

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-523402

(P2020-523402A)

(43) 公表日 令和2年8月6日 (2020. 8. 6)

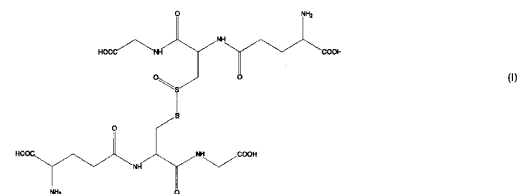
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/06 (2006. 01)	A 6 1 K 38/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/00 (2006. 01)	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 7/02 (2006. 01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 31/12 (2006. 01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 33/243 (2019. 01)	A 6 1 K 33/243	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-570489 (P2019-570489)	(71) 出願人	519448496
(86) (22) 出願日	平成30年7月17日 (2018. 7. 17)		オブシエストバ ス オグラニーチェンノ
(85) 翻訳文提出日	令和1年12月16日 (2019. 12. 16)		イ アトヴェストヴェンノスチュー “イ
(86) 国際出願番号	PCT/RU2018/000471		ヴァ ファーム”
(87) 国際公開番号	W02019/098877		ロシア連邦 1 9 0 1 2 1 サンクトペテ
(87) 国際公開日	令和1年5月23日 (2019. 5. 23)		ルブルク ウーリッツァ プスコフスカヤ
(31) 優先権主張番号	2017140106		1 7
(32) 優先日	平成29年11月17日 (2017. 11. 17)	(74) 代理人	110002860
(33) 優先権主張国・地域又は機関	ロシア (RU)		特許業務法人秀和特許事務所
		(72) 発明者	バラゾフスキー, マーク ポリゾヴィッチ
			ロシア連邦 1 9 9 1 0 6 サンクトペテ
			ルブルク ウーリッツァ ナリチナヤ 3
			/ 2 1 クバルチーラ 9 0
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 グルタチオンジスルフィド及びグルタチオンジスルフィド S-オキシドを含む医薬組成物

(57) 【要約】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において用量関連毒性を排除するための、並びに薬理活性化合物の治療活性を向上させるための、グルタチオンジスルフィド又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩、及び以下の構造：(I) のグルタチオンジスルフィド S-オキシド又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩を含む医薬組成物が提供される。典型的には、組成物は、全組成物の 0. 0 1 ~ 1 0 重量%の量でグルタチオンジスルフィド S-オキシドを、加えて、金属 (Me) を、Me-S-グルタチオン結合を含有する配位化合物の形態で含み、前記金属は、白金族から選択され、典型的には、白金である。患者に投与される d-金属配位化合物の量は、 $10^{-3} \sim 10^{-15}$ モル/kg 体重であってよい。組成物は、抗凝固剤の第 Xa 因子阻害剤、抗微生物剤又は抗ウイルス剤である薬理活性化合物と組み合わせて用いられて、それらの治療活性を増加させ、用量関連毒性を排除することができる。

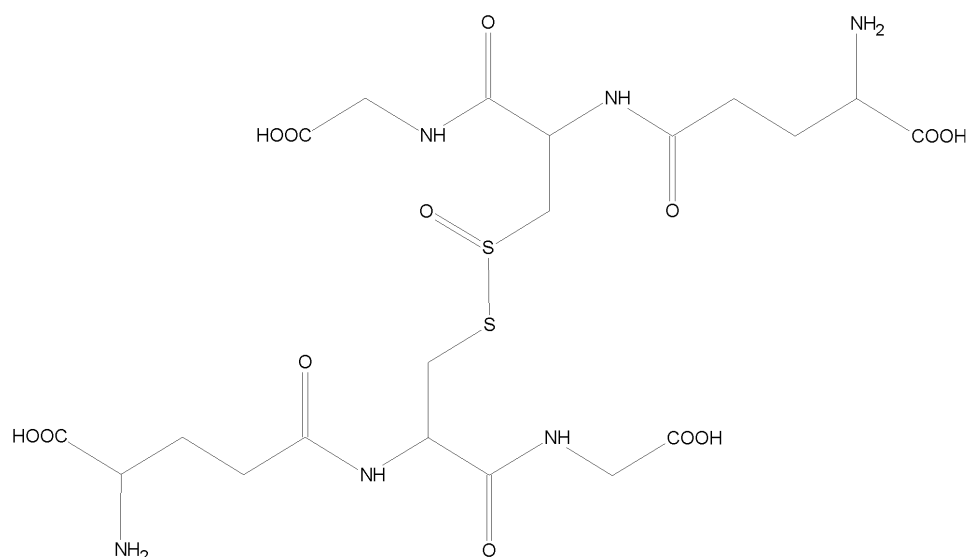


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬組成物であって、該医薬組成物が、グルタチオンジスルフィド又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩、及び以下の構造のグルタチオンジスルフィド S-オキシド：

【化 1】



10

20

又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩を含む、医薬組成物。

【請求項 2】

グルタチオンジスルフィド S-オキシドの量が、前記全組成物に対して 0.01～10 重量%である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記組成物が、金属 (Me) をさらに含み、該金属 (Me) が、Me-S-グルタチオン結合を含有する配位化合物として示される、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 4】

前記金属が、白金族から選択される、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記金属が、白金である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記組成物中の d-金属の量が、前記組成物の 1 kg あたり 1×10^{-10} モル～ 1×10^{-3} モルの範囲内である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記組成物中の d-金属の量が、前記組成物の 1 kg あたり 1×10^{-5} モルである、請求項 3 に記載の組成物。

40

【請求項 8】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量依存性の毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための薬理学的組み合わせであって、該薬理学的組み合わせが、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物、及び抗凝固剤、第 Xa 因子阻害剤、抗微生物剤又は抗ウィルス剤、カルシウムチャネル阻害剤の群から選択される薬理活性化合物を含む、薬理学的組み合わせ。

【請求項 9】

前記組み合わせを、血栓症の治療法に用いることができ、前記薬理活性化合物が、抗凝固剤、第 Xa 因子阻害剤のアミジン塩酸塩である、請求項 8 に記載の組み合わせ。

【請求項 10】

50

前記組み合わせを、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス・エルジノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、及びリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) EGD、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、MRSA—メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスを含むグラム陰性細菌並びにグラム陽性細菌によって引き起こされる感染性疾患の治療に用いることができ、前記薬理活性化合物が、抗微生物剤のモキシフロキサシンである、請求項 8 に記載の組み合わせ。

【請求項 11】

前記薬理活性化合物が、広範囲の抗ウイルス作用を有する抗ウイルス剤—インターフェロナルファである、ウイルス性疾患の治療法のための、請求項 8 に記載の組み合わせ。

10

【請求項 12】

前記薬理活性化合物が、抗狂犬病ワクチンの抗原性物質である、狂犬病を予防するための、請求項 8 に記載の組み合わせ。

【請求項 13】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬であって、該医薬が、治療有効量の請求項 1～7 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの組成物を、医薬的に許容される賦形剤と共に含む、医薬。

【請求項 14】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬であり、該医薬が、治療有効量の請求項 8～12 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの組み合わせを、医薬的に許容される賦形剤と共に含む、医薬。

20

【請求項 15】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、外用、吸入、経腸、又は非経口投与用に製造することができる、請求項 13 又は 14 に記載の医薬。

【請求項 16】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用。

30

【請求項 17】

前記組成物が、さらに、好ましくは白金族からの、さらにより好ましくは白金である d—金属 (Me) を含み、該 d—金属が、Me—S—グルタチオン結合を含有する配位化合物の形態で示され、患者に投与される前記 d—金属配位化合物の量が、 $10^{-3} \sim 10^{-15} \text{ mol/kg}$ 体重である、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、請求項 8～12 のいずれか一項に記載の薬理学的組み合わせの使用。

40

【請求項 19】

前記薬理活性化合物が、血栓症の治療法のための、抗凝固剤、第 Xa 因子阻害剤のアミジン塩酸塩である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 20】

前記薬理活性化合物が、大腸菌、シュードモナス・エルジノーサ、アシネトバクター・バウマンニ、及びリステリア・モノサイトゲネス EGD、スタフィロコッカス・アウレウス、MRSA—メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスを含むグラム陰性細菌並びにグラム陽性細菌によって引き起こされる感染性疾患の治療のための、抗微生物剤のモキシフロキサシンである、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 21】

50

前記薬理活性化合物が、ウィルス性疾患の治療のための、抗ウィルス剤のインターフェロナルファである、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 22】

前記薬理活性化合物が、狂犬病を予防するための抗狂犬病ワクチンの抗原性物質である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 23】

前記薬理学的組み合わせの投与が、吸入、経腸、又は非経口投与によって行われる、請求項 18 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、医薬産業及び医学に関し、すなわち、医薬作製の分野に関し、薬理学、医学、及び獣医学に用いることができる。

【背景技術】

【0002】

薬物動態及び／若しくは薬物動力学を最適化することによって、並びに／又は薬物分子の化学的修飾を通して及び／若しくは別の化学化合物と合わせてのその使用を通して毒性を低下させることによって、薬理学的分子の治療有効性を増加させることは、生理学的により最適である用量でその活性を呈する新世代薬物の開発のための方向の 1 つである。

【0003】

20

現時点では、酸化グルタチオン（酸化型グルタチオン、グルタチオンジスルフィド、GSSG）という物質が知られており、これは、グルタチオントリペプチド、γ-グルタミルシステイニルグリシンの二量体であり、前記トリペプチドの二分子が、システイン残基間のジスルフィド共有結合を介して互いに連結されている。トリペプチドグルタチオン（還元型グルタチオン、GSH）及びその二量体GSSGは、いずれも天然の代謝物であり、ヒト及び動物の組織並びに生物体液中に存在する [Isabella Dalle-Donne et al. S-glutathionylation in protein redox regulation/Free Radical Biology & Medicine, 2007, V. 43, pp. 883-898; Калинина Е.В. и др. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Успехи биологической химии, 2014, Т. 54, с. 299-348]。

30

【0004】

本技術分野において、酸化グルタチオン（GSSG）自体が、様々な薬理活性を有することが知られている。特に、抗ウィルス、抗細菌、抗腫瘍、抗線維化の作用を含む身体の複合的な保護反応を制御する広範なサイトカインの産生を向上させる酸化グルタチオンの能力が示されている。

【0005】

したがって、ロシア特許第 2089179（C1）号、1997 年 9 月 10 日公開]、及び国際公開第 9721444（A1）号、1997 年 6 月 19 日公開] には、サイトカイン及び造血因子の内因性産生の刺激が適切である腫瘍学的疾患、感染性疾患、免疫性疾患、新生物性疾患、及び血液学的疾患の治療のための、酸化グルタチオン及びその医薬組成物の使用が開示されている。

40

【0006】

ロシア特許第 2206334（C1）号、2003 年 6 月 20 日公開]、ロシア特許第 2208452（C1）号、2003 年 7 月 20 日公開]、及びロシア特許第 2208453（C1）号、2003 年 7 月 20 日公開] には、それぞれ、環境の熱効果に対する、呼吸ガス媒体の圧力上昇に対する、及び動揺病に対する耐性（許容度）を高めるための、酸化グルタチオンを含む医薬組成物の使用が開示されている。

【0007】

酸化グルタチオンの剤形は、使用が認可されており、免疫調節性の肝保護的造血性効果

50

を、さらには体内での酸化還元プロセスを制御する薬理学的効果を呈す [http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_10764.htm] 。

【0008】

本技術分野では、サイトカイン及び／又は造血因子の内因性産生の制御、さらには正常細胞及びトランスフォーム細胞における代謝、増殖、分化、及びアポトーシスのプロセスの制御を提供し、癌疾患、感染性疾患、免疫性疾患、血液学的疾患、虚血性疾患、神経異栄養性 (neurodystrophic) 疾患、代謝性疾患の治療に用いられる、酸化グルタチオン又はその医薬的に許容される塩と白金又はパラジウム化合物との複合体 (特に、酸化グルタチオンの二ナトリウム塩とシスージアミノジクロロ白金から成る複合体) の開発も知られている [ロシア特許第 2 1 4 4 3 7 4 (C 1) 号、2 0 0 0 年 1 月 2 0 日公開；ロシア特許第 2 1 5 3 3 5 0 (C 1) 号、2 0 0 0 年 7 月 2 7 日公開；米国特許第 6, 3 1 2, 7 3 4 (B 1) 号、2 0 0 1 年 1 1 月 6 日公開] 。

10

【0009】

加えて、グルタチオンジスルフィドを含む混合剤も知られている。

【0010】

したがって、文書 [特許出願国際公開第 1 9 9 8 0 3 0 2 2 8 (A 1) 号、1 9 9 8 年 7 月 1 6 日公開] には、インフルエンザウィルス感染症の治療のための、酸化グルタチオン (G S S G) の単独での、又はグルタチオンの還元型 (G S H) と組み合わせての、又はアスコルベート-2-ホスフェートと組み合わせての、又はN-アセチル-L-システインと組み合わせての使用が開示されている。

20

【0011】

ロシア特許第 2 4 8 2 8 6 8 (C 1) 号、2 0 1 3 年 5 月 2 7 日公開] には、二ナトリウム塩の形態のグルタチオンジスルフィド (G S S G) と、ナトリウム塩の形態のリポ酸、並びにパラジウム、銅、及び還元グルタチオン (G S H) によって形成された配位化合物との組み合わせが記載されており、これは、血糖降下作用、コレステロール低下作用、脂質低下作用、及び／又は抗酸化作用を有する。

【0012】

最も近い類似体は、ロシア特許第 2 1 5 3 3 5 1 (C 2) 号、2 0 0 0 年 7 月 2 7 日公開、に開示されている薬物である、酸化グルタチオン (G S S G) 及びその医薬的に許容される塩を延長剤 (prolongator) と組み合わせて含む医薬組成物であり、この組成物は、サイトカイン及び造血因子の内因性産生を制御する。アスコルビン酸、ジメチルスルホキシド、イノシン (ヒポキサンチン-9-D-リボフラノシド)、シスタミン (2, 2'-ジチオビス [エチルアミン])、白金化合物 (例えば、塩化白金) が、酸化グルタチオンの作用の延長剤として用いられる。

30

【0013】

前記既知薬物、さらには上述したすべての剤の欠点は、いくつかの因子に起因する医学における使用の制限である。特に、G S S G は、投与後 5 ~ 1 0 秒の範囲内という非常に短い半減期を有しており、このことによって、薬物の所望される治療効果を得るための投与の正確な場所を特定するために、医療関係者にある程度のトレーニング及び適切な資格が必要となる、又は用量及び投与回数を増やすことが必要となる。前記問題は、ロシア特許第 2 1 5 3 3 5 1 号に記載の数多くの延長化合物を用いることによって部分的に解決されるが、この場合、患者にとってのその剤の潜在的な危険性が増加し、G S S G と延長剤との組み合わせを注意深く選択することが必要となる。複合的な治療法における G S S G 及び延長剤の組み合わせと他の薬物との混合による、又は逐次による使用では、さらに、実施される治療法の毒性プロファイルに負の変化を起こすことなく期待される治療効果を得るために、薬物動態の類似性を考慮することが必要となる。G S S G といずれかの延長剤との組み合わせの開発では、追加の処理装置の使用、原薬及び対応する剤形の製造プロセスにおいて追加の工程を含めること、並びに賦形剤のリストの拡張が必要となる。酸化グルタチオンベースの薬物の使用における、その生物活性、治療法の有効性及び安全性を低下させ、薬物の治療有効性に悪影響を及ぼす病理過程における代謝の特徴に関連する既

40

50

存の制限にも関わらず、G S S Gは、薬理的ソリューションにおける議論の余地のない興味の対象である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の目的は、高い有効性、及び様々な薬物療法剤群からの薬理活性分子に対する増強作用を有する新規な医薬組成物を提供することである。特に、本目的は、より少ない用量を用いて、必要とされる治療効果を、それを必要とする患者に吸入、経腸、非経口によって、単独及び他の薬理活性物質と組み合わせての単一剤形の両方での外用投与で投与された場合に得ることを可能とする目的で、薬物動力学を最適化し、最終的には、G S S Gの薬物動力学を最適化することである。薬理活性物質は、薬物動力学及び／若しくは薬物動態の最適化、並びに／又は毒性の低下が実現されることになる、抗微生物薬及び抗ウィルス薬、抗凝固剤、第X a因子阻害剤；細胞膜イオンチャネルの作用の修飾剤；他の医薬品を含むいかなる薬物療法剤群から選択されてもよい。

【0015】

医薬組成物及び医薬の組み合わせの両方が、追加の賦形剤を含む医薬として用いられてよい。

【0016】

本発明の技術的な結果は、単一又は合計用量を減少させ、したがって、薬理活性物質の確立された治療用量での用量関連毒性を低下させること；様々な薬物療法剤群からの治療活性剤の有効性を向上させ、それに応じて、単一又は合計用量を減少させ、したがって、用量関連毒性を低下させることである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

前記技術的結果は、単一又は合計用量の減少が確立され、それに応じて、用量関連毒性が低下される、グルタチオンジスルフィド（G S S G）又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩とグルタチオンジスルフィドS－オキシド（G S（O）S G）又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩との治療有効量の組み合わせを、医薬的に許容される賦形剤及びいずれかの薬物療法剤群からの薬理活性分子と共に含む薬物である新規な医薬組成物を提供することによって実現される。

【0018】

典型的には、薬理活性化合物は、薬物動力学及び／若しくは薬物動態の最適化、並びに／又は毒性の低下が実現されることになる以下の薬物療法剤群から選択される：

- － 抗凝固剤、第X a因子阻害剤、特に、アミジン塩酸塩；
- － 抗微生物薬及び抗ウィルス薬、特に、モキシフロキサシン、抗狂犬病ワクチンの抗原性物質、インターフェロンα；
- － 細胞膜カルシウムチャネルの作用の修飾剤、特に、ニフェジピン。

【0019】

通常、グルタチオンジスルフィドS－オキシドの量は、全組成物に対して0.01～10重量％である。

【0020】

また、組成物は、さらに、好ましくは白金族からの、さらにより好ましくは白金であるd－金属（Me）であって、Me－S－グルタチオン結合を含有する配位化合物の形態で示される、d－金属を含んでいてもよい。

【0021】

配位化合物として組成物に添加されるd－金属の量は、任意のd－金属に対する生理学的に許容される値を超えない。しかし、治療効果を実現するために配位化合物の形態で大量の金属を添加する必要がある場合は、この値を超えてもよい。

【0022】

組成物中のd－金属の量は、組成物1kgあたり 1×10^{-10} モル～ 1×10^{-3} モ

10

20

30

40

50

ルまで変動し、好ましくは、組成物 1 k g あたり 1×10^{-5} モルである。

【0023】

提供される組成物は、外用、吸入、経腸、又は非経口投与用に調製され得る。

【0024】

成分の特性

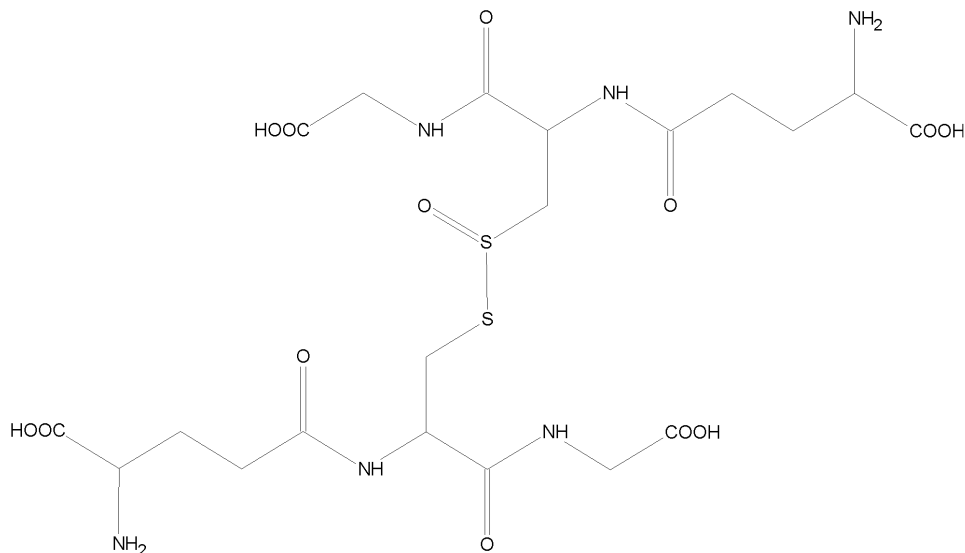
グルタチオンジスルフィド（又は酸化グルタチオン、G S S G）は、トリペプチドグルタチオン、 γ -グルタミルシステイニルグリシンの二量体であり、前記トリペプチドの二分子が、システイン残基間のジスルフィド共有結合を介して互いに連結されている。本発明によると、アルカリ金属又はアルカリ土類金属との塩の形態であるグルタチオンジスルフィドは、本技術分野において公知のいかなる方法によって調製されてもよい〔ロシア特許第 2 1 4 4 3 7 4（C 1）号、2 0 0 0 年 1 月 2 0 日公開〕。

【0025】

グルタチオンジスルフィド S-オキシド（グルタチオンチオスルフィネート又は G S（O）S Gとも称される）は、以下の構造を有する：

【0026】

【化 1】



【0027】

グルタチオンジスルフィド S-オキシドは、酸化グルタチオンに類似の薬物動態を特徴とし、したがって、それは、酸化グルタチオン分解酵素の負の制御因子であり、したがって、それは、酸化グルタチオンの薬物動力学を最適化し、酸化グルタチオンの生物学的効果を増強する G S S G に対する延長剤として作用するものであり、それによって、G S S G の薬物動力学が最適化され、所望される治療効果を得るためにより少ない用量の G S S G を使用することが可能となる。より低いレベルへ移行することは、薬物の活性成分の毒性を低下させるための重要な条件の 1 つである。したがって、グルタチオンジスルフィド S-オキシドは、薬物動態、薬物動力学を最適化し、G S S G 使用の安全性を高めるものであり、これらはすべて、G S S G の場合と比較して、実際の治療にグルタチオンジスルフィド S-オキシド及び G S S G を組み合わせて使用する場合の薬剤経済学的基準最適化のための条件である。

【0028】

グルタチオンジスルフィド及びグルタチオンジスルフィド S-オキシドの分子は、薬物の活性成分とファンデルワールス相互作用などの弱い分子間相互作用を形成することができ、薬物動態及び／又は薬物動力学及び／又は毒性に影響を与えることによって、その治療特性を最適化する。

【0029】

「配位化合物」とは、錯化剤と称される中心原子（イオン）の周りにある特定の順序で

配置された（配位された）リガンドと称されるイオン又は中性分子の群を含有する化合物を意味する。

【0030】

「d-金属」、「遷移金属」、及び「遷移元素」は、同一であり、電子がd-サブレベルを満たしている周期系の化学元素を意味する。

【0031】

「医薬的に許容される賦形剤」は、外用、吸入、経腸、非経口、又は他の投与手段のための本発明の組成物を含む医薬を得るのに適する、当業者に公知の物質である。例えば、賦形剤として、公知の医薬的に許容されるいずれの無機又は有機キャリア、保存剤、可溶化剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、甘味剤、着色剤、香味剤、浸透圧を制御するための塩、緩衝剤、矯味剤、又は酸化防止剤、及び他の必要な成分が用いられてもよい。

10

【0032】

「医薬的に許容される」とは、患者に投与された場合に毒性効果又は他の望ましくない効果を引き起こさない化合物を意味する。

【0033】

「治療有効剤」とは、治療目的で用いられるいかなる物質をも意味する。

【0034】

「患者」とは、何らかの方法でその身体に、組成物、又は組成物と公知の薬理活性化合物との、特に、第Xa因子阻害剤のアミジン塩酸塩；抗微生物剤のモキシフロキサシン、抗狂犬病ワクチンの抗原性物質、抗ウィルス剤のインターフェロン α ；カルシウムチャネル阻害剤のニフェジピンとの組み合わせが投与される、ヒト若しくは他の哺乳類、鳥類、両生類、又は魚類を意味する。

20

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】37℃の温度で保存された様々な溶液中に溶解されたモノクローナル抗体の製剤の電気泳動図を示す。レーン1－サイズ標準（Fermentas Page Ruler（商標）染色済みタンパク質ラダー）；レーン2－サンプル2；レーン3－サンプル3；レーン4－サンプル4；レーン5－サンプル1。

【図2】生理学的条件を模倣した条件下での血清サンプル中の保存物から得たモノクローナル抗体の構造中間体に対するHPLCデータである（（1）－サンプル1；（2）－サンプル2；（3）－サンプル3；（4）－サンプル4）。

30

【図3】平均INR（1）－表1から得たアミジン塩酸塩物質の場合、及び（2）－表2から得たアミジン塩酸塩物質とアジュバントとの混合物の場合（アジュバントは、グルタチオンジスルフィドとグルタチオンジスルフィドS-オキシドとの組み合わせを含む組成物である）。

【図4】 Ca^{2+} イオンを含有する媒体中（1）、（2）、及びカルシウムを含有しない媒体中（3）、（4）での腹腔マクロファージにおける、ATP（1）、（3）、及びタプシガルジン（2）、（4）によって誘導された Ca^{2+} シグナル。縦軸－サイトゾル中の Ca^{2+} の濃度（nM）、横軸－経過時間（分）。

【図5】生理食塩水中（1）又は公称カルシウム非含有媒体中（2）、（3）でのマクロファージにおける、非刺激時（at rest）の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、並びに200 μM のATP（1、2）及び0.5 μM のタプシガルジン（TG）（3）によって誘導された Ca^{2+} シグナルに対するグルタチオンジスルフィドの効果。

40

【図6】非刺激時の細胞内カルシウム濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及びATPによって誘導された Ca^{2+} シグナルに対する例3の組成物（製剤）の効果。製剤は、選択的カルシウムチャネル阻害剤ニフェジピンの阻害効果を打ち消しており（1）、薬物自体の効果は、還元剤ジチオスレイトール（DTT）によって抑制されている（2）。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本発明を、本質的に例示的であり、請求される請求項の範囲をまったく限定するもので

50

はない本発明の具体的な実施形態によって説明する。

【0037】

略語：

G S H－ グルタチオン（還元グルタチオン）、
 G S S G－ 酸化グルタチオン（グルタチオンジスルフィド）、
 G S O₃ H－ グルタチオンスルホン酸、
 G S (O) S G－ グルタチオンジスルフィド S－オキシド又はスルホキシド；
 G S (O₂) S G－ グルタチオンジスルフィド S－ジオキシド；
 H P L C－ 高速液体クロマトグラフィ；
 P A A G－ ポリアクリルアミドゲル；
 S D S－ ドデシル硫酸ナトリウム

10

【0038】

組成物の作製方法

方法 A

L－グルタチオンから誘導したグルタチオンジスルフィドのナトリウム塩の溶液に（例 2）、手順（例 1）に従って合成したグルタチオンジスルフィド S－オキシドを添加した。グルタチオンジスルフィド S－オキシドの量は、全組成物に対して 0.1～10 重量%であってよい。実際の実施形態では、特に例 3 及び 4 では、グルタチオンジスルフィド S－オキシドの量は、全組成物の重量に基づいて、それぞれ 2%及び 4%であった。提供された方法により、グルタチオンジスルフィド S－オキシドの含有量を高い精度で制御することが可能となる。

20

【0039】

方法 B

水酸化ナトリウム水溶液中のグルタチオンジスルフィドナトリウム塩の得られた溶液に、低下された温度で、通常は 0～5℃で、過剰の過酸化水素を添加して、グルタチオンジスルフィド S－オキシドを *in situ* で生成した。1つの実施形態（例 5）では、+3℃以下の温度で、6%の過酸化水素の 127g を添加した。グルタチオンジスルフィド S－オキシドの量は、全組成物に対して 5 重量%であった。

【0040】

方法 A 又は B によって得た組成物は、タンパク質のジスルフィド結合の形成及び安定性に影響を与える能力を特徴とし（例 5 及び 12）、したがって、タンパク質の天然のコンフォメーションの、すなわち、タンパク質が機能活性を保持するコンフォメーションの、特に、ジスルフィド結合を介して連結して治療活性を有する機能的活性分子となっている 2つの重鎖及び 2つの軽鎖のペプチド鎖から成るモノクローナル抗体であるタンパク質製品に代表される薬物のコンフォメーションの形成及び安定化を可能とするタンパク質のフォールディングに影響を与える能力を特徴とする（例 5）。

30

【0041】

方法 A 又は B によって得た組成物は、生体異物解毒の第 2 相の酵素発現を増加させる能力を特徴とし（例 13）、それによって、組成物は、単独で毒性修飾剤（*toxicomodifying agent*）として、すなわち、投与された薬物療法剤の複合的な用量依存性の毒性副作用を含む様々な化学分子の毒性効果を低下させる剤として使用することが可能となる。

40

【0042】

方法 A 又は B によって得た組成物は、用量の減少、及びそれに応じた用量関連毒性の低下が確立される他の公知の薬理活性で広く用いられている治療分子、特に、抗凝固剤、第 Xa 因子阻害剤のアミジン塩酸塩（例 8）；抗生物質のモキシフロキサシン；抗ウィルス剤、抗狂犬病ワクチンの抗原性物質、及びインターフェロン α（例 9、10、14）；カルシウムチャネル阻害剤のニフェジピン（例 11）、と合わせた医薬の作製のために、組み合わせて用いることができる。

【実施例】

【0043】

50

例 1. グルタチオンジスルフィド S-オキシド (GS(O)SG) の作製方法

還元 L-グルタチオン物質 (GSH) 100 g の 100 ml の水による溶液に、150 ml の酢酸中 30% 過酢酸溶液を、攪拌しながら、0~5℃の温度で 30~40 分間かけて滴下した。滴下後、反応物を 5℃以下の温度で 1 時間にわたって攪拌し、その後、凍結し、24 時間にわたって凍結乾燥した。110 g の物質が白色フォームとして得られ、それは、HPLC 分析によると、成分の混合物を含有している (40% GS(O)₃H、55% GS(O)SG、5% GS(O₂)SG)。

【0044】

凍結乾燥物を 400 ml の水に溶解し、分取用 HPLC (カラム YMC-Actus Triart Prep C18-S 50×250 mm、溶離液は水) を用いて精製し、95% より高い純度の表題の化合物を含有する画分を 1 つにまとめ、蒸発させて体積を 700 ml とし、凍結乾燥した。42 g の所望される化合物グルタチオンジスルフィド S-オキシドを (ジアステレオマー混合物として)、95+ % の純度 (HPLC) で得た。

【0045】

例 2. 酸化グルタチオン (グルタチオンジスルフィド) の作製

7 L の水による 2760 g の還元 L-グルタチオンの懸濁液に、2245 g の 16% 水酸化ナトリウム溶液を、17℃以下の温度で攪拌しながら添加した。グルタチオンが完全に溶解した後、混合物を冷却し、2546 g の 6% 過酸化水素を、30~50 ml / 分の速度で、攪拌しながら +15℃以下の反応物温度で添加した。過酸化物の添加後、得られた溶液を、所定の温度でさらに 1 時間にわたって攪拌した。反応の完了後 (HPLC で制御)、11.5 L の水に 2.95 kg のグルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩を含有する溶液が得られ、3℃に冷却した。生成物、グルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩の化学純度は、98.5% 超であり (HPLC で制御)、生成物単離のための追加の手順の必要はない。

【0046】

例 3. あるグルタチオンジスルフィド S-オキシド含有量を有するグルタチオンジスルフィドの組成物 (薬物) の作製

例 2 で作製したグルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩 (11.5 L の水に 2.95 kg) に、60 g の例 1 に従って得たグルタチオンジスルフィド S-オキシドを、3~5℃の温度で、5 分間にわたって十分に混合しながら添加し、この溶液を、120 分間にわたって 5℃の温度で放置し、その後凍結乾燥した。

【0047】

例 4. あるグルタチオンジスルフィド S-オキシド含有量を有するグルタチオンジスルフィドの組成物 (薬物) の作製

120 g の例 1 に従って作製したグルタチオンジスルフィド S-オキシドを、例 2 で作製したグルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩 (11.5 L の水に 2.95 kg) に、5 分間にわたって十分に混合しながら添加し、この溶液を、120 分間にわたって 5℃の温度で放置し、その後凍結乾燥した。

【0048】

例 5. あるグルタチオンジスルフィド S-オキシド含有量を有するグルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩の組成物の作製

7 L の水による 2760 g の還元 L-グルタチオンの懸濁液に、2245 g の 16% 水酸化ナトリウム溶液を、17℃以下の温度で攪拌しながら添加した。グルタチオンが完全に溶解した後、混合物を冷却し、2546 g の 6% 過酸化水素を、30~50 ml / 分の速度で、攪拌しながら +15℃以下の反応物温度で添加した。過酸化物の添加後、得られた溶液を、所定の温度でさらに 1 時間にわたって攪拌した。反応の完了後 (HPLC で制御)、反応物を 3℃に冷却した。生成物、グルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩の化学純度は、98.5% 超であった (HPLC で制御)。

【0049】

次に、追加の 127 g の 6% 過酸化水素を、30~50 ml / 分の速度、+3℃以下の

10

20

30

40

50

温度で添加した。反応物を、1 時間にわたって + 3 °C で放置し、次に凍結乾燥した。

【0050】

得られた組成物は、95% のグルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩、及び 4.5 ~ 5.0% のグルタチオンジスルフィド S-オキシド二ナトリウム塩 (HPLC で制御) を含有しており、生成物の追加の精製手順の必要はない。

【0051】

例 6. ある量のグルタチオンジスルフィド S-オキシド及び Pt-S を含有するグルタチオンジスルフィドの組成物の作製

7 L の水による 2760 g の還元 L-グルタチオンの懸濁液に、2245 g の 16% 水酸化ナトリウム溶液を、17 °C 以下の温度で添加した。グルタチオンが完全に溶解した後、混合物を冷却し、0.5 g のシス-白金を添加し、2546 g の 6% 過酸化水素を、30 ~ 50 ml / 分の速度で、攪拌しながら + 15 °C 以下の反応物温度で添加した。過酸化物の添加の終了後、得られた溶液を、所定の温度でさらに 1 時間にわたって攪拌した。反応の完了後 (HPLC で制御)、11.5 L の水に 2.95 kg のグルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩を含有する溶液が得られ、3 °C に冷却する。生成物、グルタチオンジスルフィド二ナトリウム塩の化学純度は、98.5% 超であり (HPLC で制御)、生成物単離のための追加の手順の必要はない。溶液を 3 °C に冷却し、60 g のグルタチオンジスルフィド S-オキシドを添加し、5 分間にわたって十分に混合し、この溶液を、120 分間にわたって 5 °C で放置し、次に凍結乾燥した。

【0052】

例 7. 例 5 で得た組成物のフォールディング活性の分析

モノクローナル抗体製剤の組成:

モノクローナル抗体 - 10 mg / ml ;

グリシン - 2 mg / ml ;

ポリソルベート 80 - 0.05 mg / ml ;

塩化ナトリウム - 7 mg / ml ;

クエン酸一水和物 - 2.101 mg / ml ;

注射用水

【0053】

生理学的条件を再現するために、ヒト血清を、自由意志での同意書と共に得た。血清保存バンクの血清番号は、O-17-1002 である。

【0054】

リフォールディング実験では、以下を用いた:

サンプル 1 - 50 µl の量のモノクローナル抗体の製剤 + 1 ml の血清 O-17-1002 の組成物

サンプル 2 - 50 µl の量のモノクローナル抗体の製剤 + 0.2 mM の例 3 で得た組成物 + 1 ml の血清 O-17-1002 の組成物

サンプル 3 - 50 µl の量のモノクローナル抗体の製剤 + 0.2 mM の例 4 で得た組成物 + 1 ml の血清 O-17-1002 の組成物

サンプル 4 - 50 µl の量のモノクローナル抗体の製剤 + 0.2 mM の例 5 で得た組成物 + 1 ml の血清 O-17-1002 の組成物

【0055】

サンプル 1 及び 2 のバイアルを、37 °C の温度で保存した。24 時間後、バイアルをサーモスタットから取り出し、ヒト体内の生理学的環境を模倣した条件下、異なる温度での保存中のモノクローナル抗体の安定性について分析した。

【0056】

安定性実験の結果は、まず、還元性条件下、ポリアクリルアミドゲル (PAA G) 中での電気泳動分離によって分析した。

【0057】

電気泳動は、15% PAA G において、変性条件中、サンプル濃縮工程に等速電気泳動

10

20

30

40

50

(ITP)機構を用いた不連続(段階的)緩衝系(ディスク電気泳動)で行った。サンプルは、以下の方法で調製した：遠心分離によって細胞を沈澱させ、200 μ Lの緩衝液(0.2 MのTris-HCl pH 7.5; 0.2 MのNaCl; 0.01 Mの酢酸ナトリウム; 0.01 Mのb-メルカプトエタノール、及び5%のグリセロール)に再懸濁し、続いて2分間煮沸した。

【0058】

電気泳動を行うために、いくつかの緩衝溶液の系を用いた：カソード緩衝液は、Tris ベース 0.1 M; トリシン 0.1 M; SDS 0.1% (ターミナルアニオン-トリシン)であり; アノード緩衝液は、トリスベース 0.2 M pH 8.9 (リーディングアニオン-Cl⁻)であった。濃縮ゲル T=2.5~3%、分離ゲル T=5~15%及びC=2~5% (Tは、ゲル中のモノマーの相対的含有率であり、Cは、合計モノマー中の架橋剤の含有率である)。細胞ライセートの電気泳動は、変性条件下、2%のSDS中で行った。

【0059】

タンパク質製剤の電気泳動図(図1)を、Image Jプログラムを用いて分析した。このプログラムは、様々な実験からのデータの濃度測定分析用に設計されている。レーンをマニュアルモードでマークし、次に、各レーン内のタンパク質に対応するバンドをマークした。このプログラムは、バックグラウンドを差し引いて各バンドの濃さを評価するものであり、それによって、標的タンパク質の純度を算出することが可能となる。

【0060】

模擬生理学的条件下での保存から生じたモノクローナル抗体の構造中間体を調べるためのHPLC条件

クロマトグラフ Shimadzu LC-20「Prominence」

カラム Phenomenex「Jupiter」C18、5 μ m、300Å、250 $\times$ 4.6

検出周波数=210 nm

注入量=25 μ l

流速=1.0 ml/分

カラム温度=35 $^{\circ}$ C

セル検出器温度=35 $^{\circ}$ C

移動相:

Eluent A. 30%アセトニトリル+0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

Eluent B. 70%アセトニトリル+0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

ランタイム=47分

勾配プログラム:

0~1分間 44%アセトニトリル

1~5分間 48%アセトニトリル

5~20分間 50%アセトニトリル

20~30分間 53.4%アセトニトリル

30~35分間 60%アセトニトリル

35~37分間 60%アセトニトリル

37~40分間 44%アセトニトリル

40~47分間 44%アセトニトリル

【0061】

得られたデータを図2に示すが、そこから示唆されることは、例3、4、5に従って得た組成物を含む血清サンプル(それぞれ、図2(2)、図2(3)、図2(4))中には、前記組成物を含むしないサンプル(図2(1))とは対照的に、抗原を認識することのできない損なわれた構造のモノクローナル抗体の画分が存在しなかったということである。

【0062】

例 8. グルタチオンジスルフィド及びグルタチオンジスルフィド S-オキシドを含む組成物と抗凝固剤、第 X a 因子阻害剤のアミジン塩酸塩との併用

本出願の例 3 に従って得た組成物を、抗凝固剤の第 X a 因子阻害剤である薬理活性剤アミジン塩酸塩の治療有効性を高める能力について調べた。試験物質のアミジン塩酸塩（例えば、ユーラシア特許第 0 1 5 9 1 8 (B 1) 号、2 0 1 1 年 1 2 月 3 0 日公開の例 2 に従って得られる）又はアミジン塩酸塩物質とアジュバント（アジュバントは、本出願の例 3 で得た組成物であった）との混合物を、尾の基部へ 1 / 3 近づいた領域の外側尾静脈に、3 0 G 針を取り付けた 1 m l のインスリンシリンジで静脈内投与した。各動物に対する個々の投与量は、体重に基づいて算出し、各々の体重測定後に補正した。物質の投与は 1 回とした。前記混合物を、アミジン塩酸塩物質とアジュバントとの混合物の動物への静脈内投与用に調製した。この目的のために、アミジン塩酸塩物質及びアジュバントを、別々に蒸留水に溶解し、次にこれらの溶液を混合した。溶液の調製は、動物への投与の直前に

10

【0063】

血液のサンプリングは、4 3 °C の温度の湯浴で少なくとも 1 5 分間ラットの尾の予備加温を行って、麻酔を用いずに、静脈内投与部位より上の外側尾静脈（尾の長さの 1 / 3 ~ 2 / 3）から行った。血液量 0. 3 6 m l を、0. 0 4 m l の 0. 1 1 M クエン酸ナトリウム溶液を入れたプラスチックチューブ（E p p e n d o r f など）に 2 3 G 針で採取して 0. 4 m l の体積とし、クエン酸ナトリウム対血液の比を 1 : 9 とした。サンプリング後の 3 0 分以内に、血液を 8 0 0 0 r p m (7 0 0 0 g) で 1 0 分間遠心分離し、血漿を別のチューブに移し、2 0 °C、1 2 0 0 0 r p m (1 5 0 0 0 g) で 1 0 分間再度遠心分離して、乏血小板血漿を得た。1 1 0 μ l の量で得られた血漿を、プラスチックチューブ（E p p e n d o r f など）に注ぎ入れ、- 2 0 °C で凍結した。サンプリングは、各ラットに対して 6 回行った。

20

【0064】

国際感受性指標（I S I）に従って認証されたカルシウムイオンを添加した水溶性の凍結脱水トロンボプラスチン、Renamplastin（NPO「RENAM」）を、この実験で用いた。

【0065】

方法の原理：過剰の組織トロンボプラスチン及びカルシウムイオンがクエン酸血漿に添加されると、フィブリン血栓の形成時間は、外因性及び共通凝固経路の因子、因子 I、I I、V、V I I、X の活性にのみ依存する。カルシウムを含むトロンボプラスチンの血漿への添加の瞬間からフィブリン血栓の形成までの時間を測定する。

30

【0066】

アッセイ：8 m l の蒸留水を、凍結乾燥した Renamplastin を入れたバイアルに添加し、振とうして溶解する。アッセイの前に、試薬を 3 7 °C で 3 0 分間加熱する。5 0 μ l のクエン酸血漿を分析器のキュベットに添加し、3 7 °C で正確に 1 ~ 2 分間インキュベートする。次に、1 0 0 μ l の renamplastin を添加し、ABW Medizin und Technik GmbH の Merlin MC1 Coagulation Analyzer で凝固時間を秒で記録する。

40

【0067】

得られた結果を、国際標準比（I N R）：

$$I N R = P R^{I S I},$$

で表し、I S I は、Renamplastin の国際感受性指標であり、添付のパスポートに示されているはずである。PR-プロトロンビン比：

$$P R = P T_B / P T_{100\%},$$

P T_B は、試験サンプルの血漿のプロトロンビン時間（秒）であり、P T_{100%} は、物質を投与する前の任意の動物に対して得られたサンプルの平均プロトロンビン時間である。

50

【0068】

実験パラメータの測定結果を、実験群全体で平均し、 $M \pm m$ として表すが、 M は、群平均であり、 m は、標準偏差である。群間の有意差は、正規分布サンプルに対しては、 $p < 0.05$ でのスチューデントパラメトリックt検定を用いて、非正規分布に対しては、 $p < 0.05$ でのマン・ホイットニーのノンパラメトリックU検定を用いて判定する。

【0069】

得られた結果を、表1及び2、並びに図3に示す。表1及び図3(1)は、アミジン塩酸塩物質のみで得られたデータを示し、表2及び図3(2)は、アミジン塩酸塩物質とアジュバントとの混合物で得られたデータを示す。

【0070】

【表1】

表1 アミジン塩酸塩の投与でのINR分析の結果

注射後の経過時間(秒)	0	5	10	20	40	60
INR	1	1.46	1.33	1	0.94	
	1	4.18	3.72	3.45	3.16	
	1	6.45	2.42	1.93	0.96	
	1	3.22	2.51	1.9	1.25	
	1	2.71	2.76	1.53	2.04	
	1	5.88	2.08	1.59	1.83	0.79
	1	9.82	1.18	2.94	1.74	1.63
	1	2.05	5.01	1.57	1.3	0.98
	1	2.42	5.53	1.85	1.8	1.43
	1	2.62	1.78	1.41	1.61	1.75
	1	2.13	2.15	1.68	1.05	1.24
	1	2.46	1.85	1.45	1.35	1.52
	1	2.3	2.21	2	1.44	1.65
	1	6.32	2.12	1.21	1.33	1.55
	1	4.85	2.23	1.75	1.48	1.38
	1	5.46	2.11	1.54	0.93	0.9
	1	2.63	2.23	1.79	1.31	1.24
	1		1.72	1.61	1.21	0.96
	1				1.15	1.07

【0071】

【表 2】

表 2 アミジン塩酸塩とアジュバントとの併用における I N R 値の分析結果

注射後の経過 時間 (秒)	0	5	10	20	40	60
I N R	1	9. 6 4	6. 7 7	4. 9 6	2. 6 8	2. 4 7
	1	10. 3 8	5. 2 1	4. 2 6	2. 3 8	1. 9 2
	1	11. 3 8	3. 6 4	3. 0 2	2. 9 4	2. 7 3
	1	4. 5 3	4	2. 4 4	1. 6 3	1. 8 4
	1	4. 3 5	3. 6 9	2. 5 9	4. 8 4	4. 4 5
	1	6. 8 4	3. 9	2. 0 9	2. 2 8	1. 5 9
	1	6. 9 7	3. 7 1	2. 7	1. 7 2	2. 0 5
	1	4. 6 9	4. 1 7	2. 2 9	1. 7 2	1. 9 6

10

【0072】

得られた結果は、本発明の組成物が他の治療活性剤の有効性を高めることができることを示している。

【0073】

20

例 9：グルタチオンジスルフィド及びグルタチオンジスルフィド S-オキシドの組成物と組み合わせたモキシフロキサシンを含む組み合わせの抗微生物作用の実験

本出願の例 3、4、及び 5 に従って得た製剤について調べた。

【0074】

製剤の抗微生物作用を、グラム陰性：大腸菌 (*Escherichia coli*) A T C C 2 5 9 2 3、シュードモナス・エルジノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*) A T C C 2 7 8 5 3、臨床分離株アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、並びにグラム陽性細菌：リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) E G D (A T C C B A A-6 7 9)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) A T C C 2 5 9 2 2、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスである M R S A A T C C 3 3 5 9 1、に対して調べた。

30

【0075】

微生物を、2. 1% ミューラーヒントンブロス M 3 9 1 (O x o i d、ドイツ) 中、振とう器上で連続的に振とうしながら 37℃ で一晚 (16~18 時間) 培養した。この後、細菌懸濁液のアリコートを一晩の培養物から取り出し、15 ml の新しい無菌 2. 1% ミューラーヒントンブロスに移し、次に振とう器上で、37℃ で 2. 5~3 時間インキュベートした。続いて、得られた懸濁液の光学密度 (OD) を、DU-50 分光光度計 (B e c k m a n、米国) 上、620 nm の波長で、無菌 2. 1% ミューラーヒントンブロスに対して測定し、1 ml あたりのコロニー形成単位 (C F U) の数を以下の式によって特定した： $1 \times OD_{620} = 2.5 \times 10^8 \text{ c f u} / \text{ml}$ [Protocols in antimicrobial peptides. W. Shafer Ed. Springer-Verlag New York, LLC, 7/8/1997]。この計算に基づいて、細菌懸濁液を、無菌 2. 1% ミューラーヒントンブロスを用いて $1 \times 10^5 \text{ c f u} / \text{ml}$ の濃度に希釈した。

40

【0076】

96 ウェルの滅菌 U 底プレートを用いた (S a r s t e d t、ドイツ)。試験製剤の 2 倍の段階希釈物を、ミューラーヒントン培地で調製した (各製剤に対して、50 μl / サンプルの量で 8 段階の希釈物)。さらに、50 μl の細菌懸濁液を、プレートのウェルに添加した (サンプル中の細菌の最終濃度は、 $0.5 \times 10^5 \text{ c f u} / \text{ml}$ であった)。製剤の各希釈物に対して、5 つの反復サンプルを調製した。

【0077】

50

サンプルを入れたプレートとを、サーモスタット中、37℃で18時間インキュベートした。

【0078】

翌日に結果を記録した。プレートの対応するウェルでの微生物の増殖が目視で観察されなかった（完全に阻害された）ものである得られた物質の最低濃度を、最小発育阻止濃度（MIC）として認めた。最終結果を、試験した各サンプルの各希釈物に対して5つの反復サンプルを各々で用いた5つの独立した実験からのデータに基づいて算出した。

【0079】

製剤の抗微生物作用（AMA）も、Lehrer教授、University of Los Angeles、米国 [Lehrer R.I. et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial poly-peptides / Journal of Immunological Methods, 1991, V.137, pp. 167-173] によって開発された、試験微生物を含有するアガロースゲル中での放射状拡散法によって特定した。微生物を、ダイズトリプシン加水分解物の3%溶液である培地中、37℃で16時間予備培養した。次に、微生物を含む培地のアリコートとを、新しく調製した培地に別々に移し、37℃で2.5時間インキュベートして、対数増殖期の中間の微生物を得た。各微生物の細胞数を、分光光度計上、620nmで懸濁液の光学密度を測定することによって評価した。4×10⁶の微生物細胞を含有する懸濁液のアリコートを、0.15MのNaClを含有しpH7.4の10mMリン酸ナトリウム緩衝液中の滅菌1%アガロース溶液の10mlと、42℃で混合する。得られた混合物を、直径90mmの滅菌プラスチックペトリ皿に注ぎ入れ、固化するまで室温で放置する。pH7.4の10mMリン酸ナトリウム緩衝液による製剤の段階希釈物である5μlの量の分析サンプルを、アプリケーションによって作製したウェル（直径3mm）に添加し、エアーサーモスタット中、37℃で3時間インキュベートした。次に、6%TGSを含有する1%アガロースをプレートに注ぎ入れ、37℃で18時間インキュベートする。増殖阻害ゾーン（ウェル周囲の微生物のいないゾーン）の直径を、抗微生物作用の1慣用単位を0.1mmとして取って、測定値からウェル自体の直径に相当する30慣用単位を差し引くことによって測定する。用いた製剤の濃度は、64μg/ml、32μg/ml、16μg/ml、8μg/ml、4μg/ml、2μg/ml、1μg/mlであった。

【0080】

製剤の微生物の増殖を阻害する最小濃度（MIC）を、ペプチド濃度に対する抗微生物作用の依存性の直線回帰、 $y = a + bx$ を構築することによって特定し、yは、抗微生物作用（c. u.）であり、xは、製剤の濃度である。MICは、 $y = 0$ の場合のxの値、すなわち、 $MIC = -a/b$ であると見なした。

【0081】

【表 3】

表3 大腸菌ATCC 25922[#]に対するペプチドの最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
(液体培地中での段階希釈法)

細菌 製剤	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	実験 1	実験 2	実験 3	実験 4	実験 5	平均±SE
N o. 1 (例 3 に 従う)	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.25;0.25; 0.25;0.5; 0.25	0.25; 0.25; 0.25;0.5; 0.25	0.25;0.25; 0.25;0.5; 0.25	0.5;0.5; 0.5;0.5; 0.5	0.33±0.02
N o. 2 (例 4 に 従う)	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.5	0.5;0.5; 0.5;0.5; 0.25	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.5;0.5; 0.5;0.5; 0.5	0.35±0.03
N o. 3 (例 5 に 従う)	0.25;0.5; 0.5;0.5; 0.5	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25; 0.25;0.25	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.25; 0.25; 0.25;0.5; 0.5	0.31±0.02

10

20

[#] 示した値の各々は、平均±平均の標準誤差である (n = 25)。

【0082】

【表 4】

表4 スタフィロコッカス・アウレウスATCC 25923[#]に対するペプチドの最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) (液体培地中での段階希釈法)

細菌 製剤	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	実験 1	実験 2	実験 3	実験 4	実験 5	平均±SE
N o. 1 (例 3 に 従う)	0.5;0.5; 0.5;0.5; 0.5	0.5;0.5; 0.5;0.5; 0.5	0.25;0.25; 0.25;0.5; 0.25	0.5;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.25;0.25; 0.25;0.5; 0.25	0.38±0.03
N o. 2 (例 4 に 従う)	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.5;0.5; 0.5;0.5; 0.5	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.5	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.31±0.02
N o. 3 (例 5 に 従う)	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.5;0.5; 0.5;0.5; 0.5	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.25;0.25; 0.25;0.25; 0.25	0.25;0.25; 0.25;0.5; 0.5	0.32±0.22

30

40

[#] 示した値の各々は、平均±平均の標準誤差である (n = 25)。

* モキシフロキサシンのMIC (No. 13) に対して有意差、スチューデント t 検定。

【0083】

実施した実験から、グラム陰性細菌及びグラム陽性細菌の両方に対する本発明の組成物の高い抗微生物作用が実証されている。

50

【0084】

例10. グルタチオンジスルフィド及びグルタチオンジスルフィドS-オキシドを含有する例3で得た組成物の、ワクチン製剤中のアジュバントとしての使用

乾燥濃縮精製不活化細胞由来抗狂犬病ワクチン及び本出願の例3に従う組成物の組み合わせの調製

PBS中0.5mg/mlの滅菌水酸化アルミニウム溶液を調製した。本出願の例3に従って得た組成物の12gを、得られた溶液の60mlに添加した。得られた溶液を、細孔径0.44µmのフィルターに通すことによって滅菌した。0.5mg/mlの水酸化アルミニウム濃度のPBS中、20mg/ml、10mg/ml、5mg/ml、1mg/mlの濃度の希釈溶液(AD)を、得られた溶液から調製した。

10

【0085】

得られた溶液を、0.5mg/mlの水酸化アルミニウムを含むPBS中の例3に従う物質(本出願)の所定の濃度の溶液中、1:200(マウスの50%の保護と算出)及び1:1200(マウスの20%の保護と算出)に希釈したワクチンの調製に用いた。得られた溶液を、振とう器上(約150rpm)、発泡しないようにしながら4℃で1時間インキュベートした。

【0086】

乾燥濃縮精製不活化細胞由来抗狂犬病ワクチンの1:200及び1:1200希釈物を、参照サンプルとして用いた。

【0087】

1回供給(one supply)の体重13~15gであるBALB/sマウスを本実験の対象として用いた。

20

【0088】

0.03ml中に20~100LD₅₀を含有する作業希釈を、狂犬病ウィルスのCVS試験株(狂犬病ウィルスで感染させたマウスの10%脳懸濁液)の滴定の結果に基づいて算出した。

【0089】

マウスの最初のワクチン接種は、組成物の各希釈物に対して、10体の計算から0.5mlの腹腔内投与によって行った。

【0090】

マウスの2回目のワクチン接種は、7日後、組成物の各希釈物に対して、10体の計算から0.5mlの腹腔内投与によって行った。

30

【0091】

実験で用いる実際のウィルス投与量を決定するための、56℃で30分間不活性化した2%ウマ血清を添加したウィルスの作業(許容)希釈物、及び注射用水による3つの連続する10倍希釈物の調製。

【0092】

許容投与量の0.03ml及びその10倍希釈物を、一希釈あたり6体のマウスを用いて、ワクチン接種済みマウスと同時にコントロール群のマウスに脳内投与した。

【0093】

動物のフォローアップ期間は、14日間とした。実験結果の評価には、5~14日間で発症又は死亡したマウスも考慮に入れる。

40

【0094】

リード・ミュンヒ法による結果の数値処理。

【0095】

得られた結果を表5にまとめる。

【0096】

【表 5】

表5 ワクチン製剤の有効性に対するアジュバントの影響の結果

投与した物質の名称	ワクチン (1 : 200)		ワクチン (1 : 1200)		MLT
	生存数	保護%	生存数	保護%	
ワクチン (1 : 70) AD 1mg/ml	10/10	100%	6/10	60%	12.8日
ワクチン (1 : 200) AD 5mg/ml	10/10	100%	1/10	10%	12.8日
ワクチン (1 : 70) AD 10mg/ml	8/10	80%	5/10	50%	10.7日
ワクチン (1 : 200) AD 20mg/ml	10/10	100%	2/10	20%	11.2日
ADなしのワクチン	7/10	70%	3/10	30%	12.8日
St. CVS	—	—	—	—	5.5日

10

20

【0097】

示したデータから、グルタチオンジスルフィド及びグルタチオンジスルフィドS-オキシドの組み合わせを含有するワクチンが投与された場合に、動物の生存率が高いことが示される。これらの値は、参照サンプルの値と同等であり、ほとんどの場合では、参照サンプルよりも高い（細胞由来抗狂犬病ワクチンにおいて）。

【0098】

例11. 例3で得たグルタチオンジスルフィド及びグルタチオンジスルフィドS-オキシドを含む組成物のカルシウムチャネル阻害剤の作用に対する効果

本実験の目的は、本出願の例3で得た組成物の、細胞膜イオンチャネルの作用及びカルシウムチャネル阻害剤の作用に対する効果を試験することである。

30

【0099】

以下の化合物を、試験化合物として用いた：選択的カルシウムチャネル阻害剤ニフェジピン、グルタチオンジスルフィド（本出願の例2で調製）、及び本出願の例3に従う組成物（グルタチオンジスルフィドをグルタチオンジスルフィドS-オキシドと共に含む）。

【0100】

本実験のための製剤の調製：

試験化合物及び組成物を、+4℃で保存し、これらの物質を、実験の開始直前に脱イオン水（super Q）に溶解した。調製した溶液を、+4℃で5時間以下にわたって保存した。化合物を、実験すべき最終濃度まで細胞培養培地に添加した。

【0101】

製剤を、示した時間に対して1回細胞に添加した。

40

【0102】

用いた細胞株、培養条件：

実験は、培養常在腹腔ラットマクロファージに対して行った。常在マクロファージを、体重200～300gのラットの腹腔から、既に報告されている方法によって単離した [Conrad R.E. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. Manual of macrophages methodology/New York: Marcell Dekker pp.5-11; Randriamampita C. et al. Ionic channels in murine macrophages/Cell Biology, 1987, V.105, pp.761-769]。単離の直後、細胞は球形状であり、10～20μmの直径であった。細胞懸濁液を、10×10mmの石英ガラスを含有する培養皿に入れた。ガラス上の細胞を、20%ウシ

50

血清、ブルタミン溶液（３％）、ペニシリン（１００Ｕ／ｍｌ）、及びストレプトマイシン（１００ｍｇ／ｍｌ）を添加した培地１９９（ｐＨ７．２）中、３７℃で１～３日間培養した。α-ナフチルアセテートエステラーゼ染色から [Monahan R.A. et al. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages and lymphocytes/Blood, 1981, V.58, pp.1089-1099]、単層中の細胞の少なくとも９６％がマクロファージであることが特定された。実験は、２～３日間の細胞培養に対して、２０～２２℃の室温で行った。

【０１０３】

細胞を含む石英ガラスを、以下のイオン組成（ｍＭ）の生理学的溶液で満たした実験チャンバーに入れた：ＮａＣｌ－１４０、ＫＣｌ－５、ＣａＣｌ_２－１、ＭｇＣｌ_２－１、ＨＥＰＥＳ－ＮａＯＨ－５；ｐＨ７．３～７．４（Alonso-Torre, Trautmann, 1993）。カルシウム非含有培地は、０ｍＭのＣａＣｌ_２及び１ｍＭのＥＧＴＡを含有していた。

【０１０４】

本実験では、Sigmaからの試薬を用いた。タブシガルジン（５００μＭ）、ニフェジピン（２０ｍＭ）のストック溶液を、ジメチルスルホキシドで調製した。グルタチオンジスルフィド、及び例３に従う組成物（０．４５μｍｏｌ／ｍｌ）、ＡＴＰ（１００ｍＭ）のストック溶液を、水で調製した。

【０１０５】

実験モード：

細胞内カルシウム濃度（ $[Ca^{2+}]$ ）を測定するために、Fura-2 AM蛍光プローブを用いた。マクロファージを、２μＭのFura-2 AMを含有する生理食塩水中、室温で４５分間インキュベートした（３７℃で発生するFura-2 AMミセルのエンドサイトーシスを防止するため） [Alonso-Torre S.R. et al. Calcium responses elicited by nucleotides in macrophages. Interaction between two receptor subtypes/The Journal of Biological Chemistry, 1993, V.268, pp.18640-18647]。

【０１０６】

着色した細胞を含むガラスを、生理食塩水で洗浄し、発光顕微鏡「Люма-КФ」のテーブル上に位置する実験チャンバーに移した。Fura-2の蛍光は、窒素レーザーЛГИ-503を用いて３３７nmで励起した。レーザーを、対象に直接レーザービームを指向することができるように、実験チャンバーに対して３０°の角度で顕微鏡に沿って配置した。蛍光の強度を、スペクトロフォトメーターСФН-10を用いて５１０nmで記録した。ФЭУ-79からのシグナルを、特別に設計した増幅器で増幅し、オリジナルのソフトウェアを用いてコンピュータIBM PCに記録した。本実験では、１０×０．４０のレンズを用いた。所与の倍率において、４０～５０の細胞が測光範囲の領域に入る。光焼け（photo-burning）を避けるために、測定は、対象への照射を２．５秒として２０秒ごとに行う。ＡＴＰ及びＵＴＰが添加されると、細胞は、蛍光の最大値に到達するまで連続的に照射される。 $[Ca^{2+}]$ の値は、Grynkiwiczの式から算出され [Grynkiwicz G. et al. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties/The Journal of Biological Chemistry, 1985, V.260, pp.3440-3450]：

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F),$$

式中、Fは、観察された蛍光強度であり； F_{max} は、 Ca^{2+} で飽和された状態の染料の蛍光であり； F_{min} は、 Ca^{2+} がまったく結合していない染料の蛍光（カルシウム非含有培地中）である。

【０１０７】

Fura-2 AM： Ca^{2+} 複合体の解離定数 K_d は、２０℃及びｐＨ７．１～７．２において１３５nmであり、 F_{max} は、 Ca^{2+} を含有する培地中の細胞に１０μＭのイオノマイシン又は２５μＭのジギトニンを添加した後に測定した。ジギトニンで細胞を処理することにより、ミトコンドリア膜及び小胞体の透過性に影響を与えることなく、 Ca^{2+} イオンが細胞膜を自由に透過できるようになる。シグナルの安定化後、５ｍＭのＥ

GTAを添加し、公称カルシウム非含有の培地での染料の蛍光 (F_{min}) を特定する。マクロファージに $MnCl_2$ の溶液 ($100 \mu M$) を添加した後に、固有蛍光のレベルを差し引いた。 Mn^{2+} は、 $Fura-2$ との複合体からの Ca^{2+} と置き換わり、 Mn^{2+} との染料複合体の蛍光は、 Ca^{2+} との $Fura-2$ 複合体の蛍光よりも 100 倍低い。 $Fura-2$ の場合、 $F_{min} = F_{max} / 3$ である。

【0108】

本実験では、2つの実験手法を用いた。第一に、生理食塩水中のマクロファージにおけるATP、UTP、タブシガルジン、又はシクロピアゾン酸 (cyclopiazonic acid) (CPC) によって引き起こされる Ca^{2+} 応答に対する薬理剤の効果について調べた。この剤を、外部媒体からの Ca^{2+} の流入を反映する Ca^{2+} シグナルの定常期の間に、アゴニストの作用の前又は後のいずれかに投与した。実験の第二の変型では、以下の実験スキーム (Ca^{2+} 非含有/ Ca^{2+} 再導入プロトコル) を用いて、 Ca^{2+} の細胞内への流入を検出し、促進した。マクロファージを、公称カルシウム非含有媒体中でインキュベートし、次にアゴニストのうちの1つに曝露させて、細胞内貯蔵庫からの Ca^{2+} 動員を引き起こした。 $2 mM$ の Ca^{2+} を外部媒体へ添加し、 Ca^{2+} 濃度の生理学的勾配を復元した後、細胞内への Ca^{2+} の流入を反映する $[Ca^{2+}]$ の急速な増加が観察された。さらに、アゴニストの投与前に添加した薬理剤の効果を、 Ca^{2+} の投与前、又は外部環境からの Ca^{2+} 流入の進行中に調べた。

【0109】

ラットマクロファージにおける Ca^{2+} の細胞内濃度並びにATP及びタブシガルジンによって誘導される Ca^{2+} シグナルに対する試験化合物の効果の結果：

$200 \mu M$ のATPをラット腹膜マクロファージのインキュベーション媒体に添加することによって、 P_2u 受容体活性化によって引き起こされる貯蔵庫からの Ca^{2+} 動員に主として伴う初期の短期ピークと、顕著な長期の「定常」フェーズとから成る2フェーズの Ca^{2+} シグナルが引き起こされる。この定常フェーズは、外部媒体からの Ca^{2+} の流入に起因し、 P_2u 及び P_2z 受容体が同時に活性化されていることを反映しているものと推定される。図4(1)は、生理食塩水中の $40 \sim 50$ のマクロファージの集団における、細胞外ATP ($200 \mu M$) によって誘導された特徴的な Ca^{2+} シグナルを示す。

【0110】

細胞外ATPの添加に応答して、 $[Ca^{2+}]_i$ は、基底レベル $75 \pm 18 nM$ からピークの $820 \pm 105 nM$ まで増加する。そして、ゆっくり減少する定常フェーズがそれに続き、その間において、ATP添加の4分後の平均 $[Ca^{2+}]_i$ は、 $460 \pm 115 nM$ である。

【0111】

内質 Ca^{2+} - ATPアーゼの特異的阻害剤タブシガルジン ($0.5 \mu M$) も、2フェーズの Ca^{2+} シグナルを引き起こし、非常に速い貯蔵庫からの Ca^{2+} 動員に伴うピークと、外部環境からの Ca^{2+} の貯蔵庫依存的流入を反映する長いフェーズとである。図4(2)は、生理食塩水中のマクロファージにおいてタブシガルジンによって誘導された典型的な Ca^{2+} シグナルを示す。

【0112】

細胞内への Ca^{2+} 流入フェーズを識別し、促進するために、カルシウム非含有媒体を用いた実験を行った。公称カルシウム非含有媒体 ($0 mM$ の $CaCl_2$ 及び $1 mM$ のEGTA) 中においてマクロファージを $200 \mu M$ のATP (図4(3)) 又は $0.5 \mu M$ のタブシガルジン (図4(4)) で刺激した後、外部環境に $2 mM$ の Ca^{2+} を添加することによって、 Ca^{2+} 流入を誘導した。

【0113】

図5は、生理食塩水中(1)又は公称カルシウム非含有媒体中(2)、(3)でのマクロファージにおける、非刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ 、並びに $200 \mu M$ のATP(1)、(2)及び $0.5 \mu M$ のタブシガルジン(3)によって誘導された Ca^{2+} シグナルに対す

るグルタチオンジスルフィドの効果を示す。

【0114】

得られたデータは、グルタチオンジスルフィドが、細胞内貯蔵庫からのカルシウム動員に起因して、 $[Ca^{2+}]_i$ を $180 \pm 19 \text{ nM}$ まで増加させることができることを示している。細胞内カルシウム貯蔵庫の破壊によって、ATPの効果が低下される。タブシガルジンは、グルタチオンジスルフィドが貯蔵庫からカルシウムを動員する能力の効果を完全に反転させる。

【0115】

図6は、非刺激時の細胞内カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_i$ 及びATPによって誘導された Ca^{2+} シグナルに対する本出願の例3に従う組成物（製剤）の効果を示す。製剤は、選択的カルシウムチャネル阻害剤ニフェジピンの阻害効果を打ち消しており（1）、製剤自体の効果は、還元剤ジチオスレイトールによって抑制されている（2）。

【0116】

得られたデータは、グルタチオンジスルフィドが、グルタチオンジスルフィドS-オキシドと一緒にあって、細胞内貯蔵庫からのカルシウム動員に起因して、 $[Ca^{2+}]_i$ を $240 \pm 28 \text{ nM}$ まで増加させることができることを示している。細胞内カルシウム貯蔵庫の破壊によって、ATPの効果が低下される。グルタチオンジスルフィドは、グルタチオンジスルフィドS-オキシドと一緒にあって、媒体からの細胞へのカルシウム供給プロセスを安定化しており、このことは、このプロセスに対するカルシウムチャネル阻害剤ニフェジピンの効果の抑制として示されている。ジチオスレイトールは、カルシウムチャネルの働きに対するグルタチオンジスルフィドS-オキシドと一緒にあったグルタチオンジスルフィドの安定化効果を打ち消した。

【0117】

したがって、グルタチオンジスルフィドS-オキシドは、細胞に対するある特定の化合物の効果を高めることができ、実施した実験では、それはグルタチオンジスルフィドであり、グルタチオンジスルフィドS-オキシドは、それに対する相乗効果剤として作用した。グルタチオンジスルフィドと組み合わせたグルタチオンジスルフィドS-オキシドは、他の化合物（実施した実験ではニフェジピンであった）の効果を、組成物がニフェジピンのアンタゴニストとして及びニフェジピンの毒性を中和する対応策として作用する方向へと、低下又は阻害することができる。

【0118】

提示した例の結果から、グルタチオンジスルフィドS-オキシドと組み合わせたグルタチオンジスルフィドは、高い生物活性を呈し、このことは、カルシウム動員作用の30～50%の増加によって示される。細胞表面受容体及びカルシウムチャネルの作用を修飾するグルタチオンジスルフィドの能力を考慮すると、それは、細胞外及び細胞内受容体、細胞膜及び細胞内膜のキャリアタンパク質、ペプチド性の細胞外調節分子及び輸送分子、細胞骨格タンパク質、自己免疫反応；抗原の結合及び認識、エキソサイトーシス及びエンドサイトーシスのプロセス、ケモタキシス、ケモキネシス、細胞質分裂；細胞間、マトリックス細胞、及び体液性細胞の相互作用、に影響を与える能力を指し示しており、ジスルフィドS-オキシドが、グルタチオンジスルフィドのこれらの効果における相乗効果剤として作用するものと想定することができ、このことは、新規な薬物の開発、治療有効性を失うことなくより少ない用量を用いる可能性、並びに用量依存性の毒性及び副作用の低下に用いることができる。

【0119】

例12. ジスルフィド結合の形成速度による例5で得た組成物の効果

例5に従って得た1gのサンプル（グルタチオンジスルフィドS-オキシド含有量5%）を、水（9ml）に溶解した。得られた溶液へ、還元L-グルタチオンのナトリウム塩の溶液（2.5mg/ml）の1mlを攪拌しながら添加した。この反応物を、5分間攪拌し、HPLCによって分析した。得られた反応溶液中には、グルタチオンジスルフィドS-オキシドは検出されなかった。

【0120】

例13. 例6に従って得たグルタチオンジスルフィド及び金属、白金化合物Pt-Sシスプラチンと共にグルタチオンジスルフィドS-オキシドを含む組成物の、生体異物解毒の第2相の酵素発現に対する効果

試験化合物として以下を用いる：

- 1－ グルタチオンジスルフィドS-オキシド（例1で得た化合物）；
- 2－ グルタチオンジスルフィド（例2で得た化合物）；
- 3－ グルタチオンジスルフィドS-オキシドとグルタチオンジスルフィドとの組成物（例5で得た組成物）；
- 4－ グルタチオンジスルフィドS-オキシドとグルタチオンジスルフィド及び金属、白金化合物Pt-Sシスプラチン、との組成物（例6で得た組成物）。 10

【0121】

実験は、飼育所RAMS「Rappollovo」からの体重140～160gの雄のランダム交配白色ラットに対して行い、生理食塩水中のシクロホスファン（CP）を20mg/kgの用量で10日間にわたって毎日皮下投与することによって肝毒性を引き起こした。

【0122】

実験動物の6群を形成した。

- No. 1－ 試験化合物の溶媒（生理食塩水）の注射を受けた未処理動物（溶媒コントロール）； 20
- No. 2－ CPを受け、次に治療剤として生理食塩水を受けた動物（コントロール）；

実験群：

- No. 3－ 10日間にわたって、毒性剤CPを投与した30分後に、生理食塩水中の試験化合物1を、10mg/kgの用量での腹腔内投与で受けた動物；
- No. 4－ 10日間にわたって、毒性剤CPを投与した30分後に、生理食塩水中の試験化合物2を、0.1mg/kgの用量での腹腔内投与で受けた動物；
- No. 5－ 10日間にわたって、毒性剤CPを投与した30分後に、生理食塩水中の試験化合物3を、10mg/kgの用量での腹腔内投与で受けた動物；
- No. 6－ 10日間にわたって、毒性剤CPを投与した30分後に、生理食塩水中の試験化合物4を、10mg/kgの用量での腹腔内投与で受けた動物。 30

【0123】

肝細胞のサイトゾル画分中における生体異物解毒の第2相の酵素：グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（XE2. 5. 1. 18）、グルタチオンペルオキシダーゼ（XE1. 11. 1. 9）、グルタチオンレダクターゼ（XE1. 6. 4. 2）、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（XE1. 1. 1. 49）。

【0124】

実験結果

毒性物質の作用に対する許容性を与える複合的な分子反応の実験の結果は、グルタチオンジスルフィドS-オキシド（1）、グルタチオンジスルフィド（2）、それらの組成物（3及び4）による、生体異物解毒の第2相の酵素であるグルタチオンレダクターゼ（XE1. 6. 4. 2）、グルタチオンペルオキシダーゼ（XE1. 11. 1. 9）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（XE2. 5. 1. 18）の活性、及びそれらに伴う還元グルタチオンの交換を誘導する能力を示している（表6）。 40

【0125】

【表 6】

表6 シクロホスファンを20mg/kgの用量で10日間にわたって繰り返し投与した場合の、試験物質：1ー グルタチオンジスルフィドSーオキシド；2ー グルタチオンジスルフィド；3ー グルタチオンジスルフィドSーオキシドとグルタチオンジスルフィドとの組成物（例5で得た組成物）；4ー グルタチオンジスルフィドSーオキシドとグルタチオンジスルフィドと金属、白金化合物PtーSシスプラチン、との組成物（例6で得た組成物）の作用下での、ランダム交配白色ラットの肝細胞における生体異物解毒の第2相の酵素活性（酵素活性、 $\mu\text{mol}/(\text{分} \times \text{gタンパク質})$ 、還元グルタチオン $\mu\text{mol}/\text{gタンパク質}$ ）の変化

10

実験群	分析パラメータの値				
	GR	GP	GST	G-6-PDG	GSH
コントロール	371.3 $\pm$ 15.8	71.2 $\pm$ 0.4	2281 $\pm$ 187	181.6 $\pm$ 12.9	23.68 $\pm$ 0.62
未補正	95.3 $\pm$ 11.7*	13.8 $\pm$ 0.2	1727 $\pm$ 86*	86.2 $\pm$ 7.7*	9.61 $\pm$ 0.02*
No 1 (GS (O) SG、 例1に従う化 合物)	117.8 $\pm$ 12.6**	27.9 $\pm$ 2.2**	1857 $\pm$ 120**	98.1 $\pm$ 13.3**	11.21 $\pm$ 0.56**
No 2 (GS SG、例2に 従う化合物)	125.6 $\pm$ 11.2**	24.5 $\pm$ 3.1**	1794 $\pm$ 165**	96.9 $\pm$ 18.7**	12.93 $\pm$ 1.15**
No 3 (GS SG+GS (O) SG、 例5に従う組 成物)	237.4 $\pm$ 23.1**	48.3 $\pm$ 5.9**	2117 $\pm$ 223**	133.1 $\pm$ 21.2**	17.87 $\pm$ 2.12**
No 4 (GS SG+GS (O) SG+ Pt-S、例 6に従う組成 物)	394.7 $\pm$ 37.4**	83.9 $\pm$ 7.1**	2310 $\pm$ 343**	189.7 $\pm$ 29.3**	36.12 $\pm$ 5.07**

20

30

40

*ー 有意差の信頼性 $p < 0.05$ 対コントロール群；

**ー 有意差の信頼性 $p < 0.05$ 対毒性剤投与動物群、未補正；

GRー グルタチオンレダクターゼ (XE1.6.4.2)；

GPー グルタチオンペルオキシダーゼ (XE1.11.1.9)；

GSTー グルタチオンSートランスフェラーゼ (XE2.5.1.18)；

G6PDGー グルコースー6ーホスフェートデヒドロゲナーゼ (XE1.1.1.49)；

GSHー 還元グルタチオン

【0126】

50

金属化合物を、特に白金の化合物 Pt-S を組成物に添加することは、グルタチオンジスルフィド及びグルタチオンジスルフィド S-オキシドの組成物が生体異物解毒の第 2 相の酵素の活性を誘導する能力を高め、それらに伴う重要な代謝物還元グルタチオンの交換の強度を増加させた。

【0127】

したがって、生体異物解毒の第 2 相の酵素の活性を誘導する能力を有する金属化合物、特に白金 Pt の化合物は、グルタチオンジスルフィド S-オキシド及びグルタチオンジスルフィドの組成物による生体異物解毒の第 2 相の酵素の誘導に起因して、その毒性修飾効果を増加させ、その結果として細胞保護効果を増加させる。

【0128】

例 14. グルタチオンジスルフィド S-オキシド及びその組成物のインターフェロン α の抗ウィルス作用に対する効果

グルタチオンジスルフィド S-オキシド及びその組成物（例 1、2、5、6）のインターフェロンの抗ウィルス作用に対する効果の実験を、感染細胞の培養物に対して行う。

【0129】

インターフェロンの抗ウィルス作用を評価するための方法は、 $\Lambda-68$ 株の細胞をウィルスの細胞傷害作用から保護するその最小量を特定することに基づいている。組成物を、インターフェロンを添加する前、インターフェロンと共に、並びにインターフェロン添加の 10 分後、30 分後、及び 60 分後に、細胞インキュベーション媒体に、 $0.0015 \mu\text{mol/ml}$ 、 $0.015 \mu\text{mol/ml}$ 、及び $0.15 \mu\text{mol/ml}$ の濃度まで添加する。この実験におけるインターフェロンの力価は、 $4 \times 10^{-4} \text{U/ml}$ 、 $8 \times 10^{-4} \text{U/ml}$ 、 $1.6 \times 10^{-5} \text{U/ml}$ 、 $3.2 \times 10^{-5} \text{U/ml}$ 、 $6.4 \times 10^{-5} \text{U/ml}$ 、 $1.28 \times 10^{-6} \text{U/ml}$ 、 $2.56 \times 10^{-6} \text{U/ml}$ 、 $5.12 \times 10^{-6} \text{U/ml}$ であった。製剤の抗ウィルス作用は、クリスタルバイオレットを吸収する生細胞の能力によって評価した。吸収されたクリスタルバイオレットの量は、生細胞画分の分離及びメタノールによる染料の抽出の後、 595nm での光度測定によって特定した。吸収された染料の量は、生細胞の数に比例し、光学密度として表した。

【0130】

この実験用に $\Lambda-68$ 細胞株を調製する。

【0131】

$\Lambda-68$ 細胞株は、Russian Academy of Medical Sciences (RAMS) の Moscow Research Institute of Viral Preparations (MRIVP) から入手した、腫瘍、性病、肝炎、結核、遺伝的及び先天性異常を有しない 28 歳女性からの 11 週ヒト中絶胚の肺細胞由来のヒト胚性肺の二倍体細胞株である。

【0132】

二倍体細胞株 $\Lambda-68$ のシードバンクは、L. A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations (SISC) と共に、MRIVP RAMS において、免疫生物学的製剤の調製について認可されている。

【0133】

$\Lambda-68$ 株の細胞を、完全増殖培地 I 中、 37°C で培養した。培養は、 250ml のプラスチックバイアル（「Costar」型）中で行う。細胞は、バイアルの底を覆い、二倍体線維芽細胞に特徴的な形態を有する単層を形成した。扁平な細胞 (flatted cells) を、等量部の $0.02\% \text{Versene}$ 液及び 0.25% トリプシン溶液から成る特別媒体を用いて懸濁させた。これを行うために、細胞の単層を形成したバイアルから完全増殖培地を排出し、単層を特別媒体（トリプシンを含む Versene 液）で 2 回洗浄し、 37°C で 5 分間インキュベートした。この間に、線維芽細胞の単層がプラスチックから剥離した。剥離した細胞を、完全増殖培地で希釈し、複数回のピペット操作によって細胞集合

10

20

30

40

50

体をばらした。滅菌遠心分離チューブに細胞を移し、1200rpmで10分間遠心分離した。上澄を排出し、細胞を完全増殖培地に移した。次に、Gorjajevチャンバーで細胞数を計数し、この実験で用いた。

【0134】

活性及び毒性の特定には、20以上30以下の継代数で継代培養した細胞培養物を用いることができる。

【0135】

水疱性口内炎ウィルスの調製

実験のために、滅菌条件下でガラスアンプルに密封包装された凍結乾燥水疱性口内炎ウイルス(VSV)を用いた。

【0136】

ウィルスを、L-929細胞株上で増殖させた。これを行うために、予め滴定した用量のウィルスを、完全培地中に細胞の単層を形成したバイアルに添加した(VSVの感染力価は、37℃、1日間で細胞の単層の完全な破壊を引き起こしたウィルスの最大希釈とした)。バイアルの内容物を、37℃で1日間培養し、その後、培地を滅菌50mlチューブに排出し、2000rpmで遠心分離した。さらに、水疱性口内炎ウィルスを含有する得られた上澄の1mlアリコート、滅菌条件下でアンプルに分配し、凍結乾燥した。

【0137】

ウィルスの感染力価の特定

0.2mlの体積中 5×10^4 細胞/ウェルの濃度の完全培地1に懸濁させて調製した π -68株の細胞を、96ウェルプレート(「Costar」型)に添加した。この後、プレートを、5%CO₂を含有する雰囲気中のCO₂インキュベータ中、37℃で1日間インキュベートした。この間に、細胞はウェルを覆い、連続単層を形成した。1日後、培地を滅菌条件下でデカントし、予め調製しておいたウィルスの2倍希釈物を、4つの反復サンプルとしてプレートのウェルに添加した。VSVウィルスを、0.2mlの体積の完全培地に添加した。次に、上記で述べた条件下でプレートをインキュベートした。インキュベーションの終了後(1日後)、培地をデカントし、20%メタノール中のクリスタルバイオレットの0.2%溶液0.05mlを、ウェルに添加した。10分後、染料を取り除き、プレートを水流下で洗浄し、乾燥した。さらに、染料を溶液中に溶出させるために、0.1mlの溶解緩衝液をプレートに添加した。染色の強度を、マイクロプレートリーダー上、595nmで記録した。

【0138】

これらの条件下で1日のうちにウェル中の細胞単層の完全な破壊を引き起こすウィルスの最大希釈を、ウィルスの感染力価と見なす。これらのウェル中の溶液の光学密度は、最小限であり、バックグラウンド値に近い。

【0139】

活性の特定

完全増殖培地中、標準活性サンプルの2倍希釈物(予測される力価の上及び下)を調製し(42-28-119-96P; L. A. Tarasevich SISC)、その活性は、国際単位IUで表した。標準の希釈は、0.1mlの体積で96ウェルプレート(「Costar」型)中で行い、各希釈に対して少なくとも4つのウェルを用いた。プレートの1つの列は、培地のコントロール(4ウェル)及びVSVウィルスの用量のコントロール(4ウェル)に残した。これらのウェルに、0.1mlを添加した。標準の希釈後、0.1mlの体積中 5×10^4 細胞/ウェルの濃度の完全培地1に懸濁させて調製した π -68株の細胞を、プレートに添加した。この後、実験画分：

- 1- グルタチオンジスルフィドS-オキシド(例1で得た化合物)；
- 2- グルタチオンジスルフィド(例2で得た化合物)；
- 3- グルタチオンジスルフィドS-オキシドとグルタチオンジスルフィドとの組成物(例5で得た組成物)；
- 4- グルタチオンジスルフィドS-オキシドとグルタチオンジスルフィド及び金属、

10

20

30

40

50

白金化合物 Pt-S シスプラチン、との組成物（例 6 で得た組成物）

を、希釈標準を含む列の一部に、ある特定の時間間隔で、 $0.0015 \mu\text{mol/ml}$ 、 $0.015 \mu\text{mol/ml}$ 、及び $0.15 \mu\text{mol/ml}$ の濃度で添加した。次に、各プレートを、 $5\% \text{CO}_2$ を含有する雰囲気中の CO_2 インキュベータ中、 37°C で 1 日間インキュベートした。この間に、細胞はウェルを覆い、連続単層を形成する。1 日後、完全増殖培地を滅菌条件下でデカントし、所定の感染力価の VSV ウィルスを各プレートのウェルに添加した。完全培地中、 0.2 ml の体積の VSV ウィルスを添加した。VSV ウィルスを含まない同じ培地の 0.2 ml を、培地コントロールとしてウェルに添加した。この後、各プレートを、上記で述べた条件下でインキュベートした。インキュベーションの終了後（1 日後）、培地をデカントし、 20% メタノール中のクリスタルバイオレットの 0.2% 溶液 0.05 ml を、ウェルに添加した。10 分後、染料を取り除き、ディッシュを水流下で洗浄し、乾燥した。培地コントロールウェルでは、着色した単層は、破壊の徴候を示していないはずである。さらに、染料を溶液中に溶出させるために、 0.1 ml の溶解緩衝液をプレートに添加した。染色の強度を、マイクロプレートリーダー上、 595 nm で記録した。

10

【0140】

ウェルの 50% で細胞培養物をウィルスの細胞傷害効果から完全に保護する製剤の希釈率の逆数値を、インターフェロンの力価と見なす。

【0141】

実験結果

細胞を各試験化合物と共に予めインキュベートすることは、インターフェロンの抗ウィルス作用に対してまったく影響を与えないことが実験的に確立された。

20

【0142】

インターフェロンの後に各組成物を添加した実験の結果は、細胞のインターフェロンへの曝露後 30 分以降に組成物を添加した場合、実質的にすべての試験物質がインターフェロンの有効性を増加させる能力を有することを指し示している。

【0143】

試験物質は、 $6.4 \times 10^{-5} \sim 1.28 \times 10^{-6}$ のインターフェロン力価において様々な度合いで有効性を増加させ、このことは、インターフェロンのみが作用した実験と比較して、いずれかの物質と一緒にインターフェロンが作用した実験の方が光学密度の増加が大きいことによって示された。

30

【0144】

いずれかの組成物とのインターフェロンの有効性の増加のより信頼できる値を特定するために、その作用が示されたインターフェロンの希釈物に対するより多数の実験データを得るために、実験を行った。

【0145】

【表 7】

表 7 インターフェロン有効性増加の定量的値（光学密度の単位として表す）

インターフェロン α の希釈率	媒体コントロール	インターフェロン α 標準	インターフェロン α 標準 + 例 1 に従う物質	インターフェロン α 標準 + 例 2 に従う物質	インターフェロン α 標準 + 例 5 に従う物質	インターフェロン α 標準 + 例 6 に従う物質	観察サンプル数
0.64×10^{-6}	$2.703 \pm 0.089^*$	$1.59 \pm 0.131^*$	$1.73 \pm 0.076^*$	$1.79 \pm 0.079^*$	$1.91 \pm 0.096^*$	$2.57 \pm 0.098^*$	n = 21
1.28×10^{-6}	$2.728 \pm 0.172^{**}$	$0.905 \pm 0.088^{**}$	$1.03 \pm 0.097^{**}$	$1.01 \pm 0.137^{**}$	$1.72 \pm 0.133^{**}$	$2.34 \pm 0.118^{**}$	n = 19

* $P < 0.1$ * * $P < 0.05$

【0146】

得られた結果は、すべての試験組成物が、インターフェロン後に添加される場合、インターフェロン α の抗ウィルス作用を、そのある特定の範囲の濃度において増加させることを示している。インターフェロンの前に投与される場合における、又はインターフェロンと共投与される場合における組成物の効果の類似の性質は、培地中に酸化剤が存在しないこと、又は酸化剤の量が比較的不充分であることに起因する。培地の複雑な組成は、培地から細胞内空間に向かっての少量の活性成分の比較的速い消滅に繋がる。向性細胞（tropic cells）へのインターフェロンの作用は、酸化剤の産生を伴っているが、十分な量のその産生の時間は、金属配位化合物が培地中で費やす時間を超えている。先行するインターフェロンの添加及びその向性細胞への効果は、これらの細胞による酸化剤の産生を促進し、これは、続いて、インターフェロン受容体を含む様々な受容体のスルフヒドリル基への触媒作用に用いられ、最終的には、中でも、インターフェロンと相互作用する細胞の数を増加させることに寄与し、そしてこのことは、その抗ウィルス効果の向上を決定する。

【0147】

したがって、すべての試験物質は、インターフェロン α の作用の有効性を増加させることができるが、組成物の製剤中にある金属配位化合物は、その作用を大きく増強し、インターフェロン α との受容体媒介相互作用を起こすことができる細胞の数を増加させる。ここで、例 1 及び 2 に従って得た物質によるインターフェロン α の抗ウィルス作用の増強は、実質的に一致しており、異なる希釈において 9 ~ 10 % であることには留意されたい。例 5 に従う組成物の形態での例 1 及び 2 に従う物質の組み合わせた作用により、より低い希釈率におけるインターフェロン α の抗ウィルス効果のさらなる向上（最大 18 %）を、インターフェロン α の大きい希釈率では、すなわち、インターフェロン α のより低い用量においては、ほぼ 2 倍の増幅を得ることが可能となる。例 6 に従う組成物を用いた場合にも、類似のパターンが見出されており、インターフェロン α の抗ウィルス効果は、より顕著であり、特に、低希釈率では 50 % 増加し、より大きい希釈率では 2.5 倍増加した。治療用量でのインターフェロン α の抗ウィルス効果は、インターフェロン α の製剤を受けている患者のうちの 72 % での用量依存性の副作用及び毒性効果の発生を伴う。インフルエンザ様症状、胃腸障害及び心因性障害、骨髄抑制の徴候、甲状腺及び副甲状腺の機能障害、患者の内在性インターフェロン α に対する自己抗体のプールの形成が、実施された治療

10

20

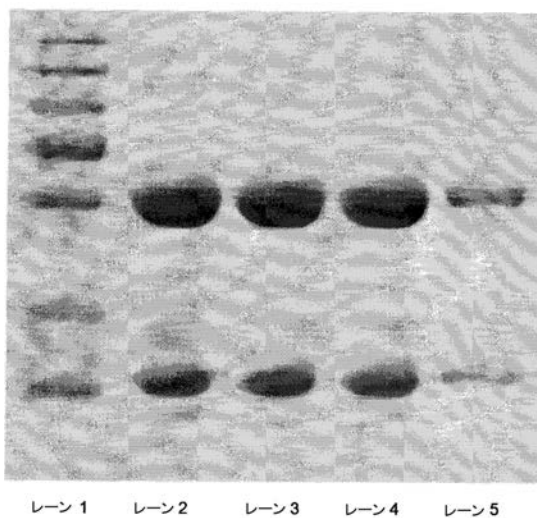
30

40

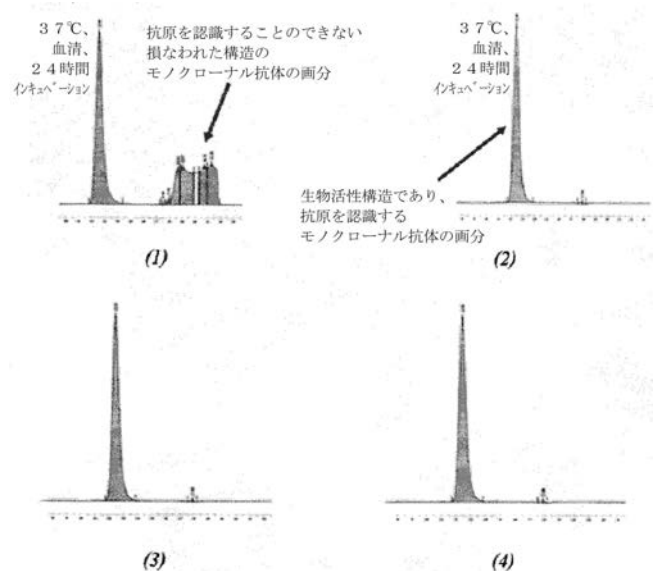
50

法の負の発現の中でも最も頻繁に報告されている。例5又は6に従う組成物と組み合わせてより低い治療用量でインターフェロン α を用いることの可能性は、インターフェロン α に対する様々な副作用及び毒性の用量依存性の反応を大きく低減することを可能とするものである。

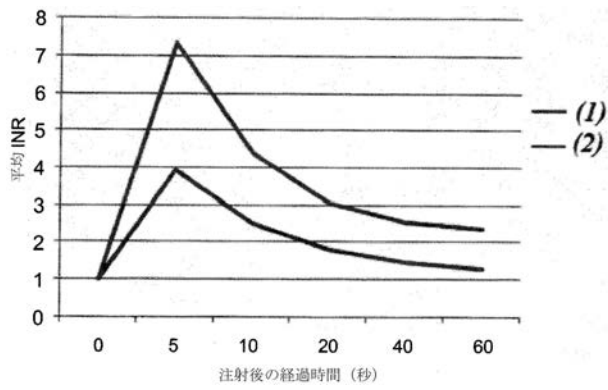
【図1】



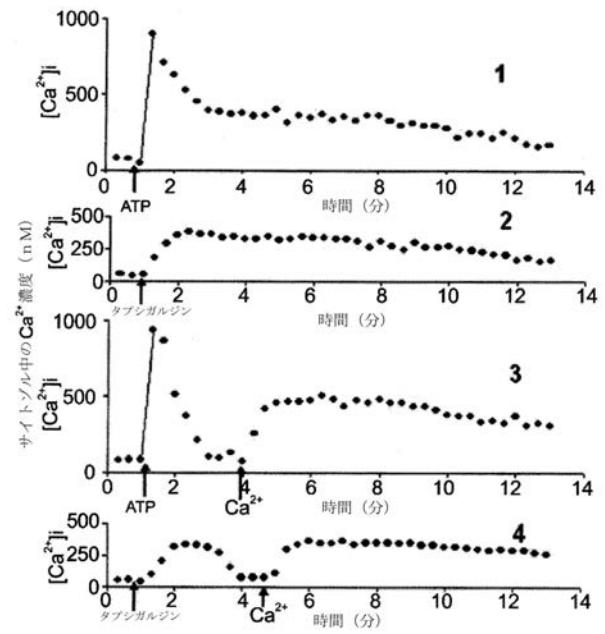
【図2】



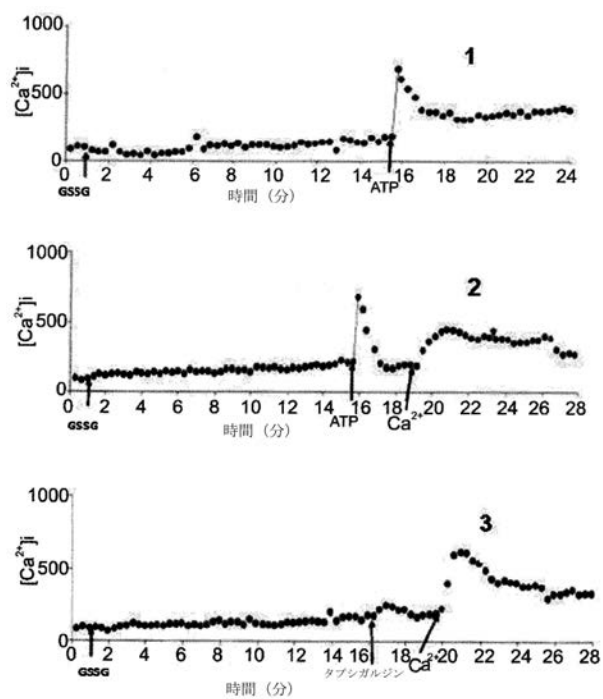
【図 3】



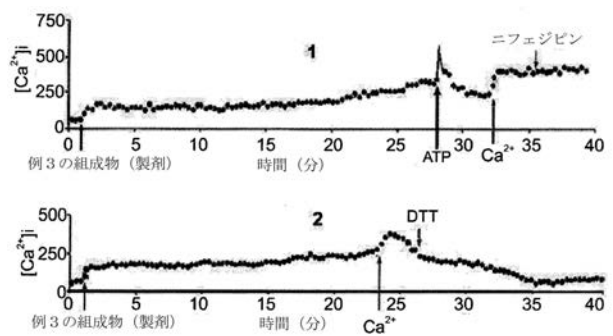
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【手続補正書】

【提出日】平成31年4月10日(2019.4.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

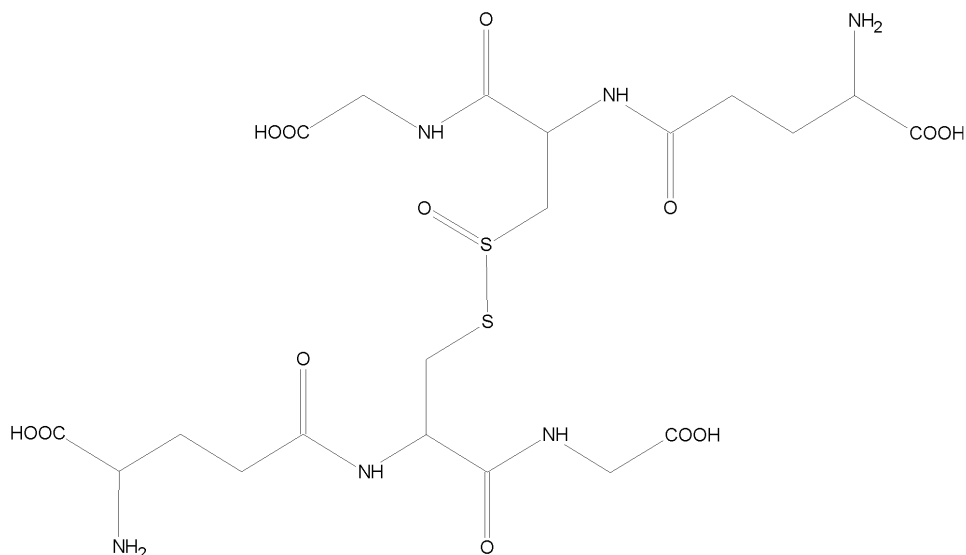
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬組成物であって、該医薬組成物が、グルタチオンジスルフィド又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩、Me-S-グルタチオン結合を含有する配位化合物として示される金属 (Me)、及び以下の構造のグルタチオンジスルフィド S-オキシド：

【化 1】



又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩を含む、医薬組成物。

【請求項 2】

グルタチオンジスルフィド S-オキシドの量が、前記全組成物に対して 0.01～10 重量%である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記金属が、白金族から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記金属が、白金である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物中の d-金属の量が、前記組成物の 1 kg あたり 1×10^{-10} モル～ 1×10^{-3} モルの範囲内である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記組成物中の d-金属の量が、前記組成物の 1 kg あたり 1×10^{-5} モルである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量依存性の毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための薬理学的組み合わせであって、該薬理学的組み合わせが、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の組成物、及び抗凝固剤、第 Xa 因子阻害剤、抗微生物剤又は抗ウィルス剤、カルシウムチャネル阻害剤の群から選択される薬理

活性化化合物を含む、薬理的組み合わせ。

【請求項 8】

前記組み合わせを、血栓症の治療法に用いることができ、前記薬理活性化化合物が、抗凝固剤、第 X a 因子阻害剤のアミジン塩酸塩である、請求項 7 に記載の組み合わせ。

【請求項 9】

前記組み合わせを、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス・エルジノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、及びリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) E G D、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、MRSA—メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスを含むグラム陰性細菌並びにグラム陽性細菌によって引き起こされる感染性疾患の治療に用いることができ、前記薬理活性化化合物が、抗微生物剤のモキシフロキサシンである、請求項 7 に記載の組み合わせ。

【請求項 10】

前記薬理活性化化合物が、広範囲の抗ウィルス作用を有する抗ウィルス剤—インターフェロナルファである、ウィルス性疾患の治療法のための、請求項 7 に記載の組み合わせ。

【請求項 11】

前記薬理活性化化合物が、抗狂犬病ワクチンの抗原性物質である、狂犬病を予防するための、請求項 7 に記載の組み合わせ。

【請求項 12】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬であって、該医薬が、治療有効量の請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの組成物を、医薬的に許容される賦形剤と共に含む、医薬。

【請求項 13】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬であり、該医薬が、治療有効量の請求項 7 ~ 11 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの組み合わせを、医薬的に許容される賦形剤と共に含む、医薬。

【請求項 14】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、外用、吸入、経腸、又は非経口投与用に製造することができる、請求項 12 又は 13 に記載の医薬。

【請求項 15】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 16】

前記組成物が、さらに、好ましくは白金族からの、さらにより好ましくは白金である d—金属 (Me) を含み、該 d—金属が、Me—S—グルタチオン結合を含有する配位化合物の形態で示され、患者に投与される前記 d—金属配位化合物の量が、 $10^{-3} \sim 10^{-15} \text{ mol/kg}$ 体重である、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、請求項 7 ~ 11 のいずれか一項に記載の薬理的組み合わせの使用。

【請求項 18】

前記薬理活性化化合物が、血栓症の治療法のための、抗凝固剤、第 X a 因子阻害剤のアミジン塩酸塩である、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

前記薬理活性化化合物が、大腸菌、シュードモナス・エルジノーサ、アシネトバクター・

バウマンニ、及びリステリア・モノサイトゲネス E G D、スタフィロコッカス・アウレウス、MRSA－メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスを含むグラム陰性細菌並びにグラム陽性細菌によって引き起こされる感染性疾患の治療のための、抗微生物剤のモキシフロキサシンである、請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 2 0】

前記薬理活性化合物が、ウィルス性疾患の治療のための、抗ウィルス剤のインターフェロナルファである、請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 2 1】

前記薬理活性化合物が、狂犬病を予防するための抗狂犬病ワクチンの抗原性物質である、請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 2 2】

前記薬理学的組み合わせの投与が、吸入、経腸、又は非経口投与によって行われる、請求項 1 7 に記載の使用。

【手続補正書】

【提出日】 令和1年12月16日 (2019.12.16)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

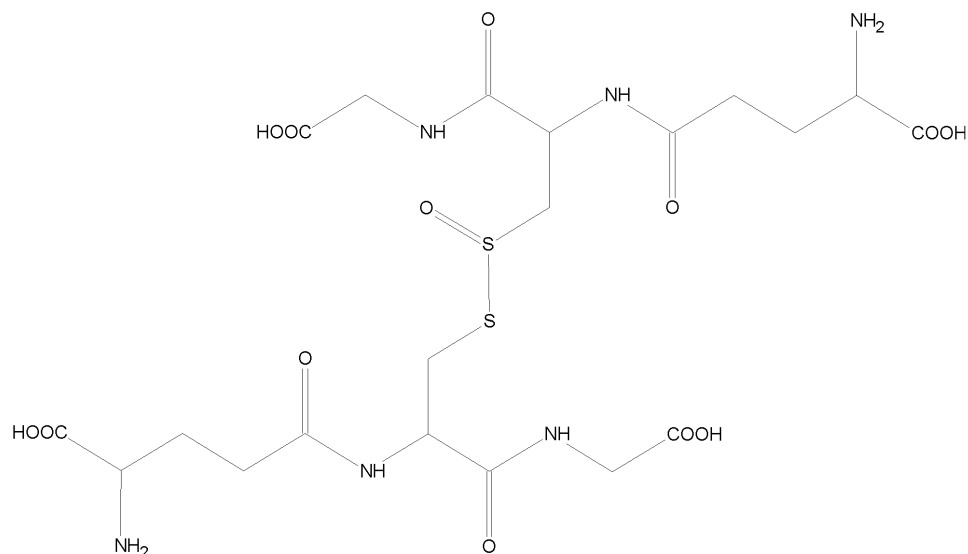
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬組成物であって、該医薬組成物が、グルタチオンジスルフィド又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩、Me－S－グルタチオン結合を含有する配位化合物として示される金属（Me）、及び以下の構造のグルタチオンジスルフィド S－オキシド：

【化 1】



又はその医薬的に許容される有機若しくは無機塩を含む、医薬組成物。

【請求項 2】

グルタチオンジスルフィド S－オキシドの量が、前記全組成物に対して 0.01～10 重量％である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記金属が、白金族から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記金属が、白金である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物中の d-金属の量が、前記組成物の 1 kg あたり 1×10^{-10} モル～ 1×10^{-3} モルの範囲内である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記組成物中の d-金属の量が、前記組成物の 1 kg あたり 1×10^{-5} モルである、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量依存性の毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための薬理学的組み合わせであって、該薬理学的組み合わせが、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物、及び抗凝固剤、第 Xa 因子阻害剤、抗微生物剤又は抗ウィルス剤、カルシウムチャネル阻害剤の群から選択される薬理活性化合物を含む、薬理学的組み合わせ。

【請求項 8】

前記組み合わせを、血栓症の治療法に用いることができ、前記薬理活性化合物が、抗凝固剤、第 Xa 因子阻害剤のアミジン塩酸塩である、請求項 7 に記載の組み合わせ。

【請求項 9】

前記組み合わせを、大腸菌 (*Escherichia coli*)、シュードモナス・エルジノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、及びリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) EGD、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、MRSA-メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスを含むグラム陰性細菌並びにグラム陽性細菌によって引き起こされる感染性疾患の治療に用いることができ、前記薬理活性化合物が、抗微生物剤のモキシフロキサシンである、請求項 7 に記載の組み合わせ。

【請求項 10】

前記薬理活性化合物が、広範囲の抗ウィルス作用を有する抗ウィルス剤-インターフェロナルファである、ウィルス性疾患の治療法のための、請求項 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の組み合わせ。

【請求項 11】

前記薬理活性化合物が、抗狂犬病ワクチンの抗原性物質である、狂犬病を予防するための、請求項 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の組み合わせ。

【請求項 12】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬であって、該医薬が、治療有効量の請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの組成物を、医薬的に許容される賦形剤と共に含む、医薬。

【請求項 13】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための医薬であり、該医薬が、治療有効量の請求項 7 ～ 11 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの組み合わせを、医薬的に許容される賦形剤と共に含む、医薬。

【請求項 14】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、外用、吸入、経腸、又は非経口投与用に製造することができる、請求項 12 又は 13 に記載の医薬。

【請求項 15】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 16】

前記組成物が、さらに d-金属 (Me) を含み、該 d-金属が、Me-S-グルタチオン結合を含有する配位化合物の形態で示され、患者に投与される前記 d-金属配位化合物の量が、 $10^{-3} \sim 10^{-15} \text{ mol/kg}$ 体重である、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

感染性疾患及び非感染性疾患の治療において、薬理活性化合物の用量関連毒性を排除するため及び治療活性を向上させるための、請求項 7～11 のいずれか一項に記載の薬理学的組み合わせの使用。

【請求項 18】

前記薬理活性化合物が、血栓症の治療法のための、抗凝固剤、第 Xa 因子阻害剤のアミジン塩酸塩である、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

前記薬理活性化合物が、大腸菌、シュードモナス・エルジノーサ、アシネトバクター・バウマンニ、及びリステリア・モノサイトゲネス EGD、スタフィロコッカス・アウレウス、MRSA-メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウスを含むグラム陰性細菌並びにグラム陽性細菌によって引き起こされる感染性疾患の治療のための、抗微生物剤のモキシフロキサシンである、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 20】

前記薬理活性化合物が、ウィルス性疾患の治療のための、抗ウィルス剤のインターフェロナルファである、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 21】

前記薬理活性化合物が、狂犬病を予防するための抗狂犬病ワクチンの抗原性物質である、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 22】

前記薬理学的組み合わせの投与が、吸入、経腸、又は非経口投与によって行われる、請求項 17 に記載の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/RU2018/000471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P43/00 A61K39/205 A61K38/06 A61K38/21 A61K31/155 A61K31/4709 A61K33/24 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI JUNFA ET AL: "Glutathiolation of proteins by glutathione disulfide S-oxide derived from S-nitrosoglutathione: Modifications of rat brain neurogranin/RC3 and neuromodulin/GAP-43", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 276, no. 5, 2 February 2001 (2001-02-02), pages 3098-3105, XP009510493, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M008260200 abstract Materials and methods: Purification of the Various Glutathione Derivatives of GSNO; figure 2 ----- -/--	1,2
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 January 2019		12/02/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Böhmerova, Eva

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/RU2018/000471

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/054580 A1 (KOZHEMYAKIN LEONID A [RU] ET AL) 10 March 2005 (2005-03-10) the whole document -----	1-23
A	US 6 013 632 A (JONES DEAN P [US] ET AL) 11 January 2000 (2000-01-11) the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/RU2018/000471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005054580 A1	10-03-2005	AT 279431 T	15-10-2004
		AU 2582800 A	13-06-2000
		CA 2351354 A1	02-06-2000
		CN 1371388 A	25-09-2002
		DE 69921175 T2	30-06-2005
		EP 1131340 A2	12-09-2001
		ES 2233100 T3	01-06-2005
		HK 1042306 A1	06-05-2005
		JP 3547400 B2	28-07-2004
		JP 2002538079 A	12-11-2002
		OA 11714 A	18-01-2005
		RU 2144374 C1	20-01-2000
		RU 2153350 C1	27-07-2000
		US 2005054580 A1	10-03-2005
		WO 0031120 A2	02-06-2000
US 6013632 A	11-01-2000	AT 444760 T	15-10-2009
		AU 5910998 A	03-08-1998
		CA 2277911 A1	16-07-1998
		EP 1007077 A1	14-06-2000
		JP 4578578 B2	10-11-2010
		JP 2001511770 A	14-08-2001
		US 6013632 A	11-01-2000
		US 6107281 A	22-08-2000
		WO 9830228 A1	16-07-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 K	38/21	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 7 1

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 アントノフ, ヴィクター ジョージヴィッチ

ロシア連邦 1 8 8 6 4 0 レニングラードスカヤ オーブラスチ ウセボロジスク ウーリツ
 ア ヴォッカ 1 4 クバルチーラ 2 7

(72)発明者 イグナテンコ, オレグ アレクサンドロヴィッチ

ロシア連邦 1 9 5 2 2 0 サンクトペテルブルク クシェレフスカヤ ダローガ 3 コルプス
 3 リト. エー クバルチーラ 7 9

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA19 BA01 BA15 DA22 MA52 MA55 MA63 NA05

ZA542 ZB092 ZB322 ZB332 ZC751

4C086 AA01 AA02 HA12 MA01 MA02 MA04 MA52 MA55 MA63 NA05

ZA54 ZB09 ZB32 ZB33 ZC75

【要約の続き】

