

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6062917号

(P6062917)

(45) 発行日 平成29年1月18日 (2017. 1. 18)

(24) 登録日 平成28年12月22日 (2016. 12. 22)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/737 (2006. 01)

A 6 1 K 31/737

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 9/48 (2006. 01)

A 6 1 K 9/48

A 6 1 K 9/20 (2006. 01)

A 6 1 K 9/20

請求項の数 8 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-501262 (P2014-501262)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月23日 (2012. 3. 23)
 (65) 公表番号 特表2014-511841 (P2014-511841A)
 (43) 公表日 平成26年5月19日 (2014. 5. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/030233
 (87) 国際公開番号 W02012/129461
 (87) 国際公開日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27)
 審査請求日 平成27年3月20日 (2015. 3. 20)
 (31) 優先権主張番号 13/069, 860
 (32) 優先日 平成23年3月23日 (2011. 3. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 PCT/US2011/039550
 (32) 優先日 平成23年6月8日 (2011. 6. 8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504260058
 ザ ユニバーシティ オブ ユタ リサー
 チ ファウンデーション
 アメリカ合衆国ユタ州84108, ソルト
 ・レイク・シティ, アラビーン・ドライブ
 615, スイート 310
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 (72) 発明者 プレストウィッチ, グレン, ディー.
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9824
 5, イーストサウンド, ダウンウィンド
 ライヴ 166, ピー. オー. ボックス
 218

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 泌尿器科の炎症の治療及び予防の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

泌尿器の炎症を治療または予防する局所用医薬の製造における、
 硫酸化ヒアルロナン、または医薬的に許容可能なその塩若しくはエステルの使用において、
 前記硫酸化ヒアルロナンの N-アセチル-グルコサミン残基の第一級 C-6 ヒドロキシ
 ルプロトンの 100% が硫酸基で置換されており、前記硫酸化ヒアルロナンの硫酸化度が
 3.5 ~ 4.0 であり、前記硫酸化ヒアルロナンの平均分子サイズが 2 kDa ~ 10 kDa
 であることを特徴とする使用。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の使用において、前記医薬が更に、消炎剤、解熱性剤、消炎の用に供す
 ステロイド薬及び非ステロイド薬、ホルモン、成長因子、避妊薬、抗ウイルス剤、抗菌
 剤、抗真菌薬、鎮痛薬、催眠薬、鎮静剤、精神安定剤、抗痙攣薬、筋弛緩薬、局所麻酔薬
 、鎮痙薬、抗潰瘍薬、ペプチド性アゴニスト、交感神経作動薬、心血管薬剤、制癌薬、ま
 たはオリゴヌクレオチドを更に含むことを特徴とする使用。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の使用において、前記医薬が、経粘膜投与に適した製剤を含むことを特
 徴とする使用。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の使用において、前記医薬が、経腔投与、又は膀胱内注入に適した製剤
 を含むことを特徴とする使用。

10

20

【請求項 5】

請求項 1 に記載の使用において、前記泌尿器の炎症が前記膀胱、尿道、尿路上皮内膜、前立腺、膣、子宮、またはそれらの任意の組み合わせの炎症を含むことを特徴とする使用。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の使用において、前記硫酸化ヒアルロنانの平均分子サイズが 3 k D a ～ 6 k D a であることを特徴とする使用。

【請求項 7】

硫酸化ヒアルロナン、または医薬的に許容可能な塩若しくはそのエステルを含む泌尿器の炎症を治療または予防する局所用医薬において、前記硫酸化ヒアルロنانの N-アセチルグルコサミン残基の第一級 C-6 ヒドロキシルプロトンの 100% が硫酸基で置換されており、前記硫酸化ヒアルロنانの硫酸化度が 3.5 ～ 4.0 であり、前記硫酸化ヒアルロنانの平均分子サイズが 2 k D a ～ 10 k D a であることを特徴とする医薬。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の医薬において、前記硫酸化ヒアルロنانの平均分子サイズが 3 k D a ～ 6 k D a であることを特徴とする医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国仮特許出願第 13/069,860 号明細書（2011 年 3 月 23 日出願）からの優先権を主張する一部継続出願である。該出願は米国特許出願第 12/870,774 号明細書（2010 年 8 月 27 日出願）からの優先権を主張する一部継続出願であり、該出願は国際出願第 PCT/US09/039498 号明細書（2009 年 4 月 3 日出願）からの優先権を主張する一部継続出願であり、該出願は米国仮特許出願第 61/042,310 号明細書（2008 年 4 月 4 日出願）の利益を主張するものである。本出願はまた、米国仮特許出願第 61/352,550 号明細書（2010 年 6 月 8 日出願）に対する優先権を主張する国際出願第 PCT/US11/39550 号明細書（2011 年 6 月 8 日出願）に対して優先権を主張するものでもある。これらの出願は、それら全ての教示内容に関して、その全体が本明細書において参照により援用されている。

【0002】

謝辞

本研究は、米国国立衛生研究所（許可番号 T32 HL079874-04）、及び中小企業技術革新制度（許可番号 R43 DK093413-01）から一部の資金助成を受けて、本発明に至った。

【背景技術】

【0003】

泌尿器科の炎症は、多くの個人にとって健康上の大きな懸念である。例えば、神経因性膀胱（NGB: neurogenic bladder）疾患が過度な炎症によるものであり、後に膀胱線維症を来す場合がある。小児における先天性疾病の多くは、後部尿道弁、膀胱／排泄腔外反症、及び脊髄髄膜瘤（MMC: myelomeningocele）／二分脊椎を含む NGB 疾病につながる。NGB 疾患はいまだに、小児における腎不全及び腎移植の原因で最も多いものの 1 つであり続けている。小児におけるこれらのプロセスは成人におけるものと共通部分があり、間質性膀胱炎（IC: interstitial cystitis）などの慢性炎症膀胱疾患から、有意な骨盤部疼痛及び消耗性尿症状が起こる。米国において IC に患う人々は 4 百万人を突破し、その大部分は女性が占めている。根本となる生理は炎症に基づくが、厳密な病因については解明がつかないままになっている。近年、米国泌尿器疾患プロジェクトによって IC 関連の経費及び疾病負担額が分析され、年間 7 億 5 千万ドルを超過していることが判明した。この病状は原因及び病因が不可解なため、現在における治療は最適なものにはなっていない。疾病過程を永續さ

せる炎症カスケードについての根本的な理解の欠如が、治療選択肢の不足という結果を招いていた。

【0004】

膀胱痛症候群／間質性膀胱炎（PBS／IC：painful bladder syndrome／interstitial cystitis）は、消耗性疾病にとどまる無痛性の膀胱疾患であり、真に有効な治療選択肢は僅かしかない^{1～4}。PBS／ICは、主として女性に影響を及ぼす慢性の疾病であり、頻尿、膀胱痛、夜間多尿、尿意促進、及び骨盤部疼痛により特徴付けられる。根本となる生理が炎症に基づくのに対して、機序の一因となる病因は多くの因子からなり⁴、GAG層の欠失、及びマスト細胞によって媒介される神経性炎症を包含する⁵。米国においてPBS／ICは1997年には約百万人に影響すると推定されていた⁶。より最近の推定値は、全女性の0.1%～1%の範囲に及ぶ²。近年、PBS／ICに関連した経費及び疾病負担は、米国泌尿器疾患プロジェクトによって分析され、年間7億5千万ドルを超過していることが判明した⁷。

10

【0005】

2つの消炎性の硫酸化多糖類は、現在利用可能な医療治療法であるが、両方とも特に効果が無い。まず、膀胱内にヘパリンを投与した。ただし、作用が非特異的であり、コストが嵩み、大きな効能が得られないため、定期的な使用を制限された^{8～10}。第二に、GAG層を補充すると言われる経口エルミロン（ペントサンポリ硫酸）は、効能開始のリードタイムが長いと、その効能が発揮されるのは女性の50%未満に過ぎず、生物学的利用能に乏しい（摂取量の6%未満）^{11、12}。他の2とおりの治療法には、Cystistat¹³（未改変型0.04%のヒアルロン酸、HA）、及びCystoProtek^{14、15}、または0.2%のコンドロイチン硫酸を膀胱内に滴注することが包含される。PBS／IC治療技術の選択肢としては、経口ヒドロキシジン、ケルセチン、アミトリプチリン、ガバペンチン及び麻薬が挙げられ、また、併用療法のほか、膀胱内DMSO、レシニフェラトキシシン及びボトックスも使用されている^{2～4}。治療選択肢を再考すると、効力の高い治療が必要であるという点に同意出来る^{2、3}。

20

【0006】

膀胱に尿が貯蔵されるためには、柔順性（適応性）が必要である。これは、低圧では尿の可変容積の保持が不可欠なものであることを意味する。機能不全になると、結果として膀胱圧力が上昇し、尿が腎臓に送られ、糸球体の外傷、腎実質性の線維症、及び腎機能不全を招く。膀胱壁内における細胞外基質（ECM：extracellular matrix）の過剰な堆積は、膀胱壁の柔軟性が失われる主要な機序である。この線維症は複数の機序に起因する場合があります、それらの機序の1つに慢性炎症が含まれる。それに呼応して、膀胱線維症は、ECMタンパク質（コラーゲンI型及びIII型）が蓄積される創傷癒合プロセスの一部になっている。また、慢性組織の炎症中に、線維芽細胞及び筋線維芽細胞に対する損傷は、細胞増殖、自動能、収縮性、及びECM合成を活性化させる。最終的な結果として、線維症、柔順性の欠如、及び膀胱機能不全に至る。

30

【0007】

従来より受け入れられている炎症の治療としてはほかにも、UV光線療法、コルチコステロイド及び糖質コルチコイド、アシトレチン、シクロスポリン及びメトトレキサートを挙げることができるが、これらの治療はそれぞれ、免疫抑制及び肝疾患から皮膚の菲薄化までにわたる重篤な副作用を引き起こし、更には出生時欠損の原因にもなりかねない。これらの治療は、部分的または完全に効果が無いと、多くの場合は、患者が結果に納得のいかない状態に放置されることになる。

40

【0008】

上述したように、ヘパリン治療はまた実験的にも探求されてきた。ヘパリン（即ち、硫酸化多糖）は、因習的に殆ど抗凝固剤としてしか使用されてこなかったが、その消炎特性はよく知られている。これらの炎症疾患の治療においては、ヘパリン及びその誘導体が幾分有望であることが立証されてきた。炎症カスケードにおいて、特にヘパリン及びその誘導体は、少なくとも3つの重要な事象を阻害する。第一に、ヘパリンが白血球インテグリン

50

ンPセレクトイン及びLセレクトインに結合してブロックすることである。第二に、ヘパリン及びその誘導体が、カチオン性PMNプロテアーゼヒト白血球エラスターゼ及びカテプシンGに結合しこれを阻害することである。それによって炎症カスケードが低減され、セレクトイン阻害の第1のヘパリン障壁をエスケープするPMNを介して、タンパク質分解性の組織外傷が軽減される。第三に、ヘパリン及びその誘導体が、前進性グリコシル化終末産物に対する受容体(RAGE: receptor for advanced glycation end-products)の相互作用をそのリガンドで阻害する可能性のあることである。

【0009】

ヘパリン及びその誘導体が炎症治療において有望であることが立証されてきた一方で、ヘパリン及びその誘導体を用いた治療は幾つかの重大な欠点も露呈している。第一は、ヘパリン及びその誘導体はブタ由来であることから、ウイルスの異種間転移が懸念されることである。第二は、ヘパリンの抗凝血性特性により、この化合物で治療された糖尿病患者が出血過剰の危険に曝されることである。第三は、カチオンタンパク質血小板因子-4(PF-4)を有するヘパリンの複合体に対する抗体を産生する特定の個体において、ヘパリンが血小板減少を誘発し、結果として、破滅的な血小板凝集、並びに全身的な奇異性の動脈及び静脈凝固を来す可能性のあることである。ゆえに、泌尿器科の炎症の治療に使用できる一方で他の治療において遭遇する無数の副作用を回避できる化合物を処方することが重要となっているが、そのニーズはいまだ満たされていない。

【発明の概要】

【0010】

本明細書中には、被験者における泌尿器科の炎症を治療または予防する方法が記載されており、本方法は

a. 前記ヒアルロナンまたはその薬学的に許容可能な塩若しくはそのエステルが、少なくとも1つの硫酸基と、アルキル基またはフルオロアルキル基を含んでなるN-アセチルグルコサミン残基の少なくとも1つの第一級C-6ヒドロキシル位と、を含んで構成される、改変型ヒアルロナンまたは薬学的に許容可能な塩若しくはそのエステルと、

b. 部分的若しくは完全硫酸化ヒアルロナン、薬学的に許容可能な塩若しくはそのエステル、またはそれらの組み合わせと、

を含有してなる有効量の化合物を被験者に投与する工程を含む。

【0011】

本発明の利益は、後述する説明の一部に記載されており、部分的にはその説明から明らかであり、または以下に記載する態様の慣行によって学ぶことができる。以下に記述した利益は、特に添付の請求の範囲において指摘されている要素及び組み合わせによって実現され、達成される。上掲の概要説明及び下掲の詳細説明は両方とも、例示的かつ単なる説明であり、限定的なものでないことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0012】

添付の図面は、本明細書の一部に組み込まれ、本明細書の一部を構成しており、後述する幾つかの態様を示す。

【0013】

【図1】図1は、アルキル化及びフルオロアルキル化ヒアルロナン及び硫酸化されたその誘導体を生成するための合成スキームを示す。

【図2】図2は、部分的硫酸化ヒアルロナンを製造するための例示的な合成手順であって、この合成手順とは、(1)制御された加水分解的な鎖開裂による局部脱重合、(2)トリブチルアンモニウム塩への変換、及び(3)硫酸化によって部分的硫酸化ヒアルロナンの生成である。

【図3】図3は、LL-37を滴注された膀胱と生理食塩水対照とを比較した膀胱の肉眼的画像を示す。12時間後(A)及び24時間後(B)に、生理食塩水を滴注された対照膀胱を回収した。内側粘膜表面を露出した半切除済み膀胱には、炎症の形跡がなかった。

12時間後（C）及び24時間後（D）に、LL-37を滴注された膀胱（45分間の単回滴注）を回収した。12時間後（C）、中度の炎症が観測され、紅斑／出血の病巣領域、及び大域的な浮腫が観測された。24時間後（D）、重篤な炎症が観測され、大域的な浮腫／出血、有意な浮腫、及び血管過多が明瞭に見られた。

【図4】図4は、LL-37を滴注された膀胱と生理食塩水対照とを比較した、H&Eによる組織像を示す。12時間後（A）及び24時間後（B）に、生理食塩水を滴注された対照膀胱を回収した。断面の組織診断に基づき、12時間目または24時間目に炎症（U－尿路上皮、SBM－粘膜下組織、LP－基底膜、SMC－平滑筋細胞層）の形跡が無いことが実証された。12時間後（C）及び24時間後（D）に、LL-37を滴注された膀胱（45分間の単回滴注）を回収した。12時間後（C）、中度の炎症が観測され、尿路上皮の潰瘍の病巣領域、SBMにおける中度の組織浮腫、及びLP層が観測された。全ての層（U、SBM、LP及びSMC）にわたって中度のPMN浸潤があると共に、血管からPMN（矩形）が辺縁趨向していた。微小膿瘍（MA）が形成された形跡はなかった。24時間後（D）、重篤な炎症が観測され、SBMにおける中度の浮腫、及びLPにおける重篤な浮腫が見られた。全ての層（円形）にわたってPMNが有意に浸潤し、MAが形成されているほか、血管からPMN（矩形）が辺縁趨向していることも認められた。画像の拡大倍率は全て10倍である。

【図5】図5は、LL-37を滴注された膀胱と生理食塩水対照とを比較する、組織MPO炎症定量アッセイを示す。生理食塩水対照組織における最小のMPO活性（12時間後に11 ng/mL、24時間後に14 ng/mL；青いバー）。LL-37を滴注された膀胱におけるMPO活性の有意な上昇、及び12時間（229 ng/mL）～24時間（849 ng/mL）の継続的な漸増（赤いバー）。

