

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6367801号
(P6367801)

(45) 発行日 平成30年8月1日 (2018.8.1)

(24) 登録日 平成30年7月13日 (2018.7.13)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 36/37	(2006.01)	A 6 1 K 36/37	Z M D
A 6 1 K 31/337	(2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1

請求項の数 4 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2015-528556 (P2015-528556)
 (86) (22) 出願日 平成25年8月19日 (2013.8.19)
 (65) 公表番号 特表2015-529664 (P2015-529664A)
 (43) 公表日 平成27年10月8日 (2015.10.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/055602
 (87) 国際公開番号 W02014/031543
 (87) 国際公開日 平成26年2月27日 (2014.2.27)
 審査請求日 平成28年7月19日 (2016.7.19)
 (31) 優先権主張番号 61/684,792
 (32) 優先日 平成24年8月19日 (2012.8.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507175267
 ウェスタン ユニバーシティ オブ ヘル
 ス サイエンス
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 917
 66-1854, ボモナ, イースト セカ
 ンド ストリート 309
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学療法耐性を克服するための、トリプテリジウム・ウィルフォルディ由来の抽出物の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌を処置するための組み合わせ医薬であって、

(a) トリプテリジウム・ウィルフォルディ (Tripterygium wilfordii) のエタノール抽出物、及び

(b) 化学療法剤
を含み、

ここで前記癌は、前記化学療法剤 (b) 単剤による処置に対して少なくとも部分的に耐性を有し、

(a) の少なくとも一部が、(b) の投与よりも前に投与され、

前記化学療法剤 (b) はドセタキセルである、

前記組み合わせ医薬。

【請求項 2】

トリプテリジウム・ウィルフォルディの前記エタノール抽出物は、図 2 に記載の MS / LC クロマトグラムによって同定可能である、請求項 1 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 3】

前記癌は、乳癌、白血病又は前立腺癌である、請求項 1 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 4】

単体で投与される時の (b) の有効性を超える程度に、(b) の有効性を増大させる量で (a) が投与される、請求項 1 に記載の組み合わせ医薬。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2012年8月19日に出願された米国特許出願第61/684,792号に基づく優先権を主張し、その開示を参照により本明細書に含む。

【0002】

発明の技術分野

本発明は、化学療法剤の有効性を向上させる化合物及び天然物に関する。

【背景技術】

10

【0003】

薬剤耐性は常に、継続的化学療法の過程で進行する。この問題の克服は、癌の処置における主要な課題である。実際、腫瘍細胞は、化学療法剤に対するそれらの耐性を増強するために複数のメカニズムを利用する。例えば、腫瘍細胞は、多剤耐性トランスポーター及び腫瘍性上皮成長因子受容体遺伝子を過剰発現し、そしてNF- κ B-関連因子2、すなわちグルタチオン代謝及び薬物解毒に関与する広範囲の遺伝子を上方制御するレドックスセンシング転写因子の活性を誘発する。(Huang et al., 2005a; Makarovskiy et al., 2002; Wang et al., 2010); (Salzberg et al., 2007; Sirotnak et al., 2000); (Singh et al., 2010; Zhang et al., 2010); and (Huang and Sadee, 2003; Seruga et al., 2010) を参照のこと。ヘッジホッグ経路は、化学療法耐性に関与する別の細胞シグナル伝達経路である(Domingo-Domenech et al., 2012)。

20

【0004】

現在まで、耐性の特定の機構を標的とするよう設計された単一の剤が有効であることが見出されていない。しかしながら、薬剤耐性に対処するための新規治療の1つの可能性ある源は、伝統的な漢方薬である。実際、そのような薬は、多数の疾患に起因する身体機能の不均衡を回復するために何千年もの間、使用されて来た。漢方薬による治療は、通常、潜在的に身体中の異なった部位及び経路で作用することができる複数の化学成分を含む薬草「抽出物」の摂取を伴う。従って、薬剤は、薬剤耐性の克服において新規の機会を提供するか、又は薬物の効果を単に改善できる複数の細胞及び分子機構を標的とする可能性を有する(Chow & Huang 2010, Pon et al 2010を参照のこと)。本明細書に記載される場合、その中国名(北京語)レイ・コン・テン(Lei Gong Teng)によっても知られている、1つの特定の伝統的な漢方薬であるトリプテリジウム・ウィルフォルディ(Tripertium wilfordii)のエタノール抽出物は、化学療法薬に対して耐性となっている癌細胞を感作して(sensitize)、その結果、癌が再び化学療法薬に対して敏感になる。

30

【発明の概要】

【0005】

発明の概要

本発明は、トリプテリジウム・ウィルフォルディの有機溶媒抽出物、及び癌処置、特に化学療法剤による処置に対していくらかの耐性を示している癌の処置へのそれらの使用に関する。抽出物の様々な実施形態において有用なトリプテリジウム・ウィルフォルディの有機抽出物は、(i)エタノール抽出物であり；そして図1に記載されるようにMS/LCクロマトグラムにより同定できる。

40

【0006】

1つの実施形態によれば、本発明は癌の処置方法に関する。前記方法は、(a)トリプテリジウム・ウィルフォルディの有機溶媒抽出物、及び(b)化学療法剤の組み合わせを、それを必要とする患者に投与することを包含する。トリプテリジウム・ウィルフォルディの有機溶媒抽出物(a)及び化学療法剤(b)は、癌を処置するのに効果的な組み合わせられた量で投与される。処置される癌は、化学療法剤(b)単剤による処置に対して少なくとも部分的に耐性を有する。本発明の1つの実施形態によれば、前記方法は、(b)単剤で投与される場合の効率よりも(b)の効率を、(a)高める量で投与する。本発明の

50

1つの実施形態によれば、前記癌は、乳癌、白血病又は前立腺癌であり、そしてそのような癌を処置するために現在使用される化学療法剤（b）は、例えばドセタキセル（docetaxel）、ダウロルピシン（daunorubicin）、トラスツズマブ（trastuzumab）及びラパチニブ（lapatinib）である。

【0007】

トリプテリジウム・ウィルフォルディの有機溶媒抽出物（a）及び化学療法剤（b）は、連続的に又は同時投与され得る。それらが連続的に投与される場合、（a）の少なくとも一部が、（b）の投与の前に投与される。トリプテリジウム・ウィルフォルディの有機溶媒抽出物（a）は、同じ態様で、類似するか、又は同じ化学療法組成物を用いて投与され得る。上記に示されるように、本発明の方法によれば、トリプテリジウム・ウィルフォルディの有機溶媒抽出物（a）及び化学療法剤（b）は、同時投与されてもよく、そして（a）及び（b）の両者を含む単一組成物の形態でもよい。従って、本発明の別の実施形態は、（a）トリプテリジウム・ウィルフォルディの有機溶媒抽出物及び（b）化学療法剤の組み合わせ、並びに薬学的に許容される担体を含む化学療法組成物に関する。ここで、（a）及び（b）は癌の処置に有効な併用量で投与される。

10

【0008】

表の簡単な説明

表1は、 $12\mu\text{g}/\text{ml}$ のレイ・コン・テン（Lei Gon Teng）抽出物（LGT-E）により前処置され、続いて種々の濃度のドセタキセルにより72時間処置された、ドセタキセル耐性PC3-TxR細胞のスルホローダミンB（SRB）細胞生存率アッセイの結果を報告する。

20

【0009】

表2は、種々の濃度のドセタキセルによる72時間の処置後における（但し、LGT-Eによる前処置は行わない）、ドセタキセル耐性PC3-TxR細胞のSRB細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【0010】

表3は、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ のLGT-Eにより前処置され、続いて種々の濃度のドセタキセルにより72時間処置された、ドセタキセル耐性PC3-TxR細胞のSRB細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【0011】

表4は、種々の濃度のドセタキセルによる72時間の処置後における（但し、LGT-Eによる前処置は行わない）、ドセタキセル耐性PC3-TxR細胞のSRB細胞生存率アッセイの結果を報告する。

30

【0012】

表5は、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のLGT-Eにより前処置され、続いて種々の濃度のドセタキセルにより72時間処置された、ドセタキセル耐性DU145-TxR細胞のSRB細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【0013】

表6は、種々の濃度のドセタキセルによる72時間の処置後における（但し、LGT-Eによる前処置は行わない）、ドセタキセル耐性DU145-TxR細胞のSRB細胞生存率アッセイの結果を報告する。

40

【0014】

表7は、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ のLGT-Eにより前処置され、続いて種々の濃度のドセタキセルにより72時間処置された、ドセタキセル耐性DU145-TxR細胞のSRB細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【0015】

表8は、種々の濃度のドセタキセルによる72時間の処置後における（但し、LGT-Eによる前処置は行わない）、ドセタキセル耐性DU145-TxR細胞のSRB細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【0016】

50

表 9 は、 $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のドセタキセルにより 72 時間処置された、ドセタキセル耐性 D U 1 4 5 - T x R 細胞のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 1 7 】

表 1 0 は、種々の濃度のドセタキセルによる 72 時間の処置後における (但し、L G T - E による前処置は行わない)、ドセタキセル耐性 D U 1 4 5 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 1 8 】

表 1 1 は、種々の濃度のドセタキセルによる 72 時間の処置後における (又は、L G T - E による前処置は行わない)、ドセタキセル耐性 P C 3 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

10

【 0 0 1 9 】

表 1 2 は、種々の濃度のドセタキセルによる 72 時間の処置後における (又は、L G T - E による前処置は行わない)、ドセタキセル感受性 P C 3 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 2 0 】

表 1 3 は、種々の濃度の L G T - E による 72 時間の処置後における、ドセタキセル感受性 P C 3 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 2 1 】

表 1 4 は、種々の濃度の L G T - E による 72 時間の処置後における、ドセタキセル耐性 P C 3 - T x R 細胞のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

20

【 0 0 2 2 】

表 1 5 は、種々の濃度の L G T - E による 72 時間の処置後における、ドセタキセル耐性 D U 1 4 5 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 2 3 】

表 1 6 は、種々の濃度の L G T - E による 72 時間の処置後における、ドセタキセル感受性 D U 1 4 5 細胞のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 2 4 】

30

表 1 7 は、各薬剤についての IC_{50} を確認するために使用された、細胞系及び 4 種の化学療法剤の濃度範囲を報告する。

【 0 0 2 5 】

表 1 8 は、ドセタキセル、ダウロルピシン、トラスツズマブ及びラパチニブ下での L G T - E についての C E 決定の結果を要約する。

【 0 0 2 6 】

表 1 9 は、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のドセタキセルにより 72 時間処置された、ドセタキセル感受性 D U 1 4 5 細胞のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 2 7 】

40

表 2 0 は、種々の濃度のドセタキセルによる 72 時間の処置後における (但し、L G T - E による前処置は行わない)、ドセタキセル - ドセタキセル感受性 D U 1 4 5 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 2 8 】

表 2 1 は、 $13 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のハーセプチン (Herceptin) (登録商標) により 72 時間処置された、ハーセプチン (登録商標) 感受性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 細胞のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 2 9 】

表 2 2 は、種々の濃度のハーセプチン (登録商標) による 72 時間の処置後における (

50

但し、L G T - E による前処置は行わない)、ハーセプチン(登録商標)感受性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 3 0 】

表 2 3 は、 $13 \mu\text{g} / \text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のハーセプチン(登録商標)により 7 2 時間処置された、ハーセプチン(登録商標)耐性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 / H e r 細胞のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 3 1 】

表 2 4 は、種々の濃度のハーセプチン(登録商標)による 7 2 時間の処置後における(但し、L G T - E による前処置は行わない)、ハーセプチン(登録商標)耐性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 / H e r のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

10

【 0 0 3 2 】

表 2 5 は、種々の濃度のラパチニブによる 7 2 時間の処置後における、ハーセプチン(登録商標)感受性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 3 3 】

表 2 6 は、 $13 \mu\text{g} / \text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のハーセプチン(登録商標)により 7 2 時間処置された、ハーセプチン(登録商標)耐性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 - T x R 細胞のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

20

【 0 0 3 4 】

表 2 7 は、種々の濃度のハーセプチン(登録商標)による 7 2 時間の処置後における(但し、L G T - E による前処置は行わない)、ハーセプチン(登録商標)耐性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 - T x R のスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 3 5 】

表 2 8 は、 $12.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のラパチニブにより 7 2 時間処置された、ハーセプチン(登録商標)耐性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

30

【 0 0 3 6 】

表 2 9 は、種々の濃度のラパチニブによる 7 2 時間の処置後における(但し、L G T - E による前処置は行わない)、ハーセプチン(登録商標)耐性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 3 7 】

表 3 0 は、 $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のラパチニブにより 7 2 時間処置された、ハーセプチン(登録商標)耐性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 3 8 】

表 3 1 は、種々の濃度のラパチニブによる 7 2 時間の処置後における(但し、L G T - E による前処置は行わない)、ハーセプチン(登録商標)耐性、H E R 2 陽性乳管癌系 B T 4 7 4 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

40

【 0 0 3 9 】

表 3 2 は、ラパチニブ - 感受性 H E R 2 陽性乳管癌系におけるラパチニブ感受性のラパチニブ用量応答分析の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 4 0 】

表 3 3 は、ラパチニブ耐性 H E R 2 陽性乳管癌系におけるラパチニブ感受性のラパチニブ用量応答分析の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 4 1 】

50

表 3 4 は、 $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のラパチニブにより 7 2 時間処置された、ラパチニブ耐性、H E R 2 陽性乳がん系 S k B r 3 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 4 2 】

表 3 5 は、種々の濃度のラパチニブによる 7 2 時間の処置後における（但し、L G T - E による前処置は行わない）、ラパチニブ耐性、H E R 2 陽性乳がん系 S k B r 3 - T x R 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 4 3 】

表 3 6 は、 $25 \mu\text{g}/\text{mg}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のダウロルピシンにより 7 2 時間処置された、ダウロルピシン感受性骨髄性白血病 K 5 6 2 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

10

【 0 0 4 4 】

表 3 7 は、種々の濃度のダウロルピシンによる 7 2 時間の処置後における（但し、L G T - E による前処置は行わない）、ダウロルピシン感受性骨髄性白血病 K 5 6 2 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 4 5 】

表 3 8 は、 $25 \mu\text{g}/\text{mg}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のダウロルピシンにより 7 2 時間処置された、ダウロルピシン耐性骨髄性白血病 K 5 6 2 / D o x 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【 0 0 4 6 】

20

表 3 9 は、種々の濃度のダウロルピシンによる 7 2 時間の処置後における（但し、L G T - E による前処置は行わない）、ダウロルピシン耐性骨髄性白血病 K 5 6 2 / D o x 細胞の S R B 細胞生存率アッセイの結果を報告する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 7 】

【図 1 A】図 1 A は、T.ウィルフォルディの根皮についての高圧液体クロマトグラフィー - ダイオード - アレイ検出 (H P L C - D A D) クロマトグラフィーフィンガープリントを示す。

【図 1 B】図 1 B は、T.ウィルフォルディの木部組織についての高圧液体クロマトグラフィー - ダイオード - アレイ検出 (H P L C - D A D) クロマトグラフィーフィンガープリントを示す。

30

【図 2】図 2 は、T.ウィルフォルディ抽出生成物、レイ・コン・テン抽出物 (L G T - E) についての液体クロマトグラフィー及び質量分析法クロマトグラムを示す。

【図 3 A】図 3 A は、 $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ のレイ・コン・テン抽出物 (L G T - E) により前処置され、続いて、種々の濃度のドセタキセルにより 7 2 時間処置された、ドセタキセル耐性 P C 3 - T x R 細胞からのスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイ結果を示す。表 1 ~ 4 を参照のこと。

【図 3 B】図 3 B は、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて、種々の濃度のドセタキセルにより 7 2 時間処置された、ドセタキセル耐性 P C 3 - T x R 細胞からのスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイ結果を示す。表 1 ~ 4 を参照のこと。

40

【図 4 A】図 4 A は、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて、種々の濃度のドセタキセルにより 7 2 時間処置された、ドセタキセル耐性 D U 1 4 5 - T x R 細胞からのスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイ結果を示す。表 5 ~ 1 0 を参照のこと。

【図 4 B】図 4 B は、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて、種々の濃度のドセタキセルにより 7 2 時間処置された、ドセタキセル耐性 D U 1 4 5 - T x R 細胞からのスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイ結果を示す。表 5 ~ 1 0 を参照のこと。

【図 4 C】図 4 C は、 $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置され、続いて、種々

50

の濃度のドセタキセルにより72時間処置された、ドセタキセル耐性DU145-TxR細胞からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表5~10を参照のこと。

【図5】図5は、(A)ドセタキセル耐性PC3-TxR細胞及び(B)ドセタキセル感受性PC4細胞のドセタキセル用量-応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表11及び12を参照のこと。

【図6A】図6Aは、ドセタキセル感受性PC3及びドセタキセル耐性PC3-TxR細胞、のLGT-E用量-応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表13~16を参照のこと。

【図6B】図6Bは、ドセタキセル感受性PC4細胞及びドセタキセル耐性DU145-TxR細胞のLGT-E用量-応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表13~16を参照のこと。

【図7】図7は、50µg/mlのLGT-Eにより前処置された、ドセタキセル感受性DU145細胞のドセタキセル用量応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表19~20を参照のこと。

【図8】図8は、13µg/mlのLGT-Eにより前処置された、ハーセプチン(登録商標)感受性、HER2陽性乳管癌系BT474のハーセプチン(登録商標)用量応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイの結果を示す。表21~22を参照のこと。

【図9】図9は、13µg/mlのLGT-Eにより前処置された、ハーセプチン(登録商標)耐性、HER2陽性乳管癌系BT474のハーセプチン(登録商標)用量応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイの結果を示す。表23~24を参照のこと。

【図10】図10は、ハーセプチン(登録商標)感受性、BT474のハーセプチン(登録商標)用量応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイの結果を示す。表25を参照のこと。

【図11】図11は、13µg/mlのLGT-Eにより前処置された、ハーセプチン(登録商標)耐性、HER2陽性乳管癌系BT474-TxRのハーセプチン(登録商標)用量応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイの結果を示す。表26~27を参照のこと。

【図12A】図12Aは、12µg/mlのLGT-Eにより前処置され、続いて、種々の濃度のラパチニブにより72時間処置された、ハーセプチン(登録商標)耐性、HER2陽性乳管癌BT474-TxR細胞からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表28~31を参照のこと。

【図12B】図12Bは、25µg/mlのLGT-Eにより前処置され、続いて、種々の濃度のラパチニブにより72時間処置された、ハーセプチン(登録商標)耐性、HER2陽性乳管癌BT474-TxR細胞からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表28~31を参照のこと。

【図13】図13は、ラパチニブ耐性HER2陽性乳管癌亜系SkBr3-TxRのラパチニブ感受性に対する、ラパチニブ感受性HER2陽性乳管癌亜系SkBr3のラパチニブ用量応答分析からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表32~33を参照のこと。

【図14】図14は、12.5µg/mlのLGT-Eにより前処置され、続いて、種々の濃度のラパチニブにより72時間処置された、ラパチニブ耐性HER-2陽性乳管癌SkBr3-TxR細胞からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表34~35を参照のこと。

【図15】図15は、25µg/mgのLGT-Eにより前処置され、続いて種々の濃度のダウロルピシンにより72時間処置された、ダウロルピシン感受性骨髄性白血病K562細胞からのスルホローダミンB(SRB)細胞生存率アッセイ結果を示す。表36~37を参照のこと。

10

20

30

40

50

【図 1 6】図 1 6 は、 $25 \mu\text{g} / \text{mg}$ の L G T - E により前処置され、続いて種々の濃度のダウロルピシンにより 7 2 時間処置された、ダウロルピシン耐性骨髓性白血病 K 5 6 2 / D o x 細胞からのスルホローダミン B (S R B) 細胞生存率アッセイ結果を示す。表 3 8 ~ 3 9 を参照のこと。

【図 1 7 A】インビボでの L G T - E の化学感作効果を例示する。図 1 7 A は、0 日目でのドセタキセル投与の開始が D o c 処置の最初の日である、 20mg のドセタキセル / kg 体重による 1 5 日間の処置期間にわたっての腫瘍サイズに関して、S C I D マウス腫瘍宿主におけるドセタキセル感受性 P C R 3 - A T C C 細胞腫瘍に対するドセタキセル耐性 P C 3 - T x R 細胞に関する。

【図 1 7 B】インビボでの L G T - E の化学感作効果を例示する。図 1 7 B は、未処置腫瘍、L G T - E 処置腫瘍、及び L G T - E 及びドセタキセル処置腫瘍を包含する、図 1 7 A に記載される P C 3 - T x R 腫瘍モデルを用いての P C 3 - T x R 腫瘍のドセタキセル処置に関しての L G T - E ($500 \text{mg} / \text{kg}$ 体重) の化学感作効果に関する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 8 】

詳細な記載

T . ウィルフォルディのエタノール抽出物、及び化学療法剤の組み合わせを、それを必要とする患者に投与することにより、癌を処置するための方法及び医薬製剤が本明細書に記載され、ここで前記 T . ウィルフォルディのエタノール抽出物及び化学療法剤は、癌を処理するために有効な併用量で投与される。種々の実施形態によれば、本発明の方法は、化学療法剤が単独で投与される場合、すなわち T . ウィルフォルディのエタノール抽出物の存在下で、化学療法剤による処置に対して少なくとも部分的に耐性がある癌を処置する。従って、種々の実施形態によれば、本発明の方法は、化学療法剤耐性癌細胞と、本明細書に記載されるような T . ウィルフォルディのエタノール抽出物の少なくとも 1 つの成分とを接触することにより、抗癌化学療法剤耐性を克服し、そして化学療法剤に対する細胞の耐性の逆転をもたらす、それにより、化学療法剤による薬剤耐性癌細胞の死又は細胞分裂停止の誘発を可能にする。従って、本発明の処置方法は、化学療法剤に対して耐性である腫瘍細胞の増殖を阻害し、遅延し、又は妨げるために使用される。

【 0 0 4 9 】

本発明の T . ウィルフォルディ抽出物は、中国の吉林省 (Province of Jilin, China) から得られた薬用植物であるトリプテリジウム・ウィルフォルディ Hook f . の根木部から得られる。上記されるように、本発明の方法は、T . ウィルフォルディのエタノール抽出物を使用する。種々の実施形態によれば、本発明の方法は、一連の 9 5 % エタノール抽出からの抽出された材料を組み合わせることにより調製された、T . ウィルフォルディのエタノール抽出物を使用する。種々の他の実施形態によれば、エタノール抽出された T . ウィルフォルディ材料はさらに、シリカゲルに、抽出された材料を吸着し、そしてその吸着された材料を追加のエタノール抽出に供することにより、抽出される。エタノールは典型的には、抽出物をロータリー・エバポレーションに供することにより、抽出物から除去される。乾燥された材料は、任意には、凍結乾燥され得る。前記方法により使用される、T . ウィルフォルディの乾燥された最終エタノール抽出物は L G T - E と呼ばれ、そして図 2 に記載される液体クロマトグラフィー及び質量分析法クロマトグラムを有することにより特徴づけられる。

【 0 0 5 0 】

本発明の方法により処置され得る癌は、様々な器官の固形及び血液腫瘍を包含する。固形腫瘍の非制限的な例は、転移性乳癌及び前立腺癌、例えばアンドロゲン依存性及びアンドロゲン非依存性前立腺癌を包含する。本発明の方法により処置できる血液腫瘍は、例えば血液、骨髓、脾臓、肝臓及び時々、他の組織において、未熟顆粒球、例えば好中球、好酸球及び好塩基球の異常増殖により特徴づけられる慢性骨髓性白血病 (C M L) を包含する。

【 0 0 5 1 】

T.ウィルフォオルディの抽出物又は抽出物成分と組み合わせて使用するために適切な本発明の化学療法剤の非制限的な例は、トポイソメラーゼ阻害剤、例えばドキソルピシン及びダウノルピシン；タキサン、例えばドセタキセル；及び標的化された細胞の表面に組込まれる受容体、例えばHER受容体を標的とする生物学的製剤、例えばトラスツズマブ（ハーセプチン（Herceptin）（登録商標）の商標名で市販されている）の標的物であるHER2/neuを包含する。

【0052】

本明細書において使用される場合、用語「処置する」（treating）又は「処置」（treatment）とは、化学療法剤による処置に対して耐性である癌を有する対象に、癌を治療し、治癒し、軽減し、緩和し、変更し、救済し、改善し、向上するか又は影響を与えるために、化学療法剤と共に、T.ウィルフォオルディのエタノール抽出物を同時投与することを意味する。種々の実施形態によれば、本発明の方法は、本発明のT.ウィルフォオルディのエタノール抽出物、及び同時に又は即座に連続して、抽出物と共に同時投与される化学療法剤を投与し、ところが他の実施形態によれば、T.ウィルフォオルディのエタノール抽出物は、化学療法剤と接触される前、処置される癌細胞の少なくとも部分的感作を可能にするために、化学療法剤の投与の前に投与される。

【0053】

用語「有効量」（effective amount）とは、指定される化学療法剤に対する癌細胞の耐性を低下させるために必要とされるT.ウィルフォオルディのエタノール抽出物の量を意味する。有効量は、当業者により認識されるように、投与経路、賦形剤の使用、及び他の剤との併用の可能性に依存して、変更することができる。

【0054】

上記されるように、本発明は、T.ウィルフォオルディの抽出物又は抽出された成分を含む医薬組成物を包含する。本発明の方法を実施するために、上記医薬組成物は、経口、非経口、吸入スプレーにより、局所、直腸、経鼻、頬側、経膈、又は移植されたリザーバーを介して投与され得る。用語「非経口」（parenteral）とは、本明細書において使用される場合、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液包内、胸骨内、髄腔内、病巣内、及び頭蓋内注射又は注入技術を包含する。

【0055】

注射可能な組成物は、液体溶液又は懸濁液の何れかとしての従来の形で、注射の前、液体中、溶液又は懸濁液のために適切な固体形で、又はエマルジョンとして調製され得る。注射可能な溶液及びエマルジョンはまた、1又は2以上の賦形剤も含むことができる。例えば、適切な賦形剤は、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール又はエタノールである。さらに、所望には、投与されるべき医薬組成物はまた、少量の非毒性補助物質、例えば湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝液、安定剤、溶解促進剤、及び他のそのような剤、例えば酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート及びシクロデキストリンも含むことができる。

【0056】

経口投与のための組成物は、任意の経口的に許容される投与形、例えばカプセル剤、錠剤、エマルジョン及び水性懸濁液、分散液及び溶液であり得るが、それらだけには限定されない。経口使用のための錠剤の場合、通常使用される担体は、ラクトース及びコーンスターチを包含する。滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムがまた、典型的には、添加される。カプセル形での経口投与のためには、有用な希釈剤は、ラクトース及び乾燥コーンスターチを包含する。水性懸濁液又はエマルジョンが経口投与される場合、活性成分は、乳化剤又は懸濁化剤と共に組み合わされた油相に懸濁されるか、又は溶解され得る。

【0057】

医薬組成物中の担体は、製剤中の活性成分と適合できるという意味において「許容される（acceptable）」（及び好ましくは、それを安定化できる）べきであり、そして処置される対象に対して有害であるべきでない。例えば、融合される二環式又は三環式化合物と共に、より溶解性の複合体を形成する1又は2以上の溶解剤、又はそれ以上の溶解剤が、

10

20

30

40

50

活性化合物の送達のための医薬担体として使用され得る。他の担体の例としては、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、及び D & C Yellow # 10 列举することができる。

【実施例】

【0058】

トリプテリジウム・ウィルフォルディ H o o k . f の確認。T.ウィルフォルディの根を、Sanyuan Pharmaceuticals Co. Ltd. (吉林、中国人民共和国)から購入し、そして次の通りに、マカオのマカオ科学技術大学の医学と健康のための応用研究のマカオ研究所 (Macau Institute of Applied Research for Medicine and Health of Macau University of Science and Technology, Macau) で確認した。T.ウィルフォルディの根皮及び根木部を、同じプロトコルに従って確認した。従って、根皮及び根木部組織を、それぞれ粉末に粉碎し、そして60メッシュ篩に通した。各根又は木部調製のために、0.2gの粉碎された粉末を正確に計量し、そして20mlの酢酸エチルを添加した。サンプルを、45で1時間、超音波処理浴を用いて抽出した。その混合物を濾過し、そして残留物を、20mlのメタノールを用いて再懸濁し、続いて、45でさらに1時間、超音波処理浴に通した。酢酸エチル抽出物及びメタノール抽出物を合わせ、そしてロータリー・エバポレーターを用いて蒸発乾燥した。固形抽出物を、2mlのメタノールを用いて再構成し、そして0.45µgのフィルターを通して濾過した。

【0059】

HPLC-DAS. 高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) 処理を、Agilent 1200 Series LC System and Modules (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)により実施した。分析カラムの温度を20で設定し、そして検出波長は210nmであった。線形勾配溶出を、アセトニトリル (A) 及び0.1%リン酸 (v/v) (B) を含む移動相を用いて、1ml/分の流速で実施した。勾配は、40%溶離剤A及び60%溶離剤Bで開始した。勾配は、20分で50%溶離剤B、20分で25%溶離剤B及び10分で20%溶離剤Bまで直線的に変化された。次に、勾配は10分で80%溶離剤Bに戻され、そしてこの%で維持された。T.ウィルフォルディ根皮及び木部組織のためのHPLC-ダイオード-アレイ検出 (HPLC-DAD) クロマトグラフィーフィンガープリントは、それぞれ図1A及び1Bに示される。

【0060】

T.ウィルフォルディ抽出物の調製。T.ウィルフォルディの根木部組織 (390.61g) を、ブレンダー中に配置し、そして小断片にブレンドした。ブレンドされた根材料を、2Lの95%エタノールに添加し、1時間、音波処理し、そして次に、95%エタノール中で一晩、浸軟した。その後、材料を真空下で加圧濾過し、そしてエタノールを集めた。加圧濾過の後に残存する残存物を、600mlの95%エタノールにより2度、洗浄し、そして各洗浄サイクル当たり30分間、音波処理した。2回の洗浄からのエタノールを、初期の2Lのエタノールと共に合わせ、そしてその合わせた抽出物を、ロータリー・エバポレーターを用いて蒸発し、そして次に、凍結乾燥した。前記抽出方法の全収量は、16.16gのエタノール抽出された材料であり、これをさらに、シリカゲル60上に、前記蒸発された生成物を吸着し、そしてその吸着された材料を、次の順序の溶媒下で連続的抽出に供することにより分別した：95%エタノール及びクロロホルム。エタノール及びクロロホルム抽出物の化学感作効果を定量化した。水抽出物も調製し、そしてそのCEを決定し、エタノール及びクロロホルム抽出物と比較した。T.ウィルフォルディの水抽出物は、中国の雲南から供給され、そしてJiangyin Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd. (Jiangsu, China)から入手され、そしてACE Pharmaceuticals Ltd. (Hong Kong)から市販されている。

【0061】

抽出物の化学感受性の評価。

【0062】

化学感作効果 (chemosensitizing effect) (CE) は、化合物及び化学療法剤が同時投

10

20

30

40

50

与される場合、化学療法剤の半最大阻害濃度 (IC_{50}) の必要とされる濃度を、前記化合物が低下させることができる (すなわち、化学感作できる (chemosensitize)) 程度の尺度である。従って、 CE は、 $CE = IC_{50D} / IC_{50E+D}$ として表される。 IC_{50D} は、化学療法剤の IC_{50} であり、この剤に対して、試験抽出物 (又は CE を有することが疑われる他の化合物) が評価される。 IC_{50E+D} は、試験抽出物及び化学療法剤の組み合わせの IC_{50} である。試験抽出物又は化合物の CE は、細胞又は特定の化学療法剤型、又は評価される治療剤の種類又は組み合わせに依存して、変化することができる。

【 0 0 6 3 】

しばしば、試験抽出物又は化合物はまた、 CE を生成するために必要とされる濃度よりも高い濃度で投与される場合、非特異的に細胞毒性 (腫瘍細胞を標的化する化学療法剤とは対照的に) でもあり得る。理想的には、 CE を生成するために必要とされる試験化合物の濃度は、その IC_{50} よりも有意に低い。それらの濃度間の分散は、試験抽出物又は化合物についての化学感作ユーティリティ指数 (CUI) を計算することにより定量化される。 CUI は、 $CUI = CE \times (IC_{50E} / C_{onE})$ として表される。 IC_{50E} は、細胞増殖を 50 % 阻害する抽出物、例えばトリプテリジウム・ウィルフォルディの抽出物又は抽出された化合物の濃度である。 C_{onE} は、所望する CE を生成するために必要とされる抽出物又は化合物の濃度である。次に、所望する CE 及び CUI 値を有することが見出された抽出物及び化合物を、インビボで化学感作剤としてのそれらの可能性について試験する。

【 0 0 6 4 】

CE 及び CUI 値を、上記に記載される水、エタノール及びクロロホルム抽出物について個々に得た。それらの分析を、下記実施例 5 に記載されるスルホローダミン B (SRB) ベースの増殖アッセイを用いて、ドセタキセル耐性前立腺癌系である $PC3-TxR$ (University of Michigan) と組み合わせて、化学療法剤であるドセタキセルを用いて実施した。前述のすべての抽出物は、所望する CE 及び CUI 値と関連していた。水、エタノール、及びクロロホルム抽出物の IC_{50E+D} 濃度はそれぞれ、9.3、3.97 及び 3.8 nM であり、そして CUI 値はそれぞれ、17.74、27.39 及び 17.37 であった。その相対的に高い CUI 値に基づいて、エタノール抽出物を、下記実施例において記録されるように、さらなる研究のために選択した。その実施例によれば、当該エタノール抽出物はレイ・コン・テン抽出物 ($LGT-E$) と呼ばれる。

【 0 0 6 5 】

$LGT-E$ の液体クロマトグラフィー及び質量分析 ($LC-MS$) 分析。上で調製された、 $LGT-E$ 抽出生成物の 500 mg / ml 原液を、500 mg の $LGT-E$ 抽出物をエタノールに溶解することにより製造した。原液を、80 % アセトニトリル下で 500 μ g / ml に、さらに希釈した。10 μ l のアリコート、API 3200 LC/MS/MS システム (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、及び SIL-20A Prominence オートサンプラー (Shimadzu, Columbia, MD, USA) を備えた、2 つの Shimadzu LC-20AD Prominence Liquid Chromatograph ポンプを用いて、 $LC-MS/MS$ 分析のために使用した。クロマトグラフィー処理を、 $S13-C18$ ガードカートリッジ (12.5 x 2.1mm, Zorbax, Agilent, Santa Clara, CA, USA) により先行される Zorbax SB C18 カラム (150 x 2.1mm, 5 μ m, Zorbax, Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて、実施した。

【 0 0 6 6 】

線形勾配溶出を、アセトニトリル (A) 及び 0.2 % 蟻酸含有 2 mM 酢酸アンモニウム (B) を含む移動相を用いて、0.35 ml / 分の流速で実施した。勾配は、30 % 溶離剤 A 及び 70 % 溶離剤 B で 3 分間、開始し、そして 2 分で 40 % 溶離剤 B まで、直線的に変化し、そして 2 分間、そのままであった。次に、勾配は、1 分で 95 % 溶離剤 B に戻り、そしてこの % で 6 分間、維持した。分析カラム及びオートサンプラーの温度は、両者とも室温に設定された。次に、すべての液体クロマトグラフィー溶離剤を、大気圧化学イオン化 ($APCI$) 源中に導入した。質量分析条件は次の通りであった：ガス 1、窒素 (30 psi)；ガス 2、窒素 (30 psi)；ネブライザー電流 (5.0 v)；源温度、40

0 ;カーテンガス、窒素(25 psi)。LGT-EについてのHPLCクロマトグラムが、図2に示される。

【0067】

LGT-EのCEを評価するために使用される細胞系。本明細書における実施例に記載されるLGT-Eの化学感作効果の連続した分析は、次のヒト細胞系を利用した：(i)ドセタキセル耐性前立腺癌系DU145-TxR及びPC3-TxR(Department of Medicine, University of Pittsburgh and Partners Healthcareにより提供されたが、実施例2~7で使用されたPC3-TxR細胞は、University of Michiganから得られた)；(ii)ドセタキセル感受性系PC3及びDU145(ATCC, Manassas, VA, USAから購入された)；(iii)ハーセプチン(登録商標)感受性HER2陽性乳癌系BT474(Dr. Cui, Cedars-Sinai, Beverly Hills, CAにより提供された)；(iv)ハーセプチン(登録商標)耐性HER2陽性乳癌系SKBR3(Dr. Xiaojiang Cui, Cedars-Sinai, Beverly Hills, CAにより提供された)；及び(v)ドキシソルピシン感受性及び耐性骨髓性白血病系K562/Dox(Dr. Kenneth Chan, Ohio State Universityにより提供された)。

【0068】

実施例2

ドセタキセルに対する、ドセタキセル耐性前立腺癌細胞系PC3-TxRの感作に対するLGT-Eの用量-依存性効果。PC3-TxR細胞を、10%ウシ胎児血清により補充されたRPMI1640(Thermo Scientific, Logan, UT)中、3000個の細胞、及びペニシリン(100 U/ml)及びストレプトマイシン(100 µg/ml)の溶液(Life Technologies Grand Island, NY)を含む培地100 µlを、各ウェル中に配置することにより、蓋付きの無菌F-底Cellstar(登録商標)ウェル細胞培養プレート(カタログ番号655180, Greiner Bio-one, Monroe, NCからの購入された)中に配置した。細胞は、配置の時点で第52継代細胞であった。三連ウェルを、試験される各実験条件に割り当て、そしてウェルの播種に続いて、24時間の回復期間を可能にした。回復期間の間、細胞は、37 °C及び5%CO₂下でインキュベートされた。

【0069】

適切な量のLGT-E粉末をDMSOに添加し、500 mg/mlの原液を形成することにより、LGT-Eを調製した。原液を交互にボルテックスにかけ、そしてLGT-E粉末が溶液になるまで、音波処理した。原液を、RPMI1640培地(Mediatech, Manassas, VA, 又はLife Technologies Grand Island, NY)に希釈し、所望する濃度のLGT-E(例えば、12, 25、又は60 µg/ml)とした。

【0070】

LGT-Eによる細胞の前処理を、ウェルから培地を吸引し、続いて12又は25 µg/mlの何れかの濃度のLGT-E溶液を含むLGT-E溶液50 µlを添加し、そして37 °C及び5%CO₂の条件下で2時間、細胞をインキュベートすることにより実施した。2時間の前処置期間の最後で、RPMI1640培地(すなわち、100、33.3、10.0、3.33、1.0、0.333、0.1及び0.001 nM)中、1×10²~1×10⁻³ mMのドセタキセルを含むドセタキセル50 µlアリコート、LGT-E培地の存在下で、前記前処置された細胞に添加した。細胞に添加される直前、ドセタキセルを、原液(DMSO中、105 µMのドセタキセル、カタログ番号01885, Sigma-Aldrich, St. Louis, MOから購入された)から希釈した。ドセタキセルの添加の後、細胞を、前処置段階に使用される同じ温度及び雰囲気条件下で、さらに72時間インキュベートした。

【0071】

72時間のドセタキセル処置期間に続いて、スルホローダミンB(SRB)アッセイを用いて、生存細胞を定量化した。培地を各ウェルから吸引し、そして冷トリクロ酢酸(TCA)(カタログ番号T6399, Sigma-Aldrichから購入された)の10%溶液により置換し、そして4 °Cで1時間インキュベートした。TCAインキュベーションの後、TCA溶液を吸引し、そして細胞を、水道水により5度洗浄した。最後の洗浄液を除いた後

、プレートを、蓋を除いて、表面が乾燥するまで（１～２時間を要する）、室温で放置した。次に、スルオロダミンＢ（ＳＲＢ）ナトリウム塩（カタログ番号Ｓ９０１２、Sigma-Aldrichから購入された）の０．４％溶液５０μｌを、各ウェルに添加し、そしてプレートを室温で２０～３０分間インキュベートした。その後、ウェルを、１０ｍＭのＴＲＩＳ塩基（カタログ番号１６１－０７１９、Bio-Rad Laboratories, Hercules, CAから購入された）中、１％酢酸溶液により５度洗浄した。続いて、プレートを、数時間、又は一晩、乾燥するまで放置した。乾燥されたウェルに残ったＳＲＢを、各ウェルに１００μｌのＳＲＢ可溶性溶液（１０ｍＭのＴＲＩＳ塩基）を添加し、そしてプレートを、緩やかに動く振盪機上に配置するか、又はプレートを、ＳＲＢが溶解するまで（約５～１０分を有する）、室温で静止したままにすることにより、溶解した。固定化された生存細胞の数に直接相関する、各ウェル中のＳＲＢの量を、マイクロプレートリーダーにより、５６５ｎｍの吸光度で分光光度的に決定した。細胞生存率の増加又は減少を、ＬＧＴ－Ｅ前処置細胞と、またドセタキセルにより処置されたが、しかしＬＧＴ－Ｅによっては処置されていない細胞とを比較することにより決定した。

【００７２】

この実施例に記載される実験についての結果は、次の通りである：表１及び３は、１２及び２５μｇ／ｍｌのＬＧＴ－Ｅによる前処置に関する細胞生存率を報告し；表２及び４は、割り当てられた濃度のドセタキセルのみにより細胞を処置することにより得られた対照データを報告する。図３は、表１－４のデータをグラフ形で要約する。

【００７３】

【表１】

表１

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	0.090	0.140	0.422	1.275	1.924	2.084	2.091	2.084
	0.077	0.143	0.460	1.329	2.011	2.124	2.125	2.074
	0.084	0.145	0.418	1.225	2.066	2.140	2.249	1.979
平均 A	0.084	0.143	0.433	1.276	2.000	2.116	2.155	2.046
SD	0.007	0.003	0.023	0.052	0.072	0.029	0.083	0.058
% 生存	4.1	7.0	21.2	62.4	97.8	103.4	105.3	100.0
CV	7.79	1.77	5.35	4.08	3.58	1.36	3.86	2.83

【００７４】

【表２】

表２

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	0.243	0.672	1.716	2.124	2.316	2.142	2.190	2.257
	0.257	0.699	1.734	2.195	2.337	2.354	2.216	2.185
	0.252	0.605	1.676	2.184	2.354	2.173	2.151	2.215
平均 A	0.251	0.659	1.709	2.168	2.336	2.223	2.186	2.219
SD	0.007	0.048	0.030	0.038	0.019	0.115	0.033	0.036
% 生存	11.3	29.7	77.0	97.7	105.3	100.2	98.5	100.0
CV	2.83	7.35	1.74	1.76	0.82	5.15	1.50	1.63

【 0 0 7 5 】

【 表 3 】

表 3

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	0.092 0.115 0.085	0.104 0.102 0.095	0.200 0.203 0.179	0.754 0.699 0.681	1.672 1.774 1.634	2.013 2.104 1.991	2.071 2.122 1.960	2.027 2.066 2.068
平均 A	0.097	0.100	0.194	0.711	1.693	2.036	2.051	2.053
SD	0.016	0.005	0.013	0.038	0.072	0.060	0.083	0.023
% 生存	4.7	4.9	9.4	34.6	82.5	99.1	99.9	100.0
CV	16.19	4.73	6.76	5.35	4.28	2.94	4.04	1.13

10

【 0 0 7 6 】

【 表 4 】

表 4

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	0.332 0.306 0.313	0.763 0.776 0.801	1.791 1.862 1.802	2.350 2.321 2.332	2.432 2.369 2.255	2.413 2.373 2.314	2.363 2.292 2.360	2.449 2.376 2.285
平均 A	0.317	0.780	1.818	2.334	2.352	2.366	2.338	2.370
SD	0.013	0.019	0.038	0.015	0.090	0.050	0.040	0.082
% 生存	13.4	32.9	76.7	98.5	99.2	99.9	98.7	100.0
CV	4.25	2.48	2.10	0.63	3.82	2.10	1.72	3.47

20

【 0 0 7 7 】

実施例 3

ドセタキセルに対する、ドセタキセル耐性前立腺癌系である DU145-TrX の感作に対する LGT-E の用量依存効果。実施例 2 に記載される方法を用いて、ドセタキセル処置された DU145-TrX 細胞に対する LGT-E 前処置の化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、50、25 又は 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LGT-E により前処置し、その後、 $1 \times 10^2 \sim 10^{-3}$ nM のドセタキセルを含む、1 : 3 連続的希釈のドセタキセルのアリコート 50 μl により細胞を処置した。DU145-TrX 細胞を、第 38 継代でプレートに配置した。表 5、7 及び 9 は、それぞれ、50、25 及び 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LGT-E による前処置に関する細胞生存率データを報告する。表 6、8 及び 10 は、LGT-E により前処置されなかった DU145-TrX 細胞から得られた対照データを報告する。図 4 は、表 5 - 10 のデータを、グラフ形で要約する。

30

40

【 0 0 7 8 】

【表 5】

表 5

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	0.110	0.103	0.260	0.638	1.565	1.846	1.854	1.922
	0.103	0.103	0.214	0.679	1.576	1.978	1.989	1.985
	0.118	0.115	0.222	0.741	1.770	1.978	1.974	2.076
平均 A	0.110	0.107	0.232	0.686	1.637	1.934	1.939	1.994
SD	0.008	0.007	0.025	0.052	0.115	0.076	0.074	0.077
% 生存	5.5	5.4	11.6	34.4	82.1	97.0	97.2	100.0
CV	6.81	6.48	10.60	7.56	7.04	3.94	3.82	3.88

10

【0079】

【表 6】

表 6. DU145-TxR細胞、前処置なし

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	2.268	2.368	2.380	2.399	2.385	2.360	2.441	2.408
	2.159	2.369	2.397	2.434	2.398	2.414	2.379	2.309
	2.192	2.304	2.332	2.316	2.350	2.318	2.338	2.262
平均 A	2.206	2.347	2.370	2.383	2.378	2.364	2.386	2.326
SD	0.056	0.037	0.034	0.061	0.025	0.048	0.052	0.075
% 生存	94.8	100.9	101.9	102.4	102.2	101.6	102.6	100.0
CV	2.53	1.59	1.42	2.54	1.04	2.04	2.17	3.20

20

【0080】

【表 7】

表 7

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	0.139	0.337	0.762	1.752	2.312	2.349	2.437	2.379
	0.142	0.332	0.825	1.863	2.385	2.534	2.377	2.359
	0.158	0.305	0.786	1.681	2.298	2.334	2.432	2.354
平均 A	0.147	0.325	0.791	1.766	2.332	2.406	2.416	2.364
SD	0.010	0.017	0.032	0.092	0.047	0.111	0.033	0.013
% 生存	6.2	13.7	33.5	74.7	98.6	101.8	102.2	100.0
CV	6.96	5.30	4.02	5.20	2.00	4.63	1.38	0.56

40

【0081】

【表 8】

表 8

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	2.185	2.349	2.450	2.494	2.430	2.525	2.531	2.492
	2.194	2.371	2.444	2.450	2.438	2.453	2.449	2.369
	2.136	2.302	2.269	2.342	2.428	2.323	2.327	2.297
平均 A	2.172	2.341	2.388	2.429	2.432	2.434	2.436	2.386
SD	0.031	0.035	0.103	0.078	0.005	0.102	0.103	0.099
% 生存	91.0	98.1	100.1	101.8	101.9	102.0	102.1	100.0
CV	1.44	1.51	4.31	3.22	0.22	4.21	4.21	4.13

10

【0082】

【表 9】

表 9

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	0.420	1.055	2.116	2.412	2.562	2.451	2.538	2.562
	0.408	1.059	2.152	2.385	2.479	2.538	2.540	2.650
	0.542	1.090	2.219	2.365	2.635	2.522	2.596	2.612
平均 A	0.457	1.068	2.163	2.388	2.559	2.504	2.558	2.608
SD	0.074	0.019	0.052	0.024	0.078	0.046	0.033	0.044
% 生存	17.5	41.0	82.9	91.5	98.1	96.0	98.1	100.0
CV	16.22	1.79	2.42	0.99	3.05	1.85	1.29	1.69

20

【0083】

【表 10】

表 10. Du145-TxR細胞、前処置なし

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	2.342	2.416	2.402	2.480	2.513	2.454	2.600	2.538
	2.274	2.395	2.508	2.511	2.551	2.494	2.600	2.515
	2.196	2.338	2.372	2.409	2.372	2.372	2.391	2.439
平均 A	2.271	2.383	2.428	2.467	2.479	2.440	2.531	2.498
SD	0.073	0.040	0.071	0.052	0.094	0.062	0.121	0.052
% 生存	90.9	95.4	97.2	98.8	99.3	97.7	101.3	100.0
CV	3.22	1.69	2.94	2.12	3.80	2.55	4.77	2.07

40

【0084】

実施例 4

ドセタキセル耐性前立腺癌細胞のドセタキセル感受性に対するドセタキセル感受性前立腺癌細胞のドセタキセル感受性の比較。ドセタキセル耐性細胞系がそれらのそれぞれの親ドセタキセル感受性細胞系よりも、ドセタキセルに対してより耐性である程度を決定するために、ドセタキセル耐性PC3-TxR細胞系、及びPC3-TxRが由来するドセタ

50

キセル感受性細胞系 P C 3 の細胞生存率を、L G T - E 前処置の不在下でドセタキセル処置に従って比較した。細胞培養条件、ドセタキセル処置、及び細胞生存率分析を、実施例 2 に記載のようにして実施した。実施例 2 のように、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-3}$ n M のドセタキセルを含む、1 : 3 で連続的に希釈されたドセタキセルのアリコート 50 μ l により、細胞を処置した。P C 3 - T r X 及び P C 3 細胞を、それぞれ、第 5 2 継代及び第 1 1 継代でプレートに配置した。表 1 1 及び 1 2 は、それぞれ、ドセタキセル耐性 P C 3 - T r X 細胞及びドセタキセル感受性 P C 3 細胞のドセタキセル処置から得られたデータを示す。図 5 は、表 1 1 及び 1 2 のデータを、グラフ形式で要約する。

【 0 0 8 5 】

【表 1 1】

10

表 1 1

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.049	0.332	0.763	1.791	2.350	2.432	2.413	2.363	2.449
	0.306	0.776	1.862	2.321	2.369	2.373	2.292	2.376
	0.313	0.801	1.802	2.332	2.255	2.314	2.360	2.285
平均 A	0.317	0.780	1.818	2.334	2.352	2.366	2.338	2.370
SD	0.013	0.019	0.038	0.015	0.090	0.050	0.040	0.082
% 生存	13.4	32.9	76.7	98.5	99.2	99.9	98.7	100.0
CV	4.25	2.48	2.10	0.63	3.82	2.10	1.72	3.47

20

【 0 0 8 6 】

【表 1 2】

表 1 2

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.049	0.287	0.354	0.448	1.038	1.811	1.982	2.591	2.362
	0.331	0.370	0.450	1.090	1.855	2.247	2.097	2.291
	0.330	0.339	0.517	0.976	1.797	2.091	2.111	2.082
平均 A	0.316	0.354	0.472	1.035	1.821	2.107	2.266	2.245
SD	0.025	0.016	0.039	0.057	0.030	0.133	0.281	0.146
% 生存	14.1	15.8	21.0	46.1	81.1	93.8	101.0	100.0
CV	7.95	4.38	8.33	5.52	1.66	6.32	12.41	6.48

30

【 0 0 8 7 】

実施例 5

40

ドセタキセル感受性及びドセタキセル耐性前立腺癌細胞についての L G T - E $I C_{50}$ の決定。L G T - E $I C_{50}$ 濃度を、ドセタキセル感受性細胞系 P C 3 及び D U 1 4 5、及びそれらのドセタキセル耐性亜系について決定した。細胞培養条件及び細胞生存率分析を、実施例 2 に記載のようにして実施した。実施例 2 とは異なって、細胞は、100.0、33.3、10.0、3.33、1.0、0.333、0.1又は0.001 μ g / m l の L G T - E の存在下で標準培養条件下での72時間のインキュベーションに供され、そして細胞はドセタキセルにより処置されなかった。P C 3 及び P C 3 - T r X 細胞を、それぞれ第 1 5 継代及び第 3 8 継代でプレートに配置し、そして D U 1 4 5 及び D U 1 4 5 - T r X 細胞をそれぞれ、第 4 6 継代でプレートに配置した。表 1 3 及び 1 4 は、それ

50

それ P C 3 及び P C 3 - T x R 細胞から得られた細胞生存率データを報告する。表 1 5 及び 1 6 は、それぞれ D U 1 4 5 - T r X 及び D U 1 4 5 細胞から得られた細胞生存率データを報告する。図 6 は、表 1 3 ~ 1 6 のデータを、グラフ形式で要約する。

【 0 0 8 8 】

【表 1 3】

表 1 3

LGT-E ($\mu\text{g/ml}$)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	0.355	0.208	0.255	0.665	1.327	1.649	1.555	1.629
	0.328	0.186	0.250	0.560	1.496	1.723	1.658	1.705
	0.323	0.181	0.235	0.590	1.281	1.629	1.579	1.668
平均 A	0.335	0.192	0.247	0.605	1.368	1.667	1.597	1.667
SD	0.017	0.014	0.010	0.054	0.113	0.050	0.054	0.038
% 生存	20.1	11.5	14.8	36.3	82.0	100.0	95.8	100.0
CV	5.13	7.49	4.22	8.94	8.27	2.97	3.37	2.28

10

【 0 0 8 9 】

【表 1 4】

表 1 4

LGT-E ($\mu\text{g/ml}$)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	0.354	0.245	0.279	1.261	2.395	2.416	2.468	2.455
	0.366	0.260	0.311	1.503	2.445	2.559	2.536	2.495
	0.353	0.241	0.291	1.331	2.394	2.508	2.497	2.506
平均 A	0.358	0.249	0.294	1.365	2.411	2.494	2.500	2.485
SD	0.007	0.010	0.016	0.125	0.029	0.072	0.034	0.027
% 生存	14.4	10.0	11.8	54.9	97.0	100.4	100.6	100.0
CV	2.02	4.03	5.50	9.12	1.21	2.91	1.36	1.08

30

【 0 0 9 0 】

【表 1 5】

表 1 5

LGT-E ($\mu\text{g/ml}$)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.043	1.247	0.442	1.224	1.883	1.966	1.936	1.953	1.880
	1.699	0.416	1.156	1.948	1.995	1.999	2.056	2.034
	1.173	0.444	0.869	1.827	1.940	2.002	1.962	1.896
平均 A	1.373	0.434	1.083	1.886	1.967	1.979	1.990	1.936
SD	0.285	0.016	0.188	0.061	0.028	0.037	0.057	0.085
% 生存	70.9	22.4	55.9	97.4	101.6	102.2	102.8	100.0
CV	0.207	0.036	0.174	0.032	0.014	0.019	0.029	0.044

40

50

【 0 0 9 1 】

【 表 1 6 】

表 1 6

LGT-E ($\mu\text{g/ml}$)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.043	1.036 1.104 0.854	0.217 0.257 0.272	0.651 0.685 0.792	2.179 2.148 2.129	2.162 2.174 2.083	2.235 2.229 2.150	2.163 2.097 2.115	2.109 2.090 2.002
平均 A	0.998	0.248	0.709	2.152	2.139	2.204	2.125	2.067
SD	0.129	0.028	0.074	0.025	0.049	0.047	0.034	0.057
% 生存	48.3	12.0	34.3	104.1	103.5	106.7	102.8	100.0
CV	0.130	0.115	0.104	0.012	0.023	0.022	0.016	0.028

10

【 0 0 9 2 】

実施例 6

種々の化学療法剤及び癌細胞系により対にされる場合のLGT-EについてのCE値の比較。この比較においては、LGT-E IC_{50} を、次のものについて決定した：(i) ドセタキセル感受性細胞系PC3及びDU145、並びにそれらのドセタキセル耐性亜系により対にされたドセタキセル；(ii) それぞれ、ドキソルビシン感受性及び耐性骨髓白血病系K562及びK562/Doxにより対にされたドキソルビシン；(iii) ハーセプチン（登録商標）感受性、HER2陽性乳管癌系BT474；及び(iv) ハーセプチン（登録商標）耐性、HER2陽性乳管癌系SkBr3。上記細胞系の細胞培養を、実施例2に記載された通りに実施したが、但し3,000ではなく5,000の細胞を、K562、K562/Dox、BT474、SkBr3系について、ウェル当たりに配置した。

20

【 0 0 9 3 】

LGT-Eと組み合わせて、化学感作について試験される化学療法剤は、ドセタキセル、ダウノルビシン、ハーセプチン（登録商標）及びラパチニブであった。それらの薬物についての IC_{50} を決定し、そしてそれらの研究に使用される細胞系の既知薬物感受性を確認するために、細胞系を上で詳述した通りにプレートに配置し、そして表17に示されるようにして、前述の化学療法剤の存在下で72時間培養し、続いて細胞生存率のSRB分析を実施した。表17はまた、各細胞が試験される、連続的に希釈された濃度の薬物も含む。

30

【 0 0 9 4 】

【 表 1 7 】

表 1 7

化学療法剤	IC_{50} を決定するために使用される薬物濃度の範囲	IC_{50} を決定するために使用される細胞系
ドセタキセル	100, 33, 10, 3.3, 1, 0.3, 0.1 (nM)	PC3及びDU145
ハーセプチン (登録商標)	30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 (μM)	BT474
ラパチニブ	20, 6.7, 2, 0.7, 0.2, 0.07, 0.02 (μM)	BT474 及び SkBr3
ダウノルビシン	100, 33, 10, 3.3, 1, 0.3, 0.1 (μM)	K562

40

【 0 0 9 5 】

IC_{50} 濃度を、ドセタキセル、ダウノルビシン、ハーセプチン（登録商標）及びラパチ

50

ニブについて決定した後、薬物についてのCE値を、実施例2及び4に記載のようにして調製され、プレートに配置され、そして生存性アッセイされた化学療法剤耐性細胞の培養物を、12.5、25及び50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でのLGT-Eにより前処置することにより決定した。実施例2のように、前処置期間は2時間であった。表18は、化学療法剤についてのCE決定の結果を要約する。

【0096】

【表18】

表18

治療剤	感作剤 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		細胞系	細胞が薬物のみに より処置された時の 薬物の IC_{50}	細胞が薬物処置の 前に、感作剤により 前処理された時の 薬物の IC_{50}	CE
ドセタキセル	無添加		PC3	1.796 nM (1.45 ng/ml)		
	LGT-E	12.5	PC3-TxR	17.54 nM (14.17 ng/ml)	4.077 nM (3.29 ng/ml)	4.3
	LGT-E	25	PC3-TxR	18.33 nM (14.8 ng/ml)	2.195 nM (1.77 ng/ml)	8.35
	LGT-E	50	DU-145	6.652 nM (5.37 ng/ml)	3.389 nM (2.74 ng/ml)	
	LGT-E	12.5	DU-145-TxR	>100 nM (80.78 ng/ml)	23.49 nM (18.98 ng/ml)	4.26
	LGT-E	25	DU-145-TxR	>100 nM (80.78 ng/ml)	5.759 nM (4.65 ng/ml)	>17.36
ダウノルビン	無添加		K562	1.046 μM (0.55 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	LGT-E	25	K562	32.62 μM (17.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	6.534 μM (3.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	4.99
ハーセプチン (登録商標)	無添加		BT474	3.593 μM (523 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	LGT-E	12.5	BT474-TxR	30 μM (4366 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	30 μM (4366 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.0
ラパチニブ	無添加		BT474	0.1158 μM (0.067 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	LGT-E	12.5	BT474-TxR	20 μM (11.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	4 μM (2.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	5.0
	LGT-E	25	BT474-TxR	11 μM (6.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	2 μM (1.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	5.5
	無添加		SkBr3	0.2407 μM (0.14 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	LGT-E	12.5	SkBr3-TxR	6.204 μM (3.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	3.924 μM (2.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.58

【0097】

実施例7

ドセタキセルに対する、ドセタキセル感受性前立腺癌細胞系DU145の感作に対するLGT-Eの用量-依存性効果。実施例2に記載される方法を用いて、ドセタキセル処置されたDU145に対するLGT-E前処置の化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLGT-Eにより前処置し、その後、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times$

10^{-3} nM のドセタキセルを含む、1 : 3 で連続的に希釈された、ドセタキセルの $50 \mu\text{l}$ アリコートにより、細胞を処置した。表 19 は、細胞生存率データを報告する。表 20 は、LTG-E により前処置されなかった DU145 細胞から得られた対照データを報告する。図 7 は、表 19 及び 20 のデータを、グラフ形式で要約する。

【0098】

【表 19】

表 19

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.060	0.220	0.241	0.620	1.407	2.574	2.685	2.633	2.652
	0.265	0.283	0.610	1.437	2.561	2.581	2.703	2.662
	0.247	0.229	0.656	1.416	2.551	2.645	2.628	2.581
平均 A	0.244	0.251	0.629	1.420	2.562	2.637	2.655	2.632
SD	0.023	0.028	0.024	0.015	0.012	0.052	0.042	0.044
% 生存	9.3	9.6	23.9	54.0	97.4	100.2	100.9	100.0
CV	9.27	11.28	3.85	1.08	0.45	1.99	1.58	1.68

10

【0099】

【表 20】

表 20

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.060	0.589	0.694	1.184	2.318	2.758	2.769	2.740	2.741
	0.650	0.635	1.268	2.365	2.741	2.760	2.733	2.730
	0.555	0.652	1.196	2.453	2.756	2.771	2.775	2.744
平均 A	0.598	0.661	1.216	2.379	2.752	2.767	2.750	2.739
SD	0.048	0.030	0.045	0.069	0.009	0.006	0.023	0.007
% 生存	21.8	24.1	44.4	86.9	100.5	101.0	100.4	100.0
CV	8.04	4.60	3.73	2.88	0.34	0.21	0.82	0.27

20

30

【0100】

実施例 8

ハーセプチン（登録商標）感受性、HER2 陽性乳管癌系 BT474 の LTG-E 前処置により提供される、限定された追加のハーセプチン（登録商標）感作。BT474 細胞のハーセプチン（登録商標）のために適合されるように、実施例 2 及び 9 に記載される細胞培養方法を用いて、ハーセプチン（登録商標）処置された BT474 細胞に対する LTG-E 前処置の化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、 $13 \mu\text{g}/\text{ml}$ の LTG-E により前処置し、その後、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ のハーセプチン（登録商標）を含む、1 : 3 で連続的に希釈されたハーセプチン（登録商標）の $50 \mu\text{l}$ アリコートにより細胞を処置した。表 21 は、ハーセプチン（登録商標）処置の前、LTG-E による前処置に関する細胞生存率データを報告する。表 22 は、ハーセプチン（登録商標）処置の前、LTG-E により前処置されていない細胞から得られた対照データを報告する。図 8 は、表 21 及び 22 のデータを、グラフ形式で要約する。

40

【0101】

【表 2 1】

表 2 1

トラスツズマブ (μM)	30	10	3	1	0.3	0.1	0.03	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.045	0.607 0.693 0.760	0.416 0.708 0.696	0.970 0.959 0.997	1.247 1.321 1.182	1.441 1.417 1.315	1.431 1.328 1.277	1.491 1.323 1.204	1.541 1.423 1.367
平均 A	0.687	0.607	0.976	1.250	1.391	1.346	1.340	1.444
SD	0.077	0.165	0.020	0.070	0.067	0.078	0.144	0.089
% 生存	47.6	42.0	67.6	86.6	96.4	93.2	92.8	100.0
CV	11.16	27.21	2.00	5.56	4.81	5.83	10.76	6.15

10

【0 1 0 2】

【表 2 2】

表 2 2

トラスツズマブ (μM)	30	10	3	1	0.3	0.1	0.03	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.045	0.815 0.565 0.759	0.717 0.648 0.657	1.187 1.225 1.293	1.386 1.462 1.389	1.490 1.581 1.512	1.508 1.669 1.660	1.405 1.678 1.505	1.596 1.690 1.533
平均 A	0.713	0.674	1.235	1.413	1.528	1.613	1.530	1.607
SD	0.131	0.038	0.054	0.043	0.047	0.090	0.138	0.079
% 生存	44.4	42.0	76.9	87.9	95.1	100.4	95.2	100.0
CV	18.39	5.56	4.35	3.05	3.11	5.61	9.03	4.92

20

【0 1 0 3】

実施例 9

ハーセプチン（登録商標）耐性、HER2 陽性乳管癌系 BT474 / Her の LTG - E 前処置により提供される LET - E - 介在性ハーセプチン（登録商標）感作。BT474 細胞のハーセプチン（登録商標）のために適合されるように、実施例 2 及び 9 に記載される細胞培養方法を用いて、ハーセプチン（登録商標）処置された BT474 / Her 細胞に対する LTG - E 前処置の化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、 $13 \mu\text{g}/\text{ml}$ の LTG - E により前処置し、その後、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ のハーセプチン（登録商標）を含む、1 : 3 で連続的に希釈されたハーセプチン（登録商標）の $50 \mu\text{l}$ アリコートにより細胞を処置した。表 2 3 は、ハーセプチン（登録商標）処置の前、LTG - E による前処置に関する細胞生存率データを報告する。表 2 4 は、ハーセ

30

40

【0 1 0 4】

【表 2 3】

表 2 3

トラスツズマブ (μM)	30	10	3	1	0.3	0.1	0.03	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	1.020 0.803 0.468	1.755 1.638 0.920	1.757 1.599 1.655	1.928 1.713 1.680	1.947 1.837 1.829	1.808 1.665 1.772	1.780 1.689 1.729	1.792 1.682 1.695
平均A	0.764	1.438	1.670	1.774	1.871	1.748	1.733	1.723
SD	0.278	0.452	0.080	0.135	0.066	0.074	0.046	0.060
%生存	44.3	83.4	96.9	102.9	108.6	101.5	100.6	100.0
CV	36.41	31.45	4.80	7.59	3.52	4.25	2.63	3.49

10

【 0 1 0 5 】

【表 2 4】

表 2 4

トラスツズマブ (μM)	30	10	3	1	0.3	0.1	0.03	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	1.870 2.271 2.216	1.758 2.417 2.254	1.867 2.299 2.172	2.128 2.271 2.216	2.104 2.327 2.346	2.137 2.323 2.279	2.016 2.346 2.249	2.238 2.432 2.386
平均 A	2.119	2.143	2.113	2.205	2.259	2.246	2.204	2.352
SD	0.217	0.343	0.222	0.072	0.135	0.097	0.170	0.101
%生存	90.1	91.1	89.8	93.8	96.0	95.5	93.7	100.0
CV	10.26	16.02	10.51	3.27	5.96	4.33	7.70	4.31

20

【 0 1 0 6 】

実施例 1 0

ラパチニブの IC_{50} を、ハーセプチン（登録商標）感受性 BT 4 7 4 細胞系について決定した。細胞培養条件及び細胞生存率分析を、実施例 2 に記載のようにして実施したが、但し 5 0 0 0 の細胞をウェル当たり配置した。しかしながら、実施例 2 とは異なって、細胞は、表 2 5 に示される濃度 (μM) のラパチニブの存在下で標準培養条件下で 7 2 時間のインキュベーションに供された。ラパチニブ IC_{50} データがまた、表 2 5 に報告され、そして図 1 0 にグラフで表される。

【 0 1 0 7 】

30

【表 2 5】

表 2 5

ラパチニブ (μM)	50	16.7	5	1.67	0.5	0.167	0.05	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.046	0.035	0.137	0.240	0.383	0.415	0.909	1.082	1.655
	0.063	0.137	0.250	0.347	0.501	0.894	1.083	1.745
	0.018	0.134	0.224	0.338	0.445	0.838	1.165	1.664
平均A	0.038	0.136	0.238	0.356	0.453	0.880	1.110	1.688
SD	0.023	0.002	0.013	0.024	0.044	0.037	0.048	0.050
%生存	2.3	8.0	14.1	21.1	26.9	52.1	65.7	100.0
CV	59.45	1.28	5.52	6.70	9.63	4.25	4.29	2.94

10

【0108】

実施例 11

ハーセプチン（登録商標）耐性、HER2陽性乳管癌系BT474-TxRのLTG-E前処置により提供されるLET-E-介在性ハーセプチン（登録商標）感作。BT474細胞のハーセプチン（登録商標）のために適合されるように、実施例2及び9に記載される細胞培養方法を用いて、ハーセプチン（登録商標）処置されたBT474-TxR細胞に対するLTG-E前処置の化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、 $13\mu\text{g}/\text{ml}$ のLTG-Eにより前処置し、その後、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{-3}\mu\text{M}$ のハーセプチン（登録商標）を含む、1:3で連続的に希釈されたハーセプチン（登録商標）の50 μl アリコートにより細胞を処置した。表26は、ハーセプチン（登録商標）処置の前、LTG-Eによる前処置に関する細胞生存率データを報告する。表27は、ハーセプチン（登録商標）処置の前、LTG-Eにより前処置されていない細胞から得られた対照データを報告する。図11は、表26及び27のデータを、グラフ形式で要約する。

20

【0109】

【表 2 6】

30

表 2 6

トラスツズマブ (μM)	200	66.7	20	6.67	2	0.667	0.2	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.045	1.480	1.066	1.012	1.577	1.901	1.836	1.848	1.867
	1.555	0.986	1.011	1.533	2.098	1.939	1.955	1.909
	1.580	1.115	1.017	1.529	2.062	1.929	1.873	1.885
平均A	1.538	1.056	1.013	1.546	2.020	1.901	1.892	1.887
SD	0.052	0.065	0.004	0.027	0.105	0.057	0.056	0.021
%生存	81.5	55.9	53.7	81.9	107.1	100.8	100.3	100.0
CV	3.38	6.15	0.35	1.73	5.21	2.99	2.94	1.12

40

【0110】

【表 2 7】

表 2 7

トラスツズマブ (μM)	200	66.7	20	6.67	2	0.667	0.2	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.045	2.089	1.959	1.985	2.071	2.049	1.982	1.929	1.948
	1.811	1.803	1.461	1.980	2.106	2.058	2.096	2.050
	1.980	2.063	1.600	2.099	2.224	2.134	2.015	2.090
平均A	1.960	1.941	1.682	2.050	2.126	2.058	2.013	2.029
SD	0.140	0.131	0.272	0.062	0.089	0.076	0.084	0.073
%生存	96.6	95.7	82.9	101.0	104.8	101.4	99.2	100.0
CV	7.15	6.75	16.15	3.03	4.20	3.71	4.16	3.61

10

【0 1 1 1】

実施例 1 2

ハーセプチン（登録商標）耐性、HER2 陽性乳管癌系 BT 4 7 4 - T x R の LTG - E 前処置により提供される LET - E - 介在性ラパチニブ感作。BT 4 7 4 細胞のために適合されるように、実施例 2 及び 9 に記載される細胞培養方法を用いて、ラパチニブ処置された BT 4 7 4 - T x R 細胞に対する LTG - E 前処置の化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、12.5 又は 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LTG - E により前処置し、その後、 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ のラパチニブを含む、1 : 3 で連続的に希釈されたラパチニブの 50 μl アリコートにより細胞を処置した。表 2 8 及び 3 0 は、ラパチニブ処置の前、12.5 又は 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LTG - E による前処置に関する細胞生存率データを報告する。表 2 9 及び 3 1 は、ラパチニブ処置の前、LTG - E により前処置されていない細胞から得られた対照データを報告する。図 1 2 は、表 2 8 - 3 1 のデータを、グラフ形式で要約する。

20

【0 1 1 2】

【表 2 8】

30

表 2 8

ラパチニブ (μM)	20	6.7	2	0.67	0.2	0.067	0.02	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.045	0.416	0.512	0.526	0.594	0.738	1.024	0.898	1.048
	0.393	0.434	0.521	0.602	0.712	0.871	0.968	0.980
	0.404	0.437	0.552	0.596	0.670	0.836	0.944	0.962
平均 A	0.405	0.461	0.533	0.598	0.707	0.911	0.937	0.997
SD	0.012	0.044	0.017	0.004	0.034	0.100	0.036	0.045
% 生存	40.6	46.3	53.5	59.9	70.9	91.3	94.0	100.0
CV	2.84	9.58	3.12	0.70	4.85	10.98	3.80	4.55

40

【0 1 1 3】

【表 2 9】

表 2 9

ラパチニブ (μM)	20	6.7	2	0.67	0.2	0.067	0.02	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.045	0.598	0.677	0.726	0.742	0.932	1.043	1.054	1.137
	0.616	0.677	0.717	0.752	0.956	1.126	1.125	1.085
	0.567	0.667	0.774	0.844	0.993	1.151	1.132	1.181
平均 A	0.594	0.674	0.739	0.780	0.961	1.107	1.104	1.135
SD	0.025	0.006	0.031	0.056	0.031	0.057	0.043	0.048
% 生存	52.3	59.4	65.2	68.7	84.7	97.6	97.3	100.0
CV	4.17	0.86	4.15	7.21	3.20	5.11	3.91	4.24

10

【 0 1 1 4 】

【表 3 0】

表 3 0

ラパチニブ (μM)	20	6.7	2	0.67	0.2	0.067	0.02	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	0.264	0.337	0.485	0.654	0.762	0.953	1.016	1.041
	0.222	0.413	0.516	0.483	0.640	0.664	0.749	0.939
	0.231	0.316	0.447	0.512	0.548	0.603	0.699	0.893
平均 A	0.239	0.355	0.482	0.549	0.650	0.740	0.821	0.957
SD	0.022	0.051	0.035	0.092	0.107	0.187	0.170	0.076
% 生存	24.9	37.1	50.4	57.4	67.9	77.3	85.8	100.0
CV	9.27	14.38	7.17	16.66	16.53	25.28	20.76	7.91

20

【 0 1 1 5 】

【表 3 1】

表 3 1

ラパチニブ (μM)	20	6.7	2	0.67	0.2	0.067	0.02	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	0.530	0.647	0.779	0.881	0.933	1.148	1.021	1.160
	0.445	0.604	0.673	0.818	0.841	1.073	0.968	1.147
	0.571	0.694	0.686	0.790	0.941	1.017	0.924	1.221
平均 A	0.515	0.648	0.712	0.829	0.905	1.079	0.971	1.176
SD	0.064	0.045	0.058	0.047	0.056	0.066	0.049	0.040
% 生存	43.8	55.1	60.6	70.5	76.9	91.8	82.6	100.0
CV	12.48	6.95	8.12	5.62	6.14	6.09	5.00	3.36

40

【 0 1 1 6 】

実施例 1 3

ラパチニブ感受性 H E R 2 陽性乳癌系 S k B r 3 のラパチニブ感受性の、そのラパチニブ耐性垂系のそのラパチニブ感受性に対する比較。ラパチニブ耐性細胞系がそれらのそれぞれの親ラパチニブ感受性細胞系よりも、ラパチニブに対してより耐性である程度を決定するために、ラパチニブ耐性 S k B r 3 - T x R 細胞系、及び S k B r 3 - T x R が由来

50

するラパチニブ感受性細胞系 S k B r 3 の細胞生存率を、化学感作前処置段階の不在下でラパチニブ処置に従って比較した。細胞培養条件、及び細胞生存率分析を、実施例 2 に記載のようにして実施した。実施例 2 におけるように、細胞を、20、6.7、2、0.7、0.2、0.07又は0.02 μ Mのラパチニブを含むアリコート50 μ lにより処置した。表32及び33は、それぞれ、S k B r 3 及び S k B r 3 - T x R 系におけるラパチニブ用量 - 応答を示す。図13は、表32 - 33のデータを、グラフ形式で要約する。

【0117】

【表32】

表32

ラパチニブ(μ M)	20	6.7	2	0.67	0.2	0.067	0.02	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	0.220	0.206	0.344	0.738	1.325	1.710	2.038	2.216
	0.215	0.198	0.331	0.681	1.255	1.681	1.934	2.145
	0.228	0.228	0.365	0.705	1.362	1.729	2.195	2.247
平均A	0.221	0.211	0.347	0.708	1.314	1.707	2.056	2.203
SD	0.007	0.016	0.017	0.029	0.054	0.024	0.131	0.052
%生存	10.1	9.6	15.8	32.2	59.7	77.5	93.3	100.0
CV	2.96	7.36	4.94	4.04	4.13	1.42	6.39	2.37

【0118】

【表33】

表33

ラパチニブ(μ M)	20	6.7	2	0.67	0.2	0.067	0.02	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.047	0.605	1.117	1.754	2.086	2.205	2.350	2.341	2.244
	0.599	1.069	1.781	2.177	2.233	2.314	2.390	2.301
	0.615	1.012	1.790	2.063	2.264	2.370	2.340	2.349
平均A	0.607	1.066	1.775	2.109	2.234	2.345	2.357	2.298
SD	0.008	0.053	0.019	0.060	0.030	0.028	0.029	0.053
%生存	26.4	46.4	77.2	91.8	97.2	102.0	102.6	100.0
CV	1.33	4.93	1.06	2.86	1.32	1.21	1.21	2.29

【0119】

実施例14

ハーセプチン(登録商標)及びラパチニブ耐性、HER2陽性乳がん細胞系 S k B r 3 - T x R の L T G - E 前処置により提供される L E T - E - 介在性ラパチニブ感作。実施例2及び9に記載される細胞培養方法を用いて、但し、5000の S k B r 3 - T x R 細胞をプレート当たり配置し、ラパチニブ処置された S k B r 3 - T x R 細胞に対する L T G - E 化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、12.5 μ g/mlの L T G - E により前処置し、その後、20、6.7、2、0.7、0.2、0.07又は0.02 μ Mのラパチニブを含む、ラパチニブの50 μ lアリコートにより細胞を処置した。表34は、前処置に関する細胞生存率データを報告する。表35は、ラパチニブ処置の前、L G T - E により前処置されていない細胞から得られた対照データを報告する。図14は、表34及び35のデータを、グラフ形式で要約する。

【0120】

10

20

30

40

【表 3 4】

表 3 4

ラパチニブ(μM)	20	6.7	2	0.67	0.2	0.067	0.02	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.044	0.424	0.810	1.378	1.679	2.042	2.101	2.109	2.226
	0.435	0.716	1.235	1.652	1.967	1.939	2.223	2.238
	0.358	0.790	1.431	1.712	1.986	2.111	2.121	2.177
平均 A	0.406	0.772	1.348	1.681	1.999	2.051	2.151	2.214
SD	0.042	0.050	0.101	0.030	0.039	0.097	0.063	0.032
%生存	18.3	34.9	60.9	75.9	90.3	92.6	97.2	100.0
CV	1.33	4.93	1.06	2.86	1.32	1.21	1.21	2.29

10

【0 1 2 1】

【表 3 5】

表 3 5

ラパチニブ(μM)	20	6.7	2	0.67	0.2	0.067	0.02	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.044	0.481	1.124	1.684	2.067	2.083	2.181	2.233	2.324
	0.657	1.068	1.543	2.071	2.223	2.213	2.287	2.289
	0.612	1.092	1.613	1.974	2.100	2.225	2.306	2.267
平均A	0.584	1.095	1.614	2.038	2.136	2.207	2.276	2.294
SD	0.091	0.028	0.071	0.055	0.076	0.023	0.038	0.029
%生存	25.4	47.7	70.4	88.8	93.1	96.2	99.2	100.0
CV	15.67	2.57	4.37	2.69	3.58	1.03	1.66	1.25

20

【0 1 2 2】

実施例 1 5

ダウノルビシン感受性骨髄性白血病系 K 5 6 2 におけるダウノルビシンに対する感作の L G T - E 介在性上昇は存在しない。実施例 2 に記載される細胞培養方法を用いて、ダウノルビシン処置された K 5 6 2 細胞に対する L T G - E の化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の L G T - E により前処置し、その後、細胞を、 $30 \sim 1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ のダウノルビシンを含む、1 : 3 で連続的に希釈された $50 \mu\text{l}$ のアリコートにより処置した。表 3 6 は、ダウノルビシン処置の前、L T G - E による前処置に関する細胞生存率データを報告する。表 3 7 は、ダウノルビシン処置の前、L K G T - E により前処置されていない細胞から得られる対照データを報告する。図 1 5 は、表 3 6 及び 3 7 のデータを、グラフ形式で要約する。

30

40

【0 1 2 3】

【表 3 6】

表 3 6

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.044	0.585 0.483 0.591	0.854 0.723 0.591	1.422 1.266 0.756	1.304 1.458 1.229	1.534 1.612 1.493	2.283 2.210 2.277	2.837 2.840 2.875	2.851 2.863 2.864
平均 A	0.553	0.723	1.148	1.331	1.547	2.257	2.851	2.860
SD	0.061	0.132	0.348	0.117	0.060	0.041	0.021	0.007
% 生存	19.3	25.3	40.2	46.5	54.1	78.9	99.7	100.0
CV	10.97	18.19	30.34	8.77	3.91	1.80	0.74	0.25

10

【 0 1 2 4 】

【表 3 7】

表 3 7

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.044	0.496 0.387 0.424	0.422 0.204 0.272	1.057 0.327 0.812	1.275 1.259 1.272	1.512 1.379 1.350	2.242 2.353 2.227	2.858 2.899 2.863	2.840 2.853 2.839
平均 A	0.436	0.300	0.732	1.269	1.414	2.274	2.874	2.844
SD	0.055	0.112	0.372	0.009	0.086	0.069	0.022	0.008
% 生存	15.3%	10.5%	25.7%	44.6%	49.7%	80.0%	101.0%	100.0%
CV	12.72%	37.24%	50.74%	0.67%	6.11%	3.03%	0.78%	0.27%

20

【 0 1 2 5 】

実施例 1 6

ダウノルビシン耐性骨髄性白血病系 K 5 6 2 / D o x におけるダウノルビシンに対する感作の L G T - E 介在性上昇。実施例 2 に記載される細胞培養方法を用いて、ダウノルビシン処置された K 5 6 2 / D o x 細胞に対する L T G - E の化学感作効果を研究した。この研究においては、細胞を、25 μ g / ml の L G T - E により前処置し、その後、細胞を、30 ~ 1 \times 10⁻³ μ M のダウノルビシンを含む、1 : 3 で連続的に希釈された 50 μ l のアリコートにより処置した。表 3 8 は、ダウノルビシン処置の前、L T G - E による前処置に関する細胞生存率データを報告する。表 3 9 は、ダウノルビシン処置の前、L K G T - E により前処置されていない細胞から得られる対照データを報告する。図 1 6 は、表 3 8 及び 3 9 のデータを、グラフ形式で要約する。

30

40

【 0 1 2 6 】

【表 3 8】

表 3 8

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.043	0.563	1.165	0.870	2.389	2.722	2.812	2.817	2.905
	0.412	1.137	1.328	2.339	2.740	2.816	2.864	2.838
	0.557	1.223	1.581	2.174	2.657	2.805	2.863	2.499
平均 A	0.510	1.175	1.259	2.300	2.706	2.811	2.848	2.747
SD	0.086	0.044	0.360	0.113	0.044	0.006	0.027	0.218
% 生存	18.6	42.8	45.8	83.7	98.5	102.3	103.7	100.0
CV	16.75	3.73	28.62	4.89	1.61	0.20	0.94	7.92

10

【 0 1 2 7 】

【表 3 9】

表 3 9

ドセタキセル (nM)	100	33.3	10	3.33	1	0.333	0.1	0.001
565 nmでのA (三連下で) バックグラウンド = 0.043	0.703	1.683	2.731	2.863	2.395	2.962	2.914	2.653
	0.775	1.716	2.740	2.847	2.620	2.951	2.918	2.827
	0.691	1.652	2.678	2.834	2.512	2.967	2.967	2.835
平均 A	0.723	1.683	2.716	2.848	2.509	2.960	2.933	2.771
SD	0.045	0.032	0.034	0.015	0.113	0.008	0.030	0.103
% 生存	26.1	60.7	98.0	102.8	90.5	106.8	105.8	100.0
CV	16.75	3.73	28.62	4.89	1.61	0.20	0.94	7.92

20

【 0 1 2 8 】

実施例 1 7

LGT-E は、インビボでドセタキセルのための効果的化学感作剤である。LGT-E がドセタキセルのための化学感作剤であることが示された結果に基づいて、インビボ研究を、ドセタキセルの化学療法効果に対する、経口投与された LGT-E の有効性を評価するために企画した。このことを目標にして、CD-1 マウス (Charles River Laboratories International, Inc. Wilmington, MA) における経口最大許容量 (MTD) を、7 日間にわたって、100、250、500、750 及び 1000 mg / kg の増大する単一の一度のみの経口用量、及び 62.5、125、250 又は 500 mg / kg の毎日の用量を投与することにより決定した。特に、MTD は、(i) 非致死性である；(ii) 対照動物に比べて 10% を越えない体重増加の位相差を引き起こさない；及び (iii) 明らかな器官機能障害又は副作用を引き起こさない、用量として定義される。単一及び複数回投与アプローチの場合、MTD は約 500 mg / kg であった。

30

40

【 0 1 2 9 】

LGT-E についての MTD の同定に続いて、ドセタキセル (20 mg / kg、i.v.) と組み合わせて投与される LGT-E (500 mg / kg、強制経口投与) の抗腫瘍効果を、ドセタキセル処置のみと比較した。より具体的には、それらの研究は、体重 15 ~ 20 g であり、生後 4 ~ 6 週であり、そして HEP A - 濾過され空気下でケージに収容された (12 時間の明 / 暗サイクル) 6 匹の重症複合免疫不全 (SCID) 雄マウス (Taconic Farms, Inc. Oxnard, CA) を包含した。腫瘍は、PC3 及び PC3-TxR 細胞をマウス中に皮下注入することにより、マウスにおける形成を引き起こされた。細胞注入を実施

50

するために、まず P C 3 及び P C 3 - T x R 細胞を、マトリゲル (Matrigel) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) 及び R P M I 1 6 4 0 (Mediatech, Manassas, VA, 又は Life Technologies Grand Island, NY) の 1 : 1 混合液に別々に懸濁した。次に、細胞を、注射によりマウスの脇腹中に皮下移植した。細胞の注入に続いて、19日間、一貫して腫瘍増殖を示したマウスを、腫瘍研究に使用した。さらに具体的には、それらの研究は、異種移植片腫瘍が、半楕円体 (semiellipsoid) についての式、すなわち体積 = 幅² × (長さ / 2) を用いて計算して、約 1 2 0 m m³ の体積に達した場合に開始された。

【 0 1 3 0 】

腫瘍研究は、処置の最初の日を開始し、15日間にわたって、各マウスの腫瘍サイズの変化を測定するために、上記に記載される基本的方法に従って実施された。研究における腫瘍含有マウスを、次の6種のグループにランダム化した：グループ(1)マウスは、P C 3 細胞腫瘍異種移植変を有し、そしてドセタキセル (2 0 m g / k g、静脈内 (I V)、週1度、n = 9) によってのみ処置され、グループ(2)マウスは、P C 3 - T x R 細胞腫瘍異種移植変を有し、そしてまったく処置されなかった (n = 7)。研究の間にわたってのグループ(1)及び(2)の腫瘍サイズの変化が、図9Aに示されている。グループ(3)マウスは、P C 3 - T x R 細胞腫瘍異種移植片を有し、そしてドセタキセル (2 0 m g / k g、I V、週1度、n = 8) により処置され；グループ(4)マウスは、P C 3 - T x R 細胞腫瘍異種移植片を有し、そして L T G - E (5 0 0 m g / k g、強制経口投与 (P O) による、毎日、n = 8) により処置され；グループ(5)マウスは、P C 3 - T x R 細胞腫瘍異種移植片を有し、そしてドセタキセル (2 0 m g / k g、I V、週1度) 及び L T G - E (2 5 0 m g / k g、P O、毎日) により処置され；そしてグループ(6)マウスは、P C 3 - T x R 細胞腫瘍異種移植片を有し、そしてドセタキセル (2 0 m g / k g、I V、週1度) 及び L T G - E (5 0 0 m g / k g、P O、毎日、n = 9) により処置された。この研究の間にわたってのグループ(3 - 6)の腫瘍サイズの変化が、図23に示される。

【 0 1 3 1 】

この研究の間にわたってのグループ(1)及びグループ(2)の腫瘍サイズの変化が、図23に示され、これは、P C 3 及び P C 3 - T x R 細胞の両者が S C I D マウスにおいて首尾よく増殖されたことを示した。研究の間にわたってのグループ(3 ~ 6)の腫瘍サイズの変化が図[]に示される。L G T - E 単独では、何れの抗腫瘍効果も示されなかったが、しかしドセタキセルのみのグループに比べて、ドセタキセルの抗腫瘍効果を優位に増強した。

【 0 1 3 2 】

参考文献：

Chow M, and Huang Y. "Utilizing Chinese Medicines to Improve Cancer Therapy- Fiction or Reality?" Current Drug Discovery Technologies, 2010.

Huang Y, and Sadee W. (2003). Drug sensitivity and resistance genes in cancer chemotherapy: a chemogenomics approach. Drug Discov Today 8, 356-363.

Huang Y., and Sadee W. (2006). Membrane transporters and channels in chemoresistance and sensitivity of tumor cells. Cancer Lett 239, 168-182 .

Huang Y, et al. (2004). Membrane transporters and channels: role of the transporter in cancer chemosensitivity and chemoresistance. Cancer Res 64, 4294-4301.

Huang Y, et al. (2005a). Correlating gene expression with chemical scaffolds of cytotoxic agents: ellipticines as substrates and inhibitors of MDR1. Pharmacogenomics J 5, 112-125.

Huang Y, et al. (2005b). Cystine-glutamate transporter SLC7 A 11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. Cancer Res 65, 7446-7454.

Makarovskiy, AN et al. (2002). Survival of docetaxel-resistant prostate cancer cells in vitro depends on phenotype alterations and continuity of drug exposure . Cell Mol Life Sci 59, 1198-1211.

Pon D, et al. "Harnessing traditional Chinese medicine to improve cancer therapy: issues for future development". Therapeutic Delivery 2010; 1 :335-344.

Salzberg M, et al. (2007). An open-label, noncomparative phase II trial to evaluate the efficacy and safety of docetaxel in combination with gefitinib in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer, Onkologie 30, 355-360.

Seruga B., et al. (2010). Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. Nat Rev Clin Oncol.

Singh A, et al. (2010). Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. Mol Cancer Ther 9, 2365-2376.

10

Sirotnak FM, et al. (2000). Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. Clin Cancer Res 6, 4885-4892.

Wang Z., et al. (2010). Transporter-mediated multidrug resistance and its modulation by Chinese medicines and other herbal products. Curr Drug Discovery Technologies 1 :54-56.

Wang Z., et al. (2011) An Improved Method for Evaluation of Chemosensitizing Effect from Herb-Drug Combination - Example with Tripterygium wilfordii .. Abstract Presented 8th International Conference of Society for Integrative Oncology, Cleveland, November 10-12.

20

Zhang P, et al. (2010). Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. Mol Cancer Ther 9, 336-346.

【 図 1 A 】

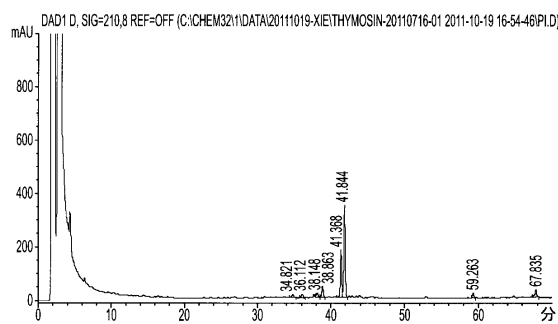


FIG. 1A

【 図 2 】

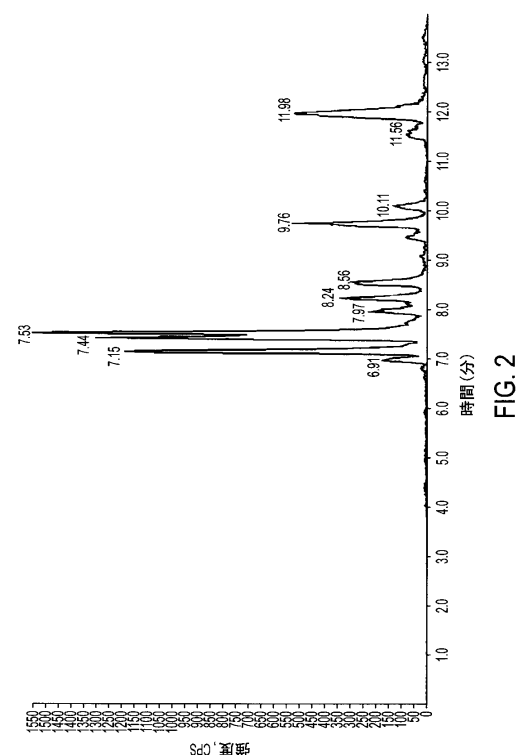


FIG. 2

【 図 1 B 】

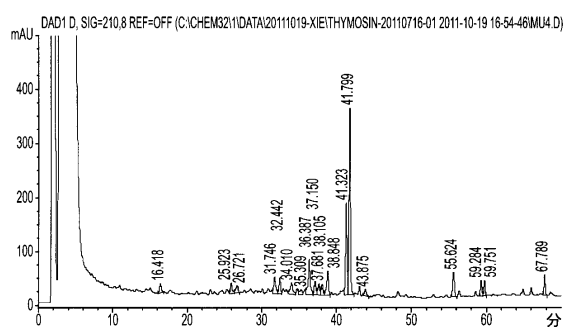


FIG. 1B

【 図 3 A 】

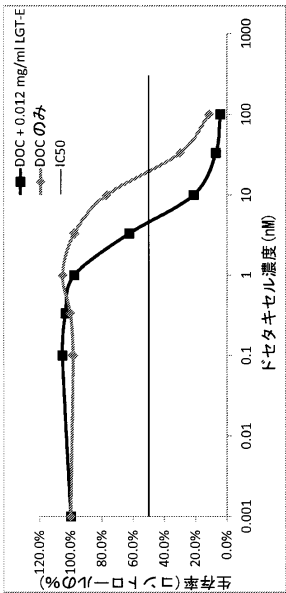


FIG. 3A

【 図 3 B 】

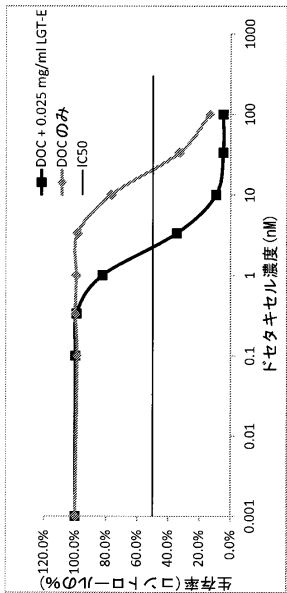


FIG. 3B

【 図 4 A 】

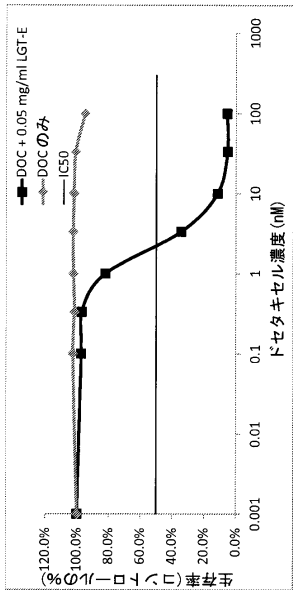


FIG. 4A

【 図 4 B 】

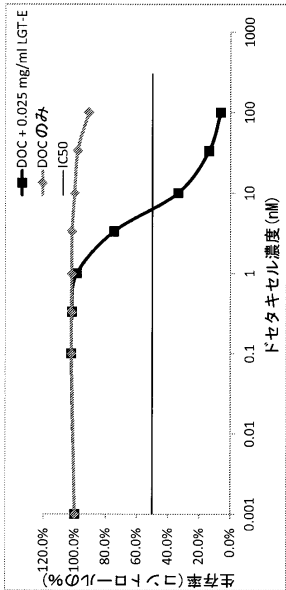


FIG. 4B

【 図 4 C 】

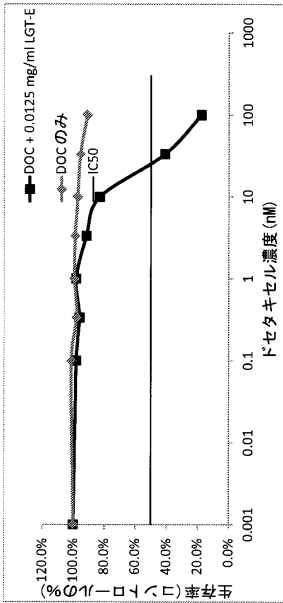


FIG. 4C

【 図 5 】

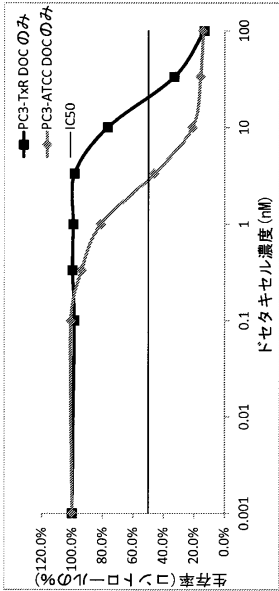


FIG. 5

【 図 6 A 】

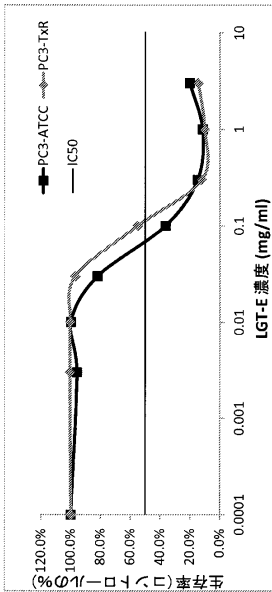


FIG. 6A

【 図 6 B 】

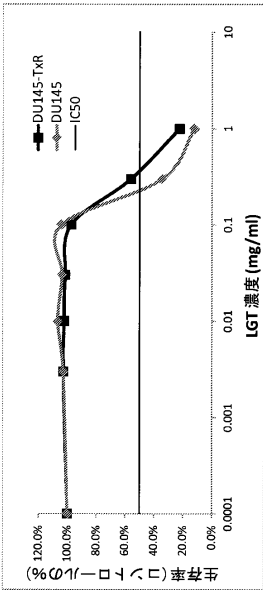


FIG. 6B

【 図 7 】

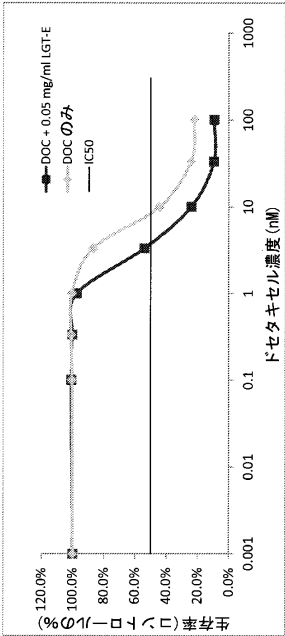


FIG. 7

【 図 8 】

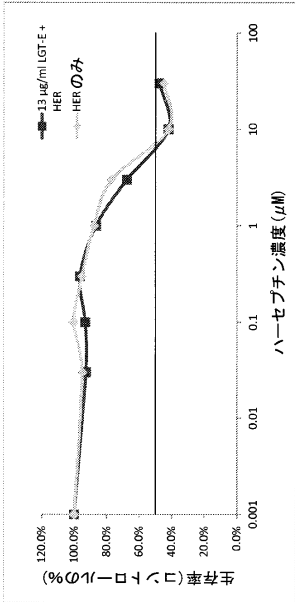


FIG. 8

【 図 9 】

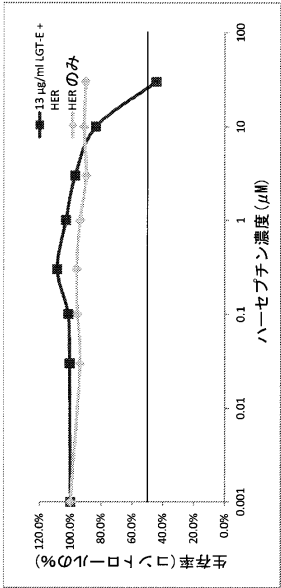


FIG. 9

【 図 10 】

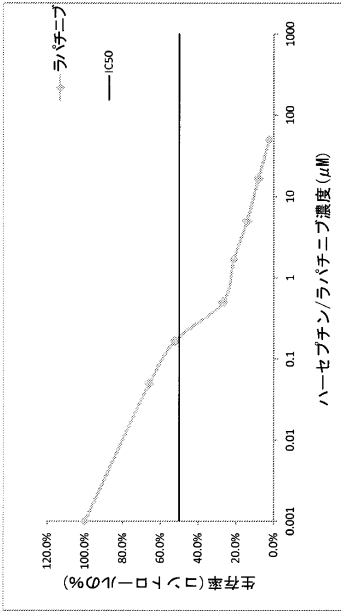


FIG. 10

【 図 1 1 】

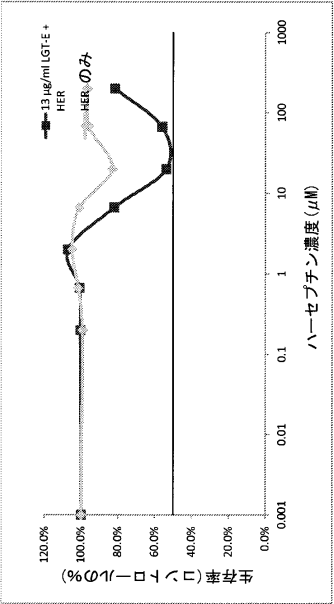


FIG. 11

【 図 1 2 A 】

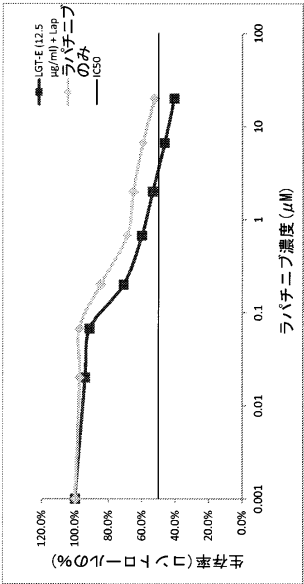


FIG. 12A

【 図 1 2 B 】

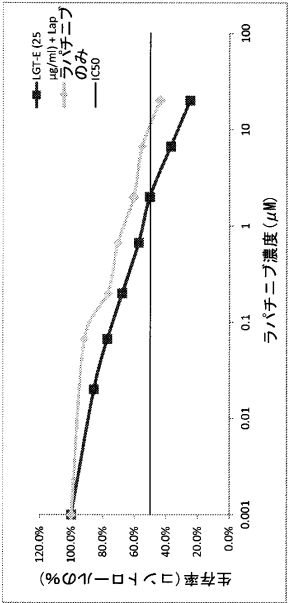


FIG. 12B

【 図 1 3 】

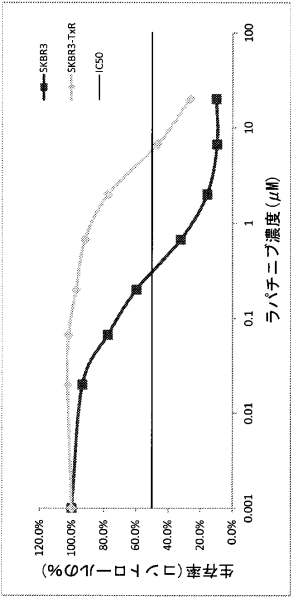


FIG. 13

【図 14】

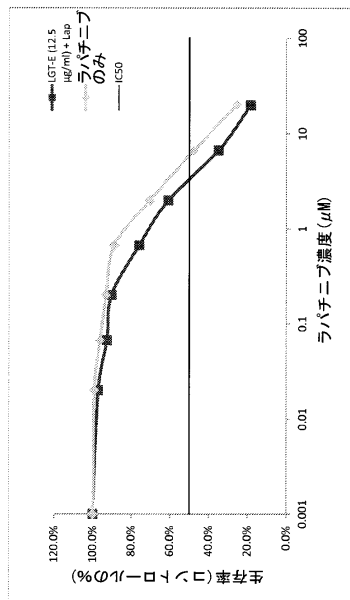


FIG. 14

【図 15】

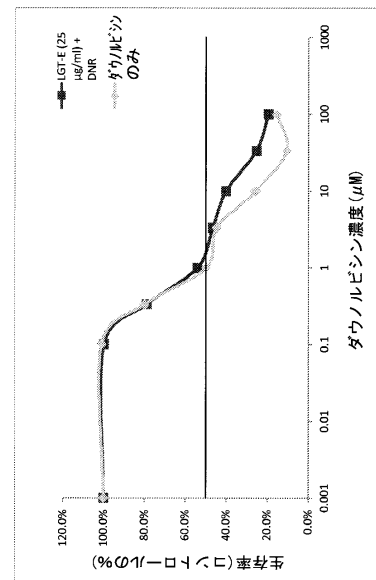


FIG. 15

【図 16】

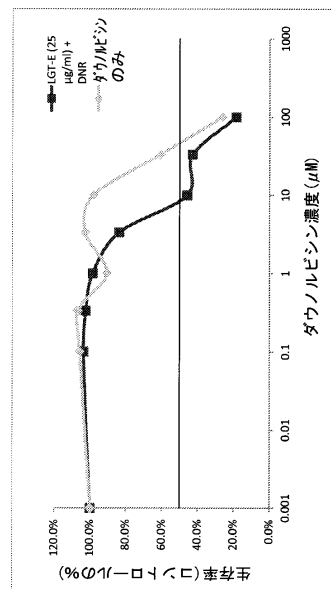


FIG. 16

【図 17 A】

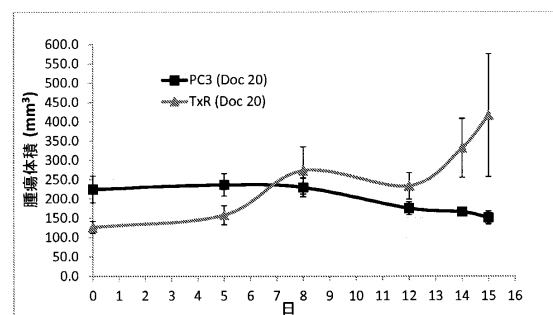


FIG. 17A

【図 17 B】

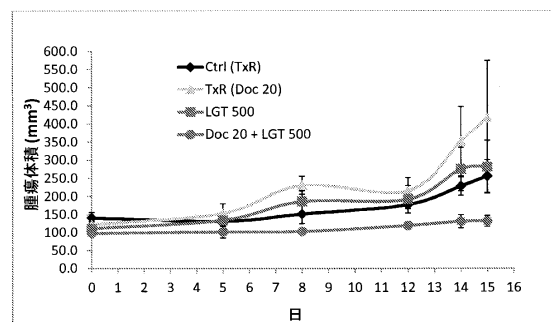


FIG. 17B

フロントページの続き

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100164563
弁理士 佐々木 貴英
- (72)発明者 モーゼス シング サム チョウ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 1 7 0 9 , チノ ヒルズ, ロック クレスト レーン 1 2
8 5 0
- (72)発明者 イン ファアン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 1 0 0 6 , アルカディア, サウス サンタ アニタ アベニ
ュ 1 3 3 1
- (72)発明者 チンファ ジェフリー ワン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 0 6 , アルカディア, イースト ウィニー ウェイ 3
3 1
- (72)発明者 ラナドヒーア ラブラ
アメリカ合衆国, ジョージア 3 0 3 4 1 , アトランタ, フラワーズ ロード サウス 3 1 1 3
, アpartment エフ
- (72)発明者 ジ ジュン ワン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 1 7 0 9 , チノ ヒルズ, ピートン ドライブ 1 3 4 3 9
, アpartment 2 4 3

審査官 鶴見 秀紀

- (56)参考文献 中国特許出願公開第1 0 2 4 4 3 0 3 9 (C N , A)
再公表特許第2 0 0 4 / 0 7 5 8 8 8 (J P , A 1)
J.Clin.Pharmacol. , 2 0 1 1 年, Vol.51, No.9 , p.1364 , 1124364
Cancer Letters , 2 0 1 2 年 1 月 1 0 日, Vol.319, No.2 , pp.203-213
POSTGRADUATE MEDICAL JOURNAL , 2 0 0 7 年, vol.83, no.979 , pages 338 - 343
Anti-Cancer Drugs , 2 0 1 0 年, Vol.21, No.5 , pp.502-513
Cancer Research , 2 0 1 0 年, Vol.70, No.8, SUPPL.1 , Abstract Number 1534, (abstract)[on l
ine]STN, EMBASE, AN.0051443548, DN.71453687

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 6 / 0 0 - 3 6 / 9 0 6 8
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 2
A 6 1 P 4 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)