

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6449537号  
(P6449537)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int. Cl.

F 1

<b>A 6 1 K 51/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 51/04	1 0 0
<b>A 6 1 K 45/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 2 1
<b>A 6 1 K 33/34</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 33/34	

請求項の数 13 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-250743 (P2013-250743)  
 (22) 出願日 平成25年12月4日(2013.12.4)  
 (65) 公開番号 特開2014-141457 (P2014-141457A)  
 (43) 公開日 平成26年8月7日(2014.8.7)  
 審査請求日 平成28年11月8日(2016.11.8)  
 (31) 優先権主張番号 特願2012-289452 (P2012-289452)  
 (32) 優先日 平成24年12月27日(2012.12.27)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(出願人による申告)平成25年度、文部科学省、「分子イメージング研究戦略推進プログラム」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(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  
 (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  
 (74) 代理人 100091502  
 弁理士 井出 正威  
 (74) 代理人 100131613  
 弁理士 大塚 章宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 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】

${}^6\text{Cu}$  ATSMを含有し、ピリミジン代謝拮抗剤、プリン代謝拮抗剤、及び、葉酸代謝拮抗剤からなる群から選択される1種又は2種以上の代謝阻害剤と併用投与するために用いられる抗腫瘍剤。

【請求項2】

前記代謝阻害剤が、フッ化ピリミジン系薬剤である、請求項1に記載の抗腫瘍剤。

【請求項3】

前記フッ化ピリミジン系薬剤が、有効成分として、5 フルオロウラシル、テガフル、カペシタピン及びこれらの塩からなる群から選択される1又は2以上の化合物を含有する、請求項2に記載の抗腫瘍剤。

【請求項4】

前記代謝阻害剤が、有効成分として、6 -チオグアニン、又は、ペメトレキセドを含有する、請求項1に記載の抗腫瘍剤。

【請求項5】

殺がん幹細胞剤として用いられる、請求項1乃至4いずれか一項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項6】

前記代謝阻害剤を投与した後に用いられる、請求項1乃至5いずれか一項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項7】

10

20

前記代謝阻害剤の投与量が、前記代謝阻害剤を単独投与したとき該代謝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抗腫瘍剤。

【請求項8】

$^{64}\text{Cu}$  ATSMと併用投与するために用いられる、ピリミジン代謝拮抗剤、プリン代謝拮抗剤、及び、葉酸代謝拮抗剤からなる群から選択される1種又は2種以上の抗腫瘍剤。

【請求項9】

殺がん幹細胞剤として用いられる、請求項8に記載の抗腫瘍剤。

【請求項10】

有効成分として、5-フルオロウラシル、テガフル、カペシタピン及びこれらの塩からなる群から選択される1又は2以上の化合物を含む、請求項8又は9に記載の抗腫瘍剤。

【請求項11】

ピリミジン代謝拮抗剤、プリン代謝拮抗剤、及び、葉酸代謝拮抗剤からなる群から選択される1種又は2種以上の代謝阻害剤と、

$^{64}\text{Cu}$  ATSMと、  
を有する抗腫瘍用キット。

【請求項12】

がん幹細胞を殺傷するために用いられる、請求項11に記載の抗腫瘍用キット。

【請求項13】

前記代謝阻害剤としてフッ化ピリミジン系薬剤を含む、請求項11又は12に記載の抗腫瘍用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、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 $^{64}\text{Cu}$  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。

【0003】

また、近年、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMは、CD133陽性細胞に集積することが明らかとなった（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 $^{64}\text{Cu}$  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）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平8-245425号公報

【特許文献2】特開2010-13380号公報

【非特許文献】

【0005】

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

【非特許文献2】Yukie Yoshii et al (2010), *Nucl. Me*

10

20

30

40

50

d . B i o l . v o l . 3 7 , 3 9 5 - 4 0 4

【非特許文献3】Yukie Yoshii et al (2011), Nucl . Me  
d . B i o l . v o l . 3 8 , 1 5 1 - 1 5 7

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、特許文献2の開示によれば、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMは、腫瘍内で $^{18}\text{F}$  FDGと異なる部位に集積することが明らかにされている。そのため、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与では、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMが集積しない腫瘍領域を効果的に殺傷できない、という問題がある。

10

【0007】

放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの投与量を高めれば、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの発する放射線により、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMが集積しない腫瘍領域も殺傷できるかもしれない。しかしながら、正常組織に対する被曝量の増加が懸念される。

【0008】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMによる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】

【0009】

本発明者は、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMを代謝阻害剤と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た。また、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMと代謝阻害剤との併用投与により、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与に比べてがん幹細胞(cancer stem cell)の殺傷効果が高まることも見出した。

20

【0010】

本発明の一態様は、放射性ジアセチルピス(N4メチルチオセミカルバゾン)銅錯体(放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSM)を含有し、代謝阻害剤と併用投与するために用いられる抗腫瘍剤を提供するものである。

【0011】

また、本発明の他の態様は、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMと併用投与するために用いられる、代謝阻害剤を提供するものである。

30

【0012】

さらに、本発明の他の態様は、代謝阻害剤と、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSM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】

【0013】

本発明によれば、がん幹細胞及び腫瘍細胞に対する高い殺傷効果を得ることができ、放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMによる抗腫瘍効果を高めることが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】実施例及び比較例の腫瘍体積の経時変化を示す図である。

40

【図2】実施例及び比較例の腫瘍におけるアポトーシス細胞の割合を示す図である。

【図3】実施例及び比較例の腫瘍におけるCD133陽性細胞の割合を示す図である。

【図4】実施例及び比較例の腫瘍体積の経時変化を示す図である。

【図5】実施例及び比較例の腫瘍体積の経時変化を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

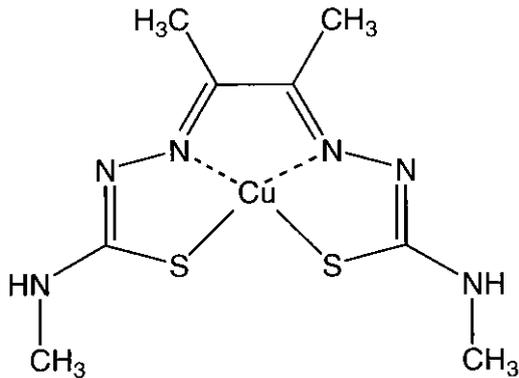
[抗腫瘍剤]

本発明の抗腫瘍剤は、下記式(1)で表される放射性 $^{64}\text{Cu}$  ATSMを含有するものである。

【0016】

50

## 【化1】



(1)

10

## 【0017】

式(1)中、Cuは放射性同位体を示すが、より効果的に腫瘍細胞を殺傷できるという観点から、 $^{64}\text{Cu}$ 又は $^{67}\text{Cu}$ は、 $\gamma$ 線を放出するため、好ましい。

## 【0018】

放射性Cu ATSMは、例えば、Jalilian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。

20

## 【0019】

放射性Cu ATSMは、各種の腫瘍に集積することができる。放射性Cu ATSMが集積する腫瘍としては、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、子宮内膜癌、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。

30

## 【0020】

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、腫瘍細胞をがん幹細胞とともに殺傷し、これらの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。

## 【0021】

本発明の抗腫瘍剤は、上記の放射性Cu ATSMを有効成分としてそのまま含んでもよいし、薬理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てもよい。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。

40

## 【0022】

本発明の抗腫瘍剤は、後述する代謝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。抗腫瘍剤の投与前に代謝阻害剤が投与されてもよいし、抗腫瘍剤の投与後に代謝阻害剤が投与されてもよいし、抗腫瘍剤と代謝阻害剤とが同時に投与されてもよい。

## 【0023】

50

好ましくは、代謝阻害剤の投与後に本発明の抗腫瘍剤を投与することができ、代謝阻害剤を単回投与（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。

#### 【0024】

代謝阻害剤の投与後に本発明の抗腫瘍剤を投与する場合、代謝阻害剤と抗腫瘍剤との投与間隔は、特に限定されないが、例えば、生体内における代謝阻害剤の有効成分（例えば、5-フルオロウラシル、6-チオグアニン又はペメトレキセド）の血中濃度が最高血中濃度に到達した後に、本発明の抗腫瘍剤を投与することができる。

10

#### 【0025】

本発明の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、投与方法などによって異なり特に限定されないが、一般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。

#### 【0026】

また、放射性Cu-ATSMを含有する抗腫瘍剤は、代謝阻害剤を併用することで、放射性Cu-ATSMのがん幹細胞の殺傷効果を高めることができる。したがって、本発明の抗腫瘍剤は、がん幹細胞を殺傷する殺がん幹細胞剤として用いることもできる。がん幹細胞が殺傷されたか否かは、例えば、そのがん幹細胞が発現している細胞表面マーカーの発現をフローサイトメトリーを用いて測定すること、あるいは、腫瘍の切片を調製し、がん幹細胞に特定に結合する抗体を用いて免疫組織染色を行うことにより、確認することができる。がん幹細胞が発現している細胞表面マーカーは、腫瘍の種類によって異なることが知られており、急性骨髄性白血病（AML）でCD34+など；脳腫瘍、髄芽腫、神経膠芽腫、上衣腫、大腸癌、乳癌、悪性黒色腫でCD133+など；膵臓癌、乳癌、前立腺癌でCD44+など；黒色腫でCD20+などがある。

20

#### 【0027】

##### [代謝阻害剤]

本発明において代謝阻害剤とは、がん細胞が分裂・増殖する際に、核酸の材料となる物質と化学構造が類似する化合物、又はそれを有効成分とする薬剤であって、核酸の生合成あるいは核酸の生合成経路を妨げ、増殖を抑制する抗がん剤である。好ましくは、代謝阻害剤として、ピリミジン系代謝拮抗剤、プリン系代謝拮抗剤及び葉酸代謝拮抗剤からなる群から選択される1又は2以上の薬剤を用いることができる。

30

#### 【0028】

ピリミジン系代謝拮抗剤としては、チミジル酸合成酵素阻害剤が好ましい。チミジル酸合成酵素阻害剤とは、チミジル酸合成酵素を阻害してDNA合成障害を引き起こす薬剤であり、例えば、フッ化ピリミジン系薬剤が挙げられる。フッ化ピリミジン系薬剤は、投与により生体内で5-フルオロウラシルを存在させるものであればよく、5-フルオロウラシル又はそのプロドラッグを有効成分として含有するものであればよい。フッ化ピリミジン系薬剤として、好ましくは、有効成分として、5-フルオロウラシル、テガフル、カペシタピン及びこれらの塩からなる群から選択される1又は2以上の化合物を含有するものを採用することができる。5-フルオロウラシル、テガフル又はカペシタピンがそれぞれ塩を形成するときは、塩は薬理的に許容される塩であればよい。

40

#### 【0029】

フッ化ピリミジン系薬剤としては、種々の市販品を用いることができる。5-フルオロウラシルとしては、例えば、5-FU（商品名）が挙げられる。また、テガフルとしては、フトラフル（登録商標）が挙げられる。また、本発明においては、フッ化ピリミジン系薬剤として、例えば、テガフル・ウラシル（ユーエフティ（登録商標））、テガフ

50

ール・ギメラシル・オテラシルカリウム（TS-1（登録商標））等の混合剤を使用してもよい。

【0030】

また、プリン代謝拮抗剤としては、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン及びこれらの塩からなる群から選択される1又は2以上の化合物を有効成分として含有するものが挙げられる。6-メルカプトプリン、アザチオプリン又は6-チオグアニンが塩を形成するときは、塩は薬理的に許容される塩であればよい。種々の市販品を用いることもでき、6-メルカプトプリンの市販品としては、プリネトール、ロイケリンが挙げられる。また、アザチオプリンの市販品としては、アザニン、イムランが挙げられる。

10

【0031】

葉酸代謝拮抗剤としては、メトトレキサート、ペメトレキセド及びこれらの塩からなる群から選択される1又は2以上の化合物を有効成分として含有するものが挙げられる。メトトレキサート又はペメトレキセドがそれぞれ塩を形成するときは、塩は薬理的に許容される塩であればよい。種々の市販品を用いることもでき、メトトレキサートの市販品としては、メソトレキサートが挙げられる。また、ペメトレキセドの市販品としては、アリムタ（登録商標）が挙げられる。

【0032】

本発明において代謝阻害剤は、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ていればよく、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。

20

【0033】

この代謝阻害剤は、放射性Cu ATSMと併用投与して用いられればよく、本発明の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、本発明の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、抗腫瘍剤と同時に投与されてもよいが、本発明の抗腫瘍剤の投与前に投与されることが好ましい。

30

【0034】

本発明の抗腫瘍剤と併用投与される代謝阻害剤の投与量は、特に限定されないが、好ましくは、代謝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、代謝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、代謝阻害剤を単独で投与したとき代謝阻害剤の投与後の体重減少率が10%以下、好ましくは9%以下、より好ましくは8%以下、更に好ましくは7%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、代謝阻害剤の副作用を低減しつつ放射性Cu ATSMの抗腫瘍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Cu ATSM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(%) = { (代謝阻害剤の投与開始前の体重 - 代謝阻害剤の投与開始後の体重) / 代謝阻害剤の投与開始前の体重 } × 100」で表すことができ、「代謝阻害剤の投与開始後の体重」は、好ましくは、代謝阻害剤の投与開始から1~2週間後の体重にすることができる。

40

【0035】

また、代謝阻害剤は、放射性Cu ATSMを含有する抗腫瘍剤と併用して用いることにより、がん幹細胞を殺傷することができる。したがって、本発明の抗腫瘍剤と併用投与して用いられる代謝阻害剤は、殺がん幹細胞剤となり得る。

【0036】

[抗腫瘍用キット]

本発明の抗腫瘍用キットは、放射性Cu ATSMを含有する上記の抗腫瘍剤と、上記

50

の代謝阻害剤とを有するものである。

【0037】

また、本発明の抗腫瘍用キットは、上記の代謝阻害剤を投与した後に上記の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、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。

【0038】

本発明の抗腫瘍用キットは、好ましくは、上記の抗腫瘍剤、及び、上記の代謝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。

【0039】

[抗腫瘍剤、代謝阻害剤、及び、抗腫瘍用キットの使用方法]

本発明の抗腫瘍剤、代謝阻害剤、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。

【0040】

まず、腫瘍を発現した被検体又は患者に代謝阻害剤を投与する。このとき、代謝阻害剤を単独投与したとき該代謝阻害剤の投与後の体重減少率が10%以下、好ましくは9%以下、より好ましくは8%以下、更に好ましくは7%以下となるように、代謝阻害剤の投与量を設定することができる。

【0041】

その後、放射性Cu ATSMを含有する抗腫瘍剤を投与する。この抗腫瘍剤は、代謝阻害剤の投与後、生体内における、代謝阻害剤の有効成分（例えば、5 フルオロウラシル、6 -チオグアニン又はペメトレキセド）の血中濃度が最高血中濃度に到達した後に、投与することが好ましい。

【0042】

また、代謝阻害剤の反復投与と、放射性Cu ATSMを含有する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。

【0043】

これにより、放射性Cu ATSMと代謝阻害剤とが相乗的に作用して、がん幹細胞を含む腫瘍細胞を殺傷する。したがって、本発明の抗腫瘍キットは、がん幹細胞を殺傷する殺がん幹細胞剤として用いることもできる。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、投与する放射エネルギー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、代謝阻害剤の投与量は体重減少させない程度に少ないため、代謝阻害剤の副作用も低減することができる。

【0044】

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。たとえば、本発明は以下の技術思想を包含する。

[1] フッ化ピリミジン系薬剤と併用投与するために用いられる、放射性ジアセチルピス(N4メチルチオセミカルバゾン)銅錯体を含有する抗腫瘍剤。

[2] 前記フッ化ピリミジン系薬剤が、有効成分として、5フルオロウラシル、テガフルール、カペシタビン及びこれらの塩からなる群から選択される1又は2以上の化合物を含有する、[1]に記載の抗腫瘍剤。

[3] 前記放射性ジアセチルピス(N4メチルチオセミカルバゾン)銅錯体が、<sup>64</sup>Cu ATSM、又は、<sup>67</sup>Cu ATSMである、[1]又は[2]に記載の抗腫瘍剤。

[4] 殺がん幹細胞剤として用いられる、[1]~[3]のいずれか一に記載の抗腫瘍剤。

[5] 前記フッ化ピリミジン系薬剤を投与した後に用いられる、[1]~[4]いずれか

10

20

30

40

50

ーに記載の抗腫瘍剤。

[ 6 ] 前記フッ化ピリミジン系薬剤の投与量が、前記フッ化ピリミジン系薬剤を単独投与したとき該フッ化ピリミジン系薬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、[ 1 ] ~ [ 5 ] いずれかーに記載の抗腫瘍剤。

[ 7 ] 放射性ジアセチル ビス ( N 4 メチルチオセミカルバゾン ) 銅錯体と併用投与するために用いられる、フッ化ピリミジン系薬剤。

[ 8 ] 殺がん幹細胞剤として用いられる、[ 7 ] に記載のフッ化ピリミジン系薬剤。

[ 9 ] フッ化ピリミジン系薬剤と、放射性ジアセチル ビス ( N 4 メチルチオセミカルバゾン ) 銅錯体と、を有する抗腫瘍用キット。

[ 10 ] がん幹細胞を殺傷するために用いられる、[ 9 ] に記載の抗腫瘍用キット。

10

#### 【実施例】

##### 【0045】

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。

##### 【0046】

( 製造例 1 )  $^{64}\text{Cu}$  ATSM、及び、代謝阻害剤の調製

( ATSM の合成 )

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

20

##### 【0047】

(  $^{64}\text{Cu}$  ATSM の合成 )

$^{64}\text{Cu}$  は McCarthy からの方法 ( Nuclear medicine and biology , vol . 24 , 1997 , pp . 35 - 43 ) 及び Obata からの方法 ( Nuclear medicine and biology , vol . 30 , 2003 , pp . 535 - 539 ) に準じて製造・精製した。ATSM と  $^{64}\text{Cu}$  を用い、Tanaka からの方法 ( 上掲 ) に準じて  $^{64}\text{Cu}$  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  $^{64}\text{Cu}$  ATSM の分析条件は下記のとおりである。

30

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

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、富士フイルム株式会社製 )

##### 【0048】

( 5 フルオロウラシル溶液の調製 )

5 フルオロウラシル ( 5 Fluorouracil , Wako 社製 ) を生理食塩液に溶解し、マウス 1 匹あたり 100  $\mu\text{L}$  になるように調製して、以下の実験に使用した。なお、以下本実施例及び対応する図面では、この 5 フルオロウラシル溶液を「5 FU」と省略する。

40

( 6 - チオグアニン溶液の調製 )

6 - チオグアニン ( 6 - Thioguanine , Wako 社製 ) を生理食塩液に溶解し、マウス 1 匹あたり 100  $\mu\text{L}$  になるように調製して、以下の実験に使用した。なお、以下本実施例及び対応する図面では、この 6 チオグアニン溶液を「6 TG」と省略する。

( ペメトレキセド溶液の調製 )

ペメトレキセド ( アリムタ ( 登録商標 ) 注射用 , 日本イーライリリー株式会社社製 ) を生理食塩液に溶解し、マウス 1 匹あたり 100  $\mu\text{L}$  になるように調製して、以下の実験に使用した。なお、以下本実施例及び対応する図面では、このペメトレキセド溶液を「PT

50

」と省略する。

【0049】

(実施例1)ヌードマウスを用いた5 FUの投与量の検討

BALB/cヌードマウス(オス,7週齢,体重約25g,日本エス・エル・シーから入手)に、5 FUを1日1回25mg/kg,50mg/kg又は100mg/kgずつ4日間腹腔内に反復投与した。最初の投与開始日から5日目以降の体重を測定して、体重減少率を求めた。体重減少率は下記式に基づき算出した。

体重減少率(%) = [ {(最初の5 FU投与前日の体重) - (5 FU投与開始後に測定した体重)} / (最初の5 FU投与前日の体重) ] × 100

対照群には、5 FUに代えて生理食塩液を投与した。結果を表1に示す。表1には、マウス4匹の平均及び標準偏差で示した。なお、5 FUを50mg/kg投与したマウスは投与から10又は11日目に、5 FUを100mg/kg投与したマウスは投与から7又は8日目に死亡したため、死亡後の体重の測定データはない。

【0050】

【表1】

表1

		最初の投与開始からの経過日				
		5日目	9日目	12日目	16日目	18日目
体重の減少率 (%)	対照群	0.46±3.71	2.61±4.45	0.63±6.31	2.30±7.86	1.05±7.23
	25mg/kg/day	6.56±0.78	3.55±1.28	4.73±2.29	1.10±1.97	-1.33±2.81
	50mg/kg/day	16.09±1.54	29.38±3.22	-	-	-
	100mg/kg/day	22.59±1.44	-	-	-	-

【0051】

表1で示すように、1日50mg/kg又は100mg/kgずつ投与した群は、5日目で体重減少率が10%を超えたが、1日25mg/kgずつ投与したものは、18日目においても体重減少率が10%以内であった。そこで、以後の実施例では、5 FUは、1日1回25mg/kgずつ4日間反復投与することにした。

【0052】

(実施例2)HT29担がんマウスへの<sup>64</sup>Cu ATSM及び5 FUの投与による抗腫瘍効果

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,7週齢,体重約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<sup>7</sup>個を移植して作製し、移植後1週後に、5 FUを1日1回25mg/kgずつ4日間腹腔内に反復投与した。5 FU最終投与日に、<sup>64</sup>Cu ATSM37MBq(1mCi)を尾静脈より投与した。なお、対照群には5 FU及び<sup>64</sup>Cu ATSMに代えて生理食塩液を投与した。5 FUの投与開始後、2、4、8、12又は15日後に、マウスの腫瘍径を計測した。また、<sup>64</sup>Cu ATSM投与から2日後に摘出した腫瘍から得られた細胞について、フローサイトメトリー(Guava flow cytometry, ミリポア社製)を用い、アポトーシス細胞、及び、CD133陽性(CD133+)細胞の検出を行った。アポトーシス細胞の検出は、アネキシンV(Mouse Anti Human Annexin V FITC, AbD MCA2712F, serotec社製)により行った。また、CD133+細胞の検出は抗CD133抗体(CD133/1(A133)-PE, ミルテニーバイオテク社製)を用いた。

【0053】

(比較例1)HT29担がんマウスへの5 FUの単独投与による抗腫瘍効果

<sup>64</sup>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。

【0054】

(比較例2) HT29 担がんマウスへの $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与による抗腫瘍効果  
5 FU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2と同様に行った。

【0055】

(比較例3) HT29 担がんマウスへの $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与による抗腫瘍効果  
5 FUを投与する代わりに生理食塩液を投与した。また、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの投与量は、74 MBq (2 mCi)とした。それ以外は、実施例2と同様に行った。

【0056】

[評価1]

実施例2、及び、比較例1～3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では、5 FUの投与を開始した日の前日の腫瘍体積を100%とし、これに対する比率を示した。また、図1は、マウス6匹の平均及び標準偏差で示した。図1で示すように、5 FUの単独投与では、腫瘍の増殖を抑制できなかった。また、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与では、投与量に応じて腫瘍の増殖を抑制できたが、37 MBqの $^{64}\text{Cu}$  ATSMと5 FUとの併用投与により、74 MBqの $^{64}\text{Cu}$  ATSMを単独投与したとき(比較例3)よりも高い腫瘍増殖抑制効果が認められた。

10

【0057】

実施例2、及び、比較例1～3のアポトーシス細胞の検出結果を図2に示す。図2は、摘出した腫瘍中のアポトーシス細胞の割合について、マウス6匹の平均及び標準偏差で示した。図2で示すように、5 FU、及び、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与でも腫瘍細胞のアポトーシスは確認できたが、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMと5 FUとを併用することで、それぞれの単独投与によるアポトーシス細胞を合わせた量を上回る量のアポトーシス細胞が検出された。

20

【0058】

実施例2、及び、比較例1～3のCD133+細胞の検出結果を図3に示す。図3は、摘出した腫瘍中のCD133+細胞の割合について、マウス6匹の平均及び標準偏差で示した。図3で示すように、5 FU、及び、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与でもCD133+細胞を殺傷できたが、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMと5 FUとの併用投与により、更にCD133+細胞を殺傷できることが示された。

【0059】

以上の結果から、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMと体重減少のない量の5 FU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。

30

【0060】

(実施例3)ヌードマウスを用いた6TGの投与量の検討

BALB/cヌードマウス(オス, 7週齢, 体重約25g, 日本エス・エル・シーから入手)に、6TGを1日1回12.5mg/kg, 25mg/kg又は50mg/kgずつ4日間腹腔内に反復投与した。最初の投与開始日から5日目以降の体重を測定して、体重減少率を求めた。体重減少率は下記式に基づき算出した。

体重減少率(%) = [ { (最初の6TG投与前日の体重) - (6TG投与開始後に測定した体重) } / (最初の6TG投与前日の体重) ] × 100

対照群には、6TGに代えて生理食塩液を投与した。結果を表2に示す。表2には、マウス4匹の平均及び標準偏差で示した。なお、6TGを25mg/kg投与したマウスは投与から13～15日目に、6TGを50mg/kg投与したマウスは投与から6～8日目に死亡したため、死亡後の体重の測定データはない。

40

【0061】

## 【表 2】

表 2

		最初の投与開始からの経過日				
		5日目	9日目	12日目	16日目	18日目
体重の減少率 (%)	対照群	-5.48±1.80	-9.03±6.04	-12.1±8.73	-18.89±5.63	-12.57±5.61
	12.5mg/kg/day	6.79±7.85	-1.48±5.75	-2.99±7.67	-5.86±7.4	-7.22±7.22
	25mg/kg/day	11.93±8.40	20.58±15.29	19.84±19.68	-	-
	50mg/kg/day	16.75±0.57	-	-	-	-

## 【0062】

表 2 で示すように、1 日 25 mg / kg 又は 50 mg / kg ずつ投与した群は、5 日目  
で体重減少率が 10 % を超えたが、1 日 12.5 mg / kg ずつ投与したものは、18 日  
目においても体重減少率が 10 % 以内であった。そこで、以後の実施例では、6 TG は、  
1 日 1 回 12.5 mg / kg ずつ 4 日間反復投与することにした。

10

## 【0063】

(実施例 4) ノードマウスを用いた PT の投与量の検討

BALB/c ノードマウス (オス, 7 週齢, 体重約 25 g, 日本エス・エル・シーから  
入手) に、PT を 1 日 1 回 25、50、100 又は 200 mg / kg ずつ 4 日間腹腔内に  
反復投与した。最初の投与開始日から 5 日目以降の体重を測定して、体重減少率を求めた。  
体重減少率は下記式に基づき算出した。

体重減少率 (%) = [ { (最初の PT 投与前日の体重) - (PT 投与開始後に測定し  
た体重) } / (最初の PT 投与前日の体重) ] × 100

20

対照群には、PT に代えて生理食塩液を投与した。結果を表 3 に示す。表 3 には、マウ  
ス 4 匹の平均及び標準偏差で示した。

## 【0064】

## 【表 3】

表 3

		最初の投与開始からの経過日				
		5日目	9日目	12日目	16日目	18日目
体重の減少率 (%)	対照群	-5.48±1.80	-9.03±6.04	-12.1±8.73	-18.89±5.63	-12.57±5.61
	25mg/kg/day	-8.42±12.36	-12.11±13.3	-10.94±12.04	-14.11±11.25	-15.38±9.65
	50mg/kg/day	-3.94±7.7	-12.12±5.33	-12.91±7.21	-16.03±8.57	-15.41±11.86
	100mg/kg/day	-5.03±8.95	-12.82±9.29	-16.86±8.46	-20.08±9.11	-21.05±6.18
	200 mg/kg/day	-5.75±9.93	-15.25±10.49	-18.1±9.64	-18.1±9.64	-17.19±9.86

30

## 【0065】

表 3 で示すように、すべての群について、18 日目においても体重減少率が 10 % 以内  
であった。そこで、以後の実施例では、PT は、1 日 1 回 200 mg / kg ずつ 4 日間反  
復投与することにした。

40

## 【0066】

(実施例 5) HT29 担がんマウスへの  $^{64}\text{Cu}$  ATSM 及び 6 TG の投与による抗腫瘍  
効果

実施例 2 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 1 週後  
に、6 TG を 1 日 1 回 12.5 mg / kg ずつ 4 日間腹腔内に反復投与した。6 TG 最終  
投与日に、 $^{64}\text{Cu}$  ATSM 37 MBq (1 mCi) を尾静脈より投与した。なお、対  
照群には 6 TG 及び  $^{64}\text{Cu}$  ATSM に代えて生理食塩液を投与した。6 TG の投与開  
始後、2、4、8、12 又は 15 日後に、マウスの腫瘍径を計測した。

## 【0067】

(比較例 4) HT29 担がんマウスへの 6 TG の単独投与による抗腫瘍効果

50

$^{64}\text{Cu}$  ATSMに代えて生理食塩液を投与した以外は、実施例5と同様にした。

【0068】

(実施例6) HT29担がんマウスへの $^{64}\text{Cu}$  ATSM及びPTの投与による抗腫瘍効果

実施例2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1週後に、PTを1日1回200mg/kgずつ4日間腹腔内に反復投与した。PT最終投与日に、 $^{64}\text{Cu}$  ATSM 37MBq (1mCi)を尾静脈より投与した。なお、対照群にはPT及び $^{64}\text{Cu}$  ATSMに代えて生理食塩液を投与した。PTの投与開始後、2、4、8、12又は15日後に、マウスの腫瘍径を計測した。

【0069】

(比較例5) HT29担がんマウスへのPTの単独投与による抗腫瘍効果

$^{64}\text{Cu}$  ATSMに代えて生理食塩液を投与した以外は、実施例6と同様にした。

【0070】

[評価2]

実施例5、6、及び、比較例4、5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4に示す。図4では、6TG又はPTの投与を開始した日の前日の腫瘍体積を100%とし、これに対する比率を示した。また、図4は、マウス6匹の平均及び標準偏差で示した。さらに、図4では、実施例2、比較例1~3の結果も併せて示した。図4で示すように、6TG又はPTの単独投与では、腫瘍の増殖を抑制できなかった。また、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与では、投与量に応じて腫瘍の増殖を抑制できたが、37MBqの $^{64}\text{Cu}$  ATSMと6TG又はPTとの併用投与により、74MBqの $^{64}\text{Cu}$  ATSMを単独投与したとき(比較例3)よりも高い腫瘍増殖抑制効果が認められた。

【0071】

(実施例7) HT29担がんマウスへの $^{64}\text{Cu}$  ATSM及び5FUの反復投与による抗腫瘍効果

実施例2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1週後に、5FUを1日1回25mg/kgずつ4日間腹腔内に反復投与し、5FU最終投与日(4日目)に、 $^{64}\text{Cu}$  ATSM 37MBq (1mCi)を尾静脈より投与した。5FU投与開始から25日目に、再び5FUの投与を開始し、1日1回25mg/kgずつ4日間反復投与した。そして、5FU最終投与日に、 $^{64}\text{Cu}$  ATSM 37MBq (1mCi)を尾静脈より投与した。なお、対照群には5FU及び $^{64}\text{Cu}$  ATSMに代えて生理食塩液を投与した。5FUの投与開始後、2、4、8、12、14、16、20、24、27、31、34日後に、マウスの腫瘍径を計測した。

【0072】

(比較例6) HT29担がんマウスへの5FUの単独投与による抗腫瘍効果

$^{64}\text{Cu}$  ATSMに代えて生理食塩液を投与した以外は、実施例7と同様にした。

【0073】

(比較例7) HT29担がんマウスへの $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与による抗腫瘍効果

5FU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7と同様に行った。

【0074】

[評価3]

実施例7、及び、比較例6、7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5に示す。図5では、5FUの投与を最初に開始した日の前日の腫瘍体積を100%とし、これに対する比率を示した。また、図5は、マウス6匹の平均及び標準偏差で示した。図5で示すように、5FUの単独投与では、腫瘍の増殖をほとんど抑制できなかった。また、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMの単独投与では、投与量に応じて腫瘍の増殖を抑制できたが、37MBqの $^{64}\text{Cu}$  ATSMと5FUとの併用投与により、 $^{64}\text{Cu}$  ATSMを単独投与したとき(比較例7)よりも高い腫瘍増殖抑制効果が認められた。なお、何れの投与群においても、体重の減少は認められなかった。

【0075】

10

20

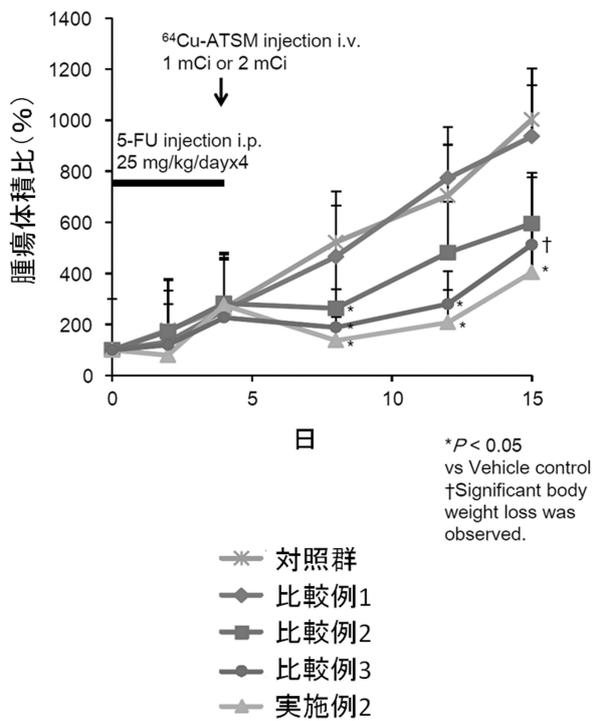
30

40

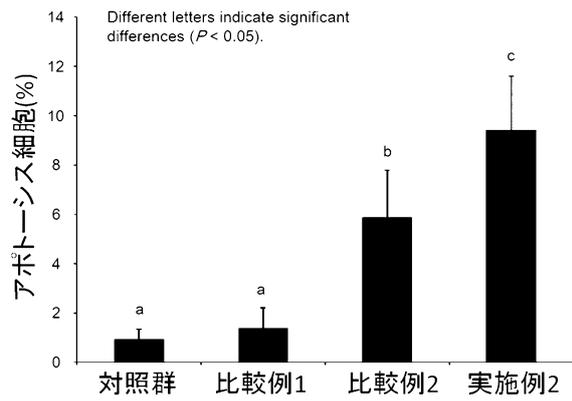
50

以上の結果から、<sup>64</sup>Cu-ATSMと体重減少のない量の代謝阻害剤との併用により、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。

【図1】



【図2】





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/513 (2006.01)	A 6 1 K	31/513
A 6 1 K	31/7068 (2006.01)	A 6 1 K	31/7068
A 6 1 K	31/522 (2006.01)	A 6 1 K	31/522
A 6 1 K	31/52 (2006.01)	A 6 1 K	31/52
		A 6 1 P	43/00 1 0 5

(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 独立行政法人放射線医学総合研究所内

(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 独立行政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 独立行政法人放射線医学総合研究所内

(72)発明者 松本 博樹

千葉県袖ヶ浦市北袖3-1 日本メジフィジックス株式会社内

(72)発明者 吉本 光喜

東京都中央区築地五丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献 特開2010-013380(JP,A)

国際公開第2011/105551(WO,A1)

特表2010-504755(JP,A)

Dis. Colon. Rectum., 2008年, Vol.51(11), pp.1641-1648

Cancer Research, 2003年, Vol.63, pp.5496-5504

Biochimie, 2006年, Vol.88, pp.437-448

Mebio, 2011年, Vol.28(8), pp.7-15

胆道, 2012年 7月, Vol.26(1), pp.31-39

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 5 1 / 0 4

A 6 1 K 3 1 / 5 1 3

A 6 1 K 3 1 / 5 2

A 6 1 K 3 1 / 5 2 2

A 6 1 K 3 1 / 7 0 6 8

A 6 1 K 3 3 / 3 4

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)