【図6】図6は、LL-37を滴注する前（A）のGM-1111（10 mg/mL）プレコート／前処理、及びLL-37を滴注した後（B）のGM-1111（10 mg/mL）後処理の肉眼的画像（内側粘膜表面を露出した半切除済み膀胱）を示す。24時間後に全ての組織を回収した。（A）において最小限度の炎症が観測され、浮腫及び斑状の血管過多が軽度すぎないことが認められた。（B）において中度の炎症が観測され、中度の浮腫が認められたが、出血の形跡はなかった。パネル（C）及び（D）組織の組織像（（C）は（A）に対応し、（D）は（B）に対応する）。粘膜下組織（SBM：submucosa）においてSAGEプレコート／前処理（C）によって、中度の浮腫があることが明らかにされたが、基底膜（LP：lamina propria）における浮腫の形跡はなかった。全ての層にわたってPMNの形跡がなく、血管からの辺縁趨向が無いことも観測された。GM-1111後処理（D）により、SBM及びLPに浮腫が存在する一方、尿路上皮及びSBMにはPMNが全く存在せず、LP層内にはPMNが有意に少ないことが明らかにされた。平滑筋細胞層（SMC：smooth muscle cell layer）と隣接したLP層の深部においては、存在するPMN（円形）が濃厚化されていた。血管からPMN（矩形）が辺縁趨向している有意な形跡は、観測されなかった。パネル（E）は、GM-1111プレコート／前処理の組織MPOアッセイを示し、前処理済みサンプルにおいてMPO活性が2.2倍に減少したことを図示したものである（紫色のバー）。パネル（F）は、GM-1111後処理の組織MPOアッセイを示し、後処理済みサンプルにおいてMPO活性が2.5倍に減少したことを図示したものである（紫色のバー）。組織像の画像の拡大倍率は全て10倍である。

【図7】図7は、LL-37を滴注する前（A）のヘパリン（10 mg/mL）プレコート／前処理、及びLL-37を滴注した後（B）のヘパリン（10 mg/mL）後処理の肉眼的画像（内側粘膜表面を露出した半切除済み膀胱）を比較対照して示している。24時間後に全ての組織を回収した。（A）において有意な炎症が観測され、浮腫、血管過多、及び出血が明瞭に見られた。（B）において有意な炎症が観測され、同様なレベルの浮腫、血管過多、及び出血が明瞭に見られた。パネル（C）及び（D）の組織の組織像（（C）は（A）に対応し、（D）は（B）に対応する）。ヘパリンプレコート／前処理（C）によって、尿路上皮の潰瘍（U）、粘膜下組織（SBM）及び基底膜（LP）における

10

20

30

40

50

浮腫、全ての層にわたってPMNが存在しており、かつ血管からPMNが辺縁趨向していることも明らかにされた。ヘパリン後処理済みサンプル（D）に同様な炎症の組織像が観測された。パネル（E）は、ヘパリンプレコート／前処理の組織MPOアッセイを示し、前処理済みサンプルにおいてMPO活性が僅かに減少したことを図示したものである（紫色のバー）。パネル（F）は、ヘパリン後処理の組織MPOアッセイを示し、後処理済みサンプルにおいてMPO活性に有意な減少がなかったことを図示したものである（紫色のバー）。組織像の画像の拡大倍率は全て10倍である。

【図8】図8は、GM-1111を「膀胱アーマー（bladder armor）」として使用してコーティングした図を示す。パネル（A）及び（B）は、GM-1111（10mg/ml）の滴注直後に回収された組織を表す。（A）は低倍率（10倍）、（B）は高倍率（20倍）である。（A）及び（B）は、尿路上皮（U）と隣接した泌尿器GAG層の様なGM-1111でのコーティング（緑色蛍光）、粘膜下組織（SBM）、基底膜（LP）、及び表在性平滑筋（SMC）層への浸透が深くなったことを示したものである。細動脈を裏打ちする内皮細胞は、基底部及び管腔の両側面（矩形）にGM-1111で有意なコーティングを施した図である。パネル（C）及び（D）は、GM-1111（10mg/ml）の滴注後24時間目に、回収された組織を表す。（C）及び（D）は両方とも20倍の拡大倍率で撮像された。泌尿器のGAG層沿いにはGM-1111の形跡が無いが、血管構造は依然として、SBMの選択領域内で、並びに小細動脈を裏打ちする内皮の基底部及び管腔の両側面（矩形）沿いに、顕著に確認された。GM-1111は依然として、SMC層の無作為領域に挿入されていることが明瞭に見られた。

【図9】図9は、GM-0111の事前滴注が、LL-37（250μM）誘発性膀胱炎を予防することを示している。LL-37を膀胱腔内に滴注した後24時間目の体量（a）、膀胱重量／体量（b）、死体解剖スコア（c）、及び組織学的スコア（d）の変化が、データに示されている。各グラフ内の横線は、平均値（a及びb）並びにメジアン値（c及びd）を示す。グレー色の領域は正常範囲を示す（*p<0.05、**p<0.01、及び***p<0.001）。

【図10】図10は、ヘマトキシリン及びエオシンで染色された組織の顕微鏡写真を示す。LL-37（250μM）を滴注した後24時間目に、膀胱における炎症が顕著に変化したことがわかる。GM-0111の事前滴注によって、膀胱における炎症変化の重篤度が用量依存的な様式で低減する。このことは、多形核好中球浸潤（PMNで充填された好塩基領域、矢印）、大浮腫（*）、及び剥離した上皮層（矢印）の炎症が軽減されたという特徴によって示されている。膀胱は無処理の正常なもの（a及びe）、PBS／LL-37（b及びf）、GM-0111（10mg/mL）／LL-37（c及びg）、並びにGM-0111（100mg/mL）／LL-37（d及びh）で処理されたものである。MLは筋肉層、ELは上皮層、及びLuは内腔である。a-dは画像の概観図、e-hは元の拡大率を5xとして圍繞領域（boxed area）を拡大表示した画像である。

【図11】図11は、GM-0111の事前滴注によって、LL-37（250μM）による膀胱炎誘発が防止されることを示す。LL-37を膀胱腔内に滴注した後24時間目の血清中のSAP濃度（a）、MPOの組織活性（b）、IL-6の組織中濃度（c）、及びPTX3（d）が、データに示されている。各グラフ内の横線は平均値を示す。グレー色の領域は正常範囲を示す（**p<0.01、及び***p<0.001）。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本化合物、組成物、及び／または方法を開示し記述する前に、下掲の態様はそれらに限定されるものではなく、特定の化合物、合成方法、またはそのような使用は当然変動し得ることを理解すべきである。また、本明細書において用いられている用語は特定の態様に関してのみ記述することを目的とするものであって、制限を意図したものではないことも、理解すべきである。

【0015】

本明細書、及びそれに続く特許請求の範囲においては、複数の用語に言及する。それらの用語は以下の意味を持つように定義されていなければならない。

【0016】

明細書及び添付の特許請求の範囲に用いられているように、文脈上別段の指示が無い限り、単数形の名詞「或る (a)」または「或る (an)」、及び「その (the)」は複数形の指示物を包含することに注意すべきである。ゆえに、例えば、「薬学的担体」に言及する場合、2つ以上のそのような担体の混合物、及びこれらに類するものが包含される。「任意選択的 (optional)」或いは「任意選択的に (optionally)」は、後述する事象または状況が起こり得るかどうか、並びに事象または状況が起こる事例、及び起こらない事例がその説明に包含されることを意味する。例えば、語句「任意選択的に置換された低級アルキル」は、低級アルキル基の置換が可能または不可能であり、この説明には非置換低級アルキル及び置換低級アルキルの両方が包含されることを意味する。

10

【0017】

明細書及び結びの特許請求の範囲において組成物または物品における特定のエレメントまたは成分の重量部に言及する場合、エレメントまたは成分と、重量部を表す対象となる組成物または物品中の他の任意のエレメントまたは成分との間の重量関係を示す。ゆえに、2重量部の成分Xと5重量部成分Yとを含む化合物においてはX及びYが2：5の重量比で存在し、化合物中に付加的な成分が含有されているかどうかに関係なくそのような重量比で存在する。

20

【0018】

成分の重量%は、特に別段の指定が無い限り、成分が含まれている処方物または組成物の総重量に基づく。

【0019】

明細書及び結びの特許請求の範囲において使用されている化学種の残基は、特定の反応スキーム、または以降の処方物若しくは化学製品において、その化学種から部分が実際に採取されるかどうかに関係なく、化学種の結果的産物としての部分を指す。例えば、Yをヒアルロナン分子の残部（即ち、残基）とした場合、少なくとも1つの-OH基を含有するヒアルロナンは、式Y-OHで表すことができる。

【0020】

30

本明細書において用いられている「治療する」という用語は、先在する症状の徴候を維持するかまたは低減するものとして定義される。本明細書において用いられている「防止する」という用語は、1つ以上の疾患の徴候が起こる確率をなくすか減ずるものとして定義される。本明細書において用いられている「阻害する」という用語は、本明細書に記載されている化合物が、化合物の不在下における同じ活性と比較して活性を完全になくすかまたは活性を減ずることができることを云う。

【0021】

本明細書において用いられている「泌尿器科の炎症」という用語は、泌尿生殖系の任意の部分または領域に関連する炎症として定義される。泌尿器科の炎症には、膀胱、尿道、尿路上皮内壁、腎臓、前立腺、膣、子宮、またはそれらの任意の組み合わせの炎症が包含されるが、これらに限定されない。

40

【0022】

本明細書において用いられている「SAGE」という用語は、アルキル化及びフルオロアルキル化半合成グリコサミノグリコサンエーテルとして定義される。

【0023】

泌尿器科の炎症を治療または防止するための方法が、本明細書中に記載されている。一態様において本方法は、改変型ヒアルロナンまたは薬学的に許容可能な塩若しくはそのエステルを被検者に投与する工程を含み、前記ヒアルロナンまたはその薬学的に許容可能な塩若しくはそのエステルが、少なくとも1つの硫酸基と、アルキル基またはフルオロアルキル基を含んでなるN-アセチルグルコサミン残基の少なくとも1つの第一級C-6ヒ

50

ドロキシル位と、を含んで構成される。

【0024】

一態様においては、改変型ヒアルロナンのN-アセチルグルコサミン残基の少なくとも1つの第一級C-6ヒドロキシル位が、非置換アルキル基で置換される。本明細書において用いられている「アルキル基」という用語は、炭素原子数が1～24の分枝状または無分枝状の飽和炭化水素基である。一態様において、アルキル基はC₁～C₁₀分枝状または直鎖状アルキル基である。アルキル基は非置換または置換であり得る。アルキル基が置換されている場合、アルキル基上に存在する1つ以上の水素原子が、アルキニル、アルケニル、アリール、ハライド、ニトロ、アミノ、エステル、ケトン、アルデヒド、ヒドロキシ、カルボン酸、アラールキル、またはアルコキシを含むがこれらに限定されない1つ若しくはそれ以上の基と置換され得る。アルキル基に関して「非置換」という用語は、水素と炭素のみからなる飽和炭化水素のことを指す。非置換アルキル基の例としては、限定はされないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、テトラデシル、ヘキサデシル、エイコシル、テトラコシル及びこれらに類するものが挙げられる。

10

【0025】

別の態様においては、ヒアルロナンのN-アセチルグルコサミン残基の少なくとも1つの第一級C-6ヒドロキシルプロトンが、フルオロアルキル基で置換される。本明細書において用いられている「フルオロアルキル基」という用語は、少なくとも1つの水素原子がフッ素で置換されている、炭素原子数が1～24の分枝状または無分枝状の飽和炭化水素基のことを指す。或る態様において、フルオロアルキル基は少なくとも1つのトリフルオロメチル基を含む。他の態様において、フルオロアルキル基は式-CH₂(CF₂)_nCF₃を有し、式中のnは1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数である。一態様において、フルオロアルキル基は-CH₂CF₂CF₃または-CH₂CF₂CF₂CF₃である。

20

【0026】

一態様においては、(a)ヒアルロナンまたはその誘導体を十分な量の塩基と反応させて、N-アセチルグルコサミン残基の少なくとも1つの第一級C-6ヒドロキシルプロトンを脱プロトン化する工程と、(b)脱プロトン化されたヒアルロナンまたはその誘導体をアルキル化剤と反応させるか、または少なくとも1つの脱プロトン化された第一級C-6ヒドロキシル基をアルキル化若しくはフルオロアルキル化するのに十分な時間及び濃度にてフルオロアルキル化する工程と、によって、SAGEが生成される。塩基性条件がまた改変プロセス中にグリコシド結合の開裂、更にはヒアルロナン誘導体の低分子量化につながり得ることは、当業者であれば理解されるであろう。また、塩基性条件によって酸が脱プロトン化され、カルボキシレート基及び二次ヒドロキシル基を生じ、これらの求核性部分のそれぞれが、平衡状態における相対存在量及びアニオン種の求核性に比例して、引き続いて起こるアルキル化に関与し得ることも理解されよう。例えば、グルクロン酸部分の2-O及び/若しくは3-Oヒドロキシルプロトン、またはN-アセチルグルコサミン部分のC-4ヒドロキシル位は、脱プロトン化され、アルキル化若しくはフルオロアルキル化され得る。これについての例は図1に示されている。図中のRは水素、アルキル基またはアルキル基であり得る。ヒアルロナン出発材料は、遊離酸またはその塩として存在し得る。

30

40

【0027】

ヒアルロナン出発材料の誘導体はまた本明細書中で使用できる。アルキル化またはフルオロアルキル化ステップに先立って、誘導体はヒアルロナンに対する何らかの改変を含む。本明細書においては多種多様な分子量ヒアルロナンを使用できる。一態様において、改変(例えば、アルキル化、フルオロアルキル化、及び硫酸化)前のヒアルロナンの分子量は10kDa未満である。別の態様において、アルキル化またはフルオロアルキル化前のヒアルロナンの分子量は、10kDa～2,000kDa、25kDa～1,000kDa、または50kDa～500kDaである。或る態様において、ヒアルロナン出発材料また

50

はその誘導体は、動物源から誘導されない。これらの態様において、ヒアルロナンは細菌などの他の源から誘導され得る。例えば、組み換えB. サブティリス (B. subtilis) 発現系またはストレプトマイセス (Streptomyces) 株をヒアルロナン出発材料の生成に使用できる。

【0028】

ヒアルロナン出発材料またはその誘導体を最初に十分な量の塩基と反応させて、N-アセチルグルコサミンの少なくとも1つの第一級C-6ヒドロキシルプロトン脱プロトン化する。塩基の選択肢は多様であり得る。例えば、本明細書においては水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムなどのアルカリ水酸化物を使用できる。塩基の濃度または量は、所望のアルキル化度またはフルオロアルキル化度に依りて変動し得る。一態様において塩基の量は、ヒアルロナン出発材料またはその誘導体のN-アセチルグルコサミン部分の少なくとも0.001%の第一級C-6ヒドロキシルプロトン脱プロトン化するのに十分である。他の態様において塩基の量は、ヒアルロナン出発材料またはその誘導体のN-アセチルグルコサミン部分の第一級C-6ヒドロキシルプロトンの0.001%~100%、0.001%~90%、0.001%~80%、0.001%~70%、0.001%~60%、0.001%~50%、1%~50%、5%~45%、5%~40%、5%~30%、5%~20%、10%~50%、20%~50%、または30%~50%を脱プロトン化するのに十分である。溶液の塩基性が高いほど、鎖開裂反応が発生する確率が上昇し、アルキル化/フルオロアルキル化が遂行され得る度合いが高まることが理解されよう。例えば、ヒアルロナン上に存在する他のヒドロキシル基(例えば、2-OH、及び/または3-OH)が、アルキル化またはフルオロアルキル化され得る。一態様においては、ヒアルロナン上に存在する全てのヒドロキシル基が、アルキル化またはフルオロアルキル化され得る。他の態様においては、ヒアルロナン上に存在するヒドロキシルプロトンの0.001%、0.01%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、またはその任意の範囲が脱プロトン化され、引き続いてアルキル化またはフルオロアルキル化され得る。

【0029】

ヒアルロナン出発材料またはその誘導体を塩基で処理した後、脱プロトン化ヒアルロナンをアルキル化剤またはフルオロアルキル化剤と反応させて、SAGEを生成する。アルキル化剤の例としては、限定はされないが、アルキルハライドが挙げられる。臭化アルキル及びヨウ化アルキルは、特に有用である。同様に、フルオロアルキル化剤はフルオロアルキルハライドを包含し得る。有機合成に一般に使用されるアルキル化剤及びフルオロアルキル化剤は、本明細書中で使用できる。

【0030】

アルキル化及びフルオロアルキル化されたSAGEを製造するための例示的な合成手順は、図1に提供されている。図1を参照すると、ヒアルロナン(HA: hyaluronan)を塩基(例えば、NaOH)及びアルキル化剤(例えば、CH₃I)で処理し、ヒアルロナンのN-アセチルグルコサミン残基の第一級C-6ヒドロキシルプロトンでメチル化して、メチル化したヒアルロナン(MHA: methylated hyaluronan)を生成する。図1にはまた、フルオロアルキル化剤(例えば、CF₃(CF₂)₂CH₂Br)を使用してフルオロアルキル化ヒアルロナン(FHA: fluoroalkylated hyaluronan)を製造するための例示的な合成手順が提供されている。

