

(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2020-516663

(P2020-516663A)

(43) 公表日 令和2年6月11日 (2020.6.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/192 (2006.01)	A 6 1 K 31/192	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02 1 0 1	4 C 2 0 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 31/195 (2006.01)	A 6 1 K 31/195	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-556183 (P2019-556183)
 (86) (22) 出願日 平成30年4月16日 (2018.4.16)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年12月3日 (2019.12.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/027786
 (87) 国際公開番号 W02018/194976
 (87) 国際公開日 平成30年10月25日 (2018.10.25)
 (31) 優先権主張番号 62/486,033
 (32) 優先日 平成29年4月17日 (2017.4.17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 507277642
 インディアナ ユニバーシティー リサーチ
 アンド テクノロジー コーポレーション
 INDIANA UNIVERSITY
 RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION
 アメリカ合衆国 46202 インディアナ
 ナ州 インディアナポリス インディアナ
 アベニュー 518
 (74) 代理人 100106002
 弁理士 正林 真之
 (74) 代理人 100120891
 弁理士 林 一好

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症によって誘起されるDNA損傷の阻止及び回復

(57) 【要約】

ニューロンの感受性を低減し、それによって炎症及び慢性疼痛を低減する方法が本明細書に開示される。具体的には、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1酸化還元因子1 (APE1/Ref-1) 阻害剤であるAPX3330を投与して、DNA塩基除去修復 (BER) 経路を強化し、それによって炎症メディエーターに対するニューロンの感受性を低減し、炎症又は慢性疼痛を軽減する方法が開示される。

【選択図】 図 8 B

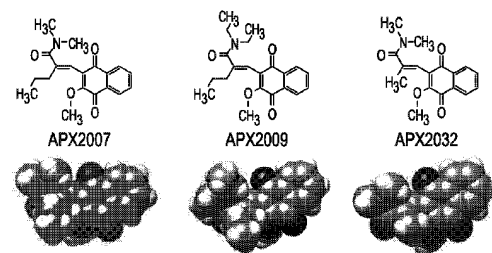


FIG. 8B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要としている被験体におけるニューロンの感受性を低減する方法であって、A P E 1 のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ 1 酸化還元因子 1 (A P E 1 / R e f - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項 2】

前記 A P E 1 / R e f - 1 阻害剤が、3 - [(5 - (2 , 3 - ジメトキシ - 6 - メチル 1 , 4 - ベンゾキノイル)) - 2 - ノニル - 2 - プロピオン酸 (A P X 3 3 3 0) 、 [(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N , N - ジエチルペンタンアミド] (A P X 2 0 0 9) 、 (2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N - メトキシペンタンアミド] (A P X 2 0 1 4) 、これらの薬学的に許容し得る塩及び薬学的に許容し得る溶媒和物、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記 A P E 1 / R e f - 1 阻害剤が A P X 3 3 3 0 であり、前記被験体に約 5 μ M ~ 約 5 0 μ M の A P X 3 3 3 0 を投与する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 1 つの追加の治療剤を前記被験体に投与する工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記追加の治療剤が、白金薬剤、タキサン、ドキソルビシン、アルカロイド、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、エリブリン、電離放射線、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

それを必要としている被験体における炎症及び慢性疼痛を治療する方法であって、A P E 1 のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ 1 酸化還元因子 1 (A P E 1 / R e f - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を前記被験体に投与する工程を含む方法。

30

【請求項 7】

前記 A P E 1 / R e f - 1 阻害剤が、3 - [(5 - (2 , 3 - ジメトキシ - 6 - メチル 1 , 4 - ベンゾキノイル)) - 2 - ノニル - 2 - プロピオン酸 (A P X 3 3 3 0) 、 [(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N , N - ジエチルペンタンアミド] (A P X 2 0 0 9) 、 (2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N - メトキシペンタンアミド] (A P X 2 0 1 4) 、これらの薬学的に許容し得る塩及び薬学的に許容し得る溶媒和物、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 A P E 1 / R e f - 1 阻害剤が A P X 3 3 3 0 であり、前記被験体に約 5 μ M ~ 約 5 0 μ M の A P X 3 3 3 0 を投与する、請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 9】

少なくとも 1 つの追加の治療剤を前記被験体に投与する工程を更に含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記追加の治療剤が、白金薬剤、タキサン、ドキソルビシン、アルカロイド、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、エリブリン、電離放射線、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

50

前記被験体が、肥満及び糖尿病のうちの少なくとも１つに罹患している、請求項６に記載の方法。

【請求項１２】

それを必要としている被験体におけるニューロンDNA修復機能を強化する方法であって、APE１のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ１酸化還元因子１（APE１/Ref-１）阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項１３】

前記APE１/Ref-１阻害剤が、３-[（５-(２,３-ジメトキシ-６-メチル１,４-ベンゾキノイル)）]-２-ノニル-２-プロピオン酸（APX３３３０）、[(２E)-２-[(３-メトキシ-１,４-ジオキソ-１,４-ジヒドロナフタレン-２-イル)メチリデン]-N,N-ジエチルペンタンアミド]（APX２００９）、(２E)-２-[(３-メトキシ-１,４-ジオキソ-１,４-ジヒドロナフタレン-２-イル)メチリデン]-N-メトキシペンタンアミド]（APX２０１４）、これらの薬学的に許容し得る塩及び薬学的に許容し得る溶媒和物、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１２に記載の方法。

10

【請求項１４】

前記APE１/Ref-１阻害剤がAPX３３３０であり、前記被験体に約５μM～約５０μMのAPX３３３０を投与する、請求項１２に記載の方法。

【請求項１５】

少なくとも１つの追加の治療剤を前記被験体に投与する工程を更に含む、請求項１２に記載の方法。

20

【請求項１６】

前記追加の治療剤が、白金薬剤、タキサン、ドキシソルピシン、アルカロイド、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、エリブリン、電離放射線、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

それを必要としている被験体における化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）を治療する方法であって、APE１のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ１酸化還元因子１（APE１/Ref-１）阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を前記被験体に投与する工程を含む方法。

30

【請求項１８】

前記APE１/Ref-１阻害剤が、３-[（５-(２,３-ジメトキシ-６-メチル１,４-ベンゾキノイル)）]-２-ノニル-２-プロピオン酸（APX３３３０）、[(２E)-２-[(３-メトキシ-１,４-ジオキソ-１,４-ジヒドロナフタレン-２-イル)メチリデン]-N,N-ジエチルペンタンアミド]（APX２００９）、(２E)-２-[(３-メトキシ-１,４-ジオキソ-１,４-ジヒドロナフタレン-２-イル)メチリデン]-N-メトキシペンタンアミド]（APX２０１４）、これらの薬学的に許容し得る塩及び薬学的に許容し得る溶媒和物、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１７に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本願は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、２０１７年４月１７日出願の米国仮特許出願第６２／４８６，０３３号に対する利益を主張する。

【０００２】

50

政府の支援についての記載

本発明は、米国国立衛生研究所（NIH）によって与えられたNS091667の下で政府の支援を受けて成された。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表の組み込み

1,070バイトのサイズ（MICROSOFT WINDOWS（登録商標）EXPLORERで測定したとき）の「IURTC__2017-116-02__ST25.txt」という名称のファイルを含むコンピュータ可読形態の配列表を本明細書に提供し、参照により本明細書に組み込む。この配列表は、配列番号1～4からなる。

【0004】

本開示は、一般に、ニューロンの感受性を低減し、それによって、炎症及び慢性疼痛を低減する方法に関する。具体的には、APX3330の投与を通じてDNA塩基除去修復（BER）経路を強化することによって、炎症メディエーターに対するニューロンの感受性が低減され、それによって、炎症又は慢性疼痛が軽減されることが本明細書において見出された。

【背景技術】

【0005】

損傷を受けた組織及び損傷中の免疫細胞から放出される炎症メディエーターは、一次感覚ニューロンの感受性に対して急性及び慢性の作用を有し得る。プロスタグランジン、ブラジキニン、ヒスタミン、セロトニン、トリプターゼ、サイトカイン、及びATPは、感覚ニューロンの脱分極の一因となるイオンチャネルの翻訳後修飾を介して、様々な刺激に対する感覚ニューロンの感受性を変化させ得る（非特許文献1を参照）。これら炎症メディエーターはキナーゼ活性を強化し、その結果、イオンチャネルがリン酸化及び調節されて、ニューロンの感受性が変化する。末梢感作は、炎症性疾患及び慢性疼痛症候群の鍵となる構成要素である。この感作は、ヒトでは痛覚過敏及び異痛症として、並びに疼痛の動物モデルでは過剰侵害受容として顕在化する。傷害後の急性過敏症は、傷害の保護に役立つ炎症応答の重要な構成要素であるが、組織修復に必要な時間を過ぎてもこの過敏症が維持されていることが多い。

【0006】

炎症メディエーターのキナーゼ活性に対する広く研究されている作用に加えて、炎症中及び慢性神経因性疼痛の動物モデルでは、反応性の酸素（ROS）及び窒素の種（RNS）の生成が増加する（非特許文献2～7）。現在の治療法では治療が困難な多くの持続性炎症及び慢性疼痛状態の根底には、この維持された過敏性がある。具体的には、幾つかの研究で、抗酸化剤によってニューロンの感受性が回復することが示唆されている（非特許文献8～11）が、ROS/RNSは細胞シグナル伝達及び細胞酸化還元ホメオスタシスにおいて広範な役割を有していることから、全身抗酸化剤治療には有害作用がある（非特許文献12を参照）。感覚ニューロンにおけるROS/RNS生成の重大な帰結は、酸化的DNA損傷である。実際、後根神経節に由来する培養物中において、ROS/RNS及びその後のDNA損傷が、シスプラチン、オキサリプラチン、又は電離放射線によって誘起されるニューロンの感受性の変化を媒介することが、以前の研究で証明された（非特許文献13～15）。

【0007】

DNA損傷の修復は、ニューロンのホメオスタシスの維持にとって非常に重要である（非特許文献16～19）が、その理由は、内因性代謝活性、傷害に続発する酸化的ストレス（非特許文献20）、環境有害物質（非特許文献21）、及び薬物（非特許文献22）が全てニューロンのDNA損傷を引き起こし得るためである。ニューロンは、塩基除去修復（BER）、ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復、直接損傷修復、及び非相同末端結合又は相同組み換えを含む、主なDNA修復経路を含む（非特許文献23～25）。BER経路は、塩基に対する酸化的損傷、塩基のアルキル化、又は脱アミノ化によって引き起こされる核及びミトコンドリアにおけるDNA損傷を修復し、かつニューロンを保護す

10

20

30

40

50

るための最も重要な修復経路である可能性がある。BERにおける最初の工程は、DNAグリコシラーゼによって不正確な又は損傷を受けた塩基を除去することである。BER経路における第2の工程には、脱プリン及び/又は脱ピリミジン（AP）部位のすぐ5'側のホスホジエステル骨格を加水分解する酵素APE1が関与している。これによって、正常な3'-ヒドロキシル基及び脱塩基デオキシリボース-5-リン酸が生じるが、これは、BER経路の後続酵素によってプロセッシングされる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Richardson及びVasko, 2002

10

【非特許文献2】Bauerova及びBezdek, 1999

【非特許文献3】Babior, 2000

【非特許文献4】Kimら, 2004

【非特許文献5】Remansら, 2005

【非特許文献6】Fidanboylyら, 2011

【非特許文献7】Salveminiら, 2011

【非特許文献8】Khattab, 2006

【非特許文献9】Keebleら, 2009

【非特許文献10】Fidanboylyら, 2011

【非特許文献11】Duggettら, 2016

20

【非特許文献12】Martin及びBarrett, 2002

【非特許文献13】Jiangら, 2008a

【非特許文献14】Vaskoら, 2011

【非特許文献15】Kelleyら, 2014

【非特許文献16】Brooks, 2002

【非特許文献17】McMurray, 2005

【非特許文献18】Fishelら, 2007a

【非特許文献19】Hetmanら, 2010

【非特許文献20】Kruman及びSchwartz, 2008

【非特許文献21】Kisbyら, 1999

30

【非特許文献22】Ahles及びSaykin, 2007

【非特許文献23】Fishelら, 2007b

【非特許文献24】Barzilaiら, 2008

【非特許文献25】Fortini及びDogliotti, 2010

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

現在の治療法は限られた有効性しか有さず、重大な副作用が生じる場合があるので、末梢感作を維持するための機序を決定し、炎症及び慢性疼痛を治療するための新規治療法を設計するためにその情報を使用することが、臨床的に重要である。

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

したがって、本開示は、炎症メディエーターがニューロンの感受性の変化を維持する経路に洞察を加え、かつ炎症及び/又は慢性疼痛を軽減するための薬理的ターゲットとしてニューロンDNA修復の強化にスポットを当てる。更に、本開示は、DNA修復を強化し、ニューロンの感受性を低減するための化合物APX3330を提供する。

【0011】

本開示は、一般に、ニューロンの感受性を低減し、それによって、炎症性及び慢性の疼痛を低減する方法に関する。具体的には、APX3330（及び/又はそのアナログ）の投与を通じてDNA塩基除去修復（BER）経路を強化することによって、炎症メディエ

50

ーターに対するニューロンの感受性が低減され、それによって、炎症又は慢性疼痛が軽減されることが本明細書において見出された。

【0012】

上記に基づいて、一態様では、本開示は、それを必要としている被験体におけるニューロンの感受性を低減する方法を目的とする。該方法は、APE1のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1酸化還元因子1 (APE1 / Ref - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を該被験体に投与する工程を含む。

【0013】

別の態様では、本開示は、それを必要としている被験体における炎症及び慢性疼痛を治療する方法を目的とする。該方法は、APE1のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1酸化還元因子1 (APE1 / Ref - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を該被験体に投与する工程を含む。

【0014】

更に別の態様では、本開示は、それを必要としている被験体におけるニューロンDNA修復機能を強化する方法を目的とする。該方法は、APE1のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1酸化還元因子1 (APE1 / Ref - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を該被験体に投与する工程を含む。

【0015】

以下の詳細な説明を考慮すると、本開示がより深く理解され、かつ上記以外の特徴、態様、及び利点が明らかになるであろう。このような詳細な説明は、以下の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1A～1Cは、後肢の炎症後に腰DRGにおいてDNA損傷が強化されることを示す。図1Aは、ラットの片側の後肢にCFAを注射した5日間後の、対側及び同側のL4/L5 DRGにおけるpH2A.X及びピンクリン(ローディング対照)の発現の代表的なウエスタンブロットである。図1Bは、ピンクリンの量に対して正規化した、6回の実験から得られたpH2A.Xの密度の平均±SEMを示す。*は、注射と対側のDRGと比較した、CFA注射と同側のDRGにおける統計的に有意な増加を示す(p<0.05、t検定)。図1Cは、CFA注射の5日間後のラット由来のL5 DRGにおけるpH2A.Xの顕微鏡写真(20×)である。緑色蛍光は、pH2A.Xに対する免疫反応性を示す。

【図2】図2A及び2Bは、炎症メディエーターに曝露した後、ニューロン培養物においてDNA損傷が時間依存的に強化されることを示す。図2Aは、指定の期間LPS又はMCP-1の有り無しで成長させた培養物からのpH2A.X及びピンクリン(ローディング対照)の代表的なウエスタンブロットである。図2Bは、1µg/mLのLPS(薄色のバー)又は100ng/mLのMCP-1(濃色のバー)で処理した後、ピンクリンに対して正規化したpH2A.Xのバンドの密度の平均±SEMを示す。*は、時間=0における発現からの有意差を示す、ダネットの事後検定を伴う一元配置分散分析、p<0.05。

【図3】図3は、炎症メディエーターに曝露した後、ニューロン培養物からのCGRP放出が変化したことを示す。カラムは、漸増濃度のLPS(薄色のバー)又はMCP-1(濃色のバー)に24時間曝露した後、30nMカブサイシンに10分間曝露することによって刺激したCGRP放出の平均±SEMを表す。*は、LPS又はMCP-1の非存在下における放出からの有意差を示す、ダネットの事後検定を伴う一元配置分散分析、p<0.05。

【図4】図4A及び4Bは、LPS又はMCP-1に曝露した後のDNA損傷及び刺激さ

10

20

30

40

50

れたCGRP放出の変化が、TLR4(LPS)並びにCCR2(MCP-1及びLPS)に対するアンタゴニストによって回復したことを示す。カラムは、指定の通り、LPS-RS又はRS50493の有り無しで、3µg/mLのLPS(薄色のバー)又は0.3µg/mLのMCP-1(濃色のバー)に24時間曝露した後のpH2A.X発現(図4A)又は30nMカプサイシンに10分間曝露することによって刺激したCGRP放出(図4B)の平均±SEMを表す。*は、LPS又はMCP-1の非存在下におけるDNA損傷又は放出からの有意差を示す、ダネットの事後検定を伴う一元配置分散分析、 $p < 0.05$ 。

【図5A】図5Aは、APE1によって媒介されるDNA修復を増加させることによって、DNA損傷を誘起し(include)、かつCGRP放出を阻害するLPSの作用が回復したことを示す。図5Aは、処理スキームを示す。

10

【図5B】図5Bは、APE1によって媒介されるDNA修復を増加させることによって、DNA損傷を誘起し、かつCGRP放出を阻害するLPSの作用が回復したことを示す。図5Bは、指定の前処理後24時間LPSの有り無しで成長させた培養物からのpH2A.X、APE1、HAタグ、及びピンクリン(ローディング対照)の代表的なウエスタンブロットである。

