

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6494400号
(P6494400)

(45) 発行日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日(2019.3.15)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 51/00	(2006.01)	A 61 K 51/00	1 O O
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	N
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00	
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1

請求項の数 9 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2015-92692 (P2015-92692)
 (22) 出願日 平成27年4月30日 (2015.4.30)
 (65) 公開番号 特開2016-210688 (P2016-210688A)
 (43) 公開日 平成28年12月15日 (2016.12.15)
 審査請求日 平成30年2月27日 (2018.2.27)

(73) 特許権者 301032942
 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
 (73) 特許権者 510097747
 国立研究開発法人国立がん研究センター
 東京都中央区築地五丁目1番1号
 (73) 特許権者 000230250
 日本メジフィジックス株式会社
 東京都江東区新砂3丁目4番10号
 (74) 代理人 100168848
 弁理士 黒崎 文枝
 (72) 発明者 吉井 幸恵
 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
 国立研究開発法人放射線医学総合研究所内
 最終頁に続く

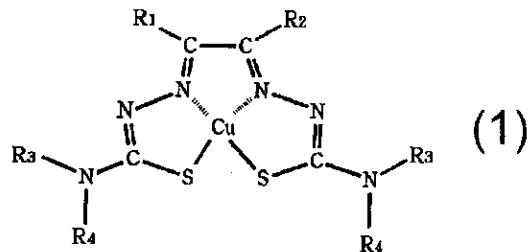
(54) 【発明の名称】放射性抗腫瘍剤、及び、抗腫瘍用キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式(1)で表される放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体を含有し、血管新生阻害剤と併用投与するために用いられ、前記血管新生阻害剤が抗VEGF抗体を含む、放射性抗腫瘍剤。

【化 1】



[式中 R₁、R₂、R₃、R₄はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基又はアルコキシ基を示す。Cuは銅の放射性同位体を示す。]

【請求項 2】

前記銅の放射性同位体が、⁶⁴Cu又は⁶⁷Cuである、請求項1に記載の放射性抗腫瘍剤。

【請求項 3】

前記 V E G F 抗体が、ベバシズマブ又はその塩を含む、請求項 1 又は 2 に記載の放射性抗腫瘍剤。

【請求項 4】

前記放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体が、
 放射性グリオキザール-ビス (N 4-メチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、
 放射性グリオキザール-ビス (N 4-ジメチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、
 放射性エチルグリオキザール-ビス (N 4-メチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、
 放射性エチルグリオキザール-ビス (N 4-エチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、
 放射性ピルブアルデヒド-ビス (N 4-メチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、
 放射性ピルブアルデヒド-ビス (N 4-ジメチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、
 放射性ピルブアルデヒド-ビス (N 4-エチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、
 放射性ジアセチル-ビス (N 4-メチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、
 放射性ジアセチル-ビス (N 4-ジメチルチオセミカルバゾン) 銅錯体、又は、
 放射性ジアセチル-ビス (N 4-エチルチオセミカルバゾン) 銅錯体である、請求項 1
 乃至 3 いずれか一項に記載の放射性抗腫瘍剤。 10

【請求項 5】

前記放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体が、⁶⁴Cu-ATSM 又は ⁶⁷Cu-ATSM
 M である、請求項 1 乃至 4 いずれか一項に記載の放射性抗腫瘍剤。

【請求項 6】

前記血管新生阻害剤の投与後に用いられる、請求項 1 乃至 5 いずれか一項に記載の放射
 性抗腫瘍剤。 20

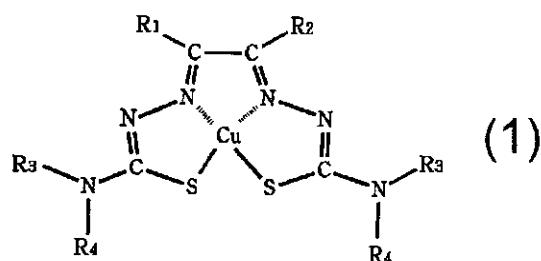
【請求項 7】

前記血管新生阻害剤の投与量が、前記抗血管新生阻害剤を単独投与したとき該血管新生
 阻害剤の投与後の体重減少率が 10 % 以下となるように設定されている、請求項 1 乃至 6
 いずれか一項に記載の放射性抗腫瘍剤。

【請求項 8】

下記一般式 (1) で表される放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体と併用投与するため
 に用いられ、抗VEGF抗体を含む、血管新生阻害剤。

【化 2】

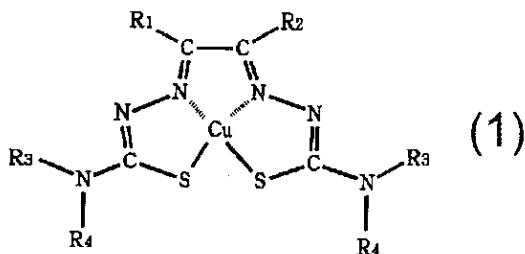


[式中 R₁、R₂、R₃、R₄はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基又はアルコキシ基を示す。Cuは銅の放射性同位体を示す。]

【請求項 9】

抗VEGF抗体を含む血管新生阻害剤と、
 下記一般式 (1) で表される放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体と、
 を有する抗腫瘍用キット。

【化3】



[式中R₁、R₂、R₃、R₄はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基又はアルコキシ基を示す。Cuは銅の放射性同位体を示す。] 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、放射性抗腫瘍剤、及び、抗腫瘍用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体は、低酸素部位やミトコンドリア機能障害の診断剤として知られている（例えば、特許文献1）。また、非特許文献1には、放射性ジアセチル-ビス（N4-メチルチオセミカルバゾン）銅錯体（以下、「放射性Cu-ATSM」ともいう。）は、低酸素領域を標的とした腫瘍の放射線治療剤として有用であることが記載されている。 20

【0003】

また、近年、⁶⁴Cu-ATSMは、CD133陽性細胞に集積することが明らかとなつた（非特許文献2）。非特許文献3には、腫瘍中のCD133陽性細胞の量を低減し、腫瘍が縮小できたことが報告されている。このため、放射性Cu-ATSMは、がん幹細胞の検出剤、及び、がん幹細胞を標的化したがんの予防・治療剤としての有用性も期待されている（特許文献2）。

【0004】

しかしながら、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体は、生体内に投与すると正常な肝臓に対しても放射能が大量に集積してしまう。かかる課題を解決する手法として、特許文献3、非特許文献4には、⁶⁴Cu-ATSMとD-ペニシラミンとを併用投与することで、肝臓への放射能集積を減少させた例が記載されている。 30

【0005】

また、特許文献4には、放射性Cu-ATSMを代謝阻害剤と併用することにより、抗腫瘍効果を高めたことが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開平8-245425号公報

40

【特許文献2】特開2010-13380号公報

【特許文献3】特開2014-129316号公報

【特許文献4】特開2014-141457号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Jason S. Lewis et al (2001), Prog. Natl. Acad. Sci. vol. 98, 1206-1211