【0031】

アルキル化またはフルオロアルキル化されたSAGEは、アルキル化またはフルオロアルキル化されたSAGEを硫酸化剤と反応させて硫酸化生成物を生じる。硫酸化の度合いは、部分的な硫酸化から完全な硫酸化にいたるまで変動し得る。一般的に、アルキル化またはフルオロアルキル化されたヒアルロナンまたはその誘導体上に存在する遊離ヒドロキシル基は、硫酸化され得る。一態様において、少なくとも1つのC-2ヒドロキシルプロトン、及び/またはC-3ヒドロキシルプロトンが硫酸基で置換される。追加の実施形態

は、N-アセチルグルコサミン部分のC-4ヒドロキシル位における硫酸塩、または本化合物のグルクロン酸部分のC-2位、C-3位、及びN-アセチルグルコサミン部分のC-4ヒドロキシル位における硫酸化の任意の組み合わせを含み得る。硫酸化度は、アルキル化またはフルオロアルキル化されたSAGEの0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、またはその任意の範囲／二糖単位であり得る。一態様においては、アルキル化またはフルオロアルキル化されたSAGEを塩基で処理することによって、1つ以上のヒドロキシルプロトン脱プロトン化し、続いて、硫酸化剤を添加する。硫酸化剤は、ヒドロキシル基または脱プロトン化されたヒドロキシル基と反応して硫酸基を生ずる任意の化合物である。SAGEの分子量は反応条件に応じて変動し得る。一態様において、SAGEの分子量は2kDa～500kDa、2kDa～250kDa、2kDa～100kDa、2kDa～50kDa、2kDa～25kDa、または2kDa～10kDaである。図1は、硫酸化されたアルキル化またはフルオロアルキル化されたSAGE（それぞれSMHA及びSFHA）の例示的な合成を示す。

10

【0032】

一態様においては、改変型ヒアルロナンのアルキル基がメチルであり、ヒアルロナンの少なくとも1つのC-2ヒドロキシルプロトン及び／またはC-3ヒドロキシルプロトンが硫酸基で置換される。別の態様において、改変型ヒアルロナンのアルキル基はメチルであり、ヒアルロナンの少なくとも1つのC-2ヒドロキシルプロトン、及び／またはC-3ヒドロキシルプロトンが硫酸基で置換され、アルキル化後に化合物の分子量が2kDa～200kDaである。そのような化合物の例は、実施例に記載されているGM-111101である。追加の実施形態は、N-アセチルグルコサミン部分のC-4ヒドロキシル位における硫酸塩、または本化合物のグルクロン酸部分のC-2位、C-3位、及びN-アセチルグルコサミン部分のC-4ヒドロキシル位における硫酸化の任意の組み合わせを含み得る。或る態様において、C-6位がアルキル化またはフルオロアルキル化されていない場合、1つ以上のC-6位が硫酸化される。一態様においては、C-6位の最大50%、最大60%、最大70%、最大80%、最大90%、最大95%、または100%が硫酸化される。他の態様においては、アルキル化、及び／若しくはフルオロアルキル化、または硫酸化のいずれかによって全てのC-6位が改変される。

20

【0033】

本明細書に記載されている改変型ヒアルロナンは、多分散性及び初期平均分子量が異なる様々なヒアルロン酸源から調整され得る。in vitro生化学的結果、in vivo生物学的活性、及びアルキル化／硫酸化レベルは、開始HAのサイズ及び可溶性に基づいて変動し得る。例えば、サイズが5～60kDaの易溶性HAから始めて、再現可能なレベルのメチル化、硫酸化、及び生物学的に高い活性が得られる。

30

【0034】

一態様において、部分的若しくは完全硫酸化ヒアルロナンまたは薬学的に許容可能な塩若しくはそのエステルは、泌尿器科の炎症を治療するまたは防止する目的に被検者に投与し得る。本明細書において用いられている「部分的硫酸化ヒアルロナン」という用語は、ヒアルロナンにおいて二糖単位当たりの硫酸化度が3.5未満である場合を云う。本明細書において用いられている「完全硫酸化ヒアルロナン」という用語は、ヒアルロナンにおいて二糖単位当たりの硫酸化度が3.5～4.0である場合を云う。この場合、ヒアルロナンC-6ヒドロキシル基の全体ではないにしてもその大部分が硫酸化されている。

40

【0035】

ヒアルロナン出発材料は、遊離酸またはその塩として存在し得る。ヒアルロナン出発材料の誘導体はまた本明細書中で使用できる。硫化に先立って、誘導体はヒアルロナンに対する何らかの改変を含む。本明細書における多種多様な分子量ヒアルロナンは、脱重合ステップに使用できる。一態様において、脱重合前のヒアルロナンの分子量は1,000kD超である。別の態様において、脱重合前のヒアルロナンの分子量は10kDa～1,000kDであり得る。別の態様において、脱重合前のヒアルロナンの分子量は10kDa未満であり得る。また、硫酸化ステップに使用できるヒアルロナン分子量には様々な種類

50

があり得る。一態様においてヒアルロナン出発材料は、硫酸化によって部分的硫酸化ヒアルロナンを生じる前に、低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖に変換できる。後で更に詳述するように、低分子量ヒアルロナンは酸または塩基で減成されたヒアルロナンである。別法としてヒアルロナンオリゴ糖は、例えば、ヒアルロナンシンターゼまたはヒアルロニダーゼなどの酵素でヒアルロナンを制御された様式で減成することによって生成される。以後に、様々な分子量を有するヒアルロナンオリゴ糖は、GPCまたはイオン交換分離によって分離できる。図1は、ヒアルロナンから低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖を生成するための例示的な手順を示す。

【0036】

一態様において、硫酸化対象となるヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖は分子量が1 kDa～2,000 kDaである。別の態様において、硫酸化対象となる低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖は分子量が5 kDa～500 kDa、10 kDa～200 kDa、または20 kDa～100 kDaである。低分子量ヒアルロナンを調製するための例示的な手順は、実施例に提供されている。上述したように、ヒアルロナンを酸または塩基で開裂して低分子量のヒアルロナンを生成することによって、ヒアルロナンの分子量を改変できる。或る態様において、ヒアルロナン出発材料またはその誘導体は、動物源から誘導されない。これらの態様において、ヒアルロナンは細菌などの他の源から誘導され得る。例えば、組み換えB. サブティリス (B. subtilis) 発現系をヒアルロナン出発材料の生成に使用できる。

【0037】

低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖を塩基で処理した後、硫酸化剤と反応させて、部分的または完全硫酸化ヒアルロナンを生成した。有機合成に一般に使用されている硫酸化剤は、本明細書中で使用できる。硫酸化剤の例としては、限定はされないが、ピリジン三酸化硫黄複合体、トリエチルアミン三酸化硫黄複合体、またはジメチルホルムアミド三酸化硫黄複合体が挙げられる。部分的硫酸化ヒアルロナンを製造するための例示的な合成手順は、図2に提供されている。図2を参照すると、低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖はトリブチルアミン塩に変換され、凍結乾燥され、ジメチルホルムアミド中に再懸濁され、引き続き硫酸化剤（例えば、ピリジン三酸化硫黄複合体、トリエチルアミン三酸化硫黄複合体、またはジメチルホルムアミド三酸化硫黄複合体）で処理されて、1つ以上のヒドロキシルプロトンが硫酸化される。場合によっては、多糖をピリジン三酸化硫黄複合体で硫酸化すると、結果として多糖の一部分の鎖が切断されて還元末端を生じ、この還元末端がグリコシル硫酸に変換され、複合体中のピリジンと反応して、多糖断片のN-グリコシル-ピリジニウム複合体が形成され得ることは、当該技術分野において公知である。一部の態様において、これらの複合体は、効能の減失または有害な影響を示す。他の態様において、硫酸化HA複合体は、驚くべきことに、活性を保持し、または更には活性の改善をも示すことの両方が見出された。

【0038】

一態様において、部分的硫酸化ヒアルロナンの二糖単位当たりの硫酸化度は、0.1、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5若しくは最大4.0、またはその任意の範囲である。別の態様において、部分的硫酸化ヒアルロナンの硫酸化度は約2.5～4.0まで、2.5～3.5、または3.0～3.5である。一態様において、部分的または完全硫酸化ヒアルロナンの平均分子量は100 kDa未満である。別の態様において、部分的または完全硫酸化ヒアルロナンの平均分子サイズは1 kDa～50 kDa未満、2 kDa～20 kDa、または3 kDa～10 kDaである。一態様において、部分的または完全硫酸化ヒアルロナンの平均分子サイズは約3 kDa、4 kDa、5 kDa、6 kDa、7 kDa、8 kDa、9 kDa、または10 kDaであり、任意の値は下方端点または上方端点を形成し得る。別の態様において、部分的または完全硫酸化ヒアルロナンの平均分子サイズは約3 kDa～10 kDa未満、約3 kDa～約9 kDa、約3 kDa～約8 kDa、約3 kDa～約7 kDa、約3 kDa～約6 kDa、約4 kDa～約6 kDa、または約5 kDaである。反応条件に応じて、低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナン

オリゴ糖上に存在する1つ以上の異なるヒドロキシル基が、硫酸化され得る。一態様においては、低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖のN-アセチルグルコサミン残基の第一級C-6ヒドロキシルプロトンが、硫酸化される。別の態様においては、ヒアルロナンのN-アセチルグルコサミン残基の第一級C-6ヒドロキシルプロトン、及びウロン酸残基の少なくとも1つのC-2ヒドロキシルプロトンまたはC-3ヒドロキシルプロトン、またはN-アセチルグルコサミン残基の少なくとも1つのC-4ヒドロキシルプロトンが、硫酸基で置換される。別の態様においては、低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖のN-アセチルグルコサミン残基の第一級C-6ヒドロキシルプロトン、ウロン酸残基の少なくとも1つのC-2ヒドロキシルプロトン及びC-3ヒドロキシルプロトン、並びにN-アセチルグルコサミン残基の少なくとも1つのC-4ヒドロキシルプロトンが、硫酸基で置換される。別の態様においては、低分子ヒアルロナンまたはヒアルロナンオリゴ糖上に存在するヒドロキシルプロトンの0.001%、0.01%、0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%若しくは100%未満、またはその任意の範囲が脱プロトン化され、引き続き硫酸化され得る。

10

【0039】

本明細書に記載されている改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは、薬学的に許容可能な塩若しくはそのエステルであり得る。薬学的に許容可能な塩は、遊離酸を適量の薬学的に許容可能な塩基で処理することによって調製される。薬学的に許容可能な塩は、有機塩、金属塩、またはそれらの組み合わせであり得る。薬学的に許容可能な塩基の代表は、水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、水酸化鉄、水酸化亜鉛、水酸化銅、水酸化アルミニウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、2-トリメチルエタノールアンモニウムカチオン（コリン）、リジン、アルギニン、ヒスチジン、及びこれらに類するものである。一態様において反応は、水中で、単独でまたは不活性な水溶性有機溶媒と組み合わせて、約0℃～約100℃の温度で、例えば室温にて実行される。構造式Iの化合物と使用される塩基とのモル比率は、何らかの特定の塩に所望される比率が得られるように選択される。例えば、遊離酸出発材料のアンモニウム塩を調製する場合、その出発材料をおよそ1当量の薬学的に許容可能な塩基で処理することによって中性塩を生じ得る。

20

30

【0040】

下記の実施例に例示するように、エステル誘導体は典型的に本化合物の酸性型の前駆体として調製されるため、プロドラッグとして役立ち得る。これらの誘導体は一般に、メチル、エチル、及びこれらに類するものなどの低級アルキルエステルになる。アミド誘導体 $-(CO)NH_2$ 、 $-(CO)NHR$ 、及び $-(CO)NR_2$ （式中、Rは上に定義されているアルキル基）は、カルボン酸含有の化合物をアンモニアまたは置換アミンと反応させて調整し得る。また、エステルは脂肪酸エステルであり得る。例えば、パルミチン酸エステルを調製し、代替エステラーゼ活性プロドラッグとして使用してもよい。

【0041】

40

本明細書に記載されている改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは、医薬組成物を生成するうえで生物学的系またはエンティティが許容する任意の賦形剤の形で処方できる。そのような賦形剤の例としては、限定はされないが、水、水性ヒアルロン酸、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、ハックス溶液、及び他の水性の生理的バランスのよい塩溶液が挙げられる。不揮発性油などの非水性ビヒクル、オリーブ油及び胡麻油などの植物油、トリグリセリド、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、並びにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルもまた使用できる。他の有用な処方物としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなどの増粘剤を含有する懸濁液が挙げられる。賦形剤はまた、等張性及び化学安定性を増強する物質などの添加剤を小量含有していてもよい。緩衝液の例としては

50

、リン酸緩衝液、重炭酸緩衝液、及びトリス緩衝液が挙げられ、一方、保存料の例としては、チメロサル（thimerosal）、クレゾール、ホルマリン及びベンジルアルコールが挙げられる。或る態様においてpHは、投与様式に応じて変化し得る。例えば、組成物のpHは、局所投与に適した約5～約6である。加えて、医薬組成物は、本明細書に記載されている化合物のほか、担体、濃化剤、希釈液、保存料、界面活性剤、及びこれらに類するものも包含し得る。

【0042】

医薬組成物はまた、本明細書に記載されている化合物と併用される1種以上の活性成分を含み得る。結果として得られた医薬組成物は、適用場所と隣接しているかまたは適用場所から遠位の組織に薬剤及び他の生理活性物質を持続的、継続的送達するための系を提供し得る。生理活性物質は、適用の対象となる生物学的系において局所若しくは全身に生物学的、生理的、治療的な効果をもたらし得る。例えば、薬剤は、数ある機能の中でもとりわけ、感染または炎症の抑制及び／または防止、細胞増殖及び組織再生の増強、腫瘍成長の抑制、鎮痛剤としての作用、抗細胞結合の促進、歯槽骨及び歯の喪失の低減、軟骨及び重量軸受継ぎ手の退化の阻害、並びに骨成長の増強に向けて作用し得る。加えて、本明細書に記載されている化合物はいずれも、2つ以上の薬学的に許容可能な化合物の組み合わせを含み得る。

10

【0043】

そのような化合物の例としては、限定はされないが、抗菌剤、消炎剤、麻酔剤、及びこれらに類するものが挙げられる。これらの組成物を薬物供給装置として使用する方法については、以下に詳述する。

20

【0044】

医薬組成物は、当該技術分野において公知の技術を使用して調製できる。一態様において組成物は、本明細書に記載されている改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンを薬学的に許容可能な化合物、及び／または担体と混合して調製される。用語「混合」は、化学反応または物理的相互作用が生じないように、2つの成分を混ぜ合わせることとして定義される。用語「混合」には、化合物と薬学的に許容可能な化合物との間の化学反応または物理的相互作用もまた包含される。本化合物に対して、反応性治療薬（例えば、求核基を有するもの）への共有結合が為され得る。第二に、架橋結合した多糖においては、薬理活性剤の非共有結合的閉じ込めもまた起こり得ることである。第三に、静電気的または疎水的な相互作用によって、本明細書に記載されている化合物において薬学的に許容可能な化合物の保持が促され得ることである。

30

【0045】

周知のように、指定された場合において改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンの実際の好ましい量は、利用される特定の化合物、処方された特定の組成物、適用の様式、並びに特定の治療対象の特定の位置及び被検者に応じて変動する。所与の宿主に対する用量は、従来 of 考慮点を用い、例えば、対象化合物及び公知の薬剤の差次的活性の慣習的比較によって（例えば、適切な従来型の薬理学的プロトコールによって）定量できる。医師及び処方者、即ち、医薬化合物の用量を定量する当業者は、標準的な推奨事項に従って問題なく用量を定量できる（Physician's Desk Reference, Barnhart Publishing（1999年））。

40

【0046】

本明細書に記載されている医薬組成物の投与方法には幾つかの方法があり得、所望される治療が局所的かまたは全身的かに応じて、更には治療対象となる領域に応じても異なる。処方物には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐薬、スプレー、トローチ剤、液体及び粉剤が包含され得る。従来 of 薬学的担体、水溶性、粉剤、または油性基剤、濃化剤、及びこれらに類するものは、必要であるかまたは望ましい。投与物はまた、エアロゾルまたは乾燥した微粒状の粉剤を吸入するという手段で直接肺に投与できるほか、炎症を起こした空間または縮重した関節空間内に直接に注射することもできる。また、静注、筋注、皮下、経口摂取、または経粘膜的に投与を行うこともできる。経粘膜経路には

