

(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2019-536767

(P2019-536767A)

(43) 公表日 令和1年12月19日(2019.12.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/353 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/353	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 31/675 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/675	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 33/24 (2019.01)</b>	A 6 1 K 33/24	
<b>A 6 1 K 31/519 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/519	
<b>A 6 1 K 31/7068 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7068	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-523821 (P2019-523821)	(71) 出願人	518327682
(86) (22) 出願日	平成29年11月1日 (2017.11.1)		スフェラ ファーマ ビービーティー リ
(85) 翻訳文提出日	令和1年5月27日 (2019.5.27)		ミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/IN2017/050506		SPHAERA PHARMA PVT.
(87) 国際公開番号	W02018/083713		LTD.
(87) 国際公開日	平成30年5月11日 (2018.5.11)		インド、122051 ハリヤナ州 マー
(31) 優先権主張番号	201611037375		ネーサル、アイエムティー、セクター 5
(32) 優先日	平成28年11月1日 (2016.11.1)		、プロット ナンバー32
(33) 優先権主張国・地域又は機関	インド (IN)		Plot No. 32, Sector
		(74) 代理人	110002871
			特許業務法人サカモト・アンド・パートナーズ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エピカテキン及び抗癌化合物の組合せを含む組成物

## (57) 【要約】

本発明は、エピカテキンと抗癌化合物の新規で安定で相乗的な組合せを開示する。本発明はまた、エピカテキンと抗癌化合物の新規な組合せを、他の薬学的許容される賦形剤と共に含む組成物を開示する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

エピカテキンと少なくとも 1 つの抗癌化合物の新規な組合せ。

## 【請求項 2】

前記エピカテキンが、(+) - エピカテキン、(-) - エピカテキン、及び (+) - エピカテキンと (-) - エピカテキンの混合物を含む群から選択される、請求項 1 に記載の組合せ。

## 【請求項 3】

(+) - エピカテキン：(-) - エピカテキンの比率が 0.1 : 99.9 ~ 99.9 : 0.1 の範囲内である、請求項 1 に記載の組合せ。

10

## 【請求項 4】

エピカテキン：抗癌化合物の比率が、0.1 : 99.9 ~ 99.9 : 0.1 の範囲内である、請求項 1 に記載の組合せ。

## 【請求項 5】

前記抗癌化合物が、シクロホスファミド、ニトソウレア、アルコールスルホネート等のアルキル化抗腫瘍化合物；シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン等の白金配位化合物；メトトレキサート、6 - メルカプトブリン、5 - フルオロウラシル (5 - F U)、ゲムシタピン等の代謝拮抗薬；ドキソルビシン等の抗腫瘍抗薬；ドセタキセル、パクリタキセル、トポテカン、エトポシド、イリノテカン、ビンブラスチン等の微小管阻害薬；イマチニブ、ラパチニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、テムシロリムス等の生物学的化合物；イバンドロン酸、ゾレドロン酸等のビスホスホネート；免疫療法化合物；標的抗癌療法化合物；選択的又は非選択的な P I 3 キナーゼ阻害薬、m T O R 阻害薬、M E K 阻害薬、A k t 阻害薬、E G F 受容体を標的とするイマチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ等のチロシンキナーゼ阻害薬；F G F、V E G F、P D G F に対するスニチニブ阻害薬；A L K 阻害薬、A B L 阻害薬、S C R 阻害薬、F L T 3 阻害薬、K I T 阻害薬、M E T 阻害薬、B R A F 阻害薬、I l 阻害薬、J A K 1 / 2 阻害薬、J A K 3 阻害薬、プロテオソーム阻害薬ボルテゾミブ、他の成長因子阻害薬、R A S / R A F / M A P K 経路の阻害薬、他のシグナル伝達阻害薬、多標的キナーゼ阻害薬、トポイソメラーゼ阻害薬、解糖系阻害薬、カテプシン B 阻害薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬等の群から選択される他の一般的な免疫療法化合物等を含む群から選択され、単独又は他の抗癌化合物と組合せて用いられ、好ましくは抗癌化合物がシスプラチン、カルボプラチン又はオキサリプラチン等の白金含有抗癌剤、P I 3 キナーゼ / m T O R 阻害薬等の化学療法化合物を含む群から選択される、請求項 1 に記載の組合せ。

20

30

## 【請求項 6】

P I 3 キナーゼ / m T O R を有する抗癌化合物が、以下の化合物を含む群から選択される、請求項 1 及び 5 に記載の組合せ：

i . 4 - ( 4 - ( 2 - アミノチアゾール - 5 - イル ) - 6 - モルホリノ - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イルオキシ ) - N , N - ジメチルベンズアミド；

i i . 4 - ( 4 - ( 2 - アミノチアゾール - 5 - イル ) - 6 - モルホリノ - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イルオキシ ) - N , N - ジメチルベンズアミド；

i i i . ( S ) - 4 - ( ( 4 - ( 2 - アミノチアゾール - 5 - イル ) - 6 - ( 3 - メチルモルホリノ ) - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イル ) オキシ ) - 3 - フルオロ - N , N - ジメチルベンズアミド；

