(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2005-512961
(P2005-512961A)
(43)公表日　平成17年5月12日(2005.5.12)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61K 31/20	A61K 31/20		2G045
A61K 31/203	A61K 31/203		4C084
A61K 31/593	A61K 31/593		4C085
A61K 39/00	A61K 39/00	Z	4C086
A61K 39/395	A61K 39/395	E	4C206

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 61 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-528538 (P2003-528538)
(86)(22)出願日　平成14年9月17日 (2002.9.17)
(85)翻訳文提出日　平成16年5月6日 (2004.5.6)
(86)国際出願番号　PCT/EP2002/010419
(87)国際公開番号　WO2003/024442
(87)国際公開日　平成15年3月27日 (2003.3.27)
(31)優先権主張番号　01121722.1
(32)優先日　平成13年9月18日 (2001.9.18)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

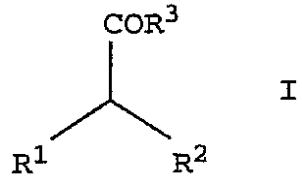
(71)出願人　504105221
ゲー・ツヴァイ・エム　キャンサー　ドラッグス　アー・ゲー
ドイツ国　Ｄ－６０５９６　フランクフルト・アム・マイン　パウロ・エールリヒ・シュトラーセ　４２－４４
(74)代理人　100077012
弁理士　岩谷　龍
(72)発明者　グロナー・ベルント
ドイツ国　Ｄ－６０３２２　フランクフルト・アム・マイン　フィハートシュトラーセ　４８ａ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト癌の組合せ療法的処置、及び腫瘍転移並びに微小残存病変処置のためのバルプロ酸及びその誘導体

(57)【要約】
本発明は、薬剤であるバルプロ酸及びその誘導体を、確立された治療原理との組合せでヒト癌の増感処置のために、ヒストン脱アセチル化酵素活性を有する酵素の阻害剤として使用することに関する。本発明はまた、これらの化合物を、腫瘍の転移及び微小残存病変の処置のために使用することにも関する。本発明は、ヒト癌の処置のために臨床で使用される物質の製造を包含する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
臨床的に確立されている抗癌治療薬との併用療法における処置効果のためにヒト癌細胞を感受性にする医薬の製造における式Ｉ：
【化１】



Ｉ

（式中、R^1及びR^2は、独立して直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の、一個又は数個のヘテロ原子を含んでいてもよく、また置換基を有していてもよい炭素数３～２５の脂肪族炭化水素鎖を表し、R^3は水酸基、ハロゲン、アルコキシ基又はアルキル化されていてもよいアミノ基を表わす。）で表わされる化合物又はその薬学上許容される塩の使用。
【請求項２】
R^1及びR^2が、独立して一個の二重結合又は三重結合を含んでいてもよく、直鎖状又は分枝状の炭素数３～２５の炭化水素鎖であることを特徴とする請求項１に記載の使用。
【請求項３】
該化合物が、ＶＰＡ、４－ｙｎ ＶＰＡ及びそれらの薬学上許容される塩からなる群より選択されることを特徴とする請求項１又は２に記載の使用。
【請求項４】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が、放射線照射処置、分化誘導薬剤による処置、化学療法剤による処置、細胞毒性薬剤による処置、ホルモン療法、免疫療法、抗血管新生療法及び／又は遺伝子治療を含むことを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の使用。
【請求項５】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が放射線照射を含むことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の使用。
【請求項６】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が分化誘導薬剤による処置を含むことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の使用。
【請求項７】
該分化誘導薬剤がビタミンＡを主成分とする薬剤、ビタミンD_3を主成分とする薬剤及びサイトカイン類からなる群より選択されることを特徴とする請求項６に記載の使用。
【請求項８】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が免疫療法を含むことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の使用。
【請求項９】
該免疫療法が抗体の使用を含むことを特徴とする請求項８に記載の使用。
【請求項１０】
該抗体が細胞毒性タンパク質又は薬剤成分等の官能基と結合していることを特徴とする請求項９に記載の使用。
【請求項１１】
該抗体が放射性同位元素と結合していることを特徴とする請求項９に記載の使用。
【請求項１２】
該免疫療法が腫瘍ワクチン接種を含むことを特徴とする請求項８に記載の使用。
【請求項１３】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が拮抗的に作用するホルモン試薬による処置を含むことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の使用。
【請求項１４】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が請求項４に記載した抗腫瘍療法の少なくとも２つの

方法を含むことを特徴とする請求項１～１３のいずれかに記載の使用。
【請求項１５】
該ヒト癌が、微小残存腫瘍症、腫瘍転移、皮膚癌、エストロゲン受容体依存性及び非依存性乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、結腸及び結腸直腸癌、膵臓癌、頭頚部癌、小細胞及び非小細胞肺癌及び血液細胞の癌からなる群より選択されることを特徴とする請求項１～１４のいずれかに記載の使用。
【請求項１６】
該式Ｉの増感剤がＨＤＡＣ活性を有する酵素の阻害剤であり、１種又は数種の他の抗癌処置との併用療法により相加的な治療効果をもたらすことを特徴とする請求項１～１５のいずれかに記載の使用。
【請求項１７】
該ヒストン脱アセチル化酵素活性を有する酵素が哺乳類、好ましくはヒトのヒストン脱アセチル化酵素であることを特徴とする請求項１６に記載の使用。
【請求項１８】
該ヒトのヒストン脱アセチル化酵素がＨＤＡＣ１～８及びＳＩＲ２タンパク質ファミリーの一員からなる群より選択されることを特徴とする請求項１６又は１７に記載の使用。
【請求項１９】
該式Ｉの増感剤がＨＤＡＣ群のサブセットのみを特異的に阻害することを特徴とする請求項１６～１８のいずれかに記載の使用。
【請求項２０】
該式Ｉの増感剤が細胞の分化誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～１９のいずれかに記載の使用。
【請求項２１】
該式Ｉの増感剤が形質転換細胞の分化誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～１９のいずれかに記載の使用。
【請求項２２】
該式Ｉの増感剤が形質転換細胞のアポトーシス誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～１９のいずれかに記載の使用。
【請求項２３】
ヒストン又はアセチル化によって機能が調節されているその他のタンパク質の高アセチル化の誘導が、ヒト癌の治療に好ましい効果を与えることを特徴とする請求項１～２２のいずれかに記載の使用。
【請求項２４】
該式Ｉの増感剤又はその薬学上許容される塩が第一の治療剤として投与され、また抗癌剤が第二の治療剤として投与され、該抗癌剤の１日当たりの投与量が、該抗癌剤の単独投与における１日当たりの投与量と比べて有意に低減されることを特徴とする請求項１～２３のいずれかに記載の使用。
【請求項２５】
請求項１～３に記載の式Ｉの化合物又はその薬学上許容される塩を、患者体内の癌細胞を感受性にするのに有効な量で癌患者に投与することを特徴とする、抗癌剤の投与量を低減させる方法。
【請求項２６】
患者体内の癌細胞を抗癌剤に対し感受性にするのに有効な量の請求項１～３に記載の式Ｉの化合物又はその薬学上許容される塩、及び治療的に有効な量の該抗癌剤とを投与することを特徴とする患者体内の癌を処置する方法。
【請求項２７】
請求項１～３に記載の式Ｉの化合物又はその薬学上許容される塩を、患者体内の癌細胞を抗癌剤に対し感受性にするのに有効な量で患者に投与することを特徴とする抗癌剤の治療的活性を高める方法。
【請求項２８】

第一の治療剤として請求項１に記載の式Ｉの化合物又はその薬学上許容される塩を、第二の治療剤として抗癌剤を含み、該抗癌剤が投与に適した形でその抗癌剤単独投与の際の投与量と比べ有意に低減された１日当りの投与量で提供されていることを特徴とする薬剤キット。

【請求項２９】

患者の体内で請求項１～３に記載の増感剤に代謝される物質の、ヒト癌の併用療法のための医薬の製造における使用。

【請求項３０】

バルプロ酸誘導体を提供し、

そのヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を測定し、

併用癌治療におけるその有効性を判定し、そして

もし、その物質がヒストン脱アセチル化酵素活性及び併用癌治療でそれぞれの単独処置よりも有意により高い有効性を有していればその物質を選択することを特徴とする、癌の併用療法に有用な増感剤を同定するための方法。

【請求項３１】

ヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を、

転写抑制アッセイ、

ヒストンＨ３又はヒストンＨ４のアセチル化を検出するウェスタン・ブロット法、又は

酵素による脱アセチル化アッセイ

により測定することを特徴とする請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

併用療法効果を細胞培養で、又はインビボ動物腫瘍モデルを用いて測定することを特徴とする請求項３０又は３１に記載の方法。

【請求項３３】

細胞周期分析、アポトーシス細胞の検出、生細胞数又は腫瘍サイズの測定、細胞分化マーカーの検出、細胞の代謝活性の測定及び／又は細胞膜の完全性測定を含む方法を含むことを特徴とする請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

ａ）実質的に同一の２つの細胞個体群を用意する工程、

ｂ）第一の個体群をＶＰＡ又はその誘導体と接触させる工程、

ｃ）第一の個体群を一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法による処置に付す工程、及び

ｄ）ＶＰＡ又はその誘導体と接触させなかった第二の個体群よりも、ＶＰＡ又はその誘導体と接触させ、一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法による処置に付された第一の個体群中で有意に高いレベルで発現した遺伝子あるいは遺伝子生成物を検出する工程（ここで工程ｂ）及びｃ）は、同時にあるいはどのような順番でも実施することができる。）

を含むことを特徴とする、バルプロ酸又はその誘導体と一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法との併用療法により調節される遺伝子を同定するための方法。

【請求項３５】

サブトラクティブハイブリダイゼーションあるいは複数のｃＤＮＡサンプル、発現配列タグ又はユニジーンコレクションのスクリーニングを用いることを特徴とする請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

核酸技術の使用を含むことを特徴とする請求項３４又は３５に記載の方法。

【請求項３７】

ハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ連鎖反応を用いることを特徴とする請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

分化的に制御されたタンパク質に対する特異抗体を検出に用いることを特徴とする請求項３４又は３５に記載の方法。

【請求項３９】

ヒトあるいは動物の体外で、請求項３４～３８のいずれかに記載の方法により同定される遺伝子の発現レベルの測定を含むことを特徴とする腫瘍診断方法。

【請求項４０】

インビトロで腫瘍又は腫瘍細胞が、ＶＰＡ又はその誘導体と一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法との併用療法に応答性であるかどうかを調べる工程を含むことを特徴とする、腫瘍又は腫瘍細胞を同定するための診断方法。

【請求項４１】

請求項３３～３７のいずれかの方法を含むことを特徴とする請求項４０に記載の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、薬剤であるバルプロ酸及びその誘導体の、従来の治療原理との組合せによるヒト癌の増感処置のための使用に関する。本発明はまた、腫瘍の転移及び微小残存病変の処置のためのそれらの化合物の使用に関する。本発明はヒト癌の処置用に臨床で用いられる医薬の製造をも包含する。

【背景技術】

【０００２】

クロマチンの局所的な再構成及びＤＮＡのヌクレオソームへのパッケージングにおける動的な変化は遺伝子発現制御における重要な工程であり、従って、正しい細胞機能、分化及び増殖に影響を与える。標的遺伝子の活性を決定する最も重要な機構の一つは、コアヒストン類のＮ末端尾部のアセチル化による翻訳後修飾及びそれに続くクロマチン構造の変化である(Davie, 1998, Curr Opin Genet Dev 8, 173-8; Kouzarides, 1999, Curr Opin Genet Dev 9,40-8; Strahl及びAllis, 2000, Nature 403, 41-4)。ヒストンＨ３及びＨ４中に多く見られるリジン残基のアセチル化は、ヒストン・アセチル化酵素（ＨＡＴ）活性を有する酵素群により仲介されている。逆に、ε－Ｎ－アセチルリジンのアセチル基は、ヒストン脱アセチル化酵素群（ＨＤＡＣｓ）によって除去される。ＨＡＴ及びＨＤＡＣの活性は、共に配列特異的転写因子及びそれらの補因子との複合で標的遺伝子に動員される。レチノイン酸受容体や甲状腺ホルモン受容体等のステロイド／レチノイド受容体スーパーファミリーの核内受容体は、しかるべきリガンドにより活性化されたその状態に応じ、ＨＡＴ及びＨＤＡＣ関連の補因子を動員する転写因子の典型的な例である。リガンドが存在しない場合には、これらの核内受容体はＮ－ＣｏＲやＳＭＲＴ等のコリプレッサーと相互作用する。該コリプレッサーはヒストン脱アセチル化酵素を含有する大きなタンパク質複合体を形成し、これにより転写を抑制する(Pazin及びKadonaga, 1997, Cell 89, 325-8)。リガンドが結合するとこのコリプレッサー複合体は解離し、ヒストン・アセチル化酵素活性を有する多タンパク質複合体に存在する例えばＳＲＣ－１やＣＢＰ等のコアクチベータータンパク質により置換される。このように、リガンドにより誘導される核内受容体の抑制から活性化への切替えは、コアクチベーターと拮抗的酵素活性を有するコリプレッサー複合体との交換を反映している(Glass及びRosenfeld, 2000, Genes Dev 14, 121-41)。興味深いことに、例えばＭａｄ－１，ＢＣＬ－６及びＥＴＯ４(Pazin及びKadonaga, 1997, Cell 89, 325-8; Huynh及びBardwell, 1998, Oncogene 17, 2473-84; Wang,J.et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95, 10860-5)等の多くの他の転写因子もＨＤＡＣ依存性転写抑制複合体を構築することが示されており、これが遺伝子制御の一般的な機構であることを示している。

【０００３】

哺乳類のヒストン脱アセチル化酵素は三つのサブクラスに分けられる(Cress及びSeto, 2000, J Cell Physiol 184,1-16; Gray及びEkstrom 2001, Exp Cell Res 262, 75-83)。クラスＩの酵素群は酵母のＲＰＤ３タンパク質の同族体であり、哺乳類のＨＤＡＣ１、ＨＤＡＣ２、ＨＤＡＣ３及びＨＤＡＣ８酵素など４２～５５ｋＤａの範囲の分子量を有する酵素が挙げられる。クラスＩＩのヒストン脱アセチル化酵素群であるＨＤＡＣ４、ＨＤＡ

Ｃ５、ＨＤＡＣ６及びＨＤＡＣ７は、より大きなタンパク質（約１２０～１３０ｋＤａ）であり、酵母のＨＤＡ１タンパク質と関連がある。最近、酵母のＳＩＲ２タンパク質及び推定されるいくつかの哺乳類の対応タンパク質と相同性を持つ第３のクラスのヒストン脱アセチル化酵素が同定された(Imai et al., 2000, Nature 403, 795-800)。目下のところ、これらのＨＤＡＣ群がどの程度まで、アイソザイム特異的な、又は重複的な作用をするのかまだはっきりしていない。したがって、これらの酵素それぞれの生物学的な役割を解明するには、遺伝子欠失解析を含む更なる検討が必要である。

【０００４】

ヒストン脱アセチル化酵素群は多くの異なるタンパク質に結合し、通常、大きな複合体として細胞内に存在している。それらの会合タンパク質の多くは、ＨＤＡＣ群をその基質又は転写リプレッサーに標的を定めさせるのに関係しているように思われる。例えば、Ｒｂ（Ｒｅｔｉｎｏｂｌａｓｔｏｍａ：網膜芽細胞腫）関連タンパク質ＲｂＡＰ４６及びＲｂＡＰ４８は、通常ヌクレオソーム基質の認識を担うＨＤＡＣ酵素複合体の欠くことのできない構成成分と考えられている(Taunton et al., 1996, Science 272, 408-11; Verreault et al., 1996, Cell 87, 95-104)。他方、コリプレッサーＮ－ＣｏＲ、ＳＭＲＴ及びＳｉｎ３は、ＨＤＡＣを転写因子に動員するのに必要な架橋因子である(Pazin及びKadonaga, 1997, Cell 88, 737-40)。ヒストン脱アセチル化酵素群はヌクレオソーム再構成及びデアセチラーゼ（ＮｕＲＤ）複合体（この複合体もまたＲｂＡＰ４６及びＲｂＡＰ４８，Ｍｉ－２及びＭＴＡ２を含む）の構成成分でもある(Zhang,Y.et al., 1999, Genes Dev 13, 1924-35)。ＨＤＡＣのアイソザイム及び相互作用を有するタンパク質が数多く存在するので、複合体組成が基質特異性を調節し、ＨＤＡＣ類を非ヒストンタンパク質までも標的とすることができるのであろうと考えられる。

【０００５】

細胞分化に必要な遺伝子の不適切な抑制は、数種のタイプの癌、特に急性白血病と関連付けられてきた。急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）患者においては、染色体の転座に由来するＲＡＲ融合タンパク質は、前骨髄球性白血病タンパク質（ＰＭＬ）か又は前骨髄球性亜鉛フィンガータンパク質（ＰＬＺＦ）を伴っている(de The, 1996, Faseb J 10, 955-60)。両融合タンパク質共、コリプレッサー複合体の構成成分と相互作用が可能である。しかしながら、高投与量のオールトランスレチノイン酸の添加により、ＰＭＬ－ＲＡＲからのみコリプレッサー複合体が除かれるが、ＰＬＺＦ－ＲＡＲからは除かれない(Grignani et al., 1998, Nature 391, 815-8; Guidez et al., 1998, Blood 91, 2634-42; He et al., 1998, Nat Genet 18, 126-35; Lin et al., 1998, Nature 391, 811-4)。これらの発見により、なぜＰＭＬ－ＲＡＲ　ＡＰＬ患者は通常レチノイン酸処置により完全寛解を達成するのにＰＬＺＦ－ＲＡＲ　ＡＰＬ患者はこの治療法に極めて応答不良なのかについて、一つの説明が与えられる。コリプレッサーが介する異常な抑制がＡＰＬの病因であろうとの仮説は、コリプレッサーが関連するＨＤＡＣ活性の阻害剤が、ＰＬＺＦ－ＲＡＲ融合タンパク質を含む細胞での分化抑制を克服する能力を有するとの発見によって裏付けられる。

【０００６】

急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ）の頻発形において、ｔ（８；２１）の転座によりＡＭＬ１／ＥＴＯ融合タンパク質が生じるが、この融合タンパク質では転写因子ＡＭＬ１の転写活性化ドメインがほとんどＥＴＯタンパク質全体によって置換されている。転座パートナーのＥＴＯは、Ｎ－ＣｏＲ，ＳＭＲＴ，ｍＳｉｎ３及びＨＤＡＣ群と相互作用することが報告されている(Lutterbach et al., 1998, Mol Cell Biol 18, 7176-84; Gelmetti et al., 1998, Mol Cell Biol 18, 7185-91; Wang et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95, 10860-5; Hildebrand et al., J Biol Chem 276, 9889-95)。こうして、該融合タンパク質はコアクチベーターの代わりに、ＨＤＡＣ活性を含むコリプレッサー複合体を動員する。最近の報告では、転座生成物ＡＭＬ１／ＥＴＯの発癌能及び転写抑制活性にはオリゴマー化が必要であることが示されている(Minucci et al., 2000, Mol Cell 5, 811-20)。非ホジキンリンパ腫において、転座及び点変異はしばしばＢ細胞の増殖調節に関連のある

ＢＣＬ－６癌遺伝子生成物の過剰発現をもたらす。ＢＣＬ－６は、コリプレッサーＮ－ＣｏＲ及びＳＭＲＴと相互作用することが示されている転写因子であるので、急性白血病におけるような異常な抑制が非ホジキンリンパ腫の病因にも関係している可能性がある(Huynh及びBardwell, 1998, Oncogene 17, 2473-84)。

【０００７】

核内ホルモン受容体における変異は、甲状腺ホルモン抵抗性（ＲＴＨ）症候群の原因としても考えられている。ＲＴＨ症候群は内分泌関連のヒト遺伝的疾患であり、T_3による負のフィードバック調節及び正の調節両方の崩壊が特徴である。甲状腺ホルモン受容体β（ＴＲβ）遺伝子における多様な優性ネガティブ変異が、コリプレッサーと関連ＨＤＡＣ群の構造的な結合をもたらす。これが、ＲＴＨの分子的基礎である(Yoh et al., 1997, Mol Endocrinol 11, 470-80; Yoh及びPrivalsky 2000, Mol Cell Endocrinol 159, 109-24)。

【０００８】

急性白血病及び非ホジキンリンパ腫の病因は細胞分化に必要な遺伝子の異常抑制と関連するので、この機構が固形癌を含む多くの別の型の癌にも当てはまるものと思われる。目下のところ、多くの腫瘍形成の分子的な機序はまだ大半が未解明である。転写抑制とヒストン脱アセチル化酵素群の動員との関連性からみて、この酵素活性の阻害剤は抑制を逆転させ、分化誘導遺伝子の再発現を誘導すると期待できる。したがって、ＨＤＡＣ阻害剤は、癌の分化療法及びある種の内分泌疾患の治療のための有望な候補薬剤としての可能性がある。

【０００９】

ＨＤＡＣ阻害の臨床的な恩恵とその再分化療法との関わりについては、目下いくつかの場所で研究されている。レチノイン酸治療及び化学療法後に多数回の再発を経験したあるＰＭＬ－ＲＡＲ患者が、ＨＤＡＣ阻害剤のフェニルブチレートによる治療を受け、白血病から完全寛解している(Warrell et al., 1998, J Natl Cancer Inst 90, 1621-4)。この最初の研究結果は、臨床的な応答を得るのに高投与量のＨＤＡＣ阻害剤を永続的に維持する必要はないことを示唆している。癌患者での第ＩＩ段階の試験がＨＤＡＣ阻害剤が治療において有効であるとの原則の証明となるであろう。

【００１０】

最近、抗てんかん薬のバルプロ酸（ＶＰＡ、２－プロピルペンタン酸）がヒストン脱アセチル化酵素群の阻害剤として作用することが発見された(PCT/EP01/07704; Phiel et al., 2001, J Biol Chem, 印刷中)。この活性は、ＶＰＡ分子を適切に修飾することにより、これまで治療的に利用されてきた抗てんかん活性と分けることができる(PCT/EP01/07704)。

【００１１】

バルプロ酸はそれぞれ異なった分子的作用機構に基づく多様な生物学的活性を有する。すなわち、

－ＶＰＡは抗てんかん薬である。

－ＶＰＡは催奇性である。抗てんかん薬として妊娠中に用いられた場合、ＶＰＡは生まれた子供の２～３％に先天性欠損（神経管閉鎖障害及びその他の奇形）を起す可能性がある。マウスにおいて、ＶＰＡは、適切に投与すると大多数のマウス胎児について催奇性である。

－ＶＰＡは核内ホルモン受容体（ＰＰＡＲδ）を活性化する。他のいくつかの転写因子もまた抑制解除されるが、それほど抑制解除されない因子（グルココルチコイド受容体、ＰＰＡＲα）もある。

－ＶＰＡは時に肝毒性を引き起こす。これは代謝され難い補酵素Ａとのエステルによる可能性がある。

【００１２】

ＶＰＡ誘導体を用いることにより、異なった活性が異なった分子的作用機構により媒介されていることをはっきりさせることができた。催奇性と抗てんかん活性は、優先的に催

奇性の、あるいは優先的に抗てんかん性の化合物が単離できたからことから、別々の作用形態に因っている。(Nau et al., 1991, Pharmacol. Toxicol. 69, 310-321)。ＰＰＡＲδの活性化が厳密に催奇性と相関していることが見出された(Lampen et al., 1999, Toxicol. Appl. Pharmacol. 160, 238-249)が、このことは、ＰＰＡＲδの活性化と催奇性とが共にＶＰＡの同じ分子的活性を必要としていることを示唆している。また、Ｌａｍｐｅｎら（１９９９年）により示唆され、分化マーカーの解析により実証された(Werling et al., 2001, Mol. Pharmacol. 59, 1269-1276)ように、Ｆ９細胞の分化はＰＰＡＲδ活性化及び催奇性と厳密に相関している。ＰＰＡＲδの活性化はＶＰＡ及びその誘導体のＨＤＡＣ阻害活性によりもたらされることが示された(PCT/EP01/07704)。さらに、ＨＤＡＣ阻害剤として確証されているＴＳＡはＰＰＡＲδを活性化し、ＶＰＡと同じ型のＦ９細胞分化を誘導することが示された。これらの結果から、我々は、ＶＰＡあるいはＶＰＡ誘導体のＰＰＡＲδの活性化のみならずＦ９細胞の分化誘導及び催奇性も、ＨＤＡＣの阻害により引き起こされている可能性が高いと結論する。

【００１３】

抗てんかん及び鎮静活性は異なる構造活性相関に従うので、明らかにＨＤＡＣの阻害とは区別されるＶＰＡの主要な活性に因るものである。肝臓毒性の機構はほとんど分かっておらず、それがＶＰＡ－ＣｏＡエステルの形成と関係があるのかどうか不明である。しかしながら、ＨＤＡＣの阻害には、ＣｏＡエステルの形成は必要ないと思われる。

【００１４】

今日、患者を１種以上の抗腫瘍治療試薬の組合せで処置する腫瘍療法が知られている。例としては、放射線治療と化学療法及び／又は細胞毒性試薬との併用及び、より最近では放射線治療と腫瘍細胞に特異的な治療抗体等の免疫学的療法との併用などがある。しかしながら、個々の治療単独よりも効果的な組合せを見つけるべく、個々の処置法を互いに組合せる可能性はあるが、そのためには広範な前臨床及び臨床試験が必要である。どの組合せが相加的、又はさらに相乗的な効果を示すかを予想することは不可能である。治療効果を高めるという目的に加えて、もう一つの目的は、得られた組合せにおいて、個々の成分のより高い投与量が原因で起こる望ましくない、あるいは有害な副作用を減らすために、個々の成分の投与量を低減させる可能性を追求することである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１５】

本発明の目的は、ヒト癌の治療に有用な方法及び／又は薬剤を提供することである。この目的のため、驚くべきことに、ＶＰＡが、それぞれ全く異なった作用機序に基づく極めて多様な他の抗腫瘍療法との併用で使用された場合に、おそらく多くの異なった型のヒト癌の治療では予期し得なかった有益な効果を持つことが今や見出された。したがって、ＶＰＡを多くの抗腫瘍剤の組合せにおける一成分として治療に使える可能性は、特定の分子機構を有する薬剤との組合せに限られるものではないと思われる。このことは、実際ＶＰＡを現存する抗腫瘍アプローチの大半と組合せられる薬剤とするであろう。ここでＶＰＡの正確な作用機序は完全には解明されていないが、その分化誘導能がそのような広範な抗腫瘍薬剤の活性に対して腫瘍細胞を感受性にする基礎となる可能性がある。このＶＰＡの驚くほど幅広い潜在能力は、ＶＰＡの、ＨＤＡＣ活性を有する酵素の特定の組合せに対する阻害剤としての活性に基づいているものと考えられる。

【課題を解決するための手段】

【００１６】

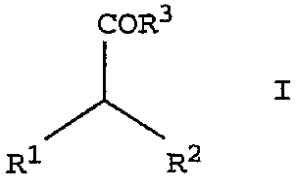
したがって、本発明の一つの特徴は、ＶＰＡ及びその誘導体を種々のヒト癌の組合せ処置において使用することである。そのような組合せ処置の抗腫瘍活性はそれぞれの構成成分を単独で利用した場合と比べ増強させることができるので、必要に応じ、個々の薬剤に関連した望ましくない副作用を低減させるためにそのような組合せ処置での個々の成分の投与量を減らしてもよい。本発明はまた、ヒト癌の組合せ治療用医薬品の製造のための、ＶＰＡ又はその誘導体の使用にも関する。

【００１７】
ここで用いられているように、「組合せ処置」という術語は、１人の人を、少なくとも２つの異なる治療薬で処置することを指す。本発明によれば、各人は第一の治療薬の構成要素となる式Ｉの化合物で処置される。第二の治療薬は、例えば放射線療法又は化学療法剤の投与など臨床的に確立されたいかなる抗癌療法でもよい。組合せ処置は、第三の、あるいはさらにより多くの治療薬を含んでいてもよい。本発明によれば、式Ｉの化合物及び第二の治療薬や任意のさらなる治療薬は同時に投与することができ、又は式Ｉの化合物を第二の治療剤の前又は後に投与することもできる。式Ｉの化合物を第二の治療薬の前に投与するか、又は同時に投与するのが好ましい。投与（同時又は異なる時点に）は前記の表示で決められたとおり全身的に又は局所的に行なえる。さらに、第二の治療薬が放射線療法である場合には、式Ｉの化合物は癌患者に、癌の影響を治療ないし軽減するために放射線治療の前又は後に投与することができる。第一及び第二の治療薬が異なる時点で適用される場合、二つの処置間の時間は１０日未満である。

【００１８】
ここに、「組合せ処置」、「併用療法」及び「併用処置」等の術語は交換可能なものとして用いられている。

【００１９】
ＶＰＡ誘導体は、式Ｉ：

【化２】



Ｉ

（式中、R^1及びR^2は独立して直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の、任意に一個ないし数個のヘテロ原子を含み置換基を有していてもよい炭素数３～２５の炭化水素鎖を表わし、R^3は水酸基、ハロゲン、アルコキシ基又は任意にアルキル化されたアミノ基を表わす。）で表わされるα－炭素で分岐したカルボン酸あるいはカルボン酸誘導体類である。

【００２０】
R^1及びR^2が異なる残基である場合、キラル化合物を生じる。通常、一方の立体異性体が他方より強い催奇性を有し(Nau et al., 1991, Pharmacol. Toxicol.69, 310-321)。そして、より催奇性の異性体がＰＰＡＲδをより活性化する(Lampen et al., 1999)ので、この異性体がＨＤＡＣ群をより強く阻害すると期待される(PCT/EP01/07704)。本発明はそれぞれの化合物のラセミ混合物、特にはより活性の強い異性体を包含する。

【００２１】
炭化水素鎖R^1及びR^2は、その炭化水素鎖中の炭素原子と置換する一個ないし数個のヘテロ原子（例えばＯ、Ｎ、Ｓなど）を含んでいてもよい。このことは、それらのヘテロ原子が対応する炭素原子と同じタイプの混成を取っている場合には、ヘテロ原子基も炭素基の構造と極めて類似した構造をとるであろうという事実による。

【００２２】
R^1及びR^2は置換基を有していてもよい。可能な置換基としては、アリール基及びヘテロ環状基のみならず水酸基、アミノ基、カルボキシル基及びアルコキシ基などが挙げられる。

【００２３】
R^1及びR^2は、好ましくはそれぞれ独立して３～１０個の、より好ましくは４～１０個又は５～１０個の炭素原子を含む。またR^1及びR^2は独立して飽和であるか、あるいは一つの二重結合又は三重結合を含むことが好ましい。特に、好ましくは側鎖の一つ（R^1）は、２位及び３位にsp^1混成の炭素原子、あるいは類似の構造を生じるヘテロ原子を含んでいてもよい。この側鎖は３個の炭素原子あるいはヘテロ原子を含むべきであるが、よ

り長い鎖もＨＤＡＣ阻害性分子を生成する可能性がある。また、R^2に芳香環又はヘテロ原子が含まれるとＨＤＡＣ阻害活性を有する分子を生成すると考えられる。なぜなら、ＨＤＡＣタンパク質の触媒部位は、明らかに多様な結合分子を受け入れるからである。催奇性のＶＰＡ誘導体がＨＤＡＣ阻害剤であるとの観察から、以前に好ましい抗てんかん薬とは考えられていなかった化合物もＨＤＡＣ阻害剤として考えられる(PTC/EP01/07704)。特に、ただしこれらに限られるというのではないが、R^1としてプロピニル残基を、R^2として７以上の炭素原子からなる残基を持つ化合物が考えられる(Lampen et al., 1999)。

【００２４】

好ましくは、“COR^3”基はカルボキシル基である。また、可能性のあるＨＤＡＣ阻害活性を有する化合物を生成するためには、カルボキシル基の誘導体化も考慮されなければならない。そのような誘導体としてはハライド類（例えば、クロライド類）、エステル類又はアミド類であってもよい。R^3がアルコキシである場合には、該アルコキシ基は１～２５、好ましくは１～１０の炭素原子を含む。R^3がモノ－又はジ－アルキルアミノ基である場合には、該アルキル置換基は１～２５、好ましくは１～１０の炭素原子を含む。

【００２５】

本発明によれば、式Ｉの化合物の薬学上許容される塩もまた、癌の組合せ治療に用いることができる。本発明によれば、人体内において式Ｉで定義される化合物に代謝される物質、又は例えばエステル加水分解により式Ｉで定義される化合物の放出を導く物質もまた使用することができる。

【００２６】

ある特定の態様において、本発明は式Ｉで表わされるα－炭素で分岐したカルボン酸又はその薬学上許容される塩を、ヒストン脱アセチル化酵素活性を有する酵素の阻害剤として用いること及びその化合物を癌の組合せ治療において使用することに関する。なお、式中、R^1は直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の、炭素数３～２５の脂肪族炭化水素鎖を、R^2は独立して直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の、炭素数３～２５の脂肪族炭化水素鎖を表し、ただし、$-CH_2-CH=CH_2$、$-CH_2-C\equiv CH$あるいは$-CH_2-CH_2-CH_3$ではなく、R^1及びR^2は水酸基、アミノ基、カルボキシル基、アルコキシ基、アリール基及び／又はヘテロ環基で置換されていてもよく、R^3は水酸基を表わす。

【００２７】

さらにもうひとつの態様において、本発明は、式Ｉで表わされるα－炭素で分岐したカルボン酸又はその薬学上許容される塩を、癌の組合せ療法用に使用することに関する。なお、式中、R^1は直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の、炭素数３～２５の脂肪族炭化水素鎖を、そしてR^2は独立して直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の、炭素数３～２５の脂肪族炭化水素鎖を表し、R^1あるいはR^2は炭化水素鎖中の炭素原子と置換する一個あるいはいくつかのヘテロ原子（例えばＯ、Ｎ、Ｓなど）を含み、R^1及びR^2は任意に水酸基、アミノ基、カルボキシル基、アルコキシ基、アリール基及び／又はヘテロ環基で置換されていてもよく、R^3は水酸基を表わす。

【００２８】

本発明のさらにもうひとつの態様において、R^1及びR^2はエステル基（－ＣＯ－Ｏ－）を含まず、R^1及びR^2はＯ、Ｎ、又はＳ等のヘテロ原子を含まない炭化水素鎖であってもよい。

【００２９】

本発明に従って最も好ましく用いられる化合物は、ＶＰＡ及び／又は４－ｙｎ ＶＰＡである。

【００３０】

態様のひとつにおいて、式Ｉの化合物は、臨床的に確立された抗癌治療薬との併用療法において、治療効果を高める為にヒト癌細胞を感受性するための医薬の製造用に用いられる。抗癌剤の該増感剤と接触させていない癌細胞と比べて、与えられた抗癌剤がより低投与量で確かな抗癌効果を達成することが要求される場合、癌細胞は増感剤と接触させることにより感受性となる。抗癌効果としては、腫瘍の大きさの減少、増殖抑制及び／又は細

胞毒性でもよい。抗腫瘍効果の測定方法は当業者にとって公知である。例えば、５－ＦＵをＶＰＡと併用すると、直腸癌細胞の細胞量の一定の低下を達成するのに必要な５－ＦＵ濃度がより低濃度で済むことが実施例１で示されている。

【００３１】

本発明によれば、ＶＰＡ又はその誘導体はヒト癌の組合せ処置用、あるいはヒト癌の組合せ処置のための医薬の製造に用いられる。組合せ処置は抗腫瘍療法の公知の方法を含んでいてもよい。

【００３２】

固形腫瘍として現れる癌に対する最も効果的な治療方法は、その腫瘍塊を外科的に取り除くことである。完全に切除可能な初期腫瘍に対しては、薬剤療法が用いられるのはまれである。しかしながら、より後期においては、腫瘍は通常かなりの大きさに成長しており、及び／又はからだ中にかなり広がっていて、もはや切除は選択すべき適切な治療手段ではない。これらの場合には、切除の前に腫瘍を小さくするためや腫瘍切除後にからだの中に残っている癌細胞（微小残存病変）を除去するために薬剤療法が用いられる。

【００３３】

今日、種々のクラスの抗癌薬剤療法があり、化学療法剤及び細胞毒性試薬、分化誘導試薬（例えば、レチノイン酸、ビタミンＤ、サイトカンなど）、ホルモン療法、免疫学的アプローチ、及びさらに最近では、抗血管形成アプローチの開発などが挙げられる。これらの方法は、ＶＰＡ又はその誘導体による処置との組合せで、第二の治療剤として用いてもよく、以下により詳しく説明する。

【００３４】

化学療法剤及び細胞毒性剤

このような薬剤は、通常標準的な外科的手法に加え、活発に増殖及び分裂しているいかなる細胞にも損傷を与えることを目的として使用される。大抵の場合、正常細胞よりも癌細胞の方に増殖及び分裂過程にある細胞が多いので、化学療法及び細胞毒性は正常細胞より癌細胞により重大な影響を与える。化学療法／細胞毒性薬剤は明確に分類することができ、

－　アルキル化剤
－　細胞毒性抗生物質
－　代謝拮抗剤
－　ビンカアルカロイド及びエトポシド
－　その他

などが挙げられる。

【００３５】

アルキル化剤は、ＤＮＡ産生のためのヌクレオチド前駆体上の化学物質等の求核残基と反応する。アルキル化剤は、これらのヌクレオチド類をアルキル化してそれらがＤＮＡに集合するのを妨げることにより、細胞分裂過程に影響を与える。

細胞毒性抗生物質は、直接的にＤＮＡ又はＲＮＡ合成を阻害することにより作用し、全細胞周期を通して有効である。

代謝拮抗剤は、細胞分裂過程に関連する細胞の酵素あるいは天然の代謝産物と相互作用し、かくして細胞分裂を混乱させる。

【００３６】

植物アルカロイド及びエトポサイドは植物由来の作用物質である。それらは細胞分裂に必須の細胞成分の集合を妨げることにより細胞複製を阻害する（例えば、ビンカ・アルカロイド；エトポシド）。

“その他”に分類された化合物群には、主としてタキサン類（例えば、パクリタキセル、タキソール、ドセタキセル、タキソテールなど）及び金属錯体（例えば、シスプラチナム）が含まれる。

【００３７】

ホルモン療法

ある種の癌、例えば乳癌あるいは前立腺癌等の進行は、からだの中のホルモンの過剰あるいは不在に依存している。これらの場合、これらの器官での腫瘍増殖を抑制すべく体内のホルモンレベルを上昇又は下降させるため、ホルモン療法が用いられる。

ホルモン療法の区分には５種類の主要な製品がある。すなわち、

－　プロゲストーゲン類
－　抗アンドロゲン類
－　抗エストロゲン類
－　黄体形成ホルモン放出ホルモン（ＬＨＲＨ）類似体
－　アロマターゼ阻害剤

である。プロゲストーゲン類は子宮内膜癌の治療において使用される。なぜなら、これらの癌はプロゲストーゲンに対抗されていない高レベルのエストロゲンに晒された女性に発生するからである。

【００３８】

抗アンドロゲン類は、主にホルモン依存性である前立腺癌の治療に用いられる。抗アンドロゲン類はテストステロンのレベルを下げ、腫瘍の増殖を抑制するために使用される。

【００３９】

乳癌のホルモン治療は、腫瘍性乳房細胞中のエストロゲン受容体のエストロゲン依存性活性化のレベルを下げることを含む。抗エストロゲン類は、エストロゲン受容体に結合することによって作用し、コアクチベーターの動員を妨げ、かくしてエストロゲンのシグナルを抑制する。

【００４０】

前立腺癌の処置において用いられるＬＨＲＨ類似体は、テストステロンのレベルを下げる働きをし、それにより腫瘍の増殖を抑える。

【００４１】

最後に、アロマターゼ阻害剤は、ホルモン合成に必要な酵素を阻害することにより作用する。閉経後の女性においては、エストロゲンの主な供給源はアロマターゼによるアンドロステンジオンのエストロンへの変換によるものである。

【００４２】

革新的療法

１９９０年代までは、細胞毒及びホルモン療法が癌の薬剤処置の基礎であった。しかしながら、最近の進歩により革新的療法の区分に

－　遺伝子療法
－　免疫療法
－　リンパ管及び血管の抗血管形成的アプローチ

を含む追加のカテゴリーが導入された。

【００４３】

今日までのところ、遺伝子療法として癌患者に対し臨床的使用が認められているものはないが、多くの形態の遺伝子治療が前臨床あるいは初期臨床治験で行われている。

【００４４】

体は癌に応答し、そうした応答が体が癌細胞に対処するのをどのように助けるかについて鋭意研究されてきている。その結果出された抗腫瘍アプローチとしては、抗体による免疫療法及び腫瘍ワクチン接種アプローチで使用される試薬などが挙げられる。この療法分類における主な薬剤は、単独でのあるいは例えば毒素類又は癌細胞に対する化学療法剤／細胞毒等を伴う抗体である。

【００４５】

最後だが大事な点は、腫瘍血管形成阻害（抗血管形成）に基づく治療的抗腫瘍アプローチが現在開発中であることである。この構想の目的は、腫瘍を、新たに形成される腫瘍脈管系により与えられる栄養分及び酸素の供給から切り離すことである。

【００４６】

式Ｉの化合物又はその誘導体は一般にＨＤＡＣ阻害活性を示し、しばしばかつ意外にも

、対象とする機構は互いに全く異なる一つ又はいくつかの他の抗癌処置との組合せ治療において、相乗的な治療効果を発揮する。

【００４７】

式Ｉの化合物は普通ヒト癌細胞を感受性にすることができる。したがって、ここでは式Ｉの化合物は式Ｉの増感剤とも呼べる。その結果、併用療法で抗腫瘍効果を達成するのに要する第二の治療剤の投与量は、式Ｉの増感剤と併用した場合、かなり減量することが可能である。第二の治療剤の投与量は、臨床的癌治療において通常投与される投与量と比較して少なくとも２５％少なくできることが好ましいが、投与量を少なくとも５０％下げられることがより一層好ましい。“臨床的抗癌療法において通常投与される投与量”とは、ここでは患者の１平方メートル（m^2）あるいはｋｇ体重（ＢＷ）当たり、１日当たりの抗癌剤の量と定義される（参考文献及び服用の詳細については、S.Seeber及びJ. Schuette, Therapiekonzepte Onkologie, Springer-Verlag, 2. Auflage 1998, ISBN 3-540-58586-9もまた参照のこと）。

【００４８】

一般に用いられる抗癌剤と通常投与される１日当たりの投与量としては以下のものが挙げられるが、これらに限られるわけではない。すなわち、

代謝拮抗剤	
１．メトトレキセート	２０～４０　ｍｇ／m^2　静脈内注射
	４～６　ｍｇ／m^2　経口投与
	１２０００　ｍｇ／m^2　高投与量療法
２．６－メルカプトプリン	１００　ｍｇ／m^2
３．６－チオグアニン	（１～２）×８０　ｍｇ／m^2　経口投与
４．ペントスタチン	４　ｍｇ／m^2　静脈内注射
５．フルダラビンフォスフェート	２５　ｍｇ／m^2　静脈内注射
６．クラドリビン	０．１４　ｍｇ／ｋｇ体重　静脈内注射
７．５－フルオロウラシル	５００～２６００　ｍｇ／m^2　静脈内注射
８．カペシタビン	１２５０　ｍｇ／m^2　経口投与
９．シタラビン	２００　ｍｇ／m^2　静脈内注射
	３０００　ｍｇ／m^2　静脈内注射　高投与量療法
１０．ゲムシタビン	８００～１２５０　ｍｇ／m^2　静脈内注射
１１．ヒドロキシ尿素	８００～４０００　ｍｇ／m^2　経口投与
抗生物質	
１２．アクチノマイシン　Ｄ	０．６　ｍｇ／m^2　静脈内注射
１３．ダウノルビシン	４５～６０　ｍｇ／m^2　静脈内注射
１４．ドキソルビシン	４５～６０　ｍｇ／m^2　静脈内注射
１５．エピルビシン	６０～８０　ｍｇ／m^2　静脈内注射
１６．イダルビシン	１０～１２　ｍｇ／m^2　静脈内注射
	３５～５０　ｍｇ／m^2　経口投与
１７．ミトキサントロン	１０～１２　ｍｇ／m^2　静脈内注射
１８．ブレオマイシン	１０～１５　ｍｇ／m^2　静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射
１９．マイトマイシンＣ	１０～２０　ｍｇ／m^2　静脈内注射
２０．イリノテカン（ＣＰＴ－１１）	３５０　ｍｇ／m^2　静脈内注射
２１．トポテカン	１．５　ｍｇ／m^2　静脈内注射
アルキル化剤	
２２．ムスタルゲン	６　ｍｇ／m^2　静脈内注射
２３．エストラムスチンフォスフェート	１５０～２００　ｍｇ／m^2　静脈内注射
	４８０～５５０　ｍｇ／m^2　経口投与
２４．メルファラン	８～１０　ｍｇ／m^2　静脈内注射
	１５　ｍｇ／m^2　静脈内注射

２５．クロラムブシル　３～６　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２６．プレドニムスチン　４０～１００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
２７．シクロフォスファミド　７５０～１２００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
５０～１００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
２８．イフォスファミド　１５００～２０００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２９．トロフォスファミド　２５～２００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３０．ブスルファン　２～６　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３１．トレオスルファン　５０００～８０００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
７５０～１５００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３２．チオテパ　１２～１６　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３３．カルムスチン（ＢＣＮＵ）　１００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３４．ロムスチン（ＣＣＮＵ）　１００～１３０　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３５．ニムスチン（ＡＣＮＵ）　９０～１００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３６．ダカルバジン（ＤＴＩＣ）　１００～３７５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３７．プロカルバジン　１００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３８．シスプラチン　２０～１２０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３９．カルボプラチン　３００～４００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
抗核分裂剤
４０．ビンクリスチン　１．５～２　ｍｇ静脈内注射
４１．ビンブラスチン　４～８　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
４２．ビンデシン　２～３　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
４３．エトポシド（ＶＰ１６）　１００～２００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１００　ｍｇ経口投与
４４．テニポシド（ＶＭ２６）　２０～３０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
４５．パクリタキセル（タキソール）　１７５～２５０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
４６．ドセタキセル（タキソテール）　１００～１５０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
ホルモン類、サイトカイン類及びビタミン類
４７．インターフェロン－α　（２～１０）×１０^6　ＩＵ／ｍ^2
４８．プレドニソン　４０～１００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
４９．デキサメタゾン　８～２４　ｍｇ　経口投与
５０．Ｇ－ＣＳＦ　５～２０　μｇ／ｋｇ体重、皮下注射
５１．オールトランスレチノイン酸　４５　ｍｇ／ｍ^2
５２．インターロイキン－２　１８×１０^6　ＩＵ／ｍ^2
５３．ＧＭ－ＣＳＦ　２５０　ｍｇ／ｍ^2
５４．エリスロポイエチン　１５０ＩＵ／ｋｇ　tiw
その他
５５．放射線　２０～６０グレイ

【００４９】

上記の第二の治療用抗癌剤の１日当たりの投与量は、式Ｉの増感剤との組合せ処置においては、それらが単独又は他の治療成分と一緒に投与される際の通常の投与量と比べてかなり低減させることができる。以下の１日投与量は本発明に係る組合せ処置において使用され得るものである。すなわち、

代謝拮抗剤
１．メトトレキセート　１０～３０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２～４　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
６０００～８０００　ｍｇ／ｍ^2　高投与量療法
２．６－メルカプトプリン　５０～７５　ｍｇ／ｍ^2
３．６－チオグアニン　（１～２）×（４０～６０）　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
４．ペントスタチン　２～３　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
５．フルダラビンフォスフェート　１２～１８　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射

６．クラドリビン　０．７～１１　ｍｇ／ｋｇ体重　静脈内注射
７．５－フルオロウラシル　２５０～１８００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
８．カペシタビン　７００～１０００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
９．シタラビン　１００～１５０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１５００～２２００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射　高投与量療法
１０．ゲムシタビン　４００～８２５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１１．ヒドロキシ尿素　４００～３０００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
抗生物質
１２．アクチノマイシンＤ　０．３～０．４５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１３．ダウノルビシン　２０～４５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１４．ドキソルビシン　２０～４５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１５．エピルビシン　３０～６０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１６．イダルビシン　５～９　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１８～３８　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
１７．ミトキサントロン　５～９　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
１８．ブレオマイシン　５～１２　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射
１９．マイトマイシンＣ　５～１５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２０．イリノテカン（ＣＰＴ－１１）　１７５～２９０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２１．トポテカン　０．７～１．２　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
アルキル化剤
２２．ムスタルゲン　３～４．５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２３．エストラムスチンフォスフェート　７５～１５０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２４０～４００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
２４．メルファラン　４～７．５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
７～１２　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２５．クロラムブシル　１．５～４．５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２６．プレドニムスチン　２０～７５　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
２７．シクロフォスファミド　３７５～９００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２５～７５　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
２８．イフォスファミド　７５０～１５００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
２９．トロフォスファミド　１２～１５０　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３０．ブスルファン　１～４．５　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３１．トレオスルファン　２５００～６０００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３７５～１２００　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３２．チオテパ　６～１２　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３３．カルムスチン（ＢＣＮＵ）　５０～７５　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３４．ロムスチン（ＣＣＮＵ）　５０～９５　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３５．ニムスチン（ＡＣＮＵ）　４５～７５０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３６．ダカルバジン（ＤＴＩＣ）　５０～２８０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３７．プロカルバジン　５０～７５　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
３８．シスプラチン　１０～９０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
３９．カルボプラチン　１５０～３００　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
抗核分裂剤
４０．ビンクリスチン　０．７５～１．５　ｍｇ　静脈内注射
４１．ビンブラスチン　２～６　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
４２．ビンデシン　１～２．２　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
４３．エトポシド（ＶＰ１６）　５０～１５０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
５０～７５　ｍｇ経口投与

４４．テニポシド（ＶＭ２６）１０～２２　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
４５．パクリタキセル（タキソール）　８０～１８０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
４６．ドセタキセル（タキソテール）　５０～１２０　ｍｇ／ｍ^2　静脈内注射
ホルモン類、サイトカイン類及びビタミン類
４７．インターフェロン－α　（１～５）×１０^6　ＩＵ／ｍ^2
４８．プレドニソン　２０～７５　ｍｇ／ｍ^2　経口投与
４９．デキサメタゾン　４～１８　ｍｇ　経口投与
５０．Ｇ－ＣＳＦ　２．５～１５　μｇ／ｋｇ体重、皮下注射
５１．オールトランスレチノイン酸　２２～３５　ｍｇ／ｍ^2
５２．インターロイキン－２　（９～１４）×１０^6　ＩＵ／ｍ^2
５３．ＧＭ－ＣＳＦ　１２５～１８０　ｍｇ／ｍ^2
５４．エリスロポイエチン　７５～１２０ＩＵ／ｋｇ　tiw
その他
５５．放射線　１０～４５グレイ

【００５０】
本発明のさらなる態様は、第一の治療剤として式Ｉの化合物、及び第二の治療剤として抗癌剤を含む薬剤キットであって、ここで該抗癌剤は、投与に適した形態で、臨床抗癌療法において通常投与される投与量と比べ少なくとも２５％低減させた投与量で供給されている。好ましくは、該投与量は少なくとも５０％減量されるのがよい。該キットの成分は、一個の容器に入れられていてもよいが、またそれぞれの成分を別々に投与するのに適した形態でパッケージされていてもよい。

【００５１】
本発明のさらにもう一つの態様は、患者体内の癌細胞を感受性にするのに効果的な量の式Ｉの化合物及びその薬学上許容される塩を癌患者に投与することを特徴とする、抗癌剤の投与量を低減させる方法であり、ここで式Ｉは上記で定義されたのと同じ意味を有する。

【００５２】
本発明はさらに、患者体内の癌細胞を抗癌剤に対し感受性にするのに効果的な量の式Ｉの化合物及びその薬学上許容される塩、及び治療的に有効な量の抗癌剤を癌患者に投与することを特徴とする、患者体内の癌を治療する方法に関し、ここで式Ｉは上記で定義されたのと同じ意味を有する。

【００５３】
本発明はさらに、患者体内の癌細胞を抗癌剤に対し感受性にするのに効果的な量の式Ｉの化合物及びその薬学上許容される塩を患者に投与することを特徴とする、該抗癌剤の治療活性を高める方法に関し、ここで式Ｉは上記で定義されたのと同じ意味を有する。

【００５４】
式Ｉの化合物は、酵母のＳＩＲ２タンパク質とその推定される哺乳類の同類のタンパク質と相同性を有する最近同定された新しい部類のヒストン脱アセチル化酵素群(Imai et al., 2000, Nature 403, 795-800)だけでなく、哺乳類（インビトロ検定及び動物モデル系においてそれらの細胞株を使用するために）及び特にヒト（インビボ及びインビトロ）のヒストン脱アセチル化酵素ＨＤＡＣ１～３及び８（クラスＩ）、ＨＤＡＣ４～７（クラスＩＩ）を阻害するのに、また他の癌療法との併用での癌治療に使用するのに有用であろう。一態様では、式Ｉの化合物はＨＤＡＣ群の一部のみを阻害する。

【００５５】
本発明のさらにもう一つの態様は、式Ｉの化合物を、ヒストンの高アセチル化の誘導が好ましい効果を持つような疾患、例えば患者の腫瘍細胞の分化及び／又はアポトーシスを生じ患者の状態の臨床的な改善につながるような疾患の組合せ処置のための医薬の製造に用いることである。そのような疾患の例としては皮膚癌、エストロゲン受容体－依存性及び非依存性乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、大腸癌及び直腸癌、膵臓癌、頭頚部癌、小細胞及び非小細胞上皮性肺癌などがある。高アセチル化の誘導は、甲状腺抵抗（耐性）症

候群等のヒストン脱アセチル化酵素活性の異常動員に基づく疾患における不適切な遺伝子発現を元に戻すことでも有益であろう。本発明の組合せ処置は、微小残存腫瘍症あるいは腫瘍転移の処置に特に有用である。

【００５６】

本発明はまた、患者体内で式Ｉの化合物に代謝される化合物の使用を包含する。本発明中に記載された態様は、それらの化合物にも同様に適用される。

【００５７】

該化合物類とその塩は、少なくとも一つのそれらの化合物を単独又は薬学上許容される担体、賦形剤及び／又は希釈剤との混合物を含む医薬組成物（例えば、粉末、顆粒、錠剤、丸薬、カプセル、注射液、溶液、発泡体、浣腸など）として製剤化されてもよい。該医薬組成物は常法に従って製剤化できる。どの特定の患者についても、用いる特定化合物の活性、年齢、体重、総体的な健康状態、性別、食事、投与時刻、投与経路、排出速度、薬剤の組合せ及び治療が行われている特定疾患の重度などを含む種々の要因により、特定の投与量レベルが採用される。式Ｉの増感剤は、例えば１日当たり約１０ｍｇ／ｋｇ体重～１００ｍｇ／ｋｇ体重の範囲の適量を、経口的にあるいは静脈内投与で投与されることが好ましい。投与量レベルは、０．０５ｍＭ～３ｍＭ、好ましくは約０．４ｍＭ～１．２ｍＭの血清レベルが達成されている限り、特に制限されない。

【００５８】

本発明のもう一つの態様は、バルプロ酸の誘導体を供給し、そのヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を測定し、組合せ癌療法におけるその有効性を判定し、もしその物質がヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を有し、組合せ癌療法においてそれぞれ単独での処置における有効性より顕著に高い有効性を持っていれば、その物質を選択することを含むことを特徴とする、組合せ癌療法に有用な物質を同定する方法である。

【００５９】

バルプロ酸は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を示す他の化合物を同定するためのリード物質として役立つ。それにより、より低投与量及び低血清レベルで、増強されたＨＤＡＣ阻害活性を示し、鎮静作用のような中枢神経系への作用が減弱した化合物が選ばれよう。最大限利用されうるもうひとつのパラメーターは、肝臓毒作用の出現である。減少した肝臓毒性を示す化合物が選ばれてもよい。誘導体類は、追加の及び／又は修飾された置換基を持つ化合物の合成によって供給されてもよい。ＨＤＡＣ阻害作用は、転写抑制検定法、ヒストンＨ３及び／又はヒストンＨ４のアセチル化を検出するウエスタン・ブロット法等の最新式の技術か、あるいは酵素的検定法などにより測定できる。最大限利用されうるもうひとつのパラメーターは、組合せ癌療法におけるＶＰＡの誘導体類の使用である。

【００６０】

リプレッサー活性の転写検定は、Ｇａｌ４依存性レポーター遺伝子の活性化及び抑制解除を利用する。この検定は、哺乳類の細胞株（例えばＨｅＬａ、２９３Ｔ、ＣＶ－１など）への一時的な遺伝子導入によっても、あるいは特異的に樹立された永続性の細胞株を用いても行える。甲状腺ホルモン受容体、ＰＰＡＲδ、レチノイン酸受容体、Ｎ－ＣｏＲ及びＡＭＬ／ＥＴＯ等の転写因子は、それらが酵母のＧａｌ４タンパク質の非相同ＤＮＡ結合ドメインとの融合タンパク質としてＵＡＳエレメントを含むプロモーターに結合すると、転写を抑制する。Ｇａｌ４融合タンパク質非存在の場合、レポーター遺伝子は、チミジンキナーゼプロモーター中の他の転写因子に対する結合部位が存在することにより、高い基礎転写活性を有する。Ｇａｌ４融合タンパク質は、この活性を１４０分の１にまで抑制する。ＨＤＡＣ阻害剤はこの抑制の緩和を誘導するが、それはレポーター遺伝子活性の上昇（例えばルシフェラーゼアッセイによる等）として検出できる。

【００６１】

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、Ｎ末端部高アセチル化ヒストンＨ３及びＨ４の蓄積を誘導する。これらのアセチル化されたヒストンは、ヒストンＨ３及びＨ４のＮ末端リシン残基に特異的な抗体を用いて、全細胞抽出液あるいはヒストン脱アセチル化酵素阻害

剤で処理された細胞からのヒストン標本のウエスタン・ブロット解析により検出できる。

【００６２】

ＨＤＡＣ活性の酵素的アッセイでは、高アセチル化された基質からの^{3}Ｈ標識酢酸の放出を記録する。ＨＤＡＣ活性の試料は、ＨＤＡＣ群又はＮ－ＣｏＲ（又はＨＤＡＣ群を動員することが知られているその他の抑制因子）、あるいはヒストン脱アセチル化酵素を含む粗細胞抽出液（例えば、Ｈｅｌａ、２９３Ｔ、Ｆ９）に対する抗体で共免疫沈降させることで得られる。基質としては、ヒストンＨ３又はＨ４のＮ末端に対応するペプチド類を化学的に^{3}Ｈ－アセチル化したものか、あるいはＨＤＡＣ阻害剤で処理された代謝的に標識した細胞から単離させたヒストンタンパク質のいずれかであってよい。酢酸エチルで抽出後、^{3}Ｈ標識酢酸の放出を液体シンチレーションカウンティングにより検出する。

【００６３】

本発明のさらにもうひとつの態様は、式Ｉで定義される化合物のＨＤＡＣイソ酵素特異性を明らかにする方法である。そのためには、ＨＤＡＣ群をＨＤＡＣのアイソフォームに特異的な抗体、コリプレッサー複合体に対する抗体、あるいは形質変換した細胞中に過剰発現させた組換えＨＤＡＣ群に対する特異的な抗体と免疫沈降させる。この方法は、これらの免疫沈降物中に存在する個々のＨＤＡＣ群のウエスタン・ブロット解析を含む。放射線標識したＶＰＡ又は式Ｉの化合物を免疫沈降物に結合させ、適当な洗浄工程の後、結合している化合物の量を結合している放射能の測定により求める。本態様の一変形は、ＶＰＡ、ＴＳＡあるいはトラポキシンのようなＨＤＡＣ阻害剤の標識体の結合及び式Ｉの化合物による結合の競争を含む。この方法のもう一つの変形として、代替の標識及び／又は検出工程の利用がある。ＨＤＡＣ群のあるサブセットのみを特異的に阻害する化合物が選択されることが好ましい。上述の化学的に^{3}Ｈ－アセチル化されたペプチド類を用いるＨＤＡＣ阻害アッセイを、ＨＤＡＣ阻害の特異性の決定に用いてもよい。

【００６４】

本発明の特別な一態様は、上記のＶＰＡ又はその誘導体を、確立された治療的癌処置法と併用し、その組合せ処置により原発性のヒトあるいはゲッ歯類の細胞、白血病細胞、その他の癌細胞又は腫瘍細胞の細胞株等の細胞において制御されている遺伝子を特定するために使用することである。したがって、本発明は、実質的に同一の二つの細胞個体群を用意し；その第一の個体群をＶＰＡ又はその誘導体と接触させ；同じくその第一の個体群を一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法で処置し；前記ＶＰＡ又はその誘導体と接触させられ一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法で処置された第一の細胞群において、ＶＰＡ又はその誘導体と接触させられていない第二の個体群におけるよりも有意に高いレベルで発現している遺伝子又は遺伝子産物を検出する工程を含むことを特徴とする方法に関する。第一の個体群をＶＰＡ又はその誘導体と接触させる工程、及び第一の個体群を１種あるいは数種の他の抗腫瘍療法で処置する工程は、どのような順番でも、また同時にでも行うことができる。

【００６５】

組合せ処置により制御される遺伝子を限定あるいは同定するための方法としては、多数のｃＤＮＡ、発現配列タグ又はいわゆるユニジーンコレクション(unigene collection)をスクリーニングするための、確立された技術が挙げられる。サブトラクティブハイブリダイゼーション技術の使用もまた、そのような組合せ処置により制御されている遺伝子を限定するのに適している。これらの方法を、他の薬剤作用機構との併用で、ＶＰＡが仲介するＨＤＡＣ阻害反応の下流において薬剤開発の可能性のある標的物質を同定するために用いること、及び、さらにこれらの方法を、適切な化合物及び併用処置により患者を治療的に処置することを容易にするための診断方法を明確にするために用いることは本発明の一部である。ＶＰＡの生体における一般毒性が他のＨＤＡＣ阻害剤と比べて低いことを考慮すると、ＶＰＡ又はその誘導体を、確立された癌治療法との併用で使用し、その組合せにより選択的に制御されるか又は制御されない標的遺伝子を明らかにすることは、特にトラポキシン又はトリコスタチンＡのような他のＨＤＡＣ阻害剤の使用と比べても、本発明の特異的な一側面である。

【００６６】
特定の一態様において、組合せ処置により制御される遺伝子の同定方法は、検出に核酸技術、好ましくはハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ連鎖反応が用いることを含む。しかし、その他のタイプの核酸技術を用いてもよい。もう一つの態様においては、該方法は検出に差別的に制御されたタンパク質に対する特異抗体を使用することを含む。
【００６７】
本発明によれば、組合せ処置により制御された遺伝子の同定方法に従って同定された遺伝子の発現レベルを、腫瘍の診断に用いるため、ヒトあるいは動物の体外において測定してもよい。
【００６８】
また本発明は、腫瘍がＶＰＡ又はその誘導体と確立された腫瘍治療法との組合せ処置に応答性であるかどうかをインビトロで調べる工程を含む、腫瘍を同定する診断方法にも関する。この方法は、これらの処置によって制御される遺伝子の同定方法を含むことが好ましい。ある特定の態様としては、該診断方法は検出に核酸技術、好ましくはハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ連鎖反応の使用を含む。しかしながら、他の核酸技術を用いてもよい。もう一つの態様においては、該方法は検出に差別的に制御されたタンパク質に対する特異抗体を使用することを含む。この為には、ＶＰＡ及びその誘導体を用いる組合せ処置によりその発現が脱制御される遺伝子によりコードされたタンパク質を、例えば組換え発現系において発現させ、次にこれらのタンパク質に対する抗体が産生させられてもよい。次いで、それらの抗体（又は抗体のパターン）は、診断及び／又は予後的な理由から、腫瘍あるいは腫瘍細胞の状態の特徴付けに利用できよう。
【００６９】
概して、本発明は種々の癌疾患を治療する新規な可能性を提供する。本願出願人はＶＰＡ及びその誘導体のＨＤＡＣ阻害及び細胞分化誘導活性が、十分確立された臨床的に使用されている治療薬と併用で、異なる起源の腫瘍細胞の処置に成功裏に利用できることを見出した。それらのＶＰＡとその誘導体に基づく組合せ処置は、対応する治療薬の単独使用よりもヒト腫瘍患者において優れた治療上の成功をもたらすと考えられる。ＶＰＡ及びその誘導体を用いる組合せ治療的アプローチを癌治療のために提供することは、本発明の目的の一つである。そのような組合せ処置は、必要とされる例えば化学療法剤の治療上必要な投与量を減らすことができ、したがって目下見られている部分的には極めて重大な繁用療法の副作用を制限することができよう。
【００７０】
本発明の特徴は、ＶＰＡ又はその誘導体と現在臨床で用いられているか臨床開発中の、例えば以下のような治療原理との併用である。
－　化学療法剤又は細胞毒性薬剤（例：５－ＦＵ、タキソール、シスプラチナム、カンプトテシン、ゲムシタビン、アドリアマイシン、イリノテカン）
－　分化誘導薬剤（例：ビタミンＤ、レチノイン酸、及びＩＩ－３、ＩＩ－６、ＳＣＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ等のサイトカイン類）
－　放射線療法（例：Ｘ線又はγ線）
－　免疫学的アプローチ（抗体療法、ワクチン接種）
－　免疫療法／細胞毒性複合的アプローチ（例：細胞毒性成分を結合させた抗体）
－　抗血管形成的アプローチ
【００７１】
次の化合物、すなわちＴＮＦα、酪酸、酪酸塩、酪酸誘導体、ＩＬ－２、α－メルカプトプロピオニルグリシン、９－アミノカンプトテシン、ＢＣＮＵ、シタラビン、テニポシド、ビンクリスチン、シスプラチン及び／又はドキソルビシンは、第二の治療剤として好ましいものではない。
【００７２】
腫瘍療法後、しばしば残存腫瘍細胞が患者の体内に残存する。この状態は微小残存病変として知られている。これらの腫瘍細胞は、原発腫瘍が除かれた後何年も経ってからでさ

えも、二次的な腫瘍を引き起こす可能性がある。したがって、腫瘍療法を成功したものとならしめる大きな課題は、そのような残存腫瘍細胞の根絶であるに違いない。

かくして、本発明のもう一つの特徴は、ＶＰＡ及びその誘導体の、腫瘍転移の抑制及び微小残存病変の消滅のための使用である。

【００７３】

我々は、種々の起源のヒト腫瘍細胞に対するＶＰＡとの併用における確立された抗腫瘍治療原理の効果を調べた。意外にも、我々は決まって、ＶＰＡとそれらの確立された治療原理との併用は、ＶＰＡ単独あるいは調べた確立された処置単独で見られる効果に比べ、相乗的な抗腫瘍効果を示すことを見出した。これらのしばしば観察された作用の増強は予期されないものであり、特にＶＰＡは、例えば化学療法、種々の抗体療法、放射線治療、分化誘導薬剤又は抗血管新生的アプローチなど根本的に異なる治療的アプローチとの併用でその相乗効果を頻繁に示したため予期されないものであった。これらのアプローチが対象にしている作用機序は、みなお互いに著しく異なっている。一つの単独の薬剤（ＶＰＡ）が、それほど広範かつ異種な作用機序に亘る抗腫瘍アプローチの治療活性を増強できるとは予期できないものであった。

ＶＰＡのこの治療上の成功の根拠として最も可能性があるのは、ＶＰＡの、ＨＤＡＣ活性を有する酵素の新規な阻害剤としての活性である。しかしながら、例えばＴＳＡはＶＰＡが示すほどの相乗活性を示さないので（例えば図２１及び２５参照）、ＶＰＡによって成し遂げられた微調整された機構的ターゲッティングは、他のＨＤＡＣ阻害剤に勝ると思われる。

加えて、ＶＰＡは腫瘍転移形成の抑制に用いられてもよく、したがって微小残存病変の処置に用いられてもよい。このことは、腎臓癌及び乳癌のインビボモデルを用いて成功裏に調べられた。

【発明を実施するための最良の形態】

【００７４】

下記の実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

【実施例】

【００７５】

〔実施例１〕

ＶＰＡ又は化学療法剤／細胞毒性薬剤の５－フルオロウラシル単独及びＶＰＡと５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）の組合せによる処置による、ＨＣＴ－１５結腸癌細胞の総細胞量の相乗的な減少（図１）。

【００７６】

方法：

細胞量の減少はＳＲＢ試験により測定した。この試験用に、細胞を９６ウェル培養皿にウェル当たり細胞数３，０００から８，０００の密度で播種した。２４時間の回復の後、それらをＶＰＡ非存在あるいは示された濃度のＶＰＡの存在下で４８時間培養した。培養物を冷ＴＣＡで最終ＴＣＡ濃度が１０％になるようにして固定し、４℃で１時間培養後、細胞を５回水洗しついで風乾した。固定した細胞を、１％酢酸に溶かした０．４％（ｗｔ／ｖｏｌ）スルホローダミンＢ（ＳＲＢ）で３０分間染色し、１％酢酸で４回洗浄して結合していない染料を除いた。風乾後、結合した染料を１０ｍＭの緩衝化していないトリス塩基（ｐＨ１０．５）で５分間可溶化し、光学密度をＴｉｔｅｒｔｅｋ　Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　Ｐｌｕｓ分光測定用プレートリーダー上５５０ｎｍで読んだ。各用量応答につき６個のテスト用ウェルを、細胞株ごとの１２個の増殖対照ウェルと平行に設置した。時間０（$Ｔ_0$；薬剤が添加された時点）における細胞集団密度の測定も、テストプレートに薬剤を加える直前に、１２個の追加の参照ウェルの細胞をＴＣＡで固定して行った。上記と同様に固定、染色した５％ＦＢＳを含む完全培地の背景ＯＤも１２個の別のウェルにおいて測定した。それぞれのマイクロタイター・プレートからの未処理ＯＤデータから、背景ＯＤ測定値（すなわち、完全培地プラス染色分のＯＤ及び$Ｔ_0$における細胞のＯＤ）を差し引き、その細胞の細胞生物量の減少を求めた。

【００７７】
結果：
ＨＣＴ－１５細胞をＶＰＡ非存在下又は表示濃度のＶＰＡ単独の存在下（図１Ａ）、あるいは５－ＦＵの非存在下又は表示濃度の５－ＦＵ単独の存在下、あるいは０．７５ｍＭＶＰＡとの併用の下で（図１Ｂ）４８時間培養した。細胞量の相乗的な減少が、ＶＰＡと５－ＦＵ両者の組合せ処置において、ＶＰＡあるいは５－ＦＵ単独での処置と比較して観察された。これは低濃度の５－ＦＵを用いた場合に特に顕著であった。例えば、５－ＦＵを単独で０．５μＭ未満の用量で用いた場合には、細胞量の観測値の増大さえもたらしたが、一方で同量の５－ＦＵを０．７５ｍＭのＶＰＡと併用した場合には、０．７５ｍＭのＶＰＡ単独使用よりもさらに大きな細胞量の減少をもたらした。したがって、これら二つの薬剤の組合せ活性は、この処置が相乗的な活性をもつとして説明すべきである。
〔実施例２〕
【００７８】
ＶＰＡ又は化学療法剤／細胞毒性薬剤のシスプラチナム単独及びＶＰＡとシスプラチナムとの併用での処置によるＤＵ－１４５前立腺癌細胞の総細胞量の相乗的な減少（図２Ａ～Ｂ）及び、化学療法剤／細胞毒性薬剤のシスプラチナムとＶＰＡの誘導体のひとつであるラセミ体２－ｎ－プロピル－４－ペンチン酸（４－ｙｎ ＶＰＡ）との併用による処置により達成されたＤＵ－１４５前立腺癌細胞の総細胞量の相乗的な減少（図２Ｃ～Ｄ）
【００７９】
総細胞量減少作用はＳＲＢ試験により測定した（試験及び読み取り手順の詳細については実施例１参照）。ＤＵ－１４５細胞を、ＶＰＡ非存在下又は表示濃度のＶＰＡ単独の存在下（図２Ａ）、あるいはシスプラチナム非存在下又は表示濃度のシスプラチナム単独又は１ｍＭのＶＰＡとの併用（図２Ｂ）でのシスプラチナムの存在下で４８時間培養した。
特に低濃度のシスプラチナムが用いられた場合に、相乗的な細胞量観測値の減少が見られた。なぜなら、シスプラチナムを単独で１μＭ未満の用量で用いた場合には、細胞量観測値になんらの減少ももたらさなかったからである。これと対照的に、同じ投与量のシスプラチナムと１ｍＭ ＶＰＡとの併用では、１ｍＭ ＶＰＡ単独使用と比べて細胞量が減少した（図２Ｂ）。このように、これら二つの薬剤の組合せ活性は、この処置が相乗的な活性をもつとして説明すべきである。
【００８０】
加えて、また同様に、ＤＵ－１４５細胞を、ＶＰＡの非存在下又は表示濃度のＶＰＡ単独（図２Ｃ）あるいはシスプラチナムの非存在下又は表示濃度のシスプラチナム単独又はＶＰＡ誘導体のラセミ体２－ｎ－プロピル－４－ペンチン酸（４－ｙｎ ＶＰＡ）との併用（図２Ｄ）下で４８時間培養した。
ここでは、特に、１０μＭ未満のシスプラチナム濃度を用いた場合、相乗的な細胞量観測値の減少があった。なぜなら、シスプラチナムを単独でこれらの投与量で用いても細胞量の減少はもたらされなかったからである。これと対照的に、同じ投与量のシスプラチナムと０．７５ｍＭのラセミ体４－ｙｎ ＶＰＡとの組合せでは、０．７５ｍＭの４－ｙｎ ＶＰＡ単独使用と比べて細胞量の減少がもたらされた（図２Ｄ）。このように、これら二つの薬剤の組合せ活性は、この処置が相乗的な活性をもつとして説明すべきである。
〔実施例３〕
【００８１】
ＶＰＡ又は化学療法剤／細胞毒性薬剤のパクリタキセル単独及びＶＰＡとパクリタキセルとの組合せによる処置でのＭＣＦ－７エストロゲン依存性乳癌細胞の総細胞量の減少（図３）
【００８２】
総細胞量減少作用はＳＲＢ試験により測定した（試験手順及び読み取り手順の詳細については実施例１参照）。ＭＣＦ－７細胞を、ＶＰＡ非存在下又は表示濃度のＶＰＡ単独の存在下（図３Ａ）、あるいはパクリタキセル非存在下又は表示濃度のパクリタキセル単独又は０．７５ｍＭのＶＰＡとの併用（図３Ｂ）でのパクリタキセルの存在下で４８時間培

養した。ＶＰＡあるいはパクリタキセル単独処置と比べ、ＶＰＡとパクリタキセルの同時組合せ処置において細胞量の明瞭な相加的減少が観察された。

〔実施例４〕

【００８３】

ＶＰＡ又は化学療法剤／細胞毒性薬剤のゲムシタビン単独及びＶＰＡとゲムシタビンとの組合せによる処置でのＡ－５４９非小細胞性肺癌細胞の総細胞量の減少（図４）

【００８４】

総細胞量減少作用はＳＲＢ試験により測定した（試験手順及び読み取り手順の詳細については実施例１参照）。Ａ－５４９細胞をＶＰＡ非存在下又は表示濃度のＶＰＡ単独の存在下（図４Ａ）、あるいはゲムシタビン非存在下又は表示濃度のゲムシタビン単独又は０．７５ｍＭのＶＰＡとの併用（図４Ｂ）でのゲムシタビンの存在下で４８時間培養した。

ＶＰＡあるいはゲムシタビン単独処置と比べ、ＶＰＡとゲムシタビンの同時組合せ処置において細胞量の明瞭な相加的減少が観察された。

〔実施例５〕

【００８５】

ＶＰＡ又は化学療法剤／細胞毒性薬剤のカンプトテシンの単独及びＶＰＡとカンプトテシンの組合せ（図５Ａ～Ｂ）での処置によるＣＯＬＯ３２０ＤＭ結腸癌細胞の総細胞量の減少を示し、またＶＰＡの誘導体のひとつであるラセミ体２－ｎ－プロピル－４－ペンチン酸（４－ｙｎ ＶＰＡ）と化学療法剤カンプトテシンとの併用による処置により達成された、ＰＣ－３前立腺癌細胞の総細胞量の少なくとも相加的な減少（図５Ｃ～Ｄ）を提示する

【００８６】

総細胞量減少作用はＳＲＢ試験により測定した（試験手順及び読み取り手順の詳細については実施例１参照）。ＣＯＬＯ３２９ＤＭ又はＰＣ－３細胞を、ＶＰＡ又はラセミ体４－ｙｎ ＶＰＡ非存在下、あるいは表示濃度のＶＰＡ単独（図５Ａ）又はラセミ体４－ｙｎ ＶＰＡ単独（図５Ｃ）の存在下、あるいはカンプトテシン単独の非存在下又は表示濃度のカンプトテシン単独又は０．７５ｍＭのＶＰＡ（図５Ｂ）あるいは０．７５ｍＭのラセミ体４－ｙｎ ＶＰＡ（図５Ｄ）との併用でのカンプトテシンの存在下で４８時間培養した。

両組合せ処置において明瞭な細胞量の減少が見られ、これはカンプトテシンとの併用で、ＶＰＡのみならずその誘導体である４－ｙｎ ＶＰＡも、他の抗癌剤と併用すると、ここでカンプトテシンについて示されたように、同様の少なくとも相加的な治療効果をもたらす付加的かつふさわしい作用を有することを示すものである。

〔実施例６〕

【００８７】

免疫療法剤としてのモノクローナル抗体類との併用における、バルプロ酸による腫瘍細胞の生存率の相乗的及び／又は相加的な抑制（図６）

【００８８】

細胞株及び細胞培養

ヒトＭＤＡ－ＭＢ４６８、ＭＤＡ－ＭＢ４５３及びＳＫＢＲ３乳癌細胞及びＡ４３１扁平上皮癌を、１０％の熱不活化ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１００単位／ｍｌペニシリン及び１００μｇ／ｍｌストレプトマイシンを補充したダルベッコ修飾イーグル培地（ＤＭＥＭ, ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ, Ｖｅｒｖｉｅｒｓ, Ｂｅｌｇｉｕｍ）中で維持した。

【００８９】

細胞生存率試験

腫瘍細胞を通常の増殖培地中９６ウェルプレートに1×10^{4}細胞／ウェルの密度で播種し、７０時間の間、最終濃度３ｍＭのバルプロ酸、２μｇ／ｍｌの治療用アンチＥｒｂＢ２抗体ヘルセプチン^{TM}、２μｇ／ｍｌの治療用アンチＥＧＦ受容体抗体 ｃ２２５(Fan & Mendelsohn, Curr. Opin. Oncol.,10: 67-73, 1998)、又はバルプロ酸と上記と同じ濃

度のヘルセプチン™あるいはｃ２２５抗体との組合せで処理した。対照細胞はバルプロ酸又は抗体の非存在下で増殖させた。各ウェルに１０ｍｇ／ｍｌの３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド（ＭＴＴ）（Ｓｇｍａ，Ｄｅｉｓｅｎｈｏｆｅｎ，　Ｇｅｒｍａｎｙ）ＰＢＳ溶液を１０μｌ加え、さらに３時間細胞を培養した。細胞を９０μｌの溶解用緩衝液（２０％ＳＤＳの５０％ジメチルホルムアミド溶液、ｐＨ４．７）を加えて溶解した。ホルマザン生成物を可溶化させた後、５９０ｎｍにおける吸収をマイクロプレート・リーダー（Ｄｙｎａｔｅｃｈ，　Ｄｅｎｋｅｎｄｏｒｆ，　Ｇｅｒｍａｎｙ）中で測定し、生存細胞の相対量をバルプロ酸あるいは抗体を加えずに培養した細胞と比較して計算で求めた。

【００９０】

結果

図６に示された結果は、バルプロ酸及び治療用抗体ヘルセプチン™及びｃ２２５は、それぞれ単独薬剤として乳癌細胞及び扁平上皮細胞癌の生存率を抑制することを示している。しかしながら、バルプロ酸と治療用抗体ヘルセプチン™の併用処置は、ＳＫＲＢ３細胞において顕著な相加的治療効果をもたらしている。しかし、さらに興味深いことには、ＶＰＡとの組合せ処置において、細胞生存率の相乗的な減少が試験した上記以外の３つの細胞株において観察されたことである。すなわち、ＭＤＡ－ＭＢ４５３細胞におけるヘルセプチン™との併用、及びＭＤＡ－ＭＢ４６８とＡ４３１細胞におけるｃ２２５との併用である。これらの結果は、バルプロ酸が治療用抗体と併用されると、強く高められた治療効果を示すこと、そして上皮起源の固形癌に由来する多種多様な腫瘍細胞の生存率を強力に抑制することを実証するものである。さらにこの結果は、バルプロ酸及びその誘導体が治療用抗体との併用で、それらの腫瘍の療法として相乗的な治療的成功を収めつつ使用できるであろうことを示すものである。

〔実施例７〕

【００９１】

バルプロ酸と組換え抗体融合タンパク質を用いる免疫療法的／細胞毒性アプローチによる腫瘍細胞増殖抑制（図７及び８）

【００９２】

細胞株及び細胞培養

ヒトＳＫＢＲ３乳癌細胞、Ａ４３１扁平上皮癌細胞及びＳＫＯＶ３卵巣癌細胞を１０％の熱不活化したウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１００単位／ｍｌペニシリン及び１００μｇ／ｍｌストレプトマイシンを補充したダルベッコ修飾イーグル培地（ＤＭＥＭ，ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ，　Ｖｅｒｖｉｅｒｓ，　Ｂｅｌｇｉｕｍ）中で維持した。

Ｅ．ｃｏｌｉβ－ガラクトシダーゼをコードするｐＺｅｏＳＶ２／ｌａｃＺプラスミドを安定に遺伝子導入された腎臓細胞癌（Ｒｅｎｃａ）細胞で、さらにｃｅｒｂＢ２及びネオマイシン抵抗性をコードするプラスミドｐＳＶ２ＥｒｂＢ２Ｎ及びｐＳＶ２ｎｅｏを導入されたＲｅｎｃａ細胞（Ｒｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥｒｂＢ２）(Maurer-Gebhard et al., Cancer Res. 58:2661-2666, 1998)、あるいは上皮性増殖因子（ＥＧＦ）受容体、腫瘍原性に活性化されたＥＧＦ受容体変異株ＥＧＦＲｖＩＩＩ及びネオマイシン抵抗性をコードしているプラスミドｐＬＴＲ－ＥＧＦＲ又はｐＬＴＲ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ及びｐＳＶ２ｎｅｏを導入されたＲｅｎｃａ細胞（Ｒｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥＧＦＲ及びＲｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥＧＦＲｖＩＩＩ）(Schmidt et al., Oncogene 18: 1711-1721, 1999)を８％ＦＢＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン、０．２５ｍｇ／ｍｌ　Ｚｅｏｃｉｎ及び０．４８ｍｇ／ｍｌ　Ｇ４１８を補充したＲＰＭＩ－１６４０培地中で増殖させた。

【００９３】

細胞生存率試験

腫瘍細胞を通常の増殖培地中９６ウェルプレートに1×10^4細胞／ウェルの密度で播種した。ＳＫＢＲ３、Ａ４３１，及びＳＫＯＶ３細胞は４０時間の間、最終濃度３ｍＭの

バルプロ酸、又は１０ｎｇ／ｍｌの組換えアンチＥｒｂＢ２単鎖抗体毒素ｓｃＦｖ（ＦＲＰ５）－ＥＴＡ(Wels et al., Cancer Res. 52: 6310-6317,1992)、又は１０ｎｇ／ｍｌの組換えアンチＥＧＦ受容体単鎖抗体毒素ｓｃＦｖ（１４Ｅ１）－ＥＴＡ(Schmidt et al., Brit. J. Cancer 75: 1575-1584, 1997)、あるいはバルプロ酸と上記と同濃度のｓｃＦｖ（ＦＲＰ５）－ＥＴＡ又はｓｃＦｖ（１４Ｅ１）－ＥＴＡのいずれかとの組合せにより処理した。Ｒｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥｒｂＢ２、Ｒｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥＧＦＲ及びＲｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥＧＦＲｖＩＩＩ細胞は４０時間の間、最終濃度１ｍＭのバルプロ酸、又は１０ｎｇ／ｍｌの組換えアンチＥｒｂＢ２単鎖抗体毒素ｓｃＦｖ（ＦＲＰ５）－ＥＴＡ、又は１ｎｇ／ｍｌの組換えアンチＥＧＦ受容体単鎖抗体毒素ｓｃＦｖ（１４Ｅ１）－ＥＴＡ、あるいはバルプロ酸と上記と同濃度のｓｃＦｖ（ＦＲＰ５）－ＥＴＡ又はｓｃＦｖ（１４Ｅ１）－ＥＴＡいずれかとの組合せにより処理した。対照細胞はバルプロ酸あるいは抗体毒素の非存在下で増殖させた。各ウェルに１０ｍｇ／ｍｌの３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド（ＭＴＴ）（Ｓｉｇｍａ，Ｄｅｉｓｅｎｈｏｆｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）ＰＢＳ溶液を１０μｌ加え、さらに3時間細胞を培養した。９０μｌの溶解用緩衝液（２０％ＳＤＳの５０％ジメチルホルムアミド溶液、ｐＨ４．７）を加えて細胞を溶解した。ホルマザン生成物を可溶化させた後、５９０ｎｍにおける吸収をマイクロプレート・リーダー（Ｄｙｎａｔｅｃｈ，Ｄｅｎｋｅｎｄｏｒｆ，Ｇｅｒｍａｎｙ）中で測定し、生存細胞の相対量をバルプロ酸あるいは抗体毒素を加えずに培養した細胞と比較して計算で求めた。

【００９４】

結果

提示した結果（図７及び８）は、バルプロ酸及びアンチＥｒｂＢ２又はアンチＥＧＦ受容体免疫毒素は、単独の薬剤として乳癌、卵巣癌、腎臓癌及び扁平上皮癌の細胞の生存率を抑制することを示している。しかしながら、バルプロ酸とアンチＥｒｂＢ２又はアンチＥＧＦ受容体免疫毒素との併用処置は、顕著な付加的治療効果をもたらす。これらの結果は、バルプロ酸が免疫毒素等の抗体融合タンパク質との併用で強く高められた治療効果を示すこと、そして上皮起源の固形癌に由来する多種多様な腫瘍細胞の生存率を強力に抑制することを実証するものである。さらにこの結果は、バルプロ酸及びその誘導体が、免疫毒素類との併用でそれら腫瘍の治療法として使用できるであろうことを示す。

〔実施例８〕

【００９５】

ＶＰＡは腎臓癌細胞（図９）のインビボマウスモデルにおける腫瘍転移発生の進行及び微小残存病変の阻害剤として作用する。

【００９６】

マウス腎臓癌細胞（Ｒｅｎｃａ）は、Ｂａｌｂ／ｃマウスに自然発生する腎臓腫瘍から樹立された。これらの細胞はＢａｌｂ／ｃマウスに尾静脈経由で移植されると効率よく肺に腫瘍を形成し、Ｒｅｎｃａ細胞の腫瘍形成性はよく確立されている(Murphy, et al., 1973, J. Natl. Cancer Inst., 50:1013-1025; Hrushesky et al., 1973, J. Surg. Res., 15: 327-332; Williams et al., 1981, Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., 34: 345-349)。このモデル設定における循環している腫瘍細胞は、残存腫瘍細胞が患者の体内を循環し、最後に種々の臓器に侵入して定着し、転移癌として成長していく際に腫瘍患者にしばしば見られる状況の模倣である。そのような微小残存腫瘍症の抑制は、現代の腫瘍療法の主要目標の一つであり、ここで用いたインビボモデルで実験的に調べることができる。

【００９７】

実験設定

Ｒｅｎｃａ細胞及び遺伝子導入された細胞クローンＲｅｎｃａ－ｌａｃＺ（β－ガラクトシダーゼをコード）を１０％のウシ胎仔血清（ＦＣＳ）を補充したＲＰＭＩ－１６４０中で培養した。宿主マウスに転移を形成するには、４～６週齢のメスＢａｌｂ／ｃマウスに側面尾静脈中に１００μｌのＰＢＳ中の10^5個のＲｅｎｃａ－ｌａｃＺ細胞を注射し

た。１群につき５匹の動物を、腫瘍細胞注入後４週まで１週間隔で屠殺し肺を切除した(Maurer-Gebhard et al., 1998, Cancer Research 58, 2661-2666)。

【００９８】

マウスの処置と結果：

ＶＰＡでの処置は次の通りである。すなわち、２×４００ｍｇ／ｋｇ／日　腹腔内（Ｎａ－ＶＰＡ，　水中１５５ｍＭ）。対照動物はグルコース溶液で処置した(Maurer-Gebhard et al., 1998, Cancer Research 58, 2661-2666)（図９）。

肺転移の可視化のためのＸ－ｇａｌ染色：

切除した肺を終夜、４℃で、２％ホルムアルデヒド及び０．２％グルタルアルデヒドを含むＰＢＳ中で固定した。固定液を除去し、肺をＰＢＳで洗浄した。Ｘ－Ｇａｌ溶液での染色は、３７℃、暗所で１０から１２時間行った(Maurer-Gebhard et al., 1998, Cancer Research 58, 2661-2666)。転移性表面小結節を解剖顕微鏡のもとで分析し、代表的な写真を撮った。それらを図９に示す。

【００９９】

図９はＶＰＡでの処置が肺転移の形成、すなわち転移小結節の数とサイズを効果的に抑制していることを示す。このことは、ＶＰＡが上皮性腫瘍から生じる転移の発展の抑制、及び微小残存腫瘍症の療法に治療的に用い得ることを示唆している。

〔実施例９〕

【０１００】

ＶＰＡによる、ラットでの皮下腫瘍の増殖及びＭＴ４５０乳癌細胞の肺転移、及び微小残存病変の抑制（図１０）

【０１０１】

実験設定

ＭＴ４５０細胞を、ＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳ培質中で培養し、注射直前にマイコプラズマが存在しないことを検査した。細胞をＰＢＳ中で２回洗い、ＰＢＳ１ｍｌ当たり５×10^6細胞の密度に懸濁した。０．１ｍｌのＰＢＳ中の５×10^5個の細胞を各ラットに注射した。それぞれ各８匹２群のラットを用いた（それぞれ±ＶＰＡ）。ラットは原発癌を増殖させるべく２１日間放置した。ＶＰＡナトリウム塩を１５５ｍＭ（等張）の水に溶かした。ｐＨを少量の塩酸により６から７に調整し、得られた溶液を滅菌ろ過した。化合物は腹腔内注射で施用した。投与量は２５０ｇのラット当たり２ｍｌであり、これはｋｇＢＷ（体重）及び１投与量当たり１．２５ｍｍｏｌ　ＶＰＡに相当する。１日２投与を適用した。対照動物には同量の無菌等張塩化ナトリウム溶液を投与した。

【０１０２】

結果

原発腫瘍の成長を腫瘍体積を測ることにより追跡し、ＶＰＡが腫瘍の拡大を遅らせることが分かった。実験は、対照群のラットの１匹における腫瘍サイズが法で定められている限度の５０ｍｍに達した時点で終了とした。その時点で肺転移を評価するため、試験に用いた全てのラットを剖検した。対照群のすべてのラットで転移が顕著に進行していた。代表例を図１０に示した。転移はＶＰＡ処置ラット８匹中７匹にも見られた。しかし、転移のサイズと数はＮａＣｌ処置ラットと比較してずっと小さかった。代表例を図１０に示した。投与量決定のための実験は、上記で選んだ投与量プロトコルは高い初期血清レベルを生じる（例えば、腹腔内注射後１時間で３．６ｍＭ）が、それは急速に低下し（例えば、腹腔内注射後４時間で０．２５ｍＭなど）、ヒトでのてんかん治療中に維持されるレベルより低くなることを示した。要約すると、実験は、ＶＰＡはゲッ歯類の血清からのクリアランスが早く、有効範囲として期待される０．５ｍＭ以上のＶＰＡ血清レベルを維持することはできないにもかかわらず、ＶＰＡ処置によりＭＴ４５０ラット乳癌モデルにおいて原発腫瘍の増殖及び肺転移を顕著に抑制した。したがって、微小残存腫瘍症を抑制するために用いられてもよい。

〔実施例１０〕

【０１０３】

ＶＰＡのインビトロにおける造血前駆細胞の分化遮断への相乗作用。すなわち、ＶＰＡはＰＭＬ－ＲＡＲを発現している細胞の分化能の回復において、サイトカイン類と協同する。それゆえＶＰＡはサイトカイン類の分化誘導活性にとって増感剤と見なされなければならない（図１１）。

【０１０４】

急性の前骨髄球性白血病細胞はＨＤＡＣ阻害剤による処置に応答することが知られているので、ＰＭＬ－ＲＡＲによる造血前駆細胞の分化遮断に対するＶＰＡの効果を調べた。ネズミの造血前駆細胞（ｌｉｎ－）をＰＭＬ－ＲＡＲをコードしているレトロウイルスベクター及びマーカーとしてＧＦＰで形質導入した。形質導入された細胞を、ＶＰＡ非存在下又は存在下で、いくつかのサイトカイン（ＩＬ３、ＩＬ６、ＳＣＦ、Ｇ－ＣＳＦ及びＧＭ－ＣＳＦ）を含むカクテルで分化するように刺激した。骨髄様の分化は、分化マーカーＭａｃ－１の存在を分析することにより評価した。

【０１０５】

結果

ＶＰＡ処置は対照細胞の分化に影響を与えなかったが、一方、ＰＭＬ－ＲＡＲの発現は強力な分化遮断を起し（図１１）、それは上記のサイトカインのみによる処置では克服できなかった。しかしながら、ＶＰＡ（１ｍＭ，右区画、ＰＭＬ－ＲＡＲと表記したもの）は、ＰＭＬ－ＲＡＲにより課された分化遮断をほぼ完全に回復させた（図１１）。このように、ＲＡなしで、ＶＰＡは、恐らくはＰＮＬ－ＲＡＲにより対象遺伝子に動員されたＨＤＡＣ複合体の作用を阻害することによって、細胞を分化が許容される状態に再建及び増感し、ついで、サイトカインにより分化が誘導される。このＶＰＡの活性は相乗的な活性と見なされなければならない。なぜなら、上記のようにサイトカイン類のみでの処置では、これらのＰＭＬ－ＲＡＲ細胞における分化遮断を相当程度解き放つことには至らなかったからである。

【０１０６】

方法

ネズミの造血前駆細胞を、１２９匹のマウスの骨髄から系統分化マーカーがないこと（ｌｉｎ－）を基礎に精製した。Ｌｉｎ－細胞は、ＩＬ－３（２０ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－６（２０ｎｇ／ｍｌ）、ＳＣＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）の存在下で４８時間培養し、ついでレトロネクチン（宝酒造）でコートした組織培養に未使用のプレートに付着させた。細胞は次いで、対照レトロウイルス性ベクターＰＩＮＣＯ、又はＰＩＮＣＯ－ＰＭＬ－ＲＡＲで一過性に遺伝子導入したフェニックス同種指向性パッケージング細胞からの上澄み（上記のように新鮮血清及びＩＬ－３、ＩＬ－６及びＳＣＦで補充されている）と培養することにより形質導入した。６０時間後、ＧＦＰ＋細胞をＦＡＣＳにより選別し、上記と同様のものに加えてＧ－ＣＳＦ（６０ｎｇ／ｍｌ）及びＧＭ－ＣＳＦ（２０ｎｇ／ｍｌ）を補充したメチルセルロースプレートに播種した。それと表示したものでは、バルプロ酸ナトリウム（ＶＰＡ，左から右へ０．２あるいは１ｍＭ）を分化用媒質に加えた。８～１０日後、細胞を骨髄球分化マーカーＭａｃ－１の存在についてＦＡＣＳで分析した。ＶＰＡは１ｍＭまでの濃度は、Ｍａｃ－１$^{+}$細胞の数にも対照細胞のコロニーの数にも顕著な変化をもたらさなかった。より高い濃度（＞３ｍＭ）では、コロニー数の減少が観察され、これは恐らく細胞死の導入による（データ示さず）。対照として、赤血球系の分化マーカー（Ｔｅｒ－１１９）を有するＶＰＡ－処置細胞を調べたが陽性細胞は見つからなかった（データ示さず）。対照ベクターのＰＩＮＣＯベクターの影響を受けていない細胞と影響を受けた細胞の反応パターンは同一であった（データ示さず）。

【０１０７】

図１１については、Ｌｉｎ－細胞を、表示したベクター（対照はＰＩＮＣＯ、ＧＦＰのみをコードする空のベクター）で形質導入し、ＦＡＣＳでＧＦＰ＋細胞を選別した。ＧＦＰ＋細胞をついでＶＰＡ非存在あるいは存在下（左から右へ０．２及び１ｍＭ）で分化用媒質中に播種した。分化は８～１０日後に骨髄球分化マーカーＭａｃ－１の分析により評価した。

