

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2005/075681

発行日 平成19年10月11日(2007.10.11)

(43) 国際公開日 **平成17年8月18日(2005.8.18)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 B	
	GO1N 33/53 Y	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

出願番号	特願2005-517829 (P2005-517829)	(71) 出願人	506137147 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ ジメント株式会社 東京都文京区小石川四丁目6番10号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/002091	(71) 出願人	000001915 メルシャン株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
(22) 国際出願日	平成17年2月4日(2005.2.4)	(74) 代理人	100087642 弁理士 古谷 聡
(31) 優先権主張番号	特願2004-69384 (P2004-69384)	(74) 代理人	100076680 弁理士 溝部 孝彦
(32) 優先日	平成16年3月11日(2004.3.11)	(74) 代理人	100091845 弁理士 持田 信二
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100098408 弁理士 義経 和昌

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗癌剤に対する癌細胞の感受性を検定する方法

(57) 【要約】

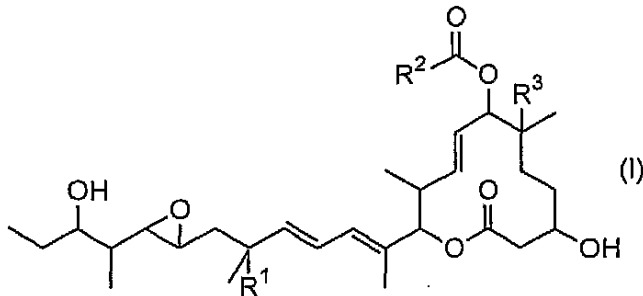
癌患者から生検等により採取した癌細胞に発現している分子を調べることにより、本化合物に対する癌細胞の感受性を調べることができれば、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者のみに、本化合物を投与することが可能となり、治療効果を高め不要な副作用を軽減できることが期待された。詳しくは、「pRB低発現」「p16発現陽性」「cyclinE高発現」という特徴が、癌細胞の本化合物に対する高感受性のマーカーとして有用であることが明らかとなり、癌細胞のこれら性質を調べることにより、本化合物に対する癌細胞の感受性を予め調べることが可能となった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

- 1) pRBの発現が減少している、
 - 2) p16が発現している、
 - 3) cyclin Eの発現が増強している、
 - 4) pRBの発現が減少しかつcyclin Eの発現が増強している、または
 - 5) p16が発現しかつcyclin Eの発現が増強している、の何れか一つを指標とする、下記一般式Iで表される化合物に対する癌細胞の感受性を検定する方法。
- 式(I)

10



20

[式中、R¹は

- 1) 水素原子または
- 2) 水酸基

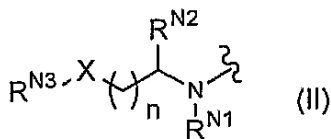
R³は

- 1) 水素原子、
- 2) 水酸基または
- 3) C₁-6 アルコキシ基

R²は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良いC₁-6 アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良いC₇-10 アラルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基
- 5) 式(II)

30



[式中、

A)

nは0ないし4の整数、

Xは

- i) -CHR^{N4}-、
- ii) -NR^{N5}-または
- iii) -O-

R^{N1}及びR^{N2}は同一または異なって、

i) 水素原子または

ii) C₁-6 アルキル基、R^{N3}及びR^{N4}は同一または異なって、

40

50

- i) 水素原子、
 - i i) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
 - i i i) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
 - i v) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルコキシ基、
 - v) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
 - v i) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
 - v i i) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
 - v i i i) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
 - i x) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、
 - x) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、
 - x i) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、
 - x i i) $-NR^{N6}R^{N7}$ (ここにおいて、 R^{N6} および R^{N7} は同一または異なっ
- て、水素原子または C_{1-6} アルキル基を表す) または
- x i i i) R^{N3} 及び R^{N4} が一緒になって結合する炭素原子と共に形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基 (該非芳香族複素環式基は置換基を有していても良い)、

R^{N5} は

- i) 水素原子、
- i i) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- i i i) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- i v) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- v) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- v i) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- v i i) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- v i i i) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、
- i x) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、
- x) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基または
- x i) R^{N3} 及び R^{N5} が一緒になって結合する窒素原子と共に形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基 (該非芳香族複素環式基は置換基を有していても良い)、

B)

X 、 n 、 R^{N3} 、 R^{N4} 及び R^{N5} は前記定義の基を表し、 R^{N1} 及び R^{N2} は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、

C)

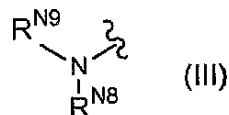
X 、 n 、 R^{N2} 、 R^{N4} 及び R^{N5} は前記定義の基を表し、 R^{N1} 及び R^{N3} は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基あるいは

D)

X 、 n 、 R^{N1} 、 R^{N4} 及び R^{N5} は前記定義の基を表し、 R^{N2} 及び R^{N3} は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]

または

6) 式 (III)



[式中、 R^{N8} 及び R^{N9} は同一または異なって、

- i) 水素原子、
- i i) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- i i i) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、

i v) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリアル基、
 v) 置換基を有していても良いC₇₋₁₀ アラルキル基または
 v i) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基を表す]
 を表す]

【請求項2】

R² が

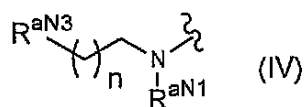
- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良いC₁₋₆ アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良いC₇₋₁₀ アラルキル基または
- 4) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基である請求項1

10
 に記載の検定方法。

【請求項3】

R² が下式式 (IV) で表される請求項1に記載の検定方法。

式 (IV)



[式中、nは0ないし4の整数、

R^{a N 1} は

20

- 1) 水素原子または
- 2) C₁₋₆ アルキル基、

R^{a N 2} は

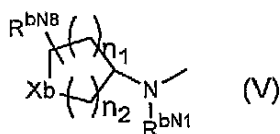
- 1) 水素原子
- 2) N-C₁₋₆ アルキルアミノ基、
- 3) N, N-ジC₁₋₆ アルキルアミノ基、
- 4) エチルメチルアミノ基、
- 5) ピリジル基、
- 6) ピロリジン-1-イル基、
- 7) ピペリジン-1-イル基、
- 8) モルホリン-4-イル基または
- 9) 4-メチルピペラジン-1-イル基を表す]

30

【請求項4】

R² が下式式 (V) で表される請求項1に記載の検定方法。

式 (V)



40

(式中、n₁ 及び n₂ は同一または異なって、0ないし4の整数、

X_b は

- 1) -CHR^{b N 4} -、
- 2) NR^{b N 5} -または
- 3) -O-

R^{b N 1} は

- 1) 水素原子または
- 2) C₁₋₆ アルキル基、

R^{b N 8} は

- 1) 水素原子、

50

- 2) C_{1-6} アルキル基、
- 3) C_{6-14} アリール基または
- 4) C_{7-10} アラルキル基、

R^{bN4} は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルコキシ基、
- 5) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、
- 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、

10

11) $-NR^{bN6}R^{bN7}$ (ここにおいて、 R^{bN6} および R^{bN7} は、同一または異なって、水素原子または C_{1-6} アルキル基を表す) または

- 12) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、

R^{bN5} は

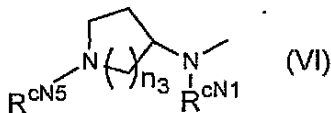
- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 5) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 6) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基または
- 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]

20

【請求項5】

R^2 が下記式 (VI) で表される請求項1に記載の検定方法。
式 (VI)

30



[式中、 n_3 は1または2の整数、

R^{cN1} は

- 1) 水素原子または
- 2) C_{1-6} アルキル基、

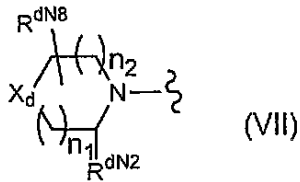
R^{cN5} は

- 1) 水素原子または
- 2) C_{1-6} アルキル基を表す]

40

【請求項6】

R^2 が下記式 (VII) で表される請求項1に記載の検定方法。
式 (VII)



(式中、 n_1 及び n_2 は同一または異なって、0 ないし 4 の整数、

X_d は

- 1) $-\text{CHR}^{\text{dN}^4}-$ 、
- 2) $-\text{NR}^{\text{dN}^5}-$ または
- 3) $-\text{O}-$ 、

10

R^{dN^2} は

- 1) 水素原子または
- 2) C_{1-6} アルキル基、

R^{dN^8} は

- 1) 水素原子、
- 2) C_{1-6} アルキル基、
- 3) C_{6-14} アリール基または
- 4) C_{7-10} アラルキル基、

20

R^{dN^4} は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルコキシ基、
- 5) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、

30

10) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基、
 11) $-\text{NR}^{\text{dN}^6}\text{R}^{\text{dN}^7}$ (ここにおいて、 R^{dN^6} 及び R^{dN^7} は同一または異な
 って、水素原子または C_{1-6} アルキル基を表す) または

12) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基、

R^{dN^5} は

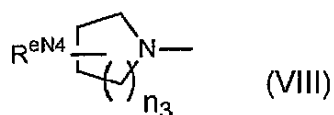
- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 5) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、
- 6) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基または
- 10) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基を表す]

40

【請求項 7】

R^2 が下記式 (VIIII) で表される請求項 1 に記載の検定方法。

式 (VIIII)



[式中、 n_3 は1ないし3の整数、

R^{eN^4} は

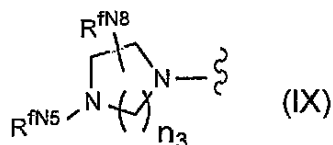
- 1) アミノ基、
- 2) $N-C_{1-6}$ アルキルアミノ基、
- 3) ピロリジン-1-イル基、
- 4) ピペリジン-1-イル基または
- 5) モルホリン-4-イル基を表す]

10

【請求項8】

R^2 が下記式 (IX) で表される請求項1に記載の検定方法。

式 (IX)



20

[式中、 n_3 は1ないし3の整数、

R^{fN^8} は

- 1) 水素原子、
- 2) C_{1-6} アルキル基、
- 3) C_{6-14} アリール基または
- 4) C_{7-10} アラルキル基、

R^{fN^5} は

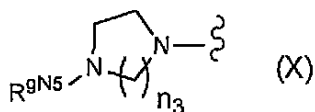
- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い3ないし8員環非芳香族複素環式基、
- 5) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い5員環ないし14員環ヘテロアラルキル基または
- 9) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基を表す]

30

【請求項9】

R^2 が下記式 (X) で表される請求項1に記載の検定方法。

式 (X)



40

[式中、 n_3 は1ないし3の整数、

R^{gN^5} は

50

- 1) 水素原子、
- 2) 置換されていてもよいC₁ - 6。アルキル基、
- 3) 置換されていてもよいC₃ - 8。シクロアルキル基、
- 4) 置換されていてもよいC₄ - 9。シクロアルキルアルキル基、
- 5) 置換されていてもよいC₇ - 11。アラルキル基、
- 6) 置換されていてもよいピリジル基または
- 7) 置換されていてもよいテトラヒドロピラニル基を表す]

【請求項10】

一般式 (I) で表される化合物が下記化合物の何れか一つの化合物である、請求項1に記載の検定方法。

10

- 1) (8E, 12E, 14E) - 7-アセトキシ-3, 6, 21-トリヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド
- 2) (8E, 12E, 14E) - 7-((4-シクロヘプチルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド、
- 3) (8E, 12E, 14E) - 3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-7-((4-イソプロピルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド及び
- 4) (8E, 12E, 14E) - 3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-7-((4-メチルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド

20

【請求項11】

pRBの発現の減少、p16の発現、またはcyclin Eの発現の増強を、それぞれをコードするmRNA量を測定することにより検定する、請求項1に記載の検定方法。

【請求項12】

mRNA量を測定する方法が定量的RT-PCR法である、請求項11に記載の検定方法。

30

【請求項13】

mRNA量を測定する方法がDNAチップ法である、請求項11に記載の検定方法。

【請求項14】

pRBの発現の減少、p16の発現、またはcyclin Eの発現の増強を、それぞれの蛋白質量を測定することにより検定する、請求項1に記載の検定方法。

【請求項15】

蛋白質量を測定する方法がウエスタンブロット法である、請求項14に記載の検定方法。

【請求項16】

蛋白質量を測定する方法が免疫組織染色法である、請求項14に記載の検定方法。

【請求項17】

蛋白質量を測定する方法がELISA法である、請求項14に記載の検定方法。

40

【請求項18】

pRB、p16またはcyclin E遺伝子の連続した少なくとも15塩基の配列から成るプライマーを含んで成る、請求項12の検定方法に使用するキット。

【請求項19】

pRB、p16またはcyclin Eに対する抗体を含んで成る、請求項15、16または17に記載の検定方法に使用するキット。

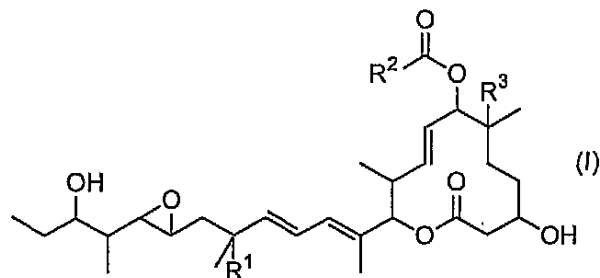
【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、抗癌剤として有用な式 (I) の一般式で表される化合物 (以下、本化合物と

50

称す) に対する癌細胞の感受性を予測するための検定方法に関する。



10

【背景技術】

従来の癌化学療法においては、臓器癌種毎に効果の立証されている抗癌剤を、単剤またはそれらの併用で行ってきた。また、近年の盛んに行われている大規模な無作為比較試験を通して、特定の癌種においては標準治療が確立されている。しかしながら、これらの治療において達成される奏効率は、概して20～50%程度であり、半数以上の患者においては治療効果を享受できないにも関わらず、副作用の危険性を伴う化学療法を施行するという状況である (JACR Monograph No. 7, 10-19, 2002)。

抗癌剤が効く患者と効かない患者を選別しようという試みは、従来から「薬剤感受性試験」という方法が試されてきた。抗癌剤感受性試験にはSDI法 (Jpn J Cancer Res. 85:762-765, 1994)、CD-DST法 (Jpn J Cancer Res. 92:203-210, 2001)、HDRA法 (Clin Cancer Res. 1:305-311, 1995) などがあり、いずれも患者から癌細胞を採り、抗癌剤を接触させて抗癌剤に対する感受性を調べる方法であることで共通している。しかしながら、これらの方法は、癌細胞を試験管内で生存させておく必要があることや、更に検査結果と臨床効果が必ずしも一致しないという問題などがあり、実施率も0.5%程度にとどまっている (制癌剤適応研究会集計アンケート1996)。

癌細胞に特異的な分子を標的とした分子標的薬剤の中には、ハーセプチンテストなどのように分子診断によって薬剤に対する感受性を予測することに成功している例も報告されている (Clin Cancer Res. 7:1669-1675, 2001)。しかしながら、その他の薬剤においては単独の標的分子のみでは感受性を予測出来ず、複数の分子が感受性を規定している場合が多いと考えられている (Nat Genet. 24:236-244, 2000)。近年発展したcDNAマイクロアレイ技術は超多量遺伝子の発現解析を可能とし、感受性規定因子の包括的解析を可能にした。例えば、慢性骨髄性白血病治療薬のグリーベックの場合は、15～30の遺伝子群の発現解析により治療効果の予測可能であることが、cDNAマイクロアレイ解析の結果から提唱されている (Jpn J Cancer Res. 93:849-56, 2002)。

今後の癌化学療法で用いられる抗癌剤の開発は、治療前にその感受性を調べる診断法と組み合わせた提供を目指すべきであり、分子診断を可能にするためには開発する薬剤への感受性を予測できる分子を見出すことが重要となる。

【発明の開示】

本発明者らはWO 02/060890、WO 03/099813及びWO 04/011661において、本化合物が、ヒト乳癌細胞株 (BSY-1) に対し極めて強い抗腫瘍効果を発現し、ヒト大腸癌細胞株 (WiDr) に対しても強い抗腫瘍効果を発現することを見出した。

一方で、本化合物は小細胞性肺癌細胞株 (Calu-1) に対しては、上述した癌細胞株と比べて効果が弱いことを見出し、本化合物の抗腫瘍効果が、癌細胞により異なることが明らかとなった。

癌細胞の本化合物に対する感受性と関連する分子を明らかにし、生検等により癌患者から採取した癌細胞で、それら分子の発現を調べることにより、本化合物に対する癌細胞の

50

感受性を予測することができれば、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者のみに、本化合物を投与することが可能となり、治療効果を高め不要な副作用を軽減できることが期待される。

本化合物に対する感受性の高いBSY-1株の分子的特徴を探索するにあたり、本発明者らは乳癌や肺癌において破綻していることが提唱されている細胞周期のG1/S移行を制御する分子群に着目した。癌抑制遺伝子であるp16とpRB、及びそれらと拮抗する、またはそれらを負に制御するcyclin D1とcyclin Eの4分子に関して、蛋白質発現量を調べたところ、BSY-1株にはpRBの発現減少、p16発現陽性、cyclin E高発現という分子的特徴があることを見出した。

BSY-1株、WiDr株及びCalu-1株を含むヒト癌細胞株25株について、pRBの発現減少若しくは変異（以下pRB低発現と称す）、p16発現陽性またはcyclin E高発現という特徴を調べ、これら癌細胞を移植したマウスを用いて本化合物の抗腫瘍効果を比較検討したところ、これら特徴を一つでも有していたヒト癌細胞株の多くが本化合物に対する高い感受性を示したのに対し、有していない癌細胞株のほとんどは低感受性であった。

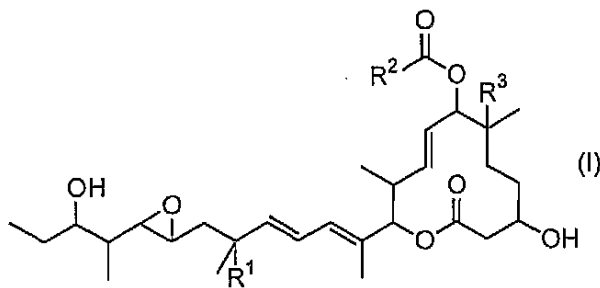
特にpRB低発現及びcyclin E高発現の特徴を有する7株、p16発現陽性及びcyclin E高発現の特徴を有する6株のうち、4株は本化合物投与により完全な腫瘍の消失を示し、1株は消失はしないまでも長期間にわたる腫瘍縮小の継続を示した。

