

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6336914号
(P6336914)

(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)

(24) 登録日 平成30年5月11日(2018.5.11)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 31/22	(2006.01)	A 61 K 31/22
A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00
A 61 P 9/10	(2006.01)	A 61 P 9/10
A 61 P 25/28	(2006.01)	A 61 P 25/28

請求項の数 29 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2014-553497 (P2014-553497)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月18日 (2013.1.18)
 (65) 公表番号 特表2015-504096 (P2015-504096A)
 (43) 公表日 平成27年2月5日 (2015.2.5)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/022325
 (87) 國際公開番号 WO2014/011209
 (87) 國際公開日 平成26年1月16日 (2014.1.16)
 審査請求日 平成27年12月4日 (2015.12.4)
 (31) 優先権主張番号 61/588,162
 (32) 優先日 平成24年1月18日 (2012.1.18)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/588,165
 (32) 優先日 平成24年1月18日 (2012.1.18)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 514181875
 バイオサクセス バイオテック カンパニー リミテッド
 アメリカ合衆国 95131 カリフォルニア州, サンノゼ, スイート 200, ノース ファースト ストリート 2570
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (74) 代理人 100169971
 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

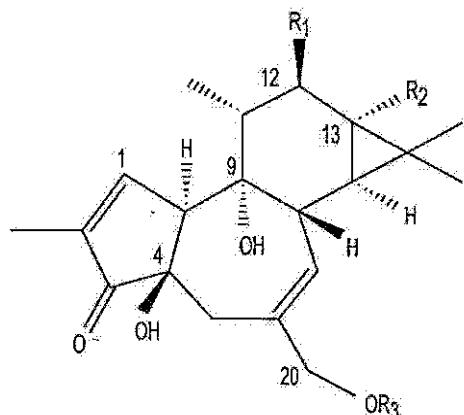
(54) 【発明の名称】脳卒中の治療のためのホルボールエステルの組成物および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類対象における1つ以上の脳卒中の影響を予防または治療するための医薬の製造における、式Iのホルボールエステルまたはその薬学的に許容される塩、異性体、もしくは鏡像異性体の使用、ここで

【化1】



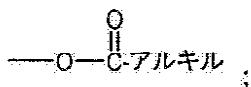
10

式 I

式中、R 1 および R 2 が、水素、ヒドロキシル、

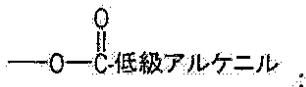
20

【化 2】



ここで該アルキル基は1～15の炭素原子を含み、

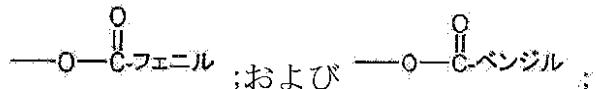
【化 3】



ここで該低級アルケニル基は1～7の炭素原子を含み、

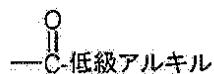
10

【化 4】



からなる群から選択され、R 3 が、水素、および

【化 5】



20

ここで該低級アルキル基は1～7の炭素原子を含み、

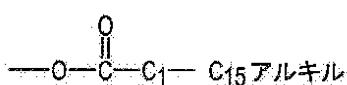
からなる群から選択され、

前記1つ以上の脳卒中の影響が、麻痺、空間障害、判断障害、左半側無視、記憶喪失、失語症、協調および平衡の問題、嘔気、嘔吐、認知障害、知覚障害、見当識障害、同名半盲、または衝動性である、前記使用。

【請求項 2】

R 1 または R 2 が、

【化 6】



30

であり、残りのR 1 または R 2 が、

【化 7】



であり、R 3 が水素である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記ホルボールエステルが、ホルボール13-ブチレート、ホルボール12-デカノエート、ホルボール13-デカノエート、ホルボール12, 13-ジアセテート、ホルボール13, 20-ジアセテート、ホルボール12, 13-ジベンゾエート、ホルボール12, 13-ジブチレート、ホルボール12, 13-ジデカノエート、ホルボール12, 13-ジヘキサノエート、ホルボール12, 13-ジプロピオネート、ホルボール12-ミリステート、ホルボール13-ミリステート、ホルボール12, 13, 20-トリアセテート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート-20-アセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-

40

-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-

50

チグリエート 13 - デカノエート、12 - デオキシホルボール 13 - アセテート、ホルボール 12 - アセテート、またはホルボール 13 - アセテートである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記医薬が前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するための組み合わせ製剤であり、該組み合わせ製剤の製造における、式 I の前記ホルボールエステルとの組み合わせ製剤において有効である少なくとも 1 つの二次または補助治療剤の使用、または

前記医薬が協調的治療レジメン用医薬と用いられるためのものであり、前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するための該協調的治療レジメン用医薬の製造における式 I の前記ホルボールエステルとの協調的治療レジメンにおいて有効である少なくとも 1 つの二次または補助治療剤の使用を更に含む、請求項 1 に記載の使用。 10

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの二次または補助治療剤が、協調投与プロトコールにおいて、前記対象への前記ホルボールエステルの投与と同時、投与の前、または投与の後で、前記対象に投与されるためのものである、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの二次または補助治療剤が、組織プラスミノーゲン活性化因子、抗凝固剤、スタチン、フィブレーント、アンギオテンシン II 受容体遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、抗血小板剤、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤である、請求項 4 に記載の使用。 20

【請求項 7】

前記対象における脳卒中の影響の治療または予防が、式 I のホルボールエステルを含む医薬の投与と組み合わせた外科的介入を更に含むものであるための、請求項 1 に記載の使用。

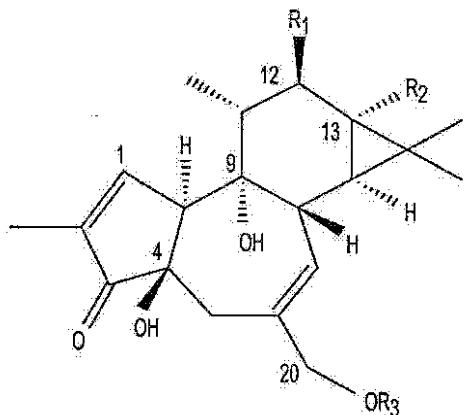
【請求項 8】

前記外科的介入が、頸動脈内膜剥離術、血管形成術、ステント留置術、開頭術、ペースメーカーの挿入、除細動器の埋め込み、弁置換術、冠動脈バイパス術、心臓移植、血管内コイル塞栓術、または卵円孔開存閉鎖術である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

哺乳類対象における 1 つ以上の脳卒中の影響を予防または治療するための組成物であって、式 I のホルボールエステルまたはその薬学的に許容される塩、異性体、もしくは鏡像異性体の有効量を含み、 30

【化 8】



式 I

式中、R 1 および R 2 が、水素、ヒドロキシル、

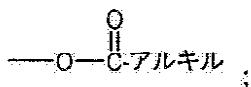
10

20

30

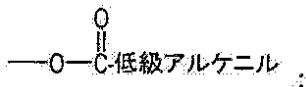
40

【化9】



ここで該アルキル基は1~15の炭素原子を含み、

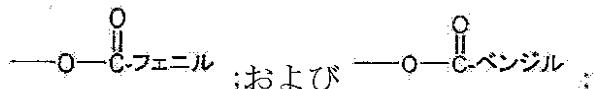
【化10】



ここで該低級アルケニル基は1~7の炭素原子を含み、

10

【化11】



からなる群から選択され、R3が、水素、および

【化12】



20

ここで該低級アルキル基は1~7の炭素原子を含み、

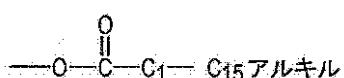
からなる群から選択され、

前記1つ以上の脳卒中の影響が、麻痺、空間障害、判断障害、左半側無視、記憶喪失、失語症、協調および平衡の問題、嘔気、嘔吐、認知障害、知覚障害、見当識障害、同名半盲、または衝動性である、前記組成物。

【請求項10】

R1またはR2が、

【化13】



30

であり、残りのR1またはR2が、

【化14】



であり、R3が水素である、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記ホルボールエステルが、ホルボール13-ブチレート、ホルボール12-デカノエート、ホルボール13-デカノエート、ホルボール12,13-ジアセテート、ホルボール13,20-ジアセテート、ホルボール12,13-ジベンゾエート、ホルボール12,13-ジブチレート、ホルボール12,13-ジデカノエート、ホルボール12,13-ジヘキサノエート、ホルボール12,13-ジプロピオネート、ホルボール12-ミリステート、ホルボール13-ミリステート、ホルボール12,13,20-トリアセテート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート-20-アセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-

40

-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-

50

チグリエート 13 - デカノエート、12 - デオキシホルボール 13 - アセテート、ホルボール 12 - アセテート、またはホルボール 13 - アセテートである、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するために、式 I の前記ホルボールエステルとの組み合わせ製剤において有効である少なくとも 1 つの二次または補助治療剤を更に含む、請求項 9 に記載の組成物。

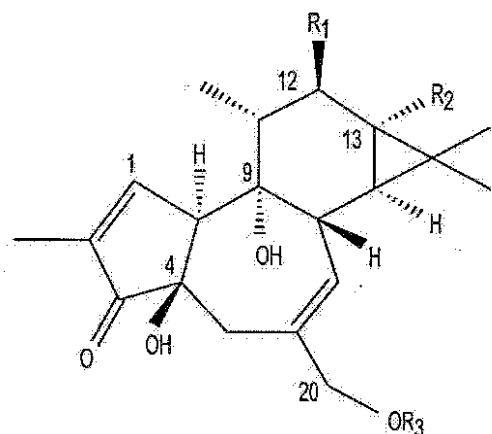
【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの二次または補助治療剤が、組織プラスミノーゲン活性化因子、抗凝固剤、スタチン、フィブレート、抗血小板剤、アンギオテンシン II 受容体遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤である、請求項 12 に記載の組成物。 10

【請求項 14】

脳卒中の危険性のある哺乳類対象において脳卒中の 1 以上の症状を予防または治療するための医薬の製造における、式 I のホルボールエステルまたはその薬学的に許容される塩、異性体、もしくは鏡像異性体の使用、ここで

【化 15】



10

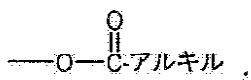
20

式 I

30

式中、R 1 および R 2 が、水素、ヒドロキシル、

【化 16】



ここで該アルキル基は 1 ~ 15 の炭素原子を含み、

【化 17】



40

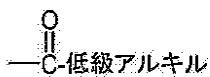
ここで該低級アルケニル基は 1 ~ 7 の炭素原子を含み、

【化 18】



からなる群から選択され、R 3 が、水素、および

【化19】



ここで該低級アルキル基は1～7の炭素原子を含み、
からなる群から選択され、

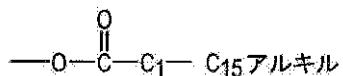
前記脳卒中の1つ以上の症状が、突発性のしびれ、脱力感、突発性の混乱、発話または会話理解の問題、片目または両目による突発性の視覚の問題、歩行の問題、眩暈、平衡もしくは協調の喪失、および突発性の頭痛である、前記使用。

【請求項15】

10

R1またはR2が、

【化20】



であり、残りのR1またはR2が、

【化21】



20

であり、R3が水素である、請求項14に記載の使用。

【請求項16】

前記ホルボールエステルが、ホルボール13-ブチレート、ホルボール12-デカノエート、ホルボール13-デカノエート、ホルボール12,13-ジアセテート、ホルボール13,20-ジアセテート、ホルボール12,13-ジベンゾエート、ホルボール12,13-ジブチレート、ホルボール12,13-ジデカノエート、ホルボール12,13-ジヘキサノエート、ホルボール12,13-ジプロピオネート、ホルボール12-ミリステート、ホルボール13-ミリステート、ホルボール12,13,20-トリアセテート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート-20-アセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-チグリエート13-デカノエート、12-デオキシホルボール13-アセテート、ホルボール12-アセテート、またはホルボール13-アセテートである、請求項14に記載の使用。

30

【請求項17】

40

前記医薬が前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するための組み合わせ製剤であり、該組み合わせ製剤の製造における、式Iの前記ホルボールエステルとの組み合わせ製剤において有効である少なくとも1つの二次または補助治療剤の使用、または

前記医薬が協調的治療レジメン用医薬と用いられるためのものであり、前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するための該協調的治療レジメン用医薬の製造における式Iの前記ホルボールエステルとの協調的治療レジメンにおいて有効である少なくとも1つの二次または補助治療剤の使用を更に含み、ここで前記二次または補助治療剤が、式Iの前記ホルボールエステルの投与と同時、投与の前、または投与の後に投与されるためのものである、請求項14に記載の使用。

【請求項18】

50

前記少なくとも1つの二次または補助治療剤が、抗凝固剤、スタチン、フィブレート、アンギオテンシンII受容体遮断薬、抗血小板剤、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤である、請求項17に記載の使用。

【請求項 19】

式Iのホルボールエステルが 12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセタート(T P A)である、請求項 1 又は 14 に記載の使用。

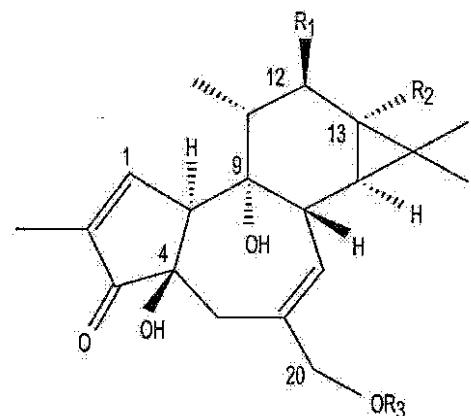
【請求項 20】

式Iのホルボールエステルが 12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセタート(T P A)である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 21】

哺乳類対象における 1 つ以上の脳卒中の後遺症を予防または治療するための医薬の製造における、式Iのホルボールエステルまたはその薬学的に許容される塩、異性体、もしくは鏡像異性体の使用、

【化 2 2】



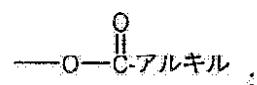
10

20

式 I

[式中、R 1 および R 2 が、水素、ヒドロキシル、

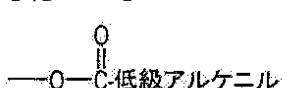
【化 2 3】



、ここで該アルキル基は 1 ~ 15 の炭素原子を含み、

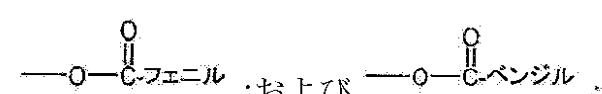
30

【化 2 4】



、ここで該低級アルケニル基は 1 ~ 7 の炭素原子を含み、

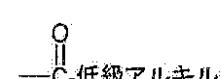
【化 2 5】



40

からなる群から選択され、R 3 が、水素、および

【化 2 6】



ここで該低級アルキル基は 1 ~ 7 の炭素原子を含み、

からなる群から選択される】

ここで前記 1 つ以上の脳卒中の後遺症が、麻痺、空間障害、判断障害、左半側無視、記憶喪失、失語症、協調および平衡の問題、嘔気、嘔吐、認知障害、知覚障害、見当識障害

