

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6444399号
(P6444399)

(45) 発行日 平成30年12月26日(2018.12.26)

(24) 登録日 平成30年12月7日(2018.12.7)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 31/737	(2006.01)	A 61 K 31/737
A 61 P 35/04	(2006.01)	A 61 P 35/04
A 61 K 35/19	(2015.01)	A 61 K 35/19

Z

請求項の数 18 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2016-525966 (P2016-525966)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月22日 (2014.10.22)
 (65) 公表番号 特表2016-534078 (P2016-534078A)
 (43) 公表日 平成28年11月4日 (2016.11.4)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/072620
 (87) 國際公開番号 WO2015/059177
 (87) 國際公開日 平成27年4月30日 (2015.4.30)
 審査請求日 平成28年12月2日 (2016.12.2)
 (31) 優先権主張番号 102013111630.2
 (32) 優先日 平成25年10月22日 (2013.10.22)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 516119243
 セル レセプター アーゲー
 スイス国 1208 ジュネーヴ ルート
 ド シエンヌ 30エー エルアンドエ
 ス トラスト サービシーズ エスエー内
 (74) 代理人 100120891
 弁理士 林 一好
 (74) 代理人 100165157
 弁理士 芝 哲央
 (74) 代理人 100126000
 弁理士 岩池 満
 (72) 発明者 フアブリシウス ハンスーアケ
 ドイツ国 14193 ベルリン ブラ
 ムスシュトラッセ 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌の処置に用いるための硫酸化多糖

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌細胞表面と血小板との物理的相互作用を妨げることによって癌細胞増殖を阻害することによる、硫酸化多糖を含む癌治療用医薬組成物であって、前記癌が血液循環している血小板結合性癌細胞を含む、癌治療用医薬組成物。

【請求項 2】

前記血液循環している血小板結合性癌細胞により引き起こされる転移を防ぐために投与される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

経口投与される、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 4】

前記癌が血液循環している血小板結合性癌細胞を含み、前記血液循環している血小板結合性癌細胞により引き起こされる転移を防ぐために経口投与され、かつ癌細胞表面と血小板との物理的相互作用を妨げることによって癌細胞増殖を阻害することによる、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記多糖の硫酸化度は 1.0 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記多糖の硫酸化度は 1.2 である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 7】

前記硫酸化多糖はグリコサミノグリカンである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記グリコサミノグリカンは、ヘパリンの末端五糖が存在しないことを特徴とする、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記グリコサミノグリカンは、5 0 0 0 ダルトンから 1 2 0 0 0 ダルトンの平均分子量を示す、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記グリコサミノグリカンはペントサンポリ硫酸 (P P S) である、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記グリコサミノグリカンはデキストラン硫酸 (D X S) である、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記グリコサミノグリカンはヘパリンである、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記ヘパリンは低分子量 (L M W) ヘパリンである、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記低分子量ヘパリンはエノキサパリン、ダルテパリンまたはチンザパリンである、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記硫酸化多糖は硫酸アルギネットまたは硫酸化フコイダンである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記硫酸化多糖を含む医薬組成物が腫瘍の近くに局所的に投与される、腫瘍疾患の処置のための請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

細胞表面と血小板との物理的相互作用を阻害することによって細胞増殖を阻害するための方法における請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の医薬組成物のインピトロの使用。

【請求項 18】

前記硫酸化多糖はペントサンポリ硫酸 (P P S) またはデキストラン硫酸 (D X S) である、細胞増殖の阻害のための、請求項 17 に記載の医薬組成物のインピトロの使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、血小板（栓球）と細胞表面との物理的相互作用を調節することによって、哺乳動物細胞の生育および／または増殖を調節するための方法に関する。したがって本発明は、望ましくない細胞生育および／または増殖に関連する医学的障害の処置における、細胞表面と血小板との物理的相互作用の阻害のための薬物として用いるための硫酸化多糖、好ましくはグリコサミノグリカンに関する。細胞増殖を調節するために、血小板（栓球）と細胞表面との物理的相互作用を調節するためのインピトロの方法も、本発明に含まれる。したがって本発明は、細胞生育の阻害のために細胞表面と血小板との相互作用を阻害すること、および細胞生育を増強するために血小板と細胞表面との相互作用を増強することに関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

インピトロで生育されるヒトの初代および永久細胞系のほとんどは、安定した細胞生育および増殖のために、ヒトまたはその他の動物由来の血清の存在を必要とする。血清は、

10

20

30

40

50

血液の凝固および沈降物の遠心除去によって生成される上清である。化学添加剤または血小板を含まない血漿によって血清を置き換えた培養液中で血清依存性細胞系を培養する試みは、通常失敗する。これに対し、いくつかの培養系においては、細胞増殖を支援するために血小板溶解物を使用できる。これは部分的には、血液凝固の際に起こる血小板活性化の際に放出される血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factors: PDGF) の存在によるものである。これによって、大部分の哺乳動物細胞系のインビトロでの増殖および生育にとって必須の増殖刺激特性が、生育促進性の血清に与えられる。

【0003】

インビトロの細胞も、インビトロの細胞と同様の PDGF 依存性を有することが想定され得る。しかし、インビトロの血液循環に血清は存在しない。それは高等生物の生存のための生理的要件に適合しない。したがって、インビトロにおける増殖因子は遊離物質として血液中に存在するのではなく、血小板内の小胞の中に存在する。しかし、活性化の際に血小板から PDGF が放出される。

【0004】

増殖因子は正常な細胞および悪性細胞の生育に必須であるため、細胞に対して利用可能にされる必要がある。G0期を離れてG1期になった細胞は、S期および関連する細胞増殖に入ることに関する適切なシグナルを必要とする。したがって、増殖因子の放出をもたらす血小板の活性化は、インビトロにおける細胞増殖および細胞生育の開始において固有の重要な機構である。この機構の別の局面は形態である。増殖因子は、それらが必要とされる部位において血小板から放出される必要がある。血小板活性化は、生育に関係付けられた細胞の部位において正確に起こる必要がある。このことを達成する機構は、現在もなお深く研究されていない。

【0005】

いくつかの腫瘍細胞の表面に血小板が結合すること、およびこの結合が腫瘍の転移に関与することが当該技術分野において公知である。たとえば、非特許文献1および非特許文献2は、血小板と腫瘍細胞との物理的相互作用が、これらの細胞の転移に重要な役割を果たし得ることを開示している。

【0006】

いくつかの腫瘍細胞においては血小板受容体が過剰発現されており、結果として腫瘍細胞の表面への血小板凝集が増強される。前述の研究は、血小板 - 細胞表面結合と細胞の転移との相関を開示しているが、細胞生育、特に腫瘍細胞増殖と、細胞表面における血小板の物理的相互作用との関係は記載していない。

【0007】

細胞増殖の抑制は、望ましくない細胞生育に関連する疾患の処置の中心的役割を果たす。医師および医薬製品の製造者は数十年もの間、腫瘍の望ましくない細胞増殖を阻害するための有効な戦略を開発しようと試みてきた。血小板との相互作用を介した腫瘍細胞への PDGF の提供は、腫瘍細胞の生育または増殖を阻害するための重要なターゲットと考えられ得る。

【0008】

グリコサミノグリカンは、反復する二糖の直鎖構造を含む。ヘパリンはグリコサミノグリカンの一例である。ヘパリンは内在性の多糖であり、凝固カスケードに対する阻害効果を有するため、抗凝固のために治療的に使用される。ヘパリンは抗凝固薬としてだけでなく、腫瘍の転移防止のための潜在的治療薬としても公知である。腫瘍細胞転移の阻害のためのヘパリンの使用は、当該技術分野において記述されている（非特許文献3）。低分子量ヘパリンの使用によって、結腸腫瘍の転移が低減した。低分子量ヘパリンの投与後の、腫瘍の細胞生育または細胞増殖に対する活性は、この研究の著者によって確認されなかつた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【0009】

【非特許文献1】モデリー - パウロウスキ (Modery - Pawlowski) ら (バイオマクロモレキュールズ (Biomacromolecules) 2013, 14, 910 - 919)

【非特許文献2】タカギ (Takagi) ら (プロス・ワン (PLOS ONE)、2013年8月、8、8、e73609)

【非特許文献3】マ (Ma) ら、インベスティゲーション・ニュー・ドラッグス (Invest New Drugs) (2012) 30: 508

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0010】

先行技術に鑑みて、本発明の根底にある技術的課題は、細胞増殖を調節するための手段を提供することである。

【0011】

この課題は、独立請求項の特徴によって解決される。本発明の好ましい実施形態は、従属請求項によって提供される。

【0012】

増殖する細胞、分化のさまざまな程度にある正常な細胞および悪性細胞は、休止細胞には存在しない共通の驚くほど基本的な特性を有する。すなわち、それらの細胞は血小板と結合できる。血小板は、物質のうちでもとりわけ増殖因子を含有しており、増殖因子は細胞生育を維持することができる。血小板由来増殖因子の欠乏は、結果として細胞生育を停止させ、最終的には細胞死 (アポトーシス) に導く。本出願は、増殖細胞への血小板の結合を妨げることができ、したがって細胞生育を妨げて、その後治療効果を提供することができる物質のグループを提供する。

20

【0013】

したがって本発明は、血小板 (栓球) と哺乳動物細胞の表面との物理的相互作用をプロックすることによって、前記細胞の増殖を調節するための方法に関する。

【0014】

血小板と細胞表面との物理的相互作用が、インビオおよびインビトロ両方の細胞増殖に必要であるという認識は、本発明の新たな驚くべき特徴を表す。血小板と腫瘍細胞の表面との相互作用は、腫瘍細胞の転移において役割を果たし得るが、この相互作用が物理的相互作用を通じて直接的に細胞増殖に影響することは、先行技術において過去に記述されていない。

