

(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2005-505540

(P2005-505540A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/36

4 C O 7 6

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 45/00

4 C O 8 4

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/00

4 C O 8 6

// A 6 1 K 31/704

A 6 1 K 31/704

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 148 頁)

(21) 出願番号 特願2003-522577 (P2003-522577)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月27日 (2002.8.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年2月27日 (2004.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2002/001160
 (87) 国際公開番号 W02003/018062
 (87) 国際公開日 平成15年3月6日 (2003.3.6)
 (31) 優先権主張番号 PR 7302
 (32) 優先日 平成13年8月27日 (2001.8.27)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)
 (31) 優先権主張番号 PR 9504
 (32) 優先日 平成13年12月13日 (2001.12.13)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 501274654
 メディテック リサーチ リミテッド
 MEDITECK RESEARCH L
 I M I T E D
 オーストラリア3142ビクトリア州トゥ
 ーラク、トゥーラク・ロード459番、レ
 ベル1、ティオーケイ・コーポレート・セ
 ンター
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100103230
 弁理士 高山 裕貴
 (74) 代理人 100087114
 弁理士 齋藤 みの里

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された治療プロトコール

(57) 【要約】

本発明は、癌を含む細胞増殖障害のような疾患の化学療法領域に関するものである。特に本発明は、被験者の処置における保護薬剤としてのヒアルロナン (HA) の使用に関するものである。HAは化学療法剤とともに投与されると、被験者に投与される用量の化学療法剤の投与が長期化される。HAの保護効果によって化学療法剤の投与量が一般に有効な投与量として認められている量よりもかなり高くすることができ、そのような投与量は本発明でなければ、被験者において受け容れがたい副作用を引き起こすと予想される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

一般に有効な投与量として認められている量よりも高用量の化学療法剤を長期に投与する方法であって、有効量のHAをその前に、および／または同時に投与することを特徴とする方法。

【請求項 2】

単回投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも200%まで高用量であることができ、および／または累積投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも600%まで高用量であることができる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

化学療法剤の投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも約10%から約150%高用量である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

化学療法剤の投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも約35%から約100%高用量である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

HAおよび化学療法剤を同時に投与する、請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

化学療法剤の投与の約24時間前から約5分前にHAを投与する請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

化学療法剤の投与の約12時間前から約10分前にHAを投与する請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

化学療法剤の投与の約30分前にHAを投与する請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

有効量のHAが1日あたり約0.5 mg/kg体重から約20 mg/kg体重である、請求項 1 から請求項 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

有効量のHAが1日あたり約5 mg/kg体重から約10 mg/kg体重である、請求項 1 から請求項 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

単回投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも200%まで高用量であることができ、および／または累積投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも600%まで高用量であることができる化学療法剤によって対象を長期に処置する方法であって、有効量のHAを上記の化学療法剤の前に、および／または同時に投与することを特徴とする方法。

【請求項 12】

化学療法剤の投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも約10%から約150%高用量である、請求項 12 記載の方法。

【請求項 13】

化学療法剤の投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも約35%から約100%高用量である、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

HAおよび化学療法剤を同時に投与する請求項 11 から請求項 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

化学療法剤の投与の約24時間前から約5分前にHAを投与する請求項 11 から請求項 13 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

化学療法剤の投与の約12時間前から約10分前にHAを投与する請求項 11 から請求項 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

化学療法剤の投与の約30分前にHAを投与する請求項 11 から請求項 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

有効量のHAが1日あたり約0.5 mg/kg体重から約20 mg/kg体重である、請求項 11 から請求項 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

有効量のHAが1日あたり約5 mg/kg体重から約10 mg/kg体重である、請求項 11 から請求項 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

悪性疾患を処置する際に、化学療法剤の投与の前に、および/または同時に投与する医薬を製造するためのHAの使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、癌を含む細胞増殖障害のような疾患の化学療法領域に関するものである。特に本発明は、被験者の処置における保護薬剤としてのヒアルロン (HA) の使用に関するものである。HAは化学療法剤とともに投与されると、被験者に投与される用量の化学療法剤の投与が長期化される。HAの保護効果によって化学療法剤の投与量が一般に有効な投与量として認められている量よりもかなり高くすることができ、そのような投与量は本発明でなければ、被験者において受け容れがたい副作用を引き起こすと予想される。

【発明の背景】**【0002】**

明細書中に引用した参考文献の図書目録の詳細は、本明細書の最後に列記する。

【0003】

本明細書における先行文献の引用は、その先行文献がいずれかの国における技術常識を示すことを認め、あるいはそのことを示唆する記載ではなく、およびそのようなものとして解釈されるべきではない。

【0004】

人間を含む動物を苦しめる多くの疾患は、化学療法剤によって処置される。例えば、化学療法剤は膠原病または自己免疫疾患、代謝障害および皮膚病を含む腫瘍性疾患の処置に有効であることが立証されており、これらの薬剤の中には、非常に有効であり (例えばビンクリスチンおよびブレオマイシン)、好中球減少症のような毒性副作用の問題を引き起こさないものもある。

【0005】

化学療法剤を正しく使用するには、化学療法剤を選択し、投与量を決定し、および治療を行う前に、疾患の自然史や病理生理学を徹底的に熟知している必要がある。各被験者は、顕性または潜在性感染、血液疾患、栄養失調状態および重篤な代謝障害のような毒性を増強しかねない要因に向けて注意深く評価されなければならない。さらに、肝臓、腎臓および骨髄のような特定の主要器官の機能状態はきわめて重要である。それゆえ、適切な化学療法剤の選択や有効な治療方法の工夫は被験者の症状によって影響される。残念なことに、多くの化学療法剤は正常組織と悪性組織との間の選択性を欠くため、重大な副作用をもたらす。

【0006】

望ましくない毒性副作用には、心毒性、毛髪欠乏、胃腸毒性 (吐き気および嘔吐を含む)、神経毒性、肺毒性、喘息および骨髄抑制 (好中球減少症を含む) が含まれる。

【0007】

10

20

30

40

50

化学療法に付随する骨髄抑制は、少なくとも部分的に、骨髄の造血前駆細胞 (HPCs) の著しい薬物誘発性の機能低下の結果である (Shimamura et al., Exp. Hematol. 16: 681-685, 1988)。続いて起こる好中球数の減少が二次感染を引き起こし、その軽重が好中球減少症の持続性と重篤度を引き起こす (Bodey et al., Ann. Intern. Med. 64: 328, 1966)。二次感染の結果、患者は化学療法から解放され、細胞毒性処置の潜在的利益を制限する広域スペクトラム抗生物質の処置下に置かれる。しかし抗生物質の使用にもかかわらず、重篤な好中球減少症患者が敗血症により死亡することは珍しいことではない (Pettengel et al., Blood 80(6): 430-436, 1992)。

【0008】

一般に、好中球減少症のレベルは骨髄の再生能および/または投与される薬物の投与量に依存する。実際、好中球減少症は被験者に与える薬物投与量を軽減する決定の主な理由となることが多い (Dotti et al., Haematologica 80: 142-145, 1995)。薬物投与量の軽減は化学療法の有効性、または潜在的有効性の欠乏を典型的に伴うため、薬物投与量の軽減は望ましくない。それゆえ、化学療法に付随する好中球減少症の頻度または重篤度を緩和することができ、それによって薬物投与量の軽減を回避でき、または化学療法剤の標準的な投与量よりも高用量で投与することすら可能とする投与計画または同時投与薬物を同定する必要がある。

10

【0009】

マウスモデルにおける骨髄抑制を軽減するいくつかの最近の研究において、5-フルオロウラシル (Shimamura et al., Blood 69: 353-355, 1987)、とりわけドキソルビシン (Shimamura et al., 1988, supra) の初期注射後、ヒト組換え顆粒球コロニー刺激因子 (rG-CSF) を毎日皮下注射することにより、好中球減少症からの回復が促進されることが観察されている。ヒトrG-CSFは造血前駆細胞の増殖と分化を刺激することによって本効果を発揮する (Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2484-2488, 1987)。より最近には、rG-CSFが細胞毒性の化学療法を受けた患者において、好中球減少症の回復を促進するアジュバントとして使われた (Sheridan et al., Lancet 339: 640-644, 1992; Pettengel et al., 1992, supra; Anglin et al., Leuk, Lymphoma 11: 469-472, 1993; Kotaka et al., Int. J. Utrol. 6: 61-67, 1999)。しかし、rG-CSFの適用は最適には、数が増大した造血前駆細胞が細胞毒性薬物に対して過敏となる可能性があるため (Dotti et al., 1995, supra)、化学療法の繰り返しサイクルと組合せなければならない。

20

30

【0010】

化学療法剤の癌または標的細胞殺傷のための高用量を毒性副作用を伴わずに、またはそのレベルを軽減させて、使用できるプロトコルを開発する必要がある。

【発明の概要】

【0011】

本明細書を通して、その文脈から他の意味が類推されなければ、「含む」という語句、または「含まれる」または「含んでいる」のようなバリエーションの語句は、記載している要素または数字またはそれらの群を含むことを意味すると理解され、他の要素または数字またはそれらの群を除外する意味ではない。

【0012】

本発明は、被験者が一般的な細胞毒性薬物を用いて処置を受けるときに、ヒアルロナン (HA) が保護物質として被験者に使用することができるという決定を一部分基礎としている。被験者が細胞毒性薬物を投与され得る場合には、癌のような生命を脅かす疾患の処置がある。これらの場合において一義的な治療目標は、悪性細胞を退縮させることである。しかし、現在利用できる治療に有効な薬剤は、期待されるよりも特異性が低く、それらの投与が、最終的には被験者の正常細胞の多くを同様に死滅させる。癌が十分すばやく退縮されないと、同時に起こる正常細胞への望ましくない影響がとて高いために、処置を縮小し、または停止しなければならないところまで被験者の状況を悪化することがある。これが処置を受ける被験者に悲惨な結果をもたらし得る。

40

【0013】

50

化学療法剤の治療効果を延長および増大するために十分な長期間、処置の休止の必要性を緩和することができる薬剤は、癌やその他の疾患の多くの形態の処置に明瞭な利点を示すであろう。処置計画にHAを利用する利益はいくつか既に知られているものもあるが、HAの保護効果は現在まで知られていない。

【0014】

それゆえに本発明はある側面では、単回投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも200%まで高用量であることができ、および/または累積投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも600%まで高用量であることができる化学療法剤を長期に投与する方法であって、有効量のHAをその前に、および/または同時に投与することを特徴とする方法を提供する。

10

【0015】

本方法では、HAのその前の、および/または同時の投与は、本発明でなければ同時に起こる正常細胞への望ましくない有害な影響を改善または廃止する効果すら有する。治療薬剤の細胞毒性効果によって患者の健康は悪影響を受けないため、上記の治療薬剤を通常投与量よりも高用量で投与でき、およびより長期間作用させることが可能である。これは、望ましくない悪性細胞に対する投与薬物の望ましい細胞毒性効果により処置が成功する機会を増大させる。

【0016】

それゆえ、本発明は別の側面では、単回投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも200%まで高用量であることができ、および/または累積投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも600%まで高用量であることができる化学療法剤によって対象を長期に処置する方法であって、有効量のHAを上記の化学療法剤の前に、および/または同時に投与することを特徴とする方法を包含する。

20

【0017】

このような処置方法の結果は、通常観察される受け容れがたい重篤な副作用が除去されることである。

【0018】

HAはポリマー分子であるので、さまざまな分子量の分子を含むものとして製剤化できる。より低い分子量を有する製剤も本発明の方法に有効であるが、750,000から2,000,000 Daの範囲のモダル分子量をもつHAを含む製剤が好ましい。より高い分子量のHAは、低濃度では自己凝集して三次元網構造を形成するような三次構造をとる利点がある。この網構造は制御可能な多孔性と分子次元を特徴としており、これにより多糖類の容積ドメイン中に保持される治療用分子とその外部環境との間に平衡を確立することが可能となる。HA三次元構造への治療用分子の「充填」により、病態部位への治療薬剤の放出を制御でき、続いて正常組織に対する非特異的な標的性を克服できる。特に好ましい分子量は750,000から1,000,000 Daの範囲である。

30

【0019】

好ましい態様では、HA製剤は化学療法剤の投与と同時にまたはその前に被験者に投与することができる。注射用溶液、粉末製剤、錠剤またはカプセル剤、または他の簡便な形態など、当業者によく知られている多くの方法によってHA製剤は調製できる。

40

【好ましい態様の詳しい説明】

【0020】

本発明では有効量のHAの存在下、正常細胞への化学療法剤の望ましくない累積的な細胞毒性効果が改善されることが明らかにされた。通常、この望ましくない細胞毒性により、結果的に化学療法剤を除き、または少なくとも処置レベルまたは処置期間を軽減することが必要となる。

【0021】

しかし本発明の方法によれば、HAを使用することにより、化学療法患者における化学療法剤の投与量または投与期間の望ましくない軽減の必要性を回避することができる。好中球減少症、心毒性、および吐き気、嘔吐や重篤な体重損失によって明らかになる胃腸毒性を

50

含む受け容れがたい重篤な副作用が緩和または回避される。有効量のHAの非存在下では化学療法剤が投与されたなら起こり得る以上のレベルまで化学療法剤の投与量を、有効量のHAをその前に、および/または同時に投与することによって、増大することができる。

【0022】

それゆえに本発明はある側面では、単回投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも200%まで高用量であることができ、および/または累積投与量が、一般に有効な投与量として認められている量よりも600%まで高用量であることができる、化学療法剤を長期に投与する方法であって、有効量のHAをその前に、および/または同時に投与することの特徴とする方法を提供する。

【0023】

当業者であれば、化学療法を受けている被験者が受け容れがたい副作用に苦しんでおり、改変したまたは代替の処置を受けさせるべきか否か、またはいつ受けさせるべきかを容易に決定することができる。例えば、化学療法患者が5-フルオロウラシルおよび/またはドキソルビシンのような細胞毒性の化学療法剤を投与されており、その投与期間中、好中球減少症、心毒性および胃腸毒性のような受け容れがたい副作用を示すことが予想される場合には、臨床医は、化学療法剤の投与量を軽減するかわりに、本発明に従い、有効量のHAをその前に、および/または同時に投与することにより、その化学療法剤の投与量を維持または増加させることができる。そのような副作用は「受け容れがたい重篤な副作用」と呼称することができる。

【0024】

「その前に、および/または同時に投与する」とは、被験者に化学療法剤が投与される前に、それと同時に、またはその後、HAを投与することができることを意味する。HAを化学療法剤の前に投与する場合、化学療法剤の投与の約24時間前から約5分前に投与するのが好ましく、より好ましくは約12時間前から約10分前に、さらに好ましくは約5時間前から約10分前に、および最も好ましくは約0.5時間前に投与する。HAを化学療法剤の後に投与する場合、化学療法剤の投与の0.05時間後から24時間後に投与するのが好ましく、より好ましくは0.1時間後から5時間後に、および最も好ましくは約0.5時間後に投与する。

【0025】

投与する化学療法剤は、好ましくはカルムスチン (BCNU)、クロラムブシル (ロイケラン)、シスプラチン (プラチノール)、チタラビン、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、フルオロウラシル (5-FU)、メトトレキサート (メキセート)、シクロホスホアミド、CPT11、エトポシド、プリカマイシン (ミトラシン) および例えばパクリタキセルのようなタキサンから成る群から選択する。

【0026】

最も好ましい場合には、化学療法剤はドキソルビシン (アドリアマイシン) である。ドキソルビシンはアントラサイクリングリコシド抗生物質であり、臨床上使用されている最も有効な抗腫瘍薬物のひとつである (Carter, J. Nat. Cancer Inst. 55: 1265-1274, 1975)。臨床での有効性は、乳癌腫、肺癌腫および甲状腺癌腫を含む固形腫瘍、急性白血病およびリンパ腫のような血液学的悪性腫瘍および柔組織肉腫および骨肉腫および神経芽細胞腫のような広範囲の腫瘍状態にわたる。

【0027】

当業者であれば、一般的な治療処置において、連続投与により受け容れがたい副作用が生じる時点に関する判断を経験に基づいて行うことができる。この時点を超えて細胞毒性薬剤を連続投与することを本明細書では、薬物を「長期に投与」と呼称する。

【0028】

それゆえ、本発明の別の側面は、一般に有効な投与量として認められている量よりも200%まで高用量の化学療法剤を長期に投与する処置の方法であって、有効量のHAを上記の化学療法剤の前に、および/または同時に投与することの特徴とする方法を提供する。

【0029】

本明細書で使用する「被験者」という用語は、化学療法剤を用いた処置が必要な疾患また

10

20

30

40

50

は状態をもつ動物を意味する。好ましくは、被験者は細胞増殖障害（例えば腫瘍障害）に罹患している。本発明の目的の被験者は、ヒトおよび他の霊長類、家畜動物（例えば羊、馬、牛、豚、ロバ）、研究用動物（例えばラット、マウス、ウサギ、モルモット）およびコンパニオン動物（例えば犬および猫）のような哺乳類を含むが、それらに限定されない。ヒトは霊長類の中で最も好ましい。

【0030】

腫瘍疾患に苦しむ被験者の処置において、細胞毒性薬物には投与される薬物に応じて「一般に有効な投与量として認められている量」があり、これは処置する臨床医が熟知しており、それ以上の量は、臨床医は現在では一般に処方したがない量である。これは、上記のように処方された細胞毒性薬物の正常細胞への有害効果がこれらの受け容れがたい重篤な副作用が続くのを予防するために処置を軽減し、取り除くまで、長期にわたり蓄積されるからである。当業者であれば、種々の化学療法剤について、一般に有効な投与量として認められている量を何が構成するかを認識している。

10

【0031】

しかし本発明のとおり、単回投与量が200%まで高用量であることができ、および/または累積投与量が600%まで高用量であることができる化学療法剤を投与することができる。「200%まで高用量である」という表現は約5%から約200%までの間のいずれかの数字または分数を含み、包含するものと理解されるべきである。より好ましい範囲は約20%から約150%までである。最も好ましい態様では、一般に有効な投与量として認められている量は約35%から約100%まで増加される。

20

【0032】

それゆえに本発明の別の側面は、被験者を処置する方法であって、上記の化学療法剤が有効量のHAの前に、および/または同時に投与されるときに、臨床的に受け容れがたい副作用を引き起こす投与量よりも高用量の化学療法剤を投与できるという特徴を有する上記の方法を提供している。

【0033】

ここで用いられているように、「有効量」という用語は、化学療法剤の副作用の重篤度を減少させるのに有効なHA量を意味しており、一般に有効な投与量として認められている量と同用量または高用量の化学療法剤の投与量を使用することができる。

【0034】

特有の「有効量」は、その前に、または同時に投与される化学療法剤の同一性、患者の肉体的条件、処置される哺乳類のタイプ、処置の継続期間および（もしあれば）同時になされる治療の性質のような因子によって明らかに変化する。しかし一般に、有効量のHAは体重キログラムあたり約0.5 mgから約10 mgのオーダーであり、一日に体重キログラムあたり約5 mgから約20 mgの間が好ましい量である。（一日患者一人当たり約0.3 gから約3 gまで）

30

【0035】

HAはポリマー分子であるので、さまざまな分子量の範囲を示す。それゆえHA製剤は種々の分子量の分子を含むことができる。ほとんどいずれの平均モダル分子量のHA製剤は本発明の方法に有効である。しかし、より好ましい製剤はより高いモダル分子量のものである。750,000から2,000,000 Daの範囲のモダル分子量をもつHAが好ましい。より高い分子量のHAは、低濃度では自己凝集して三次元網構造を形成するような三次構造をとる利点がある。この網構造は制御可能な多孔性と分子次元を特徴としており、これにより多糖類の容積ドメイン中に保持される治療用分子とその外部環境との間に平衡を確立することが可能となる。HA三次元構造への治療用分子の「充填」により、病態部位への治療薬剤の放出を制御でき、続いて正常組織に対する非特異的な標的性を克服できる。特に好ましい分子量は750,000から1,000,000 Daの範囲である。

40

【0036】

本発明の方法は、上記の化学療法剤が有効量のHAの非存在下投与された場合に被験者に受け容れがたい重篤な副作用を引き起こすと予想される量の、またはそれ以上の量の化学療

50

法剤を継続的に、または長期に使用することを可能にする。投与量は、特定の化学療法剤の同一性やその他の因子に応じて変化する。しかし本発明の方法では、例えば60 mg/m²以上の、より好ましくは80 mg/m²以上の、および最も好ましくは100 mg/m²以上のドキソルピシンを投与することができる。

【0037】

化学療法剤および/またはHAは、経口的に、局部的に、非経口的に、腫瘍内注射によって、または従来の製薬的に許容される非毒性の担体、アジュバント、およびビヒクルを含むユニット製剤の投与のときに投与することができる。ここで用いられる「非経口的」という用語は、皮下注射、エーロゾル注射、静脈注射、筋肉注射、鞘内注射、頭蓋注射、舌下注射、リンパ注射、または注入、または灌流のテクニックを含む。

10

【0038】

ここで用いられているように、「製薬的に許容される担体」とは、被験者に化学療法剤、および/またはHAを運搬するための製薬的に許容される溶媒、担持した薬剤、またはビヒクルである。担体は、液体または固体であり、計画された投与方法とともに選択される。

【0039】

従って化学療法剤、および/またはHAは、例えば局部的の、経口の、および非経口の製薬的な製剤化のような本発明の方法での使用のために製剤化され得る。それゆえに化学療法剤、および/またはHAを、錠剤、水性または非水性懸濁液、口内錠、トローチ、粉末、顆粒、乳液、カプセル、シロップ、またはエリキシル剤として経口的に投与することができる。経口的な使用のための製剤は、甘味料、香料、着色料、および保存料のうちのひとつ、またはそれ以上から成る。化学療法剤、および/またはHAの錠剤構成物は、錠剤製品に適する製薬的に許容される非毒性の賦形剤とともに組合せ中に活性な成分を含むことができる。これらの賦形剤は例えば、(1)炭酸カルシウム、ラクトース、リン酸カルシウム、またはリン酸ナトリウムのような不活性な希釈剤、(2)コーンスターチまたはアルギン酸のような粒化剤および分解剤、(3)澱粉、ゼラチン、またはアカシアのような結合剤、(4)ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクのような潤滑剤である。そのような錠剤は、胃腸管での分解および吸収を遅らせる既知の技術によって、コーティングしない、またはコーティングすることができ、長期間持続する作用を提供する。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルのような時間遅延物質を用いることができる。コーティングには放出制御のための浸透性治療用錠剤を形成するために、U.S. Patent Nos. 4,256,108、4,160,452、および4,265,874記載の技術を使用することができる。

20

30

【0040】

HAだけでなく化学療法剤は、本発明の方法の使用のために、生体内の塗り薬、非経口注射、または長期間の個別の、または他のものと一緒の緩やかな灌流によって投与され得る。投与ルートは、静脈注射、動脈注射、腹膜注射、筋肉注射、皮下注射、口腔注射、または超真皮注射であることができる。非経口的投与の調製は、無菌の水性または非水性溶液、懸濁液および乳液を含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物油、およびエチルオレートのような注射用有機エステルである。水性担体は、食塩および緩衝化媒質などの、水、アルコール性/水性溶液、乳液、または懸濁液を含む。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンガーのブドウ糖、ブドウ糖、および塩化ナトリウムが含まれ、乳酸塩のリンガーの静脈注射ビヒクルには、流動体および栄養補給剤、電解質補給剤(リンガーのブドウ糖を基本とするもの)、および同種のものが含まれる。保存料および他の添加物は、例えば抗菌物質、抗酸化物質、キレート剤、発育因子、および不活性ガス、および同種のものの中にも存在しうる。

40

【0041】

HAは小さな単薄膜小囊、大きな単薄膜小囊、および多薄膜小囊のようなリポソーム運搬システムの形態でも投与することができる。リポソームはコレステロール、ステアリルアミン、またはホスファチジルコリンのような種々のホスホリピッドから形成され得る。

【0042】

50

本発明の方法は、細胞増殖障害の処置のための化学療法剤を被験者のどの部分に処置すべきかということに使用され得ることを明らかにする。「細胞増殖障害」とは、ある細胞またはいくつかの細胞が、新生物、腫瘍、または癌を引き起こす変質的発育、典型的な異常型発育を示すことを意味する。細胞増殖障害は例えば、乳癌、肺癌、前立腺癌、腎臓癌、皮膚癌、神経組織癌、卵巣癌、子宮癌、肝臓癌、膵臓癌、上皮組織癌、頭部組織癌、および頸部組織癌、さらには胃潰瘍系組織癌、腸系組織癌、外分泌系組織癌、内分泌系組織癌、リンパ系組織癌、または造血系組織癌を含む。

【0043】

本発明の方法は、神経消耗障害、ホルモンの不均衡、および同種のものの処置のために化学療法剤を被験者のどの部分に処置すべきかということに使用され得る。

10

【0044】

本明細書に含まれているいずれの文書、証書、物質、装置、記事、または同種のものに関する検討は、本発明のための文脈を提供する目的のためだけのものである。いずれかの、またはすべてのこれらの事項は、先行文献の基礎部分を形成するか、または本出願の各請求項の優先日の前にオーストラリアまたはその他の地域に存在する本発明に関する分野の一般的な共通知識であるかのいずれかの承認として解釈されるべきではない。

【0045】

本発明は、下記の非制限的な例の参照としてさらに記載する。しかし下記の例は例証となるのみであると理解されるべきであり、本明細書で記述される本発明の一般性についての制限として解釈されるべきではない。特に、本発明は癌に関する詳細について記載される場合には、本明細書での発見は癌の処置に限定されるものではないと明らかに理解される。例えばHAは、他の条件で処置されるような化学療法剤の細胞毒性副作用の処置に使用することができる。

20

【実施例】

【0046】

実施例 1

細胞毒性のインビボモデル (1)

静脈注射用薬物

抗癌剤のドキソルピシン (アドリアマイシン) は、以下に「Dox」と呼称するが、Asta Medical (NSW, オーストラリア) からそれぞれの容量が2.5 mLで最終濃度が2 mg/mLのものをシリンジ単位で、または最終濃度が2 mg/mLである0.9%無菌塩化ナトリウムから再構成されるドキソルピシンの塩酸塩粉末として購入した。乾燥ヒアルロナン (HA) 824,000 KDaはPearce Pharmaceuticals (ビクトリア、オーストラリア) から購入し、無菌水に溶かして最終濃度を10 mg/mLとし、0.22 μ mフィルターを通して殺菌し、使用するまで4で保存した。ヒアルロナンとドキソルピシンの組合せ (以下に「HyDox」と呼称する) は、望む投与量のドキソルピシンとなるように、計量した10 mg/mLのヒアルロナンと計量した0.5 mg/mLのDoxを混合して調製した。本研究を通して使用するHAの投与量は体重あたり13.3 mg/kgであった。Doxの投与量は6, 9, 12, 16, 24 mg/kgであった。

30

【0047】

実験用動物

オスのF1マウス (C57 x CBA; 11~13週齢) をAnimal Central Division (モナシュ大学、ビクトリア、オーストラリア) から得て、インビボ研究で使用した。マウスはランダムに各処置群 (処置群あたり6匹) に分配し、実験開始前の2~3週間は順応させた。処置群は、それぞれ投与量6, 9, 12, 16および24 mg/kgのDoxを受ける「薬物のみ」の群、6, 9, 12, 16, 24 mg/kgのDoxの投与30分前にHA (13.3 mg/kg) を注射される群、および6, 9, および12 mg/kgのHyDoxの群に分割した。二つの対照群には、生理食塩水、HA (13.3 mg/kg) をそれぞれ静脈注射した。処置群を始める前に、各実験動物の血液 (200 μ L) を後部眼窩洞出血により収集し、EDTAを含んだチューブにすぐに移し変えて、軽くはじいて混合し、分析まで氷上で保存した。対応する対照、薬物、またはHA/薬物の組合せとともにマウスの尾静脈に単回ボーラス静脈内注射を行った後、これを0日目とした。そして前述の方

40

50

法により、1, 4, 7, 10, 14日目に連続してマウスの採血を行った。すべての血液サンプルは、Adiva 120 Differential Coulter Counter (Bayer Diagnostics, USA) で白血球組織の分析を行った。本研究期間を通して、マウスの数、食物摂取量、および一般的な活動レベルを日にちベースで記録した。14日目にマウスを頸部脱臼によって死亡させ、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胃、腸、および睾丸を取り除き、すぐに食塩水で緩衝されたリン酸塩中の10% v/v ホルマリン溶液に固定した。

【0048】

一般的な毒性

Doxを投与されたマウスは、HyDox製剤の場合、またはDox注射の30分前の13.3 mg/kgのHAにあらかじめ敏感な場合のいずれも、本実験期間中生存した。より高用量のDoxを投与した処置群にだけマウスの死亡が観察された。24 mg/kgのDoxを投与した群では、二匹のマウスが本研究の最後まで生存したのに対し、同量のDoxの投与の30分前にHAを受けたマウスは、処置期間中生存した (図3)。薬物の静脈注射の後、8日目に不意に死亡した9 mg/kgのDoxを投与した群のマウス一匹を除いて、他のすべてのマウスは本研究の最後まで生存した。

10

【0049】

血液学的決定

好中球減少症

すべての群の0日目の平均好中球数は、血液中 1.39×10^3 cells/ μ L ± 0.60 SD (最小値 = 0.54, 最大値 = 3.34×10^3 cells/ μ L) であった。処置群どうしの比較を可能にするためデータを標準化するために、実験データは各マウスの採血時基準値に対する割合として表し、続く1, 4, 7, 10, および14日目の測定結果も同様に表した。(0日目の血量 = 100%)

20

【0050】

6 mg/kgドキソルビシンとHyDox処置群

本研究のDox最低投与量は6 mg/kgであり、ヒトの30 mg/m²の投与量に相当する。二つの薬物の組合せ (HyDoxまたはDoxの投与前のHA) において、好中球減少症は実際に逆で、「Doxのみ」の処置群と比較したときに末梢好中球レベルの増加が観察された (図1および2中、6 mg/kgとラベルされたパネル)。その最高値は約160% (テーブル1A、BおよびC) であり、4日目に観察された。7日目まで段階的に低下したが、「Doxのみ」の群よりも高い値を保っており、好中球レベルは14日目になってもベースラインまで回復しなかった。

30

テーブル1A

0日目の割合として表された全ドキソルビシン投与量と薬物の組合せの好中球減少症のデータ: ドキソルビシン注射の好中球減少症のデータ

【表1】

日	処置群: ドキソルビシンのみ				
	6 mg/kg Dox (n=12)	9 mg/kg Dox (n=9)	12 mg/kg Dox (n=10)	16 mg/kg Dox (n=3)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100
1	102.4 \pm 9.3	128.1 \pm 32.7	91 \pm 12.5	59.1 \pm 2.5	199.5 \pm 42.5
4	73.7 \pm 15.9	72.4 \pm 12	44.1 \pm 6.9	8.2 \pm 1.5	6.7 \pm 3.6
7	69.4 \pm 20	68.5 \pm 10.6	71.1 \pm 10.3	85.9 \pm 4.7	58.9 \pm 14.7
10	65.6 \pm 9.6	67.10 \pm 6.2	104 \pm 13.2	58.5 \pm 8.7	262.7 \pm 56.6
14	68.3 \pm 9.6	71.4 \pm 7.7	65 \pm 4	43.1 \pm 4.6	233*

40

*本実験の終わりに、二匹のマウスだけが生存した。これらのサンプルのうち一つが不意に凝固したため、一つの血液サンプルのみで、好中球含有量を分析した。

テーブル1B

ヒアルロナン (13.3 mg/Kg、824,000 Da) をドキソルビシンの30分前に注射した場合の好中球減少症のデータ

50

【表 2】

処置群: Doxの投与30分前に注射したHA					
日	6 mg/kg Dox (n=5)	9 mg/kg Dox (n=6)	12 mg/kg Dox (n=5)	16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100
1	78 ± 11.4	68.70 ± 17.3	44.7 ± 8.5	102.8 ± 24.8	189.4 ± 40.4
4	159.4 ± 33.9	146.2 ± 52.3	69.1 ± 7.6	41.1 ± 8.9	10 ± 5.8
7	131.4 ± 36.1	81.3 ± 19.9	61.4 ± 8.2	96.2 ± 19.6	56.3 ± 13.7
10	79.8 ± 20.2	75.5 ± 11.9	90.2 ± 23.4	86.5 ± 18.9	424.6 ± 65
14	119.4 ± 23.8	68.3 ± 9.8	67.6 ± 7.5	67 ± 10.1	501.2 ± 105.5

10

テーブル10

HyDox製剤と対照注射の場合の好中球減少症のデータ

【表 3】

処置群: HyDox製剤				対照	
日	6 mg/kg HyDox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)	12 mg/kg HyDox (n=5)	ヒアルロナン 13.3 mg/kg (n=6)	食塩水 (400 µL) (n=6)
0	100	100	100	100	100
1	70 ± 10.2	80 ± 10.6	230.8 ± 73.3	92.6 ± 10.3	78.8 ± 11.7
4	161 ± 36	151.9 ± 51.6	64.7 ± 10.7	158 ± 10.1	111 ± 8.4
7	121.2 ± 25.4	111.3 ± 14.8	139.1 ± 56.5	91.1 ± 23.3	66.6 ± 6
10	56.7 ± 10.8	247.7 ± 114.6	158.6 ± 17.2	128.8 ± 20.1	78.9 ± 12.7
14	84.5 ± 17.3	195.6 ± 58.5	114.6 ± 7.7	136.2 ± 18.6	105.2 ± 6.5

20

【0051】

9 mg/kgドキソルビシンとHyDox処置群

9 mg/kgのDoxはヒトの45 mg/m²の投与量に相当し、類似の傾向がHyDox製剤とHAがDoxの投与前に投与されたときの両方で観察された（それぞれFigure 1および2）。しかし、これら両方の処置群において末梢好中球がわずかに減少したが、4日目までにこれらの値は約150%まで増加した。「Doxのみ」の群において、薬物誘発性の最低血算値の好中球減少症が4日目に観察され、0日目の採血時基準値の約72%であった。続く7、10および14日目の測定で、Doxの投与前にHAを投与する群での好中球の割合が、Doxのみの群で観察されたパターンに戻ることが明らかになった。（Figure 2, 9 mg/kgとラベルされたパネル）

30

【0052】

12 mg/kgドキソルビシンとHyDox処置群

好中球減少症に対するHAの保護効果は、Doxの投与前にHAを投与する群と比較したときに、12 mg/kgのHyDox（ヒトの60 mg/m²に相当）を投与したときにおいてよりいっそう明らかであった。（Figure 1および2のそれぞれ）4日目のみ12 mg/kgのHyDoxを投与した群の末梢好中球が平均64%レベルまで低下した。その後、末梢好中球は採血時基準値よりも大きな値を回復し、および維持した。また好中球減少症の最も低いレベルはDoxのみの群において観察された。（Figure 1, 12 mg/kgのパネル、黒線）

40

【0053】

16 mg/kgおよび24 mg/kgのドキソルビシンとHyDox処置群

16 mg/kgおよび24 mg/kgのDox投与群には、HyDoxの製剤化に直面する困難、およびマウスへの注射の容量制限のために、HyDoxを含まなかった。それゆえこれらの投与量において、DoxのみおよびDoxの投与前のHAを研究した。HAが薬物投与前に投与された場合、103%の値が観察された一方で、Dox16 mg/kg（ヒトの80 mg/m²の投与量に相当）中の好中球レベ

50

ルが1日目までに約59%になった (Figure 2; 16 mg/kgとラベルされたパネル)。好中球減少症の最も低いレベルが4日目に観察され、「Doxのみ」の群でより重篤であった。好中球減少症の程度は、24 mg/kgの投与量のDoxで非常に重篤で、HAとともに投与するかまたはしないかで同じ重篤度であった。(Figure 2; 24 mg/kgとラベルされたパネル)

【0054】

すべての処置群を通して、最低血算値の好中球減少症は投与量に依存し、HyDoxの群またはDoxの投与前にHAを投与された群のいずれも投与された同用量のDoxと比較して、Doxのみを受けた処置群において、より重篤であった (Figure 4)。食塩水の対照注射の投与は好中球レベルにあまり効果はなく、それゆえグラフ化しなかった。データはテーブル1Cに示す。

10

【0055】

ほとんど予期しなかったことは、HA対照群から得られた結果で、他のすべての実験群と同じ投与量 (13.3 mg/kg) を注射した群である。HA群の末梢好中球の割合は、HyDox製剤の場合 (Figure 1) とHAが薬物の30分前に投与された場合 (Figure 2) の両方で6 mg/kgと9 mg/kgの投与量に非常に類似していた。

【0056】

他の血液学的測定

好中球測定だけでなく、赤血球、ヘモグロビンの割合、ヘマトクリットの割合、血小板の割合およびリンパ球の割合も考慮した。これらのパラメータのデータを、テーブル2から6に示す。これらのテーブルにあるすべてのデータは採血前の値に対する割合として表され

20

テーブル2

ヘモグロビンの割合

【表4】

日	処置群					
	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 mg/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	83.9±1.90	82.3±2.40	84.7±1.80	85.8±2.10	80.8±4.50	78.8±6.90
4	67.3±2.10	66.5±3.10	69.0±1.10	68.20±3.80	70.1±5.50	67.7±1.80
7	57.0±1.30	77.4±2.10	79.7±2.70	45.7±4.60	76.0±7.10	59.6±1.10
10	81.4±1.14	91.2±1.30	95.7±2.50	70.7±3.10	91.7±2.20	98.3±1.80
14	100±1.30	104.7±1.70	103±3.00	98.5±1.50	102.6±3.50	85.4±2.10
日	12 mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12 mg/kg Dox (n=5)	12 mg/kg HyDOX (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	79.7±1.50	75.7±3.20	72.9±6.20	**	86.5±4.0	82.6±1.60
4	60.3±2.30	58.8±2.60	62.2±2.10	74.10±2.40	74.2±4.20	68.9±3.20
7	47.7±1.90	59.5±1.80	63.80±13.0	51.4±4.60	52.8±3.50	63.2±6.70
10	70.1±4.20	93.1±0.80	52.4±5.00	64.3±3.40	80.7±3.80	42.2±3.40
14	90.6±1.30	93.10±2.20	93.0±2.20	86.0±3.60	101.2±4.0	79.3
日	HA b/f 24 mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3 mg/kg) (n=6)	食塩水 (n=6)			
0	100	100	100			
1	81.7±2.30	88.8 ± 1.5	81.8 ± 1.3			
4	76.3±2.60	81.1 ± 1.1	79.1 ± 2.2			
7	61.3±3.60	88.3 ± 3.5	85.2 ± 0.9			
10	43.1±2.50	89.10 ± 3.3	85.0 ± 1.9			
14	65.5±2.90	95.3 ± 1.9	92.6 ± 1.3			

10

20

30

(b/f) はドキソルピシンの30分前にヒアルロナンを注射したことを示す。

** ではこの処置群からのサンプルが測定1日目に「ゼロ」と読まれた。

テーブル3

ヘマトクリットの割合

【表5】

日	処置群					
	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 mg/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg (n=6) HyDox
0	100	100	100	100	100	100
1	95.5±11.50	180.1±91.20	82.6±1.40	93.4±6.90	43.2±14.20	96.4±6.40
4	75.3±8.80	275.6±128.3 0	54.8±9.30	90.2±9.80	132.7±66.60	82.30±5.80
7	70.1±8.80	204.7±107.0	74.5±5.10	74.9±10.10	163.2±84.70	75.0±4.80
10	103.7±10.60	106.5±75.4	99.4±3.0	92.10±4.45	31.7±13.20	107.5±3.10
14	121.4±12.7	483.9±239.00	108.0±2.80	98.8	220.5±92.70	106.5±4.40
日	12 mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12 mg/kg Dox (n=5)	12 mg/kg HyDOX (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	94.8±1.50	92.3±7.20	77.8±5.60	110.7±21.5	102.8±24.80	80.4±2.50
4	52.9±1.80	68.6±5.40	54.0±2.50	88.0±17.7	41.10±8.90	34.6±8.0
7	50.5±4.30	73.1±5.40	46.6±3.30	25.20±3.20	96.2±19.60	59.2±4.80
10	74.2±5.10	96.0±6.70	50.9±5.80	90.7±16.70	86.5±18.90	37.5±3.20
14	60.0±6.40	59.2±7.30	84.0±3.40	107.8±18.90	67.0±10.10	85.7
日	HA b/f 2 mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3 mg/kg) n=6	食塩水 n=6			
0	100	100	100			
1	77.7±2.30	85.7±1.9	78.8±11.7			
4	31.6±9.20	83.0±1.6	111±8.4			
7	55.9±3.50	89.8±2.3	66.6±6			
10	37.3±1.80	50.9±5.8	78.9±12.7			
14	73.3±2.80	87.3±5.2	105.2±6.5			

10

20

30

テーブル4
血小板の割合
【表6】

日	処置群					
	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 g/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	98.0±11.0	100.4±6.60	102.0±6.60	72.6±5.30	105.7±7.90	76.4±2.90
4	124.7±18.0	151.9±8.50	192.2±10.40	103.8±10.10	154.3±10.3	107.9±8.30
7	175.1±17.2	155.7±8.30	136.2±11.20	152.7±15.0	171.7±10.10	135.2±14.80
10	98.1±6.60	86.6±3.90	91.1±2.50	112.1±12.2	97.1±7.60	51.0±7.90
14	84.7±10.5	75.0±5.50	94.7±5.80	96.0±7.20	71.1±4.80	58.10±2.80
日	12 mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12 mg/kg Dox (n=5)	12 mg/kg HyDOX (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	105.2±6.0	115.7±31.40	76.9±4.50	106.6±23.6	71.7±1.20	78.4±13.10
4	150.1±12.6	195.6±54.40	114.60±10.9 0	159.6±24.3	103.5±5.10	91.2±6.00
7	205.6±10.0	204.7±25.60	187.8±15.20	145.3±6.70	123.9±8.10	59.4±11.40
10	190.4±15.4	88.0±13.0	228.3±43.60	223.1±13.3	107.3±15.5	254.9±48.30
14	147.0±9.80	158.1±31.0	127.3±29.2	137.9±6.20	91.1±11.20	218.20
日	HA b/f 24mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3mg/kg) (n=6)	食塩水 (n=6)			
0	100	100	100			
1	86.8±9.10	100.7 ± 10.2	104 ± 1.9			
4	81.8±12.80	135.6 ± 8.6	123.4 ± 9.8			
7	58.30±4.80	138.9 ± 14.5	125 ± 9.4			
10	324.5±32.5	112.2 ± 11.6	134.2 ± 12.6			
14	222.5±18.4 0	110.6 ± 10.4	94.7 ± 19.9			

10

20

30

テーブル5
赤血球の割合
【表7】

処置群						
日	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 mg/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	124.6±17.4	78.0±11.40	85.8±1.10	98.6±7.20	44.0±13.20	102.7±6.90
4	89.5±10.30	159.4±33.90	58.5±3.30	98.5±10.90	134.7±60.3	90.7±6.40
7	80.20±10.10	131.4±36.10	67.5±4.50	80.4±13.10	136.2±61.2	77.1±5.0
10	106.3±14.4	79.8±20.20	88.4±2.40	92.90	26.4±8.90	102.4±12.40
14	128.8±17.0	119.4±23.8	96.1±2.10	103.50	185.1±69.6	104.3±6.10
日	12mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12mg/kg Dox (n=5)	12mg/kg HyDOX (n=5)	16mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16mg/kg Dox (n=6)	24mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	77.0±1.20	97.8±15.30	77.3±2.60	113.7±23.30	102.8±24.80	84.6±1.90
4	55.4±1.70	73.6±11.80	56.6±2.50	90.10±41.10	41.1±8.90	35.5±7.20
7	49.1±3.10	67.3±9.10	48.2±2.70	25.40±3.50	96.2±19.60	64.3±6.50
10	61.0±4.60	77.0±10.10	46.2±4.90	72.7±13.8	86.5±18.90	41.6±4.10
14	59.4±9.30	50.9±5.80	76.2±3.60	96.6±18.0	67.0±10.10	64.50
日	HA b/f 24 mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3 mg/kg) (n=6)	食塩水 (n=6)			
0	100	100	100			
1	81.6±2.90	83.4 ± 2.1	80.5 ± 2.0			
4	32.10±9.20	73.4 ± 1.5	72.4 ± 1.8			
7	61.9±3.90	77.2 ± 1.9	76.8 ± 2.8			
10	41.4±2.30	44.0 ± 4.9	42.6 ± 2.8			
14	59.9±2.10	76.3 ± 5.1	78.9 ± 4.1			

10

20

30

テーブル6
リンパ球の割合
【表 8】

処置群						
日	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 mg/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	122.1±14.70	77.5±11.10	142.1±23.90	70.5±8.40	59.0±6.10	65.6±8.30
4	71.5±5.30	92.6±7.40	134.9±29.7	49.70±4.60	114.5±20.0	65.6±11.30
7	97.1±9.50	89.6±21.9	122.4±15.30	95.3±13.7	122.3±10.20	119.2±11.40
10	84.1±6.60	80.2±21.8	138.4±11.9	100.4±12.9	68.9±14.80	63.20±7.60
14	77.9±7.80	91.2±17.5	126.4±11.5	82.60±8.10	89.1±10.50	88.7±8.50
日	12 mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12 mg/kg Dox (n=5)	12 mg/kg HyDOX (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	36.8±5.10	38.2±3.50	41.0±9.60	119.1±16.0	144.1±18.0	48.1±6.80
4	39.8±6.60	47.7±4.90	57.5±11.70	35.3±10.70	69.6±13.40	17.0±3.30
7	59.7±6.80	68.2±4.90	86.3±14.40	64.5±4.80	99.6±13.70	32.4±6.40
10	85.5±5.80	52.4±5.80	183.7±46.4	111.7±11.50	108.2±4.70	66.8±17.4
14	51.2±5.40	60.4±2.00	74.5±13.90	71.4±12.10	90.7±27.4	112.2
日	HA b/f 24 mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3 mg/kg) n=6	食塩水 (n=6)			
0	100	100	100			
1	60.1±11.90	101.2 ± 6.7	78.8 ± 11.7			
4	19.9±6.70	168.4 ± 11.8	111 ± 8.4			
7	43.3±8.10	90.9 ± 9.6	66.6 ± 6			
10	110.5±16.10	108 ± 13.4	78.9 ± 12.7			
14	120.9±13.20	119.1 ± 17.5	105.2 ± 6.5			

10

20

30

【0057】

HyDox製剤におけるすべての投与量において、末梢リンパ球の割合が同用量のDoxと比べてより大きく観察された（テーブル6）。HAの対照注射により末梢リンパ球がますます増加し、最大168%の増加が4日目に確認された。24 mg/kgのDoxを投与したときの血小板の増加は、同用量の投与における好中球数の増加と関連しており、これはおそらく体内組織のダメージとその感染を示している。

【0058】

代謝ストレス

すべての処置群で、日ベースで体重損失が見られた。本研究の終わりに、データを本来の体重の割合として表し、この方法でグラフ化した。HAおよび食塩水注射を対照する群の両方において、体重損失の割合は同じであった。それゆえ、HAデータのみを比較のための実験データとともにプロットした。すべての実験群の体重損失のデータはHAと食塩水対照を含み、テーブル7A、7Bおよび8に示す。

テーブル7A

6, 9および24 mg/kgの投与量のドキソルピシン、および6, 9および24 mg/kgの投与量のドキソルピシン注射の前のHA投与の際の体重損失のデータ。データは処置開始前の本来の体重の割合として表される。

【表9】

40

日	処置群					
	6 mg/kg Dox (n=6)	HA before 6 mg/kg Dox (n=5)	9 mg/kg Dox (n=6)	HA before 9 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=4)	HA before 24 mg/kg Dox (n=5)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	-1.10 ± 0.65	-2.70 ± 0.40	-0.90 ± 0.73	-0.70 ± 0.50	-3.60 ± 0.40	-3.90 ± 1.00
2	-1.00 ± 0.73	-4.00 ± 0.90	-1.50 ± 0.61	-1.30 ± 0.40	-6.40 ± 0.35	-6.80 ± 1.10
3	-3.00 ± 0.40	-4.40 ± 0.80	-5.00 ± 0.16	-1.10 ± 0.80	-12.60 ± 0.90	-13.80 ± 0.90
4	-5.90 ± 0.73	-4.20 ± 0.50	-7.60 ± 0.69	-1.70 ± 0.90	-15.90 ± 0.80	-17.50 ± 1.00
7	-4.50 ± 0.53	-8.60 ± 0.70	-9.70 ± 0.89	-5.20 ± 1.70	-26.20 ± 2.10	-27.50 ± 0.50
8	-2.70 ± 1.55	-5.90 ± 0.60	-8.30 ± 0.61	-2.70 ± 1.70	-24.90 ± 1.75	-25.80 ± 0.35
9	-2.10 ± 0.97	-3.00 ± 0.50	-6.30 ± 0.73	-0.40 ± 1.20	-24.80 ± 2.30	-24.10 ± 0.40
10	-5.00 ± 0.89	-4.20 ± 0.60	-8.00 ± 0.81	-1.60 ± 1.10	-26.30 ± 2.30	-23.90 ± 0.85
11	-2.90 ± 1.10	-5.60 ± 0.30	-6.90 ± 0.85	-3.00 ± 1.20	-27.70 ± 2.75	-23.60 ± 0.70
14	-1.90 ± 0.85	-5.10 ± 0.71	-6.30 ± 0.48	-2.91 ± 0.44	-16.80 ± 2.50	-22.10 ± 1.80

10

テーブル7B

12および16 mg/kgの投与量のドキソルピシン、および12および16 mg/kgの投与量のドキソルピシン注射の前のHA投与の際の体重損失のデータ

【表 1 0】

日	12 mg/kg Dox (n=4)	HA before 12 mg/kg Dox (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA before 16 mg/kg Dox (n=6)
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	-1.90 ± 0.75	-2.10 ± 0.89	-5.60 ± 0.60	-4.60 ± 0.69
4	-6.10 ± 0.85	-2.40 ± 0.84	-14.50 ± 0.90	-10.90 ± 1.60
5	-6.80 ± 0.95	-4.10 ± 0.84	-15.20 ± 1.70	-11.20 ± 2.00
6	-7.80 ± 1.10	-4.30 ± 1.43	-11.90 ± 2.40	-11.50 ± 1.80
7	-9.50 ± 1.10	-4.50 ± 1.65	-14.20 ± 1.80	-11.80 ± 0.90
8	-9.70 ± 1.75	-3.90 ± 2.54	-16.80 ± 1.70	-12.60 ± 0.60
11	-12.70 ± 1.35	-4.10 ± 2.50	-12.40 ± 1.67	-9.00 ± 0.65
12	-9.10 ± 1.45	-5.00 ± 2.19	-10.50 ± 1.67	-7.20 ± 0.69
13	-7.70 ± 1.75	-2.50 ± 2.45	-9.10 ± 1.32	-5.90 ± 0.89
14	-10.80 ± 1.70	4.80 ± 2.28	-9.80 ± 1.03	-7.80 ± 1.02

20

30

テーブル8

6, 9および12 mg/kgの投与量のHyDox注射の際の体重損失のデータ

【表 1 1】

日	処置群					
	6 mg/kg Dox (n=6)	6 mg/kg HyDox (n=6)	9 mg/kg Dox (n=3)	9 mg/kg HyDox (n=6)	12 mg/kg Dox (n=6)	12 mg/kg HyDox (n=5)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	-1.40 ± 0.93	0.50 ± 1.02	-2.30 ± 0.51	-0.80 ± 0.85	-4.90 ± 0.65	-2.80 ± 0.70
2	-1.50 ± 1.30	0.90 ± 1.10			-5.90 ± 0.57	-4.00 ± 0.80
3	-4.60 ± 1.38	0.10 ± 0.97			-7.70 ± 0.65	-7.60 ± 0.70
4	-7.30 ± 2.32	0.70 ± 1.06	-6.60 ± 2.36	0.20 ± 1.14	-9.00 ± 0.53	-8.70 ± 0.60
5			-8.70 ± 4.07	-0.80 ± 1.42		
6			-7.50 ± 5.88	-1.00 ± 0.85		
7	-4.50 ± 2.12	0.90 ± 1.06	-8.30 ± 4.67	1.60 ± 1.91	-11.50 ± 1.14	-9.80 ± 0.90
8	-1.40 ± 1.95	3.50 ± 1.26	-7.10 ± 6.50	5.20 ± 2.08	-12.20 ± 1.10	-10.80 ± 1.10
9	2.30 ± 2.04	7.10 ± 1.42			-11.10 ± 1.26	-9.70 ± 0.70
10	-0.70 ± 1.75	5.10 ± 1.38			-12.70 ± 1.30	-10.70 ± 0.90
11	1.50 ± 1.30	6.40 ± 1.42	0.20 ± 0.63	-2.50 ± 1.87	-13.50 ± 1.74	-11.00 ± 0.60
12			0.40 ± 0.23	6.20 ± 2.69		
13			3.80 ± 1.38	5.50 ± 3.30		
14	0.60 ± 1.47	5.50 ± 1.30	3.10 ± 1.32	0.90 ± 2.77	-11.80 ± 1.63	-10.80 ± 0.70

日	対照	
	HA (13.3 mg/kg) N=6	食塩水 N=6
0	0.0	0.0
1	-2.5 ± 1.5	-3.2 ± 0.48
2	-3.0 ± 1.4	-1.9 ± 0.97
3	-3.2 ± 1.3	-4.10 ± 1.02
4	-4.0 ± 1.2	-5.10 ± 1.95
7	-4.8 ± 1.0	-4.0 ± 0.94
8	-5.7 ± 1.1	-4.7 ± 1.14
9	-4.8 ± 1.5	-4.1 ± 1.22
10	-7.1 ± 1.3	-5.9 ± 1.26
11	-6.6 ± 1.2	-4.4 ± 1.34
14	-4.6 ± 1.3	-2.9 ± 0.89

【0059】

マウスの体重損失は投与量に依存し、最も高い程度の損失が24 mg/kgの投与群において観察され、本来の体重のほぼ25%が7日目までに減少した (Figure 5; 24 mg/kgとラベルされたパネル)。より低い6および9 mg/kgの投与量のDoxを投与した場合において、Doxの投与前のHAにおける体重損失はHA対照データと比較でき、Doxの投与前に9 mg/kgのHAを投与した場合において8日目までにほぼ本来の開始体重まで戻り始めた。9 mg/kgのDoxのみの群は最大ほぼ-10%まで減少したが、Doxの投与前にHAを投与した群では最大-5.7%だけにとどまった。12 mg/kgの用量のDox投与の前にHAを投与した群 (ヒトの60 mg/m²に相当) では、体重損失が対照群において観察されたものとまた比較できたが、Doxのみの群と比較したときは、体重損失が本来の体重のほとんど13%が11日目までに損失したことがより明らかになり始めた。(Figure 5)

【0060】

興味深いことに、HyDox製剤において同用量の投与がテストされたときに、体重損失が対応するDoxのみの群と同じであった (Figure 6)。しかしより低い投与量のHyDoxが試験されたときに、6および9 mg/kgの群は体重損失がなく、7日目までに実際に本来の開始体重

を超える体重を得始めた。

【0061】

上記データは、ヒトの30, 45および60 mg/m²に相当する投与量では、HyDoxおよびDoxの30分前にHAを投与された群において好中球減少症が軽減され、血液循環への好中球の放出が実際に蓄積される可能性を有することを示す。これは、薬物関連の好中球減少症のための処置の不完全性に妨げられることの多い現在の化学療法計画の見地からは重要な発見である。

【0062】

実施例 2

心毒性のインビボモデル (1)

実験動物

大人のメスのWistarラット (10週齢) はAnimal Central Division (モナシュ大学、ビクトリア、オーストラリア) から購入し、6つの実験群 (処置群あたりn=8) にランダムに分配した。群1から3は毎週 (1) 1.5 mg/kgのDoxのみ; (2) 1.5 mg/kgのDoxの30分前に投与するHA; および (3) 1.5 mg/kgのHyDoxの静脈注射を受けた。群4から5は毎週それぞれ食塩水および13.3 mg/kgのHAと同用量の静脈注射を受けた。群6は処置なしとした。

10

【0063】

本研究の開始前に、血液 (500 μL) がそれぞれのラットから尾静脈血手順によって集められた。血液は1.5 mLキャピジェクトチューブに集められ、最低30分間凝固させた。この後、凝固物は3,500 g_{av}で2分間の遠心分離によってペレット化し、得られた血清をきれいな1.5 mLのエッペンドルフに移し換え、さらなる分析まで-20 °Cで即座に保存した。採血前処置の後、各実験動物にそれぞれの薬物の組合せを注射し、または対照処置を行い、投与の24時間後、ラットの尾静脈から採血し、上記のように処置を施した。その後、動物は1週間ごとに12週間の間、薬物組合せの注射を受け、血液は処置後24時間で集められた。群1、2、および3の動物が受けたDoxの全累積投与量は18 mg/kgであった。

20

【0064】

分析のための組織の加工

最後の注射から1週間後、ラットは首を切って死亡させ、内臓は食塩水で緩衝されたリン酸塩中の10% v/v ホルマリン溶液に固定した。組織固定の前に、腎臓、肝臓、および骨格筋の一部および心臓をすぐに取り除き、氷中のチューブ中に置いた。組織はすぐに使用するか、または評価まで-80 °Cで保存した。「ウェット」組織重量を記録する前に、各サンプルは細かく小片にし、1 mM EDTAを含む氷冷0.25 Mスクロース、0.1 mM EDTAを含む50 mMのpH7.8のリン酸カリウム緩衝液の二種類で激しく洗浄した。組織は2 mLの氷-リン酸塩-EDTA緩衝液に再懸濁させ、Ultraturraxホモジナイザーを用いて、5秒の破裂を3回、5分以上の間、氷上で均一化した。細かい懸濁液はリン酸塩-EDTA緩衝液とともに4 mLの最終的な容積までにし、後述の酵素およびGSHの評価分析のために使用した。

30

【0065】

抗酸化酵素およびGSHの評価分析

4 mLの均一化された組織から、1 mLをきれいな1.5 mLエッペンドルフに移し、氷上で保存した。別の1 mLのリン酸塩緩衝液が3 mLの均一化された組織に最終容積が4 mLとなるように加えた。酵素の評価分析のために均一化されたクルードホモジネート (4 mL) がTLA100.2ローターを固定したBeckman TL-100 ultracentrifugeを用いて、100,000 x g、4 °Cで60分間遠心分離した。遠心分離の後、透明な高スピードの上澄みを分割し、グルタチオンペルオキシダーゼ (GP)、カタラーゼおよびジスムターゼ超酸化物 (SOD) 活性の直接的な決定まで-80 °Cで保存した。

40

【0066】

GSHの評価分析のために、0.25 mLの25% w/vメタホスホリッ酸を1 mLの本来のクルードホモジネートに加え、徹底的に混合し、氷上で15分間培養した。たんぱく質沈殿物は10,000 g、4 °Cで10分間遠心分離によって錠剤化した。透明な上澄みをきれいなチューブに移

50

し変え、3日を超えない期間-70℃で保存するか、またはGSHレベルを直接決定するかのいずれかの処置を行った。GSHレベルはCohn & Lyleによって記載されたo-フタルアルデヒドを用いた蛍光評価分析により決定した。(Anal. Biochem. 14(3): 434-440, 1996)

【0067】

SOD活性はMcCord & Fridovichによる方法 (J. Biol. Chem. 244(22): 6056-6063, 1969) によってシトクロムcを測定して決定した。GP活性は間接的に連結した評価分析 (Paglia & Valentine, J. Lab. Clin. Med. 70(1): 158-169, 1967) によって評価した。カタラーゼ活性はClaiborneによる記載の方法 (Am. Rev. Respir. Dis. 131(6): 947-949, 1985) によって240 nmでのH₂O₂の分解に続いて測定された。

【0068】

100,000 gおよび10,000 gの上澄みのたんぱく質濃度はBCAたんぱく質評価分析を用いて決定した。

【0069】

心臓トロポニン-T (cTnT) の血清レベル

Doxによって引き起こされる心毒性の程度を定量するために、cTnTの血清レベルをRoche Diagnostics (ビクトリア、オーストラリア) からの心臓トロポニンTの免疫分析を用いた研究を通して集めた各血清サンプルについて決定した。

【0070】

電子顕微鏡による心ダメージの分析

動物犠牲の直後に、静脈隔膜の横断片を心臓から切断し、リン酸塩緩衝液中の2%グルタルアルデヒド、2%パラホルムアルデヒド、および4%グルコースに固定した。標準のポストバッファリング、オスミウム酸染色、およびプロセッシングを続けて行った。標本はPhilipの電子顕微鏡で試験し、心筋細胞中の心ダメージの頻度および重篤度がBillinghamらによる方法 (Can. Treat. Rep. 62: 865-872, 1978) によって段階化した。要するに、主に横断された心筋細胞から成るようにブロックを選択した。障害は記録し、心ダメージの程度が空胞化された筋細胞の割合として表した。

【0071】

Figure 7は心毒性へのHA/Doxの効果を示す。このグラフによって示されるように、HAのDoxとの製剤、またはDox投与前のHA注射は心毒性の開始を遅らせることができる。ラット研究からの血清トロポニンTのデータは、本段階ではHyDoxが確かにトロポニンTの放出を遅らせる効果を有することを示す。(HyDoxの心毒性が12 mg/kgの累積投与量において始まるが、Doxの累積的投与量は9 mg/kgである。)

【0072】

Figure 8A-8Bはラットの心毒性へのHAおよびDoxの効果を示す。動物の心臓の空胞化した筋細胞はDoxを受けるのに対して、動物の空胞化していない正常な筋細胞はHAおよびDoxで処置されることに注意すべきである。

【0073】

実施例 3

細胞毒性のインビボモデル (2)

実験動物

オスのF1マウス (C57 x CBA, 11~13週齢) はAnimal Central Division (モナシュ大学、ビクトリア、オーストラリア) から得た。各投与処置のために計6群 (群あたりn=8マウス) が使われた。各処置群からのデータは、日々の評価が確立されるように4日ごとに各群からサンプリングし (個別に数えられた)、6つの群の結果を相互参照することによって確立した。各群は薬物投与の前に上記のように扱われた。本研究を通して血液を集め、先の例で概略されるように好中球含有量を分析した。最後には、すべての動物が人道的に犠牲になり、内臓はPBS中の10% v/vホルマリン中で固定された。

【0074】

血液学的決定

本研究は、それぞれヒトの60 mg/m²および80 mg/m²の治療に相当する量の12 mg/kgおよび

10

20

30

40

50

16 mg/kgの二種類の投与量のDoxに焦点を絞った。また処置間の比較のためのデータを標準化するために、好中球減少症を0日目（投与前）の好中球の割合として表した。

【0075】

12 mg/kgのドキソルビシンおよびHyDox処置群

12 mg/kgの投与量で実施例1記載の好中球減少症に似た傾向が観察された。(Figure 9, 12 mg/kgのパネル) HyDox投与の24時間後の好中球含有量の約74%までの低下にもかかわらず、2日目および3日目までにそれぞれ267%および207%までの末梢好中球の平均的増加があった。Doxのみの群で末梢好中球の増加が観察され、2日目にピークとなったにもかかわらず、HyDoxで処置された群で得られた最大値には達しなかった。最低血算値の好中球減少症の開始および継続期間が両方の群において同様に重篤であり、4日目に初めて起こり、7日目までに正常なレベルに回復するまで2日間続いた。

【0076】

16 mg/kgのドキソルビシンおよびHyDox処置群

16 mg/kgのDoxの投与において、テストされた薬物の組合せに関わりなく、同様の好中球減少症プロフィールが観察された (Figure 9)。この傾向に関わらず、好中球減少症の開始が、HyDox製剤で処置を受けた群 (Figure 9, 16 mg/kgのパネル, 実線) において1日の差で遅れ、5日目に起こった。最低血算値の好中球減少症が両方の薬物投与の組合せの場合と同じであったが、HyDoxで処置された群において正常な測定への回復まで24時間続くだけであった。対照的にDoxで処置されたマウスは最低血算値の好中球減少症からの回復に48時間以上かかった。

【0077】

これは、末梢好中球の減退の後起こり、4日目までに最低血算値の好中球減少症が薬物の組合せ間で比較でき、正常な測定に戻るまで48時間続いた。

【0078】

16 mg/kgのDoxで処置されたマウスにおいて、いずれの薬物の組合せにおいても、同じ好中球減少症プロフィールが観察された。両方の群は、薬物の静脈注射に続いて2日目までに末梢好中球の増加を示し、これは好中球数の減少に先行して起こった。しかし16 mg/kgのHyDoxを受けたマウスにおいて好中球数の減少は、24時間の差で遅れたが、Doxのみを受けたマウスと比較したときと同様に重篤であった。(Figure 9)

【0079】

他の血液学的考察

赤血球数、ヘモグロビン、血小板およびリンパ球の特異な結果の分析はHyDoxとともに、または薬物のみのいずれかにおいてDoxが投与されたときの効果にどのような違いも示さなかった。

【0080】

代謝ストレス

体重損失は本来の開始体重の割合として表した。体重損失は12 mg/kgのDoxまたはHyDoxで処置された群において4日目まで等しかった。しかし、5日目までにHyDoxの群は体重を回復し始めて12日目までに本来の開始体重まで回復した (Figure 10A, 12 mg/kg)。対照的に12 mg/kgのDoxで処置された動物は、体重を回復し始める前に6日目まで体重を損失し続けた。12 mg/kgの投与量の群において、体重損失の最大の割合は12.9%で6日目に起こったのに対し、HyDox群は4日目までに最大9.6%のみの損失であった。Doxのみを受けたマウスはその本来の開始体重を回復しなかった。(Figure 10A, 12 mg/kg)

【0081】

16 mg/kgのDoxおよびHyDox製剤で処置されたマウスの体重損失は同様の傾向に従い、両方の群はその本来の体重を回復しなかった。しかし、二つの群間の等しい体重損失にも関わらず、Doxのみを受けたマウスは研究期間を通して平均してより多くの食物を消費したことは興味深い (Figure 10B, 16 mg/kgのDox)。この効果は12 mg/kgの薬物投与でのHyDoxを受けた群においてよりいっそう顕著であった。HyDoxの群は本研究を通して同量の食物を消費したが、Doxのみのデータと比較したときよりも早く体重を回復した。(Figure 10B

, 12 mg/kg)

【0082】

実施例 4

心毒性のインビボモデル (2)

静脈注射用薬物および他の化学物質

ドキソルピシンをドキソルピシン塩酸塩粉末としてAsta Medical (NSW, オーストラリア) から購入し、最終濃度が2 mg/mLの0.9%無菌塩化ナトリウムに再構成した。乾燥HA、824, 000 DaをPearce Pharmaceuticals (ビクトリア、オーストラリア) から購入し、無菌水に溶かして最終濃度を10 mg/mLとして、0.22 μmフィルターを通して殺菌し、使用するまで4 で保存した。HyDoxは計量した10 mg/mLのHAを計量した0.5 mg/mLのDoxと混合することによって調製し、1.0 mg/kgの望む投与量のDoxとなるようにした。

10

【0083】

本研究を通して使用したHAの投与量は13.3 mg/kg体重であった。グルタチオン、o-フタルアルデヒド、キサンチン、キサンチンオキシダーゼ (Buttermilkから購入、Grade I)、還元NADPHタイプIIIをシグマケミカルから購入した。(St. Louis, MO) カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼおよびグルタチオンリダクターゼはRoche Molecular Biochemicals (NSW, オーストラリア) から購入した。他のすべての試薬はアナリティカルグレードであった。

【0084】

実験動物

大人のメスの自発性高血圧のラット (10週齢) をBaker Medical Research Institute (メルボルン、オーストラリア) から購入し、4つの実験群 (処置群あたりn=10) にランダムに分配した。群1および2には毎週 (1) 1.0 mg/kgのDoxのみ: (2) 1.0 mg/kgのHyDoxの静脈注射を行った。群3には毎週13.3 mg/kgのHAの静脈注射を行った。群4は処置なしとした。12週間の間、薬物組合せを1週間ごとに動物に注射した。両方の処置群の受けたDoxの全累積投与量は13 mg/kgであった。

20

【0085】

分析のために抗酸化剤酵素およびGSHの組織プロセッシングおよび評価分析を実施例2記載のとおりに行なった。透過型電子顕微鏡による心ダメージの分析もまた実施例2記載のとおりに行なった。

30

【0086】

心筋の病態、超微細構造の研究

誘発的な慢性の心毒性モデルを発展させるために、DoxのみまたはHyDoxのいずれの場合も、毎週1.0 mg/kgのDoxを4回の注射によりラットに投与した。実験群に与えたDoxの全累積投与量は13 mg/kgであった。そしてHA存在下の、またはHA非存在下のDoxへの慢性的な影響がそれぞれ心保護または心毒性かを評価するために電子顕微鏡を使用した。処置群にわたる解剖組織上の変化を最小にするために、左心室の側面の境界のサンプルのEM分析を行った。

【0087】

13 mg/kgの累積投与量のDoxは、自発性高血圧のラットモデルには心毒性であることが電子顕微鏡試験によって明らかになり、他の同様の被験者の研究と一致した。主に細胞質の空胞化、筋原線維の破壊および筋細胞の超構造組織への分裂としてDox心毒性が特に述べられている。

40

【0088】

HyDoxを受けたラットから得られた顕微鏡写真と比較したとき、Doxで処置されたラットでははるかに多く心筋細胞の空胞化が発生した (それぞれFigure 11Cおよび11D)。Doxはクリステへの小さな分裂を伴ったミトコンドリアの膨潤も引き起こした。しかしその重篤度は、Doxのみを受けたラットにおいてより高かった。実際、退行性のミトコンドリアの変化はこれらの副細胞器官への完全な分裂に関連しており、ミエリン特徴の出現と一致した (Figure 12Aおよび12B、実線矢印)。これらの観察はHyDoxを受けたラットではほとんど

50

見られなかった (Figure 12B)。Doxへの慢性的な影響が、筋原線維の溶解およびZ-バンドの誤配列を含む組織化された筋原線維配列への穏やかな分裂も引き起こした。またこれらのDoxの心毒性の特徴はDoxのみを受けたラットにおいて常により重篤であった (Figure 12A、点線矢印)。筋原線維の溶解がまだ明らかではあるが、HyDoxで処置されたラットにおいて、重篤度は低く、まだ順序正しい筋原線維配列が明らかであった。(Figure 12B、ダッシュ矢印)

【0089】

すべての処置群での心筋細胞の空胞化の重篤度を図13に示す。HyDox群と比較したとき、Dox群の筋細胞の空胞化はほぼ2~3倍大きい。(p<0.05: 処置群間のt-テスト)

【0090】

Dox±HAへの慢性的影響に続く抗酸化剤レベル

フリーラジカルスカベンジング酵素すなわちジスムターゼ超酸化物、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼのレベルおよび還元グルタチオン (GSH) のレベルをDox±HAへの慢性的影響の後に測定した。対照のために、肝臓、腎臓、および骨格筋の抽出物からの抗酸化剤もまた決定した。心臓、肝臓、腎臓、および骨格の抗酸化剤の容量へのDoxおよびHyDoxへの慢性的な影響の効果をFigure 14に示す。

【0091】

カタラーゼ

DoxおよびHyDoxの対照群と比較したとき、HyDoxに反応した心臓カタラーゼにわずかな増加が観察された。HyDox活性が両方の対照群から観察されたものに反映しているのに対して、肝臓カタラーゼはDox群に反応して著しく増加した。(Figure 14A)

【0092】

還元グルタチオン (GSH)

肝臓GSHのレベルはHyDoxを受けたラットにおいて著しく減少した。しかし、Doxで処置されたラットのGSHレベルは対照値に関連して変化しなかった (Figure 14)。同様の傾向が心臓のレベルで観察されたが、Dox処置が対照に類似の値を与えたのに対し、HyDox処置ではGSH含有量を減少した。(Figure 14: 除かれた肝臓のデータの挿入)

【0093】

グルタチオンペルオキシダーゼ

対照群から得られた値と比較したときに、HyDoxおよびDox処置の両方で同様に、心臓のグルタチオンペルオキシダーゼのレベルが増加した (Figure 14C)。対応する対照データと比較したときに、両方の薬物組合せの群で、類似の肝臓、腎臓、および骨格のグルタチオンペルオキシダーゼ活性を示した。(Figure 14C)

【0094】

ジスムターゼ超酸化物 (SOD)

処置なしの対照群と比較したときに、心臓SOD活性は処置群間で比較的、変化しなかった (Figure 14D)。HA対照群はこの酵素の活性を著しく減少した (Figure 14D)。骨格SOD活性が緩やかに増加したのに対して、(Figure 14D) 肝臓および腎臓SODの抑圧が両方の処置群で観察された。HyDox活性が両方の対照群から観察されたものと反映したのに対して、肝臓カタラーゼ活性がDoxの影響に反応して著しく増加した。(Figure 14A)

【0095】

心毒性がDox治療の全累積投与量を500~550 mg/m²に制限する複雑な要因である。DoxとHAを組合せること (HyDox) によって、心毒性のレベルがDoxのみと比較したときにほぼ3倍に軽減されることをこれらのデータが示している。従って、HyDoxの使用によって、通常起こる心毒性を引き起こさずに、高有効性抗癌剤のより高用量の累積投与が可能となる。心毒性を伴わない処置の完成は腫瘍への反応の蓋然性を拡張し、究極的に生存数を増加させる。

【0096】

実施例 5

段階I 臨床試験 - 進行した癌患者におけるドキソルピシン + HAの組合せ (「HyDox」)

10

20

30

40

50

Doxとの同時のHAの投与が進行した癌患者におけるDoxの毒性に影響するか否かを決定するために段階Iの研究を行った。

【0097】

本研究に含まれる適格性の判断基準は、以下のとおりであった。患者は、組織学的に、または細胞学的に確認されるような進行した、または転移した癌を有していなければならない。患者は前に治療を受けているべきではなく、多くても前に一つの治療計画しか有するべきではなく、および前にアントラサイクリンを投与されるべきではない。患者は歩行可能で、適切な骨髄、肝臓および腎臓機能を有した18歳から75歳であるべきである。

【0098】

最初の治療サイクルでの処置計画では、患者はDoxのみまたはDoxとHAを受けるかで任意抽出される。二番目のサイクルでは会話が適用された。続く4回のサイクルで、患者はDoxとHAを受けた。これは、結果解釈に影響される患者間の変化を軽減しながら、最初の2サイクルにおいて毒性分析における患者自身の対照として各患者が活動することを可能にした。

【0099】

HyDox製剤（注入バッグとして）が以下のようにして調製された。HAはGlycoMed Research, ニューヨーク, USAから得て、蒸留水中に粉末HAを溶かして0.22 μm フィルターを通し、無菌化して調製した10 mg/mlの原料から使用した。DoxはAsta Medicaから得て、250 mgのラクトースを含む50 mgの小瓶として供給され、8分から12分間の一定の回転によって25 mLの通常の注射用食塩水を再構成した。注射用塩化ナトリウムはBaxter Healthcare, シドニー、オーストラリアから500 mLの注入バッグとして得た。注射用HyDoxは13.3 mg/kgのHAと30, 45または60 mg/m^2 のDoxから調製した。

【0100】

Dox ± HAを3週間サイクルで1時間以上かけて静脈投与により与えた。段階Iの研究におけるDoxの初期投与量は30 mg/m^2 であり、HAの投与量は500 mg/m^2 であった。二段階で60 mg/m^2 の標準投与量に達するように投与量をだんだんと増加した。従って初期投与量のレベルは30 mg/m^2 、次は45 mg/m^2 でその次は60 mg/m^2 とした。

【0101】

4人の患者が各投与量レベルにおいて処置された。その結果は、HAがDoxの既知のいずれの毒性も増加させないことを示した。より高用量のレベルでは、60 mg/m^2 の投与により、Doxによって誘発される毛髪欠乏および好中球減少症の程度の両方が軽減されるだけでなく、治療後の吐き気および嘔吐も明らかに減少した。好中球数の結果をテーブル9に示す。患者の幸福が改善されたようだ。他の毒性は報告されなかった。

テーブル9

【表12】

患者1 : A-S#1							
Cycle 1:	30 mg/m ²			Cycle 2:	30 mg/m ²		
HyDOX				DOX			
時間 (日)	Neutrophils X 109/L	Neutrophils as % of Day 1	時間 (日)	Neutrophils X 109/L	Neutrophils as % of Day 1	時間 (日)	Neutrophils X 109/L
1	3.6	100	1	3.5	100	1	2.6
3	4.5	125	6	3.5	100		
6	5.7	158	8	3.8	109		
8	5	139	10	3.8	109		
10	5.1	142	13	2.9	83		
15	2.9	81	15	2	57		
17	2.3	64	20	2	57		
20	2.7	75	21	2.6	74		
21	3.5	97					
患者2 : H-Y #2							
Cycle 1:	30 mg/m ²			Cycle 2:	30 mg/m ²		
DOX				HyDOX			
時間 (日)	Neutrophils X 109/L	Neutrophils as % of Day 1	時間 (日)	Neutrophils X 109/L	Neutrophils as % of Day 1	時間 (日)	Neutrophils X 109/L
1	5	100	1	4.3	100	1	3
4	6	120	4	5.3	123		
8	6.6	132	8	6.4	149		
10	3.9	78	11	4	93		
15	2.7	54	12	4.2	98		
17	2	40	15	4.1	95		
21	4.3	86	17	2.3	53		
			21	3	70		

【表 13】

40

【表 14】

40

40

【表 1 6】

段階Ⅰ 臨床試験 - 転移した結腸直腸の癌患者における5-フルオロウラシル + HAの組合せ (「Hyfive」)

転移した結腸直腸の癌患者に、HAと5-フルオロウラシルの組合せ (Hyfive) で類似の段階Ⅰの研究を実行した。適格性の判断基準は、アントラサイクリンが使用できること以外は実施例3と同様である。処置計画は実施例3で行ったものを続けた。

【0103】

HyDox製剤 (注入バッグとして) は以下のようにして調製した。実施例3で行ったように、HAおよび注射用塩化ナトリウムをGlycoMed ReseachおよびBaxter Healthcareからそれぞれ得た。DoxはDavid Bull Laboratoriesから500 mgの5-フルオロウラシル (5-FU) を含む10 mlの小瓶として得た。

10

【0104】

5-FU ± HAを4週間のサイクルで1時間以上かけて静脈投与により与えた。本研究での5-FUの初期投与量は3日間で毎日450 mg/m²であり、各5-FU投与とともに500 mg/m²のHAを投与した。連続5日間の各サイクルで450 mg/m²の標準投与量に二段階で達するように投与量をだんだんと増加した。従って初期投与量のレベルは3日間は毎日450 mg/m²で、次の4日間は450 mg/m²で最後の5日間は毎日450 mg/m²とした。

【0105】

4人の患者が各投与量レベルにおいて処置された。HAが5-FUの既知のいずれの毒性も増加させないことをその結果が示した。より高用量のレベルでは、治療後の吐き気および嘔吐が明らかに減少し、好中球減少症または胃腸管毒性を示さなかった。好中球数の結果をテーブル10に示す。

20

テーブル10

【表17】

[illegible]

【表 18】

40

【表 19】

患者 7 - V- D (5Day Tx)										
Cycle 1 - HyFive										
時間 (日)	Neutrophil Count	as % Day 1	時間 (日)	Neutrophil Count	as % Day 1			Cycle 3 - 時間 (日)	Neutrophil Count	as % Day 1
1	2.7	100	1	3	100			1	3	
3	3.2	119	3	2.3	77					
5	2.7	100	5	2.8	93					
8	3.3	122	8	3.2	107					
10	2.5	93	10	2.5	83					
12	2.6	96	15	2.7	90					
19	2.5	93	17	2.5	83					
22	2.4	89	19	3	100					
24	2.9	107	22	3.4	113					
26	2.9	107	24	3.1	103					
			26	3.5	117					

【 0 1 0 6 】

实施例 7

細胞毒性のインビボモデル (3)

実施例5および6で、それぞれ6ヶ月および6週間の間、HA/細胞毒性薬物の組合せの効果を調査し、メトトレキセートまたは5-FUへのHAの付加が腫瘍への反応を拡張し、転移を軽減し、および胃腸毒性を軽減することを示した。それらの結果が、ヌードマウスにおけるヒトの乳癌の異種移植に対する処置において、シクロホスホアミド、メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル (CMF) の有効性へのHAの効果の調査の後に付け加えられた。以下のような有効性のパラメータを調査した。主な腫瘍容積、癌の転移、および体重、臓器の病態、血液学、および生存に関する処置毒性。

【0107】

ヒトの乳癌腫細胞線

ヒトの乳癌腫細胞線MDA-MB-468 (American Tissue Culture Collection, Rockville, USA) をCD44およびRHAMMのHAレセプターの表現に基づいて選択した。細胞は定期的に成長し、10% w/vウシ胎児血清および10 μ g/mlのゼンタマイシンで満たされたLeibovitz L-15 Medium (Sigma, St. Louis, USA) の175 cm²培養フラスコまたは700 cm²ローラーボトルで単層として二次培養した。マウスへの注射のために細胞は80%コンフルエンスまで成長させ、0.05%トリプシン/0.01%EDTA溶液中でトリプシン化され、Beckman TJ-6ベンチ遠心分離 (Beckman, メルボルン、オーストラリア) で10分間400 gavでの遠心分離によって2回洗浄し、Model-ZM Coulterカウンター (Coulter Electronics, イギリス) を用いて数を数え、血清フリーなLeibovitz L-15 Mediumで2 x 10⁸ cell/mlで再懸濁した。

【0108】

マウスの腫瘍モデル

無胸腺症のCBA/WEHIの6~8週齢のメスのヌードマウス (Walter and Elisa Hall Research Institute, メルボルン、オーストラリア) を特定病原体フリーの条件下、無菌の食物および水を自由に与えつつ飼育した。各マウスに1 x 10⁷ cellsを含む50~100 μ lの注射を1回行った。第一の乳首の下、乳房脂肪部分に直接的に26ゲージ針でそれらの細胞を注射した。(Lamszus et al., Lab. Invest. 76(3): 339-353, 1997) 腫瘍測定が毎週3つの垂直な直径 (d₁d₂d₃) を測定することによってなされた。腫瘍容積は公式 (1/6) (d₁d₂d₃) を用いて見積もった。CMF±HAを用いた処置を癌細胞接種の約4~8週間後に開始した。テーブル11は処置開始時点における各処置群の平均腫瘍容積を示す。

テーブル11

【表20】

処置群	処置開始時の腫瘍容積 (mm ³) 平均±標準偏差	処置開始時の体重の割合 (%) としての腫瘍容積 (mm ³) 平均±標準偏差
Saline Day 1 & 2	39.98 ± 13.88	0.20 ± 0.07
HA Day 1 & 2	50.99 ± 18.07	0.22 ± 0.10
HA Day 1 & 3	28.65 ± 20.90	0.14 ± 0.11
CMF Day 1 & 2	44.51 ± 26.92	0.23 ± 0.13
HA/CMF Day 1 & 2	37.13 ± 22.30	0.20 ± 0.12
HA days 1 & 3 followed by CMF days 2 & 4	35.31 ± 9.42	0.20 ± 0.05

【0109】

動物の維持および飼育場所

同じ数のマウスを各ケージに割り当てた。実験の段階に依存して、ケージあたりの動物の数は5~8まで変化した。モナシュ大学のCentral Animal Services SPF施設で施設内品質保証プログラムに一致してすべての動物を飼育した。

【0110】

ヒトの乳癌異種移植の評価：乳癌腫におけるHAレセプターの免疫的組織化学的決定

腫瘍誘発の約8週間後、二つの腫瘍をもったマウスに致死量のネンブタールを与えた。マウスを死亡させて3分以内に、腫瘍を外科的に取り除き、すぐに10% v/vホルマリン緩衝液に12時間固定した。その固定した腫瘍を70～100% v/vエタノールで脱水し、パラフィンに埋め込んだ。断片（2から4 μm ）を切り取ってスライドに置き、油分をとり、水中に入れた。スライドはPBSで5分間3回洗浄した。異染性たんぱく質を10% w/vウシ胎児血清での10分間の培養によって遮断し、PBSですすいだ。抗体の検出を室温（RT）で60分間適用した。抗血清または抗体はRHAMM (Applied Bioligands Corporation, Manitoba, カナダ), CD 44H, CAEに対するもので、二次抗体はZymed (カリフォルニア, USA) から購入した。スライドはPBSで5分間3回洗浄し、メタノール中0.3% H_2O_2 で20分間浸すことにより、内部に生じるペルオキシダーゼ活性を遮断した。さらなるPBSでの5分間3回の洗浄に続いて、ペルオキシダーゼ-結合ブタ抗ウサギ二次抗血清 (Dako, カリフォルニア, USA) をRTで60分間適用した。Sigma Fast DAB (3,3'-ジアミノベンジジン, Sigma, St. Louis, USA) 錠剤を製造説明書によって調製し、DAB溶液をRTで5～10分間適用した。スライドを10分間タップ水で洗浄し、ヘマトキシリンで対比染色し、脱水して置いた。

10

【0111】

CMF/HA薬物組合せの調製および注射

シクロホスホアミド / メトトレキサート / 5-フルオロウラシル (CMF) 注射をマウスの体重によって個別にし、ヒトでは以下の用量に相当する15 mg/kg MTX / 30 mg/kg Cycloおよび30 mg/kg 5-FUを注射した。

20

15 mg/kg MTX = ヒトの565 mg/m^2 に相当

30 mg/kg Cyclo = ヒトの1 g/m^2 に相当

30 mg/kg 5-FU = ヒトの400 mg/m^2 に相当

5-FUをmtxに加え、薬物組合せを1 m: シリンジに抜き出すことにより100 μl 注射を調製した。そしてシクロは個別のシリンジに抜き出した。

【0112】

5-FU/HAを目的としてピロゲンフリーなHA原料溶液（10 mg/ml; 形式的に m_r 8.5 $\times 10^5$ da）を20 mg/mlの5-FU原料溶液に加え、渦動しながら一晩かけて培養し、最終HA濃度がマウスの体重の12.5 mg/kgに相当するまでとした。注射を個別にマウスの体重によって行い、100 μl 中で30 mg/kg 5-FUおよび12.5 mg/kg HAを注入した。

30

【0113】

HA/CMF注射をマウスの体重によって個別に行い、15 mg/kg MTX / 30 mg/kg Cyclo / 30 mg/kg 5-FUおよび12.5 mg/kg HAを注入し、これはヒトでは上記に示した用量となる。

【0114】

mtxを5-FU/HAに加え、薬物組合せを調製して100 μl の注射を調製した。そしてCycloは個別のシリンジに抜き出した。

【0115】

マウスはランダムに以下の処置群に分配した。

食塩水（7日サイクルの1日目および2日目）

40

12.5 mg/kg HA 850 kD（7日サイクルの1日目および2日目）

12.5 mg/kg HA 850 kD（7日サイクルの1日目および3日目）

CMF（7日サイクルの1日目および2日目）

12.5 mg/kg HA 850 kD/CMF（7日サイクルの1日目および2日目）

CMF（7日サイクルの2日目および4日目）

1日目および3日目の12.5 mg/kg HA 850 kD; CMF（7日サイクルの2日目および4日目）

処置は尾静脈を経由して定量的に投与された。動物に5-FU/MTX \pm HAに続いて2分後にCycloを注射した。動物の体重および腫瘍容積を日にちベースで測定した。

【0116】

腫瘍および体臓器の採集およびプロセッシング

50

実験の終わりに、動物が疾患の進行のために安楽死すべきであるとき、または6週間の処置計画が完了したときは、0.1 mlのネンブタール (60 mg/ml) を腹膜内注射することによって動物を麻痺させ、血液を採集し、子宮頸部脱臼により死亡させた。

【0117】

マウスを死亡させてすぐに、腫瘍、肝臓、心臓、脾臓、膀胱、左および右腎臓、子宮、肺、胃、腸、脳、およびリンパ節が切開され、重量を量り、および10% v/vホルマリン中に置いた。組織を組織学的にプロセッシングするまで16~24時間の間、固定した。固定した組織を100% v/vエタノールに段階的に脱水し、パラフィンブロックに埋め込み、そこから2~4 μmの断片をガラス顕微鏡スライドに置いた。ヘマトキシリン核ステインおよびエオシン細胞質ステインを用いた組織断片の染色により、処置毒性を示すいずれの病理学的特徴も際立った。

【0118】

処置の副作用のモニタリング

胃腸 (GI) 管毒性

動物の下痢のようなGI管不調および体重損失のようなより重篤な毒性の徴候を調べた。体重損失を腫瘍の重量を引いて見積もられる実質体重を計算することによって調べ、腫瘍の重量はShibamoto et al., Br. J. Cancer 74(11): 1709-1713, 1996で引用されている1 g x 腫瘍容積 (cm³) のように計算した。重量の変化を実証するため、以下のように動物の体重を処置開始時での体重に標準化した。

体重 (腫瘍を除く) - 処置開始時の体重 (腫瘍を除く) / x100

処置開始時の体重 (腫瘍を除く)

【0119】

骨髄抑制

赤血球、血小板、および白血球数をマウスの粘性の食塩水中の血液を1/50~1/2000に希釈し、血球計で数えることによって見積もった。血液の塗抹を作り、およびGiemsaで染色し、それによって好中球、リンパ球、および赤血球の相対的な割合の定量化が可能となった。血球サブ集団の全概算をマウスの血液の公表されているデータと比較した。

【0120】

臓器の重量への処置の効果

処置が臓器の萎縮または増大を誘発しないことを確かめるために、臓器を取り出し、死後出血の間に重量を量った。各臓器の重量を全体の実質体重の割合として計算し、食塩水のみ群の臓器の重量と比較した。

【0121】

全体の集団の生存時間

全体の生存時間を処置の開始後、動物が生きた時間 (日または週) として計算した。

【0122】

CMF誘発毒性へのHAの効果

胃腸毒性：体重のモニタリング

下痢のGI毒性の存在を毎日調べたところ、処置群のうちどの群もその徴候を示さなかった。GI毒性の明らかな徴候に加えて、動物の実質体重 (腫瘍を除く) も6週間の研究期間中に観察した。他のすべての処置群と比較したときに、HAのCMFの前の、または同時の投与が、統計的に著しい体重の増加の原因となった。(テーブル12またはFigure 15)

テーブル12

CMF胃腸毒性へのHAの効果の統計的比較

【表21】

処置	体重（腫瘍を除く）の 平均的な変化の割合（%） ±誤差	HA/CMF処置群と比較した ときの統計的に著しい差 （t-テスト）
HA/CMF administered days 1 and 2	8.74 ± 1.93	Not applicable
Saline	0.09 ± 1.87	P=0.005
HA administered days 1 and 2	2.47 ± 1.05	P=0.013
HA administered days 1 and 3	2.78 ± 1.28	P=0.022
HA Days 1 and 3; CMF days 2 and 4	5.97 ± 1.65	Not Significant
CMF administered days 1 and 2	-15.51 ± 4.15	P<0.001

10

【 0 1 2 3 】

骨髄毒性：好中球減少症

CMF処置計画で白血球（WBC）の全体的な循環の減少に続いて骨髄毒性を示した。HA/CMFのその前の、または同時の投与が毒性に打ち勝つようだ（テーブル13～15）。WBCサブ集団は、CMFによって最も影響を受ける多形体細胞タイプであり、HA/CMFが数の増加の原因となる場合には、血液循環への好中球前駆体の補充の可能性が示される。

テーブル13

20

骨髄毒性へのCMF/HA処置の効果

【 表 2 2 】

処置	血球サブ集団の全数（平均±標準偏差）				
	赤血球 X10 ⁶ /ul	血小板 X10 ³ /ul	白血球 X10 ³ /ul	好中球／好酸球 ／好塩基球 (%)	リンパ球／ 単核細胞 (%)
食塩水	8.71 ± 0.43	1290 ± 88	6.15 ± 0.19	54 ± 3	46 ± 3
HA/CMF administered days 1 and 2	8.99 ± 0.07	1323 ± 21	6.75 ± 0.12	58 ± 2	42 ± 2
HA administered days 1 and 2	8.99 ± 0.13	1374 ± 7	6.15 ± 0.03	53 ± 1	47 ± 1
HA administered days 1 and 3	8.78 ± 0.25	1356 ± 41	6.15 ± 0.05	53 ± 2	47 ± 2
HA Days 1 and 3; CMF days 2 and 4	8.99 ± 0.05	1335 ± 38	6.54 ± 0.17	56 ± 2	44 ± 2
CMF administered days 1 and 2	8.90 ± 0.17	1295 ± 56	5.63 ± 0.32	45 ± 3	56 ± 3

30

40

テーブル14

血球の食塩水処置群との比較

【 表 2 3 】

細胞タイプ	CMF	CMF/HA	HA 1,3	HA 1,2	HA 1,3 followed by CMF 2,4	結果
赤血球	NO	NO	NO	NO	NO	
白血球	8% decrease p=0.003	9% increase p<0.001	NO	NO	6% increase p<0.001	HAの添加がCMF群で観察されたWBCの減少を改善
好酸球／好中球	13% decrease p<0.001	8% increase p=0.007	NO	NO	NO	HAの同時の投与により多形体細胞数が増加
単核細胞／リンパ球	20% increase p<0.001	10% decrease p=0.007	NO	NO	NO	
血小板	NO	NO	NO	6% increase p=0.010	NO	

10

20

テーブル15

血球のHA/CMF処置群との比較

【表 2 4】

30

細胞タイプ	食塩水	CMF	HA 1,3	HA 1,2	HA 1,3 followed by CMF 2,4	結果
赤血球	NO	NO	NO	NO	NO	
白血球	9% decrease p<0.001	17% decrease p<0.001	9% decrease p<0.001	9% decrease p<0.001	3% decrease p=0.012	HAの添加が CMF群で観察 されたWBCの 減少を改善
好酸球/好中球	9% decrease p=0.007	24% decrease p<0.001	9% decrease p<0.001	9% decrease p<0.001	7% decrease p=0.050	HAの同時の 投与により 多形体細胞 数が増加
単核細胞/ リンパ球	25% increase p<0.001	10% increase p=0.007	11% increase p<0.001	12% increase p<0.001	9% increase p=0.050	
血小板	NO	NO	NO	3% increase p<0.001	NO	

10

20

30

【 0 1 2 4 】

臓器重量への処置の効果

HAまたはCMFへのHAの添加は処置なしの群と比較したとき（テーブル16）に著しい脾臓の拡大を引き起こし、脾臓の病態試験がいずれの異常組織または細胞病変も示さなかった。HAも心臓の重量のわずかな減少を引き起こすようで、組織の病態評価でいずれの異常病変も引き起こさなかった。CMF処置計画によって子宮萎縮が発生するが、HAの同時の投与によってかなり抑えられるようだ。CMFもGI管の拡大を引き起こす。

テーブル16

食塩水による処置なしの対照臓器重量との臓器重量の比較

40

【 表 2 5 】

臓器	CMF/HA	CMF	HA 1,3	HA 1,2	HA 1,3 followed by CMF 2,4	結果
脾臓	101% larger p<0.001	No	No	No	197% larger p=0.007	CMFへのHAの添加が脾臓の膨張を引き起こす
心臓	14% smaller p=0.013	No	11% smaller p=0.023	16% smaller p=0.029	13% smaller p=0.023	HAの添加が心臓重量のわずかな減少を引き起こす
腎臓	10% smaller p=0.001	No	8% smaller p=0.038	No	No	わずかな差ではあるが、HAが腎臓重量に影響を与えた
子宮	49% smaller p=0.004	102% smaller p=0.001	No	No	97% smaller p=0.001	HAが53%まで毒性を軽減した場合、CMFが子宮の収縮を引き起こす
脳	No	27% larger p=0.001	No	No	22% larger p=0.01	CMFはHAの同時の投与によって抑えられる脳のわずかな膨張を引き起こすようだ
肝臓	No	No	No	No	15% larger p=0.046-	
膀胱	No	No	No	No	No	
GI管	28% larger p=0.002	27% larger p=0.002	No	No	19% larger p=0.001	CMFはGI管の膨張を引き起こすようだ
肺	No	26% larger p=0.020	No	No	No	
胃	66% larger p=0.006	49% larger p=0.005	No	14% smaller p=0.046	69% larger p=0.002	処置群間に著しい差は見られなかった

10

20

30

40

【 0 1 2 5 】

臓器病態への処置の効果

CMFで処置した動物の臓器の病態評価は、肝臓がいくらか逆の病変を示すことを示した (テーブル17)。肝臓では、重要な壊死および炎症の範囲がCMF、CMFに続くHA、食塩水、およびHA処置群で観察された。重要な壊死および炎症の最もひどい程度がCMFのみを受けたCMF群で、または動物がHAで処置される前に観察された。HAの添加は肝臓の壊死および炎症を全体的に抑制した。

テーブル17

50

肺および肝臓において観察される逆の病変への処置の比較

【表 2 6】

臓器	食塩水	CMF/HA	CMF	HA	HA 1,3 followed by CMF 2,4
肝臓	25%の重要な肝臓壊死／炎症	異常なし	87.5%の重要な肝臓壊死／炎症	25%の重要な肝臓壊死／炎症	87.5%の重要な肝臓壊死／炎症
肺	異常なし	異常なし	異常なし	12.5%の浮腫およびマクロファージ浸潤物	異常なし

10

【 0 1 2 6 】

生存への処置の効果

CMF処置計画はとても毒性が高く、動物は過度の体重損失を通して死亡した。他の処置群は毒性を引き起こさなかった。HA/CMFの同時の投与によって処置毒性が全体的に除去され、続いて著しく生存期間が増加した。(テーブル18およびFigure 16)

20

テーブル18

生存へのHA/CMFの効果の統計的比較

【表 2 7】

処置 *	生存時間 (日) 平均±誤差	CMF/HA処置群と比較したときの 統計的に著しい差 (t-test)
HA/CMF administered days 1 and 2	42 ± 0	Not applicable
食塩水	42 ± 0	No
HA administered days 1 and 2	42 ± 0	No
HA administered days 1 and 3	42 ± 0	No
HA Days 1 and 3; CMF days 2 and 4	42 ± 0	No
CMF administered days 1 and 2	37.38 ± 2.84	P<0.05

30

先の結果は、HAのCMFの前の、または同時の投与が処置毒性を変え、抗腫瘍の有効性を維持することを示す。

【 0 1 2 7 】

実施例 8

試験管内でのH9C2ラットの未発達的心筋細胞におけるドキソルビシン細胞毒性へのヒアルロナンの効果

H9C2心筋細胞を、DMEM中10% w/v FCSで50,000 cells/ml/wellの密度とし、24穴板中で一晩中沈殿させた。24時間後、細胞を1% w/v FCS中での成長により4日間分化させた。4日後、0 μg/ml, 0.0097 μg/ml, 0.0195 μg/ml, 0.03905 μg/ml, 0.0781 μg/ml, 0.1562 μg/ml, 0.3125 μg/ml, 0.625 μg/ml, 1.25 μg/ml, 2.5 μg/mlおよび5 μg/mlのDoxを含む成長媒質中で細胞を48時間培養した。各Dox濃縮をHAの存在下、および非存在下4回行った。HAの分子量は824,000 kDであり、Doxの存在下細胞に適用した濃度は、1 μM, 2.5 μM, 5 μM, 7.5 μMおよび10 μMであった。

40

50

【 0 1 2 8 】

Dox±HAでの48時間の培養後、細胞をハンス液で洗浄し、0.5 mlのトリプシン / EDTAによって分離して均一な単細胞懸濁液を生成し、細胞を15 mlの食塩水で懸濁した。15.5 mlの細胞懸濁液はCoulterカウンターを用いて細胞数を数えるために使用した。Dox±HA数の各濃度を薬物なし / HA対照なしの細胞数の平均の割合として表した。結果をFigure 17に示す。

【 0 1 2 9 】

本文献中の技術者は、本明細書に記載された本発明が特に記載されているものよりも他の変形および修飾を受けやすいものであると理解できる。本発明はそのようなすべての変形および修飾を含むものと解釈されるべきである。本発明は、本明細書に個々に、またはまとめて呼称されている、または示されているすべての段階、特徴、構成、および化合物、および上記の段階または特徴のいずれかの二つ、またはそれ以上のいずれの、およびどの組合せをも含む。

10

【 0 1 3 0 】

参考文献

Aglietta, M., Piacibello, W., Sanavio, F., Stacchini, A., Apra, F., Schena, M., Mossetti, C., Carnino F, Caligaris-Cappio, F & Gavosto F. Kinetics of human hemopoietic cells after in vivo administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Invest.* 83: 551-557, 1989.

Anglin, P., Strauss, B. A., & Brandwein, J. M. Prevention of chemotherapy-induced neutropenia using G-CSF with VACOP-B, A case report. *Leuk. Lymphom.* 11: 469-472, 1993.

20

Billingham, M. E., Mason, J. W., Bristow, M. R., and Daniels, J. R. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Can. Treat. Rep.* 62: 865-872, 1978.

Bodey, G. P., Buckley, M., Sathe, Y. S., Freireich, E. J. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann. Intern. Med.* 64: 328-340, 1966.

Carter, S.K. Adriamycin-a review. *J. Nat. Cancer Inst.* 55: 1265-1274, 1975.

Claiborne, R. A. and Dutt, A. K. Ioniazid-induced pure red cell aplasia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131(6): 947-949, 1985.

30

Cohen, A. M., Zsebo, K. M., Inoue, H., Hines, H., Hines, D., Boone, T. C., Chazin, V. R., Tsai, L., Ritch, T., and Souza, L. M. In vivo stimulation of granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2484-2488, 1987.

Cohn, V. H. and Lyle, J., *Anal Biochem.* 14 (3): 434-404, 1966.

Dotti, G., Carlo-Stella, C., Mangoni, L., Cottafavi, L., Caramatti, C., Ahnici, C., and Rizzoli, V. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) prevents dose-limiting neutropenia in lymphoma patients receiving standard dose chemotherapy. *Haematologica* 80: 142-145, 1995.

40

Grigg, A., Begley, C. G., Juttner, C. A., Szer, J., To L. B., Maher, D., McGrath, K. M., Morstyn, G., Fox, R. M and Sheridan W. P. Effect of peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 11: 23-29, 1993.

Hryniuk, W. M, The importance of dose intensity in the outcome of chemotherapy. In: *Advances in Oncology: Hellman S, De Vita V, Rosenberg S, Eds., Philadelphia: J. B. Lippincott: pp. 1121-414, 1988.*

Kotake, T., Usami, M., Miki, T., Togashi, M., Akaza, H., Kubota, Y., & Matsumura Y. Effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (lenograstim) on chemotherapy induced neutropenia in patients with urothelial cancer. *Int.*

50

- J. Urol. 6: 61-67, 1999.
- Lamszus, K., Jin, L., Fuchs, A., Shi, E., Chowdhury, S., Yao, Y., Polverini, P. J., Laterra, J., Goldberg, I. D. and Rosen, E. M. Scatter factor stimulates tumor growth and tumor angiogenesis in human breast cancers in the mammary fat pads of nude mice. *Lab. Invest.* 76 (3): 39-353, 1997.
- Legras, S., Levesque, J. P., Charrad, R., Morimoto, K., Le Bousse, C., Clay, D., Jasmin C & Smadja-Joffe F. CD44-mediated adhesiveness of human hematopoietic progenitors to HA is modulated by cytokines. *Blood* 89: 1905-1914, 1997.
- Levesque, J. P., Leavesley, D. I., Niutta, S., Vadas, M., & Simmons, P. J. Cytokines increase human haematopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)- 4 and VLA-5 integrins. *J. Exp. Med.* 181: 1805-1815, 1995. 10
- Maher DW, Lieschke GJ, Green M, Bishop J, Stuart-Harris R, Wolf M, Sheridan WP, Kefford RF, Cebon J, Oliver I, et al. Filgrastim in patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 121: 492-501, 1994.
- Mavroudis, D. A., Read, E. J., Molldrem, J., Raptis, A., Plante, M., Carter, C. S, Phang, S., Dunbar, C. E. and Barrett, A. J. T cell-depleted granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) modified allogeneic bone marrow transplantation for haematological malignancy improves graft CD34+ cell content but is associated with delayed pancytopenia. *Bone Marrow Transplant* 21: 431-440, 1998. 20
- McCord, J. M. and Fridovich, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* 244(22): 6056-6063, 1969.
- Paglia, D. E. and Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70(1): 158-169, 1967.
- Pettengell, R., Gurney, H., Radford, J. A., Deakin, D. P., James, R., Wilkinson, P. M., Kane, K., Bentley, J., and Crowther, D. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent dose-limiting neutropenia in non-Hodgkin's lymphoma: a randomized controlled trial. *Blood* 80(6): 430-436, 1992. 30
- Scott, J. E., Cummings, C., Brass, A., and Chen, Y. Secondary and tertiary structures of HA in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. *Biochem. J.* 274: 699-705, 1991.
- Shibamoto, Y., Murata, R., Miyauchi, S., Hirohashi, M., Takagi, T., Sasai, K., Shibata, T., Oya, N., and Takahashi, M. Combined effect of clinically relevant doses of emitefur, a new 5-fluorouracil derivative, and radiation in murine tumors. *Br. J. Cancer* 74(11): 1709-1713, 1996.
- Shimamura, M., Kobayashi, Y., You, A., Urabe, A., Okabe, T., Komatsu, Y., Itoh, S., and Takaku, F. Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic injury in mice induced by 5-fluorouracil. *Blood* 69: 353-355, 1987. 40
- Shimamura, M., Takigawa, T., Urabe, A., Okabe, T., Souza, L. M. and Takalcu, F. Synergistic effect of dolichyl phosphate and human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on recovery from neutropenia in mice treated with anti-cancer drugs. *Exp. Hematol.* 16: 681-685, 1988.
- Simmons, P. J., Zannettino, A., Gronthos, S., Leavesley, D. Potential adhesion mechanisms for localization of haematopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk. Lymphoma.* 12: 353-363, 1994.
- Sheridan, W. P., Begley, C. G., Juttner, C. A., Szer, J., To, L. B., Maher, D., McGrath, K. M., Morstyn, G., and Fox, R. M. Effect of peripheral-blood progenitor 50

cells mobilized by filgrastin (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. Lancet 339: 640- 644,1992.

Watanabe, T., Dave, B., Heimann, D. G., Lethaby, E., Kissinger, A and Talmadge, J. E. GM-CSF mobilized peripheral blood CD34+ cells differ from steady-state bone marrow CD34+ cells in adhesion molecule expression. Bone Marrow Transplant 19: 1175-1981, 1997.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 3 1 】

【図 1】 Figure 1A, 1Bおよび1Cは、ドキソルビシンおよびHyDox製剤を注射されたマウスの末梢血液好中球へのドキソルビシンの効果を示した図的表示である。11～13週齢のオスのF1マウスに、それぞれ（A）6 mg/kg、（B）9 mg/kgおよび（C）12 mg/kgの投与量で上記のドキソルビシンと組合せて注射した。血液は静脈注射後、0（ベースライン）、1、4、7、10および14日目に集めた。サンプルは材料および方法で概略しているように好中球数を分析した。毎日のデータは0日目の好中球の平均的割合±誤差としてグラフ化した。（破線：ドキソルビシン；実線：HyDox；点線：HA）実験データはテーブル1Aおよび1Cに示す。

【 0 1 3 2 】

【図 2】 Figure 2A, 2B, 2C, 2Dおよび2Eは、ドキソルビシンおよびドキソルビシン投与前のHAを注射されたマウスの末梢血液好中球へのドキソルビシンの効果を示した図的表示である。11～13週齢のオスのF1マウスに、それぞれ（A）6 mg/kg、（B）9 mg/kg、（C）12 mg/kg、（D）16 mg/kg、および（E）24 mg/kgのドキソルビシンを上記薬物と組合せて注射した。血液を集めて、先に記載したように好中球数を分析した。毎日のデータは0日目の好中球の平均的割合±誤差としてグラフ化した。（破線：ドキソルビシン；実線：ドキソルビシンの30分前に注射されたHA）実験データはテーブル1Aおよび1Bに示す。

【 0 1 3 3 】

【図 3】 Figure 3は、ドキソルビシンを注射されたマウスの生存の割合を示した図的表示である。二つの処置群のみで、本研究の継続期間の終了前に何匹かが死亡した。その処置群は9 mg/kg（実線）および24 mg/kg（破線）のドキソルビシンを投与した群である。他のすべてのマウスは、ヒアルロナンと合わせてより低用量のドキソルビシンおよびより高用量のドキソルビシンを受けたものを含み、本研究の最後まで生存した。

【 0 1 3 4 】

【図 4】 Figure 4は、HAを伴って、およびHAなしで、段階的に増減するドキソルビシンとともに観察された最低血算値の好中球減少症を示した図的表示である。各処置投与量に関して、最も低レベルの好中球数を記録し、グラフ化した。好中球減少症を各個別の処置群の0日目の測定の割合として示す。（実線 = Hydox；中断した線 = Dox；点線 = Dox投与前のHA）

【 0 1 3 5 】

【図 5】 Figure 5A, 5B, 5C, 5Dおよび5Eは、ドキソルビシンおよびドキソルビシン投与前のHAを注射されたマウスの代謝ストレスへのドキソルビシンの効果を示した図的表示である。オスのF1マウスに、それぞれ（A）6 mg/kg、（B）9 mg/kg、（C）12 mg/kg、（D）16 mg/kg、および（E）24 mg/kgの投与量でドキソルビシンを上記の薬物と組合せて注射し、マウスの体重を日にちベースで記録した。データは体重の増減を表し、本来の体重の平均の割合±誤差として表している。（破線：ドキソルビシン；実線：ドキソルビシン投与前のHA；点線：HA）グラフのデータはテーブル2Aおよび2Bに示す。

【 0 1 3 6 】

【図 6】 Figure 6A, 6Bおよび6Cは、代謝ストレスへのHyDox製剤の効果を示した図的表示である。オスのF1マウスに、それぞれ（A）6 mg/kg、（B）9 mg/kgおよび（C）12 mg/kgのドキソルビシンおよび同用量のHyDox製剤を静脈注射した。体重を日にちベースで記録し、図3に記載された同じ方法でグラフ化した。表したデータは、平均±誤差として表している。（破線：ドキソルビシン；実線：HyDox；点線：HA）これらのグラフのデータはテ

ーブル3に示す。

【0137】

【図7】Figure 7は、心毒性へのHA/Doxの効果を示した図的表示である。

【0138】

【図8】Figure 8Aおよび8Bは、(A)ドキソルピシンおよび(B)ヒアルロナンおよびドキソルピシンへの慢性的な影響の後のラットの心筋細胞の変化を示した電子顕微鏡写真を表している。

【0139】

【図9】Figure 9Aおよび9Bは、HyDoxを注射されたマウスの末梢血液好中球へのドキソルピシンの効果を示した図的表示である。マウスにそれぞれ(A)12 mg/kgおよび(B)16 mg/kgの投与量のドキソルピシンとともにHyDoxを注射された。その結果が4日ごとに採血した6群の結果に相互参照することによって確立された。この方法で、日々の好中球含有量の評価を決定することができた。毎回のポイントでプロットされたデータは、その群(n=8)の本来の0日目の数の割合±誤差として表される平均好中球数を表す。(実線: HyDox; 破線: ドキソルピシン; 点線: HA)

【0140】

【図10】Figure 10Aおよび10Bは、代謝ストレスおよび食物消費量へのHyDox製剤の効果を示した図的表示である。(A)オスのF1マウスに12および16 mg/kgのDoxおよびHyDoxを静脈注射した。体重を日にちベースで記録し、グラフ化し、およびデータは、本来の開始体重の割合としての体重の増減として表した。各データポイントは8匹のマウスの平均±誤差である。(B)同じ実験群において、食物消費量を日にちベースでモニターし、マウス1匹、1日あたり消費する食物の平均量として表した。点は、n=6~8の平均食物量を表す。(破線および黒丸: ドキソルピシン; 実線および+: HyDox) パネルAにおける点線: H A対照

【0141】

【図11】Figure 11A, 11B, 11Cおよび11Dは、ドキソルピシン±ヒアルロナンへの慢性的な影響の後のラットの心筋変化を示した電子顕微鏡写真を表している。ラットにドキソルピシンまたはHyDoxを12週間かけて毎週注射した。ドキソルピシンの累積投与量は13 mg/kgであった。サンプル中の心筋に含まれる大きな融合した空胞(実線矢印)は、ドキソルピシンのみ(C)およびHyDox(D)から得られたことに注意する。筋細胞の空胞化の重篤度はHyDox(D)を受けたラットにおいてずっと少なかった。筋細胞の空胞化はテストされた対照群の処置なし(A)およびヒアルロナン(B)において最も少なかった。

【0142】

【図12】Figure 12A, 12B, 12Cおよび12Dは、ドキソルピシンへの慢性的な影響の後の心筋中の筋原線維量の損失を示した電子顕微鏡写真を表している。ドキソルピシン(A)を受けたラットは、筋原線維の特徴的な平行性の損失とZバンドの曇り(点線矢印)によって示された筋原線維溶解をより大きく示した。この損失は、順序正しい筋原線維配列がまだ存在するHyDox処置を受けたラット(B、点線矢印)からのサンプルには見られなかった。ミトコンドリアプロファイルが大きくなり、クリステの分裂も見られた。ミトコンドリア機能への重篤な分裂がミエリン特徴の出現によって明らかとなった。(AおよびB、実線矢印)これらの観察がHyDoxを受けたラット(B)ではほとんど見られなかった。対照群から得られたすべてのサンプルで、Zバンドの平行な整列によって示される完全なミトコンドリアおよび順序正しい筋原線維の配列が含まれていた。(CおよびD: それぞれヒアルロナンおよび処置なし)

【0143】

【図13】Figure 13は、空胞化された筋細胞の割合を心筋症のかかりやすさとして示した図的表示である。ラットからの心室内隔膜の断片が伝達電子分析のために加工され、ダメージの程度が記録された。筋細胞の空胞化がすべての影響を受けた細胞に不変の特徴であったため、本特徴が傷を評価する有効な方法として使われた。いずれかの超薄断片において、影響を受けていない心筋細胞の数だけでなく、傷ついた細胞(例えば、空胞化した

もの)の数により、完全な横断面を評価できた。そして各サンプルにおける傷ついた細胞の比率を割合として表した。データは平均±誤差 (n=8~10) で表す。HA=ヒアルロナン; NT=処置なし; *Doxのみの群と比較したとき $p < 0.001$ (t-test)

【0144】

【図14】Figure 14A, 14B, 14Cおよび14Dは、ドキソルピシン±HAへの慢性的な影響の後の抗酸化レベルを示した図的表示である。抗酸化酵素カタラーゼ (CAT) [A]; グルタチオンペルオキシダーゼ [C]; ジスムターゼ超酸化物 (SOD) [D]の活性、および軽減されたグルタチオン [B]のレベルをDoxおよびHyDoxへの慢性的な影響の後に測定した。各バーは8から10匹の動物の平均的な評価±誤差を表している。[B]において心臓のGSH含有量が見えるように、肝臓データを除き、再グラフ化した (B: 挿入)。*処置群 [A]間、およびHyDox およびDox [B]間では $p < 0.05$ (変異度の一方的分析)

10

【0145】

【図15A】Figure 15Aは、マウスの体重へのCMF/HA治療の効果を示した図的表示である。HAのCMFの前の、または同時の投与で、体重が統計的に著しく増加した。6つの処置群が示されている。丸 = 食塩水; 逆三角 = 1日目、2日目のHA; 四角 = 1日目、3日目のHA; 菱形 = 1日目、2日目のCMF; 三角 = 1日目、2日目のCMF/HA; 六角形 = CMFに続く1日目、3日目のHA。さらなる詳細はテーブル12に示す。

【0146】

【図15B】Figure 15Bは、マウスの体重へのCMF/HA治療の効果の直線回帰分析を示した図的表示である。

20

【0147】

【図16】Figure 16は、マウスの平均生存数へのCMF/HA処置計画の効果を示した図的表示である。HAの同時投与により毒性が排除され、生存期間が統計的に著しく増加した。(p < 0.05) さらなる詳細はテーブル18に示す。

【0148】

【図17】Figure 17は、異なる濃度におけるDoxの細胞毒性すなわち心筋細胞を分化させるH9C2へのHAの異なる濃度範囲の効果を示した投与量対応曲線の図的表示である。

【図 1】

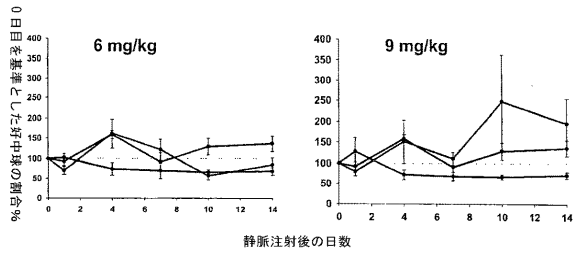


Figure 1A

Figure 1B

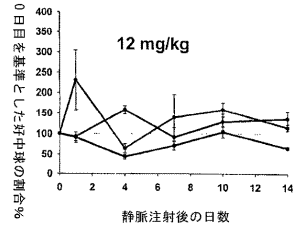


Figure 1C

【図 2】

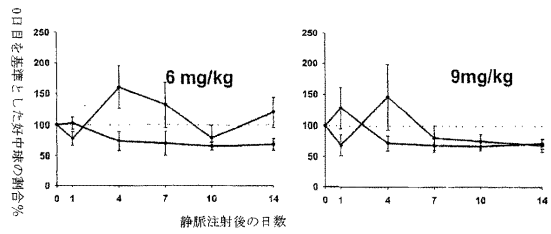


Figure 2A

Figure 2B

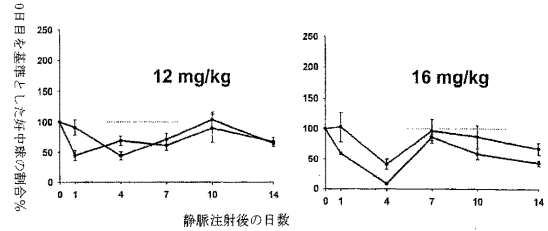


Figure 2C

Figure 2D

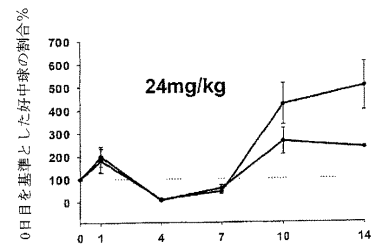


Figure 2E

【図 3】

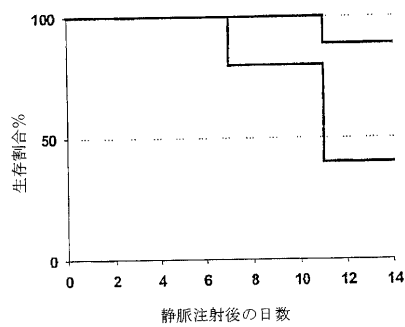


Figure 3

【図 4】

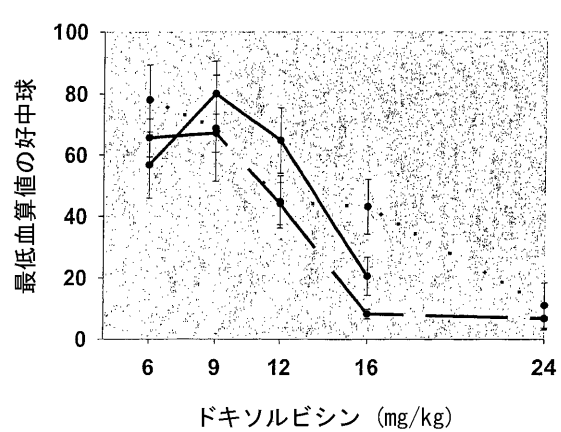


Figure 4

【図 5】

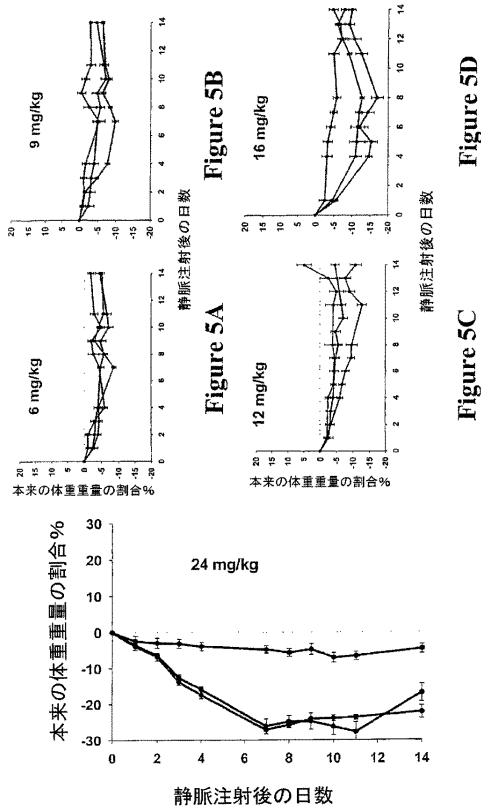


Figure 5E

【図 7】

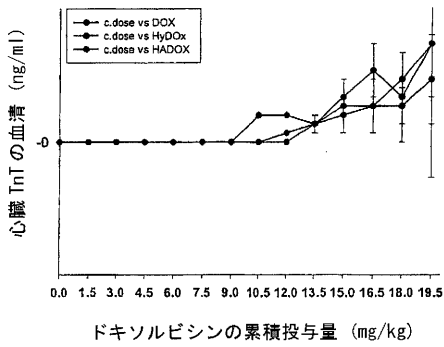
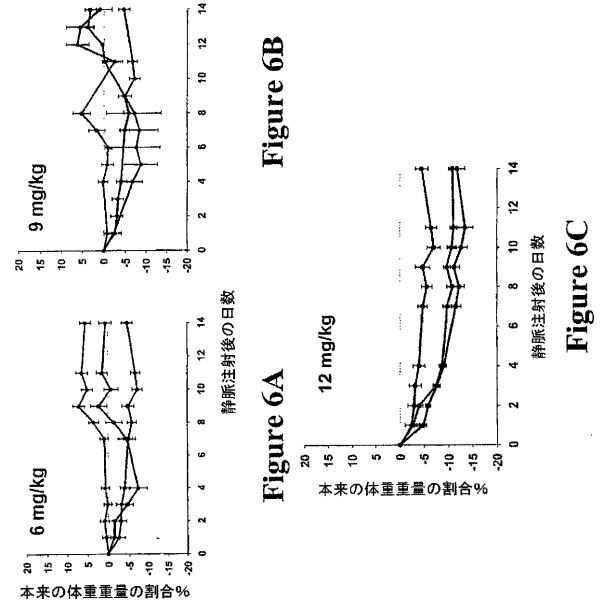


Figure 7

【図 6】



【図 9】

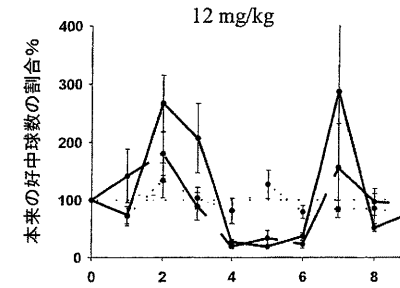


Figure 9A

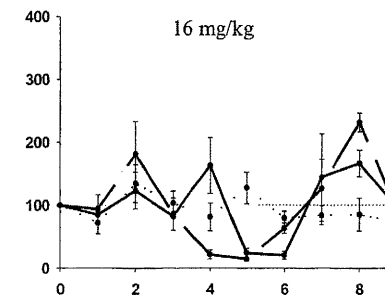


Figure 9B

【図 10】

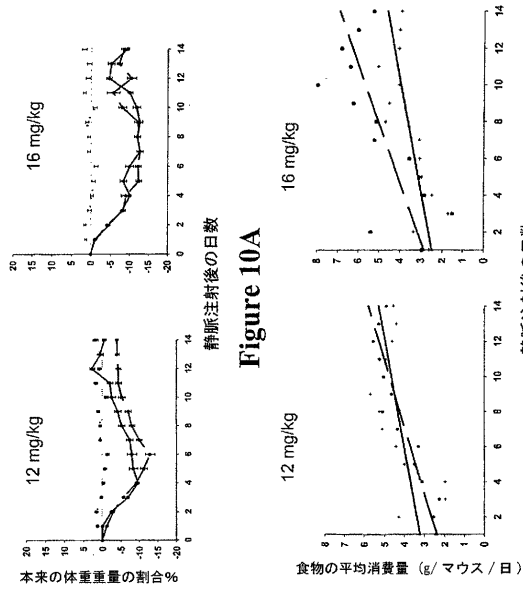


Figure 10A

Figure 10B

【図 13】

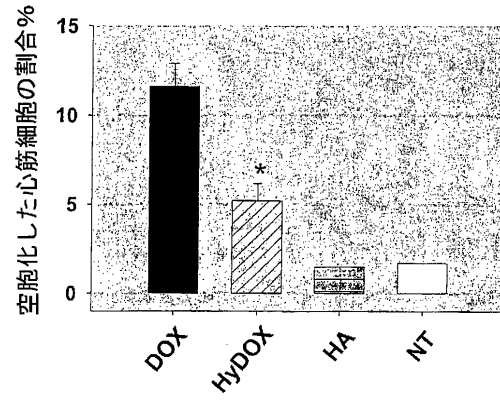


Figure 13

【図 14】

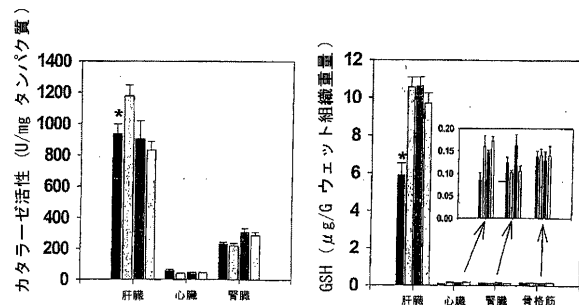


Figure 14A

Figure 14B

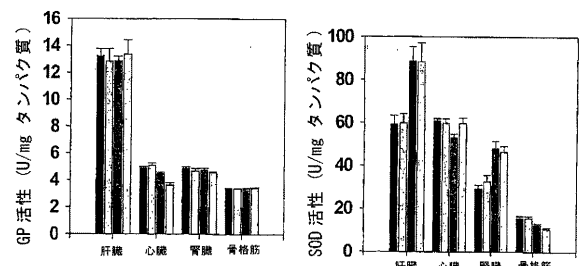


Figure 14C

Figure 14D

【図 15 A】

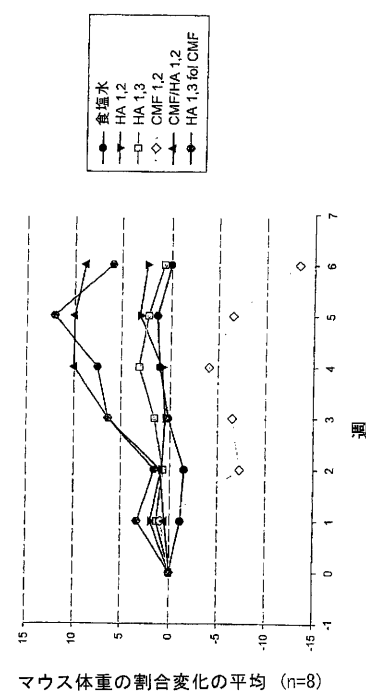


Figure 15A

【図 15 B】

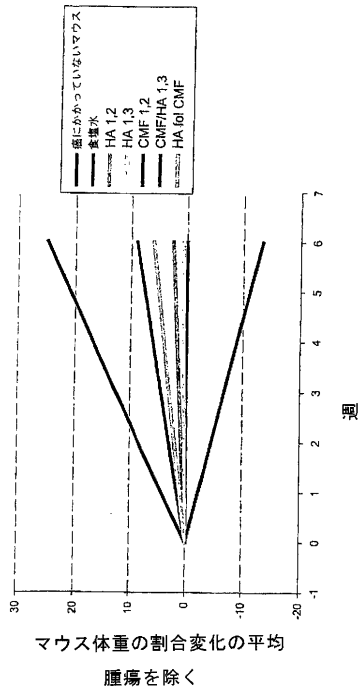


Figure 15B

【図 16】

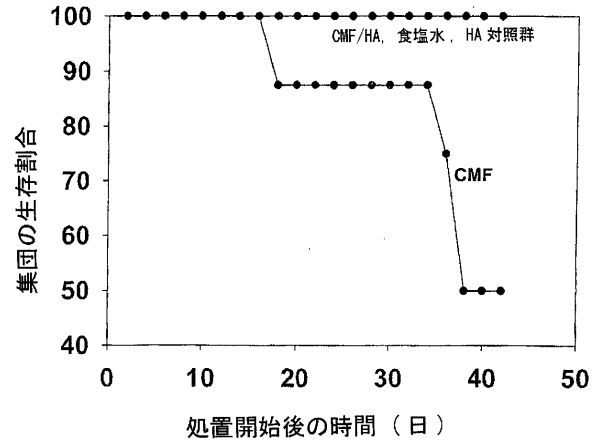


Figure 16

【図 17】

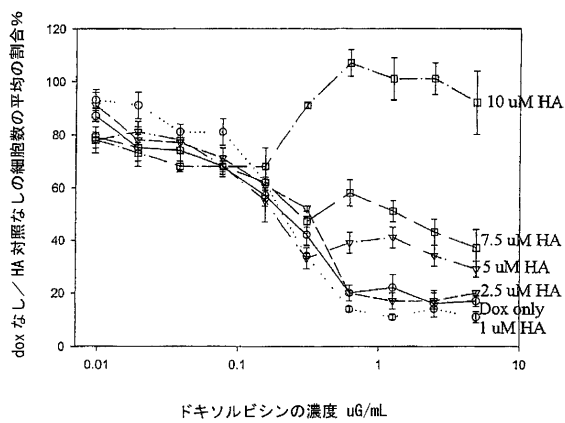


Figure 17

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/018062 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 47/36, A61P 35/00
- (74) Agents: HUGHES, E., John, L. et al.; Davies Collison Cave, Level 3, 303 Coronation Drive, Milton, QLD 4064 (AU).
- (21) International Application Number: PCT/AU02/01160
- (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 27 August 2002 (27.08.2002)
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
PR 7302 27 August 2001 (27.08.2001) AU
PR 9504 13 December 2001 (13.12.2001) AU
- (71) Applicant (for all designated States except US):
MEDTECH RESEARCH LIMITED [AU/AU]; TOK
Corporate Centre, Level 1, 459 Toorak Road, Toorak, VIC
3142 (AU).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BROWN, Tracey,
Jean [AU/AU]; 23 Norwood Street, Flemington, VIC 3031
(AU). FOX, Richard, Mark [AU/AU]; 171 Powlett Street,
East Melbourne, VIC 3002 (AU).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/018062 A1

(54) Title: IMPROVED THERAPEUTIC PROTOCOLS

(57) Abstract: The present invention relates to the field of chemotherapy of diseases such as cell proliferation disorders including cancer. In particular, the present invention relates to the use of hyaluronan (HA) as a protective agent in the treatment of subjects. HA is administered in conjunction with a chemotherapeutic agent to facilitate the prolonged administration of a dose of the chemotherapeutic agent to be administered to a subject. Owing to the protective effects of the HA, the dose of chemotherapeutic agent may be substantially higher than a generally accepted effective dose, which would otherwise be expected to cause unacceptable side effects in the subject.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

IMPROVED THERAPEUTIC PROTOCOLS**FIELD OF THE INVENTION**

- 5 The present invention relates to the field of chemotherapy of diseases such as cell proliferation disorders including cancer. In particular, the present invention relates to the use of hyaluronan (HA) as a protective agent in the treatment of subjects. HA is administered in conjunction with a chemotherapeutic agent to facilitate the prolonged administration of a dose of the chemotherapeutic agent to be administered to a subject.
- 10 Owing to the protective effects of the HA, the dose of chemotherapeutic agent may be substantially higher than a generally accepted effective dose, which would otherwise be expected to cause unacceptable side effects in the subject.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 15 Bibliographic details of references provided in the subject specification are listed at the end of the specification.

- Reference to any prior art in this specification is not, and should not be taken as, an acknowledgment or any form of suggestion that this prior art forms part of the common general knowledge in any country.
- 20

- Many diseases that afflict animals, including humans, are treated with chemotherapeutic agents. For example, chemotherapeutic agents have proven valuable in the treatment of neoplastic disorders including connective or autoimmune diseases, metabolic disorders, and dermatological diseases, and some of these agents are highly effective (e.g. vincristine and bleomycin) and do not cause any toxic side effects problems, such as neutropenia.
- 25

- Proper use of chemotherapeutic agents requires a thorough familiarity with the natural history and pathophysiology of the disease before selecting the chemotherapeutic agent, determining a dose, and undertaking therapy. Each subject must be carefully evaluated,
- 30

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 2 -

with attention directed toward factors, which may potentiate toxicity, such as overt or occult infections, bleeding dyscrasias, poor nutritional status, and severe metabolic disturbances. In addition, the functional condition of certain major organs, such as liver, kidneys, and bone marrow, is extremely important. Therefore, the selection of the appropriate chemotherapeutic agent and devising an effective therapeutic regimen is influenced by the presentation of the subject. Unfortunately, many chemotherapeutics have severe side effects due to lack of selectivity between normal and malignant tissue.

Unwanted toxic side effects may include cardiac toxicity, hair loss, gastrointestinal toxicity (including nausea and vomiting), neurotoxicity, lung toxicity, asthma and bone marrow suppression (including neutropenia).

Bone marrow suppression associated with chemotherapy is the result, at least in part, of pronounced drug-induced depression of haematopoietic progenitor cells (HPCs) of the bone marrow (Shimamura *et al.*, *Exp. Hematol.* 16: 681-685, 1988). The subsequent drop in neutrophil numbers leads to occurrences of secondary infections, the severity of which is directly related to the duration and severity of neutropenia (Bodey *et al.*, *Ann. Intern. Med.* 64: 328, 1966). As a consequence of secondary infections patients are removed from their chemotherapy regime and placed on a treatment of broad-spectrum antibiotics resulting in limitations of the potential benefits of the cytotoxic treatment. However, despite the use of antibiotics, death from sepsis in severely neutropenic patients is not infrequent (Pettengel *et al.*, *Blood* 80(6): 430-436, 1992).

The level of neutropenia is generally dependent on the regenerative capacity of the bone marrow and/or the dose of the drug being administered. Indeed, neutropenia is often the main reason for decisions to reduce the drug dose being given to a subject (Dotti *et al.*, *Haematologica* 80: 142-145, 1995). Since drug dose reduction is typically accompanied by a loss of effectiveness, or potential effectiveness, of the chemotherapy, drug dose reduction is undesirable. Therefore, there is a need to identify administration regimes, or co-administered agents, which may lessen the incidence or severity of neutropenia associated

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 3 -

with chemotherapy, thereby allowing drug dose reduction to be avoided or even enabling the possibility of using higher than standard doses of a chemotherapeutic agent.

In some early studies to reduce bone marrow suppression in a mouse model, accelerated
5 recovery from neutropenia, by daily sub-cutaneous injections of human recombinant
granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF) following initial injection of 5-fluorouracil
(Shimamura *et al.*, *Blood* 69: 353-355, 1987) and, more specifically, doxorubicin
(Shimamura *et al.*, 1988, *supra*), has been observed. Human rG-CSF exerts this effect by
stimulating proliferation and differentiation of haematopoietic progenitor cells (Cohen *et*
10 *al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2484-2488, 1987). More recently, rG-CSF has been
used as an adjunct, in patients undergoing cytotoxic chemotherapy, to enhance neutropenia
recovery (Sheridan *et al.*, *Lancet* 339: 640-644, 1992; Pettengell *et al.*, 1992, *supra*;
Anglin *et al.*, *Leuk. Lymphoma* 11: 469-472, 1993; Kotaka *et al.*, *Int. J. Urol.* 6: 61-67,
1999). The application of rG-CSF, however, has to be optimally combined with repeated
15 cycles of chemotherapy, due to the potential for the increased number of haematopoietic
progenitor cells to become hypersensitive to cytotoxic drugs (Dotti *et al.*, 1995, *supra*).

There is a need to develop protocols where a high cancer or target cell-killing dose of
chemotherapeutic agent can be used without or with reduced levels of toxic side effects.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 4 -

SUMMARY OF THE INVENTION

Throughout this specification, unless the context requires otherwise, the word "comprise", or variations such as "comprises" or "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated element or integer or group of elements or integers but not the exclusion of any other element or integer or group of elements or integers.

The present invention is predicated in part on the determination that hyaluronan (HA) may be used as a protective agent in subjects, when these subjects receive treatment with a generally cytotoxic drug. Situations wherein subjects may receive a cytotoxic drug include the treatment of life-threatening diseases such as cancer. In these circumstances, the primary therapeutic objective is to effect the regression of malignant cells. However, the presently available therapeutically effective agents are less specific than would be preferred, and their administration results, eventually, in the death of many of the subject's normal cells as well. Where cancer regression is not effected quickly enough, the concomitant unwanted effect on normal cells may be so high that the subject's condition deteriorates to the point where treatment must be curtailed or stopped. This can have disastrous consequences for the subject undergoing treatment.

An agent that could moderate the need for cessation of treatment, for a period sufficiently long to facilitate the prolonged and increased therapeutic effect of the chemotherapeutic agent, would be a distinct advantage in the treatment of many forms of cancer and other diseases. While some of the beneficial effects of the inclusion of HA in treatment regimes have been known for some time, the protective effect of HA has not been appreciated until now.

Accordingly, in one aspect, the present invention provides a method which facilitates the prolonged administration of a dose of chemotherapeutic agent to a subject, wherein said a single dose may be up to 200% higher and/or the cumulative dose may be up to 600% higher than a generally accepted effective dose, said method comprising the pre- and/or co-administration of an effective amount of HA.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 5 -

Under this regime, the pre- or co-administration of HA has the effect of ameliorating or even abolishing the otherwise unwanted concomitant deleterious effects on normal cells.

As the patient's health is not being as adversely affected by the cytotoxic effects of the therapeutic agent, the said therapeutic agent may be administered at a higher than normal dose and allowed to act over a longer period of time. This increases the chances that the desirable cytotoxic effects of the administered drug, against unwanted malignant cells, will result in successful treatment.

10 Accordingly, another aspect of the present invention contemplates a method for the prolonged treatment of a subject with a dose of a chemotherapeutic agent where a single dose may be up to 200% higher and/or the cumulative dose may be up to 600% higher than a generally accepted effective dose, said method comprising pre- and/or co-administering an effective amount of HA with said chemotherapeutic agent.

15 The result of such treatment regimes is that the unacceptably severe side effects that are usually observed are obviated.

As HA is a polymeric molecule, it may be formulated to comprise molecules of varying molecular weights. Although lower molecular weight formulations are also effective in the methods of the present invention, preferred formulations comprise HA having a modal molecular weight in the range 750,000 to 2 million Da. Higher molecular weight HA has the advantage of a tertiary structure whereby, at low concentrations, it self-aggregates forming a three-dimensional meshwork. This meshwork exhibits the characteristics of

20 controllable porosity and molecular dimension, which enables the establishment of equilibrium between therapeutic molecules held within the volumetric domain of the polysaccharide and the external environment. The "loading" of the HA three-dimensional structure with therapeutic molecules results in a controlled release of the therapeutic agent at the pathological site, subsequently overcoming non-specific targeting of healthy tissue.

25 A particularly preferred weight range is 750,000-1,000,000 Da.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 6 -

In a preferred embodiment, HA formulations may be administered to a subject simultaneously with or prior to administration of the chemotherapeutic agent. HA formulations may be generated in any number of ways, well known to those skilled in the art, including injectable solutions, powder formulations, tablets pills or capsules, or in any
5 other convenient form.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 7 -

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figures 1A, 1B and 1C are graphical representations showing the effect of doxorubicin on peripheral blood neutrophils in mice injected with doxorubicin and HyDox formulation.

- 5 Male F1 mice aged between 11-13 weeks were injected with the above mentioned doxorubicin combinations at dosages of **(A)** 6 mg/kg, **(B)** 9 mg/kg and **(C)** 12 mg/kg, respectively. Blood was collected on Days 0 (baseline), 1, 4, 7, 10, and 14 after iv administration. Samples were analyzed for neutrophil numbers as outlined in materials and methods. Data for each day were graphed as average percentage of neutrophils of Day 0 \pm SEM. (Broken line: Doxorubicin; solid line: HyDox; dotted line: HA). Experimental data can be found in Tables 1A and 1C.

Figures 2A, 2B, 2C, 2D and 2E are graphical representations showing the effect of doxorubicin on peripheral blood neutrophils in mice injected with doxorubicin and HA

- 15 before doxorubicin. Male F1 mice, aged between 11-13 weeks, were injected with the above-mentioned drug combinations of dosages **(A)** 6 mg/kg, **(B)** 9 mg/kg, **(C)** 12 mg/kg, **(D)** 16 mg/kg and **(E)** 24 mg/kg doxorubicin, respectively. Blood was collected and analyzed for neutrophil numbers as previously described. Data for each day were graphed as the average percentage neutrophils of Day 0 \pm SEM (broken line: Doxorubicin; solid line: HA injected 30 minutes before doxorubicin). Experimental data can be found in Tables 1A and 1B.

Figure 3 is a graphical representation showing the percentage survival of mice injected with doxorubicin. In only two treatment groups were there any deaths before the end of the duration of this study. The treatment groups were 9 mg/kg (solid line) and 24 mg/kg (broken line) doxorubicin. All other mice, including those receiving the lower dosages of doxorubicin and the higher dosages in combination with hyaluronan, survived until the end of the study.

- 30 **Figure 4** is a graphical representation showing nadir neutropenia observed with escalating dosages of doxorubicin, with and without HA. For each treatment dosage, the lowest level

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 8 -

of neutrophil counts was noted and graphed. Neutropenia is shown as a percentage of the day 0 measurement for each individual treatment group (solid line = HyDox; interrupted line = Dox; dotted line = HA before Dox)

5 **Figures 5A, 5B, 5C, 5D and 5E** are graphical representations showing the effect of doxorubicin on metabolic stress in mice injected with doxorubicin and HA before doxorubicin. Male F1 mice were injected with the above-mentioned combinations of doxorubicin, at dosages of (A) 6 mg/kg, (B) 9 mg/kg, (C) 12 mg/kg, (D) 16 mg/kg and (E) 24 mg/kg, respectively, and their weights were recorded on a daily basis. Data represent
10 the loss or gain in weight, as average percentage of the original body weight \pm SEM (broken line: Doxorubicin; solid line: HA before doxorubicin; dotted line: HA). Data for graphs can be found in Tables 2A and 2B.

Figures 6A, 6B and 6C are graphical representations showing the effect of HyDox
15 formulation on metabolic stress. Male F1 mice were intravenously injected with (A) 6 mg/kg, (B) 9 mg/kg and (C) 12 mg/kg doxorubicin, respectively, and equivalent dosages in the HyDox formulation. Body weights were recorded on a daily basis and graphed in the same manner as described in Figure 3. Data represent mean \pm SEM (broken line: Doxorubicin; solid line: HyDox; dotted line: HA). Data for these graphs can be found in
20 Table 3.

Figure 7 is a graphical representation showing the effect of HA/Dox on cardiotoxicity.

Figures 8A and 8B are photographic representations of electron micrographs showing
25 changes in cardiac myocytes in rats after chronic exposure to (A) doxorubicin and (B) hyaluronan and doxorubicin.

Figures 9A and 9B are graphical representations showing the effect of doxorubicin on peripheral blood neutrophils in mice injected with HyDox. Mice were injected with HyDox
30 with doxorubicin dosages of (A) 12 and (B) 16 mg/kg, respectively. The results were established by staggering the results of six groups, each bled every 4 days. In this manner,

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 9 -

a daily assessment on the neutrophil content could be determined. Data plotted at each time point represent the average neutrophil count expressed as a percentage of the original day 0 count for that group ($n=8$) \pm SEM. (solid line: HyDOX; broken line: Doxorubicin; dotted line: HA).

5

Figures 10A and 10B are graphical representations showing the effects of HyDox formulation on metabolic stress and food consumption. **(A)** Male F1 mice were intravenously injected with 12 and 16 mg/kg Dox and HyDox. Body weights were recorded on a daily basis and graphed, and the data presented as the loss or gain in weight as the percentage of the original starting body mass. Each data point is the average of 8 mice \pm SEM. **(B)** In the same experimental groups, the food consumption was monitored on a daily basis and expressed as average mass of food eaten per day per mouse. Points represent the average mass of food where $n=6-8$. (broken line and \bullet : doxorubicin; solid line and $+$: HyDox), for panel A (dotted line): HA control.

15

Figures 11A, 11B, 11C and 11D are photographic representations of electron micrographs showing changes in the myocardium in rats after chronic exposure to doxorubicin \pm hyaluronan. Rats received weekly injections of doxorubicin or HyDox over a 12 week period. The cumulative dose of doxorubicin was 13 mg/kg. Note large coalcent vacuoles (solid arrows) contained in myocytes in samples obtained from doxorubicin only **(C)** and HyDox **(D)**. The severity of myocyte vacuolation was much less evident in rats receiving HyDox **(D)**. Myocyte vacuolation was least evident in control groups tested: no treatment **(A)**, and hyaluronan **(B)**.

25

Figures 12A, 12B, 12C and 12D are photographic representations of electron micrographs showing loss of myofibrillar mass in myocardium after chronic exposure to doxorubicin. Rats receiving doxorubicin **(A)** displayed a greater degree of myofibrillar lysis which was indicated by loss of characteristic parallel orientation of myofibrils and blurring of the Z-bands (dotted arrows). This loss was not as evident in samples from HyDox treated rats where ordered myofibril arrays were still present **(B, dashed arrows.)** Mitochondria profiles also appeared enlarged and disruption of cristae was also noted. Severe disruption to

30

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 10 -

mitochondrial function was evidenced by the appearance of myelin figures (**A and B**, solid arrows). These observations were not as frequent in rats receiving HyDox (**B**). In samples obtained from control groups, all contained intact mitochondria and an ordered array of myofibril as indicated by the parallel alignment of the Z-bands (**C and D**: hyaluronan and no treatment respectively).

Figure 13 is a graphical representation showing percentage of vacuolated myocytes as a score of cardiomyopathy. Sections of the intraventricular septum from rats were processed for transmission electron analysis and the degree of damage was scored. Because vacuolation of myocytes was a constant feature in all affected cells, this feature was used as an efficient way of assessing injury. On any one ultra thin section, the number of injured cells (i.e. vacuolated) was counted, as well as the number of unaffected cardiac myocytes, provided that the complete transection could be assessed. The proportion of injured cells in each sample was then expressed as a percentage. Data represent the mean \pm SEM (n = 8-10). HA = hyaluronan; NT = no treatment; * p<0.001 (t-test) when compared with Dox only group.

Figures 14A, 14B, 14C and 14D are graphical representations showing antioxidant levels after chronic exposure to doxorubicin \pm HA. The activities of the antioxidant enzymes Catalase (CAT) [**A**]; Glutathione peroxidase [**C**]; superoxide dismutase (SOD) [**D**], and levels of reduced glutathione [**B**] were measured after chronic exposure to Dox and HyDox. Each bar represents the average estimation of 8-10 animals \pm SEM. In [**B**], the liver data have been removed and re-graphed (B: insert) so that cardiac GSH content can be seen. * p<0.05 (one-way analysis of variance) between treatment groups [**A**], and between HyDox and Dox [**B**].

Figure 15A is a graphical representation showing the effects of CMF/HA therapy on body weight in mice. Pre- or co-administration of HA with CMF resulted in statistically significant increase in body weight. Six treatment groups are shown. circle = saline; inverted triangle = HA on days 1, 2; square = HA on days 1, 3; diamond = CMF on days 1,

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 11 -

2; triangle = CMF/HA on days 1, 2; hexagon = HA on days 1, 3, followed by CMF.
Further details are provided in Table 12.

Figure 15B is a graphical representation showing linear regression analysis of the effects
5 of CMF/HA therapy on mouse body mass.

Figure 16 is a graphical representation showing the effect of the CMF/HA treatment
regime on mouse mean survival. Co-administration of HA eliminated toxicity and resulted
in a statistically significant ($p < 0.05$) increase in the survival period. Further details are
10 provided in Table 18.

Figure 17 is a graphical representation of a dose-response curve showing the effect of a
range of different concentrations of HA on the cytotoxicity of Dox - at different
concentrations - on H9C2 differentiated cardiomyocytes.
15

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 12 -

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

In accordance with the present invention, it has been determined that, in the presence of an effective amount of HA, undesirable and cumulative cytotoxic effects of chemotherapeutic agents on normal cells are ameliorated. Usually, this unwanted cytotoxicity eventually causes the need to remove the chemotherapeutic agent or, at least, reduce the levels or duration of treatment.

According to the methods of the present invention, however, HA can be used to avoid the need for undesirable reductions in the dose or duration of administration of a chemotherapeutic agent, in chemotherapy patients. Unacceptably severe side effects including neutropenia, cardiac toxicity and gastro-intestinal toxicity as manifested by nausea, vomiting and severe weight loss, are mitigated against or avoided. That is, by pre- and/or co-administering an effective amount of HA, the dose of a chemotherapeutic agent may be increased to a level above that which would be possible if the said chemotherapeutic agent were administered in the absence of the effective amount of HA.

Accordingly, in one aspect, the present invention contemplates a method which facilitates the prolonged administration of a dose of chemotherapeutic agent to a subject, wherein said dose may be up to a single dose may be up to 200% higher and/or the cumulative dose may be up to 600% higher than a generally accepted effective dose, said method comprising the pre- and/or co-administration of an effective amount of HA.

Persons skilled in the art can readily determine if or when a subject receiving chemotherapy is suffering from unacceptable side effects and should be subjected to a variation or alteration of the treatment. Where, for example, a chemotherapy patient were receiving a cytotoxic chemotherapeutic agent such as 5-fluorouracil and/or doxorubicin and, over time, would be expected to exhibit unacceptable side effects such as neutropenia, cardiac toxicity, and gastrointestinal toxicity, instead of reducing the dose of the chemotherapeutic agent, the medical practitioner may, in accordance with the present invention, maintain or increase the dose of the chemotherapeutic agent by pre- or co-

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 13 -

administering an effective amount of HA. Such side effects may also be referred to as "unacceptably severe side effects".

By "pre- or co-administering", it is to be understood that the HA may be administered before, at the same time as, or after the subject has been administered the chemotherapeutic agent. Where the HA is administered before the chemotherapeutic agent, preferably it is administered from about 24 hours to about 5 minutes, more preferably from about 12 hours to about 10 minutes, still more preferably from about 5 hours to about 10 minutes, and most preferably about 0.5 hour, before administration of the chemotherapeutic agent. Where the HA is administered after the chemotherapeutic agent, preferably it is administered 0.05 to 24 hr, more preferably 0.1 to 5 hr, and most preferably about 0.5 hr, after administration of the chemotherapeutic agent.

Preferably, the chemotherapeutic agent that is administered is selected from the group consisting of carmustine (BCNU), chlorambucil (Leukeran), cisplatin (Platinol), Cytarabine, doxorubicin (Adriamycin), fluorouracil (5-FU), methotrexate (Mexate), Cyclophosphamide, CPT 11, etoposide, plicamycin (Mithracin) and taxanes such as, for example, paclitaxel.

Most preferably, the chemotherapeutic agent is doxorubicin (Adriamycin). Doxorubicin is an anthracycline glycoside antibiotic and is one of the most effective anti-neoplastic drugs used in clinical practice (Carter, *J. Nat. Cancer Inst.* 55: 1265-1274, 1975). Its clinical usefulness extends across a wide range of neoplastic conditions, such as solid tumors including breast, lung and thyroid carcinoma; hematologic malignancies such as acute leukemia and lymphoma and soft tissue and bone sarcoma and neuroblastoma.

In general therapeutic treatments, persons skilled in the art are able to exercise judgement, based on experience, concerning the point at which continued administration will result in unacceptable side effects. The continued administration of a cytotoxic agent beyond this point in time is referred to herein as "prolonged administration" of the drug.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 14 -

Accordingly, another aspect of the present invention provides a method for the prolonged treatment of a subject with a dose of a chemotherapeutic agent which is up to 200% higher than a generally accepted effective dose, said method comprising pre- and/or co-administering an effective amount of HA with said chemotherapeutic agent.

5

The term "subject" as used herein refers to any animal having a disease or condition which is in need of treatment with a chemotherapeutic agent. Preferably, the subject is suffering from a cellular proliferative disorder (e.g. a neoplastic disorder). Subjects for the purposes of the invention include, but are not limited to, mammals such as humans and other
10 primates, livestock animals (e.g. sheep, horses, cows, pigs donkeys), laboratory test animals (e.g. rats mice, rabbits, guinea pigs) and companion animals (e.g. dogs and cats). Humans are the most preferred of the primates.

In the treatment of subjects such as patients suffering from neoplastic disease, there are
15 "generally accepted effective doses" of cytotoxic drug, depending on the drug being administered, with which the treating medical practitioner would be familiar, and above which medical practitioners are at present generally unwilling to prescribe. This is because, as mentioned above, deleterious effects of prescribed cytotoxic drugs on normal cells accumulate over time until the treatment must be reduced or removed in order to prevent
20 the continuation of these unacceptably severe side effects. For a range of different chemotherapeutic agents, the person skilled in the art would be aware of what constituted a generally accepted effective dose.

In accordance with the present invention, however, doses of a chemotherapeutic agent in a
25 single dose may be up to 200% higher and/or the cumulative dose may be up to 600% higher may be administered. The expression "up to 200%" is to be understood to include and encompass any integer or fraction between approximately 5% to approximately 200%. Preferred ranges are from about 20% to about 150% higher. In a most preferred embodiment, the generally accepted effective dose is increased by from about 35% to
30 about 100%.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 15 -

Accordingly, another aspect of the present invention provides a method of treating a subject, said method comprising administering to said subject a dose of a chemotherapeutic agent which is higher than a dose which causes clinically unacceptable side effects wherein said chemotherapeutic agent is pre- and/or co-administered with an effective amount of
5 HA.

As used herein, the term "effective amount" means an amount of HA which is effective to diminish the severity of the side effects of the chemotherapeutic agent, such that a dose of the chemotherapeutic agent which is equal to or higher than the generally accepted
10 effective dose, may be used.

The specific "effective amount" will, obviously, vary with such factors as the identity of the pre- or co-administered chemotherapeutic agent, the physical condition of the patient, the type of mammal being treated, the duration of the treatment, and the nature of
15 concurrent therapy (if any). However, generally, an effective amount of HA will be of the order of about 0.5 mg to about 10 mg per kilogram body weight, with a preferred amount being in the range of between about 5 mg to about 20 mg per kilogram body weight per day (from about 0.3 g to about 3 g per patient per day).

20 Being a polymeric molecule, HA molecules may exhibit a range of varying molecule weights. HA formulations may, therefore, comprise molecules of different molecular weights. Almost any average of modal molecular weight formulation of HA may be effective in the methods of the present invention. Preferred formulations, however, exhibit higher rather than lower modal molecular weights. HA having a modal molecular weight
25 in the range 750,000 to 2 million Da is preferred. Higher molecular weight HA has the advantage of forming a tertiary structure whereby at low concentrations, it self-aggregates forming a three-dimensional meshwork, which exhibits the characteristics of controllable porosity and molecular dimension, which enables the establishment of equilibrium between therapeutic molecules held within the volumetric domain of the polysaccharide
30 and the external environment. The "loading" of the HA three-dimensional structure with therapeutic molecules results in a controlled release of the therapeutic agent at the

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 16 -

pathological site, subsequently overcoming non-specific targeting of healthy tissue. A particularly preferred weight range is 750,000-1,000,000 Da.

5 The methods of the present invention enable the continued or prolonged use of a dose of a chemotherapeutic agent at or above that which would be expected to cause unacceptably severe side effects in the subject, if said chemotherapeutic agent were administered in the absence of the effective amount of HA. The dosage amount will vary, depending upon the identity of the particular chemotherapeutic agent and other factors. However, by way of example, the methods of the present invention allow use of doses of doxorubicin of ≥ 60
10 mg/m^2 , more preferably $\geq 80 \text{ mg/m}^2$ and most preferably, $\geq 100 \text{ mg/m}^2$.

The chemotherapeutic agent and/or HA may be administered orally, topically, parenterally, by intra-tumoral injection, or in dosage unit formulations containing conventional non-toxic pharmaceutically acceptable carriers, adjuvants, and vehicles. The term "parenteral"
15 as used herein includes subcutaneous injections, aerosol, intravenous, intramuscular, intrathecal, intracranial injection, sub-lingual, lymphatically, or infusion or perfusion techniques.

As used herein, a "pharmaceutically acceptable carrier" is a pharmaceutically acceptable
20 solvent, suspending agent or vehicle for delivering the chemotherapeutic agent and/or HA to the subject. The carrier may be liquid or solid and is selected with the planned manner of administration in mind.

Accordingly, the chemotherapeutic agent and/or HA may be formulated for use in the
25 methods of the present invention as, for example, topical, oral, and parenteral pharmaceutical formulations. Therefore the chemotherapeutic agent and/or HA may be administered orally as tablets, aqueous or oily suspensions, lozenges, troches, powders, granules, emulsions, capsules, syrups or elixirs. Formulations for oral use may contain one or more of the following: sweetening agents, flavouring agents, colouring agents and
30 preserving agents. Tablet formulations of the chemotherapeutic agent and/or HA may contain the active ingredients in admixture with non-toxic pharmaceutically acceptable

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 17 -

excipients which are suitable for the manufacture of tablets. These excipients may be, for example, (1) inert diluents, such as calcium carbonate, lactose, calcium phosphate or sodium phosphate; (2) granulating and disintegrating agents, such as corn starch or alginic acid; (3) binding agents, such as starch, gelatin or acacia; and (4) lubricating agents, such as magnesium stearate, stearic acid or talc. Such tablets may be uncoated or coated by known techniques to delay disintegration and absorption in the gastrointestinal tract and thereby provide a sustained action over a longer period. For example, a time delay material such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate may be employed. Coating may also be performed using techniques described in U.S. Patent Nos. 4,256,108, 4,160,452; and 4,265,874 to form osmotic therapeutic tablets for controlled release.

The chemotherapeutic agent as well as the HA can be administered for use in the methods of the present invention by *in vivo* application, parenterally by injection or by gradual perfusion over time independently or together. Administration route may be intravenous, intra-arterial, intra-peritoneal, intramuscular, subcutaneous, intra-cavity, or trans-dermal. Preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose), and the like. Preservatives and other additives may also be present such as, for example, anti-microbials, anti-oxidants, chelating agents, growth factors and inert gases and the like.

HA may also be administered in the form of liposome delivery systems, such as small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles, and multilamellar vesicles. Liposomes can be formed from a variety of phospholipids, such as cholesterol, stearylamine, or phosphatidylcholines.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 18 -

It is envisioned that the methods of the present invention can be used where a subject is to be treated with a chemotherapeutic agent for the treatment of a cell proliferative disorder. By "cell proliferative disorder" is meant that a cell or cells demonstrate abnormal growth, typically aberrant growth, leading to a neoplasm, tumor or a cancer. Cell proliferative disorders include, for example, cancers of the breast, lung, prostate, kidney, skin, neural tissue, ovary, uterus, liver, pancreas, epithelium, head and neck tissue as well of the gastric, intestinal, exocrine, endocrine, lymphatic or haematopoietic system.

The methods of the present invention may also be used where the subject is to be treated with a chemotherapeutic agent for the treatment of a neurodegenerative disorders, hormonal imbalance and the like.

Any discussion of documents, acts, materials, devices, articles or the like, which has been included in the present specification, is solely for the purpose of providing a context for the present invention. It is not to be taken as an admission that any or all of these matters either formed part of the prior art base or were common general knowledge in the field relevant to the present invention as it existed in Australia or elsewhere before the priority date of each claim of this application.

The invention will now be further described by way of reference to the following non-limiting examples. It should be understood, however, that the examples following are illustrative only, and should not be taken in any way as a restriction on the generality of the invention described herein. In particular, while the invention is described in detail in relation to cancer, it will be clearly understood that the findings herein are not limited to treatment of cancer. For example, HA may be used for treatment of the cytotoxic side effects of chemotherapeutic agents used to treat other conditions.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 19 -

EXAMPLE 1

*In vivo model of cytotoxicity (I)*Drugs for Intravenous Injection

5 The anti-cancer drug, doxorubicin (Adriamycin), hereinafter referred to as "Dox", was purchased from Asta Medical (NSW, Australia) in syringes, each containing 2.5 mL at a final concentration of 2 mg/mL or as doxorubicin hydrochloride powder which was reconstituted in 0.9% sterile sodium chloride to a final concentration of 2 mg/mL.

10 Desiccated hyaluronan (HA), 824,000 KDa, was purchased from Pearce Pharmaceuticals (Victoria, Australia) and was dissolved in sterile water to a final concentration of 10 mg/mL, filter sterilized through a 0.22 µm filter, and stored at 4°C until used. Hyaluronan mixed with doxorubicin (hereinafter referred to as "HyDox") was prepared by mixing calculated volumes of 10 mg/mL hyaluronan with a calculated volume 0.5 mg/mL Dox

15 with to achieve the desired dosages of doxorubicin. The dosage of HA used throughout this study was 13.3 mg/kg of bodyweight. The dosages of Dox studied were, 6, 9, 12, 16 and 24 mg/kg.

Experimental Animals

20 Male F1 mice (C57 x CBA; 11-13 weeks old), used for *in vivo* studies, were obtained from The Animal Central Division (Monash University, Victoria, Australia). The mice were distributed at random into each treatment group (6 per treatment group) and allowed to acclimatize for 2-3 weeks before commencing the study. The treatment groups were split

25 into 'drug only' which received the dosages 6, 9, 12, 16, and 24 mg/kg of Dox, respectively: HA (13.3 mg/kg) injected 30 minutes before 6, 9, 12, 16, and 24 mg/kg dox: and 6, 9 and 12 mg/kg HyDox. Two control groups received intravenous injections of physiological saline, HA (13.3 mg/kg) respectively. Before a treatment group was started, blood (200 µL) from each experimental animal was collected by retroorbital sinus bleed

30 and immediately transferred to tube containing EDTA, gently flick mixed and stored on ice until analysis. This was taken as day 0, after which the mice were given a single bolus

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 20 -

intravenous injection via tail vein with corresponding control, drug, or HA/drug combinations. The mice were then sequentially bled on days 1, 4, 7, 10 and 14 by the aforementioned method. All blood samples were analysed for white blood cell composition in an Adiva 120 Differential Coulter Counter (Bayer Diagnostics, USA). Throughout the duration of the study, mouse mass, food intake and general activity levels were recorded on a daily basis. On day 14, mice were sacrificed by cervical dislocation and the heart, lungs, liver, spleen, kidneys, stomach, intestines and testicles removed and immediately fixed in 10% v/v formalin in phosphate buffered saline.

10 General Toxicity

Mice that received dox, in either the HyDox formulation or pre-sensitized with 13.3 mg/kg HA 30 minutes before the Dox injection, survived the duration of the experiment. Only in the Dox treatment groups at higher drug dosages were mice fatalities observed. In the 24 mg/kg Dox group, 2 mice survived until the end of the study, whereas mice receiving HA 30 minutes prior to the same dosage of dox, survived the treatment period (see Figure 3). With the exception of one mouse in the 9 mg/kg Dox group, which died unexpectedly at day 8 after iv administration of drug, all other mice survived until the end of the study.

20 Haematological Determinations

Neutropenia

The average neutrophil number for day 0 for all groups was 1.39×10^3 cells/ μ L blood \pm 0.60 SD (min value = 0.54, max value = 3.34×10^3 cells/ μ L blood). To normalize the data to allow comparison between treatment groups, experimental data were expressed as the percentage of the baseline bleed for each individual mouse and subsequent measurements on day 1, 4, 7, 10 and 14 (where day 0 bleed = 100%).

6 mg/kg doxorubicin and HyDox treatment groups

30 The lowest dosage of Dox in this study was 6 mg/kg, which is equivalent to a human dosage of 30 mg/m². In both drug combinations (HyDox or HA before dox), neutropenia

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 21 -

was actually reversed and an increase in the level of peripheral neutrophils was observed when compared with the "Dox only" treatment group (Figures 1 and 2, panels labeled 6 mg/kg). The maximum value was approximately 160% (see Table 1A, B and C) and was observed at day 4. This gradually declined by day 7, but still remained higher than the "Dox only" group, whose neutrophil level never recovered to baseline even by day 14.

TABLE 1A Neutropenia data expressed as percentage of Day 0 for all doxorubicin dosages and drug combinations; neutropenia data for doxorubicin injections

Treatment Groups: <i>Doxorubicin only</i>					
Day	6 mg/kg Dox (n=12)	9 mg/kg Dox (n=9)	12 mg/kg Dox (n=10)	16 mg/kg Dox (n=3)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100
1	102.4 ± 9.3	128.1 ± 32.7	91 ± 12.5	59.1 ± 2.5	199.5 ± 42.5
4	73.7 ± 15.9	72.4 ± 12	44.1 ± 6.9	8.2 ± 1.5	6.7 ± 3.6
7	69.4 ± 20	68.5 ± 10.6	71.1 ± 10.3	85.9 ± 4.7	58.9 ± 14.7
10	65.6 ± 9.6	67.10 ± 6.2	104 ± 13.2	58.5 ± 8.7	262.7 ± 56.6
14	68.3 ± 9.6	71.4 ± 7.7	65 ± 4	43.1 ± 4.6	233*

*At this end point of the experiment, only 2 mice remained. Due to one of these samples unexpectedly clotting only one blood sample was analysed for neutrophil content.

TABLE 1B Neutropenia data for Hyaluronan (13.3 mg/Kg, 824,000 Da) injected 30 minutes before doxorubicin

Treatment Groups: <i>HA injected 30 minutes before Dox</i>					
Day	6 mg/kg Dox (n=5)	9 mg/kg Dox (n=6)	12 mg/kg Dox (n=5)	16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100
1	78 ± 11.4	68.70 ± 17.3	44.7 ± 8.5	102.8 ± 24.8	189.4 ± 40.4
4	159.4 ± 33.9	146.2 ± 52.3	69.1 ± 7.6	41.1 ± 8.9	10 ± 5.8
7	131.4 ± 36.1	81.3 ± 19.9	61.4 ± 8.2	96.2 ± 19.6	56.3 ± 13.7
10	79.8 ± 20.2	75.5 ± 11.9	90.2 ± 23.4	86.5 ± 18.9	424.6 ± 65
14	119.4 ± 23.8	68.3 ± 9.8	67.6 ± 7.5	67 ± 10.1	501.2 ± 105.5

TABLE 1C Neutropenia data for HyDox formulation and control injections

Day	Treatment groups: HyDox formulation			Controls	
	6 mg/kg HyDox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)	12 mg/kg HyDox (n=5)	Hyaluronan 13.3 mg/kg (n=6)	Saline (400 µL) (n=6)
0	100	100	100	100	100
1	70 ± 10.2	80 ± 10.6	230.8 ± 73.3	92.6 ± 10.3	78.8 ± 11.7
4	161 ± 36	151.9 ± 51.6	64.7 ± 10.7	158 ± 10.1	111 ± 8.4
7	121.2 ± 25.4	111.3 ± 14.8	139.1 ± 56.5	91.1 ± 23.3	66.6 ± 6
10	56.7 ± 10.8	247.7 ± 114.6	158.6 ± 17.2	128.8 ± 20.1	78.9 ± 12.7
14	84.5 ± 17.3	195.6 ± 58.5	114.6 ± 7.7	136.2 ± 18.6	105.2 ± 6.5

5 *9 mg/kg doxorubicin and HyDox treatment groups*

Dox at 9 mg/kg is equivalent to a human dose of 45 mg/m² and a similar trend was again observed in both the HyDox formulation and when HA was administered before Dox (Figures 1 and 2, respectively). In both these treatment groups, however, there was a slight decrease in the percentage of peripheral neutrophils, but by day 4 these values had increased to approximately 150%. In the "Dox only" group, drug-induced (nadir) neutropenia was observed at day 4 and was approximately 72% of day 0 baseline bleeds. Subsequent measurements on day 7, 10 and 14 revealed the percentage of neutrophils in the HA before Dox returning to the pattern observed in the Dox only group (Figure 2, panel labeled 9 mg/kg).

15

12 mg/kg doxorubicin and HyDox treatment groups

The protective effect of HA against neutropenia was even more evident in the 12 mg/kg HyDox dosage (60 mg/m², human equivalent) when compared with the HA before Dox group (Figures 1 and 2, respectively). Only on day 4 did the peripheral neutrophils from 12 mg/kg HyDox group drop to an average level of 64%. Thereafter, they recovered and maintained a value greater than the baseline bleeds. Again, the lowest level of neutropenia was observed in the Dox only group (Figure 1, panel 12 mg/kg, black line).

20

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 23 -

16 mg/kg and 24 mg/kg doxorubicin and HyDox treatment groups

The 16 mg/kg and 24 mg/kg Dox groups did not include HyDox due to the difficulties encountered with its formulation and volume restrictions for injection into a mouse. Therefore, at these dosages, only Dox, and HA before Dox, were studied. By day 1, the level of neutrophils in the 16 mg/kg Dox (80 mg/m² human equivalent dose) was approximately 59% while a value of 103% was observed where HA was administered prior to drug (Figure 2; panel labelled 16 mg/kg). The lowest level of neutropenia was observed at day 4, and was more severe in the "Dox only" group. The degree of neutropenia was most severe in the 24 mg/kg Dox dose, and was equally severe whether administered with or without HA (Figure 2; panel labeled 24 mg/kg).

Throughout all the treatment groups, the nadir neutropenia was dose-dependent and was more severe in treatment groups receiving Dox only, compared with equivalent Dox dosages administered as either HyDox or HA before Dox (see Figure 4). The administration of control injection of saline did not have any considerable effect on the level of neutrophil levels and was therefore not graphed. The data are presented in Table 1C.

Quite unexpected was the result obtained from the HA control group, which was injected at the same dosage of all other experimental groups (13.3 mg/kg). The percentage of peripheral neutrophils in the HA group closely resembled the 6 and 9 mg/kg dosages in both the HyDox formulation (Figure 1) and where HA was administered 30 minutes before drug (Figure 2).

Other Haematological Measurements

As well as neutrophil determination, the red blood cell, percentage hemoglobin, percentage hematocrit, percentage platelets and lymphocytes were also considered. Data for these parameters can be found in Tables 2 to 6. All data presented in these Tables are expressed as a percentage of the pre-bleed value, obtained from day 0 prior to injection of drug.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 24 -

TABLE 2 Percent hemoglobin

Day	Treatment Groups					
	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 mg/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	83.9±1.90	82.3±2.40	84.7±1.80	85.8±2.10	80.8±4.50	78.8±6.90
4	67.3±2.10	66.5±3.10	69.0±1.10	68.20±3.80	70.1±5.50	67.7±1.80
7	57.0±1.30	77.4±2.10	79.7±2.70	45.7±4.60	76.0±7.10	59.6±1.10
10	81.4±1.14	91.2±1.30	95.7±2.50	70.7±3.10	91.7±2.20	98.3±1.80
14	100±1.30	104.7±1.70	103±3.00	98.5±1.50	102.6±3.50	85.4±2.10
Day	12 mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12 mg/kg Dox (n=5)	12 mg/kg HyDOX (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	79.7±1.50	75.7±3.20	72.9±6.20	**	86.5±4.0	82.6±1.60
4	60.3±2.30	58.8±2.60	62.2±2.10	74.10±2.40	74.2±4.20	68.9±3.20
7	47.7±1.90	59.5±1.80	63.80±13.0	51.4±4.60	52.8±3.50	63.2±6.70
10	70.1±4.20	93.1±0.80	52.4±5.00	64.3±3.40	80.7±3.80	42.2±3.40
14	90.6±1.30	93.10±2.20	93.0±2.20	86.0±3.60	101.2±4.0	79.3
Day	HA b/f 24 mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3 mg/kg) (n=6)	Saline (n=6)			
0	100	100	100			
1	81.7±2.30	88.8 ± 1.5	81.8 ± 1.3			
4	76.3±2.60	81.1 ± 1.1	79.1 ± 2.2			
7	61.3±3.60	88.3 ± 3.5	85.2 ± 0.9			
10	43.1±2.50	89.10 ± 3.3	85.0 ± 1.9			
14	65.5±2.90	95.3 ± 1.9	92.6 ± 1.3			

(b/f) = indicates hyaluronan injection 30 minutes before doxorubicin.

5 ** = samples from this treatment group read 'zero' on day 1 of measurement.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 25 -

TABLE 3 Percentage hematocrit

Day	Treatment Group					
	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 mg/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDOX (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	95.5±11.50	180.1±91.20	82.6±1.40	93.4±6.90	43.2±14.20	96.4±6.40
4	75.3±8.80	275.6±128.30	54.8±9.30	90.2±9.80	132.7±66.60	82.30±5.80
7	70.1±8.80	204.7±107.0	74.5±5.10	74.9±10.10	163.2±84.70	75.0±4.80
10	103.7±10.60	106.5±75.4	99.4±3.0	92.10±4.45	31.7±13.20	107.5±3.10
14	121.4±12.7	483.9±239.00	108.0±2.80	98.8	220.5±92.70	106.5±4.40
Day	12 mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12 mg/kg Dox (n=5)	12 mg/kg HyDOX (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	94.8±1.50	92.3±7.20	77.8±5.60	110.7±21.5	102.8±24.80	80.4±2.50
4	52.9±1.80	68.6±5.40	54.0±2.50	88.0±17.7	41.10±8.90	34.6±8.0
7	50.5±4.30	73.1±5.40	46.6±3.30	25.20±3.20	96.2±19.60	59.2±4.80
10	74.2±5.10	96.0±6.70	50.9±5.80	90.7±16.70	86.5±18.90	37.5±3.20
14	60.0±6.40	59.2±7.30	84.0±3.40	107.8±18.90	67.0±10.10	85.7
Day	HA b/f 2 mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3 mg/kg) n=6	Saline n=6			
0	100	100	100			
1	77.7±2.30	85.7 ± 1.9	78.8 ± 11.7			
4	31.6±9.20	83.0 ± 1.6	111 ± 8.4			
7	55.9±3.50	89.8 ± 2.3	66.6 ± 6			
10	37.3±1.80	50.9 ± 5.8	78.9 ± 12.7			
14	73.3±2.80	87.3 ± 5.2	105.2 ± 6.5			

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 26 -

TABLE 4 Percentage platelets

Day	Treatment Groups					
	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 g/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	98.0±11.0	100.4±6.60	102.0±6.60	72.6±5.30	105.7±7.90	76.4±2.90
4	124.7±18.0	151.9±8.50	192.2±10.40	103.8±10.10	154.3±10.3	107.9±8.30
7	175.1±17.2	155.7±8.30	136.2±11.20	152.7±15.0	171.7±10.10	135.2±14.80
10	98.1±6.60	86.6±3.90	91.1±2.50	112.1±12.2	97.1±7.60	51.0±7.90
14	84.7±10.5	75.0±5.50	94.7±5.80	96.0±7.20	71.1±4.80	58.10±2.80
Day	12 mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12 mg/kg Dox (n=5)	12 mg/kg HyDOX (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	105.2±6.0	115.7±31.40	76.9±4.50	106.6±23.6	71.7±1.20	78.4±13.10
4	150.1±12.6	195.6±54.40	114.60±10.90	159.6±24.3	103.5±5.10	91.2±6.00
7	205.6±10.0	204.7±25.60	187.8±15.20	145.3±6.70	123.9±8.10	59.4±11.40
10	190.4±15.4	88.0±13.0	228.3±43.60	223.1±13.3	107.3±15.5	254.9±48.30
14	147.0±9.80	158.1±31.0	127.3±29.2	137.9±6.20	91.1±11.20	218.20
Day	HA b/f 24mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3mg/kg) (n=6)	Saline (n=6)			
0	100	100	100			
1	86.8±9.10	100.7 ± 10.2	104 ± 1.9			
4	81.8±12.80	135.6 ± 8.6	123.4 ± 9.8			
7	58.30±4.80	138.9 ± 14.5	125 ± 9.4			
10	324.5±32.5	112.2 ± 11.6	134.2 ± 12.6			
14	222.5±18.40	110.6 ± 10.4	94.7 ± 19.9			

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 27 -

TABLE 5 Percentage red blood cells

Day	Treatment Groups					
	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 mg/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDOX (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	124.6±17.4	78.0±11.40	85.8±1.10	98.6±7.20	44.0±13.20	102.7±6.90
4	89.5±10.30	159.4±33.90	58.5±3.30	98.5±10.90	134.7±60.3	90.7±6.40
7	80.20±10.10	131.4±36.10	67.5±4.50	80.4±13.10	136.2±61.2	77.1±5.0
10	106.3±14.4	79.8±20.20	88.4±2.40	92.90	26.4±8.90	102.4±12.40
14	128.8±17.0	119.4±23.8	96.1±2.10	103.50	185.1±69.6	104.3±6.10
Day	12mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12mg/kg Dox (n=5)	12mg/kg HyDOX (n=5)	16mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16mg/kg Dox (n=6)	24mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	77.0±1.20	97.8±15.30	77.3±2.60	113.7±23.30	102.8±24.80	84.6±1.90
4	55.4±1.70	73.6±11.80	56.6±2.50	90.10±41.10	41.1±8.90	35.5±7.20
7	49.1±3.10	67.3±9.10	48.2±2.70	25.40±3.50	96.2±19.60	64.3±6.50
10	61.0±4.60	77.0±10.10	46.2±4.90	72.7±13.8	86.5±18.90	41.6±4.10
14	59.4±9.30	50.9±5.80	76.2±3.60	96.6±18.0	67.0±10.10	64.50
Day	HA b/f 24 mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3 mg/kg) (n=6)	Saline (n=6)			
0	100	100	100			
1	81.6±2.90	83.4 ± 2.1	80.5 ± 2.0			
4	32.10±9.20	73.4 ± 1.5	72.4 ± 1.8			
7	61.9±3.90	77.2 ± 1.9	76.8 ± 2.8			
10	41.4±2.30	44.0 ± 4.9	42.6 ± 2.8			
14	59.9±2.10	76.3 ± 5.1	78.9 ± 4.1			

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 28 -

TABLE 6 Percentage lymphocytes

Day	Treatment Group					
	6 mg/kg Dox (n=12)	HA b/f 6 mg/kg Dox (n=5)	6 mg/kg HyDOX (n=6)	9 mg/kg Dox (n=9)	HA b/f 9 mg/kg Dox (n=6)	9 mg/kg HyDox (n=6)
0	100	100	100	100	100	100
1	122.1±14.70	77.5±11.10	142.1±23.90	70.5±8.40	59.0±6.10	65.6±8.30
4	71.5±5.30	92.6±7.40	134.9±29.7	49.70±4.60	114.5±20.0	65.6±11.30
7	97.1±9.50	89.6±21.9	122.4±15.30	95.3±13.7	122.3±10.20	119.2±11.40
10	84.1±6.60	80.2±21.8	138.4±11.9	100.4±12.9	68.9±14.80	63.20±7.60
14	77.9±7.80	91.2±17.5	126.4±11.5	82.60±8.10	89.1±10.50	88.7±8.50
Day	12 mg/kg Dox (n=10)	HA b/f 12 mg/kg Dox (n=5)	12 mg/kg HyDOX (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA b/f 16 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=5)
0	100	100	100	100	100	100
1	36.8±5.10	38.2±3.50	41.0±9.60	119.1±16.0	144.1±18.0	48.1±6.80
4	39.8±6.60	47.7±4.90	57.5±11.70	35.3±10.70	69.6±13.40	17.0±3.30
7	59.7±6.80	68.2±4.90	86.3±14.40	64.5±4.80	99.6±13.70	32.4±6.40
10	85.5±5.80	52.4±5.80	183.7±46.4	111.7±11.50	108.2±4.70	66.8±17.4
14	51.2±5.40	60.4±2.00	74.5±13.90	71.4±12.10	90.7±27.4	112.2
Day	HA b/f 24 mg/kg Dox (n=5)	HA (13.3 mg/kg) n=6	Saline (n=6)			
0	100	100	100			
1	60.1±11.90	101.2 ± 6.7	78.8 ± 11.7			
4	19.9±6.70	168.4 ± 11.8	111 ± 8.4			
7	43.3±8.10	90.9 ± 9.6	66.6 ± 6			
10	110.5±16.10	108 ± 13.4	78.9 ± 12.7			
14	120.9±13.20	119.1 ± 17.5	105.2 ± 6.5			

5

In all dosages, a greater percentage of peripheral lymphocytes was observed in the HyDox formulation when compared with the Dox equivalent (see Table 6). The HA control injection increased peripheral lymphocytes, with maximum of 168% increase observed at day 4. The increase in platelets in the 24 mg/kg Dox dosages correlated to the increase in

10 neutrophil numbers at the same dosage, perhaps indicating internal tissue damage and infection.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 29 -

Metabolic stress

All treatment groups were monitored for weight loss on a daily basis. At the end of the study the data were expressed as percentage of original body mass and graphed in this manner. The percentage of weight lost in both control groups of HA and saline injections was similar. Therefore, only HA data were plotted with experimental data for comparison. Weight loss data for all experimental groups, including HA and saline controls, can be found in Tables 7A, 7B and 8.

10 **TABLE 7A** Weight loss data for Doxorubicin and HA before Doxorubin injections for 6, 9 and 24 mg/kg dosages. Data are expressed as a percentage of original body mass prior to commencement of treatment

Day	Treatment groups					
	6 mg/kg Dox (n=6)	HA before 6 mg/kg Dox (n=5)	9 mg/kg Dox (n=6)	HA before 9 mg/kg Dox (n=6)	24 mg/kg Dox (n=4)	HA before 24 mg/kg Dox (n=5)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	-1.10 ± 0.65	-2.70 ± 0.40	-0.90 ± 0.73	-0.70 ± 0.50	-3.60 ± 0.40	-3.90 ± 1.00
2	-1.00 ± 0.73	-4.00 ± 0.90	-1.50 ± 0.61	-1.30 ± 0.40	-6.40 ± 0.35	-6.80 ± 1.10
3	-3.00 ± 0.40	-4.40 ± 0.80	-5.00 ± 0.16	-1.10 ± 0.80	-12.60 ± 0.90	-13.80 ± 0.90
4	-5.90 ± 0.73	-4.20 ± 0.50	-7.60 ± 0.69	-1.70 ± 0.90	-15.90 ± 0.80	-17.50 ± 1.00
7	-4.50 ± 0.53	-8.60 ± 0.70	-9.70 ± 0.89	-5.20 ± 1.70	-26.20 ± 2.10	-27.50 ± 0.50
8	-2.70 ± 1.55	-5.90 ± 0.60	-8.30 ± 0.61	-2.70 ± 1.70	-24.90 ± 1.75	-25.80 ± 0.35
9	-2.10 ± 0.97	-3.00 ± 0.50	-6.30 ± 0.73	-0.40 ± 1.20	-24.80 ± 2.30	-24.10 ± 0.40
10	-5.00 ± 0.89	-4.20 ± 0.60	-8.00 ± 0.81	-1.60 ± 1.10	-26.30 ± 2.30	-23.90 ± 0.85
11	-2.90 ± 1.10	-5.60 ± 0.30	-6.90 ± 0.85	-3.00 ± 1.20	-27.70 ± 2.75	-23.60 ± 0.70
14	-1.90 ± 0.85	-5.10 ± 0.71	-6.30 ± 0.48	-2.91 ± 0.44	-16.80 ± 2.50	-22.10 ± 1.80

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 30 -

TABLE 7B Weight loss data for Doxorubicin and HA before Doxorubicin injections for 12 and 16 mg/kg dosages

Day	12 mg/kg Dox (n=4)	HA before 12 mg/kg Dox (n=5)	16 mg/kg Dox (n=3)	HA before 16 mg/kg Dox (n=6)
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	-1.90 ± 0.75	-2.10 ± 0.89	-5.60 ± 0.60	-4.60 ± 0.69
4	-6.10 ± 0.85	-2.40 ± 0.84	-14.50 ± 0.90	-10.90 ± 1.60
5	-6.80 ± 0.95	-4.10 ± 0.84	-15.20 ± 1.70	-11.20 ± 2.00
6	-7.80 ± 1.10	-4.30 ± 1.43	-11.90 ± 2.40	-11.50 ± 1.80
7	-9.50 ± 1.10	-4.50 ± 1.65	-14.20 ± 1.80	-11.80 ± 0.90
8	-9.70 ± 1.75	-3.90 ± 2.54	-16.80 ± 1.70	-12.60 ± 0.60
11	-12.70 ± 1.35	-4.10 ± 2.50	-12.40 ± 1.67	-9.00 ± 0.65
12	-9.10 ± 1.45	-5.00 ± 2.19	-10.50 ± 1.67	-7.20 ± 0.69
13	-7.70 ± 1.75	-2.50 ± 2.45	-9.10 ± 1.32	-5.90 ± 0.89
14	-10.80 ± 1.70	4.80 ± 2.28	-9.80 ± 1.03	-7.80 ± 1.02

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 31 -

TABLE 8 Weight-loss data for HyDox injections for 6, 9 and 12 mg/kg dosages

Day	Treatment Groups					
	6 mg/kg Dox (n=6)	6 mg/kg HyDox (n=6)	9 mg/kg Dox (n=3)	9 mg/kg HyDox (n=6)	12 mg/kg Dox (n=6)	12 mg/kg HyDox (n=5)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	-1.40 ± 0.93	0.50 ± 1.02	-2.30 ± 0.51	-0.80 ± 0.85	-4.90 ± 0.65	-2.80 ± 0.70
2	-1.50 ± 1.30	0.90 ± 1.10			-5.90 ± 0.57	-4.00 ± 0.80
3	-4.60 ± 1.38	0.10 ± 0.97			-7.70 ± 0.65	-7.60 ± 0.70
4	-7.30 ± 2.32	0.70 ± 1.06	-6.60 ± 2.36	0.20 ± 1.14	-9.00 ± 0.53	-8.70 ± 0.60
5			-8.70 ± 4.07	-0.80 ± 1.42		
6			-7.50 ± 5.88	-1.00 ± 0.85		
7	-4.50 ± 2.12	0.90 ± 1.06	-8.30 ± 4.67	1.60 ± 1.91	-11.50 ± 1.14	-9.80 ± 0.90
8	-1.40 ± 1.95	3.50 ± 1.26	-7.10 ± 6.50	5.20 ± 2.08	-12.20 ± 1.10	-10.80 ± 1.10
9	2.30 ± 2.04	7.10 ± 1.42			-11.10 ± 1.26	-9.70 ± 0.70
10	-0.70 ± 1.75	5.10 ± 1.38			-12.70 ± 1.30	-10.70 ± 0.90
11	1.50 ± 1.30	6.40 ± 1.42	0.20 ± 0.63	-2.50 ± 1.87	-13.50 ± 1.74	-11.00 ± 0.60
12			0.40 ± 0.23	6.20 ± 2.69		
13			3.80 ± 1.38	5.50 ± 3.30		
14	0.60 ± 1.47	5.50 ± 1.30	3.10 ± 1.32	0.90 ± 2.77	-11.80 ± 1.63	-10.80 ± 0.70

Day	Controls	
	HA (13.3 mg/kg) N=6	Saline N=6
0	0.0	0.0
1	-2.5 ± 1.5	-3.2 ± 0.48
2	-3.0 ± 1.4	-1.9 ± 0.97
3	-3.2 ± 1.3	-4.10 ± 1.02
4	-4.0 ± 1.2	-5.10 ± 1.95
7	-4.8 ± 1.0	-4.0 ± 0.94
8	-5.7 ± 1.1	-4.7 ± 1.14
9	-4.8 ± 1.5	-4.1 ± 1.22
10	-7.1 ± 1.3	-5.9 ± 1.26
11	-6.6 ± 1.2	-4.4 ± 1.34
14	-4.6 ± 1.3	-2.9 ± 0.89

5

The weight lost by the mice was dose dependant: the highest degree of loss was observed in the 24 mg/kg dosage group, where almost 25% of original weight was lost by day 7 (Figure 5; panel labeled 24 mg/kg). In the lower dosages of 6 and 9 mg/kg dox, the weight loss in HA before Dox was comparable with the HA control data and by day 8 in the 9 mg/kg HA before Dox started to re-gain close to original starting body mass. The 9 mg/kg

10

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 32 -

Dox only group lost a maximum of close to -10%, whereas the HA before Dox only lost a maximum of -5.7% (Figure 5). In the HA before 12 mg/kg Dox dosage (60 mg/m² human equivalent) weight loss was again comparable to that observed in the control groups but when in the Dox only group the weight loss was starting to become more apparent with almost 13% of original body mass lost by day 11 (Figure 5).

Interestingly when the equivalent dose was tested in the HyDox formulation the weight loss was equivalent to the corresponding Dox only group (Figure 6). When the lower HyDox dosages were examined, however, the 6 and 9 mg/kg groups did not lose weight, and by day 7 actually started to gain weight above that of original starting body mass.

The above data indicate that HyDox, and HA administered 30 minutes before Dox have the capacity to reduce neutropenia and actually stimulate neutrophil release into blood circulation, at human equivalent dosages of 30, 45 and 60 mg/m². This is a significant finding in light of current chemotherapy regimes which are often hampered by non-completion of treatment due to drug related neutropenia.

EXAMPLE 2

In vivo model of cardiotoxicity (I)

20

Experimental animals

Adult female Wistar rats (10 weeks old) were purchased from The Animal Central Division (Monash University, Victoria, Australia) and were randomly divided into 6 experimental groups (n = 8 per treatment group). Group 1 through to 3 received weekly intravenous injections of: (1) 1.5 mg/kg Dox only; (2) HA administered 30 minutes before 1.5 mg/kg Dox; and (3) 1.5 mg/kg HyDox. Group 4 through to 5 received weekly intravenous injections of comparable volumes of saline and 13.3 mg/kg HA, respectively. Group 6 received no treatment.

30

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 33 -

Prior to the commencement of the study, blood (500 μ L) was collected from each rat *via* a tail vein bleed procedure. Blood was collected in 1.5 mL Capiject tube and allowed to clot for a minimum of 30 minutes. After this time, the clot was pelleted by centrifugation at 3,500 g_{av} for 2 minutes and the serum was transferred to a clean 1.5 mL Eppendorf and immediately stored at -20°C until further analysis. After pre-bleeds, each experimental animal was injected with respective drug combination or control treatment and 24 hours after administration the rats were tail-bled and processed as described above. Thereafter, animals were injected with drug combinations at weekly intervals for 12 weeks, and blood was collected 24 hours after treatment. The total cumulative dose of Dox received by animals in Groups 1, 2 and 3 was 18 mg/kg.

Processing of tissue for analysis

One week after the last injection, the rats were killed by decapitation and internal organs were fixed in 10% v/v formalin in phosphate buffered saline. Prior to tissue fixation, portions of the kidney, liver, and skeletal muscle and heart were quickly removed and placed in tubes on ice. The tissue was either used immediately or stored at -80°C until assayed. Each sample was minced into small pieces, washed vigorously in two changes of ice cold 0.25 M sucrose containing 1 mM EDTA, then washed in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.8 containing 0.1 mM EDTA prior to recording the tissues 'wet' weight. The tissue was then resuspended in 2 mL of ice-phosphate-EDTA buffer and homogenized on ice for three 5-second bursts over 5 minutes using an Ultraturrax homogenizer. The fine suspension was made up to a final volume of 4 mL with the phosphate-EDTA buffer and used for the enzyme and GSH assays described below.

Antioxidant enzymes and GSH assay

From the 4 mL tissue homogenate, 1 mL was transferred to a clean 1.5 mL Eppendorf and stored on ice. Another 1 mL of phosphate buffer was added to 3 mL tissue homogenate to make the final volume 4 mL. For the enzyme assays, the crude homogenate (4 mL) was centrifuged for 60 minutes at 100,000 $\times g$ at 4°C in a Beckman TL-100 ultracentrifuge

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 34 -

fitted with a TLA100.2 rotor. After centrifugation, the clear high-speed supernatant was aliquoted and stored at -80°C until direct determinations of glutathione peroxidase (GP), catalase, and superoxide dismutase (SOD) activities were made.

- 5 For the GSH assay, 0.25 mL of 25% w/v metaphosphoric acid was added to the 1 mL of the original crude homogenate, mixed thoroughly and incubated on ice for 15 minutes. The protein precipitate was pelleted by centrifugation at 10,000 g for 10 minutes at 4°C. The clear supernatant was transferred to a clean tube and either stored at -70°C for no longer than three days or GSH levels were directly determined. The level of GSH was determined
10 using a fluorometric assay using *o*-phthalaldehyde as described by Cohn & Lyle (*Anal. Biochem.* 14(3): 434-440, 1966).

- SOD activity was determined measuring the Cytochrome c by the method according to McCord & Fridovich (*J. Biol. Chem.* 244(22): 6056-6063, 1969). GP activity was assessed
15 by an indirect coupled assay (Paglia & Valentine, *J. Lab. Clin. Med.* 70(1): 158-169, 1967). Catalase activity was measured by following the decomposition of H₂O₂ at 240 nm by a method described by Claiborne (*Am. Rev. Respir. Dis.* 131(6):947-949, 1985).

- The protein concentrations of 100,000 g supernatants and 10,000 g supernatants were
20 determined using the BCA protein assay.

Serum Levels of cardiac Troponin-T (cTnT)

- To quantify the degree of cardiotoxicity caused by Dox, the serum levels of cTnT were
25 determined on each serum sample collected throughout the study using an immunoassay for cardiac troponin T from Roche Diagnostics (Victoria, Australia).

Analysis of cardiac damage by electron microscopy

- 30 Immediately after animal sacrifice, a traverse section of the intraventricular septum was dissected from the heart and fixed in 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde and 4%

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 35 -

glucose in phosphate buffer. Standard post-buffering, osmication and processing were followed. Specimens were examined with a Philip's electron microscope and the frequency and severity of cardiac damage in the myocardial cells were graded according to the method according to Billingham *et al.* (*Can. Treat. Rep.* 62: 865-872, 1978). In brief, blocks were selected that consisted predominantly of transected cardiac myocytes. Lesions were scored, and the extent of cardiac damage was expressed as a percentage of vacuolated myocytes.

Figure 7 shows the effect of HA/Dox on cardiotoxicity. As indicated by this graph, the formulation of HA with Dox or injection of HA before drug can delay the onset of cardiotoxicity. The serum troponin T data from the rat study, at this stage appears that HyDox does have an effect of delaying the release of Troponin T (the cumulative dose of Dox is 9 mg/kg while cardiotoxicity of HyDox begins at 12 mg/kg cumulative dose.)

Figures 8A-8B shows the effect of HA and Dox on Cardiotoxicity in rats. It should be noted that the vacuolated myocytes in the hearts of animals which received Dox versus the non-vacuolated healthy myocytes of animals treated with HA and Dox.

EXAMPLE 3

In vivo model of cytotoxicity (II)

Experimental Animals

Male F1 mice (C57 × CBA, 11-13 weeks old) were obtained from The Animal Central Division (Monash University, Victoria, Australia). For each treatment dosage a total of 6 groups ($n=8$ mice per group) were used. Data from each treatment group were established by staggering results of groups of 6 (counted individually), sampling each group every 4 days so that a daily assessment could be established. Each group was treated as described above, prior to the drug administration. Throughout this study, blood was collected and analysed for neutrophil content as outlined in previous examples. At the end point, all animals were humanely sacrificed and body organs fixed in 10% v/v formalin in PBS.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 36 -

Hematological Determinations

This study focused on the two dosages of 12 mg/kg Dox and 16 mg/kg Dox that are the human therapeutic equivalents of 60 and 80 mg/m², respectively. Again, to normalize the data for comparison between treatments, neutropenia was expressed as a percentage of neutrophils on day 0 (before drug administration).

12 mg/kg doxorubicin and HyDox treatment groups

At a dosage of 12 mg/kg, a trend similar to neutropenia in Example 1 was observed (Figure 9, panel 12 mg/kg). Despite a drop in neutrophil content 24 hours after HyDox administration to approximately 74%, by days 2 and 3 there was an average increase in peripheral neutrophils to 267% and 207%, respectively. Although an increase in peripheral neutrophils, which peaked at day 2, was observed in the Dox only group, it never reached the maximum value obtained in the HyDox treated groups. The onset and duration of nadir neutropenia was equally severe in both groups: it occurred initially at day 4 and lasted for 2 days before recovering to normal levels by day 7.

16 mg/kg doxorubicin and HyDox treatment groups

At the Dox dosage of 16 mg/kg, a similar neutropenia profile was observed irrespective of drug combination tested (Figure 9). Despite this trend, the onset of neutropenia was delayed by one day in those groups treated with the HyDox formulation (Figure 9, panel 16 mg/kg, solid line) and occurred at day 5. Nadir neutropenia was equal in both combinations of drug administration but only lasted for a period of 24 hours in those groups treated with HyDox, before recovery to normal measurement. In contrast, in mice treated with Dox, the recovery from nadir neutropenia took longer than 48 hours.

This was followed by a decline in peripheral neutrophils and by day 4 nadir neutropenia was comparable between drug combinations, lasted for 48 hours before returning to normal measurements.

30

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 37 -

In mice treated with 16 mg/kg Dox, in either drug combination, the same neutropenia profile was observed. Both groups displayed an increase in peripheral neutrophils by day 2 following iv administration of drug, which preceded a decline in neutrophil numbers. In mice receiving 16 mg/kg HyDox, however, this decline was delayed by 24 hours but was
5 equally severe when compared with mice receiving Dox only (Figure 9).

Other Haematological Considerations

Analysis of the differential results for red blood cell count, haemoglobin, platelets and
10 lymphocytes did not show any difference in effect when Dox was administered as either HyDox or drug alone.

Metabolic stress

15 Weight-loss was expressed as a percentage of the original starting mass. Weight loss was equal up to day 4, in groups treated with 12 mg/kg Dox or HyDox. By day 5, however, the HyDox group started to re-gain weight and by day 12 had recovered to original starting mass (Figure 10A, 12 mg/kg). In contrast, animals treated with 12 mg/kg Dox continued to lose weight until day 6, before starting to re-gain weight. In the 12 mg/kg dosage groups,
20 the maximum percentage of weight lost was 12.9% and occurred at day 6, whereas the HyDox group only lost a maximum of 9.6% by day 4. Mice receiving drug only never regained their original starting Figure 10A, 12 mg/kg).

The weight loss in mice treated with 16 mg/kg Dox and HyDox formulation followed a
25 similar trend, and both groups never re-gained their original body mass. It is interesting note, however that despite equal weight loss between the two groups, mice receiving drug only consumed more food on average throughout the duration of the study (Figure 10B, 16 mg/kg Dox). This effect was even more noticeable in the groups receiving HyDox at the drug dosage of 12 mg/kg. The HyDox group regained weight faster when compared with
30 the drug alone data, yet consumed equal amounts of food throughout the study (Figure 10B, 12 mg/kg).

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 38 -

EXAMPLE 4***In vivo model of cardiotoxicity (II)***Drugs for intravenous injection and other chemicals

5

Doxorubicin was purchased from Asta Medical (NSW, Australia) as doxorubicin hydrochloride powder, which was reconstituted in 0.9% sterile sodium chloride to a final concentration of 2 mg/mL. Desiccated HA, 824,000 Da, was purchased from Pearce Pharmaceuticals (Victoria, Australia) and was dissolved in sterile water to a final
10 concentration of 10 mg/mL, filter sterilized through a 0.22 µm filter and stored at 4°C until used. HyDox was prepared by mixing calculated volumes of 10 mg/mL HA with a calculated volume of 0.5 mg/mL Dox to achieve the desired 1.0 mg/kg Dox dosage.

The dosage of HA used throughout this study was 13.3 mg/kg of bodyweight. Glutathione, *o*-phthalaldehyde, xanthine, xanthine oxidase (from Buttermilk, Grade I), reduced NADPH
15 type III were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase were purchased from Roche Molecular Biochemicals (NSW, Australia). All other reagents were of analytical grade.

20 Experimental animals

Adult female spontaneously hypertensive rats (10 weeks old) were purchased from The Baker Medical Research Institute (Melbourne, Australia) and were randomly divided into 4 experimental groups (*n* = 10 per treatment group). Groups 1 and 2 received weekly
25 intravenous injections of: (1) 1.0 mg/kg Dox only; (2) 1.0 mg/kg HyDox. Group 3 received weekly intravenous injections of 13.3 mg/kg HA. Group 4 received no treatment. Animals were injected on weekly intervals with drug combinations for 12 weeks. The total cumulative dose of Dox received in both treatment groups was 13 mg/kg.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 39 -

For analyses, tissue processing and assays of antioxidant enzymes and GSH, were carried out as described in Example 2. Analysis of cardiac damage by transmission electron microscopy was also carried out as described in Example 2.

5 Myocardial pathology, ultra-structural studies

To develop a model for induced chronic cardiotoxicity, weekly iv injections of 1.0 mg/kg Dox, as either drug alone or HyDox, were administered to rats. The total cumulative dose of Dox given to experimental groups was 13 mg/kg. Electron microscopy was then used to
10 assess whether chronic exposure to Dox, with or without the presence of HA, was cardioprotective or cardiotoxic, respectively. To minimize anatomical variation across treatment groups, samples of the lateral border of the left ventricle were processed for EM analysis.

15 Electron microscopy examination revealed that a cumulative dose of 13 mg/kg Dox was cardiotoxic in the spontaneously hypertensive rat model and was consistent with other studies of similar subject. Specifically, Dox-cardiotoxicity presented primarily as cytoplasmic vacuolation, myofibrillar disorganization and disruption to the ultrastructure organization of myocytes.

20 In rats treated with Dox, the occurrence of cardiomyocyte vacuolation was far more frequent when compared with micrographs obtained from rats receiving HyDox (Figures 11C and 11D, respectively). Dox also caused mitochondrial swelling with minor disruption to the cristae. However, the severity was greater in rats receiving Dox only. In fact, the
25 degenerative mitochondrial changes were associated with complete disruption to these sub-cellular organelles and were consistent with the appearance of myelin figures (Figures 12A and 12B, solid arrows). These observations were less frequent in rats receiving HyDox (Figure 12B). Chronic exposure to Dox also caused mild disruption to the organized myofibrillar array that included myofibrillar lysis and misalignment of the Z-bands. Again
30 these features of Dox cardiotoxicity were always more severe in rats receiving Dox only (Figure 12A, dotted arrows). Although myofibrillar lysis was still evident, it was less

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 40 -

severe in rats treated with HyDox and ordered myofibril arrays were still evident (Figure 12B, dashed arrows).

The severity of cardiomyocyte vacuolation in all treatment groups is shown in Figure 13.

- 5 When compared with the HyDox group, myocyte vacuolation in the Dox group is almost two-three-fold greater ($p < 0.05$: t-test between treatment groups).

Antioxidant levels following chronic exposure to Dox \pm HA

- 10 The levels of free-radical scavenging enzymes; namely, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and levels of reduced glutathione (GSH), were measured after chronic exposure to Dox \pm HA. For control purposes, antioxidant loading from hepatic, renal and skeletal muscle extracts was also determined. The effect of chronic exposure to Dox and HyDox on the cardiac, hepatic, renal and skeletal antioxidant capacity is shown in
15 Figure 14.

Catalase

- A slight increase in cardiac catalase in response to HyDox was observed when compared with Dox and both control groups. Hepatic catalase was significantly increased in response
20 to Dox yet the HyDox activity mirrored those observed from both control groups (Figure 14A).

Reduced glutathione (GSH)

- The level of hepatic GSH was significantly reduced in rats receiving HyDox. However, the
25 GSH levels in Dox-treated rats remained unchanged in relation to the control values (Figure 14B). A similar trend was observed in cardiac levels where HyDox reduced the GSH content yet Dox treatment yielded similar values to the controls (Figure 14B: insert with hepatic data removed).

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 41 -

Glutathione peroxidase

Both HyDox and Dox treatment equally increased the level of cardiac glutathione peroxidase levels (Figure 14C) when compared with the values obtained from the control groups. Both drug combinations resulted in similar hepatic, renal and skeletal glutathione peroxidase activities when compared with corresponding control data (Figure 14C).

Superoxide dismutase (SOD)

Cardiac SOD activity remained relatively unchanged between treatment groups when compared with the no treatment control group (Figure 14D). The HA control group significantly decreased the activity of this enzyme (Figure 14D). Suppression of hepatic and renal SOD was observed in both treatment groups, whereas skeletal SOD activity was moderately increased (Figure 14D). Hepatic catalase activity was significantly increased in response to Dox exposure, yet the HyDox activity mirrored those observed from both the control groups (Figure 14A).

Cardiotoxicity is a complicating factor that limits the total cumulative dose of Dox chemotherapy to 500-550 mg/m². These data demonstrate that, by combining Dox with HA (HyDox), the level of cardiotoxicity is reduced almost three-fold when compared with drug alone. Hence, the use of HyDox enables a higher cumulative dose of the highly efficacious anti-cancer drug, without the normally encountered cardiotoxicity. Completion of treatment without cardiotoxicity enhances the probability of tumor response and ultimately increases survival.

EXAMPLE 5

***Phase I clinical trials – combination of doxorubicin + HA ("HyDox")
in patients with advanced cancer***

A phase I study was conducted to determine whether co-administration of HA with Dox impacted on Dox toxicity in patients with advanced cancer.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 42 -

The eligibility criteria, for inclusion in this study, were as follows: Patients must have advanced or metastatic cancer, histologically or cytologically confirmed. Patients were not to have had previous chemotherapy or were to have had no more than one prior chemotherapy regime and were not to have had prior anthracyclines. Patients were to be
5 aged between 18 and 75 years with ambulatory performance status and adequate bone marrow, liver and renal function.

The treatment plan provided that, in the first chemotherapy cycle, patients be randomized to receive Dox alone or Dox plus HA. The converse applied in the second cycle. In the
10 subsequent four cycles, patients received Dox plus HA. This allowed each patient to act as his/her own control in the toxicity analysis in the first two cycles, reducing the possibility of inter-patient variability affecting result interpretation.

The HyDox formulation (as infusion bags) was prepared as follows: HA was obtained
15 from GlycoMed Research, New York, USA and used from a 10 mg/ml stock prepared from dissolving powdered HA in distilled water and filter sterilising through a 0.22 μ m filter. Dox was obtained from Asta Medica, supplied as a 50 mg vial containing 250 mg lactose, and was reconstituted in 25 ml of injectable normal saline, by constant swirling for 8 to 12 minutes. Injectable sodium chloride was obtained from Baxter Healthcare, Sydney,
20 Australia, as supplied as a 500 ml infusion bag. The injectable HyDox was prepared to deliver 13.3 mg/kg HA with 30, 45 or 60 mg/m² Dox.

The Dox \pm HA was given by intravenous administration over one hour on a three week cycle. The initial dose of Dox in this phase 1 study was 30 mg/m² and the dose of HA 500
25 mg/m². Dose escalation occurred in two steps to reach the standard dose of 60 mg/m². Therefore, the initial dose level was 30 mg/m², the next 45 mg/m² and the next 60 mg/m².

Four patients, at each dose level, were treated. The results demonstrated that HA does not increase any of the known toxicities of Dox. At the higher dose level, 60 mg/m², was a
30 lessening of nausea and vomiting post-chemotherapy was apparent, as well as a reduction of both hair loss and the extent of neutropenia induced by Dox. The results of neutrophil

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 43 -

counts are shown in Table 9. The patient's well-being appeared to be improved. No other toxicities were reported.

Patient 1: A-S/H									
Cycle 1: HyDOX	30 mg/m2				Cycle 2: DOX				
Time (days)	Neutrophils X 109/L	Neutrophils as % of Day 1			Time (days)	Neutrophils X 109/L	Neutrophils as % of Day 1		Time (days)
1	3.6	100			1	3.5	100		1
3	4.5	125			6	3.5	100		
6	5.7	158			8	3.8	109		
8	5	139			10	3.8	109		
10	5.1	142			13	2.9	83		
15	2.9	81			15	2	57		
17	2.3	64			20	2	57		
20	2.7	75			21	2.6	74		
21	3.5	97							
Patient 2: H-Y #2									
Cycle 1: DOX	30 mg/m2				Cycle 2: HyDOX	30 mg/m2			Cycle 3: DOX
Time (days)	Neutrophils X 109/L	Neutrophils as % of Day 1			Time (days)	Neutrophils X 109/L	Neutrophils as % of Day 1		Time (days)
1	5	100			1	4.3	100		1
4	6	120			4	5.3	123		
8	6.6	132			8	6.4	149		
10	3.9	78			11	4	93		
15	2.7	54			12	4.2	98		
17	2	40			15	4.1	95		
21	4.3	86			17	2.3	53		
					21	3	70		

[illegible]

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 49 -

EXAMPLE 6

*Phase I clinical trials – combination of 5-fluorouracil + HA ("Hyfive")
in patients with metastatic colorectal cancer*

- 5 A similar phase I study was carried out with a combination of HA and 5-fluorouracil (Hyfive) in patients with metastatic colorectal cancer. The eligibility criteria were as for Example 3, except that anthracyclines were not contraindicated. The treatment plan proceeded as set out for Example 3.
- 10 The HyDox formulation (as infusion bags) was prepared as follows: HA and injectable sodium chloride were obtained from GlycoMed Research and Baxter Healthcare respectively, as set out in Example 3. Dox was obtained from David Bull Laboratories, and supplied as a 10 ml vial containing 500 mg 5-fluorouracil (5-FU).
- 15 The 5-FU \pm HA was given by intravenous administration over one hour on a four week cycle. The initial dose of 5-FU in this study was 450 mg/m² daily for three days and the dose of HA 500 mg/m² with each administration of 5-FU. Dose escalation occurred in two steps to reach the standard dose of 450 mg/m² for five consecutive days with each cycle. Therefore, the initial dose level was 450 mg/m² daily for three days, the next 450 mg/m²
- 20 for four days and the final 450 mg/m² daily for five days.

Four patients, at each dose level, were treated. The results demonstrated that HA does not increase any of the known toxicities of 5-FU. At the higher dose level there was an apparent lessening of nausea and vomiting post-chemotherapy, and there was no

25 neutropenia or gastrointestinal tract toxicities. The results of neutrophil counts are shown in Table 10.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 50 -

TABLE 10

Patient 2 - L- R (Day 3 TX)		Neutrophil Count		as % Day 1		Cycle 2 - HyFive Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1		Cycle 3 - HyFive Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1	
Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1		Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1		Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1	
1	9.3	100	8.7	100	100	1	8.7	100	9.6	100	100	2	9.6	100	9.6	100	100
3	7.6	82	8.1	93	93	3	8.1	93	9.6	93	93						
7	8.4	90	8.1	93	93	7	8.1	93	9.6	93	93						
9	8.3	89	7.5	86	86	9	7.5	86	9.6	86	86						
11	6.8	73	7.2	83	83	11	7.2	83	9.6	83	83						
14	7	75	7.7	89	89	14	7.7	89	9.6	89	89						
16	7.3	78	10.8	124	124	16	10.8	124	9.6	124	124						
18	8.4	90	7.9	91	91	18	7.9	91	9.6	91	91						
21	8.2	88	7.9	91	91	21	7.9	91	9.6	91	91						
23	7.8	84	7.9	91	91	23	7.9	91	9.6	91	91						
25	8.7	94	8.4	97	97	25	8.4	97	9.6	97	97						
Patient 4 - C- X (4 Day TX)		Neutrophil Count		as % Day 1		Cycle 2 - 5FU Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1		Cycle 3 - HyFive Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1	
Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1		Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1		Time (Days)		Neutrophil Count		as % Day 1	
1	5.8	100	5.1	100	100	1	5.1	100	5.5	100	100	1	5.5	100	5.5	100	100
4	6.1	105	4.4	86	86	4	4.4	86	5.5	86	86						
8	10.2	176	4.4	86	86	5	4.4	86	5.5	86	86						
10	10.8	186	5	98	98	8	5	98	5.5	98	98						
15	14.3	247	10.3	202	202	10	10.3	202	5.5	202	202						
17	13.1	226	6.9	135	135	12	6.9	135	5.5	135	135						
19	12.2	210	6.7	131	131	15	6.7	131	5.5	131	131						
22	6	103	7.5	147	147	17	7.5	147	5.5	147	147						
24	5.8	100	6.5	127	127	19	6.5	127	5.5	127	127						
			6.1	120	120	22	6.1	120	5.5	120	120						
			7.9	155	155	24	7.9	155	5.5	155	155						
			5.3	104	104	26	5.3	104	5.5	104	104						

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 51 -

Patient 5 - J-		M (5 Day Tx)		Cycle 1 - HyFive		Cycle 2 - HyFive		Cycle 3 - HyFive	
Time (Days)	Neutrophil Count	as % Day 1	Neutrophil Count	as % Day 1	Time (Days)	Neutrophil Count	as % Day 1	Time (Days)	Neutrophil Count
1	4.2	100	4	100	1	4	100	1	5.8
5	4.5	107	5.9	98	3	5.9	98		
10	4.1	98	4.8	120	7	4.8	120		
12	4.3	102	5.6	140	9	5.6	140		
15	3.7	88	7.1	178	11	7.1	178		
17	3.3	79	5.8	145	14	5.8	145		
19	4.3	102	5.6	140	16	5.6	140		
22	4.3	102	4.5	113	18	4.5	113		
24	4	95	5.2	130	21	5.2	130		
26	4.5	107	5.5	138	23	5.5	138		
			5.7	143	25	5.7	143		
Patient 6 - J-		B (5 Day Tx)		Cycle 2 - HyFive		Cycle 3 -			
Time (Days)	Neutrophil Count	as % Day 1	Neutrophil Count	as % Day 1	Time (Days)	Neutrophil Count	as % Day 1	Time (Days)	Neutrophil Count
1	5.3	100	4.5	100	1	4.5	100	1	6.1
3	4.3	81	4.9	109	3	4.9	109		
8	4.5	85	4.6	102	5	4.6	102		
10	6.6	125	7.5	167	8	7.5	167		
12	4.5	85	8.6	191	10	8.6	191		
15	4.2	79	5.8	129	12	5.8	129		
17	5.5	104	7	156	13	7	156		
19	5.3	100	6	133	19	6	133		
22	5.7	108	7	156	22	7	156		
24	5.4	102	5.5	122	24	5.5	122		
26	5	94	5.5	122	26	5.5	122		

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

Portion 7 - V-D (5Day Tx)		Cycle 1 - HyFire		Cycle 2 - SFU		Cycle 3 -	
Time (Days)	Neutrophil Count	as % Day 1	Time (Days)	Neutrophil Count	as % Day 1	Time (Days)	Neutrophil Count as % Day 1
1	2.7	100	1	3	100	1	3
3	3.2	119	3	2.3	77		
5	2.7	100	5	2.8	93		
8	3.3	122	8	3.2	107		
10	2.5	93	10	2.5	83		
12	2.6	96	15	2.7	90		
19	2.5	93	17	2.5	83		
22	2.4	89	19	3	100		
24	2.9	107	22	3.4	113		
26	2.9	107	24	3.1	103		
			26	3.5	117		

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 53 -

EXAMPLE 7

In vivo model of cytotoxicity (III)

Examples 5 and 6 investigated the effect of HA/cytotoxic drug combinations for a 6-month period and a 6-week period, respectively, and showed that the addition of HA to methotrexate or 5-FU enhanced tumor response, reduced metastasis and reduced gastrointestinal toxicity. Those results were followed up with an investigation of the effect of HA on the efficacy of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) in the treatment of human breast cancer xenografts in nude mice. The following efficacy parameters were investigated: primary tumor volume; cancer metastasis and treatment toxicity in relation to body mass, organ pathology, hematology and survival.

Human Breast Carcinoma Cell Line

Human breast carcinoma cell line MDA-MB-468 (American Tissue Culture Collection, Rockville, USA) was selected based on its expression of the HA receptors of CD44, and RHAMM. Cells were routinely grown and subcultured as a monolayer in 175 cm² culture flasks or 700 cm² roller bottles in Leibovitz L-15 Medium (Sigma, St. Louis, USA) supplemented with 10% w/v fetal calf serum and 10 µg/ml gentamycin. For injection into mice, cells were grown to 80% confluency, trypsinized in 0.05% trypsin/0.01% EDTA solution, washed twice by centrifugation in a Beckman TJ-6 bench centrifuge (Beckman, Melbourne, Australia) at 400 g for 10 minutes, counted using a Model-ZM Coulter counter (Coulter Electronics, England) and resuspended in serum-free Leibovitz L-15 medium at 2×10^8 cell/ml.

Mouse Tumor Model

Athymic CBA/WEHI nude female mice (Walter and Eliza Hall Research Institute, Melbourne, Australia), 6 to 8 weeks old, were maintained under specific pathogen-free conditions, with sterilized food and water available *ad libitum*. Each mouse received one injection containing 1×10^7 cells in 50-100 µl. The cells were injected with a 26-gauge

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 54 -

needle into the mammary fat pad directly under the first nipple (Lamszus *et al.*, *Lab. Invest.* 76(3): 339-353, 1997). Tumor measurements were made weekly by measuring three perpendicular diameters (d_1, d_2, d_3). Tumor volume was estimated using the formula:

$$(1/6)\pi(d_1 d_2 d_3).$$

Treatment with CMF \pm HA was commenced approximately 4-8 weeks after the cancer cell inoculation. Table 11 shows the mean tumor volume of each treatment group at commencement of treatment.

10

TABLE 11

Treatment Group	Tumor volume (mm^3) at commencement of treatment Mean \pm SD	Tumor volume (mm^3) as percentage of body mass at commencement of treatment Mean \pm SD
Saline Day 1 & 2	39.98 \pm 13.88	0.20 \pm 0.07
HA Day 1 & 2	50.99 \pm 18.07	0.22 \pm 0.10
HA Day 1 & 3	28.65 \pm 20.90	0.14 \pm 0.11
CMF Day 1 & 2	44.51 \pm 26.92	0.23 \pm 0.13
HA/CMF Day 1 & 2	37.13 \pm 22.30	0.20 \pm 0.12
HA days 1 & 3 followed by CMF days 2 & 4	35.31 \pm 9.42	0.20 \pm 0.05

Animal maintenance and housing

15

Equal numbers of mice were allocated to each cage. The animal number per cage varied from 5-8, depending on the stage of experimentation. All animals were housed at the Monash University Central Animal Services SPF facility in accordance with internal quality assurance programs.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 55 -

Validation of human breast cancer xenograft: Immunohistochemical detection of HA receptors on breast carcinoma

Approximately 8 weeks after tumor induction, two tumor-bearing mice were given a lethal dose of Nembutal. Within 3 minutes of killing the mice, tumors were surgically removed and immediately fixed in 10% v/v buffered formalin for 12 hour. The fixed tumor was dehydrated overnight in a series of 70-100% v/v ethanol, and embedded in paraffin. Sections (2-4 μ m) were cut and placed on slides, de-waxed, and brought to water. Slides were washed 3 x 5 minutes in PBS. Heterophile proteins were blocked by incubation with 10% w/v fetal calf serum for 10 minutes, and then rinsed in PBS. The detection antibodies were applied for 60 minutes at room temperature (RT). The antisera or antibodies were against RHAMM (Applied Bioligands Corporation, Manitoba, Canada), CD44H, CAE and secondary antibodies were purchased from Zymed (California, USA. The slides were washed 3 x 5 minutes in PBS and endogenous peroxidase activity blocked by immersion in 0.3% H₂O₂ in methanol for 20 minutes. Following a further PBS wash, the peroxidase-conjugated swine anti-rabbit secondary antiserum (Dako, California, USA) was applied for 60 minutes at RT, followed by 3 x 5 minute washes in PBS. Sigma *Fast* DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Sigma, St. Louis, USA) tablets were prepared according to the manufacturer's instructions and the DAB solution was applied for 5-10 minutes at RT. The slides were washed in tap water for 10 minutes, counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted.

Preparation and injection of CMF/HA drug combinations

Cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil (CMF) injections were individually made according to mouse masses, to deliver 15 mg/kg MTX/30 mg/kg Cyclo and 30 mg/kg 5-FU, which provides the human equivalent doses of:

15 mg/kg MTX = human equivalent dose 565mg/m²
 30 mg/kg Cyclo = human equivalent dose 1g/m²
 30 mg/kg 5-FU = human equivalent dose 400mg/m².

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 56 -

One hundred μ l injections were prepared by adding the 5-FU to mtx and drawing the drug combination into a 1 ml syringe. the cyclo was then drawn into an individual syringe.

- 5 For 5-FU/HA, a pyrogen-free, HA stock solution (10 mg/ml; modal m, 8.5×10^5 da) was added to a portion of the 20 mg/ml 5-FU stock solution and incubated overnight with vortexing, to a final HA concentration equivalent to 12.5 mg/kg of mouse mass. injections were individually made according to mouse masses, to deliver 30 mg/kg 5-FU and 12.5 mg/kg HA in 100 μ l.

10

HA/CMF injections were individually made according to mouse masses, to deliver 15 mg/kg MTX/30 mg/kg Cyclo/30 mg/kg 5-FU and 12.5 mg/kg HA, which provides the human equivalent doses indicated above.

- 15 Adding the mtx to 5-FU/HA and preparing a 100 μ L injection prepared the drug combination. the Cyclo was then drawn into an individual syringe.

Mice were randomly divided into the following treatment groups:

- 20 Saline (Day 1 and Day 2 of a 7 day cycle)
 12.5 mg/kg HA 850 kD (Day 1 and Day 2 of a 7 day cycle)
 12.5 mg/kg HA 850 kD (Day 1 and Day 3 of a 7 day cycle)
 CMF (Day 1 and Day 2 of a 7 day cycle)
 12.5 mg/kg HA 850 kD/CMF (Day 1 and Day 2 of a 7 day cycle)
 25 CMF (Day 2 and Day 4 of a 7 day cycle)
 12.5 mg/kg HA 850 kD on Days 1 and 3; CMF (Days 2 and Day 4 of a 7 day cycle).

- The treatments were quantitatively administered *via* the tail vein. The animals were injected with Cyclo followed, 2 minutes later, by 5-FU/MTX \pm HA. Animals were
 30 weighed and tumor volumes measured on a daily basis.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 57 -

Collection and processing of tumor and body organs

At the experimental end-point, when animals had to be euthanased due to degree of disease progression or when the 6-week treatment regimen was completed, the animals were
 5 anaesthetised by a 0.1 ml intra-peritoneal injection of Nembutal (60 mg/ml), blood was collected, and the animals killed using cervical dislocation.

Immediately after killing the mouse, the tumor, liver, heart, spleen, bladder, left and right kidneys, uterus, lungs, stomach, intestines, brain and lymph nodes were excised and
 10 weighed, and placed in 10% v/v formalin. The tissue was fixed for 16-24 hrs before histological processing. Fixed tissue was dehydrated stepwise to 100% v/v ethanol and embedded in paraffin blocks from which 2-4 µm sections were placed on glass microscope slides. Staining the tissue sections with a hematoxylin nuclear stain and eosin cytoplasmic stain highlighted any pathological features that could indicate treatment toxicity.

15

Monitoring of treatment side-effectsGastro-intestinal (GI) tract toxicity

Animals were monitored for GI tract upset, such as diarrhoea, and more severe toxicity
 20 manifestations, such as weight loss. Weight loss was monitored by calculating net body weight as estimated by subtracting tumor weight, which was calculated as $l \times \text{tumor volume (cm}^3\text{)}$ as cited in Shibamoto *et al.*, *Br. J. Cancer* 74(11): 1709-1713, 1996. For demonstration of any weight changes the animal body weight was normalized to the body weight at the time of treatment commencement as:

25

$$\frac{\text{Body mass (ex - tumor) - body mass at commencement of treatment (ex - tumor)}}{\text{Body mass at commencement of treatment (ex - tumor)}} \times 100$$

Bone Marrow suppression

Erythrocyte, platelet and white blood cell numbers were estimated by making a $1/50 - 1/2000$
 30 dilution of blood in mouse tenacity saline and counting on a hemocytometer. A blood

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 58 -

smear was made and stained with Giemsa, thereby enabling a relative percentage quantification of neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes. The total estimation of blood cell sub-populations was compared with published data for mouse blood.

5 *Effect of treatment on organ mass*

To ensure that treatments did not induce organ atrophy or enlargement, the organs were removed and weighed during the post-mortem blood. The mass of each organ was calculated as a percentage of the overall net bodyweight, and compared to the organ masses of the saline only group.

10

Overall population survival time

The overall survival time was calculated as the time (days or weeks) that the animal lived, after the commencement of treatment.

15

Effect of HA on CMF induced toxicity

Gastro-intestinal toxicity: Monitoring of body mass

20 The presence of GI toxicity in the form of diarrhoea was monitored daily and none of the treatment groups displayed symptoms. In addition to visual indications of GI toxicity, net animal body mass (excluding tumor) was also observed for the duration of the six week study. The pre- or co-administration of HA with CMF resulted in a statistically significant increase in body mass, when compared to all of the other treatment groups (see Table 12 and Figure 15).

TABLE 12 Statistical comparison of the effect of HA on the gastro-intestinal toxicity of CMF

Treatment	Mean % change in body mass (excluding tumor) \pm SEM	Statistically significant difference when compared to HA/CMF treatment group (<i>t</i> -test)
HA/CMF administered days 1 and 2	8.74 \pm 1.93	Not applicable
Saline	0.09 \pm 1.87	P=0.005
HA administered days 1 and 2	2.47 \pm 1.05	P=0.013
HA administered days 1 and 3	2.78 \pm 1.28	P=0.022
HA Days 1 and 3; CMF days 2 and 4	5.97 \pm 1.65	Not Significant
CMF administered days 1 and 2	-15.51 \pm 4.15	P<0.001

5 Bone marrow toxicity: Neutropenia

The CMF treatment regimen resulted in a reduction in the total circulating white blood cells (WBC) subsequently indicating bone marrow toxicity. The pre- or co-administration of HA/CMF appeared to overcome the toxicity (see Tables 13-15). The WBC sub-population most affected by the CMF was the polymorph cell types, where HA/CMF

10 appeared to result in increased numbers, indicating a possible recruitment of neutrophil progenitors to the circulation.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 60 -

TABLE 13 Effect of CMF/HA treatment on bone marrow toxicity

Treatment	Total counts of blood cell sub-populations (Mean \pm SD)				
	Erythrocytes X10 ⁶ /ul	Platelets X10 ³ /ul	White Cells X10 ³ /ul	Neutrophils/ eosinophils/ basophils (%)	Lymphocytes/ Monocytes (%)
Saline	8.71 \pm 0.43	1290 \pm 88	6.15 \pm 0.19	54 \pm 3	46 \pm 3
HA/CMF administered days 1 and 2	8.99 \pm 0.07	1323 \pm 21	6.75 \pm 0.12	58 \pm 2	42 \pm 2
HA administered days 1 and 2	8.99 \pm 0.13	1374 \pm 7	6.15 \pm 0.03	53 \pm 1	47 \pm 1
HA administered days 1 and 3	8.78 \pm 0.25	1356 \pm 41	6.15 \pm 0.05	53 \pm 2	47 \pm 2
HA Days 1 and 3; CMF days 2 and 4	8.99 \pm 0.05	1335 \pm 38	6.54 \pm 0.17	56 \pm 2	44 \pm 2
CMF administered days 1 and 2	8.90 \pm 0.17	1295 \pm 56	5.63 \pm 0.32	45 \pm 3	56 \pm 3

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 61 -

TABLE 14 Comparison of blood cells as compared to saline treatment group

Cell Type	CMF	CMF/HA	HA 1,3	HA 1,2	HA 1,3 followed by CMF 2,4	Conclusions
Red Blood Cell	NO	NO	NO	NO	NO	
White Blood Cells	8% decrease p=0.003	9% increase p<0.001	NO	NO	6% increase p<0.001	Addition of HA overcomes the reduction in WBC observed in the CMF group
Eosinophils/neutrophils	13% decrease p<0.001	8% increase p=0.007	NO	NO	NO	Co-administration of HA increases polymorphic cell numbers
Monocytes/lymphocytes	20% increase p<0.001	10% decrease p=0.007	NO	NO	NO	
Platelets	NO	NO	NO	6% increase p=0.010	NO	

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 62 -

TABLE 15 Comparison of blood cells as compared to HA/CMF treatment group

Cell Type	Saline	CMF	HA 1,3	HA 1,2	HA 1,3 followed by CMF 2,4	Conclusions
Red Blood Cell	NO	NO	NO	NO	NO	
White Blood Cells	9% decrease p<0.001	17% decrease p<0.001	9% decrease p<0.001	9% decrease p<0.001	3% decrease p=0.012	Addition of HA overcomes the reduction in WBC observed in the CMF group
Eosinophils/neutrophils	9% decrease p=0.007	24% decrease p<0.001	9% decrease p<0.001	9% decrease p<0.001	7% decrease p=0.050	Co-administration of HA increases polymorphic cell numbers
Monocytes/lymphocytes	25% increase p<0.001	10% increase p=0.007	11% increase p<0.001	12% increase p<0.001	9% increase p=0.050	
Platelets	NO	NO	NO	3% increase p<0.001	NO	

Effect of treatment on organ mass

- 5 HA or the addition of HA to CMF resulted in significant enlargement of the spleen when compared to the untreated control (Table 16); pathological examination of the spleen did not demonstrate any abnormal tissue or cellular pathology. HA also appeared to result in a small decrease in heart mass; once again pathological assessment of the tissue did not demonstrate any abnormal pathology. The CMF treatment regimen appeared to generate a
- 10 uterine atrophy that was substantially overcome by the co-administration of HA. CMF also caused an enlargement of the GI-tract.

TABLE 16 Comparison of organ mass as compared to saline untreated control organ masses

Organ	CMF/HA	CMF	HA 1,3	HA 1,2	HA 1,3 followed by CMF 2,4	Conclusions
Spleen	101% larger p<0.001	No	No	No	197% larger p=0.007	Addition of HA to CMF results in spleen enlargement
Heart	14% smaller p=0.013	No	11% smaller p=0.023	16% smaller p=0.029	13% smaller p=0.023	Addition of HA results in a slight decrease in the mass of the heart
Kidneys	10% smaller p=0.001	No	8% smaller p=0.038	No	No	Although a slight difference, HA may affect kidney mass
Uterus	49% smaller p=0.004	102% smaller p=0.001	No	No	97% smaller p=0.001	CMF results in shrinking of the uterus, where HA reduced the toxicity up to 53%
Brain	No	27% larger p=0.001	No	No	22% larger p=0.01	CMF appears to result in a slight brain enlargement which is overcome by co-administration of HA
Liver	No	No	No	No	15% larger p=0.046-	
Bladder	No	No	No	No	No	
GI tract	28% larger p=0.002	27% larger p=0.002	No	No	19% larger p=0.001	CMF appears to result in an enlargement of the GI tract
Lungs	No	26% larger p=0.020	No	No	No	
Stomach	66% larger p=0.006	49% larger p=0.005	No	14% smaller p=0.046	69% larger p=0.002	No significant differences between treatments groups

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 64 -

Effect of treatment on organ pathology

Pathological assessment of the organs of animals treated with CMF showed that the liver did demonstrate some adverse pathology (Table 17). In the liver, areas of focal necrosis and inflammation were observed in the CMF, HA followed by CMF, saline and HA treatment groups. The greatest degree of focal necrosis and inflammation was observed in the CMF groups that received the drug only, or where animals were pre-treated with HA. The addition of HA totally inhibited the necrosis and inflammation of the liver.

TABLE 17 Comparison of treatment on the adverse pathology observed in the lungs and liver

Organ	Saline	CMF/HA	CMF	HA	HA 1,3 followed by CMF 2,4
Liver	25% with areas of focal liver necrosis/ inflammation	No adverse pathology	87.5% with areas of focal liver necrosis/ inflammation	25% with areas of focal liver necrosis/ inflammation	87.5% with areas of focal liver necrosis/ inflammation
Lungs	No adverse pathology	No adverse pathology	No adverse pathology	12.5% with oedema and macrophage infiltrate	No adverse pathology

Effect of treatment on survival

15

The CMF treatment regimen was very toxic: animals died through excessive weight loss. The other treatment groups did not result in toxicity. The co-administration of HA/CMF totally eliminated treatment toxicity, subsequently resulting in a significantly increased survival period (see Table 18 and Figure 16).

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 65 -

TABLE 18 Statistical comparison of the effect of HA/CMF on survival

Treatment	Survival time (days) mean \pm SEM	Statistically significant difference when compared to CMF/HA treatment group (t-test)
HA/CMF administered days 1 and 2	42 \pm 0	Not applicable
Saline	42 \pm 0	No
HA administered days 1 and 2	42 \pm 0	No
HA administered days 1 and 3	42 \pm 0	No
HA Days 1 and 3; CMF days 2 and 4	42 \pm 0	No
CMF administered days 1 and 2	37.38 \pm 2.84	P<0.05

- 5 The foregoing results indicate that the pre- or co-administration of HA with CMF alters the treatment toxicity, while maintaining anti-tumor efficacy.

EXAMPLE 8*Effect of Hyaluronan on Doxorubicin cytotoxicity in*10 *H9C2 rat embryonic cardiomyocytes in vitro*

H9C2 cardiomyocytes were plated at the density of 50,000 cells/ml/well in DMEM with 10% w/v FCS and allowed to settle overnight in 24-well-plates. After 24 hours cells were differentiated for 4 days by growth in 1% w/v FCS. After 4 days, the cells were incubated
 15 for 48 hours in growth media containing 0 μ g/ml, 0.0097 μ g/ml, 0.0195 μ g/ml, 0.03905 μ g/ml, 0.0781 μ g/ml, 0.1562 μ g/ml, 0.3125 μ g/ml, 0.625 μ g/ml, 1.25 μ g/ml, 2.5 μ g/ml and 5 μ g/ml of Dox. Each Dox concentration was done in quadruplets with and without the presence of HA. The molecular weight of HA was 824,000 kD and the concentration used to apply to the cells in presence of Dox was 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M and 10 μ M.

20

After 48 hours of incubation with Dox \pm HA, the cells were washed with Hank's, detached by 0.5 ml Trypsin/EDTA to generate a homogenous single-cell suspension and the cells were suspended in a 15 ml of saline. This 15.5-ml cell suspension was used to count the

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 66 -

cell number using a Coulter counter. Each concentration of Dox ± HA count was expressed as a mean percentage of cell count of No drug/No HA control reading. The results are shown in Figure 17.

- 5 Those skilled in the art will appreciate that the invention described herein is susceptible to variations and modifications other than those specifically described. It is to be understood that the invention includes all such variations and modifications. The invention also includes all of the steps, features, compositions and compounds referred to or indicated in this specification, individually or collectively, and any and all combinations of any two or
- 10 more of said steps or features.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 67 -

BIBLIOGRAPHY

Aghietta, M., Piacibello, W., Sanavio, F., Stacchini, A., Apra, F., Schena, M., Mossetti, C., Carnino F, Caligaris-Cappio, F & Gavosto F. Kinetics of human hemopoietic cells after in vivo administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Invest.* 83: 551-557, 1989.

Anglin, P., Strauss, B.A., & Brandwein, J.M. Prevention of chemotherapy-induced neutropenia using G-CSF with VACOP-B, A case report. *Leuk. Lymphoma*.11: 469-472, 1993.

Billingham, M.E., Mason, J.W., Bristow, M.R., and Daniels, J.R. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Can. Treat. Rep.* 62: 865-872, 1978.

Bodey, G.P., Buckley, M., Sathe, Y.S., Freireich, E.J. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann. Intern. Med.* 64: 328-340, 1966.

Carter, S.K. Adriamycin-a review. *J. Nat. Cancer. Inst.* 55: 1265-1274, 1975.

Claiborne, R.A. and Dutt, A.K. Ioniazid-induced pure red cell aplasia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131(6): 947-949, 1985.

Cohen, A.M., Zsebo, K.M., Inoue, H., Hines, H., Hines, D., Boone, T.C., Chazin, V.R., Tsai, L., Ritch, T., and Souza, L.M. *In vivo* stimulation of granuloipoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2484-2488, 1987.

Cohn, V.H. and Lyle, J., *Anal Biochem.* 14(3): 434-404, 1966.

Dotti, G., Carlo-Stella, C., Mangoni, L., Cottafavi, L., Caramatti, C., Almici, C., and Rizzoli, V. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) prevents dose-limiting

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 68 -

neutropenia in lymphoma patients receiving standard dose chemotherapy. *Haematologica* 80: 142-145, 1995.

Grigg, A., Begley, C.G., Juttner, C.A., Szer, J., To L.B., Maher, D., McGrath, K.M., Morstyn, G., Fox, R.M and Sheridan W.P. Effect of peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 11: 23-29, 1993.

Hryniuk, W.M. The importance of dose intensity in the outcome of chemotherapy. In: *Advances in Oncology: Hellman S, De Vita V, Rosenberg S, Eds., Philadelphia: J.B. Lippincott; pp. 1121-414, 1988.*

Kotake, T., Usami, M., Miki, T., Togashi, M., Akaza, H., Kubota, Y., & Matsumura Y. Effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (lenograstim) on chemotherapy induced neutropenia in patients with urothelial cancer. *Int. J. Urol.* 6: 61-67, 1999.

Lamszus, K., Jin, L., Fuchs, A., Shi, E., Chowdhury, S., Yao, Y., Polverini, P.J., Laterra, J., Goldberg, I.D. and Rosen, E.M. Scatter factor stimulates tumor growth and tumor angiogenesis in human breast cancers in the mammary fat pads of nude mice. *Lab. Invest.* 76(3): 39-353, 1997.

Legras, S., Lévesque, J.P., Charrad, R., Morimoto, K., Le Bousse, C., Clay, D., Jasmin C & Smadja-Joffe F. CD44-mediated adhesiveness of human hematopoietic progenitors to HA is modulated by cytokines. *Blood* 89: 1905-1914, 1997.

Lévesque, J.P., Levesley, D.I., Nutta, S., Vadas, M., & Simmons, P.J. Cytokines increase human haematopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J. Exp. Med.* 181: 1805-1815, 1995.

Maher DW, Lieschke GJ, Green M, Bishop J, Stuart-Harris R, Wolf M, Sheridan WP,

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 69 -

Kefford RF, Cebon J, Oliver I, *et al.* Filgrastim in patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 121: 492-501, 1994.

Mavroudis, D.A., Read, E.J., Mollidrem, J., Raptis, A., Plante, M., Carter, C.S, Phang, S., Dunbar, C.E. and Barrett, A.J. T cell-depleted granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) modified allogeneic bone marrow transplantation for haematological malignancy improves graft CD34+ cell content but is associated with delayed pancytopenia. *Bone Marrow Transplant* 21: 431-440, 1998.

McCord, J.M. and Fridovich, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J. Biol. Chem.* 244(22): 6056-6063, 1969.

Paglia, D.E. and Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70(1): 158-169, 1967.

Pettengell, R., Gurney, H., Radford, J.A., Deakin, D.P., James, R., Wilkinson, P.M., Kane, K., Bentley, J., and Crowther, D. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent dose-limiting neutropenia in non-Hodgkin's lymphoma: a randomized controlled trial. *Blood* 80(6): 430-436, 1992.

Scott, J.E., Cummings, C., Brass, A., and Chen, Y. Secondary and tertiary structures of HA in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. *Biochem. J.* 274: 699-705, 1991.

Shibamoto, Y., Murata, R., Miyauchi, S., Hirohashi, M., Takagi, T., Sasai, K., Shibata, T., Oya, N., and Takahashi, M. Combined effect of clinically relevant doses of emitefur, a new 5-fluorouracil derivative, and radiation in murine tumours. *Br. J. Cancer* 74(11): 1709-1713, 1996.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 70 -

Shimamura, M., Kobayashi, Y., You, A., Urabe, A., Okabe, T., Komatsu, Y., Itoh, S., and Takaku, F. Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic injury in mice induced by 5-fluorouracil. *Blood* 69: 353-355, 1987.

Shimamura, M., Takigawa, T., Urabe, A., Okabe, T., Souza, L.M. and Takaku, F. Synergistic effect of dolichyl phosphate and human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on recovery from neutropenia in mice treated with anti-cancer drugs. *Exp. Hematol.* 16: 681-685, 1988.

Simmons, P.J., Zannettino, A., Gronthos, S., Leavesley, D. Potential adhesion mechanisms for localization of haematopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk. Lymphoma*. 12: 353-363, 1994.

Sheridan, W.P., Begley, C.G., Jutner, C.A., Szer, J., To, L.B., Maher, D., McGrath, K.M., Morstyn, G., and Fox, R.M. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilized by filgrastin (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet* 339: 640-644, 1992.

Watanabe, T., Dave, B., Heimann, D.G., Lethaby, E., Kissinger, A and Talmadge, J.E. GM-CSF mobilized peripheral blood CD34+ cells differ from steady-state bone marrow CD34+ cells in adhesion molecule expression. *Bone Marrow Transplant* 19: 1175-1981, 1997.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 71 -

CLAIMS

1. A method which facilitates the prolonged administration of a dose of chemotherapeutic agent to a subject, wherein said dose is higher than a generally accepted effective dose, said method comprising the pre- and/or co-administration of an effective amount of HA.
2. The method of Claim 1 wherein a single dose may be up to 200% higher and/or a cumulative dose may be up to 600% higher than the dose is up to 200% higher than the generally accepted effective dose
3. The method of Claim 2 wherein the dose of chemotherapeutic agent is from about 10% to about 150% higher than the generally accepted effective dose.
4. The method of Claim 3 wherein the dose of chemotherapeutic agent is from about 35% to about 100% higher than the generally accepted effective dose.
5. The method of any one of Claims 1 to 4 wherein HA and the chemotherapeutic agent are simultaneously administered.
6. The method of any one of Claims 1 to 4 wherein HA is administered from about 24 hours to about 5 minutes before the chemotherapeutic agent.
7. The method of any one of Claims 1 to 4 wherein HA is administered from about 12 hours to about 10 minutes before the chemotherapeutic agent.
8. The method of any one of Claims 1 to 4 wherein HA is administered about half an hour before the chemotherapeutic agent.
9. The method of any one of Claims 1 to 8 wherein the effective amount of HA is from about 0.5 mg to about 20 mg per kilogram body weight per day.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 72 -

10. The method of any one of Claims 1 to 8 wherein the effective amount of HA is from about 5 mg to about 10 mg per kilogram body weight per day.

11. A method for the prolonged treatment of a subject with a dose of a chemotherapeutic in a single dose may be up to 200% higher and/or the cumulative dose may be up to 600% higher than a generally accepted effective dose, said method comprising pre- and/or co-administering an effective amount of HA with said chemotherapeutic agent.

12. The method of Claim 12 wherein the dose of chemotherapeutic agent is from about 10% to about 150% higher than the generally accepted effective dose.

13. The method of Claim 13 wherein the dose of chemotherapeutic agent is from about 35% to about 100% higher than the generally accepted effective dose.

14. The method of any one of Claims 11 to 13 wherein HA and the chemotherapeutic agent are simultaneously administered.

15. The method of any one of Claims 11 to 13 wherein HA is administered from about 24 hours to about 5 minutes before the chemotherapeutic agent.

16. The method of any one of Claims 11 to 13 wherein HA is administered from about 12 hours to about 10 minutes before the chemotherapeutic agent.

17. The method of any one of Claims 11 to 13 wherein HA is administered about half an hour before the chemotherapeutic agent.

18. The method of any one of Claims 11 to 17 wherein the effective amount of HA is from about 0.5 mg to about 20 mg per kilogram body weight per day.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

- 73 -

19. The method of any one of Claims 11 to 17 wherein the effective amount of HA is from about 5 mg to about 10 mg per kilogram body weight per day.

20. Use of HA in the manufacture of a medicament for pre- or co-administration with a chemotherapeutic agent in the treatment of a malignant condition.

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

1/19

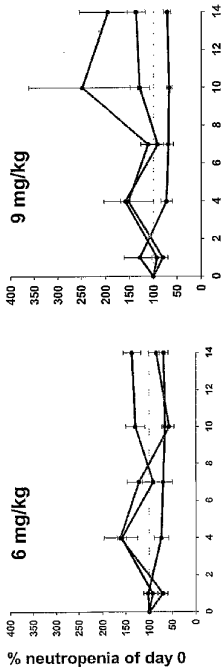


Figure 1A

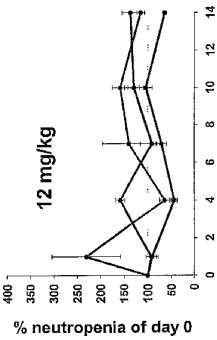


Figure 1C

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

2/19

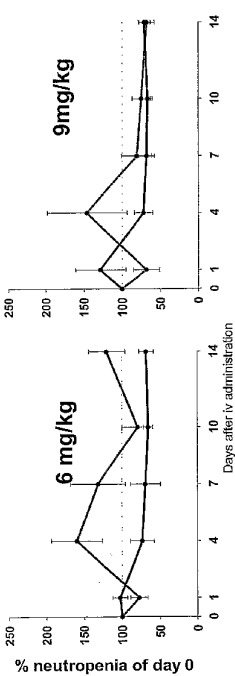


Figure 2A

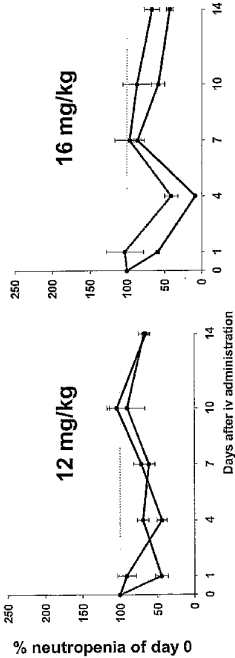


Figure 2B

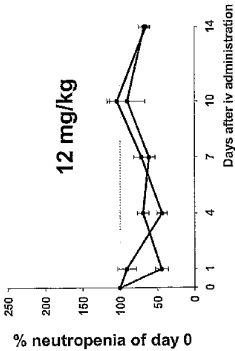


Figure 2C

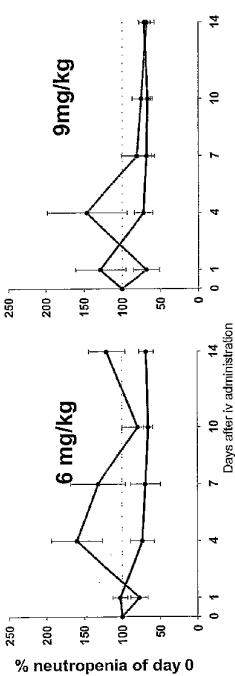


Figure 2D

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

3/19

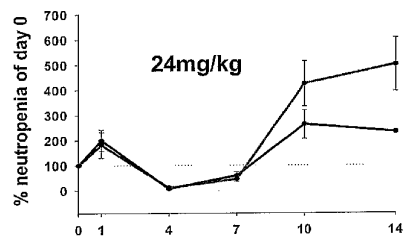


Figure 2E

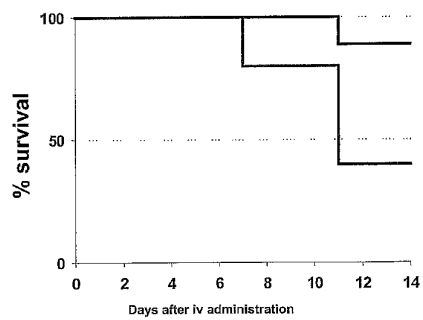
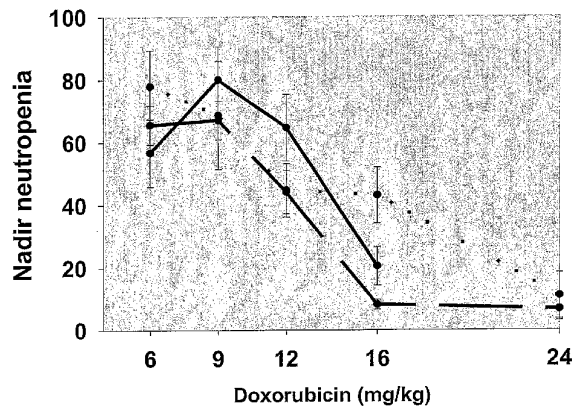


Figure 3

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

4/19

**Figure 4**

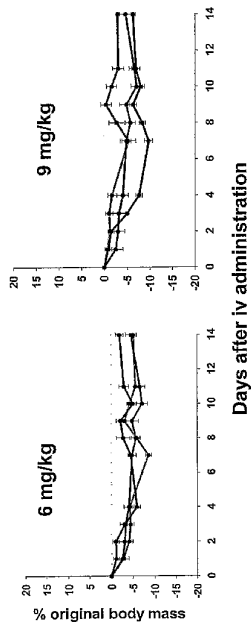


Figure 5A

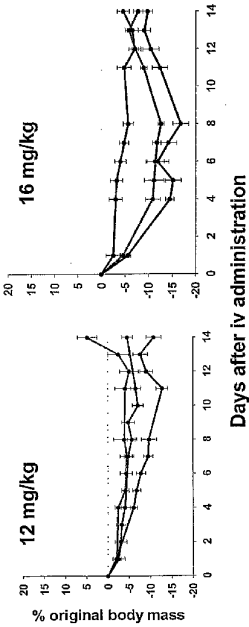


Figure 5B

Figure 5C

Figure 5D

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

6/19

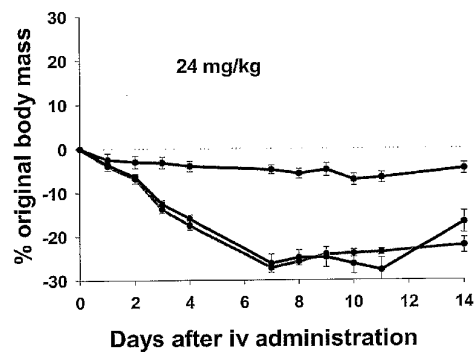


Figure 5E

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

7/19

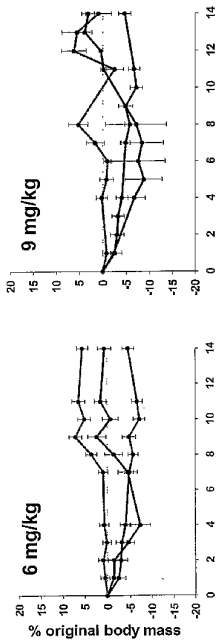


Figure 6A

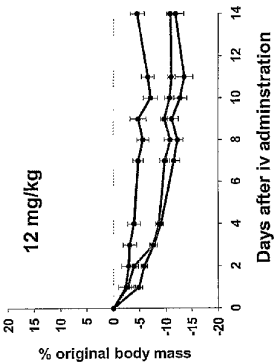


Figure 6B

Days after iv administration

Figure 6C

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

8/19

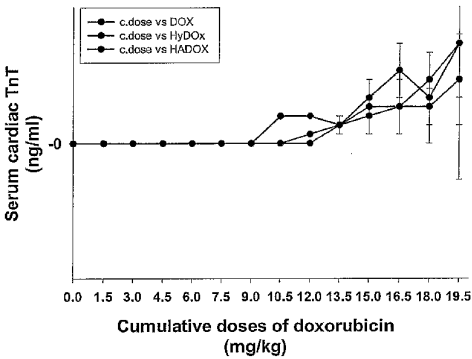


Figure 7

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

9/19



Figure 8A



Figure 8B

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

10/19

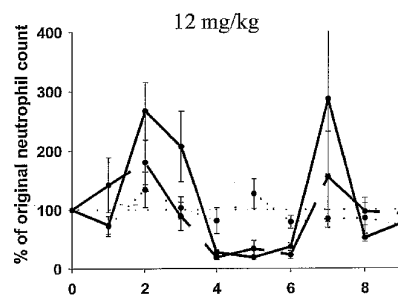


Figure 9A

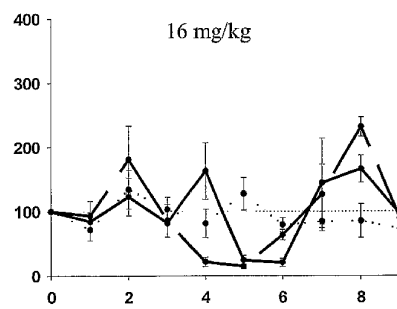


Figure 9B

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

11/19

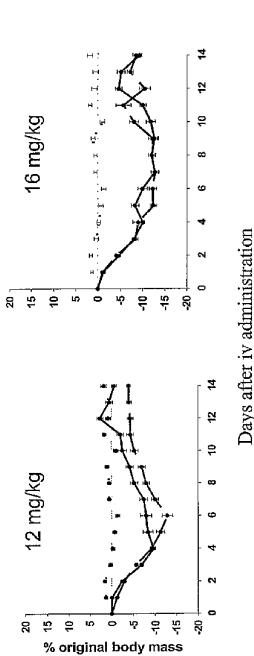


Figure 10A

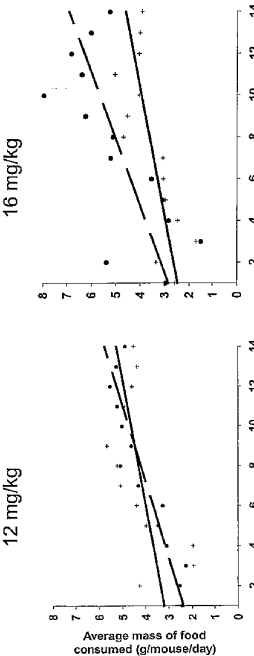


Figure 10B

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

12/19

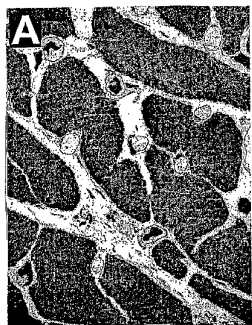


Figure 11A

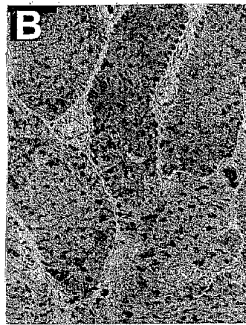


Figure 11B

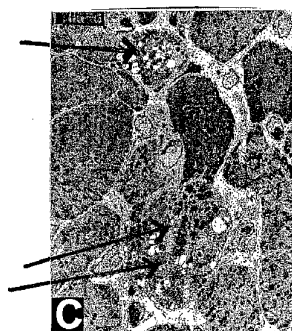


Figure 11C

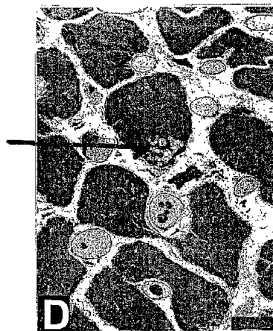


Figure 11D

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

13/19



Figure 12A

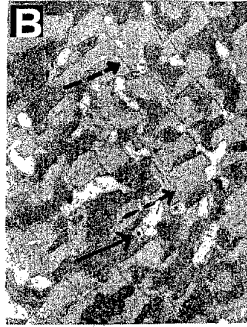


Figure 12B

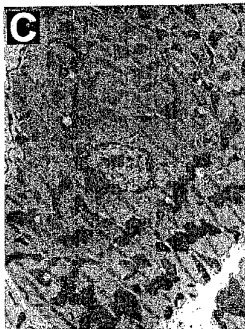


Figure 12C

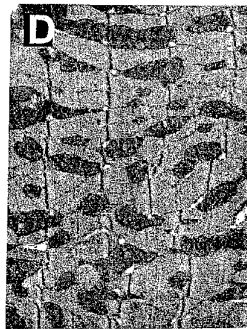
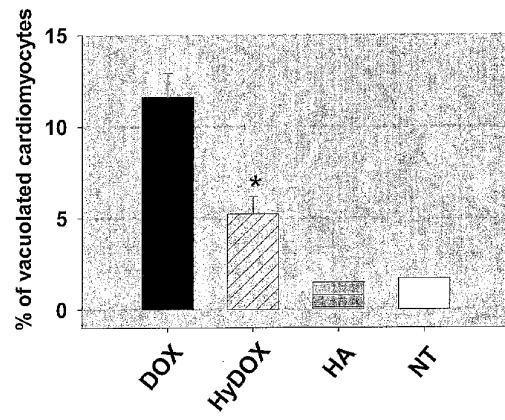


Figure 12D

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

14/19

**Figure 13**

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

15/19

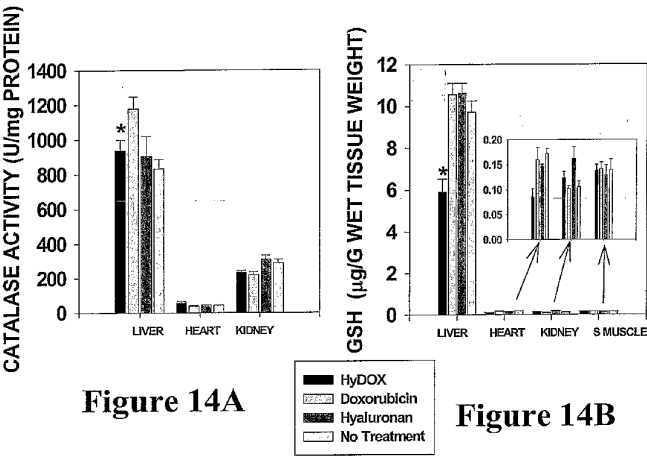


Figure 14A

Figure 14B

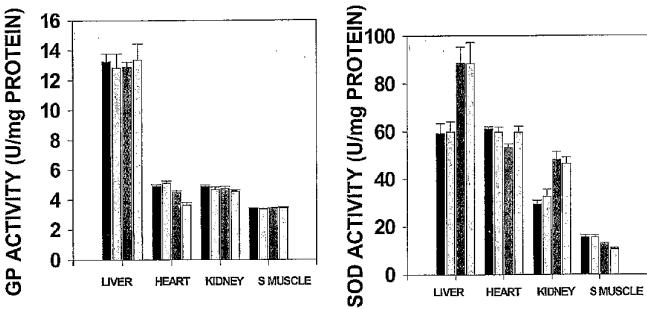


Figure 14C

Figure 14D

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

16/19

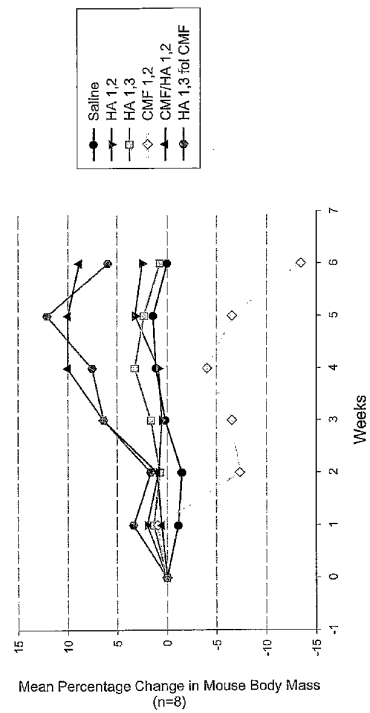


Figure 15A

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

17/19

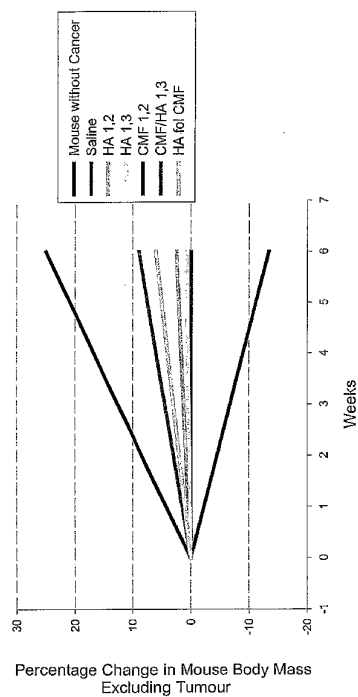


Figure 15B

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

18/19

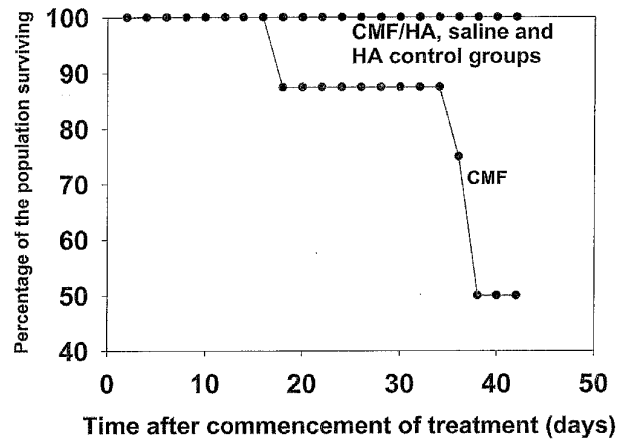


Figure 16

WO 03/018062

PCT/AU02/01160

19/19

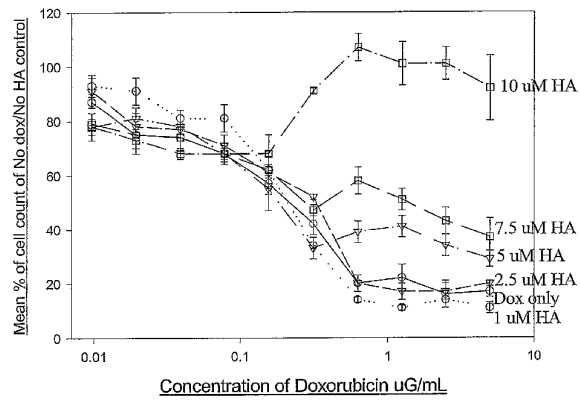



Figure 17

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01160
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : A61K 47/36, A61P 35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC AS ABOVE		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPAT, CAPLUS, MEDLINE; keywords: hyaluronic acid, hyaluronan, HA, cancer, chemohera+		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/41730 A (MEDITECH RESEARCH LIMITED) 20 July 2000. Whole document.	1-20
X	WO 97/40841 A (HYAL PHARMACEUTICAL CORPORATION) 6 November 1997. Whole document.	1-20
X	WO 91/04058 A (NORPHARMCO INC) 4 April 1991. Whole document.	1-20
<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 "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 October 2002		Date of mailing of the international search report 14 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer  G.R. PETERS Telephone No : (02) 6283 2184

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01160
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CA 2089621 A (NORPHARMCO INC) 17 August 1994, Whole document.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU02/01160

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
WO	97/40841	AU	25644/97	CA	2175282	ZA	9703622
WO	91/04058	AU	14850/97	AU	64330/90	AU	52274/93
		BR	2042034	CN	1051503	EP	445255
		EP	656213	US	5827834	US	5830882
		US	5985851	US	5990095	US	6022866
END OF ANNEX							

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 トレイシー・ジーン・ブラウン

オーストラリア 3 0 3 1 ビクトリア州フレミントン、ノーウッド・ストリート 2 3 番

(72)発明者 リチャード・マーク・フォックス

オーストラリア 3 0 0 2 ビクトリア州イースト・メルボルン、ポーレット・ストリート 1 7 1 番

Fターム(参考) 4C076 CC27 EE30M FF31

4C084 AA18 NA12 ZB261

4C086 AA01 AA02 EA10 MA02 MA05 NA12 ZB26