

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4795539号  
(P4795539)

(45) 発行日 平成23年10月19日(2011.10.19)

(24) 登録日 平成23年8月5日(2011.8.5)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/506

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/36

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/00

請求項の数 16 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2000-589041 (P2000-589041)  
 (86) (22) 出願日 平成11年12月21日 (1999.12.21)  
 (65) 公表番号 特表2003-522732 (P2003-522732A)  
 (43) 公表日 平成15年7月29日 (2003.7.29)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US1999/030575  
 (87) 國際公開番号 WO2000/036918  
 (87) 國際公開日 平成12年6月29日 (2000.6.29)  
 審査請求日 平成18年12月13日 (2006.12.13)  
 (31) 優先権主張番号 09/218,288  
 (32) 優先日 平成10年12月22日 (1998.12.22)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 501250337  
 マリン ポリマー テクノロジーズ, イン  
 コーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 O 1 9 2 3 マサチュ  
 セッツ州, ダンバース, ウォーター スト  
 リート 107  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞増殖性疾患を治療するための方法および組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

Ro61を、ポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミンと組み合わせて含む抗腫瘍用組成物であって、ポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミンが、 -1 4立体配座で共有結合された4,000～150,000個のN-アセチルグルコサミン単糖を含み、800,000～3,000万ダルトンの分子量を有するものである、上記組成物。

## 【請求項2】

ポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミンは、少なくとも1個のN-アセチルグルコサミン単糖が脱アセチル化されているポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミン誘導体から成る、請求項1に記載の組成物。

10

## 【請求項3】

脱アセチル化された単糖が乳酸塩に誘導体化されている、請求項2に記載の組成物。

## 【請求項4】

少なくとも25～75%のN-アセチルグルコサミン単糖が脱アセチル化されている、請求項2または3に記載の組成物。

## 【請求項5】

ポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミンがゲルとして製剤化されている、請求項1～4のいづれかに記載の組成物。

## 【請求項6】

ポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミンがマット、ひも、ロープ、膜、纖維またはスポ

20

ンジである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

Ro61がポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミンのゲル中に溶解している、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

Ro61を、ポリ- -1 4-グルコサミンと組み合わせて含む抗腫瘍用組成物であって、ポリ- -1 4-グルコサミンが、 -1 4立体配座で共有結合された4,000 ~ 150,000個のグルコサミン単糖を含み、640,000 ~ 2,400万ダルトンの分子量を有するものである、上記組成物。

【請求項 9】

ポリ- -1 4-グルコサミンが乳酸塩に誘導体化されている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

ポリ- -1 4-グルコサミンがゲルとして製剤化されている、請求項 8 または 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

ポリ- -1 4-グルコサミンがマット、ひも、ロープ、膜、繊維またはスポンジである、請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 12】

Ro61がポリ- -1 4-グルコサミンのゲル中に溶解している、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 13】

ポリ- -1 4-グルコサミンゲルが 2 % ゲルである、請求項 10 または 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

増殖性疾患の治療用医薬を製造するための、ポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミンと組み合わせたRo61の使用であって、ポリ- -1 4-N-アセチルグルコサミンが、 -1 4立体配座で共有結合された4,000 ~ 150,000個のN-アセチルグルコサミン単糖を含み、800,000 ~ 3,000万ダルトンの分子量を有するものである、上記使用。

【請求項 15】

増殖性疾患の治療用医薬を製造するための、ポリ- -1 4-グルコサミンと組み合わせたRo61の使用であって、ポリ- -1 4-グルコサミンが、 -1 4立体配座で共有結合された4,000 ~ 150,000個のグルコサミン単糖を含み、640,000 ~ 2,400万ダルトンの分子量を有するものである、上記使用。

【請求項 16】

増殖性疾患が癌である、請求項 14 または 15 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、1998年12月22日出願の米国特許出願第09/218,288号の一部継続出願である。前記出願は1995年6月6日出願の米国特許出願第471,290号（米国特許第5,858,350号）の一部継続出願であり、さらに該出願は1994年12月1日出願の米国特許出願第347,911号（米国特許第5,623,064号）の一部継続出願であり、さらに該出願は1993年12月1日出願の米国特許出願第160,569号（米国特許第5,622,834号）の一部継続出願である。これらの出願は参考としてその全体を本明細書に含めるものとする。

【0002】

1.序

本発明は、少なくとも 1 種のエンドセリンアンタゴニストを、好ましくはポリ- 1 4-N-アセチルグルコサミン(p-GlcNAc)多糖マトリックスと組み合わせて、含有する癌や他の増殖性疾患の治療に用いるための組成物ならびに方法に関するものである。さらに特定すると、本発明のエンドセリンアンタゴニストはペプチドまたは非ペプチド化合物であってよ

10

20

30

40

50

く、本発明のp-GlcNAcマトリックスは、構成成分の单糖が 1-4立体配座で結合されている高分子量のポリマーであって、タンパク質を含まず、单一のアミノ酸やその他の有機および無機汚染物質を実質的に含まないものである。本発明の組成物および方法は腫瘍やその他の新生物細胞の増殖を抑制し、かつ / また、新生物細胞の *in vivo* 転移を防止するのに有用である。

#### 【 0 0 0 3 】

##### 2. 発明の背景

エンドセリン類は21アミノ酸のペプチド（例えば、ET-1、ET-2およびET-3）のファミリーであり、もともとはそれらの強力な血管収縮作用および脈管形成作用により特徴づけられたものである（例えば、Luscherら，1995，Agents Actions Suppl. (Switzerland) 45: 2 37-253; Yanagisawaら，1988，Nature 332: 411-415を参照のこと）。これらのペプチドはさらにbFGFのような増殖因子と関係があるようであり、しばしばそれらと協同的に作用する（例えば、Halaban, 1996, Seminars in Oncology 23: 673-681; Reidら, 1996, Development 122: 3911-3919; Markowitzら, 1995, Am. J. Physiol. 268: L192-L200; およびNelsonら, 1996, Cancer Res. 56: 663-668を参照のこと）。さらに、これらのペプチドはサイトカイン様調節活性を示し、インスリンやアンギオテンシンIIなどのホルモンおよびTGF- $\beta$ やTNF- $\alpha$ などの増殖因子によって影響を受けることがある（Nelsonら, 前掲; Suzukiら, 1989, J. Biochem. 106: 736-741; およびLundbladら, 1996, Crit. Care Med. 24: 820-826）。エンドセリン活性は、自己分泌 / パラ分泌様式で2つの異なるG共役型受容体ETAおよびETBに高親和性で結合することにより媒介される（例えば、Hocherら, 1997, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35(3): 175-189; Shichiriら, 1991, J. Cardiovascular Pharmacol. 17: S76-S78を参照のこと）。

#### 【 0 0 0 4 】

種々のエンドセリン受容体のアゴニストおよびアンタゴニストが存在しており（Webbら, 1997, Medicinal Research Reviews 17(1): 17-67）、これらはエンドセリンの作用機構の研究に使用してきた。エンドセリンは強力な血管収縮活性をもつことが知られているので、特にエンドセリンのアンタゴニスト（当技術分野では「エンドセリン受容体アンタゴニスト」ともいう）はヒトの疾患、主に高血圧、うっ血性心不全、アテローム硬化症、再狭窄、心筋梗塞といった心血管疾患の治療におけるそれらの可能な役割に関して研究されている（Mateoら, 1997, Pharmacological Res. 36(5): 339-351）。例えば、Ro 46-2005やボセンタン(bosentan)のようなピリミジニルスルホンアミド化合物群に属する非ペプチド系のエンドセリンアンタゴニストは、その芳香環を介してエンドセリン受容体と相互作用するのであるが、現在、高血圧、血管病およびうっ血性心不全の治療についての臨床評価が進行中である。これらのアンタゴニストはETAとETBの双方に様々な親和性で結合することができ、ペプチド系のアンタゴニストに比して有利である。なぜならば、非ペプチド系アンタゴニストは代謝安定性が高いからである（Webbら, 前掲; Parrisら, 前掲）。その上、エンドセリンアンタゴニストは肝硬変における腎機能障害および急性腎不全のような腎臓病を治療する上でのそれらの可能な役割に関しても研究されている（Gomez-Garreら, 1996, Kidney Int. 50: 962-972; Hocherら, 前掲）。

#### 【 0 0 0 5 】

最近になって、エンドセリンとエンドセリン受容体はいくつかの正常および病理学的細胞増殖過程、例えば、細胞周期の進行、細胞増殖および細胞の発達に関与していることが示された（例えば、Parrisら, 1997, Vascular Medicine 2: 31-43; Markowitzら, 前掲; Morbidelliら, 1995, Am. J. Physiol. 269: H686-H695; およびBattistiniら, 1993, Peptides 14: 385-399を参照のこと）。ET1およびET3は、内皮および上皮細胞からマクロファージまでの範囲にわたる正常組織の有糸分裂因子およびケモキネシス因子であることが示されている（例えば、Webbら, 1997, Medicinal Research Reviews 17(1): 17-67; およびGomez-Garreら, 前掲を参照のこと）。加えて、エンドセリンのその受容体への結合は、正常および腫瘍性細胞においてDNA合成、増殖および細胞可動化を引き起こすことがわかっている（Webbら, 前掲; Zicheら, 1995, Cardiovasc. Pharmacol. 26: S284-S286; 50

およびYamashitaら, 1991, Res. Comm. in Chem. Pathol. and Pharmacol. 74(3): 363-369)。

#### 【0006】

細胞増殖および細胞周期の進行を媒介するエンドセリンのこの潜在能力は、いくつかの初期の研究を癌細胞におけるエンドセリン発現および/またはエンドセリン受容体の存在についての研究へと導いた。例えば、ET-1は乳癌および膵臓の細胞系において過剰発現されることが示され、乳癌組織、卵巣細胞系および前立腺腫瘍において増殖を誘導する(例えば、Moriatisら, 1997, Eur. J. Canc. 33(4): 661-668; Nelsonら, 1996, Cancer Res. 56: 663-668; Patelら, 1995, Br. J. Cancer 71: 442-447; Oikawaら, 1994, Br. J. Cancer 69: 1059-1064; Shichiriら, 前掲; およびYamashitaら, 前掲を参照のこと)。さらに、ET1とET2に対する親和性がより高いETA型受容体の存在は、卵巣細胞系(Moriatisら, 前掲)および乳癌組織(Yamashitaら, 前掲)において実証されている。エンドセリンの3種すべてのアイソフォームに対して同様の親和性を有するETB受容体を発現する腫瘍の1つはメラノーマである(Yohnら, 1994, Biochem. Biophys. Res. Comm. 201(1): 449-457)。興味深いことに、ETB受容体は原発または再発メラノーマでは高度に発現されているが、転移メラノーマではそれほど多く発現されていない(Kikuchiら, 1996, Biochem. Biophys. Res. Comm. 219: 734-739)。

#### 【0007】

これらの研究は、エンドセリンアンタゴニストが癌治療に利用可能であることを示唆しているが、そのような治療用途を実証している研究はこれまで皆無である。事実、エンドセリンが、各種の血管増殖性疾患および良性の前立腺肥大症(BPH)のような増殖性疾患を促進させるうえで、どのような役割を果たしているのか不明である(Webbら, 前掲; およびKennyら, 1997, J. Med. Chem. 40(9): 1293-1315)。さらに、米国特許第5,550,110号および同第5,641,752号は、特定のヘキサペプチドエンドセリンアンタゴニストを用いた癌治療について開示しているが、それらの開示には癌治療に関するデータが実際に存在しておらず、かかる治療を如何に行なうのか、また、実際にそのような治療がうまくいくのかについて何も示していない(さらに、PCT出願WO 97/37987、WO 96/11927およびWO 94/03483、カナダ国特許出願第2072395号、および米国特許第5,658,943号を参照のこと)。

#### 【0008】

3. 発明の概要  
30  
本発明は、癌などの細胞増殖性疾患を治療するための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、少なくとも1種のエンドセリンアンタゴニストを、好ましくはポリ-1-4-N-アセチルグルコサミン(p-GlcNAc)と組み合わせて、含有する癌やその他の増殖性疾患の治療に用いるための組成物に関する。本発明は、一部には、エンドセリンアンタゴニストを、単独で高用量をin vivo投与するか、または多糖マトリックスと組み合わせて投与すると、腫瘍細胞の増殖および/または新生物細胞の増殖もしくは転移が著しく抑制されるという本発明者らの発見に基づくものである。

#### 【0009】

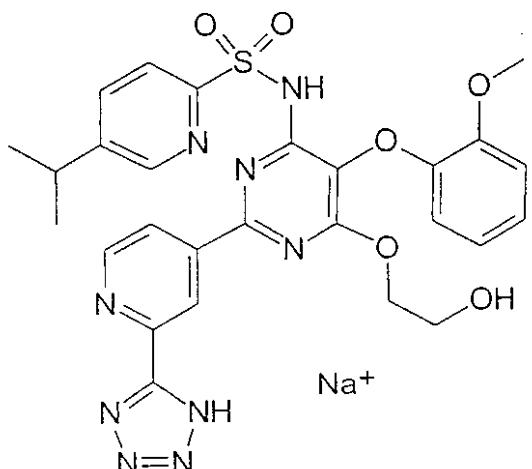
本発明の好ましい実施形態によれば、エンドセリンアンタゴニストは下記の式Iに示すような非ペプチド系ピリミジルスルホンアミド化合物である:

10

20

30

40



10

式 I の化合物は、本明細書中では「Ro61」とも呼ばれる5-イソプロピル-ピリジン-2-スルホン酸[6-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-5-(2-メトキシ-フェノキシ), -2-[2-(1H-テトラゾール-5-イル)-ピリジン-4-イル]-ピリミジン-4-イル]アミドナトリウム塩(1:2)であり、約650kDの分子量を有する。この化合物は両エンドセリン受容体ETAおよびETBに対する非特異的非ペプチドインヒビターである。

[ 0 0 1 0 ]

20

本発明の好ましい実施形態によれば、多糖マトリックスは、米国特許第5,635,493号に記載されているような、ポリ-1-4-N-アセチルグルコサミン(p-GlcNAc)多糖マトリックスまたはその誘導体であり、前記特許を参考としてここに含めるものとする。p-GlcNAcまたはその誘導体は膜、フィラメント、不織布、スポンジ、ゲル、三次元マトリックスを含めて、種々の形態で利用することができる。好適な実施形態によると、p-GlcNAcはゲルの形態をしており、好ましくは脱アセチル化されており、場合によりp-GlcNAc乳酸塩へと誘導体化されており、そしてin vivo投与のためにR061と組み合わされる。

[ 0 0 1 1 ]

本発明の組成物はドラッグデリバリーシステム、例えば徐放性薬物送達に有用である。本発明の組成物は、それが例えば有効性の向上、毒性の低下、生物学的利用能（バイオアベイラビリティー）の増加をもたらすという点で従来の薬剤より改良されている。

[ 0 0 1 2 1 ]

本発明の方法は、ヒトを含めた動物の細胞増殖性疾患（例えば、癌）を治療するために、治療に有効な量の本発明組成物を *in vivo* 投与することを含んでなる。本発明の一実施形態によれば、癌やその他の増殖性疾患もしくは障害の治療のために、Ro61のようなエンドセリンアンタゴニスト少なくとも 1 種を、脱アセチル化した p-GlcNAc 乳酸塩ゲル中に溶解し、治療に有効な量で患者に *in vivo* 投与する。本発明の別の実施形態は、癌やその他の増殖性疾患もしくは障害の治療のために、エンドセリンアンタゴニスト、より好ましくは非ペプチド系のエンドセリンアンタゴニスト、例えばピリミジルスルホンアミドエンドセリンアンタゴニストを *in vivo* 投与することを含む。本発明のさらに別の実施形態は、癌やその他の増殖性疾患もしくは障害の治療のために、p-GlcNAc マトリックス単独を *in vivo* 投与することを含む。本発明の組成物および方法は、*in vivo* において腫瘍および／または他の新生物細胞の増殖を抑制したり、かつ／また、新生物細胞の転移を防止するのに有用である。

〔 0 0 1 3 〕

#### 4. 図面の簡単な説明

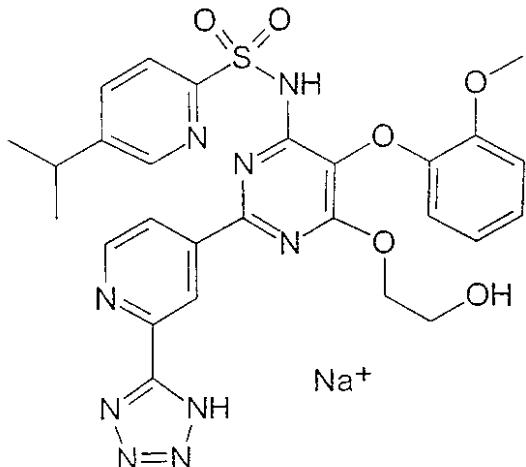
( 本明細書の最後に記載する。 )

## 5. 詳細な説明

本発明は、少なくとも1種のエンドセリンアンタゴニストを、好ましくはポリ-1-4-N-アセチルグルコサミン( $\text{p-GlcNAc}$ )多糖マトリックスと組み合わせて、含有する組成物、

30

ならびに癌やその他の増殖性疾患の治療においてこれらの組成物を使用する方法に関する。本発明によるエンドセリンアンタゴニストは、ETAまたはETB受容体に対して特異的もししくは非特異的であってよく、また、ペプチド系もしくは非ペプチド系の化合物でありうる。本発明の好ましい実施形態によれば、エンドセリンアンタゴニストは非ペプチド系の非特異的エンドセリンアンタゴニストである。他の好ましい実施形態によれば、エンドセリンアンタゴニストは非ペプチド系のピリミジルスルホンアミド化合物、例えば、下記の式Iに示されるRo61化合物である：



10

20

#### 【0014】

本発明によれば、少なくとも1種のエンドセリンアンタゴニストは、単独でまたは1種以上の他の抗腫瘍薬と組み合わせて、p-GlcNAc（これについては以下の第5.1節で詳述する）に共有結合でまたは非共有結合で結合されるか、または組み合わされる。本発明の好ましい一実施形態では、Ro61のような少なくとも1種のエンドセリンアンタゴニストを脱アセチル化p-GlcNAcゲルに溶解して、本発明のエンドセリンアンタゴニスト（「EA」）/p-GlcNAc組成物を形成させる。さらに好ましい実施形態によると、脱アセチル化p-GlcNAcはp-GlcNAc乳酸塩を形成するように乳酸で誘導体化される。

#### 【0015】

本明細書中で定義する「エンドセリンアンタゴニスト」とは、エンドセリン受容体アンタゴニストを含み、また、「EA/p-GlcNAc組成物」とは、少なくとも1種のエンドセリンアンタゴニストがp-GlcNAcに共有結合で結合されているか、非共有結合で結合されているか、p-GlcNAcと混合されているか、またはp-GlcNAcの内部に封入されているか、のいずれかである組成物を含む。本発明の組成物はさらに、エンドセリンアンタゴニストと組み合わせて、腫瘍や他の新生物細胞の増殖および/または転移を抑制するように作用する他の抗腫瘍薬を含むことができる。本明細書中で定義する「抗腫瘍薬」とは、腫瘍細胞、癌細胞、または他のいずれかのタイプの新生物細胞の増殖または転移を抑制するあらゆる化合物を含む。

#### 【0016】

本発明は、一部には、エンドセリンアンタゴニストが、単独でまたはここに記載のp-GlcNAcとの組合せで、*in vitro*において新生物細胞の増殖を抑制し、かつ*in vivo*で腫瘍細胞の転移を低下させかつ/また腫瘍細胞保有動物の生存を高めるという本発明者らの発見に基づくものである（以下の第12~16節を参照のこと）。さらに、本発明のp-GlcNAcは単独でも*in vivo*において新生物細胞の増殖および転移に対して抑制効果を及ぼす。

#### 【0017】

したがって、本発明の方法によれば、癌やその他の増殖性疾患の治療のために、本発明のEA/p-GlcNAc組成物を含む医薬組成物が治療に有効な量で患者に*in vivo*投与される。本発明の別の好ましい実施形態は、増殖性疾患の治療のために、エンドセリンアンタゴニスト、例えばピリミジルスルホンアミドエンドセリンアンタゴニストを*in vivo*投与することを含む。そして、さらに別の実施形態は、増殖性疾患の治療のために、以下で説明され

30

40

50

るp-GlcNAcをin vivo投与することを含む。

【0018】

単に説明を容易にするために、発明の詳細な説明を次の小節に分けて記載する：(1) 本発明の組成物および方法のp-GlcNAc、(2) 本発明の組成物および方法のエンドセリンアンタゴニスト、(3) 本発明の組成物の好ましい製剤、および(4) 本発明の組成物および方法の用途。

【0019】

5.1 本発明の組成物のp-GlcNAc

本発明の組成物および方法において利用されるp-GlcNAc多糖マトリックスは、ゲル濾過クロマトグラフィーでの測定に基いて、重量平均で約800,000ダルトン～約3,000万ダルトンの範囲にある高分子量のポリマーを含む。このような分子量の範囲は、1～4立体配座で結合した約4,000～約150,000個のN-アセチルグルコサミン単糖を有するp-GlcNAc種を示すものである。約4,000～約15,000個のN-アセチルグルコサミン単糖が好ましい(図1)。

10

【0020】

このp-GlcNAcの多様性は非常に低く、純度は非常に高い。これらはともに、化学的および物理的基準により証明されている。中でも、これらは化学組成および非多糖汚染物質である。第一に、2種の異なる精製方法を用いて得られたp-GlcNAcの化学組成データを以下の表1に示す。表に見られるように、両方の方法で得られたp-GlcNAcの化学組成は、実験誤差の範囲内でp-GlcNAcの公式組成と同一である。第二に、同様に表1に示されたとおり、得られたp-GlcNAcは検出し得るタンパク質汚染物質を含まず、遊離のアミノ酸などの他の有機汚染物質を実質的に含まず、また灰分や金属イオンなどの無機汚染物質を実質的に含んでいない(本発明のp-GlcNAcは、純粋なp-GlcNAcについての炭素、水素、窒素および酸素の理論値から約2%まで外れていてもよい)。従って、本明細書で使用されているとおり、用語「実質的に有機汚染物質を含まない」および「実質的に無機汚染物質を含まない」とは、理論値から約2%より大きくは外れない炭素、水素、窒素および酸素のプロフィールを有するp-GlcNAcの組成を意味し、好ましくは本発明のp-GlcNAcは、表1のp-GlcNAcマットについての実験データにおいて例示したようなプロフィール(偏差%を考慮)を有する。さらに、p-GlcNAcは結合水の割合が非常に低い。

20

【0021】

表 I

化学分析データ(重量%)純粋 p-GlcNAc に関する理論値:

|       |        |
|-------|--------|
| 炭素    | 47. 29 |
| 水素    | 6. 40  |
| 窒素    | 6. 89  |
| 酸素    | 39. 41 |
| タンパク質 | 0. 00  |

10

p-GlcNAc マットに対する実験データ:

(各膜タイプに対する実験バッチの数は、

(各膜タイプにつき 30 より多数)

|    | 機械力による方法         |        | 化学的/生物学的方法       |        |
|----|------------------|--------|------------------|--------|
|    | 正規化 <sup>1</sup> | % 偏差   | 正規化 <sup>1</sup> | % 偏差   |
| 炭素 | 47. 21±0. 08     | -0. 17 | 47. 31±0. 11     | +0. 04 |
| 水素 | 6. 45±0. 08      | +0. 78 | 6. 34±0. 08      | -0. 94 |
| 窒素 | 6. 97±0. 18      | +0. 87 | 6. 94±0. 16      | +0. 73 |
| 酸素 | 39. 55±0. 36     | +0. 36 | 39. 41±0. 10     | 0. 00  |

20

|       | 平均値   | 平均値   |
|-------|-------|-------|
| タンパク質 | 0. 00 | 0. 00 |
| 灰分    | 1. 30 | 0. 98 |
| 水分    | 2. 0  | 1. 2  |

30

<sup>1</sup> 分析の生データの数値は、サンプルの灰分および水分含量を説明するために正規化されている。

## 【0022】

40

本発明の組成物の p-GlcNAc は、図 2 に示されたものと実質的に同様の炭水化物分析プロファイルを示す。p-GlcNAc の主要な単糖は N-アセチルグルコサミンである。さらに、p-GlcNAc は単糖グルコサミンを含有しない。p-GlcNAc の他の物理的特性は、参考として本明細書に組み入れる米国特許第 5,635,493 号に詳細に記載されている。

## 【0023】

本発明の p-GlcNAc は高度な生体適合性を有する。このことは、限定するものではないが、溶出試験、筋内埋込み、または動物被験体への皮内もしくは全身的注射などの種々の技術により測定し得る。例えば、参考として本明細書に組み入れる米国特許第 5,635,493 号を参照されたい。

## 【0024】

50

p-GlcNAcは、微細藻類、好ましくは珪藻により産生され、それから精製することができる。p-GlcNAc調製の出発源として使用し得る珪藻には、限定するものではないが、Coscinodiscus属、Cyclotella属およびThalassiosira属のメンバーが含まれるが、Thalassiosira属が好ましい。

【0025】

Coscinodiscus属の中では、使用し得る珪藻の種としては、限定するものではないが、*concinus*種および*radiatus*種が含まれる。Cyclotella属の中では、使用し得る珪藻の種としては、限定するものではないが、*capsia*種、*cryptica*種および*meneghiniana*種が含まれる。本発明のp-GlcNAcの出発原料を製造するために利用し得るThalassiosira属の珪藻には、限定するものではないが、*nitzschoides*、*aestivalis*、*antarctica*、*decipiens*、*eccentrica*、*floridana*、*fluviatilis*、*gravida*、*guillardii*、*hyalina*、*minima*、*nordenskioldii*、*oceanica*、*polychorda*、*pseudonana*、*rotula*、*tubifera*、*tumida*および*weissflogii*の各種が含まれ、*fluviatilis*種および*weissflogii*種が好ましい。上記のような珪藻は、例えば、Bigelow Laboratory for Ocean Science, Center for Collection of Marine Phytoplankton(McKown Point, West Boothbay Harbor, Maine, 04575)のタイプカルチャーコレクションから入手し得る。これらの珪藻はいずれも、参考として本明細書に組み入れる米国特許第5,635,493号に記載された方法および栄養培地を用いて増殖させ得る。

10

【0026】

p-GlcNAc纖維は、上記のような珪藻培養物から、多数の異なる方法により得られる。機械力による方法では、培養物の内容物を好適な機械力に付すことにより、p-GlcNAc纖維を珪藻細胞体から分離する。かかる機械力には、限定されるものではないが、コロイドミル、超音波装置もしくは泡発生器などにより発生される剪断力、または例えばワーリングブレンダーにより発生される切斷力などが含まれる。

20

【0027】

続いて、得られた珪藻細胞体懸濁液とp-GlcNAc纖維を分離する。例えば懸濁液を、細胞体からp-GlcNAc纖維を分離する一連の遠心分離ステップに付し、目視で観察し得る綿状物質を、含むにしてもごく微量しか含まない清澄な上清を得る。遠心分離ステップには、固定アングルのローターおよび約10°の温度が好ましい。必要となる速度、持続時間、および遠心分離ステップの総数は、例えば使用される特定の遠心分離ローターなどにより変動し得るが、このようなパラメーターの数値決定は当業者には自明であろう。

30

【0028】

次いで、上清中のp-GlcNAc纖維を、当業者によく知られた技術を用いて濃縮し得る。このような技術としては、限定するものではないが、吸引および濾過装置が挙げられる。最後に、濃縮p-GlcNAc纖維を、例えば蒸留脱イオン水、HClおよびエタノール、または他の好適な溶媒、好ましくは有機物と無機物を両方とも溶解するアルコールなどの溶媒を用いて洗浄する。このp-GlcNAcの精製方法の使用を実証する例を、以下の第6節に示す。

【0029】

化学的/生物学的方法では、珪藻細胞体を化学的および/または生物学的薬剤に曝露することにより、珪藻細胞体からp-GlcNAc纖維を分離する。例えば、珪藻培養物を、珪藻細胞壁を弱体化させ得る化学薬品で処理し、それによりp-GlcNAc纖維をその構造を変えることなく放出させる。かかる化学薬品には、限定するものではないが、フッ化水素酸(HF)が含まれる。あるいは、成熟珪藻培養物を、p-GlcNAc纖維の合成を抑制するように生物学的プロセスを変化させ得る生物学的薬剤で処理して、それにより既に存在する纖維を放出させてもよい。かかる薬剤としては、限定するものではないが、酵素N-アセチルグルコサミニル-P-トランスフェラーゼの阻害剤であるポリオキシン-Dが挙げられる。

40

【0030】

次に、上記の化学的薬剤または生物学的薬剤のメンバーで処理した珪藻培養物の、細胞体およびpGlcNAc含有纖維を分離する。例えば、処理した珪藻培養物の内容物を静置して、培養物の内容物が2つの別々の層を形成するようにする。上方の層は主にp-GlcNAc纖維を含み、下方の層は細胞体を含むだろう。静置した細胞物質の下層を残しつつ、上方のp-GI

50

cNAc纖維を含む層をサイフォンで吸い上げて取り出す。次いで、サイフォンで取り出したp-GlcNAc纖維を含む層をさらに精製し、p-GlcNAc纖維に害を与えない界面活性剤で処理することにより、タンパク質およびその他の所望でないものを除去する。かかる界面活性剤には、限定するものではないが、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が含まれる。

【0031】

p-GlcNAc纖維を珪藻細胞体から分離するためにHF処理のような酸処理を用いる場合には、纖維を分散させるためのステップが含まれ得る。かかるステップとしては、限定するものではないが、纖維分散のための機械力を使用するステップ、例えば軌道シェーカーの運動に纖維を付すステップが挙げられる。

【0032】

あるいは、任意のステップにおいて、酸処理した懸濁液を界面活性剤処理によりさらに精製する前に中和してもよい。かかる中和では、一般に、懸濁液のpHを約1.8～約7.0へと変化させるが、これを行うには例えば適切な量の1M Tris(pH 8.0)を添加するか、または適切な量の水酸化ナトリウム(NaOH)を添加する。中和により一般に、本明細書で検討した他の精製方法よりも実質的に長い純粋なp-GlcNAc纖維が得られる。

【0033】

次いで、精製したp-GlcNAc纖維を、吸引および濾過装置の利用などの当業者に公知の技術を用いて濃縮し得る。最後に、p-GlcNAc纖維を、蒸留脱イオン水、HClおよびエタノール、または他の好適な溶媒、好ましくは有機物と無機物の両方を溶解するアルコールなどの溶媒を用いる一連のステップで洗浄する。このような精製方法を用いて成功した実証例を、以下の第7節に示す。

【0034】

藻類(好ましくは珪藻)出発源からのp-GlcNAcの精製方法は各々が、非常に高純度の、品質低下していない結晶p-GlcNAcをもたらす一方で、各方法は、特定の性質および有利な特徴を有するp-GlcNAcを生成した。例えば、機械力による方法で精製されたp-GlcNAcからは、細胞をp-GlcNAcに付着させるための優れた基体を提供するp-GlcNAc膜が作製される。化学的/生物学的/物理的方法によっては、機械力による方法により得られるp-GlcNAcの平均収量よりもはるかに高い平均収量が得られる。さらに、化学的/生物学的/物理的方法の酸処理/中和変法によっては、非常に長いp-GlcNAc纖維(纖維によっては100 μmを超え、また非常に高い分子量(2000～3000万ダルトンもの高分子量)を有するp-GlcNAcポリマーの分子を含む)が得られる。

【0035】

本発明の方法および組成物において用いられるp-GlcNAc(化学的/生物学的方法の酸処理/中和変法により得られたもの)の電子顕微鏡写真を図3に示す。p-GlcNAc纖維の精製においては、図3に示すような纖維性の膜が形成されることが多い。

【0036】

5.1.1. p-GlcNAcの誘導体化

完全にアセチル化された本発明のp-GlcNAcを、多様な制御条件および手順を用いて、広範囲にわたる様々な化合物へと誘導体化することができる。これらの化合物のいくつかを示す図は、図4を参照されたい。かかる誘導体化された化合物には、限定するものではないが、以下にさらに詳述する化学的および/または酵素的手段により変化された、部分的または完全脱アセチル化p-GlcNAcが含まれる。本発明の好ましい実施形態によれば、p-GlcNAcは100%脱アセチル化されたp-GlcNAcである。

【0037】

加えて、p-GlcNAcまたはその脱アセチル化誘導体を、硫酸化、リン酸化、および/またはニトロ化により誘導体化し得る。さらに、以下に詳述するとおり、O-スルホニル、N-アシリル、O-アルキル、N-アルキル、デオキシハロゲンおよびN-アルキリデンおよびN-アリーリデンおよびその他の誘導体を、本発明のp-GlcNAcまたは脱アセチル化p-GlcNAcから調製できる。また本発明の脱アセチル化p-GlcNAcを使用して、種々の有機塩および/または金属キレートを調製できる。

10

20

30

40

50

## 【0038】

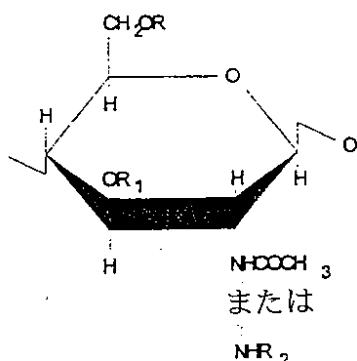
本発明の好ましい実施形態によると、p-GlcNAcの1個以上の単糖ユニットを脱アセチル化し、脱アシル化ポリ-1-4-N-グルコサミン種を作製できる。ポリ-1-4-N-アセチルグルコサミン種の各単糖ユニットが脱アセチル化されているポリ-1-4-N-グルコサミン種(すなわち、100%脱アセチル化された誘導体)は、約640,000ダルトン～約2400万ダルトンの分子量を有するであろうが、約640,000ダルトン～約240万ダルトンが好ましい。このような分子量範囲を有する種は、1-4立体配座で共有結合した約4,000～約150,000個のグルコサミン単糖を有する種に相当する。

## 【0039】

p-GlcNAcを塩基処理して脱アセチル化すると、遊離のアミノ基を有するグルコサミンが得られる。この加水分解プロセスは、濃水酸化ナトリウム溶液または濃水酸化カリウム溶液を用いて昇温で実施し得る。例えば、以下の第8節を参照されたい。あるいは、キチンデアセチラーゼ酵素を利用する酵素的方法をp-GlcNAcの脱アセチル化のために用いてもよい。このようなデアセチラーゼによる酵素的方法は当業者によく知られており、参考として本明細書にその全体を組み入れる米国特許第5,219,749号に記載のとおりに実施し得る。

## 【0040】

さらに、以下に示すように、本発明のp-GlcNAcの1個以上の単糖ユニットを、少なくとも1個の硫酸基を含むように誘導体化することができ、または他には、リン酸化もしくはニトロ化することができる。



10

20

30

式中、水素に代わるRおよび/またはR<sub>1</sub>、および/または、-COCH<sub>3</sub>に代わるR<sub>2</sub>は、硫酸基(-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、リン酸基(-P(OH)<sub>2</sub>)、またはニトロ基(-NO<sub>2</sub>)であってもよい。

## 【0041】

以下に、かかるp-GlcNAc誘導体の調製方法を記載する。これらの方法を実施する前に、そのp-GlcNAc出発原料を最初に凍結乾燥し、液体窒素中で凍結し、そして粉碎しておくのが有利である。

## 【0042】

硫酸化p-GlcNAc誘導体は、例えば、2工程法により調製し得る。第一工程においては、本発明のp-GlcNAcおよび/またはp-GlcNAc誘導体から、例えばTokuraら(Tokura, S.ら、1983, Polym. J. 15:485)に記載されるような方法を用いて、O-カルボキシメチルp-GlcNAcを調製する。第二に硫酸化工程を、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド-三酸化硫黄を用いて、Schweiger(Schweiger, R. G., 1972, Carbohydrate Res. 21:219)により記述されるような当業者によく知られた方法に従って実施し得る。得られた生成物はナトリウム塩として単離し得る。

40

## 【0043】

リン酸化p-GlcNAc誘導体は、例えば、Nishiら(Nishi, N.ら、1986, in "Chitin in Nature and Technology", Muzzarelliら編, Plenum Press, New York, pp.297-299)により記述された方法など、当業者によく知られた方法を利用して調製し得る。簡潔に説明すると、p-GlcNAc/メタンスルホン酸混合物を、攪拌しながら、約0～約5℃の温度で五酸化リン(約0.5～4.0モル等量)により処理する。処理はおよそ2時間にわたる。次いで、得

50

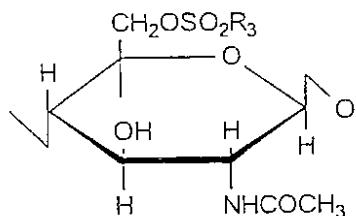
られた生成物を、当業者によく知られた標準的な技術を用いて沈殿させ、洗浄する。例えば、サンプルをエーテルなどの溶媒により沈殿させ、遠心分離し、エーテル、アセトン、またはメタノールなどの溶媒を用いて洗浄し、乾燥させる。

【0044】

ニトロ化p-GlcNAc誘導体は、例えば、SchoriginおよびHalt(Schorigin, R.およびHalt, E., 1934, Chem. Ber. 67:1712)に記載の技術など、当業者によく知られた技術を用いて調製し得る。簡潔に説明すると、p-GlcNAcおよび/またはp-GlcNAc誘導体を濃硝酸で処理し、安定なニトロ化生成物を形成する。

【0045】

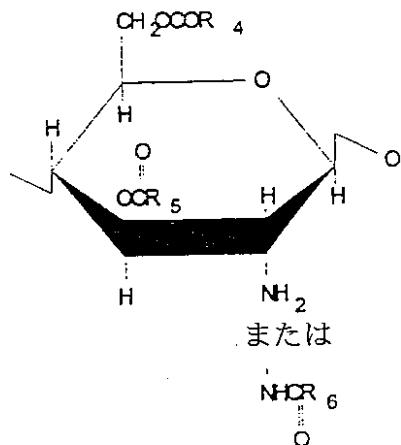
本発明のp-GlcNAcの1個以上の単糖ユニットは、以下のように、スルホニル基を含んでいてもよい。 10



式中、R<sub>3</sub>はアルキル、アリール、アルケニル、またはアルキニル基である。このような誘導体は、Kuritaら(Kurita, K.ら、1990, Polym. Prep[Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.] 31:624-625)に記述された方法など、よく知られた方法で調製できる。簡潔に説明すると、水性アルカリp-GlcNAc溶液を塩化トシリルのクロロホルム溶液と反応させ、次いでこの反応を低温で遅滞なく進行させることができる。 20

【0046】

本発明のp-GlcNAcまたはその脱アセチル化誘導体の1個以上の単糖は、以下のように1個以上のO-アシル基を含んでもよい。

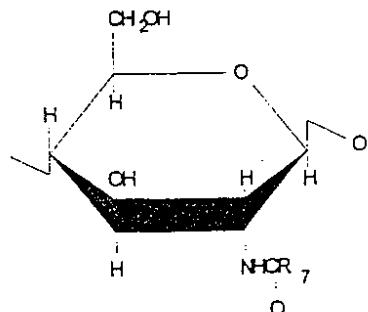


式中、水素に代わるR<sub>4</sub>および/またはR<sub>5</sub>はアルキル、アルケニル、またはアルキニル基であってもよく、そしてR<sub>6</sub>はアルキル、アルケニル、またはアルキニル基であってもよい。このような誘導体の例は、Komai(Komai, T.ら、1986, in "Chitin in Nature and Technology", Muzzarelliら編、Plenum Press, New York, pp.497-506)により記述された方法など、よく知られた方法により調製し得る。簡潔に説明すると、p-GlcNAcを、メタンスルホン酸中で、種々の好適な塩化アシルのいずれかと反応させ、p-GlcNAc誘導体を得ることができる。かかる誘導体には、限定するものではないが、カブロイル、カブリル、ラノリルまたはベンゾイル誘導体が含まれる。 40

【0047】

本発明の脱アセチル化p-GlcNAcの1個以上の単糖は、以下のように、N-アシル基を含んで 50

もよい。



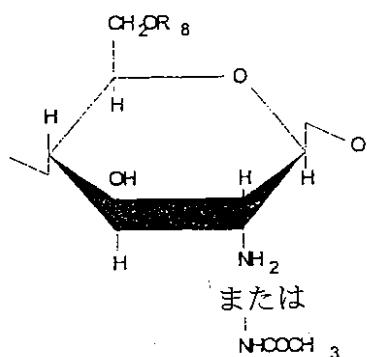
10

式中、R<sub>7</sub>はアルキル、アルケニル、またはアルキニル基である。かかる誘導体は、Hiranoら(Hirano, S.ら、1976, Carbohydrate Research 47:315-320)に記載の技術など、当業者によく知られた技術を利用して得られる。脱アセチル化p-GlcNAcは多数の有機酸の水溶液中で可溶性である。選択したカルボン酸無水物を、このようなp-GlcNAcの水性メタノール性酢酸溶液に添加すると、N-アシルp-GlcNAc誘導体が形成される。N-アシルp-GlcNAcは制御放出薬物送達系を製造するための好ましい誘導体である。

【0048】

本発明のp-GlcNAcまたはその脱アセチル化誘導体の1個以上の単糖は、以下のように、O-アルキル基を含んでもよい。

20



30

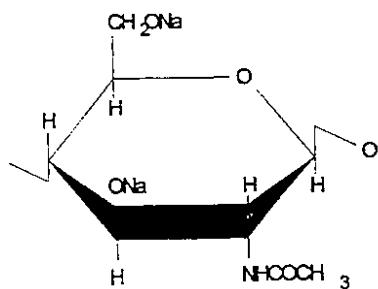
式中、R<sub>8</sub>はアルキル、およびアルケニル、またはアルキニル基である。かかる誘導体化は、当業者によく知られた技術を用いて行い得る。例えば、Mareshら(Maresh, G.ら、in "Chitin and Chitosan", Skjak-Braek, G.ら編、1989, Elsevier Publishing Co., pp.389-395)に記載された手順などである。簡潔に説明すると、脱アセチル化p-GlcNAcを、ジメトキシエタン(DME)中に分散させ、過剰量のプロピレンオキシドと反応させる。反応時間は24時間程度であり、反応を40～90のオートクレーブ中で行う。続いて混合物を水で希釈し、濾過する。DMEを留去する。最後に、目的の生成物を凍結乾燥により単離する。O-アルキルp-GlcNAcおよびその脱アセチル化誘導体もまた、制御放出薬物送達系を製造するための好ましい誘導体である。

40

【0049】

本発明のp-GlcNAcの単糖ユニットの1個以上は、以下に示すようなアルカリ誘導体であつてもよい。

【0050】

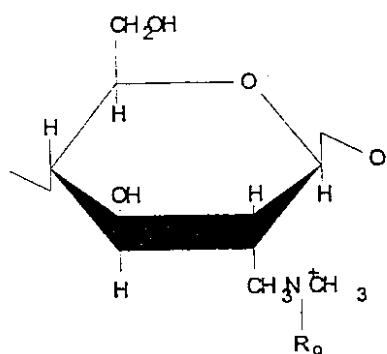


10  
そのような誘導体は、当業者に公知の技法を用いて得ることが可能である。例えば、Noguchiら(Noguchi, J. et al., 1969, Kogyo Kagaku Zasshi 72: 796-799)により記載された  
ような方法を利用することができる。簡潔に述べると、約0.1において約2時間にわたり  
減圧下でNaOH(好ましくは43%)中にp-GlcNAcを浸漬することが可能である。次に、例え  
ば、バスケット遠心機による遠心および機械的な加圧によって、過剰のNaOHを除去するこ  
とが可能である。

【0051】

本発明のp-GlcNAcの脱アセチル化誘導体の単糖ユニットの1個以上は、以下に示すようにN-アルキル基を含有していてもよい。

【0052】



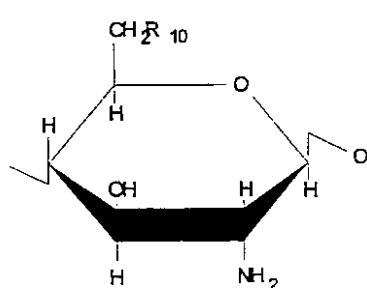
20

30  
式中、R9は、アルキル、アルケニル、またはアルキニル基であることが可能である。その  
ような誘導体は、例えば、N-アルキルp-GlcNAc誘導体の製造に関して先に述べたように、  
Mareshら(Maresh, G. et al., in "Chitin and Chitosan," Skjak-Bræk, G. et al.,  
eds. 1989, Elsevier Publishing Co., pp. 389-395)により報告されているような手順を  
利用して得ることが可能である。

【0053】

本発明のp-GlcNAcの脱アセチル化誘導体の単糖ユニットの1個以上は、以下に示すような  
デオキシハロゲン誘導体を1つ以上含有していてもよい。

【0054】



40

式中、R10は、F、Cl、Br、またはIであることが可能であるが、Iが好ましい。そのような

50

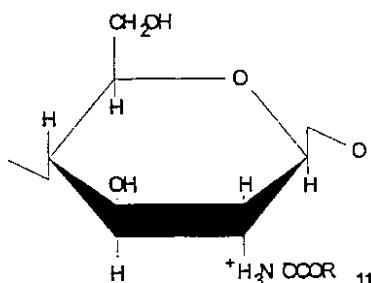
誘導体は、当業者に公知の技法を用いて得ることが可能である。例えば、Kuritaら (Kurita, K. et al., 1990, Polym. Prep. [Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.] 31: 624-625) により記載されたような方法を利用することが可能である。簡潔に述べると、トシリ化p-GlcNAcをジメチルスルホキシド中でハロゲン化ナトリウムと反応させてデオキシハロゲン誘導体を生成させる。p-GlcNAcのトシリ化は、アルカリp-GlcNAc水溶液を塩化トシリのクロロホルム溶液と反応させることによって行うことが可能である。そのような反応は、低温で円滑に進行させることが可能である。

## 【0055】

本発明のp-GlcNAcの脱アセチル化誘導体の単糖ユニットの1つ以上は、以下に示すような塩を形成していてもよい。

10

## 【0056】



20

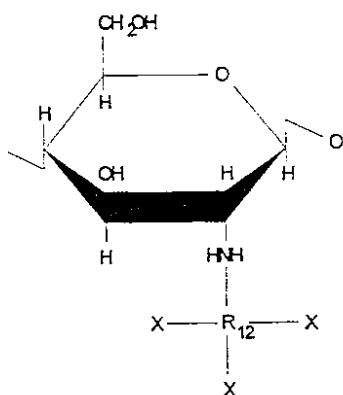
式中、R<sub>11</sub>は、アルキル、アルケニル、またはアルキニル基であることが可能である。そのような誘導体は、当業者に公知の技法を用いて得ることが可能である。例えば、Austin および Sennett (Austin, P. R. and Sennett, S., in "Chitin in Nature and Technology," 1986, Mazzarelli, R. A. A. et al., eds. Plenum Press, pp. 279-286) により記載されたような手順を利用することが可能である。簡潔に述べると、例えば、酢酸エチルまたはイソプロパノールのような有機媒質中に脱アセチル化p-GlcNAcを懸濁させることができある。この媒質には、例えば、ギ酸、酢酸、グリコール酸、または乳酸のような適切な有機酸を添加してもよい。この混合物は、一定時間(例えば、1~3時間)放置することが可能である。反応および乾燥の温度は、約12~約35の範囲で変化させることができあるが、20~25が好ましい。次に、濾過により塩を分離し、新鮮な媒質で洗浄し、そして残留する媒質を蒸発させることができる。

30

## 【0057】

本発明のp-GlcNAcの脱アセチル化誘導体の単糖ユニットの1個以上は、以下に示すような金属キレートを形成していてもよい。

## 【0058】



40

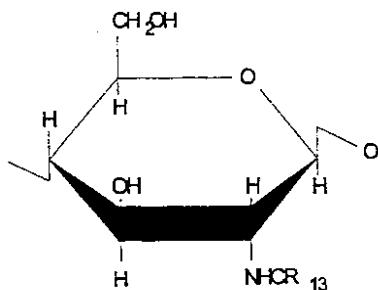
式中、R<sub>12</sub>は、金属イオン、特に、遷移金属の1つであることが可能であり、Xは、脱アセチル化p-GlcNAc中に存在するアミノ基または置換アミノ基に存在する窒素の電子により形成される配位結合である。

50

## 【0059】

本発明のp-GlcNAcの脱アセチル化誘導体の単糖ユニットの1個以上は、以下に示すようにN-アルキリデン基またはN-アリーリデン基を含有していてもよい。

## 【0060】



10

式中、R<sub>13</sub>は、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアリール基であることが可能である。そのような誘導体は、当業者に公知の技法を用いて得ることが可能である。例えば、Hiranoら(Hirano, S. et al., 1981, J. Biomed. Mat. Res. 15: 903-911)により記載されたような手順を利用することが可能である。簡潔に述べると、脱アセチル化p-GlcNAcとカルボン酸無水物および/またはアリールアルデヒドとのN-置換反応を行うことにより、アシル誘導体および/またはアリーリデン誘導体を得ることが可能である。

20

## 【0061】

更に、p-GlcNAcまたはその脱アセチル化誘導体を制御された加水分解条件に付すことにより、一様な個別の分子量および別の物理的特性を有する分子のグループを得ることが可能である。そのような加水分解条件としては、例えば、酵素リゾチームによる処理が挙げられる。加水分解度を制御するために、p-GlcNAcを様々な時間にわたってリゾチームに曝露することが可能である。その上、加水分解の速度は、リゾチーム処理されるp-GlcNAcの脱アセチル化度の関数として制御することが可能である。脱アセチル化条件は、先に記載した通りであってよい。約20~約90%の間で脱アセチル化される場合、p-GlcNAc分子がより完全に脱アセチル化される程、分子は所定の時間内でより完全に加水分解されるであろう。加水分解処理および/または脱アセチル化処理によって、分子量の低下に加えて物理的特性の変化を導き出すことが可能である。大規模に加水分解を行うと、p-GlcNAcの液化が起こる。

30

## 【0062】

更に、熱変性は、p-GlcNAcの結晶構造を改変する働きをしうる。p-GlcNAc生成物の結晶質構造をそのように改変することにより、例えば、p-GlcNAcの反応性に有利な影響を及ぼすことが可能である。

## 【0063】

そのほか、p-GlcNAcおよび/またはp-GlcNAc誘導体を含むハイブリッドを形成することも可能である。そのようなハイブリッドには、p-GlcNAcおよび/またはp-GlcNAc誘導体に加えて、何種類かの天然および/または合成の物質が含まれていてもよい。例えば、ハイブリッドは、p-GlcNAcおよび/またはp-GlcNAc誘導体と1種類以上の細胞外マトリックス(ECM)成分から形成されていてもよい。そのようなECM成分としては、コラーゲン、フィブロネクチン、グリコサミノグリカン、および/またはペプチドグリカンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、ハイブリッドは、p-GlcNAcおよび/またはp-GlcNAc誘導体と1種類以上の合成物質、例えばポリエチレン、から形成されていてもよい。そのようなp-GlcNAc/ポリエチレンハイブリッドまたはp-GlcNAc誘導体/ポリエチレンハイブリッドは、例えば、オートクレーブによる処理を介して、ハイブリッド成分を熱的に連結させることによって作製することが可能である。

40

## 【0064】

特許請求の範囲に係る本発明で使用するための好ましいp-GlcNAc誘導体は、p-GlcNAc乳酸

50

塩誘導体のような脱アセチル化p-GlcNAc塩誘導体、特に、p-GlcNAc乳酸塩ゲル誘導体である。本明細書で使用される場合、用語「p-GlcNAc乳酸塩」は、部分的にまたは完全に脱アセチル化されたp-GlcNAcに、乳酸部分が機能的に結合していることを意味する。そのようなp-GlcNAc乳酸塩誘導体は、先に記載したようにして(例えば、乳酸で誘導体化することによって)得られ、そして以下の第10節の実施例に記載されているようにプロピレングリコールおよび水を用いてゲルとして製剤化することが可能である。高粘度および低粘度を有するp-GlcNAc乳酸塩誘導体を製造することが可能であり、これにより、対象となる特定の適応症に合わせてp-GlcNAcを調製することが可能になる。例えば、注射器や噴霧器を介して送達するために、より低粘度を有するp-GlcNAcを使用することが有用な場合もある。

## 【0065】

10

以下の第5.3節に更に詳細に記載されているように、先に記載のp-GlcNAcおよび/またはその誘導体は、エンドセリンアンタゴニストのような対象となる分子または薬物に共有結合もしくは非共有結合で結合させるかまたはそれらと組み合わせることによって、更に誘導体化することができる。

## 【0066】

5.1.2 p-GlcNAcの再製剤化

本発明の組成物中で使用されるp-GlcNAc、先に記載したような、その脱アセチル化誘導体、および/またはそれらの誘導体は、溶解してから様々な形状および形態に再製剤化することが可能である。

## 【0067】

20

p-GlcNAcの溶解は、ジメチルアセトアミド(DMA) / 塩化リチウムで処理することによって達成することができる。LiClを5% (DMAの重量基準で)含有するDMA溶液中で攪拌することによってp-GlcNAcを容易に溶解させることができ。p-GlcNAc塩、例えば、乳酸塩誘導体またはカルボキシメチル誘導体のような水溶性p-GlcNAc誘導体は、水に溶解させることができ。少なくとも約75%脱アセチル化されたp-GlcNAcは、例えば、1%酢酸のような弱酸性の溶液に溶解させることができる。水に不溶性のp-GlcNAc誘導体は、有機溶剤に溶解させることができる。

## 【0068】

DMA:LiCl中のp-GlcNAcをフェニルイソシアネートで誘導体化することによって、カルバニレートを生成することができる。更に、DMA:LiCl中のp-GlcNAcをトルエン-p-スルホニルクロリドで誘導体化することによって、トルエン-p-スルホネートを生成することができる。

30

## 【0069】

溶液状態にあるp-GlcNAc、その脱アセチル化誘導体、および/またはそれらの誘導体は、次に、沈殿させていろいろな形状に再製剤化することが可能である。こうした形状としては、マット、ひも、ミクロスフェア、ミクロビーズ、膜、纖維、粉末、スポンジ、およびゲルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。更に、超薄(すなわち、厚さ約1ミクロン未満)の均一な膜に再製剤化することも可能である。そのほか、ピル剤、錠剤、およびカプセル剤のような医薬製剤を調製することもできる。

## 【0070】

40

そのような再製剤化は、純粋なp-GlcNAcが水およびアルコール、好ましくはエタノールのような溶液に不溶であるという事実を利用することによって達成することが可能である。例えば、p-GlcNAc含有DMA/LiCl混合物を注入のような従来の手段によって水またはアルコール、好ましくはエタノールに導入すると、溶液は再沈殿を起こし、その結果、溶解していたp-GlcNAcをもたらす。p-GlcNAc膜から纖維状物質への再製剤化については、以下の第9節の実施例で具体的に説明する。水溶性のp-GlcNAc誘導体の場合、例えば、酢酸エチルまたはイソプロパノールのような有機溶剤中で再沈殿させることによって再製剤化を行うことが可能である。少なくとも約75%脱アセチル化されたp-GlcNAcの再製剤化は、アルカリ性溶液中で再沈殿させることによって達成することが可能である。水に不溶性のp-GlcNAc誘導体は、例えば、水のような水性溶液中で再沈殿させることによって再製剤化を行う

50

ことが可能である。

【0071】

p-GlcNAc膜および三次元p-GlcNAcマトリックスは、膜内またはマトリックス内に制御された平均細孔サイズの形成をもたらす方法を利用して作製することが可能である。膜および/またはマトリックスを形成する前に、使用するp-GlcNAc材料の量を変化させることによって、およびメタノールまたはエタノール、好ましくはエタノールのような特定の溶剤を約5%～約40%の範囲の特定の量で添加することによって、膜中およびマトリックス中における細孔サイズを制御することができる。一般的には、溶剤のパーセントが大きくなる程、形成される平均細孔サイズは小さくなるであろう。