癌細胞のpRB低発現、p16発現陽性またはcyclin E高発現という特徴を調べることにより、当該癌細胞の本化合物に対する感受性を予測できることが明らかとなり、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は、以下に関する。

- 1) pRBの発現が減少している、
- 2) p16が発現している、
- 3) cyclin Eの発現が増強している、
- 4) pRBの発現が減少しかつcyclin Eの発現が増強している、または
- 5) p16が発現しかつcyclin Eの発現が増強している、の何れか一つを指標とする、下記一般式1で表される化合物に対する癌細胞の感受性を検定する方法。

式(I)



30

[式中、R¹は

- 1) 水素原子または
- 2) 水酸基

40

R³は

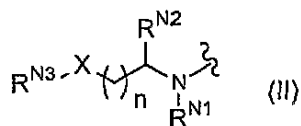
- 1) 水素原子、
- 2) 水酸基または
- 3) C₁-6アルコキシ基

R²は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良いC₁-6アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良いC₇-10アラルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基

50

5) 式 (II)



[式中、

A)

n は 0 ないし 4 の整数、

X は

i) $-\text{CHR}^{\text{N}4}-$ 、ii) $-\text{NR}^{\text{N}5}-$ またはiii) $-\text{O}-$ 、 $\text{R}^{\text{N}1}$ 及び $\text{R}^{\text{N}2}$ は同一または異なって、

i) 水素原子または

ii) C_{1-6} アルキル基、 $\text{R}^{\text{N}3}$ 及び $\text{R}^{\text{N}4}$ は同一または異なって、

i) 水素原子、

ii) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、iii) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、iv) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルコキシ基、v) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、

vi) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、

vii) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、viii) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、ix) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、

x) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基、

xi) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基、

xii) $-\text{NR}^{\text{N}6}\text{R}^{\text{N}7}$ (ここにおいて、 $\text{R}^{\text{N}6}$ および $\text{R}^{\text{N}7}$ は同一または異なって、水素原子または C_{1-6} アルキル基を表す) またはxiii) $\text{R}^{\text{N}3}$ 及び $\text{R}^{\text{N}4}$ が一緒になって結合する炭素原子と共に形成する置換基

を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基 (該非芳香族複素環式基は置換基を有していても良い)、

 $\text{R}^{\text{N}5}$ は

i) 水素原子、

ii) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、iii) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、iv) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、

v) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、

vi) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、vii) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、viii) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、

ix) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基、

x) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基または

xi) $\text{R}^{\text{N}3}$ 及び $\text{R}^{\text{N}5}$ が一緒になって結合する窒素原子と共に形成する置換基を有

していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基 (該非芳香族複素環式基は置換基を有していても良い)、

B)

X、n、 $\text{R}^{\text{N}3}$ 、 $\text{R}^{\text{N}4}$ 及び $\text{R}^{\text{N}5}$ は前記定義の基を表し、 $\text{R}^{\text{N}1}$ 及び $\text{R}^{\text{N}2}$ は一緒になって形成する置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基、

10

20

30

40

50

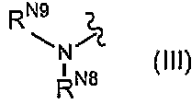
C)

X、n、 R^{N2} 、 R^{N4} 及び R^{N5} は前記定義の基を表し、 R^{N1} 及び R^{N3} は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基あるいは

D)

X、n、 R^{N1} 、 R^{N4} 及び R^{N5} は前記定義の基を表し、 R^{N2} 及び R^{N3} は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す] または

6) 式 (III)



10

[式中、 R^{N8} 及び R^{N9} は同一または異なって、

i) 水素原子、

i i) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、i i i) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、

i v) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、

v) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基または

v i) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基を表す]

20

を表す]

2. R^2 が

1) 水素原子、

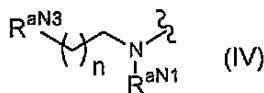
2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、3) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基または

4) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基である1に記載の

検定方法。

3. R^2 が下記式 (IV) で表される1に記載の検定方法。

式 (IV)



30

[式中、nは0ないし4の整数、

 R^{aN1} は

1) 水素原子または

2) C_{1-6} アルキル基、 R^{aN2} は

1) 水素原子

2) N- C_{1-6} アルキルアミノ基、3) N、N-ジ C_{1-6} アルキルアミノ基、

4) エチルメチルアミノ基、

5) ピリジル基、

6) ピロリジン-1-イル基、

7) ピペリジン-1-イル基、

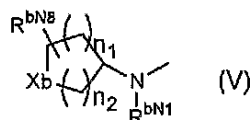
8) モルホリン-4-イル基または

9) 4-メチルピペラジン-1-イル基を表す]

40

4. R^2 が下記式 (V) で表される1に記載の検定方法。

式 (V)



(式中、 n_1 及び n_2 は同一または異なって、0 ないし 4 の整数、

X_b は

- 1) $-\text{CHR}^{\text{bN}4}-$ 、
- 2) $-\text{NR}^{\text{bN}5}-$ または
- 3) $-\text{O}-$ 、

10

$R^{\text{bN}1}$ は

- 1) 水素原子または
- 2) C_{1-6} アルキル基、

$R^{\text{bN}8}$ は

- 1) 水素原子、
- 2) C_{1-6} アルキル基、
- 3) C_{6-14} アリール基または
- 4) C_{7-10} アラルキル基、

$R^{\text{bN}4}$ は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルコキシ基、
- 5) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、
- 10) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基、
- 11) $-\text{NR}^{\text{bN}6} \text{R}^{\text{bN}7}$ (ここにおいて、 $R^{\text{bN}6}$ および $R^{\text{bN}7}$ は、同一または

20

異なって、水素原子または C_{1-6} アルキル基を表す) または

- 12) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基、

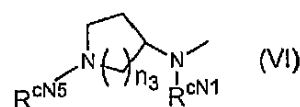
$R^{\text{bN}5}$ は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 5) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、
- 6) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基または
- 10) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基を表す]

40

5. R^2 が下記式 (VI) で表される 1 に記載の検定方法。

式 (VI)



50

[式中、 n_3 は1または2の整数、

R^{cN1} は

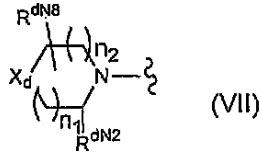
- 1) 水素原子または
- 2) C_{1-6} アルキル基、

R^{cN5} は

- 1) 水素原子または
- 2) C_{1-6} アルキル基を表す]

6. R^2 が下記式 (VII) で表される1に記載の検定方法。

式 (VII)



10

(式中、 n_1 及び n_2 は同一または異なって、0ないし4の整数、

X_d は

- 1) $-CHR^{dN4}-$ 、
- 2) $-NR^{dN5}-$ または
- 3) $-O-$ 、

20

R^{dN2} は

- 1) 水素原子または
- 2) C_{1-6} アルキル基、

R^{dN8} は

- 1) 水素原子、
- 2) C_{1-6} アルキル基、
- 3) C_{6-14} アリール基または
- 4) C_{7-10} アラルキル基、

R^{dN4} は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルコキシ基、
- 5) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い C_{4-9} シクロアルキルアルキル基、
- 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、
- 11) $-NR^{dN6}R^{dN7}$ (ここにおいて、 R^{dN6} 及び R^{dN7} は同一または異な

30

って、水素原子または C_{1-6} アルキル基を表す) または

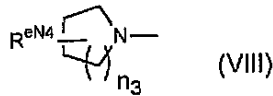
- 12) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、

R^{dN5} は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C_{1-6} アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 C_{2-10} アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い C_{6-14} アリール基、
- 5) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 6) 置換基を有していても良い C_{7-10} アラルキル基、
- 7) 置換基を有していても良い C_{3-8} シクロアルキル基、

50

- 8) 置換基を有していても良いC₄ - 9 シクロアルキルアルキル基、
 9) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアルキル基または
 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]
 7. R² が下記式 (VII) で表される1に記載の検定方法。
 式 (VII)

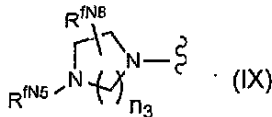


[式中、n₃ は1ないし3の整数、
 R^eN⁴ は

10

- 1) アミノ基、
- 2) N-C₁ - 6 アルキルアミノ基、
- 3) ピロリジン-1-イル基、
- 4) ピペリジン-1-イル基または
- 5) モルホリン-4-イル基を表す]

8. R² が下記式 (IX) で表される1に記載の検定方法。
 式 (IX)



20

[式中、n₃ は1ないし3の整数、
 R^fN⁸ は

- 1) 水素原子、
- 2) C₁ - 6 アルキル基、
- 3) C₆ - 14 アリール基または
- 4) C₇ - 10 アラルキル基、

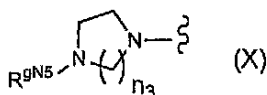
30

R^fN⁵ は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良いC₁ - 6 アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良いC₃ - 8 シクロアルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い3ないし8員環非芳香族複素環式基、
- 5) 置換基を有していても良いC₆ - 14 アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良いC₇ - 10 アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い5員環ないし14員環ヘテロアルキル基または
- 9) 置換基を有していても良いC₄ - 9 シクロアルキルアルキル基を表す]

40

9. R² が下記式 (X) で表される1に記載の検定方法。
 式 (X)



[式中、n₃ は1ないし3の整数、
 R^gN⁵ は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換されていてもよいC₁ - 6 アルキル基、

50

- 3) 置換されていてもよいC₃ - 8 シクロアルキル基、
- 4) 置換されていてもよいC₄ - 9 シクロアルキルアルキル基、
- 5) 置換されていてもよいC₇ - 10 アラルキル基、
- 6) 置換されていてもよいピリジル基または
- 7) 置換されていてもよいテトラヒドロピラニル基を表す]

10. 一般式 (I) で表される化合物が下記化合物の何れか一つの化合物である、1に記載の検定方法。

1) (8E, 12E, 14E) - 7-アセトキシ-3, 6, 21-トリヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド

10

2) (8E, 12E, 14E) - 7-((4-シクロヘプチルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド、

3) (8E, 12E, 14E) - 3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-7-((4-イソプロピルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド及び

4) (8E, 12E, 14E) - 3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-7-((4-メチルピペラジン-1-イル)カルボニル)

20

11. pRBの発現の減少、p16の発現、またはcyclin Eの発現の増強を、それぞれをコードするmRNA量を測定することにより検定する、1に記載の検定方法。

12. mRNA量を測定する方法が定量的RT-PCR法である、11に記載の検定方法。

13. mRNA量を測定する方法がDNAチップ法である、11に記載の検定方法。

14. pRBの発現の減少、p16の発現、またはcyclin Eの発現の増強を、それぞれの蛋白質量を測定することにより検定する、1に記載の検定方法。

15. 蛋白質量を測定する方法がウエスタンブロット法である、14に記載の検定方法。

30

16. 蛋白質量を測定する方法が免疫組織染色法である、14に記載の検定方法。

17. 蛋白質量を測定する方法がELISA法である、14に記載の検定方法。

18. pRB、p16またはcyclin E遺伝子の連続した少なくとも15塩基の配列から成るプライマーを含んで成る、12の検定方法に使用するキット。

19. pRB、p16またはcyclin Eに対する抗体を含んで成る、15、16または17に記載の検定方法に使用するキット。

癌細胞のpRB低発現、p16発現陽性またはcyclin E高発現という特徴を調べることにより、癌細胞の本化合物に対する感受性を予め予見することが可能となり、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者のみに、本化合物を投与することが可能になった。治療効果を高め不要な副作用を軽減できることが期待された。

【発明を実施するための最良の形態】

40

本明細書中でpRBとは、Genbank Accession No. NM000321に記載の塩基配列でコードされる分子量約110kDaの蛋白質である。pRBをコードするRB遺伝子は、網膜芽細胞腫で変異を起こしている癌抑制遺伝子として単離され (Proc. Natl Acad. Sci. USA 84:9059-9063, 1987)、その後種々の悪性細胞での変異が確認されている。

p16とは、Genbank Accession No. HM000077に記載の塩基配列でコードされる分子量約16kDaの蛋白質である。p16は、CDK4及びCDK6と結合し、CDK4/6によるpRBのリン酸化を抑制してpRB活性保持に寄与している (Science 264:436-440, 1994)。

cyclin Eとは、Genbank Accession No. M74093に

50

記載の塩基配列でコードされる分子量約52KDaの蛋白質である。細胞周期のG1/S移行時に一過的に発現量が上昇することで細胞周期進行に中心的役割を果たしているが、癌化に伴って発現量の絶対量の上昇及び一過的上昇のパターンの破綻が報告されている (Int. J. Cancer 104:369-75, 2003)。

また、p16とpRBの発現量の逆相関関係は多くの癌種において報告されていることから、p16の発現陽性とpRBの低発現は同一の事象に起因していると考えられる (EMBO J. 14:503-511, 1995)。

本化合物は、WO 02/060890、WO 03/099813及びWO 04/011661に記載の方法により製造できる。また、本化合物が抗癌活性を有していることは、WO 02/060890、WO 03/099813及びWO 04/011661に記載されている。 10

本発明は、癌細胞のpRB低発現、p16発現陽性またはcyclin E高発現という特徴を調べることにより、本化合物に対する感受性を検定する方法であり、癌細胞は癌組織から採取した細胞であっても、in vitroで培養された細胞であっても許されるが、好ましくは、生検により癌組織から取り出された癌組織の細胞であることが望ましく、更に好ましくは、その癌組織は癌の診断に際して生検により取り出された癌組織であることが望ましい。

本発明の方法により、高感受性と判断された癌細胞が採取された患者に対して、本化合物を投与することにより、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者を選択して、本化合物を投与することが可能なる。これにより、治療効果を高め不要な副作用を軽減できることが期待される。 20

本発明における癌細胞のpRB低発現、p16発現陽性またはcyclin E高発現という特徴を調べる方法としては、転写されたmRNAの量を測定しても、または翻訳された蛋白質の量を測定しても良い。mRNA量を測定する方法としては、RT-PCR法・DNAチップ法などが挙げられ、蛋白質量を測定する方法としては、ウエスタンブロット法・免疫組織染色法・ELISA法などが挙げられるが、発現量を測定する方法であれば良く、本発明がこれらの例に限定されるものではない。

また、突然変異によりこれら蛋白質が変異し (pRBの変異に関しては次の報告が有る: Proc Natl Acad Sci USA 87:6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 87:6-10, 1990) 発現が減少しているのと実質的に同等であることを、該DNA・mRNAの塩基配列や電気泳動度より解析して変異DNA・mRNAを検出した場合 (Oncogene 8:1913-9, 1993)、または変異を識別できる抗体若しくは電気泳動度により変異蛋白質を検出した場合も、本発明に含まれる。 30

以下に、採取した腫瘍組織からpRB、p16、cyclin Eの発現を測定する方法について詳しく説明するが、培養細胞からも同様の方法により発現を測定できるが、本発明はこれに限られない。

なお、本明細書において引用した文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

1. RT-PCR法:

採取した腫瘍組織から常法 (実験医学増刊「PCRとその応用」8:1063-1071, 1990) によりmRNAを調製する。調製したmRNAを鋳型にして、RT-PCRによりpRB・p16・cyclin Eの発現量を測定することができる。RT-PCRは、例えばReal Time RT-PCR Core Kit (TaKaRa Code PR032A) を用いて、逆転写反応とそれに引き続くPCR反応 (RT-PCR) を行うことが可能である。 40

mRNAを定量して発現量を測定するために、RT-PCRは定量的なRT-PCRであることが好ましい。定量的なRT-PCRとしては、様々な方法が報告されているが (Genome Res. 6:986-994, 1996)、好ましくは同じプライマーにより増幅される既知量の競合鋳型RNAを共存させてRT-PCRを行い、両増幅産物の 50

量を比較して定量を行う競合RT-PCRが望ましい。

上記Genbank Accession No.に記載の配列情報を基にpRB・p16・cyclin EをコードするmRNA(標的mRNAと称す)を検出するためのプライマーを作製する。また定量のため、そのプライマーと相補的な配列を有するが、分子量または制限酵素切断部位が標的mRNAとは異なる競合鋳型RNAを作製する。変異が高発する部位(pRBに関しては、Proc Natl Acad Sci USA 87:6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 87:6-10, 1990に報告)にプライマーを設定することにより、変異蛋白質のみを、または正常蛋白質のみを定量することができる。

腫瘍組織から調製したmRNA試料に、既知量の競合鋳型RNAを希釈したものを加え、プライマーを加えてRT-PCRを行う。生成した増幅産物の分子量または制限酵素消化後の分子量により、生成増幅産物が標的mRNA由来であるか競合鋳型RNA由来であるかを区別し、両増幅産物の量比、及び添加した競合鋳型RNAの量から標的mRNAの定量値を計算する。mRNA量は普遍的に発現が認められるアクチンmRNA、18SrRNA等と比較した相対量として測定することも許される。高感受性及び低感受性の癌細胞のpRB・p16・cyclin EのmRNA量を測定してカットオフ値を決め、カットオフ値との比較で高発現であるか低発現であるかを判断する。

また、標準細胞とは電気泳動度の異なるバンドが現れた場合、または変異蛋白質が検出された場合は、低発現であると判断する。

pRB低発現、p16発現陽性またはcyclin E高発現の場合に、好ましくはpRB低発現かつcyclin E高発現の場合、またはp16発現陽性かつcyclin E高発現の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

2. DNAチップ法:

採取した腫瘍組織から、例えば常法(実験医学増刊「PCRとその応用」8:1063-1071, 1990)によりmRNAを抽出して、逆転写反応によって蛍光標識し、合成された標識cDNAを癌関連遺伝子のOligonucleotideがスポットしてあるマイクロアレイIntelliGene Human Cancer CHIP Ver. 4.0(タカラバイオ株式会社X102)上にハイブリダイズする(Nature genetics supplement 21:10-14; 1999)。

その際、腫瘍組織サンプルと正常組織サンプルを別々の蛍光色素で、例えばCy3(赤)とCy5(緑)に標識することによって、どちらのサンプルで遺伝子が増えているかを判定する。コンピュータ解析ソフトにより、正常組織から得られた標識cDNAをハイブリダイズした場合と比較して癌組織の方が多ければ例えば赤、同等ならば例えば黄、少なければ例えば緑として画像表示させることができる。このシグナルの強弱をコンピュータ解析ソフトで数値化することで、両者における遺伝子発現比(Cy3=癌組織/Cy5=正常組織)のデータを算出し、これらの発現比が2倍以上または1/2以下を、好ましくは3倍以上または1/3以下を有意として判定する。

pRBが緑、p16が黄若しくは赤、またはcyclin Eが赤の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。好ましくはpRBが緑かつcyclin Eが赤の場合、またはp16が黄若しくは赤かつcyclin Eが赤の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

3. ウェスタンブロット法:

以下のウェスタンブロット法、免疫組織染色法及びELISA法に用いる抗pRB抗体・抗p16抗体・抗cyclin E抗体は、市販の抗体を用いることができる。抗pRB抗体は、例えばCell Signaling社からRb Antibody(カタログNo.: 9302)を、抗p16抗体は、例えばSanta Cruz社からp16(C-20)(カタログNo.: sc-468)を、抗cyclin E抗体は、例えばBD Pharmingen社からPurified anti-human Cyclin E(カタログNo.: 554182)を入手できる。

また、抗体は上記Genbank Accession No.に記載の情報を基に作

製された抗原を免疫して作製することも可能である。抗原は、上記 Genbank Accession No. に記載の配列情報を基に pRB・p16・cyclin E 発現ベクターを作製し、該ベクターを導入した発現細胞から pRB-p16・cyclin E 蛋白を精製して得ることができる。これら蛋白質は精製が容易となるよう、融合蛋白質として発現させることが好ましい。また別法として、上記 Genbank Accession No. に記載の配列情報を基にペプチドを合成し、キャリアー蛋白質と結合させて抗原とすることもできる。それら抗原を動物に免疫し、得られた血清から抗体を精製するか、または得られた抗体産生細胞からハイブリドーマを作製して、その培養液から抗体を精製することができる。

また、pRB・p16・cyclin E、特に pRB の変異を検出するために、例えば、Proc Natl Acad Sci USA 87:6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 87:6-10, 1990 に記載の変異を有する変異蛋白質を発現させ、または変異部位を含むペプチドを合成して、それを動物に免疫し、変異蛋白質に特異的に反応する抗体を得ることができる。または逆に、正常蛋白質を免疫して、正常蛋白質は反応するが変異蛋白質には反応しない抗体も作製可能である。抗体の作製法は Methods in Enzymology 182, p663-679 に記載されている。

採取した腫瘍組織より、pRB・p16・cyclin E を含む SDS-PAGE 用サンプルを調整する。具体的には例えば、腫瘍組織を細胞調製液（好ましくは各種プロテアーゼ阻害剤及び 10% グリセロールを含む）を用いてホモゲナイズし、等量の SDS-PAGE 用サンプルバッファーを混合し 97°C で 5 分の熱処理を行って、SDS-PAGE 用サンプルとする。ウエスタンブロット法は、Methods in Enzymology 182, 679-688 に記載の方法により行うことができるが、具体的には例えば以下の通り行うことができる。

各サンプル一定量を SDS-PAGE にて分画後、Hybond ECL 膜にトランスファーし、抗 pRB 抗体・抗 p16 抗体・抗 cyclin E 抗体を反応させた後、酵素標識した二次抗体を反応させ、酵素活性により Hybond ECL 膜にトランスファーされた pRB・cyclin E・p16 を検出する。好ましくは対照として、pRB・p16・cyclin E の発現が認められる標準細胞、好ましくは全ての発現が認められる MDA-MB 435 細胞等を同時にアプライして、MDA-MB 435 細胞での発現と比較して、高発現であるか低発現であるかを判断する。

また、標準細胞とは電気泳動度の異なるバンドが現れた場合、または変異蛋白質が検出された場合は、低発現であると判断する。

pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclin E 高発現の場合に、好ましくは pRB 低発現かつ cyclin E 高発現の場合、または p16 発現陽性かつ cyclin E 高発現の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

4. 免疫組織染色法

免疫組織染色法は、例えば実験医学別冊（ポストゲノム時代の免疫染色、in situ ハイブリダイゼーション、1997）に記載の方法により行うことができるが、具体的には例えば以下の通り行うことができる。

採取した腫瘍組織に埋包剤を浸透させてブロックを作製した後、2~8 μm の厚さにスライスしてスライドガラスに貼り付けて組織標本を作製する。組織標本に、抗 pRB 抗体や抗 cyclin E 抗体、または抗 p16 抗体を反応させた後、アビジン-ビオチン-酵素抗体法にて染色する（J. Histochem. Cytochem. 27; 1131-1139, 1979）。染色した組織標本中の腫瘍組織の pRB・p16・cyclin E の染色度を正常組織と比較して、pRB 低発現、p16 発現陽性あるいは cyclin E 高発現を判断する。変異蛋白質が検出された場合は、低発現であると判断する。

pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclin E 高発現の場合に、好ましくは pRB 低発現かつ cyclin E 高発現の場合、または p16 発現陽性かつ cyclin E 高発現の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

5. ELISA法

ELISA法はEd Harlowら (Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) に記載の方法により行うことができるが、具体的には例えば以下の通り行うことができる。

採取した腫瘍組織より、pRB・p16・cyclin Eを含む画分を調整する。具体的には例えば、腫瘍組織を細胞調製液 (好ましくは各種プロテアーゼ阻害剤及び10%グリセロールを含む) を用いてホモゲナイズし、そこに1%NP-40を添加して可溶画分と残渣を得る。可溶画分をそのままELISA法に用いるか、もしくは残渣画分を0.5MのNaClを加え抽出操作を行った後、NaCl濃度を0.1~0.15Mに下げてからELISA法に用いる。 10

可溶画分及びNaCl抽出画分を、抗pRB抗体、抗p16抗体、または抗cyclin E抗体がコートされている96穴プレートに添加し抗体と反応させる。コートされた抗体に結合したpRB、p16、またはcyclin Eを、それぞれに対する酵素標識抗体でサンドイッチし、結合した酵素の活性を測定することにより腫瘍組織で発現しているpRB、p16、またはcyclin Eを定量する。

高感受性及び低感受性の癌細胞のpRB・p16・cyclin Eの量を測定してカットオフ値を決め、カットオフ値との比較で高発現であるか低発現であるかを判断する。

pRB低発現、p16発現陽性またはcyclin E高発現の場合に、好ましくはpRB低発現かつcyclin E高発現の場合、またはp16発現陽性かつcyclin Eが高発現の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。 20

【図面の簡単な説明】

図1は、各ヒト癌細胞株におけるpRB・cyclin E・p16・cyclin D1のウエスタンブロットによる発現量解析結果である。

図2は、SY-1株及びH-526株、H-460株におけるpRB・p16・cyclin Eの免疫組織染色による発現量解析結果である。

図3は、子宮体癌の臨床標本におけるp16・cyclin Eの免疫組織染色による発現量解析結果である。

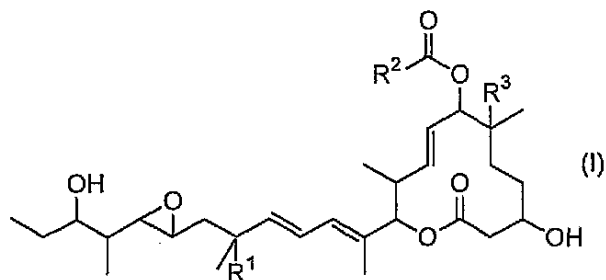
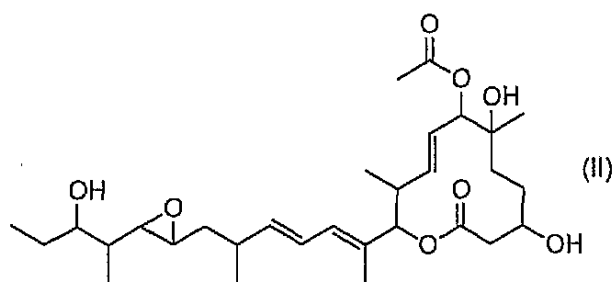
図4は、p16 mRNA量とT/C%、p16 mRNA量とp16蛋白の発現量の関連を示したグラフである。 30

【実施例】

以下に、本発明の有用性を示すための例を示すが、これらは例示的なものであって、本発明は如何なる場合にも以下の具体例に制限されるものではない。

[実施例1] BSY-1株及びWidr株を含むヒト癌細胞株25株における細胞周期関連分子群の発現解析

WO 02/060890において、下記式I Iで表される(8E, 12E, 14E)-7-アセトキシ-3, 6, 21-トリヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド (以下、化合物1と称す) に対して強い感受性を示したBSY-1株、及びWO 03/099813において一般式1で表される化合物のうちR1が水酸基である化合物群に対して感受性を示したWidr株を含む、ヒト癌細胞株25株における細胞周期関連分子群pRB・p16・cyclin E・cyclin D1の発現をウエスタンブロット法にて解析した。 40



