

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5345342号
(P5345342)

(45) 発行日 平成25年11月20日 (2013.11.20)

(24) 登録日 平成25年8月23日 (2013.8.23)

(51) Int.Cl.	F I
C O 8 B 37/08 (2006.01)	C O 8 B 37/08 Z
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/282
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 9 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2008-142863 (P2008-142863)	(73) 特許権者	506030963
(22) 出願日	平成20年5月30日 (2008.5.30)		タイワン ホパックス ケミカルズ マニ
(65) 公開番号	特開2008-297549 (P2008-297549A)		ュファクチャリング カンパニー リミテ
(43) 公開日	平成20年12月11日 (2008.12.11)		ッド
審査請求日	平成20年5月30日 (2008.5.30)		TAIWAN HOPAX CHEMS.
(31) 優先権主張番号	60/933,034		MFG. CO., LTD
(32) 優先日	平成19年6月4日 (2007.6.4)		台湾 83162 カオシュン ダリアオ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ファ ドン ロード ナンバー28
		(74) 代理人	100068755
			弁理士 恩田 博宣
		(74) 代理人	100105957
			弁理士 恩田 誠
		(74) 代理人	100142907
			弁理士 本田 淳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 金属－多糖複合体の組成および合成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コンドロイチンと、
カルボキシル基およびアミノ基を有する少なくとも1つの単量体アミノ酸と、
白金 (I I) または白金 (V I) から選択される1つの金属を有する薬剤とからなり、
前記単量体アミノ酸は前記単量体アミノ酸のアミノ基によって前記コンドロイチンに共有結合し、かつ前記薬剤は前記金属によって前記単量体アミノ酸のカルボキシル基に共役結合している、
多糖複合体。

【請求項 2】

前記多糖複合体が20,000ダルトンから50,000ダルトンの間の分子量を有する、請求項1に記載の多糖複合体。

【請求項 3】

前記単量体アミノ酸がアスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン、グルタミン、グリシン、およびそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、請求項1に記載の多糖複合体。

【請求項 4】

前記単量体アミノ酸がアスパラギン酸を含む、請求項1に記載の多糖複合体。

【請求項 5】

前記多糖複合体が重量にして10%から50%の間の前記単量体アミノ酸を含む、請求項

10

20

1 に記載の多糖複合体。

【請求項 6】

前記金属が、白金、鉄、ガドリニウム、レニウム、マンガン、コバルト、インジウム、ガリウム、ロジウム、またはそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、請求項 1 に記載の多糖複合体。

【請求項 7】

前記多糖複合体が重量にして 10 % から 50 % の間の前記金属を含む、請求項 1 に記載の多糖複合体。

【請求項 8】

カルボキシル基およびアミノ基を有する単量体アミノ酸を、前記アミノ基によってコンドロイチンに共有的に結合する工程と、

多糖複合体を形成するために、白金 (I I) または白金 (V I) から選択される金属を有した薬剤を前記金属によって前記カルボキシル基に共役結合させる工程とを備える、多糖複合体合成方法。

【請求項 9】

前記多糖複合体を粉末にするために乾燥する工程を更に備える、請求項 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の実施形態は、金属および多糖の単量体アミノ酸を介した複合体に関する。これらの多糖複合体は、癌細胞の死を誘導するために、また癌治療において用いられる可能性がある。

【背景技術】

【0002】

血管新生過程は腫瘍の血管系の密度と透過性に関与する。これらの過程、ならびに細胞周期制御および細胞シグナル伝達物質に関するより一層の理解は、様々な腫瘍の治療の新しい時代を切り開いた。血管新生分野において顕著な進展がなされたにもかかわらず、血管新生の要素がある癌、腫瘍、およびその他の疾患の薬剤を介した治療には多少の重要な制限が今なお残っている。現時点で最も重要な制限の一つは細胞増殖抑制剤ではなく細胞毒性薬のインビボでの送達に関する。

【0003】

腫瘍の活動に対する白金複合体の効果が示されている。例えば、広く用いられる抗癌剤であるシスプラチンは単独または他の薬剤との組み合わせで乳癌および卵巣癌を治療するために用いられている。cis-ジアンミンジクロロ白金 (I I) (CDDP) としても知られるシスプラチンは、白金が NH_3 分子に共役した単純な分子である。シスプラチンは細胞増殖の分裂停止をもたらす細胞の S 期停止を引き起こす。またシスプラチンは、化学療法の際に血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を減少させ、ひいては血管新生を制限する。シスプラチンは大部分の固形癌の治療に有効である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、シスプラチンを用いる臨床応用は顕著な腎臓毒性、骨髄抑制、薬剤耐性、胃腸毒性、神経毒性、およびその他の副作用 (例えば、嘔吐、顆粒球減少、および体重減少) のため限定される。また、シスプラチンは水への溶解性に乏しいため、溶媒中に調剤されるが、この溶媒はかさばり、治療効果を損なう。副作用を低減し治療効果を改善するために様々な白金複合体の化学修飾が行われてきたが、これらの複合体は依然として重大な欠点を示す。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、一実施形態において多糖複合体を提供する。この多糖複合体は多糖および多

10

20

30

40

50

糖に共有結合する酸素基を有する少なくとも1つの単量体アミノ酸を有する。また多糖複合体は、アミノ酸の酸素基によって結合された少なくとも一つの金属を有する。

【0006】

別の実施形態によると、本発明は酸素基を有する単量体アミノ酸の多糖への共有結合によって、また多糖複合体を形成するために金属を酸素基に共役することによって多糖複合体を合成する方法を提供する。

【0007】

第三の実施形態によると、本発明は有効量の多糖複合体を細胞に投与することによって癌細胞を殺す方法に関する。この多糖複合体は、多糖および多糖に共有結合するための酸素基を有する少なくとも1つの単量体アミノ酸を有する。多糖複合体はまた、アミノ酸の酸素基によって共役された少なくとも1つの金属を有する。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

特定の実施形態において、本発明は金属-多糖複合体、それらの合成方法、および癌細胞死の誘導およびガンの治療を含むそれらの使用を含む。具体的には、複合体は少なくとも1つの結合された単量体アミノ酸を含む多糖を含む。このアミノ酸は次に金属を共役することができる。選択された実施形態では、金属はN基ではなく酸素基を介して共役することができる。一部の実施形態では、金属は遷移金属である可能性がある。多くの実施形態では、結合された複数の単量体アミノ酸があり、そのため複数の金属基の共役が可能になる。複合体は任意のサイズであってよいが、特定の実施形態において、腎臓と通じた排泄を限定するために複合体は各分子が少なくとも10,000ダルトン、例えば10,000から50,000ダルトンの間であるように設計される場合がある。具体的な実施例では、多糖複合体は約20,000ダルトンから約50,000ダルトンの間、より具体的には約26,000ダルトンから約30,000ダルトンの間の分子量を有する場合がある。

20

【0009】

選択された多糖は、任意の多糖であってよいが、血管吸収に関与する多糖が特に有用である可能性がある。具体的には、コラーゲン、コンドロイチン、ヒアルロン酸塩、キトサン、およびキチンといった接着性分子が多糖としての使用に適している可能性がある。具体的な一実施形態では、多糖はコンドロイチンAである場合がある。本発明は特定の作用形態に限定されないが、前記多糖は血管系を通じた吸収および癌細胞への送達を促進する。これは多くのガンなど、進行中の血管新生の領域において特に当てはまる可能性がある。20,000から50,000ダルトンの範囲の分子量の最終産物は、血管に基づく治療の達成を助ける。

30

【0010】

アミノ酸は任意の安定した方法で多糖に結合することができるが、多くの実施形態では共有的に多糖に結合される。アミノ酸は個別のモノマーが別々に多糖に結合されるように、単量体の形であってよい。アミノ酸は金属の共役を利用可能な酸素基を有し、特に二つの酸素基が利用可能であってもよい。金属は、単独の単量体アミノ酸によって、もしくは二つまたはそれ以上の単量体アミノ酸を介して共役することができる。単独または組み合わせで用いることができるアミノ酸単量体の例は、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンと組み合わせたグルタミン酸、アスパラギンと組み合わせたグルタミン酸、グルタミンと組み合わせたグルタミン酸、グリシンと組み合わせたグルタミン酸、およびグリシンと組み合わせたアスパラギン酸を含む。二つのカルボン酸間の結合距離とより良い腫瘍の吸収特異性のため、アスパラギン酸が好ましい。アミノ酸はL型、またはD型、またはL型およびD型のラセミ混合物であってもよい。最適な腫瘍吸収にはL型のアミノ酸が好ましい。単独のアスパラギン酸単量体はそれ自体に金属を共役することができることから、アスパラギン酸が選択されても良い。更に、アスパラギン酸はほ乳類細胞によって生産されないが必須の栄養素であり、増殖中の腫瘍細胞によって迅速に吸収されるようにしていると思われる。

40

50

【0011】

以下の図面は本明細書の部分を成し、本発明の特定の様態を更に示すために含まれる。本発明はここに示された実施形態の説明と組み合わせて、一つまたは一つ以上のこれらの図面を参照することによってより一層理解することができる。本特許または出願書は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。

【0012】

図1A～1Cは、本発明の実施形態による金属多糖複合体の三つのタイプを図示する。「AA」は、アミノ酸を表す。「M」は金属を表す。図1Aにおいて、一つだけまたはいくつかのアミノ酸基および共役された金属が示される。図1Bにおいて、中間の数のアミノ酸基および共役された金属が示される。図1Cにおいて、考えられる最大数またはほぼ最大数のアミノ酸基および共役された金属が示される。