【非特許文献2】Yukie Yoshii et al (2010), Nucl. Med. Biol. vol. 37, 395-404

【非特許文献3】Yukie Yoshii et al (2011), Nucl. Me 50

d. Biol. vol. 38, 151-157

【非特許文献4】 Yukie Yoshii et al (2014), PLoS ONE, 9 (1), e86996

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体は、低酸素化した腫瘍増殖を抑制できるものとして有用である一方、生体内に投与すると正常な肝臓に対しても放射能が大量に集積してしまう。このため、特許文献3、非特許文献4に示すような技術を使用しない場合、肝臓等の正常組織への被曝線量が制限となり、抗腫瘍効果を得るために十分な量を投与することができない。

10

【0009】

血管新生阻害剤は、副作用が少なく腫瘍増殖を抑制できるものとして、腫瘍の治療に汎用されているが、腫瘍への血液供給が減少するため、低酸素化した耐性腫瘍ができることが問題になっている。こうした耐性腫瘍では、血管新生阻害剤と他の薬剤とを併用した場合、単独投与時と比較して、取りこみ量が減少するおそれがある。

20

【0010】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体及び血管新生阻害剤の各々の抗腫瘍効果を高める技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

20

【0011】

本発明者らは、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体と血管新生阻害剤とを併用することにより、腫瘍細胞に対する相乗的な殺傷効果が得られることを新たに知見し、本発明を完成させた。

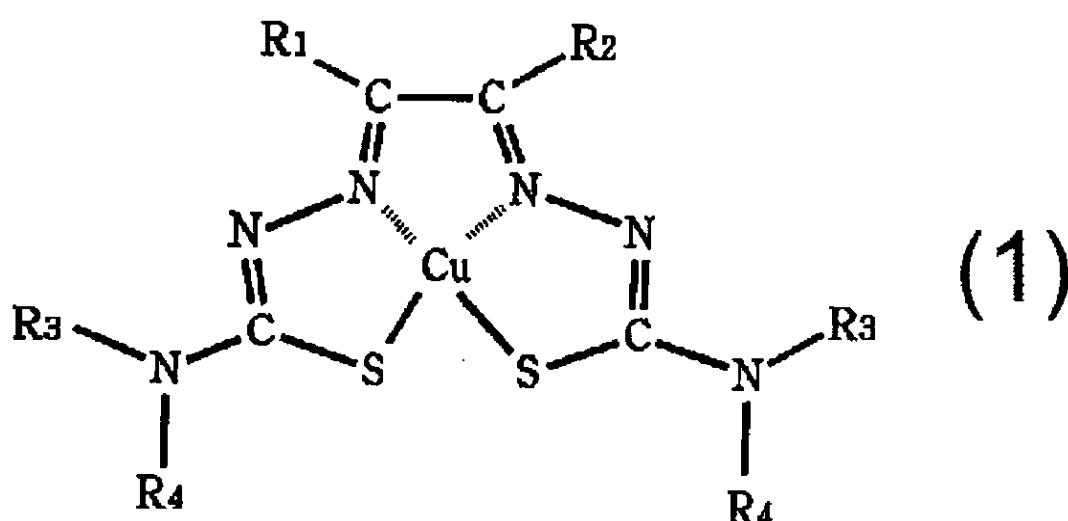
【0012】

本発明の一態様は、下記一般式(1)で表される放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体を含有し、血管新生阻害と併用投与するために用いられ、前記血管新生阻害剤が抗VEGF抗体を含む、放射性抗腫瘍剤を提供するものである。

【0013】

【化1】

30



【0014】

上記一般式(1)中R₁、R₂、R₃、R₄はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基又はアルコキシ基を示す。Cuは銅の放射性同位体を示す。

【0015】

また、本発明の他の態様は、上記一般式(1)で表される放射性ジチオセミカルバゾン

50

銅錯体と併用投与するために用いられ、抗VEGF抗体を含む、血管新生阻害剤を提供するものである。

【0016】

また、本発明の他の態様は、

抗VEGF抗体を含む血管新生阻害剤と、

上記一般式（1）で表される放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体と、
を有する抗腫瘍用キットを提供するものである。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体と血管新生阻害剤とを併用することにより、相乗的な抗腫瘍効果を得ることができる。 10

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】^{[64]Cu}ジアセチル-ビス（N4-メチルチオセミカルバゾン）銅錯体（⁶⁴Cu-A T S M）及びベバシズマブを併用投与し又は単独投与したH T 2 9 担がんマウスの腫瘍体積の経時変化を示す図である。

【図2】H T 2 9 担がんマウスについて、⁶⁴C u - A T S Mとベバシズマブとの併用前後の白血球の数を比較した図である。

【図3】H T 2 9 担がんマウスにおける⁶⁴C u - A T S Mの体内分布を示す図である。

【図4】H T 2 9 担がんマウスの腫瘍移植部位の画像を示す図であり、破線で囲んだ部位が腫瘍移植部位である。Aが対照群の⁶⁴C u - A T S M（P E T）画像であり、Bが対照群の^{99m}T c - ヒト血清アルブミン（^{99m}T c - H S A）（S P E C T）画像であり、CがAとBとの重ね合わせ画像であり、Dがベバシズマブ投与群の⁶⁴C u - A T S M（P E T）画像であり、Eがベバシズマブ投与群の^{99m}T c - H S A（S P E C T）画像であり、FがDとEとの重ね合わせ画像である。 20

【図5】ベバシズマブ投与の有無による腫瘍細胞への⁶⁴C u - A T S M取り込み比較を示す図である。

【図6】⁶⁴C u - A T S M及びベバシズマブを併用投与し又は単独投与したA 5 4 9 担がんマウスの腫瘍体積の経時変化を示す図である。

【図7】⁶⁴C u - A T S M及びレゴラフェニブを併用投与し又は単独投与したH T 2 9 担がんマウスの腫瘍体積の経時変化を示す図である。 30

【図8】H T 2 9 担がんマウスについて、⁶⁴C u - A T S Mとレゴラフェニブとの併用前後の白血球数を比較した図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

【放射性抗腫瘍剤】

本発明において、「抗腫瘍」とは、腫瘍の増加を抑制すること、更には、腫瘍を減少若しくは消滅することをいい、本発明の「抗腫瘍剤」は、腫瘍細胞を殺傷し、腫瘍の増殖を抑制し、更には、腫瘍を減少若しくは消滅できるものを有効成分として含有する剤をいう。 40

【0020】

本発明の放射性抗腫瘍剤は、各種の腫瘍に対し適用することができる。本発明の放射性抗腫瘍剤が適用される腫瘍としては、例えば、乳癌、脳腫瘍、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、肺癌、結腸癌、直腸癌、大腸癌、小腸癌、食道癌、十二指腸癌、舌癌、咽頭癌、唾液腺癌、神経鞘腫、肝臓癌、腎臓癌、胆管癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、皮膚癌、血管腫、悪性リンパ腫、悪性黒色腫、甲状腺癌、副甲状腺がん、鼻腔がん、副鼻腔がん、骨腫瘍、血管線維腫、網膜肉腫、陰茎癌、精巣腫瘍、小児固形癌、肉腫、白血病などが挙げられる。これらの腫瘍は、原発性であっても転移性であってもよい。

【0021】

本発明の放射性抗腫瘍剤は、上記一般式（1）で表される放射性ジチオセミカルバゾン 50

銅錯体をそのまま、あるいは薬理学的に許容され得る担体、希釈剤、若しくは賦形剤とともに製剤化されていればよい。剤形は、経口投与又は非経口投与のいずれであってもよいが、例えば注射剤などの非経口投与の剤形が好ましい。

【0022】

本発明において、上記一般式(1)中の置換基R₁、R₂、R₃、R₄のアルキル基及びアルコキシ基の炭素数は、好ましくは1～5の整数であり、より好ましくは炭素数1～3の整数である。本発明において、上記一般式(1)中の置換基R₁、R₂、R₃、R₄は、同一又は異なって水素原子又は炭素数1～3のアルキル基であることが好ましく、R₁及びR₂が同一又は異なって水素原子又は炭素数1～3のアルキル基であり、R₃が水素原子であり、R₄が炭素数1～3のアルキル基であることがより好ましく、R₁及びR₂が同一又は異なって水素原子又はメチル基であり、R₃が水素原子であり、R₄がメチル基であることが更に好ましい。10

【0023】

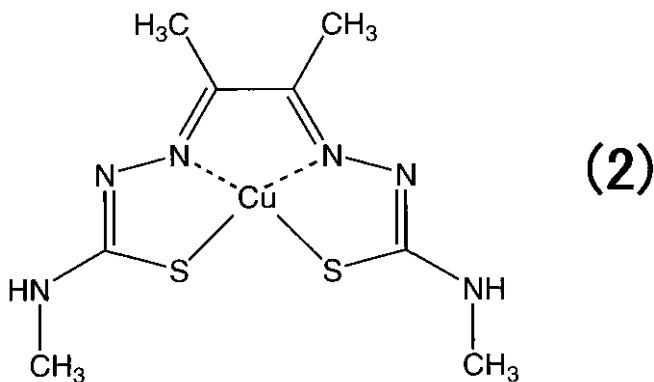
上記一般式(1)中の銅の放射性同位体は、⁶¹Cu、⁶²Cu、⁶⁴Cu又は⁶⁷Cuであることが好ましく、⁶⁴Cu、⁶⁷Cuがより好ましい。⁶⁴Cu、⁶⁷Cuは飛程の短いβ線も放出し、細胞を破壊するため、抗腫瘍効果を更に高めることができる。

【0024】

上記一般式(1)で表される放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体は、具体的には、放射性グリオキザール-ビス(N4-メチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性グリオキザール-ビス(N4-ジメチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性エチルグリオキザール-ビス(N4-メチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性エチルグリオキザール-ビス(N4-エチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性ピルブアルデヒド-ビス(N4-メチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性ピルブアルデヒド-ビス(N4-ジメチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性ピルブアルデヒド-ビス(N4-エチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性ジアセチル-ビス(N4-メチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性ジアセチル-ビス(N4-ジメチルチオセミカルバゾン)銅錯体、放射性ジアセチル-ビス(N4-エチルチオセミカルバゾン)銅錯体等が示される。中でも、下記式(2)で表される放射性ジアセチル-ビス(N4-メチルチオセミカルバゾン)銅錯体(以下、放射性Cu-ATSMともいう。)又は放射性ピルブアルデヒド-ビス(N4-ジメチルチオセミカルバゾン)銅錯体(以下、放射性Cu-PTSMともいう。)が好ましく、放射性Cu-ATSMがより好ましい。20 30

【0025】

【化2】



【0026】

式(2)中、Cuは銅の放射性同位体を示し、好ましくは⁶⁴Cu、⁶⁷Cuである。

【0027】

本発明の放射性抗腫瘍剤は、例えば、以下の方法により製造することができる。50

【0028】

まず、Petering et al. (Cancer Res., 24, 367-372, 1964) に記載の方法によりジチオセミカルバゾン誘導体を合成する。すなわち、 α -ケトアルデヒドの1mol水溶液又は50体積%エタノール溶液を30~40分かけてチオセミカルバジド、N4-メチルチオセミカルバジド、N4-ジメチルチオセミカルバジド等の2.2mol含有5%氷酢酸溶液に50~60°Cで滴下する。滴下中は反応液を攪拌する。滴下終了後室温で数時間放置した後、冷却して結晶を分離する。結晶はメタノールに溶解して再結晶を行い精製する。

【0029】

つづいて、放射性銅イオンを製造する。放射性銅イオンは、公知の方法により製造することができるが、 ^{64}Cu イオンは例えば、McCarthyらの方法 (Nuclear Medicine and Biology, vol. 24 (1), 1997, pp. 35-43)、又は、Obataらの方法 (Nuclear Medicine and Biology, vol. 30 (5), 2003, pp. 535-539) により得ることができる。 ^{67}Cu イオンは例えば、 ^{68}Zn (p, 2p) ^{67}Cu 反応から ^{67}Cu を生成した後、イオンクロマトグラフィー等を用いてターゲットから化学的に分離することにより得ることができる。

【0030】

その後、上記ジチオセミカルバゾン誘導体をジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液として、上記放射性銅イオンを含む溶液と接触させることにより、上記一般式 (1) で表される放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体を得ることができる。放射性Cu-ATSMは、例えば、Jalilianiらの方法 (Acta Pharmaceutica, 59 (1), 2009, pp. 45-55)、「PET用放射性薬剤の製造および品質管理—合成と臨床使用へのてびき」(PET化学ワークショップ編)第4版(平成23年改定版)記載の方法、Tanakaらの方法 (Nuclear Medicine and Biology, vol. 33, 2006, pp. 743-50)、Lewisらの方法 (J. Nucl. Med., 2001, 42, 655-661) 等により製造することができる。

【0031】

本発明の放射性抗腫瘍剤は、後述する血管新生阻害剤と併用投与するために用いられる。本発明において「併用投与」とは、同一の投与レジメンで用いられることをいい、同一の腫瘍領域に対し、同一の治療効果(腫瘍の増殖抑制、更には、縮小又は消滅の効果)を発揮できるようにそれぞれの剤が投与されればよい。放射性抗腫瘍剤の投与前に血管新生阻害剤が投与されてもよいし、放射性抗腫瘍剤の投与後に血管新生阻害剤が投与されてもよいし、放射性抗腫瘍剤と血管新生阻害剤とが同時に投与されてもよい。

