

(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2015-516378

(P2015-516378A)

(43) 公表日 平成27年6月11日 (2015.6.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	4 B 0 6 5
A 6 1 K 31/5415 (2006.01)	A 6 1 K 31/5415	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C 2 0 6
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-502028 (P2015-502028)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月28日 (2013.3.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2013/050255
 (87) 国際公開番号 W02013/143000
 (87) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013.10.3)
 (31) 優先権主張番号 61/616, 658
 (32) 優先日 平成24年3月28日 (2012.3.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/837, 115
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513212785
 マックマスター ユニヴァーシティ
 カナダ国、エル8エス 4エル8 オンタ
 リオ州、ハミルトン、メイン ストリート
 ウェスト 1280
 (74) 代理人 100086461
 弁理士 齋藤 和則
 (72) 発明者 バティア、ミッキー
 カナダ国、エル8エス 4ケイ1 オンタ
 リオ州、ハミルトン、メイン ストリート
 ウェスト 1280、マックマスター
 ユニヴァーシティ - エムディシーエル 5
 O2O、ステム セル アンド キャンサ
 ー リサーチ インスティテュート

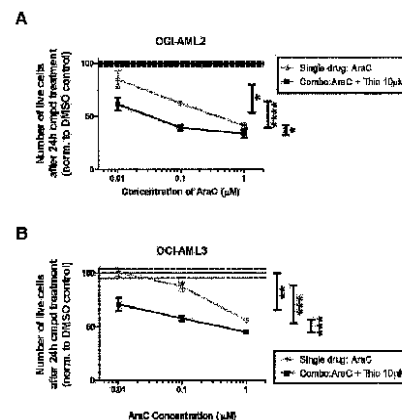
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の処置のための組み合わせ療法

(57) 【要約】

本明細書には、チオリダジンのようなドーパミン受容体 (DR) 遮断薬と化学療法剤を含む、癌を処置するための方法、使用方法、組み合わせおよび組成物が記載されている。選択肢として、化学療法剤はシタラピンのようなデオキシリボ核酸 (DNA) 合成阻害薬、またはパクリタキセルまたはドセタキセルのような微小管阻害薬である。本発明の方法、使用方法、組み合わせおよび組成物は急性骨髄性白血病 (AML) のような癌の処置に有用である。

【選択図】 図 19



Each point, n=3; mean ± SD
 (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001, (****) p<0.0001.

FIG. 19

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者における急性骨髄性白血病を処置するためのチオリダジンとシタラビンの使用。

【請求項 2】

前記チオリダジンと前記シタラビンは同時に使用される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記チオリダジンと前記シタラビンは異なる時間に使用される、ことを特徴とする請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記チオリダジンは前記シタラビンの使用の前に使用される、ことを特徴とする請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

前記シタラビンは前記チオリダジンの使用の前に使用される、ことを特徴とする請求項 3 に記載の使用。

【請求項 6】

使用時に前記シタラビンの前記被験者における血漿濃度は 1 nM と 100 nM の間である、ことを特徴とする請求項 1 - 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7】

使用時に前記シタラビンの前記被験者における血漿濃度は 5 nM 未満である、ことを特徴とする請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

使用時に前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度は $5 \mu\text{M}$ と $15 \mu\text{M}$ の間である、ことを特徴とする請求項 1 - 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

使用時に前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度は約 $10 \mu\text{M}$ である、ことを特徴とする請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

使用時に前記シタラビンの前記被験者における血漿濃度は 1 nM と 100 nM の間であり、前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度は $5 \mu\text{M}$ と $15 \mu\text{M}$ の間である、ことを特徴とする請求項 1 - 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 11】

前記被験者は寛解にある、ことを特徴とする請求項 1 - 10 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 12】

前記被験者はヒトである、ことを特徴とする請求項 1 - 11 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 13】

被験者における急性骨髄性白血病を処置するためのチオリダジンとシタラビンの組み合わせ。

【請求項 14】

前記チオリダジンと前記シタラビンは同時に使用される、ことを特徴とする請求項 13 に記載の組み合わせ。

【請求項 15】

前記チオリダジンと前記シタラビンは異なる時間に使用される、ことを特徴とする請求項 13 に記載の組み合わせ。

【請求項 16】

前記チオリダジンは前記シタラビンの使用の前に使用される、ことを特徴とする請求項 15 に記載の組み合わせ。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記シタラピンは前記チオリダジンの使用の前に使用される、ことを特徴とする請求項 15 に記載の組み合わせ。

【請求項 18】

前記シタラピンは、使用時に前記シタラピンの前記被験者における血漿濃度が 1 nM と 100 nM の間であるように調製される、ことを特徴とする請求項 13 - 17 のいずれかに記載の組み合わせ。

【請求項 19】

前記シタラピンは、使用時に前記シタラピンの前記被験者における血漿濃度が 5 nM 未満であるように調製される、ことを特徴とする請求項 18 に記載の組み合わせ。

【請求項 20】

前記チオリダジンは、使用時に前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度が 5 μ M と 15 μ M の間であるように調製される、ことを特徴とする請求項 13 - 19 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ。

【請求項 21】

前記チオリダジンは、使用時に前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度が約 10 μ M であるように調製される、ことを特徴とする請求項 20 に記載の組み合わせ。

【請求項 22】

前記シタラピンは使用時に前記シタラピンの前記被験者における血漿濃度が 1 nM と 100 nM の間であるように調製され、そして前記チオリダジンは前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度が 5 μ M と 15 μ M の間であるように調製される、ことを特徴とする請求項 13 - 17 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ。

【請求項 23】

前記被験者は寛解にある、ことを特徴とする請求項 13 - 22 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ。

【請求項 24】

前記被験者はヒトである、ことを特徴とする請求項 13 - 23 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ。

【請求項 25】

チオリダジンとシタラピンを含む組成物。

【請求項 26】

さらに医薬的に許容可能な担体を含む、ことを特徴とする請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

急性骨髄性白血病を処置するための請求項 25 または 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

急性骨髄性白血病を処置するためのチオリダジンとシタラピンを含むキット。

【請求項 29】

チオリダジンとシタラピンが異なる容器に入っており、選択肢として医薬的に許容可能な担体と共にある、ことを特徴とする請求項 28 に記載のキット。

【請求項 30】

チオリダジンとシタラピンが単一の容器、選択肢として医薬的に許容可能な担体、に入っていることを特徴とする請求項 28 に記載のキット。

【請求項 31】

キットの使用説明書をさらに含む、ことを特徴とする請求項 28 - 30 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 32】

チオリダジンとシタラピンを投与するステップを有する、ことを特徴とする被験者の急性骨髄性白血病を処置する方法。

【請求項 33】

前記チオリダジンと前記シタラピンは前記被験者に同時に投与される、ことを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

前記チオリダジンと前記シタラピンは前記被験者に異なる時間に投与される、ことを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記チオリダジンは前記シタラピンの前に被験者に投与される、ことを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記シタラピンは前記チオリダジンの前に被験者に投与される、ことを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記シタラピンは前記シタラピンの前記被験者における血漿濃度が 1 n M と 1 0 0 n M の間であるように被験者に投与される、ことを特徴とする請求項 3 2 - 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

前記シタラピンは前記シタラピンの前記被験者における血漿濃度が 5 n M 未満であるように被験者に投与される、ことを特徴とする請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記チオリダジンは前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度が 5 μ M と 1 5 μ M の間であるように被験者に投与される、ことを特徴とする請求項 3 2 - 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 4 0】

前記チオリダジンは前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度が約 1 0 μ M であるように被験者に投与される、ことを特徴とする請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記シタラピンは前記シタラピンの前記被験者における血漿濃度が 1 n M と 1 0 0 n M の間であるように被験者に投与され、そして前記チオリダジンは前記チオリダジンの前記被験者における血漿濃度が 5 μ M と 1 5 μ M の間であるように被験者に投与される、ことを特徴とする請求項 3 2 - 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記被験者は寛解にある、ことを特徴とする請求項 3 2 - 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 4 3】

細胞にチオリダジンとシタラピンを接触させるステップを有することを特徴とする、1 つまたはそれ以上の白血病細胞の増殖を減少させる方法。

【請求項 4 4】

前記白血病細胞が急性骨髄性白血病 (A M L) 細胞である、ことを特徴とする請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記白血病細胞が癌幹細胞である、ことを特徴とする請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記細胞が生体内 (i n v i v o) にある、ことを特徴とする請求項 4 3 - 4 5 のいずれか 1 項記載の方法。

40

【請求項 4 7】

前記細胞が試験管内 (i n v i t r o) にある、ことを特徴とする請求項 4 3 - 4 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4 8】

前記細胞は 1 n M と 1 0 0 n M の間の濃度のシタラピンと接触させられる、ことを特徴とする請求項 4 3 - 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記細胞は 5 n M 未満の濃度のシタラピンと接触させられる、ことを特徴とする請求項

50

4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記細胞は 5 μ M と 1 5 μ M の間の濃度のチオリダジンと接触させられる、ことを特徴とする請求項 4 3 - 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記細胞は約 1 0 μ M の濃度のチオリダジンと接触させられる、ことを特徴とする請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記細胞は 1 n M と 1 0 0 n M の間の濃度のシタラビンと接触させられ、そして前記細胞は 5 μ M と 1 5 μ M の間の濃度のチオリダジンと接触させられる、ことを特徴とする請求項 4 3 - 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 5 3】

前記細胞は約 1 0 μ M の濃度のチオリダジンと接触させられる、ことを特徴とする請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ドーパミン受容体遮断薬と化学療法剤を使用することを特徴とする、被験者における癌を処置するための方法。

【請求項 5 5】

前記化学療法剤は D N A 合成阻害薬または微小管阻害薬である、ことを特徴とする請求項 5 4 に記載の方法。

20

【請求項 5 6】

前記 D N A 合成阻害薬はシタラビンである、ことを特徴とする請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記ドーパミン受容体遮断薬は D₂ ファミリードーパミン受容体遮断薬である、ことを特徴とする請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記ドーパミン受容体遮断薬はフェノチアジン誘導体である、ことを特徴とする請求項 5 4 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記フェノチアジン誘導体はチオリダジンである、ことを特徴とする請求項 5 4 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 6 0】

前記ドーパミン受容体遮断薬は表 1 から選択される、ことを特徴とする請求項 5 4 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記癌または前癌性の疾病は白血病またはリンパ腫である、ことを特徴とする請求項 5 4 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記白血病は急性骨髄性白血病 (A M L) である、ことを特徴とする請求項 6 1 に記載の方法。

40

【請求項 6 3】

前記被験者は寛解にある、ことを特徴とする請求項 5 4 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記被験者はヒトである、ことを特徴とする請求項 5 4 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

細胞にドーパミン受容体遮断薬と化学療法剤を接触させるステップを有することを特徴とする、癌細胞の増殖を減少させる方法。

50

【請求項 66】

前記化学療法剤はDNA合成阻害薬または微小管阻害薬である、ことを特徴とする請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

前記DNA合成阻害薬はシタラビンである、ことを特徴とする請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記ドーパミン受容体遮断薬はD₂ファミリードーパミン受容体遮断薬である、ことを特徴とする請求項 65 67 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 69】

前記ドーパミン受容体遮断薬はフェノチアジン誘導体である、ことを特徴とする請求項 65 68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 70】

前記フェノチアジン誘導体はチオリダジンである、ことを特徴とする請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

前記ドーパミン受容体遮断薬は表 1 から選択される、ことを特徴とする請求項 65 69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 72】

前記癌細胞は白血病癌細胞である、ことを特徴とする請求項 65 71 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 73】

前記白血病癌細胞は白血病癌幹細胞である、ことを特徴とする請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記白血病は急性骨髄性白血病 (AML) である、ことを特徴とする請求項 72 に記載の方法。

【請求項 75】

前記細胞が生体内 (in vivo) にある、ことを特徴とする請求項 65 - 74 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 76】

前記細胞が試験管内 (in vitro) にある、ことを特徴とする請求項 65 - 74 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の処置のための方法および組成物に関し、特にドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤による癌の処置のための方法および組成物に関するものである。

【0002】

(関連出願)

本出願は2013年3月15日出願の米国特許出願13/837,115 (特許文献1) および2012年3月28日出願の米国暫定特許出願61/616,658 (特許文献2) に対し優先権を主張し、それらはここに参照としてそれらの全てが採り入れられる。

【背景技術】

【0003】

多くの証拠が癌/腫瘍の発現が癌幹細胞 (CSC) と呼ばれ (Dick, 2009; Jordan, 2009; Reya 他, 2001) 独自に疾病を開始し維持することができる希な細胞集団に起因することを示唆した。さらに実験の結果が、癌細胞系の増殖を抑制し (Shoemaker, 2006) またはマウスモデルにおいて腫瘍量を減少させる (

10

20

30

40

50

F r e s e 及び T u v e s o n , 2 0 0 7) 能力を特徴とする従来型の化学療法薬剤がヒト癌幹細胞 (C S C) に対して有効でないことを示した (G u a n 他 , 2 0 0 3 ; L i 他 , 2 0 0 8) 。この化学療法剤に対する抵抗性は、しばしば健康な幹細胞および前駆細胞に影響を与える無差別な細胞毒性と組合わされて、投与量制限につながり、そして保護処置を必要とさせる (S m i t h 他 , 2 0 0 6) 。この方向に沿った最近の事例には、細胞死の選択的誘導 (G u p t a 他 , 2 0 0 9 ; R a j 他 , 2 0 1 1) があるが、それはまだ正常幹細胞及びヒトシステムでのテストが残されている。したがって前臨床検査用の真に選択的な抗ガン剤を提供するために、癌幹細胞のみを標的とする薬剤の識別が喫緊の課題である。

【 0 0 0 4 】

正常幹細胞及び腫瘍性幹細胞は自己再生と分化ポテンシャルとの間のしっかりと制御された平衡状態により機能的に定義される。癌幹細胞の場合この平衡状態は増大した自己再生とサバイバルの側にかたより、その結果限定された分化能力をもたらし、それは最終的に腫瘍の成長を可能にする。正常な幹細胞にも等しく影響する直接的毒性効果とは対照的に、癌幹細胞を根絶する他の手段は、癌幹細胞集団を消耗させる努力の中で、この平衡状態を分化の側に変更することによる。したがって、選択的に体細胞性癌幹細胞を標的にし、一方で健常な幹細胞能力を助命する分子を識別することは、革新的な診断及び処置の開発にとって選択的にヒト癌幹細胞を標的にするために有用である。

【 0 0 0 5 】

血液系腫瘍は血液、骨髄およびリンパ節に影響を及ぼす癌のタイプである。血液系腫瘍は2つの主要血液細胞分化系列のいずれかに由来する：骨髄性またはリンパ性細胞系。血液系腫瘍の例は、急性骨髄性白血病および慢性骨髄性白血病を含む。

【 0 0 0 6 】

血液系腫瘍は全て一般的に骨髄内の骨髄性分化系列の前駆体から発生すると考えられているが、それらは症状、病理および処置において高度に多岐にわたっている。例えば2008年WHO骨髄増殖性腫瘍分類 (T e f f e r i 他、C a n c e r 9月1日号、3842 - 3847頁 (2 0 0 9 年) および ; V a n n u c c h i 他 骨髄増殖性腫瘍の理解と管理の進展 C A C a n c e r J . C l i n . 2 0 0 9 年 ; 5 9 : 1 7 1 - 1 9 1 参照。両文献はここに参照され採り入れられる。) は骨髄性腫瘍の5つの異なる分類スキームを提示し、そして急性骨髄性白血病 (A M L) を慢性骨髄性白血病 (C M L) 及び他の骨髄増殖性腫瘍とは異なるカテゴリーに分類している。さらに慢性骨髄性白血病 (C M L) はしばしば B C R - A b l 転座を含むことが特徴としてあげられるが、これは急性骨髄性白血病 (A M L) には存在しない。骨髄腫瘍のような白血病の好適な処置は、造血性幹細胞集団に不当に影響を与えることなく白血病細胞を標的とするであろう。

【 0 0 0 7 】

チオリダジンはフェノチアジン薬グループに属するドーパミン受容体遮断薬であり、そして抗精神病薬として使用されている。それは1959以来、病院で使用されてきたが、高投与量での心毒性および網膜症にたいする懸念から、この薬は一般的には処方されず、より普遍的に使用される抗精神病薬に対し、応答に失敗した又は禁忌である患者に対しておかれている。統合失調症に有効であると見做される量の投与量でドーパミン受容体遮断薬による処置を受けている統合失調症患者は、一般集団に比べて直腸、結腸及び前立腺癌の発現率が低いことが報告されている。

【 0 0 0 8 】

シタラビン (シトシンアラビノシド (A r a C)) はDNA合成阻害薬であり、そして成人ヒト急性骨髄性白血病 (A M L) の導入療法および強化化学療法の両方に使用される至適基準の化学療法剤である。しかしこの処置は高用量において有意の罹患リスクおよび死亡リスクの問題を提起する (E s t e y と D o h n e r , 2 0 0 6) 。

【 0 0 0 9 】

癌の処置のための新規の方法および組成物、とくに急性骨髄性白血病の処置と予後のための方法に対するニーズが存在する。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許出願13/837,115

【特許文献2】米国暫定特許出願61/616,658

【発明の概要】

【0011】

ドーパミン受容体(DR)遮断薬とDNA合成阻害薬のような化学療法剤との組み合わせは、癌細胞の殺傷に驚くほど効果的であると判断された。本明細書に記載の通り、チオリダジン、クロルプロマジン、フルフェナジンまたはプロクロルペラジンのようなドーパミン受容体遮断薬は、癌細胞とくに急性骨髄性白血病(AML)に対し細胞毒性である。ドーパミン受容体遮断薬は癌細胞に毒性な濃度において造血性幹細胞のような正常幹細胞に対し比較的限定的な効果を及ぼすことが分かっている。さらに事例13と15で示されるように、ドーパミン受容体遮断薬チオリダジンと化学療法剤シタラビンの組み合わせはシナジー的效果を示し、そしてAML癌細胞数の有意の減少をもたらした。チオリダジンとシタラビンの組み合わせはまた、AML癌細胞を根絶し、一方で正常造血幹細胞機能を維持することが示された。従ってドーパミン受容体遮断薬とシタラビンのような化学療法剤の組み合わせは、低レベルで投与されるべき化学療法剤の治療的に効果のある用量を可能にし、それにより化学療法剤の高用量に通常付帯する望ましくない副作用を防止する。

【0012】

従って本発明の1側面は、ドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤を被験者に投与するステップを有する、被験者の癌または前癌性の疾病を処置する方法を含む。他の側面は、癌または前癌性の疾病の処置に対しドーパミン受容体(DR)遮断薬および化学療法剤を使用する方法を含む。本発明のもう1つの側面は、癌または前癌性の疾病の処置に使用されるドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤の組み合わせを含む。ある実施形態では化学療法剤はシタラビンのようなDNA合成阻害薬である。ある実施形態では化学療法剤はタキサンのような微小管阻害薬である。ある実施形態ではドーパミン受容体(DR)遮断薬はチオリダジンのようなフェノチアジン誘導体または表1から選択されるドーパミン受容体(DR)遮断薬である。ある実施形態ではドーパミン受容体(DR)遮断薬は1つまたはそれ以上のドーパミン受容体(DR)に選択的な抗体である。ある実施形態では癌または前癌性の疾病は白血病またはリンパ腫であり、選択肢として急性骨髄性白血病(AML)である。ある実施形態では、シタラビンの使用または投与は、被験者におけるシタラビンの濃度を1nMと100nMの間、場合によって5nM未満にする。ある実施形態では、チオリダジンの使用または投与は、被験者におけるチオリダジンの濃度を5μMと15μMの間、場合によって約10μMにする。

【0013】

本発明の他の側面は、癌細胞にドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤を接触させるステップを含む癌細胞の細胞死を誘導する方法を含む。本発明の類似の側面は、癌細胞にドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤を接触させるステップを含む癌細胞の増殖を減少させる方法を含む。他の実施形態では細胞は生体内(in vivo)である。ある実施形態では、化学療法剤はシタラビンのようなDNA合成阻害薬である。ある実施形態ではドーパミン受容体(DR)遮断薬はチオリダジンのようなフェノチアジン誘導体または表1から選択される化合物である。ある実施形態ではドーパミン受容体(DR)遮断薬は1つまたはそれ以上のドーパミン受容体(DR)に選択的な抗体である。ある実施形態では化学療法剤はタキサンのような微小管阻害薬である。ある実施形態では癌は白血病であり、選択肢として急性骨髄性白血病(AML)である。ある実施形態では癌細胞は癌幹細胞であり、選択肢として白血病癌幹細胞である。

【0014】

本発明のさらなる側面は、ドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤からなる組成物を含む。ある実施形態ではドーパミン受容体(DR)遮断薬はチオリダジンのようなフェノ

チアジン誘導体または表 1 から選択される化合物である。ある実施形態では、化学療法剤はシタラピンのような DNA 合成阻害薬である。また、ドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤からなる組成物の癌の処置における使用法が提供される。選択肢として、組成物は化学療法剤に接合したドーパミン受容体遮断薬を含む。例えば、ある実施形態ではシタラピンのような DNA 合成阻害薬に接合したドーパミン受容体遮断薬からなる化合物が提供される。ある実施形態では、タキソールのような微小管阻害薬に接合したドーパミン受容体遮断薬が提供される。ある実施形態では、ドーパミン受容体 (DR) 遮断薬はチオリダジンのようなフェノチアジン誘導体または表 1 から選択される化合物である。ある実施形態ではドーパミン受容体 (DR) 遮断薬は 1 つまたはそれ以上のドーパミン受容体 (DR) に選択的な抗体である。ある実施形態では、組成物はさらに医薬的に許容可能な担体を含む。

10

【0015】

本発明のある側面では、ドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤からなるキットが提供される。ある実施形態では、そのキットは白血病の処置に使用されるような、癌の処置に使用される。ある実施形態では、キットは急性骨髄性白血病 (AML) の処置に使用される。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤は別々の容器、選択肢として 1 つまたはそれ以上の医薬的に許容可能な担体に入れられる。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤は別々の容器に入れられるが、キット内に一緒に梱包される。ある実施形態では、キットは単一の容器、選択肢として 1 つの医薬的に許容可能な担体の中に、ドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤を含む。ある実施形態では、キットは、癌の処置におけるドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤の使用説明書のような、キットの使用説明書を含む。ある実施形態では、ドーパミン受容体 (DR) 遮断薬はチオリダジンである。ある実施形態では、化学療法剤はシタラピンである。

20

【0016】

本発明の 1 側面では、ドーパミン受容体遮断薬および放射線治療を被験者に投与するステップを有する、被験者の癌または前癌性の疾病を処置する方法が提供される。選択肢として、方法は被験者に本明細書に記載される化学療法剤を投与するステップも含む。

【0017】

本開示の他の特徴および優位性は以下の詳細説明から明らかになるであろう。しかし詳細説明および特定の事例は、本開示の好適な実施形態を示すが、説明のためにだけ与えられ、開示の精神と範囲内で多くの変更と修飾がこの記述を読んだ当業者には自明である。

30

【図面の簡単な説明】

【0018】

本発明の 1 つ以上の実施形態が図に関連して記載される；

【図 1】10 μ M のチオリダジンは HL-60、MV4-11 および OCI3 の白血病細胞系に対し細胞毒性があることを示す図である。

【図 2】10 μ M のチオリダジンは正常造血幹細胞 (HSC) のコロニー形成ポテンシャルには限られた影響しか及ぼさないが (図 2A)、急性骨髄性白血病 (AML) の芽細胞形成ポテンシャルを有意に減少させることを示す図である。

【図 3 - 4】(図 3) は、チオリダジンで処置された正常造血幹細胞 (HSC) および急性骨髄性白血病 (AML) から形成された CFU コロニーの細胞ペレットを示す図である。(図 4) は、10 μ M のクロルプロマジンと 10 μ M のチオリダジンは共に HL-60、MV4-11 および OCI3 の白血病細胞系に対し細胞毒性があることを示す図である。

40

【図 5】ドーパミン受容体 DR1、DR2、DR3、DR4 および DR5 の発現を示す図である。ドーパミン受容体 (DR) 発現は、急性骨髄性白血病 (AML) 細胞系、幾つかの原発性 AML および単核細胞 (MNC) には見られるが、造血幹細胞 (HSC) を豊富に含んだ細胞 (系統枯渇へその緒臍帯血 CB1in (-)) では見られなかった。

【図 6】多重ドーパミン受容体 (DR) 遮断薬は急性骨髄性白血病 (AML) 細胞系に対し細胞毒性があることを示す図である。SKF = (R) - (+) - SKF-38393 塩

50

酸塩； $7OH = R(+) - 7 - \text{ヒドロキシ} - DPAT$ 臭化水素酸塩； $GR = GR 103691$ ； $SCH = R(+) - SCH - 23390$ 塩酸塩； $CLOZ = \text{クロザピン}$ ； $CHL = \text{クロルプロマジン塩酸塩}$ ； $THIO = \text{チオリダジン}$ 。

【図7-8】(図7)は、原発性AMLにおいてドーパミン受容体がCD14+細胞集団の中に発現することを示す蛍光標識細胞分取(FACS)データの図である。(図8)は、原発性AMLにおいてチオリダジンがCD14+細胞を選択的に標的とし、そしてその正規化出現度数を減少させることを示す図である。

【図9A-C】腫瘍性のヒト多能性幹細胞(hPSC)を分化する化合物のための化学スクリーニングを使用した、メフロキンとチオリダジンの識別を示す図である。(図9A)はスクリーニング手順の概略を示す。(図9B)は590種類の化合物スクリーンの緑色蛍光タンパク質(GFP)およびヘキスト信号の%残存活性(%RA)のXY分散プロットである。囲まれた領域は減少したGFPと減少したヘキストで定義される多能性の喪失(LOP)を示す。各点は $n = 3$ 、平均+/-標準誤差。(図9C)は590種類の化合物の反応の要約を示す。

【図9D-G】(図9D)は候補化合物；チオリダジン、アザチオプリンおよびメフロキンの化学構造式を示す。(図9E)は候補化合物 $10\mu M$ で処置したv1H9-Oct4-GFP細胞のGFP、ヘキストおよびそれらを合体させた代表的顕微鏡画像である。(図9F)はこれら画像のGFP強度のヒストグラムである。(図9G)はv1H9-Oct4-GFPの投与量反応曲線と50%有効濃度(EC_{50})の計算値である。各点は $n = 3$ 、平均+/-標準誤差。

【図10A-C】サリノマイシン、メフロキンおよびチオリダジンの正常および腫瘍性集団に対する影響を示す図である。(図10A-B) $10^{-7} - 10^{-6} M$ のサリノマイシン(SAL)、メフロキン(MQ)およびチオリダジン(THIO)で処置されたH9(図10A)およびv1H9-Oct4-GFP(図10B)内のOct4+細胞の出現頻度のフローサイトメトリ分析である。各バーは $n = 3$ 、平均+/-標準誤差。数値はジメチルスルホキシド(DMSO)で処置された対照試料に対し正規化されている；(-)DMSO平均、(- -)平均マイナス1標準誤差、(-)BMP4処置試料における%Oct4+レベル。(図10C)同一化合物の同一濃度での、v1H9-Oct4-GFP内のOct4+細胞の正規化出現頻度%に対するH9内のOct4+細胞の正規化出現頻度%の比率である。

【図10D-H】(図10D、E)は $10\mu M$ のエトポシド、チオリダジン(THIO)、BMP4で24時間処置後、およびジメチルスルホキシド(DMSO)処置(対照、CTRL)において、p53(図10D)およびp21(図10E)に対しポジティブに染色する腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)のパーセントを示す。各バーは $n = 3$ 、平均+/-標準誤差。エトポシド、チオリダジン処置後の代表的画像が含まれる。矢印はエトポシド処置細胞とチオリダジン処置細胞におけるp53+とp21+を示す。(図10F)は腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)のチオリダジン処置後、2倍超増加した分化に伴う遺伝子を示す図である。遺伝子はそれぞれの行に分けられている、内胚葉(ENDO)、中胚葉(MESO)、胚細胞(GERM)、神経細胞(NEURO)および栄養芽細胞(TROPH)。各バーは2つの別個の実験の平均値である。(図10G-K)はメチルセルロース検定法を使用して検知された、化合物処置に反応した造血性多重分化系列及びクローン原性ポテンシャルを示す。(図10G)は化合物処置後の造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)からの代表的コロニー形成単位(CFU)ペレットを示す。(図10H)は化合物処置後のAMLからの代表的芽細胞CFUペレットを示す。

【図10I-L】(図10I-J)は、化合物処置後のHSPC(図10I)およびAML芽細胞(図10J)から生成されたそれぞれCFUと芽細胞CFUの定量化結果を示す。数値はジメチルスルホキシド(DMSO)で処置された対照試料に対し正規化されている；(-)DMSO平均、(- -)平均マイナス1標準誤差。各HSPCバーは $n = 7$ 個別サンプル、平均+/-標準誤差。各AMLバーは少なくとも $n = 5$ 個別患者サンプル、平均+/-標準誤差。(図10K)は同一化合物の同一濃度における正規化されたAML

10

20

30

40

50

芽細胞のCFUに対するHSPCのCFUの比率。(図10L)チオリダジン10 μ M (THIO 10 μ M)またはDMSO溶媒(CTRL)で96時間まで処置後の培養された患者AML細胞内のCD11b顆粒球細胞の正規化出現頻度を示す。各バーはn = 3、平均 + / - 標準誤差。(*) p < 0.05 (**) p < 0.01 (***) p < 0.001 (****) p < 0.0001。

【図11A - B】サリノマイシン、メフロキンおよびチオリダジンの線維芽細胞由来人工多能性幹細胞(iPSC)および造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)に対する効果を示す図である。(図11A)10⁻⁷ - 10⁻⁶ Mのサリノマイシン(SAL)、メフロキン(MQ)およびチオリダジン(THIO)で処置した線維芽細胞由来iPSC(Fib-iPS)におけるOct4+細胞の出現頻度のフローサイトメトリ分析である。各バーはn = 3; 平均 + / - 標準誤差。数値はジメチルスルホキシド(DMSO)で処置された対照試料に対し正規化されている; (-) DMSO平均、(- -) 平均マイナス1標準誤差、(-) BMP4処置試料の% Oct4+レベル。(図11B)化合物の腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)に対する拡大投与量応答である。各点は平均 + / - 標準誤差。

