

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6849683号
(P6849683)

(45) 発行日 令和3年3月24日 (2021.3.24)

(24) 登録日 令和3年3月8日 (2021.3.8)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	31/444	(2006.01)	A 6 1 K	31/444	
A 6 1 K	31/734	(2006.01)	A 6 1 K	31/734	
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	

請求項の数 6 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2018-530677 (P2018-530677)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月13日 (2016.9.13)
 (65) 公表番号 特表2018-527407 (P2018-527407A)
 (43) 公表日 平成30年9月20日 (2018.9.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/051482
 (87) 国際公開番号 W02017/035542
 (87) 国際公開日 平成29年3月2日 (2017.3.2)
 審査請求日 令和1年9月12日 (2019.9.12)

(73) 特許権者 518063654
 アッペルバウム、エラシュミエル ヨリ
 イスラエル9258111エルサレム、チ
 エルニコフスキー・ストリート8番
 (74) 復代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 復代理人 100138900
 弁理士 新田 昌宏
 (74) 代理人 100145403
 弁理士 山尾 憲人
 (74) 代理人 100150500
 弁理士 森本 靖
 (74) 代理人 100176474
 弁理士 秋山 信彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低酸素関連疾患の治療のための医薬組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

0.1 ~ 100 μ M の濃度の N, N, N', N' - テトラキス - (2 - ピリジルメチル) - エチレンジアミン (TPEN) 又はその医薬的に許容可能な塩と、約 0.1 ~ 約 10 % (w/v) の濃度の、平均分子量が約 20 ~ 約 50 kDa であるアルギン酸ナトリウムと、医薬的に許容可能な担体からなる、心臓血管疾患、虚血性心疾患、急性心筋梗塞および心筋低酸素症からなる群から選択される低酸素関連心疾患の治療用医薬組成物であって、静脈内投与又はカテーテル法によって投与される医薬組成物。

【請求項 2】

静脈内投与が、静脈内注射又は静脈内点滴である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3】

前記カテーテル法が、動脈内カテーテル法である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

医薬組成物の治療有効量が約 0.1 ~ 約 10 ml の範囲である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項 5】

医薬組成物の治療有効量が約 0.5 ~ 約 5 ml の範囲である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

医薬組成物が、再灌流の開始時、再灌流中、又は再灌流後の同日中に投与される、請求

20

項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野及び背景

本発明は、そのいくつかの実施形態において、低酸素関連疾患を治療するための医薬組成物及びその使用方法、より詳細には、T P E N 及びアルギネート (alginate) 化合物を有効成分として含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

低酸素症 - 虚血性傷害は、酸素供給と需要との間のミスマッチをもたらす血液供給の組織制限に起因し、これは細胞壊死をもたらし得る。虚血組織に対する酸素化された (oxygenated) 血液の回復、すなわち再酸素化は、通常、プログラムされた細胞死、すなわちアポトーシスに関連するより重篤な組織損傷を引き起こし得る。これらの 2 つの事象間の関連は、虚血 - 再灌流傷害 (ischemia-reperfusion Injury, I R I) として知られている。したがって、I R I を最小化することは、広範な臨床的意味を有する。I R I は、急性心筋梗塞、脳卒中、血栓溶解、及び再酸素化 / 再灌流後の虚血に関連する他の病的状態の間に生じるレドックス活性金属及びフリーラジカル媒介カスケードとみなされる。組織及び器官への傷害 / 損傷のこのタイプは、心肺バイパス、経皮的冠動脈インターベンション、冠動脈形成術及び他の血栓溶解処置のような医療処置中の虚血後再灌流においても生じる。

【0003】

銅、鉄及び亜鉛のような生物学的に重要な遷移金属もまた、レドックス活性金属であり、且つ、再灌流誘発心筋損傷において決定的な媒介的 (mediatory) 役割を果たすことが判明している。したがって、それらの細胞内輸送は厳密に調節され、且つ、正常な生理学的条件下では、フェリチン及びセルロプラスミンのような保護細胞内貯蔵タンパク質内に *in situ* で保存される。

【0004】

しかし、低酸素症 - 虚血のような状況下では、それらは頻繁にその貯蔵 (stores) から放出され、且つ、再灌流を開始すると高酸素レベルにさらされる。その結果は、酸化還元活性触媒プロセス、及びフェントン (Fenton) 反応及びハーバー・ワイス (Haber-Weiss) 反応による有害なフリーラジカル、いわゆる活性酸素種 (reactive oxygen species, R O S) の形成の誘発すること (triggering) である。

