

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6228113号
(P6228113)

(45) 発行日 平成29年11月8日(2017.11.8)

(24) 登録日 平成29年10月20日(2017.10.20)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/366 (2006.01)	A 6 1 K 31/366
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 K 31/4188 (2006.01)	A 6 1 K 31/4188

請求項の数 7 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2014-515214 (P2014-515214)	(73) 特許権者	513315514
(86) (22) 出願日	平成24年6月15日 (2012. 6. 15)		ライフ・アンド・ブレイン・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
(65) 公表番号	特表2014-517025 (P2014-517025A)		L I F E A N D B R A I N G m b H
(43) 公表日	平成26年7月17日 (2014. 7. 17)		ドイツ53127ボン、ジークムントーフロイトーシュトラッセ25番
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/061485	(73) 特許権者	513315606
(87) 国際公開番号	W02012/172069		ライニシェ・フリードリッヒ-ヴィルヘルムス-ウニヴェルジテート・ボン
(87) 国際公開日	平成24年12月20日 (2012. 12. 20)		R H E I N I S C H E F R I E D R I C H - W I L H E L M S - U N I V E R S I T A E T B O N N
審査請求日	平成27年6月12日 (2015. 6. 12)		ドイツ53113ボン、レギーナーパーツイス-ヴェーク3番
(31) 優先権主張番号	61/497, 215		最終頁に続く
(32) 優先日	平成23年6月15日 (2011. 6. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 グリア芽腫阻害化合物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ガンボギン酸アミドを含有する、グリア芽腫の治療に用いるための医薬組成物。

【請求項2】

治療されるグリア芽腫が、原発性グリア芽腫、再発性グリア芽腫、O6 - メチルグアニン - メチルトランスフェラーゼ (MGMT) 遺伝子のプロモーターのメチル化が増大したグリア芽腫、MGMTのプロモーターのメチル化が増大していないグリア芽腫、p53の変異したグリア芽腫、p53の変異していないグリア芽腫、B - 細胞インヒビターにおけるカッパ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサー (NFKBIA) をコードする遺伝子の改変しているグリア芽腫、NFKBIAをコードする遺伝子の改変していないグリア芽腫、
10
上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) をコードする遺伝子の改変しているグリア芽腫、EGFRをコードする遺伝子の改変していないグリア芽腫、血小板由来成長因子受容体 (PDGFRA) をコードする遺伝子の改変しているグリア芽腫、PDGFRAをコードする遺伝子の改変していないグリア芽腫、イソクエン酸脱水素酵素1 (IDH1) をコードする遺伝子の改変しているグリア芽腫、IDH1をコードする遺伝子の改変していないグリア芽腫、1型神経線維腫 (NF1) をコードする遺伝子の改変しているグリア芽腫、およびNF1をコードする遺伝子の改変していないグリア芽腫からなる群より選択される、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項3】

グリア芽腫が、CD133、ATP結合カセットサブファミリーGメンバー2 (ABC

G 2)、アルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH 1 A 1)、ムサシホモログ 1 (MSI - 1)、ネスチンおよび性決定領域 Y - ボックス 2 (SOX - 2) からなる群より選択される遺伝子を過剰発現または発現する細胞を含む、請求項 1 または 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4】

グリア芽腫が幹様細胞の一部を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

投与から 10 日まで間、グリア芽腫細胞の細胞成長を遅らせる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

抗癌活性を有する少なくとも一つのさらなる化合物を付加的に含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 7】

少なくとも一つのさらなる化合物がテモゾロマイドまたはその塩である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はグリア芽腫阻害化合物、特にグリア芽腫の治療用のガンボギン酸アミド (gambogic acid amid) およびその誘導体に関する。さらには、本発明の化合物を用いる治療が患者の治療に適するかどうかを決定する方法を開示する。

20

【背景技術】

【0002】

グリア芽腫 (GBM; 世界保健機関グレード IV 神経膠腫) は成人にて最もよく見られる原発性脳腫瘍である。近年の術後の放射線療法および化学療法の進歩と共に、最新式の手術前および手術中の神経画像を用いる大幅な外科的切除を行ったとしても、GBM 患者についての予後は惨憺たるままである。平均生存率 (期間) は、現在の最適な術後処置のプロトコル下で、15 ヶ月に過ぎない (Stuppら、2005)。かくして、新しい候補となる療法を同定することが最優先課題となる。新たな治療法を定める際の一の課題が GBM の異質性である。腫瘍内異質性は遺伝的原因および非遺伝的な後生的原因に由来する。また、新しい概念として、異質的腫瘍細胞の表現型が、一部の少数の幹様細胞によって引き起こされた異常でかつ極めて有害な分化過程の連続する働きに起因することが提案されている。これらの幹様細胞は、(i) その自己複製能、(ii) 種々の異種移植パラダイムにおける腫瘍の発生および増殖能、および (iii) 多効能、すなわちその星状細胞、オリゴデンドロサイトおよび神経細胞への分化能により規定される (Singhら、2004)。加えて、これらの細胞は最新の放射線療法および化学療法に対して耐性のあることが推測され、幹様細胞を対象とする療法は近年の慣用的に使用される療法のひどい結果を改善する可能性があると考えられる (Dirks、2008; Chalmers、2007)。これらの見解に基づき、幹細胞をリサーチする分野にて一般的に利用されるインビトロ技術と適合して、幹細胞の特徴を有する腫瘍細胞を単離し、増殖させ、より特徴付けることが始められた (Pardalら、2003; Glasら、2010)。「球状」培養体と比べて、有意な利点を提供しうる、接着状態にある単層培養体として細胞を繁殖させた (Leeら、2006; Pollardら、2009)。

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

よって、本発明の根本課題は、グリア芽腫の化学療法を改善するための新規な化合物を提供することと考えられ得る。

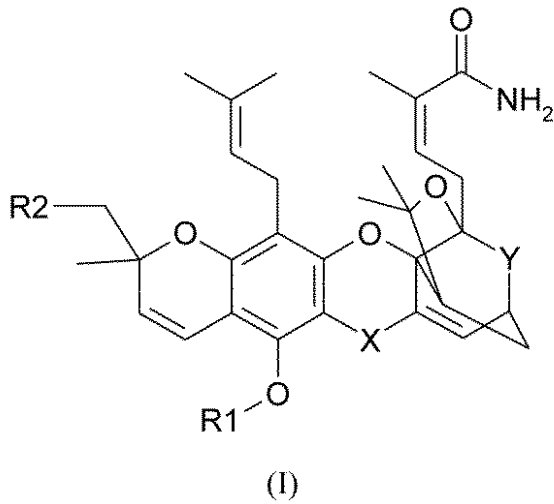
【課題を解決するための手段】

【0004】

第一の態様において、本発明は、グリア芽腫の治療に用いるための、式 I、II または

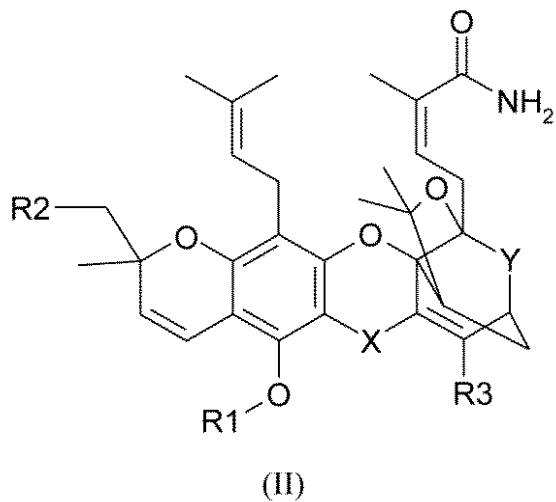
50

III :
【化1】



10

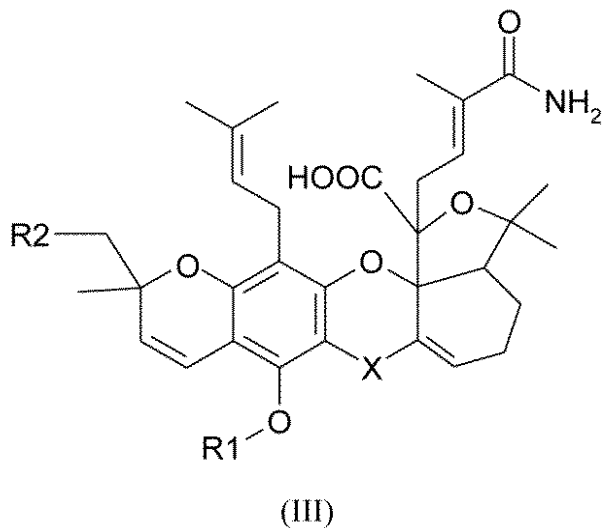
【化2】



20

30

【化3】



40

[式中、

Xはカルボニル、メチレン、ヒドロキシメチニル、アルコキシメチニル、アミノメチニル、オキシム、ヒドラゾン、アリールヒドラゾンまたはセミカルバゾンであり；

Yはカルボニル、メチレン、ヒドロキシメチニル、アルコキシメチニル、アミノメチニ

50

ル、オキシム、ヒドラゾン、アリアルヒドラゾンまたはセミカルバゾンであり；

R_1 は水素、置換アルキル、アシル (R_aCO)、カルバミル (R_bR_cNCO) またはスルホニル (R_dSO_2) であり；ここで、 R_a は水素、置換低級アルキル、置換アリアル、置換低級アラルキル基または N -スクシンイミジルであり； R_b および R_c は、独立して、水素、置換ヘテロアルキル、置換低級アルキル、置換アリアル、置換ヘテロアリアルまたは置換低級アラルキル基であり；

R_2 はプレニルまたは水素であり；および

R_3 は、あるとすれば、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、置換アルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルキルチオまたはアミノを意味する]

で示される化合物に関する。

10

【0005】

さらなる態様において、本発明は、グリア芽腫の治療に用いるための、 X 、 Y 、 R_1 、 R_2 および R_3 が上記に示される意義を有する、式 I、II または III で示される化合物を含む、医薬組成物に関する。

【0006】

さらなる態様において、本発明は、 X 、 Y 、 R_1 、 R_2 および R_3 が上記に示される意義を有する、式 I、II または III で示される化合物を用いる治療が、一の患者に適するかどうかを決定する方法であって、

a) 該患者の腫瘍組織または腫瘍細胞のサンプル中の CD133 の発現レベルを測定する工程；

20

b) 工程 a) で測定した発現レベルを、基準値と比較する工程；および

c) 式 I、II または III で示される化合物を利用する治療が、工程 b) での比較結果に基づいて適しているかどうかを決定し、ここで過剰発現は該治療が該患者に適していることを示す工程；

を含む方法に関する。

【発明を実施するための形態】

【0007】

特記されない限り、本明細書にて使用される専門および科学用語はすべて、当業者が一般的に認識しているのと同じ意義を有する。

【0008】

30

好ましくは、本明細書にて使用される語は、「A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)」、Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. および Kibl, H. 編 (1995)、Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland に記載されるとおりである。

【0009】

本明細書および添付の特許請求の範囲を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「comprise (含む、含有する)」なる語、ならびに「comprises」および「comprising」などの変形は、所定の整数または工程あるいは一群の整数または工程を含むが、他のいずれの整数または工程あるいは一群の整数または工程も排除しないことを暗示することが理解されよう。

40

【0010】

多数の文献が本明細書中に引用されている。本明細書に引用されている、上記または下記のいずれかの文献 (すべての特許、特許出願、科学出版物、製造者明細書、使用説明書等を含む) は、各々、その内容が出典明示により本明細書の一部とされる。本明細書の記載は、本発明がかかる先の発明の開示に先行する利益を受けることができないことを承認するものとして解釈されるべきではない。

【0011】

本発明の研究にて、導入部に記載の改善された培養条件を利用して患者に特異的な 4 種の GBM 細胞の初代培養物を種々の化合物の適用に対するその代謝応答についてスクリーニングに供した。31 種の化合物が、アラマブルー (alarBlue) (登録商標) 分析に

50

基づき、大きな代謝応答を示した。最も興味のある抗 - G B M 化合物 (すなわち、ガンボギン酸アミド (Gambogic acid amide)、ガンボギン酸、プリステメリン (Pristimerin)、塩酸エピルピシン、エメチン (Emetine) およびニコロサミド (Niclosamide)) が、薬力学アッセイ、アポトーシスのアネキシン V - 解析、成長速度実験、自己再生の定量化、多能性 C S C、幹細胞マーカーの発現プロファイリングおよび個々の作用モードの研究を用いてさらにその有効性が確認された。該データはこれらの物質が極めて効果的な抗 - G B M 治療剤であることを示した。

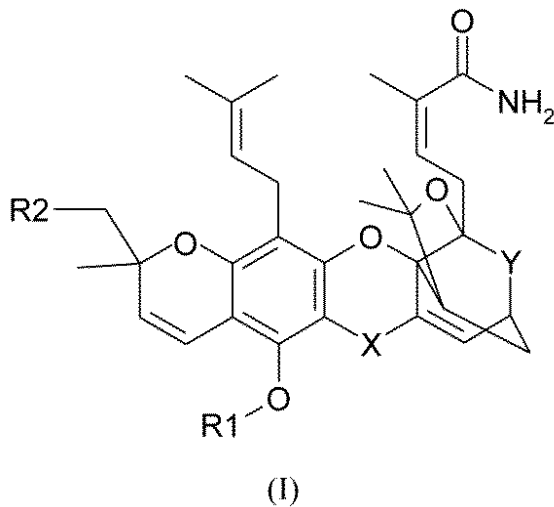
【 0 0 1 2 】

かくして、本発明の課題は、グリア芽腫の治療にて用いるための、ガンボギン酸アミド、ダウノルピシン、ガンボギン酸、チメロサル、塩酸ミトキサントロン、酢酸フェニル水銀、ダクチノマイシン、プリステメリン、塩酸エピルピシン、硫酸ピンクリスチン、エメチン、バクリタキセル、10 - ヒドロキシカンプトテシン、ドキシソルピシン、コルヒチン、カンプトテシン、テニポシド、硫酸ピンブラスチン、マイトマイシン C、フロキシウリジン、ウアバイン、塩酸アンシタピン、塩酸キナクリン、ニコロサミド、アムサクリン、チオグアニン、ロテノン、塩酸アクラビン、シタラビン、メトトレキセート、およびピクロポドフィロトキシンからなる群より選択される化合物を提供することで解決される。

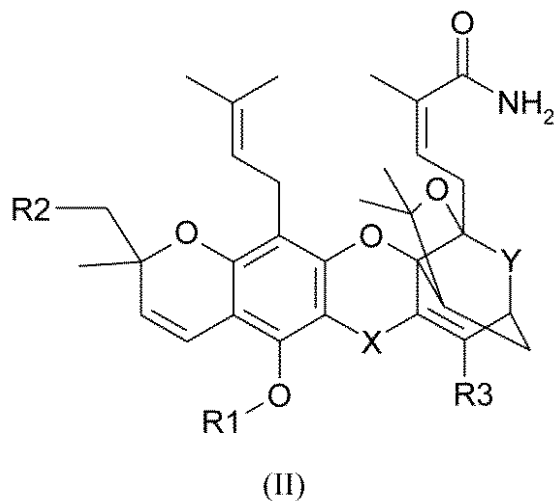
【 0 0 1 3 】

好ましい態様において、該化合物は、式 I、II または III :

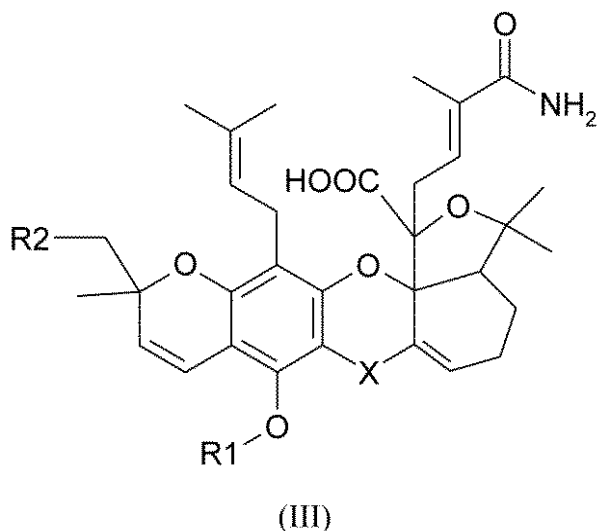
【 化 4 】



【 化 5 】



【化6】



10

〔式中

Xはカルボニル、メチレン、ヒドロキシメチニル、アルコキシメチニル、アミノメチニル、オキシム、ヒドラゾン、アリールヒドラゾンまたはセミカルバゾン、好ましくはカルボニルであり；

20

Yはカルボニル、メチレン、ヒドロキシメチニル、アルコキシメチニル、アミノメチニル、オキシム、ヒドラゾン、アリールヒドラゾンまたはセミカルバゾン、好ましくはカルボニルであり；

R₁は水素、置換アルキル、アシル(R_aCO-)またはカルバミル(R_bR_cNCO-)であり；ここで、R_aは水素、置換低級アルキル、置換アリール、置換低級アラルキル基またはN-スクシンイミジルであり；R_bおよびR_cは、独立して、水素、置換ヘテロアルキル、置換低級アルキル、置換アリール、置換ヘテロアリールまたは置換低級アラルキル基、好ましくは水素であり；

R₂はプレニルまたは水素、好ましくはプレニルであり；および

R₃は水素、ハロゲン、ヒドロキシル、置換アルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルキルチオまたはアミノ、好ましくは水素を意味する]

