

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4336584号
(P4336584)

(45) 発行日 平成21年9月30日(2009.9.30)

(24) 登録日 平成21年7月3日(2009.7.3)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10
A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/20
A 6 1 K	31/496	(2006.01)	A 6 1 K	31/496
A 6 1 K	31/536	(2006.01)	A 6 1 K	31/536
A 6 1 K	31/5513	(2006.01)	A 6 1 K	31/5513

請求項の数 7 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-556070 (P2003-556070)
(86) (22) 出願日	平成14年12月23日(2002.12.23)
(65) 公表番号	特表2005-513147 (P2005-513147A)
(43) 公表日	平成17年5月12日(2005.5.12)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/014727
(87) 国際公開番号	W02003/055493
(87) 国際公開日	平成15年7月10日(2003.7.10)
審査請求日	平成17年11月16日(2005.11.16)
(31) 優先権主張番号	RM2001A000767
(32) 優先日	平成13年12月24日(2001.12.24)
(33) 優先権主張国	イタリア(IT)
(31) 優先権主張番号	M12002A001833
(32) 優先日	平成14年8月19日(2002.8.19)
(33) 優先権主張国	イタリア(IT)

(73) 特許権者	500254996 イスティテュート スペリオール ディ サニタ イタリア国、00161 ローマ、ヴィア ーレ レジナ エレナ、299
(74) 代理人	100065385 弁理士 山下 穰平
(72) 発明者	スパダフォラ・コロラド イタリア国、00165 ローマ、ヴィア ーレ ゴッザディニ、63
(72) 発明者	ラヴィア・パトリヰア イタリア国、00141 ローマ、ヴィア モンギネヴラ、9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞増殖の拮抗剤及び細胞分化の誘導剤としての逆転写酵素の非ヌクレオシド抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性成分として、ネピラピン、エファビレンツ、及び、これらに対応する塩からなる群から選択される少なくとも1つの、逆転写酵素の抑制化合物の有効量を含んでなり、

上皮性腫瘍、間葉系腫瘍及び神経系の腫瘍からなる群から選択される、細胞分化低下及び未制御の細胞増殖を特徴とする疾患の治療及び/又は予防に用いられることを特徴とする医薬品組成物。

【請求項 2】

前記疾患が、白血病、テラトカルシノーマ、繊維肉腫、骨肉腫、結腸癌、乳癌、神経膠腫及び肝癌からなる群から選択される、請求項 1 に記載の医薬品組成物。

【請求項 3】

前記抑制化合物は、細胞増殖を低下させながら細胞分化を促進するものである、請求項 1 又は 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 4】

当該医薬品は、ピル、溶液、又は懸濁液の形状である、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の医薬品組成物。

【請求項 5】

経口投与、静脈内注射、筋肉内注射又は皮下注射により投与される、請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の医薬品組成物。

【請求項 6】

10

20

さらに、キャリア、希釈剤、溶媒、賦形剤及び添加剤からなる群から選択される少なくとも1つを含有してなる、請求項1乃至3のいずれか1項に記載の医薬品組成物。

【請求項7】

請求項1乃至6のいずれか1項に記載の医薬品組成物の調製のための、

ネビラピン、エファビレンツ、及び、これらに対応する塩からなる群から選択される少なくとも1つの化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は癌のような増殖性及び分化型疾患の治療及び/又は予防において治療的使用のための細胞増殖の拮抗剤及び細胞分化の誘導剤としての逆転写酵素(RT)非ヌクレオシド抑制剤に関する。

【背景技術】

【0002】

内因性の非末端重合性逆転写酵素(RT)はあらゆる真核生物ゲノム中に豊富に存在する2種類の反復要素：レトロトランスポゾン及び内因性レトロウイルス(非特許文献1、非特許文献2)にコードされている酵素である。一般には、RTをコードする遺伝子の発現は分化を終了した正常組織では抑制されているが - この場合は基礎レベルでのみ検出できる - 哺乳動物の生殖細胞系、胚組織及び腫瘍細胞では非常に活発である。細胞増殖や分化といった基本的なプロセスでRTが果たす役割はまだ明らかにされていない。それぞれ商品名VIRAMUNE(登録商標)、SUSTIVA(登録商標)及びRESCRIPTOR(登録商標)としても知られるネビラピン(Nevirapine)、エファビレンズ(Efavirenz)及びレスクリプター(Rescriptor)は非ヌクレオシド性RT抑制剤として知られており、抗レトロウイルス剤としてAIDS治療に広く用いられている。具体的には、ネビラピンは実験式 $C_{15}H_{14}N_4O$ を持つ。純粋状態では、それは分子量266.302、融点247~249及び水溶解度0.1mg/ml、エタノール溶解度5.5mg/mlの結晶固体であり、特許文献1の記載の指示に従って調製できる。ネビラピン(5, 11-ジヒドロ-11-シクロプロピル-4-メチル-6H-ジピリド-[3, 2-b:2'3'-e][1, 4]ジアゼピン-6-オン)は5, 11-ジヒドロ-6H-ジピリド[3, 2-b:2'3'-e][1, 4]ジアゼピンの化合物群に含まれ、それらはRTの非ヌクレオシド抑制剤として知られており、特許文献1に記載のようにHIV感染の予防及び治療に用いられている。

【0003】

エファビレンズ(分子量315.68)(-) - 6-クロロ-4-シクロプロピルエチニル-4-トリフルオロメチル-1, 4-ジヒドロ-2H-3, 1-ベンゾキシザジン-オン[参照により本明細書への記載に代える：1. 非特許文献3]

レスクリプター(分子量552.68)[1-(5-メタンスルホンアミド)-1H-インドール-2-イル-カルボニル]-4-[3-(イソプロピルアミノ)-2-ピリジニル]ピペラジン](参照により本明細書への記載に代える：1. 非特許文献4、2. 非特許文献5。

【特許文献1】欧州特許第429, 987号公報

【非特許文献1】di Marzo Veronese F、Copeland TD、DeVico AL、Rahman R、Oroszian S、Gallo RC、Samgadharan MG Science (1986年)231、1289~91 - Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV

【非特許文献2】Grob PM、Wu JC、Cohen KA、Ingraham RH、Shih CK、Hargrave KD、McTague TL、Merluzzi VJ AIDS Res Hum Retroviruses (19

10

20

30

40

50

92年) 8, 145~52 Nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase: nevirapine as a prototype drug

