

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6608431号  
(P6608431)

(45) 発行日 令和1年11月20日(2019.11.20)

(24) 登録日 令和1年11月1日(2019.11.1)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745 ZMD
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 9/107

請求項の数 5 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2017-511261 (P2017-511261)	(73) 特許権者	000004086
(86) (22) 出願日	平成27年8月24日 (2015. 8. 24)		日本化薬株式会社
(65) 公表番号	特表2017-530951 (P2017-530951A)		東京都千代田区丸の内二丁目1番1号
(43) 公表日	平成29年10月19日 (2017.10.19)	(74) 代理人	110001173
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/001683		特許業務法人川口国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W02016/030748	(72) 発明者	齋藤 電太
(87) 国際公開日	平成28年3月3日 (2016. 3. 3)		宮城県仙台市東北大学脳神経外科気付
審査請求日	平成30年6月6日 (2018. 6. 6)	(72) 発明者	富永 悌二
(31) 優先権主張番号	62/041, 372		宮城県仙台市東北大学脳神経外科気付
(32) 優先日	平成26年8月25日 (2014. 8. 25)	審査官	原口 美和
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳腫瘍に対するSN-38装填ミセルのCED

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

NK012を含む頭蓋内脳腫瘍治療剤であって、  
前記NK012はSN-38を放出するものであり、  
前記頭蓋内脳腫瘍治療剤は、対流増強送達系を介して中枢神経系に投与するためのもの  
であることを特徴とする、頭蓋内脳腫瘍治療剤。

【請求項2】

対流増強送達系が浸透圧ポンプである、請求項1に記載の頭蓋内脳腫瘍治療剤。

【請求項3】

対流増強送達系が注入ポンプである、請求項1に記載の頭蓋内脳腫瘍治療剤。

【請求項4】

頭蓋内脳腫瘍が悪性神経膠腫である、請求項1から3のいずれか一項に記載の頭蓋内脳腫瘍治療剤。

【請求項5】

頭蓋内脳腫瘍治療剤が、頭蓋内脳腫瘍領域に投与される、請求項1から4のいずれか一  
項に記載の頭蓋内脳腫瘍治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権が、2014年8月25日出願の米国特許仮出願第62/041,372号に対

して主張され、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、ヒトの中樞神経系(CNS)へのSN-38装填ポリマーミセルの効率的な送達に一般に関する。特に、本発明は、頭蓋内脳腫瘍、より詳細には悪性神経膠腫の治療のための化学療法に関する。

【背景技術】

【0003】

神経膠芽種のような悪性脳腫瘍は、外科的切除、放射線療法および全身化学療法を含む集中的な集学的治療にもかかわらず、依然として治療することが困難な新生物として残されている。全身化学療法は、血管脳関門への浸透が不十分であるので、高用量の多くの抗癌薬を必要とする(Groothuis DR. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro Oncol.* 2000年; 2(1): 45-59頁を参照すること。また、Huynh GH、Deen DF、Szoka FC Jr. Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors. *J Control Release.* 2006年; 110(2): 236-259頁を参照すること。)。したがって、全身的な副作用が脳腫瘍を有する患者における化学療法プロトコールにとっての制限因子であり、ヒト神経膠芽種の治療における効率的で特定の送達方法の必要性が強調されている。

【0004】

対流増強送達(CED)は、作用物質を連続陽圧注入に基づいて腫瘍および周囲の実質に直接送達することによって血液脳関門を迂回する送達系である(Bobo RH、Lasker DW、Akbasak A、Morrison PF、Dedrick RL、Oldfield EH. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994年; 91(6): 2076-2080頁を参照すること。)。CEDは、濃度勾配により誘導される拡散伝播のみならず、連続陽圧注入によっても駆動されるので、大量の分布を達成することができる(Chen MY、Lonsner RR、Morrison PF、Governale LS、Oldfield EH. Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg.* 1999年; 90(2): 315-320頁を参照すること。)。重要なことは、CEDにより腫瘍床(tumor bed)への直接的な到達手段が提供されることから、薬物の高い局所濃度がもたらされるとともに全身吸収は最小限であることである(Yun J、Rothrock RJ、Canoll P、Bruce JN. Convection-enhanced delivery for targeted delivery of antiglioma agents: the translational experience. *J Drug Deliv.* 2013年; 2013: 107573を参照すること。)。現在、CEDは、パーキンソン病(Eberling JL、Jagust WJ、Christine CWら、Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology.* 2008年; 70(21): 1980-1983頁を参照すること。また、Gill SS、Patel NK、Hotton GRら、Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med.* 2003年; 9(5):

10

20

30

40

50

589 - 595頁を参照すること。)および神経腫瘍学(Kunwar S. Convection enhanced delivery of IL13-PE38QQR for treatment of recurrent malignant glioma: presentation of interim findings from ongoing phase 1 studies. *Acta Neurochir Suppl.* 2003年; 88: 105 - 111頁を参照すること。また、Mardor Y、Roth Y、Lidar Zら、Monitoring response to convection-enhanced taxol delivery in brain tumor patients using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 2001年; 61(13): 4971 - 4973頁を参照すること。)のような神経変性疾患の治療において臨床試験されている