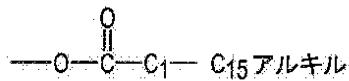
50

、同名半盲、および衝動性の 1 以上である、前記使用。

【請求項 2 2】

R 1 または R 2 が、

【化 2 7】



であり、残りの R 1 または R 2 が、

【化 2 8】



10

であり、R 3 が水素である、請求項 2 1 に記載の使用。

【請求項 2 3】

前記ホルボールエステルが、ホルボール 13 - プチレート、ホルボール 12 - デカノエート、ホルボール 13 - デカノエート、ホルボール 12 , 13 - ジアセテート、ホルボール 13 , 20 - ジアセテート、ホルボール 12 , 13 - ジベンゾエート、ホルボール 12 , 13 - ジブチレート、ホルボール 12 , 13 - ジデカノエート、ホルボール 12 , 13 - ジヘキサノエート、ホルボール 12 , 13 - ジプロピオネート、ホルボール 12 - ミリステート、ホルボール 13 - ミリストート、ホルボール 12 , 13 , 20 - トリアセテート、12 - デオキシホルボール 13 - アンゲレート、12 - デオキシホルボール 13 - アンゲレート 20 - アセテート、12 - デオキシホルボール 13 - イソブチレート、12 - デオキシホルボール 13 - イソブチレート - 20 - アセテート、12 - デオキシホルボール 13 - フェニルアセテート、12 - デオキシホルボール 13 - フェニルアセテート 20 - アセテート、12 - デオキシホルボール 13 - テトラデカノエート、ホルボール 12 - チグリエート 13 - デカノエート、12 - デオキシホルボール 13 - アセテート、ホルボール 12 - アセテート、またはホルボール 13 - アセテートである、請求項 2 1 に記載の使用。

20

【請求項 2 4】

ホルボールエステルが 12 O テトラデカノイルホルボール 13 アセタートである、請求項 2 1 に記載の使用。

30

【請求項 2 5】

治療または予防において少なくとも 1 つの二次または補助治療剤が投与される、請求項 2 1 に記載の使用。

【請求項 2 6】

前記少なくとも 1 つの二次または補助治療剤が、協調投与プロトコールにおいて、前記対象への前記ホルボールエステルの投与と同時に、投与の前、または投与の後で、前記対象に投与されるためのものである、請求項 2 5 に記載の使用。

【請求項 2 7】

前記少なくとも 1 つの二次または補助治療剤が、組織プラスミノーゲン活性化因子、抗凝固剤、スタチン、フィブレート、アンギオテンシン I I 受容体遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、抗血小板剤、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤である、請求項 2 5 に記載の使用。

40

【請求項 2 8】

前記治療または予防が、式 I のホルボールエステルと組み合わせた外科的介入を更に含むものである、請求項 2 1 に記載の使用。

【請求項 2 9】

前記外科的介入が、頸動脈内膜剥離術、血管形成術、ステント留置術、開頭術、ペースメーカーの挿入、除細動器の埋め込み、弁置換術、冠動脈バイパス術、心臓移植、血管内コイル塞栓術、または卵円孔開存閉鎖術である、請求項 2 8 に記載の使用。

50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願**

本出願は、米国特許仮出願第61/588,167号、2012年1月18日出願の優先権の利益を主張する米国の一般特許であり、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0002】**追加の開示**

本出願に関する追加の開示は、「ホルボールエステルの組成物およびその使用方法」
の米国特許出願第12/023,753号、2008年1月31日出願、Richard

10

L. Changらにおいて見出すことができ、これは米国特許仮出願第60/898,
810号、2007年1月31日出願の優先権の利益を主張するものであり、これらのそれぞれは、その全体が全ての目的において参照として本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、一般に、脳卒中および脳卒中の影響の治療および予防におけるホルボールエ
ステルの医薬用途に関する。

【背景技術】**【0004】**

植物は、歴史的に多くの医薬的な目的のために役立ってきた。世界保健機構（WHO）
は、世界の人口の80%である40億人がプライマリヘルスケアのある局面において漢方
薬を現在使用していると推定する（WHOファクトシート番号134、2008年12月）。しかし、望ましい医薬効果を有する特定の化合物を植物から単離すること、およびそれを商業規模で再生することは、困難であり得る。加えて、活性化合物は植物から単離され得るが、ミネラル、ビタミン、揮発性油、グリコシド、アルカノイド、ビオフラバノイド
のような他の植物部分、および他の物質は、植物が知られている活性化合物または医薬
効果の機能に関与していることもあり、植物に基づいた医薬品の使用、精製、および商業化を難題にしている。

20

【0005】

ホルボールは、ジテルペンのチグリアンファミリーにおける天然の植物由来有機化合物
である。これは、東南アジア原産のトウダイグサ科の葉状灌木であるクロトンチグリウム
(*Croton tigarium*)の種に由来するクロトン油の加水分解生成物として、
1934年に最初に単離された。ホルボールの多様なエステルは、シアシルグリセロール
および活性タンパク質キナーゼC (PKC) を模倣すること、ならびにマイトジエン活性化
タンパク質キナーゼ (MAPK) 経路を含む下流細胞シグナル伝達経路を調節するとい
う報告された能力を含む、重要な生物学的特性を有する。加えてホルボールエステルは、
キメリソ、Ras活性化因子RasGRP、および小胞刺激タンパク質Munc-13に
結合すると考えられる (Brose N, Rosenmund C., J Cell Sci; 115: 4399-411 (2002))。幾つかのホルボールエステルは、核内因子カッパB (NF-B) も誘発する。ホルボールエステルの最も重要な生理学的特性は
、腫瘍プロモーターとして作用することが報告されているこれら的能力である。 (Blumberg, 1988; Goel, G et al., Int. Journal of Toxicology 26, 279-288 (2007))。

30

【0006】

12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (TPA) は、ホルボール
-12-ミリストート-13-アセテート (PMA) とも呼ばれ、複数の細胞株および初
代細胞の分化および/またはアポトーシスのインデューサーとして発癌モデルに使用され
るホルボールエステルである。TPAは、また、化学療法により骨髄機構が抑制されて
いる患者において循環白血球および好中球の増加をもたらすこと (Han Z. T. et
al. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 5363-5365 (1998))

40

50

)、ならびにMT-4細胞に対するHIV誘発性細胞変性効果を阻害することが報告されている。(Mekkawy S. et al., Phytocchemistry 53, 47-464 (2000))。しかし、皮膚と接触したときの腐食性反応およびその潜在的な毒性の懸念を含む多様な要因に起因して、TPAは、疾患を治療、管理、または予防する有効なツールであることが示されていない。事実、ホルボールエステルが、炎症性反応および腫瘍発生をもたらす多様な細胞応答の引き金を引くタンパク質キナーゼCの活性化において、主要な役割を果たすので(Goel et al., Int. Journal of Toxicology 26, 279-288 (2007))、ホルボールエステルは、脳卒中のような炎症性反応を伴う状態の可能な治療候補から一般に除外されている。

10

【0007】

心臓疾患および脳卒中は、年間におよそ1千7百万人を死亡させており、全世界の全ての死者のほぼ三分の一を占める。これらは、世界中の死亡および身体障害の両方の主な原因となっていることが予測され、死者数は、2020年までに2千万人を超え、2030年までに2千4百万人まで増加すると推定される。(Atlas of Heart Disease and Stroke, World Health Organization 2004)。

【0008】

先進国において冠動脈性心疾患および脳卒中に関連する300を超える危険因子が存在するが(Atlas of Heart Disease and Stroke, World Health Organization 2004)、全ての心血管疾患の少なくとも1/3は、喫煙、アルコールの摂取、高血圧、高コレステロール、および肥満に起因する。

20

【0009】

脳卒中を管理および予防する現在の治療は、一般に、ACE阻害剤、アスピリン、遮断薬、および脂質低下薬物療法などの薬物療法と、ペースメーカー、埋め込み式除細動器、冠動脈ステント、人工弁、および人工心臓のような装置と、冠動脈バイパス術、バルーン血管形成術、弁修復術および置換術、心臓移植、ならびに人工心臓手術のような手術との組み合わせである。「ますます、先端技術による手法のほうが、費用はかからなくても有効な戦略よりも選択されている」(Atlas of Heart Disease and Stroke, World Health Organization 2004)ことが、医療費の上昇を増加させ、異なる個体群の間で治療の品質に顕著な差をもたらしている。

30

【0010】

しかし、先端技術および施設が利用可能であっても、脳卒中に罹患している60%が死亡しているか、または要介護になり、毎回の脳卒中は、更なる発症の危険性を有意に増加する。「世界中で、心血管疾患およびこれらの危険因子の治療は、大部分の患者において不適切である。」(Atlas of Heart Disease and Stroke, World Health Organization 2004)。したがって、脳卒中を治療および予防する、ならびに脳卒中により引き起こされる長期間の影響を治療または予防する新たなより有効な手段の必要性が明らかに存在する。

40

【発明の概要】

【0011】

本発明は、ホルボールエステルを含有する組成物、およびホルボールエステルを使用する方法に関する。本明細書に記載されている組成物および方法は、脳卒中を予防および治療すること、ならびに急性虚血性事象を含む脳卒中の後遺症を管理することに有効である。

【0012】

本明細書に記載されているホルボールエステルおよびホルボールエステルの誘導体を使用して予防または治療され得る脳卒中の影響には、麻痺、空間障害、判断障害、左半側無

50

視、記憶喪失、失語症、協調および平衡の問題、嘔気、嘔吐、認知障害、知覚障害、見当識障害、同名半盲、ならびに衝動性が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、ホルボールエステルおよびホルボールエステルの誘導体の使用は、初回およびその後の脳卒中が生じることを予防し得る。

【0013】

治療の成功は、脳卒中の重篤度もしくは後遺症の低減、脳卒中の影響の減少もしくは排除、個体が脳卒中を起こしやすくする危険因子の減少、および／またはその後の脳卒中を含む脳卒中の数もしくは重篤度の減少のような、従来の方法に従って決定される。

【0014】

別の実施形態において、本明細書に記載されているホルボールエステルおよびホルボールエステルの誘導体を使用して、細胞シグナル伝達経路を調節することができる。そのような調節は、多様な結果を有することができ、例えば、幾つかの実施形態において、ホルボールエステルおよびホルボールエステルの誘導体を含有する組成物は、哺乳類対象において $\text{Th}1$ サイトカインの放出を変えることができる。更なる実施形態において、ホルボールエステルおよび／またはホルボールエステルの誘導体を含有する組成物は、哺乳類対象において、インターロイキン 2 (IL-2) の放出を変えることができる。追加の実施形態において、ホルボールエステルおよび／またはホルボールエステルの誘導体を含有する組成物は、哺乳類対象において、インターフェロンの放出を変えることができる。なお別の実施形態において、ホルボールエステルおよび／またはホルボールエステルの誘導体を含有する組成物は、ERK リン酸化の速度を変えることができる。

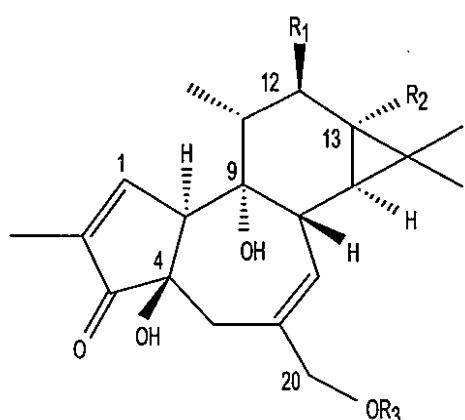
10

20

【0015】

本発明は、下記の式 I のホルボールエステルを含有する組成物を使用して、脳卒中を治療および予防するための、細胞シグナル伝達経路を調節するための、ならびに／または脳卒中の後遺症を管理、治療、および予防するための新規で驚くほど有効な方法および組成物を提供することにより、前述の目的を達成し、追加の目的および利点を満たし。

【化1】



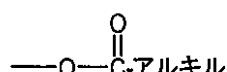
30

式I

式中、R1 および R2 は、独立して、水素、ヒドロキシル、

40

【化2】



(ここでアルキル基は、1～15個の炭素原子を含有する)、

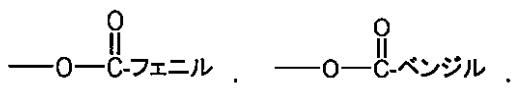
【化3】



(ここで低級アルケニル基は、1～7個の炭素原子を含有する)、

50

【化4】



およびこれらの置換された誘導体であり得る。R3は、独立して、水素または

【化5】



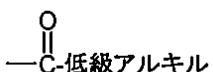
およびこの置換された誘導体であり得る。本発明の方法および組成物は、式Iの組成物の任意の薬学的に許容される塩、鏡像異性体、異性体、多形体、プロドラッグ、水和物、および溶媒和物を更に含む。

10

【0016】

幾つかの実施形態において、R1およびR2の少なくとも1つは、水素以外であり、R3は、水素または

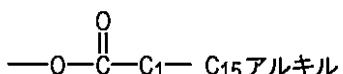
【化6】



20

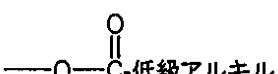
およびこの置換された誘導体である。別の実施形態において、R1またはR2のいずれかは、

【化7】



であり、残りのR1またはR2は

【化8】



30

(ここで低級アルキルは、1~7個の炭素のものである)であり、R3は、水素である。

【0017】

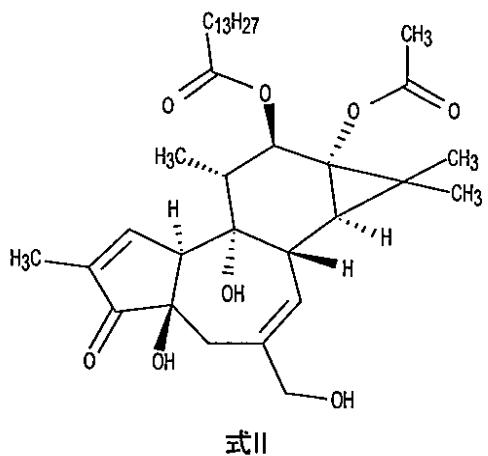
本明細書の式Iの式のアルキル、アルケニル、フェニル、およびベンジル基は、非置換であり得、またはハロゲン、好ましくは、塩素、フッ素もしくは臭素、ニトロ、アミノ、および/または同種のラジカルにより置換され得る。

【0018】

本明細書に記載されている方法および組成物に使用される例示的なホルボールエステル組成物は、下記の式IIの12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート(TPA)である。

40

【化9】



10

【0019】

式Iの有用なホルボールエステル、ならびに本発明の製剤および方法の範囲内の関連化合物および誘導体には、前記化合物の他の薬学的に許容される活性塩、ならびに前記化合物の活性異性体、鏡像異性体、多形体、グリコシリ化誘導体、溶媒和物、水和物、および/またはプロドラッグが含まれるが、これらに限定されない。本発明の組成物および方法の範囲内で使用されるホルボールエステルの例示的な形態には、ホルボール13-ブチレート、ホルボール12-デカノエート、ホルボール13-デカノエート、ホルボール12,13-ジアセテート、ホルボール13,20-ジアセテート、ホルボール12,13-ジベンゾエート、ホルボール12,13-ジブチレート、ホルボール12,13-ジデカノエート、ホルボール12,13-ジヘキサノエート、ホルボール12,13-ジプロピオネート、ホルボール12-ミリストート、ホルボール13-ミリストート、ホルボール12-ミリストート-13-アセテート(TPAまたはPMAとしても知られている)、ホルボール12,13,20-トリアセテート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート-20-アセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-チグリエート13-デカノエート、12-デオキシホルボール13-アセテート、ホルボール12-アセテート、およびホルボール13-アセテートが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0020】

本発明の方法に従った式Iのホルボールエステルまたは式Iのホルボールエステルの誘導体、特にTPAによる治療に適している哺乳類対象には、脳卒中を罹患している、または脳卒中の危険性のある個体が含まれるが、これらに限定されない。式Iのホルボールエステル、特にTPAによる治療に適している対象には、麻痺、空間障害、判断障害、左半側無視、記憶喪失、失語症、協調および平衡の問題、嘔気、嘔吐、認知障害、知覚障害、見当識障害、同名半盲、および衝動性が含まれるが、これらに限定されない脳卒中の影響に苦しんでいるものが追加的に含まれる。

30

【0021】

これらおよび他の対象は、NF-B活性を調節するために、Th1サイトカイン活性を増加するために、麻痺を予防または治療するために、空間認識を増加させるために、記憶喪失を減少させるために、失語症を減少させるために、協調および平衡を増加させるために、脳卒中の発生および重篤度を予防するため、または減少させるために、ならびに認知を改善するために十分な式Iのホルボールエステルまたは式Iのホルボールエステルの誘導体の有効量を対象に投与することによって、予防的および/または治療的に、有効治療される。

40

50

【0022】

本発明の治療上有用な方法および製剤は、前記化合物の任意の活性な薬学的に許容される塩、ならびに活性な異性体、鏡像異性体、多形体、溶媒和物、水和物、プロドラッグ、および／またはこれらの組み合わせを含む、上記に示された多様な形態で式Iのホルボールエステルまたは式Iのホルボールエステルの誘導体を有効に使用する。式IIのTPAは、後述の本明細書の実施例の範囲内において本発明の例示的実施形態として用いられる。

【0023】

本発明の追加の態様の範囲内において、対象に有効な応答を生じるために式Iのホルボールエステル化合物と組み合わせ的に処方される、または協調的に投与される1つ以上の二次または補助活性剤と組み合わせた式Iのホルボールエステルまたは式Iのホルボールエステルの誘導体の有効量を用いる、組み合わせ製剤および方法が提供される。

10

【0024】

脳卒中を治療する組み合わせ製剤および協調的治療方法は、脳卒中を予防するか、治療するか、または他の適応症の、1つ以上の追加の二次または補助治療剤と組み合わせた式Iのホルボールエステルまたは式Iのホルボールエステルの誘導体を用いる。これらの実施形態におけるホルボールエステル、例えばTPAと組み合わせて使用される二次または補助治療剤は、単独で、またはホルボールエステル、例えばTPAと組み合わせて脳卒中の予防または回復に対して直接的または間接的な効果を有することができ、例えばTPAと組み合わせて他の有用な補助治療活性（例えば、抗凝固、抗コレステロール血症、血管拡張、抗高血圧、細動脈抵抗の低下、静脈容量の増加、心臓酸素要求量の低減、心拍数の減少、心拍数の安定化、または神経保護）を示すことができ、あるいは単独で、または例えばTPAと組み合わせて、脳卒中または関連する症状を治療または予防するのに有用な補助治療活性を示すことができる。そのような二次または補助治療剤を、式Iのホルボールエステルまたは式Iのホルボールエステルの誘導体の投与の前、投与と同時、または投与の後に投与することができる。

20

【0025】

哺乳類対象において脳卒中を予防または治療するこれらの組み合わせ製剤および協調的治療方法に有用な補助または二次治療剤には、組織プラスミノーゲン活性化因子、抗凝固剤、スタチン、アンギオテンシンII受容体遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、抗血小板剤、遮断薬、アスピリン、フィブレート、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤が含まれるが、これらに限定されない。さらに、補助または二次療法には、頸動脈内膜剥離術、血管形成術、バルーン血管形成術、弁修復術および置換術、冠動脈バイパス術、ステント留置術、開頭術、血管内コイル塞栓術、または卵円孔開存閉鎖術を含む外科的介入などがあるが、これらに限定されない療法を使用することができる。

30

【0026】

本発明の前述、ならびに追加の目的、特徴、態様、および利点は、以下の発明を実施するための形態により明らかとなる。

【発明を実施するための形態】**【0027】**

40

新規方法および組成物は、ヒトを含む哺乳類対象において脳卒中および脳卒中の後遺症を予防および／または治療するのに使用されることが特定されている。

【0028】

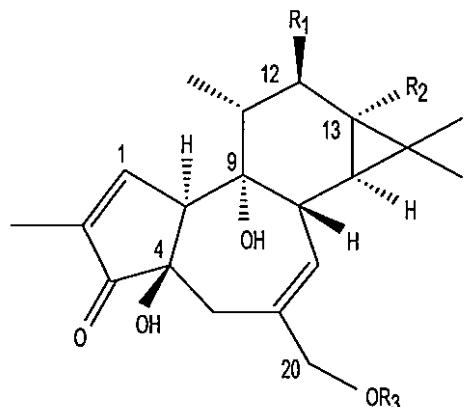
多様な実施形態において、本明細書に記載されている組成物および方法は、Th1サイトカインの放出を増加すること、ERKリン酸化を増加すること、NF- κ B活性を調節すること、麻痺を予防または治療すること、空間認識を増加させること、記憶喪失を減少させること、失語症を減少させること、協調および平衡を増加させること、認知を改善すること、見当識を改善すること、その後の脳卒中の有病率を減少すること、および衝動性を減少させることができる。

【0029】

50

本明細書に提供される製剤および方法は、式 I のホルボールエステルまたは式 I のホルボールエステルの誘導体化合物を用い、米国特許出願第 12 / 023,753 号、2008 年 1 月 31 日出願により完全に記載されており、これは米国特許仮出願第 60 / 898,810 号、2007 年 1 月 31 日出願の優先権利益を主張し、それぞれその全体が参照として本明細書に組み込まれ、

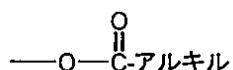
【化 10】



式I

式中、R 1 および R 2 は、独立して、水素、ヒドロキシル、

【化 11】



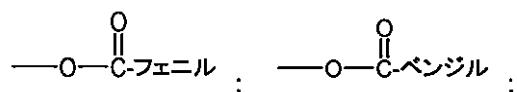
(ここでアルキル基は、1 ~ 15 個の炭素原子を含有する)、

【化 12】



(ここで低級アルケニル基は、1 ~ 7 個の炭素原子を含有する)、

【化 13】



およびこれらの置換された誘導体であり得る。R 3 は、独立して、水素または

【化 14】

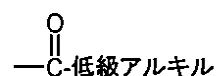


であり得る。

【0030】

幾つかの実施形態において、慢性または再発性の状態の治療に使用される新規組成物では、R 1 および R 2 の少なくとも 1 つは、水素以外であり、R 3 は、水素または

【化 15】



および置換された誘導体である。別の実施形態において、R 1 または R 2 のいずれかは、

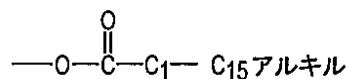
10

20

30

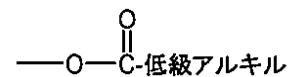
40

【化16】



であり、残りの R 1 または R 2 は

【化17】



(ここで低級アルキルは、炭素が 1 ~ 7 個のものである) であり、R 3 は、水素である。 10

【0031】

本明細書の式のアルキル、アルケニル、フェニル、およびベンジル基は、非置換であり得、またはハロゲン、好ましくは、塩素、フッ素もしくは臭素、ニトロ、アミノ、および / または同種のラジカルにより置換され得る。

【0032】

本明細書に提供される脳卒中治療製剤および方法は、抗脳卒中剤として、本記載の全ての活性な薬学的に許容される化合物、ならびにこれらの化合物の多様な予見され容易に提供される複合体、塩、溶媒和物、異性体、鏡像異性体、多形体、およびプロドラッグ、およびこれらの組み合わせを含む、上記の式 I のホルボールエステルまたは式 I のホルボールエステルの誘導体化合物を用いる。 20

【0033】

本明細書に提供される Th 1 サイトカイン增加製剤および方法は、新規の Th 1 サイトカイン増加剤として、本記載の全ての活性な薬学的に許容される化合物、ならびにこれらの化合物の多様な予見され容易に提供される複合体、塩、溶媒和物、異性体、鏡像異性体、多形体、およびプロドラッグ、およびこれらの組み合わせを含む、上記の式 I のホルボールエステルまたは誘導体化合物を用いる。ヒト対象を含む広範囲の哺乳類対象が、本発明の製剤および方法を使用する治療に適している。これらの対象には、脳卒中を罹患している、または脳卒中の危険性のある個体が含まれるが、これらに限定されない。

【0034】

本明細書に提供される E R K リン酸化增加製剤および方法は、新規の E R K リン酸化増加剤として、本記載の全ての活性な薬学的に許容される化合物、ならびにこれらの化合物の多様な予見され容易に提供される複合体、塩、溶媒和物、異性体、鏡像異性体、多形体、およびプロドラッグ、およびこれらの組み合わせを含む、上記の式 I のホルボールエステルまたは誘導体化合物を用いる。ヒト対象を含む広範囲の哺乳類対象が、本発明の製剤および方法を使用する治療に適している。これらの対象には、脳卒中を罹患している、または脳卒中の危険性のある個体が含まれるが、これらに限定されない。 30

【0035】

本発明の方法および組成物の範囲内では、本明細書に開示されている式 I のホルボールエステルまたは式 I のホルボールエステルの誘導体の 1 つ以上が、脳卒中または脳卒中の後遺症を治療および予防するのに有効な薬剤として効果的に処方または投与される。例示的な実施形態において、TPA は、単独または 1 つ以上の補助治療剤との組み合わせにより薬学的製剤および治療方法において有効な薬剤であることが実例の目的で示されている。本開示は、追加的に、本明細書に開示されている化合物の複合体、誘導体、塩、溶媒和物、異性体、鏡像異性体、多形体、およびプロドラッグ、ならびにこれらの組み合わせを含む天然または合成化合物の形態で薬学的に許容されるホルボールエステル化合物を更に提供し、これらは、脳卒中および脳卒中の後遺症の治療および予防における本発明の方法および組成物の範囲内で治療剤として有効である。 40

【0036】

脳卒中は、脳への血液供給の中断により引き起こされる。このことは、遮断（虚血性脳卒中）または血管の破裂（出血性脳卒中）のいずれかにより生じ得る。脳卒中の症状には、

10

20

30

40

50

特に身体の片側の突発性のしびれまたは脱力感、発話または会話理解の突発性の混乱または問題、片目または両目による突発性の視覚の問題、突発性の歩行、眩暈、または平衡もしくは協調の問題、あるいは原因不明の突発性の重篤な頭痛が含まれるが、これらに限定されない。脳卒中の危険因子には、高血圧、血中脂質異常、タバコの使用、身体的不活発、肥満、ストレス、糖尿病、アルコールの使用、過剰な血中ホモシステイン、炎症、および凝固異常が含まれる。年齢、遺伝、性別、および民族性のような変更不能な危険因子も存在する。

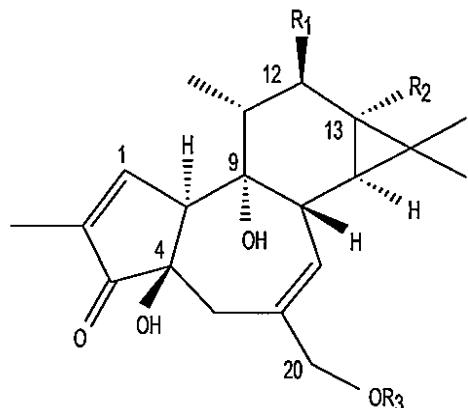
【0037】

脳卒中の治療は、3つの別個の段階があり、予防、脳卒中直後の治療、および脳卒中後のリハビリテーションである。本明細書に記載されている組成物および方法を、独立して、または他の医薬品、装置、もしくは外科的介入を含む1つ以上の追加的な療法と共に、脳卒中治療の任意の段階に使用することができる。10

【0038】

ホルボールは、ジテルペンのチグリアンファミリーにおける天然の植物由来多環式アルコールである。これは、クロトンチグリウムの種に由来するクロトン油の加水分解生成物として、1934年に最初に単離された。大部分の極性有機溶媒および水において良好な可溶性がある。ホルボールのエステルは、下記の式Iの一般構造を有し、20

【化18】

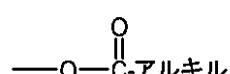


20

30

式中、R1およびR2は、水素、ヒドロキシル、30

【化19】



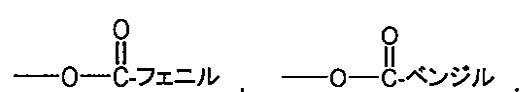
(ここでアルキル基は、1~15個の炭素原子を含有する)、40

【化20】



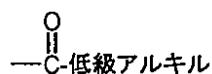
(ここで低級アルケニル基は、1~7個の炭素原子を含有する)、40

【化21】



およびこれらの置換された誘導体からなる群から選択され、R3は、水素、または

【化22】



およびその置換された誘導体であり得、ならびに、式Iの化合物の薬学的に許容される塩、鏡像異性体、多形体、プロドラッグ溶媒和物および水和物の構造を有する。

【0039】

用語「低級アルキル」または「低級アルケニル」は、本明細書で使用されるとき、1～7個の炭素原子を含有する部分を意味する。式Iの化合物において、アルキルまたはアルケニル基は、直鎖または分岐鎖であり得る。幾つかの実施形態において、R₁またはR₂のいずれかまたは両方は、長鎖炭素部分である（すなわち、式Iはデカノエートまたはミリストートである）。

【0040】

本明細書の式のアルキル、アルケニル、フェニル、およびベンジル基は、非置換であり得、またはハロゲン、好ましくは、塩素、フッ素もしくは臭素、ニトロ、アミノ、および同種のラジカルにより置換され得る。

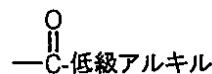
【0041】

クロトンチグリウムのような薬草供給源からの任意の調製物または抽出物を含む、ホルボールエステルの有機および合成形態は、本明細書の実施形態の範囲内で使用されるホルボールエステル（またはホルボールエステル類縁体、関連化合物、および／もしくは誘導体）を含む有用な組成物と考慮される。本明細書の実施形態の範囲内で使用される有用なホルボールエステルおよび／または関連化合物は、典型的には、式Iにより説明された構造を有するが、そのような化合物の機能的に同等な類縁体、複合体、抱合体、および誘導体も本発明の範囲内であると当業者により理解される。

【0042】

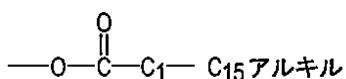
より詳細な実施形態では、上記の式Iによる実例的な構造の変更が、ヒトを含む哺乳類対象において脳卒中、脳卒中に起因する損傷を治療および／もしくは予防する、ならびに／または脳卒中の影響もしくは後遺症を管理するのに有用な候補化合物を提供するために選択され、式中、R₁およびR₂の少なくとも1つは、水素以外であり、R₃は、水素、

【化23】



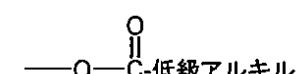
およびこれらの置換された誘導体からなる群から選択される。別の実施形態において、R₁またはR₂のいずれかは、

【化24】



であり、残りのR₁またはR₂は、

【化25】



であり、R₃は水素である。

【0043】

ヒトを含む哺乳類対象において脳卒中、脳卒中に起因する損傷を治療および／もしくは予防する、ならびに／または脳卒中の影響もしくは後遺症を管理する治療において有用な

10

20

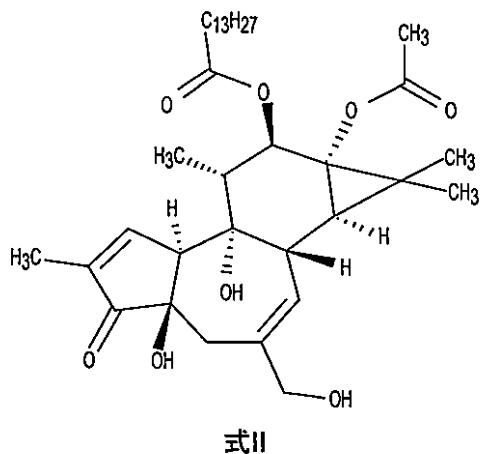
30

40

50

式Iのホルボールエステル化合物の例示的な実施形態は、下記の式IIに示されている、ホルボール12-ミリステート-13-アセテート(PMAまたは12-O-テトラデカノイル-ホルボール-13-アセテート(TPA)としても知られている)において見出される。

