

(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2014-526511

(P2014-526511A)

(43) 公表日 平成26年10月6日 (2014. 10. 6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 33/04 (2006. 01)	A 6 1 K 33/04	4 C 0 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 2 3	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/48 (2006. 01)	A 6 1 K 9/48	
A 6 1 K 9/107 (2006. 01)	A 6 1 K 9/107	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-530796 (P2014-530796)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月13日 (2012. 9. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月28日 (2014. 4. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/055205
 (87) 国際公開番号 W02013/040240
 (87) 国際公開日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)
 (31) 優先権主張番号 61/534, 585
 (32) 優先日 平成23年9月14日 (2011. 9. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514061072
 メエヴァス オルタナティヴァス ナチュ
 ラルズ, エス. エー. ビー. アイ. デ シ
 ー. プイ.
 メキシコ合衆国 シー. ビー. 6 4 3 2
 O メエボ レオン, モンテレイ, コル
 ミトラス ノルテ, リオ グリハルバ ナ
 ンバー 2 0 8
 (71) 出願人 509304896
 エモリー ユニバーシティ
 アメリカ合衆国, ジョージア州 3 0 3 2
 2, アトランタ, 4階, エヌイー, クリフ
 トン ロード 1 5 9 9, オフィス オブ
 テクノロジー トランスファー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄の調製及び組成物並びにその使用

(57) 【要約】

本発明は、高い生物学的利用率の硫化水素プロドラッグとして安全かつ有効である硫黄に富む組成物及びその調製物を特徴とする。本発明は、硫黄に富む組成物を用いて酸化ストレスに関連する病的状態を治療する方法も含む。本発明は、全身の健康状態を保存及び促進するための解毒剤及び医療食品としての硫黄に富む組成物をさらに含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤も含む組成物の有効量を投与することによって、その必要のある対象において酸化ストレスに関連する状態を治療する方法。

【請求項 2】

前記組成物が約99%(w/w)のゼロ価硫黄及び約1%(w/w)の高極性構成要素を含み、前記高極性構成要素が硫酸ナトリウム、ポリチオン酸ナトリウム及びチオ硫酸ナトリウムから選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記高極性構成要素が、ポリチオン酸ナトリウム、ポリチオン酸カリウム、ポリチオン酸アンモニウム、ポリチオン酸カルシウム、チオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、チオ硫酸アンモニウム、チオ硫酸カルシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素カリウム、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸水素カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、塩化カルシウム、酢酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、パルミチン酸カリウム及びラウリン酸アンモニウムからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

元素状アルファ硫黄及び1つ以上の高極性構成要素を、元素状アルファ硫黄を約10から約150部に対して高極性構成要素を1部の比(w/w)で含む、腸内、局所又は非経口投与用の組成物の有効量を投与することによって、その必要のある対象における酸化ストレスに関連する状態を治療する方法。

【請求項 5】

前記組成物が腸内投与のために製剤化され、前記元素状アルファ硫黄及び前記高極性構成要素が400mgの量で共に存在する、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記組成物がカプセルである、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記組成物が局所投与用に製剤化され、前記組成物が1～20%のゼロ価硫黄含有量を有する、請求項2に記載の方法。

【請求項 8】

前記組成物がクリームである、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記クリームが(i)5～20%のゼロ価硫黄含有量及び(ii)ポリエチレングリコール又は石油ゼリーを含む、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記クリームが5～15%のゼロ価硫黄含有量を有する、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

第三の薬物をさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 12】

前記第三の薬物が心血管疾患剤、抗炎症剤、抗神経変性剤又は抗癌剤/抗増殖剤である、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記元素状アルファ硫黄、前記高極性構成要素及び前記第三の薬物が酸化ストレスに関連する状態を治療するための有効量で存在する、請求項11に記載の方法。

【請求項 14】

酸化ストレスに関連する前記状態が、統合失調症、双極性障害、脆弱X症候群、鎌形赤血球症、慢性疲労症候群、変形性関節症白内障、黄斑変性症、中毒性肝炎、ウイルス性肝炎、肝硬変、慢性肝炎、透析からの酸化ストレス、腎毒性、腎不全、潰瘍性大腸炎、細菌感染、HIV及びAIDSなどのウイルス感染、ヘルペス、耳感染症、上気道疾患、高血圧、脱

10

20

30

40

50

毛及び抜け毛、男性不妊症、運動能力に関連するオーバートレーニング症候群、水虫、乾癬、湿疹、強皮症、アトピー性皮膚炎、多発性筋炎、酒さ、疱疹状皮膚炎、他の神経変性疾患、他の炎症性疾患並びに癌からなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項 15】

酸化ストレスに関連する前記状態が心血管疾患である、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記心血管疾患が、動脈硬化、冠動脈心疾患、虚血、内皮機能障害(特に血管弾性に影響を及ぼす機能障害)、再狭窄、血栓症、狭心症、高血圧、心筋症、高血圧性心疾患、心不全、肺性心、不整脈、心内膜炎、炎症性心拡大、心筋炎、心筋梗塞、心臓弁膜症、発作及び脳血管性疾患、大動脈弁狭窄、うっ血性心不全並びに末梢動脈疾患からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

10

【請求項 17】

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物の有効量を投与することによって、硫黄栄養欠乏を有する対象における硫化水素レベルを増大させる方法。

【請求項 18】

第三の薬物をさらに含む、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記第三の薬物が栄養補助食品である、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記元素状アルファ硫黄、前記高極性構成要素及び前記第三の薬物が全身の健康状態を促進又は維持するための有効量で存在する、請求項18に記載の方法。

20

【請求項 21】

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物を投与することによって心血管疾患の治療を評価するための方法であって、前記方法が、

前記対象由来の試料中の硫化水素のレベルを決定すること、

前記心血管疾患を治療するために十分な量に前記組成物の投与量を調整すること、を含み、

硫化水素のレベルの増大又は心血管系パラメーターの改善が前記心血管疾患の治療をもたらす、前記方法。

30

【請求項 22】

前記心血管系パラメーターが、拡張末期容積(EDV)、収縮末期容積(ESV)、1回拍出量、駆出率、心拍数及び心拍出量からなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる米国仮特許出願第61/534,585号、2011年9月13日出願の利益を主張する。

40

【0002】

一般に本発明は、ゼロ価硫黄に富む組成物及び調製方法、製剤並びに酸化ストレスに関連する病的状態の予防及び治療を特徴とする。

【背景技術】

【0003】

血圧を低下させる、コレステロールを低減する及び心血管系状態を治療するための多数の薬物療法にもかかわらず、心血管疾患は合衆国における死因の第1位であり続けている。心血管障害の発生率は、「ベビーブーム」世代が高齢化し、肥満及び糖尿病の率が上昇を続けているのに伴って上昇を続ける可能性がある。したがって、より良い療法の開発は何よりも重要である。

50

【 0 0 0 4 】

硫化水素(H_2S)は、免疫及びミトコンドリア機能を調節し、抗酸化物質として直接的及び間接的の両方で作用し、種々の機序によって血流を増大させることが示されている内因性シグナル伝達分子であると考えられている。加えて、硫化水素は、強力な抗炎症剤及び細胞死の調節因子である。この多血特性は、硫化水素を心血管疾患、癌、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS並びに酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡及び/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態の治療のための理想的な候補にする。

【 0 0 0 5 】

H_2S の主な生理学的役割は、正常(すなわち非癌化)細胞及び組織ではシグナル伝達及び細胞保護である一方で、癌化(すなわち悪性)細胞では H_2S が酸化促進及びアポトーシス促進性効果を示すことはいまや明らかである。これらの効果は、癌及び他の過剰増殖疾患などの制御されていない細胞増殖に関連する状態を治療するための新規の治療的及び/又は予防的手法を開発するための基礎を構成する。

10

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

硫化水素は、内因的には酵素、シスタチオニンペータ合成酵素、シスタチオニンガンマ-リアーゼ及び3-メルカプトビルビン酸硫黄トランスフェラーゼによってシステインから産生される。硫化水素プロドラッグは、身体において硫化水素のための外因供給を提供できるが、現在用いられている硫化水素プロドラッグは、57%以下の生理活性硫黄(in vivoで硫化水素に転換されうる硫黄)を含有する。一方で57%の生理活性硫黄を含有する硫化水素ナトリウム(NaHS 、水硫化ナトリウムとしても知られる)が哺乳動物の身体に注射された場合に急激かつ未制御なやり方で硫化水素を放出することが次第に明らかになったが、細胞又は組織がそのようなやり方で生成された H_2S に暴露される可能性は極めて低い。したがって、安全かつ有効であり、経口投与された場合に活性であり、制御された持続的なやり方で H_2S を放出し、心血管疾患、癌、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS並びに酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡及び/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態の治療のための高い生物学的利用率を有する硫化水素プロドラッグを同定する必要がある。

20

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、90~99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01~10%(w/w)の高極性構成要素を含む組成物を特徴とする。特定の実施形態では組成物は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を場合により含む。他の実施形態では組成物は、約99%(w/w)のゼロ価硫黄及び約1%(w/w)の高極性構成要素を含む場合があり、高極性構成要素は硫酸ナトリウム、ポリチオン酸ナトリウム及びチオ硫酸ナトリウムから選択される。

【 0 0 0 8 】

元素状アルファ硫黄及び1つ以上の高極性構成要素を、元素状アルファ硫黄を約10から約150部に対して高極性構成要素を1部の比(w/w)で含む、腸内、局所又は非経口投与用の組成物も特徴とする。特定の実施形態では元素状アルファ硫黄の高極性構成要素に対する比は、15:1、20:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、110:1、120:1、130:1、140:1又は145:1である。

40

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では本発明の組成物は、腸内投与のために製剤化され、元素状アルファ硫黄及び高極性構成要素は400mgの量で共に存在する。本実施形態の一態様では組成物は、カプセルである。

【 0 0 1 0 】

他の実施形態では本発明の組成物は局所投与のために製剤化され、組成物は1~20%のゼロ価硫黄含有量を含む。本実施形態の一態様では組成物は、クリームである。一態様では

50

クリームは(i)5~20%のゼロ価硫黄含有量及び(ii)ポリエチレングリコール又は石油ゼリーを含む。別の態様ではクリームは、5~15%のゼロ価硫黄含有量を含む。特定の実施形態ではクリームは、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%又は19%のゼロ価硫黄含有量を含む。

【0011】

上に記載の任意の組成物について高極性構成要素は、ポリチオン酸ナトリウム、ポリチオン酸カリウム、ポリチオン酸アンモニウム、ポリチオン酸カルシウム、チオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、チオ硫酸アンモニウム、チオ硫酸カルシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素カリウム、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸水素カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、塩化カルシウム、酢酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、パルミチン酸カリウム及びラウリン酸アンモニウムからなる群から選択されうる。

10

【0012】

特定の実施形態では本発明の組成物は、第三の薬物をさらに含む。いくつかの実施形態では第三の薬物は、心血管疾患剤、抗炎症剤、抗神経変性剤又は抗癌剤/抗増殖剤である。他の実施形態では第三の薬物は、栄養補助食品である。本発明の特定の態様では元素状アルファ硫黄、高極性構成要素及び第三の薬物は、酸化ストレスに関連する状態を治療するための有効量で存在する。他の態様では元素状アルファ硫黄、高極性構成要素及び第三の薬物は、全身の健康状態を促進又は維持するための有効量で存在する。

20

【0013】

本発明は、90~99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01~10%(w/w)の高極性構成要素を含む組成物を調製するための方法も特徴とし、前記方法は、(a)⁻²(マイナス2)酸化状態にある硫黄を含む第一無機化合物を提供するステップ、(b)第一無機化合物を⁺⁴(プラス4)酸化状態にある硫黄を含む第二化合物及び場合により酸と反応させるステップであって、前記反応が90~99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01~10%(w/w)の高極性構成要素を含む組成物を産生するステップを含む。

【0014】

一実施形態では第一無機化合物は、硫化水素ナトリウム又は硫化ナトリウムである。第二の実施形態では第二無機化合物は、二亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム又は亜硫酸ナトリウムである。第三実施形態では酸は、濃硫酸である。

30

【0015】

本発明は、90~99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01~10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物の有効量を投与するステップによって、必要とする対象における酸化ストレスに関連する状態を治療する方法も特徴とする。特定の態様では組成物は、約99%(w/w)のゼロ価硫黄及び約1%(w/w)の高極性構成要素も含む場合があり、高極性構成要素は硫酸ナトリウム、ポリチオン酸ナトリウム及びチオ硫酸ナトリウムから選択される。

【0016】

別の態様では本発明は、元素状アルファ硫黄及び1つ以上の高極性構成要素を、元素状アルファ硫黄を約10から約150部に対して高極性構成要素を1部の比(w/w)で含む、腸内、局所又は非経口投与用の組成物の有効量を投与するステップによって、必要とする対象における酸化ストレスに関連する状態を治療する方法も特徴とする。

40

【0017】

いくつかの実施形態では酸化ストレスに関連する状態は、統合失調症、双極性障害、脆弱X症候群、鎌形赤血球症、慢性疲労症候群、変形性関節症白内障、黄斑変性症、中毒性肝炎、ウイルス性肝炎、肝硬変、慢性肝炎、透析からの酸化ストレス、腎毒性、腎不全、潰瘍性大腸炎、細菌感染、HIV及びAIDSなどのウイルス感染、ヘルペス、耳感染症、上気道疾患、高血圧、脱毛及び抜け毛、男性不妊症、運動能力に関連するオーバートレーニング症候群、水虫、乾癬、湿疹、強皮症、アトピー性皮膚炎、多発性筋炎、酒さ、疱疹状皮膚炎、他の神経変性疾患、他の炎症性疾患並びに癌からなる群から選択される。

50

【0018】

他の実施形態では酸化ストレスに関連する状態は、心血管疾患である。実施形態の特定の態様では心血管疾患は、動脈硬化、冠動脈心疾患、虚血、内皮機能障害(特に血管弾性に影響を及ぼす機能障害)、再狭窄、血栓症、狭心症、高血圧、心筋症、高血圧性心疾患、心不全、肺性心、不整脈、心内膜炎、炎症性心拡大、心筋炎、心筋梗塞、心臓弁膜症、発作及び脳血管性疾患、大動脈弁狭窄、うっ血性心不全並びに末梢動脈疾患からなる群から選択される。

【0019】

本発明は、90～99.9%の(w/w)元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物の有効量を投与するステップによって、硫黄栄養欠乏を有する対象における硫化水素レベルを増大させる方法も特徴とする。

10

【0020】

一態様では本発明は、90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物を投与するステップによって、心血管疾患の治療を評価する方法も特徴とする。前記方法は、対象由来の試料中の硫化水素のレベルを決定するステップ、心血管疾患を治療するために十分な量に組成物の投与量を調整するステップを含み、硫化水素のレベルにおける増大又は心血管系パラメーターの改善は心血管疾患の治療をもたらす。特定の態様では心血管系パラメーターは、拡張末期容積(EDV)、収縮末期容積(ESV)、1回拍出量(stroke volume)、駆出率、心拍数及び心拍出量(cardiac output)からなる群から選択される。

20

【0021】

定義

「元素状アルファ硫黄」によって、式 S_8 を有する斜方元素状硫黄が意味される。元素状アルファ硫黄は、 S_8 (シクロオクタ硫黄分子)として存在するが、 S_7 (シクロヘプタ硫黄分子)及び S_6 (シクロヘキサ硫黄分子)も含みうる。

【0022】

「元素状ベータ硫黄」によって、式 S_8 を有し、主にシクロオクタ硫黄分子からなる単斜元素状硫黄が意味される。

【0023】

「高極性構成要素」によって、その分子が少なくとも1つのイオン結合又は1つの高極性共有結合を含有する化合物が意味される。高極性構成要素は、例えば、ポリチオン酸ナトリウム、ポリチオン酸カリウム、ポリチオン酸アンモニウム、ポリチオン酸カルシウム、チオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、チオ硫酸アンモニウム、チオ硫酸カルシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素カリウム、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸水素カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、塩化カルシウム、酢酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、パルミチン酸カリウム及び/又はラウリン酸アンモニウムを含む。高極性構成要素は、高極性O-H共有結合を含有する分子、例えば水、アルコール、ポリオール、ポリチオン酸、カルボン酸及び/又はモノステアリン酸ソルビタンも含む。高極性構成要素は、その分子が高極性N-H共有結合を含有する化合物、例えば一級アミン、アミノ酸、一級アミド、ペプチド及びタンパク質をさらに含む。

30

40

【0024】

「ポリチオン酸」によって、式 $^{-}O_3S-S_n-SO_3^{-}$ のアニオン又は基(例えば式中nは1から60、好ましくは1～20の整数、より好ましくは1、2、3、4、5又は6である)が意味される。

【0025】

「ゼロ価硫黄」によって、当業者に周知の決められた一連の法則に従って算出される場合にゼロの酸化状態を有する硫黄原子が意味される(例えば、各シクロオクタ硫黄分子(S_8)は8個のゼロ価硫黄原子を含有し、各チオ硫酸イオン($S_2O_3^{-2}$)は1個のゼロ価硫黄原子を含有し、各ポリチオン酸イオンは「n」個のゼロ価硫黄原子を含有する。ゼロ価硫黄は、

50

スルファン硫黄化合物において見出されうる。

【0026】

「ゼロ価硫黄含有量」によって、元素状アルファ硫黄及び高極性構成要素(ポリチオン酸ナトリウム、ポリチオン酸カリウム、ポリチオン酸アンモニウム、ポリチオン酸カルシウム、チオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、チオ硫酸アンモニウム、チオ硫酸カルシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム及び硫酸アンモニウムなど)を含有する組成物中に存在するゼロ価硫黄の量が意味される。

【0027】

「スルファン硫黄」によって、0又は-1価の還元された酸化状態にあり、別の硫黄原子に共有結合している不安定な高反応性硫黄原子が意味される。スルファン硫黄化合物は、例えば過硫化物、ポリスルフィド、ポリチオン酸、ポリスルファン、チオタウリン、チオ硫酸及び/又は元素状硫黄を含みうる。スルファン硫黄化合物は、嫌氣的システイン硫黄代謝においてシスタチオナーゼ、3-メルカプトピルビン酸硫黄トランスフェラーゼ及び/又はロダネーゼなどの酵素の関与で形成されうる。酵素的H₂S-生成経路における最終ステップは、一般にスルファン硫黄含有分子種を含む。スルファン硫黄を含有する化合物は、例えば鉄又はモリブデン原子を含有する酸化還元酵素、例えばキサンチン酸化酵素、アルデヒド酸化酵素及びリンゴ酸脱水素酵素)などの酵素の活性化又は不活性化を通じて細胞制御工程に関与する場合がある。

10

【0028】

「腸内」によって、胃腸管の任意の部分に關与する投与が意味される。腸内投与は、錠剤、カプセル又は滴下剤の形態での口からの、胃栄養管、十二指腸栄養管又は直腸性によるものを含みうる。

20

【0029】

「局所」によって局所又は全身性、特に皮膚上、吸引力、点眼剤及び/又は点耳剤である投与が意味される。

【0030】

「非経口」によって経口摂取以外の手段によって、特に液体形態の身体への注射によって本発明の組成物を投与するステップが意味される。非経口投与は、静脈内、動脈内、骨内注入、筋肉内、脳内、脳室内及び皮下投与を含みうる。

【0031】

「心血管疾患剤」によって心血管系を侵す疾患、特に心疾患、脳及び腎臓の血管疾患並びに末梢動脈疾患を治療するために用いられる薬物又は物質の種類が意味される。

30

【0032】

「抗炎症剤」によって炎症を低減するステップによって作用する薬物又は物質が意味される。

【0033】

「抗癌剤/抗増殖剤」によって、細胞の制御されない増殖、その開始、促進、進行及び/又は他臓器への伝播を低減、予防及び/又は妨げる薬物、物質及び/又は物質の混合物が意味される。

【0034】

「抗神経変性剤」によって、ニューロンに直接又はニューロン機能に関連する経路(例えば軸索輸送経路、タンパク質ミスフォールディング経路、タンパク質分解経路及びプログラム細胞死経路)に間接的に作用するステップによってニューロン機能を回復させる及び/又は改善する薬物、物質及び/又は物質の混合物が意味される。

40

【0035】

「栄養補助食品」によって、食事を補い、ヒトの食事において欠ける場合がある又は十分な量が摂取されない場合があるビタミン、ミネラル、繊維、脂肪酸若しくはアミノ酸などの栄養素を提供することを目的とする補助食品(food supplement)又は栄養剤(nutritional supplement)である薬物、物質及び/又は物質の混合物が意味される。

【0036】

50

「全身の健康状態を促進又は維持」によって、温度、pH、電解質及び/又は代謝物などの特性の安定な状態を含む恒常性均衡によって特徴付けられるヒトの健康状態を達成することの補助が意味される。

【0037】

「無機」によって、有機化合物ではない化合物が意味される。

【0038】

「酸化状態」によって、電子を当業者に周知の決められた一連の法則に従って数えた場合に原子が有すると仮定されるであろう電荷として定義される、物質の分子中における原子の酸化度の大きさが意味される。

【0039】

「酸」によって、アレニウス酸、ブレンステッド-ローリー酸及び/又はルイス酸が意味される。アレニウス酸は、水に溶解される場合にヒドロニウムイオンの濃度を増加させる物質である。ブレンステッド-ローリー酸は、ブレンステッド-ローリー塩基にプロトンを提供する分子種である。ルイス酸は、別の分子種から電子対を受容する分子種である。

【0040】

「酸化ストレスに関連する状態」によって、反応性酸素分子種の全身性所見と、反応性中間体を直ちに解毒する及び/又は生じた損傷を修復する生物システムの能力との間の不均衡を特徴とする又はそれに由来する状態が意味される。

【0041】

「硫化水素」によって、式 H_2S を有し、哺乳動物の身体多くの細胞によって少量産生され、多数の生物学的シグナル伝達機能(例えば平滑筋の弛緩、血管拡張、NMDA受容体の応答を増大、長期増強を促進及び記憶形成への関与)を有する化合物が意味される。

【0042】

「硫化水素レベルを増大させる」によって、哺乳動物の身体において(例えば酵素、シスタチオニンペプチド合成酵素及びシスタチオニンガンマ-リアーゼによってシステインから)産生される硫化水素レベルにおける、対照参照試料と比較して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%での増大が意味される。硫化水素のレベルは、当技術分野において公知の任意の有用な方法を用いて決定されうる。

【0043】

「硫黄栄養欠乏」によって、通常食での十分な量の硫黄の不足による酵素活性、ホルモンレベル及び免疫系機能における不均衡によって特徴付けられる状態が意味される。硫黄栄養欠乏の症状は、例えば肝機能障害及び腎機能障害、脆い爪、毛髪の脱落、肌又は頭皮の敏感さ、湿疹、ざ瘡、おむつ皮膚炎、偏頭痛、膨満感、消化障害、嘔吐、下痢、痔疾、不能、月経痛及び不規則月経、細菌性若しくはウイルス性感染の頻繁な発症、咽頭炎、歯痛、鼻出血、麻疹、関節痛、枯草熱、発熱、夜尿症並びに/又は母乳栄養問題を含む。

【0044】

「心血管系パラメーターにおける改善」によって、心血管系パラメーター(例えば拡張末期容積(EDV)、収縮末期容積(ESV)、1回拍出量、駆出率、心拍数及び心拍出量)の正常範囲(例えば拡張末期容積(EDV)約65~240mL、収縮末期容積(ESV)約16~143mL、1回拍出量約55~100mL、駆出率約55~70%、心拍数約60~100bpm及び/又は心拍出量約4.0~8.0L/分)への変化が意味される。

【0045】

「治療する」によって、疾患又は障害と闘う及び臨床結果などの有益な又は望ましい結果を得る目的のための管理レジメンに患者を従わせるステップが意味される。有益な又は望ましい結果は、これだけに限らないが生活の質の改善、1つ以上の症状又は状態の軽減又は回復;疾患、障害又は状態の程度の縮小;疾患、障害又は状態の安定化(すなわち悪化しない);疾患、障害又は状態の伝播の予防;疾患、障害又は状態の進行の遅延又は緩徐化;疾患、障害又は状態の回復又は緩和;並びに寛解(部分又は全体にかかわらず)を検出可能又は検出不可能にかかわらず含む。

【0046】

10

20

30

40

50

「対象」によって、哺乳動物(例えばヒト又は非ヒト)が意味される。

【0047】

薬物の「有効量」によって、有益な又は望ましい結果(例えば心血管疾患、癌(例えば悪性細胞過剰増殖)、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS及び酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡及び/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態の治療)に作用するために十分な薬物の量並びに、組成物を投与しない場合の硫化水素及び/又はスルファン硫黄レベルと比較してin vivo硫化水素及び/又はスルファン硫黄のレベルの増大を達成するために十分な量の組成物が意味される。

【0048】

「組成物」によって、本明細書に記載の物質を含み、場合により許容される賦形剤と製剤化され、哺乳動物の疾患を治療するため又は全身の健康状態を促進及び維持するための治療のレジメンの一部として政府規制機関の認可を有して製造又は販売される系が意味される。医薬組成物は、例えば経口投与用に単位投与形態(例えば錠剤、カプセル、カプレット、ゲルキャップ若しくはシロップ)で;局所投与用(例えばクリーム、ゲル、ローション若しくは軟膏)に;静脈内投与用(例えば粒子栓子不含有の滅菌溶液若しくはコロイド分散剤として及び静脈内使用のために好適な溶媒系中で)に;又は本明細書に記載の任意の他の製剤中に製剤化されうる。

10

【0049】

「許容される賦形剤」によって、本明細書に記載の物質以外であり(例えば活性物質及び/又は物質を懸濁又は溶解できるビヒクル、例えば石油ゼリー及びポリエチレングリコール)患者において無毒性及び非炎症性である特性を有する任意の成分が意味される。賦形剤は、例えば、抗付着剤、抗酸化物質、結合剤、コーティング剤、圧縮補助剤、崩壊剤、色素(着色料)、軟化剤、乳化剤、注入剤(希釈剤)、フィルム形成剤若しくはコーティング剤、香料、芳香剤、流動促進剤(流動性向上剤(flow enhancers))、潤滑剤、保存剤、印刷インク、吸着剤、懸濁剤若しくは分散剤、コロイド安定化剤、甘味剤及び水を含みうる。例示的賦形剤は、これだけに限らないが、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム(二塩基性)、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスポビドン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチルセルロース、メチルパラベン、結晶セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ化デンプン、プロピルパラベン、セラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン(コーン)、ステアリン酸、ショ糖、タルク、二酸化チタン及びキシリトールを含む。賦形剤は、希釈剤(例えば生理食塩水及び水性緩衝溶液)、水性担体並びに非水性担体、例えば水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)並びにこれらの好適な混合物、オリーブ油などの植物油並びにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルも含みうる。

20

30

【0050】

本明細書において使用される用語「約」は引用値の平均 $\pm$ 10%を意味する。

40

【0051】

表1に提供されるのは、略号の表及び本明細書に記載の用語の意味である。

【表 1】

表1

略号	意味
3-MST	3-メルカプトピルビン酸硫黄トランスフェラーゼ
ACS6	シルデナフィルのH ₂ S-供与誘導体
ADEM	急性散在性脳脊髄炎
Akt	プロテインキナーゼB
Akt-P ^{Ser473}	セリン残基473でのリン酸化Akt
Akt-P ^{Thr308}	スレオニン残基308でのリン酸化Akt
ALS	筋萎縮性側索硬化症
BHT	ブチルヒドロキシトルエン
CBS	シスタチオニンベータ合成酵素
CO	一酸化炭素
CRISPs	富システイン分泌タンパク質
CS-CSE Tg	心臓特異的CSE遺伝子導入マウス
CSE	シスタチオニンガンマリナーゼ
CSE KO	CSE欠損
DADS	ジアリルジスルフィド
DATS	ジアリルトリスルフィド
DBTS	ジベンジルトリスルフィド
ED	勃起機能障害
EDV	拡張末期容積
eNOS	内皮一酸化窒素合成酵素
eNOS-P ^{Ser1177}	セリン1177でのeNOS
ESV	収縮末期容積
FEG	フェニルアラニン-グルタミン-グリシン
feG	D-異性体形態
GSH	グルタチオン
H ₂ S	硫化水素
HO-1	ヘムオキシゲナーゼ1
IJM	循環スルファン硫黄レベル
ImSAIDs	免疫選択的抗炎症誘導体
I/R	虚血/再灌流
IVSd	脳室内中隔拡張末期径
j.JM 02/秒/mg	ミトコンドリア呼吸機能
LV	左心室
LVEDD	左心室拡張末期径
LVEF	左心室拍出率
LVEDSd	左心室収縮末期径
MFR	回収された可動形態
NaHS	硫化水素ナトリウム
NO	一酸化窒素
NO ₂ ⁻	亜硝酸塩
NO ₃ ⁻	硝酸塩
NOX	NADPHオキシダーゼ
Nox4	NADPHオキシダーゼ4
NSAIDs	非ステロイド性抗炎症剤
PDE5	ホスホジエステラーゼ5型
RCR	呼吸調節率
RCR	呼吸調節率
ROS	反応性酸素分子種

10

20

30

40

$S_2O_3^{2-}$	チオ硫酸イオン
S_8	シクロオクタ硫黄分子
SG-1002	高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物
TAC	大動脈縮窄術
TBZ	4-ヒドロキシチオベンズアミド
VEGF	血管内皮増殖因子
WT	野生型

【図面の簡単な説明】

10

【0052】

【図1】心不全がヒト及びマウスにおける硫化物レベルを低減させることを示すデータを示すグラフである。図1A～1Dは、代表的ガスクロマトグラフピーク並びに正常対照及び心不全患者における循環遊離硫化水素(H_2S)及びスルファン硫黄のレベルの要約データを示す。図1E～1Fは、標準固形飼料(TAC+ビヒクル)を維持した又は H_2S 供与体SG-1002(TAC+SG-1002、20mg/kg/日)を含有する固形飼料を維持したマウス群における圧付加誘発心不全(TAC)の6週間後の遊離 H_2S 及びスルファン硫黄の循環レベルを示す。図1G～1Hは、実験群における遊離 H_2S 及びスルファン硫黄の心筋レベルを示す。結果は平均±SEMとして表される。バー内の数字は試料サイズを表す。** $p<0.01$ 及び*** $p<0.001$ 対シャム(Sham)。

【図2】シスタチオンガンマリアーゼ(CSE)の欠損がTAC後の心臓機能障害を増悪させることを示すデータを示すグラフである。図2Aは、野生型(WT+TAC)マウス、CSE欠損(CSE KO+TAC)マウス及びSG-1002(CSE KO+TAC+SG-1002)で処置したCSE KOマウスのTAC 12週間目の代表的心臓像である。図2Bは、TAC後12週間での心臓重量/頸骨長比及び肺重量/脛骨長の比を示す。図2Cは、脳室内中隔拡張末期径(IVSd、mmによる)を示す。TAC後の図2DはLV拡張末期径(LVEDD、mmによる)を示し、図2EはLV収縮末期径(LVESD、mmによる)を示し、図2FはLV駆出率(%)を示す。壁厚は、TAC後1週間から12週間まで全ての群において同様に増加した。CSE KOマウスは、TAC 6週間目に開始した拡大及び機能障害を示した。SG-1002で処置したWT及びCSE KOマウスは、LV容量に有意な変化は示さず、保存された心臓機能を示した。結果は、平均±SEMとして表される。[†] $p<0.05$ 、[‡] $p<0.01$ 及び[#] $p<0.001$ 対WT。 * $p<0.05$ 及び*** $p<0.001$ 対ベースライン。

20

30

【図3】CSEの心臓特異的過剰発現がTAC後の心拡大及び心臓機能障害を減弱することを示すデータを示す図である。図3Aは、TAC 12週間での野生型(WT+TAC)及び心臓特異的CSE遺伝子導入マウス(CS-CSE Tg+TAC)の代表的顕微鏡像である。図3Bは、TAC 12週間での脛骨長の比で表した心筋重量(mg/cm)及び肺重量(mg/cm)を示す。TAC後の図3CはIVSd(mm)を示し、図3DはLVEDD(mm)を示し、図3EはLVESD(mm)を示し及び図3FはLV駆出率(%)を示す。TAC 1週間から12週間では壁厚はWT及びCSE Tgマウスにおいて同様に増大した。WTマウスと比較してCSE Tgマウスは、有意に少ない拡大及び心臓機能障害を経験した。結果は、平均±SEMとして表される。** $p<0.01$ 及び*** $p<0.001$ 対ベースライン。

【図4】外因 H_2S 療法がTAC後の心拡大及び機能障害を予防することを示すデータを示す図である。図4Aは、シャム、ビヒクル(TAC+ビヒクル)及びSG-1002(TAC+SG-1002)処置マウスのTAC 12週間での代表的心臓像である。図4Bは心臓重量/脛骨長の比を示す。図4Cは肺重量/脛骨長の比を示す。図4DはTAC 6及び12週間での循環BNPレベル(ng/mL)を示す。TAC後の図4EはIVSd(mm)を示し、図4FはLVEDD(mm)を示し、図4GはLVESD(mm)を示し及び図4Hは駆出率(%)を示す。壁厚はTAC後に両群において同様に増大した。しかしSG-1002餌は、TAC 6週間で開始した心拡大及び機能障害を予防した。結果は、平均±SEMとして表される。 * $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 及び*** $p<0.001$ 対ベースライン。

40

【図5】 H_2S がTAC後の筋肉間及び血管周囲の線維症を減弱することを示すデータを示す図である。図5Aは、TAC 6週間でのシャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002処置マウス由来の心臓における筋肉間及び血管周囲の線維症を示すマッソンのトリクローム及びピクロシウス赤染色心臓切片の代表的顕微鏡像である。図5Bは、マッソンのトリクローム切片から

50

算出されるLVの%としての線維症領域の概要である。図5Cは、ピクロシリウス赤切片から算出されるLVの%としての線維症領域の概要である。結果は、平均±SEMとして表される。
p<0.01及び*p<0.001対シャム。

【図6】TAC後にH₂SがAktリン酸化、VEGF発現を上方制御し、eNOS-NO経路を活性化することを示すデータを示す図である。図6Aは、総Akt、Akt-P^{Ser473}及びAkt-P^{Thr308}の代表的免疫プロットである。図6Bは、総Akt発現の濃度測定分析である。図6Cは、TAC 6週間でのシャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002由来の心臓におけるAkt-P^{Ser473}及びAkt-P^{Thr308}の濃度測定分析である。図6Dは、TAC 6週間での心臓VEGF発現の代表的免疫プロット及び濃度測定分析である。図6E～6Fは、TAC 6週間でのシャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002由来の心臓における総eNOS及びeNOS-P^{Ser1177}発現の代表的免疫プロット及び濃度測定分析である。図6G～6Hは、TAC 6週間での実験群の心臓における亜硝酸塩及び硝酸塩レベルを示す。結果は、平均±SEMとして表される。

10

【図7】TAC後にH₂Sがミトコンドリア呼吸機能を保存し、酸化ストレスを減弱することを示すデータを示す図である。図7Aは、TAC 6週間でのシャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002由来の心臓における状態3及び状態4でのミトコンドリア呼吸機能(j.JM 02/秒/mg)を示す。図7Bは、TAC 6週間での実験群の心臓由来の呼吸調節率(RCR)を示す。図7C～7Dは、TAC 6週間での血漿及び心臓8-イソプロスタンレベルを示す。図7Eは、TAC 6週間での実験群の心臓におけるNADPHオキシダーゼ4(Nox4)の代表的免疫プロット及び濃度測定分析である。図7Fは、TAC 6週間での実験群の心臓におけるヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)の代表的免疫プロット及び濃度測定分析である、結果は平均±SEMとして表される。*p<0.05及び***p<0.001対シャム。

20

【図8】図8Aは、TAC 6週間でのシャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002処置マウスの心臓におけるシスタチオニンガンマリナーゼ(CSE)、シスタチオニンベータ合成酵素(CBS)及び3-メルカプトピルビン酸硫黄トランスフェラーゼ(3-MST)の代表的免疫プロットを示す図である。図8B～8Dは、TAC後6週間でのシャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002群におけるCSE、CBS及び3-MSTの濃度測定分析を示すグラフである。結果は、平均±SEMとして表される。バー内の数字は、試料サイズを示す。

【図9】図9Aは、循環遊離硫化水素(H₂S)を示し、図9Bは野生型(WT)対照、CSE欠損(CSE KO)及びH₂S供与体SG-1002を含有する餌を摂食したCSE KOマウスにおける循環スルファン硫黄レベル(IJM)を示し、図9Cは遊離H₂Sを示し、及び図9DはWT、CSE KO及びCSE KO+SG-1002マウスの心臓におけるスルファン硫黄レベル(nmol/mg湿重量)を示すグラフである。結果は、平均±SEMとして表される。*p<0.05、**p<0.01対WT。

30

【図10】図10Aは、TAC+WTマウス、TAC+CSE KOマウス及び12週間TACプロトコールの際にSG-1002餌(TAC+CSE KO+SG-1002)を摂食したCSE KOマウスについてのカプラン-マイヤー生存曲線を示すグラフである。図10Bは、TACの12週間後のTAC+WT及び心臓特異的CSE遺伝子導入マウス(TAC+CS-CSE Tg)についてのカプラン-マイヤー生存曲線を示すグラフである。図10Cは、TACの12週間後の対照餌(TAC+ビヒクル)を摂食したマウス及びSG-1002餌(TAC+SG-1002)を摂食したマウスについてのカプラン-マイヤー生存曲線を示すグラフである。

【図11】野生型及びCS-CSE遺伝子導入マウスの心臓由来のシスタチオニンベータ合成酵素(CBS)及び3-メルカプトピルビン酸硫黄トランスフェラーゼ(3-MST)の代表的免疫プロットを示す図である。

40

【図12】TAC(SG-1002)6週間後のSG-1002処置、TAC後1週間SG-1002で処置され、次いで5週間SG-1002を使用中止されたマウス及びTAC後3週間SG-1002で処置され、SG-1002が3週間使用中止されたマウスでの、図12Aは脳室内中隔拡張末期径(IVSd、mm)を示し、図12BはLV拡張末期径(LVEDD、mm)を示し、図12CはLV収縮末期径(LVESD、mm)を示し及び図12DはLV駆出率(%)を示すグラフである。結果は、平均±SEMとして表される。*p<0.05、***p<0.001対ベースライン。

【図13】図13Aは、TAC後6週間でのTAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002処置マウスにおけるVEGF-Aの血清レベル(pg/mL)を示すグラフである。図13Bは、TAC 6週間でのシャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002処置マウスの心臓由来の心筋nNOS及びiNOSについての代表的免疫

50

プロットを示す図である。図13Cは、シャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002の心臓におけるフィブリラリンに対するnNOSタンパク質の濃度測定分析を示す図である。図13Dは、TACの6週間後のシャム、TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002マウスにおけるフィブリラリンに対する心筋iNOSタンパク質の濃度測定分析の棒グラフである。結果は、平均±SEMとして表される。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 対シャム。

【図14】大動脈縮窄術(TAC)後にシスタチオンガンマリアーゼ(CSE)又は外因性硫化水素が心臓を保護する提案される機構を強調する模式図である。本発明者らのデータは、(CSE)又はSG-1002での硫化水素供与体療法が血管内皮増殖因子(VEGF)を活性化し、次にAktをリン酸化することを示唆する。Akt活性化は、eNOSのリン酸化及び活性化をもたらす。eNOS活性化後に、一酸化窒素(NO)生物学的利用率及び亜硝酸塩レベルが増大する。これらの分子シグナルは、心筋酸化ストレス及び傷害の低減、ミトコンドリア呼吸の改善及び心臓線維症の減少をもたらす。最終的にはこれらの細胞保護的作用は、代償性から非代償性心不全への移行を予防し、左心室(LV)駆出率を保存する。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明者らは、高い生物学的利用率の非常に安全かつ有効な硫化水素プロドラッグを発見した。本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、硫化水素への生物変換を容易に受ける少なくとも96%の生理活性ゼロ価硫黄を含有する。

【0054】

他の現在用いられている硫化水素前駆体は、57%以下の生理活性硫黄を含有する。表2はいくつかの先行技術硫化水素プロドラッグに含有される生理活性硫黄の百分率を示し、表3は種々の癌経路における硫化水素の効果を示す。本発明者らは、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の調製及び特徴付け並びに心血管疾患、癌、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS及び酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡及び/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態を治療及び/又は予防するために組成物を投与する方法を本明細書に記載する。

【表2】

表2

硫化水素プロドラッグ	%生理活性硫黄(W/W)
NaSH(無水)	57
ジアリルトリスルフィド(DATS)	53.9
ジアリルジスルフィド(DADS)	45.1
Na ₂ S(無水)	41
4-ヒドロキシチオベンズアミド(TBZ)	20.9
スルホラファン(イソチオシアネート、ブロッコリ由来)	18
アネトールトリチオン(ジチオレチオン(dithiolethione))	13.3
ジベンジルトリスルフィド(DBTS)	11.5
ATB346(ナプロキセン-TBZコンジュゲート)	8.8
GY4137(モルホリニウムアリールモルホリノホスフィノジチオネート)	8.5
ACS83(レボドパ-ジチオレチオンコンジュゲート)	7.1
ACS15*(ATB337としても知られる)(ジクロフェナク-ジチオレチオンコンジュゲート)	6.3
ATB343(ヨードメタシン-ジチオレチオンコンジュゲート)	5.6
ACS67(ラナトプロスト-ジチオレチオンコンジュゲート)	5.3
ACS6(シルデナフィル-ジチオレチオンコンジュゲート)	3.5

【表 3】

表3

	効果	調節因子	影響を受ける段階*			
			1	2	3	4
1	免疫能増大	GSH↑, タウリン↑				
2	慢性炎症の消滅/急性炎症の消散	GSH↑, CAMs in 白血球 ↓, NF-kB ↓				
3	オキシダーゼ(Cyp-450など)による前発がん物質 活性化の阻害	無(?)				
4	発がん物質の解毒	Nrf2↑, GSH↑, SO ₄ ²⁻ ↑				
5	がん原遺伝子のエピジェネティクスサイレンシング	SAM↑				
6	腫瘍抑制因子遺伝子のエピジェネティクス 再活性化	HDAC ↓				
7	DNA保護/修復	GSH↑, Trx↑				
8	NF-kB及びTNF-α核移行の阻害	GSH↑				
9	細胞周期停止	チェックポイントキナーゼI				
10	酸化促進物質/アポトーシス促進性「差別」	スルファン硫黄↑, ROS↑				
11	血管新生抑制(H ₂ Sの「高レベル」で)	?				
12	転移抑制効果	E-カドヘリン ↑				
13	抗溶骨性効果	Nf-kB ↓				

*1=開始, 2=促進, 3=進行, 4=転移

【 0 0 5 5 】

硫黄に富む組成物

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の調製

一実施形態では高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄を含む組成物の2.7kgロットを調製するための下に概説する手順Iによって得られる。出発材料は表4に列挙され、好適な装置は表5に列挙される。

【表 4】

表4

材料	%純度(w/w)	重量(kg)	容積(L)
無水二亜硫酸ナトリウム(Na ₂ S ₂ O ₅)	99.4	4.890	
硫化水素ナトリウム(sodium hydrogen sulfide)、水和物*(硫化水素ナトリウム(sodium sulfhydrate)、水和物)	70	7.090	
濃硫酸	98	6.408	3.483
蒸留水	100	67.25	67.25
高純度水	100	30.0	
無水エタノール(変性添加剤不含有)	≥99.5	5.68	7.2

*およそ30%水及び70%NaHSを含有。

【表 5】

表5

装置	好ましい規格
200L主反応容器	プラスチック又はガラスで覆った
80L補助反応容器	プラスチック又はガラスで覆った
40L容器	プラスチック又はステンレススチール
19L容器	プラスチック又はステンレススチール
10L容器	プラスチック又はステンレススチール
大トレイ	ステンレススチール又はガラス
周波数変換器-速度調節器付き高トルクモータースターラーアセンブリ(220v、3HP)(ABB、モデルACS150)	0から1725rpmの間で連続的に速度を変更できなければならない。ディスプレイに示される速度は0から50の間である。304ステンレススチールプロペラ型スターラーの寸法は、長さ80cm、直径1インチである。
低トルクスターラー	-
pHメーター又はpH測定棒	-
温度計(-5～110℃)	-
測定シリンダー	-
秤	-
4L北旦フラスコ	-
ブフナー漏斗	内径185mm
2個の追加漏斗	目盛り付き
酸ヒュームを吸着するように設計されたカートリッジ付きの少なくとも2個のフルフェース安全マスク	-
真空ポンプ又は水流真空系	-

10

20

【0056】

手順I

Na₂S₂O₅ 4.890kgを、高トルクスターラー(7～8と表示)を装着した200L-主反応容器中に含まれる蒸留水20Lに一部ずつ活発な攪拌下で添加する。望ましくは、添加は3～5分間かけて行われ、粉末に塊ができないようにしなければならない。NaHS・xH₂O 7.090kgを、低トルクスターラーを装着した80L補助反応容器に含有される蒸留水15Lに溶解する。北里-ブフナーアセンブリを用いて減圧下でWhatman#1ろ紙3枚を通してNaHS溶液をろ過する。ろ液を19L容器に回収する。通常非常に少量の不純物だけがろ紙上に保持されることは記載されるべきである。

30

【0057】

次に80L補助反応容器をリンスし、ろ過したNaHS溶液を19L容器から80L補助反応容器へ移す。蒸留水30Lをろ過したNaHS溶液を含有する80L補助反応容器に添加する。10L容器に含有される2.25kg氷及び2.25kg蒸留水の攪拌混合物に濃硫酸(98%)1.458kgを注ぐ。次の2ステップは、同時に行われなければならない40分間持続される。Na₂S₂O₅溶液600mlを、攪拌したNaHS溶液を含有する補助反応容器に一度に注ぎ、(追加漏斗から)希釈硫酸溶液(5.958kg)を良く攪拌しながら同じ容器に添加し始める。攪拌ではプロペラに至るまでのうず流ができるようにする。フルフェースマスク(酸吸着カートリッジを装着した)を着用し、Na₂S₂O₅溶液を含有する主反応容器に氷2.5kgを添加する。濃硫酸(4.95kg)を活発な攪拌下で少量ずつ注ぎ始める。氷添加と交互の酸添加は、溶液が加熱されるのを防ぐためである。両反応容器中の溶液の温度を測定する。200L主反応容器(Na₂S₂O₅に加えてH₂SO₄)中の溶液の温度は約0 であり、80L補助反応容器(NaHSに加えて少量のNa₂S₂O₅に加えてH₂SO₄)中の溶液は30～35 の間である。200L反応容器(Na₂S₂O₅に加えてH₂SO₄)に氷5kgを入れ、次いで80L補助反応容器(NaHSに加えて少量のNa₂S₂O₅に加えてH₂SO₄)に含有されている溶液に

40

50

活発な攪拌下(表示に示される速度24.5~25)で入れる。この操作は、約10分間かかり、攪拌ではプロペラに至るまでのうず流ができるようにする。2つの溶液を混合する際に、反応混合物は無色からカナリヤ色へ進み、流動性が増すはずであり、いくらかの気泡及び黄色がかった沈殿分離物がある。反応混合物の最終温度及びpHを測定する。温度は25~30の間であり、pHは3付近である。攪拌を活発に90分間継続する。攪拌ではプロペラに至るまでのうず流ができるようにする。

