

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3723206号
(P3723206)

(45) 発行日 平成17年12月7日(2005. 12. 7)

(24) 登録日 平成17年9月22日(2005. 9. 22)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 38/21
A 6 1 K 38/00
A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/04A 6 1 K 37/66
A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/04
A 6 1 K 37/02

請求項の数 13 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願平6-520726
 (86) (22) 出願日 平成6年3月21日(1994. 3. 21)
 (65) 公表番号 特表平8-511235
 (43) 公表日 平成8年11月26日(1996. 11. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR1994/000307
 (87) 国際公開番号 W01994/021275
 (87) 国際公開日 平成6年9月29日(1994. 9. 29)
 審査請求日 平成13年3月21日(2001. 3. 21)
 (31) 優先権主張番号 93/03230
 (32) 優先日 平成5年3月19日(1993. 3. 19)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 93/03787
 (32) 優先日 平成5年3月31日(1993. 3. 31)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者

バクスイン・エス・アー
 フランス国、エフ — 7 5 0 1 5 パリ
 、プールパール・デュ・ジェネラル・マル
 シャル・パリ 33、 “レ・シュブロン
 ”

(74) 代理人

弁理士 鈴江 武彦

(74) 代理人

弁理士 村松 貞男

(74) 代理人

弁理士 橋本 良郎

(74) 代理人

弁理士 花輪 義男

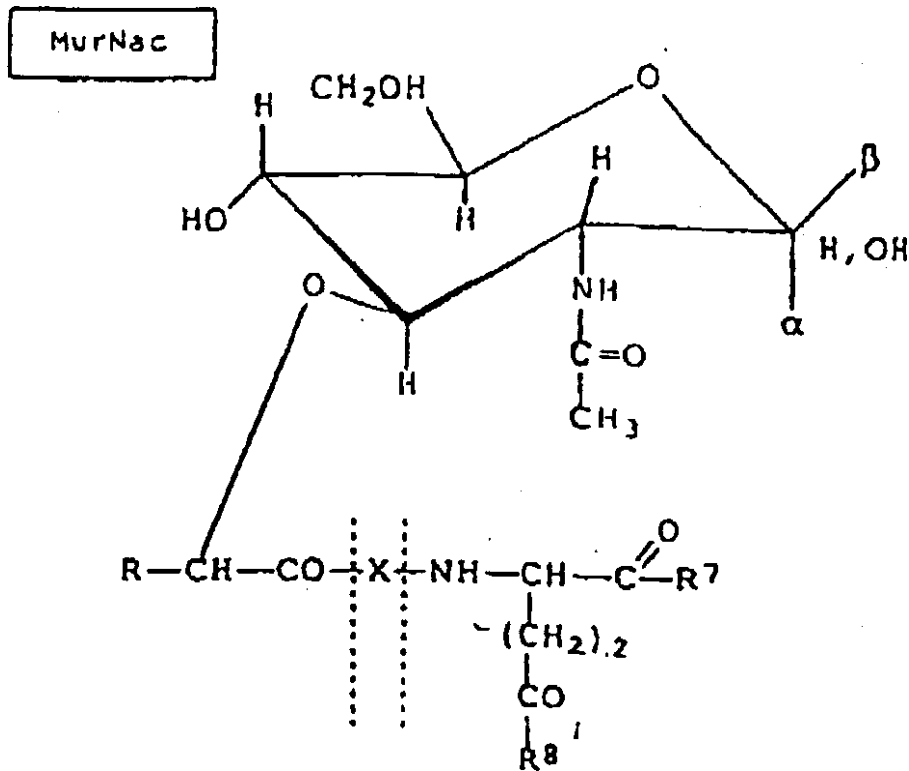
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ムラミルペプチドとサイトカインとを組み合わせることを特徴とするヒトに用いる治療用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インターフェロン、CSF、およびインターロイキンによって形成される群から選択される少なくとも1種類のヒトの天然または組換えサイトカインを、少なくとも1種類の以下の式を有する親水性ムラミルペプチドと共に含む治療用組成物：



10

20

式中、

R 基は、メチル基であり；

X は、L-アラニルまたはL-トレオニルであり；

R⁷ は、X' = 1、2、3、もしくは4のO(CH₂)_xH基であり；

R⁸ は、アミノ基またはX'' = 1、2、3、もしくは4のO(CH₂)_xH基である。

【請求項2】

前記ムラミルペプチドは、前記の投与条件において、生体内でのIL-6もしくはG-CSF、またはこれら両者の合成の増大を誘導することを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

請求項1または2に記載の組成物であって、式中：

R は、CH₃を示し；

X は、L-アラニルまたはL-トレオニルを示し；

R⁷ は、X' = 1、2、3、もしくは4のO(CH₂)_xH基であり；

R⁸ は、アミノ基またはX'' = 1、2、3、もしくは4のO(CH₂)_xH基である組成物。

【請求項4】

請求項1ないし3のいずれか1項に記載の組成物であって、前記ムラミルペプチドが、ムラメチド、ムラブチド、およびこれらの同族体であってムラミルペプチド基のL-トレオニル残基がL-アラニル残基に置換されている同族体から選択される組成物。

【請求項5】

前記サイトカインがインターフェロンβである、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】

前記サイトカインがインターフェロンαである、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項7】

前記サイトカインがCSFである、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項8】

前記CSFがGM-CSFである、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の組成物。

30

40

50

【請求項 9】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記ムラミルペプチドは、 R^7 が OC_4H_9 または $O-CH_3$ であり、 R^8 が NH_2 または $O-CH_3$ であるものから選択される組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記ムラミルペプチドは、 R^7 が OC_4H_9 であり、 R^8 が NH_2 であるものから選択される組成物。

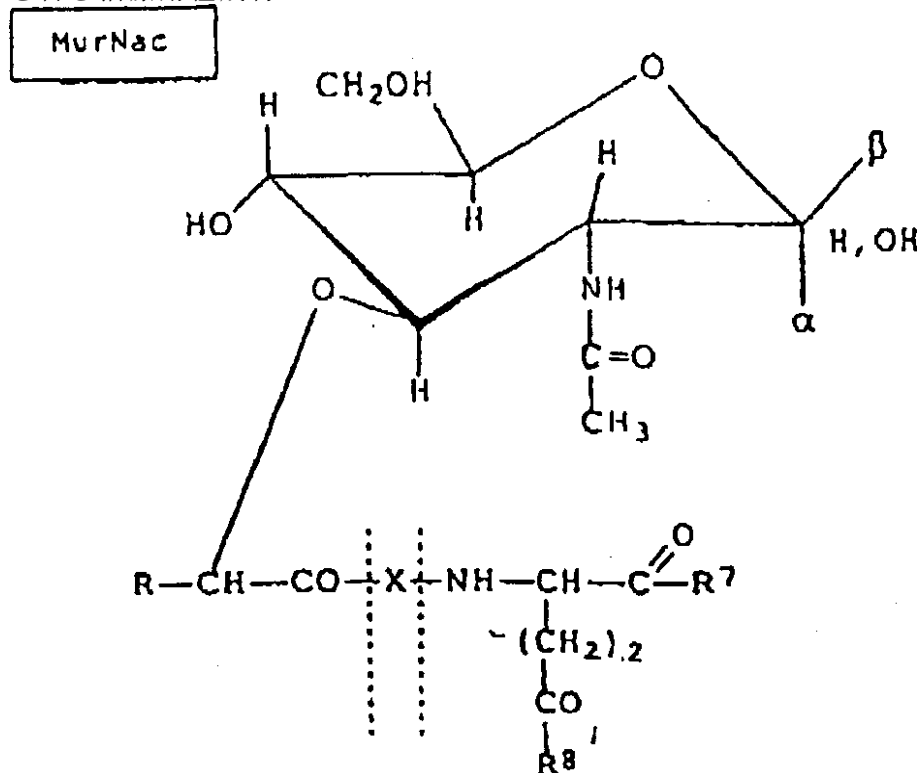
【請求項 11】

請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記ムラミルペプチドは、 R^7 が $O-CH_3$ であり、 R^8 が $O-CH_3$ であるものから選択される組成物。

10

【請求項 12】

α インターフェロン、GM-CSF、およびインターロイキン 2 の群から選択される少なくとも 1 種類のヒトの天然または組換えサイトカインと、以下の式を有するムラミルペプチドを含む治療用組成物：



20

30

式中、

R 基は、メチル基であり；

X は、L-アラニルであり；

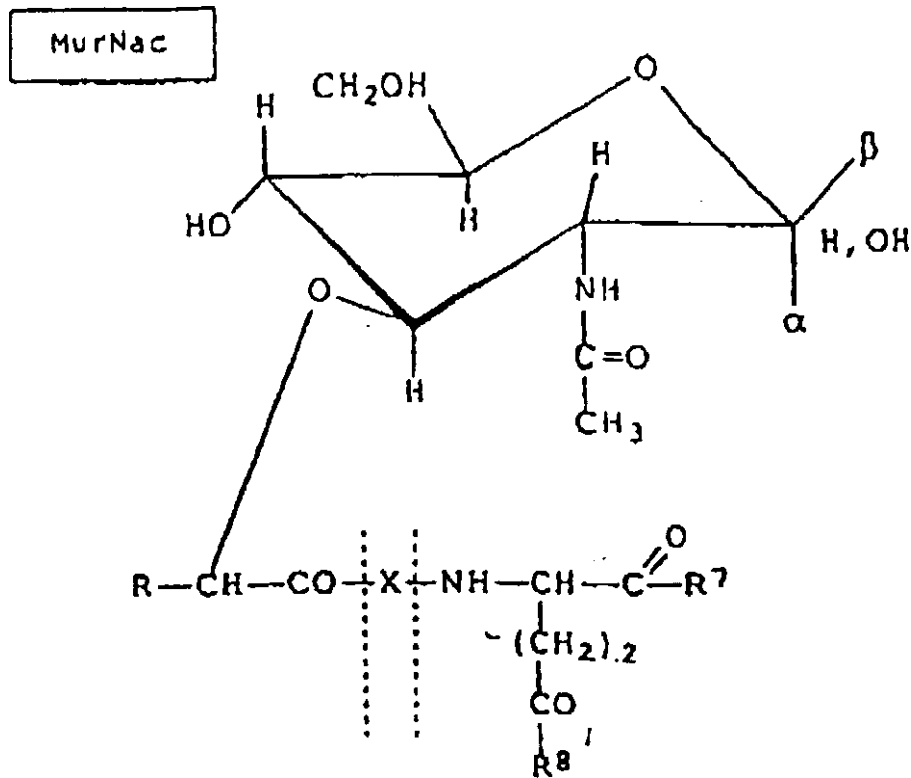
R^7 は、 $O(CH_2)H$ 基であり；および

R^8 は、アミノ基である。

【請求項 13】

40

α インターフェロン、GM-CSF、およびインターロイキン 2 の群から選択される少なくとも 1 種類のヒトの天然または組換えサイトカインと、以下の式を有するムラミルペプチドを含む治療用組成物：



式中、

R 基は、メチル基であり；

X は、L-アラニルであり；

R⁷ は、OC₄H₉ 基であり；および、

R⁸ は、アミノ基である。

【発明の詳細な説明】

インターフェロン（特にインターフェロンα）は、白血球からの分泌物である。これは、サイトカインのなかでも、免疫系の細胞の主要媒介産生物の分類名である。普通には、サイトカインは、免疫系に特徴的なホルモンとも見なされ得るものである。遺伝子組換えによりサイトカインを作る可能性によっては、いくつかのサイトカイン、特に動物の組換えインターフェロンの挙動についてのより進んだ研究への道が開かれた。インターフェロンの中で最も研究されたものはインターフェロンα（IFNα）であり、これはさらに、IFNα 2a、IFNα 2b および IFNα 2c に細分化される。

特に、マウスのある種のインターフェロンの抗ウイルス活性、ならびにマウスにおける該活性の潜在強度が、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（MDP）のある種の誘導体またはその同族体により高まることはすでに明らかとなっている。それに対し、F. ディアンザーニ（F. Dianzani）が、1992年5月、メリー・アン・リーバール（Mary Ann Liebert）社発行の「インターフェロン研究雑誌（Journal of Interferon Research）」の特集のpp.109-118にある「インターフェロン療法：いかにして生体内の系に治療薬として用いるか（Interferon Treatments: how to use an Endogenous System as a Therapeutic Agent）」と題する論文に記載しているように、インターフェロンを用いてヒトにおいて試みた多くの臨床検査、「ひどく期待はずれ」なものだった。たしかに、動物での実験では治療法が開発される可能性があったにもかかわらず、それらの良好に制御できない副作用のために、現在までのところそれらの活用は制限された治療にしか許可されてはいなかった。したがって、従来のインターフェロンのヒト治療への適用に際して遭遇する困難を取り扱ったものである、1993年PJB出版社（PJB publications Ltd.）発行の「スクリプのサイトカイン報告（Scrip's Cytokines Report）」でも、下記のような少数の「稚戯（niches）」とも言うべき場合を除いて、IFNα 2a は用いられないと述べられている。即ち、

a) B型肝炎およびC型肝炎の症例の治療が最も重要である。治療は、連日の投与または

、3か月から6か月の間に500万から1000万ユニットとなるように週3回の割合で投与することからなる。良好な結果は、症例の30%から40%において見られる。

b) 癌の患部領域、毛髪細胞白血病（ヘアリー・セル白血病（Hairy Cell Leukemia））および慢性骨髄性白血病の治療において、検討された適用例は、エイズ、カポジ症候群、多発性骨髄腫、メラノーマ（黒色腫）および癌腫のある種のものである。

これらの症候群の深刻さには、ヒトの治療にIFN α を使用することに伴う重い副作用を受け入れなければならないことも含まれる。かくして、治療を受けた患者の98パーセントは嘔吐感、嘔吐、中枢神経系および末梢神経系の障害ならびに心臓障害を伴った、しばしば極めて重傷のインフルエンザ症候群の発作に苦しむことになる。これらの発作は、少なくとも部分的には、IL-1であるだろう発熱媒介性インターフェロンおよび該インターフェロンにより活性化される生成物であるプロスタグランジンによる誘導が、原因である。更に、同様にインターフェロンにより誘導されるTNFの産生および／またはTNFのレセプターの発現増加に少なくとも部分的には関係があるであろう、疲労、食欲不振および体重減少といった症状が加わる。治療に役立つインターフェロンまたはサイトカインの有益な効果を最適化する全手法は、一方でサイトカインまたはIL-1、IL-8および／もしくはTNF（腫瘍壊死因子）のような好ましからぬ別の生物学的媒介物の産生または活性を最適化しても、確実な失敗に終わるだけであった。

結局のところ、インターフェロンの投与にはしばしば、骨髄前駆体の成熟を停止させる、強度の白血球減少および血小板障害が伴う。これらの現象によって、インターフェロンを主成分とする治療を周期的に中断することが必要となり、そのために血液の処方を毎回変化させることになる。

上記症候群を再発させるような治療を除けば、現在まで、ヒト治療においてインターフェロンの活用の実現の可能性の探求を許容しないほどの支障はない。

類似の困難は、該困難を無くすことが可能であるならば治療上の有益性が確実であるような、別のサイトカインでも遭遇する。それは例えばIL-2、IL-3、IL-6、G-CSF、M-CSF、GM-CSFなどであり、治療上の可能性が、ほんの僅かしか開発され得なかった、TNF、およびIL-1においても同様である。

特に化学療法の治療の後に（病原性、内因性および／もしくは医原性の要因によって現れる）骨髄の形成不全の害を被っている患者、または骨髄の移植がなされた患者において造血の回復を加速させるために、特にIL-3およびある種のCSFの利用が考えられていたことが知られている。しかし、IL-3または最も高活性のCSF（例えばGM-CSF）をヒトの臨床に利用しても、実際は、インターフェロン α におけると同様の困難に遭遇する。

治療手法の不便に加えて、治療に有益なサイトカインを主成分とする実際の治療は、極めて高価である。その投与量は、体内で正常に働き得るかぎり、治療に有益な量に対して重大な影響を有し、その事から、おそらく実際は内分泌ホルモンとは対照的に、サイトカインの作用は遠くまで及ばず、ただ分泌細胞の近くの細胞にのみ働くことが理解される。言い換えれば、標的細胞に達していなかった、投与されたサイトカインの全量は、「無駄な治療」のように思われる。

本発明は、少なくとも上記の欠点および困難の大部分を改善することを目的とする。

場合によっては投与量を減らしても治療上の効果があり、耐え難い副作用を誘発せずにIFN α 、またはIFN α とは別の治療的に有益なサイトカインを使用することの利益を得る可能性を開くことは、治療の次元におけると同様、経済的な次元においても極めて重要なステップである。これが本発明が設定した目標である。

さらに正確には、本発明の目的は、インターフェロンもしくはより包括的に、治療上の有効性を有するサイトカインの示す治療効果を増大させること、および、特にインターフェロンに関係がある、上記の欠点の大半を除く一方で、（当然インターフェロンをも含む）サイトカインに因る治療範囲を拡大することである。

本発明の主要な観点は、ヒトへの治療効果が現れやすいサイトカインへのある種のムラミルペプチドの組み合わせが、有効投与量でのヒト臨床におけるある種のサイトカインの利

10

20

30

40

50

用を今後可能とするとの発見に根拠を置いている。このことはあらかじめしっかりと考察できていたものではなく、最良の条件の下で（例えばインターフェロンの場合）、より重要なかなりの数および効果の臨床上の知見により、治療処置の段階への道が開けた。ムラミルペプチドでもやはり、体内において、少なくとも検出し得る程度には現れず、インターフェロンとムラミルペプチドとの2つの要素のいずれか一つだけを投与した後に、この事からサイトカインおよびムラミルペプチドの治療作用のスペクトルが拡大するとは思われないような別のサイトカインの合成をするとの結論を下し得るような効果が確認された。誘導されたサイトカインの中でも、特にインターロイキン6（IL-6）、G-CSFおよびインターロイキンIレセプターアンタゴニスト（IL-1RA）について言及されるであろう。加えて、ある種のムラミルペプチドおよびインターフェロンα（IFNα）の一体投与により、サイトカインの有益な効果の潜在力を高め、しかし、特にIL-1、TNFまたはIL-8と言った好ましくないサイトカインの誘発を無くすことから、サイトカイン、特にインターフェロンαのようなサイトカインの、最適投与量に準ずる条件での利用において研究された効果を得ることが可能となる。

従って本発明は特に、少なくとも1種類の、好ましくはヒトの天然または組換えサイトカインと、少なくとも1種類のムラミルペプチドとを組み合わせ、ヒトの治療への適用を目的とする組成物であって、前記ムラミルペプチドは、インターフェロンと組み合わせて体内に投与したときに、インターロイキンIのレセプターのアンタゴニストであるIL-1RAの体内での産生の増幅もまた誘導し、且つ好ましくは、IL-1、TNFおよびIL-8の増幅を誘導しないムラミルペプチドから選択される組成物に関するものである。

そして特に、上記の条件において反応し、それがインターフェロンと共に投与されるときは、生体内でのIL-6もしくはG-CSF、また、より好ましくは同時にこの両者の合成の増大が同様に誘導されるムラミルペプチドのいずれかを用いることが好ましい。

本発明は、1種類のインターフェロン（α、βまたはγいずれか）に、前記のムラミルペプチドを組み合わせるものに限定されない。インターフェロンは同様に、特に例として確認された前記のものからの別のサイトカインに置き換えられる。言い換えれば、本発明は、サイトカインと組み合わせて投与するときの、ある種のムラミルペプチドの作用力に由来する。それは、

— 治療上の要請として実際に検討された細胞においてよりも弱い程度の投与の後においてもまた求められる効果が得られた、検討可能とされたサイトカインの生物学的活性の潜在力を高めること、

— IFNとの組み合わせにおいて観察されたような、それらのサイトカインによる治療上の適用への可能性の限定要因の体内での誘導を促進すること無く、場合によってはむしろ阻害することであり、

— 万一の場合に同時に、一方では、上記の限定要因の阻害物質、例えばIL-1RAおよび、特にサイトカインがインターフェロンであるときはTNFの可溶レセプター（STNF-R）の本来の部位での産生を誘導し、かつ他方では、例えばインターフェロンの場合であればIL-6およびG-CSFのようなサイトカインの、本来のリンパ系機能細胞からの分泌を誘導して、それにより投与組成物のサイトカインの挙動のスペクトルの拡大を可能とすることである。

したがって、本発明は、IL-1および／またはIL-8および／またはTNFのような生物学的媒介物質の分泌をヒトの分泌能力を有する細胞について、誘導することも、同様に抑制することもないかまたは、少なくともそれら物質の作用を阻害する機能を判断基準として選ばれた、単独または複数のサイトカインおよびムラミルペプチドを用いた組み合わせのすべてに関する。実際に、ある種のサイトカインの投与による副作用において、それらの媒介物質の極めて確からしい働きが知られている。すべてのサイトカインの働きの潜在活性を高めるムラミルペプチドの作用力を、サイトカインまたはそれ以外の有害な媒介物の誘導から宿主を保護した上で、それぞれの場合ごとに、特にヒトにおいて、一方では選択されたサイトカインだけを、他方では該サイトカインと選択されたムラミルペプチ

10

20

30

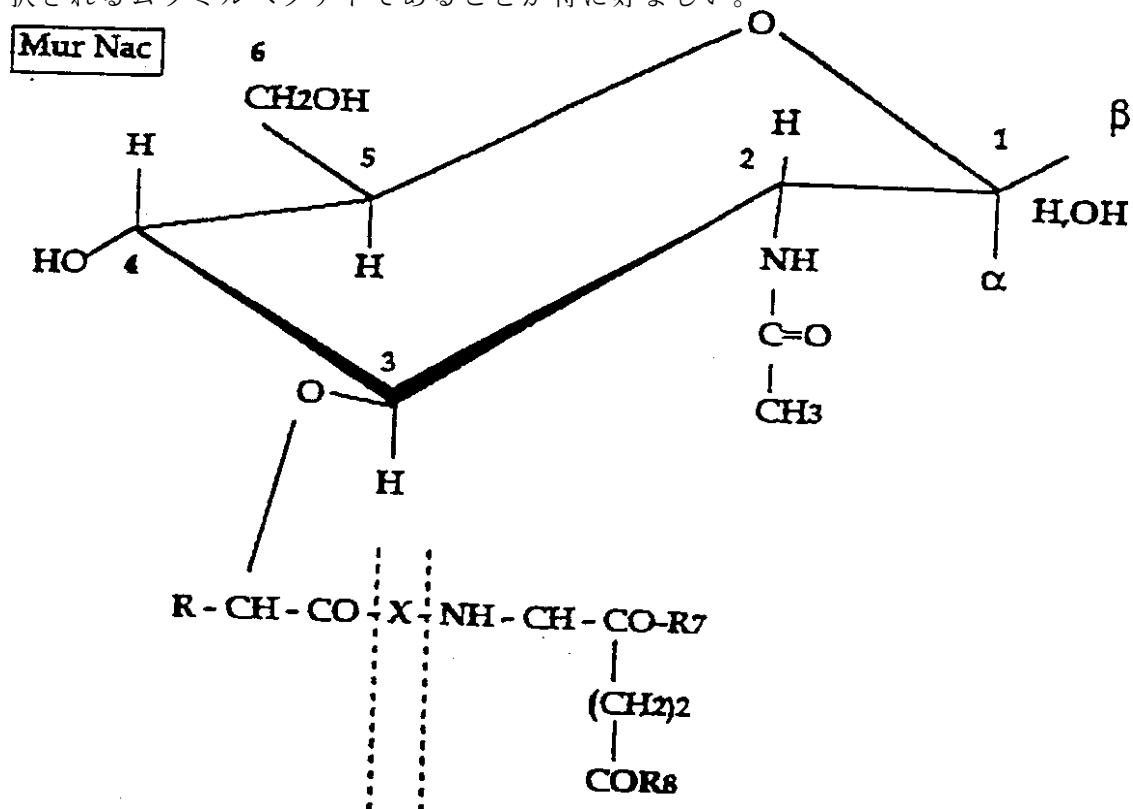
40

50

ドとの組み合わせを干渉しての生体内での比較試験、並びに誘導されたサイトカインで研究されたものの比率の、比較基準に基づいた検出及び計測（例えば、適切な抗体を利用したRIAまたはELISA定量において）から確認できる。得ることのできる結果は、インターフェロン α をさらに説明するのに用いられる以下の例に限定されるものでないことは良く理解されるように明らかである。

特に、用いられるサイトカインは常にヒト起源のサイトカインであろう。このヒト起源のサイトカインという表現は、ヒト起源の天然サイトカイン（それ故に、適切な量のその単離のもたらす困難を、ひとは無視し得ない）に加えて、遺伝子工学的技術による産生物である組換えサイトカイン、すなわち天然サイトカインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列により特徴づけられたサイトカインでもよく、「同一配列」の組換えサイトカインの特徴である諸特性に実質的な変化も、有害な性質の発現（例えばヒト宿主における抗体の誘導）も引き起こさないような、特にアミノ酸の置換、付加または欠失により前記のサイトカインと異なる等価の（equivalents）アミノ酸配列でも排除しない、ということを含むものとして理解されねばならないことが強調されるべきである。

本発明に用いられるムラミルペプチドは、下記一般式に示される特徴を有するものから選択されるムラミルペプチドであることが特に好ましい。



上記式中、官能基Rは水素またはメチル基であり、XはL-アラニル、L-ロイシル、L-イソロイシル、L-バリル、L-トレオニル、L-(N-メチル)-アラニルであり、並びに、R₇およびR₈はそれぞれ独立に、ヒドロキシル基、アミノ基、x=1、2、3、4もしくは5のO(CH₂)_xH基または、好ましくは左旋性（L型）のアミノ酸残基を含むペプチド基である。

このましいムラミルペプチドの種類は、

—R=CH₃で、

—XはL-アラニルまたはL-トレオニルであり、

—R₇はx'=1、2、3もしくは4のO(CH₂)_xH基であり、

—R₈はアミノ基またはx''=1、2、3もしくは4のO(CH₂)_xH基であるものである。

特に好ましいムラミルペプチドは、ムラメチド（murametide, ムラミルメトキシド；R=CH₃, X=L-Ala, R₇=OCH₃およびR₈=NH₂）、ムラブチド（murabutide,

10

20

30

40

50

ムラミルプトキシド； $R = CH_3$ ， $X = L - Ala$ ， $R_7 = OnC_4H_9$ および $R_8 = NH_2$ ）及び最後にムラジメチド（muradimetide, ムラミルジメトキシド； $R = CH_3$ ， $X = L - Ala$ ， $R_7 = R_8 = OCH_3$ ）、並びに万一の場合、上記のペプチド基のL-アラニル残基がトレオニル基に置き換わったものである同族体からなる。

言うまでもないことであるが、上記の種類のムラミルペプチドは、親水性の点で少しも限定的ではない。フランス特許n 8 4 0 7 3 4 0に記載されているような親油性のムラミルペプチドも、同様に本発明の範囲内で用いることができる。

そして、前記に記載された好ましいムラミルペプチドと同様の好ましい効果を有するので、糖質官能基の1、4または6位に置換基を有するものが、すべてその他のムラミルペプチド補助剤に用いることができることもまた、結局のところ明らかである。

10

結局、「組み合わせ（association）」という表現は、サイトカインと選択されたムラミルペプチドがヒト宿主に対して混合物で、または同時投与の処方で投与される必要があることを意味するのではないことに注意がなされるであろう。それは、無意味でない時間間隔でのそれらの投与を含む、あらゆる利用または提示についてまでも同様に拡張されるが、それでもその間隔は、上記に示した条件における組み合わせの下にある2つの構成成分の相互作用を可能にするくらい十分に短くなければならないと理解すべきである。

インターロイキンおよびムラミルペプチドを用いる組み合わせの型は、インターロイキンが下記の分量で投与されるときに有効である：

情報としては、用いたIFNの特有の活性は、

4 UI / mg タンパク質ないし8 UI / mg タンパク質である。

20

— インターフェロンについては：

0. 005 MU / kg / 日から1 MU / kg / 日、および好ましくは0. 05 MU / kg / 日から0. 5 MU / kg / 日、最適量は、0. 11 MU / kg / 日から0. 5 MU / kg / 日である。

— IL-2については：

0. 3 MU / kg / 日から10 MU / kg / 日、好ましくは1 MU / kg / 日から2 MU / kg / 日、IL-2の特有の活性について知るところは、特にプロロイキン（Proleukin）の名称でシータス（Cetus）により商品化されたものは、およそ、mg タンパク質当たり1千万UIである。

— GM-CSFについては、好ましい投与量は、1日につき1 μ g / kg ないし25 μ g / kg であり、さらに好ましいのは、1日につき5 μ g / kg ないし10 μ g / kg である。

30

— ムラミルペプチド、特にムラプチドはおよそ10 μ g / kg / j（=日）ないし350 μ g / kg / jの量で、好ましくは50 μ g / kg / j ないし200 μ g / kg / jの量で投与され、100 μ g / kg / jの投与量は、関係する事例すべてにおいて、サイトカインの最適もしくは最適に準ずる投与量である。

本発明のもう一つの特徴についても、例示を利用しているにもかかわらず、次の叙述に限定されたいと思われるだろう。

健常人のボランティアでなされた臨床検査の間に、ロフェロンA（ROFERON A）の商標でロシュ（Roche）により商品化され、3 MU / mlに調合されたIFN α 2a（インターフェロン、ロフェロンA）を、ムラミルペプチド、特にムラメチドおよびムラプチドと組み合わせ投与した。そして、以下のことが示された。

40

a) IFNの免疫刺激作用の痕跡を残すものとして認められた生物学的指標であるネオプテリンの分泌は、極めて強く増幅され、IFNの最適に準ずる分量での投与での結果は、ムラプチドまたはムラメチドの量に関連していた。そのことは、IFNだけが合成をかすかに誘導するIL-1レセプターアンタゴニスト（IL-1RA）でも同様であり、その合成はしたがって、IFNと合成についての免疫モジュレーターとの間で協同作用を発揮するムラミルペプチドの添加により非常に増幅する。このことはTNF可溶レセプター（STNF-R）においても同様にその通りである。

b) 該組み合わせを受容した被験者では、IFN治療を受けたグループと比較して、ブラ

50

ンクの系における細胞数に明らかな増大が現れる。

c) 被試験者の血漿において、該組み合わせについての、免疫性の媒介物質は、特にサイトカインの I L - 1、I L - 8 および T N F のような、主要な発熱性及び炎症性の媒介物質のいかなる誘導も観察されないのに、インターロイキン 6、G - C S F であると結論できる。

上記事項の確認は、特に下記の測定結果に根拠を置くものである。

ー 第 1 の試験シリーズ：インターフェロン α - I N F - α - 2 a とムラブチドあるいはムラメチドとの混合物の皮下注射：

健常被験者において、試験に含まれる項目についての能力を明らかにするため一連の試験を実施した。彼らは以下の表 1 に示したムラブチド (M U B) あるいはムラメチド (M U M) とインターフェロン α 2 a (I F N α) との混合物を皮下経路で摂取した。

表 I

IFN- α A MUB B MUM	10^5 U	3×10^5 U	10^6 U	3×10^6 U	6×10^6	O
A 35 μ g/Kg	A I	A II	A III	A IV	A V	A35
A 100 μ g/Kg	A VI	A VII	A VIII	A IX	A X	対照 A100
B 35 μ g/Kg	B I	B II	B III	B IV	B V	対照 B35
B 100 μ g/Kg	B VI	B VII	B VIII	B IX	B X	対照 B100
O	対照 IFN 10^5	対照 IFN 3×10^5	対照 IFN 10^6	対照 IFN 3×10^6	対照 IFN 6×10^6	プラシーボ

被験者を、I F N および／またはムラミルペプチドの投与後 3 日間追跡し、フェーズ ■ 試験の実施に必要なすべての試験および検査を実施した。

特に次の検査を行った：

注射の時点ならびに注射後 6、12、36、60 および 72 時間目に白血球算定を含む血液学的分析がなされた。

ネオプテリン、インターロイキン 1、インターロイキン 6、インターロイキン 8、G - C S F、I L - 1 R A および T N F - α の定量を行うための血清を集めるため、注射前と注射後 6、24、48 時間目に血液サンプルを採取した。

白血球算定は自動血球計数器 C O U L T E R C O U N T E R において実施した。

血清での定量のための血液サンプルは、採取後直ちに 4 $^{\circ}$ C、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。血清は - 20 $^{\circ}$ C で保存した。白血球算定およびネオプテリンとサイトカインの定量は市販のキットを用いて実施した。

検査および試験の結果

1) 副作用：

試験中に報告された副作用（頭痛、発熱および関節痛など）は非常に軽度であった。特に、ムラミルペプチドとの組合せにより、I F N の生物学的活性は大きく上昇し、新しい生物学的メディエータの合成によるこの活性の変化したプロファイルが現れたが、I F N の 3 M 単位および 6 M 単位での高用量で認められたインフルエンザ症候群型の作用はこの組合せによって上昇しなかった。

2) 白血球算定：

白血球減少治療によって最も影響を受ける細胞は好中球である。放射線療法または細胞毒性および／もしくは骨髄毒性化学療法を受けた被験者における非特異的な免疫防御力の低下の原因となるのは、好中球の比率の低下である。読取りを簡単にするため、変化が最も著明であった時点で好中球の計数だけを行った。

表 II

ムラミルペプチドとIFN α の組み合わせを投与した後の健常ボランティアにおける好中球数の増加

IFN- α 投与 (単位数)	ムラミルペプチド投与 化合物 投与量 ($\mu\text{g/Kg}$)	試験 番号	好中球の計測 % 基準量 ^a
0	ムラブチド 100	6	268 $\pm$ 43 ^b
0	ムラメチド 100	4	279 $\pm$ 67
1 $\times$ 10 ⁵	- 0	6	143 $\pm$ 34
1 $\times$ 10 ⁵	ムラブチド 100	6	265 $\pm$ 61
3 $\times$ 10 ⁵	- 0	6	169 $\pm$ 47
3 $\times$ 10 ⁵	ムラブチド 100	6	292 $\pm$ 112
1 $\times$ 10 ⁶	- 0	6	147 $\pm$ 42
1 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド 100	6	207 $\pm$ 46
1 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド 100	6	232 $\pm$ 78
3 $\times$ 10 ⁶	- 0	6	144 $\pm$ 19
3 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド 100	6	252 $\pm$ 59
3 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド 100	6	255 $\pm$ 96
6 $\times$ 10 ⁶	- 0	6	191 $\pm$ 75
6 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド 100	6	226 $\pm$ 74
6 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド 100	6	298 $\pm$ 71

a: 投与後 24 時間の間に観察された最大値を示す。

b: 平均 $\pm$ 標準偏差

3) ネオプテリンの定量:

0、24 および 48 時間目に採取した血清に関して定量を行った。RIA (放射免疫測定法) キット (Behring Diagnostic, France) を使用した。結果は nmol/ml で表わした。正常値は 4 ~ 9 nmol/ml の範囲である。

表 III

ムラミル ペプチド	T	IFN α					
		0	10 ⁵ u	3 $\times$ 10 ⁵ u	10 ⁶ u	3 $\times$ 10 ⁶ u	6 $\times$ 10 ⁶ u
0	0	プラシーボ 6.00 $\pm$ 0.80	対照 IFN 6.03 $\pm$ 1.58	対照 IFN 5.78 $\pm$ 2.03	対照 IFN 3.26 $\pm$ 0.85	対照 IFN 3.22 $\pm$ 0.73	対照 IFN 4.87 $\pm$ 2.50
	24	5.50 $\pm$ 0.40	9.02 $\pm$ 2.75	10.21 $\pm$ 2.20	9.20 $\pm$ 2.13	14.39 $\pm$ 2.58	20.95 $\pm$ 3.73
	48	5.20 $\pm$ 0.40	9.43 $\pm$ 2.11	11.20 $\pm$ 1.37	9.72 $\pm$ 2.90	14.80 $\pm$ 2.22	18.73 $\pm$ 2.62
MUB 35 $\mu\text{g/Kg}$	0	NT	NT	A II 5.23 $\pm$ 1.06	A III 5.06 $\pm$ 0.77	A IV 4.26 $\pm$ 0.34	A V 5.21 $\pm$ 0.73
	24			9.78 $\pm$ 1.18	13.00 $\pm$ 3.62	17.31 $\pm$ 2.03	22.61 $\pm$ 3.94
	48			10.67 $\pm$ 3.41	12.41 $\pm$ 2.90	18.01 $\pm$ 3.56	21.30 $\pm$ 6.25
MUB 100 $\mu\text{g/Kg}$	0	対照 MUB 6.37 $\pm$ 0.99	A VI 5.97 $\pm$ 1.78	A VII 4.91 $\pm$ 0.96	A VIII 3.83 $\pm$ 0.82	A IX 4.14 $\pm$ 0.49	A X 5.85 $\pm$ 0.68
	24	7.33 $\pm$ 0.75	11.30 $\pm$ 3.64	12.43 $\pm$ 2.67	20.11 $\pm$ 6.73	19.45 $\pm$ 4.09	29.14 $\pm$ 0.97
	48	8.22 $\pm$ 1.39	11.76 $\pm$ 4.87	13.42 $\pm$ 2.75	18.13 $\pm$ 6.92	19.18 $\pm$ 4.00	28.29 $\pm$ 0.92
MUM 35 $\mu\text{g/Kg}$	0	NT	NT	NT	B III 4.42 $\pm$ 0.70	B IV 5.67 $\pm$ 0.70	B V 4.61 $\pm$ 1.20
	24				12.48 $\pm$ 1.89	16.56 $\pm$ 1.89	21.17 $\pm$ 2.17
	48				12.24 $\pm$ 2.41	14.36 $\pm$ 3.47	18.33 $\pm$ 2.33
MUM 100 $\mu\text{g/Kg}$	0	対照 MUM 5.43 $\pm$ 0.66	NT	NT	B VI 5.20 $\pm$ 1.95	B VII 6.59 $\pm$ 1.62	B VIII 4.06 $\pm$ 0.17
	24	7.14 $\pm$ 1.00			16.33 $\pm$ 2.13	20.78 $\pm$ 2.90	18.41 $\pm$ 2.60
	48	7.39 $\pm$ 1.37			14.49 $\pm$ 4.72	20.33 $\pm$ 4.18	16.10 $\pm$ 2.74

この表から、0 時間目にはすべての被験者が正常な割合のネオプテリンを有していたこと、プラシーボだけを摂取した被験者は不変の比率のネオプテリンを有していたこと、10

10

20

30

40

50

0 $\mu\text{g/kg}$ 用量のムラメチドあるいはムラブチドは比率に有意の影響を及ぼさなかったことがわかる。

インターフェロンの最も低い用量において、ムラミルペプチドとの組合せはネオプテリン比率の有意の上昇を得ることができた。最高用量では、100 $\mu\text{g/kg}$ で投与したムラブチドは確かに有意の上昇を得ることができたが、併用によって認められた割合よりはるかに小さかった。

4) IL-1レセプターアンタゴニスト (IL-1 RA) の定量:

10⁶単位のIFN α を摂取した被験者の血清に関して実施した定量を次の表(表4)において報告する。ムラミルペプチドとインターフェロンとの併用の非常に強い作用が認められる(ここでもBritish Biotechnology Products Ltd.のキットを使用した)。

表 IV

ムラミルペプチドおよびIFN α の投与6時間後の、健常ボランティアの血清が示すIL-1レセプターアンタゴニスト (IL-1 RA) の量

IFN- α 投与 (単位量)	ムラミルペプチド投与		血清中のIL-1 RA量 (Pg/ml) ⁺
	化合物	投与量 ($\mu\text{g/Kg}$)	
0	ムラブチド	100	496 $\pm$ 326 ϕ
3 $\times$ 10 ⁵	-	0	258 $\pm$ 113
3 $\times$ 10 ⁵	ムラブチド	100	10 294 $\pm$ 16 554 [*]
1 $\times$ 10 ⁶	-	0	2 093 $\pm$ 1 278
1 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	16 093 $\pm$ 1 621 [*]
1 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド	100	16 204 $\pm$ 1 879 [*]
3 $\times$ 10 ⁶	-	0	7 332 $\pm$ 3 215
3 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	30 563 $\pm$ 23 410 [*]
6 $\times$ 10 ⁶	-	0	15 523 $\pm$ 6 554
6 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	66 870 $\pm$ 36 554 [*]

⁺: 化合物投与の6時間後に検出されたもの。投与前の値は、すべて200Pg/mlよりも小さかった

ϕ : 同一グループの6人のボランティアの平均 $\pm$ 標準偏差

^{*}: IFN α のみにより誘導された量の、実質的な変化量(マン・ホイットニー・ランク(Mann Whitney Rank)の検定において、 $P < 0.05$ – $P < 0.005$)

5) IL-6の定量:

0時間目と6時間後に採取した血清に関してELISA定量キット(British Biotechnology Products Ltd.)によって定量を行った。数字はpg/mlで表わしている。正常値は6pg未満である。

表 ▽

IFN- α 投与 ($\times$ 単位量)	ムラミルペプチド投与		血清中の IL-6 量 (Pg/ml) ⁺
	化合物	投与量 (μ g/Kg)	
0	ムラブチド	100	2.80 $\pm$ 1.60 ^S
0	ムラメチド	100	4.30 $\pm$ 1.80
1 $\times$ 10 ⁶	-	0	2.00 $\pm$ 1.70
1 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	15.00 $\pm$ 12.00 [*]
1 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド	100	30.00 $\pm$ 30.00 [*]
3 $\times$ 10 ⁶	-	0	3.60 $\pm$ 0.40
3 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	30.00 $\pm$ 23.00 [*]
3 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド	100	31.00 $\pm$ 19.00 [*]
6 $\times$ 10 ⁶	-	0	34.00 $\pm$ 56.00
6 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	76.00 $\pm$ 58.00
6 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド	100	107.00 $\pm$ 72.00 [*]

φ: 各グループは、ムラメチドについての投与では4人であることを除けば、6人のボランティアを含んでいる。

+: 投与6時間後に測定された量。検出される化合物の投与の前にはいかなる値も得られなかった。

S: 平均 $\pm$ 標準偏差

*: IFN α のみにより誘導された量の、実質的な変化量 (マン・ホイットニー・ランク (Mann Whitney Rank) の検定において、 $P < 0.05$ - $P < 0.005$)

表5から、検討したすべての用量においてムラブチドとインターフェロンは協同的に作用したことがわかる。

6) G-C S F の定量:

これらの定量は、ブリティッシュ・バイオテクノロジー・プロダクツ社 (British Biotechnology Products Ltd.) のキットを用いて実施した (表6参照)。

表 VI

ムラミルペプチドおよびIFN α の組み合わせの投与前および投与6時間後の健康ボランティアの血清が示すG-CSFの量

IFN- α 投与 (単位量)	ムラミルペプチド投与		血清中のG-CSF量(経過時間)	
	化合物	投与量($\mu\text{g/Kg}$)	0 時間	6 時間
0	ムラブチド	100	< 10	18 $\pm$ 9
0	ムラメチド	100	61 $\pm$ 103*	73 $\pm$ 115
1 $\times$ 10 ⁶	-	0	< 10	13 $\pm$ 10
1 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	< 10	58 $\pm$ 51*
1 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド	100	< 10	98 $\pm$ 81*
3 $\times$ 10 ⁶	-	0	< 10	17 $\pm$ 21
3 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	< 10	77 $\pm$ 65
3 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド	100	< 10	79 $\pm$ 83
6 $\times$ 10 ⁶	-	0	< 10	17 $\pm$ 26
6 $\times$ 10 ⁶	ムラブチド	100	< 10	140 $\pm$ 168
6 $\times$ 10 ⁶	ムラメチド	100	12 $\pm$ 15	284 $\pm$ 425*

*: ムラメチドを投与されたグループは4人しか存在しないが、それ以外は、それぞれのグループは6人のボランティアを含む

X: 平均 $\pm$ 標準偏差

*: IFN α のみにより誘導された量の、実質的な変化量(マン・ホイットニー・ランク(Mann Whitney Rank)の検定において、 $P < 0.05$ - $P < 0.005$)

この場合もG-CSFを誘導するためのムラミルペプチドとIFNの協同作用が確認される。

7) TNFの可溶性レセプター(STNF-R)の定量:

これらの定量は、6M単位のIFNを摂取した被験者の血清においてELISA検定により実施した。この用量では、既にSTNF-R比率の著明な上昇があったが、ムラブチドの付加はこのメディエータ分泌の有意の上昇をもたらした。

表 VII

治療		血清中のSTNF-Rの量 (pg/ml)		正味の増加 (pg/ml)
IFN- α 単位	ムラブチド ($\mu\text{g/Kg}$)	0 時間	6 時間	
0	100	195 $\pm$ 28	216 $\pm$ 65	31 $\pm$ 37
6 $\times$ 10 ⁶	0	229 $\pm$ 37	389 $\pm$ 95	159 $\pm$ 108
6 $\times$ 10 ⁶	100	232 $\pm$ 35	576 $\pm$ 139	345 $\pm$ 120*

*: IFN- α のみにより誘導された量とは明らかに異なる($P = 0.005$ のマン・ホイットニー・ランク検定)

8) IL-1、IL-8、TNF- α の定量：

これらの定量は同じ条件下で実施した。これらのサイトカインのいずれも、試験した血清中には検出できなかった。使用したキットはすべて、ブリティッシュ・バイオテクノロジー・プロダクツ社 (British Biotechnology Products Ltd.) のものであった。

9) 第2の試験シリーズ：

9. 1. IFNとムラブチドの併用：

1) ヒトにおける単回投与：

試験に参加した被験者を、次の臨床徴候発現への種々の治療の影響を調べるために検討した：頭痛、関節痛－筋肉痛、発熱、悪寒、無力症、吐気－嘔吐。行った観察の要約を表8に示す。

表 VIII

治療	副作用の頻度および平均速度					
	頭痛	間接神経痛/ 筋痛	発熱	悪寒	無力症	嘔吐
IFN-アルファ (6 MU)	6/6 ^a (1.5) ^b	4/6(1.0)	6/6(1.2)	3/6(0.8)	0/6(0)	0/6(0)
IFN-アルファ (1 MU) + ムラブチド (100 µg/kg)	6/9(1.0)	5/9(0.8)	6/9(1.2)	6/9(1.2)	1/9(0.1)	1/9(0.2)
IFN-アルファ (6 MU) + ムラブチド (100 µg/kg)	4/6(1.3)	3/6(0.7)	6/6(2.3)	2/6(0.7)	0/6(0)	0/6(0)
IFN-アルファ (1 MU) + ムラメチド (100 µg/kg)	4/6(1.0)	6/6(1.7)	6/6(1.7)	3/6(0.8)	1/6(0.2)	0/6(0)
IFN-アルファ (6 MU) + ムラメチド (100 µg/kg)	5/6(1.2)	4/6(0.8)	5/6(1.2)	4/6(1.2)	3/6(0.7)	2/6(0.7)

a: 副作用を示す被験者の、全被験者数に対する数

b: 副作用の平均強度。評点はCTC-NCIの尺度に準拠する。この評点は副作用なしの0から深刻な症状の下での薬の使用禁止の作用である4に至る。段階1および2は、望ましくはないが耐えられる作用に相当する

この表から、認められた副作用はすべての群においてほぼ等しいことがわかる。6 MUの

10

20

30

40

50

I F N 単独を摂取したグループは、I F N - α とムラブチドを併用したすべてのグループと等しいかまたはそれ以上の副作用の発現率および平均強度を示した。これらの作用の一部に関して、特に I F N (6 M U) + ムラブチドの組合せにおいては副作用の発現率と強度の低下を認められる。

表 9 は同じ群において得た生物学的作用を示す。これらの結果は、1 M U のインターフェロン α とムラブチドあるいはムラメチドを併用して得た生物学的作用が、6 M U 用量のインターフェロン α 単独で得られた作用に少なくとも等しいかまたはそれ以上であることを示唆している。

表 IX

治療	誘導されるサイトカインのレベルの平均				★
	G-CSF (pg/nl)	IL-6 (pg/nl)	IL-1 RA (ng/ml)	好中球の計測 %基準量表示 Δ	
IFN- αアルファ (6 MU)	17 ± 26	34 ± 56	15.5 ± 6.6	191 ± 74	
IFN- αアルファ (1 MU) + ムラメチド (100 μg/kg)	55 ± 56	15 ± 12	16.1 ± 1.6	207 ± 46	
IFN- αアルファ (6 MU) + ムラメチド (100 μg/kg)	135 ± 166	75 ± 59	66.9 ± 36.5	226 ± 74	
IFN- αアルファ (1 MU) + ムラメチド (100 μg/kg)	94 ± 76	30 ± 30	16.1 ± 1.8	232 ± 78	
IFN- αアルファ (6 MU) + ムラメチド (100 μg/kg)	273 ± 412	107 ± 72	111 ± 123	296 ± 70	

★ : 注射の6時間後に試験した

Δ : 注射の6時間後から12時間後に算出された

従って、この表によれば、本発明は、副作用を上昇させることなく求める作用においてム

10

20

30

40

50

ラブチドーサイトカインの併用による協同作用の恩恵に浴しうることが明らかである。ムラブチドあるいはムラメチドと組合わせた1MUのIFN投与は、6MUのIFN単独の場合よりも高活性であることに注目しなければならない。さらに、6MUの活性はムラブチドあるいはムラメチドの付加によってより強められるが、副作用は減少する。

2) ヒトにおける反復投与:

1、3および5日目に次の治療を受けた各々6名の健常ボランティアからなる3つのグループにおいてフェーズ■/IIa試験を実施した:

a) IFN- α 2a (1MU) ロフェロン

b) ムラブチド 7 mg

c) 2つの免疫促進薬の併用

これらの治療は極めて良好に耐受され、特にC群の被験者においては3回目の注射後も著明な副作用は全く認められなかった。

上記の処置の治療上の潜在能を次のようにして評価した:

a) 副作用の検討:

循環好中球数への影響を調べた。表10にまとめた結果は、ムラブチド+IFNの併用が、単独で投与した免疫促進薬によって得られるよりも有意に大きな好中球数の増加をもたらすこと、また興味深いことに、この現象は5回目の注射後も3回目の注射後と同程度に明らかであったことを示している。

表 X

治療	治療日	好中球の計測 (% 基準量) 経過時間 :		
		3 時間	6 時間	12 時間
・ IFN- アルファ	1	124 $\pm$ 27	122 $\pm$ 30	151 $\pm$ 20
・ ムラブチド	1	139 $\pm$ 26	256 $\pm$ 51	227 $\pm$ 46
・ IFN- アルファ + ムラブチド	1	112 $\pm$ 22	187 $\pm$ 70	156 $\pm$ 60
・ IFN- アルファ	3	121 $\pm$ 35	126 $\pm$ 54	151 $\pm$ 51
・ ムラブチド	3	133 $\pm$ 24	182 $\pm$ 27	176 $\pm$ 59
・ IFN- アルファ + ムラブチド	3	116 $\pm$ 19	266 $\pm$ 112	205 $\pm$ 47
・ IFN- アルファ	5	104 $\pm$ 11	117 $\pm$ 27	149 $\pm$ 21
・ ムラブチド	5	107 $\pm$ 19	150 $\pm$ 28	153 $\pm$ 23
・ IFN- アルファ + ムラブチド	5	106 $\pm$ 11	210 $\pm$ 103	205 $\pm$ 56

b) インターフェロンの生物学的活性の発現における重要性によって選択した遺伝子の誘発に対する種々の治療の影響の分析。これらの体外実験は、治療した被験者の循環血液の細胞に関して実施した。

次の遺伝子産物: PKR、MxA、2-5 OAS、9-27および15Kdは、IFNの抗腫瘍および抗ウイルス作用のメディエータであり、従って、IFNと併用したムラブチドが、少なくともIFN単独で認められたのと等しい誘発レベルを得られることを確認することが重要である。

種々のグループの被験者の細胞によって産生されるmRNAの分析を、「ノーザンブロット」手法ならびにシュレック (Schreck) らの論文 (1992、clin. Exp. Immunol. vol. 90, p.188-192) に従った特異的ヌクレオチドプローブによるハイブリダイゼーションによ

って実施した。この試験は治療後4時間目に採取した細胞を対象とした。IFNの作用に感受性のある遺伝子の誘発へのIFNの影響を観察する上で最も早期の時点であったためである。

得られた結果は、ムラブチド-IFNの併用は、検討した遺伝子を活性化させる上でIFN単独と少なくとも同等に活性であることを示している。

ムラブチド-IFNの組合せを2日間の間隔で3回投与した臨床試験において得た結果全体は次のことを示している：

- －反復投与は単回投与と同等に良好に耐容される、
- －併用の生物学的作用は、特に好中球数の増加ならびに抗ウイルス作用と抗腫瘍作用に關与する遺伝子の誘発に関して、3回目の投与後も最初の投与後と同じ大きさで発現する。

3) ヒト単球によるメディエータ合成へのムラブチドとIFN- α 併用の影響に関する体外実験：

健常ボランティアから採取した血液を、ムラブチドとIFN- α を結合した様々な組合せと共にイン・ビトロでインキュベートした。ムラブチドは20 $\mu\text{g/ml}$ の用量で、IFNは30～100 $\mu\text{g/ml}$ の用量で使用した。このインキュベーションの間、様々な時点で血液サンプルを採取し、フィコール (Ficoll) の密度勾配で単核細胞を分離した。全RNAを抽出し、精製し、電気泳動によって分離した。その後、治療によって誘発された遺伝子が何であるかをハイブリダイゼーション手法によって調べるため、シュレック (Schreck) の方法に従って分析した。この手法は、血清中でその存在を検出することができるIL-1 RA、sTNFR2、IL-6およびG-CSFのようなサイトカインの他に、非常に重要なサイトカインがムラブチド-IFN α 併用の影響下で細胞によって産生されることを明らかにすることができた。イン・ビトロで得られた、表11に示す結果は、健常ボランティアにおいてイン・ビボで実施し、血清中のIL-1 RA、sTNFR2、IL-6およびG-CSFの存在を明らかにした試験 (前述) において得られた所見を確認している。

細胞間メディエータとしての役割が非常に重要であるその他のサイトカイン、IFN- γ およびIL-12は、該循環の中には検出することができなかったが、ハイブリダイゼーション法はそれらに相当する高い量のRNAを示した。これらのサイトカインは細胞内感染に対する防御に強く関与する。

表 XI

細胞のインキュベーション		分泌されたサイトカインの平均量		
IFN-アルファ	ムラブチド 20 $\mu\text{g/ml}$	IL-6 pg/ml	sTNFR2 pg/ml	IL-1 RA ng/ml
-	-	1.1 $\pm$ 1.6	958 $\pm$ 290	0.3 $\pm$ 0.2
-	+	15.5 $\pm$ 11.3	1171 $\pm$ 478	7.8 $\pm$ 6.0
30 u	-	1.9 $\pm$ 1.7	1098 $\pm$ 222	3.5 $\pm$ 4.6
30 u	+	460.8 $\pm$ 330.9	1953 $\pm$ 483	50.8 $\pm$ 43.8
100 u	-	1.5 $\pm$ 0.6	1150 $\pm$ 286	5.0 $\pm$ 4.5
100 u	+	400.8 $\pm$ 313.4	1486 $\pm$ 625	52.0 $\pm$ 55.2

4) 毒性ショックモデルにおけるムラブチド-IFN併用の作用を示すスイスマウス体内での実験：

これらの実験は、毒性ショックモデルにおけるムラブチド-IFNの併用の効果、特に菌体内毒素性ショックに対する防護効果とインターフェロンとの協同作用を示した。

スィスマウスでのD-ガラクトサミンとリポ多糖類(LPS)の投与は、菌体内毒素性ショックを誘発する性質があり、24～48時間以内で70%以上の死亡率である。ムラブチドを単独あるいはIFN- α/β と組合わせて投与した時の抗炎症作用を評価するため、このモデルにおいてムラブチドの予防的あるいは治療的作用を検討した。ムラブチドあるいはインターフェロン α/β によるマウスの前処置は、ガラクトサミン/LPS混合物による攻撃誘発に関して予防的作用を示さなかった(表12)。これに対して、ムラブチドとインターフェロン α/β の組合せによる前処置はわずかに33%の死亡率(対照では78%)で有意の保護作用を誘発した。

10

菌体内毒素性ショックの誘発から1時間後のマウスにおけるムラブチドの投与は、インターフェロン α/β の投与によって誘発されるよりもはるかに良好な有意の治療効果があった。他方で、ムラブチドとインターフェロン α/β の組合せによる治療は、菌体内毒素性ショックによる死亡に対して80%近いマウスの保護作用があり、極めて協同的な治療作用を示した。

表 XII

ムラブチドとマウスインターフェロン α/β の、予防または治療目的の投与による、マウス・ガラクトサミンモデルにおける菌体内毒性ショックに対する防止

1)

治療		全被験マウスに対する死亡マウスの数			平均死亡率 %
化合物	分量	時間	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
NaCl	-	- 3 hrs	6/9	7/8	8/10
ムラブチド	15 mg/kg	- 3 hrs	7/9	7/8	6/10
IFN α/β	5x10 ⁵ IU/kg	- 3 hrs	8/9	5/8	9/10
FN α/β + ムラブチド	5x10 ⁵ IU/kg + 15 mg/kg	- 3 hrs	7/9	5/8	5/10
FN α/β	1.25x10 ⁶ IU/kg	- 3 hrs	7/9	8/8	6/10
FN α/β + ムラブチド	1.25x10 ⁶ IU/kg g + 15 mg/kg	- 3 hrs	1/9	4/8	4/10
NaCl	-	+ 1 hr	6/9	7/8	6/9
ムラブチド	15 mg/kg	+ 1 hr	2/9	3/8	3/9
FN α/β	11.25x10 ⁶ IU/kg	+ 1 hr	6/9	3/8	6/9
FN α/β + ムラブチド	1.25x10 ⁶ IU/kg g + 15 mg/kg	+ 1 hr	1/9	1/8	1/9

1) スイス マウスには、時間0において、18mg D-ガラクトサミン+50mg LPSを用いた腹腔内試験がなされた

死亡率は、48時間後に計測された。

2) 化合物は、試験の3時間前か、1時間後に静脈内に投与される。

結果は明らかに、インターフェロン α/β + ムラブチドの組合せはD-ガラクトサミンと

10

20

30

40

50

L P Sによって試験したマウスにおいて、予防的（D-ガラクトサミン+L P Sなしで75%～81%の死亡率に対して33%）および治療的（I F N α/β +ムラブチドの組合せなしで73%の死亡率に対し12%）に劇的な死亡率の低下をもたらすことを示した。

9. 2. GM-CSFとの組合せ：

ムラブチド-GM-CSFの組合せを検討するため、前述したのと同様の試験を実施した。これらの試験は、単独あるいは併用した免疫調節薬と共にインキュベーションした後の健常ボランティアの細胞に関してイン・ビトロで行った。

a) RNAレベルでの分析：

試験したすべてのドナーにおいて、インターフェロン- γ レセプターの合成およびI L-1 R A合成の誘発が認められた。

b) 上清の分析：

上清においていくつかのサイトカインを検索し、測定した（表13参照）。この分析は重要な量のI L-1 R Aが併用の影響下で産生されることを確認し、ムラブチドは、副作用の一部が炎症性現象と結びついているGM-CSFの耐性を改善することができるであろうことを示唆した。

これらの実験で得られた結果は、従って、I F Nの場合と同様に、ムラブチド-GM-CSFの組合せは、別々の治療時には発現しないメディエイタの重要な誘発を可能にすることを示唆している。さらに、これらのメディエイタの誘発は、ムラブチドがGM-CSFの投与に対する耐性を上昇させるに違いないことを示唆している。

表 XIII

細胞のインキュベーション		分泌されたサイトカインの平均量		
サイトカイン (ng/ml)	ムラブチド 20 μ g/ml	IL-6 pg/ml	sTNFR2 pg/ml	IL-1 RA ng/ml
-	-	1.1 $\pm$ 1.6	958 $\pm$ 290	0.3 $\pm$ 0.2
-	+	15.5 $\pm$ 11.3	1171 $\pm$ 478	7.8 $\pm$ 6.0
GM-CSF(1)	-	2.0 $\pm$ 1.5	1027 $\pm$ 624	4.0 $\pm$ 1.4
GM-CSF(1)	+	34.8 $\pm$ 25.2	1396 $\pm$ 341	57.1 $\pm$ 26.9
GM-CSF(5)	-	2.3 $\pm$ 2.1	1359 $\pm$ 350	8.7 $\pm$ 10.0
GM-CSF(5)	+	52.8 $\pm$ 70.9	1970 $\pm$ 545	76.3 $\pm$ 47.0

9. 3. I L-2との組合せ

1) ムラブチドを使用したマウス体内での実験：

I L-2は転移性腎臓癌および悪性黒色腫の症例において著明な治療効果を持つことを示した。しかしながら、症例の25%で致死的となりうる、毒性ショックに類似した症候群を生じる極めて深刻な毒性作用により、その使用は限定されている。

C 3 H/H e Nマウスにおいてマウスモデルを発現させた。K H T肉腫の細胞を静脈内経路で投与した。4日後と6日後にマウスを次のもので処置した：

a) ムラメチド単独、

b) I L-2、

c) 2つの免疫調節薬の併用、

d) 4番目の群は処置を行わなかった。

一播種性癌の免疫療法における治療としてインターロイキン2と組合わせたムラメチド：

I L-2による免疫療法は、腎細胞の転移性癌および悪性黒色腫の治療において有効であ

ることが明らかにされている。その有効性にもかかわらず、I L-2の投与は敗血症型の一連の副作用を伴っており、それが投与しうる用量を制限し、その使用を専門的な医療施設だけに限定することになった。腫瘍のあるマウスにおいてI L-2と共に投与すると、ムラメチドのアジュバントペプチドがI L-2の毒性を低下させる。I L-2を単独で摂取したマウスは自分達でひとかたまりに寄り集まり、一般に不活動的になる。生存試験において、I L-2とムラメチドの組合せを摂取したマウスは、I L-2だけを摂取したマウスよりも生き残った。肺肉腫の転移を有するマウスにおいて、ムラメチド単独では全く抗腫瘍作用を持たなかった、I L-2とムラメチドの組合せはI L-2単独よりも有効であった。これらの予備的データは、ムラメチドが、I L-2の高用量による治療の毒性を低下させる手段として、I L-2との組合せにおいて有用となりうることを示唆している。

10

2) ムラブチドを使用したヒト細胞に関する体外実験：

健常志願者の細胞に関して実施した実験において、ムラブチドとI L-2の併用はI F N- γ およびI L-12をコードするRNAの非常に高い割合を得ることができることが示された。これら2つのサイトカインは抗腫瘍作用のために重要である。I L-2による治療の際に、その産生が大部分の副作用、特に悪液症の原因となるT N Fの合成がなかったことに注目しなければならない。

イン・ビボおよびイン・ビトロで得られた結果全体が、I L-2とムラブチドの併用はより良い治療効果と、同時に、より少ない副作用を可能にするであろうことを明らかに示している。なぜなら、I L-2はより低い用量しか必要とせず、またムラメチドあるいはムラブチドがI L-2の毒性作用を低下させるからである。

20

得られた結果は、従って、次のことを示している：

A) 特にインターフェロンに関して：

a) 単独で投与した時にはネオプテリンの合成比率を有意に変化させることができない用量で、ムラブチドあるいはムラメチドとI F N α の組合せはこのマーカの重要な比率を得ることができる。I F Nのより高い用量では、併用はこの比率の有意の上昇を可能にする。ネオプテリンはヒトマクロファージにおけるインターフェロンの活性の主要なマーカーのひとつと考えられており、これらの結果は、従って、マクロファージの活性化に結びつくI F N α の作用が低い用量で、良好な耐性で得られることを示している；同様の指摘がI L-1 R Aにも適用でき、併用投与後にはその極めて高い比率が得られる。また、I F Nとムラブチドまたはムラメチドとの間に協同作用が存在すること、I F Nの用量を2倍にした時にはI L-1 R A比率もおおよそ2倍になることから、投与量効果が得られることも認められる。同じことがS T N F-Rについても認められ、これはI F N単独でも誘発されるが、併用によって誘発される比率に比べてより低い。

30

b) I F Nとムラミルペプチドの併用は対照よりも高い白血球数を得ることができる；

c) ムラミルペプチドとI F N α の併用は、さらに、その他のサイトカインあるいは免疫メディエータの選択的分泌を生じさせた。実際に、併用によって治療された被験者におけるI L-6、G-C S FおよびS T N F-Rの血清比率と、I F N単独あるいはムラブチド単独によって治療された被験者の比率の間には有意差が存在することが認められる。これに対し、I L-1、I L-8あるいはT N F α の比率の上昇は認めなかった。サイトカインの分泌へのインターフェロンとムラミルペプチド併用のこの選択的作用は全く予想外であり、極めて興味深いものである。単独で投与した2つの成分の既知の特性からは予測することができなかった。この発見は非常に興味深い適用の可能性を提供する。

40

B) G-C S Fは起源細胞の顆粒球系への分化と、骨髄毒性治療後のそれらの再生の役割を担うサイトカインであり、I L-6も造血に深く関わっている。従って、外因性I F N α の作用と、宿主に投与したこの外因性I F N α によって誘発される内因性のG-C S FおよびI L-6の作用を結合させる可能性は、重要な治療上の進歩を構成する。実際に：

a) この結果は最小の副作用条件下で行われる；必要なI F Nの用量はあまり高くない；

b) この結果は、対応するサイトカインの「カクテル（混合物）」を投与した場合よりもはるかに良好な用量およびアベイラビリティでの生理的条件において生じる；

50

c) TNF、IL-1 および IL-8 の分泌が存在しないことは特に好ましい要素であり、IL-6 の偶発的な活性量において IL-1RA がそうであるように、不確定な量の TNF に結びついてその作用を中和する STNF-R の分泌が存在するだけに、そのことは一層有利である。このデータ全体が、ヒト医療における新しい治療適用と、既存の治療適用領域の拡大へと導いている。特に：

1. 今後 IFN α の治療上の利点が明らかにされるすべての状況。特に、本発明は、主として上記で検討した相対的にあまりに重大な副作用のため、今日までほとんど検討されなかった腫瘍性疾患の治療への、この併用形態でのインターフェロンの拡大を可能にする。カポジ肉腫、慢性骨髄性白血病、種々の癌、多発性骨髄腫、黒色腫、様々な白血病とリンパ腫が考えられる。本発明は、治療的に有用なサイトカインの産生に関して及ぼされる刺激作用のおかげで、通常恒常性の保持に關与する複雑な生物学的・生理的システムを少なくとも一部は再生させることができ、またそれは、それらの成分と可溶性あるいは細胞に結合した他の調節因子との相互作用のおかげでもある。

2. さらに詳しくは、脊髄形成異常症候群の症例におけるような自発性の、または薬剤、特にサイトカインを主成分とする薬剤の治療によって誘発される、顆粒球系欠損症に關わる状況。本発明に従った併用の大きな利点のひとつは、単独で使用した同じサイトカインの白血球減少作用に対する宿主の保護作用にあり、その結果、特に癌、感染性疾病、あるいは遺伝子由来の欠損症の治療のために、適切なサイトカインを用いた細胞毒性化合物を、より確実な治療効果をもたらすまで延長させることができる。言い換えれば、併用は、衰弱消耗の緩徐化、あるいは顆粒球系が細胞毒性治療（化学療法あるいは癌の放射線療法、AZT による AIDS の治療）および／あるいは免疫抑制薬によって損なわれるたびにその十分な修復（さらには骨髄の修復）を可能にする。併用はまた、問題となる領域の細胞毒性治療と平行して併用のサイトカインとは異なる細胞毒性因子が使用される、本発明に従った状況（サイトカインとムラミルペプチド）においても、あるいは細胞毒性治療が食細胞、血小板および骨髄刺激を修復させるために中断される場合その都度使用することができる。最後に本発明は、たとえば骨髄移植あるいはより一般的には同種組織あるいは器官の移植を可能にするために、免疫系が既に抑制されている、さらに破壊されている人において造血系のより速やかな再形成への道を開くものである。

IL-6 の誘発も、骨髄巨核球形成への作用、従って血小板再生への作用に結びつくと考えられる。このことは、さらに、2 週間にわたって追跡した被験者の一部において認められた。

この抗好中球減少あるいは抗白血球減少作用の範囲内で、本発明はまた、サイトカイン、たとえばインターフェロンあるいはインターロイキンを、一方では GM-CSF と、他方ではムラミルペプチド、特にムラブチドと結びつけた組合せを含む組成に關する；実際に、我々が見てきたように、サイトカインはヒトにおいて腫瘍あるいはウイルス性感染を低下させる治療効果を持つが、その副作用の中でも極めて有害な好中球減少症あるいは白血球減少症を患者にもたらす。

GM-CSF の場合、単独で投与した時には非常に深刻な炎症型の副作用を患者にもたらす。しかし同時に、血液中の好中球あるいは白血球の数を上昇させることによる抗好中球減少あるいは抗白血球減少作用も有している；我々は、ムラブチドあるいはムラメチドのようなムラミルペプチドがサイトカインの好中球減少あるいは白血球減少作用を代償することを認めた。

GM-CSF、サイトカイン、たとえばインターフェロンあるいは IL-2、およびムラミルペプチドの組合せは、従って、3 つの化合物の組合せである：ムラブチドと GM-CSF は好中球減少の累積的修復効果を持ち、GM-CSF 単独での副作用を取り除くことができる。

C) 同様に、TNF、IL-1 および IL-8 の分泌を伴わない IL-1RA および STNF-R の重要な産生を認めた。これは適用の第二の局面を導くものである。まず最初は、IL-1 と TNF が極めて重要な役割を果たす敗血症性ショックの予防および治療に向けて。その他の適応症は、慢性関節リウマチあるいは一部の自己免疫疾患、あるいは骨髄

10

20

30

40

50

、組織または器官の移植の症例において宿主に対する移植片の反応によって誘発される疾病の症例におけるように、炎症に対処することが必要な場合である。

D) 当然ながら、この組合せは慢性C型またはB型肝炎あるいは呼吸器系のウイルス性感染のようなウイルス性疾患の治療にとっても有用である。すなわち、サイトカインがその抗ウイルス能力によって直接関与する治療（たとえばインターフェロンの場合）、あるいは断続的に中断しなければならない抗ウイルス治療の間に挿入されあるいは置換される治療（たとえばAZTあるいは同様の抗ウイルス作用スペクトルも持つ他のヌクレオシド誘導体によるHIVウイルス増殖の抑制）である。

一般的に、本発明は、上に示した基準に合致するあらゆる組合せに関するものであり、その場合、さらにその上に薬学的に許容されうる賦形剤を含む。それらの薬剤組成は非経口経路、特に皮下、静脈内、あるいは灌流の経路で投与されうる溶液によって好都合に構成されるが、それらに限定されるわけではない。ムラミルペプチドは単独で、あるいはそれらの保護を保証する生薬形態で（たとえば、胃関門を越えることができるカプセルあるいはマイクロスフィアのリポゾーム中にカプセル化して）、経口投与することができる。使用されるサイトカイン、特にインターフェロンについても同様である。

インターフェロンとムラミルペプチドの組合せの場合、注射のためのIFNの好ましい用量はおよそ $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ (0.05 M $\sim$ 5 M) 国際単位であり、ムラミルペプチド、特にムラメチドあるいはムラプチドの用量はおよそ10 μ g $\sim$ 250 μ g/kgと考えられる。

GM-CSFとムラミルペプチドの組合せの場合には、好ましい用量は各々10 μ g $\sim$ 250 μ g/kgのムラミルペプチドについて1 μ g $\sim$ 25 μ g/kgのGM-CSFとなるであろう。

上記に示した用量は、自ずから本発明を例証する以外の価値は持たない。当然ながら、患者の状態および患者が罹患している疾患に応じて、併用の成分を組合わせる用量を決定することは臨床医の管轄である。

本発明はまた、公知の抗腫瘍作用、特に腎臓癌あるいはその他の癌の転移に対する抗腫瘍作用を持つが、治療指数が極めて低いIL-2との組合せにも関する。注射のための好ましい用量は、10 μ g $\sim$ 250 μ g/kgのムラミルペプチドと組合わせた100万 $\sim$ 1000万単位kg/日のIL-2となるであろう。

追加的な例として、本発明はまた、先に示した種類のムラミルペプチドとIL-6、IFN γ および／あるいはTGF β 因子（「形質転換成長因子」の英語略語）の組合せにも関する。それらは、アレルギー現象の責任を担う、IgEクラスの免疫グロブリンの負の調節（ネガティブ・レギュレーション）に重要な関係があるとみなされている。「負の調節」という語は、他の免疫グロブリン、特にIgAおよびIgGの産生に比べてのIgEクラスの免疫グロブリンの産生の低下と理解しなければならない。ムラミルペプチドと組合わせた1つまたは複数のサイトカインの併用投与は、免疫系細胞によって合成される免疫グロブリンのプロフィールを、IgEの産生に比べて、さらにはIgE産生を犠牲にしても、IgGおよびIgAの産生を促進する方向に調節することができる。この結果は、本発明に従った組合せを治療的なアレルギー処置のために使用する可能性を示している。

組合せの成分の各々の用量、特に非経口経路で投与する時の用量は、約10 μ g $\sim$ 250 μ g/kgのムラミルペプチドについて、次のようになるであろう：

- 0.05 M $\sim$ 10 M UIのIFN γ /kg/日、好ましくは0.5 M UI/kg/日 $\sim$ 5 M UI/kg/日、さらに好ましくは1 M UI/kg/日 $\sim$ 5 M UI/kg/日、
- 0.5 μ g $\sim$ 100 μ g/kgのTGF β 、および／または
- 0.1 μ g $\sim$ 25 μ g/kgのIL-6。

最後に、次に述べる特許請求の範囲は、自ずから、選択したサイトカインと、ヒト臨床において利用しうるムラミルペプチド型の分子または重要な生物学的特性を示す分子とを組合せて用いる組成の作用と理解される。例として次の化合物が挙げられる：

- N a c M u r - L - T h r - D i s o G l n - s n グリセリルジパルミトイル
- N A c - M u r - L - A l a - D - i s o G l n - L - A l a - 2 (1', 2' ジパル

10

20

30

40

50

ミトイル) -sn-グリセロ-3'-ホスホリルエチルアミド (MTP-PE) ;
-N2 (Nac-Mur-L-Ala-D-isoGln) N6-ステアロイル-リシン (ムロクタシン) またはMDP-Lys (L18) ;
-Nac-グルコサミニル-Nac-Mur-L-Ala-D-isoGln-L-Ala-グリセリル-ジパルミテート (DTP-GTP) またはNac-グルコサミニル-Nac-Mur-L-Thr-D-iso-Gln-L-Ala-グリセリル-ジパルミテート ;
-Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln ;
-Nac-Mur-D-Ala-D-isoGln-1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール ;
-Nac-Mur-D-Thr-D-isoGln-1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール ;
- 2 番目のアミノ酸であるグルタミンがノルロイシンによって置換されて、発熱作用を持たないMDPの類似体 ;
- 毒性、特に発熱性が十分に失われた細菌産生物の誘導体あるいは類似体 (分画化あるいはより好ましくは合成によって得られた)、その中でも、ヒトにおいて免疫学的な能力を有する細胞を活性化させ、サイトカインを誘発することができる内毒素、特にモノマーあるいはペプチドグリカン。

フロントページの続き

- (72)発明者 シェディド、ルイーズ
フランス国、エフ — 75015 パリ、リュ・ガストン・ドゥ・カイラベット 18
- (72)発明者 バー、ジョルジュ
フランス国、エフ — 92800 ピュトー、リュ・ポール・ラファルゲ 14、ミネルブ 1
- (72)発明者 ルフランシア、ピエール
フランス国、エフ — 91190 ジフ・スール・イベット、シェブリー 2、アレ・ドゥ・ラ
・マレ・ロワゾー 46

審査官 内田 俊生

- (56)参考文献 特開昭62-228026 (JP, A)
特開平02-001410 (JP, A)
特開平01-079125 (JP, A)
Br. J. Cancer, 1991, Vol.63, No.3, pp.399-403
J. Biol. Response Mod., 1990, Vol.9, No.1, pp.98-102
Adv. Exp. Med. Biol., 1992, Vol.319, pp.253-263
J. Interferon Res., 1991, Vol.11, Suppl.1, p.S257, abst. No.8.30
- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61K 38/00 - 38/58