

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4366527号
(P4366527)

(45) 発行日 平成21年11月18日 (2009.11.18)

(24) 登録日 平成21年9月4日 (2009.9.4)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198
A 6 1 K 31/401 (2006.01)	A 6 1 K 31/401
A 6 1 K 31/405 (2006.01)	A 6 1 K 31/405
A 6 1 K 31/4172 (2006.01)	A 6 1 K 31/4172
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02

請求項の数 17 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2003-518497 (P2003-518497)	(73) 特許権者	508125427
(86) (22) 出願日	平成14年6月10日 (2002.6.10)		ソーラーティウム エンタープライゼス
(65) 公表番号	特表2005-501068 (P2005-501068A)		リミテッド
(43) 公表日	平成17年1月13日 (2005.1.13)		SOLARTIUM ENTERPRISES LIMITED
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/002147		アイルランド国 6 ダブリン リッチモ
(87) 国際公開番号	W02003/013487		ンド ヒル 22
(87) 国際公開日	平成15年2月20日 (2003.2.20)	(74) 代理人	100068526
審査請求日	平成17年6月10日 (2005.6.10)		弁理士 田村 恭生
(31) 優先権主張番号	T02001A000804	(74) 代理人	100100158
(32) 優先日	平成13年8月8日 (2001.8.8)		弁理士 鯨島 睦
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)	(74) 代理人	100138900
			弁理士 新田 昌宏
		(74) 代理人	100076521
			弁理士 坪井 有四郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特に眼科分野における適用のための外傷および損傷の治癒および／または修復のための治療に適したアミノ酸組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

想定される全てのアミノ酸または活性成分の合計に対し、その合計が 80 重量%未満の
プロリン、グリシンおよびリジン；

想定される全てのアミノ酸または活性成分の合計に対し、その合計が 2 ~ 60 重量%の
、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニン；

バリン；

フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファンおよびメチオニンからなる群から選択
される 1 以上の他の必須アミノ酸

を含有する、角膜の外傷および損傷の治癒および／または修復のためのアミノ酸を基礎と
する眼科用組成物であって、

トレオニンとリジンのモル数がそれぞれ、該他の必須アミノ酸の個々のモル数の合計よ
りも大きく、

トレオニンのモル数がグリシン、プロリン、リジン、ロイシン、イソロイシンおよびバ
リンの個々のモル数よりも小さく；

リジンのモル数がグリシン、プロリン、ロイシンの個々のモル数よりも小さいことを特
徴とする眼科用組成物。

【請求項 2】

トレオニンおよびリジンのモル数の合計が、

グリシンおよびプロリンの個々のモル数の合計よりも小さく；および／または

10

20

ロイシン、イソロイシンおよびバリンの個々のモル数の合計よりも小さい、
ことを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

ロイシン、イソロイシン、バリンおよびトレオニンの合計が、想定される全てのアミノ酸または活性成分の合計の 75 重量%未満である、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

更なる活性成分としてメチオニンおよび/またはチロシンを含有することを特徴とする、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

更なる活性成分としてシスチンおよびシステインを、メチオニンに対して等モル～2：1 よりも高い割合で含有することを特徴とする、請求項 1～4 のいずれかに記載の組成物。

10

【請求項 6】

1 以上の更なるアミノ酸を含有し、そのモル数の合計が、他の活性成分の合計に対して 20%未満であり、さらなる個々のアミノ酸のそれぞれに対して 10%未満であることを特徴とする、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 7】

想定されるアミノ酸の合計に対して 8 重量%～40 重量%のグリシン；

想定されるアミノ酸の合計に対して 7 重量%～40 重量%のプロリン；

想定されるアミノ酸の合計に対して 3 重量%～35 重量%のリジン

20

を含有し、グリシン、プロリンおよびリジンの合計が、想定されるアミノ酸の合計に対して 18 重量%以上であることを特徴する、請求項 1～6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

想定されるアミノ酸の合計に対して 4 重量%～35 重量%のロイシン；

想定されるアミノ酸の合計に対して 2 重量%～20 重量%のイソロイシン；

想定されるアミノ酸の合計に対して 2 重量%～20 重量%のバリン；

想定されるアミノ酸の合計に対して 20 重量%未満のトレオニン

を含有することを特徴とする、請求項 1～7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 9】

想定されるアミノ酸の合計に対してロイシン、イソロイシン、バリンおよびトレオニンの合計が 10 重量%～50 重量%であることを特徴とする、請求項 1～8 のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 10】

ロイシン、イソロイシンおよびバリンの化学量論的比率が 2：1：1 であることを特徴とする、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

トレオニンおよびリジンが、ロイシン、イソロイシンおよびバリンに対して互いに 20%～70%のモル比であり、トレオニンとリジンの割合が、リジンがトレオニンよりも多い割合であることを特徴とする、請求項 1～10 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 12】

40

ヒスチジンが、以下のアミノ酸の 50%未満の割合で存在することを特徴とする、請求項 1～11 のいずれかに記載の組成物：

シスチンおよびシステイン並びにメチオニン；

フェニルアラニンおよびチロシン；

他の全てのアミノ酸に対し 5%未満のモル比のトリプトファン。

【請求項 13】

想定される全てのアミノ酸または活性成分の合計に対し、その合計が 80 重量%未満のプロリン、グリシンおよびリジン；

想定される全てのアミノ酸または活性成分の合計に対し、その合計が 2～60 重量%の、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニン；

50

バリン；

フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファンおよびメチオニンからなる群から選択される１以上の他の必須アミノ酸

を使用する、角膜の外傷および損傷の治癒および／または修復のための治療に適したアミノ酸を基礎とする眼科用組成物の製造方法であって、

トレオニンとリジンのモル数がそれぞれ、該他の必須アミノ酸の個々のモル数の合計よりも大きく、

トレオニンのモル数がグリシン、プロリン、リジン、ロイシン、イソロイシンおよびバリンの個々のモル数よりも小さく；

リジンのモル数がグリシン、プロリン、ロイシンの個々のモル数よりも小さいことを特徴とする製造方法。

10

【請求項１４】

トレオニンおよびリジンのモル数の合計が、

グリシンおよびプロリンの個々のモル数の合計よりも小さく；および／または

ロイシン、イソロイシンおよびバリンの個々のモル数の合計よりも小さい

ことを特徴とする、請求項１３記載の製造方法。

【請求項１５】

更なる活性成分としてメチオニンおよび／またはチロシンを使用することを特徴とする、請求項１３記載の製造方法。

【請求項１６】

20

更なる活性成分としてシスチンおよびシステインを、メチオニンに対して等モル～２：１よりも高い割合で使用することを特徴とする、請求項１３～１５のいずれかに記載の製造方法。

【請求項１７】

そのモル数の合計が、他の活性成分の合計に対して２０％未満であり、さらなる個々のアミノ酸のそれぞれに対して１０％未満である１以上の更なるアミノ酸を使用することを特徴とする、請求項１６に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

30

本発明は、特に眼科分野における適用のための、外傷および損傷の治癒および／または修復のための治療に適した、アミノ酸を基礎とする組成物に関する。

【背景技術】

【０００２】

プロリン、グリシンおよびリジンを基礎とし、さらにメチオニン、シスチン、システイン、 α -ケトグルタル酸およびビタミンＣを含有することもある組成物は、米国特許第5,198,465号により公知であり、該組成物は、コラーゲンの生合成を欠いている状況においてこの合成を誘導または促進することが可能である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【０００３】

上記の公知技術から出発して、本発明の目的は、具体的には眼科の分野における適用において、外傷および損傷の治癒および／または修復のための治療に特に有効である、新規のアミノ酸を基礎とする組成物を示すことである。

【０００４】

この観点において、発明者は、本明細書の不可欠な部分を構成するものとして意図し、提案した目的に照らして特に有効であると明らかである、添付の請求の範囲に記載のアミノ酸を基礎とする組成物の製剤を得ることに成功した。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

50

上記組成物は、主な活性成分であるグリシン、プロリンおよびリジンを含むし、その合計は、想定される全てのアミノ酸または活性成分の合計の80重量%未満である。

【0006】

さらに、本発明の組成物は、更なる活性成分として、その全体量が想定される全てのアミノ酸または活性成分の合計の2重量%～60重量%である、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニンからなる群から選択される1以上のアミノ酸を意図することにおいて特徴付けられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

好ましくは、本組成物は、更なる活性成分として、バリンを含むし、この場合、ロイシン、イソロイシン、バリンおよびトレオニンの合計が、好ましくは、想定されるすべてのアミノ酸または活性成分の合計の75重量%未満である。

10

【0008】

本組成物は、更なる活性成分として、その他の必須アミノ酸、具体的にはフェニルアラニンおよび/またはヒスチジンおよび/またはトリプトファンおよび/またはメチオニン、および非必須アミノ酸、具体的にはチロシンおよび/またはシスチン(システイン)(即ち、シスチンおよびシステイン)を想定してもよい。

【0009】

好ましくは、トレオニンおよびリジンの分子量として示される量の合計は、存在している他の必須アミノ酸の個々の量の合計よりも大きい、グリシンおよびプロリンの個々の量の合計またはロイシン、イソロイシンおよびバリンの個々の量の合計よりも小さい。

20

【0010】

さらに、トレオニンおよびリジンの分子量で示される量は、想定される他の必須アミノ酸の個々の量よりもそれぞれ大きくてもよいが、好ましくはトレオニンの量がグリシン、プロリン、ロイシン、イソロイシンおよびバリンの個々の量よりも小さいおよび/またはリジンの量が、グリシン、プロリンおよびロイシンの個々の量よりも小さいおよび/またはトレオニンの量がリジンの量よりも小さい。

【0011】

本発明の組成物は、さらに、記述したアミノ酸に対して、1以上の更なるアミノ酸を含むことができ、分子量として表されるその合計は、好ましくは、その他の活性成分の合計の20%未満であり、個々の更なるアミノ酸各々について10%未満である。

30

【0012】

必須および非必須アミノ酸(グリシン、プロリン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、メチオニン、フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファン、チロシンおよびシスチン(システイン))を含む本発明の組成物の好ましい製剤は、以下の範囲内である(以下において、特記しない限り、種々のアミノ酸のその全体に対する重量%を示す)：

- グリシン(8～40重量%)、プロリン(7～40重量%)、リジン(3～35重量%)でアミノ酸の全組成の18～80重量%を占める

- ロイシン(4～40重量%)、イソロイシン(2～20重量%)、バリン(2～20重量%)、トレオニン(20重量%未満)でアミノ酸の全組成の8～70重量%を占め、ロイシン、イソロイシンおよびバリンは、好ましくは、化学量論比2：1：1であり、トレオニン+リジンは、好ましくは、ロイシン、イソロイシンおよびバリンに対して互いに20～70%のモル比であり、好ましくは、トレオニンとリジンの比はリジンがトレオニンよりも多い比である；および

40

- 以下のアミノ酸の50%未満のモル比で存在するヒスチジン：

- ヒスチジンの50%未満の、シスチン(システイン)(即ち、シスチンおよびシステイン)およびメチオニンであり、シスチン(システイン)とメチオニンの比は好ましくは、モル比でシスチン(システイン)よりも50～200%大きい非である；

- モル比でヒスチジンの60%未満のフェニルアラニンおよびチロシン(チロシンは

50

好ましくはフェニルアラニンの分子量の50%未満として表される)；

- 分子量で全ての他のアミノ酸の重量の5%未満のトリプトファン。

【0013】

上記したように、上記の製剤に、任意の他のアミノ酸をその製剤に期待される効果を変えることなしに添加することができる。但し、そのさらなるアミノ酸の合計は、他の活性成分の合計に対し20重量%未満である(各アミノ酸の10重量%未満)。

【0014】

外傷および損傷の治癒のための治療を目的とした本発明の混合物の効果を実証するために、2種類の細胞ストック(角膜繊維芽細胞および結膜細胞)の細胞増殖活性に対する刺激作用を試験する目的で、2つのアミノ酸混合物によって実験を行なった。

【0015】

第1の混合物は、US-A-5,198,465の教示にしたがって得、グリシン、プロリン、リジンおよびビタミンCのみを含有した。

【0016】

本発明にしたがって得られたもうひとつの混合物は、以下の組成であった：

アミノ酸	量 (mg) (混合物 1 g あたり)	重量パーセント (アミノ酸全体に対して)
グリシン	250,0	25.00%
プロリン	218,8	21.88%
リジン	112,5	11.25%
ロイシン	156,3	15.63%
イソロイシン	78,1	7.81%
バリン	78,1	7.81%
トレオニン	43,8	4.38%
メチオニン	6,3	0.63%
フェニルアラニン	12,5	1.25%
ヒスチジン	18,8	1.88%
トリプトファン	2,5	0.25%
チロシン	3,8	0.38%
シスチン (システイン)	18,8	1.88%

【0017】

この2種類の混合物の活性を *in vitro* および *in vivo* で試験し、比較分析に付した。

【実施例】

【0018】

In vitro 試験

実験モデルの開発のために選択した細胞系は以下のものであった：ウサギ角膜繊維芽細胞(SIRC)およびヒト結膜細胞(1-5C-4)。使用した細胞系を、0.1~1 mg/mLの2種類のアミノ酸混合物、即ち、US-A-5,198,465にしたがって得られた混合物および本発明に従って得られた混合物、の濃度範囲で作成した用量応答曲線に暴露させた。

【0019】

生成品を可溶化した後、血清成分不含培地を用いて実験に用いる濃度に希釈した。暴露に対する細胞の応答を、MTT比色試験法を用いて測定した。この方法は、ミトコンドリアの代謝機能を数値化し、生成品に暴露された細胞の残存活力を明示することが可能である。この試験は3、6および8日目に行なった。

【0020】

10

20

30

40

50

用量応答曲線の実験した各点について、8個のウェルで細胞応答を評価した。吸光度の値を統計解析に付し、平均値、標準誤差および有意性を求めた（スチューデントt）。

【0021】

以下の表に個々の記録から得られたデータをまとめ、数値は、生成品に暴露しなかった対照（細胞活力を100%とした）に対する、細胞活力の百分率で示す。

【0022】

以下の表1および表2において、US-A-5 198 465の教示にしたがって得られた混合物と本発明の混合物それぞれについての、繊維芽細胞のウシ胎児血清の不在下での用量応答曲線を示す。

【0023】

【表1】

表1 (US-A-5,198,465に記載の混合物)

mg/ml	3 rd 日	6 th 日	8 th 日
0	100	100	100
0.1	126.02 *	131.08 #	206.6 #
0.25	129.27 *	148.09 #	219.4 #
0.5	127.78 *	169.65 #	235.41 #
1	125 *	153.75 #	229 #

* = p<0.005 vs. 対照

= p<0.0001 vs. 対照

【表2】

表2 (本発明の混合物)

mg/ml	3 rd 日	6 th 日	8 th 日
0	100	100	100
0.1	140.31 #°	178.70 #°°	220.53 #°
0.25	154.01 #°	180.42 #°°	230.91 #°
0.5	160.22 #°	193.08 #°°	260.07 #°
1	163.04 #°	190.23 #°°	261.18 #°°

= p<0.0001 vs. 対照

° = p<0.005 vs. US-A-5,198,465 混合物

°° = p<0.0001 vs. US-A-5,198,465 混合物

表1からわかるように、周知技術の混合物は、繊維芽細胞の増殖に対して刺激効果を示し、試験した全ての濃度について3日目で既に統計的に有意であり、6日目および8日目には、ほぼ用量依存的な増大がさらに顕著になった。それよりもむしろ、表2からは、本発明の混合物が如何に早い時点で刺激することができるかをみとめることができ、従来技術の混合物と比較して増大しており、3日目には既に有意である。表1と表2の比較により、本発明の混合物が、繊維芽細胞の増殖に対して如何により効果的であり、応答時間の減少およびさらには細胞数の増加につながるかが明確に示されている。

【0024】

以下の表3および4は、それぞれUS-A5,198,465の教示にしたがって得られた混合物および本発明の混合物についての、結膜細胞系のウシ胎児血清の不在下での用量応答曲線を示している。

【0025】

10

20

30

40

【表 3】

表 3 (US-A-5,198,465 に記載の化合物)

mg/ml	3 rd 日	6 th 日	8 th 日
0	100	100	100
0.1	91.14	102.32	109.71
0.25	104.3	107.91	108.08
0.5	111.06	109.84	110.13
1	101.02	113.06 *	118.77 *

* = p<0.005 vs. 対照

10

【表 4】

表 4 (本発明の混合物)

mg/ml	3 rd 日	6 th 日	8 th 日
0	100	100	100
0.1	87.7	108.16 *°	138.97 #°°
0.25	112.83	122.45 *°	178.07 #°°
0.5	100.97	133.13 *°	193.81 #°°
1	113.91	126.26 *°°	201.68 #°°

* = p<0.005 vs. 対照

= p<0.0001 vs. 対照

° = p<0.005 vs. US-A-5,198,465 混合物

°° = p<0.0001 vs. US-A-5,198,465 混合物

20

表 3 から、結膜細胞が、培地における従来技術の混合物の添加に対して如何に弱い応答を示しているか、そして 6 日目および 8 日目で 1 mg / mL の用量でのみ中程度の有意の増大を示していることがみとめられる。

30

【 0 0 2 6 】

それに対し、表 4 から、本発明の混合物は、3 日目では有意の増大を示さなかったが、6 日目および 8 日目には細胞増殖が顕著に増大し、対照および従来技術の混合物の両方に対して有意であることがみとめられる。

【 0 0 2 7 】

上記の結果から、本発明の混合物は、基底膜の角膜実質の迅速な形成およびしたがって粘膜の早い再上皮化を保証する角膜損傷の修復のために、2 つの基本的な細胞ストックを如何に刺激することが可能であるかが明らかである。

【 0 0 2 8 】

In vivo 試験

US-A-5,198,465 の混合物と比較した、本発明のアミノ酸の混合物の有効性を試験するために、通常の治療法が効かない角膜潰瘍を 18 月間患っており、処置開始前の 3 ヶ月間観察してきた 20 人の患者を選抜した。

【 0 0 2 9 】

この群は、男性 12 人、女性 8 人からなり、平均年齢は 58 歳であった。うち 6 人は I I 型糖尿病であり、血糖値を下げる薬物によって治療中であり、良好な代謝補償 (metabolic compensation) 状態であった。

【 0 0 3 0 】

症例を、各群に 3 人の糖尿病患者を含む 10 人ずつの群に無作為に分けた。

50

【 0 0 3 1 】

試験期間中は、局所用薬物も一般的な経路で投与する薬物も、薬物は変更せず、本発明にしたがって２種類の混合物のみを添加した。従来技術の混合物は経口で１２ｇの用量を１日３回に分けて投与した。本発明の混合物も１２ｇの用量で、１日３回に分けて経口投与した。処置は１ヶ月間継続した。

【 0 0 3 2 】

治療活性の評価は、２つの可能性をだけを想定する：損傷の完全な治癒；および１ヶ月の処置では治癒されず。

【 0 0 3 3 】

本発明の混合物で処置された１０人の患者のうち、９人の患者に完全な治癒が認められたのに対し、US-A5,198,465の混合物を用いた場合、治癒が認められたのは１人で、改善（損傷の直径の減少）が認められたのは４人であった。

【 0 0 3 4 】

上記の知見から、本発明の混合物による処置が、如何にその混合物自身がUS-A-5,198,465の混合物による処置よりも明らかに優れているかを、この症例における９０％の治癒（ $p < 0.05$ ）でもって明らかにしていることが、みとめられる。

【 0 0 3 5 】

本発明の組成物は、経口（丸剤、錠剤、粉末剤等）、局所的投与（洗眼液、クリーム、ゲル等）および非経口経路、例えば局所的な注射、での投与に用いることができる。後者の使用の可能性については、予め凍結乾燥された形態に製造された本発明の組成物を生物学的に適する水性液体（蒸留水、生理学的溶液またはその他の水性溶液）中で溶解し、その場で準備する、注射可能な溶液を想定することができる。

【 0 0 3 6 】

必要であれば、混合物の投与は、多くの異なった調製物の形態、例えば、想定されるいくつかのアミノ酸および／またはその画分（例えば、グリシン、プロリン、リジン）を含有する錠剤（またはその他の任意の医薬製剤）およびその他の想定されるアミノ酸および／またはその画分（例えば、ロイシン、イソロイシン、トレオニンおよび場合によりリジンおよび／またはメチオニンおよび／またはフェニルアラニンおよび／またはヒスチジンおよび／またはトリプトファンおよび／またはチロシンおよび／またはシスチン（システイン））を含有する錠剤（またはその他の任意の医薬製剤）であってよい。

【 0 0 3 7 】

勿論、本発明の組成物の製造を目的として、希釈剤や賦形剤を、選択された用途に適した任意の薬学的形態において用いることが可能である。

【 0 0 3 8 】

上記の記載から、本発明の特徴は、主として、特に基質の細胞増殖の増大によって、外傷、損傷および潰瘍の治癒および／または修復の治療における高い有効性によって示される、その特徴によって得られる利点と同様、明らかである。本発明の混合物は、角膜潰瘍の処置および屈折矯正手術の分野において効果が高いことが分かるが、本発明の範囲が眼科の分野に限定されると理解してはならない。このような観点に立てば、本発明は、それゆえに、骨折や内臓への外傷を含む任意の種類の損傷の迅速な治癒または修復が好ましい全ての適用にわたるものと理解されねばならない。

【 0 0 3 9 】

本発明の組成物は、全重量の２０重量％未満の - ケトグルタル酸、および全重量の１０重量％～５０重量％のビタミンＣを想定することができ、後者は、特に、コラーゲンの生合成の触媒において特定の水酸化酵素の補酵素として機能する。

フロントページの続き

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(72)発明者 フランコ・コンティ

イタリア、イ - 2 0 1 2 1 ミラノ、ヴィア・デッラ・スピーガ 3 3 番

(72)発明者 フランチェスコ・サヴェリオ・ディオグアルディ

イタリア、イ - 2 0 1 2 2 ミラノ、ヴィア・マナラ 1 5 番

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 特開昭 5 6 - 1 3 5 4 1 7 (J P , A)

特開昭 5 9 - 1 3 7 4 2 2 (J P , A)

英国特許出願公開第 0 1 0 5 0 7 5 6 (G B , A)

JAIS ABDUL MANAN MAT , GENERAL PHARMACOLOGY , 1 9 9 4 年 , V25 N5 , P947-950

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 31/00

BIOSIS(STN)

CAPLUS(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)

JSTPLUS(JDREAMII)

JMEDPLUS(JDREAMII)

JST7580(JDREAMII)