【0072】

本発明の好ましい再製剤化によれば、p-GlcNAc乳酸塩誘導体は、以下の第10節の実施例で詳細に説明するようにゲルに再製剤化される。

【0073】

5.2 本発明の組成物中のエンドセリンアンタゴニスト

本発明の組成物および方法で利用されるエンドセリンアンタゴニストとしては、ペプチド系エンドセリンアンタゴニスト、非ペプチド系エンドセリンアンタゴニスト、ETA特異的エンドセリンアンタゴニスト、ETB特異的エンドセリンアンタゴニスト、または非特異的エンドセリンアンタゴニストが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の組成物および方法に有用なペプチド系エンドセリン受容体アンタゴニストとしては、例えば、BQ-123 (シクロ(-D-Trp-D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-))、BQ-153、BQ-238、BQ-485、BQ-610、BQ-788、BQ-928、TAK-044、FR139317 (ペルヒドロアゼピン-1-イルカルボニル-L-ロイシル-(I-メチル)-D-トリプトフィル-[3-(2-ピリジル)]-D-アラニン)、RES-701-1 (Novabiochem)、PD 142893 (アセチル-(3,3-ジフェニル-D-アラニン)-L-Leu-L-Asp-L-Ile-L-Ile-L-Trp)、PD 145065、CP 170687、AcDBhg16-Leu-Asp-Ile、IRL-1038 ([Cys11-Cys15]-エンドセリン-1 (11-21))、GRGDSペプチド、およびET-1 [Dpr1-Asp 15]が挙げられる。これらのペプチドの多くは、例えば、American Peptide Company, Sunnyvale CAまたはCalbiochem Novabiochem Company, San Diego CAから市販品として入手可能である。

【0074】

本発明の組成物および方法に使用するための非ペプチド系エンドセリン受容体アンタゴニストとしては、例えば、Ro 61-0612、Ro 61-1790、Ro 42-2005、Ro 46-2005、Ro 46-8443、Ro 47-0203 (当技術分野においてボセンタン (bosentan) としても知られる)、PD 155080、PD 156707、SB 209670、SB 217242、L-744,453、L-749,329、L-754,142、CGS 27830、BMS 182874、LU 135252、S-1039、mA386、A-127722、TBC11251、Nz-arg-3-(isoxazdylsulfametyl)-2-チオフェンカルボキサミド、およびEQ 123が挙げられる。これらの公知のエンドセリンアンタゴニストの多くの構造については、例えば、先に記載のWebbらの文献およびOhlsteinらの文献を参照されたい。

【0075】

本発明によれば、非ペプチド系エンドセリンアンタゴニストが好ましいこともある。なぜなら、ペプチド系アンタゴニストよりも好ましい薬物動力学的性質、例えば、向上した代謝安定性ならびにより良好なバイオアベイラビリティ - および経口活性を呈するからである。本発明の好ましい実施形態によれば、利用されるエンドセリンアンタゴニストは、先の図1に示されているRo61である。

【0076】

5.3 本発明の組成物の好ましい製剤

本発明の好ましい実施形態によれば、先に記載のエンドセリンアンタゴニスト(「EA」)は、p-GlcNAc、または先に記載したような1種以上のその誘導体もしくは再製剤化物に共有結合もしくは非共有結合により機能的に結合されるかまたはそれらと組み合わされる。一実施形態によれば、少なくとも一つのタイプのエンドセリンアンタゴニストが、脱アセチル化p-GlcNAcと、共有結合、非共有結合、または他の方法で組み合わせるかまたは混合される。本発明のEA / p-GlcNAc組成物と一緒に使用しうる他の抗腫瘍剤については、以下

10

20

30

40

50

で説明する。

【0077】

エンドセリンアンタゴニストまたは他の抗腫瘍剤は、例えば、特定の長さの化学的スペーサーとして作用する二官能性架橋試薬を利用した化学的結合によって、脱アセチル化p-GlcNAcの露出した第一級アミンに共有結合させることができ。そのような技法は、当業者に公知であり、例えば、DavisおよびPreston (Davis, M. and Preston, J. F. 1981, Anal. Biochem. 116: 404-407)ならびにStarosら (Staros, J. V. et al., 1986, Anal. Biochem. 156: 220-222)の方法に類似したものであると言つてよいであろう。例えば、ペプチド系化合物の場合、脱アセチル化または部分的に脱アセチル化されたp-GlcNAcに結合されるペプチド上のカルボキシル基を活性化し、次に、p-GlcNAcに架橋結合させることができ。活性化は、例えば、カルボジイミドEDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)などの溶液を、リン酸塩緩衝液中のペプチド溶液に添加することによって達成することができる。好ましくは、この溶液には、このほかに、カップリングを促進するためのスルホ-NHS (N-ヒドロキシスルホスクシンイミド)のような試薬が含まれるであろう。活性化されたペプチドは、炭酸塩緩衝液のような高pH緩衝液中 (pH 9.0~9.2) で混合することによって、脱アセチル化p-GlcNAcに架橋させることができ。 10

【0078】

結合された分子の生物学的活性は、該分子をp-GlcNAcに結合させるために利用するリンカーフォース (例えば、二官能性架橋性化合物) の長さを変化させることによって保持することができる。結合された分子の生物学的活性を変化させないような、結合される所定の分子に対するリンカーフォースの適切な長さは、慣例に従つて確定することができる。例えば、所定の長さのリンカーフォースを介して結合された分子の生物学的活性 (例えば、治療に有効なレベルの生物学的活性) は、結合された所定の分子に特異的な公知のアッセイを利用して試験することができる。このほか、結合された分子の生物学的活性を保持するためには、適切な天然の酵素により開裂されて結合分子を放出することができるリンカーフォースを利用することが必要な場合もある。当業者により一般に用いられるアッセイを使用して、結合された特定の分子の生物学的活性が保持されているかを試験することにより、許容しうるレベルの活性 (例えば、治療に有効なレベルの活性) が得られるかを確認することができる。 20

【0079】

このほか、ペプチド系または非ペプチド系のエンドセリンアンタゴニストは、単独でまたは他の抗腫瘍剤と組み合わせて、当業者に公知の技法を用いてp-GlcNAcおよび / またはその誘導体と混合するかあるいは非共有結合でそれらに結合させることにより本発明の組成物を形成することができる。例えば、エンドセリンアンタゴニストなどの選択された1種または複数種の分子を、p-GlcNAcの懸濁液、脱アセチル化もしくは部分的に脱アセチル化されたp-GlcNAcの溶液、脱アセチル化もしくは部分的に脱アセチル化p-GlcNAc塩の溶液、例えば、(部分的または完全に脱アセチル化された)p-GlcNAc-乳酸塩の溶液、または任意のp-GlcNAc誘導体の溶液と、混合することが可能である。混合物は、場合により、凍結乾燥させてもよい。凍結乾燥の後、恐らく、疎水的、静電的、および他の非共有結合的な相互作用により、分子はp-GlcNAcマトリックスに非共有結合で結合されるようになる。そのようなp-GlcNAc製剤は、製造が非常に容易である。更に、そのような製剤は、広範にわたる物理的特性および極めて疎水的なものから極めて親水的なものにまで及ぶ水溶性を有する多種多様な物質を用いて効果的に得ることができる。1種または複数種の分子を結合させる際には、非共有結合で結合させる特定の1種または複数種の分子の活性を試験するために当業者により一般に用いられているアッセイを使用することにより、結合させた分子を用いて許容しうるレベルの活性 (例えば、治療に有効な活性) が得られるかを確認することができる。 40

【0080】

更に、エンドセリンアンタゴニストは、単独でまたは他の抗腫瘍剤と組み合わせて、当技術分野で公知の方法によりp-GlcNAc中に封入することができる。例えば、封入を行う一方

10

20

30

40

50

法として、Hwangらにより概説された手順が挙げられる (Hwang, C. et al. in Muzzarelli, R. et al., eds., 1985, "Chitin in Nature and Technology", Plenum Press, pp. 389-396)。この文献の全体を、参考として本明細書に組み入れるものとする。また、封入は、例えば、先に提示した酸処理 / 中和型の化学的 / 生物学的精製方法の別法に従って行うこともできる。p-GlcNAc溶液のpHをほぼ中性のpH領域(すなわち、約7.4)にまで上昇させるのではなく、p-GlcNAcの精製が終了した後、pHを約9.0にまで上昇させることによって塩基性のpH環境を形成することが可能である。より高い塩基性pHでは、p-GlcNAcまたはその誘導体の構造は、より三次元的または「開放的」な形態をとる。pHを低下させるにつれて、分子の形態は、よりコンパクトで「閉鎖的」な形態に戻る。従って、エンドセリンアンタゴニストのような対象の化合物または薬物を高pHのp-GlcNAc溶液に添加し、次に、p-GlcNAc / 薬物懸濁液のpHを低下させることができ、これによって、対象の薬物をp-GlcNAcマトリックス内に「捕獲」または封入することができる。分子を封入した後、当業者により一般に用いられているアッセイを利用して、封入させた1種または複数種の特定の分子の活性を試験することにより、封入させた分子が許容しうるレベルの生物学的活性(例えば、治療に有効な活性)を保有しているかを確認することができる。

#### 【0081】

本発明のEA / p-GlcNAc組成物の製剤の一例が、エンドセリンアンタゴニストをp-GlcNAc乳酸塩ゲルと混合させる以下の第10節の実施例に示されている。このほか、EA組成物(付随するp-GlcNAcが含まれていない)は、例えば、エンドセリンアンタゴニストをPBSもしくはHBSS中に溶解させるかまたは製造業者の取扱い説明書の記載に従って溶解させ、そして所望の濃度に溶液を調節することによって、調製することができる。

#### 【0082】

EA / p-GlcNAc組成物を含めて、本発明の組成物は、医薬組成物として投与すべく、例えば、吸入もしくは吹送による投与(口または鼻のいずれかを経由して)、または経口、口腔内、非経口、もしくは直腸内の投与を行うべく、製剤化することができる。好ましい実施形態によれば、本発明のEA / p-GlcNAc組成物は、以下の第10節の実施例に記載されているようなゲルの形態で注射することにより投与される。癌などの増殖性疾患を治療するために、医薬組成物が、エンドセリンアンタゴニスト(例えば、ピリミジルスルホニアミドのような非ペプチジルエンドセリンアンタゴニスト)の投与を含んでなる本発明の実施形態では、組成物には、治療に有効な量のエンドセリンアンタゴニストが製薬上許容される担体と組み合わせて含まれていてもよい。

#### 【0083】

経口投与の場合には、医薬組成物は、例えば、結合剤(例えば、前もってゼラチン化した(pregelatinised)トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、充填剤(例えば、ラクトース、微結晶性セルロース、またはリン酸水素カルシウム)、滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ)、崩壊剤(例えば、ジャガイモデンプンまたはナトリウムデンブングリコレート(sodium starch glycolate))、あるいは湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)のような製薬上許容される賦形剤または担体を用いた従来の手段により調製される錠剤またはカプセル剤の形態をとることができる。賦形剤、担体、および充填剤の代わりに、またはそれらに加えて、p-GlcNAcを使用することができる。当技術分野で公知の方法を用いて、p-GlcNAcで錠剤をコーティングすることができる。

#### 【0084】

経口投与用の液状製剤は、例えば、溶液剤、シロップ剤、または懸濁剤の形態をとることができるか、あるいは使用前に水または他の好適なビヒクルとの構成体を形成するための乾燥品として提供することができる。そのような液状製剤は、懸濁化剤(例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用脂)、乳化剤(例えば、レシチンまたはアラビアゴム)、非水性ビヒクル(例えば、扁桃油、油性エステル、エチルアルコール、または分別植物油)、および保存剤(例えば、メチルもしくはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸)のような製薬上許容される添加剤を用いた従来の手段によ

10

20

30

40

50

り調製することができる。この製剤にはまた、適切な場合には、バッファー塩、矯味矯臭剤、着色剤、および甘味剤が含まれていてもよい。

#### 【0085】

##### 5.4 本発明の組成物および方法の用途

本発明の組成物の生医学的使用としては、エンドセリンアンタゴニストならびに他の抗腫瘍剤のような他の治療剤のための薬物送達システムとしての使用が含まれる。本発明のp-GlcNAc含有製剤は、公知の薬物製剤と比較して、例えば、増大した効力、低減した毒性および改良された生物学的利用能を含めた更なる利点を提供する。実際に、本発明のp-GlcNAc系薬物送達システムの使用には多数の利点が存在する。例えば、注射による伝統的な薬物投与は、一般に、タンパク質および多くの他の薬物と併用される。しかしながら、繰り返し投与を行うと、血中薬物濃度が変動し、患者の快適さおよび服薬遵守に影響を及ぼすことになる。経口投与が有利である可能性がある。なぜなら、経口投与では、放出されるべき薬物の量をより大きく変化させることができあり、しかも患者の受ける不快感が少なくなるからである。しかしながら、タンパク質および他の化合物は、胃の中で変性および劣化する。

#### 【0086】

しかしながら、一度投与された薬物を保護することによって、改良された経口投与が本発明のp-GlcNAc含有組成物により達成される。例えば、p-GlcNAcは、ペプチド系エンドセリンアンタゴニストを胃の酸性および酵素的環境から保護する。P-GlcNAc系は、ひとたび腸領域に到達すると、拡散および/またはカプセル分解により化合物を放出し、そこで効果的に血流中に吸収される。本発明のこれらのp-GlcNAc系を使用することにより、例えば、タンパク質ならびに多くの他の化合物を送達することができる。p-GlcNAc誘導体でコーティングされたリポソームまたはp-GlcNAc誘導体-アルギネートカプセル化合物は、そのような経口送達方法のために好ましい。

#### 【0087】

更に、本発明の組成物を患者に導入すると、p-GlcNAcが次第に生分解されて、結果として、結合または内包された化合物が徐々に患者の血流中に放出されるため、制御された徐放性薬物送達を行う方法が提供される。

#### 【0088】

予測可能な生分解速度を有する脱アセチル化または部分脱アセチル化p-GlcNAc種を生成することができる。例えば、脱アセチル化のパーセントは、p-GlcNAc種が劣化する速度に影響を及ぼす。一般的には、脱アセチル化のパーセントが高くなる程、生分解および再吸収の速度は速くなるであろう。従って、p-GlcNAcの生成の間、p-GlcNAcの生分解度およびin vivo再吸収速度を制御することができる。

#### 【0089】

そのような制御可能な生分解速度を有するp-GlcNAc物質は、膜、ゲル、スポンジ、ミクロスフェア、繊維などに製剤化することが可能である。本発明の好ましい実施形態によれば、予測可能な生分解速度を有する100%脱アセチル化または部分脱アセチル化p-GlcNAcを利用することができる。

#### 【0090】

本発明のp-GlcNAc/薬物組成物は、当業者に公知の標準的な手順を用いて様々な経路を介して患者に送達することができる。例えば、そのような送達は、部位特異的、経口、経鼻、静脈内、皮下、皮内、経皮、筋肉内、または腹腔内の投与であってよい。部位特異的送達に関して、投与方法としては、注射法、埋植法、関節鏡法、腹腔鏡法、または類似の手段があるが、これらに限定されるものではない。p-GlcNAcの膜および/またはゲルならびにミクロスフェアおよびスポンジは、そのような部位特異的送達方法のために好ましい。

#### 【0091】

先に述べたように、本発明の組成物のp-GlcNAcは、膜、ゲル、スポンジ、ミクロスフェア、繊維などに製剤化することができる。これらのp-GlcNAc生成物は、縫合を必要とすることなく、軟組織および硬組織の両方を含めて人体内の組織に固着したり組織を密着させる

10

20

30

40

50

。p-GlcNAc物質は、例えば、腹腔鏡手術のような一般手術または低侵襲手術の際に適用することができる。

【0092】

本発明の好ましい実施形態によれば、p-GlcNAcは、エンドセリンアンタゴニストおよび/または他の抗腫瘍剤が溶解されているか、ないしは他の方法で組み入れられるゲルの形態で存在する。p-GlcNAc系のゲルおよび膜には、例えば、腫瘍への、または手術後の腫瘍が除去された領域への直接的な部位特異的徐放性送達を提供するための治療薬送達システムとしての種々の適用がある。そのような固定化徐放性組成物は、手術後の重要な初期防御方法として作用できる。また、そのような抗腫瘍薬送達システムは、手術をまったくまたは部分的に行うことのできない腫瘍、例えば、特定の脳腫瘍を処置するのに特に有用である。

10

【0093】

従って、本発明のEA / p-GlcNAc組成物は、癌および他の増殖性疾患の治療を行うための治療薬送達システムとして有用である。これらの組成物には更に、相乗効果を得るために、本発明のp-GlcNAcに結合させるかまたはその中にカプセル化することのできる他の抗腫瘍剤を含有させることができる。そのような抗腫瘍剤は、当業者に公知であり、例えば、次のようなカテゴリーおよび特定化合物：アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、ピンカアルカロイド剤およびエピポドフィロトキシン剤、ニトロソウレア、酵素、合成物、ホルモン治療薬、生物製剤、ならびに治験薬があるが、これらに限定されるものではない。

20

【0094】

そのようなアルキル化剤には、ナイトロジエンマスター、クロラムブシリ、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、チオテバ、およびプスルファンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0095】

代謝拮抗剤には、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド(ara-C)、5-アザシチジン(azacytidine)、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、およびフルダラビンホスフェートが含まれるが、これらに限定されるものではない。抗腫瘍抗生物質には、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ブリカマイシン(plicamycin)、イダルビシンおよびミトキサントロンが含まれるが、これらに限定されるものではない。ピンカアルカロイドおよびエピポドフィロトキシンとしては、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ピンデシン、エトポシド、およびテニポシドが含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0096】

ニトロソウレアには、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、およびストレプトゾシンが含まれる。酵素には、L-アスパラギナーゼが含まれるが、これに限定されるものではない。合成物には、ダカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ヒドロキシウレア、ミトタン、プロカルバジン、シスプラチニン、およびカルボプラチニンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0097】

ホルモン治療薬には、コルチコステロイド(酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、およびデキサメタゾン)、エストロゲン(ジエチルスチルベスチロール、エストラジオール、エステル化エストロゲン、抱合卵胞ホルモン、クロロトリアニセン)、プロゲスチン(酢酸メドロキシプロゲステロン、カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メガストロール)、抗エストロゲン(タモキシフェン)、アロマターゼ阻害剤(アミノグルテチミド)、アンドロゲン(プロピオニ酸テストステロン、メチルテストステロン、フロオキシメステロン、テストラクトン)、抗アンドロゲン(フルタミド)、LHRH類似体(酢酸ロイプロリド)、ならびに前立腺癌用の内分泌物(ケトコナゾール)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

【0098】

50

生物製剤には、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壞死因子、および生物学的応答調節剤が含まれうるが、これらに限定されるものではない。

【0099】

治験薬には、アルキル化剤、例えば、ニムスチンAZQ、BZQ、シクロジゾン(cyclodisone)、DADAG、CB10-227、CY233、DABISマレート、EDMN、ホテムスチン(Fotemustine)、ヘプスルファム(Hepsulfam)、ヘキサメチルメラミン、マホサミド(Mafosamide)、MDMS、PCNU、スピロムスチン(Spiromustine)、TA-077、TCNU、およびテモゾロミド(Temozolomide)；代謝拮抗剤、例えば、アシビシン、アザシチジン(Azacytidine)、5-アザ(aza)-デオキシシチジン、A-TDA、ベンジリデングルコース、カルベチメル(Carbetimer)、CB3717、デアザグアニンメシレート、DODOX、ドキシフルリジン、DUP-785、10-EDAM、ファザラビン(Fazarabine)、フルダラビン(Fludarabine)、MZPES、MMPR、PALA、PLAC、TCAR、TMQ、TNC-P、およびピリトレキシム(Piritrexim)；抗腫瘍抗生物質、例えば、AMPAS、BWA770U、BWA773U、BWA502U、アモナフィド(Amonafide)、m-AMSA、CI-921、ダテルリップチウム(Datelliptium)、ミトナフィド(Mitonafide)、ピロキサントロン(Piroxantrone)、アクラルビシン、シトロジン(Cytorhodin)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、ヨード-ドキソルビシン、マルセロマイシン(Marcellomycin)、メナリル(Menaril)、モルホリノアントラサイクリン、ピラルビシン、およびSM-5887；微小管紡錘体阻害剤、例えば、アムフェチニル(Amphethinile)、ナベルビン、およびタキソール；アルキルリソホスホ脂質(lysophospholipid)、例えば、BM41-440、ET-18-OCH<sub>3</sub>、およびヘキサクリホスホコリン；金属化合物、例えば、硝酸ガリウム、CL286558、CL287110、シクロプラタム(Cycloplatin)、DWA2114R、NK121、イプロプラチニン(Iproplatin)、オキサリプラチニン(Oxaliplatin)、スピロプラチニン(Spiroplatin)、スピロゲルマニウム、およびチタン化合物；ならびに新規な化合物、例えば、アフィドイコリン(Aphidoicolin)グリシネート、アムバゾン(Ambazone)、BSO、カラセミド(Caracemide)、DSG、ジデムニン(Didemnin)、B、DMFO、エルサミシン(Elsamicin)、エスペルタトルシン(Espertatrucin)、フラボン酢酸、HMBA、HHT、ICRF-187、ヨードデオキシウリジン、イポメアノール、リブロマイシン(Liblomycin)、ロニダミン、LY186641、MAP、MTQ、メラバロン(Merabarone)SK & F104864、スラミン、タルリソマイシン(Tallysomycin)、テニポシド、THU、およびWR2721；ならびにトレミフェン(Toremifene)、トリロサン(Trilosane)、およびジンドキシフェン(zindoxifene)が含まれうるが、これらに限定されるものではない。

【0100】

放射線増強剤である抗腫瘍薬は、手術の代わりにまたは手術の後で放射線治療を行うように指示された場合に好適である。そのような薬物としては、例えば、化学療法薬の5'-フルオロウラシル、マイトマイシン、シスプラチニンおよびその誘導体、タキソール、ドキソルビシン、アクチノマイシン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、メタマイシンなどがある。

【0101】

急性非リンパ球性白血病の改良された治療を行うためにシトシンアラビノシド(ara-C)と組み合わされたチオグアニン、乳癌のためにシスプラチニンと組み合わされたタモキシフェン、および乳癌や前立腺癌のためにシスプラチニンと組み合わされたプロスタグラジンのような2種以上の他の抗腫瘍剤と組み合わせて本発明のEA / GlcNAc組成物を使用すると、更なる相乗効果を得ることができる。当業者の公知の抗癌剤の多くの他の相乗的組み合わせを、本発明のEA / p-GlcNAcおよびEA / p-GlcNAc誘導体の製剤と一緒に使用することができる。

【0102】

加えて、今まで製剤化および送達を行うことが困難であつたいくつかの薬物の製剤化および送達を可能にする化学的性質および特徴をp-GlcNAcポリマーが有しているならば、本発明のp-GlcNAc含有組成物を使用することが望ましい。例えば、乳癌を治療するために使用される微小管紡錘体阻害剤であるタキソールは、疎水性であり、静脈内送達用の液状注入剤として溶解させるためには、ポリオキシエチル化ヒマシ油の添加が必要である。タキソ

ールの疎水性の性質によって、タキソールがp-GlcNAcポリマー物質との局所的制御放出性送達用の製剤化に、理想的な化合物となる。参考として本明細書に組み込まれる米国特許第5,635,493号の第23節には、そのようなp-GlcNAc / タキソール製剤が提示されている。p-GlcNAc抗腫瘍系の更なる標的としては、皮膚、GI管、膵臓、肺、胸部、尿路、および子宮の腫瘍、ならびにHIV関連カポージ肉腫があるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0103】

本発明のp-GlcNAc物質は、ヒトにおいて免疫応答を誘導しないという点で、それ自体、免疫学的に中性であるので、固定化された薬物を収容するp-GlcNAcの膜、3D多孔性マトリックス、および / またはゲルを含有してなる上記のようなp-GlcNAcデバイスは、免疫応答を起こさない方法で該薬物を送達することができる。p-GlcNAc物質と組み合わせてそのようなデバイスを構築するいくつかの場合、天然のアルギメントおよび合成ポリマーのような特定の追加物質を使用することができる。例えば、A. Polk (Polk, A. et al., 1994, J. of Pharmaceutical Sciences, 83 (2): 178-185) によって提案されたものと類似の方法により、高分子系遅延放出薬物送達システムを作製することができる。そのような手順では、脱アセチル化p-GlcNAcを、塩化カルシウムの存在下でアルギン酸ナトリウムと反応させることにより、適切な条件下で一定の時間経過にわたって送達および放出すべき薬物を含有してなるマイクロカプセルを形成する。

#### 【0104】

本明細書に記載のp-GlcNAc系のシステムで併用される上記の任意の薬物または薬剤の治療に有効な用量は、当業者に公知の方法を用いて慣例に従って決定することができる。「治療に有効な」用量とは、本明細書中に記載されている過程および / または疾患の症状を改善するのに十分な化合物量を意味する。

#### 【0105】

薬物の毒性および治療効能は、細胞培養物または実験動物を用いて行われる標準的な薬剤学的手順により、例えば、LD<sub>50</sub> (集団の50%が死亡する用量)およびED<sub>50</sub> (集団の50%で治療に有効な用量)を調べることにより、決定することができる。毒性作用と治療効果の用量比は治療指数であり、LD<sub>50</sub> / ED<sub>50</sub>の比で表すことができる。大きな治療指数を呈する化合物が好ましい。毒性副作用を呈する化合物を使用することもできるが、感染していない細胞で生じる可能性のある損傷を最小限に抑えるために、またそれによって副作用を低減させるために、罹患した組織の部位に該化合物をターゲッティングする送達システムを設計するように注意を払うべきである。

#### 【0106】

ヒトに使用する用量の範囲を定式化する際、細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータを使用することができる。そのような化合物の用量は、毒性をほとんどまたはまったく示さないED<sub>50</sub>が含まれる循環濃度の範囲内にあることが好ましい。用量は、使用する剤形および利用する投与経路に応じて、この範囲内で変化させることができる。本発明の方法で使用される任意の化合物に対して、最初に、治療に有効な用量を細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養での決定と同様にして、IC<sub>50</sub>(すなわち、症状の最大抑制の半分が達成される試験化合物濃度)が含まれる循環血漿中濃度の範囲が得られるように、動物モデルで用量を定式化することができる。そのような情報を使用することにより、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば高性能液体クロマトグラフィーにより測定できる。好ましい実施形態によれば、本発明の組成物中で使用されるエンドセリンアンタゴニストの用量範囲は、約1mg/kg ~ 約100mg/kgである。

#### 【0107】

更に、先に列挙した抗腫瘍薬の多くは、その用量が当業者に公知であり、PHYSICIANS' REFERENCE, Medical Economics Data Publishers; REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Co.; GOODMAN & GILMAN, THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, McGraw Hill Publishers, THE CHEMOTHERAPY SOURCE BOOK, Williams and Wilkins Publishersのような概説中に、Cancer Lit (登録商標), U. S. National Cancer Inst

10

20

30

40

50

stitute databaseのようなオンラインサービス中に、ならびに「A MultiCenter Randomized Trial of Trial of Two Doses of Taxol」Nabholz, J. M., Gelmon, K., Bontenbal, M. et al. Medical Education Services Monograph - 1994 Bristol-Myers Squibb Company Publication; 「Randomized Trial of Two Doses of Taxol in Metastatic Breast Cancer: An Interim Analysis」Nabholz, J. M., Gelmon, K., Bontenbal, M., et al. 1993, Proc. Am. Clin. Oncol., 12: 60. Abstract 42のような薬理学的研究の報告中に、容易に見いだすことができる。

## 【0108】

本発明の組成物中の抗腫瘍薬の用量範囲は、患者の全身的治療に対して処方される典型的な日常の用量よりも少なくともよいし、同じでもよいし、または多くてもよい。例えば、ヒトにおいて5'-FUで結腸直腸癌を治療するのに使用される標準的な用量の50%に等しい5'-FUの用量(5日間、毎日静脈内に300~450mg/m<sup>2</sup>)では、scidマウスにおいて異所性HT29大腸癌腫瘍埋植片の体積が80~90%減少した。5'-FUを投与するための薬物送達マトリックスとしてp-GlcNAc膜を使用したところ、必要な用量は減少し、静脈内投与の対照動物と比較して腫瘍体積が劇的に50%低下した。このデータに関する詳細は、参考として本明細書に組み込まれる米国特許第5,635,493号の第21節の実施例中に見いだすことができる。より高い用量が必要な場合には、こうしたより高い用量は、薬物が腫瘍の部位に局所的に送達されるということから考えて、従って、血液細胞を含めて他の組織が薬物にそれほど容易に暴露されることはないということから考えて、許容しうる。

## 【0109】

ある種の抗腫瘍剤は、ダクチノマイシン、ダウノマイシン、ドキソルビシン、エストラムスチン、メクロレタミン、マイトマイシンC、ビンプラスチン、ビンクリスチンおよびビンデシンを含めた発疱薬であり、一方、ある種の抗腫瘍薬は、カルムスチン、デカルバジン(decarbazine)、エトポシド、ミトラマイシン、ストレプトゾシンおよびテニポシドを含めた刺激薬である。発疱薬および刺激薬は、疼痛を伴う組織の溢出および刺激、発赤、腫脹および他の症状を含む有害な副作用の原因となる。更に、副作用のいくつかから組織壊死を生じる恐れがある。抗腫瘍薬の局所的制御放出に使用される本発明の組成物のp-GlcNAc膜およびゲル物質は、創傷治癒特性を有する。従って、本発明のp-GlcNAc膜およびゲル製剤により送達される発疱性または刺激性の抗腫瘍薬に接触する正常組織は、それほど容易に損傷を受けることはなく、本発明のp-GlcNAc含有組成物のp-GlcNAc成分の有効な治癒効果のおかげでより迅速に治癒するであろう。

## 【0110】

## 6. 実施例：機械力精製法を用いるp-GlcNAcの精製

この節では、先の第5.1節に記載の機械力精製法を用いてp-GlcNAcを精製した。

## 【0111】

## 6.1 材料および方法 / 結果

珪藻培養条件：参考として本明細書に組み込まれる米国特許第5,635,493号に記載の手順に従って珪藻種タラシオシラ・フルビアチリス(*Thalassiosira fluviatilis*)を増殖させた。

## 【0112】

SEM手順：ここで使用されるSEM法は、次の通りである。加速電圧10kVおよび作動距離15mmでZeiss 962装置を利用した。記載の種々の倍率でPolaroidタイプ55 p/n (u4)を利用した。サンプルコート：炭素コート(100 ) & 100 AuPd。

## 【0113】

(a) 試料の作製：一次固定のために、培養増殖培地を、グルタルアルデヒドを2%含有し血清の含まれないイーグルDMEMと交換した。増殖培地から固定液に完全に移行させるべく、交換を数回行った。固定は、室温で0.5時間続けた。0.1Mスクロースを含むpH7.2の0.1Mカゴジル酸Na中にグルタルアルデヒドを2%含有する溶液の入った新しいバイアルにカバースリップを移し、さらに室温で1.5時間固定した。

## 【0114】

10

20

30

40

50

p-GlcNAc精製手順：上記の第5.1節に記載の機械力法を利用して珪藻培養物からp-GlcNAcを精製した。具体的には、ワーリングブレンダー中において最高速度の混合運動の3回の短時間バーストに培養物の中身を付すことによって、珪藻細胞体からp-GlcNAc纖維を分離した。3回のバーストの合計時間は、約1秒間であった。得られた懸濁液を、約10 においてSorvall GS-4固定角ローターにより3500rpmで20分間遠心した。上清をデカントし、そして今度は約10 においてSorvall GS-4固定角ローターにより4000rpmで再度20分間遠心した。もう一度、上清をデカントし、10 において4000rpmで遠心した。3回目の遠心で得られた最終上清は清澄であり、液体中に浮遊する目に見える凝集塊は、仮に存在したとしてもごく僅かであった。清澄な上清を、細孔サイズ0.8 μmのSupor-800ポリエーテルスルホン濾過膜を備えたBuchner濾過装置(Gelma, Inc.)にデカントし、次に、吸引を行って纖維懸濁液から液体を濾過し、膜上に纖維を集めることを可能にした。回収した纖維を、蒸留および脱イオン処理の施された70 のH<sub>2</sub>O 1リットルで洗浄した。ほとんどすべての水を排出させた後、吸引しながら70 の1N HCl 1リットルで纖維を洗浄した。ほとんどの酸溶液を排出させた後、吸引を用いて、蒸留および脱イオン処理の施された70 のH<sub>2</sub>O 1リットルで洗浄した。ほとんどの洗浄水を排出させた後、室温の95%エタノール1リットルで纖維を洗浄し、そして減圧処理した。次に、白色纖維膜が集められた濾過膜を濾過装置から移し、膜および膜支持体を58 の乾燥オーブン中で20分間乾燥させ、その後、膜および膜支持体をデシケーター中に16時間入れた。

## 【0115】

この精製手順の後、1000mlの培養物から得られたp-GlcNAcの収量は、珪藻培養物1リットルあたり6.85ミリグラムであった。

## 【0116】

7. 実施例：生物学的 / 化学的精製方法を使用するp-GlcNAcの精製

この節においては、上記の第5.1節に記載した化学的 / 生物学的技法の2つを使用して、p-GlcNAcを精製した。簡潔に述べると、第1の場合はHF処理により、第2の場合は酸処理 / 中和によって、p-GlcNAcを精製した。

## 【0117】

7.1 材料および方法 / 結果

珪藻培養条件：参考として本明細書に含める米国特許第5,635,493号に記載された方法にしたがう培地で、Thalassiosira fluviatilisを増殖させた。

## 【0118】

SEM操作法：この研究において利用した技法は上記のとおりである。

## 【0119】

精製操作法：最初に、HF処理によって、p-GlcNAcを精製した。詳記すると、換気フード下で、珪藻含有培養物に、当初の細胞培養物の容積1000 mlあたり、室温で49% (29N) HF溶液2.42 mlを添加して、0.07 M HF溶液とした。次に混合物を約30秒間激しく振盪し、持続性の泡を発生させて液体を覆うようにした。容器を5~6時間動かさないようにして、重い粒子を沈降させた。この時間の最後に、泡の層が形成され、一方液体自体は2層に分かれた。その1層は第2層の下の容器の底部に残留する、非常に暗い緑色の薄層であり、第2層はおそらく液体の総容積の85~90%に相当する、ずっと明るい灰緑色の曇った相であった。ガラス毛細管および真空吸引を使用して、泡の層を注意深く吸い上げた。次に主として沈降した細胞体からなる暗色の底部層をかき乱さないように注意しながら、灰色がかかった不透明な上層を吸い上げ、別のプラスチック容器に移した。この灰色がかかった不透明な上層をさらに16時間静置した。この液体は当初ほとんど無色で、明灰色だったが、透明ではなかった。16時間静置した後、液体主部の上面に少量の泡が残留し、少量の緑色物質が容器の底部に沈降していた。液体の色は明るくなったが、まだ透明ではなかった。液体の上部の泡を前記のように吸い上げた。次に、容器の底部の沈降した少量の緑色物質を残して、液体主部を注意深く吸い上げた。こうして単離した液体は大部分のp-GlcNAc纖維といくらかの不純物を含んでいた。

## 【0120】

10

20

30

40

50

纖維を含有する液体から、この操作の前記ステップ中に珪藻から遊離したタンパク質およびその他の不要物質を除去するため、纖維および細胞残留物の懸濁液をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で洗浄した。詳記すると、液体中の最終濃度が容積で0.5% SDSになるよう に、必要な容積の20% SDS溶液を添加した。液体を保持した容器を密閉し、振盪装置上で水平に固定して、1分間に約100振盪数で24時間振盪した。振盪開始後間もなく、懸濁液中に白いp-GlcNAc纖維の大きな固まりが出現し、容器の上部空間に相当量の泡が蓄積した。SDS洗浄の最後に、0.8ミクロン孔径のSupor-800ポリエーテルスルホンフィルター膜 (Gelman, Inc.) を装備したBuchner 濾過器に、容器の内容物を移した。液体を吸引濾過し、液体中のp-GlcNAc纖維をフィルター膜上に集めた。

## 【0121】

10

次に、フィルター膜上に集めたp-GlcNAc纖維をさらに洗浄した。最初に、高温 (70 ) の蒸留脱イオンH<sub>2</sub>Oで、当初の懸濁液の容積の3倍を使用して、纖維を洗浄した。蒸留脱イオンH<sub>2</sub>Oを使用するウォータージェットによって、ブーフナーろ過器のフィルター膜上に集めた白色纖維凝塊をWaringブレンダーに移し、約10回の短いミキシングジェットによって、纖維凝塊を崩壊させた。崩壊させた纖維の懸濁液を、上記のようにポリエーテルスルホンフィルター膜を装備したブーフナーロートに移し、液体を吸引除去した。集めた纖維を熱 (70 ) 1N HCl溶液1000 mlで洗浄し、その後熱 (70 ) 蒸留脱イオンH<sub>2</sub>O 1000 mlでさらに洗浄した。最後に、室温で95%エタノール1000 mlで纖維を洗浄し、濾過して乾燥させた。次に、纖維膜および纖維膜を支持するフィルター膜を58 の乾燥オーブンで20分乾燥させた。次に膜および膜支持体をデシケーター中に16時間置いた。次に膜をフィルター膜から注意深く分離した。

## 【0122】

20

第2方法として、上記第5.1節に記載した酸処理 / 中和法を使用することによって、p-GlcNAcを精製した。詳記すると、SDS洗浄ステップの前までは本節ですでに記載したようにして、p-GlcNAcを処理し、この時点で2.9 M Tris溶液の添加によって、溶液を約pH 7.0に中和した。この特定の精製操作からのp-GlcNAc収量は珪藻培養物1リットルについて約20.20ミリグラムだった。しかし、平均では珪藻培養物1リットルについて約60ミリグラムが得られる。酸処理 / 中和精製操作の結果として形成された膜のSEM顕微鏡写真を図3に示す。

## 【0123】

30

## 8. 実施例 : p-GlcNAcの脱アセチル化

p-GlcNAc膜を水性50% NaOH溶液中に懸濁させた。懸濁液を80 に2時間加熱した。生成した脱アセチル化膜を乾燥し、図5に示すように、走査電子顕微鏡によって調べた。

## 【0124】

## 9. 実施例 : p-GlcNAcの再製剤化

5% LiClを含有するジメチルアセトアミド溶液 1 ml中にp-GlcNAc膜 (16.2 mg) を溶解させた。このp-GlcNAc含有溶液を注射器に入れ、純水 50 ml中に押し出し、纖維を沈殿させた。図6に示すように、走査電子顕微鏡を使用して、生成した纖維物質を調べた。

## 【0125】

## 10. 実施例 : 本発明のEA/p-GlcNAc組成物の調製

40

Ro61-0612/001 (本明細書中で「Ro61」とも称する) は、上記の式Iに示す構造を持つ非特異的で非ペプチド性のエンドセリンアンタゴニストである。その塩の化学名は、5-イソプロピル-ピリジン-2-スルホン酸[6-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-5-(2-メトキシ-フェノキシ)、-2-[2-(1H-テトラゾール-5-イル)-ピリジン-4-イル]-ピリミジン-4-イル]アミドナトリウム塩 (1:2) であり、その分子量は649.59である。その水への溶解度は3%より大きい。Ro61の結合阻害力 (IC<sub>50</sub>) は、ETA受容体に対して1~20 nMであり、ETB受容体に対しては20~30 nMである。その機能的阻害力 (pA2) は、ETA受容体に対して9.5であり、ETB受容体に対しては7.7である。そのin vivoでの推奨用量は静脈内投与若しくは腹腔内投与で1~30 mg/kgである。そのin vitroでの推奨用量は10<sup>-9</sup>~10<sup>-5</sup> Mである。

## 【0126】

50

本発明の組成物に使用するRo61は、最初にAcetelion Ltd,Allschwil,Switzerlandからの凍結乾燥粉末として供給され、これを滅菌水中に懸濁し、pHを滅菌塩酸で4.0に調整した。あるいは、当分野で知られた技術を使用して、Ro61を合成することもできる。

【0127】

p-GlcNAc纖維スラリーを以下のようにして調製した。上記の第7節の実施例で記載した生物学的 / 化学的方法によって調製したp-GlcNAcを蒸留脱イオン水に再懸濁し、攪拌して約1 mg/mlの纖維性懸濁液またはスラリーを形成させた。次にこの纖維スラリーを60 で2時間オーブン乾燥し、p-GlcNAcポリマー膜を形成させた。この膜を40% NaOH溶液中、80 で2時間脱アセチル化した。膜が100%脱アセチル化に到達したとき、pH7.0に達するまで、それらを蒸留脱イオン水で洗浄した。

10

【0128】

次に、参考として本明細書に含める米国特許第5,623,064号の記載に基本的にしたがって、乳酸の存在下で、洗浄した脱アセチル化膜をp-GlcNAc乳酸塩に変換させた。簡潔に述べると、(10%の水を含有する)2-プロパノールなどの有機溶媒中に脱アセチル化p-GlcNAcを懸濁して、脱アセチル化p-GlcNAc物質全体に浸潤するようにし、攪拌しながら、適切な量の50%乳酸水性溶液を添加した。この乳酸は試薬グレードのものとすべきで、分析して、存在する有効な(すなわちエステル化していない)乳酸の正確な濃度を決定しなければならない。これは一般的に、0.1 N NaOHでフェノールフタレイン終点(pH 7.0)まで滴定することによって達成させた。混合物を室温で少なくとも2時間攪拌した。反応速度を増大させるために、低温加熱をしてもよい。反応の完結を確実にするため、反応時間を延長するか、または50%乳酸水性溶液の量を増加してもよい。次に定量用無灰濾紙を使用して、ブーフナーロートで懸濁液を精密に濾過し、物質は、膜のまま、無水2-プロパノールで洗浄した。次に膜を換気フード内で2時間空気乾燥し、その後40 のオーブン内に一晩置いた。

20

【0129】

次に、p-GlcNAc乳酸塩膜を所望の濃度、例えば2%p-GlcNAc乳酸塩になるように、蒸留脱イオン水中に溶解し、この溶液にRo61を添加することによって、注射用のEA/p-GlcNAcゲルを調製した。ゲルサンプル 200 μlについて各動物が3 mg/kgを受容するように、ゲル中のRo61の最終濃度を調整した。任意に、p-GlcNAc溶液に、試薬グレードのプロピレングリコール(2-プロパンジオール)を、最終プロピレングリコール濃度が1~10%になるように、添加することができる。場合によっては、細菌および/または菌類の混入を防止するために、防腐剤を添加してもよい。その他の実施形態において、上記のようにして、0.1%から4.0%の範囲でp-GlcNAc乳酸塩の濃度を調製することができる。これらの調製物の粘度はp-GlcNAc乳酸塩の割合が増加するにつれて増大し、p-GlcNAc乳酸塩が0.5%またはそれ以上の製剤はゲルとして挙動する。

30

【0130】

11A. 実施例：エンドセリン応答性腫瘍モデルとしてのB16

エンドセリン応答性腫瘍モデルシステムとしての使用について、B16細胞を評価した。B16細胞、すなわち(纖維芽細胞起源の)B16マウスマラノーマ細胞系由来の細胞は、American Type Culture Collection(Rockville MD)から凍結保存品として取得した。細胞を以下の完全培地(CM)で培養した：10%熱不活性化ウシ胎仔血清(Summit Biotechnologies, Ft.Collins CO)、ペニシリン(50単位/ml)、ストレプトマイシン(50 μg/ml)、2 mM L-グルタミン、0.1 mM MEM非必須アミノ酸(Gibco BRL, Gaithersburg MD)、1 mMピルビン酸ナトリウムおよび0.05 mM 2-メルカプトエタノール(Sigma Immunochemicals, St.Louis MO)を補充したRPMI 1640(Irvine Scientific, Santa Ana CA)。加湿した5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 で細胞を増殖させ、2日毎に1×10<sup>5</sup>細胞/mlに調整した。

40

【0131】

このB16細胞をエンドセリンレベルおよびエンドセリン受容体(ETR)発現について、以下のようにして分析した。放射性リガンドおよびET1特異的抗体を使用する競合ラジオイムノアッセイ(RPA 545, Amersham, Milford Ma)によって、B16培養上清中のET1を測定した

50

。結合および遊離ETを第2抗体相システムと反応させ、その後磁力分離した。結合リガンド/ゼロ標準の比率(B/Bo)を算出することによって、標準曲線を決定し、この標準曲線からET濃度を読み取ることを可能にした。抽出操作からの回収は血漿添加標準(4~20 fmol/ml)を基準として75±5%だった。このETラジオイムノアッセイ操作について、アッセイ間の変動は10%、アッセイ内の変動は9%だった。

【0132】

1実験においてこのアッセイを使用したとき、24時間のB16培養物上清中の基準ET1レベルは1.269 fmol/mlであることがわかった。ETA若しくはETBのいずれかまたは両方の10 μMの培養物への添加は、それぞれ無処理対照に対して137%、117%および164%まで、B16細胞の増殖の増加を誘導したが、これはそれぞれ34.01、1.158および34.01 fmol/mlのET1レベルに相当する。その後の実験において、24時間のB16培養物におけるET1の基準レベルは59 10 7±58 fmol/mlであり、非選択的アゴニスト(ET1)、選択的ETB受容体アゴニスト(BQ3020)または両方の10 μMの添加は、それぞれ無処理対照に比較して、154%、116%および141%まで、B16細胞の増殖を増加させた(下記表1を参照のこと)。これらのデータはマウスB16メラノーマ細胞がETRを発現し、これが確立されたエンドセリンアゴニストに応答性であることを意味している。

【0133】

【表1】

|       | リガンド(受容体)    | 未処理対照に比較した増殖% |
|-------|--------------|---------------|
| アゴニスト | ET1(ETA>ETB) | 154(±20.9)    |
|       | BQ3020(ETB)  | 116(±0.8)     |
|       | ET1+BQ3020   | 141(±4.1)     |

20

【0134】

さらに、Pharmingen社製細胞内フローサイトメトリーキットを抗細胞質エンドセリン受容体抗体、すなわち受容体の細胞質領域に対して特異的なもの(Research Diagnostics Inc., Flanders NJ)およびヒツジ抗マウスIgGイソタイプ抗体対照(Sigma Immunchemicals, St. Louis MO)とともに使用して、免疫蛍光染色により、B16細胞はエンドセリン受容体を発現することが確定された。この操作において、B16細胞をCytofix/Cytopermバッファー(Pharmingenキットより)で洗浄し、透過性化溶液(0.1%クエン酸ナトリウム中0.1% Triton X100)とともに20分インキュベートした。次に細胞を一次抗体である抗エンドセリン受容体抗体若しくはイソタイプ対照抗体とともに暗所、4°で30分インキュベートし、その後洗浄し、FITC標識した二次抗体(マウス抗ヒツジIgG; Sigma)とともにさらに30分インキュベートした。細胞を可視化し、100ワット水銀光源および40×plan-neufluar na 3.3対物レンズを装備したAxioplan研究用顕微鏡(Carl Zeiss Inc. Jena Germany)を使用して、撮影した。

30

【0135】

これらの免疫蛍光染色試験から、B16メラノーマ細胞が検出し得るレベルのETAおよびETB受容体を発現することが示された。

【0136】

ET-1<sup>125</sup>による結合アッセイもまた、B16細胞がET受容体を発現することを示唆した。これらのアッセイは以下のように実施した。A10細胞と命名した大動脈血管平滑筋細胞、B16およびCHO細胞を、別々のチューブ内で結合バッファー(50 mM Tris/HCl - pH7.4、5 mM EDTA、および0.5% BSA)中に2×10<sup>6</sup>細胞/mlの濃度で懸濁させた。A10をETA陽性対照として使用し、一方CHO細胞を陰性対照として使用し、標識ET1の結合がないことが証明され、

40

50

この結果はこの細胞系にはETRが不在であることと整合する。

【0137】

各チューブに、(3-[125I]ヨードチロシル)エンドセリン-1 (ET1-I<sup>125</sup>、Amersham Life Science Inc, Arlington Heights, ILより) 21  $\mu$ lを分取し、最終濃度10<sup>-12</sup> Mで添加した。次に標識した細胞をマイクロ遠心チューブに分注し、非標識ET1 (最終濃度 10<sup>-8</sup> M) 若しくはHBSS 18  $\mu$ lを添加した。チューブ内容を混合し、各サンプルを300  $\mu$ l分取し、シリコーン処理したチューブに入れ、37℃で2.5時間振盪した。インキュベート後、チューブを10,000 rpmで6分遠心分離し、細胞ペレットを結合バッファー 300  $\mu$ l中にボルテックスして再懸濁し、結合バッファーでさらに2回洗浄した。最後の洗浄後、細胞を1N NaOH 500  $\mu$ lに再懸濁し、37℃で10分振盪し、Packard Cobra Autogamma 5000 Series (Model 5002) ガンマカウントシステム (Packard Instrument Co., Meriden, CT) でカウントするため、シンチレーションチューブに入れた。

【0138】

これらのET1結合アッセイの結果はB16細胞がETRを発現することを証明しており、これを下記の表2に示す。

【0139】

【表2】

B16腫瘍細胞へのET1の結合

|                  | A10                 | B16                 | CHO              |
|------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| ET1の結合*          | 53885 ( $\pm$ 2555) | 25605 ( $\pm$ 3801) | 119 ( $\pm$ 91)  |
| 競合体存在下でのET1の結合** | 1135 ( $\pm$ 120)   | 1398 ( $\pm$ 691)   | 346 ( $\pm$ 259) |

結果は10<sup>6</sup>細胞当たりの平均cpm ( $\pm$ SEM) で示す。

\* ET1-I<sup>125</sup>を最終濃度10<sup>-12</sup> Mで添加した。

\*\*競合体は最終濃度10<sup>-6</sup> Mで添加した非標識ET1である。

【0140】

11B. 実施例：in vitroでのメラノーマ細胞増殖のRo61による抑制

上記のように免疫蛍光によって検出した場合、正常な脾細胞は可視レベルのETRを示さない。脾細胞の単離および培養は容易であることから、細胞増殖に及ぼすRo61の影響を評価するための対照細胞として、これらを使用した。以下のようにして、6~8週齢の雌のC57BL/6(H-2b)マウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor MA) から脾細胞を収穫した。脾臓を取り出し、CM中に入れ、その細胞を3 ccシリンジプランジャーで分散させた。次に細胞懸濁液を70  $\mu$ m細胞濾過器で濾過し、塩化アンモニウム溶解溶液 (8.3 g/Lの塩化アンモニウム9部と、20.59 g/LのTris (pH 7.65) 1部とを、使用直前に混合することによって調製) で赤血球を溶解した。次に脾細胞を洗浄してCM中に再懸濁した。

【0141】

上記のように、Acetelion Ltd, Allschwil, Switzerlandから凍結乾燥粉末としてRo61を入手し、B16細胞増殖に及ぼすRo61の影響をin vitroで評価するために、増殖アッセイを実施した。さらに詳記すると、96ウェル培養プレートに、HBSS中のRo61を濃度を増加させながら添加した。次に、上記のB16細胞または対照脾細胞を1ウェルについて10<sup>5</sup>細胞の濃度でウェルに添加し、72時間増殖させた。以下のようにして、非放射性細胞増殖測定用のCellTiter96キット (Promega, Madison WI) を使用して、細胞増殖をアッセイした。簡潔に述べると、細胞を15mlのMTT染料 (Promegaキットより) とともに4時間インキュベートした。その後、ホルマザン結晶の形成が見られた。結晶を可溶化 / 停止溶液 (Promegaキット

20

30

40

50

トより) 50 ml中に室温で30分溶解し、OD 570 nmで色の変化を測定した。630でのバックグラウンド ODを自動的に差し引いた。3組のウェルの平均値を算定した。また、細胞の増殖または死を40×の倍率での光学顕微鏡写真によって記録した。

【0142】

B16メラノーマ細胞に及ぼすRo61の抑制効果を図7に示す。Ro61処理細胞の増殖を未処理対照細胞に対する比率として表わす。3組のウェルの平均値を算定した。図7に見られるように、Ro61はB16細胞(黒丸)の増殖を抑制したが、正常脾細胞(白丸)は抑制しなかった。さらに、培養物中の細胞に濃度を増加させながらRo61を添加したとき、用量依存性の抑制が観察された。この効果は濃度 0.1 μMで見られ(未処理対照と比較して22%抑制)、10 μMで最大であった(83%抑制)。顕微鏡下では、最高濃度のRo61では、B16細胞は最早正常な纖維芽様の紡錘形ではなく、球形で疎らであって、生存率は低かった(図17 A ~ 17 Bを参照のこと)。これとは対照的に、最高濃度のRo61(10 μM)を添加しても、脾細胞はほんの少し影響を受けただけだった。

【0143】

B16培養上清中のエンドセリンレベルが用量依存様相で( $p < 0.001$ )(50 nMのRo61で513 ± 27 fmol/lから5 μMのRo61で954 ± 31 fmol/lに)増加することもわかった。この観察結果はETRのRo61遮断と一致し、受容体が介在するフィードバック回路を妨害する。

【0144】

ET受容体のインヒビターであるRo61はB16細胞の増殖を抑制するので、ETA若しくはETBに特異的なペプチドアゴニストの添加がこの効果を逆行させる、すなわちRo61と受容体結合部位について競合することによって該効果を逆行させるかどうかを決定することが、興味の対象となった。アゴニストBQ-3020-[Ac-[Ala<sup>11,15</sup>]-エンドセリン(6,21)、すなわちBQ3020(Novabiochem, カタログ番号AI 4534)およびアゴニスト[Ala<sup>1,3,11,15</sup>]-エンドセリン1(Sigma Immunochemicals, St. Louis MO, カタログ番号E6877)をHBSS中に懸濁して使用した。 $5 \times 10^4$  個のB16細胞を、各ウェルについて10 nMの濃度のいずれかのアゴニストのみか、両方のアゴニストとともにか、またはいずれも含ませないで、培養し、次にウェルに各種濃度のRo61を添加した。

【0145】

図10に示すように、B16増殖のRo61による抑制は、ET受容体アゴニストの添加によって妨害された。Ro61処理細胞の増殖を未処理対照細胞との比率として表わす。3組のウェルの平均値を算定した。最初に、図10のY軸(Ro61濃度0)によって示すように、BQ3020アゴニスト(黒三角)若しくはET-1アゴニスト(白菱形)のみ、または2つのアゴニストを組合せたもの(白四角)の添加は、B16細胞の増殖を誘導した。BQ3020アゴニストについては、増殖は未処理対照の137%、ET1アゴニストについては、増殖は未処理対照の117%であり、アゴニストの組合せについては、増殖は未処理対照の164%だった。

【0146】

図10にさらに示すように、これらのアゴニストの添加はまた、Ro61の用量を増加させることによって誘導される抑制をも妨害した。例えば、10 nM濃度のET1の添加は、1 nM濃度のRo61の効果を完全に逆転させ、5 μMでのRo61の抑制を50%低下させた。BQ3020アゴニストは5 μMのRo61の効果(5 μMで増殖のわずか12%の阻害)を有意に逆転させた。2つのアゴニストの組合せによって、最も有意な効果が観察され、0.1 μM Ro61の添加があっても増殖が誘導された(未処理対照の123%)。これらの用量依存性の知見は、ETRアンタゴニストによって抑制され得るマウスB16細胞に対するエンドセリン受容体介在性増殖応答を定義付けた。

【0147】

別の実験において、上記の細胞増殖アッセイを使用し、ETAおよびETBの両方のアンタゴニストであって、ETAに対して約10倍高い親和性を持つRo61を、ETAアンタゴニストであるBQ123およびETBアンタゴニストであるBQ788(いずれもAmerican Peptide Co., Sunnyvale, CAより入手)とともに試験し、B16細胞の増殖に及ぼすこれらのアンタゴニストの影響を判定した。培養物中にBQ123、BQ788、BQ123 + BQ788、またはRo61-0612/001(それぞれの合

計濃度が10  $\mu$ M) を存在させた結果、増殖の有意な抑制があった(未処理対照と比較してそれぞれ16、18、19および50% ;  $p = 0.001$ 、下記表3参照)。

【0148】

【表3】

表3

|         | リガンド(受容体)       | 未処理対照と比較した増殖%   |
|---------|-----------------|-----------------|
| アンタゴニスト | BQ 123 (ETA)    | 84 ( $\pm$ 6.6) |
|         | BQ 788 (ETB)    | 82 ( $\pm$ 1.9) |
|         | BQ123 + BQ 788  | 81 ( $\pm$ 4.5) |
|         | Ro 61 (ETA>ETB) | 50 ( $\pm$ 4.8) |

【0149】

さらに別の上記の増殖アッセイにおいて、各種のエンドセリンアンタゴニストを試験して、B16細胞の増殖に及ぼすこれらの影響を判定した。動物において10回継代した野生型全長ETRを発現するB16細胞を、F0と命名した対照B16細胞と比較した。この対照B16細胞は末端切断型ETA mRNAを発現するので、不完全なETA受容体を産生するものと見られる。

【0150】

図8および9に示すように、エンドセリンアンタゴニストであるIRL、BQ123、BQ610、BQ485、BQ788、RESは10<sup>-6</sup>Mの濃度においてすべて、F0対照ならびにエンドセリンアゴニスト対照であるET1およびBQ3020と比較して、B16細胞の増殖を抑制した。

【0151】

12. 実施例：B16メラノーマ腫瘍アポトーシス性細胞死のRo61による誘導

in vitro研究で、Ro61処理は細胞増殖の抑制に寄与するばかりでなく、細胞死または壊死の存在の重要な構成成分であることも示された。実際に、Ro61で処理されたB16細胞はプログラムされた細胞死と一致する有意な程度の形態学的变化を示した(図11を参照のこと)。

【0152】

そこで、B16アポトーシス性細胞死に及ぼすRo61の影響を調査した。25 ml培養フラスコ内のCM中、1  $\mu$ M Ro61の存在下または不在下で、B16細胞を5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37度72時間まで増殖させた。以下のようにして、Fluorescein In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を使用し、アポトーシス若しくは細胞死について、細胞をアッセイした。簡潔に述べると、細胞をトリプシン処理し、1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含有するPBSで洗浄した。PBS中4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) で30分固定した後、0.1%クエン酸ナトリウム中0.1%Triton X100の溶液で氷上で2分、細胞を透過性化した。次に細胞を洗浄し、TUNEL反応混合物 (Boehringerキット) を用いて37度1時間標識し、洗浄した。Coulter EPICS XLフローサイトメーター (Coulter, Miami FL) で蛍光を分析した。DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 100  $\mu$ g/mlを室温で10分使用して、2本鎖DNAの開裂を誘導し、測定値を陽性対照と比較した。

【0153】

図12に示すように、エンドセリンアンタゴニストのRo61は培養中のB16メラノーマ細胞のアポトーシスを誘導した。例えば、B16細胞に1  $\mu$ MのRo61を添加することにより、未処理対照と比較して、アポトーシスに到る細胞の割合が有意に増加した( $p = 0.0007$ )。上記のTUNELアッセイで陽性を示す細胞の割合の増加は、24時間目という早さで検出するこ

10

20

30

40

50

とができ、72時間目でもまだ検出することができた。Ro61との培養後の持続期間による影響は顕著ではなかったが、未処理対照と比較したRo61処理細胞のアポトーシスの増加は非常に顕著だった(12.7%、95%信頼区間:11.7%-13.8%)。これらの結果から、ETRによって仲介されるアポトーシス性細胞のシグナル伝達の存在と、これをETRアンタゴニストによって誘導し得ることが立証された。このように、アポトーシスは少なくとも部分的に、細胞の増殖の抑制と観察される細胞死とに寄与している。

## 【0154】

13. 実施例：エンドセリンアンタゴニストまたは本発明のEA/p-GlcNAc組成物による *in vivo* でのB16メラノーマ腹腔内癌腫症の抑制

Ro61がB16細胞に及ぼす *in vitro* での有意な効果に基づいて、攻撃性腹腔内(IP)B16メラノーマ転移/癌腫症モデルを利用する、*in vivo* での腫瘍増殖に及ぼすETRアンタゴニズムの影響力を評価するための別の研究が導かれた。このモデルについては、HBSS 100 μl中の $5 \times 10^4$  個のB16細胞を雌 C57BL/6マウスの腹腔内に注入した。1日後、このマウスにHBSSのみ(未処理)、3 mg/kgのRo61を含有するHBSS(毎日投与)、30 mg/kgのRo61を含有するHBSS(毎日投与)、p-GlcNAcゲル(2%)のみ、または18 mg/kgのRo61を含有するp-GlcNAcゲル(2%)のいずれかを100 μl注入した。

## 【0155】

3 mg/kg若しくは30 mg/kgのRo61を含有するHBSSのみで処理するグループの動物には毎日i.p.注入を行い、一方その他のグループはすべて1回のみの処理をした。この実験で使用したp-GlcNAcゲルのみのものは、上記第10節の実施例に示すものからRo61の添加を除いて調製した。この実験で使用したRo61/p-GlcNAcゲルも、上記第10節で詳述したようにして調製した。7日後にマウスを犠牲にし、腹腔内の疾患の存在を評価した。さらに詳記すると、解剖用顕微鏡下で、各動物について腹腔表面、腸間膜、肝臓、脾臓および脾臓上の個々の腫瘍コロニーを計数した。研究は二重盲検条件下で実施した。腹膜および消化器官の写真をとり、またHおよびEならびにメラニン染色による組織学的分析のために、腸間膜、肝臓、脾臓および脾臓脂肪ならびに腹膜の切片の写真をとった。

## 【0156】

図13Aは、低用量、例えば3 mg/kgで6日間毎日(合計で18 mg/kg)、Ro61のIP注入を受けたマウスが、1動物についての転移若しくは腫瘍コロニーの数の有意な低下がなかったことを示している(本明細書で使用する用語「転移」は、上記の癌腫症モデルにしたがってB16メラノーマ細胞を注入したマウスの腹膜および消化器官内に検出される腫瘍コロニーを称する)。

## 【0157】

対照的に、30 mg/kgで6日間毎日(合計で180 mg/kg)というより高い用量のRo61のみの注入は、腫瘍注入後7日目の腫瘍コロニーの平均数を有意に減少させた。

## 【0158】

その上、図13Bに示すように、p-GlcNAcゲルのみでは、IP注入したときに未処理対照と比較して腫瘍コロニーの平均数を減少させたが、皮下に注入したとき(SC)はコロニーの増殖に何ら有意な影響を与えなかった。図13Bはまた、p-GlcNAcゲル内に配合した単一用量(18 mg/kg)のRo61の投与により腫瘍コロニーの最大の減少が見られたことを示している(コロニーの平均数 =  $2.7 \pm 1.4$ )。このゲル/Ro61組成物は、高用量のRo61( $p = 0.01$ )およびp-GlcNAcゲルのみのIP( $p = 0.02$ )の両方と比較したとき、コロニーが顕著に少なかった。低用量のRo61処理およびp-GlcNAcゲルのみのSCは、未処理対照と有意な差異が無かった。

## 【0159】

Ro61がp-GlcNAcによる局所作用だけでなく全身作用も有するかどうかを判定するため、B16メラノーマの皮下、SCモデルにおけるIP Ro61処理の効果を究明した。雌C57BL/6マウスの側腹部にHBSS 100 μl中の $5 \times 10^4$  個のB16メラノーマ細胞をSC注入した。24時間後、この動物に以下の処理の1つ(100 μl、IP)を実施した: HBSS(毎日×6)、HBSS中 30 mg/kgのRo61(毎日×6)、p-GlcNAcゲル(1回投与)、またはp-GlcNAcゲル中 18mg/kgのRo6

10

20

30

40

50

1(1回投与)。腫瘍注入後3週間、腫瘍の出現および増殖について、動物をモニターした(全グループについてn=10)。

【0160】

図14に示すように、B16メラノーマのSCモデルから、HBSS中のRo61 IPを受けた動物は全部17日目までに腫瘍を発生させたが、腫瘍の出現には有意な遅延があることが示された(未処理対照における15日目での腫瘍担持マウスは100%であることと比較して、15日目での腫瘍担持マウスは50%)。Ro61とp-GlcNAcとの組み合わせは、腫瘍の出現の遅延(13日目での腫瘍担持マウスは50%)をもたらし、また腫瘍注入後21日目で腫瘍がない動物が10%となる。このことは、腫瘍とは別の部位におけるRo61の持続放出が、B16メラノーマの増殖に有意に影響を与えることができる事を示唆している。未処理対照グループとIP p-GlcNAcグループ間では腫瘍の出現および増殖に差異がなかった。

【0161】

上記の癌腫症モデルを使用して、B16腫瘍コロニー形成に及ぼす各種のその他のエンドセリンアンタゴニストの影響を評価した。これらの試験では、各薬剤若しくは薬剤混合物 4.3 mg/mlを含有するサンプル 100 μlを1回投与で動物に注入した。図15に示されるように、最終合計濃度がRo61(ETAおよびETBアンタゴニスト)のものと等しいBQ123(ETAアンタゴニスト)およびBQ788(ETBアンタゴニスト)の混合物は、未処理対照B16細胞と比較して、Ro61によって示されたものと同程度まで腫瘍コロニーの数を有意に減少させた。さらに、上記のようにBQ混合物をp-GlcNAcと配合したとき、腫瘍コロニーの数はさらに減少し、Ro61プラスp-GlcNAcで見られたものとほとんど同程度となった。最後に、市販のペニタペプチドである混合ETA/ETBアンタゴニストのGRGDS(American Peptide Co.)をp-GlcNAcと配合したとき、Ro61/p-GlcNAcよりもさらに腫瘍コロニーの数が減少することが示された(図15、最終欄を参照のこと)。

【0162】

14. 実施例：エンドセリンアンタゴニストのみまたは本発明のEA/p-GlcNAc組成物による腹腔内B16メラノーマチャレンジ後のC57BL/6マウスの長期生存

in vivoでの長期生存実験におけるエンドセリンアンタゴニズム治療法をも評価した。結果を図16に示す。雌C57BL/6マウスの腹腔内にHBSS 100 ml中 $5 \times 10^4$  個のB16細胞を注入した。以下のいずれかの処理のために、マウスをランダムに4グループに分けた：(a)未処理(黒四角)；(b)p-GlcNAcゲル 100 μlのみ(十字)；(c) 3 mg/kg のRo61を含有するHBSSを毎日100 μl(黒三角)、または(d) 3 mg/kg のRo61を含有するp-GlcNAcゲル 100 μl(白四角)。動物を毎日モニターし、死が近いと判定されたとき、苦痛を与えないという理由から犠牲にした。

【0163】

B16メラノーマが非常に悪性の腫瘍であり、腫瘍注入後19～20日以内に一様に生存率0%となることに着目することは興味深い。図10に示すように、p-GlcNAcのみの注入は死を5日遅延させたが、動物の生存率を増加しなかった。しかし、低用量(3 mg/kg)のp-GlcNAcとRo61の配合では死を遅延させ、腫瘍注入後33日目には動物の33%が腫瘍の跡を示さなかった。Ro61のみを同一の低用量で毎日注入しても、マウスの生存に影響しなかった。

【0164】

15. 結果の考察

本明細書中で実施した研究は、エンドセリンのその受容体への結合の阻害が、in vitroおよびin vivoの両方で、マウスマラノーマ細胞系の標準的な増殖に影響を与えることの直接の証拠を示している。例えば、エンドセリンアンタゴニストのRo61は、ETAおよびETB受容体の両方のインヒビターであり、ETAの方に約10倍高い親和性がある。これは、本発明者らの実験におけるRo61によるメラノーマ細胞増殖の用量依存性抑制、ならびにETBアゴニストとは対照的にETAアゴニストの添加によって獲得されるこの抑制に対するより強い対抗効果とよく相關する。その上、多数のその他のエンドセリンアンタゴニストもメラノーマ細胞の増殖を抑制することが本明細書中で証明された。これらのアンタゴニストには、ETAおよびETB特異的アンタゴニストの両方、例えばBQ123、BQ485、BQ610、BQ788、RE

10

20

30

40

50

SおよびIRLが含まれる。

【0165】

メラノーマ細胞が高レベルのET受容体を発現することが示され、ずっと少ない膜ET受容体を持つことが知られている正常脾細胞よりも、エンドセリンアンタゴニスト抑制を受けやすいことに着目することは興味深い。このように、本明細書中に提供した証拠は、Ro61、BQ123、BQ485、BQ610、BQ788、RESおよびIRLなどのエンドセリンアンタゴニストが培養中の腫瘍細胞に対して抗増殖作用を持つものであり、この腫瘍細胞増殖の抑制はETAおよび/またはETBに特異的なペプチドアゴニストに応答するエンドセリン受容体に結合することによって仲介されることを指摘するものである。

【0166】

10

その上、本発明者らの研究は、エンドセリンアンタゴニストのみまたは本発明に記載するp-GlcNAcとの組み合わせがin vivoで癌腫を有意に減退させることを示している。さらに、本発明のEA/p-GlcNAc組成物、例えばRo61/p-GlcNAcは、in vivoで腫瘍細胞担持動物の生存率を劇的に増大させる。このRo61の効果はアポトーシス性作用機構に関与するものと見られ、これはエンドセリンのいくつかの既知の作用機構およびそのシグナル伝達機構に矛盾しない。

【0167】

Ro61についての薬理学的研究では、Ro61がin vivoで比較的迅速に、例えば2~4時間以内に代謝されることを示している。しかし、Ro61を本発明のp-GlcNAcポリマーと組み合わせたとき、Ro61はゲル内に保持され、より緩やかに放出され、そして例えば少なくとも48時間検出することができる。さらに、ゲル内のエンドセリンアンタゴニストの濃度を増加させれば、このアンタゴニストを少なくとも72時間ゲル内に保持することができる（データは示していない）。このように、本発明のp-GlcNAc中のエンドセリンアンタゴニストの濃度を変更することによって、増殖性疾患を治療する際に、アンタゴニストの所望の徐放性、したがって強化された効果を獲得することができる。

20

【0168】

最後に、下記の表4に示すように、ETA受容体を発現するその他の細胞型も、本明細書に記載するように、エンドセリンアンタゴニスト Ro61に反応する、すなわちエンドセリンアンタゴニストに曝露したとき、細胞増殖を抑制する。このデータから、各種細胞型において、例えばETA受容体の存在と、細胞増殖に及ぼすエンドセリンアンタゴニストの影響とが関連づけられる。例えば、これらの結果は、脾臓、乳房または前立腺腫瘍などの腫瘍がETA受容体を発現するならば、本明細書で開示したようにして、ETA感受性エンドセリンアンタゴニストで治療することができることを意味している。

30

【0169】

【表4】

表4

|                 |  | ETA                   | Ro61効果   |
|-----------------|--|-----------------------|--|
| 陰性対照            | <i>CHO</i>   | 無                     | 無(5/5)   |
| メラニン細胞<br>メラノーマ | メラニン細胞<br><i>B16 F10</i><br><i>MEL 501</i><br><i>MEL 888</i>                     | 有<br>有<br>無<br>有      | 有(2/2)<br>有(5/5)<br>無<br>有(2/3)                |
| 膵臓癌             | <i>ASPC 1</i><br><i>ASPC4</i><br><i>CAPAN 1</i><br><i>PANC 1</i><br><i>BXPC3</i> | 有<br>無<br>無<br>有<br>有 | 有(5/5)<br>無(5/5)<br>無(4/5)<br>有(4/5)<br>有(3/4) |
| 乳癌              | <i>MDA 231</i><br><i>MDA 453</i>   | 無<br>有                | 無(3/3)<br>有(3/3)                               |
| 前立腺癌            | <i>DUI 45</i><br><i>LN CAP</i>   | 無<br>無                | 無(5/5)<br>無(5/5)                               |

## 【0170】

本発明は本明細書中に記載した特定の実施形態によって範囲を限定するものではなく、それらは本発明の個々の態様の単なる説明として意図するものであり、機能的に等価な方法および構成成分は本発明の範囲内である。実際、前記の記載および添付する図面から、本明細書中に示しかつ記述したものの他に、本発明の各種の改変が当業者にとって明らかになるであろう。こうした改変は添付する特許請求の範囲の範囲内として意図するものである。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 100% p-GlcNAcの化学構造。nは約4,000～約150,000の範囲の整数をさし、約4,000～約15,000が好適である。

【図2】 p-GlcNAcの炭水化物解析、ガスクロマトグラフィー/質量スペクトル解析データ。黒四角は以下の第5.1節に記載する酸処理/中和法を用いて精製したp-GlcNAcを表す。

【図3】 化学的/生物学的精製法の酸処理/中和変法で調製したp-GlcNAc膜を示す走査型電子顕微鏡写真。倍率：10,000x

【図4】 本発明の可能なp-GlcNAcおよび脱アセチル化p-GlcNAc誘導体のいくつかを示す図(S. Hirano, "Chitin and Chitosan", 1989, Skjak-Braek, AnthonsenおよびSanford編, Elsevier Science Publishing Co., pp. 37-43から改作したもの)。

【図5】 脱アセチル化p-GlcNAcマットの走査型電子顕微鏡写真。倍率：図5A: 1000x；図5B: 10,000x

【図6】 以下の第8節の実施例に記載するように、ジメチルアセトアミド/塩化リチウム中に溶解し、水中で纖維材料へと再沈殿させたp-GlcNAc膜の走査型電子顕微鏡写真。

【図7】 *in vitro*におけるB16メラノーマ細胞増殖のエンドセリン受容体アンタゴニストRo61による阻害。96ウェル培養プレートにRo61を次第に増加する濃度で加え、次にC57BL/6(H-2b)マウス由来のB16細胞(黒丸)および脾細胞(白丸)を加えた。Ro61で処理した細胞の増殖は、未処理対照細胞に対するパーセントとして表してある。3回反復実験ウェルの平均値を求めた。

【図8】 細胞を種々のエンドセリンアンタゴニストに暴露したときの未処理対照に対するB16メラノーマ細胞の増殖パーセントを示す棒グラフ。結果は、細胞をエンドセリンアンタゴニストに暴露したときの増殖の抑制を示している。FO細胞は全長ETA受容体を欠失している対照B16細胞である。ET1と表示した棒グラフは対照を表し、対照では細胞を既知のエンドセリンアンタゴニストに暴露した。

【図9】 細胞を種々のエンドセリンアンタゴニストに暴露したときの未処理対照に対する

るB16メラノーマ細胞の増殖パーセントを示す棒グラフ。結果は、細胞をエンドセリンアンタゴニストに暴露したときの増殖の抑制を示している。F0細胞は全長ETA受容体を欠失している対照B16細胞である。ET1およびBQ3020と表示した棒グラフは対照を表し、対照では細胞を2種類の既知のエンドセリンアゴニストに暴露した。

【図10】 *in vitro*におけるB16メラノーマ細胞増殖のRo61阻害のETAおよびETBアゴニストによる逆転。B16細胞をアゴニストBQ-3020-[Ac-[Ala<sup>11</sup>,Ala<sup>15</sup>]-エンドセリン(6,21)(黒三角)、アゴニスト[Ala<sup>1,3,11,15</sup>]-エンドセリン1(白菱形)、両アゴニスト(白四角)と共に、または両アゴニストなし(黒丸)で培養し、次にRo61を各ウェルに添加した。Ro61で処理した細胞の増殖を、未処理対照細胞に対するパーセントとして表してある。3回反復実験ウェルの平均値を求めた。

10

【図11】 培養下のB16細胞に及ぼすRo61の影響。倍率40xでのB16細胞の光学顕微鏡写真。図A: 96ウェルプレートにおいて完全培地中37で $5 \times 10^4$ 個/ウェルにて72時間培養したB16細胞。図B: 5 μMのRo61を含む完全培地中で培養したB16細胞。

【図12】 Ro61はアポトーシスを誘導する。B16細胞を、標準培地(対照)またはRo61(1 μM)( )と共に37で0、24、48および72時間培養した後にフルオレセイン*in situ*細胞死検出キットを使ってアポトーシスについてアッセイした。

【図13】 B16腹腔内癌腫症のRo61抑制。図13Aは、B16腹腔内癌腫症に及ぼすIP Ro61の影響を示す。C57BL/6雌マウスに $5 \times 10^4$ 個のB16メラノーマ細胞を腹腔内注射し、翌日、動物に100 μlの次のいずれかを注射した: HBSSを6日間(対照)、3mg/kgのRo61を含むHBSSを6日間(低用量)、30mg/kgのRo61を含むHBSSを6日間(高用量)。図13Bは、Ro61のp-GlcNAc送達の効果を示す。図13Aと同様にして動物を腫瘍でチャレンジし、翌日100 μlのp-GlcNAcゲルをIP注射、SC注射または18mg/kgのRo61と共にIP注射(IP+Ro61)して処理した。7日後動物を犠牲にし、B16コロニーの存在を評価した。数値は肉眼で見えるコロニーの平均数および各群の標準誤差を表す(全ての群はn=11、ただし未処理群はn=13)。

20

【図14】 B16メラノーマ腫瘍を皮下にチャレンジした後のRo61処理C57BL/6マウスにおける遅れた腫瘍出現。C57BL/6雌マウスに $5 \times 10^4$ 個のB16メラノーマ細胞をSC注射した。翌日、動物を無作為に4群に分けた: 未処理( )、p-GlcNAcゲルのみのIP注射1回( )、3mg/kgのRo61を含むHBSSのIP注射毎日(6日間)( )、18mg/kgのRo61を含むp-GlcNAcゲルのIP注射1回( )。腫瘍の存在について動物を3週間モニターした(全ての群においてn=10)。

30

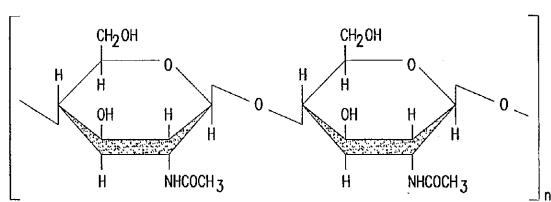
【図15】 後述する癌腫症モデルを用いた、B16腫瘍コロニーの出現に及ぼす種々のエンドセリンアンタゴニストの阻害効果。F10は未処理のB16対照細胞を表し、BQmixはETAアンタゴニストのBQ123とETBアンタゴニストのBQ788との混合物を表し、BQmix/ゲルは後述するp-GlcNAcゲルと組み合わせたBQ123とBQ788の混合物を表し、Ro61は後述する非特異的ETA/ETBエンドセリンアンタゴニストであり、Ro61/ゲルはp-GlcNAcゲルと組み合わせたRo61であり、GRGDS/ゲルはp-GlcNAcとETA/ETBペプチドエンドセリンアンタゴニストGRGDSとの組合せである。

【図16】 B16メラノーマの腹腔内チャレンジ後のRo61処理C57BL/6マウスの長期生存。C57BL/6マウスにB16細胞を腹腔内注射した。動物を次の処理のいずれかのために無作為に4群に分けた:(a) 未処理(黒四角)、(b) p-GlcNAcゲルのみを100 μl(×印)、(c) 3mg/kgのRo61を含むHBSSを毎日100 μl(黒三角)、または(d) 18mg/kgのRo61を含むp-GlcNAcゲルを100 μl(白四角)。動物を毎日モニターし、瀕死の状態にあると判定したときには安楽死させた。

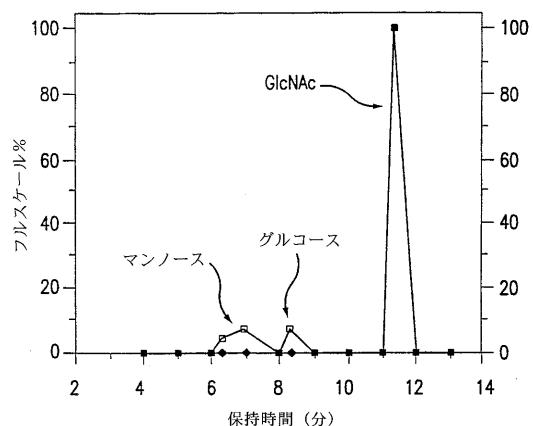
40

【図17】 Ro61で処理した(図17A)および処理していない(図17B)B16細胞の細胞形態の顕微鏡写真(倍率40X);  $10^{-7}$ M Ro61、 $10^5$ 個の細胞。

【図1】



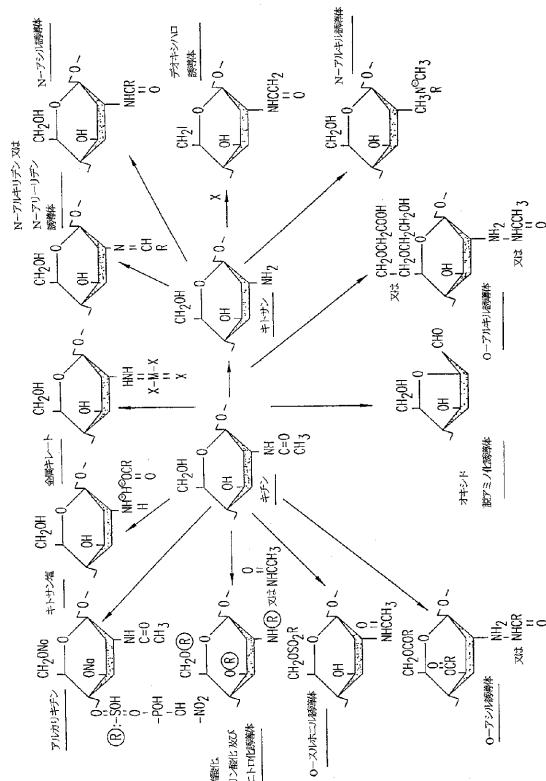
【図2】



【図3】



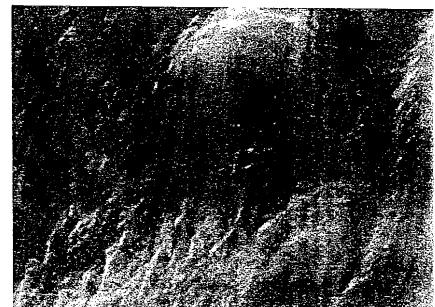
【図4】



【図5】

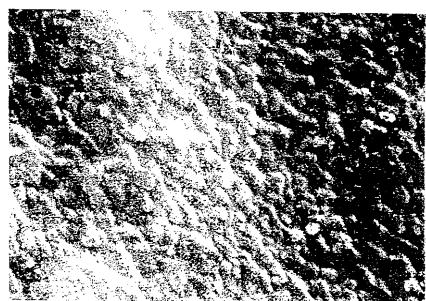


A

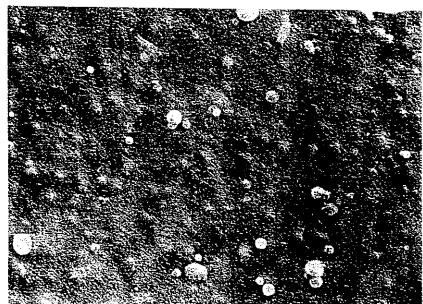


B

【図6】

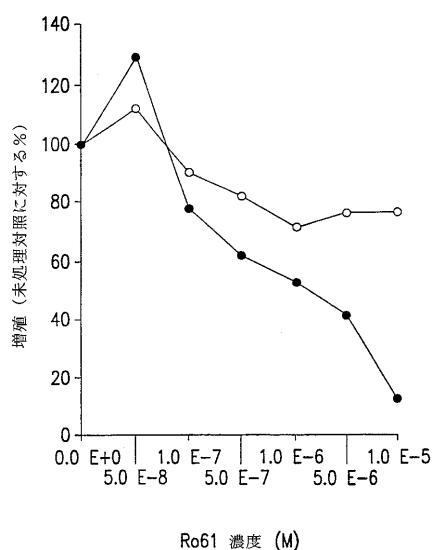


A

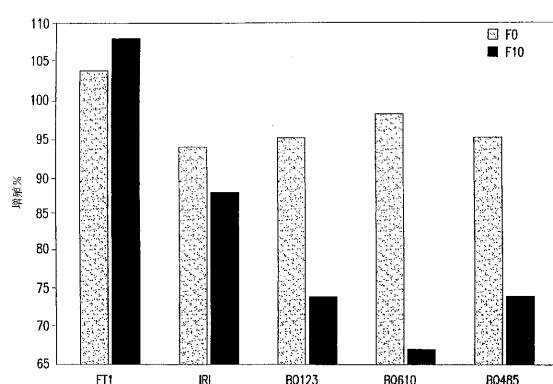


B

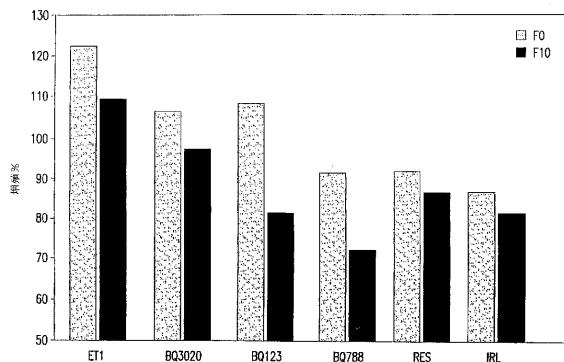
【図7】



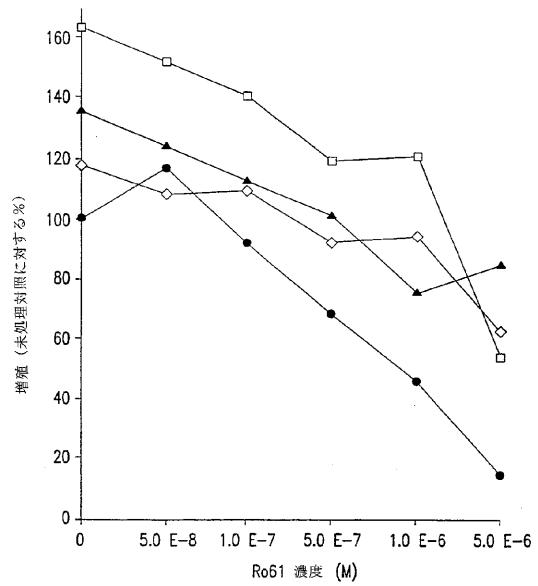
【図8】



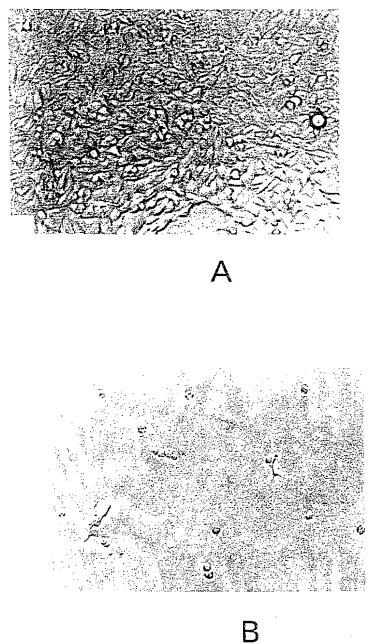
【図9】



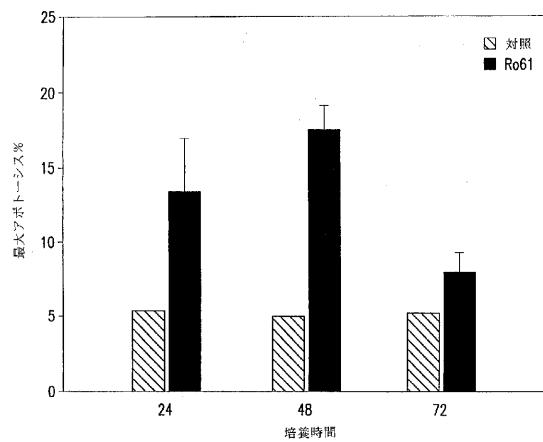
【図10】



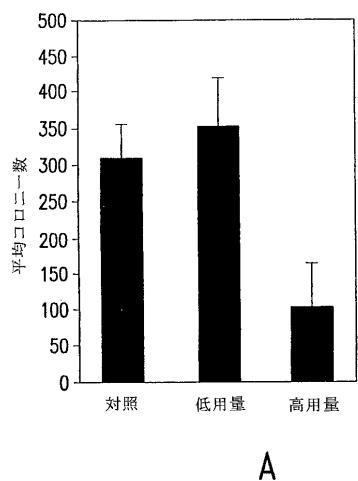
【図 1 1】



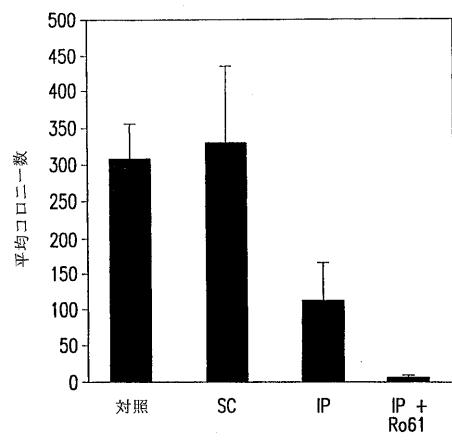
【図 1 2】



【図 1 3】

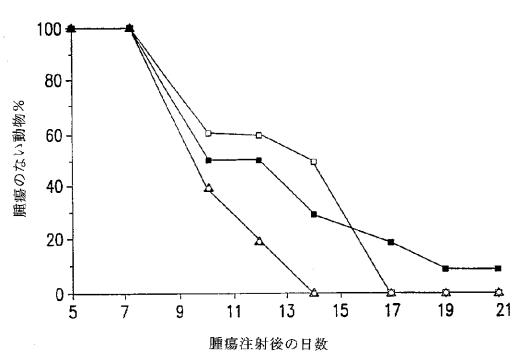


A

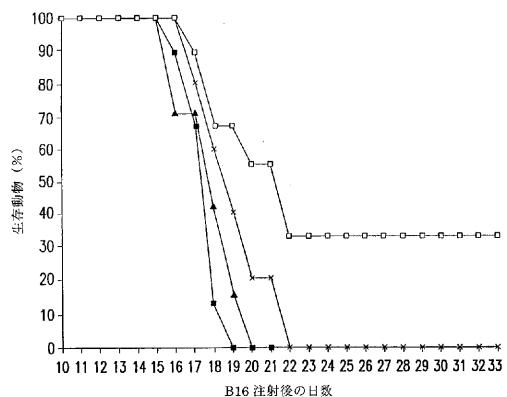


B

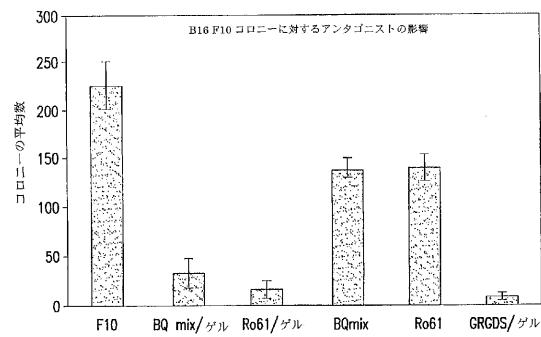
【図14】



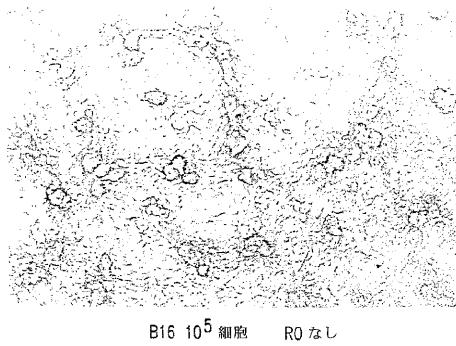
【図16】



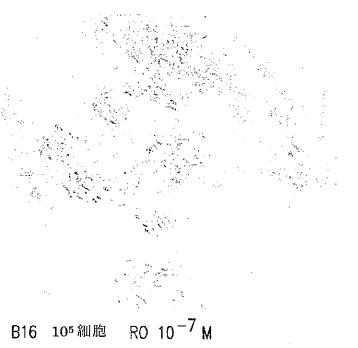
【図15】



【図17】



B



A

---

フロントページの続き

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(72)発明者 ヴォウナキス, ジョン, エヌ.

アメリカ合衆国 29401 サウス カロライナ州, チャールストン, メノッチ ストリート  
19

(72)発明者 フайнケルステイン, サージオ

アメリカ合衆国 02467 マサチューセッツ州, チェストナッティ ヒル, ブルークリン スト  
リート 40

(72)発明者 パリサー, エルнст, アール.

アメリカ合衆国 02421 マサチューセッツ州, レキシングトン, ウォルサム ストリート  
1010

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 特表平09-506126 (JP, A)

特開平04-334322 (JP, A)

特開昭59-027826 (JP, A)

特表平10-509182 (JP, A)

国際公開第96/011927 (WO, A1)

KITAGAWA,N. et al, A selective endothelin ETA antagonist, BQ-123, inhibits 125I-endothelin-1 (125I-ET-1) binding to human meningiomas and antagonizes ET-1-induced proliferation of meningioma cells, Cell Mol Neurobiol, 1994年, Vol.14, No.2, p.105-18

J Biol Regul Homeost Agents, 1993年, Vol.7, No.3, p.95-8

ISHIBASHI,M. et al, Endothelins in hepatoma cell proliferation, Kenkyu Nenpo - Seicho Kagaku Kyokai, 1995年, Vol.19, 193-204

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00-33/44

A61K 47/00-47/48

A61K 9/00- 9/72