【0005】

R O S は、心臓発作及び脳卒中、脳外傷、臓器移植拒絶、様々な神経変性疾患、関節炎などの多くの疾患、症候群及び病状に関与し、且つ、それらを媒介する。

【0006】

神経細胞アポトーシス死の促進による虚血性脳損傷のような臓器損傷に有意に寄与する鉄、銅及びまた亜鉛のような細胞内遷移金属の虚血誘発された高蓄積。キレート剤によって亜鉛を除去することは、虚血性脳損傷を軽減する有効なアプローチであり得る。

【0007】

本発明者に対する米国特許第 5,082,851 号は、虚血 - 再灌流障害から心臓組織を保護することができる金属キレート剤、N, N, N', N' - テトラキス - (2 - ピリジルメチル) - エチレンジアミン (T P E N) を教示している。この高特異性の重金属キレート剤は、酸化還元活性化の開始前に酸化還元活性金属 (遷移金属) の酸化還元電位を不活性形態に変化させることにより、及び従って、有害な活性酸素種 (R O S) の収量および放出を防止することによって作用すると考えられる。

【0008】

国際特許出願公開 W O 2 0 1 3 / 0 0 3 4 4 5 は、T P E N は、低酸素ストレス傷害か

10

20

30

40

50

ら最大70%までの(但し70%以下の)保護を心臓細胞に提供することができることを教示している。TPENの有効濃度範囲は約1~約10 μ Mであった。より高濃度で投与されたTPENは、保護効力の低下をもたらした(Journal of Muscle Research and Cell Motility、2007年10月、第28巻、第7-8号、第421~428頁)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、有効でありかつ上記の制限がない低酸素関連疾患を治療するための医薬組成物の必要性が広く認識されており、且つ、そのような医薬組成物を持つことが非常に有益である。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の概要

本発明の一態様によれば、TPEN又はその医薬的に許容可能な塩、アルギネート化合物、及び医薬的に許容可能な担体を包含する医薬組成物が提供される。

【0011】

本発明の別の態様によれば、低酸素関連疾患を治療する方法が提供される。該方法は、それを必要とする対象(a subject)に医薬組成物の治療有効量を投与するステップを包含する。

20

【0012】

本発明のさらに別の態様によれば、低酸素関連疾患を治療する方法が提供される。該方法は、以下のステップ:

(a) 治療有効量のTPEN又はその医薬的に許容可能な塩を、それを必要とする対象に投与するステップと、

(b) 治療有効量のアルギネート化合物を前記対象に投与するステップと、を包含する。

【0013】

以下に記載する本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、アルギネート化合物はアルギン酸ナトリウムである。

30

【0014】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、アルギネート化合物の平均分子量は約10~約300kDaの範囲である。

【0015】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、アルギネート化合物の平均分子量は、約10~約50kDaの範囲である。

【0016】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、医薬組成物中のアルギネート化合物の濃度は約0.1~約10%(w/v)の範囲である。

【0017】

40

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、医薬組成物中のアルギネート化合物の濃度は、約1~約4%(w/v)の範囲である。

【0018】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、医薬組成物中のアルギネート化合物の濃度は約2%(w/v)である。

【0019】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、医薬組成物中のアルギネート化合物の濃度は、約1%(w/v)である。

【0020】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、医薬組成物中のTP

50

ＥＮの濃度は、 $0.1 \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲である。

【００２１】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、医薬組成物中のＴＰＥＮの濃度は約 $1 \sim 50 \mu\text{M}$ である。

【００２２】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、医薬組成物中のＴＰＥＮの濃度は $1 \sim 10 \mu\text{M}$ の範囲である。

【００２３】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、医薬組成物中のＴＰＥＮの濃度は $3 \sim 5 \mu\text{M}$ の範囲である。

【００２４】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、アルギネート化合物中の -L- グルロン酸と -D- マヌロン酸との間のモノマー比は $1 : 1 \sim 3 : 1$ の範囲である。