10

【0013】

アミノ酸は、多糖複合体の重量に対して約10%から約50%の間で含むことができる。

多糖のアミノ酸結合点の飽和度は様々であってよい。例えば、図1Aに示されるように、一つのみのアミノ酸が結合してもよい。5%以下、10%以下、または20%以下といった非常に低い飽和度が実現されても良い。図1Bは、およそ30%、およそ40%、およそ50%、またはおよそ70%といった中程度の飽和度の複合体を図示する。図1Cは、80%以上、90%以上、95%以上、または実質的に完全飽和といった非常に高い飽和度の複合体を図示する。図1では各アミノ酸が共役した金属を有するが、多くの実際の例では5%未満、10%未満、または20%未満、およそ30%、およそ40%、およそ50%、またはおよそ70%、80%以上、90%以上、95%以上、または実質的に完全飽和といった、金属によって利用可能なアミノ酸の飽和度がある。

20

【0014】

金属は任意の金属原子または鉄またはアミノ酸モノマーの酸素基によって共役することができる金属を含む化合物であってよい。具体的な実施形態では、金属は白金、鉄、ガドリニウム、レニウム、マンガン、コバルト、インジウム、ガリウム、またはロジウムといった遷移金属であってよい。金属は治療的金属であってもよい。薬剤などのより大きな分子の一部であってもよい。金属はアミノ酸モノマーの酸素基を介して多糖-アミノ酸骨格に共役することができる。

30

【0015】

一実施形態において、金属は多糖複合体の重量に対して15%から約30%の間であってもよい。

実施形態の一例では、複合体は、白金含有化合物においては白金を共役させるアスパラギン酸モノマーに共有的に結合したコンドロイチンAを含む。一変形物において白金は白金(II)であってもよく、別の変形物では白金は白金(IV)であってもよい。

【0016】

複合体は水に可溶である場合もある。例えば、少なくともおよそ20mg(金属当量)/水mlの溶解性を有する可能性がある。複合体は水溶液または粉末といった様々な形で提供される可能性もある。複合体とその製剤は滅菌されてもよい。例えば、滅菌粉末として提供されてもよい。

40

【0017】

複合体は本発明の一実施形態に従って、一つ以上のアミノ酸を多糖に別に共有的に結合させることによって合成されてもよい。次に、アミノ酸モノマーによる共役金属が提供されてもよい。本発明の別の実施形態によると、金属がアミノ酸モノマーに共役されてもよく、次に一つ以上のアミノ酸モノマーが多糖に共有的に結合されてもよい。

【0018】

本発明の複合体は、癌細胞または腫瘍細胞を殺すために用いることもでき、ひいては癌または腫瘍を治療することができる。複合体は腫瘍、特に固形癌を標的とすることができる。これは例えば、ガンマ線イメージングを可能にする、 ^{99m}Tc に共役された多糖-

50

アミノ酸骨格といった放射線標識した化合物の変形物を通じて実証することができる。金属成分を含む細胞毒性薬は、毒性作用を低減するために多糖－アミノ酸骨格に共役されてもよい。例えば、細胞毒性薬は急性全身毒性を低減させるために多糖から次第に放出されてもよい。また、水への可溶性が乏しい薬剤の治療指数（毒性／効果）または腫瘍ターゲティング能は、多糖ポリマー骨格にそれらの薬剤を共役することによって増大する可能性がある。

【0019】

実施形態の具体的な例では、白金含有複合体は癌細胞の増殖をシスプラチンより少ない用量で阻害できる可能性がある。更に、白金含有複合体はシスプラチン耐性癌細胞、特に卵巣癌細胞の細胞増殖も阻害できる可能性がある。

10

【0020】

任意の種類の癌細胞または腫瘍細胞は、本発明の選択された複合体によって殺されるか増殖が阻害される可能性がある。しかし、固形癌はこれらの複合体に最もよく反応する可能性がある。本発明の特定の複合体に感受性である癌の例は、卵巣癌、シスプラチン耐性卵巣癌、膵臓癌、乳癌、肉腫、子宮癌およびリンパ腫を含む。

【0021】

癌に加えて、本発明の特定の複合体は以下の疾患の発症と進行に関わる細胞を標的とし、阻害できる可能性がある：HIV、自己免疫疾患（例えば、脳脊髄炎、白斑、強皮症、甲状腺炎、および穿孔性膠原病）、遺伝病（例えば、色素性乾皮症およびグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症）、代謝疾患（例えば、糖尿病）、心臓血管疾患、神経精神

20

実施例

以下の実施例は、本発明の具体的な実施例を示すために含まれている。発明者によって発見された本技術に従う実施例に開示された技術が本発明の実践において良好に機能することが、当業者により正しく理解されるはずである。しかし、開示された具合的な実施形態において多くの変更を行うことができること、また同等または類似の結果を本発明の精神および範囲から離れずに更に得ることを、当業者は本開示を踏まえて正しく理解するだろう。

【0022】

実施例1：白金アナログ（II）および（IV）－多糖複合体の合成
方法A

30

cis-1, 2-ジアミノシクロヘキサン硫酸白金（II）（cis-1, 2-DACH-PtSO₄）を二段階の手順を介して合成した。第一の段階では、120mLの脱イオン水にK₂PtCl₄（5.00g、12mmol）の濾過した溶液をKI（12mLの水に20.00g、120mmol）と混合して5分間攪拌することによって、cis-1, 2-DACH-PtI₂複合体を合成した。この溶液に1当量のcis-1, 2-DACH（1.37g、1.487mmol、12mmol）を添加した。反応混合液を室温で30分間攪拌した。得られた黄色固体を濾過で分離し、次に少量の脱イオン水で洗浄した。最終生成物を真空下で乾燥したところ、cis-1, 2-DACH-PtI₂（6.48g、96%）が得られた。第二の段階では、cis-1, 2-DACH-PtI₂（

40

【0023】

水（5mL）にコンドロイチン（1g、MW. 30,000-35,000）の攪拌溶液に、硫酸NHS（241.6mg、1.12mmol）および3-エチルカルボジイミド1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドHCl（EDC）（218.8mg、1.15mmol）（ピアース・ケミカル・カンパニー社（Pierc

50

e Chemical Company)、イリノイ州、ロックフォード)を加えた。次に、L-アスパラギン酸ナトリウム(356.8mg、1.65mmol)を加えた。混合液を室温で24時間攪拌した。10,000でカットオフしたSpectra/POR分子多孔膜(スペクトラム・メディカル・インダストリーズ社(Spectrum Medical Industries Inc.))、テキサス州、ヒューストン)を用いて混合液を48時間透析した。透析後、生成物を濾過し、凍結乾燥機(ラブコンコ社(Labconco))、ミズーリ州、カンザスシティ)で凍結乾燥した。生成物である塩の形のアスパラギン酸-コンドロイチン(多糖)は、1.29gの重さだった。同様の手法をグルタミン酸とアラニン、グルタミン酸とアスパラギン、グルタミン酸とグルタミン、グルタミン酸とグリシン、およびグルタミン酸と、アラニン、アスパラギン、グルタミン、およびグリシンの一つと共役したアスパラギン酸を有するコンドロイチンの調製に用いた。

10

【0024】

Cis-1, 2-DACH-Pt(II)SO₄(500mg、1.18mmol)を10mLの脱イオン水に溶解し、アスパラギン酸-コンドロイチン(15mL脱イオン水に1.00g)を添加した。溶液を室温で24時間攪拌した。透析(MW:10,000)と凍結乾燥後、cis-1, 2-DACH-Pt(II)-多糖の収量は1.1462gだった。

【0025】

白金-多糖複合体であるCis-1, 2-DACH-ジクロロ-Pt(IV)-アスパラギン酸-コンドロイチン(PC)は、次のように合成した:上記溶液を2.5mLの30%過酸化水素水溶液に滴下した。24時間後、HCL(0.02Nを75mL)を添加し、室温で24時間攪拌し、脱イオン水で一晩透析(MW:10,000)し、真空下で凍結乾燥した。得られた最終生成物は、1.15gだった。元素分析でPt:21.87%(w/w)と示された。合成の図式を図2に示す。

20

方法B

Cis-1, 2-DACH-Pt(II)SO₄またはCis-1, 2-DACH-ジクロロ-Pt(IV)(500mg、1.18mmol)を10mLの脱イオン水に溶解し、2mL脱イオン水にアスパラギン酸塩(67mg、0.5mmol)を溶解した溶液を添加した。溶液を室温で24時間攪拌した。透析と凍結乾燥後、cis-1, 2-DACH-Pt-アスパラギン酸塩を、水(5mL)に溶解したコンドロイチン(1g、MW:30,000-35,000)、硫酸NHS(241.6mg、1.12mmol)および3-エチルカルボジイミド1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドHCl(EDC)(218.8mg、1.15mmol)(ピアース・ケミカル・カンパニー社(Pierce Chemical Company)、イリノイ州、ロックフォード)と反応させた。合成の図式を図3に示す。

30

【0026】

実施例2:インビトロ細胞培養アッセイ

シスプラチンおよび方法Aを用いて上述のように調製された白金(II)-多糖複合体(PC)の乳腺腫瘍細胞に対する細胞毒性を評価するため、2008株およびその白金耐性亜株である2008-c13の二つのヒト腫瘍細胞株を選択した。全ての細胞を37℃で加湿した5%CO₂を含む大気中で、10%ウシ胎仔血清およびグルタミン(2mM)を添加したRPMI1640培地で培養した。2008または2008-C13細胞を96穴プレートに播種し(4,000細胞/ウェル)、RPMI1640培地中に24時間維持した。次に、細胞を2.5、5、10、20、25、および50μg/mLの濃度のPCまたはCDDPで48または72時間処理した。コントロールはDMSOまたはPBSで処理した。細胞の処理後、細胞を20μLのテトラゾリウム基質と共に37℃で1~2時間インキュベートして、増殖と生存率を測定した。96-well Synergy HT-microplate reader(バイオテック社(Biotek))、バーモント州、ウィノオスキー)を用いて450nmの吸収を測定した。細胞増殖の阻害率は、以下のように、パーセンテージとして表現した:%=100-(ODコントロール