30

【0015】

一実施形態において、本発明は本明細書に記載されるとおりの方法に関し、ここで細胞表面と血小板との物理的相互作用の阻害は、細胞生育および/または増殖を阻害する。

【0016】

一実施形態において、本発明は本明細書に記載されるとおりの方法に関し、ここで前記増殖する細胞はヒト細胞である。

40

【0017】

好ましい実施形態において、本発明は、望ましくない細胞生育および/または増殖に関連する医学的障害の処置における、細胞表面と血小板との物理的相互作用の阻害のための薬物として用いるための硫酸化多糖に関する。

【0018】

驚くべきことに、硫酸化多糖、たとえばグリコサミノグリカンなど、たとえばヘパリンなど、またはその他の低分子量 (low molecular weight) グリカン分子、たとえばLMWヘパリンもしくはその他のLMWグリコサミノグリカンなど、または硫酸アルギメントなどを、細胞表面と血小板との結合を阻害するために投与してもよい。この物理的相互作用の妨害によって、細胞の増殖が阻害される。硫酸化多糖の適用によって、細胞表面と血小板との相互作用の妨害を介した細胞増殖の阻害をもたらし得ること

50

は、先行技術において開示されていない。本発明に従うと、こうした硫酸化多糖は「阻害剤」と呼ばれることがある。

【0019】

硫酸化多糖の投与によって血小板・細胞表面の相互作用を防止することによる細胞増殖の阻害は、新規の技術的効果を表す。この技術的効果によって、1つまたはそれ以上の新規の臨床的状況が生じる。

【0020】

以前は、腫瘍細胞の転移性播種のみがヘパリンによって予防可能または処置可能であると考えられていた。本発明は、腫瘍転移の根底にある必要条件である細胞増殖の阻害に対する硫酸化多糖の新規の適用を可能にするものである。本発明に従うと、腫瘍の患者は、転移が起きたか否かにかかわらず、たとえ転移が起こる前であっても、血小板・細胞表面の相互作用を妨害するという新規の技術的効果、およびその後の細胞生育および/または増殖に対する効果を利用するという意図によって、硫酸化多糖で処置されてもよい。

10

【0021】

一実施形態において、本発明は本明細書に記載されるとおりの方法に関し、ここで血小板と細胞表面との物理的相互作用は、細胞の表面に位置する血小板受容体によって媒介される。インビボの生理的細胞生育は血小板受容体に依存する制御系に従うため、この受容体は細胞増殖調節に重要な役割を果たす。血小板受容体は典型的に、増殖する細胞の表面上に、細胞周期のG0期からの細胞の継代によって、細胞表面上に存在する。このプロセスの調節は、細胞生育を調節するための有効な手段を提供する。

20

【0022】

以下に説明するものなどの実験的アプローチを通じて、発明者らは、たとえばグリコサミノグリカンなどの多糖の硫酸化によって、血小板・細胞表面の相互作用の妨害が増強されるという驚くべき特徴を確認した。自然発生する硫酸化多糖および合成硫酸化多糖の両方において、さまざまな程度の硫酸化が起こる。好ましい実施形態においては、本明細書に記載される技術的効果を増強するために、特定の硫酸化度に対して硫酸化多糖を選択または改変してもよい。

【0023】

硫酸化によって、分子は負に帯電するようになる。ヘパリンは、生物において生じる最も負に帯電した有機分子である。より高硫酸化された多糖、たとえばグリコサミノグリカンなど、すなわちより負に帯電した硫酸化多糖は、それより低硫酸化のもの、すなわち負の帯電の程度がより低い硫酸化多糖よりも血小板・細胞相互作用の阻害の効果が高い。

30

【0024】

阻害剤の負の電荷は、上述の血小板・細胞結合の阻害の根底にある機構の決定的特徴である。おそらくは増殖に関わる細胞の細胞膜は、血小板に結合できる硫酸化グリコサミノグリカンに似た構造を有すると結論付けることが妥当である。よって、本発明の血小板・細胞表面の相互作用の阻害剤は競合的に作用し、通常は増殖に関わる細胞の膜上の負に帯電した分子の認識を行う、おそらくは血小板上の別の膜受容体分子をブロックする。よって、より高硫酸化された多糖はいくつかのこうした受容体分子を一度にブロックすることができ、体液によって希釈されるか洗い流される前に結合する確率が高くなる。

40

【0025】

硫酸化多糖の硫酸化度は、好ましくは約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、または2.0より上であってもよい。好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための硫酸化多糖に関し、ここで多糖の硫酸化度は1.0である。

【0026】

好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための硫酸化多糖に関し、ここで多糖の硫酸化度は1.2である。

【0027】

50

好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための硫酸化多糖に関し、ここで多糖の硫酸化度は 1.4 である。

【 0 0 2 8 】

以下に説明するとおり、当業者に公知の方法を用いて、あらゆる所与の多糖の硫酸化度を調整することができる。加えて、適切な実験によって硫酸化度を定めることができ、それによって当業者は、意図される用途に対する最適な特性を示す多糖を生成するために硫酸化度を調整することが可能である。したがって、それに応じてそれぞれの硫酸化度を調整するために、商業的に入手可能な多糖分子または天然に得られる多糖分子を改変できる。

【 0 0 2 9 】

本発明の一実施形態において、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための硫酸化多糖は、グリコサミノグリカンである。

【 0 0 3 0 】

本発明の一実施形態において、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるためのグリコサミノグリカンは、ヘパリンである。過去にヘパリンは腫瘍治療に適用されてきたが、血小板 - 細胞表面の相互作用に対する効果は示されていない。血小板結合を妨害するという新規の技術的効果は、特に細胞増殖および / または細胞生育の低減が要求されるような医学的状態をターゲットとする、ヘパリンの新規の医学的使用を可能にする。

【 0 0 3 1 】

1.0 を超える硫酸化度を有するグリコサミノグリカン分子は、たとえばペントサンポリ硫酸 (pentosan polysulfate: PPS) またはデキストラン硫酸 (dextran sulfate: DXS) などの他のグリコサミノグリカン分子に加えて、典型的にヘパリン、およびヘパリンのその他の硫酸化低分子量 (low molecular weight: LMW) 変形物である。

【 0 0 3 2 】

本発明の一実施形態において、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるためのグリコサミノグリカンは、低分子量 (LMW) ヘパリンである。

【 0 0 3 3 】

一実施形態において、本発明は本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための LMW ヘパリンに関し、ここで低分子量ヘパリンはエノキサパリンである。

【 0 0 3 4 】

一実施形態において、本発明は本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための LMW ヘパリンに関し、ここで低分子量ヘパリンはダルテパリンである。

【 0 0 3 5 】

一実施形態において、本発明は本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための LMW ヘパリンに関し、ここで低分子量ヘパリンはチンザパリンである。

【 0 0 3 6 】

好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるためのグリコサミノグリカンに関し、ここでグリコサミノグリカンは、ヘパリンの末端五糖が存在しないこと、好ましくは五糖 GlcNAc / NS (6S) - GlcA - GlcNS (3S, 6S) - IdUA (2S) - GlcNS (6S) が存在しないことを特徴とする。

【 0 0 3 7 】

したがって好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるためのグリコサミノグリカンに関し、ここでグリコサミノグリカンはペントサンポリ硫酸 (PPS) である。

【 0 0 3 8 】

したがって好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるためのグリコサミノグリカンに関し、ここでグリコサミノグリカンはデキストラン硫酸 (DXS) である。

10

20

30

40

50

【0039】

本発明の好ましい実施形態において、ヘパリンの末端五糖が存在しないことを特徴とするグリコサミノグリカンは、好ましくは1000ダルトンから約500 000ダルトン、好ましくは2000ダルトンから100 000ダルトン、より好ましくは約5000ダルトンから約12 000ダルトンの分子量、または本明細書に開示される低分子量ヘパリン分子と本質的に同じ近似分子量を示す。約5000ダルトンから約12 000ダルトンの分子のグリコサミノグリカンが、低分子量グリコサミノグリカンと名付けられてもよい。

【0040】

一実施形態において、ヘパリンの末端五糖が存在しないことを特徴とするグリコサミノグリカン、たとえばDXSまたはPPSなどは、約2kDaから約12kDa、より好ましくは約3kDaから約8kDa、最も好ましくは約4kDaから約6kDaの分子量を有する。本明細書に記載される低分子量グリコサミノグリカン（約2kDaから約12kDa、好ましくは8kDa未満）は、未分画または高分子量グリコサミノグリカンに比べて付加的な利点を特徴とする。低分子量グリコサミノグリカンは、典型的に未分画または高分子量調製物よりも少ない量の血小板凝集物をもたらす。こうした比較的低分子量の調製物を投与することによって、処置の際の血栓症の合併症が顕著に低減する。

10

【0041】

驚くべき態様で、ヘパリンの末端五糖が存在しないことを特徴とするグリコサミノグリカンは、ヘパリンの末端五糖が存在しないことを特徴とする他の硫酸化多糖、たとえばアルギネートなどに加えて、血小板減少症（血液が過剰に薄くなることによってもたらされる可能性がある）および血栓症（望ましくない凝固）の両方の危険性を低減することを可能にする。これら2つの合併症は、対照的な機構によるものであるようにみえるが、どちらもたとえば未分画ヘパリンなどの未分画グリコサミノグリカンによる処置の際に起こり得る。したがって未分画ヘパリンは血小板の数を強力に減らし過ぎるか、または血小板凝集をもたらす可能性があり、そのいずれもが危険な副作用をもたらすおそれがある。驚くべきことに、PPSおよびDXSはどちらも、これらの影響を回避することを可能にする有益な特性を示す。インビトロの研究では、（UFHと比較して）DXSおよびPPSによって、抗凝固の低減に加えて血小板凝集の低減がもたらされることが示されている。

20

【0042】

実験例において用いられるDXSはシグマ（Sigma）より得られるものであり（31404；ロイコノストック（Leuconostoc）種からのデキストラン硫酸ナトリウム塩）、平均MW5000ダルトンを有する。類似または同じ平均分子量がPPSに用いられてもよい。本実施例は、PPSとしてSP54（ナトリウム塩）を使用する。

30

【0043】

一実施形態において、関連グリコサミノグリカンの分子量は、たとえばロンバーグ（Rhomberg）ら（米国科学アカデミー紀要（PNAS）、vol. 95 no. 8、4176-4181）に記載されるものなどの質量分析に基づく方法を用いて定められ得る。特定の糖の構造ならびに硫酸化および分子量に対するさらなる情報は、ターンブル（Turnbull）ら（米国科学アカデミー紀要（PNAS）、vol. 96 no. 6、2698-2703）に開示される配列決定技術を用いて定められ得る。

40

【0044】

したがって好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための硫酸化多糖に關し、ここで硫酸化多糖は硫酸アルギネートである。

【0045】

アルギネートは非分岐鎖多糖であり、藻類によって生成されるが、いくつかのバクテリアにも生成される。典型的にアルギネートは、褐藻類の細胞壁に見出され得るゲル形成多糖として存在する。

【0046】

したがって好ましい実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物

50

として用いるための硫酸化多糖に関し、ここで硫酸化多糖はフコイダンである。

【0047】

フコイダンは構造的にアルギネートに関連する。フコイダンは天然の変動し得る硫酸化度を有する。これは、アルギネートに適用可能な方法と類似の方法を用いて変更されてもよい。それに従ってフコイダンの硫酸化度が調整されてもよい。硫酸アルギネートおよび硫酸化フコイダンは、どちらも血小板・細胞結合に対する阻害効果を有する。

【0048】

ヘパリンは2つのやり方で抗凝固薬として作用する。すなわち、凝固因子Xaの阻害およびトロンビンの阻害によるものである。しかし、未分画ヘパリン(*Unfractionated heparin* : UFH)はしばしば、重度の血小板減少症をもたらす。ヘパリンの主要な機構は、凝固因子Xaの阻害である。それはヘパリンの非還元末端における末端五糖配列 (GlcNAc / NS (6S) - GlcA - GlcNS (3S, 6S) - IdUA (2S) - GlcNS (6S) 、分子量 1.7KD) によってもたらされる。この五糖を純粋な形状で半合成的に生成することができ、こうしたものはフォンダパリヌクスの名称で公知である。

【0049】

フォンダパリヌクスはヘパリンに比べて血小板に結合する程度が低く、結果的に上述のすべての調製物のうちで血小板減少性または血栓性の合併症の割合が最低である。フォンダパリヌクスは、生育する細胞への血小板の結合の阻害が比較的少ないことが発明者らによって示された。

【0050】

しかし、フォンダパリヌクス五糖はデキストラン硫酸にもペントサンポリ硫酸にも含まれておらず、これらはどちらも血小板・細胞表面の相互作用妨害に関する所望の特性を示す。PPSおよびDXSはどちらも抗凝固特性を有するが、それはヘパリン調製物の抗凝固特性よりもかなり弱い。

【0051】

したがって好ましい実施形態において、本発明は、たとえば血小板減少性の合併症などの、血液を薄くする活性または抗凝固活性に関連する望ましくない副作用なしに、血小板・細胞表面の相互作用の所望の妨害を示すグリコサミノグリカン変形物を提供することによって、グリコサミノグリカン分子のさまざまな特性を技術的に利用する。

【0052】

ヘパリンまたはヘパリン誘導体も所望の効果(血小板・細胞表面の相互作用の妨害)を示すが、好ましい実施形態においては、望ましくない抗凝固副作用を回避するために、ヘパリンの末端五糖を含まないグリコサミノグリカン分子が好ましい。

【0053】

本発明の技術的効果は、グリコサミノグリカン分子の公知の抗凝固特性とは異なる。本発明は新規の技術的効果に関し、公知の化合物の新規の医学的使用を可能にするものである。たとえば、抗凝固薬に関連する副作用の危険性のある患者は、以前はヘパリンによる処置ができなかった。たとえば、ヘパリンまたはその誘導体で処置されていた可能性のある腫瘍患者で、抗凝固薬に関連する副作用の危険性が高くなっている患者は、以前は処置できなかった。本明細書に記載される新規の技術的効果の利用によって、新たな患者グループ、すなわち細胞増殖障害を有していて抗凝固薬に関連する副作用の危険性が高くなっている患者の処置が可能になった。たとえば、ヘパリンに誘導された血小板減少症を有する患者の細胞増殖障害が処置可能になり得る。好ましい実施形態において、ヘパリンの末端五糖が存在しないことを特徴とするグリコサミノグリカン分子、たとえばPPSおよびDXSなどの、これらのグループにおける投与が意図される。

【0054】

ヘパリンが投与される一般的な状況は、長期または短期の抗凝固薬療法の間である。ヘパリンは典型的に、長期処置に用いられるクマリン誘導体よりも迅速かつ直接的に作用する。ヘパリンは典型的に、処置の開始または短期処置に対して好まれる。長期処置の初期

10

20

30

40

50

段階におけるヘパリン処置の具体例は、たとえば深部静脈血栓症、肺塞栓症、脳卒中または心臓発作をもたらした血栓症などの血栓症の処置を含む。ヘパリンによる短期治療の例は、外科手技における血栓症予防のためのヘパリンの頻用である。しかし、こうした手技を受ける患者にはヘパリンに誘導される血小板減少症の危険性があるかも知れず、望ましくない細胞増殖に関連する障害も有する患者は、おそらくはフォンダパリヌクスと組み合わせた、ヘパリンとは異なる糖骨格を特徴とするグリコサミノグリカン分子を用いて、効果的に処置され得る。

【0055】

一局面において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための硫酸化多糖、好ましくはグリコサミノグリカン、硫酸アルギネートまたはフコイダンに関し、ここで望ましくない細胞生育および／または増殖に関連する医学的障害は腫瘍疾患である。

10

【0056】

一局面において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための硫酸化多糖、好ましくはグリコサミノグリカン、硫酸アルギネートまたはフコイダンに関し、ここで望ましくない細胞生育および／または増殖に関連する医学的障害は自己免疫疾患である。

【0057】

多くの疾患の病因は細胞生育に関連している。一例として、望ましくない免疫応答はこうした疾患の1つである。免疫応答によって、原因物質に対するさらなる免疫細胞または抗体を生成するために、免疫系による1つまたはいくつかの関連細胞クローンの増殖が導かれる。望ましくない、すなわち病原性の免疫応答の場合、免疫系のエフェクター細胞または免疫系によって生成される抗体が、身体自身の組織に向けられて自己免疫をもたらし得る。これらの免疫反応が著しい組織の損傷をもたらす。この損傷が自己免疫疾患の疾患症状を引き起こす。

20

【0058】

したがって、免疫細胞の増殖も、細胞表面への血小板結合の阻害剤の臨床的適用において薬理学的に影響され得る。よって、この機構を通じて免疫系の望ましくない活性を制御することが可能である。この目的のために現在用いられる他の薬物は、顕著な副作用を有する傾向がある。本明細書に記載されるグリコサミノグリカンの使用は、典型的に比較的低い副作用を有し、こうした疾患を処置するための安全なやり方を示す。

30

【0059】

発明者によって確認された新規の技術的効果に照らして、いくつかの新規の臨床的状況が生じる。これまで、ヘパリンの潜在的な抗転移効果は、抗凝固に関する全身的作用によるものと考えられていた。したがって本発明は、医学界で過去には考えられなかつたまったく新規の機構に関するものである。

【0060】

硫酸化多糖は細胞表面と血小板との接触を直接阻害するという知識に加えて、血小板と増殖する細胞との物理的相互作用によって、本発明は、腫瘍組織に近接する領域への前記硫酸化多糖の局所投与を特徴としてもよい。腫瘍組織に近接する領域への硫酸化多糖の局所投与によって、より低い用量の硫酸化多糖を投与することが可能となり、それは全身的毒性を低減させながら有効な抗増殖効果を維持する。本発明の意味における局所投与とは、たとえば注射、経粘膜または経皮的アプローチによる、腫瘍組織から好ましくは10cm以内、5cm以内、または好ましくは1cm以内の領域への投与、または腫瘍自体への送達などによる投与に関する。

40

【0061】

したがって、局所投与の方法は、たとえば静脈内（静脈の中へ）、動脈内（動脈の中へ）、骨内注入（骨髄の中へ）、筋内、脳内（脳実質の中へ）、脳室内（脳室系の中へ）、くも膜下腔内（脊柱管への注入）、または皮下（皮膚の下）の投与などの非経口投与に関し得る。

50

【 0 0 6 2 】

一実施形態において、局所投与は、腫瘍への血液供給を行う動脈への動脈内投与に関する。たとえ腫瘍が発生した場合でも、特定の器官または組織を患者から除去できないような場合において、こうしたアプローチは特に関連し得る。この領域における動脈内投与を介した局所投与によって、血小板と分裂細胞の細胞表面との相互作用を妨害する一意の方法が提供され、それによって有用な治療効果が与えられる。

【 0 0 6 3 】

さらなる局面において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの硫酸化多糖と、薬学的に許容できる担体とを含む、望ましくない細胞生育および／または増殖に関連する医学的障害の処置における、細胞表面と血小板との物理的相互作用の阻害のための医薬組成物に関する。

10

【 0 0 6 4 】

本発明はさらに、硫酸化多糖のインピトロ投与によって、細胞表面と血小板との物理的相互作用を阻害することによって、細胞生育および／または増殖を阻害するためのインピトロの方法に関する。したがって本発明は、細胞表面と血小板との物理的相互作用の阻害のための本発明の方法における、本明細書に記載されるとおりの硫酸化多糖のインピトロの使用に関する。本発明はさらに、細胞生育および／または増殖の阻害のための本発明の方法における、本明細書に記載されるとおりの硫酸化多糖のインピトロの使用に関する。

【 0 0 6 5 】

一実施形態において、本発明の方法における硫酸化多糖のインピトロの使用は、前記硫酸化多糖がヘパリンまたはLMWヘパリンであり、かつインピトロで0.01U/mLから10U/mL、好ましくは0.05から1、好ましくは0.05から0.5、より好ましくは約0.1U/mLにて投与されることを特徴とする。

20

【 0 0 6 6 】

一実施形態において、本発明の方法における硫酸化多糖のインピトロの使用は、前記硫酸化多糖がDXSまたはPPSであり、かつインピトロで溶液中で0.01ppmから10ppm、好ましくは0.05から5、より好ましくは約1ppmにて投与されることを特徴とする。

【 0 0 6 7 】

血小板と細胞の表面との相互作用は、硫酸化多糖の使用によって阻害され得るだけでなく、血小板の添加によって増強され得る。したがって本発明は別の局面において、細胞増殖を調節するための方法に關し、ここで前記増殖は、血小板と細胞表面との物理的相互作用を増加させることによって増強される。本発明は、血小板と細胞表面との相互作用の増強によって、細胞生育および／または増殖を増強する方法を提供する。増強は細胞生育の相対的尺度に関するものであってもよく、ここで対照細胞は、対応する用量の血小板の低減した量を伴うか、または伴わずに処置された細胞となる。

30

【 0 0 6 8 】

したがって本発明は、医学的障害の処置における細胞表面と血小板との物理的相互作用の増強のための薬物として用いるための血小板に關し、この増強した細胞生育および／または増殖は、前記障害の処置において有益である。

40

【 0 0 6 9 】

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの薬物として用いるための血小板に關し、ここで増強した細胞生育および／または増殖が医学的障害の処置において有益であるような前記障害は、たとえば外傷性の影響によってもたらされたものなどの創傷、または血小板減少症を伴い得る障害である、手術後の創傷治癒妨害である。

【 0 0 7 0 】

したがって本発明はさらに、血小板のインピトロ投与によって、細胞表面と血小板との物理的相互作用を増強することによって、細胞生育および／または増殖を増強するためのインピトロの方法に関する。本発明の方法における血小板のインピトロの使用は、細胞表面と血小板との物理的相互作用の増強のために意図されるものである。本明細書に記載さ

50

れるインピトロの方法または使用は、血小板が部分的に活性化された血小板であることを特徴としてもよい。

【0071】

本発明の治療的適用の1つは、創傷治癒の処置である。たとえば糖尿病などの慢性疾患、たとえば肝炎またはAIDSなどの慢性感染症は、ときに創傷治癒の障害に関連する。これは、血小板減少症またはその他の疾患に関する細胞膜の変化によって血管が損傷したことによる不十分な血液供給によってもたらされ得る。創傷端縁の治癒における凝集性の細胞生育のための必要条件である血小板の可用性は、十分な量の血小板が創傷の端縁に到達できないときに細胞増殖を制限する問題であり得る。したがって、本発明には標的血小板輸血が含まれる。

10

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】生育するHeLa細胞の表面に対する血小板の選択的結合を示す図である。(A) 繰代後2日目の培養物。血小板は暗い点として示される。(B) 拡大図は細胞表面相互作用を示す。

【図2】HeLa生育実験を示す図である。細胞を1日1回30分間血小板と共にインキュベートし、その後洗浄して無血清培地でさらに培養するとき、無血清培地中で7日後にもなお細胞の分裂および生育が見出される。7日後の培養物中のほぼコンフルエントな未染色の生細胞を示す。矢印：有糸分裂の中期。付着血小板は明るい点として示される。

20

【図3】生育細胞が血小板に結合することを示す図である。ここでは第1継代におけるヒト初代皮膚線維芽細胞を示す。血小板は明るい点として示される。

【図4】皮膚線維芽細胞の時間を経た培養物を示す図である。乏しい血小板結合が示される。血小板は暗い点として示される。

【図5】未処置HeLa細胞、クローンS3を示す図である。血小板は暗い点として示される。

【図6】1U/mLのエノキサパリンで処理したHeLa細胞、クローンS3を示す図である。血小板は暗い点として示される。

【図7】1U/mLのダルテパリンで処理したHeLa細胞、クローンS3を示す図である。血小板は暗い点として示される。

【図8】1U/mLのチンザパリンで処理したHeLa細胞、クローンS3を示す図である。血小板は暗い点として示される。

30

【図9】LMWヘパリンは血小板が生育細胞に結合することを阻害することを示す図である。顕微鏡分析の定量化。0値は、細胞培養物への血小板の添加のない細胞に関する。正の対照は、LMWヘパリンの添加のない血小板結合を示す。エラーバーは、3つ組で行われた実験の標準偏差に関するものである。

【図10】0.1ug/mLのPPSで処理したHeLa細胞、クローンS3を示す図である。血小板は暗い点として示される。

【図11】硫酸化GAGのPPSおよびDXSによる、生育細胞への血小板結合の阻害を示す図である。顕微鏡分析の定量化。エラーバーは、3つ組で行われた実験の標準偏差に関するものである。硫酸化GAGのPPSおよびDXSによる、生育細胞への血小板結合の阻害は、0.1ppmのPPSまたはDXSによっておよそ75%に達し、1ppmによって95%より高くなる。

40

【図12】生育細胞への血小板結合に対する、高硫酸化および低硫酸化GAGの比較を示す図である。ダナパロイド(オルガラン)(正方形)は、血小板と細胞表面との相互作用に対する阻害効果を示すが、高硫酸化PPS(菱形)よりも程度が低い。

【発明を実施するための形態】

【0073】

本発明は、血小板の細胞への結合が細胞生育および/または増殖に関連するという発見に関する。血小板は、細胞生育周期に存在する細胞に結合する。生育細胞の表面への血小板結合の、薬物が介在する変更は、好ましくはインピボだがインピトロにおいても細胞生

50

育に影響し得る。

【0074】

悪性の癌性の細胞生育、またはあらゆるその他の制御されない細胞生育が存在するようなあらゆる所与のシナリオにおいて、本発明が適用されてもよい。加えて本発明は、発生期の制御された細胞生育または制御されない細胞生育が医学的徵候において機能的な役割を果たすような、任意の医学的状態において適用されてもよい。その例は、正常または病的な免疫応答におけるエフェクター細胞のクローニング増殖、たとえば回腸末端炎（クローニング病）を引き起こす腸粘膜内の病的免疫細胞の細胞生育など、またはたとえば骨髄抑制の後の骨髄などにおける細胞および器官の再生を含む。

【0075】

10

本発明によって、本明細書に記載される相互作用の薬理学的修正が提供される。本明細書に記載される調節のために好適な材料は、血小板の表面または細胞分裂しようとする細胞の表面に結合した後に、細胞表面 - 血小板の相互作用の調節をもたらすような材料である。

【0076】

特に興味深い化合物は、外側の細胞膜に関連することが公知である化合物、たとえばいわゆる細胞表面グリカンに属するものなどである。これらの化合物はしばしばタンパク質スキャフォールドに結合することによって、糖タンパク質を形成する。

【0077】

20

本発明に関して、「細胞生育」および「増殖」という用語の両方が用いられており、かつ互いに交換可能に用いられることがある。医学、特に腫瘍学において、細胞生育という用語はしばしば（例、腫瘍の成長による）細胞数の増加に関して用いられる。腫瘍の成長は、腫瘍細胞の増殖の増加によってもたらされる。単一細胞の体積の増加の規模での細胞生育も、この定義に含まれる。好ましい実施形態において、本発明は細胞増殖の調節に関する。細胞生育または細胞増殖は、細胞の移動（場所の変更）に関する腫瘍細胞の転移とは区別され得る。転移および増殖は腫瘍の異なる局面を表すものであり、異なる臨床的徵候として示され得る。

【0078】

30

「血小板（栓球）と前記細胞の表面との物理的相互作用」という用語は、前記血小板と細胞とがインビトロでともに存在したときに偶然起こり得るものよりも高い頻度または強度の、血小板と細胞表面とのあらゆる所与の物理的相互作用または結合に関するものである。好ましい実施形態において、前記相互作用は、たとえば共培養またはインキュベーション、洗浄（好ましくは2回から4回）、ならびにその後の固定および識別などの、本明細書に記載される方法を実行することによって定義および調査できる。

【0079】

本明細書において用いられる「グリコサミノグリカン」という用語は、好ましくはアミノヘキソース単位を含むオリゴ糖または多糖を示す。硫酸化グリコサミノグリカンは、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ペントサンポリ硫酸（PPS）、およびデキストランポリ硫酸（DXS）を含むが、それらに限定されない。

40

【0080】

「ヘパリン」という用語は、未分画ヘパリンおよび低分子量を有するヘパリンを含む。一実施形態において、本発明に従って用いられるヘパリンは「未分画ヘパリン」（UFH）であり、これは約8kDaから約30kDa、好ましくは約10kDaから約20kDa、最も好ましくは約12kDaから約16kDa、たとえば約15kDaなどの平均分子量を有してもよい。

【0081】

加えて「ヘパリン」という用語は、天然に生じるヘパリンから切断および単離によって得られるか、または合成経路による、ヘパリン分子の低分子量フラグメントをも含む。

【0082】

50

別の実施形態において、この発明に従って用いられるヘパリンは低分子量ヘパリン (low molecular weight heparin : LMWH) である。LMWHは8000Da未満の平均分子量を有するヘパリンまたはヘパリン塩であり、すべての鎖の少なくとも60%は8000Da未満の分子量を有する。低分子量ヘパリンは当該技術分野において一般的に認められた用語であり、当業者にはさらなる説明は必要ない。LMWHは、UFHほど頻繁に血小板減少症を引き起こさない。LMWHが血小板に結合する能力は実質的に低減している。

【0083】

好ましくは、本発明に従って用いられるLMWHの分子量は約2kDaから約8kDa、より好ましくは約3kDaから約6kDa、最も好ましくは約4kDaから約5kDa、たとえば約4.5kDaなどである。LMWHは、重合体ヘパリンの分画または脱重合のさまざまな方法によって得ることができる。

10

【0084】

LMWHの例は、アルデパリン(ノルミフロ)、セルトパリン(サンドパリン)、エノキサパリン(ロベノックスおよびクレキサン)、パルナパリン(フルクサム)、チンザパリン(イノヘップおよびロギパリン)、ダルテパリン(フラグミン)、レビパリン(クリバリン)、およびナドロパリン(フラキシパリン)を含むが、それらに限定されない。

【0085】

アルギネートは、典型的にナトリウム塩として抽出される。モノマー単位は、好ましくはLグルコネート(guluronate:G)およびDマヌロネート(mannuronate:M)であってもよい。重合単位は、Gブロックのホモポリマー、Mブロックのホモポリマー、およびG/Mブロックのヘテロポリマーを含んでもよい。天然アルギネートは一般的に、好ましくはマンヌロン酸および/またはグルロン酸による、交互になったホモポリマーおよびヘテロポリマー部分を含む規則的な繰り返し構造を有さない。アルギネートは構造的構成要素または保護バイオフィルムとして機能してもよい。

20

【0086】

アルギネートの硫酸化は、FTIR(フーリエ変換赤外分光法(Fourier-transform infrared spectroscopy))、HR-ICP-MS(高分解能質量分析法および誘導結合プラズマ(high resolution mass spectrometry and inductively coupled plasma))、および¹³C-NMR(NMR、核磁気共鳴(nuclear magnetic resonance))、およびSEC-MALLS(多角度レーザー散乱検出による分子ふるいクロマトグラフィー(size-exclusion chromatography with multi-angle laser scattering detection))によって確認されてもよい。アルギネート分子は、たとえば重硫酸ナトリウムおよび硝酸ナトリウムの水溶液から調製される(N(SO₃Na)₃)などの硫酸化剤、またはホルムアミドにおけるクロロスルホン酸(chlorosulfonic acid)処理を用いることなどによる、当業者に公知の方法によって硫酸化されてもよい。

30

【0087】

フコイダンは、たとえばモズク、コンブ、ヒバマタ、ワカメ、およびヒジキなど、褐藻類および褐海藻のさまざまな種に主に見出される硫酸化多糖(MW:平均20,000)である。フコイダンの変形は、ナマコを含む動物種にも見出されている。フコイダンは、いくつかの栄養補助食品製品の成分として用いられる。フコイダンには少なくとも2つの公知の異なる形がある。すなわち、>95%がフコースの硫酸化エステルで構成されるF-フコイダン、および約20%がグルクロン酸であるU-フコイダンである。

40

【0088】

本明細書において用いられる「硫酸化度」という用語は、単糖単位当りの硫酸基(-OSO₃)の数を示す。文献の他の出典においては、硫酸化度が二糖単位当りの硫酸基(-OSO₃)の数として与えられていることがあるが、本発明の定義は単糖単位当りの硫酸

50

の数に関する。いくつかのGAGは、二糖ポリマーではなく単糖ポリマーとして存在する。一貫した硫酸化度測定値を提供するために、単糖単位当りの硫酸化度を用いており、それに従って二糖単位に対する硫酸化度を調整している。

【0089】

あらゆる所与の多糖またはGAGの硫酸化は、その全体がここに引用により援用される米国特許出願公開第20050119469号に記載される糖硫酸化法に従って変更されてもよい。

【0090】

硫酸化度は、たとえばザイア(Zaia)ら(BioMed Research International)、第2014卷(2014)、論文ID 986594に開示される技術、または質量分析を用いたその他の関連する方法など、当業者に公知の技術によって定められてもよい。

【0091】

ヘパリンは、ヘパラン硫酸(0.3~0.7)硫酸/単糖よりも高い硫酸化度(1~3硫酸/単糖、好ましくは1.5または2)を示す。

【0092】

【表1】

表1. グリコサミノグリカンおよび硫酸化度(ワン(Wang)、カレント・アナリティカル・ケミストリー

(Curr Anal Chem.) 2012年10月1日;8(4): 506-511より補正)。

GAG	糖1	硫酸	糖2	硫酸	硫酸化度
ヒアルロナン	GlcNAc	無し	GlcA	無し	0
コンドロイチン	GalNAc	無し	GlcA	無し	0
コンドロイチン硫酸	GalNAc	4Sまたは6S	GlcA	無し	0.5
デルマタン硫酸	GalNAc	4S	IdoAまたはGlcA	無し	0.5
ヘパロサン	GlcNAc	無し	GlcA	無し	0
ヘパラン硫酸	GlcNAc またはNS	無しまたは 6Sまたは3S	GlcA	無しまたは 2S	0.5
ヘパリン	GlcNSまたは GlcNAc	6S±3S	IdoAまたは GlcA	2S	1.5
N-スルホヘパロサン	GlcNS	無し	GlcA	無し	0.5
低硫酸化ヘパリン	GlcNSまたは GlcNAc	無しまたは6S または3S	GlcAまたは IdoA	無しまたは 2S	1

【0093】

10

20

30

40

50

表1における硫酸化度は、各GAGの単糖単位における硫酸の平均数である。示されるGAGは二糖GAGであるが、硫酸化度は单糖GAGに対して調整されている。略称は、GalNAc、N-アセチル-D-グルコサミン；GalNAc、N-アセチル-D-ガラクトサミン；GalNS、N-スルホ-D-グルコサミン；GalA、-D-グルクロン酸；-L-IdoAイズロン酸；およびS、スルホである。

【0094】

オーソ・マクニール・ファーマスティカル(Ortho-McNeil Pharmaceutical)によってエルミロン(Elmiron)の名称で販売されているペントサンポリ硫酸(PPS)は、有痛性膀胱症候群としても公知である間質性膀胱炎(interstitial cystitis: IC)の処置のための、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)によって認可された経口薬剤であり、ベン・ファーマ(bene Pharma)によってFibrezym(登録商標)およびPentosan polysulfat SP54(登録商標)の名称で販売されている。獣医学の分野において、ペントサンポリ硫酸はバイオファー・ム・オーストラリア(Biopharm Australia)によってカートロphen・ベット(Cartrophen Vet)の名称で販売されている。加えて、PPSはネイチャーベット・エキン(Naturevet Equine)およびアースロペン(Arthroopen)の名称でも販売されている。PPSの抗凝固活性は、ヘパリンの1/15である。PPSは高硫酸化された半合成多糖であり、ヘパリンよりも高い負電荷密度および硫酸化度を有する。他のグリコサミノグリカンと同様に、PPSの構造的および化学的特性は、薬物の内皮への結合を促進する。PPSは典型的に、グルコシル残基当たり1.5硫酸基よりも高い硫酸化度を示す。

【0095】

デキストラン硫酸(DXS)は、クロロスルホン酸によるデキストランのエステル化によって生成されるデキストランのポリアニオン誘導体である。DXSはd-グルコースの分岐鎖多糖ポリマーであり、透水性であり、かつ粘着性のゼラチン質の材料を形成する。硫黄含有量は約17%であり、これはデキストラン分子のグルコシル残基当たり平均1.9硫酸基に相当する。

【0096】

すべての正常な組織は、その生育を制御する1つまたはそれ以上の内在性機構を有する。組織は標準状態であってもよく、すなわち二倍体核のみを有するほぼ休止状態であってもよい。生育(増殖)する組織は、細胞生育のために必要なDNA合成の結果として増加したDNA含有量を有する付加的な核を有する。こうした組織は、顕微鏡的に可視の細胞分裂の量が増加する傾向がある。

【0097】

細胞生育は、胚形成、小児期および青年期の間、または器官の機械的もしくは有毒な病変の後の器官の生育、ならびに正常または病的な免疫応答、および癌性組織に関係するがそれらに限定されず、さらに通常は粘膜、皮膚細胞および骨髄の持続的な生育としても存在する。

【0098】

生育機構の不完全な制御の結果もたらされる疾患及び障害の例は、以下のものに関する。

- 悪性細胞生育、特に腫瘍の成長、
- たとえば骨髄、結合組織、上皮などの組織の再生、
- 免疫応答の調節(自己免疫疾患)。

【0099】

本発明に従うと、本明細書において用いられる「癌」または「増殖性障害」とは、悪性に変化した内在性細胞の制御されない生育および/または広がりを特徴とする増殖性の疾患または障害のグループである。

【0100】

10

20

30

40

50

本明細書において用いられる癌とは、冒された組織の生育制御機構の変化によって引き起こされるあらゆる所与の細胞腫、たとえば外胚葉の組織から生じるもの、すなわち皮膚、乳房、神経系の癌など、およびたとえば中胚葉の組織から生じるもの、すなわち骨、軟骨、筋肉、腎臓の癌、リンパ腫または白血病、胚細胞腫瘍など、および内胚葉の組織から生じるもの、すなわち肝臓、脾臓、甲状腺、肺、胃、腸および膀胱の癌などに関するものであってもよい。

【0101】

癌の例は、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病、多発性骨髓腫、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、ウィルムス腫瘍、精巣癌、軟部組織肉腫、膀胱癌、慢性顆粒球性白血病、原発性脳癌、悪性黒色腫、小細胞肺癌、胃癌、結腸癌、骨肉腫、脾臓癌、急性顆粒球性白血病、ヘアリーセル白血病、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、カポジ肉腫、尿生殖器癌、甲状腺癌、食道癌、腎細胞癌、子宮内膜癌、本態性血小板増加症、副腎皮質癌、皮膚癌、および前立腺癌を含むが、それらに限定されない。さらに、たとえば良性前立腺肥大症、家族性腺腫症ポリープ病 (familial adenomatosis polyposis : FAP)、乾癬、アテローム性動脈硬化に関する血管平滑細胞増殖、肺線維症、ケロイド過多症、糸球体腎炎、ならびに術後の狭窄症および再狭窄症などの、特定の細胞増殖障害が本発明に包含される。

【0102】

本発明に従うと、本明細書において用いられる「自己免疫障害」または「自己免疫疾患」とは、個体自身の組織に向けられた体液性もしくは細胞性またはその両方の病的免疫応答およびその結果もたらされる状態から生じる疾患または障害のグループである。

【0103】

自己免疫疾患または障害の例は、急性および慢性のリウマチ様疾患、たとえばリウマチ熱、関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎、および強直性脊椎炎など、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、皮膚の急性および慢性自己免疫疾患、たとえば蕁麻疹、皮膚筋炎、中毒性表皮壊死症、強皮症、多発性硬化症、壞疽性膿皮症、結節性紅斑、全身性エリトマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) など、アレルギー状態、たとえば喘息など、ならびに自己免疫性の胃腸管および内分泌障害、たとえば潰瘍性大腸炎、クローン病、糖尿病、橋本甲状腺炎、自己免疫性拡張性心筋炎、閉塞性血栓血管炎 (thrombangitis obliterans) などの自己免疫性脈管炎、および筋炎など、自己免疫性貧血および自己免疫の形の骨髄癌 (myelophthysis)、特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP)、ならびに腎臓の自己免疫疾患、たとえば急性および慢性の糸球体腎炎などを含むが、それらに限定されない。

【0104】

本明細書において用いられる「薬学的に許容できる担体」とは、当業者に公知のさまざまな担体のいずれかを意味する。いくつかの日常的に使用される医薬担体を利用する以下の送達系は、即時組成物を投与するために考えられる多くの実施形態を単に代表するものである。

【0105】

注射可能な薬物送達系は、溶液、懸濁物、ゲル、微粒子、および重合体注射剤を含み、かつたとえば溶解度を変える薬剤（例、エタノール、プロピレン glycol およびスクロース）およびポリマー（例、ポリカプリラクトンおよび P L G A ）などの賦形剤を含み得る。埋め込み型の系はロッドおよびディスクを含み、たとえば P L G A およびポリカプリラクトンなどの賦形剤を含有し得る。

【0106】

経口送達系は、錠剤およびカプセルを含む。これらは、たとえば結合剤（例、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン (polyvinyl pyrrolidone)、その他のセルロース材料およびデンプン）、希釈剤（例、ラクトースおよ

10

20

30

40

50

びその他の糖、デンプン、リン酸二カルシウム、およびセルロース材料)、崩壊剤(例、デンプンポリマーおよびセルロース材料)、および潤滑剤(例、ステアリン酸塩およびタルク)などの賦形剤を含有し得る。

【0107】

経粘膜送達系はパッチ、錠剤、坐剤、ペッサリー、ゲル、およびクリームを含み、かつたとえば可溶化剤および賦活薬(例、プロピレングリコール、胆汁酸塩およびアミノ酸)、ならびにその他の媒介物(例、ポリエチレングリコール、脂肪酸エステルおよび誘導体、ならびにヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびヒアルロン酸などの親水性ポリマー)などの賦形剤を含有し得る。

【0108】

経皮送達系は、たとえば水性および非水性のゲル、クリーム、複数のエマルション、マイクロエマルション、リポソーム、軟膏、水性および非水性の溶液、ローション、エアロゾル、炭化水素基剤および粉末などを含み、かつたとえば可溶化剤、浸透賦活薬(例、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪アルコール、およびアミノ酸)、および親水性ポリマー(例、ポリカルボニルおよびポリビニルピロリドン)などの賦形剤を含有し得る。一実施形態において、薬学的に許容できる担体は、リポソームまたは経皮賦活薬である。

【0109】

再構成可能な送達系に対する溶液、懸濁物および粉末は、たとえば懸濁剤(例、ゴム、キサンタン(zanthans)、セルロースおよび糖)、湿潤剤(例、ソルビトール)、可溶化剤(例、エタノール、水、PEG、およびプロピレングリコール)、界面活性剤(例、ラウリル硫酸ナトリウム、スパン(Spans)、ツイーン(Tweens)、およびセチルピリジン)、保存剤および酸化防止剤(例、パラベン、ビタミンEおよびC、ならびにアスコルビン酸)、固化防止剤、コーティング剤、およびキレート剤(例、EDTA)などの媒介物を含む。

【0110】

したがって本発明は、上述の医薬組成物の1つの薬学的に有効な量を対象に投与するステップを含む、対象にグリコサミノグリカンを経口送達するための方法を提供する。

【0111】

本発明の医薬組成物は、治療上有効な用量で患者に投与され、治療上有効な用量とは、耐えられない有害な副作用を生じる用量に到達することなく、処置される状態または徴候の重症度または広がりを防止または減少させる所望の効果を生じるために十分な用量を意味する。正確な用量は、たとえば徴候、調合物、投与のモードなどの多くの要素によって決まり、それぞれの徴候の各々に対して前臨床および臨床試験において定める必要がある。

【0112】

上に示した状態の処置においては、1日当たり体重1キログラム当り約0.01mgから約500mgの硫酸化多糖の用量レベルが有用である。たとえば、細胞増殖障害は、1日当たり体重1キログラム当り約0.01mgから100mgの化合物の投与(1日当たり患者当り約0.5mgから約3.5g)によって効果的に処置され得る。単一用量形状を生成するために担体材料と組み合わせ得る活性成分の量は、処置されるホストおよび投与の特定のモードに依存して変動する。たとえば、ヒトへの経口投与が意図される調合物は、合計組成物の約1%から約95%まで変動してもよい。用量単位形状は、一般的に約1mgから約500mgの活性成分を含有する。しかし、あらゆる特定の患者に対する特定の用量レベルは、使用される特定の化合物の活性、年齢、体重、全般的健康、性別、投与の食事時間、投与経路、排出の割合、薬物の組み合わせ、および治療を受ける特定の疾患の重症度を含むさまざまな要素によって決まることが理解されるだろう。本発明に従う化合物の用量有効量は、特定の化合物、毒性、および阻害活性、処置される状態、および化合物が単独で投与されるか、他の治療とともに投与されるかを含む要素に依存して変動する。典型的に、用量有効量は約0.0001mg/kgから1500mg/kg、より好ましくは1mg/kgから1000mg/kg、より好ましくは約1mg/kgから150m

10

20

30

40

50

g / kg 体重、および最も好ましくは約 10 mg / kg から 100 mg / kg 体重の範囲にわたる。

【0113】

たとえばシュワルツ (Schwartz) ら (Journal of Surgical Research)、第 86巻、1号、1999年9月、24-28頁) などにおいて、PPS 投与が行われた動物モデルは典型的に、同種移植片生着の増強のための処置の際に、10 mg / kg から 30 mg / kg 体重の PPS を用いた。

【0114】

本発明はさらに、上述の病理学的状態の処置のためのプロセスまたは方法にも関する。本発明の化合物は予防的または治療的に、好ましくは前述の障害に対して有効な量が、こうした処置を必要とするたとえばヒトなどの温血動物に投与されてもよく、化合物は好ましくは医薬組成物の形で用いられる。

10

【0115】

図面によって、本発明をさらに説明する。これらの図面が本発明の範囲を制限することは意図されない。

【実施例】

【0116】

以下の実施例によって、本発明をさらに説明する。これらの実施例が本発明の範囲を制限することは意図されない。実験例は、さまざまな細胞型および前記細胞の表面に対する血小板の付着の定性的および定量的な顕微鏡分析に関する。さまざまなグリコサミノグリカン、および血小板結合に対するそれらの効果を評価している。

20

【0117】

以下の実施例において用いる方法を下に説明する。本明細書において概説する血小板と細胞との相互作用の決定のためのプロセスは、テスト物質が生育細胞の表面への血小板結合を防止できるかどうか、およびどの濃度で防止できるかを調べるために好適である。さらに、細胞への血小板結合を阻害できる物質の濃度を定めるためのバイオアッセイとして、この方法を使用できる。

【0118】

実施例の概要

30

実施例 1：細胞の表面への血小板結合に関する HeLa 細胞および皮膚線維芽細胞の顕微鏡分析 (図 1 から図 4)。

実施例 2：生育細胞の表面への血小板結合の阻害に関する低分子量 (LMW) ヘパリンの分析 (図 5 から図 9)。

実施例 3：生育細胞の表面への血小板結合の阻害に関するフォンダパリヌクスおよびダナパロイドの分析。

実施例 4：生育細胞の表面への血小板結合の阻害に関する硫酸化 GAG のペントサンポリ硫酸 (PPS) およびデキストランポリ硫酸 (DXS) の分析 (図 10 および図 11)。

実施例 5：高硫酸化および低硫酸化 GAG の間の、血小板結合に対する GAG の比較分析 (図 12)。

40

【0119】

実施例の詳細な説明

実施例 1

図 1 に示すとおり、HeLa 細胞は血小板に対する特異的な結合能力を有することを確認した。HeLa 細胞への血小板の結合は、細胞培養プレートの表面への結合よりも 20 倍から 100 倍高かった。以下に説明するとおりに血小板を調製し、説明のとおりに培養物中の細胞に適用した。

【0120】

図 2 は、細胞に 1 日 30 分間血小板を提供すれば、HeLa 培養に対して無血清培地を

50

使用してもよいことを示す。細胞に毎日血小板を接触させる期間が短いことは、増殖をわずかに低減させる。この実験は、インビトロで別様では必要とされる血清の補充に代わって、血小板が細胞増殖を維持できることを示す。

【0121】

図3および図4は、皮膚線維芽細胞が自身の生育期に依存してその表面で血小板と結合することを示す。培養物中で増殖している線維芽細胞は、もっと古い培養物中の線維芽細胞よりも顕著に多くの血小板と結合している。初代のヒト皮膚線維芽細胞N H D Fは、調査したH e L a細胞と同様に最初の対数増殖期において血小板と結合するが、H e L a細胞よりも程度が幾分低い。N H D Fの血小板結合の減少に付随して増殖が減少することは、正常な初代細胞の増殖においても血小板が重要であることを示す。G 0期の細胞のパーセンテージが高くなることは、血小板受容体の数のダウンリギュレーションに関連する。これは、血小板自身が増殖刺激の伝達を開始できることを示す。これは悪性化の決定的現象となり得る。このことは、いくつかの細胞が常時存在しない血小板受容体を誘導することによって細胞周期に入ることに類似し得る。したがって、血小板結合は増殖誘導シグナル伝達をもたらす。

【0122】

実施例2

加えて、0.1U / mLに相当するエノキサパリン、ダルテパリン、およびチンザパリンがH e L a細胞への血小板の結合をほぼ完全に阻害したことを示すことができた(図5から図9)。0.01U / mLの濃度でも細胞への血小板結合の顕著な低減が起こった。

【0123】

実施例3

しかし、重合グリコサミノグリカンヘパリンの化学的または酵素的切断の後に単離できる5モノマー糖単位に対応する合成五糖であるフォンダパリヌクスは、H e L a細胞への血小板結合を顕著に阻害できなかった。さらに、ヘパリンとは化学的に異なる抗凝固薬であるダナパロイド(オルガランとしても公知である)による処理は、血小板と細胞表面との相互作用の阻害に対して顕著に低い効果を示した。

【0124】

ダナパロイドを治療域の上限の約5倍の1.25U / mLにて適用するとき、対照測定(15.9+/-7.7血小板/細胞)と、ダナパロイド処理(13.2血小板/細胞)との間に有意差は見出されない。

【0125】

ヘパリンおよびいくつかの他の抗凝固薬は過剰に強い抗凝固効果を有し、重篤な出血合併症を起こし得るという不利益を有し、これは主に前述の凝固因子X aの阻害に起因するものである。ヘパリンの抗凝固効果の最も重要な要素は、凝固因子X aを不活性化する硫酸化五糖である。しかし、前述の五糖は生育細胞への血小板結合を阻害しない。

【0126】

興味深いことに、ダナパロイドはヘパリン(典型的に1から2)よりも低い硫酸化度(典型的に0.4から0.6)を示す。同様に血小板結合の阻害剤として顕著に効果が低かったのは、他の低硫酸化コンドロイチン硫酸G A G、たとえばデルマタン硫酸およびヘパラン硫酸などであった。

【0127】

実施例4

ペントサンポリ硫酸(PPS)は植物製品であり、ナトリウム塩またはカルシウム塩として製造される。PPSは典型的にヘパリンの抗凝固活性の1/10未満を有し、間質性膀胱炎の処置に用いられており、獣医学においては関節疾患、特に関節炎の形状に対して用いられる。デキストランポリ硫酸(DXS)も、通常は他の物質と組み合わせて関節痛を処置するために用いられる。

【0128】

図10および図11に示すとおり、PPSおよびDXSは、どちらも血小板と増殖する

10

20

30

40

50

細胞の表面との物理的相互作用の再現性ある阻害を示す。

【0129】

実施例5

図12に示すとおり、ダナパロイドによる細胞培養物の処理をPPSと直接比較したものは、細胞表面への血小板結合の妨害に関するこれら2つの分子の明瞭な差を示す。

【0130】

方法

生育細胞の血小板結合を評価するためのプロセスは、末梢血からの血小板の単離と、その後の2回の洗浄および細胞沈降を含む。これらの洗浄は血小板の部分的活性化を含み、これは血小板のヘパリンとの相互作用に関連する。調査する細胞とのインキュベーションは、血小板の完全な活性化に近づく条件下で起こり、それは血小板に塊を形成する。これは分析を妨げる。したがって、アッセイに低濃度のEDTAを加える。適切なソフトウェアを用いて、すなわちオープンソースプログラムImageJのマクロによって、血小板の定量化と、細胞の表面部分およびバックグラウンドの算出とを行う。

10

【0131】

血小板単離手順

血小板単離のためにさまざまな方法を利用できる。以下の方法が好ましい。

【0132】

発明者による実験は、結果的に血小板の粘性の変態を最終的に導く血小板の活性化が、2段階で起こり得ることを示した。第1の段階は血小板の顕著な形態変化を伴わないが、血小板の外表面の外観にわずかな変化をもたらす。これらの血小板を「部分的に活性化された血小板」と呼ぶ。細胞表面の受容体に結合する能力を最適化するための、本明細書に記載される付着テストのためにこの変化は重要である。

20

【0133】

最初に、ブレーキを有さない遠心機内で血液サンプルを190×Gにて7分間遠心分離する。これによって血漿と赤血球とを分離する。遠心分離の間に、1mlのPBS-EDTAを伴う10mlチューブを準備する。血小板に富む血漿を、準備したチューブにピペットで移す。必要であればEDTA-PBS補充を行う。最終混合物は、1:1のEDTA-PBSおよび血漿となるべきである。

【0134】

30

血漿から血小板を分離するために、血小板を含有する血漿を遠心分離する。265~275×Gにて遠心分離を行う。この持続時間は、使用するチューブのサイズによって決まる（たとえば、直径16mm×長さ100mm；270×Gにて15分間の遠心分離）。

【0135】

結果として得られる沈降物はかなり緩い。上清を捨てる。血小板沈降物を非常に少量の緩衝液混合物とともに3分間置き、穏やかに振とうすることによってほぐす。次の緩衝液混合物に血小板を再懸濁する。

2mLの1:1v/vハンクス平衡塩類溶液(Hank's Balanced Salt Solution: HBSS)ならびにCaおよびMg、ならびにCaおよびMgを伴わない緩衝溶液。後者の緩衝溶液は、CaおよびMgを伴わないHBSSであってもよいし、たとえばCaおよびMgなしで作製したダルベッコリン酸緩衝食塩溶液(Phosphate Buffered Saline Solution: PBS)であってもよい。前述の緩衝液混合物を0.02%EDTAで処理する。

40

【0136】

血小板の粘性の変態はCaおよびMgに依存する。試験のために、この変化を受けようとする血小板の傾向を低減すべきである。しかし、組織培養において維持するとき、細胞は完全にCaおよびMgを含まない環境で1時間のインキュベーションにも耐えられない。前述の混合物は血小板の前処理を緩衝するために十分であり、かつそれと同時に培養中の細胞の代謝機能のために十分なCaおよびMgを含有する。

【0137】

50

血小板懸濁物は、まだ付着テストのために最適な特性を得ていない。したがって血小板を265～275×Gにて15分間遠心分離することによって前処理する。緩衝液を捨て、ここで著しく固くなった沈降物を2mLの緩衝液混合物と混合して3分間置き、次いで穏やかに振とうすることによってほぐす。次いで遠心分離を繰り返し、血小板カウントを定める。

【0138】

付着実験（細胞表面への血小板結合）

ウイルスおよびマイコプラズマを含まないHeLa細胞、クローンS3、およびヒト皮膚線維芽細胞（NHD F）を、Promo Cell（ハイデルベルグ）から購入した。それらのヒト由来をSTR分析によって確認した。イーグルMEMおよび10%ウシ胎仔血清の中でHeLa細胞を維持した。NHD Fも10%ウシ胎仔血清を加えた RPMI 1640によって維持した。トリプシン-EDTA処理によって継代培養を行った。これらの細胞系を、25m1ボトルまたは3cmプレートにおいて維持した。

10

【0139】

実験に用いる細胞を標準プレートにおいて2日または3日間培養する。実験開始時に、プレート表面の約1/3が細胞で覆われている必要がある。その後培養プレートを上述の緩衝液混合物で洗浄し、さらなる緩衝液混合物で充填する。たとえば、30mmの培養皿を、2m1の37℃に予熱した緩衝液混合物と、上述の懸濁物から得た 3×10^7 の血小板とで充填する。

20

【0140】

血小板処理したプレートを37℃にて60分間インキュベートする。このインキュベーション中に、前処理された血小板が増殖細胞に付着する。しかし、G0期の細胞は、前処理された血小板にほとんどまたはまったく結合しない。このインキュベーションの段階のときに、血小板結合に対する効果が観察されるかどうかを検出するために、テストすべき物質を細胞培養緩衝液に加える。

【0141】

1時間のインキュベーション後に、遊離した水に浮遊する血小板が存在しなくなるまで（通常2から4洗浄）、室温にて上述の緩衝液混合物でプレートを洗浄し、直ちにグルタルアルデヒド（1%v/v、H2O中）によって固定する。

30

【0142】

評価は写真によって行う。この目的のために、画像分析プログラムImageJを適用する。細胞の記録細胞数に対する細胞結合血小板の数を定める。加えて、細胞に覆われた面積に対する細胞結合血小板の数を定めてもよい。

【0143】

写真の文書化

プレート当たり3つ組の固定の後に画像を生成する。位相差または明視野25×、16×または10×対物レンズを用いる。SOP IJに従って画像分析を行う。微分画像減算およびマスク最適化のために、オープンソースプログラムImageJを使用してもよい。その後、他のIJコンポーネントによって血小板数、細胞数および比例的細胞表面を定める。

40

【0144】

細胞増殖の阻害をテストするための細胞培養実験

付加的な実験は、血小板-細胞表面の相互作用に依存する細胞生育に対するインビオの要求を模倣する条件下で、硫酸化多糖、特にグリコサミノグリカンを投与することによって、細胞増殖の阻害が直接もたらされることを示す。細胞生育の阻害に関するPPSおよびDXSの有効性を調べるために、以下の実験を行ってもよい。

【0145】

実験期間：5日間。培地：血清を添加していないイーグルMEM。

【0146】

50

テストアプローチ：P P S または D X S を 1 . 0 、 0 . 1 μ g / m L 、および対照（最終濃度 0 μ g / m L ）。

【 0 1 4 7 】

H e L a 細胞をストックから培養する：1 0 4 細胞 / 2 5 c m 2 フラスコ、フックス - ローゼンタールチャンバ内で細胞数をカウントする。上述のとおりに血小板を調製する。

【 0 1 4 8 】

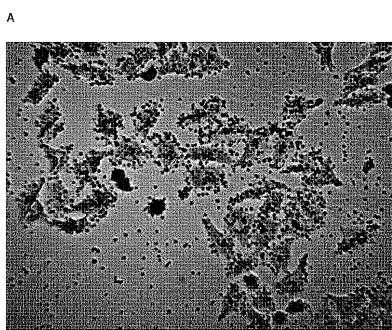
血小板と H e L a 細胞またはその他の腫瘍細胞系とを、阻害剤を伴うか、または伴わずに、1 日から 4 日間にわたり毎日 1 回 3 0 分間共インキュベートする。共インキュベーション後に細胞を上述のとおりに洗浄し、次いで標準的な培養条件下に置く。典型的に、1 日当りウェル当り 9 0 \times 1 0 6 の血小板をインキュベートする。

10

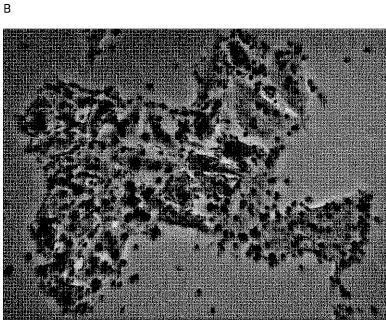
【 0 1 4 9 】

5 日目に、細胞を H B S S で洗浄し、写真撮影し、トリプシン処理し、上述のとおりに細胞数をカウントする。この実験アプローチは、毎日 3 0 分間の血小板とのインキュベーションによる増殖によって典型的に増加する細胞数の増加の程度が、3 0 分間のインキュベーションの際に血小板とともに D X S または P P S を共インキュベートするときには低減することを示す。

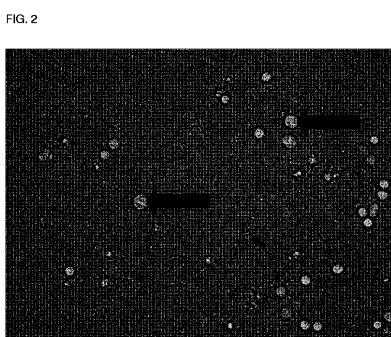
【 図 1 A 】



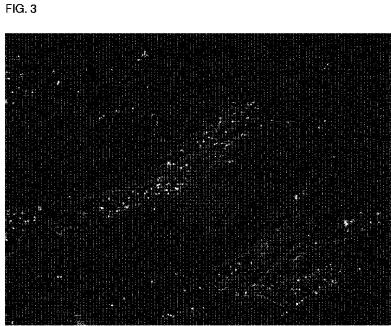
【 図 1 B 】



【 図 2 】

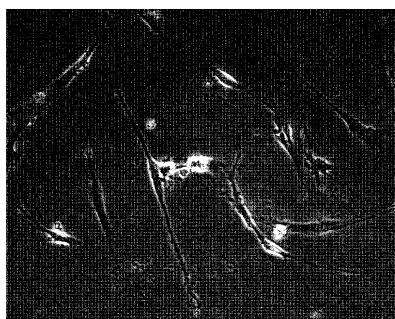


【 図 3 】



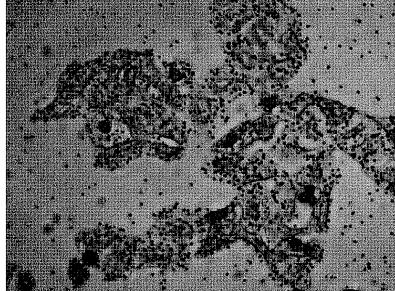
【図4】

FIG. 4



【図5】

FIG. 5



【図6】

FIG. 6



【図7】

FIG. 7



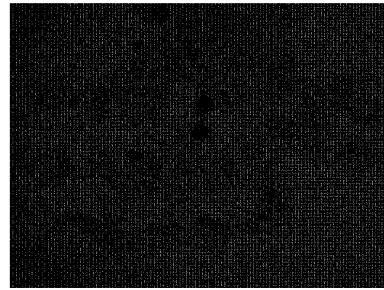
【図8】

FIG. 8

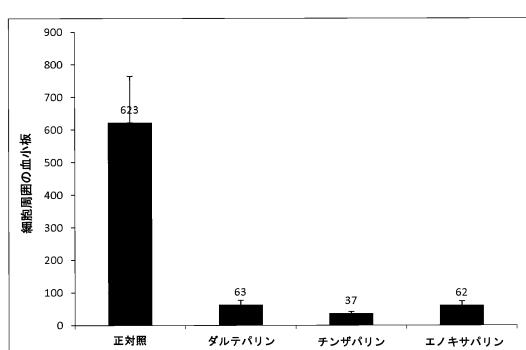


【図10】

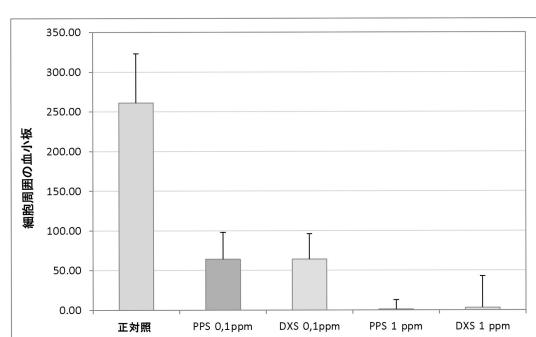
FIG. 10



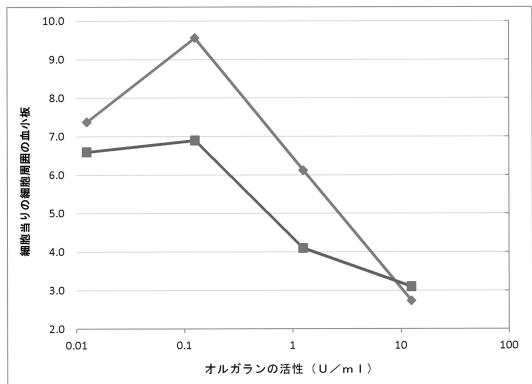
【図9】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

審査官 横田 優子

(56)参考文献 国際公開第2006/083328 (WO, A1)

特表2013-522172 (JP, A)

国際公開第2012/103588 (WO, A1)

Thrombosis Res., 2012, Vol.130, p.894-900

Can J Physiol Pharmacol., 2011, Vol.89, p.705-711

J Korean Chemical Society, 2002, Vol.46 No.2, p.151-156

J Neuroimmunol., 1998, Vol.90 Issue 1, p.57(313)

Acta Universitatis Carolinae Medica, 1985, Vol.31 No.3/4, p.243-245

Anticancer Res., 1993, Vol.13 No.6A, p.2143-47

Haemostasis, 1999, Vol.29 Suppl 1, p.48-60

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 45 / 00

A 61 K 31 / 737

A 61 K 35 / 00

A 61 P

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

CAP Plus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)