【0032】

好ましくは、血管新生阻害剤の投与後に本発明の放射性抗腫瘍剤を投与することができ、血管新生阻害剤を単回投与(好ましくは持続投与)又は反復投与した後に、本発明の放射性抗腫瘍剤が投与されることがより好ましい。本発明において「反復投与」とは、一定の時間を空けて複数回投与することであり、例えば、1日1回又は複数回ずつ、2日~1ヶ月間投与することができる。また、「持続投与」とは、一定の時間連続して投与することであり、例えば、数時間~1週間、連続して投与することができる。血管新生阻害剤の前投与で腫瘍内の血管は低減するが、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体は、組織浸透性が高いため、腫瘍内に浸透し抗腫瘍効果を発現することができる。したがって、本発明の放射性抗腫瘍剤によれば、血管新生阻害剤との間で相乗的な抗腫瘍効果をより一層高めることができる。

【0033】

血管新生阻害剤の投与後に本発明の放射性抗腫瘍剤を投与する場合、血管新生阻害剤と放射性抗腫瘍剤との投与間隔は、特に限定されないが、例えば、生体内における血管新生阻害剤の有効成分(例えば、ベバシズマブ、レゴラフェニブなど)の血中濃度が最高血中

10

20

30

40

50

濃度に到達した後に、本発明の放射性抗腫瘍剤を投与することができる。

【0034】

本発明の放射性抗腫瘍剤の投与対象は、例えば哺乳動物であり、好ましくはヒトである。本発明の放射性抗腫瘍剤の投与量は、投与対象となる患者の種別、年齢、性別、体重、症状、投与法などによって異なり特に限定されないが、一般的の放射性医薬品において通常採用されている範囲を採用することができる。また、本発明の放射性抗腫瘍剤は、単回投与されてもよいし、複数回投与されてもよい。

【0035】

[血管新生阻害剤]

本発明において血管新生阻害剤とは、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）と受容体（VEGFR）を主な標的とした薬剤であって、血管新生阻害により、癌細胞への増殖因子や酸素の供給を抑制し、腫瘍の増殖を抑制する抗がん剤である。血管新生阻害剤には、抗体医薬と低分子阻害剤とに分類できる。

10

【0036】

抗体医薬の有効成分としては、モノクローナル抗体が挙げられる。モノクローナル抗体としては、マウス型モノクローナル抗体、66%がヒト抗体のキメラ型モノクローナル抗体、90%がヒト抗体のヒト化モノクローナル抗体、100%ヒト抗体からなるヒト型モノクローナル抗体の4種類が挙げられるが、本発明の放射性抗腫瘍剤と併用効果の観点からは、ヒト化モノクローナル抗体が好ましい。中でも、抗VEGF抗体がより好ましく、ベバシズマブ又はその塩が特に好ましい。

20

【0037】

低分子阻害剤としては、チロシンキナーゼ阻害剤、mTOR阻害剤が挙げられるが、チロシンキナーゼ阻害剤が好ましい。チロシンキナーゼ阻害剤としては、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤が好ましく、VEGFRを標的とした、スニチニブ、ソラフェニブ及びレゴラフェニブ並びにこれらの塩から選択される1種又は2種以上を有効成分として含有するものがより好ましい。

【0038】

本発明の血管新生阻害剤の有効成分（例えば、ベバシズマブ、スニチニブ、ソラフェニブ及びレゴラフェニブ）が塩を形成するときは、その塩は薬理学的に許容される塩であればよい。

30

【0039】

本発明において血管新生阻害剤は、有効成分をそのまま、あるいは、有効成分とともに、薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、徐放剤、バッファ、コーティング剤及び着色剤等を適宜含ませて製剤化されればよく、経口投与又は非経口投与のいずれに適する剤形であってもよい。例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等の経口剤、注射剤、外用剤、坐剤、ペレット、点滴剤、徐放性製剤等の非経口剤が挙げられる。また、2種以上の剤形を組み合わせてもよい。

【0040】

本発明の血管新生阻害剤としては、種々の市販品を用いてもよい。抗体医薬としては、例えば、アバスチン（商品名）が挙げられる。また、低分子阻害剤としては、ステント（商品名）、ネクサバール（商品名）、スチバーガ（商品名）が挙げられる。

40

【0041】

この血管新生阻害剤は、前述の放射性抗腫瘍剤と併用投与して用いられればよく、放射性抗腫瘍剤の投与前若しくは投与後に単回投与（好ましくは持続投与）されてもよいし、反復投与されてもよい。また、放射性抗腫瘍剤の投与前後の両方において投与されてもよいし、放射性抗腫瘍剤と同時に投与されてもよいが、本発明の放射性抗腫瘍剤の投与前に投与されることが好ましい。血管新生阻害剤の前投与で腫瘍内の血管は低減するが、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体は組織浸透性が高いため、腫瘍内に浸透し抗腫瘍効果を発現することができる。したがって、本発明の血管新生阻害剤によれば、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体の間で相乗的な抗腫瘍効果をよりいっそう高めることができる。

50

【0042】

本発明の放射性抗腫瘍剤と併用投与される血管新生阻害剤の投与量は、特に限定されないが、好ましくは、血管新生阻害剤が単独で抗腫瘍薬として用いられる際の投与量を超えない範囲で使用することができ、血管新生阻害剤を単独投与したとき体重減少が認められない量を投与することがより好ましい。具体的には、血管新生阻害剤を単独で投与したとき血管新生阻害剤の投与後の体重減少率が10%以下となるように投与量を設定することができる。これにより、血管新生阻害剤の副作用を低減しつつ放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体の腫瘍細胞の殺傷効果を高めることができる。ここでいう単独投与とは、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体を含む他の医薬を併用しない投与レジメンをいう。体重減少率は、「体重減少率(%) = {(血管新生阻害剤の投与開始前の体重 - 血管新生阻害剤の投与開始後の体重) / 血管新生阻害剤の投与開始前の体重} × 100」で表すことができ、「血管新生阻害剤の投与開始後の体重」は、好ましくは、血管新生阻害剤の投与開始から5日～2週間後の体重にすることができる。10

【0043】**[抗腫瘍用キット]**

本発明の抗腫瘍用キットは、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体を含有する前述の放射性抗腫瘍剤と、前述の血管新生阻害剤とを有するものである。

【0044】

また、本発明の抗腫瘍用キットは、前述の血管新生阻害剤を投与した後に前述の放射性抗腫瘍剤を投与することを記載した添付文書を含むことが好ましい。この添付文書には、20後述する本発明の抗腫瘍用キットの使用方法を記載することができる。

【0045】

本発明の抗腫瘍用キットは、好ましくは、上記の放射性抗腫瘍剤、及び、前述の血管新生阻害剤を哺乳動物に投与して用いられる。投与対象となる哺乳動物としては、ヒトがより好ましい。

