

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-505047
(P2004-505047A)

(43) 公表日 平成16年2月19日(2004.2.19)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 31/352
A61K 31/22
A61K 31/739
A61K 38/00
A61K 45/06

F 1

A 61 K 31/352
A 61 K 31/22
A 61 K 31/739
A 61 K 45/06
A 61 P 35/00

テーマコード(参考)

4 C 084
4 C 086
4 C 206

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-515253 (P2002-515253)	(71) 出願人	502418745 キャンサー・リサーチ・テクノロジー・リミテッド イギリス・WC2A・3PX・ロンドン・リンカーンズ・イン・フィールズ・61
(86) (22) 出願日	平成13年7月27日 (2001.7.27)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月28日 (2003.1.28)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 國際出願番号	PCT/NZ2001/000154	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 國際公開番号	W02002/009700	(72) 発明者	バグリー, ブルース・チャールズ ニュージーランド国, オークランド, レミュエラ, バセット・ロード 74エイ
(87) 國際公開日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		
(31) 優先権主張番号	506060		
(32) 優先日	平成12年7月28日 (2000.7.28)		
(33) 優先権主張国	ニュー・ジーランド(NZ)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】複合治療による癌治療

(57) 【要約】

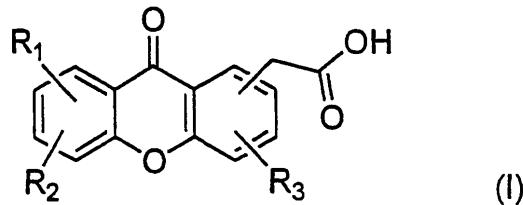
癌を治療する方法と、このような方法に使用する組成物とであって、(i) キサンテノン酢酸群化合物の1つの化合物と、(ii) TNF産生を調節する化合物類および生化学経路に作用してTNF合成を生じる化合物類から選択される少なくとも1つの化合物とを逐次的または同時に投与するステップを含む方法と、上記(i)と(ii)の組み合わせを、許容可能な製薬学的担体および/または賦形剤とともに含む組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 式 (I)、

【化 1】



10

(式中、R₁、R₂ および R₃ は、各々独立に、H、C₁ ~ C₆ のアルキル、ハロゲン、C F₃、C N、N O₂、N H₂、O H、O R、N H C O R、N H S O₂ R、S R、S O₂ R またはN H R からなる群から選択され、各 R は、独立に、ヒドロキシ、アミノおよびメトキシから選択される 1 つ以上の置換基で必要に応じて置換された C₁ ~ C₆ のアルキルであり、R₁、R₂ および R₃ の各々は、利用可能な位置 1 位 ~ 8 位のいずれに存在してもよく、式 (I) の炭素環式芳香環の各々において、2 つ以下のメチン (- C H =) 基はアザ (- N =) 基で置換されていてもよく、R₁、R₂ および R₃ の任意の 2 つが一緒になってさらに - C H = C H - C H = C H - 基を示し、該 - C H = C H - C H = C H - 基が、結合している炭素または窒素原子と一緒にになって、縮合六員環芳香環を形成してもよい) で表される化合物または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルと、

(i i) TNF 産生を調節する化合物類および生化学経路に作用して TNF 合成を生じる化合物類から選択される化合物と

を、同時にまたは逐次的に、このような治療を必要としている哺乳類に投与するステップを含む癌を治療する方法。

【請求項 2】

前記化合物 (i i) が、細胞の CD14 受容体に結合するリガンド、CD14 受容体以外の TNF 産生に関連する細胞表面受容体に結合するリガンド、プロテインキナーゼ C を誘導する化合物およびプロテインホスファターゼ類の活性を低下させることができる化合物から選択される請求項 1 に記載の方法。

30

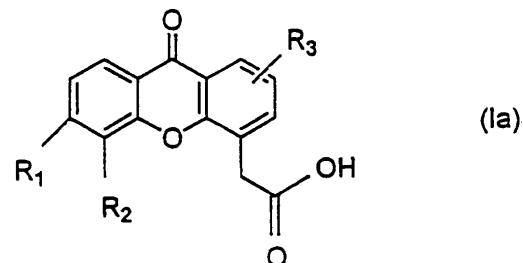
【請求項 3】

前記化合物 (i i) が、細菌 LPS、脱アシル化された LPS、CD14 受容体抗体類、インターロイキン - 1 、ミリスチン酸ホルボールエステルおよびオカダ酸から選択される請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記化合物 (i) が、式、

【化 2】



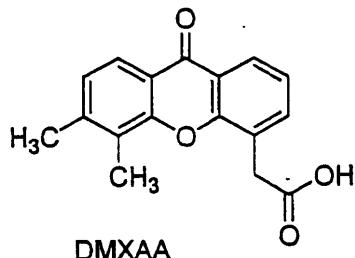
40

(式中、R₁、R₂ および R₃ は請求項 1 に規定するとおりである) で表される化合物である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記化合物 (i) が、式、

【化3】



を有する、5,6-ジメチルキサンテノン-4-酢酸である請求項1または請求項4に記載の方法。 10

【請求項6】

医薬と、TNF産生を調節する化合物類および生化学経路に作用してTNF合成を生じる化合物類から選択される化合物(iii)とを逐次的または同時に投与することにより哺乳類の癌を治療するための医薬の製造における、請求項1に規定する式(I)の化合物(i)または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルの使用。

【請求項7】

前記化合物(i)がDMXAAである請求項6に記載の使用。

【請求項8】

前記化合物(iii)が、細胞のCD14受容体に結合するリガンド、CD14受容体以外のTNF産生に関連する細胞表面受容体に結合するリガンド、プロテインキナーゼCを誘導する化合物またはプロテインホスファターゼ類の活性を低下させることができる化合物の少なくとも1つから選択される化合物である請求項6または請求項7に記載の使用。 20

【請求項9】

医薬と、上記に規定する式(I)の化合物または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルとを逐次的または同時に投与することにより哺乳類の癌を治療するための医薬の製造における、TNF産生を調節する化合物類および生化学経路に作用してTNF合成を生じる化合物類から選択される化合物の使用。

【請求項10】

前記化合物(i)がDMXAAである請求項9に記載の使用。 30

【請求項11】

前記化合物(iii)が、細胞のCD14受容体に結合するリガンド、CD14受容体以外のTNF産生に関連する細胞表面受容体に結合するリガンド、プロテインキナーゼCを誘導する化合物またはプロテインホスファターゼ類の活性を低下させることができる化合物の少なくとも1つから選択される化合物である請求項9または請求項10に記載の使用。

【請求項12】

請求項1に規定する式(I)で表される化合物(i)または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルと、TNF産生を調節する化合物類および生化学経路に作用してTNF合成を生じる化合物類から選択される化合物(iii)とを製薬学的に許容可能な1つ以上の担体または賦形剤と併用して含む、癌を治療するのに好適な医薬組成物。 40

【請求項13】

前記化合物(i)がDMXAAである請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

前記化合物(iii)が、細胞のCD14受容体に結合するリガンド、CD14受容体以外のTNF産生に関連する細胞表面受容体に結合するリガンド、プロテインキナーゼCを誘導する化合物またはプロテインホスファターゼ類の活性を低下させることができる化合物の少なくとも1つから選択される化合物である請求項12または請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

実施例のいずれか1つを参照して実質的に本明細書に記載されているように、請求項1に 50

規定される式(Ⅰ)の化合物と請求項1に規定される化合物(iii)とを併用する組成物の方法および使用。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

[技術分野]

本発明は、癌を治療する方法と、このような方法に使用する組成物とに関する。

【 0 0 0 2 】

[背景技術]

キサンテノン酢酸クラスの化合物は、癌治療に有用である可能性があることが示されている。これらのうち、化合物 5, 6 - デミチルキサンテノン - 4 - 酢酸 (DMXAA) はマウス腫瘍に対する有意な抗腫瘍活性を有することが示されている。動物における研究において、この活性が、特に腫瘍組織内のサイトカイン腫瘍壊死因子 (TNF) を誘導し、結果として腫瘍の血流を阻止することが示されている。これまでに、DMXAA は、ヒトにおける臨床的な抗癌作用は非常に低いという所見しか認められていない。

10

〔 0 0 0 3 〕

出願人らは、驚くべきことに本明細書において、D M X A Aは、第2のシグナルを誘導することができ、それ自体がTNF産生を調節する種々の薬剤に応答して、培養中のヒト抹消血液細胞によるTNF産生の誘導を増強することを見出した。これらには、TNF誘導経路に関連する細胞外受容体を占めるリガンドおよびTNF誘導に関連する細胞の生化学経路を調節する化合物が挙げられる。

20

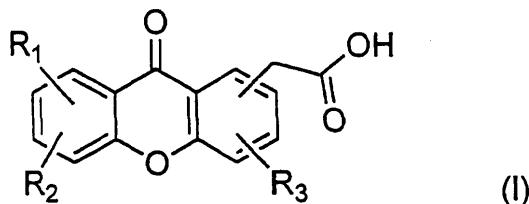
[0 0 0 4]

上記の背景を考慮すると、本発明の目的は、少なくとも社会に有用な選択肢を提供する癌治療方法を提供することである。

〔 0 0 0 5 〕

「発明の開示」

従つて、第1の態様において、本発明は癌を治療する方法であつて、(i)式(I)、
【化4】



30

(式中、R₁、R₂およびR₃は、各々独立に、H、C₁～C₆のアルキル、ハロゲン、C₂F₃、CN、NO₂、NH₂、OH、OR、NHCOR、NHSO₂R、SR、SO₂RまたはNHRからなる群から選択され、各Rは、独立に、ヒドロキシ、アミノおよびメトキシから選択される1つ以上の置換基で必要に応じて置換されたC₁～C₆のアルキルであり、R₁、R₂およびR₃の各々は、利用可能な位置1位～8位のいずれに存在してもよく、式(I)の炭素環式芳香環の各々において、2つ以下のメチン(-CH=)基はアザ(-N=)基で置換されてもよく、R₁、R₂およびR₃の任意の2つが一緒になってさらに-CH=CH-CH=CH-基を示し、この-CH=CH-CH=CH-基が、結合している炭素または窒素原子と一緒にになって、縮合六員環芳香環を形成してもよい)で表される化合物または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルと、(iii)TNF産生を調節する化合物類と生化学経路に作用してTNF合成を生じる化合物類とから選択される化合物とを、このような治療を必要としている哺乳類に同時にまたは逐次的に投与するステップを含む方法を提供する。

40

〔 0 0 0 6 〕

好ましくは、哺乳類はヒトである。

〔 0 0 0 7 〕

50

ある種の好ましい実施態様において、化合物(i i)は、細菌LPS、脱アシル化されたLPSおよびCD14受容体抗体類などの、細胞のCD14受容体に結合するリガンドである。

【0008】

他の好ましい実施態様において、化合物(i i)は、インターロイキン-1などの、CD14受容体以外のTNF産生に関連する細胞表面受容体に結合するリガンドである。

【0009】

他の好ましい実施態様において、化合物(i i)は、ミリスチン酸ホルボールエステルなどの、プロテインキナーゼCを誘導する化合物である。

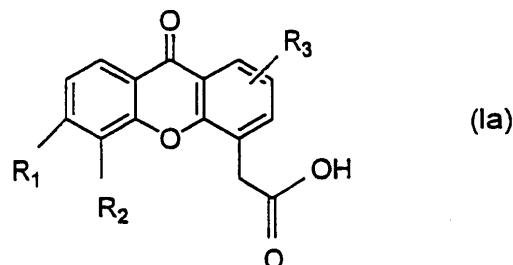
【0010】

他の好ましい実施態様において、化合物(i i)は、オカダ酸などの、プロテインホスファターゼ類、好ましくはプロテインホスファターゼ2Aの活性を低下させることができる化合物である。

【0011】

好ましくは、化合物(i)は、式(Ia)、

【化5】

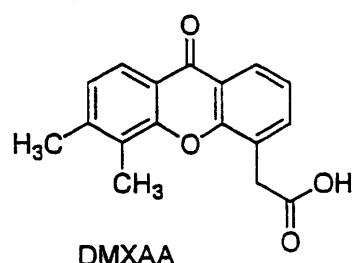


(式中、R₁、R₂およびR₃は上記の式(I)の化合物について規定するとおりである)で表されるものである。

【0012】

最も好ましくは、式(I)または(Ia)の化合物は、式、

【化6】



を有する5,6-ジメチルキサンテノン-4-酢酸である。

【0013】

さらに別の態様において、本発明は、医薬と、TNF産生を調節する化合物類および生化学経路に作用してTNF合成を生じる化合物類から選択される化合物(i i)とを逐次的にまたは同時に投与することによって、哺乳類の癌を治療するための医薬の製造における、上記に規定する式(I)の化合物(i)または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルの使用を提供する。

【0014】

好ましくは、化合物はDMXAAである。

【0015】

好ましくは、化合物(i i)は、細胞のCD14受容体に結合するリガンド、CD14受容体以外のTNF産生に関連する細胞表面受容体に結合するリガンド、プロテインキナーゼCを誘導する化合物またはプロテインホスファターゼ類の活性を低下させることができ

10

20

30

40

50

る化合物から選択される。

【0016】

よりさらに別の態様において、本発明は、医薬と、上記に規定する式(I)の化合物または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルとを逐次的または同時に同時投与することによって哺乳類の癌を治療するための医薬の製造における、TNF産生を調節する化合物類および生化学経路に作用してTNF合成を生じる化合物類から選択される化合物(i)の使用を提供する。

【0017】

好ましくは、化合物(i)はDMXAAである。

【0018】

好ましくは、化合物(ii)は、細胞のCD14受容体に結合するリガンド、CD14受容体以外のTNF産生に関連する細胞表面受容体に結合するリガンド、プロテインキナーゼCを誘導する化合物またはプロテインホスファターゼ類の活性を低下させることができる化合物から選択される。

【0019】

よりさらに別の態様において、本発明は、上記に規定する式(I)の化合物(i)または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルと、TNF産生を調節する化合物類および生化学経路に作用してTNF合成を生じさせる化合物類から選択される化合物(ii)とを製薬学的に許容可能な1つ以上の担体または賦形剤と併用して含む、癌を治療するのに好適な医薬組成物を提供する。

【0020】

好ましくは、化合物(i)はDMXAAである。

【0021】

好ましくは、化合物(ii)は、細胞のCD14受容体に結合するリガンド、CD14受容体以外のTNF産生に関連する細胞表面受容体に結合するリガンド、プロテインキナーゼCを誘導する化合物またはプロテインホスファターゼ類の活性を低下させることができる化合物から選択される。

【0022】

好ましくは、組成物は化合物(i)と(ii)とを同時投与するために製剤化されるか、または化合物(i)と(ii)とを任意の順序で逐次的に投与するために製剤化される。

【0023】

本発明は概して上記に規定するとおりであるが、本発明はまた以下の説明が実施例を提供する実施態様も含む。これらの具体的な実施態様は、添付の図面を参照して記載されている。

【0024】

[発明の説明]

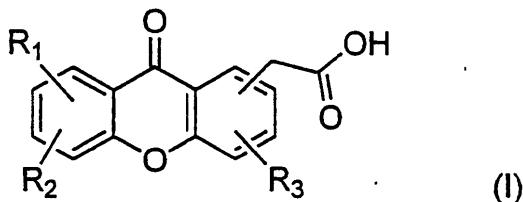
上記に規定するように、本発明は、癌を治療する方法と、このような方法に使用する組成物とに関する。

【0025】

本発明は、培養ヒト抹消血液細胞における、以下に規定する式(I)を有するキサンテノン酢酸クラスの化合物、

【化7】

FORMULA (I)



10

(式中、R₁、R₂ および R₃ は、各々独立に、H、C₁～C₆ のアルキル、ハロゲン、C F₃、C N、N O₂、N H₂、O H、O R、N H C O R、N H S O₂ R、S R、S O₂ R または N H R からなる群から選択され、各 R は、独立に、ヒドロキシ、アミノおよびメトキシから選択される 1 つ以上の置換基で必要に応じて置換された C₁～C₆ のアルキルであり、R₁、R₂ および R₃ の各々は、利用可能な位置 1 位～8 位のいずれに存在してもよく、式 (I) の炭素環式芳香環の各々において、2 つ以下のメチル (-C H =) 基はアザ (-N =) 基で置換されてもよく、R₁、R₂ および R₃ の任意の 2 つが一緒になってさらに -C H = C H - C H = C H - 基を示してもよく、この -C H = C H - C H = C H - 基が、結合している炭素または窒素原子と一緒にになって、縮合六員環芳香環を形成してもよい) または製薬学的に許容可能なその塩またはエステルと、ヒト細胞において TNF (腫瘍壞死因子) を調節するコントロール経路に寄与することができる化合物、すなわち、それ自体が TNF 産生を調節する化合物または経路に作用して TNF 合成を生じさせることができる化合物との非常に大きな相乗作用を出願人らが予期せず発見したことにある。

20

【0026】

特に、式 (I) の化合物 5,6-ジメチルキサンテノン-4-酢酸 (DMXAA) と、ヒト細胞において TNF 合成を調節するコントロール経路に寄与することができる化合物との同時投与は、どちらかの薬剤の単独での使用と比較して、培養ヒト抹消血液細胞における TNF を大きく誘導することを示している。TNF は抗癌作用があることが確認されており、癌細胞に直接作用するか、または癌の血液供給に間接的に作用することができる。

30

【0027】

DMXAA 単独では培養ヒト抹消血白血球 (HPBL) における TNF 誘導にほとんど影響を与えないが、TNF 誘導に寄与する化合物と併用すると、驚くべきことに、どちらかの薬剤を単独で使用する場合と比較して、格段に大きい影響を生じ、個々の薬剤の影響の合計をはるかに上回ることが本明細書において示されている。従って、DMXAA または式 (I) の他の化合物 (上記) と TNF 経路に作用する第 2 の薬剤の併用は、癌治療における臨床的な有用性を有することが期待される。式 (I) の全ての化合物が DMXAA と同様の方法で作用することを確認するためにはさらなる検討が必要とされる。しかし、この段階では、化合物 (i i) との併用における効果の点で、キサンテノン酢酸化合物類のうち、DMXAA が唯一のものであると推測する根拠はほとんどない。

40

【0028】

式 (I) の化合物は既知であり、当業者に既知の方法を使用して製造することができる。例えば、式 (I) の化合物およびそれらの製造方法は以下の参考文献に記載されている。それらは、引用することにより本明細書の一部をなすものとする、Journal of Medicinal Chemistry 34 (1) : 217-22, 1991 年 1 月、Journal of Medicinal Chemistry 34 (2) : 491-6, 1991 年 2 月、Journal of Medicinal Chemistry 33 (5) : 1375-9, 1990 年 5 月、Journal of Medicinal Chemistry 34 (9) : 2864-70, 1991 年 9 月、および Journal of Medicinal Chemistry 32 (4) : 79

50

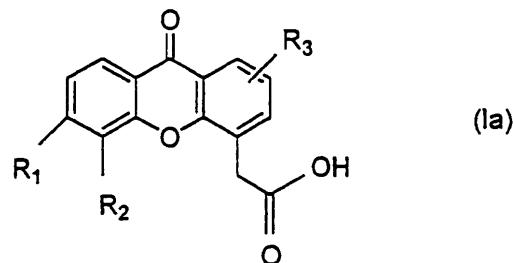
3 - 9, 1989年4月である。

【0029】

上記に規定する式(I)の化合物のうち、以下に記載する式(Ia)の化合物(式中、置換基R₁およびR₂は5位および6位にある)

【化8】

FORMULA (Ia)



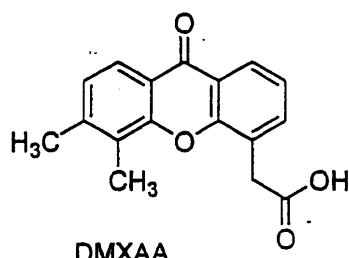
10

(式中、R₁、R₂およびR₃は、上記(I)の化合物について規定するとおりである)は、一般に本発明の方法に使用するのに好ましい。

【0030】

特に好ましい化合物は5,6-ジメチルキサンテノン-4-酢酸(DMXAA)である。この化合物の製造は、Journal of Medicinal Chemistry 34(1): 217-22, 1991年1月に記載されている。

【化9】



20

30

【0031】

上記の、ヒト癌組織におけるTNF合成を調節するコントロール経路に寄与することができる化合物も既知の化合物であり(例えば、Philpott M, Ching LM, Baguley BC; Eur J Cancer 2001, 印刷中)、同様に当業者に既知の方法によって製造することができる。明らかなことであるが、このような化合物の2つ以上を式(I)または(Ia)の化合物と併用することができる。「化合物(compound)」は1つだけのこのような化合物に限定するものと考えるべきではない。

【0032】

本発明の特定の実施態様において、TNF合成を調節するコントロール経路に寄与することができる化合物は、細胞のCD14受容体に結合するリガンドである。このようなリガンドの例は細菌リポ多糖(LPS)、脱アシル化されたリポ多糖(dLPS)並びにLPSおよびdLPSのCD14受容体の抗体である。

【0033】

本発明の別の実施態様において、TNF合成を調節するコントロール経路に寄与することができる化合物は、TNF産生に関連する、CD14受容体以外の表面受容体に作用する化合物である。このような化合物の例はインターロイキン-1(IL-1)である。

【0034】

40

50

本発明のよりさらに別の態様において、化合物は、酵素プロテインキナーゼCを誘導することによって、TNF合成を調節するコントロール経路に寄与することができる。このような化合物の例は、酢酸ミリスチン酸ホルボールなどのミリスチン酸ホルボールエステルである。

【0035】

本発明のよりさらに別の実施態様において、化合物は、プロテインホスファターゼ類、好ましくはプロテインホスファターゼ2Aの活性を低下させることができる。このような化合物の例はオカダ酸である。

【0036】

従って、本発明の治療方法は、TNF合成を調節するコントロール経路に寄与することができる薬剤と、上記に規定する式(I)の化合物または製薬学的に許容可能なその塩もしくはエステルとを同時または逐次的に患者に投与するステップを含む。

【0037】

式(I)の化合物およびTNF合成を調節するコントロール経路に寄与することができる化合物は任意の好適な形態で患者に投与することができる。例えば、化合物は、便利なことに、当技術上既知の各化合物の製剤を使用して静脈内投与することができる。本明細書に記載の化合物の併用を使用した癌治療に使用するための医薬と、製薬学的に許容可能な担体、賦形剤(vehicles)および添加剤(excipients)との製剤化は当業者の能力の範囲内であると考えられる。既知の注意すべきことの一つは、水への溶解度の高いDMXAA化合物の溶液を遮光することであると考えられる。

【0038】

式(I)の化合物およびTNF合成を調節するコントロール経路に寄与することができる化合物は、同時または逐次的に投与することができる。すなわち、TNF合成を調節するコントロール経路に寄与することができる化合物は、式(I)の化合物を投与する前または後に投与することができる。ほとんどの場合、同時投与が好ましいと思われる。

【0039】

本発明は、本明細書において、以下の限定的ではない実施例を参照してさらに詳細に記載される。実施例は化合物の特定の組み合わせに関するものであるが、その結果はそのような化合物の組み合わせのみには限定されないことが当業者によって理解される。

【0040】

[実施例]

[方法]

[HPLCと薬剤とのインキュベーション]

部分精製バフィーコートをAuckland Blood Centreから購入し、50mlの遠心管(2070 Conical Tubes, Becton Dickinson Labware, ニュージャージー州、米国)に15mlずつに分割した。組織培養皿(10ml、10⁷細胞/ml)中のHPLCを、FCS(10%v/v)、硫酸ストレプトマイシン(100μg/ml)およびペニシリンG(100単位/ml)を補給した-MEM培養培地で終夜にわたりインキュベーションした。全ての抽出操作は、凝固させないように、7において実施した。補給していない-MEM培地を30mlに添加し、Ficoll-Paque PLUSの10ml層を管の底部に徐々に添加した。300gにおいて30分間遠心分離後、上層を取り、HPLC層を慎重に吸引し、50mlの遠心管に入れた。容量を50mlに調整し、細胞を300gにおいて遠心分離し、HPLCを補給した-MEMに再度懸濁させ、24ウェルプレート(Nunc社製, Kamstrup, Rockilde, デンマーク)に添加した(1ml/ウェル)。薬剤(最終濃度の2倍に調製)を添加し、プレートを37において、5%のCO₂/大気中で終夜にわたり適当な時間インキュベーションした。DMXAAのナトリウム塩(当研究室製)を培地に溶解し、遮光した。FAA(National Cancer Institute製、米国)を5%(w/v)の炭酸水素ナトリウムに溶解し、培地で希釈した。インターロイキン-1(R&D Systems、米国)、オカダ酸、LPSお

10

20

30

40

50

および脱アシル化されたLPS (Sigma Chemical Co. 製、米国)を -MEMに溶解し、ろ過滅菌し、即座に使用した。MEM-18マウス抗ヒトCD14 IgG抗体はSanbio bv社, am Uden、オランダから入手し、限外ろ過によって使用前にアジドから遊離させた。

【0041】

[TNFの測定]

HPLCと薬剤を適当な期間インキュベーションした後、上清を即座に使用するか、または-20において保存した。TNF標準は、補給した培養培地でTNFストック溶液の連続希釈液を作製することによって調製した(濃度範囲10~10,000pg/ml)。OptEIA Human TNF-alpha Set (Pharmingen社製, カリフォルニア州サンディエゴ、米国)を使用してELISAプレートを作製した。TNF標準および試料をELISAプレートに添加し、製造業者の取り扱い説明書によりアッセイを実施した。

【0042】

[実施例1]

予期しないことに、低濃度の細菌細胞壁リポ多糖(LPS)による抹消血単球のTNF誘導はDMXAAによって刺激された。LPSは、抗腫瘍作用を含む広範囲の生物作用を有する(Raetz CRH, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding AH, Nathan CF. FASEB J 1991, 5, 2652-2660)。ある種の細菌は腫瘍組織に局在化させることができ(Kimura NT, Taniguchi S, Aoki K, Baba T, Cancer Res. 1980, 40, 2061-2068)、従って局在化LPSシグナルを提供すると考えられる。DMXAAの同時投与はこのシグナルを増強すると考えられる。

【0043】

[実施例2]

改変された細菌細胞壁成分の局所濃度が低いことは、それ自体はTNF産生を刺激しないが、それによるTNFの誘導はDMXAAによって刺激されうる。このような成分は、腫瘍組織に局在化すると思われるが、弱毒化された全身応答しか生じないので、このような治療の副作用などの内毒素性ショックがない、遺伝的に改変された細菌に含まれる(Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodis S, Amoss M, Ash O, Carmichael E, Chakraborty A, Fisher J, Lin SL, Luo X, Miller SI, Zheng LM, King I, Pawelek JM, Bermudez D, Nature Biotechnology, 1999, 17, 37-41)。

【0044】

予期しないことに、LPSの不活性型である脱アシル化LPS(dLPS)による抹消血単球におけるTNFの誘導は、DMXAAによって刺激された。dLPSは単独ではTNFを誘導せず、CD14受容体の競合により、LPSによるTNFの誘導を競合的に阻害する(Riedo FX, Munford RS, Campbell WB, Reisch JS, Chien KR, Gerard RD. J Immunol 1990, 144, 3506-3512)。dLPS(500μg/ml、15分間のプレインキュベーション)単独では、対照と比較してわずかに多くTNF産生を誘導した。dLPSはまた、LPS(1ng/ml)に応答したTNF産生を強力に低下した。DMXAA単独(800μg/ml)は、TNFの実質的な誘導を生じなかった。しかし、dLPS(500μg/ml、15分間のプレインキュベーション)およびDMXAA(800μg/ml)の併用は、TNF産生を大幅に増加させた。

【0045】

[実施例3]

予期しないことに、LPS受容体、CD14の抗体(MEM-18)による抹消血単球に

10

20

30

40

50

おけるTNFの誘導はDMXAAによって刺激された。抗CD14抗体は単独ではTNFだけを誘導せず、LPSによるTNFの誘導を阻止する(Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD, Nature 1998, 392, 505-509)。

【0046】

[実施例4]

予期しないことに、インターロイキン-1(IL-1)などのサイトカインによる抹消血球におけるTNFの誘導はDMXAAによって刺激された。サイトカインIL-1は、それ自体が実験的な抗腫瘍作用を有することが報告されている炎症性サイトカインである(Braunschweiger PG, Johnson CS, Kumar N, Ord V, Furmanski P, Cancer Res. 1998 48, 6011-6016)。図4に示すように、IL-1単独は、ヒト抹消血白血球(HPBBL)におけるTNFを誘導することができる。しかし、DMXAAの同時投与は、IL-1単独によるものと比較して、TNFの誘導を大幅に増加する(この場合、56倍以下)。

【0047】

[実施例5]

予期しないことに、酢酸ミリスチン酸ホルボール(PMA)などのプロテインキナーゼCの低分子量活性化因子によるTNFの誘導はDMXAAの同時投与によって増強された。HPBLを20ng/ml以下の濃度のPMA単独と共にインキュベーションするとき、TNFは実質的に誘導されなかった。DMXAA単独(800μg/ml)も実質的な影響を与えたが、PMAと併用したDMXAAは高い程度のTNF産生を誘導した。20ng/mlより高い濃度では、他の研究者によって報告されているように、PMA単独がTNF合成を誘導した(Dong ZY, Lu S, Zhang YH. Immunobiol 1989, 179, 382-394)。

【0048】

[実施例6]

予期しないことに、オカダ酸(OA)などの低分子量プロテインホスファターゼ阻害剤によるTNFの誘導はDMXAAの同時投与によって増強された。HPBLを20ng/ml以下の濃度のOA単独と共にインキュベーションするとき、TNFは実質的に誘導されなかった。DMXAA単独(800μg/ml)も実質的な影響を与えたが、OAと併用したDMXAAは高い程度のTNF産生を誘導した。20ng/mlより高い濃度では、他の研究者によって報告されているように、OA単独がTNF合成を誘導した(Sung SSJ, Walters JA, Fu SM, J. Exp. Med. 1992, 176, 897-907)。

【0049】

[実施例7]

対照としてLPSを使用して、培養マウス白血球に対するDMXAAの影響も検討した。8時間後に、酵素結合免疫結合アッセイによってTNFを測定した。

【0050】

[材料]

DMXAAナトリウム塩(当研究室製)を培地に溶解し、遮光した(9)。LPSおよび脱アシル化LPS(Sigma Chemical Co.製、ミズーリ州)を-MEMに溶解し、ろ過滅菌し、即座に使用した。MEM-18マウス抗ヒトCD14 IgG抗体はSanbio bv社、am Uden、オランダから入手し、限外ろ過によって使用前にアジドから遊離し、LPS無しとした(Endospeicy ES-50M LPS定量システム、Seikagaku Corporation製、東京、日本)。

【0051】

[マウス白血球の抽出]

白血球を抽出するための血液試料をハロタン麻酔下のマウスの心穿刺によって採血し、A

10

20

30

40

50

CD-A抗凝固剤を含有する1mlのシリンジに入れた。全ての抽出操作は、凝固しないように、7において実施した。試料をプールし、補給されていない-MEMを30mlに添加し、Ficoll-Plusの10ml層を管の底部に徐々に添加した。300×gにおいて30分間遠心分離後、上層を取り、白血球層を慎重に吸引し、50mlの遠心管に入れた。未補給の増殖培地で容量を50mlに調整し、細胞を300×gにおいて遠心分離し、ウシ胎仔血清(10%v/v)、硫酸ストレプトマイシン(100μg/ml)およびペニシリン-G(100単位/ml)を補給した-MEMに10⁷細胞/mlの濃度で白血球を再度懸濁した。

【0052】

[マウス白血球によるインビトロにおける検討]

細胞を24ウェルプレート(1ml/ウェル、Nunc社製、Kamstrup, Rockilde, デンマーク)または100mmのペトリ皿(10ml/プレート)に添加し、37において5%のCO₂/大気雰囲気下において終夜インキュベーションした。薬剤(増殖培地で最終濃度の2倍に調製)を添加し、さらに8時間インキュベーションした。24ウェルプレートにおいてHPLBを薬剤と共に適当な期間インキュベーションした後、上清を取り、即座にアッセイするか、または-20で保存した。

【0053】

図7からわかるように、抗CD14抗体単独で処理した細胞またはdLPS単独で処理した細胞は非常に低い濃度のTNFを産生した。LPSはTNF産生を有意に増加し、この増加は抗CD14抗体またはdLPSとの同時インキュベーションによって消失した。DMXA单独はTNF産生を有意に増加しなかったが、抗CD14抗体との同時インキュベーションは、高いレベルのTNF産生を生じ、これはLPSによって生じるものよりも大きかった。dLPSとの同時インキュベーションもTNF産生の有意な(p<0.001)増加を生じたが、この影響の大きさは抗CD14抗体によって生じるものよりも小さかった。

【0054】

[実施例8]

マウスにおいてTNFをインビボにおいて産生するためのLPSの考えられる役割は、腸を滅菌するように設計された抗生物質の組み合わせで前処理されたマウスによって再検討されている。その結果、DMXAは、マウスおよびヒト単核球細胞においてTNFの他の誘導因子との同時刺激因子として作用するという考えを支持するものである。

【0055】

インビボにおけるTNF産生に、低濃度のLPSがDMXAと相乗作用するという仮説を試験するために、マウスに抗生物質を3日間経口投与して処理し、次いで25mg/kgのDMXAで処理した。24時間後にTNFを測定した。

【0056】

[インビボにおける検討]

C57BLマウスを未処理のままか、DMXA処理の前に抗生物質の混合物(セファロシン2g/lおよびネオマイシン2g/lを飲料水に混合)で4日間処理した。マウスにDMXA(25mg/kg)を単回腹腔内投与し、3時間後にハロタン麻酔科のマウスの心穿刺によって採血した。各マウスの血液を個々の微小遠心管に移し、氷上で終夜凝固させてから、4において2000×gで20分間遠心分離した。凝固が完全でない場合には、試料をさらに2時間氷上に放置し、その後再度遠心分離した。血液試料の上層部から血清を吸引し、TNF含有量のアッセイ時まで-20において保存した。

【0057】

[TNFの測定]

補給培養培地でTNFストック溶液の連続希釈液を作製することによってTNF標準を調製した(濃度範囲10~10,000pg/ml)。OptEIA Human TNF-alpha Set(Pharmingen社製、カリフォルニア州サンディエゴ、米国)を使用してELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)プレートを作製した。TNF標

10

20

30

40

50

準および試料を E L I S A プレートに添加し、製造業者の取り扱い説明書によりアッセイを実施した。

【 0 0 5 8 】

[抗生物質処理の影響]

T N F 濃度は、対照マウスおよび抗生物質単独で処理したマウスでは低かった。図 8 に示すように、D M X A A による処理は、抗生物質を投与していないマウスの血清 T N F 濃度を実質的に増加した。抗生物質処理後にマウスに D M X A A を投与しても血清 T N F を増加したが、この増加は、抗生物質処理をしていないマウスと比較して有意に小さかった ($p < 0.001$) 。

【 0 0 5 9 】

[考察]

上記実施例の結果 (1 ~ 8) は、ヒト白血球細胞の T N F 合成を誘導するためには、D M X A A は第 2 のシグナルを必要とすると考えられることを示しており、マウス白血球細胞の場合と同様の影響も証明している。L P S の C D 1 4 受容体に結合し、従って L P S による T N F 誘導を阻害する抗 C D 1 4 抗体および d L P S が、D M X A A に T N F を誘導させることができるとシグナルを提供することは注目に値し、予測されていない (図 6) 。抗生物質による前処理の結果 (図 7) は、L P S または L P S 産物を含んでもよい細菌産物が循環液中に少量存在することが D M X A A に対する T N F 応答に必要であるという仮説を強く支持している。

【 0 0 6 0 】

T N F 合成の調節に寄与することができる化合物を使用することによるなどの、腫瘍組織の第 2 のシグナルを増加するための方法を D M X A A と併用することにより、有意な臨床抗腫瘍作用を有する併用治療を行うことができる結果は支持している。T N F 誘導の増加およびこれが腫瘍増殖に対して与える結果としての影響は、顕著な社会的関心のある大きな進歩である。

【 0 0 6 1 】

[産業上の利用]

上記の説明および実施例から明らかになるように、本発明は、広範囲の臨床的有用性を見出しが予測される癌の治療方法の改善を提供する。本発明はまた、このような癌の治療方法に使用する組成物を提供する。

【 0 0 6 2 】

当業者は、提供されている具体的な説明は例示的なものにすぎないこと、および本発明はそれに限定されないことを理解することができるであろう。当業者に明らかであると思われる変更および改良は、添付の特許請求の範囲に規定される本発明の精神および範囲に含まれることが意図されている。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】インビトロにおいて H P B L における L P S 誘導性 T N F 産生に対する D M X A A の影響を示す。H P B L を、単独 (影なし) または D M X A A と併用して (影つき) 、示した濃度の L P S と共にインキュベーションした (8 h) 。次いで、上清を取り、 T N F 含有量についてアッセイした。

【 図 2 】インビトロにおいて H P B L における d L P S 誘導性 T N F 産生に対する D M X A A の影響を示す。H P B L を、単独 (影なし棒グラフ) または D M X A A と併用して (影つき棒グラフ) 、示した濃度の d L P S と共にインキュベーションした (8 h) 。次いで、上清を取り、 T N F 含有量についてアッセイした。水平の線は S E M を示す。

【 図 3 】インビトロにおいて H P B L における D M X A A 誘導性および L P S - 誘導性 T N F 産生に対する抗 C D 1 4 抗体の影響を示す。H P B L を、抗 C D 1 4 が存在しない場合 (影なし) または存在する場合 (影つき) において L P S (1 n g / m l または 1 μ g / m l) 、 D M X A A (8 0 0 μ g / m l) またはフラボン酢酸 (F A A) (8 0 0 μ g / m l) と共にインキュベーションした。次いで、上清を取り、 T N F 含有量についてアッセイした。水平の線は S E M を示す。

10

20

30

40

50

【図4】インビトロにおいてH P B Lにおける、インターロイキン-1に応答したT N F産生に対するD M X A Aの影響を示す。H P B Lを、単独（塗りつぶし記号）またはD M X A Aと併用して（白記号）示した濃度の薬剤と共にインキュベーションした（8 h）。次いで、上清を取り、T N F含有量についてアッセイした。垂直の線はS E Mを示す。

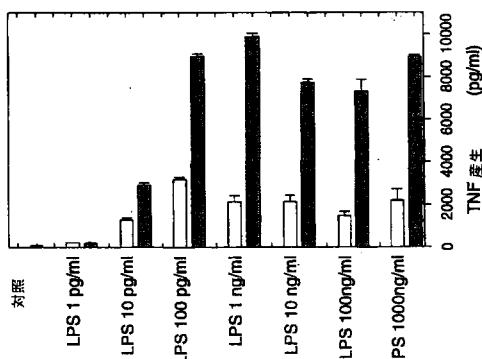
【図5】インビトロにおいてH P B Lにおける、ホルボール-12-ミリステート-13-アセテートに応答したT N F産生に対するD M X A Aの影響を示す。H P B Lを、単独（影なし）またはD M X A A（影つき）と併用して、示した濃度の薬剤と共にインキュベーションした（8 h）。次いで、上清を取り、T N F含有量についてアッセイした。水平の線はS E Mを示す。

【図6】インビトロにおいてH P B Lにおける、オカダ酸に応答したT N F産生に対するD M X A Aの影響を示す。H P B Lを、単独（影なし）またはD M X A A（影つき）と併用して、示した濃度の薬剤と共にインキュベーションした（8 h）。次いで、上清を取り、T N F含有量についてアッセイした。水平の線はS E Mを示す。

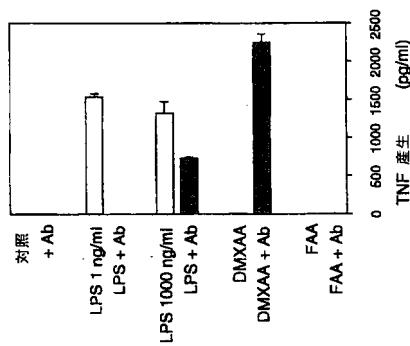
【図7】インビトロにおいてマウス白血球における、L P SおよびD M X A Aに応答したT N F産生に対する抗C D 1 4抗体およびd L P Sの影響を示す。マウス白血球は、D M X A A（8 0 0 μ g / m l）、D M X A A（8 0 0 μ g / m l）またはL P S（1 n g / m l）を添加する前に、a n 9 - C D 1 4抗体（1 0 μ l / ウエル）またはd L P S（5 0 0 μ g / m l）のどちらかが存在する場合または存在しない場合に、1 5分間事前インキュベーションした。培養物を8時間インキュベーションし、上清のT N F含有量を測定した。

【図8】インビオにおけるT N F産生に対する抗生物質処理の影響を示す。抗生物質複合治療を3日間マウスに経口投与して処理して、腸の細菌叢を低下する。次いで、マウスをD M X A A（2 5 m g / k g）で処理し、2 4時間後にT N Fを測定した。

【図1】



【図3】



【図2】

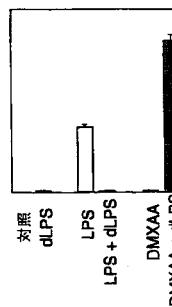


FIGURE 1
FIGURE 2

【図4】

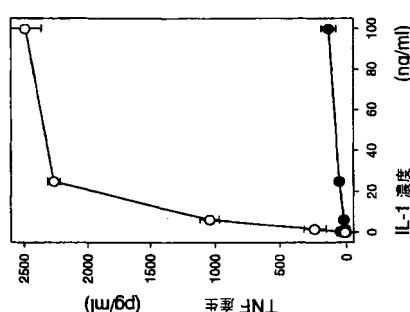


FIGURE 3
FIGURE 4

【図5】

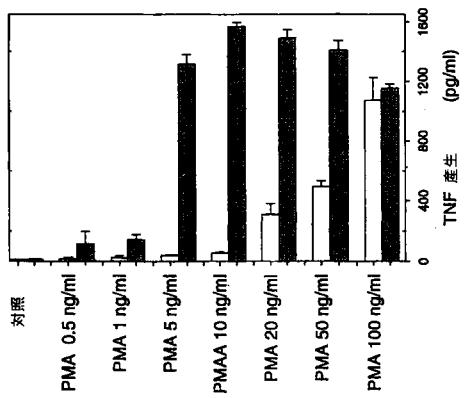


FIGURE 5

【図6】

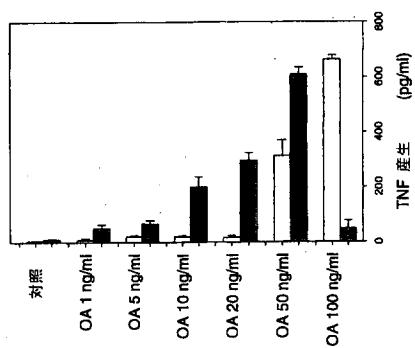


FIGURE 6

【図7】

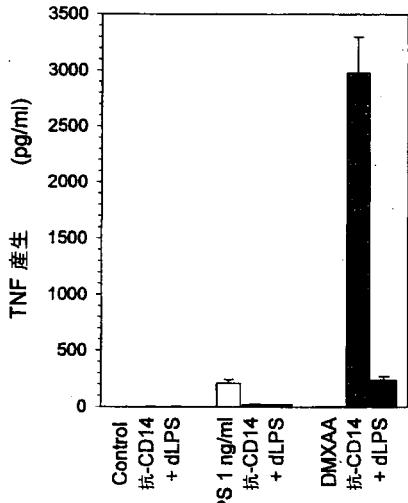


FIGURE 7

【図8】

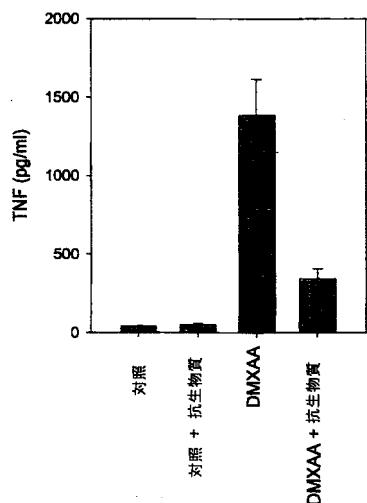


FIGURE 8

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/09700 A1

(51) International Patent Classification: A61K 31/352. (74) Agent: BALDWIN SHESLTON WATERS, P.O. Box A61P 35/00

(21) International Application Number: PCT/NZ01/00154

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 27 July 2001 (27.07.2001)

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
506060 28 July 2000 (28.07.2000) NZ(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BAGULEY, Bruce, Charles [NZ/NZ]; 74A Bassett Road, Remuera, Auckland (NZ); CHING, Li-Ming [NZ/NZ]; 9 Monet Grove, West Harbour, Auckland (NZ); PHILPOTT, Martin [NZ/NZ]; 7 Copperfield Terrace, Howick, Auckland (NZ).

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/09700 A1

(54) Title: CANCER TREATMENT BY COMBINATION THERAPY

(57) Abstract: A method of treating cancer and compositions of use in such a method, the method including the step of administering, either sequentially or simultaneously, (i) a compound of the xanthene acetic acid group of compounds, and (ii) at least one compound selected from compounds which modulate TNF production and compounds which act on biochemical pathways leading to TNF synthesis, the composition including a combination of (i) and (ii) above together with acceptable pharmaceutical carriers and/or vehicles.

CANCER TREATMENT BY COMBINATION THERAPY

FIELD OF THE INVENTION

5

This invention relates to a method of treating cancer and to compositions of use in such a method.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10

The xanthone acetic acid class of compounds have been shown to be of potential utility in cancer treatment. Of these, the compound 5,6-dimethylxanthone-4-acetic acid (DMXAA) has been shown to have significant antitumour activity against murine tumours. Studies in animals have shown that this activity is a consequence of 15 the induction of the cytokine tumour necrosis factor (TNF), particularly within tumour tissue, and of the consequent inhibition of tumour blood flow. To date, DMXAA has shown evidence of marginal clinical anti-cancer activity in humans.

20 The applicants have now surprisingly found that DMXAA amplifies the induction of TNF by cultured human peripheral blood cells in response to a variety of agents capable of inducing a second signal that by itself modulates TNF production. These include ligands that occupy external cellular receptors connected with the TNF induction pathway and compounds that modulate cellular biochemical pathways connected to TNF induction.

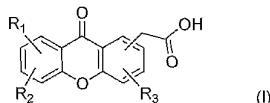
25

With the above background in mind, it is an object of the present invention to provide a method of treatment of cancer which will at least provide the public with a useful choice.

30 SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, in a first aspect, the present invention provides a method of treating cancer, the method including the step of administering to a mammal in need of such treatment, either simultaneously or sequentially:

5 (i) a compound of the formula (I)



or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, wherein R₁, R₂ and R₃ are each independently selected from the group consisting of H, C₁-C₆ alkyl, halogen, CF₃, CN, NO₂, NH₂, OH, OR, NHCOR, NHSO₂R, SR, SO₂R or NHR, wherein each R is independently C₁-C₆ alkyl optionally substituted with one or more substituents selected from hydroxy, amino and methoxy, and wherein each of R₁, R₂ and R₃ may be present at any of the available positions 1 to 8;

15 and wherein in each of the carbocyclic aromatic rings in formula (I), up to two of the methine (-CH=) groups may be replaced by an aza (-N=) group;

20 and wherein any two of R₁, R₂ and R₃ may additionally together represent the group -CH=CH-CH=CH-, such that this group, together with the carbon or nitrogen atoms to which it is attached, forms a fused 6 membered aromatic ring, and

(ii) a compound selected from compounds which modulate TNF production and compounds which act on biochemical pathways leading to TNF synthesis.

25 Preferably, the mammal is a human.

In certain preferred embodiments, the compound (ii) is a ligand that binds to the CD14 receptor of cells, such as bacterial LPS, deacylated LPS and CD14 receptor antibodies.

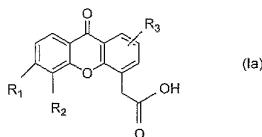
5 In other preferred embodiments, the compound (ii) is a ligand that binds to a surface receptor of cells connected with TNF production other than the CD14 receptor, such as interleukin-1 alpha.

10 In other preferred embodiments, the compound (ii) is a compound that induces protein kinase C, such as phorbol myristate ester.

In other preferred embodiments, the compound (ii) is a compound that can decrease the activity of protein phosphatases, preferably protein phosphatase 2A, such as okadaic acid.

15

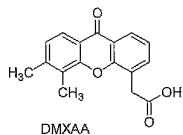
Preferably, compound (i) is of the formula (Ia):



wherein R₁, R₂ and R₃ are as defined for the compound of formula (I) above.

20

Most preferably, the compound of formula (I) or (Ia) is 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid, having the formula



In a further aspect, the present invention provides the use of a compound (i) of the formula (I) as defined above, or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, in the manufacture of a medicament for treating cancer in a mammal by sequential or simultaneous co-administration of the medicament and a compound (ii) selected 5 from compounds which modulate TNF production and compounds which act on biochemical pathways leading to TNF synthesis.

Preferably the compound (i) is DMXAA.

10 Preferably compound (ii) is selected from a ligand that binds to the CD14 receptor of cells; a ligand that binds to a surface receptor of cells connected with TNF production other than the CD14 receptor; a compound that induces protein kinase C; or a compound that can decrease the activity of protein phosphatases.

15 In still a further aspect, the present invention provides the use of a compound (ii) selected from compounds which modulate TNF production and compounds which act on biochemical pathways leading to TNF synthesis, in the manufacture of a medicament for treating cancer in a mammal by sequential or simultaneous co-administration of the medicament and a compound (i) of the formula (I) as defined 20 above, or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof.

Preferably the compound (i) is DMXAA.

25 Preferably compound (ii) is selected from a ligand that binds to the CD14 receptor of cells; a ligand that binds to a surface receptor of cells connected with TNF production other than the CD14 receptor; a compound that induces protein kinase C; or a compound that can decrease the activity of protein phosphatases.

30 In yet a further aspect, the present invention provides a pharmaceutical composition suitable for treating cancer, the composition including a compound (i) of the formula (I) as defined above or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, and a compound (ii) selected from compounds which modulate TNF production and

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

5

compounds which act on biochemical pathways leading to TNF synthesis, in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers or vehicles.

Preferably the compound (i) is DMXAA.

5

Preferably compound (ii) is selected from a ligand that binds to the CD14 receptor of cells; a ligand that binds to a surface receptor of cells connected with TNF production other than the CD14 receptor; a compound that induces protein kinase C; or a compound that can decrease the activity of protein phosphatases.

10

Preferably the composition is formulated for co-administration of compounds (i) and (ii), or is formulated for sequential administration of compounds (i) and (ii) in any order.

15 DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

While the invention is broadly as defined above, it also includes embodiments of which the following description provides examples. These specific embodiments are described in conjunction with the accompanying drawings in which:

20

Figure 1 shows the effect of DMXAA on LPS-induced TNF production in HPBL *in vitro*. HPBL were incubated (8 h) with the indicated concentrations of LPS alone (no shading) or in combination with DMXAA (shading). Supernatants were then removed and assayed for TNF content;

25

Figure 2 shows the effect of DMXAA on dLPS-induced TNF production in HPBL *in vitro*. HPBL were incubated (8 h) with the indicated concentrations of dLPS alone (light bars) or in combination with DMXAA (shaded bars). Supernatants were then removed and assayed for TNF content. Horizontal lines represent the SEM;

30

Figure 3 shows the effect of anti-CD14 antibodies on DMXAA- and LPS-induced TNF production in HPBL *in vitro*. HPBL were incubated (8 h) with LPS (1 ng/ml or

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

6

1 μ g/ml), DMXAA (800 μ g/ml) or flavone acetic acid (FAA) (800 μ g/ml) in the absence (no shading) or the presence (shading) of anti-CD14 antibodies. Supernatants were then removed and assayed for TNF content. Horizontal lines represent the SEM;

5

Figure 4 shows the effect of DMXAA on TNF production in HPBL *in vitro* in response to interleukin-1alpha. HPBL were incubated (8 h) with the indicated concentrations of drug either alone (filled symbols) or in combination with DMXAA (unfilled symbols). Supernatants were then removed and assayed for TNF content.

10 Vertical lines represent the SEM;

Figure 5 shows the effect of DMXAA on TNF production in HPBL *in vitro* in response to phorbol-12-myristate-13-acetate. HPBL were incubated (8 h) with the indicated concentrations of drug either alone (unshaded) or in combination with DMXAA (shaded). Supernatants were then removed and assayed for TNF content. Horizontal lines represent the SEM; and

15 Figure 6 shows the effect of DMXAA on TNF production in HPBL *in vitro* in response to okadaic acid. HPBL were incubated (8 h) with the indicated concentrations of drug either alone (unshaded) or in combination with DMXAA (shaded). Supernatants were then removed and assayed for TNF content. Horizontal lines represent the SEM.

20 Figure 7 shows the effect of anti-CD14 antibodies and dLPS on TNF production in response to LPS and DMXAA in murine leucocytes *in vitro*. Murine leucocytes were pre-incubated for 15 minutes with or without either an9-CD14 antibodies (10 μ l/well) or dLPS (500 μ g/ml) before the addition of DMXAA (800 μ g/ml), DMXAA (800 μ g/ml) or LPS (1 ng/ml). Cultures were incubated for 8 hours and the TNF content of the supernatant was measured.

25

25 Figure 8 shows the effect of antibiotic treatment on *in vivo* TNF production. Mice were treated orally for three days with an antibiotic combination to reduce the

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

7

bacterial flora in the gut. Mice were then treated with DMXAA (25 mg/kg) and TNF was measured 24 hours later.

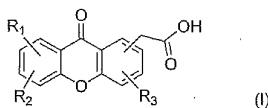
DESCRIPTION OF THE INVENTION

5

As defined above, the present invention relates to a method of treating cancer and to compositions of use in such a method.

The invention resides in the applicant's unexpected finding of a very large synergistic interaction in cultured human peripheral blood cells between compounds of the xanthenone acetic acid class having the formula (I) as defined below and compounds capable of contributing to the control pathway that modulates TNF (tumour necrosis factor) synthesis in human cells, that is, compounds that themselves modulate TNF production or compounds which are capable of acting on pathways leading to TNF synthesis.

FORMULA (I)



(I)

20

or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, wherein R₁, R₂ and R₃ are each independently selected from the group consisting of H, C₁-C₆ alkyl, halogen, CF₃, CN, NO₂, NH₂, OH, OR, NHCOR, NHSO₂R, SR, SO₂R or NHR, wherein each R is independently C₁-C₆ alkyl optionally substituted with one or more substituents selected from hydroxy, amino and methoxy, and wherein each of R₁, R₂ and R₃ may be present at any of the available positions 1 to 8;

and wherein in each of the carbocyclic aromatic rings in formula (I), up to two of the methine (-CH=) groups may be replaced by an aza (-N=) group;

and wherein any two of R₁, R₂ and R₃ may additionally together represent the group -CH=CH-CH=CH-, such that this group, together with the carbon or nitrogen atoms to which it is attached, forms a fused 6 membered aromatic ring.

5

In particular, the simultaneous administration of a compound of formula (I) 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) and a compound capable of contributing to the control pathway that modulates TNF synthesis in human cells, shows greater induction of TNF in cultured human peripheral blood cells than either 10 agent alone. TNF has recognised anticancer activity and can act either directly on cancer cells or indirectly on the cancer's blood supply.

It is shown herein that while DMXAA alone has little effect on TNF induction in cultured human peripheral blood leucocytes (HPBL), its combination with 15 compounds that contribute to TNF induction surprisingly achieves effects dramatically larger than for either agent alone, and greatly exceeds the sum of effects of the individual agents. The combination of DMXAA or other compounds of the formula (I) (as described above) with a second agent acting on the TNF pathway is therefore expected to have clinical utility in cancer treatment. Further studies are 20 needed to confirm that all compounds of formula (I) will act in a similar manner to DMXAA, but at this stage there is little reason to presume that DMXAA will be alone amongst the xanthenone acetic acid compounds in its effect in combination with the compounds (ii).

25 The compounds of the formula (I) are known and can be prepared using methods known to those persons skilled in the art. For example, compounds of the formula (I) and their preparation are described in the following references:

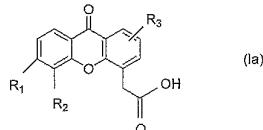
- 30 *Journal of Medicinal Chemistry* 34(1): 217-22, January 1991;
Journal of Medicinal Chemistry 34(2): 491-6, February 1991;
Journal of Medicinal Chemistry 33(5): 1375-9, May 1990;
Journal of Medicinal Chemistry 34(9): 2864-70, September 1991; and

Journal of Medicinal Chemistry 32(4): 793-9, April 1989,

the contents of which are incorporated herein by reference.

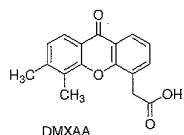
- 5 Of the compounds of formula (I) defined above, compounds of the formula (Ia) as described below (in which the substituents R₁ and R₂ are at the 5- and 6-positions), are generally preferred for use in the methods of the invention.

10 FORMULA (Ia)



wherein R₁, R₂ and R₃ are as defined for the compound of (I) above.

- 15 A particularly preferred compound is 5,6-dimethylxanthone-4-acetic acid (DMXAA). The preparation of this compound is described in *Journal of Medicinal Chemistry* 34(1): 217-22, January 1991.



- 20 The compounds capable of contributing to the control pathway that modulates TNF synthesis in human cancer tissue described above are also well known compounds (see, for example, Philpott M, Ching LM, Baguley BC; *Eur J Cancer* 2001, in press) and can likewise be prepared by methods known to those skilled in the art. As will be readily apparent, more than one of those compounds can be combined with the

compound(s) of formula (I) or (Ia). Reference to "a compound" should not be seen to be restrictive to only one such compound.

- In certain embodiments of the invention, the compound capable of contributing to the control pathway that modulates TNF synthesis is a ligand that binds to the CD14 receptor of cells. Examples of such ligands are bacterial lipopolysaccharide (LPS), deacylated lipopolysaccharide (dLPS), and antibodies to the CD14 receptor for LPS and dLPS.
- 10 In further embodiments of the invention, the compound capable of contributing to the control pathway that modulates TNF synthesis is a compound that acts on surface receptors, other than CD14 receptors, that are connected with TNF production. An example of such a compound is interleukin-1 alpha (IL-1).
- 15 In still further embodiments of the invention, the compound is capable of contributing to the control pathways that modulate TNF synthesis by inducing the enzyme protein kinase C. Examples of such compounds are phorbol myristate esters such as phorbol myristate acetate.
- 20 In still further embodiments of the invention, the compound is capable of decreasing the activity of protein phosphatases, preferably protein phosphatase 2A. An example of such a compound is okadaic acid.
- 25 The therapeutic methods of the present invention therefore include the step of administering to a patient, simultaneously or sequentially, an agent capable of contributing to the control pathway that modulates TNF synthesis, and a compound of the formula (I) as defined above or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof.
- 30 The compound of formula (I) and the compound capable of contributing to the control pathway that modulates TNF synthesis can be administered to a patient in any suitable form. For example, the compounds may conveniently be administered

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

11

intravenously, using formulations for each compound already known in the art. The formulation of medicaments for use in cancer treatment utilising combinations of the compounds referred to herein, together with pharmaceutically acceptable carriers, vehicles and excipients would be well within the abilities of a person skilled in this
5 art. One known precaution would be to protect solutions of the highly water soluble DMXAA compound from light.

The compounds of formula (I) and the compound capable of contributing to the control pathway that modulates TNF synthesis can be administered either
10 simultaneously or sequentially, i.e. the compound capable of contributing to the control pathway that modulates TNF synthesis can be administered either before or after the compound of formula (I) is administered. Simultaneous co-administration, in most cases, is likely to be preferred.

15 The invention will now be described in more detail with reference to the following non-limiting examples. While the examples have been directed to specific combinations of compounds it will be appreciated by those skilled in this art that the results are not restrictive to those compound combinations only.

20 EXAMPLES

Methods

Incubation of HPBL with drugs

Partially purified buffy coats were purchased from Auckland Blood Centre and divided into 15-ml aliquots in 50-ml centrifuge tubes (2070 Conical Tubes, Becton
25 Dickinson Labware, New Jersey, USA). HPBL in tissue culture dishes (10 ml; 10^7 cells/ml) were incubated overnight in α -MEM culture medium supplemented with FCS (10% v/v), streptomycin sulphate (100 μ g/ml) and penicillin-G (100 units/ml). All extraction operations were carried out at 7°C to prevent clotting. Unsupplemented α -MEM medium was added to 30 ml and a 10-ml layer of Ficoll-
30 Paque PLUS was slowly added to the bottom of the tubes. After centrifugation at

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

12

300 g for 30 min the upper layer was removed and the HPBL layer was carefully drawn off into a fresh 50-ml centrifuge tube. The volume was adjusted to 50 ml, the cells were centrifuged at 300 g, and HPBL were resuspended in supplemented α -MEM medium and added (1 ml/well) to 24 well plates (Nunc, Kamstrup, Roskilde, Denmark). Agents (made up at twice the final concentration) were added and plates were incubated for the appropriate times in 5% CO₂/air at 37°C overnight. DMXAA sodium salt (this laboratory) was dissolved in medium and protected from light. FAA (National Cancer Institute, USA) was dissolved in 5% (w/v) sodium bicarbonate and diluted with medium. Interleukin-1alpha (R&D Systems, USA), okadaic acid, LPS and deacylated LPS (Sigma Chemical Co., USA) were dissolved in α -MEM, filter-sterilised and used immediately. The MEM-18 mouse anti-human CD14 IgG antibody was obtained from Sanbio bv, am Uden, Netherlands, and was freed from azide before use by ultrafiltration.

15 **Measurement of TNF**

After the appropriate incubation period of HPBL with drug, supernatants were either used immediately or stored at -20°C. TNF standards were prepared by making serial dilutions of the TNF stock solution in supplemented culture media (concentration range 10 – 10,000 pg/ml). ELISA plates were made using the OptEIA Human TNF-alpha Set (Pharmingen, San Diego, CA, USA). TNF standards and samples were added to the ELISA plates and the assays were carried out according to the makers' directions.

25 **Example 1**

The induction of TNF in peripheral blood monocytes by low concentrations of the bacterial cell wall lipopolysaccharide (LPS) was unexpectedly stimulated by DMXAA. LPS has a large range of biological effects including antitumor effects (Ractz CRH, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding AH, Nathan CF. *FASEB J* 1991, **5**, 2652-2660). Certain bacteria can localise in tumour tissue (Kimura NT, Taniguchi S, Aoki K, Baba T, *Cancer Res.* 1980, **40**, 2061-2068) and would

therefore provide a localised LPS signal. Co-administration of DMXAA would amplify this signal.

Example 2

5

The induction of TNF by low local concentrations of the modified bacterial cell wall components, which by themselves do not stimulate TNF production, may be stimulated by DMXAA. Such components are included in genetically modified bacteria that might localise in tumour tissue but produce an attenuated systemic 10 response, thus eliminating endotoxic shock as a side effect of such therapy (Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M, Ash O, Carmichael E, Chakraborty A, Fischer J, Lin SL, Luo X, Miller SI, Zheng LM, King I, Pawelek JM, Bermudes D, *Nature Biotechnology*, 1999, **17**, 37-41).

15 The induction of TNF in peripheral blood monocytes by deacylated LPS (dLPS), an inactive form of LPS, was unexpectedly stimulated by DMXAA. dLPS does not alone induce TNF, and competitively inhibits the induction of TNF by LPS by competition for the CD14 receptor (Riedo FX, Munford RS, Campbell WB, Reisch JS, Chien KR, Gerard RD. *J Immunol* 1990, **144**, 3506-3512). dLPS (500 µg/ml; 15 20 minutes pre-incubation) only slightly induced TNF production above the controls. dLPS also strongly reduced TNF production in response to LPS (1 ng/ml). DMXAA alone (800 µg/ml) caused no substantial induction of TNF. However the combination of dLPS (500 µg/ml; 15 minutes pre-incubation) and DMXAA (800 µg/ml) caused a large increase in TNF production.

25

Example 3

30 The induction of TNF in peripheral blood monocytes by an antibody (MEM-18) to the LPS receptor, CD14, was unexpectedly stimulated by DMXAA. Anti-CD14 antibody does not alone induce TNF alone and inhibits the induction of TNF by LPS (Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD, *Nature* 1998, **392**, 505-509).

Example 4

The induction of TNF in peripheral blood monocytes by cytokines such as interleukin-1 (IL-1) was unexpectedly stimulated by DMXAA. The cytokine IL-1 is an inflammatory cytokine that itself has been reported to have experimental antitumor activity (Braunschweiger PG, Johnson CS, Kumar N, Ord V, Furmanski P, *Cancer Res.* 1988 **48**, 6011-6016). As shown in Figure 4, IL-1 alone is capable of inducing TNF in human peripheral blood leukocytes (HPBL). However, co-administration of DMXAA greatly increases (up to 56-fold in this case) the induction of TNF as compared to that by IL-1 alone.

Example 5

The induction of TNF by low molecular weight activators of protein kinase C such as phorbol myristate acetate (PMA) was unexpectedly enhanced by co-administration of DMXAA. When HPBL were incubated with PMA alone at concentrations up to 20 ng/ml, there was no substantial induction of TNF. DMXAA alone (800 µg/ml) also had no substantial effect, DMXAA but in combination with PMA induced a higher degree of TNF production. At concentrations higher than 20 ng/ml, PMA alone induced TNF synthesis, as has been reported by others (Dong ZY, Lu S, Zhang YH. *Immunobiol* 1989, **179**, 382-394).

Example 6

The induction of TNF by low molecular weight protein phosphatase inhibitors such as okadaic acid (OA), was unexpectedly enhanced by co-administration of DMXAA. When HPBL were incubated with OA alone at concentrations up to 20 ng/ml, there was no substantial induction of TNF. DMXAA alone (800 µg/ml) also had no substantial effect, DMXAA but in combination with OA induced a higher degree of TNF production. At concentrations higher than 20 ng/ml, OA alone induced TNF

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

15

synthesis, as has been reported by others (Sung SSJ, Walters JA, Fu SM, *J. Exp. Med.* 1992, **176**, 897-901).

Example 7

5

The effect of DMXAA on cultured murine leucocytes has also been investigated using LPS as a control. TNF was measured by enzyme-linked immunosorbent assay after 8 h.

Materials

- 10 DMXAA sodium salt (this laboratory) was dissolved in medium and protected from light (9). LPS and deacylated LPS (Sigma Chemical Co., MO) were dissolved in α -MEM, filter-sterilised and used immediately. The MEM-18 mouse anti-human CD14 IgG antibody was obtained from Sanbio bv, am Uden, Netherlands, and was freed from azide before use by ultrafiltration and was LPS-free (Endospecy ES-50M LPS
- 15 quantitation system, Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan).

Extraction of murine leucocytes

- Blood samples for extraction of leucocytes were taken by cardiac puncture of halothane-anaesthetised mice into 1-ml syringes containing ACD-A anticoagulant (0.1 ml). All extraction operations were carried out at 7°C to prevent clotting.
- 20 Samples were pooled and unsupplemented α -MEM was added to 30 ml and a 10-ml layer of Ficoll-Paque PLUS was slowly added to the bottom of the tubes. After centrifugation at 300×g for 30 min the upper layer was removed and the leucocyte layer was carefully drawn off into a fresh 50-ml centrifuge tube. The volume was adjusted to 50 ml with unsupplemented growth medium, the cells were centrifuged at
- 25 300×g, and the leucocytes were resuspended at 10^7 cells/ml in α -MEM supplemented with foetal bovine serum (10% v/v), streptomycin sulphate (100 µg/ml) and penicillin-G (100 units/ml).

In vitro studies with murine leucocytes

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

16

Cells were added either to 24 well plates (1 ml/well; Nunc, Kamstrup, Roskilde, Denmark) or to 100 mm Petri dishes (10 ml/plate) and incubated in 5% CO₂/air at 37°C overnight. Agents (made up at twice the final concentration in growth medium) were added and plates were further incubated for 8 hours. After the appropriate 5 incubation period of HPBL with drug in 24-well plates, supernatants were removed and either assayed immediately or stored at -20°C.

As seen in Figure 7, control cells, cells treated with anti-CD14 antibodies alone, or 10 cells treated with dLPS alone produced very low concentrations of TNF. LPS significantly increased TNF production and this increase was abolished by co- 15 incubation with anti-CD14 antibody or dLPS. DMXAA alone did not significantly increase TNF production, but co-incubation with anti-CD14 antibody resulted in a high level of TNF production that was even greater than that caused by LPS. Co- incubation with dLPS also caused a significant (p < 0.001) elevation of TNF 15 production, although the magnitude of the effect was less than that caused by anti- CD14 antibody.

Example 8

20 The possible role of LPS for the *in vivo* production of TNF in mice was reviewed by pre-treating mice with a combination of antibiotics designed to sterilise the gut. The results support the concept that DMXAA acts as a co-stimulator with other inducers of TNF in both murine and human mononuclear cells.

25 To test the hypothesis that low concentrations of LPS synergise with DMXAA for *in vivo* TNF production, mice were treated orally with antibiotics for 3 days and then treated with 25 mg/kg DMXAA. TNF levels were measured 24 hours later.

In vivo studies

20 C57BL mice were either untreated, or treated for 4 days prior to DMXAA with a mixture of antibiotics (cephalocin 2 g/l and neomycin 2 g/l in the drinking water). 30 Mice received a single i.p. dose of DMXAA (25 mg/kg) and blood was collected by

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

17

cardiac puncture of halothane-anaesthetised mice after 3 hours. Blood from each mouse was transferred to individual microcentrifuge tubes and allowed to clot overnight on ice before centrifugation at 2000×g for 20 minutes at 4°C. If clotting was not complete the sample was allowed to stand on ice for a further 2 hours, after 5 which it was re-centrifuged. Serum was drawn off the top of the blood samples and stored at -20°C until assay of TNF content.

Measurement of TNF

TNF standards were prepared by making serial dilutions of the TNF stock solution in 10 supplemented culture media (concentration range 10 – 10,000 pg/ml). ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) plates were made using the OptEIA Human TNF-alpha-Set (Pharmingen, San Diego, CA, USA). TNF standards and samples were added to the ELISA plates and the assays were carried out according to the manufacturer's directions.

15

Effect of Antibiotic Treatment

TNF concentrations were low in control mice and in mice treated with antibiotics alone. As shown in Figure 8, treatment with DMXAA substantially increased serum 20 TNF concentrations in mice not receiving antibiotics. Administration of DMXAA to mice following antibiotic treatment also increased serum TNF but the increase was significantly smaller (p < 0.001) than that in mice not receiving antibiotic treatment.

Discussion

25

The results of the above Examples (1-8) show that DMXAA appears to require a second signal for the induction of TNF synthesis with human leucocytes, and also demonstrates a similar effect with murine leucocytes. It is notable and unexpected that anti-CD14 antibody and dLPS, which bind to the CD14 receptor for LPS and 30 thus inhibit TNF induction by LPS, provide a signal that enables DMXAA to induce TNF (Fig. 6). The results of antibiotic pre-treatment (Fig. 7) strongly support the

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

18

hypothesis that small amounts of circulating bacterial products, which could include LPS or LPS products, are required for the TNF response to DMXAA.

The results suggest that combination of DMXAA with a strategy for increasing the 5 second signal in tumour tissue, such as by use of compounds capable of contributing to modulation of TNF synthesis, may lead to a combination therapy having significant clinical anti-tumour effect. The increased induction of TNF, and the resultant effect this will have on tumour growth, is a significant advance of considerable public interest.

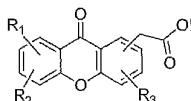
10

INDUSTRIAL APPLICATION

As will be apparent from the above description and examples, the present invention provides an improved method of cancer therapy that is expected to find widespread 15 clinical utility. The invention also provides compositions of use in such methods of cancer therapy.

Those persons skilled in the art will understand that the specific description provided thereof is exemplary only and that the present invention is not limited thereto. 20 Alterations and modifications that would be apparent to a person skilled in the art are intended to be included within the spirit and scope of the invention as defined in the appended claims.

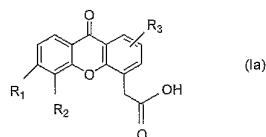
CLAIMS

1. A method of treating cancer, the method including the step of administering to a mammal in need of such treatment, either simultaneously or sequentially:
- 5 (i) a compound of the formula (I)
- 10 
- 15 or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, wherein R₁, R₂ and R₃ are each independently selected from the group consisting of H, C₁-C₆ alkyl, halogen, CF₃, CN, NO₂, NH₂, OH, OR, NHCOR, NHSO₂R, SR, SO₂R or NHR, wherein each R is independently C₁-C₆ alkyl optionally substituted with one or more substituents selected from hydroxy, amino and methoxy, and wherein each of R₁, R₂ and R₃ may be present at any of the available positions 1 to 8; wherein in each of the carbocyclic aromatic rings in formula (I), up to two of the methine (-CH=) groups may be replaced by an aza (-N=) group; wherein any two of R₁, R₂ and R₃ may additionally together represent the group -CH=CH-CH=CH-, such that this group, together with the carbon or nitrogen atoms to which it is attached, forms a fused 6 membered aromatic ring, and
- 20 (ii) a compound selected from compounds which modulate TNF production and compounds which act on biochemical pathways leading to TNF synthesis.
- 25 2. The method according to claim 1 wherein the compound (ii) is selected from a ligand that binds to the CD14 receptor of cells; a ligand that binds to

a surface receptor of cells connected with TNF production other than the CD14 receptor; a compound that induces protein kinase C; and a compound that can decrease the activity of protein phosphatases.

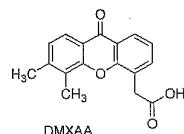
5 3. The method of claim 1 or claim 2 wherein compound (ii) is selected from bacterial LPS, deacylated LPS, CD14 receptor antibodies, interleukin-1 alpha, phorbol myristate ester and okadaic acid.

10 4. The method of any one of the previous claims wherein compound (i) is a compound of the formula:



wherein R₁, R₂ and R₃ are as defined in claim 1.

15 5. The method of claim 1 or claim 4 wherein compound (i) is 5,6-dimethylxanthene-4-acetic acid, having the formula



20 6. The use of a compound (i) of the formula (I) as defined in claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, in the manufacture of a medicament for treating cancer in a mammal by sequential or simultaneous co-administration of the medicament and a compound (ii) selected from

compounds which modulate TNF production and compounds which act on biochemical pathways leading to TNF synthesis.

7. The use according to claim 6 wherein the compound (i) is DMXAA.
- 5 8. The use according to claim 6 or claim 7 wherein compound (ii) is a compound selected from at least one of the following: a ligand that binds to the CD14 receptor of cells; a ligand that binds to a surface receptor of cells connected with TNF production other than the CD14 receptor; a compound 10 that induces protein kinase C; or a compound that can decrease the activity of protein phosphatases.
- 15 9. The use of a compound selected from compounds which modulate TNF production and compounds which act on biochemical pathways leading to TNF synthesis, in the manufacture of a medicament for treating cancer in a mammal by sequential or simultaneous co-administration of the medicament and a compound (i) of the formula (I) as defined above, or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof.
- 20 10. The use according to claim 9 wherein compound (i) is DMXAA.
11. The use according to claim 9 or claim 10 wherein compound (ii) is a compound selected from at least one of the following: a ligand that binds to the CD14 receptor of cells; a ligand that binds to a surface receptor of cells 25 connected with TNF production other than the CD14 receptor; a compound that induces protein kinase C; or a compound that can decrease the activity of protein phosphatases.
- 25 12. A pharmaceutical composition suitable for treating cancer, including a compound (i) of the formula (I) as defined in claim 1 or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, and a compound (ii) selected from compounds which modulate TNF production and compounds which act on 30

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

22

biochemical pathways leading to TNF synthesis, in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers or vehicles.

13. The composition according to claim 12 wherein compound (i) is DMXAA.
- 5 14. The composition according to claim 12 or claim 13 wherein compound (ii) is a compound selected from at least one of the following: a ligand that binds to the CD14 receptor of cells; a ligand that binds to a surface receptor of cells connected with TNF production other than the CD14 receptor; a
- 10 15. A composition method or use, combining a compound of formula (I) as defined in claim 1 and a compound (ii) as defined in claim 1 substantially as herein described with reference to any one of the examples.

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

1/8

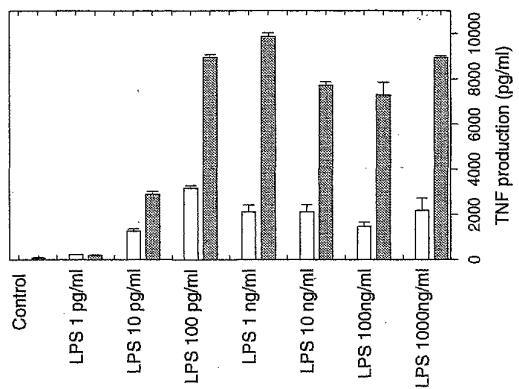


FIGURE 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2/8

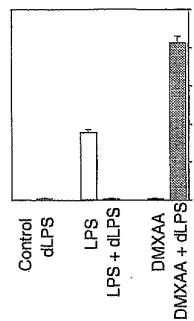


FIGURE 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

3/8

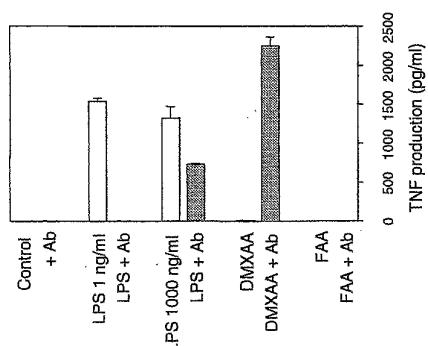


FIGURE 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

4/8

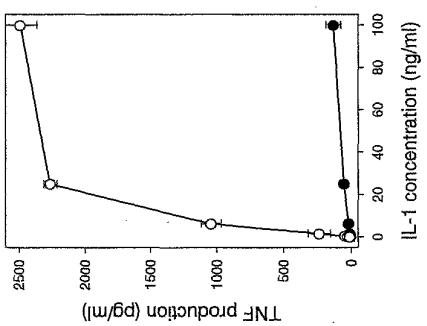


FIGURE 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

5/8

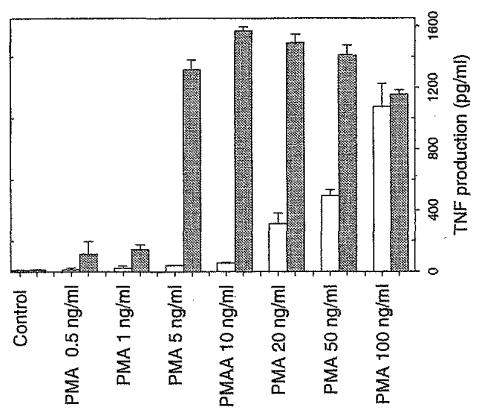


FIGURE 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/09700

PCT/NZ01/00154

6/8

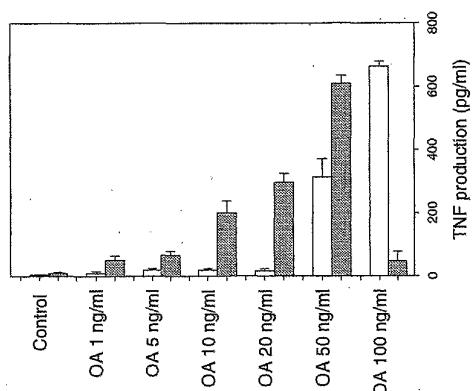


FIGURE 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

7/8

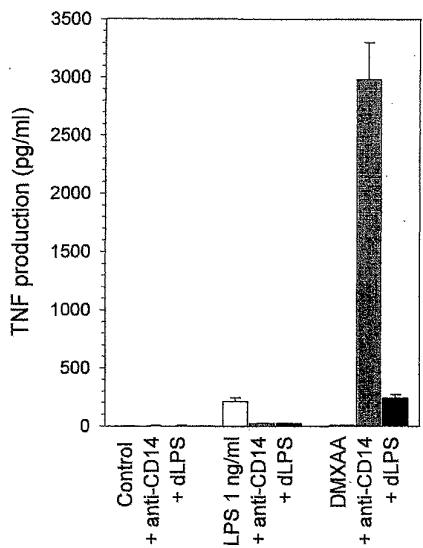


FIGURE 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

8/8

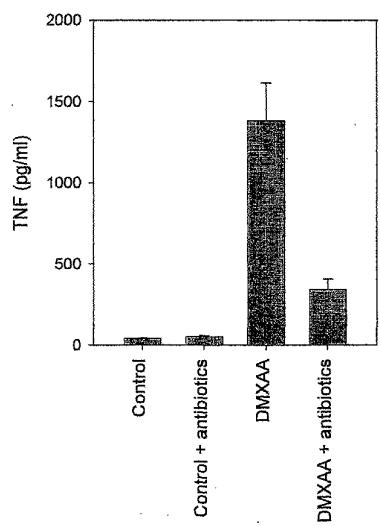


FIGURE 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		international application No. PCT/NZ01/00154
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int Cl ⁷ : A61K 31/352, A61P 35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K 31/352, A61P 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DERWENT: Xanthenone, tumour, TNF, CD14, protein kinase, phosphatase, and related terms MEDLINE: As above		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHING LM et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1994, 35 (2), "Interaction between endotoxin and the antitumour agent 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid in the induction of tumour necrosis factor and haemorrhagic necrosis of colon 38 tumours", pages 153-160 Whole document	1-15
A	FUTAMI H et al, Journal of Immunotherapy, Nov. 1992, 12 (4), "Cytokine induction and therapeutic synergy with interleukin-2 against murine renal and colon cancers by xanthenone-4-acetic acid derivatives", pages 247-255 Whole document	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C		<input type="checkbox"/> See patent family annex
* Special categories of cited documents: "A" Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search: 19 October 2001	Date of mailing of the international search report 30 OCT 2001	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: (02) 6283 3929	Authorized officer STEVEN CHEW Telephone No.: (02) 6283 2248	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national application No. PCT/NZ01/00154
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAPLIN DJ et al, Proc. Annu. Meet Am. Assoc. Cancer Res., Mar 1996, Vol.37, #3009, "Antivascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of tubulin binding agents". Abstract	1-15
A	VESZELOVSZKY E et al., European Journal of Cancer, 1993, 29A (3), "Flavone acetic acid and, 5, 6-dimethylxanthone-4-acetic acid: Relationship between plasma nitrate elevation and the induction of tumour necrosis, pages 404-408 Whole document	1-15

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
A 61 P 35/00 A 61 P 43/00 111
A 61 P 43/00 A 61 K 37/02

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72) 発明者 チン,ライミニ
ニュージーランド国,オークランド,ウェスト・ハーバー,モネット・グローヴ 9

(72) 発明者 フィルポット,マーティン
ニュージーランド国,オークランド,ホーウィック,コッパー・フィールド・テラス 7

F ターム(参考) 4C084 AA23 DA13 NA14 ZB261 ZC191 ZC201
4C086 AA01 AA02 EA20 MA03 MA04 NA14 ZB26 ZC19 ZC20
4C206 AA01 AA02 DB46 MA03 MA04 NA14 ZB26 ZC19 ZC20