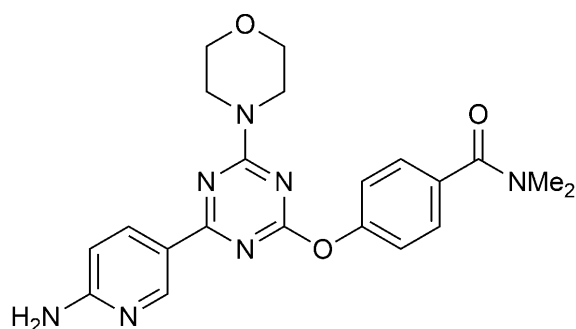
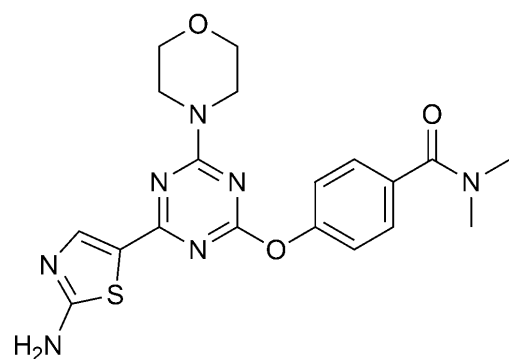
i v . ( S ) - 4 - ( ( 4 - ( 6 - アミノピリジン - 3 - イル ) - 6 - ( 3 - メチルモルホリノ ) - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イル ) オキシ ) - 3 - フルオロ - N , N - ジメチルベンズアミド。

40

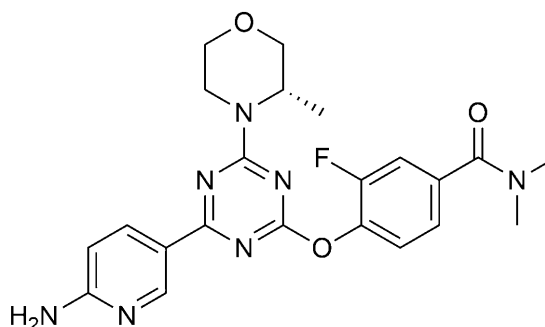
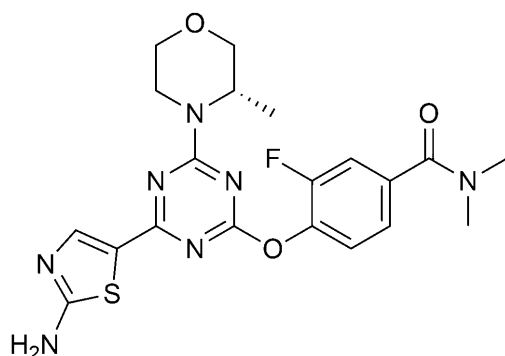
## 【請求項 7】

P I 3 キナーゼ / m T O R を有する抗癌化合物が、以下の化合物を含む群から選択される、請求項 1 及び 5 に記載の組合せ：

## 【化 1】



10



20

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の組合せを、他の薬学的許容される賦形剤と共に含む新規な組成物。

## 【請求項 9】

癌治療で相乗効果をもたらすための、請求項 1 に記載の新規な組合せの使用。

## 【請求項 10】

抗癌組合せに対する患者の耐性の発症リスクを減少させるための、請求項 1 に記載の新規な組合せの使用。

## 【請求項 11】

肥満に関連する効果を減少させるための、請求項 1 に記載の新規な組合せの使用。

30

## 【請求項 12】

癌細胞に対する免疫応答を誘導するための、請求項 1 に記載の新規な組合せの使用。

## 【請求項 13】

ワールブルク効果を減少させるための、請求項 1 に記載の新規な組合せの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、エピカテキンと抗癌化合物の新規な組合せ、及びその新規な組合せを含む組成物に関する。

## 【背景技術】

40

## 【0002】

癌は、ヒトにおいて最も一般的な疾患の 1 つであり、ヒトの大部分の死亡率及び疾病率の原因となり、その結果、毎年何百万の人々が死亡し、また患者の生活の質が低下している。疾患のグループとしての癌は、身体他の部分に侵入及び / 又は拡大する潜在能力を持つ異常な細胞増殖の特徴を有し、すべての癌の発生率は世界中で上昇している。癌の発生は、一般に、とりわけ、遺伝的要因、特定の毒素への曝露、及び既知の癌を引き起こす物質、食事、喫煙（タバコ）等の習慣に関連する。癌細胞内の遺伝的経路及び代謝経路の変化は、疾患の推進因子として確立されている。ワールブルク効果は、ほとんどの癌細胞が、ほとんどの正常細胞におけるミトコンドリア中のピルビン酸の酸化よりもむしろ主に解糖とそれに続く乳酸発酵を通してエネルギーを生産するという観察である（Gatenby RA

50

; Gillies RJ, Nature Reviews Cancer 4 (11): 891-9, 2004 ; Kim JW, Dang CV, Cancer Res. 66 (18): 8927-8930, 2006)。後者のプロセスは好気性（酸素を使用）である。悪性の急速に増殖する腫瘍細胞は、通常、それらの起源の正常な組織のものよりも最大200倍高い解糖速度を有する。酸素が豊富であってもこれは起こる。Otto Warburgは、この代謝の変化が癌細胞にとって必須であると仮定した（Warburg O, Science 123 (3191): 309-314, 1956）。これは現在、ワールブルク効果として知られている。ワールブルク効果は、単に癌におけるミトコンドリアの損傷、又は腫瘍内の低酸素環境への適応の結果であるか、あるいは癌性細胞を死滅させる細胞のアポトーシスプログラムにミトコンドリアが関与しているため、癌遺伝子がミトコンドリアを停止させる結果である可能性がある。それは、細胞増殖に関連する効果でもあり得る。解糖は細胞増殖に必要な構成要素の大部分を提供するので、癌細胞は解糖を活性化して増殖する必要があることが提唱されている。今日、癌遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子における変異は悪性形質転換の原因であると考えられており、ワールブルク効果はこれらの変異の原因ではなくその結果であると考えられている（Bertram JS, Mol. Aspects Med. 21 (6): 167-223, 2000 ; Grander D, Med. Oncol. 15 (1): 20-26, 1998）。併せて、肥満も発癌の促進因子である（Oncogene, 2016 Dec 8; 35(49): 6271-6280）。

10

#### 【0003】

解糖を阻害する化合物は、現在、抗癌剤として熱心な研究の主題であり（Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P Oncogene 25 (34): 4633-4646, 2006）、S B - 2 0 4 9 9 0、2 - デオキシ - D - グルコース（2 D G）、3 - プロモピルベート（3 - B r P A、プロモピルビン酸、又はプロモピルベート）、3 - B r O P、5 - チオグルコース及びジクロロ酢酸（D C A）を含む。シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸は、モノカルボン酸トランスポーター（M C T；腫瘍内に乳酸が蓄積するのを防ぐ）の小分子阻害薬であり、脳腫瘍の前臨床研究における代謝標的としてうまく用いられている。ジクロロ酢酸（D C A）は、ミトコンドリアのピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの小分子阻害薬であり、インビトロ及びインビボで解糖を「下方制御」し、多種類の癌に対して治療効果を有し得る。癌遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子における変異も悪性形質転換の原因である。別の可能性は、癌細胞における解糖経路に影響を与えることであり、ミトコンドリア経路を増強して酸化リン酸化を促進することである。

20

#### 【0004】

それ故、癌細胞には代謝的でミトコンドリア的な根本的な変化がある。それ故、癌細胞内の代謝経路／ミトコンドリア経路及び発癌経路の両方への干渉は、増強された利点を有するはずである。

30

#### 【0005】

さらに、癌治療のための薬物及び薬物の組成物は、一般に患者に入手可能である。そのような薬物及び組成物はしばしば非常に高用量及び長期間の治療に関し、結果として患者に様々な副作用をもたらす。また、これらのいくつかの薬物は耐性の発症のために効果を失くなる。それ故、これらの薬物の用量及び治療期間を減少させることで、効果を増強しながら副作用を減少させて、著しい利益が患者に提供されるであろう。

#### 【0006】

チョコレート、茶、果物、野菜及びワインに含まれるフラボノールは、その抗酸化活性によって癌の治療に使用されることが報告されている。例えば、カテキンは、抗癌化合物、例えば、アドリアマイシン及びドキソルビシンの効果を増強することが、以前に報告されている（Sugiyama and Sadzuka, 1998, Can. Lett. 133:19-26 ; Sadzuka et al., 1998, Clin. Can. Res. 4:153-156）。しかし、フラボノールはしばしば代謝経路及びミトコンドリア経路に影響を与えない。初期の研究によって、エピカテキンが代謝経路及びミトコンドリア経路の増強に有効であること、この活性が他のフラボノールより著しく高く、特に（-）- エピカテキン及び（+）- エピカテキン（まとめて「エピカテキン」）に特異的であることを示された（参照, P C T / U S 2 0 1 2 / 0 4 0 9 2 9）。

40

#### 【0007】

50

そこで、本出願では、抗癌化合物と組合せたエピカテキンの効果を調べる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】PCT/US2012/040929

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Gatenby RA; Gillies RJ, Nature Reviews Cancer 4 (11): 891-9, 2004

【非特許文献2】Kim JW, Dang CV, Cancer Res. 66 (18): 8927-8930, 2006

10

【非特許文献3】Warburg O, Science 123 (3191): 309-314, 1956

【非特許文献4】Bertram JS, Mol. Aspects Med. 21 (6): 167-223, 2000

【非特許文献5】Grander D, Med. Oncol. 15 (1): 20-26, 1998

【非特許文献6】Oncogene, 2016 Dec 8; 35(49): 6271-6280

【非特許文献7】Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P Oncogene 25 (34): 4633-4646, 2006

【非特許文献8】Sugiyama and Sadzuka, 1998, Can. Lett. 133:19-26

【非特許文献9】Sadzuka et al., 1998, Clin. Can. Res. 4:153-156

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0010】

本発明の課題は、エピカテキンと抗癌化合物の新規で安定で相乗的な組合せ、及びその新規な組合せを含む組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、エピカテキンと抗癌化合物の新規で安定で相乗的な組合せを開示する。本発明はまた、エピカテキンと抗癌化合物の新規な組合せを、他の薬学的許容される賦形剤と共に含む組成物を開示する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

30

【図1a】HCT116細胞株誘発異種移植マウスモデルの結腸癌におけるPI3K/mTOR阻害薬化合物1004と組合せたラセミ体エピカテキン（経口投与）の相乗効果を示す。

【図1b】腫瘍重量の減少におけるPI3K/mTOR阻害薬化合物1004と組合せたラセミ体エピカテキンの相乗効果を示す。

【図2a】細胞増殖の阻害におけるシスプラチンの効果を示す。

【図2b】A549の阻害におけるエピカテキンの効果を示す。

【図2c】アイソボログラムに含まれる原理を示す。

【図2d】シスプラチンと（-）-エピカテキンの相乗効果を説明するアイソボログラムを示す。

40

【図3】NCI-H1299及びHCC-827等の癌細胞株における（-）-エピカテキンとシスプラチンの相乗効果を示す。

【図4a】アポトーシスにおける（-）-エピカテキンとシスプラチンの相乗効果を示す。

【図4b】アポトーシスにおける（-）-エピカテキンとシスプラチンの相乗効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、エピカテキンと少なくとも1つの抗癌化合物の新規な抗癌組合せを開示する。

50

## 【 0 0 1 4 】

本発明のエピカテキンは、( + ) - エピカテキン、( - ) - エピカテキン、及び( + ) - エピカテキンと( - ) - エピカテキンの混合物を含む群から選択することができる。

## 【 0 0 1 5 】

エピカテキンは、本発明の組合せの 0 . 1 % 対 9 9 . 9 % ~ 9 9 . 9 % 対 0 . 1 % の範囲で変化する比で存在してもよく、本発明の組合せの残りの成分は抗癌化合物であってもよい。本発明は、エピカテキンの純粋な異性体、エピカテキンの混合物と抗癌化合物との新規で安定で相乗的な組合せを開示する。( + ) - エピカテキン：( - ) - エピカテキンは、0 . 1 : 9 9 . 9 ~ 9 9 . 9 : 0 . 1 の範囲内で変化する比で存在し得る。

## 【 0 0 1 6 】

本発明のエピカテキンは、天然又は合成の供給源から得ることができる。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の抗癌化合物は、シクロホスファミド、ニトソウレア、アルコールスルホネート等のアルキル化抗腫瘍化合物；シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン等の白金配位化合物；メトトレキサート、6 - メルカプトブリン、5 - フルオロウラシル( 5 - F U )、ゲムシタピン等の代謝拮抗薬；ドキソルビシン等の抗腫瘍抗薬；ドセタキセル、パクリタキセル、トポテカン、エトポシド、イリノテカン、ビンブラスチン等の微小管阻害薬；イマチニブ、ラパチニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、テムシロリムス等の生物学的化合物；イバンドロン酸、ゾレドロン酸等のビスホスホネート；免疫療法化合物；標的抗癌療法化合物；選択的又は非選択的な P I 3 キナーゼ阻害薬、m T O R 阻害薬、M E K 阻害薬、A k t 阻害薬、E G F 受容体を標的とするイマチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ等のチロシンキナーゼ阻害薬；F G F、V E G F、P D G F に対するスニチニブ阻害薬；A L K 阻害薬、A B L 阻害薬、S C R 阻害薬、F L T 3 阻害薬、K I T 阻害薬、M E T 阻害薬、B R A F 阻害薬、I l 阻害薬、J A K 1 / 2 阻害薬、J A K 3 阻害薬、プロテオソーム阻害薬ボルテゾミブ、他の成長因子阻害薬、R A S / R A F / M A P K 経路の阻害薬、他のシグナル伝達阻害薬、多標的キナーゼ阻害薬、トポイソメラーゼ阻害薬、解糖系阻害薬、カテプシン B 阻害薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬等の群から選択される他の一般的な免疫療法化合物等を含む群から選択することができ、個別に又は当業者に知られている他の抗癌化合物と組合せて用いることができる。

## 【 0 0 1 8 】

好ましくは、本発明の抗癌化合物は、シスプラチン、カルボプラチン又はオキサリプラチン等の白金含有抗癌剤、P I 3 キナーゼ / m T O R 阻害薬等の化学療法化合物を含む群から選択することができる。

## 【 0 0 1 9 】

抗癌化合物は、本発明の新規な組合せに対して 0 . 0 1 ~ 9 9 . 9 9 の比率で存在し得る。

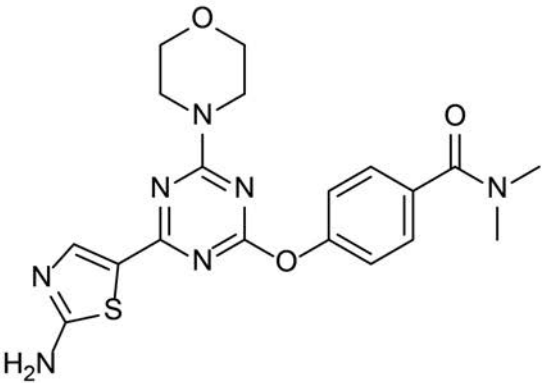
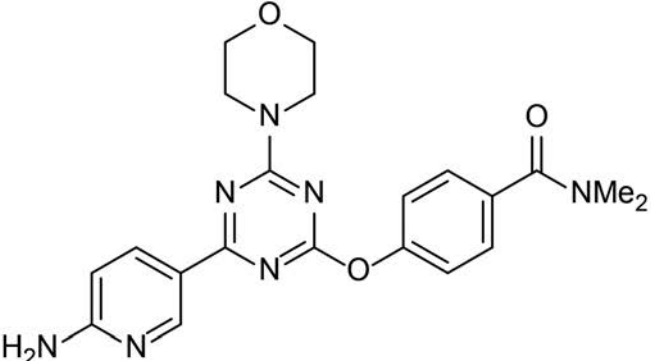
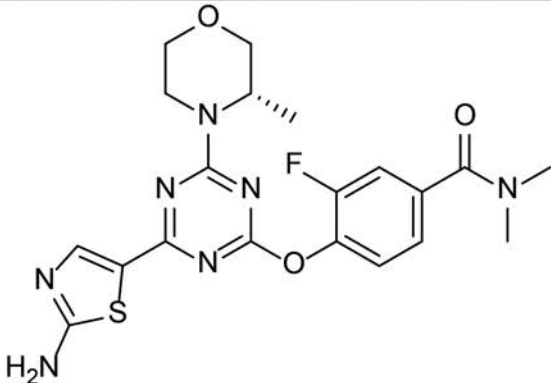
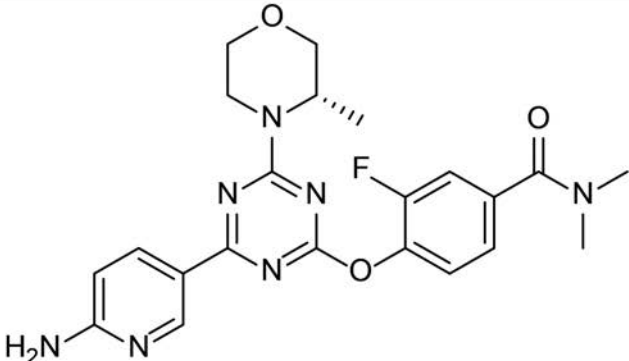
## 【 0 0 2 0 】

本発明の抗癌化合物は、以下の表 1 に列挙される P I 3 キナーゼ / m T O R 阻害薬であってもよく、又は P I 3 キナーゼ / m T O R を有する他の化合物から選択してもよい。

## 【 0 0 2 1 】

【表 1】

表 1 : PI3キナーゼ／mTOR活性を有する例示化合物

化合物 番号	構造	IUPAC名
1001		4-(4-(2-アミノチ アゾール-5-イル) -6-モルホリノー1, 3, 5-トリアジン-2 -イルオキシ)-N, N -ジメチルベンズアミ ド
1002		4-(4-(6-アミノピ リジン-3-イル)-6 -モルホリノー1, 3, 5-トリアジン-2-イル オキシ)-N, N-ジ メチルベンズアミド
1003		(S)-4-((4-(2- アミノチアゾール-5 -イル)-6-(3-メ チルモルホリノー1, 3, 5-トリアジン-2 -イル)オキシ)-3-フ ルオロー-N, N-ジメ チルベンズアミド
1004		(S)-4-((4-(6- アミノピリジン-3-イ ル)-6-(3-メチル モルホリノー1, 3, 5 -トリアジン-2-イル )オキシ)-3-フル オロー-N, N-ジメチ ルベンズアミド

【0022】

他の側面において、本発明は、本発明の新規な組合せを、他の薬学的許容される賦形剤と共に含む組成物を開示する。

【0023】

本発明の組成物は、経口、局所、又は非経口の剤形で投与するのに適した方法で製剤化

10

20

30

40

50

することができる。

#### 【 0 0 2 4 】

理論に制限されることなく、本発明は、実施例 1 ～ 3 に示されるように、エピカテキンと抗癌化合物の新規な組合せが相乗的に作用し、様々な癌における緩和効果、癌治療における相乗効果を実質的に増強し、抗癌組合せに対する患者の耐性の発症リスクを減少させ、肥満に関連する効果を減少させ、癌細胞株におけるアポトーシスを誘導し、癌細胞に対する免疫応答を誘導し、ワールブルク効果を減少させることを開示する。

#### 【 0 0 2 5 】

##### 発明の効果

1. 本発明の組合せは、新規であり、副作用が減少し、効力が増加する。
2. 本発明の組合せは、安定であり、相乗効果を有する。

10

#### 【実施例】

#### 【 0 0 2 6 】

以下の実施例は、本発明及びその独特の特徴をさらに入念に説明する。しかし、以下の実施例は、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

#### 【 0 0 2 7 】

実施例 1 : P I 3 K / m T O R 阻害薬、化合物 1 0 0 4 と組合せたエピカテキンの相乗効果の評価

免疫無防備のマウスにおける癌異種移植モデルに対して、P I 3 K / m T O R 阻害薬と組合せたエピカテキンの抗癌能力を評価する。C D 1 ヌードマウスに、ビヒクルコントロール、P I 3 K / m T O R 阻害薬、及び P I 3 K / m T O R 阻害薬とエピカテキンの組合せを 2 1 日間投与する。群 ( G - 3 ) で腫瘍体積の減少が最大であることが見出される。群 ( G - 3 ) は、組合せて投与することで 9 7 % の腫瘍増殖阻害 % ( T G I % ) を有した。その結果を、表 2、表 3、図 1 a 及び図 1 b に示す。

20

#### 【 0 0 2 8 】

##### 【表 2】

**表 2: HCT116 誘発異種移植マウスモデルにおけるエピカテキンと化合物 1004 の組合せの効果**

HCT116 誘発異種移植マウスモデル における 21 日間有効性試験		TGI% (平均)	T/C% (平均)
G-1	コントロール	0	0
G-2	化合物 1004 __ 5 mpk	80	29
G-3	エピカテキン __ 30 mpk + 化合物 1004 __ 5 mpk	97	14

30

TGI: 腫瘍増殖阻害

T/C: 21 日目の処置 / コントロール

40

#### 【 0 0 2 9 】



【表 3】

表3:腫瘍重量の減少におけるエピカテキンと化合物1004の組合せの結果

群	腫瘍重量(g)
コントロール	1.27
化合物1004	0.72
エピカテキン__30 mpk + 化合物1004__5 mpk	0.55

10

【0030】

表2、表3、図1a及び図1bに示されたデータから、エピカテキンと化合物1004の組合せは相乗的に作用することが分かる。

【0031】

実施例2：シスプラチンと組合せた(-)-エピカテキンの相乗効果の評価

#### 2.1 細胞培養：

正常肺細胞に対応するHe11-299細胞株を正常細胞コントロールとして用いる。肺腺癌に対応するA549細胞株を37℃で5%CO<sub>2</sub>下、標準条件下で培養する。細胞を、異なる濃度のシスプラチン[CDDP(シス-ジアンミンジクロロ白金(II), Sigma)][1~100μM]、又は(-)-エピカテキン(EC, Sigma)[0.1~1000μM]、又は両化合物の組合せで、48時間、処理する。両方の化合物はDMSO(0.9%)に溶解される。

20

【0032】

#### 2.2 細胞生存率：

細胞生存率はMTTアッセイで決定される。簡単に説明すると、細胞を0.1mg/mlのMTT(3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド)と共に37℃で40分間インキュベートする。紫色のホルマゼンを0.01MのHCl-イソプロパノールを用いて可溶化する。溶解した物質を595nmで分光光度的に測定する(Biotek Synergy HT)。

30

【0033】

生存率は次のように計算される。

生存率：

(実験群の光学密度) / (コントロール群の光学密度) × 100

【0034】

#### アイソボログラム解析：

EC及びCDDPの濃度反応曲線を決定した後、アイソボログラム解析を実施する。この方法は、最初に服用組合せの理論的分析効果を可能にし、Tallaridaによって報告された研究に基づいており、これは任意の2つの薬物間の相互作用の種類を定量的及びグラフ的に評価する。簡潔には、各化合物の阻害濃度(IC)が計算された後、式(式(1))に従って、一定の比率1:1の組合せの理論値(例えば、IC<sub>50</sub>、IC<sub>30</sub>及びIC<sub>15</sub>)を得る。次いで、それらは実験値によって置換される(式(2))。

40

式(1)：

(CDDP理論値 / IC<sub>x</sub>) + (EC理論値 / IC<sub>x</sub>) = 1

【0035】

つまり、相加効果が存在するかどうかを判断するには、1/2 EC有効濃度 + 1/2 CDDP有効濃度が1と等しくなければならない。例えば、1/2 EC(IC<sub>30</sub>) + 1/2 CDDP(IC<sub>30</sub>)に従う組合せでは、相加効果が存在する場合、実験条件で30%の阻害があるだろう。

【0036】

50

次いで、ECとCDDPの相互作用を、 $1/2 EC(IC_x) + 1/2 CDDP(IC_x)$ 濃度の同時投与で実験的に評価する。ここで、 $IC_x$ は異なる濃度に対応するが常に1:1の比率である。これらの組合せで得られた実験結果が採用され、2つの化合物間で観察された相互作用の種類を決定することができる。

式(2)：

$$(CDDP \text{ 実験値} / IC_{30}) + (EC \text{ 実験値} / IC_{30}) = \text{計算結果}$$

【0037】

前述のように、実験の計算結果が1に等しい場合、相加効果がある。計算結果が1以下の場合、相乗効果又は超加性(supera d d i t i v e)効果があり、計算結果が1以上の場合、効果は拮抗的である。

【0038】

アポトーシス解析(アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド染色)

アポトーシスの存在は、アクリジンオレンジ/臭化エチジウム染色[15mM/0.002mM]を用いて評価される。アクリジンオレンジ(AO)は細胞核を緑色に染める。エチジウムブロマイド(EB)は、原形質膜の完全性が失われた場合にのみ細胞核を赤色に染色する。画像取得のために落射蛍光顕微鏡(Nikon Eclipse E600)を用いる。生存し健全な細胞は、光沢のある緑色の染色を呈する。アポトーシス過程にある細胞及び死細胞は、光沢のある赤色の染色を示す。

【0039】

緑色と赤色の蛍光強度は、ImageJ software(バージョン1.38x, <http://rsb.info.nih.gov/ij>)を用いて評価される。

【0040】

細胞毒性の減少におけるエピカテキンとシスプラチンの相乗作用は、A549細胞株で評価される。図2aはA549細胞におけるシスプラチンの細胞毒性効果を示し、図2bは、A549細胞におけるエピカテキンの細胞毒性効果を示す。本発明の組合せの効果はアイソボログラムで表される。アイソボログラムの構築と解釈は、すぐに参照できるように図2cに示される。本発明の組合せのアイソボログラムを図2dに示す。相加性の線の下に位置する赤色の点は、30%の効果(細胞毒性)を達成するのに必要な両化合物の実験的な組合せを表す。組合せた場合、細胞増殖の30%阻害を達成するために必要な(-)-エピカテキン及びシスプラチンの濃度は、それらが別々に適用されたときに同じレベルの効果を達成するために必要な用量よりはるかに低い。組合せ指数( )を決定するために数学的分析が行われる。

$$= (IC_{30} \text{ 実験値} / IC_{30} \text{ 理論値}) = 0.741 / 2.96 = \underline{0.250}$$

= 1 相加作用

< 1 相乗作用

> 1 拮抗作用

【0041】

結果：

図3から、NCI-H1299及びHCC-827等の肺癌細胞株に基づく細胞障害性モデルにおいて、本発明の(-)-エピカテキンとシスプラチンの組合せが、相乗的であることが認められる。

【0042】

図4から、(-)-エピカテキンとシスプラチンが個別に試験された場合のアポトーシス効果と比較して、(-)-エピカテキンとシスプラチンの組合せが、癌細胞株におけるアポトーシスの誘導において相乗効果を有することが認められる。

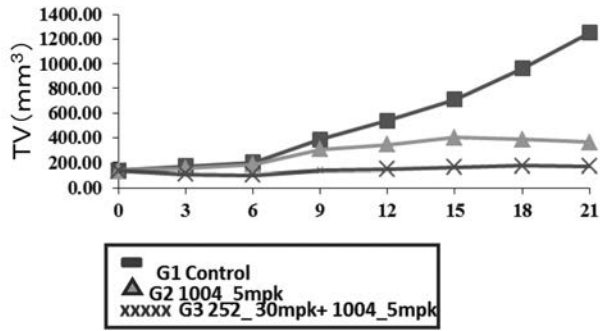
10

20

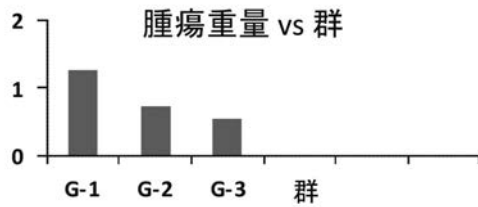
30

40

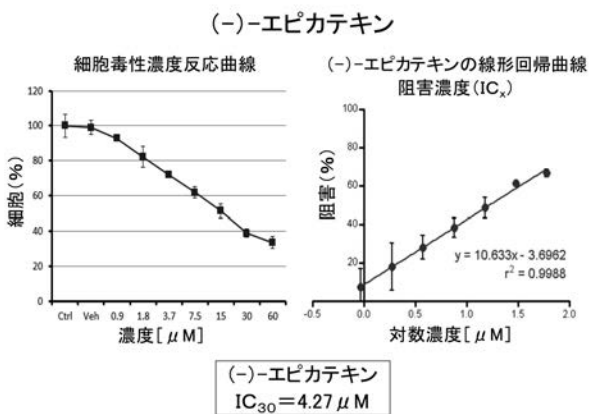
【図 1 a】



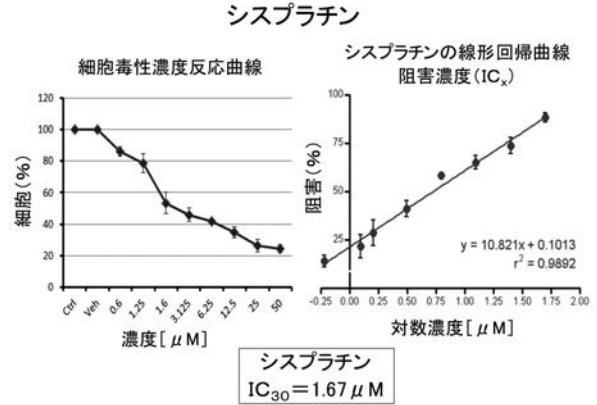
【図 1 b】



【図 2 b】

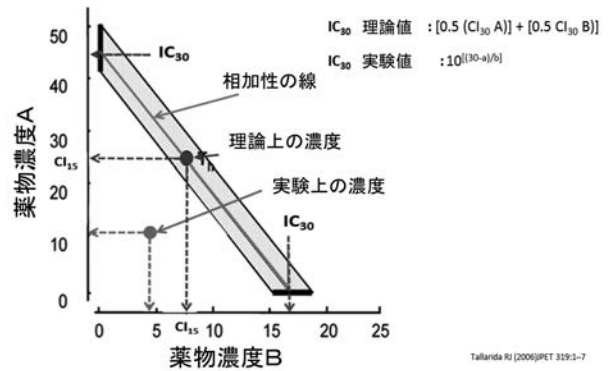


【図 2 a】



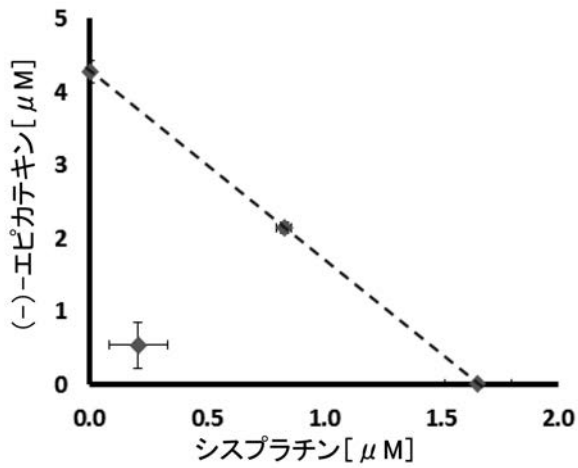
【図 2 c】

アイソボログラムが如何に構築されるか？



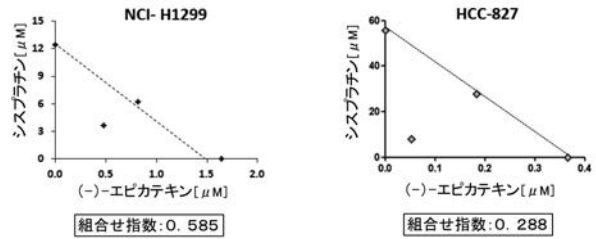
【図 2 d】

シスプラチンと(-)-エピカテキンの効果の  
アイソボログラム解析



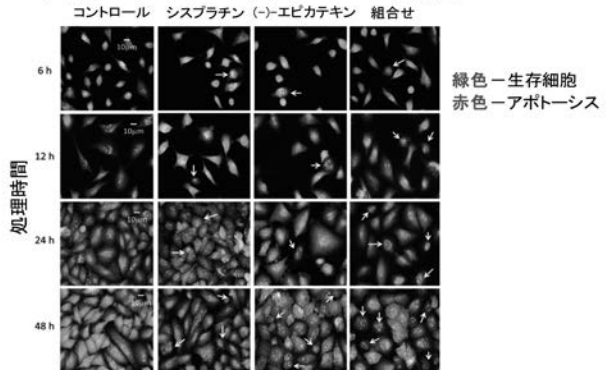
【図 3】

(-)-エピカテキンとシスプラチンの相乗効果は  
他の肺癌細胞でも観察された



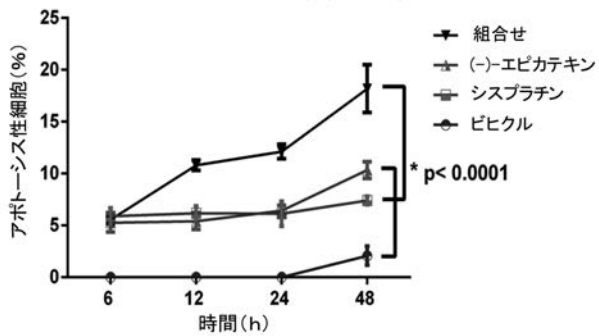
【図 4 a】

アポトーシス検出のための  
アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド染色



【図 4 b】

アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイド染色で  
同定されたアポトーシス性細胞の数



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IN2017/050506

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07D311/00,A61K36/00 Version=2018.01  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>  Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D, A61K  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patseer, IPO Internal Database		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7192612 B2 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 20 MAR 2007 (20-03-2007) Abstract, column 2 lines 30-35, column 6 lines 35-42, column 9 lines 54-56, column 10 lines 5-10, column 16 lines 52-55, examples and claims 9, 10	1-5, 8-12
Y	column 14 lines 46-63 and claim 9	6-7, 13
Y	WO 2014016849 A2 (SPHAERA PHARMA PVT. LTD.) 30 JAN 2014 (30-01-2014) Abstract, page 2, page 21 table 1 and claims 5, 6	6-7, 13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30-01-2018		Date of mailing of the international search report 30-01-2018
Name and mailing address of the ISA/ Indian Patent Office Plot No.32, Sector 14, Dwarka, New Delhi-110075 Facsimile No.		Authorized officer Manish Kumar Yadav Telephone No. +91-1125300200

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family membersInternational application No.  
PCT/IN2017/050506

Citation	Pub.Date	Family	Pub.Date
US 7192612 B2	20-03-2007	US 20050031716 A1	10-02-2005
		WO 2005058340 A1	30-06-2005
WO 2014016849 A2	30-01-2014	CN 104582707 A	29-04-2015
		EP 2874632 A2	27-05-2015
		JP 2015526424 A	10-09-2015
		US 2015197515 A1	16-07-2015

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/663 (2006.01)	A 6 1 K 31/663	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100144048

弁理士 坂本 智弘

(72)発明者 ドゥガー、サンディーブ

インド、1 2 2 0 5 1 ハリヤナ州 マーネーサル、アイエムティー、セクター 5、プロット  
ナンバー 3 2、スフェラ ファーマ ピーブイティー リミテッド

F ターム(参考) 4C084 AA19 MA02 MA52 MA55 NA05 ZA701 ZB261 ZC751

4C086 AA01 AA02 BA02 BA08 BC50 BC64 CB09 DA34 DA35 EA10

EA17 GA01 GA07 GA08 GA09 GA10 GA12 HA12 HA28 MA02

NA05 NA06 ZA70 ZB26 ZC75