

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4711626号
(P4711626)

(45) 発行日 平成23年6月29日(2011.6.29)

(24) 登録日 平成23年4月1日(2011.4.1)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/4045	(2006.01) A 61 K 31/4045
A 61 K 31/405	(2006.01) A 61 K 31/405
A 61 K 31/417	(2006.01) A 61 K 31/417
A 61 K 31/4172	(2006.01) A 61 K 31/4172
A 61 K 31/4178	(2006.01) A 61 K 31/4178

請求項の数 22 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-570868 (P2003-570868)
(86) (22) 出願日	平成15年2月28日 (2003.2.28)
(65) 公表番号	特表2005-532269 (P2005-532269A)
(43) 公表日	平成17年10月27日 (2005.10.27)
(86) 國際出願番号	PCT/RU2003/000072
(87) 國際公開番号	W02003/072124
(87) 國際公開日	平成15年9月4日 (2003.9.4)
審査請求日	平成18年2月28日 (2006.2.28)
(31) 優先権主張番号	2002105392
(32) 優先日	平成14年2月28日 (2002.2.28)
(33) 優先権主張国	ロシア (RU)

前置審査

(73) 特許権者	507245010 オブシエストヴォス オグラニチエンノイ オトヴェツトヴェンノスティユ “ファ ルメンテルプリセス” ロシア連邦 117571 モスコウ プ ロスペクト ヴェルナドスコゴ 86 ス トロエニエ 5
(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 賢男
(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
(74) 代理人	100084663 弁理士 稲田 篤
(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

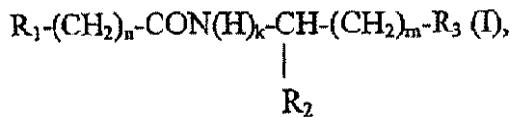
(54) 【発明の名称】細胞分化の誘発方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

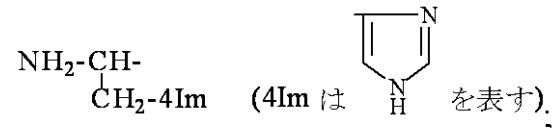
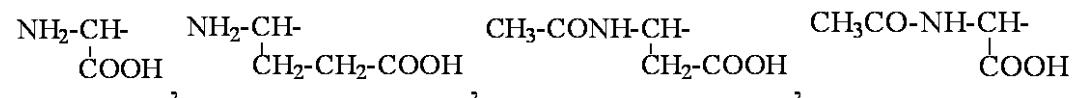
下記の一般式のペプチド誘導体またはその製薬上許容し得る塩を有効量で投与することを特徴とする、哺乳類(ヒトを除く)における黒色腫または血芽球症の細胞分化の誘発方法:

【化 1】



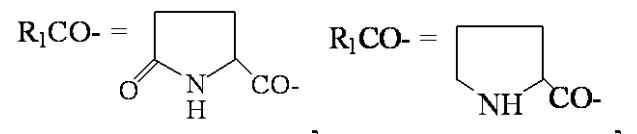
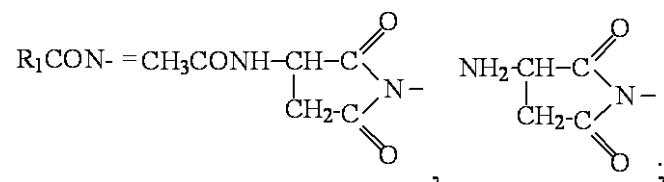
(式中、n=0 ~ 4、m=1 ~ 4、k = 0 ~ 1、

R₁ は NH₂CH₂-, HOOC-CH₂-, CH₃CONH-CH₂-, CH₃OCO-CH₂-,



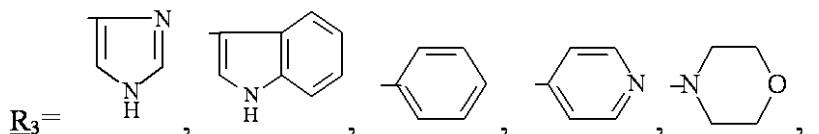
10

n=0 でありかつ k=0 の場合



20

R₂=H, COOH, COOCH₃;



30

NH₂, COOH, -COOCH₃, m=1-4)。

【請求項 2】

請求項 1 記載の一般式(I)のペプチド誘導体を0.5~5.0 mg/kgの投与量で毎日経口投与する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の一般式(I)のペプチド誘導体を化学療法クールと組合せて投与する、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4】

黒色腫または血芽球症の増殖を安定化させるために、請求項 1 記載の一般式(I)のペプチド誘導体を少なくとも15日間投与する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

40

【請求項 5】

黒色腫または血芽球症の免疫療法の有効性を増強させるために、請求項 1 記載の一般式(I)のペプチド誘導体をインターフェロンと一緒に投与する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

血液毒性を軽減させるために、請求項 1 記載の一般式(I)のペプチド誘導体を、化学療法クールの開始前 5 日間およびその終了まで投与する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

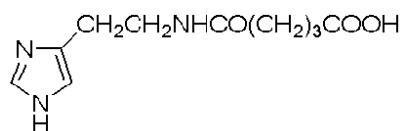
【請求項 7】

前記ペプチド誘導体が下記式で表される化合物である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記

50

載の方法。

【化2】

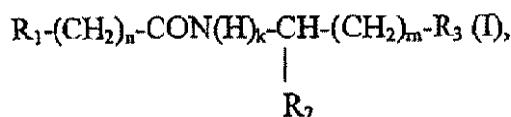


【請求項8】

下記の一般式のペプチド誘導体またはその製薬上許容し得る塩の、哺乳類における黒色腫または血芽球症の細胞分化誘発用の医薬品の製造における使用：

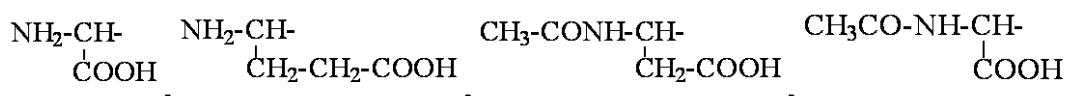
【化3】

10

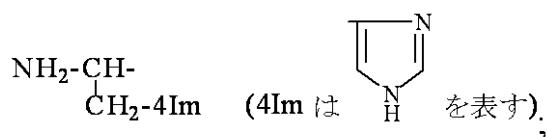


(式中、n=0~4、m=1~4、k=0~1；

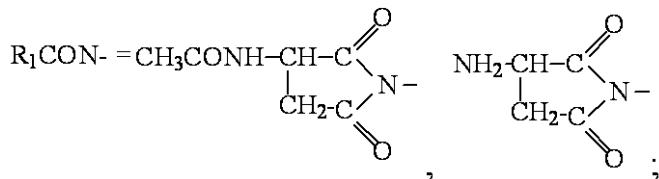
R₁はNH₂CH₂-, HOOC-CH₂-, CH₃CONH-CH₂-, CH₃OCO-CH₂-,



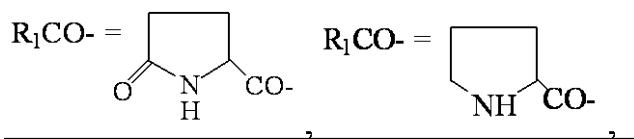
20



n=0 でありかつ k=0 の場合

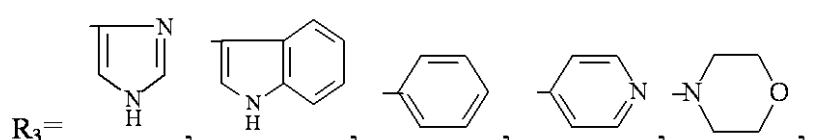


30



R₂=H, COOH, COOCH₃;

40



NH₂, COOH, -COOCH₃, m=1-4)。

【請求項9】

哺乳類(ヒトを除く)において化学療法により生じる好中球減少または血小板減少を軽減させるための、請求項8記載の一般式(I)のペプチド誘導体の使用。

【請求項10】

50

哺乳類(ヒトを除く)において黒色腫または血芽球症の増殖を安定化させるための、請求項8記載の一般式(I)のペプチド誘導体の使用。

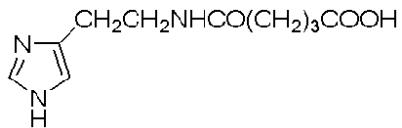
【請求項11】

哺乳類(ヒトを除く)において黒色腫または血芽球症の免疫療法の有効性を増強させるためにインターフェロンと併用する、請求項8記載の一般式(I)のペプチド誘導体の使用。

【請求項12】

前記ペプチド誘導体が下記式で表される化合物である、請求項8～11のいずれか1項記載の使用。

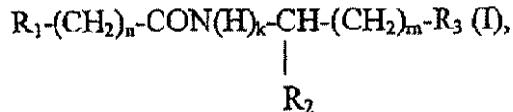
【化4】



【請求項13】

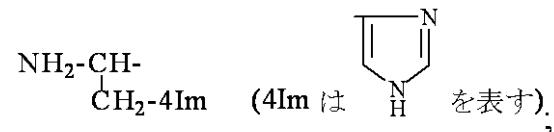
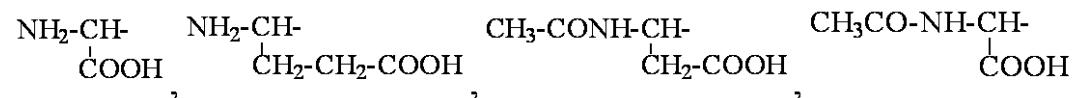
下記の一般式のペプチド誘導体またはその製薬上許容し得る塩を含有する、ヒトを含む哺乳類における黒色腫または血芽球症を治療するための医薬組成物：

【化5】



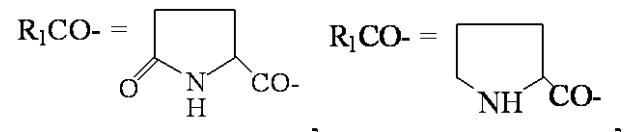
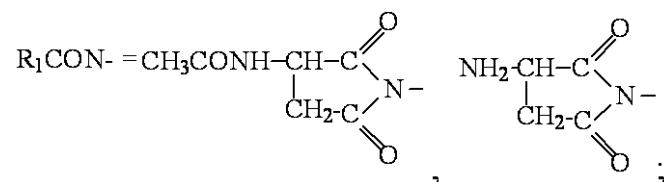
(式中、n=0～4、m=1～4、k=0～1、

R_1 は NH_2CH_2 -、 HOOC-CH_2 -、 $\text{CH}_3\text{CONH-CH}_2$ -、 $\text{CH}_3\text{OCO-CH}_2$ -、



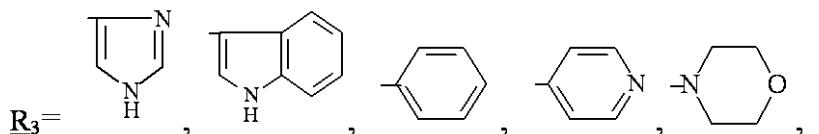
10

$n = 0$ でありかつ $k = 0$ の場合



20

R₂=H, COOH, COOCH₃;



30

NH₂, COOH, -COOCH₃, m=1-4) 。

【請求項 14】

請求項13記載の一般式(1)のペプチド誘導体が0.5～5.0 mg/kgの投与量で毎日経口投与されることを特徴とする、請求項13記載の医薬組成物。

【請求項 15】

哺乳類において化学療法により生じる血液毒性を低減するための、請求項1_3または1_4に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

黒色腫または血芽球症の増殖を安定化させるために、請求項13記載の一般式(1)のペチド誘導体が少なくとも15日間投与されることを特徴とする、請求項13～15のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 17】

黒色腫または血芽球症の免疫療法の有効性を増強させるために、請求項13記載の一般式(1)のペプチド誘導体がインターフェロンと一緒に投与されることを特徴とする、請求項13～16のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 18】

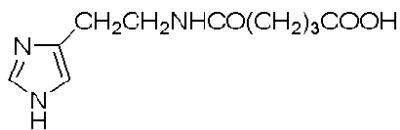
血液毒性を軽減するために、請求項13記載の一般式(1)のペプチド誘導体が、化学療法クールの開始前5日間およびその終了まで投与されることを特徴とする、請求項13～15のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 19】

50

前記ペプチド誘導体が下記式で表される化合物である、請求項 1_3 ~ 1_8 のいずれか 1 項記載の医薬組成物。

【化 6】



【請求項 2 0】

請求項 1_3 記載の一般式(1)のペプチド誘導体を含む、哺乳類における化学療法により生じる好中球減少または血小板減少を軽減させるための医薬組成物。

10

【請求項 2 1】

請求項 1_3 記載の一般式(1)のペプチド誘導体を含む、哺乳類において黑色腫または血芽球症の増殖を安定化させるための医薬組成物。

【請求項 2 2】

請求項 1_3 記載の一般式(1)のペプチド誘導体を含む、インターフェロンと併用して哺乳類における黑色腫または血芽球症の免疫療法の有効性を増強させるための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、医薬品、とりわけ癌疾病の治療に関し、種々の起源の腫瘍の治療において有用である。

20

本発明は、ペプチド誘導体を細胞分化の誘発剤として使用する細胞分化の誘発方法、とりわけ、抗癌非細胞毒療法におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

殆どの腫瘍細胞における分化する能力の欠如が制御し得ない腫瘍増殖をもたらすことは知られている。

従って、細胞分化の特異的または非特異的誘発双方の薬剤についての研究は、抗癌非細胞毒療法に対する新規な試みの 1 つである。

「細胞分化の誘発」下においては、種々の理由により喪失または低下した下記の機能を再生する(または駆使する)種々の物質の能力は、平均化される：細胞の正常な細胞サイクルの通過、生物学的に活性な致命的に重要な物質の細胞内での合成。

30

作用機序がある特定の細胞機能に関連してなく幾つかのパラメーターによって細胞の分化を生じさせ得る物質または化合物は、非特異性分化誘発剤に帰属し得る。

レチノイド類または -2-インターフェロンを投与することによって腫瘍細胞の分化を誘発させる方法は、知られている [Cancer Res., 40, 2245-3350, 1980]。

細胞分化誘発剤のポリトランスレチノイン酸(PTRA)は、急性前骨髓球性白血病の誘発後の寛解または寛解後治療を長引かせる薬剤として使用されている。レチノイン酸誘導体に影響されるような細胞分化は、腫瘍細胞増殖の安定化に至る [Abelev G.I. Differentiation and tumor phenotype in cells of leukoses and lymphomas/ In: The Clinical Oncohematology (edited by M.A. Volkova). Moscow, the Meditsina publishers, 2001, Chapter 11, pages 116-123]。

40

【0 0 0 3】

また、黑色腫の治療における免疫療法剤としての -インターフェロン製剤の使用も、付着能力が増強され抗原性プロフィールが変化する腫瘍細胞分化の誘発に関連している。インターフェロンによる治療は、腫瘍増殖の進行低減をもたらしさに転移の発生および速度を抑制する [Atzpodien J., Kirchner H. Cancer, Cytokines, and cytotoxic cells : interleukin-2 in the immunotherapy of human neoplasms. Klin. Wochenschr, 1990, v.68, pp.1-7]。

細胞毒性化学療法によって損傷された造血細胞分化を生ずる製剤が、臨床診療において

50

最近導入されている。これらの製剤は、血液ホルモン類、即ち、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子等のような骨髄から調製した種々のサイトカイン類である。これらの種々のヒト腫瘍の治療における使用は、骨髄細胞の促進された成熟をもたらし、化学療法製剤の血液毒性作用を阻止する [Crawford J., Ozer H., Stoller R. et al. Phase II of clinical investigation of GM-CSF by the patients of SCLC with the dose-intensive chemotherapy. The New England Journal of Medicine. 1991, v.325, No.3, pp.164-170].

即ち、腫瘍細胞分化の誘発は、新生物増殖の安定化、免疫療法効果の増強および化学療法製剤の血液毒性修正の先端的機序の1つである。

【発明の開示】

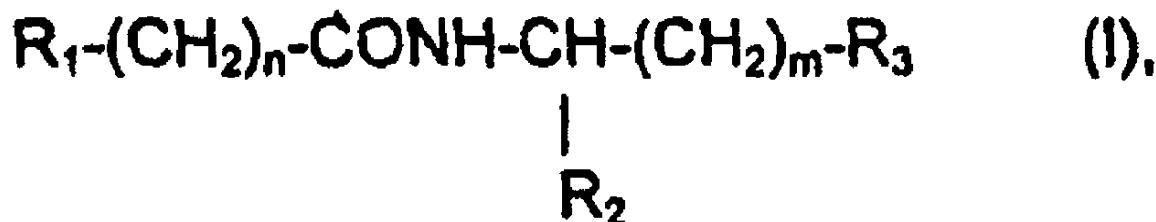
10

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者等は、下記の一般式(I)：

【化1】



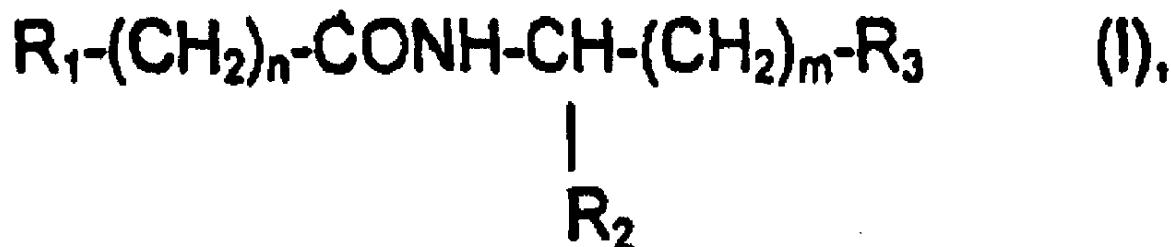
20

のペプチド誘導体が、細胞分化の強力な誘発剤であり、癌疾患、とりわけ黒色腫および血芽球症の非細胞毒性療法のための薬剤並びにヘマトコレゲーティング剤(hematocorregating agent)として有用であることを見出した。

【0005】

式(I)：

【化2】



30

の化合物は、国際出願 PCT/RU98/00215号において、酸化防止作用、抗喘息作用、抗低酸素作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用、抗菌作用、脂質調節作用、癌転移予防作用および他の種類の治療作用を有するものとして開示されている。環状アスパルチルヒスタミンおよびアセチル-アスパリチル-ヒスタミン構造体は、研究：Kvamme, E.; Reichelt, K.L.; Edminson, P.D.; et al. N-substituted peptides in brain. Fed. Eur. Biochem. Society Meet., [Proc.], 1975, 41, 127-136に開示されている。

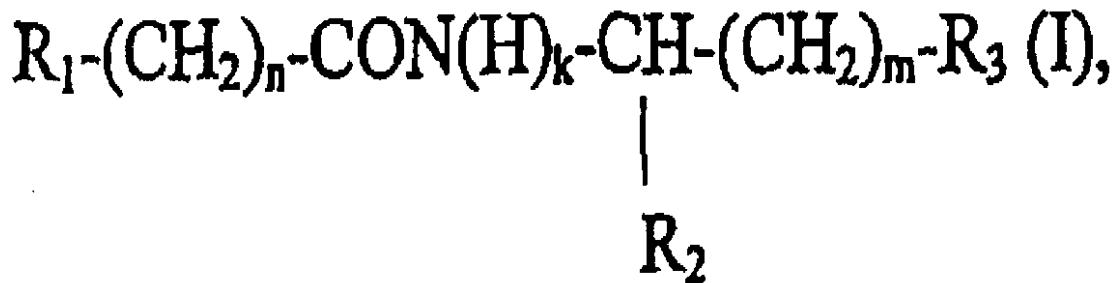
40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、有効量の下記の一般式の化合物またはその製薬上許容し得る塩を活性薬剤として投与することを含む細胞分化の誘発方法に関する：

【化3】



【0007】

10

(式中、 R_1 は、アミノ、 $C_1 \sim C_5$ アミド-またはカルボキシル基から選ばれた官能基によって置換された $C_1 \sim C_3$ 炭化水素基 (カルボキシル基は必要に応じてエーテル化されており、アミノ基は必要に応じてアシル置換基によって置換されている)；アミノ基およびカルボキシル基で同時に置換された $C_1 \sim C_3$ 炭化水素基 (アミノ基必要に応じてアシル置換基によって置換されており、カルボキシル基はN-末端アミノ基または-CONH-基の-NH-基を含む $C_5 \sim C_6$ 員環状イミド中に必要に応じて含まれている)；または、5~6員の不飽和複素環基によって置換された $C_1 \sim C_3$ 炭化水素基 (炭化水素基は、必要に応じてアシル置換基によって置換されたアミノ基を同時に含み得る)であり；

あるいは、 R_1 は、飽和複素環基であり；

R_2 は、水素原子、またはエーテル化し得るカルボキシルから選ばれた官能基であり；

20

R_3 は、5~6員の飽和または不飽和環状または複素環基、またはアミノ-もしくはカルボキシル基であり、カルボキシル基は必要に応じてエーテル化されており；そして、

$n = 0 \sim 4$ 、 $m = 1 \sim 4$ 、 $k = 0 \sim 1$ である)。

好ましい実施態様においては、本発明は、有効量の4-[N-(2-イミダゾール-4-イル)エチル]カルバモイル]酪酸 (Dicarbamine^R)を活性薬剤として投与することを含む細胞分化の誘発方法に関する。

本発明において使用する好ましい一般式(I)の化合物は、下記に示す一般式(I)の化合物である：

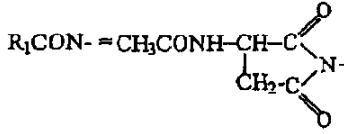
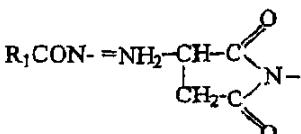
30

40

50

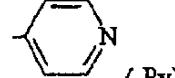
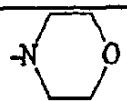
【 0 0 0 8 】

【化4】

化合物番号	R ₁	n	k	R ₂	m	R ₃
1	NH ₂ -CH-COOH	2	1	H	1	 (-4-Im)
2	HOOC-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
3	HOOC-CH ₂ -	1	1	H	1	-4-Im
4	NH ₂ -CH-COOH	2	1	-COOH	1	-4-Im
5	NH ₂ -CH-CH ₂ -CH ₂ -COOH	0	1	H	1	-4-Im
6	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
7	HOOC-CH ₂ -	1	1	-COOH	1	-4-Im
8	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-4-Im
9	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOCH ₃	1	-4-Im
10	NH ₂ -CH ₂ -	1	1	-COOH	1	-4-Im
11	NH ₂ -CH ₂ -	1	1	H	1	-4-Im
12	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
13	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-4-Im
14	CH ₃ -CONH-CH-CH ₂ -COOH	0	1	H	1	-4-Im
15		0	0	H	1	-4-Im
16		0	0	H	1	-4-Im

【0009】

【化5】

17	CH ₃ CONH-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
18	NH ₂ -CH-COOH	1	1	H	1	-4-Im
19	CH ₃ OCO-CH ₂ -	2	1	H	1	-4-Im
20	NH ₂ -CH-COOH	2	1	COOH	1	 (-3-Ind)
21	NH ₂ -CH-CH ₂ -CH ₂ -COOH	0	1	H	1	-3-Ind
22	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-3-Ind
23	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	-COOH	1	-3-Ind
24	$R_1CO- = \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{N} \\ \text{H} \end{array}$ CO-	0	1	H	1	-3-Ind
25	COOH-CH ₂ -	2	1	H	1	-3-Ind
26	NH ₂ -CH-COOH	2	1	H	1	-3-Ind
27	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	H	1	-C ₆ H ₅
28	NH ₂ -CH ₂ -	2	1	H	1	 (-Py)
29	NH ₂ -CH-COOH	2	1	H	1	-Py
30	HOOC-CH ₂ -	2	1	H	1	-Py
31	HOOC-CH ₂ -	2	1	-COOH	4	-NH ₂
32	NH ₂ -CH-CH ₂ -4Im	0	1	H	1	-COOH
33	$R_1CO- = \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{C} \\ \text{N} \\ \text{H} \end{array}$ CO-	0	1	H	1	-4Im
34	HOOC-CH ₂ -	2	1	H	1	
35	NH ₂ -CH-CH ₂ -4Im	0	1	H	1	-COOCH ₃
36	CH ₃ CO-NH-CH-COOH	2	1	H	1	-4Im
37	CH ₃ CONH-CH ₂ -	1	1	-COOH	1	-4Im
38	NH ₂ -CH ₂ -	4	1	H	1	-4Im

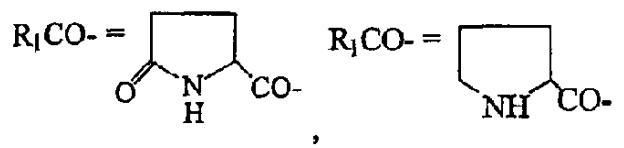
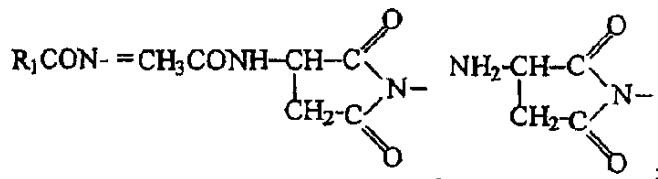
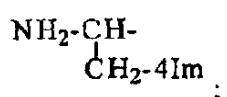
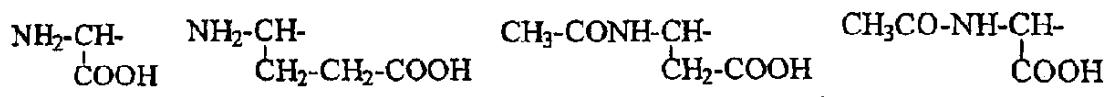
【0010】

本発明において使用するより好ましい一般式(I)の化合物は、R₁、R₂、R₃、n、mおよびkが下記のとおりの一般式(I)の化合物である。

【0011】

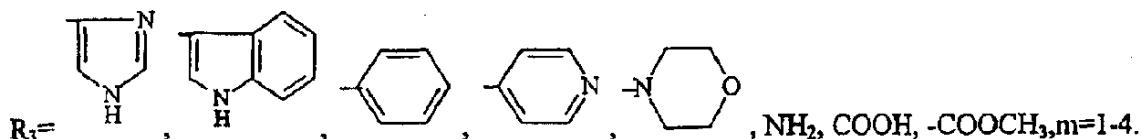
【化6】

$R_1 = NH_2CH_2$ -, $HOOC-CH_2$ -, $CH_3CONH-CH_2$, $CH_3OCO-CH_2$ -,



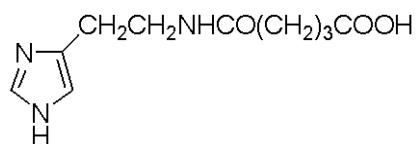
$n=0-4$; $k=0-1$

$R_2 = H, COOH, COOCH_3$;



【0012】

本発明において使用する最も好ましい化合物は、下記式で表される化合物 ($Dicarbamin e^R$) である。



【0013】

本発明の好ましい実施態様においては、一般式(I)のペプチド誘導体は、0.5~5.0 mg/kg 体重の単回投与量で長時間投与する。

本発明のもう1つの好ましい実施態様においては、一般式(I)のペプチド誘導体は、化学療法と併用して投与する。

また、本発明の好ましい実施態様は、悪性腫瘍増殖、とりわけ黒色腫または血芽球症を安定化させるために、一般式(I)のペプチド誘導体を、化学療法の能力が消失したときに、少なくとも15日間0.5~5.0 mg/kg 体重の単回投与量で投与する、細胞分化の誘発方法でもある。

一般式(I)のペプチド誘導体の免疫療法剤インターフェロンとの併用投与は、悪性腫瘍細胞とりわけ黒色腫に対するインターフェロン有効性の増強をもたらす。

本発明のさらにもう1つの好ましい実施態様は、黒色腫免疫療法の有効性を増強するために、一般式(I)のペプチド誘導体をインターフェロンの投与と一緒に15日間よりも短くない期間0.5~5.0 mg/kg 体重の投与量で投与する、細胞分化の誘発方法である。

また、本発明の好ましい実施態様は、血液毒性を軽減するために、一般式(I)のペプチド誘導体を、化学療法クールの開始前の5日間、化学療法中および化学療法クールと次の細胞毒療法クールまでの間に、0.5~5.0 mg/kg 体重の単回投与量で毎日投与する、細胞分

10

20

30

40

50

化の誘発方法でもある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明の好ましい実施態様を具体的に示す実施例を提示する。

【実施例1】

【0015】

黒色腫M-6細胞分化に対する一般式(1)のペプチド誘導体の活性

試験は、10～12週齢体重20～22グラムの無胸腺(ヌード)雌Balb/Cマウス(Russian Academy of Medical Sciences (RAMS)のN.N. Blokhinの改名後のRussian Cancer Research Center (RCRC)の繁殖)において実施した。臨床原材料から早期に入手したヒト黒色腫株を上記RAMSのRCRCの腫瘍株バンクから取得し無胸腺“ヌード”マウスに移植した。腫瘍は、活性トリパン(Tripan)ブルー染色を含むバーセン(Versen)溶液により分解し、マウス当り160万個の細胞量で、マウスに皮下接種した。

ジカルバミン(Dicarbamine)を、金属プローブを使用して、腫瘍接種前の4日で開始しその後の10～11日間(15日までの投与クール)、1.0 mg/kgの投与量で毎日マウスに胃内投与した。各マウスは、最後の投与後12時間、24時間および48時間でエーテル麻酔により殺処分した。

4群のマウスを試験において使用した：

群1：対照、ジカルバミンを投与しない。マウスは、ジカルバミンを受けた群と同じ時間で殺処分する。

群2：ジカルバミンを投与し、マウスを投与終了後12時間で殺処分する。

群3：ジカルバミンを投与し、マウスを投与終了後24時間で殺処分する。

群4：ジカルバミンを投与し、マウスを投与終了後48時間で殺処分する。

色素を含む細胞数およびアポトーシス兆候(分化する能力)を有する細胞数、有糸分裂数(増殖活性)および壊死領域のような4つの形態学的パラメーターを測定して、対照動物群および各ジカルバミン群におけるM-6黒色腫の分化および増殖度合をモニターした。これらのパラメーターは、動的に測定し、完全兆候としての腫瘍増殖の一般的形態像と関連付けた。そのためには、腫瘍をマウス中で取出し、ホルマリン中に入れ、光学顕微鏡において組織学的に加工した。得られたデータを表1に示す。

10

20

30

40

50

【0016】

【表1】

表1

M-6黒色腫の形態学的パラメーター(光学顕微鏡)

パラメーター(in %)		ジカルバミン投与中止からの経過時間		
		12 時間	24 時間	48 時間
壊死領域	対照	1-2	2-3	3-5
	ジカルバミン 投与後	6-7	7-9	8-10
有糸分裂	対照	3-5	3-5	3-5
	ジカルバミン 投与後	3-5	3-5	3-5
アポトーシス	対照	0.1-0.2	0.1-0.2	0.1-0.2
	ジカルバミン 投与後	0.1-0.2	0.2-0.3	0.2-0.3
色素含有細胞	対照	1-2	1-2	2-3
	ジカルバミン 投与後	2-3	2-4	3-5

【0017】

実施した試験により、本発明者等は、ヌードマウスに接種したヒト黒色腫が、有意でないストローマ発生を含む連続領域により増殖する多形組成物からなる腫瘍を9日目で形成するのを確立し得た。小さい壊死部位が腫瘍内で計数し得、これらの部位は、12時間および24時間での殺処分(それぞれ、1~2%および2~3%)と比較したとき、48時間で僅かに増大している(スライス領域の3~5%まで)。3~5%の有糸分裂がすべての増殖期間中に腫瘍中で観察されている。アポトーシスは僅かに発現している。色素含有細胞は稀に見出され、第1日目におけるその数は1~2%を越えず、増殖の48時間においてのみ、その数は2~3%まで増大している。即ち、この期間中のメラニン起源の強度は有意ではない。得られた特徴は、黒色腫がアポトーシスの度合、さらに、なかんずく、メラニン起源の基本的機能能力の双方に基づき分化能力を実際に喪失した急速増殖性の腫瘍であると結論付けるのを可能にしている。

【0018】

黒色腫細胞分化に対するジカルバミンの効果を、腫瘍スライス中のメラニン含有細胞数を計数することにより、メラニン起源の強度に基づき評価した。この目的において、腫瘍をマウス中で摘出し、グルタルアルデヒド中に入れ、電子顕微鏡における組織学的加工を行った。細胞分化の度合を反映するメラニン起源強度指数(MGII)を、下記の等式に従い、調製したスライス中で算出した：

$$MGII = NCM \times NM$$

(式中、NCMはメラノソームを含有する細胞数であり；

NMは細胞当りの平均メラノソーム数である)。

この指標により実施したメラニン起源強度の分析を表2に示す。

10

20

30

40

50

【0019】

【表2】

表2

ジカルバミン投与後の黒色腫細胞中のメラニン起源強度の比較（電子顕微鏡）

パラメーター(絶対値)		ジカルバミン投与中止からの経過時間		
		12 時間	24 時間	48 時間
メラノソーム 含有細胞数 (500 細胞当たり)	対照	135.0	144.0	159.0
	ジカルバミン投与後	175.0	210.0	227.0
細胞1当りのメラ ノソーム平均数	対照	19.0	21.0	26.0
	ジカルバミン投与後	28.0	35.0	42.0
MGII	対照	5.1	6.0	8.2
	ジカルバミン投与後	9.8	14.7	19.0

【0020】

電子顕微鏡試験は、対照と比較したとき、メラノソームを含む腫瘍細胞数および細胞1個当たりのメラノソーム数がジカルバミン効果に基づき増大していることを示している。MG II指数は、観察期間において、次のとおり増大している：12時間において、1.9倍；24時間において2.4倍；および48時間において2.3倍。

即ち、ジカルバミンの15日間投与クール後、M-6黒色腫腫瘍細胞分化度合の平均増大は、メラニン起源強度(MGII指数)、メラノソームを含む細胞数の増大(1.3倍)およびメラノソーム数の増大(1.3倍)によって裏付けされた2.2倍である。

【実施例2】

【0021】

接種ヒト黒色腫細胞のメラニン合成機能に対するジカルバミンの効果

実施例1において述べたようにしてヒト黒色腫を皮下接種したマウスに、ジカルバミンを高めの単回投与量 4.5 mg/kgで腫瘍移植時から3週間毎日経口投与した。

各動物を腫瘍移植から3週間で殺処分した。殺処分において、腫瘍容積は、平均 150 mm^3 であった。殺処分後、腫瘍をマウス中で摘出し、バーセン溶液により分解し、細胞画分を分離し、色素を含む細胞数を光学顕微鏡においてGoryaev's室内で算出した。

実施した試験は、対照においてはメラミンを含む平均細胞数が 39.14 ± 8.72 であり、試験においては 108 ± 11.91 であり、即ち、メラミンを合成する細胞数は有意に($p < 0.01$) 3倍増大していたことを示している。

即ち、種々の投与量でジカルバミンを使用して実施した1連の試験において、メラミン起源強度に基づいて明らかのように、ヒト黒色腫細胞分化の統計的に有意な明白な誘発効果が得られた。

データを表3に示す。

10

20

30

40

50

【0022】

【表3】

表3

ジカルバミンによって誘発されたヒト黒色腫細胞中のメラニン起源強度

腫瘍数	対照	腫瘍数	試験
			メラニン含有細胞数
1	32	1	95
2	35	2	111
3	29	3	95
4	42	4	110
5	46	5	130
6	36	6	106
7	54	7	111
平均	39.14	平均	108.42*
標準偏差	8.72	標準偏差	11.91

*p<0.01

【実施例3】

【0023】

接種ヒト黒色腫Me1-6の増殖動力学に対するジカルバミンの効果

試験は、10～12週齢体重20～22グラムの無胸腺(“ヌード”)雌Balb/Cマウス(RAMSのN.N. Blokhinの改名後のRCRCの繁殖)において実施した。臨床原材料から早期に入手したヒト黒色腫株Me1-6をRAMSのRCRCの腫瘍株バンクから取得し無胸腺マウスに移植した。

1.5 mg/kgおよび4.5 mg/kgの各単回投与量のジカルバミンを、2つのマウス群に、腫瘍発症時から3週間(腫瘍移植から15日目より36日目まで)毎日経口投与した。

【0024】

腫瘍の測定は、移植から18日、25日、33日、39日、46日および53日で行った。ジカルバミン効果は、下記の式に従う腫瘍容積“V”の複数回測定における8週間での腫瘍増殖動力学に基づき評価した：

【数1】

$$V = \pi * L * s * h \text{ (mm}^3\text{)}$$

(式中、Lはmmでの長さであり、sはmmでの幅であり、hはmmでの高さである)。

その後、パーセントで示す腫瘍容積間の比 V_t/V_{t-1} を算出し、スチューデントの方法に従い統計的処理して統計的有意差を算出する。得られたデータを下記の表4に示す。

【0025】

10

20

30

40

50

【表4】

表4
ヌードマウス中でのM-6ヒト黒色腫増殖に対するジカルバミンの効果

接種後日数	対照 (n=7)		ジカルバミン 1.5 mg/kg (n=10)		ジカルバミン 4.5 mg/kg (n=10)		
	M+m*		M+m		M+m		
	V	%	V	%	V	%	P
18 日	66.2+2.8	100	21.8+12.8	100	91.9+54.4	100	
25 日	266.0+69.4	329.0+88.9	77.5+46.4	302.0+186.0	0.82	266.0+198.0	166.0+93.0 0.015
33 日	582.0+127.4	132.9+57.3	342.0+142.0	428.0+313.1	0.11	852.0+495.0	276.0+104.0 0.011
39 日	701.0+123.5	21.9+12.6	435.0+187.0	23.2+22.1	0.92	1129.0+600.0	39.8+27.3 0.169
46 日	778.0+148.4	10.5+8.1	662.0+417.0	23.9+31.0	0.45	1354.0+735.0	19.6+17.5 0.276
53 日	821.0+221.8	3.8+10.3	783.0+423.0	18.6+54.0	0.43	1550.0+780.0	4.2+22.5 0.538

* 標準偏差を含む平均値、

** 有意性算出は、腫瘍容積の%変化のデータについてのみ行った。

【0026】

50

30

10

20

得られたデータは、対照との比較において、最高腫瘍塊獲得において7日の遅れを示していた。対照群と比較したとき、腫瘍増殖速度における統計的有意差は、45 mg/kgのクール投与量で投与するジカルバミンの10日間クールに相当するジカルバミンを4.5 mg/kgの単回投与量で受けたマウス群の移植から25日で見受けられた。この群においては、平均腫瘍容積は $166.0 \pm 93.0\%$ まで増大していたが、対照においては、このパラメーターは $329.0 \pm 88.9\%$ であった($p < 0.015$)。

【実施例4】

【0027】

無胸腺マウスに移植した接種ヒトM-6黒色腫の増殖に対する化学療法と併用したジカルバミンの効果

10

試験を実施例3で述べた方法に従って実施した。ジカルバミンは、腫瘍発現時から3週間(15日目から36日目まで)、4.5 mg/kgの単回投与量で毎日経口投与した。また、併用治療群においては、投与量 6 mg/kg i.v.の抗腫瘍細胞静止剤シスプラチニ(Cisplatin) (25日目)および投与量 40 mg/kg i.p.のアラノザ(Aranoza) (27日目)の単回投与と併用して、ジカルバミンも、3週間(15日目～36日目)、4.5 mg/kgの単回投与量で毎日経口投与した。細胞静止療法は、平均腫瘍容積が $200 \pm 62 \text{ mm}^3$ であるときに開始した。移植から18日、25日、33日、39日、46日および53日において、腫瘍容積を測定し、値 V_t/V_{t-1} を算出し、この値をパーセントで示した。得られたデータを下記の表5に示す。

【0028】

【表5】

20

表5
ヒトM-6黒色腫増殖力学に対する抗腫瘍細胞
静止剤とジカルバミンによる併用化学療法の効果

マウス群	治療処方		腫瘍接種後日数でのM±m(%)				
	投与量(mg/kg)	投与日数	25日	33日	39日	46日	53日
対照	生理食塩水 p.o.	15～36	329.0+88.9	132.9+57.3	21.9+12.6	10.5+8.1	3.8+10.3
シスプラチニ アラゾナ	6 mg/kg i.v.	25	413.0+276.0	177.0+46.0	62.04+30.1	21.2+18.7	18.2+12.7
	40 mg/kg i.p.	27					
ジカルバミン	4.5 mg/kg p.o.	15～36	166.0+93.0**	276.0+104.0	39.8+27.3	19.6+17.5	4.2+22.5
ジカルバミン シスプラチニ アラゾナ	4.5 mg/kg p.o.*	15～36	182.0+60.0**	191.0+71.0	24.5+17.4	28.7+9.8	8.0+30.6
	6 mg/kg i.v.	25					
	40 mg/kg i.p.	27					

* - 毎日 ; **- $p < 0.05$

【0029】

提示したデータから、使用投与経路におけるジカルバミンが初期段階において腫瘍増殖を遅延させていることが分り、このことは、腫瘍塊獲得が $329.0 \pm 88.9\%$ であった対照と比

50

較したときの $166.0 \pm 93.0\%$ の25日目の腫瘍塊獲得の減少によって示され得る。即ち、黒色腫増殖に対するジカルバミン効果の結果は、再生されていた(実施例3参照)。提示した処方でのアラノザとシスプラチソとの併用化学療法は有効ではないようであった、即ち、この期間での腫瘍獲得は、対照値よりも高かった($413.0 \pm 276.0\%$)。このことは、与えられた化学療法方式に対する使用MeI-6ヒト黒色腫株の感受性の欠如を証明している。上記有効でない化学療法処方へのジカルバミンの導入は、 $182.0 \pm 60.0\%$ までの25日目での腫瘍塊獲得の統計的に有意な($p < 0.05$)減少を生じており、このことは、化学療法効果がない場合のその効果を証明している。

【実施例5】

【0030】

インターフェロン投与の場合の黒色腫細胞の増殖能力に対する一般式(I)のペプチド誘導体の効果

-インターフェロン(Introne^R、IN)投与と一緒に黒色腫細胞の増殖能力に対するジカルバミンの効果を試験した。ジカルバミン自体が黒色腫細胞の増殖活性をその生存性を変化させることなく遅延させ得ることに留意すべきである。

試験は、マウスB-16黒色腫細胞とヒトM-5黒色腫細胞における組織培養物中で単分子層の形で増殖する2つの連続細胞培養物において実施した。INは、70~700 IU/ml濃度で投与した。ジカルバミン(D)は、原液($1,000 \mu M$)中に移し、 $0.22 \mu m$ 孔径を有するフィルターにより滅菌し、次いで 0.01 および $1.0 \mu M$ 濃度に希釈した。

細胞に対する各調製物の効果を、細胞増殖初期速度(IRCP)に基づき評価した。コロニー増殖速度と通常称されるこの指標(IRCP)は、“試験”(調製物を含む)皿および“対照”(調製物を含まない)皿中での作用後の最初の数日間の微小コロニー中の細胞数を計数し、各皿内に50個のコロニーを分析することによって測定する。各“点”は、特定濃度の試験調製物の添加において増殖中の細胞コロニーを含む3枚よりも少なくないペトリ皿を含んでいた。コロニーの増殖速度(%での)は、下記の式に従い算出した：

$$(\text{試験皿内の細胞数} / \text{コロニー(平均値)} - 1) / (\text{対照皿内の細胞数} / \text{コロニー} - 1) \times 100\%$$

微小コロニー中の細胞数は、“点”毎に算出した。選定した濃度範囲における各調製物の毒性は、“試験”皿および“対照”皿内の増殖コロニー数間の比によって決定した細胞生存度により判断した。試験結果を下記の表6に示す。

10

20

30

40

【0031】

50

【表6】

表6

マウスB-16黒色腫細胞およびヒトM-5黒色腫細胞の増殖活性に対するジカルバミンおよび α -インターフェロンの効果

調 製 物	IN 濃度 (IU/ml)	各調製物との接触後の時間における細胞増殖 の初期割合(対照に対する%細胞/コロニー)								
		48時間			72時間			96時間		
		D 無	D 0.01 μ M	D 1.0 μ M	D 無	D 0.01 μ M	D 1.0 μ M	D 無	D 0.01 μ M	D 1.0 μ M
M-5の対照		100.0	84.2	69.0	100.0	73.6	50.0	100.0	70.2	49.1
IN	7.0	111.3	79.1	54.7	94.8	49.1	36.9	73.0	46.9	33.3
	70.0	53.7	40.5	30.7	51.9	34.9	24.5	48.8	31.7	23.9
B-16 の対照		100.0	52.9	44.6	100.0	61.0	43.6	-	-	-
IN	70.0	-	-	-	50.2	-	26.1	-	-	-
	700.0	38.0	24.9	21.5	29.8	22.0	16.0			

【0032】

上記表から、M-5黒色腫を含む対照においては、IRCP指数が96時間において100%のレベルに保持されていることを理解し得る。

-インターフェロンを濃度 7.0 IU/mlで添加したときのM-5細胞を含むサンプルにおいては、48時間においてIRCP指数が111.3%まで増大し、72時間および96時間においてのみ、それぞれ94.8%および73.0%へ低下していた。-インターフェロンを濃度 70 IU/mlで添加した場合、IRCP指数は、48時間で53.7%へ、72時間で51.9%へ、さらに、96時間で48.8%へ低下していた。即ち、濃度 70 IU/mlでの-インターフェロンの最大抑制効果は、50%IRCPを達成している。

濃度 0.01 μ Mのジカルバミンを添加したとき、IRCP指数は、48時間で82.4%へ、72時間で73.6%へ、96時間で70.2%へ低下し、濃度 1 μ Mのジカルバミンを添加したときは、IRCP指数は、48時間で69.0%へ、72時間で50.0%へ低下していた。

即ち、ジカルバミンの最大抑制効果も50%のIRCP指数を達成しており、調製物濃度 1.0 μ Mで得られていた。

-インターフェロンを濃度 70 IU/mlで添加したときのB-16黒色腫における試験においては、72時間でのIRCP指数は50.0%に低下しており、ジカルバミンを2通りの提示濃度で添加したときは、48時間でのIRCP指数はそれぞれ52.9%および44.6%に、72時間ではそれぞれ61.0%および44.6%に低下していた。38.0%および29.8%へのIRCP指数の有意の低下は、-インターフェロンを濃度 700 IU/mlで添加したときにのみ得られていた。

即ち、実施した試験は、-インターフェロンとジカルバミンが分化誘発剤の特徴である40.0~50.0%のレベルでM-5黒色腫およびB-16黒色腫細胞の増殖を抑制することを示している。

【0033】

M-5細胞への濃度 70.0 IU/mlの-インターフェロンとジカルバミンとの併用添加は、すべての場合において、IRCP指数が記録した各時間に対してそれぞれ30.7%、24.0%、31.0%に低下したことを示している。最も顕著な効果は、濃度 700 IU/mlの-インターフェロンと2通りの濃度のジカルバミンを併用したときにB-16黒色腫において得られた：IRCP指

10

20

30

40

50

数は、それぞれ、48時間において24.9%および29.8%、72時間において22.0%および16.0%に低下していた。

即ち、ジカルバミンは、インターフェロン同様に、マウスB-16黒色腫およびヒトM-5黒色腫細胞増殖を遅延させ、毒性を示していない(生存指数による)。提示した各実施例において示されているように、ジカルバミンの上記効果は、分化誘発剤の特徴であり、黒色腫細胞に対して、既知の分化誘発剤 -インターフェロンとの併用において付加的な特徴を有する。この効果は、腫瘍増殖抑制の増進をもたらし、黒色腫の免疫療法有効性を向上させる指針である。

【0034】

5.2. ペプチド誘導体の黒色腫細胞増殖能力に対する効果

10

試験を、組織培養物中で単分子層の形で増殖するマウスB-16黒色腫の連続細胞培養物において実施した。比較調製物として選択した -インターフェロンは、濃度 70 IU/mlで投与した。

試験化合物は、原液(1,000 μ M)中に移し、0.22 μ m孔径を有するフィルターにより滅菌し、次いで100 μ M濃度に希釈した。

細胞に対する各化合物の効果を、細胞増殖初期速度(IRCP)に基づき評価した。この指数は、“試験”(調製物を含む)皿および“対照”(調製物を含まない)皿中での作用後の最初の数日間の微小コロニー中の細胞数を計数し、各皿内に50個のコロニーを分析することによって測定する。

【0035】

20

コロニーの増殖速度(%での)は、下記の式に従い算出した：

(試験皿内の細胞数/コロニー(平均値) - 1)/(対照皿内の細胞数/コロニー - 1) × 100%

微小コロニー中の細胞数の算出は、“点”毎に行った。毒性は、“試験”皿および“対照”皿内の増殖コロニー数間の比によって決定したB-16黒色腫細胞生存度により判断した。試験結果を下記の表7に示す。

30

40

【0036】

【表7】

表7

マウスB-16黒色腫細胞増殖活性に対する濃度 100 μ Mの各ペ
プチド誘導体と濃度 70 IU/mlの α -インターフェロンの効果

化合物	各調製物との接触後の時間における細胞増殖の初期割合(対照に対する%細胞/コロニー)	
	48 時間	72 時間
対照	2.52=100%	3.49=100%
インターフェロン	29.6 \pm 2.3	27.4 \pm 2.1
ジカルバミン	30.8 \pm 2.8	28.2 \pm 2.2
1	26.6 \pm 2.7	26.6 \pm 2.8
2	25.5 \pm 1.9	25.5 \pm 1.7
3	35.6 \pm 2.9	35.6 \pm 2.9
4	38.3 \pm 3.5	38.3 \pm 3.5
5	32.4 \pm 2.6	32.4 \pm 2.3
6	29.3 \pm 2.4	29.3 \pm 2.2
7	38.8 \pm 2.7	38.8 \pm 2.8
8	21.4 \pm 1.5	16.9 \pm 0.9
9	27.1 \pm 1.7	17.2 \pm 1.3
10	35.9 \pm 3.6	23.1 \pm 1.6
11	21.5 \pm 1.9	20.7 \pm 1.8
12	28.7 \pm 2.1	20.3 \pm 1.9
13	44.9 \pm 4.0	18.9 \pm 1.4
14	33.8 \pm 3.5	19.9 \pm 1.8
15	39.7 \pm 2.5	29.8 \pm 2.3
16	41.3 \pm 4.0	28.9 \pm 2.5
17	39.7 \pm 2.1	26.6 \pm 2.1
18	42 \pm 3	39 \pm 3
19	21 \pm 1	41 \pm 5
20	44 \pm 3	42 \pm 4
21	42 \pm 4	28 \pm 2

対照との差は有意である($p < 0.01$)。

【0037】

表7に示したデータは、各ペプチド誘導体が、分化誘発剤の特徴である50.0~70.0%のレベルでB-16黒色腫細胞コロニー増殖を抑制していることを示している。

【実施例6】

【0038】

ジカルバミン投与後の種々の時間での細胞サイクル期による腫瘍細胞の分布

試験は、接種B-16黒色腫において実施した。腫瘍細胞の分布に対するジカルバミンの効果を、調製物投与後の種々の時間でのDNA含有量に基づき試験した。腫瘍接種後の6日目から、マウスに、0.5 mg/kgのジカルバミンを胃内に10日間毎日投与した。各動物を、摂取後10日目、12日目、16日目および18日目、即ち、ジカルバミン投与後のそれぞれ5日目お

10

20

30

40

50

より7日目、並びにジカルバミン10日間投与終了後の2日目および4日目で、その後の腫瘍材料の試験のため殺処分した。

試験結果は、ジカルバミンが間期腫瘍細胞($G1$)割合の有意の増大(約25%)を生じさせていたことを示している。増殖性細胞の一定割合(約30%)においては、 $G2$ 細胞割合の増大(12~14%)が認められる。従って、サンプル中の正常なストローマ細胞($G0$)の割合は、補整的に減少する。これらの変化は、ジカルバミンの5~10日投与後に最も明確に顕著である。

【0039】

ジカルバミンのクール投与は、腫瘍細胞集団の動的再配列を生じさせる。合成サイクル期(S期)における細胞の抑制は、増殖状態にある細胞または増殖性細胞($G2$ 期)の割合の補整的減少を伴なって認められる。静止期($G0$)中の腫瘍細胞の蓄積は、同時に生ずる。10

増殖活性レベルを低下させることにより、ジカルバミンは、静止(非増殖)細胞サイクル期における細胞の蓄積を促進させる。ジカルバミンは、腫瘍増殖を遅延させ且つ細胞のより分化した状態への転移を促進させる。

【実施例7】

【0040】

シクロホスファミドおよびそのシスプラチニンおよびカルボプラチニンとの組合せの血液毒性に対するジカルバミンの効果

ジカルバミンのヘマトコレゲーティング(hematocorregating)作用を雄マウスハイブリッド F_1 ($GBA \times C_{57}BI$)の第1継代において試験した。20

7.1 4群の動物を使用してシクロホスファミド(CPH)の血液毒性に対するジカルバミンの効果を試験した：

群1：ジカルバミン 0.5 mg/kg、CPH投与前5日間に開始し投与量 200 mg/kgのCPH単回投与後の5日間、毎日；

群2：200 mg/kgのCPH単回投与；

群3：完全対照；

群4：ジカルバミン 0.5 mg/kg、10日間毎日。

得られたデータを表8に示す。

【0041】

【表8】

表8

シクロホスファミド作用およびシクロホスファミドとジカルバミンとの併用下での末梢マウス血液中の総白血球数

群	シクロホスファミド投与後の日数における総白血球数 (mm ³ 中での千単位)						
	3	5	7	10	13	17	21
1	2.80±0.22	7.96±1.10	13.38±1.54	11.88±1.92	13.30±1.48	12.40±1.76	12.90±2.60
2	1.06±0.44	4.38±0.77	10.50±3.02	6.44±0.60	12.20±3.02	12.20±1.80	11.86±1.32
3	16.50±8.20	16.10±3.20	14.80±3.30	15.80±1.90	14.90±2.70	16.90±4.70	14.70±2.80
4	15.70±4.30	15.30±7.80	17.30±5.10	15.70±3.80	12.50±3.52	17.80±4.70	16.30±3.90

【0042】

得られたデータは、CPHと組合せたジカルバミンの使用がCPHの血液毒性作用を軽減し、血液パラメーターの回復を速めていることを示している。

【0043】

7.2. CPHの白金誘導体との併用の血液毒性作用に対するジカルバミンの効果の試験においては、ジカルバミンをマウスに0.5 mg/kgの単回投与量で20日間毎日胃内投与した。細胞静止調製物は、ジカルバミン投与クール開始から5日目で1度に腹腔内投与した。細胞静止調製物の投与量は、表10および11に示している。40

CPOHをシスプラチニまたはカルボプラチニと併用投与したときのマウス末梢血液中の白血球数に対するジカルバミンの効果についての試験結果を、それぞれ、表9および10に示す。

【0044】

【表9】

表9

シスプラチニと併用したシクロホスファミドの血液毒性に対するジカルバミンの効果

細胞静止調製物	細胞静止調製物投与量 (mg/kg)	細胞静止調製物投与後日数における総白血球数(mm ³ 中での千単位)					死亡時間 (日数)
		0	3	5	7	21	
ジカルバミン CPH	200	11.30±	2.32±	6.60±	10.40±	12.30±	8 ; 16
	8	2.30	0.49	0.90	1.54	1.56	
CPH シスプラチニ	200	11.30±	1.20±	4.32±	6.24±	10.80±	3 ; 4 ; 7
	8	2.30	0.33	0.77	1.15	1.02	
ジカルバミン CPH	100	11.30±	4.14±	11.40±	14.90±	11.80±	無
	4	2.30	0.60	1.10	1.32	1.32	
CPH シスプラチニ	100	11.3±	2.65±	4.74±	8.05±	12.0±	無
	4	2.3	0.66	0.66	0.88	1.4	
ジカルバミン CPH	50	11.30±	6.70±	17.00±	14.50±	12.40±	無
	2	2.30	1.15	5.17	2.00	0.99	
CPH シスプラチニ	50	11.30±	4.04±	7.62±	8.72±	13.10±	無
	2	2.30	0.77	0.99	1.15	1.54	

【0045】

提示したデータは、最大投与量の細胞静止調製物をジカルバミンと一緒に受けたマウス群において、5日目で既に、白血球数は生理学的基準の下限に達しており、7日目で、白血球数は初期レベルまで実際に回復していたことを示している。ジカルバミン無しでは、再生は、試験の21日目でのみ観察された。ジカルバミン無しの最大投与量の細胞静止調製物を受けたマウスにおいては、動物の死亡が、試験の3日目、4日目および7日目で認められた。ジカルバミンと一緒に最大投与量の細胞静止調製物を受けたマウスにおいては、8日目および16日目での遅れた死亡のみが認められた。

【0046】

【表10】

表10
カルボプラチンと併用したシクロホスファミドの血液毒性に対するジカルバミンの効果

細胞静止調製物	細胞静止調製物投与量	細胞静止調製物投与後日数における総白血球数(mm^3 中での千単位)					死亡日数(日数)
		0	3	5	7	21	
ジカルバミン CPH カルボプラチン	200	11.50±	3.10±	12.80±	15.30±	12.30±	10
	30	2.80	0.70	1.37	1.26	0.89	
CPH カルボプラチン	200	11.30±	1.18±	4.60±	7.54±	12.60±	3
	30	2.30	0.49	0.60	0.77	1.28	
ジカルバミン CPH カルボプラチン	100	11.50±	4.04±	10.40±	14.80±	11.80±	無
	15	2.80	0.44	1.59	1.76	1.34	
CPH カルボプラチン	100	11.30±	2.74±	6.48±	10.50±	13.20±	無
	15	2.30	0.49	0.60	1.38	1.50	
ジカルバミン CPH カルボプラチン	50	11.30±	6.60±	10.90±	11.20±	10.90±	無
	7.5	2.30	0.77	1.21	1.20	1.28	
CPH カルボプラチン	50	11.50±	3.94±	8.72±	10.80±	11.20±	無
	2	2.80	1.04	1.98	2.40	0.99	

【0047】

提示したデータ(表10)は、致死的投与量のカルボプラチンとシクロホスファンと一緒にジカルバミンを使用した場合、末梢血液中の白血球数および動物死亡時間は、表9に提示したデータと同様であることを示している。

即ち、ジカルバミンは、すべての試験クールにおいて白血球減少症の発症を抑制し、総白血球数の回復を速めており、致死的投与量で細胞静止調製物を使用したときのマウス死亡時間を遅延させている。

【0048】

7.3. CPHのカルボプラチンとの併用の血液毒性作用に対する一般式(I)の各ペプチド誘導体の効果の試験においては、各化合物をマウスに0.5 mg/kgの投与量で10日間毎日胃内投与した。各試験化合物の投与開始後の5日目において、マウスに、投与量 200 mg/kgのCPHおよび単回投与量5 mg/kgのカルボプラチンを腹腔内注射した。その後、各試験化合物の投与をさらに5日間以上続行した。

試験化合物の投与を開始する前に、血液をマウスの尻尾から採取して総白血球数を算出した。シクロホスファミドとカルボプラチンの投与後の3日目、5日目および7日目においても、血液をマウスの尻尾から採取して総白血球数を算出した。各群は、15匹の動物を含んでいた。

対照としては、細胞静止調製物のみを受けたマウス群を使用した。

表11に提示したデータは、一般式(I)のペプチド誘導体が白血球減少症の発症を抑制

10

20

30

40

50

し、総白血球数の回復を速めていることを示している。

【0049】

【表11】

表11

カルボプラチント併用したシクロホスファミドの血
液毒性作用に対する一般式(I)のペプチド誘導体の効果

化合物番号	細胞静止調製物投与後日数での末梢血中の総白血球数(mm^3 中での千単位)			
	0	3	5	7
1	13.3±3.5	3.3±1.0*	10.0±1.3*	11.6±2.5*
2	13.8±3.5	3.18±0.82*	9.1±0.5*	11.9±2.5*
3	15.5±3.2	4.18±2.0	19.2±1.9	17.5±1.7*
4	15.8±2.7	3.02±0.83	9.62±3.84	16.1±0.15
5	12.1±1.4	2.1±1.04	10.5±2.08	15.26±1.23
6	14.2±1.1	3.04±1.61	14.56±2.65	25.68±3.1*
7	13.7±1.1	3.14±0.62	13.7±0.57	16.58±2.9
8	12.9±2.5	3.98±0.78	10.8±0.57	16.16±0.85
9	13.2±3.0	5.04±0.20*	8.64±1.97	19.38±1.8
10	12.9±1.9	5.18±1.97*	19.76±3.22*	21.82±3.74*
11	14.8±2.3	3.32±1.3	10.28±1.35	17.56±2.6
12	12.8±0.8	3.56±0.12	20.66±3.7*	17.4±2.8
13	14.9±0.6	2.66±0.21	25.7±4.1*	32.1±4.87*
14	13.8±0.5	2.66±0.23	16.24±2.3	28.9±3.65*
15	12.7±0.7	3.76±0.14	26.4±5.8*	27.6±4.12*
16	12.6±0.6	3.9±0.23	15.44±1.3	24.9±4.31*
17	13.4±0.8	3.36±0.27	17.6±3.1	26.1±3.97*
CPH+C	16.1±3.5	1.14±0.55	4.31±1.3	8.3±0.58

* $p \leq 0.05$ での有意差

【0050】

7.4. 細胞分化に対するジカルバミンの効果は、シクロホスファミド単独投与と比較したジカルバミンと併用したシクロホスファミド作用下でのマウス末梢血液差数の試験によって裏付けされている。

2群のマウスを使用する。群1は、投与量 0.5 mg/kgのジカルバミンを、投与量 200 mg/kgのCPH投与前5日間および投与後5日間投与する。群2のマウスは、投与量 200 mg/kgのCPHを単独投与する。試験の結果を下記の表12および13に示す。

【0051】

【表1-2】

ジカルバミンとの併用でのシクロホスファミド作用下のマウス末梢血生成物の動力学

生成因子	群1					
	シクロホスファミド投与後日数					
	3	5	7	10	13	17
骨髓球	0	0	0.4/54±0.4	0	0	0
幼若	0	0	1.4/188±148	0.4/48±3	0	0
帯状	3.2/89±16	4.6/370±13	4.8/660±223	5.7/620±260	2.2/293±146	1.6/198±150
セグメント化	10.4/290±210	17.6/1400±31	14/4200±960	27/3200±450	24/3190±440	19.6/2430±545
好酸球	1.2/34±15	1.2/95.5±44	0	0	1.2/290±73	2.6/322±93
単球	6.2/172±62	7.2/570±17	5.4/724±74	5.2/690±130	4.6/612±219	5.4/60±150
リンパ球	75.6/2120±310	69.4/5520±56.2/753	0±1250	65.4/7780±450	67.8/9017±580	70.8/8780±545
群2						
骨髓球	0	0.6/26±5	0	0	0	0
幼若	0.4/4±1	1.6/70±24	0.6/63±12	0.4/26±5	0	0
帯状	1.2/13±3	4.2/184±48	3.6/378±41	3.2/206±71	2.2/2681±34	1.6/195±67
セグメント化	5.2/55±0.6	16/700±240	35.2/3700±705	23.7/1494±390	18.2/2220±470	20.2/2460±37
好酸球	0.4/4±1	0.4/17±5	0	1.0/64±35	1.4/170±134	1.4/170±79
単球	4.6/49±17.5	6.4/280±48	4.8/504±115	5.4/350±160	3.8/464±134	4.4/537±134
リンパ球	88.2/935±23	71/3110±217	55.8/6860±750	65.8/4240±708	75.0/9150±402	71.6/8740±604

表は、mm³での%絶対量を示す。

【0052】

50

10

20

30

【表13】

シクロホスファミドおよびジカルバミンとの併用でのシクロホスファミドの作用下でのマウス骨髄の細胞質

群番号	シクロホスファミド投与後日数					
	3	5	7	10	13	17
1	14.5±3.43	21.55±1.92	32.35±3.57	33.8±3.85	32.6±5.22	28.25±3.02
2	8.2±1.65	13.05±2.75	25.22±2.75	27.9±2.75	30.15±6.6	25.0±3.16

* 百万単位での細胞数

【0053】

表12および13に示したデータは、末梢血液の回復が、ジカルバミンの分化作用を確証する成熟形の破壊に基づき生じていることを示している。この回復は、末梢血液数およ

10

20

30

40

50

び骨髄の細胞質により、3日目および5日目において特に見られる(表12および13)。ジカルバミンによる群においては骨髄球および帯状好中球は末梢血液中に存在せず、ジカルバミン無しの群においてはこれらの形状因子は存在する(表12)。

【実施例8】

【0054】

ペプチド誘導体によって影響を受けるような、マウス中の皮下接種フレンド赤芽球症(FEB)の速度および寸法の低減

試験は、各々10匹のマウスを含む群に分けた雄マウスハイブリッド100 BDF₁において実施した。直系DBA₂マウスを使用してFEBを生体内で継代させた。

フレンド(Friend)赤芽球症株は、RAMSのN.N. Blokhinの改名したGU RCRCの腫瘍株バンクから入手し、皮下接種における継代3~8を使用して、腹腔内で2回継代させた。接種は、0.3 mlの1999培地中の 1×10^6 量の細胞懸濁液を使用して実施した。 10

試験化合物の溶液を、マウスに、腫瘍接種後の3日目から7日目までプローブを使用して毎日腹腔内投与した。

治療有効性は、腫瘍増殖抑制(TGI、%)および平均寿命期間(ALS)に基づき評価した。寿命期間の増大は、試験群と対照群間のALSの比として算出する一般に受け入れられている基準T/C(%)により確認した。腫瘍増殖速度 V_t/V_1 を平均腫瘍容積の変化動力学に基づき算出した。

腫瘍サイズおよび腫瘍増殖速度に対するペプチド誘導体の効果についての試験データを、それぞれ、下記の表14および15に示す。 20

30

30

30

40

【0055】

50

【表14】

表14

フレンド赤芽球症を有するマウスにおける腫瘍サイズに対するペプチド誘導体の効果

化合物	5日間毎日投与における単回投与量 (mg/kg)	治療終了後の日数における平均腫瘍容積			腫瘍増殖抑制 (%)
		8	13	19	
対照	-	342[139÷545]	706[457÷961]	777[199÷1355]	
1	1.5	157[73÷241]	284[197÷371]	318[136÷500]	54 60*
2	1.5	130[68÷192]	367[105÷629]	367[105÷629]	62 48 57
対照**	-	249[150÷348]	678[373÷983]	645[385÷905]	- - -
3	1.5**	77[52÷102]	219[104÷334]	368[193÷543]	69* 68* 43
ジカルバミン	1.5	96[37÷155]	150[87÷213]	290[103÷477]	61 78* 55
	4.5**	129[67÷191]	300[130÷470]	485[1354÷835]	62 58 38

* 対照との差は、p<0.05で有意である。

** 2回目試験

【0056】

【表15】

表1.5

フレンド赤芽球症を有するマウスにおける腫瘍増殖率に対するペプチド誘導体の効果

化合物	5日間毎日投与における単回投与量 (mg/kg)	毎日のジカルバミン取込みと一緒の腫瘍接種後の日数における腫瘍増殖抑制		
		相対腫瘍容積 Vt/V1	日数	%
対照	-	8	13	19
1	1.5	1.0	2.0	2.3
2	1.5	1.0	1.8	2.0
対照***	1.5	1.0	2.8	2.8
3	1.5***	1.0	2.72	2.59
ジカルバミン	1.5	1.0	4.78	69**
	4.5***	1.0	1.56	3.0
				61
				78**
				55
				55
				38
				38

注記: * p < 0.05

** 2回目試験

【0057】

得られた結果は、ペプチド誘導体が皮下接種FEBの増殖抑制を治療終了後19日間生じさ

せていることを示している。この効果は、単回投与量 5 mg/kg での化合物の投与終了後直ぐに記録し始め、13日目まで有意のレベル($p < 0.05$)で保持されていた。腫瘍増殖速度は、化合物の撤退後の1週間安定化に至った。

実施した試験から、一般式(I)の化合物はFEB皮膚結節の発症に対して抑制効果を有するという結果を確立した。得られたデータにより、試験化合物はヒト血芽球症の治療において有用であるとみなし得る。

【実施例9】

【0058】

フレンド赤芽球症腫瘍細胞に対するジカルバミンおよび2'-インターフェロン(Reaferon)の効果

10

脾臓細胞を介してDBA₂雌マウスに皮下接種したフレンド赤芽球症を試験した。

4群の試験を実施した。

群1：治療無しの対照動物、生理食塩水を投与した。

群2：投与量 100000 IU/kgのリアフェロン(Reaferon)を接種後3日目から7日目まで毎日皮下投与した。

群3：単回投与量 4.5 mg/kgのジカルバミンを接種後3日目から7日目まで毎日経口投与した。

群4：ジカルバミンとリアフェロンを同様な処方により同時投与した。

光学顕微鏡用の材料を、治療または生理食塩水投与終了後の3日目、7日目および14日目で、殺処分したマウスにおいて採取し、電子顕微鏡用の材料を7日目および14日目で採取した。

20

【0059】

組織学検査においては、腫瘍片を10%中性ホルマリン中で固定し、パラフィン中に埋め込む；得られたスライスをヘマトキシリン-エオシンで染色し、定期的に酸シッフ反応を使用してのグリコ-ゲン(多糖類)含有量について、プラチエット(Brachet)によるRNA含有量について、さらに脂質および鉄について試験した。スライスは、Polivar光学顕微鏡(オーストリア)で検視し写真撮影した。

電子顕微鏡測定においては、腫瘍片を2.5%グルタルアルデヒド溶液および1%オスミウムニアドリオキサイド(osmium quadrioxide)中で固定し、EPON-812中に埋め込んだ。半厚および超厚スライスをLKB-111ウルトラトーム(スウェーデン)上で作成した。得られた半厚スライスをトルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で検視した。超厚スライスを酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛でさらに染色し、スライスをJEOL 1200EX-II電子顕微鏡(日本)で検視し写真撮影した。

30

種々のタイプの分化(芽細胞、リンパ球および顆粒球)を含む細胞の割合を電子顕微鏡測定中に定量評価において算出した。

有糸分裂およびアポトーシスを含む細胞並びに壊死領域の割合を組織学検査中に評価した。

【0060】

組織学検査

群1：治療無しの対照動物

40

組織学検査において、腫瘍細胞は大きくて多形性であり、細胞核は軽量であり、細胞質は中程度に発生していることが判明した。細胞サイズは時折変動しており、個々の小さめの細胞は数えられるが、大細胞が細胞の主要塊を代表していた。

腫瘍細胞は、連続するアウトグロースを形成する。個々の腫瘍においては、腫瘍細胞の保存領域を取巻く壊死部位が数えられる。壊死領域は、スライス表面の10~15%を越えてなかつた。

大多数の腫瘍細胞においては、RNAに対するプラチエット反応は強力に顕著であり、反応が弱いかまたは存在しない場合は少なかつた(個々の小細胞において)。

定期的酸シッフ反応は特徴を拡散しており、鉄に対する反応は個々の細胞中においてのみ陽性であった。

50

大細胞の中の腫瘍においては、有糸分裂(1~1.5%まで)およびアポトーシス兆候を有する細胞(0.5%まで)が数えられた。

腫瘍が増殖するにつれて、壊死領域はスライス表面の20~30%までに増大しており、有糸分裂数は増大し(1.5~2%まで)、アポトーシス活性は変化しなかった。大きい多形性細胞の数が、すべての時間において有意に支配していた。

【0061】

群II：リアフェロンの投与

腫瘍は通常の組織学的構造を有する。対照におけるように、多形性細胞のうちでは、高色素核を有する小さめの細胞が見出された。

14日目までに壊死領域はスライス表面の40~50%であり、有糸分裂活性は0.5~1%であり、7日目までにアポトーシスは1~2%まで増大していたが、14日目までにアポトーシスは1~1.5%に低下していた。

【0062】

群III：ジカルバミンの投与

高色素核を有する小腫瘍細胞量の増大が観察されている。多形性細胞量は有意に広がっている。壊死領域は、群Iの画像と比較したとき、有意には変化してなかった。有糸分裂活性も、対照画像の限界内のままであった。3日目および7日目において、アポトーシスの割合は、僅かに低下していた(7日目で0.1~0.5%に低下)。

【0063】

群IV：ジカルバミンとリアフェロンの同時投与

20

壊死領域および有糸分裂活性は、群IIにおける変化と比較したとき、有意の変化を示してなかった。3日目でアポトーシスは0.2~0.5%に低下し、7日目および17日目でアポトーシスは0.5%であった(対照におけるように)。

芽球タイプの多形性細胞が、腫瘍内を有意に支配している。

【0064】

電子顕微鏡測定

群I：治療無しの対照動物

芽球タイプの多形性低分化細胞が、電子顕微鏡測定中に腫瘍内で見出されている。これら細胞内の核は、不均一な表面を時折有する丸型または僅かに不規則な形状を有している。クロマチンの拡散した分布が細胞内で通常見受けられ、これらの細胞の若干数のみに、端部に位置するヘテロクロマチンの形成が認められる。核は細胞質の主要部分を占めており、複数のリボソーム、1個のミトコンドリア、時折の僅かに粗い小胞体構造体が支配している。芽球細胞は、すべての腫瘍集団の90~95%に達する。

30

芽球細胞以外に、種々の成熟度のリンパ球、即ち、リンパ芽球、リンパ球(大、中、小)も数えられる。これら細胞内の核は、多くの場合不均一な表面を有する丸型、卵型であり、大蓄積体形のヘマトクロマチンを含み、核小体が数えられる。細胞質は中程度に発生しており、1群のリボソームを含み；僅かな他のオルガネラ類が存在し、濃密な顆粒体が時折数えられる。

【0065】

顆粒球は好中球の特徴を有する小顆粒体であり、多くはないが好酸球が細胞質中で目視し得る。細胞内の核は、セグメント化されており、深い窪みを有する。細胞質内の顆粒体、不規則な核および突起形状の突出原形質膜を有する細胞が時折観察され得る(単球)。遊離状態で存在する赤血球が腫瘍内で数えられた。

40

大芽球細胞が腫瘍内を主として支配している(90~95%まで)。リンパ球は4~8%の範囲で数えられ、顆粒球は1~2%である。

種々の細胞タイプ間の比における有意の変化は、腫瘍が埋め込み後の増殖するときには認められなかった。

【0066】

群II：リアフェロンの投与

種々のタイプの一般的な腫瘍細胞超微細構造は保持されている。

50

大芽細胞の量は低下しておらず、リンパ球系細胞は4~8%を占め、顆粒球は1~2%を占めている。個々の赤血球が腫瘍内に存在している。

群III：ジカルバミンの投与

種々のタイプの腫瘍細胞超微細構造は前のままである。それらの量的比は変化しており、分化レベルは幾分上昇している。大芽球タイプの細胞量は70~80%に低下しており、リンパ球および顆粒球の量は、それぞれ、18~25%および2~5%まで増大している。個々の赤血球が腫瘍内に存在している。

【0067】

群IV：ジカルバミンとリアフェロンの同時投与

種々のタイプの腫瘍細胞超微細構造は、上述したことに實際上相応している(群I参照)

10

。 大芽球タイプの細胞の量は、70~80%の範囲内で変動している。リンパ球の数は18~25%に達し、白血球の量は2~5%のレベルのままである。他の細胞の中に存在する赤血球が数えられる。

【0068】

上記の各群におけるように、判明した変化は、7日目において最も顕著である。

即ち、フレンド赤芽球症マウスに投与量 4.5 mg/kgで5日間毎日経口投与したジカルバミンにより、未成熟腫瘍細胞の分化を、主として顆粒球および赤血球系の細胞を形成する方向で生じさせることを確立した。

対照動物の腫瘍と比較したとき、ジカルバミンを使用した場合、未成熟腫瘍細胞の量は 90~95%から70~80%へ、即ち、15~20%低下しており、リンパ球の量は4~8%から18~25%までに、即ち、4倍増大していた。

20

顆粒球系細胞の量は、あまり有意には増大していなかった(1~2%から約2~5%へ)。

最も頻繁な変化は、治療終了後の7日目において見出されることに留意すべきである。治療終了後14日目では、これらの変化は安定化されていた。

【0069】

投与量 100000 IU/kgでの5日間皮下投与のリアフェロンは、腫瘍内の壊死領域の増大を生じていた(対照における15~20%から治療終了後7日目での試験における40~50%へ、さらに14日における20~30%から40~50%へ)。有糸分裂の割合は幾分低下しており(1.5~2%から0.5~1%へ)、アポトーシス兆候を有する細胞の量は増大していた(0.5%から治療終了後7日目での1~2%へ)。腫瘍細胞の分化は、實際上変化してなかった。

30

同じ投与量および同じ時間でのジカルバミンとリアフェロンの同時投与においては、各調製物の効果の総和が見出された。ジカルバミン単独の効果の特徴である芽球未成熟細胞の分化促進が観察され、同時に、リアフェロン単独投与において観察された壊死領域の増殖および有糸分裂数の減少が見出された。

即ち、ジカルバミンはフレンド赤芽球症の未成熟腫瘍造血細胞の分化を異なった方向へ、とりわけリンパ球および骨髄球系腫瘍細胞の形成を伴なって増強し得ることを確立した。細胞分化に対するジカルバミンの効果は、黒色腫試験の実施例において先に観察された効果と同様に、その一般的特性を代表している。

【実施例10】

40

【0070】

化学療法中の卵巣癌患者における骨髄および末梢血の造血細胞に対するジカルバミン保護作用の電子顕微鏡測定

骨髄に対するジカルバミンの作用機序の研究に関する前述の試験において、一定の調製物は、正常な造血細胞中のアポトーシスを減少させることにより、シクロホスファミドの有害細胞毒作用に対して動物の骨髄を試験条件下において保護することが判明した。

同様なデータが、第III~IV期卵巣癌の10名の患者の骨髄穿孔バイオプシー検体および末梢血において得られた。

各患者を2つの等しい群、即ち、群1(化学療法のみを受けた患者)および群2(ジカルバミン投与と一緒に化学療法を受けた患者)に分けた。

50

群Iおよび群IIの各患者は、治療第1日目に、 600 mg/m^2 のシクロホスファンと 400 mg/m^2 のカルボプラチニンを受けた；各クールは3~4週間間隔で繰返された。1名の患者の平均化学療法クール数は、ジカルバミン無しで6クール、ジカルバミン有りで5.7クールであった。

群IIにおいては、各患者は、最初のクール前の5日間に始まりその後同じ投与量の次のクール開始までの単回投与量 100 mg でのジカルバミン投与と一緒に化学療法を受けた。2つのクール間のジカルバミン使用期間は、平均24.5日であった。平均総投与量は2.5グラムであった。

【0071】

電子顕微鏡測定用の骨髄の穿孔バイオプシー検体および末梢血は、化学療法開始前およびジカルバミン有りまたはジカルバミン無しの治療クール終了時に採取した。

10

新鮮骨髄穿孔バイオプシー検体をスライドプレート上に置き、小濃密フラグメントが得られるまで攪拌棒により多数回攪拌した。得られたフラグメントを2.5%グルタルアルデヒド溶液中で固定し、さらに1%オスミウムニアドリオキサイド溶液中で固定した；pH 7.4のリン酸塩緩衝液で洗浄した後、フラグメントを増分濃度のアルコール中で脱水し、エポキシ樹脂EPON-812混合物中に埋め込んだ。半厚および超厚スライスをLKB-IIIウルトラトーム(スウェーデン)上で作成した。半厚スライスはメチレンまたはトルイジンブルーで染色し、超厚スライスは、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で対照させた。

ヘパリンを含む末梢血を3,000 rpmで1時間遠心処理した。次いで、2.5%のグルタルアルデヒド溶液を形成されたフィルムの表面上に10~15分間注ぎ、フィルムを取り出し、その後、処理を上述のようにして進めた。

20

薄いスライスを光学顕微鏡Polivar(オーストリア)で観察し、半薄スライスを電子顕微鏡JEOL-1200-CX-11(日本)で観察した。

【0072】

1. 化学療法およびジカルバミン投与開始前の対照試験

群IおよびIIの患者

異なる成熟度と分化方向の造血細胞が骨髄の穿孔バイオプシー検体において見出され、細胞の1部は空胞化およびジストロフィーの兆候を伴なっている。

主としてリボソームを含む狭い細胞質周辺部を有する大サイズの芽球未分化細胞が存在する。これらの細胞においては、拡散クロマチンおよび個々の核小体を含む丸型~卵型形状の核が細胞質の主要部分を占めている。

30

細胞の1部は、種々のタイプの白血球の顆粒球系の方向および分化度で分化している。

丸型または卵形核を含む前骨髄球および骨髄球、細胞質中に異なる量の特定の顆粒体を含む拡散クロマチンが見受けられる。赤血球およびより成熟した顆粒球は、多くの場合、これらの細胞の周りに位置している。

より分化した顆粒球、即ち、帯状好中球およびセグメント化好中球の蓄積が、多くの場合見受けられる。好中球、好酸球および好塩基球の特徴を有する樹種のタイプの特定の顆粒体がこれらの細胞質中に存在する。

種々の分化度のリンパ球系細胞(小、中、大リンパ芽球)は、顆粒球の間に位置している。

40

多くの場合種々の形状を有する多数の成熟赤血球並びに核を含む正赤芽球および血小板が数えられる。

【0073】

2. シクロホスファンおよびカルボプラチニンによる化学療法後の骨髄(群I)

種々のタイプの保持造血細胞(顆粒球、リンパ球、正赤血球、赤血球、血小板)において、ジストロフィーの兆候および低度の成熟が、化学療法クール後に採取した骨髄穿孔バイオプシー検体において数えられる。

芽球細胞においては、細胞質は、リボソームを含有しており、多くの場合空胞化されている。核は、拡散クロマチンおよび時折不規則形状のヘテロクロマチンの集積を伴ない且つ内側に引込んだ部位を有して大である。

50

前骨髓球および骨髓球中の特定の顆粒体の量は有意ではなく、細胞質は多くの場合顕著なジストロフィー変化を有する。

帯状およびセグメント化タイプの保持顆粒球においては、ジストロフィー変化および有意でない量の特定の顆粒体も観察される。これらの顆粒体多くの場合ジストロフィー変化を受け、空胞化されている。

保持正赤芽球は、突起および細胞質の突出部を有する不規則形状を多くの場合有する。

穿孔骨髓バイオプシー検体、とりわけ顆粒球細胞においては、アポトーシス兆候を有する細胞が数えられたことに留意すべきである。そのような細胞においては、ヘテロクロマチンの辺縁化(margination)、核および細胞質のフラグメント化の兆候並びにアポトーシス体の形成が認められた。

10

【0074】

3. ジカルバミン投与と一緒にシクロホスファンおよびカルボプラチンによる化学療法後の骨髓(群II)

ジカルバミン投与と一緒に化学療法を受けた患者の穿孔骨髓バイオプシー検体においては、種々の度合とタイプの分化の造血細胞(顆粒球、リンパ球、血小板、正赤芽球)が数えられる。

芽球タイプの細胞は大きく、これら細胞は拡散クロマチンおよび個々の核小体を有する丸型の核を含有し、それらの細胞質は狭く、その中に、リボソーム、個々のミトコンドリアおよび時折の单一1次濃密顆粒体が見受けられる。

拡散または凝縮クロマチンを含む丸型または卵型核を含む多数の前骨髓球および骨髓球が存在し；それらの細胞質は、1次顆粒体(暗色)およびあまり成熟していない顆粒体(より成熟)双方のむしろ多量の特定の顆粒体を含む。

20

帯状およびセグメント化白血球も頻繁に数えられる。これら白血球は、くぼんだ(豆様)またはセグメント化核、細胞質内の豊富な主として好中球タイプの特定の顆粒体、晶質構造を有するあまり多くはない好酸球タイプを有する。

種々の分化度の白血球は、細胞質内に、ミトコンドリア、粗い小胞体の構造体、時折の单一顆粒体形状の单一内包体を含む。

顆粒球タイプの細胞、リンパ球は、多くの場合、コンパクトな蓄積体を形成している。

赤血球と一緒に、種々の分化度と比較的普通の形状を有する正赤芽球が数えられる。

アポトーシス兆候を有する細胞は、稀に数えられる。

30

骨髓因子について先に説明した同じ組成の規則性は、末梢血の造血細胞の試験において見出された。

【0075】

卵巣癌患者において併用化学療法(シクロホスファミド + カルボプラチン)の前後およびジカルバミン投与と一緒に該化学療法中に実施した骨髓および末梢血造血細胞の比較電子顕微鏡測定により、使用した調製物の細胞毒作用からのその保護効果の機序を確立し得た。

上記試験は、本研究において使用した化学療法調製物が顆粒球系、リンパ球系および赤血球系の種々のタイプの造血細胞に対して顕著な細胞毒作用を奏することを示していた。

この細胞毒作用は、細胞質内のジストロフィー変化および骨髓細胞(および末梢血それぞれ)中で発生する特定の顆粒体の死滅の形で発現する。

40

上記の障害は、分化の、即ち、芽球細胞、前骨髓球、骨髓球、リンパ芽球形成の早期段階において、とりわけ顆粒球により低い度合でリンパ球系細胞に関連し、さらにまた、上記障害は、赤血球系にも同様に関連し、分化した機能的に有効な形の造血細胞の不十分な蓄積をもたらす。

さらに、顆粒球系の因子において判明したように、遺伝子的にプログラムされた細胞死、即ち、アポトーシスは促進されている。

ジストロフィー変化およびアポトーシスは、一般に、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症および他の造血状態の障害の発症をもたらし、且つ化学療法の能力を制約する。

50

実施した試験によれば、ジカルバミンにより、骨髓(および末梢血それぞれ)の造血細胞を使用した化学療法調製物の細胞毒作用から保護して幼若形の成熟細胞因子への分化を促進し且つアポトーシス事象を減少させるのを確立した。

ジカルバミンの判明した効果の結果として、化学療法中の患者の骨髓において、幼若(芽球)形の造血細胞の蓄積が生じ、とりわけ重要なことは、それらの機能的に有効な形への分化が促進される。

即ち、化学療法条件下においては、とりわけ顆粒球系細胞の骨髓造血細胞分化の刺激およびアポトーシス増殖の阻止が、ジカルバミンの保護作用の基礎となる機序である。

【実施例 11】

【0076】

卵巣癌における化学療法の血液毒性の軽減に対するジカルバミンの効果

ジカルバミンの効果を、以下の処方に従い77クールの化学療法を受けた13名の第III～IV期卵巣癌患者において試験した：400 mg/m²のカルボプラチニ静注点滴、1回 + 600 mg/m²のシクロホスファン静注点滴、1回；このクールを28日繰返した。ジカルバミンは、1回目のクール前の5日間から開始しその後3週間において、食後の経口による投与量 100 mgで毎日処方された。投与期間は26日であり、クール投与量は2600 mgであった。ジカルバミンは、2回目の化学療法クール前の5日間再度投与され、投与は21日間続けた。2回の化学療法クール中のジカルバミン取込みの合計期間は52日であった。

血液毒性(白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症)を、ジカルバミンと一緒に77クールの化学療法を受けた13名の患者において、ジカルバミン無しで25～27クールの化学療法を受けた7名の患者群(対照)と比較して評価した。

造血パラメーターを、実施した化学療法の前後において動的に多数回(対照)、さらに、試験群におけるジカルバミン投与の前後において動的に評価した。以下に、上述の処方に従い、ジカルバミン有りまたはジカルバミン無しで化学療法を受けた個々の患者における造血パラメーターを提示する。

【0077】

8.1. ジカルバミン無しで化学療法を受けた患者

51歳女性、診断：第III期卵巣癌；彼女は、次のような治療処方に従い、1回目の化学療法クールを受けた：600 mg/m²のシクロホスファンおよび400 mg/m²のカルボプラチニ、1回。

【0078】

【表16】

完全血液分析、1回目化学療法クール

パラメーター (測定単位)	1回目化学療法 クール開始前	1回目化学療法 クール後5日	1回目化学療法 クール後2週間	1回目化学療法 クール後3週間
白血球 (10 ⁹ /l)	4.5	3.8	2.2	2.0
好中球 (10 ⁹ /l)	2.9	2.4	0.9	0.8
血小板	168	160	154	150

2回目の治療クールは、好中球減少症のため7日間遅れた。

治療処方に従う2回目の化学療法クールは、次のとおりであった：600 mg/m²のシクロホスファン + 400 mg/m²のカルボプラチニ、ジカルバミン無しの1回。

【0079】

10

20

30

40

50

【表 17】

完全血液分析、2回目化学療法クール

パラメーター (測定単位)	2回目化学療法 クール開始前	2回目化学療法 クール後5日	2回目化学療法 クール後2週間	2回目化学療法 クール後3週間
白血球 ($10^9/l$)	3.5	3.3	2.0	2.1
好中球 ($10^9/l$)	2.2	2.0	0.8	0.9
血小板	178	170	154	150

3回目のクールは、好中球減少症のために遅れた。

【0080】

10

63歳女性、診断：第IV期卵巣癌、右鼠径リンパ腺転移、腹水症；彼女は、次のような治療処方に従い1回目の化学療法クールを受けた：600 mg/m²のシクロホスファン + 400 mg/m²のカルボプラチニン、ジカルバミン無しの1回。

【表 18】

完全血液分析、1回目化学療法クール

パラメーター (測定単位)	1回目化学療法 クール開始前	1回目化学療法 クール後5日	1回目化学療法 クール後2週間	1回目化学療法 クール後3週間
白血球 ($10^9/l$)	5.0	3.9	2.1	2.0
好中球 ($10^9/l$)	3.2	1.7	0.9	1.0
血小板	160	150	151	152

20

2回目の治療クールは、白血球および好中球減少症のため4日間遅れた。

治療処方に従って実施した2回目の化学療法クールは、次のとおりであった：600 mg/m²のシクロホスファン + 400 mg/m²のカルボプラチニン、ジカルバミン無しの1回。

【0081】

【表 19】

完全血液分析、2回目化学療法クール

パラメーター (測定単位)	2回目化学療法 クール開始前	2回目化学療法 クール後5日	2回目化学療法 クール後2週間	2回目化学療法 クール後3週間
白血球 ($10^9/l$)	3.7	2.9	2.0	2.2
好中球 ($10^9/l$)	2.2	1.8	0.9	0.9
血小板	166	160	140	155

30

3回目のクールは、好中球減少症のために遅れた。

【0082】

8.2. ジカルバミンと一緒に化学療法を受けた患者

51歳女性、診断：第III期卵巣癌；彼女は、次のような治療処方に従い、1回目の化学療法クールを受けた：治療1日目での600 mg/m²のシクロホスファンおよび400 mg/m²のカルボプラチニン。ジカルバミンは、1回目クール前の5日間から開始し次いで21日間、投与量 100 mgで毎日処方された。ジカルバミンによる治療期間は、2回目クール前26日間であった。

40

【表 2 0】

完全血液分析、ジカルバミンと一緒に1回目化学療法クール

パラメーター (測定単位)	ジカルバミン投 与開始前	1回目化学療法 クール開始前	ジカルバミン取 込み終了後	2回目化学療法 クール後
	“0”日目	5日目	21日目	33日目
白血球 ($10^9/l$)	5.9	5.5	4.7	4.0
好中球 ($10^9/l$)	4.2	4.0	3.3	2.9
血小板	170	164	160	158

【0083】

10

2回目化学療法クールは、次のような治療処方に従い適時実施した：1回目化学療法クール後28日目での $600 \text{ mg}/\text{m}^2$ のシクロホスファンおよび $400 \text{ mg}/\text{m}^2$ のカルボプラチニン、1回投与を、+ ジカルバミンで実施した。ジカルバミンは、2回目クール前の5日間その後21日間毎日の投与量 100 mgで投与した。ジカルバミン取込みの合計期間(2クールの化学療法)は、52日であった。

【表 2 1】

完全血液分析、2回目化学療法クール

パラメーター (測定単位)	ジカルバミン投 与開始前	2回目化学療法 クール開始前	ジカルバミン取 込み終了後	3回目化学療法 クール前
	1回目化学療法 後の28日目	33日目	54日目	61日目
白血球 ($10^9/l$)	4.9	5.0	4.2	4.2
好中球 ($10^9/l$)	3.2	3.3	3.1	3.0
血小板	180	170	160	160

3回目の化学療法クールは、適時実施された。

【0084】

20

75歳女性、診断：第III期卵巣癌、腹水症；彼女は、次のような治療処方に従い、ジカルバミンと一緒に化学療法を受けた：治療1日目での $600 \text{ mg}/\text{m}^2$ のシクロホスファンおよび $400 \text{ mg}/\text{m}^2$ のカルボプラチニン。ジカルバミンは、1回目クール前の5日間から開始しその後の21日間、投与量 100 mgで毎日処方された。ジカルバミンによる治療期間は、2回目クール前26日間であった。

30

【表 2 2】

完全血液分析、ジカルバミンと一緒に1回目化学療法クール

パラメーター (測定単位)	ジカルバミン投 与開始前	1回目化学療法 クール開始前	ジカルバミン取 込み終了後	2回目化学療法 クール前
	“0”日目	5日目	21日目	33日目
白血球 ($10^9/l$)	7.4	7.2	6.6	5.2
好中球 ($10^9/l$)	5.7	5.0	5.2	3.8
血小板	174	165	162	167

40

【0085】

2回目化学療法クールは、次のような治療処方に従い適時実施した：1回目化学療法クール後28日目での $600 \text{ mg}/\text{m}^2$ のシクロホスファンおよび $400 \text{ mg}/\text{m}^2$ のカルボプラチニン、1回投与を、+ ジカルバミンで実施した。ジカルバミンは、2回目クール前の5日間その後21日間毎日の投与量 100 mgで投与した。ジカルバミン取込みの合計期間(2クールの化学療法)は、52日であった。

【0086】

50

【表 2 3】

完全血液分析、2回目化学療法クール

パラメーター (測定単位)	ジカルバミン投 与開始前	2回目化学療法 クール開始前	ジカルバミン取 込み終了後	3回目化学療法 クール前
	1回目化学療法 後の28日目	33日目	54日目	61日目
白血球 ($10^9/l$)	7.8	8.2	7.6	7.2
好中球 ($10^9/l$)	5.2	6.0	6.2	5.8
血小板	165	160	162	157

10

3回目の化学療法クールは、適時実施された。

【0087】

65歳女性、診断：第IV期卵巣癌、腹水症、へそ領域への転移；彼女は、次のような治療処方に従い、ジカルバミンと一緒に化学療法を受けた：治療1日目での $600\text{ mg}/\text{m}^2$ のシクロホスファンおよび $400\text{ mg}/\text{m}^2$ のカルボプラチニン。ジカルバミンは、1回目クール前の5日間から開始しその後の21日間、投与量 100 mgで毎日処方された。ジカルバミンによる治療期間は、2回目クール前26日間であった。

【0088】

【表 2 4】

完全血液分析、ジカルバミンと一緒に1回目化学療法クール

20

パラメーター (測定単位)	ジカルバミン投 与開始前	1回目化学療法 クール開始前	ジカルバミン取 込み終了後	2回目化学療法 クール前
	“0”日目	5日目	21日目	33日目
白血球 ($10^9/l$)	6.6	5.9	5.5	5.0
好中球 ($10^9/l$)	5.0	4.2	4.4	3.4
血小板	170	172	166	164

2回目化学療法クールは、次のような治療処方に従い適時実施した：1回目化学療法クール後28日目での $600\text{ mg}/\text{m}^2$ のシクロホスファンおよび $400\text{ mg}/\text{m}^2$ のカルボプラチニン、1回投与を、+ ジカルバミンで実施した。ジカルバミンは、2回目クール前の5日間その後21日間毎日の投与量 100 mgで投与した。ジカルバミン取込みの合計期間(2クールの化学療法)は、52日であった。

【0089】

【表 2 5】

完全血液分析、2回目化学療法クール

30

パラメーター (測定単位)	ジカルバミン投 与開始前	2回目化学療法 クール開始前	ジカルバミン取 込み終了後	3回目化学療法 クール前
	1回目化学療法 後の28日目	33日目	54日目	61日目
白血球 ($10^9/l$)	5.6	5.8	5.7	5.5
好中球 ($10^9/l$)	3.0	3.2	3.4	3.2
血小板	170	170	176	165

40

3回目の化学療法クールは、適時実施された。

【0090】

8.3. 化学療法を受けた患者およびジカルバミンを受けたまたは受けなかつた患者における血液毒性についての比較データを表16および表17に示す。

【表26】

表16

ジカルバミン無しで化学療法を受けた血液毒性を示す患者数(%)

毒性のタイプ	化学療法 クール数	WHOに従う血液毒性度					
		0	I	II	III	IV	III+IV
白血球減少症	26	3 11.5%	5 19.2%	12 46.1%	5 19.2%	1 3.8%	6 28.07%
好中球減少症	26	7 26.9%	0	8 30.7%	6 23.07%	5 19.2%	11 42.3%
血小板減少症	25	10 40.0%	3 12.0%	7 28.0%	4 16.0%	1 4.0%	5 20.0%

【0091】

【表27】

表17

ジカルバミンと一緒に化学療法を受けた血液毒性を示す患者数(%)

毒性のタイプ	化学療法 クール数	WHOに従う血液毒性度					
		0	I	II	III	IV	III+IV
白血球減少症	77 100%	6 7.7%	18 23.3%	43 55.8%	10 12.9%	0	10 12.9%
好中球減少症	67 100%	21 31.3%	12 17.9%	23 34.3%	5 7.4%	6 8.9%	11 16.4%
血小板減少症	76 100%	27 35.5%	32 42.1%	10 13.1%	6 7.8%	1 1.3%	7 9.1%

【0092】

得られたデータは、ジカルバミンを使用しない場合、第III～IV期の血液毒性の抑制(表16)が、白血球減少症で23.0%以上、好中球減少症で42.3%および血小板減少症で20.0%の基準に達していることを示している。

ジカルバミンを受けた患者群においては、白血球減少症、好中球減少症および血小板減少症の発生率は有意に低かった(表17)。血液毒性は、白血球減少症基準では12.9%に、即ち、1.8倍、好中球減少症基準では2.6倍、血小板基準では2.2倍低下していた。即ち、ジカルバミンの使用は、提示した種類の血液毒性すべての軽減をもたらしていた。

【0093】

以下に、ジカルバミンの投与が細胞静止剤による治療有効性を低下させず、対照的に、達成される効果をある程度増強するという事実を裏付けるデータを提示する。

治療の有効性を、上述した処方に従うジカルバミンの有無による2通りの化学療法クール後の各群において評価した。有効性は、一般的に受け入れられているパラメーター、即ち、CR：完全寛解、PR：部分寛解、SB：安定化、およびProgr.：進行に従って評価した。

得られたデータを表18に示す。

【0094】

10

20

30

40

50

【表28】

表18
ジカルバミンと一緒にシクロホスファン +
カルボプラチナ処方による患者治療の有効性

患者群	患者の数	CR	PR	SB	Progr.
化学療法	6 100.0%	2 33.3%	1 16.6%	2 33.5%	1 16.6%
化学療法 + ジカルバ ミン	15 100.0%	4 26.6%	7 46.6%	2 13.5%	2 13.3%

【0095】

提示したデータは、ジカルバミン無しで化学療法を受けた患者群において、腫瘍増殖制御(CR + PR)が49.9%に達していることを示している。ジカルバミンと一緒に化学療法を受けた患者群においては、治療有効性は、73.2%である。

即ち、化学療法を受ける患者の治療におけるジカルバミンの使用は、治療の有効性を低下させることなく、主なタイプの血液毒性の軽減をもたらしている。

【0096】

上記で提示した試験および臨床データは、一般式(1)のペプチド誘導体の非特異性分化誘発剤としての有効性を明らかに証明しており、その有効性は、上記ペプチド誘導体を骨髓抑制化学療法と一緒に使用したとき、好中球減少症等の程度と数を低減させることによって示され、また、単独での使用においては、マウス血芽球症の増殖安定化、化学療法の有効性無い場合のようなマウスおよびヒト黒色腫の分化をもたらしている。

腫瘍増殖に対する一般式(1)のペプチド誘導体の効果は、腫瘍細胞の増殖活性の遅延並びに分化度合、とりわけ黒色腫細胞のメラニン合成能力の上昇およびフレンド赤芽球先駆体細胞の分化誘発に関連していることが明らかになった。

臨床試験は、一般式(1)のペプチド誘導体の特性が種々の処方の併用化学療法を使用する癌患者の治療において血液毒性を有意に低下させることを明らかにした。即ち、卵巣癌を患っている患者をペプチド誘導体と一緒に白金製剤(シクロホスファン)で治療したとき、好中球減少症および血小板減少症の抑制度合は、2~3倍低下していた。同時に、治療の有効性は、低下してなかった。

10

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 K 37/66
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 D	209/14	(2006.01)	C 0 7 D 209/14
C 0 7 D	209/20	(2006.01)	C 0 7 D 209/20
C 0 7 D	233/64	(2006.01)	C 0 7 D 233/64 1 0 5
C 0 7 D	403/12	(2006.01)	C 0 7 D 233/64 1 0 6
			C 0 7 D 403/12

- (72)発明者 ネボルシン ヴラディミール エフゲニエヴィッチ
ロシア 1 1 3 6 4 8 モスクワ セヴェルノエ チエルタノヴォ デー 4 コルプス 4 0 3
カーヴェー 2 4 9
- (72)発明者 ゴルブノヴァ ヴェラ アンドレーフナ
ロシア 1 0 3 0 4 5 モスクワ デーヴ ペル デー 3 カーヴェー 1 1
- (72)発明者 トレスチャリン イヴァン ドミトリエヴィッチ
ロシア 1 1 5 4 4 6 モスクワ ウリッサ アーカー ミリオンスチコヴァ デー 1 8 カー
ヴェー 3 9 4
- (72)発明者 ライクリン ナタン タンフェレヴィッチ
ロシア 1 1 5 5 2 2 モスクワ カシルスコエ ショッセ デー 2 8 コルプス 1 カーヴ
エー 2 1
- (72)発明者 ガリン アフグスト ミハイロヴィッチ
ロシア 1 1 5 5 2 2 モスクワ カシルスコエ ショッセ デー 2 8 コルプス 1 カーヴ
エー 5
- (72)発明者 ピッチコヴ マルク ポリソヴィッチ
ロシア 1 1 7 5 7 1 モスクワ ペーエル ヴェルナドスコゴ デー 1 1 9 カーヴェー 2
5
- (72)発明者 トレスチャリナ エレナ ミクハイロフナ
ロシア 1 1 5 4 4 6 ウリッサ アーカー ミリオンスチコヴァ デー 1 8 カーヴェー 3
9 4
- (72)発明者 ゼルテュキナ ガリナ アレクサンドロフナ
ロシア 1 2 9 3 4 4 モスクワ ウリッサ イスクリー デー 1 3 コルプス 1 カーヴェ
ー 2 9 2

審査官 鳥居 福代

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第0 1 0 2 0 1 7 9 (E P , A 1)
特開昭6 0 - 0 1 6 9 2 6 (J P , A)
特開昭6 0 - 0 1 6 9 3 4 (J P , A)
特開昭6 4 - 0 4 2 4 3 0 (J P , A)
特開昭6 3 - 2 1 1 2 3 6 (J P , A)
国際公開第0 0 / 0 2 0 5 7 6 (WO , A 1)
特開平0 7 - 3 0 9 7 1 3 (J P , A)
特開平0 5 - 0 8 5 9 4 2 (J P , A)
特表2 0 0 1 - 5 2 2 8 1 1 (J P , A)
黒木登志夫 他, 岩波講座 現代医学の基礎1 0 細胞増殖とがん, 岩波書店, 1 9 9 9 年, p.201
-203
渋谷正史, 発癌遺伝子, 医学のあゆみ, 1 9 8 4 年, Vol.129, No.13, p.979

酒井敏行 他, 種々のヒト悪性腫瘍細胞に対するプロスタグランдинD2の抗腫瘍効果, 医学
のあゆみ, 1984年, Vol.128, No.5, p.309-311

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/33-33/44

A61K 38/00

A61P 7/00

A61P 35/00

C07D 209/00

C07D 233/00

C07D 403/00

CAplus/REGISTRY(STN)