

(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2006-519842

(P2006-519842A)

(43) 公表日 平成18年8月31日(2006.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/403 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/403	4 C O 3 4
<b>A 6 1 K 31/438 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/438	4 C O 5 0
<b>A 6 1 K 31/407 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/407	4 C O 8 6
<b>C O 7 D 209/54 (2006.01)</b>	C O 7 D 209/54	4 C 2 O 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-506985 (P2006-506985)  
 (86) (22) 出願日 平成16年3月10日 (2004. 3. 10)  
 (85) 翻訳文提出日 平成17年11月10日 (2005. 11. 10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/007144  
 (87) 国際公開番号 W02004/080408  
 (87) 国際公開日 平成16年9月23日 (2004. 9. 23)  
 (31) 優先権主張番号 60/452, 951  
 (32) 優先日 平成15年3月10日 (2003. 3. 10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/474, 929  
 (32) 優先日 平成15年6月3日 (2003. 6. 3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

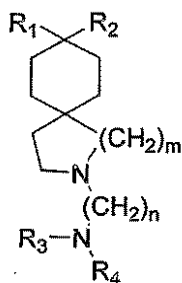
(71) 出願人 505343790  
 カリスト・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド  
 CALLISTO PHARMACEUTICALS, INC.  
 アメリカ合衆国10170ニューヨーク州  
 ニューヨーク、スウィート2500、レキシントン・アベニュー420番  
 (74) 代理人 100068526  
 弁理士 田村 恭生  
 (74) 代理人 100126778  
 弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

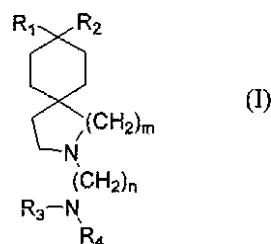
(54) 【発明の名称】 アザスピラン化合物による癌治療法

(57) 【要約】

以下の式 (I) :



式 (I)



(I)

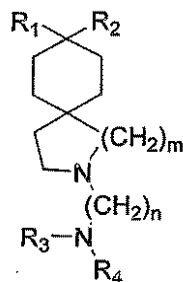
[式中、nは、3～7を示し；mは、1～2を示し；R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は独立して水素原子を示すか、または置換もしくは非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>を合わせた炭素原子の総数は5以上、10以下であり；またはR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、一緒になって炭素数が3以上、7以下である環状アルキル基で表され；R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は独立して水素原子を表す

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の式 (I) :

## 【化 1】



式 (I)

10

[ 式中、

n は、3 ~ 7 を表し；

m は、1 ~ 2 を表し；

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して水素原子を表すか、または置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> を合わせた炭素原子の総数が 5 以上であり；または

20

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、一緒になって 3 以上、7 以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し；

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、独立して水素原子であるか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表すか、または R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が窒素と一緒に、少なくとも 4 員の複素環基を表す]

で示される化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物の治療上の有効量を哺乳類に投与することからなる白血病、癌、黒色腫、および / または肉腫を治療する方法。

## 【請求項 2】

該 R<sub>3</sub> または R<sub>4</sub> の少なくとも一つがアルキルを含む、請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

30

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が独立して水素原子または 1 以上および 3 以下の炭素原子を有する直鎖アルキルを表すか；または

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が窒素と一緒に、5 ~ 8 員の複素環基を形成する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 4】

さらに、化学治療剤または増強剤を投与する前記請求項のうち、いずれか一つの方法。

## 【請求項 5】

化学療法剤または増強剤が、トリプロリジンまたはそのシス - 異性体、プロコダゾール、1 H - ベンズイミダゾール カーバメート - 2 - プロパン酸；

プロバゾール、モネンシン、プロモデオキシウリジン、ジピリダモール、インドメタシン、メトクロプラミド、7 - チア - 8 - オキソグアニン、N - ソラネシル - N , N ' - ビス ( 3 , 4 - ジメトキシベンジル ) エチレンジアミン、ロイコボリン、ヘパリン、N - [ 4 - [ ( 4 - フルオロフェニル ) スルホニル ] フェニル ] アセトアミド、ヘパリン硫酸塩、シメチジン、ビタミン A、2 ' - デオキシコホルマイシン、またはジメチルスルホキシドから選択される、請求項 4 の方法。

40

## 【請求項 6】

該化合物が、N , N - ジエチル - 8 , 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4 , 5 ] デカン - 2 - プロパンアミン、またはその医薬的に許容される塩、水和物もしくは溶媒和物である前記請求項のうち、いずれか一つの方法。

50

## 【請求項 7】

該化合物が経口投与される前記請求項のいずれか一つの方法。

## 【請求項 8】

該化合物が非経口投与される前記請求項のいずれか一つの方法。

## 【請求項 9】

該化合物を一日あたり約 0.05 ~ 約 100 mg / キログラム ( 体重 ) の用量で投与する前記請求項のいずれか一つの方法。

## 【請求項 10】

該哺乳類がヒトである、前記請求項のいずれか一つの方法。

## 【請求項 11】

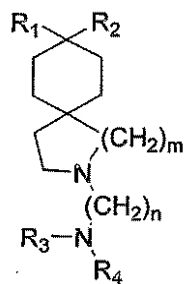
哺乳類に治療上の有効量の N, N - ジエチル - 8, 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4, 5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩を投与することからなる癌の治療方法。

10

## 【請求項 12】

以下の式 ( I ) :

## 【化 2】



式 ( I )

20

[ 式中、

n は、 3 ~ 7 を表し ;

m は、 1 ~ 2 を表し ;

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して水素原子を表すか、または置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> を合わせた炭素原子の総数が 5 以上であり ; または

30

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、一緒になって 3 以上、7 以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し ;

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、独立して水素原子であるか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表すか、または R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が窒素と一緒に、少なくとも 4 員の複素環基を表す ]

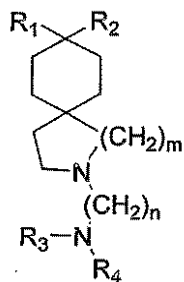
で示される化合物またはその塩、水和物もしくは溶媒和物の治療上の有効量を哺乳類に投与することからなる、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞種、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、初期の血小板増多症、初期のマクログロブリン血症、小細胞肺癌、初期の脳腫瘍、胃ガン、大腸癌、悪性脾臓脾島細胞腺種、悪性カルチノイド、膀胱癌、前癌性の皮膚障害、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞種、食道癌、尿路生殖器癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮体癌、副腎皮質癌、および前立腺癌を含む、癌の治療方法。

40

## 【請求項 13】

以下の式 ( I ) :

## 【化 3】



式 (I)

10

[ 式中、

n は、3 ~ 7 を表し；

m は、1 ~ 2 を表し；

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して水素原子を表すか、または、置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> を合わせた炭素原子の総数が 5 以上であり；または

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、一緒になって 3 以上、7 以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し；

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、独立して水素原子を表すか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表すか、または R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が窒素と一緒に、少なくとも 4 員の複素環基を表す]

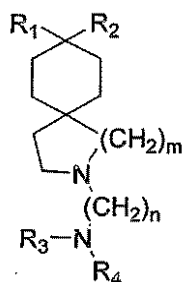
で示される化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物の治療上の有効量を哺乳類に投与することからなる癌または腫瘍における血管新生の抑制または遅延する方法。

20

## 【請求項 14】

以下の式 (I)：

## 【化 4】



式 (I)

30

[ 式中、

n は、3 ~ 7 を表し；

m は、1 ~ 2 を表し；

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して水素原子を表すか、または置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> を合わせた炭素原子の総数が 5 以上であり；または

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、一緒になって 3 以上、7 以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し；

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、独立して水素原子であるか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表すか、または R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が窒素と一緒に、少なくとも 4 員の複素環基を表す]

で示される化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物の治療上の有効量で該細胞を処置することからなる癌細胞におけるアポトーシスの速度を速めるための方法。

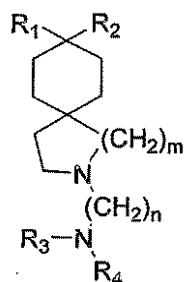
40

50

## 【請求項 15】

以下の式 (I) :

## 【化 5】



式 (I)

10

[ 式中、

n は、3 ~ 7 を表し ;

m は、1 ~ 2 を表し ;

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して水素原子を表すか、または置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> を合わせた炭素原子の総数が 5 以上であり ; または

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、一緒になって 3 以上、7 以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し ;

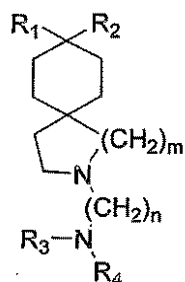
R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、独立して水素原子を表すか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表すか、または R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が窒素と一緒に、少なくとも 4 員の複素環基を表す ]

で示される化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物の治療上の有効量を該細胞に処置することからなる癌細胞の増殖を阻害する方法。

## 【請求項 16】

以下の式 (I) :

## 【化 6】



式 (I)

30

[ 式中、

n は、3 ~ 7 を表し ;

m は、1 ~ 2 を表し ;

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して水素原子を表すか、または、置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> を合わせた炭素原子の総数が 5 以上であり ; または

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、一緒になって 3 以上、7 以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し ;

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、独立して水素原子を表すか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表すか、または R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が窒素と一緒に、少なくとも 4 員の複素環基を表す ]

40

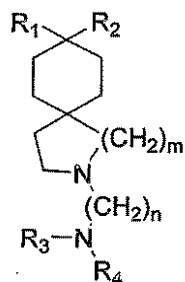
50

で示される化合物、またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物の治療上の有効量で該細胞を処置することからなる癌細胞における V E G F の分泌を減少する方法。

【請求項 17】

以下の式 (I) :

【化 7】



式 (I)

10

[ 式中、

n は、3 ~ 7 を表し ;

m は、1 ~ 2 を表し ;

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して水素原子を表すか、または、置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> を合わせた炭素原子の総数が 5 以上であり ; または

20

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、一緒になって 3 以上、7 以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し ;

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、独立して水素原子を表すか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表すか、または R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が窒素と一緒に、少なくとも 4 員の複素環基を表す ]

で示される化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物の治療上の有効量を投薬説明書に従って、哺乳類に投与して癌を治療するためのキット。

【請求項 18】

該化合物が、分割される用量で提供される、請求項 17 のキット。

30

【請求項 19】

該キットが、ヒトに投与するために設計される、請求項 17 のキット。

【請求項 20】

該説明書が、ある種の癌に特定した注釈を与える、請求項 17 のキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

( 関連出願の参照 )

本出願は、2003 年 3 月 10 日に提出した米国仮出願第 60/452951 号および 2003 年 6 月 3 日に提出した米国仮出願第 60/474929 号の優先権を主張し、またそれらは、本明細書全体に参照によって引用される。

40

【0002】

( 技術分野 )

本発明は、癌の治療をするための治療法として、特定のアザスピランの使用に関する。特に、本発明は、例えば、本明細書に定義される特定のアザスピランを投与することにより、血管新生および / またはアポトーシスの調整または制御をすることにより、ヒトを含む哺乳類の癌を治療する事に関する。

【0003】

( 背景技術 )

癌は、動物およびヒトにおける主要な死因である。癌の正確な原因はわからないが、例

50

えば、喫煙または発癌性物質への暴露のような特定の活性化とある種の癌の発病率との関連は、多くの研究者によって示されてきた。

#### 【 0 0 0 4 】

多くのタイプの化学療法剤は、癌に対して有効性が示されてきたが、全てのタイプの癌にこれらの薬剤が適用されるとは限らない。不幸にも、これらの薬剤の多くは、通常細胞も破壊する。これらの化学療法剤の作用についての正確な機構は、必ずしもわかってない。

#### 【 0 0 0 5 】

癌治療の分野における進歩にかかわらず、現在のところ、主要な治療は、外科、放射線および化学療法である。化学療法は、転移する癌と闘うか、または特に癌に対して攻撃的であるとされる。当該細胞破壊剤または細胞増殖抑制剤は、大きな成長因子（すなわち、細胞がすぐに分裂する成長因子）を有する癌に最も有効に作用する。現在のところ、ホルモン、特にエストロゲン、プロゲステロンおよびテストステロン、ならびにある種の微生物によって生産される抗生物質、アルキル化剤、および代謝拮抗剤は、腫瘍学者が入手可能な治療の大半を形成する。

#### 【 0 0 0 6 】

有力な証拠は、血管新生が癌の成長および転移の両方ならびに、例えば、糖尿病性網膜症、関節リウマチおよび乾癬等の人に起こる他の病気にも役割を果たし得ることと関係している。血管新生は、生物が既存の脈管構造から新しい血管を形成するのに使用する多段階工程である。これらの段階は、成長因子およびサイトカインによって血管形成の刺激によって活性化される。参照：Folkman, J. What is the Evidence that Tumors are Angiogenesis-Dependent? J. Natl. Cancer Inst. 1991, 82, 4-6; Folkman, J. Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and Other Disease. Nat. Med 1995, 1, 27-31; McDonnell, C.O.; Hill, A.D.K.; McNamara, D.A.; Walsh, T.N.; Bouchier-Hayes, D.J. Tumor Micrometastases: The Influence of Angiogenesis. Eur. J. Surg. Oncol. 2000, 26, 105-115; Li, W. Tumor Angiogenesis: Molecular Pathology Therapeutic Targeting, and Imaging. Acad Radiol. 2000, 7, 800-811; Kerbel, R.S. Tumor Angiogenesis: Past, Present and the Near Future. Carcinogenesis 2000, 21, 505-515; Carmeliet, P.; Jain, R.K. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. Nature 2000, 407, 249-257.