30

で示される化合物またはその塩である。

【0014】

アルキル基は、好ましくは、直鎖または分岐鎖のC₁~C₁₀アルキル基、より好ましくはC₁~C₆アルキル基である。多くて6個の炭素原子を含むアルキル基を「低級アルキル」という。好ましいアルキル基は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、3-ペンチル、ヘキシルおよびオクチル基を含む。

【0015】

好ましいアルコキシ基は、上記したアルキル基の一つで、好ましくはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、3-ペンチル、ヘキシルおよびオクチル基で、より好ましくはメチルで置換されている酸素を含む。

40

【0016】

好ましいアルキルチオ基は、上記したアルキル基の一つで、好ましくはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、3-ペンチル、ヘキシルおよびオクチル基で、より好ましくはメチルで置換されている硫黄を含み、スルホキシドおよびスルホンを含む。

【0017】

好ましいアミノ基は、-NH₂、-NHR₁₁、-NR₁₁R₁₂を含み、ここでR₁₁およびR₁₂はC₁~C₁₀アルキルであり、好ましくはメチル、エチル、プロピル、

50

イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、3-ペンチル、ヘキシルおよびオクチル基からなる群より選択され、最も好ましくはメチルまたはシクロアルキル基であるか、あるいは R_{11} および R_{12} はNと合わさって、環構造、好ましくは5~7員の環構造、例えばピペリジンを形成するか、または R_{11} および R_{12} はNおよびもう一つ別のヘテロ原子と合わさって飽和、置換または一部飽和の5-7員ヘテロシクロ基を形成する。好ましいヘテロ原子はO、NおよびSを包含する。

【0018】

アルキル基の好ましい置換基は、少なくとも1つのハロゲン、ヒドロキシル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミノ、ニトロ、シアノ、 $C_1 \sim C_6$ アシルアミノ、 $C_1 \sim C_6$ アミノアシル、 $C_1 \sim C_6$ アシルオキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、アリールオキシ、アルキルチオ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_4 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニルおよび $C_2 \sim C_6$ アルキニルを含む。

10

【0019】

アリール、アラルキルおよびヘテロアリール基の好ましい置換基は、少なくとも1つのアシル、アルケレンジオキシ(-OCH₂O-)、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_4 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_1 \sim C_6$ ヒドロキシアルキル、ニトロ、アミノ、ウレイド、シアノ、 $C_1 \sim C_6$ アシルアミノ、チオール、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ アシルオキシ、アジドおよびカルボキシを含む。

【0020】

好ましいヘテロアルキル基は、1~10個の炭素原子および1~3個のヘテロ原子を含む。ヘテロアルキル基は置換されていてもよい。好ましい置換基は少なくとも1つのアシル、アルケレンジオキシ(-OCH₂O-)、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_4 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_1 \sim C_6$ ヒドロキシアルキル、ニトロ、アミノ、シアノ、 $C_1 \sim C_6$ アシルアミノ、チオール、ヒドロキシ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ アシルオキシ、アジドおよびカルボキシを含む。

20

【0021】

好ましいアリール基は C_6 ないし C_{14} アリール、より好ましくは C_6 ないし C_{10} アリールを含む。より好ましくは、アリール基はフェニル、ナフチル、フェナントレニル、アントラセニル、インデニル、アズレニル、ペフェニル、ビフェニレニルまたはフルオレニルである。

30

【0022】

好ましいハロゲンはフッ素、ヨウ素、塩素および臭素を含む。

【0023】

好ましいシクロアルキル基は C_3 ないし C_8 シクロアルキル、特にシクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルおよびシクロオクチルである。対応するシクロアルケニル基、特にシクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニルおよびシクロオクテニルがさらには好ましい。

【0024】

好ましいアラルキル基は、上記したいずれかの C_6 ないし C_{14} アリール基により置換されている上記したいずれかの C_1 ないし C_{10} アルキル基を含む。ベンジル、フェネチルおよびナフチルメチルが特に好ましい。

40

【0025】

好ましいヘテロアリール基は、チエニル、ベンゾ[b]チエニル、ナフト[2,3-b]チエニル、チアントレニル、フラニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサントニル、2H-ピロリル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジリル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、インドリル、インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、イソキノリル、キノリル、フタルジニル、ナフチリジニル、キノザリニル、シンノリ

50

ニル、プテリジニル、カルバゾリル、 α -カルボリニル、フェナントリジニル、アクリンジニル、ペルミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、イソチアゾリル、フェノチアゾニル、イソオキサゾリル、フラザニル、フェノキサジニル、1,4-ジヒドロキノキサリン-2,3-ジオン、7-アミノイソクマリン、ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン、1,2-ベンゾイソキサゾール-3-イル、ベンズイミダゾリル、2-オキシインドリルおよび2-オキソベンズイミダゾリルを含む。ヘテロアリール基の好ましい置換基は、少なくとも1のヘテロアリール、ヘテロシクロ、アルキル、アラルキル、シクロアルキル、アルコキシカルボニル、カルバミル、アリールおよびC₁ないしC₆-アミノアシルを含む。

【0026】

10

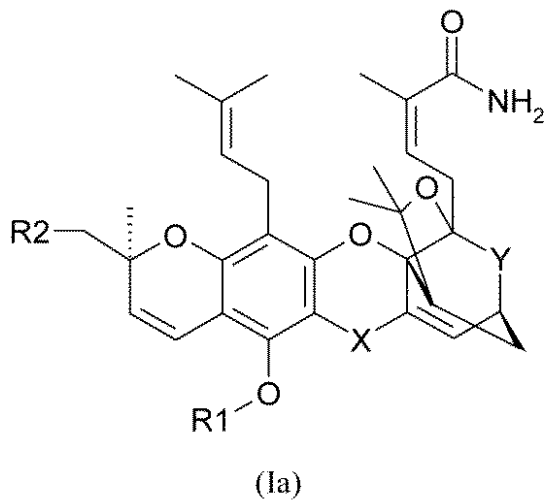
より好ましい実施態様にて、該化合物は、式Iで示される、R₁が水素、R₂がプレニル、XがカルボニルおよびYがカルボニルである、化合物；式Iで示される、R₁が水素、R₂がプレニル、R₃が水素、XおよびYがヒドロキシメチニルである、化合物；式I Iで示される、R₁が水素、R₂がプレニル、XがカルボニルおよびYがヒドロキシメチニルである、化合物；式Iで示される、R₁がアセチル、R₂がプレニル、XがカルボニルおよびYがカルボニルである、化合物；ならびに式I I Iで示される、R₁が水素、R₂がプレニルおよびXがカルボニルである、化合物からなる群より選択される。

【0027】

好ましくは、式(I)および(II)で示される化合物は、式(Ia)および(IIa)

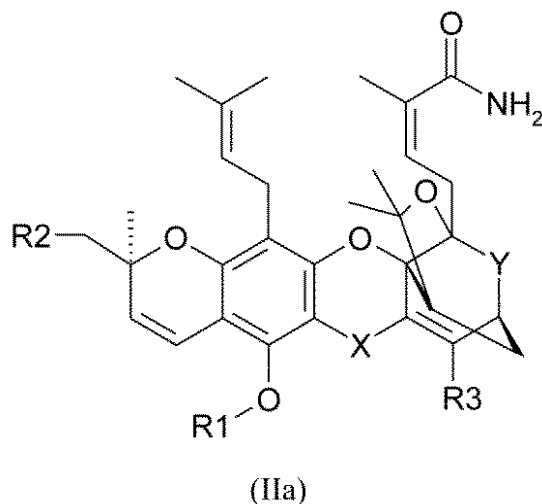
20

【化7】



30

【化8】



40

50

で示される立体化学構造を有する。

【0028】

最も好ましい実施態様にて、該化合物は、式(I)または(Ia)で示される、 R_1 が水素、 R_2 がプレニル、Xがカルボニル、およびYがカルボニルである。式(Ia)で特徴付けられる本発明の化合物は、「ガンボギン酸アミド」と称されるであろう。

【0029】

「グリア芽腫」または「多形グリア芽腫」なる語はグリア細胞と関連する原発性脳腫瘍をいう。グリア芽腫は、好ましくは、増殖性グリア腫瘍細胞、血管増殖および優先的には壊死組織領域の組織学的存在に基づいて診断される(さらなる分類に関して: Louis, D.N.、Ohgaki, H.、Wiestler, O.D.、Cavenee, W.K.、Burger, P.C.、Jouvet, A.、Scheithauer, B. W. および Kleihues, P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol 114: 97-109)。

10

【0030】

本発明の基礎となる実験は、本発明の化合物が、同一患者の原発性および再発性グリア芽腫に; O6-メチルグアニン-メチルトランスフェラーゼ(MGMT)遺伝子のプロモーターのメチル化が増減したグリア芽腫に; p53の変異した、していないグリア芽腫に; およびB-細胞インヒビターにおけるカップ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子(NFKBIA)を野生型にて有する、ならびにNFKBIAの異種接合欠失したグリア芽腫に対して等しく効果的であることを立証した。

【0031】

従って、「グリア芽腫」なる語は、好ましくは、MGMT-プロモーターのメチル化状態と関係しないグリア芽腫を、p53の変異した、変異していないグリア芽腫を、NFKBIAをコードする遺伝子の改変している、改変していないグリア芽腫を、上皮細胞成長因子受容体(EGFR)をコードする遺伝子の改変している、改変していないグリア芽腫を、血小板由来成長因子受容体(PDGFR α)をコードする遺伝子の改変している、改変していないグリア芽腫を、イソクエン酸脱水素酵素1(IDH1)をコードする遺伝子の改変している、改変していないグリア芽腫を、1型神経線維腫(NF1)をコードする遺伝子の改変している、改変していないグリア芽腫をいう。「グリア芽腫」なる語はまた、上記した少なくとも2つの特性を合わせるにより特徴付けられるグリア芽腫を包含すると理解されるべきである。

20

30

【0032】

「改変」なる語は、問題の遺伝子の変異、欠失および付加的なコピーの存在していることをいう。変異および欠失は同種-または異種接合であってもよい。その上、「グリア芽腫」なる語は、原発性ならびに再発性疾患をいう。

【0033】

好ましい態様において、グリア芽腫は幹様特性を有する細胞を含む。好ましくは、幹様特性を有する細胞は、3つの特徴:(i)多効能、(ii)自己複製能、および(iii)腫瘍原性により定められる。上記した特徴を有する細胞は、好ましくは、CD133、ATP結合カセットサブファミリーGメンバー2(ABCG2)、アルデヒド脱水素酵素1(ALDH1A1)、ムサシホモログ1(MSI-1)、ネスチンおよび性決定領域Y-ボックス2(SOX-2)からなる群より選択される少なくとも1の遺伝子の発現状態を測定することにより検出され得る。本発明によれば、最も好ましいマーカーはCD133である。

40

【0034】

本発明の特に好ましい実施態様において、グリア芽腫は、一のグリア芽腫にて典型的に認められる割合よりも大きな一の割合の幹様特性の細胞を含む。一のグリア芽腫にて典型的に認められる幹様細胞の割合は、好ましくは、代表的な数のグリア芽腫における該細胞の平均割合を測定することにより定められる。好ましくは、その平均割合は、少なくとも20、少なくとも50、または少なくとも100のグリア芽腫における幹様細胞の割合を測定することに基づく。好ましくは、幹様細胞の平均割合を定めるのに用いられるグリア

50

芽腫は無作為に選択される。

【0035】

好ましくは、幹様特性を有する細胞は、幹様特性のない細胞と比べて、上記した遺伝子を少なくとも1つ過剰発現することで特徴付けられる。腫瘍中の幹様細胞の割合は、典型的には、小さい(1%より低い)ため、比較の根拠として、適宜選択された腫瘍生検の一部にて問題の遺伝子の発現を用いることも可能である。

【0036】

一の細胞または一群の細胞での上記した遺伝子の発現状態を測定する好ましい方法はフローサイトメトリーである。この方法は当業者に周知である。少なくとも一の遺伝子、好ましくは、細胞表面上の遺伝子の発現に関して異なる細胞集団の差別化によく適する。その結果に基づき、特定の遺伝子が問題の細胞または一群の細胞にて過剰発現されているかいないかどうかを定める適切な閾値を決定することが可能である。

10

【0037】

測定した閾値の有効性は、フローサイトメトリーに従って「幹様」と称される細胞が実際に(i)多効能、(ii)自己複製能、および(iii)腫瘍原性の特性を有することを証明する対照実験を行うことにより試験され得る。しかし、統計学的に有意な高割合の「幹様」細胞は、「幹様」と称されなかった細胞集団と比べて、該特性を有することが要求される。このことはスチューデントt-試験などの周知の統計試験により確認され得る。

【0038】

「過剰発現」なる語は、好ましくは、幹様特性を有しない同じ腫瘍からの細胞と比べて、または腫瘍の一部にある遺伝子の平均的な発現と比べて、少なくとも2倍、少なくとも3倍、または少なくとも4倍大きな発現をいう。より好ましい実施態様において、上記した遺伝子の少なくとも1つの発現は問題の細胞または一群の細胞が幹様特性を有することを示す。

20

【0039】

本発明の一の実施態様において、上記される化合物は医薬上許容される塩として存在する。「医薬上許容される塩」なる語は、本発明の化合物の塩をいう。本発明の化合物の適切な医薬上許容される塩は、例えば、本発明の化合物の溶液を、塩酸、硫酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酢酸、安息香酸、クエン酸、酒石酸、炭酸またはリン酸などの医薬上許容される酸の溶液と混合することにより形成されてもよい、酸付加塩を包含する。さらには、本発明の化合物が酸性の部分を持つ場合、その適切な医薬上許容される塩は、アルカリ金属塩(例えば、ナトリウムまたはカリウム塩);アルカリ土類金属塩(例えば、カルシウムまたはマグネシウム塩);および適当な有機リガンドで形成される塩(例えば、アンモニウム、第四アンモニウムおよびハライド、ヒドロキシド、カルボキシレート、サルフェート、ホスフェート、ニトレート、アルキルサルフェートおよびアリアルサルフェートなどのカウンターアニオンを用いて形成されるアミンカチオン)を包含してもよい。医薬上許容される塩の代表例は、限定されないが、アセテート、アジベート、アルギネート、アスコルベート、アスパルテート、ベンゼンスルホネート、ベンゾエート、ピカルボネート、ピサルフェート、ピタートレート、ボレート、プロミド、プチレート、カルシウムエデテート、カンホレート、カンホスルホネート、カンシレート、カルボネート、クロリド、シトレート、クラブラネート、シクロペンタンプロピオネート、ジグルコネート、ジハイドロクロリド、ドデシルサルフェート、エデテート、エジシレート、エストレート、エシレート、エタンズルホネート、ホルメート、フマレート、グルセプテート、グルコヘプトネート、グルコネート、グルタメート、グリセロホスフェート、グリコリルアルサニレート、ヘミサルフェート、ヘプタノエート、ヘキサノエート、ヘキシルソルシネート、ヒドラバミン、ヒドロプロミド、ヒドロクロリド、ヒドロヨーダイド、2-ヒドロキシ-エタンズルホネート、ヒドロキシナフトエート、ヨーダイド、イソチオネート、ラクテート、ラクトピオネート、ラウレート、ラウリルサルフェート、マレート、マレエート、マロネート、マンデレート、メシレート、メタンズルホネート、メチルサルフ

30

40

50

エート、ムケート、2 - ナフタレンスルホネート、ナブシレート、ニコチネート、ニトレート、N - メチルグルカミンアンモニウム塩、オレート、オキサレート、パモエート（エンボネート）、パルミテート、パントテネート、ペクチネート、ペルサルフェート、3 - フェニルプロピオネート、ホスフェート/ジホスフェート、ピクレート、ピバレート、ポリガラクトロネート、プロピオネート、サリチレート、ステアレート、サルフェート、スパセテート、スクシネート、タンネート、タートレート、テオクレート、トシレート、トリエチオジド、ウンデカノエート、バレレート等（例えば、Berge, S.M.ら、「Pharmaceutical Salts」、Journal of Pharmaceutical Science、1977、66、1-19を参照のこと）を包含する。本発明の特定の具体的な化合物は、該化合物を塩基または酸付加塩に変換されることを可能とする、塩基性および酸性の両方の官能基を含有する。

10

【0040】

中性形態の該化合物は、一般的な方法にて、該塩を塩基または酸と接触させ、親化合物を単離することにより産生されてもよい。親形態の該化合物は、極性溶媒での溶解度などの特定の物理特性において、種々の塩の形態と異なるが、その他の点では本発明の目的について該塩は親形態の化合物と均等である。

【0041】

塩の形態に加えて、本発明はプロドラッグの形態である化合物を提供する。本明細書に記載の化合物のプロドラッグは、生理学的条件下で容易に化学的变化を受け、一般式（I） - （III）の化合物を提供するそれらの化合物である。プロドラッグは、該プロドラッグを患者に投与した後に、加水分解、代謝作用等などのインビボでの生理作用を介して化学的に本発明の化合物に修飾される薬理的に活性または不活性な化合物である。また、プロドラッグは、エクスピボ環境にて化学的または生化学的方法により本発明の化合物に変換され得る。例えば、プロドラッグは、適切な酵素を含む経皮パッチ容器に置かれると、本発明の化合物にゆっくりと変換され得る。プロドラッグの製造および使用に関する適合性および技法は当業者に周知である。エステルを含む、プロドラッグの一般的検討については、SvenssonおよびTunek、Drug Metabolism Reviews 16.5（1988）ならびにBundgaard、Design of prodrugs, Elsevier（1985）を参照のこと。マスクされた酸性アニオンの例は、アルキル（例えば、メチル、エチル）、シクロアルキル（例えば、シクロヘキシル）、アラルキル（例えば、ベンジル、p - メトキシベンジル）およびアルキルカルボニルオキシアルキル（例えば、ピバロイルオキシメチル）などの種々のエステルを包含する。アミンはアリアルカルボニルオキシメチル置換誘導体としてマスクされ、それはインビボにてエステラーゼで切断されて遊離ドラッグおよびホルムアルデヒドを放出する（Bundgaard J. Med. Chem. 2503（1989））。また、イミダゾール、イミド、インドール等などの酸性NH基を含有する薬物はN - アシルオキシメチル基でマスクされる（Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier（1985））。ヒドロキシ基はエステルおよびエーテルとしてマスクされる。EP 0 039 051（SloanおよびLittle、1981年4月11日）は、マンニヒ塩基とヒドロキサム酸のプロドラッグ、その調製および使用を開示する。

20

30

【0042】

本発明の化合物、また本発明に従うその調製のための出発物質は、本明細書に示されるように合成され、あるいはまた当業者に公知の、すなわち文献（例えば、Houben-Weyl、Methoden der organischen Chemie [Methods of Organic Chemistry]、Georg-Thieme-Verlag、Stuttgartなどの標準的著作物）に記載される方法および標準的操作により、当業者に既知で、該反応に適する反応条件下で合成され得る。

40

【0043】

所望により、出発物質はまた、それらを反応混合物より単離しないで系内にて形成されてもよいが、それらはその代わりに本発明の化合物に直ちにさらに変換される。他方にて、該反応を段階的に実施することが可能である。一般的操作はそれが非特異的立体化学の化合物の調製に関連するものとして知られていることに留意すべきである。しかしながら、かかる操作は、例えば、立体中心での立体化学が（S）または（R）である、特異的立

50

体化学のそれらの化合物に一般的に適用できる。加えて、一の立体化学（例えば、（R））を有する化合物は、周知方法、例えば反転反応を用いて、反対の立体化学（すなわち、（S））を有する化合物の生成にしばしば利用され得る。

【0044】

本発明の特定の化合物は、非溶媒和形態にて、ならびに水和形態を含む、溶媒和形態にて存在しうる。一般に、溶媒和形態は非溶媒和形態と等価であり、本発明の範囲内に含まれることが意図される。本発明の特定の化合物は複数の結晶形態または非晶質の形態にて存在してもよい。一般に、すべての物理的形態は本発明により予想される使用について等価であり、本発明の範囲内にあることが意図される。

【0045】

本発明の特定の化合物は、不斉炭素原子（光学中心）または二重結合を有する。ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、幾何異性体および個々の異性体はすべて、本発明の範囲内に含まれることが意図される。したがって、本発明の化合物は、立体異性体の混合物、特にエナンチオマーの混合物、ならびに精製された立体異性体、特に精製されたエナンチオマー、あるいは立体異性に富む混合物、特に鏡像異性に富む混合物を包含する。上記した式（I）ないし（III）で示される化合物の個々の異性体ならびにその全体的にまたは部分的に平衡状態にある混合物も本発明の範囲内に含まれる。本発明はまた、一または複数のキラル中心が反転されているその異性体との混合物として上記の式で示される化合物の個々の異性体にも及ぶ。また、式（I）ないし（III）の化合物のすべての互変異性体および互変異性体の混合物も式（I）ないし（III）の化合物、好ましくはそれに対する式および下位式の化合物の範囲内に含まれることが理解される。

【0046】

得られるラセミ体は自体公知の方法により機械的または化学的に異性体に分割され得る。ジアステレオマーは、好ましくは、光学活性な分割剤との反応によりラセミ混合物より形成される。

【0047】

適切な分割剤の例として、DおよびL形態の酒石酸、ジアセチル酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、マンデル酸、リンゴ酸、乳酸などの光学活性な酸、または種々の光学活性なカンフルスルホン酸、例えば - カンフルスルホン酸が挙げられる。光学活性な分割剤（例えば、ジニトロベンゾイルフェニルグリシン）を充填し、適切な溶出液の一例がヘキサン/イソプロパノール/アセトニトリルの混合液である、カラムを活用するエナンチオマー分割も有利である。

【0048】

ジアステレオマー分割もまた、例えば、クロマトグラフィーまたは分別結晶化などの標準的精製工程により実施され得る。

【0049】

既に光学活性である出発物質を用いることにより上記した方法で式（I）ないし（III）の光学活性な化合物を得ることも可能である。

【0050】

さらなる態様にて、本発明は、X、Y、R₁、R₂およびR₃が上記される意義および好ましい意義を有する、式I、Ia、II、IIaまたはIIIで示される化合物を含むグリア芽腫の治療のための医薬組成物に関する。

【0051】

本明細書に言及される「医薬組成物」は、少なくとも1つの本発明の化合物および少なくとも1つの医薬上許容される担体を含む。

【0052】

本発明の化合物より医薬組成物を調製するために、医薬上許容される担体は固形または液状のいずれかとすることができる。固形製剤は、散剤、錠剤、ピル、カプセル剤、カシユ剤、坐剤および分散性顆粒剤を包含する。固形担体は、希釈剤、香料、結合剤、保存剤、錠剤崩壊剤またはカプセル化材料としても作用してもよい、一または複数の物質とする

10

20

30

40

50

ことができる。

【0053】

散剤にて、担体は微粉化固体であり、それは微粉化成分との混合物中にある。錠剤にて、活性成分は必須の結合特性を有する担体と適当な割合で混合されており、所望の形状および大きさに圧縮される。

【0054】

散剤および錠剤は、好ましくは5%～80%、より好ましくは20%～70%の活性化化合物または活性化化合物類を含有する。適当な担体は炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖類、乳糖、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、低融点ワックス、カカオ脂等である。

10

【0055】

「製剤」なる語は、活性化化合物の、活性成分が他の担体と共にまたはなしで一の担体により覆われており、その担体が該活性成分と関連して、カプセルを提供する担体としてのカプセル化材料との処方を含むことを意図とする。カシュ剤およびトローチ剤も同様に包含される。錠剤、散剤、カプセル剤、ピル、カシュ剤およびトローチ剤は経口投与に適する固体剤形として使用され得る。

【0056】

坐剤を調製する場合、最初に、脂肪酸グリセリドまたはカカオ脂の混合物などの低融点ワックスを融解させ、攪拌することでその中に活性成分を均質に分散させる。次に、融解した均質混合物を都合のよい大きさの型に注ぎ、冷却し、それで固形化させる。

20

【0057】

液状製剤は、溶液、懸濁液、および乳濁液、例えば、水または水/プロピレングリコール溶液を包含する。液体形態は眼への局所投与に特に好ましい。非経口注射の場合、液体ポリエチレングリコール水溶液の溶液に処方され得る。

【0058】

経口的使用に適する水溶液は、活性成分を水に溶かし、所望により、適当な着色剤、香料、安定化剤および増粘剤を添加することにより調製され得る。経口的使用に適する水性懸濁液は、微粉化された活性成分を、天然または合成ガム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび他の周知の懸濁化剤と共に水中に分散させることにより調製され得る。

30

【0059】

使用直前に経口投与用の液状製剤に変換されることを意図とする固形製剤も包含される。かかる液体形態は、溶液、懸濁液および乳濁液を包含する。これらの製剤は、活性成分に加えて、着色剤、香料、安定化剤、緩衝剤、人工および天然甘味料、分散剤、増粘剤、可溶化剤等を含有してもよい。

【0060】

医薬製剤は単位剤形であることが好ましい。かかる形態にて、製剤は適量の活性成分を含有する単位用量に細分割される。該単位剤形はパッケージされた製剤とすることができ、該パッケージはバイエルまたはアンプルに個別量のパックした錠剤、カプセルおよび散剤などの製剤を含有する。また、単位剤形はカプセル、錠剤、カシュ剤またはトローチ剤そのものとしてすることができ、あるいはパックされた形態の適当数のこれらのいずれとすることもできる。

40

【0061】

本発明の好ましい実施態様にて、医薬組成物は付加的に少なくとも1つのさらなる細胞増殖抑制性または細胞毒性化合物を含む。該付加的な化合物はテモゾリミドダウノルビシン、ガンボギン酸アミド、ガンボギン酸、チメロサル、塩酸ミトキサントロン、フェニル水銀アセテート、ダクチノマイシン、プリスチメリン、塩酸エピルピシン、硫酸ピンクリスチン、エメチン、パクリタキセル、10-ヒドロキシカンプトテシン、ドキシソルピシン、コルヒチン、カンプトテシン、テニポシド、硫酸ピンブラスチン、マイトマイシンC

50

、フロキシウリジン、ウアバイン、塩酸アンシタピン、塩酸キナクリン、ニコロサミド、アムサクリン、チオグアニン、ロテノン、塩酸アクラピン、シタラビン、メトトレキセートおよびピクロポドフィロトキシシンからなる群より選択される。

【 0 0 6 2 】

さらに好ましい付加的な細胞増殖抑制性または細胞毒性化合物は、フェソロデックス、タモキシフェンまたはラロキシフェンなどの抗エストロゲン；カンプトテシン（トポ I）またはエトポシド（トポ II）などのトポイソメラーゼ I または II のいずれの阻害剤；アナストロゾールまたはレトロゾールなどのアロマトラーゼ活性の阻害を介して作用するいずれの化合物；ハーセプチンなどの HER2 シグナル伝達を干渉するいずれの製剤；ドキシソルピシンなどの、DNA をインターキレートするいずれの化合物も包含する。本発明の化合物と組み合わせることのできる特に好ましい細胞増殖抑制性または細胞毒性薬物は、アルキル化物質、代謝拮抗剤、抗生物質、エポシロン、核受容体アゴニストおよびアンタゴニスト、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、プラチナ化合物、ホルモンおよび抗ホルモン、インターフェロンならびに細胞周期依存性タンパク質キナーゼ（CDK）の阻害剤、シクロオキシゲナーゼおよびノまたはリポキシゲナーゼの阻害剤、プロスタノイドおよびロイコトリエンを含む生体脂肪酸および脂肪酸誘導体、タンパク質キナーゼの阻害剤、タンパク質ホスファターゼの阻害剤、脂質キナーゼの阻害剤、白金配位錯体、エチレンイミン、メチルメラミン、トラジン、ピンカアルカロイド、ピリミジンアナログ、プリンアナログ、アルキルスルホネート、葉酸アナログ、アントラセンジオン、置換ウレア、メチルヒドラジン誘導体、特にアセジアスルホン、アクラルピシン、アンバゾン、アミノグルテチミド、L - アスパラギナーゼ、アザチオプリン、ブレオマイシン、ブスルファン、カルシウムホリナート、カルボプラチン、カルベシタピン、カルムスチン、セレコキシブ、クロランブシル、シス - プラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン・ダブソン、ダウノルピシン、ジプロモプロパミジン、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エネジイン、エピルピシン、エポシロン B、エポシロン D、リン酸エストラムシン、エストロゲン、エチニルエストラジオール、エトポシド、フラボピリドール、フロキシウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミドホスフェストロール、フラゾリドン、ゲムシタピン、ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ、ヘキサメチルメラミン、ヒドロキシカルバミド、ヒドロキシメチルニトロフランチン、ヒドロキシプロゲステロンカプロエート、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イドクスウリジン、イホスファミド、インターフェロン Y、イリノテカン、ロイプロリド、ロムスチン、ラルトテカン、硫酸マフェニドオラミド、メクロレタミン、酢酸メドロキシプロゲステロン、メガストロールアセテート、メルファラン、メパクリン、メルカプトプリン、メトトレキセート、メトロニダゾール、マイトマイシン C、ミトポゾジド、ミトタン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、ナリジクス酸、ニフェラテル、ニフロキサジド、ニフララジン、ニフロチモックス、ニムスチン、ニノラゾール、ニトロフランチン、ナイトロジェンマスタード、オレオムチン、オキシリン酸、ペンタミジン、ペントスタチン、フェナゾピリジン、フタリルスルファチアゾール、ピボプロマン、プレドニムスチン、プレドニゾン、プレウシン、プロカルバジン、ピリメタミン、ラルチトレキセド、ラパマイシン、ロフェコキシブ、ロシグリタゾン、サラゾスルファピリジン、塩化スクリフラビニウム、セムスチンストレプトゾシン、スルファカルバミド、スルファセトアミド、スルファクロピリダジン、スルファジアジン、スルファジクラミド、スルファジメトキシシン、スルファエチゾール、スルファフラゾール、スルファグアニジン、スルファグアノール、スルファメチゾール、スルファメトキサゾール、コ - トリモキサゾール、スルファメトキシジアジン、スルファメトキシピリダジン、スルファモキソール、スルファニラミド、スルファペリン、スルファフェナゾール、スルファチアゾール、スルフィソミジン、スタウロスポリン、タモキシフェン、タキソール、テニポシド、テルチポシド、テストラクトン、テストステロンプロピオネート、チオグアニン、チオテパ、チニダゾール、トポテカン、トリアジクオン、トレオスルファン、トリメトプリン、トロホスファミド、UCN - 01、ピンブラスチン、ピンクリスチン、

10

20

30

40

50

ビンデシン、ピンブラスチン、ビノレルピンおよびズルピシン、またはその各々の誘導体またはアナログである。

【0063】

本発明の特に好ましい実施態様にて、付加的な細胞増殖抑制性または細胞毒性化合物はテモゾロマイドである。

【0064】

塩/エステル

本発明の組成物中の化合物または本発明にて利用可能な化合物は、塩またはエステルとして、特に医薬上許容される塩またはエステルとして存在しうる。本発明の化合物の医薬上許容される塩は、その適当な酸または塩基付加塩を包含する。適当な医薬上許容される塩は、Bergeら、J Pharm Sci、66、1-19 (1977) に概説されている。塩は、例えば、鉱酸、例、硫酸、リン酸または塩酸などの無機強酸で；置換されていないか、置換されている（例、ハロゲンで）炭素数1～4のアルカンカルボン酸、例えば酢酸などの有機強酸で；飽和または不飽和の二カルボン酸、例えばシュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸またはテトラフタル酸で；ヒドロキシカルボン酸、例えばアスコルビン酸、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸またはクエン酸で；アミノ酸、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸で；安息香酸で；または置換されていないか、（例、ハロゲンで）置換されている（ $C_1 - C_4$ ）-アルキル-またはアリール-スルホン酸、例えばメタン-またはp-トルエンスルホン酸などの有機スルホン酸で形成される。

【0065】

エステルは、官能基のエステル化に応じて、有機酸またはアルコール/ヒドロキシドのいずれかを用いて形成される。有機酸は、置換されていないか、置換されている（例、ハロゲンで）炭素数1～12のアルカンカルボン酸、例えば酢酸などのカルボン酸を；飽和または不飽和の二カルボン酸、例えばシュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸またはテトラフタル酸を；ヒドロキシカルボン酸、例えばアスコルビン酸、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸またはクエン酸を；アミノ酸、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸を；安息香酸を；または置換されていないか、（例、ハロゲンで）置換されている（ $C_1 - C_4$ ）-アルキル-またはアリール-スルホン酸、例えばメタン-またはp-トルエンスルホン酸などの有機スルホン酸を包含する。適当なヒドロキシドは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アルミニウムなどの無機ヒドロキシドを包含する。アルコールは、置換されていないか、（ハロゲンで）置換されていていてもよい炭素数1～12のアルカンアルコールを包含する。

【0066】

同位体

本発明の化合物はまた、かかる化合物を構成する一または複数の原子で、天然に存在しない割合の原子同位体を含有してもよい。本発明の剤またはその医薬上許容される塩の同位体変形は、少なくとも一つの原子が自然界で通常認められる原子量と異なる原子量であるが、同じ原子番号を有する原子と置き換えられているものとして定義される。該剤およびその医薬上許容される塩に組み込むことのできる同位体の例として、水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、フッ素および塩素の同位体、例えば、各々、 2H 、 3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F および ^{36}Cl が挙げられる。該剤およびその医薬上許容される塩の特定の同位体変形、例えば 3H または ^{14}C などの放射性同位元素が組み込まれている変形は、薬物および/または基質の組織分散実験にて有用である。トリチウム化水素、すなわち 3H 、および炭素-14、すなわち ^{14}C 同位元素がその調製および検出特性の容易性から特に好ましい。さらには、ジウム、すなわち 2H などの同位元素での置換は、より大きな代謝安定性よりもたらされるある治療有利性、例えばインピボでの半減期の増加または必要用量の減少を提供し、そのために状況次第では好ましい可能性がある。本発明の剤およびその医薬上許容される塩の同位体変形は、一般に、適当な試薬の適切な同位体変形を用いる通常の手続きにより調製され得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

放射性であっても、なくても、本発明の化合物および組成物の同位体変形はすべて本発明の範囲内に含まれることを意図とする。

【 0 0 6 8 】

溶媒和物

本発明はまた、組成物に含まれる化合物または本発明に従って使用可能な一般式 (I) ないし (I I I) で示される化合物の溶媒和形態を包含する。特許請求の範囲で使用される語はこれらの形態を包含する。

【 0 0 6 9 】

多形体

本発明はさらには、その種々の結晶形、多形体および (無) 水和形の、本発明の組成物中に含まれる化合物または本発明に従って使用可能な式 (I) で示される化合物に関する。かかる化合物の合成にて使用される溶媒からの精製および / または単離方法を少し変形することで、化合物がかかるいずれかの形態で単離され得ることは、製薬産業の分野で十分に確立されている。

【 0 0 7 0 】

投与

本発明の化合物は、経口、直腸、胃内、脳内および非経口投与、例えば静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮内、皮下および同様の投与経路を含む、種々の周知経路により投与され得る。非経口投与、特に静脈内投与、好ましくはデポー注射が好ましい。投与経路に応じて、異なる医薬製剤が必要とされ、そのいくつかは保護コーティングが薬物製剤に塗布されており、例えば消化管での本発明の化合物の分解が妨げられることを必要とする。

【 0 0 7 1 】

かくして、好ましくは、本発明の化合物は、シロップ、注入または注射液、錠剤、カプセル、タブレット、トローチ、リポソーム、坐剤、プラスター、バンドエイド、遅延放出性カプセル、散剤または遅効性製剤として処方される。好ましくは、稀釈剤は水、緩衝液、緩衝化塩溶液または塩溶液であり、担体は好ましくはカカオ脂およびビテボソール (vitebesole) からなる群より選択される。

【 0 0 7 2 】

本発明の化合物を投与するのに特に好ましい医薬形態は注射可能な使用に適する形態であり、滅菌水溶液または分散液ならびに滅菌注射用溶液または分散液をその場で調製するための滅菌粉末を含む。あらゆる場合で、最終溶液または分散液の形態は滅菌かつ流動性でなければならない。典型的には、かかる溶液または分散液は、例えば、水緩衝性水溶液、例えば生体適合性緩衝剤、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、その適当な混合液などのポリオール、界面活性剤または植物油を含有する溶媒または分散媒体を包含するであろう。本発明の化合物はまた、リポソームに、特に非経口投与用に処方され得る。リポソームは、遊離薬物の場合と比べて、循環において半減期を増加させ、封入薬物においてさえ放出を長期化するとの特長を提供する。

【 0 0 7 3 】

注入または注射用溶液の滅菌処理は、限定されないが、抗菌剤または抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸またはチメロサールのような保存剤を添加することを含む、当該分野にて理解される種々の方法により達成され得る。さらには、糖類または塩、特に塩化ナトリウムなどの等張剤が注入または注射用溶液に配合されてもよい。

【 0 0 7 4 】

一または複数の本発明の化合物を含有する滅菌性注射可能な溶液の製造は、個々の化合物を必要とされる量で、必要ならば上記される種々の成分と共に、適切な溶媒に配合し、つづいて滅菌処理することにより達成される。滅菌散剤を得るには、上記した溶液を必要に応じて真空乾燥または凍結乾燥させる。本発明の好ましい稀釈剤は、水、生理的に許容されるバッファー、生理的に許容されるバッファー塩溶液または塩溶液である。好ましい

10

20

30

40

50

担体はカカオ脂およびビテボソールである。上記されている好ましい賦形剤の他に、限定されないが、種々の医薬上許容される形態の本発明の化合物と共に用いるのに、以下に示される賦形剤も選択され得る：

a) 結合剤、例えば乳糖、マンニトール、結晶性ソルビトール、二塩基性リン酸塩、リン酸カルシウム、糖類、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルピロリドン等；

b) 滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、硬化植物油、ロイシン、グリセリドおよびステアリルフルマル酸ナトリウム；

c) 崩壊剤、例えばデンプン、クロスカルメロース、ナトリウムメチルセルロース、寒天、ペントナイト、アルギン酸、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等。

【0075】

他の適切な賦形剤は、出典明示により本明細書の一部とされる、米国医薬品協会 (the American Pharmaceutical Association) より発行される「Handbook of Pharmaceutical Excipients」に開示され得る。

【0076】

障害の重篤度および本発明の化合物の一つで治療できる障害の特定の型、ならびに治療される個々の患者、例えば、患者の通常健康状態等に応じて、個々の化合物で治療的または予防的作用を惹起するのに必要とされる用量が変わることを理解すべきである。適切な用量の決定は顧問医の裁量の範囲内にある。

【0077】

当該分野にて知られているように、所定の組成物の薬学的に効果的な量は、投与経路にも依存している。一般に、投与が消化管、例えば坐剤により、直腸を介してなされるならば、その必要な用量は多く、投与経路が非経口、例えば静脈内であるならば少ない。

【0078】

本発明の意義の範囲内で、置換基または可変基の組み合わせは、かかる組み合わせが安定したまたは化学的に可能性のある化合物をもたらす場合においてのみ許容される。安定したまたは化学的に可能性のある化合物は、40 以下の温度で、水分または他の化学的に反応する条件下になく、少なくとも1週間保持された場合に、実質的に変化しない化合物である。本発明はまた、本明細書に開示される化合物の塩基性窒素を含有する基の四級化も想定する。水または油溶性あるいは水または油分散性の生成物がかかる四級化で得られてもよい。

【0079】

本発明のさらなる実施態様は、X、Y、R₁、R₂ および R₃ が上記と同意義である、式 I、II または III で示される化合物を用いる治療が、患者に適しているかどうかを決定する方法であって、

a) 患者の腫瘍組織または腫瘍細胞のサンプル中の、CD133、ATP 結合カセットサブファミリー G メンバー 2 (ABC G2)、アルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1A1)、ムサシホモログ 1 (MSI-1)、ネスチンおよび性決定領域 Y - ボックス 2 (SOX-2) からなる群より選択される遺伝子の発現レベルを測定し；

b) 工程 a) で測定された発現レベルと、対照値とを比較し；

c) 工程 b) の比較結果に基づいて、式 I、II または III で示される化合物を用いる治療が患者に適しているかどうかを決定し、ここで過剰発現は該治療が患者に適していることを示す、方法に関する。

【0080】

好ましくは、本発明の方法はインビトロにて行われる。患者は、好ましくは、グリア芽腫に罹患している。

【0081】

遺伝子の発現レベルの測定方法は当業者に周知である。遺伝子発現は問題の遺伝子の mRNA - 転写物の量を測定することで決定され得、該遺伝子によりコードされる蛋白の量

10

20

30

40

50

を測定することによっても決定され得る。産生された mRNA - 転写物の量の測定に基づく好ましい方法は、定量性リアルタイム PCR およびマイクロアレイなどの技法に基づくハイブリッド形成を包含する。特定の蛋白の量を測定するための好ましい方法は、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) などの免疫学的方法を包含する。ほとんどのケースで腫瘍にてほんの数個の細胞が幹様細胞であるにすぎないため、単個細胞のレベルで遺伝子発現の測定を可能とする方法の使用が特に好ましい。多数の細胞での遺伝子発現を測定する方法では、幹様細胞の小部分母集団の逸脱した値を含み得る、平均値が得られる。

【0082】

従って、転写物に対して標識されたプローブをハイブリッド形成に付すか、または問題の遺伝子によりコードされる蛋白を一の抗体で検出し、その後で単個細胞により産生されるシグナルの強度を決定することが遺伝子発現を測定するための一の好ましい方法である。この目的には、適切な抗体で標識された細胞のサイトメトリーが好ましい。

10

【0083】

過剰発現を規定する適切な閾値を定め、確認する方法は上記されるとおりである。上記される遺伝子の少なくとも一つを過剰に発現する細胞の存在は、式 I、II または III の化合物を用いる治療がその患者に適していることを示す。

【0084】

本発明の好ましい実施態様にて、上記される遺伝子の少なくとも一つを過剰に発現する腫瘍細胞の割合が決定される。該細胞の個々の腫瘍中での割合が典型的な数の腫瘍にて認められる平均割合よりも高い場合、式 I、II または III の化合物を用いる治療はその患者に特に適している。

20

【0085】

本発明のさらに好ましい実施態様は、次の項目 1 ~ 11 に示される。

【0086】

1. グリア芽腫細胞を、細胞毒性および/または細胞増殖抑制性化合物からなる群より選択される少なくとも一の化合物と接触させることを含む、ヒト患者特異的グリア芽腫細胞の阻害方法であって、ここで該化合物がグリア芽腫細胞に対してテモゾロマイドよりも大きなインビトロでの抑制性代謝活性を示す、方法。

【0087】

2. グリア芽腫細胞を、細胞毒性および/または細胞増殖抑制性化合物と接触させることが、該グリア芽腫細胞にてアポトーシスを誘発し、NF- κ B シグナル伝達を阻害し、Hsp70 の発現を誘発する、項目 1 の方法。

30

【0088】

3. 細胞毒性および/または細胞増殖抑制性化合物が、ダウノルビシン、ガンボギン酸アミド、ガンボギン酸、チメロサル、塩酸ミトキサントロン、酢酸フェニル水銀、ダクチノマイシン、プリステメリン、塩酸エピルピシン、硫酸ピンクリスチン、エメチン、パクリタキセル、10-ヒドロキシカンプトテシン、ドキシソルピシン、コルヒチン、カンプトテシン、テニポシド、硫酸ピンブラスチン、マイトマイシン C、フロキシウリジン、ウアバイン、塩酸アンシタピン、塩酸キナクリン、ニクロサミド、アムサクリン、チオグアニン、ロテノン、塩酸アクラビン、シタラビン、メトトレキセートおよびピクロポドフィロトキシンからなる群より選択される少なくとも一の化合物である、項目 1 の方法。

40

【0089】

4. 細胞毒性および/または細胞増殖抑制性化合物が、ガンボギン酸アミド、ガンボギン酸、プリステメリン、塩酸エピルピシン、エメチン、ウアバイン、塩酸アンシタピン、塩酸キナクリン、ニクロサミド、アムサクリン、塩酸アクラビンおよびピクロポドフィロトキシンからなる群より選択される少なくとも一の化合物である、項目 3 の方法。

【0090】

5. 細胞毒性および/または細胞増殖抑制性化合物がプリステメリンであり、該プリステメリンが約 0.1 ~ 約 10 μ M、特に約 0.9 ~ 約 1.3 μ M の範囲の濃度で付加される、項目 4 の方法。

50

【 0 0 9 1 】

6 . グリア芽腫が幹様細胞の一部を含む、項目 1 の方法。

【 0 0 9 2 】

7 . グリア芽腫細胞の細胞毒性および / または細胞増殖抑制性化合物との接触が、該接触から 1 0 日まで間、該グリア芽腫細胞の細胞成長を遅らせる、項目 1 の方法。

【 0 0 9 3 】

8 . 細胞毒性および / または細胞増殖抑制性化合物からなる群より少なくとも 1 つの化合物であり、グリア芽腫患者に対してテモゾロマイドよりも大きなインビトロでの抑制性代謝活性作用を示す、グリア芽腫細胞増殖阻害化合物。

【 0 0 9 4 】

9 . グリア芽腫細胞にてアポトーシスを誘発し、NF - B シグナル伝達を阻害し、H S p 7 0 の発現を誘発する、項目 8 の化合物。

【 0 0 9 5 】

1 0 . 細胞毒性および / または細胞増殖抑制性化合物が、ダウノルビシン、ガンボギン酸アミド、ガンボギン酸、チメロサル、塩酸ミトキサントロン、酢酸フェニル水銀、ダクチノマイシン、プリステメリン、塩酸エピルビシン、硫酸ピンクリスチン、エメチン、パクリタキセル、1 0 - ヒドロキシカンプトテシン、ドキシソルビシン、コルヒチン、カンプトテシン、テニポシド、硫酸ビンブラスチン、マイトマイシン C、フロキシウリジン、ウアバイン、塩酸アンシタピン、塩酸キナクリン、ニクロサミド、アムサクリン、チオグアニン、ロテノン、塩酸アクラビン、シタラビン、メトトレキセートおよびピクロポドフィロトキシンからなる群より選択される少なくとも一の化合物である、項目 8 の化合物。

【 0 0 9 6 】

1 1 . 細胞毒性および / または細胞増殖抑制性化合物が、ガンボギン酸アミド、ガンボギン酸、プリステメリン、塩酸エピルビシン、エメチン、ウアバイン、塩酸アンシタピン、塩酸キナクリン、ニクロサミド、アムサクリン、塩酸アクラビンおよびピクロポドフィロトキシンからなる群より選択される少なくとも一の化合物である、項目 1 0 の化合物。

【 0 0 9 7 】

以下の実施例および図面は本発明の単なる例示であり、添付した特許請求の範囲により示されるように、何ら発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 8 】

【 図 1 】 (上図) 1 6 0 種の化合物 (x 軸) の、その単回投与した (各 1 μ M) 5 日後の代謝活性についての効果 (D M S O 処理細胞と比較した患者に特異的な 4 種の G B M 初代培養体から由来の平均データ) を示す、序列図表である。アラマブルー (登録商標) アッセイに基づき、相対的代謝活性を < 5 0 % に減少させる 3 1 種の「ヒット」化合物が同定された。対照として、5 0 μ m (橙色線) および 5 0 0 μ M (青線) のテモゾロマイド (T M Z) を用いて細胞を処理した。 (差し込み図) 3 1 種のヒット化合物 (ダウノルビシン (Daunorubicin)、ガンボギン酸アミド (Gambogic acid amide)、ガンボギン酸 (Gambogic acid)、チメロサル (Thimerosal)、塩酸ミトキサントロン (Mitoxanthrone hydrochloride)、酢酸フェニル水銀 (Phenylmercuric acetate)、ダクチノマイシン (D actinomycin)、プリステメリン (Pristimerin)、塩酸エピルビシン (Epirubicin hydrochloride)、硫酸ピンクリスチン (Vincristine sulfate)、エメチン (Emetine)、パクリタキセル (Paclitaxel)、1 0 - ヒドロキシカンプトテシン (10-Hydroxycamptothecin)、ドキシソルビシン (Doxorubicin)、コルヒチン (Colchicine)、カンプトテシン (Camptothecin)、テニポシド (Teniposide)、硫酸ビンブラスチン (Vinblastine sulfate)、マイトマイシン C (Mitomycin C)、フロキシウリジン (Floxuridine)、ウアバイン (Ouabain)、塩酸アンシタピン (Ancitabine hydrochloride)、塩酸キナクリン (Quinacrine hydrochloride)、ニクロサミド (Niclosamide)、アムサクリン (Amsacrine)、チオグアニン (Thioguanine)、ロテノン (Rotenone)、塩酸アクラビン (Aklavine hydrochloride)、シタラビン (Cytarabine)、メトトレキセート (Methotrexate) およびピク

10

20

30

40

50

ロポドフィロトキシン (Picropodophyllotoxin) の詳細なデータを示す。エラーバーは3回行ったアッセイ結果の標準偏差を示す。

【図2】(上図) 160種のキラ-プレート (Killer-Plate) (登録商標) 化合物に反応して、患者に特異的な4種のGBMサンプルおよびU87グリオーマ細胞株の相対的平均代謝活性を比較プロットで示す。(差し込み図) 31種の患者に特異的な「ヒット」化合物に対する詳細なデータ(左側バー)をU87グリオーマ細胞株(右側バー)の解析より得られた結果と比較して示す。エラーバーは3回行ったアッセイ結果の標準偏差を示す。

【図3】(上図) 160種の化合物に反応して、患者に特異的な4種のGBMサンプルおよび#155細胞の相対的平均代謝活性を比較プロットで示す。(差し込み図) 31種の「ヒット」化合物に対する詳細なデータを示す。相対的平均代謝活性をGBM初代細胞では暗灰色バーにて、#155細胞では明灰色バーにて示す。エラーバーは3回行ったアッセイ結果の標準偏差を示す。

【図4】プリステメリン (pristimerin) の構造式を示す。

【図5】(a) プリステメリンの、種々の患者に特異的なGBM初代細胞に対する薬力学的解析を示す。アッセイは化合物をインビトロにて投与した5日後のアラマーブルー(登録商標)解析に基づいて定量された。(b) 独立した供給源より入手したプリステメリンで同様の結果が得られた。マイクロソース (Microsource) 化合物(実線)およびシグマ (Sigma) 化合物(点線)の中央ICM50は、各々、580および430 nMである。(c) 調査した患者に特異的なGBMのICM50値を示す。MS = マイクロソース、S = シグマ、ICM50 = 代謝的に活性な細胞の総量を50%まで阻害する濃度。あらゆるデータ点は3回行った解析の平均を示す。

【図6】アネキシンVをベースとするFACS解析を示す。結果を1 μMのプリステメリン(黒色バー)または0.01% DMSO(白色バー)を単回投与した5日後に得た。挿入図は平均値を示す。

【図7】増殖速度解析を示す(データは患者番号#035、046、078、081および106についての平均値を表す)。対照条件(0.01% DMSO)下、GBM初代細胞は対数尺度で直線的に増殖した(菱形)。調査したあらゆるケースで、1 μMのプリステメリンを投与した後は勾配の減少が注目された(四角)。

【図8】2つの独立したGBM初代細胞培養実験(035 = 三角; 046 = 四角)にて1 μMのプリステメリン(点線)および0.1% DMSO(実線)を投与した後の細胞密集度の長期間のモニター観察を示す。その仕様書(Roche Diagnostics)に従い、セラビスタ (CellaVista) システムを用いて生細胞の画像化を行った。

【図9】(a) 1 μMのプリステメリンを単回投与した後のNSAの第一、第二および第三のニューロスフェアの相対的密集度を示す(データはケース046、078および106についての平均値を示す)。(b) NSAにおける対照の、および処理した第一ニューロスフェアの明視野での状況を示す。(c) GFAPを発現する星状細胞および - チュブリンを発現するニューロンにて得られた対照の、および処理した第一ニューロスフェアから由来の細胞のプレーティングおよび分化は、ニューロスフェアを形成する細胞の多機能を意味する。

【図10】GBM初代細胞(#046)をプリステメリンまたは0.01% DMSOで5日間処理した。蛋白抽出物を特異抗体を用いるウェスタンプロット解析で試験した。均等な蛋白負荷を確認するために、膜を - アクチン抗体と一緒にインキュベートした。

【図11】接着(実線)対非接着(点線)の状態でのGBM初代細胞の阻害を示す。結果は3種の異なる試料(046、078、106)を各濃度で3回行うウェル解析の平均を示す。

【図12】1 mMのプリステメリンを単回投与した後の、再発性GBM腫瘍から由来の2つの初代細胞培養物の相対的代謝活性を示す。アラマーブルー(登録商標)アッセイは処理から5日後に3つのウェルで行われた。

【図13】製造業者により提供される(a) ガンボギン酸および(b) ガンボギン酸アミ

10

20

30

40

50

ドの構造組成を示す。Enzo Life Sciencesは、該生成物をそのウェブページにてT r k A リガンド「ガンボギグ・アミド (Gambogig amide)」として表示する。

【図14】薬力学的解析を示す。(A)ガンボギン酸およびガンボギン酸アミドはpGBMの代謝活性を効果的にかつ比較可能な程度にまで阻害する。(B)データは、しかしながら、ガンボギン酸アミドの阻害活性がより早い時点で発生することを示す。グラフは化合物(指示される濃度)に暴露された後の1日目(菱形)、2日目(四角)または5日目(三角)のpGBM(表示される番号)の相対的代謝活性を示す。データは3回行った結果の平均±SDである。

【図15】細胞毒性実験を示す。DMSO-対照、IMC50-または1μM-濃度の各化合物をpGBM(表示される番号)に適用した後の5日目にcPARPに基づくFACS解析を示す。ガンボギン酸およびガンボギン酸アミドはその細胞毒性作用を同程度で付与するようである。

【図16】細胞周期解析を示す。pGBM(表示される番号)をDMSO-対照または化合物に個々のIMC50-または1μM-濃度で5日間暴露した。サイトメトリ解析を標準プロトコルを適用して行った。PI、ヨウ化プロピジウム; n.d.、測定せず(個々の化合物の濃度で多量の細胞喪失が生じたため)

【図17】ニューロスフェアのアッセイを示す。該アッセイを用いて、pGBM(n=3:番号046;106;138;あらゆるサンプルで3回重複して解析する)にある自己複製および多能性細胞のプールへの改変の可能性を推測する。第一(1°)、第二(2°)および第三(3°)ニューロスフェアの度数を指示される濃度の化合物で一回前処理した後に測定した。(A)ガンボギン酸での前処理は自己複製細胞の度数を改変しなかった。(B)反対に、ガンボギン酸アミドでの前処理は調査されるpGBMの自己複製細胞のかなりの減少をもたらした。

【図18】ガンボギン酸アミドはpGBMの腫瘍化の可能性を減少させる。pGBM(#046)をIMC50濃度の各化合物を用いてインビトロにて5日間処理した。その後、106の生存する生活細胞を集め、免疫無防備状態の生体マウス(各実験についてn=5)の線条体に注射した。(A)カプラン-マイヤー曲線は、ガンボギン酸(点線)対DMSO対照(実線)で前処理したpGBMの注射で生存の有意な利点を示さない。(B)反対に、ガンボギン酸アミドで前処理したpGBM(点線)は個々の対照(DMSO;実線)と比べて有意に腫瘍形成の低下を示した。

【図19】ガンボギン酸アミドによるCD133⁺GBM細胞の好ましい標的化を示す。(A)pGBM(#106、上図;#058、下図)からのCD133⁺下位集団のFACSをベースとする同定および分類を示す。CD133⁺細胞の個々の度数はパネル内で示されることに留意する。(B)ガンボギン酸(IMC50、上図)およびガンボギン酸アミド(IMC50、下図)に1回暴露した5日目に測定された、CD133⁻陽性対CD133⁻陰性pGBM細胞の相対的代謝活性および細胞密集度を示す。ガンボギン酸アミドの適用に応答するCD133⁺細胞の選択的感受性に留意する。

【図20】ガンボギン酸アミドは広域スペクトルのpGBMの細胞生存性を効果的に阻害する。17のpGBM(表示される番号)の、化合物(指示される濃度)に暴露した5日目の薬力学的解析を示す。IMC50値は78nM~514nMの範囲であった。

【図21】ガンボギン酸アミドの薬力学的解析データの層別化を示す。(A)代謝活性を対照の50%レベルまで減少させる濃度を表すIMC50値の範囲を示す。データを市販のグリオーマ/GBM細胞株(青色:LN229、T98G、U87、U138およびU373細胞)および17のpGBMより集めた。(B)臨床的に関連する下位群の患者によるpGBMデータの層別化を示す。該グラフは、腫瘍の中心対末端から、原発性対再発性疾患から、MGMTプロモータ高メチル化対非メチル化試料から、野生型(wt)p53対変異p53から、および野生型(wt)NFκBIA対欠失遺伝子型NFκBIAから由来のpGBMにおける個々のIMC50値の対比較(コード化形状)を示す。ガンボギン酸アミドのIMC50値はこれらの下位群の間で大きく変化せず、該化合物の広範な利用性を示唆することに留意する。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0099】

実施例1

組織サンプル

腫瘍組織をボン大学、メディカルセンターの脳神経外科でのGBM手術より得た。実験は地域倫理委員会により承認され；患者はすべてインフォームド・コンセントを受けた。すべての生検サンプルの組織分類は世界保健機関の最新の区分（Louisら、ActaNeuropathol2007）に基づいて実施され、ボン大学、メディカルセンターの脳神経外科（the National Reference Center of Neuropathology）にいる独立した2人の神経病理学者により確認された。

10

【0100】

表1

ケースID	診断	性別	年齢	ニューロスフェア度数	多能性ニューロスフェア？	異種移植モデルにおける腫瘍形成？
#023	新規GBM	f	89	0.28/0.32/0.39	はい、ニューロン、神経膠、オリゴデンドロサイト	いいえ
#035	新規GBM	f	75	0.1/0.1/0.18	はい、ニューロンおよび神経膠	はい、300 dptsに拡散的に侵襲したグリオーマ
#046	新規GBM	m	76	0.5/0.76/1.1	はい、ニューロンおよび神経膠	はい、60-90 dptsでの患者に特異的なGBM
#106	新規GBM	f	68	0.98/0.96/0.89	調査中	はい

20

表1：化合物のスクリーニングのために使用された4つの原発性GBM培養物の患者のデータおよび特徴化を示す。ニューロスフェア度を1° / 2° / 3°ニューロスフェアの各々について測定した。2° および3°ニューロスフェアをプレーティングし、つづいて21日の分化工程に付し、ニューロン（ベータIIIチューブリン）、星状膠細胞（GFAP）およびオリゴデンドロサイト（CNPase）にて特徴的に発現されるマーカーを用いて免疫細胞化学操作を行った。年齢：手術時の患者の歳；dpts：移植後の日数；性別：M=男性；f=女性

30

【0101】

組織処理および初代培養

生検サンプルは切除した30～60分後に受け取り、その後で該組織を滅菌条件下で3種の表示フラクションに切断した。1のフラクションを組織解析用に4%パラホルムアルデヒド（PFA）で固定し、第二フラクションを分子解析用に液体窒素での即時凍結（snap freezing）に供し、第三フラクションを0.25%トリプシン緩衝溶液および先端熱加工されているパストゥール・ピペットを用いて緩やかにトリチュレート（titurate）し、単個細胞懸濁液を調製した。該単個細胞懸濁液を6cmのラミニン/ポリ-L-オルニチンをコートしたプラスチック皿に入れた増殖性培地（PROL；Leeら、2006に記載の組成）にて細胞増殖のための接着性培養条件でプレーティングさせた。プレーティングの際に20ng/mlのEGF/bFGFが付与され、その後は一日おきに10ng/mlのEGF/bFGFが添加された。接着細胞を4-7日毎に1：2または1：3の割合で連続継代することで繁殖させた。

40

【0102】

ニューロスフェア検定

以前の研究（Schefflerら、2005）に基づいて、 1×10^4 細胞/cm²の単個細胞懸濁液を、20ng/mlのEGF/bFGFが付与されている1%メチルセルロース含有のPROL培地に希釈させ、非接着性培養皿に接種した。ついで、一日おきに10ng/

50

mlのEGF/bFGFを添加した。ニューロスフェアを培養して21日目に定量し、単個細胞懸濁液にトリチュレートし、それを同じ条件下でプレATINGし、第二またはより高度のニューロスフェアの形成を解析するために使用した。多能性を解析するために、3°ニューロスフェアの表示フラクションを用いた。ニューロスフェアをラミニン/ポリ-L-オルニチンをコートしたガラス製カバースリップ上にプレATINGし、結合した後に、ミトゲンを欠くPROL培地を提供し、2-3週間培養して分化させ、PFA固定および免疫蛍光解析に供した。

【0103】

蛍光解析

培養細胞の免疫蛍光解析は、4%PFA固定のサンプルについて、pIIIチユプリン (Promega, Mannheim, Germany; マウスモノクローナル、1:1000)、CNPase (Millipore, Schwalbach, Germany; マウスモノクローナル、1:300) およびGFAP (DAKO, Hamburg, Germany; ウサギポリクローナル、1:600) に対する抗体を用いて、標準プロトコル (Schefflerら、2005; Goetzら、2006) に従って行われた。細胞核をDAPI (Sigma) で標識化することで可視化した。

10

【0104】

ウェスタンブロット解析

細胞を指示される濃度の化合物と一緒に24時間インキュベートした。細胞の抽出物を記載 (Wiechenら、2001) に従って調製し、処理した。ウェスタンブロットの膜を、サイクリン-D1 (1:1000; BD Pharmingen, Heidelberg, Germany)、Hsp-70 (1:1000)、開裂したノッチ1 (cleaved-Notch 1) (1:1000)、ホスホ-S6蛋白 (1:1000)、pIkB (1:1000)、ホスホ-カテニン (Ser 33/37/Thr 41) (1:1000)、ホスホ-IKBA (Ser 32) (1:1000) およびp85/p55-PI3K抗体 (1:1000; すべてCell signaling, Frankfurt am Main, Germany) と一緒に4で一夜インキュベートした。広範に洗浄した後、ペルオキシダーゼ結合第二抗体 (SantaCruz, Heidelberg, Germany) を1時間添加した。洗浄後、ブロットをECLシステム (AmershamPharmacia, Buckinghamshire, UK) を用いて発色させた。均等な負荷を確認するのに、ブロットをp-アクチン抗体 (Sigma, Deisenhofen, Germany) で再び証明した。

20

【0105】

増殖速度

6cm皿で処理した5日後に、47,000個の生活細胞を3.5cmのラミニン/ポリ-L-オルニチンをコートしたプラスチック製皿にプレATINGした。プレATINGの際に20ng/mlのEGF/bFGFが付与され、その後は一日おきに10ng/mlのEGF/bFGFが添加された。4ないし6日後に、接着細胞をトリプシン処理に付し、収穫し、計数し、 4.7×10^4 個の細胞の密度でプレATINGした。この操作を4~5継代繰り返した。平均値を標準誤差と共に示す。

30

【0106】

フローサイトメトリー

6cm皿で化合物処理した4日後に細胞を集めた。 1×10^5 個の細胞を遠心分離により堆積させ、100μlのアネキシンV緩衝液 (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) に再び懸濁させ、5μlのアネキシンV-FITC (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) と共に室温で1時間インキュベートした。生存細胞と死亡細胞を分けるのに、1.2μg/mlのビスベンズイミドH33258 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) での標識化を利用した。FACS Divaソフトウェア (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) を備えたLSRIIにおいて標準条件を用いて発現を測定した。各々の測定では、20,000個の細胞を計数した。アネキシンV陽性細胞、アネキシンVおよびH33258陽性細胞ならびにH33258陽性細胞は非生活細胞 (avital cell) と称された。

40

【0107】

薬物スクリーニング

50

Microsource Discovery Systems, Inc., Gayordsville, CT, USAより入手された種々の化合物をスクリーニングに付した。スクリーニングの前に、各細胞株を別々に細胞数について測定し、細胞増殖が実験を通して線形対数期に残るようにした。2 - 3 × 10³個の細胞/ウェルをラミニン/ポリ-L-オルニチンをコートした96-ウェルプレートに播種した24時間後に、初代培養物を2 nM、1 μMまたは10 μMの各化合物(DMSO中10 mMストック溶液)で処理した。対照として、本発明者らは細胞を50 μMおよび500 μMのテモゾロマイド(TMZ、SigmaAldrich, Taufkirchen, Germany; DMSO中100 mMのストック溶液)で処理した。対照細胞を0.5 - 0.01% DMSOで処理した。処理した6日後に、細胞の生存をアラマブルー(登録商標)アッセイを用い、製造業者(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)の指示に従って測定した。蛍光をインフィニイト(Infinite)200マイクロプレートリーダー(Tecan, Crailsheim, Germany)を用い、Xex = 540 nmおよびXem = 590 nmで測定した。実験は各サンプルについて3回重複して行われた。

10

【0108】

プリステメリンおよびニコロサミドの薬学的解析には、5 × 10⁴個の細胞を、表示される濃度で処理される前に、12ウェルのプレートにプレATINGした。処理から5日経過した後、細胞の生存をアラマブルー(登録商標)検定によりモニター観察した。実験は3回重複して実施された。ICM₅₀は、実験条件下で代謝活性を50%まで減少させる濃度である。

20

【0109】

さらなる実験のために、初代GBM細胞を、ラミニン/ポリ-L-オルニチンをコートした6 cm皿に、40 - 50%密集度でプレATINGした。細胞を表示される濃度のプリステメリンおよびニコロサミドで処理した。対照細胞を0.1% DMSOで処理した。

【0110】

結果と考察

細胞毒性および細胞増殖抑制性化合物を同定するために、本発明者らは4つの異なる患者に特異的な初代GBM培養にてインビトロ薬物スクリーニング検定を行った(研究標体の基本的な特性評価については表1を参照のこと)。

【0111】

化合物ライブラリーを3種の異なる濃度(10 μM、1 μM、2 nM)でスクリーニングした。化合物と共に5日間インキュベーションした後に、相対的代謝活性を決定した。(1 μM)データセットを図1に示す。この濃度で、31種の化合物が相対的代謝活性をDMSO処理対照の50%以下に減少させたため(図1の上図; 赤色バー)、それらはヒット体として適任である。参考までに、本発明者らは、該細胞に対して現行の標準的な化学療法用のGBM薬である、50 μM(血漿中の報告されているピーク濃度)および500 μMのテモゾロマイド(TMZ、Beierら、2008に記載されるとおりである)を適用した。50 μMのTMZの適用は17%(橙色線)の減少をもたらすのに対して、500 μMのTMZは患者の特異的な4種の初代細胞の相対的代謝活性を63%のレベルにまで減少させた(平均データ、青色線; 図1の上図)。かくして、スクリーニングした化合物のうち39種、61種の化合物が、1 μMの濃度で、各々、500、50 μMの濃度のTMZよりも患者に特異的なGBM細胞の活性にてより大きな代謝活性の減少を生じさせた。しかしながら、主たるスクリーニングのセッティングにて「ヒット体」は、相対的代謝活性をDMSO処理の対照細胞の50%のレベルより下に減少させるものとして定義されている。患者に特異的な4種のGBM初代細胞より由来の平均データの解析に基づき、スクリーニングされた化合物の集合体のうち31種の化合物がこの定義を満たした(図1)。しかしながら、代謝障害の程度は試験した個々の研究標体の間で変化した。31種の「ヒット体」のうち26種の化合物だけがすべての患者に特異的なケースにて50%より下に代謝活性を減少させた(図1, 下図)。

30

40

【0112】

患者に特異的な4種の初代GBM細胞標体と比較するために、本発明者らは創薬のセッ

50

ティングにて頻繁に研究される市販のグリオーマ細胞株U87を利用した(図2)。興味深いことに、患者に特異的な「ヒット体」化合物のうち9種(すなわち、プリステメリン、テニポシド、フロキシウリジン、塩酸アンシタピン、ニコロサミド、チオグアニン、ロテノン、メトトレキセート、ピクロポドフィロトキシン)はU87の相対的代謝活性の>50%減少をもたらさなかった(図2、下図)。反対に、一の化合物(フィジシオン(Physiclon))だけが、初代GBM細胞に影響を及ぼすことなく、U87代謝活性に対して有意な影響を示した。

【0113】

もう一つ別の対照として、薬理耐性のでんかんに罹患している患者(患者#155)から得た初代細胞を評価した。U87細胞株と同様に、155細胞は31種の「ヒット体」化合物に暴露された場合に、一般により耐性の表現型を示した(図3)。これらの化合物のうち11種(5 硫酸ピンクリスチン、エメチン、パクリタキセル、10-ヒドロキシカンプトテシン、カンプトテシン、テニポシド、フロキシウリジン、ニコロサミド、チオグアニン、ロテノン、メトトレキセートおよびピクロポドフィロトキシン)は#155細胞の代謝活性に対してほとんど効果を示さなかった(図3、下図)。4種の化合物(サイトカラシンD、ホルボール・ミリステート・アセテート、カンタリジン、2,3-ジクロロ-5,8-ジヒドロキシナフトキノン)は#155細胞の代謝活性を有意に減少させたが、GBM初代細胞に対しては有意な効果がなかった(図3、上図)。

【0114】

31種の「ヒット体」のうち以下に示される数種の化合物はさらなる検証より除外された:(i)グリオーマ療法の臨床適用に使用される/使用されている化合物、すなわち、ダウノルピシン、塩酸ミトキサントロン、硫酸ピンクリスチン、パクリタキセル、10-ヒドロキシカンプトテシン、ドキシソルピシン、テニポシド、硫酸ピンブラスチン、フロキシウリジン、チオグアニンおよびメトトレキセート;(ii)グリオーマについての臨床試験にて研究される/されている化合物、すなわち、ダクチノマイシン、10-ヒドロキシカンプトテシン、マイトマイシンCおよびシタラピン;または(iii)ヒトまたは動物にて有意な毒性を示す化合物、すなわち、チメロサル、酢酸フェニル水銀、コルヒチン、カンプトテシンおよびロテノン。

【0115】

12種の候補化合物(すなわち、ガンボギン酸アミド、ガンボギン酸、プリステメリン、塩酸エビルピシン、エメチン、ウアバイン、塩酸アンシタピン、塩酸キナクリン、ニコロサミド、アムサクリン、塩酸アクラビン、ピクロポドフィロトキシン)はさらなる検証実験に生き残った。これらはすべて、GBM化学療法のセッティングのための新規な可能性のある候補化合物を示す。

【0116】

プリステメリン検証実験

プリステメリンは、ニシキギ科(Celastraceae)およびトチノキ科(Hippocrateaceae)にて見出すことのできる天然に存するトリテルペノイドである(Buffa Filhoら、2002; Chenagら、2003; Niampokaら、2005)。それは抗炎症、抗酸化、抗マラリアおよび殺虫プロセスを誘発しうる(Sassaら、1994; Dirschら、1997; Figueiredoら、1998; Avillaら、2000; Luoら、2005)。用量応答様式にて、トリテルペノイドは細胞保護性、腫瘍分化誘導、細胞増殖停止およびアポトーシス作用(Suhら、1999; Suhら、2003; Jiら、2006)。プリステメリンは骨髄腫のNF- κ Bシグナル伝達作用を遮断しうる(Tiedemannら、2009; Luら、2010)。NF- κ Bシグナル伝達作用は細胞増殖、炎症、遊走およびアポトーシスに関連付けられ、NF- κ Bシグナル伝達経路の構造的活性化作用はGBMのホールマーク特性として記載されている(Yamamotoら、2000; Nozelliら、200)。また、放射線療法および化学療法の細胞機構における関連性も報告されている(EylerおよびRich、2008)。かくして、本発明者らはプリステメリンがNF- κ Bシグナル伝達カスケードの阻害を介して抗GBM活性を発揮すると仮定した。

【0117】

プリステメリンはG B M一次細胞にてアポトーシスを誘発する。4種の患者特異的細胞サンプルでのプリステメリンの適用はすべてのケースで代謝活性の極めて強い減少をもたらした(023 = 90%; 035 = 97%; 046 = 78%; 106 = 97%; 図1の下図)。プリステメリンの血漿中ピーク濃度は未だに不明であるため、本発明者らは70 nM ~ 10 μMの範囲の濃度を調査した(図5)。これらの条件下で、プリステメリンは約500 nMの中央ICM50(代謝活性の最大阻害濃度の半分)で強力に細胞毒性を示す(図5 a、b、d)。

【0118】

これらの効果は、同様の結果を生じさせる独立した供給業者より購入されたプリステメリンの解析(Sigma; 図5 b)に基づいて、化合物特異的であると実証することができた。さらなる実験のために、プリステメリンを1 μM濃度で適用した(図6)。アネキシンVをベースとするFACS解析は5日間のプリステメリン暴露が健全なアポトーシスを誘発をもたらすことを示した。8つの調査された患者に特異的なG B M初代培養物のうち7つで、全細胞の50%より多くが非生活細胞として分類され得た(図6; *** p < 0.001、その対応する対照細胞との比較)。

【0119】

しかしながら、プリステメリンの単回適用は、細胞増殖の完全な停止をもたらすものではなかった。プリステメリンの適用を生き延びた細胞は対数尺度で直線的に増殖する。最初に最長で10日間続く細胞増殖の遅延がある。しかしながら、その後で、本発明者らの調査したすべての患者に特異的なG B M初代培養物、ならびにその個々のDMSO対照は大いに増殖し続けた(図7)。

【0120】

代替的解析ツールとしての細胞密集度をモニター観察するのに、本発明者らは、Cella Vistasystem (Roche Diagnostics、Mannheim)を利用した。プリステメリンの単回用量の適用は、成長速度を解析するのに比較しうる、細胞密集度の大きな初期減少をもたらした。化合物を適用した後で10日目までは、生存細胞は増殖活性を呈しない(図8)。

【0121】

さらには、プリステメリンの単回投与は、クローン形成細胞、すなわち、ニューロスフェア形成細胞の度数を30 - 60%まで減少させた(図9 a、b)。クローン形成細胞の枯渇は1 mMの濃度で観察されなかった。クローン形成細胞は常に自己複製可能であり、未成熟なニューロンおよび星状細胞を生じさせる高次ニューロスフェアを形成することができた(図9 c)。これらの知見はプリステメリンがG B M癌幹細胞を選択的に阻害していないことを示す。プリステメリンは、用量依存的様式にて、幹細胞特性を有する、および有しないG B M細胞の活性をかなり減少させている。

【0122】

次に、ウェスタンブロット解析を行い、アポトーシス誘発機構を明らかにした。データはプリステメリンの適用が検出可能なサイクリンD1およびホスホ - 1 B シグナルの喪失をもたらすことを実証する(図10)。また、骨髄腫の実験(Tiedemannら、2009)と比較可能である、熱ショック蛋白70(HSP70)発現の強い誘発がこのサンプルにて観察された(図10)。

【0123】

プリステメリンのG B M阻害活性が3D培養システム、すなわち非接着培養の状態にて確認された(図11)。アンカレッジの除去(anchorage-withdrawal)の下、G B M細胞はニューロスフェアを形成し、その代謝応答パターンを研究することでより耐性な表現型が明らかとなった。しかしながら、これらの培養条件下で培養されたG B M細胞は、プリステメリンの単回用量の適用(平均ICM50 = 1.1 μM)で効果的に阻害され得る。

【0124】

最後に、再発性疾患から由来のG B M細胞は放射線照射および化学療法の耐性が原因であると示唆されている(Raoら、2003)ため、本発明者らは2つの個々の患者特異的ケース(患者番号91HZおよび118RZ)を調べた。両ケースで、1 μMのプリステメリ

10

20

30

40

50

ンの単回用量の適用は代謝活性をほぼ完全に喪失させた(図12)。

【0125】

結論

総合的に、本発明のデータは、31種の化合物がGBM療法にて新規候補体としての可能性があることを確立する。これらの化合物のうち、検証実験には、12種の化合物(すなわち、ガンボギン酸アミド、ガンボギン酸、プリステメリン、塩酸エピルピシン、エメチン、ウアバイン、塩酸アンシタピン、塩酸キナクリン、ニコロサミド、アムサクリン、塩酸アクラビン、ピクロポドフィロトキシン)が特に適していた。とりわけ、ガンボギン酸、ガンボギン酸アミド、プリステメリン、塩酸エピルピシン、エメチンおよびニコロサミドが極めて効果的な抗GBM治療剤である。プリステメリンは原発性および再発性疾患のセッティングにおけるGBM療法にて優れた新規候補化合物を示す。ヒト患者に特異的なGBM細胞の効果的な阻害は約1 μ Mの濃度で発揮され得る。プリステメリンは幹細胞特性のある、またはないGBM細胞にてアポトーシスを誘発し、NF- κ Bシグナル伝達を阻害し、Hsp70の発現を誘発する。

10

【0126】

実施例2

2つの構造的に関連する分子、すなわちガンボギン酸アミド(GAA)およびガンボギン酸(GA)を検証に選択した。GAAおよびGAは共に、1 μ Mの濃度で適用した場合に、患者に特異的な原発性ヒトグリア芽腫細胞(pGBM)の細胞生存性を対照の50%以下のレベルまで阻害しうることを示した。

20

【0127】

一次スクリーニングより得られる結果を検証するのに、これらの化合物を独立した供給業者より購入した(図13)。pGBMの代謝活性を対照の50%レベルにまで減少させる濃度(IC50)を決定することで薬学的解析を行った。比較可能な用量応答曲線が認められる一方で、GAAの阻害活性は常により低い濃度で生じた(図14)。各サンプルについて3回の解析を行った。さらに解析するために、pGBMを個々の化合物をインビトロで単回適用した5日後に集めた。サイトメトリー解析は、両方の化合物について、強度の細胞毒性と、ほんの適度の細胞増殖抑制性の抗pGBM作用を示した(図15および16)。

【0128】

次の一連の実験にて、本発明者らは、化合物の、腫瘍始原細胞(TIC)の活性に対する影響を測定することに狙いを定めた。TICは、少なくともヒトグリア芽腫にて、腫瘍内異質性の重大な機能的結果を具現化し、幹細胞、すなわち自己複製性および多能性細胞の小部分母集団により表されると考えられる(例えば、StiesおよびRowitch, 2008; Zhouら, 2009)。以前の研究にて、本発明者らは、5-10回培養継代したpGBMで、その度数を0.25~1%の範囲にて確立した(Glasら, 2010を参照のこと)。化合物誘発のpGBMにおける自己複製性および多能性細胞への改変の可能性を評価するために、ニューロスフェアアッセイ(NSA)を近年記載されるように適用させた(Schefflerら, 2005; Glasら, 2010)。異種pGBMサンプルを(番号046、078、106)を化合物に暴露し、5日目に生存細胞を集め、非接着性条件下、NSA(ニューロスフェアアッセイ、方法を参照のこと)にて処理した。このアッセイにおける第一、第二および第三スフェアの定量化および分化はGA誘発の改変がないことを示す。反対に、GAAの単回適用は、意外にも、pGBMの中で自己複製性、多能性細胞の度数がかなり減少することを示した(図17)。DMSO対照の、または個々の化合物で前処理した3 $^{\circ}$ ニューロスフェアからの細胞のプレーティングおよび分化は、GFAP発現の星状細胞およびベータIIII発現のニューロン表現型を示した。これらの結果は生存細胞の多能性が変化していないことを示す。

30

40

【0129】

したがって、GAAだけがpGBMの中で腫瘍形成細胞のフラクションを減少させたと推測したくなった。同所性異種移植実験はこの仮説を実際に確認した(図18)。統計解

50

析はG A Aで前処理されたp G B Mを受理した動物の生存を有意に増加させることを暗示した。この効果はG Aで前処理された細胞では明瞭ではなかった。総合的に、これらのデータは、G Aとは異なり、G A Aが幹様癌細胞/T I Cを効果的に枯渇させ、p G B M中で活性を開始する腫瘍の有意な減少を惹起させることを暗示した。

【 0 1 3 0 】

G A Aの癌幹細胞特異的阻害活性をさらに裏付けるために、本発明者らはp G B MよりC D 1 3 3 - 陽性および - 陰性細胞集団を選択した(図19)。C D 1 3 3 + 細胞はグリア芽腫サンプル中で少数の腫瘍形成性幹様表現型を示すことが知られている((Singhら、2004)。C D 1 3 3 + 対 C D 1 3 3 - のp G B MについてG A AおよびG Aによって誘発される阻害作用を比較して評価し、本発明の仮説を確認した。同一患者のサンプルより単離されたC D 1 3 3 - 集団と比べて、G A Aの適用はC D 1 3 3 + 細胞の中で細胞の増殖および生存を有意に大きく減少させた(3回の解析)。同様の選択的阻害作用はG Aについては明らかにされなかった。

10

【 0 1 3 1 】

総合的に、これらのデータは癌幹細胞に特異的な細胞毒性化合物としてのG A Aを顕在化させる。

【 0 1 3 2 】

G B Mを特徴付ける細胞および遺伝的多様性を考慮して、本発明者らは次に、11人の患者から誘導される17種のp G B MサンプルにおけるG A A薬理作用を調査した(サンプルおよび患者のデータの一覧については表2を参照のこと)。G A Aの大きな阻害活性は、I M C 5 0が78 nM(#132)~514 nM(#106)の範囲にある、調査したすべての細胞株で明らかにすることができた(図20)。標体として使用される5種の市販のグリオーマ/G B M細胞株(L N 2 2 9、T 9 8 G、U 8 7、U 1 3 8およびU 3 7 3、方法を参照のこと)より比較結果を得た。次に、G A Aの薬力学的作用の対比較をp G B Mで行い、重要な臨床データ群に係る結果を分類した(Bredelら、2011; Glasら、2010; Simpsonら、2006; Wellerら、2010)。グリア芽腫サンプルは、(i)同一患者の腫瘍の中心領域 対 末端領域から、(ii)同一患者の原発性 対 再発性疾患から、(iii)M G M Tプロモータ高メチル化 対 非メチル化組織から、(iv)野生型p 5 3 対 変異p 5 3サンプルから、および(v)野生型N F K B I A 対 欠失遺伝子型N F K B I Aから誘導される。G A Aはこれらのサンプルをすべて同様の程度まで阻害するようである(図21)。

20

30

【 0 1 3 3 】

【表 2 2】

表 2									
患者 (ケース#)	診断	性別	年齢	組織構造	RPA クラス	主たる療法	PFS	OS	MGMT 状態
021	新規	m	78	GBM	V	R, RT/TMZ, 2xTMZ (5/28)	4	12	unmet
023	新規	f	79	GBM	V	RA	NA	9	meth
046D	新規	m	76	GBM	IV	RB	1	1	unmet
066D	新規	f	69	GBM	IV	R, RT/TMZC	2	2	unmet
078D	新規	m	52	GBM	IV	R, RT/TMZ, 2xTMZ (5/28)	5	10+	unmet
091E	新規	m	52	GBM	IV	R, RT/TMZ, 4xTMZ (5/28)	7	10	unmet
106	新規	f	68	GBM	IV	R, RT/TMZ, 1xTMZ (5/28)	5	5+	unmet
118E	新規	m	63	GBM	IV	R, RT/TMZ, 4xTMZ (5/28)	7	9	unmet
132E	新規	m	75	GBM	IV	R, RT/TMZ, 4xTMZ (5/28)	7		n. d.
135	新規	m	41	GBM	IV	R, RT/TMZC	8	9	n. d.
138	新規	w	54	GBM	IV	R, RT/TMZ, 5xTMZ (5/28)	10	14+	unmet

表 2 : この実験にて調査された患者および組織試料の一覧を示す。A : さらなる治療を拒否した患者 ; B : 術後合併症 ; C : 臨床的悪化による治療の中断 ; D : 同一患者の個々の脳腫瘍の中心および末端領域を提示する一対の GBM 生検より単離された細胞 ; E : 同一患者から由来の原発性および再発性疾患を提示する GBM 生検より単離された細胞 ; R : 腫瘍切除 ; RT : 標準的放射線療法 ; RT/TMZ : RT+毎日の持続的なテモゾロマイド (同時処理) ; TMZ : テモゾロマイド (5/28 : 28 日の一周期のうちの 1~5 日目) ; PES : 進行せず生存 ; OS : 全生存 ; meth : メチル化 MGMT プロモータ ; unmet : 非メチル化 MGMT プロモータ

【 0 1 3 4 】

総合的には、これらのデータは、本発明の一次スクリーニング結果により、GAA が極めて効果的な細胞毒性の抗 pGBM 化合物として働き、優先的には腫瘍形成、癌幹様表現型細胞を標的とすることを確認し、検証した。

【 0 1 3 5 】

試薬

以下の試薬はこの実験のために購入された : アラマーブルー (AlamarBlue) (登録商標)、ヨウ化プロピジウム、LIVE/DEAD (登録商標) 固定可能な死細胞株染色キットおよびヘキスト 33342 (Life Technologies) ; ガンボギン酸 (Sigma-Aldrich) ; ガンボギン酸アミド (Enzo Life Sciences)。

【 0 1 3 6 】

マウス

ボン大学、メディカルセンターの倫理委員会は動物を含むあらゆる実験を承認した。Rag2^{fl/fl}マウスを、the National Institute of Allergy and Infectious

10

20

30

40

50

Diseases' investigators (Caoら、1995) の請負業者である、Taconic Farm Inc. より入手した。

【0137】

組織サンプル

腫瘍組織はGBMの手術に由来した。患者の特徴は追加表1に詳細に記載されている。地域倫理委員会は該実験を個々に承認しており；患者はすべてインフォームド・コンセントを受けた。組織診断および分類は世界保健機関の最新の区分(Louisら、2007)に基づき、ボン大学、メディカルセンターの脳神経外科(the National Reference Center of Neuropathology)にいる独立した2人の神経病理学者により確認された。

【0138】

組織処理および初代細胞の培養

新たな生検の処理およびpGBMの誘導化(Glasら、2010)は、最近の記載に従って行われた。pGBMサンプルの培地条件が記載されている(Glasら、2010; Leeら、2006)。データは7~10回の培養継代で得られた。

【0139】

薬力学的解析

薬力学的解析のために、 5×10^4 個の細胞を12ウェルのプレートに24時間プレATINGし、一連の化合物を適用した。処理を行った5日目に、アラマブルー(登録商標)をベースとする解析を行った。実験は3回繰り返して行われた。IMC50は対照の症状と比べて代謝活性を50%まで減少させる化合物の濃度として規定され、グラフパッド・プリズム(GraphPad Prism)4.0のデータ解析を通して決定された。

【0140】

細胞周期解析

細胞(5×10^4 個/ウェル)を12-ウェルプレートで増殖させ、表示される時点で処理した後に集めた。細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)に再び懸濁させ、氷冷メタノールで固定し、4で少なくとも24時間インキュベートした。細胞ペレットを遠心分離により集め、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヨウ化プロピジウムおよび $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のRNaseを含む、PBS溶液に再び懸濁させた。37で30分間インキュベートした後、細胞をFACSキャリブル・フローサイトメーター(calibur flow cytometer)(BD Bioscience)を用いてDNA含量について解析した。

【0141】

cPARRPをベースとするFACS解析

1×10^5 個の細胞を化合物を加えた5日目に集め、遠心分離で沈殿させ、 $100 \mu\text{l}$ のLIVE/DEAD固定可能な死細胞株染色FarRedに再び懸濁させ、4で30分間インキュベートした。ついで、細胞を氷冷したPBS中4%(w/v)パラホルムアルデヒドに10分間固定し、0.5%トリトンX-100で5分間透過処理した。次に、細胞懸濁液をFITC結合したcPARRP抗体(BD Bioscience; 1:5稀釈)を用いて室温で30分間染色した。生細胞と死細胞を分けるのに、 $1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヘキスト(Hoechst)33258を用いる標識化を利用した。FACSDivaソフトウェア(BD Bioscience)を備えたLSRIIで標準条件を用いて発現を測定した。測定に付き20,000個の細胞を計数した。