【図5C】図5Cは、APE1によって媒介されるDNA修復を増加させることによって、DNA損傷を誘起し、かつCGRP放出を阻害するLPSの作用が回復したことを示す。図5Cは、pH2A.Xの密度測定を示す。各カラムは、SCsiRNA(薄色のバー)又はAPE1siRNA(濃色のバー)と併せて指定の前処理後に3µg/mLのLPSで処理することによって誘起された、ピンクリンに対して正規化したpH2A.Xのバンドの密度の平均±SEMを表す。*は、SCsiRNAで処理したベクター対照と比較した発現からの有意差を示す、ダネットの多重比較事後検定を伴う二元配置分散分析、 $p < 0.05$ 。

20

【図5D】図5Dは、APE1によって媒介されるDNA修復を増加させることによって、DNA損傷を誘起し、かつCGRP放出を阻害するLPSの作用が回復したことを示す。図5Dは、CGRP放出を示す。各カラムは、SCsiRNA(薄色のバー)又はAPE1siRNA(濃色のバー)と併せて、指定通り、APE1過剰発現の有り無しで、3µg/mLのLPSで処理した後の、カプサイシンによって刺激されたCGRP放出(総含量の%として表される)の平均±SEMを表す。*は、SCsiRNAで処理したベクター対照と比較した放出の有意差を示す、ダネットの多重比較事後検定を伴う二元配置分散分析、 $p < 0.05$ 。

30

【図6A】図6Aは、APE1によって媒介されるDNA修復を増加させることによって、DNA損傷を誘起し、かつCGRP放出を増強するMCP-1の作用が回復したことを示す。図6Aは、処理スキームを示す。

【図6B】図6Bは、APE1によって媒介されるDNA修復を増加させることによって、DNA損傷を誘起し、かつCGRP放出を増強するMCP-1の作用が回復したことを示す。図6Bは、指定の前処理後24時間MCP-1の有り無しで成長させた培養物からのpH2A.X、APE1、HAタグ、及びピンクリン(ローディング対照)の代表的なウエスタンブロットである。

40

【図6C】図6Cは、APE1によって媒介されるDNA修復を増加させることによって、DNA損傷を誘起し、かつCGRP放出を増強するMCP-1の作用が回復したことを示す。図6Cは、pH2A.Xの密度測定を示す。各カラムは、SCsiRNA(薄色のバー)又はAPE1siRNA(濃色のバー)と併せて指定の前処理後に3µg/mLのMCP-1で処理することによって誘起された、ピンクリンに対して正規化したpH2A.Xのバンドの密度の平均±SEMを表す。*は、SCsiRNAで処理したベクター対照と比較した発現からの有意差を示す、ダネットの多重比較事後検定を伴う二元配置分散分析、 $p < 0.05$ 。

【図6D】図6Dは、APE1によって媒介されるDNA修復を増加させることによって、DNA損傷を誘起し、かつCGRP放出を増強するMCP-1の作用が回復したこ

50

を示す。図 5 D は、CGRP 放出を示す。各カラムは、SCSiRNA（薄色のバー）又は APE1 siRNA（濃色のバー）と併せて、指定通り、APE1 過剰発現の有り無しで、 $3 \mu\text{g/mL}$ の MCP-1 で処理した後の、カプサイシンによって刺激された CGRP 放出（総含量の % として表される）の平均 \pm SEM を表す。* は、SCSiRNA で処理したベクター対照と比較した放出の有意差を示す、ダネットの多重比較事後検定を伴う二元配置分散分析、 $p < 0.05$ 。

【図 7 A】図 7 A は、感覚ニューロン対腫瘍細胞における Ref-1 / APE1 酸化還元阻害の種々の役割を示す。図 7 A は、腫瘍細胞では、Ref-1 / APE1 酸化還元阻害が、腫瘍の成長、生存、移動、及び腫瘍の浸潤に対する複数の下流の作用を有することを示す。

【図 7 B】図 7 B は、感覚ニューロン対腫瘍細胞における Ref-1 / APE1 酸化還元阻害の種々の役割を示す。図 7 B は、DRG ニューロン等の感覚ニューロン細胞では、APX3330 の添加が細胞に対して負の作用を有さず、DNA BER 経路を発動する酸化的 DNA 損傷剤（例えば、シスプラチン、オキサリプラチン）に対する Ref-1 / APE1 DNA 修復活性の強化を通して生存及び機能的保護を促進することを示す。右下のパネルでは、担癌マウスにシスプラチンを全身投与することによって誘起される神経毒性を APX3330 が弱毒化した。

【図 7 C】図 7 C は、感覚ニューロン対腫瘍細胞における Ref-1 / APE1 酸化還元阻害の種々の役割を示す。図 7 C は、DRG 内の DNA 損傷に対するシスプラチン及び APX3330 の効果について調べるための処理パラダイムを提供する。

【図 7 D】図 7 D は、感覚ニューロン対腫瘍細胞における Ref-1 / APE1 酸化還元阻害の種々の役割を示す。図 7 D は、D24 及び D31 における pH2A-X の免疫反応性を示す代表的なプロットである。

【図 7 E】図 7 E は、感覚ニューロン対腫瘍細胞における Ref-1 / APE1 酸化還元阻害の種々の役割を示す。図 7 E は、pH2A-X の免疫反応性の定量を示す。* は、チューキーの事後検定を伴う一元配置分散分析によって決定された、D18 と D24 との間の統計的有意性（ $p < 0.05$ ）を示す（図 7 E）。† は、ボンフェローニの事後検定を伴う二元配置分散分析によって決定された、Veh / Veh 群と Veh / Cis 群との間の統計的有意性（ $p < 0.05$ ）を示す（図 7 E）。

【図 8】図 8 A 及び 8 B は、新規化学物質（NCE）；E3330 アナログを示す。図 8 A は、E3330 及び新規化合物の概略図である。検討した基は、キノンシリーズ（A）、3 位シリーズ（B）、アルキル側鎖シリーズ（C）、及びカルボン酸 / アミンシリーズ（D）を含む。図 8 B は、より強力な Ref-1 酸化還元阻害を示す現在の新規アナログを示す。

【図 9 A】図 9 A は、化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）を予防するための、APE1 を標的とする APX3330（E3330）の化学的アナログの同定及び特性評価を示す。図 9 A は、APX3330 及びその化学的アナログの酸化還元阻害アッセイから得られた結果を示す。

【図 9 B】図 9 B は、化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）を予防するための、APE1 を標的とする APX3330（E3330）の化学的アナログの同定及び特性評価を示す。図 9 B は、APX3330 及びその化学的アナログの NF- κ B 結合の阻害を示す。

【図 9 C】図 9 C は、化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）を予防するための、APE1 を標的とする APX3330（E3330）の化学的アナログの同定及び特性評価を示す。図 9 C は、IMR32 細胞株における APX3330 及びそのアナログの腫瘍細胞死滅能力を示す。

【図 9 D】図 9 D は、化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）を予防するための、APE1 を標的とする APX3330（E3330）の化学的アナログの同定及び特性評価を示す。図 9 D は、SK-N-SH 細胞株における APX3330 及びそのアナログの腫瘍細胞死滅能力を示す。

【図 10】図 10 は、APX3330 及びその化学的アナログの EMSA 及びトランス活

10

20

30

40

50

性化のデータを示す。

【図 1 1】図 1 1 A 及び 1 1 B は、IMR 3 2 細胞（図 1 1 A）及び SK-N-SH 細胞（図 1 1 B）における APX 2 0 0 9 の薬物動態プロファイルを示す。

【図 1 2】図 1 2 A 及び 1 2 B は、E 3 3 3 0 及び APX 2 0 0 9 による前処理が、感覚ニューロン培養物においてシスプラチンによって誘起される細胞死を減弱したが、APX 2 0 0 7 も APX 2 0 3 2 も減弱しなかったことを示す。図 1 2 A は、指定の通り様々な濃度の薬物で 2 4 時間処理した培養物からの細胞の生存を示す。各カラムは、百分率の平均 \pm SEM を表す。トリパンブルー排除によって測定される細胞生存率を、3 つの独立した収集から培養下で 1 4 日目に求めた。* は、分散分析及びチューキーの事後検定を使用した、薬物処理無しと比べた薬物処理後の生存率の有意差を示す。図 1 2 B は、ビヒクル（DMSO）又は 2 0 μ M の E 3 3 3 0、APX 2 0 0 7、APX 2 0 0 9、若しくは APX 2 0 3 2 APX 薬（指定の通り）に 7 2 時間及び様々な濃度のシスプラチンに 2 4 時間曝露したニューロン培養物を示す。各カラムは、トリパンブルー排除によって測定した細胞の生存率の平均 \pm SEM を表す。* は、分散分析及びチューキーの事後検定を使用した、薬物で処理された培養物と比べたシスプラチンで処理されていない培養物における有意差を示す。

【図 1 3 A】図 1 3 A は、APX 3 3 3 0 の化学的アナログ（阻害剤 III（図 1 3 A））の DNA 修復アッセイの結果を示す。

【図 1 3 B】図 1 3 B は、APX 2 0 0 7（図 1 3 B）の DNA 修復アッセイの結果を示す。

【図 1 3 C】図 1 3 C は、APX 2 0 0 9（図 1 3 C）の DNA 修復アッセイの結果を示す。

【図 1 3 D】図 1 3 D は、APX 2 0 3 2（図 1 3 D）の DNA 修復アッセイの結果を示す。

【図 1 4】図 1 4 A 及び 1 4 B は、E 3 3 3 0 及び APX 2 0 0 9 は、培養下の感覚ニューロンからの CGRP 放出は変化させなかったが、カプサイシンによって惹起される CGRP の放出のシスプラチンによって誘起される低減を減弱したことを示す。各カラムは、CGRP の基本放出（オープンカラム）又はカプサイシンによって刺激された放出（陰影カラム）（fmol/ウェル/分）の平均 \pm SEM を表す。図 1 4 A は、放出実験前に 7 2 時間、培地又は 1 0 若しくは 2 0 μ M の様々な薬物（指定の通り）に曝露した培養物を示す。図 1 4 B は、放出実験前に 7 2 時間培地又は 1 0 若しくは 2 0 μ M の様々な薬物（指定の通り）に、及び 2 4 時間シスプラチンに曝露した培養物を示す。* は、分散分析及びチューキーの事後検定を使用した、未処理細胞と比べたカプサイシンによって刺激された放出における有意差を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、APX 2 0 0 9 は、感覚ニューロン培養物におけるシスプラチンによって誘起される H₂A_X のリン酸化を減弱したが、APX 2 0 0 7 も APX 2 0 3 2 も減弱しなかったことを示す。上のパネルは、1 0 μ M のシスプラチンに曝露する前並びに 2 4 時間及び 4 8 時間曝露した後の培養物からのホスホ-H₂A_X（pH₂A_X）及びピンクリンの代表的なウエスタンブロットを示す。指定の通りシスプラチン処理する前 7 2 時間及び処理中に、ビヒクル対照としての DMSO 又は 2 0 μ M の APX 2 0 0 7、APX 2 0 0 9、若しくは APX 2 0 3 2 に培養物を曝露した。下のパネルは、3 つの独立した実験からのピンクリンに対して正規化した pH₂A_X 発現の密度測定の平均 \pm SEM を表す。分散分析及びチューキーの事後検定を使用して同時点における DMSO 対照と比較したとき、* は、シスプラチンで処理した細胞における pH₂A_X 密度の統計的に有意な増加を示し、一方、† は、薬物による有意な変化を示す。

【図 1 6 A】図 1 6 A は、培養下の感覚ニューロンのオキサリプラチンによって誘起される毒性を APX 2 0 0 9 が減弱したことを示す。図 1 6 A は、様々な濃度のオキサリプラチンに 2 4 時間曝露した後の細胞生存率を示す。各カラムは、指定の通り様々な濃度のオキサリプラチンに 2 4 時間曝露した後に、トリパンブルー排除によって測定したときの細胞生存率の平均 \pm SEM を表す。ビヒクル対照としての DMSO（左）、1 0 μ M の AP

10

20

30

40

50

X 2 0 0 9 (中央)、又は 2 0 μ M の A P X 2 0 0 9 (右) で 7 2 時間培養物を処理する。

【図 1 6 B】図 1 6 B は、培養下の感覚ニューロンのオキサリプラチンによって誘起される毒性を A P X 2 0 0 9 が減弱したことを示す。図 1 6 B は、C G R P の基本放出 (オープンカラム) 又は 3 0 n M のカブサイシンによって刺激された放出 (陰影カラム) (f m o l / ウェル / 分) を示す。カラムは、C G R P の基本放出 (オープンカラム) 又は 3 0 n M のカブサイシンによって刺激された放出 (陰影カラム) (f m o l / ウェル / 分) の平均 \pm S E M を表す。水平バーは、放出実験前に 2 4 時間 3 0 μ M のオキサリプラチンに、及び 7 2 時間 1 0 又は 2 0 μ M の A P X 2 0 0 9 に曝露した培養物を示す。

【図 1 6 C】図 1 6 C は、培養下の感覚ニューロンのオキサリプラチンによって誘起される毒性を A P X 2 0 0 9 が減弱したことを示す。図 1 6 C の上のパネルは、指定の通り、3 0 μ M のオキサリプラチンに曝露する前並びに 2 4 時間及び 4 8 時間曝露した後、並びにシスプラチン処理する前 7 2 時間及び処理中に D M S O 又は 2 0 μ M の A P X 2 0 0 9 に曝露した、培養物からのホスホ - H 2 A X (p H 2 A X) 及びピンクリンの代表的なウエスタンブロットを示す。下のパネルは、3 つの独立した実験からピンクリンに対して正規化した p H 2 A X 発現の密度の平均 \pm S E M を表す。* は、分散分析及びチューキーの事後検定を使用して対照と比較したとき、オキサリプラチンによって処理された培養物における統計的に有意な差を示す。

【図 1 7 A】図 1 7 A は、P D A C 3 D モデルにおいて A P X 2 0 0 9 が腫瘍細胞を死滅させるが、C A F は死滅させないことを示す。図 1 7 A は、C A F (E G F P で形質導入) の有り無しで、3 D 培養下で成長した P a 0 3 C (腫瘍細胞 (T d T o m a t o で形質導入)) を示す。腫瘍細胞のみと、スフェロイド中腫瘍細胞及び C A F とを示す。図 1 7 A における中央及び右の定量グラフは、腫瘍 (中央) 対 C A F (右) の強度 (図 1 7 A) を示す。スフェロイドを A P X 2 0 0 9 で処理し、腫瘍 (赤色チャンネル) 及び C A F (緑色チャンネル) の強度の面積 (図 1 7 A) を培養下で 1 2 日間後に定量した。

【図 1 7 B】図 1 7 B は、P D A C 3 D モデルにおいて A P X 2 0 0 9 が腫瘍細胞を死滅させるが、C A F は死滅させないことを示す。図 1 7 B は、C A F (E G F P で形質導入) の有り無しで、3 D 培養下で成長した P a 0 3 C (腫瘍細胞 (T d T o m a t o で形質導入)) を示す。腫瘍細胞のみと、スフェロイド中腫瘍細胞及び C A F とを示す。図 1 7 B における中央及び右の定量グラフは、腫瘍 (中央) 対 C A F (右) の面積 (図 1 7 B) を示す。スフェロイドを A P X 2 0 0 9 で処理し、腫瘍 (赤色チャンネル) 及び C A F (緑色チャンネル) の面積 (図 1 7 B) を培養下で 1 2 日間後に定量した。

【図 1 7 C】図 1 7 C は、P D A C 3 D モデルにおいて A P X 2 0 0 9 が腫瘍細胞を死滅させるが、C A F は死滅させないことを示す。代表的な画像を図 1 7 C に示す。スチューデントの t 検定 (各用量におけるビヒクル対照対薬物処理) 及び一元配置分散分析の両方を使用して差を求め、腫瘍のみ又は C A F と共培養した腫瘍について統計的差を観察した (* p < 0 . 0 5、* * p < 0 . 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1)。A P X 2 0 0 9 で処理した C A F では対照からの差が観察されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0017】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載するものと類似の又は等価な任意の方法及び材料を本開示の実施又は試験で用いることができるが、好ましい方法及び材料について以下に記載する。

【0018】

本開示は、一般に、ニューロンの感受性を低減し、それによって、炎症及び慢性疼痛を低減する方法に関する。具体的には、A P X 3 3 3 0 の投与を通じて D N A 塩基除去修復 (B E R) 経路を強化することによって、炎症メディエーターに対するニューロンの感受性が低減され、それによって、炎症又は慢性疼痛が軽減されることが本明細書において見出された。

10

20

30

40

50

【0019】

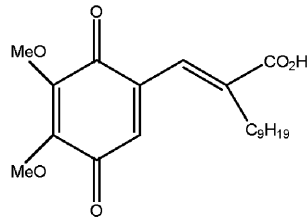
好適な実施形態では、本開示は、有効量の A P E 1 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物を、それを必要としている被験体に投与することを含み、該 A P E 1 阻害剤は、A P E 1 タンパク質と相互作用して A P E 1 タンパク質のアンフォールディングを引き起こすことができ、ニューロンにおいて他のタンパク質と相互作用するか又はその酸化還元シグナル伝達機能を実行する A P E 1 の能力を阻害することができる。特に好適な実施形態では、該 A P E 1 阻害剤は、3 - [(5 - (2 , 3 - ジメトキシ - 6 - メチル 1 , 4 - ベンゾキノイル)) - 2 - ノニル - 2 - プロピオン酸 (以後、「E 3 3 3 0」又は「3 3 3 0」又は「A P X 3 3 3 0」) 、及び / 又はそのアナログ (例えば、[(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N , N - ジエチルペンタンアミド] (以後「A P X 2 0 0 9」) 、(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N , N - ジメチルペンタンアミド] (以後、「A P X 2 0 0 7」) 、(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N - メトキシペンタンアミド] (以後、「A P X 2 0 1 4」) 、(2 E) - 2 - (3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) - N , N , 2 - トリメチルプロパ - 2 - エンアミド (以後、「A P X 2 0 3 2」)) である。更なる好適なアナログを以下に示す。A P X 3 3 3 0 についての更なる情報は、A b e ら、米国特許第 5 , 2 1 0 , 2 3 9 号に見出すことができ、A P X 2 0 0 9 についての情報は、K e l l e y ら、J P h a r m a c o l E x p T h e r . 2 0 1 6 年 1 1 月 , 3 5 9 (2) : 3 0 0 - 3 0 9 に見出すことができ、これらはそれぞれ、本明細書と一致する範囲で参照により本明細書に組み込まれる。

10

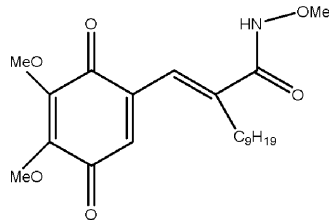
20

【0020】

【化 1】

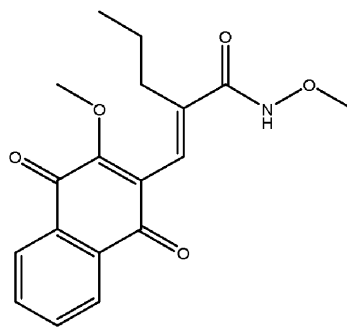


APX3330



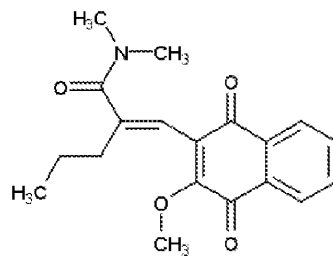
APX2009

10



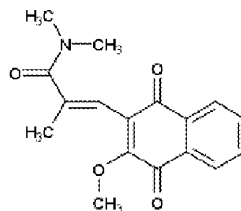
APX2014

20



APX2007

30



APX2032

40

【0021】

APX3330（及び／又はそのアナログ）を投与すると、APE1タンパク質がニューロンにおける他のタンパク質と相互作用するのが阻害されることが本明細書で判明した。この相互作用の阻害によって、APE1が遊離して、損傷を受けたDNA（炎症及びニューロンの疼痛経路誘導の他のエフェクターによって損傷を受けた）における酸化又は脱塩基部位において強化されたDNA修復機能を発揮することが可能になる。具体的には、以下の実施例に記載する通り、末梢性炎症が、腰DRGのニューロンの細胞体においてDNA損傷を誘起し、炎症メディエーターLPS又はMCP-1に曝露されたDRG培養物

50

においてこのDNA損傷を再現することが最初に証明された。また、酵素APE 1の過剰発現を介してDNA修復を外因的に強化することによって、カプサイシンによって刺激された神経ペプチドの放出によって判定される、ニューロンの感受性の変化をDNA損傷が媒介することも本明細書において証明される。本開示は、それによって、炎症メディエーターがニューロンの感受性の変化を維持する経路を同定し、炎症又は慢性疼痛を軽減するための薬理的ターゲットとしてニューロンDNA修復の強化にスポットを当てる。

【0022】

具体的な一実施形態では、APX3330（及び/又はそのアナログ）の投与は、化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）の作用を阻止又は低減するのに役立ち得る。化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）は、多数の化学療法剤の潜在的に体を衰弱させる副作用である。異痛症、冷え性の悪化、固有感覚欠如、触覚欠如、腱反射の減少、及び疼痛を含むこれら神経障害の主な症状は、大部分が、末梢感覚機能の変化を特徴とし、このことは、感覚ニューロンが毒性の主な標的であることを示唆している。

10

【0023】

本開示の方法において使用するための、APE 1阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の好適な投与量は、例えば、個体の年齢及び体重、炎症又は慢性疼痛の重篤度、組成物の性質、投与経路、並びにこれらの組み合わせを含む多数の要因に依存する。最終的に、例えば、医師、獣医師、科学者、並びに他の医療及び研究の専門家等の当業者であれば、好適な投与量を容易に決定することができる。例えば、当業者は、低投与量から始めてよく、これを所望の治療成績又は結果を達成するまで増加させてよい。あるいは、当業者は、高投与量から始めてもよく、これを所望の治療成績又は結果を達成するのに必要な最低投与量に達するまで減少させてよい。

20

【0024】

特に好適な一実施形態では、APE 1 / Ref - 1阻害剤はAPX3330であり、被験体に、約5 μ M ~ 約50 μ MのAPX3330を投与する。

【0025】

幾つかの実施形態では、APE 1阻害剤及び薬学的に許容し得る担体を含む組成物を介してAPE 1阻害剤を投与する。薬学的に許容し得る担体は、例えば、賦形剤、ビヒクル、希釈剤、及びこれらの組み合わせであってよい。例えば、組成物を経口投与するべきである場合、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、若しくはシロップ剤として製剤化してよく；又は非経口投与の場合は、注射剤（筋肉内、皮下、髄内、くも膜下腔内、脳室内、静脈内、硝子体内）、点滴調製物、又は坐剤として製剤化してよい。これらの組成物は、従来の手段によって調製することができ、必要に応じて、活性化化合物（例えば、APX3330）を任意の従来の添加剤、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味剤、可溶性剤、懸濁助剤、乳化剤、コーティング剤、又はこれらの組み合わせと混合してもよい。

30

【0026】

本開示の医薬組成物は、本明細書に記載される疾患、障害、及び病態を軽減、媒介、予防、及び治療するために、更なる公知の治療剤、薬物、合成化合物のプロドラッグへの修飾等を更に含んでもよいことを理解すべきである。例えば、一実施形態では、APE 1阻害剤を、白金薬剤（例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン）、タキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、カバジタキセル）、ドキシソルビシン、アルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、サリドマイド、レナリドミド（lenolidomide）、ボマリドミド、ボルテゾミブ（bortezomib）、カルフィルゾミブ、エリブリン、又は電離放射線のうちの1つ以上と共に投与してよい。

40

【0027】

APE 1阻害剤及び/又は本開示の方法で使用される医薬担体を含む医薬組成物は、必要としている個体の小集団に投与してもよい。本明細書で使用するとき、「必要としている個体」とは、炎症及び/若しくは慢性疼痛のリスクがあるか若しくは有している個体、又は炎症及び/若しくは慢性疼痛に関連する疾患若しくは障害（例えば、肥満、糖尿病、

50

喘息、関節炎（変形性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎）、慢性歯周炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性静脈洞炎、慢性活動性肝炎、慢性消化性潰瘍、憩室炎、線維筋痛、過敏性腸症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、アテローム性動脈硬化症、及び結核）のリスクがあるか若しくは有している個体を指す。更に、「必要としている個体」は、本明細書において、炎症又は慢性疼痛のリスクがあるか又は有していると医療専門家によって診断された個体を指すためにも使用される。したがって、幾つかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、一般集団のうちの小集団を対象とするので、これら実施形態において、一般集団の全てが該方法から恩恵を得ることができる訳ではない。上記に基づいて、本開示の方法の実施形態のうちの一部は、同定された個体の特定の小集団又は部分集団（すなわち、本明細書において言及される1つ以上の特定の病態に対処するのに支援「を必要としている」個体の小集団又は部分集団）を対象とするので、全ての個体が、本明細書に記載される個体の小集団又は部分集団に入る訳ではない。具体的には、必要としている個体は、ヒトである。必要としている個体は、例えば、研究動物、例えば、非ヒト霊長類、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ、及び当業者に公知の他の種類の研究動物であってもよい。

10

【0028】

本開示のこれら及び他の実施形態の様々な機能及び利点は、以下に示す実施例からより深く理解されるであろう。実施例は、本開示の利益を説明することを意図するものであるが、本開示の全範囲を例示するものではない。

20

【実施例】

【0029】

実施例 1

この実施例では、炎症メディエーターへの曝露に続発する感覚ニューロンの感受性における持続的変化のDNA損傷に対する依存性について分析した。更に、DNA損傷及びニューロンの感受性に対するDNA BER経路の強化の効果についても分析した。

【0030】

材料及び方法

特に指定しない限り、組織培養用品は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) から入手した。ポリ-D-リジン、ラミニン、マウスモノクローナル抗ピンクリン抗体、1-メチル-2-ピロリドン (MPL)、完全フロインドアジュバント (CFA)、及びルーチンな化学物質は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。神経成長因子は、Envigo (Indianapolis, IN) から、及びNormocinは、Invivogen (San Diego, CA) から購入した。Neuroporterは、Genlantis (San Diego, CA) から購入した。マウスモノクローナル抗ヒトAPE1抗体は、研究室で産生させ、Novus Biologicals (Littleton, CO) から入手可能であり、マウスモノクローナル抗ホスホ-H2AX抗体は、EMD Millipore (Billerica, MA) 製であり、セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合している抗血球凝集素 (HA) 抗体は、Milttenyi Biotec (San Diego, CA) から購入した。化学発光二次抗体は、Roche Diagnostics Corp. (Indianapolis, IN) から入手した。

30

40

【0031】

APX3330（本明細書では「E3330」とも称される）は、以前の刊行物（例えば、J Med Chem. 2010年2月11日; 53(3): 1200-1210）に従って合成し、N,N-ジメチルホルムアミド (Sigma-Aldrich) に溶解させ、40 mM 原液として -80 で保存した。大腸菌 (Escherichia coli) 0111:B4 由来のリポ多糖類 (LPS) は、Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO) から購入し、MPLに溶解させ、50 mM として -20 で1ヶ月間保存した。組み換えラットCCL2/MCP-1タンパク質は、R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入し、PBSに溶解させ、-2

50

0 で最長1ヶ月間保存した。TLR4アンタゴニストであるLPS-RSは、InvivoGenから購入し、MPLに溶解させ、-80 で保存した。CCR2アンタゴニストであるRS504393は、Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO) から購入し、MPLに溶解させ、-20 で1ヶ月間保存した。薬物処理前に、原液をF-12成長培地で希釈し、培養物に添加し、指定の通り2~96時間インキュベートした。この実施例で使用した全ての手順は、インディアナ大学医学部 (Indianapolis, IN) の実験動物委員会によって承認された。

【0032】

後肢の炎症

ラットをイソフルランで一時的に麻酔し、CFA及び0.9%生理食塩水の1:1 (v/v) 溶液150 µLを右後肢の足底面に皮下注射した。発赤及び腫脹によって炎症を確認し；注射された肢の厚みが3.5 mm以上増加した動物のみを実験で使用した。

【0033】

細胞培養

後根神経節 (DRG) を成体雄 (150~175 g) Sprague-Dawley ラット (Envigo, Indianapolis, IN) の全ての脊髄レベルから切開し、既に記載されている通り (Kelleyら、2014)、細胞を解離させた。簡潔に述べると、ラットをCO₂ 窒息によって安楽死させた。DRGをコラゲナーゼ溶液 (1 mg/mL) に移し、37 で1時間インキュベートした。次いで、消化されたDRGを成長培地ですすぎ、遠心分離し、機械的攪拌によって解離させた。約30,000細胞を、12ウェル培養プレートの各ウェルにプレATINGした。全ての培養皿を、ポリ-D-リジン及びラミニンでプレATINGした。37、3%CO₂ 中において、10%ウマ血清、2 mMのグルタミン、100 µg/mLのNormocin、50 µg/mLのペニシリン、50 µg/mLのストレプトマイシン、50 µMの5-フルオロ-2'-デオキシウリジン、150 µMのウリジン、及び30 ng/mLのNGFを補給したF-12培地中で細胞を維持した。1日おきに成長培地を交換した。

【0034】

APE1発現の調節

既に記載されている通り (Vaskoら、2005、Jiangら、2008a)、APE1に対する低分子干渉RNA (APE1 siRNA) 及びスクランブル siRNA (SC siRNA) 対照を使用して、感覚ニューロン細胞培養物におけるAPE1タンパク質の発現を減少させ、それぞれ対照として使用した。培養3日目、100 nMのAPE1 siRNA (5'-GUCUGGUAAGACUGGAGUACCC-3' (配列番号1)) 又はSC siRNA (5'-CCAUGAGGUCAGCAUGGUCUG-3' (配列番号2))；(Vaskoら、2005)) 及びトランスフェクション試薬Neuroporter 10 µLを含有するOpti-MEM1培地0.5 mLに成長培地を交換した。次の日、抗生物質を含まない成長培地0.5 mLを各ウェルに添加し、更に24時間後、siRNAを含有する培地を通常の成長培地に交換した。

【0035】

(1) CMVプロモータ、HAタグ付APE1、IRES、及び高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP)；又は(2) CMV、IRES、及びEGFPを含有するレンチウイルスコンストラクトを開発した。DNAシーケンシングによって、WT-、C65-、又は226+177-APE1-IRES-EGFPを含有するpLenti6-R4R2-V5プラスミド中のコンストラクトを確認した。レンチウイルス感染のために、DRG細胞を5日間培養した後、150 pfu/細胞のレンチウイルスを培地に添加した。2日間後、ウイルスを除去し、通常の培地中で更に5日間細胞を成長させた。この実施例では、ラットAPE1 mRNAに対するsiRNAを含むニューロン培養物ではAPE1の発現が選択的に減少し、ラットsiRNAによって影響を受けないヒトAPE1トランス遺伝子で戻り、その理由は、ヒトAPE1ホモログが、結合部位において異なる核酸配列を有しているためである (Vaskoら、2005)。

10

20

30

40

50

【0036】

イムノブロッティング

組織又は細胞を収集し、RIP Aバッファ (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA) で溶解し、超音波処理し、4000 RPMで2分間遠心分離することによって細胞残屑を除去した。Lowryアッセイを使用してタンパク質を定量し、12% SDS - ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。電気泳動後、タンパク質をPVDFメンブレンに転写し、穏やかに攪拌しながら、室温で1時間、0.1% Tween - 20 (TBS-T) 及び5% 脱脂粉乳を含有するTris 緩衝生理食塩水でブロッキングした。マウスモノクローナル抗ヒトApe1抗体 (1:1000)、マウスモノクローナル抗ホスホH2AX抗体 (1:1000)、マウスモノクローナル抗ピンクリン抗体 (1:1000)、及び抗血球凝集素 (HA) 抗体をブロッキング溶液に添加し、穏やかに攪拌しながら室温で2時間インキュベートした。化学発光を使用して適切な二次抗体法に従って抗体結合を検出した。Bio-Rad (Hercules, CA) 製のQuantity Oneソフトウェアを使用してバンドの密度を測定し、ピンクリンに対して正規化した密度としてデータを表した。

10

【0037】

CGRP放出の測定

ニューロン培養物を適切な薬物で処理した後、25 HEPES、135 NaCl、3.5 KCl、2.5 CaCl₂、1 MgCl₂、3.3 D-グルコース (単位mM)、及び0.1% ウシ血清アルブミン、pH 7.4 からなるHEPESバッファで該培養物を1回洗浄し、37 で維持した。次いで、HEPESバッファ0.4 mLのみ (基本放出)、30 nMカプサイシンを含有するバッファ、次いで、バッファのみ (基本放出への回復を評価するため) と共に10分間隔で逐次インキュベートした。各インキュベーション後、バッファを除去し、既に記載されている通り (Chenら, 1996)、ラジオイムノアッセイを使用して、各サンプル中の免疫反応性CGRPの量を測定した。放出実験後、各ウェル内の細胞を10分間0.1 MのHCl 0.4 mL中に入れ、ラジオイムノアッセイを使用して該培養物中の総CGRP含量を測定するためにアリコートを採用した。全てのインキュベーションにおいて放出された総量を細胞内で測定された量に加えることによって、総含量 (fmol / ウェル) を計算した。放出されたfmol / ウェル / 10分として、放出データを計算した。

20

30

【0038】

統計解析

データは、各実験の少なくとも3回の反復実験からの平均 ± SEMとして表す。一元配置又は二元配置の分散分析 (ANOVA) 及びダネットの事後検定を使用して、DRG培養物におけるpH2A . X発現及びCGRP放出の差を求めた。スチューデントのt検定を使用して、DRG組織におけるpH2A . X発現の差を求めた。全ての場合において、処理対対照を比較して有意性をp < 0.05) に設定した。

【0039】

結果

後肢炎症は、L4 / L5 DRGにおいてDNA損傷を惹起し、APE1の発現を強化する

40

DNAを修復するニューロンの能力は、ニューロンのホメオスタシスの維持において非常に重要である (Brooks, 2002、McMurray, 2005、Fishellら, 2007a、Hetmanら, 2010)。しかし、組織炎症がDNA損傷を生じさせるのかどうかという疑問は残る。組織炎症がDNA損傷を惹起するかどうかを判定するために、完全フロインドアジュバント (CFA: 生理食塩水の1:1希釈液) をラットの片側の後肢の足底に注射した。注射の5日間後、動物を絶命させ、腰DRGを回収した。このようにして、炎症と同側の組織からのDNA損傷及びタンパク質発現を、対側の対照と比較することができた。図1Aから分かる通り、H2A . Xのリン酸化が58%増加したことによって示される通り (Rogakouら, 1998)、炎症は二本鎖DNA切断

50

の増加を誘起した。D R Gにおける感覚ニューロン細胞体内でD N A損傷が生じたかどうかを確認するために、免疫組織学的検査を実施した。図1 Bの代表的な画像に示す通り、p H 2 A . Xの免疫反応性は、ニューロン及び支持細胞の両方の核に局在していた。免疫反応性は、炎症と同側のD R Gに由来する感覚ニューロン細胞体においてより強く、これによって、炎症が感覚ニューロン内でD N A損傷を引き起こすという考えが確認された。炎症がD N A損傷を引き起こす機序及び感覚ニューロンの感受性に対するD N A損傷の影響については未だ分かっていない。

【0040】

炎症メディエーターL P S及びM C P - 1は、時間依存的にD N A損傷を強化した

C F Aをラットの後肢に注射すると、熱的な、及び機械的な刺激に対する行動過敏性が惹起され(Steinら, 1988、Woolfら, 1994)、この過敏性は、損傷を受けた組織内の局所的炎症メディエーターの亢進が原因であった(Ferreiraら, 1988、Williams及びHiggs, 1988、Cunhaら, 1992、Ferreiraら, 1993、Safieh-Garabedianら, 1995)。炎症によって誘起されるニューロンの感受性の変化をD N A損傷が媒介するかどうかを確認するために、感覚ニューロンの培養物を利用した。組織炎症の代わりに、培養物をL P S又はM C P - 1に曝露し、次いで、D N A二本鎖切断及びニューロンの感受性を判定した。ニューロンの培養物では、L P S (1 μ g / mL)に曝露した結果、p H 2 A . Xの濃度は時間依存的に増加し、処理の16時間以内に明白になり、24時間でピークに達した。L P S処理で観察された通り、M C P - 1 (100 ng / mL)への曝露によってp H 2 A . X発現が誘導されたが、これは16時間で始まり、24時間で作用がピークに達した。D N A損傷に対する炎症メディエーターのピーク作用は24時間で観察されたので、その後の実験は全てその時点で実施した。

【0041】

L P S及びM C P - 1は、濃度依存的にC G R P放出を変化させた

D R G培養物内のニューロンの感受性の炎症メディエーターによって誘起される変化を証明するために、該培養物を漸増濃度の各炎症メディエーターに24時間曝露し、次いで、推定侵害受容ニューロペプチドであるカルシトニン遺伝子関連ペプチドの基本放出及び刺激された放出について調べた。T R P V 1受容体のアゴニストであるカプサイシンによってC G R Pの放出を刺激した。図3に示す通り、カプサイシンは、10分間にわたってC G R Pの総含量の約10%の放出を刺激した。感覚ニューロンを低濃度のL P S (1 . 0 μ g / mL)に曝露すると、カプサイシンによって刺激されるC G R Pの放出が総含量の14 . 4 \pm 1 . 2%に増強された。同様に、培養物を低濃度のM C P - 1に24時間曝露すると、それぞれ0 . 3及び1 . 0 μ g / mLのM C P - 1で処理した培養物において、C G R Pの放出が総含量の13 . 0 \pm 0 . 8及び15 . 0 \pm 1 . 0%に増強された。対照的に、より高濃度の炎症メディエーターで処理すると、それぞれ10 . 0 μ g / mLのL P S及びM C P - 1で処理した培養物において、C G R Pの放出が総含量の6 . 3 \pm 0 . 4及び6 . 3 \pm 1 . 0%に有意に減少した。C G R Pの放出の変化は、ニューロンにおけるC G R Pの含量の変化には続発しなかったが、その理由は、ビヒクル、L P S、及びM C P - 1で処理した培養物においてC G R Pの総含量が同様であったためである(データ不図示)。

【0042】

D N A損傷を誘起し、C G R P放出を変化させるL P S及びM C P - 1の作用は、T L R 4及びC C R 2の受容体のアンタゴニストによって回復した

L P S及びM C P - 1によって活性化される同種受容体経路は、それぞれ、T L R 4受容体経路及びC C R 2受容体経路である(Charoら, 1994、Poltorakら, 1998)が、これら炎症性物質が他の標的を調節し得ることが最近報告された(Messegueiraら, 2014)。したがって、T L R 4及びC C R 2の活性化をブロックすると、p H 2 A . X発現を強化し、ニューロンの感受性を変化させる炎症メディエーターの作用が阻害されるかどうかを、それぞれ、T L R 4アンタゴニストであるL P S - R S

($2 \mu\text{g}/\text{mL}$)又はCCR2アンタゴニストであるRS50493($1 \mu\text{M}$)の存在下で実験を実施することによって判定した。これら実験では、様々な濃度のLPS及びMCP-1でDNA損傷が誘起された。 $3.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ のLPSを使用して、炎症メディエーターによって誘起される機能の喪失を模し、 $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ のMCP-1を使用して、DNA損傷と相関するニューロペプチド放出の過敏化を模倣した。培養下の感覚ニューロンをLPS処理すると、CCL2の内因性生成をアップレギュレートできることが最近の研究で証明された(Millerら, 2015)ので、ニューロンのDNA損傷及びニューロペプチド放出に対するLPSの作用をCCR2アンタゴニストがブロックするかどうかにについても調べた。炎症メディエーターを導入する1時間前に、培養物を受容体アンタゴニストで処理し、曝露の間中培地中で維持した。既に観察されている通り、LPS及びMCP-1の両処理によってpH2A.Xの発現が誘起された。LPSによって誘起された発現の増加は、TLR4アンタゴニスト(89.9%減少)及びCCR2アンタゴニスト(92.5%減少)の両方によって回復した。また、CCR2アンタゴニストは、MCP-1単独で惹起した発現のわずか8.5%までpH2A.Xの発現を低減した(図4A)。

10

【0043】

炎症メディエーターによって誘起されるニューロペプチド放出の変化をブロックする該アンタゴニストの作用についても調べた。既に観察されている通り、 $3.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ のLPSは、ニューロン培養物からのCGRPの刺激された放出を32.7%減少させた。TLR4又はCCR2アンタゴニストによる処理はいずれも、LPSによって誘起された放出の減少をブロックした。ニューロン培養物を $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ のMCP-1に24時間曝露すると、CGRP放出の過敏化がMCP-1の非存在下における放出の142.8%に惹起された。この増強は、RS50493で処理することによって阻止された(図4B)。

20

【0044】

DNA損傷を誘起し、CGRP放出を減弱させるLPSの作用は、APE1 OE(wt又はC65)によって回復したが、APE1 OE(226/177)では回復しなかった

ニューロンは、BER、ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復、直接損傷修復、及び非相同末端結合又は相同組み換えを含む主なDNA修復経路を含む(Fishelら, 2007b、Barzilaiら, 2008、Fortini及びDogliotti, 2010)。BER経路は、塩基に対する酸化的損傷、塩基のアルキル化、又は脱アミノ化によって引き起こされる核及びミトコンドリアにおけるDNA損傷を修復し、ニューロンを保護するための最も重要な修復経路である可能性がある(Fishelら, 2007bを参照)。次に、BER経路における重要な酵素であるAPE1の活性の強化又は低下が、LPS及びMCP-1処理によって誘起されるDNA損傷及びニューロン感受性の変化を変化させるかどうかについて調べた。

30

【0045】

この実施例のために、図5Aに示す通り培養物を処理した。培養下の4~6日目に、培養物をSCsiRNA又はAPE1 siRNAでトランスフェクトし、次いで、培養下の6~8日目に、ベクター対照、野生型APE1、C65 APE1、又は226/117 APE1のための発現ベクターを含有するレンチウイルスに曝露した。C65 APE1変異体は、酸化還元機能が損なわれており、一方、226/117 APE1変異体は、DNA修復機能が損なわれている(Izumira, 2004、Luoら, 2008)。

40

1セットの培養物において、培養下の10~14日目にニューロンをE3330で処理した。最後に、実験の直前に、培養物をLPS($3 \mu\text{g}/\text{mL}$)で24時間処理した。SCsiRNAで処理した培養物をLPSに24時間曝露したとき、pH2A.X発現が有意に誘起された(図5B及び5C)。野生型内因性発現の約175%のレベルの、HAタグの新規発現によって示される野生型APE1又はC65 APE1(修復能力あり)のいずれかの外因性発現(図5B)は、二本鎖切断を誘起するLPSの能力を緩和し、pH2

50

A . X の密度をそれぞれ 95 % 及び 94 % 減少させた。対照的に、227 / 177 APE1 変異体 (修復不全) の外因性発現は、LPS によって誘起される pH2A . X のレベルに対して効果を有していなかった。野生型の発現の約 20 % に APE1 発現を減少させた APE1 siRNA で処理した培養物でも同様の効果が観察され ; LPS は pH2A . X を誘導し、これは、SC siRNA 処理された培養物と比べてより作用が大きい傾向があった。興味深いことに、E3330 による APE1 の DNA 修復活性の強化は、外因的に発現している野生型 APE1 の効果によく似ていた。E3330 (20 μ M) による前処理は、SC siRNA 及び APE1 siRNA で処理された培養物の両方で pH2A . X の誘導を阻止した。DNA 損傷の回復もニューロンの感受性に対する LPS の作用を回復させるかどうかを見出すために、刺激された CGRP の放出についても調べた。LPS (3 μ g / mL) 処理は、カプサイシンによって刺激された CGRP の放出を減弱した (図 5D) 。SC siRNA で処理された培養物では、ビヒクル処理したウェルからの刺激された CGRP の放出は、総含量の 10.4 ± 0.6 % であり、一方、LPS で 24 時間処理した細胞からの放出は、総含量の 7.1 ± 0.6 % に減少した。野生型 APE1 又は C65 APE1 (修復能力あり) のいずれかの外因性発現は LPS の作用を回復させ、その結果、刺激された CGRP の放出は、それぞれ、APE1 野生型及び C65 変異体の存在下で総含量の 10.4 ± 1.1 及び 10.5 ± 0.4 % であった。修復不全 APE1 変異体の外因性発現は、LPS の作用を回復させなかったが、それは、放出が総含量の 7.0 ± 0.9 % と依然として減弱していたためである。最後に、E3330 による処理も CGRP 放出に対する LPS の作用から保護し ; E3330 処理後の放出は総含量の 9.7 ± 0.8 % であり、これは、LPS 処理しなかった場合の放出と差がなかった。

10

20

30

40

50

【0046】

DNA 損傷を誘起し、CGRP 放出を変化させる MCP-1 の作用は、APE1 OE (wt 又は C65) によって回復したが、APE1 OE (226 / 177) では回復しなかった

図 5A ~ 5D で使用したのと同じ方法を使用して、APE1 の発現及び活性を操作し、次いで、実験の直前に、培養物を MCP-1 (0.3 μ g / mL) で 24 時間処理した (図 6A) 。図 2A 及び 2B に示す通り、MCP-1 に曝露した、SC siRNA で処理した感覚ニューロンは、pH2A . X の発現が強化された (図 6B 及び 6C) 。野生型又は修復能力を有する APE1 の外因性発現の増加は、pH2A . X を増加させる MCP-1 の能力を妨げ ; pH2A . X のレベルは、それぞれ、野生型及び C65 APE1 の存在下では MCP-1 によって誘起される増加の 36.9 % 及び 33.6 % に減少した。対照的に、修復不全 APE1 の外因性発現は、MCP-1 によって誘起される pH2A . X の発現を妨げなかった。APE1 siRNA で処理した培養物でも同様の効果が観察され ; MCP-1 は pH2A . X を誘導し、これは、SC siRNA 処理された培養物と比べてより作用が大きい傾向があった。LPS で観察された通り、SC siRNA 又は APE1 siRNA に曝露した感覚ニューロンを E3330 で処理すると、MCP-1 による pH2A . X の誘導が妨げられた。これら pH2A . X 発現の変化がニューロンの感受性の変化と関連していたかどうかを判定するために、カプサイシンによって刺激された CGRP の放出 (図 6D) について調べた。SC siRNA による処理後、MCP-1 (0.3 μ g / mL) は CGRP の放出を亢進した。この亢進は、野生型 APE1 又は修復能力のある APE1 (C65 APE1) のいずれかで APE1 発現が外因的に強化されたときには観察されなかった。しかし、修復不全 APE1 (226 / 177) の外因性発現は、MCP-1 によって誘起された CGRP 放出の過敏化を妨げなかった (図 6D、ライトグレーのカラム) 。APE1 siRNA で処理した培養物では、MCP-1 処理によって CGRP 放出の減少が引き起こされ、このことは、DNA 修復活性の低下した培養物では、図 3 に提示した濃度応答曲線に基づいて、MCP-1 に対する応答が左にシフトすることを示唆する。この減少は、野生型又は修復能力のある APE1 の外因性発現によって回復したが、修復不全 APE1 の発現には影響を受けなかった (図 6D、ダークグレーのカラム) 。pH2A . X 発現の誘導で観察された通り、E3330 で培養物を処理すると、MC

P - 1 曝露によって誘起された C G R P 放出の変化が妨げられた (図 6 D) 。まとめると、これらデータは、L P S がニューロン核における二本鎖 D N A 切断を誘起し、この D N A 損傷がニューロンの感受性の変化を媒介するという考えを支持している。

【 0 0 4 7 】

考察

この実施例では、ニューロン培養物の炎症メディエーターへの曝露が D N A 損傷及び感覚ニューロンの感受性の変化を惹起するかどうかについて調べた。次に、D N A 塩基除去修復 (B E R) 経路を強化することによって D N A 損傷及び感覚ニューロンの感受性の変化が回復するかどうかを判定することを目指した。結果は、p H 2 A . X 発現の増加によって示された通り、末梢性炎症が、炎症組織を神経支配する感覚ニューロンの細胞体内の D N A 損傷を強化することを証明する。p H 2 A . X 発現の増加は、L P S 又は M C P - 1 に曝露した後の、感覚ニューロン培養物でも明らかである。D N A 損傷に加えて、感覚ニューロン培養物を L P S 又は M C P - 1 に曝露した結果、ニューロペプチドである C G R P の休止放出又は総含量が変化することなく C G R P の放出が刺激されたことによって示される通り、ニューロンの感受性が変化した。A P E 1 発現を遺伝子操作するか、又は塩基除去修復経路を介して D N A 修復を強化する A P E 1 活性の低分子調節因子で処理すると、L P S 又は M C P - 1 によって惹起される D N A 損傷が減弱する。D N A 損傷の修復に加えて、A P E 1 の D N A 修復活性を強化すると、炎症メディエーターによって誘起されるニューロンの感受性の変化が回復する。興味深いことに、L P S によって誘起される D N A 損傷及びニューロンの感受性の変化が、C C R 2 アンタゴニストによって阻害されることも証明され、このことは、T L R 4 活性化によって誘起される長期過敏化が、C C L 2 / M C P - 1 の生成及び推定オートクリン活性の増加を通して媒介されている可能性があることを示唆する。

【 0 0 4 8 】

炎症が一次求心性ニューロンの感受性を変化させるシグナル伝達経路は広範囲にわたって調べられており、受容体、イオンチャネル、若しくは関連する制御タンパク質の機能を可逆的に変化させる翻訳後修飾、及び受容体、イオンチャネル、若しくは神経伝達物質の発現を変化させるか又はこれらタンパク質の新規発現を誘導して感覚ニューロンの表現型を調節する転写制御を含む (N e u m a n n ら , 1 9 9 6) 。炎症によって誘起されるニューロンの過敏化の維持における D N A 損傷の原因的役割を特定するために、D R G 由来のニューロン培養物を利用した。培養下のニューロンに対する炎症の作用を模倣するために、それぞれ T L R 4 又は C C R 2 のリガンド、L P S 又は M C P - 1 / C C L 2 で培養物を処理した。L P S は、インビボ炎症試験で使用される完全フロインドアジュバント中に存在する不活化結核菌 (*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s*) を含むグラム陰性細菌の外膜で発現し、T L R 4 受容体の外因性リガンドである。L P S は、感覚ニューロンにおける T N F 、 I L - 1 、C O X - 2、及び M C P - 1 の発現を強化し (T s e ら , 2 0 1 4、M i l l e r ら , 2 0 1 5)、したがって、炎症によって惹起される複数の経路の活性化を再現する。更に、げっ歯動物の後肢に注射した後の侵害受容行動 (F e r r e i r a ら , 1 9 9 3、C a l i l ら , 2 0 1 4) によって、L P S が感覚ニューロンの興奮性及び開口分泌活性を強化するというインビトロ実験 (H o u 及び W a n g , 2 0 0 1、D i o g e n e s ら , 2 0 1 1、M e s e g u e r ら , 2 0 1 4) によって証明される通り、L P S は感覚ニューロンの感受性を急性的に強化する。M C P - 1 は、炎症によって D R G でアップレギュレートされ (J e o n ら , 2 0 0 8)、感覚ニューロンの刺激を介して D R G 又は背側脊髄から放出される (D a n s e r e a u ら , 2 0 0 8) サイトカインである。M C P - 1 に曝露すると、N F B の活性化によって媒介される可能性のある (T s e ら , 2 0 1 4、Z h a o ら , 2 0 1 4)、T R P V 1 及び N a V 1 . 8 のニューロン発現がアップレギュレートされる (K a o ら , 2 0 1 2) ことが示されている。また、後肢注射後の侵害受容行動の増加 (D a n s e r e a u ら , 2 0 0 8) によって、新生児 D R G に由来する培養物からの C G R P の直接刺激 (Q i n ら , 2 0 0 5) によって証明される通り、M C P - 1 も翻訳後修飾を介して感覚ニューロン