#### 【 0 0 0 7 】

一般的に、血管新生は、初期の血管新生シグナルが鎮静するとき、他のまたは2回目のシグナルは、該血管新生過程を主に遮断するように停止する。しかしながら、癌のような病状において、血管新生の局所濃度は決して減少せず、新しい血管は継続的に形成する。それ故、望まない血管新生は、定常的に癌に栄養補給を行い、癌を転移と同じくらい成長する。参照：Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. Nat. Med. 1, 27-31, 1995; Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. Ann Intern Med. 1975; 82:96-100; Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature. 1989;339:58-61; Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst. 1989; 82:4-6; Folkman J. Ingber DE. Angiostatic steroids: method of discovery and mechanism of action. Ann Surg. 1987; 206:374-383; Barger AC, Beeuwkes R. Lainey LL. Silverman K). 仮説: vasavasorum and neovascularization of human coronary arteries. N Engl. J. Med. 1984;310:175-177; Heistad DH, Armstrong ML. Blood flow through vasa vasorum of coronary arteries in atherosclerotic monkeys. Arteriosclerosis. 1986;6:326-331; O'Brien ER, Garvin MR. Dev R, Stewart DK, Hinohara T. Simpson, JB. Shwartz SM. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. Am J Pathol. 1994; 145: 883-894; Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. Oncogene. 19, 6122-6129,

10

20

30

40

50

2000.

【 0 0 0 8 】

多くの成長因子は、血管内皮増殖因子 ( V E G F )、塩基性線維芽細胞成長因子 ( b F G F )、トランスフォーミング成長因子 ( T G F )、T G F、腫瘍壊死因子、血小板由来内皮増殖因子、肝細胞増殖因子、アンジオゲニン、インターロイキン - 8 および胎盤成長因子を含む、血管新生の強力な正の制御因子として同定されている。これらの血管形成因子のうち少なくとも二つ、b F G F および V E G F は、生体内で血管新生を誘導することができる。参照 : Klagsbrun, M.; D'Amore, P.A. Regulators of Angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* 1991, 53, 217-239; Gerwins, P.; Skoldenberg, E.; Clacsson-Welsh, L. Function of Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors in Angiogenesis. *Crit. Rev, Oncol. Hematol.* 2000, 34, 185-194; Liekens, S.; Clercq, E.D.; Neyts. 1. Angiogenesis Regulators and Clinical Applications. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61, 253-270; Leung, D.W.; Cachianes. C.; Kuang. W.J.; Goeddel, D.V., Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor is A Secreted Angiogenic Mitogen. *Science* 1989, 246, 1306-1313; Ferrara N. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Pathological Angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 1995, 36, 127-137; Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor. *Trends Cardivasc. Med* 1993, 3, 244-250.

10

【 0 0 0 9 】

臨床的に、高循環レベルの b F G F および V E G F は、特定の癌の促進および進行と関連がある。V E G F は、内皮細胞特異的分裂促進因子として作用する事がこれらの成長因子とは異なり ; 血管新生と関連する多種多様の症状において、ほとんど常に見出される成長因子の一つである。参照 : Heistad DH, Armstrong ML. Blood flow through vasa vasorum of coronary arteries in atherosclerotic monkeys. *Arteriosclerosis.* 1986;6:326-331; O'Brien ER, Garvin MR. Dev R, Stewart DK, Hinohara T. Simpson, JB. Shwartz SM. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1994; 145:883-894; Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene.* 19, 6122-6129, 2000; Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat. Med.* 1, 27-31, 1995; Klagsbrun, M.; D'Amore, P.A. Regulators of Angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* 1991, 53, 217-239; Gerwins, P.; Skoldenberg, E.; Clacsson-Welsh, L. Function of Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors in Angiogenesis. *Crit. Rev, Oncol. Hematol.* 2000, 34, 185-194. 良性の結腸大腸腺腫において、V E G F タンパク質および転写レベルは、通常の大腸粘液のそれに優る。参照 : Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur. J. Cancer.* 2000, 36:748-753.

20

30

【 0 0 1 0 】

V E G F 活性の阻害、またはそのレセプターの機能を無力化することは、多様な動物癌モデルにおける腫瘍の成長および転移の両方を阻害することを示す。例えば、V E G F レベルは、転移性の結腸直腸癌において、かなり高い。これらの結果は、V E G F およびそのレセプターは、腫瘍血管新生において、重要な役割を果たしている事を示唆し、それ故病理学的な血管新生を含む、ヒトの病気の介入のために優れた標的である。参照 : Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS.* 79, 233-269, 1997; Cascinu, S., Graziano, F., Catalano, V., Staccioli, M.P., Barni, S., Giordani, P., Rossi, M.C., Baldelli, A.M., Muretto, P., Valenti, A., and Catalano, G. Differences of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression between liver and abdominal metastases from colon cancer. Implications for the treatment with VEGF inhibitors. *Clin Exp Metastasis.* 18, 651-655, 2

40

50



10

## 20

30

## 40

## 50

式 (I)

m は、 1 ~ 2 を表し；

$R_1$ および $R_2$ は、独立して水素原子を表すか、または置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり、但し、 $R_1$ および $R_2$ を合わせた炭素原子の総数が5以上であり；または

$R_1$ および $R_2$ が、一緒になって3以上、7以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し；

$R_3$ および $R_4$ は、独立して水素原子であるか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表し；または

$R_3$ および $R_4$ が窒素と一緒に、少なくとも4員の複素環基を表す]

で示される化合物またはその医薬的に許容される塩、水和物、もしくは溶媒和物の治療上の有効量を哺乳類に投与することからなる癌治療の方法を提供する。

10

【0015】

本発明の別の態様として、癌治療の方法は、式Iの化合物と化学療法剤または増強剤を組み合わせることで提供される。さらに本発明の態様として、5  $\mu$ MでのCaCo-2細胞の増殖におけるパーセント阻害が45%以上、例えば、50%、60%、70%または80%以上を含む化合物を投与することによる癌の治療を含む。

【0016】

本発明の別の態様として、癌細胞の増殖を阻害する方法を式Iで示される化合物を投与することにより提供される。本発明の別の態様として、治療上許容される量の式Iの化合物を投与することにより得られる癌細胞におけるアポトーシスの速度を促進する方法を提供する。さらに、本発明の態様は、式Iの化合物の治療上許容される量を投与することによって、VEGFの分泌を阻害する方法である。本発明の別の態様は、治療上許容される量の式Iで示される化合物を投与することによって、血管新生を阻害またはさらに停止する方法を提供する。

20

【0017】

さらに、本発明の目的、有利性および特長を本明細書内で説明し、一つには以下の試験において当業者に明らかとなるか、または該発明の実施によって理解されうる。本出願における公開された該発明は、特に目的、有利性および特長の一連または組合せのいずれかに限定されない。記載された目的、有利性および特長の様々な組合せが本出願で公開された発明を作り出すことを意図する。

【0018】

(発明の詳細な説明)

特に断らない限り、以下の用語を本明細書で用いるときは、以下の意味を有することを理解する。

30

【0019】

「化合物」は、該化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物を意味する。例えば、「式Iで示される化合物」における用語「化合物」の使用は、「式Iで示される化合物またはその医薬的に許容される塩、水和物、もしくは溶媒和物」を意味すると理解される。

【0020】

「HUVEC」は、ヒト臍帯静脈内皮細胞を意味する。

40

【0021】

本明細書で用いる「非経口」は、静脈内、筋肉内、皮下、鼻腔内、経腸、腔内、または腹腔内投与を含む。

【0022】

リスクに対する利点を考慮に入れるとき、「医薬的に許容される」とは、必要以上の副作用（例えば、毒性、炎症、およびアレルギー応答等）がなく、ヒトを含む哺乳類の使用に許容される基質を意味する。

【0023】

「癌(cancer)」は、制御されない方法で、増殖する傾向のある新生物、腫瘍および白血病を含む細胞の異常な成長を意味する。好ましくは、本発明の方法は、白血病、黒色腫、

50

癌および肉腫の治療を含む。さらに具体的な癌として、脳、乳房、脾臓、頸部、大腸、頭頸部、腎臓、肺、肺小細胞、黒色腫、中皮腫、卵巣、肉腫、胃、子宮、肝臓、精巣、口腔、および髄芽腫等の癌を含む。

#### 【0024】

「白血病」は、造血器官の病気を広く意味し、一般的に、組織、血液および/または骨髓における白血球およびそれらの前駆体の歪んだ増殖および発達によって特徴づけられる。白血病は、一般的に臨床的には(1)該病気の持続時間および特徴 - 急性または慢性 - ; (2) 骨髓球性(骨髓性)、リンパ系(リンパ向性)、または単核球性を含む細胞の型 ; および(3)血液白血病性または無白血病性(亜白血病性)における多くの異常細胞の数の増加または非増加に基づいて分類される。該P388白血病モデルは、インビボでの抗白血病活性の予測ができるとして広く受け入れられる。試験がP388アッセイにおいて正を示す化合物は、治療された白血病のタイプに関わらず、生体内での抗白血病活性のある程度のレベルを示すと一般的に考えられる。従って、本発明は、式Iで示される化合物の治療上許容される量を投与することによって、白血病を治療する方法を含む。例えば、本発明は、急性非リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髓球性白血病、成人T細胞白血病、無白血病性白血病、白血球溶血性(leukocytchemic)白血病、好塩基球性白血病、芽細胞性白血病、ウシ白血病、慢性骨髓球性白血病、皮膚白血病、胎児性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、毛様細胞白血病、血芽性白血病、血球芽細胞性白血病、組織球性白血病、幹細胞白血病、急性単核球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ向性白血病、リンパ様白血病、リンパ肉腫細胞白血病、肥満細胞白血病、巨核球性白血病、微小骨髓球性白血病、単核球性白血病、骨髓芽球性白血病、骨髓球性白血病、骨髓顆粒球性白血病、骨髓性単球性白血病、ナエゲリ白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髓球性白血病、リーダー細胞白血病、シリング白血病、幹細胞白血病、亜白血病性白血病、および未分化細胞白血病の治療方法を具体化する。

10

20

#### 【0025】

「肉腫」は、基質のような胎児性結合組織からなる癌性の成長を一般的に意味し、原線維または均一基質に包埋した血中血球からなる。肉腫は、式Iで示される化合物の治療上許容される量の投与によって治療されうる。この方法で治療されうる特定の肉腫は、例えば、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、アベメシー肉腫、脂肪性肉腫、脂肪肉腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮肉腫、ブドウ状肉腫、緑色肉腫、絨毛癌、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、子宮内膜肉腫、間質性肉腫、エウイング肉腫、筋膜肉腫、繊維芽細胞肉腫、巨大細胞肉腫、顆粒球性肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性脱色性出血性肉腫、B細胞免疫芽細胞肉腫、リンパ腫、T細胞免疫芽細胞肉腫、ジェンセン肉腫、カボジ肉腫、クッパー細胞肉腫、血管肉腫、白血肉腫、悪性間葉細胞肉腫、傍骨性骨肉腫、網赤血球肉腫、ラウス肉腫、血清嚢胞性肉腫、滑膜肉腫、および末梢血管拡張性肉腫を含む。

