

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4929436号
(P4929436)

(45) 発行日 平成24年5月9日(2012.5.9)

(24) 登録日 平成24年2月24日(2012.2.24)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 31/55 (2006.01)

A 6 1 K 31/55

A 6 1 K 31/352 (2006.01)

A 6 1 K 31/352

A 6 1 K 31/36 (2006.01)

A 6 1 K 31/36

A 6 1 K 31/473 (2006.01)

A 6 1 K 31/473

A 6 1 K 31/4745 (2006.01)

A 6 1 K 31/4745

請求項の数 8 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-566662 (P2001-566662)
 (86) (22) 出願日 平成13年3月15日 (2001.3.15)
 (65) 公表番号 特表2003-526667 (P2003-526667A)
 (43) 公表日 平成15年9月9日 (2003.9.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/008480
 (87) 国際公開番号 W02001/068098
 (87) 国際公開日 平成13年9月20日 (2001.9.20)
 審査請求日 平成20年3月11日 (2008.3.11)
 (31) 優先権主張番号 60/189,699
 (32) 優先日 平成12年3月15日 (2000.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502332795
 ケムジェネックス・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
 CHEMGENEX Pharmaceuticals, Inc.
 アメリカ合衆国94025カリフォルニア州メンロ・パーク、エディソン・ウェイ3475番、スウィート・エム
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鯨島 睦
 (74) 代理人 100126778
 弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セファロタキシンアルカロイド組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固形腫瘍の増殖を減少または抑制するのに使用するための医薬の製造における、ホモハリングトニンおよび抗増殖性剤の使用であって、

該抗増殖性剤がシスプラチン、シタラピン、カンプトテシン、ビンブラスチン、エトポシド、5-フルオロウラシル、アモナフィド、コルチシン、またはゲニステインである使用。

【請求項 2】

医薬はホモハリングトニン薬物および抗増殖性薬物を含み、該ホモハリングトニン薬物は抗増殖性薬物の投与前に投与する、請求項 1 記載の使用。

【請求項 3】

医薬はホモハリングトニン薬物および抗増殖性薬物を含み、該ホモハリングトニン薬物は抗増殖性薬物の投与の間に投与する、請求項 1 記載の使用。

【請求項 4】

医薬はホモハリングトニン薬物および抗増殖性薬物を含み、該ホモハリングトニン薬物は抗増殖性薬物の投与後に投与する、請求項 1 記載の使用。

【請求項 5】

該医薬を用いた該固形腫瘍についてのモジュレートは、該抗増殖性剤を単独で用いた場合よりも大きい、請求項 1 記載の使用。

【請求項 6】

ホモハリングトニンおよび抗増殖性剤を含有する、固形腫瘍の増殖を減少または抑制するのに使用するための医薬組成物であって、

該抗増殖性剤がシスプラチン、シタラビン、カンプトテシン、ビンブラスチン、エトポシド、5 - フルオロウラシル、アモナフィド、コルチシン、またはゲニステインである医薬組成物。

【請求項 7】

該固形腫瘍の増殖の減少または抑制は腫瘍の大きさが 4 倍になる時間の増加を含む、請求項 1 記載の使用。

【請求項 8】

増殖の減少または抑制が相乗的である、請求項 1 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、細胞増殖性疾患を有する宿主を処置するために、セファロタキシンアルカロイドを抗増殖性剤と一緒に使用することに関する。

【0002】

(背景技術)

通常の抗新生物剤に関係する抗腫瘍効果の速度および持続時間を増大させるために、現在使用されている抗増殖性剤の効能をモジュレートすることにかんがりの関心が存在する。

【0003】

癌の処置に使用される通常の抗増殖性剤は、(1) 結合し、アルキル化し、鎖の開裂を誘発し、塩基対間でインターカレートし、または DNA および RNA の無傷の状態 (integrity) および機能性を維持する酵素に影響を及ぼすことによって、核酸高分子の無傷の状態に影響を及ぼす化学的な化合物；(2) タンパク質と結合して酵素的な作用を阻害し (例えば、抗代謝性剤)、または細胞の無傷の状態に必要な構造タンパク質の機能を阻害する (例えば、抗チューブリン剤) 化学的な剤として広く分類されている。いくつかの癌の処置において有用であると同定されている他の化学的な化合物としては、例えば乳癌および精巣癌の処置のためにステロイド性ホルモンを遮断する薬剤、光化学的に活性な剤、放射線増感剤および保護剤を含む。

【0004】

本発明の最も関心のあるものは、癌細胞の遺伝的な構造の無傷の状態に直接に影響を及ぼす化合物である。核酸高分子 (例えば、DNA および RNA) は、抗癌薬剤の主要な標的である。アルキル化剤 (例えば、窒素マスタード、ニトロソウレア、アジリジン含有化合物) は DNA を直接に攻撃する。金属配位化合物 (例えば、シスプラチンおよびカルボプラスチン) は同様に、核酸構造を直接に攻撃し、細胞が修復するのが困難な病変となり、その後に細胞死を生じ得る。他の核酸に影響を及ぼす化合物としては、アントラサイクリン分子 (例えば、DNA 高分子の核酸塩基対の間にインターカレートするドキソルビシン、核酸鎖の開裂を生じるプレオマイシン)、および偽塩基ヌクレオシドを含む。偽塩基ヌクレオシドとしては、核酸高分子構造に不適当に取り込まれ、最終的に未熟な DNA 鎖の終結を生じる、ピリミジンおよびプリンヌクレオシドアナログを含む。ゲノムの無傷の状態および機能性に影響を及ぼすある酵素はまた、特定の化学的な剤によって癌細胞中で抑制され、そして癌細胞の死を生じ得る。これらのものとしては、例えばリボヌクレオチドレダクターゼに影響を及ぼす酵素 (例えば、ヒドロキシウレアおよびゲムシタビン)、トポイソメラーゼ I (例えば、カンプトテシン) およびトポイソメラーゼ II (例えば、エトポシド) を含む。

【0005】

これらの DNA を標的とする抗癌剤の中で最も広く使用されている剤の 1 つは、シスプラチン (これは、シス - ジアミンジクロロ白金 II、CDDP) である。この化合物は、いくつかのヒトの癌 (例えば、精巣癌、小細胞肺癌、膀胱癌、頸部癌および頭頸部 (head and neck) 癌を含む) に対して活性である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

現在承認されている抗増殖性剤の多数の形態の癌に対する臨床的な活性が知られ得るが、腫瘍応答速度の改善、応答の持続期間の改善、究極的には患者の生存率の改善についてなお求められている。本明細書に記載の発明は、セファロタキシンアルカロイドおよびそのアナログ（例えば、ホモハリントニン（HHT）を含み、このものは化学療法剤、特に核酸ポリマー（例えば、DNA）の無傷の状態に影響を及ぼす剤の抗腫瘍効果を増強することができる）の新規な使用を示す。

【 0 0 0 7 】

（発明の概要）

本発明は、細胞増殖性疾患、特に異常増殖を有する宿主の処置を提供する。本発明の方法において、医薬的に許容し得るセファロタキシンおよび抗増殖性剤を、該細胞増殖性疾患をモジュレートするのに十分な量で投与する。

10

【 0 0 0 8 】

（発明の詳細な記載）

本発明は、細胞増殖性疾患（特に、異常増殖）を有する宿主の処置する方法およびその組成物を提供する。本発明の方法において、医薬的に許容し得るセファロタキシンを、抗増殖性剤と一緒に投与（全身投与が好ましい）して、抗癌効果を改善する。好ましい態様において、セファロタキシンは化学増強効果を示す。

【 0 0 0 9 】

該剤は、細胞増殖性疾患をモジュレートするのに十分な量で与える。ある態様において、細胞増殖性疾患のモジュレートは腫瘍の増殖の減少を含む。別の態様において、疾患のモジュレートは腫瘍の増殖の抑制を含む。別の態様において、細胞増殖性疾患のモジュレートは腫瘍の大きさを4倍にする時間の増加（以下に記載する）を含む。別の態様において、細胞増殖性疾患のモジュレートは化学増強効果を含む。別の態様において、疾患のモジュレートは化学増感効果を含む。他の態様において、疾患のモジュレートは細胞分裂停止を含む。更に他の態様において、疾患のモジュレートは細胞毒性効果を含む。

20

【 0 0 1 0 】

化学増強剤または抗増殖性剤を単独で使用する場合の活性と比べて加成よりも大きい様式で公知の抗増殖性剤の効果を増大させる場合に、化学的な剤は「化学増強剤」である。ある場合に、化学増感効果を観察することができる。これは、単独で使用する場合に有意な抗腫瘍効果を示さないが、抗増殖性剤を単独で使用する場合と比較して、抗増殖性剤の抗腫瘍効果を改善するであろう剤の使用による効果と定義される。

30

【 0 0 1 1 】

本明細書で使用する用語「セファロタキシン」とは、中国常緑樹のアルカロイド誘導体、セファロタキス フルテリ（*Cepharotaxus fortunei*）およびそのアナログを含む化学群の全ての構成要素を含む。セファロタキシン群は、化学構造が図1の環構造であるものとして定義される。

【 0 0 1 2 】

セファロタキシンアナログは、 R_1 および R_2 に置換基を有する図1に示す構造によって更に定義されるが、このものに限定されない。 R_1 および / または R_2 としては、例えばエステル（例えば、ハリントニン、イソハリントニン、ホモハリントニン、デオキシハリントニン、アセチルセファロタキシンなどを含む）を含む。表1は、これらのアナログについてのいくつかの R_1 および R_2 の構造を示す。 R_1 および R_2 置換基は典型的に、生物学的な活性および医薬的な属性（例えば、生物学的な適合性または安定性）を増大するか、または毒性を減少するのに使用する。ある態様において、 R_1 および / または R_2 としては、例えばアルキル置換基（例えば、メチル、エチル、プロピルなど）を含む。別の態様において、 R_1 および / または R_2 としては、例えばエステル（例えば、メトキシ、エトキシ、ブトキシなど）を含む。しかしながら、 R_1 および R_2 は本発明の範囲内で上記の例に限定されるものではない。

40

【表1】

50

表 1	R1	R2	
イソハリントニン	-OCH ₃	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CHCO}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{CO}_2^- \end{array}$	
ハリントニン	-OCH ₃	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^- \end{array}$	10
アセチルセファロタキシン	-OCH ₃	CH ₃ CO ₂ ⁻	
ホモハリントニン	-OCH ₃	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^- \end{array}$	20

【 0 0 1 3 】

セファロタキシンアナログは更に化学的な改良物である。セファロタキシンアナログの具体的な例は、ホモハリントニン（これは、セファロタキシンの4 - メチル - 2 - ヒドロキシ - 2 - (4 - ヒドロキシ - 4 - メチルペンチル) ブタン二酸エステルである) を挙げられる (図 2) 。

【 0 0 1 4 】

本明細書で使用する、抗増殖性剤は細胞分裂停止または細胞毒性を誘発する化合物である。「細胞分裂停止」とは細胞の増殖の抑制であり、一方で「細胞毒性」とは細胞を殺すことと定義される。抗増殖性剤の具体的な例としては、抗代謝性剤（例えば、メトトレキサート、5 - フルオロウラシル、ゲムシタビン (gemcitabine)、シタラビン (cytarabine)、ペントスタチン (pentostatin)、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、L - アスパラギナーゼ、ヒドロキシウレア、N - ホスホノアセチル - L - アスパラギン酸 (PALA)、フルダラビン (fludarabine)、2 - クロロデオキシアデノシンおよびフロキシウリジン (floxuridine)) ; 構造タンパク質剤（例えば、ピンカルカロイドであって、これはピンblasチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ビノレルビン (vinorelbine)、パクリタセルおよびコルチシンを含む) ; 抗生物質（例えば、ダクチノマイシン (dactinomycin)、ダウノルビシン (daunorubicin)、ドキソルビシン (doxorubicin)、イダルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン (paclimycin) およびミトマイシン (mitomycin)) ; ホルモン拮抗薬（例えば、タモキシフェンおよび黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アナログ) ; 核酸損傷剤（例えば、アルキル化剤であるメクロレタミン (mechlorethamine)、シクロホスファミド、イフォスファミド (ifosfamide)、クロラムブシル (chlorambucil)、デカルバジン (decarbazine)、メチルニトロソウレア、セムスチン (semustine) (メチル - CCNU)、クロロゾトシン、ブスルファン (busulfan)、プロカルバジン、メルファラン、カルムスチン (carmustine) (BCNU)、ロモムスチン (lomustine) (CCNU) およびチオテパ (tiotepa)) ; インターカレート剤（例えば、ドキソルビシン (doxorubicin)、ダクチノマイシン (dactinomycin)、ダウノルビシン (daunorubicin) およびメトキサントロン (mitoxantrone)) ; トポイソメラーゼインヒビター（例えば、エトポシド、カンプトテシンおよびテニポシド) および金属配位錯体（例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン) を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

以下の実施例を例示するが、これらは限定するものではない。

【 0 0 1 6 】

実施例

実施例 1

ホモハリントニン（HHT）によるシスプラチン（CDDP）の化学増強作用

移植可能な実験用マウスの繊維肉腫（ 2×10^5 RIF-1細胞）を、3ヶ月齢の雌性C3Hマウス（チャールズリバー（Charles River）、ホリスター（Holister）、CA）の側腹部で皮内増殖させた。腫瘍の大きさが約 100 mm^3 の大きさに達した後に、該マウスをランダムに各々の群（群毎に4匹）に割り当てた。

10

【 0 0 1 7 】

実験用の組成物を表2に記載の通り製造した。

【表2】

表 2

薬物	用量	溶媒	供給源
ホモハリントニン	2 mg/kg	DMSO	NCI
シスプラチン	4 mg/kg	注射用の水	デビッドブルラボ社

20

【 0 0 1 8 】

化学増強剤であるホモハリントニンをNCIから入手し、このものをDMSO中で適当な濃度とした。シスプラチン（このものは、デビッド・ブルラボ社製、ムルグレーブ、豪州、製品番号5201844X）を、注射用の水中で適当な濃度とした。該組成物を100ミリリットルの容量で全身（すなわち、腹腔腔内的、i.p.）注射した。群3の処置の場合には、該化学増強剤であるホモハリントニンを、シスプラチンの注射30分前に注射した。処置後に、腫瘍の3垂直方向をノギス測定することによって該腫瘍の増殖を週に3回追跡して、式：

【数1】

$$V = \frac{1}{6} \times D_1 \times D_2 \times D_3$$

（式中、 $D_1 \sim D_3$ はmm単位である）

から腫瘍の大きさを算出した。

30

【 0 0 1 9 】

0日目の処置の大きさの4倍のサイズ（TVQT）に達するか、または処置の30日後のいずれかが最初に来るまで、該腫瘍を追跡した。該データを、「腫瘍の大きさを4倍にする時間（TVQT）」の平均値または「遅延」として表わす。平均TVQTは、個々の腫瘍を初期の処置日での大きさの4倍にまで増殖するのに必要な平均日数である。該「遅延」とは、処置群の平均的な大きさを4倍にまで増殖するのに必要な日数の中央値から、コントロール群の平均的な大きさを4倍にまで増殖するのに必要な日数の中央値を引いたものである。該データを、未処置のコントロール群の場合に対して処理腫瘍の腫瘍の大きさを4倍とする時間の比率（TVQT / TVQT）としても表わす。

40

【 0 0 2 0 】

該データを、以下の表3および図3に示す。

【表3】

表 3

群	処置	用量 (mg/kg)	平均 TVQT ± S.E.	TVQT/ CTVQT	中央値 (TVQT)	遅延 (日数)
1	未処置のコントロール	-	8.3 ± 0.4	1.0	8.6	0.00
2	ホモハリントニン	2	10.1 ± 0.4	1.2	9.8	1.20
3	ホモハリントニン →シスプラチン	2 → 4	14.9 ± 0.8	1.8	14.8	6.17
4	シスプラチン	4	12.9 ± 1.1	1.5	12.5	3.83

群3の矢印(→)は、ホモハリントニン投与の30分後に投与することを示す。

10

【0021】

表3の結果は、シスプラチン単独(群4)またはホモハリントニン単独(群2)を使用する場合と比較して、両方の化合物を腫瘍を有するマウスに使用した場合に(群3)、加成性よりも大きい効果が観察されたことで、化学増強剤であるホモハリントニンの使用によって、シスプラチンの抗増殖性効果が増大されることを示している。

【0022】

実施例2

C3HマウスでのRIF-1腫瘍の増殖における、ホモハリントニン単独および他の化学療法剤との組み合わせの効果

RIFマウス繊維肉腫モデルを、ホモハリントニン単独および様々な抗増殖性剤との組み合わせによる抗腫瘍活性を評価するのに使用した。使用した該抗増殖性剤としては、例えば核酸(例えば、DNA)の無傷の状態に影響を及ぼす剤(例えば、シスプラチン、シタラビン、カンプトテシン、エトポシド、5-フルオロウラシルまたはアモナフィド)、構造タンパク質に影響を及ぼす剤(例えば、パクリタキセル、ビンブラスチンまたはコルチシン)または細胞質内酵素(例えば、ゲニステイン)を含む。

20

【0023】

ホモハリントニン(HHT-NCI)を粉末としてNCIから入手した。ホモハリントニン(HHT-CLin)はハングホウ・ミンシェング医薬グループ(Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group)(ハングホウ(Hangzhou), 中国)(このものは、水を用いて予め1mg/mLまで希釈している)から1mLバイアルで入手した。注射用のシスプラチン、USPは、凍結乾燥した粉末としてデビッド・ブルラボ社(David Bull Labs)(ムルグレーブ(Mulgrave)、豪州)(製品番号5201844X)から入手した。パクリタキセルは、ブリストルマイヤーズスクイブ社(Bristol Myers Squibb Co.)(プリンストン、NJ)(このものは、クレマホルCremaphor)中で予め6mg/mLまで希釈している)(製品番号は9J16241, 2001年9月輸出(exp.))から入手した。シタラビンは、ベッドフォード(Bedford, OH)社(製品番号は86968A)(2002年6月輸出)から凍結乾燥した粉末として入手した。カンプトテシンは、ベーリンガーインゲルハイム社(Boehringer-Ingelheim)(製品番号は142088)から粉末として入手した。ビンブラスチンは、ベッドフォード社(ベッドフォード、OH)(製品番号112647)から凍結乾燥した粉末として入手した。エトポシドは、ファルマシア(Pharmacia)(カラマゾ(Kalamazoo, MI)(製品番号ETA013)(1999年5月輸出)(このものは、予め20mg/mLに希釈した液体である)から入手した。5-フルオロウラシルはファルマシア(Pharmacia)(カラマゾ(Kalamazoo, MI)(製品番号FFA191)(2000年7月輸出)(このものは、予め50mg/mLに希釈した液体である)から入手した。アモナフィドは、ペンタバイオテック社(Penta Biotech)(ユニオンシティー(Union City)、CA)(製品番号039-01)から粉末として入手した。コルチシンは、シグマ社(Sigma)(セントルイス、MO)(製品番号55H0685)から粉末として入手した。ゲニステインは、ケムコン(ChemCon)GmbH社(フレブルグ(Freiburg), Br.)(製品番号CC-6700-26)から粉末として入手した。DMISOは、シグマ社(セントルイス、MO)(製品番号80K3695)から入手した。注射用の0.9%塩化ナトリウム、USP(サリン)は、アボットラボ社(Abbott Laboratories)(製品番号55-19

30

40

50

9-DK) から入手した。注射用の滅菌した水、U S P (W F I) は、リフォメド社 (Lyphomed) (製品番号390849) から入手した。

【 0 0 2 4 】

製剤：試験調製物 (処置群) を表 4 にまとめる。

製剤 1 ~ 4 の調製については、H H T - N C I をバイアル中で秤量し、このものを表示濃度で D M S O 中に溶解した。

【 0 0 2 5 】

製剤 5 については、含有量が 1 0 m g バイアルの凍結乾燥させた C D D P (注射用のシスプラチン) を W F I (1 0 m L) と一緒に再懸濁して、1 m g / m L の C D D P 懸濁液を得た。

10

【 0 0 2 6 】

製剤 6 については、パクリタキセル (このものは、クレマホール / E L および脱水アルコール中に予め 6 m g / m L まで希釈している) を更に W F I を用いて希釈して 3 . 3 m g / m L とした。

【 0 0 2 7 】

製剤 7 および 8 は、H H T - C l i n を更に W F I を用いて表示濃度にまで希釈することによって調製した。製剤 9 は未希釈の H H T - C l i n であり、入手したままで使用した。

【 0 0 2 8 】

製剤 1 0 は、W F I (1 m L) を凍結乾燥させた粉末であるシタラピン (1 0 0 m g) に加えることによって調製した。

20

【 0 0 2 9 】

製剤 1 1 は、濃度が 1 m g / m L であるカンプトテシンに D M S O を加えることによって調製した。

【 0 0 3 0 】

製剤 1 2 は、注射用の 0 . 9 % 塩化ナトリウムを凍結乾燥させたビンブラスチン粉末 (1 0 m g バイアル) に加えることによって調製した。

【 0 0 3 1 】

製剤 1 3 ~ 1 7 は、適当な量の各々の試験剤をサリンに希釈させることによって調製した (1 3 ~ 2 . 5 m g / m L のエトポシド、1 4 ~ 7 . 5 m g / m L の 5 - フルオロウラシル、1 5 ~ 7 . 5 m g / m L のアモナフィド、1 6 ~ 2 . 5 m g / m L のコルチシン、1 7 ~ 3 . 7 5 m g / m L の 5 - フルオロウラシル) 。

30

【 0 0 3 2 】

製剤 1 8 は、ゲニステイン (1 5 m g) を D M S O (1 m L) に希釈させることによって調製した。

【 0 0 3 3 】

動物：雌性 C 3 H マウス (チャールズ・リバー・ラボ社、ホリスター、C A) (これは、約 3 ヶ月齢) を研究に使用した。平均体重は約 2 5 g であった。動物をアイソレーターゲージ中、1 2 時間の明 - 暗周期で保った。食糧および水は自由に与えた。

【 0 0 3 4 】

腫瘍：R I F - 1 マウス繊維肉腫セルラインを、加湿した 5 % C O ₂ インキュベート中、3 7 °C でインビトロ培地 (このものは、2 0 % 胎児ウシ血清を用いて補足したウェイモウス (Waymouth) 培地) 中で保った。ログ期の R I F - 1 細胞をトリプシン処理し、細胞培養フラスコから収集して濃度を 4 × 1 0 ⁶ 細胞 / m L とした。次いで、このものを各々のマウスの両方の側腹部に容量が 5 0 μ L (これは、注射 1 回当たり 2 × 1 0 ⁵ 細胞に相当する) で皮内注射した。9 日後に、腫瘍は大きさが約 1 0 0 m m ³ に達し、該動物を異なる処置群にランダム化した。

40

【 0 0 3 5 】

処置群：処置群を表 4 にまとめる。4 ~ 5 匹の動物を各々の処置群に割り当てた。腹膜腔内注射の容量は 1 0 0 μ L とした。対側性の腫瘍 (このものは未処置のコントロールとして

50

機能する)を有する各々の動物の2つの腫瘍のうちの1つに、腫瘍内注射(50 μL)を行った。経口投与の容量は100 μLとした。該2つの試験剤を用いる組み合わせ処置を、2つの別々の注射として投与した。この場合に、2番目は1番目の直後または30分後のいずれかとした。

【0036】

腫瘍の大きさを4倍にする時間の評価：

腫瘍をベルニエル(Vernier)ノギスを用いて、22日まで週に3回測定した。腫瘍の大きさ(立方ミリメートル、mm³)を、式：

【数2】

$$V = \pi / 6 \times D_1 \times D_2 \times D_3$$

(式中、D₁ - D₃は、測定された垂直方向の直径(単位はmmである)である)に従って算出した。

【0037】

腫瘍の大きさを4倍にする時間(TVQT)(これは、腫瘍の大きさを最初の大きさ(処置時)の4倍にまで増殖するのに必要とされる時間と定義する)を、研究の終わりとして使用した。該TVQTを各々の処置群について測定し、平均値±標準誤差(SE)として表わした(単位は日数)。

【0038】

ホモハリントニンを単剤としてまたは他の化学療法剤と組み合わせて投与することによる、抗腫瘍活性または腫瘍増殖のモジュレート(これは、遅延した腫瘍の増殖、すなわちTVQT値の増加によって測定される)を、表5に示す。