10

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

【非特許文献1】Groothuis DR. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro Oncol.* 2000年; 2(1): 45 - 59頁

【非特許文献2】Huynh GH、Deen DF、Szoka FC Jr. Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors. *J Control Release.* 2006年; 110(2): 236 - 259頁

20

【非特許文献3】Bobo RH、Laske DW、Akbasak A、Morrison PF、Dedrick RL、Oldfield EH. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994年; 91(6): 2076 - 2080頁

【非特許文献4】Chen MY、Lonser RR、Morrison PF、Governale LS、Oldfield EH. Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg.* 1999年; 90(2): 315 - 320頁

30

【非特許文献5】Yun J、Rothrock RJ、Canoll P、Bruce JN. Convection-enhanced delivery for targeted delivery of antiglioma agents: the translational experience. *J Drug Deliv.* 2013年; 2013: 107573

40

【非特許文献6】Eberling JL、Jagust WJ、Christine CWら、Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology.* 2008年; 70(21): 1980 - 1983頁

【非特許文献7】Gill SS、Patel NK、Hotton GRら、Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med.* 2003年; 9(5): 589 - 595頁

【非特許文献8】Kunwar S. Convection enhanced delivery of IL13-PE38QQR for treatment of r

50

recurrent malignant glioma: presentation of interim findings from ongoing phase 1 studies. *Acta Neurochir Suppl.* 2003年; 88: 105 - 111頁

【非特許文献9】Mardor Y、Roth Y、Lidar Zら、Monitoring response to convection-enhanced taxol delivery in brain tumor patients using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 2001年; 61(13): 4971 - 4973頁

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

技術的課題

しかし、CEDを介した治療剤の投与は、作用物質の正確で一貫した送達を含む様々な課題を有する(Sawamura Y、Shirato H、de Tribolet N. Recent advances in the treatment of central nervous system germ cell tumors. *Adv Tech Stand Neurosurg.* 1999年; 25: 141 - 159頁を参照すること。)。したがって、本発明の発明者らは、再現性のある送達プロファイルを提供することができ、用量制限的な全身性または神経毒性を引き起こすことなく予後

20

を改善することができる、CEDによって送達される新たな治療剤の設計に焦点を合わせている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

課題の解決手段

NK012は、両親媒性ブロックコポリマーであるポリ(エチレングリコール) - ポリ(アミノ酸)(SN-38)の自己集合により水性培地において構築される新規のSN-38装填ポリマーミセルである(Koizumi F、Kitagawa M、Negishi Tら、Novel SN-38-incorporating polymeric micelles、NK012、eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res.* 2006年; 66(20): 10048 - 10056頁を参照すること。)。SN-38はイリノテカンの活性代謝産物であり、イリノテカンはカンプトテシンの類縁体である。NK012は薬物送達系として分類されており、いくつかの前臨床および臨床研究は製剤が浸透性および保持効果の増強に起因して固形腫瘍組織に選択的に蓄積し、長時間存続すると思われることを示している(Matsumura Y. Preclinical and clinical studies of NK012、an SN-38-incorporating polymeric micelles、which is designed based on EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011年; 63(3): 184 - 192頁を参照すること。)。全身投与されたNK012は、脳腫瘍に対して抗腫瘍効果を有するが(Kuroda J、Kuratsu J、Yasunaga M、Koga Y、Saito Y、Matsumura Y. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle、NK012、against malignant glioma. *Int J Cancer.* 2009年; 124(11): 2505 - 2511頁を参照すること。また、Kuroda J、Kuratsu J、Yasunaga Mら、Antitumor effect of NK012、a 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin-incorporating polymeric

30

40

50

c micelle、on U87MG orthotopic glioblastoma in mice compared with irinotecan hydrochloride in combination with bevacizumab. Clin Cancer Res. 2010年; 16(2): 521-529頁を参照すること。) 、初期局所脳送達に最適な方法は、確立されていない。

【0008】

本発明者らは、齧歯類同所性脳腫瘍モデルにおいてCEDにより送達されたNK012の分布プロファイルと治療効果とを比較し、CEDを介したNK012が齧歯類脳腫瘍モデルにおいて生存期間を有意に延長することを見出した。

【0009】

本発明の第1の態様によると、SN-38装填ポリマーミセルを対象に送達するための方法であって、SN-38装填ポリマーミセルを、対流増強送達系を介して対象の中樞神経系に投与するステップを含む方法が提供される。この態様において、対流増強送達系は、浸透圧ポンプまたは注入ポンプである。対象はヒトである。加えて、SN-38装填ポリマーミセルは、対象の脳の標的領域に投与される。

【0010】

本発明の第2の態様によると、SN-38装填ポリマーミセルを、頭蓋内脳腫瘍を有する対象に送達するための方法であって、SN-38装填ポリマーミセルを、対流増強送達系を介して対象の中樞神経系に投与するステップを含み、SN-38装填ポリマーミセルが、SN-38およびブロックコポリマーを含む方法が提供される。この態様において、頭蓋内脳腫瘍は悪性神経膠腫である。加えて、SN-38装填ポリマーミセルは、対象の脳の標的領域に投与される。

