(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4426097号
(P4426097)

(45)発行日　平成22年3月3日(2010.3.3)　(24)登録日　平成21年12月18日(2009.12.18)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 35/74	(2006.01)	A61K	35/74	B
A61K 31/711	(2006.01)	A61K	31/711	
A61P 13/10	(2006.01)	A61P	13/10	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 20　(全 15 頁)

(21)出願番号	特願2000-532127 (P2000-532127)
(86)(22)出願日	平成10年12月22日 (1998.12.22)
(65)公表番号	特表2002-503697 (P2002-503697A)
(43)公表日	平成14年2月5日 (2002.2.5)
(86)国際出願番号	PCT/CA1998/001190
(87)国際公開番号	WO1999/042113
(87)国際公開日	平成11年8月26日 (1999.8.26)
審査請求日	平成17年12月22日 (2005.12.22)
(31)優先権主張番号	60/075,111
(32)優先日	平成10年2月18日 (1998.2.18)
(33)優先権主張国	米国(US)

早期審査対象出願

(73)特許権者　503082723
バイオニケ　ライフ　サイエンシーズ　インコーポレイテッド
カナダ　ケー８エヌ　５ジェイ２　オンタリオ　ベルビール　ダンダス　ストリート　イー.　２３１
(74)代理人　100089244
弁理士　遠山　勉
(74)代理人　100090516
弁理士　松倉　秀実
(74)代理人　100100549
弁理士　川口　嘉之
(74)代理人　100098268
弁理士　永田　豊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】膀胱癌の治療のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

膀胱ガンを有するほ乳類の膀胱中のガン細胞の成長を阻害するための医薬組成物であって、

a.　マイコバクテリウム・フレイ(M. phlei)デオキシリボ核酸(M-DNA)；

b.　脱タンパク質化、脱脂質化されたM. phleiの細胞壁であって、前記M-DNAが保持され、複合体化されたM. phleiの細胞壁、および

c. 薬学的に許容される担体

を含み、膀胱ガンを有するほ乳類の膀胱に投与されるための医薬組成物。

【請求項２】

免疫系細胞が生物活性分子を生産するように刺激されることにより前記ガン細胞成長が抑制される、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項３】

前記生物活性分子がサイトカインおよび活性酸素種からなる群から選択される、請求項２に記載の医薬組成物。

【請求項４】

前記サイトカインがIL-6、IL-10およびIL-12からなる群から選択される、請求項３に記載の医薬組成物。

【請求項５】

前記サイトカインがIL-12である請求項４に記載の医薬組成物。

【請求項６】
前記ガン細胞成長はガン細胞へのアポトーシス誘導により抑制される、請求項1に記載の医薬組成物。
【請求項７】
前記アポトーシス誘導が異常p53/p21に依存しない、請求項６に記載の医薬組成物。
【請求項８】
前記アポトーシス誘導が薬剤耐性に依存しない、請求項６に記載の医薬組成物。
【請求項９】
前記の薬学的に許容される担体が液体担体および固体担体からなる群から選択される、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
前記ガン細胞成長がガン細胞増殖の阻害により抑制される、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
膀胱ガンを有するほ乳類の膀胱内のガン細胞の成長を阻害するための医薬組成物であって、
ａ．マイコバクテリウム・フレイ(M. phlei)デオキシリボ核酸（M-DNA）および、
ｂ．薬学的に許容される担体を含み、
ガンを有するほ乳類の膀胱に投与されるための医薬組成物。
【請求項１２】
前記の薬学的に許容される担体が、液体担体および固体担体からなる群から選択される請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
前記ガン細胞成長がガン細胞中へのアポトーシス誘導により抑制される、請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
前記アポトーシス誘導が異常p53/p21に依存しない、請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記アポトーシス誘導が薬物耐性に依存しない、請求項１３に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
免疫系細胞が生物活性分子を生産するように刺激されることにより前記ガン細胞成長が抑制される、請求項１１に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
前記生物活性分子がサイトカインおよび活性酸素種からなる群から選択される、請求項１６に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
前記サイトカインが、IL-６、IL-10およびIL-12からなる群から選択される、請求項１７に記載の医薬組成物。
【請求項１９】
前記サイトカインがIL-１２である請求項１８に記載の医薬組成物。
【請求項２０】
前記ガン細胞成長がガン細胞の増殖阻害により抑制される請求項１１に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
［発明の分野］
本出願は、１９９８年2月１８日に出願された米国の予備出願第６０／０７５，１１１号の完全な利益を求め、かつ、参考として取り込む。
本発明は、マイコバクテリアデオキシリボ核酸（Ｂ－ＤＮＡ）－マイコバクテリア細胞壁複合体（ＢＣＣ）を含み、ここでＢ－ＤＮＡは細菌細胞壁上に、ＢＣＣが膀胱癌を治療す

るのに有効であるように保存され、複合体化される。さらに特に、本発明は、マイコバクテリウム・フレイ（M. phlei）－ＤＮＡ（Ｍ－ＤＮＡ）－M. phlei細胞壁複合体（ＭＣＣ）を含み、ここでＭ－ＤＮＡはM. phlei細胞壁上に、ＭＣＣが膀胱癌細胞の増殖を阻害し、膀胱癌細胞中のアポプトーシスを誘発するのに有効であるように保存され、複合体化される。

【０００２】

［発明の背景］

癌は、変則的な細胞の異常な最終的な蓄積であり、これは過度の増殖、不完全なアポプトーシス、またはこれら２つの組合せから生じ得る。アポプトーシスは、細胞表面上のレセプターに結合するリガンドにより開始され得る（Muzio et al. Cell 85:817-827, 1996）。これらのレセプターにおける突然変異は、アポプトーシスの損傷を生じ得る。アポプトーシスはまた、ｐ５３／ｐ２１調節因子を含むが、これには限定されない細胞内タンパク質により誘発され得る（Levine A. Cell 88:323-331, 1997）。機能的ｐ５３／ｐ２１の損失は、種々の癌における攻撃性と相関する（Fisher D. Cell 78:529-542, 1994）。化学療法剤は、主としてこの治療的効果のために癌細胞中でアポプトーシスの誘発に依存する。化学療法剤の有効性を消失させる薬剤耐性は、低下したアポプトーシスを直接的にまたは間接的に誘発し、一般的に種々の癌における不良な予後と関連する。

【０００３】

膀胱の癌は、良好に治療するのが特に困難である（Lamm et al. Journal of Urology 153:1444-1450, 1995）。膀胱癌を治療するのに用いられる細菌起源の調製物には、バチルス　カルメット　ゲーリン（ＢＣＧ：bacillus Calmette-Guerin）（Pryor et al. British Journal of Cancer 71:801-807, 1995）およびレグレッシン（Regressin）（商標）（Bioniche, Inc. London, Ontario, Canada）、鉱油乳濁液として処方されたマイコバクテリア細胞壁抽出物（ＭＣＷＥ）（米国特許第4,744,984号：Chin et al. Journal of Urology 156:1189-1193, 1996）が含まれるが、これらには限定されない。

【０００４】

ＢＣＧは、直接的にはアポプトーシスを誘発しない（Sasaki et al. Urology International 59:142-148, 1997）。むしろ、ＢＣＧは免疫系の細胞を刺激して、生物活性分子、例えばサイトカインおよび反応性酸素種（これらには限定されない）を生成し（Kudoh et al. British Journal of Urology 80S2:40, 1997）、これが次にアポプトーシスおよび細胞溶解を誘発する。

【０００５】

ペプチドグリカン、並びにＮ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミンおよびミコール酸誘導体を含む糖脂質から主として構成されるＭＣＷＥ（Chin et al. Journal of Urology 156:1189-1193, 1996）は、マクロファージおよび単球媒介反応の活性化により免疫系を刺激すると考えられている（Teware et al. Veterinary Parasitology 62:223-230, 1996）。

【０００６】

ＢＣＧおよびＭＣＷＥを用いて得られる治療学的利点は、種々であり、矛盾し、製造方法および送達方法並びに得られた調製物の免疫原性および安定性の変異に依存ようである。さらに、生きたＢＣＧは、発熱、血清病状症候群、肉芽腫性感染症、敗血症（セプシス）およびさらには死を含むが、これらには限定されない重大な副作用を引き起こし得る（Lamm et al. Journal of Urology 147:596-600, 1992）。

【０００７】

他の従来技術の抗膀胱癌剤もまた、臨床的適用のために比較的適切ではないことが明らかになった。これらの薬剤の多くは、有効でなく、あるいはまた有毒であり、顕著な副作用があり、薬剤耐性または免疫感作の発生を生じ、および受容体を衰弱させる。さらに、これらの薬剤の多くは、それらの有効性について、リガンド表面レセプターまたはｐ５３／ｐ２１に依存する。

【０００８】

従って、膀胱癌細胞の増殖を阻害し、膀胱癌細胞におけるアポプトーシスを誘発する新規な治療薬剤の必要性がある。この治療薬剤は、抗膀胱癌細胞剤として、および他の抗膀胱癌細胞剤への付加物として有用でなければならない。付加物は、治療効果を高めるのに、他の抗膀胱癌細胞剤と共に有用となるるものを意味する。さらに、このような治療剤は、簡素であり、製造するのが比較的安価でなければならず、この活性は製造中に再現性を有しなければならず、この活性は長時間にわたり安定なままでなければならず、かつこの膀胱癌細胞に対する効果は、最小の毒性と関連する投与計画と共に達成可能でなければならない。

【０００９】

［発明の概要］

本発明は、マイコバクテリアデオキシリボ核酸（Ｂ－ＤＮＡ）－マイコバクテリア細胞壁複合体（ＢＣＣ）を含み、ここでＢ－ＤＮＡが、ＢＣＣが膀胱癌細胞を治療するのに有効であるように、細菌細胞壁上に保存され、複合体化された組成物および方法を提供することにより、前述の必要性を満たす。さらに特に、本発明は、ＭＣＣが膀胱癌細胞の増殖を阻害し、膀胱癌におけるアポプトーシスを誘発するのに有効であるように、Ｍ－ＤＮＡがM. phlei細胞壁上で保存され、複合体化された、マイコバクテリウム・フレイ（M. phlei）－ＤＮＡ（Ｍ－ＤＮＡ）－M. phlei細胞壁複合体（ＭＣＣ）を提供することにより、前述の必要性を満たす。ＭＣＣは簡素であり、製造するのが比較的安価であり、その活性は製剤間で再現性があり、ＭＣＣは長時間にわたり治療的に安定なままであり、かつＭＣＣは、繰り返しの投与に際してさえ、最小毒性と関連する投与計画において有効である。

【００１０】

ＭＣＣを調製するために、M. phleiを液体培地中で生育させ、採取する。M. phleiは破壊され、破壊されたM. phleiの固体成分は、遠心沈降により採取される。固体成分は脱タンパク質化および脱脂質化され、洗浄される。ＤＮａｓｅ非含有試薬を用いて、調製中のＭ－ＤＮＡ分解を最小にする。

【００１１】

ＭＣＣは、薬学的に許容可能な担体と組合せて、ヒトを含む動物に、膀胱内の癌細胞を、防げ、治療し、消失させるのに十分な投与量で投与される。ｐ５２／２１異常、および薬剤耐性の細胞を含むがこれらには限定されない膀胱癌細胞の増殖を阻害し、この膀胱癌細胞におけるアポプトーシスを誘発する、ＭＣＣの予期されず、驚異的な能力は、医薬業界において長期にわたり満たされないと感じられていた必要性に向けられており、重要な利点を提供する。

【００１２】

ＭＣＣはまた、他の抗癌剤の有効性を高める付加物として有効である。それらは、薬物；免疫促進剤；抗原；抗体；ワクチン；放射線；化学療法剤；核酸剤；生物学的に工作された薬剤；化学的に合成された薬剤；活性化または不活性化のために細胞死分子を標的する薬剤；並びに応答性細胞の増殖を阻害し、応答性細胞におけるアポプトーシスを誘発する薬剤を含むが、これらには限定されない。

【００１３】

従って、本発明の目的は、膀胱癌を防止するのに有効な組成物および方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、膀胱癌を治療するのに有効な組成物および方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、膀胱癌を消失させるのに有効な組成物および方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、膀胱癌細胞の増殖を阻害する組成物および方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、膀胱癌細胞におけるアポプトーシスを誘発する組成物および方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、膀胱内に免疫系の応答細胞を刺激して生物活性分子を生成する組成

物および方法を提供することにある。
本発明の他の目的は、膀胱癌において新脈管形成を阻害するのに有効な組成物および方法を提供することにある。
本発明の他の目的は、他の抗膀胱癌療法への付加物として有効な組成物および方法を提供することにある。
本発明の他の目的は、応答細胞による認識に最適な粒度および組成を有する組成物を提供することにある。
本発明の他の目的は、応答細胞による取り込みに最適な粒度および組成を有する組成物を提供することにある。
本発明の他の目的は、大量に製造することができる組成物を提供することにある。
本発明の他の目的は、製造するのが比較的安価な組成物を提供することにある。
本発明の他の目的は、製剤間で再現性のある活性を有する組成物を提供することにある。
本発明の他の目的は、長時間にわたり安定なままである組成物を提供することにある。
本発明の他の目的は、長時間にわたりその有効性を維持する組成物を提供することにある。
本発明の他の目的は、受容体に最小の毒性を有する組成物を提供することにある。

【００１４】

本発明のこれらのおよび他の目的、特徴および利点は、以下の開示された実施態様および添付した特許請求の範囲を検討すればに明らかになる。

【００１５】

［発明の詳細な説明］
本発明は、細菌のデオキシリボ核酸（Ｂ－ＤＮＡ）－細菌細胞壁複合体（ＢＣＣ）を含み、ここで、Ｂ－ＤＮＡは細菌細胞壁上に、この複合体がヒトを含む動物の膀胱の癌細胞を予防、治療および消失するのに有効であるように保存され、複合体化される。

【００１６】

コリネホルム（Coryneform）の各種、コリネバクテリウム（Corynebacterium）の各種、ロドコッカス（Rhodococcus）の各種、ユーバクテリウム（Eubacterium）の各種、ボルデテッラ（Bordetella）の各種、エシェリヒア（Escherichia）の各種、リステリア（Listeria）の各種、ノカルディア（Nocardia）の各種およびマイコバクレリウム（Mycobacterium）の各種を含むが、これらに限定されない多くの細菌種を使用して本発明を実施することができる。好ましくは、M. smegmatis、M. fortuitum、M. kansaasii、M. tuberculosis、M. bovis、M. vacciae、M. aviumおよびM. phleiを含むがこれらに限定されないMycobacterium種が使用される。最も好ましくは、Mycobacterium種のM. phleiが使用される。

【００１７】

したがって、本発明は、より詳細には、M. phleiデオキシリボ核酸（Ｍ－ＤＮＡ）－M. phlei細胞壁複合体（ＭＣＣ）を含み、ここで、Ｍ－ＤＮＡはＭＣＣが膀胱の癌細胞を予防、治療および消失させるのに有効であるようにM. phlei細胞壁上に保存され、複合体化される。ＭＣＣにおいて、Ｍ－ＤＮＡの量は、無傷のM. phlei細胞におけるＭ－ＤＮＡの量に応じて増加される。さらに、Ｍ－ＤＮＡは、無傷のM. phlei細胞内のＭ－ＤＮＡよりも応答細胞に作用しやすいように、M. phlei細胞壁上に保存され、複合体化される。以下の仮説に拘束されることを望まないが、短鎖のオリゴヌクレオチドの形態で、Ｍ－ＤＮＡとそのM. phlei細胞壁との物理的関連の両方がＭＣＣの治療活性の最適な発現に寄与すると考えられる。

【００１８】

ＭＣＣの治療活性を増大させる方法には、同一または異なる細菌種由来の刺激配列又はＤＮＡ構造の化学的な補足、もしくは生物工学的な増幅、及び、Ｍ－ＤＮＡまたはＭＣＣの天然または合成担体との複合体化が含まれるが、これらに限定されない。さらに、治療有効性を増大させるために、ＭＣＣを別の抗膀胱癌剤の前、同時、または後に投与することができる。

【００１９】

ＭＣＣおよびその薬学的に許容可能な担体を含む組成物は、ＭＣＣと液体担体、固体担体、またはその両方と均一かつ密接に関連させることにより調製される。液体担体には、水性担体、非水性担体またはその両方が含まれるが、これらに限定されない。固体担体には、生物学的担体、化学的担体および生物工学的に操作された担体が含まれるが、これらに限定されない。

【００２０】

薬学的に許容可能な担体のうち、ＭＣＣは、水性懸濁液、油性乳濁液、水－油乳濁液、水－油－水乳濁液、リポソーム、微小粒子、部位特異的乳濁液、長期持続性乳濁液、粘着性乳濁液、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、ミクロスフェア、ナノスフェア、ナノパーティクル、ミニポンプ中およびＭＣＣの放出を維持させる種々の天然または合成ポリマーとともに投与することができる。さらに、ＭＣＣは、応答細胞にＭＣＣを供与するために使用された担体に関係なく賦形剤の任意の１つ、全部、または任意に組み合わせて使用することができる。これらには、抗酸化剤、緩衝液および静菌剤（これらに限定されない）が含まれ、懸濁剤および増粘剤を含んでもよい。

【００２１】

好ましくは、ＭＣＣは、水性懸濁液として投与される。ＭＣＣは、ＤＮａｓｅ非含有水、生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）など（これらに限定されない）の薬学的に許容可能な担体中に懸濁され、超音波処理によって乳化される。必要に応じて、乳化された混合物を微小流動化（microfluidization）によってホモジナイズする。例えば、凍結乾燥ＭＣＣを、ＤＮａｓｅ非含有水に懸濁し、２０％出力で５分間超音波処理する（Model W-385 Sonicator, Heat Systems-Ultrasonics Inc.）。超音波処理した組成物を、１５，０００～３０，０００ｐｓｉで１貫流の微小流動化によってホモジナイズする。（Model M-110Y; Microfluidics, Newton, MA）。混合物は、無菌的に処理されるか、または最終的に滅菌される。

【００２２】

非水性担体での投与のために、ＭＣＣを、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質、脂質、油およびその混合物（これらに限定されない）などの鉱油または中性油で乳化される。前記油は、ポリ不飽和脂肪酸および飽和脂肪酸と適切に混合されている。例として、ダイズ油、キャノーラ油、パーム油、オリーブ油およびミグリオール（myglyol）（これらに限定されない）が含まれ、ここで、脂肪酸の炭素数は１２と２２との間であり、この脂肪酸は飽和でも不飽和であってもよい。必要に応じて、中性油中に荷電した脂質またはリン脂質を懸濁させることができる。例えば、ＤＮａｓｅ非含有ホスファチジルコリンを、ＤＮａｓｅ非含有トリグリセリドダイズ油に1gリン脂質／２０ｍｌトリグリセリドの比率で添加し、５０℃～６０℃で穏やかに加熱しながら溶解させる。数グラムのＭＣＣを、乾燥オートクレーブ処理コンテナに添加し、リン脂質－トリグリセリド溶液を２０ｍｌ／１ｇＭＣＣの濃度で添加する。懸濁物を２０℃で６０分間インキュベートし、２０ｍｌＭＣＣの懸濁物／１ＬのＰＢＳの比率でＤＮａｓｅ非含有ＰＢＳと混合する。混合物を、２０％出力で５分間超音波処理（Model W-385 Sonicator, Heat Systems-Ultrasonics Inc.）することにより、乳化する。必要に応じて、乳化ＭＣＣ混合物を、１５，０００ｐｓｉ～３０，０００ｐｓｉで１回貫流する微小流動化（Model M-110Y; Microfluidics）によってホモジナイズする。ＭＣＣ乳濁物をオートクレーブ処理した蓋付き瓶に移し、４℃で保存する。

【００２３】

ＭＣＣ粒子のサイズは、応答細胞が認識し、取り込むために最適でなければならない。好ましくは、ＭＣＣ粒子の平均直径は、約１０～約１０，０００ｎｍ、より好ましくは約１００～約１，０００ｎｍ、最も好ましくは約２５０～約６００ｎｍである。

【００２４】

ＭＣＣのＭ－ＤＮＡ含有量は、好ましくは約０．００１～約９０ｍｇ／１００ｍｇ乾燥ＭＣＣ、より好ましくは約０．０１～約４０ｍｇ／１００ｍｇ乾燥ＭＣＣ、最も好ましくは約０．１～約３０ｍｇ／１００ｍｇ乾燥ＭＣＣである。また、タンパク質含有量は、約２

ｍｇ／１００ｍｇ乾燥ＭＣＣ未満であり、脂肪酸含有量は約２ｍｇ／１００ｍｇ乾燥ＭＣＣ未満であることが好ましい。予期されないことに、本発明者らは、ＭＣＣの乾燥重量の少なくとも約３．６％が抽出可能なＭ－ＤＮＡであることを見出した。

【００２５】

ＭＣＣおよび／またはＭ－ＤＮＡは、膀胱の応答細胞において治療的応答を誘発するのに有効な量を投与される。投与されるＭＣＣおよび／またはＭ－ＤＮＡの投与量は、治療される症状、特定の処方および受容体の体重および健康状態ならびに投与経路などの他の臨床的因子に依存する。好ましくは、ＭＣＣおよび／またはＭ－ＤＮＡの投与量は１投与あたり約０．０００００１～約１００ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは１投与あたり約０．０００１～約５０ｍｇ／ｋｇ、最も好ましくは１投与あたり約０．００１～約１０ｍｇ／ｋｇである。

【００２６】

投与経路には、経口、静脈内、病変内、腫瘍内および膀胱内が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、ＭＣＣおよび／またはＭ－ＤＮＡは、尿管カテーテル（これに限定されない）による膀胱内注入によって投与される。膀胱内へのＭＣＣおよび／またはＭ－ＤＮＡ注入の他の方法は、当業者に公知である。

【００２７】

投与経路に依存して、１投与あたりの体積は、好ましくは、約０．００１～約１００ｍｌ、より好ましくは約０．０１～約７０ｍｌ、最も好ましくは約０．１～約４０ｍｌである。ＭＣＣおよび／またはＭ－ＤＮＡは、治療される疾患、受容体の健康状態および投与経路に適切なスケジュールおよび期間で単回投与および複数回投与することができる。

【００２８】

膀胱内へ投与する場合、投与体積に依存して、膀胱への用量は、約１分～約８時間、より好ましくは約１５分～約４時間、最も好ましくは約３０分～約２時間を維持すべきである。

【００２９】

【実施例】

以下の実施例は、本発明をさらに例示するために提供されるが、それと同時に、いかなる限定もされない。これに対して、本明細書を読解後、本発明の精神および／または添付の請求の範囲から逸脱することなく、当業者は種々の他の実施形態、改変および等価物を行い、提案できることが明確に理解されるべきである。

【実施例１】

Mycobacterium phleiからのＭＣＣの調製、並びにＭＣＣおよびM. phleiからのＭ－ＤＮＡの精製

ＰＣＴ出願番号ＣＡ９８１／００７４４号に記載されているように、ＭＣＣを、Mycobacterium phlei（M. phlei）（１１０株）から調製し、Ｍ－ＤＮＡを、ＭＣＣから精製し（ＭＣＣ－ＤＮＡ）、Ｍ－ＤＮＡをM. phleiから精製した（M. phlei－ＤＮＡ）。ＤＮＡの保存を促進するようにすべての試薬を選択した。別記しない限り、ＭＣＣ、ＭＣＣ－ＤＮＡおよびM. phlei－ＤＮＡをＤＮａｓｅ非含有水または薬学的に許容可能なＤＮａｓｅ非含有緩衝液中に再懸濁し、超音波処理によって乳化した。カブトガニ遊走細胞（Limulus amebocyte）ライゼートＱＣＬ－１０００キット（BioWhittaker, Walkersville, MD）を用いて測定したところ、ＭＣＣ、ＭＣＣ－ＤＮＡおよびM. phlei－ＤＮＡはエンドトキシンを含んでいなかった。

【実施例２】

細菌ＤＮＡ－細菌細胞壁複合体および他の細菌種由来の細菌ＤＮＡの調製

実施例１と同様にして、細菌ＤＮＡ－細菌細胞壁複合体（ＢＣＣ）および細菌ＤＮＡ（Ｂ－ＤＮＡ）を、M. smegmatis、M. fortuitous、Nocardia rubra、Nocardia asteroides、Corynebacterium parvum、M. kansaasii、M. tuberculosisおよびM. bovisから調製した。

【実施例３】
ＤＮａｓｅ処理
ＭＣＣ－ＤＮＡおよびＭＣＣ（それぞれ１μｇのＭ－ＤＮＡを含む）およびレグレッシン（商標）（米国特許第４，７４４，９８４号）を、１国際単位（ＩＵ）のＲＮａｓｅ非含有ＤＮａｓｅＩ（Life Technologies）を用いて２０ｍＭ　トリスＨＣｌ（ｐＨ８．４）、２ｍＭ　$MgCl_2$および５０ｍＭ　ＫＣｌ中、２５℃で１時間消化した。ＤＮａｓｅＩを、最終濃度２．５ｍＭのＥＤＴＡの添加および６５℃で１０分間の加熱により不活化した。
【実施例４】
細胞および試薬
ＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６ヒト膀胱癌細胞?????を、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC, Rockville, MD）から入手し、非必須アミノ酸およびビタミンを補充し１０％ＦＣＳを含むＭＥＭ（ＭＥＭ－ＦＣＳ）（Gibco Life Science）中で培養した。ＨＴ－１１９７は、男性のヒトで発症した未分化の移行膀胱癌の第４段階の細胞である。ＨＴ－１１９７細胞は、ドキソルビシン（doxorubicin）（これに限定されない）などの化学療法剤に感受性を有する。ＨＴ－１３７６は、女性のヒトで発症した未分化の移行膀胱癌の第３段階の細胞である。ＨＴ－１３７６細胞は、ｐ５３／ｐ２１異常であり、シスプラチンおよびマイトマイシン(これらに限定されない）などの化学療法剤に耐性を有する。Ｂ－１６Ｆ１、ＴＨＰ－１、ＲＡＷ２６４．７、Ｊｕｒｋａｔ、＃Ｌ－６０およびＨＬ－６０ＭＸ－１細胞をＡＴＣＣから入手し、ＡＴＣＣで推奨されている培地中で培養した。別記しない限り、細胞を６ウェルの平底組織培養プレートに、3×10^5～10^6細胞／ｍｌの濃度で播種し、５％のCO_2中３７℃で維持した。
【００３０】
仔牛胸腺ＤＮＡ、ニシン精子ＤＮＡおよびEscherichia coliリポ多糖（ＬＰＳ）を、Sigma Chemicals Co.（St. Louis, MO）から入手した。組換えヒトＩＬ－１２（ｈＩＬ－１２）を、R & D Systems（Minneapolis, MN）から入手した。
【実施例５】
細胞増殖の阻害
細胞増殖を、ジメチルチアゾール－ジフェニルテトラゾリウムブロミド（ＭＴＴ）還元（Mosman et al. Journal of Immunological Methods 65:55-63, 1983）を用いて測定した。
【００３１】
ＨＴ－１３７６、ＨＴ－１１９７、Ｂ－１６Ｆ１、ＴＨＰ－１、ＲＡＷ２６４．７、Ｊｕｒｋａｔ、ＨＬ－６０およびＨＬ－６０ＭＸ－１細胞を、０～１０μｇ／ｍｌのＭＣＣ、M. phlei－ＤＮＡ、ＭＣＣ－ＤＮＡ、ニシン精子ＤＮＡおよび仔牛胸腺ＤＮＡと共に２４時間インキュベートした。ＭＣＣ（第１図）、M. phlei－ＤＮＡ（第２図Ａ）およびＭＣＣ－ＤＮＡ（第２図Ｂ）は、用量に依存して増殖を阻害した。ニシン精子ＤＮＡ（第２図Ａおよび第２図Ｂ）および仔牛胸腺ＤＮＡ（第２図Ａおよび第２図Ｂ）は、増殖を阻害しなかった。ＨＴ－１１９７（第３図Ａ）およびＨＴ－１３７６（第３図Ｂ）細胞もまた、０～１００μｇ／ｍｌのＭＣＣおよびＬＰＳと共に２４時間インキュベートした。ＭＣＣは、用量に依存して増殖を阻害したが、ＬＰＳは、増殖を阻害しなかった（第３図Ａおよび３Ｂ）。
【００３２】
ＭＣＣおよびＭ－ＤＮＡは、ＨＴ－１１９７およびｐ５３／ｐ２１異常で薬物耐性のＨＴ－１３７６膀胱癌細胞の増殖を阻害した。さらに、細胞増殖の阻害はすべてのＤＮＡ（ニシン精子ＤＮＡおよび仔牛胸腺ＤＮＡ）に共通ではなく、非特異的免疫刺激（ＬＰＳ）由来の結果ではない。
【実施例６】
ＤＮＡ断片化によって示されるアポプトーシスの誘発
細胞ＤＮＡのヌクレオソームサイズ化されたフラグメントへの断片化は、アポプトーシス

を受ける細胞に特有である（Newell et al. Nature 357:286-289, 1990）。ＤＮＡ断片化を評価するために、非接着性細胞を、２００ｇで１０分間の遠心分離によって回収した。非接着性細胞および残存した接着性細胞のペレットを、０．５ｍｌの低浸透圧性の溶解緩衝液（１０ｍＭ　トリス緩衝液、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．２％　Ｔｒｉｔｏｎ（トライトン）Ｘ－１００、ｐＨ７．５）で溶解した。溶解物を、１３，０００ｇで１０分間遠心分離し、上清（断片化ＤＮＡを含む）を５０％イソプロパノールおよび０．５Ｍ　ＮａＣｌ中、－２０℃で一晩沈殿させた。沈殿物を、遠心分離にて回収し、１００Ｖで３時間０．７％のアガロースゲルでの電気泳動によって分析した。

【００３３】

ＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６膀胱癌細胞を、１μｇ／ｍｌ　ＭＣＣまたは１ｎｇ／ｍｌ　ｈＩＬ－１２で４８時間インキュベートした（第４図）。ＭＣＣは、非接着性ＨＴ－１１９７細胞（第４図Ａ、レーン２）およびＨＴ－１３７６細胞（第４図Ｂ、レーン２）ではＤＮＡ断片化を顕著に誘発するが、接着性ＨＴ－１１９７細胞（第４図Ａ、レーン３）およびＨＴ－１３７６細胞（第４図Ｂ、レーン３）では誘発しなかった。ＰＢＳ（第４図Ａおよび４Ｂ、レーン５）、ｈＩＬ－１２（第４図Ａおよび４Ｂ、レーン４）およびＤＮａｓｅＩ処理ＭＣＣ（第４図Ａおよび４Ｂ、レーン７）は、非接着性ＨＴ－１１９７またはＨＴ－１３７６細胞におけるＤＮＡ断片化を誘発しなかった。未処理細胞（第４図Ａおよび４Ｂ、レーン１）は、ＤＮＡ断片化が認められなかった。１２３ｂｐのＤＮＡラダー（Gibco Life Science）を使用してヌクレオソームサイズのＤＮＡフラグメントの分子量を測定した（第４図Ａおよび４Ｂ、レーンＬ）。

【００３４】

ＭＣＣは、ＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６膀胱癌細胞のアポプトーシスを誘発するが、ＤＮａｓｅＩ処理ＭＣＣは、これらの細胞においてアポプトーシスを誘発しない。これは、Ｍ－ＤＮＡの無傷のオリゴヌクレオチド構造は、アポプトーシスの誘発に必要であることを示唆する。ｈＩＬ－１２は、ＨＴ－１１９７またはＨＴ－１３７６細胞においてアポプトーシスを誘発しない。

【実施例７】

核有糸分裂タンパク質装置（nuclear mitotic protein apparatus）（ＮｕＭＡ）の可溶化によって指示されるアポプトーシスの誘発

細胞核における顕著な形態的変化は可溶化によって生じ、ＮｕＭＡの放出はアポプトーシスに特有である。培養細胞からのＮｕＭＡの放出を、市販のＥＬＩＳＡ（Calbiochem, Cambridge, MA）を用いて単位／ｍｌ（Ｕ／ｍｌ）で測定した（Miller et al. Biotechniques 15:1042-1047, 1993）。

【００３５】

ＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６膀胱癌細胞（０～１００μｇ／ｍｌのＭＣＣと共に４８時間インキュベート）は、用量に依存してＮｕＭＡを放出した（第５図）。ＨＴ－１１９７（第６図Ａ）およびＨＴ－１３７６（第６図Ｂ）細胞（１μｇ／ｍｌまたは１００μｇ／ｍｌのＭＣＣと共に４８時間インキュベート）は、２４時間以内にＮｕＭＡ放出の増大が認められた。ＨＴ－１１９７細胞（ＭＣＣおよびＭＣＣ－ＤＮＡと共に４８時間インキュベート）は、ＭＣＣ－ＤＮＡよりもＭＣＣを用いた方が有意に大きいＮｕＭＡの放出が認められた（第７図）。ＭＣＣおよびＭＣＣ－ＤＮＡのＤＮａｓｅＩ処理は、ＮｕＭＡ放出を顕著に減少させた（第７図）。

【００３６】

ＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６膀胱癌細胞におけるアポプトーシスのＭＣＣ誘発は時間および用量の両方に依存する。以下の仮説に拘束されることを望まないが、Ｍ－ＤＮＡのオリゴヌクレオチド構造およびM. phlei細胞壁上のＭ－ＤＮＡの供与は、最適なアポプトーシス誘発に重要であると考えられる。

【実施例８】

ＭＣＣ細胞毒性

細胞毒性を、原形質膜の完全性の喪失およびＬＤＨ（これに制限されない）などの原形質

酵素の放出によって特徴付けた（Phillips et al. Vaccine 14:898-904）。

【００３７】

ＭＣＣの細胞毒性を評価するために、全ＬＤＨ放出を対照としてＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６ヒト膀胱癌細胞を、０～１００μｇ／ｍｌのＭＣＣまたは溶解緩衝液（１０ｍＭ　トリス、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．２％トライトンＸ－１００、ｐＨ７．５）と共に４８時間インキュベートした（Filion et al. Biochim Biophys Acta 1329:345-356, 1997）。ＬＤＨを、市販のアッセイ（Sigma-Aldrich）で同定した。ＭＣＣが細胞毒性ではないことは（第８図）、ＭＣＣがＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６膀胱癌細胞に直接作用して増殖を阻害し、アポプトーシスを誘発することを示す。

【実施例９】

ｎｕ／ｎｕマウスにおけるヒト膀胱癌のＭＣＣおよびＭＣＣ－ＤＮＡ治療

ヒト膀胱癌（ＨＴ－１１９７）を、免疫不全無胸腺症ヌードマウス（ｎｕ／ｎｕマウス）の皮下組織の異所性固体腫瘍として確立し、マウスを、５つの群に分けた。第１群には、賦形剤のみを投与する。第２群には、ＭＣＣを投与する。第３群には、ＤＮａｓｅＩ処理ＭＣＣを投与する。第４群には、ＭＣＣ－ＤＮＡを投与する。第５群には、ＤＮａｓｅＩ処理ＭＣＣ－ＤＮＡを投与する。癌の質量を、治療前および治療後４週間週毎に測定する。第２群のマウスおよび第４群のマウスには、癌の質量の退行が認められる。第１、３、および５群のマウスには、癌の質量の退行が認められない。

【実施例１０】

ヒト膀胱癌のＭＣＣ治療

１０人の第３段階の正所性膀胱癌患者を、２つの群に分ける。第１群には、ＭＣＣを８週間週毎に静脈注入する。第２群には、標準的な化学療法治療を行う。第１群の患者には、膀胱癌の顕著な退行が認められ、身体を衰弱させるような顕著な副作用は報告されなかった。第２群の患者には、膀胱癌の最小の退行が認められ、身体を衰弱させるような顕著な副作用が報告された。

【実施例１１】

ＭＣＣの安定性

１ｍｇ／ｍｌのＭＣＣを０．８５％ｗ／ｖＮａＣｌの滅菌懸濁液として４℃で６ヶ月間暗所で保存した。平均粒子直径を、光子相関分光法（N4 Plus, Coulter Electronics Inc.）を用いて計算した。ＭＣＣ懸濁液を、5×10^{4}～10^{6}カウント／秒の粒子計数率まで０．８５％ｗ／ｖＮａＣｌで希釈した。平均粒子直径を、以下の条件を用いた粒度分布プロセッサモード（ＳＤＰ）において計算した：流体屈折率１．３３、温度２０∞Ｃ、粘度０．９３センチポイズ、測定角度９０．０∞、サンプル時間１０．５μｓ、サンプル実行時間１００秒。電位、即ち粒子とバルク（bulk）溶媒との間の水力学的境界面での電荷を、以下の条件を用いてＤｅｌｓａ　４４０ＳＸ（Coulter Electronics Inc.）で測定した：電流０．７ｍＡ、周波数域５００Ｈｚ、温度２０∞Ｃ、流体屈折率１．３３、粘度０．９３センチポイズ、誘電率７８．３、導電率１６．７ｍｓ／ｃｍ、オンタイム２．５秒、オフタイム０．５秒、サンプル実行時間６０秒。

【００３８】

第９図に見られるように、ＭＣＣ電荷およびＭＣＣの直径は、６ヶ月間の保存の間に比較的変化しないままであった。さらに、ＴＨＰ－１単球におけるＭＣＣによるＩＬ－１２産生の刺激およびアポプトーシスの誘発は、６ヶ月間の保存では変化しないままであった。

【００３９】

上記が本発明の好ましい実施形態のみに関連し、かつ添付の請求の範囲に記載のように、本発明の精神および範囲から逸脱することなく多数の改変および変更を行うことができると当然理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【図１】　第１図。ＨＴ－１３７６、ＨＴ－１１９７、Ｂ－１６Ｆ１、ＴＨＰ－１、ＲＡＷ２６４．７、Jurkat、ＨＬ－６０およびＨＬ－６０ＭＸ－１癌細胞のＭＣＣによる増殖阻害に関する図である。結果は、３つの独立した実験の平均±ＳＤである。

【図２】　第２図Ａ。ＨＴ－１３７６、ＨＴ－１１９７、Ｂ－１６Ｆ１、ＴＨＰ－１、ＲＡＷ２６Ａ．７、Jurkat、ＨＬ－６０およびＨＬ－６０ＭＸ－１膀胱癌細胞のM. phlei－ＤＮＡ（２Ａ）、ＭＣＣ－ＤＮＡ（２Ｂ）、仔牛胸腺－ＤＮＡ（２Ａおよび２Ｂ）およびニシン精子－ＤＮＡ（２Ａおよび２Ｂ）による増殖阻害に関する図である。結果は、３つの独立した実験の平均±ＳＤである。

【図３】　第２図Ｂ。第２図の続きである。

【図４】　第３図Ａ。ＨＴ－１１９７（３Ａ）およびＨＴ－１３７６（３Ｂ）ヒト膀胱癌細胞のＭＣＣおよびＬＰＳによる増殖阻害に関する図である。結果は、３つの独立した実験の平均±ＳＤである。

【図５】　第３図Ｂ。第３図の続きである。

【図６】　第４図。ＨＴ－１１９７（４Ａ）およびＨＴ－１３７６（４Ｂ）ヒト膀胱癌細胞における未処理およびＤＮａｓｅＩ処理ＭＣＣならびにｈＩＬ－１２によるＤＮＡ断片化の誘発に関する図である。示した結果は３つの実験のうちの１つについてのものであり、それぞれ類似の結果を示した。

【図７】　第５図。漸増濃度のＭＣＣを用いたＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６ヒト膀胱癌細胞からのＮｕＭＡの放出に関する図である。結果は、３つの独立した実験の平均±ＳＤである。

【図８】　第６図Ａ。１μｇ／ｍｌのＭＣＣまたは１００μｇ／ｍｌのＭＣＣを用いて４８時間処理したＨＴ－１１９７（６Ａ）およびＨＴ－１３７６（６Ｂ）ヒト膀胱癌細胞からのＮｕＭＡの放出に関する図である。結果は、３つの独立した実験の平均±ＳＤである。

【図９】　第６図Ｂ。第６図の続きである。

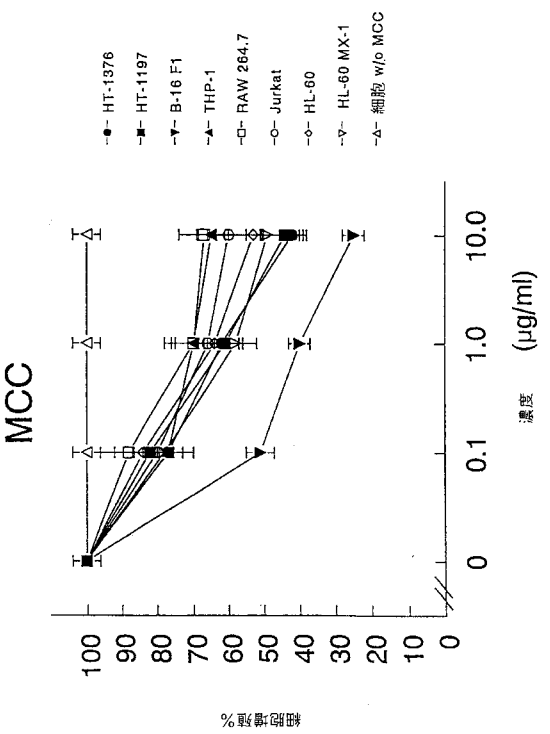
【図１０】　第７図。１μｇ／ｍｌの未処理およびＤＮａｓｅＩ処理のＭＣＣ－ＤＮＡおよびＭＣＣを用いて処理したＨＴ－１３７６ヒト膀胱癌細胞からのＮｕＭＡの放出に関する図である。結果は、３つの独立した実験の平均±ＳＤである。

【図１１】　第８図。ＭＣＣ細胞毒性の指標としてのＨＴ－１１９７およびＨＴ－１３７６ヒト膀胱癌細胞によるＬＤＨ放出％に関する図である。結果は、３つの独立した実験の平均±ＳＤである。

【図１２】　第９図。６ヶ月間の保存の間のＭＣＣの安定性に関する図である。

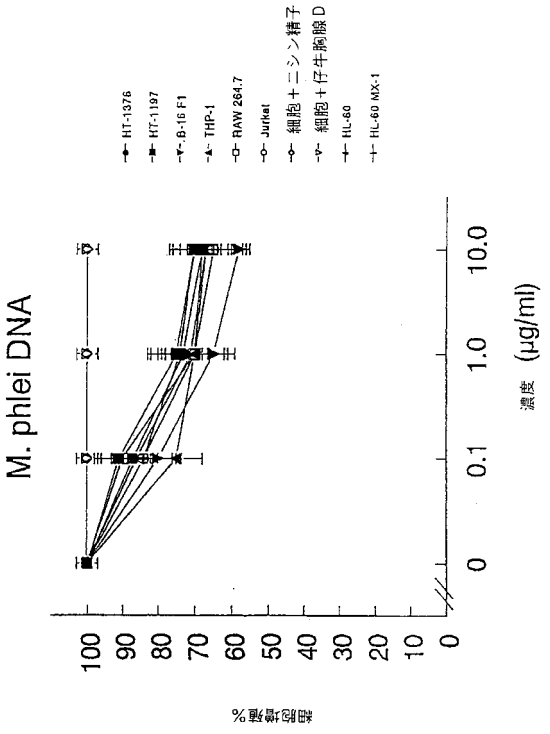
【図１】

Figure 1



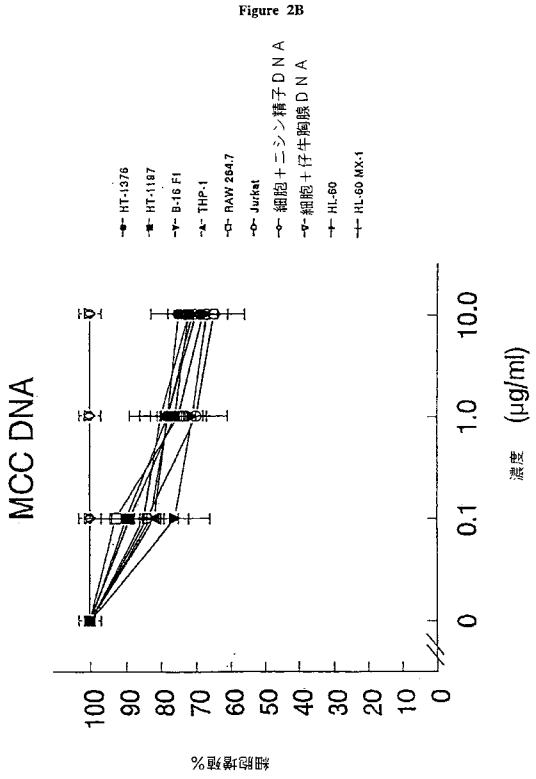
【図２】

Figure 2A



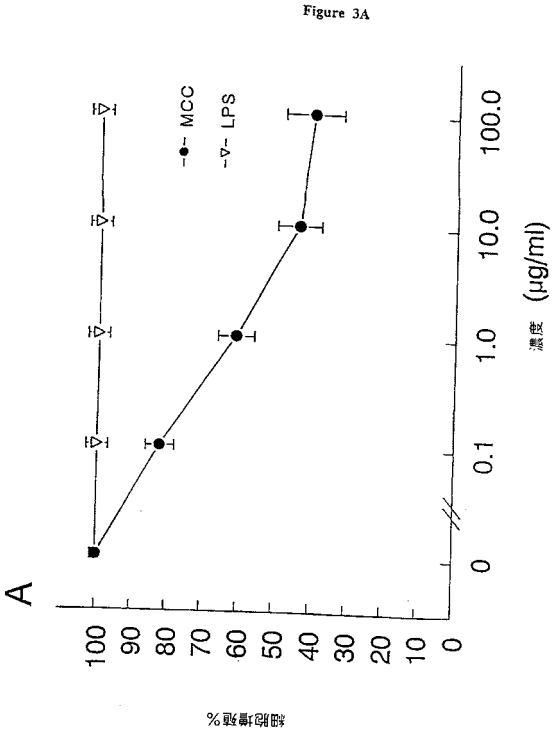
【図３】

Figure 2B



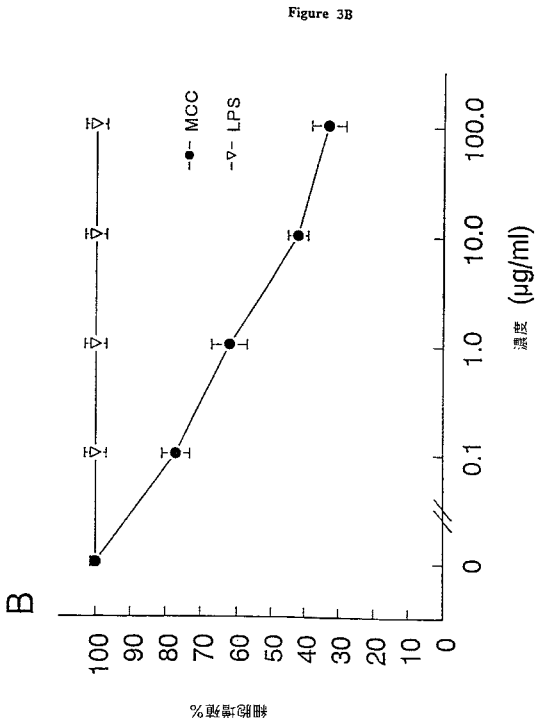
【図４】

Figure 3A



【図５】

Figure 3B



【図６】

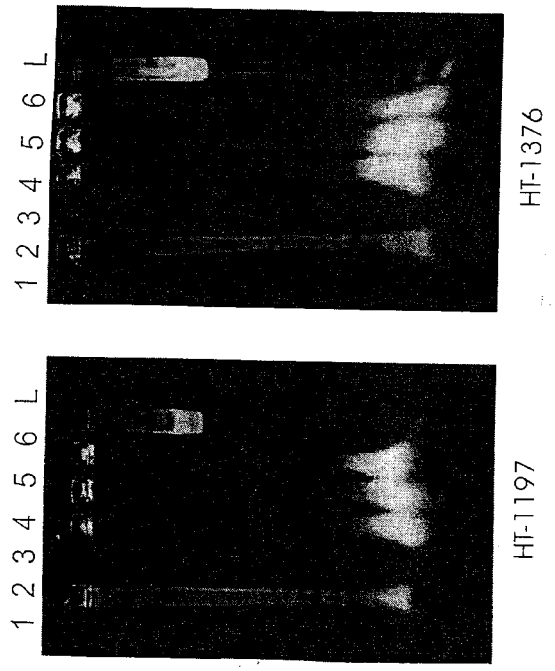
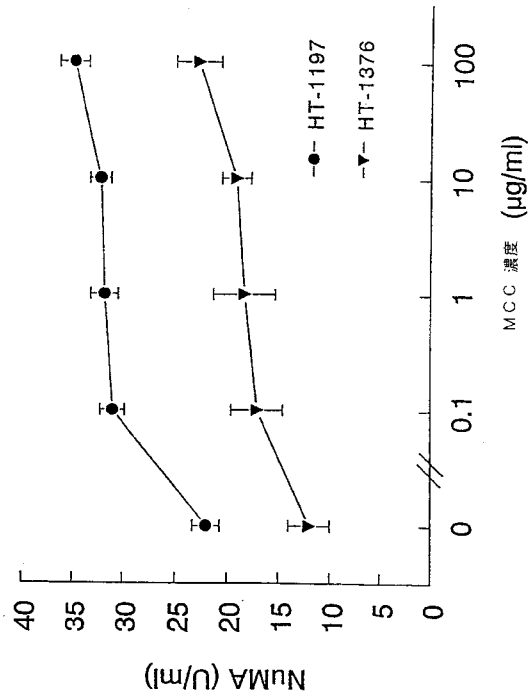


FIG. 4

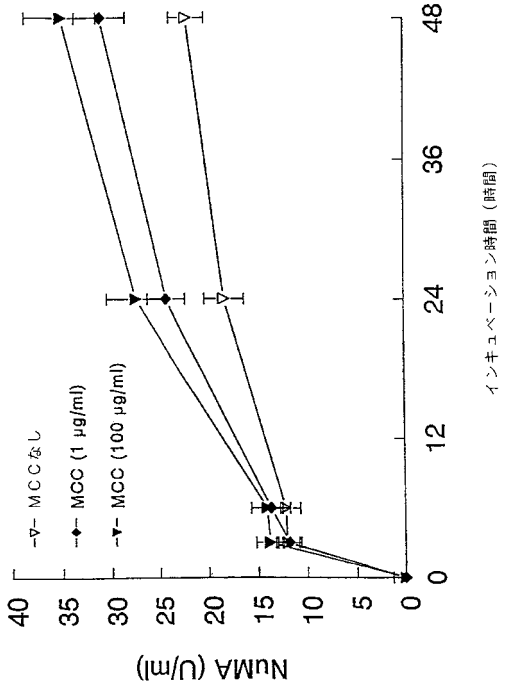
【図７】

Figure 5



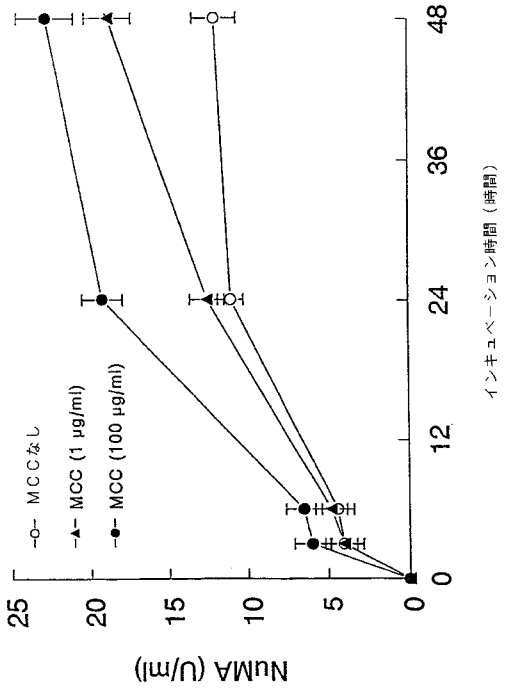
【図８】

Figure 6A



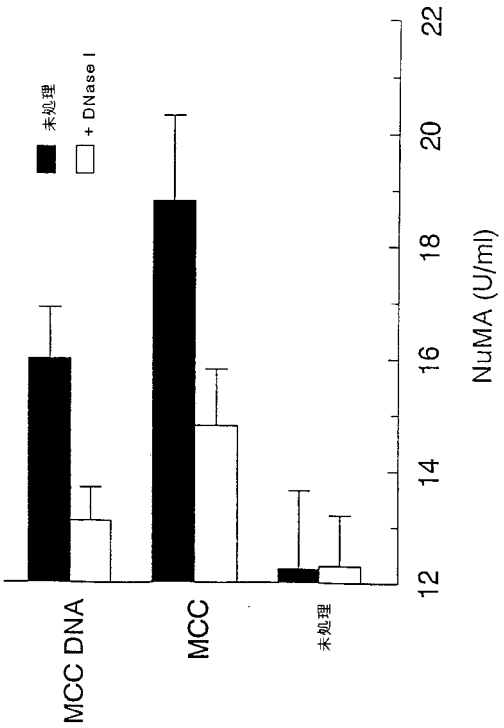
【図９】

Figure 6B



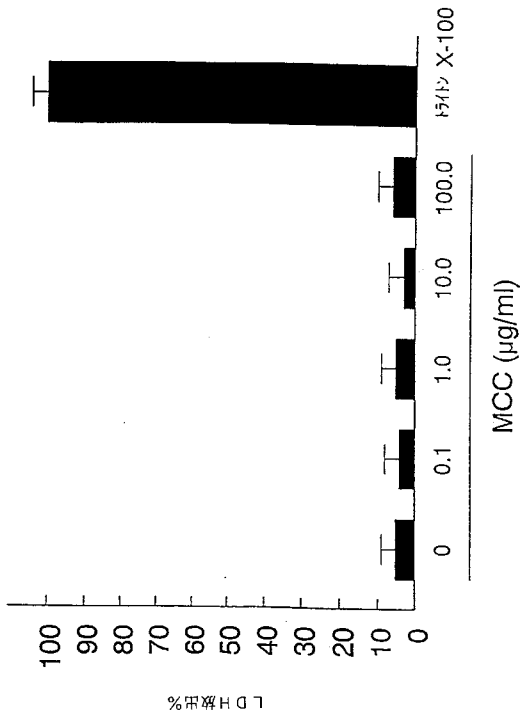
【図１０】

Figure 7



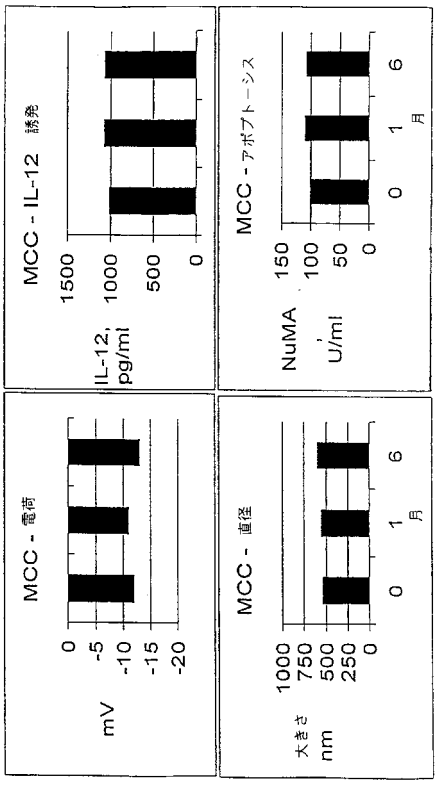
【図１１】

Figure 8



【図１２】

Figure 9



フロントページの続き

(74)代理人 100089026
弁理士 木村 高明
(72)発明者 フィリップス, ナイジェル, シー
カナダ エヌ６エム １エー３ オンタリオ ロンドン ソブリン ロード ３８３
(72)発明者 フィリオン, マリオ, シー
カナダ エヌ６エム １エー３ オンタリオ ロンドン ソブリン ロード ３８３

審査官 小柳 正之

(56)参考文献 特表２００１－５１３５０４（ＪＰ, Ａ）
特表平０８－５０８９７６（ＪＰ, Ａ）
Journal of Urology (1995), Vol.153, p.1706-1710
Journal of Urology (1996), Vol.156, p.1189-1193
Journal of Urology (1995), Vol.154, p.269-274
J.Exp.Med. (1995), Vol.181, p.1615-1621
SHIMADA S, ANTITUMOR ACTIVITY OF THE DNA FRACTION FROM MYCOBACTERIUM BOVIS BCG 2. 以下備考, JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, 米国, １９８５年 3月 1日, V74N3, P681-688, EFFECTS ON VARIOUS SYNGENEIC MOUSE TUMORS
Microbiol.Immunol. (1992), Vol.36, No.9, p.983-997

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 35/00-48/00
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE(STN)