10

25株のヒト癌細胞株をヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が 100mm^3 以上になった時点で腫瘍を摘出、各種プロテアーゼ阻害剤 (Leupeptin, p-APMSF, EDTA, o-NaVO₄) 及び10%グリセロール含有の細胞調製液を用いてホモゲナイズした。その際、腫瘍サンプル重量あたりの細胞調製液量を一定にした。それぞれの細胞調製液に、等量のSDS-PAGE用サンプルバッファーを混合し、97℃で5分の熱処理を行って、SDS-PAGE用サンプルとした。各SDS-PAGE用サンプルの一定量をSDS-PAGEにて分離し、Hybond ECL膜にトランスファーした後、pRB・cyclin E・p16・cyclin D1に対する抗体を反応させた。その後HRP標識の二次抗体を反応させ化学発光基質 (Super Signal; PIERCE社) を加えて、イメージマスターVDS-CL (Amersham Pharmacia) を用いてpRB・cyclin E・p16・cyclin D1のbandを検出した。

20

30

各癌細胞株におけるpRB・p16・cyclin E・cyclin D1の発現量を相対的に比較するための対照として、全分子の発現が認められるMDA-MB435細胞をすべてのSDS-PAGEにアプライして同様に検出した。

その結果を図1に示した。強い感受性を示すBSY-1株にpRBの欠失、p16の発現、cyclin Eの高発現という性質が有ることから、これら性質が、in vivoでの本化合物への感受性に関連するか否かについて検討を行った。

図1において、A~Z、E、A1~E1およびEの各符号は、各々下記のヒト癌細胞株を示す。

A : BSY-1 (breast)	K : FaDu (head & neck)	U : DLD-1 (colorectal)
B : MDA-MB-468 (breast)	L : LC-6-JCK (NSCLC)	V : PC-3 (prostate)
C : HBC-4 (breast)	M : Lu99 (NSCLC)	W : NCI-H510A (SCLC)
D : KPL-4 (breast)	N : NCI-H460 (NSCLC)	X : NCI-H522 (SCLC)
E : MDA-MB-435 (breast)	O : NCI-H596 (NSCLC)	Y : WiDr (colorectal)
F : NCI-H146 (SCLC)	P : Calu-1 (NSCLC)	Z : DU145 (prostate)
G : NCI-H69 (SCLC)	Q : PC14 (NSCLC)	A1: DMS114 (NSCLC)
H : NCI-H526 (SCLC)	R : HT-29 (colorectal)	B1: Colo320DM (colorectal)
I : NIH:OVCAR-3 (ovarian)	S : SW620 (colorectal)	C1: CQL-3 (colorectal)
J : SK-OV-3 (ovarian)	T : KM12 (colorectal)	D1: LoVo (colorectal)
		E1: MKN45 (stomach)

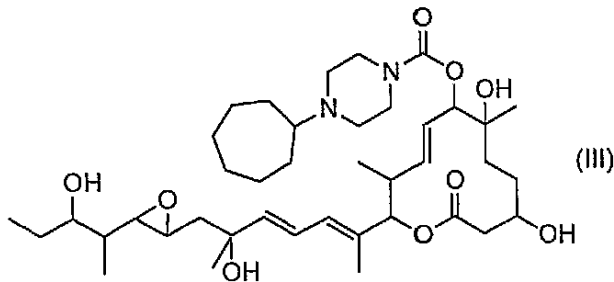
40

[実施例2] pRB・p16・cyclin E・cyclin D1の発現と本化合物への感受性の相関

実施例1でpRB・p16・cyclin E・cyclin D1の発現を調べた2

50

5株のヒト癌細胞株について、代表的な本化合物、下記式IIIで示される [(8E, 12E, 14E)-7-(4-シクロヘプチルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-3,6,16,21-テトラヒドロキシ-6,10,12,16,20-ペンタメチル-18,19-エポキシトリコサ-8,12,14-トリエン-11-オリド] (以下、化合物2と称す) に対する感受性を調べた。



10

培養フラスコ、またはヌードマウスの皮下において増殖させた25種類のヒト癌細胞を、ヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が 100mm^3 以上になった時点で各群の腫瘍体積の平均が均一になるように群分けをし、対照群5匹、化合物2投与群5匹とした。投与群には 10mg/kg/day となるように5日間静注し、対照群は無処理または媒体投与とした。投与開始日(Day1)からDay5, 8, 12, 15と以下経時的に腫瘍体積を測定し、相対的な腫瘍体積比(T/C%)を求めた。

20

pRB・p16・cyclin E・cyclin D1の発現と化合物2への感受性の相関を、表1に示した。実施例1で解析したヒト癌細胞株におけるpRB・cyclin E・p16・cyclin D1の発現量を相対的に評価し、発現が認められないものを-、発現量が認められるものをその強度に応じて+~+++と表記して、腫瘍体積比(T/C%)の結果と並べて示した。また、pRBに関しては、変異型pRBの発現が報告されている小細胞肺癌株・卵巣癌株・前立腺癌株(Oncogene 9, 3375-3378, 1994; Prostate 21, 145-52, 1992; Exp Cell Res, 233, 233-9, 1997)に()を付して記載した。

表 1

pRB・cyclin E・p16・cyclin D1発現量と、
化合物 2 に対する感受性

細胞株	pRB	p16	cyclin E	cyclin D1	T/C%
BSY-1	—	++	+++	+++	0
MDA-MB468	—	+	+++	++	0
LC-6-JCK	—	++	+++	+	0
OVCAR3	(+)	++	+++	++	0
NCI-H146	(±)	++	+++	±	1
NCI-H69	(++)	++	±	±	1
NCI-H526	(+)	++	+	±	1
PC-3	++	—	++	+++	2
FaDu	+	—	±	+++	3
WiDr	+	—	+++	+++	4
HBC4	—	—	++	++	5
Lu99	+++	—	±	±	8
NCI-H510	(+)	++	+	±	10
NCI-H596	—	++	+++	+	18
KPL-4	+	—	+	+++	23
SK-OV-3	+++	—	++	+++	27
DU145	—	—	+++	++	28
MDA-MB435	+++	+	++	+++	28
HT-29	+	—	+	±	28
SW620	+++	—	+	++	28
NCI-H460	+++	—	+	±	33
KM12	++	—	+	++	34
NCI-H522	+	—	+++	+++	42
DLD-1	++	—	+	+++	47
Calu-1	+	—	++	++	55

10

20

30

40

50

調べたヒト癌細胞株 25 株中、ウエスタンブロット法でバンドが検出されない（「—」で表示）、または文献情報で変異や欠失が報告されている（括弧付きで表示）癌細胞株 11 株が pRB 低発現に分類され、このうちの 7 株（64%）が $T/C\% \leq 1\%$ であった。これに対し pRB を発現している 14 株には $T/C\% \leq 1\%$ となる癌細胞株は無く（ $p = 0.0006$ ）、pRB 低発現により化合物 2 に対する感受性を検定できることが明らかとなった。

また p16 発現陽性の癌細胞 10 株中 7 株（70%）が $T/C\% \leq 1\%$ であるのに対し、p16 を発現していない 15 株には $T/C\% \leq 1\%$ となる癌細胞株は無く（ $p = 0.0002$ ）、pRB 低発現と同様、p16 発現陽性により化合物 2 に対する感受性の検定が可能であった。

調べた 25 の癌細胞株株の中で、11 株が pRB 低発現（ウエスタンブロット法で検出されなかったか文献情報で変異や欠失が報告されている）に分類され、このうちの 9 株で p16 は発現していた。逆に p16 を発現している 10 株中 9 株が pRB 低発現であり、報告されている通り（EMBO J. 14:503-511, 1995）、p16 発現陽性の癌細胞は pRB 低発現の癌細胞とほぼ一致していた。

cyclin E 高発現については、高発現（+++）している 9 株中 5 株（56%）が $T/C\% \leq 1\%$ であるのに対し、高発現していない癌細胞では 16 株中 2 株（13%）が $T/C\% \leq 1\%$ と、cyclin E 高発現の癌細胞は明らかに感受性が高かった（ $p = 0.02$ ）。

完全な腫瘍の消失（ $T/C\% = 0\%$ ）を見た 4 株、及び消失はしないまでも長期間にわ

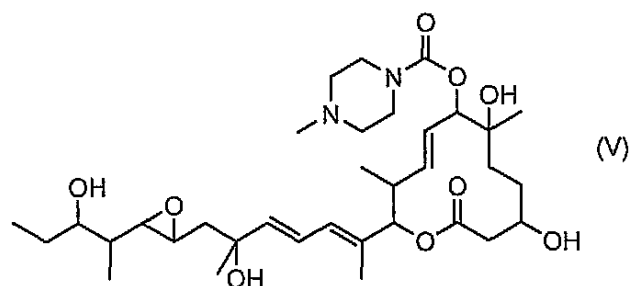
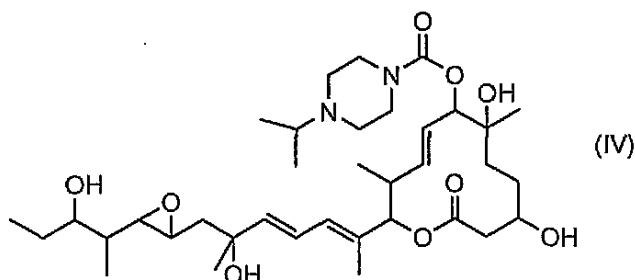
たる腫瘍縮小の継続を示したNCI-H146を合わせた5株に対する化合物2の効果は、治癒的效果と考えられ、これら全ての株はpRB低発現・p16発現・cyclin E高発現という性質を示した。

そこで、pRB低発現・cyclin E高発現の2つの性質と、化合物2の治癒的效果の相関を見てみると、両方の性質を持つ癌細胞7株中5株(71%)で治癒的效果を示したのに対し、それ以外の癌細胞株18株中には治癒的效果を示した癌細胞株は見出されなかった($p=0.0001$)。また、p16発現陽性・cyclin E高発現の両方の性質を持つ癌細胞では、両方の性質を持つ癌細胞6株中5株(83%)で治癒的效果を示し、それ以外の癌細胞株19株中には治癒的效果を示した癌細胞株は見出されなかった($p=0.00002$)。cyclin E高発現は、pRB低発現またはp16発現陽性の指標と組み合わせることにより、更に有用な指標となった。

これらの結果より、pRB低発現・p16発現・cyclin E高発現の性質を調べることにより、癌細胞株の化合物2に対する感受性が予見できることが明らかとなった。

[実施例3] 代表的な3化合物に対する癌細胞株の感受性検定

WO 02/060890においてBSY-1株に対して高い抗腫瘍活性を示した化合物1、及びWO 03/099813においてWiDr株に対して抗腫瘍活性を示した一般式Iで表される本化合物のうち代表的な化合物(8E, 12E, 14E)-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-7-(4-イソプロピルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド(下記式IV、以下化合物3と称す)、及び(8E, 12E, 14E)-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-7-(4-メチルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド(下記式V、以下化合物4と称す)について、ヒト癌細胞株のpRB低発現・p16発現・cyclin E高発現の性質と、感受性の相関について調べた。



培養フラスコ、またはヌードマウスの皮下において増殖させた癌細胞を、ヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が 100 mm^3 以上になった時点で各群の腫瘍体積の平均が均一になるように群分けをし、対照群5匹、化合物投与群5匹とした。投与群には 10 mg/kg/day となるように5日間静注し、対照群は無処理または媒体投与とした。投与開始日(Day 1)からDay 5, 8, 12, 15と以下経時的に腫瘍体積を測定し、相対的な腫瘍体積比(T/C%)を求めた。但し、化合物1の評価の際は原則としてDay 15までで実験を終了した。表2には、各癌細胞に対する化合物1, 2, 4、及び実

施例 2 の化合物 2 の T/C % を示した。

表 2 に示す通り、化合物 1 の T/C % が多少大きな値を示すものの試験した化合物全てで抗腫瘍効果が認められ、各種ヒト癌細胞株のこれら化合物に対する感受性は同じ傾向を示した。化合物 1, 3, 4 で化合物 2 との T/C % の相関を求めたところ、それぞれ 0.724、0.948、0.923 と高い相関を示した。このことから、一般式 I で表される化合物間において、各種癌細胞株の感受性が共通していることが示された。

表 2

化合物 2 と化合物 1, 3, 4 の抗腫瘍効果の相関

細胞株	腫瘍体積比(T/C%)			
	化合物 2	化合物 1	化合物 3	化合物 4
BSY-1	0	0	2	N.D.
LC-6-JCK	0	N.D.	0	N.D.
OVCAR3	0	23	N.D.	N.D.
PC-3	2	20	4	3
FaDu	3	33	1	5
WiDr	4	29	4	7
NCI-H596	18	76	N.D.	N.D.
DU145	28	26	34	26
MDA-MB435	28	50	N.D.	N.D.
HT-29	28	58	26	46
SW620	28	N.D.	19	N.D.
NCI-H460	33	53	N.D.	N.D.
NCI-H522	42	64	N.D.	N.D.
DLD-1	47	59	N.D.	N.D.

10

20

[実施例 4] BSY-1 株及び H-526 株、H-460 株における pRB・p16・cyclin E 発現の免疫組織染色による解析 30

化合物 2 に対して治療するまでの強い感受性を示した BSY-1 株、及び治療には至らないまでも強い感受性を示した H526 株、更には感受性が低かった H460 株において、細胞周期関連分子群 pRB・p16・cyclin E の発現を免疫組織染色法にて解析した。

上記 3 株のヒト癌細胞株をヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が 100 mm³ 以上になった時点で腫瘍を摘出して、中和した 10% ホルマリンにて 1 日間固定してパラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィンブロックを 4 μm の厚さにスライスしてスライドグラスに貼り付けたものを、免疫組織染色用標本とした。免疫組織染色用標本は、脱パラフィン操作、恒温槽を用いた熱処理で抗原賦活化、内在性ペルオキシダーゼのブロッキングなどの操作を施した後に、pRB・p16・cyclin E に対する一次抗体と室温で 1 時間反応させた。ペルオキシダーゼ標識した抗マウスあるいは抗ウサギ二次抗体を反応させて、DAB を発色基質としてそのペルオキシダーゼ活性を可視化して顕微鏡下観察した。 40

その結果を図 2 示した。ウエスタンブロット法で示された結果と同様の結果が、免疫組織染色においても得られることが明らかとなった。この結果から、臨床において繁用されるパラフィン包埋ブロックの標本を用いても、細胞周期関連分子群 pRB・p16・cyclin E の発現解析が行える可能性が示された。

[実施例 5] 臨床標本における p16・cyclin E 発現の免疫組織染色による解析 SuperBioChips Laboratories 社より購入したパラフィン包 50

埋の臨床標本（正常組織12、癌組織12）を用いて、免疫組織染色法による細胞周期関連分子群 p16・cyclin Eの発現解析を行った。

臨床パラフィン包埋標本を、実施例4と同様に p16・cyclin Eに対する抗体で免疫組織染色を行った。その結果、正常組織において、p16・cyclin Eの過剰発現は観察されなかったのに対し、一部の癌組織において p16（12例中3例）、cyclin E（12例中1例）の過剰発現が観察された。図3には、p16・cyclin Eの両分子が過剰発現していた子宮体癌の染色結果を示した。この結果から、臨床パラフィン包埋ブロックの標本を用いても、細胞周期関連分子群 p16及び cyclin Eが過剰発現している癌組織を選別出来る可能性が示された。

[実施例6] 臨床標本における p16・cyclin E発現の免疫組織染色 - 2

実施例5に加え、更に多数の癌種（胃癌・食道癌・肺癌・大腸癌・甲状腺癌・腎癌・乳癌・肝癌・膀胱癌・卵巣癌・膵癌・前立腺癌・子宮内膜癌・胆嚢癌・喉頭癌・子宮頸癌・悪性リンパ腫・悪性メラノーマ、各10サンプルの合計180サンプル）についてパラフィン包埋した臨床腫瘍標本を SuperBioChips Laboratories社より購入し、実施例4、5と同様に、免疫組織染色法による細胞周期関連分子群 p16・cyclin Eの発現解析を行った。

臨床パラフィン包埋標本を、実施例4、5と同様に、p16, cyclin Eに対する抗体で免疫組織染色を行ったところ、表2に示したとおり、「p16及び cyclin Eの過剰発現」の特徴が、子宮頸癌において10例中全例で観察されたのを筆頭に、卵巣癌で10例中4例、乳癌で10例中3例において認められた。臨床パラフィン包埋ブロックの標本を用いた「p16及び cyclin Eの過剰発現」の癌組織を選別出来る可能性が確認されると共に、癌種によっては高率で「p16及び cyclin Eの過剰発現」の特徴を持っている可能性があることが示された。

表3

各癌種標本における「p16及びcyclin Eの過剰発現」の出現頻度

癌種	過剰発現の頻度	癌種	過剰発現の頻度
胃癌	1/10	卵巣癌	4/10
食道癌	1/10	膵癌	1/10
肺癌	0/10	前立腺癌	0/8*
大腸癌	1/10	子宮内膜癌	1/10
甲状腺癌	0/10	胆嚢癌	1/10
腎癌	0/9*	喉頭癌	1/10
乳癌	3/10	子宮頸癌	10/10
肝癌	0/10	悪性リンパ腫	0/10
膀胱癌	2/9*	悪性メラノーマ	2/9*

*: 評価不能サンプル(癌細胞の含有なし、スライドガラスからの剥離等)を除外したため、10例に満たない。

[実施例7] RT-PCRによる p16 過剰発現の検出

28株のヒト癌細胞株をヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が100mm³以上になった時点で腫瘍を摘出し、各癌種につき3例の腫瘍をプールした。それらの腫瘍を液体窒素で凍結後、TRIzol試薬(SIGMA社)を用いて全RNAを抽出し、RNeasy mini Kit(OIAGEN社)を用いて精製した。Taqman^(R) reverse transcription reagents(ABI社)を用いてcDNAを合成後、プローブとしてp16のTaqman^(R) gene expression assays(ABI社)と反応試薬としてTaqman^(R) Gold RT-PCR reagentsを用いてSequence detection systems(7900HT, ABI社)で各腫瘍のp16 mRNA量を測定した。

得られた数値を18S rRNAの値で補正してp16 mRNAの相対的な量を求めた。

表3に、実施例1においてウエスタンブロット法により求めたp16蛋白の発現量を求め、実施例2において抗腫瘍効果T/C%を求めたヒト癌細胞株について、p16 mRNAの相対的な量をまとめて示した。また、図4にp16 mRNA量とT/C%、p16 mRNA量とp16蛋白の発現量の関連をグラフに示した。