【0142】

ニューロスフェア検定

確立されたプロトコル(Glasら、2010; Schefflerら、2005)に基づいて、自己複製性クローン形成細胞の度数を推測するのに、ニューロスフェア検定を行った。ニューロスフェアを培養して21日目に定量し、単個細胞懸濁液にトリチュレートし、第二または第三のニューロスフェアを解析するために再びプレATINGした。3°ニューロスフェアの表示フラクションをラミニン/ポリ-L-オルニチンをコートしたガラス製カバースリップ上にプレATINGし、2-3週間分化させ、4%パラホルムアルデヒド(PFA)に固定することで多能性を決定した。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 3 】

蛍光解析

免疫蛍光解析は、PFA固定のサンプルについて、bIIIIチユプリン (Promega; モノクローナルマウス、1:1000) およびGFAP (DAKO; ポリクローナルウサギ、1:600) に対する抗体を用いて、標準プロトコル (Schefflerら、2005) に従って行われた。細胞核をDAPI (Sigma) を用いて可視化した。

【 0 1 4 4 】

CD133⁺ およびCD133⁻ 細胞の分離

蛍光励起細胞分離 (FACS) のために、細胞をCD133/2-PEまたはCD133/2-APC (共に1:20; Miltenyi Biotech) で染色し、BD FACS Diva Cell Sorter (Becton Dickinson) で分取した。

10

【 0 1 4 5 】

腫瘍異種移植実験

細胞を収穫し、カウントして、0.1% DNase / PBS に再び懸濁させた。細胞生存性はトリパンブルー色素排除法を介して確認された。10⁶ 個のDMSO対照 -、ガンボギン酸またはガンボギン酸アミド - で前処理されたpGBMを12週齢のRag2Il2rg^{-/-}マウスの線条体中に定位的に注射した (前部0.8mm、側部2mm、深部3mm)。マウスを毎日モニター観察し、苦痛 / 神経学的徴候の兆しまたは有意な体重喪失が示されればマウスを殺した。その後の組織学的解析のために、脳を摘出し、凍結防止剤で処理し、クリオスタット (Leica) 上で20µm厚に連続して切断した。腫瘍形成の組織学的解析のために、5個の切片毎に慣用的なH&E染色操作に供した。

20

【 0 1 4 6 】

参考文献

Avilla, J.; Teixido, A.; Velazquez, C.; Alvarenga, N.; Ferro, E. および Canela, R. (2000): Insecticidal activity of Maytenus species (Celastraceae) nortriterpene quinone methides against codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: tortricidae), *J Agric Food Chem* (vol. 48), No. 1, pp. 88-92

Beier, D.; Rohrl, S.; Pillai, D. R.; Schwarz, S.; Kunz-Schughart, L. A.; Leukel, P.; Proescholdt, M.; Brawanski, A.; Bogdahn, U.; Trampe-Kieslich, A.; Giebel, B.; Wischhusen, J.; Reifenberger, G.; Hau, P. および Beier, C. P. (2008): Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma, *Cancer Res* (vol. 68), No. 14, pp. 5706-15

30

Bredel, M., Scholtens, D.M., Yadav, A.K., Alvarez, A.A., Renfrow, J.J., Chandler, J.P., Yu, I.L., Carro, M.S., Dai, F., Tagge, M.J. ら、2011. NFKBIA deletion in glioblastomas. *N Engl J Med* 364:627-637

Buffa Filho, W.; Corsino, J.; Bolzani da, S. V.; Furlan, M.; Pereira, A. M. および Franca, S. C. (2002): Quantitative determination for cytotoxic Friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Phytochem Anal* (vol. 13), No. 2, pp. 75-8

40

Cao, X., Shores, E.W., Hu-Li, J., Anver, M.R., Kelsall, B.L., Russell, S.M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E.T. ら、1995. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2:223-238

Chalmers, A. J. (2007): Radioresistant glioma stem cells-therapeutic obstacle or

50

promising target?, DNA Repair (Amst) (vol. 6), No. 9, pp. 1391-4

Chang, F. R.; Hayashi, K.; Chen, I. H.; Liaw, C. C.; Bastow, K. F.; Nakanishi, Y.; Nozaki, H.; Cragg, G. M.; Wu, Y. C. および Lee, K. H. (2003): Antitumor agents. 228. five new agarofurans, Reissantins A-E, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii*, J Nat Prod (vol. 66), No. 11, pp. 1416-20

Dirks, P. B. (2008): Brain tumor stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer, J Clin Oncol (vol. 26), No. 17, pp. 2916-24

10

Dirsch, V. M.; Kiemer, A. K.; Wagner, H. および Vollmar, A. M. (1997): The triterpenoid quinonemethide pristimerin inhibits induction of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages, Eur J Pharmacol (vol. 336), No. 2-3, pp. 211-7

Figueiredo, J. N.; Raz, B. および Sequin, U. (1998): Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity, J Nat Prod (vol. 61), No. 6, pp. 718-23

Glas, M.; Rath, B. H.; Simon, M.; Reinartz, R.; Schramme, A.; Trageser, D.; Eisenreich, R.; Leinhaas, Keller, M.; Schildhaus, H. U.; Garbe, S.; Steinfarz, B.; Pletsch, T.; Steindler, D. A.; Schramm, J.; Herrlinger, U.; Brustle, および Scheffler, B. Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma, Ann Neurol (vol. 68), No. 2, pp. 264-9

20

Goetz, A. K.; Scheffler, B.; Chen, H. X.; Wang, S.; Suslov, O.; Xiang, H.; Brustle, O.; Roper, S. N. および Steindler, D. A. (2006): Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells, Proc Natl Acad Sci USA (vol. 103), No. 29, pp. 11063-8

Honda, T.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Favaloro, F. G., Jr.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Wang, Y. および Spor, M. (1999): Novel synthetic oleanane triterpenoids: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages, Bioorg Med Chem Lett (vol. 9), No. 24, pp. 3429-34

30

Ji, Y.; Lee, H. J.; Goodman, C.; Uskokovic, M.; Liby, K.; Sporn, M. および Suh, N. (2006): The synthetic triterpenoid CDDO-imidazolide induces monocytic differentiation by activating the Smad and ERK signaling pathways in HL60 leukemia cells, Mol Cancer Ther (vol. 5), No. 6, pp. 1452-8

Lee, J.; Kotliarova, S.; Kotliarov, Y.; Li, A.; Su, Q.; Donin, N. M.; Pastorino, S.; Purow, B. W.; Christopher, N.; Zhang, W.; Park, J. K. および Fine, H. A. (2006): Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines, Cancer Cell (vol. 9), No. 5, pp. 391-403

40

Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K.; Burger, P.; Jouvett, A.; Scheithauer, B. W. および Kleihues, P. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, Acta Neuropathol (vol. 114), No. 2, pp. 97-109

50

- Lu, Z.; Jin, Y.; Chen, C.; Li, J.; Cao, Q. および Pan, J.、Pristimerin induces apoptosis in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T315I mutation by blocking NF-kappaB signaling and depleting Bcr-Abl, *Mol Cancer* (vol. 9), p. 112
- Luo, D. Q.; Wang, H.; Tian, X.; Shao, H. J. および Liu, J. K. (2005): Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrus hypoleucus*, *Pest Manag Sci* (vol. 61), No. 1, pp. 8590
- Niampoka, C.; Suttisri, R.; Bavovada, R.; Takayama, H. および Aimi, N. (2005): Potentially cytotoxic triterpenoids from the root bark of *Siphonodon celastrineus* Griff, *Arch Pharm Res* (vol. 28), No. 5, pp. 546-9 10
- Pardal, R.; Clarke, M. F. および Morrison, S. J. (2003): Applying the principles of stem-cell biology to cancer, *Nat Rev Cancer* (vol. 3), No. 12, pp. 895-902
- Pollard, S. M.; Yoshikawa, K.; Clarke, I. D.; Danovi, D.; Stricker, S.; Russell, R.; Bayani, J.; Head, R.; Lee, M.; Bernstein, M.; Squire, J. A.; Smith, A. および Dirks, P. (2009): Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens, *Cell Stem Cell* (vol. 4), No. 6, pp. 568-80 20
- Rao, J. S. (2003): Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases, *Nat Rev Cancer* (vol. 3), No. 7, pp. 489-501
- Sassa, H.; Kogure, K.; Takaishi, Y. および Terada, H. (1994): Structural basis of potent antiperoxidation activity of the triterpene celastrol in mitochondria: effect of negative membrane surface charge on lipid peroxidation, *Free Radic Biol Med* (vol. 17), No. 3, pp. 201-7 30
- Scheffler, B.; Walton, N. M.; Lin, D. D.; Goetz, A. K.; Enikolopov, G.; Roper, S. N. および Steindler, D. A. (2005): Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA* (vol. 102), No. 26, pp. 9353-8
- Simpson, L. および Galanis, E., 2006. Recurrent glioblastoma multiforme: advances in treatment and promising drug candidates. *Expert Rev Anticancer Ther* 6:1593-1607
- Singh, S. K.; Hawkins, C.; Clarke, I. D.; Squire, J. A.; Bayani, J.; Hide, T.; Henkelman, R. M.; Cusimano, M. D. および Dirks, P. B. (2004): Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature* (vol. 432), No. 7015, pp. 396-401 40
- Stiles, C.D., および Rowitch, D.H. 2008. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron* 58:832-846
- Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E. および Mirimanoff, R. O. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med* (vol. 352), No. pp. 50

987-96

Suh, N.; Roberts, A. B.; Birkey Reffey, S.; Miyazono, K.; Itoh, S.; ten Dijke, P.; Heiss, E. H.; Place, A. E.; Risingsong, R.; Williams, C. R.; Honda, T.; Gribble, G. W. および Sporn, M. B. (2003): Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling, *Cancer Res* (vol. 63), No. 6, pp. 1371-6

Suh, W. S.; Kim, Y. S.; Schimmer, A. D.; Kitada, S.; Minden, M.; Andreeff, M.; Suh, N.; Sporn, M. および Reed, J. C. (2003): Synthetic triterpenoids activate a pathway for apoptosis in AML cells involving downregulation of FLIP and sensitization to TRAIL, *Leukemia* (vol. 17), No. 11, pp. 2122-9

10

Tiedemann, R. E.; Schmidt, J.; Keats, J. J.; Shi, C. X.; Zhu, Y. X.; Palmer, S. E.; Mao, X.; Schimmer, A. D. および Stewart, A. K. (2009): Identification of a potent natural triterpenoid inhibitor of proteasome chymotrypsin-like activity and NF-kappaB with antimyeloma activity in vitro and in vivo, *Blood* (vol. 113), No. 17, pp. 4027-37

Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A.A., van den Bent, M.J., Wick, W. および Hegi, M.E. 2010. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 6:39-51

20

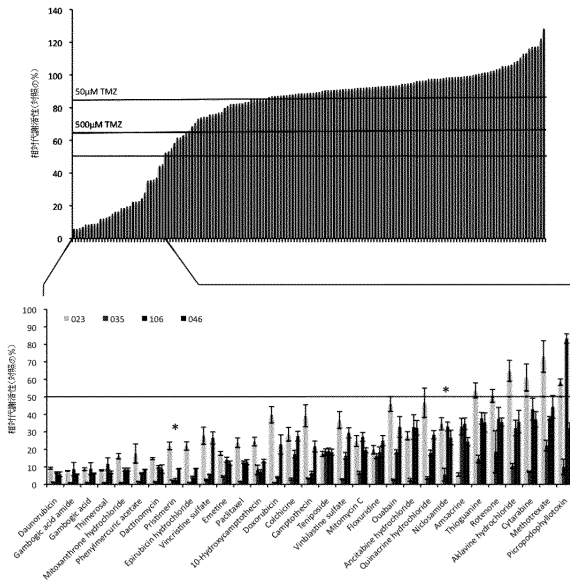
Wiechen, K.; Diatchenko, L.; AgoulNIK, A.; Scharff, K. M.; Schober, H.; Arlt, K.; Zhumabayeva, B.; Siebert, P. D.; Dietel, M.; Schafer, R. および Sers, C. (2001): Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene, *Am J Pathol* (vol. 159), No. 5, pp. 1635-43

Yamamoto, M.; Fukushima, T.; Hayashi, S.; Ikeda, K.; Tsugu, H.; Kimura, H.; Soma, G. および Tomonaga, M. (2000): Correlation of the expression of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor receptor type 1 (TNFR 1) and c-Myc with the clinical course in the treatment of malignant astrocytomas with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha (TNF-SAM2), *Anticancer Res* (vol. 20), No. 1C, pp. 611-8

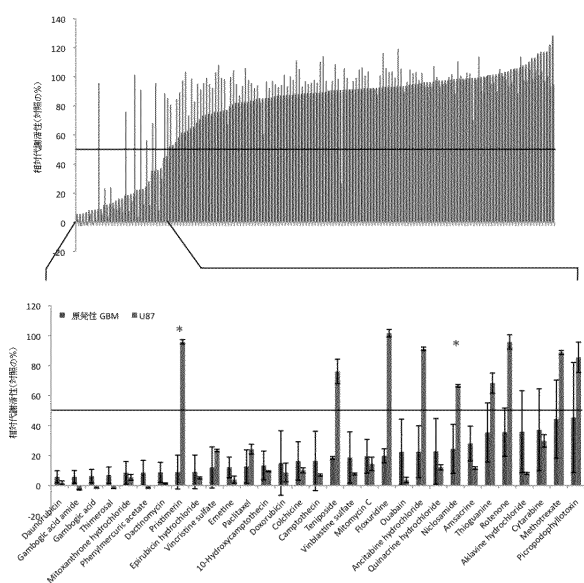
30

Zhou, B.B., Zhang, H., Damelin, M., Geles, K.G., Grindley, J.C. および Dirks, P.B. 2009. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 8:806-823

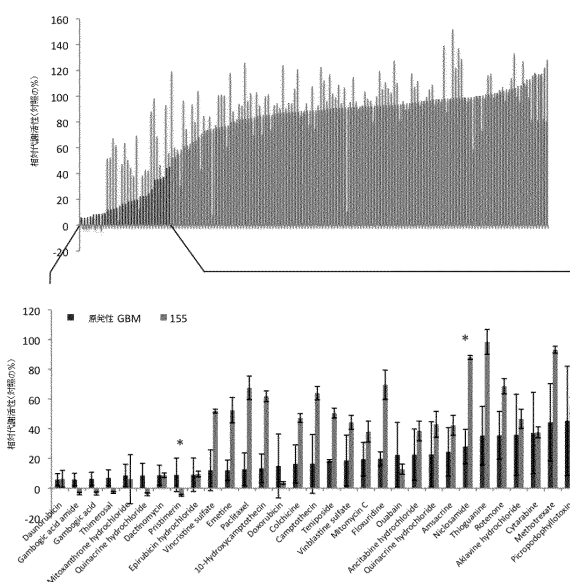
【 図 1 】



【 図 2 】

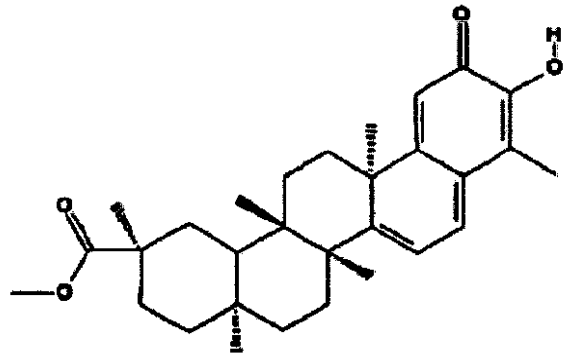


【 図 3 】

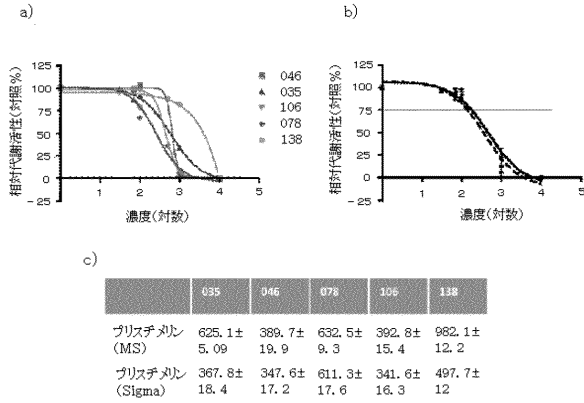


【 図 4 】

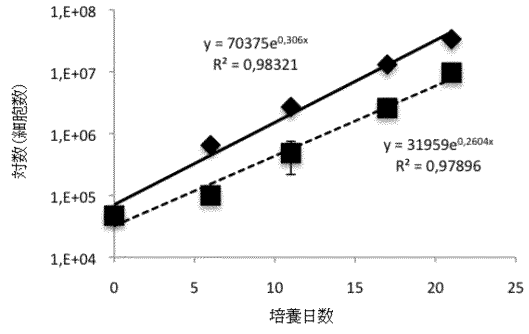
Figure 4



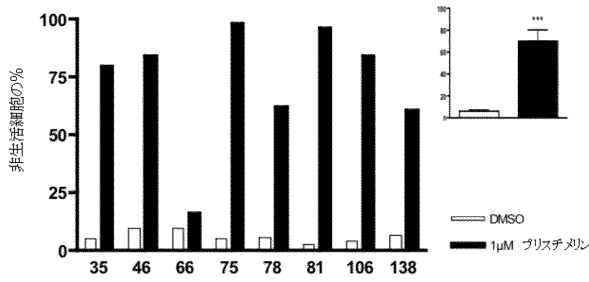
【 図 5 】



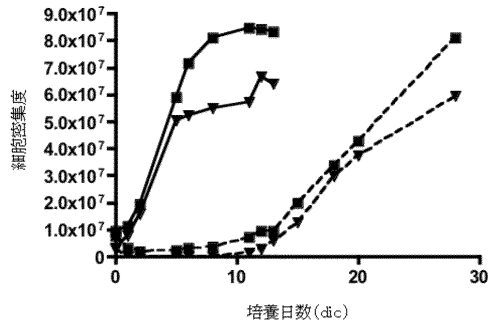
【 図 7 】



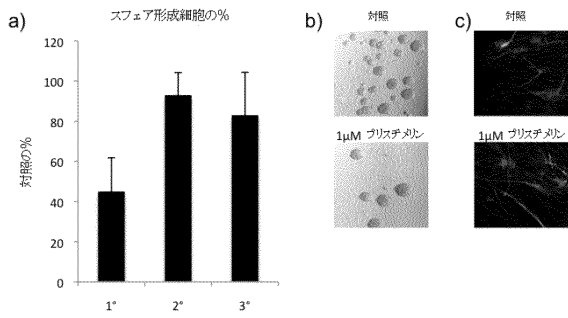
【 図 6 】



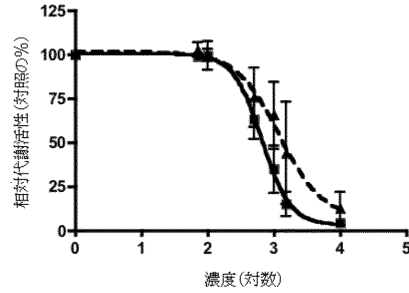
【 図 8 】



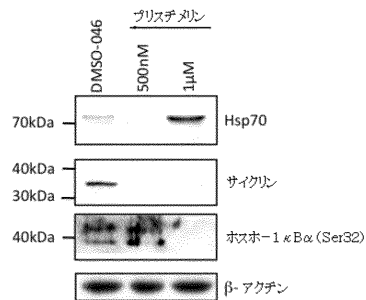
【 図 9 】



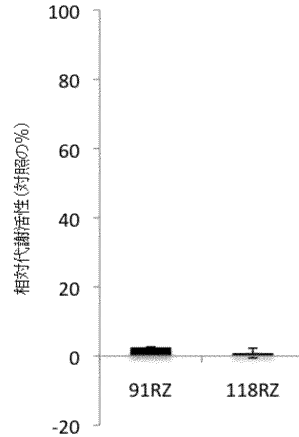
【 図 1 1 】



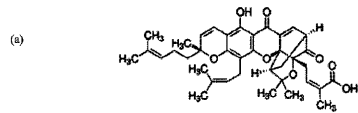
【 図 1 0 】



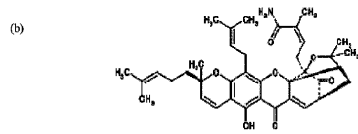
【 図 1 2 】



【 図 1 3 (a) 】

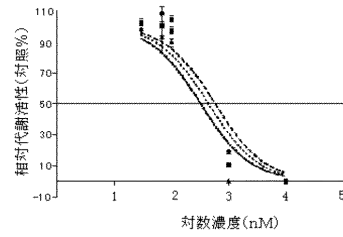


【 図 1 3 (b) 】

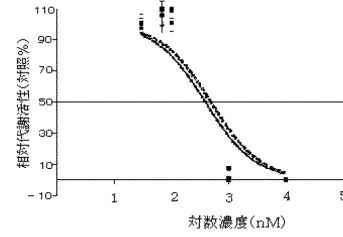


【 図 1 4 A (1) 】

#046 ガンボキン酸

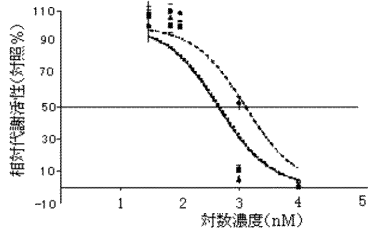


#046 ガンボキン酸アミド

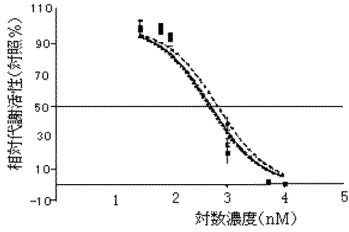


【 図 1 4 A (2) 】

#106 ガンボキン酸

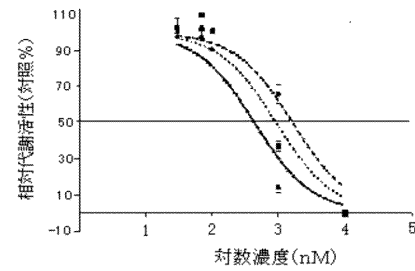


#106 ガンボキン酸アミド

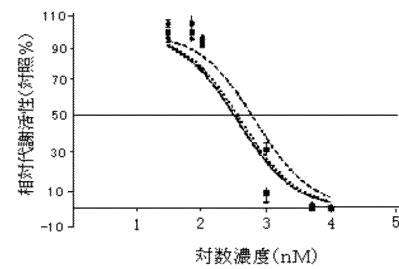


【 図 1 4 A (3) 】

#138 ガンボキン酸



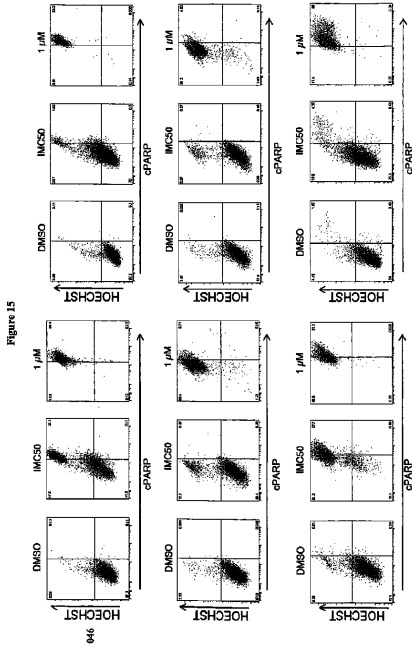
#138 ガンボキン酸アミド



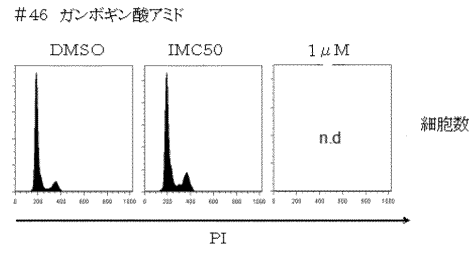
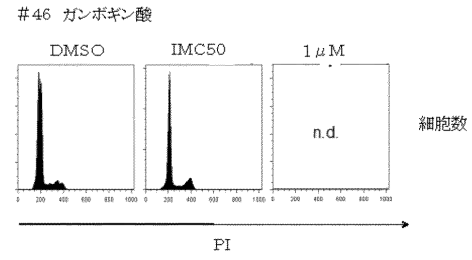
【 図 1 4 B 】

MCS0	24h	48h	144h
046 GA	575nM	441nM	324nM
046 GAA	501nM	470nM	392nM
106 GA	1294nM	481nM	448nM
106 GAA	681nM	474nM	514nM
138 GA	1640nM	929nM	436nM
138 GAA	676nM	405nM	363nM

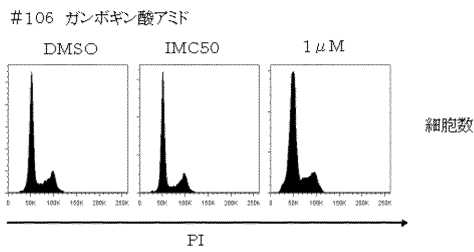
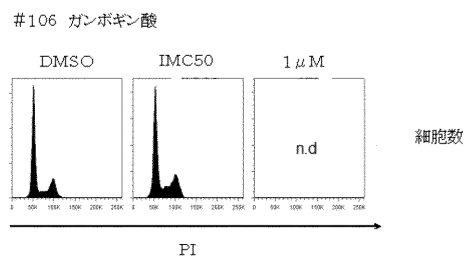
【 15 】



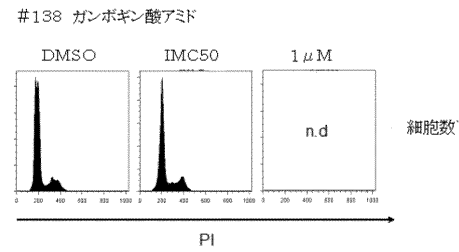
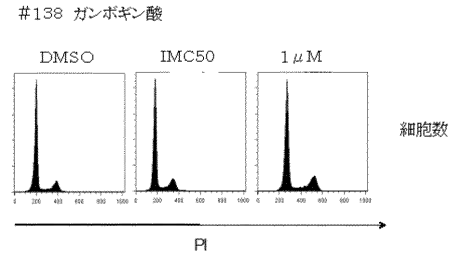
【 16 (1) 】



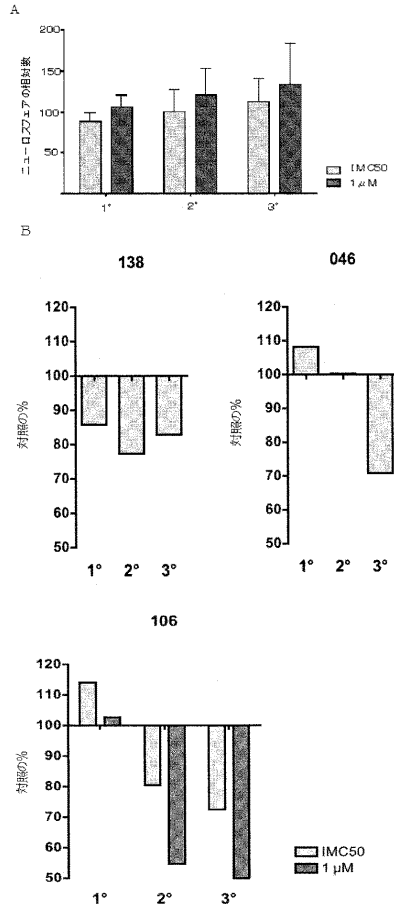
【 16 (2) 】



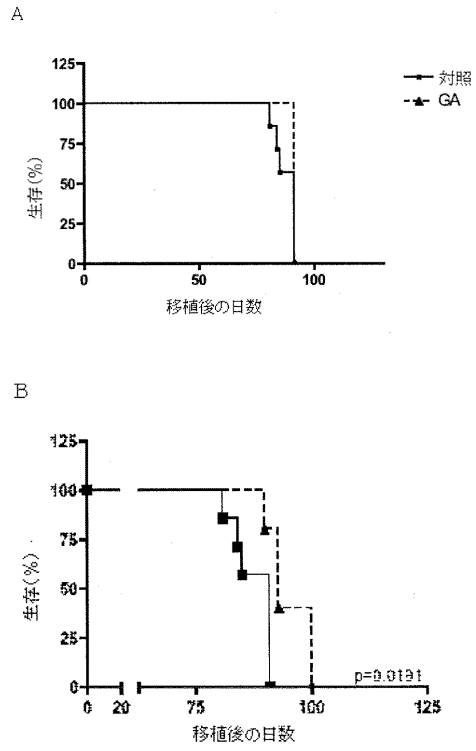
【 16 (3) 】



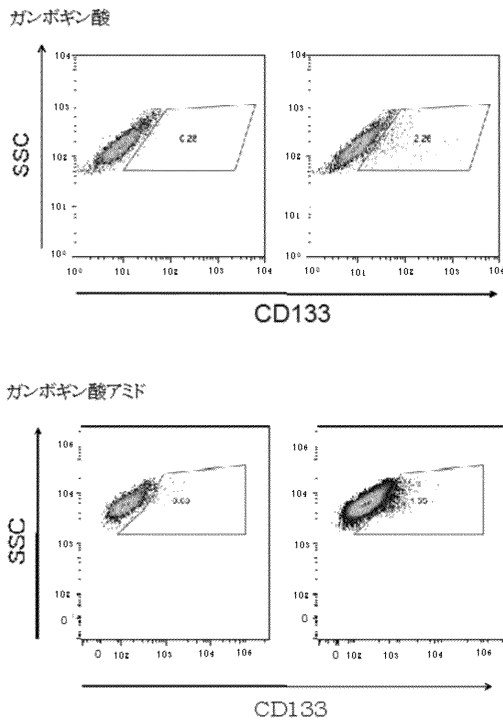
【 図 1 7 】



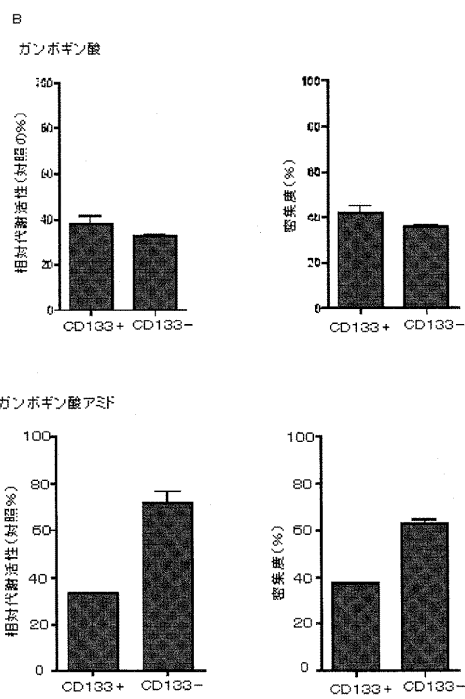
【 図 1 8 】



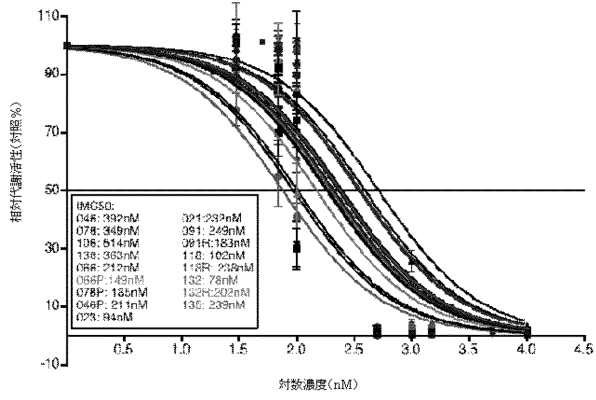
【 図 1 9 A 】



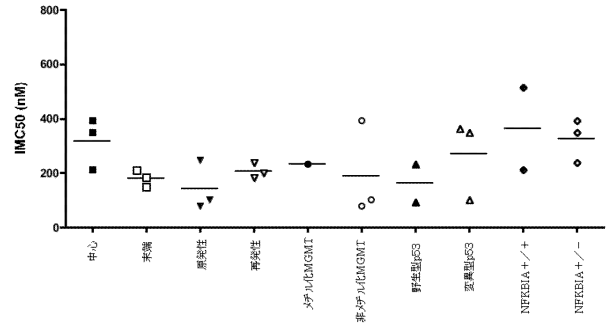
【 図 1 9 B 】



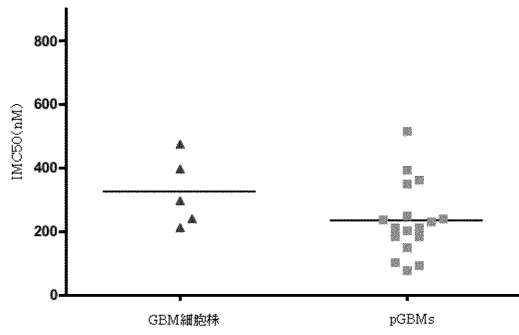
【 2 0 】



【 2 1 B 】



【 2 1 A 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100100158
弁理士 鮫島 睦
- (74)代理人 100126778
弁理士 品川 永敏
- (74)代理人 100150500
弁理士 森本 靖
- (74)代理人 100156100
弁理士 西野 満
- (72)発明者 ビョルン・シェフラー
ドイツ5 3 2 2 5 ボン、エルンスト - モーリッツ - アルント - シュトラーセ 1 6 アー番
- (72)発明者 マルティン・グラス
ドイツ5 3 1 1 5 ボン、ルドルフ - シュテッカー - ヴェーク 1 9 番
- (72)発明者 マティアス・ジモン
ドイツ5 3 1 2 7 ボン、キーフェルンヴェーク 3 8 番
- (72)発明者 ザビーネ・ゴゴロク
ドイツ5 8 0 9 3 ハーゲン、エッペンハウザーシュトラーセ 1 0 2 番
- (72)発明者 ダニエル・トラゲザー
ドイツ5 3 1 1 5 ボン、ユリウス - プリュッカー - シュトラーセ 6 番
- (72)発明者 ロマン・ライナルツ
ドイツ5 3 1 1 1 ボン、ドロテーンシュトラーセ 7 5 番
- (72)発明者 アーニャ・ヴィーラント
ドイツ5 3 3 4 3 ヴァッハトベルク、ロートドルンヴェーク 7 番

審査官 澤田 浩平

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 1 4 8 0 0 8 (WO, A 1)
国際公開第 0 0 / 0 4 5 1 6 5 (WO, A 1)
Biochem Pharmacol. 2008 Mar 1;75(5):1083-92
Cancer Lett. 2009 Jun 28;279(1):13-21

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 1 / 0 0

CAPLUS, REGISTRY, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE (STN)