50

、口腔粘膜経由、舌下、経口、腔口、鼻腔内、直腸、及びこれらに類するものが包含され得る。また、膀胱内滴注によって（即ち、尿道カテーテル経由で）膀胱への投与を行うこともできる。

【0047】

投与のための調製物には、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液及び乳剤が包含される。非水性担体の例としては、水、アルコール／水溶性溶液、乳剤または懸濁液（生理食塩水及び緩衝媒質を含む）が挙げられる。非経口ビヒクル（開示された組成物及び方法の副次的使用に必要とされる場合）としては、塩化ナトリウム溶液、リンガーズデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンガーズ、または不揮発性油が挙げられる。静脈内のビヒクルは、流動性、及び栄養素補充液、電解質補充液（リンガーズデキストロースを主成分とするものなど）、並びにこれらに類するものが挙げられる。また、保存料及び他の添加剤、例えば、抗菌物質、抗酸化剤、キレート化剤、不活性ガス、及びこれらに類するものなども存在し得る。

10

【0048】

投薬量は通常1日に1回以上とされるが、治療のコースは数日から数か月、または当業者が送達を中止すべきであると断定するまで継続する。最適な用量、投薬方法、及び繰り返し数は、当業者であれば容易に定量できる。

【0049】

改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは、全身的な泌尿器炎症疾患を治療または防止する目的に、非経口的、静注、筋注、または皮下経由で注射できる。同様に、改変型ヒアルロナン若しくは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンはまたカプセル、錠剤、チューインガム、粉剤、トローチ剤、または飲料の形で経口投与できる。別法として、改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは膀胱内導入（intravesical installation）によって（即ち、カテーテルを通して）投与され得る。

20

【0050】

本明細書に記載されている改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは、少なくとも1つの薬学的に許容可能な化合物を、そのような送達を必要とする患者に送達することが可能であり、薬学的に許容可能な化合物を受容可能な少なくとも1つの組織を、本明細書に記載されている1つ以上の組成物に接触させることを含む。改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは、ヒトまたはヒト以外の動物にとって治癒または治療上の価値がある多種多様な放出性生物活性物質に対して、担体として使用され得る。これらの物質のうち、改変型ヒアルロナン、または部分的／完全硫酸化ヒアルロナンによって担持され得るものの多くは、上述されている。本発明のゲルへの取り込みに適した生物活性材料としては、消炎の用途に有効な治療薬、例えば、消炎剤、解熱剤、ステロイド性及び非ステロイド性の薬物、ホルモン、成長因子、避妊薬、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌薬、鎮痛剤、催眠薬、鎮静剤、精神安定剤、抗痙攣薬、筋弛緩薬、局所麻酔薬、鎮痙薬、抗潰瘍薬、ペプチド性アンタゴニスト、交感神経様作用剤（sympathomimetic agent）、心血管剤、制癌薬、オリゴヌクレオチド及びそれらの類似物などが挙げられる。生物活性物質は、薬学的活性量で添加される。

30

40

【0051】

本明細書に記載されている改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは、他の関連する療法よりも安全性が高い。例えば、ヘパリン及び他の硫酸化多糖は動物実験及び臨床研究の両方において糖尿病の合併症を低減でき、特に糖尿病性腎症に効力がある。ただし、ヘパリンは糖尿病性合併症を防止するための一般的な臨床的環境においては使用できない。これは、ヘパリンの抗凝固特性が過度の出血リスクを招くためである。本明細書に記載されている改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは抗凝固活性が低い。この点は、長期治療にとって重要な考慮事項であり、下掲の実施例において実証されている。加えて、SAGEは毒性が殆ど無いかまたは皆無であり、実施例においても実証されている。

50

【0052】

一態様において、本明細書に記載されている改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは、被験者におけるLL-37の活性を阻害し得る。LL-37はhCAP18前駆体タンパク質のC末端から生成される宿主防御ペプチドであり、循環好中球、粘膜上皮の細胞、ケラチノサイト、脊髄性骨髄細胞、皮膚の上皮細胞、消化管、副睾丸腺、及び肺において生成される。LL-37はヒト及びマウスの両方における尿路の上皮細胞（尿路上皮細胞）によって生成され、腎臓及び／または膀胱感染症（腎盂腎炎または膀胱炎）の発症時に尿濃度が有意に高くなる。LL-37は免疫調節剤であるがゆえに、微生物を根絶する役割を担うばかりでなく白血球走化性、血管新生を促し、マスト細胞の脱顆粒を刺激し、好中球機能を増強し、IL-8をはじめとするケモカインを誘発し、NF-κB経路で炎症応答を調節し、細胞外基質成分の発現を増強することによって、炎症を誘発する。LL-37の作用の下流炎症機序の詳細は完全には理解されていないが、応答には幾つかの細胞表面レセプター及びシグナル伝達経路の活性化が関与する。実施例に示すように、本明細書に記載されている化合物によるLL-37の阻害は泌尿器科の炎症の治療においてだけでなく、泌尿器科の炎症防止においても有用であり得る。

10

【0053】

LL-37の濃度上昇と泌尿器科の炎症発生とのつながりに基づき、化合物が被験者における泌尿器科の炎症を治療または防止する能力を有するかどうかに関して、スクリーニングする方法が本明細書に記載されている。一態様において本方法は、被験者における泌尿器科の炎症を誘発する量のLL-37を実験動物に投与する工程と、被験者における泌尿器科の炎症を誘発する量のLL-37を実験動物に投与する工程と、ステップ（a）の前及び／またはステップ（a）の後に動物に投与する工程と、同量のLL-37を投与された対照動物（化合物でない）と比較する工程と、を含む。

20

【0054】

一態様においては、ネズミモデルを使用して、様々な化合物がLL-37を阻害することにより泌尿器科の炎症を治療または防止する能力を有するかどうかに関してスクリーニングできる。泌尿器科の炎症の治療及び防止に有用な化合物をスクリーニングするための例示的な手順が、実施例に提供されている。

【0055】

或る態様において、改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンが泌尿器系の組織内を貫通し限局する能力を追跡することが望ましい。例えば、改変型ヒアルロナンまたは部分的／完全硫酸化ヒアルロナンは、蛍光で標識できる。一態様において蛍光標識された改変型ヒアルロナンまたは薬学的に許容可能な塩若しくはそのエステルは、（a）少なくとも1つの硫酸基と、（b）アルキル基またはフルオロアルキル基を含んでなるN-アセチルグルコサミン残基の少なくとも1つの第一級C-6ヒドロキシル位と、（c）少なくとも1つの二糖単位に共有結合される蛍光基と、を含んで構成される。蛍光標識された改変型ヒアルロナンを製造するための例示的な手順が、実施例に提供されている。

30

【実施例】

【0056】

下記実施例は、本明細書に記載されかつ請求されている化合物、組成物、及び方法を製造し評価する方法に関する完全な開示及び記述を当業者に提供する目的で記載されており、単なる例示を目的としたものであって発明者らが自らの発明と見なすものの範囲を制限することは意図していない。数値（例えば、量、温度など）に関して精度を確保するための努力が為されてきたが、多少の誤差及び逸脱があることを考慮すべきである。特に明記しない限り、部は重量部であり、温度は℃単位であるかまたは周囲の温度であり、圧力は大気または大気付近の圧力である。反応条件のバリエーション及び組み合わせ（例えば、成分濃度、所望の溶媒、溶媒混合物、温度、圧力及び他の反応範囲）、並びに記述されたプロセスから得られる生成物の純度及び収率を最適化するための使用できる条件は非常に

40

50

多い。そのようなプロセス条件の最適化に必要とされるものは、合理的かつ日常的な実験だけである。

【0057】

I. アルキル化及び硫酸化されたヒアルロنانの評価 GM-1111の調製

下記の研究において評価された改変型ヒアルロナンGM-1111は、本明細書中に参照により援用されている国際公開第WO2009/124266号パンフレットにおいて以前に合成されたものである。GM-1111の構造は図1に提供されており、「SMHA」として示されている。

【0058】

膀胱炎に関するLL-37誘発モデル

ユタ大学において全ての動物実験は、完全な承認の下で Institutional Animal Care and Use Committeeに従って行われた。全ての動物実験に、8~12週齢の成体雌のC57/B16マウス(Charles River, Wilmington, MA)が利用された。全ての動物を、病原体のいない環境に収容して維持し、12時間の光サイクルで食物及び水を自由に(ad libitum)与えた。合成されたLL-37はユタ大学の中核施設(ペプチド配列: LLGDFFRKSKKKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES)からHPLC均一形態で購入されたものであり、このLL-37を超純水に溶解して320 μ Mの作用濃度にした。各実験群は、6匹のマウスから構成されていた。イソフルラン(Minrad, Bethlehem, Pennsylvania)媒介の全身麻酔に続き、可撓性カテーテル(SILASTIC laboratory tubing, DOW Corning, 0.30mm I.D. $\times$ 0.64mm O.D., 1.5cm長)を無菌条件の下で経尿道的に導入した。尿を完全に排液させた後、発熱物質を含まない0.9%の塩化ナトリウム溶液150 μ lを1分間滴注し、洗浄ステップとして空にした。次に、LL-37(320 μ M)を最大容量(150 μ l)に等しい容積で滴注した。膀胱内接触/滞留時間は45分であった。対照は発熱物質を含まない0.9%の塩化ナトリウム滴注物から構成され、容積及び接触/滞留時間は実験群と同じであった。突然の過膨張に起因する膀胱の外傷の可能性を回避し、潜在的膀胱尿管逆流を予防するため、注入操作を低速に維持し、滴注用シリンジをカテーテル上に維持して、45分間全体で溶液の漏出が起こることのないようにした。45分間の接触/滞留時間の後、膀胱を完全に空にして動物を麻酔から覚ました。実験群に応じて、動物を屠殺し、膀胱内投与後12時間目または24時間目のいずれかに組織を回収した。

【0059】

改変型ヒアルロナン及びヘパリンによるLL-37誘発性膀胱炎の治療

2つの実験群をSAGE及びヘパリン処理の両方について調べた。マウスに麻酔をかけ、先に詳述したようにカテーテル処置を行った。第1(SAGE及びヘパリン処理のそれぞれについてn=4)群は、最初にLL-37(320 μ M)を最大膀胱容量(150 μ l)で45分間滴注し、次に完全に空にする工程から構成された。その後直ちに、SAGEまたはヘパリンのいずれか10mg/mlを最大膀胱容量(150 μ l)で45分間滴注した。続いて、SAGEまたはヘパリンを膀胱内投与した後24時間目に、膀胱を回収した。第2(SAGE及びヘパリン処理のそれぞれについてn=4)群は、最初にSAGEまたはヘパリンのいずれか10mg/mlを最大膀胱容量で45分間滴注する工程から構成された。その後、膀胱を空にし、LL-37(320 μ M)に45分間にわたって曝露(challenge)させた。LL-37投与後24時間目に、組織を回収した。全ての膀胱組織を半切除、処理、固定し、H&Eによる染色または組織MPOアッセイのいずれかを行い、炎症の度合いを数量化する。

【0060】

蛍光GM-1111の合成

GM-1111(表1)50mgとN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)10mg

とを脱イオン化 (DI) H₂O 10 mL 中に溶かした攪拌溶液に、AlexaFluor 633 ヒドラジド (Invitrogen, Eugene, OR) 1 mg をジメチルホルムアミド (DMF) 4 mL 中に溶かした溶液を添加した。pH を 4.75 に調整し、粉末状 N, N-ジエチルアミノプロピルカルボジイミド (EDCI) 10 mg を添加した。3 規定の NaOH を滴下により添加して、混合物の pH を 4.75 に維持した。反応混合物をアルミニウム箔で光線から保護し、室温で一晩攪拌した。その後、反応混合物を NaCl 溶液 (MWCO 1000) 100 mm に対して 2 回透析してから、DI H₂O に対して 1 回透析した。透析された溶液を凍結乾燥で乾燥させることによって、GM-1111-AlexaFluor 633 接合体 25 mg が得られた。Cary 50 UV-Vis 分光光度計 (Varian, Inc., Palo Alto, CA) を使用して、溶液 1 mg/mL の吸光度から 632 nm における置換度 (SD) を求めた。GM-1111 では平均分子量が 5000 Da、二糖類重量が 539 (二糖類 9 つ) AlexaFluor 633 では 1200 Da、SD が 14 %、即ち、二糖類 7 単位当たり AlexaFluor 633 の修飾はおおよそ 1 つである。

【0061】

AlexaFluor 633-GM-1111 の滴注による膀胱のコーティング

マウスに麻酔をかけ、先に詳述した方法と同様にカテーテル処置を行った。SAGE AlexaFluor 633 バイオコンジュゲート (10 mg/mL) を用いて、最大膀胱容量 (150 µL) で 45 分間膀胱に滴注した。その後直ちに (t = 0) または膀胱内 SAGE 投与後 24 時間目に (t = 24)、膀胱を回収した。全ての組織を処理し、固定して、感光条件下で切断した。全ての細胞核を識別できるように、組織切片を DAPI で対比染色した。ユタ大学の中核施設において、FV1000 Confocal Olympus IX81 顕微鏡、及び可変光フィルタ付き HeNe レーザーを利用して、蛍光画像処理が行われた。

【0062】

組織収集及び組織学的評価

膀胱を摘出して長手方向に分割した。膀胱の 1 切片を 4 % のパラホルムアルデヒド中に固定し、2 切片目を組織ミエロペルオキシダーゼ (MPO: myeloperoxidase) アッセイ用に処理した。解剖用実体顕微鏡を使用して半切除済み膀胱の肉眼的画像の処理 (gross images) を行い、Moticam1000 デジタルカメラ (Moticam North America, Richmond, CA) で撮影した。膀胱における炎症の変化を評価するため、組織を一連の等級のアルコールで処理してパラフィンに包埋し、5 µm 切片を切断して、ヘマトキシリン及びエオシン (H&E: hematoxylin and eosin) で染色した。膀胱上皮 (尿路上皮)、粘膜下層、固有層、及び平滑筋層における炎症浸潤物 (多形核白血球 (PMN)) の存在及び度合い、浮腫と出血の存在及び度合い、表在性尿路上皮の変化の存在、糜爛、潰瘍化、並びに微小膿瘍形成を基準に、膀胱炎の重篤度を評価した。個々のスライドを検査して、Olympus BX41 顕微鏡 (オリンパス株式会社, 東京, 日本) 及び Imaging Planet 1.4 MPX デジタル顕微鏡カメラ (Imaging Planet Research, Goleta, CA) で撮影した。

【0063】

組織ミエロペルオキシダーゼアッセイ

半切除済み膀胱を組織 MPO アッセイ用に前もって別にしておき、液体窒素中で急速冷凍して、-80 °C で貯蔵した。溶解緩衝液 (200 mM の NaCl、5 mM の EDTA、10 mM の トリス、10 % のグリセリン) (SIGMA, St. Louis, MO)、及びプロテアーゼ阻害剤カクテル (Thermo Scientific, Cat # 78140, Rockford, IL) を冷凍組織サンプル (200 µL 溶解緩衝液 / 10 mg 冷凍組織) に添加した。組織をマイクロ剪刀で切り刻み、小型のサンプル実験室用 Tissue-Tear or Homogenizer (Biospec Products, Model # 985-370, Bartlesville, OK) を使用して 4 °C で 9

10

20

30

40

50

0秒間ホモジナイズした。サンプルを2回にわたってそれぞれ(1500gを4℃で)15分間遠心分離し、上清を新しい無菌管に移した。MPO Sandwich ELISAキット(Cell Sciences, Cat #HK210, Canton, MA)を使用して、膀胱サンプルホモジェネートにおけるMPOの活性を定量した。概括して言うと、ELISAキットDiluent Bufferを用いサンプルを1:5で希釈して、メーカーの推奨事項に従ってアッセイを実行した。標準液のデュプリケート100μl、サンプル及び対照をウェルに添加した。特に明記しない限り、全てのインキュベーションを室温で1時間行い、続いて洗浄した。インキュベーション及び洗浄ステップの後、トレーサー及びストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを順番に添加した。TMB基質を添加して25分間インキュベートした。その後、停止液を添加し、マイクロプレートリーダー(Optimax Tunable, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で450nmにおける吸光度を測定した。各サンプルプレート上の標準曲線を生成し、線形回帰曲線を生成した。全ての値は、平均値+/-SDとして表される。

10

【0064】

抗凝固特性及び毒性

GM-1111が抗Xa抗凝固活性を全く示さず、0.2U/mg未満の抗IIa抗凝固活性を示す。対照的に、非分画ヘパリンの抗Xa抗凝固活性及び抗IIa抗凝固活性はそれぞれ150U/mgであった。大きな電荷を有するポリアニオン系ポリマーは、ヘパリンとは異なり、第XII因子を活性化し、二次的にキニンを活性化することによって、内因性凝固カスケードを強力に誘発する。第XII因子の活性化に対する検査では、Pセクレチン及びRAGEの薬理的阻害を遂行するのに必要とされるよりも10倍~100倍の高濃度においてさえも、医療用ヘパリンよりもGM-1111の方が安全性が高いようである。GM-1111は、最適な安全性及び広範な効能を有するようである。

20

【0065】

標準ドレイズ試験においてGM-1111は、培養線維芽細胞または上皮細胞に対して毒性を全く示さず、皮膚毒性は皆無であった。GM-1111の作用に関する予備的なGLP研究では、ラットに対する単回静脈内投与として、及び毎日の静脈内注射において(ラット雌雄それぞれn=3)、GM-1111は毒性の徴候を呈さず、単回急性用量に対する任意の用量レベルにて100mg/kgまでであり、7回繰り返された毎日の静脈内投与は10mg/kgであった。GM-1111に対する静脈内LD₅₀は100mg/kg超である。

30

【0066】

結果

LL-37による膀胱炎の誘発

膀胱腔内をLL-37に1回曝露させた後、12時間目及び24時間目に、組織を回収して調べた。12時間後の肉眼的検査から、膀胱に中度の炎症があると思われた。この炎症は、紅斑及び出血の病巣領域と共に大域的浮腫によって特徴付けられる(図3C)。24時間後、膀胱に重篤な炎症があるように見えた。この炎症は、大域的浮腫及び出血と共に、有意な組織浮腫及び血管過多によって特徴付けられる(図3D)。生理食塩水に曝露された対照組織は両方の時点において完全に正常であり、炎症の形跡が無いことが観測された(図3A及び図3B)。

40

【0067】

その後、12時間目及び24時間目の両方の組織をH&Eによる染色で処理し、組織構造に基づき評価した。図3A及び図3Bに図示されているように、生理食塩水に曝露された対照組織は両方の時点に予期されたとおり、全く炎症が観測されなかった。尿路上皮、粘膜下組織、基底膜、及び平滑筋層は完全に無傷で、PMNまたはリンパ球浸潤の形跡がなく、組織浮腫もなかった。12時間後、LL-37に曝露された組織において(図3C)、尿路上皮細胞潰瘍の病巣領域が存在していた。中度の組織浮腫が粘膜下組織及び基底膜層に存在していた。加えて、尿路上皮、粘膜下組織及び基底膜(表面及び深部)層内に

50

中度の数のPMNに加えて、血管からの辺縁があるPMNも観測された。12時間後に、微小膿瘍（PMNクラスタ）の形跡は観測されなかった。肉眼的及び組織学的な調査結果からの形跡から、12時間後に中度の組織炎症反応が生じたことが実証された。これらの調査結果は、12時間目の回収群における6匹のマウス全てに一貫して観測された。

【0068】

24時間目の回収群におけるLL-37に曝露された膀胱の組織学的評価によって、同様な炎症反応が生じたが、炎症が重度化したことが明瞭にわかった（図4D）。粘膜下組織内に存在する組織浮腫の質的な量は、24時間目と12時間目の組織とで類似していたが、基底膜に生じた浮腫は重度化した。加えて、24時間目の組織は、尿路上皮、粘膜下組織、及び基底膜（表面及び深部）層内に存在するPMNが有意に多かった。そのうえ、24時間目の組織は、微小膿瘍（PMNクラスタ）が存在する複数の領域を有し、炎症反応の顕著化を更に呈した。両方の回収グループにおいて血管からのPMN辺縁趋向のパターンは類似していることが認められた。LL-37に1回曝露させた後、24時間目の回収群については、肉眼的及び組織学的な調査結果の形跡から炎症の重度がわかりやすいことが実証され、また12時間目の回収群の方がよりわかりやすいことが実証された。24時間目のコホートにおいても、12時間目の回収群と同様の調査結果が6匹のマウス全てに一貫して観測された。

【0069】

組織MPOアッセイを使用して、炎症の度合いを定量した。MPOは、骨髄性系統の全ての細胞において発現される糖タンパク質であり、PMNのアズール顆粒で多量に存在する。それは、感染症または炎症の発症時に、活性化されたPMNによって放出される重要な酵素であり、ゆえに、炎症の定量的マーカーとして利用される。12時間目に回収された組織（図5）を比較した発明者らによる結果は、生理食塩水を滴注された対照膀胱（11 ng/mL）及び無処理／無滴注の対照膀胱（5 ng/mL）に対する最小限度のMPO活性を図示したものである。12時間後に、LL-37に曝露された組織のMPO活性は、生理食塩水に曝露させた対照サンプル（11 ng/mL）と比較して、際立って21倍に増加したことが明らかにされた（229 ng/mL）。24時間目に回収された組織（図5）を更に評価したところ、MPO活性は、生理食塩水に曝露された対照組織（14 ng/mL）において前と同じように最小限度であったが、対照的に、LL-37に曝露された膀胱においては61倍に増加したことが明らかにされた（849 ng/mL）。MPOデータは、H&Eによる組織構造を裏付けると共にこれと一貫性を持つ。12時間後に中度の炎症が生じ、24時間後には炎症の度合いが増した。

【0070】

改変型ヒアルロナンによるLL-37誘発性膀胱炎の排除

硫酸化多糖溶液10 mg/mLを滴注してGM-1111がLL-37誘発性膀胱炎を防止または軽減する能力を評価した。2つの群が調査の対象となった。第1（後処理、n=4）群は、LL-37に45分間曝露させ、その後直ちにGM-1111で処理する（滞留時間を45分間とする）工程から構成された。第2（前処理、n=4）群は、GM-1111で処理し（滞留時間を45分間とする）続いてLL-37に45分間曝露させる工程から構成された。第2群は事前のコーティングが予防的効果を発揮するかどうかを評価するのに役立つ。両方の群において、24時間後にマウスを屠殺し、膀胱の回収、撮像、処理を行い、H&Eで染色した。

【0071】

第1群において、GM-1111後処理の膀胱の肉眼的検査では、紅斑及び血管過多が軽減されたように見えたが、膀胱は依然として浮腫状であった（図6B）。組織学的評価によって、尿路上皮及び粘膜下組織にPMNが全く存在せず、基底膜層の全体にわたってPMNが有意に少ないことが、露呈された。加えて、調査結果はグラジエント型の応答と一貫しており、PMNの所在は基底膜層の深部だけに限られているようであった（図6D）。更にまた、SAGE処理済みの膀胱に微小膿瘍が形成された形跡はなく、血管から少量のPMNが延在していることが観測された。組織MPOアッセイによって炎症を定量し

、LL-37で炎症を起こした膀胱と第1群の組織とを比較することによって、GM-1111処理済みの膀胱における炎症反応が1/2.5に減少したことが露呈された（図3F-青色のバー）（LL-37のMPO活性が849 ng/mLであったのに対して、SAGEで後処理された第1群のMPO活性は347 ng/mLであった）。

【0072】

第2群においては、SAGEで処理される前の膀胱に紅斑及び血管過多がほぼ全く存在せず、かつ浮腫の所在が最小限度に限られていることが明瞭なことが、肉眼的検査から明らかにされた（図6A）。組織学的評価によって粘膜下組織における中度の浮腫が露呈されたが、基底膜には浮腫の形跡がなかった。膀胱の全ての層にわたってPMNの形跡が全くなく、血管から少量のPMNが延在または辺縁趨向している形跡も無いことが観測された（図6C）。GM-1111前処理済み組織は概して、炎症の無い生理食塩水対照組織とほぼ似ていた。組織MPOアッセイによって炎症を定量し、LL-37で炎症を起こした膀胱と第2群の組織とを比較することによって、GM-1111で前処理された膀胱における炎症反応が1/22.3に減少したことが露呈された（図6E）（LL-37のMPO活性は849 ng/mLであったのに対して、GM-1111で前処理された第2群のMPO活性は38 ng/mLであった）。組織学的な調査結果及びMPO結果の両方から、膀胱組織をGM-1111で前処理すれば、重要な保護治療として役立ち得ることが示唆された。

【0073】

膀胱をヘパリンで処理することによって、準最適な消炎結果が得られた。第1（後処理）群の肉眼的結果から、浮腫、血管過多、及び出血が全く明瞭に見られるという点で炎症が有意なものであることが露呈された（図7B）。組織学的な調査結果に一貫性があり、尿路上皮の潰瘍、粘膜下組織及び基底膜浮腫、全ての組織層にわたる大量のPMN、及び血管から辺縁趨向しているPMNが認められた（図7D）。MPOアッセイ（図7F）によって、無処理のLL-37に曝露（challenge）された膀胱とヘパリン後処理済み組織との間の炎症性活性の差異はほぼ無視してよい程度であることが露呈された（LL-37のMPO活性が849 ng/mLであったのに対して、ヘパリンで後処理された第1群のMPO活性は827 ng/mLであった）。第2（前処理）群の肉眼的結果から、浮腫、血管過多、及び出血が全く明瞭に見られる形態であるという点で炎症が有意なものであり、調査結果が第1群と類似していることが露呈された（図7A）。組織学的な調査結果も第1群と相似しており、尿路上皮の潰瘍、粘膜下組織及び基底膜浮腫、全ての組織層にわたって存在するPMN、及び血管から辺縁趨向しているPMNが認められた（図7C）。MPOアッセイ（図7E）によって、無処理のLL-37に曝露された膀胱とヘパリン前処理の組織との間の炎症性活性の差異はごく僅かであることが露呈された（LL-37のMPO活性が849 ng/mLであったのに対して、ヘパリンで前処理された第2群のMPO活性は759 ng/mLであった）。

【0074】

「膀胱アーマー（Bladder Armor）」剤としてのGM-1111

改変型ヒアルロナン組織コーティング特性及び貫通特性をよりよく解明するために、蛍光標識されたAlexaFluor633-GM-1111溶液10 mg/mLを滴注し、45分間の滞留時間を1回経た直後に（t=0）組織を回収して、24時間後に（t=24）再び組織を回収した。また、全ての細胞核を識別できるように、処理済みの組織をDAPIで染色した。即時回収群の最初の結果から、尿路上皮に近接した表在性泌尿器GAG層のコーティングが均一なことから、粘膜下層、基底膜、及び表在性平滑筋層への浸透が深くなったことがわかった（図8A及び図8B）。加えて、細動脈を裏打ちする内皮細胞において、これらの血管構造の基底部及び管腔の両側面にGM-1111で有意なコーティングが施されていることも図示されている。細動脈を裏打ちする内皮においてGM-1111でコーティングされている形跡が無いことが観測された。24時間目の回収群の結果から、即時回収群において前回観測された認められたGM-1111が、泌尿器GAG層沿いに存在する形跡の無いことが明らかにされた。重要な点は、粘膜下組織の領域内

、並びに基底部及び管腔の両側面上の小細動脈を裏打ちする内皮沿いに、GM-1111が依然としてはっきり鮮明に見えたことであった（図8C及び図8D）。最後に、GM-1111は依然として、膀胱平滑筋の無作為領域に挿入されていることが可視化された。これらの結果から、24時間後に依然として膀胱内でGM-1111の単回曝露が持続していることがわかった。

【0075】

II. 部分的及び完全硫酸化ヒアルロنانの評価

塩基処理済みヒアルロナンを原料とする硫酸化低分子量ヒアルロナン（LMW-HA）の調製

a. 塩基処理済みLMW-HA

100mlのビーカーに入ったNaOH（40%のw/v）20mLにHA（2g、67kDa）を溶解して、混合物を室温にて2時間攪拌し、ストランド開裂を誘発させて部分的にHAを脱重合した。結果として得られた粘性液を、イソプロパノール100mLが入った400mlのビーカーに移し、室温で24時間攪拌した。結果として得られた溶液を重力濾過器（濾紙）に通して粗生成物を収集してから、蒸留水250mL中に溶解させ、pHを7.0に調製した。その溶液を蒸留水に対して24時間透析し、この間にウォーターバスを4回交換してから、凍結乾燥で乾燥させ、1.2gの塩基処理済みHAを得た。この生成物のサイズはHPLC<GPCまたは電気泳動で定量でき、概して5kDa〜20kDaの範囲である。

【0076】

b. 部分的O-硫酸化塩基処理済みLMW-HA

LMW-HAのトリブチルアミン（TBA）塩を得るため、塩基処理済みHA（0.2g）を蒸留水20mL中に溶かしたものに、TBA 0.2mLを添加した。その混合物を激しく攪拌して凍結乾燥で乾燥させた。結果として得られた塩（LMW-HA-TBA）を20mLのN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中に溶解させ、必要過剰量（6mol/H A中の総ヒドロキシル基（即ち、二糖当たり4）の当量）のピリジン三酸化硫黄複合体（0.325g）を添加した。3時間後40℃にて水20mLを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール30mLを添加して、粗製物質を沈殿させた。硫酸化された粗生成物を濾過して収集し、蒸留水（30mL）中に溶解させ、2日間にわたってNaCl溶液100mmに対して（溶液を6回交換）及び水に対して（水を2回交換）透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥で乾燥させた。生成物の収率は61%（0.22g）であった。¹H-NMRに基づく置換度は、およそ0.5〜1であった。元素分析によって硫黄含有率4.13%が求められた。平均分子量はGPCで6,100と定量され、多分散性は2.3であった。

【0077】

c. 完全O-硫酸化塩基処理済みLMW-HA

HAのトリブチルアミン（TBA）塩を得るため、塩基処理済みHA（0.2g）を蒸留水20mL中に溶かしたものに、TBA 0.2mLを添加した。その混合物を激しく攪拌して凍結乾燥で乾燥させた。結果として得られた塩（LMW-HA-TBA）を20mLのN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中に溶解させ、必要過剰量（16mol/H A中で利用可能なヒドロキシ基の当量）のピリジン三酸化硫黄複合体（11.0g）を添加した。3時間後40℃にて水20mLを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール30mLを添加して、粗生成物を沈殿させた。硫酸化された生成物を濾過して収集し、蒸留水（30mL）中に溶解させ、2日間にわたってNaCl溶液100mmに対して（溶液を6回交換）及び水に対して（水を2回交換）透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥で乾燥させることによって0.26gの生成物が得られた（60%の収率）。生成物を¹H-NMRにより特性評価し、概算の置換度が約3.5であることがわかった。元素分析によって硫黄含有率13.22%が求められた。平均分子量はGPCで5,900と定量され、多分散性は2.2であった。

【0078】

酸処理済みヒアルロナンを原料とする硫酸化低分子量ヒアルロナン (LMW-HA) の調製

a. 完全O-硫酸化低MW HA (F-O SHA (1) - 10, 000)

HAのトリブチルアミン (TBA) 塩を得るため、HA (0.2 g、約10,000 Da、1.3 MDaのHAから減成したもの) を蒸留水20 mL中に溶かしたものに、0.2 mLのTBAを添加した。その混合物を激しく混合して凍結乾燥で乾燥させた。結果として得られた塩 (HA-TBA) を20 mLのN, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 中に溶解させ、必要過剰量 (6 mol / HA中で利用可能なヒドロキシル基の当量) のピリジン三酸化硫黄複合体 (0.325 g) を添加した。3時間後40℃にて水20 mLを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール30 mLを添加して、粗製物質を沈殿させた。硫酸化された生成物を濾過して収集し、蒸留水 (30 mL) 中に溶解させ、2日間にわたってNaCl溶液100 mmに対して (溶液を6回交換) 及び水に対して (水を2回交換) 透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥で乾燥させることによって0.19 gの生成物が得られた (58%の収率)。元素分析によって硫黄含有率12.62%が求められた。これは、硫酸化度が3.0~3.5であることを示している。分子量は3,000 Da未満であり、これは硫酸化及びワークアップ中の酸性脱重合を示唆している。

【0079】

b. 完全O-硫酸化低MW HA (F-O SHA (2) - 10, 000)

HAのトリブチルアミン (TBA) 塩を得るため、酸変性10,000 MWのHA (0.2 g) を蒸留水20 mL中に溶かしたものに、TBA 0.2 mLを添加した。その混合物を激しく混合して凍結乾燥で乾燥させた。結果として得られた塩 (HA-TBA) を20 mLのDMF中に溶解させ、必要過剰量 (16 mol / HA中で利用可能なヒドロキシル基の当量) のピリジン三酸化硫黄複合体 (1.1 g) を添加した。3時間後40℃にて水20 mLを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール30 mLを添加して、粗製物質を沈殿させた。硫酸化された生成物を濾過して収集し、蒸留水 (30 mL) 中に溶解させ、2日間にわたってNaCl溶液100 mmに対して (溶液を6回交換) 及び水に対して (水を2回交換) 透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥させることによって0.23 gの生成物が得られた (62%の収率)。その生成物を¹H NMRにより特性評価し、置換度が3.0~3.5であることがわかった。元素分析によって硫黄含有率12.10%が求められた。分子量は3,000 Da未満であった。

【0080】

c. 完全O-硫酸化低MW HA (Kewpie Hyalo-Oligo-Pyr. SO₃)

Kewpie製Hyalo-Oligo HA (200 mg、0.5 mmole、8.4 kDa) をDMF 10 mL中に溶解させた。攪拌しながらTBA (1当量、0.5 mmole、0.12 mL) を添加し、更に10分間攪拌した。必要過剰量 (6 mol / HA中で利用可能なヒドロキシル基の当量数) のピリジン三酸化硫黄複合体 (24当量、12 mmole、1.916 g) を添加した。40℃で3時間攪拌した後、水15 mLを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール25 mLを添加して、粗製物質を沈殿させた。硫酸化された生成物を濾過して収集し、蒸留水25 mL中に溶解させて、2日間にわたってNaCl溶液100 mmに対して (溶液を6回交換) 及び水に対して (水を2回交換) 透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥で乾燥させることによって0.175 gの生成物が得られた (51%の収率)。その生成物を¹H NMRにより特性評価し、置換度が3.5超であることがわかった。平均分子量はGPCで6,800 Daと定量され、多分散性は1.88であった。

【0081】

d. 完全O-硫酸化低MW HA (Novozymes-Pyr. SO₃)

Novozymes製HA (200 mg、0.5 mmole) を11 kDaに減成させ

10

20

30

40

50

たものを、DMF 10 mL中に溶解させた。攪拌しながらTBA（1当量、0.5 mmol、0.12 mL）を添加し、混合物を更に10分間攪拌した。次に、必要過剰量（6 mol / HA中で利用可能なヒドロキシル基の当量数）のピリジン三酸化硫黄複合体（24当量、12 mmol、1.916 g）を添加した。40℃で3時間攪拌した後、水15 mLを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール25 mLを添加して、粗製物質を沈殿させた。硫酸化された生成物を濾過して収集し、蒸留水25 mL中に溶解させて、2日間にわたってNaCl溶液100 mmに対して（溶液を6回交換）及び水に対して（水を2回交換）透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥で乾燥させることによって0.194 gの生成物が得られた（57%の収率）。その生成物を¹H NMRにより特性評価し、置換度が約3.0～3.5であることがわかった。平均分子量はGPCで8,100 Daと定量され、多分散性は2.00であった。

10

【0082】

e. 部分的O-硫酸化低MW HA（Novozymes-Pyr. SO₃）

Novozymes製HA（400 mg、1.0 mmol、11 kDa）を11 kDaに減成させたものを、DMF 25 mL中に溶解させた。攪拌しながらTBA（1当量、1.0 mmol、0.24 mL）を添加し、更に10分間攪拌した。必要過剰量（3 mol / HA中で利用可能なヒドロキシル基の当量数）のピリジン三酸化硫黄複合体（12当量、12 mmol、1.908 g）を添加した。40℃で3時間攪拌した後、水30 mLを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール50 mLを添加して、粗製物質を沈殿させてから、濾過して収集した。結果として得られた部分的O-硫酸化粗HAを蒸留水40 mL中に溶解させて、2日間にわたってNaCl溶液100 mmに対して（溶液を6回交換）及び水に対して（水を2回交換）透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥で乾燥させることによって0.386 gの生成物が得られた（56%の収率）。その生成物を¹H NMRにより特性評価し、置換度が2.0であることがわかった。平均分子量はGPCで9,500 Daと定量され、多分散性は1.77であった。

20

【0083】

f. 完全O-硫酸化低MW HA（Novozymes-DMF. SO₃）

Novozymes製HA（200 mg、0.5 mmol）を11 kDaに減成させたものを、DMF 10 mL中に溶解させた。攪拌しながらTBA（1当量、0.5 mmol、0.12 mL）を添加し、混合物を更に10分間攪拌した。必要過剰量（6 mol / HA中で利用可能なヒドロキシル基の当量数）のDMF三酸化硫黄複合体（24当量、12 mmol、1.836 g）を添加した。30℃で3時間攪拌した後、水15 mLを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール25 mLを添加して、粗製物質を沈殿させてから、濾過して収集した。結果として得られた完全O-硫酸化粗HAを蒸留水25 mL中に溶解させて、2日間にわたってNaCl溶液100 mmに対して（溶液を6回交換）及び水に対して（水を2回交換）透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥で乾燥させることによって0.057 gの生成物が得られた（17%の収率）。その生成物を¹H NMRにより特性評価し、置換度が約3.0～3.5であることがわかった。平均分子量はGPCで1,900 Daと定量され、多分散性は2.48であった。

30

40

【0084】

図3aは、(A) FOS HA (2) 10 kDa、(B) FOS HA (1) 10 kDa、(C) FOS BHA、及び(D) POS BHAに関する非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）分析を示す。Novex（登録商標）トリス-グリシン18%のゲル（Invitrogen, Carlsbad, CA）上で各サンプルを10 μgずつ分離させ、非変性条件下で125 Vにて1.5時間泳動させた。図3bは、(E) ピリジン三酸化硫黄複合体を使用してKewpie製Hyaloligo HAから製造されたFOS HA、(F) ピリジン三酸化硫黄複合体を使用してNovozymes HAから製造されたFOS HA、(G) ピリジン三酸化硫黄複合体を使用してNov

50

ozymes HAから製造されたPOS HA、及び(H)三酸化硫黄N, N-ジメチルホルムアミド複合体から製造されたFOS HA 10kDaに関する非変性PAGE分析を示す。20%のアクリルアミドIDSmartゲル(Boca Scientific, Boca Raton, FL)上で各サンプルを15μgずつ分離させ、非変性条件下で125Vにて75分間泳動させた。0.08%アズールA水溶液中でゲルを染色した。

【0085】

g. 完全O-硫酸化低MW HA (GM-0111)

Novozymes製HA(5.0g、5.4kDa、950kDaのHAから減成されたもの)をN, N-ジメチルホルムアミド(DMF)400ml中に懸濁させて、3.0ml(1当量)のトリブチルアミン(TBA)を添加した。溶液を5分間攪拌した。ピリジン三酸化硫黄複合体(24当量、48.4g)を6回に分けて添加し、混合物を40℃で3時間攪拌した。水100mlを添加して反応を抑制し、無水酢酸ナトリウムで飽和された低温エタノール500mlを添加して、粗製物質を沈殿させた。硫酸化された生成物を濾過して収集し、蒸留水(650ml)中に溶解させ、2日間にわたってNaCl溶液100mmに対して(溶液を6回交換)及び水に対して(水を2回交換)透析して、1日に4回溶液を交換してから、凍結乾燥で乾燥させることによって4.6gの生成物が得られた(51%の収率)。元素分析によって硫黄含有率13.5%が求められた。これは、硫酸化度が3.0~3.5SDであることを示している。分子量はゲル浸透クロマトグラフィーで5.1kDaと定量され、多分散性は1.9であった。

【0086】

抗凝固特性及び毒性

GM-0111は耐性が極めて十分であり、C57BL/6Jマウスに2,000mg/kgを1回で経口的に大量に瞬時に投与したときに、毒性の徴候をいっさい呈しなかった。加えて、GM-0111経口投与後24間目に死体解剖の調査結果からは、いかなる異常も認められなかった。

【0087】

In Vitro研究

a. ヒト白血球エラスターゼ(HLE: Human Leukocyte Elastase)阻害アッセイ

白血球エラスターゼに対する硫酸化HAの阻害作用を調べるため、7.5μg/mlのHLE100μlを0.001~100μg/mlの濃度範囲の硫酸化HA100μlと共にインキュベートした。混合物を25℃で10分間インキュベートし、その後にHLE基質suc-Ala-Ala-Val-pNA50μl(1.5mm)を添加した。基質が活性HLEによって開裂され、色原体のpNAが生成された後、動力学的読み出し(kinetic read)によって405nmにおける吸光度の変化を測定した。IC₅₀値は、硫酸化HA濃度に対するV_{max}(吸収速度)の4パラメータロジスティック非線形回帰方程式を使用して求められる(表1)。

表 1. ヒト白血球エラスターゼ(HLE)の阻害

サンプル	IC50 値 (μg/ml)
POS BHA	0.30
FOS BHA	0.18
F-OSHA(2) 10k	0.23
F-OSHA(1) 10k	0.22
FOSHA Kewpie	0.46
FOSHA Novozymes	0.45
POSHA Novozymes	0.47
FOSHA Novozymes DMF	0.76

10

【0088】

In vitro 研究から、GM-0111 がヒト白血球エラスターゼを阻害し、その IC₅₀ が 430 ng/mL であることがわかった。GM-0111-03 は、リガンドに結合する RAGE を阻害した。IC₅₀ は CML-BSA に対しては 36 ng/mL、S-100 タンパク質に対しては 60 ng/mL、HMGB1 に対しては 91 ng/mL であった。

20

【0089】

b. CML-BSA/RAGE 複合体阻害アッセイ

CML-BSA 及び RAGE 複合体阻害アッセイは、ポリ塩化ビニルプレートに 5 μg/mL の CML-BSA 100 μl でコーティングして準備された。別途に、RAGE-Fc キメラ含有 PBST-0.1% BSA の 1 μg/mL 溶液を、等量の連続希釈済み硫酸化低分子量ヒアルロン酸及び HA オリゴ糖 (0.0005 μg/mL ~ 100 μg/mL の濃度範囲) と共に 4℃で一晩インキュベートした。翌日、RAGE-硫酸化 HA 混合物 50 μl をそれぞれリガンドでコーティングされたウェルに移して 37℃で 1 時間インキュベートした。その後、ウェルを PBST で 4 回洗浄した。結合した RAGE を検出するため、0.5 μg/mL の抗 RAGE 抗体 50 μl をそれぞれのウェルに添加した。プレートを室温で 1 時間インキュベートし、再びウェルを PBST で 4 回洗浄した。HRP 接合二次抗体 (50 μl/ウェル) を添加し、ウェルを室温で 1 時間インキュベートしてから PBST で 4 回洗浄した。TMB 100 μl を添加して比色反応を開始させ、1 規定の HCl を 50 μl 添加して停止させた。450 nm での吸光度を硫酸化 HA 濃度に対してプロットし、4 パラメータロジスティック非線形回帰方程式を使用して IC₅₀ 値を求めた (表 2)。

30

表 2. RAGE に結合する CML-BSA の阻害

サンプル	IC50 値 (μg/ml)
POS BHA	>100
FOS BHA	0.0468
F-OSHA(2) 10k	0.0176
F-OSHA(1) 10k	0.0197
FOSHA Kewpie	0.037
FOSHA Novozymes	0.023
POSHA Novozymes	0.066
FOSHA Novozymes DMF	0.521

10

【0090】

c. ピリジニウム付加体の特性評価

ピリジン三酸化硫黄複合体を使用して調製された硫酸化HAサンプルのピリジニウム含有率を、UV吸光度により分析した。1-臭化ブチルピリジニウム (Sigma, St. Louis, MO) を使用して標準曲線を作成し、必要に応じて、UV測定値が標準曲線内に収まるように硫酸化HAサンプルを2mg/mlから0.025mg/mlまで希釈した。標準液及びサンプルについてクォーツ製キュベットにおける255nmでの吸光度値を記録した。標準曲線から、各サンプルについてピリジニウムの重量%値を計算した。これらの計算は表3に記載されている。また、FOSHA-Kewpie-Pyr. SO₃のピリジニウム付加体も¹³C NMR分光法により特性評価し、公開されているデータと比較した (Hintze V, Moeller S, Schnabelrauch M, Beirbaum S, Viola M, Worch H, Scharnweber D. "Modifications of Hyaluronan Influence the Interaction with Human Bone Morphogenetic Protein-4 (hBMP-4)" Biomacromolecules 10:3290-3297, 2009年)。¹³C NMRデータを表4に示す。最後に、図5は¹H NMRスペクトルのFOSHA-Kewpie-Pyr. SO₃で、ピリジニウム付加体のピリジニウムプロトンを示し8.00ppm~9.10ppmの間の3つのピークを露呈している。

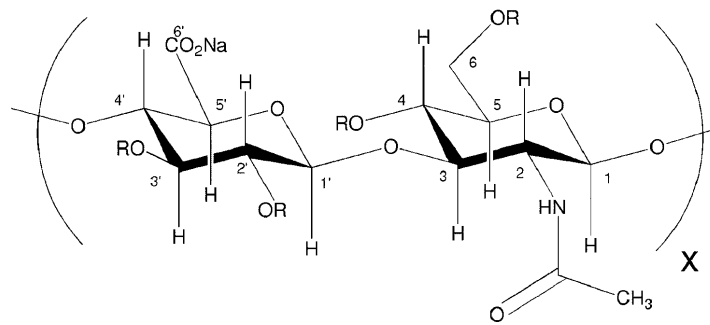
20

30

表 3. ピリジン三酸化硫黄複合体で生成された硫酸化HAのピリジニウム含有率の測定

サンプル	ピリジニウムの平均 wt%	標準偏差
FOSHA Kewpie	0.80	0.02
FOSHA Novozymes	0.462	0.009
POSHA Novozymes	0.662	0.006
POS BHA	0.11	0.03
FOS BHA	1.7	0.1
F-OSHA(2) 10k	14.7	0.8
F-OSHA(1) 10k	9.0	0.6

40

表 4. FOSHA-Kewpie-Pyr.SO₃ の ¹³C NMR データと公開データとの比較

	Hya	sHya 1.0 (6.6% S)	sHya2.8 (13.1% S)	FOSHA-Kewpie
C=O	175.4	175.2	175.3	174.9
C'=O (6')	174.4	174.2	175.0	173.9
C1'	103.6	103.5	102.0	101.4
C1	101.0	101.3	100.6	100.4
C3	83.5	82.5	79.3-76.9	79.1-75.6
C4'	80.7	81.4		
C5'	77.1	76.8		
C5	76.2	74.2		
C3'	74.4	73.8	73.7	73.0
C2'	73.3	72.9		
C4	69.4	68.8	69.5 (小)	68.6
C6	61.5	67.5	68.3	67.7
C2	54.9	54.7	56.0	55.2
CH ₃	23.2	22.9	23.6	23.2
Py 2,6				142.7
Py 4				128.2
Py 3,5				103.4

【 0 0 9 1 】

I n V i v o 研究

a. マウスの膀胱炎モデル

マウスの膀胱はLL-37（カテリシジンペプチド）をはじめとする様々な催炎物質に対する感受性が高く、膀胱炎を含む炎症疾患において有望な治療剤を研究するための秀逸な動物モデルとして役立つ。硫酸化HAの消炎効果を研究するため、ネズミ膀胱炎モデルでFOSHA誘導体の防護効果を測定した。最初に、C57/BL6成体雌のマウスを麻痺させて、尿道を通してカテーテルを膀胱に挿入した。0.9%の滅菌生理食塩水を注入してから排液させて、膀胱を洗浄した。その後、膀胱に150μLの生理食塩水、または10mg/mlのFOSHA（Kewpie）若しくは10mg/mlのFOSHA（Novozymes）のいずれかを1時間事前滴注した。膀胱を空にしてから、更に1時間かけて320μmのLL-37を150μL滴注した。全ての動物が合併症を伴わずに完全に回復した。手順完了後24時間目に、膀胱を摘出し、撮影して、MPO分析用に冷蔵した。

【 0 0 9 2 】

b. ミエロペルオキシダーゼ (MPO) アッセイ

催炎物質に対する主な細胞応答は、損傷のある細胞から様々なサイトカインを分泌して様々な免疫細胞を標的部位に補充するというものである。MPOは、炎症の初期に炎症部位に補充される一次細胞である多形核細胞において多量に発現するペルオキシダーゼ酵素であり、ゆえに、炎症の度合いを量的に測定するマーカーとして優れている。ネズミ膀胱炎モデルにおいて、完全硫酸化HAの消炎作用を分析するため、酸化HAで前処理された膀胱内で発現したMPOの量を測定し、無処理の膀胱及び生理食塩水対照において発現したMPOの濃度と比較した。膀胱を秤量してホモジナイズした。ホモジナイズされたサンプルを5,000 rpmで遠心分離し、可溶性画分を組織破片から分離させてから、マウスMPO ELISAキット (HK210, Hycult biotech, The Netherlands) を使用して組織ホモジェネート内のMPO濃度 (ng/mg組織) を測定し、生理食塩水を滴注された対照 (炎症の無い正常な膀胱) との差分 (%) として表した。結果を図2に示す。

【0093】

LL-37の滴注により誘発された組織MPO濃度が、硫酸化HAの前処理によって低減するかどうかを判別するため、発明者らは一方向ANOVAを使用して統計分析を行い、続いてGraphPad InStatソフトウェア (Version 3.1, GraphPad Software, Inc.) を使用してチューキー・クレーマー (Tukey-Kramer) の多重比較試験を行った。統計的有意性は、 $p < 0.0$ に設定された。

【0094】

c. 結論

in vitro研究による結果は、RAGE拮抗剤活性に関して硫酸化度が重要なことを実証している (表2)。部分的硫酸化 (硫黄分が6%未満) の場合、RAGE拮抗剤の効力が大幅に低下する。硫酸化HA化合物MWが2,000 Da未満の場合はまた、in vitroアッセイにおける効力の低減を示す。膀胱炎のマウスモデルにおいて完全硫酸化HA化合物 (1% w/w超のピリジニウム付加体を有するものを含む) は、in vivoで炎症を軽減する効果が良好であることを示した。

【0095】

GM-0111を用いた事前滴注実験

LL-37により誘発されたネズミ膀胱炎モデルにおいて、GM-0111の治療効果を研究するため、更なる実験を行った。各動物をイソフルランで麻痺し、可撓性カテーテル (SILASTIC laboratory tubing, 0.30 mm i.d. $\times$ 0.64 mm o.d., DOW Corning, MI) を、尿道口を通して膀胱中に挿入した。腹部を静かに押圧して尿を排液させた。エンドトキシンを含まない滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, Amresco, OH) 150 μ Lを滴注し排泄させて、膀胱を洗浄した。その後、空にした膀胱に150 μ LのPBSを充填するか、または様々な濃度のGM-0111 (1、5、10、30、及び100 mg/mL) をPBS中に溶解した。膀胱に対するGM-0111の接触を増やすために、膀胱から排液してから、PBSまたはGM-0111のいずれかを再滴注した。GM-0111を1時間滴注した後、膀胱炎を誘発するため、膀胱から排液してから同じ容量のLL-37 (250 μ M) を滴注した。また、GM-0111を滴注するたびにLL-37の滴注手順を繰り返した。LL-37の初回滴注後1時間目に、カテーテルを取り出して動物を回復させた。膀胱の損傷を最小限に抑え、膀胱尿管逆流を低減するため、溶液を流速2 μ L/sec (または10 μ L/5 sec) で滴注した。溶解した全ての材料を除菌して、微生物汚染の可能性を最小限に抑えた。

【0096】

死体解剖及び死体解剖スコア

LL-37滴注後24時間目に、動物をイソフルランで高度に麻痺させて死体解剖を行った。尾部大静脈を通して全血液を収集し、動物を失血させて、膀胱を回収した。血液を

Microvetteチューブ (Sarstedt, Germany) に移して、血清を収集する。回収された膀胱を秤量して横方向に二等分した。続いて、二等分された膀胱を (血清サンプルと同様) 生化学分析の目的に -20°C で貯蔵するか、または組織学的評価の目的に 4 %ホルマリンで貯蔵した。

【0097】

死体解剖時に、充血の有無 (0 : 無し、及び 1 : 充血)、並びに浮腫の程度 (0 : 無し、1 : 軽度、2 : 中度、及び 3 : 重度) をスコアすることによって、膀胱炎の重篤度を定量した。充血及び浮腫のスコア合計を、統計分析の目的に死体解剖スコアとして使用した。

【0098】

生化学分析

体内において誘発性膀胱炎による全般的な反応を定量するため、GM-0111の防護効果を調べて、ELISAキット (ICL Laboratories, OR) を使用して血清アミロイド P (SAP: serum amyloid P) の濃度を測定した。局部組織内の炎症の重篤度を定量するため、プロテアーゼ阻害剤 (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, IL) を補充した溶解緩衝液 (200mmのNaCl、10mmのトリス、10%のグリセリン) 中で膀胱をホモジナイズした。Fluoro MPO (商標) キット (Cell Technology, CA) を使用してミエロペルオキシダーゼの組織活性を測定し、IL-6 及び PTX-3 (BioLegend, CA and R&D Systems, MN) の組織中濃度をELISAで測定した。

【0099】

組織学的評価

ホルマリンで固定した組織をパラフィン包埋し、 $4\mu\text{m}$ の厚さに切断して、ヘマトキシリン及びエオシン (Histology Services by Charles River Laboratories, MA) で染色した。下掲の基準 (表5) に従い、浮腫の有無及び程度、多形核好中球 (PMN: polymorphonuclear neutrophilic) 浸潤、並びに各断層内の尿路上皮の糜爛を評価することによって、各サンプルの炎症の重篤度を評価し、定量した。

10

20

30

表 5. 組織学的評価(組織学的スコア)の定量化

パラメータ	度合い	スコア
浮腫	明白な浮腫がない	0
	浮腫が粘膜下領域だけに限られている。粘膜下領域の幅が、尿路上皮と排尿筋層とを組み合わせた幅に等しいかまたはそれ未満である。	1
	浮腫が粘膜領域だけに限られている。粘膜下領域の幅が、尿路上皮と排尿筋とを合わせた幅よりも大きい、この幅の2倍よりも小さい。	2
	浮腫が排尿筋に近接している。粘膜下領域の幅が尿路上皮および排尿筋の幅の2~4倍である。	3
	浮腫が全ての層にある。粘膜下領域の幅が尿路上皮および排尿筋の幅の4倍よりも大きい。	4
PMN の浸潤	無い乃至無視してよい程度	0
	若干	1
	中度	2
	広範	3
尿路上皮の浸食	無し	0
	狭範	1
	剥離領域の存在	2
組織学的スコア		合計 (0~9)

【0100】

統計分析

様々な測定からのデータを全て個別に識別した。GM-0111の事前滴注が、PBS処理と比較して、観測されたデータに有意に異なる変更をもたらしたかどうかを比較するため、分散試験の分析を行ってからダネットのt検定を行った。死体解剖スコア及び組織学的スコアをクラスカル-ウォリス順位検定で評価し、続いて、R2.14.0を使用したpgirmessライブラリでkwmc（多重比較）試験を行った。また、データを無処理の正常な動物のデータと比較し、試験を繰り返して、GM-0111の事前滴注が膀胱に炎症性変化が生ずるのを防ぐかどうかを判別した。

【0101】

結果

GM-0111の事前滴注による、膀胱における膀胱炎の防止

LL-37誘発性膀胱炎モデルに対するGM-0111の防護効果を定量するため、膀胱を数とおりの濃度のGM-0111を膀胱に1時間滴注してコーティングし、続いてLL-37を1時間滴注した。LL-37滴注後24時間目に動物を屠殺し、死体解剖を行い、生化学及び組織学的評価の目的のために膀胱を回収した。

【0102】

死体解剖時に、肉眼的な解剖学的変化を観測し、膀胱の重量を測定することによって、各動物における炎症の重篤度を定量した。膀胱にGM-0111を事前滴注するとLL-37誘発性膀胱炎が生ずる徴候が低減することが、発見された。GM-0111を事前注入された動物の体重は、PBSで処理された動物よりも有意に増加した（図9a）。炎症を起こした組織内で流体及びコロイド状タンパク質が増加した結果として、浮腫のある膀胱の重量が増加した。膀胱にGM-0111を事前滴注すると膀胱重量が有意に減少したことも、発見された（図9b）。これは、LL-37により誘発される炎症性変化が低減したことを示唆している。

【0103】

10

20

30

40

50

LL-37 (250 μ M) を膀胱に滴注すると炎症性変化が誘発され、粘膜下層への多形核好中球 (PMN) の浸潤、血管増加、出血、膀胱の全層にわたる広範な浮腫、並びに尿路上皮層の菲薄化及び糜爛という特質が認められた (図10eと10fとを比較対照のこと)。流体の増加及び血管化の存在によって、膀胱の典型的な外観が充血を生じて大きくなる (図10aと10bとを比較対照のこと)。肉眼的観測結果をより綿密に評価するため、膀胱にGM-0111を事前滴注した結果としてもたらされる組織学的変化を調べた。GM-0111の事前滴注によって、炎症の徴候の重篤度が有意に低減した。この炎症の徴候は僅か5mg/ml程度の投与量で容易に観測でき、PBSを事前滴注された膀胱と比較して、GM-0111を事前注入された膀胱内において尿路上皮層が損なわれず、かつ浮腫が狭範化しPMNが減少したことによって示される (図10bと、10c及び10dとを比較対照のこと)。濃度10mg/mL以上のGM-0111を事前滴注された膀胱の組織学的な外見は、無処理の正常な膀胱に近い類似していた (図10eと10g及び10hとを比較対照のこと)。

【0104】

膀胱においてGM-0111がLL-37媒介の炎症性変化を低減しかつ動物の全身健康状態を改善する機序を調べるため、膀胱及び血清における生化学マーカーの変化を調べた。最初に、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) の組織活性を定量した。MPOの一次供給源は、炎症中に主として病原体を取り除くのに使用される好中球顆粒の白血球である。PBSを事前滴注されたMPOの膀胱内での平均組織活性は、無処理の正常な動物の組織におけるよりも114倍高かった (図11b)。GM-0111を事前滴注すると、1mg/mLの場合でもMPOの組織活性が有意に低下した (図11b)。次に、炎症の刺激により様々な細胞が放出する主要な炎症性サイトカインの1つである、IL-6の組織中濃度を定量した。PBSを事前滴注された膀胱内でのIL-6の濃度は、正常な膀胱におけるよりもおよそ70倍高いことが発見された (図11c)。GM-0111の事前滴注によって、GM-0111の濃度が1.0mg/mLの場合でも、組織内のIL-6の濃度が正常な膀胱内と同様な濃度まで急激に低減した。また、発明者らはLL-37での炎症刺激により変化する独立した組織マーカーを捜し求めた。PTX3は、様々な炎症刺激により、組織または血清中で増加する長いペントラキシンファミリの新規メンバである。MPO及びIL-6の測定データと一貫して、PTX3の組織中濃度は検出不可能な濃度PBSを事前滴注された組織の1.1ng/mgまで顕著に増加した (図11d)。これらの増加は、GM-0111の事前滴注によって1mg/mLの場合でも有意に低減し、10mg/mL以上の濃度のGM-0111を事前滴注された組織において、多くは検出濃度未満 (組織の2pg/mL未満) に維持された。これらのデータは、LL-37が誘発した膀胱炎に対するGM-0111の防護効果が有意であることと、僅か1mg/mL程度の濃度のGM-0111を事前滴注することによってもたらされ得ることを示唆している。

【0105】

モデルの膀胱炎の進行をモニタするため、血液中に存在すると考えられるバイオマーカーを調べた。血清アミロイドP (SAP) は、哺乳動物の肝臓で産生されて分泌されるC反応性タンパク質 (CRP: C-reactive protein) に類似する短いペントラキシンである。SAPは、齧歯動物における炎症性サイトカインIL-6の濃度上昇に応答して、急激に増加することが知られている。IL-6の組織中濃度をLL-37によって上昇させると同時に血清中のSAP濃度も上昇するかどうかについて試験し、更にはGM-0111の事前滴注がSAP濃度に影響するかどうかについても判別した。PBSを事前滴注された動物におけるSAP濃度は無処理の正常な動物におけるよりもおよそ5倍高まったことが、測定値からわかる (図11a)。ただし、GM-0111 (10mg/mL以上) を事前滴注された動物におけるSAP濃度は、PBSを事前滴注された動物におけるよりも有意に低下した。これらのデータが組織学的評価と一貫していることから、SAPが組織における炎症変化を指示するうえで好適なバイオマーカーであり得ることがわかる。

【0106】

様々な生化学的及び組織学的分析によるデータは総体的に、GM-0111が、LL-37で誘発された膀胱の炎症の重篤度の防止及び低減に極めて強力な化合物であることを示唆している。動物モデルにおいてGM-0111が僅か1mg/mL程度でも防護効果を認めることができ、10mg/mLからは防護効果が強力になり、最大100mg/mLまで安全に利用できると思われる。

【0107】

本出願全体を通して様々な刊行物が参照されている。これらの刊行物の開示内容全体は、本明細書において参照によって本出願に組み込まれており、それによって、本明細書に記載されている化合物、組成物及び方法がより詳細に記述されている。本明細書に記載されている化合物、組成物及び方法に対しては、様々な修正及び変形を施すことができる。本明細書に記載されている化合物、組成物及び方法の他の態様は、本明細書を考慮し、本明細書中に開示されている化合物、組成物及び方法を実用化することによって明らかとなろう。本明細書及び実施例は、例示的であると見なされるように意図されている。

【0108】

参照文献

1. Theoharides, T. ; Sant, G. , New agents for the medical treatment of interstitial cystitis. Expert Opin. Investig. Drugs 2001, 10, 521-546.
2. Theoharides, T. , Treatment approaches for painful bladder syndrome/interstitial cystitis. Drugs 2007, 67, 215-235.
3. Toft, B. ; Nordling, J. , Recent developments of intravesical therapy of painful bladder syndrome/interstitial cystitis : a review. Curr. Opin. Urol. 2006, 16, 268-272.
4. Lukban, J. ; Whitmore, K. ; Sant, G. , Current management of interstitial cystitis. Urol. Clin. N. Am. 2002, 29, 649-660.
5. Theoharides, T. ; Cochrane, D. , Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. J. Neuroimmunol. 2004, 146, 1-12.
6. Jones, C. A. ; Nyberg, L. , Epidemiology of interstitial cystitis. Urology 1997, 49, (5A Suppl), 2-9.
7. Payne, C. K. ; Joyce, G. F. ; Wise, M. ; Clemens, J. Q. , Interstitial cystitis and painful bladder syndrome. J Urol 2007, 177, (6), 2042-9.
8. Parsons, C. ; Housley, T. ; Schmidt, J. ; Lebow, D. , Treatment of interstitial cystitis with intravesical heparin. Br. J. Urol. 1994, 73, 504-507.
9. Baykal, K. ; Senkul, T. ; Sen, B. ; Karademir, K. ; Adeyener, C. ; Erden, D. , Intravesical heparin and peripheral neuromod

10

20

30

40

50

- ulation on interstitial cystitis. Urol. Int. 2005, 74, 361-364.
10. Parsons, C., Successful downregulation of bladder sensory nerves with combination of heparin and alkalized lidocaine in patients with interstitial cystitis. Urology 2005, 65, 45-48.
11. Anderson, V.; Perry, C., Pentosan polysulfate: a review of its use in the relief of bladder pain or discomfort in interstitial cystitis. Drugs 2006, 66, 821-835. 10
12. Sant, G.; Probert, K.; Hanno, P.; Burks, D.; Culkin, D.; Diokno, A.; Hardy, C.; Landis, J.; Mayer, R.; Madigan, R.; Messing, E.; Peters, K.; Theoharides, T.; Warren, J.; Wein, A.; Steers, W.; Kusek, J.; Nyberg, L., A pilot clinical trial of oral pentosan polysulfate and oral hydroxyzine in patients with interstitial cystitis. J. Urol. 2003, 170, 810-815. 20
13. Iavazzo, C.; Athanasiou, S.; Pitsouni, E.; Falagas, M., Hyaluronic acid: an effective alternative treatment of interstitial cystitis, recurrent urinary tract infections, and hemorrhagic cystitis? Europ. Urol. 2007, 51, 1534-1541.
14. Theoharides, T.; Sant, G., A pilot open label of CystoProtek in interstitial cystitis. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2005, 18, 183-188. 30
15. Steinhoff, G.; Ittah, B.; Rowan, S., The efficacy of chondroitin sulfate 0.2% in treating interstitial cystitis. Can. J. Urol. 2002, 9, 1454-1458.

【図 1】

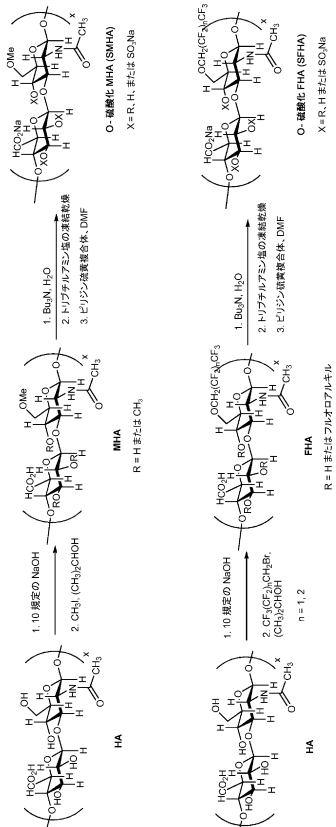


図 1

【図 2】

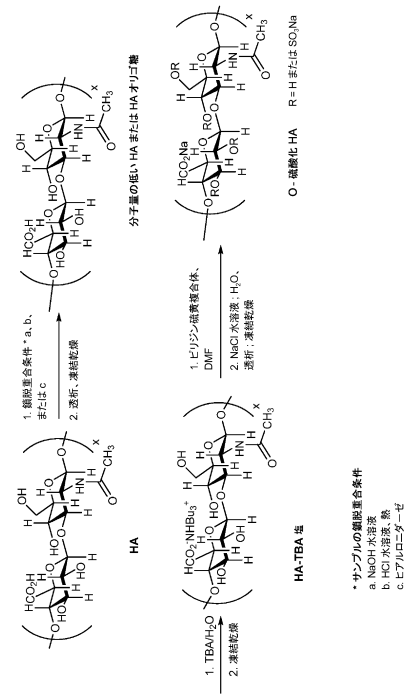


図 2

【図 3】

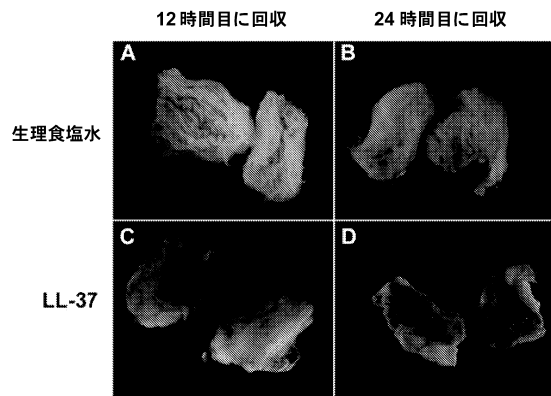


図 3

【図 4】

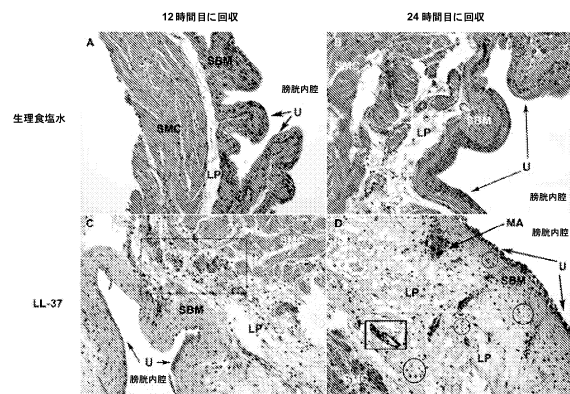


図 4

【図 5】

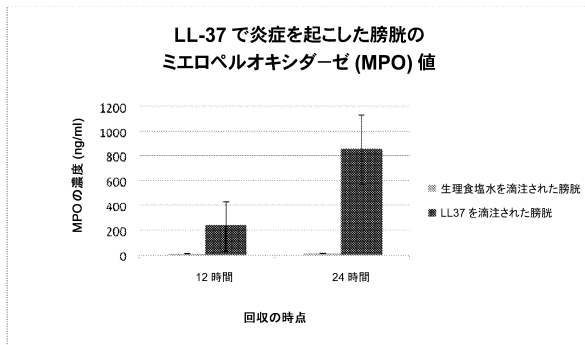


図 5

【図 6 - 1】

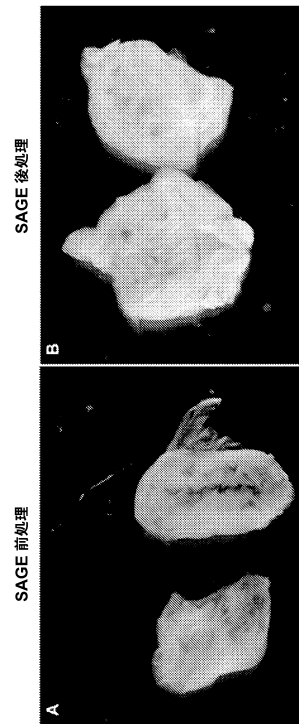


図 6

【図 6 - 2】

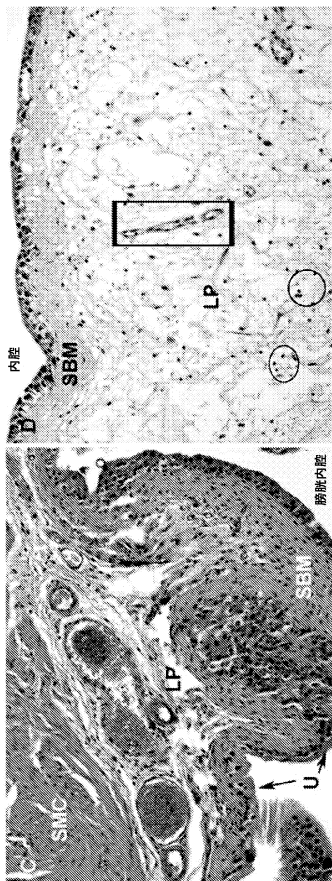


図 6

【図 6 - 3】

LL-37 で炎症を起こした膀胱の
ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 値

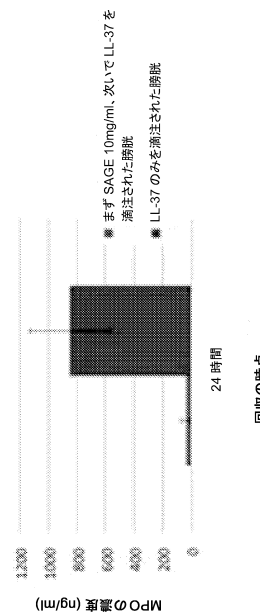


図 6

E

【図 6 - 4】

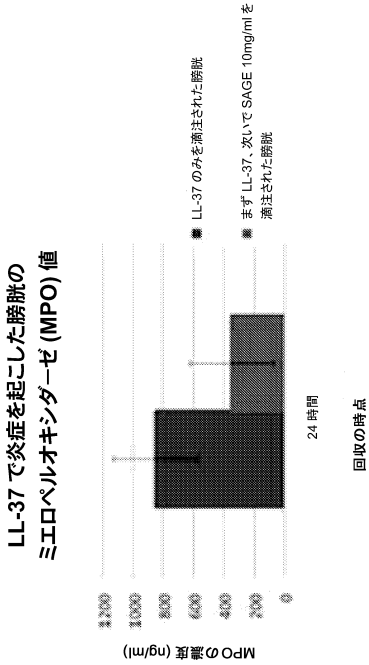


図 6

【図 6 - 5】

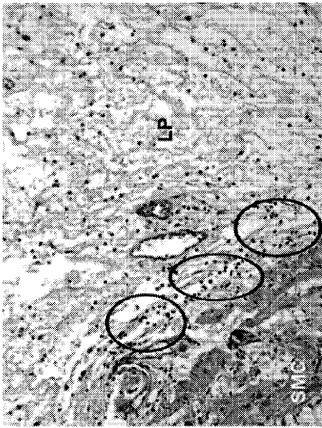


FIGURE 6

【図 7 - 1】

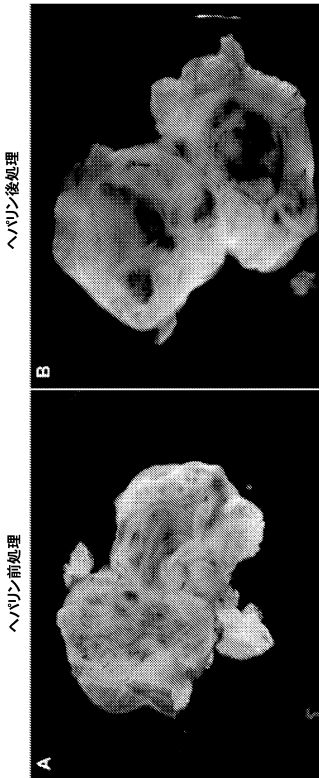


図 7

【図 7 - 2】

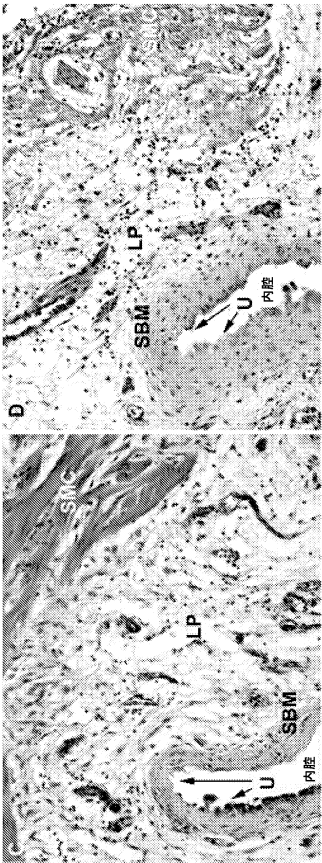


図 7

【図 7 - 3】

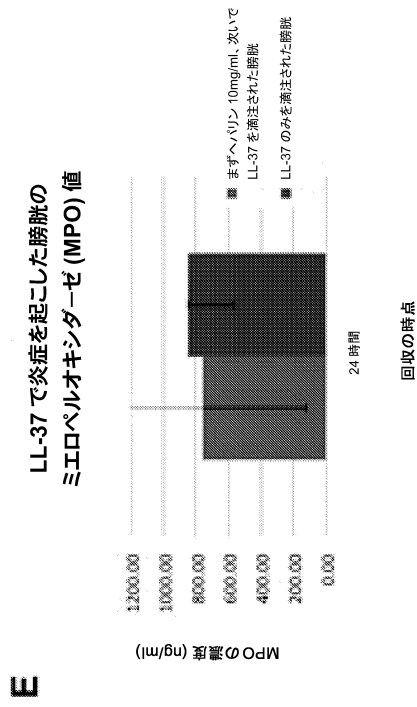


図 7

【図 7 - 4】

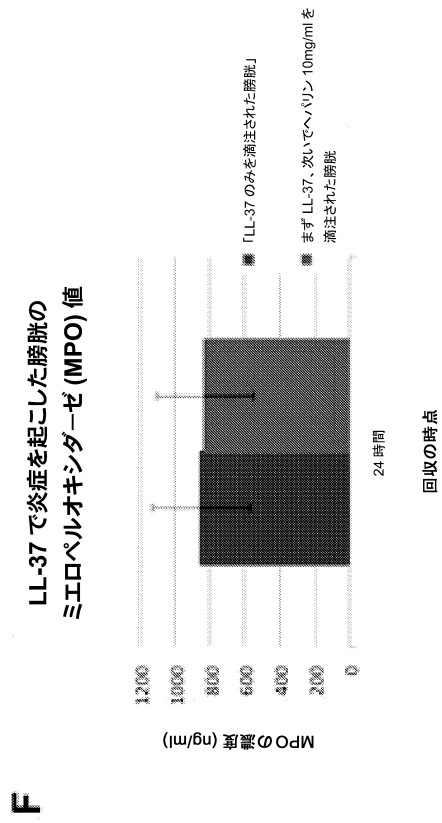


図 7

【図 8】

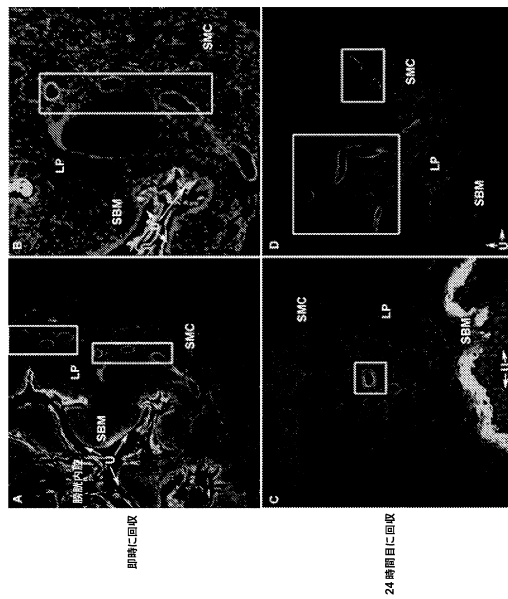


図 8

【図 9】

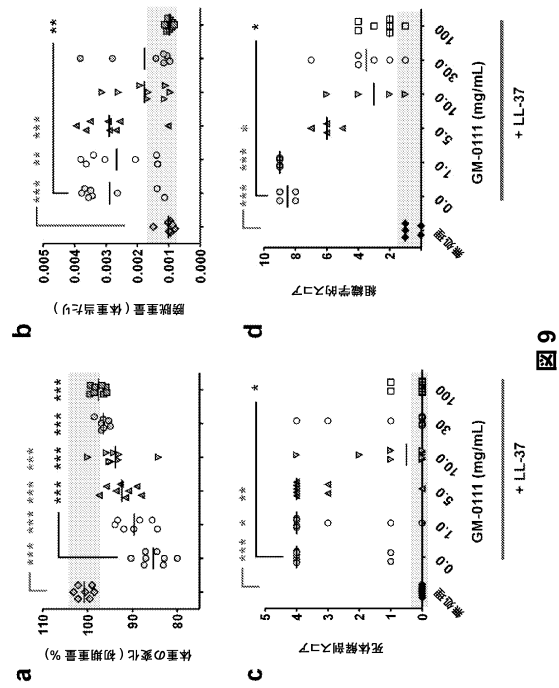


図 9

【図 10】

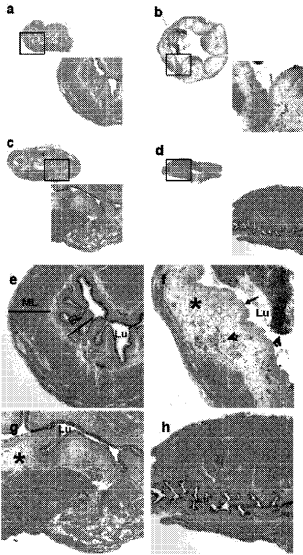


FIGURE 10

【図 11】

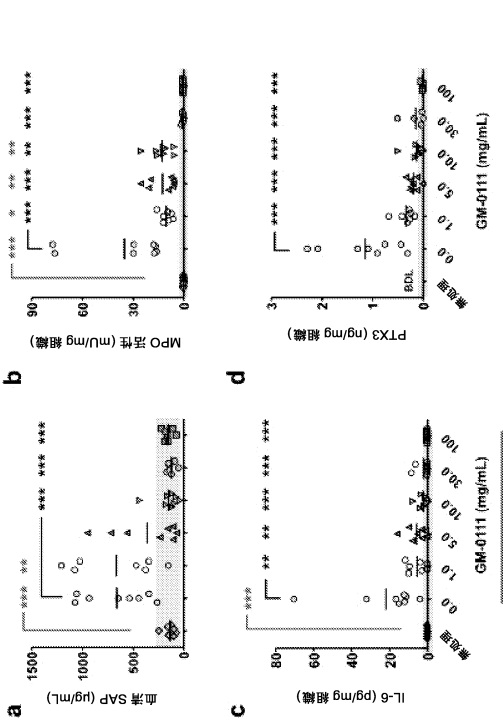


図 11

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	9/68	(2006.01)	A 6 1 K 9/68
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K 9/14
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 P	13/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/00
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P 13/02
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/08
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P 13/10
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	15/02	(2006.01)	A 6 1 P 15/02
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
			A 6 1 P 43/00 1 2 1

- (72)発明者 ウッタマサティエン, シアム
アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 6, ソルトレイクシティー, ベヴァリーストリート 2 7 2 4
- (72)発明者 ジア, ワンジア
アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 8, ソルトレイクシティー, ユニバーシティーヴィレッジ 7 5 5
- (72)発明者 マッコード, リンジ
アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 4, ソルトレイクシティー, フレモントアヴェニュー 7 6 8
- (72)発明者 リ, ウォンヨン
アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 2, ソルトレイクシティー, イーストサウステンプル 1 1 0 7, # 3

審査官 鶴見 秀紀

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 9 / 1 2 4 2 6 6 (WO, A 1)
Journal of Pathology, 2 0 0 2 年, Vol.198, No.3, pp.407-414
Nephron - Experimental Nephrology, 2 0 0 5 年, Vol.99, No.1, pp.e26-e32

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
- A 6 1 K 9 / 0 8
- A 6 1 K 9 / 1 4
- A 6 1 K 9 / 2 0
- A 6 1 K 9 / 4 8
- A 6 1 K 9 / 6 8
- A 6 1 K 4 5 / 0 0
- A 6 1 P 1 3 / 0 0
- A 6 1 P 1 3 / 0 2
- A 6 1 P 1 3 / 0 8
- A 6 1 P 1 3 / 1 0
- A 6 1 P 1 3 / 1 2
- A 6 1 P 1 5 / 0 0
- A 6 1 P 1 5 / 0 2
- A 6 1 P 4 3 / 0 0
- J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)