

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5883457号  
(P5883457)

(45) 発行日 平成28年3月15日 (2016. 3. 15)

(24) 登録日 平成28年2月12日 (2016. 2. 12)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 213/53 (2006. 01)

A 6 1 K 31/444 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/02 (2006. 01)

A 6 1 P 17/00 (2006. 01)

C O 7 D 213/53 C S P

A 6 1 K 31/444

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

A 6 1 P 17/00

請求項の数 13 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-543471 (P2013-543471)  
 (86) (22) 出願日 平成23年12月16日 (2011. 12. 16)  
 (65) 公表番号 特表2014-502599 (P2014-502599A)  
 (43) 公表日 平成26年2月3日 (2014. 2. 3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2011/001631  
 (87) 国際公開番号 W02012/079128  
 (87) 国際公開日 平成24年6月21日 (2012. 6. 21)  
 審査請求日 平成26年10月8日 (2014. 10. 8)  
 (31) 優先権主張番号 2010905539  
 (32) 優先日 平成22年12月17日 (2010. 12. 17)  
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 513151543  
 リチャードソン, デ アール  
 オーストラリア連邦, ニューサウスウェー  
 ルズ州 2 1 7 1, シドニー, カーンズ  
 ヒル, パイオニア ドライブ 1 2 1 3  
 (73) 特許権者 513151554  
 ラブジョイ, デーヴィッド ビー  
 オーストラリア連邦, ニューサウスウェー  
 ルズ州 2 0 1 6, レッドファーン, ロー  
 ズビル ストリート 5 5 / 3 2 - 4 2  
 (74) 代理人 100079108  
 弁理士 稲葉 良幸  
 (74) 代理人 100109346  
 弁理士 大貫 敏史

最終頁に続く

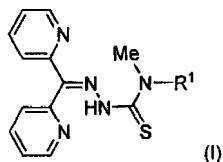
(54) 【発明の名称】 チオセミカルバゾン化合物および癌の治療における使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) の化合物:

【化 1】



(式中、R<sup>1</sup> はシクロヘキシルまたはエチルである。) ;  
 およびそれらの塩、水和物および溶媒和物。

【請求項 2】

ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - エチル - 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾンである請求  
 項 1 に記載の化合物およびそれらの塩、水和物および溶媒和物。

【請求項 3】

ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - シクロヘキシル - 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾンで  
 ある請求項 1 に記載の化合物およびそれらの塩、水和物および溶媒和物。

【請求項 4】

前記塩が薬学的に許容可能な塩である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - エチル - 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン塩酸塩である、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 6】

ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - シクロヘキシル - 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン塩酸塩である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 7】

薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤またはアジュバントと共に、請求項 1 に記載の式 ( I ) の化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物を含む、医薬組成物。

10

【請求項 8】

哺乳動物において癌を治療するための、有効量の、請求項 1 に記載の式 ( I ) の化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物を含む医薬組成物、あるいは請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記癌が、メラノーマ、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、膀胱癌、肝臓癌、消化管癌、結腸直腸癌、脳腫瘍、頭頸部癌、骨癌、膵臓癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌および血液系腫瘍から選択される、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記癌が、膵臓癌、肺癌および脳腫瘍から選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 11】

前記癌が固形腫瘍である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記血液系腫瘍が白血病またはリンパ腫である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、全内容が相互参照により本明細書によって組み込まれる、2010年12月17日出願のオーストラリア特許仮出願第2010905539号からの優先権を主張する。

30

【0002】

技術分野

本発明は、チオセミカルバゾン化合物および治療におけるそれらの使用に関する。とりわけ、本発明は、ジピリジルチオセミカルバゾン化合物の選択、これらの化合物を含有する医薬組成物および癌の治療でのこれらの化合物および組成物の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

背景技術

40

チオセミカルバゾン鉄キレート剤は、インビトロおよびインビボの両方で多くの様々な新生物に対して非常に効力が強く、選択的であることが分かっている抗癌剤類である。これらの化合物は、癌細胞においてDNA合成に対する必須元素である鉄を標的とすることにより機能する。鉄キレート剤は最初、サラセミアなどの鉄過剰性疾患に対して開発されたものであり、キレート剤デスフェリオキサミン ( DFO ) がこの疾患に対して最も広く使用される治療剤である。しかし、神経芽細胞腫に対してDFOを試験する臨床試験から、この薬剤が一部の患者においてこの癌の進行を抑制するのに効果的であったことが分かった。これらの初期研究において、抗癌剤としての鉄キレート剤の可能性が初めて確認された。それ以来、癌治療用に特別に設計された鉄キレート剤が開発されており、チオセミカルバゾン鉄キレート剤3 - アミノピリジン - 2 - カルボキサリデヒドチオセミカル

50

バゾン（トリアピン（登録商標））（Vion Pharmaceuticals, アメリカ合衆国コネチカット州ニューヘブーン（New Haven CT））が多くのフェーズ I および II 臨床試験に入っている。

#### 【0004】

チオセミカルバゾン鉄キレート剤は、鉄および銅を結合させ、レドックス活性錯体を形成させることにより機能し、癌細胞毒性を誘導する反応性酸素種（ROS）生成へと導く。開発された、現在までで最も活性が高い化合物の1つは、チオセミカルバゾン類の鉄キレート剤、ジ-2-ピリジルケトン4, 4-ジメチル-3-チオセミカルバゾン（本明細書中でDp44mTと略称）であり、これは国際公開第2004/069801号に記載されている。Dp44mTは、インビトロおよびインビボで多くの様々な腫瘍の成長を著しくおよび顕著に抑制することが明らかになっており、トリアピン（登録商標）よりも強力に毒性が少ないことが分かった。しかし、高い非最適用量のDp44mTを用いた実験から、ヌードマウスにおいて心臓毒性を幾分誘導したことが分かった。

10

#### 【0005】

チオセミカルバゾン化合物は、転移抑制因子、NDRG1を標的とする。NDRG1は、成長および転移の両方ならびにインビボでの膵臓癌の血管形成を阻害し、腫瘍進行抑制へとつながる。さらに、NDRG1はまた、最近、膵臓癌の分化促進と関連付けられており、膵臓癌に対する有望な治療標的としてのその可能性が報告されている（例えばKovacevic, Z.およびD. R. Richardson (2006年). Carcinogenesis 27:2355-66, Maruyama, Y., M. Onoら. (2006年). Cancer Res 66:6233-42）。NDRG1は、NDRG1に反応して上方制御される、腫瘍抑制因子、PTENおよびSMAD4を含め、膵臓癌において重要な多くの分子標的を有する。したがって、NDRG1は、特に、膵臓癌の治療のための、有望な治療標的であり得る。NDRG1は最近、インビトロおよびインビボにおいて、鉄-キレート抗癌剤を用いて上方制御されることが分かった。鉄キレート剤は、低酸素誘導性転写因子（HIF-1）依存性の機構を介してNDRG1発現を向上させたが、HIF-1とは独立した経路も認められている。したがって、鉄キレート抗癌剤により、鉄の枯渇によって、癌細胞においてNDRG1発現を標的とするための重要な機会が与えられる。

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

30

#### 【0006】

癌に対する新規の代替的な治療が必要とされている。本発明は、有利に細胞増殖を阻害し、癌の治療に有用であり得る、チオセミカルバゾン化合物の選択を対象とする。

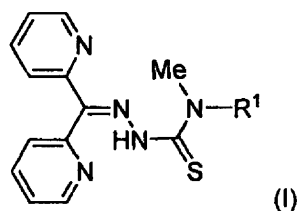
#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

#### 発明の概要

一態様において、本発明は、一般式（I）のチオセミカルバゾン化合物：

#### 【化1】



40

（式中、R<sup>1</sup>はシクロヘキシルまたはエチルである。）；  
およびそれらの塩、水和物および溶媒和物に関する。

#### 【0008】

好ましい実施形態において、本発明は、化合物ジ-2-ピリジルケトン4-エチル-4

50

- メチル - 3 - チオセミカルバゾン (本明細書中で D p 4 e 4 m T と略称) およびそれらの塩、水和物および溶媒和物に関する。

【 0 0 0 9 】

別の好ましい実施形態において、本発明は、化合物ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - シクロヘキシル - 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン (本明細書中で D p 4 c y c H 4 m T と略称)、それらの塩、水和物および溶媒和物に関する。

【 0 0 1 0 】

好ましい実施形態において、この塩とは、薬学的に許容可能な塩である。塩酸塩などの酸付加塩は、本発明の特に好ましい実施形態である。

【 0 0 1 1 】

別の態様において、本発明は、薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤またはアジュバントと共に式 ( I ) の化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物を含む医薬組成物に関する。

【 0 0 1 2 】

さらなる態様において、本発明は、癌の治療を必要とする哺乳動物に、有効量の、式 ( I ) の化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物またはその医薬組成物を投与することを含む、哺乳動物において癌を治療する方法に関する。好ましい実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【 0 0 1 3 】

別の態様において、本発明は、癌の治療のための薬剤の製造における、式 ( I ) の化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物の使用に関する。

【 0 0 1 4 】

さらなる実施形態において、本発明は、癌の治療のための、式 ( I ) の化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物またはそれらの医薬組成物に関する。

【 0 0 1 5 】

本発明の化合物は、メラノーマ、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、膀胱癌、肝臓癌、消化管癌、結腸直腸癌、脳腫瘍、頭頸部癌、骨癌、膵臓癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌ならびに血液系腫瘍 (例えば白血病およびリンパ腫) を含むがこれらに限定されない、固形および非固形腫瘍を含む、多岐にわたる癌の治療に有用である。好ましい実施形態において、癌は、膵臓癌、肺癌および脳腫瘍から選択される。特に好ましい実施形態において、癌は膵臓癌である。他の特に好ましい実施形態において、癌は肺癌である。他の好ましい実施形態において、癌は脳腫瘍である。好ましい実施形態において、本発明の化合物は、固形腫瘍の治療に有用である。他の好ましい実施形態において、本発明の化合物は、非固形腫瘍の治療に有用である。

【 0 0 1 6 】

本明細書中で開示される本発明の他の実施形態は、有効量の式 ( I ) の化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物と 1 つ以上の細胞とを接触させることを含む、細胞増殖を阻害する方法を対象とする。この細胞はインビトロまたはインビボであり得る。好ましくは、細胞は哺乳動物細胞である。

【 0 0 1 7 】

本願を通じて、文脈から別段の要求がない限り、「含む (comprise)」という用語または「含む (comprises)」または「含んでいる (comprising)」などの変形形態は、規定される要素、整数もしくは段階または、要素、整数もしくは段階の群を含むが、何らかの他の要素、整数もしくは段階または、要素、整数もしくは段階の群を除外するものではないことを示すと理解される。したがって、本願の文脈において、「含んでいる (comprising)」という用語は、「基本的に含むが、必ずしもそれらだけではない」ことを意味する。

【 0 0 1 8 】

本願に含まれている、文献、行為、材料、装置、論文などの何れの考察も、本発明に対する内容を提供する目的であるにすぎない。これは、オーストラリア内外で、本願の各請

10

20

30

40

50

求の優先日前に、これらの事項の何れかまたは全てが先行技術基準の一部を形成するかまたは、本発明に関連する技術分野における一般的知識であったことを受け入れるものとみなされるべきものではない。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】A．化合物Dp4e4mTおよびDp4cyCH4mTの構造式。B．Dp4cyCH4mTに対する一般合成スキーム。

【図2】SK-N-MC神経上皮腫に対するDp4e4mTおよびDp4cyCH4mTの抗増殖活性。

【図3】膵臓癌細胞株に対するDp4cyCH4mTの抗増殖活性。

10

【図4】SK-N-MC神経上皮腫細胞における鉄排出(A)および鉄取り込み(B)実験。

【図5】ヌードマウスにおけるDMS-53肺癌の成長。4Dp4e4mT i.v投与実験。

【図6】ヌードマウスにおけるDMS-53肺癌の成長。Dp4e4mT i.v投与実験：心臓繊維症の評価。

【図7】ヌードマウスにおけるDMS-53肺癌の成長。Dp4e4mT経口投与実験：A．処置日数に対する腫瘍サイズ。B．腫瘍重量。

【図8】ヌードマウスにおけるDMS-53肺癌。Dp4e4mT経口投与実験：心臓、脾臓、肝臓の組織学的分析。

20

【図9】ヌードマウスにおけるPANC1膵臓癌の成長。Dp4cyCH4mT i.v投与実験：A．処置日数に対する腫瘍サイズ。B．腫瘍重量。C．代表的腫瘍の写真。

【図10】ヌードマウスにおけるPANC1膵臓癌の成長。Dp4cyCH4mT i.v投与実験：心臓、脾臓、肝臓の組織学的分析。

【図11】ヌードマウスにおけるPANC1膵臓癌の成長。Dp4cyCH4mT i.v投与実験：NDRG-1、TfRおよび細胞周期分子におけるDp4cyCH4mTの影響。

【図12】インビトロでのmetHb形成におけるDFOおよびチオセミカルバゾンキレート剤の影響。1~25μMのキレート剤とともに、37℃で3時間、全RBCを温置した。超純水を用いて細胞を溶解し、分光光度計によりmetHbレベルを測定した。結果は、3回の実験からの平均±SDである。

30

【図13】インビボでのmetHb形成におけるチオセミカルバゾンキレート剤の影響。インビボでの、6mg/kg用量での尾静脈を介した静脈内投与によるDp44mT、トリアピン（登録商標）またはDp4cyCH4mT処理後のmetHb。対照群のマウスはピヒクルのみで処置した。metHbレベルの測定のために、投与から30分後、全血を回収した。

【図14】インビボでのmetMb形成における、チオセミカルバゾンキレート剤の影響。6mg/kg用量での尾静脈を介した静脈内投与によるインビボでのDp44mTトリアピン（登録商標）またはDp4cyCH4mT処理後のmetMbレベル。対照群のマウスはピヒクルのみで処置した。metMbレベルの測定のために、投与から30分後、心臓全体を摘出した。

40

【発明を実施するための形態】

【0020】

定義

以下のものは、本発明の記載を理解する上で一助となり得るいくつかの定義である。これらは、一般的な定義であり、本発明の範囲をこれらの用語のみに限定するものではないが、次の記載のより良好な理解のために提示する。