【0011】

本発明の第3の態様によると、対象の頭蓋内脳腫瘍を治療するための方法であって、(a) SN-38装填ポリマーミセルを含む調製物を提供するステップおよび(b)調製物を、対流増強送達系を介して対象の中樞神経系に投与するステップを含み、SN-38装填ポリマーミセルがSN-38を放出し、SN-38が、頭蓋内脳腫瘍の治療に適した治療効果を対象にもたらす方法が提供される。この態様において、頭蓋内脳腫瘍は悪性神経膠腫である。

【0012】

本発明の第4の態様によると、対流増強送達系を対象に使用するための方法であって、SN-38装填ポリマーミセルを含有する調製物を対象の頭蓋腔に送達するステップを含む方法が提供される。この態様において、対流増強送達は、浸透圧ポンプまたは注入ポンプである。

【0013】

本発明のこれらおよび他の特徴および利点は、以下の発明を実施するための形態および添付の図面に関連して考慮したとき容易に理解され、図中、同様の名称は様々な図面において同様の要素を示す。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ヒト、ラットおよびマウスの神経膠腫細胞におけるNK012のインビトロ増殖阻害活性を示すグラフである。

【図2A】正常なラットにおけるNK012の分布の評価を示す。CEDによりラット脳の線条体に注入された遊離SN-38(0.2mg/ml、20μl)の分布を示す画像である。

【図2B】正常なラットにおけるNK012の分布の評価を示す。CEDによりラット脳の線条体に注入されたNK012(0.2mg/ml、20μl)の分布を示す画像である。

【図2C】正常なラットにおけるNK012の分布の評価を示す。NK012および遊離SN-38が注入された後の分布の平均体積を示すチャートである。

10

20

30

40

50

【図3】2.0 mg/ml 溶液としての0.04 mgのNK012のCEDが無処置の線条体に局所注入された後の、脳組織における代表的な組織学的変化を示す。

【図4A】齧歯類同所性脳腫瘍モデルにおけるNK012のCEDの効果を示すグラフである。5%のグルコース、遊離SN-38およびNK02の単回CED注入による、9Lの腫瘍を有するラットにおける結果を示す。

【図4B】齧歯類同所性脳腫瘍モデルにおけるNK012のCEDの効果を示すグラフである。U87MG腫瘍細胞が移植され、腫瘍移植の5日後にNK012を受けた動物の結果を示す。

【図5A】CEDを使用してラット脳に同時投与されたGdの多重蛍光およびMR画像を含む一連の画像を示す。

【図5B】MRIデータおよび組織学的蛍光データに基づいて計算された分布体積を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、以下の手順によって実施される。

【0016】

材料および方法

薬物および細胞系

SN-38を、Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) から購入し、貯蔵溶液として、ジメチルスルホキシド (Sigma-Aldrich Co. ) に40 mg/mlで溶解した。NK012は、日本化薬株式会社 (東京、日本) から提供を受けた。注入溶液を、5%グルコース溶液から調製した。ヒトの神経膠芽種細胞系U87MG、ラットの神経膠芽種細胞系9Lおよび神経膠芽種細胞系F98、ならびにマウスの神経膠腫細胞系GL261 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) を、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA) および1%のペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen) を含有する基本培地中において、5%CO<sub>2</sub>の存在下、37℃で培養した。

【0017】

インビトロ細胞障害性アッセイ

インビトロ細胞増殖を、水溶性テトラゾリウム (WST) アッセイにより測定した。簡潔には、細胞 (5 × 10<sup>3</sup> 細胞/ウエル) を96ウエルプレートにおいて三重に平板培養し、24時間にわたって結合させ、次に増殖培地を、様々な濃度のNK012を含有する新たな培地に交換した。72時間インキュベートした後、10%のWST-8処理溶液 (Cell Counting Kit-8 (登録商標); 株式会社同仁化学研究所、熊本、日本) を各ウエルに加え、続いて1時間インキュベートした。次に450 nmでの吸光度を、96ウエル分光光度プレートリーダー (SpectraMax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) によって測定した。細胞生存度を三重に測定し、3回繰り返した。データを平均化し、未処理対象に対して標準化して、用量応答曲線を生成した。生細胞の数を、以下の式を使用して計算した。

対照% = (それぞれの吸光度 - ブランクウエルの吸光度) / 対照ウエルの吸光度 × 100。

【0018】

動物

12週齢の雄フィッシャー344ラットを、日本エスエルシー株式会社 (浜松、静岡、日本) から購入した。8週齢の雄無胸腺ヌードラット (F344/NJcl-rnu/rnu) を、日本クレア株式会社 (東京、日本) から購入した。動物研究に使用したプロトコールは、東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設 (Institute for Animal Experimentation of Tohoku University Graduate School of Medicine) により承認され