【0058】

反応混合物を24時間、室温で静置させる。この段階の最後に黄色がかった沈殿物は、比較的コンパクトな塊の形態で容器の底にあるはずである。沈殿物を乱すことなく、デカンテーション又はサイホニングによって可能な限り多量の液体相を別の容器に移す。反応容器(約20L)に残った材料を40Lプラスチック又はガラスコンテナに移し、均質なスラリーを得るために1時間攪拌する。スラリーをブフナー-北里アセンブリを用いて#1 Whatmanろ紙を通してろ過する。ろ過ケーキを蒸留水1Lで又はろ液が酸性を示さなくなるまで洗浄する。洗浄は、チャネリングを防ぐためにろ過ケーキに割れ目が生じる前に行われなければならない。洗浄後直ちに、10分間を超えて真空を適用し続ける。過乾燥は高度にコンパクトなる過ケーキをもたらす、次のステップにおいて大きな困難をもたらす。ラバー又はプラスチックろ過ダム(又は同様のデバイス)の使用が推奨される。比較的乾燥したろ過ケーキを10Lプラスチックコンテナに移し、純粋な無水エタノール7Lを添加する。全ての固体が懸濁されるまで攪拌し、1時間攪拌し続ける。懸濁物が濃すぎる場合は、無水エタノールをさらに添加する。#1 Whatmanろ紙を通して懸濁物をろ過し、ろ過ケーキを無水エタノール200mlで洗浄し、ラバーダムを上端に置き、真空を10分間以内に適用する。過乾燥は高度にコンパクトなる過ケーキをもたらす、次のステップにおいて大きな困難をもたらす。室温空気乾燥のためにろ過ケーキを大きなガラス又はステンレススチールのトレイに移す。約4日間又は一定重量でエタノール臭が無くなるまで乾燥させる。乾燥産生物は、脆弱な塊及び微細粉末からなる材料である。塊を脱凝集させ、材料が325標準篩いを通るように篩う。

【0059】

手順Iは、約99%のゼロ価硫黄及び約1%の高極性構成要素(例えば硫酸ナトリウム並びにポリチオン酸ナトリウム及びチオ硫酸ナトリウムの痕跡量)を含有する産生物(SG-1002)を生じる。

【0060】

いくつかの実施形態では手順Iの変法が同様の材料を得るために用いられてよく。そのような手順は、これだけに限らないが以下を含む：

手順II

硫化水素ナトリウムの代わりに硫化ナトリウムを用い、酸の量を増加するなどの当業者に周知の法則により反応物の量を調整し、手順Iに詳述した工程に従う。

【0061】

手順III

二亜硫酸ナトリウムの代わりに亜硫酸ナトリウムを用い、当業者に周知の法則により反応物の量を調整し、手順Iに詳述した工程に従う。

【0062】

手順IV

硫化水素ナトリウムの代わりに硫化ナトリウムを及び二亜硫酸ナトリウムの代わりに亜硫酸ナトリウムを用い、当業者に周知の法則により反応物の量を調整し、手順Iに詳述した工程に従う。

【0063】

手順V

濃硫酸の代わりに濃塩酸を1モルあたり1モルの置き換えで用い、手順Iに詳述した工程に従う。

【0064】

手順VI

濃硫酸の代わりに濃塩酸を1モルあたり1モルの置き換えで用い、手順IIに詳述した工程に従う。

【0065】

手順VII

濃硫酸の代わりに濃塩酸を1モルあたり1モルの置き換えで用い、手順IIIに詳述した工程に従う。

【0066】

手順VIII

濃硫酸の代わりに濃塩酸を1モルあたり1モルの置き換えで用い、手順IVに詳述した工程に従う。

【0067】

手順IX

ナトリウム塩の代わりにカリウム塩を用い、当業者に周知の法則により試薬の量を調整し、手順Iに詳述した工程に従う。

【0068】

いくつかの実施形態では手順において用いられる反応物は、マイナス2酸化状態にある硫黄を含む任意の化合物及びプラス4酸化状態にある硫黄を含む別の化合物並びに場合により酸及び/又は触媒(複数可)を含みうる。

【0069】

他の実施形態では減圧によるろ過は、加圧によるろ過及び/又は遠心分離によって置き換えられてよい。他の実施形態では閉鎖反応器が用いられてよく、熱交換冷却系は氷添加に置き換えられてよく、噴霧乾燥は空気乾燥で置き換えられてよく、1つ及び/又は複数のステップ(例えば、アルコールでの洗浄)は省略されてよい。より大きな又は小さな規模の操作を含む実施形態も本発明の範囲内であることは理解されるべきである。

【0070】

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の特徴付け

乾燥し、篩われた産生物の標準収量は、以下の特性を有する微細、無臭、綿毛状、淡黄色、微結晶性粉末2.7kgである:

・融解範囲:平均融解温度は、約117 から約121 $\pm 2 \sim 3$ の間である(例えば融解は、118 ~ 120、116 ~ 119 の間又は119 ~ 120 の間で生じる)。

【0071】

・ゼロ価硫黄含有量(w/w):90 ~ 99.9%(例えば91%、92%、93.5%、94%、96%、96.5%、97.1%、97.5%、98%、98.6%、98.9%又は99.5%)

・元素状アルファ硫黄含有量(w/w):90 ~ 99.9%(例えば91%、92%、93.5%、94%、96%、97.1%、97.5%、98%、98.6%、98.9%又は99.5%)

・高極性構成要素(w/w):0.01 ~ 10%(例えば0.02%、0.1%、0.25%、0.5%、0.8%、1%、1.5%、2%、3%、4%、5%、5.5%、6%、7%、8%、9%、9.5%又は9.9%)

・25 での水への溶解度:0%

・二硫化炭素への溶解度:87 ~ 97%

・見掛け密度(タップ):約0.6g/ml

・粒子サイズ分布中央値:約26から約33マイクロメートルの間(例えば26.5、27、27.3、28、28.5、29、29.5、30、31.3、32、32.5又は32.9)

・ナトリウム含有量:約0.03%

・酸素含有量(差異による):約0.12%

手順Iに従って得られる組成物は、ゼロ価硫黄に富む微結晶からなり;その二硫化炭素への溶解度はアルファ-硫黄(斜方硫黄)のそれよりも低く、測定可能量のナトリウム及び酸素を含有する。組成物のX-線回折パターンはアルファ硫黄のものと一致する。

【0072】

本明細書に記載のデータを得るために用いた方法は、以下を含む。二硫化炭素への組成

10

20

30

40

50

物の溶解度は、二硫化炭素6mLを最終産生物0.500gに添加するステップ及び残渣の重量を決定するステップによって得た。ゼロ価硫黄含有量は、亜硫酸分解が S_8 にある全ての硫黄原子をチオ硫酸に転換するが、 $Na^+ \cdot O_3S-S_n-SO_3^- Na^+$ 中の $(n-1)$ 硫黄原子だけであることを補正しない亜硫酸分解によって測定された。ナトリウム含有量は、Galbraith Laboratories、USA(GLI手順ME-70)によって決定された。粒子サイズ分布は、Horiba InstrumentsからのPartica LA-950 laser diffraction particle size analyzerを用いて測定された。

【0073】

いかなる仮説にも限定されることなく、上記材料の高い生物学的利用率は結晶表面の親水性に関連(次に SO_3Na 及び/又は $=SO_3Na_2$ などの高極性基の存在に関連する場合がある)する可能性がある。これらの基は、ポリチオン酸分子($Na^+ \cdot O_3S-S_n-SO_3^- Na^+$ 、例えば式中 $n=1, 2$ 若しくは 3)、チオ硫酸又は硫酸中に存在するものである場合がある。 SO_3Na などの高極性基は、水和の水分子と関連する場合があり、なんらかの環境下では陽イオン交換を受け、例えば SO_3H 基を生じさせる。さらにこの特有の微結晶性材料の表面の親水性は、純粋アルファ-又はベータ-元素状硫黄の結晶表面の疎水性とは全く対照的である。対照的に純粋アルファ-又はベータ-元素状硫黄は、二硫化炭素に完全に溶解する。同様にいかなる仮説又は理論にも限定されることなく、通常のアルフア硫黄の低生物学的利用率は、その表面の疎水性に直接関連する可能性がある。

10

【0074】

いくつかの実施形態では組成物は、アルファ硫黄に富むが親水性表面を有するように常に修飾された粒子を含んで、マイクロ又はナノサイズ化されうる。同様に本発明の範囲内の同様の組成物は、当技術分野において公知の任意の化学的、電気的、機械化学的、音響化学反応的、光化学的、マイクロ波補助的、生化学的及び/又は生物学的工程によって得られうる。元素状ベータ硫黄及び表面修飾極性基を含む組成物は、本発明の実施形態をさらに構成する。確立されたとおり元素状アルファ硫黄は、加熱されるとベータ硫黄に転換され、逆も同様である。

20

【0075】

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物中のゼロ価硫黄含有量の決定

一態様では本発明の組成物のゼロ価硫黄含有量は、アルファ硫黄、チオ硫酸ナトリウム及びポリチオン酸ナトリウム中のゼロ価硫黄の百分率(w/w)を測定するための本明細書に記載の方法を用いて決定されうる。ゼロ価硫黄含有量を決定するための本明細書に記載の亜硫酸分解法は、式(ii)に示されるとおりポリチオン酸分子の亜硫酸分解がトリチオン酸塩で停止することに関しては補正せず、したがって各ポリチオン酸分子中に存在するゼロ価硫黄原子の1つは亜硫酸分解を逃れ、チオ硫酸(式(ii))に転換されない。しかし、本明細書に開示の組成物のナトリウム含有量が少ないことから、%ゼロ価硫黄の算出に取り込まれる誤差はそれに対応して小さい。亜硫酸分解の詳細な分析はKoh et al., Anal. Sci. 6: 3~14, 1990に記載されている。

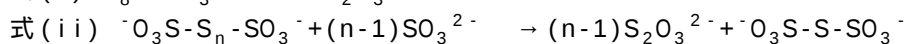
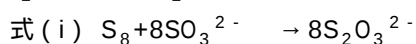
30

【0076】

亜硫酸分解反応式(i)及び(ii)は、Morris et al., Anal. Chem. 20:1037~1039, 1948によって報告された芳香族炭化水素における元素状硫黄の定量決定のための容積法のとおり進行する。本明細書に記載の亜硫酸分解方法は、亜硫酸分解触媒としてのn-ヘキサデシルビリジニウムクロリドの使用を含むいくつかの点でMorris et al.の方法と比較して改善されている。

40

【0077】



試薬溶液及び溶液の調製方法は、表6に示される。

【表 6】

表6

試薬溶液	溶液の調製
亜硫酸ナトリウム(15%w/w)水溶液	無水で化学的に純粋な亜硫酸ナトリウム150グラムを量り、850mL蒸留水に溶解する。
ホルムアルデヒド水溶液(37%)	-
6N HCl	濃塩酸(およそ12N)250mLを量り、蒸留水で500mLに希釈する。
KI(水中10%w/w)	化学的に純粋なKIを50グラム量り、450mL蒸留水に溶解する。
0.200N KIO ₃	高純度無水KIO ₃ を7.134グラム量り、蒸留水100mLに溶解し、蒸留水で1Lに希釈する。
ヘキサデシルピリジニウムクロリド水和物(1%w/w)水溶液	固体一水和物1グラムを量り、99mL蒸留水に溶解する。
可溶性デンプン(5g/L水溶液)	可溶性デンプン1グラムを量り、赤色酸化水銀ヨード10mgを添加、ペーストを形成するために冷水を添加、次いで200mL沸騰水を添加し、1又は2分間かき混ぜながら煮沸。溶液を室温へ冷却。

10

20

【0078】

ゼロ価硫黄含有量を決定するために、重量0.160g ± 10mgの組成物を250mL三角フラスコに入れる。フラスコに15%Na₂SO₃溶液100mLを添加する。フラスコを水浴中に置き、水が沸騰するまで加熱する。次いで1%ヘキサデシルピリジニウムクロリド水和物溶液0.5mLを添加し、固体が完全になくなるまで加熱し続ける。フラスコ中の内容物を室温に冷却し、マグネチック攪拌子を入れた。攪拌しながら、ホルムアルデヒド溶液15mL、6N溶液25mL、10%KI溶液10mL及び0.5%可溶性デンプン指示溶液1mLを添加する。得られた溶液は、無色であるはずである。フラスコ内の内容物を25mLビュレットを用いて0.2N KIO₃溶液で滴定する。滴定開始時に、フラスコの内容物はコハク色になるが、色は急速に消失する。等量点は、限度を超さないように非常に慎重に接近される。最終点は、滴定溶液の滴が色を変化させない場合に到達される。

30

【0079】

式(iii): 滴定反応 $IO_3^- + 5I^- + 6H^+ + 6S_2O_3^{2-} \rightarrow 6I^- + 3S_4O_6^{2-} + 3H_2O$

式(iv):

%ゼロ価硫黄 = $(V_{KIO_3}(\text{mL}) \times N_{KIO_3} \times 32.07 \times 100) / (1000 \times \text{試料重量}(\text{g}))$

*亜硫酸分解の受けやすさ

状態及び障害

本明細書に記載の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、心血管疾患、過剰増殖疾患(例えば、癌)、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS並びに酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡及び/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態を治療するために用いられうる。

40

【0080】

一態様では本発明の組成物は、心血管疾患、炎症性疾患、神経変性疾患、AIDS並びに酸化ストレス及び/若しくは酸化還元恒常性における不均衡に関連する病的状態又は癌を既に罹患している対象に投与される。別の態様では本発明の組成物は、心血管疾患、過剰増殖疾患(例えば、癌)、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS並びに酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡及び/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態を発症する危険がある対象に投与されうる。

【0081】

心血管疾患

50

本発明の組成物は、心血管疾患を治療するステップにおいても有用である。本明細書において用いられる心血管疾患は、これだけに限らないが、動脈硬化、冠動脈心疾患、虚血、内皮機能障害(特に血管弾性に影響を及ぼす機能障害)、再狭窄、血栓症、狭心症、高血圧、心筋症、高血圧性心疾患、心不全、肺性心、不整脈、心内膜炎、炎症性心拡大、心筋炎、心筋梗塞、心臓弁膜症、発作及び脳血管性疾患、大動脈弁狭窄、うっ血性心不全並びに末梢動脈疾患を含む。一態様では本発明は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物を慢性治療のために投与する方法を含む。別の態様では本発明は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物を急性治療のために投与する方法も含む。

【0082】

好ましい実施形態では本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、心血管疾患と診断された又はその危険がある対象において心血管系パラメーターを正常範囲に回復させる及び/又は改善する。心血管系パラメーターの正常範囲は、これだけに限らないが、拡張末期容積(EDV)約65~240mL、収縮末期容積(ESV)約16~143mL、1回拍出量約55~100ml、駆出率約55~70%、心拍数約60~100bpm及び/又は心拍出量約4.0~8.0L/分である。

【0083】

炎症性疾患

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、炎症性疾患を治療するためにも用いられうる。炎症性疾患の例は、これだけに限らないが、尋常性ざ瘡、喘息、自己免疫疾患(例えば、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、筋萎縮性側索硬化症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、抗合成酵素症候群、アトピー性アレルギー、アトピー性皮膚炎、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性末梢神経障害、自己免疫性膵炎、多腺性自己免疫症候群、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性蕁麻疹、自己免疫性ぶどう膜炎、パーロー同心円性硬化症、ベーチェット病、ベルガー病、ピッカーstaff脳炎、ブラウ症候群、水疱性類天疱瘡、キャスルマン病、セリアック病、シャーガス病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、慢性再発性多巣性骨髄炎、慢性閉塞性肺疾患、チャグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素病、補体成分2欠乏症、接触性皮膚炎、頭部動脈炎、CREST症候群、クローン病、クッシング症候群、皮膚白血球破碎性血管炎、デゴス病、ダーカム病、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、1型糖尿病、びまん性全身性皮膚硬化症、ドレスラー症候群、薬剤誘発性ループス、円板状エリテマトーデス、湿疹、子宮内膜症、骨付着部関連関節炎(enthesitis-related arthritis)、好酸球性筋膜炎、好酸球性胃腸炎、後天性表皮水疱症、結節性紅斑、胎児赤芽球症、本態性混合型クリオグロブリン血症、エバンス症候群、進行性骨化性線維異形性症、線維性肺胞症、胃炎、胃腸天疱瘡(gastrointestinal pemphigoid)、巨細胞性動脈炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本脳症、橋本甲状腺炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、化膿性汗腺炎、ヒューズ・ストーヴィン症候群、低ガンマグロブリン血症、特発性炎症性脱髄疾患、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病、IgA腎症、封入体筋炎、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、間質性膀胱炎、若年性特発性関節炎、川崎病、ランバート・イートン症候群、白血球破壊性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、線状IgA病、エリトマトーデス、マジード症候群、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織病、モルフェア、ムッハ・ハーベルマン病、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、視神経脊髄炎、神経性筋強直症、眼部瘢痕性類天疱瘡、眼球クロウヌス・ミオクロウヌス運動失調、オード甲状腺炎、回帰性リウマチ、PANDAS、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間血色素尿症、パリール・ロンベルグ症候群、パーソネージ・ターナー症候群、毛様体扁平部炎、尋常性天疱瘡、悪性貧血、静脈周囲性脳脊髄炎、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、進行性炎症性ニューロパチー、乾癬性関節炎、壊疽性膿皮症、赤芽球ろう、ラスムッセン脳炎、レイノー症状、再

10

20

30

40

50

発性多発性軟骨炎、ライター症候群、下肢静止不能症候群、後腹膜線維症、リウマチ熱、シュニッツラー症候群、強膜炎、強皮症、血清病、シェーグレン症候群、脊椎関節症、全身硬直症候群、亜急性細菌性心内膜炎、スザック症候群、スイート症候群、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎、血小板減少症、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織病、未分化脊椎関節症、白斑及びウェゲナー肉芽腫症)、セリアック病、慢性前立腺炎、糸球体腎炎、過敏症、炎症性腸疾患、骨盤内炎症性疾患、再灌流傷害、関節リウマチ、サルコイドーシス、移植片拒絶、血管炎、間質性膀胱炎並びに変形性関節症を含む。

【0084】

神経変性疾患

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、神経変性疾患を治療するためにも用いられうる。神経変性疾患は、ニューロンの死を含むニューロンの構造又は機能の進行性消失によって特徴付けられる任意の疾患である。神経変性疾患は、遺伝子変異(例えば、CAGヌクレオチドトリプレット変異)、タンパク質ミスフォールディング(例えば、アルファ-シヌクレインの凝集、過剰リン酸化タウタンパク質及びベータアミロイドの凝集)、タンパク質分解経路(例えば、ユビキチン-プロテアソーム経路及びオートファージ-リソソーム経路)の誤制御、膜損傷、ミトコンドリア機能障害、軸索輸送における欠損並びにプログラム細胞死経路(例えばアポトーシス、自己貪食及び細胞質性)の誤制御によって生じる場合がある。神経変性疾患の例は、これだけに限らないがアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、クロイツフェルトヤコブ病、原発性進行性失語、進行性核上性麻痺、脊髄小脳失調症3型、前頭側頭型認知症、レビー小体型認知症、皮質基底核変性症、プリオン障害、多系統萎縮症、遺伝性痙攣性麻痺、フリードライヒ失調症及びアミロイドーシスを含む。

【0085】

酸化ストレス及び/又は酸化還元恒常性における不均衡に関連する他の病的状態

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、これだけに限らないが自閉症、統合失調症、双極性障害、脆弱X症候群、鎌形赤血球症、慢性疲労症候群、変形性関節症白内障、黄斑変性症、中毒性肝炎、ウイルス性肝炎、肝硬変、慢性肝炎、透析からの酸化ストレス、腎毒性、腎不全、潰瘍性大腸炎、細菌感染、HIV及びAIDSなどのウイルス感染、ヘルペス、耳感染症、上気道疾患、高血圧、脱毛及び抜け毛、運動能力に関連するオーバートレーニング症候群、湿疹、強皮症、アトピー性皮膚炎、多発性筋炎並びに疱疹状皮膚炎を含む酸化ストレスに関連する他の状態を治療するステップにおいて有用でありうる。

【0086】

好ましい実施形態では本発明の組成物は、乾癬、水虫及び/又は酒さなどの状態を治療するために局所投与及び/又は腸内投与用に製剤化されうる。いくつかの実施形態では本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、これだけに限らないがうつ血、炎症性、増殖性及びリモデリングを含む創傷治癒の段階に影響を与えることによって創傷を治癒する場合において有用でありうる。別の実施形態では本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、持久力、エネルギー、力、視力及び/又は協調の要因の1つ以上を増大させることによって運動能力も増強する。

【0087】

別の好ましい実施形態では本発明の組成物は、男性不妊症を治療するために腸内投与用に製剤化されうる。酸化ストレスは、血漿膜への過酸化損傷の誘発を介する精子機能障害の原因において主な役割を演じる。さらに酸化ストレスは、精子核及びミトコンドリアゲノムの完全性に影響し、DNA鎖切断、異常な組換え及び/又は詰め込み欠損並びにクロマチン架橋をもたらす。洗浄ヒト精子懸濁物による反応性酸素分子種(ROS)生成とその受精能力との間の関連の観察結果は、ヒト精子への酸化損傷の臨床的重要性と一致し;この重要性は、直接又は間接的に過酸化水素に暴露されたヒト精子の機能的完全性の喪失及び高率のDNA損傷の実証によって支持される。ROSの供給源が細胞内である場合、細胞外酸化スト

10

20

30

40

50

レスに対して有効である古典的抗酸化物質(例えば、NAC及びヒポタウリン)の多くが役に立たないことになる。

【0088】

哺乳動物の精子細胞の不可逆的酸化的損傷に対する高感受性は、(i)その膜の多価不飽和脂肪酸、プラズマロゲン及びスフィンゴミエリンの特に高い含有量、(ii)排精でのそのほとんどの細胞質の喪失に関連するサイトゾル抗酸化物質酵素の不足に由来する酸化的損傷のための適切な修復機構の欠損、(iii)成熟精巣上体後(post-epididymal)精子細胞が高度に凝縮された核クロマチン(ジスルフィド結合形成の増加を伴うプロタミンによるヒストンの置換のため)を有すること;この緊密さが、ROSによる転写活性化に關与できない父性染色体のサイレンシングに寄与する、(iv)その運動性を支持するためにエネルギーの一定供給を必要とすることから精子細胞が高度に活性なミトコンドリアに特に富むことに原因がある。精子は、顕著なレベルのROSを生成することが見出された最初の細胞であり、それらの特徴は漏出したROSによるミトコンドリア膜損傷の可能性を増加させ、(v)天然富システイン分泌タンパク質(CRISP)が(それらを酸化物質による不活性化に特に感受性にする)極めて多数のチオール(未酸化)システイン残基を含有する。

10

【0089】

Predmore et al., *Antioxid Redox Signal*.17:119~140,2012に記載のとおりH₂Sは、タンパク質合成において構成成分として役立ちうるL-システインを合成するために細胞によって用いられうる。しかし硫黄欠乏食は、一般的であり特に男性においてシステイン欠乏症(その結果CRISPなどの重要な富システインタンパク質の生合成の欠損)を生じる可能性がある。CRISPは、脊椎動物(男性生殖器系内)においてだけ見出される。CRISPは、精子形成の多数の局面及び、Koppers et al., *Asian J. Androl*.13:111~117,2011に報告されたとおり実際の受精工程に關与しており、精子無力症患者における4.3の因子によるCRISP-2mRNAの下方制御が近年Jing et al., *Natl. J. Androl*.17:203~207,2011に報告された。

20

【0090】

Srilatha et al., *J. Sex. Med.*,4:1304~1311,2007は、硫化水素の内因性形成について並びにその哺乳動物の海綿体への勃起促進前弛緩効果(proerectile relaxant effect)及び女性の性的機能における硫化水素の効果についての証拠を提供するいくつかの先駆的研究を記載した。結果の最初のセットは、一酸化窒素のシグナル伝達特性を実証する業績に対して1998年にノーベル賞を受賞したLouis J. Ignarroを含む国際チームによって確認された。Bivalacqua et al., *J. Sex. Med.*2:187~197,2005に記載のとおり酸化ストレスが糖尿病げっ歯類の勃起機能障害に關係し、Deng et al., *Methods Mol Biol*.610:213~227,2010及びMinhas et al., *Expert Opin Pharmacother*.3:889~897,2002に記載のとおりテトラヒドロピオプテリンの投与に基づく治療介入及び抗酸化物質酵素の上方制御が有用でありうることの証拠もある。さらに近年の研究は、内因性及び外因性H₂Sの陰茎緊張の生理学的制御への効果及び勃起機能障害(ED)に対する新規療法(この経路を標的とする)の開発可能性を考察している。