【非特許文献3】YOUNG, S. D.; BRITCHER, S. F.; TRAN, L. O.; PAYNE, L. S.; LUMMA, W. C.; LYLE, T. A.; HUFF, J. R.; ANDERSON, P. S.; OLSEN, D. B.; CARROLL, S. S.; PETTIBONE, D. J.; O'BRIEN, J. A.; BALL, R. G.; BALANI, S. K.; LIN, J. H.; LONG, W. J.; BYRNES, V. W.; EMINI, E. A.; ET AL., L-743,726 (DMP-266): A NOVEL, HIGHLY POTENT NONNUCLEOSIDE INHIBITOR OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 REVERSE TRANSCRIPTASE. ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER 39(12): 2602~2605 (1995年)

10

【非特許文献4】ROMERO, D. L.; MORGE, R. A.; GENIN, M. J.; BILES, C.; BUSSO, M.; RESNICK, L.; ALTHAUS, I. W.; REUSSER, F.; THOMAS, R. C.; TARPLEY, W. G. BIS(HETEROARYL)PIPERAZINE (BHAP) RT INHIBITORS: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF NOVEL SUBSTITUTED INDOLE ANALOGUES AND THE IDENTIFICATION OF MONOMETHANESULFONATE (U-90152S). J MED CHEM 36(10): 1505~1508 (1993年)

20

【非特許文献5】ROMERO, D. L.; OLMSTED, R. A.; POEL, T. J.; MORGE, R. A.; BILES, C.; KEISER, B. J.; KOPTA, L. A.; FRIIS, J. M.; HOSLEY, J. D.; STEFANSKI, K. J.; WISHKA, D. G.; EVANS, D. B.; MORRIS, J.; STEHLE, R. G.; SHARMA, S. K.; YAGI, Y.; VOORMAN, R. L.; ADAMS, W. J.; TARPLEY, W. G. TARGETING DELAVIRIDINE/ATEVIRIDINE RESISTANT HIV-1: IDENTIFICATION OF (ALKYLAMINO)PIPERIDINE-CONTAINING BIS(HETEROARYL)PIPERAZINES AS BROAD SPECTRUM HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS. J MED CHEM 39(19): 3769~3789 (1996年)

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

我々のグループの予備研究は、*in vitro*受精 (IVF) アッセイで調製した胚培養体に加えた場合、ネビラピン及びエファビレンツは共に初期マウス胚の発生を迅速かつ効果的に停止することを示している。この観察は、両薬剤が細胞増殖を抑制できる可能性を最初に示したものであり、我々が腫瘍細胞に対するそれらの効果を試験するきっかけとなった。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は非ヌクレオシドRT抑制剤が細胞増殖を低下させながら細胞分化を促進するという発見に基づいている。

【0006】

すなわち、本発明は、以下の(1)及び(2)に関する。

(1) 活性成分として、ネビラピン、エファビレンツ、及び、これらに対応する塩からな

50

る群から選択される少なくとも1つの、逆転写酵素の抑制化合物の有効量を含んでなり、
上皮性腫瘍、間葉系腫瘍及び神経系の腫瘍からなる群から選択される、細胞分化低下及
び未制御の細胞増殖を特徴とする疾患の治療及び/又は予防に用いられることを特徴とす
る医薬品組成物。

【0007】

(2) 前記(1)に記載の医薬品組成物の調製のための、ネビラピン、エファビレンツ、
及び、これらに対応する塩からなる群から選択される少なくとも1つの化合物の使用。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

まず我々はPCRをベースとしたRTアッセイを用いて、各種マウス及びヒト腫瘍細胞
株抽出物の中に内因性のRT活性、即ち抑制剤の標的となる酵素を検出した。

【0012】

次に我々はマウス前駆細胞(即ちC2C7筋原前駆細胞; NIH/3T3胚繊維芽細胞
)ならびにマウス及びヒト腫瘍細胞株(F9テラトカルシノーマ; L929繊維肉腫細胞
; HT-29結腸癌細胞; エストロゲン受容体発現(ER+)MCF-7乳癌細胞; ER
発現陰性(ER-)のMDA-231乳癌細胞; U343Mg神経膠腫細胞及びSaos
-2骨肉腫細胞)の培養体に350~400µMのネビラピン又は10~20µMのエフ
ァビレンツを数日間加えた。結果はRT抑制剤が細胞増殖率の低下を誘導し、細胞分化を
促進することを示した。形態学的、機能的及び免疫表現型アッセイより、急性骨髄性白血
病(AML)細胞株(NB4、HL60、Kasumi-1)及びAML患者由来の初代
芽球細胞でも分化が観察されることが示された。

【0013】

ネビラピン曝露前後にF9細胞より抽出したmRNAのRT-PCR分析は、細胞周期
を決定制御する一群の遺伝子の遺伝子発現が大きく再プログラミングされることを示した
: サイクリンD1及びD3はダウンレギュレーションを受けた; 逆にその拮抗体であるp
16はアップレギュレーションを受けた; 程度は低いがp27キナーゼ抑制剤ならびにR
b-1及びRb-2網膜芽腫関連遺伝子もダウンレギュレーションを受けた。

【0014】

これらの結果はa) 内因性のRT活性が腫瘍形成に関係していること、及びb) RT抑
制剤が腫瘍表現型から正常表現型への変換を促進するという見方を支持している。前駆細胞
が発現しない特異的分化マーカーを使って、即ちF9細胞についてはコラーゲンIVα
鎖そしてC2C7細胞についてはミオシンをそれぞれ使って、ネビラピンが誘導する分化
について多能性F9及び胚性C2C7細胞株で詳しく調べた。さらに形態(核/細胞質比
率及び好塩基性斑の減少)、機能(NBTアッセイ)及び免疫表現型(系統特異的表面抗
原の発現)レベルの研究は、ネビラピン処理がAML患者由来初代形質転換芽球細胞のヒ
トAML細胞株に存在する分化阻止を救済できることを示した。

【0015】

これらの発見に基づいて、我々は、上記メカニズムによるRT抑制活性を示す非ヌクレ
オシド化合物を、横紋筋肉腫等の脱分化型疾患に見られる分化低下を抑える薬物として予
防的及び/又は治療的治療に使用し、さらに、腫瘍の治療、特に、上皮性腫瘍、間葉性腫
瘍及び神経系の腫瘍の治療のための抗増殖性薬物として予防的及び/又は治療的治療に使用
することを提言している。上皮腫瘍、間葉性腫瘍及び神経系腫瘍は、白血病及び固形癌
を含み、固形癌としては、例えば、テラトカルシノーマ、繊維肉腫、骨肉腫、結腸癌、乳
癌、神経膠腫、肝癌等がある。