表3及び図4に示す通り、p16 mRNAの相対量が0.3以上の高発現癌細胞12株中6株(50%)で、T/C% \leq 1%であるのに対し、0.3未満の13株中ではT/C% \leq 1%となる癌細胞株は1株しか存在しなかった(p=0.02)。p16 mRNA量の測定により、「p16過剰発現」の癌をスクリーニングし、化合物2に対する感受性を検定することが可能であることが明らかとなった。

また表3及び図4に示す通り、p16蛋白の発現量とp16 mRNA量の間には相関が認められ、p16蛋白の過剰発現(++)を認めた8株におけるp16の相対的mRNA量が 0.5786 ± 0.3259 であるのに対し、p16蛋白発現(+)の2株では 0.3610 、p16蛋白が認められなかった15株では 0.2073 ± 0.2424 であった。RT-PCR等のp16 mRNAを検出する方法によっても、p16蛋白発現を検出する方法と同様な結果を得ることができると考えられる。

表4

p16のmRNA量と蛋白発現量との関係

細胞株	p16 mRNA 相対量	p16蛋白発現	T/C%
BSY-1	1.2065	++	0
MDA-MB468	0.1503	+	0
LC-6-JCK	0.6046	++	0
OVCAR-3	0.9336	++	0
NCI-H146	0.4642	++	1
NCI-H69	0.3556	++	1
NCI-H526	0.3372	++	1
PC-3	0.5174	-	2
FaDu	0.0060	-	3
WiDr	0.2110	-	4
HBC4	0.0377	-	5
Lu99	0.0000	-	8
NCI-H510	0.4302	++	10
NCI-H596	0.2971	++	18
KPL-4	0.2822	-	23
SK-OV-3	0.0000	-	27
DU145	0.6043	-	28
MDA-MB435	0.5716	+	28
HT-29	0.2137	-	28
SW620	0.3177	-	28
NCH-H460	0.0001	-	33
KM12	0.3392	-	34
NCI-H522	0.0001	-	42
DLD-1	0.0000	-	47
Calu-1	0.1499	-	55

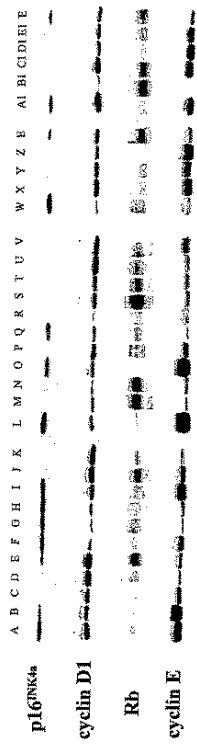
【産業上の利用可能性】

pRB低発現、p16発現陽性またはcyclin E高発現の特徴を調べることにより、本化合物に対する癌細胞の感受性を調べ、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者のみに本化合物を投与すれば、治療効果を高め不要な副作用を軽減することが可能である。

o

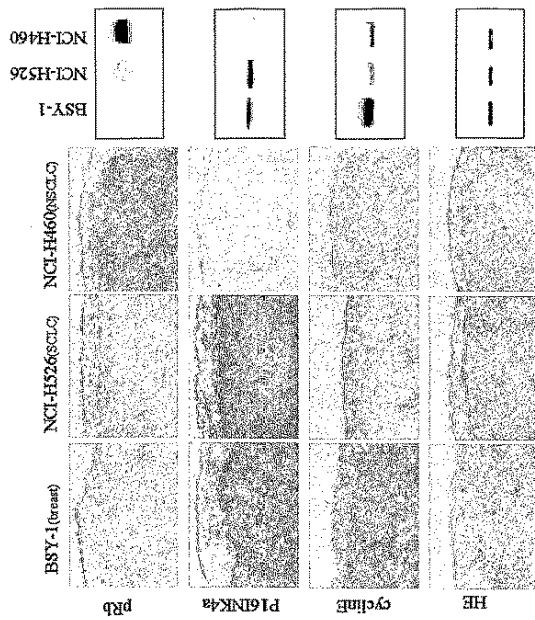
【 1】

1



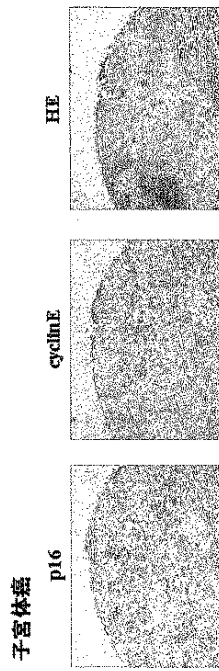
【 2】

2



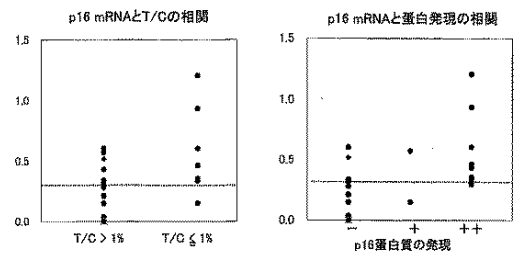
【図3】

図3



【図4】

図4



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/002091
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁷ C12Q1/68, 1/02, G01N33/48, 33/53//A61K31/365, 31/496, A61P35/00, C07D407/16 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) Int. Cl ⁷ C12Q1/68, 1/02, G01N33/48, 33/53//A61K31/365, 31/496, A61P35/00, C07D407/16 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), JICST FILE (JOIS), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Toshimitsu UENAKA et al., "E7107: Shinki Koshuyo Busshitsu Pladienolide Yudotai III., -Kanjusei Kitei Inshi ni Kansuru Kento-" UENAKA, T. et al., E7107: a novel pladienolide D derivative III., Study for predictive factors, Dai 63 Kai The Japanese Cancer Association Sokai Kiji, 25 August, 2004 (25.08.04), page 499, left column; p-1409	1-19
A	WO 2002/042493 A1 (EISAI CO., LTD.), 30 May, 2002 (30.05.02), & JP 2003-038200 A & EP 1336660 A1 & US 2004/0115664 A1	1-19
A	WO 2004/011661 A1 (MERCIAN CORP.), 05 February, 2004 (05.02.04), (Family: none)	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 18 April, 2005 (18.04.05)		Date of mailing of the international search report 10 May, 2005 (10.05.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002091

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/099813 A1 (MERCIAN CORP.), 04 December, 2003 (04.12.03), & EP 1508570 A1	1-19
A	WO 2002/060890 A1 (MERCIAN CORP.), 08 August, 2002 (08.08.02), & EP 1380579 A1	1-19

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/002091									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68, 1/02, G01N33/48, 33/53 // A61K31/365, 31/496, A61P35/00, C07D407/06											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68, 1/02, G01N33/48, 33/53 // A61K31/365, 31/496, A61P35/00, C07D407/06											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2005年										
日本国実用新案登録公報	1996-2005年										
日本国登録実用新案公報	1994-2005年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), JICST ファイル (JOIS), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
P, X	上仲俊光他, E7107: 新規抗腫瘍物質プラジエノライド誘導体 III. 一感受性規定因子に関する検討一, UENAKA, T. et al., E7107: a novel pladienolide D derivative III. Study for predictive factors, 第63回 日本癌学会総会記事, 2004. 08. 25, p. 499, 左欄P-1409	1-19									
A	WO 2002/042493 A1 (EISAI CO., LTD.) 2002.05.30, & JP 2003-038200 A & EP 1336660 A1 & US 2004/0115664 A1	1-19									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 18. 04. 2005		国際調査報告の発送日 10. 5. 2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信	4B 9455								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/002091

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2004/011661 A1 (MERCIAN CORPORATION) 2004.02.05, (ファミリーなし)	1-19
A	WO 2003/099813 A1 (MERCIAN CORPORATION) 2003.12.04, & EP 1508570 A1	1-19
A	WO 2002/060890 A1 (MERCIAN CORPORATION) 2002.08.08, & EP 1380579 A1	1-19

フロントページの続き

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

(72)発明者 上仲 俊光

茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内

(72)発明者 岩田 正夫

茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研究所内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR41 QR56
QR62 QR69 QR77 QR84 QS16 QS25 QS34 QX02

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于测定癌细胞对抗癌药物的易感性的方法		
公开(公告)号	JPWO2005075681A1	公开(公告)日	2007-10-11
申请号	JP2005517829	申请日	2005-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社 美露香株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司 梅尔恰安公司		
[标]发明人	上仲俊光 岩田正夫		
发明人	上仲 俊光 岩田 正夫		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/02 G01N33/53.B G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	古屋聪 持田真治		
优先权	2004069384 2004-03-11 JP		
其他公开文献	JP4263724B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

如果可以通过活检等检查从癌症患者收集的癌细胞中表达的分子来研究癌细胞对该化合物的敏感性，则可以预期仅有这种化合物具有抗肿瘤作用的癌症患者预计可以施用该化合物，增强治疗效果并减少不必要的副作用它是。对于细节，特征被称为“pRB的表达不足”，“表达p16阳性”，“细胞周期蛋白E的高表达”被变得清晰，它是作为对癌细胞的化合物高灵敏度的标记物是有用的，通过检查癌细胞的这些性质，可以预先研究癌细胞对该化合物的易感性。