の感受性を強化する。MCP-1は、CCR2受容体のリガンドである。CCR2は、ナイーブ動物に由来するDRGニューロンでは発現しないが、CCR2は、炎症又は神経損傷後のDRGで発現する(Whiteら, 2005、Millerら, 2012、Zhangら, 2013)。更に、CCR2は、DRGに由来する培養物中で機能的に活性である(Qinら, 2005、Kaoら, 2012)。

【0049】

過敏性を惹起するためのキナーゼ及び転写因子の活性化に加えて、炎症は、ニューロンの感受性の変化の媒介において役割を果たす反応性の酸素及び窒素の種の生成も強化する。炎症メディエーターは、酵素反応(NADPHオキシダーゼ)及び自己酸化反応(代謝によって誘起される電子伝達系の漏出の増加を介する)を介してROS/RNSの生成を強化する(Bauerova及びBezdek, 1999、Babior, 2000、Remansら, 2005、Ibira, 2008)。ROS/RNSは、TRPV1及びTRPA1のチャネルのアゴニストとして機能する(Anderssonら, 2008、Sawadaら, 2008、Keebleら, 2009、Itora, 2013、Linら, 2015)。TRPV1及びTRPA1の感受性を強化するROSの急性作用に加えて、フリーラジカル部分が細胞内で増加すると、核酸、タンパク質、及び脂質を含む分子の酸化が引き起こされ得、これは、感覚ニューロンの深刻な結果につながる可能性がある。最近、DNA損傷が、シスプラチンで処理した後の感受性を変化させる原因因子であることが証明された(REF)。シスプラチンによって誘起される酸化障害を修復することによって、ニューロンの感受性の変化を回復させ得ることが研究によって明らかにされ、このことは、損傷しているDNAによるニューロンの感受性の調節におけるROS/RNSの重要な役割を示唆している。これら知見から、炎症によって誘起されるROS/RNSの生成及びその後の酸化的DNA損傷が、炎症によって誘起されるニューロンの感受性の変化の維持に重要であるという仮説が導かれた。

【0050】

ROS/RNSは、内因性代謝活性、傷害に続発する酸化的ストレス(Kruman及びSchwartz, 2008)、環境有害物質(Kisbyら, 1999)、及び薬物(Ahles及びSaykin, 2007)によって生成され得、ROS/RNSは酸化的DNA損傷を惹起するので、感覚ニューロンは、ROS/RNSの過剰生成に対抗するための内因性抗酸化機序を有する。フリーラジカル部分が内因性抗酸化物質を圧倒する場合、感覚ニューロンは、酸化的DNA損傷を修復するためのDNA修復機序も有する。感覚ニューロンは有糸分裂後であるが、DNA損傷は、遺伝子転写の完全性に対して及びニューロンのホメオスタシスの維持にとって依然として大きな影響を有し得る(Fishelら, 2007b)ので、感覚ニューロンは、XX経路を介してDNA損傷を修復する(REFS)。ニューロンにおけるこれら様々なDNA修復経路の中でも、塩基除去修復経路(BER)が優勢であり(Fishelら, 2007b)、酸化的損傷によって引き起こされるDNAの修復に参与している。BERは、酸化的に損傷を受けた塩基をDNAグリコシラーゼによって除去して脱プリン/脱ピリミジン部位(AP部位)を作製すること、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1/酸化還元因子(APE1/Ref-1又はAPE1)によってDNA骨格を切断して、それぞれ新規塩基を挿入し、DNA骨格とライゲーションするためのDNAポリメラーゼ及びリガーゼの調製において3'-OH末端を生成することを含む、DNA損傷部を修復するための幾つかの工程を含む。酸化的DNA損傷の修復に失敗すると、突然変異、DNA複製の妨害、及び遺伝的不安定性が生じる場合がある。上述の通り、単離された感覚ニューロンを抗癌治療の毒性作用から保護することにおけるBER経路、具体的にはAPE1の活性の重要性について調べられている。APE1の発現が減少すると、シスプラチン曝露によって生じる神経毒性が増大するが、APE1の活性を増強すると、神経毒性が減弱される(Vaskoら, 2005、Jiangら, 2008b、Jiangら, 2009、Kelleysら, 2014)。APE1のAPエンドヌクレアーゼ機能に加えて、この酵素は、転写因子の酸化還元状態を調節してその機能(REF)を制御する活性も有する。酸化還元能力のあるAPE1で

はなくDNA修復能力のあるAPE1の過剰発現の知見は、炎症メディエーターによって誘起される過敏化を回復させるのにDNA修復能力のあるAPE1が必須であることを示唆している。したがって、感覚ニューロンが炎症に曝露されると、様々なシグナル伝達経路を通じて過敏性を惹起し得るようであるが、この過敏化の維持は、DNA損傷に依存する。

【0051】

感覚ニューロンをどのようにMCP-1に曝露するとDNA損傷の発生が惹起されるかは知られていない。MCP-1はDNA損傷を生じさせるが、これはBERを強化することによって回復させることができるので、MCP-1によって誘起されたDNA損傷は、ROS/RNSの増加によって媒介されたと仮定される。反応性の酸素及び窒素の種は、複数の起源によって生成され得る：ROS/RNS生成の主な駆動因子は、ミトコンドリアにおける呼吸鎖活性であるが、NADPHオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、シクロオキシゲナーゼ、シトクロムp450、及びリポキシゲナーゼ等の酵素によって、非ミトコンドリアROS/RNSも生成され得る(Sauerら, 2001、Holmstrom及びFinkel, 2014)。LPSの作用はCCR2アンタゴニストによって減弱され得ることが見出されたので、LPSによって誘起される過敏性の維持は、TLR4の活性化とその後のMCP-1/CCL2のアップレギュレーションを通して媒介されると考えられる。マクロファージではTLR4の活性化がROS/RNSの生成を惹起する(Zhangら, 2015)ので、この知見は驚くべきことであったが、ニューロンでは、CCR2の活性化なしにTLR4の活性化が感受性を維持することはできない。したがって、ROS/RNS生成の定量的、空間的、及び時間的な側面が、DNA損傷の誘起にとって重要であり、更に研究されるであろうと考えられる。

【0052】

炎症又は炎症メディエーターによって惹起される一見するとランダムな酸化的DNA損傷が、どのようにして、このような再現可能な表現型を惹起してニューロンの過敏性を維持することができるのかは未だ不明である。酸化的ストレスによって形成される主な酸化的DNA傷害、8oxoGが、炎症及び加齢の発現の一因であると疑われている(Shigenagaら, 1994、Davidら, 2007)が、最近のデータは、グアニンヌクレオチド交換因子特性を有し、全8oxoG負荷ではなく細胞内ホメオスタシスの破壊の原因となるトリガーであるOGG1-8oxoG複合体の形成を、8-オキシグアニン-DNAグリコシラーゼ-1(OGG1)による8oxyGの除去が促進することを示唆している(Aguilera-Aguirreら, 2014)。BERの促進がDNA損傷によって誘起される感受性の変化を減少させるので、これらデータは、一見すると上記知見と矛盾する。8oxoGがどのようにして感覚ニューロンに影響を与えるかを見出すために、ニューロンの機能におけるOGG1の役割について調べる更なる実験が進行中である。APE1の酸化還元機能が他の細胞型において炎症応答の一因となることが既に認められている(Jedinakら, 2011)が、本開示は、APE1のDNA修復機能についての保護的役割を初めて関連付ける。炎症メディエーターの翻訳後及び転写の効果は、ニューロンにおける過敏性の誘起を媒介することができるが、DNA損傷は、転写活性に対する酸化的DNA傷害の影響に起因して、これら変化を維持すると考えられる。したがって、炎症は、再現可能なニューロンにおける機能的変化の一因となり得、その強化されたDNA修復が、損傷によって誘起されるニューロンの機能的変化を回復させることができる。DNAに対する酸化的損傷は、プロモータ領域を認識し、結合する転写因子の能力を変化させることが知られており(Zielら, 2004、Gillespieら, 2009、Pastukhら, 2015)、したがって、炎症によって既に活性化されている遺伝子又は転写因子のプロモータ/リプレッサ領域に対する損傷のため、炎症によって引き起こされるDNA損傷は再現可能であり得る(Ruchkoら, 2009)。

【0053】

まとめると、本開示は、炎症又は炎症メディエーターへの曝露が感覚ニューロンにおいてDNA損傷を惹起することを証明する。塩基除去修復を強化することによって、このD

10

20

30

40

50

NA 損傷は、炎症メディエーターによって誘起されるニューロンの過敏性の維持を媒介することが証明される。

【0054】

実施例 2

この実施例では、DNA 修復活性に対する効果について APX3330 を分析した。

【0055】

6 週齢の雄 NSG マウスの右側腹部に神経芽細胞腫細胞を皮下移植し、腫瘍体積 150 mm^3 以上になるまで増殖させた。次いで、シスプラチンによる処理 ± APX3330 処理についてマウスを無作為化した。シスプラチン及び APX3330 を 3 週間にわたって (0 日目 ~ 17 日目) 同時投与し、シスプラチンの最後の投与後の幾つかの時点において、マウスの DRG 内で神経毒性のエンドポイントを評価した。

10

【0056】

単離された感覚ニューロンを APX3330 に曝露したとき、Ref-1/APE1 エンドヌクレアーゼ活性が濃度依存的に増大したが、これは腫瘍細胞では観察されない。APX3330 は Ref-1/APE1 の酸化還元機能を標的とする阻害剤であるが、感覚ニューロンの状況では、タンパク質の DNA 修復 (AP エンドヌクレアーゼ) 活性を強化することもできると思われる (図 7A ~ 7E)。APX3330 は、経時的にタンパク質をアンフォールドさせる。このアンフォールディングによって、主に、Ref-1/APE1 のアミノ末端が変化して、タンパク質のフォールド/アンフォールド状態の平衡を乱し、修復活性を促進することによって、下流の転写因子標的との相互作用に影響を及ぼす。このように Ref-1/APE1 をその Ref-1/APE1 酸化還元活性から切り離すことによって、Ref-1/APE1 修復エンドヌクレアーゼ活性を強化することができた。

20

【0057】

神経毒性のための任意の想定療法の重要な特性は、投与される治療 (複数可) の抗癌機能を損なわないことである。重要なことに、APX3330 による DNA 修復活性の強化は、有糸分裂細胞では観察されなかった。APX3330 は、腫瘍細胞株、患者由来の細胞株、及び動物モデルにおける腫瘍の成長及び/又は生存に負の影響を与えることが既に示されている。したがって、APX3330 は、腫瘍細胞に対する抗癌薬の効果を変化させることなく分裂終了細胞を保護することが可能である (図 7C ~ 7E)。更に、APX3330 は、シスプラチン又はオキサリプラチンのインビボにおける腫瘍死滅効果には影響を与えなかったが、酸化的 DNA 損傷から DRG ニューロンを保護する (データ不図示)。健常細胞では、Ref-1/APE1 の酸化還元機能ではなく、DNA 修復機能が、感覚ニューロンの生存/機能に必要であると思われる。これは、腫瘍細胞とは正反対である。まとめると、これらデータは、APX3330 が、治療を損なうことなく癌療法から神経を保護することができるという考えを支持している。

30

【0058】

実施例 3

この実施例では、白金の抗腫瘍効果を減弱しないと同時に、シスプラチン又はオキサリプラチンによって誘導される神経毒性から保護する能力について、APX3330 アナログを分析した。また、神経芽細胞腫細胞株及び 3D スフェロイド膵臓腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果について、アナログ APX2009 を評価した。

40

【0059】

材料及び方法

材料

一般的な組織培養用品は、Invitrogen (Carlsbad, CA) から入手し、化学物質は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。感覚ニューロン培養物については、ポリ-D-リジン及びラミニンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から、神経成長因子は Harlan Bioproducts for Science (Indianapolis, IN) から、nor

50

mocinはInvivogen (San Diego, CA) から購入した。マウスモノクローナル抗ヒトAPE1抗体は、研究室で産生させ、Novus Biologicals (Littleton, CO) から入手可能である。マウスモノクローナル抗ホスホ-H2AX抗体は、EMD Millipore (Billerica, MA) 製であり、 α -アクチンモノクローナル抗体は、Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA) 製であった。化学発光二次抗体は、Roche Diagnostics Corp. (Indianapolis, IN) 製であった。

【0060】

シスプラチンは、Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO) から購入し、オキサリプラチンは、LKT Laboratories, Inc. から購入した。シスプラチンは、まず、N, N - ジメチルホルムアミド (Sigma-Aldrich) に溶解させ、40 mM溶液として-80 で保存し、オキサリプラチンは、PBSに溶解させ、5 mM原液として-80 で保存した。薬物処理前に、原液をF-12成長培地で希釈し、培養物に添加し、24~72時間曝露した。これら研究で使用した全ての手順は、インディアナ大学医学部 (Indianapolis, IN) の実験動物委員会によって承認された。

10

【0061】

新規化学物質の合成

APX3330の新規第二世代アナログ化合物の合成についての完全な詳細は、Sardar Pasha Sheik Pran Babuら, Ref-1/APE1 inhibition with novel small molecules blocks ocular neovascularization, オンラインで入手可能、2018年4月6日; doi: 10.1101/296590に提供されており、これは、本明細書と一致する範囲で参照により組み込まれる。該化合物は、Cascade Custom Chemistry, Eugene, OR 97401 USAによって合成された。まとめると、2-ヨード-3-ヒドロキシ-1, 4-ナフトキノンの一般的な中間体であるiodolawsononeは、Cascade Custom Chemistryから入手可能である。記載されている通り、後続反応において、iodolawsononeをメタクリル酸又は2-プロピルアクリル酸、塩化オキサリル及び対応するアミン、並びにメタノール中ナトリウムメトキシドで処理して、(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N, N-ジメチルペンタンアミド (APX2007)、(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N, N-ジエチルペンタンアミド (APX2009)、及び(2E)-2-(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)-N, N, 2-トリメチルプロパ-2-エンアミド (APX2032) を生成する。更なる情報は、発行されている特許「Quinone Compounds for Treating Ape1 Mediated Diseases」(Mark R. Kelley及びJames H. Wikel)、米国特許第9,193,700号、2015年11月24日公開に見出すことができ、これは、本明細書と一致する範囲で参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

【0062】

化学構造の提示

化学構造、部分構造、及び反応を描画、表示、及び特性評価するためにMarvinを使用した、Marvin 15.8.24.0, 2015, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)。構造特性の予測にはCalculator Pluginsを使用した、Marvin 15.8.24.0, 2015, ChemAxon (www.chemaxon.com)。分子モデリングは、Open Eye ScientificソフトウェアOMEGA (OMEGA 2.5.1.4) (Hawkinsら, 2010) 及びROCS (ROCS 3.2.1.4: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. www.eyes

50

open.com) (Hawkinsら, 2007) を使用して実施した。分子の可視化は、Open Eye Scientific ソフトウェア VIDA (Open Eye Scientific Software, Santa Fe, NM. www.eyesopen.com) を使用して実施した。

【0063】

感覚ニューロンの培養

既に記載されている通り (Vaskoら, 2005)、感覚ニューロンの初代培養物を収集し、維持した。簡潔に述べると、成体雄 Sprague-Dawley ラット (150 ~ 175 g; Harlan, Indianapolis, IN) を CO₂ 窒息によって安楽死させ、全ての脊髄レベルから後根神経節 (DRG) を切開し、コラゲナーゼ溶液 (1 mg/mL) に移し、37 °C で1時間インキュベートし、次いで、機械的攪拌によって解離させた。約 30,000 細胞又は 60,000 細胞を、それぞれ、12 ウェル又は 6 ウェルの培養プレートの各ウェルにプレATINGした。全ての培養皿を、ポリ-D-リジン及びラミニンでプレATINGした。37 °C、3% CO₂ 中において、10% のウマ血清、2 mM のグルタミン、100 µg/mL の normocin (商標)、50 µg/mL のペニシリン、50 µg/mL のストレプトマイシン、50 µM の 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (Invitrogen)、150 µM のウリジン、及び 30 ng/mL の NGF を補給した F-12 培地中で細胞を維持した。1 日おきに成長培地を交換した。細胞を 12 ~ 14 日間培養下で維持した後に実験を実施した。

10

【0064】

ニューロン細胞の生存率

既に記載されている通り (Vaskoら, 2011)、感覚ニューロン培養物のトリパンブルー排除分析を実施した。0.05% トリプシン-EDTA 溶液及び培地を各ウェルに添加することによって、細胞を剥離した。PBS 中 0.4% (w/v) トリパンブルーを細胞懸濁液に等体積添加し、血球計数器を使用して位相差顕微鏡下で生細胞数 (すなわち、色素を排除するもの) を計数した。生細胞を全細胞数 (死細胞及び生細胞を含む) で除した百分率として生存率を計算した。

20

【0065】

細胞株の確認及び特性評価

IMR32 及び SK-N-SH の細胞株を American Type Culture Collection から入手し、10% FBS を補給した RPMI-1640 中で成長させた。種についての DNA フィンガープリント分析 (IDEXX BioResearch) 及びベースラインショートタンデムリピート分析試験によって細胞株のアイデンティティを確認した。全ての細胞株は 100% ヒトであり、9 マーカーショートタンデムリピート分析はファイルされている。

30

【0066】

細胞増殖アッセイ

細胞を 96 ウェルプレートに播種し (IMR32: 1000 細胞/ウェル; SK-N-SH: 3000 細胞/ウェル)、APX2007、APX2009、APX2032、又は APX3330 (本明細書では「E3330」とも称される) で 5 日間処理した。最終 DMSO 濃度は、0.1% 以下であった。既に記載されている通り (Tonsing-Carterら, 2015)、メチレンブルーアッセイを使用して細胞生存率を求めた。各実験をトリプリケートで実施し、3 回繰り返した。対照に対して正規化した生存率をグラフ化し、Chou-Talalay 法 (Chou 及び Talalay, 1984) を使用して ED₅₀ 値を求めた。

40

【0067】

イムノプロッティング

既に記載されている通り (Kelleyら, 2014)、イムノプロッティングを実施した。簡潔に述べると、細胞を RIPA バッファ (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA) 中で溶解させ、Lowey アッ

50

セイを使用してタンパク質を定量した。4 ~ 12 % SDS - ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することによって、タンパク質を分離した。ゲルをP V D Fメンブレンに転写し、穏やかに攪拌しながら、0 . 1 % Tween - 20 (T B S T) 及び5 % 脱脂粉乳を含有するT r i s緩衝生理食塩水中において4 で一晩インキュベートした。マウスモノクローナル抗ヒトA p e 1抗体 (1 : 500)、マウスモノクローナル抗ホスホH 2 A X抗体 (1 : 1000)、又は - アクチンモノクローナル抗体 (1 : 1000) をブロッッキング溶液に添加し、穏やかに攪拌しながら室温で一晩インキュベートした。化学発光を使用して適切な二次抗体法に従って抗体結合を検出した。B i o - R a d (H e r c u l e s , C A) 製のQ U A L I T Y O N E (登録商標) ソフトウェアを使用してバンドの密度を測定し、アクチンに対して正規化した密度としてデータを表した。

10

【0068】

カルシトニン遺伝子関連ペプチドの放出の測定

放出実験のために、25 H E P E S、135 N a C l、3 . 5 K C l、2 . 5 C a C l₂、1 M g C l₂、3 . 3 D - グルコース (単位m M)、及び0 . 1 % ウシ血清アルブミン、p H 7 . 4 からなるH E P E Sバッファで細胞培養物を洗浄し、37 で維持した。次いで、H E P E Sバッファ0 . 4 m Lのみ (基本放出)、30 n M カプサイシンを含有するバッファ、次いで、バッファのみ (基本放出への回復を評価するため) と共に10分間隔で逐次インキュベートした。各インキュベーション後、バッファを除去し、既に記載されている通り (C h e n ら, 1996)、ラジオイムノアッセイ (R I A) を使用して、各サンプル中の免疫反応性カルシトニン遺伝子関連ペプチド (C G R P) の量を測定した。放出プロトコルの最後に、培養物からC G R Pを抽出し、R I Aを使用して総含量を測定した。処理によって総含量はそれほど変化しなかったので、放出されたペプチドのf m o l / ウェル / 10分として放出データを提示する。

20

【0069】

A P エンドヌクレアーゼDNA修復アッセイ

既に記載されている通り (B a p a t ら, 2010)、A P E 1 DNA修復エンドヌクレアーゼ活性の阻害又は強化を実施した。一方の鎖にクエンチャーを含有する2つのアニールされたオリゴヌクレオチド (5 ' - 6 - F A M - G C C C C C * G G G G A C G T A C G A T A T C C C G C T C C - 3 ' (配列番号3) 及び3 ' - Q - C G G G G G C C C C C T G C A T G C T A T A G G G C G A G G - 5 ' (配列番号4)) と、A P 部位模倣物としてテトラヒドロフランを有する蛍光6 - F A M 標識とを使用して、プレートアッセイでA P E 1修復活性アッセイを実施した。A P 模倣部位におけるオリゴ切断の結果、6 - F A M が放出され、検出される。T e c a n U l t r a プレートリーダー (C h e m i c a l G e n o m i c s C o r e , I n d i a n a U n i v e r s i t y S c h o o l o f M e d i c i n e) を使用して、1分間隔で5回蛍光を読み取った。反応の速度を使用して、ビヒクル対照と比較したA P E 1修復活性の変化を求めた。

30

【0070】

電気泳動移動度シフトアッセイ (E M S A)

既に記載されている通り (L u o ら, 2012)、E M S A を実施した。精製されたA P E 1を1 . 0 m M のD T T で10分間還元し、P B S 中0 . 02 m M のD T T で最終濃度が0 . 006 m M になるように希釈した。還元されたA P E 1を、DNA結合ドメイン及びロイシンジッパーを含有する精製された切断型c - J u n 及びc - F o s タンパク質の0 . 007 m M のタンパク質混合物 (1 : 1) 2 m L を含むE M S A 反応バッファ (10 m M のT r i s (p H 7 . 5)、50 m M のN a C l、1 m M のM g C l₂、1 m M のE D T A、5 % [v o l / v o l] のグリセロール) に添加し、室温で30分間インキュベートした。既に記載されている通り (L u o ら, 2008 ; N y l a n d ら, 2010 ; K e l l e y ら, 2011 ; L u o ら, 2012)、E M S A アッセイを実施した。

40

【0071】

一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイ

既に記載されている通り (G e o r g i a d i s ら, 2008 ; K e l l e y ら, 20

50

11; Cardosoら, 2012b; Luoら, 2012)、レポーターアッセイを実施した。NF- κ B-応答プロモータを含有し、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を駆動するNF- κ B-ルシフェラーゼコンストラクト、及びウミシイタケルシフェラーゼ対照レポーターベクターpRL-CMVで細胞をトランスフェクトした。24時間のトランスフェクション期間後、細胞を溶解し、正規化のためにウミシイタケルシフェラーゼ活性を使用して、ホタル及びウミシイタケのルシフェラーゼ活性をアッセイした。トランスフェクション実験は全てトリプリケートで実施し、独立な実験で少なくとも3回繰り返した。代表的な実験からの平均 \pm 標準誤差としてデータを表し、スチューデントのt検定を実施した。

【0072】

10

腫瘍及び癌関連線維芽細胞(CAF)の3D共培養

患者由来の腫瘍細胞及びCAF19細胞は、Anirban Maitra博士(The Johns Hopkins University M.D. Anderson Cancer Center)(Jonesら, 2008)から供与された。全ての細胞株は、STR分析(IDEXX BioResearch)を介して認証され、マイコプラズマのコンタミネーションについて規定通りチェックされた。既に記載されている通り(Sempereら, 2011; Arpin, 2015)、Ultra low attachment 96ウェルプレート(Corning Inc., Life Sciences)を使用して、CAFの有り無しで3次元腫瘍スフェロイドを生成した。TdTomatoで標識されたPDAC細胞及びEGFPで標識されたCAFを、1:4の細胞比(腫瘍:CAF)で3%還元成長因子マトリゲル(BD Biosciences)及び5%FBSを含有する無色のDMEM培地に再懸濁させ、プレーティング後4及び8日目に供給した。共培養の12日目に、Thermo ArrayScanを介して両細胞集団を強度及び面積について定量した。

20

【0073】

薬物動態(PK)及びP450代謝分析

E3330について既に記載されている通り(Fishelら, 2011)、IU Simon Cancer Center Clinical Pharmacology Analytical Core(CPAC)においてPK試験を実施し、該化合物の標準を使用した。ヒトミクロソームを使用するP450代謝試験も、David Jones博士の指導でCPACにおいて実施した。

30

【0074】

統計解析

最低3回の独立な収集又は実験からの平均 \pm SEMとしてデータを表す。対照と様々な処理との間の統計的に有意な差は、スチューデントt検定を使用して評価した。二元配置分散分析(ANOVA)及びチューキーの事後検定を使用して、トリバンプルー排除、ガンマ-H2AX(pH2AX)、及びCGRP放出を使用した細胞生存率の差を求めた。

【0075】

結果

40

E3330アナログの化学合成、酸化還元阻害の検証、及び薬物動態

活性を調節するために、コアジメトキシベンゾキノン(A)をナフトキノン環で置換し、環構造におけるメチル基(B)を様々なハロゲン又は水素で置換し、二重結合における炭素鎖(C)を短くすることによって、E3330の多数のアナログを合成した(図8A)。継続的な努力において、二重結合における炭素鎖(C)を短くすることに合わせて、カルボン酸部分(D)を修飾した。これら変化によって、構造の2つの物性が改変された。E3330は、生理学的pHにおいて荷電分子として存在する。荷電している支持化学的特徴(supporting chemical feature)ではない、カルボン酸(D)のアミド誘導体が調製された。更に、E3330は、非常に親油性の高い炭素鎖を有し、これは、改変可能な特徴であると考えられる。新規構造は、二重結合において著しく短い炭素鎖(C)を有するので、親油性がより低い。詳細な合成データは、米国特

50

許第 9, 089, 605 号に見出すことができ、これは、本明細書に一致する範囲で参照により本明細書に組み込まれる。作製された化合物のうちの 3 つの新規構造 (図 8 B) を、酸化還元 A P E 1 電気泳動移動度シフトアッセイ (E M S A) 試験において分析して、どの化合物が A P E 1 の酸化還元機能に影響を与えるかを判定した。該化合物は、A P X 2007 2 μ M、A P X 2009 1 μ M、及び A P X 2032 1 μ M の酸化還元阻害 I C₅₀ を有していた (図 9 A)。E 3330 は既に提示されており、同様のアッセイで 25 μ M の I C₅₀ を有する。

【0076】

レポータートランス活性化アッセイを実施して、新規化合物が細胞において有効であり、このアッセイにおいて N F κ B 機能を制御するその標的 A P E 1 にヒットすることを確認した。これらアッセイでは、3 つの化合物 A P X 2007、A P X 2009、及び A P X 2032 の全てが、7 μ M の I C₅₀ でレポーターコンストラクトに対する N F κ B の結合を同様に阻害することが証明され、一方 E 3330 は 45 μ M の活性を有する (図 9 B)。更に、2 つの神経芽細胞腫細胞株 I M R 32 (p53 wt、MYCN 増幅) 及び S K - N - S H (p53 wt、MYCN 非増幅) において、腫瘍細胞死滅についての E D₅₀ を決定した (図 9 C 及び 9 D)。3 つの化合物全てが E 3330 に比べて低い E D₅₀ を有していた；I M R 32 細胞では 7 ~ 10 倍大きく、S K - N - S H 細胞では 4 ~ 6 倍大きい (図 9 C 及び 9 D)。強化された腫瘍細胞死滅データは、図 10 の E M S A 及びトランス活性化データによって証明される通り、A P E 1 機能に対する化合物の有効性の増大と一致している。A P X 2009 の薬物動態プロファイルについても評価した。図 11 A 及び 11 B に示す通り、A P X 2009 の半減期は、E 3330 の 3 . 6 時間に比べて 25 . 8 時間であり、すなわち、約 7 倍半減期が増加する。更に、P 450 代謝分析においてヒトミクロソームを使用して、A P X 2009 は、20 分間に対して 173 分間の半減期を有し、すなわち、8 . 7 倍増加した (図 11 A 及び 11 B)。

【0077】

感覚ニューロン培養物を 10、20、又は 40 μ M の E 3330 に 24 時間曝露した場合、トリパンブルー排除によって測定して、有意な細胞死は存在しなかった (図 12 A)。同様に、培養物を様々な濃度の A P X 2009 に曝露しても、細胞生存率は有意には低下しなかった (図 12 A)。対照的に、40 μ M の A P X 2007 で 24 時間、又は 20 μ M 若しくは 40 μ M の A P X 2032 で 24 時間細胞を処理した結果、細胞生存率が有意に低下した (図 12 A)。同様に、培養物を 20 又は 40 μ M の A P X 2007 又は A P X 2032 に 72 時間曝露すると、細胞死が有意に増加した (データ不図示)。

【0078】

既に記載されている通り (B a p a t ら, 2010)、DNA 修復活性アッセイを実施した。図 13 A ~ 13 D に示す通り、A P X 2009 のみがこのアッセイにおいて A P E 1 修復活性の刺激を示し、ナノモル範囲において、E 3330 と比べて活性の著しい増加を示した (図 11 A 及び 11 B)。A P X 2007 及び A P X 2032 は、A P E 1 エンドヌクレアーゼ活性の刺激についても阻害についても効果を有していなかった。

【0079】

E 3330 及び A P X 2009 は、感覚ニューロン培養物においてシスプラチンによって誘起される細胞死を減弱したが、A P X 2007 も A P X 2032 も減弱しなかった。ニューロン培養物の E 3330 への曝露は神経保護的であるので (V a s k o ら, 2005; J i a n g ら, 2008; V a s k o ら, 2011; K e l l e y ら, 2014)、E 3330 及び他のアナログが培養下のシスプラチンによって誘起される細胞死に影響を与えるかどうかについて評価した。ニューロン培養物を漸増濃度のシスプラチンに 24 時間曝露すると、それぞれ 30 及び 100 μ M で $66 \pm 5\%$ 及び $50 \pm 7\%$ に細胞生存率が濃度依存的に減少する (図 12 B)。このシスプラチンによって誘起される細胞死は、シスプラチン処理前に 48 時間及び該処理の間中、E 3330 (20 μ M) 又は A P X 2009 (20 μ M) にニューロン培養物を曝露することによってブロックされた (図 12 B)。対照的に、20 μ M の A P X 2007 又は A P X 2032 で前処理しても、シスプ

ラチンによって誘起される細胞死は減弱せず、APX2032及びシスプラチン(100 μ M)の組み合わせは細胞生存率を $9 \pm 9\%$ に低下させる(図12B)。したがって、APX2009は、使用した全ての用量レベルにおいて、シスプラチンによって誘起される細胞死に対して感覚ニューロン培養物を保護し、一方APX2007及びAPX2032は、高用量(100 μ M)において細胞死滅を引き起こした。

【0080】

E3330及びAPX2009は、シスプラチンによって誘起される感覚ニューロンからの伝達物質の放出の減少を減弱したが、APX2007もAPX2032も減弱しなかった

感覚ニューロン培養物において細胞死を引き起こすには比較的高濃度のシスプラチンが必要であるが、より低濃度では、感覚ニューロンからの伝達物質の放出が低減される。したがって、E3330アナログが、シスプラチンによって誘導される神経毒性の機能的エンドポイントを減弱できるかどうか、すなわち、カプサイシンによって惹起されるCGRPの放出の減少について更に判定した。培養下の感覚ニューロンをE3330(20 μ M)又はAPX2009(10若しくは20 μ M)に72時間曝露し、CGRP放出について調べたとき、未処理細胞と比べて、基本(休止)放出も30 nMのカプサイシンによって刺激された放出も有意には変化しなかった(図14A)。しかし、APX2007又はAPX2032(10 μ M)で72時間前処理してもCGRP放出に影響を与えず、一方各20 μ Mは、カプサイシンによって刺激される放出を有意に増加させた(図14A)。試験した濃度の薬物はいずれも、培養下のCGRPの総含量を変化させなかった(データ不図示)。上述の結果を確認して、ニューロン培養物を10 μ Mのシスプラチンに曝露した結果、カプサイシンによって惹起されるCGRPの放出が著しく減少した(図14B)。シスプラチンに曝露する前48時間及び曝露の間中、20 μ MのE3330又はAPX化合物で培養物を前処理すると、抗癌薬によって引き起こされた放出の減少が無効になった(図14B)。10 μ MのAPX2007又はAPX2009で72時間処理しても、シスプラチンによって誘起される放出の減少は阻止されなかったが、10 μ MのAPX2032はシスプラチンの効果をブロックした。APX2007及びAPX2032のみでは伝達物質の放出を増強したので、シスプラチン効果の回復は非特異的である可能性があった。対照的に、E3330及びAPX2009は共に、単独で投与されたときに放出を変化させないので、神経保護的であると思われる。

【0081】

APX2009は、感覚ニューロン培養物中でシスプラチンによって誘起されるDNA損傷を著しく減少させた

シスプラチン処理後のAPX2009の神経保護効果の更なる確認として、様々なE3330アナログの有り無しで、DNA損傷のマーカーであるホスホ-H2AX(pH2AX)のレベルを感覚ニューロン培養物中で測定した。培養物を10 μ Mのシスプラチンに24又は48時間曝露した場合、ウエスタンブロットを使用して測定してpH2AXの濃度が著しく増大し、白金化合物によるDNA損傷が確認された(図15)。シスプラチンへの曝露前48時間又は曝露の間中、APX2009(20 μ M)で培養物を前処理すると、pH2AXのレベルが著しく低下した。対照的に、APX2007もAPX2032も(20 μ M)、DNA損傷を生じさせるシスプラチンの能力を変化させなかった(図15)。