30

【0091】

Sparatore et al., *Expert Rev. Clin. Pharmacol*.4:109~121,2011は、ED、良性前立腺肥大及び下部尿路症状に臨床適用可能性を有するシルデナフィル(ACS6)のH₂S-供与誘導体を開発した。ACS6によって放出されるH₂Sは、5型ホスホジエステラーゼ(PDE5)及びNADPH酸化酵素(NOX)発現活性の両方を阻害し、それによりED、良性前立腺肥大及び下部尿路症状を罹患している患者の治療のための新規かつ有効な手法の基礎をこの機構は構成する可能性がある。実際にShukla et al., *BJU Int*.103:1522~1529,2009によって実施された研究はACS6及びクエン酸シルデナフィルが海綿体平滑筋を等効力で弛緩し、ACS6がスーパーオキシド形成及びp47^{phox}(NOXのサブユニット)の発現をクエン酸シルデナフィルよりも阻害することを示した。ACS6は勃起を促進するだけでなく、グルタチオン(GSH)合成の上方制御を通じて酸化ストレスからの有効な保護も提供すると結論された。

40

【0092】

さらに妊娠ラット子宮収縮性へのNaHSの効果のin vitro調査において、Sidhu et al., P

50

harmacol Toxicol.88:198~203,2001は、この「水素供与体」が子宮自然収縮性において顕著な用量依存性減少を生じることを見出した。

【0093】

Showell et al.,Cochrane Database Syst Rev.1:CD007411,2011は、参加者が無作為に抗酸化物質対プラセボ、代替抗酸化物質又は無治療に割り当てられた臨床試験に基づいて、確認された精子DNA損傷を有する及び/又は精液障害のパラメーターを有する男性への経口抗酸化物質の効果を評価した。考察された結果は、1)無作為化されたカップルあたりの出生率、2)カップルあたりの妊娠率、3)カップルあたりの流産率又は自然流産、4)カップルあたりの死産率、5)治療後の精子DNA損傷レベル、6)精子濃度、7)精子運動性及び7)副作用である。本報告において分析された44試験は、2876カップルを含み、4.1カ月の平均治療期間をかけて行い、次の抗酸化物質:ビタミンB、ビタミンC、ビタミンE、セレンウム、マグネシウム、亜鉛、亜鉛に加えてビタミンE、亜鉛に加えてビタミンEに加えてビタミンC、複合抗酸化物質に加えてミネラル(例えばビタミンC、ビタミンE、亜鉛、セレンウム、葉酸、リコペン及びガーリック油)、L-アセチルカルニチン、L-カルニチン、L-アセチルカルニチンに加えてL-カルニチン、ペントキシフィリン、エチルシステイン、N-アセチルシステイン及びドコサヘキサエン酸を含んだ。本研究は、低受精率男性での抗酸化物質補給が、治療(ARTサイクル)を受けた低受精率カップルについて出生率及び妊娠率の結果を改善できると結論づけた。さらなる直接比較が、ある抗酸化物質の他からの優位性を同定するためには必要である。これらの結果は、抗酸化物質補給が低受精率カップルについての結果を改善する限定された科学的に容認される証拠だけしか現在なく、利用可能な治療形態は(適正な試験の最良のものにおいてさえ)良好な反応をわずかに生じるだけであり、多数の薬剤がいかなる理論的根拠もなく用いられていることを示している。Cavallini et al,Asian J.Androl.8:143~157,2006により、男性特発性乏精子-精子無力-奇形精子症(idiopathic oligoasthenoteratozoospermia)の治療のため疑いなく有効であると明確にされうる薬剤はない。

【0094】

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、メキシコの研究者らによって実行された臨床試験において用いられ(実施例8を参照されたい)、結果は、Showell et al.,Cochrane Database Syst Rev.1:CD007411,2011に記載の全ての試験についての平均4.1カ月に対してわずか2.5カ月の治療期間、及び7~10以上の恐らく活性な成分の最適化されていないさまざまな混合物に代わる単一成分の製剤、を含むいくつかの理由により非常に有望であった。

【0095】

酸化ストレスは、酸化分子種(例えばスーパーオキシド、過氧化物、遊離ラジカル)の産生の増加並びに/又はグルタチオンなどの抗酸化物質防御の有効性及び/若しくはレベルの顕著な減少に関連する。本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、投与された場合にシステイン及びグルタチオンのレベルを回復させるように望ましく作用し、それにより身体における酸化還元恒常性を回復させる。

【0096】

糖尿病

本発明の組成物は、糖尿病及びその合併症を治療するためにも有用でありうる。糖尿病は、身体が十分なインスリンを産生しないため又は細胞が産生されたインスリンに反応しないためのいずれかでヒトが高血糖を有する任意の代謝疾患であってよい。糖尿病の非限定的例は、1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病、先天性糖尿病、嚢胞性線維症関連糖尿病、ステロイド糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病及び一遺伝子性糖尿病を含む。糖尿病に関連する合併症は、これだけに限らないが低血糖、糖尿病性ケトアシドーシス、非ケトン性高浸透圧性昏睡、心血管疾患、慢性腎不全、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病に関連した足の問題(例えば糖尿病性足部潰瘍)及び糖尿病性網膜症を含む。

【0097】

癌

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物を用いて治療されうる他の状態は、癌を含む。癌は制御されない細胞増殖、悪性腫瘍の形成及び身体の付近の部位への浸潤によって一般的に特徴付けられる。癌は、リンパ系又は血流を通じて身体のより遠位の部位にも伝播する場合もある。癌は、タバコの使用による遺伝子損傷、ある種の感染症、放射線、運動不足、肥満及び/又は環境汚染物質の結果である場合がある。癌は、遺伝性に疾患を生じる細胞内の既存の遺伝子欠陥の結果である場合もある。スクリーニングは、いかなる検知される症状も現れないうちに癌を検出するために用いられる場合があり、治療は癌を発症する高い危険がある者(例えば癌の家族歴を有する人々)に与えられる場合がある。癌のためのスクリーニング技術の例は、これだけに限らないが理学的検査、血液及び尿の検査、医用画像及び/又は遺伝子検査を含む。癌の非限定的例は、膀胱癌、乳癌、大腸及び直腸癌、子宮内膜癌、腎臓又は腎細胞癌、白血病、肺癌、メラノーマ、非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、前立腺癌、卵巣癌、胃癌、消耗性疾患及び甲状腺癌を含む。

10

20

30

40

50

【0098】

移植

本発明のゼロ価硫黄に富む組成物は、再建及び移植の手順由来の虚血再灌流障害を治療するために有効であることが予測される。ゼロ価硫黄に富む組成物の微粒子の水分散剤は、虚血再灌流障害を予防/最少化するため及び手術処置の際にミトコンドリアを保護するために、形成的又は再建的手術からの組織のフラップ及び移植由来の実質臓器を治療するために用いられうる。本発明の組成物を用いて治療される例示的組織及び臓器は、活発な代謝及び増大したミトコンドリア機能を有し、短期間の虚血後に再還流障害を起こしやすく、これだけに限らないが;骨格筋、心臓、肝臓、大腸、小腸、脳、皮膚、肢(例えば腕、脚、足、手)を含む。

【0099】

医薬組成物及び治療方法

本発明は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物又は本明細書に記載の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の1つと第二治療薬(例えば抗血小板剤、 β 遮断薬、アンジオテンシン転換酵素(ACE)阻害剤又はアンジオテンシン受容体遮断剤(ARB)、スタチン、フィブラート、ピグアナイド、血圧降下剤、サイトカイン、コレステロール降下剤、勃起機能障害剤、抗炎症剤、抗血栓症剤、抗癌剤、抗糖尿病剤及び/又は栄養補助食品)との組合せを含有する医薬組成物にも関する。

【0100】

本発明の組成物は、当技術分野において公知の種々の方法によって投与されうる。当業者によって理解されるとおり、投与の経路及び/又は様式は所望の結果に応じて変化する。医薬組成物は、非経口、鼻腔内、局所、経口又は経皮的手段によるなどの局所投与用に、予防的及び/又は治療的処置のために製剤化されうる。医薬組成物は、非経口的に(例えば静脈内、筋肉内若しくは皮下注射によって)、又は経口摂取によって、又は血管性若しくは癌状態に罹患した領域への局所適用若しくは関節内注射によって投与されうる。追加的な投与経路は、血管内、動脈内、腫瘍内、腹腔内、脳室内、硬膜内(intraepidural)及び経鼻、眼部、強膜内、眼窩内、直腸、局所又は噴霧剤吸引投与を含む。デポー注射又は浸食性インプラント若しくは構成要素などの手段による徐放投与も特に本発明に含まれる。したがって本発明は、許容される担体(好ましくは例えば水、緩衝液、生理食塩水、PBSなどの水性担体)に溶解、コロイド状に分散又は懸濁された上に記載の薬物を含む非経口投与用組成物を提供する。組成物は、薬学的に許容される補助物質を適切な生理学的状態への必要に応じて含む場合がある(pH調整及び緩衝剤、浸透圧調製剤、湿潤剤、界面活性剤など)。

【0101】

治療用組成物は、溶液、コロイド分散剤、懸濁剤、乳剤、注入デバイス又はインプラントのための送達デバイスの形態であってよく、そのまま又は水若しくは別の好適なビヒクルで使用前に再構築されて用いられる乾燥粉剤として提示される場合がある。組成物は、経口投与用の錠剤、カプセル(例えば硬ゼラチンカプセル及び軟ゼラチンカプセル)、液体

若しくは徐放性錠剤；又は静脈内用、くも膜下腔内、皮下若しくは非経口投与用の液体；又は局所投与用のクリーム若しくは軟膏又はポリマー若しくは局所投与用の他の徐放性ビヒクルの形態であってよい。

【0102】

製剤作製のための当技術分野において周知の方法は、例えば「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」(20th ed., ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)において見出される。非経口投与用製剤は、例えば賦形剤、滅菌水、生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物由来の油又は水素添加ナフタレンを含有する場合がある。生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリド共重合体又はポリオキシエチレンポリオキシプロピレン共重合体は、物質の放出を制御するために用いられる場合がある。ナノ粒子製剤(例えば生分解性ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リボソーム)は、物質の体内分布を制御するために用いられる場合がある。有用である可能性がある他の送達系は、エチレン酢酸ビニル共重合体粒子、浸透圧ポンプ、くも膜下腔内ポンプ、埋め込み型注入系及びリボソームを含む。製剤中の物質の濃度は、投与される薬剤の投与量及び投与の経路を含む多数の要因に応じて変化する。

10

【0103】

特定経路での投与によって本発明の組成物を投与するために、不活性化を予防するための材料で組成物をコートする又はそれを組成物と同時に投与する必要がある場合がある。例えば組成物は、適切な担体(例えばリボソーム又は希釈剤)中で対象に投与される場合がある。薬学的に許容される希釈剤は、生理食塩水及び水性緩衝溶液を含む。リボソームは、水中油中水CGF乳剤及び従来のリボソームを含む(Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7:27~1, 1984)。薬学的に許容される担体は、滅菌注射可能コロイド溶液又は分散剤の即時調製のための、滅菌水性溶液又は分散剤及び滅菌粉剤を含む。薬学的活性物質のためのそのような媒体及び薬物の使用は、当技術分野において公知であり、任意の従来の媒体又は薬物が活性物質と不適合である場合を除いて本発明に含まれる。補充的活性物質も組成物に組み込まれうる。

20

【0104】

治療用組成物は、典型的には滅菌されなければならない、製造及び保存の条件下で安定でなければならない。組成物は、懸濁剤、マイクロエマルジョン、リボソーム又は高薬剤濃度に好適な他に指示された構造として製剤化されうる。担体は、例えば水、エタノール、石油ゼリー(例えばVaseline(登録商標))、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど)及びその好適な混合物を含み、さまざまな百分率(例えば本明細書に記載の分散剤媒体中に重量で5、10、15、20、25、30、35、40、45若しくは50%)で製剤化される、溶媒又は分散剤媒体であってよい。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散剤の場合は所望粒子サイズの維持によって及びサーファクタントの使用によって維持されうる。多くの場合、組成物中に例えば糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール又は塩化ナトリウムの等張薬を含むことは好ましい。注射可能な組成物の持続性吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬物(例えばモノステアリン酸塩及びゼラチン)を含むステップによってもたらされうる。コロイド分散剤は、当技術分野において周知の薬物の添加を通じて安定化されうる。

30

40

【0105】

本発明の組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌でき、又は滅菌を過ぎられうる。得られた水性分散剤は、使用のためにそのまま又は凍結乾燥されて包装でき、凍結乾燥調製物は、投与の前に滅菌水性担体と合わせられる。調製物のpHは、典型的には3から11の間、より好ましくは5から9の間又は6から8の間及び最も好ましくは7から7.5などの7から8の間である。固体又は半流動性形態の得られた組成物は、錠剤又はカプセルの密封包装などの組成物の固定量をそれぞれ含有する複数の単一用量単位で包装されうる。固体形態の組成物は、局所適用クリーム又は軟膏用に設計されたスクイーザブルチューブ(squeezable tube

50

)などの可変量用のコンテナに包装されうる。

【0106】

本発明の好ましい製剤は、これだけに限らないが、100～400mgの本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物を含有する硬ゼラチンカプセルの調製物、約5～20%(5.5%、6%、6.5%、7%、8%、10%、15%、17%又は19%)の本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物及び石油ゼリー(例えばVaseline(登録商標))又はポリエチレングリコールの懸濁剤、又は約5～20%(5.5%、6%、6.5%、7%、8%、10%、15%、17%又は19%)の本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の水又は油中のコロイド分散剤の調製物を含む。

【0107】

滅菌した注射可能なコロイド懸濁剤は、所望により上に列挙した成分の1つ又は組合せと共に適切な溶媒中に所望の量で活性化化合物を組み入れるステップによって調製でき、場合により滅菌マイクロろ過が続く。一般に分散剤は、活性化化合物を、塩基性分散剤媒体及び上に列挙したものからの他の所望の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むステップによって調製される。投与計画は、最適で望ましい応答(例えば治療用又は予防的応答)を提供するために調整される。例えば単一ボラスを投与でき、いくつかに分割された用量を、時間をかけて投与でき又は治療的若しくは予防的状況の要件によって示されるとおり用量は比例的に低減又は増量されうる。例えば本発明の組成物は、週に1回若しくは2回、皮下注射によって、又は月に1回若しくは2回、皮下注射によって投与されうる。

【0108】

非経口組成物を投与の容易さ及び投与量の均一性のために投与量単位形態に製剤することは特に有利である。本明細書において用いられる投与量単位形態は、治療される対象のための単一投与量として適する物理的に個別の単位を意味し;各単位は、望ましい治療的又は予防的効果をもたらすために算出された活性化化合物の規定量の場合により所望の薬学的担体と共に含有する。本発明の投与量単位形態についての規格は、(a)活性物質特有の特徴及び達成される特定の治療的及び予防的効果、並びに(b)そのような活性物質を個体における感受性の治療のために化合物化するステップの当技術分野に固有の制限に直接依存して示される。

【0109】

本発明の物質が医薬品としてヒト及び動物に投与される場合、それらは、単独で又は例えば、1から100%(より好ましくは10から100%、例えば90から100%など)の活性成分の場合により1つ以上の薬学的に許容される担体若しくは賦形剤との組合せで含有する医薬組成物として与えられうる。

【0110】

有効量を含有する組成物は、予防的又は治療的治療のために投与されうる。予防的適用では組成物は、心血管疾患、過剰増殖疾患(例えば癌)、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS並びに酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡及び/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態の発症に臨床的に判定された素因又は増大した感受性を有する患者に投与されうる。本発明の組成物は、臨床疾患の発症を遅延、低減又は好ましくは予防するために十分な量で患者(例えばヒト)に投与されうる。治療適用では組成物は、心血管疾患、過剰増殖疾患(例えば癌)、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS並びに酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡並びに/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態を既に罹患している患者(例えばヒト)に、状態の症状及びその合併症を治療する又は少なくとも部分的に停止するために十分な量で投与される。この目的を達成するために適当な量は、「治療有効量」、疾患又は医学的状态に関連するいくつかの症状を実質的に改善するために十分な化合物の量と定義される。例えば心血管疾患、過剰増殖疾患(例えば癌)、炎症性疾患、糖尿病、脂質異常症、神経変性疾患、AIDS並びに酸化ストレス、酸化還元恒常性における不均衡及び/又は免疫機能障害に関連する他の病的状態の治療では、疾患又は状態の任意の症状を減少、予防、遅延、抑制又は停止する薬物又は物質が治療的に有効である。薬物又は物質の治療有効量は、疾患若しくは状態を治

10

20

30

40

50

癒させる必要はないが、疾患若しくは状態の発症が遅延される、妨げられる若しくは予防される又は疾患若しくは状態の症状が回復する、又は疾患若しくは状態の期間が変化する、例えば個体において重症度が低い若しくは回復が促進されるような疾患又は状態のための治療を提供する。

【0111】

本発明の組成物及び製剤は、治療又は療法の従来法との組合せで用いることができ、又は治療若しくは療法の従来法とは別に用いることができる。本発明の物質及び製剤が他の薬物との組合せで投与される場合、それらは個体に連続的に又は同時に投与されうる。代替的に本発明による医薬組成物は、本発明の物質又は製剤の組合せを、場合により本明細書に記載の薬学的に許容される賦形剤並びに当技術分野において公知の別の治療法又は予防薬と関連して含む。

10

【0112】

製剤化された薬物は、キットとして共に包装されうる。非限定的例は、例えば、丸剤2種、丸剤1種及び粉剤、坐薬及びバイアル中の液体、局所クリーム2種など含有するキットを含む。キットは、粉剤形態を再構築するためのバイアル、注射用シリンジ、特製IV送達系、吸引器などの投与単位用量の患者への投与を補助する最適な構成成分を含みうる。加えて、単位投与キットは、組成物の調製及び投与のための説明書も含有できる。キットは、患者1名のための単一使用単位用量として、特定の患者の複数回使用のために(一定用量若しくは個々の化合物は治療進行と共に強度が変化する場合があつて)製造されうる;又はキットは複数の患者への投与のために好適な複数用量を含有する場合がある(「バルク包装」)。キット構成要素は、カートン、プリスターバック、ピン、チューブなどで構成される。

20

【0113】

用量

本発明の医薬組成物は、当業者に公知の従来法によって薬学的に許容される投与形態に製剤化される。本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量のレベルは、患者に毒性となることなく具体的な患者、組成物及び投与様式について望ましい治療応答を達成するために有効である活性成分の量を得るために変更されうる。選択された投与量レベルは、使用される本発明の具体的な組成物の活性、投与の経路、投与時期、使用される具体的な薬物の吸収速度、治療期間、使用される具体的な組成物との組合せで用いられる他の薬物、物質及び/若しくは材料、年齢、性別、体重、状態、全身の健康状態及び治療される患者の先行する治療歴並びに医学分野で周知の要因を含む種々の薬物動態要因に依存する。当技術分野における通常の技術を有する医師又は獣医師は、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定及び指示できる。例えば医師又は獣医師は、望ましい治療効果を達成するために必要であるよりも低いレベルで医薬組成物中に使用される本発明の物質の投与を開始でき、望ましい治療効果が達成されるまで投与量を徐々に増量できる。一般に本発明の組成物の好適な一日用量は、治療効果を生じるために有効な最低量である物質の量である。そのような有効量は、一般に上に記載の要因に依存する。好ましくは治療用組成物の有効一日用量は、1日を通じて適切な間隔で別々に投与される2、3、4、5、6又はそれ以上のサブ用量として、場合により単位投与形態で投与されうる。

30

40

【0114】

好ましい治療投与量レベルは、本明細書に記載の症状、症候群及び病的状態の大部分に罹患した平均体重の成人へ1日あたりに経口投与される活性ゼ口価硫黄に富む組成物の約800mgから約1600mg(例えば800、850、900、1000、1050、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1550及び1600mg)である。好ましい予防的投与量レベルは、約100mgから約1200mg(例えば110、140、200、250、300、350、400、460、700、750、800、900、1000、1100及び1150mg)である。癌、AIDS及びいくつかの慢性又は難治性病態では、好ましい経口投与量レベルは、平均体重の成人へ1日あたり2400mg以上(例えば2450、2500、3000、3500、4000、8000mg、1g)である。癌に罹患した小児について、用量は滴定されうる(例えば用量は、下痢又は吐き気などの胃腸管毒性の徴候が現れるまで徐々に増やされうる)。好ましい実

50

施形態では本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、経口投与用に極めて安全であり、大部分の患者は治療進行と共により高い投与量を耐容できる。

【0115】

他の実施形態では本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、局所投与用に安全である。局所投与用の許容される投与形態は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物を含有するクリーム、ローション、ペースト、ゲル及び/又は軟膏として製剤化されうる。

【0116】

ヒト対象への投与のために好適な最終投与形態は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の1つを薬理的活性薬物として含むことができ、又はさらに、アルファ-リポ酸、カルニチン、カルニチン酒石酸塩、カルニチンフマル酸塩、コエンザイムQ10、サレニウム、アルファ-ケトグルタル酸、アルファ-ケトグルタル酸カリウム、ジエチルアルファ-ケトグルタル酸、オキサロ酢酸、オキサロ酢酸ナトリウム、ジエチルオキサロ酢酸、2-オキソ-3-(エトキシカルボニル)-ペンタノジオック酸(pentanodioic acid)ジエチルエステル、L-システイン、パラセタモール、サルファ剤、NSAID、副腎皮質ステロイド、タウリン、ビタミン、プレバイオティクス、別の抗癌剤、これだけに限らないが別のマイトカン(例えば、ミトコンドリア電子伝達系異常症を標的化する薬剤)、アルキル化薬物(例えばプロカルバジン、ダカルバジン、アルトレタミン、シスプラチン)、メトトレキサート、プリンアンタゴニスト(例えば、メルカプトプリン、チオグアニン、クラドリビン、ペントスタチン)、ピリミジンアンタゴニスト(例えば、フルオロウラシル、シタラビン、アザシチジン)、植物アルカロイド(例えば、ビンブラスチン、エトポシド、トポテカン)、ホルモン剤(例えば、タモキシフェン、フルタミド)、抗生物質(例えば、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシン、プレオマイシン)並びに抗癌成分(例えばジクロロ酢酸ナトリウム及び3-プロモピルビン酸)などの他の活性薬物を含みうる。

10

20

【0117】

医療食品

本発明は、日常摂取のため及び全身の健康状態を維持及び促進するための医療食品としての高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物にも関する。証拠は、平均体重の成人による本明細書に記載の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の約800mgの長期間の日常的摂取が、消化器及び呼吸器の感染症(例えばウイルス性及び細菌性)並びにアレルギー症状の発現の頻度及び重症度における著しい低下をもたらすことから、安全かつ健康に有益であることを示している。本発明の組成物の日常摂取は、癌、AIDS、神経変性状態、発作、糖尿病及びその合併症、心血管疾患に罹患する可能性の大きな減少並びにパラセタモール、副腎皮質ステロイド、NSAID及び抗レトロウイルス剤、毒素及び毒(例えばシアン化物、タリウム、メタノール)などの薬剤を含む生体異物によって生じる心血管系、脳血管性、胃、肝臓損傷からの保護の付与にも関連する。本発明の組成物の日常摂取は、毛髪及び爪の速い成長、頑丈な皮膚、プレバイオティクス様効果及び全身の健康感も生じうる。

30

【0118】

一態様では本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、システイン及びその誘導体の補給源を提供するパラビタミンとして用いられる。システイン及びその誘導体(例えばグルタチオン、タウリン、(胆汁酸、硫化水素及び硫酸イオンとコンジュゲートした)タウリン)は、ビタミンと同様の役割を演じる。抗酸化性ビタミンと同様にシステイン及びその誘導体は、酸化/抗酸化物質均衡及び代謝工程の調節において間接的に役割を演じる。通常食に加えてシステイン補給は、種々の有益な効果を有する場合がある(例えばシステイン補給は筋肉機能、免疫機能、血漿アルブミン濃度における増加及びTNF- α 濃度の減少をもたらす)。補給は、複数の加齢関連工程の推進力であるシステイン及びグルタチオンレベルの身体での蓄積も回復させる場合がある。

40

【0119】

別の態様ではパラビタミンは、十分な硫黄を食事内で摂っていないヒト向けに最少量の

50

カロリーと最大量の生物学的に利用可能な形態の硫黄を提供する医療食品である。予備臨床試験からの研究は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物をパラビタミンとして与えられた120名の男性及び女性参加者において、大部分の参加者が毛髪及び爪のより早い成長に気づいたことを示した。さらにin vivo実験からの証拠は、哺乳動物では、パラビタミンとしての高度に生物学的に利用可能な硫黄に富む組成物の投与で硫化水素、スルファン硫黄及びグルタチオンレベルが血液及び組織において増大することを示した。

【0120】

好ましい実施形態では高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、身体内で急速かつ効率的に硫化水素(次に大部分がL-システインに変換される)に転換される。L-システインは、ペプチド酵素及び他のタンパク質並びに小さな硫黄含有生体分子の合成において構成成分として用いられうる(例えばケラチン(毛髪及び爪の14%を構成する)、例えばグルタチオン(免疫機能を制御及び増強するために必要な並びに酸化物質、求電子剤からの細胞防御に必要なトリペプチド)、例えばタウリン(心血管系機能、骨格筋、網膜、中枢神経系の発達及び機能のために不可欠であり、胆汁の主要な構成成分であり;胆汁酸のコンジュゲーションなどの多数の基本的な生物学的役割を有する)、抗酸化物、浸透圧調整、膜安定化及びカルシウムシグナル伝達の調節(例えば硫酸、軟骨の合成及びこれだけに限らないが副腎皮質ステロイド及びアセトアミノフェンを含む多数の薬物の解毒作用のために必要である)。

10

【0121】

別の実施形態ではゼロ価硫黄に富む組成物は変換され、スルファン硫黄として保存される。スルファン硫黄は、保護遺伝子を活性化し、炎症を遮断し、遊離ラジカル損傷から細胞を保護するためにいつでもどこであろうとも硫化水素が必要であれば、この分子種を容易に放出する硫化水素の高度に多用途の前駆体として身体によって好都合に用いられる。

20

【0122】

さらに別の好ましい実施形態では最長ヒト寿命は、パラビタミンとして本発明の組成物を提供するステップによって以前の限界を超えて伸びる可能性があり、グルタチオンレベルは、免疫系の細胞において正常レベルに回復され、それにより免疫系の機能を正常化し、健康及び幸福を回復する。

30

【0123】

解毒剤

本発明は、種々の毒及び薬剤過剰投与のための解毒剤としての高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物にも関する。本発明の組成物は、シアン化物中毒のための解毒剤として用いられうる。シアン化物中毒は、毒性シアン化物化合物(例えばシアン化水素ガス、シアン化カリウム及びシアン化ナトリウム)の吸入及び/又は摂取、毒性シアン化合物を含有する駆除薬及び殺虫剤、タバコ煙、ビル火災からの煙の吸入、アーモンド、杏仁、キャッサバ、ユッカ、マニオク及びリンゴ種子を含む食品への持続的暴露から生じる場合がある。シアン化物中毒の症状は、これだけに限らないが、永久マヒ、神経病変、甲状腺機能低下症、流産、虚弱、軽度肝損傷及び軽度腎臓損傷を含む場合がある。

40

【0124】

本発明の組成物は、これだけに限らないが、アセトアミノフェン過剰投与及びサルファ剤過剰投与(例えばスルファメトキサゾール、フルフィソミジン(fulfisomidine)、ジクロロフェナミド、アセタゾラミド、ブメタニド、クロルタリドン、クロバミド、フロセミド、ヒドロクロロチアジド、メフルシド、メトラゾン、キシパミド、アセタゾラミド、エトキシゾラミド、スルチアム、ゾニサミド、マフェニド、スマトリブタン、フルファサラジン(fulfasalazine)、チプラナビル及びプロペネシド)を含む薬剤過剰投与に対する解毒剤として用いられうる。

【0125】

組合せ療法

本発明の医薬組成物は、治療される状態に応じて組合せ療法で、すなわち他の薬物(例

50

例えば抗血小板剤、 β 遮断薬、ACE阻害剤若しくはARB、スタチン、フィブラート、ピグアナイド、血圧降下剤、サイトカイン、コレステロール降下剤、勃起機能障害剤、抗炎症剤、抗血栓症剤、抗癌剤、抗糖尿病剤及び/又は栄養補助食品)との組合せで投与されうる。

【0126】

心血管疾患予防剤

本発明の組成物は、心血管疾患のための二次予防剤として用いられる1つ以上の薬剤との組合せで投与されうる。予防剤の例は、これだけに限らないが、 β 遮断薬(例えば非選択的薬物(例えばアルプレノロール、カルテオロール、オクスプレノロール、ソタロール、チモロール)、例えば β_1 -選択的薬物(例えば、アセブトロール、ベタキシロール、セリプロロール、メトプロロール)、例えば β_2 -選択的薬物(例えばブタキサミン)、例えば β_3 -選択的薬物(例えばSR 59230A))、スタチン(例えばアトルバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、メバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン及びロスバスタチン)、フィブラート(例えばベザフィブラート、シプロフィブラート、クロフィブラート、ゲムフィプロジル及びフェノフィブラート)、ピグアナイド(例えばメトホルミン、フェンホルミン、ブホルミン及びプログアニル)並びに/又はACE阻害剤(例えばスルフィドリル含有剤(例えばカプトプリル、ゾフェノプリル)、例えばジカルボン酸含有剤(例えば、エナラプリル、ラミプリル、キナプリル、ペリンドプリル、イミダプリル)、例えばリン酸含有剤(例えばホシノプリル))を含む。

10

【0127】

勃起機能障害の治療用薬剤

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、勃起機能障害の治療のために1つ以上の薬剤との組み合わせで投与されうる。勃起機能障害の治療のための薬剤の例は、これだけに限らないが、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、アルプロスタジル、アバナフィル及びヨヒンビンを含む。

20

【0128】

抗神経変性剤

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、1つ以上の抗神経変性剤との組合せで投与されうる。抗神経変性剤の例は、これだけに限らないが、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤(例えばドネペジル、ガラントミン及びリバスチグミン)、抗グルタミン酸剤(例えばアマンタジン、GABA-作動性、バルプロ酸)、レセルピン、テトラベナジン、定型/非定型神経遮断剤、三環系抗うつ剤、SSRI、カルバマゼピン、バクロフェン、チザニジン並びにラモトリギンを含む。

30

【0129】

抗炎症剤

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、1つ以上の抗炎症剤との組合せで投与されうる。抗炎症剤の例は、これだけに限らないが、ステロイド(例えばグルココルチコイド、例えば副腎皮質ステロイド)、非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)(例えばアスピリン、ジフルニサル、サルサラート、イブプロフェン、ナプロキセン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、スリンダク、エトドラク、ケトロラク、ナブメトン、ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、メフェナム酸、フルフェナム酸、トルフェナム酸、セレコキシブ、ロフェコキシブ、パレコキシブ、エトリコキシブ、フィロコキシブ、ニメスリド及びリコフェロン(liclofelone))、免疫選択的抗炎症性誘導体(ImSAID)(例えばフェニルアラニン-グルタミン-グリシン(FEG)及びそのD-異性体形態(feG))並びに/又はハーブ(例えばハルバゴフィツム属(Harpagophytum)、ヒソップ、ショウガ、ウコン、アルニカ・モンタナ(Arnica montana)及びヤナギ樹皮)を含む。

40

【0130】

栄養補助食品

本発明の組成物は、全身の健康状態を促進及び/又は維持するために1つ以上の栄養補助食品との組合せで投与されうる。栄養補助食品の例は、これだけに限らないが、ビタミン(例えば、ビタミンA、ビタミンB₁、B₂、B₃、B₅、B₆、B₇、B₉、B₁₂、ビタミンC、ビタミン

50

D、ビタミンE及びビタミンK)、ミネラル(例えばカリウム、塩素、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、亜鉛、鉄、マンガン、銅、ヨウ素、セレン及びモリブデン)、ハーブ又は植物(例えばセイヨウオトギリソウ(St. John's-wort)、キャバ(kava)、シラジツト(Shilajit)及び漢方薬)、アミノ酸(例えばグリシン、セリン、メチオニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、トリプトファン及びフェニルアラニン)並びに上記の濃縮物、構成成分、抽出物及び/又は任意の組合せを含む。

【0131】

抗癌剤/抗増殖剤

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物は、1つ以上の抗癌剤との組合せで製剤化又は投与されうる。抗癌剤の例は、これだけに限らないが、化学療法剤(例えば
10
亜ヒ酸、シスプラチン、カルボプラチン、クロラムブシル、メルファラン、ネダプラチン、オキサリプラチン、四硝酸トリプラチン、サトラプラチン、イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ及びラディシコール)、免疫調節性剤(例えばメトトレキサート、レフルノミド、シクロホスファミド、シクロスポリンA、ミノサイクリン、アザチオプリン、抗生物質(例えばタクロリムス)、メチルプレドニゾロン、副腎皮質ステロイド、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン、ミゾリピン、デオキシスバガリン、ブレキナル、T細胞受容体調節物質及びサイトカイン受容体調節物質)、抗血管新生剤(例えばベバシズマブ、スラミン及びエトラチオモリブデート(etrathiomolybdate))、有糸分裂阻害剤(例えばパクリタキセル、ビノレルビン、ドセタキセル、アバジタキセル(abazitaxel)、イクサベピロン、ラロタキセル、オルタタキセル、テセタキセル(tesetaxel)、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンフルニン及びビンデシン)、ヌクレオチド類似物(例えばゲムシタピン、アザシチジン、カペシタピン、カルモフル、クラドリピン、クロファラビン、シタラビン、デシタピン、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、メルカプトプリン、ペントスタチン、テガフル及びチオグアニン)、DNA挿入剤(例えばドキソルビシン、アクチノマイシン、プレオマイシン、マイトマイシン及びブリカマイシン)、トポイソメラーゼ阻害剤(例えばイリノテカン、アクリラルビシン、アムルビシン、ベロテカン、カンプトテシン、ダウノルビシン、エピルビシン、エトポシド、イダルビシン、ミトキサントロン、ピラルビシン、ピクサントロン、ルビテカン、テニボシド、トボテカン、バルルビシン及びゾルビシン)、葉酸代謝拮抗剤(例えばペメトレキセド、アミノプテリン、メトトレキサート、プララトレキサート及びラルチトレキセド)、抗癌成分(例えば
20
ジクロロ酢酸ナトリウム及び3-プロモビルビン酸)及び他の標的化剤(例えば、癌に関連する特定の酵素若しくはタンパク質を標的化する薬物又は特定の臓器又は癌種を標的化する薬物)並びにこれらの組合せを含む。

【0132】

[実施例]

本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物及びその使用は、次の非限定的例の手段によりここに例示される。これらの実施例は、単に例示的目的で明記され、多数の他の変更が用いられうる。

【0133】

実験方法

心不全患者由来ヒト血液試料

血清試料は、University of Louisvilleのcardiac tissue and blood biorepositoryから得た。全ての手順は、the Institutional Review Board of the University of Louisvilleによって承認された。試料はインフォームド Consent 後にLV補助装置留置を受けている進行性心不全を有する患者から調達した。対照患者由来の追加の血清試料は、商業的販売者(Innovative Research)から得た。

【0134】

実験動物

CSE欠損(KO)マウス(C57/Sv129バックグラウンド)及び心限定(α MHC)CSE Tg マウス(C57BL/6Jバックグラウンド)をLevy et al., The New England Journal of Medicine.322:156
50

1~1566,1990;Heineke et al.,Nature reviews. Molecular Cell Biology.7:589~600,2006に記載のとおり開発した。オスC57BL/6Jマウス8~10週齢をThe Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)から購入した。全ての実験プロトコルはthe Institute for Animal Care and Use Committee at Emory University School of Medicineによって承認され、National Institutes of Healthによって発行されたthe Guide for the Care and Use of Laboratory Animals(NIH Publication No.86~23,1996改訂)並びに連邦及び州の規制に適合した。

【0135】

大動脈縮窄術(TAC)プロトコル

圧負荷を作製するために、TAC手順を10~14週齢マウスに実施した。マウスをケタミン(100mg/kg)及びキシラジン(8mg/kg)で麻酔し、深部体温は正常範囲(36~37℃)に維持した。次いでマウスに経口挿管し、手術手順の際に呼吸を維持するためにげっ歯類人工呼吸器に置いた。大動脈弓が見えるようにするために第二肋間筋を切開した。大動脈弓の同定及び切開後に、7~0シルク縫合糸を腕頭動脈と左頸動脈との間で大動脈弓に巻き、27G鈍針と共に結紮した。結紮後直ちに針を除去した。胸部を外科的に閉じ、マウスを深部体温を正常範囲内に維持するために手術用加温パッドと共に100%酸素の回復チャンバーに入れた。実験プロトコルの最後(すなわち、TAC手術の6又は12週間後)にマウスを安楽死させ、心臓、肺及び血液試料を回収した。

【0136】

硫化水素供与体

ゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002、約99%のゼロ価硫黄を含有、119から120℃の間で融解)を餌中でマウスに、C57BL/6Jマウスには20mg/kg/日又はC57BL/6Jマウスには40mg/kg/日の投与量を達成するようにTAC手順の1週間前に投与し、TACの12週間後まで継続した。加えて、SG-1002餌を与えたC57BL/6Jマウス数匹はTACの1週間又は3週間後に対照餌にした。

【0137】

心エコー

TAC手順の2日前に、ベースライン経胸壁心エコー図を100% O₂を補充したイソフルフラン(0.25から0.50%)での麻酔下でVevo 2100(Visualsonics)の30-MHzプローブを用いて実施した。TAC手順後、心エコーを同様のやり方で12週まで実施した。心臓の構造及び機能を決定するために脳室内中隔拡張末期径(IVSd)、LV拡張末期径(LVEDD)、LV収縮末期径(LVESD)及びLV駆出率(LVEF)をM-mode画像から分析した。

【0138】

硫化水素及びスルファン硫黄の測定

硫化水素及びスルファン硫黄レベルを当技術分野において公知の方法により心臓及び血液中で測定した。心臓組織に関してH₂Sの量はnmol/mg湿重量として報告する。血液に関してH₂Sの量はµMで報告する。

【0139】

ウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析をLi et al.,Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.51:169~187,2011に記載のとおり実施した。等量のタンパク質をポリアクリルアミド-SDSゲルのレーンに添加した。ゲルを電気泳動し、タンパク質のPVDF膜への転写が続いた。次いで膜をブロックし、1次抗体で4℃で一晩探索した。次に免疫ブロットを2次抗体(抗ウサギ、抗ニワトリ又は抗マウス、細胞シグナル伝達)で、室温で1時間処理した。次いで免疫ブロットを、シグナルを可視化するためにECL+Plus chemiluminescence reagent kit(GE Healthcare)で探索し、X-ray film(Denville Scientific)への暴露が続いた。デジタルコピーを作製するためにフィルムを走査し、相対強度を算出するために濃度測定分析をNational Institutes of HealthからのImageJ software(version 1.40g)でRodbard functionを用いて実施した。膜を最初にリン酸化部位特異的抗体でインキュベートした。次いで膜を条片化し、全特異的抗体でインキュベートした。結果をリン酸化タンパク質発現の総タンパク質に対する比として表す。全ての実験は3回ずつ実施した。各膜について各バンドの相対強度を最

も弱いバンドの値(最小強度)に標準化した。各試料について1つの値を得るために個々の試料それぞれについての値を平均した。次いで各群についての値を平均し、続いて対照群(シャム)の平均に標準化した。

【0140】

NO代謝物の心筋測定

心臓組織の亜硝酸塩(NO_2^-)及び硝酸塩(NO_3^-)分析をイオンクロマトグラフィー(EN020 Analyzer、Eicom)によってLi et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 51:169~187, 2011に既に記載のとおり決定した。

【0141】

VEGF及びBNPの血清測定

VEGF(VEGF ELISA kit、R&D Systems)及び脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)(BNP EIA kit、Phoenix Pharmaceuticals、Inc.)の血清レベルをTAC 6及び/又は12週間後にELISAによって決定した。

【0142】

心臓ミトコンドリア呼吸アッセイ

心筋ミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア呼吸容量を当技術分野において公知の方法を用いて評価した。マウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、心臓を直ちに切除し、氷冷単離緩衝液(300mMショ糖、20mM Tris、2mM EGTA、1mM ATP、5mM MgCl_2 及び1%無脂質BSA)中に置いた。心臓を細かく刻み、Tissue Tearor(Biospec Products、Bartlesville、OK)で低から中程度の速度で約10秒間均質化した。破砕物を3分間、2,500rpmで遠心分離した。上清を回収し、5分間、9,000rpmで遠心分離した。上清を除去し、沈殿を単離緩衝液に再懸濁し、5分間、10,000rpmで遠心分離し、さらに2回繰り返した。最終沈殿を100 μL 単離緩衝液に懸濁した。タンパク質濃度をLowry protein assay kit(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)によって決定した。単離されたミトコンドリア(500 $\mu\text{g/mL}$)の O_2 消費をClark-type oxygen electrode (Hansatech Instruments、Amesbury、MA)を用いてモニターした。ミトコンドリアを呼吸緩衝液(100mM KCl、25mMショ糖、5mM KH_2PO_4 、1mM MgCl_2 、1mM EGTA、10mM HEPES、10mMグルタミン酸及び2.5mMリンゴ酸)中でインキュベートし、呼吸容量を状態3(すなわちADP-依存性)及び状態4(すなわち、ADP-非依存性)の呼吸を測定することによって評価した。呼吸調節率(RCR)を、状態3及び状態4の呼吸率の比として算出した。

【0143】

8-イソプロスタンアッセイ

血漿及び心臓中の8-イソプロスタンの濃度を製造者の説明書に従って8-isoprostane ELISA kit(Cayman Chemicals、Michigan)によって決定した。

【0144】

組織学

組織学的分析のために、心臓を表示の時期に回収し、10%緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィンに包埋した。各群からの一連の5 μm 心臓切片をマッソンのトリクローム及びピクロシリウス赤(線維症を検出するため)で染色した。次いでスライドのデジタル画像を捕捉し、ImageJを用いて分析した。各心臓について本発明者らは、心室中央部(midventricle)から採取した複数の切片を分析し、次いでこれらの数字を各動物についての単一の%線維症/LV測定値を得るために平均した。

【0145】

統計解析

全てのデータは、平均 $\pm$ SEMとして表される。統計的有意性は、2つの平均値間の比較のためには対応のないスチューデントのt検定を用いて評価し、3つ以上の平均値間の比較のためにはPrism 5(Graph Pad Software Inc)を用いてANOVA(一元又は二元)で評価した。ANOVAに関して有意な結果が見出された場合は、チューキー(一元ANOVA)又はボンフェローニ(二元ANOVA)検定を事後分析として用いた。全てのデータについて、 $p<0.05$ の値を統計的有意と記した。

【0146】

臨床研究及び統計解析

The Ethics Committee of the Universidad Autonoma de Nuevo Leon University Hospital (Monterrey, Mexico) によって登録番号でBR09-001評価及び承認された前向き、無作為、二重盲検試験を実行した。研究は、2009年7月から2010年9月にReproductive Biology Clinic of the University Hospitalに通院し、妊娠を望み、組み入れ基準に適合する患者を含んだ。年齢20から45歳で、特発性乏精子 - 精子無力症の診断を受け、研究への参加を希望した患者をインフォームドコンセントへの署名後に含んだ。乏精子 - 精子無力症の診断は、3週間の間隔をあけて異なる日での2回の精液の分析を実施するステップによって至った。診断を行うためには精液分析の結果が、the World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999に詳述のとおりA型精子運動性25%未満又はA+B型精子運動性50%未満を報告する必要がある。A型運動性は急速な前進を含み; B型運動性は中程度の前進を含み; C型移動性は低速又はぎこちない前進を含み; 及びD型移動性は不動を含む。精子減少症は、the World Health Organizationの基準により1ミリリットル当たり精子2000万未満の濃度として定義された。乏精子 - 精子無力症は、同じ患者における精子減少症及び精子無力症の存在として定義された。各精子分析では、形態を手作業でクルーガー厳密判定基準(Kruger strict criteria)を用いて評価した。

10

【0147】

精子分析で正常所見を有する不妊患者、喫煙常習者である又は研究への参加の前6カ月に抗酸化物質を摂っていた患者は排除した。糖尿病又若しくは高血圧などの慢性変性疾患を有する又はホルモン異常を有する患者も排除した。与えられた所定の薬物療法に従わなかった、薬剤を中断した又は過敏性であった全ての研究対象は、除外された。

20

【0148】

完全な病歴及び理学的検査を全ての患者について得た。全ての研究参加者は、3から5日間の禁欲後に診断を確認するために2回目精液分析を受けた。この精液分析がベースラインとして考えられた(試料1)。2回目通院時に新たな精液分析を乏精子 - 精子無力症を確認するために再調査し、摂取させる3つの物質のうちの1つを無作為に75日間処方した。与えられた物質は、抗酸化物質として硫化水素プロドラッグ1.5g、抗酸化物質としてのレスベラトロール50mg及びプラセボとしての結晶セルロース1.5gであった。

30

【0149】

各患者に与えられた物質の無作為化は、無作為に入れ物に入れることによって実施された(全てのコンテナは内容物にいかなる種類の関連も有さず、3種の別々の物質(硫化水素プロドラッグ、レスベラトロール及びプラセボ)を含む厳密に同じ色、大きさ及び形状を有した)。各コンテナは、シリアル番号付きラベルを有した。主治医及び患者は、コンテナの内容物を知らなかった。第三の研究者がコンテナの各ラベル及び内容物についてのログ及びデータベースを有した。各患者は無作為にコンテナを取るよう求められ、コンテナ番号を患者の診療記録に記録した。研究終了時、統計解析前に本発明者らは、ラベル上の番号と内容物との関係を得て、物質により患者をグループ化した。各患者に薬物療法の日数を計数し、(生じた場合に)有害事象を種類及び頻度を含めて記録するために治療アドヒアランスフォーム(患者ログ)を与えた。

40

【0150】

患者は、有害作用及び治療へのアドヒアランスを記載するために治療開始1カ月後(来診3回目)を指定された。患者が来なかった場合は、事象データは電話によって収集した。

【0151】

治療開始75日後に行われる次回指定の診察(来診4回目)では; アドヒアランスを確認し、有害作用を報告した。この来診のために患者は、治療後精液分析(試料2)のために3から5日間禁欲した。精子濃度及び運動性を自動化IVOS(Integrated Visual Optical System)デバイスで全て完全に行って評価し、各患者が含まれる治療群について知らない実験助手によって手作業で確認した。各精液分析の形態は、クルーガー基準に従って手作業で評価し

50

た。

【0152】

中心傾向(平均値、中央値及び最頻値)の測定値などの伝統的記述データ並びに定量的変数の場合は分散の測定値(分散、標準偏差及び変動係数)を各変数についてと質的変数において観察された頻度ともに研究した。

【0153】

研究対象を指定された群に従って分割し、記載の統計的変数を解析した。群ごとの各変数の結果を平均($\bar{x}$)及び割合についての仮説検定を用いて、信頼区間95%、 $p<0.05$ 統計的有意を有して変数の種類(定量及び定性それぞれ)に応じて比較及び評価もした。

【0154】

[実施例1]

硫化物レベルは患者及びマウスにおいて心不全後に低下する

以前の研究は、外因性及び内因性に由来する両方の H_2S は強力な細胞保護効果を急性心筋I/R及び虚血に誘発された心不全のモデルで示すことを示唆する。しかし、圧付加誘発心不全における内因性 H_2S の役割は、完全には解明されていない。本研究では、TAC後の心不全の重症度へのCSE-誘導 H_2S の役割に関する多数の新規発見が同定され、それにより経口 H_2S 療法がTAC誘発心不全を減弱する機構への重要な知見が提供される。

