

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-519274

(P2010-519274A)

(43) 公表日 平成22年6月3日 (2010. 6. 3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 31/7028 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7028	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 12 頁)		

(21) 出願番号 特願2009-550701 (P2009-550701)  
 (86) (22) 出願日 平成20年2月20日 (2008. 2. 20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年10月14日 (2009. 10. 14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/052055  
 (87) 国際公開番号 W02008/101951  
 (87) 国際公開日 平成20年8月28日 (2008. 8. 28)  
 (31) 優先権主張番号 07102787.4  
 (32) 優先日 平成19年2月21日 (2007. 2. 21)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 301034267  
 フラームス・インテルユニフェルシタイル  
 ・インステイチュート・フォール・ビオテ  
 ヒノロヒー・ヴェーゼットウェー (ヴェー  
 イーペー・ヴェーゼットウェー)  
 VLAAMS INTERUNIVERS  
 ITAIR INSTITUUT VOO  
 R BIOTECHNOLOGIE VZ  
 W (VIB VZW)  
 ベルギー国、ペー9052 ツウェイナ  
 ールデ、レイフィスヘストラート 120

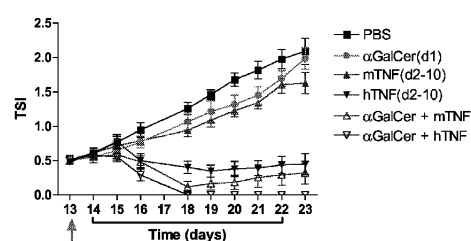
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TNFおよび $\alpha$ -ガラクトシルセラミドを使用する併用療法

## (57) 【要約】

本発明は、癌の処置に関する。より詳細には、本発明は、哺乳動物における抗癌活性が、相乗有効量のTNFおよび $\alpha$ -ガラクトシルセラミドの組み合わせを哺乳動物宿主に投与することによって増大され得ることを示す。

Fig. 2A



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

T N F および - ガラクトシルセラミドを含む医薬組成物。

## 【請求項 2】

T N F が組換え体であり、そして該 T N F がヒトである、請求項 1 記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

化学療法剤をさらに含む、請求項 1 または 2 記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

癌を処置するための医薬の製造のための、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の医薬組成物の使用。

10

## 【請求項 5】

単回 - ガラクトシルセラミド用量が T N F の投与の少なくとも 1 時間前に投与される、請求項 4 記載の使用。

## 【請求項 6】

T N F での処置が少なくとも 5 連続日間毎日施される、請求項 5 記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は、癌の処置に関する。より詳細には、本発明は、哺乳動物における抗癌活性が、相乗有効量の T N F および - ガラクトシルセラミドの組み合わせを哺乳動物宿主に投与することによって増大され得ることを示す。

20

## 【0002】

## 発明の緒言

ヒトにおける悪性腫瘍を処置するための 2 個以上の抗癌薬を使用する併用療法が、研究および臨床において現在使用されている。抗癌薬は、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生物質、免疫賦活剤、サイトカインなどであり得る。前記薬物の組み合わせは、大部分の癌（例えば、癌腫、黒色腫、リンパ種および肉種）に対する相乗的細胞傷害効果を得ようとして、薬剤耐性細胞の出現を低下させるかまたは排除しようとして、そして各々の薬物に対する副作用を低下させようとして投与される。

30

## 【0003】

157 アミノ酸のタンパク質である腫瘍壊死因子 (T N F) は、元来、Carswell et al (1975) (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975:72, 666) によって、細菌性内毒素への曝露の後に宿主によって放出される可溶性因子として、そして腫瘍細胞傷害性を担うとして見出された。その抗腫瘍効果に加えて、T N F は、免疫調節、代謝、造血および筋骨格成長に関与する。しかし、T N F は非常に毒性であり、そして、癌の処置において T N F を評価しようとする試みにおいて、低血圧、発熱、悪寒、疲労および頭痛が一般に観察されることが臨床試験により示されており、このことが T N F の全身的使用を妨げている。

## 【0004】

- ガラクトシルセラミド (- Gal Cer) は、元来、海綿 *Agelas mauritianus* から単離されており、そしてこの化合物が前臨床動物モデルにおいて抗腫瘍および免疫賦活性を示すことが見出された（例えば特許 E P 0 6 0 9 4 3 7 B 1 参照）。K R N 7 0 0 0 は、実験研究において最も頻繁に使用されている合成 - Gal Cer である。臨床的抗腫瘍効果は記録されなかったため、K R N 7 0 0 0 を使用する臨床試験は期待に反するものであった (Giaccone G et al (2002) Clin Cancer Res 8: 3702)。さらに、近年の研究は、- Gal Cer の逐次的用量の使用が T 細胞のアネルギー性状態を導き得ることを指摘している (Parekh VV et al (2005) J Clin. Invest. 115(9):2572-83)。

40

## 【0005】

本発明において、本発明者らは、- ガラクトシルセラミドとの組み合わせでの、治療量以下 (sub-therapeutic) の量の T N F の使用が、種々の形態の癌の処置において驚く

50

べき相乗作用を与えることを見出した。さらに、本発明者らは、この相乗的組み合わせが正常細胞に対する有意な細胞傷害効果を有さず、従って癌と戦うために安全に使用され得ることを示した。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1A】腫瘍実験。グラフの下線は処置期間を表す。矢印は - Gal Cer の注射の時点を示す。データを平均  $\pm$  SEM として示す。PBS については  $n = 6$  であり、ヒト TNF (hTNF) については  $n = 7$  であり、全ての他の群については  $n = 2$  である。(A) - Gal Cer (2  $\mu$ g / マウス) および hTNF での処置の後の、C57BL / 6 マウスにおける皮下成長 B16BI6 黒色腫の成長曲線。(B) 全身毒性についての尺度としての処置の間のマウスの相対的体重。処置前の平均体重は 22.3 g であった (13 日目)。

10

【図1B】腫瘍実験。グラフの下線は処置期間を表す。矢印は - Gal Cer の注射の時点を示す。データを平均  $\pm$  SEM として示す。PBS については  $n = 6$  であり、ヒト TNF (hTNF) については  $n = 7$  であり、全ての他の群については  $n = 2$  である。(A) - Gal Cer (2  $\mu$ g / マウス) および hTNF での処置の後の、C57BL / 6 マウスにおける皮下成長 B16BI6 黒色腫の成長曲線。(B) 全身毒性についての尺度としての処置の間のマウスの相対的体重。処置前の平均体重は 22.3 g であった (13 日目)。

【図2A】 - Gal Cer での前処置は治療量以下の TNF に対して感作する。グラフの下線は hTNF または マウス TNF (mTNF) での処置期間を表す。緑色矢印は - Gal Cer の注射の時点を示す。データを平均  $\pm$  SEM として示す、 $n = 7$ 。(A) - Gal Cer (1  $\mu$ g / マウス)、hTNF および低用量 mTNF での処置の後の、C57BL / 6 マウスにおける皮下成長 B16BI6 黒色腫の成長曲線。(B) 全身毒性についての尺度としての処置の間のマウスの相対的体重。処置前の平均体重は 22.2 g であった (13 日目)。

20

【図2B】 - Gal Cer での前処置は治療量以下の TNF に対して感作する。グラフの下線は hTNF または マウス TNF (mTNF) での処置期間を表す。緑色矢印は - Gal Cer の注射の時点を示す。データを平均  $\pm$  SEM として示す、 $n = 7$ 。(A) - Gal Cer (1  $\mu$ g / マウス)、hTNF および低用量 mTNF での処置の後の、C57BL / 6 マウスにおける皮下成長 B16BI6 黒色腫の成長曲線。(B) 全身毒性についての尺度としての処置の間のマウスの相対的体重。処置前の平均体重は 22.2 g であった (13 日目)。

30

【0007】

目的および詳細な説明

本発明は、腫瘍壊死因子 (TNF) および - ガラクトシルセラミドの組み合わせ、ならびに抗腫瘍治療剤としての前記組み合わせの使用に関する。

【0008】

従って、本発明は、TNF および - ガラクトシルセラミドを含む医薬組成物を提供する。

40

【0009】

特定の実施態様において、前記医薬組成物は、相乗有効量の TNF および - ガラクトシルセラミドを含む。

【0010】

別の特定の実施態様において、前記 TNF は哺乳動物種、好ましくはヒト由来である。別の特定の実施態様において、前記医薬組成物は細胞を含まず、そしてリンホトキシンを含まない。

【0011】

さらに別の特定の実施態様において、前記医薬組成物中の前記 TNF は、治療量以下の量で存在する。化合物 (ここでは TNF) の治療量以下の効果は、当該化合物が腫瘍を保

50

有する哺乳動物宿主に当該化合物（すなわち、ここではTNF）単独の治療量以下の用量として投与されるときに、統計的に関係のある効果が腫瘍成長に対して観察されないことを意味する。

【0012】

さらに別の実施態様において、TNFおよび - ガラクトシルセラミドを含む医薬組成物は、化学療法剤をさらに含む。

【0013】

さらに別の実施態様において、本発明は、癌の治療的処置のためのTNFおよび - GalCerを含む医薬組成物の使用を提供する。

【0014】

さらに別の実施態様において、TNFおよび - GalCerを含む医薬組成物の使用は転移の処置のために使用される。

【0015】

特定の実施態様において、前記TNFおよび - ガラクトシルセラミドは逐次的に投与される。

【0016】

別の特定の実施態様において、TNFの投与は - ガラクトシルセラミドの投与に先行する。

【0017】

好ましい実施態様において、 - ガラクトシルセラミドの投与はTNFの投与に先行する。

【0018】

さらに別の好ましい実施態様において、 - GalCerの投与はTNFの投与に先行し、ここで前記 - GalCerの投与は、TNFの投与の少なくとも1時間前に投与される単回用量からなる。特定の実施態様において、前記 - GalCerの単回用量は、TNFの投与の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12時間前に投与される。さらに別の特定の実施態様において、前記 - GalCerの単回用量は、TNFの投与の少なくとも1日前に投与される。さらに別の特定の実施態様において、 - GalCerの少なくとも2つの用量が、TNFの投与の前に投与される。

【0019】

別の好ましい実施態様において、TNFの投与は少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8または少なくとも9連続日間毎日である。

【0020】

用量および投与計画が、TNFおよび - ガラクトシルセラミドが別々にまたは混合物として投与されるかどうか、癌の型、患者、および患者の病歴に主に依存することは、医師の当業者にとって明らかなはずである。量は、相乗的な腫瘍縮小を達成するために有効でなければならない。多回用量が用いられる場合（例えば、TNFについて好ましい）、投与の頻度は、例えば、宿主の型および癌の型、投与量などに依存する。いくつかの型の癌については毎日の投与が有効であり、一方他については1日おきまたは3日ごとの投与が有効であるが毎日の投与は有効ではない。医師は、日常の実験に際して、どの投与経路および投与頻度が任意の特定の症例において最も有効であるかを確認することができる。

【0021】

「TNF」によって、下記の種々の形態のTNFが意味される：

151および155アミノ酸（ネイティブ形態より2および6個少ない）を有するヒトTNFのクローニングがEP155,549（Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.）に開示されており、そして155アミノ酸を有するヒトTNFがEP158,286（Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha）に開示されている。成熟TNF（157アミノ酸）およびその種々の改変形態（ムテイン）のクローニングがEP168,214（Genentech）に開示されている。組換えヒトTNFはPennica et al., Nature (1984), 312:724-729

10

20

30

40

50

; Yamada et al., J. Biotechnology (1985), 3:141-153; Wang et al., Science (1985), 228:149-154、E P 1 5 5 , 5 4 9 および E P 1 6 8 , 2 1 4 によって記載されるように得られ得る。TNFは好ましくは、SDS-PAGE上で約15,000~20,000ダルトンの分子量を有するヒト非グリコシル化TNFである。特定の実施態様において、TNFは、最初の8個までのアミノ酸残基が、US4,677,064およびUS4,677,063に記載の手順を使用して欠失されている、ヒトTNFムテインである。TNFはUS698,939に記載のシステイン枯渴ムテインである。ヒト適用のために、好ましくは、TNFはヒト供給源に由来する。さらにより好ましくは、ヒト適用のためのTNFは組換え非グリコシル化ヒトTNFである。

#### 【0022】

「 - ガラクトシルセラミドまたは - GalCer」によって、可変長さのスフィンゴシン鎖およびアシルを有するセラミド脂質に結合によって結合されたガラクトース炭水化物を含むスフィンゴ糖脂質由来の誘導体またはアナログが意味される。KR N 7 0 0 0 ( 2 S 3 S , 4 R ) - 1 - O - ( - D - ガラクトピラノシル ) - N - ヘキサコサノイル - 2 - アミノ - 1 , 3 , 4 - オクタデカントリオール)は、実験研究において、そしてまた本発明の実施例1において、最も頻繁に使用されている合成 - GalCerである。本発明はまた、特許E P 0 6 0 9 4 3 7 B 1 (Kirin Beer Kabushiki Kaisha)、出願WO 2 0 0 6 0 2 6 3 8 9 (Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University)、出願US 2 0 0 4 0 1 2 7 4 2 9に記載される - ガラクトシルセラミドを意図する。特に、後者の出願において、O - グリコシドよりインビボにおいて酵素分解に対する感受性が低い - GalCerのC - グリコシドアナログが記載されている。特定のC - グリコシド (KR N 7 0 0 0 のアナログ) がYang G. et al (2004) Angew. Chem. Int. Ed. 43, 3818-3822に記載されている。本発明の医薬組成物において使用する - GalCerの好ましい範囲は20~200 μg/kgである。

#### 【0023】

従って、 - ガラクトシルセラミドおよびTNFの組み合わせは、黒色腫、肺癌およびリンパ腫のような種々の形態の癌の処置において驚くべき相乗作用を提供することが見出される。

#### 【0024】

本明細書において使用する用語「治療的」処置は、宿主が癌にかかった(任意の手段によって決定される)後の宿主へのTNFおよび - ガラクトシルセラミドの投与を指す。存在する腫瘍負荷が減少されないかまたはより優先的には除去されない場合、処置は治療的であるとはみなされない。

#### 【0025】

本明細書において使用する用語「癌」は、例えば、腎細胞癌、カボジ肉腫、慢性白血病、乳癌、肉腫、卵巣癌、直腸癌、咽頭癌、黒色腫、結腸癌、膀胱癌、肥満細胞腫、肺癌、乳腺癌、咽頭扁平上皮癌、および胃腸癌または胃癌のような細胞性障害を含む任意の腫瘍性障害を指す。好ましくは、癌は肺癌、黒色腫およびリンパ腫である。

#### 【0026】

TNFおよび - ガラクトシルセラミドに適用される本明細書において使用する用語「相乗有効量」は、腫瘍体積の減少に有効であり、そして、TNFの用量対 - ガラクトシルセラミドの用量対腫瘍体積の減少の用量応答プロットにおいて、用量TNF軸または用量 - ガラクトシルセラミド軸のいずれかと交差しない効果を生じる医薬組成物の各成分の量を指す。当該分野において相乗作用を決定するために使用される用量応答曲線は、Sande et al., p. 1080-1105 in A. Goodman et al, ed., the Pharmacological Basis of Therapeutics, MacMillan Publishing Co., Inc., New York (1980)に十分に記載されている。95%信頼限界を使用して、用量レベル、スケジュールおよび応答のような因子を変動させ、そして - ガラクトシルセラミドおよびTNFの種々の組み合わせについての用量応答曲線からイソボログラムを生成するコンピューター生成モデルを使用することによって、至適相乗量を決定することができる。用量応答曲線上での腫瘍体積の最高の減少

10

20

30

40

50

は至適投与量レベルと相関する。

【 0 0 2 7 】

本明細書において使用する用語「組換え体」は、組換えDNA技術によって産生されるTNFを指し、ここで一般にTNFをコードする遺伝子は公知の組換えDNA技術によってクローン化される。組換え宿主は真核生物または原核生物宿主であり得る。

【 0 0 2 8 】

本明細書において使用する用語「薬学的に許容しうる」は、活性成分の生物活性の有効性に干渉せず、そしてそれが投与される宿主に対して毒性でない担体媒体を指す。

【 0 0 2 9 】

本発明の医薬組成物の投与は、非経口投与を含む任意の適切な技術によって生じ得る。非経口投与の例には、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、および腹腔内が含まれ、マウスモデルについては腹腔内投与が好ましく（利便性のために）、そしてより高等な哺乳動物のためには静脈内および皮下が好ましい。

【 0 0 3 0 】

本明細書において最も有効であるようである投与量は、腫瘍退縮または完全退縮を生じ、そして宿主に対して毒性でないものである。この至適レベルは、多くの因子、例えば宿主の型および癌の型、投与の経路、スケジュール、存在する腫瘍負荷、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミドおよびTNFの型、ならびに毒性の定義に依存する。宿主に対する毒性は、副作用の程度および型によって、または体重減少の量によって、または特定期間後の死亡によって定義され得る。体重減少が毒性の規準である場合、典型的には、10～20%の体重減少が許容され、20%より多い減少が毒性であるとみなされる。

【 0 0 3 1 】

20%より多い体重減少が毒性であるとみなされる場合、宿主がマウスである場合、投与経路がインピット口で調製された混合物を介する腹腔内であり、そして毎日または1日おきである場合、組換え産生される治療量以下のTNFの各々の投与における投与量レベルは、好ましくは約20～約50  $\mu$ g TNF / kg 宿主体重である（これらの治療量以下のレベルはマウス治療レベルより約5～10倍低いことに留意されたい）。ヒト適用に対して算出すると、TNFの範囲は約50～300  $\mu$ g / m<sup>2</sup>である。

【 0 0 3 2 】

非経口投与のために、医薬組成物は一般に単位投与量注射用形態（溶液、懸濁液、乳濁液）で、好ましくは固有に非毒性でありそして非治療的である薬学的に許容しうる担体媒体中で処方される。そのようなビヒクルの例には、生理食塩水、リンガー液、デキストロース溶液、マンニトールおよび正常血清アルブミンが含まれる。不揮発性油およびオレイン酸エチルのような非水性ビヒクルも使用され得る。担体媒体は少量の添加物、例えば等張性および化学的安定性を増強する物質（例えば、緩衝剤および保存料）を含み得る。TNFは、典型的には、そのような担体中で約0.1 mg / ml～20 mg / mlの濃度で処方される。

【 0 0 3 3 】

あるいは、医薬組成物を、無菌安定凍結乾燥処方物に作製し得、ここで精製化合物（すなわちTNFおよび $\alpha$ -GalCer）はマンニトールのような水溶性担体（これはかさを与える）、および水中の $\alpha$ -ガラクトシルセラミドの溶解性を確実にするために十分な量の界面活性剤（例えばドデシル硫酸ナトリウムのような）と混合され得る。処方物は非経口投与用の水性注射剤中での再構成のために適切であり、そしてそれは安定でありそしてヒト患者において十分に許容される。

【 0 0 3 4 】

医薬組成物およびその使用が獣医学的動物の処置にも適用され得ることは明らかであるはずである。そのような適用のために、TNFを組織培養物からまたは組換え技術によって、そして例えばウサギ、霊長類、ブタ、ウシ、ネコおよびイヌのような任意の哺乳動物供給源から調製し得る。

【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

50

本発明の種々の態様を以下の実施例によってさらに記載する。いかにしてもこれらが本発明を限定することは意図されない。

#### 【0036】

##### 材料および方法

###### 1. 試薬

適切な発現プラスミドを含む *Escherichia coli* によって産生された組換えヒト TNF (hTNF) およびマウス TNF (mTNF) (Marmenout A. (1985) Eur J Biochem. 152 (3):515-22) を見かけ上均一に精製した。記載される L929 細胞傷害性アッセイ (Takahashi et al., 1995) によって決定された比活性はそれぞれ  $6.1 \times 10^7$  IU/mg および  $1.28 \times 10^8$  IU/mg であった。hTNF および mTNF の両方について、リムルスアメーバ細胞溶解物アッセイ (Coatest; Chromogenix, Stockholm, Sweden) によってアッセイされた内毒素含量は  $< 10$  U/mg であった。使用した  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) は KRN7000 と同じ構造を有しており、そして Laboratory for Medical Chemistry (Ghent University, Belgium) の Serge Van Calenbergh のグループによって合成された。

10

#### 【0037】

###### 2. マウス

雌性 C57BL/6J @ RJ マウスを Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) から購入した。動物を、14 - 10 時間明/暗サイクルで、温度制御され、空気調節された部屋に収容し、そして食餌および水を随意に与えた。マウスを腫瘍実験のために 8 ~ 12 週齢で使用した。

20

#### 【0038】

###### 3. 腫瘍細胞

メラニン陽性黒色腫 B16BI6 細胞 (Hart et al., 1979) を、10% FCS、50 IU/ml ペニシリン G、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン硫酸塩、2 mM L-グルタミンおよび 0.4 mM Na-ピルビン酸を補充した RPMI 1640 (Invitrogen) 中で培養した。腫瘍接種のために、細胞を培養フラスコから短時間の EDTA 処理によって剥離させ、内毒素不含無菌 PBS (Sigma) 中で 3 回洗浄し、そして PBS 中に  $6 \times 10^6$  細胞/ml で再懸濁した。

30

#### 【0039】

###### 4. 腫瘍実験

0 日目に、マウスに  $6 \times 10^5$  個の細胞を皮下で後肢のちょうど前の背中に接種した。腫瘍サイズ指数 (TSI) (すなわち、最大の垂直直径 (cm) の積) が 0.5 に達したときに (13 日目) 処置を開始した。hTNF (30  $\mu$ g/注射) または低用量 mTNF (0.7  $\mu$ g/注射) での処置を 9 または 10 連続日間毎日、病巣近傍 (paraesional) 注射 (腫瘍部位の付近であるが小結節の外での皮下注射) を介して与えた。 $\alpha$ -GalCer (1 ~ 2  $\mu$ g/注射) を腹腔内注射した。全ての薬剤を PBS 中で 100  $\mu$ l/注射の最終容量に希釈した。コントロールマウスに 100  $\mu$ l の PBS を注射した。TSI および体重を、毎日注射の前に、そして処置が完了したときは 2 または 3 日毎に測定した。

40

#### 【0040】

##### 実施例

###### 1. $\alpha$ -GalCer と TNF との間の相互作用

NKT 細胞の活性化が TNF での治療量以下処置に対して感作するかどうか決定するために、皮下で成長する B16BI6 腫瘍を有する C57BL/6 マウスを特異的 NKT 細胞アゴニスト  $\alpha$ -GalCer および hTNF または低用量 mTNF のいずれかの組み合わせで処置した。

#### 【0041】

本発明者らは、TNF と比較して何が  $\alpha$ -GalCer を注射するために至適の時点であるかを評価するために、まずパイロット実験を行った。 $\alpha$ -GalCer を、TNF での処置の開始の 1 日前、1 時間前、または 1 日後のいずれかで注射した。PBS 処置マウ

50

スにおいて、腫瘍は直線的に成長した。 - G a l C e r または h T N F 単独での処置は、それぞれ腫瘍成長に対する効果も腫瘍抑制性 (tumouristatic) 効果も有さなかった。しかし、 - G a l C e r および h T N F の組み合わせに対する応答は顕著であり、全ての処置した動物において腫瘍が退縮した (腫瘍サイズの 25% 超の減少) (図 1 A)。さらに、B 1 6 B I 6 腫瘍の完全退縮 (触知可能腫瘍なし) が、 - G a l C e r を h T N F の 1 日前に注射した場合に両方の処置したマウスにおいて、そして - G a l C e r を h T N F での処置の開始の 1 日後に注射した場合に 2 匹の処置したマウスのうち 1 匹において得られた。 - G a l C e r および h T N F での併用処置は、h T N F 単独に比較して、全身毒性の穏やかな増加を引き起こした (図 1 B)。 - G a l C e r を h T N F の 1 時間前に注射した場合に、2 匹の処置したマウスのうち 1 匹が死亡した。これらの結果から、本発明者らは、 - G a l C e r を注射するために至適の時点は T N F での処置の開始の 1 日前であると結論付けた。

10

#### 【 0 0 4 2 】

次に、本発明者らは、 - G a l C e r での前処置が T N F の抗腫瘍効果の有意な増加を引き起こすかどうかを決定するために大規模実験を行った。 - G a l C e r または低用量 m T N F 単独での処置は腫瘍成長に対して小さな阻害効果を有し、一方 h T N F の効果は腫瘍抑制性であった。 - G a l C e r の h T N F または低用量 m T N F との組み合わせは明らかに相乗的であった：処置は全ての処置した動物において腫瘍退縮を引き起こし (図 2 A)、 - G a l C e r + h T N F について 7 匹の処置した動物のうち 5 匹において (2 匹のマウスが処置の間に死亡した；h T N F 単独についても 2 匹のマウスが処置の間に死亡した)、そして - G a l C e r + 低用量 m T N F について 7 匹の処置した動物のうち 4 匹において (1 匹のマウスが処置の間に死亡した；m T N F 単独についても 1 匹のマウスが処置の間に死亡した) 完全であった。しかし、 - G a l C e r + h T N F または低用量 m T N F の組み合わせは、h T N F または低用量 m T N F 単独と比較して、全身毒性の穏やかな増加を引き起こすのみであった (図 2 B)。

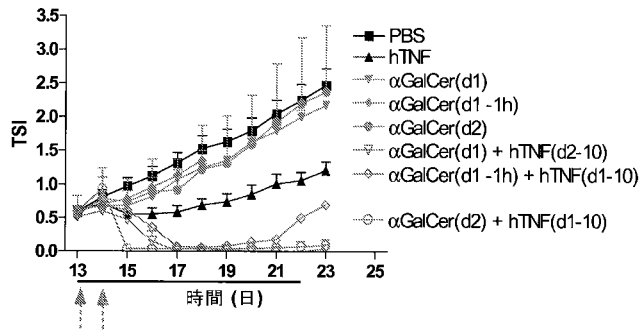
20

#### 【 0 0 4 3 】

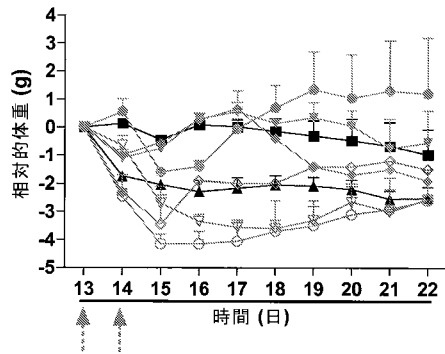
総合すると、本発明者らは、 - G a l C e r の単回注射による N K T 細胞の特異的活性化が T N F の抗腫瘍効果の選択的増加を誘導し得ることを示した。



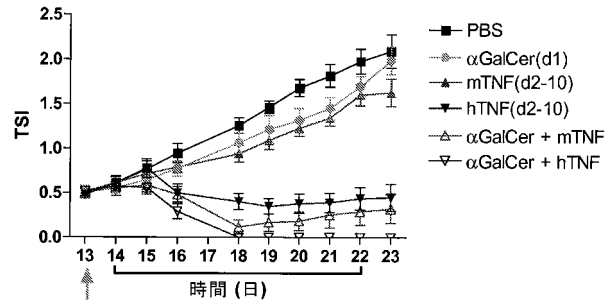
【 図 1 A 】



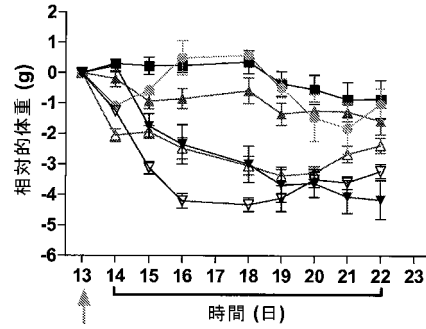
【 図 1 B 】



【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2008/052055

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K38/19 A61K31/70 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, FSTA, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAKUI ET AL: "Potentiation of antitumor effect of NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide by combination with IL-12 on lung metastasis of malignant melanoma cells" CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS, vol. 18, 2000, pages 147-153, XP019235487 * See page 147 (Abstract) *	1-6
A	INUI ET AL: "Neutralization of tumor necrosis factor abrogates hepatic failure induced by alpha-galactosylceramide without attenuating its antitumor effect in aged mice" JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 43, 2005, pages 670-678, XP005058388 * See pages 675-677 (Discussion) * -/-	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 June 2008		Date of mailing of the international search report 30/06/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Korsner, Sven-Erik

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2008/052055

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>METELITSA ET AL: "Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells"</p> <p>LEUKEMIA, vol. 17, 2003, pages 1068-1077, XP002484797 * See page 1068 (Introduction) *</p>	1-6
A	<p>NISHI ET AL: "Synergistic effect of KRN7000 with interleukin-15, -7, and -2 on the expansion of human V-alpha-24(+)-V-beta-11(+) T cells in vitro"</p> <p>HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 61, 2000, pages 357-365, XP001146058 * See page 357 (Abstract) *</p>	1-6

## フロントページの続き

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

(71)出願人 500454769

ユニフェルジテイト・ヘント

Universiteit Gent

ベルギー 9 0 0 0 ヘント、シント・ピーターズニューストラート 2 5 番

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74)代理人 100113653

弁理士 東田 幸四郎

(74)代理人 100116919

弁理士 齋藤 房幸

(72)発明者 ブロックアート, ペーター

ベルギー国、ペー - 9 0 0 0 ヘント、モンテライストラート 1 9

(72)発明者 エレヴァウト, ディルク

ベルギー国、ペー - 9 0 7 0 ヒュースデン、ブラオヴェステーンストラート 1 4

(72)発明者 ヒューグ, レアンダー

ベルギー国、ペー - 8 7 0 0 アーゼレー、デインゼステーンヴェーク 2 1 4

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA22 BA01 BA08 BA22 CA53 MA02 NA05 ZB26

ZC75

4C086 AA01 AA02 EA05 MA03 MA04 NA05 ZB26 ZC75