〔実施例１１〕
【０１０８】
ＶＰＡはインビトロでＰＭＬ－ＲＡＲを発現している細胞をＸ線処置に対し感作させ、相乗的な治療効果をもたらす（図１２）。
【０１０９】
結果
Ｘ線処置（２グレイ）によって、造血前駆細胞は生存ポテンシャルの大幅な減少を示し、アポトーシスを受ける。半固体培養条件（メチルセルロース基盤媒質）では野生型細胞培養物をＸ線処理したものにおいては、ほとんど完全にコロニー（コロニー形成細胞、ＣＦＣ由来）が存在しなくなる。このことは、未分化細胞はこの処置に非常に感受性であることを示す（図１２）。際だっているのは、ＰＭＬ－ＲＡＲの発現により、救助率＞５０％と対象細胞のＸ線感受性を著しく低下させたことである（図１２）。同条件下で、ＶＰＡ（１ｍＭ）は野生型細胞の感受性をわずかに減少させた。しかしながら、ＶＰＡはＶＰＡ処理細胞においてコロニーの完全かつ明らかに相乗的なコロニーの消滅を伴うＰＭＬ－ＲＡＲ発現細胞の再感作をもたらした（図１２）。したがって、ＶＰＡはＸ線との組合せにおいて、Ｘ線のみの処置に耐性となった（例えば、癌原性融合タンパク質の発現を介して）細胞の感受性を救い、相乗的な治療成功率をもたらすことができよう。
【０１１０】
方法
図１１について記載したと同様にしてＬｉｎ－細胞に形質導入し（詳細については実施例１０での方法を参照）、そしてＦＡＣＳにより選別した。選別の１２時間後、細胞をＰＢＳで洗浄し、サイトカインを含む媒質（図１２に提示したデータはＩＬ－３（２０ｎｇ／ｍｌ）、Ｌ－６（２０ｎｇ／ｍｌ）、ＳＣＦ（１００ｎｇ／ｍｌ）、Ｇ－ＣＳＦ（６０ｎｇ／ｍｌ）、ＧＭ－ＣＳＦ（２０ｎｇ／ｍｌ）を用いている）中、又はサイトカインを含まない媒質（データ示さず）中で８～１２時間培養した。培養の終わりに、細胞をＸ線源にさらし（合計曝露量２Ｇｙ）、さらにＶＰＡの存在下あるいは非存在下で１２～１６時間培養した。最後に、細胞をサイトカイン（ＩＬ３、ＩＬ６、ＳＣＦ、Ｇ－及びＧＭ－ＣＳＦ）存在下でメチルセルロースを含む媒質（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中に播種し、８～１０日間培養した。
【０１１１】
図１２用では、未感染細胞（“コントロール”）、ＧＦＰのみを発現している細胞（“空ベクター”）、又はＧＦＰとＰＭＬ－ＲＡＲを発現している細胞（“ＰＭＬ－ＲＡＲ”）が用いられた。メチルセルロース中に播種して８日後に、総コロニー数を測定した。ＶＰＡ処置細胞（１ｍＭ）は、Ｘ線処置に先立ってＶＰＡにも曝露した。
〔実施例１２〕
【０１１２】
ＶＰＡはレチノイン酸との併用で急性前骨髄球性白血病罹患マウスの生存延長において協同する。（図１３）
【０１１３】
ＰＭＬ－ＲＡＲを発現している造血前駆細胞を同系マウスに再導入すると、宿主動物の９０％超に、ヒトのそれと見分けのつかない型の白血病を発生させる。インビボでのレチノイン酸処置（皮下へのレチノイン酸ペレットの埋め込みによる）は、（ヒトの急性前骨髄球性白血病におけるのと同様に）白血病芽細胞の最終分化を誘発させることにより、白血病マウスの生存を有意に延長する（図１３及び非提示データ）。ＶＰＡ処置（４００ｍｇ／ｋｇＶＰＡを１２時間置きに腹腔内注射することによる）もまた、白血病マウスの生存を有意に延長した（図１３）。
最も顕著であったのは、レチノイン酸とＶＰＡの併用で最も長い生存延長を示し、末梢血中及び調べた内臓（骨髄、脾臓）中に、全処置期間中を通して白血病芽細胞を認めなかったことであった（図１３）。白血病のインビボモデルにおけるレチノイン酸とＶＰＡの併用の際のこの印象的な結果は、ＶＰＡを、白血病の処置において、少なくとも相加的な

、しかし相乗的である可能性がより高そうな、治療的生物学的応答を誘起するために、分化誘導剤（例えばレチノイン酸）との併用で投与できるであろうことを示す。

【０１１４】

方法

ＰＭＬ－ＲＡＲを発現している細胞の接種後に白血病を発病したマウスを屠殺した。脾細胞の単細胞懸濁液を調製し、第二次の宿主マウスに10^7個の細胞を再接種した。白血病芽細胞の存在が末梢血中に明らかであり、内臓（骨髄、脾臓）が既に顕微鏡的に見ると白血病細胞により侵された時点で、ＶＰＡ（４００ｍｇ／ｋｇ）の１２時間置きの腹腔内注射、及びレチノイン酸の徐放性ペレットの皮下への埋め込みによる治療を開始した。ＶＰＡ処置は、次のスケジュール、すなわち５日×２回と２日間欠期を３連続週行なった。

【０１１５】

図１３は、無処置（コントロール）、あるいはＶＰＡ、ＲＡ、又はＲＡ＋ＶＰＡ（方法参照）で処置された白血病マウスの累積生存曲線（“Ｃｕｍ．Ｓｕｒｖｉｖａｌ”）をしめす。かっこ内の数字は開示された代表的な実験におけるマウスの数を示す。実験は２回繰り返し、同様の結果を得た。

〔実施例１３〕

【０１１６】

ＶＰＡはいくつかの化学療法剤との併用で、ＨＣＴ－１１６結腸癌細胞のアポトーシス誘導において相乗作用を示す。

【０１１７】

ＨＣＴ－１１６細胞を現在結腸癌患者の処置に使用されている薬剤である５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）で処理した。高濃度の５－ＦＵはＨＣＴ－１１６細胞のアポトーシスを効率よく誘導することができた（データ非提示）。しかし、低投与量では、緩やかな効果のみしか観察されず、観察された主な生物学的応答は、細胞分裂を繰り返す細胞（ｃｙｃｌｉｎｇ　ｃｅｌｌ）の減少による細胞数の減少であった（図１４、また図１６も参照のこと）。我々はＶＰＡとの併用に低投与量を用いた。ＶＰＡ処置のみ（１週間まで）では、これら特定の細胞においてアポトーシスは誘導されず、ほんの僅かに細胞数に影響を与えたのみであった（図１５Ａ～Ｂ及び非提示データ）。５－ＦＵとＶＰＡとの併用での処置は細胞増殖の強く相乗的な低下と５－ＦＵ単独で観察されるよりもずっと高いレベルのアポトーシスを引き起こした（図１６Ａ～Ｂ）。

【０１１８】

ＶＰＡと化学療法剤との組合せによる相乗作用の基礎を成す機構をさらに特徴づけるために、我々はＶＰＡによる前処置が同様の結果を達成するのに十分であるかどうかを検討した。以下の薬剤を用いた。すなわち、５－ＦＵ、アドリアマイシン（ＡＤ）及びイリノテカン（ＩＴ）である。使用した濃度においては、これらの薬剤は有意にアポトーシスを誘導せず、ＨＣＴ－１１６細胞の増殖速度に緩やかなの影響を与えたのみであった（図１４）。

細胞を３日間ＶＰＡで前処置し、次いで４８時間まで、ＶＰＡ＋ＡＤ、ＶＰＡ＋ＦＵ又はＶＰＡ＋ＩＴによる同時処置を行った（図１７Ａ～Ｃ）。驚くべきことに、ＶＰＡによる前処置により、どの化学療法剤に晒された細胞においても目覚しい相乗的なアポトーシスの亢進を引き起した（図１７Ａ～Ｃ）。並行して行った実験で、ＶＰＡを除去（３日の前処置につづき２４時間の洗い流し）した場合には、感受性は失われた。このことは、ＶＰＡがその感作作用を達成するにはＶＰＡが化学療法剤と同時に投与されなければならないことを示している（図１７Ａ～Ｃ）。これらの結果を総合すると、ＶＰＡの使用は腫瘍細胞を抗腫瘍活性を有するいくつかの薬剤の作用に対し感作させ、そのような組合せ治療処置における相乗的な活性をもたらす可能性があることを示している。

【０１１９】

方法

図１４については、細胞は６ウェル培養皿に100,000細胞／ウェルで播種した。次の日、それらを表示した薬剤（５－ＦＵ：２μＭ　５－フルオロウラシル、ＡＤ：２０ｎｇ／

ｍｌ　アドリアマイシン、ＩＴ：３μＭ　イリノテカン）で処置し、さらに４８時間培養した。処置の２４時間及び４８時間後に細胞数を数えた。全てのアッセイは３回ずつ行った。

【０１２０】

図１５については、細胞は６ウェル培養皿に100,000細胞／ウェルで播種した。次の日、それらを表示した濃度のＶＰＡで処置し、さらに４８時間培養した。（Ａ）：生存細胞の３回計数の結果。（Ｂ）：細胞は透過化処理及び固定後にヨウ化プロピディウムで染色された。細胞周期分析の結果は、Ｇ１、Ｓ、Ｇ２＋Ｍ及びｓｕｂ－Ｇ１（アポトーシス細胞）にある細胞の割合（％）で表わしてある。全てのアッセイは３回ずつ行った。

【０１２１】

図１６については、細胞は６ウェル培養皿に100,000細胞／ウェルで播種した。次の日、それらを表示した濃度の５－フルオロウラシル（５ＦＵ、２μＭ）又はＶＰＡ（１ｍＭ）と５－ＦＵの組合せの存在下で７２時間処置した。（Ａ）：生存細胞の３回計数の結果。（Ｂ）：細胞は透過化処理及び固定後にヨウ化プロピディウムで染色された。

細胞周期分析の結果はアポトーシス細胞の割合（％）で表わしてある。全てのアッセイは３回ずつ行った。

【０１２２】

図１７については、細胞を１０ｃｍ培養皿（１００万細胞／皿）に播種した。次の日、最終濃度１ｍＭのＶＰＡの存在下で７２時間処置した。次に細胞を、図１４についての記載と同様に、ＶＰＡ存在下（＋／＋のシリーズ）とＶＰＡ非存在下（＋／－のシリーズ）で６ウェル培養皿に播種した。その翌日、それらを次の薬剤で図１４に表示されているのと同じ濃度で処置した：５－ＦＵ（パネルＡ）、ＡＤ（Ｂ）、又はＩＴ（Ｃ）。細胞の分析を処置日、処置２４時間後及び４８時間後に行った。

上部パネルは生存細胞の３回計数の結果である。下部パネルでは、細胞は透過化処理及び固定後にヨウ化プロピディウムで染色された。細胞周期分析の結果はアポトーシス細胞の割合（％）で表わしてある。全てのアッセイは３回ずつ行った。

〔実施例１４〕

【０１２３】

ＶＰＡ又は分化誘導薬剤１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3単独及びＶＰＡと１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3との組合せによる処置での、乳癌及び前立腺癌細胞の総細胞量の減少（図１８～１９）。

【０１２４】

ＭＣＦ－７エストロゲン依存性乳癌細胞を用いた結果を図１８に、ＤＵ－１４５前立腺癌細胞を用いた結果を図１９に示す。細胞は１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3の非存在下又は表示濃度の１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3単独の存在下、（図１８Ａ及び図１９Ａ）、ＶＰＡの非存在下又は表示濃度のＶＰＡ単独の存在下、あるいは表示濃度のＶＰＡと１００ｎＭの１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3の組合せの存在下（図１８Ｂ及び図１９Ｂ）にて４８時間培養した。細胞増殖への効果は実施例１に記載したのと同様にしてＳＲＢ試験により測定した。

【０１２５】

乳癌及び前立腺癌細胞において、ＶＰＡと分化誘導薬剤１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3を同時に用いる組合せ処置では、ＶＰＡ又は１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3単独での処置と比較して、明瞭な少なくとも相加的な細胞量の減少が見られた。ＭＣＦ－７細胞では、併用処置のわずかな相乗効果を観察することができた。

〔実施例１５〕

【０１２６】

ＶＰＡは急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ）芽細胞の処置においてレチノイン酸の治療効果を付加的及び／又は相乗的に高める（図２０～２６）。

【０１２７】

我々は、ｔ（８；２１）を含みＡＭＬ１／ＥＴＯ融合タンパク質を発現するＫａｓｕｍ

ｉ－１細胞株（図２０）、及び告知されたＡＭＬ患者の骨髄や末梢血液で、循環芽細胞の最初の割合が７０％以上のものからの新鮮な芽細胞（図２２）のような急性骨髄球性白血病（ＡＭＬ）芽細胞に対する、ＶＰＡの単独薬剤としての又はレチノイン酸との組合せでの効果を調べた。症例はＦｒｅｎｃｈ－Ａｍｅｒｉｃａｎ－Ｂｒｉｔｉｓｈ（ＦＡＢ）分類(Bennett et al., Ann Intern Med 103, 1985)により分類分けした。ＡＰＬ関連の融合遺伝子の存在を除外する為に、記載された(Mandelli et al., Blood 90, 1997; Mancini et al., Br J Haematol. 91, 1995; Grimwade et al., Blood 90, 1999)標準法に従い細胞遺伝学的分析及びＲＴ－ＰＣＲ試験を行った。

【０１２８】

結果

Ｋａｓｕｍｉ－１細胞（図２０）及びＭＯ、Ｍ２及びＭ４　ＦＡＢのサブタイプに属するＡＭＬ芽細胞（図２２）において、我々はＶＰＡが単独薬剤として部分的な骨髄球分化を誘導すること、そしてＲＡとの併用で、後骨髄球様又は好中球様形態を有する細胞の出現及びＮＢＴ染料還元アッセイにおける陽性細胞の数の増加（６５％まで）（Ｋａｓｕｍｉ－１細胞については図２０及び２１を、ＡＭＬ芽細胞については図２２及び２４を参照）により明らかになった、完全でそれゆえ相乗的な骨髄球分化を誘発することを見出した。加えて、Ｋａｓｕｍｉ－１細胞において細胞周期分析から、ＶＰＡとＲＡの組合せを用いた処置により、ＶＰＡ又はＲＡ単独での処置と比べて、Ｇ１期停止への細胞周期の移行が促進されていることが分かった（図２３）。更に興味深いことには、ＡＭＬ芽細胞において、ＶＰＡとＲＡの組合わせによる処置は、特定の遺伝学的損傷の存在とは独立して骨髄球の分化に影響を与えた（図２２）。

【０１２９】

興味深いことに、ＶＰＡはＲＡとの併用で、原発性又は再発性ＡＭＬのいずれか（それぞれ３例及び２例を調べた）からの芽細胞についても骨髄球分化を誘導した。加えて、ＶＰＡが、ヨウ化プロピジウムで染色した細胞のＦＡＣＳ分析により評価された（４症例を調べた）ように、ＡＭＬ芽細胞のアポトーシスを誘導するのに有効であることが分かったが、ＴＳＡはそうではなかった。このことはさらに、ＶＰＡのＨＤＡＣ阻害活性を用いて達成されるであろう治療上の有利さを示している。

【０１３０】

さらに、このアポトーシス誘導は、ＶＰＡ又はＲＡ単独での処置に比べ、ＶＰＡとＲＡの組合せを用いた処置において、強く、しばしば相乗的に高められ（図２５及び２６）、また図２７に提示した細胞周期分析による、アポトーシス細胞を示す大きなサブＧ１ピークの出現によっても明らかとなった。

〔実施例１６〕

【０１３１】

抗血管新生：最初にＶＰＡの効果をヒト内皮細胞のみについて試験した。加えて、血管内皮増殖因子受容体（ＶＥＧＦ－Ｒ）チロシンキナーゼ活性阻害剤の効果をこれらの細胞で試験したが、これはＶＥＧＦ－Ｒ阻害剤が腫瘍関連の内皮細胞活性化のモデル系（例えば、血管形成及び／又は内皮細胞活性など）において抗血管新生作用をすることが知られているからである。最後に、ＶＰＡの分化誘導及び／又はアポトーシス誘導活性を、ＶＥＧＦ－Ｒチロシンキナーゼ阻害剤との併用で、内皮細胞活性化の能力、すなわちこれらの細胞の血管新生に必要なプロセスを開始する能力に関して試験した。

【０１３２】

ＶＰＡとＶＥＧＦ－Ｒチロシン・キナーゼ活性阻害剤を同時に用いた組合せによる内皮細胞の処置は、それぞれの薬剤の単独使用と比べ、これらの内皮細胞の活性化について少なくとも相加的な効果を示した。したがって、ＶＰＡは血管新生過程の阻害剤との併用で、腫瘍血管新生の阻害に関し、腫瘍により誘導される内皮細胞の活性化の抑制を介して、強化された治療効果を達成するために使用できるであろう。

【図面の簡単な説明】

【０１３３】

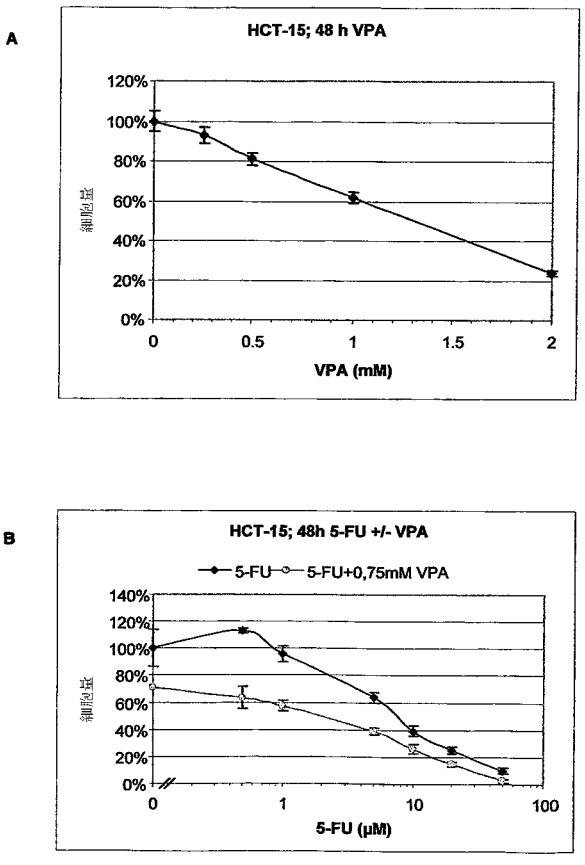
【図１】図１は、化学療法剤／細胞毒性薬剤の５－フルオロウラシル、５－ＦＵとの併用でのＶＰＡによる結腸癌細胞の総細胞量の相乗的な減少を示す（実施例１）。
【図２－１】図２－１は、化学療法剤／細胞毒性薬剤のシスプラチナムとの併用でのＶＰＡによるＤＵ－１４５前立腺癌細胞の総細胞量の相乗的な減少（図２Ａ～Ｂ）を示す（実施例２）。
【図２－２】図２－２は、化学療法剤／細胞毒性薬剤のシスプラチナムとの併用でのＶＰＡの誘導体のひとつであるラセミ体２－ｎ－プロピル－４－ペンチン酸（４－ｙｎＶＰＡ）による処置により達成されたＤＵ－１４５前立腺癌細胞の総細胞量の相乗的な減少（図２Ｃ～Ｄ）を示す（実施例２）。
【図３】図３は、化学療法剤／細胞毒性薬剤のパクリタキセルとの併用でのＶＰＡによる乳癌細胞の総細胞量の少なくとも相加的な減少を示す（実施例３）。
【図４】図４は、化学療法剤／細胞毒性薬剤のゲムシタビンとの併用でのＶＰＡによる肺癌細胞の総細胞量の少なくとも相加的な減少を示す（実施例４）。
【図５－１】図５－１は、化学療法剤／細胞毒性薬剤のカンプトテシンとの併用でのＶＰＡによる結腸癌細胞の総細胞量の少なくとも相加的な減少（図５Ａ～Ｂ）を示す（実施例５）。
【図５－２】図５－２は、化学療法剤／細胞毒性薬剤のカンプトテシンとの併用でのＶＰＡの誘導体のひとつであるラセミ体２－ｎ－プロピル－４－ペンチン酸（４－ｙｎＶＰＡ）による処置により達成されたＰＣ－３前立腺癌細胞の総細胞量の少なくとも相加的な減少（図５Ｃ～Ｄ）を示す（実施例５）。
【図６】図６は、バルプロ酸とモノクローナル抗体類を用いる免疫療法的アプローチとの併用での細胞生存率の相乗的な減少を示す（実施例６）。　ＳＫＢＲ３及びＭＤＡ－ＭＢ４５３乳癌細胞（Ａ）あるいはＭＤＡ－ＭＢ４６８乳癌細胞及びＡ４３１扁平上皮癌細胞（Ｂ）を３ｍＭバルプロ酸（ＶＰＡ）、２μｇ／ｍｌのアンチＥｒｂＢ２抗体ヘルセプチン™（Ａ）、２μｇ／ｍｌのアンチＥＧＦ受容体抗体　ｃ２２５（Ｂ）、又はバルプロ酸と上記と同濃度の抗体と組合せたものとともに培養した。生存細胞の相対数を、酵素的ＭＴＴ試験により実施例６に記載したと同様にして測定した。それぞれの点は３回の測定データの組の平均を表わす。
【図７】図７は、バルプロ酸と組換えアンチＥｒｂＢ２イムノトキシンを用いる免疫療法的／細胞毒性的アプローチとの併用での細胞生存率の少なくとも相加的な低下を示す（実施例７）。ＳＫＯＶ３卵巣癌細胞、ＳＫＢＲ３乳癌細胞及びＡ４３１扁平上皮癌細胞（Ａ）又はＲｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥｒｂＢ２腎臓癌細胞（Ｂ）を、３ｍＭ（Ａ）又は１ｍＭ（Ｂ）のバルプロ酸（ＶＰＡ）、１０ｎｇ／ｍｌの組換えアンチＥｒｂＢ２イムノトキシンｓｃＦｖ（ＦＲＰ５）－ＥＴＡ、あるいはバルプロ酸と上記と同濃度のｓｃＦｖ（ＦＲＰ５）－ＥＴＡとの組合せとともに培養した。生存細胞の相対数を、酵素的ＭＴＴ試験を用いて実施例６に記載したと同様にして測定した。それぞれの点は３回の測定データの組の平均を表わす。
【図８】図８は、バルプロ酸と組換えアンチＥＧＦ受容体イムノトキシンを用いる免疫療法的／細胞毒性的アプローチとの組合せでの細胞生存率の少なくとも相加的な低下を示す（実施例７）。　ＳＫＢＲ３乳癌細胞及びＡ４３１扁平上皮癌細胞（Ａ）又はＲｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥＧＦＲ及びＲｅｎｃａ－ｌａｃＺ／ＥＧＦＲｖＩＩＩ腎臓癌細胞（Ｂ）を、３ｍＭ（Ａ）又は１ｍＭ（Ｂ）のバルプロ酸（ＶＰＡ）、１０ｎｇ／ｍｌ（Ａ）又は１ｎｇ／ｍｌの組換えアンチＥＧＦ受容体イムノトキシンｓｃＦｖ（１４Ｅ１）－ＥＴＡ、あるいはバルプロ酸とｓｃＦｖ（１４Ｅ１）－ＥＴＡの上記と同じ濃度の組合せとともに培養した。生存細胞の相対数を酵素的ＭＴＴ試験を用いて実施例６に記載したと同様にして測定した。それぞれの点は３回の測定データの組の平均を表わす。
【図９】図９は、腎臓癌細胞を循環させることに始まる、インビボ・マウスモデルにおけるＶＰＡの腫瘍転移の発生の阻害剤、及び微小残存腫瘍症の阻害剤としての作用を示す（実施例８）。
【図１０】図１０は、ＶＰＡによるラットでの皮下腫瘍の発生及びＭＴ４５０乳癌細胞の

肺転移の発生、及び微小残存症の抑制を示す（実施例９）。
【図１１】図１１は、インビトロでの造血前駆細胞の分化遮断に対するＶＰＡの作用を示す。すなわち、ＶＰＡはサイトカイン類と協同してＰＭＬ－ＲＡＲを発現している細胞の分化能を回復させる（実施例１０）。従って、ＶＰＡはサイトカイン類の分化誘導活性に対し感作的及び相乗的に働く試薬と見なされなければならない。
【図１２】図１２は、ＶＰＡがインビトロでＰＭＬ－ＲＡＲを発現している細胞をＸ線処置に対し感作し（実施例１１）、この組合せにおいて相乗的な治療活性を惹起することを示す。
【図１３】図１３は、ＶＰＡが急性前骨髄球性白血病にかかっているマウスの生存延長において、レチノイン酸と相乗的に協同することを示す（実施例１２）。
【図１４】図１４は、いくつかの化学療法剤、すなわち５－ＦＵ、アドリアマイシン及びイリノテカンの、単独でのＨＣＴ－１１６結腸癌細胞の細胞数への作用を示す（実施例１３）。
【図１５】図１５は、ＶＰＡ単独でのＨＣＴ－１１６結腸癌細胞の細胞周期分布に及ぼす作用を示す（実施例１３）。
【図１６】図１６は、ＶＰＡ単独処理でのＨＣＴ－１１６結腸癌細胞へのアポトーシス誘導、及び化学療法剤５－ＦＵとの併用でのＶＰＡの相乗活性を示す（実施例１３）。
【図１７－１】図１７－１は、いくつかの化学療法剤、すなわち５－ＦＵ、アドリアマイシン及びイリノテカンとの併用での、ＨＣＴ－１１６結腸癌細胞の細胞生存率に及ぼすＶＰＡの相乗作用を示す（実施例１３）。
【図１７－２】図１７－２は、いくつかの化学療法剤、すなわち５－ＦＵ、アドリアマイシン及びイリノテカンとの併用での、ＨＣＴ－１１６結腸癌細胞の細胞生存率に及ぼすＶＰＡの相乗作用を示す（実施例１３）。
【図１７－３】図１７－３は、いくつかの化学療法剤、すなわち５－ＦＵ、アドリアマイシン及びイリノテカンとの併用での、ＨＣＴ－１１６結腸癌細胞の細胞生存率に及ぼすＶＰＡの相乗作用を示す（実施例１３）。
【図１８】図１８は、分化誘導薬剤１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3との併用でのＶＰＡによるＭＣＦ－７乳癌細胞の細胞量の相加的及び／又は相乗的減少を示す（実施例１４）。
【図１９】図１９は、分化誘導薬剤１α、２５－ジヒドロキシビタミンD_3との併用でのＶＰＡによるＤＵ－１４５前立腺癌細胞の細胞量の少なくとも相加的な減少を示す（実施例１４）。
【図２０】図２０は、ＲＡとの併用でのＶＰＡのＫａｚｕｍｉ１細胞の生存率への相加性作用及びＫａｚｕｍｉ１細胞の分化過程への相乗作用を示す（実施例１５）。
【図２１】図２１は、Ｋａｚｕｍｉ１細胞の生存率、細胞数及び骨髄球の分化に対するＶＰＡの単独薬剤としてのあるいはＲＡとの併用での用量依存的作用を示す。細胞数は血球計算板と光学顕微鏡を用いて直接細胞を数える（トリパンブルー染料除去法）ことにより評価、定量化された。形態学的検査はライト・ギームザ染色されたサイトスピン（ｃｙｔｏｓｐｉｎｓ）及びニトロブルーテトラゾリウム（ＮＢＴ）染料還元試験によりそれぞれ行われた。それぞれの点は3回の測定データの組の平均を表わす（実施例１５）。
【図２２】図２２は、ＶＰＡとＲＡの組合せでの処置におけるＡＭＬ患者からの白血病性芽球細胞の生体外での分化の相乗的効果を、これらの薬剤単独での使用と比較して示す（実施例１５）。
【図２３】図２３は、ヨウ化プロピジウム染色したＫａｚｕｍｉ１細胞のＦＡＣＳ分析により解析した細胞周期分布に対するＲＡの単独薬剤としてのあるいはＶＰＡとの併用での用量依存的作用を示す（実施例１５）。
【図２４】図２４は、ＶＰＡ処置単独あるいはＲＡとの併用により誘導されたＡＭＬ芽球の形態分化（後骨髄球あるいは好中球様形態を有する細胞の出現）を示す（実施例１５）。
【図２５】図２５は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤ＴＳＡ及びＶＰＡ＋／－ＲＡの原

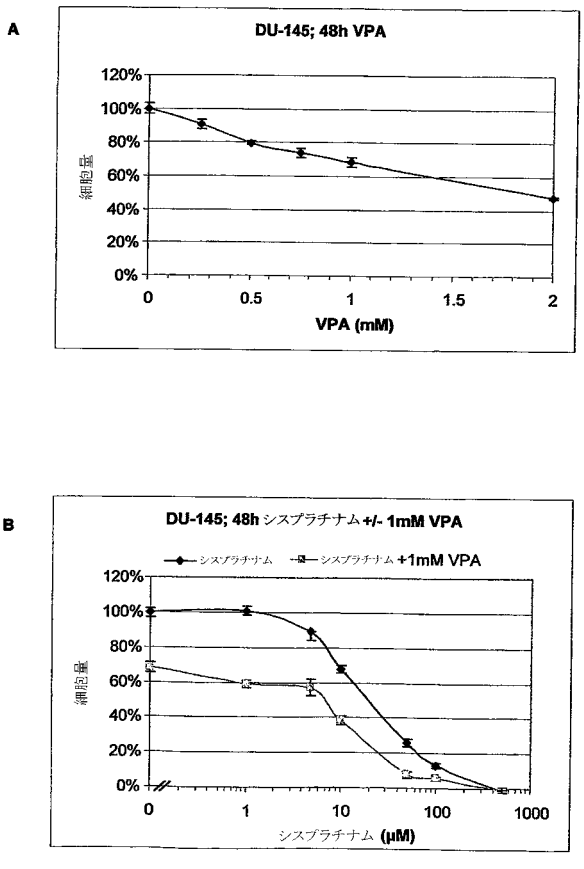
発性ＡＭＬ芽球の生存率への作用を示す。評価はトリパンブルー染料除去法により、血球計算板を用いて行った。それぞれの点は３回の測定データの組の平均を表わす（実施例１５）。ＶＰＡは相乗的治療応答をもたらす可能性がある。

【図２６】図２６は、原発性ＡＭＬ芽球において、ヨウ化プロピジウム染色した細胞のＦＡＣＳ分析による、ＶＰＡ及びＴＳＡ単独又はＲＡとの併用で処置した後の、細胞周期の変化及びアポトーシスＤＮＡの解析を示す（実施例１５）。

【図１】

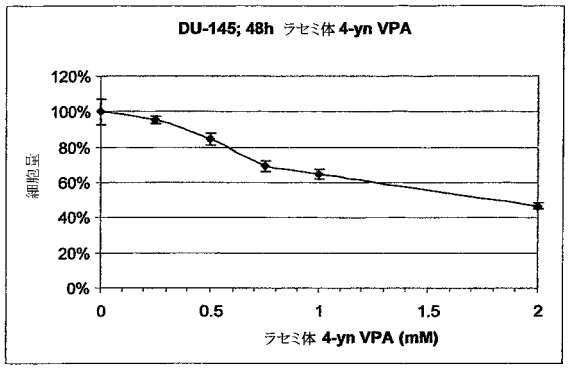


【図２－１】

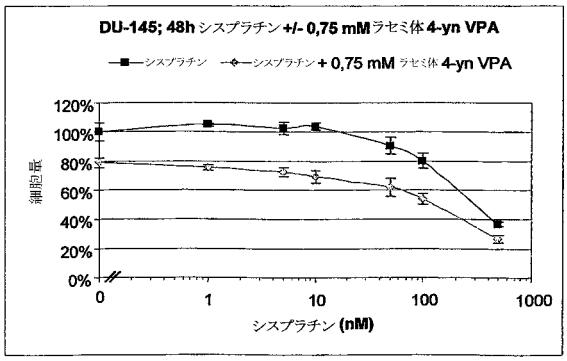


【図２－２】

C

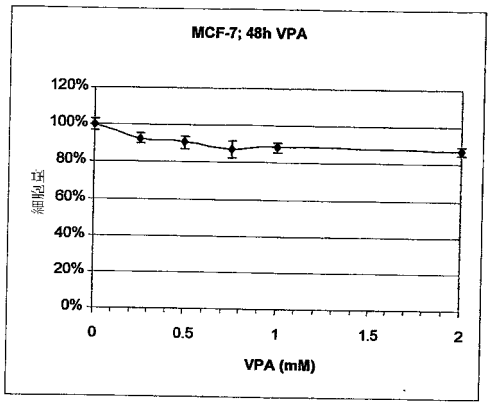


D

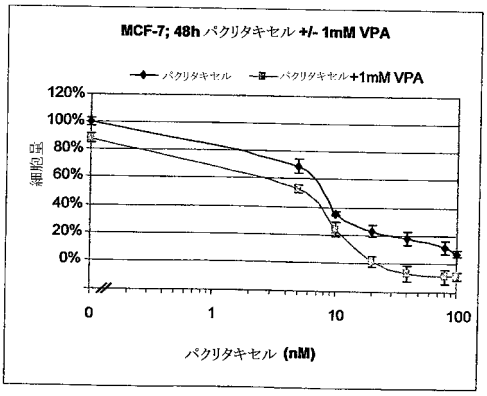


【図３】

A

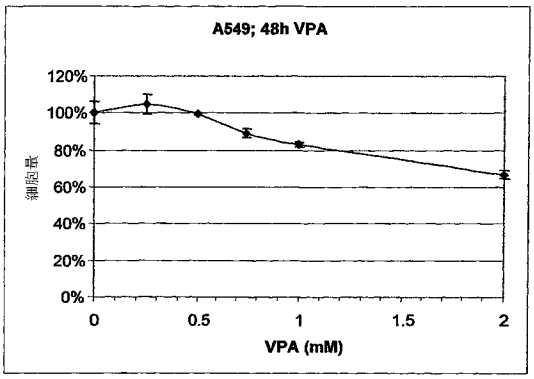


B

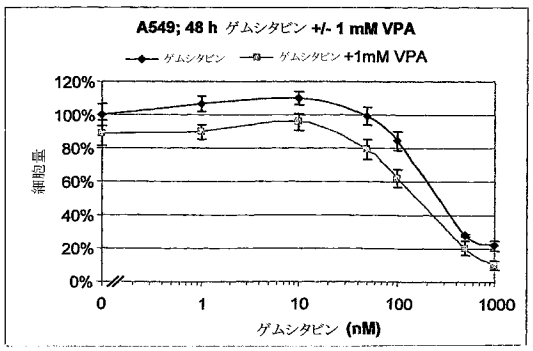


【図４】

A

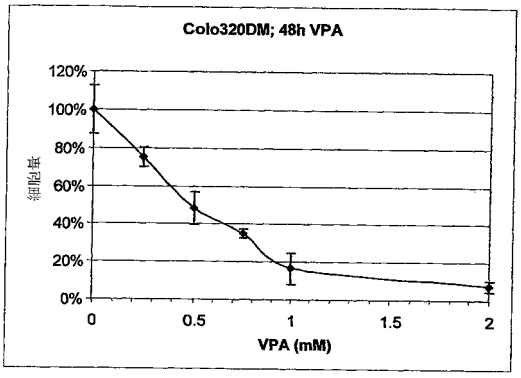


B

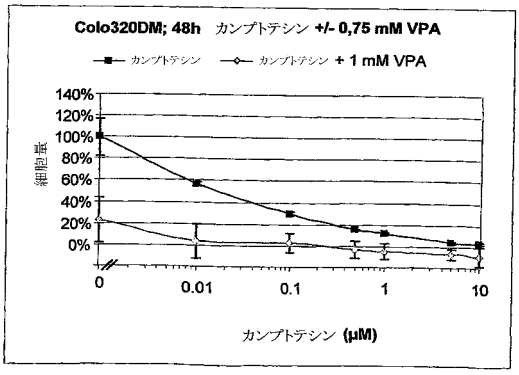


【図５－１】

A

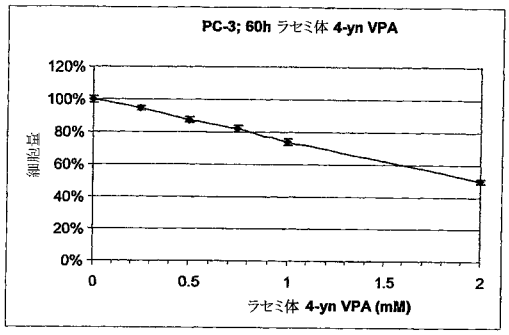


B

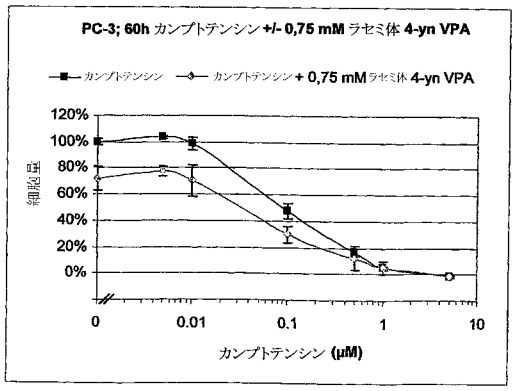


【図５－２】

C



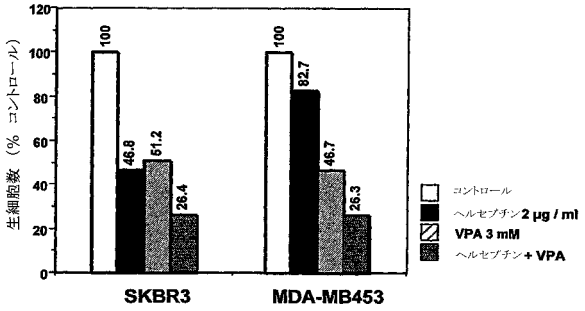
D



【図６】

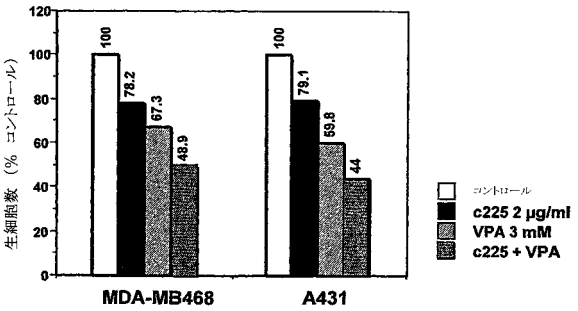
A

バルプロ酸とヘルセプチン™による
ヒト腫瘍細胞の増殖抑制



B

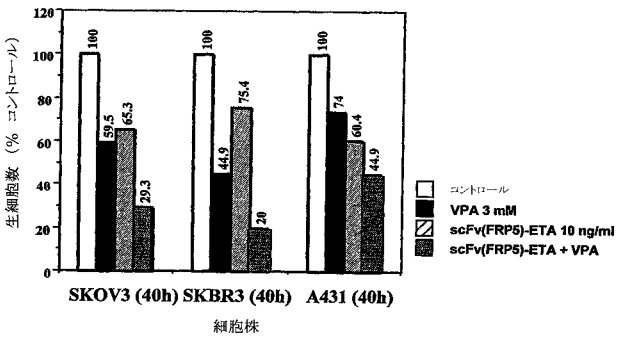
バルプロ酸とc225によるヒト腫瘍細胞の増殖抑制



【図７】

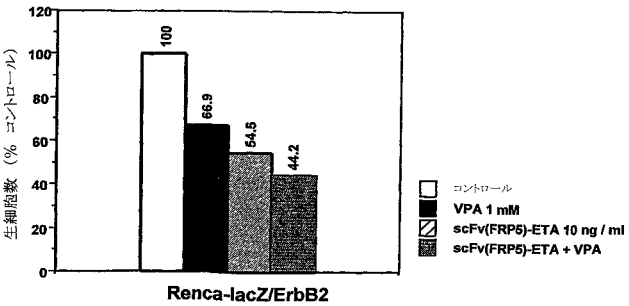
A

バルプロ酸と scFV(FRP5)-ETAによる
ヒト腫瘍細胞の増殖抑制



B

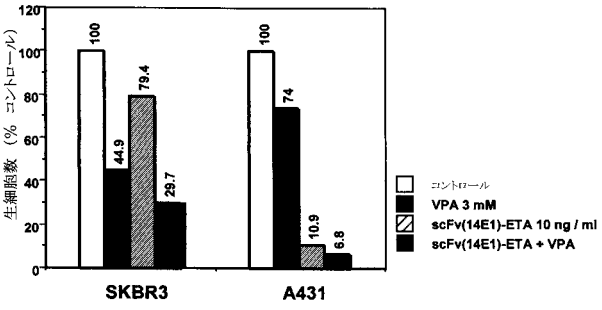
バルプロ酸と scFV(FRP5)-ETAによる
腎癌細胞の増殖抑制



【図８】

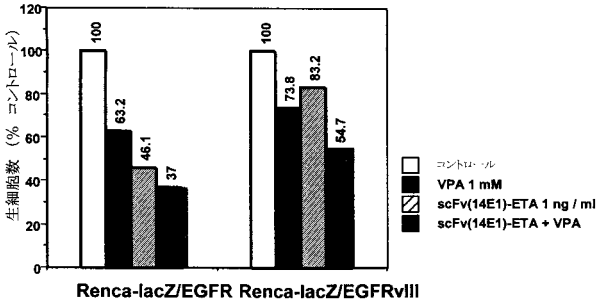
A

バルプロ酸と scFV(14E1)-ETAによる
ヒト腫瘍細胞の増殖抑制

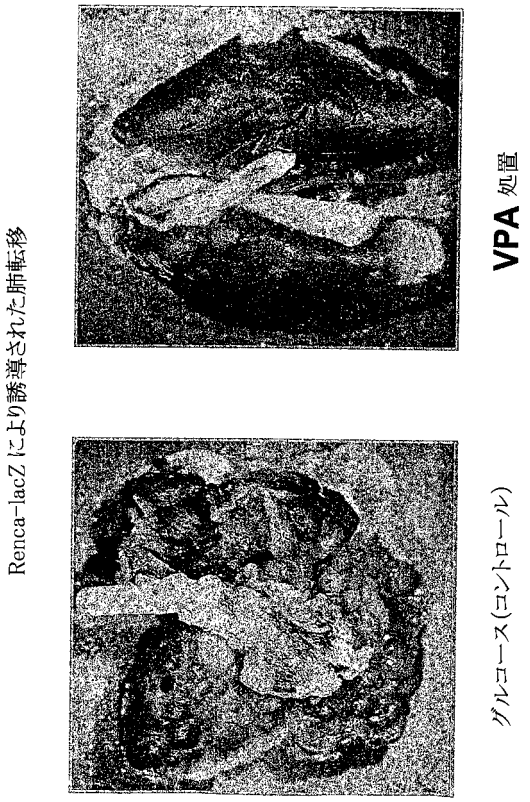


B

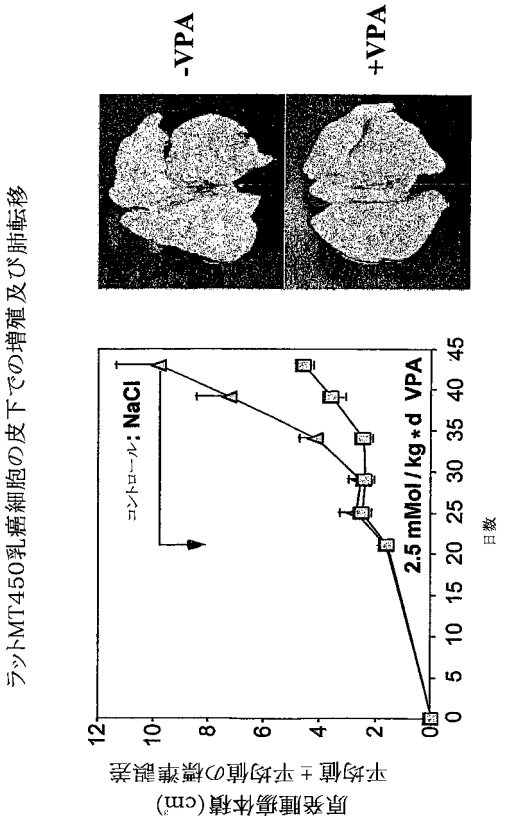
バルプロ酸と scFV(14E1)-ETAによる
腎癌細胞の増殖抑制



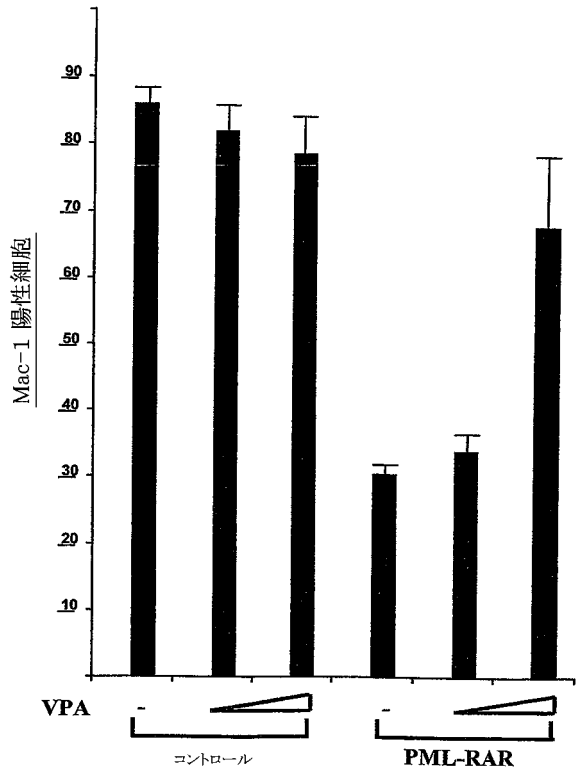
【図９】



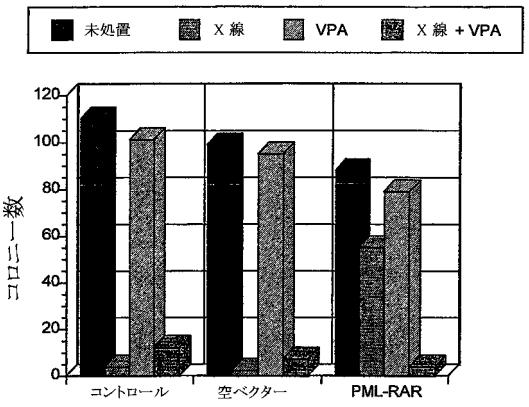
【図１０】



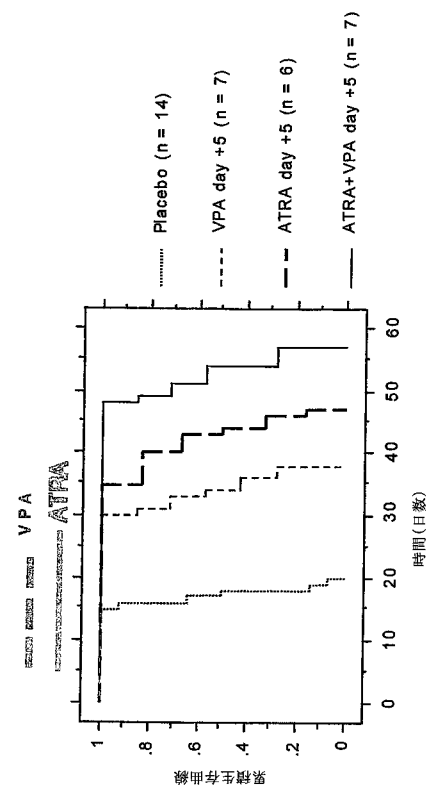
【図１１】



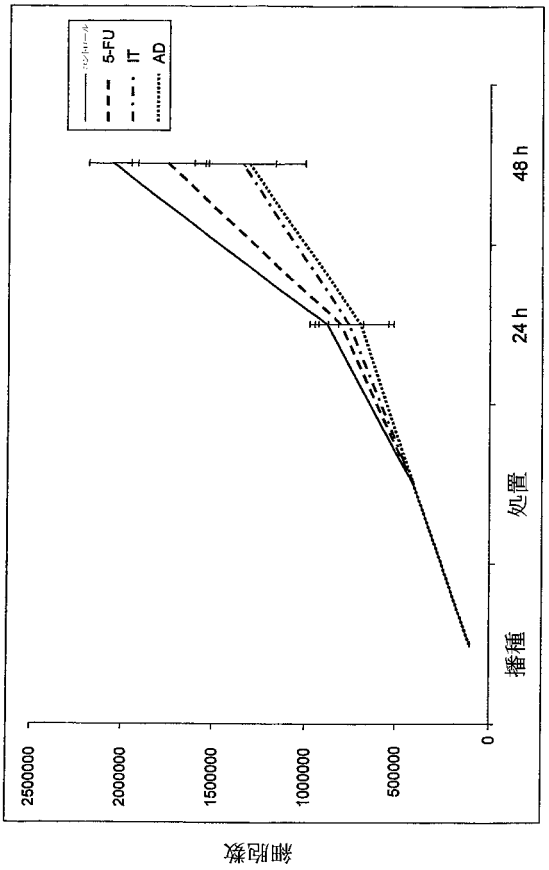
【図１２】



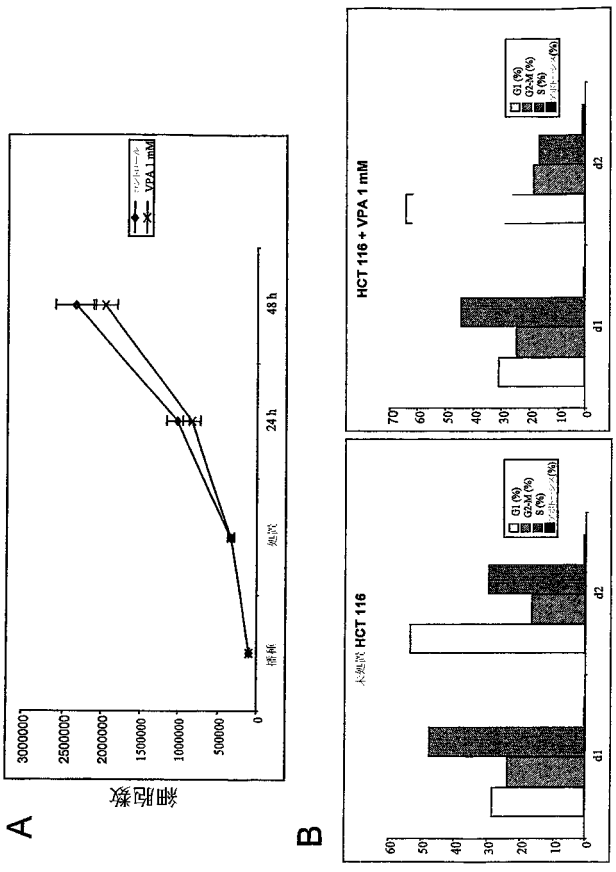
【図１３】



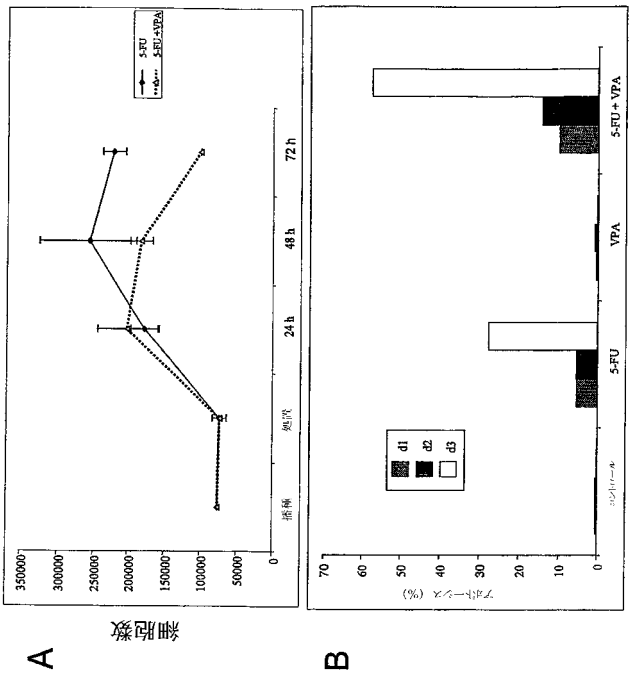
【図１４】



【図１５】

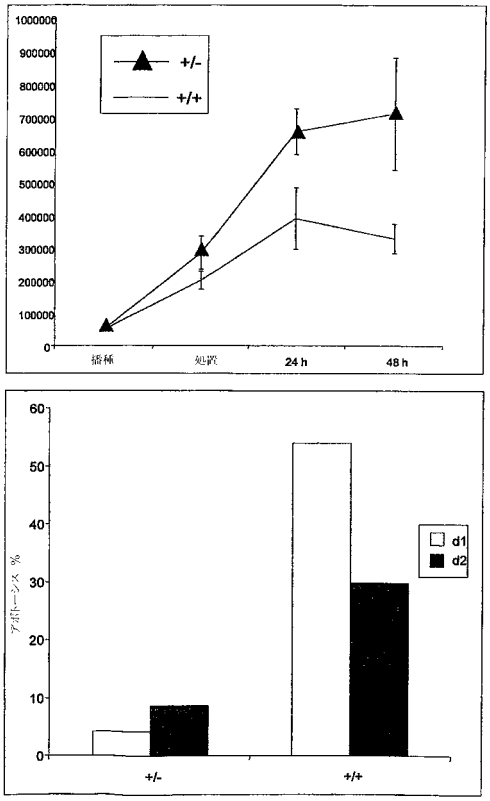


【図１６】



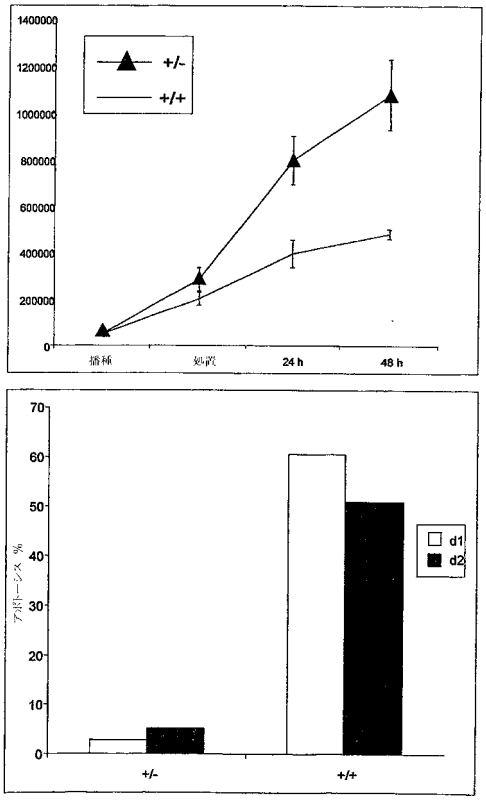
【図１７－１】

A



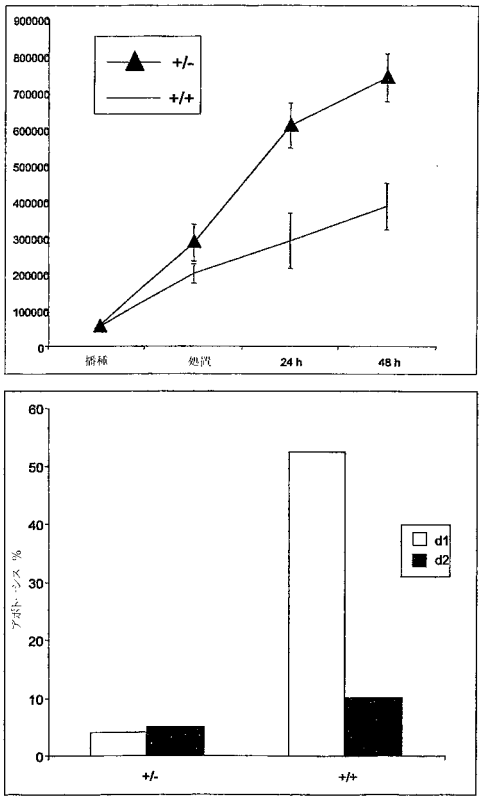
【図１７－２】

B

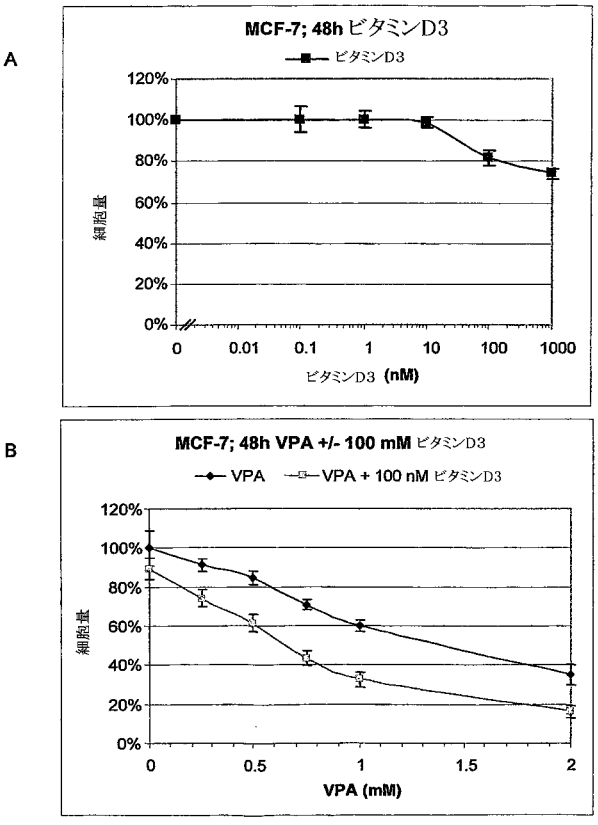


【図１７－３】

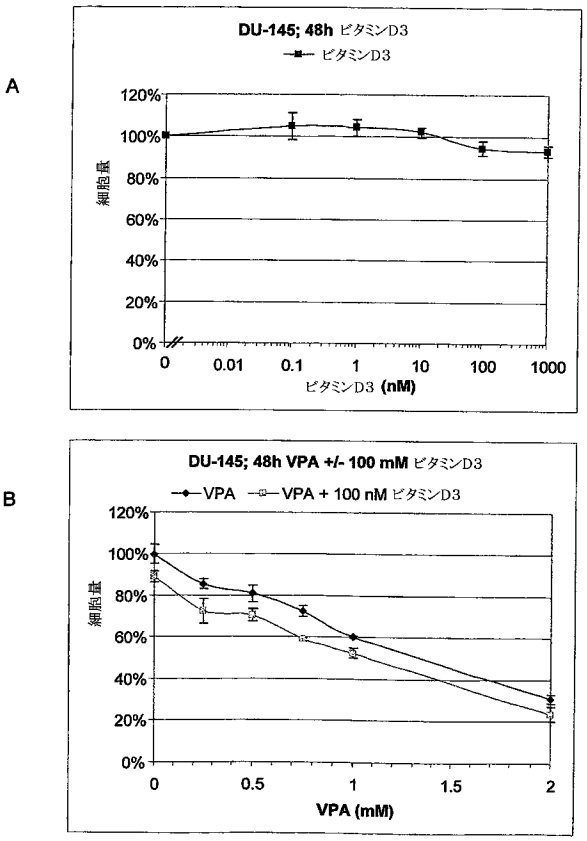
C



【図１８】



【図１９】

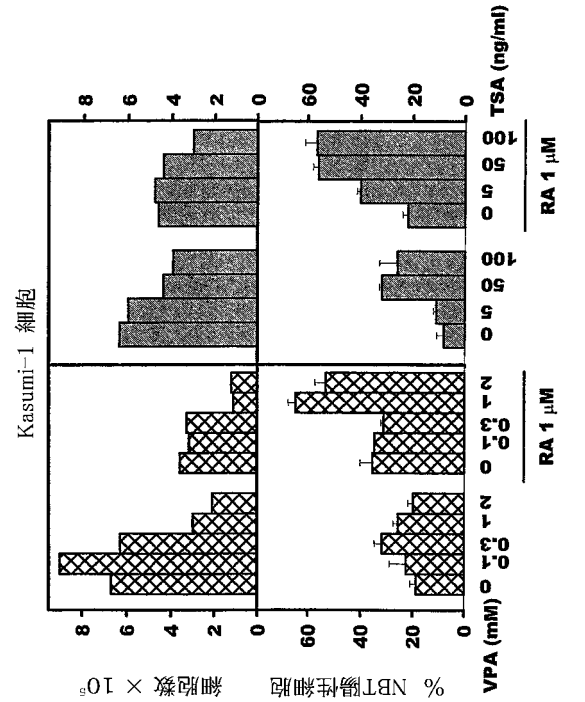


【図２０】

VPA及び／又はRAのKasumi-1細胞の増殖及び分化への効果

処置	生細胞数 N° x 10^5	CD11b (AU)	NBT+ (%)	細胞周期－相 G1	S	G2
コントロール	6.7	9.8	8.6	56.1	40.8	3.1
VPA (1 mg/ml)	3.0	12.1	15.6	50.8	43.1	6.1
RA (1μM)	3.6	13.2	25.4	66.1	27.9	6.0
VPA + RA	1.1	27.2	64.5	84.7	8.2	7.1

【図２１】



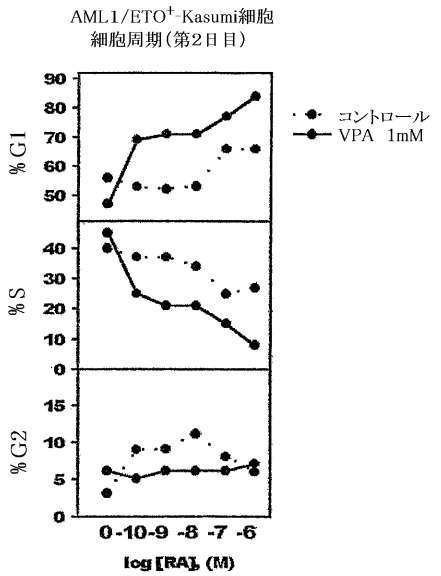
【図２２】

表1. VPA及び/又はRAの、AML患者からの原発性芽細胞の分化への効果

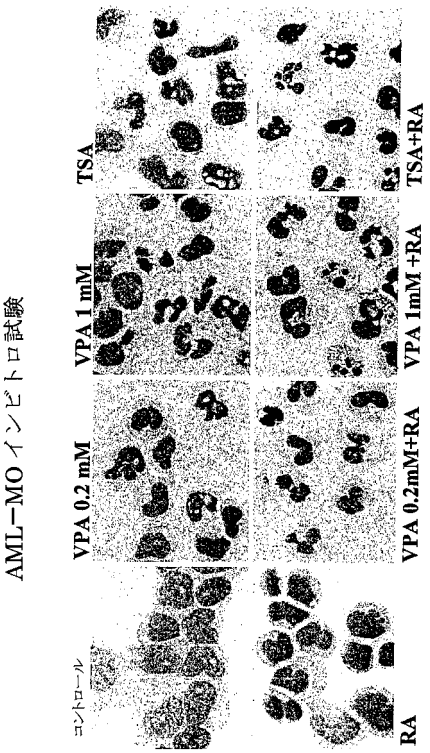
患者 (#)	FAB	細胞遺伝学的異常	形態学的及び遺伝子的特徴 VPA	RA	RA+VPA	分化 (5日間の培養) C	VPA	RA	RA+VPA	NBT (% of +ve cells)
1	M2	NN	++	+	++++	12	20	28	62	
2	M2	NN	+	++	+++	33	42	30	85	
3*	M4	Trisomy 8	++	+	++++	24	38	25	67	
4*	M0	Inv-3	+	+	+++	27	39	40	71	
5	AML post RAEB	5q-	++	++	++++	ND	ND	ND	ND	

*化学療法後の再発時に調べられたAML患者； FAB: French-American-British; RAEB: 芽球増加を伴う不応性貧血
NN: 通常核型； 分化: + 10-20%; ++ 20-40%; +++ 50-80%; ++++ 80-100% (コントロール培養細胞より更に成熟した後骨髄球及び顆粒球の割合） ND: 測定せず

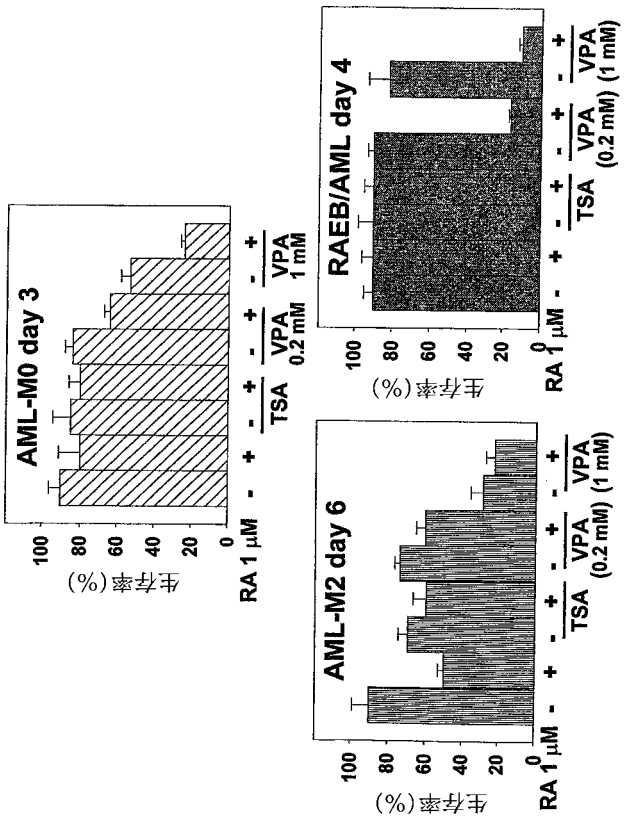
【図２３】



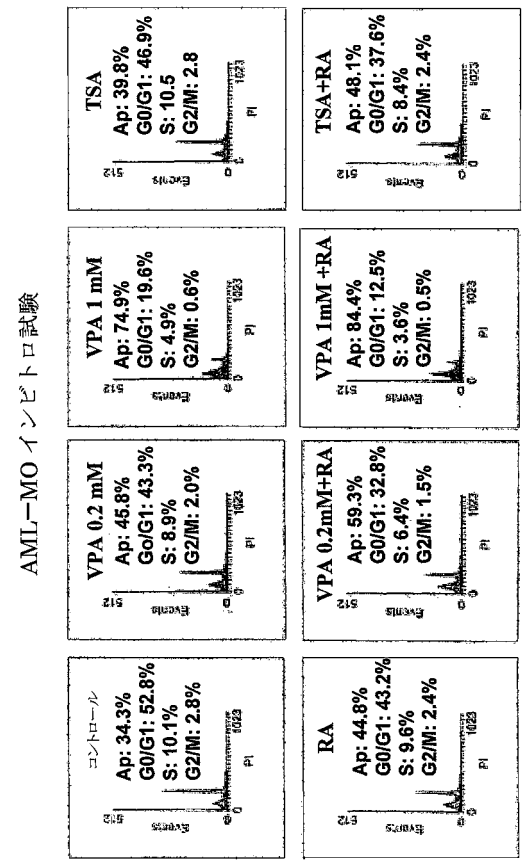
【図２４】



【図２５】

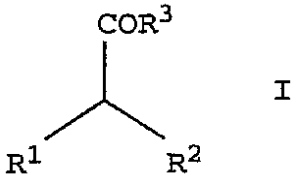


【図２６】



【手続補正書】
【提出日】平成15年12月19日(2003.12.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
バルプロ酸又はその薬学上許容される塩の、ヒト癌の併用療法のための医薬の製造における使用であり、
(i) 該併用療法が放射線照射処置を含み；及び
(ii) 該ヒト癌が乳癌、結腸癌、頭頚部癌、小細胞性肺癌及び血液細胞の癌からなる群より選択されることを特徴とする使用。
【請求項２】
併用療法が、更に、分化誘導薬剤による処置、化学療法剤による処置、細胞毒性薬剤による処置、ホルモン療法、免疫療法、抗血管新生療法及び／又は遺伝子治療からなる群より選択される抗腫瘍治療法を含むことを特徴とする請求項１に記載の使用。
【請求項３】
バルプロ酸が、ＨＤＡＣ活性を有する酵素の阻害剤であり、相加的又は相乗的な効果をもたらすことを特徴とする請求項１又は２に記載の使用。
【請求項４】
該ヒストン脱アセチル化酵素活性を有する酵素が、哺乳類、好ましくはヒトのヒストン脱アセチル化酵素であることを特徴とする請求項３に記載の使用。
【請求項５】
該ヒトのヒストン脱アセチル化酵素がＨＤＡＣ１～８及びＳＩＲ２タンパク質ファミリーの一員からなる群から選ばれることを特徴とする請求項３又は４に記載の使用。
【請求項６】
バルプロ酸がＨＤＡＣ群のサブセットのみを特異的に阻害することを特徴とする請求項３～５のいずれかに記載の使用。
【請求項７】
バルプロ酸が細胞の分化誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～６のいずれかに記載の使用。
【請求項８】
バルプロ酸が形質転換細胞の分化誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～６のいずれかに記載の使用。
【請求項９】
バルプロ酸が形質転換細胞のアポトーシス誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～６のいずれかに記載の使用。
【請求項１０】
ヒストン又はアセチル化によって機能が調節されているその他のタンパク質の高アセチル化の誘導が、ヒト癌の治療に好ましい効果を与えることを特徴とする請求項１～９のいずれかに記載の使用。
【請求項１１】
バルプロ酸又はその薬学上許容される塩が第一の治療剤として投与され、また放射線治療が第二の治療剤として投与され、該放射線治療の１日当たりの照射量が、該放射線治療単独での１日当りの照射量と比べて有意に低減されることを特徴とする請求項１～１０のいずれかに記載の使用。
【手続補正書】
【提出日】平成16年8月24日(2004.8.24)

【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
臨床的に確立されている抗癌治療薬との併用療法における処置効果のためにヒト癌細胞を感受性にする医薬の製造における式Ｉ：
【化１】



（式中、R^1及びR^2は、独立して直鎖状又は分枝状の、飽和又は不飽和の、一個又は数個のヘテロ原子を含んでいてもよく、また置換基を有していてもよい炭素数３～２５の脂肪族炭化水素鎖を表し、R^3は水酸基、ハロゲン、アルコキシ基又はアルキル化されていてもよいアミノ基を表わす。）で表わされる化合物又はその薬学上許容される塩の使用。
【請求項２】
R^1及びR^2が、独立して一個の二重結合又は三重結合を含んでいてもよく、直鎖状又は分枝状の炭素数３～２５の炭化水素鎖であることを特徴とする請求項１に記載の使用。
【請求項３】
該化合物が、ＶＰＡ、４－ｙｎ
ＶＰＡ及びそれらの薬学上許容される塩からなる群より選択されることを特徴とする請求項１又は２に記載の使用。
【請求項４】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が、放射線照射処置、分化誘導薬剤による処置、化学療法剤による処置、細胞毒性薬剤による処置、ホルモン療法、免疫療法、抗血管新生療法及び／又は遺伝子治療を含むことを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の使用。
【請求項５】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が放射線照射を含むことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の使用。
【請求項６】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が分化誘導薬剤による処置を含むことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の使用。
【請求項７】
該分化誘導薬剤がビタミンＡを主成分とする薬剤、ビタミンD_3を主成分とする薬剤及びサイトカイン類からなる群より選択されることを特徴とする請求項６に記載の使用。
【請求項８】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が免疫療法を含むことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の使用。
【請求項９】
該免疫療法が抗体の使用を含むことを特徴とする請求項８に記載の使用。
【請求項１０】
該抗体が細胞毒性タンパク質又は薬剤成分等の官能基と結合していることを特徴とする請求項９に記載の使用。
【請求項１１】
該抗体が放射性同位元素と結合していることを特徴とする請求項９に記載の使用。
【請求項１２】

該免疫療法が腫瘍ワクチン接種を含むことを特徴とする請求項８に記載の使用。
【請求項１３】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が拮抗的に作用するホルモン試薬による処置を含むことを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の使用。
【請求項１４】
該式Ｉの増感剤を用いる併用療法が請求項４に記載した抗腫瘍療法の少なくとも２つの方法を含むことを特徴とする請求項１～１３のいずれかに記載の使用。
【請求項１５】
該ヒト癌が、微小残存腫瘍症、腫瘍転移、皮膚癌、エストロゲン受容体依存性及び非依存性乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、結腸及び結腸直腸癌、膵臓癌、頭頚部癌、小細胞及び非小細胞肺癌及び血液細胞の癌からなる群より選択されることを特徴とする請求項１～１４のいずれかに記載の使用。
【請求項１６】
該式Ｉの増感剤がＨＤＡＣ活性を有する酵素の阻害剤であり、１種又は数種の他の抗癌処置との併用療法により相加的な治療効果をもたらすことを特徴とする請求項１～１５のいずれかに記載の使用。
【請求項１７】
該ヒストン脱アセチル化酵素活性を有する酵素が哺乳類、好ましくはヒトのヒストン脱アセチル化酵素であることを特徴とする請求項１６に記載の使用。
【請求項１８】
該ヒトのヒストン脱アセチル化酵素がＨＤＡＣ１～８及びＳＩＲ２タンパク質ファミリーの一員からなる群より選択されることを特徴とする請求項１６又は１７に記載の使用。
【請求項１９】
該式Ｉの増感剤がＨＤＡＣ類のサブセットのみを特異的に阻害することを特徴とする請求項１６～１８のいずれかに記載の使用。
【請求項２０】
該式Ｉの増感剤が細胞の分化誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～１９のいずれかに記載の使用。
【請求項２１】
該式Ｉの増感剤が形質転換細胞の分化誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～１９のいずれかに記載の使用。
【請求項２２】
該式Ｉの増感剤が形質転換細胞のアポトーシス誘導のために用いられることを特徴とする請求項１～１９のいずれかに記載の使用。
【請求項２３】
ヒストン又はアセチル化によって機能が調節されているその他のタンパク質の高アセチル化の誘導が、ヒト癌の治療に好ましい効果を与えることを特徴とする請求項１～２２のいずれかに記載の使用。
【請求項２４】
該式Ｉの増感剤又はその薬学上許容される塩が第一の治療剤として投与され、また抗癌剤が第二の治療剤として投与され、該抗癌剤の１日当たりの投与量が、該抗癌剤の単独投与における１日当たりの投与量と比べて有意に低減されることを特徴とする請求項１～２３のいずれかに記載の使用。
【請求項２５】
請求項１～３に記載の式Ｉの化合物又はその薬学上許容される塩を、患者体内の癌細胞を感受性にするのに有効な量で癌患者に投与することを特徴とする、抗癌剤の投与量を低減させる方法。
【請求項２６】
患者体内の癌細胞を抗癌剤に対し感受性にするのに有効な量の請求項１～３に記載の式Ｉの化合物又はその薬学上許容される塩、及び治療的に有効な量の該抗癌剤とを投与する

ことを特徴とする患者体内の癌を処置する方法。
【請求項２７】
請求項１～３に記載の式Ｉの化合物又はその薬学上許容される塩を、患者体内の癌細胞を抗癌剤に対し感受性にするのに有効な量で患者に投与することを特徴とする抗癌剤の治療的活性を高める方法。
【請求項２８】
第一の治療剤として請求項１に記載の式Ｉの化合物又はその薬学上許容される塩を、第二の治療剤として抗癌剤を含み、該抗癌剤が投与に適した形でその抗癌剤単独投与の際の投与量と比べ有意に低減された１日当りの投与量で提供されていることを特徴とする薬剤キット。
【請求項２９】
患者の体内で請求項１～３に記載の増感剤に代謝される物質の、ヒト癌の併用療法のための医薬の製造における使用。
【請求項３０】
バルプロ酸誘導体を提供し、
そのヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を測定し、
併用癌治療におけるその有効性を判定し、そして
もし、その物質がヒストン脱アセチル化酵素活性及び併用癌治療でそれぞれの単独処置よりも有意により高い有効性を有していればその物質を選択することを特徴とする、癌の併用療法に有用な増感剤を同定するための方法。
【請求項３１】
ヒストン脱アセチル化酵素阻害活性を、
転写抑制アッセイ、
ヒストンＨ３又はヒストンＨ４のアセチル化を検出するウェスタン・ブロット法、又は
酵素による脱アセチル化アッセイ
により測定することを特徴とする請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
併用療法効果を細胞培養で、又はインビボ動物腫瘍モデルを用いて測定することを特徴とする請求項３０又は３１に記載の方法。
【請求項３３】
細胞周期分析、アポトーシス細胞の検出、生細胞数又は腫瘍サイズの測定、細胞分化マーカーの検出、細胞の代謝活性の測定及び／又は細胞膜の完全性測定を含む方法を含むことを特徴とする請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
ａ）実質的に同一の２つの細胞個体群を用意する工程、
ｂ）第一の個体群をＶＰＡ又はその誘導体と接触させる工程、
ｃ）第一の個体群を一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法による処置に付す工程、及び
ｄ）ＶＰＡ又はその誘導体と接触させなかった第二の個体群よりも、ＶＰＡ又はその誘導体と接触させ、一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法による処置に付された第一の個体群中で有意に高いレベルで発現した遺伝子あるいは遺伝子生成物を検出する工程（ここで工程ｂ）及びｃ）は、同時にあるいはどのような順番でも実施することができる。）
を含むことを特徴とする、バルプロ酸又はその誘導体と一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法との併用療法により調節される遺伝子を同定するための方法。
【請求項３５】
サブトラクティブハイブリダイゼーションあるいは複数のｃＤＮＡサンプル、発現配列タグ又はユニジーンコレクションのスクリーニングを用いることを特徴とする請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
核酸技術の使用を含むことを特徴とする請求項３４又は３５に記載の方法。
【請求項３７】

ハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ連鎖反応を用いることを特徴とする請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

分化的に制御されたタンパク質に対する特異抗体を検出に用いることを特徴とする請求項３４又は３５に記載の方法。

【請求項３９】

ヒトあるいは動物の体外で、請求項３４～３８のいずれかに記載の方法により同定される遺伝子の発現レベルの測定を含むことを特徴とする腫瘍診断方法。

【請求項４０】

インビトロで腫瘍又は腫瘍細胞が、ＶＰＡ又はその誘導体と一つ又はいくつかの他の抗腫瘍療法との併用療法に応答性であるかどうかを調べる工程を含むことを特徴とする、腫瘍又は腫瘍細胞を同定するための診断方法。

【請求項４１】

請求項３３～３７のいずれかの方法を含むことを特徴とする請求項４０に記載の診断方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/19 A61K31/203 A61K31/593 A61K31/282 A61K45/06 A61K41/00 A61P35/00 //(A61K31/203,31:19),(A61K31/593, 31:19),(A61K31/282,31:19),(A61K31/19,31:00),(A61K45/06,31:19)

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 939 455 A (REPHAELI ADA) 17 August 1999 (1999-08-17) column 1 claims 1,9-12,56 ---	1-5, 14-24
X	AIKEN TC, COLLIN RC: "A possible anti-emetic role for sodium valproate in cytotoxic chemotherapy" BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 89, no. 4, 4 April 1995 (1995-04-04), pages 903-904, XP008004839 abstract --- -/--	1-5, 14-29

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 March 2003	-1 07 2003

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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DRIEVER PH, KNÜPFER MM, CINATL J, WOLFF JEA: "Valproic acid for the treatment of pediatric malignant glioma" KLINISCHE PAEDIATRIE, vol. 211, July 1999 (1999-07), pages 323-328, XP000997401 abstract page 324 page 325, column 2, paragraph 4 page 326, column 1, paragraph 2 page 327, paragraph 2 page 327, paragraph 3 ---	1-5, 14-29
X	KNÜPFER MM, HERNÁIZ-DRIEVER P, POPPENBORG H, WOLFF JEA, CINATL J: "Valproic Acid Inhibits Proliferation and Changes Expression of CD44 and CD56 of Malignant Glioma Cells in Vitro" ANTICANCER RESEARCH, vol. 18, no. 5A, 1998, pages 3585-3589, XP008004824 abstract page 3587, column 1, line 1-5, paragraph 3 page 3587, column 1, line 13,14, paragraph 4 page 3587, column 2, line 4-8 page 3588, column 1, line 4-10 page 3588, column 2, paragraph 2 ---	1-5, 14-29
X	YAO C-P, MATHER GG, STEPHENS JR, LEVY RH: "Cytotoxicity Induced by the Combination of Valproic Acid and Tumor Necrosis Factor-alpha" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 58, 1999, pages 455-459, XP002203825 abstract page 456, column 2, paragraph 4 ---	1-5, 14-29
X	VAMECQ J ET AL: "PRELIMINARY STUDIES ABOUT NOVEL STRATEGIES TO REVERSE CHEMORESISTANCE TO ADRIAMYCIN REGARDING GLUTATHIONE METABOLISM, PEROXISOMAL AND EXTRAPEROXISOMAL HYDROPEROXIDE AND VALPROIC ACID METABOLIC PATHWAYS" BIOLOGY OF THE CELL, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 77, 1993, pages 17-26, XP008004943 ISSN: 0248-4900 abstract page 25, left-hand column, paragraph 2 --- -/--	1-5, 14-29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FISCHKOFF S A ET AL: "INDUCTION OF NEUTROPHILIC DIFFERENTIATION OF HUMAN PROMYELOCYTIC LEUKEMIC CELLS BY BRANCHED-CHAIN CARBOXYLIC ACID ANTICONVULSANT DRUGS" JOURNAL OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 3, no. 2, April 1984 (1984-04), pages 132-137, XP000997488 ISSN: 0732-6580 abstract page 135, line 11 -page 136, line 2 page 136, line 14 -page 137, line 9 ---	1-5, 14-29
X	EP 0 632 008 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 4 January 1995 (1995-01-04) page 6, line 34 -page 7, line 11 page 30, line 6 - line 13 page 35, line 36 - line 38 claims 12,14 ---	1-5, 14-29
X	WO 01 47533 A (ONTARIO CANCER INST ;HOEFLICH KLAUS (CA); LUO JUAN (CA); WOODGETT) 5 July 2001 (2001-07-05) abstract page 2, line 13 - line 18 page 3, line 13 - line 19 page 5, line 8 - line 11 ---	1-5, 14-29
X	COURAGE-MAGUIRE C, BACON CL, NAU H, REGAN CM: "Correlation of in vitro anti-proliferative potential with in vivo teratogenicity in a series of valproate analogues" INT J DEVEL NEUROSCIENCE, vol. 15, no. 1, 1997, pages 37-43, XP002224044 abstract page 37, line 17 - line 19 page 37, line 21 -page 38, line 5 figure 1 tables 1,2 page 40, paragraph 4 - paragraph 5 page 42, paragraph 3 --- -/--	1-5, 14-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NORDENBERG J ET AL: "EFFECTS OF PSYCHOTROPIC DRUGS ON CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 58, no. 8, 15 October 1999 (1999-10-15), pages 1229-1236, XP001027786 ISSN: 0006-2952 abstract page 1230, left-hand column, paragraphs 2,3 page 1233, right-hand column, last paragraph -page 1234, left-hand column, paragraph 1 ---	1
X	US 6 028 102 A (BIALER MEIR ET AL) 22 February 2000 (2000-02-22) column 1, line 50 - line 53 column 2, line 42 - line 44 column 3, line 35 - line 37 ---	1-5, 14-29
X	CINATL J JR, CINATL J, SCHOLZ M, HERNÁIZ-DRIEVER P, HENRICH D, KABICKOVA H, VOGEL J-U, DOERR HW, KORNHUBER B: "Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells" ANTI-CANCER DRUGS, vol. 7, no. 7, July 1996 (1996-07), pages 766-773, XP008004842 abstract ---	1-5, 14-29
X	CINATL J ET AL: "SODIUM VALPROATE INHIBITS IN VIVO GROWTH OF HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS" ANTI-CANCER DRUGS, OXFORD, GB, vol. 8, no. 10, November 1997 (1997-11), pages 958-963, XP000997406 ISSN: 0959-4973 abstract page 959, column 2, paragraph 4 -page 960, column 1, paragraph 1 page 960, column 2, paragraph 2 page 962, column 1, paragraph 2 --- -/--	1-5, 14-29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TITTLE T V ET AL: "EFFECT OF ANTIEPILEPTIC DRUGS ON GROWTH OF MURINE LYMPHOID TUMOR CELLS IN SINGLE-CELL CULTURE" EPILEPSIA, RAVEN PRESS LTD., NEW YORK, US, vol. 33, no. 4, July 1992 (1992-07), pages 729-735, XP000997403 ISSN: 0013-9580 abstract page 729 page 733, column 2, paragraph 3 ---	1-5, 14-29
X	DATABASE MEDLINE [Online] November 1978 (1978-11) MORI H ET AL: "[Effect of alpha-mercaptopropionylglycine (alpha-MPG) and sodium dipropylacetate (DPA) on antibody formation (IV). Tumor immunity (author's transl)]" Database accession no. NLM374206 XP002166105 abstract & NIPPON YAKURIGAKU ZASSHI. JAPANESE JOURNAL OF PHARMACOLOGY. JAPAN NOV 1978, vol. 74, no. 8, November 1978 (1978-11), pages 907-923, ISSN: 0015-5691 ---	1-5, 14-29
X	US 5 672 746 A (NAU HEINZ ET AL) 30 September 1997 (1997-09-30) abstract column 4, line 62 -column 5, line 6 column 7, line 23 - line 42 ---	1-5, 14-29
X	LETIZIA C ET AL: "REDUCTION OF AN ACTH SECRETING ADENOMA IN A PATIENT WITH NELSON'S SYNDROME CHRONICALLY TREATED WITH SODIUM VALPROATE" EUROPEAN JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, ELSEVIER, AMSTERDAM,, NL, vol. 5, no. 4, October 1994 (1994-10), pages 325-328, XP000997468 ISSN: 0953-6205 abstract page 325 --- -/--	1-5, 14-29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 110 955 A (NUDELMAN ABRAHAM ET AL) 29 August 2000 (2000-08-29) abstract column 1, line 5 - line 20 column 3, line 21 -column 4, line 26 column 8, line 18 - line 21 column 8, line 57 - line 57 column 12, line 20 - line 22 column 12, line 36 - line 38 claims 1,6,15 ---	1-5, 14-29
X	EP 0 412 211 A (THERAPEUTICAL SYSTEMS CORP) 13 February 1991 (1991-02-13) page 20, line 56 -page 21, line 16 claims 9,11 ---	1-5, 14-29
X	GROSSMAN SA, HOCHBERG F, FISHER J, CHEN TL, KIM L, GREGORY R, GROCHOW LB, PIANTADOSI S: "Increased 9-aminocamptothecin dose requirements in patients on anticonvulsants" CANCER CHEMOTHER. PHARMACOL., vol. 42, 1998, pages 118-126, XP002202988 abstract ---	1-5, 14-29
X	STÄNDER M, DICHGANS J, WELLER M: "Anticonvulsant drugs fail to modulate chemotherapy-induced cytotoxicity and growth inhibition of human malignant glioma cells" JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY, vol. 37, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 191-198, XP008004836 abstract page 194, column 2, paragraph 2 page 195, column 2, paragraph 2 page 197, column 2, line 19-28 ---	1-5, 14-29
X	TITTLE TV, SCHAUMANN BA, RAINEY JE, TAYLOR K: "Segregation of the Growth Slowing Effects of Valproic Acid from Phenyltoin and Carbamazepine on Lymphoid Tumor Cells" LIFE SCIENCES, vol. 50, no. 14, 1992, pages PL79-PL83, XP008005297 abstract page PL-80, paragraph 1 page PL-82, paragraph 3 ---	1-5, 14-29

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,Y	LAMPEN A ET AL: "NEW MOLECULAR BIOASSAYS FOR THE ESTIMATION OF THE TERATOGENIC POTENCY OF VALPROIC ACID DERIVATIVES IN VITRO: ACTIVATION OF THE PEROXISOMAL PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR (PPARDELTA)" TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA,, US, vol. 160, no. 3, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 238-249, XP000987176 cited in the application the whole document ---	1-5, 14-29
Y	VAMECQ J ET AL: "PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS (PPARS) AND THEIR IMPLICATIONS IN DISEASES" CURRENT OPINION IN ENDOCRINOLOGY AND DIABETES, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 7, no. 1, 2000, pages 8-18, XP000909179 ISSN: 1068-3097 abstract ---	1-5, 14-29
Y	VAMECQ J ET AL: "Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors" LANCET, vol. 354, no. 9173, 10 July 1999 (1999-07-10), pages 141-148, XP004266618 ISSN: 0140-6736 abstract ---	1-5, 14-29
A	RAYNER A A ET AL: "LYMPHOKINE-ACTIVATED KILLER (LAK) CELLS ANALYSIS OF FACTORS RELEVANT TO THE IMMUNOTHERAPY OF HUMAN CANCER" CANCER, AMERICAN CANCER SOCIETY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 55, no. 3, 15 March 1985 (1985-03-15), pages 1327-1333, XP000108155 ISSN: 0008-543X abstract page 1327, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1 ---	1
A	US 6 207 147 B1 (GRANGER GALE A ET AL) 27 March 2001 (2001-03-27) column 3, line 23 - line 45 ---	1

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 360 205 A (FUJIMOTO SHIGEYOSHI ;AJINOMOTO KK (JP)) 28 March 1990 (1990-03-28) page 2, line 15 - line 18 ---	1
P,X	EP 1 170 008 A (CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSINSTITUT GEORG-SPEYER-HAUS) 9 January 2002 (2002-01-09) cited in the application claims 3,4,9,10 examples 1,5 paragraph [0038] paragraph [0034] paragraph [0024] - paragraph [0026] paragraph [0010] - paragraph [0011] abstract -----	1-5, 14-29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/10419

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

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

Although claims 25-27 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

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

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

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

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

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

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

5 and partially 1-4, 14-29

Remark on Protest

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

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

International Application No. PCT/EP 02/10419

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 5 and partially 1-4, 14-29

   The use of compounds according to formula (I) to sensitise human cancer cells for a treatment using irradiation.

2. Claims: 1-4, 6, 7, 14-29 (all partially)

   The use of compounds according to formula (I) to sensitise human cancer cells for the treatment with differentiation-inducing vitamin A-based drugs, as far as not comprised in invention 1.

3. Claims: 1-4, 6, 7, 14-29 (all partially)

   The use of compounds according to formula (I) to sensitise human cancer cells to enhance treatment efficacy in combination with differentiation-inducing vitamin D3-based drugs, as far as not comprised within invention 1-2.

4. Claims: 1-4, 6, 7, 14-29 (all partially)

   The use of compounds according to formula (I) to sensitise human cancer cells to enhance treatment efficacy in combination with differentiation-inducing cytokines, as far as not comprised within invention 1-3.

5. Claims: 1-4, 14-29 (all partially)

   The use of compounds according to formula (I) to sensitise human cancer cells to enhance treatment efficacy in combination with chemotherapeutic and/or cytotoxic drugs, as far as not comprised within invention 1-4.

6. Claims: 13, and partially 1-4, 14-29

   The use of compounds according to formula (I) to sensitise human cancer cells to enhance treatment efficacy in combination with hormone therapy, in particular 'antagonistic acting hormonal reagents', as far as not comprised within invention 1-5.

7. Claims: 8-12 and partially 1-4, 14-29

   The use of compounds according to formula (I) to sensitise human cancer cells to enhance treatment efficacy in combination with immunotherapy, as far as not comprised

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

within invention 1-6.

8. Claims: 1-4, 14-29 (all partially)

The use of compounds according to formula (I) to sensitise human cancer cells to enhance treatment efficacy in combination with antiangiogenic therapy, as far as not comprised within invention 1-7.

9. Claims: 30-33

A method for the identification of sensitising agents being useful for combinatorial cancer therapy.

10. Claims: 34-38

A method for the identification of genes regulated by combinatorial treatment with compounds according to formula (I) with one or several other methods of anti-tumor therapy.

11. Claims: 39-41

A diagnostic method for the in vitro identification of tumors or tumor cells.

International Application No. PCT/EP 02/10419

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

(A) Present claims 1-5, and 14-29 relate to a rather elevated number of compounds.
Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds for which a medical use is claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

(B) Present claims 1-5, and 14-29 relate to compounds/uses defined by functional/desirable characteristics/properties, namely

(1) 'differentiation inducing drugs', 'induction of differentiation', 'induction of apoptosis'
(2) 'chemotherapeutic drugs',
(3) 'cytotoxic drugs',
(4) 'hormone therapy',
(5) 'immunotherapy',
(6) 'anti-angiogenic therapy',
(7) 'gene therapy',
(8) 'inhibitor of enzymes having HDAC activity' causing 'an additive therapeutic effect upon combinatorial therapy',
(9) 'inhibitor of enzymes according to (8) which are mammalian, preferably human enzymes,
(10) inhibitor of enzymes according to (8) which specifically inhibits only a subset of HDACs,
(11) induction of hyperacetylation which has a 'beneficial effect for the treatment of human cancer',
(12) 'substance which is metabolized in patients to a compound as defined in claims 1 to 3', and
(13) 'clinically established anti-cancer therapeutic drugs'.

The claims cover all compounds/uses falling under the above functional definition, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds/uses.
Due to the choice of defining the compounds/uses of the present application by functional/desirable characteristics/properties, it is impossible to compare them with compounds/uses in the prior art over the full extent of compounds/uses claimed.

(C) Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT):

- The expression 'combinatorial treatment' in claims 16 and 29 is not clear. Claims 16 and 29 have been searched as relating to a combination treatment.

- The definition of claim 29, 'a substance which is metabolized in patients to a sensitizing agent as defined in claims 1 to 3', is not clear since it is not clear which compounds are metabolised by or in the

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

human body into compounds according to formula (I).

(D) The expression 'gene therapy' has not been further specified in the description and is therefore considered to be insufficiently supported/disclosed. Consequently, no separate invention has been drafted for this particular combination.

(E) Consequently, the search has been carried out for the first invention only and for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the use of valproic acid or 4-yn valproic acid as a sensitising agent in combination with radiation therapy for the treatment of human cancer with due regard to the ~~underlying inventive concept.~~

Remark:
Figure 8/26 (Page 59) is missing.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5939455 A	17-08-1999	AU 6547898 A	29-09-1998
		WO 9840078 A1	17-09-1998
EP 0632008 A	04-01-1995	AT 163006 T	15-02-1998
		CA 2124784 C	07-01-2003
		CN 1322524 A	21-11-2001
		CN 1100408 A ,B	22-03-1995
		DE 69408373 D1	12-03-1998
		DE 69408373 T2	16-07-1998
		DK 632008 T3	23-09-1998
		EP 0632008 A1	04-01-1995
		ES 2113574 T3	01-05-1998
		GR 3026076 T3	29-05-1998
		JP 2935110 B2	16-08-1999
		JP 10204023 A	04-08-1998
		JP 2756756 B2	25-05-1998
		JP 7316092 A	05-12-1995
		JP 3195581 B2	06-08-2001
		JP 10324626 A	08-12-1998
		JP 2826995 B2	18-11-1998
		JP 9118644 A	06-05-1997
		KR 225299 B1	15-10-1999
		KR 253725 B1	15-04-2000
		US 2003096802 A1	22-05-2003
		US 6201021 B1	13-03-2001
WO 0147533 A	05-07-2001	AU 2337601 A	09-07-2001
		WO 0147533 A2	05-07-2001
		CA 2395284 A1	05-07-2001
		EP 1244461 A2	02-10-2002
		US 2001053351 A1	20-12-2001
US 6028102 A	22-02-2000	AU 2543399 A	15-09-1999
		EP 1056446 A1	06-12-2000
		WO 9943309 A2	02-09-1999
US 5672746 A	30-09-1997	AT 200890 T	15-05-2001
		AU 3415195 A	22-03-1996
		DE 19502050 A1	14-03-1996
		DE 69520832 D1	07-06-2001
		DE 69520832 T2	09-08-2001
		DK 778820 T3	20-08-2001
		EP 0778820 A1	18-06-1997
		ES 2158124 T3	01-09-2001
		GR 3036294 T3	31-10-2001
		HK 1008882 A1	09-08-2002
		JP 10505064 T	19-05-1998
		NZ 292388 A	29-03-1999
		NZ 334119 A	29-09-2000
		PT 778820 T	31-10-2001
		US 6274624 B1	14-08-2001
		WO 9606821 A1	07-03-1996
		US RE37670 E1	23-04-2002
		US 6300373 B1	09-10-2001
		US 2002013367 A1	31-01-2002
US 6110955 A	29-08-2000	AU 6457998 A	29-09-1998
		EP 0986380 A1	22-03-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/10419

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6110955 A		WO 9840066 A1	17-09-1998
EP 0412211 A	13-02-1991	EP 0412211 A1	13-02-1991
US 6207147 B1	27-03-2001	AT 229810 T	15-01-2003
		AU 743855 B2	07-02-2002
		AU 4824297 A	11-05-1998
		BR 9712988 A	24-10-2000
		CN 1237909 A	08-12-1999
		DE 69718029 D1	30-01-2003
		EP 0930887 A2	28-07-1999
		JP 2001509135 T	10-07-2001
		KR 2000049096 A	25-07-2000
		NO 991691 A	09-06-1999
		WO 9816238 A2	23-04-1998
EP 0360205 A	28-03-1990	JP 2079969 A	20-03-1990
		EP 0360205 A2	28-03-1990
EP 1170008 A	09-01-2002	EP 1170008 A1	09-01-2002
		AU 8392501 A	05-02-2002
		WO 0207722 A2	31-01-2002
		EP 1301184 A2	16-04-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 45/00	Ａ６１Ｋ 45/00		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１２１	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/574	Ｇ０１Ｎ 33/574	Ｚ	

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

(72)発明者 ハインツェル・トーステン
ドイツ国 Ｄ－６０５２９ フランクフルト・アム・マイン リベレンヴェーク １０
(72)発明者 ヘンチェ・ベルント
ドイツ国 Ｄ－４７２３９ デュイスブルク モエルサー シュトラーセ ４５
(72)発明者 ヴェルス・ウィンフリート シュテファン
ドイツ国 Ｄ－６３１１０ ロドガウ ボナー ヴェーグ ７
(72)発明者 ヘルリヒ・ペーター アー
ドイツ国 Ｄ－７６２２９ カルルスルーエ フォーゲルザンク ８
(72)発明者 ミヌッチ・サヴェリオ
イタリア国 Ｉ－２００９０ オペラ ヴィアドン ミンツォーニ １
(72)発明者 ペリッチ・ピエル・ジュゼッペ
イタリア国 Ｉ－２００９０ オペラ ヴィアエミリア １０
(72)発明者 ゴットシャル・マルティン
ドイツ国 Ｄ－７６２９７ シュトゥーテンシー オーバーフェルトシュトラーセ １５

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BA11 DA12 DA36 DA37 DA78 FB01 FB02 FB03
4C084 AA19 MA02 NA05 ZB26 ZC75
4C085 AA03 AA13 AA21 EE03
4C086 AA01 AA02 DA14 MA02 MA05 NA05 ZB26 ZC75
4C206 AA01 AA02 DA03 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZC75