

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4489946号
(P4489946)

(45) 発行日 平成22年6月23日(2010.6.23)

(24) 登録日 平成22年4月9日(2010.4.9)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 38/00	(2006.01) A 61 K 37/02
A 61 P 1/04	(2006.01) A 61 P 1/04
A 61 P 1/16	(2006.01) A 61 P 1/16
A 61 P 17/02	(2006.01) A 61 P 17/02
A 61 P 29/00	(2006.01) A 61 P 29/00

請求項の数 9 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-555634 (P2000-555634)
(86) (22) 出願日	平成11年5月27日(1999.5.27)
(65) 公表番号	特表2002-518459 (P2002-518459A)
(43) 公表日	平成14年6月25日(2002.6.25)
(86) 國際出願番号	PCT/RU1999/000188
(87) 國際公開番号	W01999/066948
(87) 國際公開日	平成11年12月29日(1999.12.29)
審査請求日	平成18年5月12日(2006.5.12)
(31) 優先権主張番号	98111342
(32) 優先日	平成10年6月23日(1998.6.23)
(33) 優先権主張国	ロシア(RU)

(73) 特許権者	500586613 オブスチエストボ・エス・オグラニチエノ イ・オトベツトステベノスチユ“クリニカ ・インスチツカ・ビオレグリアツイ・ゲ ロントロギー” ロシア国、197110 サンクト・ペテ ルブルグ、ピーアール・ディナモ 3
(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(74) 代理人	100084618 弁理士 村松 貞男
(74) 代理人	100092196 弁理士 橋本 良郎
(74) 代理人	100095441 弁理士 白根 俊郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】修復プロセスを刺激する物質およびその適用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織再生の刺激を必要とする疾患であって、化膿炎症性疾患および術後合併症；栄養性障害；皮膚および粘液性疾患および損傷；放射線、化学的および熱性因子の後続効果に属する疾患の予防および/または治療のためのペプチド製剤をつくるためのL-リシリ-L-グルタミン酸ジペプチド(L-Lys-L-Glu)の使用。

【請求項 2】

前記ペプチド製剤が、薬学的に許容可能な担体および有効量のL-Lys-L-Gluもしくはその塩から成る、請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

前記ペプチドが、アミノ基の塩を含有するジペプチドとして存在する請求項1または2に記載の使用。

【請求項 4】

前記アミノ基の塩が、酢酸塩、塩酸塩、またはシュウ酸塩である、請求項3に記載の使用。

【請求項 5】

前記ペプチドが、カルボキシル基の塩を含有するジペプチドとして存在する、請求項1～4の何れか1項に記載の使用。

【請求項 6】

前記カルボキシル基の塩が、ナトリウム、カリウム、カルシウム、リチウム、亜鉛、マ

10

20

グネシウム、または有機もしくは無機陽イオンの塩である、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記有機もしくは無機陽イオンが、アンモニウム、またはトリエチルアンモニウムである、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

前記ペプチド製剤が、非経口投与、鼻腔内投与、経口投与、または局所適用のための薬剤として存在する、請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

前記 L - リシリル - L - グルタミン酸ジペプチド (L-Lys-L-Glu) の単位投与量が、患者の体重 1 kgあたり 0.01 ~ 100 μg に調整される、請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の使用

10

。

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、薬学、即ちペプチドおよびその組成物を含有する医薬に関し、化膿炎症性疾患および術後合併症、栄養性障害、皮膚および粘膜の疾患および損傷、修復プロセスの障害を伴う放射線、熱性および化学的因素の後続効果の症例において、組織再生の刺激薬として医薬を予防的および/または治療的に利用することが、本発明によって見出された。

【0002】

本発明は、必要としている被検者に修復プロセスを刺激する物質として、ジペプチド、L - リシリル - L - グルタミン酸 (L-Lys-L-Glu) を適用することに関する。

20

【0003】

[発明の背景]

適用の上で本発明の医薬に最も類似した医薬としては、代謝プロセスを刺激する一群の製剤がある：ビリミジンの誘導体（メチルウラシル、ペントキシル）および生体製剤（アクトベジン、ソルコセリル）(1)。

【0004】

メチルウラシルの欠点は、皮膚のアレルギー性反応（じんま疹、発疹）、ときどき頭痛およびめまい感が起こることである。ペントキシルの経口適用は、この薬剤の刺激性作用のために消化不良を引き起す。アクトベジン (Actovegin) およびソルコセリル (Solcose ry I) の傷害は、この薬剤中に活性物質の量が少ないと、長期間の治療であること、創傷プロセスの段階に対して適用が制限されること、および化膿性創傷の治療に効果が低いことである。これらの薬剤は、白血球産生に対して大きな刺激効果を発揮する。

30

【0005】

ペプチド合成の構成要素として使用されるジペプチド L - Lys - L - Glu は公知である (2)。

【0006】

ジペプチド L - Lys - L - Glu が、免疫調節活性を表すことは周知である (3)。しかし、このジペプチドの活性は、免疫生物学的作用の分野でのみ特徴付けられており、この特徴は、修復プロセスを刺激するジペプチドの特性を明らかにしていないし、相互に関連もないし、また、その臨床上の適用に関して適応症を特定していない。修復プロセスに対するジペプチド L - Lys - L - Glu の作用の実施例により、既知の特性と本発明との間に関係がないことが客観的に実証される。

40

【0007】

[発明の開示]

本発明は、修復プロセスを刺激することが可能なペプチド由来の物質を得るという課題を解決することを目的とする。

【0008】

本発明に関して、修復プロセスを刺激する特性を示す物質として、以下のアミノ酸配列：L - Lys - L - Glu を有するジペプチドを使用することが提案されている。

【0009】

50

ジペプチドは、溶液中での従来のペプチド合成法により得られる(4)。

【0010】

L-Lys-L-Gluジペプチドの修復プロセスを刺激する未知の特性が、本発明の実験研究において発見された。

【0011】

本発明に関して、再生を刺激することが可能な薬学的ペプチド製剤が提案されており、このペプチド製剤は、薬学的に許容可能な担体、および活性成分としてL-リシル-L-グルタミン酸(L-Lys-L-Glu)で表される有効量のジペプチド化合物またはその塩のような化学修飾体を含む。

【0012】

本発明に関して、修復プロセスを刺激する薬学的ペプチド製剤は、アミノ基による塩(酢酸塩、塩酸塩、シュウ酸塩)、またはカルボキシル基による塩(金属塩-ナトリウム、カルシウム、リチウム、亜鉛、マグネシウム、および他の有機および無機陽イオン、例えばアンモニウム、トリエチルアンモニウムの塩)を含んでいてもよい。

【0013】

本出願で使用される「薬学的ペプチド製剤」の概念には、組織再生の刺激を必要とする疾患の治療に治療効果を表し、前記ジペプチドの種々の薬学的誘導体を含有する、任意の薬剤形態の使用を含む。

【0014】

本出願で使用される「有効量」の概念には、この薬剤形態において利用可能な知識だけではなく、活性および毒性の量的指標に応じて効果的であるはずの活性成分の量の使用を含む。本発明を満たす薬学的組成物を得るために、提案されたジペプチドもしくはその薬学的に適用可能な誘導体を、活性成分として、薬理学で公認されている混合法に従って薬学的担体と混合する。

【0015】

担体は、製剤の薬剤形態に依存し、投与(例えば、非経口、経口、鼻腔内、もしくは局所投与)にとって望ましい種々の形態(例えば、塗り薬もしくは軟膏のような形態)をとり得る。

【0016】

全ての既知の薬学的成分を、経口もしくは局所投与に好ましい用量で組成物を調製するために使用してもよい。

【0017】

非経口(鼻腔内)投与において、担体は通常滅菌水を含むが、安定性もしくは滅菌状態の維持に役立つ他の成分を使用することもできる。

【0018】

本発明に従って、体重1kgあたり0.01~100μkgの用量で投与した場合、前記ジペプチドは活性を有しているが、疾患の重症度および特性に対して、より少ない(多い)用量を使用することもできる。

【0019】

本発明の薬学的ペプチド製剤は、非経口、鼻腔内、経口、および局所投与について提案されている。

【0020】

本発明は、再生プロセスの刺激が必要なヒトおよび動物に対して再生プロセスを刺激する方法、およびこの方法を行うための薬学的組成物の両方を包含する。

【0021】

本発明に従って、活性成分としてL-リシル-L-グルタミン酸(L-Lys-L-Glu)のジペプチド、またはその塩もしくは他の誘導体の形態の化学修飾体を含有する薬剤の投与により再生プロセスを刺激する方法は、細胞の代謝活性化および種々の組織の細胞の増殖および分化のプロセスに対する調節効果にその影響が現れる。本方法は、必要としている被検者に、体重1kgあたり0.01~100μkgの用量で、一日に少なくとも一回、治療効果に達

10

20

30

40

50

するのに必要な期間（疾患の特性および重症度に対して10～40日）、薬剤を予防もしくは治療投与することを含む。

【0022】

本発明は、組織再生の刺激を必要とする疾患（化膿炎症性プロセスおよび術後合併症、栄養性障害、皮膚および粘液性疾患および損傷、放射線、化学的および熱性因子の後続効果）の、修復プロセスのシフトを伴う予防および治療を含む。

【0023】

[産業上の利用]

本発明は、式 L-リシリ-L-グルタミン酸 (L-Lys-L-Glu) で表されるジペプチドの合成例（例1）、前記ジペプチドの毒性および生物学的活性の試験例（例2、3、4および5）、並びに前記ジペプチドの薬理学的特性を実証し、治療効果に達する可能性を確証する臨床上の適用結果の例（例6、7、8）により詳細に説明する。10

【0024】

例1 L-Lys-L-Gluジペプチドの合成

1. N、N - ジベンジルオキシカルボニルリシリ-L-ベンジルグルタミン酸 [I] 0.154 g (0.65 mmol) の L-ベンジルグルタミン酸を、3 mLのジメチルホルムアミドに懸濁し、0.091 mL (0.65 mmol) のトリエチルアミンを混合しながら添加し、次いで0.300 g (0.59 mmol) のN、N - ジベンジルオキシカルボニルリシリのオキシスクシニミドエーテルを添加した。反応後の混合物を、室温で12時間内で混合した。その後、40 の真空中で溶媒を煮詰め、10 mLの1 n H₂SO₄を残渣に添加した。その生成物を、酢酸エチル (30×2) で2回抽出した。有機層を1 n H₂SO₄および水に中性反応まで浸し、Na₂SO₄上で乾燥させた。40 の真空中で溶媒蒸留を行い、残渣を1～2 mLの酢酸エチルに溶解した。その生成物をヘキサンにより沈ませ、酢酸エチル/ヘキサンのシステムで再結晶化した。その生成物を濾過し、真空中、P₂O₅上で乾燥させた。収率は、0.0330 g (88%) であった。保持係数 R_f = 0.81 (ベンゾール：アセトン = 1 : 1、silufol) であった。20

【0025】

2. L-リシリ-L-グルタミン酸

保護されたジペプチド [I] (0.330 g) を10 mgのメタノールに溶解し、3 mLの水を添加し、パラジウム炭上で水和させた。薄層クロマトグラフィーによりコントロールを行った。水和の終了時に、触媒を濾過して取り除き、残渣を最小量の水に溶解し、メタノールにより沈ませた。その生成物を濾過し、エタノールに浸し、真空中、P₂O₅上で乾燥させた。収率は0.110 g (85%) であった。融解温度は194～196 であった。[]²⁰ = +20.0° (c = 3.0; H₂O)。R_f = 0.54 (アセトニル：水 1 : 3、“Merk”)。電気泳動：E_{Gly} = 1.96; E_{his} = 0.98 (1400ボルト、45分、2%酢酸、“Watmann 3MM”)。30

【0026】

カルボキシル基に対応する塩を得るために、遊離ジペプチドに、対応する金属の水酸化物の水溶液 (NaOH、KOH、ZnOH₂、LiOH、CaOH₂、MgOH₂、NH₄OH) を計算した量添加した。トリエチルアンモニウム塩を得るために、塩基としてトリエチルアミンを用いて同じ方法で処理を行った。40

【0027】

例2 L-Lys-L-Gluジペプチドの毒性研究

ジペプチド L-Lys-L-Gluの一般的な毒性研究を、「薬理学的物質の安全性の前臨床評価の基準 (GLP)」に従って行った。

【0028】

研究の目的は、薬剤の耐毒性投与量を検出すること、生物の種々の器官およびシステムにおける病理学的变化の段階および特性を評価すること、および投与量に関連した毒性効果と薬剤適用期間との関係を測定することにある。

【0029】

ジペプチド L-Lys-L-Gluの急性毒性の評価は、Kerberに従って行った。この研究は、体50

重20～23 g の66匹の異系交配した白色のオスマウスについて、標準的な治療プログラム（regimen）下で維持し、研究用の飼育施設中で標準的な食事を供給して行った。この動物をそれぞれ11匹ずつのマウスに6つの均等なグループに無作為に分けた。この薬剤を、1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kgの投与量で0.25 mL、即ち、臨床試験で推奨される治療用量の数千倍を筋内に1回投与した。コントロール動物には、同量の塩化ナトリウム溶液を投与した。

【0030】

72時間後および14日後、何れのグループの動物もすべて生存していた。全身の状態、行動、運動活性、毛もしくは皮膚外皮、または生理学的分泌に変化は現れなかった。

【0031】

10 このように、臨床試験で推奨される治療用量の数千倍の投与量でのL-Lys-L-Gluジペプチドは毒性効果を起こさず、これは、この薬剤の治療上の広範な応用性を示している。

【0032】

L-Lys-L-Gluジペプチドの亜急性毒性の研究を、体重150～250 g の60匹の異系交配した白色のマウスについて行った。実験グループの動物には、この薬剤を0.5 mL塩化ナトリウム溶液中1 mg/kg、0.3 mg/kg、3 mg/kgの投与量で筋内に90日間毎日1回投与した。コントロールグループの動物には、同量の塩化ナトリウム溶液を投与した。

【0033】

研究の全期間にわたって、動物は毎日コントロール下にあった。動物の行動、並びに食事および水の消費、毛および粘液性表面の状況をモニターした。週1回動物の体重を測定した。形態学的構造および末梢性血液の性質を、薬剤投与の前および30日目、60日目、90日目に調べた。血液の生化学的および凝固性（coagulologic）指標を実験終了時に調べた。

【0034】

20 本発明の方法により得られるL-Lys-L-Gluジペプチドの慢性毒性を、ジペプチドを体重150～250 mgのラットに縦断的に投与する間研究した。実験グループの動物には、この薬剤を0.5 mL塩化ナトリウム溶液中1 mg/kg、0.3 mg/kg、3 mg/kgの投与量で6ヶ月間筋内に毎日1回投与した。動物の行動、並びに食事および水の消費、毛および粘液性表面の状況を分析した。実験の最初の3ヶ月間は毎日、その後は一ヶ月に1回、動物の体重を測定した。投与を開始してから3ヶ月後、および実験の終了時に、血液学的および生化学的調査を行った。心血管系、肝臓、脾臓、腎臓、および副腎の機能を評価した。薬剤投与の終了時に、脳および骨髄の種々の部分、心臓、大動脈、肺、肝臓、内分泌系および免疫系の器官の状況を研究する目的で、幾つかの動物に病理形態学的評価を行った。

【0035】

動物の全身状況、末梢性血液の形態学的および生化学的指標、内因性（intrinsic）器官の形態学的状況、心血管系および呼吸器系、肝臓および腎臓の機能を評価したが、その動物の病理学的变化は何も現れなかった。

【0036】

L-Lys-L-Gluジペプチドの亜急性および慢性毒性の研究により、100～1000倍の治療用量の投与量でこの薬剤を長期間適用した間、副作用がないことが証明された。

【0037】

例3 柔組織の化膿性創傷・挫傷の治癒に対するL-Lys-Gluジペプチドの影響 L-Lys-L-Gluジペプチドの薬効を、体重2～3 kgの雌雄の“Shinshilla”ウサギの大腿柔組織の化膿性創傷・挫傷モデルについて評価した。このため、ウサギの大腿柔組織領域の毛を剃り、その後5センチの長さ、2センチの深さで切開した。柔組織（筋肉、皮下脂肪）を、Kocherの鉗子（forceps）で挫滅し、病原性混合物を感染させた：黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）菌株186。その後、その創傷を縫合した。72時間したら、縫合糸を取り除き、その創傷を3%過酸化水素溶液で処理した。

【0038】

実験グループの動物には、ジペプチドL-Lys-L-Gluを、注入当り1 μkgの1回投与量で5日間毎日筋内に注入した。コントロールのウサギには、同じ手法により塩化ナトリウム

10

20

30

40

50

溶液を注入した。治療プロセスでは、外用の防腐薬で創傷を処理した。

【0039】

炎症性プロセス後退 (regression) の動的変化における L-Lys- L-Gluジペプチドの薬効評価は、化膿壊死性塊から痂皮拒絶および創傷の一掃時期、創傷における粒状組織の出現時期、および輪郭の上皮形成の開始時期に基いて行われる。創傷プロセスの経過について客観的基準を同定する目的で、粒状組織の個々の細胞の構成要素および構造の半定量的特性を表す指標を、6、14、21、28および40日目に分析した。また、組織の酵素活性を評価した (5,6,7)。

【0040】

調査の結果、炎症の第一段階にある全グループの動物は、新たな線維芽細胞および組織球の拡散した粒状組織の薄い縁取りで取り囲まれた組織に、6日目に蔓延した壊死が現れた。10 増殖の段階では、壊死の小さな病巣が、管およびリンパ球を多量に有する粒状組織の厚い層で取り囲まれた。組織球の量が増大し、マクロファージは壊死性領域でクラスターを形成した。線維芽細胞は伸び広がり、薄い核を有していた。実験グループの動物では、細胞の構成要素の活性化プロセスが特に顕著であった (表1)。瘢痕形成の段階では、これらの動物に、成熟線維芽細胞を有する粒状組織の層で取り囲まれた壊死の病巣が現れた。線維芽細胞の間には、膠原線維の層が認められた。壊死領域に近い間隙性物質は、膠原前線維、線維芽細胞、吸収プロセスを示唆する組織球、および新たな粒状組織を有する壊死性組織の代替組織が含まれていた。

【0041】

L-Lys- L-Gluジペプチドの適用に対する組織応答の目立った特徴は、増殖段階において組織球の酸性ホスファターゼの活性が高いことにある。白血球浸潤の僅かな病巣において、および脈管内皮において、アルカリ性ホスファターゼの高い活性が認められた。瘢痕形成の段階において、高い含量の酸性ホスファターゼが組織球で安定化し、高い含量のアルカリ性ホスファターゼが白血球および管内で安定化した (表2)。20

【0042】

観察された変化により、組織の細胞代謝の増加、壊死組織から創傷表面が迅速に一掃され、その後、創傷上皮が形成されることが証明された (表3)。

【0043】

例4 一部肝切除後の肝臓の補償再生に対する L-Lys- L-Gluジペプチドの影響30
体重150~200 mgの26匹の異系交配した白色のオスラットについて研究を行った。その動物を以下の3つのグループに分けた：

第1グループ 健康な動物；

第2グループ コントロール（肝臓の2/3を切除された一部肝切除を受けたラット）；

第3グループ 前記手術を受け、その後（手術から2時間後および24時間後）L-Lys- L-Gluジペプチドを2回皮下注入されたラット（ラット当たり0.1 μkg）。

【0044】

同時に、第1グループと第2グループの動物を同体積の塩化ナトリウムを注入した。抽出した肝臓をホルマリンで固定した。

【0045】

手術を受けたラットは、手術から32時間後および96時間後にエーテルにより屠殺した。コントロールグループのラットも同時に屠殺した。これらの肝臓をホルマリンで固定した。ヘマトキシリン-エオシンで標本を染色した後、肝細胞の有糸分裂指数を規定し、細胞周期S期における倍数体細胞の量（分裂細胞の量）を規定した。40

【0046】

一部肝切除から32時間後の肝細胞を再生する有糸分裂活性の研究により、有糸分裂の数および細胞周期S期の細胞が、健康な動物の肝臓より2倍増大することが示された。これらの違いは、塩化ナトリウムを注入した場合には確かではないが、L-Lys- L-Gluジペプチドを注入した後では、有糸分裂の数、DNA合成細胞、および分裂細胞の全量が増大することは確かなことである。50

【0047】

肝切除から96時間後の肝臓標本の研究により、塩化ナトリウムを注入されたラットおよびL-Lys-L-Gluジペプチドを注入されたラットの両方が、肝細胞の有糸分裂活性の大幅な増大を示すことが証明された。第3グループと第2グループのデータを比較すると、L-Lys-L-Gluジペプチドを注入されたラットは、塩化ナトリウムを注入されたラットの2倍の有糸分裂数を有していることが明らかである。第3グループのラットの有糸分裂周期S期にある細胞の数は、第2グループのS期にある肝細胞の数と違いがなかったが、全体的に、肝切除から96時間後にはL-Lys-L-Gluジペプチドを注入されたラットの再生中の肝臓における分裂細胞の数は、塩化ナトリウムを注入されたラットより75%多かった（表4）。

10

【0048】

従って、一部肝切除から96時間後には、L-Lys-L-Gluジペプチドを注入されたラットは、肝細胞の有糸分裂活性の増大することが示され、これは肝臓における修復プロセスの促進に対する証拠となることが証明された。

【0049】

例5 放射線傷害後の腸管粘膜の再生に対するL-Lys-L-Gluジペプチドの影響

体重90～100グラムの24匹の2ヶ月の白色のウィスター系オスラットについて実験を行った。以下の3グループの動物を調べた：

第1グループ 健康な動物；

第2グループ コントロール（照射動物）；

20

第3グループ L-Lys-L-Gluジペプチドを注入された照射動物。

【0050】

「腸管死症候群」を誘発する1回の6Gyの全身線照射を、コバルト装置GUB 20000により200rad/minの線量で行った。

【0051】

この照射から24時間後に、腹腔内に5日間にわたってL-Lys-L-Gluジペプチドを注入した - 0.5mL塩化ナトリウム中0.5μkg。第1グループと第2グループの動物は、同じ手法により塩化ナトリウムを注入した。

【0052】

L-Lys-L-Gluジペプチドの作用の研究は、照射動物の十二指腸の近位切片について行った。

30

【0053】

照射から8日後（修復再生期間の開始）に、ネンブタール（nembutal）麻酔下（50mg/kg）で動物を屠殺した。十二指腸の一部を電子顕微鏡観察のためにKarnovskyにより24時間の間固定した。

【0054】

超微細構造の研究を、JEM-100S顕微鏡（JEOL, Japan）の下で、LKB-7A超ミクロトーム（LKB, Sweden）で調製した顕微鏡用の超薄切片について行い、ウラニルアセテートおよびクエン酸鉛によりコントラストをつけた。

【0055】

1%トルイジンブルー(Fluka)の0.5M HCl溶液(pH 0.5)を用いて、マスト細胞を選択的に染色した（8,9）。

40

【0056】

細胞の増殖活性を研究するため、増殖性細胞の核抗原 - PCNA - に対するマウスのモノクローナル抗体（clone PC 10, Calbiochem, the USA）を1:50で希釈して使用し、マウスの免疫グロブリンを明らかにするためにアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼのセット（Vectastain, the USA）を使用した。

【0057】

セロトニン陽性細胞を、セロトニンに対するウサギのポリクローナル抗体（Ready-to-Use）およびストレプタビシン - ビオチン - ペルオキシダーゼのセット（BioGenex, the USA

50

)を利用して明らかにした。MTL陽性細胞を明らかにするため、金属-チオネイン(1:2000)に対するウサギの抗体を使用した。

【0058】

組織学的切片における抗原の免疫組織化学的同定は、免疫性ペルオキシダーゼ法に対する主要な要件に従って行った(10,11)。

【0059】

定量研究は、顕微鏡画像のコンピュータ解析のシステム-IMSTAR(Imstar, France)-を利用して、Morphostar 2およびColquant 2のライセンス適用されたソフトウェアを採用して、形態測定の立体的解析の一般原理に従って行った(12,13)。各動物に対して、対応する構造の計算は、調査している器官の3つの切片により10の視野において行った。十二指腸細胞の有糸分裂指数(I_{mit})および増殖能力指標(I_{pcna})を、腸細胞の少なくとも1000個の核の全量を使用して、陰窩(crypt)の10~15の標準的切片で規定した。セロトニン陽性細胞およびマスト細胞が見出されるテスト領域は、少なくとも 3 mm^2 に及んだ。MTL陽性細胞は、100の十二指腸の陰窩で数えた。

【0060】

電離放射線のバックグラウンドに対して、8日目に、腸細胞の超微細構造の一部の(多くの場合ほとんど全ての)修復が観察されるが、過形成(膨張)ミトコンドリア、小胞体の水腫、およびそのときまで実質的に変化していないようにみえる細胞質、内分泌細胞の病巣の空胞化が更に起こる。

【0061】

6Gyの瞬時の全身への線照射から8日後に生存していた十二指腸の量的变化は、以下の特徴を示す:腸の陰窩における I_{pcna} は、46.5%まで増大し、有糸分裂指数は4.2%まで増大した(表5)。これらのデータは、生存していた動物の粘性上皮の修復が非常に早く起こり、この間、腸上皮の肝細胞が過剰再生の段階にあることを証明している(図1a)。

【0062】

ヘマトキシリンおよびエオシンで染色したプレパラートの組織学的研究は、上皮構築の標準化プロセスの開始の証拠となる。コンピューター解析の結果は、腸クロム親和細胞(図2a)およびMTL陽性細胞(図3a)の数的密度が、健康な動物のレベルに達していないことを示している。

【0063】

照射された動物の固有粘性プレートにあるマスト細胞の量は、10分の1まで減少し(図4a)、これは、電離放射線に対するマスト細胞の最大放射線感受性の証拠となり、致死量以下の量に晒されたときでさえ、修復が非常に遅いことを証明している。

【0064】

L-Lys-L-Gluジペプチドの注入により、小胞体の構造および十二指腸の内分泌腺細胞の板(plate complex)構造が活性化され、これが合成プロセスおよびホルモン分泌に対する刺激効果の証拠となる。

【0065】

形態解析の結果により、L-Lys-L-Gluジペプチドの注入後、照射された動物の腸の陰窩において、修復プロセスの大幅な促進がみられた(図1b)。PCNA指標は、49.8%に達したが、有糸分裂指数は4.7%であった(表5)。腸クロム親和細胞の量的密度は、健康な動物のものと実質的に同程度であった。陰窩の基板においてMTL陽性細胞の免疫染色の数および密度は増大する傾向にある(図3b)。

【0066】

L-Lys-L-Gluジペプチドの投与により、腸の幹細胞の増殖能が増大し、6Gyの瞬時の全身への線照射の後、腸管粘膜の形態-機能的再生が高まる。

【0067】

このように、実験研究により、L-Lys-L-Gluジペプチドは毒性がなく、代謝プロセスを活性化し、組織の細胞増殖活性を活性化し、再生を促進することが証明された。

10

20

30

40

50

【0068】

前臨床医学の研究で明らかにされた L-Lys-L-Gluジペプチドの特徴により、化膿炎症性疾患、術後合併症、栄養性障害、皮膚および粘膜の疾患および損傷、修復プロセスの障害を伴う放射線、熱性および化学的の後続効果に対して、組織再生の刺激薬として L-Lys-L-Gluジペプチドを予防的および/または治療的用途で処方することができる。

【0069】

以下に記載する、本発明のジペプチドの臨床研究の実施例により、その薬理学的特性が証明され、その特許性が確証される。

【0070】

例6 唾液腺の炎症および唾石症 (sialolithic disease) の治療として L-Lys-L-Gluジペプチドを使用する効果 10

45人の患者を観察した。このうち、27人が唾液腺に炎症をもち、4人が耳下腺炎に罹患していた。18人が顎下腺の唾石症に罹患していた。患者の平均年齢は、35~40才であった。唾石症に罹患している患者は全て、結石を抽出した。30人の患者（15人が唾液腺に炎症をもち、他の15人が唾石症に罹患している）に、1 μg の L-Lys-L-Gluジペプチドを5日間毎日筋内に注入した。

【0071】

コントロールグループの患者に、標準的治療を行った：抗生物質、脱感受性治療、ヨード (iodine-dimexid) 包帯、理学療法（超音波療法、腺領域に対する5~10%沃化カリウム電気療法）、局所的治療（防腐薬および抗生物質溶液を用いた腺の洗浄）を行った。 20

【0072】

唾石症に罹患していて、L-Lys-L-Gluジペプチドによる治療を受けた患者は、腺病巣からの膿の排出が止まり、手術後、後続効果もなく第一過程で口腔の創傷は治癒された。口腔の柔組織および粘膜の腫脹および浸潤は、手術後3~4日目に解消された。腺の大きさはかなり減少し、痛みは止まった。

【0073】

唾液腺に炎症をもち、L-Lys-L-Gluジペプチドによる治療を受けた患者は、手術後4~5日目に、腺の痛みは止まり、腺病巣からの有無の排出も止まり、唾液分泌が増大し、柔組織の膨張および浸潤は解消され；触診すると、腺のサイズはかなり縮小し、痛みもなかった。患者の全身状態は改善された。この実験室試験は規格化された。 30

【0074】

従って、L-Lys-L-Gluジペプチドの使用により、炎症の数は減少し、創傷の再生は促進され、治療期間は短縮された。

【0075】

例7 種々の位置の化膿炎症性疾患の治療として L-Lys-L-Gluジペプチドを使用する効果

L-Lys-L-Gluジペプチドを、下肢および上肢に不活発な肉芽創傷を有する9人の患者；および上顎顎面領域に急性化膿性炎症を有する19人の患者の複合治療において使用した。1 μg の L-Lys-L-Gluジペプチド製剤を10日間毎日筋内に注入した。その治療効果を、創傷酵素の活性変化および治癒時間による動的変化で評価した。 40

【0076】

L-Lys-L-Gluジペプチドが、創傷プロセスの第一および第二期における蛋白分解酵素活性が低い患者、サイトグラム (cytogram) の壊死タイプの患者、治癒の遅い患者に最も効果があることが判った。L-Lys-L-Gluジペプチドにより、創傷プロセス第一期における創傷の発酵活性が増大し、創傷での適応修復が引き起こされ、これが、組織球における酸性ホスファターゼの合成、白血球におけるアルカリ性ホスファターゼの合成、マクロファージにおけるCチトクロームの合成を可能にし、修復プロセスを増強させた。このジペプチドの投与により、壊死性組織からの創傷の除去が促進され、炎症病巣ではマクロファージ、線維芽細胞、および白血球の活性化により創傷が治癒された。

【0077】

L-Lys-L-Gluジペプチドの治療により、局所炎症性プロセスの速やかな一掃、患者の全身状態の改善、治療期間の短縮という結果に至った。

【0078】

例8 術後合併症を有する癌患者に対してL-Lys-L-Gluジペプチドを使用する効果

L-Lys-L-Gluジペプチドを、第2～第3期の肺癌および第2～第3期の胃癌の外科的治療後の不活発な肉芽創傷を有する9人の患者の複合治療において使用した。

【0079】

手術前の間、根本的な計画の放射線治療を、直線電子加速器（そのパワー 4.3Mev）およびガンマ治療装置「Rokus-M」（ブレーキモード）で、複雑な構造の広い範囲を使用して患者を行った。特別なケースにおいて、複合治療の要素の一つは化学療法であった。 10

【0080】

手術後3日目から、1μkgのL-Lys-L-Gluジペプチドを10日間毎日筋内に注入した。

【0081】

前記製剤の使用により、創傷領域における水腫および疼痛が減少し、壊死性組織からの創傷除去が促進され、術後の瘢痕形成が促進されることが見出された。注入の間、以下の要素が観察された：温度の正常化、食欲の改善および体重の迅速な増加。

【0082】

このように、癌患者の複合治療の一部としてL-Lys-L-Gluジペプチドを使用すると、組織の修復プロセスが刺激され、患者の全身状態の改善が促進され、治療期間が短縮される。 20

【0083】

L-リシル-L-グルタミン酸（L-Lys-L-Glu）の臨床上の適用により、実験研究から得られたデータを用いて、前記製剤が修復プロセスの障害に対する有効な治療薬であることが実証された。

【0084】

【表1】

表1 柔組織に化膿性創傷・挫傷を有するウサギにおける、細胞の構成要素および構造の動的変化に対するL-Lys-Gluジペプチドの影響

動物 グループ	観察期間 (日)	細胞の構成要素および構造(定式のポイント)				
		線維芽細胞	組織球	白血球	マクロファージ	壊死
コントロール	6	2	3	5	2	5
	14	3	3	5	2	4
	21	4	4	4	3	4
	28	4	4	2	3	2
	40	4	4	2	5	2
ジペプチド L-Lys-L-Glu	6	4*	4	5	3	3*
	14	5*	5*	5	3	2*
	21	5	5	4	2	2*
	28	5	4	4*	2	1
	40	6*	6*	2	2*	1

*—コントロールグループの動物の指標と比較してP<0.05。

注:

- 1点—なし;
- 2点—たった一つ(ほんの僅か);
- 3点—少数;
- 4点—散在する(中程度);
- 5点—多い;
- 6点—非常に多い。

【0085】

【表2】

10

20

30

表2 柔組織に化膿性創傷・挫傷を有するウサギにおける、
組織の酵素活性に対する L-Lys-L-Glu ジペプチドの影響

動物 グループ	観察期間 (日)	組織球の 酸性 ホスファターゼ (定式のポイント)	白血球の アルカリ性 ホスファターゼ (定式のポイント)	管内の アルカリ性 ホスファターゼ (定式のポイント)
コントロール	6	3	3	2
	14	4	4	4
	21	4	4	3
	28	3	5	3
	40	3	5	2
ジペプチド L-Lys-L-Glu	6	5*	6*	6*
	14	6*	6*	5
	21	5	5	5*
	28	5*	6	4
	40	5*	5	4*

*—コントロールグループの動物の指標と比較してP<0.05。

注:

- 1点—なし;
- 2点—たった一つ(ほんの僅か);
- 3点—少數;
- 4点—散在する(中程度);
- 5点—多い;
- 6点—非常に多い。

【0086】

【表3】

10

20

30

表3 柔組織に化膿性創傷・挫傷を有するウサギにおける、
創傷プロセスの期間に対する L-Lys-L-Glu ジペプチドの影響

動物 グループ	創傷表面から 壊死性組織の 拒絶が始まる 期間(日)	壊死性組織 から創傷表面 を完全に一掃 する期間(日)	創傷上皮 形成の期間 (日)
コント ロール	12,9±1,2	21,1±3,2	31,8±1,7
L-Lys-L-Glu ジペプチド	8,3±1,1*	14,2±1,3*	24,9±1,9*

*—コントロール動物の指標と比較してP<0.05。

【0087】

【表4】

表4 一部肝切除から32時間後および96時間後の
ラットの再生中の肝臓における分裂細胞の数に対する
L-Lys-L-Glu ジペプチドの影響(肝臓の全細胞数に対する%)

動物 グループ	研究期間		有糸分裂 指数	DNA合成期 にある細胞の %	分裂細胞の 総数
健康な動物 + 塩化ナトリウム	—		0,682±0,013	1,752±0,463	3,403±0,498
コントロール (一部肝切除+ 塩化ナトリウム)	32 時間	前	0,431±0,019	1,043±0,127	1,474±0,143
		後	1,364±0,595	2,063±0,474	3,427±1,066
	96 時間	前	0,417±0,053	0,924±0,091	1,342±0,060
一部肝切除+ L-Lys-L-Glu ジペプチド		後	2,012±0,146*	3,417±0,295*	5,429±0,388*
	32 時間	前	0,450±0,067	0,870±0,100	1,320±0,159
		後	2,314±0,461**	3,882±0,839**	6,196±1,279**
	96 時間	前	0,294±0,084	0,982±0,141	1,276±0,128
		後	4,846±0,334*&	4,664±1,315**	9,510±1,609*#

*—手術前の指標と比較してP<0.001;

**—手術前の指標と比較してP<0.05;

&—コントロールグループの動物の指標と比較してP<0.001;

#—コントロールグループの動物の指標と比較してP<0.05。

表5 形態学的画像のコンピューター解析データに基づいた、
ラット十二指腸における再生の主パラメーターの量特性に対する
L-Lys-L-Glu ジペプチドの影響

動物 グループ	I_{mit} , %	I_{PCNA} , %	P_{ser} , %	$N_{MC}/1 \text{ mm}^2$	$N_{MT}/100$ 陰窓
健康な 動物	2,9±0,1	44,8±0,2	0,64±0,02	169±23	132±8
コントロール (照射された 動物+生理 学的溶液)	4,2±0,4*	46,5±0,7*	0,43±0,08*	18±2*	75±8*
照射された 動物+ L-Lys-L-Glu ジペプチド	4,7±0,1*	49,8±0,7**	0,71±0,09	24±3*	102±9*

10

20

* - 健康な動物の指標と比較して $P < 0.05$;

** - コントロールグループの指標と比較して $P < 0.05$ 。

注:

I_{mit} は、有糸分裂指数(%) = $N_{mit}/N_{total} \times 100$;

30

I_{pcna} は、細胞の増殖能力指標-PCNA(%) = $N_{pcna}/N_{total} \times 100$;

P_{ser} は、セロトニン免疫陽性細胞の体積密度(組織体積中におけるセロトニン免疫陽性細胞含量の積分指標%);

$N_{MC}/1 \text{ 平方 mm}$ は、1平方 mmあたりのマスト細胞の量;

$N_{MT}/100$ 陰窓は、100の腸管陰窓中の L-陽性細胞の量である。

【0089】

【表6】

参照文献

1. M.Mashkovsky Medicinal substances. In two parts./ Moscow: Medicine.1993.-Part 2. - P.161-191.
2. SERVA -Catalog.- Heidelberg,1987/88. -PE 1- PE40.
3. Patent of the Russian Federation N 2080120 "Medicinal substance possessing immune-modulating activity". BI N 15.27.05.97.
4. H.-D. Yakubke, X. Eshkait. Aminoacids, peptides, proteins: Transl. from German./ Moscow, Mir, 1985. - 456 p. 10
5. V. Balin, D. Madai, D. Tsvigailo. Local treatment of purulent surgical skin and subcutaneous fat diseases in the conditions of regulated activity of wound enzymes./ St.Petersburg, 1996. - 37 p.

6. V.Kolodin, O. Kuznetsov Quantitative cytochemical revealing of enzymes in the cell culture after the Rowse virus infecting// Vopr. Onkol. (Problems in oncology).- 1975.- Vol.21, N 9. - P.65-71.
7. M. Berston Histochemistry of Enzymes. - Moscow, Mir, 1965. - 464 p. 20
8. Enerback L., Miller H.R.P., Mayrhofer G. Methods for the identification and characterization of mast cells by light microscopy //Mast cell differentiation and heterogeneity / Eds. A.D. Beifus et al. Raven Press, New York, 1986. - P. 405-416
9. Stead R. H., Dixon M.F., Bramwell N.H. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa // Gastroenterology. - 1987.- Vol. 87. - P. 575-585.
10. Polack G., van Norden S. Introduction into immunocytochemistry: modern methods and problems: Transl. from English. - Moscow, Mir,1987. - 74 p.
11. Kvetnoy I., Yuzhakov .V. Staining endocrine tissue and elements of APUD- system // Microscopic technique: Manual/ Eds. D. Sarkisov, Y. Perov. - Moscow, Medicine, 1966. 30 - P. 375 - 418.
12. G. Avtandilov. Medical morphometry. Manual. Moscow, 1990 . - 384 p.
13. Weibel E.R., Kistler G.S., Scherle W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology // J.Cell Biol. - 1966. - Vol.30. - P.23-38.

【図面の簡単な説明】

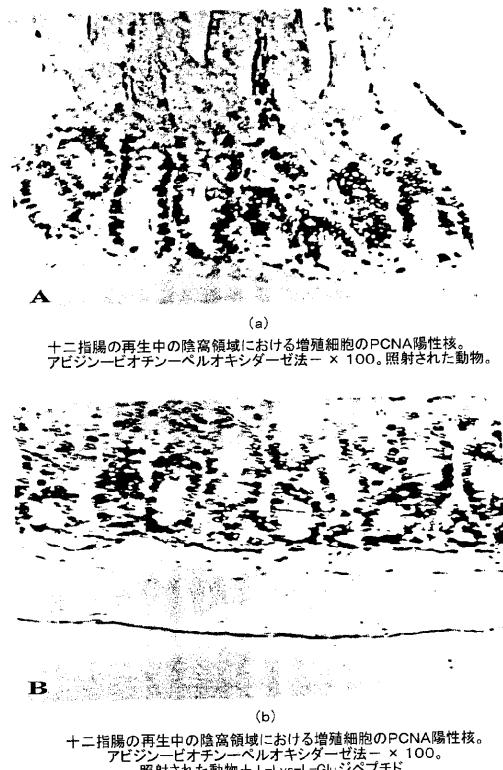
【図 1】 十二指腸の再生中の陰窩領域における増殖細胞の P C N A 陽性核を示す顕微鏡写真。

【図 2】 十二指腸の粘膜におけるセロトニン免疫陽性細胞を示す顕微鏡写真。 40

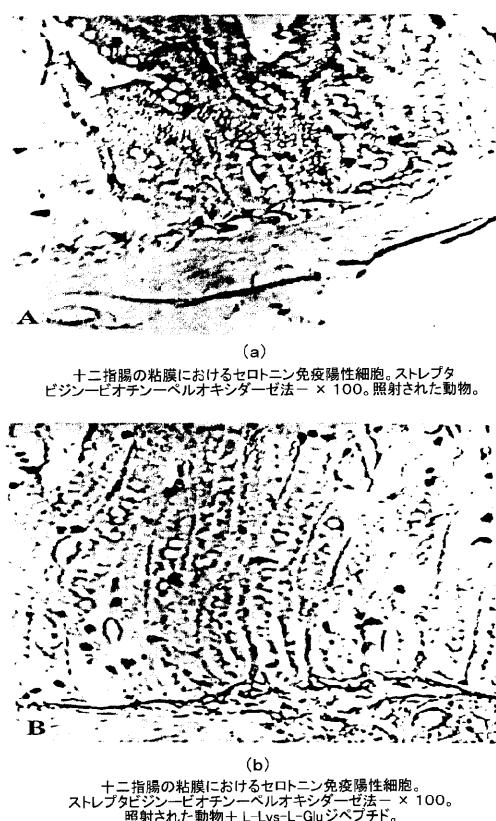
【図 3】 十二指腸の粘膜におけるメタロチオネイン免疫陽性細胞 (MTL陽性細胞の組織局所解剖学的局在) を示す顕微鏡写真。

【図 4】 十二指腸の粘膜におけるマスト細胞を示す顕微鏡写真。

【図1】



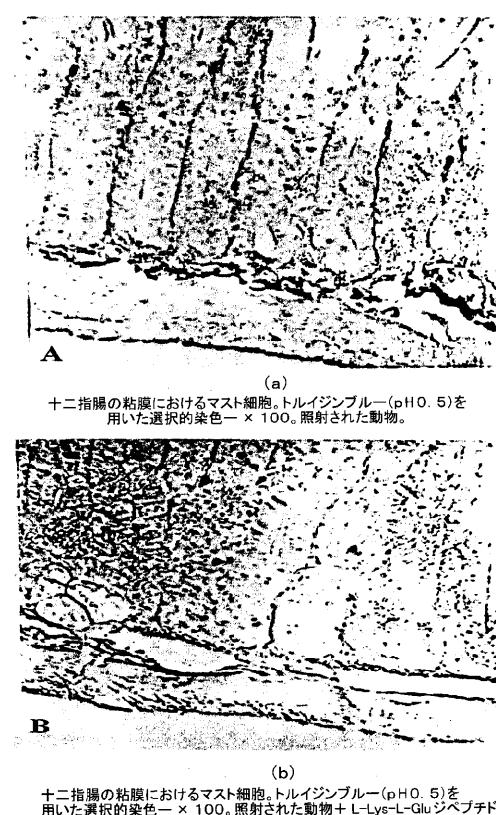
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 61 P 43/00 (2006.01) A 61 P 43/00 107

- (72)発明者 カビンソン、ウラジミール・カッケレビッテ
ロシア国、197374 サンクト・ペテルブルグ、ユーエル・サブシュキナ 26-2-7
- (72)発明者 モロゾフ、ビャチェスラフ・グリゴリエビッチ
ロシア国、188710 レニングラードスカヤ・オービーエル、ブセボロズスク、ユーエル・バ
ジレオゼルスカヤ 8/6-184
- (72)発明者 マリーニン、ウラジミール・ピクトロビッチ
ロシア国、197227 サンクト・ペテルブルグ、セレブリストイ・ブルバー 16-16-9
2
- (72)発明者 セリー、セルゲイ・ウラジミロビッチ
ロシア国、188650 レニングラードスカヤ・オービーエル、ブセボロジスキイ・アール・オ
ン、ピーオーエス・セルトロボ、ユーエル・モロズセバ 14-20

審査官 長部 喜幸

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)