(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2007-511492
(P2007-511492A)
(43)公表日　平成19年5月10日(2007.5.10)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 31/01	***(2006.01)***	A61K	31/01	4C206
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00	
A61P 35/02	***(2006.01)***	A61P	35/02	
A61K 31/015	***(2006.01)***	A61K	31/015	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 26 頁）

(21)出願番号　特願2006-538951 (P2006-538951)
(86)(22)出願日　平成16年11月12日 (2004.11.12)
(85)翻訳文提出日　平成18年7月5日 (2006.7.5)
(86)国際出願番号　PCT/GB2004/004769
(87)国際公開番号　WO2005/049001
(87)国際公開日　平成17年6月2日 (2005.6.2)
(31)優先権主張番号　0326518.8
(32)優先日　平成15年11月13日 (2003.11.13)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

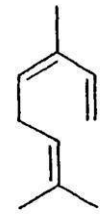
(71)出願人　506159035
コンプトン　ディベロップメンツ　エルティーディー
イギリス国　スウォンジ　エスエイ６　８ワイエイチ　ピー．オー．ボックス　４２５
(74)代理人　100095832
弁理士　細田　芳徳
(72)発明者　ボーエン，アイフォー，デルメ
イギリス国　カーディフ　シーエフ１０　３ユーエス　ピー．オー．ボックス　９１１，ミュージアム　アベニュー，バイオメディカル　サイエンシズ　ビルディング，カーディフ　ユニバーシティ（番地なし）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗腫瘍テルペン化合物

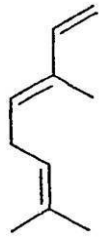
(57)【要約】
本発明は、癌の処置または予防におけるテルペン化合物の使用に関する。本発明はまた、テルペン化合物および薬学的に許容され得る賦形剤、担体、アジュバントまたはビヒクルを含有する医薬組成物に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌の処置または予防用の医薬の製造における化合物の使用であって、該化合物がテルペンまたはその酸素化された誘導体であり、該テルペンが、
【化１】
I)



シス-β-オシメン

および



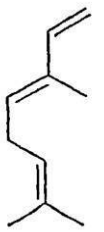
トランス-β-オシメン;ならびに

II）ビサボレン型の単環式セスキテルペン
から選択される、癌の処置または予防用の医薬の製造における化合物の使用。
【請求項２】
癌の処置または予防方法であって、かかる処置を必要とする患者に有効投薬量の化合物を投与することを含み、該化合物がテルペンまたはその酸素化された誘導体であり、該テルペンが、
【化２】
I)



シス-β-オシメン

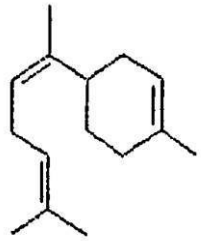
および



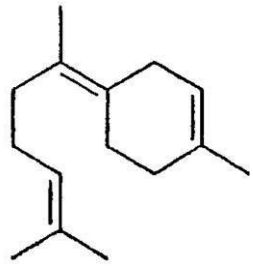
トランス-β-オシメン;ならびに

II）ビサボレン型の単環式セスキテルペン
から選択される、癌の処置または予防方法。
【請求項３】
化合物が、トランス-β-オシメンである、請求項１記載の使用または請求項２記載の方法。
【請求項４】
化合物が、

【化３】



α-ビサボレン　または



γ-ビサボレン

である、請求項１記載の使用または請求項２記載の方法。

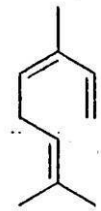
【請求項５】

化合物が、0.2μM～100mMの濃度で使用される、請求項１記載の使用または請求項２記載の方法。

【請求項６】

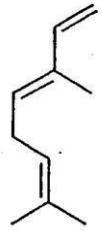
【化４】

I)



シス-β-オシメン

および



トランス-β-オシメン;ならびに

II）ビサボレン型の単環式セスキテルペン

から選択されるテルペン化合物またはその酸素化された誘導体を、薬学的に許容され得る賦形剤、担体、アジュバントまたはビヒクルとの組み合わせで含有する医薬組成物。

【請求項７】

単回単位投薬量が単位投薬量に対して0.2μM～100mMの濃度でテルペン化合物を提供するように製剤化される、請求項６記載の医薬組成物。

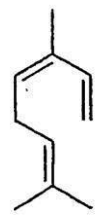
【請求項８】

癌が、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、肺癌、膵臓癌、腸の癌、黒色腫、精巣癌、子宮頸癌、線維肉腫、扁平上皮癌、白血病、星状細胞腫および神経膠腫である、請求項１記

載の使用または請求項２記載の方法。
【請求項９】
癌の処置または予防のための医薬の製造における、Commiphora guidotti抽出物の使用。
【請求項１０】
癌の処置または予防方法であって、かかる処置を必要とする患者に有効投薬量のCommiphora guidotti抽出物を投与することを含む、癌の処置または予防方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、癌の処置または予防におけるテルペン化合物の使用に関する。本発明はまた、テルペン化合物および薬学的に許容され得る賦形剤、担体、アジュバントまたはビヒクルを含有する医薬組成物に関する。
【０００２】
アフリカ産の樹脂状産物であるミルラ(Myrrh)は、長い間、治癒するという民族の歴史がある。ミルラおよび香気性ミルラ(Commiphora guidotti)の薬効の背景は、主に古代民族を根拠とし、アラブ、インドおよび中国での薬草療法に一般的に使用されている。この状況では、非毒性であり、一般的に、抗炎症性，防腐性および治癒性を示すことが知られている。また、これは、香水および香料業界でも広く使用されている。その特異的な抗腫瘍性は、体系的または科学的に試験されていないが、これまでに、エールリッヒ(Ehrlich)充実腫瘍に対するCommiphora molmol粗抽出物の活性の報告がある(Al Harbi ら，Experimental Chemotherapy，40，337-347，1994)。この粗抽出物はまた、免疫障害および住血吸虫における使用のためのいくつかの薬草療法でも記載されている。
【０００３】
C. molmol および C. gudiottiの個々の化学的成分の活性は解析されていない。該抽出物の本発明者らによる最初の化学分析は、これらが、約300の化合物を含有する非常に豊富な供給源であることを示す。
【０００４】
背景の情報として、多くの薬草療法におけるミルラの使用は公知であるが、ミルラ由来の具体的な抗癌性化合物の体系的な同定を明確に述べた先行技術文献はない。いくつかの参考文献には、マウス腫瘍に対するミルラ(Commiphora molmol)の粗抽出物の有効性が示されている(Qureshi & Al Harbiら，Cancer Chemotherapy and Pharmacology，33，130-138，1993; および Al-Harbiら，1994 (前出))。
【０００５】
国際特許出願WO 00/50053には、「癌」の古典的な薬草処置法として、他の植物とのミルラ(Commiphora molmol)の使用が記載されているが、この場合も粗抽出物する。さらなる刊行物(Rao ら，J. Ethnophannacology，76，151-154,2001)には、マウスに対するCommiphora molmolの非毒性効果が記載されている。
【０００６】
Tatman ら(Cancer Letters，175，129-139，2002)には、揮発性イソプレノイドが、黒色腫およびヒト白血病細胞株に対して活性であることが開示されている。
【０００７】
Lealら(J. Agric. Food. Chem.，51，2520-2525，2003)には、ショウガおよびウコン抽出物が抗癌活性を示したことが開示されている。
【０００８】
Saleh ら(Pharm. Pharmacol. Lett.，8，97-99，1998)には、セロリの揮発物質がヒト癌細胞株に対して細胞傷害性であることが開示されている。
【０００９】
米国特許US-A-6,486,706には、ウイルス誘導型腫瘍の処置におけるα-およびβ-サンタトールの使用が開示されている。

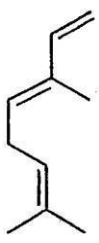
【００１０】
米国特許US-A-5,602,184には、ヒト癌細胞株に対する選択されたテルペンの使用が開示されている。
【００１１】
米国特許出願US 2002/0155522には、腫瘍細胞に対するβ-エレメン(elemene)の使用が開示されている。
【００１２】
国際PCT出願WO 01/80868には、癌の予防および処置のためのセスキテルペン混合物の使用が開示されている。
【００１３】
Itokawaら(Chem. Pharm. Bull., 33, 3488-3492, 1985)には、ビサボレンセスキテルペノイドの抗腫瘍活性に関する研究が記載されている。
【００１４】
C. molmol および／または C. gudiottiから得られる一群の化合物は、GC/MSおよびHPLC/MSにより得られる化学物質のスペクトルまたはピークから判断され得る。これらのピークを試料とし、広範囲の試験対象の新規分子を得る。本研究の革新的な局面の一部には、1) ミルラ(Commiphora molmol)およびHaddiまたは香気性ミルラ(Commiphora guidotti)の未だ試験されていない生物医学的に豊富な供給源の選択、2) これらのミルラ抽出物由来の新規化合物の広範な供給源の同定および特徴付け、および3) ヒト腫瘍細胞株を抑制するのに適当な非毒性化合物を選択するための特定の(アポトーシス性)バイオアッセイの使用が含まれる。
【００１５】
ヒト腫瘍に対して抗癌活性を有するミルラまたは香気性ミルラ由来の任意の特定の化合物を開示している先行技術文献はない。有効な抗癌薬、特に、非癌性細胞に対して毒性が全く有しないが、または限定的な毒性を有する薬物の需要があることは認識されよう。本発明者らは、ヒト腫瘍細胞において特異的にアポトーシスを誘導するが正常組織では誘導しない、いくつかの具体的な化合物を同定した。
【００１６】
Taxol、Paclitaxel および Vinblastin などの薬物を用いる現行の処置は、炎症細胞の死または壊死という損傷性形態をもたらす。プログラムされた細胞死という自然なプロセスであるアポトーシスのために選択される薬物は、副作用をほとんど、または全く誘導しないべきである。このアプローチは、医薬品業界および最終的に医療従事者の両方に対して魅力的であるはずである作用の良好機構のために選択されるという点で革新的である。この選択的アプローチは非毒性剤であることが示されている。
【００１７】
本発明の第１の局面によれば、癌の処置または予防用の医薬の製造のための化合物の使用であって、該化合物がテルペンまたはその酸素化された誘導体であり、テルペンが
【００１８】
【化１】

I)



シス-β-オシメン

および



トランス-β-オシメン；ならびに

【００１９】

II) ビサボレン(bisabolene)型の単環式セスキテルペン
から選択される、癌の処置または予防用の医薬の製造のための化合物の使用が提供される。

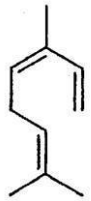
【００２０】

本発明の第２の局面によれば、癌の処置または予防方法であって、かかる処置を必要とする患者に有効投薬量の化合物を投与することを含み、該化合物がテルペンまたはその酸素化された誘導体であり、テルペンが

【００２１】

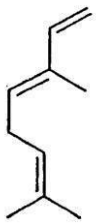
【化２】

I)



シス-β-オシメン

および



トランス-β-オシメン；ならびに

【００２２】

II) ビサボレン型の単環式セスキテルペン
から選択される、癌の処置または予防方法が提供される。

【００２３】

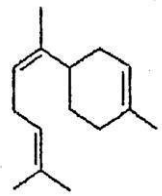
前記の具体的なテルペン化合物は、ヒト癌細胞のアポトーシスを誘導することにより抗癌剤として作用することがわかった。

【００２４】

代表的なビサボレン型のテルペンとしては、

【００２５】

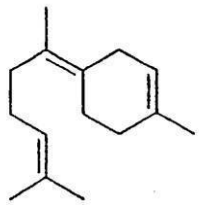
【化３】



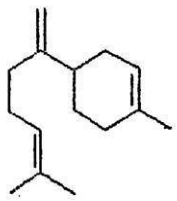
α-ビサボレン

【００２６】

【化４】

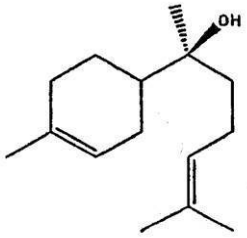


γ-ビサボレン



β-ビサボレン

【００２７】
好ましくは、ビサボレン型のテルペンはα-ビサボレンまたはγ-ビサボレンである。
【００２８】
本発明の好ましい一態様において、テルペンはα-ビサボロールではない。
【００２９】
【化５】



α-ビサボロール

【００３０】
第１または第２の局面において使用される化合物は、前記の代表的な化合物から選択されることが特に好ましい。本発明のテルペンの一般式において若干の変更を行ない得るが、修飾された化合物は抗癌活性を有するものとする。若干の変更としては、側鎖基を、該化合物の活性を破壊しないと考えられる近縁の側鎖基で置換すること（例えば、$-CH_3$の$-CH_2CH_3$での置換）が挙げられる(including)。当業者は、該化合物の活性を破壊することなく、前記一般式に包含されるテルペン化合物に対して行なわれ得る適切な変更を充分承知している。
【００３１】
テルペン化合物がトランス-β-ビサボレン、γ-ビサボレンまたはα-ビサボレンであることが特に好ましい。
【００３２】
本発明の第１または第２の局面で使用される化合物は、Detarium、Ximenia、Polygonum、Commiphora または Boswellia属の植物から得られ得る。特に、該化合物が、植物Detarium microcarpum、Ximenia americana、Polygonum limbatum、Commiphora molmol、Commiphora guidotti または Boswellia種から得られ得ることが好ましい。
【００３３】
本発明の第１または第２の局面で使用される化合物は、前記の適切な植物から単離する

ことにより得られ得る。特に、該化合物の大部分は、Commiphora molmol または Commiphora guidottiから単離され得る。該化合物は、任意の適当な調製方法を用いて単離され得る。かかる化合物の単離方法は当業者に知られており、クロマトグラフィー法（例えば、フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび固相抽出カラム）が挙げられる。核磁気共鳴および質量分析法を用いて個々の化合物を同定することができる。

【００３４】

本発明の組成物に使用される化合物は、植物から単離された場合、汚染性の植物材料が実質的に存在しない。汚染性の植物材料が実質的に存在しないとは、0.1%(w/w)未満の汚染性植物材料が存在することを意味する。

【００３５】

本発明の組成物に使用される化合物は、市販の供給元、例えば、RC Treat Ltd (トランス－β-オシメンおよびγ－ビサボレン)、ならびにKIC Inc.(α-ビサボロール)から得られ得る。本発明の化合物はまた、標準的な化学合成手順を用いて合成され得る。

【００３６】

２種類以上のテルペン化合物を一緒に抗癌剤として使用し得る。さらにまた、さらなる抗癌剤、治療剤、マーカーなどもまた、本発明の第１または第２の局面にしたがって使用されるテルペン化合物と組み合わせて使用され得る。

【００３７】

用語「抗癌」剤は、癌の発生を予防または低減するために使用され得る薬剤、または癌の大きさを縮小し得る薬剤をいう。

【００３８】

本発明の第１および／または第２の局面に従って予防または処置される癌は、任意の癌であり得るが、好ましくは、ヒトの癌である。好ましい癌としては、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、肺癌、膵臓癌、腸の癌、黒色腫、精巣癌、子宮頸癌、線維肉腫,扁平上皮癌、白血病、星状細胞腫および神経膠腫が挙げられる。

【００３９】

本発明の第１および第２で使用される化合物は、癌細胞において、対応する正常細胞よりも示差的に高レベルのアポトーシスをもたらすであることがわかった。これは、適当な投薬量で該化合物が示差的に癌細胞に対して活性であることを意味する。

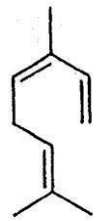
【００４０】

本発明の第３の局面によれば、

【００４１】

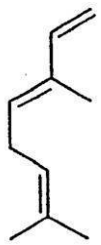
【化６】

I)



シス-β-オシメン

および



トランス-β-オシメン；ならびに

【００４２】

II) ビサボレン型の単環式セスキテルペン

から選択されるテルペン化合物またはその酸素化された誘導体を、薬学的に許容され得る賦形剤、担体、アジュバントまたはビヒクルとの組合せで含有する医薬組成物が提供される。

【００４３】

好ましくは、テルペン化合物は、本発明の第１および第２の局面に関して上記に規定し

たものである。

【００４４】

テルペン化合物は、個体に、任意の薬学的に許容され得る担体、アジュバントまたはビヒクルとの組合せで送達され得る。使用され得る薬学的に許容され得る担体、アジュバントおよびビヒクルとしては、限定されないが、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清蛋白質、リン酸塩などの緩衝性物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロトミン(protomine)、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマーおよび羊毛脂が挙げられる。

【００４５】

医薬組成物は、経口、非経口、吸入スプレーにより、局所、経直腸、経鼻、口腔内、経膣または埋め込みリザーバ(reservoir)により投与され得る。好ましくは、医薬組成物は注射により投与される。本明細書で使用される用語「非経口」としては、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、動脈内、関節滑液嚢内、胸骨内、鞘内、病変内および頭蓋内注射または輸液技術が挙げられる。

【００４６】

医薬組成物は、滅菌注射用調製物、例えば、滅菌注射用の水性または油性の懸濁液の形態で送達され得る。この懸濁液は、適当な分散剤または湿潤剤（例えば、Tween 80など）および懸濁剤を用い、当該技術分野の技術にしたがって製剤化され得る。滅菌注射用調製物はまた、非毒性非経口に許容され得る希釈剤または溶媒中の滅菌注射用溶液または懸濁液、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液であり得る。使用され得る許容可能なビヒクルおよび溶媒中の溶液は、マンニトール、水、リンゲル溶液および等張性塩化ナトリウム溶液である。また、滅菌固定油は、溶媒または懸濁媒体として従来より用いられている。この目的のため、合成のモノまたはジグリセリドを含む任意のブレンド(bland)固定油が使用され得る。オレイン酸およびそのグリセリド誘導体などの脂肪酸は、注射可能物の調製物に有用であり、オリーブ油またはキャスター油、特にそのポリオキシエチル化型などの天然の薬学的に許容され得る油である。これらの油溶液または懸濁液はまた、長鎖アルコール希釈剤またはPh. Helvなどの分散剤または類似のアルコールを含み得る。

【００４７】

本発明の医薬組成物はまた、流体として、または直腸投与のための座剤の形態で投与され得る。座剤は、テルペン化合物および室温で固体だが直腸温度で液体であり、したがって直腸内で溶解してテルペン化合物を放出する適当な賦形剤により調製され得る。かかる物質としては、限定されないが、ココアバター、みつろうおよびポリエチレングリコールが挙げられる。

【００４８】

組成物の局所投与は、所望の処置が、局所適用を容易に利用可能な領域または器官を伴う場合、望ましいことがある。皮膚への局所適用では、テルペン化合物は、限定されないが、鉱物油、鉱油、ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化用ワックスおよび水などの局所投与のための担体と製剤化すべきである。あるいは、テルペン化合物は、適当なローションまたはクリームと製剤化され得、または担体中に溶解され得る。適当な担体としては、限定されないが、鉱物油、ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート60、セチルエステル、ワックス、セテアリールアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水が挙げられる。テルペン化合物は、直腸座剤製剤により、適当な注腸製剤として下方の腸管に局所に適用され得る。

【００４９】

本発明の医薬組成物は、経鼻エーロゾルまたは吸入により投与され得る。かかる投与に

適当な組成物は、当業者に周知の医薬用製剤技術にしたがって調製され得、当該技術分野で公知のベンジルアルコールまたは他の保存剤、バイオアベイラビリティを増強するための吸収促進剤、フルオロカーボン、および／または他の可溶化剤他の分散剤を用いて、生理食塩水中の溶液として調製され得る。

【００５０】

患者に送達されるテルペン化合物の正確な量は、被験体の癌状態の重篤性、一般健康状態、年齢、体重および性別、食事、投与期間および頻度、反応敏感性、ならびに治療に対する耐性/応答に依存する。適当な量は、通常の実験により決定され得、担当医師の判断の範囲内である。一般的に、有効な投薬量は、0.2μM～100mMであり、より好ましくは、0.2μM～10μMである。

【００５１】

本発明の医薬組成物は、他の薬物、約剤またはマーカーとの組合せで投与され得る。

【００５２】

本発明はまた、治療における使用のための本発明の第１局面において使用されるテルペン化合物を提供する。

【００５３】

本発明はまた、インビトロで抗癌剤として本発明の第１局面において使用されるテルペン化合物の使用を提供する。

【００５４】

本発明はまた、癌の処置または予防のための医薬の製造のためのCommiphora guidotti抽出物の使用を提供する。

【００５５】

本発明はまた、かかる処置を必要とする患者に有効投薬量のCommiphora guidotti 抽出物を投与することを含む、癌の処置または予防方法を提供する。

【００５６】

Commiphora guidotti 抽出物は、任意の抽出物であり得、好ましくは、本発明の第１局面において使用される化合物の少なくとも１種類を含む。好ましくは、抽出物は、トランスβ-オシメン、γ-ビサボレンおよびα-ビサボレンの少なくとも１つを含む。

【００５７】

抽出物は、好ましくは、アルコール抽出物であり、植物のアルコール抽出物を得るための標準的な手順を用いて得られ得る。特に、かかるアルコール抽出物を得るための方法は当業者に周知である。あるいは、植物材料は、植物の精油のアルコール抽出物であることが好ましい。精油は、揮発性の断片植物物質の有機系構成成分である。精油は、一般的に、主に２つの方法、蒸留(蒸気、水または乾燥蒸留) および低温圧搾により、植物から抽出される。主に油を含有する植物抽出物はまた、溶媒、二酸化炭素抽出またはヒドロフルオロアルカンを用いて調製され得る。チンクチャー(tincture)植物抽出物は、植物材料を、水性、エタノール製溶媒 (水中、70%～90%エタノール)を用いて浸軟(macerate)し、抽出し、ある期間放置し、その後固体残骸を濾過することにより作製され得る。

【００５８】

図面を参照する以下の実施例は、例示のために提供し、本発明をなんら限定することを意図しない。

【実施例】

【００５９】

実施例

１．成長曲線分析は、インビトロにおける期間にわたる細胞株成長パターンにおける重要な情報を提供する。

S180 マウス肉腫細胞株およびヒト線維肉腫HT1080 細胞株におけるエタノール性の抽出 C. molmol およびヘキサン抽出Haddiの特性を誘導する細胞を試験した。以前の実験からの結果は、667 ug/ml溶液の両方の抽出物の溶液が細胞死誘導剤として効力のあることを示した。５×10^4細胞/mlの細胞濃度によるストック(stock)細胞懸濁液を、既存の細胞培

養物から、新たに産生した。48個のフラスコを標識し、５mlのこの細胞の懸濁液－２つの対照/未処理、２エタノール C. molmolおよび２ヘキサンHaddi フラスコを、８日間の実験のそれぞれの日の間、接種した。全てのフラスコを37℃および５％のCO_2 においてインキュベートした。４日目の培地を、全ての残りのフラスコにおいて変換した。未処理培地を使用して、対照フラスコを補充し、一方、667 ug/mlの抽出濃度による培地を使用して、関連性のある処理フラスコを補充した。４日目は成長曲線の指数成長期の一日目であるので、４日目を選択した。成長曲線におけるこの地点での処理は、エタノールのC. molmolおよびヘキサンHaddiの能力を完全に実証し、この形質転換された細胞株における細胞死を誘導した。同様のプロトコルを使用して、ヒト線維肉腫細胞株であるHT1080を成長させた。この例では、成長はより遅く、７日目に融合する場合、細胞を抽出物で処理した（図１参照）。

【００６０】

毎日の計測を、標準プロトコルに従ってそれぞれの日の同時刻に行った。簡潔に、全ての培地を、ピペットで移すことによって取り除いた。次いで、フラスコを、2mlのPBSで２度洗浄し、フラスコから出来るだけ多くの細胞残屑を取り除いた（これは、細胞計数において助けるであろう）。最終洗浄を、1mlのTris-EDTA を使用して行い、これはいずれかの残留する培地を単に中和する非常に早い洗浄であった。次いで、更に１mlのTris-EDTAをフラスコに加える前に、全ての液体をピペットで移して、注意深く取り除いた。これらのフラスコを、37℃および５％CO_2 にて２～５分間インキュベートし、全ての細胞がフラスコから引き離されたことを確認した。４日目以降、細胞の数が有意に増加したので、2mlのTris-EDTAを使用して細胞計数を容易にした。この細胞懸濁液を穏やかなピペッティングによって混合し、均一性を確認し、次いで細胞を血球計中に試料を配置し、細胞を光顕微鏡下で計上した。全てにおいて、それぞれのフラスコから４カウントを採取した。平均値を計算し、使用して成長曲線をプロットした（図１および２）。

【００６１】

図２は、S180細胞が古典的なＳ字状の成長曲線を示すことを、明確に示す。細胞密度は、０日目から３日目の間、5×10^4細胞/mlから21.1×10^4細胞/mlまで、非常にゆっくりと増加した。この段階の間およそ24時間の２倍の時間で、細胞密度が、10倍から240×10^4細胞/mlまで増加する場合、３日目から６日目は、指数成長期である。平坦期は、６日目と７日目の間で観察され、細胞数は、相対的に一定のままであり、次いで、８日目で下がり始める。細胞数におけるこの減少は、細胞培養における空間および栄養消耗による。

【００６２】

ヘキサンHaddi抽出物で処理された細胞は、４日目（処理の日）まで通常に挙動した。５日目は、４日目の68.6×10^4細胞/mlから1.8×10^4細胞/mlまで細胞数において劇的な減少が見られる。細胞数は、一貫して減少し続け、８日目にはゼロに達する。細胞は通常６日目まで成長し続けると予測されるので、これは明確に、ヘキサン抽出Haddiの能力を実証し、急速に成長する形質転換された細胞株における細胞死を誘導する（対照曲線参照）。エタノールC. molmolはまた、S180細胞における細胞死の効力ある誘発因子であると見られる。再び、４日目までS180 細胞は、典型的な成長パターンに従う。４日目の処理に続いて、細胞数は、47.9×10^4細胞/ml(４日目)から５日目の12.8×10^4まで下がる。細胞数における減少は、ヘキサンHaddi処理によってよりもより遅い割合で起こる。

【００６３】

図１は、667ug/mlのエタノール抽出 C.molmolおよびヘキサン抽出Haddiの、７日目の成長培地への添加後の、ヒトHT1080 線維肉腫細胞からの類似した応答を示す。未処理細胞は、13日目まで成長し続け、一方C.molmolおよびHaddi 処理細胞株は、７日目からの数が急速に減少する。

【００６４】

２．エタノールC.molmol およびヘキサンHaddi抽出物によって処理されたS 180 肉腫およびHT 1080 ヒト線維肉腫細胞株に対するＭＴＴアッセイ

MTTアッセイは、細胞母集団の生存能力を測定する、力強く、定量的なおよび大いに信

頼できる比色のアッセイである。生存可能な細胞のミトコンドリア的酵素は、3-(4,5-ジメチルチアゾール-２-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)を、黄色水溶性化合物から水不溶性紫色ホルマザン生成物（これは、アッセイの化学的主成分である）まで代謝することが出来る。生成したホルマザンの量は、試験母集団における生存可能な細胞の数に、直接比例する。形成されたホルマザン生成物は、ジメチルスルホキシド(DMSO)中で溶解し得、これは、分光測光法を経て得られる生成物の定量化を可能にする。大いに生存可能な細胞を含む母集団は、高レベルのホルマザン生成物を産生し、従ってDMSOによる溶解において深紫色溶液を与え、一方ほぼ死滅した細胞を有する細胞母集団は、無色溶液を産生するであろう。吸収された光の量（575nmの波長で）は、以下の計算を使用することによって、％細胞傷害性に変換され得る：

【００６５】

【数１】

$$\frac{[\text{対照吸収} - \text{試験吸収}]}{\text{対照吸収}} \times 100 = \%\text{細胞傷害性}$$

【００６６】

実験のプロトコル

２種類の形質転換された細胞株をMTT分析、S 180マウス肉腫細胞およびHT1080ヒト線維肉腫細胞に対して選択した。2×10^5細胞/mlの密度で、96-ウェルのマイクロ力価プレートにおいて接種し、処理の前に24時間、37℃および5％CO_2にてインキュベートした。200ul PBSをプレートの外端上のウェルに加えて、細胞を含むウェルからの蒸発損失を減少させた。

【００６７】

この調査において、本発明者は、形質転換された細胞に対する細胞傷害性活性に対して、エタノール性のC.molmol抽出物およびヘキサンHaddi 抽出物を試験した。抽出物を、それぞれの細胞株に対して培地に加え、1333ug/mlの処理を与えた。連続的な希釈を行い、抽出物の連続的により希釈する濃度の範囲を、試験可能にした。同様の手順を行い、同様の濃度のスタウロスポリン(staurosporine)およびエタノールの溶液を作製した。良く確立した細胞傷害性特性による薬剤である、スタウロスポリンを本調査中に取り込み、抽出物の細胞傷害性と比較するためのベンチマークを提供する。培地単独中に溶解しない、大部分の生体分子を含む抽出物として、培地中への導入の前に、抽出物をエタノール中に溶解する必要があるので、エタノール調節を行った（この対照は、細胞死が観察されるいずれかを引き起こすエタノールではないことを確認する）。

【００６８】

100ulのそれぞれの濃度のそれぞれの抽出物/対照を、標識されたマイクロタイタープレート中の３つの分離ウェルに加えた。未処理対照ウェルにおいて、100ulの培地を、200ulの全最終容量を有する全ウェルに加えた。この３つの同一の連を、24、48、および72時間後に、試験のために続けた。全てのプレートを、読解するまで、37℃および５％CO_2でインキュベートした。

【００６９】

要求された長さの時間の後（すなわち、24、48または72時間）、20ulのMTT溶液（5mg/ml）を、それぞれのウェルに加えた（PBSのみを含むウェルを除外する）。次いで、プレートを、更に４時間、インキュベーター（同様の条件下で）に戻した。MTTは、感光性であるので、全てのプレートをホイル中でカバーして、光への曝露を最小化した。４時間後、ウェルからの全ての培地をピペットで出し（ホルマザン結晶を妨害することを避けるために注意した）、および200ul DMSOをそれぞれのウェル中に加えた。溶解を通じて、注意深いピペットによる混合を確認した。次いで、全てのプレートを、575nmにおける光の吸収のための分光光度計上で読み取った。DMSOの添加の後にすぐにこれを行った。結果を、図３～６において示す。

【００７０】

また同様の方法を使用し、Haddi抽出物の同定された成分の影響を試験した。かくして、両方がHaddi抽出物の主要な成分である、トランス-β-オシメンおよびγ-ビサボレンを、MTTアッセイを使用して試験し、腫瘍細胞の細胞傷害性および生存能力におけるそれらの衝撃を評価した（図７～１０を参照）。

【００７１】

S180 線維肉腫およびHT 1080ヒト線維肉腫細胞株におけるエタノール抽出 C. molmolおよびヘキサン抽出 Haddiの細胞傷害性効果を、図３～６で示す。C. molmolおよびhaddi抽出物の両方は、時間による細胞傷害性の増加に依存している投薬量を作製する。概して、C.molmol抽出物の効果は、Haddi抽出物のものよりも、より漸進的であると見出された。C.molmol抽出物は、24時間後の細胞死における漸進的な増加を示し、一方、Haddi抽出物は、より低投薬量で開始する、より急な細胞死を生じる。

【００７２】

S180およびHT 1080 腫瘍細胞株におけるトランス-β-オシメンおよびγ-ビサボレンの細胞傷害性の効果を、図７～１０において示す。

【００７３】

トランス-β-オシメン、γ-ビサボロールおよびα-ビサボロールの細胞傷害性の効果をまた、MM6細胞（単球白血病細胞株）およびA 375細胞において試験した。該結果を、以下の表５～１０で示す。

【００７４】

【表１】

表 1. S180細胞に対する24、48および72時間後のトランス-β-オシメンの細胞傷害性の測定

濃度 (mM)	% 細胞傷害性 24時間	48時間	72時間
250	92± 0	95 ± 0	95 ± 0
200	87± 3	95 ± 1	95 ± 0
150	82± 7	87 ± 5	87 ± 5
100	69± 11	82 ± 7	88 ± 4
50	19± 3	28 ± 4	22 ± 5

• n=3 ３連

【００７５】

【表２】

表 2. HT1080細胞に対する24、48および72時間後のトランス-β-オシメンの細胞傷害性の測定

濃度 (mM)	% 細胞傷害性 24時間	48時間	72時間
250	67± 2	90 ± 0	90 ± 1
200	62± 2	90 ± 0	90 ± 1
150	43± 8	71 ± 10	64 ± 12
100	16± 6	33 ± 5	15 ± 3
50	1± 5	0 ± 2	-5 ± 3

* n=3 ３連

【００７６】

【表３】

表 3. S180細胞に対する24、48および72時間後のγ-ビサボレンの細胞傷害性の測定

濃度 (mM)	% 細胞傷害性 24時間	48時間	72時間
250	89±0	89±1	86±1
200	90±0	93±1	89±1
150	92±0	93±1	91±1
100	93±0	95±0	94±0
50	93±1	95±0	94±0

*n=3 ３連

【００７７】

【表４】

表 4. HT1080細胞に対する24、48および72時間後のγ-ビサボレンの細胞傷害性の測定

濃度 (mM)	% 細胞傷害性 24時間	48時間	72時間
250	78±2	89±1	81±2
200	87±1	92±1	88±1
150	87±1	93±0	90±0
100	90±0	94±1	91±0
50	90±0	94±0	92±0

*n=3 ３連

【００７８】

トランス-β-オシメンおよびγ-ビサボレンの両方が、S180 線維肉腫細胞に対して細胞傷害性であり、ヒト腫瘍細胞が培養中で成長し、抗-腫瘍剤であることを表わすことが、データより明らかである。オシメンは、200mMより高い濃度で、ほぼ100%の腫瘍細胞死を生じ、ビサボレンは、50mM付近の濃度で効力がある。両方の薬剤は、アポトーシスを誘導する（以下の部分を参照）。オシメンはフレーバーとして記載され、連邦食品医薬品局（US Food and Drug Administration）によって、食品添加物として認可され、哺乳動物に対して無毒である。

【００７９】

【表５】

表 5. MM6細胞の24、48および72時間後のトランス-β-オシメンの細胞傷害性の測定（単球白血病細胞下部）

濃度 (μM)	% 細胞傷害性 24時間	48時間	72時間
368	57	67	67
184	46	57	60
92	32	24	12
42	15	-30	-18

【００８０】

【表６】

表 6. A375細胞に対する24、48および72時間後のトランス-β-オシメンの細胞傷害性の測定（ヒト皮膚メラノーマ細胞株）

	%細胞傷害性		
濃度 (μM)	24時間	48時間	72時間
368	29	35	31
184	7	8	-10
92	-11	-25	-31
46	7	-2	-33

【００８１】

【表７】

表 7. MM6細胞に対する24、48および72時間後のγ-ビサボレンの細胞傷害性の決定

	%細胞傷害性		
濃度 (μM)	24時間	48時間	72時間
10	45	67	78
2.5	51	70	78
0.25	49	68	80
0.13	3	-37	13

【００８２】

【表８】

表 8. A375細胞に対する24、48および72時間後のγ-ビサボレンの細胞傷害性の測定

	%細胞傷害性		
濃度 (μM)	24時間	48時間	72時間
10	23	64	77
2.5	15	55	71
0.25	10	7	50
0.13	15	5	13

【００８３】

化学物質γ-ビサボレンは、両方の腫瘍細胞型に対し0.25μMもの低い濃度で高い細胞死を誘導する、強力な抗-腫瘍剤である。

【００８４】

【表９】

表 9. MM6細胞に対する24、48および72時間後のα-ビサボロールの細胞傷害性の測定

	%細胞傷害性	
濃度 (μM)	24時間	72時間
10	33	49
2.5	46	51
0.25	48	54
0.13	48	53

【００８５】

【表１０】

表 10. A375細胞に対する24、48および72時間後のα-ビサボロールの細胞傷害性の測定

	%細胞傷害性	
濃度 (μM)	24 時間	72 時間
225	31	41
112	10	26
56	-27	10
28	-2	1

【００８６】

化学物質α-ビサボロールは、MM6腫瘍細胞に対し0.13μMもの低い濃度で高い細胞死を誘導する強力な抗-腫瘍剤である。より高い濃度（225μM）が、A375腫瘍細胞のための細胞死を起こすために、必要とされる。

【００８７】

エタノールC.molmolおよびヘキサンHaddiで処理されるHT1080線維肉腫細胞におけるアポトーシスのアネキシンVバイオアッセイ

アネキシンVバイオアッセイは、アポトーシス経路による細胞死および壊死による細胞死を区別するために使用される。どのようにしてオシメンおよびビサボレンが、細胞死を引き起こすかは重大である。化合物が壊死を引き起こす場合、それらは治療剤として非常に少ないポテンシャルを有したであろう。これは、すなわち壊死細胞が破裂し、周囲にその内容物を放出し、かくして隣（非標的細胞）に潜在的に有害な炎症性の応答を引き起こす。一方、アポトーシスは、細胞自殺の自然に分離した形態を産生し、これは炎症を引き起こさない。

【００８８】

アネキシンVバイオアッセイは、このホスファチジルセリン(PS)、膜結合リン脂質が膜二重層の内面から外表面まで移動する間にアポトーシス細胞の血漿膜における早期の変化を利用し、かくしてPSを環境によって接触させる。この変化は、膜が抜かれる前およびDNA分断よりかなり早く起こり、かくして、それを早期のアポプトーシス細胞に対する理想的なマーカーとする。アネキシンVは、PSに対する高親和性によるCa^{2+}依存リン脂質結合タンパク質である。この調査において、annexin VをFITCと称される蛍光マーカーに結合し、Annexin V-FITC 接合体を生じた。蛍光顕微鏡検査によって観察する場合、FITCは強い緑色/黄色の蛍光を発する。かくして、早期のアポプト的細胞は、それらの血漿膜上にアネキシンV-FITCを結合し、緑色/黄色の蛍光を発し、一方、遅いアポプト細胞は、膜と同様の細胞質において緑色/黄色の蛍光を発する。

【００８９】

壊死細胞を同定するために、他の致死剤であるヨウ化プロピジウム(PI)を使用する。PIは、細胞の染色質を染色し、赤色/橙色の蛍光を発する、DNA挿入剤である。PIは、無傷の血漿膜を横切ることが出来ないので、それはダメージを受けた膜を有する細胞の染色質のみ染色する（すなわち、漏出性になる壊死のまたは遅いアポプトーシスの細胞）。

【００９０】

HT 1080細胞は、37℃および５％CO_2にて、１×10^6細胞/mlの細胞密度で、12ウェルプレートにおけるカバーグラス上で成長した。１度確立すると、これらの培養は、24時間、抽出物の0.2%溶液（2μlエタノールおよび996μl培地中の2μl抽出物）で処理した。未処理の対照をまた、同様の条件下で行った。

【００９１】

アネックスV-FITCおよびPI染色を、製造業者のプロトコル(Oncogene™ Research Products, Boston USA)に従って行った。全ての成長した培地を取り除いて、細胞を1ml PBSおよび500μlの結合バッファで1度洗浄し、細胞に加えた。10μlの培地結合剤（アネキシンV-PS結合は、Ca^{2+}依存であるので、カルシウム源として$CaCl_2$を含む）および1.25ulアネキシン V-FITCをウェルに加えた。次いで、アネキシン V-FITCは感光性であるので、これを

暗闇で室温（～22℃）にて15分間インキュベートした。全ての培地をピペットで移して取り除き、500μlの冷結合バッファを細胞に加えた。10μlのヨウ化プロピジウム溶液を加えた。

【００９２】

カバーグラスをウェルから取り除いて、細胞の表を下にして、Vectashield™マウント培地を使用して、スライドガラス上にマウントした。次いで、FITCおよびローダミンフィルターを使用して、細胞を、蛍光顕微鏡上で25倍の倍率で直ちに観察した。

【００９３】

実施例

以下のアネキシン V 試験は、12時間にわたって５uM ビサボレンで処理されたHT1080ヒト線維肉腫細胞中のアポトーシス細胞死の誘導を示す。緑色の蛍光を発する細胞（図中で白色として示す）は、プログラムされた形態の細胞死であるアポトーシスへの至ったことを示す（図１１参照）。

【００９４】

同様の結果が、S180 線維肉腫細胞によっておよび12時間を超えて５uM ビサボレンで処理されたHT1080 ヒト線維肉腫細胞によって得られた。

【００９５】

現在まで試験された個々の化学物質は、香気性ミルラまたはHaddiの主要な成分を表わす。ミルラまたはmolmolの主要な成分を単離し、試験する場合、多くのされるべき作業が残っている。この点において、同定し分類すべきいくつかが残っている、フラノセスキテルペノイドの抗腫瘍特性の試験に、特別な注意が払われるべきであろう。

【００９６】

正常線維芽細胞

対照培養中で成長させた正常の線維芽細胞は、97%の正常な生存細胞と対比して、アポトーシス細胞の非常に低い正常出現、計測された全400細胞の３%の平均を示した。正常な線維芽細胞が、666μg/mlのエタノールC.molmolを含む培地中で成長した場合、アポトーシス細胞の生成は、S180およびHT1080 腫瘍細胞株においてかなりより低く、６時間のインキュベーションの後の4.5%アポトーシス細胞から24時間後の32%まで増加した。アポトーシス細胞の低割合が観察されたが、細胞が234 μg/mlのエタノールC.molmolを含む培地中で成長した場合、同様の観察が示され、６時間のインキュベーションの後の6.25%から24時間のインキュベーションの後の19.25%まで増加した。図１２を参照。

【００９７】

別途の実験において、対照培養中で成長した正常線維芽細胞はまた、97.75%の正常生存細胞と対比して、アポプト細胞のかすかな正常出現、計測された全400細胞の2.25%の平均を示した。正常な線維芽細胞が、666μg/mlのヘキサンHaddi抽出物を含む培地中で成長した場合、アポトーシス細胞の産生は、S180およびHT1080 腫瘍細胞株において得られたものよりかなりより低く、６時間のインキュベーションの後の16%アポトーシス細胞から24時間後の37%のみまで増加した。アポトーシス細胞の低割合が観察されたが、細胞が201 μg/mlのヘキサンHaddi抽出物を含む培地中で成長した場合、同様の観察が示され、６時間のインキュベーションの後の11%から24時間のインキュベーションの後の25.5%まで増加した。図１３を参照。

【００９８】

ヘキサン抽出Haddiは、エタノールC.molmolよりも、S180腫瘍細胞におけるアポトーシスを起こすことにおいてわずかにより良好に行われたことは注目すべきである。エタノールC.molmol抽出物およびヘキサンHaddi処理では、HT 1080ヒト線維芽細胞におけるアポトーシス細胞の割合に関して、非常に類似する結果が得られた。差は、有意ではなかった。

【００９９】

しかしながら、両方の抽出物が、正常な線維細胞においてよりも形質転換された線維肉腫において、特異的により高いレベルのアポトーシスをもたらすことは明らかである。これは、適した投薬量で、これらの抽出物は、腫瘍細胞に対して特異的に活性であることを

意味する。

【０１００】

同様の結果が、オシメンおよびビサボレンへの特異的な応答に関して観察された。更に、線維芽細胞および腫瘍細胞を含む混合培養が処理された場合、腫瘍細胞がアポトーシス中へ侵入する間、正常線維芽細胞は、生存することが明らかである。

【０１０１】

かかる実験の結果が図１４で示され、ここで混合組織培養は、５uM ビサボレンで12時間処理された。腫瘍細胞がアポトーシス体として丸くなるまで、平坦線維細胞は生存することを示す。図１５では、混合組織培養は、100uM オシメンで12時間処理された。腫瘍細胞が丸くなってアポトーシス体を形成するまで、線維細胞は広がって生存することを示す。

【０１０２】

上記で引用された全ての文献を、参考として本明細書中に援用する。

【図面の簡単な説明】

【０１０３】

【図１】図１は、成長培地への667ug/ml mol C. molmolおよびHaddi抽出物の添加を伴う、または伴わないヒト線維肉腫細胞の成長曲線を示す。

【図２】図２は、成長培地への667ug/ml mol C. molmolおよびHaddi抽出物の添加を伴う、または伴わないS180線維肉腫細胞の成長曲線を示す。

【図３】図３は、S180線維肉腫細胞株に対するエタノール抽出C. molmolの細胞傷害性効果を示す。

【図４】図４は、HT1080ヒト線維肉腫細胞株に対するエタノール抽出C. molmolの細胞傷害性効果を示す。

【図５】図５は、S180線維肉腫細胞株に対するヘキサン抽出Haddiの細胞傷害性効果を示す。

【図６】図６は、HT1080ヒト線維肉腫細胞株に対するヘキサン抽出Haddiの細胞傷害性効果を示す。

【図７】図７は、S180腫瘍細胞株に対するトランス-β-オシメンの細胞傷害性効果を示す。

【図８】図８は、HT1080腫瘍細胞株に対するトランス-β-オシメンの細胞傷害性効果を示す。

【図９】図９は、S180腫瘍細胞株に対するγ-ビサボレンの細胞傷害性効果を示す。

【図１０】図１０は、HT1080腫瘍細胞株に対するγ-ビサボレンの細胞傷害性効果を示す。

【図１１】図１１は、5uMビサボレンで12時間処理したHT1080ヒト線維肉腫細胞におけるアポトーシス性細胞死の誘導を示す。

【図１２】図１２は、正常繊維芽細胞に対するエタノール抽出C. molmolの効果を示す。

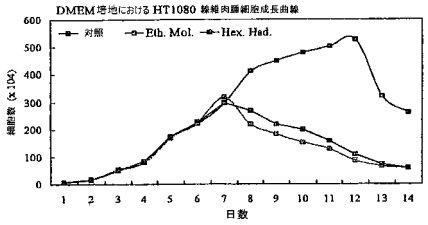
【図１３】図１３は、正常繊維芽細胞に対するヘキサン抽出Haddiの効果を示す。

【図１４】図１４は、5uMビサボレンで12時間処理した混合組織培養物を示す。

【図１５】図１５は、100uMトランス-β-オシメンで12時間処理した混合組織培養物を示す。

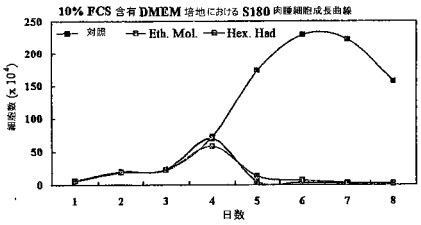
【図１】

Figure 1



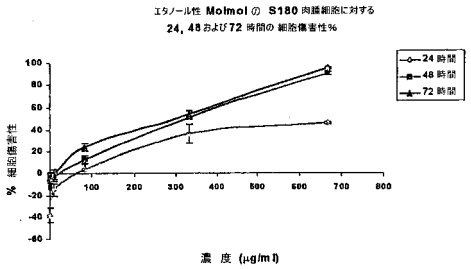
【図２】

Figure 2



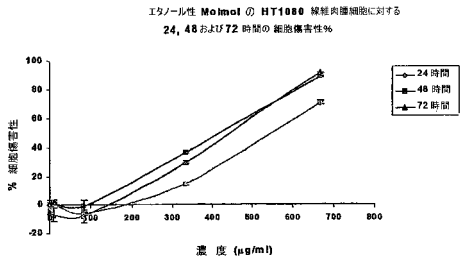
【図３】

Figure 3



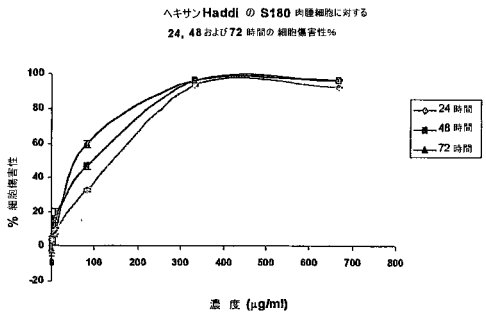
【図４】

Figure 4



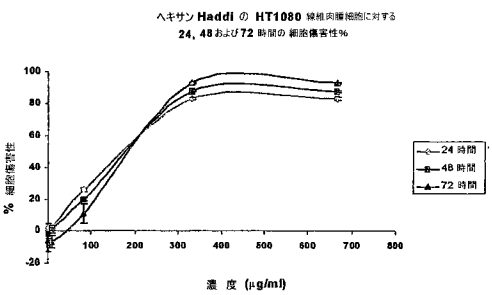
【図５】

Figure 5



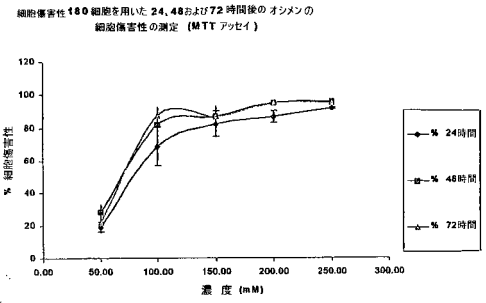
【図６】

Figure 6



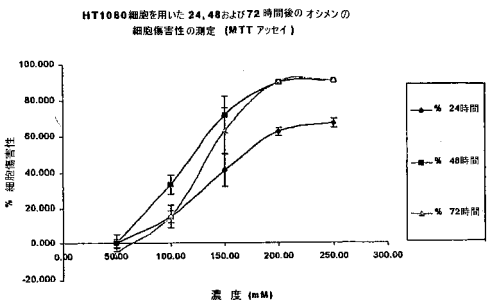
【図７】

Figure 7

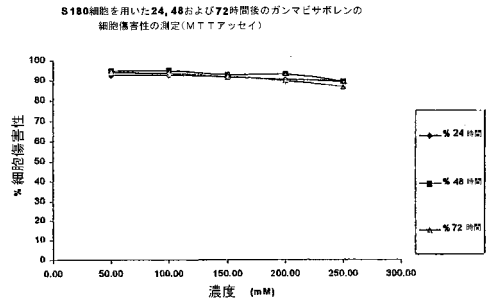


【図８】

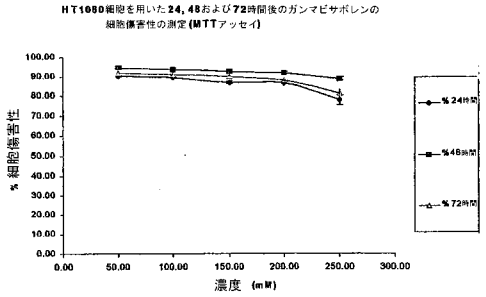
Figure 8



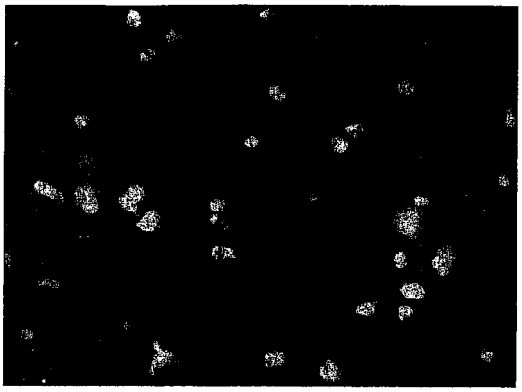
【図９】
Figure 9



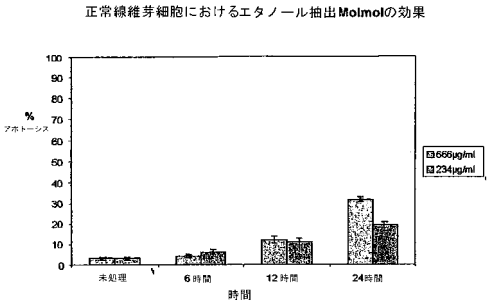
【図１０】
Figure 10



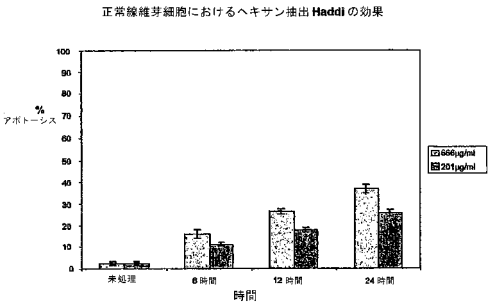
【図１１】
Figure 11



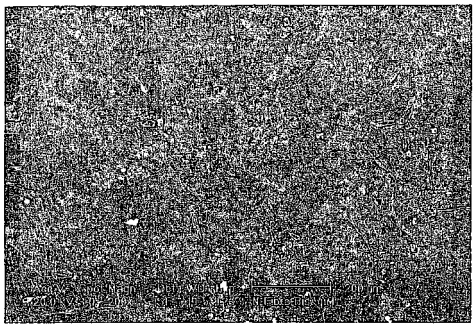
【図１２】
Figure 12



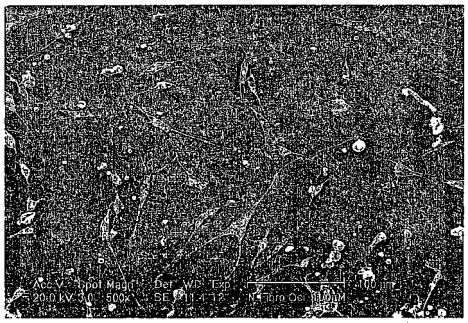
【図１３】
Figure 13



【図１４】
Figure 14



【図１５】
Figure 15



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB2004/004769

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/01 A61K31/015 A61K35/78 A61P35/00

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)
IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2004/066912 A2 (TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT FOUNDATION LTD; KEINAN, EHUD; ALT, ARO) 12 August 2004 (2004-08-12) abstract page 1, line 9 - line 11 page 2, line 1 - line 5 page 26, line 29 - line 30 page 27, line 20 - line 22; claims 77,97-103,127,143	1,2,4-8
X	WO 02/07744 A1 (GIRAUD, ANNE, MARIE, PIERRETTE) 31 January 2002 (2002-01-31) page 13, line 26 - page 21, line 14; examples	1-8
X	WO 02/053138 A2 (SHANAHAN-PRENDERGAST, ELISABETH) 11 July 2002 (2002-07-11) abstract; claims 1-3,7,12-14	1,2,4-8

-/—

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 January 2005	31/01/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Hoff, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/GB2004/004769

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TATMAN D ET AL: "VOLATILE ISOPRENOID CONSTITUENTS OF FRUITS, VEGETABLES AND HERBS CUMULATIVELY SUPPRESS THE PROLIFERATION OF MURINE B16 MELANOMA AND HUMAN HL-60 LEUKEMIA CELLS" CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 175, no. 2, 2002, pages 129-139, XP008037328 ISSN: 0304-3835 cited in the application the whole document	1-3,5-8
X	WO 01/80868 A1 (ROUGEREAU-PERSON, ODILE; ROUGEREAU, ANDRE) 1 November 2001 (2001-11-01) cited in the application abstract; claims; examples	1,2,5-8
X	QURESHI S ET AL: "EVALUATION OF THE GENOTOXIC, CYTOTOXIC, AND ANTITUMOR PROPERTIES OFCOMMIPHORA MOLMOL USING NORMAL AND EHRLICH ASCITES CARCINOMA CELL-BEARING SWISS ALBINO MICE" CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 33, no. 2, 1993, pages 130-138, XP001035052 ISSN: 0344-5704 cited in the application	1-8
Y	the whole document	9,10
X	AL-HARBI M M ET AL: "ANTICARCINOGENIC EFFECT OF COMMIPHORA MOLMOL ON SOLID TUMORS INDUCED BY EHRLICH CARCINOMA CELLS IN MICE" CHEMOTHERAPY, S. KARGER, BASEL, CH, vol. 40, no. 5, September 1994 (1994-09), pages 337-347, XP001035099 ISSN: 0009-3157 cited in the application	1-8
Y	the whole document	9,10
Y	WO 02/080951 A1 (SYNERGISTIX BIOTECH, INC; COHEN, ISAAC) 17 October 2002 (2002-10-17) abstract; claim 1	9,10

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte nal Application No
PCT/GB2004/004769

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SALEH M M ET AL: "Cytotoxicity and in vitro effects on human cancer cell lines of volatiles of Apium graveolens var. filicum" PHARMACEUTICAL AND PHARMACOLOGICAL LETTERS, vol. 8, no. 2, April 1998 (1998-04), pages 97-99, XP008041812 ISSN: 0939-9488 the whole document	1,2,5-8
X	LEAL PATRICIA F ET AL: "Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction." JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 51, no. 9, 23 April 2003 (2003-04-23), pages 2520-2525, XP008041804 ISSN: 0021-8561 cited in the application the whole document	1,2,5-8
A	WO 94/20080 A1 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS) 15 September 1994 (1994-09-15) cited in the application the whole document	1-10

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2004/004769

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 2-5,8,10 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB2004/004769

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004066912 A2	12-08-2004	NONE	
WO 0207744 A1	31-01-2002	FR 2811899 A1	25-01-2002
		AU 7759901 A	05-02-2002
		EP 1301194 A1	16-04-2003
WO 02053138 A2	11-07-2002	EP 1351678 A2	15-10-2003
		US 2004092583 A1	13-05-2004
WO 0180868 A1	01-11-2001	FR 2808196 A1	02-11-2001
		AU 5644501 A	07-11-2001
		CA 2407442 A1	01-11-2001
		EP 1276489 A1	22-01-2003
		US 2004072915 A1	15-04-2004
WO 02080951 A1	17-10-2002	NONE	
WO 9420080 A1	15-09-1994	US 5602184 A	11-02-1997
		AU 6276194 A	26-09-1994

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,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 アリ，アーメド，ヤシン
イギリス国 カーディフ シーエフ１０ ３ユーエス ピー．オー．ボックス ９１１，ミュージアム アベニュー，バイオメディカル サイエンシズ ビルディング，カーディフ ユニバーシティ（番地なし）

Ｆターム(参考) 4C206 AA01 AA02 BA02 BA04 KA01 KA17 MA02 MA05 NA06 ZB26
ZB27