【0016】

好ましい化合物は、非ヌクレオシド化合物としての活性を持つ、市販され、且つAIDS
治療に用いられている化合物である。特に好ましいものは: Viramune(ネビラ
ピン)(Boehringer)、Sustiva(エファビレンツ)(Bristol
-Myers Squibb)及びRescriptor(デラビルジン)(Agour
on Pharmaceuticals)である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

一般に使用されている市販の医薬品形態の上記化合物及び特別な例としてのネビラピンは、分化を管理しなければならず同時に細胞増殖を抑制する症例に採用される医薬品組成物、従って分化作用及び抗腫瘍作用を持つ医薬品組成物の調製に有用な物質の例として提案されている。分子の治療効果はそれらの R T 抑制能と関連するものである。

【 0 0 1 8 】

発明による細胞増殖の予防的又は治療的処理は、哺乳動物、特にヒトで実施できる。

【 0 0 1 9 】

処理を必要とする被検者は非ヌクレオシド R T 抑制剤としての活性を示す化合物の少なくとも 1 つを治療効果量用いて治療することができ、被験者に治療的利益を与えることができる。

10

【 0 0 2 0 】

発明の非ヌクレオシド化合物を薬品組成物中に用いて分化及び抗腫瘍作用を持つ薬剤を調製できる。本発明に記載する使用に適した組成物は、少なくとも 1 つの活性成分の有効量と、ピル、溶液、懸濁液といった医薬品として使用可能な調剤への活性化合物の加工を容易にする 1 又はそれ以上の生理学的に受け入れ可能なキャリア及び / 又は希釈剤及び / 又は溶媒及び / 又は賦形剤及び添加剤とを一つに混合することで得られるだろう。これら医薬品組成物は周知の方法、例えば通常の混合、溶解、顆粒化、ドラッシュ化、研和化、乳剤化、カプセル化、封入又は凍結乾燥の工程により製造されるだろう。調剤は選択した投与経路に合わせ適切に行われる。医薬品組成物は経口又は静脈内、筋肉内もしくは皮下注射により投与されるだろう。

20

【 0 0 2 1 】

用途、投与量及び投与方法は、欧州特許第 4 2 9 、 9 8 7 号に記載の指示に従う。

【 0 0 2 2 】

投与量及び投与の様式は疾患のタイプ及び重症度によって変わる。

【 0 0 2 3 】

次に上記分子を使用した幾つかの実験実施例を記載することにする。しかし本発明による好ましい化合物の化学構造は多様であることから、発明はかかる分子に限定されるものではなく、R T 抑制剤として活性を示す他化合物も同様に使用できることが理解されるであろうことを強調しなければならない。

30

【 0 0 2 4 】

以下の実施例は例示であり、本発明の範囲を制限するものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 5 】

(腫瘍細胞の内因性 R T 活性)

本明細書記載の抑制剤の標的である R T 酵素活性は、本発明の中で P C R をベースとするアッセイで試験したマウス及びヒト起源両方の細胞株全てに検出されている。図 1 A にまとめた結果は、全ての細胞株の細胞溶解物が外因性 R N A (M S 2 ファージ R N A) を *i n v i t r o* で逆転写できる R T 活性を持ち、予想通りの大きさ、即ち 1 1 2 b p (レーン 1 ~ 1 3) の増幅産物を生成したことを示している ; c D N A は、インキュベーション混合物から M S 2 R N A (レーン 1 4) 又は細胞溶解物 (レーン 1 6) を除くと合成されなかった。更に R T 活性は細胞溶解物をネビラピンと前インキュベーションすると容量依存的に抑制された : 1 1 2 b p 産物は 1 0 0 μ M (レーン 2 2) とのインキュベーションでは低下したが、1 (レーン 2 0) 又は 1 0 μ M (レーン 2 1) とのインキュベーションでは低下しなかった。腫瘍細胞内の R T 酵素の存在は、ウエスタンブロッティング分析でも確認された。図 1 B は、タンパク質分子が特異的抗 R T ポリクロナル抗体によって、完全細胞 (W C E) 及び核溶解物内の両方に認められることを示している。

40

【 0 0 2 6 】

これらの結果は R T が腫瘍細胞内に、タンパク質としても、酵素活性としても存在していること、そしてそれがネビラピンで抑制されることを示している。

50

【実施例 2】

【0027】

(マウス及びヒト細胞培養体とネビラピンのインキュベーション：細胞倍加細胞の減速)

マウス C2C7 筋原前駆細胞、NIH/3T3 胚繊維芽細胞、F9 テラトカルシノーマ及び L929 繊維肉腫細胞、及び以下の細胞株由来のヒト細胞：Saos-2 骨肉腫細胞、HT-29 結腸癌細胞、MDA-231 乳癌細胞 (ER-)、MCF7 乳癌細胞 (ER+)、U343 神経膠腫細胞を 10 ~ 20 % の胎児血清及び保存溶液 (250 mM) を 100 % DMSO で希釈した 350 μ M ネビラピン液を含む DMEM で培養した。細胞を 35 mm ペトリ皿に $2 \sim 5 \times 10^4$ の密度で播き、5 ~ 6 時間後にネビラピンに曝露した。指定した時間にサンプルを抜き取り、ネビラピン曝露及びコントロール (DMSO 曝露) 培養体の細胞数を測定した。図 2 にまとめた結果は、ネビラピンへの曝露 (破線) が全ての細胞株で増殖率を下げることを示している。薬物のこの抑制作用に対する反応には細胞のタイプ特異的な差が幾つか観察された：F9 テラトカルシノーマ細胞は最も強い反応を示し、120 時間の曝露後の増殖率は 5 倍低下した。同等の効果は HT-29 結腸癌細胞でも示された。Saos-2 骨肉腫細胞は最も反応が遅いタイプであり、曝露 5 日目になってようやくコントロール培養体に比べ増殖率が低下し始めた。

10

【実施例 3】

【0028】

(細胞培養体とネビラピンとのインキュベーション：細胞周期からの離脱)

20

ネビラピン曝露培養細胞の FACS 分析は、あるタイプの細胞で細胞周期プロフィールに変化があることを示した：図 3A に見られる様に、NIH/3T3、HT-29、MCF-7 及び U343 Mg の培養体では、ネビラピン処理 72 時間後に G0/G1 DNA 含有量を持つ細胞が蓄積したのに対し、同時に行ったコントロールサンプルは増殖培養細胞に典型的な細胞周期プロフィールを示した。これに伴って、ネビラピンに曝露した NIH/3T3、HT-29、MCF-7 (図 3B) 及び U343 Mg 神経膠腫細胞 (未提示) では、曝露なしのコントロールに比べサイクリン D1 のレベルが大きく低下した。

【実施例 4】

【0029】

(細胞培養体とネビラピンとのインキュベーション：分化誘導)

30

特徴がよく分かっているパターンで *in vitro* 分化できるモデル細胞システムを用いて、ネビラピンが細胞分化のプロセスに影響することが示された。単核筋芽細胞として増殖するマウス C2C7 筋原随伴細胞は、増殖因子を除去すると分化を誘導することができ、筋肉特異的な遺伝子を発現する多核筋管を形成する。我々の実験では、ネビラピンあり、又は無しに C2C7 細胞を 90 時間培養してから (この間にコントロールの培養体は定常密度に達した) 分化培地に移し 48 時間置いた。明視野顕微鏡を使ってスコア化 (無作為に選り出した視野の $n = 300$ 細胞) したところ、多核筋管 (即ち 3 個以上の核を持つ細胞) と単核 / 2 核細胞の比率がネビラピン処理サンプルでは約 1 : 1 であったのに対し未処理サンプルでは 1 : 2 であった。細胞単層をさらに筋肉分化の後期マーカーであるミオシン重鎖 (MHC) に対するポリクローナル抗体を用いた免疫蛍光法 (IF) で分析した。48 時間分化培地に維持したコントロール培養体では、多核型の MHC 含有筋管は、ネビラピンで前処理した培養体のもの (図 4D) に比べ細く、非常に小さかった (図 4C)。コントロール培養体では単独筋芽細胞は殆ど MHC 陰性であった (図 4A) のに対し、ネビラピン処理プレートの単独筋芽細胞ではミオシン合成が既に活性化されていた (図 4E)。

40

【0030】

ネビラピンはまたテラトカルシノーマ F9 細胞の分化も誘発した。未処理の F9 細胞は円形であり、増殖中に凝集する傾向があった (図 5a)。周知の分化促進因子であるレチノイン酸 (RA) に曝露すると、72 時間後には凝集形成傾向の低下、分化形態の出現を伴った細胞表面接着及び再編成の増加を含む形態分化に特徴的な徴候が出現した (図 5e

50

）。同様の变化がネビラピン曝露培養体にも観察された（図5 i）。形態再編成に伴って、RAに反応して誘導される分化マーカーであり（図5 g）、コントロールの培養体では合成が低レベルである（図5 c）I V型コラーゲン（ $\alpha 1$ ）鎖の合成が増加した（図5 k）。図4と5の結果をまとめると、ネビラピンは2種類の細胞で分化を誘発、又はその開始を促進することが示された。

【実施例5】

【0031】

（ネビラピン処理はヒト急性骨髄性白血病（AML）芽球の分化を誘導する）

我々は、前急性骨髄細胞芽球に存在しその分化を阻止しているt（15；17）癌タンパク質PML/RARを発現している急性前骨髄細胞NB4、及び急性骨髄芽急性白血病HL60細胞株におけるネビラピンの効果を、既知である両細胞のRA誘導顆粒球細胞分化感受性と比較して分析した。5日間のネビラピン処理では両細胞株とも骨髄単球に似た形態の細胞が顕著に出現した（図6）のに対し、1 μ MのRAでは報告通り後骨髄球様の形態を持つ細胞が誘導され（図6及び未提示データ）。次に我々はRA又はネビラピン存在下に4日間培養した後、3種類の表面抗原、CD11b、CD14及びCD15の発現を分析した（表1）。CD11bの誘導は顆粒球分化を伴い、そしてCD14は単球特異的抗原であると考えられており、そしてCD15は骨髄単球抗原である。CD14とCD11bの同時誘導は単球分化と関係している。RA処理は顆粒球分化の誘導と一致して、両細胞株でCD11b及びCD15レベルを上げたが、CD14レベルは上げなかった。ネビラピン処理NB4及びHL60細胞には、強いCD15の発現と程度は低いCD11b及びCD14マーカーの発現誘導を認めた。即ちネビラピン処理は骨髄単球分化マーカーの発現を誘導したが、これは形態学研究の結果と一致した。ネビラピン処理はまたNB T色素還元アッセイにおいて陽性細胞数を約2.0～3.5倍増加した（表2）。

【0032】

ネビラピンの分化効果を、RA誘導顆粒球分化の感受性が低い、t（8；21）転座産物AML1/ETOを発現しているKasumi-1細胞株の様な骨髄性白血病細胞、及び2名のAML患者に由来する初代芽球細胞で更に分析した。ネビラピン処理は、実際に増殖を停止することはないが、ゆっくりとではあるが一定に細胞周期G1期に細胞を蓄積した（データ未提示）。さらにKasumi-1細胞及び初代AML芽球細胞は共にネビラピン処理に反応し、（i）初期核分離を伴う染色質凝縮、細胞質好塩基性の低下及び核周辺におけるゴルジ領域の出現（AML#1例に特有の顆粒が見られた）から成る骨髄単球分化と関連した形態変化（図6）；（ii）NB T陽性度の増加により示される機能変化（表2）；（iii）骨髄性免疫表現型マーカーであるCD11b、CD14及びCD15の発現変化（表1及びデータ未提示）の誘導で表される分化を開始した。初代AML芽球に誘導された骨髄性分化の程度は、NB4及びHL60細胞に誘導されたものと同等であった。

【0033】

【表1】

表1

RA（1 μ M）又はNEV（450 μ M）に4日間曝露したNB4及びHL60細胞株の細胞表面マーカーのサイトフルオロメトリー分析：特異的マーカーの平均蛍光強度

マーカー	コントロール	RA	NEV	コントロール	RA	NEV	コントロール	NEV
NB4細胞			HL60細胞			AML#1		
CD11b	7.2	53.7	10.1	12.1	15.3	16.6	5.6	5.9
CD14	18.3	19.1	23.1	34.3	23.7	45.3	8.1	8.8
CD15	106.5	421.7	196.3	122.5	609.7	1298.1	5.5	15.6

【0034】

【表 2】

表 2

4日間曝露後の、NB4、HL60、Kasumi-1細胞株及び2名のAML患者由来初代白血病芽球の増殖及び分化に対するRA又はNevの効果

処理	生細胞 N°×10 ⁵	NBT+ (%)	生細胞 N°×10 ⁵	NBT+ (%)
	NB4細胞		HL60細胞	
コントロール	2.6±0.2	9.1±0.5	9.2±1.8	13.3±0.8
RA(1μM)	1.4±0.1	80.6±4.5	6.5±0.9	31.2±1.4
Nev(350μM)	2.6±0.4	37.2±1.4	4.7±1.1	37.8±2.5

処理	生細胞 N°×10 ⁵	NBT+ (%)	生細胞 N°×10 ⁵	NBT+ (%)	生細胞 N°×10 ⁵	NBT+ (%)
	Kasumi-1細胞		AML#1		AML#2	
コントロール	3.3±0.6	14.1±0.5	0.9±0.2	9.2±0.4	1.8±0.3	37.5±4.9
Nev(350μM)	4.5±0.9	31.2±1.1	0.6±0.1	19.5±0.7	1.2±0.1	68.1±1.4

10

【実施例 6】

【0035】

(ネビラピン処理F9細胞における細胞周期制御遺伝子の発現変化)

ネビラピンの増殖及び分化に対する影響能力が特定遺伝子の発現の変化に反映するかを調べるために、コントロール、ネビラピン-及びRA-曝露F9細胞よりRNAを抽出し、半定量RT-PCR分析にかけた。我々はD型サイクリン；増殖抑制因子；アポトーシス変調因子；及びハウスキーピングタンパク質をコードする遺伝子群について調べた。代表的なパネルを図7Aに示し、定量化した結果を図7Bに示した。最も顕著な変化はサイクリンD1遺伝子について示され、ネビラピンに曝露しなかったF9培養体に比べネビラピン曝露培養体では7倍ダウンレギュレーションされ、一方D型サイクリンの主要な拮抗因子をコードするp16^{INKAa}は8倍近くアップレギュレーションされた。アップレギュレーションは細胞形態及び接着に反応して増殖を決定的に変調するp27Kip1；増殖サイクルからの離脱と関連するRb-2/p130；及び幾つかのタイプの細胞で増殖停止を促進できるBcl-2にも見られた。サイクリンD3発現はネビラピンに反応してダウンレギュレーションを受けた。ハウスキーピング遺伝子(β-アクチン、GAPDH)ならびにp53の発現には影響がないことから、これらの変化は特異的であった。

20

30

【実施例 7】

【0036】

(マウス細胞培養体とエファビレンツとのインキュベーション：当量効果)

NIH/3T3胚繊維芽細胞及びF9テラトカルシノーマ細胞を、10～20%の胎児血清、及び2濃度のエファビレンツ、即ち100%DMSO保存溶液(10mM)を希釈して得た10及び20μMのエファビレンツを含むDMEFで培養した。細胞を35mmペトリ皿に2～5×10⁴の密度で播き、5～6時間後にエファビレンツに曝露した。指定した時間にサンプルを抜き取り、同時に行った非曝露細胞培養体と比較しながら、ネエファビレンツ曝露培養体の細胞数を測定した。図8の結果は、非曝露細胞(実線)に比べエファビレンツへの曝露(破線)は容量依存的な形で両方の細胞株の増殖率を下げることを示している。

40

【実施例 8】

【0037】

(ヒト細胞培養体とエファビレンツとのインキュベーション：時間依存性)

エファビレンツの効果をヒトHela腺癌及びSaos-2骨肉腫細胞で更に調べた。両細胞株を上記条件(実施例6)で培養した。薬物への曝露時間を延長した場合に、増殖抑制の効果が高まるか調べるために、両細胞株を連続する2サイクルの中でエファビレンツに曝露した：第一サイクルでは5日間20μMのエファビレンツに細胞を連続曝露した

50

；その後細胞を希釈してから再度接種し、翌日に新しい薬物を用いて2回目の曝露サイクルを開始した。図9の結果は、HeLa（パネルA）及びSaos-2（パネルB）細胞株は共にエファビレンツに感受性であり、細胞増殖率が大きく低下したことを示している。この抑制効果は時間依存的であったが、それはHeLa及びSaos-2培養体のいずれでも第一曝露サイクル（5日間）が1.6-及び1.5-倍の減少をそれぞれもたらしたのに対し、第二サイクル（曝露開始から20日目までに実施した）では5-及び4-倍の減少を得たからである。

【実施例9】

【0038】

（in vivoにおけるネビラピンの抗腫瘍作用：モーリス3924Aラット肝癌の治療）

10

a) ラット株及び腫瘍の特徴

ラット株：ACI/T近交系（約180グラム）

腫瘍：モーリス3924A肝癌は増殖の速い腫瘍で、近交系ACI/T動物に発生する。接種3週後の腫瘍サイズは約10cm³であった。

【0039】

腫瘍細胞の調製：肝癌細胞は接種後約2週の動物から調製した。腫瘍は動物から外科的に取り出し、結合組織及び壊死組織から分離し、小片に切り刻んだ。次に腫瘍断片を滅菌した生理溶液に浮遊させ、サイズの大きな針が付いた20mlのシリンジを用いて一方の大腿部の内側に接種した。通常は0.5mlの細胞浮遊液を注射した。腫瘍移植の成功率はほぼ99%であった。

20

方法：ネビラピン液（保存液 = 180mg / 2ml DMSO）を毎日0.2ml / ラットの割合で11日間（18mg / ラット / 日）注射して3匹のラットをネビラピンで前処理した。11日目に前処理したラットと3匹の未処理コントロールラットに肝癌細胞を皮下接種した。

結果：接種から17日後、コントロールラットは2～4cm³の典型的な腫瘍を示したが、一方ネビラピン前処理動物は1匹が注射部位に数ミリメートルの小さな結節を示しただけであった。図10の時間曲線は、コントロール（実線）及びネビラピン処理ラット（破線）に腫瘍増殖速度に差があることを示している。

【0040】

30

コントロールの増殖曲線は3匹の動物の平均値を示しているが、一方ネビラピンの曲線は処理動物の中で小さな腫瘍が発生した1匹の動物の増殖速度を表している。腫瘍組織を未処理及びネビラピン処理ラットの両方から外科的に取り出し、組織学分析にかけた。図11は、未処理サンプル（パネルCTR）に比べて、ネビラピン処理ラット（パネルNEV）由来のサンプルでは形質転換面積が大きく減少し、そして細胞が明瞭なアポトーシスの特徴を表していることを示している。

【0041】

結論すると、ネビラピン前処理は遺伝的に肝癌が発生しやすいラットに実験的に誘導した肝癌の発生及び増殖を効果的に拮抗した。2匹のラットは腫瘍接種後も最後まで健康な状態を保ったが、残りの1匹には小さな腫瘍が見つかった。未処理ラットは、同一条件下で増殖が速い腫瘍を発生し（3 / 3）、27日以内に死亡した。

40

【実施例10】

【0042】

（In vivoにおけるネビラピンの抗腫瘍活性：腹水腫瘍を接種したBALB/Cマウスの治療）

方法：8日前に接種した動物から採取した腹水0.2mlを注射して10匹のBALB/Cマウスに腹水腫瘍細胞を腹腔内接種した（2回）。同じ日に、腫瘍細胞を接種した10匹のマウスの5匹に1mg / マウス / 日（保存液10mg / mlのDMSO溶液）を腹腔内注射してネビラピン処理を開始した。マウスは7日間連続してネビラピン処理した。

【0043】

50

結果：7～8日後、動物を屠殺して調べたところコントロール動物は全て5～7mlの腹水を含む膨張した腹部を示した。これに対しネビラピン処理した動物5匹のうち3匹（3/5）は健康のままで、腫瘍増殖を示す証拠はなかった；腫瘍発生がないことは、腫瘍接種15日後にこれら動物のうち2匹を屠殺して剖検した時に確認された。残りの処理動物はその後変わらず健康を維持した。腹水を接種されたマウスは12～14日しか生存しないことを思い出すとよい。結論すると、この実験は腫瘍接種と同時に注射したネビラピンが5匹のマウスのうち3匹で腹水腫瘍細胞の発生を永久的に阻止すること、そして未処理ラットでは腫瘍が発生し（5/5）、接種後12～14日に全て死亡したことを立証した。

【実施例11】

10

【0044】

（In vivoにおけるエファビレンツの抗腫瘍活性：モーリス3924Aラット肝癌の治療）

方法と結果：モーリス肝癌細胞（3924A株）を4匹のラットに接種した。同日、そのうちの2匹にエファビレンツを1mg/ラット/日注射しエファビレンツ処理を開始した。図12はコントロール（実線）及びエファビレンツ処理動物（破線）における腫瘍の増殖率を示している。腫瘍はコントロール動物では急速に増殖し、動物は接種後27日目に2匹とも死亡した；これに対し2匹の処理動物のうち1匹のみが非常に小さな腫瘍を発生し、一方残りの1匹は完全な健康を維持した。

【0045】

20

結論すると、この実験は腫瘍接種と同時に開始したエファビレンツ処理は、モーリス肝癌の発生及び増殖を効果的に拮抗することを立証した。2匹の処理ラットのうち1匹は腫瘍接種後数週間健康を保ったのに対し、もう1匹は極小さな腫瘍を発生した。未処理ラットは同一条件下に腫瘍を発生し（2/2）、27日目に死亡した。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】マウス及びヒト細胞株の逆転写酵素。図1AはMS2 RNAを次のタイプのヒト細胞（レーン1～9）及びマウス細胞（10～22）より得た細胞溶解物とインキュベーションした後の機能的RT活性を示す：レーン1、NB4白血病細胞；レーン2、R4白血病細胞；レーン4、Kasumi-1白血病細胞；レーン4、HL60白血病細胞；レーン5、Saos-2骨肉腫細胞；レーン6、MDA-231乳癌細胞；レーン7、MCF7乳癌細胞；レーン8、U343 Mg神経膠腫細胞；レーン9、HT-29結腸癌細胞；レーン10、NIH/3T3胚繊維芽細胞；レーン11、C2C7筋芽細胞；レーン12、F9テラトカルシノーマ細胞；レーン13、L929繊維肉腫細胞；レーン14、MS2 RNAを含まないF9溶解物とのコントロール反応物；レーン15、緩衝液のみ；レーン16、哺乳動物細胞溶解物なし；レーン17、MS2 RNA及び細胞溶解物共になし；レーン18、市販RTとの陽性コントロール反応；レーン19、MS2-特異的オリゴなし；レーン20～22：1（レーン20）、10（レーン21）及び100（レーン22）μMネビラピンと前インキュベーションしたF9溶解物を用いた完全反応。レーンM、DNA分子量マーカー；レーン23、市販Rtを用いた陽性コントロール反応。WCE及び核内のRTタンパク質（上パネル）及びα-チューブリン（下パネル）のウェスタンブロット分析。WCEは：F9（レーン1）、NIH/3T3（レーン2）、MCF7（レーン3）、MDA-231（レーン4）、NB4（レーン5）、HL60（レーン6）及びML2胚細胞（レーン7）より得た。核抽出物は：F9（レーン1）、MCF7（レーン2）、MDA-231（レーン3）、NIH 3T3（レーン4）、HL60（レーン5）及びNB4（レーン6）より得た。

30

40

【図2】ネビラピンはマウス及びヒト細胞株の増殖を抑制する。細胞はネビラピンあり（点線）及びなし（DMSO、実線）で培養した。増殖率は細胞接種時の初期細胞数を1とした場合の、指示時点の測定細胞数との比で表した。点は平均値を表し、バーは全てのタイプの細胞について少なくとも3回独立に行ったアッセイの標準偏差を表す。

50

【図 3 A】コントロール及びネビラピン曝露細胞の細胞周期分析。細胞周期相の分布はネビラピン処理開始から 72 時間後に FACS を用い決定した。U343 神経膠腫細胞株では、細胞周期は二倍体細胞分画（全細胞の約 2 / 3 が相当する）及び異数性を示す残りの分画（約 1 / 3）と別々に分析した。

【図 3 B】ネビラピンあり（+、レーン 2、4 及び 6）又は無し（-、レーン 1、3 及び 5）で 72 時間培養した表示タイプの細胞の抽出物におけるサイクリン D1 のウエスタンイムノブロッティング分析。フィルターを抗アクチン抗体で再プローブ処理し、負荷量が当量になるように調整した（下パネル）。

【図 4】ネビラピン曝露後の C2C7 筋原細胞の分化。分化培地で培養する前に DMSO（A、C）又はネビラピン（B、D、E）で前処理した C2C7 筋原細胞を抗 MHC（FITC、緑）及びヘキスト 33258 で染色し核を見える様にした（青）；一つにまとめた像を示す。倍率 20 倍では、コントロール培養（図 4 A）ではネビラピン処理後（図 4 B）に比べ筋管は細く、発生頻度も低い。図 4 C は A の筋管の 60 倍拡大像である。図 4 D は B の筋管の 60 倍拡大像である。図 4 E は B の視野内にある MHC 陽性筋管の 60 倍拡大像である。

【図 5】RA-及びネビラピン-曝露 F9 細胞の形態分化。DMSO（コントロール、図 5 a、図 5 b、図 5 c、図 5 d）、ネビラピン（図 5 e、図 5 f、図 5 g、図 5 h）又は RA（図 5 i、図 5 j、図 5 k、図 5 l）に曝露した F9 培養体をまず培養 72 時間後に *in vivo* で調べ、その形態再形成を記録した（パネル図 5 a、図 5 e、図 5 i、対物 60 倍）。96 時間後、サンプルを固定し、IV 型コラーゲン（ $\alpha 1$ ）鎖（図 5 c、図 5 g、図 5 k）の IF 及び DAPI 核染色（図 5 b、図 5 f、図 5 j）で処理した；各写真を統合したものを図 5 d、図 5 h 及び図 5 l に表した（対物 100 倍）。

【図 6】ネビラピン処理は AML 芽球の分化阻止を解除する。5 日間の 400 μ M ネビラピン（Ne v）処理後の、ライト-ギムザ染色で示した前骨髄細胞株 NB4；HL60 細胞；及び 2 名の AML 患者由来の芽球（AML # 1 及び AML # 2）の形態分化。NB4 細胞は顆粒球分化を誘導する 1 μ M の RA でも処理した。未処理の細胞をコントロールとして示した。

【図 7】ネビラピンは F9 細胞に遺伝子発現の変動を誘導する。DMSO（コントロール）、ネビラピン又は RA と共に培養した F9 細胞の全 RNA を、指定の遺伝子のオリゴヌクレオチドを用いた RT-PCR 増幅にかけ、ブロッティングし、内部オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションした。代表的なパネルを図 7 A に示す。図 7 B：遺伝子発現内の量的変動。内部オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションした RT-PCR 産物をデンシトメトリーで定量化した。コントロール培養物に対するネビラピン培養物のシグナル比を、同一実験で β -アクチンについて得た比で標準化した。黒塗りの棒グラフは各遺伝子について少なくとも 3 回行った実験の平均値を表し、白色の棒グラフは標準偏差を表す。

【図 8】エファビレンツはマウス細胞株の増殖を抑制する（図 8 A 3T3 細胞株；図 8 B：F9 細胞）。細胞をエファビレンツあり（点線）及び無し（DMSO、実線）で培養した。増殖率は接種細胞初期数を 1 とした時の、これに対する指示時点の細胞数の比で表した。点は独立に行った少なくとも 3 回のアッセイの平均値を表す。

【図 9】エファビレンツはヒト細胞株の増殖を抑制する（図 9 A HeLa 第一サイクル；図 8 B：HeLa 第 2 サイクル、図 9 C SAOS 第一サイクル、図 9 D SAOS 第二サイクル）。細胞をエファビレンツあり（点線）及び無し（DMSO、実線）で培養した。増殖率は接種細胞初期数を 1 とした時の、これに対する指示時点の細胞数の比で表した。点は独立に行った少なくとも 3 回のアッセイの平均値を表す。

【図 10】コントロール（実線）及びネビラピン処理ラット（破線）におけるモーリス肝細胞癌の増殖。腫瘍増殖率は容積（ cm^3 単位）を時間（接種後日数）で除し表した。

【図 11】ネビラピン処理（パネル NEV）及び未処理サンプル（パネル CTR）ラットの組織サンプル。上パネル（対物 10 倍）では、図 11 B の NEV パネル内に見られる形質転換面積が未処理（CTR）組織（図 11 A）に比べ顕著に小さくなっている。下パネ

10

20

30

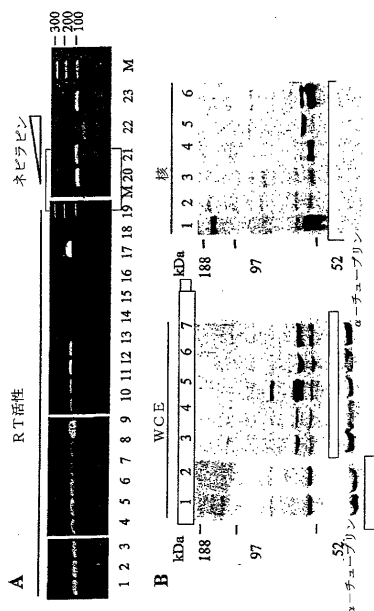
40

50

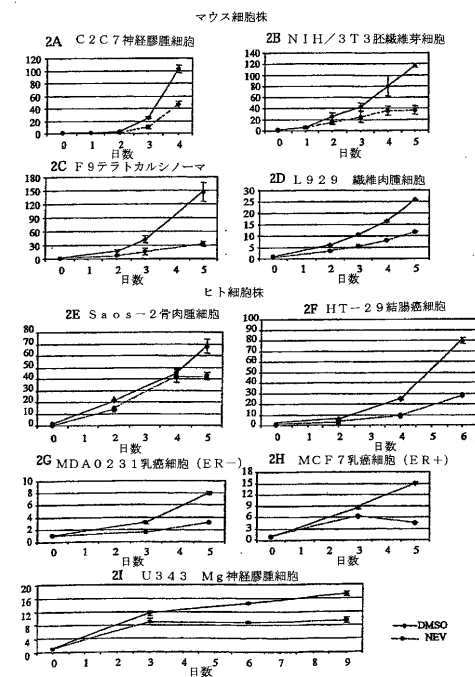
ル（対物40倍）では、アポトーシスを起こしている細胞がNEV（図11D）では明瞭に見られるが、CTRサンプル（図11C）では見られない。

【図12】コントロール（実線）及び2匹のエファビレンツ処理（破線、EFV1及びEFV2）ラットにおけるモリス肝癌細胞の増殖。腫瘍増殖率は容積（ cm^3 単位）を時間（接種後日数）で除し表した。

【図1】



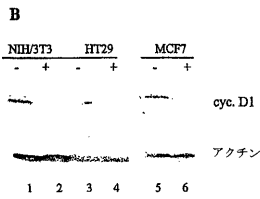
【図2】



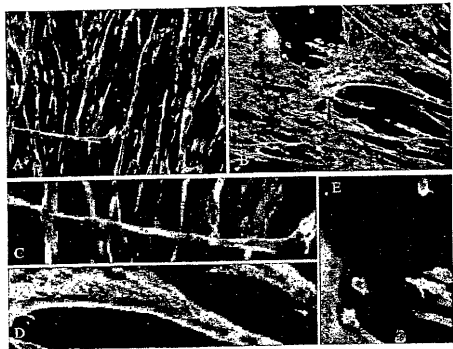
【 図 3 A 】

A		GI	S	G2/M
HT29	CTR	66,45	26,9	6,65
	NEV	78,9	15,4	5,7
MCF7	CTR	70,3	9,3	20,2
	NEV	85,9	3,9	10,2
U 3 4 3 2 倍体集団	CTR	60,3	39,1	0,6
	NEV	68,5	30,4	1,1
U 3 4 3 異数体集団	CTR	68,9	25,5	5,6
	NEV	75,9	22,1	2
NIH/3T3	CTR	73,3	16,4	10,3
	NEV	81,1	11,8	7,1

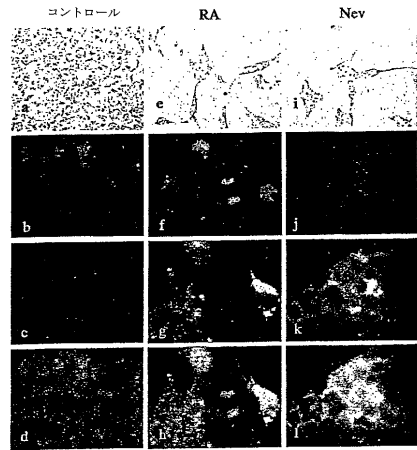
【 図 3 B 】



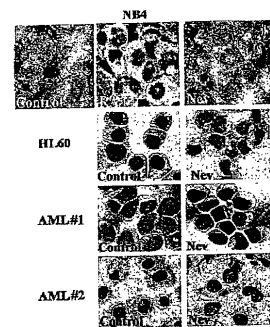
【 図 4 】



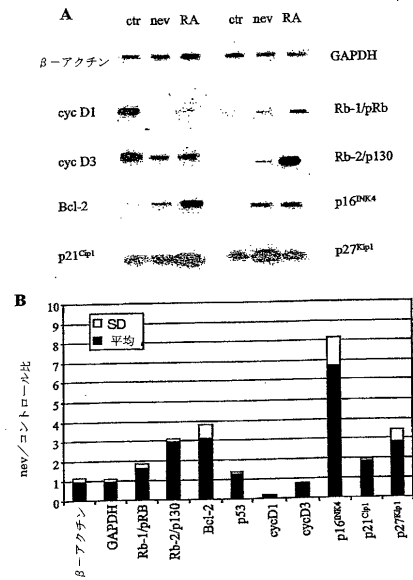
【 図 5 】



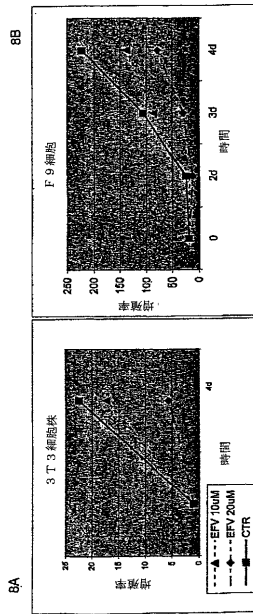
【 図 6 】



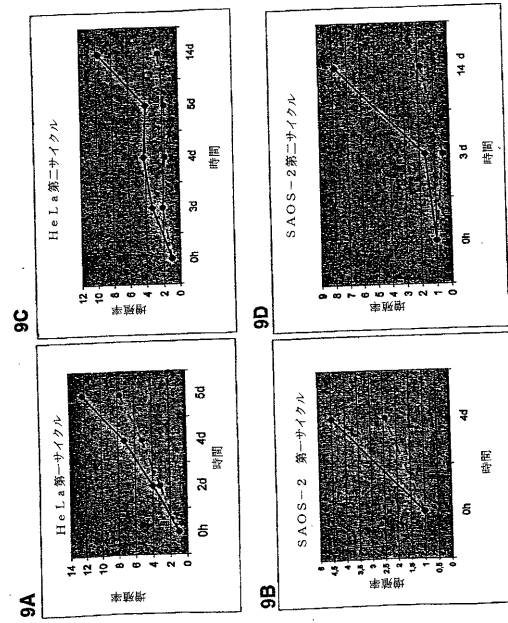
【 図 7 】



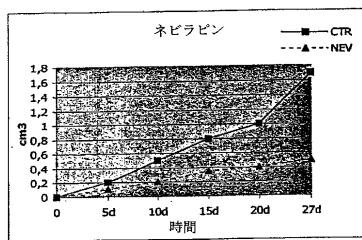
【図 8】



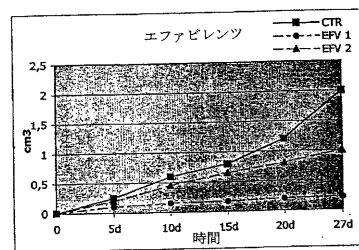
【図 9】



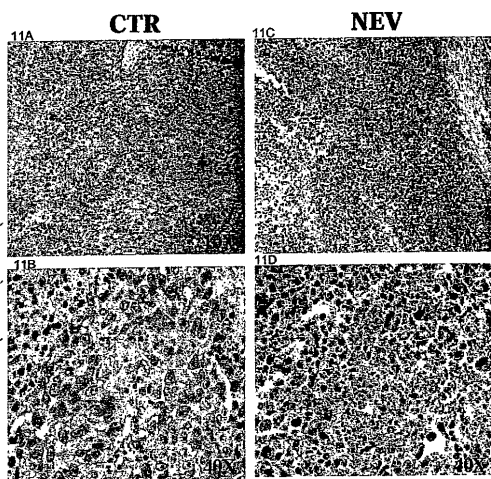
【図 10】



【図 12】



【図 11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02 (2006.01) A 6 1 P 35/02

(72)発明者 マッティ・エリザベッタ
 イタリア国、00137 ローマ、ヴィア エル・カプアナ 175
 (72)発明者 パロムビニ・ググリエルモ
 イタリア国、00060 ローマ、ヴィア モンテ サント'アンドレア、85
 (72)発明者 ロレンツィニ・ロドルフォ・ネッロ
 イタリア国、01010 ベレラ、カモッラタ、ロカリタ(無番地)
 (72)発明者 ネルヴィ・クララ
 イタリア国、00197 ローマ、ヴィア ピー・エイ・ミチェリ、78

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 GRIMAUO S, EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, 英国, PERGAMON PRESS, 1998年10月, V34 N1
 1, P1756-1763
 GHORI A, COLORECTAL DISEASE, 英国, 2000年, V2 N2, P106-112
 LAM S K, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 2001年 7月27日,
 V285 N4, P1071-1075

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A61K 45/00
 A61K 9/10
 A61K 9/20
 A61K 31/496
 A61K 31/536
 A61K 31/5513
 A61P 35/00
 A61P 35/02
 BIOSIS(STN)
 CAPUS(STN)
 EMBASE(STN)
 MEDLINE(STN)
 REGISTRY(STN)
 JSTPlus(JDreamII)
 JMEDPlus(JDreamII)
 JST7580(JDreamII)