30

#### 【0026】

「黒色腫」は、一般的に皮膚および他の器官のメラニン細胞系から生じる癌性の成長を意味する。黒色腫は、式Iで示される化合物の治療上許容される量の投与によって治療される。この方法によって治療されうる具体的な黒色腫は、例えば、末端性黒子性黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫、S91黒色腫、ハーディング-パッシー黒色腫、若年性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、悪性黒色腫、結節型黒色腫、爪下黒色腫、および表在拡大型黒色腫等を含む。

40

#### 【0027】

「癌(carcinoma)」は、一般的に周辺組織に浸潤し、転移を生じる傾向のある上皮細胞を作り上げる癌性の成長を意味する。癌は、式Iで表される化合物の治療上許容される量の投与によって治療されうる。この方法で治療されうる具体的な癌は、例えば、細葉細胞癌、腺房細胞癌、腺嚢胞癌、腺様嚢胞癌、腺腫様癌(carcinoma adenomatosum)、副腎皮質癌、細気管支肺胞上皮癌、肺胞細胞癌、基底細胞癌(basal cell carcinoma)、基底細

50

胞様癌 (carcinoma basocellulare)、類基底細胞癌、基底有棘細胞癌、気管支肺胞癌、気管支癌、気管支原性癌、大脳様癌、胆管細胞癌、絨毛癌、膠質癌、面皰癌、子宮体癌 (corpus carcinoma)、篩状癌、鑑状癌、皮膚癌、円柱状癌、円柱状細胞癌、腺管癌、硬性癌腫、胚性癌腫、脳様癌、類表皮癌、腺様上皮癌、外向発育癌、潰瘍性癌、線維性癌、ゼラチン状癌、ゼラチン様癌、巨大細胞癌、巨大細胞様癌、腺癌、顆粒膜細胞癌、毛基質腫、肝様癌、肝細胞癌、ヒュルトレ細胞癌、硝子状癌、hypemephroid癌、小児胚性癌、上皮内癌、表皮内癌、上皮内癌、Krompecher癌、Kulchitzky細胞癌、大細胞癌、レンズ状癌、レンズ様癌、脂肪腫、リンパ上皮癌、髄様癌 (carcinoma medullare)、髄様癌 (medullary carcinoma)、悪性黒色腫、軟口蓋癌、粘液性癌 (mucinous carcinoma)、粘液性癌 (carcinoma muciparum)、細胞粘液性癌、粘液性類表皮癌、粘膜癌 (carcinoma mucosum)、粘膜癌 (mucous carcinoma)、粘液腫様癌、鼻咽頭癌、燕麦細胞癌、骨化性癌、類骨癌、乳頭癌、門脈周辺癌、前浸潤癌、有棘細胞癌、糊状癌、腎臓の腎細胞癌、補充細胞癌、肉腫様癌、シュナイダー癌、スキルス癌、陰囊癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、ソレノイド癌、球状細胞癌、紡錘細胞癌、海綿癌、扁平上皮癌、扁平細胞癌、弦状癌、血管拡張性癌、毛細血管拡張性癌、移行上皮癌、結節性癌、結節状癌、疣状癌、および絨毛状癌を含む。

10

## 【 0 0 2 8 】

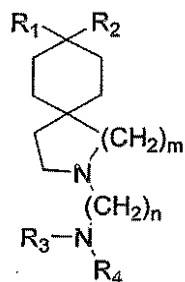
さらに、式 I で表される化合物の治療上許容される量の投与によって治療される癌は、これに限らないが、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、腺癌、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、肺小細胞癌、原発性脳腫瘍、胃癌、大腸癌、悪性膵臓膵島細胞腺腫、悪性カルチノイド、膀胱癌、前癌性皮膚障害、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞腫、グリア芽腫、食道癌、尿路生殖器癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、副腎皮質癌、および前立腺癌を含む。

20

## 【 0 0 2 9 】

以下の式 (I) :

## 【 化 2 】



式 (I)

30

[ 式中、

n は、3 ~ 7 を表し、例えば、3、4、または 6 であり；

m は、1 ~ 2 を表し、例えば、1 であり；

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して水素原子を表すか、または、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> を合わせた炭素原子の総数が 5 以上または 5 ~ 12、例えば、6、8 または 10 である、置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のアルキルであり；または

40

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、一緒になって 3 以上、7 以下の炭素原子を有する環状アルキル基を表し；

例えば、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して非置換アルキル、非分枝アルキル、分枝または非分枝もしくは環状の 1 ~ 5 炭素のアルキル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルまたはヘキシルであって；

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、独立して水素原子を表すか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表し；

例えば、該 R<sub>3</sub> または R<sub>4</sub> のうち少なくとも一つは、独立してアルキルまたは水素原子、

50

または1以上、3以下の炭素原子を有する直鎖アルキル、メチル、エチル、プロピルを含み、または $R_3$ および $R_4$ は、独立して水素原子を表すか、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状のヒドロカルビル基を表し、もしくは、 $R_3$ および $R_4$ は窒素と一緒にあって、少なくとも4員の複素環基、例えば、6員の複素環基を含む5～8員複素環基を表す]

で示される化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物からなる本発明の方法において有用な化合物。

#### 【0030】

式(I)で示される化合物およびその医薬的に許容される塩、水和物および溶媒和物の製造は、米国特許第4963557号、第5734061号、第5744495号、第5939450号、および第5952365号で開示され、参照によって本明細書に引用する。

10

#### 【0031】

通常、式(I)の化合物は、目的の投与形体によって適当に選択される医薬的な溶液、増量剤、賦形剤、または担体(本明細書では、集合的に医薬的に許容される担体または担体材料を意味する)と混合して、従来の医薬的慣習に合わせて投与される。該ユニットは、たいてい経口、経腸、局所、静脈内注射または非経口投与等の適当な形体である。

#### 【0032】

式(I)で示される化合物は、単独で投与され得るが、一般的に医薬的に許容される担体と混合される。この担体は、固体または液体であって、担体のタイプは、一般的に用いられる投与形式に基づいて選択される。本発明の経口投与形体での製剤化に用いられ得る医薬的に許容される担体および賦形剤の具体例は、1975年9月2日に発行されたロバートによる米国特許第3903297号に記載され、参照によって、全開示を本明細書に引用する。本発明に有用な投与形体を製造するための技術および組成物は、以下の参考文献に記載される: 7 Modern Pharmaceuticals, Chapters 9 and 10 (Banker & Rhodes, Editors, 1979); Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (Lieberman et al., 1981); Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2nd Edition (1976); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences Vol 7. (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995); Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Series 36 (James McGinity, Ed., 1989); Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 61 (Alain Rolland, Ed., 1993); Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology; J.G. Hardy, S.S. Davis, Clive G. Wilson, Eds.); Modern Pharmaceuticals Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds.) 参照によって、すべて本明細書に引用する。

20

30

#### 【0033】

錠剤は、適当な結合剤、潤滑剤、崩壊剤、着色剤、香料添加剤、流動誘導剤および溶解剤を含みうる。例えば、錠剤またはカプセルの投与形体ユニットにおける経口投与を例に挙げると、活性な医薬成分は、経口で無毒な医薬的に許容され、例えばラクトース、ゼラチン、寒天、デンプン、ショ糖、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、第二リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、マンニトール、ソルビトール等の不活性な担体と組み合わせることができる。

40

#### 【0034】

適当な結合剤は、デンプン、ゼラチン、グルコースまたはベータ-ラクトースのような天然糖、トウモロコシ甘味料、アカシア、トラガカントまたはアルギン酸ナトリウム等の天然および合成ゴム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ロウ等を含む。潤滑剤は、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネ

50

シウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム等を含む、これらの形で使用した。崩壊剤は、限定されないが、デンプン、メチルセルロース、寒天、ペントナイト、キサンタンガム等を含む。

【0035】

さらに、そのような組成物は、化合物に加えて、医薬的に許容される担体および投与を容易にするおよび/または取り込みを増加する事が知られる他の賦形剤を含みうる。ミクロスフェア、ナノパーティクル、リポソーム、および免疫に基づく系のような他の剤形も本発明に従って使用される。他の実施例では、ポリマー（例えば、20% w/v ポリエチレングリコール）またはセルロースを含む製剤、もしくは腸溶性製剤を含む。

【0036】

さらに、医薬的に許容される担体および医薬的に許容される錠剤、カプセル、懸濁液およびキットは、米国特許第6384049号に記載されており、それらの開示を本明細書に引用する。

【0037】

本発明の態様として、式(I)で示される該化合物は、1またはそれ以上の増強剤および/または化学療法剤と組み合わせて用いられる。これらの併用は、一緒にまたは順次投与され得る。本発明で使用される具体的な増強剤は、トリプロリジンまたはそのシス異性体を含む。トリプロリジンは、米国特許第5114951号(1992年)に記載され、その全体を本明細書に引用する。本発明に使用する他の適当な増強剤は、プロコダゾール、1H-ベンズイミダゾールカーバメート-2-プロパン酸；[ - (2-ベンズイミダゾールカーバメート)プロピオン酸；2-(2-カルボキシエチル)ベンズイミダゾールカーバメート；プロパゾール]を含む。プロコダゾールは、ウイルスおよび細菌感染に対して活性な非特異的免疫保護剤である。

【0038】

本発明の治療方法において、式(I)で示される化合物と一緒に用いられ得る他の増強剤、および適宜他の化学療法剤は、モネンシン、RAD51遺伝子のアンチセンス阻害剤、プロモデオキシウリジン、ジピリダモール、インドメタシン、モノクローナル抗体、抗トランスフェリンレセプター免疫毒素、メトクロプラミド、7-チア-8-オキソグアノシン、N-ソラネシル-N,N'-ビス(3,4-ジメトキシベンジル)エチレンジアミン、ロイコボリン、ヘパリン、N-[4-[ (4-フルオロフェニル)スルホニル]フェニル]アセトアミド、硫酸ヘパリン、シメチジン、放射線感受性増強物質、化学増感剤、低酸素細胞毒性剤、ムラミールジペプチド、ビタミンA、2'-デオキシコホルマイシン、ビス-ジケトピペラジン誘導体、およびジメチルスルホキシドを含む。

【0039】

式(I)の化合物、および適宜増強剤と一緒に用いられる適当な化学療法剤は、一般的にDNA-相互作用剤、代謝拮抗剤、チューブリン相互作用剤、ホルモン剤およびアスパラギナーゼまたはヒドロキシウレアのような群である。本発明に用いられ得る化学療法剤およびそれらの投与方法の詳細な議論は、Dorr, et al, Cancer Chemotherapy Handbook, 2nd edition, pages 15-34, Appleton & Lange(Connecticut, 1994)を、本明細書に引用する。

【0040】

適当なDNA-相互作用剤は、アルキル化剤（例えば、シスプラチン、シクロホスファミド、アルトレタミン）；プレオマイシンのようなDNA鎖切断剤；インターカレートするトポイソメラーゼII阻害剤（例えば、ダクチノマイシンおよびドキソルビシン）；エトポシドおよびテニポシドのようなインターカレートしないトポイソメラーゼII阻害剤；およびDNAマイナーグループ結合剤であるプリカマイシン等を含む。

【0041】

アルキル化剤は、細胞内DNA、RNA、およびタンパク質分子ならびにより小さなアミノ酸、グルタチオンおよび同様の化学物質と共有結合での化学付加物を形成する。一般的に、これらのアルキル化剤は、核酸、タンパク質、アミノ酸、またはグルタチオン中の

10

20

30

40

50

アミノ、カルボキシ、リン酸、スルフヒドリル基のような細胞成分中の求核原子と反応する。癌治療におけるこれらのアルキル化剤の機構および役割は、良く理解されていない。適当なアルキル化剤は、クロラムブシル、シクロホスファミド、イソファミド、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード；チオテパのようなアジリジン；ブスルファンのようなメタンスルホネートエステル；カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシンのようなニトロソウレア；シスプラチンまたはカルボプラチンのような白金錯体；マイトマイシン、およびプロカルバジンのような生体内還元性アルキル化剤；ダカルバジンおよびアルトレタミンを含む。

