

(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2008-514688

(P2008-514688A)

(43) 公表日 平成20年5月8日(2008.5.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/4995 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/4995	4 C 0 8 6
<b>C 0 7 D 515/22 (2006.01)</b>	C 0 7 D 515/22	
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	
<b>A 6 1 P 37/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/00	
<b>A 6 1 P 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-534093 (P2007-534093)  
 (86) (22) 出願日 平成17年9月28日 (2005. 9. 28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年3月28日 (2007. 3. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/050164  
 (87) 国際公開番号 W02006/035244  
 (87) 国際公開日 平成18年4月6日 (2006. 4. 6)  
 (31) 優先権主張番号 60/614, 093  
 (32) 優先日 平成16年9月29日 (2004. 9. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507100476  
 ファルマ・マル・エス・アー, ソシエ  
 ッド・ユニベルソナル  
 PHARMA MAR S. A., SO  
 CIEDAD UNIPERSONAL  
 スペイン国、28770 マドリッド、コ  
 ルメナール・ヴィエホ 1, アヴェニ  
 ダ・デ・ロス・レイエス、ポリゴノ・イン  
 ドゥストリアル・ラ・ミーナ  
 Poligono Industrial  
 La Mina, Avda. de  
 los Reyes, 1, Colme  
 nar Viejo, 28770 Ma  
 drid, Spain

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗炎症剤としてのエクテイナシジン化合物

## (57) 【要約】

我々は、抗炎症活性を、エクテイナシジン化合物において見出した。このような化合物は広く記載されており、以降の一般式 (I) を持つことがあり、式中：

R<sup>5</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；

R<sup>6</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリールであり；

R<sup>12</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリールであり；

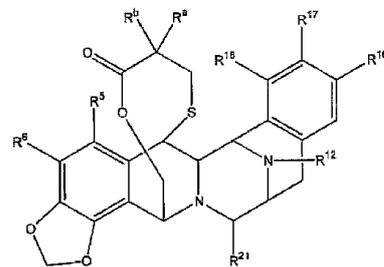
R<sup>16</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリールであり；

R<sup>17</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；

R<sup>18</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；

R<sup>21</sup> は、H、OH、CN、もしくはもう1つ別の求核基であり；ならびに

R<sup>a</sup> が水素であって R<sup>b</sup> が任意に置換されたアミノであるか、または、R<sup>a</sup> と R<sup>b</sup> とがカルボニル官能基 =



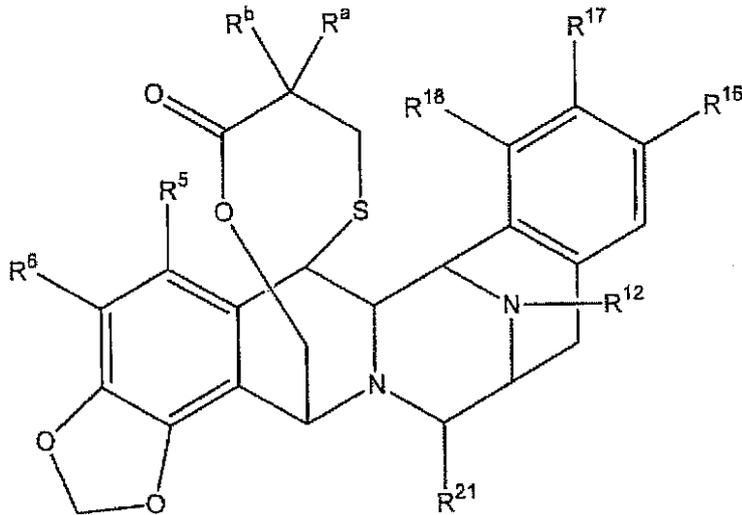
(I)

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一般式 ( I ) :

## 【化 1】



式中 :

R<sup>5</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり ;

R<sup>6</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリアルであり ;

R<sup>12</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリアルであり ;

R<sup>16</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリアルであり ;

R<sup>17</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり ;

R<sup>18</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり ;

R<sup>21</sup> は、H、OH、CN、もしくはもう 1 つ別の求核基であり ; ならびに

R<sup>a</sup> が水素であって R<sup>b</sup> が任意に置換されたアミノであるか、または、R<sup>a</sup> と R<sup>b</sup> とがカルボニル官能基 = O を形成するか、または、R<sup>a</sup>、R<sup>b</sup>、およびこれらが取り付けられている炭素がテトラヒドロイソキノリン基を形成する

の有効量のエクテイナシジン化合物の投与を含む、炎症を処置する方法。

## 【請求項 2】

前記炎症が、慢性炎症疾患、自己免疫疾患、および粥状硬化からなる群から選択される疾患により引き起こされる、請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

式 ( I ) のエクテイナシジン化合物において、基 R<sup>5</sup> がアルカノイルオキシである、請求項 1 の方法。

## 【請求項 4】

式 ( I ) のエクテイナシジン化合物において、基 R<sup>6</sup> がメチルである、請求項 1 の方法。

## 【請求項 5】

式 ( I ) のエクテイナシジン化合物において、基 R<sup>12</sup> がメチルである、請求項 1 の方法。

## 【請求項 6】

式 ( I ) のエクテイナシジン化合物において、基 R<sup>16</sup> がメチルである、請求項 1 の方法。

## 【請求項 7】

式 ( I ) のエクテイナシジン化合物において、基 R<sup>17</sup> がメトキシである、請求項 1 の方法。

## 【請求項 8】

10

20

30

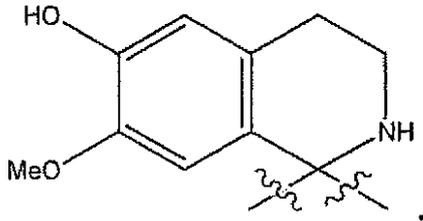
40

50

式 ( I ) のエクテイナシジン化合物において、基  $R^{1-8}$  が OH である、請求項 1 の方法。

【請求項 9】

式 ( I ) のエクテイナシジン化合物において、基  $R^{2-1}$  が、H、OH、もしくは CN であり、 $R^a$  が水素であって  $R^b$  がアミド基であるか、または、 $R^a$  と  $R^b$  とが = O を形成するか、または、 $R^a$ 、 $R^b$ 、およびこれらが取り付けられている炭素が基式 ( II ) :  
【化 2】



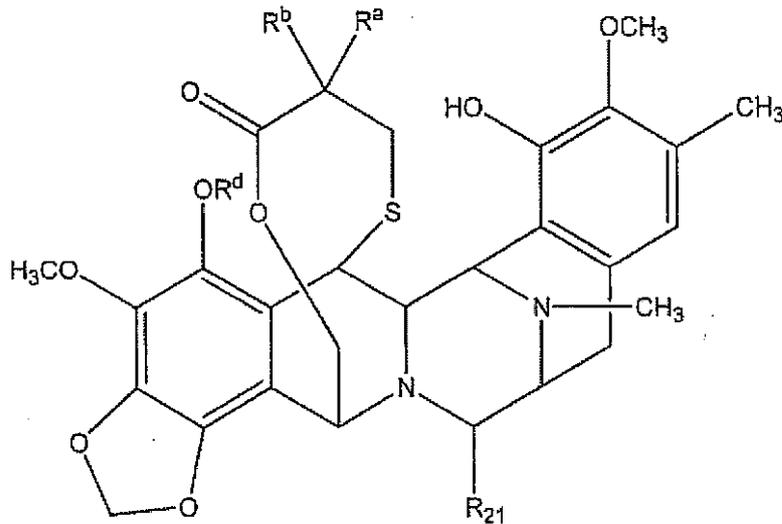
10

を形成する、請求項 1 の方法。

【請求項 10】

前記エクテイナシジン化合物が、式 ( III ) :

【化 3】



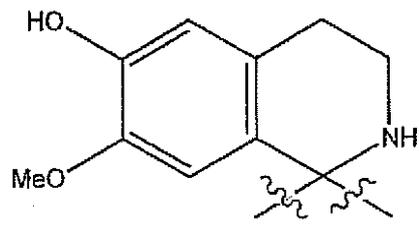
20

30

式中：

$R^a$  が水素で  $R^b$  が式 - NHR<sup>f</sup> - のアミドであり、式中、 $R^f$  がアルカノイルであるか、あるいは、 $R^a$  と  $R^b$  とが = O を形成するか、あるいは、 $R^a$ 、 $R^b$ 、およびこれらが取り付けられている炭素が基式 ( II ) :

【化 4】



40

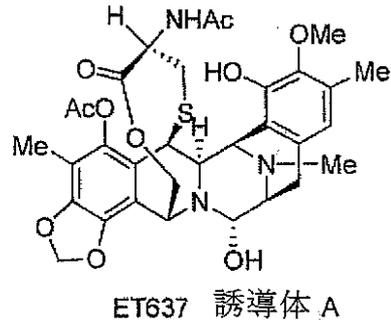
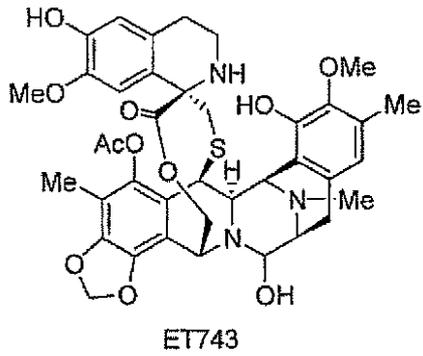
を形成し、 $R^d$  がアルカノイルであり、そして、 $R^{2-1}$  が、H、OH、もしくは CN である

、請求項 1 の方法。

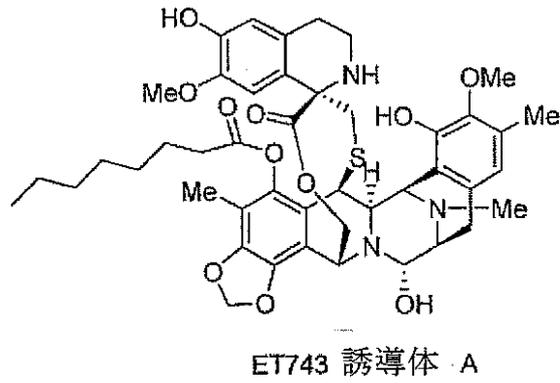
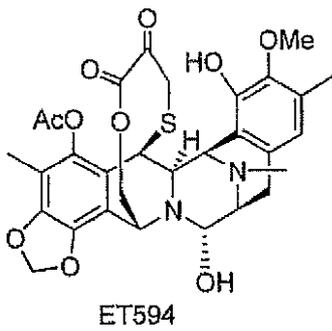
【請求項 11】