【0082】

APX2009は、オキサリプラチンによって誘導される神経毒性に対して神経保護的である

APX2009は、シスプラチンによって誘起されるDNA損傷及びCGRP放出の減少から保護したが、APX2007及びAPX2032は保護しなかったという知見に基づいて、別の白金剤であるオキサリプラチンを用いたその後の研究における使用についてはAPX2009を優先した。シスプラチン及びオキサリプラチンは共に、細胞内で著しいレベルのROSを生成し、シスプラチンがより高いレベルで生成する。しかし、これら

2つの剤によって生成されるDNAの架橋は異なる：シスプラチンはPt - 1 - 2 - d (GpG)鎖内DNA架橋を生成し、一方オキサリプラチンは、主にPt - 1 - 3 - d (ApG)鎖内DNA架橋を生成する。E3330がシスプラチン及びオキサリプラチンによって誘導される神経毒性の両方から保護することは既に証明されている。したがって、オキサリプラチン処理後に同様の保護効果を有しているかどうかを判定するためにAPX2009を分析し、これも、酸化的DNA損傷の修復が白金架橋除去の制御に關与しているという仮説を支持する。図16Aに示す通り、10又は20µMのAPX2009で72時間処理すると、オキサリプラチンに24時間曝露することによって引き起こされる細胞死滅から感覚ニューロン培養物を保護した。同様に、オキサリプラチンに24時間曝露する前48時間及び曝露の間中、APX2009でニューロン培養物を前処理すると、オキサリプラチンによって誘起される、感覚ニューロンからのCGRP放出の減少が阻止された(図16B)。

10

【0083】

また、APX2009は、オキサリプラチンで24及び48時間処理した後にH2AXのリン酸化を著しく減少させ(図16C)、これは、その神経保護効果がDNA損傷の減少に起因している可能性があることを示す。

【0084】

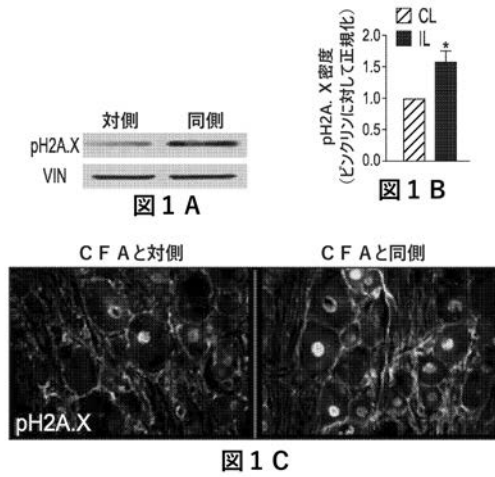
APX2009によるヒトPDAC 3D腫瘍モデルの処理

APX2009の神経保護効果は明らかである一方、これらE3330アナログが、E3330でみられたのと同様に腫瘍細胞を死滅させることができるかどうかについても調べた。低継代数の患者由来の腫瘍細胞及び癌関連線維芽細胞の両方を含むエクスピボ系として、臍臓癌の3次元共培養モデルを使用した。腫瘍細胞のみ及びCAFとの共培養物の両方の面積及び強度に対する、APX2009によって誘導される細胞毒性の作用を評価した。患者由来のPDAC細胞(Pa03C - 赤色で標識)及びCAF19細胞(緑色で標識)で構成されるスフェロイドをAPX2009で処理し、各細胞型のマーカーとして、赤色及び緑色の蛍光の面積及び強度を別々に評価した(図17A~17C)。興味深いことに、CAFはAPX2009処理によって有意には影響を受けず、このことも、非腫瘍形成性細胞が、腫瘍細胞よりもAPE1阻害の効果に耐容性を示し得ることを示唆している。このデータは、E3330で観察されるものと同様であるが、より低い用量レベルで有効であり、APX2009が、CIPN保護の指標も示すと同時に、潜在的PDAC治療剤であると確認される。

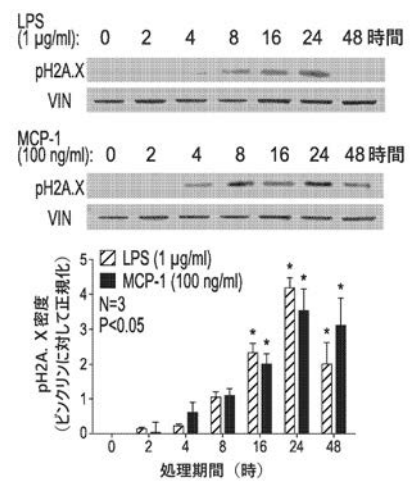
20

30

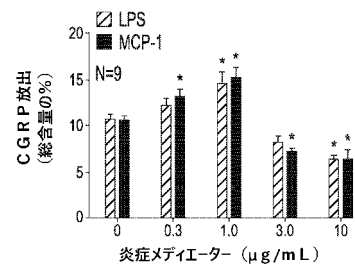
【 図 1 】



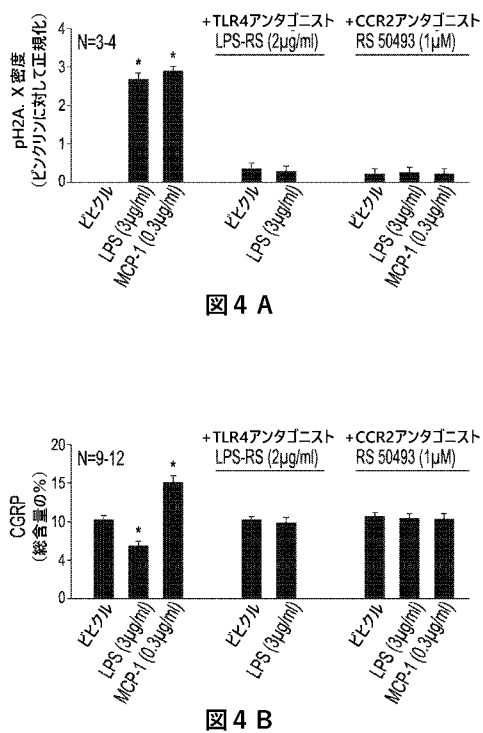
【 図 2 】



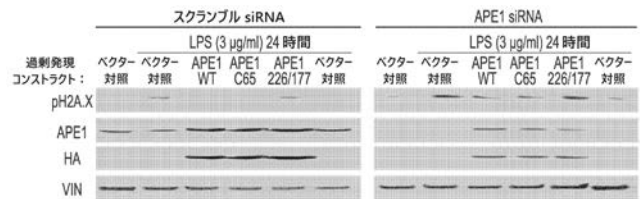
【 図 3 】



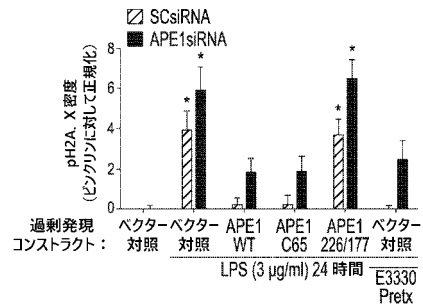
【 図 4 】



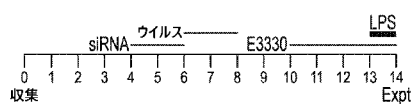
【 図 5 B 】



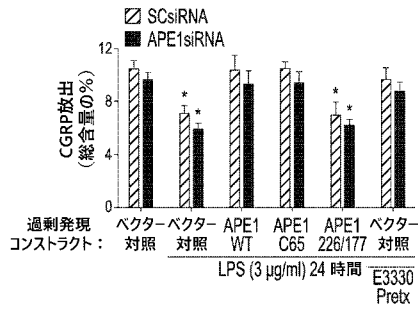
【 図 5 C 】



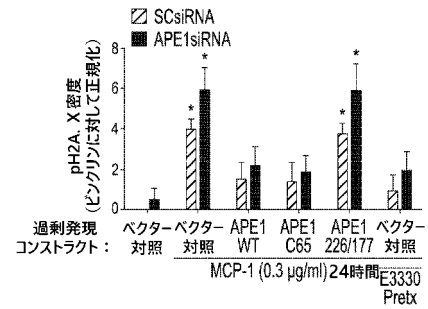
【 図 5 A 】



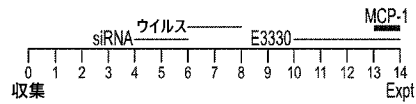
【図 5 D】



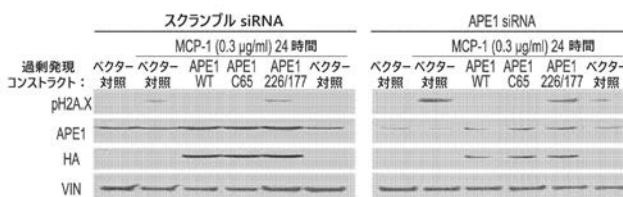
【図 6 C】



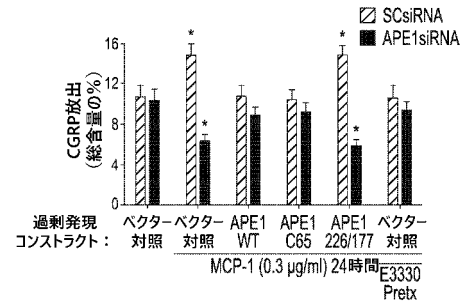
【図 6 A】



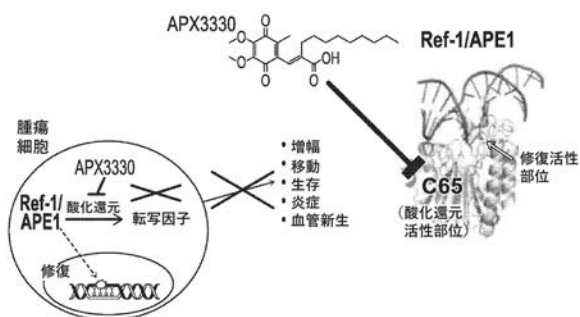
【図 6 B】



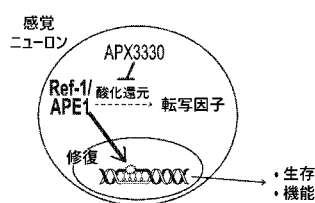
【図 6 D】



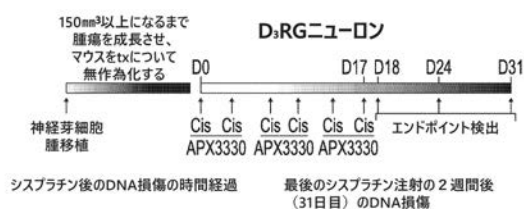
【図 7 A】



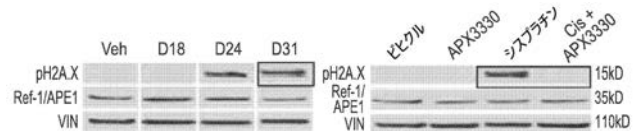
【図 7 B】



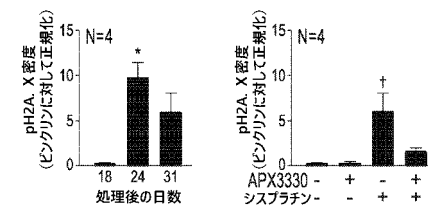
【図 7 C】



【図 7 D】



【図 7 E】



【図 8 A】

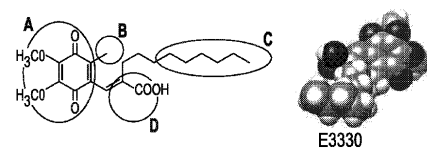


FIG. 8A

【図 8 B】

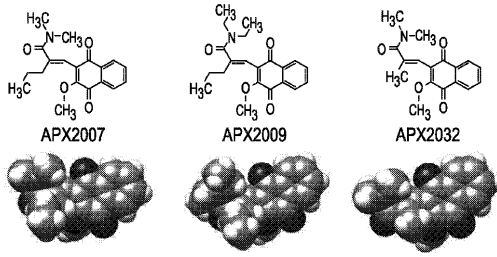
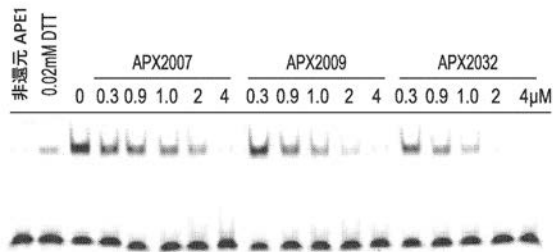
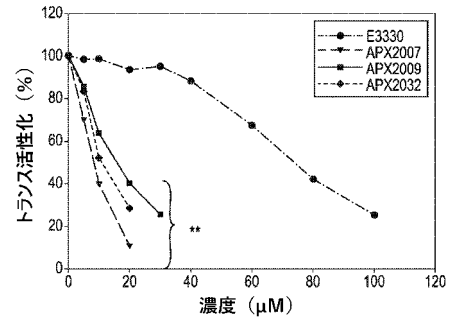


FIG. 8B

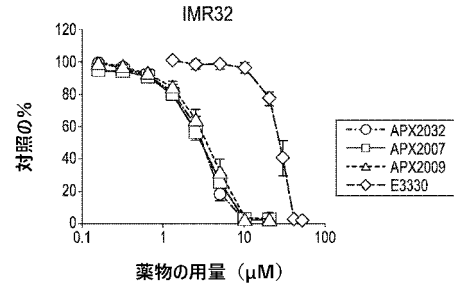
【図 9 A】



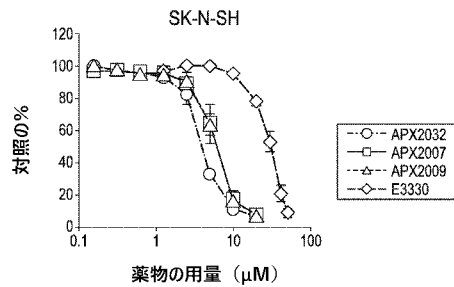
【図 9 B】



【図 9 C】



【図 9 D】



【図 1 1】

IMR32細胞p53wtの平均IC50値、MYCN増幅

化合物	IC50 (μM)	SEM
E3330	25.14	1.38
APX2007	3.58	1.38
APX2009	3.00	0.41
APX2032	2.47	0.27

図 1 1 A

【図 1 0】

	レポーター トランス 活性化 アッセイ IC50 (μM)	腫瘍細胞 死滅 IC50 (μM)	APE1 DNA 修復活性の 増大 ⁶	t _{1/2} (時間) ⁴	P450 代謝 t _{1/2} (分) ⁵
E3330	45 ¹	26 ¹	25 - 50 μM ¹	3.6	20
APX2007	7	3.6 - 6.2 ²	ND	2.9	
APX2009	7	3 - 6 ² 2.5 - 5.0 ³	0.125 μM	25.8	173
APX2032	7	4 - 25 ²	ND	2.8	
E3330に 対する APX2009 の活性増大 (倍)	6.4	4.3 - 8.7	200	7.2	8.7

SK-N-SH細胞p53wtの平均IC50値、MYCN非増幅

化合物	IC50 (μM)	SEM
E3330	27.30	0.97
APX2007	6.23	1.1
APX2009	5.96	0.57
APX2032	4.37	0.22

図 1 1 B

【図 1 2】

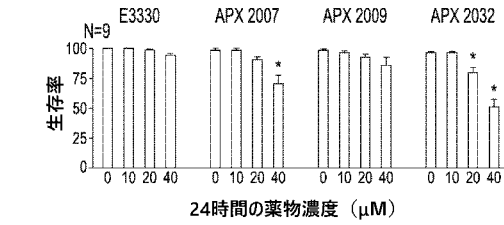


図 1 2 A

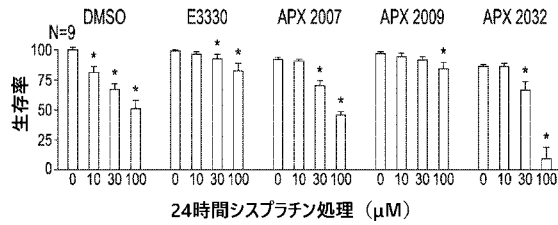
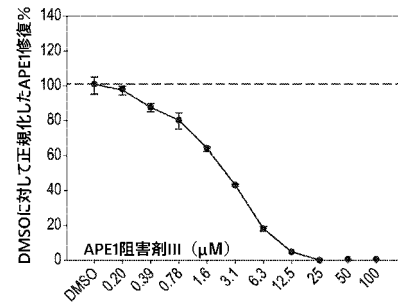
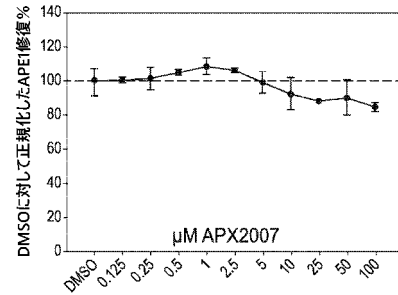


図 1 2 B

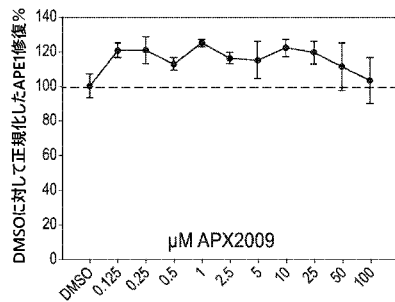
【図 1 3 A】



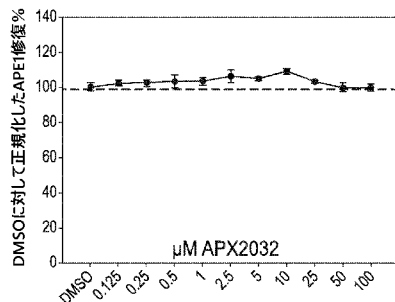
【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【図 1 3 D】



【図 1 4】

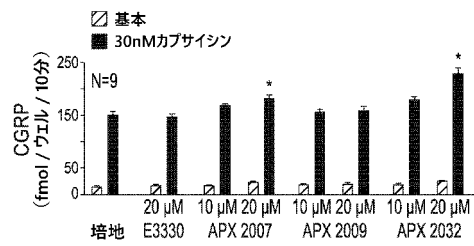


図 1 4 A

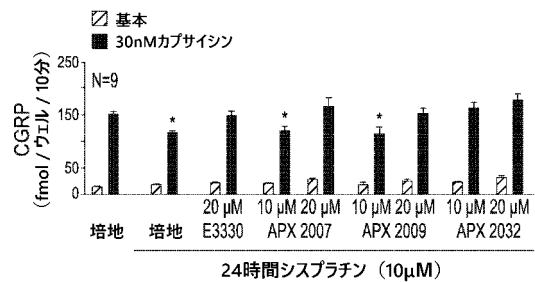
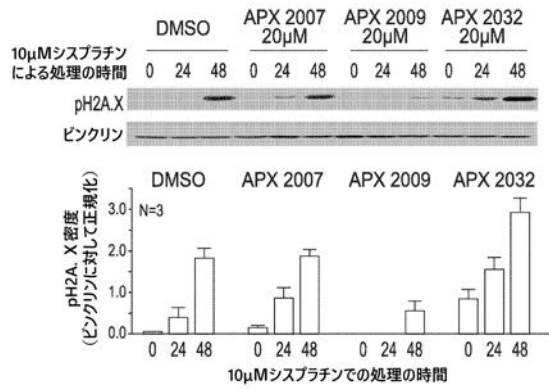
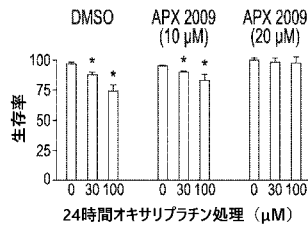


図 1 4 B

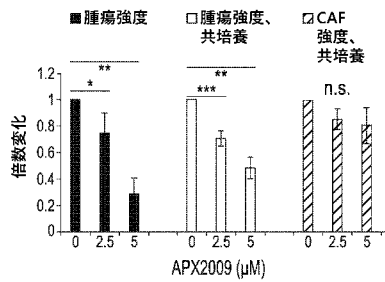
【図 15】



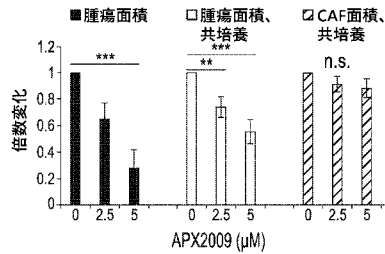
【図 16 A】



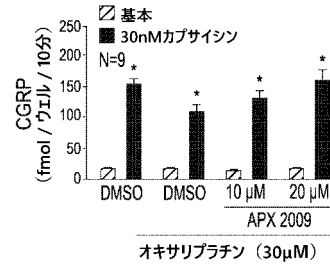
【図 17 A】



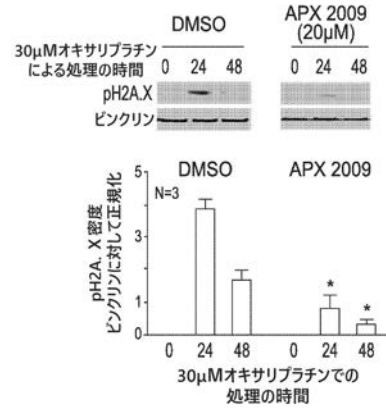
【図 17 B】



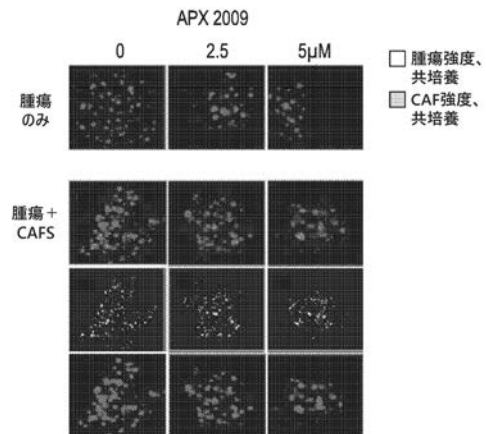
【図 16 B】



【図 16 C】



【図 17 C】



【配列表】

2020516663000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年12月17日(2019.12.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

それを必要としている被験体におけるニューロンの感受性を低減する方法であって、A P E 1 のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1酸化還元因子1 (A P E 1 / R e f - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項2】

前記A P E 1 / R e f - 1 阻害剤が、3 - [(5 - (2 , 3 - ジメトキシ - 6 - メチル 1 , 4 - ベンゾキノイル)) - 2 - ノニル - 2 - プロピオン酸 (A P X 3 3 3 0) 、 [(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N , N - ジエチルペンタンアミド] (A P X 2 0 0 9) 、 (2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N - メトキシペンタンアミド] (A P X 2 0 1 4) 、これらの薬学的に許容し得る塩及び薬学的に許容し得る溶媒和物、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記A P E 1 / R e f - 1 阻害剤がA P X 3 3 3 0であり、前記被験体に約5 μ M ~ 約50 μ MのA P X 3 3 3 0を投与する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

白金薬剤、タキサン、ドキソルビシン、アルカロイド、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、エリブリン、電離放射線、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの追加の治療剤を前記被験体に投与する工程を更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

それを必要としている被験体における炎症及び慢性疼痛を治療する方法であって、A P E 1 のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1酸化還元因子1 (A P E 1 / R e f - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項6】

前記A P E 1 / R e f - 1 阻害剤が、3 - [(5 - (2 , 3 - ジメトキシ - 6 - メチル 1 , 4 - ベンゾキノイル)) - 2 - ノニル - 2 - プロピオン酸 (A P X 3 3 3 0) 、 [(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N , N - ジエチルペンタンアミド] (A P X 2 0 0 9) 、 (2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N - メトキシペンタンアミド] (A P X 2 0 1 4) 、これらの薬学的に許容し得る塩及び薬学的に許容し得る溶媒和物、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記A P E 1 / R e f - 1 阻害剤がA P X 3 3 3 0であり、前記被験体に約5 μ M ~ 約50 μ MのA P X 3 3 3 0を投与する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

白金薬剤、タキサン、ドキソルビシン、アルカロイド、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、エリブリン、電離放射線、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの追加の治療剤を前記被験体に投与する工程を更に含む、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

それを必要としている被験体におけるニューロンDNA修復機能を強化する方法であって、APE1のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1酸化還元因子1 (APE1 / Ref - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項10】

前記APE1 / Ref - 1阻害剤が、3 - [(5 - (2 , 3 - ジメトキシ - 6 - メチル 1 , 4 - ベンゾキノイル)) - 2 - ノニル - 2 - プロピオン酸 (APX3330) 、 [(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N , N - ジエチルペンタンアミド] (APX2009) 、 (2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N - メトキシペンタンアミド] (APX2014) 、これらの薬学的に許容し得る塩及び薬学的に許容し得る溶媒和物、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記APE1 / Ref - 1阻害剤がAPX3330であり、前記被験体に約5 μM ~ 約50 μMのAPX3330を投与する、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

少なくとも1つの追加の治療剤を前記被験体に投与する工程を更に含む、前記追加の治療剤が白金薬剤、タキサン、ドキソルビシン、アルカロイド、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、エリブリン、電離放射線、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

それを必要としている被験体における化学療法誘発性末梢神経障害 (CIPN) を治療する方法であって、APE1のアミノ末端部分を選択的に阻害する、脱プリン/脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ1酸化還元因子1 (APE1 / Ref - 1) 阻害剤、その薬学的に許容し得る塩又は薬学的に許容し得る溶媒和物の有効量を前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項14】

前記APE1 / Ref - 1阻害剤が、3 - [(5 - (2 , 3 - ジメトキシ - 6 - メチル 1 , 4 - ベンゾキノイル)) - 2 - ノニル - 2 - プロピオン酸 (APX3330) 、 [(2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N , N - ジエチルペンタンアミド] (APX2009) 、 (2 E) - 2 - [(3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタレン - 2 - イル) メチリデン] - N - メトキシペンタンアミド] (APX2014) 、これらの薬学的に許容し得る塩及び薬学的に許容し得る溶媒和物、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項15】

タキサン、ドキソルビシン、アルカロイド、サリドマイド、レナリドミド、ボマリドミド、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、エリブリン、電離放射線、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの追加の治療剤を投与する工程をさらに含む、請求項13に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/27786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C07C 66/00, 235/78; C07D 295/185 (2018.01) CPC - A61K 31/12, 31/16, 31/19, 31/20, 31/21, 31/122, 31/165, 31/192, 31/495, 31/5375; C07C 66/00, 235/78; C07D 295/185		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2014/0126398 A1 (KELLEY, et al.) May 8, 2014; paragraphs [0008], [0025], [0093], [0140], [0158], [0171], [0174], [0177], [0182]	1-10, 12-16 11
Y	US 2003/0203960 A1 (HAUSHEER) October 30, 2003; paragraph [0024]	11
Y	BRAIN & BODY WORKS IN JUPITER, FL "Neurotoxicity Detoxification"; IEEE Transactions on Computing, Vol. 58, No. 10; Publication [online]. [retrieved 31 May 2018]. Retrieved from the Internet: <URL: https://www.drjohnsilva.com/neurotoxicity-detoxification/ >; pp 1-4; page 1, first paragraph.	1-2, 4-7, 9-10, 12-13, 15-16
<input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 August 2018 (08.08.2018)		Date of mailing of the international search report 29 AUG 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/27786

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-16; APX3330 (APE1/Ref-1 inhibitor), platinum drugs (additional therapeutic)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US18/27786

-***-Continuation of Box No. III - Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-16, APX3330 (APE1/Ref-1 inhibitor), platinum drugs (additional therapeutic) are directed toward methods comprising administering to a subject an effective amount of an apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor.

The methods will be searched to the extent they encompass APX3330 (first exemplary APE1/Ref-1 inhibitor), and platinum drugs (first exemplary additional therapeutic). Applicant is invited to elect additional APE1/Ref-1 inhibitor(s), and/or additional therapeutic(s) to be searched. Additional APE1/Ref-1 inhibitor(s), and/or additional therapeutic(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1, 2 (in-part), 3, 4, 5 (in-part), 6, 7 (in-part), 8, 9, 10 (in-part), 11, 12, 13 (in-part), 14, 15, 16 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass APX3330 (APE1/Ref-1 inhibitor), and platinum drugs (additional therapeutic). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an APE1/Ref-1 inhibitor encompassing APX2009 (APE1/Ref-1 inhibitor).

Groups II+, Claims 17, 18 and APX3330 (APE1/Ref-1 inhibitor) are directed toward a method of treating chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN).

The method can be searched to the extent it encompasses APX3330 (first exemplary APE1/Ref-1 inhibitor). Applicant is invited to elect additional APE1/Ref-1 inhibitor(s) to be searched. Additional APE1/Ref-1 inhibitor(s) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 17 and 18 (in-part) encompass this first named invention of Groups II+ and thus these claims can be searched with payment of a fee for the search of Groups II+, to the extent that they encompass APX3330 (APE1/Ref-1 inhibitor). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) can result in only the first claimed invention of groups II+ to be searched/examined. An exemplary election would be an APE1/Ref-1 inhibitor encompassing APX2009 (APE1/Ref-1 inhibitor).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include treating inflammation and chronic pain, not present in Groups II+; the special technical features of Groups II+ include treating chemotherapy-induced peripheral neuropathy, not present in Groups I+.

Groups I+ and II+ share the technical features including: a method of treating a subject, comprising administering to the subject an effective amount of an apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor, pharmaceutically acceptable salts or pharmaceutically acceptable solvates thereof, which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2014/0128398 A1 to Kelley et al. (hereinafter "Kelley'398").

Kelley'398 discloses a method of treating a subject, comprising administering to the subject an effective amount of an apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor (a method of treating a subject, comprising administering to the subject an effective amount of an apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor; paragraphs [0006], [0009], [0023], [0025]) which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1 (wherein the compound is APX3330 (which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1); paragraph [0023], wherein, based on paragraphs [0009], [0010] and Claim 2 of the instant application, since the compound disclosed by Kelley is the same compound claimed by Applicants, it possesses all of the qualities of said compound, including inhibiting the amino terminal portion of APE1).

No technical features are shared between the APE1/Ref-1 inhibitors and/or additional therapeutics of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a method of reducing neuronal sensitivity, enhancing neuronal DNA repair function, and treating inflammation and chronic pain in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject an effective amount of an apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor, pharmaceutically acceptable salts or pharmaceutically acceptable solvates thereof, which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1; these shared technical features are previously disclosed by Kelley'398 in view of the article 'Challenges and opportunities identifying therapeutic agents for chemotherapy-induced peripheral neuropathy resulting from oxidative DNA damage' by Kelley, et al. (hereinafter "Kelley'17").

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/27786

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

Kelley'398 discloses a method of enhancing neuronal DNA repair function (a method of enhancing neuronal DNA repair function; paragraphs [0007], [0025]) in a subject in need thereof (to an animal with an injury or defect (in a subject in need thereof); paragraphs [0025], [0131]) the method comprising administering to the subject an effective amount of an apurinic/aprimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor (administering to the subject an effective amount of APX3330 (an apurinic/aprimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor; paragraphs [0008], [0009], [0023], [0025]), which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1 (wherein the compound is APX3330 (which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1); paragraph [0023], wherein, based on paragraphs [0009], [0010] and Claim 2 of the instant application, since the compound disclosed by Kelley is the same compound claimed by Applicants, it possesses all of the qualities of said compound, including inhibiting the amino terminal portion of APE1).

Kelley'398 does not disclose a method of reducing neuronal sensitivity and treating inflammation and chronic pain.

Kelley'17 discloses wherein chemotherapy-induced peripheral neuropathy results in increased sensations of burning pain and hypersensitivity to touch (chemotherapy-induced peripheral neuropathy results in increased sensations of burning pain and hypersensitivity to touch; page 2, second paragraph); and wherein APX3330 inhibits redox signaling and enhances DNA repair in sensory neurons, and provides neuroprotection against the deleterious effects of anticancer treatment (wherein APX3330 inhibits redox signaling and enhances DNA repair in sensory neurons, and provides neuroprotection against the deleterious effects of anticancer treatment; page 3, third paragraph - fourth paragraph).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Kelley'398 to have included wherein the administration of APX3330 to a subject reduces neuronal sensitivity and treats inflammation and chronic pain, based on the disclosure of Kelley'17, in order to demonstrate the effectiveness of the compound at ameliorating a plurality of effects of chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its associated symptoms.

No technical features are shared between the APE1/Ref-1 inhibitors of Groups II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups II+ were considered to share the technical features including: a method of treating chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject an effective amount of an apurinic/aprimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor, pharmaceutically acceptable salts or pharmaceutically acceptable solvates thereof, which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1; these shared technical features are previously disclosed by Kelley'17, as above.

Kelley'17 discloses a method of treating chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) in a subject in need thereof (a method of treating chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) in a subject having CIPN and symptoms thereof (in need thereof); page 2, second paragraph; page 3, third paragraph - fourth paragraph) the method comprising administering to the subject an effective amount of an apurinic/aprimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor (the method comprising administering to the subject an effective amount of APX3330 (an apurinic/aprimidinic endonuclease 1 redox factor 1 (APE1/Ref-1) inhibitor; page 3, third paragraph - fourth paragraph), which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1 (wherein the compound is APX3330 (which selectively inhibits the amino terminal portion of APE1); page 3, fourth paragraph, wherein, based on paragraphs [0009], [0010] and Claim 2 of the instant application, since the compound disclosed by Kelley is the same compound claimed by Applicants, it possesses all of the qualities of said compound, including inhibiting the amino terminal portion of APE1).

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Kelley'398 and Kelley'17 references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 33/24 (2019.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
	A 6 1 K 31/282	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 ケリー マーク アール .

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 2 インディアナポリス インディアナ アヴェニュー
5 1 8 インディアナ ユニバーシティ リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション内

(72)発明者 フェーレンバッハー ジル

アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 2 インディアナポリス インディアナ アヴェニュー
5 1 8 インディアナ ユニバーシティ リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション内

F ターム(参考) 4C084 AA17 MA02 NA14 ZA08 ZA21 ZB11 ZC01 ZC41 ZC75
4C086 AA01 AA02 HA12 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA08 ZA21 ZB11
ZC01 ZC41 ZC75
4C206 AA01 AA02 DA12 HA16 JB16 KA01 MA01 MA02 MA04 NA14
ZA08 ZA21 ZB11 ZC01 ZC41 ZC75