

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5663741号  
(P5663741)

(45) 発行日 平成27年2月4日 (2015.2.4)

(24) 登録日 平成26年12月19日 (2014.12.19)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C O 8 F 22/32 (2006.01)</b>	C O 8 F 22/32
<b>A 6 1 K 31/198 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/198
<b>A 6 1 K 47/32 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/32
<b>A 6 1 K 9/14 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/14
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00

請求項の数 18 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-502778 (P2011-502778)  
(86) (22) 出願日 平成22年3月3日 (2010.3.3)  
(86) 国際出願番号 PCT/JP2010/053426  
(87) 国際公開番号 W02010/101178  
(87) 国際公開日 平成22年9月10日 (2010.9.10)  
審査請求日 平成25年2月5日 (2013.2.5)  
(31) 優先権主張番号 特願2009-48756 (P2009-48756)  
(32) 優先日 平成21年3月3日 (2009.3.3)  
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 513236194  
株式会社ナノカム  
神奈川県横浜市戸塚区戸塚町4361-1  
O  
(74) 代理人 110001656  
特許業務法人谷川国際特許事務所  
(72) 発明者 城武 昇一  
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1  
公立大学法人横浜市立大学内  
(72) 発明者 吉田 篤司  
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1  
公立大学法人横浜市立大学内  
(72) 発明者 横田 俊平  
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1  
公立大学法人横浜市立大学内  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノ酸抱合シアノアクリレートポリマー粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

平均粒径が1000nm未満である、アミノ酸を抱合したシアノアクリレートポリマー粒子であって、シアノアクリレートモノマー、糖類及び/又はポリソルベート、並びにアミノ酸の共存下、溶媒中で前記モノマーをアニオン重合させることにより製造され、前記溶媒が水である、粒子。

【請求項 2】

前記糖類が、水酸基を有する単糖類及び水酸基を有する多糖類から成る群より選ばれる少なくとも1種の糖類である請求項1記載の粒子。

【請求項 3】

前記糖類がデキストランである請求項1記載の粒子。

【請求項 4】

前記シアノアクリレートがn - ブチルシアノアクリレートである請求項1ないし3のいずれか1項に記載の粒子。

【請求項 5】

平均粒径が20nm ~ 600nmである請求項1ないし4のいずれか1項に記載の粒子。

【請求項 6】

前記アミノ酸が、メチオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、リジン、アラニン、バリン、セリン、システイン、ヒスチジン、ロイシン、スレオニン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群より選択される少なくとも

1 種である、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の粒子。

【請求項 7】

前記アミノ酸が、アラニン、リジン、システイン、アルギニン、グルタミン酸、及びアスパラギン酸から成る群より選択される少なくとも 1 種である、請求項 6 記載の粒子。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の粒子を有効成分として含有するがんの治療及び / 又は予防剤。

【請求項 9】

前記粒子に抱合されるアミノ酸が L-アミノ酸である請求項 8 記載の治療及び / 又は予防剤。

10

【請求項 10】

前記がんがリンパ腫である請求項 8 又は 9 記載の治療及び / 又は予防剤。

【請求項 11】

前記がんが T 細胞リンパ腫である請求項 10 記載の治療及び / 又は予防剤。

【請求項 12】

前記粒子に抱合されるアミノ酸がグリシン、アスパラギン酸及びアルギニンから選択される少なくとも 1 種である請求項 11 記載の治療及び / 又は予防剤。

【請求項 13】

前記がんが B 細胞リンパ腫である請求項 10 記載の治療及び / 又は予防剤。

【請求項 14】

前記粒子に抱合されるアミノ酸がグリシン、メチオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、アラニン、バリン、セリン、システイン、フェニルアラニン、ヒスチジン、ロイシン、スレオニン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン、及びグルタミンから選択される少なくとも 1 種である請求項 13 記載の治療及び / 又は予防剤。

20

【請求項 15】

前記がんが膵臓癌である請求項 8 又は 9 記載の治療及び / 又は予防剤。

【請求項 16】

前記粒子に抱合されるアミノ酸がアスパラギン酸及びグリシンから選択される少なくとも 1 種である請求項 15 記載の治療及び / 又は予防剤。

【請求項 17】

患者のがん病巣から採取されたがん細胞と、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載された粒子とを接触させ、前記がん細胞を障害する活性が高い粒子を前記患者に投与する粒子として選択することを含む、テラーメイド抗がん剤の有効成分の選択方法。

30

【請求項 18】

患者のがん病巣から採取されたがん細胞と、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載された粒子とを接触させ、前記がん細胞を障害する活性が高い粒子を前記患者に投与する粒子として選択し、選択された粒子を含有するがんの治療及び / 又は予防剤を製造することを含む、テラーメイド抗がん剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、アミノ酸を抱合したシアノアクリレートポリマー粒子、及び該粒子を有効成分として含有するがんの治療及び / 又は予防剤に関する。

【背景技術】

【0002】

T 細胞リンパ腫は難病の非ホジキンリンパ腫のひとつである。細胞毒性の強い抗がん剤による骨髄破壊の後に骨髄を移植するという方法以外に有効な治療法は存在しない。従来、抗がん剤は、強い細胞毒性の故に、目的の抗がん効果と共に正常細胞への毒性が強く生じる。従って、骨髄破壊後の移植ステップにおいて患者の正常細胞が既にダメージを受けていることが主因となり、その予後もしばしば不良である。また、ドナーの条件も厳しく

50

、ドナーを見出すことも容易ではない。

【 0 0 0 3 】

膵臓癌は最も生存率の低いがんのひとつである。膵臓癌には特有の初期症状がないため早期発見が非常に困難であり、かなり進行してから発見される場合が多い。有効な治療法が現在でも知られておらず、非常に予後不良である。

【 0 0 0 4 】

一方、薬物のデリバリーシステム（DDS）や徐放化による薬物の効果向上を目的に、薬剤の微粒化の研究が進んでおり、例えばシアノアクリレートポリマー粒子に薬剤を抱合させたDDSが公知である（特許文献1～5及び非特許文献1）。本願発明者らも、現在までに、粒径のばらつきが少ないシアノアクリレートポリマー粒子の製造方法、抗菌剤抱合粒子、及びプラスミド抱合粒子を開示している（特許文献3～5）。しかしながら、現在までのいずれの研究においても、薬物のDDSと徐放化が目的であり、アミノ酸のようにそれ自体が特別な薬理作用を有するわけではない物質を抱合させたシアノアクリレートポリマー粒子は知られていない。そのような抱合粒子を用いた医薬も全く知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 5 】

【特許文献1】特表平11-503148号公報

【特許文献2】特表2002-504526号公報

【特許文献3】特開2008-127538号公報

【特許文献4】国際公開第2008/126846号公報

【特許文献5】特開2008-208070号公報

【非特許文献】

【 0 0 0 6 】

【非特許文献1】Christine Vauthier et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 519-548 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

従って、本発明の目的は、がんの治療に有用な新規な手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、シアノアクリレートモノマーをアミノ酸の共存下でアニオン重合させることにより、アミノ酸を抱合したナノサイズ（平均粒径1000nm未満）のシアノアクリレートポリマー粒子を合成した。そして、該抱合粒子ががん細胞由来の各種細胞株に対しアポトーシス様の細胞死を誘導して該細胞を障害できること、抱合させるアミノ酸の種類を選択することで各種のがんに対応でき、とりわけリンパ腫由来の細胞株に対して高い親和性を発揮できること、さらに、一部の膵臓癌由来細胞株に対して増殖抑制作用があり、有効な治療法が存在しない膵臓癌の治療にも有用であり得ることを見出し、本願発明を完成した。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、平均粒径が1000nm未満である、アミノ酸を抱合したシアノアクリレートポリマー粒子であって、シアノアクリレートモノマー、糖類及び/又はポリソルベート、並びにアミノ酸の共存下、溶媒中で前記モノマーをアニオン重合させることにより製造され、前記溶媒が水である、粒子を提供する。また、本発明は、上記本発明の粒子を有効成分として含有するがんの治療及び/又は予防剤を提供する。さらに、本発明は、患者のがん病巣から採取されたがん細胞と、請求項1ないし7のいずれか1項に記載された粒子とを接触させ、前記がん細胞を障害する活性が高い粒子を前記患者に投与する粒子として選択することを含む、テーラーメイド抗がん剤の有効成分の選択方法を提供する。さ

らに、本発明は、患者のがん病巣から採取されたがん細胞と、請求項１ないし７のいずれか１項に記載された粒子とを接触させ、前記がん細胞を障害する活性が高い粒子を前記患者に投与する粒子として選択し、選択された粒子を含有するがんの治療及び／又は予防剤を製造することを含む、テラーメイド抗がん剤の製造方法を提供する。

【発明の効果】

【００１０】

本発明により、アミノ酸を抱合したナノサイズのシアノアクリレートポリマー粒子が初めて提供された。該アミノ酸抱合粒子は、がん細胞に対してアポトーシス様の細胞死を誘導してがん細胞を障害できるため、がんの治療と予防に有用である。抱合させるアミノ酸の種類を選択することで、各種のがん、例えば上皮系・血液系由来のがん細胞株に対して10  
も親和性を選択できるため、上皮系・血液系由来のがんなど種々のがんの治療・予防に有用である。特に、該抱合粒子は、がん細胞の中でもT細胞リンパ腫やB細胞リンパ腫由来の細胞株に対して親和性が高く、従ってリンパ腫の治療にとりわけ有用である。また、一部の膵臓癌由来細胞株の増殖を抑制する作用もあり、有効な治療法が存在しない膵臓癌に対しても治療効果が期待される。実際のがん治療に用いる場合、例えば患者自身のがん細胞に対してin vitroで事前に効果を確認し、抗がん活性が高いアミノ酸抱合粒子を選択して患者に投与すれば、より効果的にがんを治療・予防することができる。すなわち、本発明の治療及び／又は予防剤はテラーメイド抗がん剤として利用可能である。本発明のアミノ酸抱合粒子は生体に適合性のある材料で作製できるので、人体に対する安全性も高く、既存の抗がん剤と比較して臨床応用上非常に有利である。本発明によれば、細胞毒性の20  
強い抗がん剤やDDSという手段を使用することなくがんを治療できるので、患者のQOLの向上にも貢献できる。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】Lys抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図２】Arg抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図３】His抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図４】Asp抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図５】Gly抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図６】Ala抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図７】Val抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図８】Leu抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図９】Try抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図１０】Phe抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図１１】Ser抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図１２】Thr抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図１３】Met抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図１４】アミノ酸非抱合粒子で処理した各種細胞株の生存率を示す図である。

【図１５】Arg抱合粒子で処理したEL-4細胞株についてのAnnexin Vアッセイの結果を示す図である。

【図１６】ヒトB細胞リンパ腫由来細胞株YCUB-2に対する各種アミノ酸抱合粒子の増殖抑制効果を示す図である。

【図１７】ヒトB細胞リンパ腫由来細胞株YCUB-2を各濃度のアミノ酸（Arg, Asp）抱合粒子で48時間処理した後の細胞の生存率を示す図である。

【図１８】ヒトT細胞リンパ腫由来細胞株H9を各濃度のアミノ酸（Arg, Asp）抱合粒子で24時間処理した後の細胞の生存率を示す図である。

【図１９】既存の抗がん剤マイトマイシンC（MMC）及びアクチノマイシンD（Act-D）とアミノ酸抱合粒子との間でH9細胞株に対する細胞増殖抑制効果を比較したグラフである。

【図２０】ヒトT細胞リンパ腫由来細胞株H9を各濃度のAsp抱合粒子で1、3、6、24時間処理した場合の細胞の生存率を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 2 1】ヒトT細胞リンパ腫由来細胞株H9を各濃度のArg抱合粒子で1、3、6、24時間処理した場合の細胞の生存率を示す図である。

【図 2 2】ヒトT細胞リンパ腫由来細胞株H9を各種濃度の抗がん剤マイトマイシンC (MMC) 又はアクチノマイシンD (ACD) で24時間処理した後の細胞の生存率を示す図である。

【図 2 3】3種のアミノ酸抱合粒子(塩基性アミノ酸D70Arg-NP、酸性アミノ酸D70Asp-NP、中性アミノ酸D70Gly-NP)又はアミノ酸非抱合粒子(D70-NP)でH9細胞株を処理した場合の細胞増殖抑制率を示す図である。

【図 2 4】各種ヒト臓器癌由来細胞株を用いてアミノ酸抱合粒子(D70Asp-NP、D70Arg-NP、D70Gly-NP)の増殖抑制効果を調べた結果を示す図である。D70-NPはアミノ酸非抱合粒子。

10

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の粒子は、アミノ酸を抱合したシアノアクリレートポリマーから成る粒子であり、その粒子サイズは平均粒径1000nm未満である。なお、粒子サイズの下限は特に限定されないが、後述する方法でアクリレートモノマーの重合によりポリマー粒子を製造する場合には、粒子の粒径は通常7nm程度以上となる。平均粒径は、好ましくは20nm～600nm、より好ましくは50nm～550nmである。また、抱合粒子の電荷(ゼータ電位)は、特に限定されないが、通常-40mV～0mV程度である。なお、ゼータ電位とは、粒子表面の電荷を示すもので、粒子の分散性の指標となる。粒子サイズとゼータ電位は、例えばHe・Neレーザーを用いた市販の装置(例えばMalvern Inst.UK社製のゼータサイザー等)を用いて容易に測定

20

【0013】

アミノ酸の種類は特に限定されないが、通常、天然のタンパク質を構成する20種のアミノ酸のいずれかである。後述するように、本発明の粒子が抱合するアミノ酸の種類は該粒子の抗がん活性に影響する。抱合するアミノ酸は1種類でもよく、また2種類以上を抱合してもよい。

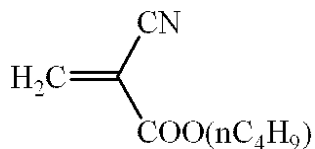
【0014】

上記アミノ酸抱合粒子のシアノアクリレートポリマー部分は、シアノアクリレートモノマーをアニオン重合して得られる。用いられるシアノアクリレートモノマーは、アルキルシアノアクリレートモノマー(アルキル基の炭素数は好ましくは1～8)が好ましく、特に、外科領域において傷口の縫合のための接着剤として用いられている、下記式で表されるn-ブチル-2-シアノアクリレート(nBCA)が好ましい。

30

【0015】

【化1】



【0016】

前記アニオン重合では、重合開始及び重合安定化のために糖類及び/又はポリソルベートを用いる。従って、本発明でいう「シアノアクリレートポリマー」には、糖類やポリソルベートのような重合開始及び安定剤を含有するものも包含される。シアノアクリレートポリマー粒子の重合反応において、ポリソルベートを重合開始・安定化剤として使用可能であることは、特許文献4に記載されるように公知である。

40

【0017】

糖類は特に限定されず、水酸基を有する単糖類、水酸基を有する二糖類及び水酸基を有する多糖類のいずれであってもよい。単糖類としては、例えばグルコース、マンノース、リボース及びフルクトース等が挙げられる。二糖類としては、例えばマルトース、トレハロース、ラクトース及びスクロース等が挙げられる。多糖類としては、公知のシアノアクリレートポリマー粒子の重合に用いられているデキストランやマンナン(特許文献5参照

50

）等を用いることができる。これらの糖は、環状、鎖状のいずれの形態であってもよく、また、環状の場合、ピラノース型やフラノース型等のいずれであってもよい。また、糖には種々の異性体が存在するがそれらのいずれでもよい。通常、単糖は、ピラノース型又はフラノース型の形態で存在し、二糖は、それらが結合又は結合したものであり、このような通常の形態にある糖をそのまま用いることができる。

#### 【0018】

ポリソルベートとしては、特に限定されず、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（商品名 Tween 20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（商品名 Tween 80）等の公知のTween系界面活性剤のいずれであってもよい。

#### 【0019】

単糖類、二糖類及び多糖類並びにポリソルベートは、単独で用いることもできるし、2種以上を組み合わせ用いることもできる。上記した糖類及びポリソルベートのうち、グルコース、デキストラン、Tween 20（商品名）が好ましく、特にデキストランが好ましい。デキストランとしては、平均分子量7万程度以上の重合度であるデキストランが好ましい。デキストランの分子量の上限は特にないが、通常、分子量50万程度以下である。

#### 【0020】

ポリマー粒子にアミノ酸を抱合させる方法としては、先にポリマー粒子を合成した後に該粒子をアミノ酸溶液中に浸漬する方法や、モノマーのアニオン重合の際にアミノ酸を共存させる方法が挙げられるが、後者の方がアミノ酸を効率良く抱合させることができるので好ましい。アニオン重合の際に2種類以上のアミノ酸を共存させれば、2種類以上のアミノ酸を抱合した粒子を製造することができる。

#### 【0021】

重合反応の溶媒としては、通常、水が用いられる。アニオン重合は水酸イオンにより開始されるので、反応液のpHは重合速度に影響する。反応液のpHが高い場合には、水酸イオンの濃度が高くなるので重合が速く、pHが低い場合には重合が遅くなる。アミノ酸抱合粒子を製造する場合には、通常、pHが1.5～3.0程度の酸性下で適度な重合速度が得られる。反応液を酸性にするために添加する酸としては、特に限定されないが、反応に悪影響を与えず、反応後に揮散する塩酸を好ましく用いることができる。塩酸の濃度は、特に限定されないが、0.0005N～0.5N程度であればよい。例えば、塩基性アミノ酸を抱合させる場合には0.05N程度とし、中性又は酸性アミノ酸を抱合させる場合には0.01N程度とする、というように、アミノ酸の性質に応じて塩酸濃度を適宜選択することができる。

#### 【0022】

重合反応は、例えば、溶媒中に抱合させるべきアミノ酸並びに上記重合開始・安定剤（すなわち糖類及び／又はポリソルベート）を溶解させた後、攪拌下にてシアノアクリレートモノマーを加え、好ましくは攪拌を続けることにより行なうことができる。反応温度は、特に限定されないが、室温で行なうことが簡便で好ましい。反応時間は、反応液のpH、溶媒の種類及び重合開始・安定剤の濃度に応じて反応速度が異なるため、これらの要素に応じて適宜選択される。特に限定されないが、通常、反応時間は10分～4時間程度、好ましくは30分～3時間程度である。得られたアミノ酸抱合粒子は、通常、中性の粒子として用いられるので、反応終了後、水酸化ナトリウム水溶液等の塩基を反応液に添加して中和することが好ましい。

#### 【0023】

反応開始時の重合反応液中のシアノアクリレートモノマーの濃度は、特に限定されないが、通常、0.5v/v%～2.0v/v%程度、好ましくは0.8v/v%～1.2v/v%程度である。反応開始時の重合反応液中のアミノ酸の濃度は、特に限定されないが、通常0.02w/v%～2w/v%程度である。重合反応に糖類及び／又はポリソルベートを用いる場合、反応開始時の重合反応液中の糖類及び／又はポリソルベートの濃度（複数種類用いる場合はその合計濃度）は、特に限定されないが、通常、0.5%～10%程度、好ましくは0.75%～7.5%程度である。なお、糖類の濃度はw/v%、ポリソルベートの濃度はv/v%を意味し、例えば糖類を単独で用いる場合には、上記した濃度範囲はそれぞれ「0.5w/v%～10w/v%」、「0.75w/v%～

10

20

30

40

50

7.5w/v%」を意味する。また、糖類を5w/v%、ポリソルベートを1v/v%で併せて用いる場合には、これらの合計濃度を6%というものとする。ただし、単糖類（例えばグルコース）のみを用いる場合には、2.5w/v%～10w/v%程度で用いることが好ましい。

【0024】

上記の重合反応によれば、平均粒径が1000nm未満であるナノサイズのアミノ酸抱合粒子を容易に製造することができる。粒子のサイズは、反応液中のシアノアクリレートモノマーの濃度やpH、反応時間を調節することによって調節することができる。また、重合開始・安定剤として糖類及び／又はポリソルベートを用いる場合には、該重合開始・安定剤の濃度や種類を変えることによって、粒子サイズを調節することができる（特許文献3、4等参照）。一般に、反応液のpHを高めた場合、反応時間を長くした場合、及び反応液の糖濃度を低くした場合には粒子サイズが大きくなり、重合開始・安定剤としてポリソルベートを用いた場合には粒子サイズが小さくなる。これらの反応条件を適宜組み合わせることで、所望のサイズの粒子を製造することができる。例えば、下記実施例に記載されるように、多糖類を1w/v%程度、シアノアクリレートモノマーを1v/v%程度で使用し、pH2程度の条件下で2時間程度重合反応を行なうと、平均粒径が120nm～500nm程度のサイズの粒子を得ることができる。なお、上記方法により得られる粒子のアミノ酸抱合率は、通常、6%～60%程度である。

【0025】

上記したアミノ酸抱合粒子は、下記実施例に示される通り、各種がん細胞（子宮頸癌、T細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫、単球性白血病、腎癌、膵臓癌など）に対して細胞障害活性を示す。一方で、健常マウスに投与した場合には、マウスに異常は無く、正常細胞に対する細胞毒性は認められない。従って、生体に投与すれば、生体内に存在するがん細胞に対して特異的に障害活性を発揮し得るため、該抱合粒子はがんの治療及び／又は予防剤として有用である。

【0026】

本発明の治療及び／又は予防剤の対象となるがんは特に限定されず、子宮癌（子宮頸癌等）、リンパ腫（T細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫等の非ホジキンリンパ腫等）、白血病（単球性白血病等）、腎癌、膵臓癌等の各種がんに対して適用可能である。抗がん効果が最も高いアミノ酸抱合粒子の種類は、がんの種類に応じて異なっており、また同一の種類のがんであっても患者ごとに異なり得るので、抱合させるアミノ酸の種類を適宜選択することで各種のがんに対応できる。アミノ酸非抱合の粒子でも処理濃度が高ければがん細胞の増殖を抑制できるが、アミノ酸の抱合によって粒子の抗がん活性が顕著に高まる。とりわけ、リンパ腫由来細胞に対しては、アミノ酸抱合による細胞障害活性の上昇が顕著であるため（下記実施例参照）、本発明の治療及び／又は予防剤はリンパ腫に対して特に効果が高い。

【0027】

アミノ酸抱合粒子の抗がん活性が抱合アミノ酸の種類に影響されることは、下記実施例に具体的に示されている。

【0028】

例えば、ヒトのB細胞リンパ腫細胞に対しては、20種のアミノ酸のほとんどのアミノ酸で強い増殖抑制効果が認められる。具体的には、アルギニンでは10 $\mu$ g/mlまでの濃度範囲では抗がん活性が認められないが、グリシン、メチオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、アラニン、バリン、セリン、システイン、フェニルアラニン、ヒスチジン、ロイシン、スレオニン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン、又はグルタミンを抱合した粒子ではがん細胞の増殖抑制が認められ、中でもグリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸又はヒスチジン抱合粒子の抗がん活性が顕著である。

【0029】

ヒトのT細胞リンパ腫細胞に対しては、例えばアルギニン抱合粒子及びアスパラギン酸抱合粒子は、マイトマイシンCやアクチノマイシンDなどの既存の抗がん剤と比較して同等又はそれ以上の増殖抑制効果がある。特に、中性アミノ酸（グリシン、アラニン、バリ

10

20

30

40

50

ン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、プロリン)を抱合した粒子で増殖抑制効果が高く、例えばグリシン抱合粒子の抗がん活性が顕著に高い。

#### 【0030】

ヒトの膵臓癌細胞に対しては、非抱合粒子でも若干の増殖抑制効果があり、アミノ酸抱合により一部の細胞株に対して増殖抑制効果が高まることから、アミノ酸抱合粒子は一部の膵臓癌に対して有効な治療手段となり得る。具体的には、ヒト膵臓癌細胞株MIA-PaCa2に対してはアスパラギン酸抱合粒子が非抱合粒子よりも増殖抑制効果が高く、また、AsPC-1に対してはグリシン抱合粒子及びアスパラギン酸抱合粒子が非抱合粒子よりも増殖抑制効果が高い。これらの膵臓癌細胞株と同様の特徴(例えば特定の化学物質に対する応答性や特定の遺伝子の発現パターンなど)を有する膵臓癌に対して、上記と同様のアミノ酸抱合粒子が有効であり得る。

10

#### 【0031】

下記実施例にあるこれらのデータは、ある特定の種類のがんに対しては特定のアミノ酸抱合粒子が治療手段として確立され得ることのみならず、がんの種類及び患者個々人のがんの性質に合わせて、抱合させるアミノ酸の種類を適宜選択することにより、がんをより効果的に治療できることを示している。例えば、ヒトのB細胞リンパ腫に対しては、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸又はヒスチジンを抱合した粒子が一般的に使用可能な治療及び/又は予防剤として確立し得る。患者ごとにアミノ酸抱合粒子の種類を選択する場合には、例えば、患者のがん病巣から採取したがん細胞を用いて各種アミノ酸抱合粒子の抗がん活性(がん細胞を障害する活性など)を評価し、いずれのアミノ酸抱合粒子が効果が抗がん活性が高いかを調べる。既存の抗がん剤又はアミノ酸を抱合しないコントロールのポリマー粒子と比較して有意に抗がん活性が高いアミノ酸抱合粒子が見出された場合、該アミノ酸抱合粒子をその患者に投与する粒子として選択できる。なお、がんの治療又は予防剤として用いる場合にも、抱合させるアミノ酸の種類は1種類でも2種類以上でもよい。また、異なるアミノ酸を抱合する粒子を混合して使用することもできる。従って、*in vitro*試験で効果の高いアミノ酸抱合粒子が複数種類見出されれば、それらすべてを同一の又は異なる粒子に抱合させて患者に投与してよい。最も効果が高いと考えられるアミノ酸抱合粒子を選択して投与すれば、患者ごとに治療法を最適化したテーラーメイド治療が可能になる。細胞試料の抗がん活性の評価方法としては各種方法が公知であり、いずれの方法を採用してもよい。例えば、実施例に記載のMTT assay等を採用することができる。

20

30

#### 【0032】

がんの治療及び/又は予防剤の対象となる動物は、特に限定されないが、好ましくは哺乳動物であり、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、サル、マウス、ウマ、ヒツジ、ウシ等が挙げられる。投与対象となるこれらの動物は、通常、がんの治療及び/又は予防を必要とする動物である。例えば、がんと診断された個体はがんの治療が必要な動物であり、これに対してはがんの治療目的で本発明の粒子を投与できる。また、がんの遺伝的要因を有しておりがん発症リスクが高いと考えられる個体や、あるいはがんが一旦治療された個体においては、がんの発症又は再発を防止することが強く望まれるため、そのような動物に対してはがんの予防目的で本発明の粒子を投与できる。

40

#### 【0033】

本発明のがんの治療又は予防剤は、上記アミノ酸抱合粒子を有効成分として含むものであるが、該抱合粒子のみからなるものであってもよいし、賦形剤や希釈剤等の公知の担体をさらに含有させて投与形態に適した剤形に調製することもできる。

#### 【0034】

治療又は予防剤の投与方法としては、皮下、筋肉内、腹腔内、動脈内、静脈内、直腸内等への非経口投与の他、経口投与が挙げられる。全身投与の他、腫瘍及びその近傍に局部投与することもできる。具体的には、例えば、生理緩衝食塩水にアミノ酸抱合粒子を懸濁し、注射等により非経口投与することができ、また、カプセル剤やシロップ剤などとして

50



経口投与することができるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 3 5 】

投与量は、腫瘍の大きさや症状等に応じて適宜選択され、特に限定されないが、成人に対し 1 回当たり粒子の量として通常 10mg ~ 200g 程度、特に 100mg ~ 50g 程度とすればよい。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 3 6 】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【 0 0 3 7 】

#### 1 . アミノ酸抱合ナノ粒子の製造

塩基性アミノ酸 (Lys, His, Arg)、酸性アミノ酸 (Asp) 及び中性アミノ酸 (Gly, Ala, Val, Leu, Try, Phe, Ser, Thr, Met) を用いて、各アミノ酸を抱合するシアノアクリレートポリマー粒子を製造した。重合開始・安定化剤としてデキストラン 70K を用いた。

#### 【 0 0 3 8 】

塩酸 (pH2) 10mL にアミノ酸 20 mg 及びデキストラン 70K 100 mg を溶解した。塩酸は、塩基性アミノ酸に対しては 0.05N 又はその塩酸塩を用いた場合は 0.01N、酸性及び中性アミノ酸に対しては 0.01N のものを用いた。溶液を攪拌下、100  $\mu$  L の nBCA を加え、120 分間攪拌して重合反応させた。NaOH 水溶液を滴下して反応溶液を中和後 (pH7.8)、さらに 30 分間攪拌した。Centriprep (YM-10) フィルター (MILLIPORE 社) を用いて反応溶液を 3500rpm/15min 遠心濾過した。フィルターを通過しなかった液に蒸留水を加えて再度遠心濾過することにより、重合粒子を洗浄した。この遠心洗浄操作を合計 5 回行ない、各種アミノ酸を抱合する粒子を得た。得られた粒子の平均粒径及びゼータ電位を市販のゼータサイザー (Malvern Inst. UK 社製) により測定した。測定結果を下記表 1 に示す。

#### 【 0 0 3 9 】

#### 【 表 1 】

	平均粒径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
塩基性アミノ酸ナノ粒子		
(1) 0.05N D70-Lys-NP	264 $\pm$ 45	-12.1
(2) 0.01N D70-His-NP	259 $\pm$ 48	-23.7
(3) 0.01N D70-Arg-NP	494 $\pm$ 90	-1.07
酸性アミノ酸ナノ粒子		
(4) 0.01N D70-Asp-NP	136 $\pm$ 24	-18.8
中性アミノ酸ナノ粒子		
(5) 0.01N D70-Gly-NP	159 $\pm$ 25	-26.4
(6) 0.01N D70-Ala-NP	193 $\pm$ 35	-9.82
(7) 0.01N D70-Val-NP	178 $\pm$ 28	-20.9
(8) 0.01N D70-Leu-NP	173 $\pm$ 31	-22.6
(9) 0.01N D70-Try-NP	182 $\pm$ 30	-21.6
(10) 0.01N D70-Phe-NP	145 $\pm$ 20	-22.9
(11) 0.01N D70-Ser-NP	184 $\pm$ 29	-16.6
(12) 0.01N D70-Thr-NP	171 $\pm$ 30	-21.6
(13) 0.01N D70-Met-NP	185 $\pm$ 27	-20.4
コントロール (アミノ酸非抱合ナノ粒子)		
(14) 0.01N D70-NP	222 $\pm$ 33	-19.7

平均粒径の数値は「平均値  $\pm$  標準偏差」を示す。

#### 【 0 0 4 0 】

#### 2 . アミノ酸抱合ナノ粒子の抗がん活性 (その 1)

上記で製造したアミノ酸抱合粒子で各種細胞株を処理し、MTT法による細胞増殖アッセイを行なうことにより、各種アミノ酸抱合粒子の細胞障害活性を評価した。アッセイにはMTTアッセイキット（ロシュ）を用いた。細胞株としては、RAW267.4（マウス単球性白血病由来細胞株）、HeLa（ヒト子宮頸癌由来細胞株）、HEK293.T（ヒト胎児腎癌由来細胞株）及びEL-4（マウスT細胞リンパ腫由来細胞株）を用いた。

#### 【0041】

EL-4はRPMI-1640培地で $1 \times 10^5$  cell/mLに調整し10mL作成した。RAW267.4、HeLa及びHEK293.TはDMEMで $1 \times 10^5$  cell/mLに調整し10mL作成した。96穴細胞培養プレート（CELLSTAR（登録商標））のウェルに細胞懸濁液を100  $\mu$ Lずつ滴下し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで37、24時間培養した。次いで、蒸留水で濃度を調整したナノ粒子を各ウェルに10  $\mu$ Lずつ滴下し（ナノ粒子終濃度：0, 0.00008, 0.00016, 0.00031, 0.00063, 0.00125, 0.00250, 0.00500, 0.01000w/v%）、さらにCO<sub>2</sub>インキュベーターで24時間培養した。10  $\mu$ LのMTT labeling reagentを各ウェルに加え（MTT最終濃度：0.5mg/mL/well）、CO<sub>2</sub>インキュベーターで4時間培養した。100  $\mu$ LのSolubilization solutionを各wellに加え、CO<sub>2</sub>インキュベーターで一夜培養した後、吸光度を550nmで測定した。基準波長は700nmとした。結果を図1～14に示す。

#### 【0042】

アミノ酸抱合粒子で処理した細胞の生存率（%、粒子非処理の細胞の生存率を100%とした相対評価）を図1～13に、アミノ酸非抱合粒子で処理した細胞の生存率（%、同上）を図14に示す。いずれにおいても、処理濃度に依存して細胞の生存率が低下しており、粒子濃度に依存した細胞障害活性が認められた。アミノ酸抱合粒子の細胞障害活性は、特にEL-4細胞に対して高く、RAW267.4、HeLa及びHEK293.Tに対する活性と比較してEL-4細胞に対する活性は約100倍高かった。特に、リジン、アルギニン及びメチオニンを抱合した粒子では、他のアミノ酸を抱合した粒子と比較して、EL-4に対する細胞障害活性がより強かった。

#### 【0043】

##### 3. アポトーシスの検出

アポトーシスでは、初期段階において細胞膜の内側にあるホスファチジルセリン（PS）が細胞膜の外側に表出し、次いで細胞膜の完全性が失われDNA断片化に至る。従って、PSに親和性の高いAnnexin Vと、死細胞を染色する核染色剤（ヨウ化プロピジウム等）とを用いて、アポトーシス初期段階、アポトーシス後期段階及び死細胞を識別することができる。本実験では、Annexin Vアッセイにより、アルギニン抱合ナノ粒子によるEL-4細胞のアポトーシス誘導を調べた。

#### 【0044】

実験にはAnnexin V-FITC Apoptosis Detection kit I（BDバイオサイエンス社）を用いた。製造者のプロトコールに従い、以下の通りに実験を行なった。

(1) 冷PBS(pH7.4)でEL-4細胞を2回洗浄し、 $\sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLの細胞濃度になるように1X Binding bufferに再浮遊した。

(2) 5 mLのFalconチューブに上記細胞浮遊液を100  $\mu$ L（ $\sim 1 \times 10^5$ 細胞）加えた。

(3) 下記表2に従い、各チューブにAnnexin V 試薬（5  $\mu$ L）又はヨウ化プロピジウム(PI)（2  $\mu$ L）を加えた。

(4) チューブを緩やかに混和し、室温、暗所で15分間インキュベートした。

(5) 各チューブに1X Binding bufferを400  $\mu$ L加えた。製造者のプロトコールに従い、下記表2のコントロールサンプル1～5を用いて機器のコンペンセーション調整を行なった。

(6) テストサンプルのチューブには、1X Binding bufferと共に終濃度100  $\mu$ g/mLのアルギニン抱合粒子を加え、CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃にてインキュベートした。粒子添加後8時間まで2時間おきにテストサンプルの測定を行なった。測定条件を以下に示す。

Annexin V-FITC：

吸収極大492nm、発光極大520nm

10

20

30

40

50

ヨウ化プロピジウム：

吸収極大370nm及び550nm、発光域：560-680nm

【 0 0 4 5 】

【表 2】

サンプル	Annexin V	PI
1 ポジティブコントロール	—	—
2 ポジティブコントロール	○	—
3 ポジティブコントロール	—	○
4 ポジティブコントロール	○	○
5 ネガティブコントロール	○	○
6 テストサンプル	○	○

10

1～4：アポトーシスが誘導されたポジティブコントロールには、マイトマイシンあるいはサイクロヘキサミドを用いた。

5：アポトーシス非誘導のネガティブコントロールには、アミノ酸抱合ナノ粒子懸濁用の超純水を用いた。

【 0 0 4 6 】

テストサンプルの測定結果を図 1 5 に示す。4 分割リージョンの左下が生細胞（Annexin(-), PI(-)）、左上が初期アポトーシス細胞（Annexin(+), PI(-)）、右上が後期アポトーシス細胞（Annexin(+), PI(+))、右下が死細胞（Annexin(-), PI(+))である。アミノ酸抱合粒子により、がん細胞にアポトーシス様の反応が生じることが確認できた。

20

【 0 0 4 7 】

4．アミノ酸抱合ナノ粒子の抗がん活性（その 2：ヒトB細胞リンパ腫）

上記 2 と同様にして、公知のヒトB細胞リンパ腫由来細胞株であるYCUB-2を使用し、アミノ酸抱合粒子のヒトB細胞リンパ腫に対する増殖抑制効果をMTTアッセイにより評価した。YCUB-2細胞株を37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養し、培養液中にアミノ酸抱合粒子（終濃度10 μg/ml）を添加した。細胞と粒子を48時間接触させた後の細胞の生存率を図 1 6 に示す。また、抱合粒子の処理濃度を0～10 μg/mlとして48時間処理した後の細胞の生存率を図 1 7 に示す。

【 0 0 4 8 】

図 1 6 にある通り、抱合させたアミノ酸の種類により増殖抑制効果に差異があったが、検討したアミノ酸のほとんどで60%程度以下まで細胞増殖が抑制されていた。アルギニン抱合粒子については、処理濃度10 μg/mlでは増殖抑制効果が認められなかった。抗がん活性の濃度依存性を検討したところ、図 1 7 にある通り、B細胞リンパ腫細胞株に対しても、アミノ酸抱合粒子の増殖抑制効果が粒子濃度に依存して高まることが確認された。

30

【 0 0 4 9 】

5．アミノ酸抱合ナノ粒子の抗がん活性（その 3：ヒトT細胞リンパ腫）

上記 2 と同様にして、公知のヒトT細胞リンパ腫由来細胞株であるH9を使用し、アミノ酸抱合粒子のヒトT細胞リンパ腫に対する増殖抑制効果をMTTアッセイにより評価した。H9細胞株を37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養し、培養液中にアミノ酸抱合粒子を所定の濃度で添加した。細胞と粒子を24～72時間接触させ、細胞の生存率を調べた。

40

【 0 0 5 0 】

粒子での処理時間を24時間とし、粒子濃度を0～100 μg/mlとして細胞増殖抑制効果の濃度依存性を調べた。結果を図 1 8 に示す。アルギニン抱合粒子よりもアスパラギン酸抱合粒子の方が増殖抑制効果が高かったが、いずれにおいても増殖抑制効果が濃度依存的であることが確認された。

【 0 0 5 1 】

アポトーシス誘導能を有する既存の抗がん剤マイトマイシンC（MMC）及びアクチノマイシンD（ACD）とアミノ酸抱合粒子との間で、H9細胞株に対する増殖抑制効果を比較した。図 1 9 中の横軸に示した各濃度で24時間H9細胞株を処理し、MTTアッセイにより生存率を

50

調べた。その結果、図 19 にある通り、アスパラギン酸抱合粒子は既存の抗がん剤と比較して増殖抑制効果が顕著に高かった。アルギニン抱合粒子はアスパラギン酸抱合粒子よりも効果が低いものの、既存の抗がん剤と同程度の処理濃度で同レベルの増殖抑制効果を示した。

#### 【0052】

アスパラギン酸抱合粒子を用いてH9細胞株に対する処理濃度と処理時間の影響を調べた。処理濃度は0~100  $\mu\text{g/ml}$ 、処理時間は1、3、6、24時間とした。結果を図20に示す。処理濃度だけではなく処理時間にも依存して増殖抑制効果が高まっており、数時間の処理でも高い増殖抑制効果が認められた。アルギニン抱合粒子でも同様に処理濃度と処理時間の影響を調べたところ、処理濃度6.3  $\mu\text{g/ml}$ までは処理時間を増やしても増殖抑制に差異は認められなかったが、これ以上の濃度範囲ではアスパラギン酸抱合粒子と同様の傾向が認められた(図21)。図22は既存の抗がん剤MMC及びACDで同様の実験を行なった結果である。

10

#### 【0053】

H9細胞株に対するアミノ酸抱合粒子の抗がん効果をさらに検討すべく、抱合させるアミノ酸を塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸、中性アミノ酸に分け、各アミノ酸抱合粒子ごとに細胞増殖抑制効果を評価した。塩基性アミノ酸としてアルギニン、酸性アミノ酸としてアスパラギン酸、中性アミノ酸としてグリシンを用いた。粒子での処理濃度は0.75、1.5、3.0、6.0  $\mu\text{g/ml}$ 、処理時間は24、48、72時間とした。その結果、粒子濃度0.75、1.5  $\mu\text{g/ml}$ ではいずれの粒子も抗がん活性を示さなかったが(データ示さず)、3.0、6.0  $\mu\text{g/ml}$ では中性アミノ酸抱合粒子が強く抗がん活性を示した(図23)。ヒトT細胞リンパ腫に対しては中性アミノ酸を抱合した粒子が効果が高いと推察される。

20

#### 【0054】

##### 6. アミノ酸抱合ナノ粒子の抗がん活性(その4:ヒト膵臓癌)

上記2と同様にして、公知のヒト膵臓癌由来細胞株を使用し、アミノ酸抱合粒子のヒトT細胞リンパ腫に対する増殖抑制効果をMTTアッセイにより評価した。膵臓癌由来細胞株として、Panc1、MIA-PaCa2、BxPC3、AsPC-1、NOZを用いた。これらの細胞株はいずれもヒト膵臓癌に由来するものであるが、発現プロファイルや化学物質に対する応答等において相違があることが知られている。各細胞株を37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養し、培養液中にアミノ酸抱合粒子を10  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加して48時間処理し、MTTアッセイにより増殖抑制効果を調べた。

30

#### 【0055】

その結果を図24に示す。非処理細胞の48時間培養後の生存率を100%として生存率を算出したところ、非抱合粒子でも若干の増殖抑制が認められ、AsPC-1細胞に対するグリシン抱合粒子及びアスパラギン酸抱合粒子の増殖抑制効果が特に顕著であった。これにより、アミノ酸抱合粒子が一部の膵臓癌に対して治療効果を発揮し得ることが示された。

#### 【0056】

##### 7. in vivo毒性の検討

下記2通りにてアミノ酸抱合粒子のin vivo毒性を調べた。

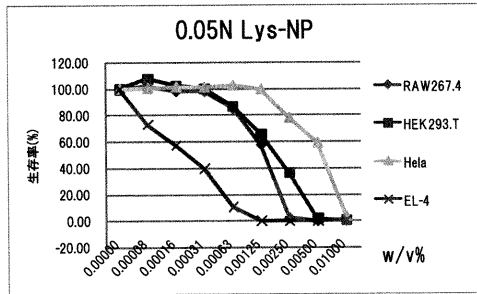
- (1) 健常マウス10匹にアミノ酸抱合ナノ粒子を各1g単回経口投与し、経過を観察した。投与後1ヶ月間の観察においても、マウスに異常は認められず正常に生存していた。
- (2) 各種アミノ酸抱合粒子を生理食塩水にて1mg/mlに調製し、健常マウス5匹に週1回1ml(粒子として1mg)を経口、静注又は腹腔内に投与し、これを4週間繰り返した。便や体重等を含め、マウスに何らの毒性も見られなかった。

40

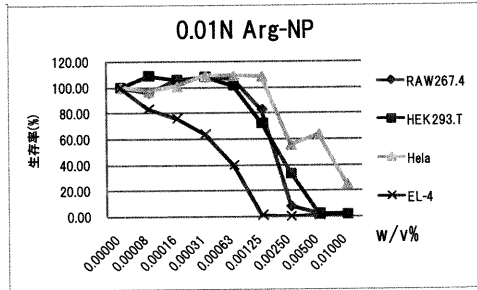
#### 【0057】

従って、上記で製造したアミノ酸抱合ナノ粒子は、正常細胞を傷害せず、がん細胞に対する特異性が高いと考えられる。

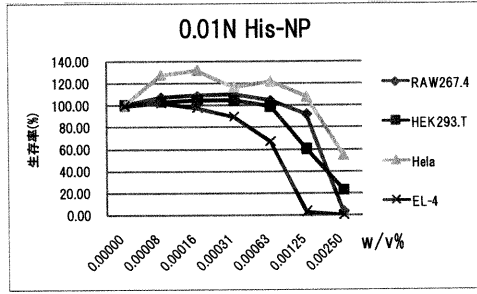
【図 1】



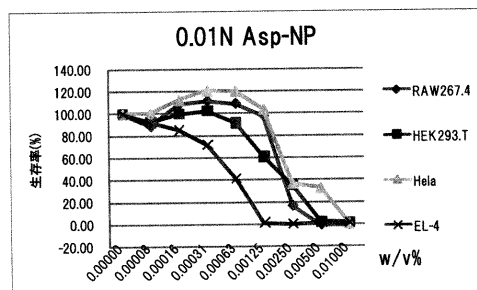
【図 2】



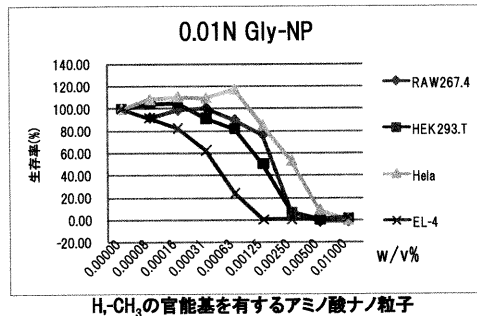
【図 3】



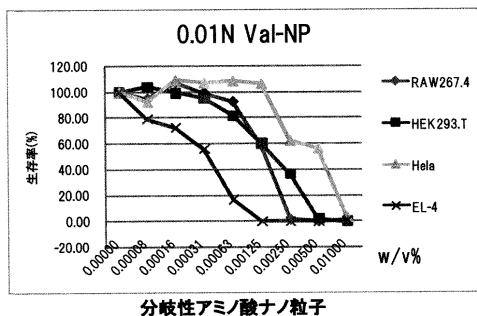
【図 4】



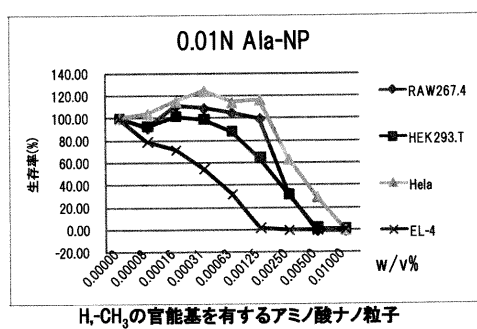
【図 5】



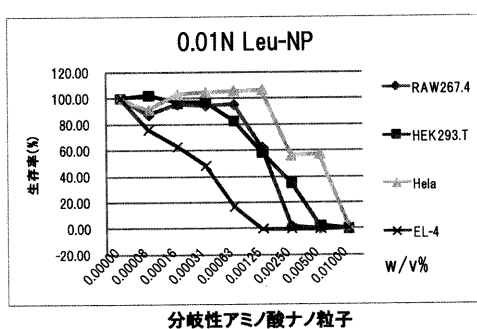
【図 7】



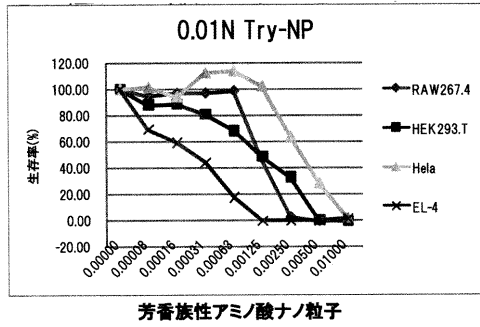
【図 6】



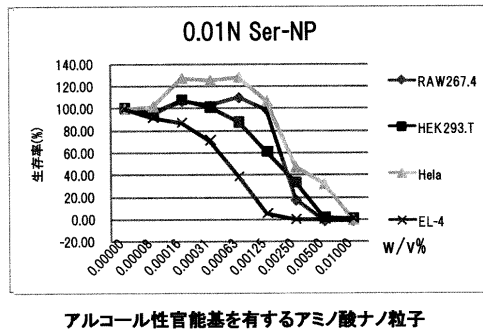
【図 8】



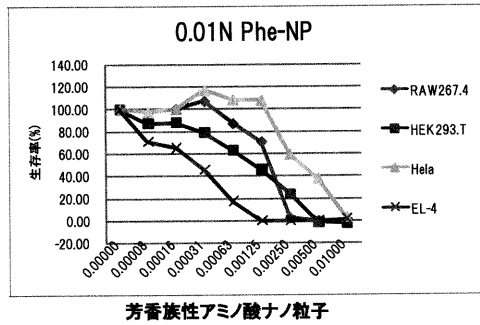
【図 9】



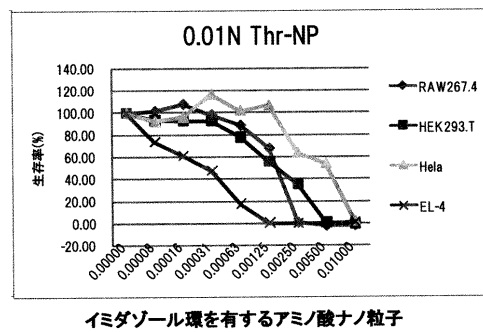
【図 11】



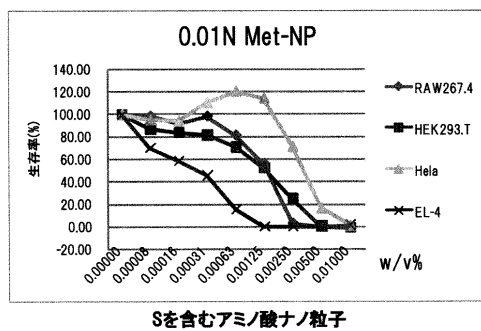
【図 10】



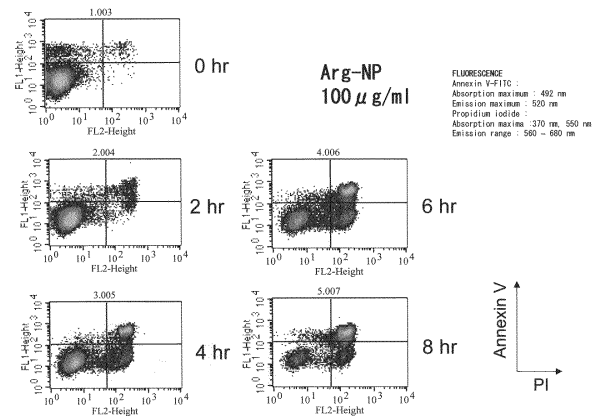
【図 12】



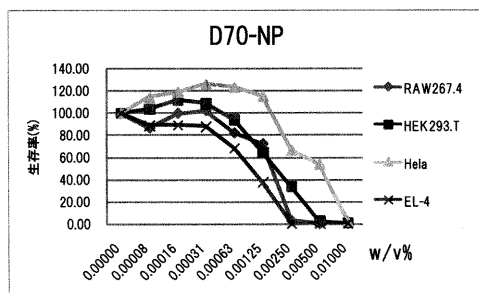
【図 13】



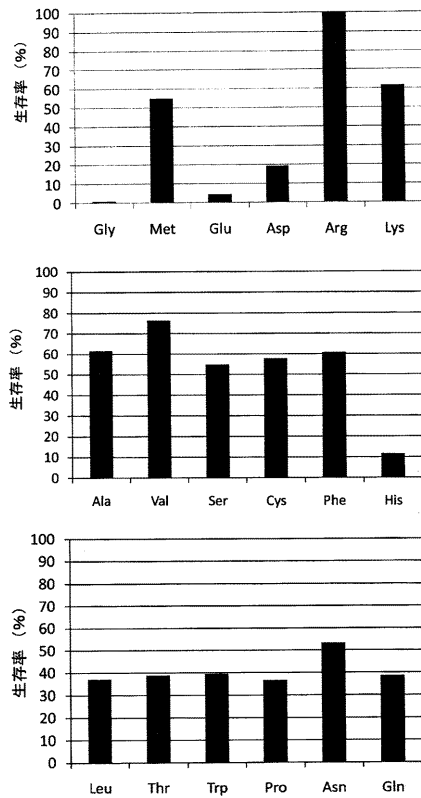
【図 15】



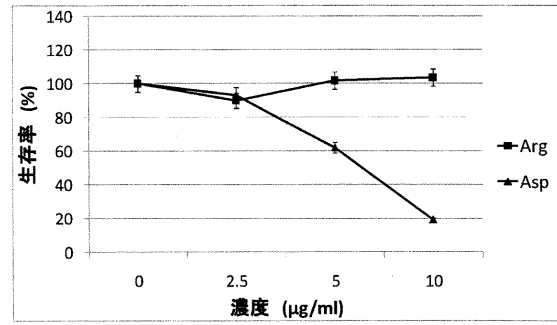
【図 14】



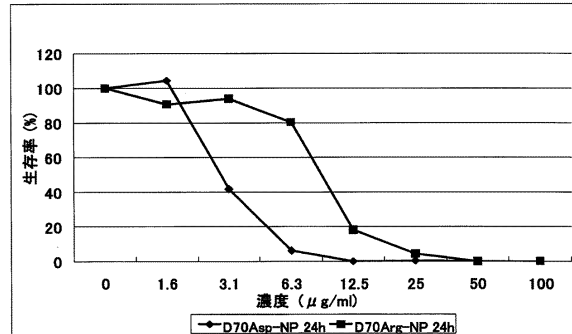
【図16】



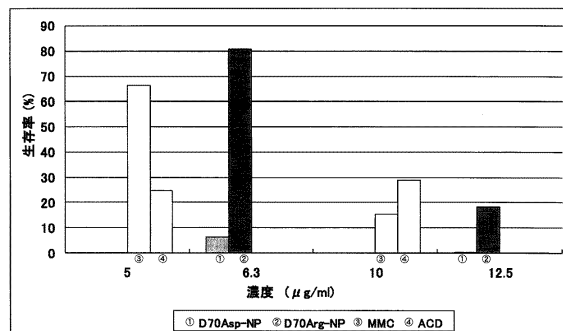
【図17】



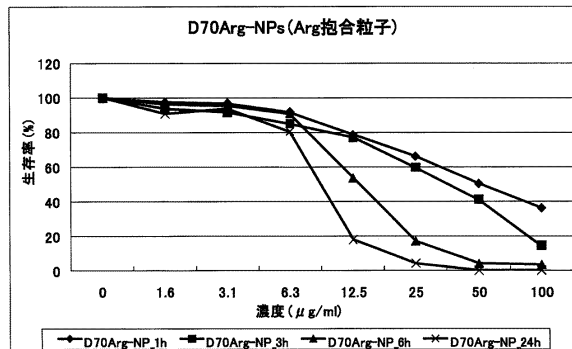
【図18】



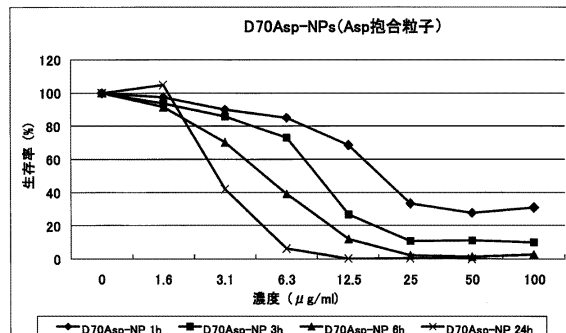
【図19】



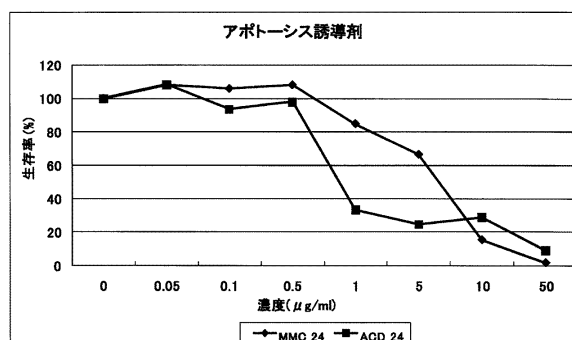
【図21】



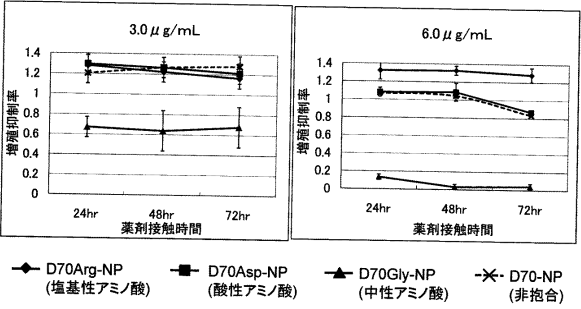
【図20】



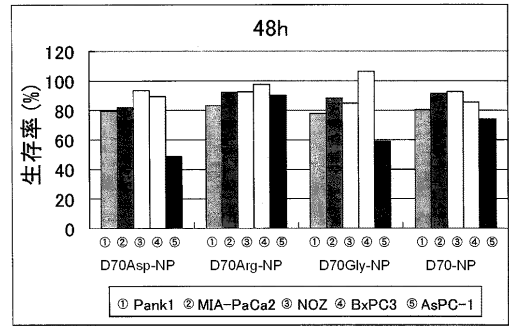
【図22】



【図 2 3】



【図 2 4】





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/4172 (2006.01)		A 6 1 K 31/4172
A 6 1 K 31/405 (2006.01)		A 6 1 K 31/405
A 6 1 K 31/401 (2006.01)		A 6 1 K 31/401
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02

(72)発明者 遠藤 格  
神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目 9 番の 1 公立大学法人横浜市立大学内

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 0 0 3 7 0 6 ( W O , A 1 )  
国際公開第 2 0 0 8 / 1 2 6 8 4 6 ( W O , A 1 )  
国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 8 2 4 3 ( W O , A 1 )  
特開昭 5 8 - 0 4 1 8 1 8 ( J P , A )  
Weiss, C.K. et al., A Route to Nonfunctionalized and Functionalized Poly(n-butylcyanoacrylate) Nanoparticles: Preparation, *Macromolecules*, 2 0 0 7 年, Vol. 40, p. 928-938  
Weiss, C.L. et al., Cellular Uptake Behavior of Unfunctionalized and Functionalized PB-CA Particles Prepared in a Miniemulsion, *Macromolecular Bioscience*, 2 0 0 7 年, Vol. 7, p. 883-896

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 3 1 , A 6 1 K 9 , A 6 1 K 4 7  
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 )  
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 )