50

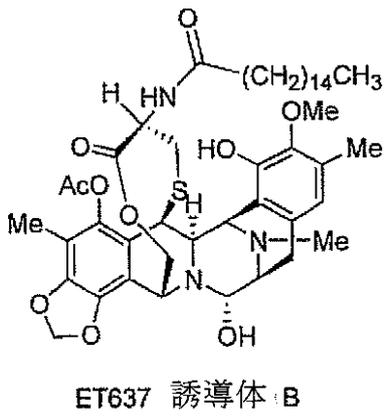
前記エクティナシジン化合物が：  
【化 5】



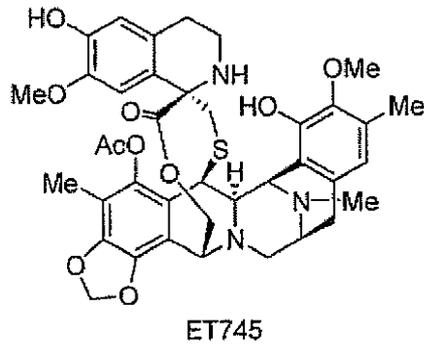
10



20



もしくは



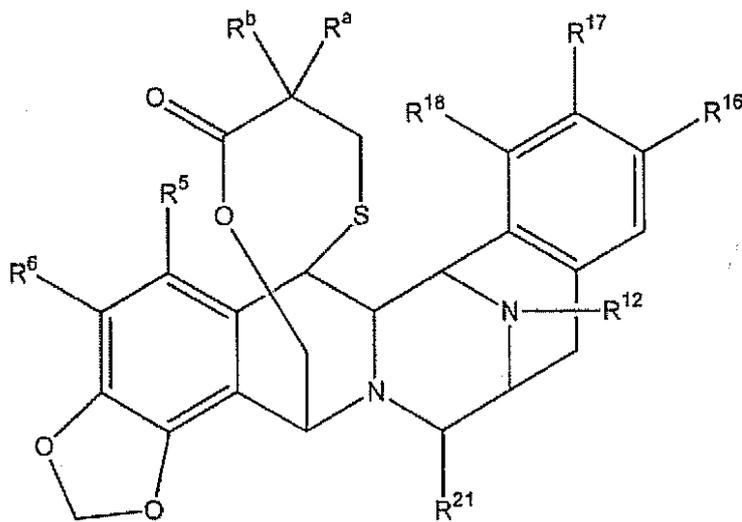
30

からなる群から選択される、請求項 10 の方法。

【請求項 12】

一般式 (I) :

## 【化6】



10

式中：

R<sup>5</sup>は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；R<sup>6</sup>は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリーールであり；R<sup>12</sup>は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリーールであり；

20

R<sup>16</sup>は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリーールであり；R<sup>17</sup>は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；R<sup>18</sup>は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；R<sup>21</sup>は、H、OH、CN、もしくはもう1つ別の求核基であり；ならびに

R<sup>a</sup>が水素であってR<sup>b</sup>が任意に置換されたアミノであるか、または、R<sup>a</sup>とR<sup>b</sup>とがカルボニル官能基=Oを形成するか、または、R<sup>a</sup>、R<sup>b</sup>、およびこれらを取り付けられている炭素がテトラヒドロイソキノリン基を形成する

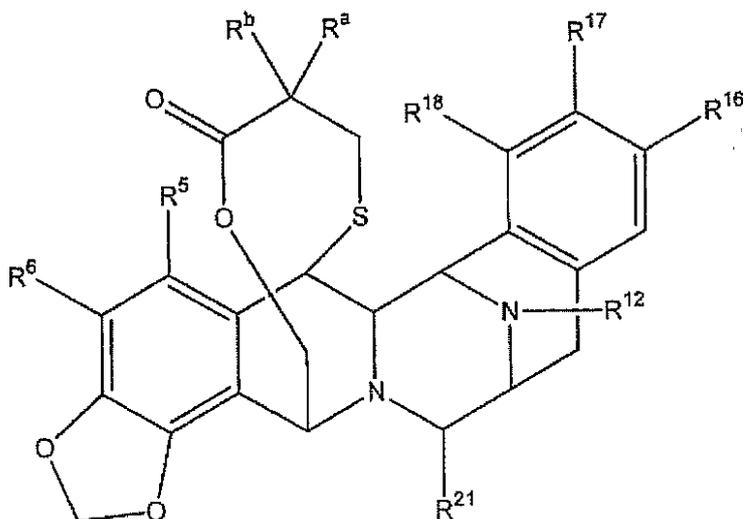
のエクティナジジン化合物の、請求項1～11のいずれか1項の方法における使用のための医薬品の調製における、使用。

【請求項13】

30

一般式(I)：

【化7】



40

式中：

R<sup>5</sup>は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；R<sup>6</sup>は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリーールであり；R<sup>12</sup>は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリーールであり；

50

$R^{16}$  は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリールであり；

$R^{17}$  は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；

$R^{18}$  は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；

$R^{21}$  は、H、OH、CN、もしくはもう1つ別の求核基であり；ならびに

$R^a$  が水素であって  $R^b$  が任意に置換されたアミノであるか、または、 $R^a$  と  $R^b$  とがカルボニル官能基 = O を形成するか、または、 $R^a$ 、 $R^b$ 、およびこれらが取り付けられている炭素がテトラヒドロイソキノリン基を形成する  
のエクティナシジン化合物、ならびに、医薬として許容可能な担体を含む、炎症処置用医薬品。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗炎症剤に関する。より具体的には、本発明は、抗炎症活性の、既知のクラスの化合物における発見に関する。

【背景技術】

【0002】

単球/マクロファージは、先天的および適応免疫（免疫）の重要な成分と認識されている。循環単球は、変化できる前駆体であり、種々の形の組織マクロファージへと分化する能力を有する。マクロファージは、外来の侵入者に対するガード（防御）に立ち、瞬時に体を病原に対してディフェンス（守備）でき、ならびに、他の免疫担当（適格）細胞動員シグナル（信号）を送り、抗原をTリンパ球に対して提示できる。もう一方では、マクロファージは、幾つかの疾患の発症もしくは進展においても、示唆されており、主に、原炎症および原血管新生メディエーター産生を経由する。このような病状は例えば、幾つかの慢性疾患（例えば、リウマチ関節炎、アテローム（粥状）硬化、紅斑性狼瘡）および腫瘍において存在する際立った炎症を包含する。

20

【0003】

腫瘍部位では、腫瘍関連マクロファージ（TAM）が、浸潤ストローマ細胞の主要な成分を代表する。TAMは、複雑な遊走の役割を、腫瘍内で持ち、<<マクロファージバランス仮説>>において示唆されるとおりである。事実、LPSおよびIFN- $\gamma$ で刺激されたマクロファージ（M1マクロファージもしくは古典経路で活性化されたマクロファージとも呼ばれる）は、腫瘍細胞を殺す潜在能力を持つが、幾つかの線の証拠が、腫瘍のミクロな環境内のマクロファージが、第2経路で活性化されたマクロファージ、つまりM2マクロファージに向かって歪曲されるとの考えを裏付ける。最も頻繁には、TAMは、非細胞毒性であり、数種の成長および血管新生因子を産生する。TAMは、免疫抑制分子（例えば、IL-10、TGF- $\beta$ ）、および、ケモカインを包含して種々の炎症メディエーターをも産生する。ケモカインは、マトリックスメタロ（金属）プロテアーゼを活性化させ、これは、マトリックス蛋白を消化し、腫瘍播種を促進させる。これゆえ、腫瘍部位でのTAMの蓄積および炎症分子の連続発現が実際に、腫瘍進展を煽ることがある。

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

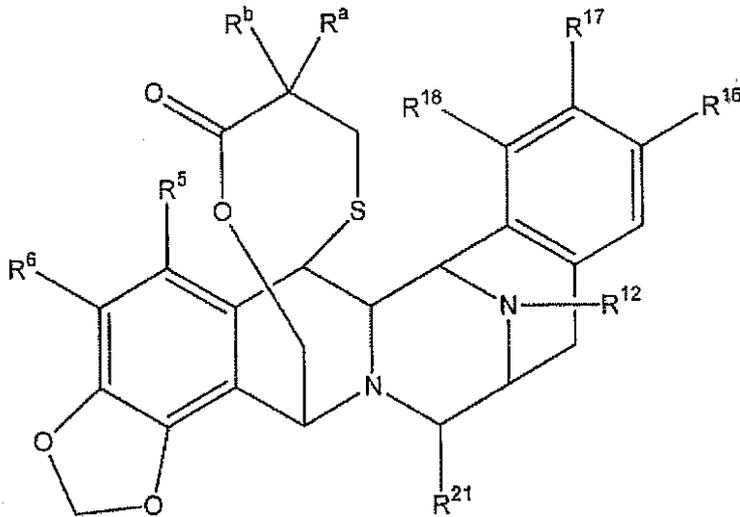
40

【0004】

エクティナシジン（ecteinascidin）化合物は、天然および合成化合物を包含する。これらは、縮合した5環系および1,4-架橋を保有する。我々は、抗炎症活性（作用）を、これらエクティナシジン化合物において見出した。このような化合物は広く記載されており、以降の一般式（I）：

【0005】

## 【化 1】



10

## 【0006】

を持ってよく、式中：

R<sup>5</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；

R<sup>6</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリールであり；

20

R<sup>12</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリールであり；

R<sup>16</sup> は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリールであり；

R<sup>17</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；

R<sup>18</sup> は、OH、アルコキシ、もしくはアルカノイルオキシであり；

R<sup>21</sup> は、H、OH、CN、もしくはもう1つ別の求核基であり；ならびに

R<sup>a</sup> が水素であって R<sup>b</sup> が任意に置換されたアミノであるか、または、R<sup>a</sup> と R<sup>b</sup> とがカルボニル官能基 = O を形成するか、または、R<sup>a</sup>、R<sup>b</sup>、およびこれらが取り付けられている炭素がテトラヒドロイソキノリン基を形成する。

## 【0007】

これゆえ、本発明は、炎症を処置していく方法を提供し、これは、一般式 (I) を持っている有効量のエクティナシジン化合物の投与を含む。

30

## 【0008】

本発明は、一般式 (I) を持っているエクティナシジンを、医薬として許容可能な担体もしくは稀釈剤と共に含んでいる医薬品をも提供する。

## 【0009】

本発明は更に、一般式 (I) を持っているエクティナシジンの、炎症処置における使用のための医薬品調製における使用を提供する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0010】

我々は、エクティナシジン化合物が、抗炎症活性を保有することを見出した。これゆえ、本発明は、上で定義されたような一般式 (I) の化合物に関する新たな医療指針に関する。

40

## 【0011】

これらの化合物において、その置換基は、以降のガイダンスに従って、選択され得る。

## 【0012】

アルキルおよびアルコキシ基は、好ましくは、1 ~ 12 炭素原子を持つ。1つのより好ましいクラス (分類) のアルキルおよびアルコキシ基は、1 ~ 約 6 炭素原子、最も好ましくは、1、2、3、もしくは 4 炭素原子を持つ。メチル、エチル、および、イソプロピルを包含してプロピルが、本発明の化合物において、特に好ましいアルキル基である。メトキシ、エトキシ、および、イソプロポキシを包含してプロポキシが、本発明の化合物にお

50

いて、特に好ましいアルキル基である。もう1つ別のより好ましいクラスのアルキルおよびアルコキシ基は、4～約12炭素原子、尚より好ましくは、5～約8炭素原子、最も好ましくは、5、6、7、もしくは8炭素原子を持つ。本明細書において使用される場合、この用語アルキルとは、他に修飾されなければ、環状および非環状基両方に関するが、環状基は、少なくとも3員環炭素を含むことになる。

【0013】

本発明の化合物における好ましいアルケニルおよびアルキニル基は、1つ以上の不飽和結合および2～約12炭素原子を持つ。1つのより好ましいクラスのアルケニルもしくはアルキニル基は、2～約6炭素原子、最も好ましくは、2、3、もしくは4炭素原子を持つ。もう1つ別のより好ましいクラスのアルケニルもしくはアルキニル基は、4～約12炭素原子、尚より好ましくは、5～約8炭素原子、最も好ましくは、5、6、7、もしくは8炭素原子を持つ。これらの用語アルケニルおよびアルキニルとは、本明細書において使用される場合、環状および非環状基両方に関する。

10

【0014】

本発明の化合物における適切なアリール基は、単および多環化合物を包含し、分離および/または縮合したアリール基を含有する多環化合物も包含する。典型的なアリール基は、1～3の分離もしくは縮合した環と、6～約18炭素環原子とを含有する。特に好ましいアリール基は、置換もしくは非置換フェニル、ナフチル、ピフェニル、フェナントリル、およびアントラシルを包含する。

20

【0015】

適切なアルカノイルオキシおよびアルカノイル基は、2～約20炭素原子、より好ましくは、2～約8炭素原子、尚より好ましくは、2～約6炭素原子、もっとより好ましくは、2炭素原子を持つ。もう1つ別の好ましいクラスのアルカノイルオキシ基は、12～約20炭素、尚より好ましくは、14～約18炭素原子、最も好ましくは、15、16、17、もしくは18炭素原子を持つ。

【0016】

上記の基は、1カ所以上の利用できる位置において、1つ以上の適切な基により、置換されてよく、OR'、=O、SR'、SOR'、SO<sub>2</sub>R'、NO<sub>2</sub>、NHR'、N(R')<sub>2</sub>、=N-R'、NHCOR'、N(COR')<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>R'、CN、ハロゲン、C(=O)R'、CO<sub>2</sub>R'、OC(=O)R'のようなものであり、式中、各R'基は独立に、H、OH、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、SH、CN、ハロゲン、=O、C(=O)H、C(=O)CH<sub>3</sub>、CO<sub>2</sub>H、置換もしくは非置換C<sub>1</sub>～C<sub>12</sub>アルキル、置換もしくは非置換C<sub>2</sub>～C<sub>12</sub>アルケニル、置換もしくは非置換C<sub>2</sub>～C<sub>12</sub>アルキニル、ならびに、置換もしくは非置換アリールからなる群から選択される。本発明の化合物における適切なハロゲン置換基は、F、Cl、Br、およびIを包含する。

30

【0017】

本発明の好ましい化合物は、一般式(I)のものであり、式中、1つ以上の以降の定義が適用される。

R<sup>5</sup>は、アルカノイルオキシであり；

R<sup>6</sup>は、メチルであり；

R<sup>12</sup>は、メチルであり；

R<sup>16</sup>は、メチルであり；

R<sup>17</sup>は、メトキシであり；

R<sup>18</sup>は、OHであり；

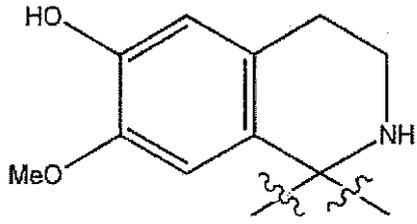
R<sup>21</sup>は、H、OH、もしくはCNであり；ならびに

R<sup>a</sup>が水素であってR<sup>b</sup>がアミド基であるか、または、R<sup>a</sup>とR<sup>b</sup>とが=Oを形成するか、または、R<sup>a</sup>、R<sup>b</sup>、およびこれらを取り付けられている炭素が基式(II)：

40

【0018】

## 【化2】



## 【0019】

を形成する。

10

## 【0020】

本発明用の化合物の例は、エクテイナシジン743のような天然エクテイナシジン、ならびに、例えば、米国特許第5,089,273号明細書、米国特許第5,478,932号明細書、米国特許第5,654,426号明細書、米国特許第5,721,362号明細書、米国特許第6,124,293号明細書、米国特許第5,149,804号明細書、米国特許第09/546,877号明細書、米国特許第5,985,876号明細書、および国際公開(WO)01/77115号において開示される他の1,4-架橋縮合エクテイナシジン化合物を包含する。

## 【0021】

エクテイナシジン743はET743としても知られ、エクテイナシジン743が特に好ましい。ET743は天然物であり、海産被囊類 *Ecteinascidia turbinata* 由来であり、潜在的な抗腫瘍活性を有する。これは新規で有効な薬剤であり、現在、臨床試験段階にあり、軟組織サルコーマ、乳癌、および卵巣癌を包含してある幾つかのヒト固形腫瘍において抗癌活性を示している。

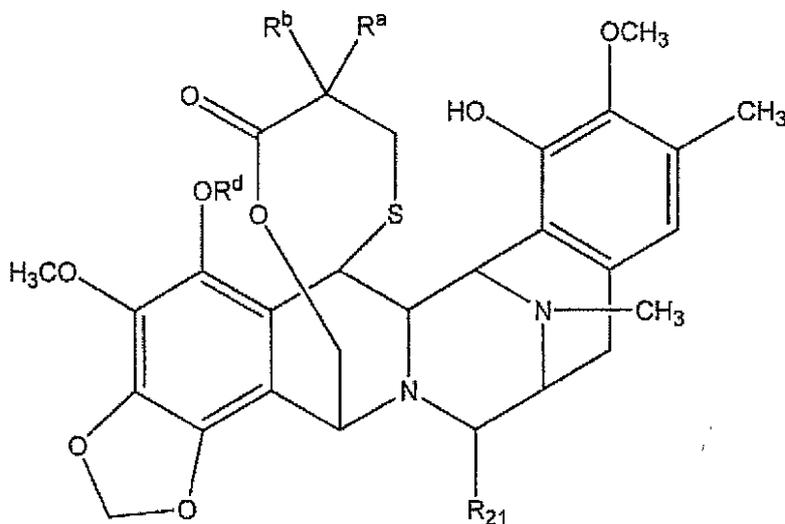
20

## 【0022】

以降の式(III)の化合物が、特に好ましい。

## 【0023】

## 【化3】



30

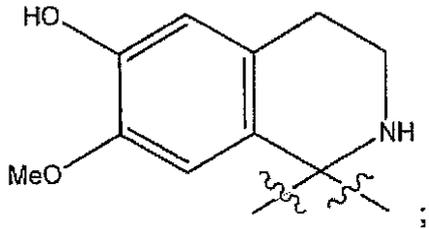
40

## 【0024】

式中、 $R^a$ が水素で $R^b$ が式 $-NHR^f-$ のアミドであり、式中、 $R^f$ がアルカノイルであるか、あるいは、 $R^a$ と $R^b$ とが $=O$ を形成するか、あるいは、 $R^a$ 、 $R^b$ 、およびこれらに取り付けられている炭素が基式(II)：

## 【0025】

【化 4】



【 0 0 2 6 】

を形成し、 $R^d$  がアルカノイルであり、そして、 $R^{21}$  が、H、OH、もしくはCNである。 10

【 0 0 2 7 】

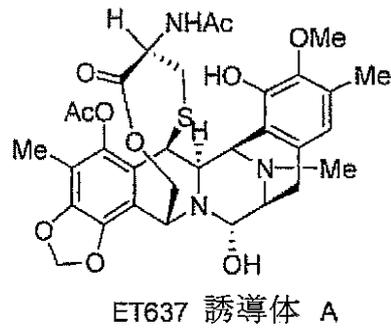
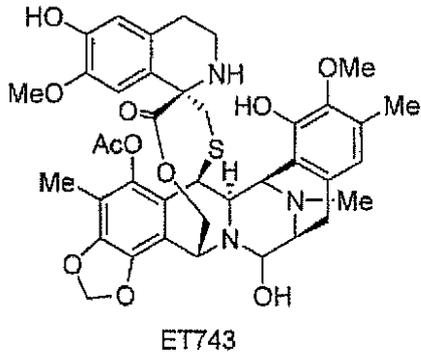
これらアルカノイル基は、アセチル以上、例えば、 $C_{20}$  までであり得る。

【 0 0 2 8 】

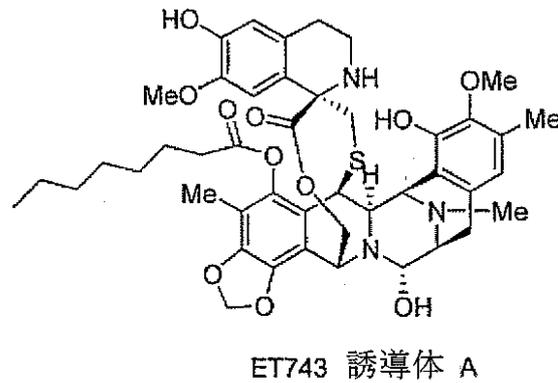
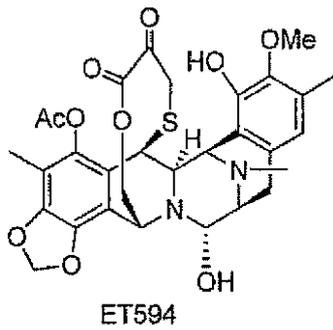
これゆえ、本発明の好ましい化合物は：

【 0 0 2 9 】

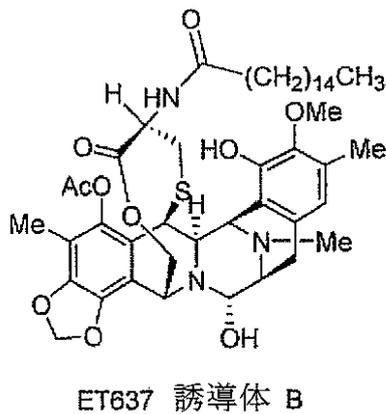
## 【化5】



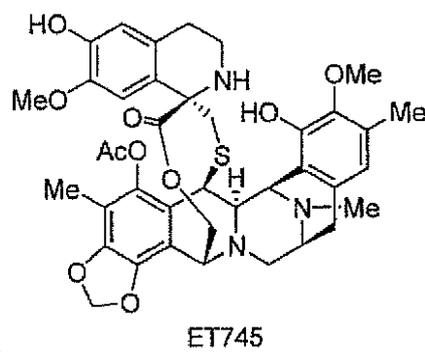
10



20



もしくは



30

## 【0030】

ならびに異なるアシル基を有する関連化合物を包含する。

## 【0031】

本発明により提供される医薬品は医薬組成物であり、本エクテイナシジン化合物、および、医薬として許容可能な担体を含んでいる。医薬品は従来形の形のものであり得、適切な投薬手順がなされ得る。

40

## 【0032】

指し示されているように、本発明の化合物は、抗炎症剤として有用である。これゆえ、これら化合物は、炎症を患う疾患の処置において、特に、慢性炎症および自己免疫疾患（例えば、リウマチ関節炎、Sjogren病、Crohn病）ならびにアテローム硬化の処置において、使用され得る。

## 【実施例】

## 【0033】

50

本研究において、我々は、薬理的範囲内濃度において、エクテイナシジン743が、選択毒性を骨髄系列に関して示し、単球/マクロファージのアポトーシスを誘導したことを実証する。非細胞毒性濃度において、エクテイナシジン743が有意に、*in vitro*でのマクロファージの分化を阻害し、選択された炎症サイトカインの産生を抑えた。これらの知見は、幾つかのヒト疾患における単球/マクロファージを標的化していくことを狙いとされる治療アプローチに関連していることがある。

#### 【0034】

ET743に加えて、ET637誘導体A、ET637誘導体B、ET594、ET743誘導体A、およびET745も、テストされた。これらも、選択された炎症サイトカイン産生を抑えると示された。

#### 【0035】

材料および方法

細胞調製：

精製された集団のヒト血液(中の)単球が、以前記載されたように(Allavena、P.、Piemonti、L.、Longoni、D.、Bernasconi、S.、Stoppacciaro、A.、Ruco、L.、およびMantovani、A. <<IL-10は、樹状細胞への単球の分化を防ぐが、マクロファージへのその成熟を促進する>> Eur. J. Immunol., 28:359-369, 1998参照)、FicollおよびPercoll勾配上での差別化密度遠心により、調製された。単球は通常>85%、CD14+細胞であった。精製されたTリンパ球(>95%CD3+)が、Percoll勾配上、以前記載されたように(Chieppa、M.、Bianchi、G.、Doni、A.、Del Prete、A.、Sironi、M.、Laskarin、G.、Monti、P.、Piemonti、L.、Biondi、A.、Mantovani、A.、Introna、M.、およびAllavena、P. <<単球由来樹状細胞上のマンノースレセプター(受容体)の架橋が、抗炎症免疫抑制プログラムを活性化させる>> J. Immunol., 171:4552-4560, 2003参照)して、得られた。ヒト胸腺細胞が、外科手術を受けている小児患者から切除された胸腺から、単離された。胸腺細胞が、梳解していくことにより得られ、Percoll勾配上で単離された。

#### 【0036】

細胞が、106細胞/mLで、完全培地RPMI(Biochrom, Berlin, FRG)+10%FCS(Hyclone, Logan, UT)中、培養された。*In vitro*において分化させられたマクロファージが、単球培養(単球コロニー刺激因子(M-CSF)Peprotech(20ng/mL)5日間)により、得られた。ある幾つかの実験において、マクロファージが、LPS(100ng/mL)(Sigma Aldrich)、IFN- (500IU/mL)もしくはIL-4(20ng/mL)(Schering Plough)で24時間、処理された。

#### 【0037】

腫瘍関連マクロファージ(TAM)および腫瘍細胞が、ミラノ-ビコッカ(Milano-Bicocca)大学S.ジェラルド(Gerardo)病院産婦人科医院に入院された卵巣アデノカルシノーマと診断された患者の腹水から単離された。該腹水中に含有された細胞が遠心され、FicollおよびPercollの識別密度勾配ならびにプラスチックに対する接着により、以前記載されたように単離された(Allavena、P.、Peccatori、F.、Maggioni、D.、Erroi、A.、Sironi、M.、Colombo、N.、Lissoni、A.、Galazka、A.、Meiers、W.、Maggioni、C.等<<再発腹水卵巣カルシノーマ患者における腹腔内組み換え-INF:腫瘍関連エフェクターにおける細胞毒性およびサイトカイン産生ならびに腫瘍細胞上での主要組織適合抗原発現の調節>> Cancer Res., 50:7318-7323, 1990参照)。TAM精製および腫瘍細胞調製は通常>65±10%であり、形態および表現型分析により定められるとおりであった。細胞が、エク

10

20

30

40

50

テイナシジン743を用いて、指し示された濃度において処理され、1～5日間培養され、図面の指示において特定されるとおりであった。インキュベーション期間の終わりに、細胞が回収され、洗浄され、DNA解析もしくは機能アッセイに使用された。

#### 【0038】

##### 細胞生存率の決定

細胞生存率が、DNA含量により、フローサイトメトリーにおいて、分析された。

処理に晒された細胞が、70%エタノールを用いて固定され、PBS中洗浄され、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のPIをPBS中において、および、25  $\mu\text{L}$ のRNase 10,000単位を含有している沃化プロピジウム(PI)溶液を用いて終夜暗所において、染色された。PI取り込みが、少なくとも20,000細胞/サンプルにおいて評価され、FACS Calibur機(Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA)を使用し、620nmの通過帯フィルターを用いた。アポトーシスが、Annexin VおよびPIを用いて染色していくことにより、検出された。FACS分析が実施され、530および620nmの通過帯フィルターを、それぞれ緑(Annexin V)および赤(PI)の蛍光に、570nmの2色鏡と組み合わせて、使用した。

10

#### 【0039】

##### 表現型解析

細胞膜マーカー発現が、免疫蛍光により実施され、フローサイトメトリーにより分析された。細胞が、抗CD14、抗CD16、抗CD68、抗CD206(マンノース受容体)、次いで、FITCヤギ抗マウスIgを用いて、記載されたようにインキュベートされた。少なくとも10,000細胞が、分析された。

20

#### 【0040】

##### サイトカイン産生

非処理細胞またはエクテイナシジン743もしくは他の抗新生物剤を用いて処理された細胞の上清が、24時間培養後回収され、凍結された。単球、マクロファージ、およびTAMが、100ng/mLのLPSを用いて刺激され、最大サイトカイン産生を誘導した。サイトカインCCL2、TNF、およびIL-6の決定が、製造元の説明書に従って、特異的ELISAにより、測定された。

#### 【0041】

##### 腫瘍患者

エクテイナシジン743を用いたフェーズII試験を受けているサルコーマもしくは卵巣癌患者が、欧州腫瘍研究機関(the European Oncology Institute、ミラノ、イタリア)に入院した。患者は、エクテイナシジン743(1300mg/m<sup>2</sup>)を、3時間の点滴で与えられた。血液サンプル(40mL)が、本処置直前、該点滴の終わりに(3時間)回収された。血液サンプルが直ちに加工され、Percoll精製単球(通常10<sup>6</sup>細胞)がM-CSF(20ng/mL)を用いて5日間培養された。分化させられた細胞が、上記のように、回収され、数えられ、表現型発現に関して分析された。結果が、絶対数マーカー陽性細胞/10,000細胞として、表される。マクロファージの分化の有意な阻害は、同一患者からの、治療前に回収された細胞に対する、マーカー陽性(+)細胞の50%抑制と見なされた。

30

40

#### 【0042】

##### 実施例1

エクテイナシジン743が、選択的細胞毒性効果を、単核食細胞において示す

我々はまず、エクテイナシジン743処理の効果を、ヒト白血球サブセット生存率に関して、*in vitro*において、研究した。血液(中の)単球、リンパ球、および胸腺細胞の精製調製品が、異なる濃度のエクテイナシジン743を用いて、48時間培養された。細胞生存率が、DNA解析および沃化プロピジウム(PI)染色により、フローサイトメトリーにおいて、査定された。血液(中の)単球の精製調製品は高度に、この薬剤の細胞毒性効果に感受性であった。用量依存的な死が、50%致死用量(IC50)の2.5～5nMを用いた48時間後の培養において見出された(図1A)。精製Tリンパ球は

50

遙かに僅かに感受性であり、5 nMにおいて全て生存していた。リンパ球に関するIC50は、20 nMであった。単離されたての胸腺細胞は、遙かにより耐性であった (IC50 > 40 nM、図1A)。

#### 【0043】

視覚的に、エクテイナシジン743に晒された全ての死んでいる単球が、Annexin Vに関して陽性に染まり、この薬剤がアポトーシスを誘導することを指し示している (図1B)。単球の死も、DNA解析により、フローサイトメトリーにおいて、確かめられた (図2)。M-CSF、単球の成長および分化因子の存在下に、エクテイナシジン743の毒性効果からの一部保護が、観察された。M-CSFが、単球の死を、55%から30%に、5 nMエクテイナシジン743において、48時間のインキュベート後に、65%から35%に、10 nMにおいて、24時間の処理後に、シフトさせた (図2)。M-CSFは、エクテイナシジン743と同時にしくは前に加えられた場合のみ有効であったが、もはや、この薬剤の4時間後に与えられた場合、有効でなかった。

10

#### 【0044】

エクテイナシジン743の細胞毒性効果の速度論的解析が、M-CSF存在下を実施された。細胞が、M-CSF (20 ng/mL) および異なる濃度のエクテイナシジン743を用いて処理された。サンプルが、指し示された時間において回収され、DNA解析用にテストされた。より高濃度において、有意な毒性が既に、24時間のインキュベート後に観察され、ずっと上昇した (図3A)。より低濃度 (2.5 nM) は、40~50%の死を、5日後に誘導した。

20

#### 【0045】

我々は次に、エクテイナシジン743の効果を、in vitroにおいて5日間、M-CSFと共に培養された単球から得られた既に分化したマクロファージに関して、研究した。最後の48時間におけるエクテイナシジン743の添加が結果的に有意な死をもたらしたが、単離したての単球に比較して、より低い程度であった。図4Aは、同一ドナーからの単球およびマクロファージの感受性を比較している代表的な実験を示す。単球が、マクロファージに、M-CSF (20 ng/mL) との培養により、分化した。3日目に、エクテイナシジン743が、培養に加えられ、48時間、インキュベートされた。結果は、同一ドナーから得られた単球およびマクロファージの比較を示す。生存率が、PI染色により査定され、フローサイトメトリーにより分析された。同様な結果が、他の4実験において得られた。一連の異なる4実験において、in vitroにおいて分化したものに關するIC50は、10 nMであった。

30

#### 【0046】

我々は次いで、LPSおよびIFN- $\gamma$ により古典経路で活性化されたマクロファージ (M1マクロファージ) ならびにIL-4により第2経路で活性化されたマクロファージ (M2マクロファージ) の、エクテイナシジン743に対する感受性をテストした。In vitroにおいて分化したマクロファージが、LPS (100 ng/mL) + IFN- $\gamma$  (500 UI/mL)、IL-4 (20 ng/mL) を用いて、エクテイナシジン743存在下もしくは非存在下に、48時間刺激された。生存率が、PI染色により査定され、フローサイトメトリーにより分析された。LPS刺激およびIL-4刺激両方のマクロファージが、非刺激マクロファージ同様、薬剤処理に対して感受性であった (図4B)。

40

#### 【0047】

我々はまた、非処置卵巣アデノカルシノーマ患者の腹水から単離された腫瘍関連マクロファージ (TAM) をも、テストした。異なる3人の卵巣癌患者から単離されたTAM強化調製品が、in vitroにおいて、エクテイナシジン743を用いて、48時間処理された。生存率が、PI染色により査定され、フローサイトメトリーにより分析された。TAMが有意に、in vitroにおいて、エクテイナシジン743により殺傷され、10 nMにおいて、40~70%殺傷率であった。異なる3人の患者からの結果が、図4Cにおいて示される。

50

## 【 0 0 4 8 】

これらの実験全体が、ヒト単核食細胞が高度に、治療範囲内濃度において、エクテイナシジン743の細胞毒性効果に対して感受性であることを実証する。M - C S F 存在下でさえ、単球が決して、細胞周期を進まなかったことが、記されるべきであり、フローサイトメトリーを用いたDNA解析によりチェックされたとおりであった。単球におけるエクテイナシジン743の毒性効果はこれゆえ、細胞周期から独立しており、非複製細胞におけるこの薬剤の生物学的効果を研究する唯一の機会を提供する。

## 【 0 0 4 9 】

## 実施例 2

非細胞毒性濃度のエクテイナシジン743が、*in vitro*および*in vivo*において、マクロファージの分化を阻害する

マクロファージの分化に関するエクテイナシジン743の効果を研究するために、非細胞毒性用量のこの薬剤が使用された。単球が、M - C S F ( 2 0 n g / m L ) および細胞毒性濃度以下のエクテイナシジン743と共に、5日間培養された。表現型の分析が、間接免疫蛍光により実施され、フローサイトメトリーにおいて、巨大細胞上で開閉させて、分析された。通常、平均  $65 \pm 15\%$  ( > 1 0 の実験の平均  $\pm$  S D ) のインプット ( 入力 ) の単球が、C D 1 6、C D 6 8、およびC D 2 0 6 ( マンノース受容体 ) を包含して典型的なマクロファージマーカーを発現している巨大細胞へと分化する。5日の培養後、単球生存率が、フローサイトメトリーにおける沃化プロビジウム染色により評価され、0 . 5 および 1 n M エクテイナシジン743において、それぞれ92%および70%の非処理細胞であった。マクロファージの分化のプロセスが一部、*de novo* 発現のC D 6 8、C D 1 6、およびC D 2 0 6 として阻害され、1 n M エクテイナシジン743において抑えられた ( 図 3 B ) 。

## 【 0 0 5 0 】

上の *in vitro* における知見を評価するために、我々は、腫瘍患者におけるエクテイナシジン743の *in vivo* 投与が、単球生存率に関する計測可能な効果ならびにマクロファージの分化に対する *in vitro* における許容量を持ち得るかどうかが、テストした。エクテイナシジン743を用いるフェーズII試験が現在、進行卵巢アデノカルシノーマ患者において進行中であり、彼らは、2とおりの異なるサイクルの従来のシスプラチンおよびタキソール主体の化学療法に失敗していた。この研究のために選択された腫瘍患者は、 $1300 \mu\text{g} / \text{mL} / \text{m}^2$  のエクテイナシジン743を用いて処置された。患者からの血液サンプルが、薬剤投与直前および3時間の点滴の終わりに、採血された。精製単球が直ちに単離され、M - C S F ( 2 0 n g / m L ) と共に5日間培養され、マクロファージの分化を誘導させ、次いで、表現型発現用に分析された。12人の評価可能な患者の内、6被験者からの単球が、エクテイナシジン743処理後に、マクロファージの分化の減少を示した。表1は、*in vitro* において分化された患者からのマクロファージの表現型分析を示し、彼らの細胞は、治療後に、治療前に回収された細胞と比較して、C D 2 0 6、C D 1 6、およびC D 6 8 発現の少なくとも50% 阻害を示した。示されるデータは、全10,000の入力細胞についての、マーカー陽性細胞の絶対数である。他の6人の患者から回収された単球は、如何なる有意な減少をも、それらの分化能において、示さなかった。

## 【 0 0 5 1 】

【表 1】

表1. In vivoエクテイナシジン743処理の、腫瘍患者におけるin vitroマクロファージ分化に関する効果

患者	マーカー陽性マクロファージ絶対数/10,000細胞		
	非被曝	エクテイナシジン743に被曝	% 阻害*
UPN 1			
CD206	4350	550	88
CD16	3110	1248	60
CD68	2703	1473	45
UPN 2			
CD206	2810	595	79
CD16	2705	1105	60
CD68	3500	1060	70
UPN 3			
CD206	3590	474	87
CD68	3260	632	80
UPN 4			
CD16	5130	3050	41
CD68	5550	2460	55
UPN 5			
CD16	1575	594	63
CD68	1620	815	50
UPN 6			
CD16	2750	480	83
CD68	2320	505	79

\*点滴前の細胞に対するマクロファージ分化の%阻害

我々はまた、エクテイナシジン743を用いた *in vivo* における処理が、測定可能な単球減少を、癌患者において引き起こしたかどうか、調べた。単球の値は、血液製剤から、通常の臨床分析の間に、得られた。単球形態分析が記録され利用可能であった9患者の内、7患者が、単球数の減少を示し(少なくとも1サイクルにおいて、点滴前の値に比較して25%阻害)、全白血球に亘る単球%および単球/ $\mu$ L血液の絶対数両方で評価された。3人の代表の患者からの結果が、図5において示される。全数白血球における一定レベルもしくは一過的な増加にもかかわらず、薬剤点滴後最初の数日において、単球は決して増加せず、実際に頻繁に減少した。

#### 【0053】

##### 実施例3

エクテイナシジン743は、炎症サイトカイン/ケモカイン産生を阻害する

単球/マクロファージは、炎症/免疫応答を司る可溶性因子の、潜在産生者である。我々はこれゆえ、これらの細胞の分泌機能に関するエクテイナシジン743処理効果をテストした。ケモカインCCL2は、単核食細胞の主要走化因子であり、免疫および幾つかの腫瘍細胞により、産生される。腫瘍由来CCL2は、循環している単球を、その腫瘍部位において惹き付け、腫瘍TAM含量は、CCL2レベルと相関し、幾つかの腫瘍において実証されているとおりである。

#### 【0054】

単球および *in vitro* において分化されたマクロファージが、LPS(100 ng/mL)で刺激された。1時間のLPS刺激後、それらは、エクテイナシジン743処理された。16時間のインキュベート後、細胞上清が回収され、ELISAにおいてテストされた。これらの処理条件下、5 nMまでの濃度に関して、細胞生存率は通常>85%であった。エクテイナシジン743処理は用量依存的に、LPS刺激単球および *in vitro* 由来マクロファージによるCCL2産生を抑えた(図6A)。5 nMでの平均阻害は、単球に関しては、65%(50~80%の範囲、n=5)であり、*in vitro* 分化マクロファージに関しては、50%(25~75%の範囲、n=5)であった。結果は、3~5実験の平均 $\pm$ SEである。

#### 【0055】

次に、卵巣カルシノーマに関連したTAMが、テストされた。単離したての卵巣腫瘍細胞およびTAMが、エクテイナシジン743と共に16時間インキュベートされた。TAMが、LPS(100 ng/mL)で刺激された。細胞上清が回収され、ELISAにおいてテストされた。結果は、TAMに関しては、4実験の平均 $\pm$ SEであり、腫瘍細胞に関しては、1実験からである。LPS刺激によるCCL2産生は、50%抑制され(40~60%の範囲、n=4)(図7A)、一方、それらの本来の産生は、43%抑制された(30~50%の範囲、n=4)。

#### 【0056】

我々は、2種の他のサイトカインIL-6およびTNFをもテストし、これらは、マクロファージおよび腫瘍細胞により産生され、炎症特性を持ち、ある幾つかの腫瘍の成長因子としても作用する。IL-6産生はいつも、エクテイナシジン743処理後に抑えられ、全体としての阻害は、5 nMにおいて、単球およびマクロファージにおいて、それぞれ54%(51~57%の範囲、n=2)および69%(66~72%の範囲、n=2)であった(図6B)。TAMにおけるIL-6放出は幾らか、処理に対してより耐性であり、5 nMにおいて、平均阻害が35%(25~53%の範囲、n=4)、10 nMにおいて、47%(33~63%の範囲、n=4)であった(図7B)。

#### 【0057】

興味あることに、エクテイナシジン743は、単離したての腫瘍細胞によるCCL2およびIL-6の本来の産生をも抑えた。代表的な実験が、図7において示される。

#### 【0058】

対照的に、そして、非常に驚くべきことに、単球、*in vitro* において分化したマクロファージ、およびTAMが、LPS(100 ng/mL)で刺激され、エクテイナ

10

20

30

40

50

シジン743処理され、1時間のLPS刺激を進められ、そして16時間のインキュベーション後に、細胞上清が回収され、ELISAにおいてテストされた場合、単球/マクロファージにより、ならびに、TAMによるTNF産生が、TAMに関して(図8A)10nMまでさえも、決して阻害されなかったことが観察され、エクテイナシジン743が、選択された遺伝子にしか干渉しないことを示唆している。これらの結果は、これらの条件下に、細胞が本処理により損傷されなかったことも、指し示している。サイトカイン産生に関するエクテイナシジン743の阻害効果とその転写レベルにあったかどうかを証明すべく、我々は、LPS刺激マクロファージからのCCL2およびTNFのmRNAを、エクテイナシジン743に晒されたLPS刺激単球におけるCCL2およびTNF転写産物のリアルタイムのPCRにより、解析した。図8Bにおいて示されるように、エクテイナシジン743処理後、CCL2転写産物の一貫した抑制が観察され、一方、TNF mRNAは、Elisaにおいて得られた結果では、影響を受けなかった。

10

【0059】

これらの結果全体が、薬理濃度におけるエクテイナシジン743が、2種の重要な炎症サイトカイン産生を、単核食細胞および腫瘍細胞において抑えることを指し示す。

【0060】

#### 実施例4

他のエクテイナシジン化合物も、炎症サイトカイン/ケモカイン産生を阻害する

我々は、5種の他のエクテイナシジン化合物(表2)も、*in vitro*におけるヒト単球によるCCL2産生の、それらの阻害能に関して、テストした。これら5種のテスト化合物の内、ET637誘導体Aのみが、単球による炎症サイトカイン産生を、濃度2.5および5nMにおいて下方修正させる顕著で一貫した能力を示した。これらの濃度は、単球生存率に、48時間の被曝後に、影響を及ぼさなかった。ET637誘導体Aの阻害の程度は、ET743と比較して、更により際立っていた。表2において、CCL2産生が、腫瘍細胞上清に対する単球の被曝により誘導され、異なる2人のドナーにおいて、2.5および5nMにおいて、それぞれ80%および97%まで阻害されることが、示される。同一の実験において、ET743は、30%~70%阻害した。他の化合物も、阻害活性を示したが、他の2種の上記化合物よりも、低レベルであった。

20

【0061】

【表 2】

表2. ET743および他のエクテイナシジン化合物の、炎症ケモカインCCL2産生に関する阻害効果

		ドナー A % 阻害	ドナー B % 阻害
ET743	2.5 nM	30	60
	5 nM	70	70
ET637 誘導體 A	2.5 nM	80	80
	5 nM	97	87
ET594	5 nM	25	-
	10 nM	25	-
ET743 誘導體 A	2.5 nM	30	-
	5 nM	35	30
ET745	2.5 nM	-	-
	5 nM	23	-
ET637 誘導體 B	2.5 nM	-	-
	5 nM	25	-

10

20

## 【0062】

単球がLPS(100 ng/mL)で刺激され、ET743および他のエクテイナシジン化合物で処理された場合、同様な結果が得られたが、全体の阻害は、腫瘍上清がCCL2誘導刺激として使用された場合の前の実験と比較して、顕著でなかった。

30

## 【0063】

図10において、ET637誘導體Aが、CCL2産生の有意な阻害を与えることが、確かめられた。

## 【0064】

## 実施例5

エクテイナシジン743の、現在卵巣癌において使用される抗新生物剤との比較

エクテイナシジン743が活発に、卵巣アデノカルシノーマ処置に向けて研究されているので、エクテイナシジン743のこれらの抗炎症効果を、この疾患において従来使用される他の化合物、つまり、ドキソルピシン、シスプラチン、およびタキソールと比較するのが、興味あった。単球が48時間、指し示された濃度のエクテイナシジン743、ドキソルピシン、タキソール、およびシスプラチンと共にインキュベートされた。生存率が、PI染色により査定され、フローサイトメトリーにより分析された。図9Aは、活性濃度において(>0.5 μM)、腫瘍細胞上、ドキソルピシンが高度に、単球上、48時間の処理後に細胞毒性であったことを示す一方、シスプラチンおよびタキソールはそうではなかった。シスプラチンでの有意な毒性は、非常に高濃度(40 μM)においてのみ観察された一方、タキソールは、300 nMにおいてさえ、無効であった。

40

## 【0065】

指し示された用量のこれら抗腫瘍剤で処理されたLPS刺激単球によるCCL2およびTNF産生も、テストされた。細胞上清が24時間のインキュベート後に回収され、ELISAにおいてテストされた。図9Bにおいて示されるように、タキソールおよびドキソ

50

ルピシンが無効であったが、DDP（シスプラチン）（ $10 \mu\text{M}$ ）がCCCL2産生を抑えた。これらの化合物のいずれもが、TNF産生に干渉しなかった。これらの結果は、単球の細胞毒性およびCCCL2の阻害が、卵巣癌処置において従来使用される抗腫瘍剤の一般化された特性でないことを、指し示す。

#### 【0066】

##### 考察

この研究において、我々は、単核食細胞に関する、エクテイナシジン743の細胞毒性効果を評価してきた。血液を循環している単球が高度に、この薬剤に対して感受性であり、濃度 $5 \text{ nM} / 48$ 時間においてアポトーシスを引き起こした。In vitroにおいて分化したマクロファージおよび腫瘍関連マクロファージ（TAM）も、 $5 \sim 10 \text{ nM}$ において感受性であった。これらの値は、有効治療濃度範囲内にある。低濃度のエクテイナシジン743において、単球が、マクロファージへのその分化において、阻害された。我々は、これらの結果を、エクテイナシジン743治療を受けている担癌患者からの単球を研究していくことにより、確かめている。12人のテスト患者のうち6人において、点滴（ $1300 \text{ mg} / \text{m}^2$ ）3時間後に回収された単球が、治療直前に回収された単球と比較して、in vitroにおけるマクロファージの分化の $> 50\%$ の阻害を示した。更に、有意な単球減少が、これらの患者の大多数における薬剤点滴後の最初の数日において観察されている。これらの結果は、in vivoにおけるエクテイナシジン743に対する簡単な被曝が、単球における細胞毒性効果を提供するに充分であることを指し示す。

#### 【0067】

我々の仕事の主要な知見は、エクテイナシジン743の、炎症サイトカイン産生における阻害活性である。単球/マクロファージにより産生される種々の炎症サイトカインの中でも、我々は、IL-6、TNF、およびケモカインCCCL2をテストしてきた。CCCL2は、単球および他の白血球（サブセット）を惹き付けるケモカインであり、単球/マクロファージおよび幾つかの腫瘍細胞の両方により、産生される。卵巣アデノカルシノーマ細胞が、莫大な量のCCCL2を産生すること、ならびに、これらのレベルが、腫瘍のマクロファージ含量と相関することが、記載されてきた。CCCL2はこれゆえ、この腫瘍部位において、単球/マクロファージの動員を統制している最重要因子の内の1種である。エクテイナシジン743は強く、LPS活性化単球、マクロファージ、およびTAMによるCCCL2放出を、阻害した。エクテイナシジン743はまた強く、単離された卵巣腫瘍細胞による本来のCCCL2産生を、阻害した。これゆえ、TAMおよび腫瘍細胞によるより低レベルのCCCL2がよく、その腫瘍部位において動員されるマクロファージ数を減らす。上記のin vitroにおける実験において、エクテイナシジン743が、16時間の培養期間を通してずっと、存在していた。我々は、in vitroでのエクテイナシジン743に対するより短い被曝が、サイトカイン産生に影響を及ぼすに充分であったかどうか、チェックした。エクテイナシジン743に晒された単球が、1時間の培養後に洗浄され、新鮮培中で置き換えられた。これらの条件下に、CCCL2産生阻害が尚、16時間の処理を受けている細胞と比較すれば僅かに低かったが、有意であった（それぞれ、 $57\%$ および $69\%$ 阻害）。

#### 【0068】

IL-6は、原炎症サイトカインであり、免疫/造血系における重要な効果を有し、CCCL2産生のコファクター（共因子）である。加えて、幾つかの研究が、IL-6が、卵巣癌を包含してある幾つかの腫瘍細胞の成長因子として作用することもあることを指摘している。CCCL2に関しては、LPS誘導IL-6が劇的に、単球/マクロファージにおいて、エクテイナシジン743により減少された。単離された腹水腫瘍細胞の本来のIL-6産生も、減少された。

