

(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2014-505876
(P2014-505876A)

(43) 公表日 平成26年3月6日(2014.3.6)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|------------|-------------|
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/53 | D 4B029 |
| C12M 1/34 (2006.01) | C12M 1/34 | B 4B063 |
| C12Q 1/04 (2006.01) | C12M 1/34 | F |
| C12Q 1/68 (2006.01) | C12Q 1/04 | Z |
| | C12Q 1/68 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁)

(21) 出願番号 特願2013-549810 (P2013-549810)
 (86) (22) 出願日 平成24年1月19日 (2012.1.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年7月19日 (2013.7.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/050814
 (87) 国際公開番号 W02012/098203
 (87) 国際公開日 平成24年7月26日 (2012.7.26)
 (31) 優先権主張番号 11151681.1
 (32) 優先日 平成23年1月21日 (2011.1.21)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 501241380
 バジリア ファルマスーチカ アーゲー
 Basilea Pharmaceutica AG
 スイス国、ツェーハー 4005 バーゼル、グレンツアーヘルストラッセ 487
 (74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100131808
 弁理士 柳橋 泰雄
 (74) 代理人 100119079
 弁理士 伊藤 佐保子

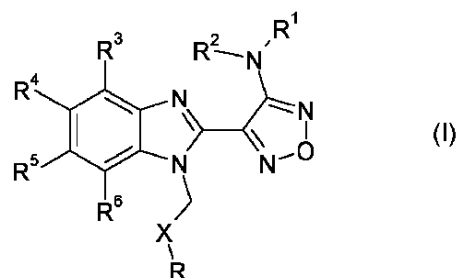
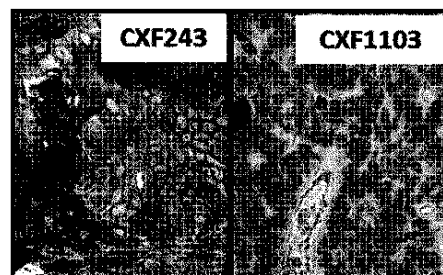
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラザノベンゾイミダゾールに対する薬物応答のバイオマーカーとしてのglucubリンの使用

(57) 【要約】

化合物に対する応答、好ましくは、前記化合物(ここで、該化合物は一般式(I)のフラザノベンゾイミダゾール化合物である)に対する被験体における癌などの疾患の耐性を予測するためのバイオマーカーとしてのglucubリンの使用。

Figure 8

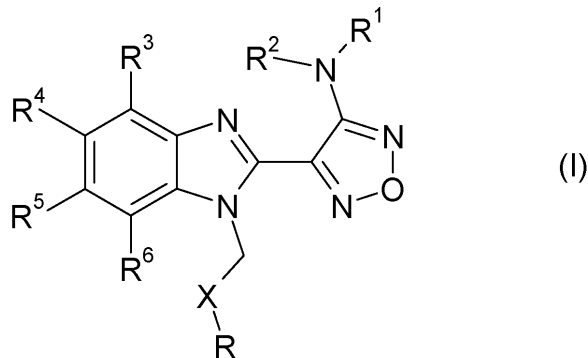


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化合物に対する応答を予測するためのバイオマーカーとしての g l u - チュープリンの使用であって、該化合物が、一般式 (I) :

【化 2 2】



10

[式中、

R は、フェニル、チエニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、アルキル、ハロ - 低級アルキル、ヒドロキシ - 低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ - 低級アルコキシ、低級アルコキシ - 低級アルコキシ、フェニル - 低級アルコキシ、低級アルキルカルボニルオキシ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルキルカルボニルアミノ、置換アミノ（窒素上の 2 個の置換基が、窒素と一緒に、ヘテロシクリルを形成する）、低級アルキルカルボニル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、シアノ、ハロゲン及びニトロから独立して選択される 1 又は 2 個の置換基により場合により置換されており；そして、2 個の隣接する置換基は、メチレンジオキシであり；そして、ピリジニルは、低級アルコキシ、アミノ又はハロゲンにより場合により置換されており；

20

X は、基 C = Y を表し、ここで、Y は、酸素、又はヒドロキシもしくは低級アルコキシにより置換されている窒素を表し；

30

R¹ は、水素、低級アルキルカルボニル、ヒドロキシ - 低級アルキル又はシアノ - 低級アルキルを表し；

R²、R³ 及び R⁶ は、水素を表し；

R⁴ 及び R⁵ は、互いに独立して、水素、低級アルキル又は低級アルコキシを表すか；又は R⁴ 及び R⁵ は、一緒になって、メチレンジオキシを表す]

で表される化合物及びその薬学的に許容しうる誘導体であるか；又は

[式中、

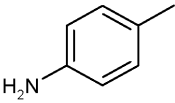
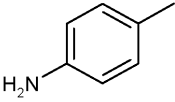
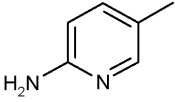
R は、フェニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、アルキル、ハロ - 低級アルキル、ヒドロキシ - 低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ - 低級アルコキシ、低級アルコキシ - 低級アルコキシ、フェニル - 低級アルコキシ、低級アルキルカルボニルオキシ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルキルカルボニルアミノ、置換アミノ（窒素上の 2 個の置換基が、窒素と一緒に、ヘテロシクリルを形成する）、低級アルキルカルボニル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、ホルミル、シアノ、ハロゲン及びニトロから独立して選択される 1 又は 2 個の置換基により場合により置換されており；そして、2 個の隣接する置換基は、メチレンジオキシであり；そして、ピリジニルは、低級アルコキシ、アミノ又はハロゲンにより場合により置換されており；

40

50

【表 10】

| R | Y | R ¹ |
|---|---|------------------------------------|
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |

10

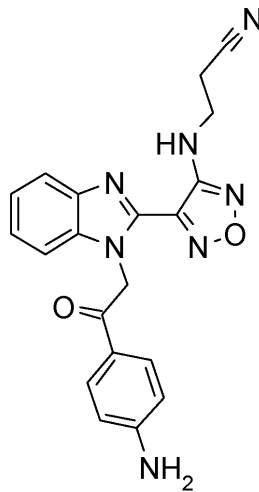
により示されるか又はその薬学的に許容しうる誘導体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

20

化合物が、以下：

【化 24】



30

又はその薬学的に許容しうる誘導体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

薬学的に許容しうる誘導体が、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物の塩、溶媒和物、プロドラッグ、プロドラッグの塩、多形及び異性体からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用。

40

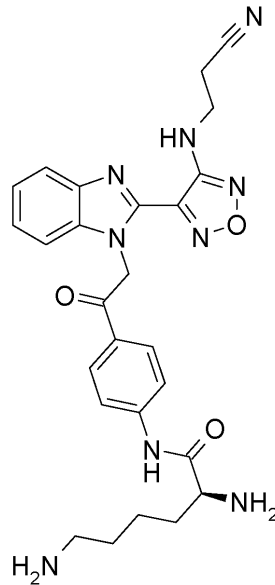
【請求項 7】

プロドラッグが、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物の R 基内に存在するアミノ基と、グリシン、アラニン又はリシンのカルボキシ基から形成されるアミドである、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

化合物が、以下；

【化 2 5】



10

又はその薬学的に許容しうる塩、好ましくはその塩酸塩、最も好ましくは、その二塩酸塩である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 9】

前記化合物に対する被験体における疾患の耐性を予測するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 10】

疾患が、新生物疾患又は自己免疫疾患、好ましくは、癌である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 11】

疾患が、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌、脳腫瘍、神経内分泌癌、肺癌、腎臓癌、血液悪性腫瘍、黒色腫及び肉腫からなる群より選択され、好ましくは、疾患が、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌及び黒色腫からなる群より、より好ましくは、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌及び黒色腫からなる群より選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 12】

被験体からの試料中の glu - チューブリンレベルが、標準値又は標準値のセットに対してより高い場合に耐性であると予測する、請求項 2 ~ 11 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 13】

試料 (1つ又は複数) 中の glu - チューブリンレベルが、
 i) 同じ腫瘍組織型を有する被験体からの標準値又は標準値のセットに対して；又は
 ii) 処置開始後に採取され、処置開始前に同じ被験体から採取された試料 (1つ又は複数) と比較され；又は
 iii) 正常な細胞又は組織からの標準値又は標準値のセットに対して；
 より高い場合に、耐性であると予測される、請求項 12 に記載の使用。

40

【請求項 14】

バイオマーカーが、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置するために、疾患、好ましくは、癌を患っている又は患う可能性がある被験体を選択するために使用される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 15】

試料が、正常な組織、腫瘍組織又は循環腫瘍細胞に由来し、好ましくは、腫瘍組織に由

50

来する、請求項 2 ~ 14 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する、被験体における疾患の応答を予測するための方法であって、

a) 被験体から事前に得られた試料中の g l u - チューブリンレベルを測定して、このレベルを表す値 (1つ又は複数) を得る工程 ; 及び

b) 工程 a) からの値 (1つ又は複数) と標準値又は標準値のセットを比較する工程を含む方法。

【請求項 17】

予測される応答が、耐性である、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 18】

被験体からの試料中の g l u - チューブリンレベルが標準値又は標準値のセットに対してより高い場合に、耐性であると予測する、請求項 16 又は 17 に記載の方法。

【請求項 19】

それを必要とする被験体において新生物疾患又は自己免疫疾患、好ましくは癌を処置する方法であって、被験体からの試料中の g l u - チューブリンレベルを測定して、このレベルを表す値 (1つ又は複数) を得る工程、及び前記試料中の g l u - チューブリンレベルが、標準値又は標準値のセットより高くない場合、被験体を請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置する工程を含む、方法。

20

【請求項 20】

被験体からの試料中の g l u - チューブリンレベルを測定して、このレベルを表す値 (1つ又は複数) を得る工程、及び g l u - チューブリンレベルが、標準値又は標準値のセットより高くない場合、被験体を請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置する工程を含む、新生物疾患又は自己免疫疾患、好ましくは癌の処置において使用するための g l u - チューブリン。

【請求項 21】

g l u - チューブリンレベルが標準レベル又は標準レベルのセットと比較してより高い試料を有する被験体中の g l u - チューブリンレベルを最初に低下させて、次に、被験体を請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置することにより、新生物疾患又は自己免疫疾患、好ましくは癌を処置する方法。

30

【請求項 22】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する応答を予測するためのキットであって、試料中の g l u - チューブリンレベルを測定するために必要な試薬を含み、好ましくは、試料中の g l u - チューブリンレベルと比較するための標準値又は標準値のセットを含む比較測定基準をさらに含む、キット。

【請求項 23】

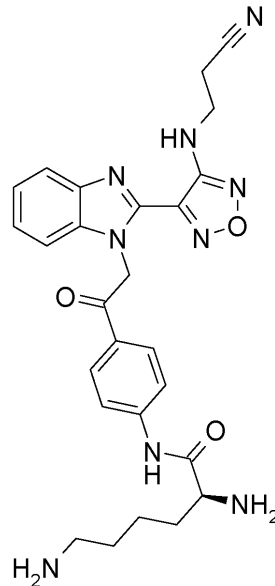
試薬が、g l u - チューブリンのための検出部を含む捕捉試薬及び検出試薬を含み、好ましくは、捕捉試薬が、抗体である、請求項 22 に記載のキット。

40

【請求項 24】

キットが、下記式 :

【化 2 6】



10

で表される化合物又はその薬学的に許容しうる塩、特に、その二塩酸塩を含む、請求項 2 又は 23 に記載のキット。

20

【請求項 25】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する応答を予測するための装置であって、試料中の glu - チュープリンレベルを測定するために必要な試薬、及び試料中の glu - チュープリンレベルと比較するための標準値又は標準値のセットを含む比較測定基準を含む、装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般式 (I) の化合物、例えば、3 - (4 - {1 - [2 - (4 - アミノ - フェニル) - 2 - オキソ - エチル] - 1H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル} - フラザン - 3 - イルアミノ) - プロピオニトリル (BAL27862) に対する、新生物疾患又は自己免疫疾患などの疾患、好ましくは、癌の応答を予測するためのバイオマーカーとしての glu - チュープリンの使用に関する。他の態様においては、本発明は、方法及びキットならびにバイオマーカーの使用を含む処置方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

微小管は、細胞骨格の構成成分の 1 つであり、 α - チュープリンと β - チュープリンの二量体から構成されている。微小管を標的とする薬剤は、広域スペクトル活性を有する最も効果的な細胞傷害性化学療法剤の 1 つである。微小管不安定化剤 (例えば、ビンクリスチン、ピンブラスチン及びピノレルピンなどのピンカアルカロイド) は、例えば、リンパ芽球性白血病及びリンパ腫などの血液悪性腫瘍ならびに肺癌などの固形腫瘍のいくつかのタイプの処置において使用される。微小管安定化剤 (例えば、パクリタキセル、ドセタキセルなどのタキサン類) は、例えば、乳癌、肺癌及び前立腺癌を含む固形腫瘍の処置において使用される。

40

【0003】

しかし、これらの公知の微小管標的薬剤に対して耐性が生じる恐れがある。耐性は、本来備わっているものか、又はこれらの薬剤に曝露された後に獲得されるものでありうる。従って、そのような耐性は、患者の生存率ならびに処置計画の選択に影響を及ぼす。耐性のいくつかの潜在的メカニズムが特定されており、これには、タキサンの結合を減少させることが知られている、 β - チュープリンサブタイプ III のレベルの上昇及び α - チュー

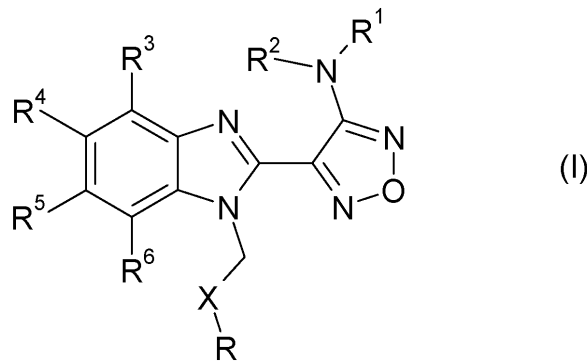
50

ープリンサブタイプ I の突然変異の獲得などの微小管標的の欠陥が含まれる。さらに、他の細胞タンパク質の欠陥が、排出ポンプである P - 糖タンパク質 (P - g p ポンプ、多剤耐性タンパク質 1 又は M D R 1 としても知られている) の過剰発現などの、特定の微小管標的薬剤に対する耐性と関連していることが示唆されている。そのため、そのような因子を、これらの従来の微小管標的薬剤に対する耐性のバイオマーカーとして使用してもよい。

【 0 0 0 4 】

比較的最近発見された微小管不安定化剤のクラスは、下記式：

【 化 1 】



10

20

30

40

50

[式中、

R は、フェニル、チエニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、アルキル、ハロ - 低級アルキル、ヒドロキシ - 低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ - 低級アルコキシ、低級アルコキシ - 低級アルコキシ、フェニル - 低級アルコキシ、低級アルキルカルボニルオキシ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルキルカルボニルアミノ、置換アミノ (窒素上の 2 個の置換基が、窒素と一緒に、ヘテロシクリルを形成する)、低級アルキルカルボニル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、シアノ、ハロゲン及びニトロから独立して選択される 1 又は 2 個の置換基により場合により置換されており；

そして、2 個の隣接する置換基は、メチレンジオキシであり；

そして、ピリジニルは、低級アルコキシ、アミノ又はハロゲンにより場合により置換されており；

X は、基 C = Y を表し、ここで、Y は、酸素、又はヒドロキシもしくは低級アルコキシにより置換されている窒素を表し；

R¹ は、水素、低級アルキルカルボニル、ヒドロキシ - 低級アルキル又はシアノ - 低級アルキルを表し；

R²、R³ 及び R⁶ は、水素を表し；

R⁴ 及び R⁵ は、互いに独立して、水素、低級アルキル又は低級アルコキシを表すか；

又は R⁴ 及び R⁵ は、一緒になって、メチレンジオキシを表す]

により包含される化合物及びその薬学的に許容しうる塩であるか；又は

[式中、

R は、フェニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、アルキル、ハロ - 低級アルキル、ヒドロキシ - 低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ - 低級アルコキシ、低級アルコキシ - 低級アルコキシ、フェニル - 低級アルコキシ、低級アルキルカルボニルオキシ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルキルカルボニルアミノ、置換アミノ (窒素上の 2 個の置換基が、窒素と一緒に、ヘテロシクリルを形成する)、低級アルキルカルボニル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、ホルミル、シアノ、

ハロゲン及びニトロから独立して選択される 1 又は 2 個の置換基により場合により置換されており；そして、2 個の隣接する置換基は、メチレンジオキシであり；
そして、ピリジニルは、低級アルコキシ、アミノ又はハロゲンにより場合により置換されており；

X は、酸素を表し；

R¹ は、水素、低級アルキルカルボニル、ヒドロキシ - 低級アルキル又はシアノ - 低級アルキルを表し；

R²、R³ 及び R⁶ は、水素を表し；

R⁴ 及び R⁵ は、互いに独立して、水素、低級アルキル又は低級アルコキシを表すか；

又は R⁴ 及び R⁵ は、一緒になって、メチレンジオキシを表す]

により包含される化合物及びその薬学的に許容しうる塩であり；

そして、ここで、接頭語の低級は、最大 7 個、とりわけ、最大 4 個の炭素原子を有する基を意味する。

【0005】

これらの化合物は、WO2004/103994 A1 (相互参照により本明細書に組み入れられる) に開示されている。これらの化合物は、腫瘍細胞増殖を停止させ、アポトーシスを誘導することが示されている。

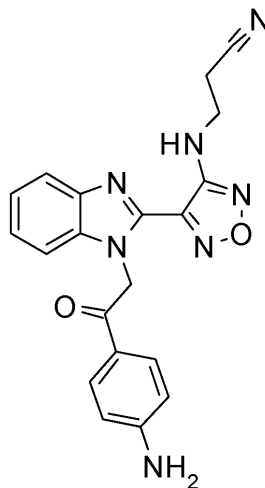
【0006】

式 (I) の化合物の合成は、WO2004/103994 A1 (相互参照により本明細書に組み入れられる) において、概要として、29 ~ 35 ページに、具体的には、39 ~ 55 ページに記載されている。これらは、本明細書に開示されるように、又は本明細書に記載のプロセスと類似の方法により調製してもよい。

【0007】

BAL27862 として知られ、そして、WO2004/103994 A1 の実施例 58 として示されるこのクラスの範囲内の一つの化合物 (具体的に参照により本明細書に組み入れられる) は、下記構造式及び化学名を有する：

【化 2】



化学名：3 - (4 - { 1 - [2 - (4 - アミノ - フェニル) - 2 - オキシ - エチル] - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル } - フラザン - 3 - イルアミノ) - プロピオニトリル。

又は本明細書において、化合物 A として示される。

【0008】

WO2004/103994 A1 の実施例 50 及び 79 としてそれぞれ例示されるさらなる化合物 (また、具体的に相互参照により本明細書に組み入れられる) は、下記構造式及び化学名を有する：

10

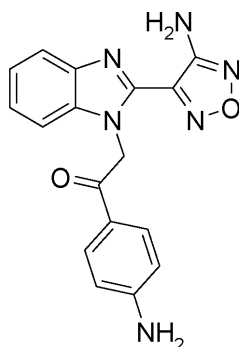
20

30

40

50

【化 3】

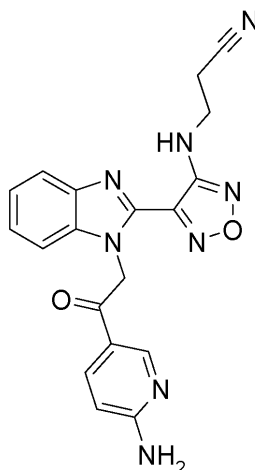


10

化学名：2 - [2 - (4 - アミノ - フラザン - 3 - イル) - ベンゾイミダゾール - 1 - イル] - 1 - (4 - アミノ - フェニル) - エタノン

又は本明細書において、化合物 B として示され、そして

【化 4】



20

30

化学名：3 - (4 - { 1 - [2 - (6 - アミノ - ピリジン - 3 - イル) - 2 - オキソ - エチル] - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル } - フラザン - 3 - イルアミノ) - プロピオニトリル

又は本明細書において、化合物 C として示される。

【0009】

BAL27862は、広範な実験的固形腫瘍異種移植モデルに対して活性を有する。さらに、その活性は、従来の微小管標的薬剤（ピンカルカロイド微小管不安定剤ならびに微小管安定剤のパクリタキセル及びエポチロンBを含む）に対して耐性を有するものとして選択された腫瘍モデルに対してもなお保持される。BAL27862の活性は、*in vitro*で試験したいずれのモデルにおいても、ヒトの乳腺腫瘍異種移植片においても、P-gpポンプの過剰発現により影響を受けない。また、BAL27862は、 α -チューブリンサブタイプIIIのレベルの上昇及びチューブリンサブタイプIの突然変異にもかかわらずその活性を保持する。

40

【0010】

従って、BAL27862の活性は、従来の微小管標的薬剤に対する耐性を付与する多くの因子により影響を受けない。

【0011】

さらに、一般式(I)の化合物は、細胞の表現型に対して、他の微小管標的薬剤（他の微小管不安定剤を含む）と比較して、異なる効果を及ぼすことが知られている。図1に示されるように、様々な器官、例えば、肺、頸部及び乳房に由来する腫瘍細胞株を一般式（

50

I) の化合物で処置することによって、一貫した微小管表現型が誘導される。これらの細胞の微小管を抗 - チューブリン抗体で染色すると、未処置細胞では有糸分裂紡錘体が可視化されるが、処置細胞においてはドット様構造のみが可視化されることが示される。この同じ効果は、肺癌細胞株 A 5 4 9 に対して、化合物 C 及び B を使用することによって示される (それぞれ図 2 A 及び 2 B)。しかし、これは、図 3 B、3 C、3 D 及び 4 にそれぞれ示されるように、従来の微小管標的薬剤のビンブラスチン、コルヒチン、パクリタキセル及びノコダゾールで観察されるものとは大きく異なっている。微小管を抗 - チューブリン抗体で染色して、細胞を 1 0 0 0 × 倍率で観察した (図 3、4)。B A L 2 7 8 6 2 で処置した細胞では、複数のドット様構造が可視化されるが、全く対照的に、他の従来の薬物では、フィラメント状の微小管構造又は高密度の微小管凝集構造が生成される。表現型レベルでのこれらの相違は、増殖抑制作用について最適と考えられる化合物用量では、分子レベルでの作用機序の相違を示唆する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

さらに、B A L 2 7 8 6 2 が、他の微小管標的薬剤の存在下で優性な微小管表現型を導くことが知られている。ビンブラスチン、コルヒチン、パクリタキセル又はノコダゾールの単独処置では、これらの薬剤に特徴的な微小管表現型が誘導される (それぞれ、図 5 A、5 D、5 G、6 C ~ 6 F)。しかし、最後の 4 時間、B A L 2 7 8 6 2 と併用処置すると、ビンブラスチン、コルヒチン、パクリタキセル又はノコダゾールが存在し続けているにもかかわらず、これらの表現型が崩壊した (それぞれ、図 5 B、5 E、5 H、6 G ~ 6 J)。対照的に、最初に B A L 2 7 8 6 2 で処置し、続いて、ビンブラスチン、コルヒチン、パクリタキセル又はノコダゾールと 4 時間併用処置しても、B A L 2 7 8 6 2 による処置と一致する表現型の生成に影響を及ぼさなかった (それぞれ、図 5 C、5 F、5 I、6 K ~ 6 N)。

【 0 0 1 3 】

これらの全てのデータは、B A L 2 7 8 6 2 が従来の微小管標的薬剤とは異なる機序で微小管生物学に影響を及ぼすことを実証している。

【 0 0 1 4 】

従って、従来の微小管標的薬剤に関する情報からは、特定の遺伝子が式 (I) の化合物の作用に関与しているかどうか、又はどのように関与しているかについて予測することができない。

【 0 0 1 5 】

本発明の目的は、式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する応答と関連する因子を同定すること、例えば、下記で定義される一般式 (I) の化合物、特に、B A L 2 7 8 6 2 又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する耐性と関連する因子を同定することである。

【 0 0 1 6 】

驚くべきことに、g l u - チューブリンを、下記で定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体による処置に対する応答のバイオマーカーとして使用してもよいことが見出された。

【 0 0 1 7 】

本発明の 1 つの好ましい実施態様においては、腫瘍試料中の比較的高い g l u - チューブリンレベルは、以下に記載されるように、B A L 2 7 8 6 2 に対する自然耐性及び獲得耐性と関連している。

【 0 0 1 8 】

チューブリンは、脱チロシン化 / チロシン化、アセチル化、グルタミン酸化、ポリグリン化、セリン残基のリン酸化、及びチロシン残基のリン酸化を含む、様々な翻訳後修飾を受けることから、最も多く修飾されるタンパク質の 1 つとして知られている。これまでに記載された多くの - チューブリン遺伝子から、チューブリンのカルボキシ末端にチロシンが存在することが予測される。近年、チューブリンが重合して、微小管を構築すると、いくつかの場合では、カルボキシペプチダーゼ (チューブリンカルボキシペプチダーゼ

又はチューブリンチロシンカルボキシペプチダーゼ、TTCP)が作用し、 α -チューブリンからC-末端のチロシンが除去されて、最後から2番目のグルタミン酸がむき出しになると考えられている。別の酵素のチューブリンチロシンリガーゼ(TTL)が、このチロシンと再結合することができる。細胞におけるこの脱チロシン化/チロシン化サイクルの正確な機能は、まだ解明されていない。

【0019】

C-末端にチロシンではなく、グルタミン酸を有する α -チューブリンの形態は、glu-チューブリン又はglu α -チューブリン又は脱チロシン化チューブリンとして知られている。glu-チューブリンという用語は、本明細書において、C-末端における最後のアミノ酸としてグルタミン酸を有する α -チューブリンの形態を指すために使用するものとする。glu-チューブリンという表示は、また、他の翻訳後修飾が追加的に存在する形態を包含するものとする。glu-チューブリンの基礎をなす α -チューブリンは、複数の変異体、サブタイプ及びイソフォームで存在することが知られており、同様に、これらを生じさせる複数の α -チューブリン遺伝子があり、そして、これらの全ては、また、glu-チューブリンという表示に含まれるものとする(但し、グルタミン酸が、C-末端における最後のアミノ酸である)。好ましくは、 α -チューブリンのヒト変異体、サブタイプ及びイソフォームに関する(但し、グルタミン酸が、C-末端における最後のアミノ酸である)。さらに好ましい実施態様においては、チロシンではなくグルタミン酸が、翻訳後修飾後の α -チューブリンのC-末端における最後のアミノ酸である。 α -チューブリンのサブタイプとしては、チューブリン 1A、チューブリン 1B、チューブリン 1C及びチューブリン 3C/Dが挙げられるが、これらに限定されない。これらのサブタイプのタンパク質配列は、それぞれ、国立生物工学情報センター(NCBI)の下記の参照番号:NP_006000、NP_006073、NP_116093及びNP_005992から入手可能である。これらは、また、それぞれ、図11~14(NP_006000.2、NP_006073.2、NP_116093.1、NP_005992.1)にSEQ. ID No. 1~4として列挙されている。glu-チューブリンは、上述するように、SEQ. ID No. 1~4で表される配列のC-末端の最後のアミノ酸はチロシンではない。

10

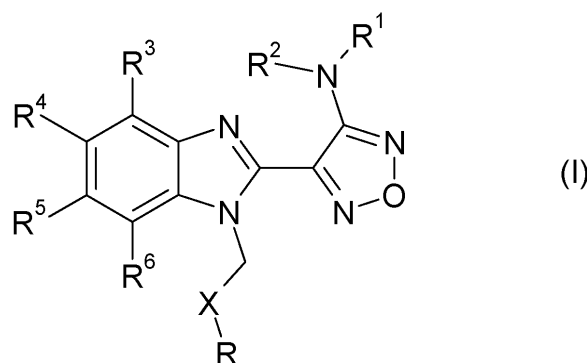
20

【0020】

本発明の一態様は、化合物に対する応答を予測するためのバイオマーカーとしてのglu-チューブリンの使用であって、該化合物が、一般式(I):

30

【化5】



40

[式中、

Rは、フェニル、チエニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、アルキル、ハロ-低級アルキル、ヒドロキシ-低級アルキル、低級アルコキシ-低級アルキル、アシルオキシ-低級アルキル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ-低級アルコキシ、低級アルコキシ-低級アルコキシ、フェニル-低級アルコキシ、低級アルキルカルボニルオキシ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルキルカルボニルアミノ、置換アミノ(窒素上の2個の置換基が、窒素と一緒にあって、ヘテロシクリルを形成する)、

50

低級アルキルカルボニル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、シアノ、ハロゲン及びニトロから独立して選択される1又は2個の置換基により場合により置換されており；そして、2個の隣接する置換基は、メチレンジオキシであり；そして、ピリジニルは、低級アルコキシ、アミノ又はハロゲンにより場合により置換されており；

Xは、基C = Yを表し、ここで、Yは、酸素、又はヒドロキシもしくは低級アルコキシにより置換されている窒素を表し；

R¹は、水素、低級アルキルカルボニル、ヒドロキシ - 低級アルキル又はシアノ - 低級アルキルを表し；

R²、R³及びR⁶は、水素を表し；

R⁴及びR⁵は、互いに独立して、水素、低級アルキル又は低級アルコキシを表すか；又はR⁴及びR⁵は、一緒になって、メチレンジオキシを表す]

で表される化合物及びその薬学的に許容しうる誘導体であるか、又は

[式中、

Rは、フェニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、アルキル、ハロ - 低級アルキル、ヒドロキシ - 低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ - 低級アルコキシ、低級アルコキシ - 低級アルコキシ、フェニル - 低級アルコキシ、低級アルキルカルボニルオキシ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルキルカルボニルアミノ、置換アミノ（窒素上の2個の置換基が、窒素と一緒に、ヘテロシクリルを形成する）、低級アルキルカルボニル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、ホルミル、シアノ、ハロゲン及びニトロから独立して選択される1又は2個の置換基により場合により置換されており；そして、2個の隣接する置換基は、メチレンジオキシであり；

そして、ピリジニルは、低級アルコキシ、アミノ又はハロゲンにより場合により置換されており；

Xは、酸素を表し；

R¹は、水素、低級アルキルカルボニル、ヒドロキシ - 低級アルキル又はシアノ - 低級アルキルを表し；

R²、R³及びR⁶は、水素を表し；

R⁴及びR⁵は、互いに独立して、水素、低級アルキル又は低級アルコキシを表すか；又はR⁴及びR⁵は、一緒になって、メチレンジオキシを表す]

で表される化合物及びその薬学的に許容しうる誘導体である、使用に関し；

そして、ここで、接頭語の低級は、最大7個、とりわけ、最大4個の炭素原子を有する基を意味する。

【0021】

好ましくは、応答は、被験体における疾患の応答でありうる。また、好ましくは、応答は、処置に対する、すなわち、一般式(I)の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体による処置に対する応答でありうる。

【0022】

バイオマーカーのglu - チュープリンは、人体又は動物体から採取、好ましくは、人体から採取した試料(1つ又は複数)中、ex vivoで測定される。

【0023】

好ましい実施態様においては、本発明は、上記で定義される一般式(I)の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する、被験体における疾患の耐性を予測するためのバイオマーカーとしてのglu - チュープリンの使用に関する。

【0024】

好ましくは、薬学的に許容しうる誘導体は、上記で定義される一般式(I)の化合物の塩、溶媒和物、プロドラッグ、プロドラッグの塩、多形及び異性体からなる群より選択される。プロドラッグは、好ましくは、天然アミノ酸、低分子ペプチド又はペグ化ヒドロキ

10

20

30

40

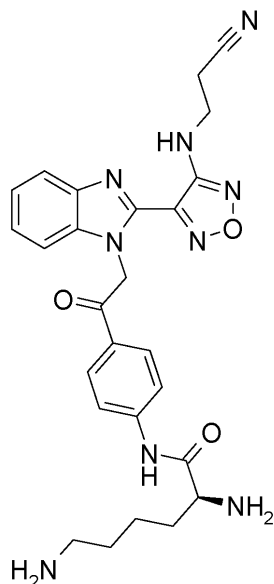
50

シ酸のエステル及びアミドである。より好ましくは、プロドラッグは、一般式 (I) の化合物の R 基内に存在するアミノ基と、グリシン、アラニン又はリシンのカルボキシ基から形成されるアミドである。

【 0 0 2 5 】

特に好ましくは、本化合物は、以下：

【 化 6 】



10

20

又はその薬学的に許容しうる塩、好ましくは、その塩酸塩、最も好ましくは、その二塩酸塩である。

【 0 0 2 6 】

本発明の別の態様は、上記で定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する、被験体における疾患の応答を予測するための方法であって、

a) 被験体から事前に得られた試料中の g l u - チューブリンレベルを測定して、このレベルを表す値 (1 つ又は複数) を得る工程 ; 及び

b) 工程 a) からの値 (1 つ又は複数) と標準値又は標準値のセットを比較する工程を含む方法に関する。

30

【 0 0 2 7 】

さらに好ましくは、予測される応答が、耐性である。

【 0 0 2 8 】

g l u - チューブリンのレベル (1 つ又は複数) の測定は、被験体から事前に得られた試料 (1 つ又は複数) 中、ex-vivoで実施される。「事前に得られた」は、試料が、バイオマーカーのレベルの測定を含む任意の方法に付与する前に得られることを指し、そして、「事前に得られた」は、処置に関連するものとして理解すべきではない。好ましい実施態様においては、被験体からの試料中の g l u - チューブリンレベルが標準値又は標準値のセットに対してより高い場合に、耐性であると予測される。

40

【 0 0 2 9 】

また、好ましくは、疾患は、新生物疾患又は自己免疫疾患である。より好ましくは、疾患は、癌である。とりわけ好ましくは、癌は、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌 (すなわち、結腸癌及び直腸癌を含む)、膵臓癌、肝臓癌、脳腫瘍、神経内分泌癌、肺癌、腎臓癌、血液悪性腫瘍、黒色腫及び肉腫からなる群より選択される。さらに、とりわけ好ましくは、癌は、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、黒色腫及び肺癌からなる群より選択される。とりわけ好ましい実施態様においては、癌は、肺癌、黒色腫、卵巣癌及び結腸直腸癌からなる群より選択される。自然耐性が決定される特に好ましい実施態様においては、癌は、肺癌、黒色腫又は結腸直腸癌からなる群より選択される。獲

50

得耐性が決定される別の特に好ましい実施態様においては、癌は、肺癌又は卵巣癌である。

【0030】

さらなる態様においては、本発明は、それを必要とする被験体において新生物疾患又は自己免疫疾患、好ましくは癌を処置する方法であって、被験体からの試料中の g l u - チューブリンレベルを測定して、このレベルを表す値（1つ又は複数）を得る工程、及び前記試料中の g l u - チューブリンレベルが、標準値又は標準値のセットより高くない場合、被験体を上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置する工程を含む、方法に関する。

【0031】

なおさらなる態様においては、本発明は、被験体からの試料中の g l u - チューブリンレベルを測定して、このレベルを表す値（1つ又は複数）を得る工程、及び g l u - チューブリンレベルが、標準値又は標準値のセットより高くない場合、被験体を上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置する工程を含む、新生物疾患又は自己免疫疾患、好ましくは癌の処置において使用するための g l u - チューブリンに関する。

10

【0032】

g l u - チューブリンレベルの測定は、被験体から事前に得られた試料中、ex-vivoで実施される。

【0033】

本発明は、また、別の態様においては、g l u - チューブリンレベルが標準レベル又は標準レベルのセットと比較してより高い試料を有する被験体中の g l u - チューブリンレベルを最初に低下させて、次に、被験体を上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置することにより、新生物疾患又は自己免疫疾患、好ましくは癌を処置する方法に関する。

20

【0034】

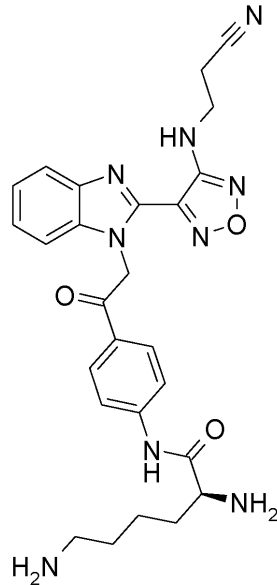
さらに別の態様においては、本発明は、試料中の g l u - チューブリンレベルを測定するために必要な試薬を含む、上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する応答を予測するためのキットに関する。より好ましくは、キットは、また、試料中の g l u - チューブリンレベルと比較するための標準値又は標準値のセットを含む比較測定基準（comparator module）を含む。

30

【0035】

より好ましくは、キットは、上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体を含む。とりわけ好ましい実施態様においては、キットは、下記式の化合物又はその薬学的に許容しうる塩を含む：

【化 7】



10

化学名：S - 2 , 6 - ジアミノ - ヘキサン酸 [4 - (2 - { 2 - [4 - (2 - シアノ - エチルアミノ) - フラザン - 3 - イル] - ベンゾイミダゾール - 1 - イル } - アセチル) - フェニル] - アミド

20

【 0 0 3 6 】

特に好ましい実施態様においては、薬学的に許容しうる塩は、二塩酸塩である。

【 0 0 3 7 】

本発明の別のさらなる態様は、上記で定義される一般式 (I) の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する応答を予測するための装置であって、試料中の g l u - チューブリンレベルを測定するために必要な試薬、及び試料中の g l u - チューブリンレベルと比較するための標準値又は標準値のセットを含む比較測定基準を含む、装置に関する。

【 0 0 3 8 】

好ましい実施態様においては、キット又は装置中の試薬は、g l u - チューブリンのための検出部を含む捕捉試薬、及び検出試薬を含む。とりわけ好ましくは、捕捉試薬は、抗体である。また、好ましくは、疾患は、g l u - チューブリンが標準値又は標準値のセットに対してより高いときに、前記化合物による処置に耐性であると予測される。好ましい実施態様においては、比較測定基準は、キットの使用説明書に含まれる。別の好ましい実施態様においては、比較測定基準は、表示装置の形態である。

30

【 0 0 3 9 】

ここで、本発明の実施態様を、添付の図面を参照し、例を挙げて説明する。しかし、本発明は、これらの実施態様に限定されるものと理解すべきではない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 0 】

40

【 図 1 】 5 0 nM の B A L 2 7 8 6 2 による異なる組織型からのヒト腫瘍細胞株の処置を示す。有糸分裂又は G 2 / M 停止細胞の微小管を、5 0 nM の B A L 2 7 8 6 2 又はビヒクルコントロールによる 2 4 時間処置後に染色した。図 1 A 及び 1 B : A 5 4 9 N S C L C 細胞 ; 図 1 C 及び 1 D : H e L a 子宮頸癌細胞 ; 図 1 E 及び 1 F : S K B R 3 乳癌細胞 ビヒクルコントロール処置 : 図 1 A 、 1 C 及び 1 E 、 B A L 2 7 8 6 2 処置 : 図 1 B 、 1 D 及び 1 F 。

【 図 2 】 化合物 B 及び C による A 5 4 9 N S C L C 細胞の処置を示す。有糸分裂又は G 2 / M 停止 A 5 4 9 N S C L C 細胞の微小管を、それぞれ、8 0 nM 又は 2 0 nM の化合物 B 及び C による 2 4 時間処置後に染色した。白色のスケールバーは、1 0 マイクロメートルを表す。図 2 A : 2 0 nM の化合物 C による処置 ; 図 2 B : 8 0 nM の化合物 B による処置

50

。

【図3】従来の微小管標的薬剤と比較したBAL27862による細胞の処置の比較を示す。有糸分裂又はG2/M停止A549 NSCLC細胞の微小管を、50nMのA：BAL27862；B：ピンブラスチン；C：コルヒチン；D：パクリタキセルによる24時間処置後に染色した。1µmごとに撮影した画像のスタックを、ImageJ softwareを使用することにより処理した。

【図4】ノコダゾールと比較したBAL27862によるA549 NSCLC細胞の処置の比較を示す。有糸分裂又はG2/M停止細胞の微小管を、様々な濃度のノコダゾール（B、C及びD）及びBAL27862（E、F及びG）による24時間処置後に染色した。A：コントロール、B：50nMのノコダゾール、C：100nMのノコダゾール、D：200nMのノコダゾール、E：20nMのBAL27862；F：30nMのBAL27862、及びG：50nMのBAL27862。白色のスケールバーは、10マイクロメートルを表す。観察される微小管表現型の代表的な画像を示す。

【図5】BAL27862と従来の微小管標的薬剤の併用処置を示す。有糸分裂又はG2/M停止A549 NSCLC細胞の微小管を、以下に表示する時間で処置した後に染色した。50nMのBAL27862、50nMのピンブラスチン、50nMのコルヒチン及び25nMのパクリタキセルを使用した。白色のスケールバーは、10マイクロメートルを表す。図5A：24時間のピンブラスチン処置；図5B：24時間のピンブラスチン処置、最後の4時間は、BAL27862を含む；図5C：24時間のBAL27862処置、最後の4時間は、ピンブラスチンを含む；図5D：24時間のコルヒチン処置；図5E：24時間のコルヒチン処置、最後の4時間は、BAL27862を含む；図5F：24時間のBAL27862処置、最後の4時間は、コルヒチンを含む；図5G：24時間のパクリタキセル処置；図5H：24時間のパクリタキセル処置、最後の4時間は、BAL27862を含む；図5I：24時間のBAL27862処置、最後の4時間は、パクリタキセルを含む。

【図6】BAL27862とノコダゾールの併用処置を示す。有糸分裂又はG2/M停止A549 NSCLC細胞の微小管を、以下に表示する時間で処置した後に染色した。25nMのBAL27862及び以下に示す濃度のノコダゾールを使用した。白色のスケールバーは、10マイクロメートルを表す。図6A：24時間のコントロール処置；図6B：24時間の25nMのBAL27862処置；図6C：24時間の50nMのノコダゾール処置；図6D：24時間の100nMのノコダゾール処置；図6E：24時間の150nMのノコダゾール処置；図6F：24時間の200nMのノコダゾール処置；図6G：24時間の50nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25nMのBAL27862を含む；図6H：24時間の100nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25nMのBAL27862を含む；図6I：24時間の150nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25nMのBAL27862を含む；図6J：24時間の200nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25nMのBAL27862を含む；図6K：24時間の25nMのBAL27862処置、最後の4時間は、50nMのノコダゾールを含む；図6L：24時間の25nMのBAL27862処置、最後の4時間は、100nMのノコダゾールを含む；図6M：24時間の25nMのBAL27862処置、最後の4時間は、150nMのノコダゾールを含む；図6N：24時間の25nMのBAL27862処置、最後の4時間は、200nMのノコダゾールを含む。

【図7】皮下異種移植マウスから得られた患者由来の結腸直腸癌（図7A）、肺癌（図7B）及び黒色腫（図7C）腫瘍から調製されたタンパク質抽出物、ならびに、ローディングコントロールとしてアクチンを含めたイムノブロットによる、glu-チューブリンの発現の分析を示す。3つの独立した腫瘍をそれぞれ分析した（1～3）。BAL27862、パクリタキセル及びピンブラスチン耐性及び感受性は、表1に記載のとおりである。

【図8】腫瘍細胞中のglu-チューブリンレベルが、ex vivoのコロニー増殖分析によりBAL27862耐性として定義された患者由来の異種移植結腸直腸腫瘍において増加することを免疫組織化学により示す。患者由来の腫瘍異種移植片（ヌードマウスで維持し

10

20

30

40

50

た) を作製し、固定し、そして、免疫組織化学を使用して g l u - チュープリンタンパク質の発現を染色した。B A L 2 7 8 6 2、パクリタキセル及びビンブラスチン耐性及び感受性を表 1 に記載する。

【図 9】化合物の存在下での *in vitro* 培養によって、B A L 2 7 8 6 2 に対する耐性について選択された腫瘍細胞株を示す。I C₅₀ 測定に基づいて、親株に対する B A L 2 7 8 6 2 の耐性係数は、A 5 4 9 (3 . 0 倍) ; S K O V 3 (7 . 6 倍 ~ 耐性 1 株) ; H 4 6 0 (5 . 3 倍) であった (表 2 を参照)。全細胞タンパク質抽出物を親株及び耐性株から調製し、イムノプロットにより g l u - チュープリンの発現を分析した。アクチンレベルをローディングコントロールとして含めた。

【図 10】g l u - チュープリンタンパク質レベルの増加が、耐性発現の間 S K O V 3 腫瘍株で維持されることを示す。S K O V 3 腫瘍細胞株は、B A L 2 7 8 6 2 の存在下で培養時間を増加させながらの *in vitro* 培養によって、B A L 2 7 8 6 2 に対する耐性について選択した。I C₅₀ 測定に基づいて、親株に対する B A L 2 7 8 6 2 の耐性係数は、S K O V 3 耐性 1 (7 . 6 倍)、S K O V 3 耐性 2 (1 1 . 6 倍) であった (表 2 を参照)。全細胞タンパク質抽出物を親株及び耐性株から調製し、イムノプロットにより g l u - チュープリンの発現を分析した。アクチンレベルは、ローディングコントロールとして作用する。

【図 11】チュープリン 1 A 鎖 [ヒト] のタンパク質配列 (SEQ. ID No. 1) を示す。

【図 12】チュープリン 1 B 鎖 [ヒト] のタンパク質配列 (SEQ. ID No. 2) を示す。

【図 13】チュープリン 1 C 鎖 [ヒト] のタンパク質配列 (SEQ. ID No. 3) を示す。

【図 14】チュープリン 3 C / D 鎖 [ヒト] のタンパク質配列 (SEQ. ID No. 4) を示す。

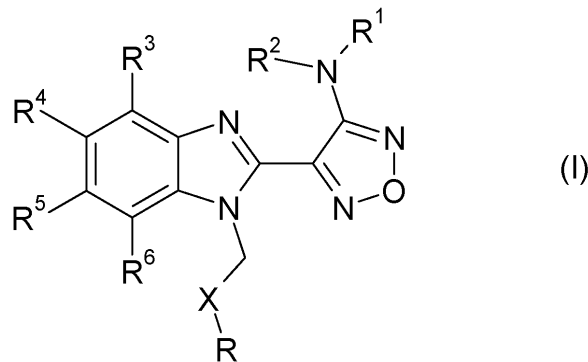
【 0 0 4 1 】

詳細な説明

式 (I) の化合物

本発明の化合物は、一般式 (I) :

【化 8 】



[式中、

R は、フェニル、チエニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、アルキル、ハロ - 低級アルキル、ヒドロキシ - 低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ - 低級アルコキシ、低級アルコキシ - 低級アルコキシ、フェニル - 低級アルコキシ、低級アルキルカルボニルオキシ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルキルカルボニルアミノ、置換アミノ (窒素上の 2 個の置換基が、窒素と一緒に、ヘテロシクリルを形成する)、低級アルキルカルボニル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、シアノ、ハロゲン及びニトロから独立して選択される 1 又は 2 個の置換基により場合により置換されており ;

そして、2 個の隣接する置換基は、メチレンジオキシであり ;

そして、ピリジニルは、低級アルコキシ、アミノ又はハロゲンにより場合により置換され

ており；

Xは、基C = Yを表し、ここで、Yは、酸素、又はヒドロキシもしくは低級アルコキシにより置換されている窒素を表し；

R¹は、水素、低級アルキルカルボニル、ヒドロキシ - 低級アルキル又はシアノ - 低級アルキルを表し；

R²、R³及びR⁶は、水素を表し；

R⁴及びR⁵は、互いに独立して、水素、低級アルキル又は低級アルコキシを表すか；又はR⁴及びR⁵は、一緒になって、メチレンジオキシを表す]

により表される化合物及びその薬学的に許容しうる誘導体であるか、又は

[式中、

Rは、フェニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、アルキル、ハロ - 低級アルキル、ヒドロキシ - 低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ - 低級アルコキシ、低級アルコキシ - 低級アルコキシ、フェニル - 低級アルコキシ、低級アルキルカルボニルオキシ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルキルカルボニルアミノ、置換アミノ（窒素上の2個の置換基が、窒素と一緒に、ヘテロシクリルを形成する）、低級アルキルカルボニル、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、ホルミル、シアノ、ハロゲン及びニトロから独立して選択される1又は2個の置換基により場合により置換されており；そして、2個の隣接する置換基は、メチレンジオキシであり；

そして、ピリジニルは、低級アルコキシ、アミノ又はハロゲンにより場合により置換されており；

Xは、酸素を表し；

R¹は、水素、低級アルキルカルボニル、ヒドロキシ - 低級アルキル又はシアノ - 低級アルキルを表し；

R²、R³及びR⁶は、水素を表し；

R⁴及びR⁵は、互いに独立して、水素、低級アルキル又は低級アルコキシを表すか；又はR⁴及びR⁵は、一緒になって、メチレンジオキシを表す]

により表される化合物及びその薬学的に許容しうる誘導体であり；

そして、ここで、接頭語の低級は、最大7個、とりわけ、最大4個の炭素原子を有する基を意味する。

【0042】

ヘテロシクリルは、好ましくは、窒素、酸素及び硫黄から選択される1、2又は3個のヘテロ原子を含む4～10個の原子を含有する、飽和、部分飽和又は不飽和の単環式又は二環式環を指し、これは、特に指定しない限り、炭素結合型又は窒素結合型であってもよく、その環窒素原子は、低級アルキル、アミノ - 低級アルキル、アリール、アリール - 低級アルキル及びアシルから選択される基により場合により置換されていてもよく、そして、その環炭素原子は、低級アルキル、アミノ - 低級アルキル、アリール、アリール - 低級アルキル、ヘテロアリール、低級アルコキシ、ヒドロキシ又はオキソにより置換されていてもよい。ヘテロシクリルの例は、ピロリジニル、オキサゾリジニル、チアゾリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、ジオキサラニル及びテトラヒドロピラニルである。

【0043】

アシルは、例えば、アルキルカルボニル、シクロヘキシルカルボニル、アリールカルボニル、アリール - 低級アルキルカルボニル又はヘテロアリールカルボニルを指す。低級アシルは、好ましくは、低級アルキルカルボニルであり、特に、プロピオニル又はアセチルである。

【0044】

好ましくは、本発明の一般式(I)の化合物は、R¹が、水素、アセチル、CH₂CH₂CN及びCH₂CH₂CH₂OHからなる群より選択されると定義される。

10

20

30

40

50

【0045】

1つの好ましい実施態様においては、本発明の一般式(I)の化合物は、以下からなる群より選択される：

4 - (1 - フェナシル - 1H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - フラザン - 3 - イルアミン、

4 - [1 - (4 - プロモフェナシル) - 1H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イルアミンオキシム、

N - {4 - [1 - (4 - クロロフェナシル) - 1H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イル} - アセトアミド、

4 - [1 - (4 - クロロフェナシル) - 1H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イル - N - (2 - シアノエチル) - アミン、

4 - [1 - (4 - クロロフェナシル) - 1H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イル - N - (3 - ヒドロキシプロピル) - アミン、

4 - [1 - (3 - アミノ - 4 - クロロフェナシル) - 1H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イルアミン、

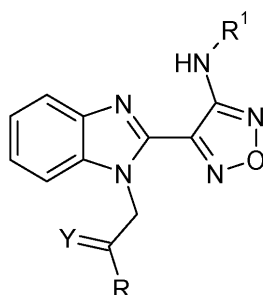
4 - [1 - (3 - メトキシ - 4 - メトキシメトキシ - フェナシル) - 1H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イルアミン

及びその薬学的に許容しうる誘導体。

【0046】

別の好ましい実施態様においては、本発明の一般式(I)の化合物は、以下からなる群より選択される：

【化9】



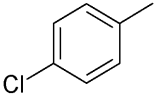
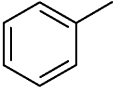
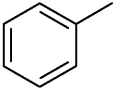
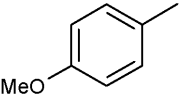
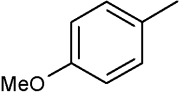
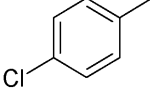
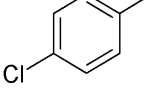
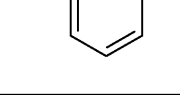
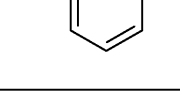
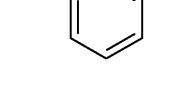
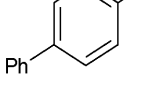
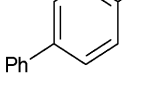
(式中、R、Y及びR¹は、以下のように定義される)

10

20

30

【表 1】

| R | Y | R ¹ |
|---|------|----------------|
|  | O | H |
|  | NOH | H |
|  | NOMe | H |
|  | O | H |
|  | NOH | H |
|  | NOH | H |
|  | NOMe | H |
|  | O | H |
|  | NOH | H |
|  | NOMe | H |
|  | O | H |
|  | NOH | H |

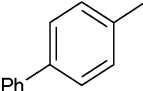
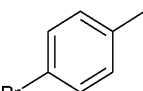
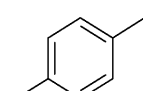
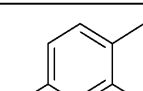
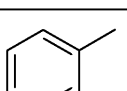
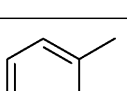
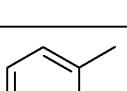
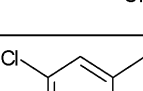
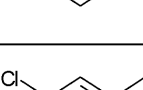
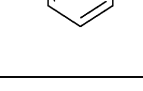
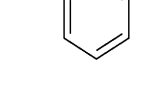
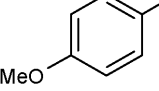
10

20

30

40

50

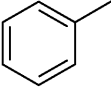
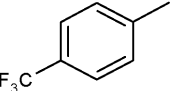
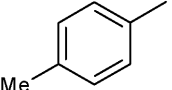
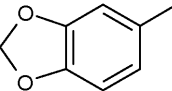
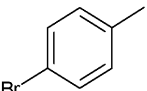
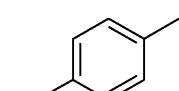
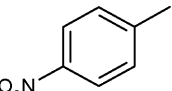
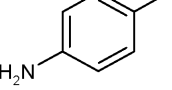
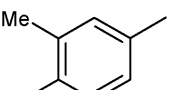
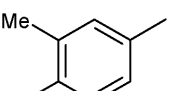
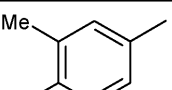
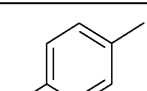
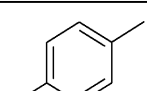
| | | |
|---|------|---|
|  | NOMe | H |
|  | O | H |
|  | NOMe | H |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | NOH | H |
|  | NOMe | H |
|  | O | H |
|  | NOH | H |
|  | NOMe | H |
|  | NOMe | H |
|  | O | H |

10

20

30

40

| | | |
|---|---|--|
|  | O | Ac |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH |
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |

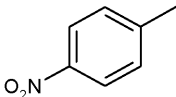
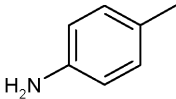
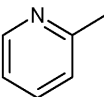
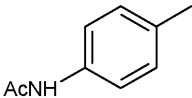
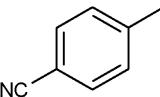
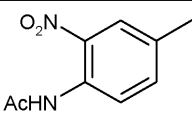
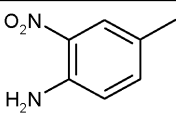
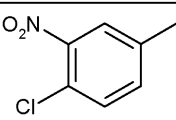
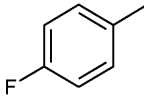
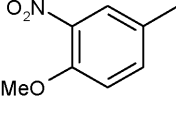
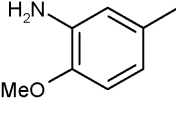
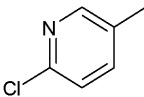
10

20

30

40

50

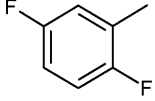

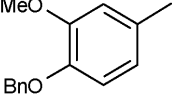
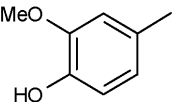
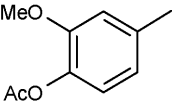
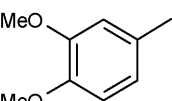
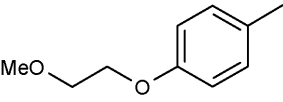
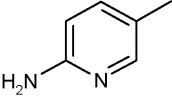
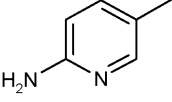
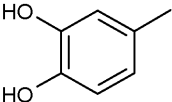
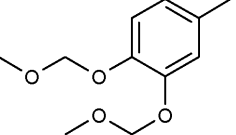
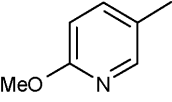
| | | |
|---|---|------------------------------------|
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | H |

10

20

30

40

| | | | |
|---|---|------------------------------------|----|
|  | O | H | |
|  | O | H | |
|  | O | H | 10 |
|  | O | H | |
|  | O | H | 20 |
|  | O | H | |
|  | O | H | |
|  | O | H | 30 |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN | |
|  | O | H | |
|  | O | H | 40 |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN | |

又はその薬学的に許容しうる誘導体。

【 0 0 4 7 】

さらに別の好ましい実施態様においては、本発明の一般式（I）の化合物は、以下からなる群より選択される：

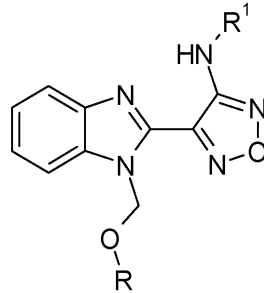
4 - (1 - フェノキシメチル - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル) - フラザン - 3 - イルアミン、

4 - [1 - (4 - フルオロフェノキシメチル) - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イルアミン、

4 - [1 - (3 , 4 - ジメチルフェノキシメチル) - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イル - N - (2 - シアノエチル) - アミン

及び下記式により表される化合物：

【 化 1 0 】

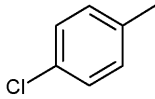
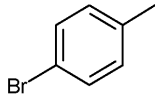
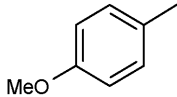
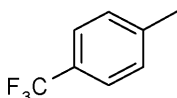
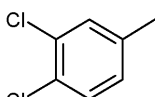
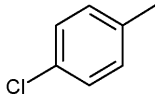
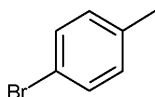
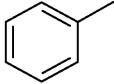
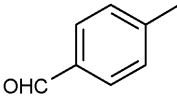
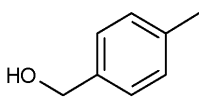
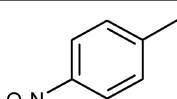
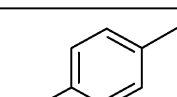


10

20

(式中、R 及び R¹ は、下記のように定義される)

【表 2】

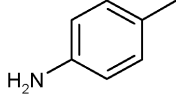
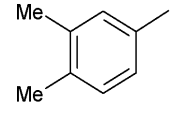
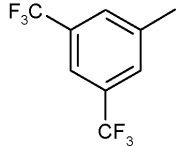
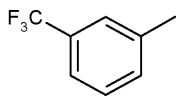
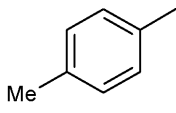
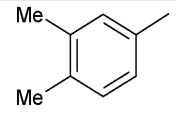
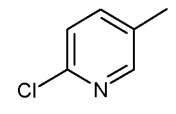
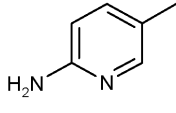
| R | R ¹ |
|---|------------------------------------|
|  | H |
|  | H |
|  | H |
|  | H |
|  | H |
|  | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | H |
|  | H |
|  | H |
|  | H |

10

20

30

40

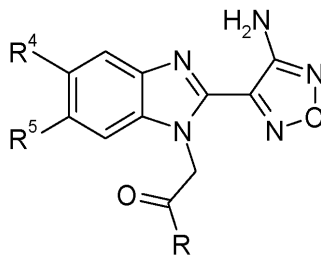
| | | |
|---|--|----|
|  | H | |
|  | H | |
|  | H | 10 |
|  | H | |
|  | CH ₂ CH ₂ CN | 20 |
|  | CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH | |
|  | H | |
|  | H | 30 |

及びその薬学的に許容しうる誘導体。

【0048】

なおさらに別の好ましい実施態様においては、本発明の一般式(I)の化合物は、以下である：

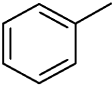
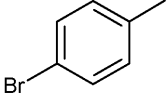
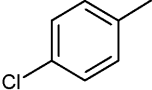
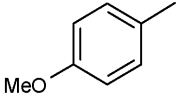
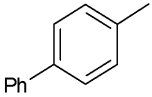
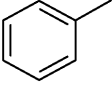
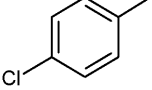
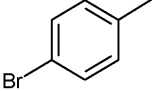
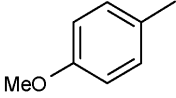
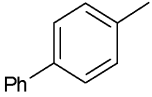
【化11】



40

(式中、R、R⁴及びR⁵は、下記のように定義される)

【表 3】

| R | R ⁴ | R ⁵ |
|---|----------------|----------------|
|  | Me | Me |
|  | Me | Me |
|  | Me | Me |
|  | Me | Me |
|  | Me | Me |
|  | OMe | OMe |
|  | OMe | OMe |
|  | OMe | OMe |
|  | OMe | OMe |
|  | OMe | OMe |

10

20

30

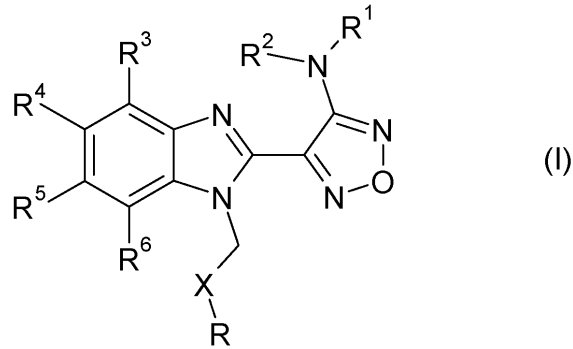
40

又はその薬学的に許容しうる誘導体。

【0049】

より好ましくは、本発明の化合物は、一般式（I）：

【化 1 2】



10

[式中、

R は、フェニル又はピリジニルを表し

ここで、フェニルは、低級アルキル、低級アルコキシ、アミノ、アセチルアミノ、ハロゲン及びニトロから独立して選択される 1 又は 2 個の置換基により場合により置換されており；

そして、ピリジニルは、アミノ又はハロゲンにより場合により置換されており；

X は、基 C = O を表し；

R¹ は、水素又はシアノ - 低級アルキルを表し；R²、R³、R⁴、R⁵ 及び R⁶ は、水素を表す]

20

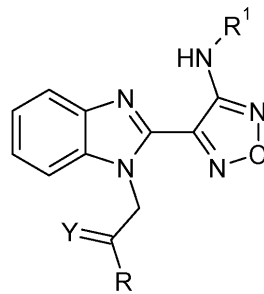
で表される化合物及びその薬学的に許容しうる誘導体であり；

そして、ここで、接頭語の低級は、最大 7 個、とりわけ、最大 4 個の炭素原子を有する基を意味する。

【 0 0 5 0】

とりわけ好ましくは、本発明の化合物は、下記式：

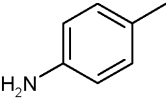
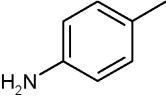
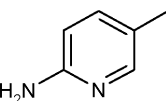
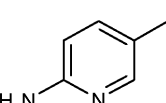
【化 1 3】



30

(式中、R、Y 及び R¹ は、以下のように定義される)

【表 4】

| R | Y | R ¹ |
|---|---|------------------------------------|
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |

10

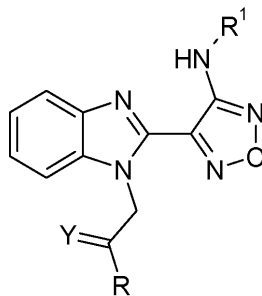
20

により表される化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体である。

【0051】

さらに、とりわけ好ましくは、本発明の化合物は、下記式：

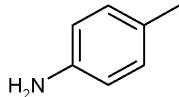
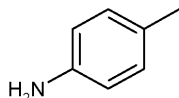
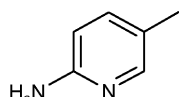
【化14】



30

(式中、R、Y及びR¹は、以下のように定義される)

【表 5】

| R | Y | R1 |
|---|---|------------------------------------|
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |
|  | O | H |
|  | O | CH ₂ CH ₂ CN |

10

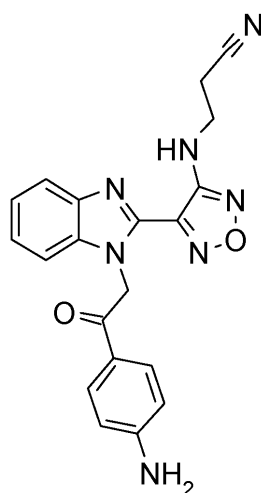
により表される化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体である。

【0052】

特に好ましくは、本発明の化合物は、

20

【化15】



30

又はその薬学的に許容しうる誘導体である。

【0053】

一般式(I)の化合物の語句「薬学的に許容しうる誘導体」(1つ又は複数)中の誘導体(1つ又は複数)という用語は、それらの塩、溶媒和物及び錯体、そして、それらの塩の溶媒和物及び錯体、ならびにそれらのプロドラッグ、多形及び異性体(光学、幾何及び互変異性体を含む)、また、それらのプロドラッグの塩に関する。さらに好ましい実施態様においては、これは、それらの塩及びプロドラッグ、ならびにプロドラッグの塩に関する。

40

【0054】

塩は、好ましくは、酸付加塩である。塩は、好ましくは、塩基性窒素原子を有する式(I)の化合物から有機酸又は無機酸と形成され、とりわけ、薬学的に許容しうる塩である。好適な無機酸は、例えば、塩酸などのハロゲン酸、硫酸又はリン酸である。好適な有機酸は、例えば、カルボン酸、ホスホン酸、スルホン酸又はスルファミン酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、オクタン酸、デカン酸、ドデカン酸、グリコール酸、乳酸、フマル酸、

50

コハク酸、アジピン酸、ピメリン酸、スベリン酸、アゼライン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、グルタミン酸又はアスパラギン酸などのアミノ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、メチルマレイン酸、シクロヘキサンカルボン酸、アダマンタンカルボン酸、安息香酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、フタル酸、フェニル酢酸、マンデル酸、ケイ皮酸、メタン-又はエタン-スルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、1,5-ナフタレン-ジスルホン酸、2-,3-又は4-メチルベンゼンスルホン酸、メチル硫酸、エチル硫酸、ドデシル硫酸、N-シクロヘキシルスルファミン酸、N-メチル-,N-エチル-又はN-プロピル-スルファミン酸、あるいは、アスコルビン酸などの他の有機プロトン酸である。

10

【0055】

本発明の化合物は、人体又は動物体中で分解されて、式(I)の化合物を与えるプロドラッグの形態で投与してもよい。プロドラッグの例としては、式(I)の化合物のin vivoで加水分解可能なエステル及びアミドが挙げられる。考慮される特定のプロドラッグは、天然アミノ酸のエステル及びアミド、低分子ペプチドの、特に、最大5個、好ましくは、2個又は3個のアミノ酸からなる低分子ペプチドのエステル又はアミド、ならびにペグ化ヒドロキシ酸、好ましくは、ヒドロキシ酢酸及び乳酸のエステル及びアミドである。プロドラッグエステルは、アミノ酸の酸官能基又はペプチドのC-末端と式(I)の化合物中の好適なヒドロキシ基から形成される。プロドラッグアミドは、アミノ酸のアミノ官能基又はペプチドのN-末端と式(I)の化合物中の好適なカルボキシ基から形成されるか、又はアミノ酸の酸官能基又はペプチドのC-末端と式(I)の化合物中の好適なアミノ基から形成される。特に好ましくは、プロドラッグアミドは、式(I)のR基内に存在するアミノ基から形成される。

20

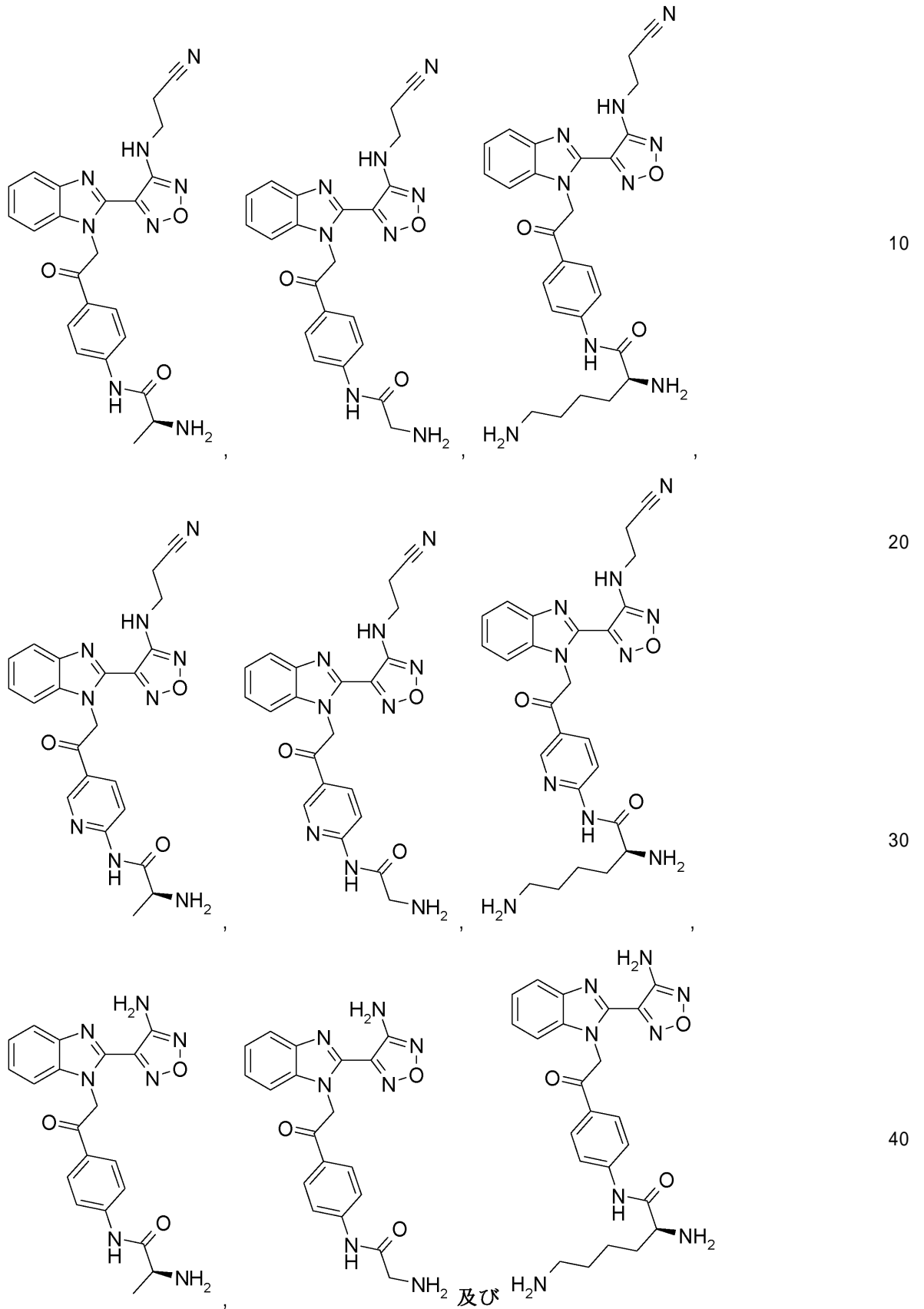
【0056】

より好ましくは、プロドラッグは、式(I)の化合物にグリシン、アラニン又はリシンを付加させることにより形成される。

【0057】

さらにより好ましくは、一般式(I)の化合物は、式：

【化 16】



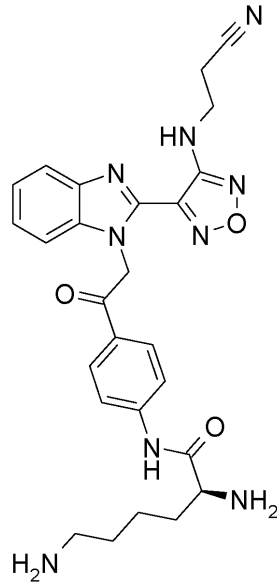
で表される化合物から選択されるプロドラッグの形態である。

【0058】

とりわけ好ましい実施態様においては、一般式(I)の化合物は、下記式：

50

【化 1 7】



10

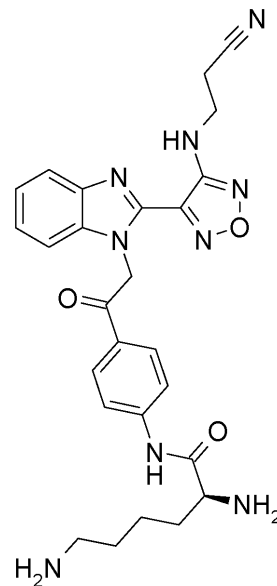
を有するプロドラッグの形態である。

【 0 0 5 9】

20

とりわけ最も好ましい実施態様においては、本発明の化合物は、下記式：

【化 1 8】



30

で表される化合物の薬学的に許容しうる塩、好ましくは塩酸塩、最も好ましくは二塩酸塩である。

40

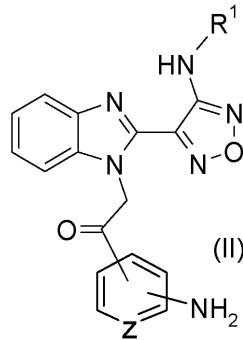
【 0 0 6 0】

この場合の *in vivo* で薬学的に活性な代謝物は、B A L 2 7 8 6 2 である。

【 0 0 6 1】

これらのプロドラッグは、それ自体公知の方法、特に、式 (I I) :

【化 1 9】

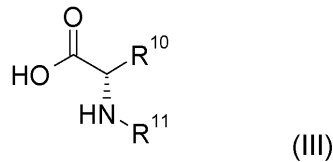


10

(式中、 R^1 は、式 (I) に関して定義され、 Z は、 CH 又は N である)
 で表される化合物、又は保護形態の官能基を含むそのような化合物の誘導体、
 又はそれらの塩を、

(1) 式 (III) :

【化 2 0】



20

(式中、 R^{10} は、水素 (Gly) ; メチル (Ala) 及び保護アミノブチル (Lys) から選択され、そして、 R^{11} は、好適なアミノ保護基である)

で表されるアミノ酸でアシル化して、そして

(2) 得られた化合物の保護誘導体中の任意の保護基を除去して、上記で示されるプロドラッグを得て、所望であれば、

(3) 前記プロドラッグを酸で処理することにより塩に変換するか、又は式 (II) の化合物の塩を対応する式 (II) の遊離化合物に、又は別の塩に変換し、そして / 又は異性体生成化合物の混合物を個々の異性体に分離する方法により調製してもよい。

30

【0062】

式 (III) のアミノ酸による式 (II) の化合物のアシル化は、それ自体公知の手法によって、通常、好適な極性又は双極性非プロトン性溶媒の存在下、必要であれば、例えば、約 $-80 \sim$ 約 $+150$ 、より好ましくは、 $-30 \sim +120$ の温度範囲、とりわけ、約 0 前後 ~ 使用する溶媒の還流温度の範囲で冷却又は加熱しながら実施される。場合により、好適な塩基、特に、ピリジンもしくはコリジンのような芳香族塩基、又はトリエチルアミンもしくはジイソプロピルエチルアミンなどの第三級アミン塩基、又は無機塩基性塩、例えば、炭酸カリウムもしくは炭酸ナトリウムを加える。

【0063】

アシル化は、ペプチド化学において、それ自体公知のアミド形成に使用される条件下、例えば、カルボキシ基の活性化剤、例えば、 N, N' -ジエチル-、 N, N' -ジプロピル-、 N, N' -ジイソプロピル-、 N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド及び N - (3-ジメチルアミノイソプロピル)- N' -エチルカルボジイミド-塩酸塩 (EDC) などのカルボジイミドを用いて、又は 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ)-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (BOP)、 O - (7-アザ-ベンゾトリアゾール-1-イル)- N, N, N' , N' -テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HATU)、2- (2-オキソ-1- (2H)-ピリジル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (TPTU) などの試薬を用いて、場合により、好適な塩基

40

50

、触媒又は共試薬の存在下で達成してもよい。カルボキシ基は、また、例えば、塩化チオニル又は塩化オキサリルと反応させることにより、ハロゲン化アシルとして、好ましくは塩化アシルとして、あるいは、例えば、場合により、好適な塩基、触媒又は共試薬の存在下で、クロロギ酸エチルなどのハロゲン化ギ酸エステルと反応させることにより、対称又は非対称無水物として活性化してもよい。

【0064】

式(II)又は(III)の化合物中に1つ又は複数の他の官能基、例えば、カルボキシ、ヒドロキシ又はアミノが、これらを反応に関与させないために、保護されるか又はされる必要がある場合、これらは、特に、当業者に公知のペプチド化合物、セファロsporin、ペニシリン、核酸誘導体及び糖のようなアミドの合成に通常適用されるような保護基である。アミノ基の好適な保護基は、例えば、カルバミン酸t-ブチル、カルバミン酸ベンジル又はカルバミン酸9-フルオレニルメチルである。

10

【0065】

保護基は、前駆体中に既に存在していてもよく、そして、アルキル化、アシル化、エーテル化、エステル化、酸化、加溶媒分解及び類似の反応などの望まない第二の反応に対して関係する官能基を保護すべきである。すなわち、保護基がそれ自体、望まない第二の反応を受けずに、典型的には、加溶媒分解、還元、光分解により、又は例えば、生理学的条件に似た条件下で酵素活性により容易に除去されること、そして、これらが、最終生成物中に存在しないことが保護基の特徴である。どの保護基が本明細書において上述及び後述される反応に適しているかどうかは、当業者にとって公知であるか又は容易に確認することができる。

20

【0066】

そのような保護基によるそのような官能基の保護、保護基自体、及びそれらの除去反応は、例えば、ペプチド合成の標準参考書及び保護基に関する専門書、例えば、J. F. W. McOmie, 「Protective Groups in Organic Chemistry」, Plenum Press, London and New York 1973, in 「Methoden der organischen Chemie」 (Methods of organic chemistry), Houben-Weyl, 4th edition, Volume 15/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974 及び T. W. Greene, G. M. Wuts 「Protective Groups in Organic Synthesis」, Wiley, New York, 2006 に記載されている。

30

【0067】

疾患

本発明の一般式(I)の化合物は、細胞増殖を停止させ、且つ、例えば、アポトーシスによる細胞死を誘導することが示された。

【0068】

細胞増殖の調節異常又は適切な細胞死の欠如は、広範な臨床的意義を有する。そのような調節異常を伴う疾患の多くは、過剰増殖、炎症、組織再構築及び修復を引き起こす。このカテゴリーでよく知られた適応症としては、癌、再狭窄、新生内膜過形成、血管新生、子宮内膜症、リンパ増殖性疾患、移植関連病変(移植片拒絶)、ポリープ症、組織再構築の症例での神経機能喪失などが挙げられる。

40

【0069】

癌は、異常な細胞増殖及び細胞死率を伴う。ほとんどの種類の増殖性新生物疾患でアポトーシスが阻害又は遅延されるので、アポトーシスの誘導は、癌、とりわけ、古典的な化学療法、放射線療法及び免疫療法に耐性を示す癌タイプを処置するための選択肢の1つである(Apoptosis and Cancer Chemotherapy, Hickman and Dive, eds., Blackwell Publishing, 1999)。また、自己免疫及び移植関連の疾患及び病変では、正常な細胞死プロセスを回復するためにアポトーシスを誘導する化合物を使用してもよく、それによって、それらの症状を取り除くことができ、疾患が治癒することができる。さらに、アポトーシスを誘導する化合物を、再狭窄、すなわち、動脈壁内の血管平滑筋細胞の蓄積、ならびに細菌及びウイルス感染細胞の根絶に失敗することによって引き起こされる持続感染に適用してもよい。さらに、アポトーシスは、上皮細胞、内皮細胞、筋細胞、及び細胞外マトリッ

50

クスと接触していないその他の細胞において、誘導又は再構築することができる。

【0070】

一般式(I)の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、人体又は動物体の予防的処置、又はとりわけ治療的処置のために、特に、新生物疾患、自己免疫疾患、移植関連病変及び/又は変性疾患を処置するために使用してもよい。そのような新生物疾患の例としては、上皮性新生物、扁平上皮細胞新生物、基底細胞新生物、移行細胞乳頭腫及び移行細胞癌、腺腫及び腺癌、付属器及び皮膚付属器新生物、粘膜表皮新生物、嚢胞性新生物、粘液性及び漿液性新生物、導管性、小葉性及び髄様新生物、腺房細胞新生物、複合上皮性新生物、特殊な性器新生物、傍神経節腫及びグロムス腫瘍、母斑及び黒色腫、軟部組織腫瘍及び肉腫、線維腫性新生物、粘液腫性新生物、脂肪腫性新生物、筋腫性新生物、複合性混合性新生物及び間質性新生物、線維上皮性新生物、滑膜様新生物、中皮性新生物、胚細胞新生物、トロホプラスト性新生物、中腎腫、血管腫瘍、リンパ管腫瘍、骨及び軟骨新生物、巨細胞腫、混合型骨腫瘍、歯源性腫瘍、グリオーマ、神経上皮腫性新生物、髄膜腫、神経鞘性腫瘍、顆粒細胞性腫瘍及び胞巣性軟部肉腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、他のリンパ網状新生物、形質細胞腫瘍、肥満細胞腫瘍、免疫増殖性疾患、白血病、混合型骨髄増殖性疾患、リンパ増殖性疾患ならびに骨髄異形成症候群が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0071】

一般式(I)の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、自己免疫疾患を処置するために使用してもよい。そのような自己免疫疾患の例としては、全ての器官(皮膚、心臓、腎臓、骨髄、目、肝臓、脾臓、肺、筋肉、中枢及び末梢神経系、結合組織、骨、血管及びリンパ管、尿生殖器系、耳、軟骨、一次及び二次リンパ系(骨髄、リンパ節、胸腺を含む)、胃腸管(口-咽頭、食道、胃、小腸、結腸及び直腸を含む)であって、上述の器官の一部から単一細胞レベル及び下部構造、例えば、幹細胞までを含む)が関与する、全身性、円板状又は亜急性皮膚エリテマトーデス、関節リウマチ、抗リン脂質症候群、CREST、全身性進行性硬化症、混合性結合組織疾患(Sharp症候群)、Reiter症候群、若年性関節炎、寒冷凝集素病、本態性混合性クリオグロブリン血症、リウマチ熱、強直性脊椎炎、慢性多発性関節炎、重症筋無力症、多発性硬化症、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、Guillain-Barre症候群、皮膚筋炎/多発性筋炎、自己免疫性溶血性貧血、血小板減少性紫斑症、好中球減少症、I型糖尿病、甲状腺炎(Hashimoto病及びGrave病を含む)、Addison病、多腺性症候群、天疱瘡(尋常性、落葉状、脂質性及び増殖性)、水疱性及び瘢痕性類天疱瘡、妊娠性類天疱瘡、後天性表皮水疱症、線状IgA病、硬化性萎縮性苔癬、Dühring病、尋常性乾癬、滴状、汎発性膿疱性及び局所性膿疱性乾癬、白斑、円形脱毛症、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、全ての形態の糸球体腎炎、肺出血(グッドパスチャー症候群)、IgA腎症、悪性貧血及び自己免疫性胃炎、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎及びCrohn病を含む)、Behcet病、Celiac-Sprue病、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性心筋炎、肉芽腫性睾丸炎、睾丸炎を伴わない精子形成欠如、特発性及び続発性肺線維症、自己免疫性病変の可能性のある炎症性疾患、例えば、壊疽性膿皮症、扁平苔癬、サルコイドーシス(Lofgren及び皮膚/皮下型を含む)、環状肉芽腫、アレルギー性I型およびIV型免疫反応、気管支喘息、花粉症、アトピー性、接触性及び空中性皮膚炎(airborne dermatitis)、大血管炎(巨細胞及び高安動脈炎)、中血管炎(結節性多発性動脈炎、川崎病)、小血管炎(Wegener肉芽腫症、Churg Strauss症候群、顕微鏡的多発性血管炎、Henoch-Schoenlein紫斑病、本態性クリオグロブリン性血管炎、皮膚白血球破碎性血管炎)、過敏症候群、中毒性表皮壊死(Stevens-Johnson症候群、多形性紅斑)、薬物副作用による疾患、I-VI型(Coombs分類)免疫学的反応形態による全形態の皮膚的、器官特異的及び全身的影響、急性及び慢性の対宿主性移植片病及び対移植片性宿主病などの移植関連病変が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0072】

特に好ましくは、本発明の疾患は、新生物疾患又は自己免疫疾患である。とりわけ好ましい実施態様においては、疾患は、癌である。

50

【0073】

罹患した器官及び体の部位についての癌の例としては、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、（結腸及び直腸、すなわち、結腸直腸癌を含む）、肺癌、（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、大細胞肺癌及び中皮腫を含む）、骨肉腫、内分泌系癌、副腎癌、胸腺癌、肝臓癌、胃癌、腸（胃癌を含む）、膵臓癌、骨髄癌、血液悪性腫瘍（リンパ腫、白血病、骨髄腫又はリンパ性悪性疾患など）、膀胱癌、尿路癌、腎臓癌、皮膚癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭部癌、頸部癌、前立腺癌及び精巣癌が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、癌は、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌、脳腫瘍、神経内分泌癌、肺癌、腎臓癌、血液悪性腫瘍、黒色腫及び肉腫からなる群より選択される。とりわけ好ましくは、癌は、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、黒色腫及び肺癌からなる群より選択される。さらに、とりわけ好ましくは、癌は、肺癌、黒色腫、卵巣癌及び結腸直腸癌からなる群より選択される。別の好ましい実施態様においては、予測される耐性が獲得耐性である場合、癌は、肺癌又は卵巣癌である。さらに別の好ましい実施態様においては、予測される耐性が自然耐性である場合、癌は、結腸直腸癌、肺癌又は黒色腫からなる群より選択される。

10

【0074】

試料

g l u - チューブリンレベルの測定は、被験体由来の生物組織の試料で *in vitro* で実施してもよい。試料は、例えば、正常な組織、腫瘍組織、細胞株、全血、血清、血漿、脳脊髄液、リンパ液、循環腫瘍細胞、細胞溶解物、組織溶解物、尿及び吸引物などの身体から分離された任意の生体材料であってもよい。好ましくは、試料は、正常な組織、腫瘍組織又は循環腫瘍細胞に由来する。より好ましくは、試料は、腫瘍組織又は循環腫瘍細胞に由来する。1つの特に好ましい実施態様においては、試料は、腫瘍組織に由来する。例えば、g l u - チューブリンレベルは、新鮮な腫瘍組織試料、凍結した腫瘍組織試料又はホルマリン固定/パラフィン包埋した腫瘍組織試料で測定してもよい。

20

【0075】

試料は、試料をバイオマーカーのレベルの測定を含む方法の工程に供する前に、被験体から事前に得られる。試料を取り出す方法は当技術分野においてよく知られており、例えば、生検、例えば、パンチ生検、コア生検又は微細針吸引生検、内視鏡生検又は擦過生検によって被験体から取り出してもよい。血液は、静脈穿刺により採血して、標準的な技術に従ってさらに処理してもよい。循環腫瘍細胞は、また、例えば、大きさ（例えば、I S E T - 上皮腫瘍細胞の大きさによる単離）又は免疫磁性細胞濃縮（例えば、Cellsearch（登録商標）、Veridex、Raritan、N J）に基づいて血液から得てもよい。

30

【0076】

試料の比較

本発明の被験体は、ヒト又は動物であってもよい。好ましくは、被験体は、ヒトである。

【0077】

バイオマーカーの g l u - チューブリンは、人体又は動物体から採取、好ましくは人体から採取した試料（1つ又は複数）中、*ex vivo* で測定される。試料（1つ又は複数）は、試料をバイオマーカーのレベルの測定を含む方法の工程に供する前に、人体又は動物体から事前に得られ、好ましくは人体から事前に得られる。

40

【0078】

バイオマーカーは、一般的に、生物学的応答の指標として、好ましくは、所与の処置に対する感受性の指標として使用される物質であり、該処置は、本願において、一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体による処置である。

【0079】

特に好ましい実施態様においては、試料中の g l u - チューブリンレベルが標準値又は標準値のセットに対してより高い場合に、耐性であると予測される。

【0080】

50

本明細書において使用されるように、標準レベル又は標準レベルのセットに対して、増加、又は比較的高い、又は高い、又はより高いレベルは、試料中のバイオマーカの量又は濃度が、標準レベル又は標準レベルのセットに対して、試料において検出可能な程度により大きいことを意味する。これは、標準に対して少なくとも約1%の増加又はより高いレベル、好ましくは、標準に対して少なくとも約5%の増加を包含する。より好ましくは、標準に対して少なくとも約10%の増加又はより高いレベルである。さらに、特に好ましくは、標準に対して少なくとも約20%の増加又はより高いレベルである。例えば、そのような増加又はより高いレベルは、標準に対して、少なくとも約1%、約10%、約20%、約30%、約50%、約70%、約80%、約100%、約150%又は約200%又はそれ以上の増加又はより高いレベルを含んでもよいが、これらに限定されない。

10

【0081】

好ましくは、試料(1つ又は複数)中のglu-チューブリンレベルが、

- i) 同じ腫瘍組織型を有する被験体からの標準値又は標準値のセットに対して；又は
 - ii) 処置開始後に採取され、処置開始前に同じ被験体から採取された試料(1つ又は複数)と比較され；又は
 - iii) 正常な細胞又は組織からの標準値又は標準値のセットに対して；
- より高い場合に、耐性であると予測される。

【0082】

glu-チューブリンレベルの測定は、被験体から事前に得られた試料中、ex-vivoで実施される。さらに好ましくは、予測される応答は、耐性である。

20

【0083】

より好ましくは、試料(1つ又は複数)中のglu-チューブリンレベルが、

- i) 同じ腫瘍組織型を有する被験体からの標準値又は標準値のセットに対して；又は
 - ii) 処置開始後に採取され、処置開始前に同じ被験体から採取された試料(1つ又は複数)と比較され；
- より高い場合に、耐性であると予測される。

【0084】

とりわけ好ましくは、試料(1つ又は複数)中のglu-チューブリンレベルが、同じ腫瘍組織型を有する被験体からの標準値又は標準値のセットに対してより高い場合に、耐性であると予測される。

30

【0085】

1つの好ましい実施態様においては、i) 試料(1つ又は複数)において、測定値を、比較されるべき試料と同じ腫瘍組織型を有する被験体からの試料からの標準値又は標準値のセットに対して比較する場合、標準値又は標準値のセットは、その癌タイプを有する被験体集団からの試料から確立される。これらの標準的な被験体からの試料は、試料の起源が標準と比較されるべき試料間で一致するならば、例えば、腫瘍組織、循環腫瘍細胞又は血液由来であってもよい。

【0086】

別の好ましい実施態様においては、ii) 処置開始後に採取した試料(1つ又は複数)において、測定値を、処置開始前に同じ被験体から採取した試料(1つ又は複数)と比較する場合、好ましくは、獲得耐性を予測するために測定される。試料は、同じ生物学的起源からの細胞又は組織と比較される。獲得耐性が予測された場合、それは、化合物による処置を中断すべきであることを示す。従って、バイオマーカは、化合物によるさらなる処置が獲得応答(例えば、異常細胞の減少)を与える可能性があるか否か、又は細胞がそのような処置に対して非応答性又は耐性になったか否かをモニタリングするために使用される。

40

【0087】

さらに別の好ましい実施態様においては、iii) 試料(1つ又は複数)において測定値を、正常な細胞又は組織からの標準値又は標準値のセットに対して比較する場合、標準値又は標準値のセットは、正常(例えば、非腫瘍性)細胞又は組織又は体液の試料から確立

50

してもよい。そのようなデータは、標準値又は標準値のセットを構築するために被験体集団から収集してもよい。

【0088】

標準値又は標準値のセットは、事前に得られた試料（少なくとも1つの被検体からの、より好ましくは被検体の平均（例えば、 $n = 2 \sim 1000$ 以上）からの細胞株、又は好ましくは、生体材料からでありうる）からex-vivoで確立される。標準値又は標準値のセットは、次に、一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体による処置に対する同じ細胞株又は同じ被験体の応答データと関連させてもよい。この関連から、例えば、場合によりカットオフ又は閾値を含む、相対的なスケール又は採点システムの形態での比較測定基準を確立して、それによって、式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する応答レベルのスペクトルと関連するバイオマーカーのレベルを示すことができる。応答レベルのスペクトルは、化合物の治療活性に対する相対的感受性（例えば、高感受性～低感受性）、ならびに治療活性に対する耐性を含んでもよい。好ましい実施態様においては、この比較測定基準は、カットオフ値又は処置に対して耐性であると予測する値のセットを含む。

10

【0089】

例えば、試料中のglu-チューブリンレベルを測定するために免疫組織化学法を使用する場合、標準値は、採点システムの形態であってもよい。そのようなシステムは、glu-チューブリン染色が存在する細胞のパーセントを考慮してもよい。そのシステムは、また、個々の細胞の染色の相対強度を考慮してもよい。glu-チューブリンレベルの標準値又は標準値のセットは、それから、式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体の治療活性に対する被検体又は組織又は細胞株の応答、とりわけ、耐性を示すデータと関連させてもよい。そのようなデータは、それから、比較測定基準の一部を形成してもよい。

20

【0090】

応答は、一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体の治療活性に対する、細胞株の、又は好ましくは被験体の、又はより好ましくは被検体における疾患の反応である。応答レベルのスペクトルは、化合物の治療活性に対する相対的感受性（例えば、高感受性～低感受性）、ならびに治療活性に対する耐性を含んでもよい。応答データは、例えば、客観的応答割合、疾患が進行する時間、無憎悪生存及び生存全体についてモニタリングしてもよい。

30

【0091】

癌性疾患の応答は、例えば、非限定的に、以下の癌治療分野の当業者によく知られる基準を使用することにより評価してもよい：

固形癌の治療効果判定のためのガイドライン(RECIST)、情報源：Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer.2009; 45:228-47 ;

高悪性度グリオーマのRANO基準、情報源：Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB, Tsien C, Mikkelsen T, Wong ET, Chamberlain MC, Stupp R, Lamborn KR, Vogelbaum MA, van den Bent MJ, Chang SM. 高悪性度グリオーマの最新の応答評価基準：神経腫瘍学ワーキンググループの応答評価、J Clin Oncol. 2010;28(11):1963-72 ;

40

卵巣癌応答のCA-125 Rustin 基準、情報源：Rustin GJ, Quinn M, Thigpen T, du Bois A, Pujade-Lauraine E, Jakobsen A, Eisenhauer E, Sagae S, Greven K, Vergote I, Cervantes A, Vermorken J. Re: 固形腫瘍（卵巣癌）の処置に対する応答を評価する新ガイドライン、J Natl Cancer Inst. 2004; 96(6):487-8 ; 及び

前立腺癌応答のPSAワーキンググループ2基準、情報源：Scher HI, Halabi S, Tannock I, Morris M, Sternberg CN, Carducci MA, Eisenberger MA, Higano C, Bublely GJ,

50

Dreicer R, Petrylak D, Kantoff P, Basch E, Kelly WK, Figg WD, Small EJ, Beer TM, Wilding G, Martin A, Hussain M; 前立腺癌の臨床試験ワーキンググループ。進行性前立腺癌及びテストステロンの去勢レベルを有する患者の臨床試験のデザイン及びエンドポイント：前立腺癌の臨床試験ワーキンググループの勧告、J Clin Oncol.2008 ; 26(7):1148-59。

【0092】

耐性は、下記の1つ又は複数の観察可能及び/又は測定可能な減少がないこと、又は不存在がないことと関連する：異常細胞、好ましくは癌性細胞の数の減少；又は異常細胞、好ましくは癌性細胞の不存在；癌性疾患の場合：腫瘍サイズの減少；さらなる腫瘍成長の阻害（すなわち、ある程度まで遅らせる、好ましくは停止させる）；PSA及びCA-125などの腫瘍マーカーのレベルの低下、他の器官への癌細胞浸潤（軟組織及び骨への癌の拡大を含む）の阻害（すなわち、ある程度まで遅らせる、好ましくは停止させる）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度まで遅らせる、好ましくは停止させる）；特定の癌と関連する1つ又は複数の症状の緩和；ならびに罹患率及び死亡率の低下。

10

【0093】

好ましい実施態様においては、耐性は、下記の基準の1つ又は複数の観察可能及び/又は測定可能な減少がないこと、又は不存在がないことを意味する：腫瘍サイズの減少；さらなる腫瘍成長の阻害、他の器官への癌細胞浸潤の阻害；及び腫瘍転移の阻害。

【0094】

さらに好ましい実施態様においては、耐性は、下記の基準の1つ又は複数を目指す：腫瘍サイズの減少がないこと；さらなる腫瘍成長の阻害がないこと、他の器官への癌細胞浸潤の阻害がないこと；及び腫瘍転移の阻害がないこと。

20

【0095】

前述の耐性基準の測定は、癌性疾患の応答を測定する上記に列挙したような、癌治療分野の当業者によく知られる臨床ガイドラインに従う。

【0096】

応答は、また、細胞増殖及び/又は細胞死を評価することによりin vitroで確立してもよい。例えば、細胞死又は増殖に対する効果は、下記の1つ又は複数のよく確立されたアッセイによりin vitroで評価してもよい：A) Hoechst 33342色素による核の染色（アポトーシスに特徴的な核形態学及びDNA断片化についての情報が得られる）。B) アネキシンV結合アッセイ（細胞膜の外側の脂質二重層のホスファチジルセリン含量を反映する。この事象は、アポトーシスの早期の特徴と考えられる）。C) TUNELアッセイ（末端デオキシヌクレオチド転移酵素媒介dUTPニック末端標識法。核酸の末端を標識してDNA断片化を測定することにより、アポトーシス又は壊死を受けている細胞を評価する蛍光法）。D) 細胞の代謝活性を測定するMTS増殖アッセイ（生存細胞は代謝的に活性であるが、呼吸鎖異常の細胞は、この試験で低い活性を示す）。E) クリスタルバイオレット染色アッセイ（細胞数に及ぼす効果が細胞成分の直接染色を介してモニタリングされる）。F) プロデオキシウリジン（BrdU）の取り込みを介してDNA合成をモニタリングする増殖アッセイ（成長/増殖に及ぼす阻害効果を直接決定することができる）。G) YO-PROアッセイ（細胞の生存を妨害することなく、死細胞（例えば、アポトーシスを起こした）を分析することが可能な、膜非透過性のシアニンモノマー核酸蛍光染色を含む。また、細胞数に及ぼす全体の効果を、細胞透過化の後に分析することができる）。H) 細胞周期分布のヨウ化プロピジウム染色（細胞周期の異なるフェーズ間の分布の変化を示す。細胞周期停止点を決定することができる）。I) 足場非依存性増殖アッセイ（例えば、軟寒天中、単一細胞懸濁液がコロニーへ成長する能力を評価するコロニー成長アッセイ）。

30

40

【0097】

in vitroでの耐性の決定に関する好ましい実施態様においては、耐性は、異常細胞の増殖率の低下及び/又は異常細胞の数の減少がないことを意味する。より好ましくは、耐性は、癌性細胞の増殖率の低下がない、及び/又は癌性細胞の数の減少がないことを意味す

50

る。異常細胞、好ましくは癌性細胞の数の減少は、様々なプログラム及び非プログラム細胞死メカニズムを介して起こりうる。アポトーシス、カスパーゼ非依存性プログラム細胞死及びオートファジー細胞死は、プログラム細胞死の例である。しかし、本発明の実施態様に含まれる細胞死の基準は、任意の1つの細胞死メカニズムに限定されるものと解釈すべきではない。

【0098】

g l u - チューブリン

- チューブリン (ヒト - チューブリン) のタンパク質配列の好ましい例を、図 1 1 ~ 1 4 の SEQ. ID No. 1 ~ 4 に列挙する。 - チューブリンは、g l u - チューブリンの前駆体である。上述したように、g l u - チューブリンそれ自体は、C - 末端のチロシンが除去されている。g l u - チューブリンという用語は、また、SEQ. ID No. 1 ~ 4 により表される配列の相同体、突然変異型、対立遺伝子変異体、イソフォーム、スプライス変異体及び等価体 (但し、グルタミン酸が、C - 末端における最後のアミノ酸である) を包含する。より好ましくは、これは、前記配列に対して少なくとも約 7 5 % の同一性、とりわけ好ましくは、少なくとも約 8 5 % の同一性、特に好ましくは、少なくとも約 9 5 % の同一性、さらに特に好ましくは、約 9 9 % の同一性を有する配列 (但し、各場合で、グルタミン酸が、C - 末端における最後のアミノ酸である) を包含する。

10

【0099】

g l u - チューブリンのレベル

g l u - チューブリンのレベルは、当業者によく知られたタンパク質分析技術により、試料中でアッセイしてもよい。g l u - チューブリンのレベルをタンパク質レベルで測定するために好適な当技術分野において公知の方法の例としては、i) 免疫組織化学 (I H C) 分析、ii) ウエスタンブロット、iii) 免疫沈降、iv) 酵素結合免疫吸着法 (E L I S A)、v) ラジオイムノアッセイ、vi) 蛍光活性化細胞選別法 (F A C S)、vii) 質量分析法 (マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 (M A L D I、例えば、M A L D I - T O F) 及びエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (E S I - M S) を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0100】

上記方法のいくつかに含まれる抗体は、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、抗体フラグメント、及び / 又はキメラ抗体を含む様々なタイプの合成抗体であってもよい。抗体は、その抗体を検出できるように、又は例えば、標識された又は検出可能な結果を生成することが可能な二次抗体を使用して、1つもしくは複数のさらなる種との次の反応を検出可能なように標識されてもよい。 - チューブリンの g l u - チューブリン形態に特異的な抗体は、Miliporeから市販品として入手するか、又は当業者によく知られた従来の抗体生成法を介して調製することができる。

30

【0101】

タンパク質分析の好ましい方法は、E L I S A、質量分析技術、免疫組織化学及びウエスタンブロットであり、より好ましくは、ウエスタンブロット及び免疫組織化学である。イムノブロットとしても知られるウエスタンブロットでは、タンパク質レベルを評価するために標識抗体を使用してもよく、その方法において、検出可能な標識からのシグナルの強度はタンパク質の量に相当し、これを、例えば、密度測定により定量することができる。

40

【0102】

免疫組織化学もまた、バイオマーカーの存在及び相対量を検出するために標識抗体を使用する。これは、バイオマーカーが存在する細胞のパーセントを評価するために使用することができる。これは、また、個々の細胞中のバイオマーカーの局在又は相対量を評価するために使用することができ、後者は、染色強度の関数と見なされる。

【0103】

E L I S A は、特異的なタンパク質を検出するために抗体又は抗原に結合した酵素を使用する、酵素結合免疫吸着法の略称である。E L I S A は、典型的には、以下のように実

50

施される（しかし、他の変法もある）：96ウェルプレートなどの固体基板を、バイオマーカーを認識する一次抗体でコートする。次に、結合したバイオマーカーを、バイオマーカーに特異的な二次抗体により認識する。これを酵素に直接連結するか、又は酵素に連結させた三次抗免疫グロブリン抗体を使用してもよい。基質を加えると、酵素が反応を触媒して、特定の色を生成する。この色の光学密度を測定することにより、バイオマーカーの存在及び量を決定することができる。

【0104】

バイオマーカーの使用

バイオマーカーは、上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する、被検体における疾患の自然耐性を予測するために使用してもよい。

【0105】

バイオマーカーは、上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する、被検体における疾患の獲得耐性を予測するために使用してもよい。

【0106】

バイオマーカーは、上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置するために、疾患、好ましくは、癌を患っている又は患う可能性がある被験体を選択するために使用してもよい。そのようなバイオマーカーのレベルは、そのような薬剤による処置に応答する、又は応答しない、又は応答し続ける、または応答し続けな可能性のある被検体を特定するために使用してもよい。不必要な処置計画を避けるために、被験体の層別化を実施してもよい。特に、バイオマーカーは、被験体からの試料（1つ又は複数）が、標準レベル又は標準レベルのセットに対して、より高いglu-チューブリンレベルを示さない被験体を特定するために使用してもよく、それによって、そのような被験体を、上記で定義される式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で処置するために選択してもよい。

【0107】

バイオマーカーは、また、投薬量及び計画に関して処置計画の決定を補助するために使用してもよい。また、バイオマーカーは、被験体に与えられる、一般式（I）の化合物（1つ又は複数）又はその薬学的に許容しうる誘導体と別の化学療法薬（細胞毒性薬）（1つ又は複数）とを含む、薬物併用の選択を補助するために使用してもよい。さらに、バイオマーカーは、一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体を、標的療法、内分泌療法、放射線療法、免疫療法もしくは外科的介入又はこれらの組み合わせと併用して投与するか否かを含む、被験体における治療方針の決定を補助するために使用してもよい。

【0108】

glu-チューブリンは、また、一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する応答を予測するため、そして、処置計画を決定するために他のバイオマーカーと組み合わせて使用してもよい。これは、さらに、耐性を予測するため、そして、処置計画を決定するために化学療法剤感受性試験と組み合わせて使用してもよい。化学療法剤感受性試験は、一般式（I）の化合物に対する細胞の応答を決定するために、被験体から、例えば、血液悪性腫瘍又は接触可能な固形腫瘍、例えば、乳房、頭部及び頸部癌又は黒色腫を有する被験体から採取した細胞に一般式（I）の化合物を直接適用することを含む。

【0109】

処置方法

本発明は、また、いくつかの態様に、処置方法及び処置方法において使用するためのglu-チューブリンを関与させるが、ここでは、最初に、glu-チューブリンレベルを、標準レベルもしくは標準レベルのセット、又は処置開始前のレベルに対して確立して、次に、前記試料中のglu-チューブリンレベルが、それぞれ、標準値又は標準値のセットより高くない場合、又は処置開始前のレベルに対して増加していない場合に、上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体を投与する。式（I）

10

20

30

40

50

の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、当業者によく知られているように、医薬組成物で投与してもよい。好適な組成物及び投薬量は、例えば、WO 2004/103994 A1（参照により本明細書に明確に組み入れられる）の35～39ページに開示されている。温血動物、とりわけヒトに対しては、腸内投与、例えば、鼻腔内、口腔、直腸、又はとりわけ経口投与用の組成物、及び非経口投与、例えば、静脈内、筋肉内又は皮下投与用の組成物がとりわけ好ましい。より具体的には、静脈内投与用の組成物が好ましい。

【0110】

本組成物は、活性成分及び薬学的に許容しうる担体を含む。組成物の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：5000個の軟ゼラチンカプセル剤（各々、活性成分として一般式（I）の化合物の1つを0.05g含む）は、以下のように調製される：微粉化した活性成分250gを、Lauroglykol（登録商標）（ラウリン酸プロピレングリコール、Gattefosse S.A., Saint Priest, France）2リッターに懸濁し、湿式造粒機中で製粉して、粒径約1～3μmの粒子を製造する。次に、カプセル充填機を用いて、混合物を0.419gずつ軟ゼラチンカプセルに注入する。

10

【0111】

本発明は、また、一態様においては、新生物疾患又は自己免疫疾患、好ましくは癌を処置する方法であって、glu-チューブリンレベルが標準レベルもしくは標準レベルのセット、又は処置開始前のレベルと比較してより高い試料を有する被験体中のglu-チューブリンレベルを最初に低下させて、次に、被験体を、上記で定義される一般式（I）の化合物又は薬学的に許容しうる誘導体で処置することによる方法に関する。glu-チューブリンレベルは、直接的又は間接的な化学又は遺伝学的方法により低下させてもよい。そのような方法の例は、glu-チューブリンの発現を減少させる薬物、ウイルス、プラスミドもしくはペプチド構築物の標的送達、又はglu-チューブリンレベルをダウンレギュレートする抗体もしくはsiRNAもしくはアンチセンスによる処置である。例えば、siRNAをTTCPのレベルを低下させるために使用して、又はプラスミドの送達をTTLの発現を増加させるために使用して、それによって、細胞中のglu-チューブリンレベルを低下させてもよい。次に、一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体で被験体を処置してもよい。

20

【0112】

一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、単独で又は1つもしくは複数の他の治療薬と併用して投与することができる。可能な併用療法は、固定された組み合わせ剤の形態であるか、あるいは、本発明の化合物と1つもしくは複数の他の治療薬を交互に又は互いに独立して投与する形態、あるいは、固定された組み合わせ剤と1つもしくは複数の他の治療薬の併用投与の形態であってもよい。

30

【0113】

一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、さらに又は加えて、とりわけ、化学療法（細胞傷害性療法）、標的療法、内分泌療法、放射線療法、免疫療法、外科的介入又はこれらの組み合わせと併用して、腫瘍治療のために投与することができる。長期療法は、上述するような他の処置方針に関連するアジュバント療法であるので同様に可能である。他の可能な処置は、腫瘍退縮後の患者の状態を維持するための治療、又は例えば、リスクを有する患者における化学予防治療である。

40

【0114】

キット及び装置

本発明は、試料中のglu-チューブリンレベルを測定するために必要な試薬を含む、上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する被験体における応答、好ましくは疾患の応答を予測するための、一態様においてはキットに、別の態様においては装置に関する。好ましくは、試薬は、glu-チューブリンのための検出部を含む捕捉試薬及び検出試薬を含む。

【0115】

キット及び装置は、また、好ましくは、試料中のglu-チューブリンレベルと比較す

50

る標準値又は標準値のセットを含む比較測定基準を含んでもよい。好ましい実施態様においては、比較測定基準は、キットの使用説明書に含まれる。別の好ましい実施態様においては、比較測定基準は、表示装置、例えば、縞模様のカラーコード化又は数値コード化された材料の形態であり、耐性レベルを表示するための試料測定の表示器の隣に位置するように設計されている。標準値又は標準値のセットは、上述するように決定してもよい。

【0116】

試薬は、好ましくは、glu-チューブリンに選択的に結合する抗体又は抗体フラグメントである。これらは、例えば、glu-チューブリンに結合する1つの特異的二次抗体と、一次抗体に結合し、且つ、それ自体検出のために標識されている二次抗体の形態であってもよい。あるいは、一次抗体は、また、直接検出のために標識されていてもよい。キット又は装置は、また、場合により、捕捉試薬に結合しているバイオマーカーを他のバイオマーカーよりも、洗浄後に選択的に保持させることができる洗浄液を含有してもよい。そのようなキットは、次に、バイオマーカーのレベルを検出するために、ELISA、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー、免疫組織化学又は他の免疫化学的方法において使用することができる。

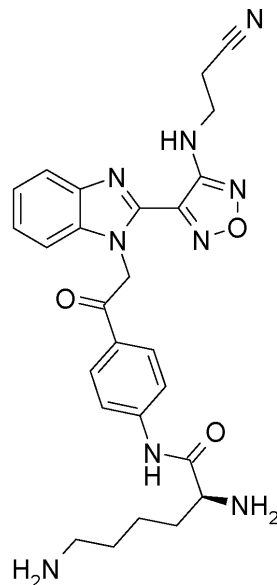
10

【0117】

より好ましくは、キットは、上記で定義される一般式(I)の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体を含む。次に、キットに含まれる試薬により測定される被験体からの試料中のバイオマーカーのレベルに従って、この化合物を被験体に投与してもよい。従って、本発明のキットは、上記で定義される本発明の処置方法において使用してもよい。とりわけ好ましい実施態様においては、キットは、下記式の化合物又はその薬学的に許容しうる塩を含む。

20

【化21】



30

【0118】

キットの特に好ましい実施態様においては、薬学的に許容しうる塩は二塩酸塩である。別の態様においては、本発明は、上述するそのようなキットの使用に関する。

40

【0119】

さらに、装置は、測定シグナルをさらに処理し、これらを比較測定基準のスケールに変換する撮像装置又は測定装置(例えば、非限定的に、蛍光の測定)を含んでもよい。

【0120】

本願において、語「含む(comprise)」又は「含む(comprises)」又は「含む(comprising)」は、記述された項目又は項目群を包含するが、任意の他の項目又は項目群を包含しないわけではないことを意図するものと理解されたい。

【実施例】

50

【0121】

実験手法

培養細胞の免疫蛍光染色

A549ヒト非小細胞肺癌（NSCLC、ATCC参照番号CCL-185）細胞、HeLa子宮頸癌細胞（ATCC参照番号CCL-2）及びSKBR3乳癌細胞（ATCC参照番号HTB-30）を円形の顕微鏡カバースリップ上に50%の密度で播種し、10% FCS（FBSとも呼ばれる）を含有するRPMI-1640中、37、5% CO₂で24時間培養した。試験化合物をDMSOに溶解した。細胞培養培地を、希釈化合物（パクリタキセル、ビンブラスチン、コルヒチン及びノコダゾールは、Sigma-Aldrichから購入した）又はビヒクルを含有する培地に交換した。図面の簡単な説明に示した時間で処置した後、カバースリップを洗浄し、メタノール/アセトン（1：1）中、室温で5分間細胞を固定し、続いて、ブロッキング緩衝液（PBS中0.5% BSA及び0.1% TX-100）中、室温で30分間インキュベートした。次に、標本を、ブロッキング緩衝液中、抗-チューブリン（Sigma、1：2000）と室温で1時間インキュベートした。数回洗浄した後、細胞を、AlexaFluor-488ヤギ抗マウスIgG（Molecular Probes、1：3000）と室温で1時間インキュベートし、続いて、ブロッキング緩衝液で数回洗浄した。次に、標本をProLong Gold antifade（Molecular Probes）で封入し、マニキュア液でシールして、Leica免疫蛍光顕微鏡で観察した。冷却CCDカメラで撮像し、ImageJソフトウェアで処理した。

10

【0122】

コロニー成長アッセイ：

患者由来の腫瘍異種移植片（ヌードマウスで維持した）の単一細胞懸濁液を調製した。コロニー成長アッセイでは、Hamburger & Salmon（Primary bioassay of human tumour stem cells, Science, 1977, 197:461-463）により紹介されたアッセイに従って、細胞を24ウェルプレートの軟寒天にプレーティングした。0.4%寒天を含有する培地0.2 mL中の $2 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 個の細胞を、0.75%寒天の最下層に沈着させた。試験化合物を培養培地0.2 mL中に適用した。24ウェルプレートごとに、未処理コントロールと試料を3連で含めた。培養物を37及び7.5% CO₂で5～28日インキュベートした。分析の24時間前に、生きているコロニーを代謝可能なテトラゾリウム塩の溶液で染色し（Alley MC et al, Life Sci. 1982, 31:3071-3078）、自動画像解析システム（Omnicon 3600, Biosys GmbH）でカウントした。

20

30

【0123】

相対薬物効果を、処置ウェルとコントロールウェルにおけるコロニーの平均数の比で表した。化合物濃度と相対コロニーカウントをプロットすることによりIC₇₀値を決定した。

【0124】

BAL27862耐性細胞株の生成及びクリスタルバイオレットアッセイ

ヒト非小細胞肺癌（H460、ATCC参照HTB-177；A549、ATCC参照CCL-185）、卵巣癌（SKOV3、ATCC参照HTB-77）株のBAL27862耐性亜系株を、完全細胞培養培地（10% FCSを含有するRPMI-1640；Sigma-Aldrich）中、BAL27862の濃度を段階的に増加させることによる長期選択により生成させた。3～11.6の耐性係数（耐性細胞株と適切な野生型細胞株のIC₅₀の比）を達成するために、細胞株に応じて選択プロセスを8～12ヶ月間実施した。耐性亜系株を最大許容濃度のBAL27862で増殖させ、その後、液体窒素中に凍結保存した。

40

【0125】

細胞を96ウェルプレートに以下の濃度：A549：2000、H460：1000、SKOV3：2000で播種し、24時間インキュベートした後、完全培地で希釈したDMSO、BAL27862、コルヒチン、ノコダゾール、パクリタキセル又はビンブラスチン（最終濃度DMSOmax. 0.5%）と72時間インキュベートした。培地を除去し

50

た後、細胞を固定し、1ウェルあたりクリスタルバイオレット染色液(50%メタノール中0.2%クリスタルバイオレット)50 μ lを加えることにより染色した。プレートを室温で1時間インキュベートした。その後、染色液をデカントし、プレートを再蒸留水で4回洗浄した。プレートを数時間風乾させた。1ウェルあたり緩衝液(0.1MのTris(pH7.5)、0.2%SDS、20%エタノール)100 μ lを加え、プレートを振とうすることにより染色液を溶解した。SpectraMax M2eプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して590nmの吸光度を測定した。GraphPad Prismソフトウェアを使用して、濃度応答曲線から抗増殖IC₅₀値を算出した。耐性係数をBAL27862耐性株変異体のIC₅₀と親株のIC₅₀の比として算出した。

【0126】

タンパク質抽出

腫瘍抽出：腫瘍を、50mMのHEPES(pH7.5)、150mMのNaCl、25mMの-グリセロリン酸塩、25mMのNaF、5mMのEGTA、1mMのEDTA、0.1%NP40、15mMのピロリン酸塩、2mMのオルトバナジウム酸ナトリウム、10mMのモリブデン酸ナトリウム、ロイペプチン(10 μ g/mL)、アプロチニン(10 μ g/mL)及び1mMのフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)を含有する氷冷溶解緩衝液(腫瘍45mgあたり抽出体積1mL)中に抽出した。Polytronによりホモジナイズした後、溶解物を1%NP40に調整し、氷上で20分間インキュベートした。溶解物を遠心により清澄化し、-80で凍結した。

【0127】

腫瘍細胞株の抽出：細胞を1mMのPMSFを含有する氷冷PBSで、そして、NP40不含の氷冷溶解緩衝液(上記を参照)で洗浄した。1%NP40を含有する同じ溶解緩衝液中に細胞を抽出した。ホモジナイズした後、溶解物を遠心により清澄化し、-80で凍結した。

【0128】

イムノブロット/ウエスタンブロット

1レーンあたり総タンパク質20 μ gを使用して、イムノブロットを実施した。総タンパク質濃度は、BCA Protein Assay(Pierce)で決定した。タンパク質を10%SDSゲルで分離し、半乾式ブロッティングを用いてPVDFメンブランに転写した(90分間、50mA/ゲル)。イムノブロットに使用する一次抗体は以下のとおりである：

【0129】

glu-チューブリン抗体(Miliporeから入手、参照番号AB3201)、ウサギポリクローナル、1:1000希釈、緩衝液条件：PBS/0.1%Tween中3%BSA。

【0130】

アクチン抗体(Chemiconから入手、参照番号MAB1501)、マウスモノクローナル、1:5000希釈、緩衝液条件：PBS/0.1%Tween中3%BSA。

【0131】

イムノブロットに使用する二次抗体は、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ又はヤギ抗マウス(Jackson ImmunoResearch Laboratories INCから入手：参照番号111-035-144 JIR及び115-035-146 JIR)、1:5000希釈、緩衝液条件：PBS/0.1%Tween中0.5%ミルクであった。標識バンドは、Raytest Stella 3200 High Performance Imaging Systemを使用して明らかにした。

【0132】

免疫組織化学

患者由来の腫瘍異種移植片(ヌードマウスで維持した)の固定は、4%ホルムアルデヒドを含有する10%中性緩衝ホルマリン中、室温で20~28時間実施した。固定した標本を70%エタノール溶液中に最大1週間維持した後、下記の条件を用いた標準プロセスに従って脱水とパラフィン包埋を行った：

【0133】

10

20

30

40

【表 6】

| 連続処理 | 時間 (時間) |
|---------------|---------|
| 70% EtOH | 1 |
| 80% EtOH | 2 |
| 99% EtOH | 1 |
| 100% イソプロパノール | 0.5 |
| 100% イソプロパノール | 1 |
| キシロール | 0.5 |
| キシロール | 1 |
| キシロール | 1 |
| パラフィン | 1 |
| パラフィン | 2 |
| パラフィン | 2 |

10

20

【0134】

約 2 μm のパラフィン切片を切り取り、自動免疫染色装置 Benchmark XT (登録商標) (Roche) を使用し、標準プロセス工程を実行して処理した。特異的抗体染色の可視化は、発色性基質として DAB (3,3-ジアミノベンジジン) を用い、5 mg/ml の濃度で行った。以下の一次抗体及び処理条件を染色に使用した：

【表 7】

| 抗体の詳細 | 処理 |
|--|--|
| 抗 Glu-チューブリン、Millipore, #AB3201、ウサギポリクローナル | Roche の緩衝液 1 で 90 分間の細胞の調整、1 : 50 の希釈で、37℃ で 32 分間の抗体インキュベーション |

30

【0135】

詳細な実施例

実施例 1：一般式 (I) の化合物により誘導される異なる有糸分裂表現型

【0136】

化合物 A (BAL27862) 又は化合物 B 又は化合物 C による処置は、全ての試験腫瘍細胞株で高い再現性及び異なる微小管表現型を誘導した (A549、HeLa 及び SKBR3 細胞での化合物 A については図 1、そして、A549 細胞での化合物 B 及び化合物 C については図 2 に示す)。分裂細胞では、有糸分裂紡錘体の明らかな分裂が起こり、ドット様構造の形成をもたらした (図 1)。この表現型は、従来の微小管標的薬剤、例えば、微小管安定化剤のパクリタキセルならびに微小管不安定剤のビンブラスチン及びコルヒチン (図 3) 及びノコダゾール (図 4) を用いた場合に観察される表現型と異なることが示された。

40

【0137】

実施例 2：BAL27862 は、従来の微小管標的薬物により優性的に誘導される微小管表現型に打ち勝つ

【0138】

微小管に及ぼすその活性の独自性を示すために、A549 細胞を使用して、BAL27862 をビンブラスチン、コルヒチン及びパクリタキセル (図 5) ならびにノコダゾール

50

(図6)と併用して試験した。ピンブラスチン、コルヒチン、パクリタキセル又はノコダゾールの単独処置では、これらの薬剤に特徴的な有糸分裂微小管表現型を誘導した。しかし、最後の4時間のBAL27862との併用処置は、微小管構造の崩壊をもたらし;ピンブラスチン、コルヒチン、パクリタキセル又はノコダゾールが継続的に存在していたにもかかわらず、BAL27862の単独処置と一致する表現型を生成した。対照的に、最初に、BAL27862で処置し、その後、ピンブラスチン、コルヒチン、パクリタキセル又はノコダゾールと4時間併用処置したところ、観察される微小管表現型(その表現型は、BAL27862による処置と一致した)に影響を及ぼさなかった。

【0139】

これらのデータから、式(I)の化合物は、微小管生物学に常に影響を及ぼすが、従来の微小管標的薬剤とは異なる機序で影響を及ぼすことが実証される。

【0140】

本発明の詳細な実施例

実施例3:高いglu-チューブリン発現レベルとBAL27862処置に耐性の患者由来の腫瘍細胞の関連性

【0141】

コロニー成長アッセイに基づいて、マウスにおいて異種移植片として維持した6種類の患者由来腫瘍に由来する腫瘍細胞を使用し、BAL27862に感受性又は比較的耐性の腫瘍細胞を黒色腫ならびに結腸直腸及び肺癌から同定した(表1を参照)。コントロールに対して70%の成長阻害が観察される濃度(IC₇₀)を表1に示す。この表では、BAL27862に感受性の腫瘍細胞は、低いナノメートル範囲のIC₇₀値を有するが、BAL27862に耐性の腫瘍細胞は、IC₇₀値>600ナノメートルと確定される。同じex vivoアッセイを使用したパクリタキセル及びピンブラスチンのデータは、6つの腫瘍モデルうち5つで有用であった。これらの5つのモデルの全てが、パクリタキセルによる処置に耐性であったが、これらの腫瘍の5つのうち4つは、ピンブラスチンによる処置に感受性であった。

【0142】

【表8】

表1

| 癌タイプ | 名称 | BAL27862 に対する応答 | IC ₇₀ BAL27862 [μM] | パクリタキセル に対する応答 | ピンブラスチン に対する応答 |
|-------|-----------|--------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| 結腸直腸癌 | CXF 1103 | 感受性 | 0.022 | 耐性 | 耐性 |
| | CXF 243 | 耐性 | 0.696 | 耐性 | 感受性 |
| 肺癌 | LXFE 211 | 感受性 | 0.021 | 耐性 | 感受性 |
| | LXFE 397 | 耐性 | > 3.5 | 不明 | 不明 |
| 黒色腫 | MEXF 1341 | 感受性 | 0.025 | 耐性 | 感受性 |
| | MEXF 276 | 耐性 | > 3.5 | 耐性 | 感受性 |

【0143】

異種移植片として維持した同じ腫瘍においてglu-チューブリンレベルを測定するために、Milipore抗体を使用してイムノプロット分析を実施した(図7)。イムノプロットのローディングコントロールとしてアクチンレベルを含めた。

【0144】

glu-チューブリンレベルの分析から、glu-チューブリンの発現が、測定した腫瘍の全てで劇的に変化したことが示された(図7)。

【0145】

コロニー成長アッセイ及び同じIC₇₀基準から、パクリタキセル又はピンブラスチン

耐性と高い g l u - チューブリンレベルとの関連性は認められなかった。これは、例えば、黒色腫の腫瘍タイプでは、両方のモデルがパクリタキセルに耐性であって、さらに M E X F 1 3 4 1 の g l u - チューブリンレベルが M E X F 2 7 6 よりも明らかに低かったことから明白である。同じ関連性の欠如は、黒色腫モデルのピンカアルカロイドのピンブラスチンの場合にも、これらの腫瘍の両方がピンブラスチンに感受性であったことから当てはまった。従って、g l u - チューブリンレベルは、患者由来の腫瘍モデルにおいて、従来の微小管薬剤のパクリタキセル及びピンブラスチンに対する耐性の信頼性の高いバイオマーカーとして不適当であることが示された。

【 0 1 4 6 】

驚くべきことに、一方で、B A L 2 7 8 6 2 耐性データを g l u - チューブリンレベルと比較したとき、g l u - チューブリンは、耐性腫瘍においてのみより高く、そして、同じ腫瘍組織型由来の感受性腫瘍ではそうでないことが示される。そのため、レベルの増加は、B A L 2 7 8 6 2 に対する耐性を一貫して示した。従って、g l u - チューブリンレベルは、本発明の化合物 B A L 2 7 8 6 2 に対する耐性のバイオマーカーであることが示された。

10

【 0 1 4 7 】

実施例 4 : 結腸直腸腫瘍異種移植片の免疫組織化学分析

【 0 1 4 8 】

結腸直腸腫瘍異種移植片で免疫組織化学分析を実施し(図 8)、腫瘍モデル C X F 2 4 3 において g l u - チューブリンが高レベルであることが明らかとなった。さらに、高レベルの g l u - チューブリンと B A L 2 7 8 6 2 に対する耐性との間に明らかな相関関係が見られた(腫瘍モデル C X F 2 4 3 は、B A L 2 7 8 6 2 に耐性であったが、腫瘍モデル C X F 1 1 0 3 は、B A L 2 7 8 6 2 に感受性であった;コロニー成長アッセイにより確定される)。従って、g l u - チューブリンレベルは、この場合も本発明の化合物 B A L 2 7 8 6 2 に対する耐性のバイオマーカーであることが示された。

20

【 0 1 4 9 】

実施例 5 : より高い g l u - チューブリンの発現が、一般式 (I) の化合物に対して耐性を有するものとして選択された腫瘍株において観察される

B A L 2 7 8 6 2 に対する耐性についての *in vitro* 選択は、親株に対して下記の耐性係数を有する 3 種類の比較的耐性の腫瘍細胞株を生成させた(クリスタルバイオレットアッセイを使用した IC_{50} 測定に基づく): A 5 4 9 (3 . 0 倍); S K O V 3 耐性 1 (7 . 6 倍); S K O V 3 耐性 2 (1 1 . 6 倍); H 4 6 0 (5 . 3 倍) (表 2) 。

30

【 0 1 5 0 】

【表 9】

表 2

| 処置化合物 | 耐性係数 (BAL27862 耐性細胞株変異体の IC_{50} と親細胞株の IC_{50} の比) | | | |
|----------|---|------|------------|------------|
| | A549 | H460 | SKOV3 耐性 1 | SKOV3 耐性 2 |
| BAL27862 | 3.0 | 5.3 | 7.6 | 11.6 |
| コルヒチン | 0.9 | 1.6 | 2.0 | 2.8 |
| ノコダゾール | 1.6 | 1.3 | 3.6 | 3.9 |
| ピンブラスチン | 2.3 | 4.6 | 15.7 | 17.8 |
| パクリタキセル | 0.06 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |

40

【 0 1 5 1 】

一般的に、これらの B A L 2 7 8 6 2 耐性細胞は、他の微小管不安定化剤、例えば、コルヒチン、ノコダゾール及びピンブラスチンに対して、B A L 2 7 8 6 2 とは異なるレベルの応答を示し;そして、全ての株で、微小管安定化剤のパクリタキセルに対する感受性

50

が実際に増加したことが観察された(表2)。

【0152】

これらの株を抽出及びイムノプロット分析して、glu-チューブリンレベルを測定し、続いて、BAL27862耐性データと比較することによって、また、glu-チューブリンが親株と比較して耐性株でより高いことが示される(図9)。これは、SKOV3細胞では耐性発現を通して維持された(図10)。これらのデータから、glu-チューブリンの発現レベルの増加とBAL27862に対する獲得耐性の関連性が示される。

【0153】

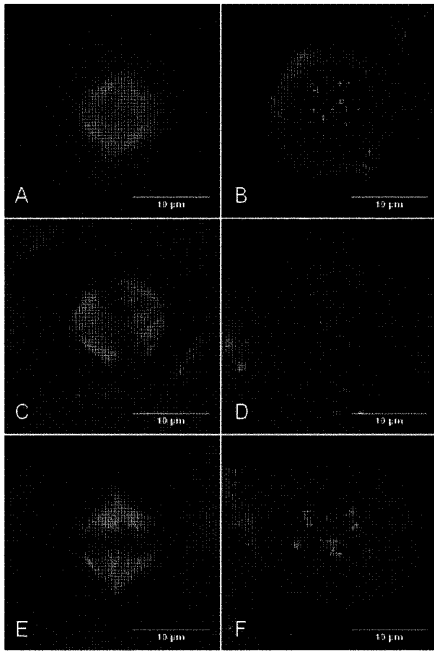
略語のリスト

| | | |
|-----------------|---|----|
| A549 | ヒト非小細胞肺癌細胞株 | 10 |
| アネキシンV | ホスファチジルセリン結合タンパク質 | |
| BCA | ビシンコニン酸 | |
| Bcl-2 | B細胞リンパ腫2タンパク質 | |
| BRCA1 | 1型乳癌感受性タンパク質 | |
| Brdu | プロモデオキシウリジン | |
| BSA | ウシ血清アルブミン | |
| CA-125 | 癌抗原125 | |
| cDNA | 相補的デオキシリボ核酸 | |
| CREST | 局限性強皮症 | |
| CO ₂ | 二酸化炭素 | 20 |
| CXF243 | 患者由来の結腸直腸腫瘍 | |
| CXF1103 | 患者由来の結腸直腸腫瘍 | |
| DAB | 3,3-ジアミノベンジジン | |
| DMSO | ジメチルスルホキシド | |
| DNA | デオキシリボ核酸 | |
| dUTP | 2'-デオキシウリジン5'-三リン酸 | |
| ELISA | 酵素結合免疫吸着アッセイ | |
| Erbb-2 | ヒト上皮成長因子受容体2 | |
| ESI-MS | エレクトロスプレーイオン化質量分析法 | |
| EtOH | エタノール | 30 |
| FACS | 蛍光活性化細胞スキャン/選別法 | |
| FCS/FBS | ウシ胎児/ウシ胎仔血清 | |
| G2/M | 細胞周期のG2から分裂期への移行 | |
| HeLa | ヒト扁平上皮癌細胞株 | |
| HEPES | 4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンサルホン酸 | |
| Hoe33342 | 2'-(4'-エトキシフェニル)-5-(4-メチルピペラジン-1-イル)-2,5'-ビス-1H-ベンゾイミダゾール三塩酸塩三水和物 | |
| H460 | ヒト非小細胞肺癌細胞株 | |
| IgG | 免疫グロブリンG | 40 |
| IHC | 免疫組織化学 | |
| LXFE211 | 患者由来の肺腫瘍 | |
| LXFE397 | 患者由来の肺腫瘍 | |
| MALDI | マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析法 | |
| MALDI-TOF | マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法 | |
| MEXF276 | 患者由来の黒色腫 | |
| MEXF1341 | 患者由来の黒色腫 | |
| mRNA | メッセンジャーリボ核酸 | |
| MTS | 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム | 50 |

| | | |
|-------------|-------------------------------|----|
| NaCl | 塩化ナトリウム | |
| NaF | フッ化ナトリウム | |
| NCBI | 国立生物工学情報センター | |
| NSCLC | 非小細胞肺癌 | |
| NP40 | ノニデットP40 | |
| PBS | リン酸緩衝生理食塩水 | |
| PCR | ポリメラーゼ連鎖反応 | |
| P-gp | P-糖タンパク質 | |
| PMSF | フッ化フェニルメチルスルホニル | |
| PSA | 前立腺特異的抗原 | 10 |
| PVDF | フッ化ポリビニリデン | |
| RANO | 高悪性度グリオーマの応答評価 | |
| RECIST | 固形腫瘍の応答評価基準 | |
| RNA | リボ核酸 | |
| RPMI - 1640 | 形質転換及び非形質転換真核細胞及び細胞株の培養に使用される | |
| 細胞培養培地 | | |
| SDS | ドデシル硫酸ナトリウム | |
| SEQ. ID No. | 配列識別番号 | |
| siRNA | 低分子阻害性リボ核酸 | |
| SKBR3 | ヒト乳癌細胞株 | 20 |
| SKOV3 | ヒト卵巣癌細胞株 | |
| TTCP | チューブリンチロシンカルボキシペプチダーゼ | |
| TTL | チューブリンチロシンリガーゼ | |
| TUNEL | 末端デオキシヌクレオチド転移酵素dUTPニック末端標識法 | |
| Tween - 20 | 洗剤、ポリオキシエチレンソルビタンラウリン酸モノエステル | |
| TX - 100 | Triton - X100 | |
| YO - PRO | シアニンモノマー核酸蛍光染色 | |

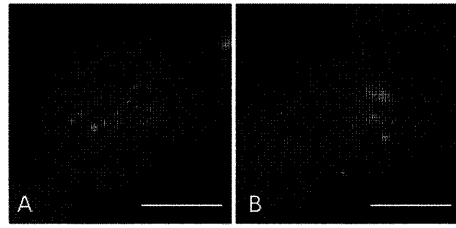
【 図 1 】

Figure 1



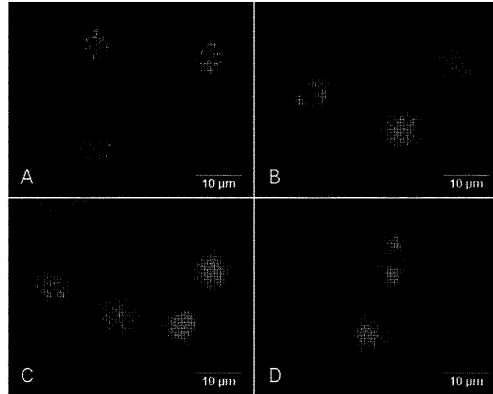
【 図 2 】

Figure 2



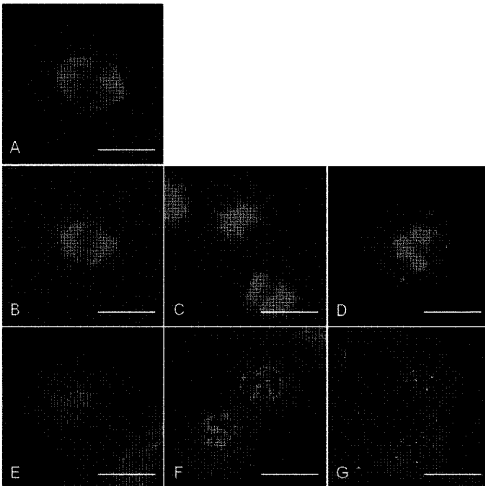
【 図 3 】

Figure 3



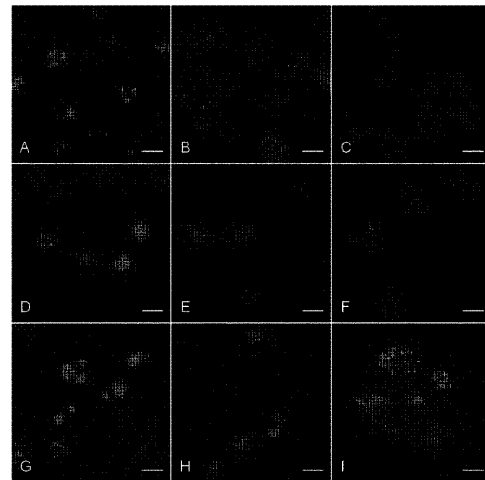
【 図 4 】

Figure 4



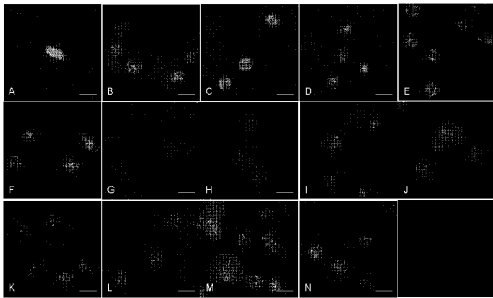
【 図 5 】

Figure 5



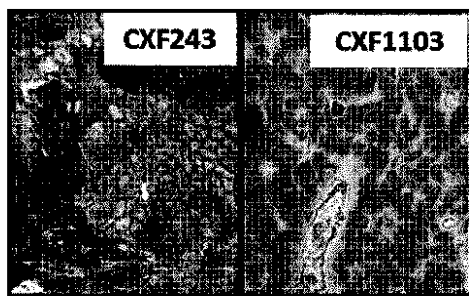
【 図 6 】

Figure 6

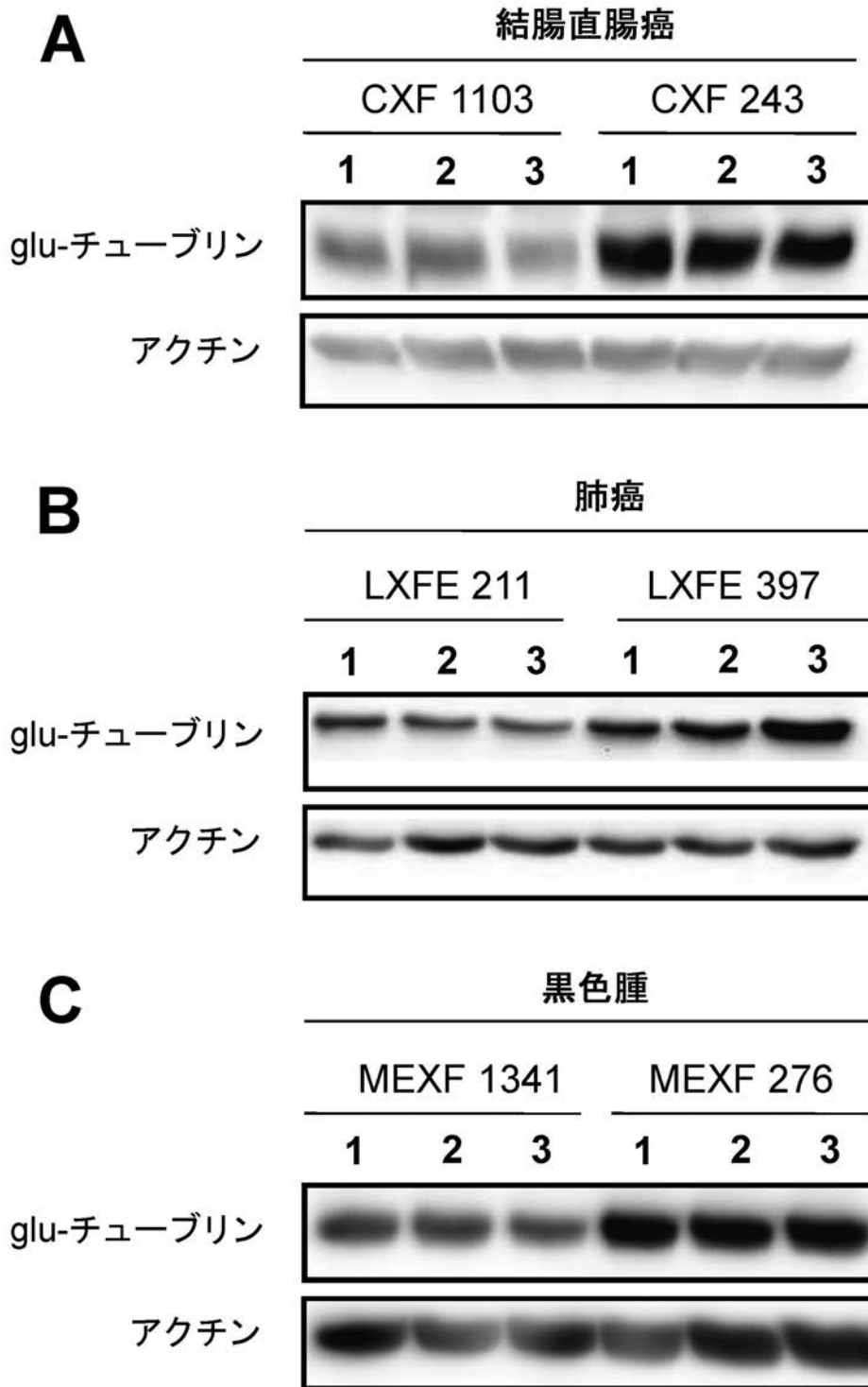


【 図 8 】

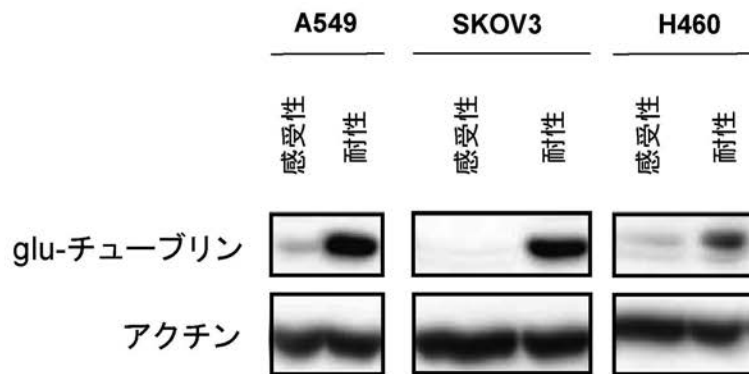
Figure 8



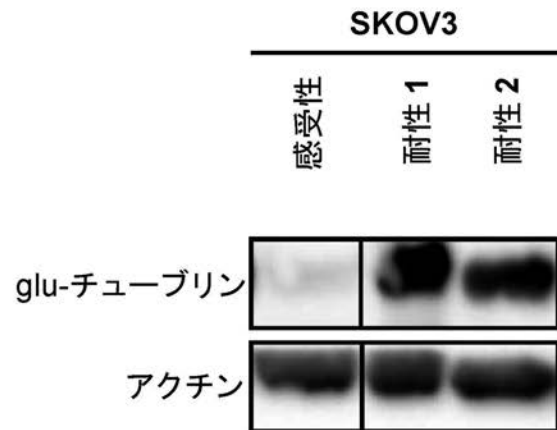
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

チューブリン α 1A 鎖 [ヒト] (SEQ. ID. No. 1)

```

1 mrecisihvg qagvqignac welyclehgi qpdgqmpsdk tigggddsfn tffsetgagk
61 hvpravfvdl eptvidevrt gtyrqlfhpe qlitgkedaa nnyarghyti gkeidlvld
121 rirkladqct glqgflvfhs fgggtgsgft sllmerlsvd ygkksklefs iypapqvsta
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrndie rptytnlnrl igqivssita
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqlsvae itnacfeapan
301 qmvkcdprhg kymaccllyr gdvvpkdvna aiatiktkrt iqfvdwcptg fkvginypqp
361 tvvpggdllak vqravcmIsn ttaiaeawar ldhkfdlmya krafvhwvyg egmeegefse
421 aredmaalek dyeevqvdsV egegeeegee y

```

【 図 1 2 】

チューブリン α 1B 鎖 [ヒト] (SEQ. ID. No. 2)

```
1 mrecisihvg qagvqignac welyclehgi qpdgqmpsdk tigggddsfn tffsetgagk
61 hvpravfvdl eptvidevrt gtyrqlfhpe qlitgkedaa nnyarghyti gkeiidlvld
121 rirkkladqct glqgflvfhs fgggtgsgft sllmerlsvd ygkksklefs iypapqvsta
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrnldie rptytnlnrl isqivssita
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqlsvae itnacfeapan
301 qmvkcdprhg kymaccllyr gdvvpkdvna aiatiktkrs iqfvdwcptg fkvginyyqpp
361 tvvpggdldak vqravcmlsn ttaiiaeawar ldhkfdlmya krafvhwvyg egmeegefse
421 aredmaalek dyeevgvdsv egegeeegee y
```

【 図 1 3 】

チューブリン α 1C 鎖 [ヒト] (SEQ. ID. No. 3)

```
1 mrecisihvg qagvqignac welyclehgi qpdgqmpsdk tigggddsfn tffsetgagk
61 hvpravfvdl eptvidevrt gtyrqlfhpe qlitgkedaa nnyarghyti gkeiidlvld
121 rirkkladqct glqgflvfhs fgggtgsgft sllmerlsvd ygkksklefs iypapqvsta
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrnldie rptytnlnrl isqivssita
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqltvae itnacfeapan
301 qmvkcdprhg kymaccllyr gdvvpkdvna aiatiktkrt iqfvdwcptg fkvginyyqpp
361 tvvpggdldak vqravcmlsn ttavaeawar ldhkfdlmya krafvhwvyg egmeegefse
421 aredmaalek dyeevgadsa dgedegeey
```

【 図 1 4 】

チューブリン α 3C/D 鎖 [ヒト] (SEQ. ID. No. 4)

```
1 mrecisihvg qagvqignac welyclehgi qpdgqmpsdk tigggddsfn tffsetgagk
61 hvpravfvdl eptvdevrt gtyrqlfhpe qlitgkedaa nnyarghyti gkeivdlvld
121 rirkladlct glqgflifhs fgggtgsgfa sllmerlsvd ygkksklefa iypapqvsta
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrnldie rptytnlnrl igqivssita
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqlsvae itnacfeapan
301 qmvkcdprhg kymaccmlyr gdvvpkdvna aiatiktkrt iqfvdwcptg fkvginyyqpp
361 tvvpggdldak vqravcmlsn ttaiiaeawar ldhkfdlmya krafvhwvyg egmeegefse
421 aredlaalek dyeevgvdsv eaeaegeey
```

【 配列表 】

[2014505876000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2012/050814 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 A61K31/00 A61K38/00 ADD. | | |
|---|---|--|
| 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) G01N A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data, CHEM ABS Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | KREIS T E: "MICROTUBULES CONTAINING DETYROSINATED TUBULIN ARE LESS DYNAMIC", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 6, no. 9, 1 January 1987 (1987-01-01), pages 2597-2606, XP008135816, ISSN: 0261-4189 | 22,23,25 |
| Y | abstract | 1-16,24 |
| Y | ----- GOKMEN-POLAR YESIM ET AL: "beta-Tubulin mutations are associated with resistance to 2-methoxyestradiol in MDA-MB-435 cancer cells", CANCER RESEARCH, vol. 65, no. 20, October 2005 (2005-10), pages 9406-9414, XP002636771, ISSN: 0008-5472 abstract ----- -/-- | 19-21 |
| <input checked="" 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 | | Date of mailing of the international search report |
| 14 May 2012 | | 22/05/2012 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Tuyman, Antonin |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/050814

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 2004/103994 A1 (APONETICS AG [CH]; EBERLE MARTIN [CH]; BACHMANN MARTIN [CH]; STREBEL A) 2 December 2004 (2004-12-02) cited in the application the whole document abstract ----- | 19-21 |
| Y | ESTEVE MARIE-ANNE ET AL: "BAL27862: A unique microtubule-targeted drug that suppresses microtubule dynamics, severs microtubules, and overcomes Bcl-2-and tubulin subtype-related drug resistance", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; 101ST ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; WASHINGTON, DC, USA; APRIL 17 -21, 2010, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 51, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 1-2, XP008135858, ISSN: 0197-016X the whole document ----- | 1-25 |
| Y | DURAN GEORGE E ET AL: "In vitro activity of the novel tubulin active agent BAL27862 in MDR1(+) and MDR1(-) human breast and ovarian cancer variants selected for resistance to taxanes", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; 101ST ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; WASHINGTON, DC, USA; APRIL 17 -21, 2010, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 51, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 1-2, XP008135859, ISSN: 0197-016X the whole document ----- | 1-25 |
| Y | MELLI G ET AL: "Erythropoietin protects sensory axons against paclitaxel-induced distal degeneration", NEUROBIOLOGY OF DISEASE, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 24, no. 3, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 525-530, XP024901475, ISSN: 0969-9961, DOI: DOI:10.1016/J.NBD.2006.08.014 [retrieved on 2006-12-01] abstract ----- | 19-21 |

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/050814

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2004103994 A1 | 02-12-2004 | AT 384718 T | 15-02-2008 |
| | | CA 2526026 A1 | 02-12-2004 |
| | | CN 1812986 A | 02-08-2006 |
| | | DE 602004011515 T2 | 29-01-2009 |
| | | DK 1636215 T3 | 02-06-2008 |
| | | EP 1636215 A1 | 22-03-2006 |
| | | ES 2300775 T3 | 16-06-2008 |
| | | JP 4829791 B2 | 07-12-2011 |
| | | JP 2006528238 A | 14-12-2006 |
| | | JP 2011207909 A | 20-10-2011 |
| | | PT 1636215 E | 29-04-2008 |
| | | SI 1636215 T1 | 30-06-2008 |
| | | US RE42890 E1 | 01-11-2011 |
| | | US 2007043061 A1 | 22-02-2007 |
| | | WO 2004103994 A1 | 02-12-2004 |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R
O, RS, 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, 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, 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, VN

(74)代理人 100135873
弁理士 小澤 圭子

(74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100122736
弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747
弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540
弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫

(72)発明者 ラーネ, ハイディ・アレクザンドラ
スイス国、ツェーハー - 4 1 0 6 テルヴィル、カルトブルネンヴェーク 8

(72)発明者 バッハマン, フェリクス
スイス国、ツェーハー - 4 0 5 5 パーゼル、ジーレンツァーシュトラッセ 1 6

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB11 BB15 BB17 CC01 FA04 FA12
4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ62 QQ79 QR42 QR48 QR72 QR77
QS33 QX01

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 使用葡萄糖 - 微管蛋白作为药物对咪唑并苯并咪唑的反应的生物标志物 | | |
| 公开(公告)号 | JP2014505876A | 公开(公告)日 | 2014-03-06 |
| 申请号 | JP2013549810 | 申请日 | 2012-01-19 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 巴斯利尔药物股份公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Bajiria制药公司Suchika | | |
| [标]发明人 | ラーネハイディアレクザンドラ バッハマンフェリクス | | |
| 发明人 | ラーネ,ハイディ・アレクザンドラ バッハマン,フェリクス | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12M1/34 C12Q1/04 C12Q1/68 | | |
| CPC分类号 | A61K31/4245 G01N33/5011 G01N33/5026 G01N2800/44 G01N2800/52 G01N33/6872 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.D C12M1/34.B C12M1/34.F C12Q1/04 C12Q1/68.Z | | |
| F-TERM分类号 | 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/FA04 4B029/FA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ62 4B063/QQ79 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01 | | |
| 代理人(译) | 津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 田中洋子 阿基奥·希巴达 | | |
| 优先权 | 2011151681 2011-01-21 EP | | |
| 其他公开文献 | JP6270481B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

使用葡萄糖 - 微管蛋白作为生物标志物来预测对化合物的反应，优选对所述化合物的受试者中的癌症如癌症的抗性，其中所述化合物是通式 (I) 的咪唑并苯并咪唑化合物。