【0021】

文脈から別段の要求がない限り、または具体的な別段の記載がない限り、単数の整数、段階または要素として本明細書中で引用される本発明の整数、段階または要素は、引用さ

50

れる整数、段階または要素の単数および複数形の両方を明確に包含する。

【 0 0 2 2 】

本明細書中に記載の発明が、具体的に記載されるものの他に変更形態および変形形態を含む余地があることを当業者ならば理解するであろう。本発明が全てのこのような変更形態および変形形態を含むことを理解されたい。本発明はまた、本願で言及されるかまたは示される、段階、特性、組成物および化合物を全て、個々にまたはまとめて、およびこれらの段階、特性、組成物および化合物の2つ以上のありとあらゆる組み合わせを含む。

【 0 0 2 3 】

式 (I) の化合物は、鉄 (Fe (II)) および Fe (III)) など、遷移金属イオンをキレートすることができる三座リガンドである。したがって、この明細書を通じて、本発明の化合物は、「リガンド」、「キレート剤」または「鉄キレート剤」と呼ばれ得る。本願を通じて、本発明の「化合物」または「キレート剤」または「リガンド」への言及は、式 (I) の化合物への言及であり、別段の明確な断りがない限り、それらの塩、水和物および溶媒和物が含まれる。

【 0 0 2 4 】

本発明は、その範囲内に、全てのジアステレオ異性体 (シス/トランス異性体を含む)、ラセミ体および鏡像異性体を含め、本明細書中で開示される、式 (I) の化合物の全ての異性体およびそれらの塩、水和物および溶媒和物を含む。

【 0 0 2 5 】

本願の文脈において、「投与すること (administering)」および、「投与する (administer)」および「投与 (administration)」を含むこの語の変化形は、本発明の化合物または組成物を生物、哺乳動物、または表面と、何らかの好適な手段によって、接触させるか、それに適用するか、送達するかまたは提供することを含む。

【 0 0 2 6 】

本願の文脈において、「哺乳動物」という用語は、ヒトおよび、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、ネコ、イヌ、霊長類 (ヒトおよび非ヒト霊長類)、げっ歯類、マウス、ヤギ、ウサギおよび鳥類に属するものを含むがこれらに限定されない、社会的に、経済的にまたは研究において重要な何らかの種の個体を含む。好ましい実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【 0 0 2 7 】

本願の文脈において、「治療」という用語は、何であれ、疾患状態または症状を改善するか、疾患の確立を予防するかまたは、そうでなければ、疾患もしくは他の望ましくない症状の進行を予防するか、妨げるか、遅延させるかまたは回復に向かわせる、ありとあらゆる使用を指す。したがって、疑義を避けるために、本明細書中での「治療」への言及は、治癒的な、一時的な緩和である、および予防的な処置への言及を含む。

【 0 0 2 8 】

本願の文脈において、「有効量」という用語は、その意味の範囲内に、本発明の化合物または組成物の、所望の治療効果をもたらすのに十分ではあるが無毒性である量を含む。必要とされる正確な量は、治療を受ける種、対象の年齢および全身状態、治療する状態の重症度、投与する特定の薬剤、投与形式などの因子に依存して、対象ごとに異なる。したがって、正確な「有効量」を特定することはできない。しかし、いかなる場合に対しても、好適な「有効量」は、通常の実験のみを使用して当業者により決定され得る。

【 0 0 2 9 】

本発明の実施形態の詳細な説明

本発明は、抗増殖特性を有し、したがって、癌の治療において有用であり得るチオセミカルバゾン化合物の選択を対象とする。特に、本発明は、一般式 (I) のチオセミカルバゾン化合物：

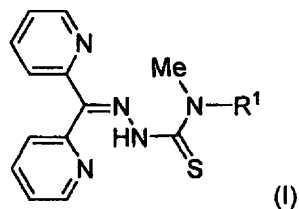
10

20

30

40

## 【化2】



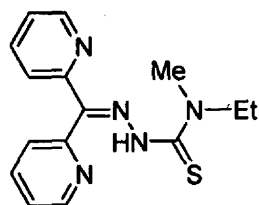
(式中、 $R^1$  はシクロヘキシルまたはエチルである。) ;  
 およびそれらの塩、水和物および溶媒和物に関する。

10

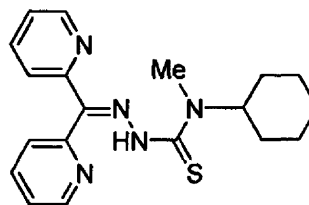
## 【0030】

とりわけ、本発明は、ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - エチル - 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン (Dp4e4mT) およびジ - 2 - ピリジルケトン 4 - シクロヘキシル - 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン (Dp4cycH4mT) ならびにそれらの塩、水和物および溶媒和物に関する :

## 【化3】



Dp4e4mT



Dp4cycH4mT

20

## 【0031】

本発明による化合物は鉄キレート剤であり、Fe (II) および Fe (III) をキレートすることができる。したがって、式 (I) の化合物の鉄錯体 (すなわち Fe (II) および Fe (III) 錯体) も本発明により包含される。

## 【0032】

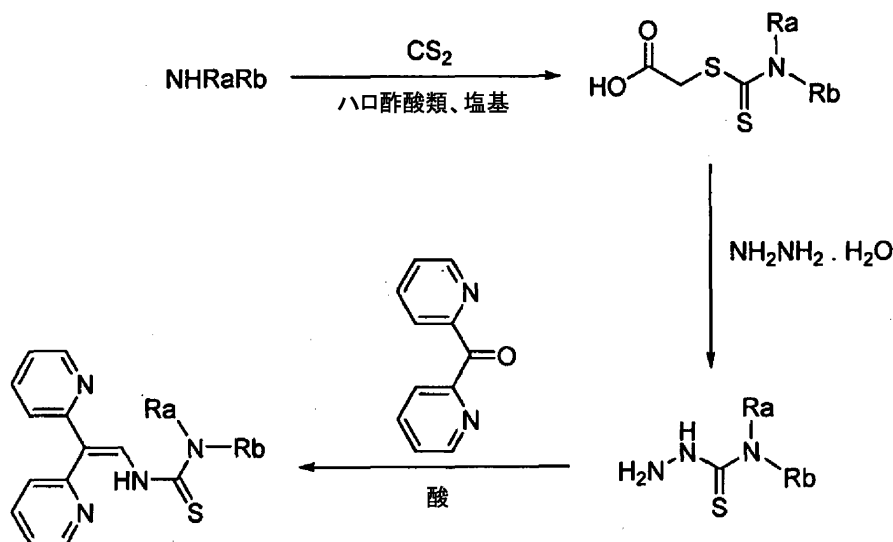
30

例えば、Advanced Organic Chemistry, 4<sup>th</sup> Ed (John WileyおよびSons, ニューヨーク 1992年) ならびに Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5<sup>th</sup> Ed (John WileyおよびSons, ニューヨーク, 1989年) などに記載のような、ケトンを用いたイミンのシッフ塩基縮合を含め、当業者にとって公知の方法によって、本発明による式 (I) の化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物を調製し得る。

## 【0033】

式 (I) の化合物を調製するための代表的な一般的合成スキームは下記スキーム 1 で示す :

## 【化 4】



スキーム 1

## 【 0 0 3 4 】

第一段階は、二硫化炭素との二級アミン（ $\text{NHRaRb}$ ）の反応からのカルボキシメチルジチオカルバメートの形成を含む。二級アミンの  $\text{Ra}$  および  $\text{Rb}$  基は、同じでも、または異なってもよく、直鎖状または環状  $\text{C}_1 \sim 6$  アルキルであり得る。本発明の好ましい実施形態において、スキーム 1 によると、 $\text{Ra}$  はメチルであり、 $\text{Rb}$  はエチルまたはシクロヘキシルである。好適な酢酸塩の例としては、クロロ酢酸塩およびブromo酢酸塩が挙げられる。好適な塩基は当業者にとって周知であり、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、アンモニア、ジエチルアミンなどが挙げられる。通常、第一段階は周囲温度（例えば約  $20 \sim 25$  ）で行われる。標準的な酸処理（例えば塩酸水溶液、硫酸水溶液など）により、カルボキシメチルジチオカルバメートが得られる。

## 【 0 0 3 5 】

次の段階は、カルボキシメチルジチオカルバメートをヒドラジン水和物と反応させることによる、チオセミカルバジド中間体化合物の形成を含む。通常、この段階は水中で、約  $25 \sim 60$  の範囲の温度にて穏やかに加熱しながら行われる。一般的に、モル過剰のヒドラジン水和物を使用する。

## 【 0 0 3 6 】

次に、式（I）のチオセミカルバゾン化合物を生成させるために、チオセミカルバジド化合物を Schiff 塩基縮合反応においてジ-2-ピリジルケトンと反応させる。通常、この反応は、何らかの好適な極性溶媒、例えばエタノール、プロパノール、テトラヒドロフラン中など、で行われ得る。この反応は通常、通常は約  $1 \sim 24$  時間、例えば約  $2 \sim 8$  時間、より典型的には約  $2$  時間  $\sim$  約  $4$  時間などであり得る、好適な時間にわたり、混合物を還流状態で加熱することにより行われる。場合によっては、乾燥剤、例えば  $\text{TiCl}_4$  もしくは分子ふるいを入れることにより、または共沸蒸留により、縮合反応中に生じた水を除去し得る。

## 【 0 0 3 7 】

式（I）の化合物の塩形態は、当業者にとって公知の技術を用いて容易に調製し得る。例えば、ヘキサン、ジクロロメタンなどの好適な非極性溶媒中で式（I）の化合物を溶解し、所望の塩に対応する酸の水溶液とともに撹拌することによって、酸付加塩を調製し得る。例えば、塩酸により塩酸塩が得られ、硝酸により硝酸塩が得られ、硫酸により硫酸塩が得られる。

## 【 0 0 3 8 】

当業者にとって公知の標準的な技術を用いて、一般式（I）の化合物またはそれらの塩

10

20

30

40

50



、水和物および溶媒和物を精製し得る。好ましい実施態様において、好適な溶媒または溶媒混合物からの結晶化によって、式（Ⅰ）の化合物を精製し得る。好適な溶媒は当業者にとって公知であり、例えば、メタノール、エタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、  
、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドおよびそれらの混合物が挙げられる。他の実施形態において、上記で列挙したものなどの１つ以上の有機溶媒および水を含む溶媒混合物から生成物を再結晶化し得る。精製後、一般式（Ⅰ）の化合物は実質的に純粋であり得る。例えば、式（Ⅰ）の化合物を少なくとも約８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％純粋である形態で分離し得る。

#### 【００３９】

##### 治療

本発明はまた、治療における、一般式（Ⅰ）のチオセミカルバゾン化合物およびそれらの塩、水和物および溶媒和物の使用にも関する。特に、式（Ⅰ）のチオセミカルバゾン化合物は抗増殖特性を有し、したがって癌の治療において有用であり得る。本発明のチオセミカルバゾン化合物は鉄キレート剤である。本発明の化合物は、メラノーマ、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、膀胱癌、肝臓癌、消化管癌、結腸直腸癌、脳腫瘍、頭頸部癌、骨癌、膵臓癌、子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌、肺癌ならびに血液系腫瘍（例えば白血病およびリンパ腫）を含むが限定されない、多岐にわたる癌（腫瘍）の治療に有用であり得る。特に好ましい実施形態において、癌は膵臓癌である。他の特に好ましい実施形態において、癌は肺癌である。他の好ましい実施形態において、癌は脳腫瘍である。好ましい実施形態において、本発明の化合物は、固形腫瘍の治療に有用である。他の好ましい実施形態において、本発明の化合物は、非固形腫瘍の治療に有用である。

#### 【００４０】

膵臓癌は、診断から最初の５年以内に症例の９８～１００％が死に至る深刻な疾患であり、この疾患からの生存率は、現在も２０年前と同じである。膵臓癌に対して現在利用可能な最良の治療は、抗癌剤、ヌクレオシド、デオキシシチジンの類似体であるゲムシタピンである。ゲムシタピンは、細胞内で活性代謝物、ジフルオロデオキシシチジンジ-およびトリ-ホスフェート（ $dFdCDP$ 、 $dFdCTP$ ）に変換されるプロドラッグである。膵臓癌治療におけるゲムシタピンの奏効は限定的である。実際に、この薬剤を使用した臨床試験から、患者の生存期間を平均でわずかに約３ヶ月しか延ばさないことが分かっている。ゲムシタピンは、５-フルオロウラシル（５-FU）などの他の抗癌剤と組み合わせられてきたが、その結果、その活性が幾分向上した。しかし、膵臓癌患者に対する予後は依然として不良である。

#### 【００４１】

意外にも、本発明のチオセミカルバゾン化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物は、有利に、既知の抗癌剤と少なくとも同程度に良好な、および好ましくはそれよりも良好な抗増殖特性を示す。例えば、好ましい実施形態において、本発明のチオセミカルバゾン化合物は、ゲムシタピンおよび５-フルオロウラシルと比較した場合、癌細胞（例えば膵臓癌細胞）の増殖を阻害することにおいてより効果が高い。したがって、（単独でまたは他の抗癌剤と組み合わせて、または治療計画の一部として使用される）本発明の化合物は、既存の抗癌剤と比較して、１つ以上の有利な治療特性を保持する代替的な抗癌剤である。

#### 【００４２】

本発明の別の意外かつ有利な特徴は、本発明のチオセミカルバゾン化合物またはそれらの塩、水和物もしくは溶媒和物が、特に侵襲性の強い形態の癌であることが周知である膵臓腫瘍の成長を実質的に抑制し得ることである。したがって本発明の化合物は、膵臓癌治療において、単独でまたは他の抗癌剤と組み合わせて、または治療計画の一部として使用され得る。好ましい実施形態において、チオセミカルバゾン化合物は $Dp4e4mT$ またはそれらの塩もしくは水和物である。他の好ましい実施形態において、チオセミカルバゾンは $Dp4cyCH4mT$ またはそれらの塩もしくは水和物である。

#### 【００４３】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる意外かつ有利な特徴は、本発明のチオセミカルバゾン化合物が、強力な抗増殖チオセミカルバゾン化合物であるジ - 2 - ピリジルケトン 4 , 4 - ジメチル - 3 - チオセミカルバゾン ( D p 4 4 m T ) よりも効果が高く、毒性が低いものであり得ることである。特に好ましい実施形態において、本発明のチオカルバゾン化合物、例えば D p 4 c y c H 4 m T または D p 4 e 4 m T は、D p 4 4 m T よりも実質的に心臓毒性が低い。