【0042】

適当なDNA鎖切断剤は、ブレオマイシンを含む。

10

【0043】

適当なDNAトポイソメラーゼII阻害剤は、以下のもの：アムサクリン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、イダルビシンおよびミトキサントロンのようなインターカレーター；エトポシドおよびテニポシドのような非インターカレーターを含む。適当なDNAマイナーグループ結合剤は、プリカマイシンを含む。

【0044】

代謝拮抗剤は、1または他の2つの主要な機構による核酸の生成物を妨害する。該薬剤のいくつかは、DNA合成の中間体前駆体であるデオキシリボヌクレオシド三リン酸の生成物を阻害し、それ故、DNA複製を阻害する。該化合物のうちのいくつかは、同化したヌクレオチド経路で、それらと置換することができるくらいプリンまたはピリミジンと充分相似する。次いで、これらのアナログは、それらの通常の対応物と代わって、DNAおよびRNAに置換され得る。本明細書で有用な代謝拮抗剤は、メトトレキサートおよびトリメトトレキサートのような葉酸拮抗剤；フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、CB3717、アザシチジンおよびフロクスウリジンのようなピリミジン拮抗剤；メルカプトプリン、6-チオグアニン、ペントスタチンのようなプリン拮抗剤；シタラビンおよびフルダビンのような糖修飾アナログ；およびヒドロキシウレアのようなりボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤を含む。

20

【0045】

チューブリン相互作用剤は、細胞性微小管を形成するために重合するタンパク質であるチューブリンの特定部位に結合することによって作用する。微小管は、重要な細胞構造ユニットである。該相互作用剤が該タンパク質に結合するとき、該細胞は、微小管を形成することができない。適当なチューブリン相互作用剤は、コルヒチン、ビンクリスチンおよびビンブラスチンのような両方のアルカロイド、ならびにパクリタキセルおよびサイトキサンを含む。

30

【0046】

ホルモン剤は、癌および腫瘍の治療にも有用である。それらは、ホルモンの影響を受けやすい癌に使用され、通常、天然資源から得られる。本発明の方法で使用される適当なホルモン剤は、エストロゲン、共役されたエストロゲンおよびエチニルエストラジオールならびにジエチルスチルベステロール、クロルトリアニセンおよびイデネステロール；ヒドロキシプロゲステロンカプロン酸塩、メドロキシプロゲステロン、およびメゲステロールのようなプロゲステン類；およびテストステロン、テストステロンプロピオン酸塩のようなアンドロゲン；フルオキシメステロン、メチルテストステロンを含む。

40

【0047】

副腎皮質ステロイドは、天然副腎コルチゾールまたはヒドロコルチゾンから生じる。それらは、抗炎症作用および有糸分裂の阻害ならびにDNA合成を停止する能力のために使用される。本発明の方法に有用である適当な副腎皮質ステロイドは、プレドニゾン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、およびプレドニゾロンを含む。

【0048】

黄体形成ホルモン放出剤またはゴナドトロピン放出ホルモンアンタゴニストは、前立腺癌の治療の初期に用いられる。本発明の方法に使用する適当な成分は酢酸ロイプロリドお

50

よび酢酸ゴセレリンを含む。

【0049】

適当な抗ホルモン抗原は、タモキシフェンのような抗エストロゲン剤、フルタミドのような抗アンドロゲン剤；およびミトタンおよびアミノグルテチミドのような抗副腎剤を含む。

【0050】

酵素であるリボヌクレオチドレダクターゼの阻害を通じて最初に作用するように思われる、ヒドロキシウレアも本発明の方法で組み合わせて用いられ得る。

【0051】

アスパラギナーゼは、アスパラギンを機能しないアスパラギン酸に変換する酵素であり、それ故、腫瘍でのタンパク質合成を妨害する酵素である。アスパラギナーゼは、本発明の方法において、式(I)の化合物と組み合わせても用いられ得る。

【0052】

式(I)で示される化合物またはその医薬的に許容される塩または水和物もしくは溶媒和物は、ヒトを含む哺乳類に、該哺乳類の癌を治療するために投与される。投与方法は、例えば、経口または非経口が含まれうる。

【0053】

式(I)で示される化合物の最適な個別の投与量および間隔が、治療される症状の性質および程度、投与の形式、経路および部位、ならびに治療される特定の患者によって決定されること、および当該最適化が、従来技術によって決定されることは当業者によって認識される。同様に治療の最適な過程は、すなわち日数で定義される期間の一日に付き与えられる式(I)の化合物の投与数は、治療定量試験の従来過程を用いて当業者によって確定される。具体的な一日の投与計画は、約0.05~約100mg/体重kg、約0.1~約80mg/体重kg、または約0.5~約50mg/体重kg、もしくは約1~約10mg/体重kgを含みうる。

【0054】

式(I)で示される化合物を用いる治療方法は、毎日生じない、例えば、1週間に数回、週2回、週1回、月2回、または月1回の投薬計画も含む。さらに治療は、例えば、月1回の注射を含む長期間注射を含み得る。本発明の方法における投薬期間は、例えば、治療目的および患者の健康を含む多様な要因に依存する。本発明の方法についての具体的な投与期間は、例えば、一治療から15年程度の治療まで、最大6年間程度される一治療、または3ヶ月から最大3年まで継続する治療を含む。投薬計画は、本明細書に記載される具体的な投薬に従って、生命維持の投薬も含み得る。

【0055】

1日に1回短時間で投与されるポーラスは、簡便な投与計画である。代替的に、1日に1回の投与は、例えば、1日に2回~12回の投与目的に応じて投薬を数回に分けられ得る。医薬組成物中の活性成分の投薬レベルは、患者、特に発癌部位およびその周辺における該化合物の過渡または持続濃度に達するため、および所望の応答を生じるために変化されうる。

【0056】

本発明の製剤の投与は、所望の効果に達するように、および所望の効果に達するまで徐々に投薬を増やす必要のないレベルで、式(I)で示される化合物の初期投与によるものである。特定の課題のいずれかにおける特異的な投与レベルが、体重、健康全般、食事、病気の自然経過、投与経路および計画、1またはそれ以上の薬剤の組合せ、および病気の重症度を含む、多様な要因に依存することを理解される。

【0057】

式(I)で示される化合物を他の治療剤を組み合わせて用いるとき、他の治療剤に対する式(I)で示される化合物の比は、所望の治療効果、観察される併用の副作用、または医薬技術における通常の知識を有する者に公知の他の考察に従う必要があるなら、変化され得る。例えば、他の治療剤(例えば、増強剤および/または化学療法剤)に対する式(

10

20

30

40

50



I) で示される化合物の比が、式 (I) で示される化合物の約 0.5 ~ 99.5 wt.% から 1 ~ 50 wt.% または 1 ~ 20 wt.% の範囲を含みうる。

【0058】

式 (I) で示される化合物は、癌または他の病気の治療の前または後に、他の治療剤を投与されるとき、式 (I) で示される化合物および他の治療剤のそれぞれの投与量および投薬法を変化しうる。該補助的または併用療法は、連続的であり、すなわち最初に 1 剤で治療し、次いで 2 剤目で治療するか、2 またはそれ以上の薬剤をほとんど同時に投与される併用治療である。連続的な治療は、2 回目の治療が始まる前の最初の治療が完了した後の妥当な時間内に行われる。同時に両方の薬剤を用いる治療は、同日に 1 回か、または分割投与される。例えば、治療は 1 日目に 1 剤目を用いて、2 日目に他の薬剤を用いる。正確な投薬計画は、治療される病気、該病気の重症度および治療に対する応答に依存する。

10

【0059】

特定の作用機構を必要とせず、式 (I) で示される化合物を用いる治療は、癌細胞のアポトーシスによって死に至らし得るか、または至らし得ない。大腸癌に関しては、本治療が腸細胞の対象の分布において、増殖およびアポトーシスの健康バランスも保ちうる。

【0060】

キットは、式 (I) で示される化合物からなる癌の治療および投薬説明書を提供しうる。さらに、該キットは、該化合物の個別の量ならびに特定の癌または上記に記載したような癌の治療における化合物の投与の仕方の記載 / 推奨を含みうる。

【0061】

さらに、式 (I) で示される化合物の投与は、サイトカインの生成および癌の持続的な成長および進行にとって重要である成長因子も阻害しうる。

20

【0062】

(実施例)

さらに詳述することなく、当業者が前記の説明を用いて、本発明を十分な内容として利用することができる。従って、以下の実施例は、単なる説明として役立ち、多少なりとも本発明の範囲には限らないとして解釈される。

【0063】

実施例 1 : T84 および CaCo-2 大腸癌細胞増殖の阻害

ヒト大腸癌細胞である T84 および CaCo-2 の増殖に対する N, N - ジエチル - 8, 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [4, 5] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩 (化合物 1) の効果を以下の方法で評価した。細胞増殖は、バイオビジョン (カリフォルニア州) から入手した該増殖キットを用いて、WST-1 色素をホルマザンに変換するアッセイによって測定した。用いた手順は、製品の取扱説明書に記載と実質的に同様であった。つまり、細胞を半集密的単層が形成するまで、7 日間成長させた。7 日目に、細胞をトリプシン処理して、約 40000 細胞 / ウェルの濃度で 96 ウェルプレートにて再懸濁し、37 °C で 24 時間成長させた。

30

【0064】

その後、図 1 に示した通り、濃度が増加した化合物 1 を含む新鮮な媒体を加え、さらにアッセイプレートが続けて 24 時間インキュベートした。ウェル当たり 5  $\mu$ L の WST-1 色素の溶液を加えて、4 時間後にプレートを、ELISA プレート読取機を用いて、440 および 600 nm で読み取った。440 nm での吸収から 660 nm での吸収を引いた値は、増殖細胞の数に正比例する。全サンプルを三回測定して、結果は三回の定量の平均として表した。

40

【0065】

図 1 に示す通り、化合物 1 は、IC<sub>50</sub> 値が 0.625 ~ 1.25  $\mu$ M の範囲で、CaCo-2 および T84 細胞の両方の増殖を阻害した。

【0066】

実施例 2 : ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 増殖の阻害

内皮細胞増殖、遊走およびアポトーシスは、血管新生過程の重要な要素である。それ故

50

、実施例 1 の T 8 4 および C a C o - 2 細胞についての記載と同一の手順を用いて、培養液中で、H U V E C 細胞の増殖およびアポトーシスにおける、N , N - ジエチル - 8 , 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4 , 5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩 ( 化合物 1 ) の効果を評価した。

【 0 0 6 7 】

図 2 に示した通り、化合物 1 は、I C <sub>50</sub> 値が 1 . 2 5 ~ 2 . 5 μ M の範囲で、H U V E C の増殖を阻害した。

【 0 0 6 8 】

実施例 3 : C a C o - 2 、 T 8 4 および H U V E C 細胞のアポトーシス誘導

T 8 4 、 C a C o - 2 および H U V E C 細胞はそれぞれ、半集密的に達するまで 1 0 0 mm 皿で 7 ~ 9 日間成長させ、H U V E C の培養液は E G M - 2 ( Clonetics, BioWhittaker 社 ) を用いた。次いで、細胞単層は、それぞれ 1 2 時間 ( C a C o - 2 および T 8 4 ) および 1 6 時間 ( H U V E C ) 、培養液中で N , N - ジエチル - 8 , 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4 , 5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩 ( 化合物 1 ) の表示された濃度で処理した。細胞をトリプシン処理して回収し、該アポトーシスの D N A を該 D N A フラグメンテーション分析キット ( ベーリンガー・マンハイム株式会社、インディアナポリス、インディアナ州 ) の該説明書に従い、これらの細胞から単離した。該アポトーシスの D N A は、臭化エチジウムを染色することにより、1 . 5 % アガロースゲル電気泳動を用いて評価した。M は、D N A の分子量マーカーを含むレーンを示す。

【 0 0 6 9 】

図 3 に示した通り、C a C o - 2 および T 8 4 細胞をそれぞれ化合物 1 と処理することにより投与量依存的に D N A ラダーの形成を生じる。D N A ラダー形成は、アポトーシスを受けた細胞において、確立された顕著な特徴である。参照 : Reed, J.C. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. Current. Opin. Oncology 11:68-75, 1999. Seymore, M. Colorectal cancer: Treatment of advanced disease. Cancer Treat. Rev., 24:119-131, 1998. Wyllie, A.H. Apoptosis and carcinogenesis. Eur. J. Cell Biol., 73:189-197, 1997. Naik, P., Karrim, J., and Hanahan, D. The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. Genes & Dev. 10:2105-2116, 1996. D N A ラダーの形成は、癌細胞が前アポトーシスおよび抗癌化合物で処理されるときに通常観察される。参照 : Pasricha P.J., Bedi. A., O'Connor K., Rashid, A., Akhtar, A.J., Zahurak, M. J.L., Piantadosi, S., Hamilton, S.R., and Giardiello, F.M., The Effect of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial adenomatous polyposis. Gastroenterology 109: 994-998, 1995. Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, Pamukcu R. Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. Cancer Res. 60:3338-3342, 2000. Rice PL, Goldberg RJ, Ray EC, Driggers LJ, Ahnen DJ. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and induction of apoptosis by sulindac metabolites. Cancer Res. 61:1541-1547, 2001. Hughes, F.M. Jr., and Cidlowski, J.A. Pottasium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. Adv. Enzyme Regul., 39:157-171, 1999.

【 0 0 7 0 】

T 8 4 細胞のアポトーシスの開始は、0 . 5 ~ 1 μ M の濃度範囲で観察された。同程度のアポトーシスは C a C o - 2 細胞において、1 . 5 ~ 2 . 0 μ M の濃度範囲で達した。

【 0 0 7 1 】

図 4 は、H U V E C 細胞と化合物 1 を処理することにより、化合物 1 の濃度がおよそ 0 . 6 2 5 ~ 1 . 2 5 μ M で達成されるアポトーシスの開始によって投与依存様式での D N A ラダーの形成を生じる事を示す。

【 0 0 7 2 】

10

20

30

40

50

実施例 4 : T 8 4 大腸癌細胞におけるカスパーゼ活性

カスパーゼ - 3 およびカスパーゼ - 9 の活性は、比色試験キット（バイオビジョン、カリフォルニア州）を用いて測定した。用いた該手順は、製品の取扱説明書に記載と実質的に同じであった。つまり、100 mm皿での T 8 4 細胞の 7 日後の単層は、ベヒクル（コントロールとして）または N, N - ジエチル - 8, 8 - ジブロピル - 2 - アザスピロ [ 4, 5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）のどちらかで表示されたそれぞれの濃度で 10 時間処理した。処理後、細胞を P B S で洗浄し、該細胞抽出液をキット内で供給される溶解緩衝液の 200  $\mu$  L（ $\sim 10^8$  細胞）で細胞を再懸濁することによって、調製した。細胞残屑は、10000  $\times$  g で 30 分間遠心分離することにより除去した。上清（50  $\sim$  100  $\mu$  g のタンパク質）は、10 mM のジチオスレイトール、50 mM の H E P E S、10 % ショ糖、0.1 % C H A P S（p H 7.5）で、プレインキュベートし、該反応液に 100  $\mu$  M の適当な基質（カスパーゼ - 3 については、D E V D - p N A であり、カスパーゼ - 9 については、L E H D - p N A）の付加によって開始した。該アッセイプレート（96 ウェル）を 37  $^{\circ}$  C で 2 時間インキュベートし、p N A の放出で生じる黄色は、E L I S A 読取機を用いて、405 nm で測定した。サンプルは 3 回繰り返し実施して、結果は 3 回の定量値の平均として表した。

10

【 0 0 7 3 】

実施例 5 : 種々の癌細胞株における抗腫瘍効果のインビトロでの測定

公知の癌細胞株の成長を阻害する N, N - ジエチル - 8, 8 - ジブロピル - 2 - アザスピロ [ 4, 5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）の能力を試験するインビトロアッセイは、国立癌研究所の標準的手順に従い実施した。参照：Lin, Z .X., Hoult, J.R., and Raman, A. Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. J Ethnopharmacol. 66: 141-150, 1999. つまり、選択された腫瘍細胞株は化合物 1 の 5 種類の異なった濃度を含んだ培養液中で培養した。48 時間暴露を継続した後、スルホローダミン B（S R B）アッセイを光学的な測定を用いて、細胞の生存または成長を評価するのに用いた。これらのデータは、以下のように報告される：表 1 a および 1 b は、化合物 1 の濃度に対する機能として、光学密度を示す。

20

【表 1】

表 1 a : インビトロでの種々の細胞株に対する化合物 1 の GI50, TGI, および LC50 を示す試験結果

LOG 10 濃度																
	時間		光学密度平均					成長パーセント								
パネル／細胞株	ゼロ	コントロール	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	GI50	TGI	LC50	
白血病																
CCRF-CEM	0.076	0.723	0.611	0.597	0.409	0.158	0.115	83	81	51	13	6	1.09E-06	>1.00E-04	>1.00E-04	
RPMI-8226	0.191	1.068	0.918	0.843	0.371	0.218	0.185	83	74	21	3	-3	2.83E-07	2.98E-05	>1.00E-04	
非小細胞肺癌																
A549/ATCC	0.256	1.346	1.277	1.307	1.126	0.070	0.056	94	96	80	-73	-78	1.57E-06	3.33E-06	7.08E-06	
EKVX	0.619	1.281	1.280	1.336	1.321	0.202	0.073	100	108	106	-67	-88	2.11E-06	4.09E-06	7.94E-06	
HOP-62	0.418	0.783	0.711	0.757	0.693	0.056	0.090	80	93	75	-87	-79	1.43E-06	2.91E-06	5.93E-06	
HOP-92	0.815	1.656	1.529	1.412	1.227	0.542	0.106	85	71	49	-33	-87	8.97E-07	3.92E-06	2.03E-05	
NCI-H23	0.368	0.791	0.728	0.814	0.822	0.040	0.030	85	105	107	-89	-92	1.96E-06	3.52E-06	6.32E-06	
NCI-H322M	0.697	1.026	0.991	0.979	0.855	0.100	0.115	89	86	48	-86	-84	8.90E-07	2.29E-06	5.41E-06	
NCI-H460	0.139	1.474	1.403	1.278	1.075	-0.001	0.015	95	85	70	-100	-90	1.31E-06	2.58E-06	5.08E-06	
NCI-H522	0.107	0.542	0.518	0.531	0.347	0.091	0.099	94	97	55	-15	-7	1.18E-06	6.05E-06	>1.00E-04	
大腸癌																
HCC-2998	0.220	0.404	0.338	0.303	0.057	0.019	0.036	64	45	-74	-92	-84	5.49E-08	2.39E-07	6.28E-07	
HCT-116	0.163	0.752	0.744	0.675	0.407	0.051	0.061	99	87	41	-69	-63	6.46E-07	2.37E-06	6.73E-06	
HCT-15	0.265	1.000	0.878	0.819	0.371	-0.027	-0.026	83	75	14	-100	-100	2.61E-07	1.34E-06	3.65E-06	
KM12	0.436	1.487	1.429	1.402	1.243	0.123	0.210	94	92	77	-72	-52	1.51E-06	3.29E-06	7.13E-06	
SW-620	0.212	0.986	0.948	0.948	0.789	-0.002	-0.016	95	95	75	-100	-100	1.38E-06	2.67E-06	5.17E-06	
CNS 癌																
SF-268	0.295	1.236	1.193	1.181	1.004	0.033	0.058	95	94	75	-89	-80	1.43E-06	2.88E-06	5.80E-06	
SF-295	0.554	1.565	1.614	1.653	1.520	0.202	0.239	105	109	96	-64	-57	1.93E-06	3.98E-06	8.21E-06	
SF-539	0.309	0.612	0.591	0.612	0.559	0.050	0.033	93	100	83	-84	-89	1.57E-06	3.13E-06	6.25E-06	
U251	0.218	0.955	0.885	0.864	0.602	-0.049	-0.042	90	88	52	-100	-100	1.03E-06	2.20E-06	4.69E-06	
黒色腫																
LOX IMVI	0.271	1.174	1.072	1.037	0.595	-0.044	-0.030	89	85	36	-100	-100	5.15E-07	1.84E-06	4.29E-06	
MALME-3M	0.938	1.135	1.103	1.047	1.108	0.089	0.084	84	55	86	-91	-91	1.60E-06	3.07E-06	5.90E-06	
M14	0.279	0.889	0.884	0.838	0.158	0.086	0.109	99	92	-43	-69	-61	2.03E-07	4.77E-07	1.80E-06	
SK-MEL-2	0.086	1.203	1.191	1.191	1.199	0.167	0.168	99	99	100	7	7	3.45E-06	>1.00E-04	>1.00E-04	
SK-MEL-28	0.515	1.492	1.301	1.473	0.846	0.061	0.026	80	98	34	-88	-95	5.61E-07	1.89E-06	4.86E-06	
SK-MEL-5	0.484	1.869	1.779	1.797	1.420	0.021	-0.001	93	95	68	-96	-100	1.28E-06	2.59E-06	5.25E-06	
UACC-257	0.455	1.459	1.403	1.427	1.302	0.190	0.113	94	97	84	-58	-75	1.74E-06	3.90E-06	8.74E-06	
UACC-62	0.529	1.518	1.375	1.379	0.421	0.034	0.060	85	86	-21	-94	-89	2.18E-07	6.42E-07	2.53E-06	

μM/L で発現された濃度

【表 2】

表 1 b : インビトロでの種々の腫瘍細胞株に対する化合物 1 の GI50, TGI, および LC50 の試験結果

Log10 濃度																
	時間		光学密度平均						パーセント阻害							
パネル／細胞株	ゼロ	コントロール	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	GI50	TGI	LC50	
腎臓癌																
786-0	0.365	1.139	1.111	1.091	0.934	0.121	0.132	96	94	73	-67	-64	1.47E-06	3.33E-06	7.57E-06	
A498	1.067	1.359	1.297	1.327	1.336	0.065	0.157	79	89	92	-94	-85	1.68E-06	3.13E-06	5.81E-06	
ACHN	0.323	0.792	0.721	0.711	0.705	-0.031	-0.041	85	83	81	-100	-100	1.49E-06	2.81E-06	5.30E-06	
CAKI-1	0.800	1.832	1.646	1.607	1.691	0.150	0.136	82	78	86	-81	-83	1.65E-06	3.27E-06	6.51E-06	
RXF 393	0.320	1.065	1.017	1.028	0.943	0.086	0.083	94	95	84	-73	-74	1.64E-06	3.41E-06	7.10E-06	
SN12C	0.360	0.826	0.717	0.701	0.668	0.069	0.036	76	73	66	-81	-90	1.29E-06	2.82E-06	6.17E-06	
TK-10	0.909	1.472	1.449	1.389	1.283	0.087	0.101	96	85	66	-90	-89	1.27E-06	2.65E-06	5.52E-06	
UO-31	0.298	1.153	1.076	1.056	0.833	0.006	0.039	91	89	63	-98	-87	1.20E-06	2.45E-06	5.03E-06	
前立腺癌																
PC-3	0.356	2.141	2.116	2.067	1.953	0.073	0.037	99	96	89	-80	-90	1.71E-06	3.38E-06	6.68E-06	
DU-145	0.237	0.763	0.728	0.766	0.733	0.005	-0.032	93	101	94	-98	-100	1.70E-06	3.09E-06	5.62E-06	
乳癌																
MCF7	0.170	1.355	1.311	1.339	0.996	0.017	0.051	96	99	70	-90	-70	1.33E-06	2.73E-06	5.60E-06	
NCI/ADR-RES	0.528	1.301	1.254	1.227	1.220	0.208	0.081	94	90	89	-61	-85	1.83E-06	3.95E-06	8.50E-06	
MDA-MB-231/ATCC	0.674	0.972	0.897	0.863	0.839	0.053	0.038	75	63	55	-92	-94	1.09E-06	2.37E-06	5.18E-06	
HS 578T	0.693	1.270	1.206	1.258	1.217	0.269	0.264	89	98	91	-61	-62	1.86E-06	3.96E-06	8.43E-06	
MDA-MB-435	0.584	1.574	1.613	1.517	0.528	0.230	0.244	104	94	-10	-61	-58	2.67E-07	8.07E-07	6.19E-06	
BT-549	0.459	0.865	0.859	0.904	0.856	0.027	0.007	98	109	98	-94	-98	1.77E-06	3.23E-06	5.89E-06	
T-47D	0.332	1.191	0.837	1.176	1.024	0.164	0.207	59	98	81	-51	-38	1.71E-06	4.11E-06		