【0155】

心不全患者20名及び年齢対照24名での循環硫化物レベル(遊離 H_2S 及びスルファン硫黄)を検討した。これらの患者の詳細な記載を表7に示す。図1A及び1C中の代表的ガスクロマトグラフピーク並びに要約データによって示されるとおり、遊離 H_2S レベルは対照と比較して心不全患者において有意に低く($p=0.049$)、一方スルファン硫黄レベルは心不全患者において低い傾向があった(図1B及びD; $p=0.054$)。次に、3種の既知の H_2S -産生酵素の心筋発現についてのTAC-誘発心不全の影響を、TAC 6週間での循環及び心筋での硫化物レベルと共に、検討した。分析は、CBSの発現が変化しなかったことを明らかにした(図8A及び8B)。しかしCSE発現は、シャムと比較してビヒクルマウスにおいて上方制御され(図8A及び8C; $p<0.001$)、一方3-MST発現はシャムレベルと比較して有意に下方制御されていた(図8A及び8D; $p<0.01$)。興味深いことに、遊離 H_2S 及びスルファン硫黄レベルは、シャム操作マウスと比較した場合にTAC+ビヒクルマウスの血液($p<0.01$)及び心臓($p<0.001$)において有意に低下していた(図1E~1H)。

【表7】

表7

	対照	心不全
数	24	20
年齢(平均年齢)	51 ± 10	53 ± 13
性別		
男性(%)	16 (67%)	18 (90%)
女性(%)	8 (33%)	2 (10%)
NYHA分類		
III (%)	--	5 (25%)
IIIb (%)	--	2 (10%)
IV (%)	--	13 (65%)

【0156】

[実施例2]

TAC後にCSE欠損は心臓機能障害を悪化させる。

【 0 1 5 7 】

圧負荷における内因性 H_2S の役割を調査するために、本発明者らはCSE KOマウスにおいてTAC手術を実施し、実施された心エコーを用いて心臓構造及び機能を評価した。最初にCSE KOマウスがWTマウスと比較して血液及び心臓において低い遊離 H_2S 及びスルファン硫黄レベルを示したことを確認した。(図9A~9D; $p<0.05$)。CSE KOマウスは、TAC後12週間でWTマウスと比較して顕著に大きい心拡大及び肺水腫を示した(図2A~2B)。両群は、TAC後1週間から12週間でIVSd厚の同程度の増加を示した(図2C)。しかしCSE KOマウスは、LVEDD及びLVESDの両方における増加によって見られるとおり顕著なLV腔拡大を示し、WTマウスと比較してTAC後3週間から12週間で悪化した心機能障害を示した(図2D~2F)。CSE KOマウスにおける増大した心臓構造及び機能変化にもかかわらず、WTマウスと比較した場合にTAC後に死亡率における差異は観察されなかった(図10A)。

10

【 0 1 5 8 】

[実施例 3]

CSEの心筋過剰発現は、TAC後の心肥大を予防することなく心機能障害を減弱する

CSE過剰発現がCBS発現を変化させることなく心臓における H_2S 産生を増加させることを示した。本研究では、CS-CSE Tgマウスにおける心臓CBS発現に変化は観察されなかったが、CS-CSE Tgマウスは、WTマウスと比較して3-MST発現が少なかった(図11)。心筋細胞に特異的なCSEの過剰発現がTAC後に心肥大及び/又は機能障害を減弱するかどうかをCS-CSE Tgマウスを用いて検討した。CS-CSE Tgマウスは、WT対照と比較した場合に脛骨長に対する心臓及び肺重量の比(mg/cm)によって評価されるとおり、有意に少ない心拡大及び肺水腫を示した(図3A~3B)。さらに心エコー分析は、WTマウスと比較した場合にCS-CSE TgマウスがIVSd厚において差異を示さなかった一方で、TAC後6週間から12週間で少ない心拡大及び機能障害を示したことを明らかにした(図3C~3F)。再び、2つの群の間で死亡率における差異は観察されなかった(図10B)。

20

【 0 1 5 9 】

合わせてこのデータは、CSEによって酵素的に生成された内因性 H_2S が心筋細胞肥大の制御とは無関係に圧付加誘発肥大後の心臓機能の維持において重要な役割を演じることを示す。

【 0 1 6 0 】

[実施例 4]

外因性 H_2S の投与がTAC後に心拡大を予防し、LV機能を保存し及び線維症を低下させる次に、圧付加誘発心肥大及び機能障害への経口 H_2S 療法の投与の効果(図4A~4H)を野生型C57BL/6Jマウスにおいて検討した。これらの実験について本発明者らは、餌中でSG-1002(20mg/kg/日)を投与した。初期研究は、SG-1002治療が血液中(図1E~1F; $p<0.05$ 対TAC+ビヒクル)の及び心臓中(図1G~1H; $p<0.05$ 対TAC+ビヒクル)の遊離 H_2S を部分的に回復させ、スルファン硫黄レベルを顕著に回復させることを見出した。TAC後12週間での肉眼形態分析は、ビヒクルマウス由来の心臓がSG-1002処置マウスと比較してより多い程度に肥大していたことを明らかにした(図4A)。これは、ビヒクル及びSG-1002処置マウスの両方の心臓がTAC後6及び12週間でシャムマウスと比較して有意に増加していた(図4B; $p<0.001$)ことを見出した心臓重量/脛骨長比によって確認された。しかしSG-1002処置マウスは、ビヒクルマウスと比較して有意に低い増加(図4B; $p<0.001$)を示した。加えて、SG-1002処置マウスは、両方の時点でビヒクルマウスと比較した場合に顕著に少ない肺水腫を示した(図4C)。さらにTAC後の心不全重症度の指標としての循環BNPレベルを評価した。BNPレベルは、シャムマウスと比較して6及び12週間でビヒクルマウスにおいて有意に増加していたが($p<0.01$)、SG-1002治療はTAC後にBNPレベルを有意に($p<0.01$ 対TAC+ビヒクル)阻害した(図4D)。心エコー分析(図4F)は、SG-1002治療がTAC後にIVSd厚さにおける増加を変化させないが(図4E)、しかしTAC後6週間から12週間で心拡大(図4F~4G; $p<0.01$ 対TAC+ビヒクル)及び心臓収縮機能障害(図4H; $p<0.001$ 対TAC+ビヒクル)を予防したことを明らかにした。TAC後12週間でのマッソンのトリクローム及びピクロシリウス染色切片の組織学的分析は、TAC+ビヒクルマウス由来の心臓における広範囲な領域の筋肉間及び血管周囲の線維症を明らか

30

40

50

にした(図5A~5C; $p<0.01$ 対シャム)。線維症はTAC+SG-1002心臓から採取した切片において明らかであったが、TAC+ビヒクル心臓と比較した場合には有意に少なかった(マッソンのトリクロームについて $p<0.001$ 及びピクロシリウス赤について $p<0.01$)。最終的にSG-1002処置マウスは、ビヒクルマウスと比較して良好だが統計的有意ではなく改善された生存率(80%対61%、 $p=0.23$)を示した(図10C)。

【0161】

さらに分析は、CSE KOマウスへのSG-1002の投与がわずかにだが有意ではなく血液及び心臓における遊離 H_2S レベルを増大させた一方で、SG-1002の投与が対照餌摂食CSE KOマウスと比較して血液($p<0.001$)及び心臓($p<0.05$)の両方においてスルファン硫黄レベルを有意に増加させたことを明らかにした(図9A~9D)。SG-1002の投与は、対照餌摂食CSE KOマウスと比較してCSE KOマウスにおけるLV腔拡大も完全に減少させた(図2D~2E; $p<0.05$)。興味深いことにSG-1002処置CSE KOマウスは、TAC後12週間で対照餌摂食CSE KOマウスとだけではなく、WTマウスと比較しても、TAC後に心駆出率を維持していた(図2F; $p<0.001$ 対CSE KO+TAC及び $p<0.05$ 対WT+TAC)。しかしCSE KO群間で死亡率における差異は観察されなかった(図10A)。

10

【0162】

合わせて本時点までの結果は、CSE及びCBS発現レベルが維持又は上方制御されるにもかかわらず、内因性 H_2S 生物学的利用率が圧負荷後の心不全において顕著に減弱されることを示す。さらに遺伝的又は薬理学的手法による H_2S レベルの増強は、代償性から非代償性心肥大への移行を予防する。

20

【0163】

[実施例5]

SG-1002の使用中止は心拡大及び機能障害の発症をもたらす

次いで餌でのSG-1002の使用中止がTAC後の心拡大及び機能障害の発症にどのような影響を与えるかを決定するための実験を実行した。これらの実験のためにSG-1002を1週間餌中で投与し、次いでマウスの異なる群をTACに6週間供し、(1)マウスはTAC後6週間餌中でSG-1002を摂取した、(2)マウスはTAC後1週間餌中でSG-1002を摂取し、次いで通常の餌を5週間摂取した、(3)マウスはTAC後3週間餌中でSG-1002を摂取し、次いで通常の餌を3週間摂取した。心エコー分析は、マウスの3つ全ての群がIVSd厚の同程度の増加及び同様のLVEDD径をTAC後1週間から6週間に示したことを明らかにした(図12A~12B)。TACの1週間後のSG-1002の使用中止がより多いLVESDの増加及び駆出率のより大きな減少を非使用中止群と比較してTAC 6週間で生じた(図12C~12D; $p<0.01$ 対SG-1002)。TAC 3週間でのSG-1002の使用中止は、非使用中止群と比較してこれらのパラメーターの両方において有意ではない増加をTAC 6週間で生じた。これらのデータは、圧負荷の発症後のSG-1002の早期の使用中止が心拡大及び機能障害の発症を予防しないことを示し、追跡期間全体を通じて餌が維持された場合にSG-1002の利益が達成されることを示唆している。

30

【0164】

[実施例6]

H_2S 療法はTAC後にVEGF-Akt-eNOS-一酸化窒素シグナル伝達を増強する

セリン/スレオニンキナーゼAktは、心臓の成長、心筋血管新生及び心筋細胞の生存を制御する、SG-1002治療を活性化Aktリン酸化がTAC後に心臓において活性化されるかどうかを理解するために検討した。TAC後6週間での心臓におけるAktリン酸化状態についての代表的ウェスタンブロットを図6Aに示す。SG-1002治療は、心臓における総Akt発現を変化させなかった(図6B)が、スレオニン残基308(Akt- P^{Thr308})($p<0.001$)及びセリン残基473(Akt- P^{Ser473})でのリン酸化Aktの発現をビヒクルマウスと比較した場合に有意に増加させた(図6e; $p<0.001$)。次にSG-1002治療をVEGF(強力な血管新生及び細胞保護サイトカイン)が心筋において上方制御されたかどうかを決定するために検討した。TAC後6週間でSG-1002処置マウスは、心臓において有意に多いVEGFタンパク質発現レベルを示した(図6D; $p<0.01$ 対シャム及び $p<0.05$ 対TAC+ビヒクル)が、全身循環においては示さなかった(図13A)。

40

【0165】

50

内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)から生成される一酸化窒素(NO)は、虚血状態の際に血管及び心筋の細胞保護を促進することが公知である。TAC後のSG-1002誘発心保護におけるeNOSの関与可能性を調査するために、発現及びセリン残基1177(eNOS-P^{Ser1177})でのeNOSのリン酸化状態をシャム、ビヒクル及びSG-1002処置マウスの心臓におけるウェスタンブロット分析によって評価した。

【0166】

全ての群において心臓における総eNOS発現に差異はなかった(図6E~6F)。しかしeNOS活性化部位(eNOS-P^{Ser1177})は、シャム及びTAC+ビヒクルマウスと比較した場合にSG-1002後に顕著に多いリン酸化を示した(図6E~6F;p<0.01)。さらにSG-1002治療は、シャムマウスと比較してTAC後に心臓NOx(亜硝酸塩及び硝酸塩)レベルを増大させ(図6G~H;p<0.05)、H₂S療法後のNO生物学的利用率の増大の示唆となる。ビヒクル又はSG-1002のいずれかを摂取し、TACに供されたマウスにおけるnNOS及びiNOSの両方の心筋発現も調査した(図13B~13D)。ビヒクル及びSG-1002処置マウスの両方におけるnNOS発現は、シャムより高い傾向があるが、統計的有意には達しなかった。興味深いことにTAC+ビヒクル群におけるiNOS発現は、シャム群と比較して上方制御された(p<0.01)が、SG-1002マウスはこの上方制御が縮小していた(p<0.01対TAC+ビヒクル)。

【0167】

[実施例7]

H₂S療法はTAC後にミトコンドリアの呼吸機能障害及び酸化ストレスを減弱する

ミトコンドリアのエネルギー不全是、心肥大から生じる心不全における主要な病態機構の1つであると考えられている。したがってTACの6週間後にマウス心臓から得られた単離されたミトコンドリアの呼吸機能を調査した。状態3呼吸速度(図7A;p<0.01)及びRCR(図7B;p<0.001)における有意な減少がシャムマウスと比較してTAC+ビヒクルマウスにおいて観察された。しかしSG-1002治療は、TAC+ビヒクルマウスと比較した場合にミトコンドリア呼吸機能を保存した(状態3についてp<0.05及びRCRについてp<0.01)。状態4呼吸ではいずれの研究群においても差異は観察されなかった(図7A)。

【0168】

ミトコンドリアの機能障害は、ATP産生不良及び反応性酸素分子種(ROS)生成の増加をもたらし、それはアポトーシスの増加を生じうる。したがって8-イソプロスタンレベルをTAC後6週間での血漿及び心臓の両方における抗酸化物質の欠乏及び酸化ストレスの指標として検討した。TAC+ビヒクル及びTAC+SG-1002処置マウスの両方が、シャムマウスと比較して8-イソプロスタンのより高い血漿レベルを示した(図7C;p<0.05)。しかしTAC+ビヒクルマウスがシャムマウスと比較して心臓において有意に高い8-イソプロスタンレベルを示した(p<0.001)、一方でSG-1002の投与は8-イソプロスタンレベルのTAC誘発増加を減弱した(図7D;p<0.05対TAC+ビヒクル)。次に心臓Nox4発現を酸化ストレスの別の指標として評価した。TAC後6週間で、心筋NADPHオキシダーゼ4(Nox4)発現は、シャムマウスと比較してTAC+ビヒクルマウスにおいて有意に上方制御されていた(図7E;p<0.01)。しかしSG-1002処置は、Nox4の上方制御を有意に阻害した(p<0.01対TAC+ビヒクル)。追加の分析は、SG-1002治療がTAC後に心臓における抗酸化物質ヘムオキシゲナーゼ酸素1(HO1)の発現の上方制御を生じることを明らかにした(図7F;p<0.01対シャム及びTAC+ビヒクル)。

【0169】

実施例1~7に記載の例は、硫化物レベルが心不全重症度の重要な予測因子となりうるとの考えを支持する数系列の証拠を提供する。最初に従来の臨床研究と一致して、硫化物の循環レベルが心不全患者において低いことを示すさらなる証拠が提供される。第二に遊離H₂S及びスルファン硫黄の心筋及び循環レベルの両方がTAC後に有意に低減されたとの発見からも明らかであるとおり、圧付加誘発心不全の実験モデルにおいてこれが反映されることを示すデータを提供する。第三に内因的に産生されたH₂Sの欠乏がTAC後に心臓機能障害の増悪を生じる一方で、CSEの遺伝的過剰発現は左心室機能を有意に保存したことが実証される。最後に、nH₂S供与体の慢性投与は、循環及び心臓硫化物レベルを増大させることによってTACに関連する有害なリモデリングに対する防御を提供する。硫化物レベルにお

10

20

30

40

50

ける心不全誘発減少の原因となる機構は現在未知であり、この発見は、 H_2S の欠乏が心不全の病態生理及び進行に寄与する可能性があることを強く示唆する。これらの発見は、経口 H_2S 供与体療法での H_2S の生物学的利用率の増加が心不全の状況において心臓機能を有意に保存することも示唆する。

【0170】

本研究における1つの主な発見は、SG-1002の投与がTAC後に心臓機能を顕著に保存することである。 H_2S が特異的受容体とは関係なく複数細胞内区画に自由に拡散する生理的气体であることを考えると、 H_2S が複数の生理的カスケードを同時に標的化することも考えられる。可能性がある1つの標的は、最も強力な血管新生及び細胞保護サイトカインであるVEGFである。Givvmani et al., J. Appl. Physiol. 110:1093~1100, 2011は、飲料水中の硫化水素ナトリウム(NaHS)がVEGF発現の増加及び抗血管新生因子(アンジオスタチン及びエンドスタチン)の阻害を介して血管新生を増強することを既に報告した。誘導性遺伝子導入マウスにおける短期間Akt活性化は、血管密度の維持を伴う生理的肥大を誘導するが、一方Aktの欠乏は、運動不足により誘発される心肥大による心臓機能障害の増悪を生じる。本研究ではSG-1002治療は、TAC誘導の6週間後にVEGF-Akt-eNOS-NOシグナル伝達経路を活性化することが実証された(心肥大及び左心室機能障害が顕著である時点)。

10

【0171】

酸化ストレスにおける増加及び/又は内因性抗酸化物質貯蔵の欠乏は、収縮性機能障害も生じる場合がある。 H_2S の心筋I/Rに対する心保護的効果は、抗酸化物質シグナル伝達によって調節される。加えて、 H_2S はin vitroで反応性酸素分子種(ROS)を直接除去する。したがって内因性 H_2S は、圧付加誘発肥大の状況において酸化ストレスの調節に直接及び/又は間接的に寄与する。SG-1002が心臓8-イソプロスタンレベルを減少させることの発見によって明らかであるとおり、本明細書において H_2S が酸化ストレスにおけるTAC誘発増大を減弱することを実証した。機構の観点から、SG-1002がNADPHオキシダーゼファミリーのメンバーであるNox4(圧負荷の状況におけるROS関連心臓機能障害の主な原因である)のTAC誘導上方制御を減弱することが決定された。SG-1002がHO-1の発現を上方制御し、ミトコンドリア呼吸機能を保存したことも決定された。心臓におけるミトコンドリアの呼吸機能障害が代謝リモデリング、心臓エネルギー性障害及び酸化ストレスの増加を導くことから、本研究において観察されたミトコンドリア呼吸機能保存は、TAC後の H_2S による酸化ストレスの阻害を説明する追加的な機構である可能性がある。

20

30

【0172】

H_2S 及びNOは、それらの生物学的効果を非依存性シグナル伝達経路を介して発現すると一般に考えられている。近年の実験的証拠は、 H_2S とNOとのシグナル伝達経路の間に、相乗的及び追加的な制御効果を提供できるクロストークがあることを示唆している。例えば H_2S は、Akt-依存性のやり方でのeNOSの活性化を通じて内皮細胞においてNO産生を上方制御する。同様にNOは血管組織からの H_2S 産生を増強することが示され、より近年にはColetta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 109:9161~9166, 2012が、NO及び H_2S が血管機能の管理のために相互に必要とされることを実証した。したがって本研究の別の主な発見は、外因性 H_2S 療法がeNOSを非常に強力に活性化し、心筋内のNO生物学的利用率を増加させる証拠である。これは2つの理由により重要であり、(1)それは、 H_2S とNO系の間にクロストークがある証拠をさらに実証し、(2)疾患のin vivoモデルにおいて H_2S がNOの生物学的利用率を増加させる証拠を初めて提供する。結果としてSG-1002によるeNOSの活性化は、TACに対して観察された保護的効果についての重要な機構として役立つ可能性がある。WTマウスと比較してeNOS KOマウスが高血圧及び心肥大を有し、圧付加誘発肥大による増悪した心臓機能障害を示す発見によって明らかであるとおり肥大への効果の観点では、eNOSから産生されるNOが心臓に抗肥大性効果を有することが示されている。さらにeNOSの心臓特異的過剰発現は、イソプロテレノール誘発心肥大を予防する。しかし極めて対照的にTakimoto et al., J. Clin. Invest. 115:1221~1231, 2011は、圧負荷が心筋オキシダント産生の増加及び心臓機能増悪をもたらすeNOS-脱共役を生じることを示唆した。これにもかかわらず医師はeNOSを活性化できる薬剤(すなわちACE-1、ARB及び β -遮断薬)の心不全治療におけ

40

50

る使用に成功している。したがって、心不全の治療におけるNO-に基づく療法の有用性及び有効性に関して未だ論議が残っており、これらの問題を解決するためのさらなる調査を必要としている。加えて、NO及びH₂Sの両方がHO-1(一酸化炭素(CO)を産生する酵素)レベルを増大させることが公知である。これは、内因的に産生された気体の1つの活性化が他の2つの活性化を導く可能性があることを示唆する。これらの条件下で3種の気体は、抗アポトーシス性、抗酸化性、抗炎症性及び抗肥大性効果を産生する相乗効果を与える能力を有し、最終的には心保護を導くことができる。

【0173】

本研究の発見は、圧付加誘発心不全発症の際の硫化物レベルの保存が心臓機能を保存し、代償性から非代償性心肥大への移行を予防することを示す。さらに本研究は新規経口H₂S供与体の投与が、NO生物学的利用率を有意に増加させるVEGF-Akt-eNOS-NOシグナル伝達経路を活性化するステップによって、これらの保護効果を促進することを示す(図14)。この心保護的シグナル伝達カスケードは、最終的には酸化ストレスの障害、心臓線維症の減弱、ミトコンドリア呼吸の保存及び左心室機能の保存を生じる。本研究は、心不全での心臓機能の保存において内因的に産生されたH₂Sが重要な役割を演じ、経口H₂S療法が圧付加誘発肥大の状況におけるLV機能障害の治療のための治療選択となりうることを示唆する。

【0174】

[実施例8]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002、約99%のゼロ価硫黄を含有する)での治療が不妊男性において精子濃度及び精子運動性を増加させる

2009年7月から2010年9月の間に合計で男性435名(その内125名(28.73%)は乏精子-精子無力症を有する)をthe University Center for Reproductive Medicineで評価した。研究への参加に同意した患者72名を採用し;その内18名を種々の理由により除外した(5名は治療前の2回目精液分析で精子減少症と精子無力症との組合せを示さず、8名は慢性変性疾患を有し、3名は喫煙常習者であり、2名は研究の2カ月前に抗酸化物質を摂取していた)。患者54名を、治療を開始する研究に含めた。3名は脱落した(1名は「奇妙な」臭いの汗が不安と述べ、1名は硬ゼラチンカプセル(SG-1002各400mgを含有する(1日あたりカプセル5個))摂取の最初の3日間に悪心及び膨満感を述べ、1名は1日あたりに摂取するカプセルの数が多すぎると述べた)。75日間の治療の最後に患者が来診した際に、4名は電話による求めにもかかわらず出席しなかった。

【0175】

プロトコールに応じた患者47名からの情報を分析した。患者の平均年齢は、32歳が最多で34.23歳であった。患者を3群に分割し(硫化水素プロドラッグ、レスベラトロール及びプラセボ)、群間で同様の関係を維持した。患者16名がレスベラトロール群に、16名が硫化水素プロドラッグ群に、15名がプラセボ群に含まれた。2種の評価、ベースライン試料及び治療後を作製した。2種の各評価において、新鮮精液及び受精能獲得後における濃度、運動性及び形態などの変数を分析した。3群のベースライン特徴は類似していた。各群の患者の平均年齢は、硫化水素プロドラッグ群について34.6歳、レスベラトロール群について35歳及びプラセボ群について33.07歳であった。

【0176】

平均精子ベースライン濃度は、1ミリリットルあたり1084万であり、最低濃度1ミリリットルあたり50万、最高濃度1ミリリットルあたり1990万であった。1回目試料中の平均濃度は、硫化水素プロドラッグ、レスベラトロール及びプラセボ群それぞれについて1ミリリットルあたり1102万、1090万及び1064万であった。ベースラインで記録された精子運動性について、A+B型運動性は硫化水素プロドラッグ、レスベラトロール及びプラセボ群それぞれについて平均13.43%、14.43%及び8.33%を有した。試料1において記録された形態は、統計的有意差を有さず3群においても同様であり、硫化水素プロドラッグ群について31.6%、レスベラトロール群について32.06%及びプラセボ群について30.06%であった。回収された可動形態(mobile forms recovered)(MFR)は、硫化水素プロドラッグ、レスベラトロール及びプラセボ群それぞれについて57.9万、40万及び37.1万であった(表8)。

