

(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2014-505877

(P2014-505877A)

(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)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 6
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 H O 4 5
A 6 1 K 31/4245 (2006.01)	A 6 1 K 31/4245	
A 6 1 K 31/4439 (2006.01)	A 6 1 K 31/4439	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-549812 (P2013-549812)
 (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9月13日 (2013.9.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/050818
 (87) 国際公開番号 W02012/098207
 (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 11151677.9
 (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 ファルマシューチカ アーゲー
 Basilea Pharmaceutica AG
 スイス国、ツェーハー 4005 バーゼル、グレンツァーヘルストラッセ 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

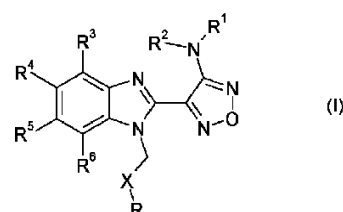
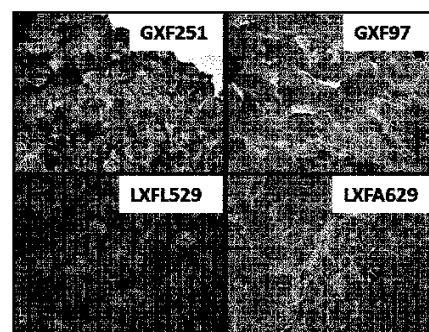
最終頁に続く

(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BUBR1の使用

(57) 【要約】

化合物が、一般式 (I) で示されるフラザノベンゾイミダゾール化合物である、化合物に対する応答、好ましくは被験体の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BUBR1の使用。

Figure 16

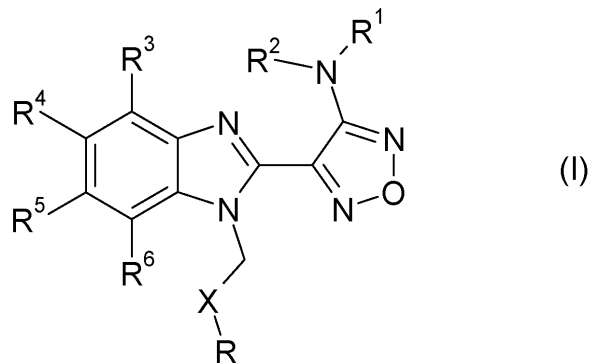


【特許請求の範囲】

【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 B U B R 1 の使用であって、該化合物が、一般式 (I) :

【化 2 3】



(I)

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；

40

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；

50

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體（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）である、使用。

【請求項 2】

応答が、被験体における疾患の応答であり、そして、バイオマーカーの BUBR1 が、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、請求項 1 に記載の使用。

10

【請求項 3】

化合物が、

R が、フェニル又はピリジニルを表し；

ここで、フェニルが、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、ピリジニルが、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 が、基 C=O を表し；

20

R¹ が、水素又はシアノ - 低級アルキルを表し；

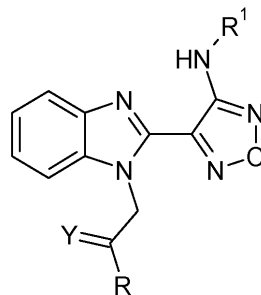
R²、R³、R⁴、R⁵ 及び R⁶ が、水素を表す、

一般式 (I) の化合物及びその薬学的に許容しうる誘導體（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）である、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

【請求項 4】

化合物が、下記式：

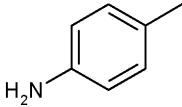
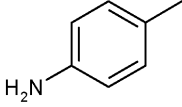
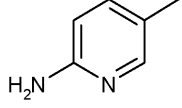
【化 2 4】



30

(式中、R、Y 及び R¹ は、以下のように定義される)

【表 10】

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

10

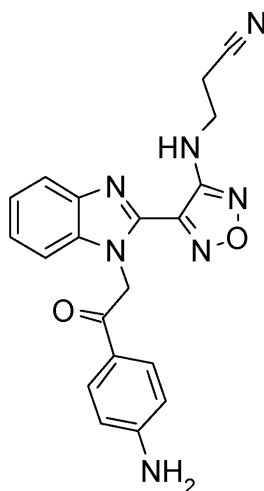
又はその薬学的に許容しうる誘導体により示される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

20

化合物が、以下：

【化 25】



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】

40

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。

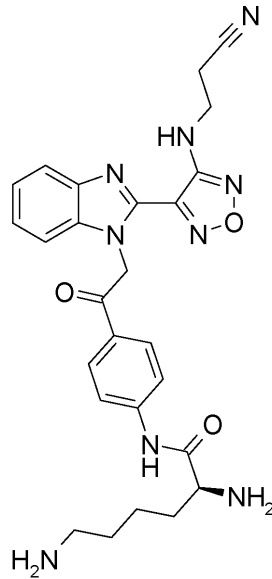
【請求項 7】

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 6】



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 ~ 7 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、癌が、卵巣癌、乳癌、胃癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌及び子宮頸癌から、特に好ましくは、肺癌又は胃癌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 B U B R 1 のレベルが、標準値又は標準値のセットに対してより低い場合に耐性であると予測される、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 B U B R 1 のレベルが、
 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
 i i) 処置開始後に採取したものと、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）を比較して；又は
 i i i) 正常な細胞、組織又は体液からの標準値又は標準値のセットに対して；
 より低い場合に、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傾向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、腫瘍組織、正常な組織、細胞株又は循環腫瘍細胞に由来し、好ましくは、腫瘍組織に由来する、請求項 2 ~ 14 のいずれか一項に記載の使用。

50

【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 B U B R 1 のレベルを測定して、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、耐性であり、そして B U B R 1 のレベルの測定が、被験体から事前に得た試料中で *ex-vivo* で実施される、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 B U B R 1 のレベルが標準値又は標準値のセットに対してより低い場合に、耐性であると予測される、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 B U B R 1 のレベルを測定して、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 B U B R 1 のレベルが、標準値又は標準値のセットより低くない場合、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】

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 B U B R 1 であって、被験体からの試料中の B U B R 1 のレベルを測定して、このレベルを表す値 (1 つ又は複数) を得る工程、及び B U B R 1 のレベルが、標準値又は標準値のセットより低くない場合、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 B U B R 1 。

【請求項 21】

B U B R 1 の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低い試料を有する被験体中の B U B R 1 のレベルを最初に増加させて、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 B U B R 1 の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 B U B R 1 のレベルを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) をさらに含む、キット。

【請求項 23】

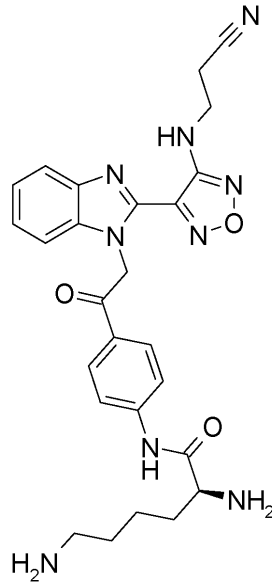
試薬が、B U B R 1 のための検出部を含む捕捉試薬及び検出試薬を含み、好ましくは、捕捉試薬が、抗体である、請求項 22 に記載のキット。

40

【請求項 24】

キットが、下記式 :

【化 2 7】



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 B U B R 1 のレベルを測定するために必要な試薬、及び試料中の B U B R 1 のレベルを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 (B A L 2 7 8 6 2) 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 B U B R 1 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 -チューブリンと β -チューブリンのヘテロ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が、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。したがって、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 -チューブリンサブタイプ III のレベルの上昇及び α -

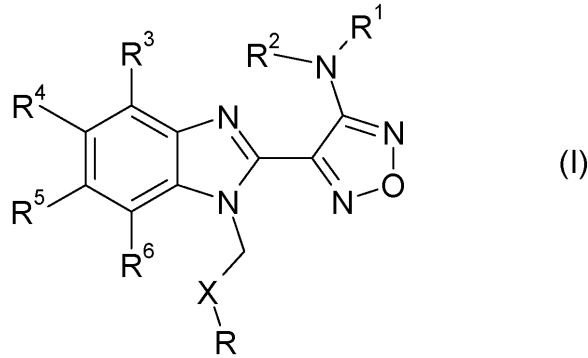
50

チューブリンサブタイプ I の突然変異の獲得などの微小管標的の欠陥が挙げられる。さらに、他の細胞タンパク質の欠陥、例えば、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) の過剰発現が、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

[式中、

20

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)、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；

30

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

40

[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、窒素と一緒にあって、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

50

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
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（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）である。

10

【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】

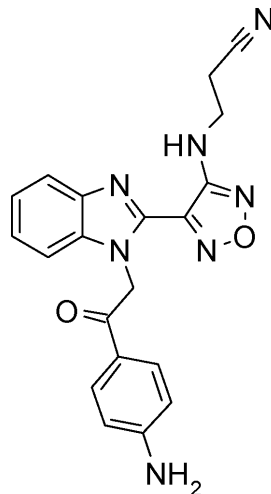
式（I）の化合物の合成は、WO2004/103994 A1（相互参照により本明細書に組み入れら
れる）において、概要として、29～35ページに、具体的には、39～55ページに記
載されている。該化合物は、そこに開示されるように、又はそこに記載のプロセスと類似
の方法により調製してもよい。

20

【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合物：

【化2】



30

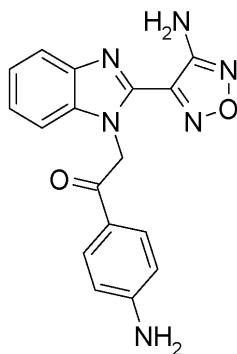
化学名：3 - (4 - { 1 - [2 - (4 - アミノ - フェニル) - 2 - オキソ - エチル] - 1
H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル } - フラザン - 3 - イルアミノ) - プロピオニトリル
又は本明細書において、化合物 A として示される化合物である。

40

【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
する化合物：

【化 3】

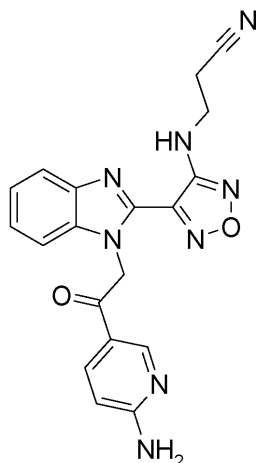


10

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 として示される化合物、及び下記構造式及び化学名を有する化合物：

【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 として示される化合物である。

【0009】

BAL27862は、広範な実験的固形腫瘍異種移植モデルに対する活性を実証した。さらに、その活性は、従来の微小管標的薬剤（ビンカルカロイド微小管不安定化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た。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かった。また、BAL27862は、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の突然変異が生じてもその活性を保持した。

40

【0010】

したがって、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（他の微小管不安定化剤を含む）とは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

50

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 (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も示される (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、表現型に影響を及ぼさず、B A L 2 7 8 6 2 による処置と一致する表現型が生成した (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 】

したがって、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、B U B R 1 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、試料中の比較的低い B U B R 1 のレベルは、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 】

B U B R 1 には、ヒト遺伝子命名委員 (Human Gene Nomenclature Committee) 識別番号 H G N C I D : 1 1 4 9 及び Entrez Gene I D 7 0 1 が割り当てられている。ヒト B U B R 1 に対応する配列は、国立生物工学情報センター (N C B I) 参照番号 NP_001202 により利用可能である (図 1 8、SEQ ID No. 1、NP_001202.4)。

【 0 0 1 9 】

BUBR1は、hBUBR1及びBubR1としても公知である；ベンズイミダゾール無抑制性発芽1、出芽酵母（*S. cerevisiae*）、相同体、；有糸分裂チェックポイント遺伝子BUB1B；BUB1B；BUB1；有糸分裂チェックポイントキナーゼMad3L；MAD3L；MAD3-様タンパク質キナーゼ；及びSSK1。BUB1Bという名称は、一般的に、核酸配列と関連しているが、一方、タンパク質に焦点を当てた出版物は、一般的に、BUBR1という用語を使用してきた。簡略化のために、BUBR1という用語は、本明細書においては、上記全ての類義語を包含することとし、かつ必要に応じて核酸レベル及びタンパク質レベルの両方に対してこの実体を指すこととする。

【0020】

ベンズイミダゾール無抑制性発芽という名称は、Hoytらによってベノミルを用いて行った実験にちなんで酵母相同体に命名された（Hoyt MA. et al., *S. Cerevisiae Genes Required for Cell Cycle Arrest in Response to Loss of Microtubule Function*. *Cell*, Vol. 66, 507-517, Aug. 9, 1991）。この出版物は、ベノミルに対して過敏症になってしまった発芽酵母相同体の突然変異について記載している。

10

【0021】

ヒト相同体は、染色体15q15に位置している。ヒトBUBR1遺伝子の配列は、US 6,593,098 B1で公開され、そしてそこにおいてヒトBUB1Aとして同定されている。該特許の実施例VIは、内在性BUB1A（BUBR1）の活性が抗-huBUB1A抗体の微量注入により阻害された、HeLa細胞中で実施された実験について記載している。次に該注入された細胞が、微小管不安定化剤であるノコダゾールに曝されたとき、有糸分裂を停止したままでいる該細胞の能力について試験した。該特許は、huBUB1a抗体を注入された細胞がノコダゾールの存在下、有糸分裂の中途での退去の結果、有糸分裂を停止するのを失敗しそしてアポトーシスへと進行すると述べている。

20

【0022】

Hoytの出版物と同様に、このことは、その後、ノコダゾールで処置された細胞中のBUBR1機能の喪失が、結果としてアポトーシスの割合を高めたことを示唆している。

【0023】

しかしながら、対照的に、本発明者らは、BUBR1発現の欠損は、一般式(I)の化合物に回答して低下した細胞死レベルと、すなわちこれらの化合物に対する耐性と関連していることを見出した。図3、4、5及び6にみられるような他の微小管不安定化剤を含む他の微小管の薬剤と比較して、式(I)の化合物が細胞の表現型に対して異なる影響を及ぼすということが再び強調されるべきである。一方ではUS 6,593,098 B1及びHoytの発見と、他方では本発明者らの発見との間の矛盾により、従来の微小管の薬剤に関する情報からは、特定の遺伝子が一般式(I)の化合物の作用に関与しているかどうか、又は特定の遺伝子が一般式(I)の化合物の活性にどのように関与しているかについて予測をすることができない、ということは確かである。

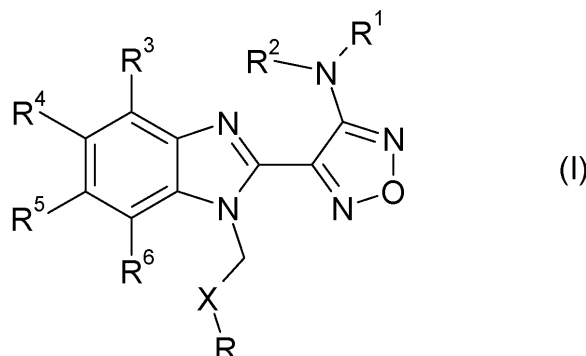
30

【0024】

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BUBR1の使用であって、該化合物が、一般式(I)：

【化5】

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、窒素と一緒にあって、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；

10

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；

20

又は R⁴ 及び R⁵ は、一緒にあって、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、窒素と一緒にあって、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；

30

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；

40

又は R⁴ 及び R⁵ は、一緒にあって、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（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）である、使用に関する。

【 0 0 2 5 】

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。

【 0 0 2 6 】

バイオマーカーの B U B R 1 は、人体又は動物体から採取、好ましくは、人体から採取

50

した試料（１つ又は複数）中、*ex vivo*で測定される。

【 0 0 2 7 】

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 B U B R 1 の使用に関する。

【 0 0 2 8 】

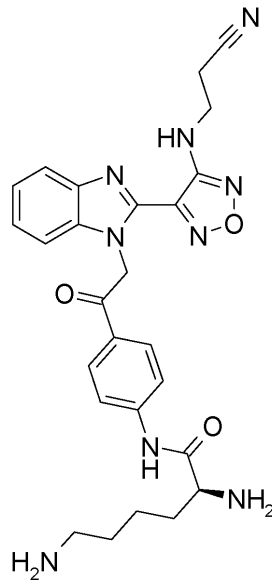
好ましくは、薬学的に許容しうる誘導体は、上記で定義される一般式（ I ）の化合物の塩、溶媒和物、プロドラッグ、プロドラッグの塩、多形及び異性体からなる群より選択される。プロドラッグは、好ましくは、天然アミノ酸、低分子ペプチド又はペグ化ヒドロキシ酸のエステル及びアミドである。より好ましくは、プロドラッグは、一般式（ I ）の化合物の R 基内に存在するアミノ基と、グリシン、アラニン又はリシンのカルボキシ基から形成されるアミドである。

10

【 0 0 2 9 】

特に好ましくは、本化合物は、以下：

【 化 6 】



20

30

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 3 0 】

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 B U B R 1 のレベルを測定して、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。

40

【 0 0 3 1 】

さらに好ましくは、予測される応答は、耐性である。

【 0 0 3 2 】

B U B R 1 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。

【 0 0 3 3 】

好ましい実施態様においては、被験体からの試料中の B U B R 1 のレベルが標準値又は

50

標準値のセットに対してより低い場合に、耐性であると予測される。

【0034】

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、大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、胃癌、膵臓癌、大腸癌及び肺癌からなる群より選択される。さらに、特に好ましくは、癌は、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌、膵臓癌、大腸癌及び肺癌からなる群より選択される。獲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。自然耐性が決定されるさらに別の特に好ましい実施態様においては、癌は、子宮頸癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、膵臓癌、大腸癌及び肺癌から、より好ましくは、肺癌又は胃癌からなる群より選択される。

10

【0035】

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BUBR1のレベルを測定して、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BUBR1のレベルが、標準値又は標準値のセットより低くない場合、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。

【0036】

なおさらなる態様においては、本発明は、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BUBR1であって、被験体からの試料中のBUBR1のレベルを測定して、このレベルを表す値（1つ又は複数）を得る工程、及びBUBR1のレベルが、標準値又は標準値のセットより低くない場合、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BUBR1に関する。

20

【0037】

BUBR1のレベルの測定は、被験体から事前に得られた試料中、ex-vivoで実施される。

30

【0038】

本発明は、また、別の態様においては、BUBR1の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低い試料を有する被験体中のBUBR1のレベルを最初に増加させて、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。

【0039】

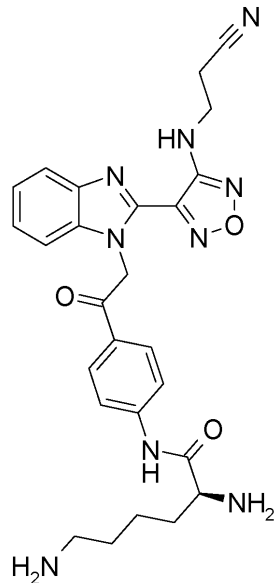
さらに別の態様においては、本発明は、試料中のBUBR1のレベルを測定するために必要な試薬を含む、上記で定義される一般式（I）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体に対する応答を予測するためのキットに関する。より好ましくは、キットは、また、試料中のBUBR1のレベルを比較するための標準値又は標準値のセットを含む比較測定基準（comparator module）を含む。

40

【0040】

よりさらに好ましくは、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 4 1 】

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 4 2 】

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 B U B R 1 のレベルを測定するために必要な試薬、及び試料中の B U B R 1 のレベルを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 4 3 】

好ましい実施態様においては、キット中の試薬又は装置中の試薬は、B U B R 1 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、B U B R 1 が標準値又は標準値のセットに対してより低いときに、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 4 4 】

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 5 】

【 図 1 A 】 図 1 は、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処置の 2 4 時間後に染色した。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 & 1 E 、 B A L 2 7 8 6 2 処置 : 図 1 B 、 1 D & 1 F 。

40

【 図 1 B 】 図 1 は、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処置の 2 4 時間後に染色した。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

50

3 乳癌細胞。ビヒクルコントロール処置：図 1 A、1 C & 1 E、B A L 2 7 8 6 2 処置：図 1 B、1 D & 1 F。

【図 1 C】図 1 は、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処置の 2 4 時間後に染色した。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 & 1 E、B A L 2 7 8 6 2 処置：図 1 B、1 D & 1 F。

【図 1 D】図 1 は、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処置の 2 4 時間後に染色した。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 & 1 E、B A L 2 7 8 6 2 処置：図 1 B、1 D & 1 F。

【図 1 E】図 1 は、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処置の 2 4 時間後に染色した。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 & 1 E、B A L 2 7 8 6 2 処置：図 1 B、1 D & 1 F。

【図 1 F】図 1 は、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処置の 2 4 時間後に染色した。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 & 1 E、B A L 2 7 8 6 2 処置：図 1 B、1 D & 1 F。

【図 2 A】図 2 は、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、8 0 nM 又は 2 0 nM の化合物 B 及び C による処置の 2 4 時間後に染色した。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。

【図 2 B】図 2 は、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、8 0 nM 又は 2 0 nM の化合物 B 及び C による処置の 2 4 時間後に染色した。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。

【図 3 A】図 3 は、従来 of 微小管標的薬剤と比較した B A L 2 7 8 6 2 による細胞の処置の比較を示す。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、5 0 nM の A：B A L 2 7 8 6 2；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処置の 2 4 時間後に染色した。1 μ m 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 3 B】図 3 は、従来 of 微小管標的薬剤と比較した B A L 2 7 8 6 2 による細胞の処置の比較を示す。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、5 0 nM の A：B A L 2 7 8 6 2；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処置の 2 4 時間後に染色した。1 μ m 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 3 C】図 3 は、従来 of 微小管標的薬剤と比較した B A L 2 7 8 6 2 による細胞の処置の比較を示す。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、5 0 nM の A：B A L 2 7 8 6 2；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処置の 2 4 時間後に染色した。1 μ m ごとに撮影した画像のスタックを、ImageJ

10

20

30

40

50

softwareを使用することにより処理した。

【図3D】図3は、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処置の24時間後に染色した。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4A】図4は、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&D)及びBAL27862(E、F&G)による処置の24時間後に染色した。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。

10

【図4B】図4は、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&D)及びBAL27862(E、F&G)による処置の24時間後に染色した。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。

20

【図4C】図4は、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&D)及びBAL27862(E、F&G)による処置の24時間後に染色した。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4D】図4は、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&D)及びBAL27862(E、F&G)による処置の24時間後に染色した。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。

30

【図4E】図4は、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&D)及びBAL27862(E、F&G)による処置の24時間後に染色した。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。

40

【図4F】図4は、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&D)及びBAL27862(E、F&G)による処置の24時間後に染色した。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4G】図4は、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

50

コダゾール (B、C & D) 及び B A L 2 7 8 6 2 (E、F & G) による処置の 2 4 時間後に染色した。A : コントロール、B : 5 0 nM のノコダゾール、C : 1 0 0 nM のノコダゾール、D : 2 0 0 nM のノコダゾール、E : 2 0 nM の B A L 2 7 8 6 2 ; F : 3 0 nM の B A L 2 7 8 6 2 及び G : 5 0 nM の B A L 2 7 8 6 2 。白色のスケールバーは、1 0 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 A】図 5 は、B A L 2 7 8 6 2 と従来 of 微小管標的薬剤の併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。5 0 nM の B A L 2 7 8 6 2、5 0 nM のビンブラスチン、5 0 nM のコルヒチン及び 2 5 nM のパクリタキセルを使用した。白色のスケールバーは、1 0 マイクロメートルを表す。図 5 A : 2 4 時間のビンブラスチン処置 ; 図 5 B : 2 4 時間のビンブラスチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 C : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、ビンブラスチンを含む ; 図 5 D : 2 4 時間のコルヒチン処置 ; 図 5 E : 2 4 時間のコルヒチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 F : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、コルヒチンを含む ; 図 5 G : 2 4 時間のパクリタキセル処置 ; 図 5 H : 2 4 時間のパクリタキセル処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 I : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、パクリタキセルを含む。

【図 5 B】図 5 は、B A L 2 7 8 6 2 と従来 of 微小管標的薬剤の併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。5 0 nM の B A L 2 7 8 6 2、5 0 nM のビンブラスチン、5 0 nM のコルヒチン及び 2 5 nM のパクリタキセルを使用した。白色のスケールバーは、1 0 マイクロメートルを表す。図 5 A : 2 4 時間のビンブラスチン処置 ; 図 5 B : 2 4 時間のビンブラスチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 C : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、ビンブラスチンを含む ; 図 5 D : 2 4 時間のコルヒチン処置 ; 図 5 E : 2 4 時間のコルヒチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 F : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、コルヒチンを含む ; 図 5 G : 2 4 時間のパクリタキセル処置 ; 図 5 H : 2 4 時間のパクリタキセル処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 I : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、パクリタキセルを含む。

【図 5 C】図 5 は、B A L 2 7 8 6 2 と従来 of 微小管標的薬剤の併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。5 0 nM の B A L 2 7 8 6 2、5 0 nM のビンブラスチン、5 0 nM のコルヒチン及び 2 5 nM のパクリタキセルを使用した。白色のスケールバーは、1 0 マイクロメートルを表す。図 5 A : 2 4 時間のビンブラスチン処置 ; 図 5 B : 2 4 時間のビンブラスチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 C : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、ビンブラスチンを含む ; 図 5 D : 2 4 時間のコルヒチン処置 ; 図 5 E : 2 4 時間のコルヒチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 F : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、コルヒチンを含む ; 図 5 G : 2 4 時間のパクリタキセル処置 ; 図 5 H : 2 4 時間のパクリタキセル処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 I : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、パクリタキセルを含む。

【図 5 D】図 5 は、B A L 2 7 8 6 2 と従来 of 微小管標的薬剤の併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。5 0 nM の B A L 2 7 8 6 2、5 0 nM のビンブラスチン、5 0 nM のコルヒチン及び 2 5 nM のパクリタキセルを使用した。白色のスケールバーは、1 0 マイクロメートルを表す。図 5 A : 2 4 時間のビンブラスチン処置 ; 図 5 B : 2 4 時間のビンブラスチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 C : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、ビンブラスチンを含む ; 図 5 D : 2 4 時間のコルヒチン処置 ; 図 5 E : 2 4 時間のコルヒチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 5 F : 2 4 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、コルヒチンを含む ; 図 5 G : 2 4

10

20

30

40

50

時間のパクリタキセル処置；図 5 H：24 時間のパクリタキセル処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 I：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、パクリタキセルを含む。

【図 5 E】図 5 は、B A L 2 7 8 6 2 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 G 2 / M 停止 A 5 4 9 N S C L C 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。50 nM の B A L 2 7 8 6 2、50 nM のビンブラスチン、50 nM のコルヒチン及び 25 nM 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 5 A：24 時間のビンブラスチン処置；図 5 B：24 時間のビンブラスチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 C：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、ビンブラスチンを含む；図 5 D：24 時間のコルヒチン処置；
10 図 5 E：24 時間のコルヒチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 F：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、コルヒチンを含む；図 5 G：24 時間のパクリタキセル処置；図 5 H：24 時間のパクリタキセル処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 I：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、パクリタキセルを含む。

【図 5 F】図 5 は、B A L 2 7 8 6 2 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 G 2 / M 停止 A 5 4 9 N S C L C 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。50 nM の B A L 2 7 8 6 2、50 nM のビンブラスチン、50 nM のコルヒチン及び 25 nM 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 5 A：24 時間のビンブラスチン処置；図 5 B：24 時間のビンブラスチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 C：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、ビンブラスチンを含む；図 5 D：24 時間のコルヒチン処置；
20 図 5 E：24 時間のコルヒチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 F：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、コルヒチンを含む；図 5 G：24 時間のパクリタキセル処置；図 5 H：24 時間のパクリタキセル処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 I：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、パクリタキセルを含む。

【図 5 G】図 5 は、B A L 2 7 8 6 2 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 G 2 / M 停止 A 5 4 9 N S C L C 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。50 nM の B A L 2 7 8 6 2、50 nM のビンブラスチン、50 nM のコルヒチン及び 25 nM 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 5 A：24 時間のビンブラスチン処置；図 5 B：24 時間のビンブラスチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 C：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、ビンブラスチンを含む；図 5 D：24 時間のコルヒチン処置；
30 図 5 E：24 時間のコルヒチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 F：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、コルヒチンを含む；図 5 G：24 時間のパクリタキセル処置；図 5 H：24 時間のパクリタキセル処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 I：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、パクリタキセルを含む。

【図 5 H】図 5 は、B A L 2 7 8 6 2 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 G 2 / M 停止 A 5 4 9 N S C L C 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。50 nM の B A L 2 7 8 6 2、50 nM のビンブラスチン、50 nM のコルヒチン及び 25 nM 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 5 A：24 時間のビンブラスチン処置；図 5 B：24 時間のビンブラスチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 C：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、ビンブラスチンを含む；図 5 D：24 時間のコルヒチン処置；
40 図 5 E：24 時間のコルヒチン処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 F：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、コルヒチンを含む；図 5 G：24 時間のパクリタキセル処置；図 5 H：24 時間のパクリタキセル処置、最後の 4 時間は、B A L 2 7 8 6 2 を含む；図 5 I：24 時間の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、
50

パクリタキセルを含む。

【図5 I】図5は、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のビンブラスチン、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5 A：24時間のビンブラスチン処置；図5 B：24時間のビンブラスチン処置、最後の4時間は、BAL27862を含む；図5 C：24時間のBAL27862処置、最後の4時間は、ビンブラスチンを含む；図5 D：24時間のコルヒチン処置；図5 E：24時間のコルヒチン処置、最後の4時間は、BAL27862を含む；図5 F：24時間のBAL27862処置、最後の4時間は、コルヒチンを含む；図5 G：24時間のパクリタキセル処置；図5 H：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5 I：24時間のBAL27862処置、最後の4時間は、パクリタキセルを含む。

10

【図6 A】図6は、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6 A：24時間のコントロール処置；図6 B：24時間の25nMのBAL27862処置；図6 C：24時間の50nMのノコダゾール処置；図6 D：24時間の100nMのノコダゾール処置；図6 E：24時間の150nMのノコダゾール処置；図6 F：24時間の200nMのノコダゾール処置；図6 G：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6 H：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6 I：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6 J：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6 K：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6 L：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6 M：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6 N：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。

20

30

【図6 B】図6は、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6 A：24時間のコントロール処置；図6 B：24時間の25nMのBAL27862処置；図6 C：24時間の50nMのノコダゾール処置；図6 D：24時間の100nMのノコダゾール処置；図6 E：24時間の150nMのノコダゾール処置；図6 F：24時間の200nMのノコダゾール処置；図6 G：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6 H：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6 I：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6 J：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6 K：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6 L：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6 M：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6 N：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。

40

【図6 C】図6は、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

50

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6D】図6は、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A549NSCLC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6E】図6は、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A549NSCLC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6F】図6は、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A549NSCLC細胞の微小管を、以下に表示する時間で処置した後に染

10

20

30

40

50

色した。25 nM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25 nMのBAL27862処置；図6C：24時間の50 nMのノコダゾール処置；図6D：24時間の100 nMのノコダゾール処置；図6E：24時間の150 nMのノコダゾール処置；図6F：24時間の200 nMのノコダゾール処置；図6G：24時間の50 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6H：24時間の100 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6I：24時間の150 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6J：24時間の200 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6K：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、50 nMのノコダゾールを含む；図6L：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、100 nMのノコダゾールを含む；図6M：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、150 nMのノコダゾールを含む；図6N：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、200 nMのノコダゾールを含む。

【図6G】図6は、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。25 nM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25 nMのBAL27862処置；図6C：24時間の50 nMのノコダゾール処置；図6D：24時間の100 nMのノコダゾール処置；図6E：24時間の150 nMのノコダゾール処置；図6F：24時間の200 nMのノコダゾール処置；図6G：24時間の50 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6H：24時間の100 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6I：24時間の150 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6J：24時間の200 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6K：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、50 nMのノコダゾールを含む；図6L：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、100 nMのノコダゾールを含む；図6M：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、150 nMのノコダゾールを含む；図6N：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、200 nMのノコダゾールを含む。

【図6H】図6は、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。25 nM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25 nMのBAL27862処置；図6C：24時間の50 nMのノコダゾール処置；図6D：24時間の100 nMのノコダゾール処置；図6E：24時間の150 nMのノコダゾール処置；図6F：24時間の200 nMのノコダゾール処置；図6G：24時間の50 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6H：24時間の100 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6I：24時間の150 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6J：24時間の200 nMのノコダゾール処置、最後の4時間は、25 nMのBAL27862を含む；図6K：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、50 nMのノコダゾールを含む；図6L：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、100 nMのノコダゾールを含む；図6M：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、150 nMのノコダゾールを含む；図6N：24時間の25 nMのBAL27862処置、最後の4時間は、200 nMのノコダゾールを含む。

【図6I】図6は、BAL27862とノコダゾールの併用処置を示す。有糸分裂又はG

10

20

30

40

50

2 / M 停止 A 5 4 9 N S C L C 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。25 nM の B A L 2 7 8 6 2 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 6 A : 24 時間のコントロール処置 ; 図 6 B : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置 ; 図 6 C : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 D : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 E : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 F : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 G : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 H : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 I : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 J : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 K : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、50 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 L : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、100 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 M : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、150 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 N : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、200 nM のノコダゾールを含む。

【図 6 J】図 6 は、B A L 2 7 8 6 2 とノコダゾールの併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。25 nM の B A L 2 7 8 6 2 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 6 A : 24 時間のコントロール処置 ; 図 6 B : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置 ; 図 6 C : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 D : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 E : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 F : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 G : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 H : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 I : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 J : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 K : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、50 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 L : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、100 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 M : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、150 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 N : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、200 nM のノコダゾールを含む。

【図 6 K】図 6 は、B A L 2 7 8 6 2 とノコダゾールの併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。25 nM の B A L 2 7 8 6 2 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 6 A : 24 時間のコントロール処置 ; 図 6 B : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置 ; 図 6 C : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 D : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 E : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 F : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 G : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 H : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 I : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 J : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 K : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、50 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 L : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、100 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 M : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、150 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 N : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、200 nM のノコダゾールを含む。

10

20

30

40

50

【図 6 L】図 6 は、B A L 2 7 8 6 2 とノコダゾールの併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。25 nM の B A L 2 7 8 6 2 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 6 A : 24 時間のコントロール処置 ; 図 6 B : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置 ; 図 6 C : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 D : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 E : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 F : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 G : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 H : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 I : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 J : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 K : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、50 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 L : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、100 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 M : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、150 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 N : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、200 nM のノコダゾールを含む。

10

【図 6 M】図 6 は、B A L 2 7 8 6 2 とノコダゾールの併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。25 nM の B A L 2 7 8 6 2 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 6 A : 24 時間のコントロール処置 ; 図 6 B : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置 ; 図 6 C : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 D : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 E : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 F : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 G : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 H : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 I : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 J : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 K : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、50 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 L : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、100 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 M : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、150 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 N : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、200 nM のノコダゾールを含む。

20

30

【図 6 N】図 6 は、B A L 2 7 8 6 2 とノコダゾールの併用処置を示す。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、以下に表示する時間で処置した後に染色した。25 nM の B A L 2 7 8 6 2 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 6 A : 24 時間のコントロール処置 ; 図 6 B : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置 ; 図 6 C : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 D : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 E : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 F : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置 ; 図 6 G : 24 時間の 50 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 H : 24 時間の 100 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 I : 24 時間の 150 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 J : 24 時間の 200 nM のノコダゾール処置、最後の 4 時間は、25 nM の B A L 2 7 8 6 2 を含む ; 図 6 K : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、50 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 L : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、100 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 M : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、150 nM のノコダゾールを含む ; 図 6 N : 24 時間の 25 nM の B A L 2 7 8 6 2 処置、最後の 4 時間は、200 nM の

40

50

ノコダゾールを含む。

【図7A】図7は、BUBR1の*siRNA*プールを用いたトランスフェクション後のBUBR1発現のイムノプロット分析を示す。コントロール：媒体だけで処置した非トランスフェクション細胞；リポフェクタミン：トランスフェクション試薬のみで処置した細胞；NTC：非標的コントロール*siRNA*で処置した細胞；BUBR1：BUBR1 - 特異的*siRNA*プールで処置した細胞。チューブリンレベルをローディングコントロールとして用いる。表示のようにCell Signaling (CS) BUBR1抗体又はBD Transduction Laboratories (BD) BUBR1抗体を用いた。図7A：HeLa子宮頸癌細胞、図7B：H460肺癌細胞。

【図7B】図7は、BUBR1の*siRNA*プールを用いたトランスフェクション後のBUBR1発現のイムノプロット分析を示す。コントロール：媒体だけで処置した非トランスフェクション細胞；リポフェクタミン：トランスフェクション試薬のみで処置した細胞；NTC：非標的コントロール*siRNA*で処置した細胞；BUBR1：BUBR1 - 特異的*siRNA*プールで処置した細胞。チューブリンレベルをローディングコントロールとして用いる。表示のようにCell Signaling (CS) BUBR1抗体又はBD Transduction Laboratories (BD) BUBR1抗体を用いた。図7A：HeLa子宮頸癌細胞、図7B：H460肺癌細胞。

【図8】図8は、HeLa細胞におけるBAL27862に対する応答へのBUBR1の*siRNA*プールの効果を示す。HeLa細胞を播種し、そして*siRNA*で処置した。48時間のインキュベーションの後、分析の前に、細胞を、DMSO単独で、又は50nMのBAL27862で24時間処置した。上のパネル：未処置表現型を示す1ウェルあたりの細胞の割合(%表示)の柱状図。下のパネル：1ウェルあたりの細胞数の柱状図。エラーバー：標準偏差。陰性コントロール：非標的コントロール*siRNA*。BubR1：BUBR1 - 特異的*siRNA*プール処置細胞。

【図9A】図9は、BAL27862に対するHeLa細胞の応答へのBUBR1の*siRNA*プールの効果を示す。急激に成長しているHeLa細胞を、媒体単独で処置した(コントロール)、又はリポフェクタミン、非標的コントロール(NTC)*siRNA*又はBUBR1 - 特異的*siRNA*プールでトランスフェクトした。24時間後、DMSOピヒクルをコントロールとして使用し、BAL27862を表示した濃度で加えた。処置の48時間後、HeLa細胞増殖(図9A)及び生存率(図9B)に対する効果を、YO-PRO増殖アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図9B】図9は、BAL27862に対するHeLa細胞の応答へのBUBR1の*siRNA*プールの効果を示す。急激に成長しているHeLa細胞を、媒体単独で処置した(コントロール)、又はリポフェクタミン、非標的コントロール(NTC)*siRNA*又はBUBR1 - 特異的*siRNA*プールでトランスフェクトした。24時間後、DMSOピヒクルをコントロールとして使用し、BAL27862を表示した濃度で加えた。処置の48時間後、HeLa細胞増殖(図9A)及び生存率(図9B)に対する効果を、YO-PRO増殖アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図10A】図10は、BAL27862に対するH460細胞の応答へのBUBR1の*siRNA*プールの効果を示す。急激に成長しているH460細胞を、非標的コントロール(NTC)*siRNA*又はBUBR1 - 特異的*siRNA*プールでトランスフェクトした。24時間後、DMSOピヒクルをコントロールとして使用し、BAL27862を表示した濃度で加えた。処置の48時間後、H460細胞増殖(図10A)及び生存率(図10B)に対する効果を、YO-PRO増殖アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図10B】図10は、BAL27862に対するH460細胞の応答へのBUBR1の*siRNA*プールの効果を示す。急激に成長しているH460細胞を、非標的コントロール(NTC)*siRNA*又はBUBR1 - 特異的*siRNA*プールでトランスフェクトした。24時間後、DMSOピヒクルをコントロールとして使用し、BAL27862を表示した濃度で加えた。処置の48時間後、H460細胞増殖(図10A)及び生存率(図

10

20

30

40

50

10 B) に対する効果を、YO-PRO増殖アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図11A】図11は、BAL27862に対するMCF-7細胞の応答へのBUBR1のsiRNAプールの効果を示す。急激に成長しているMCF-7細胞を、非標的コントロール(NTC)siRNA又はBUBR1-特異的siRNAプールで処置した。24時間後、DMSOビヒクルをコントロールとして使用し、BAL27862を表示した濃度で加えた。処置の48時間後、MCF-7細胞増殖(図11A)及び生存率(図11B)に対する効果を、YO-PRO増殖アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図11B】図11は、BAL27862に対するMCF-7細胞の応答へのBUBR1のsiRNAプールの効果を示す。急激に成長しているMCF-7細胞を、非標的コントロール(NTC)siRNA又はBUBR1-特異的siRNAプールで処置した。24時間後、DMSOビヒクルをコントロールとして使用し、BAL27862を表示した濃度で加えた。処置の48時間後、MCF-7細胞増殖(図11A)及び生存率(図11B)に対する効果を、YO-PRO増殖アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図12A】図12は、BAL27862に対するHeLa細胞、Panc1細胞及びHCT116細胞の応答へのBUBR1のsiRNAプールの効果を示す。急激に成長している細胞を、非標的コントロール(NTC)siRNA又はBUBR1-特異的siRNAプールで処置した。24時間後、DMSOビヒクルをコントロールとして使用し、50nM(HeLa、HCT116)のBAL27862、又は30nM(Panc1)のBAL27862を加えた。処置の48時間後、HeLa(図12A)、Panc1(図12B)及びHCT116(図12C)の細胞増殖に対する効果を、クリスタルバイオレット(Crystal Violet)アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図12B】図12は、BAL27862に対するHeLa細胞、Panc1細胞及びHCT116細胞の応答へのBUBR1のsiRNAプールの効果を示す。急激に成長している細胞を、非標的コントロール(NTC)siRNA又はBUBR1-特異的siRNAプールで処置した。24時間後、DMSOビヒクルをコントロールとして使用し、50nM(HeLa、HCT116)のBAL27862、又は30nM(Panc1)のBAL27862を加えた。処置の48時間後、HeLa(図12A)、Panc1(図12B)及びHCT116(図12C)の細胞増殖に対する効果を、クリスタルバイオレット(Crystal Violet)アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図12C】図12は、BAL27862に対するHeLa細胞、Panc1細胞及びHCT116細胞の応答へのBUBR1のsiRNAプールの効果を示す。急激に成長している細胞を、非標的コントロール(NTC)siRNA又はBUBR1-特異的siRNAプールで処置した。24時間後、DMSOビヒクルをコントロールとして使用し、50nM(HeLa、HCT116)のBAL27862、又は30nM(Panc1)のBAL27862を加えた。処置の48時間後、HeLa(図12A)、Panc1(図12B)及びHCT116(図12C)の細胞増殖に対する効果を、クリスタルバイオレット(Crystal Violet)アッセイを使用して評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図13A】図13は、BAL27862に対するHeLa細胞の応答への個々のBUBR1のsiRNAの効果を示す。急激に成長している細胞を、非標的コントロール(NTC)siRNA又は個々のBUBR1-特異的siRNA(以下の実験方法の節で定義されているようにsiRNA#1、2、3及び4)で処置した。24時間後、DMSOビヒクルをコントロールとして使用し、50nM BAL27862を加えた。処置の48時間後、HeLa細胞増殖に対する効果(図13A)を、クリスタルバイオレットアッセイを使用して評価し、BUBR1タンパク質発現に対する効果を、イムノプロット法(図13

10

20

30

40

50

B)によって評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図13B】図13は、BAL27862に対するHeLa細胞の応答への個々のBUBR1のsiRNAの効果を示す。急激に成長している細胞を、非標的コントロール(NTC)siRNA又は個々のBUBR1-特異的siRNA(以下の実験方法の節で定義されているようにsiRNA#1、2、3及び4)で処置した。24時間後、DMSOビヒクルをコントロールとして使用し、50nM BAL27862を加えた。処置の48時間後、HeLa細胞増殖に対する効果(図13A)を、クリスタルバイオレットアッセイを使用して評価し、BUBR1タンパク質発現に対する効果を、イムノプロット法(図13B)によって評価した。a.u. = データは、任意の単位として表現される。

【図14】図14は、BAL27862に対する獲得耐性による腫瘍株におけるBUBR1タンパク質レベルの減少を示す。腫瘍細胞株は、BAL27862の存在下でのin vitro培養によって、BAL27862に対して耐性を有するものとして選択された。IC₅₀決定に基づいて、親株に対するBAL27862の耐性係数は：A549(3.0倍)；SKOV3(7.6倍~耐性1株)；H460(5.3倍)(表1を参照)。全細胞タンパク質抽出を、親株及び耐性株から調製し、イムノプロットによりBUBR1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15】図15は、BUBR1タンパク質レベルの低下が、耐性発現の間、SKOV3腫瘍株で維持されることを示す。SKOV3腫瘍細胞は、BAL27862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、BAL27862に対して耐性を有するものとして選択された。IC₅₀測定に基づいて、親株に対するBAL27862の耐性係数は：SKOV3耐性1(7.6倍)、SKOV3耐性2(11.6倍)であった(表1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BUBR1の発現をBD Transduction Laboratories(BD)BUBR1抗体を使用して分析した。- チューブリ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16】図16は、腫瘍細胞のBUBR1のレベルが、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腫瘍において減少することを示す。患者由来の異種移植腫瘍(ヌードマウスで維持した)を調製し、固定し、そして、免疫組織化学を使用してBUBR1タンパク質の発現を染色した。BAL27862、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2に記載する。

【図17A】図17は、BUBR1について、腫瘍細胞中のタンパク質レベルがそのRNA発現レベルにより反映されることを示す。図17A：試料をHeLa及びH460細胞株から調製し、RNAレベルを測定するために定量的RT-PCRをこれらの細胞株について実施した。HeLaの結果を100%に設定し、そしてグラフは、HeLa値に対するH460試料中のRNA発現レベルを示す。図17B：全細胞タンパク質抽出物をHeLa及びH460細胞株の同じ継代から調製し、次にBUBR1のタンパク質発現についてイムノプロット法によりBD Transduction Laboratories(BD)BUBR1抗体を使用して分析した。- チューブリ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17B】図17は、BUBR1について、腫瘍細胞中のタンパク質レベルがそのRNA発現レベルにより反映されることを示す。図17A：試料をHeLa及びH460細胞株から調製し、RNAレベルを測定するために定量的RT-PCRをこれらの細胞株について実施した。HeLaの結果を100%に設定し、そしてグラフは、HeLa値に対するH460試料中のRNA発現レベルを示す。図17B：全細胞タンパク質抽出物をHeLa及びH460細胞株の同じ継代から調製し、次にBUBR1のタンパク質発現についてイムノプロット法によりBD Transduction Laboratories(BD)BUBR1抗体を使用して分析した。- チューブリ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18】図18は、BUBR1の好ましいタンパク質配列(SEQ. ID No. 1)を示す。

【図19-1】図19は、BUBR1の好ましい核酸配列(SEQ. ID No. 2)を示す。

【図19-2】図19は、BUBR1の好ましい核酸配列(SEQ. ID No. 2)を示す。

【0046】

詳細な説明

10

20

30

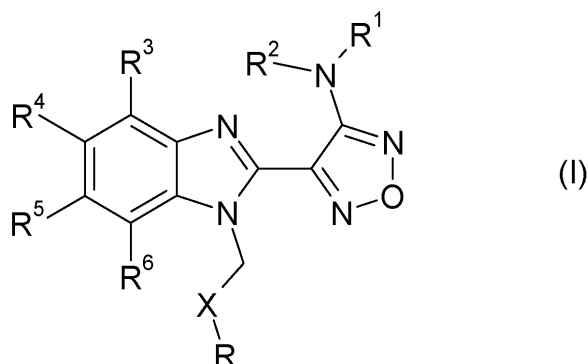
40

50

一般式 (I) の化合物

本発明の化合物は、一般式 (I) :

【化 8】



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；

20

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；

30

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；

40

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

50

アルキルを表し；

R^2 、 R^3 及び R^6 は、水素を表し；

R^4 及び R^5 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 R^4 及び R^5 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（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）である。

【0047】

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、ヘテロシクリルは、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。

10

【0048】

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。

20

【0049】

好ましくは、本発明の一般式(I)の化合物は、 R^1 が、水素、アセチル、 CH_2CH_2CN 及び $CH_2CH_2CH_2OH$ からなる群より選択されると定義される。

【0050】

1つの好ましい実施態様においては、本発明の一般式(I)の化合物及びその薬学的に許容しうる誘導体は、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、

30

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、

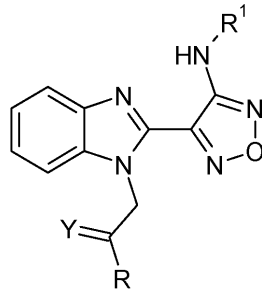
40

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。

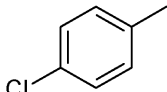
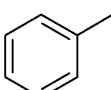
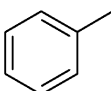
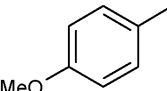
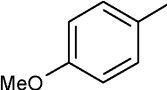
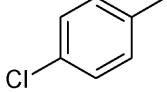
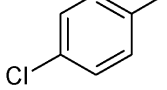
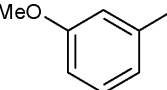
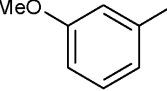
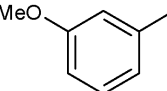
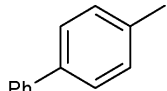
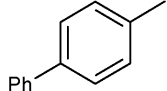
【0051】

別の好ましい実施態様においては、本発明の一般式(I)の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、以下である：

【化 9】

(式中、R、Y及びR¹は、以下のように定義される)

【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

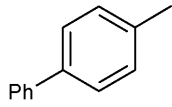
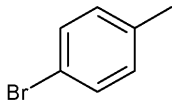
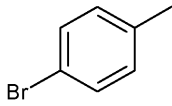
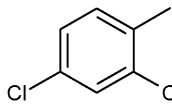
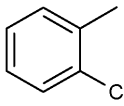
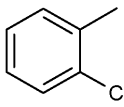
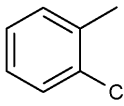
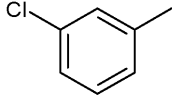
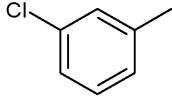
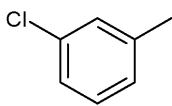
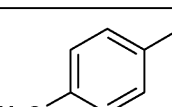
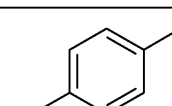
10

20

30

40

50

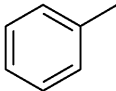
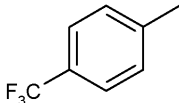
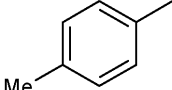
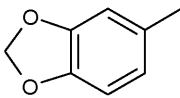
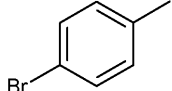
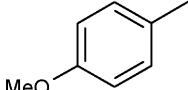
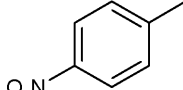
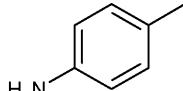
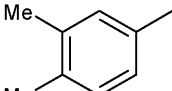
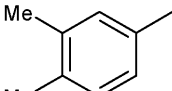
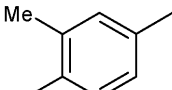
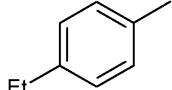
	NOMe	H
	O	H
	NOMe	H
	O	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	O	H
	NOH	H
	NOMe	H
	NOMe	H
	O	H

10

20

30

40

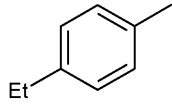
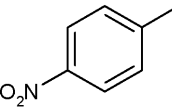
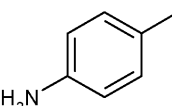
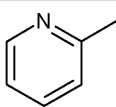
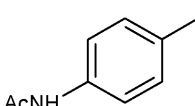
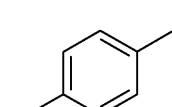
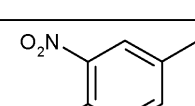
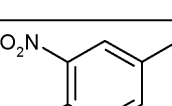
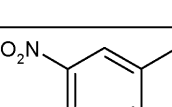
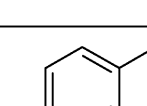
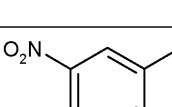
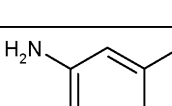
	O	Ac
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H

10

20

30

40

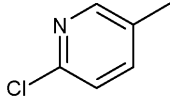
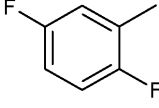
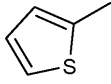
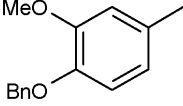
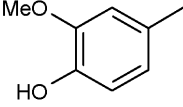
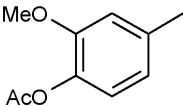
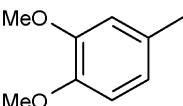
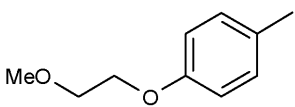
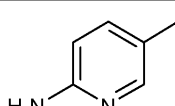
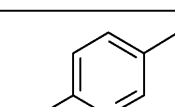
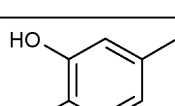
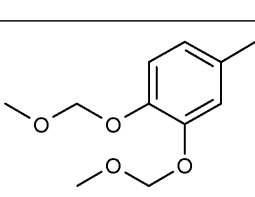
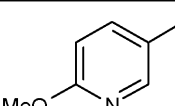
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN

10

20

30

40

	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN
	O	H
	O	H
	O	CH ₂ CH ₂ CN

10

20

30

40

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）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、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、

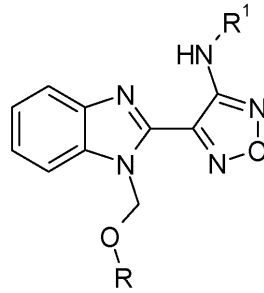
4 - [1 - (4 - フルオロフェノキシメチル) - 1 H - ベンゾイミダゾール - 2 - イル] - フラザン - 3 - イルアミン、

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】

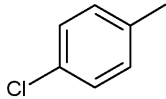
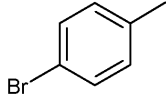
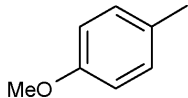
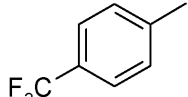
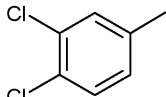
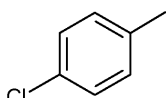
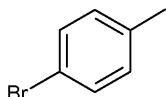
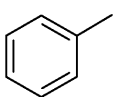
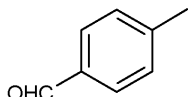
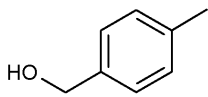
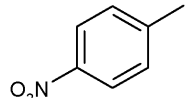
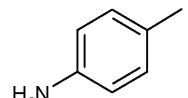
10



(式中、R 及び R¹ は、下記のように定義される)

20

【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

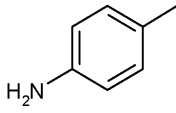
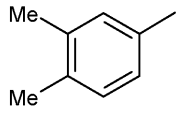
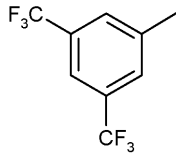
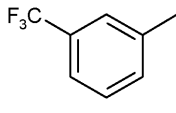
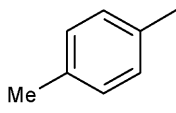
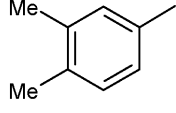
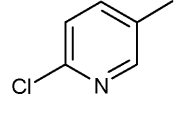
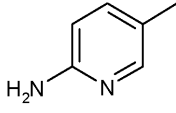
10

20

30

40

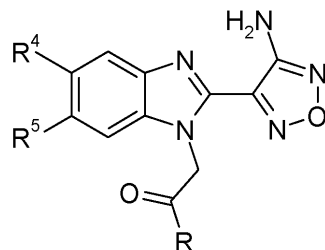
50

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

【 0 0 5 3 】

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）の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、以下である：

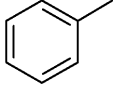
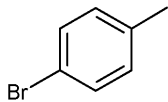
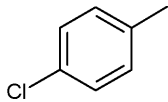
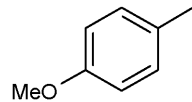
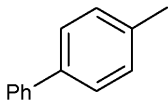
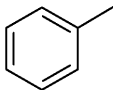
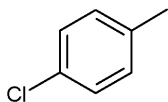
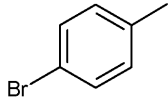
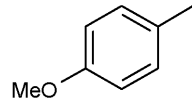
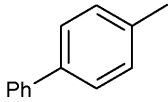
【 化 1 1 】



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

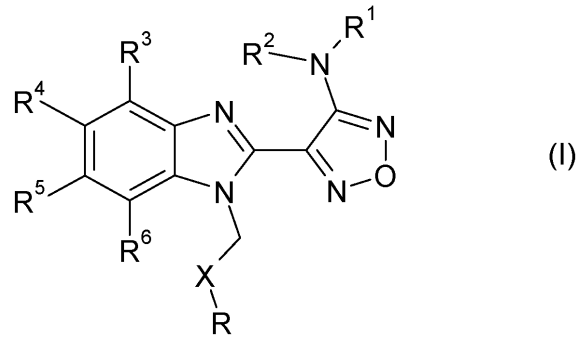
30

40

【 0 0 5 4 】

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]

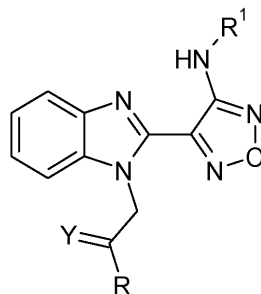
20

で表される化合物及びその薬学的に許容しうる誘導体（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）である。

【 0 0 5 5】

とりわけ好ましくは、本発明の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、下記式：

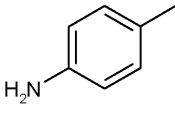
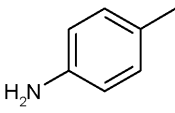
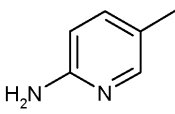
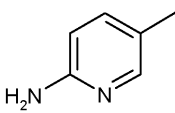
【化 1 3】



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

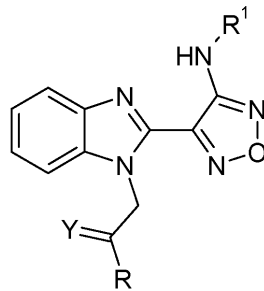
20

により表される。

【0056】

さらに、とりわけ好ましくは、本発明の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、下記式：

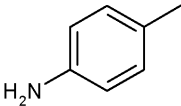
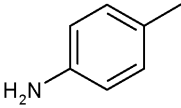
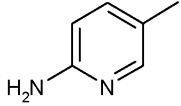
【化14】



30

(式中、R、Y及びR¹は、以下のように定義される)

【表 5】

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

10

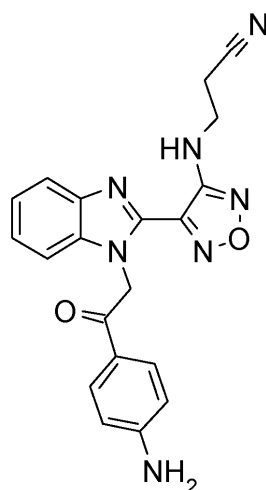
により表される。

【0057】

特に好ましくは、本発明の化合物又はその薬学的に許容しうる誘導体は、以下である。

20

【化15】



30

【0058】

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、溶媒和物及び複合体、そして、それらの塩の溶媒和物及び複合体、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

【0059】

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、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

50

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。

【0060】

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、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。

10

20

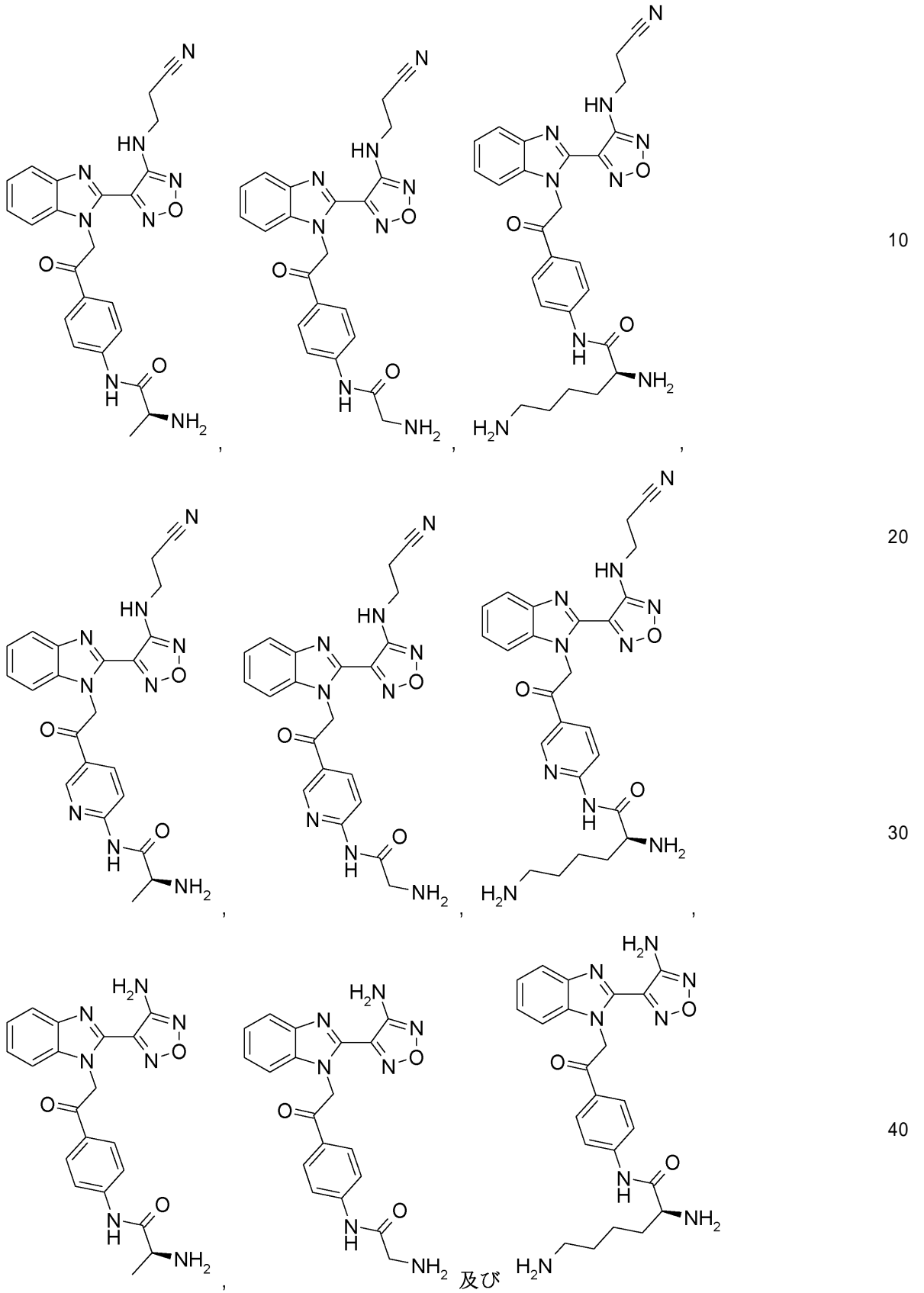
【0061】

より好ましくは、プロドラッグは、上記で定義される一般式(I)の化合物のR基内に存在するアミノ基、及びグリシン、アラニン又はリシンのカルボキシ基から形成されたアミドである。

【0062】

さらにより好ましくは、一般式(I)の化合物は、式：

【化 1 6】

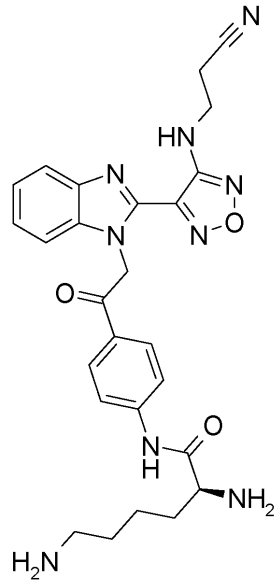


で表される化合物から選択されるプロドラッグの形態である。

【0063】

とりわけ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、下記式：

【化 1 7】



10

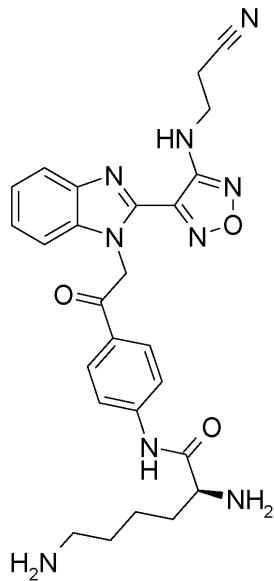
を有するプロドラッグの形態である。

【 0 0 6 4】

20

最もとりわけ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、又はそ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

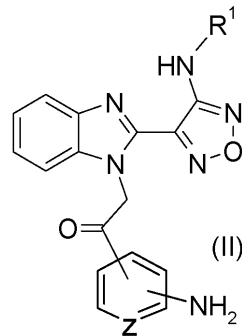
【 0 0 6 5】

この場合の *in vivo* で薬学的に活性な代謝物は、BAL27862である。

【 0 0 6 6】

これらのプロドラッグは、それ自体公知のプロセス、特に、式 (I I)：

【化 19】

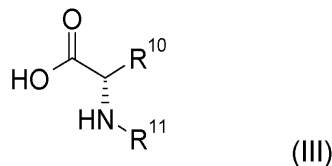


10

(式中、 R^1 は、式 (I) のように定義され、そして 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 20】



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プロセスにより調製してもよい。

30

【0067】

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 ~ 約 $+150$ 、より好ましくは、 -30 ~ $+120$ 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。

【0068】

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、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。

【0069】

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存在する場合又は保護される必要がある場合、これらを反応に関与させないために、通常、アミド、特に、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当業者に公知の合成に適用されるような保護基が存在する。

10

【0070】

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、望まない第二の反応を受けず、これらがそれ自体、例えば、生理学的条件に似た条件下で、典型的には、加溶媒分解、還元、光分解により、又は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。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り、又は容易に確認することができる。

20

【0071】

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

【0072】

疾患

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

【0073】

細胞増殖の調節解除又は適切な細胞死の欠如は、広範な臨床的意義を有する。そのような調節解除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

【0074】

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、疾患を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ク

50

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。

【0075】

一般式(I)の化合物は、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

【0076】

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)に關与する、全身性、円板状又は垂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、Guillan-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、皮脂性及び増殖性)、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~V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

【0077】

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。

【0078】

50

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、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）、内分泌系癌、骨肉腫、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、胃癌、膵臓癌、大腸癌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、子宮頸癌、胃癌、卵巣癌、膵臓癌、大腸癌及び肺癌からなる群より選択される。

10

【0079】

試料

BUBR1のレベルの測定は、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、血漿、血清、全血、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、細胞株、循環腫瘍細胞又は血液に由来する。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、BUBR1のレベルは、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

【0080】

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。血液試料は、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、ISET-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, NJ）に基づいて血液から得てもよい。

30

【0081】

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。

【0082】

バイオマーカーのBUBR1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。

【0083】

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。

40

【0084】

特に好ましい実施態様においては、試料中のBUBR1のレベルが標準値又は標準値のセットに対してより低い場合に、耐性であると予測される。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、減少、又は比較的低い、又は低い、又はより低いレベルは、試料中のバイオマーカーの量又は濃度が、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により少ないことを意味する。これは、標準に対して少なくとも約1%の減少又はより低いレベル、好ましくは、標準に対して少なくとも約5%の減少を包含する。より好ましくは、標準に対して少なくとも約10%の

50

減少又はより低いレベルである。さらに、特に好ましくは、標準に対して少なくとも約20%の減少又はより低いレベルである。例えば、そのような減少又はより低いレベルは、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90%、又は約100%の減少を含んでもよいが、これらに限定されない。したがって、減少はまた、試料中の検出可能なBUBR1が存在しないことを含む。

【0085】

好ましくは、試料(1つ又は複数)中のBUBR1のレベルが、

- 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) 処置開始後に採取したものと、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)を比較して；又は
 - iii) 正常な細胞、組織又は体液からの標準値又は標準値のセットに対して；
- より低い場合に、耐性であると予測される。

10

【0086】

BUBR1のレベルの測定は、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。

【0087】

より好ましくは、試料(1つ又は複数)中のBUBR1のレベルが、

- 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) 処置開始後に採取したものと、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)を比較して；
- より低い場合に、耐性であると予測される。

20

【0088】

とりわけ好ましくは、試料(1つ又は複数)中のBUBR1のレベルが、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低い場合に、耐性であると予測される。

【0089】

1つの好ましい実施態様においては、i)測定が、試料(1つ又は複数)を、比較される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試料間で一致するならば、例えば、腫瘍組織由来、又は循環腫瘍細胞由来であってもよい。

30

【0090】

別の好ましい実施態様においては、ii)測定が、処置開始後に採取した試料(1つ又は複数)において比較し、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、本化合物による処置を中断すべきであることを示す。したがって、バイオマーカーは、本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

【0091】

さらに別の好ましい実施態様においては、iii)測定が、試料(1つ又は複数)を、正常な細胞、組織又は体液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、組織又は体液の試料から確立してもよい。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。

【0092】

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つの被験体から、より好ましくは、被験体(例えば、n=2~1000以上)の平均からの細胞株、又は好ま

50

しくは、生体材料からでありうる) から ex-vivo で確立される。

【0093】

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で処置するために、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感度(例えば、高感度～低感度)、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、処置に対して耐性であると予測するカットオフ値又は値のセットを含む。

10

【0094】

例えば、試料中のBUBR1の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、BUBR1が染色された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。BUBR1の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験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

【0095】

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活性、好ましくは治療活性に対する、細胞株の、又は好ましくは、被験体の、又はより好ましくは、被験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、化合物の活性、好ましくは治療活性に対する相対感度(例えば、高感度～低感度)、ならびに活性、好ましくは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、無進行生存及び全生存についてモニタリングしてもよい。

【0096】

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 ;

30

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 ;

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)の処置のための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

40

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, Bubley GJ, 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。

50

【0097】

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、又は存在し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、癌性細胞の非存在；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。

【0098】

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、又は存在し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。

【0099】

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。

【0100】

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。

【0101】

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見なされる）。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) プロモデオキシウリジン（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（細胞周期の異なる段階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) 固定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）。

【0102】

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。

【0103】

10

20

30

40

50

B U B R 1

上記のように、B U B R 1 という用語は、全ての前述の同義語を包含するために本明細書において使用し、かつ必要に応じて核酸レベル及びタンパク質レベルの両方に対するこの実体を指す。核酸レベルは、例えば、mRNA、cDNA又はDNAを指し、そしてタンパク質という用語は、翻訳されたポリペプチド又はタンパク質配列及びそれらの翻訳後修飾された形を含む。

【0104】

B U B R 1 (ヒトB U B R 1) のタンパク質配列の好ましい例は、図18のSEQ. ID No. 1に列記されている。しかし、B U B R 1 という用語はまた、この配列の相同体、突然変異型、対立遺伝子変異体、イソタイプ、スプライス変異体及び等価体も包含する。好ましくは、それはまた、この配列のヒト相同体、突然変異型、対立遺伝子変異体、イソタイプ、スプライス変異体及び等価体を包含する。より好ましくは、それは、該配列に対して、少なくとも約75%の同一性、とりわけ好ましくは少なくとも約85%の同一性、特に好ましくは少なくとも約95%の同一性、そしてさらに特に好ましくは約99%の同一性を有する配列を包含する。

10

【0105】

とりわけ好ましい実施態様において、B U B R 1 は、核酸レベル又はタンパク質レベルに対する実体であり、これはタンパク質レベルに対して、SEQ. ID No. 1によって、又はこの配列と少なくとも95%の同一性、好ましくは少なくとも99%の同一性を有する配列によって表される。特に好ましい実施態様において、B U B R 1 は、SEQ. ID No. 1によって表される。

20

【0106】

B U B R 1 (ヒトB U B R 1) の核酸配列の好ましい例は、NCBI参照配列NM_001211により入手可能であり、そして図19のSEQ. ID No. 2 (NM_001211.5) に列記されている。B U B R 1 という用語はまた、修飾、該配列のより縮重した変異体、該配列の捕体、及び該配列のうちの一つとハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドも包含する。そのような修飾には、突然変異、挿入、欠失、及び一つ又は複数のヌクレオチドの置換が挙げられるが、これらに限定されない。さらに好ましくは、それは、該配列と少なくとも約75%の同一性、とりわけ好ましくは少なくとも約85%の同一性、特に好ましくは少なくとも約95%の同一性、及びさらに特に好ましくは約99%の同一性を有する配列を包含する。

30

【0107】

さらに別の好ましい実施態様において、B U B R 1 は、核酸レベル又はタンパク質レベルに対する実体であり、これは、SEQ. ID No. 2によるか、又はこの配列と少なくとも約95%の同一性、好ましくは少なくとも99%の同一性を有する配列によって核酸レベルで表される。特に好ましい実施態様において、B U B R 1 は、SEQ. ID No. 2によって表される。

【0108】

B U B R 1 のレベル

B U B R 1 のレベルは、当業者によく知られた技術手段により試料中でアッセイしてもよい。それは、転写レベル又は翻訳レベルでアッセイしてもよい。

40

【0109】

一つの好ましい実施態様において、試料中のB U B R 1 の核酸の、好ましくはB U B R 1 のmRNAのレベルを測定する。核酸レベルでB U B R 1 のレベルを測定するために最適な当技術分野において公知の遺伝子発現分析の方法の例としては、i) mRNAとハイブリッド形成することができる標識プローブを使用すること；ii) B U B R 1 遺伝子配列に基づく一つ以上のプライマーを含むPCRを使用すること、例えば、標識プローブ(例えば、蛍光発生的プローブ)を使用する定量的PCR法(例えば、定量的リアルタイムPCR)を使用すること；iii) マイクロアレイ；IV) ノーザンプロット法；V) 遺伝子発現の連続分析(SAGE)法、READS(分解されたcDNAの制限酵素増幅)

50

、ディファレンシャルディスプレイ法及びマイクロRNA測定法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

好ましい実施態様において、タンパク質レベルでのBUBR1のレベルを測定する。タンパク質レベルでのBUBR1のレベルを測定するために好適な当該技術において公知のタンパク質発現分析の方法の例には、i)免疫組織化学(IHC)分析法；ii)ウエスタンブロット法；iii)免疫沈殿法；iv)酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)；v)放射免疫測定法；vi)蛍光標示式細胞分取法(FACS)；vii)マトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI、例えばMALDI-TOF)及び表面増強レーザー脱離/イオン化(SELDI、例えばSELDI-TOF)を含む質量分析法が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0111】

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、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、その抗体を検出できるように又は1つ以上のさらなる種との次の反応を検出可能なように標識してもよい。BUBR1に特異的な抗体は、BD Transduction Laboratories及びCell Signaling Technology, Inc.から市販品として入手するか、又は当業者に周知の従来抗体生成法を介して調製することができる。

20

【0112】

タンパク質分析の好ましい方法は、ELISA、質量分析技術、免疫組織化学及びウエスタンブロット法であり、より好ましくは、ウエスタンブロット法及び免疫組織化学である。イムノブロット法としても知られるウエスタンブロット法は、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。

【0113】

免疫組織化学もまた、バイオマーカ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るが、後者は、染色強度の関数と見なされる。

30

【0114】

ELISA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。ELISAは、典型的には、以下のように実施される(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を、バイオマーカ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、又は酵素に連結する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、バイオマーカの存在及び量を決定することができる。

40

【0115】

バイオマーカの使用

一つの好ましい実施態様において、バイオマーカは、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自然耐性を予測するために使用する。

【0116】

別の好ましい実施態様において、バイオマーカは、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獲得耐性を予測するために使用する。

【0117】

50

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傾向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、又は応答し続けない可能性がある患者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、患者の層別化を実施してもよい。特に、バイオマーカーは、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、より低い B U B R 1 の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。

【 0 1 1 8 】

バイオマーカーは、また、投薬量及び投薬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) 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。

【 0 1 1 9 】

B U B R 1 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、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、及び頭頸部癌、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。

【 0 1 2 0 】

処置方法

本発明は、また、いくつかの態様においては、処置方法及び処置方法において使用するための B U B R 1 を含み、最初に、B U B R 1 のレベルを、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 B U B R 1 のレベルが、それぞれ、標準値もしくは標準値のセットより低くない場合、又は処置開始前のレベルに対して減少していない場合に、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) 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、医薬組成物の形態で投与してもよい。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 3 5 ~ 3 9 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。

【 0 1 2 1 】

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：5 0 0 0 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 . 0 5 g 含む) は、以下のように調製される：微粉化した活性成分 2 5 0 g 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 ~ 3 μm 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 . 4 1 9 g ずつ軟ゼラチンカプセルに注入する。

【 0 1 2 2 】

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

10

20

30

40

50

処置する方法であって、B U B R 1の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低い試料を有する被験体中のB U B R 1のレベルを最初に増加させて、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。B U B R 1のレベルは、直接的又は間接的な化学又は遺伝学的方法により増加させてもよい。そのような方法の例は、B U B R 1の発現を増加させる薬物、及びウイルス、プラスミドもしくはペプチド構築物の標的送達、又はB U B R 1のレベルをアップレギュレートする抗体もしくはs i R N Aもしくはアンチセンスによる処置である。例えば、ウイルス又はプラスミド構築物を使用して、細胞中のB U B R 1の発現を増加させてもよい。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。

10

【0123】

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。

【0124】

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。

20

【0125】

キット及び装置

一態様においては、本発明は、試料中のB U B R 1の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キットに関し、別の態様においては、装置に関する。好ましくは、試薬は、B U B R 1のための検出部を含む捕捉試薬及び検出試薬を含む。

30

【0126】

キット及び装置は、また、好ましくは、試料中のB U B R 1のレベルを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、縞模様のカラークォ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。

【0127】

試薬は、好ましくは、B U B R 1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、B U B R 1に結合する1つの特異的二次抗体と、二次抗体に結合し、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。二次抗体は、また、直接検出のために標識してもよい。キット又は装置は、また、場合により、洗浄後に、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選択的に保持す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、E L I S A、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー、免疫組織化学的方法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。

40

【0128】

試薬はまた、別の好ましい実施形態において、試料中のB U B R 1の核酸のレベルを測定することが可能であるものであってもよい。適切な試料は、組織又は腫瘍組織試料、固定及びパラフィン包埋もしくは凍結した組織又は腫瘍組織標本の薄切片、循環腫瘍細胞、

50

ならびに血液及び体液由来の試料である。好ましくは、試薬は、試料中のBUBR1の核酸とハイブリッド形成するための標識プローブ又はプライマーを含む。PCR増幅技術又は標識プローブの検出のいずれかに基づく適切な検出システムは、試料中のBUBR1の核酸の定量化を可能にする。これは、i) 標本そのものに対してインサイトで、好ましくはパラフィン包埋又は凍結した標本からの薄片中で、ii) 腫瘍、組織又は血液由来標本からの抽出物中で、実行することができ、ここで、適切な試薬は選択的に核酸を濃縮する。キット又は装置は、下記の測定及び定量化を可能にする：i) インサイトで標本にハイブリッド形成した標識プローブの量、又はii) プローブそのもの又はプライマーに結合したレポーターの特異的物理化学的特性に基づく方法による、プライマーベースの増幅産物の量。

10

【0129】

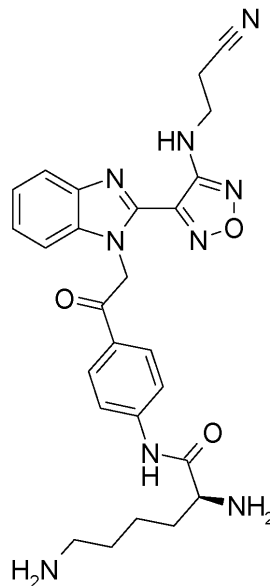
さらに、装置は、測定シグナルをさらに処理し、これらを比較測定基準のスケールに変換する撮像装置又は測定装置（例えば、非限定的に、蛍光の測定）を含んでもよい。

【0130】

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。したがって、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

【0131】

キットの特に好ましい実施態様においては、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

【0132】

本明細書において、語「含む(comprise)」又は「含む(comprises)」又は「含む(comprising)」は、規定の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】

【0133】

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

50

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。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-チューブリン抗体(Sigma、1:2000)と室温で1時間インキュベートした。数回の洗浄工程の後、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。

【0134】

siRNAトランスフェクション

BUBR1が、耐性のバイオマーカーであることを示すために、siRNA実験を実施した。腫瘍細胞表現型及び数に対する効果を評価するためのsiRNA実験(図8)のために、HeLa(ATCC参照番号CCL-2)子宮頸癌細胞を、10% FCS(Invitrogen)を含むDMEM中、37℃及び5% CO₂で培養した。1ウェルあたり1000 HeLa細胞を、ブラック384ウェルマルチタイタープレート(BD Falcon)に播種した。細胞を、20nM非標的コントロールsiRNA(ON-Target-plus non-targeting pool D001810, Dharmacon)で、又は4種類のBUBR1のsiRNA(ON-Target-plus Smartpool L-004101, Dharmacon、下記の配列情報を参照のこと)の混合物で、Dharmafect1(Dharmacon, Thermo)トランスフェクション試薬を用いて、逆トランスフェクションした。細胞播種及びsiRNAトランスフェクションから48時間後、siRNAクローンの1つの同型ペアをBAL27862(50nM、0.1% DMSO)で、及び別の同型ペアをコントロール溶液(0.1% DMSO)で24時間処置した。実験は、メタノール-ベースの固定法(-20℃、5分間)により、そして続く-チューブリン(FITC標識、1:500、F2168、Sigma)及びアクチン(TRITC-ファロイジン、1:3000、P1951、Sigma)抗体ならびにHoe33342 DNA染色(1:8000、Sigma)を用いる免疫染色法(1時間、室温)により終了した。免疫染色法に基づき、処置細胞の形態を、多様性解析手法(BD Pathway 855蛍光顕微鏡; 20倍対物レンズ)を用いて、適切なソフトウェアで分析した。ウェルあたりの細胞の数もまた、核のHoe33342染色に基づいて算出した。これにより未処置(正常)表現型(%表示)を示している細胞の割合の計算も可能になった。

【0135】

イムノプロット法によるBUBR1発現レベルに対する効果、ならびにYO-PROアッセイ(図7、9、10及び11)、及びクリスタルバイオレットアッセイ(図12及び13)を用いる腫瘍細胞増殖及び生存率に対する効果を評価するためのsiRNA実験のために、細胞を適切な密度[HeLa(子宮頸癌細胞; ATCC参照CCL-2): 1ウェルあたり2.5E+04個の細胞(YO-PRO用)又は1ウェルあたり4.0E+04個の細胞(クリスタルバイオレット用)、H460(NSCLC細胞; ATCC参照HTB-177): 1ウェルあたり5.0E+04個の細胞、MCF-7(乳癌細胞; ATCC参照HTB-22): 1ウェルあたり2.4E+05個の細胞、Panc1(膵臓癌細胞、ATCC参照CRL-1469)及びHCT116(大腸癌細胞、ATCC参照CCL-247): 1ウェルあたり8E+04個の細胞]で6ウェルプレートに播種し、そして細胞をRPMI-1640又は10% FCS含有DMEM(完全培地)中、37℃及び5% CO₂で培養した。次の日、製造者の説明書に従って、H460、Panc1及びHCT116用にハイパーフェクト(Hiperfect)(Qiagen)、又はHeLa及びMCF-7用にリ

ポフェクタミン2000 (Lipofectamine 2000) (Invitrogen) を使用して、細胞を、4種類のBUBR1のsiRNAの混合物(ON-Target-plus Smartpool L-004101, Dharmacon、下記の配列情報を参照のこと)、4種類個別のBUBR1のsiRNA(ON-Target-plus Set of four upgrade LU-004101)又は非標的コントロールsiRNA(ON-Target-plus non-targeting pool D001810, Dharmacon)でトランスフェクトした。siRNAの最終濃度は、10nM(H460)又は20~30nM(HeLa)又は20nM(MCF-7、Pancl、HCT116)であった。細胞を37及び5%CO₂で24時間維持した後、48時間の化合物処理、続くYO-PRO分析、クリスタルバイオレットアッセイ又はイムノプロットアッセイのための抽出が続いた。ON-Target-plus siRNAは、両鎖(dual-strand) siRNAであり、所望の標的に対する特異性を向上させるために化学的に修飾されている。

10

【0136】

用いた4種類のBUBR1のsiRNAの配列は下記であった：

【化22】

ON-TARGETplus BUBR1 siRNA #1 SEQ ID. No. 3

5' GAUGGUGAAUUGUGGAAUA

ON-TARGETplus BUBR1 siRNA #2 SEQ ID. No. 4

5' GAAACGGGCAUUUGAAUAU

ON-TARGETplus BUBR1 siRNA #3 SEQ ID. No. 5

5' GCAAUGAGCCUUUGGAUAU

ON-TARGETplus BUBR1 siRNA #4 SEQ ID. No. 6

5' CAAUACAGCUUCACUGAUA

20

30

【0137】

siRNA - 処置細胞のYO-PROアッセイ

DMSOに溶解したBAL27862を、完全培地中で希釈した後、表示した濃度(最終濃度DMSO 0.5%)で細胞に添加した。細胞を48時間インキュベートし、続いてYO-PRO分析をした。

【0138】

YO-PRO(登録商標)-1ヨウ化物は、細胞の生存能に干渉することなく、死亡(例えばアポトーシス)細胞の分析を可能にする、膜不浸透性、蛍光性、単量体のシアニン、核酸染色である。

40

【0139】

YO-PRO(登録商標)-1ヨウ化物(491/509)(Invitrogen/Molecular Probes, #Y-3603; DMSO中1mM)12.5µLを、5倍濃縮YO-PRO緩衝液(100mM Na-クエン酸、pH4.0; 134mM NaCl)1mLに加えて、YO-PRO混合物を生成した。細胞毒性/アポトーシスの決定のため、1ウェルあたりYO-PRO混合物500µLを、6ウェルプレート(希釈1:5)に加え、暗所にて室温で10分間インキュベートした。細胞へのYO-PRO色素の取り込みを、SpectraMax M2[®]プレートリーダー(Molecular Devices)を使用し、励起485nm及び発光538nm(カットオフ530nmで)を用いて評価した。細胞成長

50

ノ全細胞数に対する総合的効果の決定のため、1ウェルあたり溶解緩衝液(30mM EDTA; 30mM EGTA; 0.6% NP-40; 0.33倍YO-PRO緩衝液中)500 μ Lを加え、暗所にて室温で30分間インキュベートした。蛍光読み取りを、SpectraMax M2[®]プレートリーダー(Molecular Devices)で、励起485nm及び発光538nm(カットオフ530nmで)を用いて実施した。死細胞の百分率は、全残存細胞数の百分率として算出した。

【0140】

siRNA - 処置細胞のクリスタルバイオレットアッセイ

細胞を、完全培地で希釈したDMSO又はBAL27862(最終DMSO濃度0.5%)で48時間インキュベートした。培地を除去した後、細胞を固定し、そして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)1mL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)2mLを加え、そしてプレートを振盪することにより染色液を溶解した。SpectraMax M2[®]プレートリーダー(Molecular Devices)を使用して590nmでの吸光度を測定した。出発細胞の数を差し引くために、化合物を加えた同じ日にコントロールプレートを固定しそして染色した。最終結果は、出発細胞の吸光度を、コントロール(DMSO)又は化合物処理細胞の吸光度から差し引いて算出した。0より少ない値は細胞死を示す。

10

20

【0141】

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ティングした。0.4%寒天を含有する培地0.2mL中の $2.0 \times 10^4 \sim 6.0 \times 10^4$ 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0.2mL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 $^{\circ}$ C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、元気な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。

30

【0142】

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。

【0143】

定量的リアルタイムPCR

HeLa子宮頸癌及びH460 NSCLC(ATCC、参照番号HTB-177)細胞を、細胞が80%コンフルエンスに到達するまで10cm²-皿で成長させ、続いてトリプシン処置、ペレット成形、そしてTrizol試薬(Invitrogen)1mL中で再懸濁を行った。全RNAを、製造者の使用説明書に従って単離した。リアルタイムPCRは、ABI Prism 7000 Sequence Detection Systemを使用して、TaqMan RNA-to-Ct 1-step kit(Applied Biosystems、参照番号4392938)及び遺伝子発現アッセイ(Applied Biosystems)を用い、1反応あたりRNA 100ngで実施した。下記の遺伝子発現アッセイを用いた: BUBR1の定量化のためのアッセイID Hs01084828_m1、又は18S-RNAの定量化のためのアッセイID HS99999901_s1。全ての試料を3連で分析した。データ分析は、SDSソフトウェア(Applied Biosystems)を使用して実施した。BUBR1発現レベルを、18S-RNAに正規化した。

40

【0144】

50

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耐性垂系株を、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。耐性垂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。

【0145】

細胞を96ウェルプレートに以下の密度: 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ピンプラスチン (最終濃度DMSO max. 0.5%) と72時間インキュベートした。培地を除去した後、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) 50μL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 (pH 7.5)、0.2% SDS、20%エタノール) 100μLを加え、そしてプレートを振盪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で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。

【0146】

タンパク質抽出

腫瘍細胞抽出: 細胞を、1mMのフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSE) を含有する氷冷PBSで、ならびに50mMのHEPES (pH 7.5)、150mMのNaCl、25mMのグリセロリン酸塩、25mMのNaF、5mMのEGTA、1mMのEDTA、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 (10μg/mL)、アプロチニン (10μg/mL) 及び1mMのフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSE) を含有する氷冷緩衝液で洗浄した。1% NP-40を含有する同じ緩衝液中に、細胞を抽出した。ホモジナイズした後、溶解物を遠心分離により清澄化し、-80℃で凍結した。

【0147】

イムノプロット法/ウエスタンプロット法

1レーンあたり総タンパク質20μgを使用して、イムノプロット法を実施した。総タンパク質濃度は、BCA Protein Assay (Pierce) で決定した。タンパク質を7.5% SDSゲルで分離し、半乾式プロットングを用いてPVDフメンブランに転写した (90分間、50mA/ゲル)。イムノプロット法に使用する一次抗体は以下のとおりである:

【0148】

BUBR1 Ab .No 1: BUBR1_{CS} (Cell Signaling Technology, Incから入手、参照番号4116)、起源: ウサギ、ポリクローナル、1:1000希釈、緩衝液条件: PBS / 0.1% Tween中5% ミルク。

【0149】

BUBR1 Ab .No 2: BUBR1_{BD} (BD Transduction Laboratoriesから入手、参照番号612502)、起源: 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。

【0150】

- チューブリン: (Sigmaから入手、参照番号T5168)、起源: マウス、モノクローナル、1:10000希釈、緩衝液条件: PBS / 0.1% Tween中5% ミルク又は

10

20

30

40

50

3% BSA。

【0151】

アクチン：(Chemiconから入手、参照番号MAB1501)、起源：マウス、モノクローナル、1：5000希釈、緩衝液条件：PBS/0.1% Tween中5%ミルク又は3% BSA。

【0152】

イムノプロット法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。

10

【0153】

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：

【0154】

【表6】

連続処理	期間(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

20

30

【0155】

約2µm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、5mg/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：

40

【表 7】

抗体の詳述	処理
抗 BubR1、BD Transduction Lab、# 612503、マウス Mab	Roche の緩衝液 1 で 30 分間の細胞の調整、1 : 200 の希釈で、37℃で 32 分間の抗体インキュベーション

10

【0156】

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

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 細胞、HeLa 細胞及び 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崩壊が起こり、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化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。

20

【0157】

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

【0158】

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 (図 6) と併用して試験した。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; 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、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 時間併用処置したところ、観察される微小管表現型に影響を及ぼさず、その表現型は、BAL27862 による処置と一致した。

30

【0159】

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。

【0160】

本発明の詳細な実施例

実施例 3： BUBR1 発現の siRNA - 介在ダウンレギュレーションは、BAL27862 処置によって誘発された抗増殖性効果及び腫瘍細胞死を抑制する

4 種類の BUBR1 の siRNA のプールを使用して、イムノプロット分析 (BUBR1 Ab . No. 1 及び 2 の両方を用いる) により、BUBR1 発現のダウンレギュレーションは、HeLa 子宮頸部腫瘍及び H460 NSCLC 細胞株の両方において非常に効果的であることが示された (図 7)。

40

【0161】

驚くべきことに、BAL27862 の存在下での HeLa 細胞数及び正常な表現型を有する HeLa 細胞の割合に対するプールした BUBR1 の siRNA 処置の効果の分析に

50

よると、BUBR1が最適な効果のために必要であることを示した(図8)。YO-PROアッセイを用いて、HeLa細胞増殖及び生存率に対するBUBR1発現の減少の効果のさらなる分析によると、BUBR1発現そのものの欠損は、増殖速度において僅かな減少を引き起こしたが、BAL27862の抗増殖性効果は、劇的に減少したことを示した(図9、上のパネル)。さらにBAL27862 - 処置コントロールの数と比べて、観察された腫瘍細胞死の増加はみられなかった(図9、下のパネル)。

【0162】

H460(図10)及びMCF7乳癌細胞(図11)の処置の後で同じ観察が見られたので、この効果は、細胞株又は腫瘍 - タイプ - 特異的でないことが示された。さらに、細胞増殖(クリスタルバイオレットアッセイ)を分析する代替方法を用いて、同じ効果が、HeLa、ならびに膵臓(Panc1)及び大腸癌(HCT116)細胞(図12)においても同様に観察された。

10

【0163】

図7~12で示された実験のために用いられたBUBR1のsiRNAプールの特異性を制御するために、プール内に含まれている個別のsiRNAも同様に評価した。すべての個別のsiRNAでの処置により、BAL27862の細胞増殖に対する効果は減少した(クリスタルバイオレットアッセイにより分析したように)(図13A)。重要なことには、減少の程度が、各個別のsiRNAによって引き起こされたBUBR1タンパク質ダウンレギュレーションの効率と関連していることであった(図13Aと13Bを比較された)。

20

【0164】

実施例4: BUBR1発現のダウンレギュレーションは、BAL27862耐性のために選択された腫瘍株において観察される

【0165】

BAL27862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IC₅₀測定に基づく): A549(3.0倍); SKOV3耐性1(7.6倍); SKOV3耐性2(11.6倍); H460(5.3倍)(表1)。

【0166】

【表8】

30

表1:

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
ビンブラスチン	2.3	4.6	15.7	17.8
パクリタキセル	0.06	0.3	0.4	0.5

40

【0167】

一般的に、これらのBAL27862耐性細胞は、他の微小管不安定化剤、例えば、コルヒチン、ノコダゾール及びビンブラスチンに対して、BAL27862とは異なるレベルの応答を示し;そして、全ての株で、微小管不安定化剤のパクリタキセルに対する感受性が実際に増加したことが観察された(表1)。

【0168】

これらの株の抽出及びイムノプロット分析(BUBR1 Ab.No.2、マウスモノクロ

50

ナールを用いて)により、親株と比較して、BUBR1タンパク質の発現の減少を示した(図14)。これは、SKOV3細胞では耐性発現を通して維持された(図15)。これらのデータから、BUBR1発現レベルの減少とBAL27862に対する獲得耐性の関連性が示される。

【0169】

実施例5：低いBUBR1の発現レベルとBAL27862処置に耐性の患者由来の腫瘍細胞の関連性

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胃癌及び肺癌から同定した(表2を参照)。コントロールに対して70%の成長阻害が観察された濃度(IC₇₀)を表2に示す。この表では、BAL27862に感受性の腫瘍細胞は、低いナノモル範囲のIC₇₀値を有するが、BAL27862に耐性の腫瘍細胞は、IC₇₀値>600ナノモルと確定される。同じex vivoアッセイを使用したパクリタキセル及びビンブラスチンのデータはまた、すべての腫瘍モデルで利用できた。全てが、パクリタキセルによる処置に耐性であったが、全ては、ビンブラスチンによる処置に感受性であった。

【0170】

【表9】

表2：

腫瘍タイプ		感受性(S)／耐性(R)		
		BAL27862	パクリタキセル	ビンブラスチン
胃	GXF251	S	R	S
	GXF97	R	R	S
肺	LXFL529	S	R	S
	LXFA629	R	R	S

【0171】

異種移植片として維持した同じ腫瘍における腫瘍細胞BUBR1タンパク質発現を測定するために、免疫組織化学分析を実施した。全腫瘍BUBR1のレベルの分析は、BUBR1のレベルが異なる腫瘍間で異なっことを示した(図16)。

【0172】

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ビンブラスチン耐性と、低いBUBR1発現レベルとの関連性は認められなかった。これは、胃腫瘍タイプでは、両方のモデルがパクリタキセルに耐性であって、さらにGXF97のBUBR1のレベルがGXF251よりも明らかに低かったことから明白である。これらの腫瘍の両方がビンブラスチンに感受性であったことから、同じ関連性の欠如は、胃モデルのピンカアルカロイド、ビンブラスチンの場合にも当てはまった。この関連性の欠如は、肺腫瘍モデルにおいても同じであった。したがって、BUBR1のレベルは、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ビ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。

【0173】

それにひきかえ、驚くべきことに、BAL27862耐性データ(コロニー成長アッセイにより定義されている)をBUBR1のレベルと比較した場合、BUBR1発現は、耐性腫瘍においてのみ、より低く、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た(図16と表2とを比較されたし)。そのため、低いBUBR1のレベルは、BAL27862に対する耐性を一貫して示した。したがって、BUBR1のレベルは、本発明の化合物であるBAL27862に対する耐性のバイオマーカーであること

が示された。

【0174】

実施例6： BUBR1 RNA発現レベル vs タンパク質発現レベル

BUBR1 RNA発現レベルがタンパク質発現レベルを反映していることを示すために、BAL27862に対する耐性の予測においてRNA発現レベルを用いることができるので、発現レベルを、RNAレベル及びタンパク質レベルの両方について以下のように測定した。全細胞抽出タンパク質を、HeLa及びH460細胞株から調製し、そしてBUBR1タンパク質発現についてイムノプロットにより分析した(図17B)。RNA試料を同じ細胞継代から調製し、そして定量的RT-PCRを実施した(図17A)。イムノプロットデータ(図17B)とRT-PCRデータ(図17A)との比較は、これらの株中のBUBR1についてタンパク質発現レベルとRNA発現レベルとの間には良好な相関関係があることを示した。

【0175】

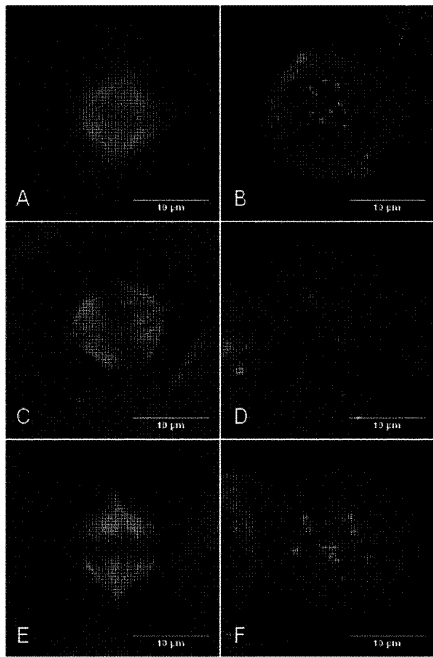
略語のリスト

A549	ヒト非小細胞肺癌細胞株	
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	20
CCD	電荷結合素子	
cDNA	相補的デオキシリボ核酸	
CA-125	癌抗原125	
CREST	局限性強皮症	
DAB	3,3-ジアミノベンジジン	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
DMEM	ダルベッコ変法基本培地	
DNA	デオキシリボ核酸	
dUTP	2'-デオキシウリジン5'-三リン酸	
EDTA/EGTA	エチレンジアミン四酢酸/エチレングリコール-ビス(-ア	30
ミノエチル)-N,N,N',N'-四酢酸		
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	
EtOH	エタノール	
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	
GXF251	患者由来の胃腫瘍	
GXF97	患者由来の胃腫瘍	
HCT116	ヒト結腸直腸癌細胞株	40
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-エタンスルホン酸	
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	
IgA	免疫グロブリンA	
IgG	免疫グロブリンG	
IHC	免疫組織化学	
ISET	上皮性腫瘍細胞のサイズによる単離	50

L X F A 6 2 9	患者由来の肺癌細胞	
L X F L 5 2 9	患者由来の肺癌細胞	
M A L D I	マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化質量分析法	
M A L D I - T O F	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	
M C F - 7	ヒト乳癌細胞株	
m R N A	メッセンジャーリボ核酸	
M T S	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) - 2 H - テトラゾリウム		
N a C l	塩化ナトリウム	10
N a F	フッ化ナトリウム	
N C B I	国立生物工学情報センター	
N S C L C	非小細胞肺癌	
N P 4 0	ノニデット P 4 0	
N T C	テンプレート以外のコントロール反応液	
P B S	リン酸緩衝生理食塩水	
P C R	ポリメラーゼ連鎖反応	
P - g p	P - 糖タンパク質	
P M S F	フッ化フェニルメチルスルホニル	
P S A	前立腺特異的抗原	20
P V D F	フッ化ポリビニリデン	
R A N O	高悪性度グリオーマの応答評価	
R E C I S T	固形腫瘍の応答評価基準	
R E A D S	分解 c D N A の制限酵素増幅	
R P M I - 1 6 4 0	トランスフォーム及び非トランスフォーム真核細胞及び細胞株	
の培養に使用される細胞培養培地		
R T - P C R	リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応	
S A G E	遺伝子発現の連続分析 (S A G E 法)	
S D S	ドデシル硫酸ナトリウム	
S E L D I	表面増強レーザー脱離 / イオン化質量分析法	30
S E L D I - T O F	表面増強レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析法	
S E Q . I D N o .	配列識別番号	
s i R N A	低分子阻害性リボ核酸	
S K B R 3	ヒト乳癌細胞株	
S K O V 3	ヒト卵巣癌細胞株	
T U N E L	末端デオキシヌクレオチド転移酵素 d U T P ニック末端標識法	
T X - 1 0 0	T r i t o n - X 1 0 0	
Y O - P R O	シアニンモノマー核酸蛍光染色	

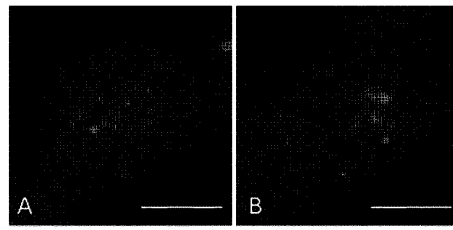
【 図 1 】

Figure 1



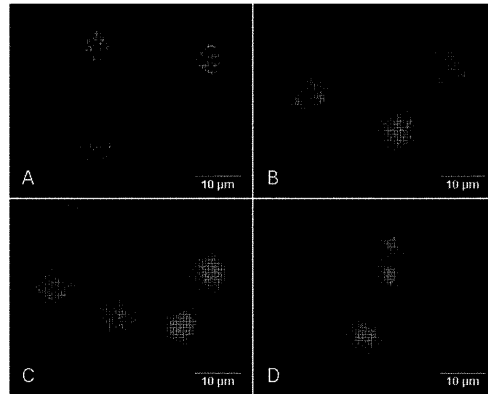
【 図 2 】

Figure 2



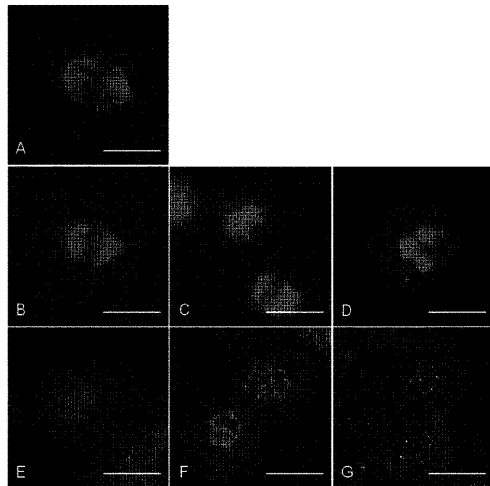
【 図 3 】

Figure 3



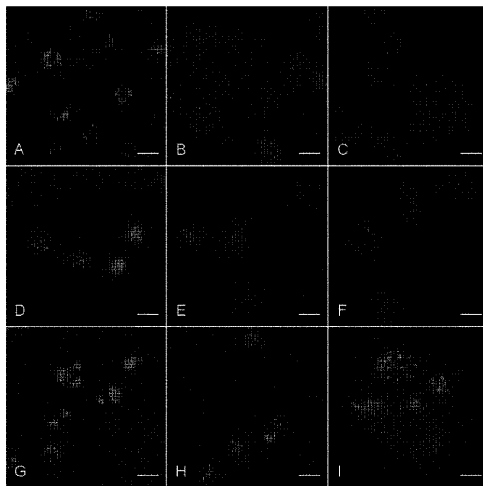
【 図 4 】

Figure 4



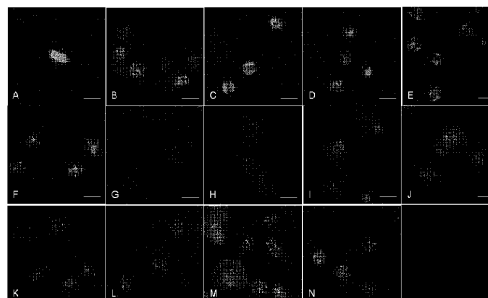
【 図 5 】

Figure 5



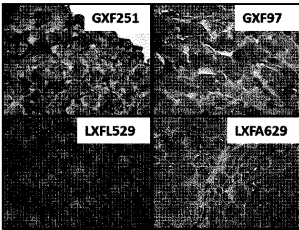
【 図 6 】

Figure 6:

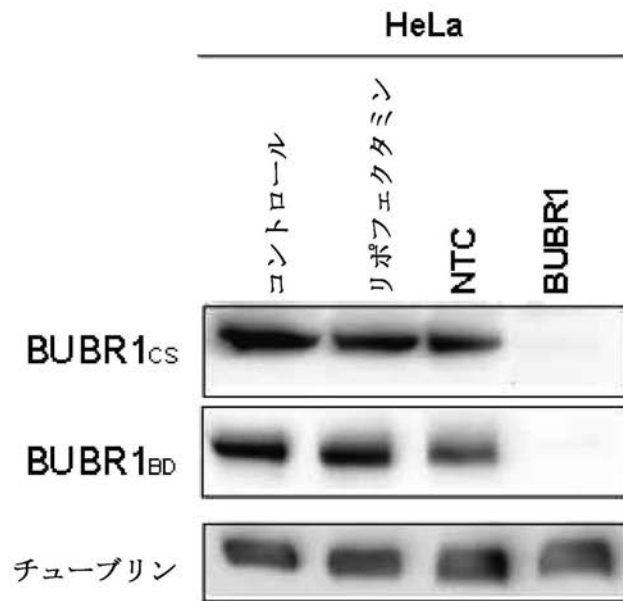


【 図 16 】

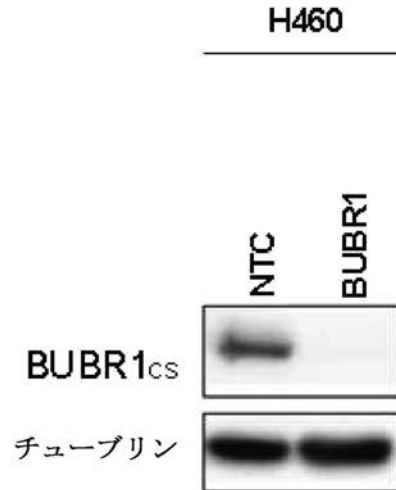
Figure 16



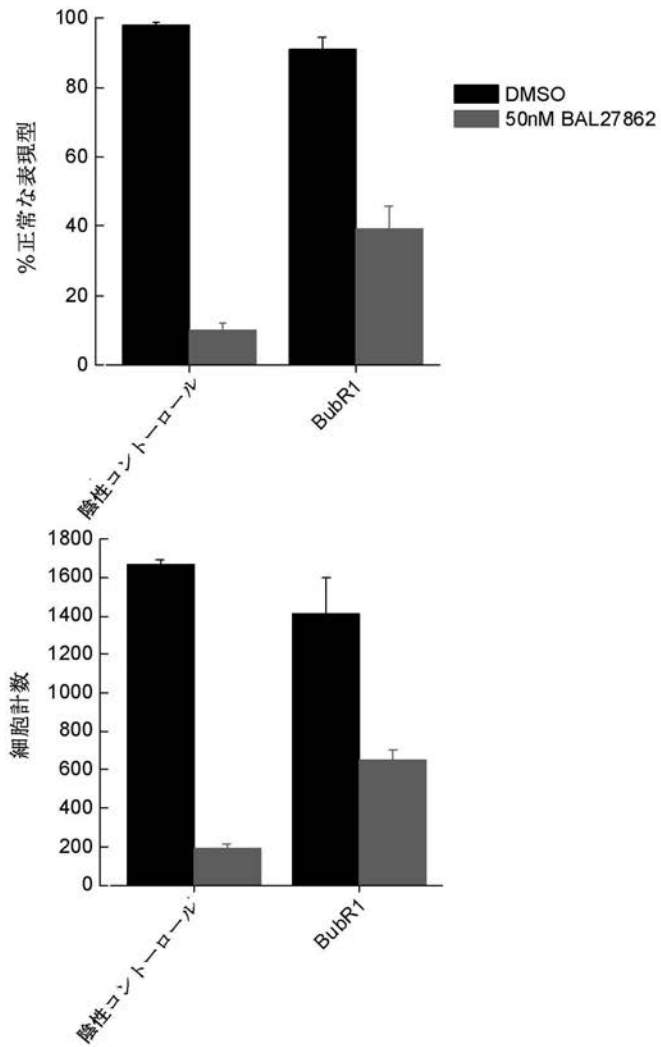
【 図 7 A 】



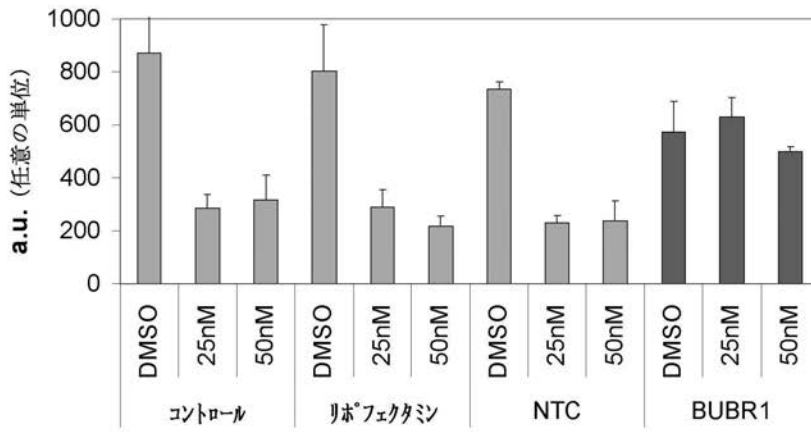
【 図 7 B 】



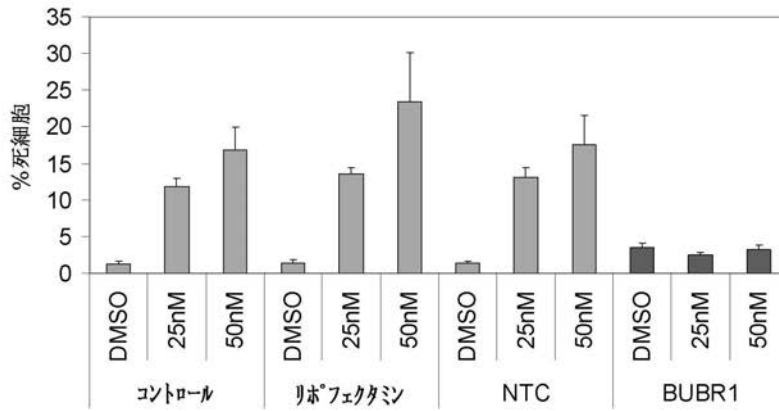
【 図 8 】



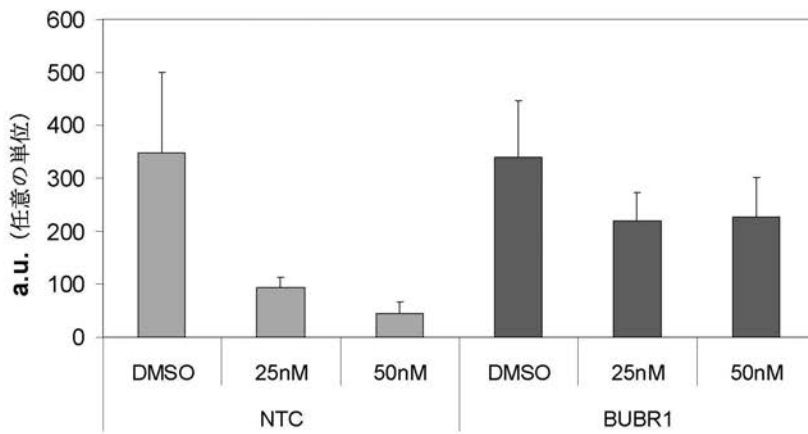
【 図 9 A 】



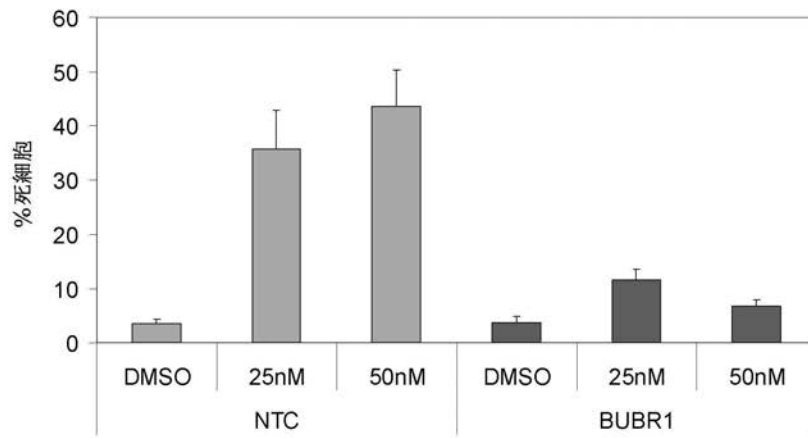
【 図 9 B 】



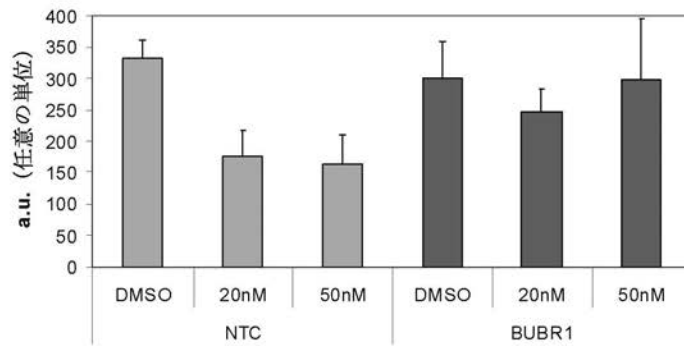
【 図 10 A 】



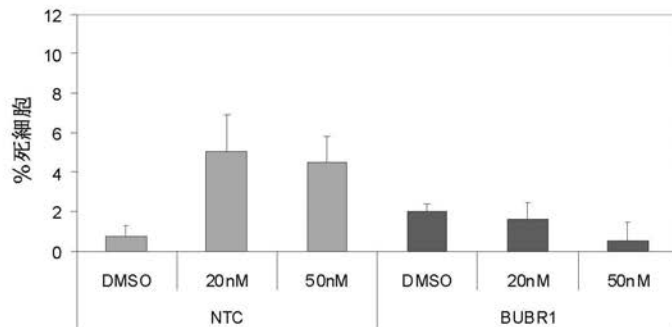
【 図 1 0 B 】



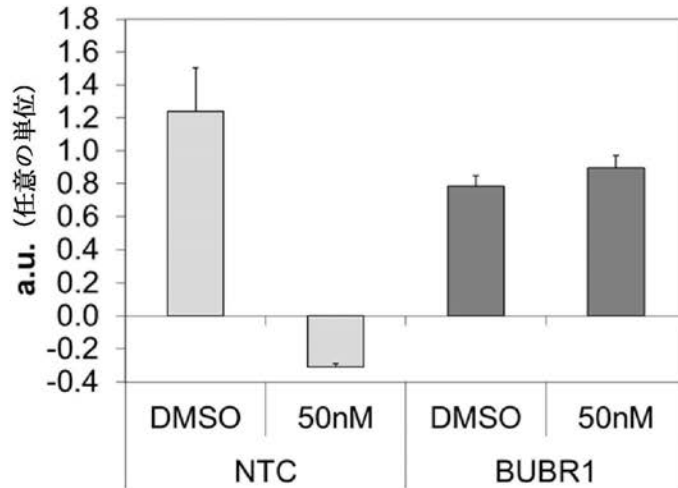
【 図 1 1 A 】



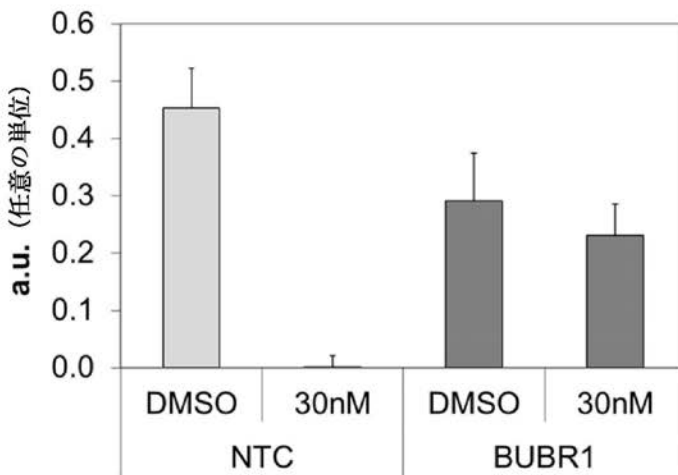
【 図 1 1 B 】



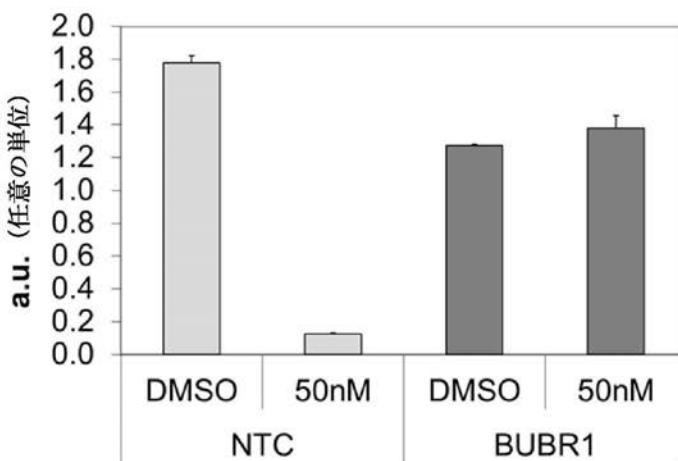
【 図 1 2 A 】



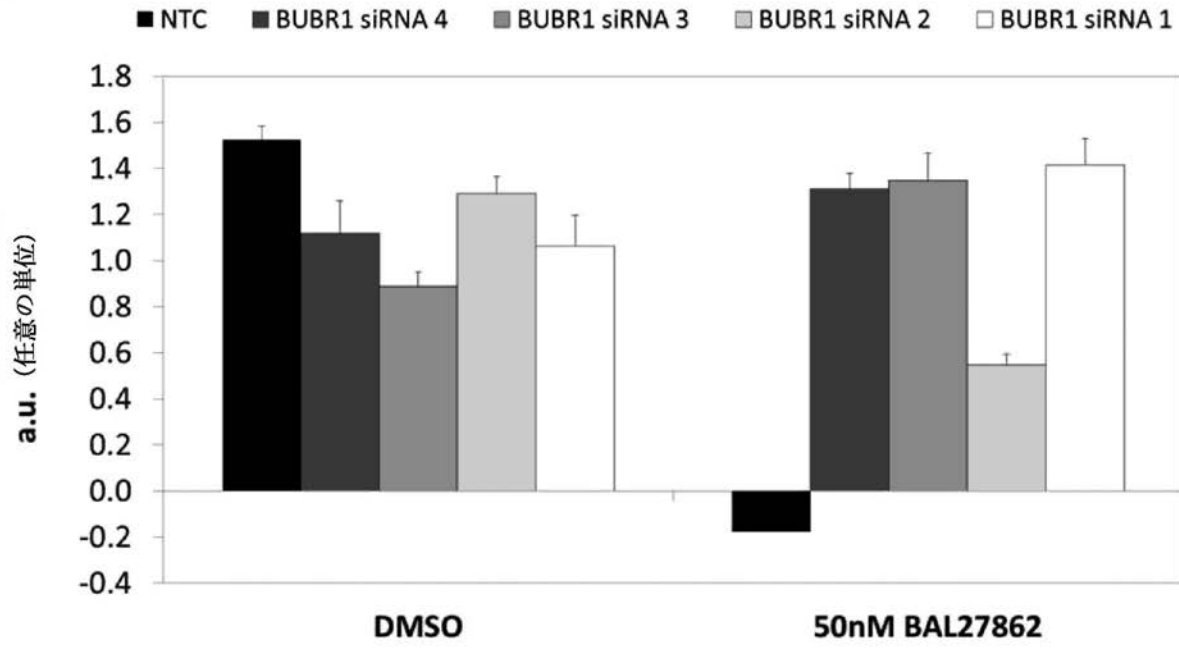
【 図 1 2 B 】



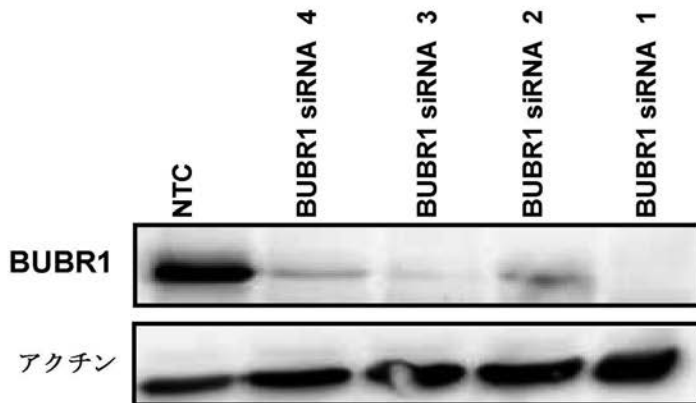
【 図 1 2 C 】



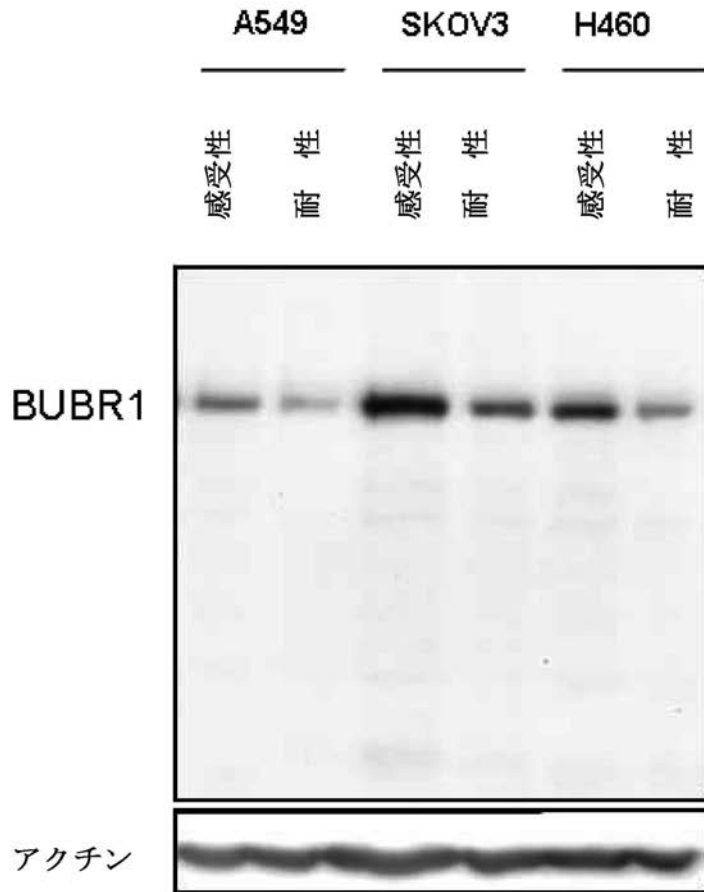
【 図 1 3 A 】



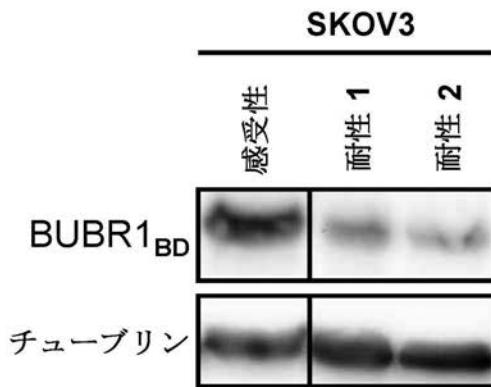
【 図 1 3 B 】



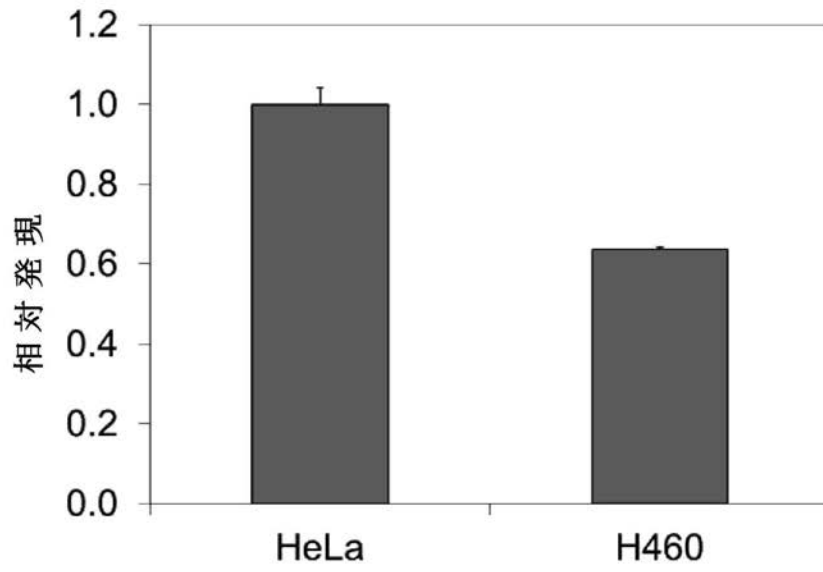
【 図 1 4 】



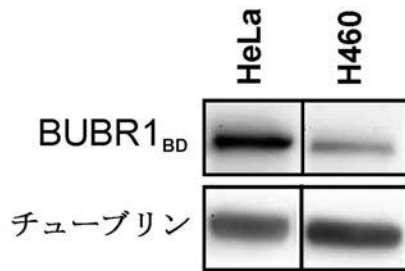
【 図 1 5 】



【図17A】



【図17B】



【 図 1 8 】

BUBR1 タンパク質配列 [ヒト] (SEQ. ID. NO. 1)

1 maavkkegga lseamslegd ewelskenvq plrqgrimst lqgalaqesa cnntlqqqkr
61 afeyeirfyt gndpldvdr yiswteqnyq qggkesnmst lleravealq gekryysdpr
121 flnlwklgr lcnepldmys ylhngqigvs laqfyiswae eyearenfrk adaihqegiq
181 qkaeplerlq sqhrqfqrav srqtllalek eeeeevfess vpqrstlael kskgkktara
241 piirvggalk apsqnrglqn pfpqqmqnns ritvfdnad eastaelskp tvqpwappm
301 prakenelqa gpwntgrsle hrprgntasl iavpavlpsf tpyveetaaq pvmtpckiep
361 sinhilstrk pgkeegdplq rvqshqqase ekkekmmmyck ekiyagvgef sfeeiraevf
421 rkkkkeqrea elltsaekra emqkqieeme kklkeiqttq qertgdqqee tmptkettkl
481 qiasesskip gmtlsssvcq vnccaretsl aeniwqepph skgpsvpfsi fdefllsekk
541 nksppadppr vlaqrrplav lktsesitsn edvspdvcode ftgieplsed aaitgfrnvt
601 icpnpedtcd faraarfvt pfheimslkd lpsdperllp eedldvktse dqqtacgtiy
661 sqtllsikkls piiedsreat hssgfsqssa svastssikc lqipeklelt netsenptqs
721 pwcsqyrrql lkslpelsas aelciedrpm pkleieekeie lgnedycikr eylicedykl
781 fwvaprnasae ltvikvssqp vpwdfyink lkerlnedfd hfcscyqqd gcivwhqyin
841 cftlqdllqh seyitheitv liiynlltiv emlhkaeivh gdlsprclil rnrihdpdc
901 nknnqalkiv dfsysvdlrv qldvftlsgf rtvqilegqk ilancsspyq vdlfgiadla
961 hlllfkehlq vfdgswfwkl sqniselkdg elwnkffvri lnandeatvs vlgelaaemn
1021 gvfdttfqsh lnkalwkvk ltspgallfq

【図 19 - 1】

BUBR1 核酸配列 [ヒト] (SEQ. ID. NO. 2)

```
1 aggggcgtgg ccacgtcgac cgcgcgggac cgttaaattt gaaacttggc ggctaggggt
61 gtgggcttga ggtggccggt ttgttaggga gtcgtgtacg tgccttggtc gcttctgtag
121 ctccgagggc aggttgcgga agaaagccca ggcggtctgt ggcccagagg aaaggcctgc
181 agcaggacga ggacctgagc caggaatgca ggatggcggc ggtgaagaag gaaggggggtg
241 ctctgagtga agccatgtcc ctggagggag atgaatggga actgagtaaa gaaaatgtac
301 aacctttaag gcaagggcgg atcatgtcca cgcttcaggg agcactggca caagaatctg
361 cctgtaacaa tactcttcag cagcagaaac gggcatttga atatgaaatt cgattttaca
421 ctggaaatga ccctctggat gtttgggata ggtatatcag ctggacagag cagaactatc
481 ctcaaggtgg gaaggagagt aatatgtcaa cgttattaga aagagctgta gaagcactac
541 aaggagaaaa acgatattat agtgatcctc gatttctcaa tctctggctt aaattagggc
601 gtttatgcaa tgagcctttg gatatgtaca gttacttgca caaccaaggg attggtgttt
661 cacttgctca gttctatata tcatgggcag aagaatatga agctagagaa aactttagga
721 aagcagatgc gatatttcag gaagggatc aacagaaggc tgaaccacta gaaagactac
781 agtcccagca ccgacaattc caagctcgag tgtctcggca aactctgttg gcacttgaga
841 aagaagaaga ggaggaagtt tttgagtctt ctgtaccaca acgaagcaca ctagctgaac
901 taaagagcaa agggaaaaag acagcaagag ctccaatcat ccgtgtagga ggtgctctca
961 aggtccaag ccagaacaga ggactccaaa atccatttcc tcaacagatg caaaataata
1021 gtagaattac tgtttttgat gaaaatgctg atgaggcttc tacagcagag ttgtctaagc
1081 ctacagtcca gccatggata gcacccccca tgcccagggc caaagagaat gagctgcaag
1141 caggcccttg gaacacaggc aggtccttgg aacacaggcc tcgtggcaat acagcttcac
1201 tgatagctgt acccgctgtg cttcccagtt tcactccata tgtggaagag actgcacaac
1261 agccagttat gacaccatgt aaaattgaac ctagtataaa ccacatccta agcaccagaa
1321 agcctggaaa ggaagaagga gatcctctac aaagggttca gagccatcag caagcgtctg
1381 aggagaagaa agagaagatg atgtattgta aggagaagat ttatgcagga gtaggggaat
1441 tctccttga agaaattcgg gctgaagttt tccggaagaa attaaaagag caaaggggaag
1501 ccgagctatt gaccagtgca gagaagagag cagaaatgca gaaacagatt gaagagatgg
1561 agaagaagct aaaagaaatc caaactactc agcaagaaag aacaggtgat cagcaagaag
1621 agacgatgcc taaaaggag acaactaaac tgcaaattgc ttccgagtct cagaaaatac
1681 caggaatgac tctatccagt tctgtttgtc aagtaaactg ttgtgccaga gaaacttcac
1741 ttgcgagaaa catttggcag gaacaacctc attctaaagg tcccagtgta ctttctcca
1801 tttttgatga gtttcttctt tcagaaaaga agaataaaag tcctcctgca gatccccac
1861 gagttttagc tcaacgaaga ccccttgagc ttctcaaac ctcagaaagc atcacctcaa
1921 atgaagatgt gtctccagat gtttgtgatg aatttacagg aattgaacc ttgagcgagg
1981 atgccattat cacaggcttc agaaatgtaa caatttgtcc taaccagaa gacacttgtg
2041 actttgccag agcagctcgt tttgtatcca ctcttttca tgagataatg tccttgaagg
2101 atctcccttc tgatcctgag agactgttac cggagaaga tctagatgta aagacctctg
2161 aggaccagca gacagcttgt ggcactatct acagtcagac tctcagcatc aagaagctga
2221 gcccaattat tgaagacagt cgtgaagcca cacactcctc tggttctctt ggttcttctg
```

【 図 19 - 2 】

2281 cctcggttgc aagcacctcc tccatcaaat gtcttcaaat tcctgagaaa ctagaactta
 2341 ctaatgagac ttcagaaaac cctactcagt caccatgggtg ttcacagtat cgcagacagc
 2401 tactgaagtc cctaccagag ttaagtgcct ctgcagagtt gtgtatagaa gacagaccaa
 2461 tgcctaagtt ggaaattgag aaggaaattg aattaggtaa tgaggattac tgcattaaac
 2521 gagaatacct aatatgtgaa gattacaagt tattctgggtt ggcgccaaga aactctgcag
 2581 aattaacagt aataaaggta tcttctcaac ctgtcccatg ggacttttat atcaacctca
 2641 agttaaagga acgtttaaat gaagattttg atcatttttg cagctgttat caatatcaag
 2701 atggctgtat tgtttggcac caatatataa actgcttcac ccttcaggat cttctccaac
 2761 acagtgaata tattacccat gaaataacag tgttgattat ttataacctt ttgacaatag
 2821 tggagatgct acacaaagca gaaatagtcc atggtgactt gagtccaagg tgtctgattc
 2881 tcagaaaacag aatccacgat ccctatgatt gtaacaagaa caatcaagct ttgaagatag
 2941 tggacttttc ctacagtgtt gacctagggt tgcagctgga tgtttttacc ctcagcggct
 3001 ttcggactgt acagatcctg gaaggacaaa agatcctggc taactgttct tctccctacc
 3061 aggtagacct gtttggata gcagatttag cacatttact attgttcaag gaacacctac
 3121 aggtcttctg ggatgggtcc ttctggaaac ttagccaaaa tatttctgag ctaaaagatg
 3181 gtgaattgtg gaataaatc tttgtgcgga ttctgaatgc caatgatgag gccacagtgt
 3241 ctgttcttgg ggagcttga gcagaaatga atggggtttt tgacactaca ttccaaagtc
 3301 acctgaacaa agccttatgg aaggtaggga agttaactag tcctggggct ttgctctttc
 3361 agtgagctag gcaatcaagt ctcacagatt gctgcctcag agcaatgggtt gtattgtgga
 3421 aactgaaac tgtatgtgct gtaatttaat ttaggacaca tttagatgca ctaccattgc
 3481 tgttctactt tttggtacag gtatattttg acgtcactga tattttttat acagtgatat
 3541 acttactcat ggccttctct aacttttgtg aagaactatt ttattctaaa cagactcatt
 3601 acaaatgggtt accttgttat ttaaccatt tgtctctact tttccctgta cttttcccat
 3661 ttgtaatttg taaaatgttc tcttatgatc accatgtatt ttgtaaataa taaaatagta
 3721 tctgttaaat ttgtgcttct aaaaaaaaa

【 配列表 】

2014505877000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/050818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 A61K31/00 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	WO 2005/020794 A2 (UNIV TEXAS [US]; SYSMEX CORP [JP]; UENO NAOTO T [US]; ISHIHARA HIDEKI) 10 March 2005 (2005-03-10)	22,25
Y	the whole document in particular: claims 1,8,18,20 page 2, line 6 - line 20 page 31, line 30 - page 32, line 3	1-21,23, 24
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 ----- -/--	1-25
<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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/050818

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>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</p> <p>-----</p>	1-25
Y	<p>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</p> <p>-----</p>	1-25
X	<p>WO 98/56910 A1 (CHIRON CORP [US]; SEELEY TODD [US]) 17 December 1998 (1998-12-17) the whole document</p> <p>-----</p>	22,25
Y	<p>in particular: page 5, line 26 - line 28 page 32, line 20 - page 34, line 6 claim 4</p> <p>-----</p>	19-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/050818

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005020794 A2	10-03-2005	EP 1664076 A2	07-06-2006
		JP 2007503809 A	01-03-2007
		US 2005136177 A1	23-06-2005
		WO 2005020794 A2	10-03-2005

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		

WO 9856910 A1	17-12-1998	AU 7828698 A	30-12-1998
		EP 0983359 A1	08-03-2000
		JP 2002508658 A	19-03-2002
		WO 9856910 A1	17-12-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)		C 0 7 K 14/47		

(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 パッハマン, フェリクス

スイス国、ツェーハー - 4 0 5 5 バーゼル、ジューレンツァーシュトラッセ 1 6

(72)発明者 ブルルー, マドライナ

スイス国、ツェーハー - 4 0 5 3 バーゼル、ユラシュトラッセ 5 2

(72)発明者 プトロス, ミヒャエル

ドイツ国、6 9 1 2 0 ハイデルベルク、マルシュタルシュトラッセ 1 1

(72)発明者 ギルベルト, ダニエル

ドイツ国、6 9 1 1 5 ハイデルベルク、ガイスベルクシュトラッセ 6 4 アー

(72)発明者 ツァン, シャン

ドイツ国、6 9 1 2 1 ハイデルベルク、ハンス - トーマ - シュトラッセ 7 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA09 CA11 DA02 GA13 HA14

4C086 AA01 AA02 BC71 GA02 GA07 GA09 MA01 MA04 NA14 ZB08

ZB26

4H045 BA10 CA40 EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014505877A5	公开(公告)日	2015-03-12
申请号	JP2013549812	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 ブルルーマドライナ ブトロスミヒヤエル ギルベルトダニエル ツアンシャン		
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 ブルルー,マドライナ ブトロス,ミヒヤエル ギルベルト,ダニエル ツアン,シャン		
IPC分类号	G01N33/53 A61P35/00 A61P37/06 A61K31/4245 A61K31/4439 C12N15/09 C07K14/47		
CPC分类号	A61K31/4245 A61K31/4439 A61P35/00 A61P37/06 G01N33/5011 G01N33/5026 G01N2800/44 G01N2800/52 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57484 G01N33/57496 G01N2333/91205		
FI分类号	G01N33/53.D A61P35/00 A61P37/06 A61K31/4245 A61K31/4439 C12N15/00.ZNA.A C07K14/47		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/GA13 4B024 /HA14 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC71 4C086/GA02 4C086/GA07 4C086/GA09 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB08 4C086/ZB26 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50		
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	2011151677 2011-01-21 EP		
其他公开文献	JP6302673B2 JP2014505877A		

摘要(译)

BUBR1用作预测对化合物的反应的生物标志物的用途，优选对象中癌症如癌症的抗性，其中所述化合物是通式(1)的咪喃并苯并咪唑化合物。