μM/L で発現された濃度

## 【 0 0 7 4 】

該測定から、以下の値を定量した： 1 ) 腫瘍細胞成長阻害の 50 % ( コントロールと比較して ) が生じる化合物 1 の濃度 ( GI50 )、 2 ) 全く成長が起こらない ( 全成長阻害、 TGI ) 化合物 1 の濃度、および 3 ) 該腫瘍細胞密度がコントロールの半分である化合物 1 の濃度 ( LC50 )。表 2 は、Log<sub>10</sub>でのこれらのデータを報告する。図 6 は、読み取った腫瘍細胞株の化合物 1 の濃度に対する機能として、腫瘍細胞の成長をグラフで説明する。

10

20

30

40

【表 3】

表 2 : 種々の腫瘍細胞株に対する化合物 1 の GI50, TGI および LC50 の Log10 の値

パネル／細胞株	Log <sub>10</sub> GI50		Log <sub>10</sub> TGI		Log <sub>10</sub> LC50
白血病					
CCRF-CEM	-5.96	>	-4.00	>	-4.00
RPMI-8226	-6.55		-4.53	>	-4.00
非小細胞肺癌					
A549/ATCC	-5.80		-5.48		-5.15
EKVX	-5.68		-5.39		-5.10
HOP-62	-5.84		-5.54		-5.23
HOP-92	-6.05		-5.41		-4.69
NCI-H23	-5.71		-5.45		-5.20
NCI-H322M	-6.05		-5.64		-5.27
NCI-H460	-5.88		-5.59		-5.29
NCI-H522	-5.93		-5.22	>	-4.00
大腸癌					
HCC-2998	-7.26		-6.62		-6.20
HCT-116	-6.19		-5.63		-5.17
HCT-15	-6.58		-5.87		-5.44
KM12	-5.82		-5.48		-5.15
SW-620	-5.86		-5.57		-5.29
CNS 癌					
SF-268	-5.84		-5.54		-5.24
SF-295	-5.71		-5.40		-5.09
SF-539	-5.80		-5.50		-5.20
U251	-5.99		-5.66		-5.33
黒色腫					
LOX IMVI	-6.29		-5.74		-5.37
MALME-3M	-5.80		-5.51		-5.23
M14	-6.69		-6.32		-5.74
SK-MEL-2	-5.46	>	-4.00	>	-4.00
SK-MEL-28	-6.25		-5.72		-5.31
SK-MEL-5	-5.89		-5.59		-5.28
UACC-257	-5.76		-5.41		-5.06
UACC-62	-6.66		-6.19		-5.60
卵巣癌					
IGROV1	-5.61	>	-4.00	>	-4.00
OVCAR-3	-5.63		-5.21		-4.29
OVCAR-4	-5.79		-5.49		-5.18
OVCAR-5	-5.62		-5.39		-5.15
OVCAR-8	-5.57		-4.92	>	-4.00
SK-OV-3	-5.34		-5.10		-4.23
腎臓癌					
786-0	-5.83		-5.48		-5.12
A498	-5.77		-5.50		-5.24
ACHN	-5.83		-5.55		-5.28
CAKI-1	-5.78		-5.49		-5.19
RXF 393	-5.79		-5.47		-5.15
SN12C	-5.89		-5.55		-5.21
TK-10	-5.90		-5.58		-5.26
UO-31	-5.92		-5.61		-5.30

10

20

30

40

【表 4】

パネル／細胞株	Log <sub>10</sub> GI50	Log <sub>10</sub> TGI	Log <sub>10</sub> LC50
前立腺癌			
PC-3	-5.77	-5.47	-5.18
DU-145	-5.77	-5.51	-5.25
乳癌			
MCF7	-5.88	-5.56	-5.25
NCI/ADR-RES	-5.74	-5.40	-5.07
MDA-MB-	-5.96	-5.63	-5.29
231/ATCC	-5.73	-5.40	-5.07
HS 578T	-6.57	-6.09	-5.21
MDA-MB-435	-5.75	-5.49	-5.23
BT-549	-5.77	-5.39	
T-47D			
MG MID	-5.93	-5.45	-5.06
デルタ	1.33	1.18	1.15
範囲	1.92	2.62	2.20

10

## 【0075】

## 実施例 6：抗血管新生 CAM アッセイ

10 日間インキュベートした白色レグホーン種の卵は、表 3 で示した通り化合物 1 の量を用いて投与した。該投与は、40 μL の指示溶液を 13 mm 丸底 Thermanox (登録商標) カバースリップにピペットで入れて、それを風乾させた。該原料を乾燥した後、該乾燥試験品と CAM の接触を保証するように、該カバースリップを各々卵の絨毛尿膜 (CAM) に置いた。投与後、該卵を約 48 時間インキュベーターに戻した。続いて 48 時間後、インキュベーターから除き、生存を観察してカバースリップの下での暴露領域では、脈管構造の損失を試験した。この実験からのデータは、表 3 に報告した。

20

## 【表 5】

表 3：化合物 1 の血管新生データを示す CAM アッセイ\*

試験溶液	卵に対する 投与量 (μg)	死滅した 卵の数	% 血管クリアランス				
			0	<25	<50	<75	>75
サリドマイド	100	0	2	3	3	2	
化合物 1 (0 mg/ml)	0	1	19				
化合物 1 (0.625 mg/ml)	25	0	8	2			
化合物 1 (1.25 mg/ml)	50	0	5	4	1		
化合物 1 (2.5 mg/ml)	100	4	1	1	3	1	
化合物 1 (5 mg/ml)	200	3	0	2	5		
化合物 1 (10 mg/ml)	400	7	0	1	0	2	

30

\* 20 個の卵がコントロール群に用いられ、10 個の卵がそれぞれの処理に用いられた。

40

血管新生の阻害は、該スリップカバー下の範囲において、新しい血管の形成の損失を視的に観察することに基づく。

## 【0076】

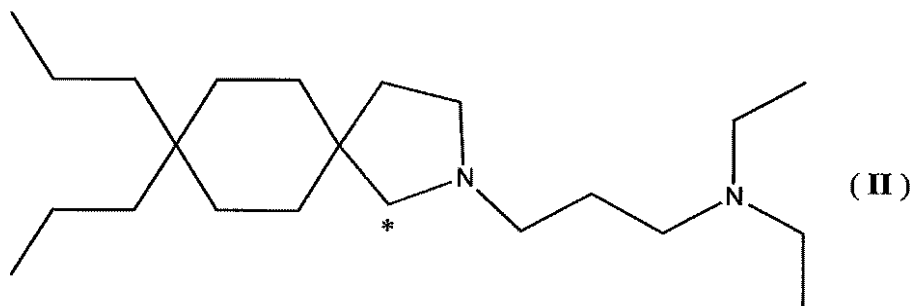
## 実施例 7：インビボでの生存ラットへの化合物 1 の投与

91 uCi / mg の特異的な活性を持つ [<sup>14</sup>C] N, N - ジエチル - 8, 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [4, 5] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩 (化合物 I I) は、化学純度が、> 99 % であり、放射線ラベル化していない N, N - ジエチル - 8, 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [4, 5] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン

50

酸塩（化合物 1）は、化学純度が、 $> 98\%$ であり、それぞれこの研究に用いた。化合物 I I でラベルした放射性炭素の部位は、式 I I 中の星印で記載される。放射線ラベル化していない材料は、参考目的で用いた。放射線ラベル化した材料は約 - 80、暗中で保存し、ラベル化していない材料は、約 - 20、暗中で保存した。化合物 I I の放射線化学純度を T L C で確認し、 $98.0\%$ であることを確認した（60 F 254 シリカゲルプレート；塩化メチレン：メタノール：アンモニア = 80：18：2 で溶離して；Isomess IM-3016 放射線 - T L C 分析機または Phosphor Imager SF で検出した）。

### 【化 3】



10

### 【0077】

年齢約 8 ~ 9 週、投与時の体重 237 ~ 255 g の 3 匹の健康な雄の Sprague Dawley ラット (CrI:CD(SD)BR) は、チャールズリバー社（英国）から提供された。該動物を使用 20  
前 8 日間この種に適した保存檻に棲ませた。S D S ラットおよび Mouse Maintenance Diet No.1 (Special Diets Services, Witham Essex)、および水道水は、至る所で任意に入手した。該動物に供給される食事および水は、定期的に品質を分析して、問題は検出されなかった。保存および研究領域は、光循環および温度を自動的にコントロールした。該研究の間に測定した温度の実際の範囲は、相対湿度 60% で、17 ~ 25 であった。

### 【0078】

該投薬は、投与の日に経口投与のために調製した。化合物 I I の適当な量を、蒸留水で溶解し、1 mg f.b./mL の目的濃度で与えた。次の投与までに、放射線化学純度のチェックを上記の T L C 法を用いて、投与製剤で実施し、該放射線化学純度は、 $> 97\%$ を示した。この事は投与期間中、該放射線ラベル化化合物の分解は無視できることを示した。 30

### 【0079】

各々のラットにおいて、投与溶液のアリコートは、チューブによる栄養補給によって経口投与された。投与量は、胃管栄養針を取り付けた 5.0 mL のガラス製注射針を用いて、わずか 1.0 mL / kg の用量で投与された。それぞれの投与量において、投与量の合計重量および注入装置は、投与前に記録され、放出した注入装置は投与後の重さを量った。投与溶液のそれぞれにおける放射性材料の濃度も定量した。これらのデータから、該動物が受けた実際の投与量を定量し、表 4 に示す。

【表 6】

表 4：試験動物が受けた化合物 I I の投与量

動物ナンバー	動物の体重 (kg)	受けた投与量		
		MBq	mg f.b.	mg f.b./kg
#1 オス	0.237	1.32	0.232	0.978
#2 オス	0.240	1.31	0.230	0.958
#3 オス	0.255	1.41	0.247	0.969

10

経口投与：目的投与レベル 1 mg f.b./kg

## 【0080】

投与の後すぐに、該ラットを排泄物および呼気の定量回収に適した硝子製の代謝物測定檻に移した。全サンプルを個別に、特定のラベルをした容器に集めた。

## 【0081】

尿を投与後、0～6、6～24、24～48、48～72、72～96、96～120、120～144、および144～168時間間隔で回収した。回収した該容器を投与後から48時間ドライアイスで冷却した。

## 【0082】

糞は、投与後0～24、24～48、48～72、72～96、96～120、120～144および144～168時間間隔で回収した。回収容器を最初の48時間ドライアイスで冷却した。

## 【0083】

それぞれ糞回収の時間に、それぞれ檻を水（約750 mL）で洗浄し、該洗浄液は放射能を保っていた。投与後0～24時間および24～48時間で、呼気は、CO<sub>2</sub>の除去を有効にするために、エタノールアミン：エトキシエタノール（3：7，v/v）を含んだ2連続のトラップを通した。該トラップの溶媒は、各々採集した期間の最後に放射定量のため、サンプリングした。

## 【0084】

投与後168時間で、それぞれの動物は、CO<sub>2</sub>麻酔および子宮頸管転位により殺した。消化管を死体から除去し、放射定量の準備のために別々に保持した。

## 【0085】

全ての尿および糞のサンプルは、分析前後において、冷凍（約20℃）で保存した。カゴ洗浄液は、分析が完了するまで、室温で保存し、次いで廃棄した。全ての子宮頸管および消化管は、分析前まで約-20℃で冷凍保存した。

## 【0086】

尿（約0.3 mL）および檻洗浄液（約1 mL）の複製したアリコートに分けて、蒸留水（もし必要なら）で1 mLに希釈し、Quickzint 1 シンチレーション流体（10 mL；Zinsser Analytic Maidenhead, 英国）と配合した。