【図11C - D】(図11C)はチオリダジンで処置された系統枯渇へその緒臍帯血(CBlin-)の造血性分化系列ポテンシャルを示す。メチルセルロース検定法において生成された赤芽球(CFU-E)、マクロファージ(CFU-M)および顆粒球(CFU-G)コロニーのコロニー形成単位(CFU)を示す。(図11D)はサリノマイシン、メフロキンおよびチオリダジンで処置された系統枯渇へその緒臍帯血(CBlin-)から生成されたCFUの構成を示す図である。0.1 μ M、1 μ M、10 μ Mのサリノマイシン(SAL)、メフロキン(MQ)およびチオリダジン(THIO)処置で生成されたCFUの%構成を示す。(*) p < 0.05 (**) p < 0.01。

【図12A - B】造血性幹細胞(HSC)および白血病幹細胞(LSC)生着に対するチオリダジンの影響を示す図である。(図12A)チオリダジン10 μ M (THIO 10 μ M)またはメフロキン10 μ M (MQ 10 μ M)で造血性幹細胞および前駆細胞(HSPC)を処置後の骨髓におけるヒトCD45+細胞の出現頻度である。数値はジメチルスルホキシド(DMSO)で処置された対照試料(CTRL)に対し正規化されている。計2つのHSPC試料が評価された。平均 + / - 標準誤差。(図12B)hCD45+集団内の側方散乱(SSC)に対する骨髓性マーカー(CD33)またはリンパ系マーカー(CD19)の代表的フローサイトメトリプロットである。

【図12C - E】(図12C)チオリダジン10 μ M (THIO 10 μ M)またはメフロキン10 μ M (MQ 10 μ M)で急性骨髓性白血病(AML)処置後の骨髓(BM)内のCD45+CD33+AML芽細胞の発現頻度である。数値はジメチルスルホキシド(DMSO)で処置された対照試料(CTRL)に対し正規化されている。計2つのAML試料が評価された。(図12D)DMSO処置された対照(CTRL)集団とチオリダジン処置(THIO 10 μ M)におけるCD33に対するCD45の代表的フロープロットである。(図12E)hCD45造血性幹細胞および前駆細胞(HSPC)生着の正規化%に対するhCD45 CD33 AML芽細胞生着の正規化%の比率である。(*) p < 0.05。

【図13A - C】薬剤処置に対する生体内(in vivo)応答を示す図である。(図13A)は1 μ Mのサリノマイシン(SAL 1 μ M)で造血性幹細胞および前駆細胞(HSPC)を処置後の骨髓内のヒトCD45+細胞の正規化出現頻度をDMSO処置された対照(CTRL)との比較で示す。計2つのHSPC試料が評価された。平均 + / - 標準誤差。(****) p < 0.0001。(図13B)は造血幹細胞(HSC)および白血病幹細胞(LSC)の脾臓生着に対するチオリダジンの効果を示す図である。(図13B上段)はチオリダジン10 μ M (THIO 10 μ M)で造血性幹細胞および前駆細胞(HSPC)を処置後の脾臓内のヒトCD45+細胞の出現頻度を示す。数値はDMSOで処置されたHSPC対照試料(CTRL)に対し正規化されている。計2つのHSPC試料が評価された。平均 + / - 標準誤差。(図13B下段)はチオリダジン10 μ M (THIO 10 μ M)でAMLを処置後の脾臓内のCD45+CD33+芽細胞の出現頻度

10

20

30

40

50

を示す。数値はDMSOで処置されたAML対照試料(CTRL)に対し正規化されている。計2つのAML患者試料が評価された。(図13C)チオリダジンの赤血球および巨核球の再生に対する効果を示す図である。チオリダジン10 μ M(THIO 10 μ M)処置またはDMSO処置された(CTRL)HSPCを注入された異種移植骨髓内で検知されるヒト血液細胞の構成。赤血球(RBC)はグリコホリンAポジティブ性により、そして血小板はCD41aにより規定される。

【図13D-F】(図13D)はAMLとの異種移植の骨髓性白血病生着の確認を示す。側方散乱対リンパ系細胞のマーカーであるCD19のフローサイトメトリ。囲み内の数値は平均+/-標準誤差。(図13E-F)は造血幹細胞(HSC)および白血病幹細胞(LSC)の生体内(in vivo)自己再生に関するチオリダジンの効果を示す図である。チオリダジン10 μ M(THIO 10 μ M)処置またはDMSO処置された(CTRL)原発性系統枯渇へその緒臍帯血(CBlin-) (図13E)または原発性AML(図13F)生着片から外植された同数のhCD45細胞を受け取る、2次異種移植の骨髓における、hCD45+細胞(図13E)またはhCD45+CD33+(図13F)の生着レベルを示す。各バーはn=3マウス、平均+/-標準誤差。

【図14A-B】腫瘍性幹細胞に発現したドーパミン受容体を示す図である。SSEA3および全ての5つのドーパミン受容体(DR)サブタイプで染色された正常H9(図14A)および腫瘍性v1H9-Oct4-GFP細胞(図14B)のフローサイトメトリである。SSEA3+断片内のドーパミン受容体(DR)発現が示される。

【図14C-D】(図14C)はCD34, CD38および全ての5つのドーパミン受容体(DR)サブタイプで染色された分化系列が枯渇した臍帯血(造血性幹細胞および前駆細胞(HSPC))のフローサイトメトリ。ドーパミン受容体(DR)発現はゲートで囲まれた集団で示される。(図14D)は全ての5つのドーパミン受容体(DR)サブタイプで染色された、FAB分類を持つ13人のAML患者試料のフローサイトメトリ。

【図14E-F】DRD3(図14E)およびDRD5(図14F)にもポジティブである、患者試料からのAML芽細胞(CD33+CD45+)の出現頻度。計8人の患者試料が異種移植のレシピエントにおける白血病発症ポテンシャルについて評価された。白血病発症はマウス骨髓においてヒト生着>CD33+hCD45+の0.1%で定義された。22匹のマウスの内4匹の白血病発症AML試料が検定され、一方17匹のマウスの内4匹の白血病非発症AML試料が検定された。計n=8AML試料、平均+/-標準誤差

。【図15A-C】(図15A-B)は全ての5種類のドーパミン受容体で染色された線維芽細胞由来ヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)(図15A)およびへその緒臍帯血由来hiPSC(図15B)内のSSEA3+断片のフローサイトメトリ。(図15C)はヒト血液集団のドーパミン受容体発現を示す。へその緒臍帯血単核細胞のフローサイトメトリであり、赤血球系(グリコホリンA)、巨核球(CD41a)で染色されている。

【図15D-E】(図15D)はへその緒臍帯血単核細胞のフローサイトメトリでありT-細胞(CD3)、B-細胞(CD19)で染色されている。(図15E)はへその緒臍帯血単核細胞のフローサイトメトリであり単球(CD14)、顆粒球(CD15)で染色されている。ゲートで囲まれた集団内の全ての5つのドーパミン受容体による染色はヒストグラムで示される。

【図15F-G】(図15F)血液集団内でのドーパミン受容体の局在性の要約。(図15G)はAML患者のフローサイトメトリであり、ゲートで囲まれた集団にドーパミン受容体を示す。

【図16A-B】図16はAMLにおいてチオリダジンがドーパミン受容体シグナル伝達を抑制し、シタラビンとの組み合わせ処置が癌細胞に対しシナジー効果を持つことを示す図である。(図16A)はAML-OCI2およびAML-OCI3細胞系のドーパミン受容体発現を示す。(図16B)は3種類のドーパミン受容体遮断薬で処置されたAML-OCI2およびAML-OCI3細胞の細胞数。数値はDMSOで処置された対照試料に対し正規化されている。各バーはn=3; 平均+/-標準誤差。

【図16C-D】無血清条件下でドーパミン受容体D2ファミリー刺激薬の70H-DPAT（図16C）またはドーパミン受容体D1ファミリー刺激薬のSKF38393（図16D）で処置された、同一の細胞系の生存可能細胞数（7AAD-、ヘキスト+）を示す図である。数値はDMSOで処置された対照試料に対し正規化されている。各バーはn = 3；平均 ± 標準誤差。

【図16E-F】AMLと造血幹細胞および前駆細胞（HSPC）の薬剤による単独処置と組み合わせ処置の対比を示す図である。（図16E）被験者AMLおよびHSPCのチオリダジン（Thio 10 μM）またはシタラビン（AraC）による単独薬剤処置の後、コロニー形成単位（CFU）を生成し、検数した。（図16F）同一の被験者試料に対しチオリダジンおよびシタラビンの組み合わせ処置の後、コロニー形成単位（CFU）を生成し、検数した。それぞれの濃度に対しHSPC：AML CFUの正規化比率が計算され、該当する棒グラフペアの上に表示されている。AraC処置に対する有効半減濃度（EC_{AraC}）はチオリダジンとの組み合わせにより（EC_{AraC + Thio}）100 nMから1 nMに減少した。あるいは、チオリダジンと組み合わせた100 nM AraCは芽細胞性CFUをほぼ完全に消滅させたが、一方でHSPC機能を維持した。HSPCの棒グラフはn = 4、2つの分化系列枯渇臍帯血（CBlin-）；AML棒グラフはn = 4、AML被験者試料、平均 ± 標準誤差、（*）p < 0.05、（**）p < 0.01、（***）p < 0.001、（****）p < 0.0001。

【図17】チオリダジンとDNA合成阻害薬との組み合わせ治療の有用性を示す図である。（図17A-B）蛍光活性化細胞の芽細胞CFU生成が被験者AML細胞をDMSO溶媒またはチオリダジン10 μM（THIO）で処置されたDR+（図17A）とDR-（図17B）の分画にソートした。（図17C）統合失調症被験者に対しチオリダジンが投与される臨床的範囲を示す図解である。抗白血病幹細胞（LSC）効果を誘導することが示されたチオリダジン濃度が被験者応答に沿ってプロットされている。（図17D）AML被験者に対しAraCが投与される臨床的範囲を示す図解である。単独処置としてのAraCの示差的用量（AraC示差的CFU）がチオリダジンと組み合わせられた場合、同じ標的応答を得るためにAraC濃度（AraC + チオリダジン10 μM示差的CFU）の100倍の減少に沿ってプロットされている。ヒト血漿レベルは公開データから適応された（Regenthaら、1999）。

【図18A】図18はチオリダジン様薬剤を同定するための拡張スクリーンの図である。（図18A）は2446個の化合物からなる拡張スクリーンのGFP平均輝度と細胞数のXY散布図である。輪郭を付けられた領域は、減少した平均GFP輝度で定義される多能性の喪失（LOP）と細胞数の点を示す。チオリダジンのデータポイントは他の選択された点と共に輪郭を付けられている。それぞれの点はn = 3の平均値。

【図18B-E】（図18B）他のフェノチアジン化合物；フルフェナジンおよびプロクロルペラジンの化学構造式を示す。（図18C）は選択された的中化合物の10 μM濃度で処置したv1H9-Oct4-GFP細胞のGFP、ヘキストおよびそれらを合体させた代表的顕微鏡画像である。（図18D）はこれら画像のGFP輝度のヒストグラムである。（図18E）は候補化合物で処置されたv1H9-Oct4-GFPの投与量反応曲線と50%有効濃度（EC₅₀）の計算値である。各点はn = 3、平均 ± 標準誤差。

【図18F】v1H9-Oct4-GFPの蛍光顕微鏡図である。BMP4で処置され、または処置されず、そしてヘキストで染色されたv1H9-Oct4-GFP細胞のGFP、ヘキストおよびそれらの合体蛍光図。対応するGFPログ輝度ヒストグラムも示される。

【図19】単一処置としての種々の濃度のシタラビン（AraC）で処置され（単一薬剤：AraC）、またはチオリダジン10 μM濃度と組み合わせで処置され（組み合わせ：AraC + チオリダジン10 μM）、DMSO対照（Y軸の100に交差する実線で示され、破線は対照の標準偏差を示す）に対して正規化された、OCI-AML2（図19A）およびOCI-AML3（図19B）細胞系における生細胞数の用量反応曲線である。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

(I . 定 義)

ここでは「癌」は、隣接組織または体の他の部位に拡大する制御されない異常な細胞増殖により引き起こされる一群の疾病の1つを言う。癌細胞は癌細胞が一塊になる固形腫瘍を形成可能であり、または白血病のように分散した細胞として存在する。

【 0 0 2 0 】

「癌細胞」とは、制御されない異常な増殖と他の組織に侵入する能力を特徴とする細胞、あるいはそのような細胞から由来する細胞を言う。癌細胞は例えば、癌患者から獲得された原発性癌細胞、またはそのような細胞から由来する細胞系を含む。同様に「血液系癌細胞」とは、血液細胞または骨髄細胞由来の癌細胞をいう。癌細胞の事例としては、限定されないが、癌幹細胞、乳癌細胞、直腸癌細胞、結腸癌細胞、前立腺癌細胞、および骨髄腫、白血病細胞またはリンパ腫細胞などの血液系癌細胞を含む。

10

【 0 0 2 1 】

「癌幹細胞」とは、自己再生能力および、腫瘍または血液系腫瘍からなる癌細胞の分化系列に分化する能力のある細胞を言う。癌幹細胞はその疾病を独自に開始しそして維持することができる。

【 0 0 2 2 】

「前癌障害」とは癌に発展する可能性のある一群の高増殖性障害の1つであり、例えば骨髄増殖性疾病のような前癌血液障害または骨髄異形成症候群を含み、それは急性骨髄性白血病 (A M L) に関連し、および / またはそれに発展する可能性のある前悪性の症状である。

20

【 0 0 2 3 】

「前癌細胞」とは、制御されない異常な増殖を特徴とする細胞またはそのような細胞に由来する細胞を言う。「前癌細胞」には、例えば前癌障害の患者から獲得された原発性前癌細胞、またはそのような細胞または癌幹細胞由来の細胞系を含む。同様に、「血液系前癌細胞」とは、血液細胞または骨髄細胞由来の前癌細胞を言う。ある実施形態では、血液系前癌細胞は骨髄増殖性細胞である。

【 0 0 2 4 】

「白血病」とは、造血性組織、他の器官および通常血液内において、増加した数で発見される異常白血球の進行的増殖を含む任意の疾病を言う。「白血病細胞」とは、増大する細胞異常増殖を特徴とする白血球細胞を言う。白血病細胞は白血病と診断された被験者から獲得されてもよい。

30

【 0 0 2 5 】

「急性骨髄性白血病 (A M L) 」とは、血液細胞の骨髄系の癌を言い、骨髄に蓄積しそして正常な血液細胞の生成を妨害する異常白血球の速い成長を特徴とする。骨髄異形成性または骨髄増殖性症候群のような前白血病症状もまた A M L に進展する可能性が有る。

【 0 0 2 6 】

「単球性白血病」とは、C D 1 4 を発現することを特徴とする白血病のサブタイプを言い、そして急性骨髄性白血病のサブタイプである急性単球性白血病を含む。ある実施形態では、被験者は、骨髄に20%超の芽細胞を持ち、かつその内80%超が単球系である場合、急性単球性白血病であると識別される。

40

【 0 0 2 7 】

「ドーパミン受容体遮断薬」とは、1つ以上のドーパミン受容体の機能または活性において任意の検知可能なまたは測定可能な減少を生成する化合物を言う。たとえば、ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬は1つまたはそれ以上のドーパミン受容体に選択的な抗体である。ある実施形態では、ドーパミン受容体 (D R) は D R 1 , D R 2 , D R 3 , D R 4 および D R 5 から選択される。ドーパミン受容体遮断薬は1つのドーパミン受容体に選択的または多重のドーパミン受容体に選択的 (即ち「多重受容体遮断薬」) であってよい。多重受容体遮断薬の事例には、チオリダジンおよびクロルプロマジンを含む。ドーパミン受容体は一般的に D 1 ファミリードーパミン受容体 (D R 1 および D R 5) と D

50

2 ファミリードーパミン受容体 (DR2、DR3 および DR4) にグループ分けされる。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬は表 1 に記載される化合物から選択される 1 つの化合物である。

【0028】

【表 1】

表 1: 本明細書での使用に適したドーパミン遮断薬

ドーパミン受容体遮断薬	作用のメカニズム
マレイン酸 アセトブロマジン	ドーパミン系遮断薬
アミスルプリド	D2 及び D3 受容体遮断薬
アモキサピン	ドーパミン再取込阻害薬
アザペロン	ドーパミン受容体遮断薬
ベンペリドール	ドーパミン遮断薬
ベンゾ [a]フェナントリジン -10,11-ジオール, 5,6,6a,7,8,12b-ヘキサヒドロ, トランス - [CAS]	D1 リガンド
プロモプリド	ドーパミン遮断薬
プロムペリドール	ドーパミン遮断薬
塩酸 クロルブロマジン	D2 遮断薬, 選択性 D1, D3, D4 & D5
塩酸 クロルプロチキセン	D2 ドーパミン受容体遮断薬
塩酸 クロミブラミン	クロルブロマジン誘導体
ジスルフィラム	ドーパミン β ヒドロキシラーゼ阻害薬
DO 897/99	D3 遮断薬
ドンペリドン	ドーパミン遮断薬
ドロペリドール	D2 (ドーパミン受容体) 遮断薬
塩酸 エトプロバジン	チオリダジン誘導体
フルペルラピン	D2 (ドーパミン受容体) 遮断薬

10

20

ドーパミン受容体遮断薬	作用のメカニズム
二塩酸フルフェナジン	ドーパミン遮断薬 D1&D2 遮断薬
二塩酸 GBR 12909	ドーパミン再取込阻害薬
ハロペリドール	ドーパミン遮断薬 D2, 非選択性遮断薬
塩酸ヒドラスチニン	ドーパミン受容体遮断薬
インダトラリン	強力なドーパミン遮断薬
イトブリド	ドーパミン D2 受容体および ACE 阻害
レボスルピリド	D2, D3, & D4 遮断薬
コハク酸ロクサピン	ドーパミン遮断薬 / D2, D4
メソリダジン	D2 遮断薬
ベシル酸 メソリダジン	D 遮断薬
マレイン酸 メトリメプラジン	チオリダジン誘導体
塩酸メチキセン	チオリダジン誘導体
塩酸モリンドン	ドーパミン受容体遮断薬
ナファドトリド	D3 遮断薬
マレイン酸 ノミフェンシン	ドーパミン取込阻害薬
オランザピン	D1&D2 遮断薬
塩酸ベロスピロン	D2&D4 遮断薬
ベルフェナジン	D1 & D2 遮断薬
フェノチアジン	チオリダジン誘導体
ピモジド	ドーパミン遮断薬
ピペラセタジン	チオリダジン誘導体
プロクロルペラジン	チオリダジン誘導体
ニマレイン酸 プロクロルペラジン	ドーパミン遮断薬
塩酸プロマジン	ドーパミン受容体遮断薬
塩酸プロメタジン	チオリダジン誘導体
クエチアピン	ドーパミン及びセロトニン受容体遮断薬
ヘミマル酸クエチアピン	D2 遮断薬
塩酸 R(+)-SCH-23390	D1 遮断薬
ラクロブリド	D2 遮断薬
塩酸レモキシブリド	ドーパミン系遮断薬
リスペリドン	D1 & D2 遮断薬
塩酸 S(-) エチクロブリド	ドーパミン受容体遮断薬
セルチンドール	ドーパミン D2 / セロトニン 5-HT2 受容体遮断薬
SKF 83566	D1 遮断薬
スピペロン	D2 遮断薬
スルピリド	D2 遮断薬
スルピリド	D2 & D3 遮断薬
マレイン酸チエチルペラジン	チオリダジン誘導体
ニメシル酸 チオプロペラジン	D1 & D2 遮断薬
塩酸チオリダジン	チオリダジン誘導体
二塩酸トリフルオペラジン	D2 遮断薬
塩酸トリフルプロマジン	D1 & D2 遮断薬

10

20

30

40

ドーパミン受容体遮断薬	作用のメカニズム
酒石酸トリメプラジン	チオリダジン誘導体
塩酸トリメトベンズアミド	D2 遮断薬
塩酸ジプラシドン	ドーパミン D2/ セロトニン 5-HT2 遮断薬
ゾテピン	ドーパミン D2/ セロトニン 5-HT2 遮断薬

【 0 0 2 9 】

「フェノチアジン」または「フェノチアジン誘導体」とは、フェノチアジン分子または骨格に由来し、または含む化合物を言う。フェノチアジンの一般式は $S(C_6N_4)_2N$

50

Hであり、フェノチアジン誘導体はフェノチアジンに対し1つ以上の置換または追加を有する。例えば、幾つかのフェノチアジン誘導体は3環構造を持ち、そこでは2つのベンゼン環が窒素および硫黄により連結されている。フェノチアジン誘導体の事例には、限定されないが、チオリダジン、クロルプロマジン、レボメプロマジン、メソリダジン、フルフェナジン、ペルフェナジン、プロクロルペラジン、およびトリフルオペラジンを含む。本発明の方法で使用されるフェノチアジン誘導体の追加の事例は、表1に示される。ある実施形態では、チオリダジンはIUPAC名10-{2-[(RS)-1-メチルピペリジン-2-イル]エチル}-2-メチルサルファニルフェノチアジンを持つ。

選択肢として、チオリダジンのような1種類以上のフェノチアジン誘導体のラセミ体がここに記載される方法で使用される。

10

【0030】

「化学療法剤」とは、癌の処置に有用な化学物質を言う。化学療法剤の事例には、細胞分裂および/またはDNA合成を阻害する抗増殖薬剤または抗腫瘍薬剤を含む。本明細書に記載される方法および組成物での使用に適合する化学療法剤のさらなる事例には、スティーブングラント (Steven Grant) 著「AMLおよびMDS用の新薬」Best Practice & Research Clinical Haematology 22 (2009) 501-507に記載の化学療法剤を含む。本明細書に記載される方法および組成物での使用に適合する化学療法剤のまたさらなる事例には、<http://www.cancer.org/Treatment/TreatmentsandSideEffects/TreatmentTypes/Chemotherapy/ChemotherapyPrinciplesAnInDepthDiscussionoftheTechniquesanditsRoleinTreatment/chemotherapyprinciples-types-of-chemo-drugs>に記載される化学療法剤を含む。本明細書に記載される方法および組成物での使用に適合する化学療法剤の他の事例には、ミトキサントロン (DNAトポイソメラーゼ阻害薬) およびダウノルビシン (DNA干渉物質) などのAML処置に適した薬剤を含む。ある実施形態では、化学療法剤はシタラビンである。

20

【0031】

「DNA合成阻害薬」とは、癌細胞によるDNAの合成を阻害または防止する化学療法剤を言う。DNA合成阻害薬の事例には、限定されないが、シタラビン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、5-フルオロウラシル、カペシタビン、フロクスウリジン、ゲムシタビン、デシタビン、ビダーザ、フルダラビン、ネララビン、クラドリビン、クロファラビン、ペントスタチン、チアラビン、トロキサシタビン、サバシタビン (sapacitabine) またはフォロデシン、およびWilliam B Parker 著「癌治療に使用されるプリンおよびピリミジン抗代謝薬の酵素学」Chem Rev. 2009 July; 109 (7): 2880-2893に記載されるプリンおよびピリミジン抗代謝薬を含む。ある実施形態では、DNA合成阻害薬はシタラビンまたは本明細書に記載される他のデオキシシチジン類似体である。ある実施形態では、DNA合成阻害薬はフルダラビン、ネララビン、クラドリビンまたはクロファラビンのようなDNA伸長ターミネータであり、そしてシタラビンと同様に機能する。

30

40

【0032】

「シタラビン」とは、シトシン塩基とアラビノース糖からなる化合物で、生体内 (in vivo) でアラビノフラノシルシトシン三リン酸に変換されるものを言う。シタラビンはまたシトシンアラビノシドまたはAra-C (アラビノフラノシルシトシン) とも呼ばれる。

【0033】

「微小管阻害薬」とは有糸分裂の間の微小管の正常な機能またはプロセスに干渉する化学療法剤を言う。微小管阻害薬の事例には、限定されないが、バクリタキセルまたはドセタキセルのようなタキサン、およびビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、およびビノレルビンのようなビンカアルカロイドを含む。

50

【 0 0 3 4 】

「癌細胞の増殖を減少させる」とは、細胞成長または細胞分裂の結果として癌細胞から発生する細胞数の減少を意味し、細胞死または癌幹細胞の分化を含む。「細胞死」とは、ネクローシスおよびアポトーシスを含む全ての形態の細胞死を含む。「癌幹細胞の分化」とは、それにより癌幹細胞が自己再生の能力を失い、腫瘍または血液系腫瘍を含む癌細胞の系列分化を引き起こすプロセスを言う。

【 0 0 3 5 】

「効果的な数量」または「治療的に効果的な数量」とは、投与において、そして所望の結果を得るために必要な期間において効果的な数量を言う。例えば、AMLのような癌のコンテキストまたは治療において効果的な数量とは、たとえば寛解を誘発し、腫瘍量を減少させ、および/またはその化合物の投与無く得られた応答に比べて腫瘍の拡散または白血病細胞の成長を防止する数量をいう。効果的な数量は病期、動物の年齢、性別、および体重のような因子により変化する。このような数値に対応する所定の化合物の数量は所定の薬剤または化合物、製剤処方、投与経路、疾病または障害のタイプ、治療される被験者またはホストの独自性、など多くの因子により変化するが、それでも当業者により日常的に決定可能である。例えば図 17 C および図 17 D はチオリダジンおよび Ara C それぞれに対する代表的な用量と被験者反応を示す。

10

【 0 0 3 6 】

「血漿濃度」とは、ある特定の化合物の総血漿濃度を言う。例えば、ある実施形態において、チオリダジンの 1 つの血漿濃度約 $10 \mu\text{M}$ は結合型および非結合型を含むチオリダジンの総血漿濃度約 $10 \mu\text{M}$ を言う。

20

【 0 0 3 7 】

「医薬的に許容可能」とは、動物、特にヒトの治療に適合するという意味である。

【 0 0 3 8 】

「被験者」とは、哺乳類を含む動物界の全ての構成要員を含み、好適にはヒトを示す。選択肢として、「被験者」は癌であると診断され、または寛解にある哺乳類を含む。

【 0 0 3 9 】

「処置する」または「処置」とは、当業者に周知のとおり、臨床転帰を含む有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチを意味する。有益なまたは所望の結果には、限定されないが、検知可能であれ不可能であれ、1 つ以上の徴候または症状の軽減または回復、疾病の程度の減弱、安定した（即ち、悪化しない）病状（例えば患者を寛解に保つ）、疾病の拡散の防止、疾病の進行の遅延または進行速度の低下、病状の回復または緩和、疾病の再発の減弱、そして寛解（部分寛解または完全寛解）を含んでよい。「処置する」または「処置」は処置を受けなかった場合の期待生存に対し延長された生存を意味してもよい。「処置する」または「処置」とは、また、予防的処置を含む。ある実施形態では、処置用法は、ここに記載されるような被験者に処置的に有効な量のドーパミン受容体遮断薬を投与するステップと、そして選択肢として、単一の投与、あるいは連続的な投与のステップを含む。

30

【 0 0 4 0 】

「シナジー」または「シナジー的」とは、DR 遮断薬と化学療法剤の組み合わせ効果が DR 遮断薬または化学療法剤の個別の効果と比較して大きいことを意味する。この文脈における用語「効果」は限定されないが、癌細胞の増殖、腫瘍細胞生存、細胞の生存率または増殖を減少させることを含む。例えば、実施例 13 と図 16 および実施例 15 と図 19 に示されるように、白血病細胞に対するチオリダジンおよびシタラビンの組み合わせ処置はシタラビンだけで処理するよりも白血病細胞の数を大きく減少させる結果をもたらす。

40

II 方法および使用方法

【 0 0 4 1 】

別の化学療法剤と組み合わせたドーパミン受容体（DR）遮断薬は、癌細胞の増殖を減少させおよび/または癌細胞の細胞死を誘導するのに驚くほど効果的であることが見出され

50

た。実施例 13 に示されているように、DR 遮断薬チオリダジンと DNA 合成阻害剤のシタラビンとの組合せは、造血多能性幹細胞 (HSPC) の機能を保持しながら、AML-芽球 FCU を減少させるのに必要なシタラビンの有効濃度の有意な減少をもたらした。さらに、実施例 15 と図 19 に示すように、シタラビンと組み合わせたチオリダジンの使用は、AML 患者由来の細胞系からの白血病細胞の生存率を有意に低下させた。

【0042】

従って、ある実施形態では、それを必要とする被験者にドーパミン受容体 (DR) 遮断薬および化学療法剤を投与するステップを有する、被験者の癌または前癌障害を処置する方法が提供される。また、癌または前癌障害を処置するためのドーパミン受容体 (DR) 遮断薬および化学療法剤の使用法、および癌または前癌障害を処置するためのドーパミン受容体 (DR) 遮断薬および化学療法剤の組み合わせが提供される。ある実施形態では、化学療法剤はシタラビンのような DNA 合成阻害薬である。ある実施形態では、ここに記載される方法または使用法は骨髓増殖性疾患などの前癌障害を処置するのに有用である。ある実施形態では、癌は AML、または単球性白血病などの白血病である。ここに記載される方法または使用法は特にドーパミン受容体を発現する癌細胞に有用である。ある実施形態では、ここに記載される方法または使用法は単球マーカー CD14 を発現する癌細胞の処置に有用である。ある実施形態では、ドーパミン受容体 (DR) 遮断薬は造血性幹細胞または正常幹細胞に比べて、優先的に被験者の癌幹細胞の分化を誘発する。ある実施形態では、癌幹細胞は白血病癌幹細胞である。ある実施形態では、被験者は AML を罹患し、癌幹細胞は AML 癌幹細胞である。

10

20

【0043】

ある実施形態では、DR 遮断薬および化学療法剤の治療上有効な用量が使用され、使用のために処方され、および / または被験者に投与される。ある実施形態では、DR 遮断薬および化学療法剤が使用され、使用のために処方されおよび / または被験者に同時に投与され、選択肢として DR 遮断薬および化学療法剤を含む 1 つの組成物として同時に投与され、または 2 つの別々の用量として投与される。例えば、ある実施形態では、DR 遮断薬と化学療法剤はリンカーと共にまたはリンカーなしに、接合される。ある実施形態では、DR 遮断薬および化学療法剤が使用され、使用のために処方され、および / または異なる時点で被験者に投与される。例えば、ある実施形態では、DR 遮断薬は化学療法剤の前または後に使用、または投与される。ある実施形態では、DR 遮断薬は、1 分、2 分、5 分、10 分、30 分、45 分、1 時間、1.5 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、8 時間、10 時間、12 時間、16 時間、または 24 時間で区切られた時間だけ化学療法剤の前または後に使用または投与される。選択肢として、いくつかの実施形態では DR 遮断薬および化学療法剤は、使用され、使用のために処方され、および / または 24 時間、36 時間、48 時間、3 日、4 日、5 日、6 日、または一週間以上の間隔を開けて被験者に投与される。

