

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-525507

(P2007-525507A)

(43) 公表日 平成19年9月6日(2007.9.6)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 38/22 (2006.01)	A 61 K 37/24	4 C08 4
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 C08 6
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	121
A61K 31/337 (2006.01)	A 61 K 31/337	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2007-500893 (P2007-500893)	(71) 出願人	501139858 ザ ペン ステイト リサーチ ファンデーション アメリカ合衆国 ペンシルベニア 16802, ユニバーシティ パーク, オールド メイン 304
(86) (22) 出願日	平成17年2月21日 (2005.2.21)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成18年10月24日 (2006.10.24)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/005268	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02005/082397		
(87) 國際公開日	平成17年9月9日 (2005.9.9)		
(31) 優先権主張番号	60/548,021		
(32) 優先日	平成16年2月26日 (2004.2.26)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】オピオイド増殖因子レセプターを用いる、新生物の処置のための組み合わせ療法

(57) 【要約】

本発明は、キャリアおよび治療上有効な量の少なくとも1つの化学療法剤とともに生物治療的な内因性の、オピオイド増殖因子と呼ばれる、ペントペプチドM e t - エンケファリンからなる動物またはヒトにおける新生物を処置するための薬学的組成物に関する。また、このような処置の必要な動物またはヒトにおいて新生物形成を処置する方法が提供され、この方法は、キャリアおよび治療上有効な量の少なくとも1つの新生物形成処置因子、例えば、化学療法剤または放射線とともにオピオイド増殖因子からなる治療上有効な量の薬学的組成物の動物またはヒトに対する投与を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療上有効な量の少なくとも1つの新生物形成処置因子、オピオイド増殖因子およびキャリアを含むオピオイド増殖因子レセプターによって特徴付けられる、動物またはヒトにおける新生物形成を処置するための薬学的組成物。

【請求項 2】

前記新生物処置因子が、生物療法剤、化学療法剤、放射性医薬品または放射線療法のための薬剤を含む、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

前記因子が、分裂抑制因子、代謝拮抗剤、DNA架橋剤およびアルキル化剤からなる群より選択される、化学療法剤である、請求項1または2に記載の薬学的組成物。 10

【請求項 4】

前記因子が、ブスルファン、シスプラチン、カルボプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、デカルバジン(DTIC)、メクロレタミン(ナイトロジエンマスター)、メルファランカルムスチン(BCNU)ロムスチン(CCNU)、5-フルオロウラシル(5-FU)、カペシタビン、メトトレキセート、ゲムシタビン、シタラビン(arac)、フルダラビンダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、イダルビシン、ミトキサントロン、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド(VP-16)、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビンブレドニゾン、デキサメタゾン、タモキシフェン、フルベストラント、アナストロゾール、レトロゾール、酢酸メゲステロール、ビカルタミド、フルタミド、ロイブロリド、ゴセレリン、L-アスパラギナーゼ、およびトレチノインからなる群より選択される化学療法剤である、請求項1~3のいずれかに記載の薬学的組成物。 20

【請求項 5】

静脈内投与のために処方され、かつオピオイド増殖因子を約20~1000μg/kg体重の用量で送達し得る、請求項1~4のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

静脈内投与のために処方され、かつオピオイド増殖因子を約100~400μg/kg体重の用量で送達し得る、請求項5に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

化学療法剤を含む、請求項1~6のいずれか1項に記載の薬学的組成物であって、該組成物は、静脈内投与のために処方され、かつ化学療法剤を約20~3000mg/m²の用量で送達し得る、薬学的組成物。 30

【請求項 8】

静脈内投与のために処方され、かつ化学療法剤を約100~1000mg/m²の用量で送達し得る、請求項7に記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

前記新生物形成が、膵臓癌、扁平上皮細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、腎臓癌、脳腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、骨肉腫、関節の癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、多発性骨髄腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、白血病、肺癌、卵巣癌、消化管癌、カポジ肉腫、肝臓癌、咽頭癌および喉頭癌からなる群より選択される、請求項1~8のいずれか1項に記載の薬学的組成物。 40

【請求項 10】

オピオイド増殖因子レセプターによって特徴付けられる新生物形成を、このような処置の必要な動物またはヒトにおいて処置するための方法であって、少なくとも1つの新生物処置因子およびオピオイド増殖因子の治療上有効な量を該動物またはヒトに投与する工程を包含する、方法。

【請求項 11】

前記新生物形成処置因子が、放射線療法のための因子である、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記新生物形成処置因子が生物治療的な因子である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記新生物形成処置因子が化学療法剤である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記新生物形成処置因子が放射性医薬品である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記新生物形成処置因子が、ゲムシタビン、パクリタキセル、カルボプラチニンおよび 5 - フルオロウラシルからなる群より選択される化学療法剤である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記オピオイド増殖因子が、1日あたり約 20 ~ 1000 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 体重で静脈内投与される、請求項 10 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記オピオイド増殖因子が、1日あたり約 100 ~ 400 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 体重で静脈内投与される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記新生物処置因子が、約 10 ~ 60 分の期間にわたって、約 20 ~ 3000 mg / m^2 で静脈内投与される化学療法剤である、請求項 10 、 13 および 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記化学療法剤が、約 10 ~ 60 分の期間にわたって、約 100 ~ 1000 mg / m^2 で静脈内投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記化学療法剤が、少なくとも 3 週間の期間にわたって、少なくとも週に 1 回投与される、請求項 18 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記オピオイド増殖因子が、新生物処置因子と同時に投与される、請求項 10 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記オピオイド増殖因子が、新生物処置因子と連続して投与される、請求項 10 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも 1 つの新生物処置因子またはオピオイド増殖因子が、移植された浸透圧ポンプによって、または経皮パッチによって、非経口的に、静脈内に、筋肉内に、腹腔内に、皮下に投与される、請求項 10 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記新生物形成が、脾臓癌、頭頸部の扁平上皮細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、腎臓癌、脳腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、骨肉腫または関節の癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、多発性骨髄腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、白血病、肺癌、卵巣癌、消化管癌、カポジ肉腫、肝臓癌、咽頭癌および喉頭癌からなる群より選択される、請求項 10 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

パクリタキセルとともに有効量のオピオイド増殖因子とを投与する工程を包含する、該パクリタキセルの毒性を軽減する方法。

【請求項 26】

少なくとも 1 つの新生物処置因子の抗新生物効果を増大する方法であって、治療上有効な量のオピオイド増殖因子と組み合わせて該因子を新生物細胞に導入する工程を包含する、方法。

【請求項 27】

前記新生物処置因子が、ゲムシタビン、パクリタキセル、カルボプラチニンおよび 5 - フル

10

20

30

40

50

オロウラシル (5-FU) からなる群より選択される化合物学療法剤である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記組み合わせで観察された前記抗新生物の効果が、前記新生物形成処置因子単独の抗新生物効果よりも大きい、請求項 26 または 27 に記載の方法。

【請求項 29】

オピオイド増殖因子レセプターによって特徴付けられる新生物形成細胞を殺傷する方法であって、このような処置の必要な動物またはヒトにおいて、該動物またはヒトに対して、治療上有効な量の少なくとも 1 つの新生物形成処置因子およびオピオイド増殖因子を投与する工程を包含する、方法。

10

【請求項 30】

前記新生物細胞が、膵臓細胞または扁平上皮癌細胞である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記新生物処置因子が、ゲムシタビン、パクリタキセル、カルボプラチニンおよび 5-フルオロウラシル (5-FU) からなる群より選択される化学療法剤である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

20

本出願は、U.S.C. 119 条の下、2004 年 2 月 26 日に出願された仮出願番号第 60/548/021 号の優先権を主張し、この出願は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は概して、新生物の処置における使用のための治療用処方物に関する。さらに詳細には、本発明は、新生物を処置するための化学療法剤および生物療法剤からなる薬学的処方物に関する。生物療法剤とともに、化学療法および / または放射線のような新生物処置因子を組み合わせた処方を投与することによって新生物を処置するための方法も開示される。

30

【背景技術】

【0003】

(関連分野の説明)

癌は、米国における死亡の 2 番目の主要な原因であり、それを上回るのは心疾患しかない。アメリカ癌学会 (American Cancer Society) によれば、約 556,000 例のアメリカ人が、毎年癌によって死亡し、平均で毎日 1,500 例を超える癌死となる (非特許文献 1)。皮膚癌を含まない種々の癌のうち、肺癌が男性および女性の癌死の主要な原因であり ; 乳癌が女性の癌死の 2 番目に主要な原因であり ; 前立腺癌が男性の癌死の 2 番目に主要な原因であり、そして結腸直腸癌が、癌の 3 番目に高頻度に診断される形態である。

40

【0004】

膵臓癌は、膵臓癌の全ての段階について診断から 3 ~ 5 ヶ月未満という平均生存期間を有する最も致死的なヒトの癌である。(非特許文献 2)。5 年生存率は 3 % 未満である。手術、放射線および化学療法の処置努力にかかわらず、生存率は、不变のままであった。(非特許文献 2) 膵臓癌の頻度は、米国ではわずか 0.01 % であるが、膵臓癌は毎年 30,000 例を越える死亡に関連しており、これによって癌の死亡率に関して最も一般的となっている (非特許文献 1)。症候性の患者のうち約 85 ~ 90 % が、診断時点での局所浸潤または転移の結果として進行性の疾患を有しており、そしてこれらの個体についての予後は極めて不良である。(非特許文献 1)。処置にはある程度の進歩が達成されており、これには、手術、化学療法、放射線療法、免疫療法およびホルモン療法が含まれるが

50

、膵臓癌は、予防、診断、予後診断および治療に関して難解な課題のままである。

【0005】

診断の時点で、膵臓の腫瘍の約20%程度までが、外科手術によって取り除かれ得る（非特許文献3）。腫瘍が、膵臓に限定されるが取り除くことができない場合、放射線療法および化学療法の組み合わせが一般に行われる。腫瘍が他の器官、例えば肝臓に転移されている場合、通常は化学療法単独を用いる。標準的な化学療法はゲムシタビンであるが、他の薬物を用いてもよい。ゲムシタビンは本質的に、患者に対症的な改善しかもたらさない。

【0006】

頭頸部の癌は世界で6番目にランクする癌であり、開発途上国では3番目に最も一般的な新生物である。米国では、気道消化器の癌の頻度は、毎年約40,000例の新規な症例に上り、毎年11,000を超える死亡者数が記録される（非特許文献1）。頭頸部の癌のうち90%より多くが扁平上皮細胞癌（S C C H N）であり、口腔および咽頭がS C C H Nの最も一般的な部位であり、次が喉頭である。外科手術、放射線療法および化学療法、ならびにそれらの組み合わせが、全て処置のために考慮される。不幸にも、2年以内のS C C H Nの再発の機会は50%を超え、5年生存率は全ての部位および段階について約50%である。さらに、ここ25年間では、S C C H Nを有する患者の5年生存率は、感知できるほど変化しなかった（非特許文献1）。

【0007】

ペプチド増殖因子およびそれらのレセプターは、S C C H Nおよび膵臓癌に、ならびに多数の他の癌に関与している（非特許文献4）。膵臓癌およびS C C H Nにおいて発現されることが見出されたペプチドのうちいくつかとしては、上皮細胞増殖因子（E G F）、トランスフォーミング増殖因子 および 、塩基性線維芽細胞増殖因子（b F G F）、インスリン様増殖因子（I G F）、血小板由来増殖因子（P D G F）、およびケラチノサイト増殖因子（K G F）が挙げられる。

【0008】

ペプチドの一群である内因性オピオイドは、正常な、新生物の、再生中のおよび治癒中の組織の増殖において、ならびに原核生物および真核生物において重要であると考えられる（非特許文献5）。内因性のオピオイドペプチドであるM e t - エンケファリンは増殖過程に直接関与し、広範な細胞および組織において負の調節因子として機能する（非特許文献6）。このペプチドの機能（増殖）および分布（神経および非神経）を考慮して、このペプチドは、オピオイド増殖因子（O G F）と命名されている。

【0009】

癌の化学療法剤は、癌細胞への致死的な作用のために用いられる。不幸にも、このような薬物の2~3しか、癌細胞と他の増殖性細胞との間を識別しない。化学療法は一般には、いくつかの因子の同時、または計画した順序での使用を要する。化学療法処置プロトコールにおいて2つ以上の因子を組み合わせることによって：（1）薬物の最高可能用量；（2）種々の機構によって作用する薬物；（3）種々の毒性を有する薬物；および（4）耐性の発達の軽減；が可能になる。

【0010】

化学療法剤は主に、分裂またはD N A合成を受けている細胞に影響し、従って、緩徐に増殖する悪性細胞、例えば、肺癌または結腸直腸癌はしばしば、不応答性である。さらに、ほとんどの化学療法剤は狭い治療指数を有する。化学療法の最も有害な効果としては、嘔吐、口内炎および脱毛症が挙げられる。化学療法剤の毒性はしばしば、骨髄または検出から逃れる細胞（免疫抑制）、消化管（粘膜潰瘍）、皮膚および毛髪（皮膚炎および脱毛症）由来のような、この因子の毒性の影響に対して脆弱である、急速に増殖する細胞に対するその化学療法剤の影響の結果である。

【0011】

多くの強力な細胞毒性因子が、細胞周期の特定の段階で作用し（細胞周期依存性）、そして分裂の過程の細胞に対してのみ活性を有し、従って、D N A合成、転写または紡錘体

10

20

30

40

50

機能のような過程に特異的に作用する。他の因子は細胞周期非依存性である。従って、細胞毒性処置に対する感受性は、細胞のライフサイクルの種々の段階で変化し得、細胞周期の特定の段階にある細胞のみが殺傷される。この細胞周期の特異性のせいで、細胞毒性因子での処置は、細胞が感受性の段階に入ることを可能にするように延長されるかまたは繰り返される必要がある。細胞周期に特異的でない因子は、細胞周期の任意の段階で作用し得る；しかし、細胞毒性効果はやはり、細胞増殖に依存する。従って、細胞毒性因子は、腫瘍細胞の一定の割合を殺傷し、この割合は、薬物処置の用量に対して比例する。

【0012】

多数の新生物処置因子が現在使用されており、これには、任意の化学療法剤および生物療法剤、ならびに放射線療法が挙げられる。多くのタイプの化学療法因子があり、これにはアルキル化剤、ニトロソ尿素、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質、分裂抑制因子、コルチコステロイドホルモン、性ホルモン、免疫療法、またはその他、例えばレアスパラギナーゼおよびトレチノインが挙げられる。いくつかを下記に簡略に考察している。

【0013】

現在広範に用いられる化学療法剤はゲムシタビンである。ゲムシタビンは、代謝拮抗剤として公知の化学療法薬物の一般的な群に属しており、かつ放射線増感因子として機能する、ピリミジンアナログである。ゲムシタビンは、細胞周期特異性を示し、主にDNA合成を起こしている細胞、すなわちS期の細胞を殺傷し、そしてまたG₁ / S期の境界を通じて細胞の進行をロックする。

【0014】

ゲムシタビンは、限定はしないが膵臓および結腸直腸癌を含む、広範な腫瘍について承認された化学療法剤である。しかし、ゲムシタビンの効力は、わずかなものであり、平均余命は、特に膵臓癌患者についてはほとんど延びることはない。ゲムシタビン投与の副作用は、他の化学療法剤に比較して、比較的軽度であり、これは、感染のリスクの増大を伴う骨髄抑制、出血のリスクの増大を伴う血小板数の減少、悪心、嘔吐、肝機能血液検査の上昇および疲労からなる。しかし、ゲムシタビンは一般には、患者に対するその毒性の影響が少なく、従ってより良い生活の質に起因して他の治療に置き換わっている。

【0015】

プラチンファミリーの化学療法剤は主に、シスプラチニンおよびカルボプラチニンからなる。シスプラチニンは無機の白金錯体であり、鎖内および鎖間の架橋を形成することによってDNAらせんを破壊する。しかし、シスプラチニンはまた、他の組織の求核試薬と反応し、腎臓に対して、および第八脳神経（極度の悪心および嘔吐を生じる原因となる）に対して毒性の影響を生じる。他の副作用としては、腎臓毒性、耳鳴りおよび聴覚喪失よって顕在化する聴器毒性、ならびに軽度から中度の骨髄抑制が挙げられる。カルボプラチニンは、主に副作用に関してシスプラチニンとは異なる。骨髄抑制は、カルボプラチニンの用量依存性の毒性であり、シスプラチニンに伴う腎臓、神経性または聴器毒性は極めて小さい。

【0016】

パクリタキセルは、天然では、かなり毒性であるが、イチイに由来する物質であり、転移性の乳癌、転移性の卵巣癌およびカポジ肉腫の処置に適応される強力な抗微小管化学療法剤を生じるように化学的に変更されている。パクリタキセルはまた、SCCHN、非小細胞肺癌、小細胞肺癌および膀胱癌を処置するために用いられている。パクリタキセル投与で通常遭遇する副作用としては、悪心および嘔吐、食欲減退、味覚の変化、細いかまたは脆弱な毛髪、2～3日にわたる腕および脚の関節の疼痛、爪の色の変化および手またはつま先の刺痛が挙げられる。

【0017】

化学療法剤、5フルオロウラシル（5-FU）は、1960年代から種々の固形癌において用いられる主要な代謝拮抗剤の1つであった。5-FUは、核酸の合成を妨害することによって細胞がDNAおよびRNAを作成することを防ぎ、これによって癌細胞の増殖を中止する。5-FUは、乳癌、結腸癌、胃腸および頭頸部の癌のアジュバント処置において、単独でまたは併用して用いられる。5-FUはまた、消化管、乳房、肝臓、泌尿生

10

20

30

40

50

殖器系および脾臓のような、手術不能の悪性の新生物の緩和的な治療として用いられる。5-FUは、多くの共通の副作用を有し、この副作用としては、感染および出血のリスクの増大を伴う骨髓抑制、皮膚および爪床の黒ずみ、恶心、嘔吐、口内または口唇上の痛み、毛髪の希薄化、下痢、もろい爪、日差しおよび乾燥に対する感受性の増大、鱗状の皮膚が挙げられる。

【非特許文献1】Jemal, Aら、CA Cancer J. Clin., 2005年、55:p.10~30

【非特許文献2】CA Cancer J. Clin., 2004年、54:p.8~20

【非特許文献3】Lancet 2004年、363:p.1049~57

【非特許文献4】Sugerman, P. B.ら、Oral Dis., 1995年、110:p.172~188

【非特許文献5】Zagon, I. S.ら、Cytokines: Stress and Immunity. Plotnikoff NPら(編). 1999年、CRC Press, Boca Raton, FL, p.245~260

【非特許文献6】Zagon, I. S.ら、Receptors in the Developing Nervous System. 第1巻、Zagon, I. S.およびMcLaughlin, P. J. (編)、1993年、Champan and Hall, London, p.39~62

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0018】

従って、有効性および生存率の向上とともに、化学療法剤が共通して遭遇する、付随する副作用および毒性の軽減を示す、種々のタイプの癌、詳細には脾臓癌およびSCCHNを処置するための治療的な処方物が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0019】

(発明の要旨)

本発明は、キャリアおよび治療上有効な量の少なくとも1つの新生物処置因子、例えば、化学療法剤または放射線療法(因子)、およびオピオイド増殖因子(OGF)と呼ばれる、生物治療的な内因性のペントペプチドであるMet-エンケファリンからなる、動物またはヒトにおける新生物を処置するための癌治療の薬学的組成物および/または処置方法を初めて提供する。本明細書において用いる場合、癌治療性組成物とは、限定はしないが真の癌腫だけでなく他の癌、例えば肉腫、黒色腫なども含む全ての新生物の処置のための化学療法剤および生物療法剤の両方を含む組成物をいう。

30

【0020】

本明細書において用いる場合、「OGFまたはMet-エンケファリン」という用語は、本明細書において記載されるようにOGFと同様の方式でOGFレセプターと相互作用する能力を保持する、OGFまたはMet-エンケファリンの全ての修飾、置換、短縮または誘導体を含むと解釈されるものとする。これはまた、OGFレセプターとの相互作用においてOGFの生物学的活性を模倣する合成のまたは任意の他の化合物を包含する。

40

【0021】

本発明はまた、新生物の処置の必要な動物またはヒトにおいてこのような処置をする方法を提供し、この方法は、治療上有効な量の各々の、少なくとも1つの新生物処置因子およびOGFの動物またはヒトに対する投与を包含する。広範な種々の新生物処置因子は、代謝拮抗剤、シトシンアナログ、架橋剤などを含むOGFと組み合わせて用いられる場合、有効であることが示されている。OGFの効果は、OGFrを通じて媒介され、従って、任意の化学療法剤、または放射線療法を含む生物療法剤が同様の効果を有することが想定される。本発明に従って用いられ得る化学療法剤のいくつかの例としては、限定はしないが、新生物処置因子が挙げられ、これには、任意の化学療法剤および放射線療法を挙げることができる。多くのタイプの化学療法剤が存在し、そのいずれが、本発明に従って用

50

いられてもよく、これには、限定はしないが、アルキル化剤、ニトロソ尿素、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、分裂抑制因子、コルチコステロイドホルモン、性ホルモン、免疫療法または他に例えば、L-アスパラギナーゼおよびトレチノインが挙げられる。

【0022】

生物治療的OGFおよび新生物処置因子の組み合わせはほとんどの場合、少なくとも相加的であって、処置の毒性を軽減することを可能にする。なぜなら同様の結果をより低用量の新生物処置因子で達成できるからである。これは重要である。なぜならこれらの因子の多くが高度に毒性であって、できるだけ低用量で用いられなければならないからである。少なくとも1つのプロトコールでは、因子の相加的性質に加えて、毒性の軽減がみられた。この組み合わせの結果はしばしば相乗効果であり、すなわち、細胞における軽減は、その因子単独の各々の合計よりも大きい。OGFの効果は、ナロキソンによってブロックされ、このことは、OGFの効果がOGFrによって全体的に媒介されることを示す。

【0023】

さらに別の実施形態では、OGFrは、自殺タイプ(suicide type)の処置プロトコールで腫瘍細胞に導入され得、ここで腫瘍または新生物細胞は、細胞へのさらなるOGFrレセプターの導入によって抗新生物処置に対して感作され、その結果OGFは、治療の効果を媒介することおよび増強することにおいて、できるだけ多くの細胞と相互作用し得る。

【0024】

本発明の方法に従って処置され得る新生物としては、OGFrを有する任意の新生物細胞が挙げられ、これには限定はしないが、膵臓癌、頭頸部の扁平上皮細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、腎臓癌、脳腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、骨または関節の癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、多発性骨髄腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、白血病、肺癌、卵巣癌、消化管癌、カポジ肉腫、肝臓癌、咽頭癌または喉頭癌を挙げることができる。

【0025】

この組成物によって、静脈内プロトコールで投与され得るOGFの有効な治療量は、例えば、1日あたり約20～1000μg/kg体重、好ましくは約100～400μg/kg体重である。OGFは、投与経路に依存して、処置期間全体にわたって、1週に少なくとも1回、そして毎日できるだけ高頻度に複数回、投与されてもよい。OGFは、非毒性であり、そして本質的に任意の有効量に従って投与され得る。投与の様式、すなわち、静脈内、皮下などはまた、有効用量および薬物投与のタイムテーブルを変更してもよいが、これは慣用的な実験を通じて決定され得る。抗新生物の因子は、OGFの投与と連続してまたは同時に投与されてもよく、少なくとも1つの新生物処置因子が、動物またはヒトに対して、例えば、約20～3000mg/m²、好ましくは約100～1000mg/m²という治療上有効な量で、約10～60分、そして好ましくは約30分という期間にわたって、約3～10週間、好ましくは7週の間に週に少なくとも1回、投与される。1～3週間、好ましくは1週間の休息後、化学療法剤は、約10～60分、好ましくは約30分という期間にわたって、約1～5週間、好ましくは3週間にわたって、投与される。化学療法剤の投与は、2～8週間ごとに、好ましくは4週間ごとに、疾患の進行または受容できない毒性の非存在下で繰り返されてもよい。皮下またはインプラントの送達も有効である。

【0026】

本発明の別の実施形態では、OGFは、約20～1000μg/kg体重、好ましくは約100～400μg/kg体重という有効用量で、放射線療法の経過の間、1週に少なくとも3回、好ましくは毎日投与される。

【0027】

本発明のさらに別の実施形態では、OGFは、約20～1000μg/kg体重、好ましくは約100～400μg/kg体重という有効用量で、放射線療法の経過の間、化学療法とともに、1週に少なくとも3回、好ましくは毎日投与される。

【0028】

10

20

30

40

50

抗新生物因子（単数または複数）およびオピオイド増殖因子の投与経路としては、限定はしないが、非経口投与、すなわち、静脈内、筋肉内または腹腔内、皮下、移植された浸透圧ポンプまたは経皮パッチが挙げられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

（発明の詳細な説明）

本発明は、キャリアおよび治療上有効な量の少なくとも1つの化学療法剤およびオピオイド増殖因子（OGF）と呼ばれる、生物治療的な内因性のペントペプチドであるMet-エンケファリンからなる、動物またはヒトにおける新生物を処置するための癌治療の薬学的組成物および方法を初めて提供する。

10

【0030】

本発明はまた、新生物の処置の必要な動物またはヒトにおいてこのような処置をする方法を提供し、この方法は、少なくとも1つの新生物処置因子およびOGFの各々の治療上有効な量の、この動物またはヒトに対する投与を包含する。新生物処置因子としては、任意の生物療法剤、放射性医薬品および化学療法剤、ならびに放射線療法を挙げができる。多くのタイプの化学療法剤があり、そのいずれが本発明によって用いられてもよい。これらとしては、アルキル化剤、ニトロソ尿素、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、分裂抑制因子、コルチコステロイドホルモン、性ホルモン、免疫療法または他に例えば、L-アスパラギナーゼおよびトレチノインが挙げられる。生物療法剤の例としては、限定はしないが、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍由来活性化細胞が挙げられる。ヨード¹²⁵のような放射性核種も、ガンマ線またはX線による放射線療法と同様に妥当である。

20

【0031】

化学療法のアルキル化剤は、DNA上で直接作用して、癌細胞の増殖を妨げる。薬物のクラスとして、これらの因子は、期間に特異的ではない（言い換えれば、それらは、細胞サイクルの全ての段階で作用する）。これらの薬物は、慢性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、多発性骨髄腫、ならびに肺、乳房および卵巣の特定の癌に対して活性である。アルキル化剤の例としては、ブスルファン、シスプラチニン、カルボプラチニン、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、デカルバジン（DTIC）、メクロレタミン（ナイトロジエンマスター）およびメルファランが挙げられる。

30

【0032】

ニトロソ尿素は、アルキル化剤と同様の様式で作用する。それらは、DNA修復を補助する酵素を妨害する。これらの因子は、脳に対して移動し得、そのためそれらは、脳腫瘍、ならびに非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫および悪性黒色腫を処置するために用いられる。ニトロソ尿素の例としては、カルムスチン（BCNU）およびロムスチン（CCNU）が挙げられる。

40

【0033】

代謝拮抗剤は、DNAおよびRNAの増殖を妨害するクラスの薬物である。これらの因子は、S期の間に作用して、慢性白血病、ならびに、乳房、卵巣および消化管の腫瘍を処置するために用いられる。代謝拮抗剤の例としては、5-フルオロウラシル、カペシタビン、メトトレキセート、ゲムシタビン、シタラビン（ara-C）、およびフルダラビンが挙げられる。

【0034】

抗腫瘍抗生物質は、酵素および有糸分裂を停止すること、または細胞を囲む膜を変更することによってDNAを妨害する。（それらは、感染を処置するために用いられる抗生物質と同じではない）。これらの因子は、細胞周期の全ての段階で作用する。従って、それらは、種々の癌に広範に用いられる。抗腫瘍抗生物質の例としては、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、イダルビシン、およびミトキサントロンが挙げられる。

【0035】

50

分裂抑制因子は、植物アルカロイドおよび天然の産物に由来する他の化合物である。それらは、有糸分裂を阻害するか、もしくは停止するか、または細胞の再生に必要なタンパク質を作成するための酵素を阻害し得る。これらは、細胞周期のM期の間に作用する。分裂抑制因子の例としては、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド(VP-16)、ビンプラスチン、ビンクリスチン、およびビノレルビンが挙げられる。

【0036】

ステロイドは、いくつかのタイプの癌(リンパ腫、白血病、および多発性骨髄腫)および他の疾病を処置するのに有用である天然のホルモンおよびホルモン様薬物である。これらの薬物を用いて癌細胞を殺傷するかまたはその増殖を遅らせる場合、それらは、化学療法薬物とみなされる。それらはしばしば、その有効性を増大するために他のタイプの化学療法薬物と組み合わされる。例としてはプレドニゾンおよびデキサメタゾンが挙げられる。

10

【0037】

性ホルモンまたはホルモン様薬物は、雌性または雄性のホルモンの作用または産生を変更する。それらを用いて、身体のホルモンレベルに応答して通常増殖する、乳房、前立腺および子宮内膜(子宮の裏層)の癌の増殖を遅らせる。これらのホルモンは、標準的な化学療法薬物と同じ方法では作用しない。例としては、抗エストロゲン(タモキシフェン、フルベストラント)、アロマターゼインヒビター(アナストロゾール、レトロゾール)、プロゲスチン(酢酸メガステロール)、抗アンドロゲン(ビカルタミド、フルタミド)、およびLHRHアゴニスト(ロイプロリド、ゴセレリン)が挙げられる。

20

【0038】

いくつかの薬物を、癌を有する人に与えて、さらに効率的に認識して癌細胞を攻撃するようにそれらの免疫系を刺激する。これらの薬物によって、処置の固有の方法が得られ、これらの薬物は、しばしば「化学療法」とは別であるとみなされる。

【0039】

いくつかの化学療法薬物は、わずかに異なる方法で作用して、他のいずれのカテゴリーにもあてはまらない。例としては、L-アスパラギナーゼおよびトレチノインのような薬物が挙げられる。

30

【0040】

併用療法は、アルキル化剤、カルボプラチニン、代謝拮抗剤5-FUおよびゲムシタビン、ならびに分裂抑制因子であるパクリタキセルとともに本明細書において例示されている。

【0041】

本発明の方法に従って処置され得る新生物形成としては、限定はしないが、肺腫瘍、頭頸部の扁平上皮細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、腎腫瘍、脳腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、骨または関節の癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、多発性骨髄腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、白血病、肺癌、卵巣癌、消化管癌、カポジ肉腫、肝腫瘍、咽頭癌および喉頭癌が挙げられる。

【0042】

静脈内治療のための本発明の組成物および方法によって投与され得るOGFの有効な治療量は、1日あたり体重1kgあたり約20~1000μg、好ましくは1日あたり体重1kgあたり約100~400μgである。OGFは、処置期間全体にわたって、週に少なくとも3回、そして毎日1回程度の頻度で投与されてもよい。OGFは安全かつ非毒性であり、そして有効であるために必要な本質的に任意の量で投与されてもよい。投与経路(静脈内、皮下など)は、与えられ得る量に影響し得るが、これは全て慣用的な実験を通じて決定される。OGFの投与と連続してまたは同時に、少なくとも1つの化学療法剤が、約20~3000mg/m²、好ましくは約100~1000mg/m²という治療上有効な量で、約10~60分、そして好ましくは約30分という期間にわたって、約3~10週間、好ましくは7週の間に週に少なくとも1回、動物またはヒトに投与される。1~3週間、好ましくは1週間の休息後、化学療法剤は、約10~60分、好ましくは約3

40

50

0分という期間にわたって、約1～5週間、好ましくは3週間にわたって、投与される。化学療法剤の投与は、2～8週間ごとに、好ましくは4週間ごとに、疾患の進行または受容できない毒性の非存在下で繰り返されてもよい。

【0043】

本発明の別の実施形態では、OGFは、体重1kgあたり約20～1000μg、好ましくは体重1kgあたり約100～400μgという有効用量で、放射線療法の経過の間、1週に少なくとも3回、好ましくは毎日投与される。化学療法剤(単数または複数)およびオピオイド増殖因子の投与経路としては、限定はしないが、非経口投与、すなわち、静脈内、筋肉内または腹腔内、皮下、移植された徐放性浸透圧ミニポンプまたは経皮パッチが挙げられる。

10

【0044】

OGFペントペプチドは、インビボおよびインビトロの両方で、そして正常な状態(例えば、恒常的発生)および異常な状態(例えば、癌、創傷治癒)下で、広範な細胞および組織において構成的に発現される自己分泌阻害性増殖因子である。インビトロでのOGFの作用は、立体特異的、可逆性、非細胞毒性で、血清に非依存性であり、そして生理学的に関連の濃度で生じる。

【0045】

詳細には、ヒト膵臓癌細胞株を用いて、OGFおよびゲムシタビンの組み合わせは、48時間以内に細胞数をコントロールのレベルから26%～46%減少させ、個々の化合物の阻害よりも大きい増殖阻害を生じた。OGFおよびゲムシタビンの組み合わせはまた、第二の膵臓癌細胞株の増殖を抑制した。インビボでは、ヌードマウスにおけるゲムシタビン治療へのOGFの追加は、いずれかの化合物単独よりも腫瘍容積を減少させる。腫瘍重量および腫瘍容積は、OGFおよび/またはゲムシタビン群では45日目にコントロールレベルから36%～85%に低下し、OGFおよびゲムシタビンの組み合わせに曝露されたマウスの群では、OGF単独またはゲムシタビン単独の群から62%～77%という腫瘍サイズの減少があった。

20

【0046】

OGFは、5-フルオロウラシルとの組み合わせでも、膵臓癌細胞株において、いずれかの因子単独より細胞増殖を抑制した。

30

【0047】

同様の効果がまた、扁平上皮癌細胞株で観察された。いくつかの株でのパクリタキセルおよびOGFの併用療法は、いずれかの化合物単独での細胞数減少よりも大きい細胞数の減少を生じた。腫瘍の容積および重量におけるインビボでの減少は、相乗作用的であって、OGFは、パクリタキセルの毒性を軽減して、その結果高い生存率が得られると考えられた。

【0048】

カルボプラチニンはまた、相加的な効果を生じて、扁平上皮癌細胞の数を14～27%減少させた。

【0049】

理解できるとおり、OGFと化学療法剤との併用療法によって、いずれかの化合物単独よりも細胞数の減少が大きいという利点は、しばしば相乗作用的であって、また化学療法剤の毒性を減少し得る。これは、多数の細胞株における少なくとも2つの極めて異なるタイプの癌細胞において、種々の化学療法剤でかつ、インビトロおよびインビボの両方でみられた。

40

【0050】

いかなる特定の理論にも拘束されないが、OGFは、パクリタキセルのようないくつかの化学療法剤で遭遇する細胞毒性に対して防御的な効果を付与し得ると考えられる。

【0051】

OGFおよびOGFrの両方は、げっ歯類およびヒトの舌、皮膚、消化管および角膜の上皮で検出されている。OGFおよびOGFrの両方は、外科的切除の時点で得られたヒ

50

ト腫瘍に存在することが示されている。さらに、哺乳動物の舌、表皮、角膜および食道における上皮細胞のDNA合成は、OGFによって調節され、レセプター媒介性の様式でそのように調節されることが示されている。

【0052】

OGFは、細胞数の減少に関連していることが見出されており、このことはOGFの標的が細胞複製であることを示唆する。組織培養においてヒト臍臓癌細胞を用い、十分な量のOGFを投与して、内因性OGFで生じるとおそらく同様の応答を惹起することで、OGFは細胞蓄積を抑制して、OGF曝露後24時間以内にこの活性をあらわすことが確認されている。いかなる理論にも拘束されないが、OGFはDNA合成を有意に減少して、有糸分裂を抑制し、これによって細胞の世代を調節すると考えられる。

10

【0053】

細胞周期は、5つの期からなる：前合成すなわちG₁期；DNAの合成すなわちS期；合成後すなわちG₂期（この段階は、2つの娘G₁細胞に分裂するDNAの二重の相補体を含む）；および有糸分裂すなわちM期。新規に分裂した細胞は、このサイクルに再度入ってもよいし、休止期すなわちG₀期にいってもよい。OGFは、細胞周期の段階で細胞の割合を変更して、その結果、約2時間以内にG₀ / G₁で細胞数の顕著な増大、そしてSおよびG₂ / M期における細胞の代償性の減少があることが示されている。さらに、OGFは、G₀ / G₁期の長さを劇的に増大させるようであり、これによって、観察される全細胞周期の倍加時間における顕著な増大が説明される。いかなる理論にも拘束されないが、放射線療法の前または間のいずれかにおけるOGFでの処置は、OGFが細胞周期のG₀ / G₁期（癌細胞が照射に対して最も脆弱である）で癌細胞を蓄積する能力を介して腫瘍細胞に対する照射の効果を感作させると考えられる。

20

【0054】

ゲムシタビンは、放射線増感因子としても作用する代謝拮抗剤として公知の化学療法薬物の一般群に属するピリミジンアナログである。ゲムシタビンは、細胞周期特異性を示し、主にDNA合成を起こしている、すなわちS期の細胞を殺傷し、またG₁ / S期の境界を通じた細胞の進行をブロックする。ゲムシタビンは、活性なゲムシタビンニリン酸（dFdCDP）およびゲムシタビン三リン酸（dFdCTP）ヌクレオシドに対するヌクレオシドキナーゼによって細胞内で代謝される。ゲムシタビンの細胞毒性効果は、DNA合成の阻害をもたらす、ニリン酸および三リン酸のヌクレオシドの2つの作用の組み合わせに起因する。第一に、ゲムシタビンニリン酸は、DNA合成のためのデオキシヌクレオシド三リン酸を生成する反応を触媒することを担うリボヌクレオチドリダクターゼを阻害する。ヌクレオシドニリン酸によるこの酵素の阻害は、dCTPを含むデオキシヌクレオチドの濃度の減少を生じる。第二に、ゲムシタビン三リン酸は、DNAへの取り込みについてdCTPと競合する。dCTPの細胞内濃度の減少（ニリン酸の作用による）は、DNAへのゲムシタビン三リン酸の取り込みを増強する（自己増強）。ゲムシタビンヌクレオチドがDNAに取り込まれた後、さらなるヌクレオチドが1つだけ、成長しているDNA鎖に付加される。この付加後、さらなるDNA合成の阻害が存在する。DNAポリメラーゼは、ゲムシタビンヌクレオチドを除去して成長しているDNA鎖を修復することができない（マスクされた鎖終止）。リンパ芽球様細胞では、ゲムシタビンは、プログラムされた細胞死の特徴の1つである、ヌクレオソーム間のDNA断片化を誘発する。

30

【0055】

パクリタキセルは、Taxol（タキソール）としても公知であって、Pacific yew（太平洋イチイ）の樹皮および葉に由来する（別の供給源は、ヨーロッパイチイの針状葉由来である）。パクリタキセルは、極めて脂溶性であり、調製後直ちに静脈内に投与しなければならない。パクリタキセルは、微小管の二量体のアセンブリを促進して、脱重合を防止することによって微小管を安定化する抗微小管剤である。この安定性によって、生命維持に重要な間期および有糸分裂細胞機能に必須である微小管網目状構造の正常な動的な再構築の阻害が生じる。さらに、パクリタキセルは、細胞周期全体を通じて、微小管の異常なアレイまたは「束（bundles）」、および有糸分裂の間の微小管の複数

40

50

の星状体を誘導する。パクリタキセルの副作用としては、一過性の除脈、末梢神経障害、恶心、嘔吐、下痢、好中球減少、血小板増加症、気管支痙攣、蕁麻疹、血管性浮腫、脱毛症および筋肉痛が挙げられる。デキサメタゾン、ジフェンヒドラミンおよびH2アンタゴニストの前投薬を用いて、過敏性の反応を軽減する。

【0056】

カルボプラチニンおよびシスプラチニンは、鎖間および鎖内の架橋を形成することによってDNAらせんを破壊する無機白金錯体である、化学療法剤のプラチニンファミリーに属する。シスプラチニンは詳細には、他の組織の求核試薬と反応し、これによって、腎臓、第八脳神経および強度の嘔吐に対して毒性に影響する。

【0057】

カルボプラチニンおよびシスプラチニンの両方は、腎臓、肝臓、腸および精巣に濃縮されるが、それらは血液脳関門は越えない。それらは通常、転移した精巣、卵巣癌および進行した膀胱癌で他の因子とともに用いられる。シスプラチニン投与には通常、副作用を伴い、これには、腎毒性、耳鳴りおよび聴覚喪失によって顕在化する聴器毒性、顕著な恶心および嘔吐が挙げられる。さらに、軽度から中度の骨髄抑制が発症し得る。カルボプラチニンは、主に副作用に関してシスプラチニンとは異なる。なぜなら、骨髄抑制は、カルボプラチニンの用量依存性の毒性であり、腎臓、神経性または聴器毒性は極めて小さいからである。

【0058】

5-FUは、単剤として、結腸および直腸の癌の処置において任意の他の単剤の活性よりも優れた活性を有する。5-FUは主に、緩徐に増殖する固形腫瘍、例えば、乳房および消化管の癌に用いられる。しかし、平均の奏功率は依然として低く、20%未満である。フルオロウラシルが、チミジル酸を合成するのに必須である酵素を不活性化し得るか、または複雑な経路内で作用する場合、不活性であるとして、フルオロウラシルは、5'-1リン酸ヌクレオチドに変換されなければならない。5-FUは、RNAに組み込まれて、DNA合成を阻害する。5-FUは、種々の異なる代謝経路によって活性な5-フルオロ-デオキシリジン-1リン酸(FdUMP)に変換される。この薬物は、チミジンの形成を、従ってDNAの形成を減少させる酵素チミジル酸キナーゼを阻害することによって作用する。フルオロウラシルはFdUMPとしてもRNAに組み込まれ、RNAのフッ素化を生じる。

【0059】

生存している細胞に対する5-FUの効果は、増殖期における効果に主に限定される。しかし、G₂期およびS期の細胞が最も影響されるが、任意の段階の細胞周期で影響され得る。5-FUは主に肝臓で代謝され、尿中にそのまま現れる薬物はわずか10%ある。5-FUは、脳脊髄液に入り得る。細胞が5-FUをその活性型に変換する能力を失うため、5-FUに対する耐性が生じる。一般的な副作用はしばしば遅延型である。潰瘍になる口内炎は、毒性の早期の徴候であり、そして骨髄抑制(白血球減少)が一般に、治療の9日目～14日目に生じる。他の副作用としては、脱毛症、皮膚炎、および皮膚の萎縮が挙げられる。

【0060】

いかなる特定の理論によっても拘束されることはないが、本発明の癌治療的組成物、すなわち、少なくとも1つの化学療法剤と生物療法剤OGFとの組み合わせは、化学療法剤の細胞毒性効果に対して細胞が脆弱であるG₀/G₁期においてOGFが細胞を蓄積する能力によって、癌細胞増殖に強力な阻害性の影響を発揮し、これによって、化学療法剤によって殺傷される細胞の数を大きく増強する。従って、OGFの存在なしに生じる増殖阻害よりも有意に大きい増殖阻害を生じるためには、有効量が少なくなった化学療法剤が必要である。

【0061】

以下の非限定的な実施例は、ヒト扁平上皮癌細胞株(SCC-1細胞株)、およびヒト臍臍癌細胞株(MiaPaca-2細胞株)に対する、ゲムシタビン、パクリタキセル、カルボプラチニンおよび5-FUと組み合わせたOGF投与の効果を詳細に記載する。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0062】

(実施例1 - S C C - 1 細胞株に対する併用療法)

(1. S C C - 1 細胞株の増殖曲線)

時間に対してプロットした、細胞増殖アッセイから 450 nm でとった吸光度によって示される細胞増殖を、 S C C - 1 または M i a P a C a - 2 細胞に対する種々の薬物の効果を提示するために標準的な形式とした。標準的な M T T アッセイを用いて細胞をカウントした。一般には、各々のデータポイントは、1 処置あたり 10 ウェルからとった平均の吸光度に相当し；誤差指示線は S . E . M . を表す。

【0063】

(a. パクリタキセル処置)

図1および表1に図示される結果は、 S C C - 1 細胞に対するパクリタキセル (T a x o 1) および / または O G F の添加を試験する。4日の増殖曲線を通じて、統計的分析 (A N O V A) によって、 O G F (10⁻⁶ M) 単独で、48時間、72時間および96時間で、増殖が阻害されたことが明らかになり、それぞれ細胞数がコントロールのレベルから 11.9%、6.7% および 12.7% 減少していた。パクリタキセルは、10⁻⁷ M の濃度で、24時間、48時間、72時間および96時間で、細胞増殖を阻害して、それぞれ細胞数がコントロールから 14.2%、34.4%、58% および 70% 減少していた。パクリタキセルは、10⁻⁸ M の濃度でまた、72時間および96時間で、増殖を阻害し、それぞれコントロールに対する細胞数の減少は 14.1% および 19.3% であった。パクリタキセル 10⁻⁷ M を O G F の 10⁻⁶ M と組み合わせた場合、増殖阻害は、24時間、48時間、72時間および96時間で観察され、それぞれ、13.5%、52.6%、68.4% および 78.4% というコントロールに対する細胞数の減少が生じた。パクリタキセル 10⁻⁸ M を O G F の 10⁻⁶ M と組み合わせた場合、細胞増殖阻害は、48時間、72時間および96時間で観察され、それぞれ、13.6%、30.6%、および 36.3% というコントロールに対する細胞数の減少をともなった。パクリタキセル 10⁻⁷ M と組み合わせた O G F は、(24時間でのパクリタキセル 10⁻⁷ M に加え) 全ての時点でいずれかの薬物単独よりも有意に阻害性であって、10.1~75.3% におよぶ細胞数の減少をともなった。パクリタキセル 10⁻⁸ M と組み合わせた O G F は、48時間、72時間および96時間で、いずれかの薬物単独よりも有意に阻害性であって、10.4~27.1% におよぶ細胞数の減少をともなった。

【0064】

(b. カルボプラチニン処置)

図2および表2に図示される結果は、 S C C - 1 細胞に対するカルボプラチニンおよび / または O G F の添加を試験する。4日の増殖曲線を通じて、統計的分析 (A N O V A) によって、 O G F (10⁻⁶ M) 単独で、48時間、72時間および96時間で、増殖が阻害されたことが明らかになり、ここではそれぞれ 8.2%、8.4% および 9.7% というコントロールに対する細胞数の減少を伴った。カルボプラチニンは、10⁻⁶ M の濃度で、48時間、72時間および96時間で、細胞増殖を阻害して、それぞれ細胞数をコントロールに対して 5.3%、21.8% および 24.9% 減少させた。カルボプラチニンは、10⁻⁷ M の濃度でまた、72時間および96時間で増殖を阻害し、それぞれコントロールに対して 18.7% および 21% 細胞数を減少させた。カルボプラチニン 10⁻⁶ M を O G F の 10⁻⁶ M と組み合わせた場合、増殖阻害は、24時間、48時間、72時間および96時間で観察され、それぞれ、10.3%、17.5%、32.2% および 33.3% というコントロールに対する細胞数の減少が生じた。カルボプラチニン 10⁻⁷ M を O G F の 10⁻⁶ M と組み合わせた場合、細胞増殖阻害は、48時間、72時間および96時間で観察され、それぞれ、14.1%、26.3%、および 27.1% というコントロールに対する細胞数の減少をともなった。カルボプラチニン 10⁻⁶ M と組み合わせた O G F は、48時間、72時間および96時間の時点で、いずれかの薬物単独よりも有意に阻害性であって、3.1~23.6% におよぶ細胞数の減少をともなった。カルボプラチニン 1

10

20

30

40

50

10^{-7} M と組み合わせた OGF は、48時間、72時間および96時間で、OGF 単独よりも、48時間、および72時間で、カルボプラチン 10^{-6} M よりも、そして48時間、および72時間で、カルボプラチン 10^{-7} M よりも有意に阻害性であって、10.4 ~ 27.1% におよぶ細胞数の減少をともなった（表2）。

【0065】

（c. 体重、寿命および全体的観察）

トライアルの開始時点で、全てのマウスは約 22 ~ 24 グラムと秤量され、マウスは 5 日ごとにほぼ 2 ~ 4 グラム増量した。しかし、実験の 20 日目までに、パクリタキセルのマウスは、体重が減少し始め、コントロールよりも 11% の重量減少であった（p < 0.05）。終了日またはマウスの死亡日まで（図5の生存曲線を参照のこと）、パクリタキセル群内では継続した体重減少が観察され、50日目にはマウスはコントロール、OGF およびパクリタキセル / OGF 処置マウスよりも 28%（p < 0.001）体重が減少した（図4を参照のこと）。

【0066】

パクリタキセル群のマウスは、19日目に死に始めた（図5を参照のこと）。40日目までに、パクリタキセル処置マウスのうち 75% が死亡して、パクリタキセル / OGF 群を含むいずれの他の処置群でも死んだマウスはいなかった。終了日に、1匹のマウスのみ（この群の 8%）が依然として生存していた。パクリタキセルマウスの平均寿命は、34.3 ± 3.1 日で、これは全ての他の処置群と有意に（p < 0.001）異なった。パクリタキセル / OGF 群の 1匹のマウスが 40 日目に死んだが、残りの全てのマウスは終了日まで生存していた。

【0067】

パクリタキセルのマウスが早期に死亡したため、器官を回収して、組織学的分析のためにホルマリン中で固定した。分析の際、早期の死亡は、巨大結腸症に関する腹部の膨張に起因し得ることが観察された。大腸、盲腸および小腸は全て、硬くなつた便で完全に詰まっていた。全ての他の器官系は正常と思われた。

【0068】

（実施例 2 - SCC - 1 腫瘍の出現および増殖）

SCC - 1 細胞を注射された全てのマウスが腫瘍を発症した。腫瘍細胞接種後 13 日目に、マウスの 75%、パクリタキセル処置マウスの 66%、およびパクリタキセル / OGF 処置マウスの 58% が腫瘍を有した。可視の腫瘍に対する潜伏期間を試験する場合、コントロールのマウスは、腫瘍細胞の接種の 7 日以内に、可視であるが、測定不能な腫瘍を発症した。パクリタキセルおよびパクリタキセル / OGF マウスはまた、同じ 1 週間の時間枠内に可視の腫瘍を発症したが、OGF マウスは 11 日以内に腫瘍を発症し、このことは、可視の腫瘍発症ではほぼ 4 日の遅延を示す（p < 0.05）。測定可能な（62.5 mm³）腫瘍についての潜伏期間は、可視の腫瘍についての潜伏期間と類似のパターンを示し、このパターンでは、コントロール、パクリタキセルおよびパクリタキセル / OGF 群は、腫瘍細胞接種の 2 週間以内に測定可能な腫瘍を有し、一方 OGF 群は、17 日以内に測定可能な腫瘍を発症したが、この相違はコントロール値から有意ではなかった。

【0069】

腫瘍の寸法は、腫瘍が測定可能であるとみなされた日に開始して毎日記録した。これらを、各々のマウスが 36 日の経過にわたって測定可能な腫瘍を有した初日に開始して、測定の 2 日連続する日ごとにプロットした（図3）。

【0070】

各々のマウスが 36 日の経過にわたって測定可能な腫瘍を有した初日に開始して、2 連続日ごとの測定値をプロットしたデータを用いて（図3）、測定可能な腫瘍の出現の第二の時点（測定可能な腫瘍の 4 日目）、OGF およびパクリタキセル / OGF マウスの両方とも、それぞれ、26% および 29% の減少という、コントロールのマウスよりも有意に（p < 0.05）小さい腫瘍を有した。3 番目の時点では、3 つの処置群全てが有した平均腫瘍容積は、コントロールよりも 29% ~ 33% 有意に小さかった。8 ~ 10 の時点

10

20

30

40

50

で、パクリタキセル / OGF マウスは、単独の処置を受けている群の腫瘍サイズより有意に小さい腫瘍を有した。このトライアルの終わりを通じて 11 の時点から（図 3 を参照のこと）、パクリタキセル / OGF マウスは、コントロールマウスおよび OGF マウスの両方より有意に小さい腫瘍容積を示したが、パクリタキセルのマウスに対する比較では、パクリタキセル群のマウスがほぼこの時点で死に始めたという事実のせいで有意差は明らかでなかった。パクリタキセルマウスの死によって統計学的分析が困難になった。ある場合には、マウスは、化学療法に共通した副作用を示し始め、そして腫瘍サイズはしばしば減少した。従って、パクリタキセルおよびパクリタキセル / OGF マウスを比較する腫瘍測定値はしばしば、死亡前の腫瘍サイズの減少、およびパクリタキセル群の N 数の減少の両方に起因して、有意ではなかった。

10

【0071】

（実施例 3 - Mi a P a C a - 2 細胞株に対する併用療法）

図 7 に例示される結果は、Mi a P a C a - 2 細胞に対する 5-FU および / または OGF の添加を試験する。4 日の処置期間を通じて、統計的分析 (ANOVA) によって、OGF (10^{-6} M) 単独で、24 時間、48 時間、72 時間および 96 時間で、増殖が有意に阻害されたことが明らかになり、それぞれ 7.1%、7.0%、6.9% および 14.2% というコントロールからの細胞数の減少を伴った。5-FU は、 10^{-5} M の濃度で、48 時間、72 時間および 96 時間で、細胞増殖を阻害して、コントロールに対してそれぞれ細胞数が 26.0%、30.1% および 36.4% 減少していた。5-FU は、 10^{-6} M の濃度でまた、48 時間、72 時間および 96 時間で、増殖を阻害し、それぞれコントロールに対して 12.7%、10.8% および 15.2% 細胞数が減少していた。5-FU (10^{-5} M) を OGF (10^{-6} M) と組み合わせた場合、増殖阻害は、24 時間、48 時間、72 時間および 96 時間で観察され、それぞれ、21.5%、35.7%、39.7% および 47.4% という滅菌水処置したコントロールからの細胞数の減少を生じた。5-FU (10^{-6} M) を OGF (10^{-6} M) と組み合わせた場合、細胞増殖阻害は、24 時間、48 時間、72 時間および 96 時間で観察され、それぞれ、13.2%、22.2%、23.6% および 30.3% というコントロールからの細胞数の減少をともなった。 10^{-5} M の 5-FU と組み合わせた OGF は、24 時間、48 時間、72 時間および 96 時間の時点でいずれかの薬物単独よりも有意に阻害性であって、15.5 ~ 38.7% におよぶ細胞数の減少をともなった。

20

30

【0072】

（実施例 4 - ゲムシタビンおよび OGF の細胞周期分析）

ゲムシタビンおよび / または OGF が、それらの効果を発揮する正確な細胞周期の相を検討するために、フローサイトメトリーを行った。OGF は、細胞周期の G₀ / G₁ 期への有意な増大を示さなかつたが、この相では細胞の割合のわずかな増大が、OGF 曝露後 2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、12 時間、20 時間および 24 時間で観察された。ゲムシタビンは、G₁ / S 期を変更することが公知であり、この補充は、ゲムシタビンまたはゲムシタビン / OGF のいずれかでの処置後 6 時間程度の早期に観察され得る。細胞周期の G₂ / M 期における細胞の割合の減少は、ゲムシタビンのみで処置された細胞に比較してゲムシタビン / OGF で処置した細胞で観察され、これによって、さらに多くの細胞が併用療法を用いて G₁ S 中で行き止ったことが示される。ゲムシタビンでの処置の 48 時間および 120 時間には、G₁ 補充は、強力なままであって、48 時間および 120 時間のゲムシタビン / OGF 処置で G₁ 中にそれぞれ細胞の 73.50% および 60.75% が残り、細胞周期の G₁ 期には細胞の 74.03% および 60.15% が停止した。

40

【0073】

（実施例 5 - ヌードマウスモデルにおけるインビボでの OGF / ゲムシタビン処置）

インビボにおける併用した OGF / ゲムシタビン処置の有効性を試験するため、無胸腺ヌードマウスモデルを用いた。OGF の処置 ($10 \text{ mg} / \text{kg}$ 毎日)、ゲムシタビン ($120 \text{ mg} / \text{kg}$ 、3 日ごと)、およびゲムシタビン ($120 \text{ mg} / \text{kg}$ 、3 日ごと) / OGF ($10 \text{ mg} / \text{kg}$ 毎日) を用いて、 1×10^6 Mi a P a C a - 2 細胞を接種したマ

50

ウスを処置した。

【0074】

(a. Mi a P a C a - 2 腫瘍の発現および増殖)

Mi a P a C a - 2 細胞を注射された全てのマウスが腫瘍を発症した。腫瘍細胞接種後16日目に、コントロールの生理食塩水処置群およびOGF群における全てのマウスが腫瘍を有したが、ゲムシタビン処置したマウスのうち75%、およびゲムシタビン/OGF($p < 0.0001$)処置したマウスのうち0%が腫瘍を有した(図8を参照のこと)。可視の腫瘍に対する潜伏期間を試験する場合、コントロールのマウスは、腫瘍細胞の接種の10日以内に、可視であるが、測定不能な腫瘍を発症した。OGFのマウスおよびゲムシタビンのマウスはまた、同じ10日の時間枠内に腫瘍を発症したが、ゲムシタビン/OGFマウスは、16日以内に腫瘍を発症し、このことは、可視の腫瘍発症ではほぼ6日の遅延を示す($p < 0.05$)。測定可能な(62.5 mm³)腫瘍についての潜伏期間は、可視の腫瘍についての潜伏期間と類似のパターンを示した。コントロール、OGFおよびゲムシタビン群は、腫瘍細胞接種の2週間以内に測定可能な腫瘍を有し、一方ゲムシタビン/OGF群は、20日以内に測定可能な腫瘍を発症した($p < 0.05$)。腫瘍の寸法は、腫瘍が測定可能であるとみなされた日に開始して毎日記録して、データを、各々のマウスが31日の経過にわたって測定可能な腫瘍を有した初日に開始して、測定の2日連続する日ごとにプロットした。

【0075】

測定可能な腫瘍の出現の第6の時点(測定可能な腫瘍の発生の12日目)から、各々のマウスが36日の経過にわたって測定可能な腫瘍を有した初日に開始して、2連続日ごとの測定値をプロットしたデータを用いて(図8)、OGFマウスは、それぞれ、29.9~40.7%の減少という、コントロールのマウスよりも有意に($p < 0.01$ 、時点7、9、および16、 $p < 0.001$ 、時点8、そして $p < 0.05$ 、残り全て)小さい腫瘍を有した。4番目の時点で開始して、3つの処置群全てで有した腫瘍は、コントロールの腫瘍よりも有意に小さかった。3、9、10および11に加えたあらゆる時点で、ゲムシタビン/OGFマウスは、OGF群における腫瘍サイズよりも有意に小さい腫瘍を有した。1、4、14、15および16の時点で、ゲムシタビン/OGFマウスは、ゲムシタビン単独のマウスよりも有する腫瘍が有意に小さかった。ゲムシタビンのみを投与されているマウスの腫瘍容積は、時点4、5および6で、OGFを受けているマウスの腫瘍容積とは有意に異なった。ANOVAによって、上述以外には、ゲムシタビン対ゲムシタビン/OGFの間に多くの有意差は明らかにならなかったが、ゲムシタビン/OGF腫瘍の容積は、ANOVAにより有意とみなされた時点で29.8~56.9%小さかった。

【0076】

(実施例6 - ゲムシタビン増殖曲線 - 細胞カウント)

Mi a P a C a - 2 細胞の増殖に対するゲムシタビンおよび/またはOGFの効果のさらなる検討を、正確な細胞カウントを行うことによって探究した。図9は、OGF(10^{-6} M)単独が、48時間、72時間および96時間で増殖を阻害し、それぞれ15.5%、17.6%および16.7%というコントロールからの細胞数の減少を伴っていたことを図示する。ゲムシタビンは、 10^{-7} Mの濃度で、24時間、48時間、72時間および96時間で、細胞増殖を阻害して、ここでは、コントロールに対してそれぞれ細胞数が30.1%、46.4%、47.4%および64.2%減少していた。ゲムシタビンは、 10^{-8} Mの濃度でまた、48時間、72時間および96時間で、増殖を阻害し、それぞれコントロールに対して細胞数が21.7%、21.2%および32.4%減少していた。ゲムシタビン(10^{-8} M)をOGF(10^{-6} M)と組み合わせた場合、増殖阻害は、48時間、72時間および96時間で観察され、それぞれ、26.3%、49.2%、および45.9%という細胞数の減少を生じていた。OGF(10^{-6} M)と組み合わせた場合のゲムシタビン(10^{-8} M)は、OGF単独よりも72時間および96時間で、そしてゲムシタビン(10^{-8} M)単独よりも72時間および96時間で有意に阻害性であった(表5を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0077】

表1は、96時間のトライアルにわたり、パクリタキセルおよび／またはOGF対コントロール(A)、OGF(B)、パクリタキセル 10^{-7} M(C)およびパクリタキセル 10^{-8} M(D)についての一元ANOVAから得られた有意値を示す。

【0078】

表2は、96時間のトライアルにわたり、カルボプラチン(Carb)および／またはOGF対コントロール(A)、OGF(B)、カルボプラチン 10^{-6} M(C)およびカルボプラチン 10^{-7} M(D)についての一元ANOVAから得られた有意値を示す。

【0079】

表3は、96時間のトライアルにわたり、ゲムシタビンおよび／またはOGF対コントロール(A)、 10^{-6} MのOGF(B)、ゲムシタビン 10^{-7} M(C)およびゲムシタビン 10^{-8} M(D)についての一元ANOVAから得られた有意値を示す。

【0080】

表4は、96時間のトライアルにわたり、5-FUおよび／またはOGF対コントロール(A)、OGF(B)、 10^{-5} Mの5-FU(C)または 10^{-6} Mの5-FU(D)についての一元ANOVAから得られた有意値を示す。

【0081】

表5は、96時間のトライアルにわたり、ゲムシタビンおよび／またはOGF対コントロール(A)、OGF(B)、ゲムシタビン 10^{-7} M(C)およびゲムシタビン 10^{-8} M(D)についての一元ANOVAから得られた有意値を示す。

【0082】

(表1.96時間のトライアルにわたり、パクリタキセル(Taxol[Tax])および／またはOGF対コントロール(A)、OGF(B)、パクリタキセル 10^{-7} M(C)およびパクリタキセル 10^{-8} M(D)についての一元ANOVAから得られた有意値)

【0083】

【表1】

時間	[OGF]	[Tax 10 ⁻⁷ M]	[Tax 10 ⁻⁸ M]	[Tax 10 ⁻⁷ M/OGF]	[Tax 10 ⁻⁸ M/OGF]
A. コントロール値からの有意性					
24		***		***	
48	**	***		***	***
72	**	***	***	***	***
96	***	***	***	***	***
B. OGFの値からの有意性					
24		++		++	
48		+++		+++	++
72		+++	++	+++	+++
96		+++		+++	+++
C タキソール 10⁻⁷Mの値からの有意性					
24			^^^^ ^a		
48			^^^^ ^a	^^^^ ^a	
72			^^^^ ^a	^^^^ ^a	
96			^^^^ ^a	^^	^^^^ ^a
D タキソール 10⁻⁸Mの値からの有意性					
24		###		###	
48		###		###	###
72		###		###	###
96		###		###	###

10

20

30

コントロールからの有意性、 $p < 0.001$ (***)、 $p < 0.01$ (**)、そして $p < 0.05$ (*)。

OGFからの有意性、 $p < 0.001$ (+++)、 $p < 0.01$ (++)、そして $p < 0.05$ (+)。

Taxol 10⁻⁷Mからの有意性、 $p < 0.001$ ()、 $p < 0.01$ ()、 $p < 0.05$ ()。

Taxol 10⁻⁸Mからの有意性、 $p < 0.001$ (# # #)、 $p < 0.01$ (# #)、 $p < 0.05$ (#)。

^aは、Taxol 10⁻⁸MおよびTaxol 10⁻⁸M/OGFが、Taxol 10⁻⁷Mよりもこれらの時点での阻害性が有意に小さかった ($p < 0.001$) ことを示す。

【0084】

(表2.96時間のトライアルにわたる、カルボプラチン (Carb) および/またはOGF対コントロール (A)、OGF (B)、カルボプラチン 10⁻⁶M (C) およびカルボプラチン 10⁻⁷M (D)についての一元ANOVAから得られた有意値)

【0085】

40

【表2】

時間	[OGF]	[Carb 10 ⁻⁶ M]	[Carb 10 ⁻⁷ M]	[Carb 10 ⁻⁶ M/OGF]	[Carb 10 ⁻⁷ M/OGF]	
A. コントロール値からの有意性						
24				**		
48	***	**		***	***	
72	***	***	***	***	***	
96	***	***	***	***	***	10
B. OGFの値からの有意性						
24						
48			+++ ^a	++	+++	
72		+++	+++	+++	+++	
96		+++	+++	+++	+++	
C. カルボプラチナ 10⁻⁶ Mの値からの有意性						
24						20
48			^b	^^^	^^^	
72			^b	^^^	^	
96				^^		
D. カルボプラチナ 10⁻⁷ Mの値からの有意性						
24						
48	#			###	###	
72	##			###	###	30
96				###		

コントロールからの有意性、 $p < 0.001$ (***)、 $p < 0.01$ (**)、そして $p < 0.05$ (*)。

OGFからの有意性、 $p < 0.001$ (+++)、 $p < 0.01$ (++)、そして $p < 0.05$ (+)。

カルボプラチナ 10⁻⁶ Mからの有意性、 $p < 0.001$ ()、 $p < 0.01$ ()、 $p < 0.05$ ()。

カルボプラチナ 10⁻⁷ Mからの有意性、 $p < 0.001$ (# # #)、 $p < 0.01$ (# #)、 $p < 0.05$ (#)。

^a は、OGFが、カルボプラチナ 10⁻⁷ Mよりもこの時点で有意に阻害性であった ($p < 0.001$) ことを示す。^b は、カルボプラチナ 10⁻⁶ Mが、カルボプラチナ 10⁻⁷ Mよりもこれらの時点で有意に阻害性であったことを示す。

【0086】

(表3.96時間のトライアルにわたる、ゲムシタビンおよび/またはOGF対コントロール(A)、10⁻⁶ MのOGF(B)、ゲムシタビン10⁻⁷ M(C)およびゲムシタビン10⁻⁸ M(D)についての一元ANOVAから得られた有意値)

【0087】

【表3】

時間	[OGF]	[Gem 10 ⁻⁷ M]	[Gem 10 ⁻⁸ M]	[Gem 10 ⁻⁷ M/OGF]	[Gem 10 ⁻⁸ M/OGF]	
A. コントロール値からの有意性						
24		**		***	*	
48		***		***	***	
72	***	***	***	***	***	
96	***	***	***	***	***	10
B. OGFの値からの有意性						
24				+++		
48		+++		++	+++	
72		+++		+++	+++	
96		+++	++	+++	+++	
C. ゲムシタбин 10⁻⁷ Mの値からの有意性						
24				^^^		20
48			^^^^ ^a	^^^		
72			^^^^ ^a	^^	^^^^ ^a	
96			^^^^ ^a	^^	^ ^a	
D. ゲムシタбин 10⁻⁸ Mの値からの有意性						
24				###		
48		### ^b		###	###	
72		### ^b		###	###	30
96		### ^b		###	###	

コントロールからの有意性、 $p < 0.001$ (* * *)、 $p < 0.01$ (* *)、そして $p < 0.05$ (*)。

OGFからの有意性、 $p < 0.001$ (+ + +)、 $p < 0.01$ (+ +)、そして $p < 0.05$ (+)。

Gemzar 10⁻⁷ Mからの有意性、 $p < 0.001$ ()、 $p < 0.01$ ()、 $p < 0.05$ ()。

Gemzar 10⁻⁸ Mからの有意性、 $p < 0.001$ (# # #)、 $p < 0.01$ (# #)、 $p < 0.05$ (#)。

^a は、Gemzar 10⁻⁸ MおよびGemzar 10⁻⁸ M / OGFが、Gemzar 10⁻⁷ Mよりもこれらの時点で有意に ($p < 0.001$)、 $p < 0.05$) 阻害性が小さかったことを示す。^b は、Gemzar 10⁻⁸ Mが、Gemzarの10⁻⁷ Mよりもこれらの時点で有意に ($p < 0.001$) 阻害性が小さかったことを示す。

【0088】

(表4.96時間のトライアルにわたる、5-FUおよび/またはOGF対コントロール(A)、OGF(B)、10⁻⁵ Mの5-FU(C)または10⁻⁶ Mの5-FU(D)についての一元ANOVAから得られた有意値)

【0089】

【表4】

時間	[OGF]	[5-FU 10 ⁻⁵ M]	[5-FU 10 ⁻⁶ M]	[5-FU 10 ⁻⁵ M/OGF]	[5-FU 10 ⁻⁶ M/OGF]	
A. コントロール値からの有意性						
24	***			***	***	
48	*	***	***	***	***	
72	**	***	***	***	***	
96	***	***	***	***	***	10
B. OGFの値からの有意性						
24	++ ^a	++ ^a		+++	+++	
48	+++			+++	+++	
72	+++			+++	+++	
96	+++			+++	+++	
C. 5-FU 10⁻⁵ Mの値からの有意性						
24				^^^	^^^ ^b	
48		^^^ ^b		^^		
72		^^^ ^b		^^^	^ ^b	
96		^^^ ^b		^^^	^ ^b	20
D. 5-FU 10⁻⁶ Mの値からの有意性						
24				###	###	
48	#### ^b			###	##	
72	#### ^b			###	###	30
96	#### ^b			###	###	

コントロールからの有意性、 $p < 0.001$ (* * *)、 $p < 0.01$ (* *)、そして $p < 0.05$ (*)。

OGFからの有意性、 $p < 0.001$ (+ + +)、 $p < 0.01$ (+ +)、そして $p < 0.05$ (+)。

5-FU 10⁻⁵ Mからの有意性、 $p < 0.001$ ()、 $p < 0.01$ ()、 $p < 0.05$ ()。

5-FU 10⁻⁶ Mからの有意性、 $p < 0.001$ (# # #)、 $p < 0.01$ (# #)、 $p < 0.05$ (#)。

^a は、OGFが、5-FU 10⁻⁵ Mおよび5-FU 10⁻⁶ Mよりもこれらの時点
で有意に ($p < 0.001$) 阻害性であったことを示す。^b は、5-FU 10⁻⁵ Mが
、5-FUの10⁻⁶ Mおよび5-FU 10⁻⁶ M / OGF 10⁻⁶ Mよりもこれらの
の時点で有意に阻害性であったことを示す。 40

【0090】

(表5.96時間のトライアルにわたる、ゲムシタビンおよび/またはOGF対コントロール(A)、OGF 10⁻⁶ M(B)、ゲムシタビン10⁻⁷ M(C)およびゲムシタビン10⁻⁸ M(D)についての一元ANOVAから得られた有意値)

【0091】

【表5】

時間	[OGF]	[Gem 10 ⁻⁷ M]	[Gem 10 ⁻⁸ M]	[Gem 10 ⁻⁷ M/OGF]	[Gem 10 ⁻⁸ M/OGF]	
A. コントロール値からの有意性						
24	**			***	*	
48	***			***	***	
72	***	***	***	***	***	
96	***	***	***	***	***	10
B. OGFの値からの有意性						
24				+++		
48	+++			++	+++	
72	+++			+++	+++	
96	+++	++		+++	+++	
C. ゲムシタビン 10⁻⁷ Mの値からの有意性						
24				^^^		20
48		^^^a		^^^		
72		^^^a		^^	^^^a	
96		^^^a		^^	^a	
D. ゲムシタビン 10⁻⁸ Mの値からの有意性						
24				###		
48	### ^b			###	###	
72	### ^b			###	###	30
96	### ^b			###	###	

コントロールからの有意性、 $p < 0.001$ (* * *)、 $p < 0.01$ (* *)、そして $p < 0.05$ (*)。

OGFからの有意性、 $p < 0.001$ (+ + +)、 $p < 0.01$ (+ +)、そして $p < 0.05$ (+)。

Gemzar 10⁻⁷ Mからの有意性、 $p < 0.001$ ()、 $p < 0.01$ ()、 $p < 0.05$ ()。

Gemzar 10⁻⁸ Mからの有意性、 $p < 0.001$ (# # #)、 $p < 0.01$ (# #)、 $p < 0.05$ (#)。

^a は、Gemzar (ゲムシタビン) 10⁻⁸ およびGemzar 10⁻⁸ M / OGF が、Gemzar 10⁻⁷ Mよりもこれらの時点で有意に ($p < 0.001$) 阻害性が小さかったことを示す。^b は、Gemzar 10⁻⁸ Mが、Gemzar の 10⁻⁷ Mよりもこれらの時点で有意に ($p < 0.001$) 阻害性が小さかったことを示す。

【0092】

(実施例7)

膵臓癌における抗腫瘍因子としての、OGF (生物療法) の、およびゲムシタビン (化学療法) の有望な性質を、そしてOGF およびゲムシタビンの同時の使用に関する前臨床データがないこと考慮して、本研究は、これらの様式の組み合わせの治療能力を探索するために設計した。ヒト膵臓腺癌の組織培養モデルを用いて、OGF およびゲムシタビンの

両方に対する付随する曝露の効果を、増殖に対して特徴付けた（例えば、可逆性、レセプター媒介、特異性）。膵臓癌に関する別の化学療法処置（例えば、5-FU）およびOGFの関係、ならびに他の膵臓癌細胞株に対する併用療法の普遍性を評価した。最終的に、本報告は、OGFおよびゲムシタビンの組み合わせが、インビボにおいてヒト膵臓癌の増殖に影響するか否か、そしてそれによって各々の化合物の有効性を超えるか否かという疑問に取り組む。腫瘍の出現、外見およびサイズ、ならびに転移に対するOGFおよび/またはゲムシタビンの効果を、膵臓癌の異種移植片モデルにおいて試験した。

【0093】

(材料および方法)

(細胞株)

10

MIA PaCa-2およびPNAC-1ヒト膵臓腺癌細胞株は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。MIA PaCa-2細胞は、身体に存在する未分化の上皮癌および65歳齢の男性の膵臓の尾部に由来した[36]。PNAC-1細胞は、56歳齢の男性における膵臓の頭部由来の未分化の癌腫に由来した[18]。MIA PaCa-2およびPANC-1細胞は、ダルベッコMEM(変更)培地において増殖させた；培地には10%ウシ胎仔血清、1.2%重炭酸ナトリウム、および抗生物質(5,000単位/mlのペニシリン、5mg/mlのストレプトマイシン、10mg/mlのネオマイシン)を補充し、そして細胞は、7%CO₂/93%空気という湿潤雰囲気中で37で維持した。

20

【0094】

(増殖アッセイ)

MIA PaCa-2細胞を、等価な量で、75cm² フラスコ、6ウェルプレート、または96ウェルプレート(Falcon)のいずれかの中に播種して、24時間後にカウントしてプレート効率を測定した。PNAC-1細胞の増殖アッセイは、6ウェルプレート(Falcon)中で行った。化合物または滅菌水は、播種(=0時間)の24時間後に開始して添加して、培地および化合物の両方を、毎日交換した。全ての薬物は、滅菌水中に調製して、希釀は化合物の最終濃度であった。

20

【0095】

細胞数は、分裂促進的バイオアッセイ、MTSアッセイ(Cell Titer 96 One Solution, Promega, Madison, WI)を用いること、および490nmでのBiolog(3550モデル)プレートリーダーで4時間後の吸光度を測定すること、または細胞をカウントすることのいずれかによって記録した。手動のカウントのために、細胞は、0.25%トリプシン/0.53mM EDTAの溶液で回収して、遠心分離し、血球計でカウントした。細胞の生存度は、トリパンブルー染色によって測定した。1フラスコあたり少なくとも2つのアリコートまたは1処置あたり4~10のウェルを各々の時点でカウントした。

30

【0096】

(動物および腫瘍細胞の移植)

Harlan Laboratories(Indianapolis, IN)から購入した雄性の4週齢のBALB/c-nu/nuヌードマウスを、Penn State University College of MedicineのDepartment of Comparative Medicineにおいて病原体なしのアイソレーター中で飼育した。全ての手順は、Penn State University College of MedicineのIACUC委員会で承認されて、NIHによって確立されたガイドラインに適合された。マウスは実験の開始前に48時間順応させた。

40

【0097】

MIA PaCa-2細胞(10⁶細胞/マウス)を、右肩甲骨領域への皮下注射によってヌードマウスに接種した；この手順に関してはマウスは麻酔しなかった。

【0098】

(薬物処置)

50

マウスの4つの群($n = 12$)を、毎日 $10\text{ mg} / \text{kg}$ のOGF、3日ごとに $120\text{ mg} / \text{kg}$ のゲムシタビン；毎日 $10\text{ mg} / \text{kg}$ のOGFおよび3日目ごとに $120\text{ mg} / \text{kg}$ のゲムシタビン、または毎日 0.1 ml の滅菌生理食塩水の腹腔内注射を受けるよう無作為に割り当てた[29、38]。全ての薬物は、生理食塩水に溶解して、毎週調製した。注射は腫瘍細胞接種の1時間以内に与えた。

【0099】

(腫瘍増殖および転移)

マウスは、この実験全体にわたって毎週秤量して、腫瘍の存在に関して毎日観察した。可視性の腫瘍が出現する潜伏期間、および腫瘍が測定可能(すなわち、 62.5 mm^3)になるまでの時間を記録した。腫瘍は、腫瘍出現後、毎日ノギスを用いて測定した。腫瘍容積は、式 $w^2 \times 1 \times / 6$ を用いて計算し、ここでは長さは最長の寸法であって、幅は長さに対して垂直の寸法である[31]。

10

【0100】

(終了日の測定)

IACUCガイドラインに従って、腫瘍が潰瘍化した場合、または腫瘍が直径で 2 cm に増殖した場合マウスを死亡させた。腫瘍細胞接種の45日後、全てのマウスを過剰のペントバルビタールナトリウム($100\text{ mg} / \text{kg}$)によって安楽死させ、頸椎脱臼によって殺傷したマウス(腫瘍を有する)を秤量した。腫瘍および脾臓を取り出し秤量して、リンパ節、肝臓および脾臓を転移について試験した。

20

【0101】

($[\text{Met}^5]$ - エンケファリン(OGF)の血漿レベル)

終了の時点で、体幹の血液を各々の群の数匹のマウスから収集した。血漿を分離して、OGFレベルは、Peninsula Laboratories(Belmont, CA)の $[\text{Met}^5]$ - エンケファリンキットを用いて標準的なラジオイムノアッセイ手順によって測定した。

20

【0102】

(化合物)

以下の化合物は、Sigma Chemicals(St. Louis, MO)から入手した： $[\text{Met}^5]$ - エンケファリン(OGF)、 $[\text{D}-\text{Pen}^2, \text{Pen}^5]$ - エンケファリン(DPDPE)、 $[\text{D}-\text{Ala}^2, \text{MePhe}^4, \text{Glyol}^5]$ - エンケファリン(DAMGO)、 - エンドルフィン、ナルトレキソン(NTX)、ナロキソン、ダイノルフィンA1 - 8、 $[\text{D}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Leu}-\text{エンケファリン}]$ (DADLE)、モルフィン、エンドモルフィン-1、およびエンドモルフィン-2。

30

【0103】

(データ分析)

細胞数および/または吸光度を、分散分析(ANOVA)(必要に応じて1または2つの因子)を用いて分析し、引き続く比較は、Newman - Keuls検定を用いて行った。腫瘍の発生は、カイニ乗検定によって分析した。腫瘍の出現の潜伏期間および腫瘍容積は、両側t検定またはANOVAのいずれかを用いて分析し、その後の比較はNewman - Keuls検定を用いて行った。終了データ(すなわち、体重、腫瘍重量、脾臓重量)およびOGFの血漿レベルをANOVAによって比較した。

40

【0104】

(結果)

(OGFおよび/またはゲムシタビンを用いた増殖アッセイ)

10^{-6} M OGF(MIA PaCa-2細胞の増殖を阻害することが公知の用量、44)、 10^{-8} M ゲムシタビン(予備実験によって 10^{-7} M の用量での対数増殖が明らかにならなかつたので選択した用量)、 10^{-8} M のゲムシタビンおよび 10^{-6} M のOGF、または滅菌水(コントロール)で処置したMIA PaCa-2細胞培養物の増殖曲線を図10に示す。OGF単独では、コントロールに対して48時間、72時間および96時間で増殖を阻害し、それぞれ、16%、18%および17%という細胞数の減少

50

が注目された。ゲムシタビン単独では、コントロールに対して、48時間、72時間および96時間で、それぞれ細胞数を22%、21%および32%減少させた。OGFおよびゲムシタビンの併用で処置した細胞は、コントロールに対して、それぞれ48時間、72時間および96時間で26%、49%および46%まで数が減った。72時間では、ゲムシタビンおよびOGFの併用療法を受けている培養物中の細胞数は、それぞれOGFまたはゲムシタビンにのみ曝露された細胞から38%および36%減少した($p < 0.001$)。さらに、96時間では、ゲムシタビンおよびOGFの併用療法は、それぞれOGFまたはゲムシタビンのみを投与されている培養物からMIA PaCa-2細胞の数を35%および20%減少させた($p < 0.001$)。

【0105】

(5-フルオロウラシルでの増殖アッセイ)

OGFが、膵臓癌を処置するために一般に用いられる他の化学療法剤の阻害性効果を増強し得るか否かを検討するために、MIA PaCa-2細胞培養物を5-フルオロウラシル(5-FU)に対して 10^{-6} Mの濃度で4日間曝露した(図11)。5-FU群におけるMIA PaCa-2細胞の数は、48時間、72時間および96時間でコントロールのレベルより11%~15%減少した。5-FU(10^{-6} M)およびOGF(10^{-6} M)の併用療法は、24時間、48時間、72時間および96時間でコントロールの値より13%~30%細胞数を減少させた。検討した全ての時点で、5-FUおよびOGFの併用療法は、OGFのみを投与されている培養物より6%~19%、そして5-FUのみを投与されている培養物より10%~17%、MIA PaCa-2細胞の数を減少させた。

【0106】

(OGFおよび/またはゲムシタビンのレセプター媒介性の影響)

OGF活性がOGFレセプターによって媒介されるか否かを調査するため、短時間作用性のオピオイドアンタゴニストであるナロキソンを、 10^{-6} MのOGFおよび/またはゲムシタビン(10^{-8} M)を投与されている培養物中に 10^{-6} Mの用量で添加した。96ウェルプレート中で増殖したMIA PaCa-2細胞を、 10^{-6} MのOGF、 10^{-6} Mのナロキソン、 10^{-8} Mのゲムシタビン、または同じ濃度の組み合わせ-OGF/ナロキソン、ゲムシタビン/ナロキソン、ゲムシタビン/OGF、およびゲムシタビン/OGF/ナロキソンで処置した;コントロール培養物には滅菌水を与えた。個々のプレートを薬物添加の96時間後に読み取った。コントロールのレベルに対して、OGF、ゲムシタビン、ゲムシタビン/OGFおよびゲムシタビン/OGF/ナロキソンの添加は、細胞増殖を13%~36%、阻害した(図12)。ナロキソンの添加はOGF単独の増殖阻害効果を完全にブロックしたが、ゲムシタビン単独の増殖阻害性作用には影響を有さなかった。さらに、ナロキソンは部分的に、ゲムシタビンおよびOGFの併用の増強された阻害性効果を中和した;ゲムシタビン/OGF/ナロキソン群の細胞数は、ゲムシタビンに曝露された細胞に匹敵したが、コントロールのレベルからは有意に減少した。ナロキソン単独では、MIA PaCa-2細胞の増殖に影響はなかった。

【0107】

(OGFおよび/またはゲムシタビンの阻害性の増殖効果の可逆性)

細胞数に対するOGFおよび/またはゲムシタビンの影響が薬物曝露から細胞を離脱させることによって逆転され得るか否かを確認するために、MIA PaCa-2細胞の培養物を48時間にわたって 10^{-6} MのOGFおよび/または 10^{-8} Mのゲムシタビンに曝した。薬物曝露の48時間後に、プレートの半分は培地を除いて、OGFもゲムシタビンも添加しない新鮮な培地を添加した(すなわち、OGF-逆転(reversal);ゲムシタビン-逆転;ゲムシタビン/OGF-逆転群);いくつかの培養物には、新しい培地および薬物を継続して与えた。96時間で(すなわち逆転後48時間で)、OGF、ゲムシタビン、ゲムシタビン-逆転、ゲムシタビン/OGFおよびゲムシタビン/OGF-逆転群は、コントロールから21%~46%異なった(図13A、図13B)。OGF-逆転群は、OGF曝露を継続しているOGF群よりも16%多い細胞を有した。しか

10

20

30

40

50

し、ゲムシタビン - 逆転群は、ゲムシタビンでの処置を継続している細胞培養とは異ならなかつた。OGFおよびゲムシタビンの併用に曝された細胞培養物は、ゲムシタビン / OGF - 逆転群での培養物よりも有する細胞が7%少なかつた。

【0108】

(腺臓癌細胞増殖に関連するオピオイドペプチド (単数または複数) の特異性)

他のオピオイドペプチド (単数または複数) が増殖に関連するか否かを確認するために、MIA PaCa - 2 培養物 (1,000 細胞 / ウェル) を 10^{-6} M 濃度の種々の天然および合成のオピオイドリガンドで毎日処置した。ある場合には、これらのリガンドは、他のオピオイドレセプター (例えは、 μ 、 または のレセプター) に特異的であった。薬物は、OGF、DAMGO、モルフィン、DPDPE、DADLE、ダイノルフィン A1 - 8 、エンドモルフィン - 1 、エンドモルフィン - 2 、および - エンドルフィンを含んだ。細胞数は、処置の 96 時間後にプレートリーダーで測定した (両方の薬物および培地は毎日交換した) 。OGFは、コントロールに対して細胞数を 16% 阻害した ; 増殖に阻害性または刺激性の影響を有する他の薬物は何も利用しなかつた (図 14) 。

【0109】

(OGF による増殖阻害の普遍性)

ゲムシタビンおよびOGFの併用に対して曝した後のMIA PaCa - 2 細胞で観察された増殖阻害が、細胞株特異的作用ではないかどうかを確認するため、別のヒト腺臓癌細胞株PANC - 1 を試験した。72時間後、OGF (10^{-6} M) 、ゲムシタビン (10^{-8} M) 、OGF (10^{-6} M) およびゲムシタビン (10^{-8} M) のいずれかに対するPANC - 1 細胞の曝露によって、コントロールの培養における細胞より、それぞれ、31% 、 31% および 54% 、細胞が少ないことが明らかになった (図 15) 。OGF および / またはゲムシタビンに対する曝露での細胞増殖のこれらの相違は、コントロールのレベルとは有意に異なり ($p < 0.001$) 、そしてOGF およびゲムシタビンの併用は、OGF 単独およびゲムシタビン単独の培養と異なつた ($p < 0.01$) 。

【0110】

(MIA PaCa - 2 腫瘍の出現および増殖)

インビボでの腺臓腫瘍の増殖に対するOGF および / またはゲムシタビンの効果を検討するために、ヌードマウスにMIA PaCa - 2 細胞を注射して、薬物で処置した。10日目に、生理食塩水を注射したコントロール群のマウスのうち 80% が測定可能な腫瘍を有し、OGF のうち 60% およびゲムシタビン処置動物のうち 75% が、腫瘍を有し、ゲムシタビン / OGF 群のマウスは測定可能な腫瘍を有さなかつた ; ゲムシタビンおよび OGF の併用療法を受けている群は、 $p < 0.001$ で他の全ての群と有意に異なつた (表 6) 。16日目に、測定可能な腫瘍の出現において、群間で相違は検出できず、そして全ての動物が、17日目までに腫瘍を有した。ゲムシタビン / OGF 群のマウスにおける可視の腫瘍の出現についての潜伏期間は、コントロール、OGF およびゲムシタビン群における動物からほぼ 5 ~ 6 日遅れた ; ゲムシタビン / OGF 群についてのこの遅延は、 $p < 0.05$ で他の全ての群の遅延と有意に異なつた。ゲムシタビン / OGF 群のマウスにおける測定可能な腫瘍発現についての平均潜伏期間は、コントロール、OGF およびゲムシタビン群における動物から約 6 日遅れた ($p < 0.05$) 。

【0111】

45日の実験にわたる腫瘍容積の変化を分析した (図 16) 。OGF 、ゲムシタビンおよびゲムシタビン / OGF 群は全て、14日目に開始して腫瘍容積においてコントロールとは異なつた (少なくとも $p < 0.05$) 。併用療法 (すなわち、ゲムシタビン / OGF) を受けているマウスの腫瘍容積は、10日目に開始してOGFのみで処置されたマウスと、そして 35 日目に開始してゲムシタビン単独で処置されたマウスとは異なつた ($p < 0.05$) 。群間の腫瘍容積の相違は、実験期間の残りにわたって継続した。45日の期間において増殖の速度を分析して、図 16B に示した。この結果によって、3つの処置群全てで腫瘍の増殖速度はコントロールのレベルから顕著に減少した ($p < 0.001$) ことが実証された。さらに、ゲムシタビンおよびOGF の併用で処置されたマウスにおける

腫瘍増殖速度は、OGF単独群およびゲムシタビン単独群の両方から有意に低下した（p < 0.001）。

【0112】

終わり（すなわち45日）の時点で、全ての群のマウスの体重は、統計学的評価で異なることがなかった（表7）。さらに、各々の群における動物の剖検では、転移は明らかにならなかった。しかし、ゲムシタビン単独およびゲムシタビン/OGF群におけるマウスについての45日目の脾臓重量は、コントロールの値から約40%減少していた；OGF群の脾臓重量はコントロールのレベルに比較して変化は認められなかった（表7）。OGF単独群、ゲムシタビン単独群、およびゲムシタビン/OGF単独群についての終了日での腫瘍の重量は、コントロールのレベルからそれぞれ、36%、56%および85%減少した（表7）。OGF単独群、ゲムシタビン単独群およびゲムシタビン/OGF群についての45日目の腫瘍容積は、コントロールの値からそれぞれ、46%、56%および83%減少した（表7）。

【0113】

（OGFの血漿レベル）

MIA PaCa-2腫瘍を保有するヌードマウスの血漿中のOGFレベルは、129~289pg/mlによんだ。コントロールマウスとOGF単独、ゲムシタビン単独またはゲムシタビン/OGFで処置されたマウスとの間に相違は認められなかった。

【0114】

（考察）

本研究における結果によって、OGFおよびゲムシタビンの併用がヒト膵臓癌のインビトロにおける増殖に強力な阻害効果を有することが実証される。OGFおよびゲムシタビンの併用の抗増殖作用は、個々の薬物よりも常に大きい。多くの場合、薬物の併用の効果は個々の薬物の合計の効果を上回り、OGFおよびゲムシタビンの併用の作用は、相加を上回った（相乗的であった）（supra-additive）ことが示唆された。OGFで、およびゲムシタビンで個々に観察された膵臓癌のインビトロでの増殖に対する抑制的な影響は、以前の結果と一致していた[例えば、8、35、44]。細胞増殖に対するOGFの作用は、ナロキソン感受性のレセプターによって媒介された。このナロキソン感受性のレセプターは、OGFrであると想定される。なぜなら、μ、およびのような古典的なオピオイドレセプターに選択的である合成および天然のオピオイドは、本報告および初期の報告において膵臓癌細胞の増殖に影響しなかったからである[44]。OGFはまた、MIA PaCa-2細胞の複製に対して可逆性の作用を有することが発見され、このことは、この化合物での処置が細胞毒性も細胞死ももたらさないということを示す初期の研究に由来する結果を支持している[39、44]。他方では、MIA PaCa-2細胞に対するゲムシタビンの効果は、ナロキソンによってブロックされず、逆転されることもなく、これによって、MIA PaCa-2細胞に対する薬物の影響の特徴が、OGFのものとは顕著に異なることが示される。従って、これは、ヒトの膵臓癌の増殖を遅らせるために、生物療法剤、OGF、および化学療法剤、ゲムシタビンの併用を用いることの有効性についての初めての報告である。

【0115】

この報告は、MIA PaCa-2細胞に対するOGFおよびゲムシタビンの効果に集中していたが、OGFおよびゲムシタビンは、種々のヒト膵臓癌細胞株の増殖に影響することが公知である[8、35、44]。本研究によって、個々にではなくOGFおよびゲムシタビンの組み合わせがMIA PaCa-2細胞増殖に対してさらに顕著な影響を有するだけでなく、同様のパターンが、別のヒト膵臓癌細胞株であるPANC-1で見出され得るということが実証される。従って、本明細書で観察されるOGFおよびゲムシタビンの併用療法の効果は、他のヒト膵臓癌細胞株に拡張されると結論することが合理的である。

【0116】

OGFがゲムシタビン以外の化学療法剤と組み合され得るか否かという疑問に取り組む

10

20

30

40

50

ために、OGF および 5-FU の併用によって予備的な研究を行なった。これによって、代謝拮抗剤 (5-FU) とシトシンアナログとの間の対比が可能になった [32]。ピリミジンアナログである 5-FU の機構は、活性代謝物 5-フルオロ-デオキシウリジン-1-リン酸によってチミジル酸シンターゼ (ピリミジンの新規な合成に関与する酵素) を阻害することである。さらに、活性な三リン酸代謝物である 5-フルオロ-デオキシウリジン-1-リン酸および 5-フルオロ-ウリジン-1-リン酸が、核酸機能を破壊する [6]。この結果は、5-FU および OGF の併用の効果がヒト膵臓癌に対して強力な阻害性の特性を有することを初めて示すものである。ゲムシタビンおよび OGF の場合と同様、膵臓癌細胞に対する 5-FU および OGF の併用の効果は、各々の薬物よりも顕著に大きく、しばしば事実上、相加的であった。おそらく、これらの結果によって、OGF が種々の化学療法剤と組み合わせて用いられ得るということが示される。

10

【0117】

本研究の結果、OGF およびゲムシタビンの抗増殖特性は、各々の薬物単独の阻害性の効果を上回って増強されるということが示される。これらのデータは、腫瘍の発現、可視または測定可能な腫瘍についての潜伏期間、腫瘍重量および腫瘍容積について最も明らかであった。従って、インビボ研究の結果は、インビボで行われた観察と一致する。腫瘍移植の検討は、1つのヒトの膵臓癌細胞株に集中したが、OGF またはゲムシタビンは種々のヒト膵臓癌細胞株の増殖に対してインビボで影響することが公知である [3, 28, 35, 38]。従って、本研究で示された OGF およびゲムシタビンの併用療法の効果は、インビボにおける他のヒト膵臓癌細胞株に拡大される。

20

【0118】

OGF およびゲムシタビンまたは 5-FU のいずれかの併用の増強された抗腫瘍活性の機構は規定される必要がある。OGF は、細胞周期の G₀ / G₁ 期を標的としており、膵臓癌細胞の増殖に顕著な遅延を生じる [41] が、アポトーシスは生じない [39]。ゲムシタビンおよび 5-FU は、細胞毒性であって、かつプログラムされた細胞死を誘導する [9, 27, 30]。従って、OGF の細胞分裂停止作用は、ゲムシタビンまたは 5-FU に関連するアポトーシス経路へと細胞を導くことが想定され得る。

20

【0119】

ゲムシタビンは転移癌の治療に標準的であり [7, 13, 17, 24, 42]、そして局所的に進行した膵臓癌についてのための単剤の化学療法剤として臨床試験中である [1]。ゲムシタビンでの処置は、転移性の疾患には治療的でなく、この因子での処置は、その対症的な利点に関して毒性のような因子に直面して試験されなければならない [1, 17]。膵臓癌の処置における進歩のための差し迫った必要性を考慮すれば、薬物治療の組み合わせは、その多くが新規な薬剤に加えてゲムシタビンであるが、膵臓癌について、注目を集めている [5, 7, 17, 24]。本報告は、化学療法および生物療法の組み合わせの刺激的な可能性をヒト膵臓癌のための新規な処置様相へ向けさせる。OGF は毒性ではなく、薬物耐性に関する問題を回避し、容易な接近性を有し、かつ化学療法剤の慢性使用に組み込まれ得る。さらに、OGF によって、毒性濃度未満で、および / または生物治療と組み合わせた慢性のレジメンで (メトロノーム様の化学療法) [10, 16 を参照のこと] で化学療法剤を用いるという可能性がもたらされる。単剤として用いられた OGF は、進行した切除不能の膵臓癌腫を有する患者での第 I 相の臨床試験で成功している [33]。Smith および共同研究者によるこの研究における長期の実験の間 [33]、診断の時点からの平均生存は、薬物投与の経路次第で、8.7 ~ 9.5 ヶ月であり、数例の患者では 23 ヶ月程度生存していた。OGF およびゲムシタビンの併用が、組織培養および異種移植片において膵臓癌に顕著な影響を有するということを示すこの報告での前臨床の情報、ならびに毒性の欠失を報告しつつ有効性を示唆する OGF での第 I 相臨床試験からのデータによれば、OGF およびゲムシタビンでの併用薬物療法を用いる臨床試験の予想は保証されると思われる。

30

【0120】

OGF とゲムシタビンの組み合わせが、インビトロおよびインビボの両方でヒト膵臓癌

40

50

に強力な阻害性の作用を有することを示すこの研究での観察は、頭頸部の扁平上皮細胞癌 (S C C H N) の処置のための化学療法と組み合わせた O G F についての報告と一致している [1 4 , 1 9] 。組織培養を用いて、 M c L a u g h l i n および共同研究者ら [1 9] は、 O G F がパクリタキセルまたはカルボプラチニのいずれかと組み合わせて、 S C C H N の増殖に顕著な抑制的影響を有することを実証した。 J a g l o w s k i ら [1 4] は、パクリタキセルと組み合わせた O G F が、 S C C H N の異種移植片において腫瘍増殖を顕著に阻害したことを報告した。インビトロおよびインビボの両方の検討で、 O G F および化学療法の組み合わせは、個々の化合物についてよりも大きかった。臍臓 [3 8 、 4 4] および S C C H N [1 9 ~ 2 1] に加えて、 O G F は、神経芽細胞腫 [2 2] 、腎臓癌 [2] および結腸癌 [3 7] を含む広範な種々の癌の増殖に影響する (インビトロおよび / またはインビボ) ことが示されている。これらのデータによって、種々の癌のための併用した化学療法 (例えば、ゲムシタビン、パクリタキセル) および生物療法 (O G F) が妥当であることが示される。

【 0 1 2 1 】

【 数 1 】

参考文献

1. Akerele CE, Rybalova I, Kaufman HL, Mani S (2003) Current approaches to novel therapeutics in pancreatic cancer. *Invest New Drugs* 21:113-129
2. Bisignani, GJ, McLaughlin PJ, Ordille SD, Beltz MS, Jarowenko MV, Zagon IS (1999) Human renal cell cancer proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. *J. Urology* 162:2186-2191
3. Buchsbaum DJ, Bonner JA, Grizzle WE, Stackhouse MA, Carpenter M, Hicklin DJ, Bohlen P, Raisch KP (2002) Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine, and radiation. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 54:1180-1193
4. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, von Hoff DD (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer. A randomized trial. *J Clin Oncol* 15:2403-2413
5. Corrie P, Mayer A, Shaw J, D'Ath S, Blagden S, Blesing C, Price P, Warner N (2002) Phase II study to evaluate combining gemcitabine with flutamide in advanced pancreatic cancer patients. *Brit J Cancer* 87:716-719
6. Di Paolo A, Danesi R, Del Tacca M (2004) Pharmacogenetics of neoplastic diseases: New trends. *Pharmacol Res* 49:331-342
7. Diaz-Rubio E (2004) New chemotherapeutic advances in pancreatic, colorectal, and gastric cancers. *Oncologist* 9:282-294

【 0 1 2 2 】

【数2】

8. Faivre S, Raymond E, Woynarowski JM, Cvitkovic E (1999) Supraadditive effect of 2',2"-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in combination with oxaliplatin in human cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 44:117-123
9. Fueger BJ, Hamilton G, Raderer M, Pangerl T, Traub T, Angelberger P, Baumgartner G, Dudczak R, Virgolini I (2001) Effects of chemotherapeutic agents on expression of somatostatin receptors in pancreatic tumor cells. *J Nuclear Med* 42:1856-1862
10. 10. Gasparini G (2001) Metronomic scheduling: The future of chemotherapy. *Lancet Oncol* 2:733-740
11. Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB (1990) Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2'2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res* 50:4417-4422
12. Huang P, Chubb S, Hertel L, Grindley GB, Plunkett W (1991) Action of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 51:6110-6117
13. Jacobs AD (2002) Gemcitabine-based therapy in pancreas cancer. *Cancer Supplement* 85:923-927
14. 20. Jaglowski JR, Zagon IS, Stack BC, Verderame MF, Leure-duPree AE, Manning JD, McLaughlin PJ (2005) Opioid growth factor (OGF) enhances tumor growth inhibition and increases the survival of paclitaxel-treated mice with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother Pharmacol*, in press
15. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ (2004) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 54:8-29
30. 16. Kerbel RS, Klement G, Pritchard KI, Kamen B (2002) Continuous low-dose anti-angiogenic/metronomic chemotherapy: From the research laboratory into the oncology clinic. *Ann Oncol* 13:73-80
17. 17. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363:1049-1057
18. 18. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G (1975) Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15:741-747
40. 19. McLaughlin PJ, Jaglowski JR, Verderame MF, Stack BC, Leure-duPree AE, Zagon IS (2005) Enhanced growth inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck by combination therapy of paclitaxel and opioid growth factor. *Int J Oncol*, in press

【0 1 2 3】

【数3】

20. McLaughlin PJ, Levin RJ, Zagon IS (1999) Regulation of human head and neck squamous cell carcinoma growth in tissue culture by opioid growth factor. *Int J Oncol* 14:991-998
21. McLaughlin PJ, Levin RJ, Zagon IS (2003) Opioid growth factor (OGF) inhibits the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck transplanted into nude mice. *Cancer Letters* 199:209-217
22. McLaughlin PJ, Zagon IS, Skitzki J (1999). Human neuroblastoma cell growth in tissue culture is regulated by opioid growth factor. *Int J Oncol* 14:373-380
23. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49:33-64
24. Pasetto LM, Jirillo A, Stefani M, Monfardini S (2004) Old and new drugs in systemic therapy of pancreatic cancer. *Crit Rev Oncology/Hematology* 49:135-151
25. Philip PA (2002) Gemcitabine and platinum combinations in pancreatic cancer. *Cancer* 95:908-911
26. Ryan DP, Kulke MH, Fuchs CS, Grossbard ML, Grossman SR, Morgan JA, Earle CC, Shivedasani R, Kim H, Mayer RJ, Clark JW (2002) A phase II study of gemcitabine and docetaxel in patients with metastatic pancreatic carcinoma. *Cancer* 94:97-103
27. Schniewind B, Christgen M, Kurdow R, Haye S, Kremer B, Kalthoff H, Ungefroren H (2004) Resistance of pancreatic cancer to gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis. *Int J Cancer* 109:182-188
28. Schultz RM, Merriman RL, Toth JE, Zimmermann JE, Hertel LW, Andis SL, Dudley DE, Rutherford PG, Tanzer LR, Grindey GB (1993) Evaluation of new anticancer agents against the MIA PaCa-2 and PANC-2 human pancreatic carcinoma xenografts. *Oncol Res* 5:223-228
29. Schwarz RE, McCarty TM, Peralta EA, Daimond DJ, Ellenhorn JD (1999) An orthotopic in vivo model of human pancreatic cancer. *Surgery* 126:562-567
30. Shi X, Liu S, Kleeff J, Friess H, Buchler MW (2002) Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncol* 62:354-362
31. Shim WSN, Teh M, Mack POP, Ge R (2001) Inhibition of angiopoietin-1 expression in tumor cells by antisense RNA approach inhibited xenograft tumor growth in

【0 1 2 4】

【数4】

- immunodeficient mice. *Int J Cancer* 94:6-15
32. Shore S, Raraty GT, Ghaneh P, Neoptolemos JP (2003) Review article: Chemotherapy for pancreatic cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 18:1049-1069
33. Smith JP, Conter RL, Bingaman SI, Harvey HA, Mauger DT, Ahmad M, Demers LM, Stanley WB, McLaughlin PJ, Zagon IS (2004) Treatment of advanced pancreatic cancer with opioid growth factor: Phase I. *Anti-Cancer Drugs* 15:203-209
34. Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C (1992) Pancreatic carcinoma. *N Eng J Med* 326:455-465 10
35. Yip-Schneider MT, Sweeney CJ, Jun S-H, Crowell PL, Marshall MS (2001) Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Therap* 298:976-985
36. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ (1977) Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: Sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 19:128-135 20
37. Zagon IS, Hytrek SD, Lang CM, Smith JP, McGarrity TJ, Wu Y, McLaughlin PJ (1996) Opioid growth factor ([Met⁵]-enkephalin) prevents the incidence and retards the growth of human colon cancer *Amer J Physiol* 271:R780-786
38. Zagon IS, Hytrek SD, Smith JP, McLaughlin PJ (1997) Opioid growth factor (OGF) inhibits human pancreatic cancer transplanted into nude mice. *Cancer Letters* 112:167-175
39. Zagon IS, McLaughlin PJ (2003) Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* 37:79-88 30
40. Zagon IS, McLaughlin PJ (2004) Opioid growth factor (OGF) inhibits anchorage-independent growth in human cancer cells. *Int J Oncol* 24:1443-1448
42. Zagon IS, Roesener CD, Verderame MF, Ohlsson-Wilhelm BM, Levin RJ, McLaughlin PJ (2000) Opioid growth factor regulates the cell cycle of human neoplasias. *Int J Oncol* 17:1053-1061
43. Zagon IS, Smith JP (2004) Treatment options in pancreatic cancer. *Hospital Pharmacy Europe* Nov/Dec:1-2 40
44. Zagon IS, Smith JP, Conter R, McLaughlin PJ (2000) Identification and characterization of opioid growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinoma. *Int J Mol Med* 5:77-84

【0 1 2 5】

【数5】

45. Zagon IS, Smith JP, McLaughlin PJ (1999) Human pancreatic cancer cell proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. *Int J Oncol* 14:577-584
46. Zagon IS, Verderame MF, Allen SS, McLaughlin PJ (2000) Cloning, sequencing, chromosomal location, and function of a cDNA encoding the opioid growth factor receptor (OGFr) in humans. *Brain Res* 856:75-83

10

(表6. OGFおよび/またはゲムシタビン(Gemzar)で処置したヌードマウスにおけるMIA PaCa-2膵臓癌細胞の腫瘍出現の発生率および潜伏期間)

【0126】

【表6】

パラメーター	コントロール	OGF	Gemzar	Gemzar/OGF
N	10	10	12	12
腫瘍発生率、10日	8/10	6/10	9/12	0/10 ^a
腫瘍発生率、16日	10/10	10/10	11/12	9/12
可視の腫瘍の潜伏期間(日数)	10.1±1.8	10.7±0.8	11.1±1.1	16.2±1.2*
測定可能な腫瘍の潜伏期間(日数)	13.2±1.8	14.2±0.8	13.1±1.0	19.5±1.1*

20

値は平均±SEMである。^aカイ二乗分析によってp<0.001であらゆる群と有意に異なる。ANOVAを用いてp<0.05(*)でコントロールから有意に異なる。

【0127】

(表7. MIA PaCa-2膵臓癌細胞の皮下接種ならびにOGFおよび/またはゲムシタビン(Gemzar)での処置の45日後のヌードマウスの特徴)

30

【0128】

【表7】

パラメーター	コントロール	OGF	Gemzar	Gemzar/OGF
体重(g)	33.3±1.0	31.4±1.6	27.4±0.55	30.6±0.7
腫瘍重量(g)	5.5±1.0	3.5±0.5*	2.4±0.1***	0.8±0.1***++^
腫瘍容積(mm ³)	8935±1694	4849±490***	3963±123***	1477±53***+^
脾臓重量(mg)	761±61	606±121	454±49*	437±62*

40

データは平均±SEMである。p<0.05(*)およびp<0.001(***)でコントロールから有意に異なる。p<0.05(+)およびp<0.01(++)でOGF群から有意に異なる。p<0.05(+)でGemzar処置したマウスから有意に異なる。

【0129】

(実施例8)

本研究は、ヒトSCHNの組織培養モデルを用いる頭頸部の扁平上皮細胞癌(SCHN)に対するオピオイド増殖因子(OGF)およびパクリタキセルの併用の効果を評価した。OGFおよびパクリタキセルの併用は、SCHN増殖に対して顕著に阻害性であ

50

って、48時間以内にコントロールのレベルから増殖を48%~69%低下させた。カルボプラチニンと組み合わせたOGFはまた、細胞増殖を抑制した。OGFおよびパクリタキセルまたはカルボプラチニンの併用のS C C H N増殖に対する効果は相乗的であり、個々の化合物いづれかよりも大きかった。パクリタキセルでは違うが、OGFの作用は、ナロキソン感受性のレセプターによって媒介されて、完全に可逆性であった。OGFはS C C H Nの複製を変更したが、他の内因性または外因性のオピオイドでは変更しなかった。OGFおよびパクリタキセルは、DNA合成を抑制したが、パクリタキセルのみがアポトーシスを誘導した。OGFおよびパクリタキセルの併用はまた、別のS C C H NであるC A L - 27の増殖に対して相乗的効果を有し、このことは、併用した薬物活性の普遍性を示した。これらのデータによって、生物療法剤(OGF)および化学療法剤(パクリタキセル、カルボプラチニン)の併用は、S C C H Nに対して増強した抗腫瘍作用を提供し得ることが示唆される。

10

【0130】

S C C H Nにおける抗腫瘍因子としてのOGF(生物治療)およびパクリタキセル(化学療法)の有望な性質、ならびにOGFおよびパクリタキセルの同時の使用に関する前臨床データがないことを考慮して、本研究は、これらの様式の併用の治療的能力を探索するように設計した。口腔底における十分分化した再発性の扁平上皮細胞癌由来のU M - S C C - 1細胞株(S C C - 1)の組織培養モデルを用いて、OGFおよびパクリタキセルの両方に対する同時曝露の効果を、増殖(例えば、可逆性、レセプター媒介、特異性)および作用機序(アポトーシス、壊死、および細胞増殖)に対して特徴付けた。

20

【0131】

(材料および方法)

(細胞株および細胞増殖アッセイ)

U M - S C C - 1細胞株(S C C - 1)は、73歳齢の男性の口腔底における十分に分化した再発性の扁平上皮細胞癌に由来した(25)。この細胞株は、University of MichiganのCancer Research Laboratory(所長、Thomas E. Carey博士)から入手した。56歳男性の舌の十分に分化していない癌腫由来のC A L - 27ヒト扁平上皮細胞癌細胞株(26)は、American Type Culture Collection(Manassas, VA)から入手した。両方の細胞株とも、10%ウシ胎仔血清、1.2%重炭酸ナトリウム、および抗生物質(5,000単位/mlのペニシリン、5mg/mlのストレプトマイシン、10mg/mlのネオマイシン)を補充したダルベッコのM E M(改変)培地で増殖させた。細胞培養物は、7%CO₂/93%空気の湿潤雰囲気中で37で維持した。

30

【0132】

細胞を6ウェルまたは96ウェルのプレート(Falcon)のいづれかに等量で播種して、24時間後にカウントして、プレート効率を確認した。OGF(10⁻⁶M)および/またはパクリタキセル(10⁻⁸M)、または滅菌水を播種(=0時間)の24時間後に開始して添加した;培地および化合物は毎日交換した。OGFは、滅菌水中で調製して、パクリタキセルは、D M S O中に10⁻²Mの濃度で溶解して、さらに滅菌水中に希釈した;希釈は化合物の最終濃度である。利用したOGFの濃度は、S C C H Nの増殖阻害を示す以前の証拠に基づいて選択した(13);パクリタキセルの濃度は、パクリタキセルが10⁻⁸Mでは細胞増殖を阻害した(ただし10⁻⁷Mでは阻害せず)が、5~6日の期間にわたって全ての細胞を排除はしなかったということを示す本発明者らの実験室での予備的研究から選択した(15)。

40

【0133】

いくつかの実験によってカルボプラチニンおよびOGFの効果を試験した。10⁻⁷Mのカルボプラチニンおよび/または10⁻⁶MのOGFという用量を利用した。選択したカルボプラチニンの用量は、以前の報告(27、28)に、そして本発明者らの実験室における予備的研究に基づいた。

【0134】

50

細胞数は、MTS増殖バイオアッセイ (Cell Titer 96 One Solution, Promega, Madison, WI) を用いて、および4時間後の吸光度をBiorad (3550モデル) プレートリーダーで、750nmのバックグラウンド吸光度スクリーニングを用いて490nmで測定すること、または直接細胞をカウントすることのいずれかによって記録した。MTSアッセイは、1処置あたり10ウェルを利用した。手動のカウントのために、細胞は、0.25%トリプシン/0.53mM EDTAを用いてトリプシン処理によって回収して、遠心分離し、血球計でカウントした。細胞の生存度は、トリパンブルー染色によって測定した。1ウェルあたり少なくとも2つのアリコート、および1処置あたり4~10のウェルを、手動のカウントについて各々の時点でカウントした。

10

【0135】

いくつかの実験については、96時間の期間を超える増殖速度を、線形回帰分析を用いて計算した。直線の勾配(細胞/時間の値)は、分散分析によって比較した。全ての計算は、GraphPad Prismソフトウェアで行った。

【0136】

(DNA合成、アポトーシスおよび壊死)

パクリタキセルおよび/またはOGFの作用機序を確認することを始めるために、DNA合成(BrdU取り込み)、アポトーシス(カスパーゼ-3活性)および壊死(トリパンブルー陽性)に対するこれらの薬物の効果を評価した。DNA合成を検討するために、SCC-1細胞は、6ウェルプレート上に置いた22mmの直径のカバーガラス上に播種した(3×10^3 個の細胞/カバーガラス)。細胞をパクリタキセル(10^{-8} M)および/またはOGF(10^{-6} M)を用いて24時間または72時間処置した;培地および薬物は毎日交換した。細胞固定の3時間前に、培養物に30μMのBrdUを添加した。適切な時点で、細胞をリーンして、10%の中性に緩衝化したホルマリン中で固定し、BrdUに対する抗体で染色した(Roche, Indianapolis, IN)。陽性細胞の数は、蛍光顕微鏡を用いて記録した。各々の時点で1処置あたり少なくとも1000個の細胞をカウントした。

20

【0137】

カスパーゼ-3- FITC陽性染色を用いて、アポトーシスの早期段階を特徴付けた(29)。SCC-1細胞を6ウェルプレートに播種して、24時間後に開始する薬物で処置した;薬物および培地は、毎日置き換えた。細胞は薬物処置の1日、3日および6日後に回収して、FACS分析について製造業者の推奨に従って調製した(488nmの15mWアルゴンイオンレーザーを備えるFACS細胞分取器; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)。カスパーゼ-3同定のために、APO-ACTIVE 3抗体検出キット(Cell Technology, Mountain View, CA)を用いた。各々の時点で、各々の処置に由来する3つのサンプルを分析した。フローサイトメトリーによって記録した、ゲートに入った細胞の割合をカスパーゼ陽性とみなした。

30

【0138】

(化合物)

40

全ての化合物および薬物はSigma Chemicals (St. Louis, MO) から購入した。

【0139】

(統計学的分析)

細胞数および/または吸光度を、分散分析(必要に応じて1因子または2因子)(ANOVA)を用いて分析し、引き続く比較は、Newman-Kuels検定を用いて行った。

【0140】

(結果)

50

(パクリタキセルおよびOGFを用いる増殖アッセイ)

S C C H N の増殖に対するパクリタキセルおよび O G F の併用の効果を達成するため、そしてこれを個々の薬物の効果と比較するために、S C C - 1 細胞の増殖曲線を作成した。S C C H N の増殖に対する実験は、細胞カウントまたは M T S アッセイのいずれかによって評価し、これらの方法は同程度であって、このことは、いずれの技術も分析に適切であったことを示した。増殖曲線は、図 17 A に示しており、増殖曲線の勾配から得た増殖の速度（細胞 / 時間の値）を図 17 B に示す。薬物処置の 48 時間後、O G F またはパクリタキセルは、細胞数をコントロールのレベルからそれぞれ、約 10 % (有意でない) および 33 % (p < 0.01) 減少させた。しかし、O G F およびパクリタキセルの併用は、細胞数を 48 % 減少させ (p < 0.001)、このことは、これらの薬物の相乗効果を示唆している。培養の 72 時間および 96 時間で、O G F はコントロールの値から細胞数をそれぞれ 10 % および 23 % 有意に減少させたが、パクリタキセルは細胞数をそれぞれ 25 % および 51 % 減少させた。両方の薬物に対する S C C - 1 細胞の 72 時間および 96 時間の曝露は、細胞数を正常より少なくさせ、それぞれコントロールのレベルから 63 % および 69 % という有意な (p < 0.001) 減少が記録された。72 時間後、両方の薬物 (O G F およびパクリタキセル) の効果は増殖に対して相乗的な効果を示した。O G F およびパクリタキセルの両方に対して曝露された細胞は、O G F またはパクリタキセル単独のいずれかに 72 時間および 96 時間曝された培養物に比較して、そして O G F 群の 48 時間から、顕著に細胞数が少なかった。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 1 】

4 日の期間にわたる増殖速度を分析して、その結果によって、O G F についておよびパクリタキセルについての細胞増殖は、コントロールの値から顕著に減少した (p < 0.01) ことが実証された (図 17 B)。さらに、O G F およびパクリタキセルの併用によって処置した細胞は、O G F およびパクリタキセル群の両方から、増殖速度がそれぞれ p < 0.01 および p < 0.05 で有意に減少した。

【 0 1 4 2 】

(カルボプラチニンおよび O G F での増殖アッセイ)

S C C H N の処置に用いられる他の因子が O G F と組み合わせて高まった応答を有するか否かを調査するために、カルボプラチニンおよび O G F を用いた増殖の研究を行なった (図 18)。薬物曝露の 48 時間、72 時間および 96 時間で、O G F は、細胞数をコントロールのレベルより 8 ~ 10 % 減少させたが、カルボプラチニンは細胞数を 72 時間および 96 時間でそれぞれ 19 % および 21 % 減少させた。O G F およびカルボプラチニンの併用は、細胞数をコントロールの値に対して、48 ~ 96 時間の期間で 14 ~ 27 % 減少させた。O G F およびカルボプラチニンの両方に対する S C C - 1 細胞の曝露は、48 ~ 96 時間で O G F 群よりも細胞数を、約 7 ~ 20 %、そしてカルボプラチニン単独で処置した群よりも 48 時間および 72 時間でそれぞれ約 14 % および 12 % 減少させた。

【 0 1 4 3 】

(O G F および / またはパクリタキセルのオピオイドレセプター媒介効果)

O G F および / またはパクリタキセルの効果がオピオイドレセプターによって媒介されるか否かを決定するため、いくつかの培養物を、短時間作用性のオピオイドアンタゴニストであるナロキソン (10⁻⁶ M) に曝した。細胞は、96 ウエルプレートに播種して、10⁻⁶ M O G F、10⁻⁶ M ナロキソン、10⁻⁸ M パクリタキセル、または同じ濃度の組み合わせ - O G F / ナロキソン、パクリタキセル / ナロキソン、パクリタキセル / O G F、およびパクリタキセル / O G F / ナロキソンで処置した。個々のプレートは薬物添加の 24 時間、48 時間、72 時間および 96 時間後に読み取った。コントロールのレベルに対して、O G F、パクリタキセル、パクリタキセル / O G F およびパクリタキセル / O G F / ナロキソンの添加は、細胞増殖を 8.8 % ~ 26.0 %、阻害した (図 19)。ナロキソンの添加は O G F 単独の増殖阻害効果を完全にブロックしたが、パクリタキセル単独の増殖阻害性作用には影響を有さなかった。さらに、ナロキソンは部分的に、パクリタキセルおよび O G F の併用の増強された阻害性効果を中和した；パクリタキセル / O G F / ナロキソン群の細胞数は、パクリタキセルに曝された細胞に匹敵したが、コント

ロールのレベルからは有意に減少した。ナロキソン単独では、使用した濃度では、増殖に影響はなかった。

【0144】

(OGFおよび/またはパクリタキセルの阻害性の増殖効果の可逆性)

増殖に対するOGFおよび/またはパクリタキセルの効果が薬物曝露から細胞を離脱させることによって逆転され得るか否かを確認するために、SCC-1細胞の培養物を48時間にわたって 10^{-6} MのOGF、 10^{-8} Mのパクリタキセル、またはパクリタキセル/OGFに曝した。2日後、プレートの半分は培地を除いて、OGFもパクリタキセルも添加しない新鮮な培地を添加した(すなわち、OGF-逆転群; パクリタキセル-逆転群; パクリタキセル/OGF-逆転群); いくつかの培養物には、新しい培地および薬物を継続して与えた。48時間以内に、OGF-逆転群は、OGF曝露を継続しているOGF群よりも16%多い細胞を有したが、パクリタキセル-逆転群は、パクリタキセルでの処置を継続している細胞とは異ならなかった(図20A、図20B)。OGFおよびパクリタキセルの併用に曝された細胞培養物は、OGFまたはパクリタキセル単独で処置した培養物よりも、そしてこれらの薬物の併用を48時間後に離脱した培養物よりも有する細胞が有意に少なかった。パクリタキセル/OGF-逆転群は、パクリタキセル単独またはパクリタキセル-逆転群と有意に異ならなかった。

10

【0145】

(頭頸部癌細胞増殖に関連するオピオイドペプチド(単数または複数)の特異性)

他のオピオイドペプチドが、増殖に関連するか否かを決定するために、SCC-1培養物(1000 細胞/ウェル)を 10^{-6} M濃度の種々の天然および合成のオピオイドリガンドで毎日処置した(図21)。ある場合には、これらのリガンドは、 μ 、またはのオピオイドレセプターに特異的であった。薬物は、OGF、モルフィン、DAMGO、DPDPE(d-Pen、d-Pen-エンケファリン)、DADLE(d-Ala-D-Leu-エンケファリン)、ダイノルフィン1-13、エンドモルフィン-1、エンドモルフィン-2、および-エンドルフィンを含んだ。吸光度読み取りにおいてコントロールのレベルから19%低下したOGFを除いて、使用した薬物で増殖に対して阻害性効果または刺激性効果を有するものはなかった。

20

【0146】

(プログラムされた細胞死)

30

壊死において、コントロール細胞の培養物または上清、ならびにOGFおよび/またはパクリタキセルで処置した培養物または上清中のトリパンブルー陽性細胞の数の分析では壊死に相違は観察されなかった。カスパー-3生成物の測定によってアポトーシスの検討を行った(図22)。フローサイトメトリーを用いた、OGFおよび/またはパクリタキセルでの処置の1日後のカスパー-3陽性細胞の割合は無視できた。しかし、パクリタキセルまたはOGFおよびパクリタキセルの組み合わせに対する曝露の3日以内に、コントロール培養よりも3.4倍および5.6倍多いカスパー陽性細胞があった。培養の6日目に、コントロール培養よりも、パクリタキセルまたはOGFおよびパクリタキセルで処置したカスパー反応性細胞はそれぞれ12.7および13.9倍多かった。カスパー反応性におけるコントロールレベルからの変化は、3日目または6日目にOGFに曝露された細胞では記録され得なかった。

40

【0147】

(SCC-1細胞へのBrDU取り込み)

3時間のSCCHN細胞のBrDU標識ならびにOGF、パクリタキセルまたはOGFおよびパクリタキセルでの24時間の処置は、それぞれコントロールに対する陽性細胞の数の31%、24%および33%の減少を示した(図23)。薬物処置の3日後、BrDU陽性細胞の数は、OGF処置培養物においてコントロールレベルから61%減少した。BrDU標識細胞の数は、それぞれパクリタキセルまたはパクリタキセル-OGF処置培養物においてコントロールのレベルから24%および16%減少した。

【0148】

50

(S C C H N の増殖に対するパクリタキセルおよびOGFの効果の普遍性)

OGFおよびパクリタキセルのいずれかの薬物単独に対する、相乗的な効果の普遍性を確認するために、分化が十分でないS C C H N - C A L - 2 7 を検討した(図24)。C A L - 2 7 の対数期培養物を最初に、種々の濃度(10^{-7} M ~ 10^{-10} M)のパクリタキセルに曝して、この因子に対するこれらの細胞の感度を評価した。培養(薬物および培地は毎日交換)中で48時間後、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、および 10^{-10} Mの濃度でのパクリタキセルでの処置は、コントロールのレベルから増殖を66%、53%、44%および22%減少させた。低レベルの毒性に関してOGFおよびパクリタキセルの併用の大きさを検討するため、さらなる研究のために 10^{-10} Mというパクリタキセルの用量を選択した。48時間後、OGF(10^{-6} M)、パクリタキセル(10^{-10} M)、またはOGF(10^{-6} M)、およびパクリタキセル(10^{-10} M)のいずれかに対するC A L - 2 7 細胞の曝露は、それぞれコントロールの培養よりも25%、35%および61%少ない細胞を示した。OGFおよび/またはパクリタキセルに対する曝露を用いた細胞増殖における相違は、コントロールのレベルとは有意に($p < 0.01$)異なり、そしてOGFおよびパクリタキセルの併用は、それぞれ $p < 0.001$ および $p < 0.01$ で、OGFおよびパクリタキセルで処置した培養物とは異なった。

10

20

30

40

50

【0149】

(考察)

本研究で作成したデータによって、OGFおよびパクリタキセルの併用は、組織培養中のS C C H N の2つの細胞株の増殖に強力な阻害性の効果を有することが実証される。OGFおよびパクリタキセルの抗増殖性作用は、相乗作用的であって、その一部(すなわち、OGFまたはパクリタキセルの単独)の合計よりも大きい総阻害性活性をともなう。OGFでおよびパクリタキセルで個々に観察されたS C C H N の増殖に対する抑制効果は、以前の結果と一致していた(例えば、13、30、31)。細胞増殖に対するOGFの作用は、ナロキソン感受性レセプターによって媒介された。ナロキソン感受性レセプターは、OGFrであることが推定される。なぜなら、 μ 、 α および δ のような古典的なオピオイドレセプターに対して選択性的な合成および天然のオピオイドは、本報告および初期(13、22)に実証されたとおり、S C C - 1 の細胞複製に影響しなかったからである。OGFはまた、S C C - 1 の複製に可逆的な作用を有することが見出されており、このことは、この化合物での処置が細胞毒性および細胞死をもたらさないことを示す初期の研究の結果を支持している(13, 21)。他方では、S C C - 1 細胞に対するパクリタキセルの効果は、ナロキソンによってブロックされず、逆転もされ得ず、これによってS C C - 1 に対するこの薬物の作用の特徴がOGFの特徴とは顕著に異なることが示される。従って、これは、S C C H N の増殖を遅らせる生物療法剤であるOGF、および化学療法的因素であるパクリタキセルの併用を用いる有効性の最初の報告である。

【0150】

この報告は、詳細な研究についてS C C - 1 細胞に対するOGFおよびパクリタキセルの効果に集中したが、OGFおよびパクリタキセルは、種々のS C C H N 細胞株の増殖に影響することが公知である(13, 32)。本研究によって、OGFおよびパクリタキセルがS C C - 1 細胞数に対して相乗的な阻害効果を有するだけでなく、同様の作用が、別のS C C H N 細胞株C A L - 2 7 で見出され得ることが実証される。従って、OGFおよびパクリタキセルの併用は、S C C H N 株に対して複数の効果を有するようであり、そして十分に分化した(S C C - 1)(25)そして十分に分化していない(C A L - 2 7)(26)S C C H N の両方の増殖に対して強力な阻害性の作用を有する。従って、本明細書で観察されるOGFおよびパクリタキセルでの併用療法の効果はまた、他のS C C H N 細胞株に拡大されると結論することが合理的である。

【0151】

パクリタキセルは、細胞周期のG₂ - M期における細胞増殖の停止を生じて、細胞死をもたらす微小管脱重合を妨げる化学療法剤である(33, 34)。さらに、パクリタキセルは、細胞のアポトーシスを生じ続いて核の崩壊を生じる多数の細胞内事象を調節する(

35)。OGFは、アポトーシスに影響せず(21)、しかし細胞周期のG₀ / G₁期を標的することが公知である(17)。本発明者らの実験では、パクリタキセルに対して曝露されたSCCHNは、薬物処置の開始の3日以内にアポトーシス細胞の数の顕著な増大を生じたことが示された。薬物曝露の6日目までに、SCCHN細胞の二分の一以上がアポトーシスであった。OGFは、SCCHNのアポトーシスに影響を有さなかつたが、DNA合成のS期を受けている細胞の数は有意に減少させた。従って、増殖阻害に関するOGFおよびパクリタキセルの併用の効果による増強の機構は、アポトーシス経路への細胞の動員(パクリタキセルの効果)を生じる、細胞周期の遅延(OGFの効果)に関し得る。

【0152】

OGFが、SCCHNを処置するためにタキソール以外の因子と併用され得るか否かという疑問に取り組むために、OGFおよび白金アナログ：カルボプラチニンの併用で予備的な研究を行なった。カルボプラチニンは、インターラーチューションによるDNA鎖の架橋および二機能性の共有結合的架橋の作成を生じ、これが次に細胞周期のS期の間のDNA合成を妨害する(36～38)。この薬物は、アポトーシスの誘導を通じて細胞毒性を示すことが示されている(39、40)。この結果は、カルボプラチニンおよびOGFの併用の効果が、SCCHNに関して強力な阻害性の特性を有することを最初に示すものである。しかし、OGFおよびパクリタキセルで相乗作用的な作用を示したタキサンおよびOGFについての場合と異なり、OGFおよびカルボプラチニンは、増殖に対して相加的な効果を有した。おそらく、これらの結果によって、OGFは、抗腫瘍活性を増強するために化学療法剤(すなわち、タキサン、白金)の2つ以上のファミリーと組み合わせて用いられ得ることが示される。これらの2つの薬物の併用の作用の様式を特徴付けるためには、さらなる研究が必要である。最終の結果は、OGFが細胞増殖抑制剤であるが、パクリタキセルおよびカルボプラチニンは、プログラムされた細胞死を誘導するということ、そしてOGFは、アポトーシス経路へ細胞を導くことによって細胞死に寄与するということであり得る。

【0153】

パクリタキセルは、頭頸部の扁平上皮細胞癌の処置において活性であることが報告されており、第I相の評価が成功している(6)。SCCHNの単剤治療として用いた場合、この薬物は、シスプラチニンおよび5-フルオロウラシル併用療法に比較して、奏功率およびメディアン生存時間を改善した。しかし、パクリタキセルに曝露された患者のうち91%が好中球減少を経験した。OGFは、第I相トライアルにおいて承認されているが(41)、OGFは、SCCHNの処置には臨床上用いられていない。しかし、この化合物の有効性は、異種移植片の実験において実証されている(14、16)。この報告によつて、化学療法および生物治療をSCCHNについて新規な処置様式に組み合わせるという刺激的な可能性がもたらされる。

【0154】

10

20

30

【数6】
参考文献

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, and Thun MJ: Cancer statistics. CA Cancer J Clin 54:8-29, 2004.
2. Parkin DM, Pisani P and Ferlay J: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 49: 33-64, 1999.
3. Carew JF and Shah JP: Advances in multimodality therapy for laryngeal cancer. CA Cancer J Clin 48: 211-228, 1998. 10
4. Schantz S, Harrison LB and Forastiere AA: Tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses, nasopharynx, oral cavity, and oropharynx. In: VT DeVita, S Hellman and SA Rosenberg (eds.), Cancer Principles and Practice of Oncology, 5th edition, pp. 741-801. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
5. Shah JP and Lydiatt W: Treatment of cancer of the head and neck. CA-Cancer J. Clin. 45:352-368, 1995.
6. Forastiere AA, Shank D, Neuberg D, Taylor SG, DeConti RC and Adams G: Final report of a phase II evaluation of paclitaxel with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: An Eastern Cooperative Oncology Group trial (PA390). Cancer 82: 2270-2274, 1998. 20
7. Leyvraz S, Ohnuma T, Lassus M and Holland JF: Phase I study in patients with advanced cancer, intermittent intravenous bolus, and 24-hour infusion. J Clin Oncol 3: 1385-1392, 1985.
8. Shin DM, Khuri FR, Glisson BS, Ginsberg L, Papadimitrakopoulou VM, Clayman G, Lee JJ, Ang KK, Lippman SM and Hong WK: Phase II study of paclitaxel, ifosfamide, and carboplatin in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. Cancer 91: 1316-1323, 2001. 30
9. Vokes EE, Haraf DJ, Stenson K, Stupp R, Malone D, Levin J and Weichselbaum RR: The role of paclitaxel in the treatment of head and neck cancer. Sem Oncol 22: 8-12, 1995.
10. Hussain M, Gadgeel S, Kucuk O, Du W, Salwen W and Ensley J: Paclitaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for patients with advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer 86: 2364-2369, 1999. 40
11. Coughlin CT and Richmond RC: Biological and clinical developments of cisplatin combined with radiation: concepts, utility, projections for new trials, and the emergence

【数7】

- of carboplatin. *Sem Oncol* 16: 31-43, 1989.
12. Vermorken JB, ten Bokkek Huinik WW and Eisenhauer EA: Carboplatin versus cisplatin. *Ann Oncol* 4: 41-48, 1993.
13. McLaughlin PJ, Levin, RJ and Zagon IS: Regulation of human head and neck squamous cell carcinoma growth in tissue culture by opioid growth factor. *Int J Oncol* 14: 991-998, 1999
14. McLaughlin PJ, Levin RJ and Zagon IS: Opioid growth factor (OGF) inhibits the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck transplanted into nude mice. *Cancer Letters* 199: 209-217, 2003. 10
15. McLaughlin PJ, Jaglowski JR, Stack BC and Zagon IS: Enhanced antitumor activity of paclitaxel on SCCHN with opioid growth factor (OGF): In vitro studies. *FASEB J* 18:A997.
16. McLaughlin PJ, Stack BC, Braine KM, Ruda JD and Zagon IS: Opioid growth factor (OGF) inhibition of a human squamous cell carcinoma of the head and neck in nude mice: Dependency on the route of administration. *Int J Oncol* 24: 227-232. 20
17. Zagon IS, Roesener CD, Verderame MF, Ohlsson-Wilhelm BM, Levin RJ and McLaughlin PJ: Opioid growth factor regulates the cell cycle of human neoplasias. *Int J Oncol* 17: 1053-1061, 2000.
18. Zagon IS, Wu Y and McLaughlin PJ: Opioid growth factor (OGF) inhibits DNA synthesis in mouse tongue epithelium in a circadian-rhythm-dependent manner. *Am J Physiol* 267: R645-R652. 30
19. Zagon IS, Wu Y and McLaughlin PJ: Opioid growth factor and organ development in rat and human embryos. *Brain Res* 839: 313-322, 1999.
20. Wilson RP, McLaughlin PJ, Lang CM and Zagon IS: The opioid growth factor, [Met⁵]-enkephalin, inhibits DNA synthesis during recombination of mouse tail skin. *Cell Proliferation* 33: 63-73, 2000.
21. Zagon IS and McLaughlin PJ: Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* 37: 79-88, 2003
22. McLaughlin PJ, Levin RJ and Zagon IS: The opioid growth factor receptor (OGFr) in human head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 5:191-196, 2000. 40
23. Levin RJ, Wu Y, McLaughlin PJ and Zagon IS: Expression of the opioid growth factor, [Met⁵]-enkephalin, and the zeta opioid receptor in head and neck squamous cell

【0 1 5 6】

【数8】

- carcinoma. *Laryngoscope* 107:335-339, 1997.
24. McLaughlin PJ, Stack BC, Levin RJ, Fedok F and Zagon IS: Defects in the OGF receptor (OGFr) in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 97: 1701-1710, 2003.
25. Krause CJ, Carey TE, Ott RW, Hurbis C, McClatchey KD and Regezi JA: Human squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol* 107: 703-710, 1981.
26. Gioanni J, Fischel J-L, Labert J-C Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, Ettore F, Formento P, Chavel P, Lalanne C-M and Courdi A: Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24:1445-1455, 1988. 10
27. Saikawa Y, Kubota T, Kuo TH, Tanino H, Kase S, Furukawa T, Watanabe M, Ishibiki K, Kitajima M and Hoffman RM: Combined effect of 5-fluorouracil and carboplatin against human gastric cancer cell lines in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 14: 461-464, 1994. 20
28. Takizawa M, Fukuda S, Yokohama M, Miyatake Y and Inuyama Y: An experimental study of the combined effect of radiotherapy and chemotherapy on head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Auris Nasus Larynx* 28: S83-S86, 2001.
29. Kuwahara D, Tsutsumi K, Kobayashi T, Hasunuma T and Nishioka K: Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Letters* 148: 65-71, 2000.
30. Elomaa L, Joensuu H, Kulmala J, Lemi P and Grenman R: Squamous cell carcinoma is highly sensitive to taxol, a possible new radiation sensitizer. *Acta Otolaryngol (Stockholm)* 115: 340-344, 1995. 30
31. Pulkkinen JO, Elomaa L, Joensuu H, Martikainen P, Serveomaa K and Grenman R: Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time-lapse videomicroscopy in cell lines established from head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 214-218, 1996.
32. Leonard CE, Chan DC, Chou T-C, Kumar R and Bunn PA: Paclitaxel enhances in vitro radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Cancer Res* 56: 5198-5204, 1996. 40
33. Schiff PB and Horwitz SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1561-1565, 1980.

【0 1 5 7】

【数9】

34. Schiff PB, Fant J and Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277: 665-667, 1979.
35. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS and Longo DL: Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 18: 3509-3517, 1998.
36. Ainser J, Sinibaldi V and Eisenberger M: Carboplatin in the treatment of squamous cell head and neck cancers. *Sem Oncol* 19: 60-65, 1992. 10
37. Coleman SC, Stewart ZA, Day TA, Netterville JL, Burkey BB and Pietnopol JA: Analysis of cell-cycle checkpoint pathways in head and neck cancer cell lines: Implications for therapeutic strategies. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg* 128: 167-176, 2002.
38. Engblom P, Rantanen V, Kulmala J, Heenius J and Grenman S: Additive and supra-additive cytotoxicity of cisplatin-taxane combinations in ovarian carcinoma cell lines. *Brit J Cancer* 79: 286-292, 1999. 20
39. Itoh M, Chiba H, Noutomi T, Takada E and Mizuguchi J: Cleavage of Bax- α and Bcl_{xL} during carboplatin-mediated apoptosis in squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncol* 36: 277-285, 2000.
40. Mishima K, Nakai Y and Yoshimura Y: Carboplatin induces FAS (APO-1/CD95) dependent apoptosis of human tongue carcinoma cells: Sensitization for apoptosis by upregulation of FADD expression. *Int J Cancer* 105: 593-600, 2003. 30
41. Smith JP, Conter RL, Bingaman SI, Harvey HA, Mauger DT, Ahmad M, Demers LM, Stanley WB, McLaughlin PJ and Zagon IS: Treatment of advanced pancreatic cancer with opioid growth factor: Phase I. *Anti-Cancer Drugs* 15: 203-209, 2004.

(実施例9)

本報告は、OGFおよびパクリタキセルの併用が、インビボにおいてヒトSCCHNの増殖に影響するか否か、そして各々の化合物の有効性を超えるか否かという疑問に取り組む。腫瘍の発生率、出現、サイズおよび転移に対する、そしてOGFレセプターの結合特徴に対するOGFおよび/またはパクリタキセルの効果を、ヒトSCC-1細胞を用いるSCCHNの異種移植片モデルで試験した。 40

【0158】

(材料および方法)

(細胞株)

UM-SCC-1細胞株(SCC-1)[8]は、University of MichiganのCancer Research Laboratory(所長、Thomas E. Carey博士)から入手した。細胞は、10%ウシ胎仔血清、1.2%重炭酸ナトリウム、および抗生物質(5,000単位/mlのペニシリン、5mg/mlのストレプトマイシン、10mg/mlのネオマイシン)を補充したダルベッコのMEM(変更)培地中で増殖させた。細胞培養物は、7%CO₂/93%空気の湿潤雰囲気中で3 50

7 で維持した。細胞は、0.05%トリプシン/0.53 mM EDTAを用いてトリプシン処理によって回収して、遠心分離し、血球計でカウントした。細胞の生存度は、トリパンブルー染色によって測定した。

【0159】

(動物および腫瘍細胞の移植)

Harlan Laboratories (Indianapolis, IN) から購入した雄性の4週齢のnu/nuヌードマウスを、Penn State University College of MedicineのDepartment of Comparative Medicineにおいて病原体なしのアイソレーター中で飼育した。全ての手順は、Penn State University College of MedicineのIACUC委員会で承認されて、NIHによって確立されたガイドラインに適合された。マウスは実験の開始前に48時間順応させた。

【0160】

腫瘍細胞は、右肩甲骨領域への皮下注射によってヌードマウスに接種した。皮下注射は、1マウスあたり少なくとも 2×10^6 個の細胞で行った; この手順に関してはマウスは麻酔しなかった。

【0161】

(化学療法剤の投与)

マウスの4つの群($n = 12$)を、毎日10 mg/kgのOGF、1日おきに8 mg/mlのパクリタキセル; 毎日10 mg/kgのOGFおよび1日おきに8 mg/kgのパクリタキセル、または毎日0.1 mlの滅菌生理食塩水の腹腔内注射を受けるように無作為に割り当てる。併用治療を受けている群では、OGFはパクリタキセルの前に注射した。投薬量は、刊行された報告に基づいて選択した[1, 17]。パクリタキセルは、DMSOに溶解し、次いで滅菌生理食塩水に希釈した; OGFは滅菌生理食塩水に溶解した。薬物の注射は、腫瘍細胞接種の1時間後に開始した。0.1 mlのDMSOを毎日マウスに注射することによってDMSO単独が腫瘍応答を変更したか否かを確認するために予備的研究を行なった; 生理食塩水またはDMSOの注射の間に腫瘍増殖で相違は見出されず、従ってデータを分析のために組み合わせた。薬物の用量を決定するためにマウスを毎週秤量した。

【0162】

(腫瘍の増殖および転移)

マウスを腫瘍の存在について毎日観察した。可視の腫瘍が出現するまでの潜伏期間、および腫瘍が測定可能になる(すなわち、 62.5 mm^3)までの時間を記録した。腫瘍は、毎日ノギスを用いて測定した。腫瘍容積は、式 $w^2 \times 1 \times / 6$ を用いて計算し、ここでは長さは最長の寸法であって、幅は長さに対して垂直の寸法である[24]。

【0163】

(終了日の測定)

施設の方針およびIACUCガイドラインに従って、腫瘍が潰瘍化した場合、または腫瘍が直径で2 cmに増殖した場合、マウスを死亡させた。腫瘍細胞接種の50日後、そして初めの腫瘍発生の約35~40日後、全てのマウスを過剰のペントバルビタールナトリウム(100 mg/kg)によって安楽死させ、頸椎脱臼によって殺傷したマウス(腫瘍を有する)を秤量した。腫瘍および脾臓を取り出し秤量して、リンパ節、肝臓および脾臓を転移について試験した。

【0164】

(レセプター結合分析)

各々の処置群におけるいくつかのマウス由来の腫瘍組織を、死亡した時点で取り出し、血液および結合組織を洗い流して、液体窒素中で直ちに凍結した。組織を、以前に公開された手順に従ってアッセイした[16]。Graph Pad Prismソフトウェアを用いて飽和結合等温線を作成した; 結合親和性(K_d)および容量(B_{max})の値は、コンピューターソフトウェアによって得た。

10

20

30

40

50

【0165】

(OGFの血漿レベル)

終了の時点で、体幹の血液を各々の群の数匹のマウスから収集した。血漿を分離して、OGFレベルは、Peninsula Laboratories (Belmont, CA) のキットを用いて標準的なラジオイムノアッセイ手順によって測定した。血漿サンプルは、二重にアッセイした。

【0166】

(統計学的分析)

腫瘍の出現は、カイニ乗検定によって分析した。腫瘍出現の潜伏期間および腫瘍容積を、分散分析 (ANOVA) を用いて分析し、引き続く比較は、Newman-Keuls 検定を用いて行った。腫瘍の増殖、終了日のデータ (すなわち、体重、腫瘍重量、脾臓重量)、OGFの血漿レベル、ならびに腫瘍の結合能力および親和性は、ANOVA および Newman-Keuls 検定によって比較した。

【0167】

ヌードマウスの生存データは、Kaplan-Meier プロットを用いて分析した。腫瘍増殖は、集積したデータについて非線形性混合効果モデルを用いて分析した。

【0168】

(結果)

(SCC-1腫瘍の発現および増殖)

13日目に、生理食塩水注射したコントロール群におけるマウスのうち 75% が測定可能な腫瘍を有した場合、OGFを投与されているマウスのうち 33% が腫瘍を有した；これらの値は $p < 0.05$ で有意に異なった (表8)。パクリタキセルおよびパクリタキセル/OGF群において測定可能な腫瘍を有したマウスはコントロールに比較して少なかった (それぞれ、66% および 70%) が、これらの相違は、統計学的に有意ではなかった。17日目に、コントロールマウスの 100% が測定可能な腫瘍を有した場合、OGFを投与されているマウスのうち 66% のみが腫瘍を有し、それぞれパクリタキセルおよびパクリタキセル/OGF群において腫瘍を有したマウスはそれぞれ 83% および 90% であった；しかし、有意な相違は記録されなかった (表9)。SCC-1細胞を接種された全てのマウスが腫瘍を発症し (表8)、腫瘍を有するコントロール群のマウスのうち 100% が 17日目までに腫瘍を有し、そして他の群のあらゆる動物が 28日目までに測定可能な腫瘍を有した。OGFを投与されているマウスが可視の腫瘍を発症するまでの潜伏期間は、7日という平均潜伏期間を有したコントロールに比較して 11日であった；この4日の遅延は、 $p < 0.02$ で有意に異なった (表8)。可視の腫瘍が出現する平均潜伏期間は、コントロール群におけるマウスとパクリタキセルおよびパクリタキセル/OGF群におけるマウスとの間で匹敵した。腫瘍が可視になるまでの平均潜伏期間は、14~17日におよび、群間で異なることはなかった。

【0169】

50日の実験にわたる腫瘍容積の変化は、集積したデータについての非線形性混合効果モデルを用いて分析した (図25)。これらの分析は、20日目に開始するパクリタキセルマウスの顕著な減少を補償した。3つの処置群におけるマウスの腫瘍容積は、コントロールよりも有意に小さかった。さらに、併用療法を受けているマウスの腫瘍容積は、いずれかの処置単独を受けている群における腫瘍サイズよりも有意に小さかった。

【0170】

OGFおよびパクリタキセル/OGF群における終了日 (50日) での腫瘍重量は、コントロールのレベルからそれぞれ 29% および 62% 減少していた (表9)。50日目の腫瘍容積の評価によって、OGFおよびパクリタキセル/OGF群は、コントロールの値からそれぞれ 33% および 69% 減少した (表9) ことが明らかになった。パクリタキセル群ではマウスの1匹だけがこの時点で生存していたので、腫瘍の重量または容積の分析を行った。50日目のパクリタキセル/OGF群の腫瘍の重量および容積の測定値によつても、OGF群に存在するものからそれぞれ 47% および 53% の減少が明らかになった

10

20

30

40

50

。

【0171】

(生存)

各々の群におけるマウスの生存曲線は図27に示す。パクリタキセル/OGFを投与されている12匹のマウスのうち2匹が、実験の開始の1週間以内に死んだ；これらの死亡原因（単数または複数）は、腫瘍の発達にも注入の過程（例えば、潰瘍形成）にも無関係であると考えられた。パクリタキセルを投与されているマウスは、処置の20日以内に死に始めた。40日目までに、パクリタキセルを投与されているマウスのうち75%が死に、50日目にはこの群のマウスの1匹しか生きていなかった。パクリタキセル/OGF群の1匹のマウスが42日目に死んだ。OGF群またはコントロール群では、実験期間の間に死んだマウスはいなかった。生存曲線の統計的な比較によって、パクリタキセルマウスについての死亡率が他の全ての群から統計学的に信頼できた（ $p < 0.0001$ ）ことが明らかになった。パクリタキセルマウスについての平均寿命は、他のマウスの50日の寿命に比較して 34.3 ± 3.1 日であり（50日=終了日）、この相違は3つの群全てから統計学的に有意であった（ $p < 0.001$ ）。

10

【0172】

(体重および全体的な観察)

全てのマウスが実験の開始時点で約22～23gと秤量された（図26）が、パクリタキセルを投与されているマウスは、研究の5週目に体重の10%の減少があり、そして6週目および7週目には正常より9～10%下であった。終了日（すなわち、50日）では、パクリタキセルを投与されているマウスはコントロール被験体よりも28%少ないと秤量され、そしてOGFおよびパクリタキセル/OGF群におけるマウスより体重が有意に少なかった（ $p < 0.001$ ）（表9）。コントロールの動物の体重とOGFまたはパクリタキセル/OGF群における動物の体重との間に相違は記録されなかった。

20

【0173】

パクリタキセル群におけるマウスの全体的観察によって、腹部の膨張、腸の充満および体重の重篤な減少が明らかになった。病理学的な報告によって、結腸の拡張および腹膜炎が示された；他の全ての器官系は正常と考えられた。コントロール、OGFまたはパクリタキセル/OGF群においてマウスについて、病理学的な関連の知見は検出できなかった。

30

【0174】

脾臓重量は、群間で異なることはなかった。さらに、いずれの群においてもマウスの脾臓、肝臓または腋窩リンパ節において転移は認められなかった。

【0175】

(OGFr結合の特徴)

結合の1部位モデルを用いて、OGFrについての特異的結合および飽和性の結合について、マウスの4つの群全てから収集した腫瘍を記録した。パクリタキセル群由来の腫瘍は、47日～50日で得たが、他の全ての群由来の標本は、実験の最終日（50日目）に回収した。OGFrに対するOGFの結合親和性（ K_d ）は、 $1.0 \sim 2.1 \text{ nM}$ および、そして群間で異なることはなかった（表10）。しかし、結合能力についての値（ B_{max} ）はほとんど、コントロールの被験体に対してOGF群およびパクリタキセル群では2倍高かった（タンパク質 1 mg あたり約 15 fmol ）（表10）。

40

【0176】

(OGFの血漿レベル)

SCC-1腫瘍を保有するヌードマウスの血漿中のOGFレベルは、 $282 \sim 617 \text{ pg/m1}$ によんだ。腫瘍を有するコントロールマウスと、OGF、パクリタキセル、またはパクリタキセル/OGFで処置されたマウスとの間に相違は認められなかった。

【0177】

(考察)

この結果によって、OGFおよびパクリタキセルの併用が、SCCHMの十分に分化し

50

たヒト腫瘍モデルであるヌードマウスにおける S C C - 1 の増殖に強力な阻害性の効果を有することが示される。OGF およびパクリタキセルの抗増殖作用は、相乗作用的であって、総阻害活性は、部分（すなわち、OGF またはパクリタキセル単独）の合計よりも大きかった。OGF およびパクリタキセルの相乗作用的な効果は、腫瘍の重量および容積の測定において最も明らかであった。インビボの条件下で行ったこれらの結果は、OGF およびパクリタキセルの併用が細胞数に対して相乗作用的な抑制効果を有した、組織培養中で行った初期の観察に拡大された [13]。従って、これは、インビボにおける S C C H N の増殖を遅らせるために、生物療法剤であるOGF、および化学療法剤であるパクリタキセルの併用を用いることの有効性についての初めての報告である。この研究は、S C C H N 細胞モデルである S C C - 1 に集中していたが、OGF およびパクリタキセルは、種々の S C C H N 細胞株の増殖に影響することが公知である [10、14]。従って、本明細書で観察された OGF およびパクリタキセルでの併用療法の効果はまた、他の S C C H N 細胞株に拡大されると結論することが合理的である。

【 0 1 7 8 】

本研究で記録した重要な観察は、周知であった [7、28] 体重および生存における有意な減少で明らかになったパクリタキセルに由来する顕著な全身毒性、そして全体的病変および病理的徵候ならびにOGF の同時投与によるこの毒性の軽減。しかし、OGF によるパクリタキセルの毒性の緩和は、パクリタキセルの抗腫瘍作用の減少は伴わなかった。実際、OGF およびパクリタキセルの併用は、パクリタキセル単独（またはOGF 単独）を超える腫瘍増殖への影響（すなわち、重量、容積）を有した。これらの結果によって、パクリタキセルの化学療法レベルは、耐性が優れており、生物療法剤であるOGF と同時に投与された場合の生存と両立したことが示唆される。別の薬物の投与による 1 因子の毒性の緩和は、無条件ではない [3、9]。タキサンによって生じる副作用からのOGF によって得られる保護という知見は、本来それ自体で、重要である。しかし、OGF およびパクリタキセルの併用によって、さらに高い細胞分裂停止用量のパクリタキセルを、この因子の治療有効性を改善するために投与することが可能になり得る。実際、化学療法剤の成功はしばしば、癌細胞の内因性の耐性によって制限され、そして毒性の増大を伴わないパクリタキセルのような薬物の濃度を増大するというアベイラビリティーが有利である。結局、OGF およびパクリタキセルの併用の有効性は、動物特異的であるか、そして / またはヌードマウスにおける免疫成分の欠失に起因するか否かに関しては明確でない。骨髄抑制は、化学療法の主要な副作用であるので、薬物機構の理解においては OGF / パクリタキセル療法の免疫学的な成り行きを探索することが有用である。

【 0 1 7 9 】

以前の研究では、S C C H N の外科的な標本が正常な粘膜よりも有意に少ない OGF レセプターを有するということが示されている [18]。OGF_r 遺伝子転写における不規則性ではなく OGF_r タンパク質の翻訳 / 翻訳後は、レセプターのメンバーにおけるこの減少に関与し得る。OGF レセプターの数は、腫瘍サイズに依存性であり得るということ、S C C H N における OGF レセプターの進行性の減少が OGF の阻害性活性を損ない、それによって加速された細胞増殖に寄与するということがこれらの著者によって想定される。本研究では、OGF またはパクリタキセルで処置され、そして S C C H N を接種された動物由来の腫瘍組織は、コントロールの被験体由来の新生物組織よりも 2 倍以上大きい結合能力を有した。そして、統計学的に有意ではないが、パクリタキセルおよび OGF の併用を受けている動物でさえ結合能力の 38 % の増大を有した。McLaughlin および共同研究者ら [17] によって示された仮説が正しい場合、OGF および / またはパクリタキセルマウスにおける S C C H N 腫瘍が小さいほど、抑制された細胞複製および障害の少ない OGF - OGF_r 軸という理由で、コントロールのマウスよりも多い（そしてゆっくり増殖する）OGF レセプターを有するということが理解可能である。

【 0 1 8 0 】

パクリタキセルは微小管の脱重合を妨げる化学療法剤であり、細胞死をもたらす細胞周期の G₂ - M 期における細胞の増殖の停止を生じる [31、32]。さらに、パクリタキ

10

20

30

40

50

セルは、細胞のアポトーシスを生じ、引き続き核の分解を生じる、多数の細胞内事象を調節する[27]。OGFは、アポトーシスに影響しない[31]が、細胞周期のG₀ / G₁期を標的とする[32]。組織培養における初期の実験では、パクリタキセルに曝されたSCCHNがアポトーシス細胞の数の顕著な増大を生じたことが示された。従って、OGFおよびパクリタキセルの併用効果によるインビボの増強された増殖阻害の機構は、アポトーシス経路への細胞の動員（パクリタキセルの効果）を生じる、細胞周期の遅延（OGFの効果）に関連し得る。

【0181】

パクリタキセルは、頭頸部の扁平上皮細胞癌の処置において活性であることが報告されており、第ⅠⅠ相の評価が成功している[4]。SCCHNの単剤治療として用いた場合、この薬物は、シスプラチニンおよび5-フルオロウラシル併用療法に比較して、奏功率およびメディアン生存時間を改善した。しかし、パクリタキセルに曝露された患者のうち91%が好中球減少を経験した。OGFは、第Ⅰ相トライアルにおいて承認されている[26]が、OGFは、SCCHNの処置には臨床上用いられていない。しかし、SCCHNの処置に関するこの化合物の有効性は、異種移植片の実験において実証されている[16, 17]。この報告によって、化学療法および生物治療をSCCHNについて新規な処置様式に組み合わせるという刺激的な可能性がもたらされる。OGFおよびパクリタキセルの併用は、異種移植片におけるSCCHNに相乗作用的な効果を有するという前臨床の情報によって、臨床研究の見通しが考慮されるべきである。

【0182】

10

20

【数10】

参考文献

1. Arbuck SG, Cannetta R, Onetto N, Christian MC (1993) Current dosage and schedule issues in the development of paclitaxel (Taxol). *Sem Oncol* 20:31-39
2. Carew JF, and Shah JP (1998) Advances in multimodality therapy for laryngeal cancer. *CA Cancer J Clin* 48: 211-228
3. Carpinterio A, Peinert S, Ostertag W, Zander AR, Hossfeld DK, Kuhlcke K, Eckert HG, Baum C, Hegewisch-Becker S (2002) Generic protection of repopulating hematopoietic cells with an improved MDR1-retrovirus allows administration of intensified chemotherapy following stem cell transplantation in mice. *Int J Cancer* 98:785-792
4. Forastiere AA, Shank D, Neuberg D, Taylor SG, DeConti RC, Adams G (1998) Final report of a phase II evaluation of paclitaxel with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: An Eastern Cooperative Oncology Group trial (PA390). *Cancer* 82: 2270-2274
5. Hussain M, Gadgeel S, Kucuk O, Du W, Salwen W, Ensley J (1999) Paclitaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for patients with advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 86: 2364-2369
6. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ (2004) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 54:8-29
7. Kieback DG, Dagmar-Christiane F, Engehausen DG, Sauerbrei W, Oehler MK, Tong X-W, Aguilar-Cordova E (2002) Intraperitoneal adenovirus-mediated suicide gene therapy in combination with human ovarian cancer. *Cancer Gene Therapy* 9:478-481
8. Krause CJ, Carey TE, Ott RW, Hurbis C, McClatchey KD, Regezi JA (1981) Human squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol* 107: 703-710
9. Kurbacher CM, Mallmann PK (1998) Chemoprotection in anticancer therapy: The emerging role of amifostine. *Anticancer Res* 18:2203-2210
10. Leonard CE, Chan DC, Chou T-C, Kumar R, Bunn PA (1996) Paclitaxel enhances *in vitro* radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Cancer Res* 56: 5198-5204
11. Levin RJ, Wu Y, McLaughlin PJ, Zagon IS (1997) Expression of the opioid growth

【0183】

【数11】

- factor, [Met⁵]-enkephalin, and the zeta opioid receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 107:335-339
12. Leyvraz S, Ohnuma T, Lassus M, Holland JF (1985) Phase I study in patients with advanced cancer, intermittent intravenous bolus, and 24-hour infusion. *J Clin Oncol* 3:1385-1392
13. McLaughlin PJ, Jaglowski JR, Stack BC, Zagon IS (2004) Enhanced antitumor activity of paclitaxel on SCCHN with opioid growth factor (OGF): In vitro studies. *FASEB J* 18:A997
14. McLaughlin PJ, Levin RJ, Zagon IS (1999) Regulation of human head and neck squamous cell carcinoma growth in tissue culture by opioid growth factor. *Int J Oncol* 14:991-998
15. McLaughlin PJ, Levin RJ, Zagon IS (2000) The opioid growth factor receptor (OGFr) in human head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 5:191-196
16. McLaughlin PJ, Levin RJ, and Zagon IS (2003) Opioid growth factor (OGF) inhibits the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck transplanted into nude mice. *Cancer Letters* 199:209-217
17. McLaughlin PJ, Stack BC, Braine KM, Ruda JD, Zagon IS (2004) Opioid growth factor (OGF) inhibition of a human squamous cell carcinoma of the head and neck in nude mice: Dependency on the route of administration. *Int J Oncol* 24:227-232
18. McLaughlin PJ, Stack BC, Levin RJ, Fedok F., Zagon IS (2003) Defects in the OGF receptor (OGFr) in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 97:1701-1710
19. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49:33-64
20. Schantz S, Harrison LB, Forastiere AA (1997) Tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses, nasopharynx, oral cavity, and oropharynx. *In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) Cancer Principles and Practice of Oncology* 5th edition pp. 741-801. Lippincott-Raven Philadelphia:
21. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277:665-667
22. Schiff PB, Horwitz SB (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1561-1565

【0184】

【数12】

23. Shah JP, Lydiatt W (1995) Treatment of cancer of the head and neck. *CA-Cancer J Clin* 45:352-368
24. Shim WSN, Teh M, Mack POP, Ge R (2001) Inhibition of angiopoietin-1 expression in tumor cells by an antisense RNA approach inhibited xenograft tumor growth in immunodeficient mice. *Int J Cancer* 94:6-15
25. Shin DM, Khuri FR, Glisson BS, Ginsberg L, Papadimitrakopoulou VM, Clayman G., Lee JJ, Ang KK, Lippman SM, Hong WK (2001) Phase II study of paclitaxel, ifosfamide, and carboplatin in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 91:1316-1323
26. Smith JP, Conter RL, Bingaman SI, Harvey HA, Mauger DT, Ahmad M, Demers LM, Stanley WB, McLaughlin PJ, Zagon IS (2004) Treatment of advanced pancreatic cancer with opioid growth factor: Phase I. *Anti-Cancer Drugs* 15:203-209
27. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL (1998) Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 18:3509-3517
28. Villena-Heinsen C, Friedrich M, Ertan AK, Farnhammer C, Schmidt W (1998) Human ovarian cancer xenografts in nude mice: Chemotherapy trials with paclitaxel, cisplatin, vinorelbine and titanocene dichloride. *Anticancer Drugs* 9:557-563
29. Vokes EE, Haraf DJ, Stenson K, Stupp R, Malone D, Levin J, Weichselbaum RR (1995) The role of paclitaxel in the treatment of head and neck cancer. *Sem Oncol* 22:8-12
30. Wilson RP, McLaughlin PJ, Lang CM, Zagon IS (2000) The opioid growth factor, [Met⁵]-enkephalin, inhibits DNA synthesis during recombination of mouse tail skin. *Cell Proliferation* 33:63-73
31. Zagon IS, McLaughlin PJ (2003) Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells. *Neuropeptides* 37:79-88
32. Zagon IS, Roesener CD, Verderame MF, Ohlsson-Wilhelm BM, Levin RJ, McLaughlin PJ (2000) Opioid growth factor regulates the cell cycle of human neoplasias. *Int J Oncol* 17:1053-1061
33. Zagon IS, Verderame MF, Allen SS, McLaughlin PJ (2000) Cloning, sequencing, chromosomal location, and function of a cDNA encoding the opioid growth factor
- 10
- 20
- 30
- 40

【0185】

【数13】

- receptor (OGFr) in humans. *Brain Res* 856:75-83
34. Zagon IS, Wu Y, McLaughlin PJ (1994) Opioid growth factor (OGF) inhibits DNA synthesis in mouse tongue epithelium in a circadian-rhythm-dependent manner. *Am J Physiol* 267:R645-R652
35. Zagon IS, Wu Y, McLaughlin PJ (1999) Opioid growth factor and organ development in rat and human embryos. *Brain Res* 839:313-322

10

(表8. OGFおよび/またはパクリタキセルで処置したヌードマウスにおけるSCC-1扁平上皮細胞癌の腫瘍出現の発生率および潜伏期間)

【0186】

【表8】

パラメーター	コントロール	OGF	パクリタキセル	パクリタキセル/OGF
N	12	12	12	10
測定可能な腫瘍の発生率(13日)	9/12	4/12 ^a	8/12	7/10
測定可能な腫瘍の発生率(17日)	12/12	8/12	10/12	9/10
可視の腫瘍の潜伏期間(日数)	7.2±0.5	11.2±1.5 ^b	7.4±1.4	8.6±0.8
測定可能な腫瘍の潜伏期間(日数)	14.2±0.6	17.0±1.5	14.8±1.7	15.5±1.5

20

値は平均±SEMである。^aカイ二乗分析によってp<0.05でコントロール群と有意に異なる。^bANOVAを用いてp<0.02でコントロールから有意に異なる。

【0187】

(表9. SCC-1扁平上皮癌の皮下接種ならびにOGFおよび/またはパクリタキセルでの処置(i.p.)の50日後のヌードマウスの特徴)

【0188】

【表9】

パラメーター	コントロール	OGF	パクリタキセル	パクリタキセル/OGF
体重(g)	31.6±0.7	32.0±0.5	22.6±0.8***+++^++	31.8±1.1
腫瘍重量(g)	2.4±0.2	1.7±0.2**	N.A.	0.9±0.7***++
腫瘍容積(mm ³)	3896±535	2590±364*	N.A.	1223±238***+
脾臓重量(mg)	243±25	225±12	243±8	197±19
転移	なし	なし	なし	なし

30

40

データは平均±SEMを意味する。N.A.=50日目に生きていたマウスは1匹だけであったのでデータが利用不能;脾臓および体重はパクリタキセル群でのみ各々のマウスが死んだ日に計算した。p<0.05(*), p<0.01(**)およびp<0.001(***)でコントロールから有意に異なる。p<0.05(+)およびp<0.001(++)でOGFから有意に異なる。p<0.001(+)でパクリタキセル処置したマウスから有意に異なる。

50

【0189】

(表10. OGFおよび/またはパクリタキセルで処置したマウス由来のS C C - 1腫瘍におけるOGFrのレセプター結合分析)

【0190】

【表10】

パラメーター	コントロール	OGF	パクリタキセル	パクリタキセル/OGF
K_d , nM	1.0 ± 0.1	2.1 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.3
B_{max} , fmol/mgタンパク質	14.9 ± 1.2	$27.2 \pm 2.2^*$	$27.8 \pm 1.6^*$	20.5 ± 2.1

10

データは平均 \pm SEMを意味する。 $p < 0.05$ (*) でコントロールから有意に異なる。

【0191】

本明細書に記載される実施形態は、例示の目的でしかないこと、そしてそれに照らして種々の改変または変化が当業者に示唆され、そして本出願の趣旨および条項内に包含されるべきであるということが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0192】

20

【図1】図1は、パクリタキセル(Taxol)および/またはOGFで処置されているS C C - 1細胞についての96時間増殖曲線を示すグラフである。各々のデータポイントは、10ウェル \pm S.E.M.の平均吸光度に相当する。各々の時点での有意な値は、表1に見出すことができる。

【図2】図2は、カルボプラチントリプトマウスにおけるS C C - 1細胞についての96時間増殖曲線を示すグラフである。各々のデータポイントは、10ウェル \pm S.E.M.の平均吸光度に相当する。各々の時点での有意な値は、表2に見出すことができる。

【図3】図3は、無胸腺ヌードマウスにおけるS C C - 1 S C C H N細胞の増殖を示す。1の時点は、各々の処置群において腫瘍が測定可能になった最初の日を表す。腫瘍の容積は毎日記録しており、2日連続した日の平均がx軸上の時点に相当する。

30

【図4】図4は、S C C - 1 S C C H N細胞を接種された無胸腺ヌードマウスの最終終末重量を示す。バーは、終了の時点(50日)での処置群全体についての重量の平均値を示す。コントロールからの有意性 $p < 0.01$ (****)、OGFからの有意性 $p < 0.01$ (++)、そしてタキソール/OGFからの有意性、 $p < 0.001$ (***)。

【図5】図5は、50日の研究の経過にわたる4つの群の各々での生存しているマウスのパーセントに相当する生存曲線を示す。

【図6】図6は、ゲムシタビンおよび/またはOGFで処置されているM i a P a C a - 2細胞についての96時間増殖曲線を示すグラフである。各々のデータポイントは、10ウェル \pm S.E.M.の平均吸光度に相当する。各々の時点での有意な値は、表3に見出すことができる。

40

【図7】図7は、5-FUおよび/またはOGFで処置されているM i a P a C a - 2細胞についての96時間増殖曲線を示すグラフである。各々のデータポイントは、10ウェル \pm S.E.M.の平均吸光度に相当する。各々の時点での有意な値は、表4に見出すことができる。

【図8】図8は、無胸腺ヌードマウスにおけるM i a P a C a - 2ヒト臍臓癌細胞の増殖を示す。1の時点は、各々の処置群において腫瘍が測定可能になった最初の日を表す。腫瘍の容積は毎日記録しており、2日連続した日の平均がx軸上の時点に相当する。グラフは、各々の群で一旦腫瘍が測定可能になれば増殖傾向を示すことを意味する。グラフは、この傾向を示すために、測定可能な腫瘍の発達への潜伏期間を無視している。

50

【図9】図9は、上記の薬物レジメンの毎日の添加に供されたMiaPaca-2ヒト臍臓癌細胞の対時間での増殖を示す。値は、1時点あたり4ウェルからの平均±S.E.M.に相当する。有意な値は表5に見出され得る。

【図10】図10は、OGF(10^{-6} M)および/またはゲムシタビン(10^{-8})(Gemzar)に96時間供されたMIA-PaCa-2細胞の細胞増殖アッセイを示す。薬物または等価容積の滅菌水(コントロール)を、6ウェルプレート中の播種の24時間後(0時間)に添加した;培地および薬物は毎日交換した。データは、各々の時点での1処置あたり、少なくとも4ウェルについての平均±SEMに相当する。p < 0.01(***), およびp < 0.001(***)でコントロールから有意に相違。p < 0.001(++)でOGF処置した培養物から有意に相違。p < 0.001()でゲムシタビン単独で処置した培養から有意に相違。

【図11】図11は、MTSアッセイ(96ウェルプレート)によって測定した場合の、5-FU(10^{-6} M)および/またはOGF(10^{-6} M)で処置したMIA-PaCa-2細胞の増殖を示す。値は、各々の時点での10ウェルについての平均吸光度±SEMに相当する。p < 0.05(*), p < 0.01(**), およびp < 0.001(***)でコントロールから有意に相違。OGF処置した培養物から有意に相違、p < 0.001(++)。5-FU処置した培養物から有意に相違、p < 0.01(), p < 0.001()。

【図12】図12は、MIA-PaCa-2細胞におけるゲムシタビンおよび/またはOGFの増殖阻害性効果のレセプター媒介を示す。OGF(10^{-6} M)、オピオイドアンタゴニストナロキソン(10^{-6} M)、ゲムシタビン(Gemzar)(10^{-8} M)、またはこれらの化合物の組み合わせに供された後、MTSアッセイによって測定した場合の、96時間でのMIA-PaCa-2細胞の数;コントロールは等容積の滅菌水で処置した。化合物および培地を24時間ごとに交換した。データは、96時間での1処置あたり10ウェルについての平均吸光度±SEMに相当する。コントロールから有意に相違p < 0.001(***)。NS=有意差なし。

【図13A】図13は、OGFおよび/またはゲムシタビン(Gemzar)で処置したMIA-PaCa-2細胞での増殖阻害性効果の可逆性を示す。細胞を96ウェルプレートに播種して、薬物を用いて48時間処置した。48時間で、このプレートのうち半分は、さらに48時間同じ薬物の投与を続け、このプレートの半分は、滅菌水で48時間処置した。コントロール培養物には、96時間にわたって滅菌水を与えた。化合物および培地は毎日交換した。Aは、可逆性実験における細胞の増殖。Bは、処置群における96時間での細胞数。全てのデータは、1処置あたり10ウェルについての平均吸光度±SEMに相当する。薬物で維持した培養の細胞数とビヒクルで置き換えた薬物での培養の細胞数との間の比較(逆転)を示す。NS=有意差なし。

【図13B】図13は、OGFおよび/またはゲムシタビン(Gemzar)で処置したMIA-PaCa-2細胞での増殖阻害性効果の可逆性を示す。細胞を96ウェルプレートに播種して、薬物を用いて48時間処置した。48時間で、このプレートのうち半分は、さらに48時間同じ薬物の投与を続け、このプレートの半分は、滅菌水で48時間処置した。コントロール培養物には、96時間にわたって滅菌水を与えた。化合物および培地は毎日交換した。Aは、可逆性実験における細胞の増殖。Bは、処置群における96時間での細胞数。全てのデータは、1処置あたり10ウェルについての平均吸光度±SEMに相当する。薬物で維持した培養の細胞数とビヒクルで置き換えた薬物での培養の細胞数との間の比較(逆転)を示す。NS=有意差なし。

【図14】図14は、 10^{-6} Mという濃度で内因性および外因性の種々のオピオイドで処置した96ウェルプレートにおいて増殖したMIA-PaCa-2細胞の増殖を示す。データは、1処置あたり10ウェルについて平均の吸光度値±SEMに相当する。p < 0.001(***)でコントロールから有意に相違。

【図15】図15は、6ウェルプレート中で増殖したPANC-1細胞に対するゲムシタビン(10^{-8} M)(Gemzar)および/またはOGF(10^{-6} M)の効果を示す

10

20

30

40

50

。データは、処置の72時間での4ウェルについての平均±SEMに相当する。p < 0.001 (***)でコントロールから有意に相違。p < 0.01 (++)でOGFから、そしてp < 0.001 ()でゲムシタビンのそれぞれの用量から有意に相違。

【図16A】図16は、ヌードマウスに対して異種移植したMIA PaCa-2腫瘍の増殖を示す。動物には、10mg/kgのOGFを毎日、120mg/kgのゲムシタビンを3日ごと(Gemzar)；1mg/kgのOGFを毎日、および120mg/kgのゲムシタビンを3日ごと(Gemzar/OGF)、または0.1mlの滅菌生理食塩水を毎日(コントロール)のいずれかを注射した。A.腫瘍容積を実験の45日間モニターした。値は、この群における全てのマウスについて平均±SEMに相当する(統計的比較についての結果を参照のこと)。B.45日間の実験期間にわたる腫瘍増殖の速度。腫瘍容積は、対数変換して、直線の勾配を計算した。p < 0.001 (***)でコントロールから、p < 0.001 (++)でOGFから、そしてp < 0.001 ()でゲムシタビンから有意に相違。

【図16B】図16は、ヌードマウスに対して異種移植したMIA PaCa-2腫瘍の増殖を示す。動物には、10mg/kgのOGFを毎日、120mg/kgのゲムシタビンを3日ごと(Gemzar)；1mg/kgのOGFを毎日、および120mg/kgのゲムシタビンを3日ごと(Gemzar/OGF)、または0.1mlの滅菌生理食塩水を毎日(コントロール)のいずれかを注射した。A.腫瘍容積を実験の45日間モニターした。値は、この群における全てのマウスについて平均±SEMに相当する(統計的比較についての結果を参照のこと)。B.45日間の実験期間にわたる腫瘍増殖の速度。腫瘍容積は、対数変換して、直線の勾配を計算した。p < 0.001 (***)でコントロールから、p < 0.001 (++)でOGFから、そしてp < 0.001 ()でゲムシタビンから有意に相違。

【図17A】図17は、96時間の期間にわたってOGF(10⁻⁶M)および/またはパクリタキセル(10⁻⁸M)(=タキソール)に供されたSCC-1細胞の増殖(血球計によって測定した細胞数)を示す。6ウェルプレートへの100,000個の細胞の播種の24時間後に、薬物または等容積の滅菌水(コントロール)を添加した；培地および薬物は毎日交換した。A.増殖曲線データは、各々の時点での1処置あたり少なくとも4つのウェルについての平均±SEに相当する。コントロールから有意に相違p < 0.05 (*)、p < 0.01 (**)、およびp < 0.001 (***)。OGF処置した培養物から有意に相違、p < 0.01 (++)およびp < 0.001 (++)。パクリタキセル処置した培養物から有意に相違、p < 0.001 ()。B.増殖曲線の全体的勾配から計算した増殖の速度。データは、曲線の勾配(1時間あたりの細胞数)±SEに相当する。コントロールから有意に相違p < 0.05 (*)、p < 0.01 (**)。併用療法で処置した細胞についての増殖速度もまた、OGF処置した細胞から、p < 0.01 (++)で、そしてパクリタキセル単独に供された細胞から、p < 0.05 ()で相違した。

【図17B】図17は、96時間の期間にわたってOGF(10⁻⁶M)および/またはパクリタキセル(10⁻⁸M)(=タキソール)に供されたSCC-1細胞の増殖(血球計によって測定した細胞数)を示す。6ウェルプレートへの100,000個の細胞の播種の24時間後に、薬物または等容積の滅菌水(コントロール)を添加した；培地および薬物は毎日交換した。A.増殖曲線データは、各々の時点での1処置あたり少なくとも4つのウェルについての平均±SEに相当する。コントロールから有意に相違p < 0.05 (*)、p < 0.01 (**)、およびp < 0.001 (***)。OGF処置した培養物から有意に相違、p < 0.01 (++)およびp < 0.001 (++)。パクリタキセル処置した培養物から有意に相違、p < 0.001 ()。B.増殖曲線の全体的勾配から計算した増殖の速度。データは、曲線の勾配(1時間あたりの細胞数)±SEに相当する。コントロールから有意に相違p < 0.05 (*)、p < 0.01 (**)。併用療法で処置した細胞についての増殖速度もまた、OGF処置した細胞から、p < 0.01 (++)で、そしてパクリタキセル単独に供された細胞から、p < 0.05 ()で相違した。

違した。

【図18】図18は、MTSアッセイによって測定した場合の、カルボプラチニンおよび/またはOGFで処置したSCC-1細胞の増殖を示す。値は、各々の時点での10ウェルについての平均吸光度±SEに相当する。コントロールから有意に相違 $p < 0.001$ (***). OGF処置した培養物から有意に相違、 $p < 0.001$ (+++). カルボプラチニン処置した培養物から有意に相違、 $p < 0.001$ ()。

【図19】図19は、SCC-1細胞におけるパクリタキセルおよび/またはOGFの増殖阻害効果のOGFr媒介を示す。OGF(10^{-6} M)、オピオイドアンタゴニストナロキソン(10^{-6} M)、パクリタキセル(Taxol)(10^{-8} M)、またはこれらの化合物の組み合わせに供された後、MTSアッセイによって測定した場合の、96時間でのSCC-1細胞の数；コントロールは等容積の滅菌水で処置した。化合物および培地は24時間ごとに交換した。データは、1処置あたり10ウェルについての平均吸光度±SEに相当する。コントロールから有意に相違 $p < 0.001$ (***). NS=有意差なし。

【図20】図20は、OGFおよび/またはパクリタキセル(Taxol)で処置したSCC-1細胞に対する増殖阻害効果の可逆性を示す。細胞を96ウェルプレートに播種して、薬物を用いて48時間処置した。48時間で、このプレートのうち半分には、さらに48時間同じ薬物の投与を続け、このプレートの半分は、滅菌水で48時間処置した。コントロール培養物には、96時間にわたって滅菌水を与えた。化合物および培地は毎日交換した。Aは、可逆性の実験における細胞の増殖。Bは、処置群における96時間での細胞数。全てのデータは、1処置あたり10ウェルについての平均吸光度±SEに相当する。薬物で維持した培養の細胞数とビヒクルで置き換えた薬物での培養の細胞数との間の比較(逆転)を示す。

【図21】図21は、種々の内因性および外因性のオピオイドで処置したSCC-1細胞の増殖を示す。データは、1処置あたり10ウェルについて平均の吸光度値±SEに相当する。 $p < 0.001$ (***でコントロールから有意に相違。

【図22】図22は、OGFおよび/またはパクリタキセルを用いて、24時間、72時間~144時間処置したSCC-1細胞におけるアポトーシスの評価を示す。細胞を6つのプレートに播種し、薬物で処置して、適切な時点でのカスパー-3を用いて染色した。カスパー-3活性は、1時間あたり1処置あたり10,000個の細胞でフローサイトメトリーによって測定した。データは、各々の時点での各々の処置についての3つのサンプルについてのカスパー陽性細胞のパーセント(平均±SE)に相当する。コントロールから有意に相違 $p < 0.001$ (***)、そしてOGFから有意に相違、 $p < 0.001$ (+++). 併用療法に曝された細胞はまた、 $p < 0.001$ ()で、パクリタキセル処置した細胞から異なった。

【図23】図23は、24時間または72時間にわたってOGFおよび/またはパクリタキセルで処置したSCC-1細胞においてBrDU取り込みをモニタリングすることによるDNA合成の評価を示す。データは、各々の時点での各々の処置について少なくとも1000個の細胞の分析からのBrDU陽性細胞パーセント(平均±SE)に相当する。 $p < 0.05$ (*)、 $p < 0.01$ (**)、および $p < 0.001$ (***でコントロールから、そして $p < 0.001$ (+++でOGFから有意に相違。

【図24】図24は、分化の十分でないSCCHN細胞株であるCAL-27細胞に対するパクリタキセルおよび/またはOGFの効果を示す。データは、処置の48時間での4つのサンプルについての平均±SEMに相当する。 $p < 0.001$ (***でコントロールから、そして $p < 0.001$ (+++でOGFから、そして $p < 0.01$ ()でそれぞれの用量のパクリタキセルから有意に相違。

【図25】集めたデータについての非直線的な混合効果モデルを用いて分析した実験の50日にわたる腫瘍容積の変化を示す。これらの分析を行ったところ、20日目に開始するパクリタキセルのマウスの顕著な死亡に適合した。3つの処置群の全てにおけるマウスの腫瘍容積は、コントロールよりも有意に小さかった($p < 0.001$)。さらに、併用療

10

20

30

40

50

法を受けたマウスの腫瘍容積は、いずれかの処置単独を受けた群における腫瘍サイズよりも有意に小さかった ($p < 0.001$)。動物には、滅菌生理食塩水 (0.1 ml; コントロール) 毎日、OGF (10 mg/kg) 每日、パクリタキセル (8 mg/kg; Taxol) 1日おき、またはパクリタキセルを1日おき、およびOGFを毎日 (Taxol/OGF) のいずれかの腹腔内注射を与えた。

【図26】図26は、OGF (10 mg/kg、毎日) および/またはパクリタキセル (8 mg/kg、2日ごと; Taxol) のいずれかで処置したマウス; 0.1 mlの滅菌生理食塩水 (コントロール) を与えられたコントロール動物の体重を示す。体重は7日ごとに記録した; 値は平均 \pm SEMである。コントロール、OGFまたはタキソール群の間の体重に有意な差は記録されなかった。コントロール群から $p < 0.05$ (*)、および $p < 0.001$ (****) で、そしてOGFから $p < 0.01$ (++) および $p < 0.001$ (++) で、そしてTaxol/OGF群から $p < 0.05$ ()、および $p < 0.001$ () で有意に相違。

【図27】図27は、頭頸部の 2×10^6 SCC-1扁平上皮細胞を接種されて、OGF (10 mg/kg、毎日) および/またはパクリタキセル (8 mg/kg 2日ごと; Taxol) のいずれかで処置されたマウス; 0.1 mlの滅菌生理食塩水 (コントロール) を投与されたコントロール動物の生存曲線を示す。カプランマイヤー曲線を分析して、パクリタキセルのみを投与されているマウスの生存は、他の全ての群とは $p < 0.001$ で有意に異なった。

【図1】

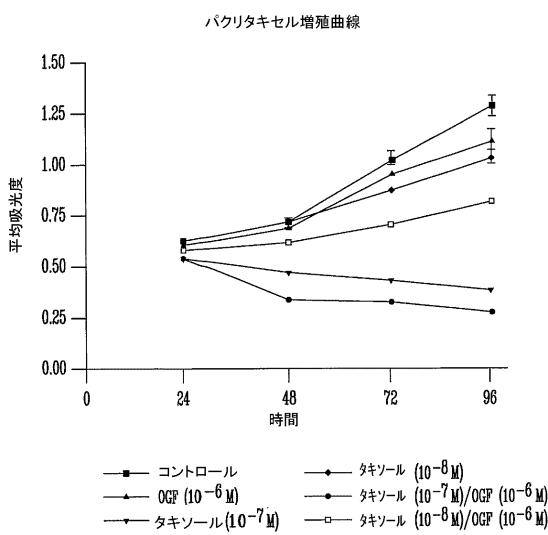


Fig.1

【図2】

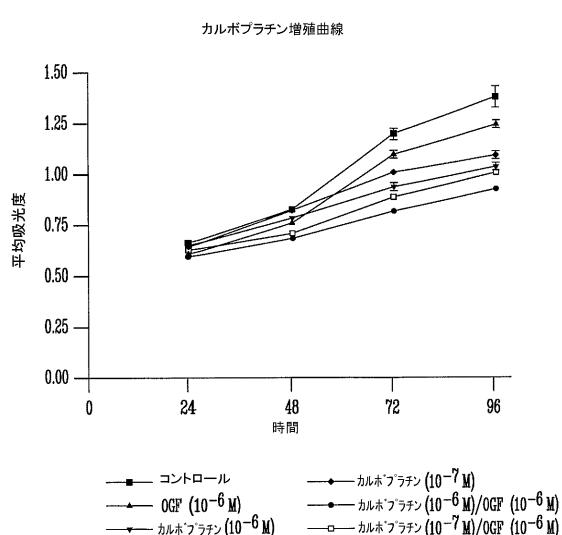


Fig.2

【図3】

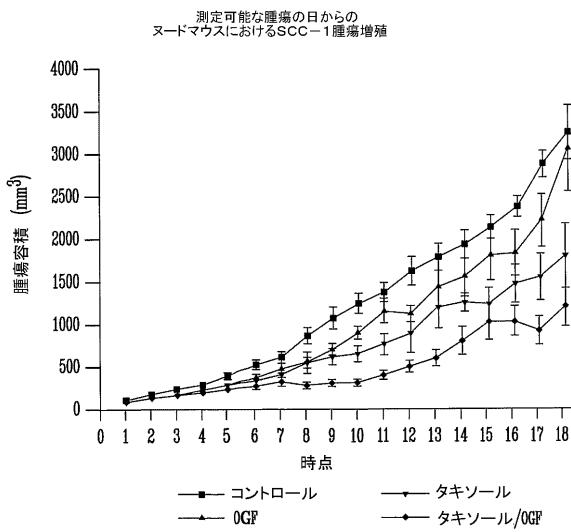


Fig.3

【図4】

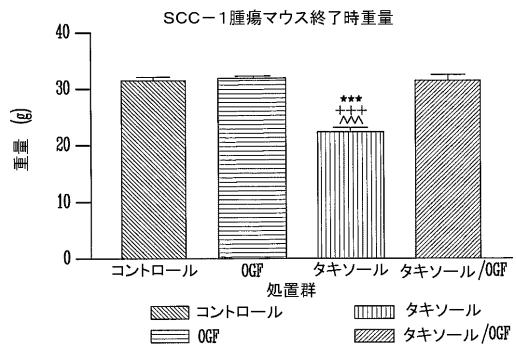


Fig.4

【図5】

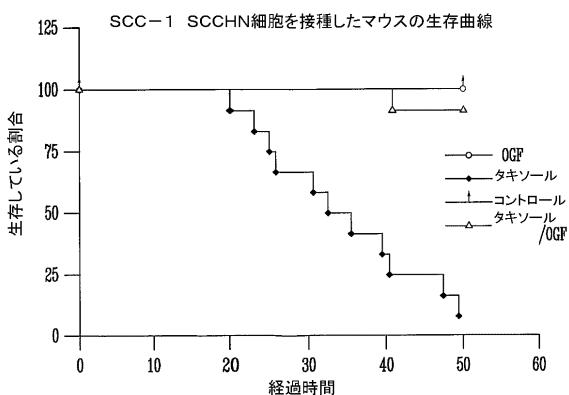


Fig.5

【図6】

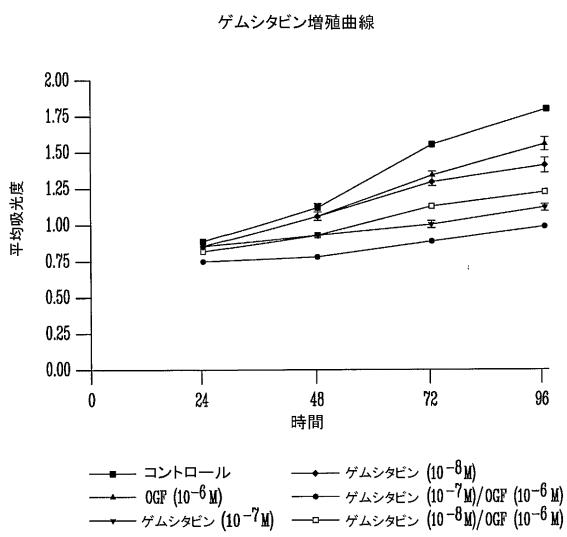


Fig.6

【図7】

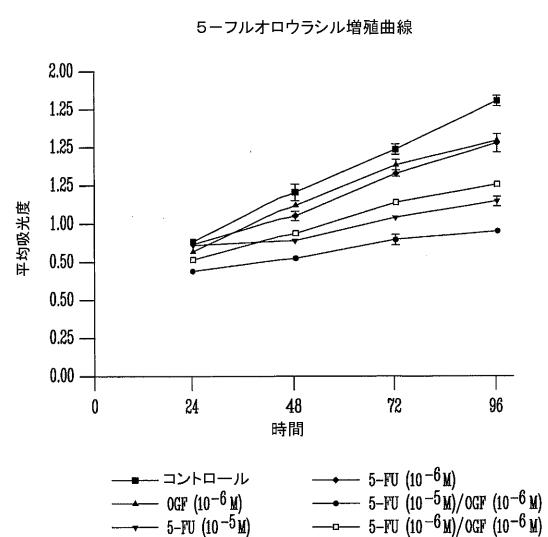


Fig.7

【図8】

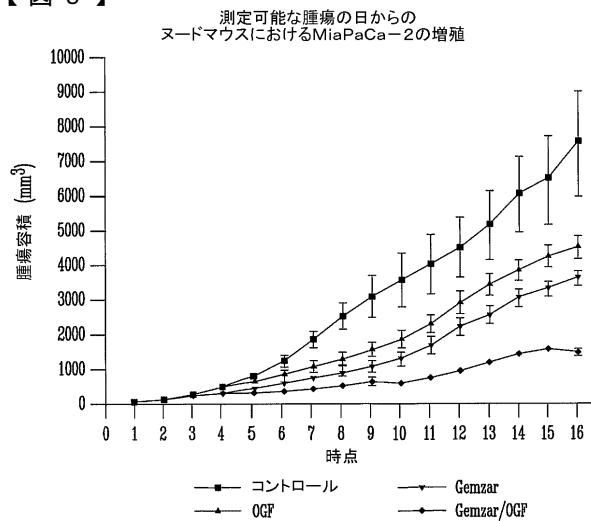


Fig.8

【図9】

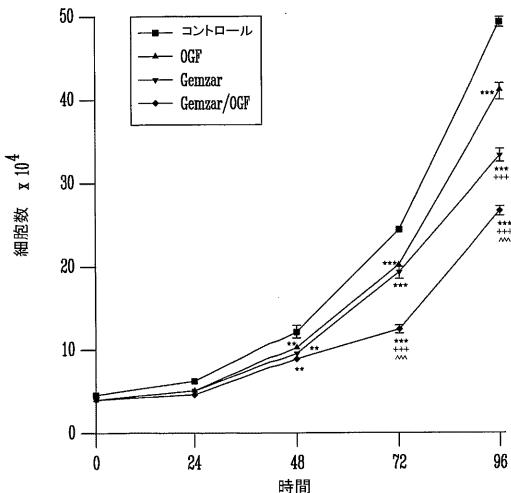


Fig.9

【図10】

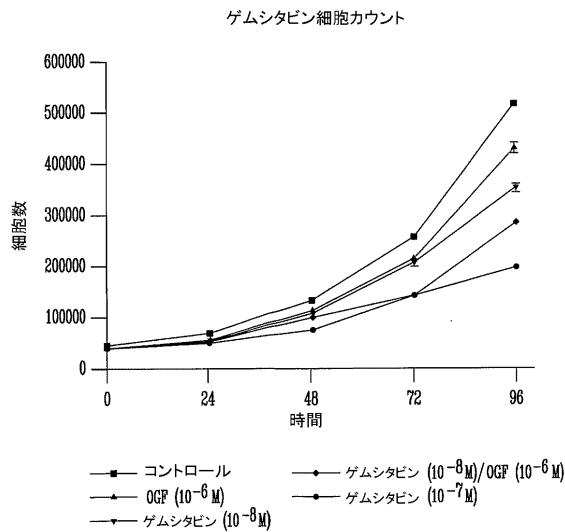


Fig.10

【図11】

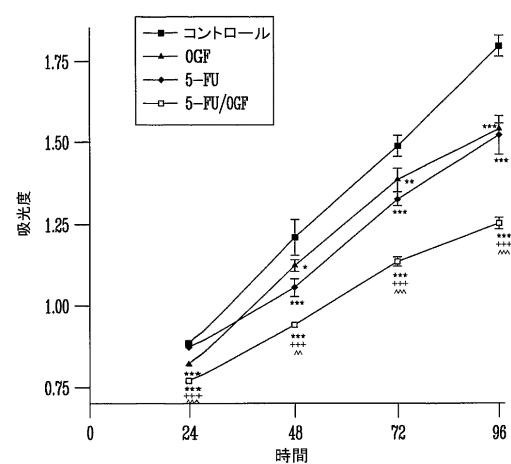


Fig.11

【図12】

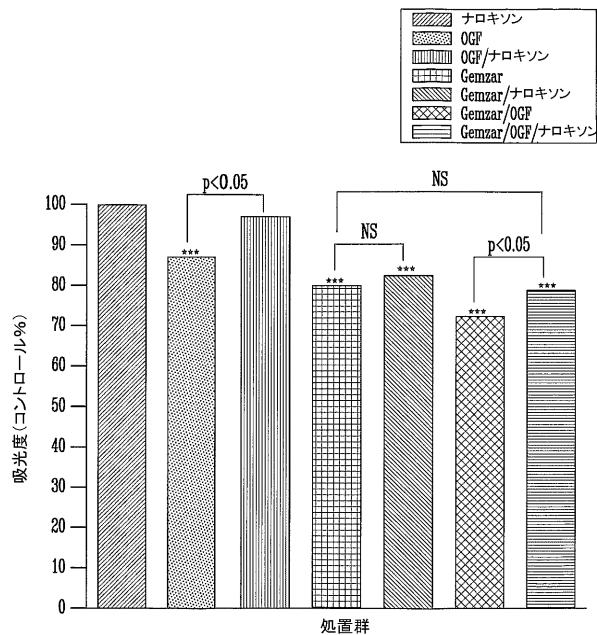


Fig.12

【図13A】

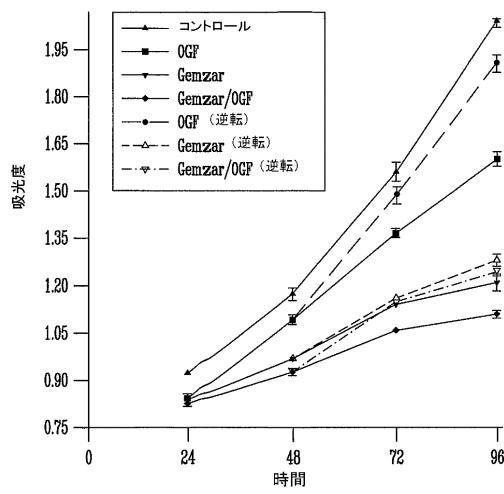


Fig.13A

【図13B】

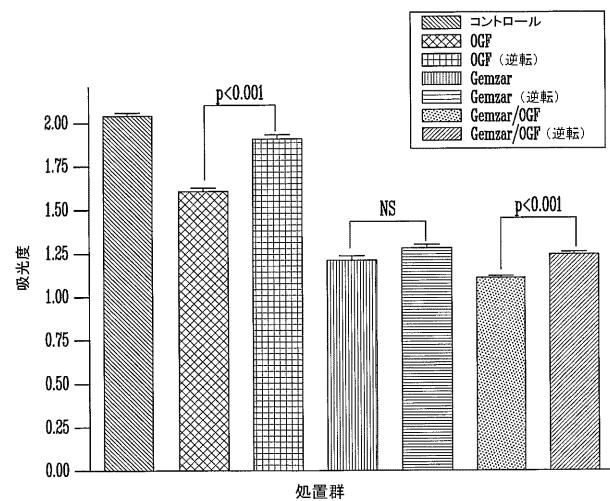


Fig.13B

【図14】

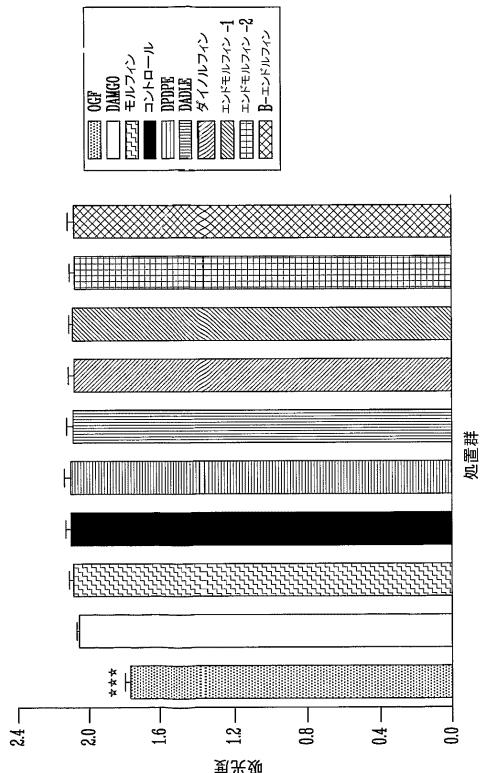


Fig.14

【図15】

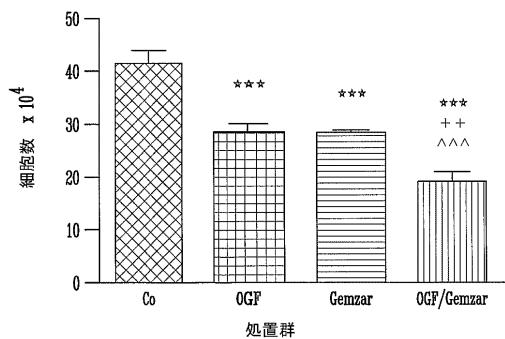


Fig.15

【図16A】

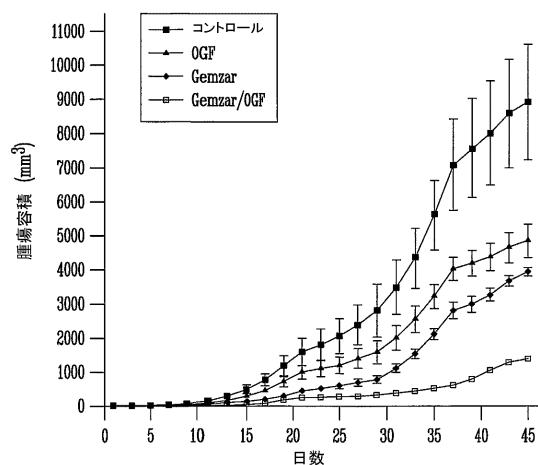


Fig.16A

【図16B】

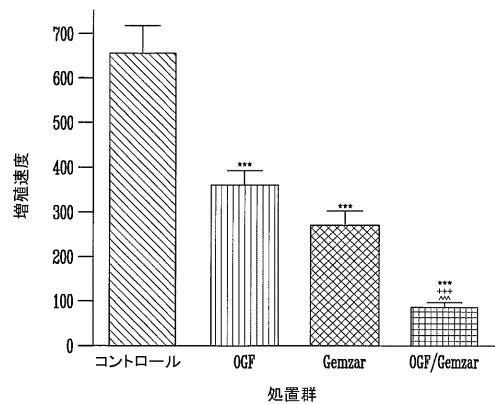


Fig.16B

【図17A】

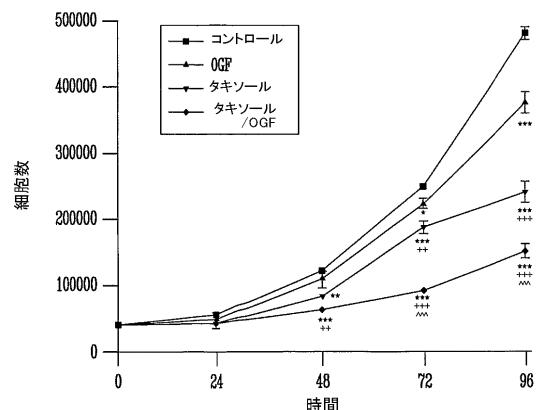


Fig.17A

【図17B】

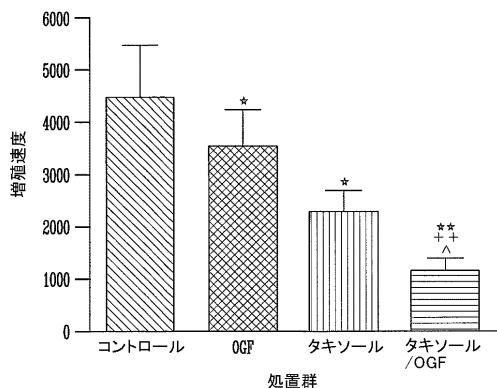


Fig.17B

【図18】

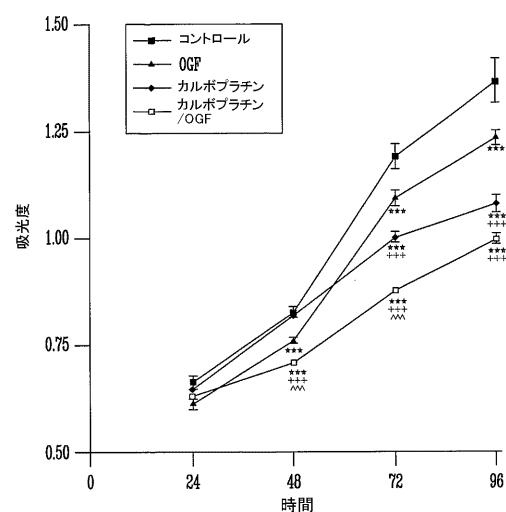


Fig.18

【図19】

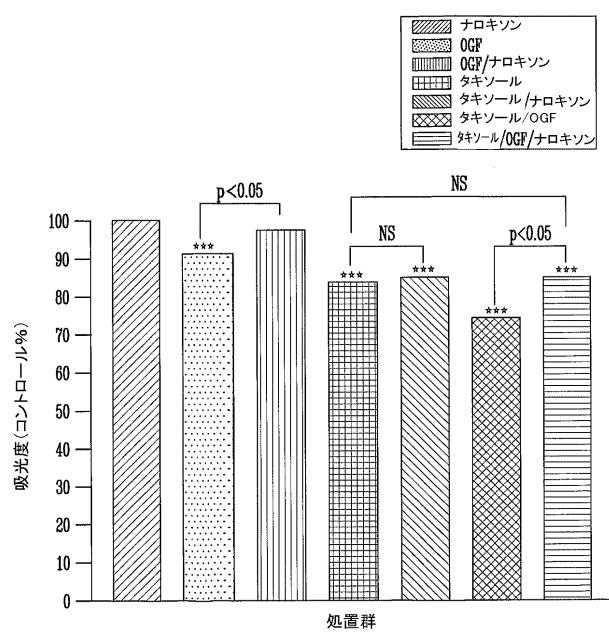
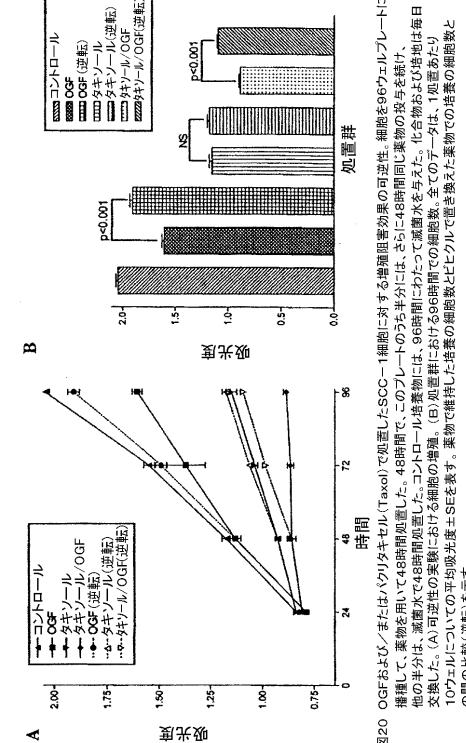


Fig.19

【図20】



【図21】

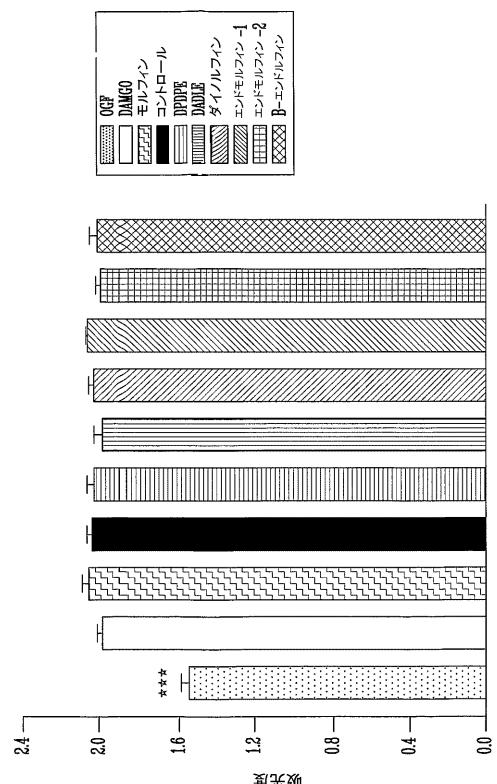


Fig.21

【図22】

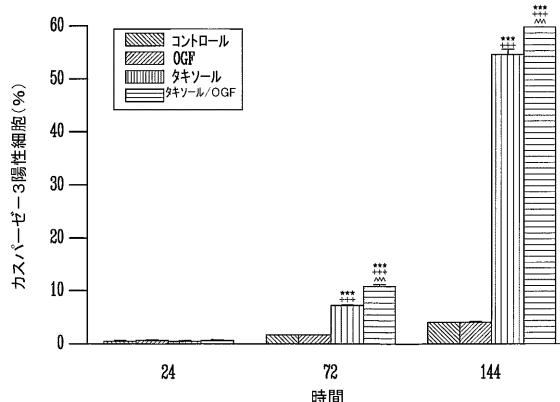


Fig.22

【図23】

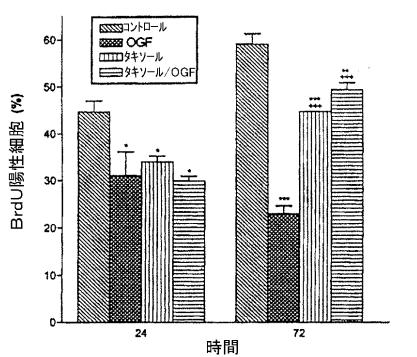


図23 24時間または72時間にわたりOGFおよび／またはバクリタキセルで処置したSCC-1細胞におけるBrdU取り込みをモニタリングすることによる、DNA合成の評価。データは、各々の処置について、少なくとも1000個の細胞の分析からのBrdU陽性細胞バーセント(平均±SE)を表す。p<0.05(*), p<0.01(**), およびp<0.001(***)でコントロールから、そしてp<0.001(++)でOGFから有意に相違。

【図24】

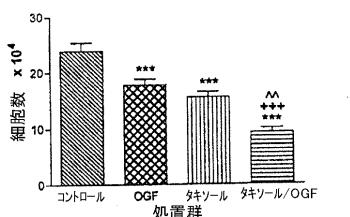


図24 分化の十分でないSCCCHN細胞株である、CAL-27細胞に対するバクリタキセルおよび／またはOGFの効果。データは、48時間の処置での4つのサンプルについての平均±SEMを表す。p<0.001(***)でコントロールから、そしてp<0.001(++)でOGFから、そしてp<0.01(△△)でそれぞれの用量のバクリタキセルから有意に相違。

【図25】

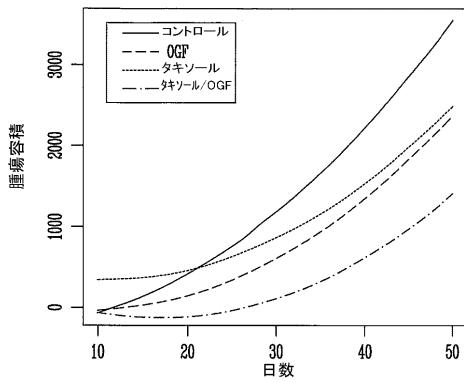


Fig.25

【図26】

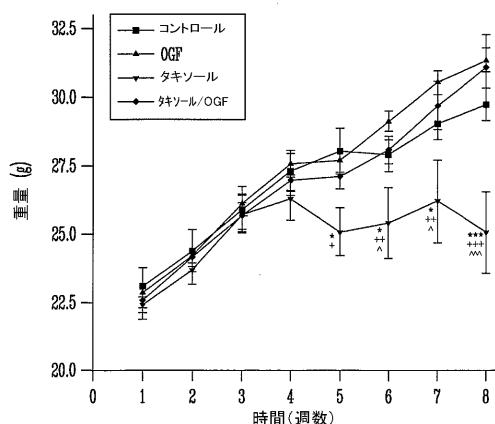


Fig.26

【図27】

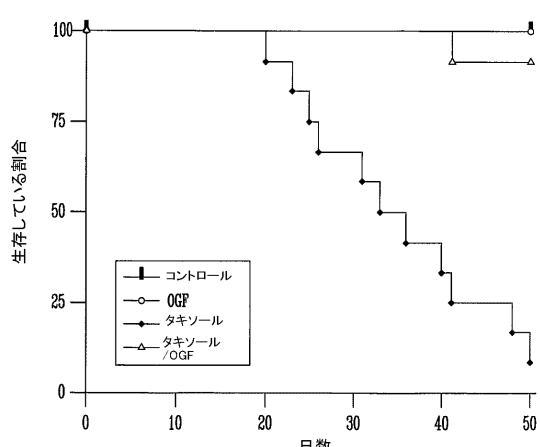
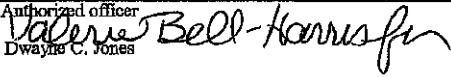


Fig.27

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/05268									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/00, 31/505 US CL : 514/2, 505 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2, 505											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">The Journal of Urology, Abstract, Volume 162(11), December 1999, page 2186, BISIGNANI, G. et al., "Human Renal Cell Cancer Proliferation in Tissue Culture is Tonically Inhibited by Opioid Growth Factor".</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-25</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">HARDMANN, J. G., Editor-in-Chief, Goodman & Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 9TH EDITION, pages 1225-1232, 1996</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-25</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	The Journal of Urology, Abstract, Volume 162(11), December 1999, page 2186, BISIGNANI, G. et al., "Human Renal Cell Cancer Proliferation in Tissue Culture is Tonically Inhibited by Opioid Growth Factor".	1-25	Y	HARDMANN, J. G., Editor-in-Chief, Goodman & Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 9TH EDITION, pages 1225-1232, 1996	1-25
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	The Journal of Urology, Abstract, Volume 162(11), December 1999, page 2186, BISIGNANI, G. et al., "Human Renal Cell Cancer Proliferation in Tissue Culture is Tonically Inhibited by Opioid Growth Factor".	1-25									
Y	HARDMANN, J. G., Editor-in-Chief, Goodman & Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 9TH EDITION, pages 1225-1232, 1996	1-25									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search 22 June 2005 (22.06.2005)		Date of mailing of the international search report 05 JUL 2005									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  Telephone No. (571) 272-1600									

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ザゴン, イアン エス.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 16802-1504, ユニバーシティーパーク, オールド メイン 304

(72)発明者 マクローリン, パトリシア ジェイ.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 16802-1504, ユニバーシティーパーク, オールド メイン 304

(72)発明者 スミス, ジル ピー.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 16802-1504, ユニバーシティーパーク, オールド メイン 304

F ターム(参考) 4C084 AA17 DB01 MA02 MA66 ZB26

4C086 AA01 AA02 BA02 MA02 MA04 MA66 NA06 NA07 ZB26 ZC75