【0039】

8個の別々の実験からの結果を本研究に含める。実験E010において、未処置のコントロール動物における腫瘍は、平均して7.2日で大きさが4倍となった。NCI製のホモハリントニンの5mg/kgを腹腔腔内投与する場合は、TVQTが14.5日であった。該用量でのホモハリントニンの腫瘍内投与する場合は、TVQTが15.6日であった。

【0040】

実験E011において、未処置のコントロール動物の場合は大きさが平均8.3日で4倍となった。一方で、NCI製のホモハリントニンを2mg/kgで腹腔腔内投与する場合には、平均TVQTが10.1日まで延びた。また、CDDPを更に腹腔腔内投与する場合には、平均TVQTが14.9日まで延びた。一方で、パクリタキセル(10mg/Kg)を単独で用いる場合には、TVQTが8.8日であった。ホモハリントニン(2mg/Kg)を加えることにより、TVQTは変わらなかった。このことにより、ホモハリントニン単独の場合よりも低いコンビナトリアル活性を有する唯一の剤はパクリタキセルであった。

【0041】

ホモハリントニン(ハングハウ・ミンシェング医薬グループ(ハングハウ、中国)製)(このものは、滅菌した水中で2mg/Kgまたは4mg/Kgのいずれかで製剤化する)を、組み合わせ研究の残りとして使用した。

【0042】

2mg/Kgの場合に、E026ではホモハリントニンは平均TVQTが10.4日であり、一方で未処置のコントロールでは7.2日で4倍となった。シスプラチン(4mg/Kg)をホモハリントニン(2mg/Kg)と組み合わせ投与する場合には、TVQTが11.1日であり、このことはホモハリントニン単独(TVQT=10.4日)またはシスプラチン単独(TVQT=9.4日)の場合よりも長かった。

【0043】

実験0430の場合に、未処置のコントロールでは6.7日で4倍となった。ホモハリントニン処置(2mg/Kg)では、TVQTが7.9日であり、カンプトテシンまたはシタラピンを使用する場合には、TVQTがそれぞれ9.4日または7.6日であった。ホ

10

20

30

40

50

モハリントニン (2 m g / K g) をカンプトテシン (6 m g / K g) またはシタラビン (4 0 0 m g / K g) と組み合わせ投与する場合には、T V Q T がそれぞれ 1 0 . 1 日および 8 . 6 日まで増大した。

【 0 0 4 4 】

E 0 3 2 の場合に、未処置のコントロールでは 6 . 5 日で 4 倍となった。ホモハリントニン (4 m g / K g) では平均 T V Q T は 8 . 5 日であった。ホモハリントニン (4 m g / K g) を 5 - フルオロウラシル (3 0 m g / K g) と組み合わせ投与する場合には、T V Q T が 1 7 . 9 日であり、それに対して 5 - フルオロウラシル単独では、1 3 . 6 日であった。ホモハリントニン (4 m g / K g) をビンブラスチン (2 m g / K g) と組み合わせ投与する場合には、T V Q T が 1 0 . 9 日であり、それに対してビンブラスチン単独では 8 . 6 日であった。ホモハリントニン (4 m g / K g) およびシスプラチン (4 m g / K g) またはアモナフィド (3 0 m g / K g) を組み合わせ投与する場合には、T V Q T がそれぞれ 1 0 . 4 日または 1 0 . 2 日であり、それに対してそれら剤の単独の場合ではそれぞれ 9 . 9 日および 7 . 6 日であった。ホモハリントニンをエトボシド (1 0 m g / K g) と組み合わせ投与する場合には、T V Q T が 8 . 7 日であり、一方でエトボシド単独の場合では 8 . 5 日であった。

【 0 0 4 5 】

E 0 3 3 の場合に、コルチシン (1 0 m g / K g) を経口投与する場合では、T V Q T が 6 . 3 日であった。一方で、未処置のコントロールおよびホモハリントニン (4 m g / K g) の場合には、T V Q T がそれぞれ 7 . 8 日および 8 . 3 日であった。ホモハリントニンをこれらの用量でのコルチシンと組み合わせる場合には、T V Q T が 9 . 4 日まで増大した。

【 0 0 4 6 】

E 0 3 6 の場合に、ゲニステイン (6 0 m g / K g) をホモハリントニン (4 m g / K g) と組み合わせる場合には、T V Q T が 9 . 2 日であった。これは、ゲニステイン単独の場合 (7 . 1 日) よりも大きかった。

【 0 0 4 7 】

以下に記載する通り、いくつかの群で動物の死が観察された。N C I から入手して D M S O 中で 1 . 2 5 m g / m L に製剤化したホモハリントニンの処置後では、4 匹のマウス中、3 匹が死亡した。この製剤を腫瘍内で与えた後では、5 匹のマウス中、2 匹が死亡した。D M S O 中で 2 . 5 m g / m L に製剤化した同様なホモハリントニンの処置後では、4 匹のマウス中、4 匹が死亡した。ホモハリントニンの D M S O (0 . 5 m g / m L) をパクリタキセル (2 . 5 m g / m L) と組み合わせる場合には、4 匹のマウス中、2 匹が死に至った。また、ホモハリントニンの D M S O (0 . 5 m g / m L) をシスプラチン (1 m g / m L) と組み合わせる場合には、4 匹のマウス中、1 匹が死に至った。ホモハリントニン (1 m g / m L) をビンブラスチン (0 . 5 m g / m L) と組み合わせる場合には、該処置を与えた 4 匹のマウス中、1 匹が死に至った。また、ホモハリントニン (1 m g / m L) およびゲニステイン (1 5 m g / m L) の組み合わせの場合には、5 匹のマウス中、2 匹が死に至った。

【 0 0 4 8 】

まとめると、R I F - 1 マウスの繊維肉腫モデルにおいて、ホモハリントニンの腹腔内投与は抗腫瘍活性を有し、すなわち腫瘍の増殖のモジュレートを有していた。ホモハリントニンをシスプラチン、シタラビン、カンプトテシン、ビンブラスチン、エトボシド、5 - フルオロウラシル、アモナフィド、コルチシンおよびゲニステインと組み合わせで腹腔内投与した場合には、ホモハリントニン単独または個々の試験剤よりも大きい抗腫瘍活性レベルを有していた。最善のコンビナトリアル活性は、5 - フルオロウラシル、アモナフィドおよびビンブラスチンを使用する場合であった。ホモハリントニンをパクリタキセルと組み合わせで投与した場合には、ホモハリントニン単独の場合よりも小さい抗腫瘍活性を有していた。N C I から入手して D M S O 中で製剤化したホモハリントニンは、ある程度の致死毒性を示し、一方でハングハウ・ミンシェング医薬グループ (ハングハウ、中

10

20

30

40

50

国)から入手し、ヒト使用のための滅菌した水中で製剤化したホモハリントニンは、使用した用量では致死毒性を示さなかった。

【表 4】

表 4
処置群のまとめ

製剤	処置	濃度 (mg/mL)	投与経路	注射容量 (μ L)
1	HHT-NCI の DMSO	1.25	IP	100
2	HHT-NCI の DMSO	2.5	IP	100
3	HHT-NCI の DMSO	2.5	IT	50
4	HHT-NCI の DMSO	0.5	IP	100
5	CDDP の WFI	1	IP	100
6	パクリタキセルの WFI	2.5	IP	100
7	HHT-Clin の WFI	0.5	IP	100
8	HHT-Clin の WFI	0.25	IP	100
9	HHT-Clin の WFI	1	IP	100
10	シタラビンの WFI	100	IP	100
11	カンプトテシンの DMSO	2.5	IP	100
12	ビンブラスチンのサリン	0.5	IP	100
13	エトポシドのサリン	2.5	IP	100
14	5-フルオロウラシルの サリン	7.5	IP	100
15	アモナフィドのサリン	7.5	IP	100
16	コルチシンのサリン	2.5	PO	100
17	5-フルオロウラシルの サリン	3.75	IP	100
18	ゲニステインの DMSO	15	IP	100

【表 5】

表 5

C3HマウスのRIF-1腫瘍増殖における、ホモハリントニンの効果および
ホモハリントニンと他の化学療法剤との組み合わせの効果

実験番号	製剤	処置	腫瘍の数	TVQT (日) (平均 ± SE)
E010	-	未処置コントロール	8	7.2 ± 0.1
E010	1	HHT-NCI (5 mg/Kg)	2*	14.5 ± 0.9
E010	2	HHT-NCI (10 mg/Kg)	0*	全て死亡
E010	3	HHT-NCI (5 mg/Kg)	3*	15.6 ± 1.8
E011		未処置コントロール	8	8.3 ± 0.4
E011	4	HHT-NCI (2 mg/Kg)	8	10.1 ± 0.4
E011	5	CDDP (4 mg/Kg)	8	12.9 ± 1.1
E011	4,5	HHT-NCI-30'-CDDP	6*	14.9 ± 0.8
E011	6	パクリタキセル (10 mg/Kg)	8	8.8 ± 0.4
E011	4,6	HHT-30'-パクリタキセル	4*	8.8 ± 0.4
E026	-	未処置コントロール	8	7.4 ± 0.3
E026	7	HHT-Clin (2 mg/Kg)	8	10.4 ± 1.0
E026	5	CDDP (4 mg/Kg)	8	9.4 ± 0.5
E026	7,5	HHT-Clin + CDDP	8	11.1 ± 0.4
E026	7,5	HHT-Clin-30'-CDDP	8	10.1 ± 0.4
E028	-	未処置コントロール	8	8.7 ± 0.5
E028	8	HHT-Clin (1 mg/Kg)	8	9.2 ± 0.7
E028	9	HHT-Clin (4 mg/Kg)	8	10.1 ± 0.4
E030	-	未処置コントロール	8	6.7 ± 0.4
E030	7	HHT-Clin (2 mg/Kg)	8	7.9 ± 0.3
E030	10	シタラビン (400 mg/Kg)	8	7.6 ± 0.2
E030	7,10	HHT-Clin + シタラビン	8	8.6 ± 0.4

【表 6】

E030	11	カンプトテシン (6 mg/Kg)	8	9.4 ± 0.4
E030	7,11	HHT-Clin + カンプトテシン	8	10.1 ± 0.6
E032	-	未処置コントロール	8	6.5 ± 0.6
E032	9	HHT-Clin (4 mg/Kg)	8	8.5 ± 0.5
E032	5	CDDP (4 mg/Kg)	8	9.9 ± 0.6
E032	9,5	HHT-Clin + CDDP	8	10.4 ± 0.4
E032	12	ビンブラスチン (2 mg/Kg)	8	8.6 ± 0.4
E032	9,12	HHT-Clin + ビンブラスチン	6*	10.9 ± 0.4
E032	13	エトポシド (10 mg/Kg)	8	8.5 ± 1.0
E032	9,13	HHT-Clin + エトポシド	8	8.7 ± 0.5
E032	14	5-フルオロウラシル (30 mg/Kg)	8	13.6 ± 1.9
E032	9,14	HHT-Clin + 5-フルオロウラシル	8	17.9 ± 0.7
E032	15	アモナフィド (30 mg/Kg)	8	7.6 ± 0.4
E032	9,15	HHT-Clin + アモナフィド	8	10.2 ± 0.5
E033	-	未処置コントロール	8	7.8 ± 0.6
E033	9	HHT-Clin (4 mg/Kg)	8	8.3 ± 0.4
E033	16	コルチシン (10 mg/Kg)	8	6.3 ± 0.3
E033	9,16	HHT-Clin + コルチシン	8	9.4 ± 0.5
E033	17	5-フルオロウラシル (15 mg/Kg)	8	6.7 ± 0.4
E033	9,17	HHT-Clin + 5-フルオロウラシル	8	8.6 ± 0.3
E036	-	未処置コントロール	8	6.8 ± 0.4
E036	18	ゲニステイン (60 mg/Kg)	8	7.1 ± 0.4
E036	9,18	HHT-Clin + ゲニステイン	6*	9.2 ± 0.5

*これらの群で、動物の死がみられる。詳細は、本文を参照。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、セファロタキシンアナログの一般式である。R₁ および R₂ は、置換基を表す。R₁ および R₂ についての構造は、セファロタキシンアナログであるホモハリントニンの場合について示す。

【図 2】 図 2 は、セファロタキシンアナログである、ホモハリントニンの構造式である。

10

20

30

40

50

【図 3】 図 3 は、H T T、H T T および続く C D D D P、または C D D P のみを用いて処置後の日数における腫瘍の大きさについての、腫瘍の増殖の遅延を示すグラフである。

【図 1】

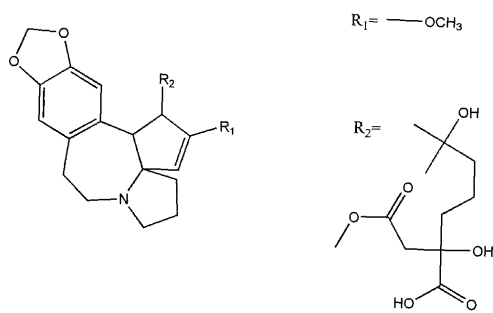


FIGURE 1

【図 2】

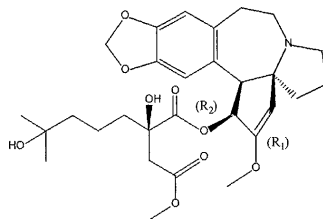


FIGURE 2

【図 3】

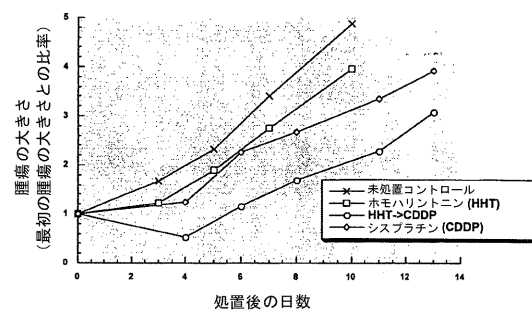


FIGURE 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K 31/475 (2006.01)

A 6 1 K 31/475

A 6 1 K 31/7042 (2006.01)

A 6 1 K 31/7042

A 6 1 K 31/7068 (2006.01)

A 6 1 K 31/7068

A 6 1 K 33/24 (2006.01)

A 6 1 K 33/24

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(74)代理人 100176485

弁理士 菊地 拓弥

(72)発明者 デニス・エム・ブラウン

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア州メンロ・パーク、サン・マテオ・ドライブ 1 0 0 番

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 C. VISANI , LEUKEMIA , スウェーデン , 1 9 9 7 年 , V11 , P624-628

Proceedings of the American Association for Cancer Research , 1 9 8 2 年 , Vol.23 , p.199

ZHANG , ASIA PACIFIC JOURNAL OF PHARMACOLOGY , SG , SINGAPORE UNIVERSITY PRESS , 1 9 9 2

年 , V7 , P191-195

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 31/55

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPI