2時間暴露され、次に3.125 μ M C P Xに2時間暴露され、その後最後に、1.5625 μ M C P Xに2時間暴露される。C P Xの影響を、異なるC P X濃度の、12時間以上経過後（24時間、48時間、及び72時間）の、ヘキソサミニダーゼアッセイによって決定した。正常尿中のC P Xの影響が完全培地中のC P Xの影響と比較される。

【0140】

この実験から得られた結果は、図25Bに示されるように、ヒト尿中の予想尿中濃度のC P Xが細胞の増殖を阻害するのに十分であることを示している。C P Xが12時間経過後もその抗増殖作用を示しており、作用が72時間まで継続していることが分かる。

【0141】

次に、72時間まで（3日間処理）毎日処理した後の、T24細胞及び253JBV細胞に対する正常尿中のC P Xの影響を決定した。この実験の裏にある意図は、患者の膀胱は予測濃度のC P Xに毎日暴露されることになるため、膀胱癌細胞に対するヒト尿中の予測濃度のC P Xの影響を理解することである。3セットのプレート、C P X（50～1.5625 μ M）の1日間処理、2日間処理及び3日間処理のそれぞれに1プレート、を使用した。T24細胞及び253JBV細胞を、正常尿（完全R P M I培地中20%の正常尿）中でC P Xと一緒にインキュベートした。1日間処理では、細胞は50 μ M C P Xに2時間暴露され、次に25 μ M C P Xに2時間暴露され、次に12.5 μ M C P Xに2時間暴露され、次に6.25 μ M C P Xに2時間暴露され、次に3.125 μ M C P Xに2時間暴露され、その後最後に、1.5625 μ M C P Xに2時間暴露される。C P Xの影響を、異なるC P X濃度の、12時間以上経過後（24時間、48時間、及び72時間）の、ヘキソサミニダーゼアッセイによって決定した。2日間処理では、細胞は50 μ M～1.5625 μ Mに2日間暴露され、48時間及び72時間の時点においてヘキソサミニダーゼアッセイにより影響が決定された。3日間処理では、細胞は50 μ M～1.5625 μ Mに3日間暴露され、72時間の時点においてヘキソサミニダーゼアッセイにより影響が決定された。

10

20

30

40

50

【0142】

図25Cは、ヒト尿中での予想CPX濃度によるT24細胞の毎日処理が有意な抗癌活性を示すことを示している。T24細胞を、正常尿（完全RPMI培地中20%の正常尿）中でCPXと一緒にインキュベートした。1日処理では、細胞は異なるCPX濃度（ $50\mu\text{M}$ ～ $1.5625\mu\text{M}$ ）に12時間暴露される。CPXの影響を、異なるCPX濃度の、12時間以上経過後（24時間、48時間、及び72時間）の、ヘキソサミニダーゼアッセイによって決定した。2日間処理では、細胞は $50\mu\text{M}$ ～ $1.5625\mu\text{M}$ に2日間暴露され、48時間及び72時間の時点においてヘキソサミニダーゼアッセイにより影響が決定された。3日間処理では、細胞は $50\mu\text{M}$ ～ $1.5625\mu\text{M}$ に3日間暴露され、72時間の時点においてヘキソサミニダーゼアッセイにより影響が決定された。CPXと一緒にインキュベートされたT24細胞は、時間依存的な増殖減少を示し、3日間処理された細胞は最大の増殖阻害（20%）を示した。

10

【0143】

図25Dは、ヒト尿中での予想CPX濃度による253JBV細胞の毎日処理が有意な抗癌活性を示すことを示している。253JBV細胞を、正常尿（完全RPMI培地中20%の正常尿）中でCPXと一緒にインキュベートした。1日処理では、細胞は異なるCPX濃度（ $50\mu\text{M}$ ～ $1.5625\mu\text{M}$ ）に12時間暴露される。CPXの影響を、異なるCPX濃度の、12時間以上経過後（24時間、48時間、及び72時間）の、ヘキソサミニダーゼアッセイによって決定した。2日間処理では、細胞は $50\mu\text{M}$ ～ $1.5625\mu\text{M}$ に2日間暴露され、48時間及び72時間の時点においてヘキソサミニダーゼアッセイにより影響が決定された。3日間処理では、細胞は $50\mu\text{M}$ ～ $1.5625\mu\text{M}$ に3日間暴露され、72時間の時点においてヘキソサミニダーゼアッセイにより影響が決定された。CPXと一緒にインキュベートされた253JBV細胞は、時間依存的な増殖減少を示し、3日間処理された細胞は最大の増殖阻害（35%）を示した。

20

【0144】

この実験から得られた結果は、図25C～25Dに示されるように、ヒト尿中の予想尿中濃度のCPXが時間依存的な細胞増殖減少を示すことを示している。T24及び253JBV等の両方の細胞株において、3日間のCPX処理はそれぞれ20%及び35%の最大増殖阻害を示す。

【0145】

図26A～26Bは共に、CPX-POMがBBN誘導性膀胱腫瘍の膀胱重量を減少させることを示すグラフを含む。 100mg/kg 及び 200mg/kg の一日一回のIP CPX-POM投与の4週間後、膀胱重量（腫瘍容積の目安）は対照と比較してCPX-POM処置動物において有意により低かった（ $p=0.013$ ）。2つのCPX-POM処置群の間に膀胱重量の有意差は無かった。BBN単独を与えられた動物は、対照健常膀胱と比較した場合に、腫瘍の誘導及び成長のために、膀胱重量の増加を示した。CPX-POM処置は 100mg/kg 及び 200mg/kg の両方の処置用量において膀胱重量を有意に減少させた。

30

【0146】

CPX-POM処置と腫瘍の病期の間には強い相関関係がある。対照（BBN単独）動物から得られた膀胱組織は主に高悪性度（T3）腫瘍を含んでいたが、一方、CPX-POM処置動物はより病期が低い腫瘍への明らかな移行を示した。BBN単独群動物のヘマトキシリン-エオシン染色をした膀胱組織切片は非常に高頻度のT3病期腫瘍を示す。CPX-POM処置膀胱から得られた組織切片は、T3病期頻度の有意な減少を示したが、これは、CPX-POMが腫瘍をその早期に停止させることを示している。

40

【0147】

以前の研究によって、高レベルのNotch1活性が膀胱癌の腫瘍進行と関連していること、及び、Notch1が膀胱癌治療のための有望な治療標的であり得ることが示された。CPX-POM処置膀胱組織から得られた組織切片は、プレセニン1等の γ -セクレターゼ複合体タンパク質の発現を有意に阻害し、それにより、切断活性化型Notch

50

細胞内ドメイン（N I C D 1）の減少をもたらした。さらに、H e y 1を含む前記経路の下流標的のレベルもC P X－P O M処理後に有意に阻害された。これらのデータは、C P X－P O MがN o t c h細胞内シグナル伝達経路のタンパク質を有意に阻害し、それによりインビボで癌幹細胞（C S C）の成長を阻害することを示唆している。

【0148】

図27Aは、C P X－P O MがインビボにおいてN o t c h 1シグナル伝達及びγ－セクレターゼ複合体タンパク質を阻害することを示す画像を含む。C P X－P O M処置はN o t c h 1活性化及びγ－セクレターゼ複合体タンパク質であるプレセニン1を有意に減少させ、H e y 1等の下流標的タンパク質を減少させる。N o t c hシグナル経路の阻害が両方のC P X－P O M処置群において認められた。

10

【0149】

図27Bは、C P X－P O MがB B N誘導膀胱腫瘍モデルにおいてN o t c h下流標的タンパク質であるサイクリンD 1及びc－M y cを阻害することを示す画像を含む。C P X－P O Mは、サイクリンD 1及びc－M y c等のN o t c h下流標的タンパク質を有意に減少させたが、これは細胞の成長において重要な役割を果たす。したがって、C P X－P O M処置は、B B N誘導性膀胱腫瘍モデルにおいて、N o t c h下流標的タンパク質であるサイクリンD 1及びc－M y cの阻害ももたらす。これらの下流標的タンパク質は細胞周期を通じた細胞の進行において大きな役割を果たす。結論として、有効な膀胱癌マウスモデルにおいてインビボ前臨床原理証明が確立された。十分な濃度のシクロピロクスが、注射用C P X－P O M投与の後、定常状態で十分な期間（すなわち、24時間に亘って）、標的作用部位（すなわち、尿路）において、達成されることが示された。第二に、シクロピロクスが、作用部位において、提唱された標的（例えば、N o t c hシグナル経路）と結合（engage）すること証明された。第三に、作用部位におけるシクロピロクス－標的間の関与が、提唱された作用機序（腫瘍サイズ減少、腫瘍病期移行）と一致する薬理的活性をもたらすことが証明された。

20

【0150】

C P X－P O Mはインビトロ及びインビボの両方において増殖性細胞核抗原（P C N A）を阻害する。筋層非浸潤性膀胱癌細胞株における、及びC P X－P O M処置膀胱腫瘍組織における、P C N A含量を調べた。ウエスタンブロット研究により、C P X－P O M処置T 2 4細胞におけるP C N Aレベルの時間依存的な減少が示されている。C P X－P O MはインビボにおいてP C N Aのレベルを減少させた。また、研究によって、n o t c h細胞内経路とP C N Aとの間の正相関が示されている。我々の研究室で作成されたデータは、C P X－P O Mが、N o t c h－1シグナル経路、N o t c h下流標的タンパク質及び増殖性細胞核抗原を抑制することにより、インビボにおいて膀胱癌の成長を阻害することを示唆している。

30

【0151】

図28は、C P X－P O Mがインビトロ及びインビボの両方において増殖性細胞核抗原（P C N A）を阻害することを示す。画像は、D N A複製で重要な役割を果たす、D N AポリメラーゼをD N Aと一緒に保持することにおけるP C N Aの役割を説明している。ウエスタンブロット研究は、C P X処置T 2 4細胞におけるP C N Aレベルの時間依存的な減少を示している。C P X－P O MはインビボにおいてもP C N Aのレベルを減少させた。

40

【0152】

さらに、仮出願からのデータ（本明細書に援用される）は、C P XがT 2 4細胞株におけるN o t c h経路、W n t経路及びH e d g e h o g経路を抑制すること；C P XがT 2 4細胞株におけるN O T C H経路関連遺伝子を抑制すること；C P XがT 2 4細胞株におけるW n tシグナル経路関連遺伝子を抑制すること；並びに、C P XがT 2 4細胞株におけるH e d g e h o g経路関連遺伝子を抑制すること、を示している。

【0153】

本明細書において提供されたデータは、以下の情報形成を提供する。P O M部分が血液

50

20

30

40

50

要約すると、CPX-POMは、投与後に活性薬剤シクロピロクスに迅速且つ完全にインビボ変換される。マウス試験208-02は、シクロピロクス暴露の程度が、IVでCPX-POMを投与するかシクロピロクスのオラミン塩を投与するかにかかわらず、本質的に同じ（137%）であることを示した。ラット試験10954は、シクロピロクス暴露の程度が、IVでCPX-POMを投与するかシクロピロクスのオラミン塩を投与するかにかかわらず、本質的に同じ（77%）であることを示した。イヌ試験10953は、シクロピロクス暴露の程度が、IVでCPX-POMを投与するかシクロピロクスのオラミン塩を投与するかにかかわらず、本質的に同じ（85%）であることを示した。また、全ての試験にわたって記載されたように、CPX-POMは、実際にいかなる試験においても、血漿中でも尿中でも検出できない。これらの試験は、CPX-POMのIV投与経路が実行可能な経路であることを示している。

C P X - P O M の皮下投与経路は生物学的に利用可能である。ラット試験 1 1 4 2 8 は、C P X - P O M の S O 投与後のシクロピロキスの絶対的生物学的利用能が 8 0 % であり

、S Q C P X - P O M の後のシクロピロクスの尿中濃度がインビトロ I C 5 0 値を超過していたことを示した。イヌ試験 1 1 4 2 9 は、C P X - P O M の S Q 投与後のシクロピロクスの絶対的生物学的利用能が 1 0 6 % であり、S Q C P X - P O M の後のシクロピロクスの尿中濃度がインビトロ I C 5 0 値を超過していたことを示した。これらの試験は、マウス試験 2 0 8 - 0 2 と共に、シクロピロクスオラミンの経口生物学的利用能がかなり低いことも示した。この投与経路は、イヌの尿中濃度がより低いこととも関連しており、これにより、皮下投与経路が、特に C P X - P O M を反復的に投与することが必要な場合（I 型糖尿病患者によるインスリン投与のような）において、有益であることが証明された。

【0158】

膀胱癌の有効なマウスモデルにおいて示されたように、C P X - P O M を用いることで、膀胱癌を治療することが可能であることが、データにより証明された。腹腔内（I P）投与経路（マウス膀胱癌試験で使用される）が生物学的に利用可能であることが、マウス試験 1 1 1 7 7 により証明された。マウス膀胱癌試験用に選択された投与計画を用いた作用部位（すなわち、尿路）におけるシクロピロクス暴露（例えば、尿中濃度）がインビトロ I C 5 0 値を数倍超過したことが、マウス試験 1 1 2 0 6 により証明された。

【0159】

C P X - P O M の注射投与（injectable administration）後に、活性薬剤（シクロピロクス）の十分な濃度が作用部位（すなわち、血液、尿）において達成されることが、試験により証明された。一日量 1 0 0 m g / k g 及び 2 0 0 m g / k g の C P X - P O M が膀胱重量（腫瘍のサイズ及び体積の指標）の有意な減少、並びにより病期が低い腫瘍への移行をもたらしたことが、マウス B B N 試験により証明された。また、C P X - P O M 処置動物から得られた膀胱組織において、N o t c h シグナル伝達が阻害されたこと、及び下流 N o t c h 標的タンパク質が減少したことが、試験により証明された。C P X - P O M 処置動物における膀胱癌組織の分析によって、シクロピロクスが作用部位（膀胱組織）において標的（例えば、N o t c h シグナル経路）と結合（engage）することが証明された。膀胱癌組織で見られた作用は、インビトロの N M I B C 及び M I B C ヒト細胞株において作成されたデータと一致する。また、C P X - P O M の毎日注射投与が、シクロピロクスが抗癌剤であり、C P X - P O M の注射投与が十分な活性薬剤を作用部位に送達して抗癌反応を生み出すという仮説と一致する薬理的作用（例えば、腫瘍のサイズ及び体積の減少、より低い腫瘍病期）を生み出したことが、試験により証明された。

【0160】

用語「アルキル」又は「脂肪族」とは、本明細書において用いられる場合、分枝状又は非分枝状の飽和炭化水素基を指す。必須ではないが、通常は 1 ～ 約 2 4 個の炭素原子を含み、例えばメチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、イソブチル、t - ブチル、オクチル、デシルなどであり、ならびにシクロペンチル、シクロヘキシルなどのシクロアルキル基を含む。一般的には、これも必須ではないが、アルキル基は、本明細書において、1 ～ 約 1 8 個の炭素原子又は 1 ～ 約 1 2 個の炭素原子を含む。用語「低級アルキル」は、1 ～ 6 個の炭素原子のアルキル基を意図する。「C₁ - C₆アルキル」又は「低級アルキル」として同定される置換基は、1 ～ 3 個の炭素原子を含み、かかる置換基は、1 又は 2 個の炭素原子（すなわちメチル及びエチル）を含む。「置換アルキル」は、1 又は 2 以上の置換基によるアルキル置換を指し、用語「ヘテロ原子含有アルキル」及び「ヘテロアルキル」は、以下により詳細に記載するように、少なくとも 1 つの炭素原子が、ヘテロ原子により置き換えられているアルキルを指す。他に示されない場合は、用語「アルキル」及び「低級アルキル」は、それぞれ、直鎖状、分枝状、環状の、無置換の、置換された、及び／又はヘテロ原子を含有する、アルキル又は低級アルキルを含む。

【0161】

本明細書において用いられる用語「アルケニル」は、少なくとも 1 個の二重結合を含む、直鎖状、分枝状又は環状の、2 個～約 2 4 個の炭素原子の炭化水素基、例えばエテニル、n - プロペニル、イソプロペニル、n - ブテニル、イソブテニル、オクテニル、デセニ

10

20

30

40

50

ル、テトラデセニル、ヘキサデセニル、エイコセニル、テトラコセニルなどを指す。一般的に、これも必須ではないが、アルケニル基は、本明細書において、2～約18個の炭素原子又は2～12個の炭素原子を含む。用語「低級アルケニル」とは、2～6個の炭素原子のアルケニル基を意図し、特定の用語「シクロアルケニル」とは、5～8個の炭素原子を有する環状アルケニル基を意図する。用語「置換アルケニル」とは、1又は2以上の置換基で置換されたアルケニルを指し、用語「ヘテロ原子含有アルケニル」及び「ヘテロアルケニル」は、少なくとも1個の炭素原子がヘテロ原子で置き換えられているアルケニルを指す。他に示されない場合、用語「アルケニル」及び「低級アルケニル」は、それぞれ、直鎖状、分枝状、環状の、無置換の、置換された、及び／又はヘテロ原子を含有する、アルケニル及び低級アルケニルを含む。

10

【0162】

本明細書において用いられる用語「アルキニル」は、直鎖状又は分枝状の2～24個の炭素原子の炭化水素基であって、少なくとも1個の三重結合を含むもの、例えばエチニル、*n*-プロピニルなどを指す。一般的に、これも必須ではないが、アルキニル基は、本明細書において、2～約18個の炭素原子又は2～12個の炭素原子を含む。用語「低級アルキニル」は、2～6個の炭素原子のアルキニル基を意図する。用語「置換アルキニル」とは、1又は2以上の置換基で置換されたアルキニルを指し、用語「ヘテロ原子含有アルキニル」及び「ヘテロアルキニル」とは、少なくとも1個の炭素原子がヘテロ原子で置き換えられているアルキニルを指す。他に示されない場合、用語「アルキニル」及び「低級アルキニル」は、それぞれ、直鎖状、分枝状、無置換の、置換された、及び／又はヘテロ原子を含有する、アルキニル及び低級アルキニルを含む。

20

【0163】

本明細書において用いられる用語「アルコキシ」は、単一の、末端のエーテル連結を通して結合したアルキル基を意図する。すなわち、「アルコキシ」基は、 $-O-$ アルキルとして表わすことができ、ここで、アルキルは上で定義したとおりである。「低級アルコキシ」基は、1～6個の炭素原子を含むアルコキシ基を意図し、例えば、メトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*t*-ブチルオキシなどを含む。「 C_1-C_6 アルコキシ」又は「低級アルコキシ」として同定される置換基は、本明細書において、1～3個の炭素原子を含み、かかる置換基は、1又は2個の炭素原子を含む（すなわちメトキシ及びエトキシ）。

30

【0164】

本明細書において用いられる用語「アリール」は、他に特定されない場合、単一の芳香族環、又は共に融合しているか、直接的に連結されているか、又は間接的に連結されている（異なる芳香族環がメチレン又はエチレン部分などの一般的な基に結合している）複数の芳香族環を含む芳香族置換基を指す。アリール基の例として、5～20個の炭素原子を含むアリール基、及び5～14個の炭素原子を含むアリール基が挙げられる。例示的なアリール基は、1つの芳香族環又は2つの融合した又は連結された芳香族環を含むもの、例えば、フェニル、ナフチル、ビフェニル、ジフェニルエーテル、ジフェニルアミン、ベンゾフェノンなどを含む。「置換アリール」とは、1又は2以上の置換基で置換されたアリール部分を指し、用語「ヘテロ原子含有アリール」及び「ヘテロアリール」とは、以下にさらに詳細に記載するとおり、少なくとも1個の炭素原子がヘテロ原子で置き換えられているアリール置換基を指す。他に示されない場合、用語「アリール」は、無置換の、置換された、及び／又はヘテロ原子を含有する、芳香族置換基を含む。

40

【0165】

本明細書において用いられる用語「アリールオキシ」は、単一の、末端のエーテル連結を通して結合したアリール基を指し、ここで、「アリール」は、上で定義されるとおりである。「アリールオキシ」基は、 $-O-$ アリールとして表わすことができ、ここでアリールは、上で定義されるとおりである。アリールオキシ基の例は、5～20個の炭素原子を含み、アリールオキシ基は、5～14個の炭素原子を含む。アリールオキシ基の例として、限定することなく、フェノキシ、*o*-ハローフェノキシ、*m*-ハローフェノキシ、*p*-

50

ハローフェノキシ、o-メトキシフェノキシ、m-メトキシフェノキシ、p-メトキシフェノキシ、2, 4-ジメトキシフェノキシ、3, 4, 5-トリメトキシフェノキシなどが挙げられる。

【0166】

用語「アルカリル (alkaryl)」とは、アルキル置換基を有するアリール基を指し、用語「アラルキル (aralkyl)」とは、アリール置換基を有するアルキル基を指し、ここで、「アリール」及び「アルキル」は、上で定義したとおりである。アラルキル基の例は、6～24個の炭素原子を含み、アラルキル基は6～16個の炭素原子を含む。アラルキル基の例は、限定することなく、ベンジル、2-フェニルエチル、3-フェニルプロピル、4-フェニルブチル、5-フェニルペンチル、4-フェニルシクロヘキシル、4-ベンジルシクロヘキシル、4-フェニルシクロヘキシルメチル、4-ベンジルシクロヘキシルメチルなどを含む。アルカリル基として、例えば、p-メチルフェニル、2, 4-ジメチルフェニル、p-シクロヘキシルフェニル、2, 7-ジメチルナフチル、7-シクロオクチルナフチル、3-エチルシクロペンター1, 4-ジエンなどが挙げられる。

10

【0167】

用語「環状」とは、脂環式又は芳香族の置換基を指し、これは、置換されていても、置換されていなくても、及び／又はヘテロ原子を含有していてもよく、単環式、二環式又は多環式であってもよい。

【0168】

用語「ハロ」及び「ハロゲン」は、クロロ、ブロモ、フルオロ又はヨード置換基を指す、慣用的な意味において用いられる。

20

【0169】

「ヘテロ原子含有アルキル基」（「ヘテロアルキル」基とも称される）又は「ヘテロ原子含有アリール基」（「ヘテロアリール」基とも称される）などにおける用語「ヘテロ原子含有」とは、1又は2以上の炭素原子が炭素以外の原子、例えば、窒素、酸素、硫黄、リン又はケイ素により、通常は窒素、酸素又は硫黄により置き換えられている、分子、連結又は置換基を指す。同様に、用語「ヘテロアルキル」とは、ヘテロ原子を含有するアルキル置換基を指し、用語「ヘテロ環状」とは、ヘテロ原子を含有する環状の置換基を指し、用語「ヘテロアリール」及び「ヘテロ芳香族」は、それぞれ、ヘテロ原子を含有する「アリール」及び「芳香族」置換基などを指す。ヘテロアルキル基の例は、アルコキシアリール、アルキルスルファニル置換アルキル、N-アルキル化アミノアルキルなどを含む。ヘテロアリール置換基の例は、ピロリル、ピロリジニル、ピリジニル、キノリニル、インドリル、ピリミジニル、イミダゾリル、1, 2, 4-トリアゾリル、テトラゾリルなどを含み、ヘテロ原子含有脂環式基の例は、ピロリジノ、モルホリノ、ピペラジノ、ピペリジノなどである。

30

【0170】

用語「ヒドロカルビル (hydrocarbyl)」とは、1～約30個の炭素原子、又は1個～約24個の炭素原子、又は1個～約18個の炭素原子、又は約1～12個の炭素原子を含む、一価のヒドロカルビルラジカルを指し、直鎖状、分枝状、環状の、飽和、及び不飽和の種、例えばアルキル基、アルケニル基、アリール基などを含む。「置換ヒドロカルビル」とは、1又は2以上の置換基で置換されたヒドロカルビルを指し、用語「ヘテロ原子含有ヒドロカルビル」とは、少なくとも1個の炭素原子がヘテロ原子で置き換えられているヒドロカルビルを指す。他に示されない限り、用語「ヒドロカルビル」は、置換されている及び／又はヘテロ原子を含有するヒドロカルビル部分を含むものとして解釈されるべきである。

40

【0171】

「置換アルキル」、「置換アリール」などにおけるような「置換 (substituted)」により、前述の定義の一部において言及されるように、アルキル、アリール又は他の部分において、炭素（又は他の）原子に結合した少なくとも1個の水素原子が、1又は2以上の非水素置換基により置き換えられていることが意味される。

50

【0172】

さらに、前述の官能基は、特定の基が許容する場合、さらに、1若しくは2以上のさらなる官能基により、又は、上で特に列挙されたものなどの1若しくは2以上のヒドロカルビル部分により、さらに置換されていてもよい。同様に、上述のヒドロカルビル部分は、1若しくは2以上の官能基、又は、特に列挙されたものなどのさらなるヒドロカルビル部分により、さらに置換されていてもよい。

【0173】

用語「置換」が、可能な置換された基のリストの前に現れる場合、それは、当該用語が、その基の全員に適用されることを意図する。例えば、句「置換アルキル、アルケニル及びアリール」は、「置換アルキル、置換アルケニル及び置換アリール」として解釈されるべきである。同様に、用語「ヘテロ原子含有」が、可能なヘテロ原子含有基のリストの前に現れる場合、それは、当該用語が、その基の全員に適用されることを意図する。例えば、句「ヘテロ原子含有アルキル、アルケニル及びアリール」は、「ヘテロ原子含有アルキル、ヘテロ原子含有アルケニル及びヘテロ原子含有アリール」として解釈されるべきである。

10

【0174】

当業者は、本明細書において開示されるこのプロセス及び方法ならびに他のプロセス及び方法、当該プロセス及び方法において実行される機能は、異なる順序において実行してもよいことを理解する。さらに、概説された工程及び操作は、単に例として提供されたものであって、当該工程及び操作の一部は、開示された実施形態の本質を損なうことなく、随意的であっても、より少ない工程及び操作中に組み合わせられても、又はさらなる工程及び操作へと拡大されてもよい。

20

【0175】

本開示は、本願において記載される特定の実施形態（これは、多様な態様の説明として意図される）により限定されるべきではない。その精神及び範囲から解離することなく、多くの修飾及び改変を行うことができ、このことは、当業者には明らかであろう。本明細書において列記されるものに加えて、開示の範囲内の機能的に等価な方法及び装置は、前述の記載から当業者には明らかであろう。かかる修飾及び改変は、添付の請求の範囲の範囲内に該当することを意図される。本開示は、添付の請求の範囲が権利を付与される均等物の完全な範囲と共に、かかる請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。本開示は、特定の方法、試薬、化合物、組成物又は生物学的システムに限定されるものではないことが理解されるべきであり、これらは、無論、変化してもよい。また、本明細書において用いられる用語は、単に特定の実施形態を記載することを目的とするものであって、限定することを意図しない。

30

【0176】

本明細書における実質的に全ての複数形及び／又は単数形の使用に関して、当業者は、文脈又は用途に適切であるように、複数形から単数形へ、及び／又は単数形から複数形へ、翻訳することができる。明確化のために、多様な単数形／複数形の置換が、本明細書において明示的に記載され得る。

【0177】

一般的に、本明細書において、及び特に添付の請求の範囲（例えば添付の請求項の主部）において用いられる用語は、一般的に「開放的（open）な」用語として意図されることが、当業者により理解されるであろう（例えば、用語「含んでいる（including）」は、「～を含んでいるがそれに限定されない」ものとして解釈されるべきであり、用語「有する（having）」は、「少なくとも～を有する」ものとして解釈されるべきであり、用語「含む（include）」は、「～を含むがそれに限定されない」として解釈されるべきであるなど）。前置きされる請求項の記述の特定のメンバーが意図される場合、かかる意図は、請求項において明示的に記述され、かかる記述の不在下において、かかる意図は存在しないことが、当業者によりさらに理解されるであろう。例えば、理解の助けとして、以下の添付の請求の範囲は、請求項の記述に前置きして、前置句「少なくとも1の」及び「1又

40

50

は2以上の」の使用を含んでもよい。しかし、かかる句の使用は、同じ請求項が前置句「1又は2以上の」又は「少なくとも1の」及び「a」又は「an」などの不定冠詞を含む場合であっても（例えば、「a」及び／又は「an」が「少なくとも1の」又は「1又は2以上の」を意味すると解釈されるべきである）、不定冠詞「a」又は「an」による請求項の記述の前置きが、かかる前置的な請求項の記述を含む任意の特定の請求項を、1つのみのかかる記述を含む実施形態に限定するものと暗示するものと解釈されるべきではない。これは、請求項の記述を前置きするために用いられる不定冠詞の使用についても真である。さらに、前置きされた請求項の記述の特定の数が明示的に記述される場合であっても、かかる記述は、少なくともその記述された数であることを意味すると解釈されるべきであることを、当業者は理解するであろう（例えば、最低限の「2つの記述」の記述は、他の修飾語句がない場合、少なくとも2つの記述、又は2又は3以上の記述を意味する）。さらに、「A、B及びCなどの少なくとも1」に類似する類句が用いられる場合において、一般的に、かかる構文は、当業者が当該構文を理解する意味を意図する（例えば、「A、B及びCなどの少なくとも1を有するシステム」は、限定されないが、A単独、B単独、C単独、A及びBと一緒に、A及びCと一緒に、B及びCと一緒に、及び／又はA、B及びCと一緒に有するシステムを含む）。「A、B又はCなどの少なくとも1」に類似する類句が用いられる場合において、一般的に、かかる構文は、当業者が当該構文を理解するような意味を意図する（例えば、「A、B又はCなどの少なくとも1を有するシステム」は、限定されないが、A単独、B単独、C単独、A及びBと一緒に、A及びCと一緒に、B及びCと一緒に、及び／又はA、B及びCと一緒に有するシステムを含む）。さらに、明細書、請求の範囲又は図面のいずれにおいても、2又は3以上の代替的用語を表わす実質的に全ての離接語及び／又は句は、用語のうちの1つ、用語のうちのいずれか、又は両方の用語を含む可能性を企図すると理解されるべきであることが、当業者により理解されるであろう。例えば、句「A又はB」は、「A」又は「B」又は「A及びB」の可能性を含むものと理解されるであろう。

10

20

【0178】

さらに、開示の特徴又は態様がマーカッシュ群により記載される場合、当業者は、当該開示はまた、それにより、当該マーカッシュ群の任意の個々のメンバー又はメンバーのサブグループにより記載されることを、当業者は理解するであろう。

【0179】

当業者により理解されるであろうことだが、任意の及び全ての目的のために、明細書を提供することなどにより、本明細書において開示される範囲はまた、任意の及び全ての可能な部分範囲及びその部分範囲の組み合わせを包含する。任意の列記される範囲は、同じ範囲が少なくとも半等分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1などに分割されることを、十分に記載し、可能にするものとして、容易に理解される。非限定的な例として、本明細書において議論される各範囲は、下3分の1、中3分の1、上3分の1などへと容易に分割することができる。これもまた当業者により理解されるであろうことだが、「～まで」、「少なくとも」などの全ての言語は、記述される数を含み、その後上記のとおり部分範囲へと分割することができる範囲を指す。最後に、当業者により理解されるであろうことだが、範囲は、かかる個々の数を含む。したがって、例えば、1～3個の細胞を有する群とは、1、2又は3個の細胞を有する群を指す。同様に、例えば、1～5個の細胞を有する群は、1、2、3、4又は5個の細胞を有する群を指す。

30

40

【0180】

以上から、本開示の多様な実施形態は、本明細書において説明を目的として記載されており、多様な修飾が、本開示の範囲及び精神から解離することなく行い得ることが、理解されるであろう。したがって、本明細書において開示される多様な実施形態は、限定することを意図されず、真の範囲及び精神は、以下の請求の範囲により示されている。本明細書において記述されるか本明細書において組み込まれる参考文献における全ての参考文献は、その全体において、本明細書において具体的な参照により組み込まれる。

【0181】

50

本特許出願は、2013年10月21日に出願された米国特許出願第14/059,287号を参照により組み込む。当該出願は、2011年12月2日に出願された米国特許出願第13/310,087号の分割出願であり、それは2010年12月2日に出願された米国仮特許出願第61/419,218号の利益を主張する。

【図1】

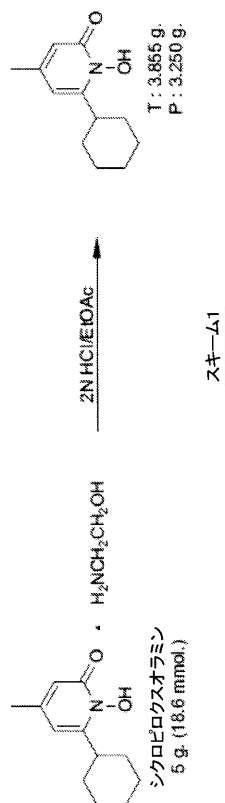


Fig. 1

【図2】

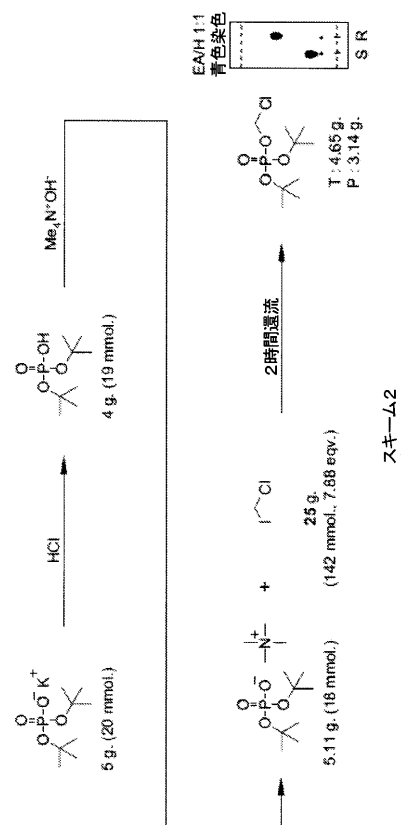


Fig. 2

【図 3】

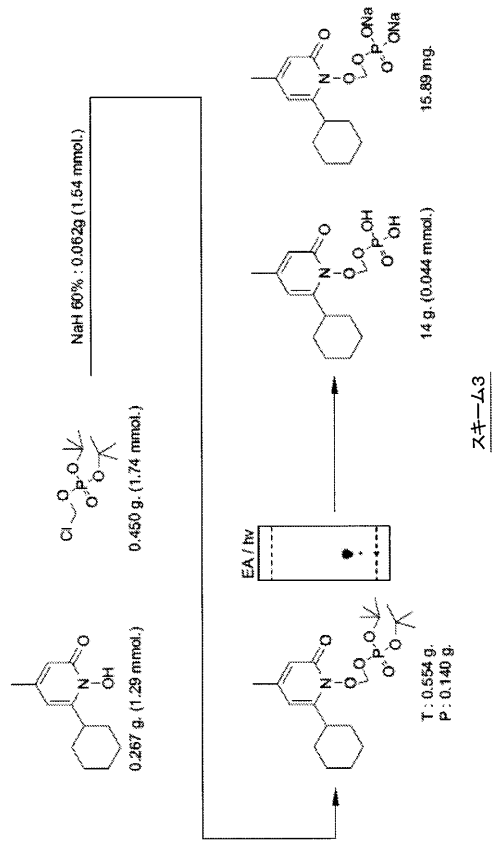


Fig. 3

【図 3 A】

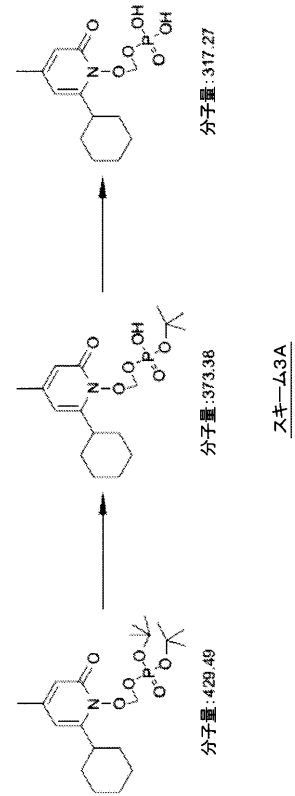
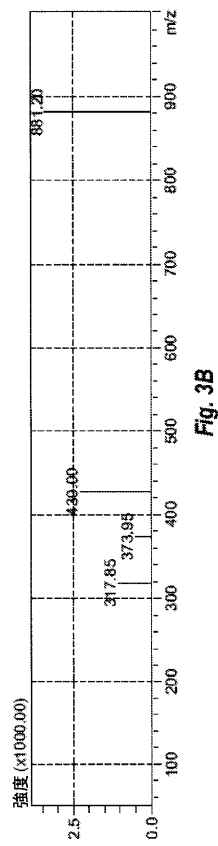
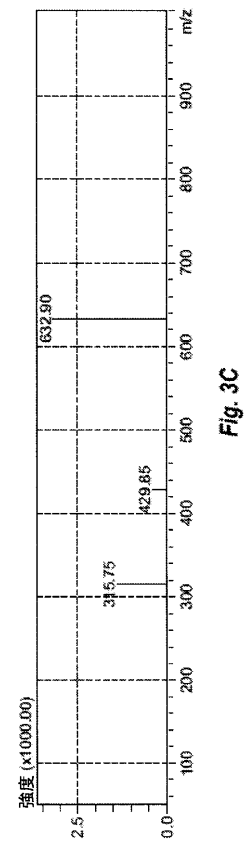


Fig. 3A

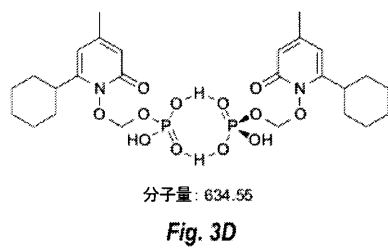
【図 3 B】



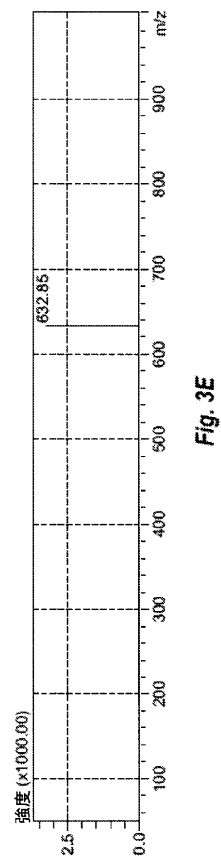
【図 3 C】



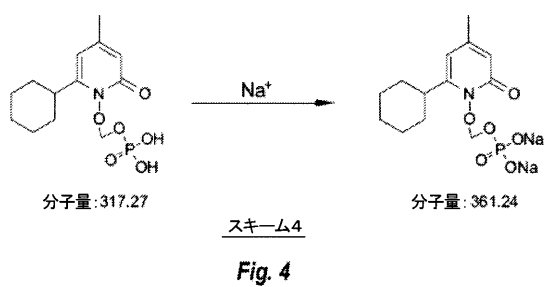
【図 3 D】



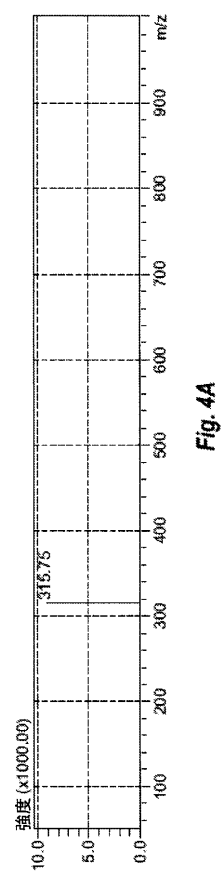
【図 3 E】



【図 4】



【図 4 A】



【図 5】

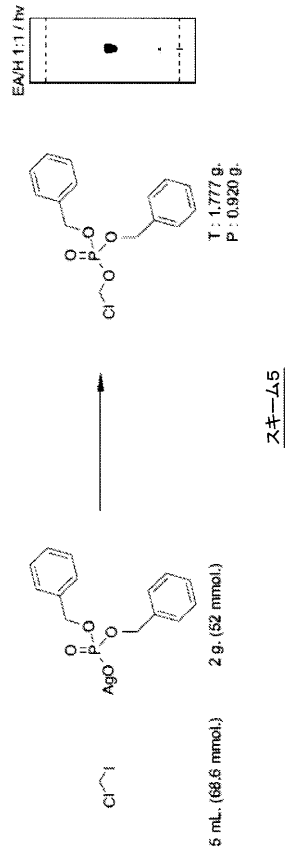


Fig. 5

【図 6】

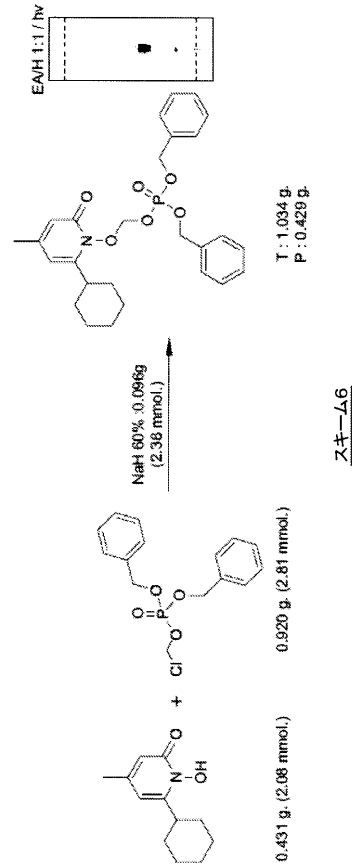


Fig. 6

【図 7】

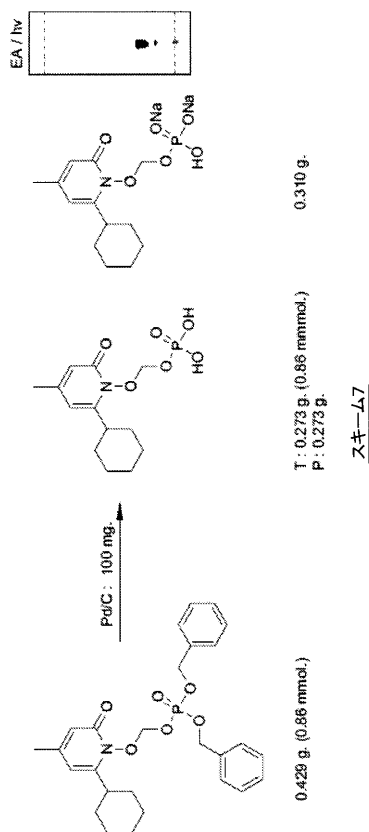


Fig. 7

【図 8】

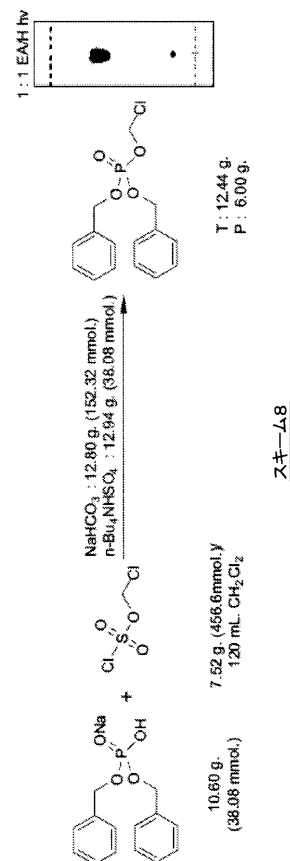


Fig. 8

【 図 9 】

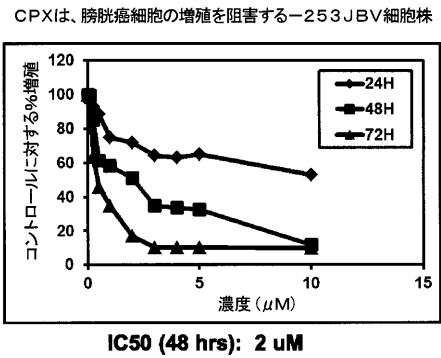


Fig. 9

【 図 1 0 】

CPXは、膀胱癌細胞のスフェロイド形成を阻害する

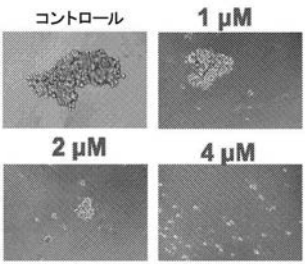


Fig. 10

【 図 1 1 】

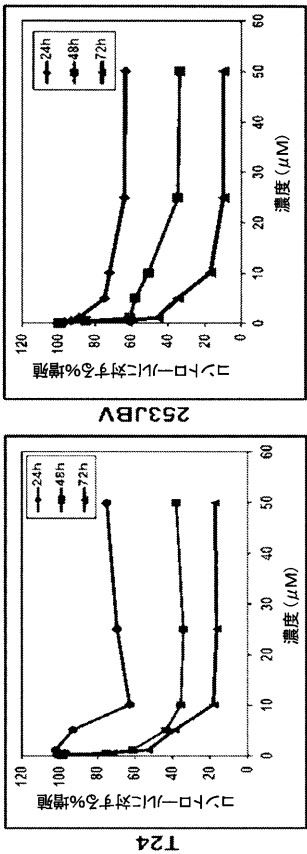


Fig. 11

【 図 1 2 A 】

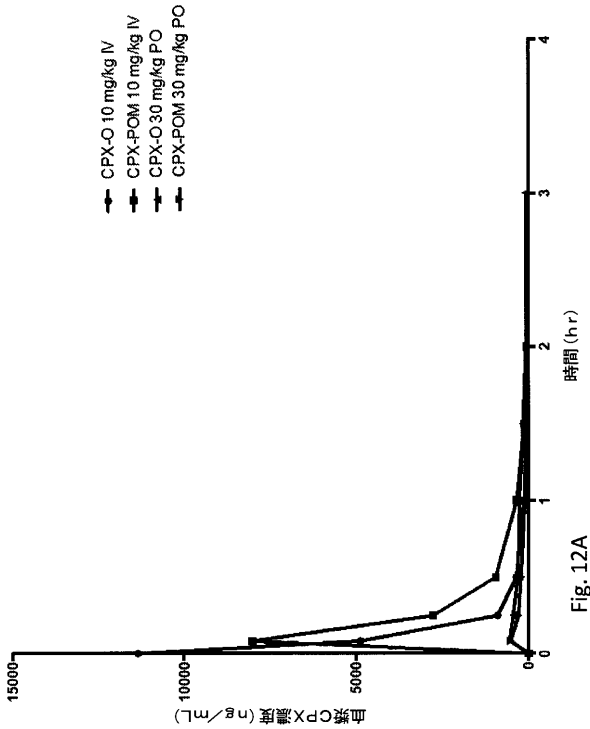
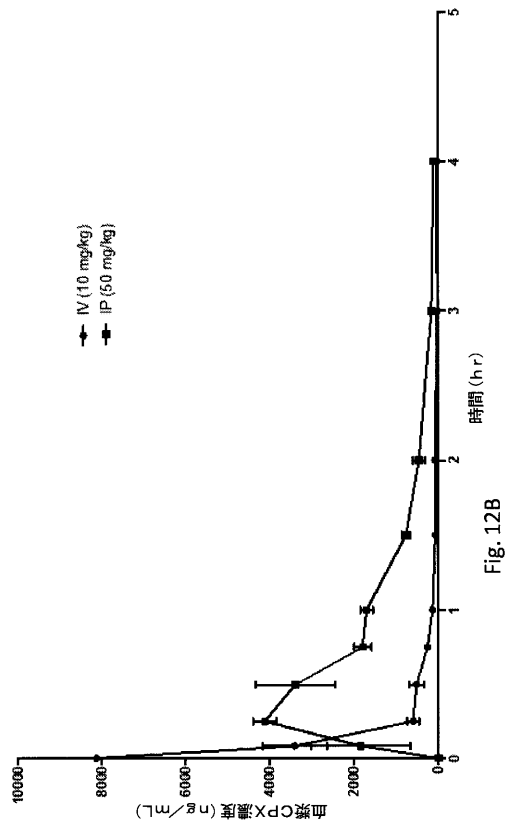
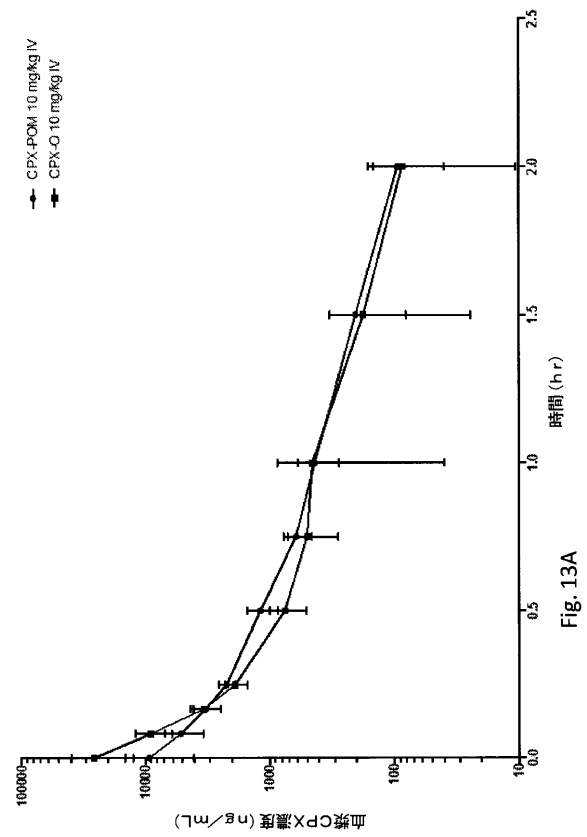


Fig. 12A

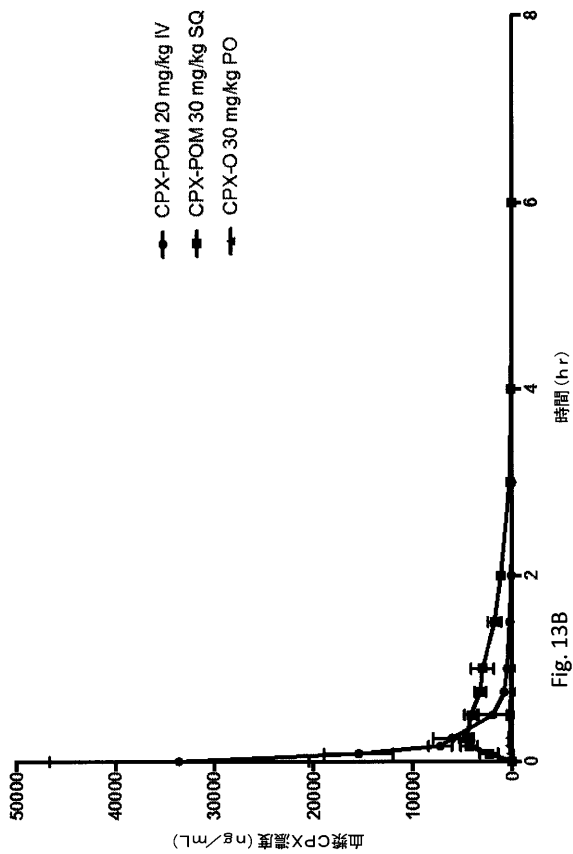
【図 1 2 B】



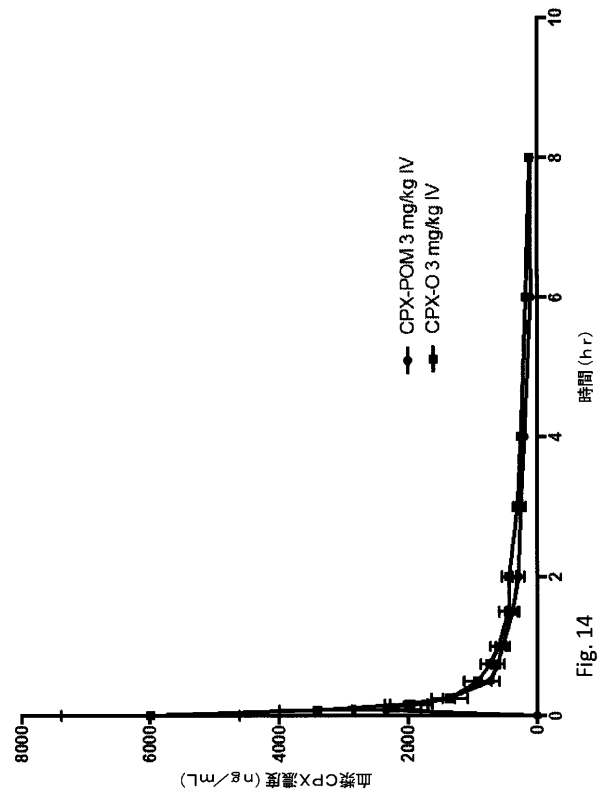
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 4】



【図 15】

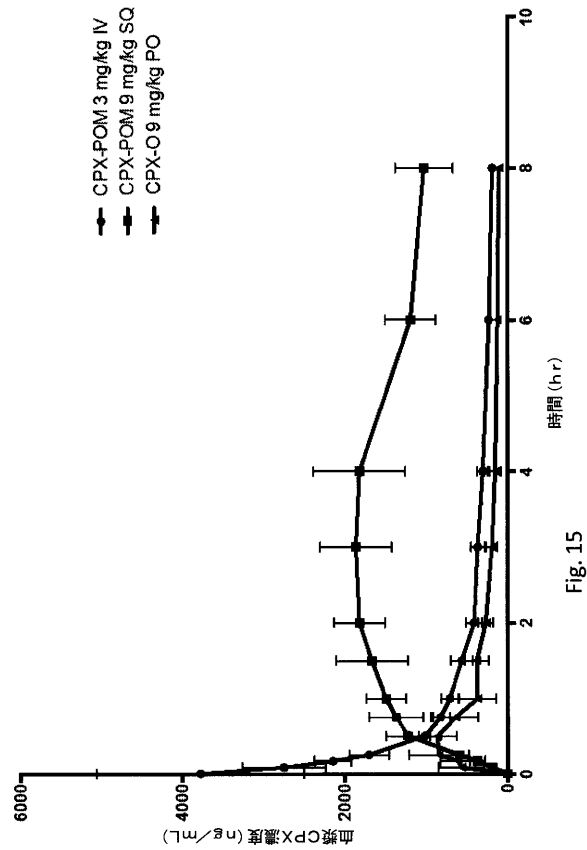


Fig. 15

【図 16】

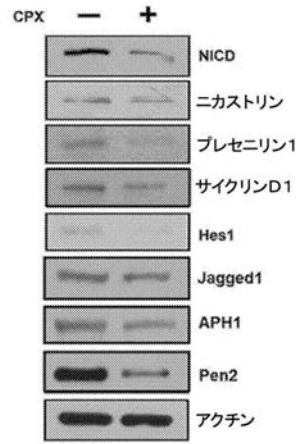


Fig. 16

【図 17】

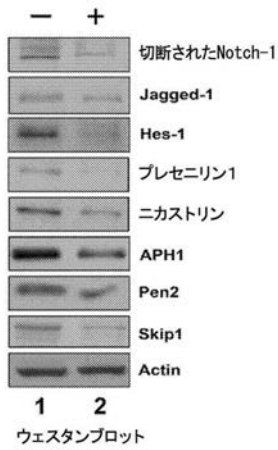


Fig. 17

【図 18】

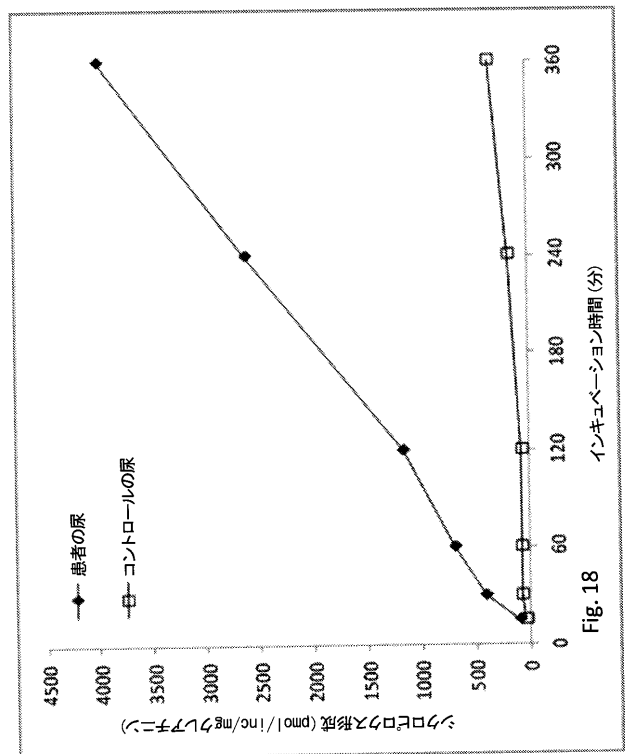


Fig. 18

【図 19】

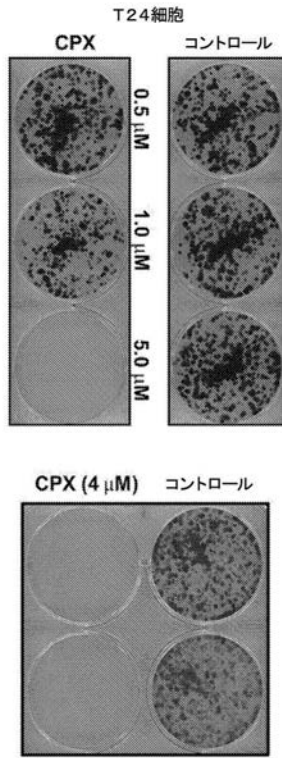


Fig. 19

【図 20】

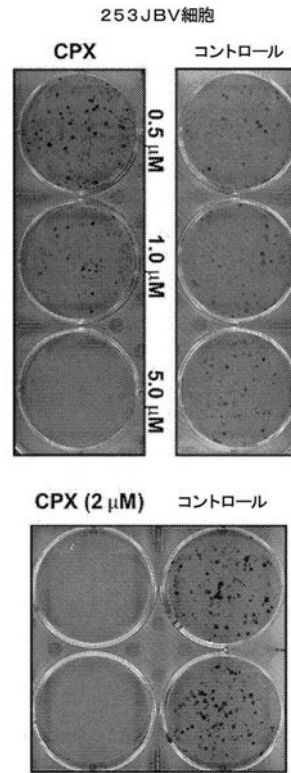


Fig. 20

【図 21】

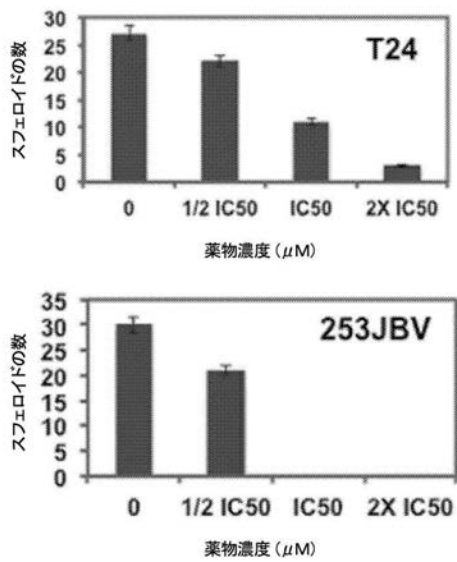


Fig. 21

【図 22】

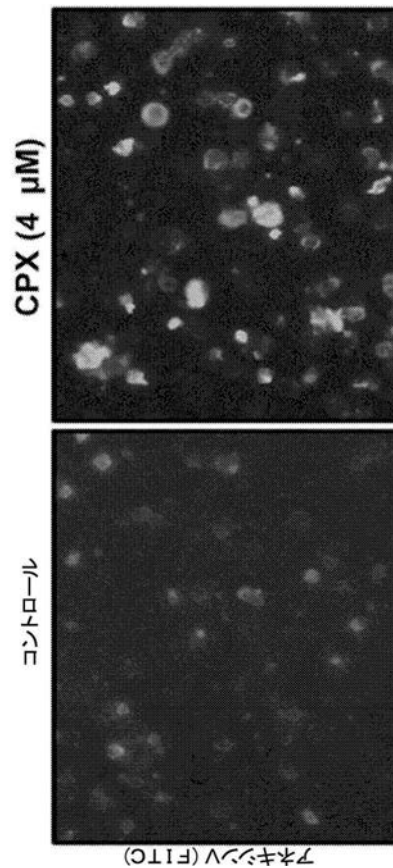


Fig. 22

【図 2 3 A】

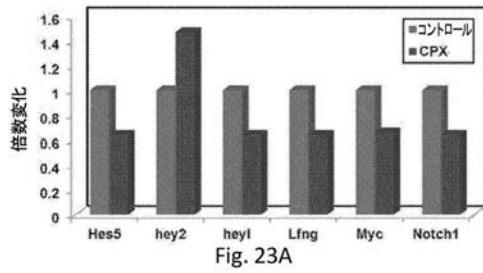


Fig. 23A

【図 2 3 B】

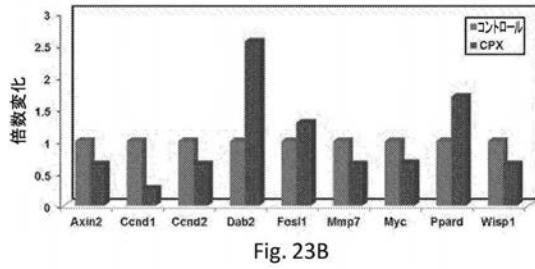


Fig. 23B

【図 2 3 C】

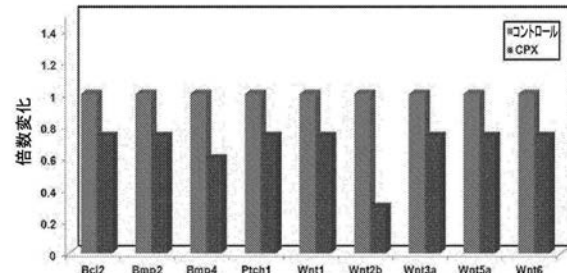


Fig. 23C

【図 2 4】

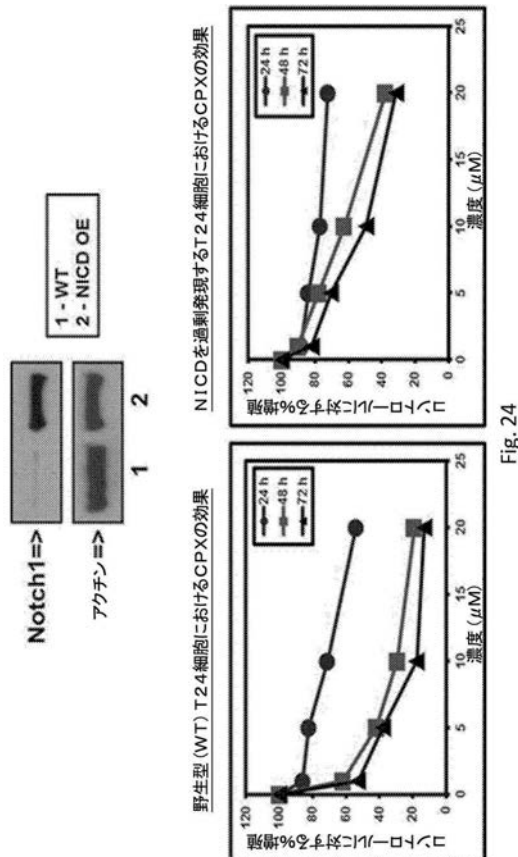


Fig. 24

【図 2 5 A】

膀胱癌細胞 (253JBV細胞) における正常な尿の効果

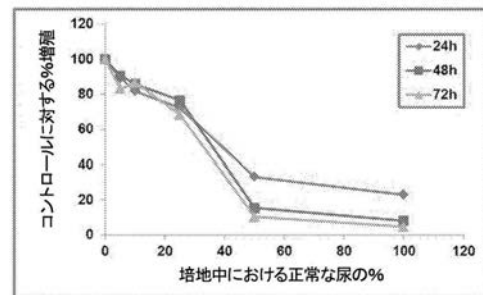


Fig. 25A

【図 2 5 B】

膀胱癌細胞におけるCPXの効果

(予測されるヒト尿のCPX濃度が、抗癌活性をもたらすために十分であることを決定するための、経時変化試験)

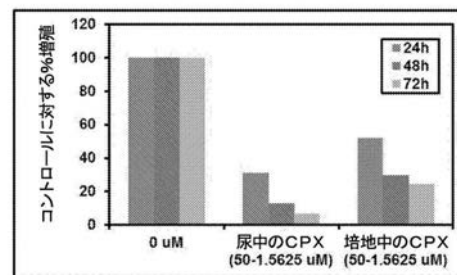
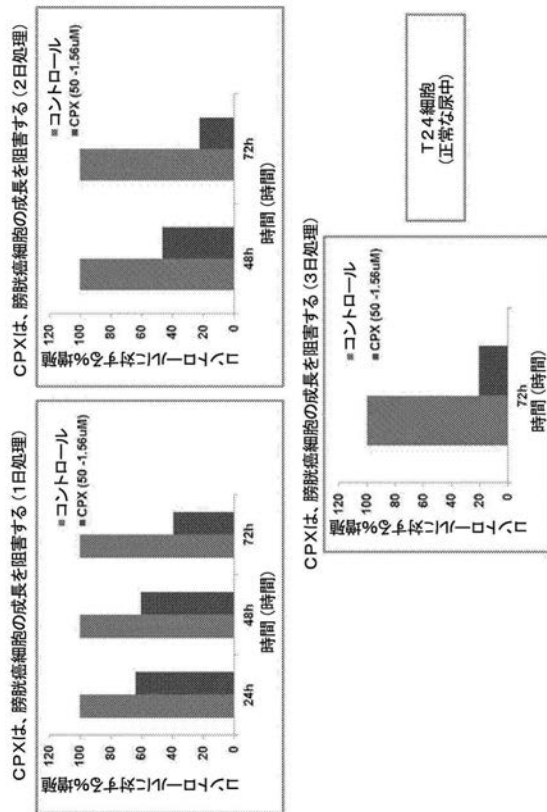
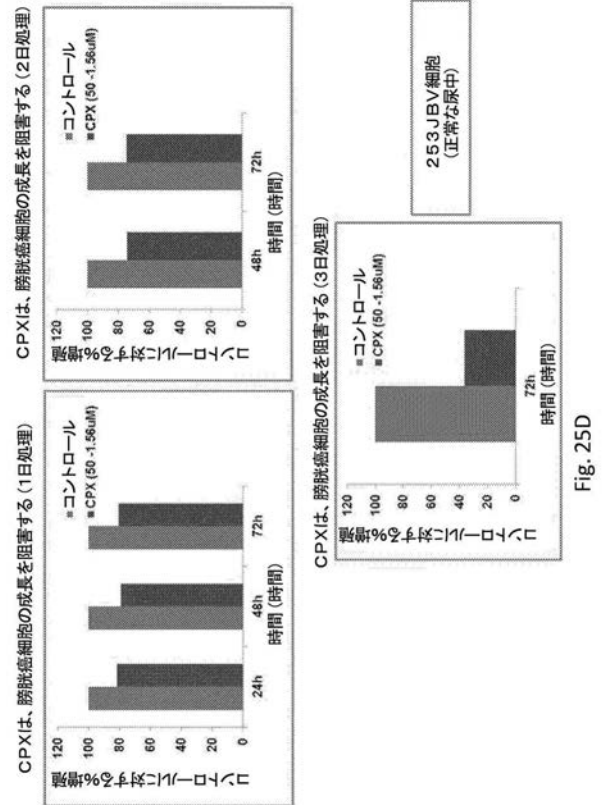


Fig. 25B

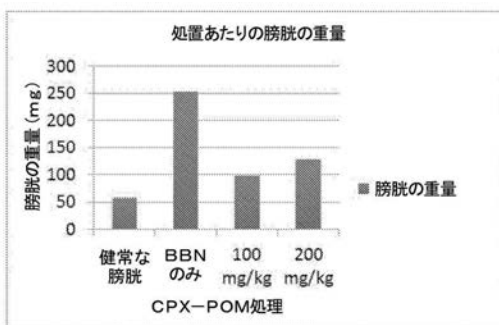
【図 25C】



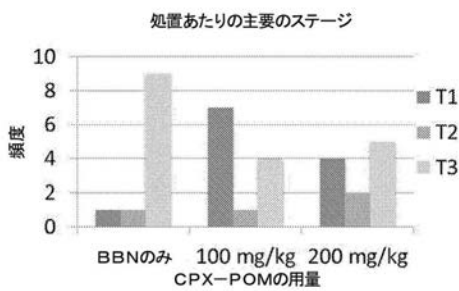
【図 25D】



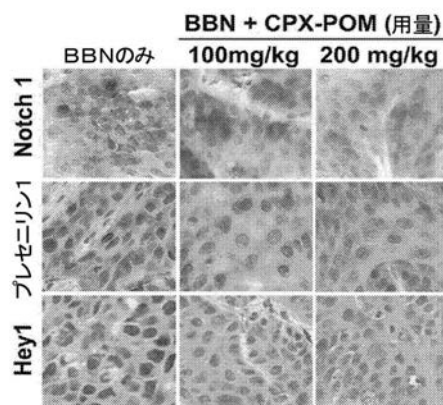
【図 26A】



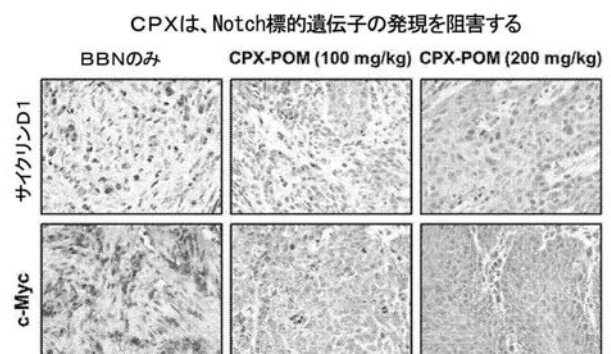
【図 26B】



【図 27A】



【図 27B】



【図 28】

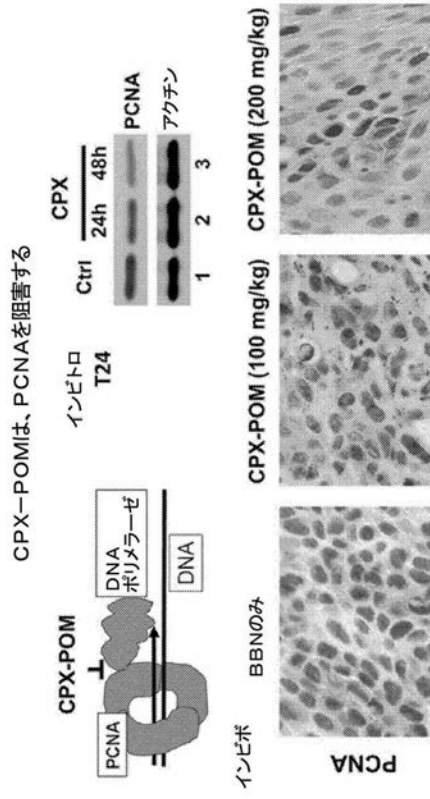


Fig. 28

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/59955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) A61K 31/4418; A61K 31/4412; A61P 35/00 (2015.01) CPC - A61K 31/4418; A61K 31/4412; C07D 213/64 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) CPC: A61K 31/4418; A61K 31/4412; C07D 213/64 IPC(8): A61K 31/4418; A61K 31/4412; A61P 35/00 (2015.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 514/350 (See Search Words Below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase: Full-text = AU BE BR CA CH CN DE DK EP ES FI FR GB IN JP KR SE TH TW US WO Google: Patents/Scholar: ciclopirox olamine bladder cancer prodrug phosphonate sodium salt invasive non-invasive muscle stem cells tgf-b stat3 DNA repair ribonucleotide reductase t-butyl phosphate sodium salt benzyl cyclohexyl methylpyridine		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2004/007676 A2 (COMBINATORX INC) 22 January 2004 (22.01.2004) pg 8, ln 9-29; pg 9, ln 25 to pg 10, ln 3; pg 12, ln 21 to pg 14, ln 7; pg 16, ln 5; pg 26, ln 11-21; pg 28, ln 19-20; pg 38, ln 21 to pg 39, ln 1	1:11;13;14;18;19;21;24;29;32 2-10;12;15-17;20;22;23;25-28;30;31;33-37
Y	US 2012/0142637 A1 (TANOL et.al.) 07 June 2012 (07.06.2012) para [0037]-[0044]; [0081]; figures 3, 3A, 3D, 4 and 6	2-10;12;25;35-37
Y	HO et al. 'Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem', Nat.Rev.Urol. 2012, Vol 9(10), pp 583-594. pg 2, para 5; pg 3, para 2; pg 4, para 1; pg 4, para 6 to pg 5, para 1; pg 9, para 6; pg 11, para 1; pg 12, para 2	15;17;22;23;26-28;30-31;33;34
Y	EDER et al. 'Expression of transforming growth factors beta-1, beta-2 and beta-3 in human bladder carcinomas', British Journal of Cancer, 1997, Vol 75(12), pp 1753-1760. Abstract	16
Y	HARSHMAN et al. 'Ribonucleotide reductase subunit M1 expression in resectable, muscle-invasive, urothelial cancer correlates with survival in younger patients', BJU International, 2010, Vol 106(11), pp 1805-1811. Abstract	20
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 application or patent 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 07 January 2016 (07.01.2016)		Date of mailing of the international search report 04 FEB 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100164563

弁理士 佐々木 貴英

(72)発明者 スコット ジェイ. ウィアー

アメリカ合衆国, カンザス 66220, レネックサ, サンセット サークル 9736

(72)発明者 シュリカント アナント

アメリカ合衆国, カンザス 66216, シャウニー, コットンウッド ストリート 5711

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 DA38 MA01 MA04 NA15 ZA66 ZB26