#### 【 0 0 4 4 】

タンパク質ミオグロビン ( M b ) は、酸素の貯蔵および筋肉への供与において重要な役割を果たし、ヘモグロビンに対する単量体の対応物である。トリアピン (登録商標) を含む癌の臨床試験において、メトヘモグロビン血症および低酸素症の誘発は、用量を制限する副作用として指摘されている (Attia S, Kolesar J ら (2008). Invest New Drugs 26: 369-379; Ma B, Goh BC ら (2008年). Invest New Drugs 26: 169-73)。癌に対する化学療法を受けている患者において、この合併症は、これらの患者の呼吸器の性能を低下させることが多かったので、望ましくない。したがって、m e t H b の過剰産生により、トリアピン (登録商標) の臨床的有用性が低下する。特に化合物 D p 4 c y c H 4 m T において、本発明の化合物は、抗腫瘍活性を維持しながら、メトヘモグロビン ( m e t H b ) および / またはメトミオグロビン ( m e t M b ) 形成を誘導しないか、または本化合物は、m e t H b および / または m e t M b 形成の誘導が D p 4 4 m T およびトリアピン (登録商標) などの他の抗癌剤よりも顕著に少ないので、他の抗癌剤を凌ぐさらなる長所を有する。

#### 【 0 0 4 5 】

製剤

本発明によれば、感染、疾患または障害の治療または予防のために使用される場合、本発明の化合物は、単独でまたは治療計画の一部として他の薬剤と組み合わせて投与される。本化合物は、本発明による少なくとも 1 つの化合物を含む医薬または獣医学用製剤として投与され得る。本化合物はまた、薬学的に許容可能な塩を含め、好適な塩としても存在し得る。

#### 【 0 0 4 6 】

本発明の化合物の送達に好適な医薬組成物およびそれらの調製法は、当業者にとって容易に明らかとなろう。このような組成物およびそれらの調製のための方法は、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company, 1995年) で見出すことができる。

#### 【 0 0 4 7 】

他の実施形態において、1 つ以上の他の治療剤と組み合わせて本発明の化合物を製剤化し得る。

#### 【 0 0 4 8 】

本発明の他の実施形態において、本発明の化合物は、外科手術および / または他の既知の処置または治療剤、例えば他の抗癌剤、特に化学療法剤、放射線治療薬および / またはアジュバントまたは予防薬との併用治療計画に含まれ得る。好適な薬剤は、例えば、内容全体が参照により本明細書中に組み込まれる、Merck Index, An Encyclopaedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12<sup>th</sup> Ed., 1996年に列挙されている。

#### 【 0 0 4 9 】

例えば、固形腫瘍の治療において使用される場合、アドリアマイシン、タキソール、ドセタキセル、フルオロウラシル、メルファラン、シスプラチン、インターフェロン、C O M P (シクロホスファミド、ピンクリスチン、メトトレキサートおよびプレドニゾン)、エトポシド、m B A C O D (メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルピシン、シクロホスファミド、ピンクリスチンおよびデキサメタゾン)、P R O M A C E / M O P P (プレドニゾン、メトトレキサート (w / ロイコピンレスキュー)、ドキソルピシン、シクロホスファミド、タキソール、エトポシド / メクロレタミン、ピンクリスチン、プレドニゾン及びプロカルバジン)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、アンギオインヒビン、T N P - 4 7 0、ペントサンポリサルフェート、血小板第 4 因子、アンギオスタチン、L

M - 609、SU - 101、CM - 101、テクガラ (Techgalan)、サリドマイド、SP - PG など、1 つ以上の化学療法剤またはそれらの組み合わせとともに本発明の化合物を投与し得る。

【0050】

抗癌剤の他の例としては、アルキル化剤、例えばナイトロジェンマスタード (例えばメクロレタミン、メルファラン、クロランブシル、シクロホスファミド、(L - サルコリシン) およびイホスファミド)、エチレンイミンおよびメチルメラミン (例えばヘキサメチルメラミン、チオテパ)、アルキルスルホネート (例えばブスルファン)、ニトロソウレア (例えばカルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン)、トリアゼン (例えばダカルバジン (ジメチルトリアゼノ - イミダゾールカルボキサミド)、テモゾロミド)、葉酸類似体 (例えばメトトレキサート)、ピリミジン類似体 (例えば 5 - フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、ゲムシタビン)、プリン類似体 (例えば 6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、ペントスタチン (2' - デオキシコホルマイシン) クラドリビン、フルダラビン)、ピンカアルカロイド (例えばビンブラスチン、ビンクリスチン)、タキサン (例えばパクリタキセル、ドセタキセル)、エポドフィロトキシン (例えばエトポシド、テニポシド)、カンプトテシン (トポテカン、イリノテカン)、抗生物質 (例えばアクチノマイシン D、ダウノルビシン (ダウノマイシン、ルビドマイシン)、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン C、ミトラマイシン)、酵素 (例えば L - アスパラギナーゼ)、インターフェロン - 、インターロイキン - 2、シスプラチン、カルボプラチン、ミトキサントロン、ヒドロキシウレア、プロカルバジン、ミトタン、アミノグルテチミド、イマチニブ、副腎皮質ステロイド (例えばプレドニゾン)、プロゲステロン (例えばカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール)、エストロゲン (例えばジェチルスチルベストロール、エチニルエストラジオール)、抗エストロゲン (例えばタモキシフェン、アナストロゾール)、アンドロゲン (例えばプロピオン酸テストステロン、フルオキシメステロン)、抗アンドロゲン物質 (例えばフルタミド) およびゴナドトロピン放出ホルモン類似体 (例えばロイプロリド) が挙げられる。

【0051】

特に好ましい実施形態において、ゲムシタビンもしくは 5 - フルオロウラシルと組み合わせて、またはゲムシタビンおよび 5 - フルオロウラシルと組み合わせて、1 つまたはそれ以上の本発明の化合物を使用し得る。

【0052】

併用計画は、各場合において必要に応じて、共に、連続して、または間隔をあけて投与される活性薬剤を含み得る。本発明の化合物を含む活性薬剤の組み合わせは、相乗効果があり得る。

【0053】

薬学的に許容可能な塩とは、健全な医学的判断の範囲内で、不好適な毒性、刺激、アレルギー反応などなく、ヒトおよび下等動物の組織と接触させるという使用に好適であり、妥当なリスク・ベネフィット比と釣り合っている塩を意味する。薬学的に許容可能な塩は当技術分野で周知である。塩酸塩などの酸付加塩は、本発明の特に好ましい実施形態である。

【0054】

例えば、本発明による化合物の好適な薬学的に許容可能な塩は、薬学的に許容可能な酸 (無機および有機酸を含む。) または薬学的に許容可能な塩基 (無機および有機塩基を含む。) と本発明の化合物を混合することにより調製し得る。したがって本発明の化合物の好適な薬学的に許容可能な塩としては、酸付加塩および塩基の塩が挙げられる。

【0055】

好適な薬学的に許容可能な酸としては、酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、クエン酸、エテンスルホン酸、フマル酸、グルコン酸、グルタミン酸、臭化水素酸、塩酸、イセチオン酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸

、メタンスルホン酸、粘液酸、硝酸、パモ酸、パントテン酸、リン酸、シュウ酸、コハク酸、硫酸、酒石酸、p - トルエンスルホン酸などが挙げられるが、これらに限定されない。現在のところ好ましい酸付加塩は、塩酸塩、臭化水素塩、リン酸塩および硫酸塩であり、最も特に好ましいのは塩酸塩である。

【 0 0 5 6 】

好適な塩基性塩は、無毒性塩を形成する塩基から形成され得る。例としては、アルミニウム、アルギニン、ベンザチン、カルシウム、コリン、ジエチルアミン、ジオラミン、グリシン、リジン、マグネシウム、メグルミン、オラミン、カリウム、ナトリウム、トロメタミンおよび亜鉛塩が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

酸および塩基のヘミ塩、例えばヘミ硫酸塩およびヘミカルシウム塩も形成させ得る。

【 0 0 5 8 】

S. M. Bergeらは、J Pharmaceutical Sciences, 1977年, 66: 1-19において薬学的に許容可能な塩を詳細に記載しており、好適な塩における概説は、StahlおよびWermuth著、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Wiley-VCH, ドイツ、ヴァインハイム, 2002年) により提供される。両文献とも、その全体が本明細書中に組み込まれる。

【 0 0 5 9 】

本発明の化合物の最終的な単離および精製中に、または別個に好適な有機酸と遊離塩基化合物を反応させることによって、塩をインサイチュで調製し得る。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、カンファー酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、ジグルコン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなど、ならびに、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン、トリエタノールアミンなどを含むが限定されない、無毒性アンモニウム、四級アンモニウムおよびアミン陽イオンなどが挙げられる。

【 0 0 6 0 】

本発明の化合物の好都合な投与方式としては、非経口（例えば皮下、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、髄腔内、眼内、鼻腔内、心室内注射または点滴技術）、腹腔内、経口投与、吸入、経皮投与、局所クリームもしくはジェルもしくは粉末または直腸投与が挙げられる。投与経路に依存して、本化合物の治療活性を不活性化させ得る、酵素、酸および他の天然状態の作用から本化合物を保護するための材料で、本製剤および/または本化合物を被覆し得る。

【 0 0 6 1 】

本発明による化合物の分散剤はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、および油中で調製され得る。通常の貯蔵および使用の条件下で、医薬品は、微生物の増殖を防止するために保存料を含有し得る。

【 0 0 6 2 】

注射に好適な医薬組成物は、滅菌水溶液（好適に水溶性である活性物質に対して）または分散液、および滅菌注射溶液または分散液の即時調合製剤のための滅菌粉末を含む。理

10

20

30

40

50

想的には、本組成物は製造および貯蔵の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して組成物を安定化させるために、保存料を含み得る。

【 0 0 6 3 】

本発明の一実施形態において、本発明の化合物は、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な可食担体とともに経口投与され得る。本化合物および他の成分はまた、硬または軟殻ゼラチンカプセルに封入されるか、錠剤に圧縮されるか、または個人の食事に直接組み込まれ得る。経口の治療用投与の場合、本化合物は賦形剤とともに組み込まれ得、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウェーハ剤などの形態で使用され得る。好適には、このような組成物および調合物は少なくとも1重量%の活性化化合物を含有し得る。医薬組成物および調合物中の、本発明の化合物のパ

10

【 0 0 6 4 】

「薬学的に許容可能な担体」という用語は、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含むものとする。薬学的に活性のある物質のための、このような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。従来の媒体または薬剤が本化合物と不適合である場合を除き、治療用組成物および治療および予防法においてそれらを使用することが企図される。本発明によると、補助的な活性化化合物も組成物に組み込み得る。投与しやすさおよび用量の均一性のため、非経口組成物を単位剤形に製剤化することは特に有利である。

20

【 0 0 6 5 】

「単位剤形」という用語は、本明細書中で使用される場合、治療しようとする個体のための単一の投与量として適した、物理的に別個の単位を指し；所定量の化合物を含有する各単位は、必要な薬剤担体と合わせて所望の治療効果をもたらすように計算される。本化合物は、許容可能な投与単位で、好適な薬学的に許容可能な担体とともに、有効量で、都合が良く、有効な投与のために製剤化され得る。補助的な活性成分を含有する組成物の場合、投与量は、通常の用量および前記成分の投与方式を参照することにより決定される。

30

【 0 0 6 6 】

一実施形態において、担体は、経口投与可能な担体であり得る。

【 0 0 6 7 】

医薬組成物の別の形態は、経口投与に好適な腸溶性の被覆がある顆粒剤、錠剤またはカプセル剤として製剤化される剤形である。

【 0 0 6 8 】

遅延または持続放出製剤も本発明の範囲に含まれる。

【 0 0 6 9 】

好ましい実施形態において、本発明の化合物を注射により投与し得る。注射溶液の場合、担体は、例えば水（例えば注射用の水）、生理食塩水、5%グルコース溶液、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適当な混合物および植物油を含有する、溶媒または分散媒であり得る。好適な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散の場合には必要な粒径の維持により、および界面活性剤（例えばポリソルベート80）の使用により、維持され得る。微生物の作用の阻止は、様々な抗菌剤および/または抗真菌剤を含めることにより達成され得る。好適な薬剤は、当業者にとって周知であり、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ベンジルアルコール、アスコルビン酸、チメロサルなどが挙げられる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを本組成物中に含むことが好ましいもので

40

50

あり得る。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含めることによって実現し得る。

【0070】

滅菌注射溶液は、上記で列举された成分の1つまたは組み合わせとともに、必要な量の類似体を好適な溶媒中に組み込み、その後、必要に応じて濾過滅菌することによって調製し得る。一般に分散液は、基本的な分散媒および上記で列举されたものからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに類似体を組み込むことにより調製し得る。

【0071】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル剤などは、次のものも含有し得る：結合剤、例えばグラガcant (gragacanth) ガム、アカシアゴム、コーンスターチまたはゼラチンなど；賦形剤、例えばリン酸二カルシウムなど；崩壊剤、例えばコーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸など；潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムなど；および甘味料、例えばスクロース、ラクトースもしくはサッカリンなど、または香味料、例えばペパーミント、ウィンターグリーン油もしくはチェリー香味料など。単位剤形の形状がカプセル剤である場合、上記のタイプの物質に加えて、液体担体を含有し得る。様々な他の物質が、コーティングとして、または用量単位の物理的形状をあるいは修飾するために存在し得る。例えば、錠剤、丸剤またはカプセル剤は、シェラック、糖または両方で被覆し得る。シロップ剤またはエリキシル剤は、類似体、甘味料としてのスクロース、保存料としてのメチルおよびプロピルパラベン、色素および、チェリーまたはオレンジ香味料などの香料を含有し得る。言うまでもなく、何らかの単位剤形を調製する際に使用される何れの物質も、薬学的に純粋であり、使用される量で実質的に無毒性でなければならない。さらに、類似体は、徐放性の調合物および製剤に組み込まれ得る。

【0072】

好ましくは、本医薬組成物は、酸の加水分解を最小限に抑えるために好適な緩衝液をさらに含み得る。好適な緩衝剤は当業者にとって周知であり、リン酸塩、クエン酸塩、炭酸塩およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0073】

本発明による医薬組成物の単回または複数回投与を行い得る。当業者は、日常的な実験により、本発明の化合物および/または組成物の効果的な無毒性の投与量レベルおよび、化合物および組成物が適用可能である疾患および/または感染の治療に適するような投与パターンを決定することができる。

【0074】

さらに、定められた日数にわたる、1日あたりに与えられる本発明の化合物または組成物の投与回数など、最適な治療コースが、治療決定試験の従来のコースを用いて確認される得ることが、当業者には明らかであろう。

【0075】

一般に、24時間当たりの有効薬量は、約0.0001mg~約1000mg/kg体重；好適には約0.001mg~約750mg/kg体重；約0.01mg~約500mg/kg体重；約0.1mg~約500mg/kg体重；約0.1mg~約250mg/kg体重；または約1.0mg~約250mg/kg体重の範囲であり得る。より好適には、24時間当たりの有効薬量は、約1.0mg~約200mg/kg体重；約1.0mg~約100mg/kg体重；約1.0mg~約50mg/kg体重；約1.0mg~約25mg/kg体重；約5.0mg~約50mg/kg体重；約5.0mg~約20mg/kg体重；または約5.0mg~約15mg/kg体重の範囲であり得る。

【0076】

あるいは、有効薬量は、治療しようとする患者の体表面積(BSA)に従い計算され得る。患者のBSAは、当業者にとって公知の方法を用いて容易に計算し得る。好適な用量は一般的に約500mg/m<sup>2</sup>以下であり得る。例えば、一般的に、有効薬量は、約10~約500mg/m<sup>2</sup>、約25~約350mg/m<sup>2</sup>、約25~約300mg/m<sup>2</sup>、約25~約250mg/m<sup>2</sup>、約50~約250mg/m<sup>2</sup>および約75~約150mg/m<sup>2</sup>

$m^2$  の範囲であり得る。

【0077】

ここで、以下の非限定例を参照して、本発明を説明する。

【実施例】

【0078】

実施例1 - Dp4cyh4mT、Dp4e4mTおよび対応する塩酸塩の合成方法：

確立されている方法の組み合わせを用いて、キレート剤、ジ-2-ピリジルケトン4-エチル-4-メチル-3-チオセミカルバゾン(Dp4e4mT)およびジ-2-ピリジルケトン4-シクロヘキシル-4-メチル-3-チオセミカルバゾン(Dp4cyh4mT)を合成した(Scovill, J P(1990年).Phosphorous, Sulphur and Silicon 60:15-19; Richardson, D.Rら(2006年). J Med Chem. 49: 6510-6521)。簡潔に述べると、NaOH溶液(250mL、0.8M)中のN-メチルシクロヘキシルアミンまたはN-エチルメチルアミン(0.2mol)に、二硫化炭素(0.2mol)を滴下して添加し、有機層が殆ど消失するまで反応させた。次に、クロロ酢酸ナトリウム(0.2mol)を水性抽出液に添加し、室温で一晩反応させた。濃HCl(25mL)の添加により、固体のカルボキシメチルチオカルバメート中間体を得られた。およそ0.08molのカルボキシメチルチオカルバメート中間体を20mLヒドラジン水和物+10mL水の中で溶解した。この後、穏やかな加熱(発煙するまで)および冷却を5サイクル行った。次に、チオセミカルバジド中間体の微細な白色結晶が形成されるまで溶液を静置した。EtOH(15mL)中で溶解させたジ-2-ピリジルケトン(10mmol)に水(15mL)中のチオセミカルバジド中間体(10mmol)の溶液を添加した。次に、5滴の氷酢酸を添加し、混合物を2時間還流させ、5に冷却したところ、黄色のDp4cyh4mTまたはDp4e4mT沈殿物がそれぞれ得られた。最終的に、最小体積の冷ヘキサン中でDp4cyh4mTまたはDp4e4mTを溶解し、等モルのHClを添加し、対応するHCl塩を得た。合成スキームを図1Bで示す。

【0079】

結果：

Dp4cyh4mT：収率64%(CS<sub>2</sub>より)。分析計算値、C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>Sに対して：C、64.56；H、6.56；N、19.81%。実測値：C、64.51；H、6.47；N、20.04%。

【0080】

Dp4cyh4mT・HCl・5H<sub>2</sub>O 収率87%(Dp4cyh4mTより)。分析計算値、C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>S・HCl・5.5H<sub>2</sub>Oに対して：C、47.54；H、7.14；N、14.59%。実測値：C、47.06；H、6.65；N、14.95%。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)：8.82(d, 1H)、8.61(d, 1H)、8.04-7.90(m, 3H)、7.62-7.56(t, 2H)、7.50-7.46(t, 1H)、3.18(s, 3H)、1.83-1.49(m, 7H)、1.40-1.10(m, 3H)。MS m/z(%) 376.3(M+H, 5)、376(M+Na, 34)。

【0081】

Dp4e4mT：収率44%(CS<sub>2</sub>より)。分析計算値、C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>Sに対して：C、63.4；H、5.7；N、19.7%。実測値：C、62.8；H、5.9；N、19.5%。

【0082】

Dp4e4mT・HCl・5.5H<sub>2</sub>O 収率91%(Dp4e4mTより)。分析計算値、C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>S・HCl・5.5H<sub>2</sub>Oに対して：C、41.42；H、6.72；N、16.10%。実測値：C、41.31；H、6.45；N、15.95%。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)：8.84(d, 1H)、8.66(d, 1H)、8.13-8.09(t, 1H)、8.04-7.97(dt, 2H)、7.67-7.

59 (dt, 3H)、3.32 (s, 3H)、1.20 (s, 3H)。MS  $m/z$  (%) 322.0 (M+Na, 46)、620.87 (M; 二量体、+Na、100)。

# 【0083】

実施例2 - Dp4e4mTおよびDp4cycH4mTの抗増殖活性

方法：

American Type Culture Collection (ATCC; アメリカ合衆国メリーランド州ロックヴィル)よりSK-N-MCヒト神経上皮腫細胞を入手して、既に述べられている方法に従って培養した (Richardson, DR (1995年). Blood 86:4295-306)。10%ウシ胎仔血清 (FCS; JRH Biosciences, アメリカ合衆国カンザス州)、1%非必須アミノ酸 (Gibco, オーストラリア、ヴィクトリア州)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン (Gibco, オーストラリア、ヴィクトリア州) およびファンギゾン (0.28 ng/mL; Squibb Pharmaceuticals, カナダ、モントリール) を含有した最小必須培地 (MEM; Invitrogen, アメリカ合衆国カリフォルニア州) 中で細胞を維持した。

# 【0084】

MIAPaCa-2、PANC1、CAPAN-2およびCFPAC-1を含む膵臓癌細胞株は、Andrew Biankin教授 (Garvan Institute, オーストラリア、ニューサウスウェールズ州) の厚意により譲渡された。MIAPaCa-2、PANC1およびCFPAC-1細胞株をDMEM培地 (Invitrogen) 中で増殖させ、CAPAN-2細胞をマッコイ培地 (Invitrogen) 中で増殖させた。培地には全て、10% (v/v) ウシ胎仔血清 (Invitrogen)、1% (v/v) 非必須アミノ酸 (Invitrogen)、1% (v/v) ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen)、2 mM L-グルタミン (Invitrogen)、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン (Invitrogen)、100 U/mL ペニシリン (Invitrogen) および0.28  $\mu$ g/mL ファンギゾンを補給した。

# 【0085】

結果：

最初に化合物の細胞増殖阻害能をMTTアッセイによりSK-N-MC細胞において評価した。Dp4e4mTおよびDp4cycH4mTの両方が、SK-N-MC細胞において、DFO ( $p < 0.05$ ) および鉄キレート剤、2-ヒドロキシ-1-ナフチルアルデヒドイソニコチノイルヒドラゾン (311) よりも有意に高い ( $p < 0.05$ ) 抗増殖活性を示し (図2; 表1)、 $IC_{50}$  値はそれぞれ0.0041および0.013  $\mu$ Mであった。

# 【0086】

表1. SK-N-MC神経上皮腫に対するDp4e4mTおよびDp4cycH4mTの抗増殖活性。MTTアッセイにより求めた場合の、SK-N-MC神経上皮腫細胞株におけるDp4e4mTおよびDp4cycH4mTの $IC_{50}$  ( $\mu$ M) 値。細胞を播種し、ウェルに24時間接着させ、次いで対照培地またはキレート剤とともに37℃で72時間温置した。結果は平均 $\pm$ SD (3回の実験) である。

# 【0087】

## 【表1】

	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>DFO</b>	<b>13.4 <math>\pm</math> 3.7</b>
<b>311</b>	<b>0.72 <math>\pm</math> 0.32</b>
<b>Dp4mT</b>	<b>0.34 <math>\pm</math> 0.11</b>
<b>Dp4m4eT</b>	<b>0.0041 <math>\pm</math> 0.0015</b>
<b>Dp4cycH4mT</b>	<b>0.013 <math>\pm</math> 0.0016</b>

# 【0088】



キレート剤、Dp4e4mTおよびDp4cycH4mTは、アルキル官能基による末端窒素(N4)での水素原子の置換を通じて、化合物ジ-2-ピリジルケトン4-メチル-3-チオセミカルバゾン(Dp4mT)と構造的に関連がある。Dp4e4mTの生成は、Dp4mTのN4での水素原子のエチル基による置換を含み、一方でDp4cycH4mTは、シクロヘキシル置換基を特徴とする。これらの構造修飾は、Dp4mTと比較して、両類似体の抗増殖活性を有意に( $p < 0.001$ )向上させることが分かったが、この $IC_{50}$ 値は $0.34 \mu M$ である(図2、表1)。

#### 【0089】

抗増殖活性スペクトルをさらに調べるために、PANC1、MIAPaCa-2、CFPAC-1およびCAPAN-2膵臓癌細胞を用いてMTT増殖アッセイを行い、インビトロで膵臓癌に対してDp4cycH4mTを試験した。比較として、ゲムシタビンおよび5-フルオロウラシルを含め、膵臓癌に対して現在使用される治療薬も試験した。鉄キレート剤、DFOを陽性対照として含めた。

#### 【0090】

MIAPaCa-2、PANC1およびCAPAN-2細胞において、最大抗増殖活性は、Dp4cycH4mTで観察され(図3A、BおよびC)、 $IC_{50}$ 値はゲムシタビンおよび5-フルオロウラシルと比較して有意に( $p < 0.01$ )低かった(表2A)。実際に、Dp4cycH4mTに対する $IC_{50}$ 値は、4種類の細胞タイプのうち2種類において、ゲムシタビンおよび5-フルオロウラシルと比較した場合、それぞれ、少なくとも100倍および1000倍低かった(表2A)。陽性対照DFOの抗増殖活性は比較的低かった。

#### 【0091】

表2A. 膵臓癌細胞株に対するDp4cycH4mTの抗増殖活性。MTTアッセイにより測定した場合の、様々な膵臓細胞株における、DFOおよび臨床で使用される薬物、ゲムシタビンおよび5-フルオロウラシルと比較した、Dp4cycH4mTの成長および抗増殖活性 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )値。細胞を播種し、ウェルに24時間接着させ、次いで対照培地またはキレート剤とともに37°Cで72時間温置した。結果は平均 $\pm$ SD(3回の実験)である。

#### 【0092】

#### 【表2】

	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )			
	DFO	Dp4cycH4mT	ゲムシタビン	5-フルオロウラシル
<b>MIAPaCa-2</b>	$38.7 \pm 6.2$	$0.009 \pm 0.0003$	$0.02 \pm 0.005$	$24.3 \pm 6.3$
<b>PANC 1</b>	$9.5 \pm 1.4$	$0.05 \pm 0.002$	$11.0 \pm 0.8$	$62.3 \pm 6.5$
<b>CAPAN-2</b>	$7.0 \pm 5.4$	$0.04 \pm 0.008$	$40.8 \pm 4.7$	$59.2 \pm 24.2$
<b>CFPAC-1</b>	$14.7 \pm 3.1$	$0.4 \pm 0.2$	$0.02 \pm 0.02$	$41.2 \pm 1.1$

#### 【0093】

チオセミカルバゾンが最大抗増殖活性を有した他のタイプの細胞と対照的に、CFPAC-1細胞はゲムシタビンに最も感受性があった。実際に、ゲムシタビンに対する $IC_{50}$ 値は、Dp4cycH4mTよりも有意に( $p < 0.05$ )低かった(図3Dおよび表2A)。Dp4cycH4mTの $IC_{50}$ 値は、CFPAC-1細胞においてゲムシタビンよりも低かった(図3D、表2B)。したがって、これらのデータから、チオセミカルバゾンは、より高い用量で使用された場合、インビトロでこの細胞タイプの増殖をほぼ完全に阻害する可能性があり、その一方でゲムシタビンの抗増殖活性がより限定的であることが示唆され(図3D)、様々な細胞タイプの間で反応が異なることが明らかとなる。

## 【0094】

表2B．膵臓癌細胞株に対するDp4cycH4mTの抗増殖活性。MTTアッセイにより測定した場合の、様々な膵臓細胞株における、DFOおよび臨床で使用する薬物、ゲムシタビンおよび5-フルオロウラシルとの比較における、Dp4cycH4mTのIC<sub>90</sub>値(μM)。細胞を播種し、ウェルに24時間接着させ、次いで対照培地またはキレート剤とともに37℃で72時間温置した。結果は平均±SD(3回の実験)である。

## 【0095】

## 【表3】

	IC <sub>90</sub> (μM)			
	DFO	Dp4cycH4mT	ゲムシタビン	5-フルオロウラシル
MIAPaCa-2	> 80	> 5	> 5	> 5
PANC 1	> 80	> 5	> 5	> 20
CAPAN-2	> 80	> 5	> 5	> 80
CFPAC-1	> 80	5.4 ± 1.1	30.4 ± 2.2	> 40

10

## 【0096】

実施例3 - 細胞からのFe排出および、Dp4e4mTおよびDp4cycH4mTからのトランスフェリンからのFe取り込みの阻害

方法：

## 鉄排出アッセイ

確立されている方法を用いて、予め標識したSK-N-MC神経上皮腫細胞からの<sup>59</sup>Feの放出における、鉄キレート剤、Dp4e4mTおよびDp4cycH4mTの影響を調べた(例えばBaker, Eら(1992年). Hepatology 15:492-501)。最初にSK-N-MC細胞を35mm培養皿に播種し、それらがおよそ80%コンフルエントになるまで、37℃で5%CO<sub>2</sub>/95%大気加湿恒温槽中で温置した。その後、0.06mg/mLの<sup>59</sup>Fe-Tf(Baker, Eら(1992年). Hepatology 15:492-501で概説されるように調製)を含有する好適な培地とともに37℃で3時間温置することにより、細胞を予め標識した。次に、培養皿を氷上に置き、過剰な<sup>59</sup>Fe-Tfを含有する上清を吸引し、氷冷PBSを用いて細胞を4回洗浄した。次いで、25μMキレート剤を含有する培地または培地単独(対照)で、37℃でさらに3時間、細胞を温置した。3時間後、培養皿を再び氷上に置き、計数管中で培地を回収し、これにより、放出された<sup>59</sup>Feの測定を行った。細胞を含有するプレートに氷冷PBS(1mL)を添加し、Teflonスパーテルを用いてプラスチック面から細胞を擦り取り、これもまた計数管中で回収した。これらの管は、細胞内<sup>59</sup>Fe含量に相当する。結果は、存在する総<sup>59</sup>Feの%としての総放出<sup>59</sup>Feとして表す。Wallac Wizard 3"ガンマカウンター(PerkinElmer, アメリカ合衆国マサチューセッツ州)を用いて、放射能を測定した。

20

30

40

## 【0097】

## 鉄取り込みアッセイ

確立されている方法を用いて、SK-N-MCが培地から<sup>59</sup>Feを得る能力に対する鉄キレート剤、Dp4e4mTおよびDp4cycH4mTの影響を調べた(Richardson, DRら(1995年). Blood 86: 4295-306; Baker, Eら(1992年). Hepatology 15: 492-501)。鉄排出実験と同じようにして細胞を培養した。細胞がおよそ80%コンフルエントになったら、25μMキレート剤を含有する培地または培地単独(対照)で、これらを37℃で3時間温置した。<sup>59</sup>Fe-Tf(0.06mg/mL)を培地に添加した。温置終了時に、培養皿を氷上に置き、培地を吸引し、氷冷PBSで細胞を4回洗浄した。プロテアーゼ(1mL; 1mg/mL; Sigma-Aldrich, オーストラリア, ニューサウスウェールズ

50

州) 溶液を各プレートに添加し、氷上で30分間静置した。これによって、膜結合 $^{59}\text{Fe}$ -Tfの除去が促進された。次に、Teflonスパーテルを用いてプラスチック面から細胞を擦り取り、エッペンドルフ管中で回収した。これらを10000rpmおよび4で3分間遠心した。次に、上清を計数管に移し、細胞ペレットをPBS中で再懸濁した後、これも別のセットの計数管に移した。Wallac Wizard 3" ガンマカウンター(Perkin Elmer, アメリカ合衆国マサチューセッツ州)を用いて放射能を測定した。結果は、対照値の%としての細胞分画の平均 $^{59}\text{Fe}$ 含量として表す。

#### 【0098】

実施例3a - Dp4e4mTおよびDp4cyCH4mTが介在する細胞からのFe排除  
全てのジピリジルチオセミカルバゾン化合物が、対照細胞と比較して有意な鉄排出活性の上昇を示した( $p < 0.001$ ) (図4A)。対照細胞は、新鮮培地との3時間の再温置後、細胞内総 $^{59}\text{Fe}$ の7%を放出した(図4A)。化合物Dp4e4mTは、細胞内 $^{59}\text{Fe}$ の38%を動員することができ(図4A)、これは42%の細胞内Feを動員した化合物Dp4mTと同等であった。化合物Dp4cyCH4mTが動員した細胞内 $^{59}\text{Fe}$ は僅か22%であり、これは、16%の細胞内Feを動員した、臨床で使用されているキレート剤DFOと同様であったが、構造的に関連のある類似体Dp4mTよりも少なかった(図4A)。このことから、Dp4cyCH4mTは、DFOおよびDp4mTと比較して、その顕著な抗増殖活性を考えると、Feキレート化以外の他の作用機構を有し得ることが示唆される(表1)。内部標準として化合物311の鉄排出プロファイルも調べたところ、これは先行実験と一致した。

#### 【0099】

実施例3b - Dp4e4mTおよびDp4cyCH4mTによる $^{59}\text{Fe}$ トランスフェリンからの細胞 $^{59}\text{Fe}$ 取り込みの阻害

Feキレート化効率の特徴をさらに調べるために、Dp4e4mTおよびDp4cyCH4mTの $^{59}\text{Fe}$ -Tfからの $^{59}\text{Fe}$ 取り込み阻害能を、構造的に関連がある化合物Dp4mTと比較した。Dp4e4mTは、 $^{59}\text{Fe}$ 細胞内取り込みを対照の12%に制限したが、これは、 $^{59}\text{Fe}$ 細胞内取り込みを対照の6%に制限したDp4mTと同等であった(図4B)。Dp4cyCH4mTは、Dp4e4mTまたはDp4mTの何れよりも効果が小さく、 $^{59}\text{Fe}$ 取り込みを21%に制限した(図4B)。しかし、化合物は全て、未処理細胞で見られたものの84%までしか $^{59}\text{Fe}$ 取り込みを制限しなかったDFOよりもかなり高い活性を示した( $p < 0.001$ ) (図4B)。鉄排出実験と同様に、化合物311も内部標準として調べたところ、 $^{59}\text{Fe}$ 細胞内取り込みを5%に制限したが、これは先行実験と一致した(例えばRichardson, DRら(1995). Blood 86:4295-306)。

#### 【0100】

実施例4 - Dp4e4mTおよびDp4cyCH4mTによる腫瘍成長のインビボでの阻害

方法:

インビボ試験のために雌ヌードマウス(BALBc nu/nu)、8週齢を使用し、試験は全て、Animal Ethics Committee(シドニー大学)により承認された。標準的技術により腫瘍異種移植片(Whitnall, M, J. Howardら(2006). Proc Natl Acad Sci USA 103: 14901-6)を確率した。DMS-53肺癌の成長を調べる試験において、指数関数的に増殖する細胞を回収し、細胞 $1 \times 10^7$ 個/ $100 \mu\text{L}$ を用いて、細胞含有培地およびマトリゲル(登録商標)(BD Biosciences, アメリカ合衆国マサチューセッツ州)の1:1混合物を調製した。メトキシフルランで麻酔したマウスの右脇腹に細胞/マトリゲル混合物をs.c.注射した。PANC1膵臓癌細胞の増殖を調べる実験において、各マウスの皮下にマトリゲル(BD Biosciences, アメリカ合衆国カリフォルニア州サンノゼ)中で懸濁した $2 \times 10^6$ 個のPANC1細胞を注射した。ノギスにより腫瘍サイズを測定し、以前に記載のとおり腫瘍体積を計算した(Balsari, A., M. Tortoretoら(2004). Eur J Cancer 40: 1275-81)。腫瘍が平均 $90 \text{ mm}^3$ に到達したら、処置を開始した(第0日; 図

10

20

30

40

50

5)。

【0101】

0.9%生理食塩水中の30%プロピレングリコール中でDp44mTおよびDp4cy c H4mT・HClを溶解し、個々の試験において特定された投与量で、5日/週で静脈内(尾静脈を介して)注射するか、または5日/週で強制経口投与により与えた。

【0102】

PANC1試験において、0.9%生理食塩水中の15%プロピレングリコール中でゲムシタピンを溶解し、3日に1回、腹腔内注射し、各群(n=8)は、ゲムシタピン(5mg/kg)、Dp44mT(0.4mg/kg)、Dp4cy c H4mT・HCl(5mg/kg)またはビヒクル対照の何れかの投与を受けた。PANC1試験において、ビヒクル対照群をさらに2つの群(n=4)に分け、一方に0.9%生理食塩水中の30%プロピレングリコールを5日/週で静脈内注射し、これを鉄キレート剤処置群に対する対照とした。他方の群には0.9%生理食塩水中の15%プロピレングリコールを3日に1回、腹腔内投与し、これはゲムシタピン処置に対する好適な対照であった。対照腫瘍が1,000mm<sup>3</sup>に到達したら、倫理的要件のため、安楽死させた。

【0103】

血液学、生化学および組織学：

インビボ実験の終了時に、心臓穿刺により血液を回収し、標準的方法により血液学的指標をアッセイした(Dunn, L. L, et al (2006) Carcinogenesis 27.2157-69)。臓器および腫瘍を含む組織をパラフィンブロック中に包埋し、切片を作製した。3種類の異なる染色法、すなわちヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)、ペルルス(Pearl's)またはゴモリトリクローム染色を利用した。PANC1腫瘍異種移植片試験において、独立した獣医病理学者(Dr Terrence Rothwell, Rothwell Consulting, オーストラリア、ニューサウスウェールズ州アバロンビーチ)が、病理学的特徴の組織学的分析および定量を行った。

【0104】

統計解析：

スチューデントのt検定を用いてデータを比較した。結果は、別段の断りがない限り、平均±SEMとして表した。p<0.05である場合、データは統計学的に有意であるとみなした。

【0105】

実施例4a-DMS-53ヒト肺癌のインビボ阻害におけるi.v投与によるDp4e4mT・HClの影響

ヌードマウス中のDMS-53異種移植片モデルにおいてDp4e4mT・HClに対する強力な反応が観察された(図5)。25日後、対照ビヒクル処理マウスにおける平均正味腫瘍サイズは、最初の腫瘍体積の780%であり、一方で、4または6mg/kgのDp4e4mTで処置したマウスでは正味腫瘍サイズが最初の体積の120~122%であった。これは、最初の腫瘍体積の122%まで腫瘍成長を抑制した0.75mg/kgのDp44mTにより示された腫瘍抑制制度と同等であった(図5)。

【0106】

実施例4a(i)-i.v.によるDp4e4mT処置後の生物学的評価：

DMS-S3ヒト肺癌腫を有するマウスにおける体重減少および血液学的分析

DMS-53肺癌試験において、0.75mg/kgのDp44mTでi.v.処置したマウスは、最初の体重の9%、体重が減少した(表3)。対照的に、4または6mg/kgのDp4e4mT・HClで処置したマウスの体重減少は、25日間の処置後、それぞれ、最初の体重の0.6%および7%であった(表3)。この実験における対照マウスの体重減少は最初の体重の6%であった(表3)。

【0107】

## 【表 4】

表 3. ノードマウスの Dp4e4mT i.v 投与実験における DMS-53 肺癌の成長：体重および臓器重量 (g)

実験群 (n=6)					
臓器	対照	Dp4e4mT-HCl (6 mg/kg)	Dp4e4mT-HCl (4 mg/kg)	Dp4e4mT-HCl (1.5 mg/kg)	Dp44mT (0.75 mg/kg)
体重減少 (% 最初の体重)	95.45 ± 3.41	93.38 ± 3.96	99.41 ± 1.75	95.14 ± 0.97	91.01 ± 5.3
肝臓	1.05 ± 0.13	1.1 ± 0.08	1.03 ± 0.02	1.01 ± 0.02	1.04 ± 0.05
脾臓	0.13 ± 0.02	0.089 ± 0.01	0.08 ± 0.003	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02
腎臓	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.01
心臓	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.004	0.11 ± 0.01
脳	0.31 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.01	0.26 ± 0.13	0.32 ± 0.01
腫瘍	0.97 ± 0.08	0.04 ± 0.03**	0.11 ± 0.09***	0.48 ± 0.6*	0.1 ± 0.02**

結果は平均 ± SEM であり、スチューデントの T 検定により判定した場合、ビヒクル対照と比較して、\*p<0.05;

\*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001

## 【 0 1 0 8 】

血液学に関して、0.75 mg/kg の Dp44mT または 1.5、4 もしくは 6 mg/kg の Dp4e4mT・HCl での処置の 2 週間後、赤血球細胞数、ヘモグロビンまたは白血球細胞数の有意な変化はなかった (表 4)。このことから、使用した用量および投与スケジュールにおいて、Dp4e4mT・HCl が耐容性良好であったことが示される。

## 【 0 1 0 9 】

10

20

## 【表 5】

表 4. ノードマウス Dp4e4mT i.v. 投与試験における DMS-53 肺癌の成長：血液学

	WBC (細胞10×9個/L)	RBC (細胞10×12個/L)	HGB (g/L)	HCT	PLT (細胞10×9個/L)
対照					
平均	2.77	10.03	144.67	0.44	874.67
STD	0.57	0.13	8.5	0.03	655.79
Dp4e4mT.HCl (1.5 mg)					
平均	3.34	8.76	150.60	0.4	766.4
STD	1.12	3.31	7.99	0.14	684.19
Dp4e4mT.HCl (4 mg)					
平均	2.94	10.74	153.75	0.47	1224.5
STD	0.56	0.33	4.92	0.01	713.7
Dp4e4mT.HCl (6 mg)					
平均	4.63	9.33	132.33	0.41	1238
STD	2.46	1.01	16.26	0.05	729.11
Dp44mT (0.75 mg)					
平均	5.38	9.87	135.50	0.43	1274.50
STD	1.46	0.83	10.61	0.01	43.13

WBC - 白血球細胞；RBC - 赤血球細胞；HGB - ヘモグロビン；HCT - ヘマトクリット；PLT - 血小板

## 【0110】

実施例 4 a ( i i ) - DMS - 53 ヒト肺癌を有するマウスにおける i . v . D p 4 e 4 m T 処置後の組織学における D p 4 e 4 m T の影響

i . v . DMS - 53 ヒト肺癌実験からの組織において、組織学的評価を行った。ビヒクル、D p 4 4 m T ( 0 . 7 5 m g / k g で 2 週間 ) または D p 4 e 4 m T . H C l ( 4 m g / k g および 6 m g / k g で 2 週間 ) で処置した、DMS - 53 異種移植片を移植したマウスからの組織を比較して、結果を考察する。ヘマトキシリンおよびエオシン ( H & E ) 染色した切片において、対照およびキレート剤処置マウスからの肝臓、脾臓、腎臓、脳または腫瘍の組織学において、顕著な差は見られなかった。

## 【0111】

しかし、D p 4 4 m T ( 0 . 7 5 m g / k g ; 図 6 ) で処置したマウスにおいて心筋病変が観察された。このような病変は、あまり分化していない壊死病巣から構成され、ゴモリトリクローム染色を用いて明らかになった未熟な繊維性組織に置き換わっており ( 矢印 ; 図 6 ) 、これは D p 4 4 m T に対して以前記載されたものと一致した ( Whitnall, M., J. Howard ら (2006年). Proc Natl Acad Sci USA 103:14901-6 ) 。しかし、D p 4 e 4 m T . H C l は、i . v . 投与 2 週間後、4 m g / k g または 6 m g / k g で心筋病変を誘発しなかった ( 図 6 ) 。

## 【0112】

10

20

30

40

50

実施例 4 b - DMS - 53 ヒト肺癌のインビボ阻害における、経口投与による Dp4e4mT・HCl の影響

Dp4e4mT・HCl を i.v. 投与により与えた場合に見られたものと同様に (図 5)、DMS - 53 異種移植片を有するヌードマウスにおいて、強制経口投与による Dp4e4mT・HCl に対する強力な反応が観察された (図 7 A)。21 日後、対照ビヒクル処置マウスにおける平均正味腫瘍サイズは、最初の腫瘍体積の 1124 % であり、一方、7.5 または 10 mg / kg の Dp4e4mT で処置したマウスでは、最初の腫瘍体積の正味腫瘍サイズは、それぞれ 404 % および 284 % であった (図 7 A)。低用量の Dp4e4mT・HCl (2.5 および 5 mg / kg) も、腫瘍成長を最初の体積の 645 % および 733 % にそれぞれ制限した (図 7 A)。

#### 【0113】

腫瘍重量を見てみると、21 日の処置期間終了時、未処置対照マウスの腫瘍重量は平均で 1.8 g となった (図 7 B)。強制経口投与により 10 mg / kg の Dp4e4mT・HCl で処置したマウスの平均腫瘍重量は、強力かつ有意に ( $p < 0.0002$ ) 0.46 g に減少した (図 7 B)。強制経口投与による低用量の Dp4e4mT・HCl も、腫瘍重量を有意に抑制した (図 7 B)。例えば、最低用量である 2.5 mg / kg を投与した結果、平均腫瘍重量が 0.63 g に有意に ( $p < 0.002$ ) 減少した (図 7 B)。

#### 【0114】

実施例 4 b (i) - 経口 Dp4e4mT 処置後の生物学的評価：DMS - 53 ヒト肺癌を有するマウスにおける体重減少および血液学的分析

Dp4e4mT・HCl で経口により処置した DMS - 53 肺癌試験マウスにおいて、対照群と比較して、どの処置群も有意な体重減少はなかった (表 5)。例えば、対照マウスがそれらの最初の体重の 96 % を維持した一方で、最高用量の Dp4e4mT・HCl (10 mg / kg) で処置したマウスはそれらの最初の体重の 94 % を保持しており、このことから、この用量での処置が耐容性良好であったことが示される (表 5)。

#### 【0115】

#### 【表 6】

表 5. ヌードマウス Dp4e4mT 経口投与実験における DMS-53 肺癌の成長：体重および臓器重量 (g)

実験群					
臓器	対照 (n = 11)	Dp4e4mT (2.5 mg/kg) (n=8)	Dp4e4mT (5 mg/kg) (n=10)	Dp4e4mT (7.5 mg/kg) (n=9)	Dp44mT (10 mg/kg) (n=9)
体重減少 (% 最初の体重)	96.3 ± 1.7	94.1 ± 1.3	91.6 ± 2.4	91.6 ± 2.2	93.6 ± 1.8
肝臓	0.84 ± 0.04	0.87 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.83 ± 0.03	0.88 ± 0.02
脾臓	0.082 ± 0.003	0.075 ± 0.004	0.075 ± 0.004	0.061 ± 0.009	0.081 ± 0.005
腎臓	0.205 ± 0.003	0.194 ± 0.005	0.187 ± 0.006	0.193 ± 0.008	0.208 ± 0.004
心臓	0.083 ± 0.002	0.078 ± 0.002	0.078 ± 0.002	0.092 ± 0.005	0.102 ± 0.005
脳	0.367 ± 0.007	0.372 ± 0.006	0.367 ± 0.007	0.356 ± 0.007	0.363 ± 0.008
肺	0.115 ± 0.003	0.121 ± 0.005	0.117 ± 0.003	0.119 ± 0.004	0.133 ± 0.008
腫瘍	1.76 ± 0.24	0.63 ± 0.17**	0.89 ± 0.14**	0.60 ± 0.15**	0.46 ± 0.1***

値は、平均 ± SE として表した。スチューデント T 検定により判定した場合、ビヒクル対照と比較して、\*  $p < 0.05$ 、

\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$

#### 【0116】

血液学に関して、2.5、5、7.5 または 10 mg / kg の Dp4e4mT・HCl

での21日間の処置後、赤血球細胞数、ヘマトクリットまたは白血球細胞数の有意な変化があった(表6)。未処置動物と比較して、5 mg / kg の D p 4 e 4 m T . H C l により白血球細胞が有意に ( $p < 0.05$ ) 減少し、10 mg / kg でヘモグロビンが有意に ( $p < 0.05$ ) 減少したものの、これらの変化の臨床的意義は不明である。全体としては、血液学により、D p 4 e 4 m T . H C l を使用した用量および投与スケジュールは耐容性良好であったことが示された。

【0117】

血清生化学分析から、5 mg / kg の D p 4 e 4 m T . H C l 処置によって、「総鉄結合能 (T I B C)」が対照と比較して有意に ( $p < 0.05$ ) 低下したことが示された(それぞれ、 $53.1 \pm 1.2 \sim 60.7 \pm 2 \mu\text{mol} / \text{L}$ ; 表6)。しかし、より高い投与量の処置群では、T I B C の抑制は示されなかった(表6)。さらに、「不飽和鉄結合能」(U I B C) が、未処置対照と比較して、5および7.5 mg / kg の D p 4 e 4 m T . H C l 処置群で有意に ( $p < 0.01$ ) 上昇したが、10 mg / kg 処置群では、何ら顕著な変化は示されなかった(表6)。10 mg / kg の D p 4 e 4 m T / H C l 処置マウスにおいて、未処置対照と比較して、アルカリホスファターゼも有意に上昇し ( $p < 0.01$ ) (それぞれ、 $89.5 \pm 4.5 \sim 68.7 \pm 12.8$ ; 表6)、2.5および7.5 mg / kg 群でも有意に上昇した(表6)。

【0118】



【表 7】

表 6. 血液学および生化学

治療群 (21 日間にわたり、3 日/週で強制経口投与)						
指標	単位	ビヒクル 対照 (n=11)	Dp4e4mT 2.5mg/kg (n=8)	Dp4e4mT 5mg/kg (n=10)	Dp4e4mT 7.5mg/kg (n=9)	Dp4e4mT 10mg/kg (n=9)
血液学的指標						
赤血球細胞 (RBC)	10 <sup>12</sup> /L	10.92 ± 0.10	10.55 ± 0.12	10.26 ± 0.17	10.85 ± 0.14	10.18 ± 0.30
白血球細胞 (WBC)	10 <sup>9</sup> /L	2.62 ± 0.20	2.68 ± 0.53	1.80 ± 0.15*	3.08 ± 0.43	3.27 ± 0.36
ヘモグロビン (HGB)	g/L	156 ± 1	148 ± 2	143 ± 2	151 ± 2	142 ± 5*
ヘマトクリット (HCT)	%	0.46 ± 0.004	0.44 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.44 ± 0.01
血小板	10 <sup>9</sup> /L	936 ± 79	1047 ± 73	973 ± 49	834 ± 114	917 ± 142
血清生化学指標						
血清中の鉄	umol/L	26.8 ± 2.1	25.5 ± 2.0	31.0 ± 1.9	32.8 ± 2.3	21.2 ± 2.0
総鉄結合能 (TIBC)	umol/L	60.7 ± 2.0	56.7 ± 2.1	53.1 ± 1.2**	56.8 ± 0.9	60.2 ± 2.3
不飽和鉄結合能 (UIBC)	umol/L	55.1 ± 2.5	57.9 ± 3.5	66.9 ± 2.3**	64.9 ± 2.0**	50.1 ± 2.7
アルカリホスファターゼ (ALP)	U/L	67.7 ± 5.7	85.7 ± 5.0*	61.7 ± 2.0	87.2 ± 4.1*	89.5 ± 4.5**
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	U/L	68.7 ± 12.8	73.1 ± 14.4	44.9 ± 2.8	57.2 ± 12.9	63.4 ± 9.9
アルブミン	g/L	32.7 ± 0.6	31.3 ± 0.9	30.4 ± 0.5*	31.3 ± 1.1	29.3 ± 1.6
コレステロール	mmol/L	2.79 ± 0.19	2.44 ± 0.23	2.63 ± 0.12	2.78 ± 0.24	2.46 ± 0.16
トリグリセリド	mmol/L	0.85 ± 0.12	1.00 ± 0.25	0.57 ± 0.05	0.67 ± 0.03	0.94 ± 0.08

値は平均 ± SEM として表す。スチューデントの t 検定を用いて判定した場合、それらの個々のビヒクル対照と比較して、\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001

実施例 4 b ( i i ) - D M S - 5 3 ヒト肺癌を有するマウスにおける経口 D p 4 e 4 m T 処置後の組織学における D p 4 e 4 m T の影響

経口 D M S - 5 3 ヒト肺癌実験からの組織において、組織学的評価を行った。ビヒクル、D p 4 4 m T ( 0 . 7 5 m g / k g で 2 週間 ) または D p 4 e 4 m T . H C 1 ( 2 . 5 、 5 、 7 . 5 および 1 0 m g / k g で 3 週間 ) で処置した D M S - 5 3 異種移植片を移植したマウスからの組織と比較して、結果を考察する。ヘマトキシリンおよびエオシン ( H & E ) 染色した切片において、対照およびチオセミカルバゾン処置マウスからの肝臓、脾臓、腎臓、脳または腫瘍の組織学において、顕著な差は見られなかった ( 図 8 ) 。

【 0 1 2 0 】

しかし、D p 4 4 m T ( 0 . 7 5 m g / k g ; 図 8 ) で処置したマウスにおいて心筋病変が観察された。このような病変は、あまり分化していない壊死病巣から構成され、ゴモリトリクローム染色を用いて明らかになった未熟な繊維性組織で置き換わっていた ( 矢印 ; 図 8 ) 。しかし、D p 4 e 4 m T . H C 1 は、2 . 5 、 5 、 7 . 5 および 1 0 m g / k g の経口投与 3 週間後、心筋病変を誘発しなかった ( 図 8 ) 。

【 0 1 2 1 】

実施例 4 c - P A N C 1 ヒト膵臓癌のインビボでの抑制における i . v 投与による D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 の影響

インビトロ分析から、チオセミカルバゾン D p 4 4 m T および D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 は、ゲムシタピンと比較した場合、一連の膵臓癌細胞株の増殖を阻害する点で非常に有効であることが明らかとなった ( 図 3 A ~ C 、表 2 A および B ) 。膵臓癌に対してチオセミカルバゾンの有効性の特徴をさらに調べるために、インビボ実験を行った。

【 0 1 2 2 】

P A N C 1 異種移植片を用いて、処置 6 週間後、ビヒクル対照マウスの平均腫瘍サイズは、最初の腫瘍体積のおよそ 6 4 0 % に達し、一方でゲムシタピン、D p 4 4 m T および D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 で処置した群の平均は、元の腫瘍サイズのそれぞれ 3 1 9 % 、 3 0 5 % および 1 1 2 % となった ( 図 9 A ) 。ゲムシタピン (  $p < 0 . 0 1$  ) 、D p 4 4 m T (  $p < 0 . 0 5$  ) および D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 (  $< 0 . 0 0 1$  ) は全て、処置 4 3 日後、対照と比較して腫瘍体積が有意に低下した。

【 0 1 2 3 】

さらに、処置 4 3 日後の最終腫瘍重量は腫瘍体積を反映しており、対照腫瘍の重量は平均  $292 \pm 65$  m g となり、一方でゲムシタピン、D p 4 4 m T および D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 で処置した腫瘍の重量はそれぞれ平均  $67 \pm 25$  m g 、  $122 \pm 33$  m g および  $40 \pm 12$  m g であった ( 図 9 B ) 。これらの結果から、各処置が、インビボで腫瘍異種移植片の成長および進行を有意に抑制することができたことが示される。

【 0 1 2 4 】

D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 とゲムシタピン腫瘍体積との間の差が統計学的に有意ではなかった (  $p > 0 . 0 5$  ) もの、得られたデータから、第 3 2 日の後、ゲムシタピンおよび D p 4 4 m T 処置の両方が、D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 と比較した場合、腫瘍成長を阻害する点で効果が僅かに低かったことが示された ( 図 9 A ) 。ビヒクル対照群の腫瘍サイズはこの実験の持続期間の限定要因であったので、倫理的制限のために、4 3 日後、さらなる処置を継続することができなかった。

【 0 1 2 5 】

実施例 4 c ( i ) - i . v . D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 処置後の生物学的評価 : P A N C 1 ヒト膵臓癌を有するマウスにおける体重減少および血液学的分析

上記のインビボの試験で使用した様々な薬剤が何らかの毒性を付随したか否かを判定するために、血液学的指標ならびに体重および臓器重量を安楽死後に分析した。

【 0 1 2 6 】

【表 8】

表 7A. ノードマウス Dp4cycH4mT i.v 投与実験における PANC-1 膵臓癌の成長：体重および臓器重量 (g)

臓器	実験群 (n=8)		
	対照	Dp4cycH4mT ( 5 mg/kg/日 )	ゲムシタビン ( 5 mg/kg/日 )
体重減少 (% 最初の体重)	104.9 ± 4.6	88.0 ± 6.5***	104.5 ± 2.2
肝臓	0.96 ± 0.11	0.80 ± 0.03	1.04 ± 0.03
脾臓	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01**	0.13 ± 0.01
腎臓	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.19 ± 0.03
心臓	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01
脳	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.01
腫瘍	0.29 ± 0.07	0.04 ± 0.01***	0.07 ± 0.02**

$p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

## 【 0 1 2 7 】

処置 6 週間後の動物の体重は、D p 4 c y c H 4 m T . H C l を除き、各群に対して処置前の体重の 1 0 0 % に近いままであった (表 7 A)。これらの動物は、それらの処置前の体重と比較した場合、体重減少が 1 2 % と、有意 ( $p < 0 . 0 0 1$ ) であった (表 7 A)。様々な処置群の間で臓器重量において有意差は見られなかったものの (表 7 A)、D p 4 c y c H 4 m T . H C l 群も、対照群と比較した場合、脾臓が有意に ( $p < 0 . 0 0 1$ ) 小さかったことが観察された (表 7 A)。脾臓の組織学的分析から、全群においてマウスの脾赤髄が、造血細胞の正常な集団を含有したことが分かった。したがって、脾臓毒性を示唆する証拠はなかった (図 1 0)。

## 【 0 1 2 8 】

## 【表 9】

表 7B. ノードマウス Dp4cycH4mT i.v 投与実験における PANC1 膵臓癌の成長：血液学

	実験群 (n=8)		
	対照	Dp4cycH4mT ( 5 mg/kg/日 )	ゲムシタビン ( 5 mg/kg/ 3日 )
RBC x 10 <sup>12</sup> /L	10.17 ± 0.15	9.46 ± 0.31	9.65 ± 0.08
Hb g/L	146.44 ± 1.68	131.88 ± 4.31**	147.88 ± 1.19
HCT	0.44 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.45 ± 0.01
血小板 10 <sup>9</sup> /L	1042 ± 147	1283 ± 160	1060 ± 205
WBC x 10 <sup>9</sup> /L	4.53 ± 0.44	3.5 ± 0.34	5.51 ± 0.56
網状赤血球 x 10 <sup>12</sup> /L	0.56 ± 0.06	0.77 ± 0.08*	0.35 ± 0.12

p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01

## 【 0 1 2 9 】

チオセミカルバゾン化合物は鉄キレート剤であるので、血液学的指標、特に貧血の兆候は、調べるべき重要なパラメーターであった。対照と様々な処置群との間で赤血球細胞 ( R B C )、白血球細胞 ( W B C ) または血小板数の有意差は検出されなかった ( 表 7 B )。しかし、D p 4 4 m T および D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 群は、対照群と比較した場合、ヘモグロビン ( H b ) が有意に (  $p < 0.01$  ) 低く、網状赤血球レベルは有意に (  $p < 0.05$  ) 高かった ( 表 7 B )。これは、これらの動物における軽度の貧血の指標であり得る。

## 【 0 1 3 0 】

実施例 4 c ( i i ) - P A N C 1 ヒト膵臓癌を有するマウスにおける経口 D p 4 c y c H 4 m T . H C 1 処置後の組織学における影響

臓器における様々な処置の潜在的な毒作用をさらに調べるために、H & E ( 全般的な病理学 )、ペルルス ( Pearls ) ( 鉄の有無について ) およびゴモリトリクローム ( 繊維症について ) で染色することによって、脾臓、腎臓、肝臓、心臓、肺、脳および骨髄の組織学的分析を行った。獣医病理学者が組織学的分析を行い、結果を表 8 で与える。

## 【 0 1 3 1 】

【表 10】

表 8. 独立した組織病理学的評価

治療群	骨	腎臓	肝臓	肺	心筋		脾臓
	HP	Fe	HP	HP	HP	繊維症	HPC
照射	N	+	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	+	N	N	N	-	N
	N	++	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	+/-	N	-	N
	N	-	N	+	N	-	N
	N	+/-	N	N	N	-	N
	N	+	N	N	N	-	N
ゲムシタピン	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
	N	-	N	N	N	-	N
Dp44mT	N	++	N	N	++	++	N
	N	+	N	N	+	+	N
	N	++	N	+/-	+	+	N
	N	+	+	N	+	+	N
	N	+	++	+	+	+	N
	N	+	+/-	+/-	+	+	N
	N	+	++	N	+	+	N
	N	+/-	+/-	+	+	+	N
Dp4cycH4mT.HCl	N	+	N	N	N	-	N
	N	+	N	+/-	N	-	N
	N	+	+/-	N	N	-	N
	N	+	+/-	N	N	-	N
	N	+	+/-	N	N	-	N
	N	+	N	+	N	-	N
	N	+	N	N	N	-	N
	N	+	N	N	N	-	N

HP - 組織病理学的変化; Fe - ペルルス (Perl's) 染色により染色した鉄の有無に関するスコア; HPC - 脾赤髄での造血細胞の有無に関するスコア; N - 組織病理学的変化は検出されず

(-) 損傷なし; (+/-) 非常に軽度で局所的な損傷; (+) 10% 未満の損傷; (++) 20% 未満の損傷

## 【0132】

2匹のDp44mT処置マウスは、肝臓において造血細胞のいくつかの証拠を含有した。さらに、10匹の対照処置マウスのうち5匹および全てのDp44mTおよびDp4cycH4mT.HCl - 処置動物の腎臓において鉄蓄積が観察されたが(表8)、これは、それぞれ、食事の鉄および尿中のチオセミカルバゾンキレート剤により形成される鉄錯体の排出によるものであり得る。ゲムシタピン処置群は、腎臓における鉄蓄積の証拠はなかった(表8)。Dp44mT群の各マウスの心筋は、心筋繊維変性および、繊維性組織による置き換えを伴う壊死を特徴とした心筋病変を呈した(図10;表8)。右心室の壁で認められた病理学的変化が最も顕著であり、左心室の心内膜下の心筋でも見られた(図10)。これは、Dp44mT - 処置ヌードマウスにおける、心臓繊維症も検出された先行試験と一致する。Dp4cycH4mT.HCl処置群の心臓において、線維性病

10

20

30

40

50

変の顕著な証拠はなく、このことから、この化合物がより高い用量でインビボで D p 4 4 m T よりも強力であり、毒性がかなり低かったことが明らかとなる。

【 0 1 3 3 】

重大なこととして、調べた他の臓器の何れでも、病理学的な証拠はなく（表 8）、このことから、D p 4 c y c H 4 m T、H C 1 もゲムシタピンも、非処置対照と比較した場合、顕著な組織損傷を誘発しなかったことが示唆される。

【 0 1 3 4 】

実施例 4 d：転移抑制因子タンパク質 N D R G - 1、トランスフェリン受容体および細胞周期制御分子の発現における D p 4 c y c H 4 m T の影響：

方法：

ウエスタンブロット分析

既に記載されているようにタンパク質単離を行った（Dunn, L. L., et al (2006年) Carcinogenesis 27: 2157-69。

【 0 1 3 5 】

確立されたプロトコールを介してウエスタン分析を行った（Gao, J. and D. R. Richardson (2001年). Blood 98:842-50）。使用した一次抗体は、N D R G 1（Abcam;UK）、p 2 1、サイクリン D 1、トランスフェリン受容体 1（T f R 1；アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタクルズ）および - アクチン（Sigma-Aldrich）に対するものであり、二次 H R P - 結合ヤギおよびマウス抗体（Sigma-Aldrich）を使用した。

【 0 1 3 6 】

結果：

D p 4 c y c H 4 m T が N D R G - 1 発現を上方制御し得るか否かを判定するために、D p 4 c y c H 4 m T を試験した。細胞周期進行に關与する他のキーとなる分子におけるキレート剤 D p 4 c y c H 4 m T の影響をさらに評価するために、M I A P a C a - 2 細胞におけるサイクリン依存性キナーゼ阻害剤、p 2 1 ならびにサイクリン D 1 の発現も調べた。トランスフェリン受容体 1（T f R 1）はチオセミカルバゾン化合物により上方制御されることが既に分かっているので、鉄キレート剤処置に対する陽性対照として、このタンパク質も調べた。

【 0 1 3 7 】

D p 4 4 m T および D p 4 c y c H 4 m T は両者とも、M I A P a C a - 2 細胞において N D R G 1 発現を有意に（ $p < 0.01$ ）上方制御したが、一方でゲムシタピンは顕著な影響がなかった（図 1 1）。さらに、D p 4 4 m T および D p 4 c y c H 4 m T も、これらの細胞において p 2 1 発現を顕著に（ $p < 0.05$ ）増加させながら、サイクリン D 1 レベルを有意に（ $p < 0.05$ ）低下させた（図 1）。さらに、チオセミカルバゾン化合物での処置後、T f R 1 レベルも、M I A P a C a - 2 細胞において有意に（ $p < 0.05$ ）上方制御され、このことから、これらの薬剤が細胞で鉄を効果的に枯渇させたことが示唆される（図 1 1）。他方では、M I A P a C a - 2 細胞において、ゲムシタピン処置により、サイクリン D 1、p 2 1 または T f R 1 レベルは調節されず（図 1 1）、このことから、その作用機構がチオセミカルバゾンの作用機構とは異なることが示される。

【 0 1 3 8 】

まとめると、これらの結果から N D R G 1 が D p 4 c y c H 4 m T により顕著に上方制御されることが示され、D p 4 c y c H 4 m T は、癌細胞における N D R G 1 発現を標的とすることにより、癌に対する有益な治療計画となり得ることが示唆される。

【 0 1 3 9 】

実施例 5：鉄キレート剤による、メトヘモグロビン（m e t H b）レベルおよびメトミオグロビン（m e t M b）のインビトロおよびインビボの調節

方法

化学物質

トリアピン（登録商標）を合成し、公開されている方法に従って特徴を調べた（Liu MC, Lin TCら (1992年). J Med Chem 35: 3672-3677）。D p 4 4 m T、B p 4 e T、D p C

10

20

30

40

50

、ジ - 2 - ピリジルケトン - 4 - エチル - 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン ( D p 4 e 4 m T )、ジ - 2 - ピリジルケトン - 4 - フェニル - 3 - チオセミカルバゾン ( D p 4 p T ) およびジ - 2 - ピリジルケトン - 2 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン ( D p 2 m T ) も合成し、公開されている方法に従って特徴を調べた。Richardson DR, Sharpe PC (2006年). J Med Chem 49: 6510-6521; Kalinowski DS, Yu Y (2007年). J Med Chem 50: 3716-3729)。他の化学物質は全て、Sigma-Aldrich(アメリカ合衆国ミズーリ州セントルイス)から購入した。下記に記載のアッセイでの使用のために、化合物を D M S O 中で新たに調製し、希釈した (最終 [ D M S O ] < 0 . 0 5 % )。

#### 【 0 1 4 0 】

##### 赤血球細胞分離

健康なヒト提供者またはマウスから、E D T A を含有する好適な採血管中に全血試料を回収し、すぐに使用した。遠心 ( 4 8 0 × g / 5 分 / 4 ) により赤血球細胞 ( R B C ) を分離し、次いでハンクス平衡塩類溶液 ( H B S S ) 中で洗浄した。H B S S 中、1 : 1 で R B C を再懸濁し、3 7 で全 R B C アッセイを行った。

#### 【 0 1 4 1 】

##### ミオグロビン調製

マウス心臓組織を徹底的に氷冷 H B S S でかん流して血液を除去し、プロテアーゼ阻害剤カクテル ( Roche, スイス, バーゼル ) を含有する氷冷 H B S S 中でホモジナイズ処理した。心臓ホモジネートを遠心 ( 1 6 , 0 0 0 × g / 4 5 分 / 4 ) し、上清 ( [ o x y M b ] = 5 0 μ M ) をすぐに使用した。

#### 【 0 1 4 2 】

##### UV - V i s 分光光度分析法による m e t H b および m e t M b レベルの測定

公開されている方法に従い、Shimadzu UV-Vis 分光光度計 ( UV-1800 ; 島津製作所、日本、京都 ) を用いて、m e t H b および m e t M b に対して 5 7 7 n m および 6 3 0 n m で、R B C 溶解液中の m e t H b および m e t M b レベルを調べた ( Winterbourn CC および Carrell RW (1977). Biochem J 165: 141-148 )。

#### 【 0 1 4 3 】

##### マウスにおける M e t H b - および m e t M b - 形成

シドニー大学の Animal Ethics Committee により承認されたプロトコール下で C 5 7 B L / 6 マウス ( 7 ~ 8 週齢 ) を使用した。3 0 % プロピレングリコール / 生理食塩水中で D p 4 4 m T、トリアピン ( 登録商標 ) または D p 4 c y c H 4 m T ( 全て 6 m g / k g ) を溶解し、尾部静脈を介して i v 投与した。続いて、投与から 3 0 分後、イソフルランでマウスに麻酔をかけ、心臓穿刺により血液試料を採取した。m e t H b の概算のために 2 . 5 体積の超純水を用いて血液試料を溶解した。イソフルランを用いて安楽死によりマウスを屠殺し、心臓を H B S S で徹底的にかん流し、M b を分離した。

#### 【 0 1 4 4 】

##### 統計

スチューデントの t 検定を用いてデータを比較した。結果は、 $p < 0 . 0 5$  である場合、有意とみなした。結果は平均 ± S D である。

#### 【 0 1 4 5 】

##### 実施例 5 a - ヒト R B C における鉄キレート剤の M e t H b 形成誘導能

無傷 R B C との m e t H b 生成におけるキレート剤濃度 ( 1 ~ 2 5 μ M ) の影響を評価した ( 図 1 2 )。3 h / 3 7 後、トリアピン ( 登録商標 ) または D p 4 4 m T で処理した無傷 R B C において、対照と比較して、m e t H b の有意な (  $p < 0 . 0 0 1$  ) 用量依存的上昇が全てのリガンド濃度で検出された ( 図 1 2 ) が、m e t H b 形成誘導能を示すキレート剤はこれらのみであった。2 5 μ M で、これらのキレート剤によって、それぞれ総 H b の 1 9 . 9 5 ± 1 . 0 および 1 9 . 9 ± 3 . 0 % に m e t H b 形成が増加した ( 図 1 2 )。陰性対照キレート剤 D p 2 m T は、意図的に錯体形成を妨げるメチル基を特色としている。したがって、このキレート剤は、m e t H b 形成を引き起こす鉄とのレドックス - 相互作用に関与することができない ( 図 1 2 )。さらに、鉄過剰症に対する治療薬と

10

20

30

40

50

して現在使用されている非レドックス活性のキレート剤 D F O も m e t H b 形成を増加させなかった。

【 0 1 4 6 】

重要なこととして、D p 4 c y c H 4 m T は、インビトロで m e t H b 形成を促進しなかった ( 図 1 2 ) 。これは、トリアピン ( 登録商標 ) と比べて、D p c y c H 4 m T 療法の明確な長所となり得る。

【 0 1 4 7 】

実施例 5 b - 鉄キレート剤トリアピン、D p 4 4 m T および D p 4 c y c H 4 m T のインビボでの m e t H b 形成誘導能

D p 4 c y c H 4 m T が m e t H b 形成を促進しなかったことを示す実施例 5 a のインビトロでの結果を確認するために、上述のようなマウスモデルにおける m e t H b 形成を調べた。

【 0 1 4 8 】

C 5 7 B L / 6 マウスに D p 4 4 m T ( 6 m g / k g ) 、トリアピン ( 登録商標 ) ( 6 m g / k g ) または D p 4 c y c H 4 m T ( 6 m g / k g ) を静脈内投与し、m e t H b を評価するために 3 0 分後に採血した ( 図 1 3 ) 。既に観察されているように、D p 4 4 m T により、ビヒクルと比較して、有意な (  $p < 0.001$  ) m e t H b レベルが誘導されたが ( それぞれ、総 H b に対する  $1.3 \pm 0.9\%$  の m e t H b % に対して、 $6.3 \pm 0.8$  ) 、一方で D p 4 c y c H 4 m T により誘導された m e t H b レベルは対照と同等であった ( 図 1 3 ) 。

【 0 1 4 9 】

D p 4 c y c H 4 m T を用いたこの結果から、実施例 5 a におけるインビトロ試験の結果が確認され、さらに、D p 4 c y c H 4 m T が、D p 4 4 m T と比較して、m e t H b を誘導しないという特定の長所を有し得ることが示唆される。

【 0 1 5 0 】

実施例 5 c - 鉄キレート剤トリアピン、D p 4 4 m T および D p 4 c y c H 4 m T のインビボでのメトミグロビン ( metmyoglobin ) ( m e t M b ) 形成誘導能

タンパク質ミオグロビン ( M b ) は、酸素の貯蔵および筋肉への供与において重要な役割を果たし、ヘモグロビンに対する単量体対応物である。したがって、インビボでの m e t M b 形成における強力な抗癌活性キレート剤の影響を評価した。C 5 7 B L / 6 マウスに D p 4 4 m T ( 6 m g / k g ) 、トリアピン ( 登録商標 ) ( 6 m g / k g ) または D p 4 c y c H 4 m T ( 6 m g / k g ) を静脈内投与し、m e t M b を評価するために 3 0 分後に採血した ( 図 1 4 ) 。

【 0 1 5 1 】

キレート剤 D p 4 4 m T は、m e t M b レベルを有意に (  $p < 0.001$  ) 誘導したが (  $82.3 \pm 2.6\%$  ) 、これはトリアピン ( 登録商標 ) (  $75.2 \pm 4.2\%$  ) と同様であり、一方で、D p 4 c y c H 4 m T が生成させた m e t M b のレベルは有意に (  $p < 0.001$  ) 低かった (  $31.7 \pm 3.2\%$  ; 図 1 4 ) 。

【 0 1 5 2 】

しかし、D p 4 c y c H 4 m T が介在する m e t M b レベルは、対照よりも有意に (  $p < 0.001$  ) 高かった (  $12.6 \pm 2.4\%$  ; 図 1 4 ) 。

【 0 1 5 3 】

まとめると、抗腫瘍活性を維持しながら、m e t H b および m e t M b 形成の誘導において非常に影響が少ないということに関する D p 4 c y c H 4 m T の特性から ( Kovacevic Z, Chikhani S ら (2011年). Mol Pharm 80: 598-609 ) 、D p 4 c y c H 4 m T がトリアピン ( 登録商標 ) および D p 4 4 m T を凌ぐ重要な長所を有することが示唆される。

10

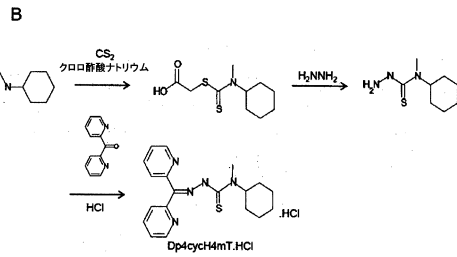
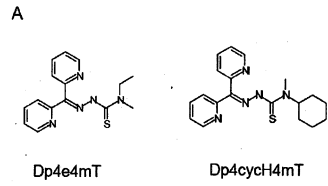
20

30

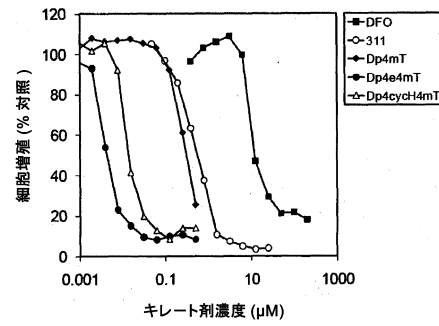
40



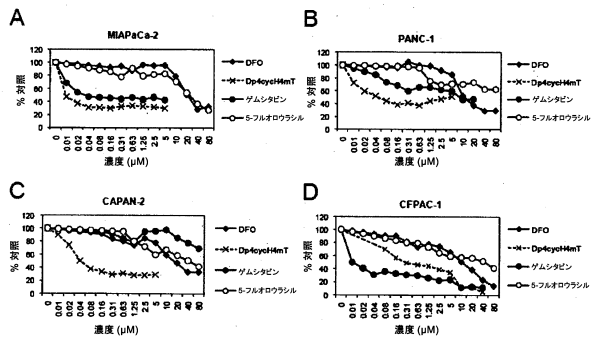
【図 1】



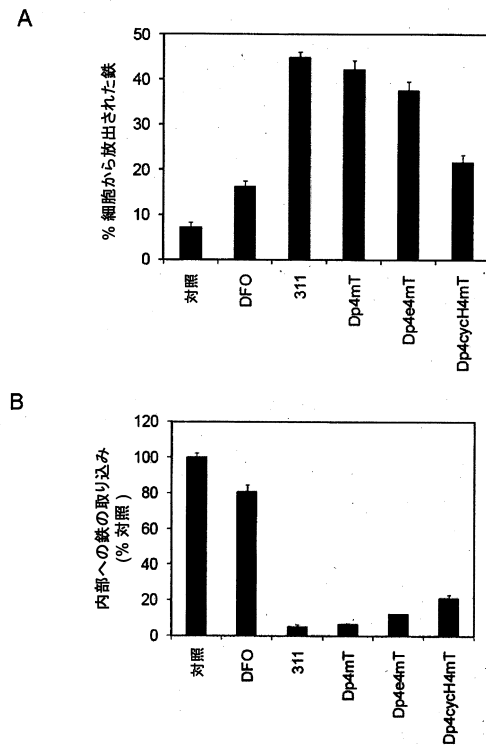
【図 2】



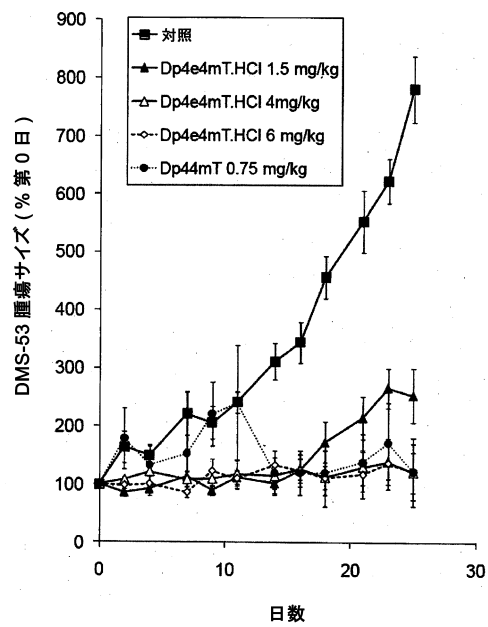
【図 3】



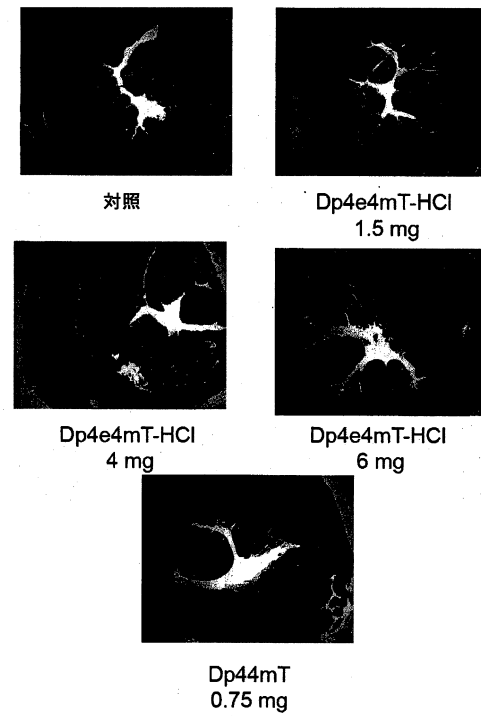
【図 4】



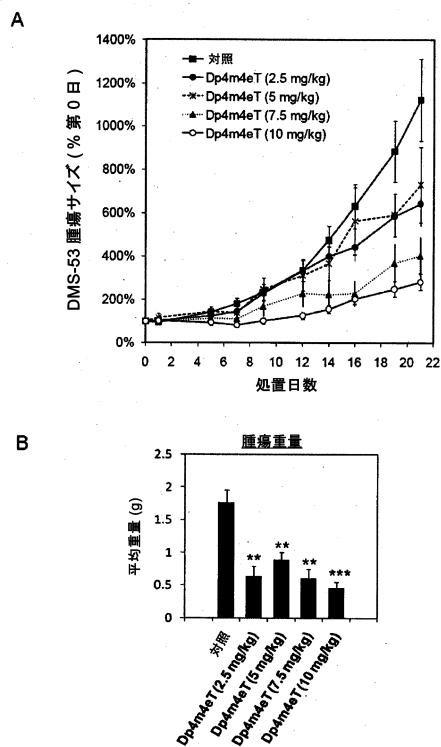
【図5】



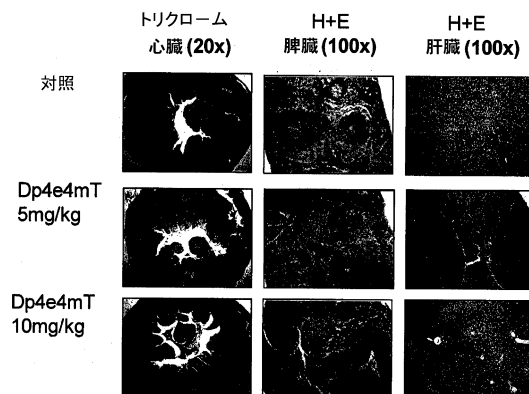
【図6】



【図7】



【図8】



【図 9】

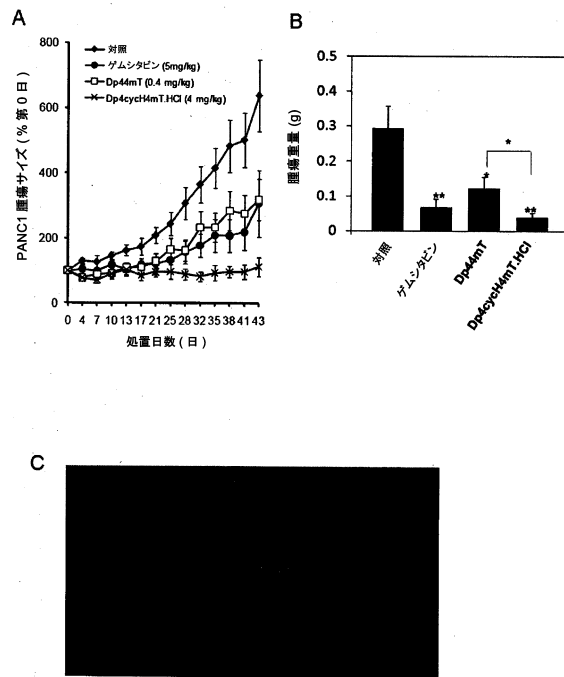
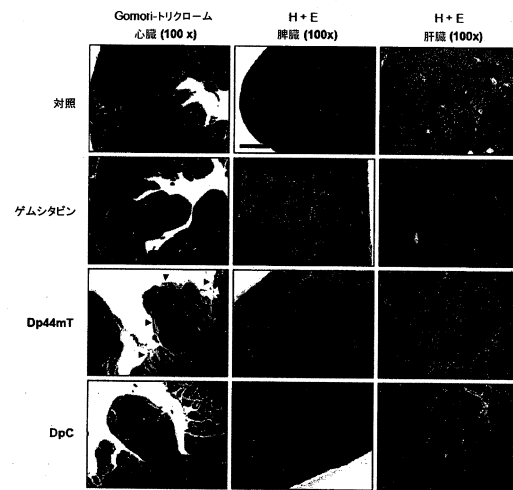
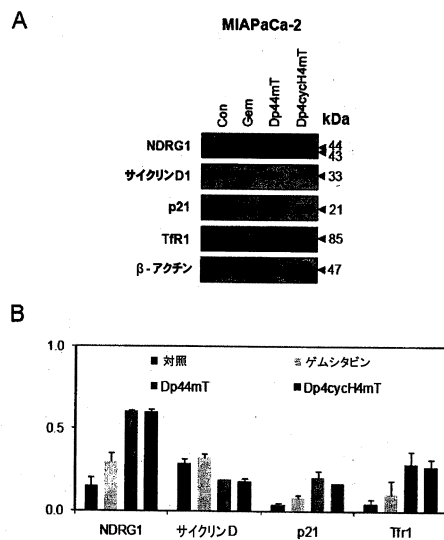


Figure 9

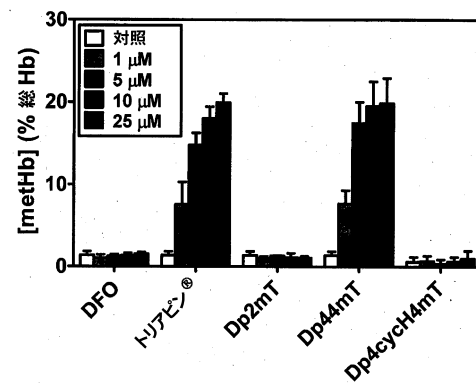
【図 10】



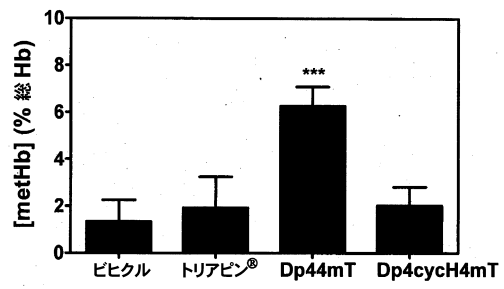
【図 11】



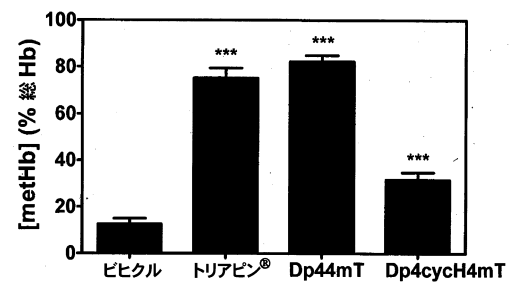
【図 12】



【図 13】



【図 14】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	13/10
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00

(72)発明者 リチャードソン, デーアール  
 オーストラリア連邦, ニューサウスウェールズ州 2 1 7 1, シドニー, カーンズ ヒル, パイオ  
 ニア ドライブ 1 2 1 3

(72)発明者 ラブジョイ, デーヴィッド ビー  
 オーストラリア連邦, ニューサウスウェールズ州 2 0 1 6, レッドファーン, ローズヒル スト  
 リート 5 5 / 3 2 - 4 2

審査官 安藤 倫世

(56)参考文献 特表2006-516979(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 D

A 6 1 K

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )