

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4855253号
(P4855253)

(45) 発行日 平成24年1月18日 (2012. 1. 18)

(24) 登録日 平成23年11月4日 (2011. 11. 4)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/22	(2006. 01)	A 6 1 K 37/24
A 6 1 P 41/00	(2006. 01)	A 6 1 P 41/00
A 6 1 P 35/00	(2006. 01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/00	(2006. 01)	A 6 1 P 37/00
A 6 1 P 7/00	(2006. 01)	A 6 1 P 7/00

請求項の数 10 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2006-521487 (P2006-521487)
 (86) (22) 出願日 平成16年7月23日 (2004. 7. 23)
 (65) 公表番号 特表2007-500157 (P2007-500157A)
 (43) 公表日 平成19年1月11日 (2007. 1. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/008245
 (87) 国際公開番号 W02005/014023
 (87) 国際公開日 平成17年2月17日 (2005. 2. 17)
 審査請求日 平成19年7月19日 (2007. 7. 19)
 (31) 優先権主張番号 03017174.8
 (32) 優先日 平成15年7月29日 (2003. 7. 29)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 506102293
 ドムベ・ファ・ル・マ・ソチエタ・ベル・
 アツィオーニ
 イタリア国イー-67100 ラクイラ、
 ヴィア・カンポ・ディ・ピレ
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞動員に有用な医薬の組み合わせ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物活性物質として顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) と胎盤成長因子 (P L G F) との組み合わせであり、臓器若しくは細胞の移植又は腫瘍化学放射線療法における末梢血前駆細胞 (P B P C s) の動員の刺激に使用するための医薬。

【請求項 2】

該生物活性物質が同時に又は別個に投与される、請求項 1 に記載の医薬。

【請求項 3】

該生物活性物質が非経口投与される、請求項 2 に記載の医薬。

【請求項 4】

該顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) が、組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (r h G - C S F) であり、該胎盤成長因子 (P L G F) が、組換えヒト胎盤成長因子 (r h P L G F) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 5】

該顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) と該胎盤成長因子 (P L G F) が、1 ~ 1 5 0 μ g / k g の G - C S F と 1 0 ~ 3 0 0 μ g / k g の P L G F の一日投与量を提供する製剤中に含有される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 6】

臓器若しくは細胞の移植又は腫瘍化学放射線療法における末梢血前駆細胞 (P B P C s) の動員の刺激に使用するための医薬組成物の製造における顆粒球コロニー刺激因子 (G

10

20

- C S F) と胎盤成長因子 (P L G F) との組み合わせの使用。

【請求項 7】

非経口用組成物の製造における請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (r h G - C S F) と組換えヒト胎盤成長因子 (r h P L G F) との組み合わせである、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 9】

非ホジキンリンパ腫 (N H L) 、再発性ホジキンリンパ腫 (H L) 、多発性骨髄腫の罹患患者における自家若しくは同種末梢血前駆細胞移植、又は骨髄抑制化学療法後の回復期における、請求項 6 に記載の使用。

10

【請求項 10】

医薬組成物が $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ の G - C S F 及び $130 \mu\text{g} / \text{kg}$ の P L G F の 1 日量を提供する、請求項 6 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、それを必要とする患者又は被験者における血液幹細胞の動員に使用するための生物活性分子の組み合わせに関するものである。より詳細には、本発明は、末梢血前駆細胞 (P B P C) の動員を刺激する際に特に有効な、G - C S F と P L G F との組み合わせを提供するものであり、それにより、腫瘍患者における臓器移植又は細胞移植及び化学放射線療法プロトコルの実現可能性及び有効性を高める。

20

【背景技術】

【0002】

自家 P B P C は、非ホジキンリンパ腫 (N H L) ³ 、再発性ホジキンリンパ腫 (H L) ⁴ 、及び多発性骨髄腫 (M M) ⁵ に罹患する患者において高用量化学放射線療法及び自家幹細胞移植 (S C T) の適用、実現可能性及び有効性を有意に増加させる ^{1 , 2} 。

【0003】

同種 P B P C は、H L A 適合 S C T のための好ましい幹細胞源であり、そして H L A 不適合同種移植のための唯一の細胞源である ^{6 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11} 。これは、H L A が適合する血縁又は非血縁ドナーのいない患者、即ち、同種移植を受けるかもしれない患者の世界人口のおよそ 40 % に相当する、危険度の高い白血病患者にとって潜在的な治療的療法である。

30

【0004】

がん患者において自家 P B P C 動員に用いられるプロトコルには、骨髄成長因子の単独使用、又は細胞毒性を有する化学療法からの回復期での使用が含まれ、後者のアプローチは最適な P B P C 動員を可能にする ^{12 , 13 , 14} 。健常ドナーからの同種 P B P C 動員は、通常、 $10 \sim 20 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ の用量の組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (r h G - C S F) による短期治療によって達成される ^{15 , 16 , 17 , 18} 。

【0005】

5×10^6 以上の C D 3 4 ⁺ 細胞 / k g の自家移植を受けたがん患者は迅速で永続的な造血移植を体験するが、 2×10^6 以下の C D 3 4 ⁺ 細胞 / k g の自家移植を受けた患者には遅発性移植、移植の不成功又は 2 次性骨髄異形成の危険性がある ¹⁹ 。したがって、自家 S C T では、適当量の C D 3 4 ⁺ 細胞の入手可能性が必須の前提条件である。事前の非常に強力な化学放射線療法又は疾患関連因子のために、相当数の化学療法を受けたことがないがん患者 (10 ~ 20 %) 又は再発性 / 不応性がん患者 (30 ~ 40 %) が、適量の C D 3 4 ⁺ 細胞の動員に失敗する ^{20 , 21 , 22} 。

40

【0006】

適当量の同種 C D 3 4 ⁺ 細胞を回収することは、H L A 同一移植のレシピエントでは重大な問題ではない；しかしながら、5 ~ 15 % の正常ドナーは幹細胞動員が弱く、r h G - C S F 用量の増加と複数回のアフエーシス処置を必要とする ^{23 , 24 , 25} 。H L

50

A不適合同種移植のレシピエントは、移植の不成功と重篤なGVHDを避けるため、Tリンパ球を除去した「メガ」用量のCD34⁺細胞の再注入を必要とする²⁶。標準動員法（即ち、rhG-CSFによる7日間の治療）では、HLA不適合SCTのドナーは平均4回の白血球搬出法を受けて標的細胞用量のCD34⁺細胞（ 12×10^6 CD34⁺細胞/kg体重）を回収するが、相当数のドナー（20～25%）は標的CD34⁺細胞用量の提供に失敗する。

【0007】

年齢、性別、サイトカイン処置スケジュール、及び事前の化学放射線療法が幹細胞動員に影響し得るにもかかわらず^{27, 28, 29}、特定の特徴は何もサイトカイン動員の予測因子として明確に同定されていない。したがって、がん患者又は正常ドナーに適用可能であり、且つ毒性を与えることなく循環前駆細胞の収率を増加可能な手順は、自家SCT及び同種SCTの実行可能性、毒性及び費用に重大な影響を有することが予想される。

【0008】

PBPC動員の増加は、造血幹細胞の輸送を制御するメカニズム、即ち、回帰時の管腔内皮から血管外の骨髓内空間への遊出及び動員時のその逆に干渉可能な分子を使用することによって達成されるであろう^{30, 31, 32, 33}。PBPC動員を高めるための更なるアプローチの1つは、組換えヒト（rh）顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（rhGM-CSF）+ rhG-CSF³⁴、インターロイキン-3（rhIL-3）+ rhG-CSF又はrhGM-CSF³⁵、及びPIXY-321³⁶のようなサイトカインの組み合わせの使用に依拠する。最後に、PBPC動員の促進は、標準動員法に、骨髓前駆細胞を増量可能な幹細胞因子（rhSCF）^{37, 38}、flt-3³⁹リガンドなどの即効性サイトカインを組み込むことにより達成され、それにより、rhG-CSFによるその後の動員に影響を受けやすい細胞の数が増加するであろう。

【0009】

これまで、rhG-CSFの代替物も付加物も、rhG-CSF単独で達成される血液前駆細胞の実質的な動員の改善に失敗しており、あるいは毒性の実質的な増加のほうが勝った限定的な改善をもたらしている。

【0010】

胎盤成長因子（PlGF）は血管内皮成長因子（VEGF）ファミリーのメンバーであり、VEGF受容体-1（VEGFR1）を介したシグナル伝達による血管形成増幅因子として機能する。最近、ヒト（h）PlGFを発現するアデノウイルスベクターの投与が、骨髓抑制後の骨髓再生の促進及び造血前駆細胞の動員を含めた複雑な造血作用を発揮することが示された。しかしながら、

1143706206311_0

組換えアデノウイルスベクター注入後の成長因子投与は、精製した因子の直接注入とは大きく異なる点をいくつか示しており、臨床設定で用いられる様式にしたがって投与した場合、その作用は予測できないであろう。

【非特許文献1】Gianni AM. 高用量化学療法及び自家移植：指針の好機。Ann Oncol. 1997; 8: 933-5

【非特許文献2】Demirer T, Bensinger WI, Buckner CD. 高用量化学療法のための末梢血幹細胞動員。J Hematother. 1999; 8: 103-13

【非特許文献3】Gianni AM, Bregni M, Siena Sら、侵襲性B細胞リンパ種におけるMACOP-Bとの比較による高用量化学療法及び自家骨髓移植。N Engl J Med. 1997; 336: 1290-7

【非特許文献4】Ferme C, Mounier N, Divine Mら、初期化学療法後の再発又は不成功の状態にある進行性ホジキン病患者に対する高用量化学療法を伴う集中的サルベージ療法：Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte H89試験の結果。J Clin Oncol. 2002; 20: 467-75

10

20

30

40

50

【非特許文献5】Barlogie B、多発性骨髄腫治療のための高用量療法及び革新的アプローチ。Semin Hematol. 2001; 38(2 Suppl 3): 21-7

【非特許文献6】Korbling M、Przepiorka D、Huh Y Oら、不応性白血病及びリンパ腫に対する同種血液幹細胞移植：骨髄同種移植に対する血液の潜在的利点。Blood. 1995; 85: 1659-1665

【非特許文献7】Schmitz N、Bacigalupo A、Hasenclever Dら、初期白血病患者における同種骨髄移植対フィルグラスチムで動員した末梢血前駆細胞の移植：血液及び骨髄移植に対するヨーロッパ群の無作為多施設治験の最初の結果。Bone Marrow Transplant. 1998; 21: 995-1003

10

【非特許文献8】Appelbaum FR、同種移植のための幹細胞源の選択：もはや末梢的問題ではない。Blood. 1999; 94: 381-383

【非特許文献9】Bensinger WI、Martin PJ、Storer Bら、血液のがん患者における、HLA同一血縁者からの末梢血細胞と比較した骨髄移植。N Engl J Med. 2001; 344: 175-181

【非特許文献10】Anderlini P、Korbling M、Dale Dら、同種血液幹細胞移植：ドナーへの考慮。Blood. 1997; 90: 903-908

【非特許文献11】Aversa F、Tabilio A、Terenzi Aら、白血病患者における組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子で動員した末梢血前駆細胞を接種骨髄へ添加することによるT細胞を除去した半合致「3遺伝子座」不適合移植の生着の成功。Blood. 1994; 84: 3948-3955

20

【非特許文献12】Haas R、Mohle R、Fruhauf Sら、悪性リンパ腫において末梢血前駆細胞の動員及び自家移植に成功した患者の特徴。Blood. 1994; 83: 3787-94

【非特許文献13】Bensinger WI、Longin K、Appelbaum Fら、組換え顆粒球コロニー刺激因子(rhG-CSF)後に回収した末梢血幹細胞(PBSC)：移植後の生着速度に 관련된 因子の解析。Br J Haematol. 1994; 87: 825-31

【非特許文献14】Watts MJ、Sullivan AM、Jamieson Eら、低用量シクロホスファミド及び顆粒球コロニー刺激因子の後の前駆細胞動員：101人の前処置された悪性リンパ腫患者におけるこれらのパラメータを予測する前駆細胞の量と質及び因子の解析。J Clin Oncol. 1997; 15: 535-46

30

【非特許文献15】Matsunaga T、Sakamaki S、Kohgo Y、Ohi S、Hirayama Y、Niitsu Y、組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子は十分な量の末梢血幹細胞を同種移植のための健常ボランティアにおいて動員することができる。Bone Marrow Transplant. 1993; 11: 103-108

【非特許文献16】Kroger N、Renges H、Sonnenberg Sら、16 µg/kgのG-CSF対10 µg/kgのG-CSFによる健常ドナーにおける同種移植のための幹細胞動員。Bone Marrow Transplant. 2002; 29: 727-730

40

【非特許文献17】Basara N、Schmetzer B、Blaui IWら、ボランティアドナーにおいてレノグラスチムで動員した末梢血前駆細胞：非盲検無作為分割用量漸増試験。Bone Marrow Transplant. 2000; 25: 371-376

【非特許文献18】Engelhardt M、Bertz H、Afting M、Waller CF、Finke J、同種ドナーからの末梢血前駆細胞の動員及びCD34+免疫選択のための高用量対標準用量フィルグラスチム(rhG-CSF)。J Clin Oncol. 1999; 17: 2160-2172

50

【非特許文献19】Siena S、Schiavo R、Pedrazzoli P、Carlo-Stella C、がん治療のための血液細胞移植におけるCD34+細胞量の治療的関連性。J Clin Oncol. 2000; 18: 1360-77

【非特許文献20】Dreger P、Kloss M、Petersen Bら、自家前駆細胞移植：幹細胞毒性薬物への事前の曝露が、骨髄移植ではなく、末梢血前駆細胞の収率及び生着を決定する。Blood. 1995; 86: 3970-8

【非特許文献21】Weaver CH、Hazeltan B、Birch Rら、骨髄機能廃絶化学療法投与後の692人の患者における末梢血前駆細胞回収物のCD34含量の関数としての生着動態の解析。Blood. 1995; 86: 3961-9

【非特許文献22】Tarella C、Di Nicola M、Caracciolo D、自家末梢血前駆細胞による支援を伴う高用量ara-Cは顕著な前駆細胞動員を誘発する：低動員の危険性のある患者の兆候。Bone Marrow Transplant. 2002; 30: 725-32

10

【非特許文献23】Anderlini P、Przepiorka D、Seong Dら、正常ドナーからの顆粒球コロニー刺激因子（フィルグラスチム）動員及び血液幹細胞アフェレーシスの臨床毒性及び実験室内効果、並びに処置負担の解析。Transfusion. 1996; 36: 590-595

【非特許文献24】Anderlini P、Przepiorka D、Huh Yら、同種移植のための正常ドナーにおけるCD34+前駆細胞及びリンパ球サブセットのフィルグラスチム動員期間及びアフェレーシス収率。Br J Haematol. 1996; 93: 940-942

20

【非特許文献25】Grigg AP、Roberts AW、Raunow Hら、健常ボランティアの末梢血前駆細胞を動員し、回収するためのフィルグラスチム（顆粒球コロニー刺激因子）の最適用量及びスケジューリング。Blood. 1995; 86: 4437-4445

【非特許文献26】Aversa F、Tabilio A、Velardi Aら、1つの完全に不適適なHLAハプロタイプを有する血縁ドナー由来の、T細胞を除去した幹細胞を用いた危険性の高い急性白血病の治療。N Engl J Med. 1998; 339: 1186-1193

【非特許文献27】Mifflin G、Charley C、Stainer C、Anderson S、Hunter A、Russell N、同種移植のための正常ドナーにおける幹細胞動員：安全性及び有効性に影響する因子の解析。Br J Haematol. 1996; 95: 345-348

30

【非特許文献28】Anderlini P、Przepiorka D、Seong Cら、フィルグラスチムで処置した正常ドナーにおいてCD34+細胞の動員に影響する因子。Transfusion. 1997; 37: 507-512

【非特許文献29】de la Rubia J、Arbona C、de Arriba Fら、正常ドナーにおける末梢血前駆細胞の低回収に関連する因子の解析。Transfusion. 2002; 42: 4-9

【非特許文献30】Craddock CF、Nakamoto B、Andrews RG、Priestley GV、Papayannopoulou T、VLA4インテグリンに対する抗体は、霊長類及びマウスにおいて長期増殖細胞を動員し、サイトカイン誘導性動員を増大させる。Blood. 1997; 90: 4779-88

40

【非特許文献31】King AG、Horowitz D、Dillon SBら、アカゲザルにおけるヒトCXCKケモカインGROβの特定の短鎖型であるSB-251353の単回注射により生着特性の増したマウス造血幹細胞の急速動員及び造血前駆細胞動員の評価。Blood. 2001; 97: 1534-42

【非特許文献32】Pruijt JF、van Kooyk Y、Figdor CG、Lindley IJ、Willemze R、Fibbe WE、抗LFA-1ブロック抗体は、インターロイキン-8で誘導される造血前駆細胞の動員を妨げる。Bl

50

ood . 1998 ; 91 : 4099 - 105

【非特許文献33】Carlo - Stella C、Di Nicola M、Magni Mら、マウスにおいてデフィブロタイドを顆粒球コロニー刺激因子と組み合わせると、初期のコミットした末梢血前駆細胞の動員を顕著に促進する。Cancer Res . 2002 ; 62 : 6152 - 7

【非特許文献34】Koc ON、Gerson SL、Cooper BWら、前駆細胞動員の無作為交差治験：高用量シクロホスファミド+顆粒球コロニー刺激因子 (G - CSF) 対顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 + G - CSF。J Clin Oncol . 2000 ; 18 : 1824 - 30

【非特許文献35】Rosenfeld CS、Bolwell B、LeFever Aら、末梢血幹細胞を動員するための4種のサイトカイン処方計画の比較：IL - 3単独及びGM - CSF又はG - CSFとの組み合わせ。Bone Marrow Transplant . 1996 ; 17 : 179 - 83

【非特許文献36】Bishop MR、Jackson JD、O' Kane - Murphy Bら、末梢血細胞を動員するための組換え融合タンパク質PIXY321の第1相試験。J Clin Oncol . 1996 ; 14 : 2521 - 6

【非特許文献37】Shpall EJ、Wheeler CA、Turner SAら、危険性の高い乳癌患者における幹細胞因子及びフィルグラスチムによる末梢血前駆細胞動員の無作為第3相試験。Blood . 1999 ; 93 : 2491 - 501

【非特許文献38】Facon T、Haroisseau JL、Maloisel Fら、多発性骨髄腫患者において化学療法後に幹細胞因子をフィルグラスチムと組み合わせると、末梢血前駆細胞の収率が向上し、アフエーシス要求性が減少する：無作為対照臨床試験。Blood . 1999 ; 94 : 1218 - 25

【非特許文献39】Brasel K、McKenna HJ、Charrier K、Morrissey PJ、Williams DE、Lyman SD、Flt3リガンドは顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子又は顆粒球コロニー刺激因子と相乗作用して造血前駆細胞をマウスの末梢血に動員する。Blood . 1997 ; 90 : 3781 - 8

【非特許文献40】Hattori K、Heissig B、Wu Yら、胎盤成長因子は、骨髄微小環境からVEGFR1 + 幹細胞を動員することによって造血を再構築する。Nature Med . 2002 ; 8 : 841 - 9

【非特許文献41】MacVittie TJ、Farese AM、Davis TA、Lind LB、McKearn JP、ヒトインターロイキン3及び顆粒球コロニー刺激因子の受容体のキメラアゴニストであるミエロポエチンは、CD34 + 細胞を動員し、致死的なX線を照射した非ヒト霊長類に急速に生着する。Exp Hematol . 1999 ; 27 : 1557 - 68

【非特許文献42】Carlo - Stella C、Di Nicola M、Longoni P、Milani R、Milanesi M、Guidetti A、Haanstra K、Jonker M、Cleris L、Magni M、Formelli F、Gianni AM、デフィブロタイド及び組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子で処置した非ヒト霊長類における初期のコミットした造血前駆細胞の動員。Exp Hematol . 2004 ; 32 : 68 - 75

【非特許文献43】Craddock CF、Nakamoto B、Andrews RG、Priestley GV、Papayannopoulou T、VLA - 4インテグリンに対する抗体は、霊長類及びマウスにおいて長期増殖細胞を動員し、サイトカイン誘導性動員を増大させる。Blood . 1997 ; 90 : 4779 - 88

【非特許文献44】Lemieux ME、Rebel VI、Lansdorp PM、Eaves CJ、長期骨髄「スイッチ」培養においてリンパ性骨髄分化の可能な成熟マウス骨髄における初期造血細胞タイプの特徴付け及び精製。Blood . 1995 ; 86 : 1339 - 1347

10

20

30

40

50

【非特許文献45】Sutherland HJ、Eaves CJ、Lansdorp PM、Tacker JD、Hogge DE、遺伝子操作されたマウス間質細胞上に維持された長期培養における初期ヒト造血細胞の分化調節。Blood. 1991; 78: 666 - 72

【非特許文献46】Carlo-Stella C、Regazzi E、Sammarelli Gら、チロシンキナーゼインヒビターAG957及び抗Fas受容体抗体のCD34+慢性骨髄性白血病前駆細胞に対する効果。Blood. 1999; 93: 3973 - 82

【非特許文献47】Sutherland HJ、Eaves CJ、Eaves AC、Dragowska AC、Lansdorp PM、in vitroで長期造血を開始可能なヒト骨髄細胞の特徴及び部分精製。Blood. 1989; 74: 1563 - 70

【発明の詳細な説明】

【0011】

発明の説明

幹細胞動員を改善可能な手順の相対的な臨床効果により、臨床症状で起こるようなPBP動員を刺激可能な動物モデルにおいてPLGFの動員活性を試験した。正常BALB/cマウスに、対照ピヒクル(PBS/MSA)、rhG-CSF単独(10µg/日)、又はrhG-CSF(10µg/日)と組換えマウス(rm)PLGF(2.5~5µg/日)との組み合わせを、5日間腹腔内(IP)注射した。サイトカインの最後の注射から2時間後に血液サンプルを回収し、以下のパラメータについて評価した：白血球(WBC)数、コロニー形成細胞(CFC)の頻度及び絶対数、長期培養開始細胞(LTC-IC)の絶対数。

【0012】

rmPLGFの効果を以下の表1~4に表す。rmPLGF単独注入ではWBC、CFC、及びLTC-ICの動員に効果がないことは明らかである。rmPLGF(5µg/日)をrhG-CSFと組み合わせて5日間注射すると、rhG-CSF単独と比較してCFC及びLTC-ICの動員を有意に増加させる。

【0015】

更に、PLGF/G-CSFの組み合わせの動員活性を非ヒト霊長類モデル(アカゲザル)で試験した。マウスで得られた結果がこの動物モデルで更に確認された。特に、PLGF/G-CSFの組み合わせは、動態、頻度及び絶対数に関し、WBC、CFC、HPP-CFC及びLTC-ICの動員を改善した。

【0016】

上記研究は、ヒト患者への造血成長因子の投与に酷似した手順及び条件を用いて実施した。この結果は、末梢血前駆細胞の動員におけるhG-CSFとrhPLGFとによる相乗作用の存在を明確に立証するものである。

【0017】

したがって、本発明の目的は、それを必要とする患者又は被験者において血液幹細胞の動員を刺激するのに有用なG-CSFとPLGFとの組み合わせ製剤である。本明細書において、「患者」及び「被験者」という用語は、好ましくはヒトの個人を意味するが、動物、特に哺乳動物を意味してもよい。血液幹細胞の動員から恩恵を受ける状態、病状又は疾患の例としては、限定されるものではないが、NHL、再発性HL⁴、MM⁵に罹患する患者における臓器移植又は細胞移植及び腫瘍化学-放射線療法、特に自家^{1,2}又は同種のSCT、あるいは骨髄抑制化学療法後の回復期にある患者が挙げられる。

【0018】

組み合わせ製剤の活性成分は、医薬的に許容可能なピヒクル及び賦形剤を有する製剤で同時に投与することも別個に投与することもできる。非経口経路の投与が好ましい。非経口投与に好適な医薬組成物の製造方法は当該技術分野において公知である；詳細は『レミントン：薬学の科学と実践』、MacK出版社、中に見出すことができる。本発明の組み

10

20

30

40

50

合わせ製剤中の活性成分量は、例えば投与経路、求められる効果又は治療すべき状態、及び患者の応答性に応じて変えることができる。原則として、有効量の G - C S F 及び P l G F は、血液幹細胞動員に関して所望の応答性を作り出すことが可能である。患者 / 被験者の応答性は、処置期間中、例えば循環血液幹細胞を計数することによってモニターでき、したがって、必要であれば容量を変更することができる。本発明の好ましい態様では、 $1 \sim 150 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、好ましくは $5 \sim 20 \mu\text{g} / \text{kg}$ の G - C S F 及び $10 \sim 300 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、好ましくは $20 \sim 150 \mu\text{g} / \text{kg}$ の P l G F で構成される日用量の活性成分を供給する注射液の形態で組換え h G - C S F 及び r h P l G F が用いられる。

【 0 0 1 9 】

以下の実施例によって本発明を更に説明する。

10

【実施例】

【 0 0 2 0 】

実施例 1 ～ 1 1

マウスモデルにおける P l G F / G - C S F の組み合わせの動員効果

材料及び方法

動物

体重 $20 \sim 25 \text{ g}$ の 6 ～ 8 週齢雌性 B A L B / c マウスは、C h a r l e s R i v e r (ミラノ、イタリア、E U) から購入した。動物に対して行った実験手順は、英国癌研究調整委員会 (英国癌研究調整委員会。腫瘍実験における動物の福祉に関する U K C C C R 指針。B r . J . C a n c e r .、58 : 109 - 113、1998) の指針にしたがって実施した。対照ピヒクル (P B S / M S A)、r h G - C S F 単独 ($10 \mu\text{g} / \text{日}$)、又は r h G - C S F ($10 \mu\text{g} / \text{日}$) と組換えマウス (r m) P l G F ($2.5 \sim 5 \mu\text{g} / \text{日}$) との組み合わせを、マウスに 5 日間毎日腹腔内 (I P) 注射した。それぞれの実験は少なくとも 3 回の別々の機会に行い、時点あたり 1 群 3 ～ 4 匹のマウスを用いた。

20

【 0 0 2 1 】

サイトカイン

組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (r h G - C S F、ニューボゲン (登録商標)) はロシュ (ミラノ、イタリア、E U) から購入した；r m P l G F は R & D S y s t e m s 社 (アビンドン、英国) から購入した；r h P l G F は G e y m o n a t S p A (アナニ、イタリア、E U) から提供された。

30

【 0 0 2 2 】

動員プロトコール

標準動員プロトコールは、B A L B / c を r h G - C S F ($10 \mu\text{g} / \text{マウス}$ 、腹腔内) で 1 日 1 回、5 日間処置することを含む。P l G F の動員効果を評価するため、r m P l G F ($2.5 \sim 5 \mu\text{g} / \text{マウス}$ 、腹腔内) を 1 日 1 回、5 日間、単剤として又は r h G - C S F と組み合わせて投与した。対照には P B S / M S A を注射した。

【 0 0 2 3 】

動員パラメータ

白血球 (W B C) 数、コロニー形成細胞 (C F C) の頻度及び絶対数、長期培養開始細胞 (L T C - I C) の絶対数によって動員を評価した。特に明記しない限り、動物は最後の処置から 2 時間後に屠殺した。

40

【 0 0 2 4 】

細胞の回収及び分離

P B を眼窩叢から回収してヘパリン含有チューブに移した。白血球 (W B C) を計数後、P B を P B S で希釈し ($1 : 4$ 、v / v)、単核細胞 (M N C) をフィコール不連続密度勾配遠心法 (280 g 、30 分、室温) で分離した。次に細胞を 10 % ウシ胎仔血清 (F B S、S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s、パンクーバー、カナダ)、 2 mM L - グルタミン及び抗生物質を添加したイスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M、S e r o m e d、ベルリン、ドイツ、E U) で 2 回洗浄した。

【 0 0 2 5 】

50

W B C 計数

ヘパリン - 抗凝固処理血液及び自動計測器 (A D V I A 1 2 0 、 バイエル、ミラノ、イタリア、 E U) を用いて W B C 計数を行った。

【 0 0 2 6 】コロニー形成細胞 (C F C) アッセイ

全コロニー形成細胞 (C F C)、即ち、顆粒球 - マクロファージコロニー形成細胞 (C F U - G M)、赤芽球バースト形成細胞 (B F U - E)、及び多系列 C F U (C F U - G E M M) を標準メチルセルロース培養で評価した。簡潔に言えば、血液の 1 m l アリコート ($5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ MNC) を、組換えマウス (r m) 幹細胞因子 (r m S C F 、 50 ng / ml)、マウス r m インターロイキン - 3 (r m I L - 3 、 10 ng / ml)、組換えヒト (r h) インターロイキン - 6 (r h I L - 6 、 10 ng / ml) 及び r h エリスロポエチン (r h E p o 、 3 U / ml) を添加したメチルセルロース培地 (H C C - 3 4 3 4 ; S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s) の入った 3 5 m m ペトリ皿に蒔いた。空气中 5 % C O ₂ の湿潤雰囲気において 3 7 ° で 1 2 ~ 1 4 日のインキュベーション後、標準的基準にしたがいコロニーを計数した (H u m p h r i e s 、 R . K . ら、B l o o d 、 5 3 : 7 4 6 - 7 6 3 、 1 9 7 9)。

10

【 0 0 2 7 】長期培養開始細胞 (L T C - I C) アッセイ

L T C - I C をバルク培養で評価した (C a r l o - S t e l l a C ら、B l o o d 、 1 9 9 9 、 9 3 : 3 9 7 3 - 8 2)。簡潔に言えば、試験細胞 ($5 \sim 8 \times 10^6$) を完全培地 (M y e l o c u l t (商標) 5 1 0 0 、 S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s) 中に再懸濁し、放射線照射した (2 , 0 0 0 c G y) マウス A F T 0 2 4 細胞 (プリンストン大学、プリンストン、ニュージャージー、U S A の K . M o o r e 博士から供与) による支持細胞層を含有する培地に蒔いた (M o o r e K A ら、B l o o d 、 1 9 9 7 ; 8 9 : 4 3 3 7 - 4 7)。

20

【 0 0 2 8 】

完全培地は、F B S (1 2 . 5 %)、ウマ血清 (1 2 . 5 %)、L - グルタミン (2 m M)、2 - メルカプトエタノール (10^{-4} M)、イノシトール (0 . 2 m M)、葉酸 ($20 \mu \text{ M}$) 及び新たに溶解したヒドロコルチゾン (10^{-6} M) を添加した α 培地から成る。毎週、増殖培地の半分を新鮮な完全培地と交換することによって培養物に栄養供給した。培養 4 週間後、トリプシン処理して回収した非接着細胞及び接着細胞をプールし、洗浄し、メチルセルロース培地中でコロニー形成性細胞に関してアッセイした。4 週齢 L T C 中に存在する全コロニー形成性細胞数 (即ち、C F U - G E M M + B F U - E + C F U - G M) は、試験懸濁液中にもともと存在した L T C - I C 数の相対数を提供する。L T C - I C 絶対数は、全コロニー形成性細胞数を、L T C - I C あたりのコロニー形成性細胞の平均出力である 4 で割って計算した (S u t h e r l a n d H J ら、B l o o d . 1 9 8 9 ; 7 4 : 1 5 6 3 - 7 0)。

30

【 0 0 2 9 】実施例 1【 0 0 3 0 】

40

【表 1】

rmPlGF及び／又はrhG-CSFで処置したマウスにおけるWBC数

動員法*	WBC / μ L 血液	
	中央値 (範囲)	平均 $\pm$ SD
PBS/MSA	2,000 (850-4,000)	2,165 $\pm$ 929
rhG-CSF (10 μ g/日)	6,000 (5,200-21,650)	9,577 $\pm$ 5,575
rmPlGF (5 μ g/日)	2,450 (1,350-2,950)	2,450 $\pm$ 141
rhG-CSF (10 μ g/日) + rmPlGF (2.5 μ g/日)	5,600 (4,600-13,700)	7,040 $\pm$ 3,778
rhG-CSF (10 μ g/日) + rmPlGF (5 μ g/日)	9,500 (4,800-18,400)	9,980 $\pm$ 5,715

* BALB/Cマウスに、PBS/MSA、rhG-CSF単独 (10 μ g/日)、又はrhG-CSF (10 μ g/日) とrmPlGF (2.5~5 μ g/日) との組み合わせを5日間腹腔内注射した。rmPlGF及び／又はrhG-CSFの最後の注射から2時間後に血液サンプルを回収した。

【0031】

実施例 2

【0032】

【表 2】

rmPlGF及び／又はrhG-CSFで処置したマウスにおける循環CFC頻度

動員法*	CFC / 10^5 MNC	
	中央値 (範囲)	平均 $\pm$ SD
PBS/MSA	7 (2-15)	8 $\pm$ 3
rhG-CSF (10 μ g/日)	76 (51-148)	82 $\pm$ 29
rmPlGF (5 μ g/日)	8 (7-9)	8 $\pm$ 1
rhG-CSF (10 μ g/日) + rmPlGF (2.5 μ g/日)	115 (93-184)	130 $\pm$ 37
rhG-CSF (10 μ g/日) + rmPlGF (5 μ g/日)	195 (113-253)	180 $\pm$ 58

* BALB/cマウスに、PBS/MSA、rhG-CSF単独 (10 μ g/日)、又はrhG-CSF (10 μ g/日) とrmPlGF (2.5~5 μ g/日) との組み合わせを5日間腹腔内注射した。rmPlGF及び／又はrhG-CSFの最後の注射から2時間後に血液サンプルを回収した。CFCには、顆粒球-マクロファージCFC (CFU-GM)、赤芽球バースト形成細胞 (BFU-E)、及び多分化能性CFC (CFU-Mix) が含まれる。CFCデータは、各動物由来のサンプルについての4つの培養に由来する。

【0033】

実施例 3

【 0 0 3 4 】

【表 3】

rmPlGF及び／又はrhG-CSFで処置したマウスにおける循環CFCの絶対数

動員法*	血液 1 m l あたりの C F C	
	中央値 (範囲)	平均 ± S D
PBS/MSA	57 (9-288)	81 ± 75
rhG-CSF (10 μ g/日)	3, 129 (1, 042-5, 518)	2, 977 ± 1, 126
rmPlGF (5 μ g/日)	96 (87-105)	96 ± 13
rhG-CSF (10 μ g/日) + rmPlGF (2. 5 μ g/日)	2, 568 (1, 480-5, 885)	3, 198 ± 1, 928
rhG-CSF (10 μ g/日) + rmPlGF (5 μ g/日)	6, 143 (2, 486-11, 520)	6, 015 ± 3, 674

10

* BALB/cマウスに、PBS/MSA、rhG-CSF単独 (10 μ g/日)、又はrhG-CSF (10 μ g/日) とrmPlGF (2. 5~5 μ g/日) との組み合わせを5日間腹腔内注射した。rmPlGF及び／又はrhG-CSFの最後の注射から2時間後に血液サンプルを回収した。CFCには、顆粒球-マクロファージCFC (CFU-GM)、赤芽球バースト形成細胞 (BFU-E)、及び多分化能性CFC (CFU-Mix) が含まれる。CFCデータは、各動物由来のサンプルについての4つの培養に由来する。血中循環CFCの絶対数は、CFC頻度に血液1mlあたりの全MNC数を乗じた関数である。

20

【 0 0 3 5 】

実施例 4

【 0 0 3 6 】

【表 4】

rmPlGF及び／又はrhG-CSFで処置したマウスにおける循環LTC-ICの絶対数

動員法*	血液1mlあたりのLTC-IC	
	中央値（範囲）	平均±SD
PBS/MSA	7 (3-29)	9±5
rhG-CSF (10 µg/日)	194 (57-337)	208±98
rmPlGF (5 µg/日)	4 (3-5)	4±2
rhG-CSF (10 µg/日) + rmPlGF (2.5 µg/日)	565 (279-852)	565±405
rhG-CSF (10 µg/日) + rmPlGF (5 µg/日)	1,173 (852-2,070)	1,365±364

* BALB/cマウスに、PBS/MSA、rhG-CSF単独（10 µg/日）、又はrhG-CSF（10 µg/日）とrmPlGF（2.5～5 µg/日）との組み合わせを5日間腹腔内注射した。rmPlGF及び／又はrhG-CSFの最後の注射から2時間後に血液サンプルを回収した。循環LTC-ICの絶対数はバルク培養においてアッセイした。試験細胞（ $5\sim 8\times 10^6$ ）を、放射線照射マウスAFT024細胞による支持細胞層を含有する培地に蒔いた。培養4週間後、トリプシン処理によって回収した非接着細胞及び接着細胞をプールし、洗浄し、コロニー形成性細胞についてアッセイした。4週齢LTCに存在する全コロニー形成性細胞数（即ち、CFU-Mix+BFU-E+CFU-GM）は、試験懸濁液中にもともと存在したLTC-IC数の相対値を提供する。血中循環LTC-ICの絶対数は、LTC-IC頻度に血液1mlあたりの全MNC数を乗じた関数である。

【0051】

実施例12～18

非ヒト霊長類モデルにおけるPlGF/G-CSFの組み合わせの動員効果

材料及び方法

実験デザイン

アカゲザルの集団（ $n=4$ ）にG-CSF単独（100 µg/kg/日、皮下、5日間）（サイクル1）で最初に動員し、6週間の洗い流し期間後、rhPlGF（130 µg/kg、静脈内、5日間）+rhG-CSF（100 µg/kg/日、皮下、5日間）から成る第2動員療法（サイクル2）を施した。更に6週間の洗い流し期間後、rhPlGF（260 µg/kg、静脈内、5日間）+rhG-CSF（100 µg/kg/日、皮下、5日間）から成る第3動員サイクル（サイクル3）を同一サル集団に行った。研究デザインによれば、サイクル1の後の動員動態は、サイクル2及びサイクル3の後の動員を評価するためのサル内の対照として役立つ。

【0052】

動員パラメータ

白血球（WBC）の動員動態について解析し、同様にコミットしたコロニー形成細胞（CFC）の頻度及び絶対数、高増殖能前駆細胞（HPP-CFC）、並びに長期培養開始細胞（LTC-IC）について解析した。処置期間中（1～5日）毎日、並びに療法停止後3日及び5日に動員パラメータを解析した。無菌技術を使用して麻酔した霊長類（ケタミン、10 mg/kg、筋肉内）の大腿動脈から末梢血サンプルを得た。

【0053】

WBC計数

EDTA-抗凝固処理血液及び自動計測器（ADVIA 120、バイエル、ミラノ、イ

10

20

30

40

50

タリア、E U)を用いてW B C計数を行った。

【0054】

C F C 及び H P P - C F C アッセイ

先に記載された技術にしたがい(41, 42)、ヘパリン添加血液を用いて全C F C [即ち、顆粒球-マクロファージコロニー形成細胞(C F U - G M)、赤芽球バースト形成細胞(B F U - E)、及び多系列(顆粒球、赤血球、マクロファージ、巨核球)C F U (C F U - G E M M)]及びH P P - C F Cをアッセイした。簡潔に言えば、フィコール不連続勾配(密度 = 1.077 g/ml)遠心法によって得た単核細胞(M N C)を、組換えヒト幹細胞因子(r h S C F、 50 ng/ml 、Stem Cell Technologies)、インターロイキン-3(r h I L - 3、 20 ng/ml 、Stem Cell Technologies)、インターロイキン-6(r h I L - 6、 20 ng/ml 、Stem Cell Technologies)、r h G - C S F (20 ng/ml 、Stem Cell Technologies)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(r h G M - C S F、 20 ng/ml 、Stem Cell Technologies)、及びエリスロポエチン(r h E p o、 3 U/ml 、R & D Systems社、アビンドン、英国)を添加したメチルセルロース培地(H C C - 4100、Stem Cell Technologies、バンクーバー、カナダ)を入れた4枚の35 mmペトリ皿に蒔いた($1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5 / \text{ml}$)。標準的基準にしたがい、12 ~ 14日のインキュベーション(37、5% C O₂)後にC F Cを記録した。r h S C F (50 ng/ml)、r h I L - 3 (20 ng/ml)、r h I L - 6 (20 ng/ml)、r h G - C S F (20 ng/ml)、r h G M - C S F (20 ng/ml)、及びr h E p o (3 U/ml)を添加したメチルセルロース培地からの直径 > 1 mmのコンパクトなコロニー増殖の肉眼で見えるコロニーとして定義されるH P P - C F Cを、28日のインキュベーション後に記録した(43)。血中の循環C F C又はH P P - C F Cの絶対数は、C F C頻度又はH P P - C F C頻度に血液1 mlあたりの全M N C数を乗じた関数である。

【0055】

L T C - I C アッセイ

L T C - I C頻度を限界希釈条件下で評価した(44)。簡潔に言えば、段階希釈した試験細胞($2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^3$)を、ウシ胎仔血清(12.5%)、ウマ血清(12.5%)、L - グルタミン(2 mM)、2 - メルカプトエタノール(10^{-4} M)、イノシトール(0.2 mM)、葉酸($20 \mu\text{M}$) + 新たに溶解したヒドロコルチゾン(10^{-6} M)を添加した α 培地から成る $150 \mu\text{L}$ の完全培地(Myelocult (商標) 5100、Stem Cell Technologies)に再懸濁し、96ウェル平底プレートに蒔いた。各試験細胞量に関し、16 ~ 22回重複して蒔いた。レトロウイルス遺伝子の移入によりヒトI L - 3及びG - C S Fを産生するように操作した放射線照射(8,000 c G y)マウスM2 - 10B4細胞($3 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 、テリーフォックス研究所、バンクーバー、カナダのDr. C. Eavesより供与)による支持細胞層を含有するプレートに試験細胞を蒔いた(45)。培養は、増殖培地の半分を新鮮な完全培地と交換することによって毎週栄養供給した。培養5週間後、トリプシン処理によって個々のウェルから非接着細胞及び接着細胞を回収し、洗浄し、C F Cの増殖についてアッセイした。12 ~ 14日間のインキュベーション後、培養を陽性(1以上のコロニー)又は陰性(コロニーなし)として記録し、L T C - I C頻度はL - C a l cソフトウェア(Stem Cell Technologies)を用いて計算した。循環L T C - I Cの絶対数をバルク培養にて評価した(46)。簡潔に言えば、試験細胞($5 \sim 8 \times 10^6$)を完全培地に再懸濁し、放射線照射したマウスM2 - 10B4細胞($3 \times 10^4 / \text{cm}^2$)による支持細胞層を含有する培地に蒔いた。培養5週間後、トリプシン処理して回収した非接着細胞及び接着細胞をプールし、洗浄し、コロニー形成性細胞についてアッセイした。5週齢L T Cに存在する全コロニー形成性細胞数(即ち、C F U - G E M M + B F U - E + C F U - G M)は、試験懸濁液中にもともと存在するL T C - I C数の相対数を提供

する。絶対LTC-IC値は、全コロニー形成性細胞数を、LTC-ICあたりのコロニー形成性細胞の平均出力である4で割って計算した。

【0056】

実施例12

循環WBC

rhG-CSF単独の5日間投与により、平均(±SD)WBC数が、前処理値と比較して平均5倍増加した。130又は260μg/kgのrhPlGFをrhG-CSFに添加することにより、処置5日目に検出されたWBC値が緩やかに増加した。

【0057】

【表12】

10

rhG-CSF単独又はrhPlGF+rhG-CSFで処置したアカゲザルにおけるWBC数

	血液1μLあたりのWBC数*		
	サイクル1	サイクル2	サイクル3
H	rhG-CSF (100μg/kg/日、皮下、 5日間)	rhPlGF (130μg/kg、静脈内、 5日間) +rhG-CSF (100μg/kg/日、皮下、 5日間)	rhPlGF (260μg/kg、静脈内、 5日間) +rhG-CSF (100μg/kg/日、皮下、 5日間)
1	8,708±2,458	13,498±5,514	8,370±1,585
2	31,313±3,889	24,533±2,789	41,180±7,364
3	40,600±6,274	35,388±2,207	44,085±6,588
4	43,055±6,562	39,440±6,744	37,960±3,598
5	43,523±13,790	60,040±9,508	49,048±7,120
8	14,363±4,163	23,073±9,017	17,783±5,964
10	12,145±5,421	16,398±8,314	11,150±2,915

20

30

* アカゲザル(n=4)に、6週間の洗い流し期間によって隔てられた3回の動員サイクルを施した。サイクル1はrhG-CSF単独(100μg/kg/日、皮下、1~5日)によって、サイクル2はrhPlGF(130μg/kg、静脈内、1~5日)+rhG-CSF(100μg/kg/日、皮下、1~5日)の組み合わせによって、及びサイクル3はrhPlGF(260μg/kg、静脈内、1~5日)+rhG-CSF(100μg/kg/日、皮下、1~5日)の組み合わせによって動員を誘発した。WBC数を、処置中(1~5日)毎日、並びに療法停止後3日及び5日に解析した。データは平均±SDで表す。

40

【0058】

実施例13

CFC頻度

ベースライン値と比較して、ピーク時に検出された血中CFC(10⁵MNCあたり)の平均頻度は、rhG-CSF単独、rhG-CSF/rhPlGF(130μg/kg

50

)、及びrhG-CSF/rhPlGF(260 μ g/kg)によりそれぞれ19倍、53倍、及び52倍に増加した。rhG-CSF単独と比較すると、rhPlGF/rhG-CSFの組み合わせ処置は、CFC頻度がピーク時の2倍に増加した。

【0059】

【表13】

rhG-CSF単独又はrhPlGF+rhG-CSFで処置したアカゲザルにおける
循環CFC頻度

	CFC/10 ⁵ MNC*		
	サイクル1	サイクル2	サイクル3
日	rhG-CSF (100 μ g/kg/日、皮下、 5日間)	rhPlGF (130 μ g/kg、静脈内、 5日間) + rhG-CSF (100 μ g/kg/日、皮下、 5日間)	rhPlGF (260 μ g/kg、静脈内、 5日間) + rhG-CSF (100 μ g/kg/日、皮下、 5日間)
1	6 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	5 $\pm$ 3
2	4 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	19 $\pm$ 8
3	9 $\pm$ 1	39 $\pm$ 13	48 $\pm$ 26
4	114 $\pm$ 51	213 $\pm$ 87	245 $\pm$ 151
5	63 $\pm$ 26	196 $\pm$ 26	261 $\pm$ 83
8	66 $\pm$ 11	40 $\pm$ 11	60 $\pm$ 39
10	10 $\pm$ 7	19 $\pm$ 10	21 $\pm$ 18

* アカゲザル(n=4)に、6週間の洗い流し期間によって隔てられた3回の動員サイクルを施した。サイクル1はrhG-CSF単独(100 μ g/kg/日、皮下、1~5日)によって、サイクル2はrhPlGF(130 μ g/kg、静脈内、1~5日)+rhG-CSF(100 μ g/kg/日、皮下、1~5日)の組み合わせによって、及びサイクル3はrhPlGF(260 μ g/kg、静脈内、1~5日)+rhG-CSF(100 μ g/kg/日、皮下、1~5日)の組み合わせによって動員を誘発した。CFCを、処置中(1~5日)毎日、並びに療法停止後3日及び5日に解析した。データは平均 $\pm$ SDで表す。CFCには、顆粒球-マクロファージCFC(CFU-GM)、赤芽球バースト形成細胞(BFU-E)、及び多分化能性CFC(CFU-Mix)が含まれる。CFCデータは、各動物由来のサンプルについての4つの培養に由来する。

【0060】

実施例14

絶対CFC値

血中循環CFCの絶対数は、CFC頻度に血液1mlあたりの全MNC数を乗じた関数

として計算した。ベースライン値と比較して、rhG-CSF単独、rhG-CSF/rhPlGF (130 µg/kg)、及びrhG-CSF/rhPlGF (260 µg/kg) で処置することにより、CFCがそれぞれ85倍、335倍及び358倍に増加した。サイクル2及び3では、CFCのピーク値が、サイクル1 (rhG-CSF単独) に対して4倍及び5倍に増加した。

【0061】

【表14】

rhG-CSF単独又はrhPlGF+rhG-CSFで処置したアカゲザルにおける
循環CFCの絶対数

10

	血液1mlあたりのCFC*		
	サイクル1	サイクル2	サイクル3
日	rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、 5日間)	rhPlGF (130 µg/kg、静脈内、 5日間) + rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、 5日間)	rhPlGF (260 µg/kg、静脈内、 5日間) + rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、 5日間)
1	134±9	138±38	170±129
2	344±207	724±254	6,552±4,365
3	472±60	6,420±4,775	9,634±7,006
4	11,406±4,093	32,347±14,206	53,002±25,250
5	5,397±3,074	46,283±8,287	60,777±8,563
8	3,952±2,666	4,532±3,714	3,719±1,899
10	224±164	448±168	943±994

20

30

* アカゲザル (n=4) に、6週間の洗い流し期間によって隔てられた3回の動員サイクルを施した。サイクル1はrhG-CSF単独 (100 µg/kg/日、皮下、1~5日間) によって、サイクル2はrhPlGF (130 µg/kg、静脈内、1~5日) + rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、1~5日) の組み合わせによって、及びサイクル3はrhPlGF (260 µg/kg、静脈内、1~5日) + rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、1~5日) の組み合わせによって動員を誘発した。CFCを、処置中 (1~5日) 毎日、並びに療法停止後3日及び5日に解析した。データは平均±SDで表す。CFCには、顆粒球-マクロファージCFC (CFU-GM)、赤芽球バースト形成細胞 (BFU-E)、及び多分化能性CFC (CFU-Mix) が含まれる。CFCデータは、各動物由来のサンプルについての4つの培養に由来する。血中循環CFCの絶対数は、CFC頻度に血液1mlあたりの全MNC数を乗じた関数である。

40

【0062】

実施例15

50

H P P - C F C 頻度

動員 5 日目に検出された血中 H P P - C F C (10^5 MNC あたり) の平均頻度は、r h G - C S F 単独又は r h G - C S F / r h P l G F ($130 \mu\text{g} / \text{kg}$) により、ベースライン値と比較してそれぞれ 5 倍及び 12 倍に増加した。r h G - C S F 単独と比較すると、r h P l G F / r h G - C S F の組み合わせ処置は、ピーク時の H P P - C F C 頻度の 2 倍に増加した。

【 0 0 6 3 】

【表 1 5】

r h G - C S F 単独又は R H P l G F + R H G - C S F で処置したアカゲザルにおける
循環 H P P - C F C 頻度

10

日	H P P - C F C / 10^5 MNC *	
	サイクル 1	サイクル 2
	rhG-CSF ($100 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、皮下、5 日間)	rhPlGF ($130 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、静脈内、5 日間) + rhG-CSF ($100 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、皮下、5 日間)
1	4 ± 1	3 ± 1
2	6 ± 1	3 ± 1
3	13 ± 4	11 ± 3
4	15 ± 4	27 ± 10
5	20 ± 9	37 ± 8
8	18 ± 6	6 ± 4
10	6 ± 1	5 ± 4

20

* アカゲザル (n=4) に、6 週間の洗い流し期間によって隔てられた 3 回の動員サイクルを施した。サイクル 1 は r h G - C S F 単独 ($100 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、皮下、1~5 日) によって、サイクル 2 は r h P l G F ($130 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、静脈内、1~5 日) + r h G - C S F ($100 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、皮下、1~5 日) の組み合わせによって、及びサイクル 3 は r h P l G F ($260 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、静脈内、1~5 日) + r h G - C S F ($100 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、皮下、1~5 日) の組み合わせによって動員を誘発した。H P P - C F C を、処置中 (1~5 日) 毎日、並びに療法停止後 3 日及び 5 日に解析した。データは平均 $\pm$ SD で表す。H P P - C F C データは、各動物由来のサンプルについての 4 つの培養に由来する。

30

【 0 0 6 4 】

実施例 1 6絶対 H P P - C F C 値

r h G - C S F 療法 5 日目に検出された血液 1 m l あたりの H P P - C F C の絶対数は、前処理値よりも 17 倍高い。r h G - C S F / r h P l G F ($130 \mu\text{g} / \text{kg}$) 組み合わせ処置を受けたサルは、ベースライン値と比較して、H P P - C F C が 158 倍増加した。サイクル 2 では、5 日目の H P P - C F C レベルが、サイクル 1 に対して 5 倍増加した。

40

【 0 0 6 5 】

【表 16】

rhG-CSF単独又はrhPlGF+rhG-CSFで処置したアカゲザルにおける
循環HPP-CFCの絶対数

日	血液1mlあたりのHPP-CFC*	
	サイクル1	サイクル2
	rhG-CSF (100 μ g/kg/日、皮下、5日間)	rhPlGF (130 μ g/kg、静脈内、5日間) +rhG-CSF (100 μ g/kg/日、皮下、5日間)
1	96 $\pm$ 17	54 $\pm$ 49
2	493 $\pm$ 218	258 $\pm$ 34
3	683 $\pm$ 155	1,709 $\pm$ 989
4	1,521 $\pm$ 332	3,883 $\pm$ 1,309
5	1,593 $\pm$ 405	8,557 $\pm$ 1,142
8	998 $\pm$ 541	603 $\pm$ 384
10	121 $\pm$ 52	121 $\pm$ 87

* アカゲザル (n=4) に、6週間の洗い流し期間によって隔てられた3回の動員サイクルを施した。サイクル1はrhG-CSF単独 (100 μ g/kg/日、皮下、1～5日) によって、サイクル2はrhPlGF (130 μ g/kg、静脈内、1～5日) +rhG-CSF (100 μ g/kg/日、皮下、1～5日) の組み合わせによって、及びサイクル3はrhPlGF (260 μ g/kg、静脈内、1～5日) +rhG-CSF (100 μ g/kg/日、皮下、1～5日) の組み合わせによって動員を誘発した。HPP-CFC数を、処置中 (1～5日) 毎日、並びに療法停止後3日及び5日に解析した。データは平均 $\pm$ SDで表す。HPP-CFCデータは、各動物由来のサンプルについての4つの培養に由来する。血中循環HPP-CFCの絶対数は、HPP-CFC頻度に血液1mlあたりの全MNC数を乗じた関数である。

【0066】

実施例 17LTC-IC 頻度

限界希釈アッセイによりLTC-IC頻度を分析したところ、rhPlGF (130 μ g/kg) とrhG-CSFとの組み合わせ投与は、rhG-CSF単独と比較して、LTC-IC頻度が平均して11倍 (5,829細胞中に1細胞対64,064細胞中に1細胞) 増加したことを示した。

【0067】

【表 17】

5日間コースのrhG-CSF単独又はrhPIGF+rhG-CSFを受けたアカゲザルにおける
循環LTC-IC頻度

動物 番号	動員法	LTC-IC 頻度 (平均) *	95% CI		LTC-IC /10 ⁵ MNC
			下限頻度	上限頻度	
1	rhG-CSF	1/84,265	1/69,209	1/102,598	1.2
2	rhG-CSF	1/65,835	1/54,341	1/79,761	1.5
3	rhG-CSF	ne**	ne	ne	ne
4	rhG-CSF	1/42,091	1/34,837	1/50,854	2.4
1	rhPIGF (130 µg/kg) + rhG-CSF	1/4,009	1/5,977	1/2,689	24.9
2	rhPIGF (130 µg/kg) + rhG-CSF	1/7,562	1/11,100	1/5,152	13.2
3	rhPIGF (130 µg/kg) + rhG-CSF	ne	ne	ne	ne
4	rhPIGF (130 µg/kg) + rhG-CSF	1/5,916	1/8,725	1/4,011	16.9

* マウスM2-10B4細胞株を間質細胞として使用し、限界希釈条件下でLTC-IC頻度をアッセイした。
動員療法5日目に血液サンプルを回収した。段階希釈した試験細胞 ($2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^3$) を5週間間培養し、
各試験細胞量について16~22回重複して計した。5週間後、それぞれのウェルの非接着細胞及び接着細胞をコロニー形成性細胞についてアッセイし、ポアソン統計解析及び最大尤度法を用いてLTC-IC頻度を計算した。

【0068】

実施例 18

絶対LTC-IC値

rhG-CSF単独では、循環LTC-ICの絶対数は、ベースライン値と比較して、
処置4日目に53倍に増加した。rhG-CSF/rhPIGF (130 µg/kg) の
組み合わせ処置は、LTC-ICを、前処理値と比較して389倍増加させ、rhG-CSF
単独と比較して15倍増加させた。

【0069】

10

20

30

【表 18】

rhG-CSF単独又はrhPlGF+rhG-CSFで処置したアカゲザルにおける
循環LTC-ICの絶対数

日	血液 1 ml あたりの LTC-IC *	
	サイクル 1	サイクル 2
	rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、5日間)	rhPlGF (130 µg/kg、静脈内、5日間) + rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、5日間)
1	4 ± 7	8 ± 5
2	92 ± 43	56 ± 20
3	111 ± 30	624 ± 340
4	211 ± 41	742 ± 176
5	130 ± 25	3, 115 ± 988
8	63 ± 22	533 ± 270
10	6 ± 2	112 ± 40

* アカゲザル (n=4) に、6週間の洗い流し期間によって隔てられた3回の動員サイクルを施した。サイクル1はrhG-CSF単独 (100 µg/kg/日、皮下、1～5日) によって、サイクル2はrhPlGF (130 µg/kg、静脈内、1～5日) + rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、1～5日) の組み合わせによって、及びサイクル3はrhPlGF (260 µg/kg、静脈内、1～5日) + rhG-CSF (100 µg/kg/日、皮下、1～5日) の組み合わせによって動員を誘発した。LTC-IC数を、処置中 (1～5日) 毎日、並びに療法停止後3日及び5日に解析した。データは、各時点での各動物由来のサンプルについての4つの培養からの平均 ± SDで表す。循環LTC-ICの絶対数はバルク培養においてアッセイした。試験細胞 (5～8 × 10⁶) を、放射線照射マウスM2-10B4細胞による支持細胞層を含有する培地に蒔いた。5週間後、トリプシン処理によって回収した非接着細胞及び接着細胞をプールし、洗浄し、コロニー形成性細胞についてアッセイした。5週齢LTCに存在する全クローン形成性細胞数 (即ち、CFU-Mix + BFU-E + CFU-GM) は、試験懸濁液中にもともと存在したLTC-IC数の相対値を提供する。血中循環LTC-ICの絶対数は、LTC-IC頻度に血液 1 ml あたりの全MNC数を乗じた関数である。

 フロントページの続き

- (72)発明者 ジャンニ, アレッサンドロ・マシーモ
 イタリア国イー - 2 0 1 4 4 ミラノ, ヴィア・ヴェネツィアン, 1
- (72)発明者 カルロ - ステラ, カルメロ
 イタリア国イー - 2 0 1 4 4 ミラノ, ヴィア・ヴェネツィアン, 1
- (72)発明者 コロッタ, フランチェスコ
 イタリア国イー - 6 7 1 0 0 ラクイラ, ヴィア・カムボ・ディ・ピレ

審査官 安藤 公祐

- (56)参考文献 KADAR, J.G. et al, Technical and safety aspects of blood and marrow transplantation using G-CSF mobilized family donors, Transfus Sci, 1996年, Vol.17, No.4, p.611-8
- DE, R.E. et al, Effects of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination, on the mobilization of peripheral blood cells that engraft lethally irradiated dogs, Blood, 1994年, Vol.83, No.12, p.3795-9
- CARLO-STELLA, C. et al, Defibrotide in combination with granulocyte colony-stimulating factor significantly enhances the mobilization of primitive and committed peripheral blood progenitor cells in mice, Cancer Res, 2002年, Vol.62, No.21, p.6152-7
- HATTORI, K. et al, Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment, Nat Med, 2002年, Vol.8, No.8, p.841-9
- CARMELIET, P. et al, Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions, Nat Med, 2001年, Vol.7, No.5, p.575-83

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00
 A61K 38/22
 A61P 7/00
 A61P 35/00
 A61P 35/02
 A61P 37/00
 A61P 41/00
 A61P 43/00
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 PubMed
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)