## 【0087】

糞は、該サンプルと1～2倍量の水でホモジナイズし、ホモジネート重量を記録した。複製したアリコート（約0.3）をそれぞれのサンプルから採取し、燃焼コーン（キャンベラパッカー社、Pangbourne, 英国）を含んだ燃焼パッドに分配した。乾燥時、これらのサンプルは、Packard Tri-Carb 306 Automatic Sample Oxidiser を用いて燃焼させた。<sup>14</sup>C O<sub>2</sub>を生成した結果物をCarbo-Sorb（登録商標）（8 mL；キャンベラパッカー社）の吸収によって回収し、Permafluor（登録商標）E<sup>+</sup>シンチレーション流体（10 m

40

50



L ; キャンベラパッカー社 ) に加えた。

【 0 0 8 8 】

該結果は、直接的に用い、%有効性が正しくなかったために、標準液の燃焼 [ Spec-Chem (登録商標) -  $^{14}\text{C}$  ; キャンベラパッカー社 ] は、回収効率が最初から最後まで 97 % 以上であったことを示した。

【 0 0 8 9 】

それぞれのラットについて、内容物を含む該頸管および消化管を Soluene 350 ( キャンベラパッカー ) で可溶化した。溶解し、該消化管内容物 ( 約 0 . 1 m L ) の一部を液体シンチレーション分光法のために採取した。メタノールを加えて、1 m L に調製し、次いで、10 m L の Quickzint を加えて、該サンプルを他の液体サンプルと同様に測定した 10

【 0 0 9 0 】

シンチラントで調製された全てのサンプルは、典型的なブランクおよび標準的な硝子瓶と一緒に、外部標準比による自動クエンチ補正を有する液体シンチレーション分析機 ( パッカー液体シンチレーション分析機、1600TR ) を用いて、5 分間分析した。可能であれば、サンプルは 2 回分析し、加熱させ、分析前に光安定化させた。それぞれの結果の測定前にバックグラウンドカウント速度を決定し、各々カウント速度を差し引いた。上記のバックグラウンドで 30 d.p.m の信頼できる定量値限界をこれらの研究室で制定した。

【 0 0 9 1 】

排泄物中のそれぞれの動物における全放射能、消化管および子宮頸管の回復は、表 5 および 6 に示す。排泄物の結果の平均は、図 7 にグラフで記載する。 20

【表 7】

表 5 : 1 mg 遊離塩基 / kg の目的投与レベルでのオスラットに化合物 I I の  
単独投与による放射線の排出

サンプルおよび 採集期間 (時間)	#1 オス	#2 オス	#3 オス	平均	SD
尿					
0-6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
6-24	0.4	0.5	0.5	0.5	0.1
24-48	1.0	1.4	1.4	1.3	0.2
48-72	1.2	1.5	1.7	1.5	0.3
72-96	1.3	1.6	2.0	1.6	0.4
96-120	1.2	1.5	1.6	1.4	0.2
120-144	0.9	1.3	1.3	1.2	0.2
144-162	0.8	1.0	1.2	1.0	0.2
0-168	6.9	8.9	9.8	8.5	1.5
糞					
0-24	18.2	14.7	17.7	16.9	1.9
24-48	16.3	17.2	14.5	16.0	1.4
48-72	10.0	15.2	12.7	12.6	2.6
72-96	7.5	7.8	8.0	7.8	0.3
96-120	5.5	4.1	6.4	5.3	1.2
120-144	3.5	3.5	4.3	3.8	0.5
144-168	3.0	3.2	3.1	3.1	0.1
0-168	64.0	65.7	66.7	65.5	1.4
檻洗浄液					
0-24	0.1	0.1	* < 0.1	+ 0.1	+ 0.0
24-48	0.1	< 0.1	0.1	0.1	0.1
48-72	< 0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
72-96	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1
96-120	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1
120-144	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1
144-168	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0
0-168	0.7	1.0	1.3	1.0	0.3

SD = 標準偏差

\* = 30d. p. m 以下の上記のバックグラウンドから計算された結果

+ = 30d. p. m 以下の上記のバックグラウンドから計算された結果を含んだ値

10

20

30

40

【表 8】

目的投与レベル 1 mg 遊離塩基 / kg でのオスラットへの  
化合物 I I の経口投与による放射線回収量のまとめ

サンプル	#1 オス	#2 オス	#3 オス	平均	SD
尿	6.9	8.9	9.8	8.5	1.5
糞	64.0	65.7	66.7	65.5	1.4
檻洗浄液	0.7	1.0	*1.3	+1.0	+0.3
呼気 1	*<0.1	*<0.1	*<0.1	+<0.1	-
呼気 2	*<0.1	*<0.1	*<0.1	+<0.1	-
消化管	13.8	13.3	10.5	12.5	1.8
死骸	11.3	14.1	14.9	13.5	1.9
合計	96.7	103.0	103.2	101.0	3.7

168 時間の回収期間での投与された投与量の%として表された結果

\* = 3 0 d. p. m 以下の上記のバックグラウンドから計算された結果

+ = 3 0 d. p. m 以下の上記のバックグラウンドから計算された結果

SD = 標準偏差

#### 【 0 0 9 2 】

投与された放射能投与量は、定量的に回収された（96.7 ~ 103.2 %）。放射能は、糞中に大部分が排出され、投与後 168 時間までに投与量の平均 65.5 % を回収した。対照的に、放射能投与量の平均 8.5 % が、このときまでに尿中で回収された。放射性ラベルした材料の脱離は、投与後 120 時間までに排泄物中に回収された投与量の約 66 % とゆっくりであった。168 時間の回収期間完了後、168 時間において、平均 75.0 % が排泄物および檻洗浄液中に、残りの投与量の約 12.5 % および 13.5 % がそれぞれ、消化管および子宮頸管に回収された。該投与量の 0.2 % 以下が、呼気に回収された。

#### 【 0 0 9 3 】

##### 実施例 8 : C a C o - 2 細胞の増殖阻害

ヒト大腸腺腫細胞である C a C o - 2 の増殖に対する N , N - ジエチル - 8 , 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4 , 5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）および他のアナログ（表 7 に示した構造）を以下の方法で評価した。細胞増殖は、バイオビジョン（カリフォルニア州）から入手した増殖キットを用いて、W S T - 1 色素からホルマザンに変換するアッセイによって測定した。用いた該手順は、製品の取扱説明書に記載通りそのまま使用した。つまり、細胞を半集密的単層が形成するまで、7 日間成長させた。7 日後、細胞をトリプシン処理し、約 50000 細胞 / ウェルの濃度になるように 96 ウェルプレートで再懸濁した。その後、5 μ M の試験化合物を含んだ新鮮なメディアを加え、アッセイプレートをさらに続けて 12 時間インキュベートした。ウェルに付き W S T - 1 色素 10 μ L の溶液を加え、4 時間後、プレートを E L I S A 読取機により、440 nm および 600 nm で読み取った。440 - 600 nm の吸収は、増殖細胞の数に正比例する。全サンプルは 2 回測定し、結果は 2 回の定量の平均として表した。

【表 9】

## CaCo-2細胞の増殖阻害\*

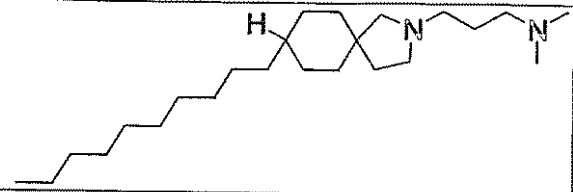
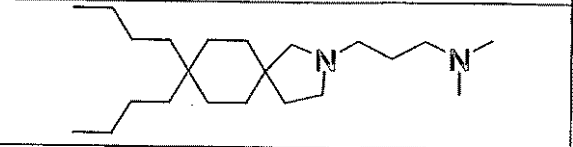
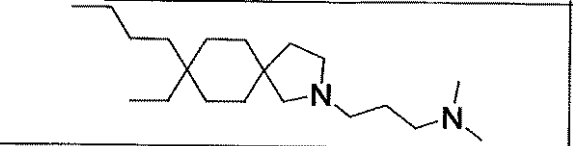
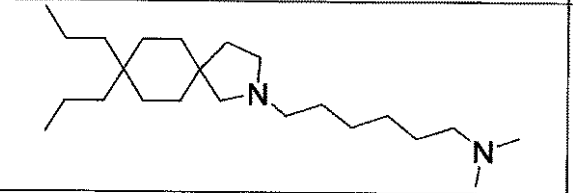
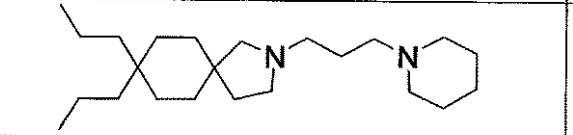
化合物	化合物構造	5 $\mu$ M 化合物での 増殖阻害%	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
化合物 1		85	~2.5
A*		45	~20
B*		0	>>20
C*		15	>>20
D*		0	>>20
E*		0	>>20
F*		35	>20
G*		86	~2.5

10

20

30

【表 10】

化合物	化合物構造	5 $\mu$ M 化合物での 増殖の阻害%	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
H*		73	~3.5
J*		84	~2.5
K*		81	~2.5
L*		76	~3.5
M*		67	~4

\*注：二塩酸塩として試験した化合物

## 【0094】

## 実施例 9：成長阻害アッセイ

HUVEC ( $1.5 \times 10^3$ ) を 100  $\mu$ L の EBM-2 (Clonetic# CC3162) 中、96 ウェルプレートに固定した。24 時間 (0 日) 後、化合物 1 (100  $\mu$ L) の試験溶液を EBM-2 溶媒中、所望の濃度 (5 ~ 7 濃度レベル) の 2X でそれぞれのウェルに加える。0 日において、1 つのプレートを 20 % メタノール中、10 分間、0.5 % クリスタルバイオレットで染色し、水でリンスし、風乾した。残りのプレートは、37 で 72 時間インキュベートした。72 時間後、プレートは 20 % メタノール中、0.5 % クリスタルバイオレットで染色し、水でリンスし、風乾した。該染色物をエタノール : 0.1 M クエン酸ナトリウム (0 日プレートを含む) 1 : 1 溶液で溶離させ、吸収を ELISA 読取機 (Dyiatech Laboratories) を用い、540 nm で測定した。0 日での吸収は、72 時間でのプレートから差し引き、データを増殖のコントロール (ベヒクル処理した細胞) のパーセントとしてプロットした。IC<sub>50</sub> (50 % 阻害を引き起こす薬剤濃度) は、プロットしたデータから計算され、表 8 に報告する。プロットしたデータは、図 8 に示す。

## 【0095】

## 実施例 10：コード生成アッセイ

マトリゲル (10 mg / mL の 60  $\mu$ L ; Collaborative Lab#35423) を氷冷した 96 ウェルプレートのウェルに固定した。該プレートを室温で 15 分間静置させ、次いで、37 で 30 分間、マトリゲルを重合させるようにインキュベートした。平均時において、HUVEC を  $2 \times 10^5$  細胞 / mL の濃度で、EGM-2 (Clonetic# CC3162) 中で調製

する。化合物 1 の試験溶液は、同一媒体中、所望の濃度（5 濃度レベル）の 2 X で調製する。該細胞（500  $\mu$ L）および 2 X の化合物 1（500  $\mu$ L）溶液を混合し、この懸濁液の 200  $\mu$ L をポリマー化したマトリゲルで複製し置換する。24 時間インキュベートした後、3 通りの写真を Bioquant 映像分析装置を用いて、それぞれの濃度で撮った。薬剤効果（IC<sub>50</sub>）は、形成したコードの長さおよび接合の数を測定することにより、未処理のコントロールと比較して評価する。該プロットしたデータは、図 9 に示す。

【0096】

#### 実施例 11：細胞遊走アッセイ

遊走は、48 ウェルのバイデンチャンバーおよび 8  $\mu$ m 微細孔サイズのコラーゲンでコーティングした（10  $\mu$ g/mL ラット尾コラーゲン；Collaborative Laboratories）ポリカーボネートフィルター（オスモニクス社）を用いて評価する。チャンバーウェルの底部に 27 ~ 29  $\mu$ M のダルベッコ変法イーグル培地（「DMEM」）単独（ベースライン）、または化学誘引物質（bFGF、VEGF または Swiss 313 細胞で調製済みの培地）を含んだ培地で受ける。チャンバーの上部には、試験化合物を含むか、含まない DMEM + 1% ウシ血清アルブミン（「BSA」）で調製された HUVEC 細胞懸濁液（ $1 \times 10^6$  細胞/mL）の 45  $\mu$ L を受ける。37℃ でインキュベーションを 5 時間した後、該膜は、リン酸緩衝生理食塩水（「PBS」）でリンスし、固定し、Diff-Quick 溶液で染色した。該フィルターは、該遊走細胞を裏返したスライドガラスに置いて、上にある細胞をキムワイプで除去する。試験は、4 ~ 6 回繰り返し実施し、それぞれのウェルから 5 つの領域をカウントした。活性化しない負のコントロール値は、活性化するコントロールから差し引かれて、処理した薬剤の値およびデータは、平均の遊走細胞  $\pm$  標準偏差としてプロットする。IC<sub>50</sub> は、プロットしたデータから計算し、表 8 に報告する。グラフ的な結果は、図 10 に示す。

【表 11】

測定 (HUVEC)	化合物 1 IC <sub>50</sub> 濃度 ( $\mu$ M)
成長阻害	2.05
コード形成	2.63
遊走	0.53

【0097】

本発明の具体的な態様を記載することは、その多くの変更が当業者によって、すぐに明らかであり、示唆され得る事は理解され、それ故、本発明が請求項の精神と範囲によってのみ限定される事を意図する。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図 1】図 1 は、N, N - ジエチル - 8, 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [4, 5] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）による（a）CaCo - 2 および（b）T84 細胞の増殖阻害を示すグラフである。

【0099】

【図 2】図 2 は、N, N - ジエチル - 8, 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [4, 5] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）による HUVEC 細胞の増殖阻害を示すグラフである。

【0100】

【図 3】図 3 は、N, N - ジエチル - 8, 8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [4, 5] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）による T84 および CaCo - 2 細胞におけるアポトーシス誘導を示す DNA 切断顕微鏡写真である。

【 0 1 0 1 】

【図 4】図 4 は、N，N - ジエチル - 8，8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4，5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）による H U V E C 細胞のアポトーシス誘導を示す D N A 切断顕微鏡写真である。

【 0 1 0 2 】

【図 5】図 5 は、N，N - ジエチル - 8，8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4，5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）によるカスパーゼ - 3 およびカスパーゼ - 9 の活性化を示すグラフである。

【 0 1 0 3 】

【図 6】図 6 は、N，N - ジエチル - 8，8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4，5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）濃度の機能として腫瘍細胞成長を示すグラフの編集である。 10

【 0 1 0 4 】

【図 7】図 7 は、1 m g 遊離塩基 / k g の目的投与レベルで雄のラットに、[  $^{14}$ C ] N，N - ジエチル - 8，8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4，5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 I I）を単独で経口投与に従った放射線の排出量の平均を示したグラフである。

【 0 1 0 5 】

【図 8】図 8 は、N，N - ジエチル - 8，8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4，5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）濃度とコントロールを比較した機能として H U V E C 細胞増殖を示すグラフである。 20

【 0 1 0 6 】

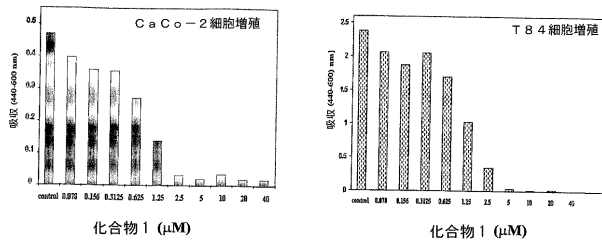
【図 9】図 9 は、N，N - ジエチル - 8，8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4，5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）濃度とコントロールを比較した機能として H U V E C コード形成を示すグラフである。

【 0 1 0 7 】

【図 10】図 10 は、N，N - ジエチル - 8，8 - ジプロピル - 2 - アザスピロ [ 4，5 ] デカン - 2 - プロパンアミン ニマレイン酸塩（化合物 1）濃度とコントロールを比較した機能としての H U V E C 細胞遊走を示すグラフである。

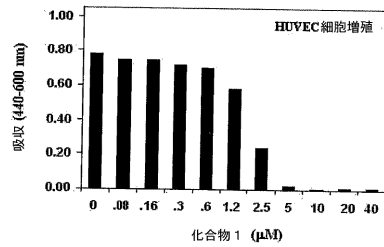
【 図 1 】

図 1



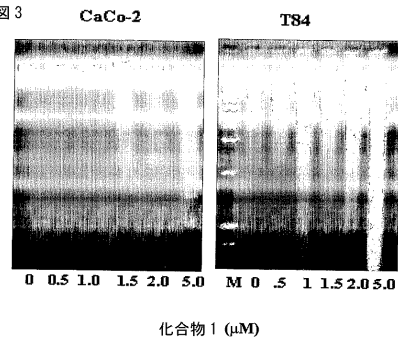
【 図 2 】

図 2



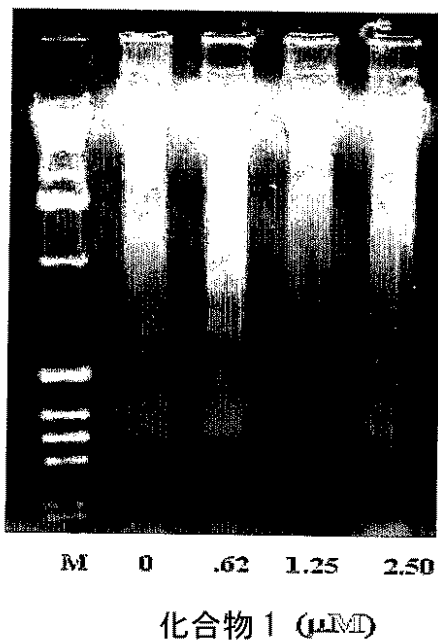
【 図 3 】

図 3



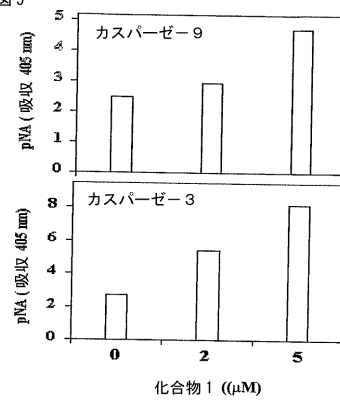
【 図 4 】

図 4



【 図 5 】

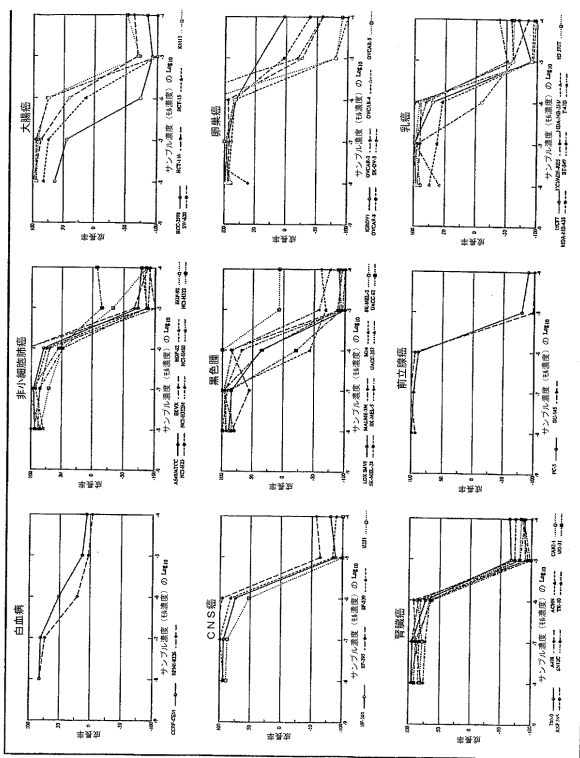
図 5





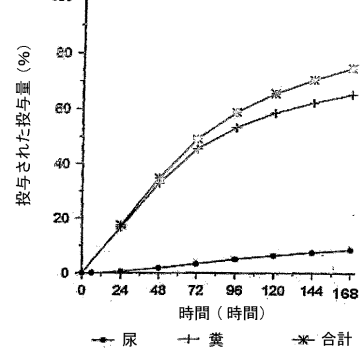
【図 6】

図 6



【図 7】

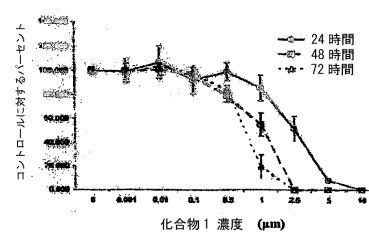
図 7



【図 8】

図 8

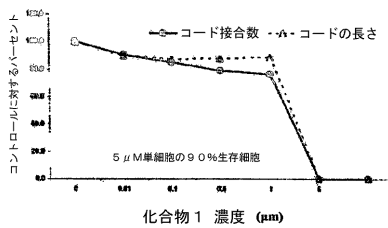
増殖阻害アッセイ



【図 9】

図 9

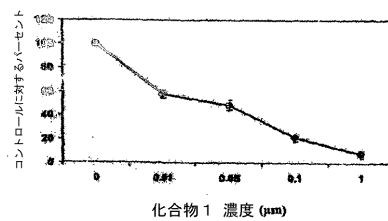
コード形成



【図 10】

図 10

遊走アッセイ



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US04/07144
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 38/00 US CL : 514/278, 409 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/278, 409  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched none  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: registry, structure search, uspatfull		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,051,596 A (BADGER) 18 April 2000 (18.04.2000), see entire document, especially col. 3 to col. 5; col. 8, lines 21-24.	17-20
Y	US 4,963,557 A (BADGER et al.) 16 October 1990 (16.10.1990), see entire document, especially col. 4, line 45 to col. 5, line 15; col. 5, line 64 to col. 6, line 26.	17-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 06 August 2004 (06.08.2004)		Date of mailing of the international search report 21 SEP 2004
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. (703) 305-3230		Authorized officer Cynthia Delacroix-Matthies Telephone No. 571-272-0572

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/07144

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

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

1. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claim Nos.: 6-10  
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:

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. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	
<b>A 6 1 P 9/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 0 1
C 0 7 D 221/20 (2006.01)	C 0 7 D 221/20	
C 0 7 D 491/107 (2006.01)	C 0 7 D 491/107	

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

- (72) 発明者 ドナルド・エイチ・ピッカー  
アメリカ合衆国 0 7 9 2 0 ニュージャージー州バスキング・リッジ、ジェイムズタウン・ロード 6 6 番
- (72) 発明者 ジェフリー・ダブリュー・ヘンソン  
アメリカ合衆国 9 8 2 4 8 ワシントン州ファーンデイル、ノース・ビューラー・アベニュー 6 1 2 8 番
- (72) 発明者 サイモン・フリッカー  
カナダ、ブイ 2 ゼット・1 エイ 6、ブリティッシュ・コロンビア、ラングレー、2 3 7 エイ・ストリート 5 8 8 2 番
- (72) 発明者 クンワル・シャイルバイ  
アメリカ合衆国 1 9 4 0 3 ペンシルベニア州ノリスタウン、ボールドイーグル・サークル 2 7 0 7 番
- (72) 発明者 ゲイリー・エス・ジェイコブ  
アメリカ合衆国 6 3 1 4 1 ミズーリ州クレブ・クール、メイソン・フォレスト・ドライブ 1 2 5 4 1 番

F ターム(参考) 4C034 CK03

4C050 AA04 BB02 CC18 EE01 FF01 GG01 HH01  
4C086 AA01 AA02 BC10 BC27 CB22 MA01 MA04 MA52 MA55 MA56  
MA59 MA66 NA14 ZB26 ZB27  
4C204 BB01 CB09 DB01 EB01 FB16 GB03

## 【要約の続き】

か、または飽和または不飽和の置換または非置換の分枝または非分枝もしくは環状であるヒドロカルビル基である]で示される化合物またはその塩、水和物、溶媒和物の治療上の有効量を投与することによる癌治療の方法。