【化26】



10

【0044】

20

本発明の製剤および方法の範囲内の追加的に有用なホルボールエステル、ならびに関連化合物および誘導体には、前記化合物の他の薬学的に許容される活性塩、ならびに前記化合物の活性異性体、鏡像異性体、多形体、グリコシリ化誘導体、溶媒和物、水和物、および/またはプロドラッグが含まれるが、これらに限定されない。式Iのホルボールエステルの誘導体は、それ自体ホルボールエステルであっても、なくてもよい。本発明の組成物および方法の範囲内で使用されるホルボールエステルの更なる例示的な形態には、表1に示されている、ホルボール13-ブチレート、ホルボール12-デカノエート、ホルボール13-デカノエート、ホルボール12,13-ジアセテート、ホルボール13,20-ジアセテート、ホルボール12,13-ジベンゾエート、ホルボール12,13-ジブチレート、ホルボール12,13-ジデカノエート、ホルボール12,13-ジヘキサノエート、ホルボール12,13-ジプロピオネート、ホルボール12-ミリステート、ホルボール13-ミリステート、ホルボール12,13,20-トリアセテート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート-20-アセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-チグリエート13-デカノエート、12-デオキシホルボール13-アセテート、ホルボール12-アセテート、およびホルボール13-アセテートが含まれるが、これらに限定されない。

30

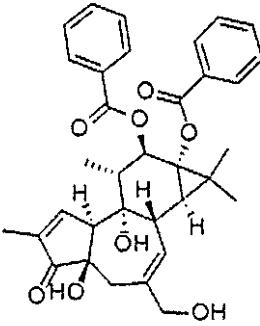
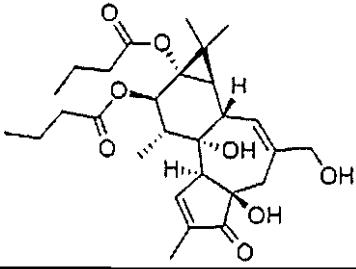
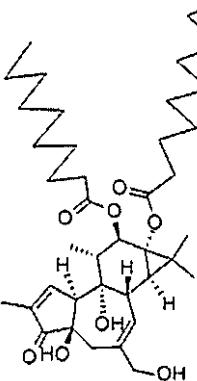
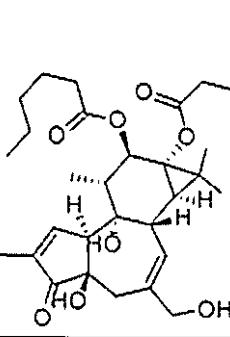
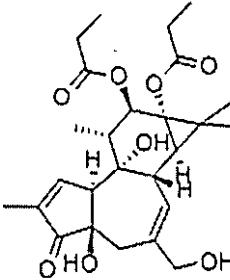
表1

40

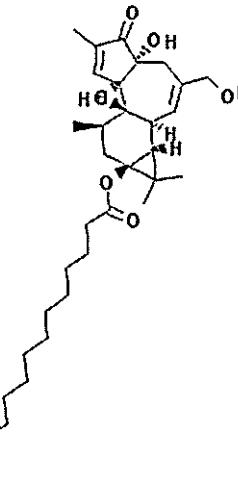
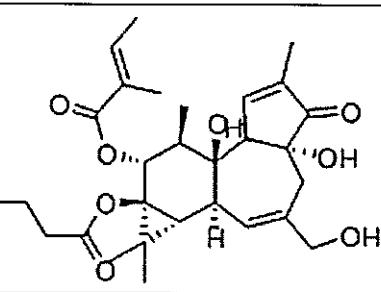
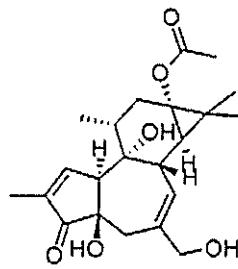
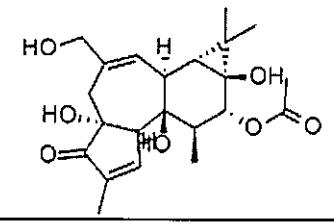
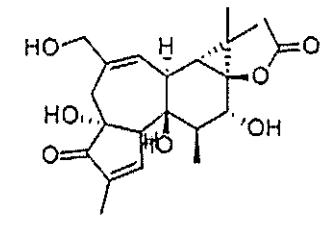
例示的なホルボールエステル

【表1】

ホルボール 13-ブチレート		
ホルボール 12-デカノエート		10
ホルボール 13-デカノエート		20
ホルボール 12,13-ジアセテート		30
ホルボール 13,20-ジアセテート		40

ホルボール 12,13-ジベンゾエート		10
ホルボール 12,13-ジブチレート		
ホルボール 12,13-ジデカノエート		20
ホルボール 12,13-ジヘキサノエート		30
ホルボール 12,13-ジプロピオネート		40

12-デオキシホルボール 13-アンゲレート 20-アセテート		10
12-デオキシホルボール 13-イソブチレート		
12-デオキシホルボール 13-イソブチレート-20-アセテート		20
12-デオキシホルボール 13-フェニルアセテート		30
12-デオキシホルボール 13-フェニルアセテート 20-アセテート		40

12-デオキシホルボール 13-テトラデカノエート		10
ホルボール 12-チグリエート 13-デカノエート		20
12-デオキシホルボール 13-アセテート		30
ホルボール 12-アセテート		
ホルボール 13-アセテート		40

【0045】

本明細書に記載されている組成物は、哺乳類対象における脳卒中、または脳卒中関連症状もしくは後遺症の予防および/または治療に有効である、式Iのホルボールエステル化合物または式Iのホルボールエステルの誘導体化合物の脳卒中損傷緩和または予防有効量

を含む脳卒中治療組成物を含む。活性化合物の「脳卒中治療」、「抗凝固」、「抗コレステロール血症」、「血管拡張」、「抗高血圧」、「細動脈抵抗の低下」、「静脈容量の増加」、「心臓酸素要求量の低減」、「心拍数の減少」、「心拍数の安定化」、または「神経保護」に有効な量は、対象において脳卒中の1つ以上の症状または後遺症を特定の治療介入期間にわたって測定可能に緩和する単回または多回単位剤形によって治療上有効である。例示的な実施形態の範囲内において、本発明の組成物は、脳卒中にかかりやすい、または脳卒中を罹患しているヒトおよび他の哺乳類対象において脳卒中または脳卒中の後遺症を予防または緩和する治療方法に有効である。

【0046】

本発明のホルボールエステル治療組成物は、典型的には、安定性、送達、吸収、半減期、効能、薬物動態、および／もしくは薬力学を向上させる、副作用を低減する、または薬学的使用の他の利点を提供することができる1つ以上の薬学的に許容される担体、賦形剤、ビヒクル、乳化剤、安定剤、防腐剤、緩衝剤、および／または他の添加剤と共に処方され得る、式Iのホルボールエステル化合物または式Iのホルボールエステルの誘導体化合物の有効量または単位投与量を含む。有効量の式Iのホルボールエステルまたは関連もしくは誘導体化合物（例えば、有効濃度／量のTPA、またはTPAの選択された薬学的に許容される塩、異性体、鏡像異性体、溶媒和物、多形体、および／もしくはプロドラッグを含む単位用量）は、臨床および患者に特異的な因子に応じて、当業者によって容易に決定される。ヒトを含む哺乳類対象への投与用の活性化合物の適切な有効単位投与量は、約10～約1500μg、約20～約1000μg、約25～約750μg、約50～約500μg、約150～約500μg、約125μg～約500μg、約180～約500μg、約190～約500μg、約220～約500μg、約240～約500μg、約260～約500μg、約290～約500μgの範囲であり得る。特定の実施形態において、式Iのホルボールエステル化合物または関連もしくは誘導体化合物の疾患治療有効投与量は、より狭い範囲内から、例えば10～25μg、30～50μg、75～100μg、100～300μg、または150～500μgから選択され得る。これらおよび他の有効単位投与量は、例えば、1日、1週間、または1か月に1～5または2～3用量を投与することを含む投与レジメンにおいて、単回用量により、または多回1日、週、もしくは月用量の形態により投与され得る。1つの例示的な実施形態では、10～30μg、30～50μg、50～100μg、100～300μg、または300～500μgの投与量が、1日あたり、1、2、3、4、または5回投与される。より詳細な実施形態では、50～100μg、100～300μg、300～400μg、または400～600μgの投与量が1日に1回または2回投与される。更なる実施形態では、50～100μg、100～300μg、300～400μg、または400～600μgの投与量が1日おきに投与される。代替的な実施形態において、投与量は、体重に基づいて計算され、例えば、1日あたり約0.5μg/m²～約300μg/m²、約1μg/m²～約200μg/m²、1日あたり約1μg/m²～約187.5μg/m²、1日あたり約1μg/m²～1日あたり約157μg/m²、1日あたり約1μg/m²～約125μg/m²、1日あたり約1μg/m²～約75μg/m²、1日あたり1μg/m²～約50μg/m²、1日あたり2μg/m²～約50μg/m²、1日あたり2μg/m²～約30μg/m²、または1日あたり3μg/m²～約30μg/m²の量で投与され得る。

【0047】

他の実施形態において、投与量は、より少ない頻度、例えば、1日おきに0.5μg/m²～約300μg/m²、約1μg/m²～約200μg/m²、1日おきに約1μg/m²～約187.5μg/m²、1日あたり約1μg/m²～1日おきに約157μg/m²、1日おきに約1μg/m²～約125μg/m²、1日おきに約1μg/m²～約75μg/m²、1日おきに1μg/m²～約50μg/m²、1日おきに2μg/m²～約50μg/m²、1日あたり2μg/m²～約30μg/m²、または1日あたり3μg/m²～約30μg/m²で投

10

20

30

40

50

与され得る。追加的な実施形態において、投与量は、週に3回、週に4回、週に5回、週日のみ、他の治療レジメンと協調する場合にのみ、連日、または臨床および患者に特異的な因子に応じて任意の適切な投与レジメンで投与され得る。

【0048】

(代替的には「脳卒中治療」、「抗凝固」、「抗コレステロール血症」、「血管拡張」、「抗高血圧」、「細動脈抵抗の低下」、「静脈容量の増加」、「心臓酸素要求量の低減」、「心拍数の減少」、「心拍数の安定化」、「ERKリン酸化の誘発」、「IL-2の調節」、および/または「神経保護」に)有効な量の式Iのホルボールエステル化合物または式Iのホルボールエステルの誘導体化合物を含む本発明の組成物の量、時間、および送達様式は、投与が予防的もしくは治療的にかかわらず、個体の体重、年齢、性別、および状態、疾患の激しさ、および/または関連する症状などの因子に基づいて、ならびに薬剤の送達、吸収、半減期を含む薬物動態、および効能に影響を及ぼすことが知られている他の因子に基づいて、個体別に日常的に調整される。10

【0049】

本発明の本疾患治療(代替的には、「脳卒中治療」、「抗凝固」、「抗コレステロール血症」、「血管拡張」、「抗高血圧」、「ERKリン酸化の誘発」、「細動脈抵抗の低下」、「静脈容量の増加」、「心臓酸素要求量の低減」、「心拍数の減少」、「心拍数の安定化」、「血餅の減少」、「神経保護」、「IL-2の調節」、または「NF-Bの調節」)製剤の有効用量または多回投与治療レジメンは、通常、対象において脳卒中の症状を実質的に予防または緩和するのに必要および十分な最小投与レジメンを推定するために選択される。投与量および投与プロトコールは、多くの場合、数日間にわたる、さらには1週間以上または1年以上にわたる反復投与療法を含む。有効な治療レジメンは、数日間、数週間、数か月、さらには数年間にわたって続く、1日に投与される、または1日に多回用量が投与される予防的投与量を含むこともある。20

【0050】

脳卒中の治療における本発明の組成物および方法の有効性は、実施例9に示されている一時的な中大脳動脈閉塞、実施例8に示されている永続的な中大脳動脈閉塞、血管内線維中大脳動脈閉塞、実施例7に示されている塞栓性中大脳動脈閉塞、静脈および動脈のエンドセリン-1-誘発性狭窄、または大脳皮質光増感反応血栓症(*cerebrocortical photothrombosis*)を含む多様なモデル系の使用により実証され得る。本発明のホルボールエステル組成物の使用は、モデル系により示された症状または長期間の影響を対照動物と比べて0%、20%、30%、50%、またはそれ以上、最大75~90%、96%、またはそれ以上の減少まで減少する。30

【0051】

脳卒中の治療における本発明の組成物および方法の有効性は、脳卒中を罹患した個体において示される症状の減少により更に実証され得る。そのような症状には、麻痺、空間障害、判断障害、左半側無視、記憶喪失、失語症、協調および平衡の問題、嘔氣、嘔吐、認知障害、知覚障害、見当識障害、同名半盲、および衝動性が含まれるが、これらに限定されない。本発明のホルボールエステル組成物の使用は、個体により示された症状を初期状態と比べて0%、20%、30%、50%、またはそれ以上、最大75~90%、96%、またはそれ以上の減少まで減少する。40

【0052】

本発明の追加的な態様の範囲内において、有効量の式Iのホルボールエステル化合物または式Iの誘導体化合物、および式Iのホルボールエステル化合物と共に組み合わせ的に処方される、または協調的に投与される1つ以上の二次または補助剤を、多重活性疾患治療組成物または協調的治療方法を生じるために用いる、組み合わせ疾患治療(「脳卒中治療」、「抗凝固」、「抗コレステロール血症」、「血管拡張」、「抗高血圧」、「ERKリン酸化の誘発」、「細動脈抵抗の低下」、「静脈容量の増加」、「心臓酸素要求量の低減」、「心拍数の減少」、「心拍数の安定化」、または「NF-Bの調節」)製剤および協調的投与方法が提供される。50

【0053】

脳卒中の予防または治療における例示的な組み合わせ製剤および協調的治療方法は、標的疾患、状態、および／または症状の治療または予防に有用な1つ以上の追加の神経保護または他の適応症の二次または補助治療剤と組み合わせて、式Iのホルボールエステルまたは式Iのホルボールエステルの誘導体化合物を用いる。本発明の大部分の組み合わせ製剤および協調的治療方法において、式Iのホルボールエステル化合物、または関連もしくは誘導体化合物は、1つ以上の二次または補助治療剤と組み合わせて処方または協調的に投与されて、脳卒中または脳卒中の影響の予防または治療に組み合わせ的に有効な、または協調的に有用な組み合わせ製剤または協調的治療方法を生じる。これに関連して、例示的な組み合わせ製剤および協調的治療方法は、組織プラスミノーゲン活性化因子、抗凝固剤、スタチン、アンギオテンシンII受容体遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、抗血小板剤、フィブレート、遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤から選択される1つ以上の二次または補助治療剤と組み合わせた、式Iのホルボールエステル化合物または式Iのホルボールエステルの誘導体化合物を用いる。例示的な抗凝固剤には、ヘパリン、ワルファリン、ヘパリノイド、フェニンジオン、アトメンチン(*a to men tin*)、アセノクマロール、フェンプロクモン、イドラパリヌクス、フォンダパリヌクス、およびトロンビン阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。例示的なスタチンには、ロバスタチン、アムロジピン、アトルバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、ピタバスタチン、およびプラバスタチンが含まれるが、これらに限定されない。例示的なアンギオテンシンII受容体遮断薬には、カンデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、オルメサルタン、テルミサルタン、およびバルサルタンが含まれるが、これらに限定されない。アンギオテンシン変換酵素阻害剤には、エナゼプリル(*en aze p r i l*)、カプトプリル、エナラプリル、ホシノプリル、イシノプリル(*i s i n o p r i l*)、モエキシプリル、ペリンドプリル、キナプリル、ラミプリル、およびトランドラプリルが含まれるが、これらに限定されない。例示的な遮断薬には、アルプレノロール、ブシンドロール、カルテオロール、カルベジロール、ラベタロール、ナドロール、オクスピレノロール、ベンブトロール、ピンドロールプロプラノロール、ソタロール、チモロール、トチュウ、アセブトロール、アテノロール、ベタキソロール、ビソプロロール、セリプロロール、エスマロール、メトプロロール、およびネビボロールが含まれるが、これらに限定されない。例示的なカルシウムチャネル遮断薬には、アムロジピン、クレビジピン、ジルチアゼム、フェロジピン、イスラジピン、ニフェジピン、ニカルジピン、ニモジピン、ニソルジピン、およびベラパミルが含まれるが、これらに限定されない。例示的な利尿剤には、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ブメタニド、エタクリン酸、フロセミド、アミロライド、エブレレノン、スピロノラクトン、およびトリアムテレンが含まれるが、これらに限定されない。例示的なフィブレートには、ベンザフィブレート(*b e n z a f i b r a t e*)、シプロフィブレート、クロフィブレート、ゲムフィブロジル、またはフェノフィブレートが含まれるが、これらに限定されない。例示的な抗血小板剤には、クロピドグレルおよびチクロピジンが含まれるが、これらに限定されない。

【0054】

協調的治療方法は、ペースメーカー、埋め込み式除細動器、冠動脈ステント、人工弁、冠動脈バイパス術、バルーン血管形成術、弁修復術および置換術、頸動脈内膜剥離術、血管形成術、ステント留置術、開頭術、血管内コイル塞栓術、卵円孔開存閉鎖術、および心臓移植の使用が含まれるが、これらに限定されない外科的介入を更に用いることができる。

【0055】

特定の実施形態において、本発明は、ホルボールエステルと、疾患治療活性を有する1つ以上の補助剤を含む組み合わせ疾患治療（「脳卒中治療」、「抗凝固」、「抗コレステロール血症」、「血管拡張」、「抗高血圧」、「ERKリン酸化の誘発」、「細動脈抵抗の低下」、「静脈容量の増加」、「心臓酸素要求量の低減」、「心拍数の減少」、「心拍

10

20

30

40

50

数の安定化」、または「N F B の調節」) 製剤を提供する。そのような組み合わせ製剤の範囲内において、式 I のホルボールエステルと、疾患治療活性を有する 1 つ以上の補助剤は、単独または組み合わせにより、疾患治療(「脳卒中治療」、「抗凝固」、「抗コレステロール血症」、「血管拡張」、「抗高血圧」、「ERK リン酸化の誘発」、「細動脈抵抗の低下」、「静脈容量の増加」、「心臓酸素要求量の低減」、「心拍数の減少」、「心拍数の安定化」、または「N F B の調節」) 有効量で組み合わせ製剤に存在する。例示的な実施形態において、式 I のホルボールエステル化合物および非ホルボールエステル剤は、それぞれ、疾患治療 / 予防量(すなわち、対象において症状の検出可能な緩和を単独で誘発する単回投与量)により存在する。あるいは、組み合わせ製剤は、式 I のホルボールエステル化合物および非ホルボールエステル剤の一方または両方を治療量以下の単回投与量で含むことができ、ここで両方の薬剤を含む組み合わせ製剤は、疾患、状態、または症状緩和応答を誘発するのに総体的に有効な両方の薬剤の組み合わせ投与量を特徴とする。したがって、式 I のホルボールエステル化合物または式 I のホルボールエステルの誘導体化合物、および非ホルボールエステル剤の一方または両方は、治療量以下の用量で製剤に存在し得る、または協調的投与プロトコールにより投与され得るが、これらは、製剤または方法において総体的に、被験者の疾患、脳卒中の発生もしくは再発、または脳卒中の後遺症の症状に検出可能な減少を誘発する。なおべつの実施形態において、組み合わせ製剤は、1 つ以上の神経保護剤を含むことができる。更なる実施形態において、組み合わせ製剤は、本明細書に記載されている、1 つ以上の抗炎症剤、または他の二次もしくは追加の治療剤を含むことができる。

10

20

【0056】

本発明の協調的投与プロトコールを実施するため、式 I のホルボールエステル化合物または式 I のホルボールエステルの誘導体化合物を、本明細書において考慮される 1 つ以上の二次または補助治療剤と同時または連続して投与することができる。したがって、特定の実施形態において、化合物は、別個の製剤または上記に記載された組み合わせ製剤(すなわち、式 I のホルボールエステル化合物、または関連もしくは誘導体化合物と、非ホルボールエステル治療剤の両方)を使用して、非ホルボールエステル剤、または本明細書において考慮される任意の他の二次もしくは補助治療剤と協調的に投与される。この協調的投与は、同時、またはいずれかの順序により連続的に実施することができ、1 つのみ、または両方(またはすべて)の活性治療剤が個別および / または総体的にこれらの生物学的活性を発揮する間に期間があり得る。

30

【0057】

別の実施形態において、そのような協調的治療方法は、例えば、脳卒中の治療の多様なプロトコールに従うことができる、または多様なプロトコールにより導かれ得る。協調的治療方法は、例えば、脳卒中により引き起こされる損傷の予防または治療のためのホルボールエステルおよび / または治療を含むことができる。すべてのそのような協調的治療方法の特徴的な態様は、式 I のホルボールエステル化合物または式 I のホルボールエステルの誘導体化合物が、相補的な脳卒中予防もしくは治療剤と共に好ましい臨床応答を生じる、または二次もしくは補助治療剤によりもたらされる特徴的な臨床応答を生じる、少なくとも幾つかの活性を発揮することである。多くの場合、式 I のホルボールエステル化合物または式 I のホルボールエステルの誘導体化合物と、二次または補助治療剤との協調的投与は、式 I のホルボールエステル化合物もしくは式 I のホルボールエステルの誘導体化合物、または二次もしくは補助治療剤が単独で投与されたときに誘発される治療効果を超えた、改善された治療または予防結果を対象において生じる。この資質は、直接的な効果と間接的な効果の両方を考慮する。

40

【0058】

例示的な実施形態の範囲内において、式 I のホルボールエステル化合物または式 I のホルボールエステルの誘導体化合物は、1 つ以上の二次脳卒中治療化合物、または他の適応症もしくは補助治療剤、例えば、組織プラスミノーゲン活性化因子、抗凝固剤、スタチン、アンギオテンシン II 受容体遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、フィブリート

50

、遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、脂質低下投薬、抗血小板剤、または利尿剤と協調的に（組み合わせた、または別個の製剤により同時にまたは連續的に）投与される。さらに、ペースメーカー、埋め込み式除細動器、冠動脈ステント、人工弁、人工心臓、冠動脈バイパス術、バルーン血管形成術、弁修復術および置換術、心臓移植、頸動脈内膜剥離術、血管形成術、ステント留置術、開頭術、血管内コイル塞栓術、または卵円孔開存閉鎖術などであるが、これらに限定されない補助または二次療法を、脳卒中または脳卒中の影響に治療に使用することができる。

【0059】

上記に示されたように、本明細書において考慮される本発明の全ての多様な実施形態において、疾患治療方法および製剤は、主題の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、異性体、鏡像異性体、多形体、溶媒和物、水和物、および／またはプロドラッグのいずれかまたは組み合わせを含む、多様な形態のいずれかによる式Iのホルボールエステル化合物を用いることができる。本発明の例示的な実施形態では、TPAが実例的な目的において治療製剤および方法の範囲内で用いられる。

10

【0060】

本発明の薬学的組成物を、これらが意図される治療または予防目的を達成する任意の手段により投与することができる。本発明の組成物の適切な投与経路には、静脈内、筋肉内、腹腔内、脊髄内、鞘内、脳室内、動脈内、皮下、および鼻腔内経路などであるが、これらに限定されない注射方法を含む、従来の経路、装置、および方法が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0061】

本発明の組成物は、用いられる特定の投与様式に適した薬学的に許容される担体を更に含むことができる。本発明の組成物の剤形は、上記に考察された投与単位の調製に適していると製薬技術において認識されている賦形剤を含む。そのような賦形剤には、限定することを意図しないで、結合剤、充填剤、潤滑剤、乳化剤、懸濁剤、甘味料、風味剤、防腐剤、緩衝剤、湿潤剤、崩壊剤、発泡剤、ならびに他の従来の賦形剤および添加剤が含まれる。

【0062】

望ましい場合、本発明の組成物を、親水性徐放ポリマーのような徐放担体の使用により、制御放出形態で投与することができる。これに関連して、例示的な制御放出剤には、約100cps～約100,000cpsの範囲の粘度を有するヒドロキシプロピルメチセルロースまたはコレステロールのような他の生体適合性マトリックスが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0063】

本発明の式Iの幾つかのホルボールエステル組成物は、本発明の多くの他の考慮される組成物と同様に、任意に抗酸化剤、緩衝剤、制菌剤、および／または製剤を哺乳類対象の血液と等張にする溶質を含み得る水性または非水性滅菌注射用液剤、ならびに懸濁剤および／または増粘剤を含み得る水性および非水性滅菌懸濁剤を含む、例えば静脈内、筋肉内、皮下、または腹腔内投与される非経口投与用に設計される。製剤は、単位用量または多回用量容器により提示され得る。本発明の追加の組成物および製剤は、非経口投与後の延長放出のためにポリマーを含むことができる。非経口調合剤は、そのような投与に適した液剤、分散剤、または乳剤であり得る。主題の薬剤を、非経口投与後の延長放出のために、ポリマーに処方することもできる。薬学的に許容される製剤および成分は、典型的には滅菌であるか、または容易に滅菌され、生物学的に不活性であり、容易に投与される。そのようなポリマー材料は、製薬技術の当業者には良く知られている。非経口調合剤は、典型的には、緩衝剤および防腐剤、ならびに水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどのような薬学的および生理学的に許容される注射用流体を含む。本注射用液剤、乳剤、および懸濁剤は、前記の種類の滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製され得る。好ましい単位投与製剤は、活性成分の、本明細書に上述したような1日用量もしくは単位、1日副用量（sub dose）、またはその適切な分画を含有するもの

40

50

である。

【 0 0 6 4 】

より詳細な実施形態において、本発明の組成物は、例えばコアセルベーション技術もしくは界面重合（それぞれ、例えばヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）により調製されたマイクロカプセル、微粒子、または微小球における、コロイド薬剤送達系（例えば、リポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルション、ナノ粒子、およびナノカプセル）における、またはマクロエマルション内における送達のために封入された、式Iのホルボールエステル化合物または式Iのホルボールエステルの誘導体化合物を含むことができる。

【 0 0 6 5 】

上記に示されているように、特定の実施形態において、本発明の方法および組成物は、薬学的に許容される塩、例えば、式Iの上記に記載されたホルボールエステル化合物および/または関連若しくは誘導体化合物の酸付加塩または塩基塩を用いることができる。薬学的に許容される付加塩の例には、無機および有機酸付加塩が含まれる。適切な酸付加塩は、非毒性塩を形成する酸、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、硝酸塩、リン酸塩、およびリン酸水素塩から形成される。追加の薬学的に許容される塩には、ナトリウム塩、カリウム塩、セシウム塩などの金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシリニアミン塩、N,N-ジベンジルエチレンジアミン塩などの有機アミン塩、酢酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、マンデル酸塩、酢酸塩、ジクロロ酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、シュウ酸塩、およびギ酸塩のような有機酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、およびp-トルエンスルホン酸塩のようなスルホン酸塩、ならびにアルギン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩のようなアミノ酸塩、酒石酸塩、およびグルコン酸塩が含まれるが、これらに限定されない。適切な塩基塩は、非毒性塩を形成する塩基、例えば、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、亜鉛、およびジエタノールアミンの塩から形成される。

【 0 0 6 6 】

本発明の他の詳細な実施形態、方法、および組成物は、式Iのホルボールエステルのプロドラッグを用いる。プロドラッグは、活性親薬剤をインビボで放出する任意の共有結合担体であると考慮される。本発明の範囲内において有用なプロドラッグの例には、置換基のヒドロキシルアルキルまたはアミノアルキルとのエステルまたはアミドが含まれ、これらは、上記に記載された化合物を無水コハク酸のような無水物と反応させることによって調製され得る。

【 0 0 6 7 】

本明細書に開示されている発明は、式Iのホルボールエステルの代謝産物をインビボで使用する（主題前駆体化合物の投与後にインビボで生成される、または代謝産物それ自体の形態で直接投与される）、前記化合物を含む方法および組成物を包含することも理解される。そのような産物は、例えば、主に酵素プロセスに起因して、投与された化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化などによりもたらされ得る。したがって、本発明は、式Iのホルボールエステル化合物を、その代謝産物を生じるのに十分な時間にわたって哺乳類対象と接触させることを含む方法によって生成される化合物を用いる、本発明の方法および組成物を含む。そのような産物は、典型的には、本発明の放射標識化合物を調製し、ラット、マウス、モルモット、サル、またはヒトなどの動物に検出可能な用量で非経口投与し、代謝が生じるのに十分な時間を与え、尿、血液、または他の生物学的試料から変換産物を単離することによって特定される。

【 0 0 6 8 】

本明細書に開示されている発明は、標識した（例えば、同位体標識した、蛍光標識した、そうでなければ従来の方法を使用して標識化合物の検出を可能にするように標識した）式Iのホルボールエステル化合物を、脳卒中の1つ以上の症状の危険性のある、または症

10

20

30

40

50

状を提示している哺乳類対象（例えば、細胞、組織、臓器、または個体）と接触させ、その後、広範囲の既知のアッセイおよび標識／検出方法のいずれかを使用して標識化合物の存在、場所、代謝、および／または結合状態を検出することを含む、哺乳類対象において、脳卒中が含まれるが、これに限定されない疾患の危険レベル、存在、重篤度、または治療指標を診断する、そうでなければ管理するための診断組成物を包含することも理解される。例示的な実施形態において、式Iのホルボールエステル化合物は、1個以上の原子が、異なる原子質量または質量数を有する原子に置き換えられることにより同位体標識される。開示されている化合物に組み込まれ得る同位体の例には、それぞれ、²H、³H、¹₃C、¹₄C、¹₅N、¹₈O、¹₇O、³₁P、³₂P、³₅S、¹₈F、および³₆Cのような水素、炭素、窒素、酸素、リン、フッ素、および塩素の同位体が含まれる。
10 次に同位体標識化合物を、個体または他の対象に投与し、その後、上記に記載されたように検出して、従来の技術によって有用な診断および／または治療管理データが得られる。

【実施例】

【0069】

下記に記載されている実験は、脳卒中治療および予防薬剤としてのホルボールエステルおよび誘導体化合物の新規で強力な用途を実証する。これらおよび追加の知見は、以下の実施例の範囲内で更に展開および解明される。

【0070】

実施例I

S180細胞が注射されたマウスにおける末梢白血球(WBC)およびヘモグロビン(Hb)に対するTPAの効果

肉腫180(S180)細胞をKwenn-Mingマウスに注射した。3日目には、マウスにTPAを50、100、または200μg/kg/日により7日間にわたって腹腔内に与えた。処理が完了した2日後、血液試料をWBCおよびHb分析のために治療マウスの尾から採取した。治療群(50、100、または200μg/kg/日を7日間)のWBCカウントは、それぞれ、16.1±7.4、18.7±3.0、および20.7±3.4×10⁹/Lであり、対照群のWBCカウントは、13.6±1.8×10⁹/Lであった。治療群のHbは、136±11、149±12、および149±10g/Lであり、対照群のHbは、134±15g/Lであった。結果は、TPAの腹腔内注射がマウスにおける抹消WBCカウントを用量依存的に増加し得るが、Hbレベルは、対照マウスと比較したとき、TPA治療マウスにおいて大きく影響を受けなかったことを示す。
30

【0071】

実施例II

用量範囲研究

TPA適用により引き起こされる強い局所刺激に起因して、TPAを静脈内注入により患者に与えた。滅菌シリンジ中のTPA液剤を、200mlの滅菌食塩水の中に注入し、静脈内注入のために十分に混合した。

【0072】

臨床的に投与された異なるTPA用量の毒性および副作用：

【0073】

(1) 1mg/患者/週で与えられたTPA：

【0074】

溶液中1mgのTPAを静脈内注入のために200mlの滅菌食塩水と十分に混合し、これは、16μg/分の速度により1時間で完了した。TPA投与の1時間後、患者は悪寒を感じ始め、これは30分間続き、続いて軽度から重度の発汗を伴って発熱した(患者の体温は、37.5~39.5に達し、これは3~5時間続いてから、正常に戻った)。上記の症状は、患者にグルココルチコイドを与えると緩和させることができた。この用量のTPAは、少数の患者の出血を引き起こし、数人の患者は、短期間にわたって呼吸困難に苦しみ、Hbが尿の中に検出された。しかし、これらの副作用は短期間であり、可逆的であった。心臓、肝臓、腎臓、および肺機能は、全て正常であることが見出された。
50

【0075】

(2) 0.5 mg / 患者 × 2 / 週で与えられた TPA : (1週間に2用量)

【0076】

溶液中 0.5 mg の TPA を静脈内注入のために 200 ml の食塩水と十分に混合し、これは、8 µg / 分の速度により 1 時間で完了した。投与後の反応は、1 mg の TPA 投与量と類似していたが、1 mg 用量よりも程度が少なかった。患者は、低用量をより容易に耐容した。時々、Hb が患者の尿の中に検出された。呼吸困難は観察されなかった。心臓、肝臓、腎臓、および肺機能は、全て正常であった。

【0077】

(3) 0.25 mg / 患者 × 4 / 週で与えられた TPA :

10

【0078】

溶液中 0.25 mg の TPA を静脈内注入のために 200 ml の食塩水と十分に混合し、これは、4 µg / 分の速度により 1 時間で完了した。投与の後、悪寒および発熱のような症状も観察されたが、より高い投与量のときよりも程度ははるかに少なかった。Hb は尿中に検出されず、呼吸困難に苦しんだ患者はいなかった。心臓、肝臓、腎臓、および肺機能は、全て正常であった。

【0079】

実施例 IIITPA による再発性 / 難治性悪性腫瘍の治療

組織学的に確認されている再発性 / 難治性血液悪性腫瘍 / 骨髄障害を有する患者を、TPA (Xichuan Pharmaceuticals, Nan Yang, Henan, China)、デキサメタゾン、およびトリサルチル酸コリンマグネシウム (choline magnesium trisalicylate) の組み合わせにより治療する。急性骨髓性白血病 (AML) の治療における TPA の治療用途を実証するために下記に記載された同等の方法を適用して、他の新生物状態および悪性腫瘍を治療する TPA の用途を実証する。本明細書の特定のプロトコールに加えて、治療および / または寛解の成功は、多種多様な周知の癌検出および評価方法を使用して、例えば、固体腫瘍のサイズ低減を決定すること、腫瘍の増殖、段階、転移能、組織学的癌マーカーの存在 / 発現レベルを評価する組織学的研究などにより異なる標的新生物および悪性状態において決定される。

20

【0080】

AML は、緊急および集中療法が一般に認められる侵襲性の疾患である。AML が診断される平均的な患者の年齢は、64 ~ 68 歳であり、標準的な化学療法により治療された 60 歳を超える患者は、その年代の < 20 % が疾患を完治している。先行する血液障害または以前からの白血病誘発性化学療法 / 放射線療法の後に AML を発生した患者は、その疾患が特定の有害な細胞遺伝学的および臨床的特徴に関連する患者と類似して不十分な結果を有する。したがって、AML を診断された大部分の患者は、極めて不十分な予後に関連する患者である、および / または疾患関連特徴を有する。再発性の疾患を有する患者では、治癒する能力を実証した標準的な非移植療法はない。これらの患者では、AML は多くの場合に致死的疾患である。AML の療法に対する新たな手法が必要である。

30

【0081】

本発明の方法および組成物を用いることにより、TPA は、TPA の細胞内シグナル経路の調節における新規な役割、細胞株に分化および / またはアポトーシスを誘発するその能力、ならびに新生物および骨髓性悪性腫瘍を含む悪性障害を治療する TPA の有効性を示す臨床データに基づいて、AML の患者を治療する治療剤として開発されている。

40

【0082】

今まで、TPA の臨床評価は、TPA が、細胞生存率およびアポトーシスアッセイにより測定して少なくとも AML 症例の部分集団に直接的な治療細胞毒性作用を及ぼすことを示している。ウエスタン分析により分析された全ての初代培養物において、TPA は 1 時間で培養物に ERK リン酸化を強く発揮した。初代 AML 細胞に対する TPA の細胞毒性

50

作用は、24時間のエキソビオ曝露後に続くホスホERK生存促進シグナルの損失と関連する。この観察は、PD98059、U0126、およびPD184352のようなMEK阻害剤によるERKシグナル伝達の薬理学的遮断の後の初代AML生存の減少を報告した他の研究と良好に一致する。本発明者たちの研究では、ERKシグナル伝達の損失は、ERKホスファターゼの誘発に関連する。

【0083】

タンパク質キナーゼCおよびERK活性化に加えて、TPAは、多くの場合にAML芽球および白血病幹細胞において構成的に活性である生存促進転写因子であるNF-Bの既知の誘発因子である。本発明者たちの研究室における最近の研究は、AML細胞のNF-Bが、デキサメタゾン+トリサルチル酸コリンマグネシウム(CMT)による48時間の治療によりインピボで阻害され得ることを実証している。さらに、本発明者たちは、デキサメタゾンが、MKP-1ERKホスファターゼの発現を誘発し得ること、および初代AML試料に対するTPA細胞毒性を増強し得ることを示している。これに関連して、本発明者たちは、下記の例示的な実施形態において、TPAによる治療の24時間前および24時間後に使用される補助薬物療法としてデキサメタゾンおよびCMTを使用することを選択した。これらの薬物療法は、十分に耐容され、治療の炎症性有害作用を低減すること、およびERKホスファターゼ発現を増加し、NF-Bを阻害してTPA細胞毒性を増強することが予測される。加えて、デキサメタゾンおよびCMTは、これらが、構成的NF-B発現の抗アポトーシス作用の阻害により、およびシグナル伝達経路活性を減少するホスファターゼの誘発により、抗炎症性であり、有害な作用を改善し得、且つ抗白血病活性を増強し得るので、補助薬物療法として使用される。10

【0084】

初期TPA第1相研究に35人の患者が登録した[23人は、再発性/難治性AMLを有し、2人は他の骨髄性悪性腫瘍(CML急性転化、過剰な芽球を有する骨髄形成異常症)、3人は、ホジキン病を有し、3人は、非ホジキンリンパ腫を有し、4人は、固形腫瘍を有した]。大多数の患者は、再発性/難治性AMLを有した。本発明者たちの臨床結果は、安定した疾患を5か月間を超えて有し、8回のTPA注入を受けた1人のAML患者を含む。第2のAML患者では、循環芽球の数に顕著(5倍)な低下がTPA投与の後に見られた。白血病芽球におけるこの低下は4週間続き、患者は、最終的に真菌感染により死亡した。最後に、再発性および難治性ホジキン病を有する患者は、自家幹細胞救出による高用量化学療法にもかかわらず、TPA投与の後に胸壁質量に部分的な寛解を有した。TPA用量増加は、0.188mg/m²の用量で1~5日、8~12日まで治療された3人の患者のうち2人が第I-II級非血液学的用量制限毒性(DLT)を経験した最後のコホートにおいて完了し、最大耐容TPA用量を単一薬剤として1~5日および8~12日で0.125mg/m²/日と確立した。30

【0085】

AMLおよび他の血液悪性腫瘍の場合では、患者には、6時間にわたる連続的/間欠的なパルス酸素計測法により投与される1mg/週×3週間(1、8、15日目)のTPAの初回用量を与える。TPA療法を開始する24時間前に、患者には、10mgのデキサメタゾンを6時間毎に与え、1500mgのトリサルチル酸コリンマグネシウム(CMT)を、TPA投与の24時間後まで8時間毎に連続して与える。初回用量のTPAを投与した後、患者は2週間の安静期間を有し、その後に再評価され得る。初回用量のTPAによる疾患応答または安定化を有する患者は、下記のプロトコールに従って、28日間の6サイクルまで治療される。40

【0086】

2週間の安静期間の後、患者は、TPA投与の30分前に650mgのタイレノールおよび25~50mg(患者のサイズおよび年齢に応じて決まる)のベナドリルにより予備薬物治療される。次に、彼らには中心静脈カテーテルによるTPAの静脈内注入を、1週間あたり5日間で2週間続けて毎日与え、その後2週間の安静期間を与える。TPAは、200mlの通常の食塩水中の1mgの用量を1時間かけて投与する。TPA療法を開始50

する 24 時間前に、患者には、10 mg のデキサメタゾンを 6 時間毎に与え、1500 mg のトリアルチル酸コリンマグネシウムを、TPA 投与の 24 時間後まで 8 時間毎に連続して与える。

【0087】

TPA の血中レベルを、有機溶媒抽出分化活性を測定するバイオアッセイの使用により、注入の前および後で測定する。1 ml の血液を 5 ml の酢酸エチルにより 2 回抽出し、抽出残渣を 50 µL のエタノールに再溶解し、アリコートの HL60 細胞を加える。48 時間後、接着細胞を測定する。

【0088】

試験は、TPA の注入の前および後に採取した血液試料においても実施して、白血球、血小板、および好中球のレベルを決定する。試料を、骨髄芽球およびアウエル小体の存在について追加的に分析する。これらおよび継続実験は、AML、ならびに他の新生物および悪性状態における新生物細胞に対して TPA が誘発する治療細胞毒性および他の作用を更に解明する。

【0089】

実施例 IV

E R K 活性化に対する調節の測定

ホスホ E R K レベルを、白血病の患者における循環悪性細胞およびリンパ腫 / 固形腫瘍の患者における末梢血単核球において測定する。血液試料を、実施例 III のプロトコールに従って治療された患者から、TPA 投与の前および後の両方で採取する。

【0090】

WBC が 1 µLあたり 1000 個以上である白血病患者において、フローサイトメトリーを、蛍光体 (BD Biosciences, San Jose, CA) に直接結合した細胞表面抗原特異的およびホスホ E R K 特異的抗体の使用により、血液試料において実施する。試料を、実施例 III のプロトコールによる初回治療の 1、2、および 11 日目、ならびに続くサイクルの 1 および 11 日目に TPA の投与前および TPA 注入の 1 時間後に採取する。絶対白血病芽球数の 1 µLあたり 2500 個以上を有する白血病の患者および他の非白血病の患者において、末梢血試料を、注入の前、ならびに 1 および 4 時間後に、実施例 III のプロトコールによる初回サイクルの 1、8、および 15 日目に採取する。また試料を、リン光体 E R K によるウエスタンプロット分析を使用し、フローサイトメトリーにより得られ、臨床応答と相關する結果を確認した総 E R K 1 / 2 レベルを使用して、分析した。

【0091】

前述の分析は、初代 AML 細胞により例示されている悪性細胞に対する TPA の細胞毒性作用、およびリン光 E R K 生存促進シグナルの TPA による関連する低減を含む、新生物および悪性状態の治療における TPA の役割を更に解明する。

【0092】

実施例 V

N F - B 調節の測定

前の研究において、本発明者たちは、N F - B 活性が、TPA とデキサメタゾンの投与後に患者において調節され得ることを示した。さらに、デキサメタゾンは、M K P - 1 E R K ホスファターゼ発現を誘発し、TPA 細胞毒性を増強することが示されている。以下の研究は、N F - B 活性が、TPA とデキサメタゾンにより治療された患者においてどのように治療的に調節されるかを更に解明するように設計されている。

【0093】

N F - B 結合は、ELISA に基づいたアッセイ (BD Bioscience, San Jose, USA) を使用して、患者末梢血試料のベースライン、ならびに実施例 III に従って TPA により治療された患者の注入前および後で測定する。N F - B レベルは、96 ウエルフォーマットの使用による細胞抽出物の限定量の結合を検出する化学発光強度を使用して定量化する。さらに、電気泳動移動度シフトアッセイを実施して、1

10

20

30

40

50

μL あたり2500個以上の絶対白血病芽球数を有する白血病患者および正常な白血球細胞カウントを有する非白血病患者からの末梢血試料における、NF-B結合を測定する。

【0094】

前述の研究は、TPAがNF-Bの誘発因子であることを更に示しているが、これらの実験は、AML細胞のNF-Bがデキサメタゾンおよびトリサルチル酸コリンマグネシウムによる治療で阻害され得ることを実証する。

【0095】

実施例V I

脳卒中に罹患した個体の治療

10

患者N.C.、男性、68歳は、TPAによる治療の18か月前に脳卒中を罹患した。TPA治療が開始された時点では、彼は杖なしでは歩行することができず、左手および左足の両方に困難を有し、疲労し、弱っていた。彼は、0.19mgのTPA(0.125mg/m²)を含有する1つのアンプル剤の注射を1日おきに4週間、次に、0.24mgのTPA(1.25×0.125mg/m²)を1日おきに2週間、次に0.26mgのTPA(1.5×0.125mg/m²)を1日おきに更に3週間、受けた。患者は完全に回復した。

【0096】

患者M.C.、男性、65歳は、TPAによる治療が開始される7年前に脳卒中を罹患した。彼は、0.19mgのTPA(0.125mg/m²)の1週間あたり3~4回の注入を10週間にわたって受け、合計で35回の注入を受けた。彼は、顔面の可動性を回復し、右側の可動性に80%の改善を有した。

20

【0097】

実施例V II

TPAによる塞栓性脳卒中モデルの治療

それぞれ280~350gの体重を有する雄Sprague-Dawleyラット(Charles River, Japan)を使用する。塞栓性脳卒中を、Kudoら(1982)による方法の変更に従って誘発する。血液の収集に使用されるラットに、自発呼吸させながら、1.0%のハロタン(Fluorothane(商標); Takeda, Osaka, Japan)で麻酔をかける。24ゲージSurfflo(商標)(Terumo Medical Products, Elkton, MD)を大腿動脈に固定し、0.1mLの動脈血を1mLの注射用シリンドリ(Terumo Medical Products, Elkton, MD)により採取する。シリンドリ中の動脈血を、30で2日間インキュベートして、血餅を形成する。その後、0.1mLの生理食塩水を注射用シリンドリに加え、26ゲージ注射針(Terumo Medical Products, Elkton, MD)に2回通過させて、血餅を粉碎する。

30

【0098】

大脳塞栓性脳卒中が誘発されるラットに、自発呼吸させながら、1.0%のハロタンで麻酔をかける。ラットの頸部を正中切開し、外頸動脈、上甲状腺動脈、後頭動脈、および翼口蓋動脈を双極凝固器(T-45; Keisei Medical Industrial Co. Ltd, Tokyo, Japan)により焼灼する。大脳塞栓症を、0.1mLの破碎された血餅を内頸動脈に注入することにより誘発する。

40

【0099】

大脳塞栓症の形成の評価は、レーザードップラー流速測定法(Floc1; Omega wave, Tokyo, Japan)を使用して実施する。30%未満のレベルまでの脳血流の減少を、塞栓形成の肯定的な証拠とする。脳血流は、血餅の注入の30分後にモニターし、血流は、血餅の注入前の50%以下の流量が残っているようにモニターする。その後、医薬の投与用のカニューレ(PE50)を、頸静脈に固定し、動物を目覚めさせる。

【0100】

50

大脳塞栓症の形成の成功したラットを4つの群に分ける。ラットの第1群には食塩水注射を1日おきに与える。第2~4群には、 0.125 mg/m^2 のTPAの注射を1日おきに4週間にわたって与える。次に第2群を殺処分する。第3~4群には、更に 0.156 mg/m^2 のTPAの注射を1日おきに2週間にわたって与え、次に第3群を殺処分する。第4群には、 0.18775 mg/m^2 のTPAの注射を1日おきに3週間にわたって与え、次に殺処分する。

【0101】

動物を殺処分した後に脳を切除し、McIwain組織細断機(Micckle Lab oratory Engineering, U.K.)を使用して1mm間隔で10枚の切片に薄切りし、2%のTTC(2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド; Tokyo Kasei)に37で20分間浸けることにより染色する。TTC染色切片の画像をデジタルカメラ(HC-2500; Fuji Photo Film)およびPhotograb-2500(Fuji Photo Film)の使用によりコンピューターにアップロードし、梗塞体積を、Mac Scope(Mitani, Japan)の使用により計算する。梗塞体積は、平均値±標準偏差により与えられる。梗塞体積の結果の統計的検定に関して、評価は、対照群および対照群と比較したTPA投与群のそれぞれにダネット検定を実施し、次にTPA投与群にt検定を実施することによって行う。

【0102】

神経症状は、殺処分されるまで毎日観察し、ラットは、3つの検定に従って評価する。(1)ラットを尾により穩やかに保持し、床の上方1メートルに吊し、前肢の屈曲を観察する。(2)ラットを、鉤爪により堅く掴むことができる大型の軟らかいプラスチック被覆紙に上に置く。手により尾を保持することにより、前肢が数インチ移動するまで、穩やかな側圧がラットの肩部に適用される。(3)ラットを、自由に動き回らせて、旋回行動を観察する。神経症状のスコア付けは、Bedersonら(1986)により開発されたスコアに従って実施され、以下の通りである。0 観察される欠陥なし、1 前肢の屈曲、2 旋回することなく、側面押しに対して抵抗が減少する、3 等級2と同じ行動であるが、旋回する。

【0103】

神経症状は、対照群および対照群と比較したTPA投与群のそれぞれにスチール検定を使用して評価し、次にTPA投与群にウィルコクソン検定を実施して評価する。いずれの評価においても、 $p < 0.05$ の値が統計的に有意であると定義される。

【0104】

実施例VIII

永続的な中大脳動脈閉塞モデルを使用する脳卒中の治療におけるTPAの有効性

雄Wistar(250~320g)をこの研究に使用する。動物にイソフルラン(3%で導入、1~2%で維持)により麻酔をかける。麻酔は、足指のピンチによりモニターする。無菌技術をこの研究の全ての手順において使用する。手術部位をクリップで挟み、アルコールおよび手術用スクラップで洗浄する。動物を温水加熱パッドに置いて、体温を維持させる。正中傍切開を、頸動脈にわたって頸部に行う。組織を鈍的切開して、頸動脈および分岐点を露出させる。縫合糸を、近位部または総頸動脈および外頸動脈の周りに設置する。これらの縫合糸を結ぶ。切開を結紮の遠位にある総頸動脈に行う。予め調製したフィラメント(4-0モノフィラメント縫合糸または同様の材料)を動脈に設置し、内頸動脈に進める。フィラメントを、頸動脈分岐点を約20mm超えて、中大脳動脈の中に押し込むように僅かな抵抗を感じるまで進める。フィラメントの挿入の際に動脈を破裂させないように注意しなければならない。フィラメントをその場に結び、皮膚切開を閉じる。動物を、目覚めたときに、閉塞の成功についてBedersonスケールの使用により評価する。(Bederson et al., (1986) Stroke, 17: 1304-1308を参照すること。)体温は、15分毎に取って、正常体温を維持する。中大脳動脈閉塞術を受けた動物は、手術の数時間後に体温調節に困難を有し得る。動物を体温によって冷却または加熱ボックスの中に置く。体温は、37.5に維持する。動物を中大

10

20

30

40

50

脳動脈後の 6 時間にわたってモニターし、次にケージに一晩置く。

【0105】

ラットを 4 群に分ける。ラットの第 1 群には食塩水注射を 1 日おきに与える。第 2 ~ 4 群には、 $0.125 \text{ mg} / \text{m}^2$ の TPA の注射を 1 日おきに 4 週間にわたって与える。次に第 2 群を殺処分する。第 3 ~ 4 群には、更に $0.156 \text{ mg} / \text{m}^2$ の TPA の注射を 1 日おきに 2 週間にわたって与え、次に第 3 群を殺処分する。第 4 群には、 $0.18775 \text{ mg} / \text{m}^2$ の TPA の注射を 1 日おきに 3 週間にわたって与え、次に殺処分する。

【0106】

動物を殺処分した後に脳を切除し、McIwain 組織細断機 (Mickie Lab oratory Engineering, U.K.) を使用して 1mm 間隔で 10 枚の切片に薄切りし、2% の TTC (2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド; Tokyo Kasei) に 37 度 20 分間浸けることにより染色する。TTC 染色切片の画像をデジタルカメラ (HC-2500; Fujifilm Photofilm) および Phatograb-2500 (Fujifilm Photo Film) の使用によりコンピューターにアップロードする。脳切片を撮影し、梗塞の大きさ、梗塞の体積、境界域、および浮腫について分析する。

10

【0107】

神経症状を、殺処分するまで毎日観察する。神経症状は、殺処分されるまで毎日観察し、ラットは、3 つの検定に従って評価する。(1) ラットを尾により穩やかに保持し、床の上方 1 メートルに吊し、前肢の屈曲を観察する。(2) ラットを、鉤爪により堅く掴むことができる大型の軟らかいプラスチック被覆紙に上に置く。手により尾を保持することにより、前肢が数インチ移動するまで、穩やかな側圧がラットの肩部に適用される。(3) ラットを、自由に動き回らせて、旋回行動を観察する。神経症状のスコア付けは、Bederson ら (1986) により開発されたスコアに従って実施され、以下の通りである。0 観察される欠陥なし、1 前肢の屈曲、2 旋回することなく、側面押しに対し抵抗が減少する、3 等級 2 と同じ行動であるが、旋回する。

20

【0108】

神経症状は、対照群および対照群と比較した TPA 投与群のそれぞれにスチール検定を使用して評価し、次に TPA 投与群にウィルコクソン検定を実施して評価する。いずれの評価においても、 $p < 0.05$ の値が統計的に有意であると定義される。

30

【0109】

実施例 IX

一時的な中大脳動脈閉塞モデルを使用する脳卒中の治療における TPA の有効性

雄 C57BL/6 マウス (25 ~ 30 g) をこの研究に使用する。マウスにイソフルラン (3% で導入、1 ~ 2% で維持) により麻酔をかける。手術部位をクリップで挟み、アルコールおよび手術用スクラップで洗浄する。正中頸部切開を、頸動脈にわたって行い、動脈をその分岐点まで切開する。モノフィラメント縫合糸を内頸動脈に導入し、中大脳動脈に留まるまで進める。縫合糸をその場に結び、切開を閉じる。閉塞の 2 時間後、マウスに再び麻酔をかけ、縫合糸を中大脳動脈 (MCA) から取り外す。体温は、手術の間および後の両方において、加熱パッドの使用により維持する。動物を中大脳動脈閉塞後の 4 時間にわたってモニターする。

40

【0110】

ラットを 4 群に分ける。ラットの第 1 群には食塩水注射を 1 日おきに与える。第 2 ~ 4 群には、 $0.125 \text{ mg} / \text{m}^2$ の TPA の注射を 1 日おきに 4 週間にわたって与える。次に第 2 群を殺処分する。第 3 ~ 4 群には、更に $0.156 \text{ mg} / \text{m}^2$ の TPA の注射を 1 日おきに 2 週間にわたって与え、次に第 3 群を殺処分する。第 4 群には、 $0.18775 \text{ mg} / \text{m}^2$ の TPA の注射を 1 日おきに 3 週間にわたって与え、次に殺処分する。

【0111】

動物を殺処分した後に脳を切除し、McIwain 組織細断機 (Mickie Lab oratory Engineering, U.K.) を使用して 1mm 間隔で 10 枚の

50

切片に薄切りし、2%のTTC(2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド; Tokyo Kasei)に37で20分間浸けることにより染色する。TTC染色切片の画像をデジタルカメラ(HC-2500; Fujifilm Photo Film)およびPhotographab-2500(Fujifilm Photo Film)の使用によりコンピューターにアップロードする。脳切片を撮影し、梗塞の大きさ、梗塞の体積、境界域、および浮腫について分析する。

【0112】

神経症状は、殺処分されるまで毎日観察し、ラットは、3つの検定に従って評価する。
(1) ラットを尾により穏やかに保持し、床の上方1メートルに吊し、前肢の屈曲を観察する。
(2) ラットを、鉤爪により強く掴むことができる大型の軟らかいプラスチック被覆紙に上に置く。手により尾を保持することにより、前肢が数インチ移動するまで、穏やかな側圧がラットの肩部に適用される。
(3) ラットを、自由に動き回らせて、旋回行動を観察する。神経症状のスコア付けは、Bedersonら(1986)により開発されたスコアに従って実施され、以下の通りである。0 観察される欠陥なし、1 前肢の屈曲、2 旋回することなく、側面押しに対して抵抗が減少する、3 等級2と同じ行動であるが、旋回する。

【0113】

神経症状は、対照群および対照群と比較したTPA投与群のそれぞれにスチール検定を使用して評価し、次にTPA投与群にウィルコクソン検定を実施して評価する。いずれの評価においても、 $p < 0.05$ の値が統計的に有意であると定義される。

【0114】

実施例X

脳卒中を治療するTPAの使用における臨床有効性

1か月未満の前に脳卒中を罹患した年齢が30~72歳の男性および女性が、TPAの10週間試験に参加するように動員される。

【0115】

動員された個人は、インフォームドコンセントのフォームに署名し、コンピューター断層撮影法(CT)、身体的および神経学的試験、神経学的検査、鎮静レベル、国立衛生研究所の脳卒中アンケート(NIHSS)、12誘導心電図、心電図の遠隔測定、パルス酸素測定、生命徵候、体重、患者の背景、妊娠検査、尿中の医薬の測定、血液学的検査、凝固パネル、一般的臨床検査、尿検査を使用して評価される。臨床検査には、完全代謝パネル(Na、K、Cl、CO₂、Glucose、BUN、Cr、Ca、TP、Alb、TBilir、AP、AST、ALT)、血液学CBC(Hgb、Hct、RBC、WBC、Plt、Diff)、および全ての女性のための血清hCGが含まれる。

【0116】

個人には、0.125mg/m²のTPAまたはプラセボを1日おきに4週間にわたって、次に1.25×0.125mg/m²またはプラセボを1日おきに5週目と6週目に、1.5×0.125mg/m²またはプラセボを1日おきに7週目から9週目に投与する。個人を、TPAまたはプラセボの投与中および投与後の2時間にわたってモニターする。

【0117】

第5および10週目に、対象を、NIHSS(NIH脳卒中スケール)、Barthel ADL指数(Granger, 1979)、および改変Rankinスケール(Farrell, 1991)の使用により評価する。

【0118】

有効性は、プラセボと比較した、TPAにより治療された個人におけるNIHSSのベースラインからの変化を測定することによって決定される。二次効能変数は、Barthel ADL指数および改変Rankinスケールである。安全性の測定がまとめられ、試験の全体にわたって評価され、特に訪問時のベースラインから5週目までの変化の測定が評価される。これらの測定には、有害事象の報告、身体検査、生命徵候、体重測定値、

10

20

30

40

50

ECG、臨床検査の結果、および生命徵候、ならびに自殺行動および／または觀念化が含まれる。有害事象は、研究薬剤と因果関係があるかにかかわらず、研究薬剤が投与された対象に生じる任意の都合の悪い医療事象である。したがって、有害事象は、研究薬剤と関連すると考慮されるかにかかわらず、研究薬剤と一時的に関連する任意の好ましくない、または意図されない徵候（例えば、異常な検査所見）、症状、または障害であり得る。

【0119】

対象は、全ての訪問を完了すると、研究を完了したと考慮される。組み入れ／除外規準を満たすことに失敗する、有害事象に苦しむ、不十分な治療応答を有する、同意書を取り消す、プロトコールに違反する、来院を止める、または死亡する場合に、研究が終了になり得る。

10

【0120】

参考文献

- Altuwaijri S, Lin H K, Chuang K H, Lin W J, Yeh S, Hanchett L A, Rahman M M, Kang H Y, Tsai M Y, Zhang Y, Yang L, and Chang C. Interruption of nuclear factor kappaB signaling by the androgen receptor facilitates 12-O-tetradecanoylphorbol acetate-induced apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Res* 2003; 63: 7106-12.
- Ando I., Crawford D. H. et al. Phorbol ester-induced expression and function of the interleukin 2 receptor in human B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 15(4), 341-4 (1985).
- Aye M. T., Dunne J. V. Opposing effects of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate on human myeloid and lymphoid cell proliferation. *J Cell Physiol*. 114(2), 209-14 (1983).
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986; 17: 472-476.
- Boutwell R.K. Biochemical mechanism of tumor promotion, in mechanisms of tumor promotion and co-carcinogenesis. Eds. Slaga, T.J., Sivak, A.J. and Boutwell, R.K. Raven, New York, 49-58 (1978).
- Boutwell R.K. The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. CRC Crit. Rev. Toxicol 2, 419-443 (1974).
- Brose N, Rosenmund C. Move over protein kinase C, you've got company: alternative effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci*; 115: 4399-411 (2002).
- Cancer Chemother Pharmacol*. Jun; 57(6): 78 (2001).

20

30

40

50

9 - 9 5 (2 0 0 6) .

- Cui X X , Chang R L , Zheng X , Woodward D , Strair R , and Conney A H . A sensitive bioassay for measuring blood levels of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients: preliminary pharmacokinetic studies . Oncol Res 2002 ; 13 : 169 - 74 .
- Deegan M. J. , Maeda k . Differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells after in vitro treatment with Epstein-Barr virus or phorbol ester . Immunologic and morphologic studies . Am J Hematol . 17 (4) , 335 - 47 (1984) .
- Falcioni F. , Rautmann A. et al . Influence of TPA (12 - O - tetradodecanoyl - phorbol - 13 - acetate) on human B lymphocyte function . Clin Exp Immunol . 62 (3) , 163 - 2 (1985) .
- Farrell B , Godwin J , Richards S , Warlow C , et al . (1991) . "The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial : final results . " J Neurol Neurosurg Psychiatry 54 (12) : 1044 - 1054 .
- Forbes I. J. , Zalewski P. D. , Letarte M . Human B-lymphocyte maturation sequence revealed by TPA-induced differentiation of leukaemi cells . Immunobiology 163 (1) , 1 - 6 (1982) .
- Gunjan Goel , Harinder P. S. Makkar , George Francis , and Klaus Becker . Phorbol Esters : Structure , Biological Activity , and Toxicity in Animals . International Journal of Toxicology , 26 : 279 - 288 , 2007 . Gogusev J. , Barbey S. , Nezelof C . Regulation of TNF-alpha and IL-1 gene expression during TPA-induced differentiation of "Malignant histiocytosis" DEL cell line t(5:6) (q35:P21) . Anticancer Res . 16 (1) , 455 - 60 (1996) .
- Granger CV , Devis LS , Peters MC , Sherwood CC , Barrett JE . Stroke rehabilitation : analysis of repeated Barthel Index measures . Arch Phys Med Rehabil . 1979 ; 60 : 14 - 17 .
- Han Z T , Zhu X X , Yang R Y , Sun J Z , Tian G F , Liu X J , Cao G S , Newmark H L , Conney A H , and Chang R L . Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies 50

- on therapeutic efficacy and toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 5357-61.
- Han Z. T., Tong Y. K., He L. M., Zhang Y., Sun J. Z., Wang T. Y., Zhang H., Cui Y. L., Newmark H. L., Conney A. H., Chang R. L. 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) - induced increase in depressed white blood cell counts in patients treated with cytotoxic cancer chemotherapy drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 5363-5365 (1998). 10
- Han Z.T., Zhu X. X., Yang R. Y., Sun J. Z., Tian G. F., Liu X. J., Cao G. S., Newmark H. L., Conney A. H., and Chang R. L. Effect of intravenous infusion of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 5357-5361 (1998). 20
- Harada S. et al.: Tumor Promoter, TPA, Enhances Replication of HTLV-III/LAV. Virology 154, 249-258 (1986).
- Hecker E. In handbuch der allgemeinen pathologie, ed. Grundmann, E. (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Vol. IV 16, 651-676 (1975)).
- Hecker E. Structure - activity relationships in diterpene esters irritant and co-carcinogenic to mouse skin, in mechanisms of tumor promotion and co-carcinogenesis. Eds. Slaga, T. J., Sevak, A. J. and Boutwell, R.K. Raven, New York, 11-49 (1978). 30
- Hofmann J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. FASEB J. 11, 649-669 (1997).
- Huberman E., Callaham M. F. Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1293-1297 (1979). 40
- Hunter T. Signaling 2000 and beyond. Cell 100, 113-117 (2000).
- Kassel O, Sancono A, Kratzschmar J, Kreft B, Stassen M, and Cato A C. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. Embo J 2001; 20: 7108-16. 50