30

【0044】

ある実施形態では、ドーパミン受容体 (DR) 遮断薬は DR1, DR2, DR3, DR4 および DR5 などの 1 種類以上のドーパミン受容体 (DR) に対する遮断薬である。選択肢としてドーパミン受容体 (DR) 遮断薬は多重受容体遮断薬であり、または単一のドーパミン受容体 (DR) サブタイプに特異である。ある実施形態では、ドーパミン受容体 (DR) 遮断薬はチオリダジン、クロルプロマジン、フルフェナジンまたはプロクロルペラジンなどのフェノチアジン誘導体である。ある実施形態では、ドーパミン受容体 (DR) 遮断薬は表 1 に記載される化合物から選択される。ある実施形態では、ドーパミン受容体 (DR) 遮断薬は 1 つまたはそれ以上のドーパミン受容体に選択的な抗体である。当業者は容易にここに記載されるような癌の処置に有用な、追加のドーパミン受容体 (DR) 遮断薬を識別できるであろう。

40

【0045】

ある実施形態では、ここに記載される方法、組み合わせ、組成物または使用法は、チオリダジン、クロルプロマジン、フルフェナジンまたはプロクロルペラジンなどのフェノチ

50

アジン誘導体を含む。当業者は容易にここに記載されるような癌の処置に有用な、ドーパミン受容体（DR）遮断薬である追加のフェノチアジン誘導体を識別できるであろう。ある実施形態では、フェノチアジン誘導体は、正常幹細胞または造血性幹細胞に比べて白血病細胞のような癌細胞に対し差別的に毒性を有する。

【0046】

ある実施形態では、本明細書に記載の方法、組み合わせ、組成物または使用法は、DNA合成阻害剤としての化学療法剤を含む。例えば、ある実施形態では、DNA合成阻害剤はシタラビンである。ある実施形態では、DNA合成阻害剤は、シタラビンと類似の構造または機能を有している。例えば、ある実施形態ではDNA合成阻害剤は、ゲムシタビン、デシタビン、ピダーザ、トロキサシタビン、チアラビンまたはサバシタビン（sapacitabine）などのデオキシシチジン類似体である。ある実施形態では、DNA合成阻害剤は、シタラビン、6-チオグアニン、フルダラビン、クラドリビンまたはクロファラビンのようなAMLの治療に有用であることが公知の化合物である。ある実施形態では、DNA合成阻害剤は、シタラビン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、5-フルオロウラシル、カペシタビン、フロクスウリジン、ゲムシタビン、デシタビン、ピダーザ、フルダラビン、ネララビン、クラドリビン、クロファラビン、ペントスタチン、チアラビン、トロキサシタビン、サバシタビン（sapacitabine）およびフォロデシンから選択される。ある実施形態では、化学療法剤は、ミトキサントロン（DNAトポイソメラーゼ阻害剤）またはダウノルビシン（DNA干渉物質）のようなAML治療に適した薬剤である。

10

20

【0047】

ある実施形態では、ドーパミン受容体（DR）遮断薬および/または化学療法剤は、使用のために処方され、および/またはそれを必要とする被験者への投与のため、既存技術において既知のように調製される。適合する調剤の選択と調製のための従来技術の手順および原材料は、例えば、Remington's Pharmaceutical Science（2003年、20版）および1999年発行のThe United States Pharmacopeia: The National Formulary（USP 24 NF19）に記載されている。

【0048】

ある実施形態では、本明細書に記載される方法、組み合わせ、組成物、および使用法は、使用、使用のための処方および/または必要とする被験者への投与に適したDR遮断薬および化学療法薬の特定のレベルを提供する。例えば、ある実施形態では、DR遮断薬および化学療法剤の組み合わせは、使用され、使用のために処方され、および/または被験者に投与されるべき化学療法剤の用量が、化学療法剤が単独で使用され、使用のために処方され、および/または被験者に投与される場合に、有益なまたは所望の結果を達成するために必要とされる化学療法剤の用量と比べて、少ない用量を可能にする（例えば図17D参照）。ある実施形態では、化学療法剤はシタラビンであり、そして使用され、使用のために処方され、および/または被験者に投与されるシタラビンの用量は結果的に0.1 nMと100 nMの間のシタラビンの血漿濃度となり、選択肢として1 nMと100 nMの間である。ある実施形態では、使用され、使用のために処方され、および/または被験者に投与されるシタラビンの用量は結果的に5 nM未満、0.1 nMと5 nMの間、または0.5 nMと2.5 nMの間の血漿濃度となる。ある実施形態では、使用され、使用のために処方され、および/または被験者に投与されるシタラビンの用量は結果的に0.0001 μと2 μの間、または選択肢として0.0001 μと2 μの間の血漿濃度となる。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬は、チオリダジンであり、そして使用され、使用のために処方され、および/または被験者に投与されるチオリダジンの用量は結果的に0.1 μと20 μの間の血漿濃度となる。ある実施形態では、使用され、使用のために処方され、および/または被験者に投与されるチオリダジンの用量は結果的に5 μと15 μの間の血漿濃度となる。ある実施形態では、使用され、使用のために処方され、および/または被験者に投与されるチオリダジンの用量は結果的に約10 μ

30

40

50

の血漿濃度となる。ある実施形態では、シタラピンが使用され、使用のために処方され、および／または被験者に投与され、被験者におけるシタラピンの血漿濃度は、1 nMおよび100 nMの間であり、そしてチオリダジンが使用され、使用のために処方され、および／または被験者に投与され、被験者におけるチオリダジンの血漿濃度は、5 μ と15 μ の間であり、そして選択肢として約10 μ である。

【0049】

ある実施形態では、その細胞にドーパミン受容体(DR)遮断薬および化学療法剤を接触させるステップを有する、癌細胞の増殖を減少させる方法もまた提供される。同様の実施形態では、癌細胞の増殖を減少させるためのドーパミン受容体(DR)遮断薬および化学療法剤の使用法が提供される。ある実施形態では、細胞をドーパミン受容体(DR)遮断薬と化学療法剤に接触させるステップを有する、癌細胞の細胞死を誘導する方法が提供される。同様の実施形態では、癌細胞の細胞死を誘導させるためのドーパミン受容体(DR)遮断薬および化学療法剤の使用法が提供される。ある実施形態では、化学療法剤はシタラピンのようなDNA合成阻害薬である。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬は1つまたはそれ以上のドーパミン受容体に選択的な抗体である。ある実施形態では、ドーパミン受容体(DR)遮断薬はチオリダジンのようなフェノチアジン誘導体である。ある実施形態では、ドーパミン受容体(DR)遮断薬は癌幹細胞の分化または細胞死を誘発する。ある実施形態では、ドーパミン受容体(DR)遮断薬は癌細胞の細胞死を誘発する。選択肢として癌細胞は生体内(in vivo)または生体外(in vitro)である。癌細胞は骨髓異形成性細胞または骨髓増殖性細胞などの前癌細胞であってもよい。ある実施形態では、癌細胞はAML患者からの細胞などの白血病細胞である。ある実施形態では、ドーパミン受容体(DR)遮断薬はチオリダジン、クロルプロマジン、フルフェナジン、またはプロクロルペラジンなどのフェノチアジン誘導体である。ある実施形態では、ドーパミン受容体(DR)遮断薬は表1に記載される化合物から選択される。ある実施形態では、化学療法剤はパクリタキセルまたはドセタキセルのような微小管阻害薬である。選択肢として化学療法剤とドーパミン受容体(DR)遮断薬はリンカーでまたはリンカー無しで接合されている。

【0050】

本開示の一側面では、1つまたはそれ以上の白血病細胞のような1つまたはそれ以上の癌細胞の増殖を低減するための方法が提供される。ある実施形態では、本方法は、1つまたはそれ以上の細胞をチオリダジンおよびシタラピンに接触させるステップを含む。ある実施形態では、白血病細胞は急性骨髄性白血病(AML)細胞である。選択肢として、白血病細胞は、白血病癌幹細胞である。ある実施形態では、細胞は、生体内(in vivo)又は試験管内(in vitro)である。ある実施形態では、細胞は、約0.1から100 nMまで、選択肢として約1 nMから100 nMまでの濃度のシタラピンと接触される。ある実施形態では、細胞は5 nM未満、0.1 nMおよび5 nMの間もしくは0.5 nMと2.5 nMの間、の濃度のシタラピンと接触される。ある実施形態では、細胞は0.0001 μ と2 μ の間で、または選択肢として0.001 μ と2 μ の間の濃度のシタラピンと接触される。ある実施形態では、細胞は0.1 μ と20 μ の間の濃度でチオリダジンと接触される。ある実施形態では、細胞は5 μ と15 μ の間の濃度でチオリダジンと接触される。ある実施形態では、細胞は約10 μ の濃度でチオリダジンと接触される。ある実施形態では、細胞は1 nMおよび100 nMの濃度のシタラピンと接触され、そして細胞は5 μ と15 μ の間、選択肢として約10 μ Mの濃度のチオリダジンと接触される。

【0051】

本発明の一側面では、DR遮断薬および化学療法剤を含む組成物が提供される。選択肢として、DRの遮断薬および化学療法剤は、接合されないか、または、リンカーでまたはリンカー無しのいずれかで接合されてもよい。ある実施形態では、化学療法剤は、DNA合成阻害剤、または微小管阻害剤である。ある実施形態では、DNA合成阻害剤は、シタラピンまたは本明細書に記載のような別のデオキシシチジン類似体である。ある実施形態

では、DNA合成阻害剤は、フルダラビン、ネララビン、クラドリビン、またはクロファラビンのようなDNA伸長ターミネータであり、シタラビンに対して類似の機能を果たす。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬は、D₂ファミリードーパミン受容体遮断薬である。ある実施形態では、組成物は表1から選択されるドーパミン受容体遮断薬である。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬は、チオリダジンのようなフェノチアジン誘導体である。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬は、1つまたはそれ以上のドーパミン受容体に対して選択的な抗体である。選択肢として、本明細書に記載の組成物は、Remington's Pharmaceutical Science (2003年、20版)および1999年発行のThe United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF 19)に記載の担体のような、医薬的に許容可能な担体を含む。ある実施形態では、チオリダジン、シタラビンおよび医薬的に許容可能な担体を含む組成物が提供される。

10

20

30

40

50

【0052】

ある実施形態では、化学療法剤とDR遮断薬は、化学療法剤の一部である1つの原子とDR拮抗薬の一部である1つの原子間の共有結合を介してなどのように、直接接合されている。あるいは、化学療法剤およびDR遮断薬は、リンカーを介して接合される。ある実施形態では、化学療法剤およびDR遮断薬は、リンカーを介して接合される。本明細書で用いる場合、用語「リンカー」は、1つまたはそれ以上の原子の部分であって化学療法剤とDR遮断薬を結合またはカップリングさせる機能を果たすものを言う。リンカーの例としては、限定されないが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコールおよび/またはポリビニルピロリドンなどのポリマーを含む。

【0053】

別の側面では、本明細書に記載されるDR遮断薬および化学療法剤を含むキットが提供される。ある実施形態では、キットは癌の処置に使用するためのものである。ある実施形態では、キットは急性骨髄性白血病の処置に使用するためのものである。

【0054】

ある実施形態では、ここに記載されるキットは、癌の処置のためのような臨床現場での使用に適した便利な形態でパッケージされたDR遮断薬および化学療法剤を提供する。ある実施形態では、DR遮断薬および化学療法剤は、選択肢として薬学的に許容される担体で別個の容器内にある。別の実施形態では、DR遮断薬および化学療法剤は、選択肢として薬学的に許容される担体で、単一の容器内にある。いくつかの実施形態では、キットは、癌の治療における使用説明書のような、DR遮断薬および化学療法剤の使用指示書を含む。ある実施形態では、化学療法剤は、シタラビンのようなDNA合成阻害剤である。ある実施形態では、化学療法剤は、タキサンのような微小管阻害剤である。ある実施形態では、DR遮断薬は、チオリダジンのようなフェノチアジン誘導体、または表1から選択されるDR遮断薬である。本明細書に記載されるキットのある実施形態では、DR遮断薬はチオリダジンであり、化学療法剤はシタラビンである。あるいはキットは1つの化学療法剤の複数の用量及び1つのドーパミン受容体遮断薬の複数の用量を含む。ある実施形態ではキットは、化学療法剤およびドーパミン受容体遮断薬からなる組成物の複数の用量を含む。

【0055】

本発明のさらなる側面は、癌または前癌障害の処置に対するドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤の使用法、または癌または前癌障害の処置に対するドーパミン受容体遮断薬および化学療法剤からなる組成物の使用法を含む。ある実施形態では、癌は白血病である。ある実施形態では、白血病は急性骨髄性白血病または単球性白血病である。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬はチオリダジン、クロルプロマジン、フルフェナジン、またはプロクロルペラジンなどのフェノチアジン誘導体である。ある実施形態では、ドーパミン受容体遮断薬は表1にリストアップされる化合物から選択される。ある実施形態では、ドーパミン受容体(DR)遮断薬は1つまたはそれ以上のドーパミン受容体を選択的な抗体である。ある実施形態では、化学療法剤はシタラビンのようなDNA合成阻害剤

、またはパクリタキセルまたはドセタキセルのような微小管阻害薬である。

【0056】

以下の、非限定的事例は本発明の開示を示す。

【0057】

(事例)

(事例1：チオリダジンは白血病細胞系に対し細胞毒性を有する)

正規化された細胞数に対するチオリダジンの効果が3つの白血病細胞系：HL-60、MV4-11及びOCI-AML3で評価された。3つの細胞系は全て白血病細胞系である。HL-60は前骨髄球性AML由来であり、一方MV4-11及びOCI-AML3はAMLの代表である。それぞれの化合物は細胞と共に72時間インキュベートされる。対照はジメチルスルホキシド(DMSO)(即ち化合物に使用される溶媒)に72時間。それぞれの条件は3度繰り返された。

10

【0058】

図1に示すように、0.1μMと1μMのチオリダジン投与は正規化細胞数にほとんど影響を与えなかったが、一方10μMでは正規化細胞数は殆どゼロに減少した。

【0059】

(事例2：AMLの芽細胞形成ポテンシャルと正常幹細胞のコロニー形成ポテンシャルに対するチオリダジンの異なる活性)

AML細胞系における芽細胞形成に対するチオリダジンの効果が正常ヒト幹細胞におけるコロニー形成に対するチオリダジンの効果と比較された。

20

【0060】

正常ヒト幹細胞(HSC)および前駆細胞は健常な患者の前駆細胞が増大させられた末梢血またはヘソの緒臍帯血のいずれかに由来した。原発性AML細胞はAMLと診断された患者から採取された。正常HSCおよび原発性AML細胞は共に標準生体外(in vitro)メトセルロース検定条件(<http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/MethoCult-H4434-Classical.aspx>およびClinton Campbell他「ヒト幹細胞序列は自己再生ポテンシャルに関するMcl-1hへの機能的依存性により定義される」Blood 116(9)1433-1442(2010年6月4日)参照、これらはここに参照され採り入れられる)のもとで少なくとも14日間培養され、その後コロニーの数が記録された。図2に示すように、10μMチオリダジンは正常HSCとAML細胞とは異なる効果を見せた。10μMチオリダジンは正常HSCのコロニー形成ポテンシャルを約100(対照、DMSO処置)から総コロニー数66まで減少させた。(図2A)。しかしAML細胞に対してはCFUコロニーの数を約22芽細胞コロニーから1.6芽細胞コロニーに大幅に減少させた(図2B)。

30

【0061】

図3はチオリダジンで処置された正常ヒト幹細胞(HSC)とAMLから形成されたCFUコロニーの細胞ペレットを示す。10μMの投与量では、ペレット化した細胞はHSCでは視認できるが、AML細胞では見えない。したがってチオリダジンはAML細胞の芽細胞CFUポテンシャルを選択的に標的とする。

40

【0062】

(事例3：クロルプロマジンはAML細胞系に対して毒性を有する)

ドーパミン受容体遮断薬でありそしてフェノチアジン関連化合物であるクロルプロマジンもAML細胞系HL-60, MV4-11およびOCI-AML3に対する効果について調査された。試験は事例1に示されるように実施された。図4に示すように、10μMクロルプロマジンはAML細胞系に対して毒性を有する。

【0063】

(事例4：正常血液vs白血病におけるドーパミン受容体の発現)

ドーパミン受容体DR1, DR2, DR3, DR4およびDR5の発現が、AML細胞系(HL-60, MV4-11, AML-OCI2およびAML-OCI3)、AML患

50

者から単離された原発性 A M L 細胞 (A M L 2 2 1 0 1、A M L 2 9 4 2 8、A M L 2 2 1 7 4、A M L 2 9 5 6 0)、正常血液単核細胞 (M N C) (M P B 2 1 4 7 1 および M P B 2 8 1 3 7 ; 健常患者血液) および S t e m S e p (登録商標) ヒト造血性前駆体細胞エンリッチメントキット (<http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/StemSep-Human-Hematopoietic-Progenitor-Cell-Enrichment-Kit.aspx>) を使用し、H S C / ヒト前駆体細胞のエンリッチメントレベルがフローサイトメトリで確認された、正常ヒト幹細胞または前駆体を豊富に含んだへその緒臍帯血原発性細胞 (C B 1 0 7、C B 1 0 8 および C B 1 0 9) に対して分析された。アイソタイプ発現が背景として計測された。アイソタイプピークの右側のピークはドーパミン受容体 (D R) マーカーのポジティブ発現を意味する。

10

【 0 0 6 4 】

図 5 に示されるように、ドーパミン受容体は原発性 A M L、A M L 細胞系および正常単核血液細胞 (M N C) において発現するが、正常ヒト幹細胞 (H S C) (系統枯渇へその緒臍帯血 (C B l i n -)) を豊富に含んだ血液では発現しない。データは試料がドーパミン受容体 (D R) 発現にポジティブな場合、全ての 5 つの D R サブタイプが通常存在することを示す。

【 0 0 6 5 】

全ての原発性 A M L がドーパミン受容体を発現するとは限らなかった。従って、ドーパミン受容体遮断薬による A M L 処置に適した被験者を識別するため、被験者はドーパミン受容体発現について事前にスクリーニングされてよい。選択肢として、被験者の事前スクリーニングは全ての 5 つの D R サブタイプ、または特定のサブタイプ、またはサブタイプの組合せに及んでもよい。

20

【 0 0 6 6 】

(事例 5 : 多重 D R 遮断薬は A M L 細胞系に対し細胞毒性を有する)

一連のドーパミン受容体刺激薬、D₃ 遮断薬、D R₁ & D R₅ 遮断薬および多重受容体遮断薬が 3 つの A M L 細胞系 H L - 6 0、O C I - A M L 2、O C I - A M L 3 に対する細胞毒性に関して試験された。試験は事例 1 の設定に従って実行された。

【 0 0 6 7 】

図 6 に示すように、高い濃度のクロザピン (C L O Z)、およびクロルプロマジン塩酸塩 (C H L)、チオリダジン (T H I O) は A M L 細胞系に対し有意の細胞毒性を有する。理論に制限されることなく、細胞毒性効果は多重ドーパミン受容体の阻害を必要とするかもしれない。多重受容体遮断薬である C L O Z、C H L、T H I O は A M L 細胞系を根絶するように作用するが、一方特異遮断薬である D₃、D R₁ & D R₅ は細胞数を 6 0 % にまで減少させるだけである。

30

【 0 0 6 8 】

(事例 6 : ドーパミン受容体は原発性 A M L の C D 1 4 + 細胞集団において発現する)

原発性 A M L 細胞においてドーパミン受容体サブタイプの発現が分析された。A M L 患者から得られた原発性 A M L 細胞は D R サブタイプおよび C D 1 4 に特異な抗体を、フローサイトメトリを使用した分析の前に含んだ。大多数の D R + 細胞は C D 1 4 ポジティブであることが判った。

40

【 0 0 6 9 】

図 7 に示すように、C D 1 4 単球マーカーの発現はそれぞれの D R サブタイプの発現と相関関係が有る。

【 0 0 7 0 】

チオリダジンの効果も原発性 A M L 内の C D 1 4 + 細胞サブ集団で試験された。原発性 A M L 細胞は対照 (D M S O 溶媒) または 1 0 μ M チオリダジンのもとで 7 2 時間培養され、そして C D 1 4 に特異な抗体により染色された。対照とチオリダジン処置試料の両方の C D 1 4 + 細胞の数はフローサイトメトリを使用して測定され、そして C D 1 4 + 細胞の出現頻度はチオリダジン処置試料の方が低く、このことはこの化合物が選択的に A M L

50

細胞の中のCD14+サブ集団を標的とすることを示唆した。

【0071】

図8に示すように、10 μ Mチオリダジンも原発性AML細胞内のCD14+細胞の正規化出現頻度を減少させ、このことはチオリダジンが選択的にCD14+細胞を標的とすることを示した。AML対照グループはCD14+細胞を一部分含んだ。この一部分はチオリダジン処置により減少し、そして対照(100%)対処置済(20%)の正規化出現頻度の減少として示されている。

【0072】

(事例7:ヒト多能性幹細胞(hPSC)の分化を誘発する薬剤の識別と特徴付け)

正常な幹細胞(SC)に影響することなく癌幹細胞(CSC)を標的にする薬剤の識別は、将来の癌治療にとって理想的であるが、しかし膨大な生物学的スクリーンを受容できるヒトの癌幹細胞(CSC)及び正常な幹細胞の両方の検定法がないため、制限されている。以下の事例で述べるように、腫瘍性vs正常ヒト多能性幹細胞(hPSC)分化プラットフォームを使用して、非毒性であり、癌幹細胞(CSC)の腫瘍性自己再生に打ち勝つための分化を誘発する、化合物が識別される。識別された抗癌幹細胞(CSC)薬剤の幾つかの候補の内、承認された抗精神病薬であるチオリダジンは、生体内(in vivo)で白血病を開始する能力のあるヒト体細胞系癌幹細胞(CSC)を選択的に標的とすることができ、一方で正常血液幹細胞(SC)の能力には影響を与えなかった。チオリダジンによるドーパミン受容体(DR)シグナリングの遮断は癌幹細胞(CSC)の選択的標的化の基礎をなし、そしてドーパミン受容体(DR)が造血性腫瘍および乳癌由来の癌幹細胞(CSC)のバイオマーカーであることを明らかにした。

【0073】

(実験手順)

(腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)EOS-GFP系の生成)

腫瘍性v1H9またはv2H9ヒト多能性幹細胞(hPSC)(Werbowetski-Ogilvie他、2009)がDr James Ellisにより提供されたEOS-C3+EOS-S4+ベクタ-を運ぶレンチウイルスを形質導入された(Hotta他、2009)。レンチウイルス形質導入の後、細胞はピューロマイシンを使用して選択され、そしてその後FASCAria II(Becton-Dickinson)を使用した緑色蛍光タンパク質(GFP)発現に基づき、単一細胞として96ウェルプレートにソートされた。単一細胞クローンから形成されたコロニーは、v1H9-Oct4-GFP(EOS-C3+)、v2H9-Oct4-GFP(EOS-C3+)およびv1H9-Sox2-GFP(EOS-S4+)系を確立するのに使用された。

【0074】

(細胞培養液)

H9ヒト胚性幹細胞(hESC)、v1H9、v1H9-Oct4-GFP、v2H9-Oct4-GFP、v1H9-Sox2-GFPおよび線維芽細胞由来人工多能性幹細胞(iPSC)は前述のように培養された(Chadwick他2003; Werbowetski-Ogilvie他、2009)。

【0075】

(原発性ヒト試料)

AML標本のため、末梢血および/または骨髓が臨床的プレゼンテーション時に収集された。健康な造血性細胞がヘその緒の臍帯血試料から得られた。全ての試料は研究倫理委員会(Research Ethics Board)承認済みプロトコルに従うインフォームドコンセントに従い、マックマスター大学(McMaster University)およびロンドン健康科学センターで採取された。

【0076】

(正常および腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)用、試験管内(in vitro)培養プラットフォーム)

化学スクリーンは、ウェル当り5,000細胞で8ng/mlの塩基性線維芽細胞成長

10

20

30

40

50

因子 (bFGF) を追加されたマウス胚性線維芽細胞条件培地 (MEFCM) 内に植えつけられた v1H9 - Oct4 - GFP 細胞を含んだ。24 時間後、培地は化合物 10 μ M および 0.1% DMSO, 0.1% DMSO (-BMP4) または BMP4 100 ng/ml および 0.1% DMSO (+BMP4) を含む MEFCM と 48 時間に亘って交換され、その後化合物を含む新鮮な培地に 24 時間に亘って交換された (合計化合物処置 72 時間)。その後固定され自動画像化及びプレート読み取り機分析のために調製された。コンフルエントな H9 及び線維芽細胞由来人工多能性幹細胞 (iPSC) が 10,000 細胞/ウェルで 8 ng/ml の塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を追加された MEFCM 内に植えつけられた。24 時間後細胞は化合物 10 μ M および 0.1% DMSO, 0.1% DMSO (-BMP4) または BMP4 100 ng/ml および 0.1% DMSO (+BMP4) で処置された。化合物を加えられた新鮮な MEFCM が毎日 5 日間にわたって交換された。5 日目にヒト多能性幹細胞 (hPSC) は固定され、自動画像化及びプレート読み取り機分析のために調製された。更なる詳細は補足的実験手順参照。

10

【0077】

(奇形腫検定法)

400,000 の H9 ヒト多能性幹細胞 (hPSC) または v1H9 - Oct4 - GFP がオス非肥満糖尿病 (NOD) / 重症複合免疫不全 (SCID) マウスの精巣内に注入され、そして奇形腫が Oct4 について前述のように (Werbowetski-Ogilvie 他、2009) 分析された。

20

【0078】

(異種移植検定法)

NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1wj1}/SzJ 成体マウス (NSG マウス) が移植 24 時間前に 315 ラドで垂致死性に放射線照射された。化合物または DMSO 溶媒で 24 時間処置された 0.8 - 1.0 $\times 10^7$ AML 単球細胞 (MNC) または 1.5 - 1.8 $\times 10^5$ 系統枯渇へその緒臍帯血 (CB lin-) 造血性細胞が尾静脈経由で注入された (静脈内注射 (IV))。6 - 10 週間後、動物は殺傷され、そして骨髓と脾臓がヒト細胞の存在についてフローサイトメトリで分析され (LSRII、BD) そしてデータは FlowJo ソフトウェア (Tree Star Inc) を使用して分析された。2 次的ヒト多能性幹細胞 (hPSC) 移植に対しては、系統枯渇へその緒臍帯血 (CB lin-) 生着からの同一数の移植ヒト細胞が、前述のように成体放射線照射 NSG マウスに静脈内注射 (IV) で注入された。

30

【0079】

(統計的分析)

データは平均値 \pm 平均値の標準誤差または平均値 \pm 標準偏差で表わされる。グループ間の有意の差異は独立 2 方向または 1 方向 t 検定を使用して決定された。

【0080】

(多能性幹細胞培養)

H9 ヒト胚性幹細胞 (hESC), v1H9, v1H9 - Oct4 - GFP, v2H9 - Oct4 - GFP, v1H9 - Sox2 - GFP および線維芽細胞由来人工多能性幹細胞 (iPSC) は 8 ng/ml の bFGF (GIBCO 13256-02) を追加されたマウス胚性線維芽細胞条件培地 (MEFCM) を有する Matrigel (登録商標) コートされた (BD Bioscience 353234) プレート上で培養された。MEFCM は KO-DMEM (GIBCO 10829-018), 20% KO-血清代替 (GIBCO 10828-028), 1% 非必須アミノ酸 (GIBCO 11140-050), 1 mM L-グルタミン、0.11 mM メルカプトエタノール (Sigma Aldrich M7522) から構成される。細胞系は 100 ユニット/mL の Collagenase IV (GIBCO 17104-019) を 2 - 3 分間使用して 7 日ごとに継代された。細胞蒔き密度、検定法継続期間、および 96 ウェル内の DMSO 溶媒濃度は、v1H9 - Oct4 - GFP 細胞および正常 H9 ヒト胚性幹細胞 (hESC) に対して最適化された。v1H9 - Oct4 - GFP に対しては、最適初期細胞蒔き密度は 7

40

50

2時間処置に対し5,000細胞/ウェルがGFP最大レベルと±BMP4対照間のz'識別に基づいて選択された。正常ヒト胚性幹細胞(hESC)に対しては、最適細胞蒔き密度10,000細胞/ウェルが最大z'プライム識別に基づいて選択された。

【0081】

(原発性ヒト試料)

単核細胞がFicoll-Paqueプレミアム(GEヘルスケア)を使用して調製された。造血性細胞に対しては、EasySep(StemCellテクノロジーズ)を使用して系統枯渇化がメーカーの推奨に従って実施された。

【0082】

(AML/HPSC細胞培養)

AML細胞系、即ち、OCI-AML2(M4), OCI-AML3(M4), HL-60(M2)およびMV-4-11(M5)は5%過熱非活性ウシ胎児血清(FBS)(HyClone)を加えたロズウェルパーク記念研究所培地(RPMI)(Gibco)内で培養された。R(+)-7-ヒドロキシ-DPATハイドロプロマイド(Sigma)でのドーパミン受容体(DR)刺激薬研究に対しては、ウシ胎児血清(FBS)内のドーパミンの蔓延のため(Little他, 2002)、無血清条件が適用された。AML患者芽細胞が5%過熱非活性化ウシ胎児血清(FBS)(HyClone)、5ng/mL IL3(R&D systems), 5×10^{-5} Mメルカプトエタノール(Sigma)およびBIT(StemCellテクノロジーズ)を加えたイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)内で培養された。ヒト幹細胞(HSC)培地は1%ウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma)、100ng/mL Flt-3L(R&D systems) 20ng/mL トロンボポエチン(TPO)(R&D systems)を加えたイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)を含んだ。患者のヒト多能性幹細胞(hPSC)および急性骨髄性白血病(AML)試料は化合物またはDMSO溶媒(0.1%)で24時間処置され、その後コロニー形成単位(CFU)プレーティングや異種移植研究が実施された。

【0083】

(抗体)

免疫細胞化学に使用された抗体は以下の通り: Oct3/4(BD Transduction Laboratories, cat# 611203), Sox2(R&D, cat# AF2018)。ヒト造血性細胞を検知するため、Pacific Blue-, フィコエリトリン(PE)-, アロフィコシアニン(APC)-またはフルオレセインイソチオシアネート(FITC)ラベル付きの抗ヒトCD45が使用された(BD Bioscience)。FITC抗CD33、PE抗CD13、FITC抗CD41a, FITC抗ヒト白血球抗原(HLA)ドーパミン受容体(DR), PE抗CD19抗体はBD Pharmingenより入手した。PE抗CD14, PE抗CD15およびPE抗GlyAはImmunotech Beckman Coulterより入手した。多能性を測定するため、PE抗SSEA2(BD Bioscience)およびPE-またはAlexaFluor488抗Oct4(BD Bioscience)が使用された。ウサギ抗ヒトドーパミン受容体抗体DRD1(Cat# 324390), DRD2(Cat# 324393), DRD3(Cat# 324402), DRD4(Cat# 324405), DRD5(Cat# 324408), はEMD Chemicalより入手した。抗ウサギAlexa-Fluor-488(Molecular Probes)は2次抗体として使用された。Cell Signalling Technologyより入手した原発性抗p53(Cat# 2527)および抗p21(Cat# 2947)ウサギ免疫グロブリンG(IgG)は固定され透過処理された細胞を染色するのに使用された。抗ウサギAlexa-Fluor-546(Molecular Probes)は2次抗体として使用された。

【0084】

(自動画像化および分析)

10

20

30

40

50

(腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)の画像化)

細胞は2%パラホルムアルデヒドで固定され、そして10 μ g/mLヘキスト33342(Invitrogen)でCombi Multidrop Dispenser(T hermo)を使用して染色された。Oct4免疫細胞学に関する実験のためには、Oct4用モノクローナル抗体(BD)がAlexs-Fluor-6472次抗体(Invitrogen)と共に使用された。免疫細胞学的染色はJanus自動液体ハンドラー(Perkin Elmer)を使用した。画像は10xN.AでArrayscan HCS VTIリーダー(Cellomics)を使用して、落射蛍光照明および標準フィルターセットの手段により獲得された。

【0085】

10

(正常ヒト多能性幹細胞(hPSC)の画像化)

細胞は2%パラホルムアルデヒドで固定され、そして10 μ g/mLヘキスト33342(Invitrogen)で染色された。標準的蛍光発光免疫細胞化学技術が、細胞をOct4用モノクローナル抗体(BD)およびAlexs-Fluor-6472次抗体(Invitrogen)で染色するのに使用された。全ての工程はJanus自動液体ハンドラー(Perkin Elmer)を使用して実施された。画像は5xでArrayscan HCS VTIリーダー(Cellomics)を使用して、落射蛍光照明および標準フィルターセットの手段により獲得された。

【0086】

20

(画像分析)

画像分析はAcapellaソフトウェア(Perkin Elmer)のカスタムスクリプトを使用して実施された。細胞核物質はヘキスト信号から区分された。腫瘍性細胞系に関しては物体輝度分析が緑色蛍光タンパク質(GFP)ポジティブ細胞に対してのみ実施された。正常細胞系に関しては、Alexs-Fluor-647ポジティブ細胞が定量された。画像およびウェルレベルのデータはColumbusデータベース(Perkin Elmer)で保存されそして分析され、さらにActivityBase(IDBS)でデータ分析、化合物登録、およびヒット識別が実施された。

【0087】

(遺伝子発現分析)

特定の条件下の細胞が集められそしてRNAがRNeasyキット(Qiagen)を使用して抽出され、相補DNA(cDNA)がSuperScript III(登録商標)cDNA合成キット(Invitrogen)を使用して生成され、事前増幅およびTaqMan(登録商標)アレイ反応(Applied Biosystems)がメーカー指示通りに実施された。それぞれの処置済み細胞集団の遺伝子発現プロファイルはTaqMan(登録商標)幹細胞多能性アレイカードを使用して、Viia7リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)上で分析された。各反応試料はアレイカード上のウェルに搭載され、そして336Xgで各1分間2度遠心分離され、密封され、サーマルサイクラーに置かれた。以下のサイクル条件が全てのアレイカードの使用に適用された: 45 で10分間、84 で10分間、そして(94 で30秒その後60 で1分間)のサイクルを40回。アレイデータは18S RNA及びグリセラルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)に対して正規化され、そしてデータ分析2.0ソフトウェア(Applied Biosystems)を使用して比較された。

30

40

【0088】

(メチルセルロースコロニー形成検定法)

AML患者および系統枯渇へその緒臍帯血(CBlin-)細胞が化合物存在下またはDMSO溶媒(0.1%)対照で24時間培養された。AML細胞は50,000細胞/mLでMethocult GF H4434(Stem Cell Technologies)内にプレートされた。系統枯渇へその緒臍帯血(CBlin-)細胞は1,000細胞/mLでMethocult GF H4434(Stem Cell Technologies)内にプレートされた。コロニーは14日間の培養後、標準形態基準

50

を使用してスコア付けされた。

【0089】

(体積測定的細胞カウント)

ドーパミン受容体遮断薬(図16B)とドーパミン受容体刺激薬(図16C, D)による72時間処置後のAML-OCI2とAML-OCI3細胞の存在数は、前方散乱および側方散乱クラスタリングにより定義される格子ストラタジーに従って固定容積内のイベントの数を測定することによりカウントされる、7AAD-およびヘキスト+。

【0090】

(事例8:腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)の分化を誘発する化合物の高生産性スクリーニング識別)

発明者らは以前に、生体外(in vitro)および生体内(in vivo)において、末端分化能力の迷走的遮断と共に自己再生および生存の増大を含む腫瘍性の特徴を示す、変異形ヒト多能性幹細胞(hPSC)系について述べた(Werbowetski-Ogilvie他、2009)。体細胞系癌幹細胞(CSC)との機能的特徴の類似性に基づき、腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)が生体外(in vitro)で高含有量高生産性のスクリーニングを許容する、体細胞系癌幹細胞(CSC)の代理物として試験された。スクリーニングプラットフォームは選択的に腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)を標的とし、一方正常hPSCには殆ど影響しない小分子を識別するように開発された。この分化スクリーニングプラットフォームは、体細胞系癌幹細胞(CSC)を選択的に標的とし、一方正常幹細胞(SC)の能力を残す、強力な候補医薬を識別することができる。

【0091】

Oct4およびSox2は正常および腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)の自己再生性多能性状態の喪失と分化の誘発に対する信頼度の高い指標を提供する。腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)の誘発された分化の間のOct4およびSox2の喪失を検知する、より直接的な方法を提供するため、GFPレポーター系が、EOS-GFPレポーター(それぞれv1H9-Oct4-GFPおよびv1H9-Sox2-GFP)を腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)に形質導入することにより形成された(Hotta他、2009)。GFP輝度は自己再生の安定性に有利に働く処置およびBMP4の追加による分化を誘発する条件において、Oct4およびSox2発現と相関しているように観察された。この応答は、Sox2レポーター系(v1H9-Sox2-GFP)のみならず、同じEOSレンチウイルスGFPレポーター(v2H9-Oct4-GFP)を形質導入された追加の腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)系、v2H9(Werbowetski-Ogilvie他、2009)を使用して一貫して見られた。

【0092】

生成された全てのヒト多能性幹細胞(hPSC)系における分化に対する均一な応答と多能性の維持はまた、EOSレポーター形成挿入によるウイルス統合またはクローンの選択は応答性に無関係であることを明らかにした。この結果は、分化を誘発する化合物は腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)系におけるGFP輝度の減少に基づいて識別可能であり、そして化学スクリーニングに利用可能であることを示唆した。そのため、自動高含有量顕微鏡法および蛍光定量ベースの高生産性スクリーニングのための条件が、ヒト多能性幹細胞(hPSC)の多能性マーカー発現の減少を検知するのに使用された。正常hPSCの顕微鏡分析では、BMP4処置の後、明確なOct4+細胞が消失したことを示した。同様に、腫瘍性Oct4-GFP hPSCのBMP4処置によるOct4とGFPの両方の減少は、高含有量顕微鏡法およびプレート読み取り機ベースの蛍光定量法により計量された。癌幹細胞(CSC)を標的とする理想的な候補を識別するため、化合物処置に応答した正常および腫瘍性hPSCの両方の分化が並行して評価された。

【0093】

スクリーニングプラットフォームの有効性を前提として、NIHクリニカルコレクションおよびカナダ化合物コレクションからの590の確立された注釈付きの化合物からなる

10

20

30

40

50

化学ライブラリーがスクリーニングされた。これらのコレクションは以前に他の多くの哺乳類細胞系において綿密に調査された (Diallo 他, 2010; Shoemaker, 2006)。蛍光定量的な高生産性スクリーニング (HTC) および高含有量スクリーニング (HCS) プラットフォームは、51 の定義された化合物の多能性の喪失 (それぞれ GFP RFU および細胞当たり平均 GFP 輝度) および細胞カウント (それぞれヘキスト RFU および細胞カウント) に対し等価の測定値を与えるという証明に従って、高生産性スクリーニング (HTC) がより高速に化合物ライブラリーをスクリーニングするための好適なプラットフォームとして選択された (図 9 A)。スクリーニングされた 590 の化合物の中で (従前の研究に基づき $10 \mu\text{M}$ で (Inglesse 他, 2007))、11 の化合物が、GFP % 残存活性 (% RA) とヘキスト % RA の両方での減少により示されるように、分化を誘発するとして識別された (図 9 B - C)。計 4 つのこれら化合物、インドトラリン、チオリダジン、アザチオプリン、およびメフロキンが、クラスタリングおよびヘキスト % RA が 30 % 超であることに基づいて (図 9 B) 候補化合物として識別された。

10

20

30

40

50

【0094】

2 次的高含有量分析はインドトラリンが疑問のある候補であることを明らかにし、それは除外された。しかし高含有量分析および高生産性スクリーニング (HTC) は共にチオリダジン、アザチオプリン、およびメフロキンが候補化合物であることを確認し (図 9 D)、そしてそれら化合物は更なる試験向けに選択された (図 9 E - G)。対照処置ヒト多能性幹細胞 (hPSC) に比較して、それぞれの化合物は明確な形態的变化を腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) に誘発した (図 9 E)。GFP 輝度の減少は、画像分析 (図 9 F) を使用して確認され、そしてさらにそれぞれの化合物の最大半量有効濃度 (EC50) を計算するため、広範囲の投与量に亘って評価された (図 9 G)。チオリダジンとメフロキンのみが $10 \mu\text{M}$ の目標閾値より低い EC50 値を有し (図 9 G)、それにより、それら化合物は患者からの腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) および体細胞系癌幹細胞 (CSC) を使用する更なる詳細な評価向けの候補として定義された。

【0095】

チオリダジン様作用化合物を同定するための我々のスクリーニングアプローチと特異性を再確認するために、腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) 応答のスクリーニングに使用される化学物質を 2446 の化合物を含む範囲に拡大した (図 18 A)。チオリダジンは、他の二つのフェノチアジン化合物; フルフェナジンおよびプロクロルペラジン; と共に、同定された 26 化合物のリストの中での中として同定された (図 18 A - B)。高含有量の分析を使用したフルフェナジンおよびプロクロルペラジンの更なる評価は、対照 - 処理細胞 (図 18 F) と比較した腫瘍性 hPSCs の明確な形態学的変化 (図 18 C) を明らかにした。GFP 輝度の低下は、画像解析 (図 18 D) を用いて確認され、広範囲の用量にわたってさらに評価され、各化合物の EC50 が計算された (図 18 E)。スクリーンで同定された 3 つのフェノチアジンの中で、チオリダジンが腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSCs) において最低の EC50 値を示し (図 9 G v s 図 18 E)、それにより AML の癌幹細胞 (CSC) の標的化のためにテストされたフェノチアジン中でチオリダジンを最良の候補フェノチアジンとした。

【0096】

(事例 9: チオリダジンは正常造血性幹 / 前駆細胞に影響を与えずに、選択的に腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) の分化を誘発し、そしてヒト AML 芽細胞を減少させる。)

Oct 4 の喪失を検知しそして分化の程度を明らかにするため、チオリダジンとメフロキンに対する応答が、正常 (図 10 A) および腫瘍性 (図 10 B) のヒト多能性幹細胞 (hPSC) の両方で、3 つの濃度で定量的フローサイトメトリを使用して評価された。乳癌幹細胞の既報告の選択的抑制薬 (Gupta 他, 2009) のサリノマイシンが比較のため含まれた。 $10 \mu\text{M}$ では、全ての化合物が細胞数を減少させた。しかし、残存正常ヒト多能性幹細胞 (hPSC) 内の Oct 4 レベルは BMP 4 処置で観察されたレベルを下回らなかった (図 10 A)。これと同一の応答が、明確な成体由来の追加の正常ヒト多能

性幹細胞 (hPSC) 系を代表する線維芽細胞由来ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) で再現され (図 11A)、このことは、効果が胚性起源に特異ではないことを示唆した。同じ化合物が腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) の処置に使用された場合、チオリダジンとメフロキン処置は腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) 内の細胞数と Oct 4 のレベルの減少をもたらした。チオリダジンだけが Oct 4 のレベルを BMP 4 分化対照以下に減少させることができ (図 10B)、これはチオリダジンが腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) の分化阻害に打ち勝つ能力が有ることを示唆した。この応答を確認するため、全ての化合物の腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) に対する網羅的な投与量反応が実施された (図 11B)。

【0097】

選択的に腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) を分化させる化合物を定量的に識別するために、これらの化合物に応答した Oct 4 + 細胞の正規化 % の正常 hPSC と腫瘍性 hPSC の間の比率が測定された。例えば、比率 1 は分化が同等であることを意味し、一方比率 > 1 は、正常 hPSC に対して腫瘍性 hPSC の方が、分化が相対的に多いことを意味する。チオリダジンだけが、1 μ M と 10 μ M の両方で正常 hPSC に対する腫瘍性 hPSC の分化に有意のインパクトを与えた (図 10C)。細胞ストレスマーカー p53 (図 10D) およびその転写ターゲット p21 (図 10E) の速い蓄積が、さらに分化誘発を細胞毒性から区別するのに使用された。腫瘍性 hPSC に対する毒性化学治療薬エトポシドによる処置は、24 時間後に高レベルの p53 と p21 をもたらした。しかし 10 μ M のチオリダジンまたは BMP 4 の処置は、毒性だけを誘発する薬剤と異なり、p53 または p21 の蓄積を生じなかった。このことはストレス応答プログラムよりはむしろ誘発された分化と一貫性があった。さらにチオリダジン処置は腫瘍性 hPSC 内に分化遺伝子の発現をもたらし、それは TaqMan Low-Density Array-qPCR により定量化された。処置された腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) 内で、分化関連遺伝子 50 種類の内 21 種類において増加が観察され (図 10F)、それはチオリダジンの分化誘発効果と一貫性があった。

【0098】

化学的応答における腫瘍性ヒト多能性幹細胞 (hPSC) の体細胞性癌幹細胞 (CSC) に対する潜在的類似性を検証するため、ヒト造血性システムの正常および腫瘍性集団が評価された。実験的に、ヒト造血性幹 前駆細胞 (HSPC) および白血病幹細胞 (LSC) の両方の自己再生および分化は、造血性システムにユニークに使用可能な、強力で確立された生体外 (in vitro) および生体内 (in vivo) 検定法により調査可能である。それにより、それを、正常および腫瘍性 hPSC を抗癌幹細胞 (CSC) 化合物の 1 次スクリーニングツールとして使用するという潜在的代理性を評価するための理想的な組織にしている。系統枯渇へその緒臍帯血 (CBln-) は造血性幹 前駆細胞 (HSPC) を高度に豊富に含み、そして、自己再生と全ての血液系統への多系統分化ができる正常体細胞性幹細胞 (SC) の信頼度の高い供給源である。急性骨髄性白血病 (AML) は、自己再生する白血病幹細胞 (LSC) により維持される成熟骨髄の分化阻害を特徴とする血液性腫瘍である (Bonnet および Dick, 1997; Lapidot 他, 1994)。

【0099】

このように、メチルセルロース内の前駆体検定法が造血性幹 前駆細胞 (HSPC) と 5 つの急性骨髄性白血病 (AML) 患者試料で実施された；各試料は各化合物の生体外 (in vitro) のクローン原性および多重系統造血性分化に対するインパクトを評価するため、チオリダジン、メフロキンまたはサリノマイシンで処置された。全コロニー形成単位 (CFU) の HSPC (図 10G) および AML (図 10H) から生成され、それぞれの化合物で処置された代表的細胞ペレットが示される。チオリダジン処置は AML の増殖/クローン原能力を低減させ、一方で HSPC の多重系統分化を維持した (図 11C)。多重系統分化における変化は、これら化合物で HSPC 試料 (図 10I) および AML 患者試料 (図 10J) を処置した後に形成されたコロニー形成単位 (CFU) の列挙

10

20

30

40

50

に基づいて定量化された。1 μ Mと10 μ Mの両方でサリノマイシンはAML - 芽細胞CFUポテンシャルを減少させたが(図10J)、しかし同時に、全ての試験投与濃度でHSPCのCFUポテンシャルを減少させ(図10I)、このことは、造血性システムにおける非特異的毒性を示唆した。対照的に、チオリダジンおよびメフロキンはAML - 芽細胞CFU形成を減少させたが(図10J)、一方でHSPCのCFUポテンシャル(図10I)および多重系統構成(図11D)に殆ど影響せず、このことは、チオリダジンおよびメフロキンは正常な造血を変化させないことを示唆した。

【0100】

識別された化合物の臨床用に最も望まれる結果は、AML - 芽細胞CFU形成の優先的消滅と、一方で正常造血性幹 前駆細胞(HSPC)の前駆体能力を維持することである。AMLを標的とするための最高の選択性を明らかにするため、HSPCから生成された全CFUに対するAML - 芽細胞の比率が計算された(図10K)。比率1は正常前駆体と腫瘍性前駆体のポテンシャルが等しいことを意味する。比率>1は選択的にAML - 芽細胞CFUポテンシャルを減少させる化合物を定義する。サリノマイシン(1 μ M)、メフロキン(10 μ M)およびチオリダジン(10 μ M)投与はそれぞれの化合物に対する最高の比率値を示し(図10K)、そして生体内(in vivo)評価向けに選択された。チオリダジン10 μ Mは、特に、全ての化合物のなかで最高比率を示したが、しかし最も重要なのは、正常HSPCのCFUポテンシャルに比較して有意に低いAML - 芽細胞CFUポテンシャルを示した唯一の化合物である点である(図10K)。

【0101】

AML - 芽細胞CFUのクローン原性ポテンシャルを減少させるチオリダジンの特殊性が分化の誘発に起因するものかを議論するため、チオリダジン処置に応答した、患者AML細胞内の顆粒球性成熟マーカーCD11bの出現頻度が検定された(図10L)。顆粒球性AML - 芽細胞の発現頻度の顕著な増加は、処置の期間観察され(図10L)、それはチオリダジンがそのAML細胞の特異的標的化を分化の誘発を介して表わすことを示唆している。この発見は、腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)においてみられた分化誘発に類似しており、そしてこのスクリーニングプラットフォームの、腫瘍性細胞を分化させることができる薬剤を識別することに対する強力な読み出しを確認する。この結果はまた、チオリダジンがAML癌幹細胞(CSC)の特異的標的化に対する最良の候補であり、生体内(in vivo)ヒトマウス異種移植検定法を使用した試験が必要であることを示唆する。

【0102】

(事例10:チオリダジンは白血病幹細胞(LSC)機能を減少させ、一方で正常造血性幹 前駆細胞(HSPC)を残す)

生体外(in vitro)で検知されたAML - 芽細胞の抑制が、腫瘍性幹細胞区画に影響する化合物に起因するかを描写するため、機能的に白血病幹細胞(LSC)および造血性幹細胞(HSC)を定義する異種移植研究(Dick, 2008)が実施された(図12)。造血性幹 前駆細胞(HSPC)のサリノマイシン(1 μ M)による処置は造血性生着をほぼ検知不能レベルにまで減少させ(図13A)、そのことはこの化合物がHSPCからの正常造血に干渉することを明示し、そしてこの化合物は所望の抗癌幹細胞(CSC)の選択的標的化を提供する可能性が低いため、さらなる評価から除外された。対照的に、メフロキン(10 μ M)処置は、僅かな、しかし有意とは言えない、造血性幹細胞(HSC)能力の減少を対照に比較して示した(図12A)。しかしメフロキンはAML白血病幹細胞(LSC)能力の減少には効果が無いことが判り、従って選択的効果が欠如しているため、さらなる評価を中断された(図12C)。

【0103】

サリノマイシンとメフロキンの両方と対照的に、HSPCのチオリダジン(10 μ M)での処置は対照溶媒処置細胞と同じ骨髓生着(図12A)と脾臓生着(図13B)のレベルを示した。多重系統再構成能力は対照とチオリダジン処置ヒト造血性幹細胞(HSC)で同一であり、骨髓性(図12B)、リンパ系(図12B)、赤血球系(図13D)、お

10

20

30

40

50

よび巨核球性発現（図13D）は全く影響されなかった。一連の2次的生着で測定されたように、チオリダジン処置は対照処置試料にくらべて造血性幹細胞（HSC）自己再生に影響を与えなかった（図13F）。しかしサリノマイシンとメフロキンと全く対照的に、チオリダジン処置は白血病疾病開始AML白血病幹細胞（LSC）を有意に減少させた（図12C-D；図13C；図13E）。

【0104】

HSPC正常造血性再生（%hCD45+）対AML白血病誘発（%CD33+hCD45+芽細胞）比率の計算は、チオリダジンが白血病幹細胞（LSC）機能を有意に減少させ、一方で正常造血性幹細胞（HSC）能力を保持することを明らかにした（図12E）。チオリダジンが無い場合、2次移植レシピエントの白血病生着レベルに差が無いことが観察された（図13F）。このことは、2次レシピエントにとってこの化合物への連続的暴露が白血病誘発を抑制するのに必要であることを示唆した。これらのデータは、生体内（in vivo）でチオリダジンが体細胞性癌幹細胞（CSC）を選択的に標的とし、一方で正常幹細胞機能には影響を与えないことを示した。チオリダジンが正常および腫瘍性ヒト多能性幹細胞（hPSC）を使用する新規の分化スクリーニングプラットフォームの生体外（in vitro）での使用を介して識別されたため、チオリダジンの機能的効果は、体細胞性癌幹細胞（CSC）を理解するのにヒト多能性幹細胞（hPSC）を使用することの予測的価値の事例を提供する。

10

【0105】

（事例11：ドーパミン受容体はヒト癌幹細胞（CSC）を明確に分離する）

20

チオリダジンはドーパミン受容体（DR1-5）を介して作用することが知られている（BeaulieuおよびGainetdinov, 2011; SeemanおよびLee, 1975）。正常幹細胞に比較してヒト癌幹細胞（CSC）に選択的に干渉するチオリダジン作用のメカニズムがドーパミン受容体遮断性を介したものなのかを評価するため、ドーパミン受容体（DR）の細胞表面発現が分析された。現在までに、5つのドーパミン受容体（DR）が識別され、そしてD1ファミリー受容体（D1とD5）とD2ファミリー受容体（D2, D3およびD4）に分けられた（SibleyおよびMonσμα, 1992）。多能性マーカーSSEA3を発現する正常ヒト多能性幹細胞（hPSC）はドーパミン受容体（DR）発現を欠く（図14Aおよび図15A-B）。対照的に腫瘍性ヒト多能性幹細胞（hPSC）は5種類全てのドーパミン受容体（DR）を発現した（図14B）。観察された腫瘍性ヒト多能性幹細胞（hPSC）に対するドーパミン受容体（DR）の差別的な発現とチオリダジンの選択的抑制は、ドーパミン受容体（DR）シグナリングの抑制が、正常幹細胞（SC）と比較したヒト癌幹細胞（CSC）に対する選択的標的化に役割を果たしている可能性を示唆する。

30

【0106】

チオリダジン処置の機能的役割に基づいた、癌幹細胞（CSC）におけるドーパミン受容体（DR）の潜在的役割を拡大するため、我々はドーパミン受容体（DR）遮断がチオリダジン処置後の白血病幹細胞（LSC）の機能喪失を説明できるかを検討した。造血性幹前駆細胞（HSPC）そして正常臍帯血（CB）からのヒト造血性単核細胞（図15C-F）及びAML患者試料（図14Dおよび図15G）におけるDR1-5の発現が分析され（図14C）た。ドーパミン受容体（DR）は、臍帯血の原始造血性幹細胞（HSC）または前駆体集団（それぞれCD34+38-またはCD34+38+として識別される（Bhatia他, 1997））では観察されなかった（図14C）。これは造血性幹細胞（HSC）および前駆体はチオリダジンの標的を発現しないことを示唆した。

40

【0107】

同様に、ドーパミン受容体（DR）は、赤血球系（図15C）、巨核球性（図15C）およびリンパ系細胞（図15D）では検知不能であった。CD14+として定義される単球およびCD15+として定義される顆粒球集団の半分のみがドーパミン受容体（DR）を発現した（図15E-F）。分析された全ての13のAML患者試料が5種類全ての受容体の異なるレベルを有するDR+芽細胞の集団を含み、そしてそれらはCD34+/C

50

D 1 4 + 細胞において優勢に検知された (図 1 5 G)。しかし、正常造血性幹細胞 (H S C) と異なり、C D 3 4 + 細胞はヒト A M L における白血病幹細胞 (L S C) 能力と相関せず (T a u s s i g 他, 2 0 0 8)、そして近年 C D 3 4 または C D 3 8 を欠く多くの細画分で識別された (E p p e r t 他, 2 0 1 1)。正常および A M L ヒト造血性試料におけるドーパミン受容体 (D R) の差別的発現は、ヒト A M L 白血病幹細胞 (L S C) が不均一であり、薬剤標的化は代替表現型の叙述ではなく分子経路に基づくべきであることを強く示唆した。

【0108】

A M L 芽細胞におけるドーパミン受容体 (D R) 発現が A M L 患者における白血病幹細胞 (L S C) 出現率に相関するか否かが調査された。D R D 3 + 芽細胞 (図 1 4 E) よび D R D 5 + 芽細胞 (図 1 4 F) の大きな分画を持つ A M L 試料は、白血病幹細胞 (L S C) が異種移植レシピエントにおいて白血病を開始することができるため白血病幹細胞 (L S C) を有し、それは白血病幹細胞 (L S C) を含まない有意に低いレベルのドーパミン受容体 (D R) を含む A M L 患者試料と異なる。白血病幹細胞 (L S C) を含む A M L 患者試料は予後不良と相関し、一方 L S C を含まない試料は良好な予後を示した (E p p e r t 他, 2 0 1 1)。高レベルのドーパミン受容体 (D R) 出現は予後不良と相関し、一方低レベルの D R 出現は良好な予後を示した (図 1 4 E - F)。これはドーパミン受容体 (D R) 評価が予後バイオマーカーとしての用途を持ち、そしてそれぞれの A M L 患者に対する分子署名または白血病幹細胞 (L S C) の検数より単純であることを示唆する。

【0109】

(事例 1 2 : チオリダジンのドーパミン受容体 (D R) 遮断はヒト A M L を抑制する)

ヒト A M L 内のドーパミン受容体 (D R) の機能的役割をよりよく理解するため、患者由来の 2 種類の A M L 細胞系 ; A M L - O C I 2 と A M L - O C I 3 が使用された (K o i s t i n e n 他, 2 0 0 1)。

【0110】

原発性試料のように、これら 2 種類の細胞系は各 D R 1 - 5 (図 1 6 A) に対し患者試料よりはるかに高いレベルの発現を示した。ウシ胎児血清 (F B S) 内のドーパミンの生物学的利用能に起因して (L i t t l e 他, 2 0 0 2)、A M L 内のドーパミン受容体 (D R) の役割を評価するのに無血清条件が採用された。両方の A M L 系はチオリダジン処置され、そして他の既知のドーパミン受容体 (D R) 遮断薬クロザピンおよびクロルプロマジンと比較された (S e e m a n および L e e, 1 9 7 5)。3 つの全ての D R 遮断薬は処置後 A M L 細胞数を減少させた (図 1 6 B)。ドーパミン受容体 (D R) のヒト A M L 細胞を標的化する特異性を評価するため、患者 A M L 試料は D R + と D R - 細画分に蛍光活性化細胞振り分けにより分割され、その後 D M S O 溶媒またはチオリダジンで 2 4 時間処置され、その後、芽細胞コロニー形成単位 (C F U) の内容について検定された。

【0111】

芽細胞コロニー形成単位 (C F U) 形成の減少はチオリダジン処置 D R + 細画分にもみ見られた (図 1 7 A)、一方チオリダジン処置 D R - 細画分では見られなかった (図 1 7 B)。逆に、ドーパミン受容体 (D R) D 2 ファミリー刺激薬 7 O H - D P A T の追加は、A M L 細胞を増加させた (図 1 6 C)。ドーパミン受容体 (D R) D 2 ファミリーおよび D 1 ファミリーは、反対の作用を細胞間シグナリングに加え、その結果異なる生物学的効果をもたらす (S e l f 他, 1 9 9 6)。ドーパミン受容体 (D R) D 1 ファミリー刺激薬 S K F 3 8 3 9 3 による処置は A M L 細胞を有意に減少させ、それは D 2 ファミリーシグナリングが A M L 細胞の生存に必要であることを確認した (図 1 6 D)。これらの結果を組み合わせ、チオリダジンの作用のメカニズムは D 2 ファミリードーパミン受容体 (D R) の遮断によるものであり、標的を外したためではないことを示唆し、そしてドーパミン受容体 (D R) シグナリングを介した癌幹細胞 (C S C) 標的化の新規の道を識別したことを示唆する。

【0112】

(事例 1 3 : ドーパミン受容体 (D R) 遮断薬と D N A 合成阻害薬を使用した組み合わせ

治療)

