

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6448366号  
(P6448366)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/352	(2006.01)
A 61 K 9/08	(2006.01)
A 61 K 31/122	(2006.01)
A 61 K 31/4745	(2006.01)
A 61 K 31/66	(2006.01)

請求項の数 13 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-513785 (P2014-513785)
(86) (22) 出願日	平成24年6月4日(2012.6.4)
(65) 公表番号	特表2014-515407 (P2014-515407A)
(43) 公表日	平成26年6月30日(2014.6.30)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/040711
(87) 國際公開番号	W02012/167236
(87) 國際公開日	平成24年12月6日(2012.12.6)
審査請求日	平成27年5月14日(2015.5.14)
審判番号	不服2017-15060 (P2017-15060/J1)
審判請求日	平成29年10月10日(2017.10.10)
(31) 優先権主張番号	61/492,940
(32) 優先日	平成23年6月3日(2011.6.3)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	513303913 ミトック ソシエテ アノニム ルクセンブルク大公国 リュ ド ラ ヴ アレ 42
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤の経口製剤ならびにそれらの調製および使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

プロピレングリコールを10%以上含み残部が水である液体溶媒、およびグリセロールを10%以上含み残部が水である液体溶媒からなる群より選択される液体溶媒中で安定化された、S k Q 1、S k Q 1 H、S k Q R 1、S k Q R 1 H、S k Q 3、S k Q 3 H、S k Q R B、S k Q R B H、S k Q B 1、S k Q B 1 H、S k Q B P 1、およびS k Q B P 1 Hからなる群より選択される化合物を含む、薬学的製剤。

## 【請求項 2】

前記溶媒がプロピレングリコールである、請求項1記載の薬学的製剤。

## 【請求項 3】

前記溶媒がグリセロールである、請求項1記載の薬学的製剤。

## 【請求項 4】

酸化型であるS k Q 1、S k Q R 1、S k Q 3、S k Q R B、S k Q B 1、およびS k Q B P 1からなる群より選択される化合物を還元する1モル当量～200モル当量の抗酸化物質；および薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項1記載の薬学的製剤。

## 【請求項 5】

前記抗酸化物質がアスコルビン酸を含む、請求項4記載の薬学的製剤。

## 【請求項 6】

前記薬学的に許容される担体が、ソルバイト、グルコース、ステアリン酸マグネシウム、またはそれらの混合物を含む、請求項5記載の薬学的製剤。

**【請求項 7】**

前記製剤が、前記化合物の治療的有効量を含む、I型糖尿病またはII型糖尿病を治療するための液状形態の経口投与用製剤である、請求項1記載の薬学的製剤。

**【請求項 8】**

前記II型糖尿病が、SKQ1H<sub>2</sub>アスコルビン酸、およびソルバイトを含む製剤で治療される、請求項7記載の薬学的製剤。

**【請求項 9】**

前記製剤が、前記化合物の治療的有効量を含む、皮膚創傷を治療するための液状形態の経口投与用製剤である、請求項1記載の薬学的製剤。

**【請求項 10】**

20%グリセロール水溶液中のSKQ1を含む、請求項9記載の薬学的製剤。

10

**【請求項 11】**

前記製剤が、前記化合物の治療的有効量を含む、炎症性障害を治療するための液状形態の経口投与用製剤である、請求項1記載の薬学的製剤。

**【請求項 12】**

前記炎症性障害が関節炎である、請求項11記載の薬学的製剤。

**【請求項 13】**

20%グリセロール水溶液中のSKQ1を含む、請求項12記載の薬学的製剤。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

20

**【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、2011年6月3日に出願された「Oral Formulations of Mitochondrially-Targeted Antioxidants and Their Medical Use」という標題の米国特許出願第61/492,940号の恩典を主張する。前述の出願の全体は、参照により本明細書に組み入れられる。

**【0002】****発明の分野**

本開示は、細胞生物学、薬理学、および医学、ならびに特に、炎症、糖尿病、敗血症ショック、創傷治癒、および冠動脈心疾患の分野のものである。

**【背景技術】**

30

**【0003】****背景**

ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤(MTA)の有望な治療的特性が説明されている(例えば、US2008176929(特許文献1); Skulachev et al. (2009), *Biochim. Biophys. Acta*, 1787:437-61(非特許文献1)を参照されたい)。これらの特性を明らかにする実施された実験は、新しく調製したMTA溶液を用いて実施され、動物にこの調製物を投与する少し前に、-80で保存していたエタノールストック溶液を溶解することによって作製した。このような調製および投与の方法は、不可能ではないにしても産業的製造、総合物流、および患者による使用にとって極めて不便であるため、薬剤の調製にとって適切でも現実的でもない。許容される安定性を有する(経口投与用または注射用の)薬学的組成物を開発しようとする試みにより、MTAが大半のタイプの経口組成物でも注射用組成物中でも安定ではないことが明らかになった。許容される安定性を有する安定なMTA含有薬学的組成物は、今までに説明されていない。したがって、安定性を有する改善された液体製剤が引き続き必要とされている。

40

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0004】****【特許文献1】US2008176929****【非特許文献】****【0005】**

50

【非特許文献 1】 Skulachev et al. (2009), Biochim. Biophys. Acta, 1787:437-61

【発明の概要】

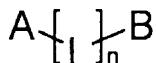
【0006】

概要

本開示は、経口投与、経鼻投与、ならびに静脈内投与および注射用投与に適した、MTAを含む安定化された液体製剤および固形製剤、ならびにそのような製剤を調製する方法を提供する。また、本発明は、そのような製剤を用いて、ミトコンドリアに関連する疾患および病態を治療および予防する方法も提供する。

【0007】

1つの局面において、本開示は、酸化型および/または還元型の式Iの化合物を含む、安定化された薬学的製剤を提供する。式Iの化合物は、

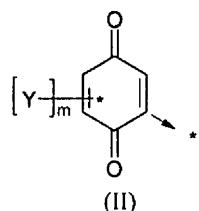


(I)

である：

式中、

Aは、式II



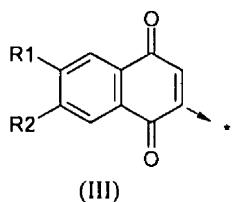
10

20

の抗酸化剤および/またはその還元型であり

(ここで、mは1~3の整数を含み；

Yは、低級アルキル、低級アルコキシからなる群より独立に選択されるか、または2つの隣接したY基は、それらが結合している炭素原子と一緒に、以下の式III



30

の構造体および/もしくはその還元型を形成する(ここで、R1およびR2は、同じもしくは異なり、それぞれ独立に低級アルキルもしくは低級アルコキシである));

Lは、a)1つもしくは複数の二重結合もしくは三重結合、またはエーテル結合、またはエステル結合、またはC-S結合、またはS-S結合、またはペプチド結合によって任意で置換されており、かつアルキル、アルコキシ、ハロゲン、ケト基、アミノ基より好ましくは選択される1つもしくは複数の置換基によって任意で置換されている、直鎖状もしくは分枝状の炭化水素鎖；またはb)天然イソプレン鎖を含む、リンカーベースであり；

nは、1~20の整数であり；かつ

Bは、a)スクラチエフ(Skulachev)イオンSk(Sk<sup>+</sup>Z<sup>-</sup>) (ここで、Skは親油性陽イオンもしくは親油性メタロポルフィリンであり、Zは薬学的に許容される陰イオンである)；またはb)両親媒性双性イオンを含む、ターゲティング基(targeting group)である；

ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のベンチル基、または二価のブロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、ユビキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない。

40

50

## 【0008】

特定の態様において、組成物は、還元されているか、または酸化されている。いくつかの態様において、製剤は液状形態であり、他の態様において、製剤は固形形態である。

## 【0009】

いくつかの態様において、液体製剤は、10%～100%のグリセロール、約10%～約100%のグリコール(例えば1,2-プロピレングリコール)、または約1%～約100%(無水)エタノール中に、式Iの化合物を含む。1つの特定の態様において、式Iの組成物は、約50%の1,2-プロピレングリコール中に存在する。

## 【0010】

また、本開示は、酸化型または還元型の式Iの化合物を含む、安定化された薬学的固形製剤も提供する：ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のペンチル基、または二価のプロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、ユビキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない。

10

## 【0011】

1つの態様において、製剤はまた、酸化型の式Iの化合物を還元する1モル当量～200モル当量の抗酸化物質および薬学的に許容される担体も含む。

## 【0012】

いくつかの態様において、抗酸化物質はアスコルビン酸である。

20

## 【0013】

いくつかの態様において、薬学的に許容される担体は、ソルバイト、グルコース、および/またはステアリン酸マグネシウムを含む。

## 【0014】

一定の態様において、薬学的製剤はSkQ1またはSkQ1H<sub>2</sub>である。他の態様において、化合物はSkQR1またはSkQR1H<sub>2</sub>である。さらに別の態様において、化合物はSkQ3またはSkQ3H<sub>2</sub>である。さらに別の態様において、化合物はSkQRBまたはSkQRBH<sub>2</sub>である。他の態様において、化合物はSkQB1またはSkQB1H<sub>2</sub>である。さらに別の態様において、化合物はSkQBP1またはSkQBP1H<sub>2</sub>である。

30

## 【0015】

他の局面において、本開示は、I型糖尿病およびII型糖尿病、炎症、敗血症ショック、関節炎、および冠動脈心疾患を治療および予防する方法、ならびに創傷治癒を助ける方法を提供する。これらの方法において、安定化された式Iの化合物を含む液状形態または固形形態の製剤の治療的有効量が患者に投与される：ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のペンチル基、または二価のプロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、ユビキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない。

## 【0016】

この方法のいくつかの態様において、製剤は、グリセロール、グリコール、および/またはエタノールを含む。いくつかの態様において、製剤は、SkQ1、SkQ1H<sub>2</sub>、SkQR1、SkQR1H<sub>2</sub>、SkQ3、SkQ3H<sub>2</sub>、SkQBP1、SkQBP1H<sub>2</sub>、SkQRB、またはSkQRBH<sub>2</sub>を含む。

40

## 【0017】

いくつかの態様において、液体製剤は、経口的にまたは注射によって投与される。他の態様において、固体製剤は、経口的に、経肛門的に、または経膣的に投与される。いくつかの態様において、製剤は固体であり、アスコルビン酸を含む。特定の態様において、製剤はまた、薬学的に許容される担体も含む。

## 【0018】

いくつかの態様において、I型糖尿病またはII型糖尿病は、20%グリセロール中のSkQ1またはSkQ1H<sub>2</sub>で治療される。

50

## 【0019】

一定の態様において、関節炎は、20%グリセロール中のSkQ1またはSkQ1H<sub>2</sub>を含む製剤で治療される。さらに別の態様において、関節炎は、SkQ1およびアスコルビン酸を含む製剤で治療される。

## [本発明1001]

グリコール、エタノール、およびグリセロールからなる群より選択される約10%～約100%の液体溶媒中に酸化型および/または還元型の式Iの化合物を含む薬学的製剤：

ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のペンチル基、または二価のプロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、ユピキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない。

10

## [本発明1002]

化合物が還元されている、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1003]

化合物が酸化されている、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1004]

化合物がSkQ1またはSkQ1H<sub>2</sub>である、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1005]

化合物がSkQR1またはSkQR1H<sub>2</sub>である、本発明1001の薬学的製剤。

20

## [本発明1006]

化合物がSkQ3またはSkQ3H<sub>2</sub>である、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1007]

化合物がSkQRBまたはSkQRBH<sub>2</sub>である、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1008]

化合物がSkQB1またはSkQB1H<sub>2</sub>である、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1009]

化合物がSkQBP1またはSkQBP1H<sub>2</sub>である、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1010]

溶媒がグリセロールである、本発明1001の薬学的製剤。

30

## [本発明1011]

溶媒がグリセロールである、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1012]

溶媒がエタノールである、本発明1001の薬学的製剤。

## [本発明1013]

酸化型または還元型の式Iの化合物；

酸化型の式Iの化合物を還元する1モル当量～200モル当量の抗酸化物質；および

薬学的に許容される担体

を含む、薬学的製剤。

## [本発明1014]

抗酸化物質がアスコルビン酸を含む、本発明1013の薬学的製剤。

40

## [本発明1015]

薬学的に許容される担体が、ソルバイト、グルコース、および/またはステアリン酸マグネシウムを含む、本発明1014の薬学的製剤。

## [本発明1016]

I型糖尿病またはII型糖尿病を治療する方法であって、それを必要とする患者に、液状形態または固形形態の安定化された式Iの化合物の治療的有効量を経口投与する段階を含む、方法：

ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のペンチル基、または二価のプロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、

50

ユビキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない。

[本発明1017]

II型糖尿病が、SkQ1H<sub>2</sub>アスコルビン酸、およびソルバイトを含む製剤で治療される、本発明1016の方法。

[本発明1018]

皮膚創傷を治療する方法であって、それを必要とする患者に、式Iの化合物を含む液状形態または固形形態の製剤の治療的有効量を経口投与する段階を含む、方法：

ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のペンチル基、または二価のプロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、ユビキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない。

10

[本発明1019]

製剤が20%グリセロール中のSkQ1を含む、本発明1018の方法。

[本発明1020]

炎症性障害を治療する方法であって、それを必要とする患者に、安定化された式Iの化合物を含む液状形態または固形形態の製剤の治療的有効量を経口投与する段階を含む、方法：

20

ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のペンチル基、または二価のプロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、ユビキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない。

[本発明1021]

炎症性障害が関節炎である、本発明1020の方法。

[本発明1022]

製剤が20%グリセロール中のSkQ1を含む、本発明1021の方法。

【図面の簡単な説明】

30

【0020】

本開示の前述の目的および他の目的、その様々な特徴、ならびに本発明それ自体は、添付図面と共に読んだ場合、以下の説明からさらに十分に理解することができる。

**【図1】**糖尿病動物モデル(アロキサン処理マウス)の血中グルコースレベルに対するSkQ1の効果に関するグラフ図である。

**【図2】**db/db糖尿病マウスの肝損傷に対するSkQ1の効果に関するグラフ図である。

**【図3 a】**糖尿病性創傷の上皮化に対するSkQ1の効果を示すグラフ図である。

**【図3 b】**糖尿病性創傷における好中球の量に対するSkQ1の効果を示すグラフ図である。

**【図3 c】**糖尿病性創傷における血管密度に対するSkQ1の効果を示すグラフ図である。

**【図4】**敗血症ショックにかかったマウスの生存に対するSkQ1の効果に関するグラフ図である。

40

**【図5】**ラットのコラーゲン誘発関節炎におけるSkQ1の抗炎症効果を実証するグラフ図である。

**【図6】**炎症誘発性サイトカインTNF- $\alpha$ によって誘導される死から内皮細胞を救う、SkQ1およびSkQR1の抗炎症性効果を実証するグラフ図である。

**【図7 a】**炎症誘発性サイトカインの発現を低下させることによってSkQ1がインビトロで炎症を阻害する能力を実証するグラフ図である。

**【図7 b】**マウスにおける相対的ICAM-1 mRNA発現に基づいて測定されるように、炎症誘発性サイトカインの発現を低下させることによってSkQ1がインビトロで炎症を阻害する能力を実証するグラフ図である。

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0021】

## 説明

本発明の説明の本文の全体を通して、様々な文献が引用される。上記または下記に本明細書において引用される各文献(特許、特許出願、科学論文、明細書、および製造業者の取扱い説明書などすべてを含む)は、参照によりその全体が本発明に取り入れられる。

## 【0022】

以下の本発明の詳細な説明の前に、本発明は、本明細書において説明する特定の方法論、プロトコール、および試薬に限定されず、それらは変更されることを理解すべきである。さらに、本発明において、専門用語は個々の態様を説明するためにのみ使用され、本発明の範囲を限定せず、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。別段の指定が無い限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、当業者が理解可能である同じ意味を有する。

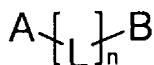
## 【0023】

注射による投与、または経口投与、IV投与、経鼻投与、局所投与、もしくは経腸投与に適している通常の薬学的液体製剤および薬学的固体製剤中で、多くの有効なMTAが十分に安定ではないことが予想外に判明した。この特徴のために、活性化合物としてMTAをベースとする薬剤の臨床応用は限定されている。

## 【0024】

## 1. 安定化された製剤

本開示は、臨床実践に適用可能な、MTAをベースとする安定な薬学的液体組成物を提供する。有用なMTAは、酸化型および/または還元型の式Iの化合物である。式Iの化合物は、

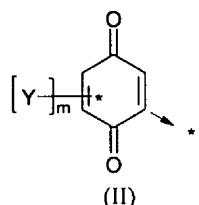


(I)

である：

式中、

Aは、式II

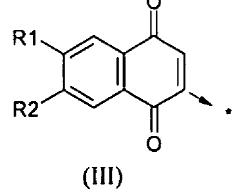


(II)

の抗酸化剤および/またはその還元型であり

(ここで、mは1~3の整数を含み；

Yは、低級アルキル、低級アルコキシからなる群より独立に選択されるか、または2つの隣接したY基は、それらが結合している炭素原子と一緒に、以下の式III



(III)

の構造体および/もしくはその還元型を形成する(ここで、R1およびR2は、同じもしくは異なり、それぞれ独立に低級アルキルもしくは低級アルコキシである))；

Lは、a)1つもしくは複数の二重結合もしくは三重結合、またはエーテル結合、またはエステル結合、またはC-S結合、またはS-S結合、またはペプチド結合によって任意で置換されており、かつアルキル、アルコキシ、ハロゲン、ケト基、アミノ基より好ましくは選択さ

10

20

30

40

50

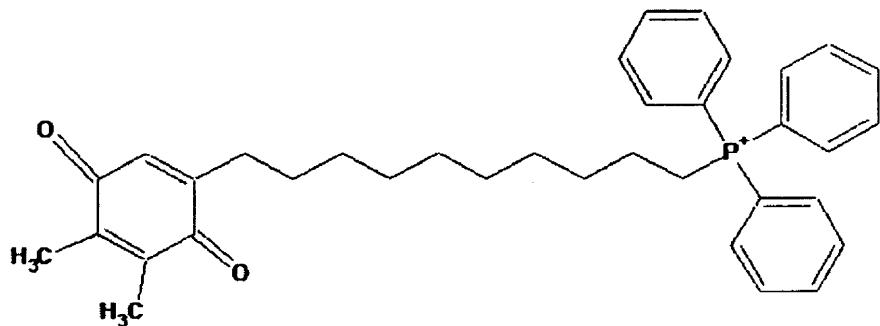
れる1つもしくは複数の置換基によって任意で置換されている、直鎖状もしくは分枝状の炭化水素鎖; またはb)天然イソプレン鎖を含む、リンカーベースであり; nは、1~20の整数であり; かつ

Bは、a)スクラチュエフェイオンSk(Sk<sup>+</sup>Z<sup>-</sup>)(ここで、Skは親油性陽イオンもしくは親油性メタロポルフィリンであり、Zは薬学的に許容される陰イオンである); またはb)両親媒性双性イオンを含む、ターゲティング基である;

ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のペンチル基、または二価のプロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、ユビキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない; ただし、式Iの化合物において、Lが二価のデシル基、二価のペンチル基、または二価のプロピル基である場合、およびBがトリフェニルホスホニウム陽イオンである場合、Aは、ユビキノン(例えば、2-メチル-4,5-ジメトキシ-3,6-ジオキソ-1,4-シクロヘキサジエニル)でも、トコフェロールでも、スーパーオキシドジスムターゼまたはエブセレンの模倣体でもない。

【0025】

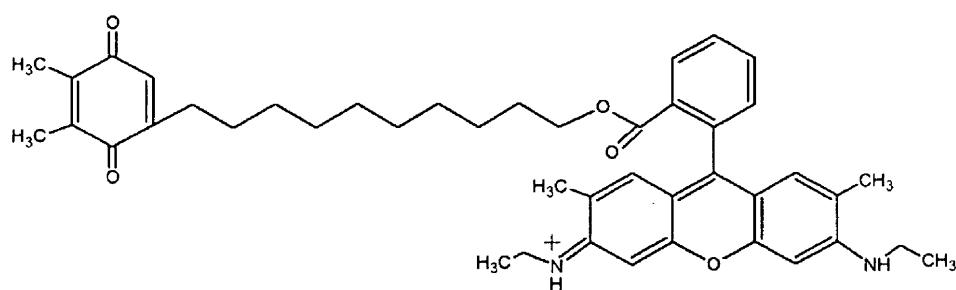
具体的な有用なMTAには、SkQ1およびSkQR1:



10

20

SkQ1



30

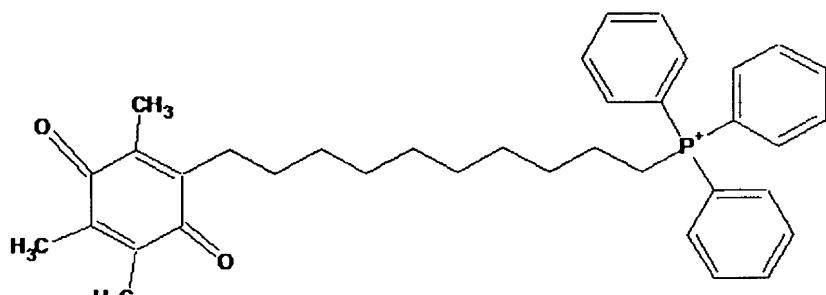
40

SkQR1

ならびにそれらの還元(キノール(quinole))型、それぞれSkQ1H<sub>2</sub>およびSkQR1H<sub>2</sub>が含まれるが、それらに限定されるわけではない。これらのMTAは、PCT/RU2006/000394において説明されている。

【0026】

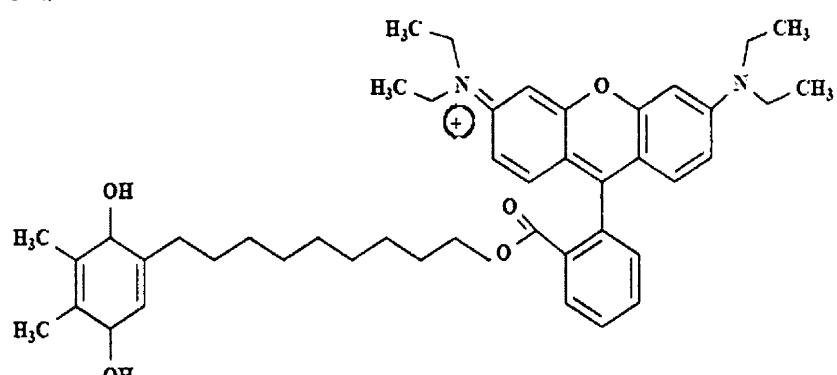
他の有用なMTA変種には、SkQ3:



SkQ3

10

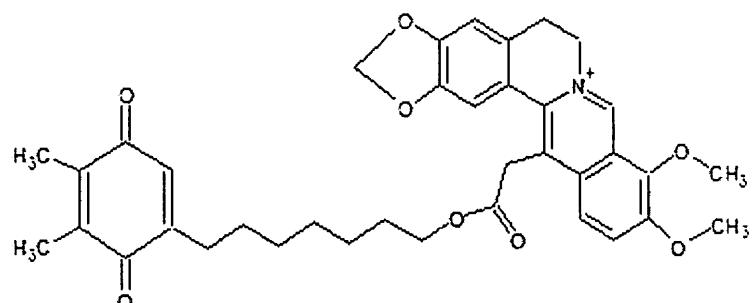
およびその還元(キノール)型SkQ3H<sub>2</sub>;  
SkQRB:



20

SkQRBH<sub>2</sub>

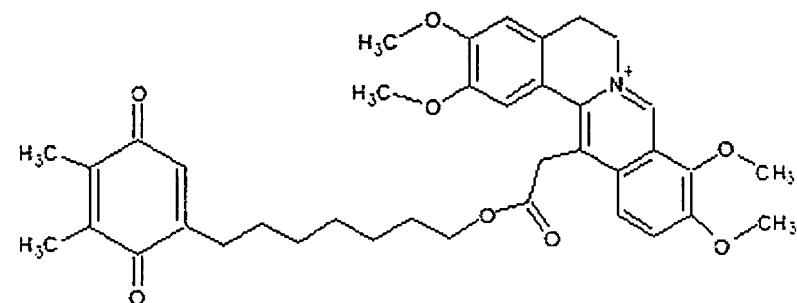
およびその酸化(キノン)型SkQRB;  
SkQB1:



30

SkQB1

およびその還元(キノール)型SkQB1H<sub>2</sub>;ならびに  
SkQBP1:



40

SkQBP1

およびその還元(キノール)型SkQBP1H<sub>2</sub>が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【 0 0 2 7 】

50

これらのMTAは、液体溶液剤および固体製剤として、経口投与用に製剤化される。

【0028】

また、液体溶液剤は、噴射によるエアロゾル送達のために、IV投与、経鼻投与、局所投与、または経腸投与のために有用である。

【0029】

このような安定な液体製剤は、MTAがその中に加えられる(placed)1種または複数種の溶媒または可溶性成分を含む。有用な溶媒には、グリセロール、エタノール、プロピレングリコール、および類似化合物が含まれる。例えば、有用である安定な製剤は、少なくとも10%の1,2-プロピレングリコール、少なくとも1%もしくは少なくとも10%のエタノール、少なくとも10%のグリセロール、またはそれらの混合物を含み、また、差を補うために水、グリセロール、エタノール、および/または1,2-プロピレンも含んでよい。例えば、1nM～1mMのSkQ1、SkQ1H<sub>2</sub>、SkQR1、SkQR1H<sub>2</sub>、SKQ3、SkQ3H<sub>2</sub>、SKQRB、SkQRBH<sub>2</sub>、SKQB1、SkQB1H<sub>2</sub>、SKQBP1、および/またはSkQBP1H<sub>2</sub>の代表的な安定化溶液剤は、10%～50%、50%～100%、10%～20%、20%～30%、30%～40%、40%～50%、50%～60%、60%～70%、70%～80%、80%～90%、10%～100%、20%～80%、および90%～100%の1,2-プロピレングリコール、グリセロール、またはエタノールを含む。このような溶媒の他の有用な比率には、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、および95%が含まれる。他の薬学的に許容される担体もまた、このような製剤の成分であってよい。

【0030】

MTAは、長期間の貯蔵に対する安定性はないため、様々な化合物を試験して、代表的なMTAとしてのSkQ1およびSkQR1を乾燥型で安定化する能力を判定した。

【0031】

-シクロデキストリン、アラビアゴム、果物纖維、および塩化ナトリウムは、適切な安定化レベルを実現しなかった(分解速度(%/日)は0.8～8.1であった)。

【0032】

また、液体溶媒も、代表的なMTAであるSkQ1およびSkQR1を安定化する能力について試験した。試験した溶媒は、グリセロール(10%～100%)、50%ラクトース、および1,2-プロピレングリコール(10%～100%、60%)の水溶液であった。いくつかの代表的な結果を下記に示す(表1)。

【0033】

(表1)

10

20

30

MTA	濃度, mM	安定化溶媒	分解速度, %/日
SkQ1	400	50% ラクツロース	9.01
SkQ1	400	10% 1,2-プロピレングリコール	0.47
SkQ1	400	50% 1,2-プロピレングリコール	0.06
SkQ1	400	100% 1,2-プロピレングリコール	0.18
SkQ1	400	10% グリセロール	0.61
SkQ1	400	20% グリセロール	0.51
SkQ1	400	30% グリセロール	0.53
SkQ1	400	40% グリセロール	0.91
SkQ1	400	50% グリセロール	1.54
SkQ1	400	60% グリセロール	1.92
SkQ1	400	70% グリセロール	2.4
SkQ1	400	80% グリセロール	3.2
SkQ1	400	90% グリセロール	4.18
SkQRB	200	50% グリセロール	0.4
SkQR1	140	50% グリセロール	0.7
SkQBP1	400	50% グリセロール	0.08
SkQR1	100	10% 1,2-プロピレングリコール	6.19
SkQR1	100	20% 1,2-プロピレングリコール	0.34
SkQR1	100	30% 1,2-プロピレングリコール	0.32
SkQR1	100	40% 1,2-プロピレングリコール	0.06
SkQR1	100	50% 1,2-プロピレングリコール	<0.01
SkQR1	100	60% 1,2-プロピレングリコール	<0.01
SkQR1	100	70% 1,2-プロピレングリコール	0.05
SkQR1	100	80% 1,2-プロピレングリコール	0.23
SkQR1	100	90% 1,2-プロピレングリコール	0.30
SkQR1	100	100% 1,2-プロピレングリコール	0.23

10

20

30

## 【0034】

これらの結果から、グリセロール(約10%～約100%のグリセロール)中の溶液、および約50%の1,2-プロピレングリコール溶液の形態で投与した場合に、薬学的組成物中のMTAの安定性が高いことが示されている。

## 【0035】

さらに、SkQ1およびSkQR1の安定性は、プラスチック製またはガラス製の黒っぽいバイアル中で有意に上昇していたことから、これらの化合物が感光性であることが示唆された。したがって、保管中および輸送中にSkQ液体組成物の安定性をさらに改善または上昇させるための方法の1つは、光からそれを保護することである。

## 【0036】

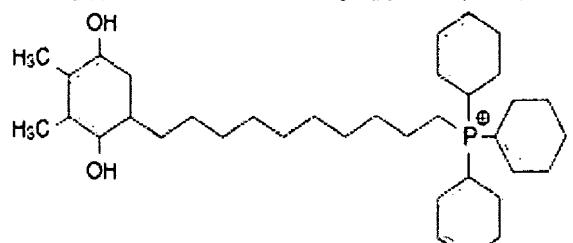
本開示による式1のSkQ化合物が固形形態である場合、例えば抗酸化物質を用いて、それらを安定化することができる。このような物質は、アスコルビン酸であってよい。アスコルビン酸の有用な量は、約1モル当量～約200モル当量の範囲である。本明細書において使用される場合、「モル当量」という用語は、溶解した粒子の数、または酸塩基反応において1モルのH<sup>+</sup>と反応するか、もしくは1モルのH<sup>+</sup>を供給する量、または酸化還元反応において1モルの電子と反応するか、もしくは1モルの電子を供給する量を意味する。代表的な安定化されたMTA製剤の他の有用な成分を表2に示す。このような製剤は、限定されるわけではないが、ソルバイト、グルコース、およびステアリン酸マグネシウムなどの薬学的に許容される担体も含んでよい。

## 【0037】

40

50

薬学的製剤中のSkQ化合物を安定化するための別のアプローチは、その還元(キノール)型を使用することである。例えば、還元型のSkQ1はキノールSkQ1H<sub>2</sub>である:



77

10

### SkO1H<sub>2</sub> (キノール型)

式中、 $Z^-$  は、限定されるわけではないが、プロミド、クロリド、またはアスコルバートなどの薬学的に許容される陰イオンである。乾燥状態の薬学的組成物または可溶性薬学的組成物では、限定されるわけではないがアスコルバートなどの還元剤によって、 $\text{SkQ1H}_2$  を安定化し酸化から保護することができる。

[ 0 0 3 8 ]

安定性を改善するためのさらに別のアプローチは、還元型または酸化型のMTAを、液体充填物を含むゼラチンベースのカプセル剤である「ソフトゲル」製剤に入れることである。MTAのソフトゲル製剤は、カプリリン酸/カプリル酸のモノグリセリドおよびジグリセリド(Capmul MCM)、Miglyol油8122(中鎖トリグリセリド)などの水混和性の油性液体担体中にソフトゲルが溶解するため、良好なバイオアベイラビリティを与える。ソフトゲルは、体内で放出された場合、乳化され、広い表面領域で薬物分散を提供する。

20

[ 0 0 3 9 ]

カプリン酸/カプリル酸のモノグリセリドおよびジグリセリド(Capmul MCM)、Miglyol油8122(中鎖トリグリセリド)が使用され得る。このような油性担体は自己乳化系の一部分となる。他の例示的な安定化成分は、ビタミンE/ポリエチレングリコールスクシナート、ソルビタンモノオレアート、ラブラソール、およびそれらの組合せである。さらに、その潜在的な酸化能力を踏まえて、トコフェロール、ブチル化ヒドロキシトルエン、および/またはブチル化ヒドロキシアニソールを抗酸化剤として組成物中に含めることができる。

30

[ 0 0 4 0 ]

溶液中のMTAの安定化を向上させるための別のアプローチは、例えばビタミンE/ポリエチレングリコールスクシナートで安定化したMTA(<1000nm)のナノ懸濁液を作ることである。Netzsch社製の湿式粉碎機(<http://www.netzsch-grinding.com>)を用いて、このナノ懸濁液を実現することができる。

[ 0 0 4 1 ]

さらに、(SkQ1H<sub>2</sub>のような)還元型MTAのエタノール溶液をアスコルビン酸と混合し、乾燥させて、結果として生じる数ヶ月間安定な固体または粉末を作り出すこともできる。

〔 0 0 4 2 〕

経口錠剤の形態の安定な製剤は、熱溶融押出によって調製することができる。この溶融造粒技術は、薬物の多形性の安定性を維持し、経口バイオアベイラビリティを有意に向上させる。熱溶融押出し機によってMTAをマクロゴール(例えば、ポリエチレングリコール3350、6000、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、およびビタミンE TPSG)と一緒に混合(co-blending)し、得られた顆粒を圧縮して錠剤にするか、または硬ゼラチンカプセル剤中に封入することによって、これを実現することができる。

40

〔 0 0 4 3 〕

安定な液状および固形の経口SkQ1製剤の代表例を以下に示す(表2)。

【 0 0 4 4 】

(表2)

### 酸化型SkQ1

## 溶液：

50

リン酸緩衝液を用いて調製した20% (wt %) グリセロールに溶かしたSkQ1  
ピルビン酸と共に50% (wt %) 1,2-プロピレングリコールに溶かしたSkQ1  
乳酸と共に50% (wt %) 1,2-プロピレングリコールに溶かしたSkQ1

固体組成物：

SkQ1および(with)PEG-4000

SkQ1およびデキストラン

SkQ1およびp-アミノ安息香酸(p-ABA)

SkQ1ならびにデキストランおよびp-ABA

SkQ1およびミオイノシット

SkQ1ならびにピルビン酸およびPearlitol 200

10

SkQ1ならびにピルビン酸および微結晶性セルロース

SkQ1ならびにピルビン酸およびF-Melt C

SkQ1ならびにピルビン酸およびSylloid FP

SkQ1ならびにクエン酸(または酒石酸、または乳酸、またはグリシン)およびPearlitol 20

0

SkQ1ならびにクエン酸(または酒石酸、または乳酸、またはグリシン)および微結晶性セルロース

SkQ1ならびにクエン酸(または酒石酸、または乳酸、またはグリシン)およびF-Melt C

SkQ1ならびにクエン酸(または酒石酸、または乳酸、またはグリシン)およびSylloid FP

SkQ1H<sub>2</sub>(還元型)

20

溶液：

55% EtOHに溶かしたSkQ1H<sub>2</sub>(0.11M)およびアスコルビン酸(10当量)

30% 1,2-プロピレングリコールに溶かしたSkQ1H<sub>2</sub>(7.4mM)ならびにアスコルビン酸(5当量)

およびソルバイト(20重量部)

固体組成物：

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(>2モル当量)およびPEG-4000

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(>2モル当量)およびデキストラン

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(>10モル当量)およびPEG-4000

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(>10モル当量)およびデキストラン

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)およびソルバイト(30重量部)

30

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびソルバイト(30重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびグルコース(10重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびラクトースー水和物(10重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびPearlitol 200(30重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)および微結晶性セルロース(30重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびF-Melt C(30重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびSylloid FP(30重量部)

【0045】

アルコール/水混合物中でSkQ1をアスコルビン酸または他の任意の適切な還元剤で還元し、続いて、クロロホルムもしくは他の任意の適切な溶媒を用いた抽出、または水から沈殿させた後に遠心分離、またはカラム(シリカゲル)クロマトグラフィーもしくはHPLC RP法のいずれかによって単離することによって、軽い粉末の形態のSkQ1H<sub>2</sub>をほぼ100%の収率まで調製した。<sup>1</sup>H NMR、LC/MC、および元素分析データによって、単離された材料を特徴付けた。

【0046】

この試料は、湿気がまったく入らない不活性雰囲気下の暗所で、室温で1ヶ月間または4で数ヶ月間という優れた安定性を有することが判明した(表17)。また、この試料は、任意の脱酸素された無水溶媒および非プロトン性溶媒に溶解することによっても、安定化することができる。還元型SkQ1H<sub>2</sub>は、空気もしくは湿潤雰囲気に曝露されるか、または水もしくは任意のプロトン性溶媒に溶解された場合、急速に酸化して元の形態のSkQ1になる(

40

50

表18)。

【0047】

固体組成物中でのSkQ1H<sub>2</sub>の安定性は、組成物の乾燥度ならびに賦形剤および他の成分の乾燥度に強く依存している。周囲雰囲気の湿気および空気の存在もまた、SkQ1H<sub>2</sub>のSkQ1への酸化とそれに続く後者の分解において非常に重要な役割を果たしている。

【0048】

II. 治療

インビボ実験およびインビトロ実験により、限定されるわけではないがSkQ1およびSkQR1を含むMTAの、糖尿病および糖尿病に関連する障害を予防および治療する能力が実証される(実施例2)。また、このようなインビボ実験およびインビトロ実験により、限定されるわけではないがSkQ1およびSkQR1を含むMTAの液体溶液剤が、炎症性疾患ならびに敗血症ショックおよび/または全身性などの関連した病態の予防および治療に使用され得ることが実証される。例えば、許容される安定性を有するMTAをベースとするこれらの液体製剤は、糖尿病、炎症、敗血症ショック、および関連する障害のモデルにおいて有効性を示す結果を併せ持った(実施例2~7)。

【0049】

また、SkQ1治療は、TNF によって引き起こされる細胞内接触および細胞骨格再構築がばらばらになることを防止した(VE-カドヘリン、-カセニン(cathenin)およびF-アクチン)の顕微鏡による研究によって得られたデータ)。すなわち、SkQ1は、サイトカインによって引き起こされる内皮バリアーの機能障害から内皮細胞を保護する際に有効であることが示された。したがって、SkQ1は、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、老化、および慢性炎症性疾患を含む多くの病理学的状態の予防および治療のために使用され得る。

【0050】

さらに、SkQ1は、TNF によって引き起こされるIkBaのリン酸化および分解を低減させる。NF Bは、炎症性腸疾患、関節炎、敗血症、胃炎、喘息、およびアテローム性動脈硬化症など多くの炎症性疾患において持続的に活性であることが公知である(Monaco et al. (2004) PNAS., 101:5634-9)。SkQ1は、NF Bの活性化を妨げ、特に心血管疾患に起因する死亡率上昇に関連しているNF B活性の重要な阻害物質であることが示された(Venuraju et al. (2010) J. Am. Coll. Cardiol., 55:2049-61)。さらに、SkQ1は、細胞質から核への転写因子p65(ReIA)の移行を妨げ、それによって、病理学的結果を潜在的に減少させることが示された。

【0051】

以下に、本発明を例示する具体的な実施例に言及する。これらの実施例は、特定の態様を例示するために提供されること、および本発明の範囲に対する制限はそれらによって意図されないことを理解すべきである。

【実施例】

【0052】

実施例1

SkQ1の還元型(SkQ1H<sub>2</sub>)の安定な製剤

SkQ1H<sub>2</sub>、すなわちSkQの還元キノール型を次のようにして調製した:エタノールに溶かしたSkQ1H<sub>2</sub>溶液(濃度1mg/ml)10mlを、アスコルビン酸200mgとしっかりと混合し、次いで、減圧乾燥させた。得られた粉末は、95%のアスコルビン酸および5%のSkQ1H<sub>2</sub>を含有し、数種類の保管温度において許容される安定性を示した。例えば、加速度的に分解させる(accelerated decay)実験において、SkQ1純度は、60 °Cで12日間保管した後、最初の98.7%から95.1%に低下した。これらの結果から、4 °Cで1年間保管すると、許容される安定性を有する活性化合物SkQ1の初期濃度から約3.5%低下すると計算することができる。

【0053】

あるいは、アスコルビン酸溶液(20mg/ml)10mlにSkQ1H<sub>2</sub> 10mgを溶解し、減圧下で乾燥させることによって、SkQ1H<sub>2</sub>およびアスコルビン酸の乾燥混合物を調製する。

【0054】

10

20

30

40

50

SkQ1-アスコルビン酸混合物を調製するためのさらに別の方法は、エタノールに溶かしたSkQ1H<sub>2</sub>溶液(2mg/ml)5mlを、アスコルビン酸水溶液(40mg/ml)5mlと混合し、減圧乾燥させるものである。還元型のSkQH<sub>2</sub>をアスコルビン酸溶液中で安定化して、乾燥段階をなくすと、かくして、対応する液体製剤となる。

#### 【0055】

##### 実施例2

###### 糖尿病に対するMTA液体製剤の効果

###### A. アロキサン動物試験

アロキサンは、動物に2型糖尿病を誘発するために広く使用されている周知の糖尿病誘発物質である(Viana et al. (2004) BMC Pharmacol., 8:4-9)。

10

#### 【0056】

アロキサン糖尿病の誘発は、次のようにして実施した: 食物および水を自由に入手できる実験用ラットの群2つ(各群20匹の動物)に、SkQ1の250nM溶液を10日間与えた。ラットの1日の摂取量は、水溶液60ml(15ナノモルのSkQ1を含む)であった。ラットの平均体重は300gであった。したがって、ラットは、1日当たり約50nmol/kg体重を摂取した。他の動物群2つには、SkQ1を与えなかった。10日後、0.9%(w/v)NaClの等張性塩溶液に溶解したアロキサンをラットに(大腿領域に)皮下注射した(100mg/kg体重; 「アロキサン+SkQ1」群および「アロキサン」群)。対照動物には、アロキサンを含まない塩溶液を注射した(「対照+SkQ1」群および「対照」群)。注射後、ラットは、SkQ1(250nM)を含む水を14日間飲み続けるか(「アロキサン+SkQ1」群)、またはSkQ1を与えずに飼育された(「アロキサン」群)。

20

#### 【0057】

アロキサン注射の2週間後に、グルコースオキシダーゼ法(Saifer et al. (1958) J. Lab. Clin. Med., 51:445-460)によって、グルコース血中レベルに関するデータを測定した。これらの結果を図1に提示する。データはすべて、平均値±SEとして提示される。

#### 【0058】

アロキサン注射後にSkQ1を摂取した動物の血中グルコースは、SkQ1治療を行わなかったマウスと比べて約2分の1の少なさであった。

#### 【0059】

これらの結果から、安定化されたMTA、例えばSkQ1が、真性糖尿病およびその合併症の予防および治療に有用であることが実証される。

30

#### 【0060】

別の実験では、200g~250gの雄ウィスターラット(7~8週齢)を各12~15匹の動物からなる3群に分け、一晩絶食させた後、125mg/kgのアロキサンを腹腔内注射(i.p.)した。対照動物には生理食塩水(0.9%NaCl)を注射した。安定化された製剤(1%エタノール、5ml/kg)およびSkQ1H<sub>2</sub>(5当量のアスコルビン酸、30重量部のソルバイト)を、投薬量1250nmol/kgで、アロキサン投与前の2週間および投与後の1週間、毎日1回、胃管栄養法によって胃内に(i.g.)投与した。一晩絶食させた後、尾静脈から血液試料を採取し、アロキサン投与前ならびに1日後、2日後、3日後、および7日後に、従来のグルコース-オキシダーゼ法によってグルコースレベルを測定した。アロキサン投与後7日目に、ラットをグルコース負荷試験に供した。3g/kgのグルコースをラットの胃内に(i.g.)与えた。グルコース注射前ならびに15分後、30分後、60分後、および90分後に、血中グルコースレベルを測定した。

40

#### 【0061】

以下の結果が得られた(表3)。

#### 【0062】

(表3)

	生理食塩水 +ビヒクル	アロキサン +ビヒクル	アロキサン +SkQ1H <sub>2</sub> 製剤
血中グルコース 濃度最大値, mM	6.7	17.6	13.9
血中グルコース 濃度積分値 (曲線下面積, a. u =mM×分)	500	1194	947

## 【0063】

10

## B. 糖尿病マウス試験

レプチン受容体遺伝子に変異を有するマウス(C57BLKS-Leprdb/Jマウスまたはdb/dbマウス)は、グルコース代謝障害の影響を受けることが公知である。これらのマウスは、過食症、高血糖症、インスリン抵抗性、進行性肥満を含むヒト疾患の特徴の多くを備えたII型糖尿病モデルとして使用される(Hummel et al. (1966) *Science*, 153:1127-1128)。

## 【0064】

下記の実施例8で説明するように、20%グリセロール中のSkQ1(250nmol/kg/日)を10~12週齢のホモ接合性db/dbマウス(n=8)に経口投与し、同時に、db/dbマウス(n=8)および対照の糖尿病ではないヘテロ接合性db/++マウス(n=5)に、12週間ビヒクルを投与した。Mihara et al. ((1978) *Anal. Biochem.*, 86:271-278)の方法によるアッセイ法によって、肝臓TBA反応性物質の含有量(MDA)を測定した。

20

## 【0065】

図2に示したように、グルコースレベルの上昇により、酸化ストレスが引き起こされ、db/dbマウスの肝臓中のMDAレベルの上昇に反映されている。MDAレベルの上昇は、糖尿病に関連した病状の主要因子である、内皮細胞、毛細血管の透過性、ならびに線維芽細胞およびコラーゲンの代謝の欠陥に関与しているとひいてはみなされている脂質過酸化の刺激を反映している。安定化されたSkQ1溶液は、糖尿病db/dbマウスの肝臓中のMDAレベルを有意に低下させ、したがって、脂質過酸化の速度の低下および肝臓の損傷の軽減が示唆された。

## 【0066】

30

## 実施例3

創傷治癒に対する安定化MTAの効果

月齢6ヶ月のC57BLKS-Leprdb/Jマウス(db/db)ホモ接合性マウスおよびヘテロ接合性C57BLKS-Leprdb/Jマウス(db/+)マウスを用いた2つの系において、創傷治癒を研究した。これらのマウスは、創傷治癒不良のII型糖尿病モデルとして使用されている(Michaels, et al. (2007) *Wound Repair and Regeneration*, 15:665-670)。

## 【0067】

これらのマウスに、実施例8で説明したような20%グリセロールに溶かした薬学的形態のSkQ1を10週~12週の期間に渡って250nmol/kg体重/日で毎日投与した。db/dbマウスおよびdb/+マウスの対照群はSkQ1で治療しなかった。ケタミン(80mg/kg)による麻酔下で、全層皮膚創傷を作った。標準的な温度、光、および給餌計画のもと、プラスチック製のおりの中で動物を飼育した。創傷後7日目に、断頭によって動物を犠死させた。創傷を摘出し、標準PBS緩衝液に溶かした10%ホルマリン中で固定し、組織学的に加工し、パラフィンに包埋した。創傷の中央部分の組織学的切片を切り出し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。これらの切片を、内皮細胞(CD31)、マクロファージ(f4/80)、および筋線維芽細胞(平滑筋-アクチン)のマーカーに関して免疫組織化学的に染色した。ImageJソフトウェア(国立衛生研究所(National Institutes of Health)(NIH)<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いて、創傷切片のマイクロ写真に基づいて細胞の総量、好中球、マクロファージの数、および血管密度(血管面積/肉芽組織面積\*100)を算出した。各動物について、100mm<sup>2</sup>の切片面積を解析した。創傷の上皮化速度は、組織切片上の創傷総面積に対する上皮

40

50

化した創傷面積の比率<sup>\*</sup>100(単位%)として評価した。統計学的解析のために、ノンパラメトリックなマンホイットニーU検定を使用した。データは、平均値±S.E.Mとして示す。

【0068】

図3a、3b、および3cに示したように、安定化された薬学的形態のSkQ1は、糖尿病マウスにおいて好中球浸潤を減少させ、血管新生を増加させ、かつ上皮化速度を速めることによって、創傷治癒を加速させることができる。

【0069】

実施例4

炎症および敗血症ショックに対する安定化MTAの効果

敗血症ショックは、生物において多数の炎症性経路を活性化させて死をもたらすことが公知である。リポ多糖(LPS)誘発性敗血症ショックマウスは、薬理学的かつ生物学的研究において広く受け入れられているモデルである(Villa et al. (2004) *Meth. Molec. Med.*, 98:199-206)。

【0070】

敗血症ショックの誘発は、次のようにして実施した: 食物および水を自由に入手できる雄BALB/cマウス43匹を4つの実験群に分けた。「K」群には薬物を与えずに水を与えた。「SkQ 50」群、「SkQ 250」群、および「SkQ 1250」群は、それに応じて50nmol/kg、250nmol/kg、および1250nmol/kgを含む、水に溶かした薬学的形態のSkQ1で毎日非経口的に治療した。3週間のSkQ1治療後、250mg/kgのLPSおよび700mg/kgのD-ガラクトサミン(D-GaIN)を動物に腹腔内注射して、敗血症ショックを誘発し、未治療対照動物の50%の死を招いた(LD50用量)。敗血症ショック誘発の4日後に、動物の死亡を記録した。

【0071】

この実験の結果を図4に示す。LPS/D-GaIN処理後のマウスの生存状況は、SkQ1によって有意に改善した。50nmol/kgの用量において、統計学的に有意な効果が示された( $p=0.03$ )。

【0072】

これらの結果から、敗血症ショック治療に治療的に応用される抗炎症物質としてSkQ1が作用することがはっきりと示される。

【0073】

他の研究では、食物および水を自由に入手できるBALB/cマウスを4つの実験群に分ける。「K」群には薬物を与えずに20%グリセロールを与える。「SkQ 50」群、「SkQ 250」群、および「SkQ 1250」群は、それに応じて50nmol/kg、250nmol/kg、および1250nmol/kgを含む、20%グリセロールに溶かした薬学的形態のSkQ1(実施例8)で毎日非経口的に治療する。3週間のSkQ1治療後、250mg/kgのLPSおよび700mg/kgのD-ガラクトサミン(D-GaIN)を動物に腹腔内注射して、敗血症ショックを誘発し、未治療対照動物の50%の死を招く(LD50用量)。敗血症ショック誘発の4日後に、動物の死亡を記録する。

【0074】

実施例5

関節炎に対する安定化MTAの効果

コラーゲン誘発関節炎(CIA)ラットモデルを用いて、潜在的な抗関節炎物質を用いた治療に対する関節リウマチ(RA)の感受性を検査した(Griffiths et al. (2001) *Immunol. Rev.*, 184:172-83)。

【0075】

食物および水を自由に入手できるウィスターラット30匹に完全フロイントアジュバントおよびII型コラーゲン250mgを注射して、CIAを誘発させた。注射後14日目および24日目から、それぞれ動物10匹の群2つに、1日当たり250nmol/kg体重を含む、水に溶かした薬学的形態のSkQ1を毎日与えた(「14日目以降SkQ1」群および「24日目以降SkQ1」群;「対照」群には薬物を与えずに水を与えた)。

【0076】

図5に示すように、SkQ1によって、炎症がはっきりと見える動物、すなわち、水マノメ

10

20

30

40

50

トリーによって測定した場合に対照群よりも足体積が増加している動物の数が減少した。したがって、SkQ1は、抗炎症効果および抗関節炎効果を有している。

【0077】

他の研究では、食物および水を自由に入手できるウィスターラットに完全フロイントアジュバントおよびII型コラーゲン250mgを注射して、CIAを誘発させる。注射後14日目および24日目から、各動物群2つに、1日当たり250nmol/kg体重を含む、20%グリセロールに溶かした薬学的形態のSkQ1(実施例8)を毎日与える(「14日目以降SkQ1」群および「24日目以降SkQ1」群;「対照」群には薬物を与えずに水を与えた)。

【0078】

実施例6

10

冠動脈心疾患に関連する炎症に対する安定化MTAの効果

炎症によって誘発される極度のサイトカイン産生は、内皮細胞の死滅を招く可能性があり、内皮細胞の死滅は、増大した酸化ストレスおよび血管炎症と共に、内皮機能障害を招き、かつ冠動脈疾患のリスクを高める。

【0079】

ヒト内皮細胞株EA.hy926(ATCCコレクション;カタログ番号CRL-2922)を血管内皮のモデルとして使用した。この細胞株は、初代HUVEC細胞株に類似しており(Edgell et al. (1983) PNAS, 80(12):3734-7; Edgell et al. (1990) *In Vitro Cell Dev Biol.*, 26(12):1167-72)、炎症研究のための適切なモデルとして広く使用されている(Riesbeck et al. (1998) *Clin. Vaccine Immunol.*, 5:5675-682)。

20

【0080】

したがって、10%の胎児血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)に溶かした0.2nM SkQR1溶液または2nM SkQ1溶液(実施例1)と共に4日間、ヒト内皮細胞EA.hy926をプレインキュベートした。その後、0.2%の胎児血清を含む新鮮なDMEM培地と共に、これらの細胞を一晩インキュベートした。これらの細胞をTNF- (0.25ng/ml ~ 50ng/ml)と共に2日間インキュベートし、標準的なMTT試験を用いて細胞死をモニターした(Berridge et al. (1996) *Biochemica*, 4:14-9)。このアッセイ法から得られたデータを、少なくとも3つの別々の実験の平均値 ± S.E.として示す。

【0081】

図6に示すように、SkQ1およびSkQR1のどちらも、MTAを与えなかった対照と比べて大幅に細胞死を減少させた。したがって、SkQ1およびSkQR1は、サイトカインの炎症作用から内皮細胞を保護する有効な物質であることが示され、アテローム血栓症を含む冠動脈心疾患の予防および治療のために使用され得る。

30

【0082】

実施例7

血管機能障害に対する安定化MTAの効果

A. インビトロ研究

炎症性サイトカインは、ICAM-1(Inter-Cellular Adhesion Molecule 1)の発現を誘導する。ICAM-1は、細胞間の接着プロセスおよび炎症反応の間の血管内皮を通過する白血球遊出において機能する重要な分子である。ICAM-1、ならびにIL-6およびIL-8を含む炎症性サイトカインの発現は、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、老化、および慢性炎症性疾患を含む多くの病理学的状態のもとで上昇する。

40

【0083】

EAhy926ヒト内皮細胞(ATCCコレクション;カタログ番号CRL-2922)においてTNF- によって誘導されるICAM-1 mRNA発現およびサイトカイン(IL-6, IL-8)タンパク質分泌に対するSkQ1の効果を検査した。TNF- は、細胞接着分子および多くの炎症性サイトカインの発現を刺激する中心的炎症誘発性サイトカインである。多くの薬物の抗炎症特性は、EAhy926内皮細胞を用いてTNF- によって誘導される炎症誘発性サイトカインの発現を阻害する能力に依拠することが多い(Edgell et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:3734-7; Lombardi et al. (2009) *Eur. J. Cell. Biol.*, 88:731-42; Manea et al. (2010) *Ce*

50

II *Tissue Res.*, 340:71-9)。

【0084】

細胞300,000個を60mm<sup>2</sup>培養皿に播種し、付着後、SkQ1溶液(0.2nM、10% 胎児血清を含むDMEM培地に溶解)で4日間処理し、次いで、TNF- (それぞれ、ICAM-1に対して0.05ng/mlを4時間またはサイトカインに対して5ng/mlを15時間)で刺激した。リアルタイムPCRによってICAM-1 mRNA発現を測定した(Okada et al. (2005) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46:4512-8)。IL-6およびIL-8の分泌は、ELISAによって評価した(Toma et al. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390:877-82; Volanti et al. (2002) *Photochem. Photobiol.*, 75:36-45)。データを、少なくとも3つの別々の実験の平均値±S.E.として示す。

【0085】

10

図7aに示す結果から、SkQ1が炎症性サイトカインおよびICAM-1の過剰な発現を防ぐ有効な血管抗炎症性物質であることが裏付けられる。したがって、MTAは、アテローム性動脈硬化症を含む血管病変の予防および治療に有用である。

【0086】

B. インビオ研究

先の実施例7Aにおいて前述したように、ICAM-1の発現は、多くの病理学的血管状態のもので上昇している。インビオでICAM-1発現を低減させるにあたってのSkQ1の有効性をマウスで試験した。実験開始時に、雄のC57Black/CBA交配マウス30匹を3つの実験群(各群に動物10匹)に分けた。「若年マウス」群は、月齢6ヶ月のマウスを含んだ。「老年マウス」および「老年マウス、SkQ1」群は、月齢24ヶ月のマウスを含んだ。「老年マウス、SkQ1」群は、体重1kg当たり100nMの水に溶解したSkQ1を含む飲料水を7ヶ月間自由に入手することができた。この期間の後に、動物を断頭した。大動脈を摘出し、DNeasy Blood and Tissueキット(QIAGEN)を用いて全RNAを単離し、cDNAに逆転写し、ICAM-1 mRNAレベルの定量的リアルタイムPCR解析のために使用した。正規化手順のために、ハウスキーピング遺伝子GAPDHおよびRPL32の発現レベルの幾何平均を使用した。データを平均値±S.E.M.として示す。

20

【0087】

図7bに示すように、SkQ1によって、治療された老年マウスのICAM-1 mRNAレベルは対照群と比べて有意に低下した。このレベルは若年マウスのICAM-1レベルに近づく。

【0088】

30

これらの結果から、SkQ1が、血管内皮での加齢に伴うICAM-1発現増大を防ぐことが実証される。したがって、アテローム性動脈硬化症を含む加齢に伴う血管病変の予防のためにSkQ1を使用することができる。

【0089】

他の研究では、前述したように、雄のC57Black/CBA交配マウスを3つの実験群、すなわち「若年」、「老年」、および「老年マウス、SkQ1」に分ける。3番目の群には、1日量当たり250nmol/kg体重を含む20%グリセロール中SkQ1を最長で7ヶ月間与える。「老年」群は対照であり、薬物を与えずにグリセロールを与える。この期間の後に、動物を断頭する。大動脈を摘出し、DNeasy Blood and Tissueキット(QIAGEN)を用いて全RNAを単離し、cDNAに逆転写し、ICAM-1 mRNAレベルの定量的リアルタイムPCR解析のために使用する。正規化手順のために、ハウスキーピング遺伝子GAPDHおよびRPL32の発現レベルの幾何平均を使用する。データは平均値±S.E.M.として算出する。

40

【0090】

実施例8

酸化型SkQ1製剤の調製および安定性

1. 20% (wt %) グリセロールおよびリン酸緩衝液に溶かしたSkQ1

グリセロール(20g)をリン酸緩衝液(80g、0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH4.77)で希釈した。SkQ1試料(20mg)を黒っぽいガラス製バイアルに入れ、プロピレングリコール(0.2mL)に溶解させ、1アリコート(19.8mL)の上記溶媒で1mMに希釈した。

【0091】

50

室温および60°Cで保管することによって、調製した溶液中のSkQ1の安定性を調査した(表4)。

【0092】

(表4)

時間, 日	SkQ1, % / 分解産物, % (室温で保管)	SkQ1, % / 分解産物, % (60°Cで保管)
0	99.34 / 0	99.34 / 0
11	99.71 / 0	-
13	99.76 / 0	-
14	99.68 / 0	-
17	99.62 / 0	-
19	99.63 / 0.07	95.30 / 4.7
21	99.52 / 0.20	-
24	99.57 / 0.08	-
61	99.49 / 0.51	-

10

【0093】

2. ピルビン酸(SkQ1に対して10当量(eq))と共に50%(wt%)1,2-プロピレングリコールに溶かしたSkQ1

SkQ1(50mg)およびピルビン酸(71mg、10当量)を黒っぽいガラス製バイアルに入れ、50%プロピレングリコール-水混合物(100mL)に溶解させて、0.081mM SkQ1溶液を得た。

20

【0094】

60°Cで保管することによって、調製した溶液中のSkQ1の安定性を調査した(表5)。

【0095】

3. 乳酸(SkQ1に対して10当量)と共に50%(wt%)1,2-プロピレングリコールに溶かしたSkQ1

SkQ1(50mg)およびL(+)-乳酸(73mg、10当量)を黒っぽいガラス製バイアルに入れ、50%プロピレングリコール-水混合物(100mL)に溶解させて、0.081mM SkQ1溶液を得た。

30

【0096】

60°Cで保管することによって、調製した溶液中のSkQ1の安定性を調査した(表5)。

【0097】

(表5)

時間, 日	SkQ1, %	SkQ1, %
0	>99.9	>99.9
72	93.2	96.6

【0098】

4. SkQ1およびPEG-4000

EtOH 0.5mLにSkQ1 8mgを溶かした溶液をPEG-4000 200mgと混合し、溶媒を蒸発乾固させた。

40

【0099】

暗所にて4°Cで保管することによって、調製した組成物中のSkQ1の安定性を調査した(表6)。

【0100】

(表6)

時間, 日	SkQ1, %	分解産物, %
18	>99.9	<0.01
19	99.83	0.17
20	99.80	0.20

50

【0101】

## 5. SkQ1 およびデキストラン

EtOH 0.75ml に溶かした SkQ1 10mg の溶液を、水 1ml にデキストラン 100mg を溶かした溶液に添加した。この混合物を勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

## 【0102】

暗所にて 60° で保管することによって、調製した組成物中の SkQ1 の安定性を調査した(表7)。

## 【0103】

(表7)

時間, 日	SkQ1, %	分解産物, %
0	96.71	3.29
6	20.66	79.34
15	24.14	75.86
25	18.93	81.07

10

## 【0104】

## 6. SkQ1 および p-アミノ安息香酸 (p-ABA)

EtOH 0.5ml に溶かした SkQ1 8mg の溶液を、EtOH 1.5ml に p-アミノ安息香酸 (p-ABA) 200mg を溶かした溶液に添加した。溶媒を蒸発乾固させた。

## 【0105】

20

暗所にて室温で保管することによって、調製した組成物中の SkQ1 の安定性を調査した(表8)。

## 【0106】

(表8)

時間, 日	SkQ1, %	分解産物, %
0	100	0
30	58.42	41.58

## 【0107】

## 7. SkQ1 ならびにデキストラン および p-ABA

30

EtOH 0.75ml に SkQ1 10mg を溶かした溶液を、p-ABA (EtOH 0.5ml 中 2mg) および デキストラン (水 1ml 中 100mg) の溶液に添加した。この混合物を勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

## 【0108】

暗所にて 60° で保管することによって、調製した組成物中の SkQ1 の安定性を調査した(表9)。

## 【0109】

(表9)

時間, 日	SkQ1, %	分解産物, %
0	97.13	2.87
6	39.22	60.78
15	7.07	92.93

40

## 【0110】

## 8. SkQ1(1当量) および ミオイノシット (SkQ1 に対して 30 重量部)

EtOH 5ml に SkQ1 5mg を溶かした溶液にミオイノシット 45mg を添加した。この混合物を勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

## 【0111】

暗所にて室温で保管することによって、調製した組成物中の SkQ1 の安定性を調査した(

50

表10)。

【0112】

(表10)

時間, 日	SkQ1, %	分解産物, %
0	95.88	4.12
5	96.86	3.14
6	95.99	4.01
15	92.26	7.74

【0113】

9. SkQ1(1当量)ならびにピルビン酸(10当量)およびPearlitol 200(SkQ1に対して30重量部)

EtOH 0.75mlにSkQ1 12.5mgおよびピルビン酸17.8mg(10当量)を溶かした溶液に、Pearlitol 200 375mgを添加した。この混合物を勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

【0114】

暗所にて60°で保管することによって、調製した組成物中のSkQ1の安定性を調査した(表11)。

【0115】

10. SkQ1(1当量)ならびにピルビン酸(10当量)および微結晶性セルロース(SkQ1に対して30重量部)

EtOH 0.75mlにSkQ1 12.5mgおよびピルビン酸17.8mg(10当量)を溶かした溶液に、微結晶性セルロース375mgを添加した。この混合物を勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

【0116】

暗所にて60°で保管することによって、調製した組成物中のSkQ1の安定性を調査した(表11)。

【0117】

11. SkQ1(1当量)ならびにピルビン酸(10当量)およびF-Melt C(SkQ1に対して重量部)

EtOH 0.75mlにSkQ1 12.5mgおよびピルビン酸17.8mg(10当量)を溶かした溶液に、F-Melt C 375mgを添加した。この混合物を勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

【0118】

暗所にて60°で保管することによって、調製した組成物中のSkQ1の安定性を調査した(表11)。

【0119】

12. SkQ1(1当量)ならびにピルビン酸(0当量)およびSyloid FP(SkQ1に対して30重量部)

EtOH 0.75mlにSkQ1 12.5mgおよびピルビン酸17.8mg(10当量)を溶かした溶液に、Syloid FP 375mgを添加した。この混合物を勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

【0120】

暗所にて60°で保管することによって、調製した組成物中のSkQ1の安定性を調査した(表11)。

【0121】

(表11)

時間, 日	SkQ1, % / SkQ1H <sub>2</sub> , %, 分解産物, %			
	(試料9)	(試料10)	(試料11)	(試料12)
0	>99.9 / <0.05 / <0.05	>99.9 / <0.05 / <0.05	>99.9 / <0.05 / <0.05	>99.9 / <0.05 / <0.05
14	60.3 / 11.3 / 28.4	50.2 / 25.8 / 24.0	38.2 / 47.7 / 14.1	57.9 / 1.4 / 40.7

【0122】

また、以下のSkQ1調製物も、実施例8において前述したようにして製剤化することがで

10

20

30

40

50

きる：

SkQ1(1当量)ならびにクエン酸(または酒石酸、または乳酸、またはグリシン、10当量)およびPearlitol 200(SkQ1H<sub>2</sub>に対して30重量部)

SkQ1(1当量)ならびにクエン酸(または酒石酸、または乳酸、またはグリシン、10当量)および微結晶性セルロース(SkQ1H<sub>2</sub>に対して30重量部)

SkQ1(1当量)ならびにクエン酸(または酒石酸、または乳酸、またはグリシン、10当量)およびF-Melt C(SkQ1H<sub>2</sub>に対して30重量部)

SkQ1(1当量)ならびにクエン酸(または酒石酸、または乳酸、またはグリシン、10当量)およびSylloid FP(SkQ1H<sub>2</sub>に対して30重量部)

【0123】

10

実施例9

還元型SkQH<sub>2</sub>製剤の調製および安定性

13. SkQ1の還元によってインサイチューで調製したSkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(2モル当量)およびPEG-4000(SkQ1H<sub>2</sub>に対して10重量部)

EtOH 0.6mlにSkQ1 10mgを溶かした溶液を、水0.1mlにアスコルビン酸5.7mg(2当量)を溶かした溶液に添加した。SkQ1H<sub>2</sub>への還元が完了するまで(約1時間)、混合物を攪拌した。次いで、PEG-4000 100mgを添加した。この混合物を30分間勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

【0124】

暗所にて4 で保管することによって、調製した組成物中のSkQ1H<sub>2</sub>の安定性を調査した(表12)。

【0125】

14. SkQ1H<sub>2</sub>(SkQ1の還元によってインサイチューで調製した1当量ならびにアスコルビン酸(2モル当量)およびデキストラン)

EtOH 0.6mlにSkQ1 10mgを溶かした溶液を、水0.1mlにアスコルビン酸5.7mg(2当量)を溶かした溶液に添加した。SkQ1H<sub>2</sub>への還元が完了するまで(約1時間)、混合物を攪拌した。次いで、水1mlにデキストラン100mgを溶かした溶液を添加した。この混合物を30分間勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

【0126】

暗所にて4 で保管することによって、調製した組成物中のSkQ1H<sub>2</sub>の安定性を調査した(表12)。

【0127】

(表12)

時間、日	( 試料13 )			( 試料14 )		
	SkQ1, %	SkQ1H <sub>2</sub> , %	分解産物, %	SkQ1, %	SkQ1H <sub>2</sub> , %	分解産物, %
0	14.65	85.35	<0.05	3.61	96.39	<0.05
1	7.72	92.28		2.80	97.20	
4	59.12	40.88		98.57	1.43	
6	57.53	42.47		99.55	0.45	
7	54.16	45.84		99.26	0.74	
10	54.22	45.78		98.93	1.07	

【0128】

15. SkQ1の還元によってインサイチューで調製したSkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(10モル当量)およびデキストラン(SkQ1H<sub>2</sub>に対して10重量部)

EtOH 0.6mlにSkQ1 10mgを溶かした溶液を、水0.25mlにアスコルビン酸28.5mg(10当量)を溶かした溶液に添加した。SkQ1H<sub>2</sub>への還元が完了するまで(約30分間)、混合物を攪拌した。次いで、水1mlにデキストラン100mgを溶かした溶液を添加した。この混合物を30分間勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

【0129】

40

50

暗所にて60℃で保管することによって、調製した組成物中のSkQ1H<sub>2</sub>の安定性を調査した(表13)。

【0130】

16. SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)(SkQ1の還元によってインサイチューで調製、ならびにアスコルビン酸(>10モル当量)ならびにデキストランおよびp-ABA(SkQ1H<sub>2</sub>に対して10重量部

EtOH 0.6mlにSkQ1 10mgを溶かした溶液を、水0.25mlにアスコルビン酸28.5mg(10当量)を溶かした溶液に添加した。SkQ1H<sub>2</sub>への還元が完了するまで(約30分間)、混合物を攪拌した。次いで、水1mlにデキストラン100mgを溶かした溶液およびEtOH 0.5mlにp-ABA 2mgを溶かした溶液を添加した。この混合物を30分間勢いよく攪拌し、溶媒を蒸発乾固させた。

【0131】

暗所にて60℃で保管することによって、調製した組成物中のSkQ1H<sub>2</sub>の安定性を調査した(表13)。

【0132】

(表13)

時間、日	(試料15)			(試料16)		
	SkQ1, %	SkQ1H <sub>2</sub> , %	分解産物, %	SkQ1, %	SkQ1H <sub>2</sub> , %	分解産物, %
0	2.35	92.59	5.06	0.74	98.65	0.61
6	4.26	91.66	4.08	2.72	97.16	0.12
15	5.11	94.27	0.62	8.49	91.12	0.39
25	5.71	88.69	5.6	11.07	86.62	2.31

【0133】

17. SkQ1H<sub>2</sub>粉末

EtOH 40mlにSkQ1 2gを溶かした溶液を、水60mlにアスコルビン酸5.7gを溶かした溶液に添加した。SkQ1H<sub>2</sub>への還元が完了するまで(約30分間)、混合物を攪拌した。溶液が無色になることにより、還元の完了を検出することができる。次いで、溶媒を蒸発させて除き、残留物を水(50ml)とCHCl<sub>3</sub>(150ml)の間で分配した。有機層を水で洗浄し(2×25ml)、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、ろ過し、蒸発させた。

【0134】

SkQ1H<sub>2</sub>の収量は、軽い粉末形態で2g(収率約100%)であった。安定性に関する結果を下記に示す(表14および表15)。

【0135】

(表14)

時間、日	室温で保管			60℃で保管		
	SkQ1H <sub>2</sub> , %	SkQ1, %	分解産物, %	SkQ1H <sub>2</sub> , %	SkQ1, %	分解産物, %
0	98.99	1.01	<0.1	99.2	0.75	0.05
3	99.34	0.66	<0.1	-	-	-
5	99.37	0.63	<0.1	99.45	0.55	0
7	99.14	0.71	<0.1	100	0	0
11	99.12	0.83	<0.1	99.76	0.19	0.05
17	99.49	0.28	<0.3	98.61	1.24	0.15
28	99.45	0.50	<0.1	88.7	11.04	0.26

【0136】

10

20

30

40

50

(表15)

時間, 時	55%EtOH水溶液			CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		
	SkQ1H <sub>2</sub> , %	SkQ1, %	分解産物, %	SkQ1H <sub>2</sub> , %	SkQ1, %	分解産物, %
0	97.79	2.21	0	97.79	2.21	0
0.5	90.79	9.21	0	95.99	4.01	0
1.48	85.24	14.76	0	94.32	5.68	0
2.8	67.43	32.57	0	93.58	6.42	0
3.44	52.17	47.83	0	94.43	5.57	0
4.37	43.43	56.57	0	92.82	7.18	0
23.23	16.55	82.39	1.06	89.61	9.30	0.97
143.45 (約6日間)	9.63	77.23	13.14	82.11	16.53	1.36

## 【0137】

18. SkQ1H<sub>2</sub> (1当量) およびソルバイト (SkQ1H<sub>2</sub> に対して30重量部)

EtOH 1.3ml に SkQ1H<sub>2</sub> 20mg を溶かした溶液を、水 1.3ml にソルバイト 600mg を溶かした溶液に添加した。溶媒を蒸発乾固させた。減圧下で五酸化二リン (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) を用いて、残留物をさらに乾燥させた。

## 【0138】

暗所にて 60° で保管することによって、調製した組成物中の SkQ1H<sub>2</sub> の安定性を調査した (表16)。

## 【0139】

(表16)

時間, 日 (60°C)	SkQ1H <sub>2</sub> , %	SkQ1, %	分解産物, %
0	99.01	0.61	0.38
4	90.8	8.7	0.5
7	90.2	9.4	0.4
11	88.8	10.7	0.5
15	89.1	10.4	0.5
28	42.9	5.3	51.8

## 【0140】

19. SkQ1H<sub>2</sub> (1当量) ならびにアスコルビン酸 (0~5当量) およびソルバイト (SkQ1H<sub>2</sub> に対して30重量部)

方法1:

EtOH 1.3ml に SkQ1H<sub>2</sub> 20mg を溶かした溶液を、水 1.3ml にアスコルビン酸 28.4mg (5当量) およびソルバイト 600mg を溶かした溶液に添加した。溶媒を蒸発乾固させた。減圧下で P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> を用いて、残留物をさらに乾燥させた。

## 【0141】

方法2:

SkQ1H<sub>2</sub> 20mg およびアスコルビン酸 28.4mg (5当量) をガラス製バイアル (浴温 110°) 中で融解させたソルバイト (600mg) に勢いよく攪拌しながらゆっくりと添加し、攪拌を 1 時間続けた。混合物を室温まで冷まし、力強く粉碎して、微結晶性粉末を得た。

## 【0142】

暗所にて 60° および 4° で保管することによって、両方の方法によって調製した組成物中の SkQ1H<sub>2</sub> の安定性を調査した (表17)。

## 【0143】

10

20

30

40

50

(表17)

SkQH <sub>2</sub> , %	SkQ1, %	分解産物, (総量, % /含有量が0.5%を超える不純物の数)	
		60°Cで20日間	4°Cで1年間
97.753	1.209	1 / 0	0.3 / 0

## 【0144】

以下のアスコルビン酸中SkQ1H<sub>2</sub>調製物もまた、前記実施例19のようにして調製される：  
SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびステアリン酸マグネシウム(Sk 10  
Q1H<sub>2</sub>に対して10wt %)およびグルコース(SkQ1H<sub>2</sub>に対して10重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびステアリン酸マグネシウム(Sk  
Q1H<sub>2</sub>に対して10wt %)およびラクトースー水和物(SkQ1H<sub>2</sub>に対して10重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびPearlitol 200(SkQ1H<sub>2</sub>に対して30重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)および微結晶性セルロース(SkQ1H<sub>2</sub>に対して30重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびF-Melt C(SkQ1H<sub>2</sub>に対して30重量部)

SkQ1H<sub>2</sub>(1当量)ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびSyloid FP(SkQ1H<sub>2</sub>に対して30重量部) 20

## 【0145】

20~22および26~30. SkQ1H<sub>2</sub>ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびグルコース

方法3：

EtOH 1.3mlにSkQ1H<sub>2</sub> 20mgを溶かした溶液を、ステアリン酸マグネシウム2mgならびに水  
1.3ml(1.3mL)にアスコルビン酸(表18に挙げた量)およびグリコース600mgを溶かした溶液  
に添加した。溶媒を蒸発乾固させた。減圧下でP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>を用いて、残留物をさらに乾燥させた。  
。

## 【0146】

方法4：

SkQ1H<sub>2</sub> 20mg、ステアリン酸マグネシウム2mg、アスコルビン酸(表18に挙げた量)、および無水グリコース600mgを混合し、力強く粉碎した。

## 【0147】

暗所にて60°で保管することによって、方法3および方法4によって調製した組成物中の  
SkQ1H<sub>2</sub>の安定性を調査した(表18)。

## 【0148】

23. ~25. SkQ1H<sub>2</sub>ならびにアスコルビン酸(0~5当量)およびラクトースー水和物

グリコースの代わりにラクトースー水和物を用い、方法3または方法4で前述したように  
して、組成物を調製した。

## 【0149】

暗所にて60°で保管することによって、両方の方法によって調製した組成物中のSkQ1H<sub>2</sub>  
の安定性を調査した(表18)。

## 【0150】

(表18)

試料番号	配合 (安定剤および賦形剤、 SkQ1H <sub>2</sub> に対する量を示す)				調製方法	分解産物、 総量、% /含有量が 0.5%を超える不純物の数	
	アスコル ビン酸、 当量	グリコース	L(+)- ラクトース x H <sub>2</sub> O	ステアリン 酸Mg		60°Cで20日間	4°Cで1年間
22	1	約10 重量部	-	10 wt %	4	>30 / 7	~6 / 2
23	3	約10 重量部	-	10 wt %	4	>12 / 9	<3 / 1
24	0.3	約10 重量部	-	10 wt %	4	>9 / 7	<3 / 1
25	1	-	約10 重量部	10 wt %	4	>12 / 7	4.6 / 1
26	3	-	約10 重量部	10 wt %	4	>9 / 6	<3 / 2
27	0.3	-	約10 重量部	10 wt %	4	>10 / 5	3.9 / 2
28	1	約10 重量部	-	10 wt %	3	~6 / 3	2.8 / 0
29	2	約10 重量部	-	10 wt %	3	4.4 / 1	2.6 / 0
30	3	約10 重量部	-	10 wt %	3	4.2 / 0	2 / 0
31	5	約10 重量部	-	10 wt %	3	3.6 / 0	1.6 / 0
32	0.3	約10 重量部	-	10 wt %	3	3.5 / 3 (60°Cで7日間)	-

## 【0151】

31.55% EtOHに溶かしたSkQ1H<sub>2</sub>およびアスコルビン酸純粋なSkQ1H<sub>2</sub>の溶液(EtOH 5ml中1g)をアスコルビン酸溶液(水10ml中2.85g(10当量))に添加した。

## 【0152】

暗所にて室温で保管することによって、調製した溶液中のSkQ1H<sub>2</sub>の安定性を調査した(表19)。

## 【0153】

(表19)

10

20

30

40

時間, 時	SkQ1H <sub>2</sub> , %	SkQ1, %	分解産物, %
0	99.73	0.27	< 0.01
1.5	99.07	0.93	< 0.01
68 (約3日間)	99.05	0.59	< 0.4
118 (約5日間)	99.69	0.31	< 0.01
165 (約7日間)	99.74	0.26	< 0.01

## 【 0 1 5 4 】

10

32. 30% 1,2-プロピレンジコールに溶かしたSkQ1H<sub>2</sub>ならびにアスコルビン酸およびソルバイト

純粋なSkQ1H<sub>2</sub>の溶液(1,2-プロピレンジコール1ml中50mg)を、水10mlにアスコルビン酸(67.4mg(5当量))およびソルバイト(1.5g)を溶かした溶液に添加した。

## 【 0 1 5 5 】

暗所にて60°で保管することによって、調製した溶液中のSkQ1H<sub>2</sub>の安定性を調査した(表20)。

## 【 0 1 5 6 】

(表20)

時間, 日	SkQ1, %	SkQH <sub>2</sub> , %	分解産物, %
0	0.18	99.82	0.00
3	1.03	98.67	0.30
14	28.34	69.51	2.15
27	51.9	3.2	44.9

20

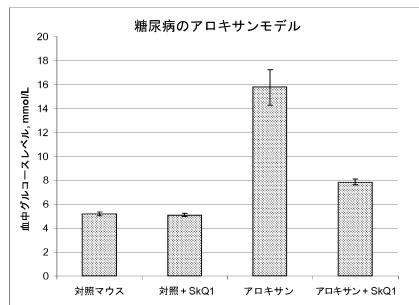
## 【 0 1 5 7 】

## 等価物

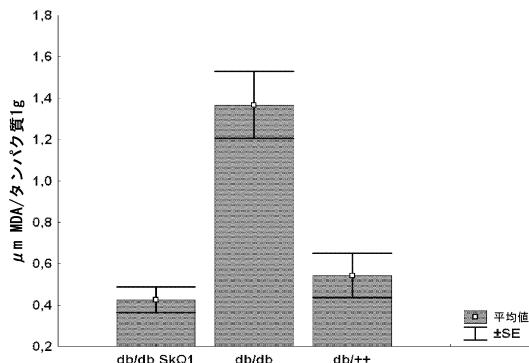
当業者なら、慣用の域を出ない実験法を用いて、本明細書において具体的に説明した特定の態様の多数の等価物を認識するか、または確認することができるであろう。このような等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されると意図される。

30

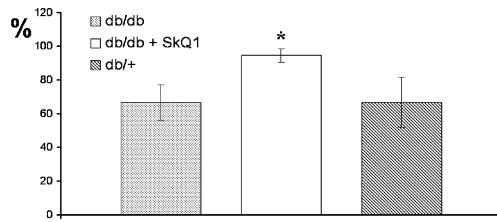
【図1】



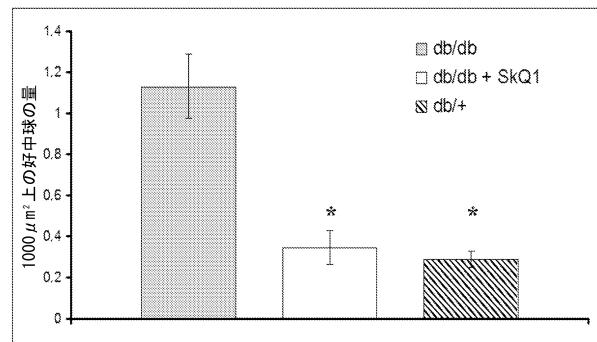
【図2】



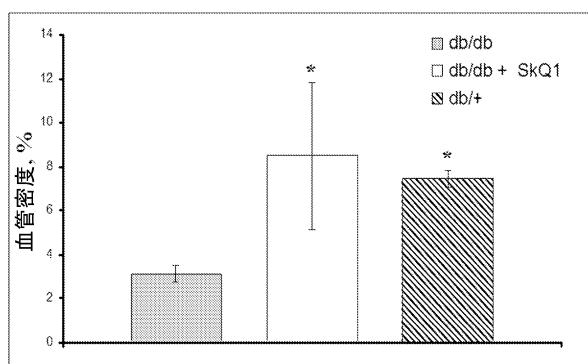
【図3 a】



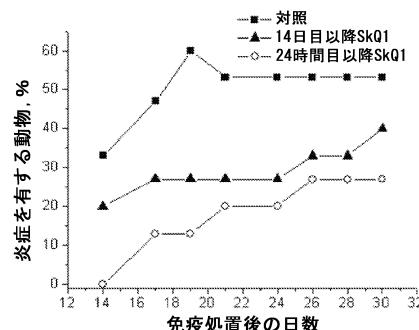
【図3 b】



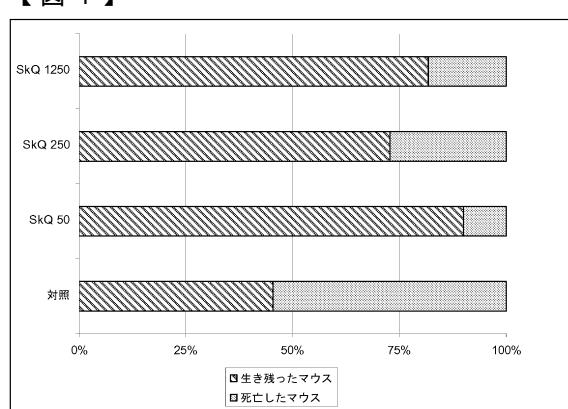
【図3 c】



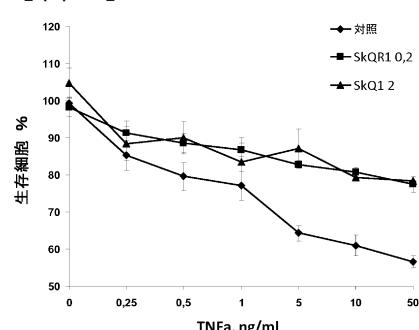
【図5】



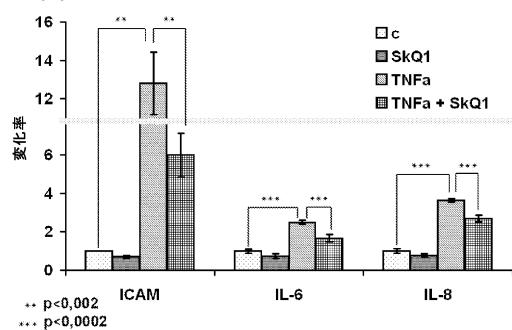
【図4】



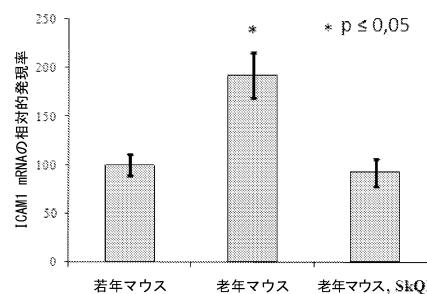
【図6】



【図 7 a】



【図 7 b】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 61 K 47/10 (2006.01)	A 61 K 47/10
A 61 K 47/12 (2006.01)	A 61 K 47/12
A 61 K 47/22 (2006.01)	A 61 K 47/22
A 61 K 47/26 (2006.01)	A 61 K 47/26
A 61 P 3/10 (2006.01)	A 61 P 3/10
A 61 P 19/02 (2006.01)	A 61 P 19/02
A 61 P 29/00 (2006.01)	A 61 P 29/00

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 スクラシェフ マキシム ブイ .  
ロシア連邦 モスクワ レニンスキー ゴリ 1 エム・ゲー・ウー エム - 180

(72)発明者 スクラシェフ ウラジミール ピー .  
ロシア連邦 モスクワ レニンスキー ゴリ 1 エム・ゲー・ウー エム - 176

(72)発明者 ザミヤートニン アンドレイ エー .  
ロシア連邦 モスクワ レニンスキー プロスペクト 44 アパートメント 107

(72)発明者 エフレーモフ エウゲニー エス .  
ロシア連邦 モスクワ ズジンスカヤ ストリート 4 カー 1 アパートメント 13

(72)発明者 タシュリテスキ ヴァディム エヌ .  
ロシア連邦 モスクワ チュソフスカヤ ストリート 11 カー 8 アパートメント 85

(72)発明者 ジノフキン ローマン エイ .  
ロシア連邦 モスクワ ベルナツキー プロスペクト 97 アパートメント 267

(72)発明者 エゴロフ マキシム ブイ .  
ロシア連邦 モスクワ州 トロイツク ソルネチナヤ ストリート 14 アパートメント 12  
7

(72)発明者 フリードホフ ローレンス ティー .  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 リバー ベール リバー ベール ロード 525

(72)発明者 プレツシュキナ オルガ ワイ .  
ロシア連邦 モスクワ プロフソユズナヤ ストリート 16/10 アパートメント 143

(72)発明者 アンドレエフ アンドレエフスキイ アレクサンドル エイ .  
ロシア連邦 モスクワ メリニコワ ストリート 18ア- アパートメント 47

(72)発明者 ジネビッチ タチアナ ブイ .  
ロシア連邦 モスクワ ノヴァトロフ ストリート 34 アパートメント 242

## 合議体

審判長 村上 騎見高  
審判官 前田 佳与子

審判官 光本 美奈子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0053895(US, A1)  
米国特許出願公開第2010/0234326(US, A1)  
米国特許出願公開第2010/0292625(US, A1)  
Biochemistry (Moscow), 2008, vol. 73, No. 12, p. 13  
29-1342  
Mechanisms of Ageing and Development, 2010, v  
ol. 131, p. 415-421

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K31

Caplus, REGISTRY, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE(STN)  
JSTPlus, JMEDPlus, JST7580(JDream3)