【表 8】

表8
3群中の1回目試料の特徴

特徴	硫化水素プロドラッグ	レスベラトロール	プラセボ
精子濃度	11.02 x 10 ⁶	10.9 x 10 ⁶	10.64 x 10 ⁶ ^{a, b}
運動性A+B(%)	13.43	14.43	8.33 ^{a, b}
正常形態(%)	31.6	32.06	30.06 ^{a, b}
MFR	0.579 x 10 ⁶	0.40 x 10 ⁶	0.371 x 10 ⁶ ^{a, b}

10

注:統計解析はx²を用いて実施した。

MFR:回収された可動形態、受精能獲得後精子

20

^aプラセボと硫化水素プロドラッグとの間に統計的有意差は見出されなかった。^bプラセボとレスベラトロールとの間に統計的有意差は見出されなかった。

【0177】

プラセボ群の1回目試料から得られたデータを硫化水素プロドラッグから得たデータと比較した。プラセボ群と硫化水素プロドラッグ群との間に統計的有意差は見られなかった。治療後に回収された試料は、群間で異なるデータを示した。硫化水素プロドラッグ群についての精子濃度は、1701万であり、対してプラセボ群については1118万であった(p=0.038)。硫化水素プロドラッグ群についてのA+B運動性は20.06%であり、対してプラセボ群については10.06%であった(p=0.037)。硫化水素プロドラッグ群についての形態は36.3%であり、比較してプラセボ群は30.4%であった(p=0.088)。硫化水素プロドラッグ群についての受精能獲得後MFRは1.62x10⁶であり、対してプラセボ群では0.338x10⁶であった(p=0.035)(表9)。

30

【表 9】

表9
硫化水素プロドラッグとプラセボ群の間の2回目試料(治療後)の特徴

特徴	硫化水素プロドラッグ	プラセボ	P
精子濃度	17.01 x 10 ⁶	11.18 x 10 ⁶	0.038
運動性A+B(%)	20.06	10.06	0.037
正常形態(%)	36.3	30.4	0.088
MFR	1.62 x 10 ⁶	0.338 x 10 ⁶	0.035

40

注:統計解析はx²を用いて実施した。

MFR:回収された可動形態、受精能獲得後精子

50

【0178】

本研究の結果は、SG1002などの抗酸化物質(すなわち、遊離ラジカル/反応性酸素分子種捕捉剤として作用するだけでなく、他の小分子抗酸化物質、抗酸化酵素及び、脂質代謝を制御する酵素を生成する遺伝子を誘導する間接的抗酸化物質としても作用する薬物)での療法を慎重に選択した患者における精子形成を改善するための有効な方法として用いることについての支持を提供する。これは、硫化水素プロドラッグ療法がいくつかの精液パラメーターを改善することを示す初めての前向き、管理された、無作為化、二重盲検臨床試験である。

【0179】

精子濃度の増加が硫化水素プロドラッグ群において観察され、これが統計的に有意な増加を有する唯一の群であった。これらの知見は、抗酸化物質療法が乏精子-精子無力症を有する患者の管理において有効であると考えられる他の研究において得られたデータを実証及び確認する。

【0180】

要約すると本研究は、SG1002などの硫化水素プロドラッグが用いられた投与量で顕著な有害作用を発症することなくヒト身体によって十分に許容され、精子数、運動性、正常形態及び受精能獲得後MFRを増加できることを実証している。

【0181】

[実施例9]

骨肉腫を有する患者の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での治療

異なる形態の骨肉腫を有すると診断された患者について2つの治験を実行した。第一研究では患者は11歳であった。ベースライン状態は、病的骨折及び重大な腫瘍関連腫脹及び隣接関節機能の喪失を有する左大腿遠位の骨芽球性骨肉腫として特徴付けられた。患者の理学的検査は、軟部組織腫瘍の存在及び原発腫瘍の部位の発赤が顕著であった。肺転移の証拠は記録されなかった。患者は、シスプラチン、ドキソルビシン、イホスファミド及びエトポシドでの化学療法を明らかな臨床反応を有せずに4周期受けた。化学療法は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物での治療の前に中止した。治療レジメンは、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の硬ゼラチンカプセル1日あたり9個(SG-1002各400mgを含有する)の12週間の投与から構成された。第二週の終わりまでに患者は気分が良くなり、疼痛が弱まり、炎症も減少し始めた。X線は、腫瘍周囲の肢軟部組織の低減を示した。第四週の終わりに四肢の炎症は劇的に低下し、ほとんど消失した。疼痛はなく、X線画像は皮質骨の成長の徴候を示した。第八週の終わりに炎症は完全に消失した。患者の気分は良好であった。疼痛はなく、X線画像はより大きな接着骨を示した。第十二週の終わりにX線画像は、より大きな接着骨を明らかに示した。骨は、元の病的骨折の産物、角形成を伴って強化された。

【0182】

第二研究では患者は13歳であった。ベースライン状態は、病的骨折及び重大な腫瘍関連腫脹及び左肩の機能喪失を示す左上腕骨近位の毛細血管拡張骨肉腫として特徴付けられた。患者の理学的検査は、軟部組織腫瘍の存在及び原発腫瘍の部位の発赤が顕著であった。診断時には両側の肺転移の証拠があった。従来のX線は、骨膜反応を伴う軟部組織腫瘍を有する嚢胞性の透明な病変を示した。患者は、シスプラチン、ドキソルビシン、高投与量メトトレキサート、イホスファミド及びエトポシドでの化学療法を中程度の臨床反応を有して6周期受けた。6周期の最後に化学療法を中止した。治療レジメンは、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の硬ゼラチンカプセル1日あたり9個の12週間の投与から構成された。第三週の終わりまでに患者は気分が良くなり始め、疼痛が鎮まり、炎症も減少し始めた。第四週の終わりまでにX線画像は、腫瘍周囲の肢軟部組織の低減を示した。CAT走査は、転移がもはや進行していないが肺転移の改善は示さなかった。第八週の終わりに四肢の炎症は低下していたがまだ検知できた。患者は疼痛を有せず、X線画像は腫瘍が進行していないことを示した。第十二週の終わりに軟部組織腫脹は持続していた。

患者の気分は良好であった。疼痛はなく、X線画像は骨中の癌の進行を示さなかった。CAT走査は新たな肺転移を示さなかった。

【0183】

[実施例10]

水頭症に関連する状態を有する患者の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での治療

3種の治験を水頭症の徴候を示す患者で実行した。最初の治験では患者は3歳であった。患者のベースライン状態は、水頭症の非特異的な徴候によって特徴付けられた。MRIは後頭蓋窩に腫瘤を示した。手術が計画され、不完全な切除が実施された。病理学結果は、軟髄膜播種を有するテント下非定型奇形/ラブドイド腫瘍を示した。その時点で患者はわずかな反応を伴って種々の周期の化学療法で治療された。化学療法は中止され、患者は緩和ケアを受けた。高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の硬ゼラチンカプセル1日あたり6個(SG-1002各400mgを含有する)の投与からなる治療レジメンを12週間の期間で開始した。第二週の終わりに患者は改善の徴候を見せ始めた。眠気が改善され、第八週の終わりまでに患者は頭痛、嘔吐又は易刺激性の臨床的証拠を伴わずに完全に意識があった。患者は第十二週の終わりに重大な神経学的な回復を有し、患者は立って数歩歩くことができた。腫瘍の放射線学的証拠は消失し、患者は介助なしで歩くことができ、次の数週間で通常どおり食べることができた。

【0184】

第二治験では患者は2歳であった。患者は、水頭症を伴う増大した頭蓋内圧の潜行性、非局所的徴候を示した。MRIは、側脳室中に脳室内腫瘤を示した。手術が計画され、CSFシャントが設置され、不完全な切除が実施された。病理学結果は、脈絡叢細胞腫と一致する未分化腫瘍を示した。その時点で患者はわずかな反応を伴って種々の周期の化学療法で治療された。その時点で両親は患者にさらなる治療を与えないことを決定した。高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の硬ゼラチンカプセル1日あたり3個(SG-1002各400mgを含有する)の投与からなる治療レジメンを12週間の期間で開始した。第二週の終わりに患者は改善の徴候を見せ始めた。眠気が改善され、第八週の終わりまでに患者は頭痛、嘔吐又は易刺激性の臨床的証拠を伴わずに完全に意識があった。患者は第十二週の終わりに重大な神経学的な回復を有し、患者は立って数歩歩くことができた。残留腫瘍の放射線学的証拠は減少したが消失しなかった。

【0185】

第三治験は5歳の患者について実行された。患者は、水頭症、嘔吐、頭痛、傾眠及び上方注意麻痺を伴う増大した頭蓋内圧の非特異的な徴候を示した。MRIは、石灰化を伴う肥大した松果体不均一性腫瘤を示した。手術が計画され、CSFシャントが設置され、不完全な切除が実施された。病理学結果は、松果体芽種と一致した。その時点で患者は髄芽腫型化学療法の種々の周期で治療され、最初は良好な応答を有したが数カ月後に再発の証拠を示した。その時点で患者の両親は、患者にさらなる治療を与えないことを決定した。高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の硬ゼラチンカプセル1日あたり6個(SG-1002各400mgを含有する)の投与からなる治療レジメンを12週間の期間で開始した。第三週までに患者は改善の徴候を見せ始めた。眠気が改善され、第十二週の終わりまでに患者は頭痛、嘔吐又は易刺激性の臨床的証拠を伴わずに完全に意識があった。残留腫瘍の放射線学的証拠は減少したが消失しなかった。

【0186】

[実施例11]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での上衣腫を有する患者の治療

治験をテント上上衣腫の診断を有する6歳の患者に実行した。患者は水頭症、嘔吐、頭痛、傾眠及びうつ血乳頭を伴う増大した頭蓋内圧の徴候を伴って悪い臨床状態を示した。MRIは、視床領域で脳に隣接して浸潤している局所的浸潤腫瘍を示した。病理学調査スライドは、上衣腫の診断と一致した。その時点で患者は、不完全な手術及びさまざまな周期

の化学療法で治療された。放射線治療は受け入れられず、両親は患者にさらなる治療を与えないことを決定した。患者は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の硬ゼラチンカプセル1日あたり6個(SG-1002各400mgを含有する)の投与の12週間の治療レジメンを開始した。第三週までに患者は改善を見せた。眠気が徐々に改善され、第十二週の終わりまでに患者は頭痛、嘔吐及び易刺激性における大きな減少を伴って相当に改善された。残留腫瘍の放射線学的証拠は減少し、臨床状態は顕著に改善された。

【0187】

[実施例12]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での大頭症を有する患者の治療

大頭症及び易刺激性を有する傾眠交代性の証拠を有する18カ月の患者を高度に生物学的に利用可能な硫黄に富む組成物で治療した。治療前のMRIは、水頭症及び後頭蓋窩に局在した腫瘍腫瘍を示した。手術が計画され、CSFシャントが設置され、部分的切除が実施された。病理学結果は、上衣腫と一致した。患者の頭蓋内圧の徴候は、シャントにより改善され、患者の不全片麻痺はほとんど消散した。さらなる治療は両親によって受け入れられなかった。4カ月後MRIは、腫瘍サイズが増大したことを示し、患者は頭痛、傾眠及び進行性不全片麻痺を再び訴え始めた。治療レジメンは、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の硬ゼラチンカプセル1日あたり6個(SG-1002各400mgを含有する)の12週間の投与から構成された。第三週までに患者はわずかに改善を見せた。頭痛及び眠気は改善されたが消失しなかった。第十二週の終わりまでに患者は気分が良くなり、時折頭痛を有したが、嘔吐は有さず、不全片麻痺は進行しなかった。14週間後に残留腫瘍の放射線学的証拠は、最後の研究と比較して大きさにおける増加を示さなかった。

【0188】

[実施例13]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での不全片麻痺を有する患者の治療

3歳時に最初に不全片麻痺の進行性の徴候を示した5歳の患者を本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の硬ゼラチンカプセル1日あたり6個(SG-1002各400mgを含有する)の12週間の投与で治療した。患者のベースライン状態は、早朝嘔吐、頭痛及び傾眠を伴う増大した頭蓋内圧の非特異的徴候から構成された。MRIは、出血及び石灰化の徴候を有するテント上腫瘍腫脹を示した。手術が計画され、CSFシャントが設置され、部分的な切除が実施された。病理学結果は、未分化上衣腫と一致した。患者の頭蓋内圧の徴候は、シャントにより改善され、患者の不全片麻痺はほとんど消散した。患者は化学療法を開始し、徴候及び症状はほぼ完全な消散を有して12周期を受けた。MRIは肉眼での腫瘍の証拠を有さない改善を示した。4カ月後MRIは局所的腫瘍浸潤を示し、患者は頭痛、傾眠及び進行性不全片麻痺を訴え始めた。さらなる治療は両親によって受け入れられなかった。高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の投与で、患者は第三週までにわずかな改善を示した。頭痛及び眠気は改善した。第十二週の終わりまでに患者は気分が良くなり、嘔吐を有さず、不全片麻痺は進行しなかった。14週間後に残留腫瘍の放射線学的証拠は、最後の研究と比較して大きさにおける増加を示さなかった。

【0189】

[実施例14]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での髄芽腫を有する患者の治療

治療を再発性髄芽腫及びCSFシャントを通じた患者の原発腫瘍の骨盤内転移を有する14歳の患者に実行した。患者は、最初に腹部痛、四肢の腫脹及び尿症状並びに頭痛、早朝悪心及び失調を示した。患者は、中程度の結果を有して化学療法を開始した。高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の治療を硬ゼラチンカプセル1日あたり9個(SG-1002各400mgを含有する)の投与によって12週間について開始した。患者は第三週までに改善を示した。腹囲が減少し、尿症状は消失した。頭痛及び失調は改善したが消失しなかった

。第十二週の終わりまでに患者は気分が良くなり、腹腔/骨盤腫瘍は顕著に減少した。頭痛及び失調は大きく改善した。後頭蓋窩の髄芽腫再発の放射線学的証拠は、以前の研究と比較して大きさにおいて増大していなかった。

【0190】

[実施例15]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での扁平上皮癌を有する患者の治療

治験を手術、化学療法及び放射線治療で治療した肛門管の再発性扁平上皮癌による直腸出血及び疼痛を有する57歳の患者に実行した。患者の状態は、最後の放射線治療の3カ月後に再発し、患者はさらなる治療を拒否した。患者に本発明の高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物を硬ゼラチンカプセル1日当たり9個(SG-1002各400mgを含有する)の治療レジメンで処方した。治療レジメン開始の4又は5日後に患者は疼痛の改善を示した。第三週までに疼痛は去り、直腸出血は鎮静した。患者は、高度に生物学的に利用可能な硫黄に富む組成物の治療レジメンと共に救援化学療法プログラムを再開することを決めた。

【0191】

[実施例16]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での白血病を有する患者の治療

治験を前駆-B-calla(+)急性リンパ性白血病を有すると診断された13歳の患者に実行した。患者は初めての寛解にあり、BFM85プロトコールに従った薬物療法を受けていた。6カ月の治療後、患者は、硫化水素前駆体カプセルを摂り始め、気分がさらに良くなったと述べ、良好な許容を有して運動できた。患者は週末にランニング、ハイキングをし、学校に定期的に出席した。患者の治療レジメンは1日当たり6個の硬ゼラチンカプセル(SG-1002各400mgを含有する)の投与から構成された。患者は、硫化水素前駆体の摂取の前後でどのように感じたかを比較できた。患者の身体的及び知的能力が改善した。現在患者は、クロスカントリーを歩き、5~10kmマラソンを走るなどの強い運動も許容できる。患者の気分も改善された。

【0192】

[実施例17]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での心不全と診断された患者の治療

46歳時に、中程度の活動又は運動後に息切れの増大及び胸部痛を有して心不全と診断された47歳の患者について治験を実行した。症状の2カ月間の無視の後に患者は心臓発作を経験した。患者は既に冠動脈形成術を経験していた。患者は喫煙していなかったが、糖尿病の家族歴及び高いコレステロールレベルを有した。患者の駆出率は40%未満であった。患者は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の1日当たり6個(SG-1002各400mgを含有する)の硬ゼラチンカプセルの治療レジメンを開始した。治療レジメンは4カ月間継続した。第二週の終わりまでに患者は気分が良くなり始め、血糖レベルは(患者は12時間ごとのグリベンクラミドの使用を継続していたが)正常化した。第三週までに息切れは改善された。第八週まで糖レベルは安定し、グリベンクラミドの使用は1日あたり1錠剤まで影響なく低減された。運動時の息切れは胸部痛と同様に低下した。4カ月の終わりに心室駆出率研究は、40%を超え、患者は気分が良くなり、より運動に耐えることができた。

【0193】

[実施例18]

高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物(SG-1002)での2型糖尿病を有する患者の治療

2型糖尿病を有する44歳肥満男性患者について治験を実行した。患者は30歳時から2型糖尿病の診断を有した。その時から患者は、通常の糖管理と共にグリベンクラミドを摂取し

10

20

30

40

50

続けている。41歳時に患者は、日常的な咳、息切れ及び起座呼吸に気づき始めた。患者は42歳時に心臓発作を有し、その後の患者の駆出率は40%未満であった。患者は、高度に生物学的に利用可能なゼロ価硫黄に富む組成物の1日当たり6個(SG-1002各400mgを含有する)の硬ゼラチンカプセルでの治療レジメンを開始した。治療レジメンは3カ月間継続した。第三週までに患者は気分が良くなり始め、血糖レベルは(患者はグリベンクラミドの使用を継続していたが)正常化した。第七週の終わりまでに空気不足は改善され始めた。三カ月目の終わりには患者はグリベンクラミドを朝に摂取するだけで患者の糖尿病は事実上正常であった。

【0194】

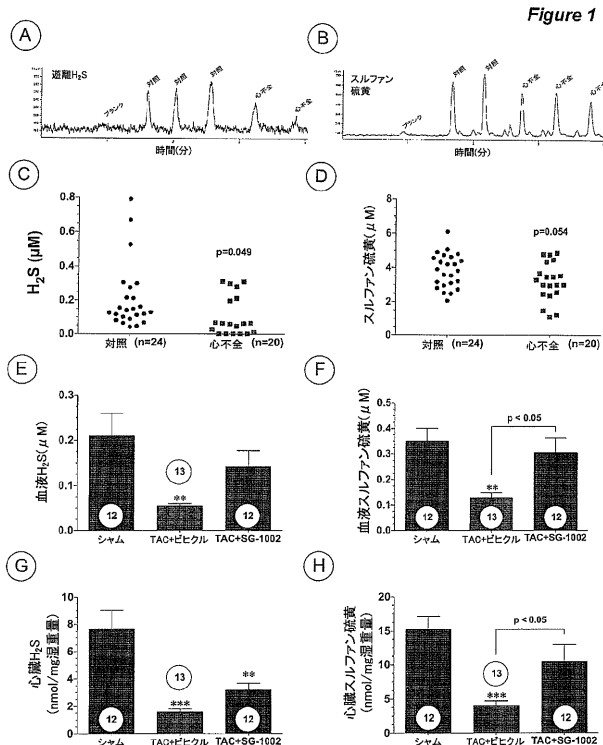
他の実施形態

本発明はその具体的な実施形態に関連して記載されているが、さらなる変更が可能であり、本出願が一般に本発明の原理に従う本発明の任意の改変、使用又は適合を本発明が関係する技術分野内で公知である又は慣行の範囲内であり、本明細書に記載の本質的特性に適用されうる本開示からのそのような発展を含んで網羅することを意図することは理解される。

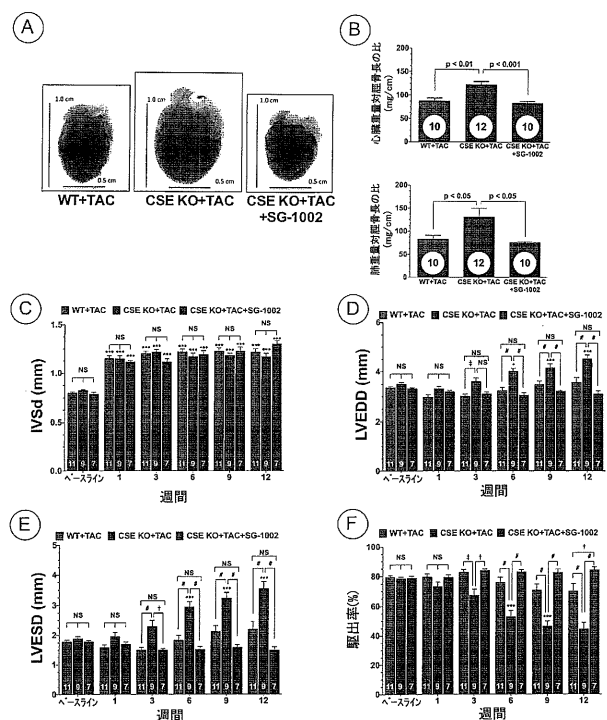
【0195】

全ての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許又は特許出願それぞれが具体的に及び個々にその全体が参照により組み込まれると記載されているのと同程度にその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

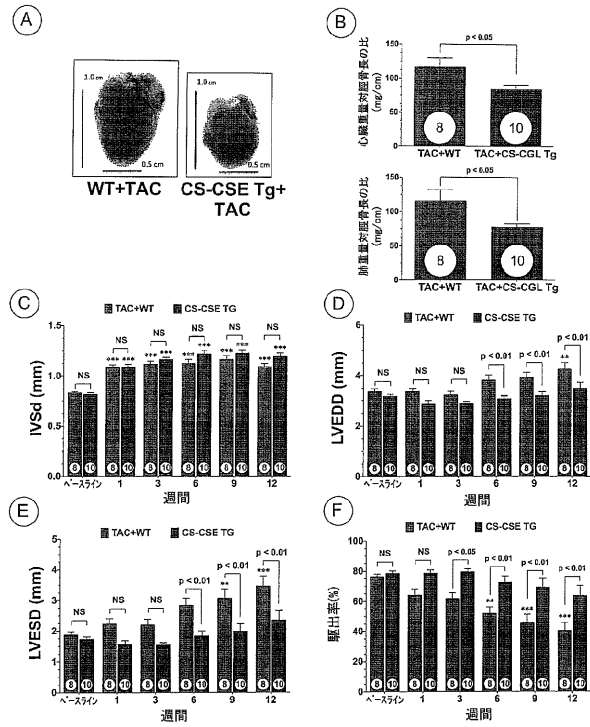
【図1】



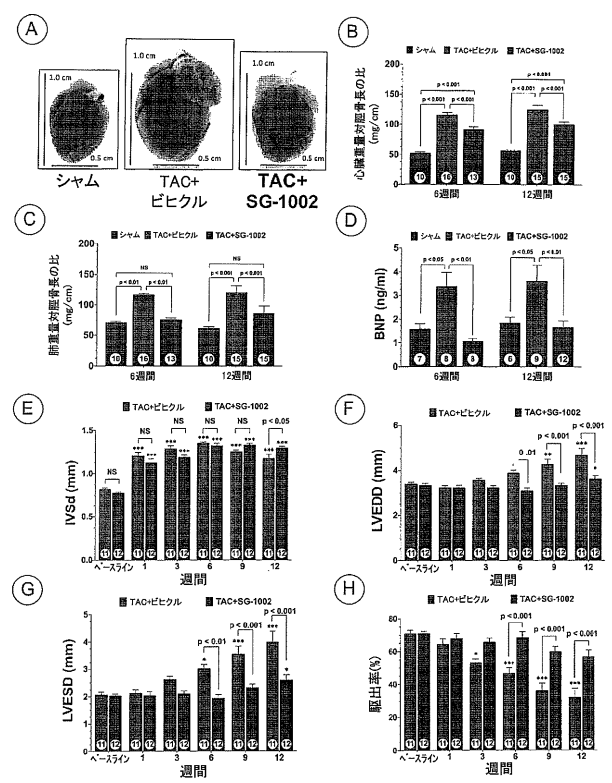
【図2】



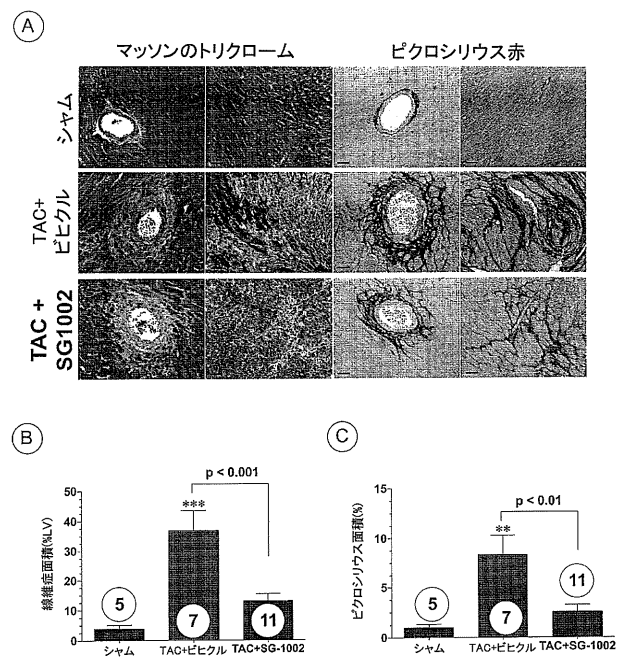
【図 3】



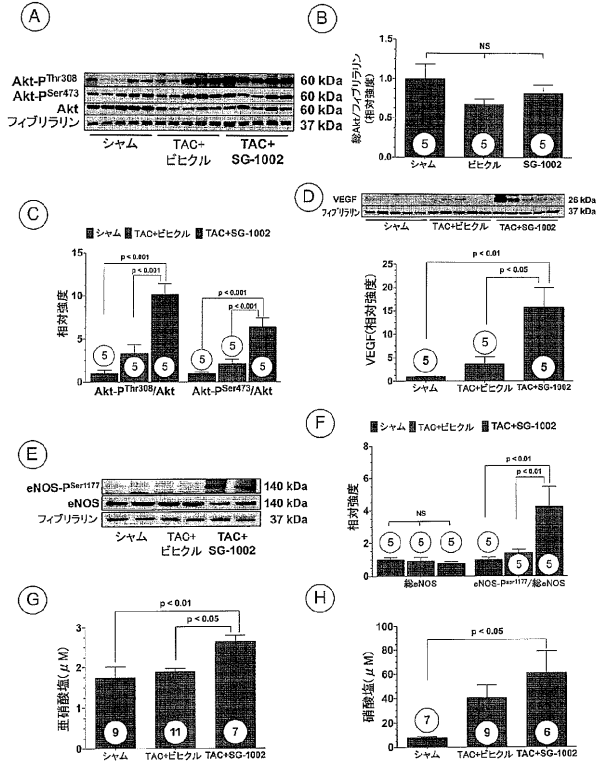
【図 4】



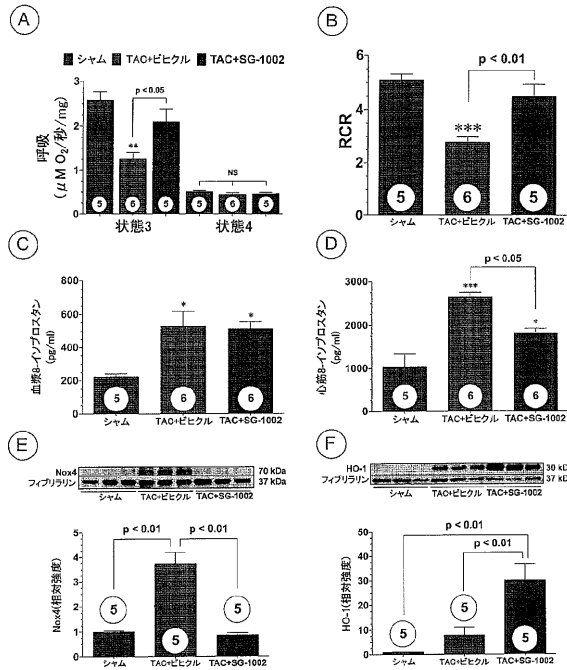
【図 5】



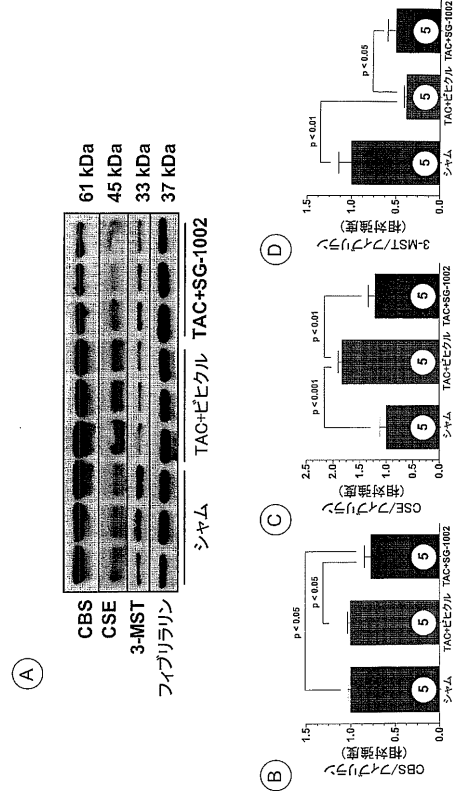
【図 6】



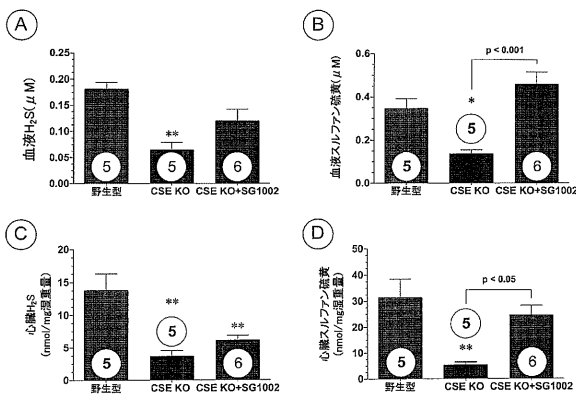
【図 7】



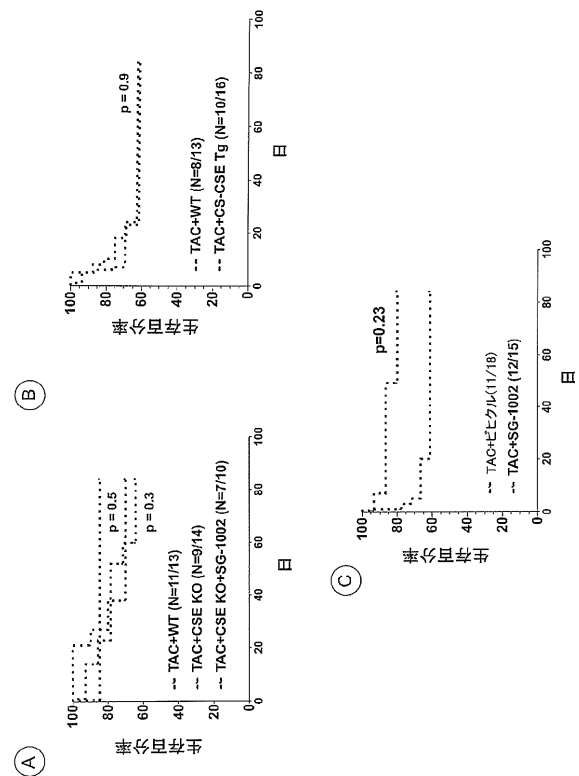
【図 8】



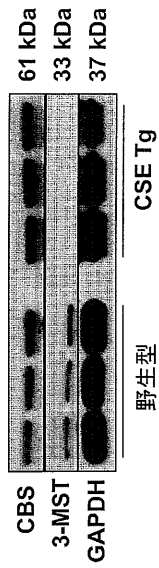
【図 9】



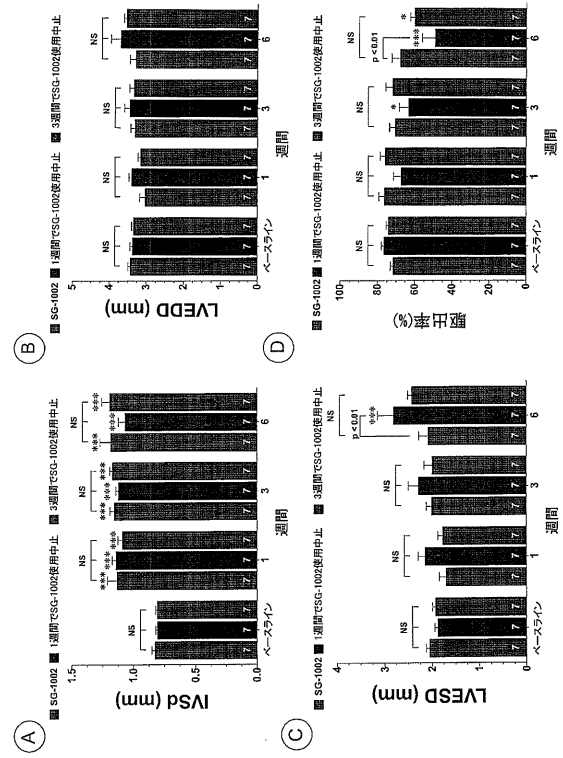
【図 10】



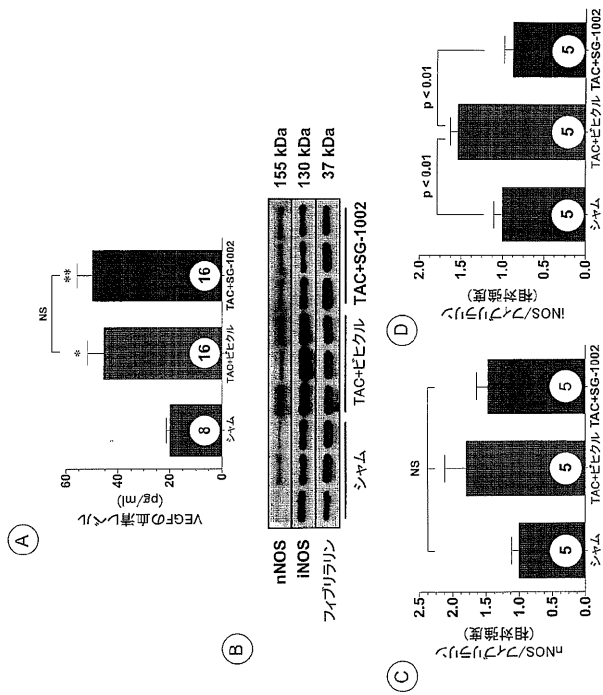
【図 1 1】



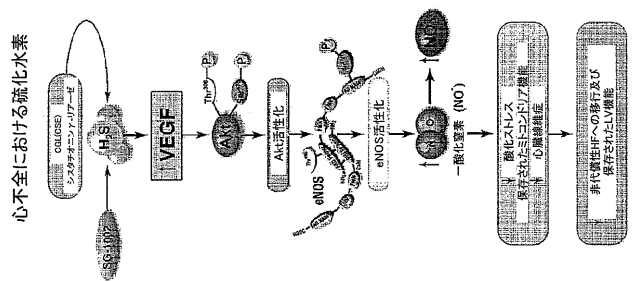
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



【手続補正書】

【提出日】平成26年5月13日(2014.5.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0195

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0195】

全ての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許又は特許出願それぞれが具体的に及び個々にその全体が参照により組み込まれると記載されているのと同程度にその全体が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の実施形態として以下を挙げることができる。

[1]

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤も含む組成物の有効量を投与することによって、その必要のある対象において酸化ストレスに関連する状態を治療する方法。

[2]

前記組成物が約99%(w/w)のゼロ価硫黄及び約1%(w/w)の高極性構成要素を含み、前記高極性構成要素が硫酸ナトリウム、ポリチオン酸ナトリウム及びチオ硫酸ナトリウムから選択される、[1]に記載の方法。

[3]

前記高極性構成要素が、ポリチオン酸ナトリウム、ポリチオン酸カリウム、ポリチオン酸アンモニウム、ポリチオン酸カルシウム、チオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、チオ硫酸アンモニウム、チオ硫酸カルシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素カリウム、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸水素カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、塩化カルシウム、酢酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、パルミチン酸カリウム及びラウリン酸アンモニウムからなる群から選択される、[1]に記載の方法。

[4]

元素状アルファ硫黄及び1つ以上の高極性構成要素を、元素状アルファ硫黄を約10から約150部に対して高極性構成要素を1部の比(w/w)で含む、腸内、局所又は非経口投与用の組成物の有効量を投与することによって、その必要のある対象における酸化ストレスに関連する状態を治療する方法。

[5]

前記組成物が腸内投与のために製剤化され、前記元素状アルファ硫黄及び前記高極性構成要素が400mgの量で共に存在する、[4]に記載の方法。

[6]

前記組成物がカプセルである、[5]に記載の方法。

[7]

前記組成物が局所投与用に製剤化され、前記組成物が1～20%のゼロ価硫黄含有量を有する、[2]に記載の方法。

[8]

前記組成物がクリームである、[7]に記載の方法。

[9]

前記クリームが(i)5～20%のゼロ価硫黄含有量及び(ii)ポリエチレングリコール又は石油ゼリーを含む、[8]に記載の方法。

[10]

前記クリームが5～15%のゼロ価硫黄含有量を有する、[9]に記載の方法。

[11]

第三の薬物をさらに含む、[4]に記載の方法。

[1 2]

前記第三の薬物が心血管疾患剤、抗炎症剤、抗神経変性剤又は抗癌剤/抗増殖剤である、[11]に記載の方法。

[1 3]

前記元素状アルファ硫黄、前記高極性構成要素及び前記第三の薬物が酸化ストレスに関連する状態を治療するための有効量で存在する、[11]に記載の方法。

[1 4]

酸化ストレスに関連する前記状態が、統合失調症、双極性障害、脆弱X症候群、鎌形赤血球症、慢性疲労症候群、変形性関節症白内障、黄斑変性症、中毒性肝炎、ウイルス性肝炎、肝硬変、慢性肝炎、透析からの酸化ストレス、腎毒性、腎不全、潰瘍性大腸炎、細菌感染、HIV及びAIDSなどのウイルス感染、ヘルペス、耳感染症、上気道疾患、高血圧、脱毛及び抜け毛、男性不妊症、運動能力に関連するオーバートレーニング症候群、水虫、乾癬、湿疹、強皮症、アトピー性皮膚炎、多発性筋炎、酒さ、疱疹状皮膚炎、他の神経変性疾患、他の炎症性疾患並びに癌からなる群から選択される、[4]に記載の方法。

[1 5]

酸化ストレスに関連する前記状態が心血管疾患である、[14]に記載の方法。

[1 6]

前記心血管疾患が、動脈硬化、冠動脈心疾患、虚血、内皮機能障害(特に血管弾性に影響を及ぼす機能障害)、再狭窄、血栓症、狭心症、高血圧、心筋症、高血圧性心疾患、心不全、肺性心、不整脈、心内膜炎、炎症性心拡大、心筋炎、心筋梗塞、心臓弁膜症、発作及び脳血管性疾患、大動脈弁狭窄、うっ血性心不全並びに末梢動脈疾患からなる群から選択される、[15]に記載の方法。

[1 7]

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物の有効量を投与することによって、硫黄栄養欠乏を有する対象における硫化水素レベルを増大させる方法。

[1 8]

第三の薬物をさらに含む、[17]に記載の方法。

[1 9]

前記第三の薬物が栄養補助食品である、[18]に記載の方法。

[2 0]

前記元素状アルファ硫黄、前記高極性構成要素及び前記第三の薬物が全身の健康状態を促進又は維持するための有効量で存在する、[18]に記載の方法。

[2 1]

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物を投与することによって心血管疾患の治療を評価するための方法であって、前記方法が、

前記対象由来の試料中の硫化水素のレベルを決定すること、

前記心血管疾患を治療するために十分な量に前記組成物の投与量を調整すること、を含み、

硫化水素のレベルの増大又は心血管系パラメーターの改善が前記心血管疾患の治療をもたらす、前記方法。

[2 2]

前記心血管系パラメーターが、拡張末期容積(EDV)、収縮末期容積(ESV)、1回拍出量、駆出率、心拍数及び心拍出量からなる群から選択される、[21]に記載の方法。

【 手 続 補 正 2 】

【 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】

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤も含む組成物の有効量を投与することによって、その必要のある対象において酸化ストレスに関連する状態を治療する方法。

【請求項 2】

前記組成物が約99%(w/w)のゼロ価硫黄及び約1%(w/w)の高極性構成要素を含み、前記高極性構成要素がポリチオン酸ナトリウム、ポリチオン酸カリウム、ポリチオン酸アンモニウム、ポリチオン酸カルシウム、チオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、チオ硫酸アンモニウム、チオ硫酸カルシウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素カリウム、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸水素カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、塩化カルシウム、酢酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、パルミチン酸カリウム及びラウリン酸アンモニウム、好ましくは硫酸ナトリウム、ポリチオン酸ナトリウム及びチオ硫酸ナトリウムからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

元素状アルファ硫黄及び1つ以上の高極性構成要素を、元素状アルファ硫黄を約10から約150部に対して高極性構成要素を1部の比(w/w)で含む、腸内、局所又は非経口投与用の組成物の有効量を投与することによって、その必要のある対象における酸化ストレスに関連する状態を治療する方法。

【請求項 4】

前記組成物が腸内投与のために製剤化され、前記元素状アルファ硫黄及び前記高極性構成要素が400mgの量で共に存在し、好ましくは前記組成物がカプセルである、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記組成物が局所投与用に製剤化され、前記組成物が1～20%のゼロ価硫黄含有量を有し、好ましくは前記組成物がクリームである、請求項2に記載の方法。

【請求項 6】

前記クリームが(i)5～20%のゼロ価硫黄含有量及び(ii)ポリエチレングリコール又は石油ゼリーを含み、好ましくは前記クリームが5～15%のゼロ価硫黄含有量を有する、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

第三の薬物をさらに含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 8】

前記第三の薬物が心血管疾患剤、抗炎症剤、抗神経変性剤又は抗癌剤/抗増殖剤であるか、又は前記元素状アルファ硫黄、前記高極性構成要素及び前記第三の薬物が酸化ストレスに関連する状態を治療するための有効量で存在する、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

酸化ストレスに関連する前記状態が、心血管疾患、好ましくは動脈硬化、冠動脈心疾患、虚血、内皮機能障害(特に血管弾性に影響を及ぼす機能障害)、再狭窄、血栓症、狭心症、高血圧、心筋症、高血圧性心疾患、心不全、肺性心、不整脈、心内膜炎、炎症性心拡大、心筋炎、心筋梗塞、心臓弁膜症、発作及び脳血管性疾患、大動脈弁狭窄、うっ血性心不全又は末梢動脈疾患、統合失調症、双極性障害、脆弱X症候群、鎌形赤血球症、慢性疲労症候群、変形性関節症白内障、黄斑変性症、中毒性肝炎、ウイルス性肝炎、肝硬変、慢性肝炎、透析からの酸化ストレス、腎毒性、腎不全、潰瘍性大腸炎、細菌感染、HIV及びAIDSなどのウイルス感染、ヘルペス、耳感染症、上気道疾患、高血圧、脱毛及び抜け毛、男性不妊症、運動能力に関連するオーバートレーニング症候群、水虫、乾癬、湿疹、強皮症、アトピー性皮膚炎、多発性筋炎、酒さ、疱疹状皮膚炎、他の神経変性疾患、他の炎症性疾患並びに癌からなる群から選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項 10】

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物の有効量を投与することによって、硫黄栄養欠乏を有する対象における硫化水素レベルを増大させる方法。

【請求項 1 1】

第三の薬物をさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記第三の薬物が栄養補助食品であるか、又は前記元素状アルファ硫黄、前記高極性構成要素及び前記第三の薬物が全身の健康状態を促進又は維持するための有効量で存在する、請求項11に記載の方法。

【請求項 1 3】

90～99.9%(w/w)の元素状アルファ硫黄及び0.01～10%(w/w)の高極性構成要素を含み、場合により1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む組成物を投与することによって心血管疾患の治療を評価するための方法であって、前記方法が、

前記対象由来の試料中の硫化水素のレベルを決定すること、

前記心血管疾患を治療するために十分な量に前記組成物の投与量を調整すること、
を含み、

硫化水素のレベルの増大又は心血管系パラメーターの改善が前記心血管疾患の治療をもたらす、前記方法。

【請求項 1 4】

前記心血管系パラメーターが、拡張末期容積(EDV)、収縮末期容積(ESV)、1回拍出量、駆出率、心拍数及び心拍出量からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/55205
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 31/00 (2012.01) USPC - 514/706 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) IPC(8)-A01N 31/00 (2012.01) USPC-514/706 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC-514/706,665,702 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PATBASE, PUBWEST, Google, Google Scholar, WIPO, Elemental sulfur, zero valent sulfur, treat, oxidative stress, disorder, disease, highly bioavailable sulfur, cyclooctasulfur, S8, alpha sulfur, cycloheptasulfur, cyclohexasulfur, topical, oral, cream, petroleum jelly, polyethylene glycol, cardiovascular, AIDs, HIV, stroke, neurodegenerative		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP0242553A1 (CAMPO et al) 28 October 1987 (28.10.1987) para[0002], [0006]-[0008]	1
Y		1-22
Y	US 2009/0304819 A1 (GOJON-ROMANILLOS) 10 December 2009 (10.12.2009) para[0003], [0050]-[0052], [0054]-[0055], [0059], [0063]-[0068], [0070]-[0086], [0091], [0109], [0112]-[0119], [0239]-[0242]	1-22
Y	US 2004/0057972 A2 (SHACKNAI et al) 25 March 2004 (25.03.2004) para[0012], [0029], [0069], [0070]	8-10
A	US 2003/0235571 A1 (GOJON-ROMANILLOS) 25 December 2003 (25.12.2003)	1-22
A	US 2009/0181081 A1 (GOJON-ROMANILLOS) 16 July 2009 (16.07.2009)	1-22
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 06 November 2012 (06.11.2012)		Date of mailing of the international search report 20 NOV 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/44 (2006.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/02	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 3/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 27/12 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 3/02	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 27/12	
A 6 1 P 39/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 39/06	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 11/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/04	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	1 0 1
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
	A 6 1 P 21/00	
	A 6 1 P 25/28	
	A 6 1 P 35/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

- (74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
- (74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
- (74)代理人 100169971
弁理士 菊田 尚子
- (74)代理人 100168893
弁理士 岩崎 正路
- (72)発明者 ゴジョン・ソリージャ, ガブリエル
メキシコ合衆国 シー・ピー・ 6 6 2 7 8 ヌエボ レオン, サン ペドロ ガルサ グラシア
, コロニア ロマス デル カンペストレ, ロマス デル ソル 6 4 9
- (72)発明者 ゴジョン・ロマニージョス, ガブリエル
メキシコ合衆国 シー・ピー・ 6 6 2 2 0 ヌエボ レオン, サン ペドロ ガルサ グラシア
, コロニア デル バージェ, リオ マデリア 5 1 1
- (72)発明者 リーファー, デビッド, ジェイ.
アメリカ合衆国 3 0 3 2 2 ジョージア州, アトランタ, エヌイー, クリフトン ロード 1 5
9 9, オフィス オブ テクノロジー トランスファー, エモリー ユニバーシティ
- F ターム(参考) 4C076 AA16 AA53 AA54 CC01 CC04 CC07 CC10 CC11 CC14 CC15
CC16 CC17 CC18 CC21 CC27 CC35 CC42 DD09 EE42 EE56
4C084 AA19 AA23 MA02 MA28 MA37 MA55 MA60 NA14 NA15 ZA122
ZA182 ZA332 ZA362 ZA392 ZA402 ZA422 ZA452 ZA512 ZA542 ZA592
ZA682 ZA752 ZA892 ZA942 ZB132 ZB332 ZB352 ZC212 ZC552 ZC752
4C086 AA01 AA02 HA08 HA17 HA25 MA02 MA03 MA04 MA28 MA37
MA55 MA60 NA14 NA15 ZA12 ZA18 ZA33 ZA36 ZA39 ZA40
ZA42 ZA45 ZA51 ZA54 ZA59 ZA68 ZA75 ZA89 ZA94 ZB13
ZB33 ZB35 ZC21 ZC55 ZC75