臨床的に許容できる用量でチオリダジンの抗LSC作用を確認する(図17C)際に、DNA合成阻害剤シタラビン(AraC)を使用して、この薬剤が従来のAML化学療法と組み合わせることができるか否かを調べた。AraCは成人のAMLの誘導療法と統合療法の両方で至適基準的な化学療法であるが、この治療は、高用量で有意な罹患率および死亡率のリスクをもたらす(EsteyとDohner、2006)。正常造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)対AML芽細胞検出を使用して、濃度 $>1\mu\text{M}$ では、AraCはAML芽細胞CFUに対し完全な毒性を誘発したが、しかし、通常のHSPCsを枯渇させるのにも十分であった(図16E)。さまざまな用量を使用して、私たちは、HSPC機能を保持しながらAML芽細胞CFUを減少させる濃度として定義されるAraCの有効濃度(EC_{AraC})を 100nM と同定した(図16E)。しかし、濃度 $10\mu\text{M}$ のチオリダジンとAraCの組み合わせは、有効濃度($\text{EC}_{\text{AraC-Thio}}$)を 1nM に減少させた。これは必要なAraC用量の 100 倍の減少を表す(図16F)。チオリダジンのこの組合せ効果は、図17Dに示すように、高用量のAraC療法に伴う重度の細胞毒性効果を減少させることができるため、AML患者に対し有意な利益を有する可能性がある。

【0113】

あるいは、 $10\mu\text{M}$ のチオリダジンと 100nM のAraCの組み合わせは、HSPC機能を保持しながらAML芽細胞CFUを完全に消滅させ(図16F)、このことはこれらの特定の濃度が患者の寛解を誘導し、AMLの再発を防止できることを示唆した。まとめると、これらのデータは、抗LSC剤(チオリダジン)とヒトAMLのための単一の一次治療として現在使用されている抗増殖剤(AraC)を組み合わせることが、白血病誘発階層における他の細胞に加えてCSCの標的化に向けたシナジー的利益をもつことを示す。

【0114】

(実施例14:DR抗体を使用した組み合わせ療法)

AML細胞はDR(DR1、DR2、DR3、DR4およびDR5)の一つに結合する一次抗体で処置され、そしてその後細胞毒性剤に接合された二次抗体(特異的に一次抗体を認識し結合する)で処置される。一次および二次抗体の順次結合は、DRを発現する細胞の特異的標的化および細胞毒性ペイロードの送達を可能にする。多数の細胞毒性薬剤が二次抗体に化学的に合体させることができる。

【0115】

リボソーム不活性化タンパク質、サボリンは二次抗体に結合され、そして受容体の内在化の際に細胞に侵入することができ、それによって細胞のリボソームを剥離させ不活性化し、それはタンパク質の阻害をもたらし、最終的には細胞死につながる。これらの順次投与された抗体は、チオリダジンおよびAraCの組み合わせ療法に類似しており、一次抗体はDRに結合し(チオリダジン様応答)、一方で二次抗体はサボリン細胞毒性効果(AraC様応答)を送達する。選択肢としてこの抗体システムは、細胞毒性剤に接合した単一のDR抗体に設計することができる。

【0116】

AML細胞を定義された期間(24時間)、この一次および二次抗体の組み合わせで処理した後、AML細胞はメチルセルロース条件で播種され、芽細胞CFUを生成し、そして二次抗体のみ(即ち、一次DR抗体無しで)で処理されたAML細胞と比較して採点された。一次DR抗体および二次サボリン結合抗体で処置された細胞は、二次抗体で処理した対照細胞に比較してAML芽細胞CFU生成を有意に減少させることが観察される。

【0117】

(実施例15:シタラビンおよびチオリダジンによる白血病細胞系の組み合わせ療法)

OCl-AML2およびOCl-AML3はAML患者由来の細胞系であり、培地 $100\mu\text{L}$ にウェル当たり25,000細胞で96平底ウェルプレートに播種された。細胞は標準的な培養培地中で、単一处置として、または $10\mu\text{M}$ のチオリダジンと組み合わせ

、 $0.01 - 1 \mu$ の範囲のシタラビン (AraC) のさまざまな濃度で24時間処理された。細胞は、次いで、蛍光生存能力染色7-アミノアクチノマイシンD (7AAD) で染色され、そして体積計測細胞数計数モードで動作するハイスループットスクリーニング (HTS) アダプタ付きのフローサイトメーターを用いて測定された。生細胞は7AAD染色に対して陰性であることに加えて、前方および側方散乱プロファイルを確立するゲート内イベントによって定義された。

【0118】

図19に示すように、シタラビンおよびチオリダジンの組み合わせでの処置は、白血病細胞系の生存率または増殖を低下させるのに非常に効果的である。試験されたAraCのすべての用量において、チオリダジンとの組み合わせは、AraC単独の処置と比較して有意に白血病細胞の数を減少させ、AraC + チオリダジン10 μ Mの組み合わせは、AraC自体よりも効果的に白血病細胞の生存率を減少させることを示した。さらに、試験されたAraCの各用量において、同一の白血病細胞レベルの減少が、チオリダジンとの組み合わせでは約10倍少ないAraCの使用により達成できた。AraCの有効性におけるこの10倍の増加は、AraCの化学療法を受けている患者への臨床的有益性を表し、そして例えば、チオリダジンと組み合わせて使用される場合、治療計画がより低用量のAraCの使用により、延長可能であることを示唆している。

10

【0119】

本発明は現在好適であると思われる事例を参照して記述されてきたが、本発明は開示された事例に制限されないことを理解するべきである。逆に、本発明は請求項の精神と範囲に含まれる種々の変形および等価のアレンジメントに及ぶことを意図している。

20

【0120】

全ての刊行物、特許および特許申請は、あたかもそれぞれの刊行物、特許および特許申請が特異的にかつ個別にその全体が参照により採り入れられるように、その全てがここに参照により採り入れられる。

【0121】

(参照)

[00131] References:

- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., *et al.* (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25, 803-816.
- 5 Beaulieu, J. M., and Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63, 182-217.
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W.,
10 Regev, A., and Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40, 499-507. 10
- Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5320-5325.
- 15 Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S.,
20 Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956. 20
- Breitman, T. R., Collins, S. J., and Keene, B. R. (1981). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* 57, 1000-1004.
- 25 Breitman, T. R., Selonick, S. E., and Collins, S. J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2936-2940.
- Burnett, A. K., Hills, R. K., Green, C., Jenkinson, S., Koo, K., Patel, Y.,
30 Guy, C., Gilkes, A., Milligan, D. W., Goldstone, A. H., *et al.* (2010). The impact on outcome of the addition of all-trans retinoic acid to intensive chemotherapy in younger patients with nonacute promyelocytic acute myeloid leukemia: overall results and results in genotypic subgroups defined by mutations in NPM1, FLT3, and CEBPA *Blood* 115, 948-956. 30
- 35 Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 102, 906-915.
- 40 Dalton, S. O., Johansen, C., Poulsen, A. H., Norgaard, M., Sorensen, H. T., McLaughlin, J. K., Mortensen, P. B., and Friis, S. (2006). Cancer risk

among users of neuroleptic medication: a population-based cohort study. *Br J Cancer* 95, 934-939.

- 5 Dalton, S. O., Mellekjaer, L., Thomassen, L., Mortensen, P. B., and Johansen, C. (2005). Risk for cancer in a cohort of patients hospitalized for schizophrenia in Denmark, 1969-1993. *Schizophr Res* 75,315-324.

Desbordes, S. C., Placantonakis, D. G., Ciro, A., Socci, N. D., Lee, G., Djaballah, H., and Studer, L. (2008). High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 602-612.

- 10 Diallo, J. S., Le Boeuf, F., Lai, F., Cox, J., Vaha-Koskela, M., Abdelbary, H., MacTavish, H., Waite, K., Falls, T., Wang, J., *et al.* (2010). A high-throughput pharmacoviral approach identifies novel oncolytic virus sensitizers. *Mol Ther* 18, 1123-1129.

- 15 Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.

Dick, J. E. (2009). Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* 27, 44-46.

- 20 Driver, J. A., Loggoscino, G., Buring, J. E., Gaziano, J. M., and Kurth, T. (2007). A prospective cohort study of cancer incidence following the diagnosis of Parkinson's disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1260-1265.

- 25 Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E. R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K. H., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., *et al.* (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine* doi:10.1038/nm.2415.

Estey, E., and Dohner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368, 1894-1907.

- 30 Estey, E. H., Thall, P. F., Pierce, S., Cortes, J., Beran, M., Kantarjian, H., Keating, M. J., Andreeff, M., and Freireich, E. (1999). Randomized phase II study of fludarabine + cytosine arabinoside + idarubicin +/- all-trans retinoic acid +/- granulocyte colony-stimulating factor in poor prognosis newly diagnosed acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 93, 2478-2484.

- 35 Fibach, E., Hayashi, M., and Sachs, L. (1973). Control of normal differentiation of myeloid leukemic cells to macrophages and granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 343-346.

Frese, K. K., and Tuveson, D. A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7, 645-658.

- 40 Friend, C., Scher, W., Holland, J. G., and Sato, T. (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus- induced leukemic cells in vitro:

10

20

30

stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 378-382.

Grant, Steven. New agents for AML and MDS. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 22 (2009) 501-507.

- 5 Guan, Y., Gerhard, B., and Hogge, D. E. (2003). Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 101, 3142-3149.

- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., and Lander, E. S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138, 645-659. 10

Hotta, A., Cheung, A. Y., Farra, N., Vijayaragavan, K., Seguin, C. A., Draper, J. S., Pasceri, P., Maksakova, I. A., Mager, D. L., Rossant, J., *et al.* (2009). Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods* 6, 370-376.

- 15 Inglese, J., Shamu, C. E., and Guy, R. K. (2007). Reporting data from high-throughput screening of small-molecule libraries. *Nat Chem Biol* 3, 438-441.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300.

- 20 Jordan, C. T. (2009). Cancer stem cells: controversial or just misunderstood? *Cell Stem Cell* 4, 203-205. 20

Koistinen P *et al.*, Regulation of the acute myeloid leukemia cell line OCI/AML-2 by endothelial nitric oxide synthase under the control of a vascular endothelial growth factor signaling system. *Leukemia*. 2001 Sep;15(9):1433-41. 25

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., and Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.

- 30 Lee, J. Y., Nakada, D., Yilmaz, O. H., Tothova, Z., Joseph, N. M., Lim, M. S., Gilliland, D. G., and Morrison, S. J. (2010). mTOR activation induces tumor suppressors that inhibit leukemogenesis and deplete hematopoietic stem cells after Pten deletion. *Cell Stem Cell* 7, 593-605. 30

- Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M. F., Hilsenbeck, S. G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G. C., *et al.* (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 100, 672-679.

- Little, K. Y., Elmer, L. W., Zhong, H., Scheys, J. O., and Zhang, L. (2002). Cocaine induction of dopamine transporter trafficking to the plasma membrane. *Mol Pharmacol* 61, 436-445. 40

Nasr, R., Guillemin, M. C., Ferhi, O., Soilihi, H., Peres, L., Berthier, C., Rousselot, P., Robledo-Sarmiento, M., Lallemand-Breitenbach, V.,

- Gourmel, B., *et al.* (2008). Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med* **14**, 1333-1342.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391.
- Niu, C., Yan, H., Yu, T., Sun, H. P., Liu, J. X., Li, X. S., Wu, W., Zhang, F. Q., Chen, Y., Zhou, L., *et al.* (1999). Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* **94**, 3315-3324.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-376.
- William B. Parker "Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer" *Chem Rev.* 2009 July; **109**(7): 2880-2893.
- Raj, L., Ide, T., Gurkar, A. U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N. J., Golub, T. R., Carr, S. A., Shamji, A. F., *et al.* (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* **475**, 231-234.
- Recher, C., Beyne-Rauzy, O., Demur, C., Chicanne, G., Dos Santos, C., Mas, V. M., Benzaquen, D., Laurent, G., Huguet, F., and Payrastre, B. (2005). Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* **105**, 2527-2534.
- Regenthal, R., Krueger, M., Koepfel, C., and Preiss, R. (1999). Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. *J Clin Monit Comput* **15**, 529-544.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.
- Sachs, L. (1978a). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature* **274**, 535-539.
- Sachs, L. (1978b). The differentiation of myeloid leukaemia cells: new possibilities for therapy. *Br J Haematol* **40**, 509-517.
- Sanz, M. A. (2006). Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 147-155.
- Sanz, M. A., Grimwade, D., Tallman, M. S., Lowenberg, B., Fenaux, P., Estey, E. H., Naoe, T., Lengfelder, E., Buchner, T., Dohner, H., *et al.* (2009). Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **113**, 1875-1891.

- Seeman, P., and Lee, T. (1975). Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 188, 1217-1219.
- Self, D. W., Barnhart, W. J., Lehman, D. A., and Nestler, E. J. (1996). Opposite modulation of cocaine- seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists. *Science* 271, 1586-1589.
- Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 6, 813-823.
- Sibley, D. R., and Monsma, F. J., Jr. (1992). Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13, 61-69. 10
- Smith, B. D., Levis, M., Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K. M., Dausess, T., Allebach, J., and Small, D. (2004). Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 103, 3669-3676. 15
- Smith, T. J., Khatcheressian, J., Lyman, G. H., Ozer, H., Armitage, J. O., Balducci, L., Bennett, C. L., Cantor, S. B., Crawford, J., Cross, S. J., *et al.* (2006). 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 24, 3187-3205. 20
- Taussig, D. C., Miraki-Moud, F., Anjos-Afonso, F., Pearce, D. J., Allen, K., Ridler, C., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S. G., *et al.* (2008). Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 112, 568-575. 25
- Tefferi *et al.* *Cancer*, September 1st, pp. 3842-3847 (2009)
- Vannucchi *et al.* *Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms CA Cancer J. Clin.* 2009; 59:171-191
- Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768. 30
- Wang, Z. Y., and Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111, 2505-2515. 30
- Werbowski-Ogilvie, T. E., Bosse, M., Stewart, M., Schnerch, A., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Wynder, T., Smith, M. J., Dingwall, S., Carter, T., *et al.* (2009). Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol* 27, 91-97. 35
- Xu, R. H., Chen, X., Li, D. S., Li, R., Addicks, G. C., Glennon, C., Zwaka, T. P., and Thomson, J. A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 20, 1261-1264. 40

- Yilmaz, O. H., Valdez, R., Theisen, B. K., Guo, W., Ferguson, D. O., Wu, H., and Morrison, S. J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 441, 475-482.
- 5 Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.
- Yoshida, H., Kitamura, K., Tanaka, K., Omura, S., Miyazaki, T., Hachiya, T., Ohno, R., and Naoe, T. (1996). Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all- trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 2945-2948. 10
- Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Hadjimitova, V., Ishikawa, M., Shinohara, Y., and Baba, Y. (2004). Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 53, 267-275. 15
- Zheng, R., Friedman, A. D., and Small, D. (2002). Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations. *Blood* 100, 4154-4161. 20
- Zhu, J., Koken, M. H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M. K., Degos, L., Wang, Z. Y., Chen, Z., and de Thé, H. (1997). Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3978-3983. 20

【 図 1 】

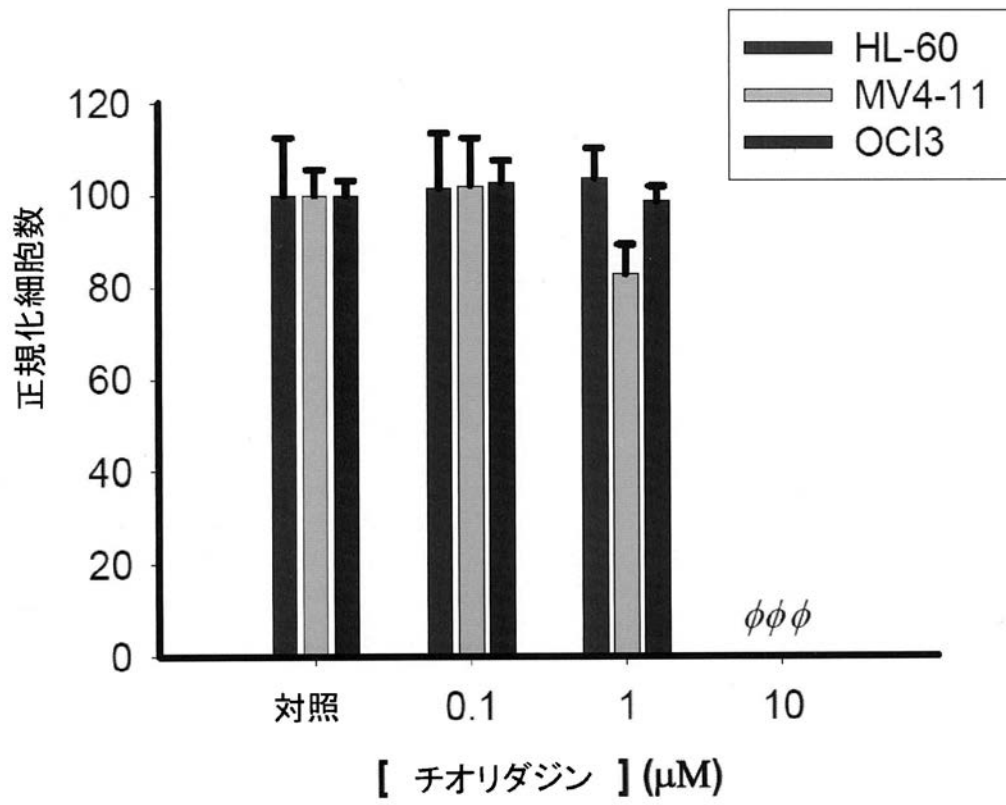


FIG. 1

【図 2】

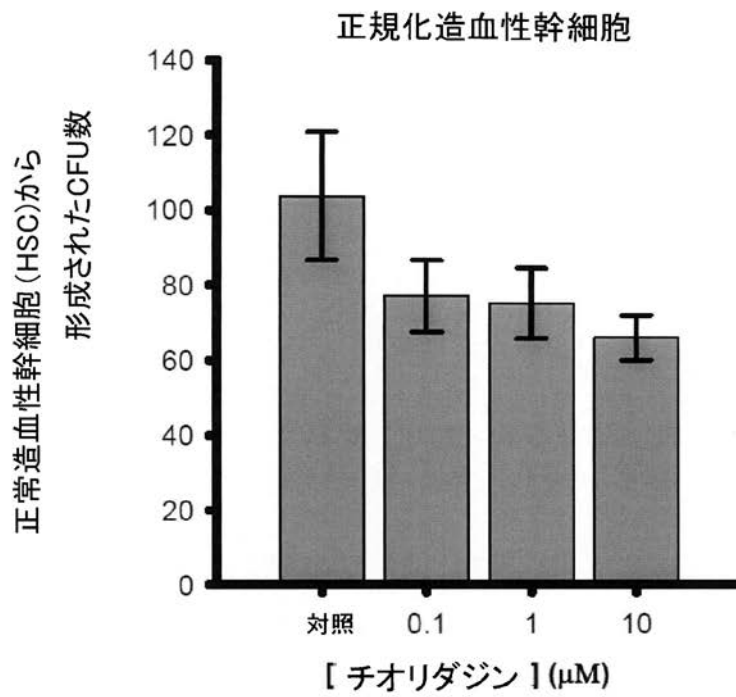
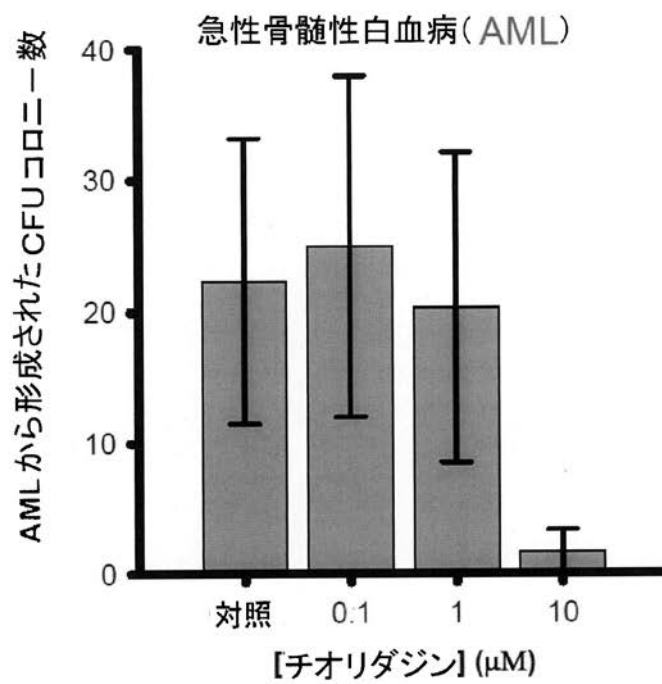
A**B**

FIG. 2

【図 3 - 4】

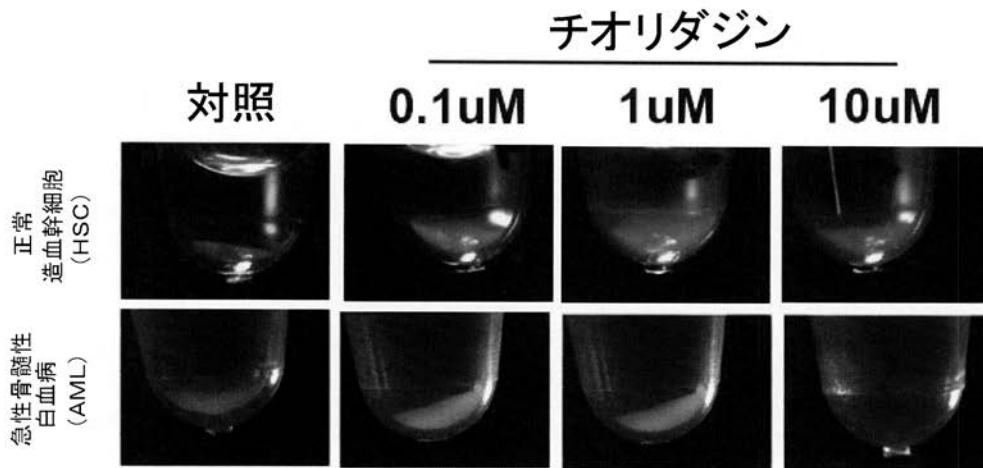
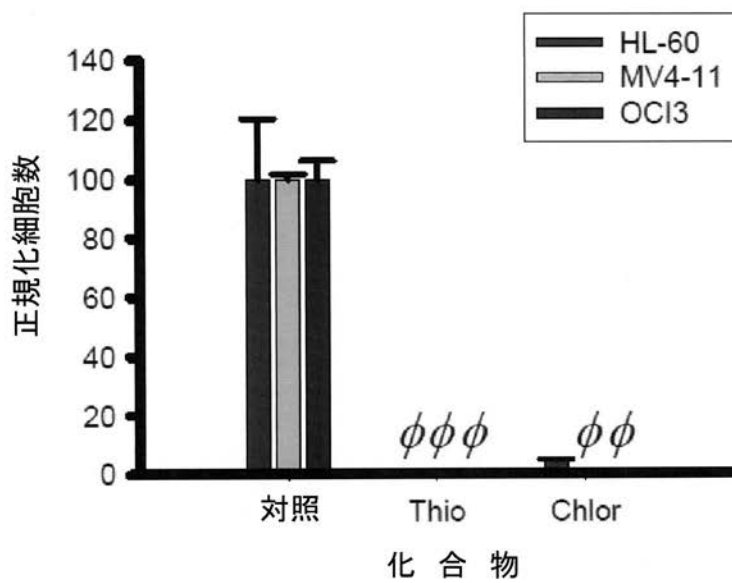


FIG. 3



Thio = チオリダジン 10uM

Chlor = クロルプロマジン 10uM

FIG. 4

【 図 5 】

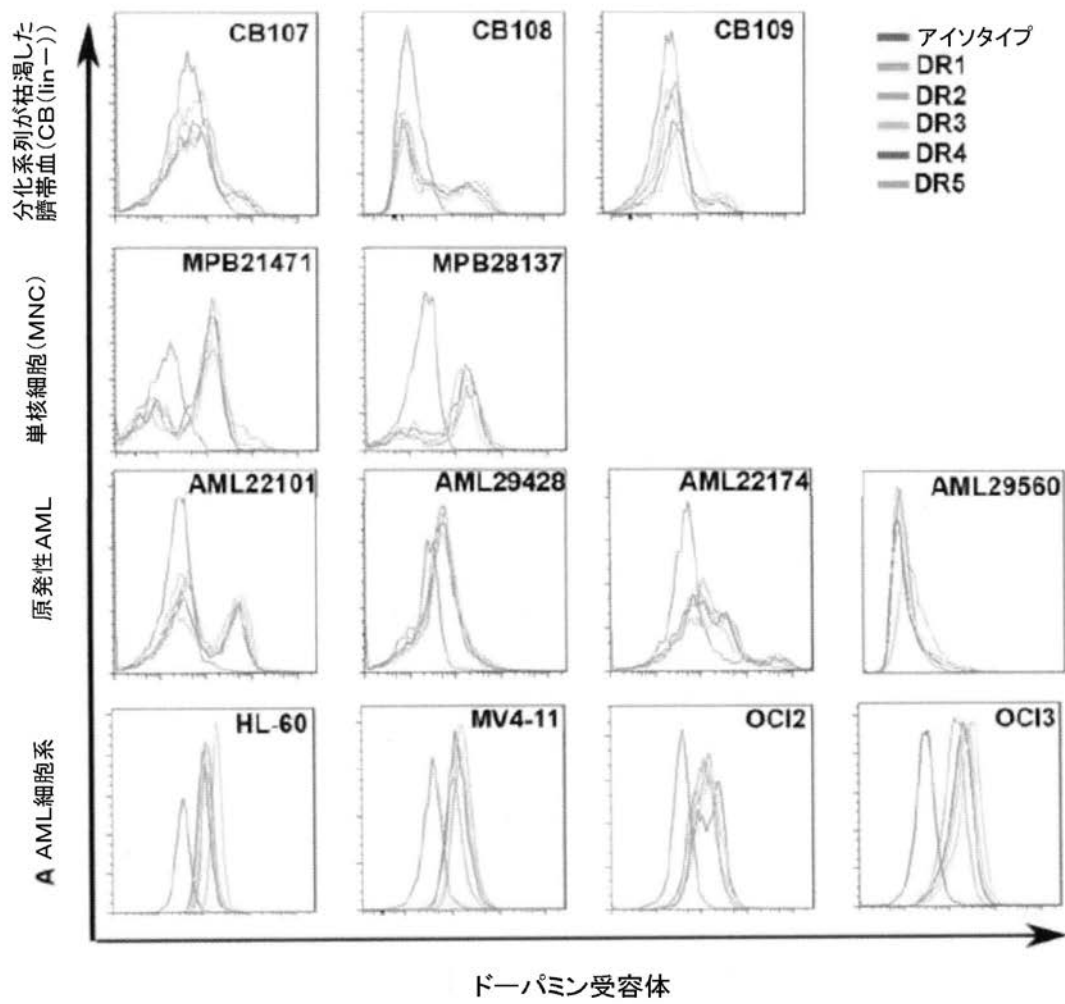


FIG. 5

【 図 6 】

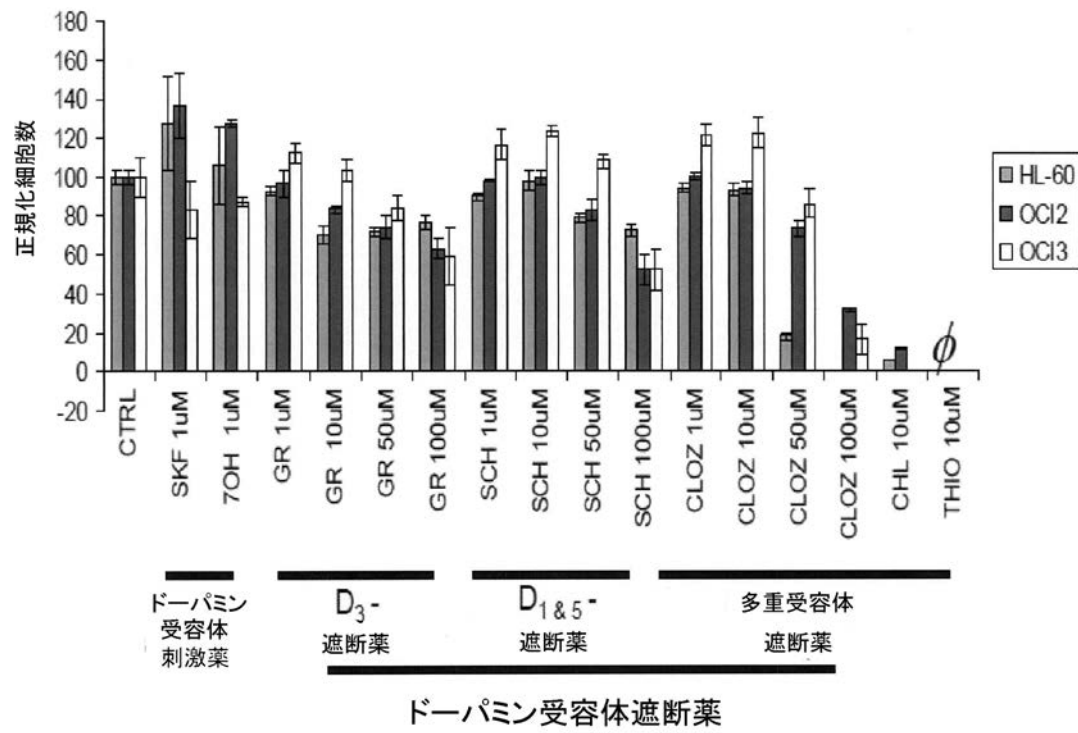


FIG. 6

【図 7 - 8】

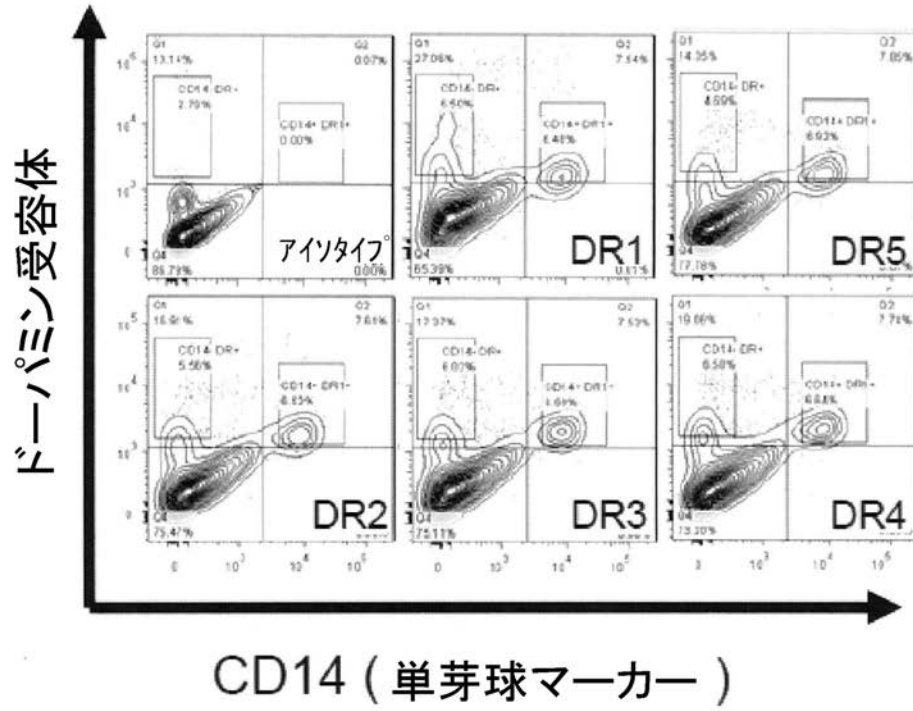


FIG. 7

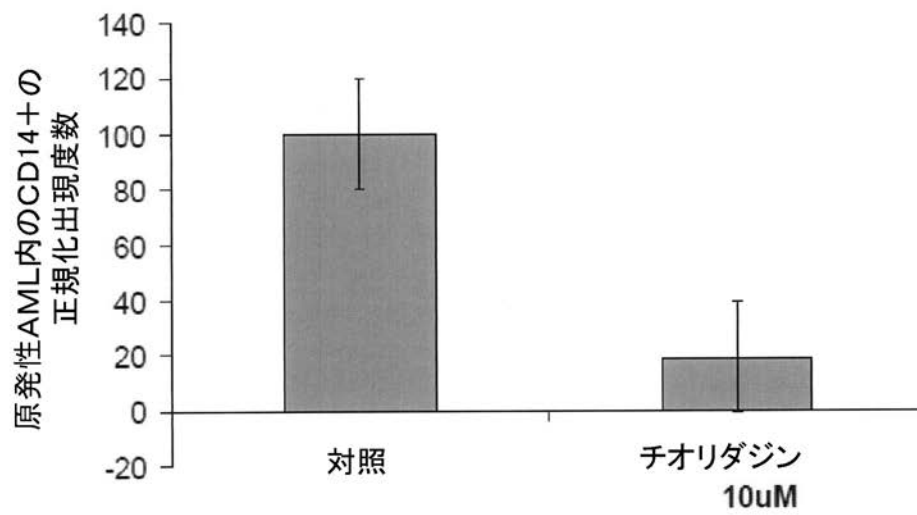


FIG. 8

【図 9 A - C】

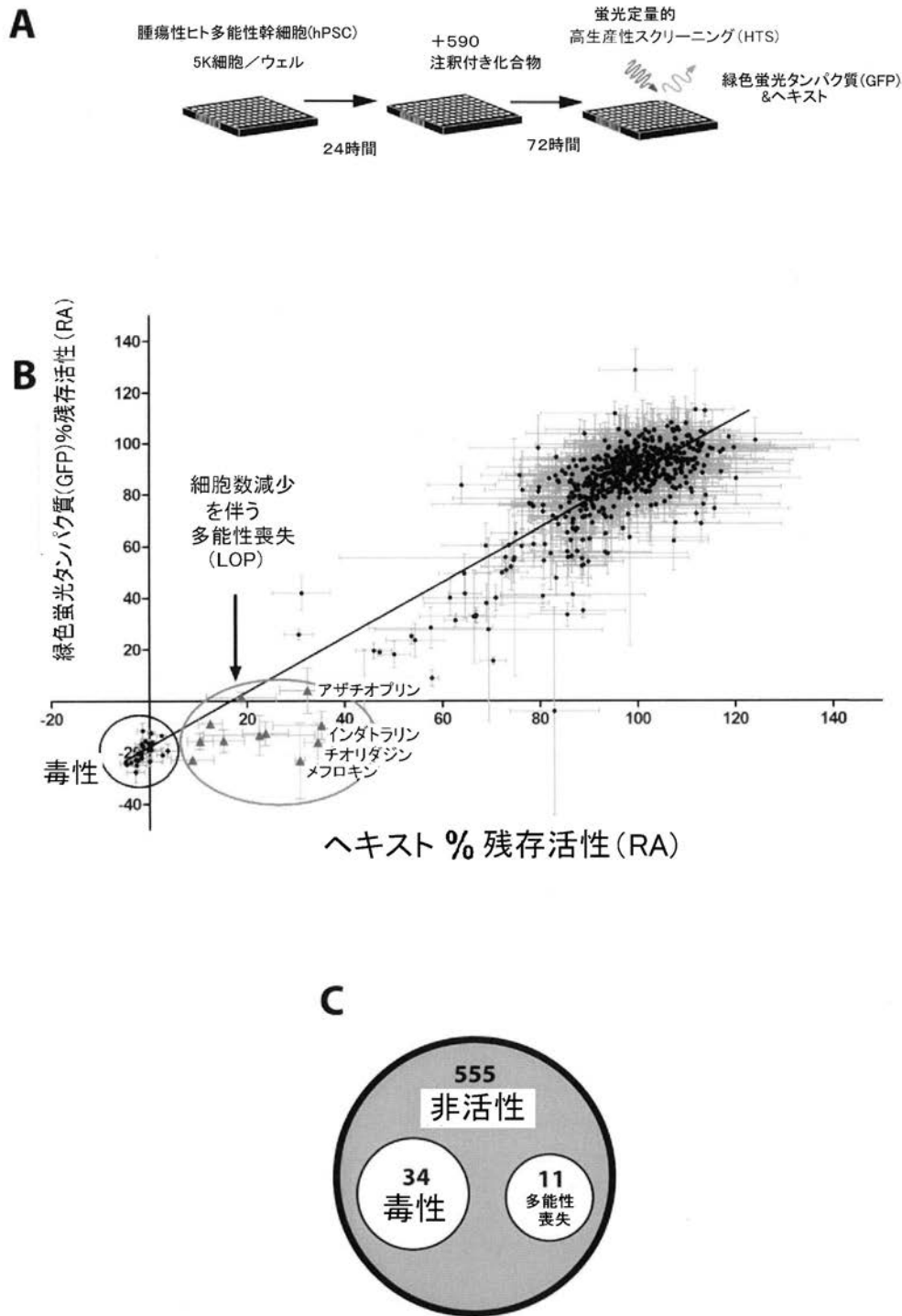


FIG. 9

【図 9 D - G】

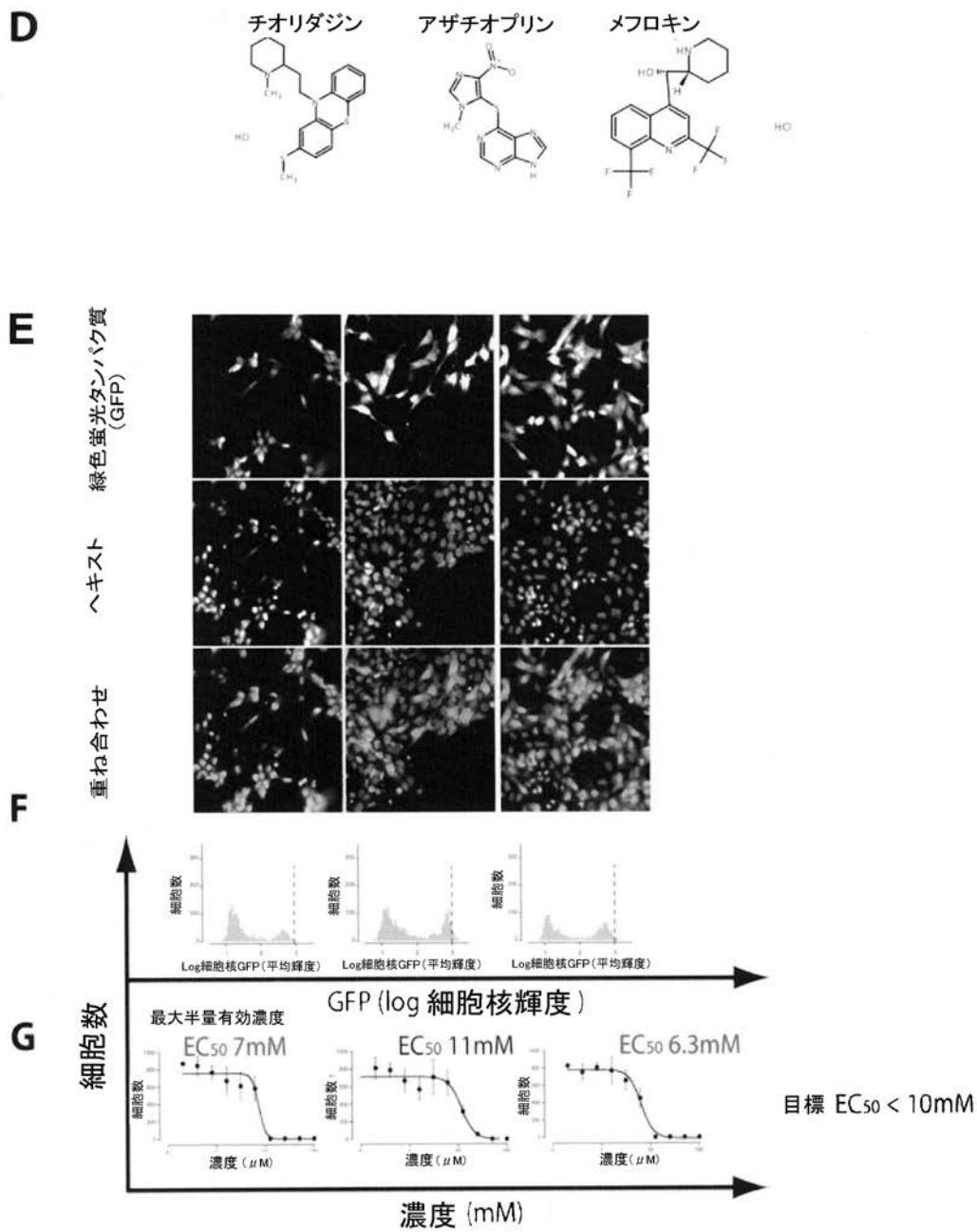


FIG. 9 (CONTINUED)

【図 10 A - C】

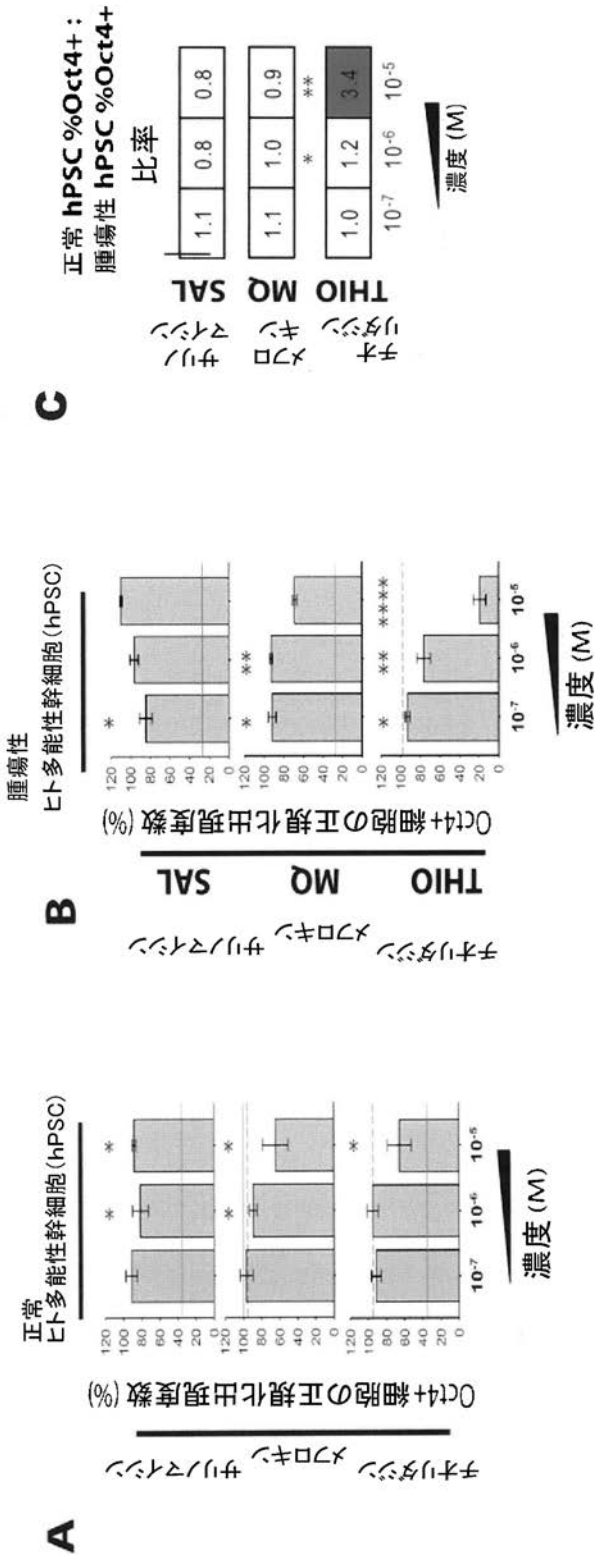


FIG. 10

【図 10 D - H】

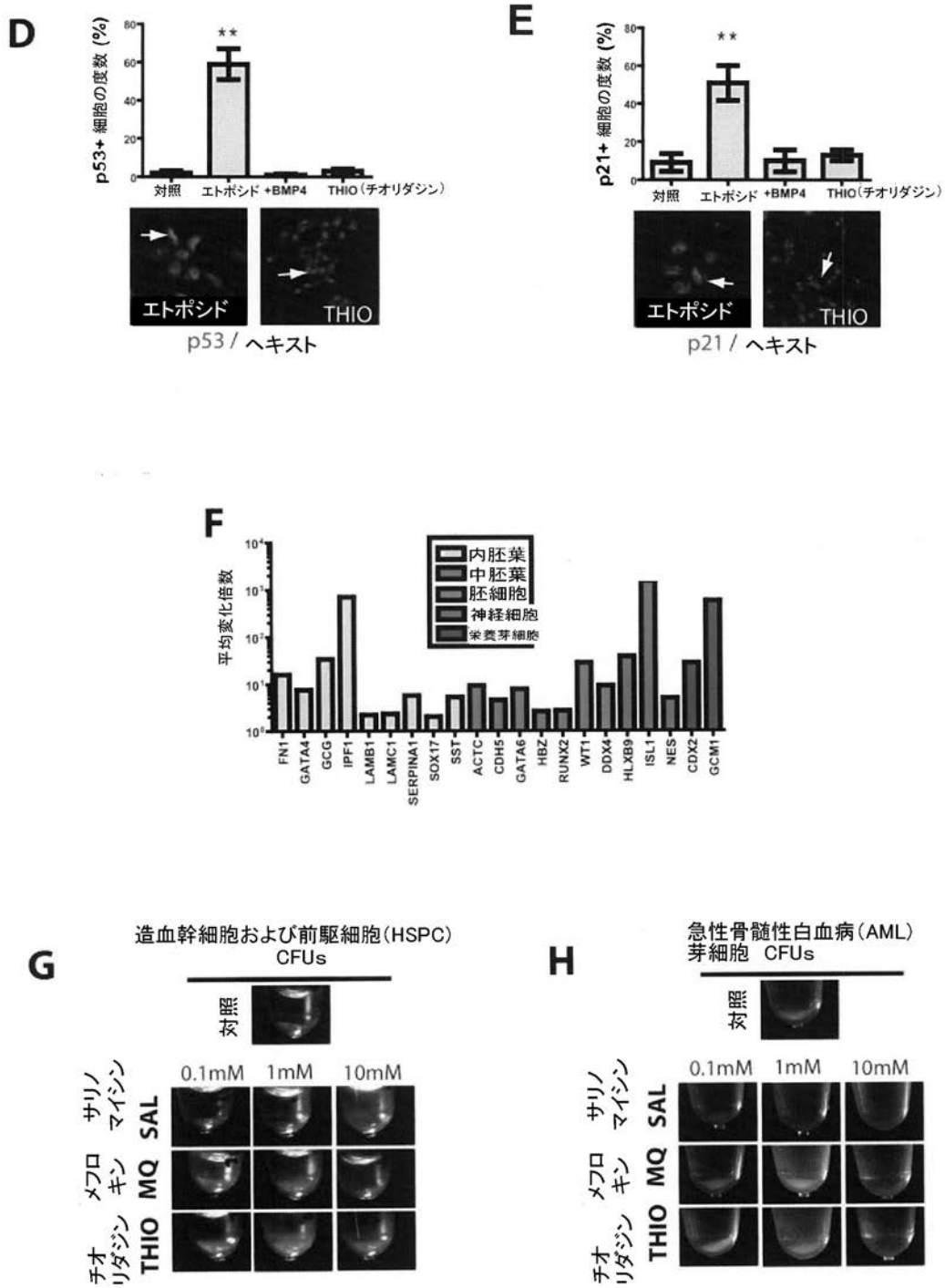


FIG. 10 (CONTINUED)

【図 10 I - L】

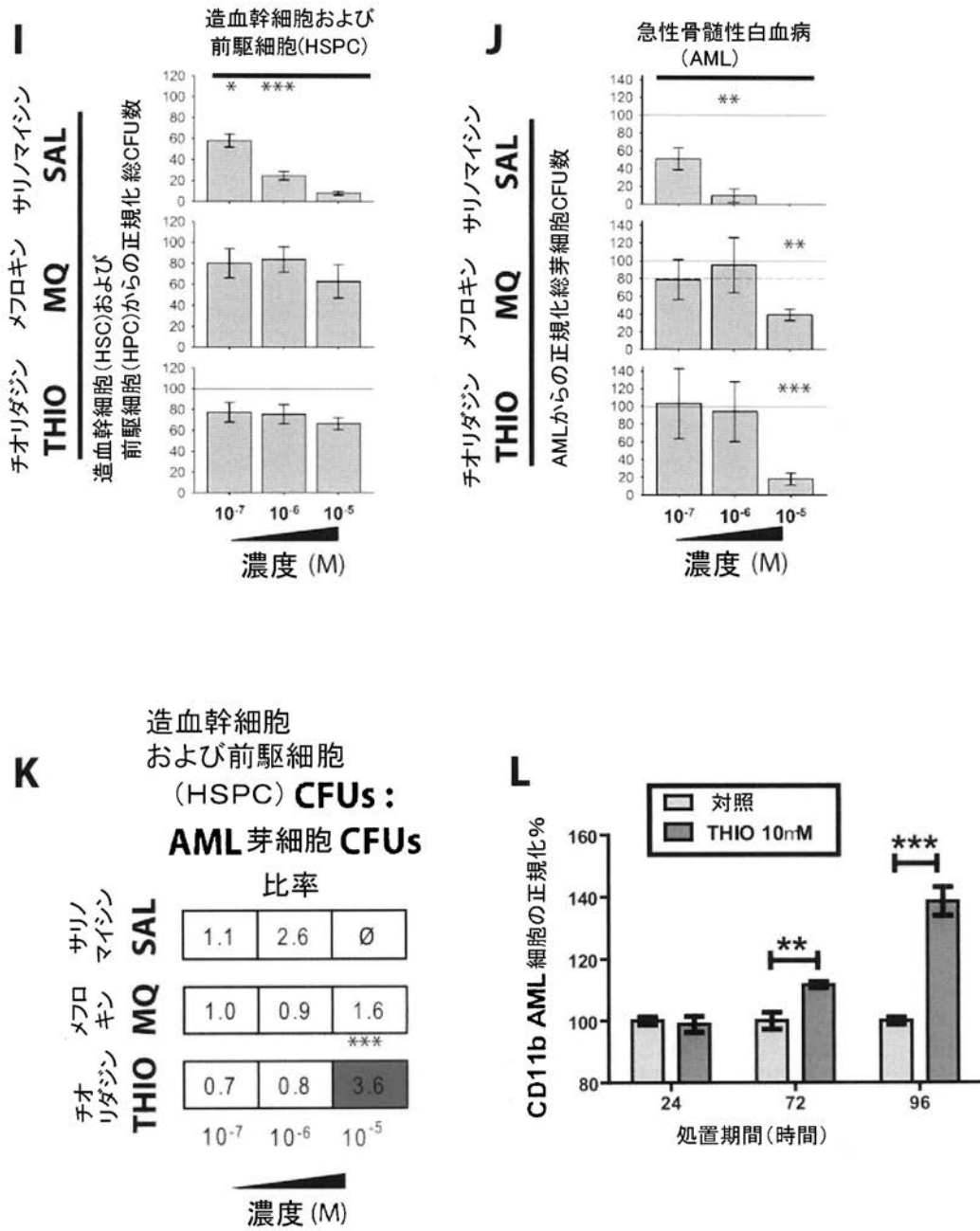


FIG. 10 (CONTINUED)

【図 11 A - B】

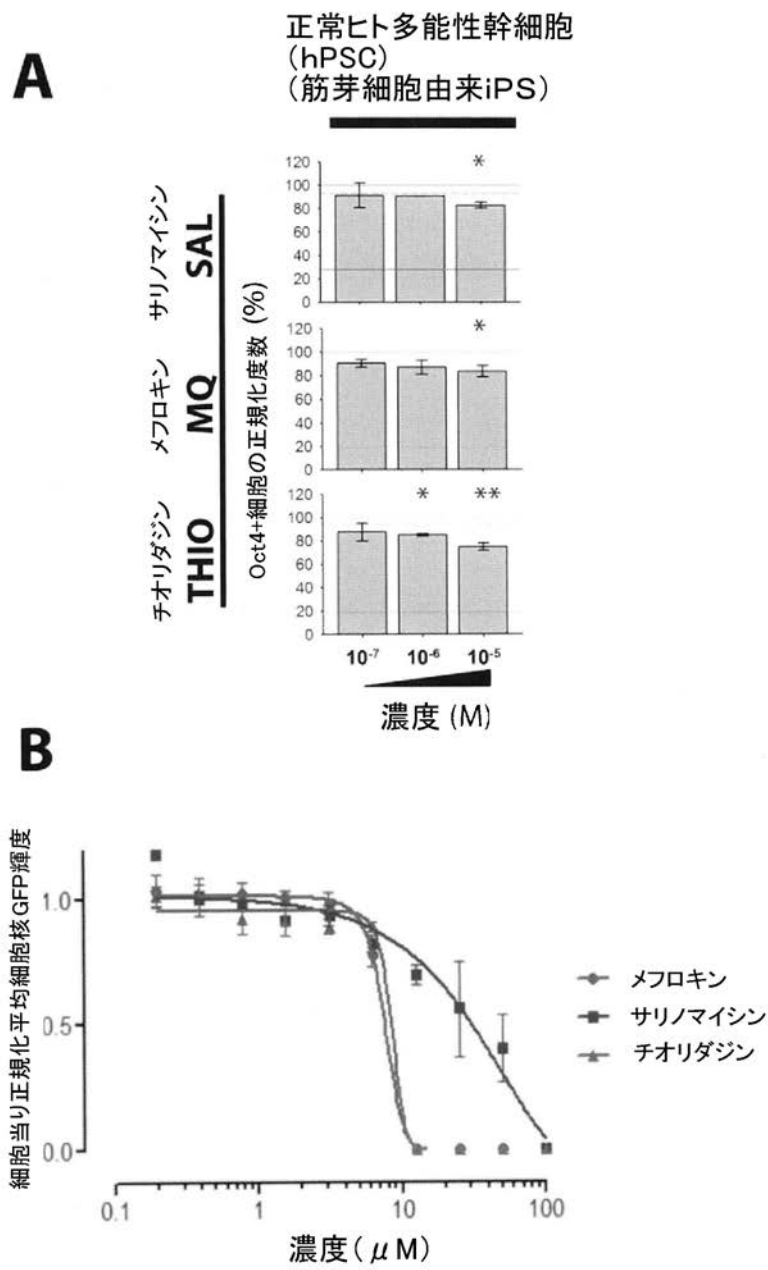


FIG. 11

【図 11 C - D】

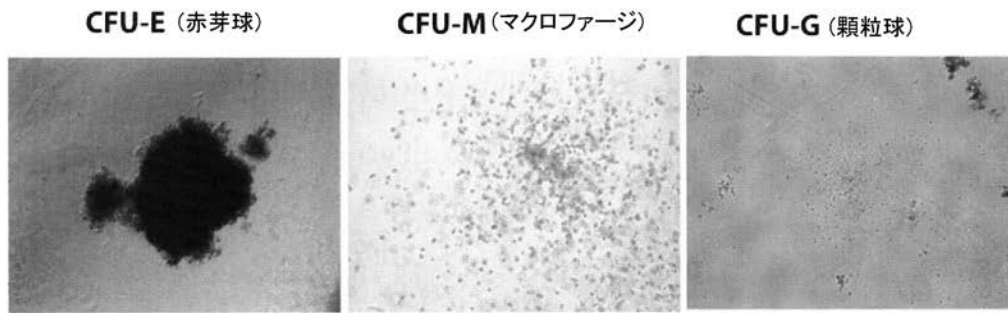
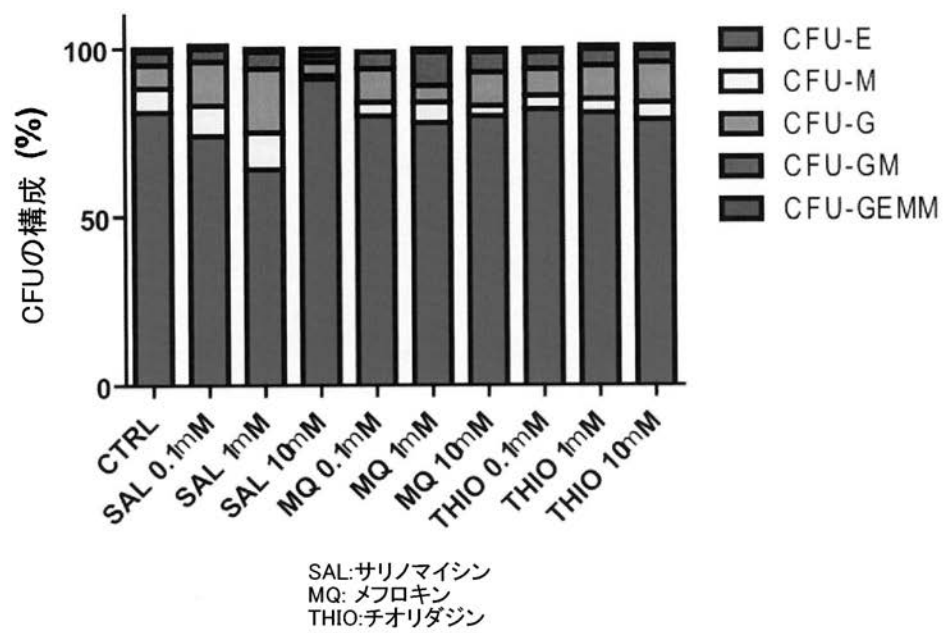
C**D**

FIG. 11 (CONTINUED)

【図 12 A - B】

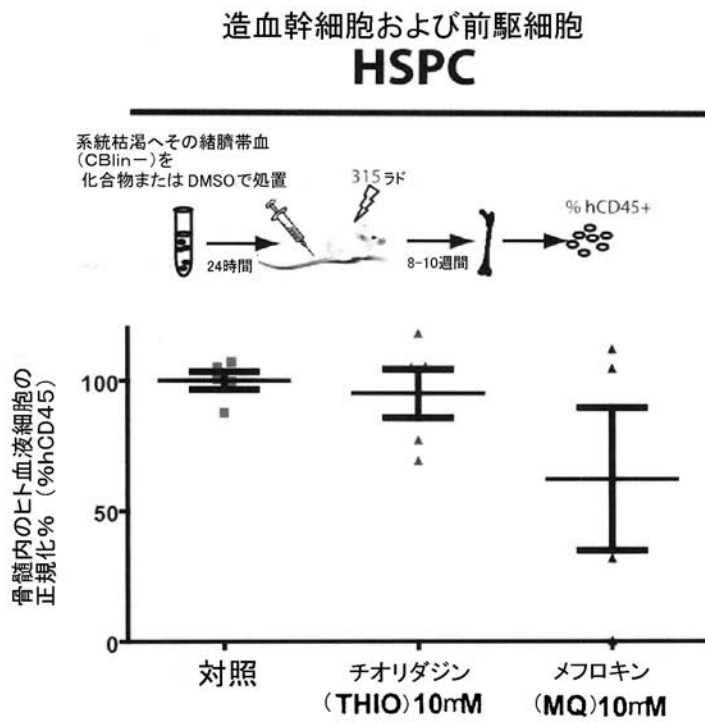
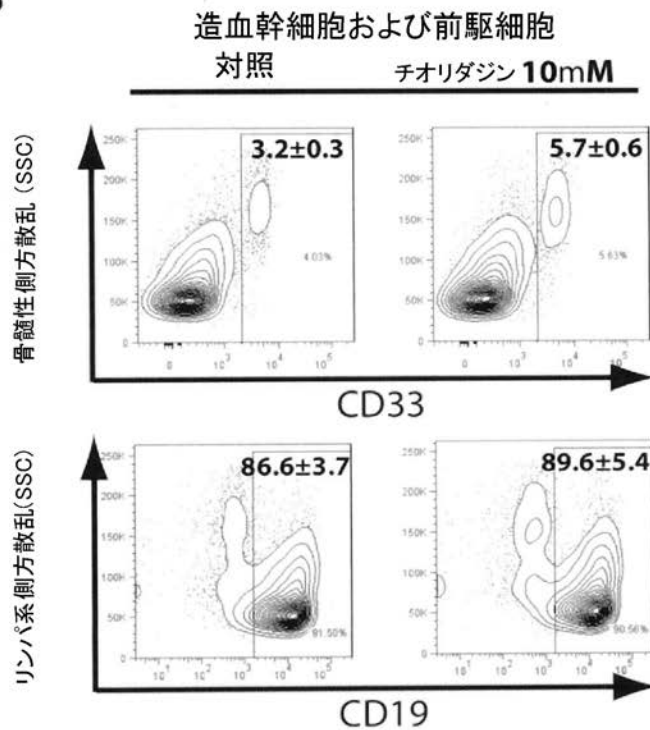
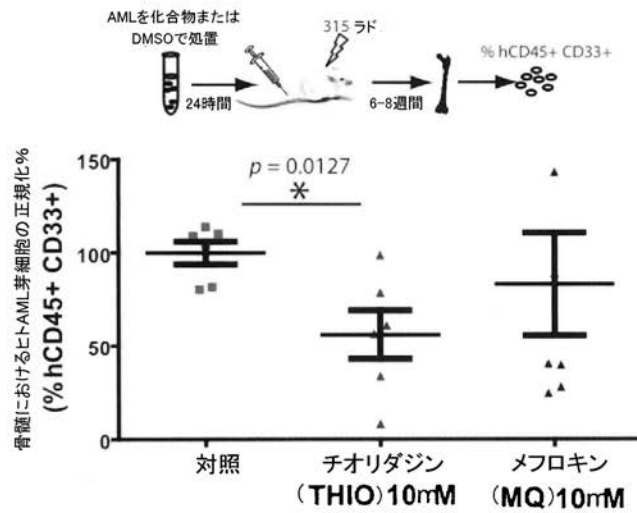
A**B**

FIG. 12

【図 1 2 C - E】

C

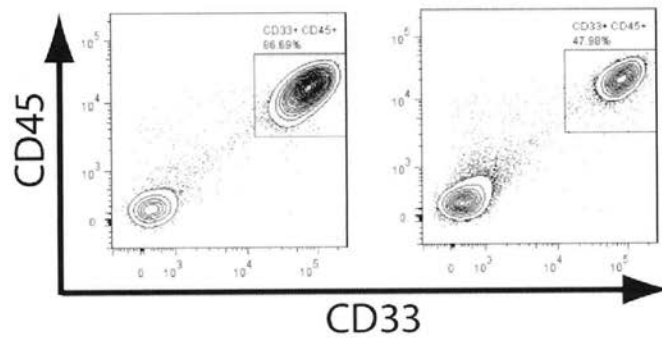
急性骨髄性白血病(AML)

**D**

急性骨髄性白血病(AML)

対照

チオリダジン 10mM

**E**

造血幹細胞および
前駆細胞(HSPC) hCD45:
AML CD33 hCD45
比率

サリノ マイシン	メフロ キン	チオリダ ジン
SAL	MQ	THIO
		*
N/A	0.7	1.7

FIG. 12 (CONTINUED)

【図 13 A - C】

A

系統枯渇へその緒臍帯血 (CBlin-)
を サリノマイシン 1mM
または DMSO で処置

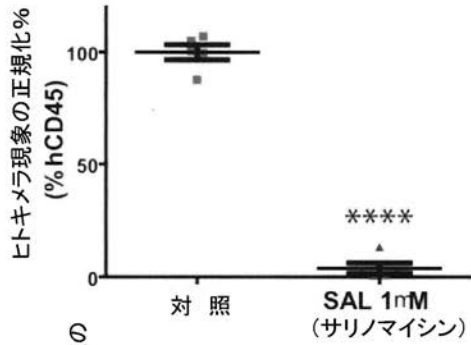
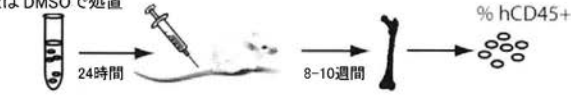
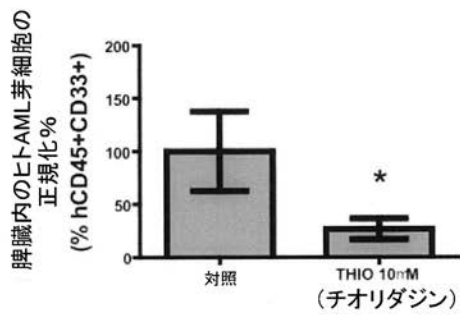
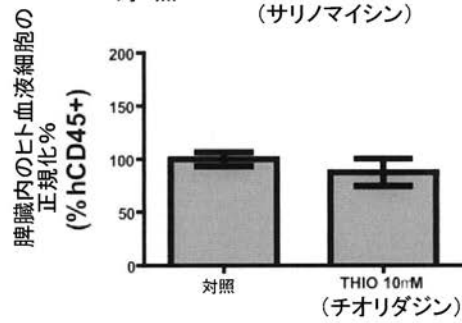
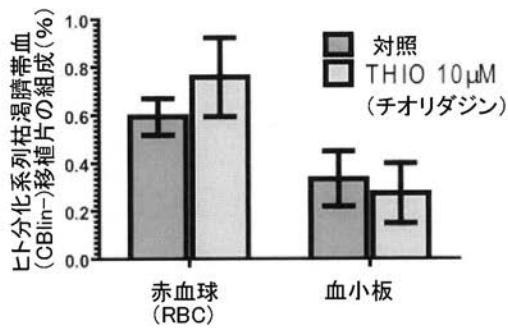
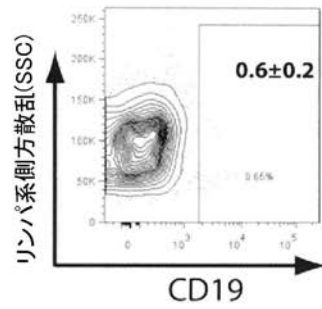
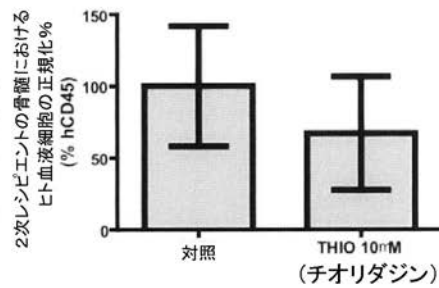
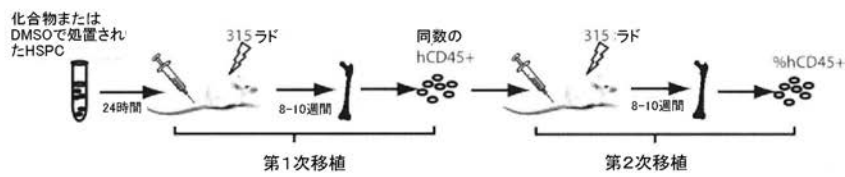
**B****C**

FIG. 13

【図 13 D - F】

D**E**

造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)

**F**

急性骨髄性白血病(AML)

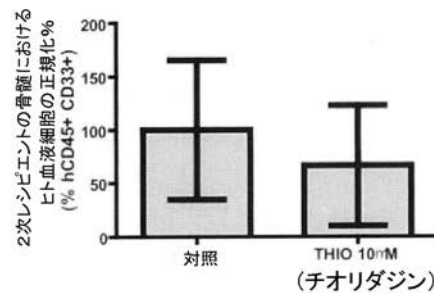
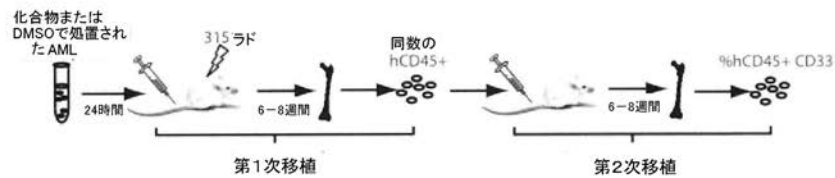
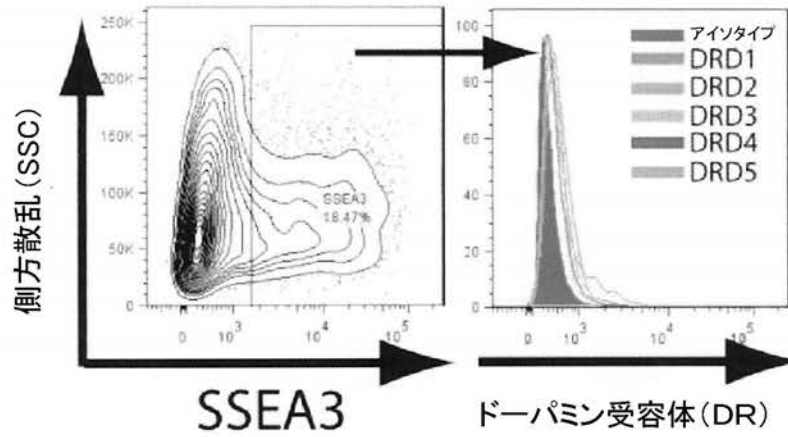


FIG. 13 (CONTINUED)

【図 14 A - B】

A

正常ヒト多能性幹細胞(hPSC)

**B**

腫瘍性ヒト多能性幹細胞(hPSC)

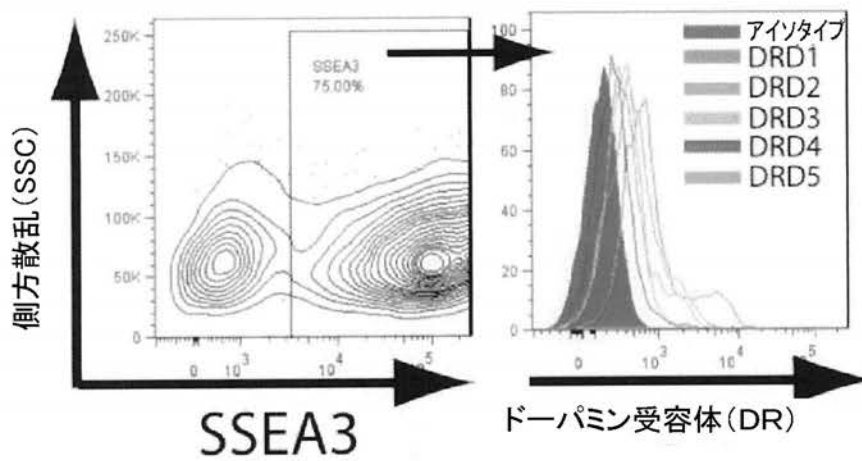


FIG. 14

【図 14 C - D】

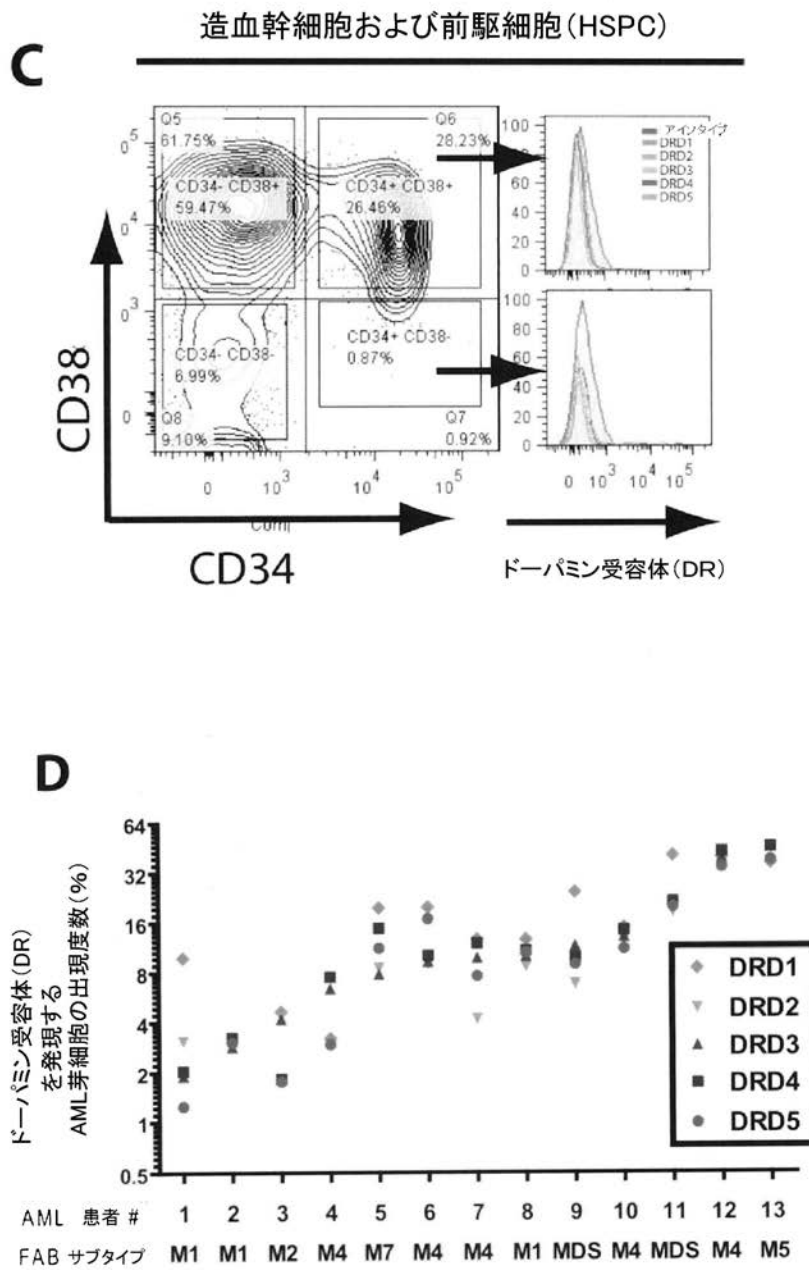


FIG. 14 (CONTINUED)

【図 1 4 E - F】

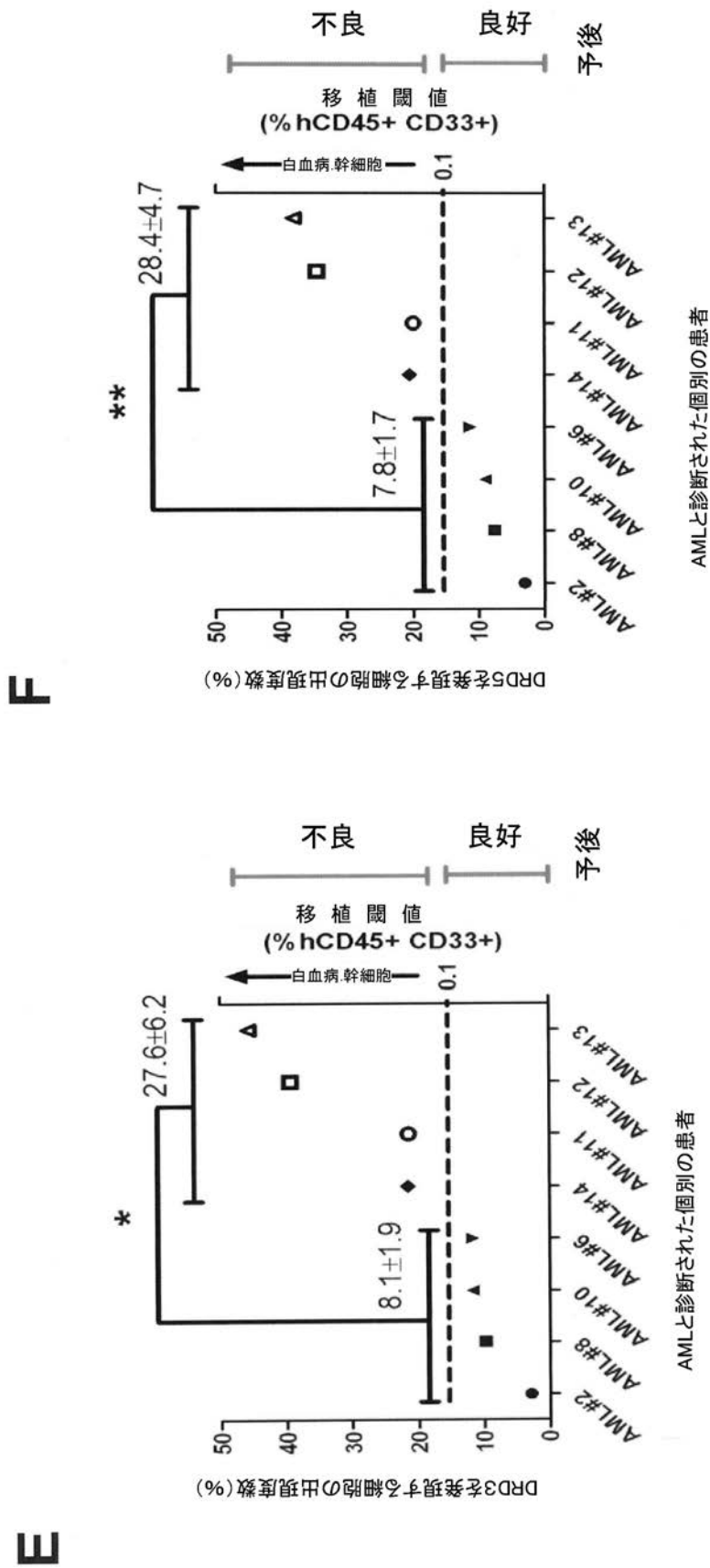
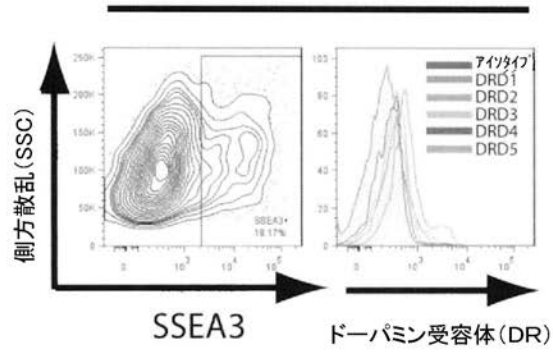


FIG. 14 (CONTINUED)

【図 15 A - C】

A

線維芽細胞由来iPSC

**B**

臍帯血由来iPSC

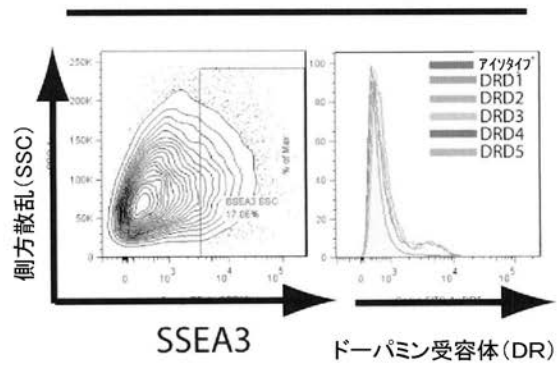
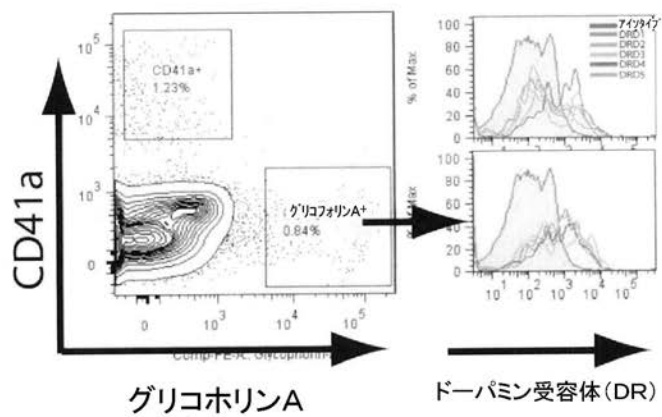
**C**

FIG. 15

【図15D - E】

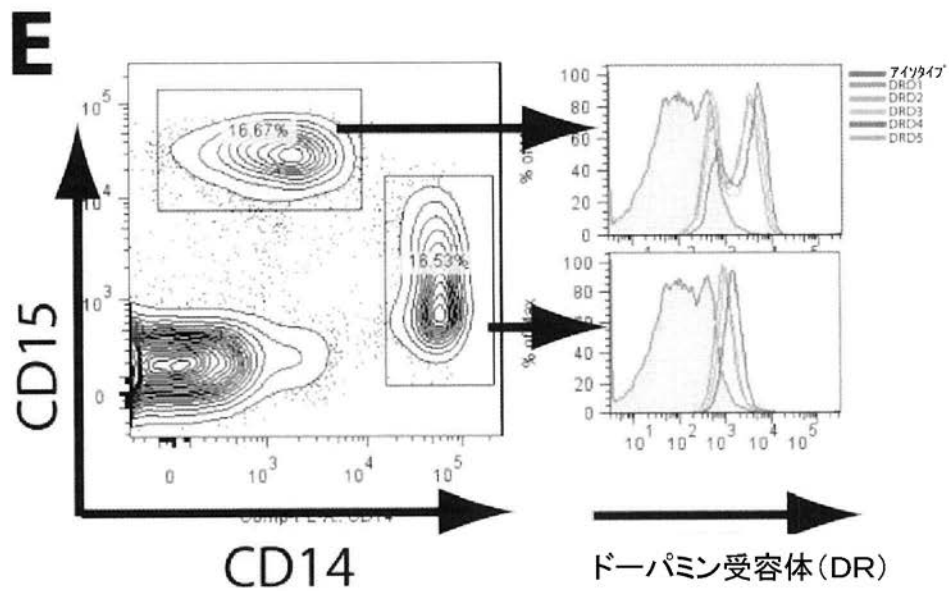
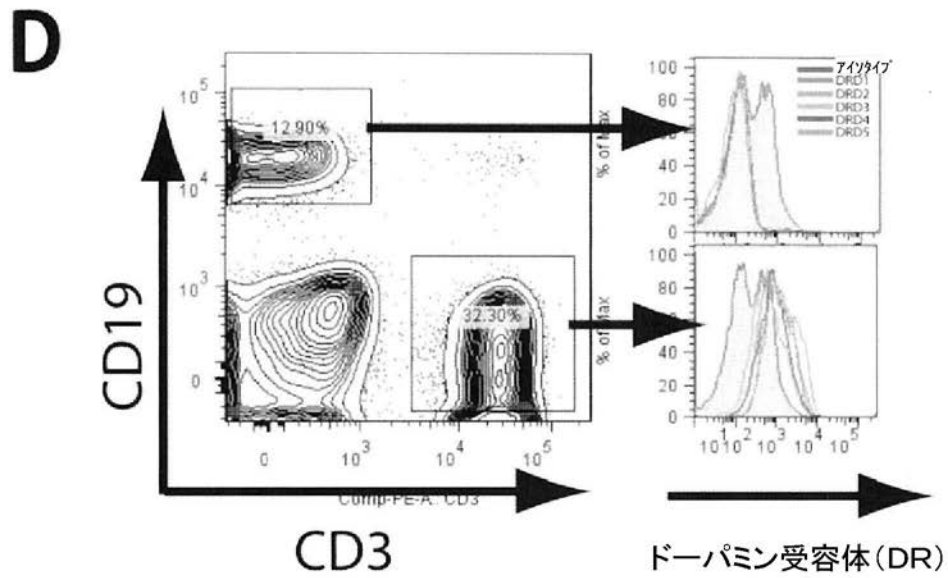


FIG. 15 (CONTINUED)

【図 15 F - G】

F

細胞タイプ	ドーパミン受容体 (DR)
巨核球	-
赤血球	-
顆粒球	+
単球	++
B細胞	-
T細胞	-

G

急性骨髄性白血病 (AML)

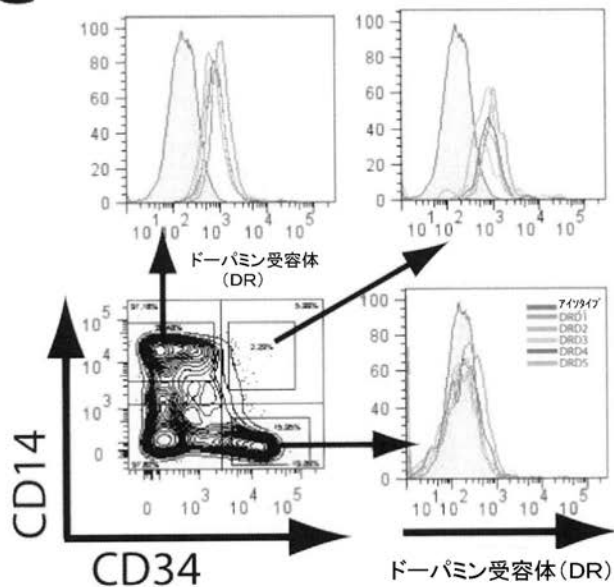


FIG. 15 (CONTINUED)

【図 16 A - B】

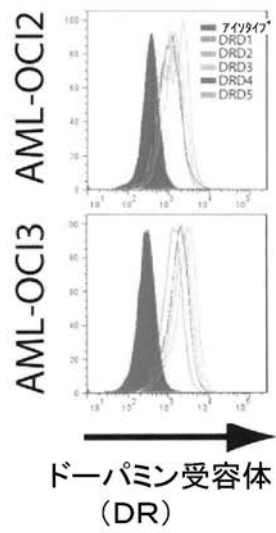
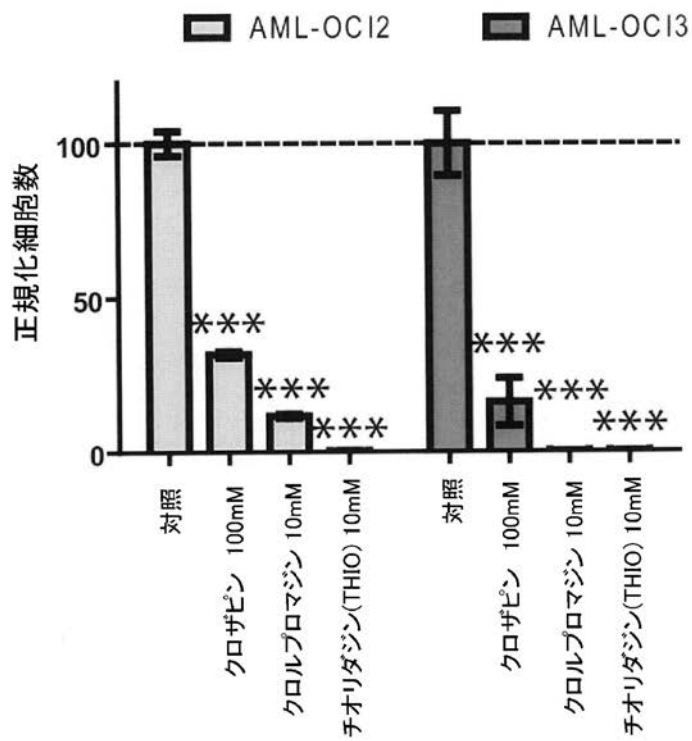
A**B**

FIG. 16

【図 16 C - D】

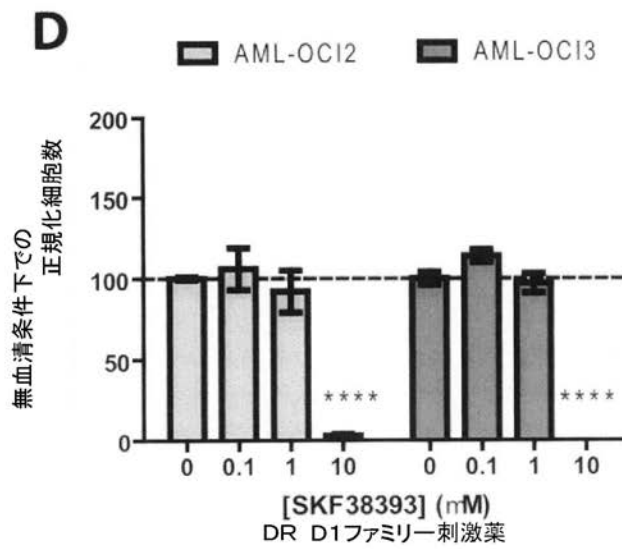
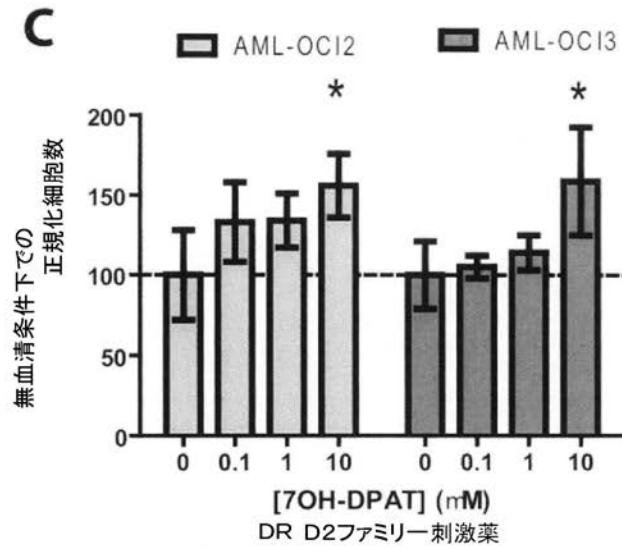
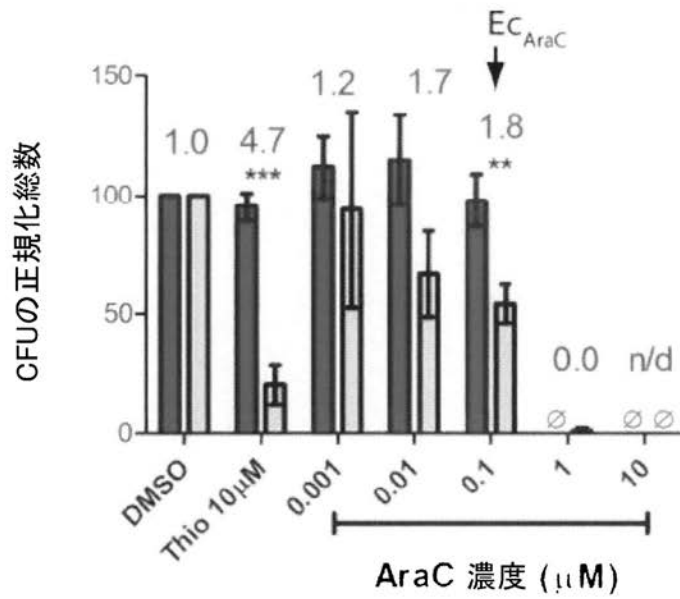
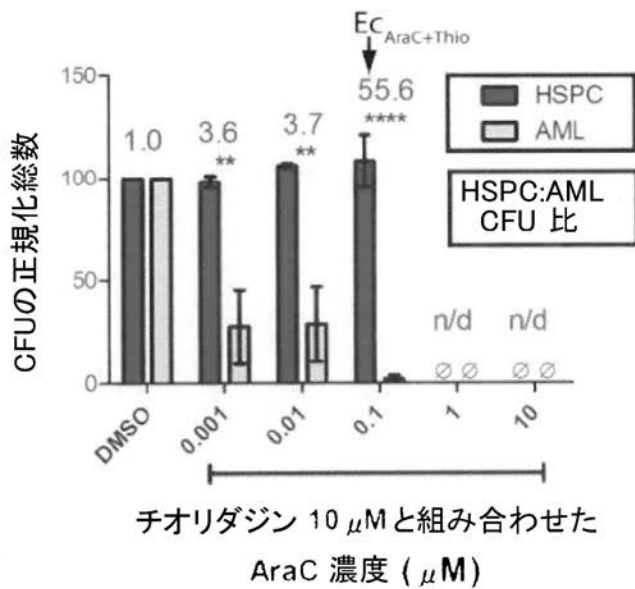


FIG. 16 (CONTINUED)

【図 16 E - F】

E**単一薬剤処置****F****組み合わせ薬剤処置****FIG. 16 (CONTINUED)**

【図 17】

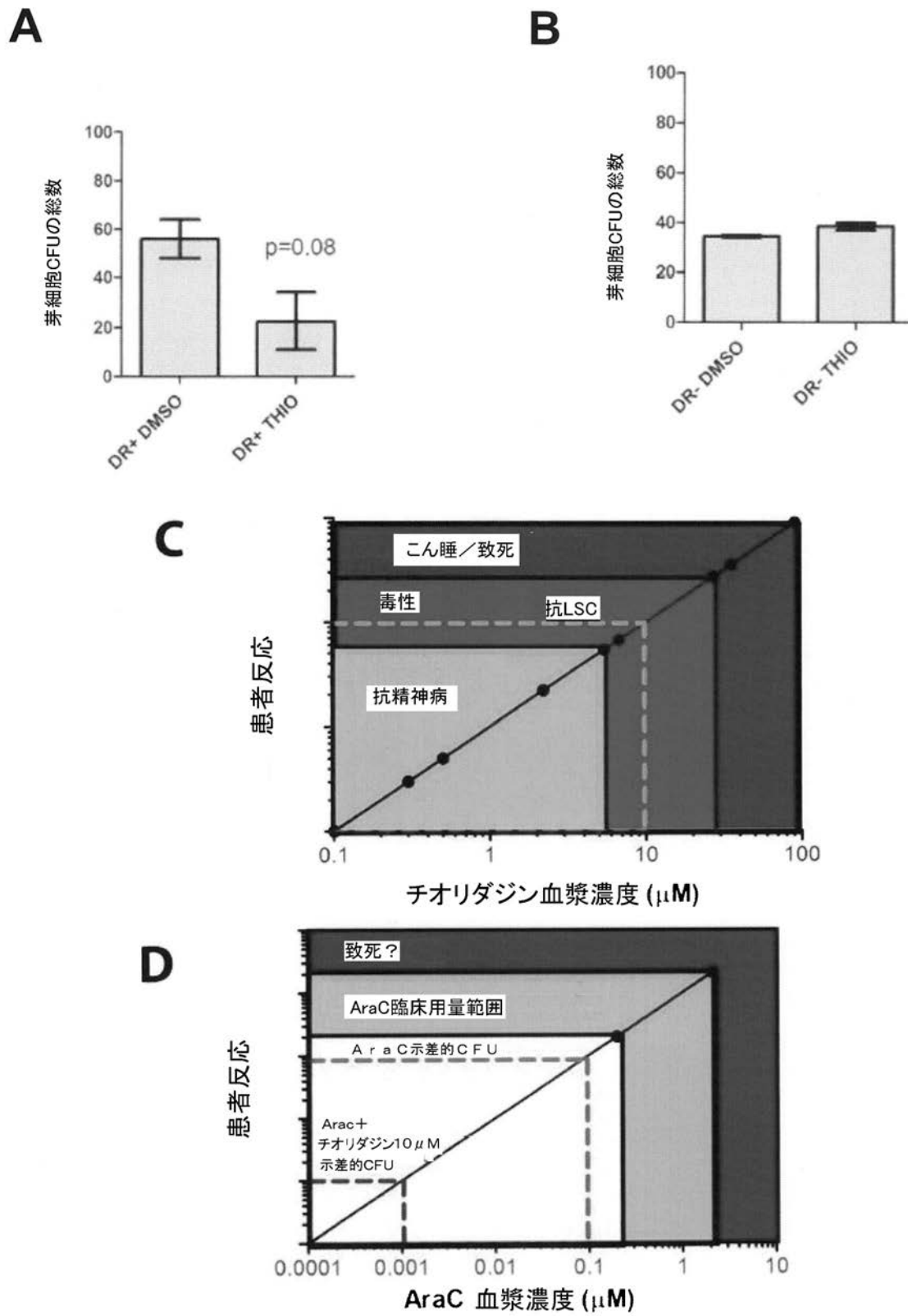
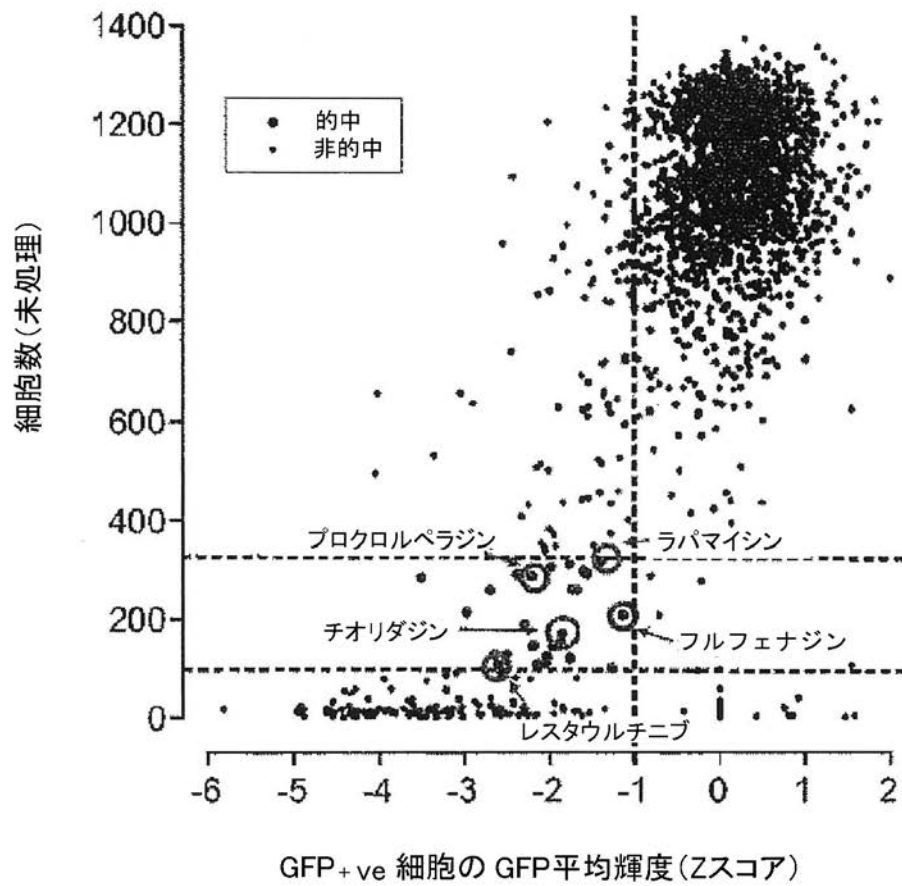


FIG. 17

【図 18 A】

A**FIG. 18**

【図 18 B - E】

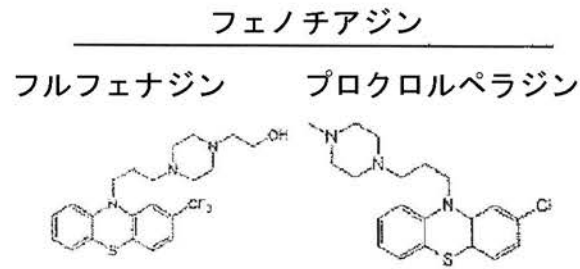
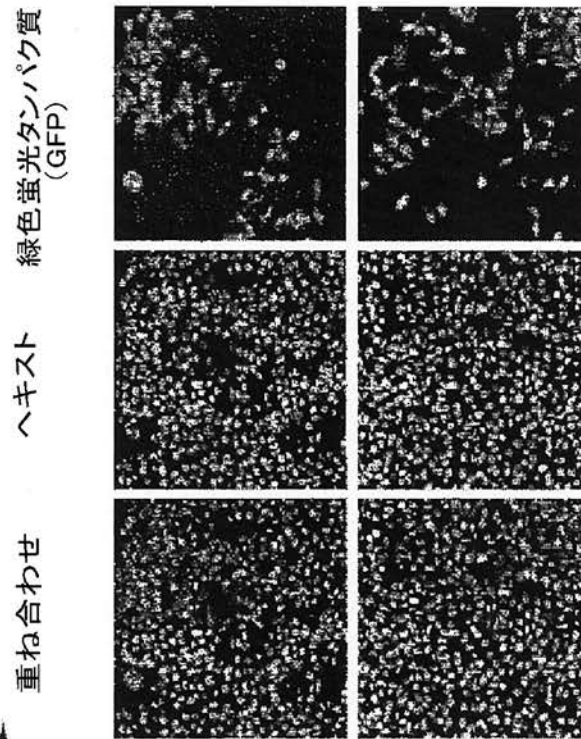
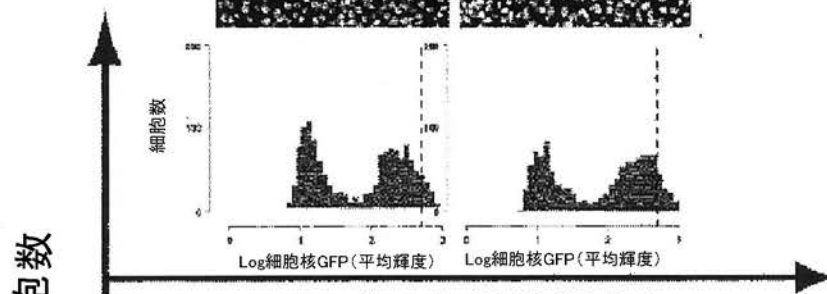
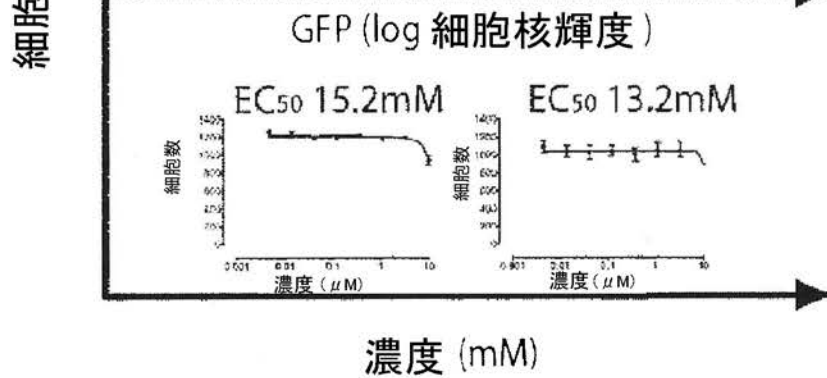
B**C****D****E**

FIG. 18 (CONTINUED)

【図 18 F】

F

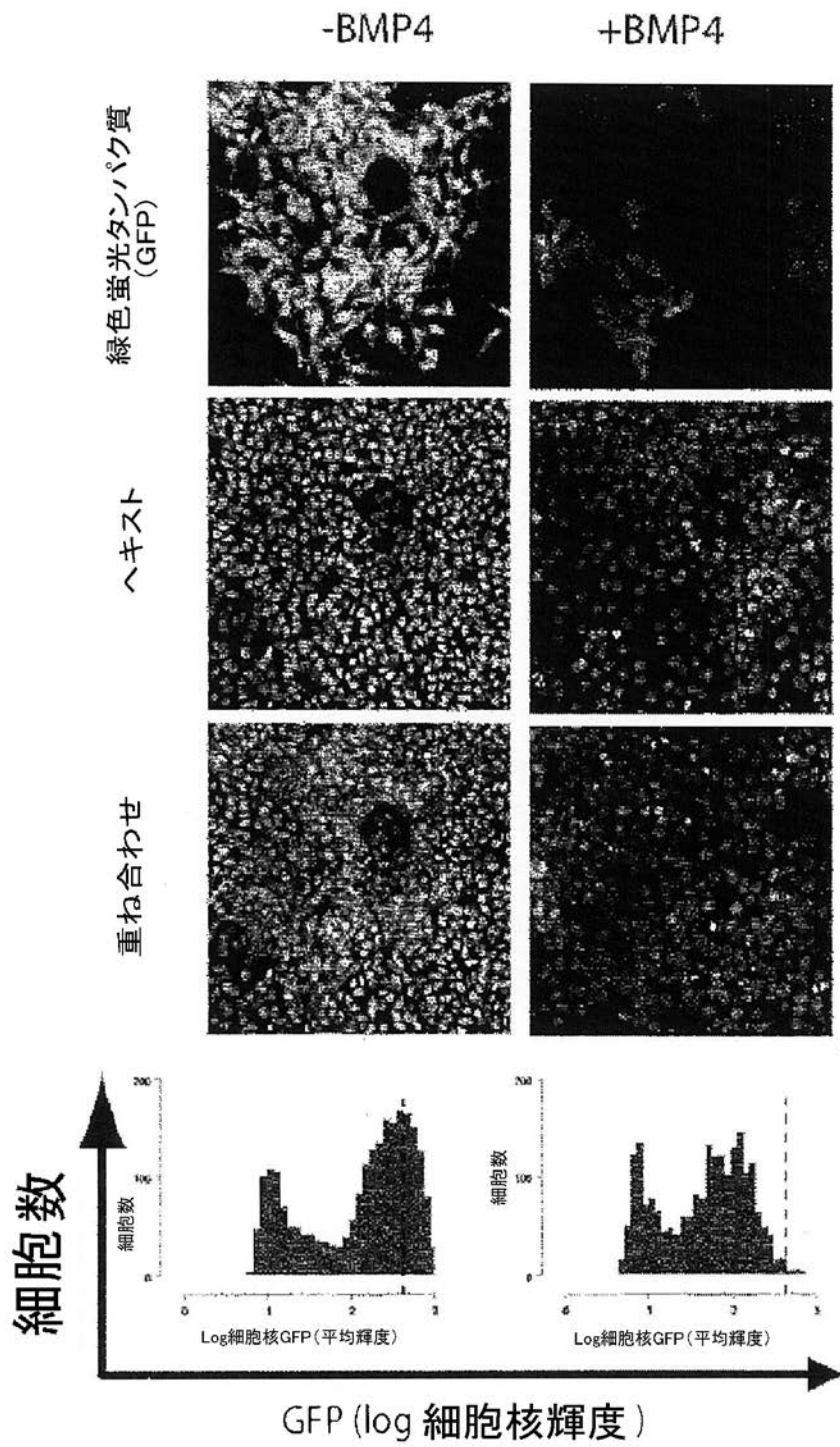
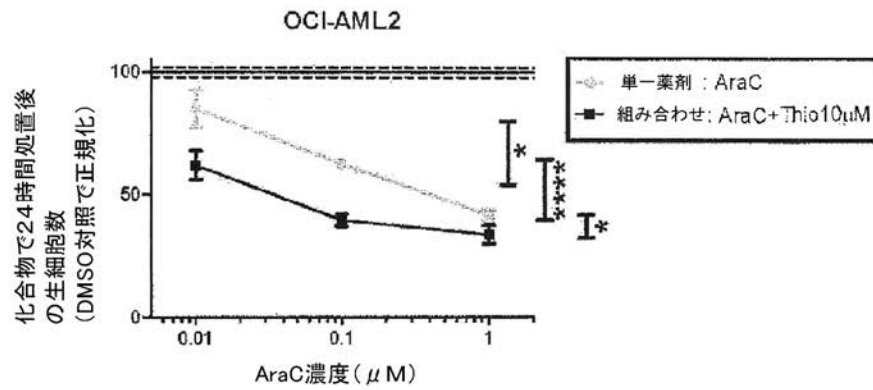


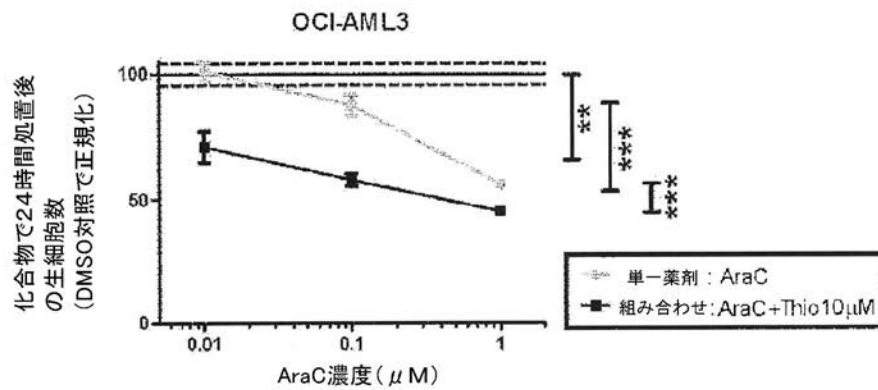
FIG. 18 (CONTINUED)

【図 19】

A



B



各点、n=3;平均±標準偏差

(*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001, (****) p<0.0001.

FIG. 19

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2013/050255
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>A61K 31/7068</i> (2006.01) , <i>A61K 31/5415</i> (2006.01) , <i>A61P 35/02</i> (2006.01) , <i>G01N 33/15</i> (2006.01) 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: <i>A61K</i> (2006.01) , <i>A61P 35/02</i> (2006.01) , <i>G01N 33/15</i> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) STN, Canadian Patent Database (Intellect), Scopus, TotalPatent, Google Scholar Key words: thioridazine, cytarabine, acute myeloid leukemia, dopamine receptor antagonist, chemotherapeutic, DNA synthesis inhibitor, cancer.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0072824 (Telerman et al), 15 April 2004 paragraphs [0007], [0010], [0011], [0012] and all the claims.	1-76
X	WO 2005/027842 (Combinatorx, Incorporated), 31 March 2005 page 2, lines 16-18; page 5, lines 13 and 15-20; page 6, lines 12-18; page 8, line 26 to page 7, line 22, page 8, line 24; Table I; page 30, line 1 to line 24.	1-76
X	WO 2009/148623 (STC.UNM), 10 December 2009 Abstract; page 6, lines 10-21; page 10, lines 7-16, Table I; claims 1-6, 10, 18-20, 26, and 28-30.	1-76
X	US 2011/0224141 (STC.UNM), 15 September 2011 Abstract, paragraphs [0045]-[0046], Table I, paragraph [0153], claims 1-6, 10, 11 and 18-20.	1-76
Y	B. Lowenberg et al, New England Journal of Medicine, vol. 364, no. 11, pages 1027-1036 (17 March 2011). The whole document.	1-76
Y	I. Gil-Ad et al, Oncology Reports, vol. 15, no. 1, p. 107-112, (January 2006). The	1-76
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 May 2013 (08-05-2013)		Date of mailing of the international search report 21 May 2013 (21-05-2013)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Nasreddine Slougui (819) 956-6132

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2013/050255

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos. : 32-53 and 65-76 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :</p> <p>Claims 32-53 and 65-76 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in these claims, namely thioridazine and cytarabine.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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 :</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claim Nos. : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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 claim Nos. :</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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 claim Nos. :</p> <p>Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International application No.
PCT/CA2013/050255

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2004072824A1	15 April 2004 (15-04-2004)	EP1418899A1	19 May 2004 (19-05-2004)
		FR2825279A1	06 December 2002 (06-12-2002)
		FR2825279B1	08 April 2005 (08-04-2005)
		US2002193371A1	19 December 2002 (19-12-2002)
		US2003087900A1	08 May 2003 (08-05-2003)
		WO02096400A1	05 December 2002 (05-12-2002)
WO2005027842A2	31 March 2005 (31-03-2005)	AR041386A1	18 May 2005 (18-05-2005)
		AR043188A1	20 July 2005 (20-07-2005)
		AR045826A1	16 November 2005 (16-11-2005)
		AR046163A1	30 November 2005 (30-11-2005)
		AR046291A1	30 November 2005 (30-11-2005)
		AR047726A1	15 February 2006 (15-02-2006)
		AR047841A1	01 March 2006 (01-03-2006)
		AU2003299196A1	23 April 2004 (23-04-2004)
		AU2004212919A1	02 September 2004 (02-09-2004)
		AU2004273880A1	31 March 2005 (31-03-2005)
		AU2004273910A1	31 March 2005 (31-03-2005)
		AU2004275777A1	07 April 2005 (07-04-2005)
		AU2004281729A1	28 April 2005 (28-04-2005)
		AU2004291084A1	02 June 2005 (02-06-2005)
		BR0314713A	26 July 2005 (26-07-2005)
		BRPI0407421A	24 January 2006 (24-01-2006)
		BRPI0414435A	14 November 2006 (14-11-2006)
		BRPI0414568A	07 November 2006 (07-11-2006)
		BRPI0414719A	21 November 2006 (21-11-2006)
		BRPI0415397A	19 December 2006 (19-12-2006)
		BRPI0416591A	30 January 2007 (30-01-2007)
		CA2509526A1	15 April 2004 (15-04-2004)
		CA2514061A1	02 September 2004 (02-09-2004)
		CA2537989A1	31 March 2005 (31-03-2005)
		CA2538023A1	07 April 2005 (07-04-2005)
		CA2538570A1	31 March 2005 (31-03-2005)
		CA2542074A1	28 April 2005 (28-04-2005)
		CA2545615A1	02 June 2005 (02-06-2005)
		CL2532004A1	18 March 2005 (18-03-2005)
		CN1700921A	23 November 2005 (23-11-2005)
		CN1761478A	19 April 2006 (19-04-2006)
		CN1878556A	13 December 2006 (13-12-2006)
		CN1889956A	03 January 2007 (03-01-2007)
		CN1901863A	24 January 2007 (24-01-2007)
		CN1993051A	04 July 2007 (04-07-2007)
		CN101102760A	09 January 2008 (09-01-2008)
		EP1553955A2	20 July 2005 (20-07-2005)
		EP1553955A4	05 November 2008 (05-11-2008)
		EP1599212A2	30 November 2005 (30-11-2005)
		EP1599212A4	08 February 2006 (08-02-2006)
		EP1670427A2	21 June 2006 (21-06-2006)
		EP1670427A4	07 January 2009 (07-01-2009)
		EP1670477A2	21 June 2006 (21-06-2006)
		EP1675550A2	05 July 2006 (05-07-2006)
		EP1675550A4	10 October 2007 (10-10-2007)
		EP1680121A2	19 July 2006 (19-07-2006)
		EP1680121A4	26 December 2007 (26-12-2007)
		EP1691744A2	23 August 2006 (23-08-2006)
		EP1691744A4	26 December 2007 (26-12-2007)
		EP2070550A1	17 June 2009 (17-06-2009)
		EP2301628A1	30 March 2011 (30-03-2011)
		HRP20050355A2	31 October 2005 (31-10-2005)
		HRP20050804A2	28 February 2006 (28-02-2006)
		IL174185D0	01 August 2006 (01-08-2006)
		IL174232D0	01 August 2006 (01-08-2006)
		IL174285D0	01 August 2006 (01-08-2006)
		IL174918D0	13 April 2008 (13-04-2008)
		IL175610D0	05 September 2006 (05-09-2006)
		IS7811A	19 April 2005 (19-04-2005)
		IS8023A	13 September 2005 (13-09-2005)
		IS8398A	05 April 2006 (05-04-2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2013/050255

IS7811A	19 April 2005 (19-04-2005)
IS8023A	13 September 2005 (13-09-2005)
IS8398A	05 April 2006 (05-04-2006)
IS8410A	12 April 2006 (12-04-2006)
IS8413A	12 April 2006 (12-04-2006)
IS8451A	11 May 2006 (11-05-2006)
IS8497A	02 June 2006 (02-06-2006)
JP2006503905A	02 February 2006 (02-02-2006)
JP2006517969A	03 August 2006 (03-08-2006)
JP2007505914A	15 March 2007 (15-03-2007)
JP2007508391A	05 April 2007 (05-04-2007)
JP2007511521A	10 May 2007 (10-05-2007)
JP2007516217A	21 June 2007 (21-06-2007)
JP2007517766A	05 July 2007 (05-07-2007)
KR20050110634A	23 November 2005 (23-11-2005)
KR20060076319A	04 July 2006 (04-07-2006)
KR20060089725A	09 August 2006 (09-08-2006)
KR20060118536A	23 November 2006 (23-11-2006)
KR20070001060A	03 January 2007 (03-01-2007)
KR20070012618A	26 January 2007 (26-01-2007)
MXPA05003152A	27 April 2006 (27-04-2006)
MXPA05008649A	23 November 2005 (23-11-2005)
MXPA06002929A	14 June 2006 (14-06-2006)
MXPA06003066A	20 June 2006 (20-06-2006)
MXPA06003320A	08 June 2006 (08-06-2006)
NO20051669A	10 June 2005 (10-06-2005)
NO20053678D0	29 July 2005 (29-07-2005)
NO20053678A	12 September 2005 (12-09-2005)
NO20061239A	08 June 2006 (08-06-2006)
NO20061284A	22 June 2006 (22-06-2006)
NO20061325A	06 June 2006 (06-06-2006)
NO20062003A	07 July 2006 (07-07-2006)
NO20062363A	11 August 2006 (11-08-2006)
PL378108A1	06 March 2006 (06-03-2006)
RU2005128559A	10 March 2006 (10-03-2006)
RU2329037C2	20 July 2008 (20-07-2008)
RU2005112233A	20 January 2006 (20-01-2006)
RU2006112587A	27 October 2007 (27-10-2007)
RU2006112834A	27 October 2007 (27-10-2007)
RU2006113595A	27 October 2007 (27-10-2007)
RU2006116511A	27 November 2007 (27-11-2007)
RU2006120408A	20 December 2007 (20-12-2007)
SG146653A1	30 October 2008 (30-10-2008)
SG146671A1	30 October 2008 (30-10-2008)
SG147442A1	28 November 2008 (28-11-2008)
SG148186A1	31 December 2008 (31-12-2008)
TW200902047A	16 January 2009 (16-01-2009)
US2007010502A1	11 January 2007 (11-01-2007)
US8080553B2	20 December 2011 (20-12-2011)
US2004220153A1	04 November 2004 (04-11-2004)
US2004224876A1	11 November 2004 (11-11-2004)
US2004229849A1	18 November 2004 (18-11-2004)
US2005112199A1	26 May 2005 (26-05-2005)
US2005119160A1	02 June 2005 (02-06-2005)
US2005137185A1	23 June 2005 (23-06-2005)
US2005153947A1	14 July 2005 (14-07-2005)
US2005187200A1	25 August 2005 (25-08-2005)
US2005192261A1	01 September 2005 (01-09-2005)
US2009075951A1	19 March 2009 (19-03-2009)
US2012058979A1	08 March 2012 (08-03-2012)
WO2004030618A2	15 April 2004 (15-04-2004)
WO2004030618A3	07 April 2005 (07-04-2005)
WO2004073614A2	02 September 2004 (02-09-2004)
WO2004073614A3	11 November 2004 (11-11-2004)
WO2005027839A2	31 March 2005 (31-03-2005)
WO2005027839A3	28 June 2007 (28-06-2007)
WO2005027842A3	22 December 2005 (22-12-2005)
WO2005027842A8	18 May 2006 (18-05-2006)
WO2005030132A2	07 April 2005 (07-04-2005)
WO2005030132A3	12 October 2006 (12-10-2006)
WO2005037203A2	28 April 2005 (28-04-2005)
WO2005037203A3	16 March 2006 (16-03-2006)
WO2005048927A2	02 June 2005 (02-06-2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2013/050255

			WO2005037203A2	28 April 2005 (28-04-2005)
			WO2005037203A3	16 March 2006 (16-03-2006)
			WO2005048927A2	02 June 2005 (02-06-2005)
			WO2005048927A3	26 January 2006 (26-01-2006)
			WO2005079284A2	01 September 2005 (01-09-2005)
			WO2005079284A3	23 March 2006 (23-03-2006)
			ZA200502708A	27 February 2008 (27-02-2008)
			ZA200505996A	27 December 2006 (27-12-2006)
			ZA200601973A	27 August 2008 (27-08-2008)
			ZA200602057A	27 June 2007 (27-06-2007)
			ZA200603116A	25 June 2008 (25-06-2008)
			ZA200604250A	28 November 2007 (28-11-2007)
WO2009148623A2	10 December 2009 (10-12-2009)	US2011224141A1	15 September 2011 (15-09-2011)	
		WO2009148623A3	25 March 2010 (25-03-2010)	
US2011224141A1	15 September 2011 (15-09-2011)	US2011224141A1	15 September 2011 (15-09-2011)	
		WO2009148623A2	10 December 2009 (10-12-2009)	
		WO2009148623A3	25 March 2010 (25-03-2010)	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 31/382 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/55 (2006.01)		A 6 1 K 31/382	
A 6 1 K 31/145 (2006.01)		A 6 1 K 31/55	
A 6 1 K 31/454 (2006.01)		A 6 1 K 31/145	
A 6 1 K 31/4515 (2006.01)		A 6 1 K 31/454	
A 6 1 K 31/40 (2006.01)		A 6 1 K 31/4515	
A 6 1 K 31/551 (2006.01)		A 6 1 K 31/40	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)		A 6 1 K 31/551	
C 1 2 N 5/095 (2010.01)		A 6 1 K 31/496	
		C 1 2 N 5/00	2 0 2 V

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

(72)発明者 サクロス、エレフテリオス

カナダ国、エル 8 エス 4 ケイ 1 オンタリオ州、ハミルトン、メイン ストリート ウェスト
1 2 8 0、マックマスター ユニヴァーシティ エムディシーエル 5 0 2 0、ステム セル ア
ンド キャンサー リサーチ インスティテュート

F ターム(参考) 4B065 AA94X AC20 CA44

4C084 AA19 AA20 ZB212 ZB261 ZB262 ZB271 ZC412 ZC422

4C086 AA01 AA02 BC07 BC21 BC39 BC89 CB30 DA25 DA26 DA27

EA17 GA07 GA10 GA12 GA13 GA14 MA02 MA03 MA04 MA05

NA05 ZB21 ZB26 ZB27 ZC75

4C206 AA01 AA02 JA72 MA02 MA03 MA04 MA05 NA05 ZB21 ZB26

ZB27 ZC41 ZC75