【0046】**[放射性抗腫瘍剤、血管新生阻害剤、及び、抗腫瘍用キットの使用方法]**

本発明の放射性抗腫瘍剤、血管新生阻害剤、抗腫瘍用キットの使用方法の一例について以下に説明する。

【0047】

まず、腫瘍を発現した被検体又は患者に血管新生阻害剤を投与する。このとき、血管新生阻害剤を単独投与したとき該血管新生阻害剤の投与後の体重減少率が10%以下となるように、血管新生阻害剤の投与量を設定することができる。30

【0048】

その後、前述の放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体を含有する放射性抗腫瘍剤を投与する。血管新生阻害剤の前投与で腫瘍内の血管は低減するが、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体は組織浸透性が高いため、腫瘍内に浸透し抗腫瘍効果を発現することができる。したがって、本発明の抗腫瘍用キットによれば、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体と血管新生阻害剤とが相乗的な抗腫瘍効果をよりいっそう高めることができる。この放射性抗腫瘍剤は、血管新生阻害剤の投与後、生体内における、血管新生阻害剤の有効成分（例えば、ベバシズマブ、スニチニブ、ソラフェニブ、レゴラフェニブ）の血中濃度が最高血中濃度に到達した後に、投与することができる。40

【0049】

また、血管新生阻害剤の反復投与と、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体を含有する放射性抗腫瘍剤の単回投与とからなる投与計画を複数回繰り返してもよい。この繰り返しは、連続して行ってもよいし、当該放射性抗腫瘍剤の投与後1～30日間、好ましくは、10～25日間の間隔をおいて行ってもよい。

【0050】

これにより、放射性ジチオセミカルバゾン銅錯体と血管新生阻害剤とが相乗的に作用して、腫瘍細胞を殺傷する。そして、本発明の抗腫瘍用キットによれば、腫瘍細胞の殺傷効50

果と放射線増感効果とを併せ持つため、高い腫瘍増殖抑制効果を得ることができる。また、投与する放射能量に対する抗腫瘍効果が高いため、正常組織に対する被曝を抑えることができる。また、血管新生阻害剤の投与量は体重減少させない程度に少ないため、血管新生阻害剤の副作用も低減することができる。

【0051】

以上、本発明の実施形態について説明したが、本発明は上記実施形態に限定されず種々の変更を行うことができる。

【実施例】

【0052】

以下、実施例を記載して本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの内容に限定されるものではない。10

【0053】

(製造例1) ^{64}Cu -ATSM、及び、血管新生阻害剤の調製
(ATSMの合成)

ジアセチル-ビス(4-メチルチオセミカルバゾン)(ATSM)の合成は、Tanakalaraの方法(Nuclear Medicine and Biology, vol. 33, 2006, pp. 743-50)に準じた。

【0054】

(^{64}Cu -ATSMの合成)

^{64}Cu はMcCartyらの方法(Nuclear medicine and biology, vol. 24, 1997, pp. 35-43)及びObataらの方法(Nuclear medicine and biology, vol. 30, 2003, pp. 535-539)に準じて製造・精製した。ATSMと ^{64}Cu を用い、Tanakalaraの方法(上掲)に準じて ^{64}Cu -ATSMを合成した。また、製造後の薬剤は、薄層クロマトグラフ法(TLC法)を用いて検定し、放射化学的純度95%以上のものを以下の実験に使用した。なお、TLCを用いた ^{64}Cu -ATSMの分析条件は下記のとおりである。20

TLCプレート：シリカゲルプレート(製品名：Silica gel 60、メルク)

展開相：酢酸エチル

検出：フルオロイメージアナライザー(形式：FLA-7000, 富士フィルム)

【0055】

(ベバシズマブ溶液の調製)

ベバシズマブ(アバスチン(登録商標)点滴静注用100mg/4mL、中外製薬)を生理食塩液に溶解し、マウス1匹あたり100μLになるように調製して、以下の実験に使用した。

(レゴラフェニブ溶液の調製)

レゴラフェニブ(スチバーガ(登録商標)錠40mg 28錠、バイエル)を生理食塩液に溶解し、マウス1匹あたり100μLになるように調製して、以下の実験に使用した。

【0056】

(実施例1) HT29担がんマウスへの ^{64}Cu -ATSM及びベバシズマブの投与による抗腫瘍効果40

ヒト大腸がん由来のHT29細胞は、ATCCより購入したものを増殖させて利用した。HT29担がんモデルは、BALB/cヌードマウス(オス、6週齢、体重約20-25g、日本エス・エル・シーから入手)の大腿部皮下にHT29細胞 1×10^7 個を移植して作製した。HT29細胞の移植後、腫瘍径が6mm前後に到達した時点で、ベバシズマブを1回5mg/kgずつ、週2回腹腔内に反復投与した。ベバシズマブ投与開始(試験開始)から21日目に、 ^{64}Cu -ATSM 37MBq(1mCi)含有の生理食塩液溶液を尾静脈より投与した。なお、対照群にはベバシズマブ及び ^{64}Cu -ATSMに代えて生理食塩液を投与した。試験開始後、経時的に週2回、マウスの腫瘍径を計測した。

【0057】

(比較例 1) HT29担がんマウスへのベバシズマブの単独投与による抗腫瘍効果

$^{64}\text{Cu-A T S M}$ に代えて生理食塩液を投与した以外は、実施例 1 と同様にした。

【0058】

(比較例 2) HT29担がんマウスへの $^{64}\text{Cu-A T S M}$ の単独投与による抗腫瘍効果

ベバシズマブを投与する代わりに生理食塩液を投与した以外は、実施例 1 と同様に行つた。

【0059】

【評価 1-1】腫瘍成長

実施例 1、及び、比較例 1、2において測定した腫瘍径から腫瘍体積を算出し、その経時変化を、図 1 に示す。図 1 中、異なるアルファベットのグループは、two-way ANOVA 検定を行った結果、有意差 ($P < 0.05$) があったものを示す。図 1 では、試験開始前日の腫瘍体積を 100% とし、これに対する比率を腫瘍体積率 (%) として示した。また、図 1 は、各マウス群 5 匹の平均及び標準偏差で示した。腫瘍体積が 1000% に達した時点を本試験でのエンドポイントに設定した（以下「エンドポイント」の定義も同じである。）。図 1 で示すように、 $^{64}\text{Cu-A T S M}$ の単独投与では、腫瘍の増殖をほとんど抑制できず、試験開始から 31 日目でエンドポイントに達した。また、ベバシズマブの単独投与により腫瘍の増殖を抑制できたが、 $^{64}\text{Cu-A T S M}$ とベバシズマブとの併用投与により、腫瘍増殖抑制効果の更なる向上が認められた。

【0060】

表 1 には、実施例 1、比較例 1、2 及び対照群について、試験開始前日における腫瘍体積が 5 倍になるまでの日数（5 倍腫瘍成長日数）を、各マウス群 5 匹の平均値±標準偏差で示す。また、実施例 1、比較例 1、2 について、対照群を基準として、基準日から対照群の腫瘍体積と同等の体積に成長するまでの日数を、対照群に対する成長遅延日数として示す。表 1 で示すとおり、 $^{64}\text{Cu-A T S M}$ とベバシズマブとの併用投与により、相乗的な腫瘍成長遅延が認められた。

【0061】

【表 1】

表 1

	5倍腫瘍成長日数	成長遅延日数 (対照群比)
対照群	17.0±4.4 日	—
比較例 1	32.1±1.8 日*	15.1 日
比較例 2	19.8±6.0 日	2.8 日
実施例 1	42.2±2.4 日*	25.2 日

* 対照群に対する有意差あり($P < 0.05$)

【0062】

なお、実施例 1、比較例 1、2 及び対照群の全ての腫瘍径測定時期において、試験開始前日からの体重に対して体重減少率が 10% 未満であった。

以上の結果から、 $^{64}\text{Cu-A T S M}$ と体重減少のない量のベバシズマブとの併用によ

10

20

50

り、有意な抗腫瘍効果が認められ、かつ体重減少も観察されないことが示された。

【0063】

[評価1-2] 白血球数

実施例1、比較例1、2のHT29担がんマウスについて、それぞれ⁶⁴Cu-ATSMの投与前後の白血球の数を調べた。試験開始から21日目（⁶⁴Cu-ATSM投与開始前）、試験開始から23日目（⁶⁴Cu-ATSM投与開始2日後）及び各例のエンドポイント日で、血液10μLを採取し、チュルク液（メルク）で10体積倍に希釈した。白血球の数は、血球計算盤で計測した。

【0064】

結果を図2に示す。図2には、各マウス群5匹の平均±標準偏差を示す。併用投与と単独投与との違いにより、白血球数に有意差はなかった。
10

【0065】

[評価1-3] ⁶⁴Cu-ATSMの体内分布

実施例1と同様にしてHT29担がんモデルを作製し、HT29細胞の移植後、腫瘍径が6mm前後に到達した時点で、ベバシズマブを5mg/kg腹腔内に投与し、投与後21日目に⁶⁴Cu-ATSM 185kBq (5μCi) 含有の生理食塩溶液を尾静脈投与した。1時間後、イソフルラン麻酔下で、心臓からの脱血によって屠殺した。血液及び臓器（肝臓、腎臓、小腸、大腸及び筋肉）を摘出して、重量を計量後、血液及び各摘出臓器の放射能を測定した。血液及び各摘出臓器の放射能分布 (% injected dose (ID) / g) を図3に示す。また、対照群は、ベバシズマブに代えて生理食塩液を投与する以外は同様に処理したマウス群とした。図3は、各マウス群5匹の平均と標準偏差を示す。
20

【0066】

図3で示すように、⁶⁴Cu-ATSMの単剤投与は、肝臓への集積が多く認められたが、ベバシズマブを前投与することで、肝臓への集積の低減することが示された。これにより、ベバシズマブと⁶⁴Cu-ATSMとの併用により、⁶⁴Cu-ATSMの肝臓への被曝を低減できることが示唆された。

【0067】

[評価1-4] PET/SPECT評価

実施例1と同様にしてHT29担がんモデルを作製し、HT29細胞の移植後、腫瘍径が6mm前後に到達した時点で、ベバシズマブを5mg/kg腹腔内に投与し、投与後21日目に、⁶⁴Cu-ATSM 37MBq (1mCi) の生理食塩液溶液をPET/SPECTスキャン開始60分前に、テクネチウム-99mヒト血清アルブミン (^{99m}Tc-HSA；プールシンチ注、日本メリフィジックス) 18.5MBq (0.5mCi) をPET/SPECTスキャン開始10分前にそれぞれ尾静脈投与し、PET/SPECTカメラ（製品名：VECTOR SPECT/PET/CT system、MILabs）で撮像した。また、ベバシズマブに代えて生理食塩液を投与し、ベバシズマブ投与後21日目の腫瘍とほぼ同じ大きさになるまで（具体的には、HT29植え付け後2週間まで）生育したものを対照群として同様な処置を行った。
30

結果を図4に示す。

40

【0068】

図4A～Fは、各HT29担がんマウスの腫瘍移植部位の画像であり、破線で囲んだ部位が腫瘍移植部位である。図4中、Aは対照群の⁶⁴Cu-ATSM (PET) 画像であり、Bは対照群の^{99m}Tc-HSA (SPECT) 画像であり、CはAとBとの重ねあわせである。Dはベバシズマブ投与群の⁶⁴Cu-ATSM (PET) 画像であり、Eはベバシズマブ投与群の^{99m}Tc-HSA (SPECT) 画像であり、FはDとEとの重ねあわせである。図4B、Eで示すように、ベバシズマブ投与により血管の描出が減少したが、図4A、Dで示すように、ベバシズマブ投与後も⁶⁴Cu-ATSMの取り込みは維持されていた。この結果から、血管新生抑制剤により血液取り込みが減少した腫瘍に対しても⁶⁴Cu-ATSMは取りこまれ、血管新生抑制剤とともに抗腫瘍効果を発揮する
50

ことが示唆された。

【0069】

[評価1-5] ^{64}Cu -ATSM取りこみ評価

実施例1と同様に作製したHT29担がんマウスに、ベバシズマブを5mg/kg腹腔内に投与し、投与後21日目に、 ^{64}Cu -ATSM 185kBq (5 μCi) 含有の生理食塩液溶液を投与した後、1時間後、イソフルラン麻酔下で、心臓からの脱血によって屠殺した。腫瘍を摘出して、重量及び放射能を測定した。また、対照群として、ベバシズマブに代えて生理食塩液を投与し、ベバシズマブ投与群の投与後21日目の腫瘍と同じ大きさになるまで（具体的にはHT29植え付け後2週間まで）生育したものを対照群として同様な処置を行った。得られた腫瘍の放射能分布 (% injected dose (ID) / g) を図5に示す。
10

【0070】

図5は、各マウス群5匹の平均値と標準偏差を示す。図5に示すように、ベバシズマブを前投与したHT29担がんマウス群は、対照群に対して、t検定による有意差 ($P < 0.05$) をもって、 ^{64}Cu -ATSMの取りこみが増加することが確認された。

【0071】

(実施例2) A549担がんマウスへの ^{64}Cu -ATSM及びのベバシズマブ投与による抗腫瘍効果

ヒト肺がん由来のA549細胞は、ATCCより購入したものを利用した。A549担がんモデルは、BALB/cヌードマウス（オス、6週齢、体重約20-25g、日本エス・エル・シーから入手）の大腿部皮下にA549細胞 1×10^7 個を移植して作製した。A549細胞の移植後、腫瘍径が6mm前後に到達した時点で、ベバシズマブを1回5mg/kgずつ、週2回腹腔内に反復投与した。ベバシズマブ投与開始（試験開始）から21日目に、 ^{64}Cu -ATSM 37MBq (1mCi) 含有の生理食塩液溶液を尾静脈より投与した。なお、対照群にはベバシズマブ及び ^{64}Cu -ATSMに代えて生理食塩液を投与した。試験開始後、経時的に週2回、マウスの腫瘍径を計測した。
20

【0072】

(比較例3) A549担がんマウスへのベバシズマブの単独投与による抗腫瘍効果
 ^{64}Cu -ATSMに代えて生理食塩液を投与した以外は、実施例2と同様にした。

【0073】

(比較例4) A549担がんマウスへの ^{64}Cu -ATSMの単独投与による抗腫瘍効果
ベバシズマブに代えて生理食塩液を投与した以外は、実施例2と同様にした。
30

【0074】

[評価2-1] 腫瘍成長

実施例2、及び、比較例3、4において測定した腫瘍径から腫瘍体積を算出し、その経時変化を、図6に示す。図6中、異なるアルファベットのグループは、two-way ANOVA検定を行った結果、有意差 ($P < 0.05$) があったものを示す。図6では、試験開始前の腫瘍体積を100%とし、これに対する比率を腫瘍体積率（%）として示した。また、図6は、各マウス群5匹の平均及び標準偏差で示した。図6で示すように、 ^{64}Cu -ATSMの単独投与により、腫瘍の増殖はやや抑制されたが、試験開始から35日目でエンドポイントに達した。また、ベバシズマブの単独投与により腫瘍の増殖を抑制できたが、 ^{64}Cu -ATSMとベバシズマブとの併用投与により、腫瘍増殖抑制効果の更なる向上が認められた。
40

【0075】

表2には、実施例2、比較例3、4及び対照群について、試験開始前日における腫瘍体積が5倍になるまでの日数（5倍腫瘍成長日数）を、各マウス群5匹の平均値±標準偏差で示す。また、実施例2、比較例3、4について、対照群を基準として、基準日から対照群の腫瘍体積と同等の体積に成長するまでの日数を、対照群に対する成長遅延日数として示す。表2で示すとおり、 ^{64}Cu -ATSMとベバシズマブとの併用投与により、相乗的な腫瘍成長遅延が認められた。
50

【0076】

【表2】

表2

	5倍腫瘍成長日数	成長遅延日数 (対照群比)
対照群	24.0±4.4日	—
比較例3	44.2±4.5日*	20.2日
比較例4	26.8±5.2日	2.8日
実施例2	60.2±12.5日*	36.2日

* 対照群に対する有意差あり($P<0.05$)

【0077】

なお、実施例2、比較例3、4及び対照群の全ての腫瘍径測定時期において、試験開始前日からの体重減少率が10%未満であった。

以上の結果から、がん種を変更した場合においても⁶⁻⁴Cu-ATSMと体重減少のない量のベバシズマブとの併用により、有意な抗腫瘍効果が認められ、かつ体重減少も観察されないことが示された。

【0078】

(実施例3) HT29担がんマウスへの⁶⁻⁴Cu-ATSM及びレゴラフェニブの投与による抗腫瘍効果

実施例1と同様な方法でHT29担がんモデルを作製し、HT29細胞の移植後、腫瘍径が6mm前後に到達した時点で、レゴラフェニブを1日1回30mg/kgずつ、10日間、中2日間の休薬を挟んで(4日目・5日目を休薬日とした)、腹腔内に反復投与した。レゴラフェニブ投与(試験開始)から7日目に、⁶⁻⁴Cu-ATSM 37MBq(1mCi)含有の生理食塩液溶液を尾静脈より投与した。なお、対照群にはレゴラフェニブ及び⁶⁻⁴Cu-ATSMに代えて生理食塩液を投与した。試験開始後、経時的に週2回、マウスの腫瘍径を計測した。

【0079】

(比較例5) HT29担がんマウスへのレゴラフェニブの単独投与による抗腫瘍効果⁶⁻⁴Cu-ATSMに代えて生理食塩液を投与した以外は、実施例3と同様にした。

【0080】

(比較例6) HT29担がんマウスへの⁶⁻⁴Cu-ATSMの単独投与による抗腫瘍効果レゴラフェニブに代えて生理食塩液を投与した以外は、実施例3と同様にした。

【0081】

[評価3-1] 腫瘍成長

実施例3、及び、比較例5、6において測定した腫瘍径から腫瘍体積を算出し、その経時変化を、図7に示す。図7中、異なるアルファベットのグループは、two-way ANOVA検定を行った結果、有意差(図示したもの以外は、 $P < 0.05$)があったものを示す。図7では、試験開始前の腫瘍体積を100%とし、これに対する比率を腫瘍体積率(%)として示した。また、図7は、各マウス群5匹の平均及び標準偏差で示した

30

40

50

。図7で示すように、⁶⁴Cu-A T S Mの単独投与により、腫瘍の増殖はやや抑制されたが、試験開始から34日目でエンドポイントに達した。また、レゴラフェニブの単独投与により腫瘍の増殖を抑制できたが、⁶⁴Cu-A T S Mとレゴラフェニブとの併用投与により、腫瘍増殖抑制効果の更なる向上が認められた。

【0082】

表3には、実施例3、比較例5、6及び対照群について、試験開始前日における腫瘍体積が5倍になるまでの日数（5倍腫瘍成長日数）を、各マウス群5匹の平均値±標準偏差で示す。また、実施例3、比較例5、6について、対照群を基準として、基準日から対照群の腫瘍体積と同等の体積に成長するまでの日数を、対照群に対する成長遅延日数として示す。表3で示すとおり、⁶⁴Cu-A T S Mとレゴラフェニブとの併用投与により、相乘的な腫瘍成長遅延が認められた。
10

【0083】

【表3】

表3

	5倍腫瘍成長日数	成長遅延日数 (対照群比)
対照群	20.0±0日	—
比較例5	31.3±2.9日*	11.3日
比較例6	22.0±2.8日	2日
実施例3	37.4±4.3日*	17.4日

* 対照群に対する有意差あり($P<0.05$)

【0084】

なお、実施例3、比較例5、6及び対照群については、試験開始13日目以降の腫瘍径測定時期において、試験開始前日からの体重減少率が10%未満であった。

以上の結果から、⁶⁴Cu-A T S Mとレゴラフェニブとの併用により、有意な抗腫瘍効果が認められ、かつ体重減少も観察されないことが示された。

【0085】

【評価3-2】白血球数

実施例3、比較例5、6のHT29担がんマウスについて、それぞれ⁶⁴Cu-A T S Mの投与前後の白血球の数を調べた。試験開始から6日目（⁶⁴Cu-A T S M投与開始前）、試験開始から9日目（⁶⁴Cu-A T S M投与開始2日後）及び各群エンドポイント日で、血液10μLを採取し、チュルク液（メルク）で10体積倍に希釈した。白血球の数は、血球計算盤で計測した。
40

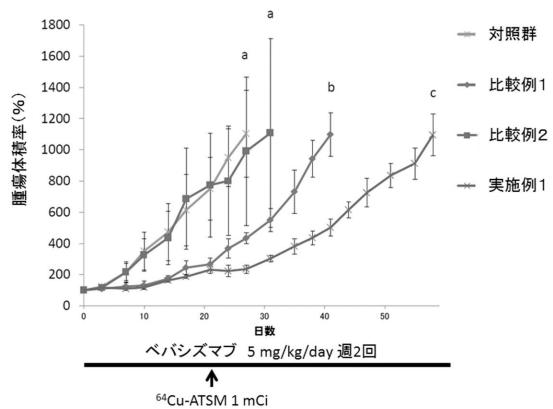
【0086】

結果を図8に示す。図8には、各マウス群5匹の平均値±標準偏差を示す。併用投与と単独投与との違いにより、白血球数に有意差はなかった。

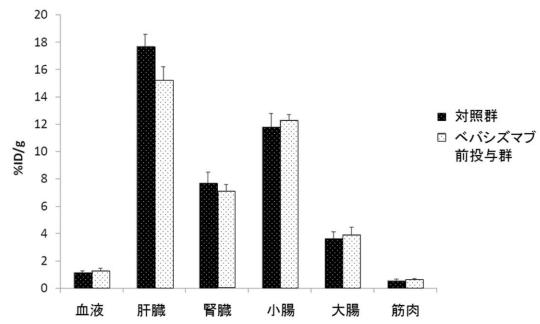
【0087】

以上の結果から、⁶⁴Cu-A T S Mと血管新生阻害剤との併用により、相乗的な抗腫瘍効果が認められた。
50

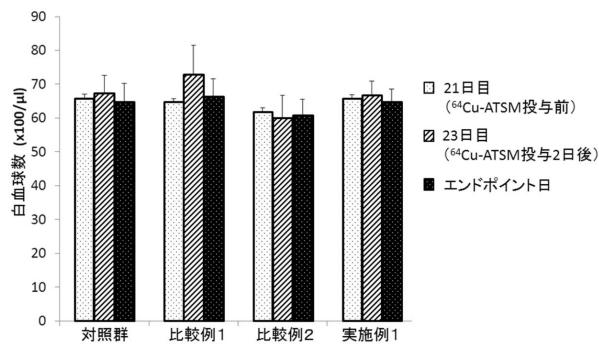
【図 1】



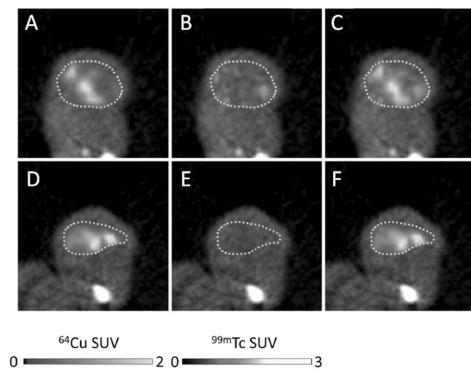
【図 3】



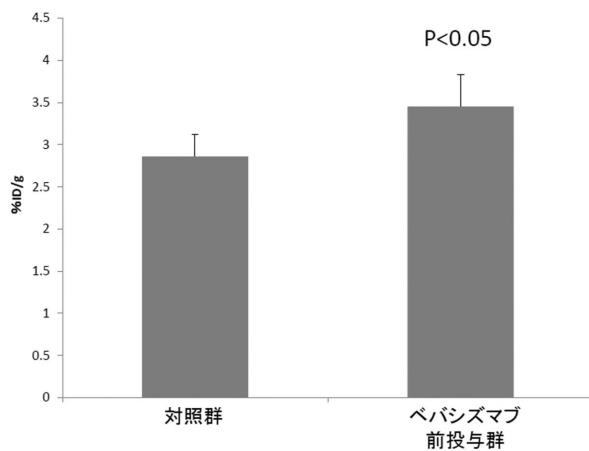
【図 2】



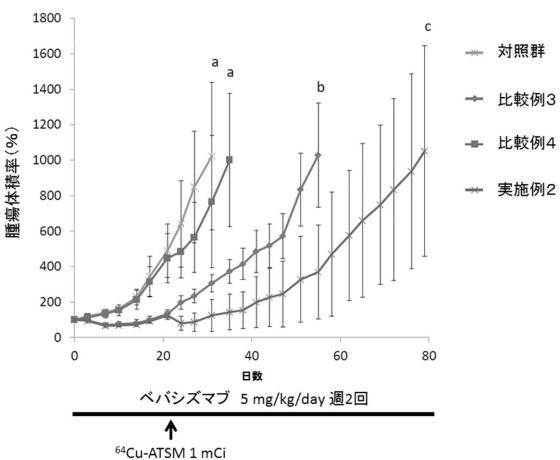
【図 4】



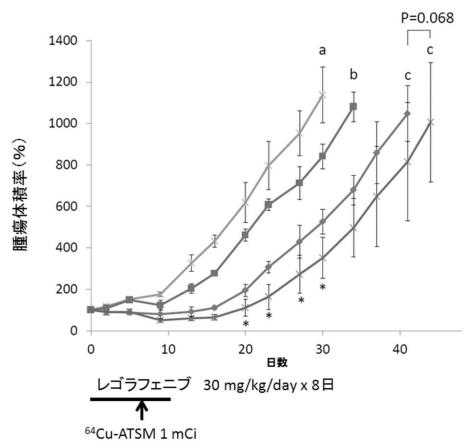
【図 5】



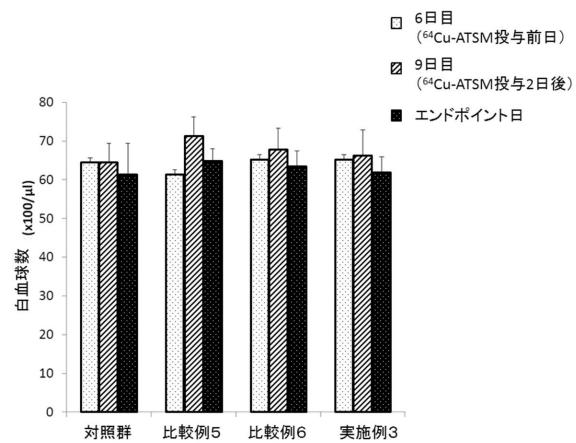
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(72)発明者 古川 高子

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 国立研究開発法人放射線医学総合研究所内

(72)発明者 佐賀 恒夫

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 国立研究開発法人放射線医学総合研究所内

(72)発明者 吉本 光喜

東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内

(72)発明者 松本 博樹

東京都江東区新砂3丁目4番10号 日本メジフィジックス株式会社内

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開2014-141457 (JP, A)

特開2010-013380 (JP, A)

がん分子標的治療, 2014年 1月, Vol.11, No.2, p.119-126

日薬理誌, 2010年, 136, p.204-209

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 51/00

A 61 K 39/395

A 61 P 35/00

A 61 P 43/00

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)