#### 【0069】

新規な、最近記載された、IL-6の効果は、Tリンパ球を抑制T細胞（Treg）媒介抑制から救うその能力である。Tregは小さいが、非常に重要なサブセットのTリンパ球であり、T細胞の自己反応性を制御し、ホメオスタシス（恒常性）を維持する。Tr

10

20

30

40

50

e g に関する自己免疫疾患における役割は、よく認められている。T r e g により抑制される自己反応性Tリンパ球は、I L - 6 により救われ得、こうして、自己免疫反応を永続していく。これゆえ、エクテナシジン743 媒介によるI L - 6 の抑制は、好ましい治療効果たり得る。エクテナシジン743 は決して、慢性炎症疾患処置用には考えられてこなかった。この研究の結果は、抗原提示細胞（つまり、単球）前駆細胞におけるその細胞毒性効果と、I L - 6 を減少させるその能力との両方に関して、エクテナシジン743 が、抗炎症治療における興味ある候補であることを指摘する。

【0070】

C C L 2 およびI L - 6 とは違って、エクテナシジン743 は、もう1種別の重要な炎症メディエーターであり、L P S 刺激単球/マクロファージにより産生されるT N F の産生には、有意な効果を全く持たなかった。

10

【0071】

我々は、他のエクテナシジン化合物がE T 7 4 3 同様、ヒト単球によるC C L 2 産生を阻害できることを、実証した。テスト化合物から、E T 6 3 7 誘導体A が、C C L 2 産生を下方修正させる顕著で一貫した能力を示している。E T 6 3 7 誘導体A の阻害の程度は、E T 7 4 3 に比較して、更により際立っていた。他の化合物も、阻害活性を示したが、より低レベルにおいてであった。

【0072】

結論として、エクテナシジン743 および他のエクテナシジン化合物が、単球/マクロファージの生存率および機能に影響を及ぼすとの知見が、これらの化合物の新規な効果および新たな治療指針を開示する。

20

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】パネルA：エクテナシジン743 と共に培養された血液（中の）単球、リンパ球、および胸腺細胞の、細胞生存率。 パネルB：エクテナシジン743 処理された単球のアポトーシス。

【図2】M - C S F 前処理が一部、単球を、エクテナシジン743 の原アポトーシス効果から保護する。

【図3】パネルA：単球へのエクテナシジン743 の細胞毒性効果の速度論。 パネルB：マクロファージの分化の阻害。

30

【図4】パネルA：同一ドナーからの単球およびマクロファージの、E T 7 4 3 に対する感受性。 パネルB：古典経路で、L P S とI F N - とにより、あるいは、I L - 4 により活性化されたマクロファージの、E T 7 4 3 に対する感受性。 パネルC：腫瘍関連マクロファージ（T A M ）の、E T 7 4 3 に対する感受性。

【図5】腫瘍患者におけるエクテナシジン743 の *i n v i v o* 点滴が、一過性の単球減少を誘導する。

【図6】エクテナシジン743 が、単球およびマクロファージによるC C L 2 （パネルA）およびI L - 6 （パネルB）産生を阻害する。

【図7】エクテナシジン743 が、T A M および単離したての腫瘍細胞におけるC C L 2 （パネルA）およびI L - 6 （パネルB）産生を阻害する。

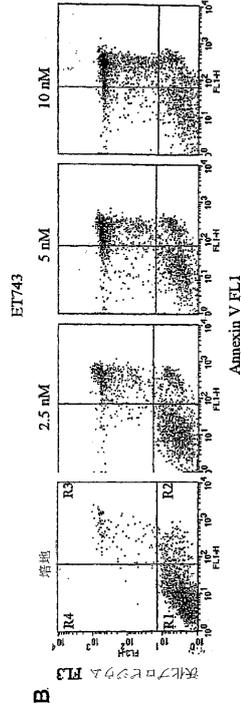
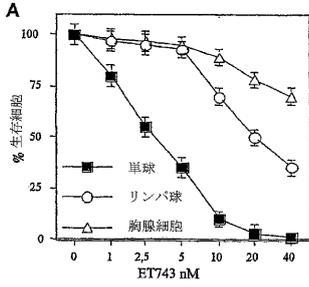
40

【図8】パネルA：エクテナシジン743 は、単球、マクロファージ、およびT A M によるT N F 産生に影響を及ぼさない。 パネルB：エクテナシジン743 に晒されたL P S 刺激単球における、C C L 2 およびT N F の転写産物のリアルタイムのP C R。

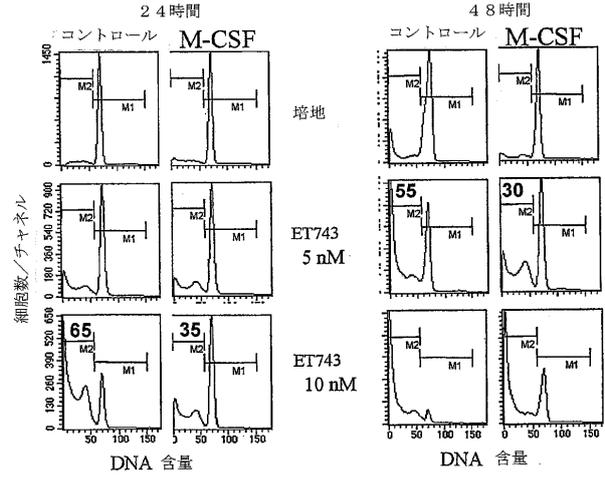
【図9】パネルA：エクテナシジン743、ドキシソルピシン、タキソール、およびC i s - D D P の、単球への細胞毒性。アスタリスク（\*）は、*i n v i t r o* 培養された腫瘍細胞株に関する、各薬剤に関するI C 5 0 を指し示す。 パネルB：指し示された用量の抗腫瘍剤で処置されたL P S 刺激単球によるC C L 2 およびT N F 産生。

【図10】エクテナシジン743 および他のエクテナシジン化合物で前処理されたL P S 単球による、C C L 2 分泌。

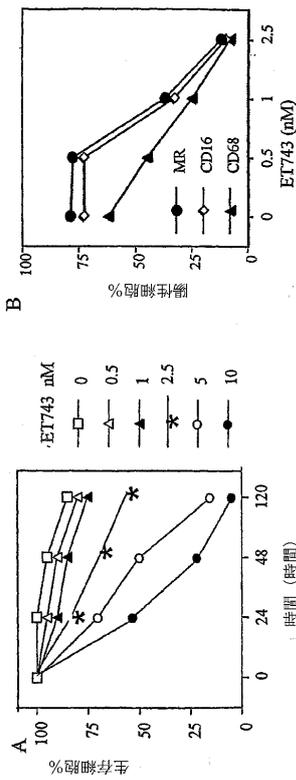
【 図 1 】



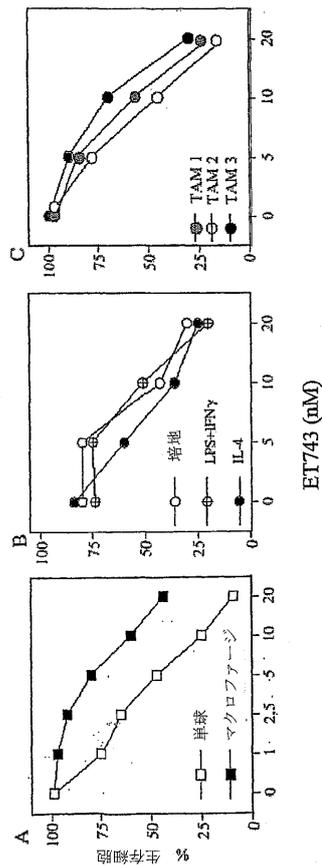
【 図 2 】



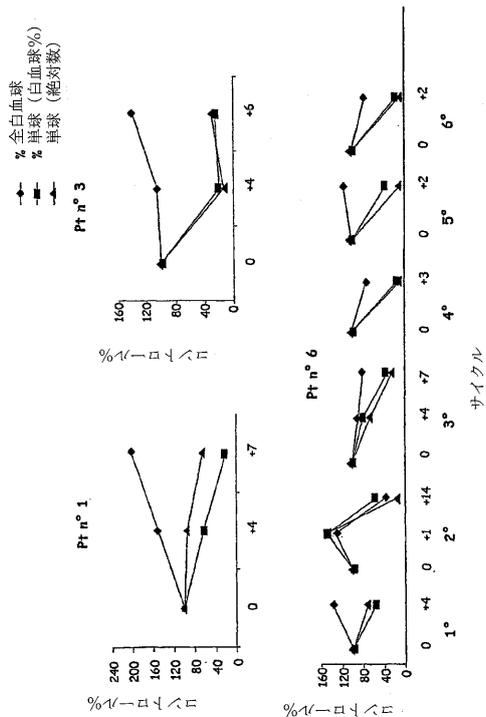
【 図 3 】



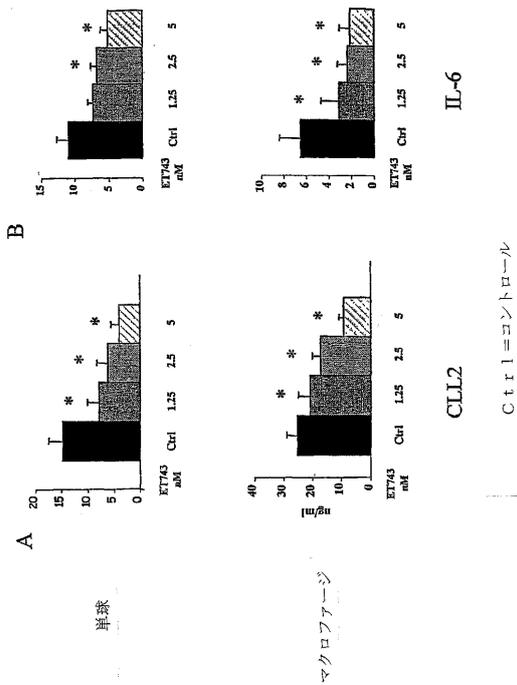
【 図 4 】



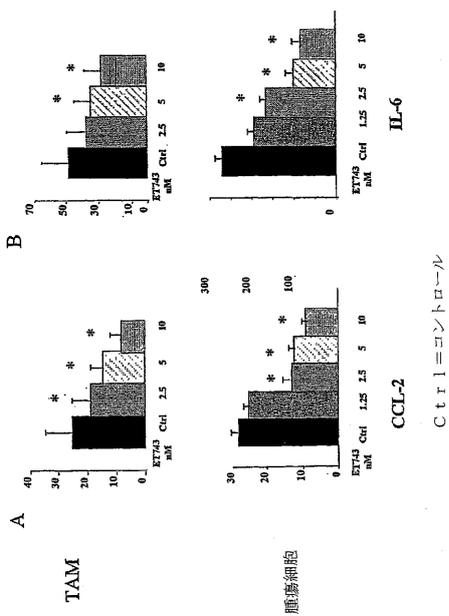
【 図 5 】



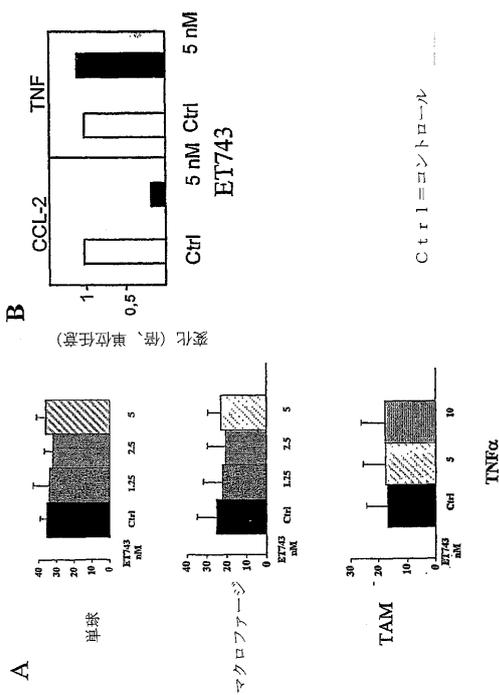
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】





## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2005/050164

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. A61P29/00 A61K31/498		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALLAVENA, P.; SIGMORELLI, M.; CHIEPPA, M.; ERBA, E.; BIANCHI, G.; MARCHESI, F.; OMERO OLIMPIO, C.; BONARDI, C.; GARBI, A.; LISSONI: "Anti-inflammatory Properties of the Novel Antitumor Agent Yondelis (Trabectedin): Inhibition of Macrophage Differentiation and Cytokine Production" CANCER RESEARCH, 2005, pages 2964-2971, XP002382505 the whole document	1-13
X	WO 01/77115 A (PHARMA MAR, S.A; RUFFLES, GRAHAM, KEITH; FLORES, MARIA; FRANCESCH, AND) 18 October 2001 (2001-10-18) page 62 - page 77 page 79 - page 85 pages 87,89 pages 107-110	13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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		"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"G" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 31 May 2006		Date of mailing of the international search report 16/06/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Damiani, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/GB2005/050164

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/066638 A (PHARMA MAR, S.A.U; MENCHACA, ROBERTO; MARTINEZ, VALENTIN; RODRIGUEZ, R) 14 August 2003 (2003-08-14) page 60 - page 64; compounds 11-15 page 65 - page 66; compounds ET-729, ET-770 page 69; compounds ET-594 page 72; compounds ET-745 page 73; compounds 18,19 page 81 - page 107; compounds 24-28, 30-33, 36-39, 41-46, 48, 50, 52, 54 page 118 - page 119; compounds 67,68 page 125 - page 130; compounds 73-77	13
X	US 5 256 663 A (RINEHART ET AL) 26 October 1993 (1993-10-26) column 1, line 25 - line 28	13
X	US 5 985 876 A (RINEHART ET AL) 16 November 1999 (1999-11-16) column 1 - column 3	13
X	US 2004/059112 A1 (RINEHART KENNETH L ET AL) 25 March 2004 (2004-03-25) the whole document	13
X	WO 00/69862 A (PHARMA MAR, S.A; RUFFLES, GRAHAM, KEITH; CUEVAS, CARMEN; PEREZ, MARTA;) 23 November 2000 (2000-11-23) page 77 - page 80; compounds 33-36	13
X	WO 03/008423 A (PHARMA MAR, S.A; MARTINEZ, VALENTIN; FLORES, MARIA; GALLEG0, PILAR; CU) 30 January 2003 (2003-01-30) page 33 - page 190; compounds 1-224	13
X	WO 99/51238 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 14 October 1999 (1999-10-14) page 2 page 4	13
X	ERBA, E.; CAVALLARO, E.; DAMIA, G.; MANTOVANI, R.; DI SILVIO, A.; DI FRANCESCO, A.M.; RICCARDI, R.; CUEVAS, C.; FAIRCLOTH, G.T.;D': "The unique Biological Features of the Marine Product Yondelis (ET-743, Trabectedin) are Shared by its Analog ET-637, which Lacks the C Ring" ONCOLOGY RESEARCH, vol. 14, 2004, pages 579-587, XP008064683 the whole document	13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2005/050164

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0177115	A	18-10-2001	AT 299146 T 15-07-2005
			AU 784249 B2 23-02-2006
			AU 4672901 A 23-10-2001
			BG 107220 A 30-05-2003
			BR 0110024 A 18-02-2003
			CA 2406080 A1 18-10-2001
			CN 1436193 A 13-08-2003
			CZ 20023352 A3 14-05-2003
			DE 60111845 D1 11-08-2005
			DK 1280809 T3 07-11-2005
			EP 1280809 A1 05-02-2003
			HK 1049005 A1 27-01-2006
			HU 0300534 A2 28-07-2003
			JP 2003530402 T 14-10-2003
			NO 20024906 A 27-11-2002
			NZ 521550 A 29-10-2004
			PL 357574 A1 26-07-2004
			SK 14352002 A3 01-04-2003
			US 2003216397 A1 20-11-2003
WO 03066638	A	14-08-2003	AU 2003244453 A1 02-09-2003
			CA 2473175 A1 14-08-2003
			CN 1646539 A 27-07-2005
			EP 1472261 A2 03-11-2004
			JP 2005523275 T 04-08-2005
US 5256663	A	26-10-1993	NONE
US 5985876	A	16-11-1999	NONE
US 2004059112	A1	25-03-2004	NONE
WO 0069862	A	23-11-2000	AT 283273 T 15-12-2004
			AU 775580 B2 05-08-2004
			AU 4597300 A 05-12-2000
			AU 5649301 A 26-11-2001
			AU 5649601 A 26-11-2001
			BG 107301 A 31-07-2003
			BR 0010559 A 02-07-2002
			BR 0110801 A 11-02-2003
			CA 2372058 A1 23-11-2000
			CN 1360588 A 24-07-2002
			CN 1440414 A 03-09-2003
			CN 1441805 A 10-09-2003
			CZ 20014102 A3 12-06-2002
			CZ 20023746 A3 16-04-2003
			CZ 20023751 A3 12-05-2004
			DE 60016209 D1 30-12-2004
			DE 60016209 T2 15-12-2005
			EP 1185536 A2 13-03-2002
			ES 2233367 T3 16-06-2005
			ES 2231486 T3 16-05-2005
			WO 0187894 A1 22-11-2001
			WO 0187895 A1 22-11-2001
			HU 0201188 A2 29-07-2002
			JP 2002544280 T 24-12-2002
			MX PA01011631 A 30-07-2002
			NO 20015547 A 14-01-2002

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2005/050164

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0069862	A		NZ 515424 A	25-06-2004
			PL 353002 A1	22-09-2003
			PT 1185536 T	29-04-2005
			SK 16502001 A3	04-06-2002
			TR 200103273 T2	22-04-2002
			US 2004002602 A1	01-01-2004
WO 03008423	A	30-01-2003	CA 2453991 A1	30-01-2003
			EP 1406907 A1	14-04-2004
			JP 2004536132 T	02-12-2004
			MX PA04000506 A	23-07-2004
			US 2006106021 A1	18-05-2006
WO 9951238	A	14-10-1999	AU 758100 B2	13-03-2003
			AU 3471399 A	25-10-1999
			BG 104902 A	31-07-2001
			BR 9909488 A	26-12-2000
			CA 2327468 A1	14-10-1999
			CN 1304309 A	18-07-2001
			EP 1067933 A1	17-01-2001
			HU 0104273 A2	28-03-2002
			JP 2002510633 T	09-04-2002
			MX PA00009840 A	24-04-2002
			NO 20004978 A	05-12-2000
			NZ 507350 A	28-03-2003
			PL 343439 A1	13-08-2001
			RU 2217432 C2	27-11-2003
			SK 15012000 A3	06-08-2001
			TR 200002921 T2	21-02-2001

## 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 P 1/04 (2006.01)** A 6 1 P 29/00 1 0 1  
 A 6 1 P 1/04

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

(74)代理人 100110423

弁理士 曾我 道治

(74)代理人 100084010

弁理士 古川 秀利

(74)代理人 100094695

弁理士 鈴木 憲七

(74)代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74)代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72)発明者 アルラヴェナ、パオラ

イタリア国、2 0 1 5 7 ミラン、ヴィア・エリトリア 6 2、マリオ・ネグリ、インスティテュト・デ・リチェルケ・ファルマコロジケ

(72)発明者 ディンカルチ、マウリツィオ

イタリア国、2 0 1 5 7 ミラン、ヴィア・エリトリア 6 2、マリオ・ネグリ、インスティテュト・ディ・リセルケ・ファルマコロジケ

(72)発明者 フェアクロス、グライン・トーマス

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州、ケンブリッジ、プトナム・アヴェニュー 3 2 0、ファルマ・マール・ユーエスエイ・インコーポレイテッド

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 CB31 MA01 MA04 NA14 ZA45 ZA68 ZB08 ZB11  
 ZB15

## 【要約の続き】

Oを形成するか、または、R<sup>a</sup>、R<sup>b</sup>、およびこれらに取り付けられている炭素がテトラヒドロイソキノリン基を形成する。