

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3628689号
(P3628689)

(45) 発行日 平成17年3月16日(2005.3.16)

(24) 登録日 平成16年12月17日(2004.12.17)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 29/00

請求項の数 19 (全 26 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平5-509106 (86) (22) 出願日 平成4年11月19日(1992.11.19) (65) 公表番号 特表平7-508497 (43) 公表日 平成7年9月21日(1995.9.21) (86) 国際出願番号 PCT/GB1992/002137 (87) 国際公開番号 W01993/010148 (87) 国際公開日 平成5年5月27日(1993.5.27) 審査請求日 平成11年11月17日(1999.11.17) (31) 優先権主張番号 9124500.1 (32) 優先日 平成3年11月19日(1991.11.19) (33) 優先権主張国 英国(GB) (31) 優先権主張番号 9210013.0 (32) 優先日 平成4年5月8日(1992.5.8) (33) 優先権主張国 英国(GB)</p>	<p>(73) 特許権者 504311626 ペプテック(ユーケイ)リミティド イギリス国, ロンドン イーシー4エム 8エスエイチ, ワン セント ポールズ チャーチャード(番地なし) (74) 代理人 100077517 弁理士 石田 敬 (74) 代理人 100086276 弁理士 吉田 維夫 (74) 代理人 100082898 弁理士 西山 雅也</p>
--	---

最終頁に続く

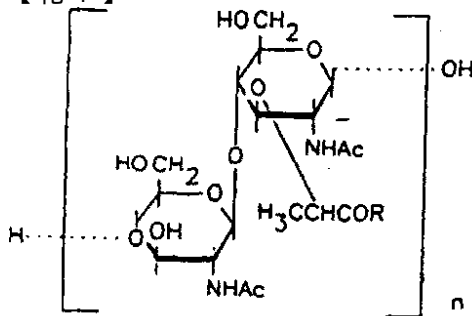
(54) 【発明の名称】 敗血症性ショックの治療のためのムラミル化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

内毒素により媒介される炎症状態を処置又は予防するための医薬組成物であって、有効な量の次の一般構造式IIのムラミルペプチド化合物：

【化1】



II

〔式中、

Rは、アミノ酸基又は2～6個のアミノ酸残基から成る線形ペプチドであり、少なくとも1つの残基が親油性基で任意的に置換されており、

nが1又は2である〕を含んで成る組成物。

【請求項 2】

前記内毒素がリポ多糖である、請求の範囲第 1 項記載の組成物。

【請求項 3】

n が 1 である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の組成物。

【請求項 4】

近位アミノ酸残基が L アミノ酸の残基である、請求の範囲第 1 項乃至第 3 項のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

近位アミノ酸残基又は 1 つしかない場合は唯一のアミノ酸残基が L - アラニンの残基である、請求の範囲第 4 項に記載の組成物。

10

【請求項 6】

ペプチドの近位末端からの第 2 のアミノ酸残基が存在する場合、それが D - 形態のものである、請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記第 2 のアミノ酸残基が D - グルタミン酸又は D - アスパラギン酸又はそのモノ -、ジ - 又は混合 C₁ - C₂₂ アルキルエステル、アミド又は C₁ - C₄ アルキルアミドのものである、請求の範囲第 6 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記第 2 のアミノ酸残基が D - イソグルタミル又は D - グルタミルである、請求の範囲第 1 項乃至第 7 項のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 9】

ペプチドの近位端部からの第 3 のアミノ酸残基が存在する場合、それが L 形態のものである、請求の範囲第 1 項乃至第 8 項のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

第 3 のアミノ酸残基が L - アラニル又は L - リシルである、請求の範囲第 9 項に記載の組成物。

【請求項 11】

アミノ酸残基又は線形ペプチドが少なくとも 1 つの親油性基で任意に置換されている、請求の範囲第 1 項乃至第 10 項のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

化合物が N - アセチル - グルコサミニル - N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン (GMDP) である、請求の範囲第 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 13】

化合物が、

N - アセチル - グルコサミニル - N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - グルタミン酸 (GMDP - A) ;

N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - グルタミン n - ブチルエステル (GMDP - OBu) ;

N - [N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミル] - N - ステアロイル - L - リシン (GMDP - Lys (St)) ;

40

N - [N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - グルタミル] - N - ステアロイル - L - リシン (GMDPA - Lys (St)) ;

N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - グルタミン酸ジベンジルエステル (GMDPA (OBzl)₂) ;

N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - N - メチル - L - アラニル - D - イソグルタミン (Me - GMDP) ;

N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - (1 - 4) - N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - ビス -

50

(L - アラニル - D - イソグルタミン) ((GMDP)₂) ;
 N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - (1 - 4)
) - N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - ビス -
 (L - アラニル - D - グルタミン酸) ((GMDPA)₂) ;
 N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - (1 - 4)
) - N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - ビス -
 (L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - リジン) ((GMDP Lys)₂) ;
 N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - (1 - 4)
) - N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - ビス -
 [L - アラニル - D - イソグルタミニル - N - ステアロイル - L - リジン] ([GMDP -
 Lys (St)]₂) ;
 N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - - L - アラ
 ニル - D - イソグルタミン 1 - アダマンチルエステル (GMDP - Ad) ;
 L - トレオニル - N - [N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセ
 チル - ムラミル - L - アラニル - - D - イソグルタミニル] - L - リシル - L - プロリ
 ル - L - アルギニン (GMDP - タフトシン E) ;
 N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチル - ムラミル - L - アラ
 ニル - - D - イソグルタミニル - L - トレオニル - L - リシル - L - プロリル - E - ア
 ルギニン (GMDP - タフトシン) A ;
 N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニ
 ル - - D - グルタミル - L - トレオニル - N - ステアロイル - L - リシル - L - プロ
 リル - L - アルギニン (親油性 GMD PA - タフトシン)
 N - [N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチル - ムラミル -
 L - アラニル - - D - イソグルタミニル] - L - リシル - L - ヒスチジル - L - グリシ
 ンアミド (GMD PA - プルシン)
 N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニ
 ル - D - イソグルタミニル - L - グルタミニル - L - トリプトファン (GMDP - チモゲン I
)
 N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニ
 ル - D - イソグルタミニル - - アミノヘキサノイル - L - グルタミル - L - トリプトフ
 ザン (GMDP - チモゲン II) ;
 N - [N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - 4) - N - アセチル - ムラミル -
 L - アラニル - D - イソグルタミニル] - N - ステアロイル - L - リシル - L - グルタ
 ミル - L - トリプトファン (GMDP - チモゲン III) ;
 N - アセチルムラミル - L - トレオニル - D - イソグルタミン (Thr - MDP) ; 又は、
 N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - グルタミン n - ブチルエステル (ムラブチ
 ド)、

である、請求の範囲第 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

生命を脅かす炎症状態が敗血症性ショックである、請求の範囲第 1 項乃至第 13 項のいずれ
 が 1 項に記載の組成物。 40

【請求項 1 5】

生命を脅かす炎症状態が全身性細菌感染の結果である、請求の範囲第 1 項乃至第 14 項のい
 ずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

生命を脅かす炎症状態が、外科手術中又はその後の細菌感染の結果である、請求の範囲第
 1 項乃至第 15 項のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

生命を脅かす炎症状態が、肺炎、穿孔性潰瘍、膵臓壊死、又は胆のうの炎症からくる器官
 の慢性又は急性細菌感染の結果である、請求の範囲第 1 項乃至第 15 項のいずれか 1 項に記 50

載の組成物。

【請求項18】

生命を脅かす炎症状態が悪液質である、請求の範囲第1項乃至第17項のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項19】

前記混合 $C_1 - C_{22}$ アルキルエステルが $C_1 - C_6$ アルキルエステルである、請求の範囲第7項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

本発明は、セプシス、敗血症性ショック及びその他の生命を脅かす炎症状態の治療及び予防に関する。

全身性細菌感染（菌血症）の死亡率は高く、特にグラム陰性菌感染については死亡率レベルが数十年前のレベルに今なお匹敵している。院内感染は、社会感染に比べ高い死亡率をもつ；細菌感染による術後合併症は、世界中の多くの病院において現実的な問題となっている。グラム陰性菌血症は敗血症性ショックによるものであることが多い。

敗血症性ショック（毒物ショックとしても知られている）は、低血圧及び/又は器官の灌流低下の形跡を特徴とする生命を脅かす急性の炎症状態である。低血圧は、血管抵抗の減少の結果もたらされる。多数の器官不全及び凝固異常が往々にして発生する。

敗血症性ショックの現行の管理には、必要な場合に血液量減少を補正するため攻撃性流体の交換を伴う集中的な血液力学的監視、及び心臓出力を増大させることによる血圧上昇のための変力作用薬の投与が含まれる。これらの薬物のいくつか、特にノルアドレナリンは血管狭窄も引き起こし、従って末梢抵抗を増大させる。付加的な裏づけされた手段が往々にして要求され、これには血液透析、機械的通気及び非経口栄養が含まれる。潜在する感染は、抗生物質又はその他の抗菌薬といった抗感染症作用物質で治療される。

その他の生命を脅かす炎症状態には、ガンや慢性的感染例えばHIVウイルスといったウイルスによる感染から生じ得る慢性的状態である悪液質が含まれる。悪液質は、高トリグリセリド血症を伴う脂質代謝異常、タンパク質及びグルコース代謝異常及び体力消耗によって特徴づけられる。これは同様に、全身性細菌感染にも関与する可能性がある。

本発明は同様に、肺炎、外科創傷感染、小骨盤化膿、腹膜炎、腹膜膿瘍、結腸周囲フィステル形成膿瘍、胆管炎、胆のう蓄膿症、前腹部フレグモーネシグマのフレグモーネ及び注射後の膿瘍といったその他の感染及び炎症状態ならびに関連する内毒素血症、グルコース低下、低血圧、心臓不整脈及び血管拡張といった合併症にも関する。