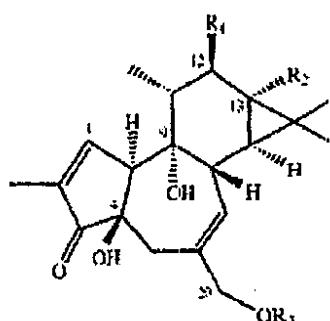
- Kazanietz M.G. Eyes Wide Shut: protein kinase C isoenzymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol. Carcinog.* 28, 5-12 (2000).
- Keoffler H.P., Bar-Eli M., Territo M.C. Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cells lines blocked at different stages of maturation. *Cancer Res.* 41, 919-926 (1981).
- Kim S.C., Hahn J.S., Min Y.H., Yoo N.C., Ko Y.W., and Lee W.J. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood* 1999; 93: 3893-9.
- Kiyoi H., Naoe T., Nakano Y., Yokota S., Minami S., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Jinnai I., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Oh H., Motoji T., Omoto E., Saito H., Ohno R., and Ueda R. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 3074-80.
- Kobayashi M., Okada N. et al. Intracellular interleukin-1 alpha production in human gingival fibroblasts is differentially regulated by various cytokines. *J Dent Res.* 78(4), 840-9 (1999).
- Kudo M., Aoyama A., Ichimori S. and Fukunaga N. An animal model of cerebral infarction: homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 13: 505-508 (1982).
- Lebien T.W., Bollum F.J. et al. Phorbol ester-induced differentiation of a non-T, non-B leudemic cell line: model for human lymphoid progenitor cell development. *J Immunol.* 128(3), 1316-20 (1982).
- MD Iqbal Hossain Chowdhury et al. The Phorbol Ester TPA Strongly Inhibits HIV-1 Induced Syncytia Formation but Enhances Virus Production: possible involvement of protein kinase C pathway. *Virology* 176, 126-132, (1990).
- Meinhhardt G., Roth J., Hass R. Activation of protein kinase C relays distinct signaling pathways in the same cell type: differentiation and caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 7, 795-803 (2000).

- 0 0 0).
- Milella M, Kornblau S M, Estrov Z, Carter B Z, Lapillonne H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estey E, and Andreeff M. The therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2001; 108: 851-9.
- Mochty-Rosen D., Kauvar L. M. Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv. Pharmacol.* 44, 91-145 (1998). 10
- Morgan M A, Dolp O, and Reuter C W. Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood* 2001; 97: 1823-34.
- Nagasawa K., Chechik B. E. et al. Modulation of human T-cell differentiation markers by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Thymus*. 3(4-5), 307-18, (1981).
- Nakao Y., Matsuda S. et al. Paradoxical anti-leukemic effects of plant-derived tumor promoters on a human thymic lymphoblast cell line. *Int J Cancer* 30(6), 687-95 (1982).
- Nakao Y., Matsuda S. et al. Phorbol ester-induced differentiation of human T-lymphotropic cell line HPB-ALL. *Cancer Res.* 42(9), 33843-50 (1982). 20
- Newton A.C. Protein kinase C: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28499 (1995).
- Palombella V J, Rando O J, Goldberg A L, and Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; 78: 773-85.
- Platanias L C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101: 4667-79. 40
- Rovera G., Santoli D., Damsky C. Human promyelocytic cells in culture differentiate into macrophage-like cells treated with a phorbol diester. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 2779-2783 (1979).
- YIP, Y.K. et al. Stimulation of human gamma interferon production by diterpene esters. *Infection and Immunity* 34(1) 131-50

139 (1981).

Zhao J., Sharma Y., Agarwal R. Significant inhibition by the flavonoid antioxidant silymarin against 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate-caused modulation of antioxidant and inflammatory enzymes and cyclooxygenase 2 and interleukin-1 alpha expression in SENCAR mouse epidermis: implications in the prevention of stage 1 tumor promotion. Mol Carcinog. 26(4), 32-33 (1999).
10

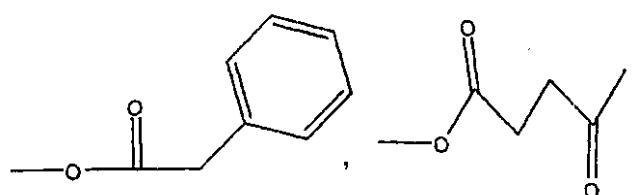
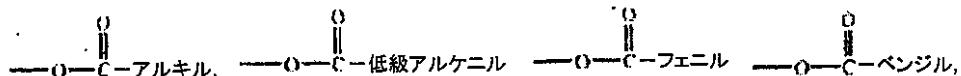
[1] 哺乳類対象における1つ以上の脳卒中の影響を予防または治療する方法であって、式Iのホルボールエステルまたはその薬学的に許容される塩、異性体、もしくは鏡像異性体の有効量を前記対象に投与することを含み、



20

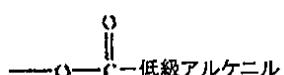
式I

式中、R₁およびR₂が、水素、ヒドロキシル、



30

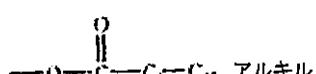
およびこれらの置換された誘導体からなる群から選択され、R₃が、水素、



40

およびこの置換された誘導体である、前記方法。

[2] R₁またはR₂が、



であり、残りのR₁またはR₂が、



50

であり、R₃ が水素である、1に記載の方法。

[3] 前記ホルボールエステルが、ホルボール13-ブチレート、ホルボール12-デカノエート、ホルボール13-デカノエート、ホルボール12, 13-ジアセテート、ホルボール12, 20-ジアセテート、ホルボール12, 13-ジベンゾエート、ホルボール12, 13-ジブチレート、ホルボール12, 13-ジデカノエート、ホルボール12, 13-ジヘキサノエート、ホルボール12, 13-ジプロピオネート、ホルボール12-ミリステート、ホルボール13-ミリステート、ホルボール12, 13, 20-トリアセテート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート-20-アセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-チグリエート13-デカノエート、12-デオキシホルボール13-アセテート、ホルボール12-アセテート、またはホルボール13-アセテートである、1に記載の方法。

10

[4] 前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するために、式Iの前記ホルボールエステルとの組み合わせ製剤または協調的治療レジメンにおいて有効である少なくとも1つの二次または補助治療剤を投与することを更に含む、1に記載の方法。

[5] 前記少なくとも1つの二次または補助治療剤が、協調投与プロトコールにおいて、前記対象への前記ホルボールエステルの投与と同時、投与の前、または投与の後で、前記対象に投与される、4に記載の方法。

20

[6] 前記少なくとも1つの二次または補助治療剤が、組織プラスミノーゲン活性化因子、抗凝固剤、スタチン、フィブレート、アンギオテンシンII受容体遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、抗血小板剤、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤である、4に記載の方法。

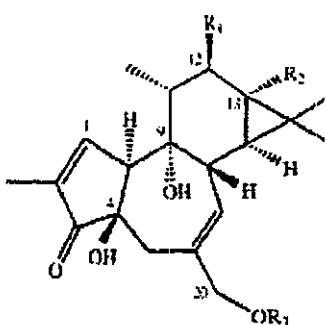
[7] 前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するために、式Iのホルボールエステルと組み合わせた外科的介入を更に含む、1に記載の方法。

[8] 前記外科的介入が、頸動脈内膜剥離術、血管形成術、ステント留置術、開頭術、ペースメーカーの挿入、除細動器の埋め込み、弁置換術、冠動脈バイパス術、心臓移植、血管内コイル塞栓術、または卵円孔開存閉鎖術である、7に記載の方法。

30

[9] 前記1つ以上の脳卒中の影響が、麻痺、空間障害、判断障害、左半側無視、記憶喪失、失語症、協調および平衡の問題、嘔気、嘔吐、認知障害、知覚障害、見当識障害、同名半盲、または衝動性である、1に記載の方法。

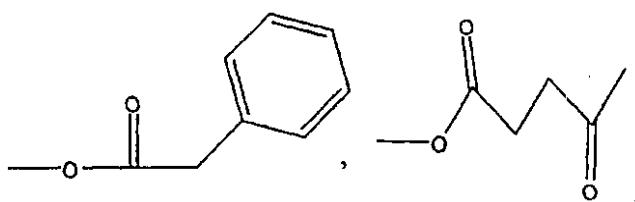
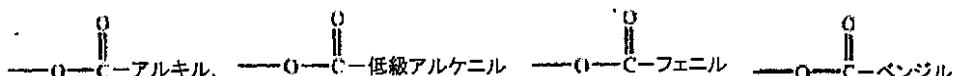
[10] 哺乳類対象における1つ以上の脳卒中の影響を予防または治療するための組成物であって、式Iのホルボールエステルまたはその薬学的に許容される塩、異性体、もしくは鏡像異性体の有効量を含み、



40

式I

式中、R₁ および R₂ が、水素、ヒドロキシル、



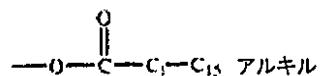
およびこれらの置換された誘導体からなる群から選択され、 R_3 が、水素、

10



およびこの置換された誘導体である、前記組成物。

[11] R_1 または R_2 が、



20

であり、残りの R_1 または R_2 が、



であり、 R_3 が水素である、10に記載の組成物。

[12] 前記ホルボールエステルが、ホルボール13-ブチレート、ホルボール12-デカノエート、ホルボール13-デカノエート、ホルボール12, 13-ジアセテート、ホルボール13, 20-ジアセテート、ホルボール12, 13-ジベンゾエート、ホルボール12, 13-ジブチレート、ホルボール12, 13-ジデカノエート、ホルボール12, 13-ジヘキサノエート、ホルボール12, 13-ジプロピオネート、ホルボール12-ミリステート、ホルボール13-ミリステート、ホルボール12, 13, 20-トリアセテート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート、12-デオキシホルボール13-アンゲレート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート、12-デオキシホルボール13-イソブチレート-20-アセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセテート、12-デオキシホルボール13-フェニルアセート20-アセテート、12-デオキシホルボール13-テトラデカノエート、ホルボール12-チグリエート13-デカノエート、12-デオキシホルボール13-アセテート、ホルボール12-アセテート、またはホルボール13-アセテートである、10に記載の組成物。

30

[13] 前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するために、式Iの前記ホルボールエステルとの組み合わせ製剤において有効である少なくとも1つの二次または補助治療剤を更に含む、10に記載の組成物。

40

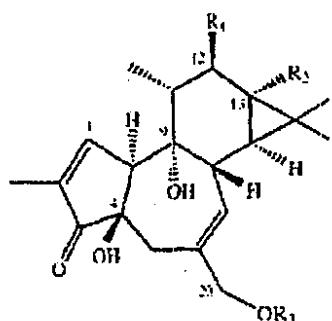
[14] 前記少なくとも1つの二次または補助治療剤が、組織プラスミノーゲン活性化因子、抗凝固剤、スタチン、フィブレート、抗血小板剤、アンギオテンシンII受容体遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤である、13に記載の組成物。

[15] 前記1つ以上の脳卒中の副次的影響が、麻痺、空間障害、判断障害、左半側無視、記憶喪失、失語症、協調および平衡の問題、嘔気、嘔吐、認知障害、知覚障害、見当識障害、同名半盲、または衝動性である、10に記載の組成物。

[16] 脳卒中の危険性のある哺乳類対象において脳卒中を予防する方法であって、式I

50

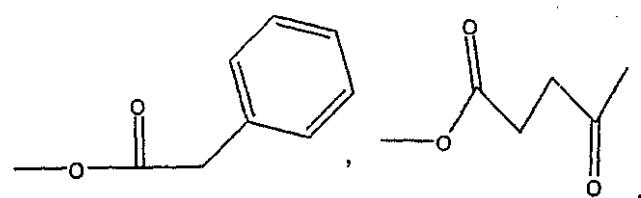
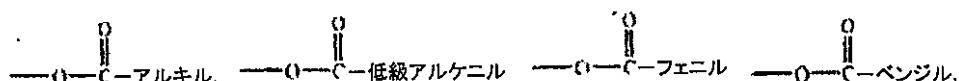
のホルボールエステルまたはその薬学的に許容される塩、異性体、もしくは鏡像異性体の有効量を前記対象に投与することを含み、



10

式 I

式中、R₁ および R₂ が、水素、ヒドロキシル、



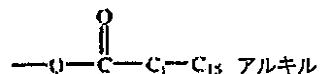
20

およびこれらの置換された誘導体からなる群から選択され、R₃ が、水素、

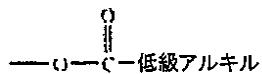


およびこの置換された誘導体である、前記方法。

[17] R₁ または R₂ が、



であり、残りの R₁ または R₂ が、



であり、R₃ が水素である、16に記載の方法。

[18] 前記ホルボールエステルが、ホルボール 13 - プチレート、ホルボール 12 - デカノエート、ホルボール 13 - デカノエート、ホルボール 12 , 13 - ジアセテート、ホルボール 13 , 20 - ジアセテート、ホルボール 12 , 13 - ジベンゾエート、ホルボール 12 , 13 - ジブチレート、ホルボール 12 , 13 - ジデカノエート、ホルボール 12 , 13 - ジヘキサノエート、ホルボール 12 , 13 - ジプロピオネート、ホルボール 12 - ミリステート、ホルボール 13 - ミリステート、ホルボール 12 , 13 , 20 - トリアセテート、12 - デオキシホルボール 13 - アングレート、12 - デオキシホルボール 13 - アングレート 20 - アセテート、12 - デオキシホルボール 13 - イソブチレート、12 - デオキシホルボール 13 - イソブチレート - 20 - アセテート、12 - デオキシホルボール 13 - フェニルアセテート、12 - デオキシホルボール 13 - フェニルアセテート 20 - アセテート、12 - デオキシホルボール 13 - テトラデカノエート、ホルボール 12 - チグリエート 13 - デカノエート、12 - デオキシホルボール 13 - アセテート、

30

40

50

ホルボール 12 - アセテート、またはホルボール 13 - アセテートである、16 に記載の方法。

[19] 前記対象において脳卒中の影響を治療または予防するために、式Iの前記ホルボールエスティルとの組み合わせ製剤または協調的治療レジメンにおいて有効である少なくとも1つの二次または補助治療剤を投与することを更に含み、前記二次または補助治療剤が、式Iの前記ホルボールエスティルの投与と同時、投与の前、または投与の後に投与される、16 に記載の方法。

[20] 前記少なくとも1つの二次または補助治療剤が、抗凝固剤、スタチン、フィブリート、アンギオテンシンII受容体遮断薬、抗血小板剤、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、または利尿剤である、19 に記載の方法。

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/588,167
(32)優先日 平成24年1月18日(2012.1.18)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(74)代理人 100182992
弁理士 江島 孝毅
(72)発明者 ハン, ツエン, タオ
アメリカ合衆国 97401 オレゴン州, ユージーン, フェリー ストリート - ナンバー 6
03 1050
(72)発明者 チエン, フン-フォン
台湾 10471, タイペイ, デル-フェイ ストリート, ナンバー 65

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 特表2010-516813 (JP, A)
Acta Neurochir Suppl, 2008年, Vol.102, p.431-436
Expert Opinion on Drug Discovery, 2011年, Vol.6, No.4, p.353-369
Drug Deliv Transl Res, 2011年, Vol.1, No.6, p.409-419
Proc Natl Acad Sci USA, 2009年, Vol.106, No.34, p.14676-14680
Proc Natl Acad Sci USA, 2008年, Vol.105, No.36, p.13620-13625

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 61 K 31 / 00
C A P L U S / R E G I S T R Y (S T N)