40

50

OD_{処理細胞})/OD_{コントロール}。実験は独立して3回反復して行った。メチレンテトラゾリウム(MTT)色素アッセイは、生存細胞の量を測定した。細胞のタンパク質含量をローリー法で測定した。次に、細胞増殖を50%阻害する薬剤濃度(IC₅₀)を測定した。データは、コントロールと比較した差のパーセンテージとして表現する(処理後の細胞のOD/処理なしの細胞のOD)。例示した細胞阻害曲線を図4および5に示す。図4, 5において、「Inhibition」は阻害、「Concentration」は濃度、「Saline」は生理食塩水を示す。

【0027】

結果は、白金感受性卵巢癌株(2008)と異なり(図5)、白金耐性卵巢細胞株では白金-多糖複合体(PC)のIC₅₀に曝露する細胞の感受性がシスプラチン(CDDP)のIC₅₀への曝露の場合と比較して5.7倍高いことを示した(図4)。特に、2.5および5 μg/mLの白金-多糖複合体(PC)の濃度は、腫瘍致死を48時間でシスプラチン(CDDP)と比較してそれぞれ5.9および4.6倍高め(図4A)、72時間でシスプラチン(CDDP)と比較してそれぞれ9.3および1.5倍高めた(図4B)。データは、低用量の白金-多糖複合体(PC)が白金耐性卵巢癌細胞の細胞増殖を顕著に阻害することを示した。

【0028】

白金-多糖複合体(PC)の白金耐性卵巢癌細胞に対する効果を測定するため、2008-c13細胞(0.5×10^{-6})を白金-多糖複合体(PC)で処理した。細胞をトリプシン処理し、2500 rpmで5分間遠心した。1×PBSで2回洗浄後、細胞を70%エタノールで一晩固定し、1×PBSで2回洗浄し、1 mLのヨウ化プロピジウム(PI)溶液に再懸濁した(1×10^6 細胞/mL)。RNase(20 μg/mL)溶液を添加し、次に1 mLのヨウ化プロピジウム溶液(PI、PBSに50 μg/mL)を添加した。試料を37℃で15分間インキュベートし、PI蛍光をEPI SXL解析装置で解析した。シスプラチン(CDDP)と比較して、白金(IV)-多糖複合体は低濃度(2.5および5 μg/mL)で白金耐性卵巢細胞のアポトーシス作用を顕著に強化した(図6-7)。図7において、「% of apoptotic cells」はアポトーシス細胞の割合、「Concentration」は濃度、「Saline」は生理食塩水を示す。

【0029】

これらの結果は、処理48時間後に両薬剤に曝露後にアポトーシス細胞の用量依存性の明確な増加が検出されたことを示すTUNELアッセイにより確認された。しかし、各用量で比較した場合、白金-多糖複合体(PC)処理群は、更に多くの細胞がアポトーシスを起こした($P < 0.05$)(図8)。図8の縦軸はアポトーシス細胞の割合を示す。

【0030】

実施例3：乳癌移植ラットモデルを用いた抗癌作用の評価

メスのFischer 344ラット(125-175 g)に乳癌細胞(13762NF、 10^6 細胞/ラット、後肢に皮下注射)を接種した。15-20日後、腫瘍体積1 cmで、腫瘍移植ラットに白金コンドロイチン(白金-多糖)複合体(PC)またはコンドロイチン単独のいずれかを10 mg Pt/kg(白金(IV)-多糖)または45 mg/kg(コンドロイチン)の用量で投与した。腫瘍体積および体重を毎日、6日間記録した。腫瘍体積は、[長さ(l)×幅(w)×厚さ(h)]/2として測定した。15%の体重減少は、化学物質に誘導された毒性作用と考えられる。結果は、白金-多糖複合体(PC)はインビボで乳癌の増殖に効果的であることを示す(図9)。DYで表される腫瘍は、コンドロイチンのみを投与された動物から採取された。DP-A-Pで表された腫瘍は、白金-多糖複合体を投与された動物から採取された。図9Aにおいて、左の腫瘍は、(2.08 cm×2.58 cm×1.96 cm)/2で5.2591 cm³の体積だった。右の腫瘍は、(2.20 cm×2.37 cm×2.02 cm)/2で5.2661 cm³の体積だった。図9Bにおいて、左の腫瘍は、(2.99 cm×3.29 cm×2.92 cm)/2で14.3622 cm³の体積だった。右の腫瘍は、(1.11 cm×1.84 cm×0.86 cm)/2で0.8782 cm³の体積だった。白金-多糖複合体処理

10

20

30

40

50

後、腫瘍組織を切除し、ホルマリンに包埋した。腫瘍組織をパラフィンに固定し、組織学的検査のためにヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。白金－多糖複合体の投与後94時間で、広範囲の壊死が観察されたが、多糖単独では観察されなかった(図10)。図10は、本発明の実施形態における白金－多糖複合体またはコンドロイチンのみの投与後24および94時間の壊死を示す腫瘍のヘマトキシリン・エオジン染色を示す。

【0031】

実施例4：腫瘍細胞死または阻害の方法

実施例1の白金－多糖複合体の腫瘍細胞に対する作用を2008-c13乳癌細胞を複合体で処理し、ウェスタンブロットで細胞のタンパク質に対する影響を分析することによって解析した(図11)。切断されたPARPは、白金－多糖複合体(PC)で処理された細胞内で、シスプラチン(CDDP)と比較して顕著に増加し、白金－多糖複合体がカスパーゼ3に依存する経路でのアポトーシス強化を通じて2008-c13の細胞増殖を阻害したことを示唆している。

【0032】

作用を、薬剤曝露48時間後と72時間後の2008-c13細胞株においてフローサイトメトリーでテストした。フローサイトメトリー解析は、低二倍体細胞を表しアポトーシスの誘導を示すsub-G1画分の細胞数にPCおよびCDDP処理後に用量依存性の上昇があることを示した。しかし、CDDPと比べてPCの使用は、同じ用量でsub-G1画分に更に明確な上昇を生じた(図14)。

【0033】

TUNELアッセイの三つの独立した実験により、アポトーシスに典型的なDNAの断片化が更に検出された。アポトーシス細胞数の用量依存性の明確な増加が、両薬剤への曝露後に検出された。しかし、各用量で比較した場合、PC処理細胞は更に高度のアポトーシスを示した($P < 0.05$)(図15)。図15は、cis-ジアンミンジクロロ白金(II)(CDDP)およびジアミンジカルボン酸白金(PCまたはDDAP)で誘導されたアポトーシスの薬剤曝露48時間後のTUNELアッセイを示す。

【0034】

PARPの切断がその後続くカスパーゼ3依存性経路を通じてアポトーシスが誘導されるかどうかを判定するため、カスパーゼ3およびカスパーゼ3の活性化後に形成するPARPのレベルをウェスタンブロット解析により測定した。PARPは、カスパーゼ3依存性アポトーシスの際に85kDaの断片に特異的に切断されることが示されている113kDaの核タンパク質である。細胞をCDDPまたはPCに48時間曝露した後、切断されたPARPは各用量に存在した。CDDP処理群では、切断されたPARPの発現が2.5μg/mLから20μg/mLへ増加し、切断されたカスパーゼ3は、PARPの発現と同様のパターンで発現された。PC処理群では、切断されたカスパーゼ3の発現は、PC5μg/mLで見られた低発現を除いてCDDP処理群での発現に匹敵した。切断されたPARPの発現は高用量(20μg/mL)のPCにより誘導され、低用量のPCによる誘導よりも低いように見えるが、その上流である切断されたカスパーゼ3の発現ではそのような差は検出されなかった(図16)。図16は、cis-ジアンミンジクロロ白金(II)(CDDP)またはジアミンジカルボン酸白金(PCまたはDDAP)で処理された2008-c13細胞における、切断されたカスパーゼ3および特異的なポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ(PARP)の切断のウェスタンブロット解析を示す。GAPDHはグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素である。

【0035】

2008-c13乳癌細胞におけるインビトロでの更なるテストにおいて、フローサイトメトリー解析は、細胞が白金－多糖複合体(PC)曝露後48時間で顕著にS期に停止したことを示した(図12)。最高レベルのS期ブロックは、より低い用量である2.5および5μg/mLで生じた(90.3%および90.1%)。シスプラチン(CDDP)と比較した場合、白金－多糖複合体(PC)のS期停止細胞に対する作用は顕著に異なる。

10

20

30

40

50

【0036】

具体的に、2008．C13脂肪をPCまたはCDDPで処理した48時間後にDNA含量をフローサイトメトリーで解析した。CDDPへの曝露は、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞のS期停止を誘導しsub-G1画分を増加させたが、最も低い用量の $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ではこれらの結果は見られなかった。S期停止した細胞数およびsub-G1画分は、CDDP用量の上昇と共に継続的に上昇し、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ で最大のS期停止(84.2%)が生じた。細胞をPCに48時間曝露した後、最高レベルのS期ブロックがより低い用量($2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ [90.3%] および $5\mu\text{g}/\text{mL}$ [90.1%]) で生じた。より高い用量(10および $20\mu\text{g}/\text{mL}$)では、sub-G1画分が増加するに従って徐々にS期停止のレベルが低下した。これは、高用量PCの強度のストレス下で細胞が迅速に、S期に停止する直前にアポトーシスを受けるという事実で説明することができる(図17)。

図17Aは、2008．C13細胞株におけるcis-ジアンミンジクロロ白金(II)(CDDP)またはジアミンジカルボン酸白金(PCまたはDDAP)で48時間の処理後の細胞周期の分布を示す。G₁、G₂、M、およびSは、細胞の位相を示す。

10

【0037】

2008．C13細胞においてCDDPおよびPCにより引き起こされるS期停止の基礎をなす機構を明らかにするために、S期における細胞周期の調節に重要なp21およびサイクリンAの発現を、薬剤曝露48時間後の2008．C13において検討した。p21もサイクリンAも、どちらもCDDP処理後のS期停止の程度には関連しなかった。しかしPC処理後では、p21およびサイクリンAの発現はS期停止の程度に直接的に関係し、p21は低用量PC処理後にS期停止を最大に上方調節されたが、高用量後では上方調節されず、サイクリンAは、高用量PC処理後に上方調節され、低用量PC処理後には低レベルに維持された(図17B)。

図17Bは、cis-ジアンミンジクロロ白金(II)(CDDP)またはジアミンジカルボン酸白金(PCまたはDDAP)に48時間曝露後の2008．C13細胞におけるp21およびサイクリンAの発現のウェスタンブロット解析を示す。GAPDHはグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素である。

20

【0038】

白金-多糖複合体(PC)で処理した2008-c13乳癌細胞は、シスプラチン(CDDP)で処理した細胞と比較して、転写(図13A)とタンパク発現レベル(図13B)の両方でp21発現の上昇を示した。

30

【0039】

本発明の典型的な実施例のみが具体的に上述されているが、当然ながら、本発明の精神と意図する範囲から逸脱することなくこれらの実施例の修正および変形が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1A】一つだけまたはいくつかのアミノ酸基および共役された金属を有する金属多糖複合体を示す模式図。

【図1B】中間の数のアミノ酸基および共役された金属を有する金属多糖複合体を示す模式図。

【図1C】考えられる最大数またはほぼ最大数のアミノ酸基および共役された金属を有する金属多糖複合体を示す模式図。

40

【図2】本発明の実施形態による白金アナログ(II)および(IV)-多糖複合体合成の一つの方法(方法A)を示すスキーム。

【図3】本発明の実施形態による多糖-白金アナログ(II)および(IV)複合体合成の別の方法(方法B)を示すスキーム。

【図4】本発明の実施形態による白金耐性卵巢癌細胞(2008-c13)の阻害における白金-多糖複合体の48時間(A)および72時間(B)での作用を示すグラフ。

【図5】本発明の実施形態による白金感受性卵巢癌細胞(2008)の阻害における白金-多糖複合体の48時間(A)および72時間(B)での作用を示すグラフ。

【図6A】白金耐性卵巢癌細胞株2008-c13に対するシスプラチン(CDDP)で

50

のアポトーシス作用を示すフローサイトメトリーの結果を示すグラフ。

【図6B】本発明の実施形態による白金－多糖複合体（PC）（B）の48時間でのアポトーシス作用を示すフローサイトメトリーの結果を示すグラフ。

【図7A】本発明の実施形態による白金－多糖複合体（PC）またはシスプラチン（CDDP）で様々な濃度で48時間処理された白金耐性卵巢癌細胞株2008－c13においてフローサイトメトリーにより検出されたアポトーシス細胞のパーセンテージを示すグラフ。

【図7B】本発明の実施形態による白金－多糖複合体（PC）またはシスプラチン（CDDP）で様々な濃度で72時間（B）処理された白金耐性卵巢癌細胞株2008－c13においてフローサイトメトリーにより検出されたアポトーシス細胞のパーセンテージを示すグラフ。

10

【図8】本発明の実施形態による白金－多糖複合体（PC）またはシスプラチン（CDDP）で様々な濃度で48時間処理された白金耐性卵巢癌細胞株2008－c13においてTUNELアッセイによって検出されたアポトーシス細胞のパーセンテージを示すグラフ。

【図9A】乳癌の増殖に対する本発明の実施形態による白金－多糖複合体のインビボでの24時間での作用を示す（単回投与、白金10mg/kg）写真。

【図9B】乳癌の増殖に対する本発明の実施形態による白金－多糖複合体のインビボでの94時間での作用を示す（単回投与、白金10mg/kg）写真。

【図10A】コンドロイチンが投与された24時間の乳腺腫瘍（13762）を示す写真。

20

【図10B】白金－多糖複合体が投与された24時間の乳腺腫瘍（13762）を示す写真。

【図10C】コンドロイチンが投与された94時間の乳腺腫瘍（13762）を示す写真。

【図10D】白金－多糖複合体が投与された94時間の乳腺腫瘍（13762）を示す写真。

【図11】白金－多糖複合体（PC）またはシスプラチン（CDDP）のいずれかで処理された2008－c13細胞由来のPARPタンパク質のウェスタンブロット。

【図12】白金－多糖複合体（PC）またはシスプラチン（CDDP）処理48時間後の2008－c13細胞の細胞周期のフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフ。

30

【図13A】白金－多糖複合体（PC）またはシスプラチン（CDDP）の低用量で処理された2008－c13細胞における、p21転写物のノーザンブロット。

【図13B】白金－多糖複合体（PC）またはシスプラチン（CDDP）の低用量で処理された2008－c13細胞における、発現されたp21のウェスタンブロット。

【図14A】シスプラチン（CDDP）または複合体（PCまたはDDAP）に曝露48時間後のsub-G₁画分の用量依存性の増加のフローサイトメトリー解析（白金耐性の2008．C13細胞において、同じ用量でPCはCDDPよりも大幅に多いsub-G₁細胞を誘導）を示すグラフ。

【図14B】2008．C13細胞におけるCDDPまたはPC（DDAP）への48時間曝露後のsub-G₁画分のパーセンテージを示すグラフ。

40

【図15A】アポトーシス性の形態が茶色の粒子で示される、写真。

【図15B】アポトーシス性の形態を示す細胞のパーセンテージ（カラムは、三つの独立した実験の平均、バーは標準誤差）を示すグラフ。

【図16】cis－ジアミンジクロロ白金（II）（CDDP）またはジアミンジカルボン酸白金（PCまたはDDAP）で処理された2008．C13細胞における、切断されたカスパーゼ3および特異的なポリ（ADPリボース）ポリメラーゼ（PARP）の切断のウェスタンブロット解析を示すグラフ。

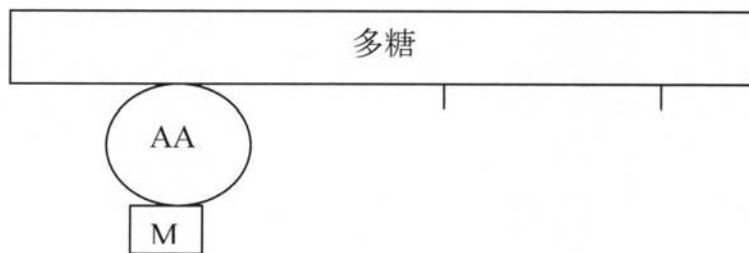
【図17A】2008．C13細胞株におけるcis－ジアミンジクロロ白金（II）（CDDP）またはジアミンジカルボン酸白金（PCまたはDDAP）で48時間の処理

50

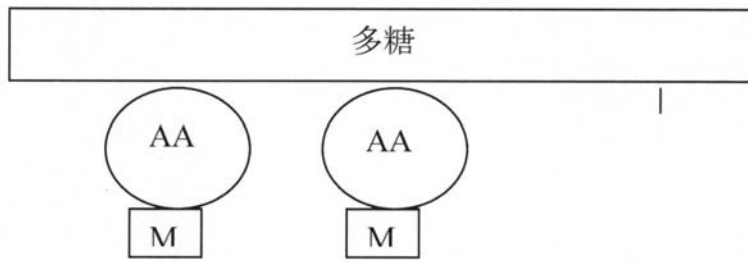
後の細胞周期の分布を示すグラフ。

【図17B】cis-ジアンミンジクロロ白金(II)(CDDP)またはジアミンジカルボン酸白金(PCまたはDDAP)に48時間曝露後の2008.C13細胞におけるp21およびサイクリンAの発現のウェスタンブロット解析を示すグラフ。

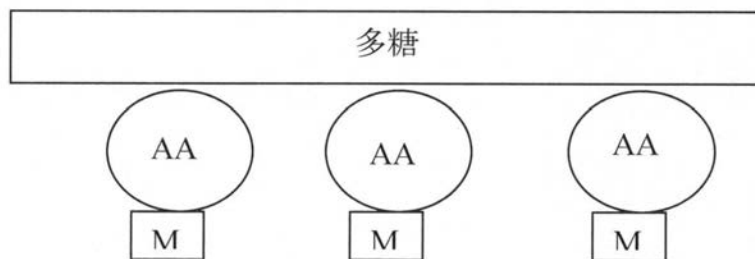
【図1A】



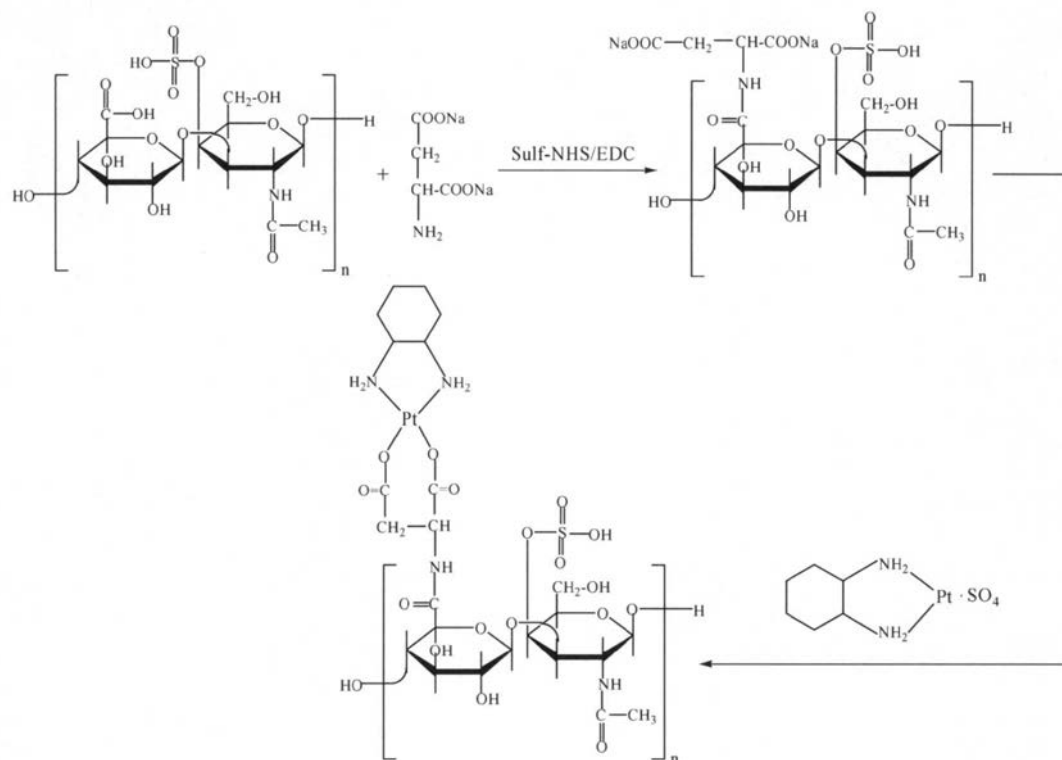
【図 1 B】



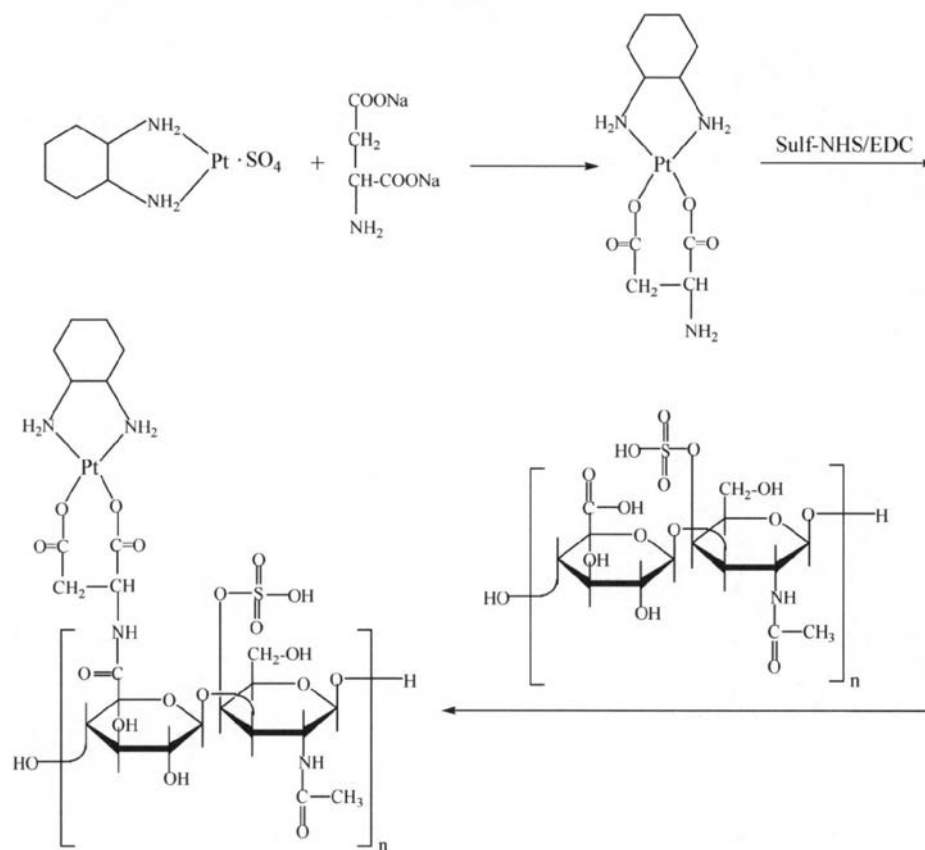
【図 1 C】



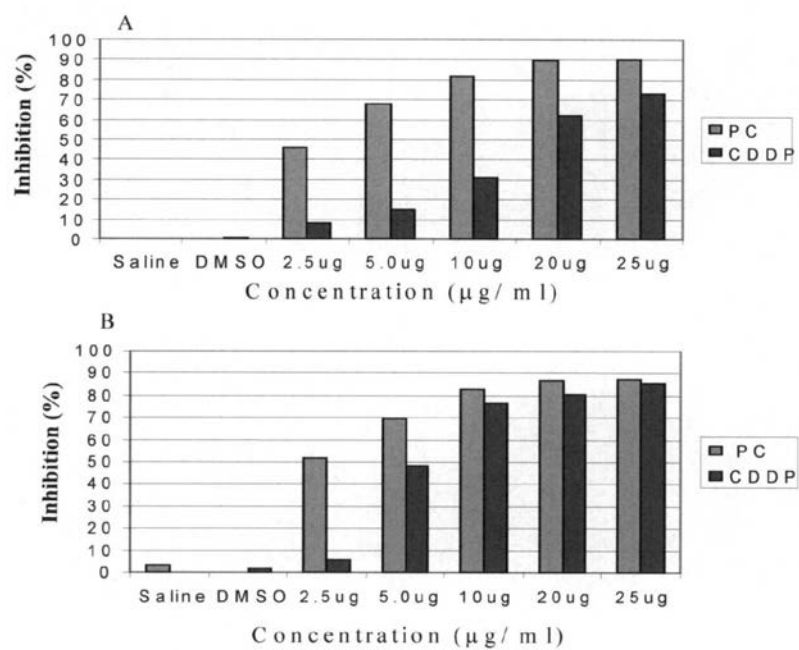
【図 2】



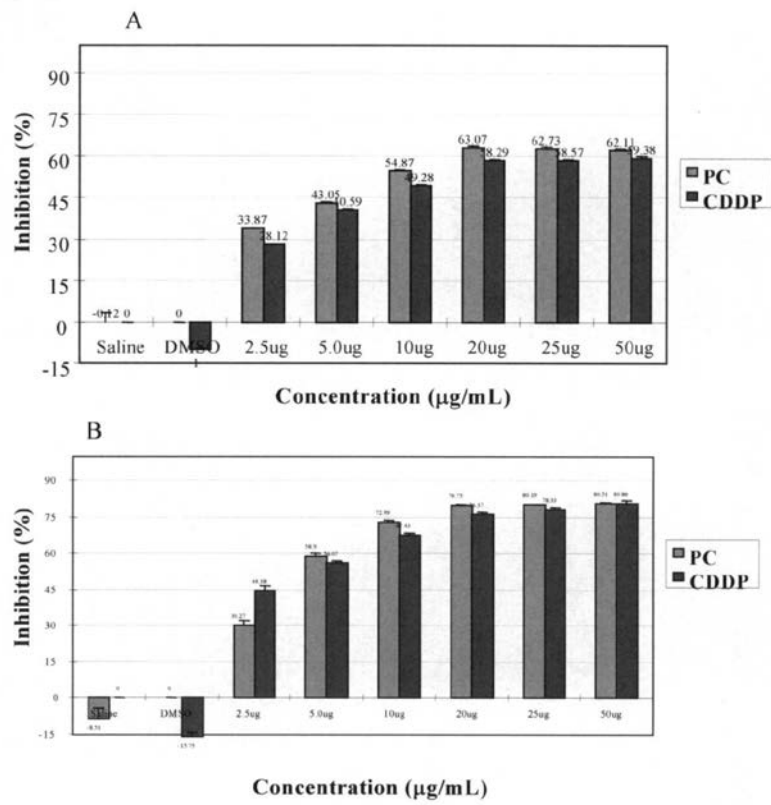
【図 3】



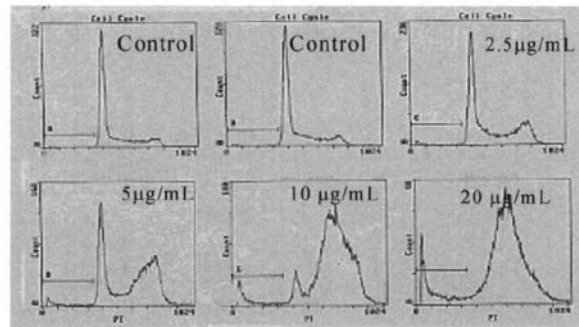
【図 4】



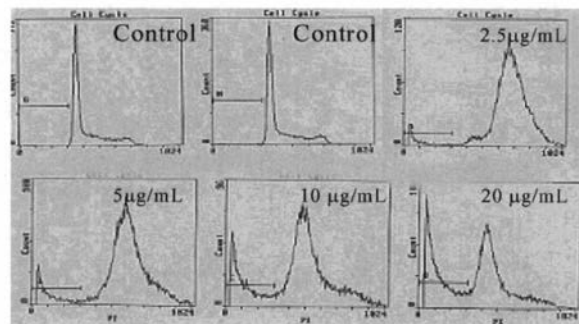
【図 5】



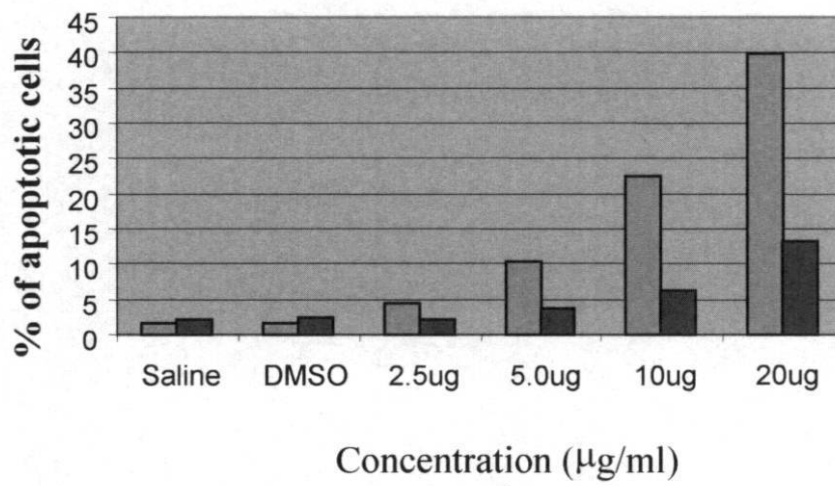
【図 6 A】



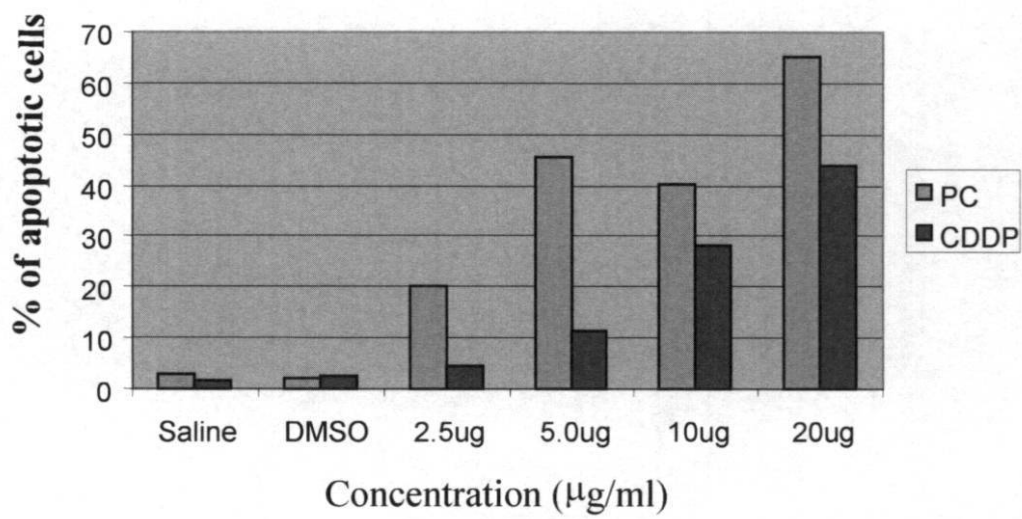
【図 6 B】



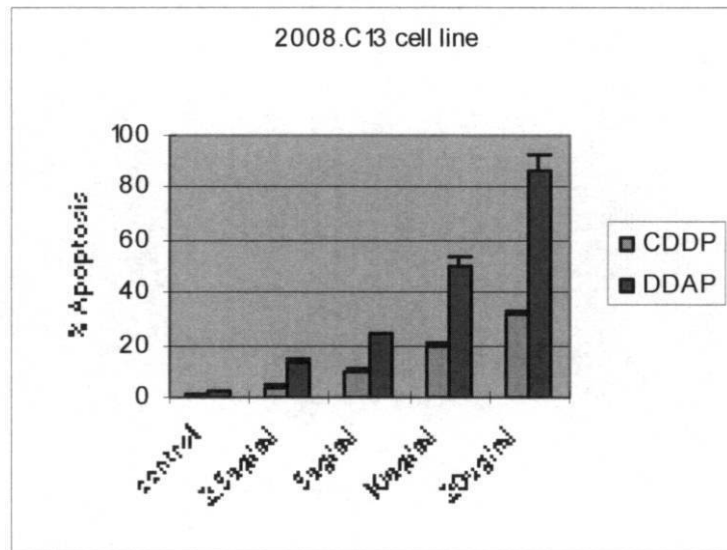
【図 7 A】



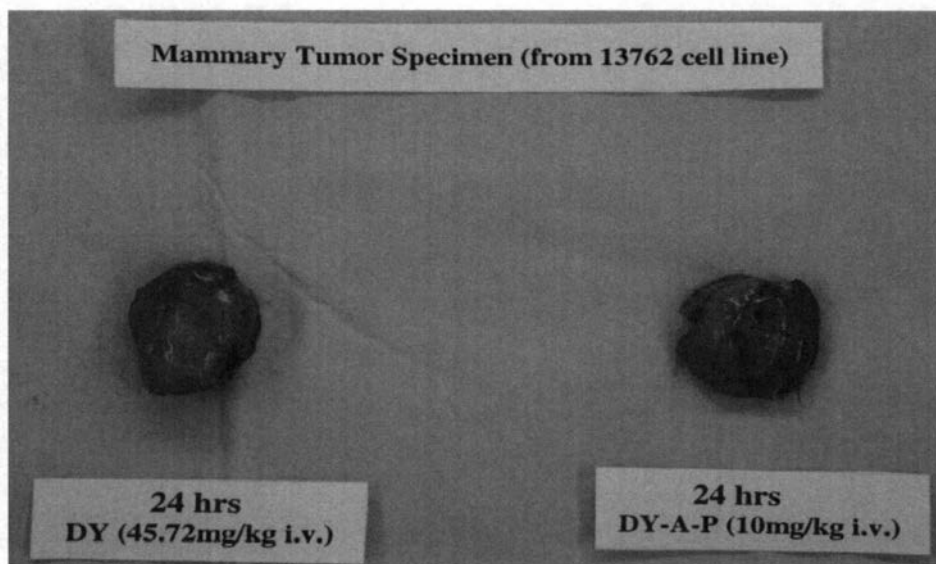
【図 7 B】



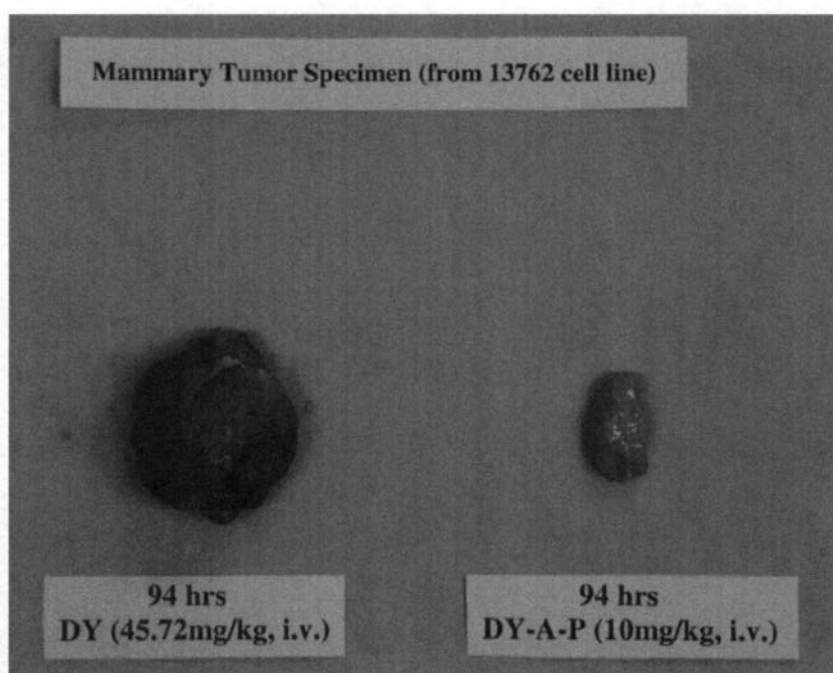
【図 8】



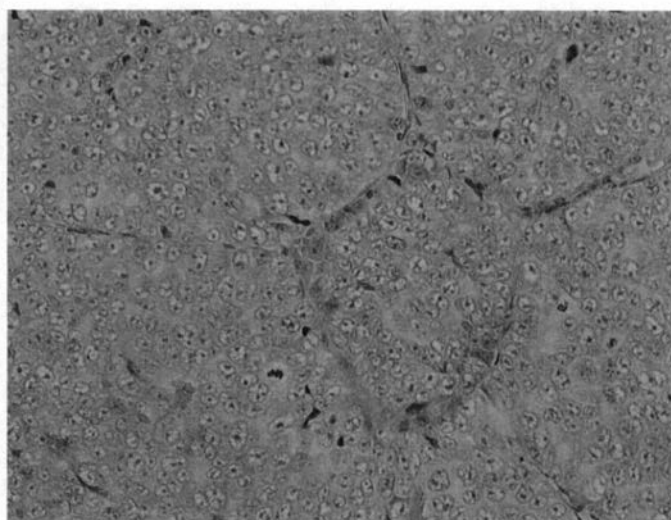
【図 9 A】



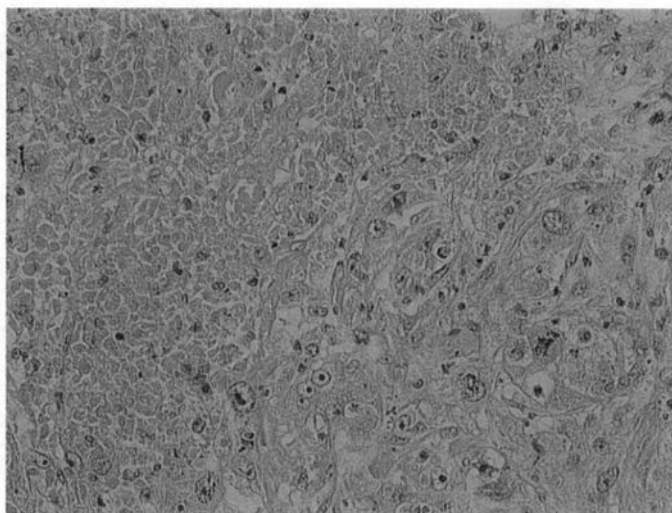
【図 9 B】



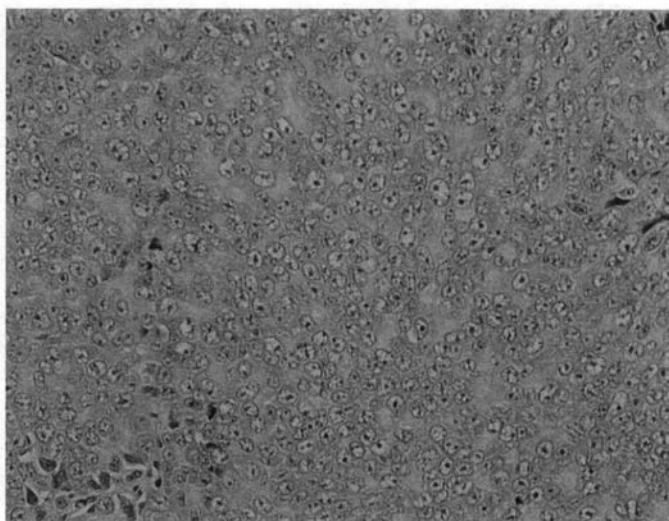
【図 10 A】



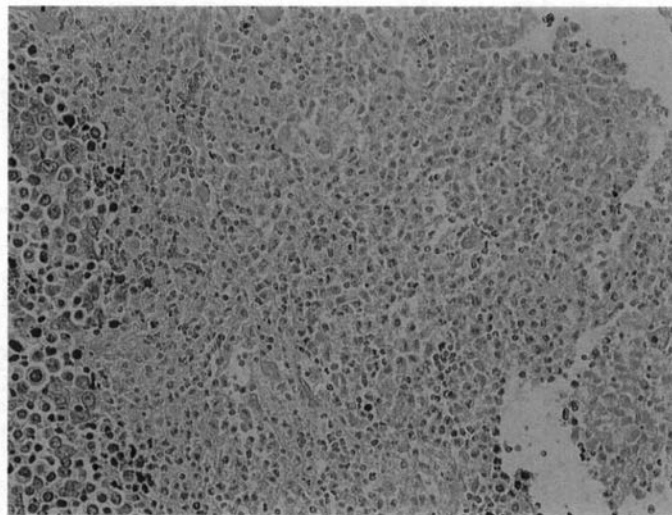
【図 10 B】



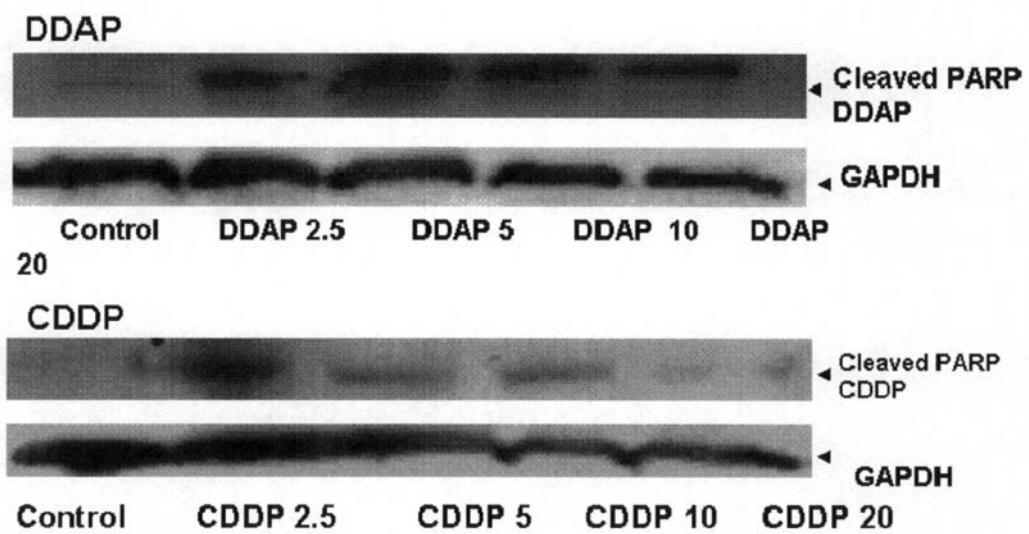
【図 10 C】



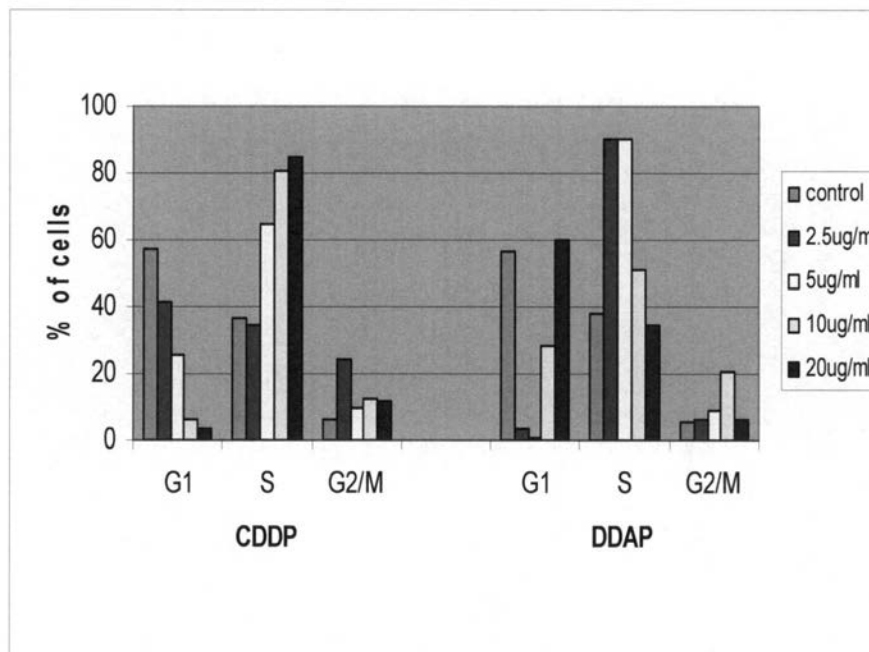
【図 10 D】



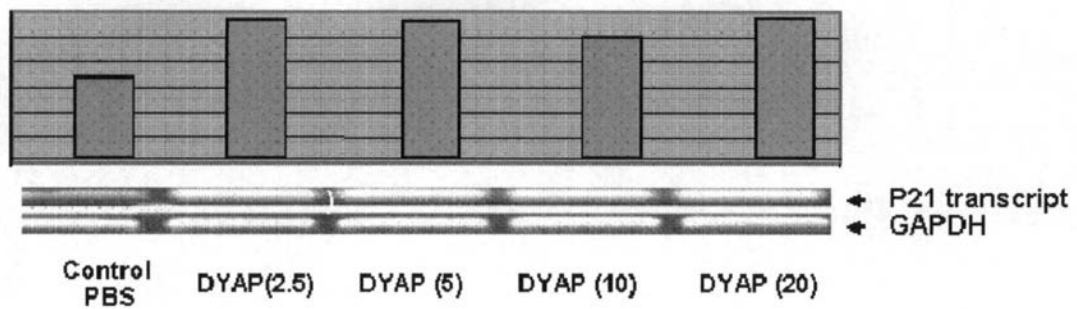
【図 11】



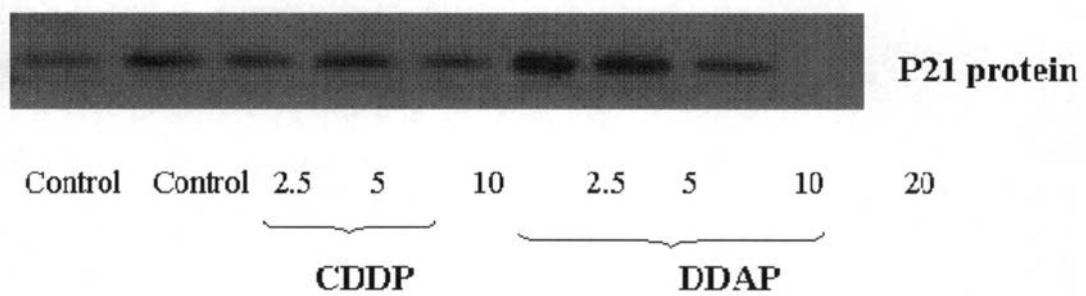
【図 1 2】



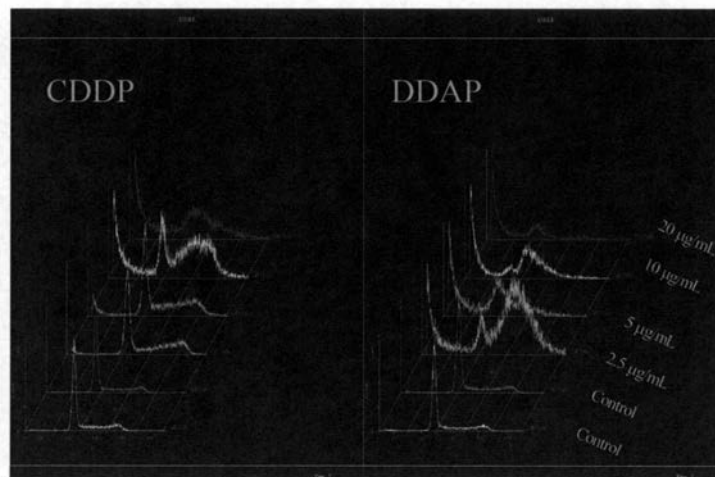
【図 1 3 A】



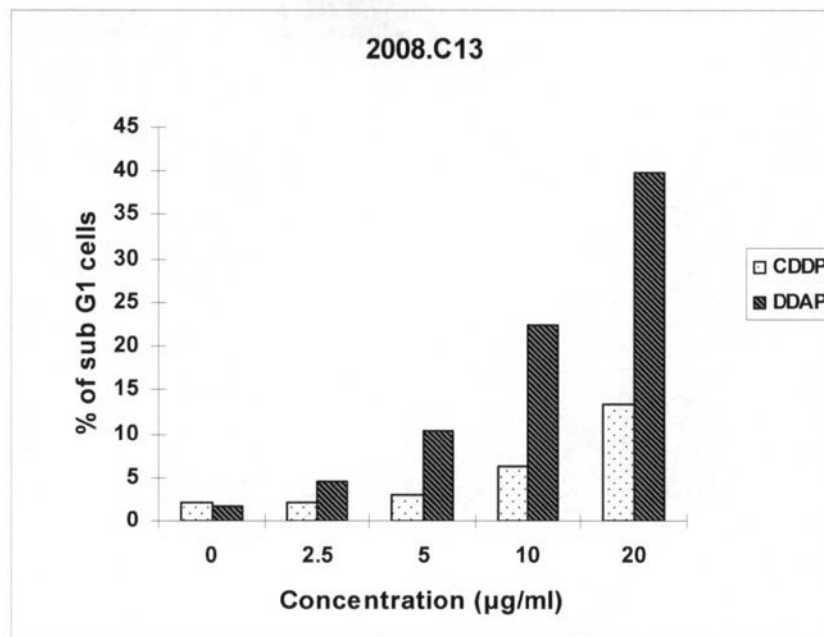
【図 1 3 B】



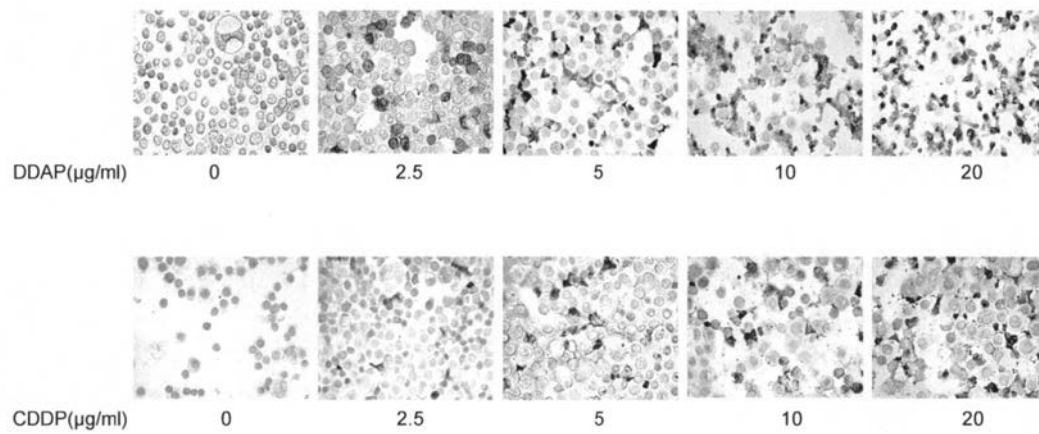
【図 1 4 A】



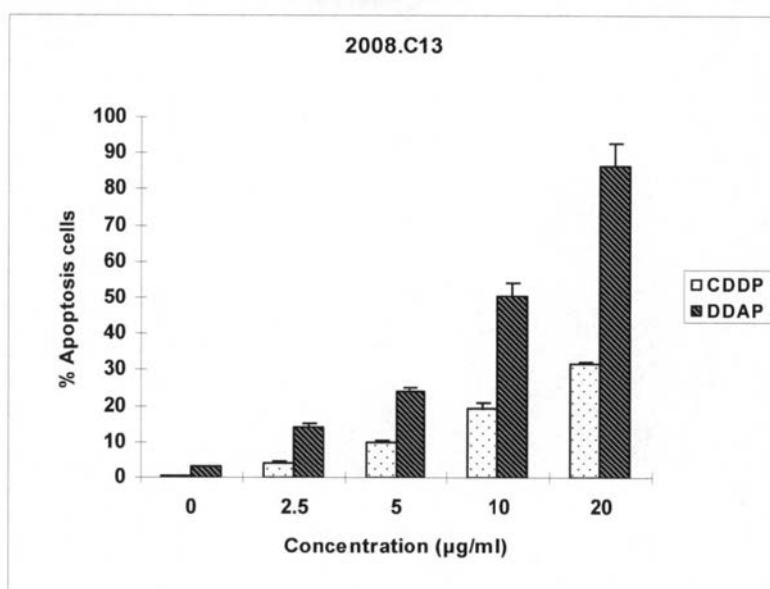
【図 1 4 B】



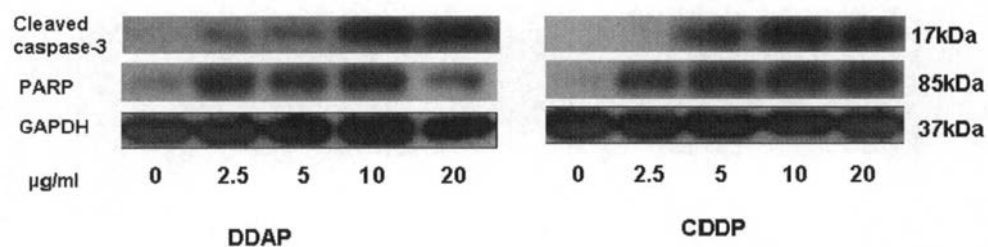
【図 1 5 A】



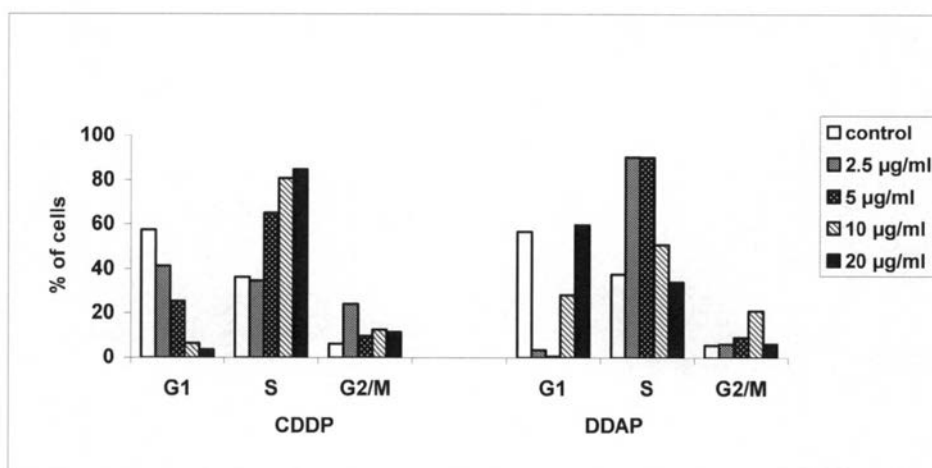
【図 15 B】



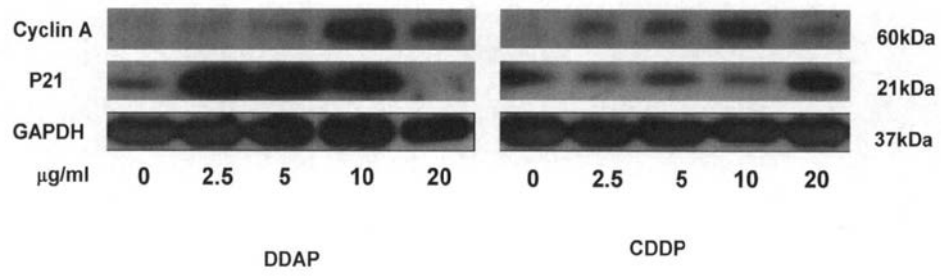
【図 16】



【図 17 A】



【図 17 B】



フロントページの続き

- (72)発明者 ウェイ イーチェン
台湾 831 カオシュン カウンティ ダリアオ タウンシップ ホアトン ロード ナンバー
28
- (72)発明者 ヤン デイビッド ジェイ.
アメリカ合衆国 77478 テキサス州 シュガー ランド スピンネーカー ウェイ 112
3
- (72)発明者 ユー トンファン
アメリカ合衆国 77030 テキサス州 ヒューストン ビーチャースト ドライブ 1500
2

審査官 三木 寛

- (56)参考文献 特開昭63-243011 (JP, A)
特開平01-022812 (JP, A)
特開平01-022809 (JP, A)
特開平02-062812 (JP, A)
特開平02-096509 (JP, A)
特開平05-255045 (JP, A)
特開昭63-284134 (JP, A)
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C08B 37/08
CAplus/REGISTRY (STN)