今日、開業医が利用できる抗感染症剤には印象的なものが数多く存在する。抗生物質が重要な抗菌薬のサブグループを形成している。抗生物質は、微生物から誘導された抗菌薬である。これには、ペニシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール及びクロテトラサイクリンが含まれる。1958年のピニシリン核、6-アミノ-ペニシラン酸（6-APA）の発見及び分離は、その数多くが今なお使用されている新しい数多くのペニシリンの合成の基礎を提供した。抗生物質以外のその他の抗菌薬も又、数多くの治療法の基礎を形成している；その例としては、往々にして同時投与されるスルフォンアミド及びトリメトプリムがある。

敗血症性ショックといった生命を脅かす炎症状態が連続的に増大し又発生率が高まっていることから、有効な抗菌薬を含む数多くの化学療法剤の利用可能性は、それらを治療し予防するという問題を解決してくれていない。実際、有効な抗菌性化学療法は逆説的にも、敗血症性ショック及びその他の合併症の可能性を増大させている：殺された細菌細胞の壁からの内毒素及びその構成成分であるリポ多糖フラグメントは、場合によっては特にTNF

といった腫瘍壊死因子（TNF）のレベルの上昇を導くことによって、敗血症性ショックに関する媒介物でありうる。本発明が解決しようとするのは、敗血症性ショック及びその他の生命を脅かす炎症状態を治療し予防するという問題である。

進行性敗血症及び敗血症性ショックを治療するか又は予防する上で一群のムラミルペプチド化合物が有用であることが発見された。いくつかのムラミルジペプチド（MDPs）は、免疫強化、抗腫瘍及び或る種の抗菌活性をもつものとしてこれまでに開示されてきた。しかし

10

20

30

40

50

ながらMDPは、内毒素の活性と相乗作用する（Parant,M.及びChedid,L.「内毒素とMDPの間の相乗作用のさまざまな様相」、Adv.Exptl.Med.Biol.256 537～547（1990））か或は少なくともその効果を悪化（Langhans et al.,Am.J.Physiol.261 R659（1991））させるものであることがわかっており、従って、少なくとも部分的であれ内毒素によって媒介されると信じられている状態を治療するのに有用であるとはほとんど期待できない。さらに、本発明の基礎を成す薬学的有益性をMDPの既知の抗菌作用から予測できないという事実は、敗血症性ショック及びその他の往々にして致命的な炎症状態と戦う上で数多くの既知の抗菌薬が臨床医のニーズを満たせないでいるということによって裏付けされている。本発明は、MDPが一般にリポ多糖（LPS）と相乗作用して炎症及び死亡をひきおこすという事実にも関わらず、いくつかのムラミルペプチド化合物は実際にインビトロ及びインビボで内毒素活性を拮抗することができるという発見に基づいている。従って、上述の技術分野での教示にもかかわらず、全てとは言わないまでもいくつかのムラミルペプチド化合物は、LPSといった内毒素により媒介される敗血症性ショック及びその他の生命を脅かす炎症状態の治療、予防又は管理において有用である。さらに又、本発明において有用なムラミルペプチド化合物は、過度の実験が関与しない日常的試験をベースとして容易に同定することができる。

免疫系の非特異的刺激が、細菌又は細菌細胞から抽出された成分に対する露呈によりもたらされうるということは、ずいぶん前から知られている。この活性の原因となる特異的成分は、細胞壁の糖含有ペプチドとして同定されており、ペプチドのさらなる生化学分析がこれらを細胞壁のペプチドグリカン成分として同定している。有効な最小合成成分はN - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミンであることが発見された（Merse et al.Biochem Biophys.Res.Comm.66 1316（1975））。この化合物（現在往々にして「始原型ムラミルジペプチド」又は「始原型MDP」と呼ばれている）のもつ細菌感染からマウスを防御する能力（*Klebsiella pneumonia*（肺炎杆菌））についてはすでに記述されてきた（Chedid et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74 2089（1977））。

その後、始原型ムラミルジペプチドの多様な類似体が合成され、そのうちのいくつかは免疫機能の回復又は免疫系の非特異的刺激のための治療として提案されてきた。これらの類似体及び始原型MDP自体が、ムラミルペプチド化合物である。

本発明の第1の態様に従うと、内毒素により媒介される炎症状態の治療又は予防のための薬剤の製造における、

- (a) 非発熱性又は低発熱性のものであり及び/又は
 - (b) 内毒素により誘発された体重損失及び/又は食欲減退を改善し、及び/又は
 - (c) TNF産生を減少させ；及び/又は、
 - (d) マクロファージを刺激して内毒素を処置させる、
- ムラミルペプチド化合物の利用、が提供されている。

この内毒素は通常はLPSであるが、本発明は、例えばウイルス又は真菌の内毒素といったその他の内毒素によって媒介される状態をも網羅する。

有意なことに、本発明において有用なムラミルペプチドは、敗血症の発症後の患者の治療のためにさえ使用可能である。始原型MDPの既知の特性に照らし合わせると、この発見事実は、正に予想外のことである。

MDPを使用して治療又は予防することのできる特に重要な炎症状態は、敗血症性ショックである。

「ムラミルペプチド化合物」という表現は当業者にとっては明確な意味をもつ。特にこれは、単数又は複数の糖残基を含み、そのうち往々にしてムラミン酸残基である少なくとも1つの糖残基が少なくとも1つ又は複数の（通常は2つ以上）アミノ酸残基で置換されている化合物のことを言う。ムラミルペプチド化合物は、哺乳動物における細胞抗原性応答を強化することができ、かつ始原性ムラミルジペプチド（MDP）又はその類似体又は誘導体であるペプチド - グリカンでありうる。

「非発熱性又は低発熱性の」という表現は、その1～2mgの投与後に0.5度未満の成人体温の上昇を誘発する化合物のことを意味する。

10

20

30

40

50

US4357322号では、炎症の治療において或る種のムラミルジペプチドが有用でありうるということが示唆された。しかしながら、炎症状態の範囲は広く、わずかな創傷の後に発生する炎症から自己免疫疾患、細菌、真菌及びウイルス性感染及びガンにまで及ぶ。

化合物を用いて正確にどの炎症状態を有効に治療できるかは、US4357333からは明らかでなく、確かにLPS媒介の炎症状態についての言及は全くなされていない。その上、この先行技術の文書の中で選定されている好ましい化合物はムラミルジペプチド、デスメチルムラミルジペプチド及びその誘導体であり、それ以後に、この先行技術文書の教示とは反対に、これらの化合物のいくつかはLPS媒介の炎症を軽減せず、実際にはそれを悪化させるということが立証されてきた (Parant et al. Journal of Leukocytology Biology (白血球生物学ジャーナル、47、164 - 169 (1990)))。

10

本発明において有用なムラミルペプチド化合物は、以上で簡単に述べたように、その特性のいくつかによって同定されうる。実際はいくつかの共通の因果関係をもちうるこれらの特性は、以下のように決定できる。

まず第1に、本発明において有用なムラミルペプチド化合物は、非発熱性でありうる。発熱性は当該技術分野において周知の方法によって簡単に測定できる。候補であるムラミルペプチド化合物が患者及び/又は実験動物の体温において統計的かつ生理学的に有意な上昇を生じさせない場合、それは本発明において有用であるのに充分非発熱性であるとみなされうる。始原型MDPIは、本発明で有用であるには発熱性があり過ぎ、従ってこの試験では不合格である。

第2に、本発明において有用なムラミルペプチド化合物は、特にLPS投与に先立って投与された場合、リポ多糖 (LPS) により誘発される体重損失及び/又は食欲減退を改善する能力をもつ可能性がある。

20

セプシス特に敗血症及び敗血症性ショックの間、体重の急速な損失が観察される。この体重損失は又、実験動物をLPSといった内毒素で処置することによっても実証できる。動物を特定のムラミルペプチド化合物で処置するとLPSの体重損失誘発効果の悪化という結果がもたらされ、一方本発明で有用なその他のMDPsムラミルペプチド化合物は体重損失に対する防御を与える。LPSの生理学的続発症の1つに対するこの防御効果は、LPSの効果が生理学的に有意なものである状態及び敗血症性ショックにおいて臨床的に有用なものでありうるムラミルペプチド化合物の迅速な同定を可能にしている。ムラミルペプチド化合物は一般に、発熱効果と体重損失誘発効果の両方を有している始原型ムラミルジペプチド (MD

30

P) 自体はLPS活性を悪化させ、従って動物の体重損失を強める結果となる (Langhans et al. Am. J. Physiol. 261 R659 (1991))。体重損失の誘発な部分的にはこのような化合物の食欲減退効果によるものと考えられている (すなわち、食物の摂取を減少させる)。始原型MDP及びLPSは両方共食欲減退作用をもつ。従って、ムラミルペプチド化合物は、LPSが循環内に放出される状態 (例えば、セプシス) の治療において適切でないと思われることになる。この考察事項及びその関連する発熱性の結果として、ムラミルペプチド化合物はセプシスの治療においてその地位を見い出すことはなかった。ここでは、予想事実に対する効果をいくつかのMDP類似体が有していることが示されている ; すなわち、これらの類似体は、始原型MDPとは異なりLPSの効果を改善する (Langhans et al. 1991)。さらに、この考察事実はこのムラミルペプチド化合物が本発明において有用であるかを決定する

40

ための適切なベースを構成している。以下のような実験プロトコルに従うことができる。体重80~100gのWistar - Porton系統のラットを、各々6匹ずつ含む4つのグループに無作為化する。動物を通常の動物小屋条件に一匹ずつ単独で閉じ込め、標準R & Mペレットで任意に給餌する。グループ1の動物は、適切な期間だけ (例えば7日間)、適当な用量で (例えば150 µg/kg/日) 試験対象のムラミルペプチド化合物で処置する。グループ2の動物は、グループ1の場合と同じように (例えば7日間150 µg/kg/日) 試験対象の化合物で処置し、適切な期間中 (例えば6日目と7日目) 適当な用量 (例えば3mg/kg) でリポ多糖 (LPS) を与える。グループ3の動物は、食塩水で処置する。グループ4の動物は、グループ3の場合と同じように食塩水で処置し、グループ2の場合と同様にLPSでも処置する。動物の体重を監視する。

50

本発明において有用な化合物は、適切な用量でLPS誘発された体重損失の統計的に有意な改善を結果としてもたらすような化合物である。例えば、以下で説明するように本発明において有用な化合物であるグルコサミニルムラミルジペプチド (GMDP) を上述の試験に付した場合、体重損失は、グループ 1 ~ 4 の各々における動物の最終的体重を示す図 1 に示されているような結果となる；統計的に有意な改善が見られる (グループ 2 及び 4 の比較については $P < 0.032$; グループ 3 と 4 の比較については $P < 0.001$)。

本発明において有用な化合物は同様に、適当な用量でLPS誘発された食欲減退の統計的に有意な改善を結果としてもたらす化合物でもありうる。例えば、GMDPが上述の試験に付された場合、食欲減退は、グループ 1 ~ 4 の各々において食べた食物を示す図 2 に示されたような結果となる；統計的に有意な改善が見られる (グループ 2 及び 4 の比較については $P < 0.04$; グループ 3 と 4 の比較については $P < 0.001$)。

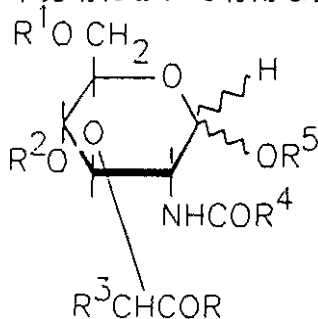
10

第 3 に、本発明において有用なムラミルペプチド化合物は、統計的及び生理学的に有意な程度まで、LPSで処置された患者又は動物における腫瘍壊死因子 (TNF) の産生を防止又は減少させる能力を有しうる。これに基づき、有用な化合物についての単純なスクリーンを設定することが可能である。

第 4 に、本発明において有用なムラミルペプチド化合物は、統計的及び生理学的に有意な程度まで、マクロファージがLPSを処置するのを刺激する能力を有しうる。この場合も又、これに基づいて、有用な化合物についての単純なスクリーンを設定することが可能である。

本発明において有用な多くのムラミルペプチド化合物は、以下の一般構造式 I に入る：

20



I

30

なお式中

R^1 は水素原子又は $C_1 - C_{22}$ アシル基を表わし、 R^2 は水素原子又は $C_1 - C_{22}$ アシル基を表わし、 R^3 は水素原子又は $C_1 - C_6$ アルキル基を表わし、 R^4 は $C_1 - C_{21}$ アルキル基又は C_6 又は C_{10} アリル基を表わし、

R^5 は水素原子を表わし；

R は、少なくとも 1 つの残基が任意に親油性原子団で置換されている、2 - 6 個のアミノ酸残基で構築された線形ペプチド又はアミノ酸の残基を表わしており、始原型ムラミルジペプチド及びデスメチルムラミルジペプチド以外のものである。

R^1 及び R^2 のための好ましいアシル基は、アセチルといった $C_1 - C_5$ アシル基である；アシル基内の炭素計数がカルボニル成分を含んでいないことがわかるだろう。 R^3 のための好ましいアルキル基はメチル及びエチルといった $C_1 - C_4$ アルキル基である。 R^4 のための好ましいアルキル基は、 $C_1 - C_6$ アルキル基特にメチル又はエチルなどの $C_1 - C_4$ アルキル基である；フェニルが、好ましいアリル基である。

40

R は好ましくはモノ -、ジ -、又はトリ - ペプチドを表わす、近位のペプチド残基 (又は 1 つしかない場合は唯一のペプチド残基) は好ましくは L - アミノ酸のものである。例としては以下のものが挙げられる。

L - アラニル	L - リトプトファニル
L - バリル	L - リシル
L - ロイシル	L - オルニチル

50

L - イソロクシル L - アルギニル
 L - - アミノブチリル L - ヒスチジル
 L - セリル L - グルタミル
 L - トレオニル L - グルタミニル
 L - メチオニル L - アスパルチル
 L - シスチニル L - アスパラギニル
 L - フェニルアラニル L - プロリル
 L - チロシル L - ヒドロキシプロリル

L - トレオニルと同様、L - アラニルが好まれる。

ペプチドの近位末端からの次のアミノ酸は好ましくはD - 配置のものである。これは好ま 10
 しくは酸性のものであり、D - グルタミン酸又はD - アスパラギン酸又はそのモノ - 、ジ
 - 又は混合C₁ - C₂₂ (好ましくはC₁ - C₆) アルキルエステル、アミド又はC₁ - C₄アルキル
 アミドであってよい。(「混合」という表現は、1つのカルボキシル基がアミド化されも
 う1つがエステル化されている場合に示される。D - イソグルタミン及びD - グルタミン
 酸塩が好ましい。

鎖の近位末端からの第3のアミノ酸残基が存在する場合、それは好ましくは近位アミノ酸
 残基に関連して前述したとおりL配置のものである。L - アラニル及びL - リシルが好ま
 れる。

アミノ酸残基又は線形ペプチドは、任意に少なくとも1つの親油性原子団で置換される。
 親油性原子団は、例えばC₁₀ - C₂₂アシル基の各々がパルミトイル基でありうるジ - (C₁₀ 20
 - C₂₂)アシル - sn - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスフェリルオキシ基又はステアロイ
 ルといったC₁₀ - C₂₂アシル基であってよい。親油性原子団は代替的に(又は複数の置換が
 存在しうる場合には付加的に)、C₂ - C₆エステル基といったC₁ - C₁₀エステル基でありう
 る。ブチルエステルがその1例である。

一般構造式Iの範囲内のムラミルジペプチドの例としては以下のものが含まれる：

ムロクタシン、別称MDP - Lys (L18) (N² - (N - アセチルムラミル - L - アラニル - D
 - イソグルタミニル) - N⁶ - ステアロイル - L - リジン)；

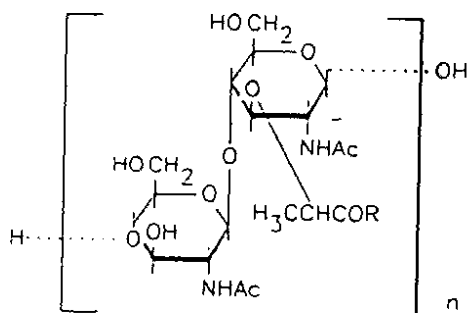
MTP - PE (N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - アラニ
 ル - 2 - (1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ヒドロキシ - ホスフォリル
 オキシ)エチルアミド、 - ナトリウム)； 30

ムラプチド (N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - グルタミン - - N - ブチルエ
 ステル)；及び

t - MDP (N - アセチルムラミル - L - トレオニル - D - イソグルタミン)。

ムロクタシンの調製についてはEP - A - 0021367及びUS - A - 4317771に開示されている。
 MTP - PEの調製についてはEP - A - 0025495に開示されている。ムラプチドの調製につい
 ては、Lefrancier et al, J. Med. Chem., 2587 (1982)の中に記述されている。t - MDPの調製
 物は、当該技術分野において既知の方法により調製されうる。ムラミルペプチド化合物の
 調製物についての詳細を示す特許公報としては一般にBE - A - 0834753, BE - A - 0834754,
 BE - A - 0847103, BE - A - 0849214, DE - A - 2710455, DE - A - 2922533, DE - A - 2747379,
 DE - A - 2912865, FR - A - 2355505, FR - A - 2358159, FR - A - 2375249, EP - A - 0004512, 40
 EP - A - 0002677, JP - A - 54063016, JP - A - 54073729, JP - A - 55019236, US - A - 40827
 35及びUS - A - 4082736が含まれる。(始原型ムラミルジペプチドの調製は、DE - A - 245
 0355及びUS - A - 4235771に開示されている)。本明細書に参照指示されている文書は、
 本書に参考として内含されるものである。

本発明において有用なムラミルジペプチドが全て一般構造式Iに入るわけではない。多く
 のものは、本発明において使用するためのはるかに好ましい一群の化合物を表わす一般構
 造式IIの中に入る：



II

10

なお式中

Rは、少なくとも1つの残基が親油性原子団で置換されている2 - 6個のアミノ酸残基で構築された線形ペプチド又はアミノ酸の残基を表わし；

nは1又は2である。

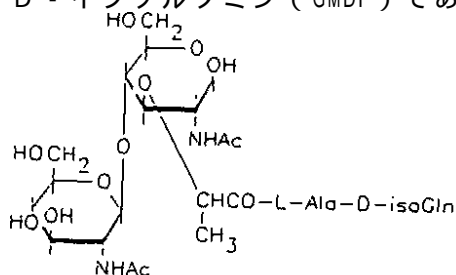
Rのための好ましい値は一般構造式Iとの関係において前述したとおりである。ペプチドRが始原型MDP (L-Ala-D-isoGln) 内のペプチドに相応することが特に好まれる。代替的には、もう1つの好ましい実施態様において、RはL-Ala-D-Glnを表わすことができる。

nに対する好ましい値は1である。

20

一般構造式IIの化合物は、US-A-4395399の中で開示されており、この文書中に規定された優先性は、本発明においても同様に好まれる。付加的には、本発明においては、基Rは上述のとおり親油的に置換されうる。

本発明において使用するための最も好ましい化合物の1つは、一般構造式IIに入り、N-アセチル-D-グルコサミニル-(1-4)-N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (GMDP) であり、その構造は以下のとおりである。



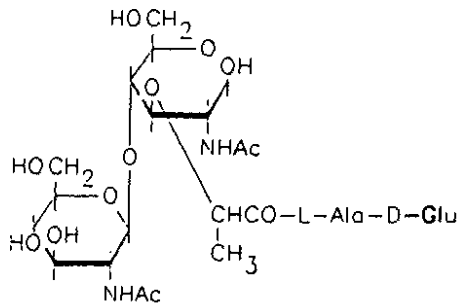
30

GMDP

グリコピンとしても知られているこの化合物 (US-A-4395399中の化合物II) はすでに、(当時の)ソ連において臨床的に使用するためのライセンス付与に必要とされた臨床前毒性試験及び薬物動力学的調査を受けていた。LD₅₀試験によって測定されたマウスの急性毒性は7g/kgである。この数字は、この化合物が、マウス体内で625mg/kgのLD₅₀値をもつムロクタシンよりもほぼ1ケタ低い毒性を有することを示している。

40

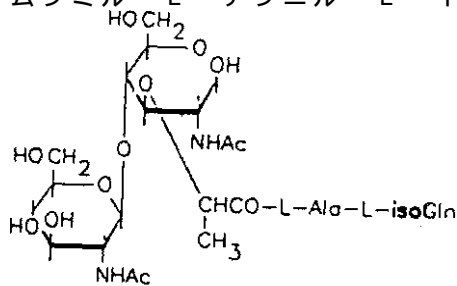
GMDPの発熱性は本発明での使用のために適したものとなりしかもその他の目的のためのその臨床的評価を妨げないほどに充分低いものであるものの、いくつかの状況の下ではさらに低い発熱性の類似体を使用することが好ましい可能性もある。このような類似体は入手可能であり、US-A-4395399中の化合物IIIで以下の構造をもつN-アセチル-D-グルコサミニル-(1-4)-N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-グルタミン酸 (GMDP-A) である：



GMDP-A

一般構造式IIの範囲内のその他の好ましい化合物には、以下のものが含まれる：
 次のような構造をもつ、N - アセチル - D - グルコサミン - (1 - 4) - Nアセチル
 ムラミル - L - アラニル - L - イソグルタミン (GMDP - LL)：

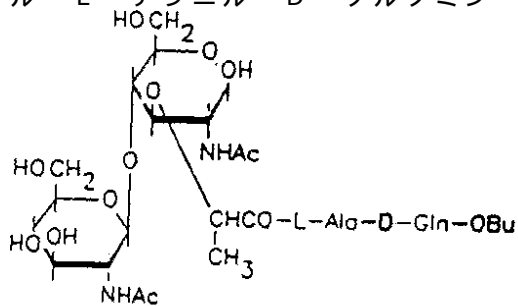
10



GMDP-LL

以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミン - (1 - 4) - Nアセチルムラミ
 ル - L - アラニル - D - グルタミン n - ブチルエステル (GMDP - OBU)：

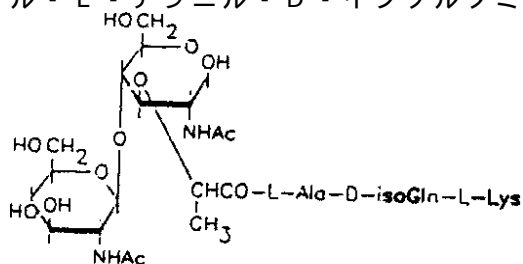
20



GMDP-OBu

以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミン - (1 - 4) - Nアセチルムラミ
 ル - L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - リジン (GMDP - Lys)：

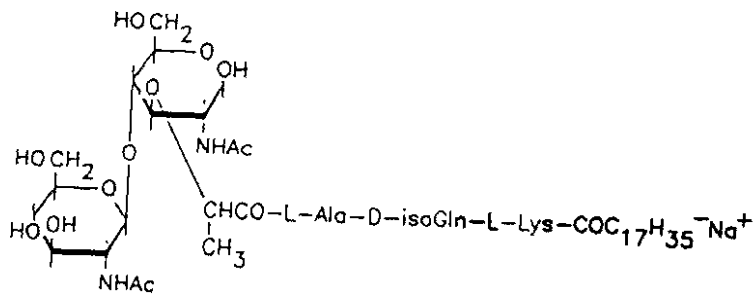
30



GMDP-Lys

以下の構造をもつ N - [N - アセチル - D - グルコサミン - (1 - 4) - N - アセ
 チルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル] - N - ステアロイル - L - リジン
 (GMDP - Lys (St))：

40

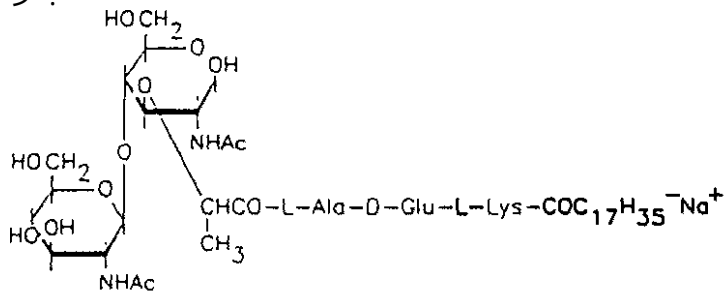


10

GMDP-Lys(St)

その他の有用な化合物としては、以下のものが含まれる：

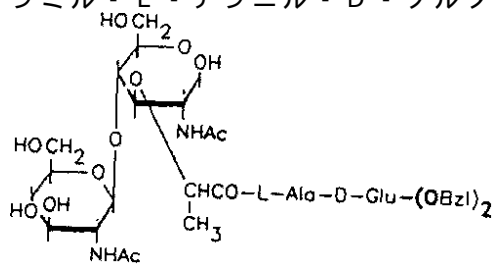
以下の構造をもつ N - [N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - - 4) - N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - - D - グルタミル] - N - ステアロイル - L - リジン：



20

GMDPA-Lys(St)

以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミニル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - グルタミン酸ジベンジルエステル

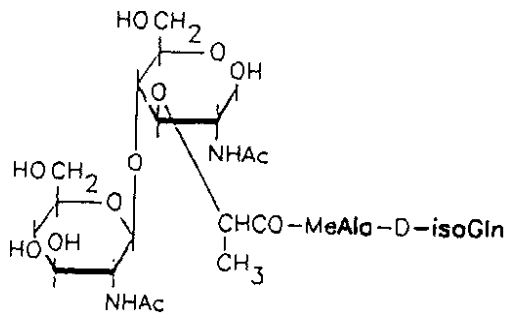


30

GMDPA(OBzl)2

以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミニル (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - N - メチル - L - アラニル - D - イソグルタミン：

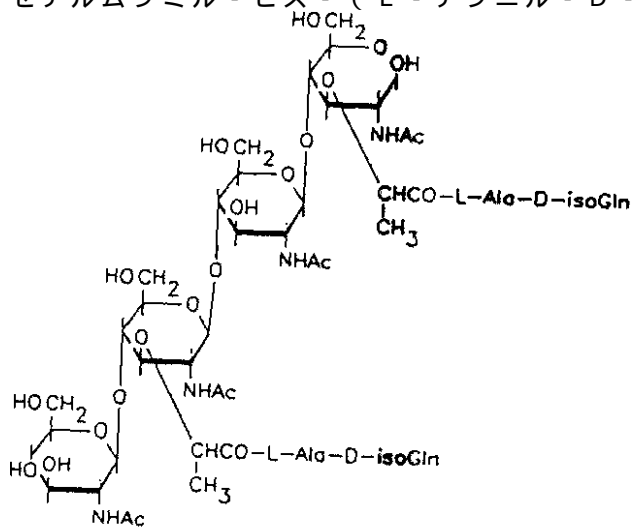
40



10

Me-GMDP

以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - (1 - - 4) - N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - ビス - (L - アラニル - D - イソグルタミン)

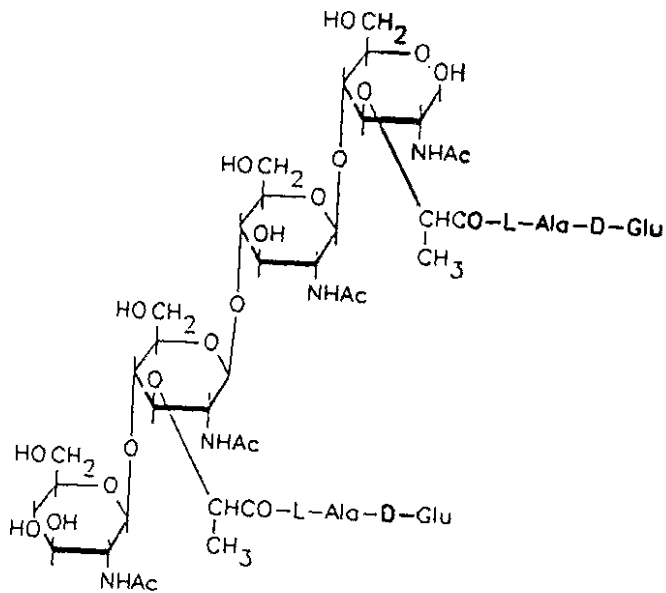


20

(GMDP)₂

以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - (1 - - 4) - N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - ビス - (L - アラニル - D - グルタミン酸) :

30

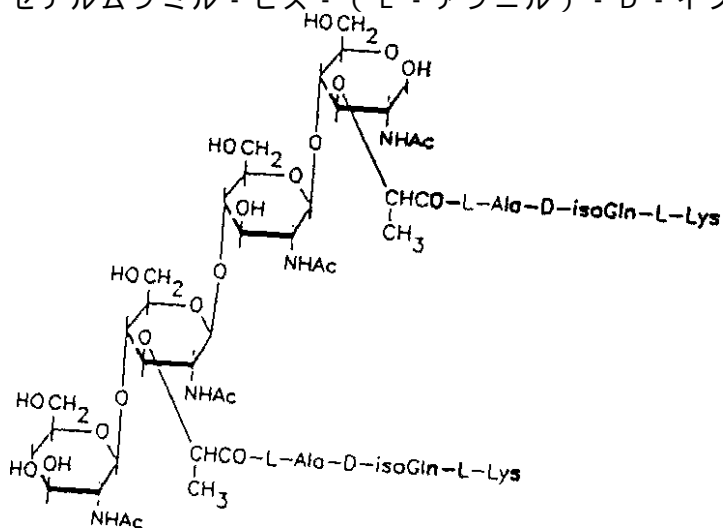


10

(GMDPA)₂

以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミンニル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - (1 - - 4) - N - アセチル - D - グルコサミンニル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - ビス - (L - アラニル) - D - イソグルタミニル - L - リジン) :

20

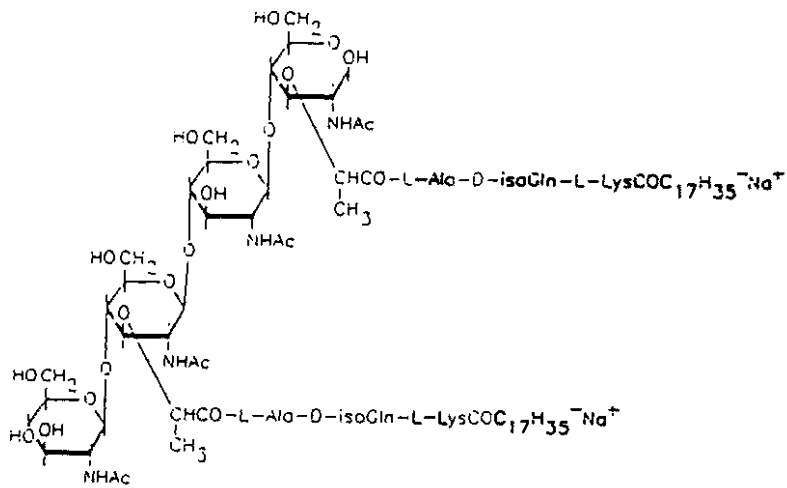


30

(GMDP Lys)₂

N - アセチル - D - グルコサミンニル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - (1 - - 4) - N - アセチル - D - グルコサミンニル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - ビス - [L アラニル - D - イソグルタミニル - N - ステアロイル - L - リジン] :

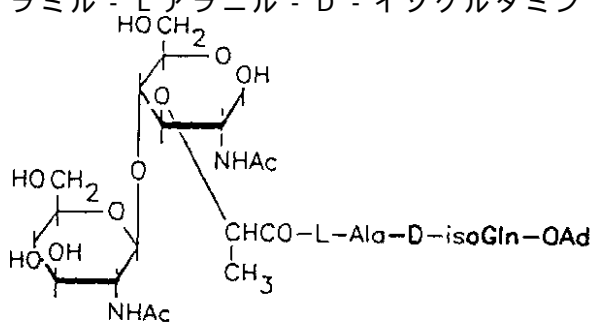
40



10

[GMDP-Lys(St)]₂

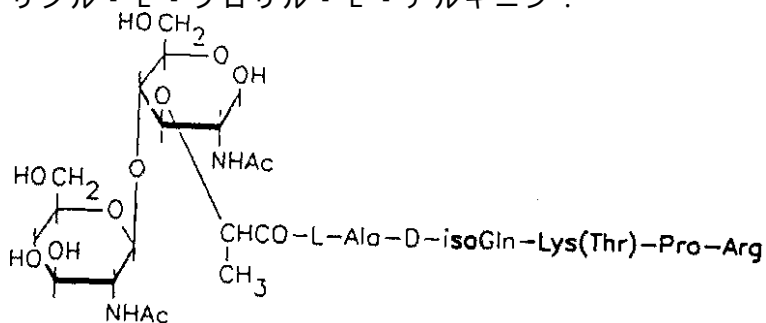
以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミン - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン 1 - アダマンチルエステル :



20

GMDP-Ad

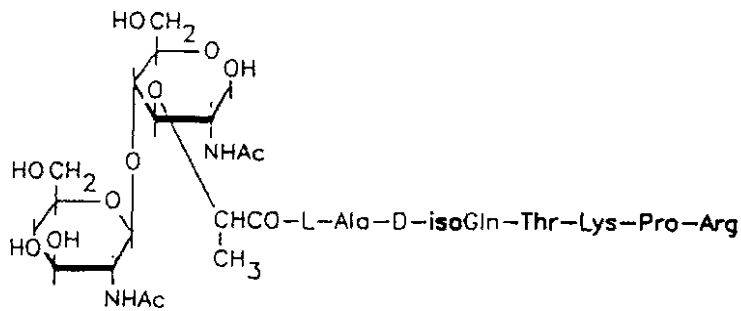
以下の構造をもつ L - トレオニル - N - [N - アセチル - D - グルコサミン - (1 - - 4) - N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル] - L - リシル - L - プロリル - L - アルギニン :



40

GMDP-タフトシン B

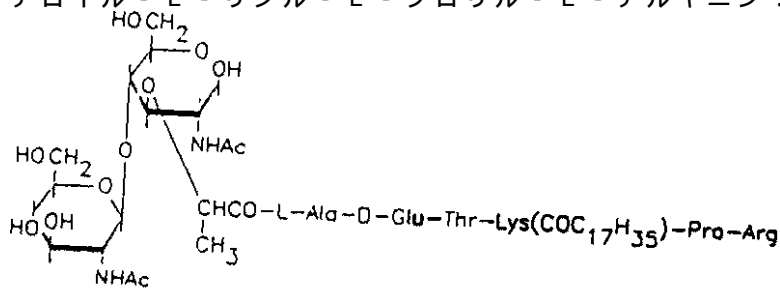
以下の構造をもつ A - アセチル - D - グルコサミン - (1 - - 4) - N - アセチル - ムラミル L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - トレオニル - L - リシル - L - プロリル - L - アルギニン :



10

GMDP-タフトシン A

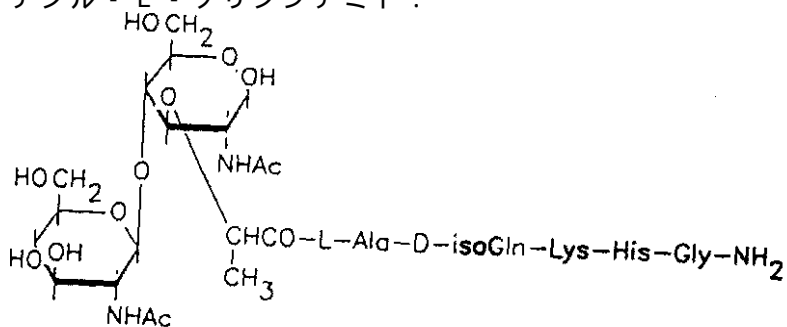
以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニル - - D - グルタミル - L - リシル - L - トレオニル - N - ステアロイル - L - リシル - L - プロリル - L - アルギニン :



20

親油性GMDPA-タフトシン

以下の構造をもつ N - [N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - - D - イソグルタミル] - L - リシル - L - ヒスチジル - L - グリシンアミド :

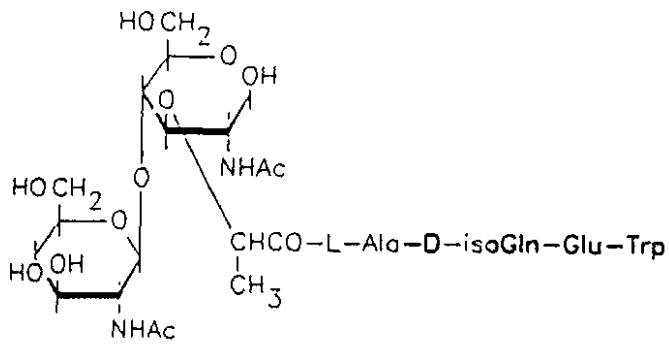


30

GMDPA-ブルシン

以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミル - L - グルタミル - L - トリプトファン

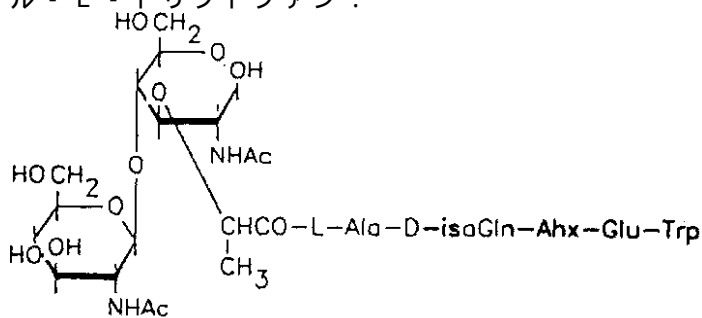
40



10

GMDP-チモゲン I

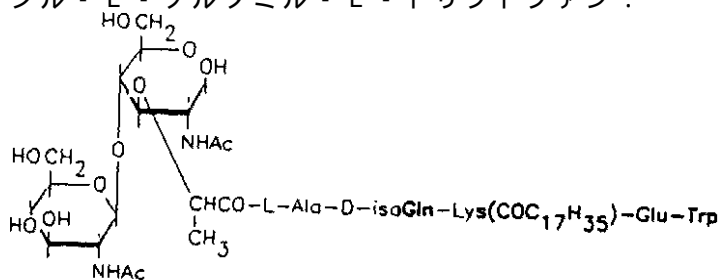
以下の構造をもつ N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミル - アミノヘキサイル - L - グルタミル - L - トリプトファン :



20

GMDP-チモゲン II

以下の構造をもつ N [N - アセチル - D - グルコサミンル - (1 - - 4) - N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミル] - N - ステアロイル - L - リシル - L - グルタミル - L - トリプトファン :

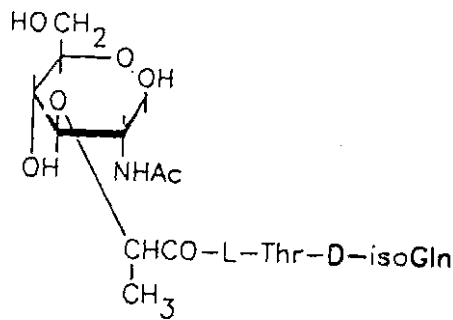


30

GMDP-チモゲン III

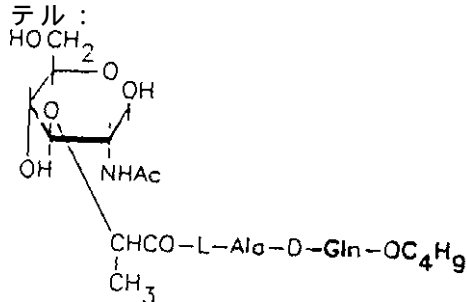
以下の構造をもつ N - アセチルムラミル - L - トレオニル - D - イソグルタミン :

40



Thr-MDP

以下の構造をもつ N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - グルタミン n - ブチルエステル :



ムラブチド

上述の構造において、以下の省略記号が用いられている :

Bzl - ベンジル ;

Me - メチル ;

Ahx - - アミノヘキサノイル

最も好ましい化合物は、GMDPでありその次にGMDP - A及びムラブチドが続く。

一般構造式IIの範囲内のグルコサミニル - ムラミルペプチドは、US - A - 4395399に開示されている方法によって比較的安価にかつ適正に大量に調製することができる。開示されている調製は、細菌 *Micrococcus lysodecticus* から二糖類の抽出及び精製及び、例えば従来のペプチド化学により合成されたジペプチドに対するその後のその化学的結合に基づくものである。しかしながら、二糖類は標準的糖化学を用いても同等にうまく化学合成できる。

上述のように、本発明を用いると、ムラミルジペプチドは、敗血症性ショック及び/又はLPSにより媒介され悪液質を含むその他の生命を脅かす炎症状態の治療又は予防において有用である。本発明は、腹腔内に腸内細菌叢が侵入する可能性のため特に腹部手術の場合といった外科手術の後の細菌感染から生じる合併症を治療、予防又は管理する上で特に利用できる。しかしながら、胸部手術及び胆のうの治療又は切除のための手術といったその他のタイプの外科手術の後にも感染の危険性は存在する。さらに、細胞セプシス及び究極的には敗血症性ショックは、肺又は尿生殖器系といった器官の慢性又は急性の細菌感染から、肺炎から、穿孔性潰瘍から、膵臓壊死から又は胆のう炎から発生する可能性がある。従って本発明が応用される状態としては、肺炎、外科的創傷の感染、小骨盤の化膿、腹膜炎、腹膜膿瘍、結腸周辺フィステル形成膿瘍、胆管炎、胆のう、蓄膿症、前腹部のフレグモーネ、シグマ及び注射後の膿瘍のフレグモーネならびに内毒素血症、グルコース低下、低血圧、心臓不整脈及び血管拡張といった関連合併症が含まれる。本発明が特に利用される状態は、免疫抑制された患者における外科手術である。これは、このような患者が特に、感染を発生させ低いリンパ球及び好中球計数を有する可能性が高いからである。本発明において有用なムラミルジペプチドは、好中球及びリンパ球に対するその免疫回復作用な

10

20

30

40

50

らびに内毒素に対するその防御効果のため、これらの患者に対し付加的な恩恵をもつものでありうる。免疫抑制された患者には、腫瘍の存在が免疫系の抑制を導く可能性があることから、ガン患者も含まれる。さらに、化学療法及び放射線療法は両方共免疫抑制という副作用をもつ。

上述のことから、本発明が同様に、有効量のムラミルジペプチドを患者に投与することを含む、敗血症性ショック及び/又はLSPといった内毒性により媒介されるその他の生命を脅かす炎症状態の治療、予防又は管理のための方法にも関するということがわかる。本発明のこの態様に対する優先性は、以上に示したとおりである。

以上で簡単に論述した通り、本発明において有用なムラミルペプチド化合物は、腸管外で又は非腸管外で投与することができる。最も普通の、実際好まれる投与経路は、経口投与であるが、その他の腸管外でない経路としては、鼻、又は舌下投与又は吸入による投与が含まれる。腸管外投与のための製剤形態は一般に無菌である。生理食塩水といった単数又は複数の適切な担体が存在する。ムラミルペプチド化合物は、注射のため生理食塩水又は水を用いて調剤する前にグリシンといった保護化合物で凍結乾燥させることができる。

本発明において有用なムラミルペプチド化合物は、薬学組成物内の唯一の有効成分でありうる。しかしながら、その他の有効成分が存在しうるということが好ましい可能性がある。例えば、生命を脅かす炎症状態が細菌を病因とする場合、抗生物質又はその他の抗菌薬が存在していることも有用である；その他の微生物又はウイルスにより媒介される炎症状態は、その他の抗菌薬又は抗ウイルス薬で治療されることになる；又ガンは、ピンブラスチン、アドリオマイシン、アクチノマイシンD、メトトレキセート及びマイトマイシンCといった抗ガン剤によって治療される。

特に錠剤の形をしたものといった経口製剤形態が好まれる。単数又は複数の適切な担体も存在しうる。標準的な担体にはラクトース、サッカロース、ジャガイモデンプン、ステアリン酸カルシウム及びメチルセルロースが含まれる。

投与のための精確な用量はつねに、臨床医又は開業医により適切と思われる用量である。その条件で、一日あたり（又は一錠あたり又はその他の単位用量あたり）0.1~100mgの範囲内の日用量が受容可能なものとされる可能性があり、一日あたり（又は一錠あたり又はその他の単位用量あたり）0.5mg~5mg又は10mgの範囲が好ましい。1~2mgの日用量が最適とみなされる。

腸管外（例えば静脈内、筋内又は皮下）投与のための用量は一般に比較的低く、一日あたり（又は単位用量あたり）0.01mg~1mgが適当である。一日あたり（又は単位用量あたり）0.05mg~0.5mgの範囲が好ましく、一日あたり約0.1mgの用量が最適である。

用量のタイミングも、臨床医又は開業医により決定されるのが最も良い。外科手術の結果生じる可能性のある敗血症性ショック及びその他の炎症状態の予防の場合、手術の前に製剤を投与することが有利であることが考えられる。

さらに化合物は、敗血症の合併症及び死亡率を減少させるため、外科手術を受けていない患者にも使用することができる。

ここで本発明について、以下の制限的意味の無い例及び図面により例示する：なお図面中、

図1は、マウスにおけるLPSにより誘発された死亡率に対するMDPの効果を示す。

図2は、マクロファージの貪食能に対するムラミルペプチドの効果を示す。

図3は、全血培養内のTNF産生に対するムラミルペプチド効果を示す。

図4は、MDPによるIL-1産生の抑制を示す。

図5は、血清TNFのLPS誘発に対するMDPの効果を示す。

図6は、TNF産生を抑制するムラミルペプチドの能力を示す。

図7は、LPSにより誘発された体重損失に対するムラミルペプチドの効果を示す。

図8は、LPSにより誘発された体重損失に対するムラミルペプチドの効果を示す。

例1

細菌感染による術後合併症を防ぎ、好中球機能を維持し、究極的に結腸ガン手術を受けている患者の死亡率を低減するための、N-アセチル-グルコサミニル-N-アセチル-ム

10

20

30

40

50

ラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン (GMDP) の使用。

この試験に参入した全ての患者は、結腸のガン腫を切除するための大規模な腹部外科手術を受けようとしていた。

手術に先立ち (3 日前)、全ての患者の好中球機能を一連の試験により監視した。

好中球を末梢血から分離した。ヘパリン化血3.5mlをM - PRM培地 (Flow Laboratories) の上に伸展させ、20 で400gで40分遠心分離した。最高97%の好中球を含むより低い中間期を除去し、ハンクス平衡塩類溶液で3回細胞を洗浄した。白血球生存度 (トリバンプル) は98%以上であった。細胞を 2×10^6 mlの濃度に調整した。

以下のパラメータを測定した：すなわち、

- 附着：平底培養皿のウェル内に100 μ lの好中球懸濁液を入れ、60分間37 でインキュベートした。非附着性細胞を洗い流した後、附着した好中球をエタノールで固定し、Romanovsky - Giemsa染料で染色した。遊離染料を洗い流した後、細胞に結びついた染料をイソプロパノール内で溶解させ、溶液の光学密度 (OD_{650}) を「ELISA II」マイクロプロセッサ (Boehringer) を用いて測定した。附着性細胞の数を、標準曲線を基準にして計算した。

- ケミルミネッセンス:1251ルミノメーター (LKB) 上でルミノール依存性ケミルミネッセンスを測定した。

- NBT試験 (Merckによりスーパーオキシドアニオン産生を決定した)。

- ミエロペルオキシダーゼ：リン酸クエン酸緩衝液 (pH5.0) 中の0.014%の過酸化水素と0.04%のオルトフェニレンジアミン (Sigma) から成る基質混合物100 μ lを細胞に付加し、10分間インキュベートしてから100 μ lの10%硫酸で反応を停止させた。492muでの光学密度をMultiscan Titertek Plus (Flow Laboratories) を用いて測定した。

- 酸性ホスファターゼ：クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中の0.84%のNaCl及び0.24%のリン酸パラニトロフェニル (Boehring) から成る50 μ lの基質混合物を細胞に付加し、30 で30分間インキュベートした後、0.2MのNaOH100 μ lを付加することによって反応を停止した。405muでの光学密度をMultiscan Titertek Plus (Flow Laboratories) で測定した。

ケミルミネッセンス、スーパーオキシドアニオン産生、ミエロペルオキシダーゼ及び酸性ホスファターゼについては、自発反応及び誘発反応の両方が測定された。検定の前に37 で30分間オプソニン化ザイモサン (30 μ l, 20mg/ml) に対して細胞を露呈することにより誘発が行なわれた。

処置済みグループにおいて、手術より2日前及び1日前に経口的に、又手術後1日目、2日目及び3日目に皮下で1日あたり1 ~ 2mgの用量でGMDPを投与した。術後5日目に、前述のものと同じパラメータにより全ての患者において再び好中球機能を評価した。

術後4週間、術後セプシスについて患者を監視した。審査された敗血症性合併症には、散在性セプシス、肺炎、腹膜炎及び腹部膿瘍が含まれていた。これらは全て敗血症性ショックを導くものとして知られている。結果は表1及び表2に表わされている。

表 1

結腸のガン腫切除後の敗血症性合併症の発生率に対する手術前後のGMDP処置の効果

	合計患者数	敗血症性合併症をもつ患者数	敗血症性合併症の発生率 (%)	死亡率 (%)
対照	20	10	50	15
GMDP処置済み	16	3	18.75	6.25

表1から、GMDP処置が敗血症性合併症の発生率を50% ~ 18.75%まで低減させたことがわかる。重要なことに、より特異的には15%から6.25%への死亡率の減少は、往々にしてこ

10

20

30

40

50

のような死亡率における死亡原因である敗血症性ショックを治療するか又は予防する上で
の本発明の有効性を示すものである。

表 2

結腸ガン腫の切除を受けているGMDP処置済み患者及び対照における好中球機能

	3 日前	対 照 3 日後	変化率 (%)	3 日前	GMDP処置済み 5 日後	変化率 %
附着 (O. D. 650 μ)	54.3 \pm 4.6	33.8 \pm 5.4	-37.8	39.8 \pm 5.4	47.9 \pm 12.6	+20.4
ケミルミネッセンス (mv)						
自発	2.3 \pm 0.31	1.39 \pm 0.2	+6.9	1.82 \pm 0.07	3.37 \pm 0.70	+85.2
誘発	19.2 \pm 2.4	11.8 \pm 2.3	-38.5	11.3 \pm 2.1	15.8 \pm 4.2	+39.8
スーパーオキシド						
自発	110.2 \pm 10.1	63.9 \pm 8.5	-42.0	78.9 \pm 15.7	97.6 \pm 12.8	+23.7
誘発	148.1 \pm 19.2	119.2 \pm 10.6	-19.5	133.7 \pm 16.1	134.9 \pm 11.3	+0.9
ミエロペルオキシダーゼ(O. D. 492 μ)						
自発	1149.3 \pm 150	993.2 \pm 178	-13.6	1145 \pm 204.1	1075 \pm 178.3	-6.1
誘発	811.3 \pm 99.3	894.1 \pm 158	+10.2	948.3 \pm 205	948.3 \pm 205	+11.2
酸性ホスファターゼ(O. D. 405 μ)						
自発	178.3 \pm 48.1	114.7 \pm 7.	-35.7	133.8 \pm 75	114.9 \pm 2.4	-14.1
誘発	138.9 \pm 21.6	110.8 \pm 11.5	-20.2	172.3 \pm 18.8	120.8 \pm 3.2	-29.94

表 2 から、GMDP処置をしなかった場合、手術後の好中球機能のパラメータの大部分において減少があったということがわかる。附着、ケミルミネッセンス及びスーパーオキシド産生の場合、GMDP処置は、この減少を妨げ、逆に好中球機能の増大をひき起こした。これは、ミエロペルオキシダーゼ及び酸性ホスファターゼについて観察されなかった。

例 2

急性セプシスを阻止し、急性セプシスを患う患者における好中球機能を維持するための N - アセチル - グルコサミニル - N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン (GMDP) の使用

この試験に参加した患者はすでに、破壊性胆のう炎、腹腔膿瘍、腹膜炎、膵臓壊死及び術後肺炎の結果として生じた重症の全身性細菌セプシスを患っていた。

GMDPでの処置の 1 日前 (1 日前 (- 1 日目)) において、全ての患者の好中球機能を、上記例 1 に記されている試験により測定した。GMDP処置済みのグループでは、連続して 5 日間、1 ~ 2mg/日の用量で腸管外でGMDPを投与した。GMDPの合計用量は 5 ~ 7mgであった。GMDP処置の停止の 1 日後 (6 日目) に好中球機能を全ての患者において再度測定した。結果は表 3 及び 4 に示されている。

表 3

敗血症性合併症を患う患者におけるセブシスの進行に対するGMDPの効果

	合計患者数	敗血症性合併症の進行を患う患者数	敗血症性合併症の進行の発生率	死亡率 (%)
対照	18	11	61	27
GMDP処置済み	14	4	28.6	14.3

表 3 から、GMDP処置が、敗血症性合併症の進行の発生率を61%から28.6%まで減少させたことがわかる。ここでも又、重要なことに、より特異的に、27%から14.3%への死亡率の減少は、本発明の有効性を示している。

表 4

GMDP処置を受けていない又は受けたセブシスを患う患者における好中球機能

	1 日前	対 照 6 日目	変化率 %	1 日前	GMDP処置済み 6 日目	変化率 %
付着	52.3±5.7	40.4±8.1	-22.8	34.6±6.2	52.3±2.3	+51.2
(O. D. 650 μ)						
ケミルミネッセンス (mv)						
自発	1.61±0.18	1.93±0.32	+19.9	2.41±0.14	4.16±0.14	+72.6
誘発	16.3±3.4	13.2±5.6	-19.0	9.41±2.1	21.3±3.51	+126.4
スーパーオキシド(O. D. 540 μ)						
自発	101.3±4.2	38.4±16.3	-12.7	55.5±6.4	84.3±8.7	+51.9
誘発	196.4±13.4	169.4±13.4	-13.7	92.1±3.21	141.1±8.3	+53.2
ミエロペルオキシダーゼ(O. D. 492 μ)						
自発	893.3±26.2	604±96.3	-32.4	504.5±118	595.2±48.3	+17.9
誘発	697.2±19.4	419.±19.4	-39.9	520.3±60.1	587.1±96.3	+12.8
酸性ホスファターゼ(O. D. 405 μ)						
自発	116.7±16.3	129.6±24.4	+11.1	119.4±10.1	251.3±16.1	+110.5
誘発	169.3±15.1	126.6±14.1	-25.2	104.4±3.6	201±14.3	+92.5

表 4 から、GMDPで処置されていない対照グループでは、1日前と6日目の間の好中球機能のほぼ全てのパラメータにおいて劣化があったが、これはGMDP処置により妨げられ、改善に転じた。

この例は、GMDPがセブシスの出現後でも有効な治療であることを明確に実証している。始原型MDPIは抗菌活性をもつことが示されてきたものの、確かにこの実験の状況では死亡率を減少させない。

例 3

マウスにおけるLPS誘発された死亡率に対するMDPの効果

各々の体重16 - 18gの25匹の雌のBAL B/Cマウスを、5匹ずつの5つのグループに分けた。各々のマウスグループに2回ずつ1日量の食塩水、GNDP, GMDP - OBU, MDP又はGMDP - Aを与えた。化合物は、マウス1匹あたり300 μ gのLPSを注射する前9日間にわたり1匹あたり100 μ g又はモル当量の一日量2回の割合で腹腔内注射によって投与した。LPS投与の2日後に死亡率を測定し、結果を図1に示した。図1は、始原型MDPといった或る種のムラミルペプチドがLPSを相乗作用して、食塩水を受けたマウスで見られるもの以上に死亡率の増大をひき起こすということを示している。これとは対照的に、GMDP及びGMDP - AはLPSの効果拮抗する。かくして、GMDP及びGMDP - Aは、セプシス及び敗血症性ショックの治療及び予防において有用であるのに対し、MDP及びGMDP - OBUは有用ではない。

10

例4

マクロファージの貧食能に対するムラミルペプチドの効果

この実験は、マクロファージの貧食能活性に対するさまざまなMDPの効果を示そうとするものである：貧食能が大きくなればなるほど、MDPはLPSに対する耐性を誘発する上で効果的になる。マウスを9つのグループに分け、各グループに対して次のものの1つを投与した：食塩水、MDP, MDP - OBU, MDP - Thr, GMDP, MDP - Lys (St), GMDP - OH及びGMDP - LL。試験対象の化合物を、マウスの腹腔内に注射し、各々のマウスは100 μ g又は当モル当量用量を受けた。対照マウスは200 μ lの食塩水を受けた。ムラミルペプチドの注射の一日後に、生理食塩水200 μ l中の致死量のLPS(マウス一匹あたり300 μ g)を腹腔内に注射し、20分後に、1mlの黒インキを同じく腹腔内に注射した。10分後、腹膜マクロファージを獲得し、これを2度洗浄した。細胞数を計数し、次にマクロファージを溶解させ、上清の光学密度を610nmで測定した。結果は図2に示されている。この図はGMDPがマクロファージ貧食能を増大する潜在能を有すること、そしてその他のMDPも同様にこの特性を有することを実証している。マクロファージの貧食能の増大は動物の細菌及びLPS処置能力と相関関係をもつものと一般に考えられている。従って、セプシス及び敗血症性ショックにおいてGMDP, GMDP - Lys (St) 及びGMDP - OHは有用である。しかしながら、発熱性に差があることから、この検定の結果と共にMDPのその他の活性を考慮に入れることも必要である。

20

例5

全血培養中のTNF産生に対するMDFの効果

ヒトヘパリン化全血を、RPMIを用いて1:2の割合に希釈させ、96ウェルのマイクロタイタープレート内に送り出した。上述の用量で食塩水、GMDP, MDP又はLPSで、個々のウェルを処置した。6時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後、標準捕獲ELISA方法によりTNFについて上清を検定した。結果は図3に示されている。この図は、MDP及びLPSの両方共が有意なTNF誘発能力を有しているのに対してGMDPがTNFをさほど誘発しないということを示している。これは、セプシス及び敗血症性ショックにおける炎症、凝血異常及び死亡の一次的媒介物であると考えられているTNFの免疫細胞産生に対する媒介物の効果を測定するための感受性検定である。GMDPが最低の炎症媒介物であることがわかる；これらの物質のそれぞれのTNF誘発活性はその毒性と偶発的相関関係をもつ。

30

例6

異なるMAPによるIL - 1産生の抑制

各グループ5匹ずつの体重13~14gのマウス(BAL B/C、雌)は、12時間の間隔をおいて2回のMDP注射を受けた。試験したMDPは、MDP、ムロクタシン、MDP - Thr, MDP - OBU, GMDP - LL, GMDP - Lys (St) 及びGMDP - Aであった。最後の注射の後、腹膜細胞を収集し、腹膜マクロファージによるIL - 1分泌の誘発について試験した。

腹膜マクロファージの調製：

マクロファージを、ハンクス平衡塩類溶液での洗浄によりマウスの腹腔から収集した。細胞を洗った後、平底の96ウェルプレートのウェル内に入れ、5%のFCSを含むRPMI内で1時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次にプレートを、温かいRPMIで洗って付着していない細胞を除去した。次に新鮮な培地内にLSP(25 μ g/ml)を付加し、さらにプレートを24時間

40

50

培養した。

腹膜マクロファージによるIL - 1 産生：

腹膜マクロファージによるIL - 1 の産生を胸腺細胞共同刺激生物学的検定によって検定した。(CBA C57BL・6) F1マウス(106)からの胸腺細胞、PHA(1 μ g・ml)及び試験された上清(50 μ l)を平底96 - ウェルプレートのウェル内に入れた。培養の終結前の6時間3HのTdR(1 μ Ci・ウェル)を取込むことにより72時間後、胸腺細胞の増殖速度を測定した。

TNF に加えて、IL - 1 が、免疫応答及び炎症において中心的役割をもつサイトカインとなることが提案された。TNF の場合と同様に、IL - 1 はLPS刺激に応答して産生される。図4は、GMDP、ムロクタシン、MDP - OBU, GMDP - Lys(St)及びGMDP - Aが全てLPSに対するIL - 1 応答を抑制しうることを示している。MDP及びMDP - Thrはこの特質においては貧弱である。前述の図の場合と同様に、このデータは、TNF、マクロファージ貪食能及びその他のインピボモデルに対するMDPの効果と合わせて考慮されなくてはならない。しかしながら、MDPとGMDPの違いはここでも明白である。

10

例7

血清TNFのLPS誘発に対するMDP類似体の効果

この実験において、4つの化合物を試験した。つまり、MDP, GMDP - A, GMDP - OBU及びGMDPである。対照マウスに対しては、食塩水を投与した。BAL B/Cマウス(1グループにつき6匹のマウス)に対しては、1.4mgの死んだC, Parum(懸濁液1mlあたり0.2ml)を腹腔内に注射した。その後(2週間後)マウスを食塩水、0.5mlの食塩水中のMDP(100 μ g)又は類似体(100 μ g)で、腹腔内で処置した。動物が等モル量を受けよう各々の「MDP」の用量を調整した。MDP/類似体の注入から18時間後にLPS(25 μ g)を注射し、次にマウスを安楽死させ出血させた。標準捕獲ELISA検定によりTNFを決定した。

20

結果は図5に示されており、この図は、GMDPがTNF の産生を抑制できることを実証したことを示しており、かくしてそれが抗炎症物質であることを示している。これとは対照的に、MDP及びGMDP - Aは、炎症促進性であり、LPSにより誘発されるTNFレベルの上昇をひき起こす。ここでも又、前述の実験の場合と同様に、このデータは、MDPのその他の特性と合わせて考慮されなくてはならない。

例8

ムラミルペプチドによるTNF誘発

ここで試験対象となったムラミルペプチドは、始原型MDP, GMDP, GMDP - A, GMDP - OBU, GMDP - Lys(St), GMDPA - Lys(St), GMDP - Benz及びThr - MDPであった。

30

BALB/マウス(1グループにつき6匹のマウス)に対して1.4mgの死んだC, parvum(7mg/mlの懸濁液0.2ml)を腹腔内に注射した。その後(2週間後)、マウスを食塩水、0.5mlの食塩水中のMDP(100 μ g)又は類似体(100 μ g)で腹腔内で処置した。動物が等モル量を受け入れるように各「MDP」の用量を調整した。MDP/類似体の注射から18時間後にLOS(25 μ g)を注射し、その後マウスを安楽死させ出血させた。TNFを標準捕獲ELISA検定によって測定した。

結果は図6に示されている。この図はさらにTNF の産生を抑制するGDMPの能力についての証拠を提供しており、この結果は例7の結果と一致している。GMDP - Lys(St)及びGMDPA - Lys(St)は同様にLPS誘発されたTNF産生も強化するが、GMDP - OBUは一貫してLPSと相乗作用できなかった。

40

例9

LPS誘発された食欲減退及び正常なラットの成長に対する効果

この実験においては、GMDP単独、GMDPとLPS、食塩水及びLPSを受けたラットについての結果を比較した。

体重80 - 100gのWistar - Porton系統のラットを、各々6匹のラットを含むグループに無作為化した。動物は、任意に給餌し(標準R & Mペレット)、1匹ずつ別々にかごに入れ、通常の動物小屋の条件に維持した。7日目と8日目に累積的食物摂取を測定した。8日の期間(150 μ g/kg/日)GMDPを投与した;LPS(3mg/kg/日)も投与されたグループでは、内

50

毒素を6日目と7日目に投与した。LPSのみの処置を受けたグループでは、動物は1日目～5日目の間食塩水(0.1ml)を受け、6日目と7日目にLPSを受けた(3mg/kg/日)、
 不對スチューデントt検定により統計的有意性を決定した。

LPSは、動物の急速な体重損失を誘発しうる。慢性又は急性感染の特徴の1つは、体重損失であり、観察された体重損失は、組織の代謝及び食物摂取の減少によって説明がつく。
 図7は、GMDPがLPS誘発された食欲減退(拒食症)を著しく拮抗することを示しているのに対し、
 図8はGMDPがLPS体重損失を拮抗することを示している。これは驚くべきことであり、LPSと相乗作用して
 体重損失の増大及び食物消費の低下という結果をもたらすMDPについて知られている事実と好対照を成すものである。

【図1】 LPS誘発されたマウスの死亡率に対する異なるMDPの効果

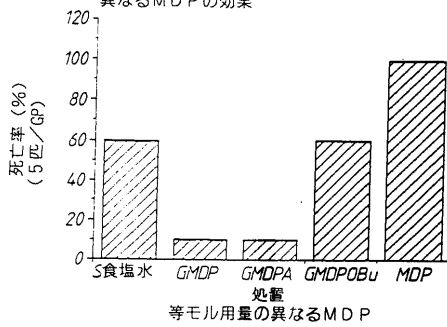


Fig.1.

【図3】 ヒト全血培養中のTNF生産に対するMDP、GMDP及びLPSの効果

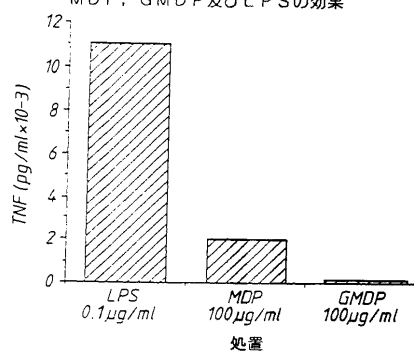


Fig.3.

【図2】 マクロファージの食食能に対するムラミルペプチドの効果

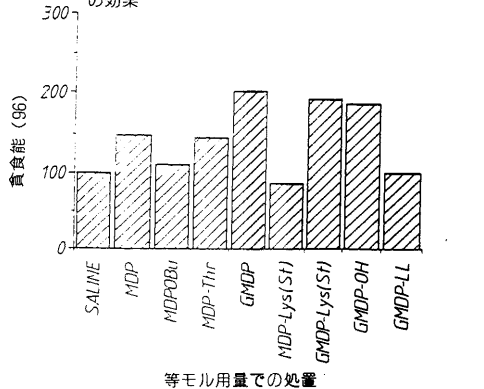


Fig.2.

【図4】 さまざまなMDPでの処理の後のマウスの腹膜マクロファージによるIL-1生産の抑制

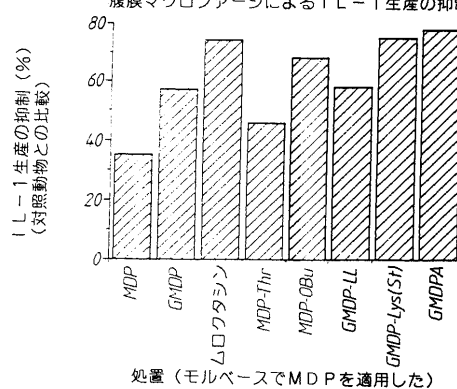


Fig.4.

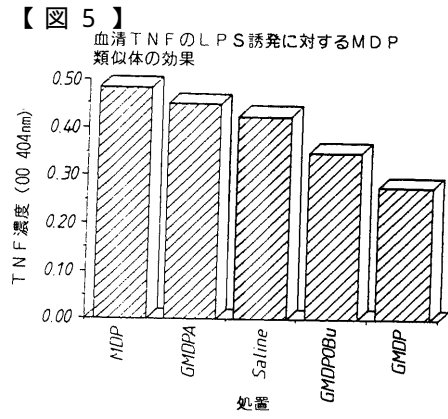


Fig.5.

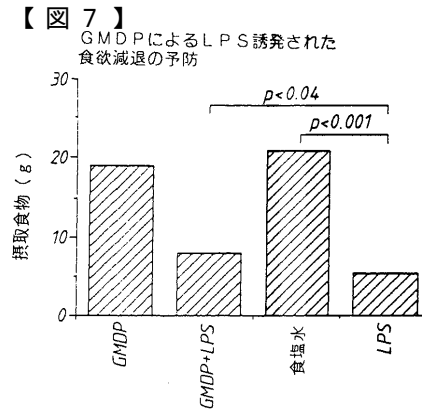


Fig.7.

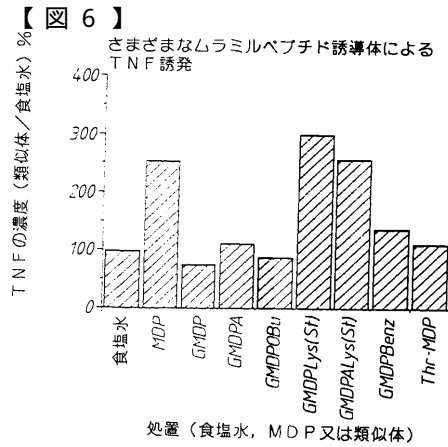


Fig.6.

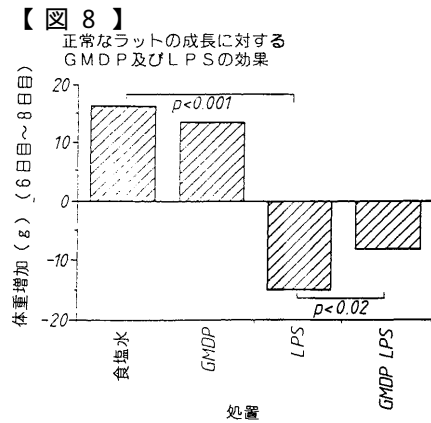


Fig.8.

フロントページの続き

(72)発明者 アストン, ロジャー
イギリス国, ウィルトシャー エフエヌ16 9エイチダブリュ, マルメスバリー, イーストコート, イーストコート コテージ(番地なし)

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 米国特許第04395399(US, A)
特開昭55-113800(JP, A)
Kensuke Masumoto et al., INFECTION AND IMMUNITY, 1981年, Vol.32, No.2, p.748-745
HIROTA M. et al., 癌と化学治療, 1989年, Vol.16, No.2, p.219-224

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A61K 38/00

CA(STN)

MEDLINE(STN)