10

20

30

40

50

た。

【0019】

頭蓋内腫瘍移植

フィッシャー344ラットを9Lモデルに使用し、F344/NJcl-rnu/rnu(ヌード)ラットをU87MGモデルに使用した。9LおよびU87MGの細胞を、以前に記載されたように得た(Saito R、Bringas JR、Panner Aら、Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model. Cancer Res. 2004年; 64(19): 6858-6862頁を参照すること。)。簡潔には、9LおよびU87MGの細胞を、トリプシン-EDTAの使用により採取し、続いて完全培地で1回洗浄し、移植のために冷リン酸緩衝食塩水(PBS)に再懸濁した。PBSの10 $\mu$ lあたり $1 \times 10^4$ (9L)または $2 \times 10^5$ (U87MG)の細胞を含有する細胞懸濁液を、ラット脳の線条体領域への移植に使用した。深いイソフルラン麻酔下において、ラットを小動物用定位フレーム(David Kopf Instruments, Tujunga, CA)に入れた。矢状切開を皮膚に開けて、頭蓋を露出させ、穿頭孔を、小型歯科用ドリルの使用により頭蓋の十字縫合から0.5mm前方および3mm側方に開けた。5マイクロリットルの細胞懸濁液を、脳の表面から4.5mmの深さに注射した。2分間待った後、更に5 $\mu$ lを4mmの深さに注射した。最後に2分間待った後、針を取り出し、創傷を縫合糸により閉じた。

10

20

【0020】

CED

注入は、以前に記載されたCED方法を使用して実施した(Saito R、Bringas JR、McKnight TRら、Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging. Cancer Res. 2004年; 64(7): 2572-2579頁を参照すること。また、Kikuchi T、Saito R、Sugiyama Sら、Convection-enhanced delivery of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin: characterization and efficacy in rat intracranial glioma models. J Neurosurg. 2008年; 109(5): 867-873頁を参照すること。)。簡潔には、微小注入ポンプ(microinfusion pump)(BeeHive; Bioanalytical System, West Lafayette, IN)に装着された1mlシリンジに接続した無還流段階設計注入カニューレ(reflux-free step-design infusion cannula)を使用して、注入速度を制御した。深いイソフルラン麻酔下において、ラットを小動物用定位フレーム(株式会社ナリシゲ、東京、日本)に入れた。矢状切開を開けて、頭蓋を露出させ、続いて穿頭孔を、小型歯科用ドリルの使用により頭蓋の十字縫合から0.5mm前方および3mm側方の位置に開けた。以下の上昇注入速度を適用して、20 $\mu$ lの総注入体積を達成した。0.2 $\mu$ l/分で15分間、0.5 $\mu$ l/分で10分間および0.8 $\mu$ l/分で15分間。

30

40

【0021】

蛍光顕微鏡法によるラット脳組織におけるNK012およびSN-38分布の評価

正常なフィッシャー344ラット(各群に3匹のラット)は、NK012および遊離SN-38(2mg/mlのSN-38当量の20 $\mu$ lの溶液)の使用によりCEDを受け、CEDの直後に安楽死させた。一連の冠状組織切片(厚さ20 $\mu$ m)を、Tissue

50

- Tek Cryo3 (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA) の使用により調製し、凍結切片を、蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ9000 (株式会社キーエンス、大阪、日本) により、377 nm の励起波長および 447 nm の発光波長で検査して、組織内の NK012 の分布を評価した。画像データを BZ-III Analyzer 1.10 ソフトウェア (キーエンス) の使用により記録した。

#### 【0022】

##### NK012 の毒性評価

およそ 250 g の重さの 4 匹の健康な雄フィッシャー 344 ラットは、NK012 (2.0 mg/ml の遊離 SN-38 当量の 20  $\mu$ l の溶液) の使用により CED を受けた。ラットを、生存期間、ならびに注意力、毛づくろい、摂食、排泄物、皮膚、毛皮、粘液、膜の状態、歩行運動、呼吸および姿勢を含む一般的な健康について毎日モニターした。ラットにジエチルエーテルで深く麻酔をかけ、CED 処理の 14 日後に、0.9% 食塩水、続いて冷 4% パラホルムアルアルデヒドを心臓を通して灌流 (transcardially perfused) した。脳を取り出し、同じ固定剤により 4 晩で一晩にわたって後固定し、パラフィン切片 (4  $\mu$ m) を作製し、ヘマトキシリンおよびエオシン染色により組織学的に検査した。

10

#### 【0023】

##### 9L および U87MG の同所性脳腫瘍モデルにおける生存率研究

9L 腫瘍細胞を移植した 20 匹のラットを、腫瘍細胞移植の 5 日後に 3 つの群に無作為に分け、以下のように処理した。(1) 対照として PBS (n=7) の CED、(2) 遊離 SN-38 (n=7) の CED および (3) NK012 (n=6) の CED。U87MG 腫瘍細胞を移植した 14 匹のラットを、腫瘍細胞移植の 5 日後に 2 つの群に無作為に分け、以下のように処理した。(1) 対照として PBS (n=7) の CED および (2) NK012 (n=7) の CED。CED 注入を、対照群では 20  $\mu$ l の 5% グルコース、NK012 群では 20  $\mu$ l の 5% グルコース中 40  $\mu$ g の NK012 および SN-38 群では、50% ジメチルスルホキシドの 20  $\mu$ l の 5% グルコース中溶液中の 40  $\mu$ g の遊離 SN-38 から構成した。他の全てのラットを、生存期間について毎日モニターした。生存期間を、ログランク検定の使用により処理群の間で比較した。推定生存率を、プランメイヤール曲線により表した。

20

#### 【0024】

##### NK012 分布を可視化するガドリニウム (Gd) の同時注入

6 匹のラットには、20  $\mu$ l の Gd-ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (5 mM) を、2 mg/ml の NK012 と共に線条体に同時注入した。注入のおよそ 1 時間後に、直径 38 mm のバードケージ型コイル (birdcage coil) を有する 7.0 テスラ PharmaScan System (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany) の使用により、MRI を実施した。最初に各ラットには、4% のイソフランおよび空気/酸素混合物 (7:3) で麻酔をかけた。イソフランレベルを、MRI の際に  $2.0 \pm 0.5\%$  に低下した。MRI の全体にわたって、動物の体温をフィードバック制御温風システム (SA Instruments, Stony Brook, NY) により  $36 \pm 1$  に保った。呼吸および直腸温度を、小動物モニタリングシステム (SA Instruments) により連続してモニターした。注入部位での NK012 と Gd の分布体積の関係を調査するため、MR 画像に基づいた Gd 分布体積を、ヒト入力シードポイント (human-entered seed point) により目的の三次元領域 (ROI) を成長させる閾値セグメンテーション (threshold-based segmentation) を使用する Osirix (Osirix Foundation, Geneva, Switzerland) を用いて計算した。用いた低閾値を、反対側に対して最大 60% 増加した。「ROI」ドロップダウンメニューの「Grow Region (2D/3D セグメンテーション)」ツールは、Gd 分布の自動的なアウトライン化を可能にした。

30

40

#### 【0025】

50

NK012分布の組織学的評価では、ラットをそれぞれのMRIセッションの直後に安楽死させた。脳を採取し、氷冷イソペンタンを使用して新鮮なままで凍結し、Tissue-Tek Cryo3 (Sakura Finetek USA, Inc.) を使用して一連の冠状切片 (20  $\mu$ m) に切断した。SN-38により生成された蛍光シグナルを、蛍光顕微鏡BIOREVO BZ9000 (キーエンス) により、377 nmの励起波長および447 nmの発光波長で可視化して、NK012の分布を評価した。画像データをBZ-II Analyzer 1.10ソフトウェア (キーエンス) を用いて記録した。NK012の分布体積を、ImageJソフトウェアの使用により分析した。蛍光顕微鏡画像によって決定されたNK012の分布体積を、7.0テスラMRIにより検出されたGdの分布体積と比較した。

10

#### 【0026】

##### 統計分析

統計分析を、GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) の使用により実施した。全ての実験を3回繰り返し、2つの試料の比較における差を、スチューデントt検定により決定した。生存率分析を、カプランマイヤー曲線およびログランク検定の使用により実施した。有意性は $P < 0.05$ によって決定した。

#### 【0027】

##### 結果

##### インビトロにおけるNK012の効力

WSTアッセイは、神経膠腫細胞系のU87MG、9L、F98およびGL261の増殖が、NK012によって強力に阻害されたことを示した。NK012の最大半量阻害濃度は、U87MG、9L、F98およびGL261の細胞系において、それぞれ0.154、0.196、0.184および0.1511  $\mu$ Mであった。(図1)。

20

#### 【0028】

図1は、ヒト、ラットおよびマウスの神経膠腫細胞におけるNK012のインビトロ増殖阻害活性を示す。U87MG、9L、F98およびGL261の細胞を、96ウエルプレートに入れ、様々なNK012 (0 - 6  $\mu$ M) 濃度により72時間にわたって処理した。72時間インキュベートした後、10%のCCK-8試薬を各ウエルに加え、続いて37で1時間インキュベートし、次に450 nmでの吸光度を96ウエル分光光度プレートリーダーにより測定した。細胞生存度を三重に測定し、3回繰り返した。データを平均化し、未処理対象に対して標準化して、用量応答曲線を生成した。

30

#### 【0029】

##### 正常なラット脳におけるNK012およびSN-38の分布

遊離SN-38の分布 (図2A) は、CEDが正常なラット線条体に入った後に完全に制限されたが、NK012の分布 (図2B) は、拡散的であり、広範囲に及んだ。図2Aは、遊離SN-38 (A) の分布を示し、一方、図2Bは、CEDによりラット脳の線条体に注入されたNK012 (0.2 mg/ml, 20  $\mu$ l) の分布を示す。動物を、注入の直後に安楽死させ、一連の切片を、クリオスタット (厚さ20  $\mu$ m、間隔1 mm) の使用により得た。明視野画像は、脳組織を明らかにし (上側)、蛍光顕微鏡により可視化された同じ切片では、紫外線下でSN-38により生成された蛍光が検出される (下側)。代表的なラットから得た一連の画像を図2Aおよび2Bに示す。遊離SN-38およびNK012の平均分布体積は、それぞれ17.00  $\pm$  2.65および79.39  $\pm$  12.99  $\text{mm}^3$  であった ( $P < 0.0001$ 、図2C)。局所的な脳損傷の増加が、遊離SN-38を受けた脳において見出されたことに留意すること。

40

#### 【0030】

##### 正常なラット脳におけるNK012の毒性

40  $\mu$ gのNK012のCED注入を受けたラットは、神経症状を有することなく生存し、CEDの14日後に安楽死させた。脳切片 (4  $\mu$ m) を、ヘマトキシリンおよびエオシン染色のために得た。組織学的研究は、針跡による僅かな組織損傷のみを明らかにした

50

(図3)。すなわち、ラットは神経症状を有することなく、無視できるほどの組織損傷によって生存した。

#### 【0031】

9LおよびU87MGの同所性脳腫瘍モデルにおけるCEDにより送達されたNK012の抗腫瘍効力

最初に、9L同所性脳腫瘍モデルのラットの生存期間を試験した。PBSを受けた対照群のラットは、腫瘍進行を示す神経症状のため、腫瘍細胞移植の19～31日後に全て安楽死させた(図4A)。この群の生存期間中央値は、29日間であった。0.04mgのSN-38をCEDにより受けたSN-38群のラットは、腫瘍関連症状のため、移植の24～30日後に安楽死させた(平均生存期間28日間、 $P = 0.2846$ 、ログランク検定)。0.04mgのNK012をCEDにより受けたNK012群のラットは、27～44日間生存した。この群の生存期間中央値は、42日間であった(対照群と比較して $P = 0.0063$ 、SN-38群と比較して $P = 0.0045$ 、ログランク検定)。

#### 【0032】

続いて、U87MG脳腫瘍移植片を有するラットの生存期間を試験した。対照群のラットは、腫瘍進行を示す神経症状のため、移植の15～23日後に安楽死させた(生存期間中央値21日間、図4B)。NK012群のラットは、腫瘍細胞移植の23～33日後に安楽死させた(生存期間中央値28日間)。NK012によるCED処理は、対照と比較して有意な生存利益をもたらした( $P = 0.0003$ 、ログランク検定)。

#### 【0033】

分布体積と組織学的分析の相関関係

NK012の組織分布は一貫しており、そこで続いて同時注入Gdの分布と比較した。正常なラット脳におけるNK012分布体積を、SN-38により生成された蛍光の組織学的検出によって決定した。MRIを使用して、CEDの際に齧齒類脳におけるNK012分布をモニターする実現性を評価するため、GdおよびNK012混合物をCEDにより6匹のラットに注入した。Gdの強く明瞭に画定された分布が、注入直後に得られたT1加重MRIにより、それぞれの注入部位において観察された。Gdの分布体積は、画像処理ワークステーションを使用して、オープンソースDICOM(Digital Imaging and Communications in Medicine)リーダーであるOsirixにより測定した。T1加重MRIは、造影増強と、SN-38により生成された蛍光の組織学的検出により決定されたNK012の分布との間の密接な相関関係を実証した(図5)。

#### 【0034】

考察

CEDは、治療剤をCNSの標的領域に特異的に送達する有望な方法であるが、CEDを用いるPRECISE無作為化第III相臨床試験は、臨床的エンドポイントを満足させることに失敗した(Kunwar S、Chang S、Westphal Mら、PRECISE Study Group. Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. Neuro Oncol. 2010年;12(8):871-881頁を参照すること。)。薬物分布は、この研究において評価されなかったが、BrainLAB iPlan(登録商標)Flowソフトウェアの使用により薬物予測分布を推定する遡及的分析は、切除空洞の2cmの境界域と画定されている関連標的体積の推定範囲が、平均して20.1%の低さであったことを報告した(Sampson JH、Archer G、Pedain Cら、PRECISE Trial Investigators. Poor drug distribution as a possible explanation for the results of the PRECISE trial. J Neurosurg. 2010年;113(2):301-309頁を参照すること。)。したがって、不十分な薬物分布は、PRECISE試験の失敗を説明している可能性がある。

10

20

30

40

50

## 【0035】

分布体積は、CEDにより送達される治療剤の抗腫瘍効力に影響を与える主要な特性である。しかし、異なる物理的および化学的特性を有する局所適用作用物質は、齧歯類脳へのCEDの際に異なる分布体積を実証している(Saito R、Krauze MT、Noble COら、Tissue affinity of the infusate affects the distribution volume during convection-enhanced delivery into rodent brains: implications for local drug delivery. *J Neurosci Methods*. 2006年; 154(1-2): 225-232頁を参照すること。)。したがって、CEDによって試験される化学療法剤は、要求される分布を達成するために特異的に製剤化されるべきである。CEDにより送達される個別の作用物質の分布特徴は、評価することが困難であるが、リポソームおよびミセルのような薬物担体の有効性は、以前に実証された。齧歯類脳腫瘍モデルにおけるリポソームまたはミセル製剤により送達されるドキソルビシンの効力は、既の実証されている(Kikuchi T、Saito R、Sugiyama Sら、Convection-enhanced delivery of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin: characterization and efficacy in rat intracranial glioma models. *J Neurosurg*. 2008年; 109(5): 867-873頁を参照すること。また、Inoue T、Yamashita Y、Nishihara Mら、Therapeutic efficacy of a polymeric micellar doxorubicin infused by convection-enhanced delivery against intracranial 9L brain tumor models. *Neuro Oncol*. 2009年; 11(2): 151-157頁を参照すること。)。更なる調査は、CEDにより送達される臨床的に有望な作用物質および臨床的に関連する送達方法を探求する。

## 【0036】

抗癌植物性アルカロイドの7-エチル-10-ヒドロキシ-カンプトテシン(SN-38)は、DNAトポイソメラーゼI阻害剤として作用する広域性抗癌カンプトテシン類縁体である。SN-38のプロドラッグであるイリノテカン塩酸塩(CPT-11)は、再発性神経膠芽種を有する患者においていくらかの抗腫瘍活性を示しており、いくつかの試験において0%から17%の応答率を有している(Friedman HS、Petross WP、Friedman AHら、Irinotecan therapy in adults with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol*. 1999年; 17(5): 1516-1525頁を参照すること。また、Cloughesy TF、Filka E、Kuhn Jら、Two studies evaluating irinotecan treatment for recurrent malignant glioma using an every-3-week regimen. *Cancer*. 2003年; 97(9 Suppl): 2381-2386頁を参照すること。更に、Chamberlain MC. Salvage chemotherapy with CPT-11 for recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2002年; 56(2): 183-188頁を参照すること。更に、Prados MD、Lamborn K、Yung WKら、North American Brain Tumor Consortium. A phase 2 trial of irinotecan(CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro Oncol*. 2006年; 8(2): 189-193頁を参照す

10

20

30

40

50

ること。)。CPT-11の活性は、CPT-11からSN-38への変換率によって決まる。このように、SN-38の直接的な使用は神経膠芽種の治療に有効でありうるが、臨床適用は、SN-38が高い毒性をもって水不溶性であるために制限されており、したがって、静脈内に投与することができない。

#### 【0037】

本発明は、CEDにより注入されたSN-38が、重篤な局所組織損傷を引き起こし、分布が注入部位の周囲に完全に限定されていることを開示している(図2A)。対照的に、NK012は、CEDにより一貫して広範囲に分布された(図2B)。局所的に送達されたNK012は、SN-38と比較して9L同所性脳腫瘍モデルにおいて優れた抗腫瘍活性を有し、カプランメイヤー分析は、SN-38群と比較して統計的に有意な差を明らかにした( $P = 0.0045$ )。加えて、組織学的検査は、 $40\mu\text{g}$ のNK012を受けたラット脳において最小限の脳組織損傷を明らかにし、同じ用量のSN-38は、自由投与(*free administration*)によって重篤な損傷を引き起こした。近年、用量ではなく濃度が、CEDによる広範囲な送達後の局所組織毒性における制御因子であることが実証されている(Zhang R, Saito R, Mano Yら、*Concentration rather than dose defines the local brain toxicity of agents that are effectively distributed by convection-enhanced delivery. J Neurosci Methods. 2013年;222:131-137*頁を参照すること。)。これらの知見は、 $2\text{mg/ml}$ 以下のSN-38を含有するNK012の製剤が、CED用途において安全であることを示唆している。

#### 【0038】

本発明は、MRIを使用して脳中におけるNK012のCEDをモニターする方法を確立して、このCEDに基づいた療法の臨床的に関連する用途を探求した。GdとNK012の分布との間の密接な相関関係が観察された。したがって、NK012の分布を、CEDの際にGdの同時送達によってモニターすることができ、脳標的への治療剤の有効な送達を確実にすることにおいて重要な意味をもちうる。

#### 【0039】

本発明は、NK012をCEDによって脳に効率的に投与することができ、用量制限的な全身性または神経毒性を正常な脳に引き起こすよりも低い濃度で神経膠芽種細胞に対して活性を生じる、実験的な証拠を提供する。NK012の分布を、同時送達されたGdのMRIによりモニターすることができる。そのような、CEDにより投与されるNK012は、神経膠芽種を有する患者を治療する有望な治療手段である。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0040】

NK012のCEDである本発明は、頭蓋内脳腫瘍、特に悪性神経膠腫の有効な治療選択肢を対象とする。NK012のMRI誘導CEDは、臨床用途において可能性を有する。

10

20

30

【 図 1 】

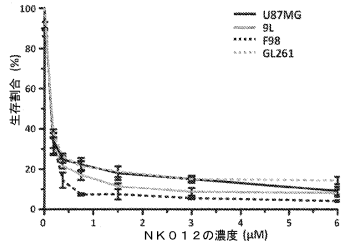


Fig. 1

【 図 2 B 】

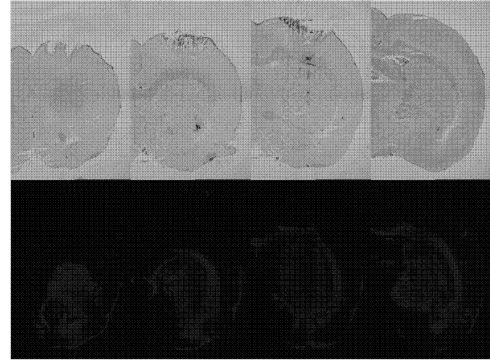


Fig. 2B

【 図 2 A 】

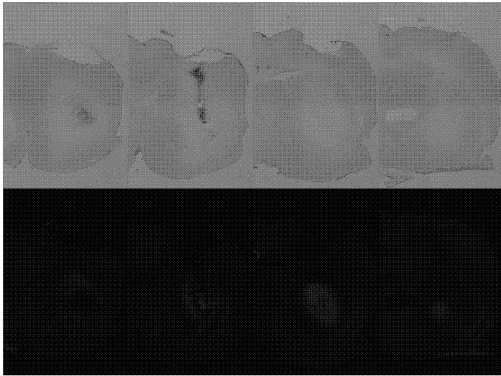


Fig. 2A

【 図 2 C 】

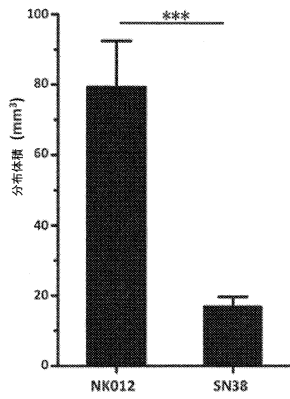


Fig. 2C

【 図 3 】

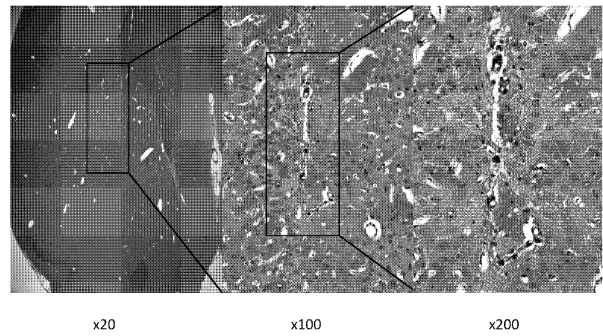


Fig 3

【 図 4 A 】

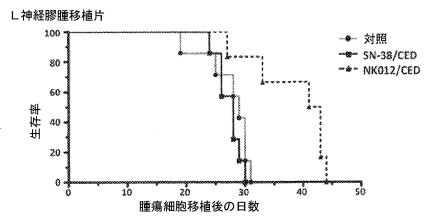


Fig. 4A

【 図 4 B 】

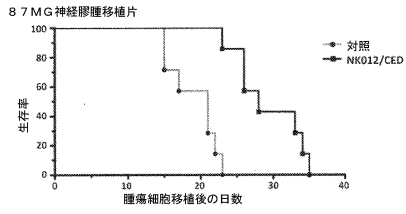


Fig. 4B

【 図 5 B 】

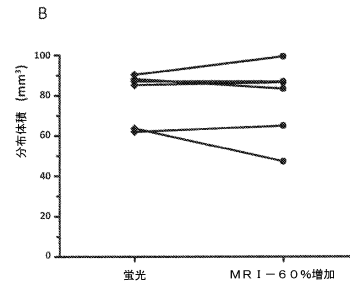


Fig. 5B

【 図 5 A 】

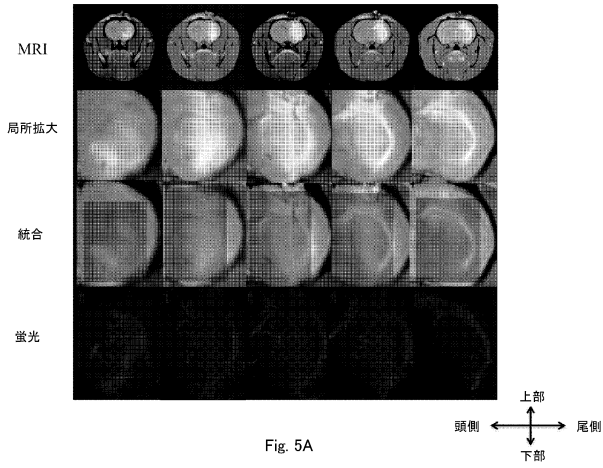


Fig. 5A

## フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2009-137884(JP,A)  
特表2002-516295(JP,A)  
Int. J. Cancer, 2009年, Vol. 124, pp. 2505-2511  
Drug Delivery System, 2010年, Vol. 25, No. 3, p. 241  
Clin Cancer Res, 2010年, Vol. 16, No. 2, pp. 521-529  
Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008年, Vol. 67, p. 316, 0-428  
Tohoku J. Exp. Med, 2010年, Vol. 221, No. 4, pp. 257-264  
NEURO-ONCOLOGY, 2009年, Vol. 11, pp. 151-157  
Neurol Med Chir (Tokyo), 2012年, Vol. 52, pp. 531-538  
Jpn J Cancer Chemother, 2013年, Vol. 40, No. 6, pp. 705-707

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/4745

A61K 9/107

A61K 47/64

A61P 25/00

A61P 35/00

WPI

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

PubMed