【００２５】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、低酸素関連疾患は、心血管疾患、虚血性心疾患、急性心筋梗塞 (acute myocardial infarction, AMI)、虚血性脳症、虚血性脳卒中、黄斑変性症、眼の虚血性症候群、虚血性視神経症、糖尿病性網膜症、関節炎、炎症、敗血症、敗血症誘発性ショック、腎臓疾患、組織線維症、胃腸疾患、神経変性疾患、呼吸窮迫症候群、気管支肺異形成症 (bronchopulmonary dysplasia)、肺高血圧、低酸素性肺高血圧、重症肺高血圧症、COPD、糖尿病網膜症、糖尿病、角膜血管新生、病理性血管成長、筋骨格障害、虚血再灌流傷害、心筋低酸素症、又は心肥大からなる群から選択される。

【００２６】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、心疾患は虚血性心疾患である。

【００２７】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、心疾患は急性心筋梗塞である。

【００２８】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、投与は注射又はカテーテル法によって行われる。

【００２９】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、カテーテル法は、動脈内カテーテル法である。

【００３０】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、有効量は約 $0.1 \sim 10 \text{ ml}$ の範囲である。

【００３１】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、有効量は約 $0.5 \sim 5 \text{ ml}$ の範囲である。

【００３２】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、ＴＰＥＮを投与するステップ及びアルギネート化合物を投与するステップは同時に (concomitantly) 行われる。

【００３３】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、ＴＰＥＮを投与するステップ及びアルギネート化合物を投与するステップは、順次行われる。

【００３４】

本発明は、低酸素関連疾患の治療のための安全で有効な医薬組成物及びその使用方法を

10

20

30

40

50

提供することによって、現在知られている構成の欠点にうまく対処する。

【0035】

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び／又は科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載された方法及び材料と類似又は同等の方法及び材料を本発明の実施形態の実施又は試験に使用することができるが、例示的な方法及び／又は材料を以下に記載する。紛争の場合、定義を含めて特許明細書が支配する。さらに、材料、方法、及び実施例は例証に過ぎず、必ずしも限定的なものではない。

【発明を実施するための形態】

【0036】

10

好ましい実施形態の説明

本発明は、TPEN及びアルギネート化合物を活性成分として包含する医薬組成物である。医薬組成物は、低酸素関連疾患の治療に使用することができる。

【0037】

本発明の原理及び動作は、図面及び付随の説明を参照することによって、よりよく理解され得る。

【0038】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明はその適用が必ずしも以下の説明に記載された詳細又は実施例により例示される詳細に限定されないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態が可能であるか、又は様々な方法で実施又は実行されることが可能である。

20

【0039】

米国特許第8,168,612号及び米国特許出願第12/530,488号は、急性心筋梗塞(AMI)の治療のためのアルギネート化合物の使用を教示している。アルギネートの治療効果は、梗塞組織の細胞外マトリクス内に固体ゲルが形成され、それにより、AMI後のその治癒及び修復過程の間に損傷した心臓組織に機械的支持を提供することに起因する。先行技術は、アルギネートが治療的に有益な生理学的活性の生化学を発揮し得ることを記載又は示唆していない。

【0040】

本発明者は、本発明を実施することを減らす一方で、アルギニン酸ナトリウムが培養細胞への低酸素誘発損傷を防止することができることを驚くべきことに明らかにした。機械的支持は培養細胞に関連することができないので、及びさらにアルギネートは生きた細胞の中に浸透することができないので、この知見は予想外であった。しかし、以下の実施例の節に示すように、低酸素条件下で培養心臓細胞にアルギニン酸ナトリウムを提供すると、当該細胞によって放出されるクレアチンキナーゼ(CK)及び乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)酵素の量が実質的に減少した。これらの酵素の放出減衰(低酸素傷害の指標である)は、生化学的経路を必要とするので、観察されたそれらの放出の減少は、アルギネートが生化学的経路を介して低酸素傷害から細胞を保護する能力の指標であると推定される。実施例はさらに、アルギニン酸ナトリウムをTPENと組み合わせることにより、いずれかの化合物単独よりも低酸素傷害からの実質的により効果的な保護がもたらされることを示す。

30

40

【0041】

したがって、本発明の1つの態様によれば、N,N,N',N'-テトラキス-(2-ピリジルメチル)-エチレンジアミン(TPEN)又はその医薬的に許容可能な塩、アルギネート化合物、及び医薬的に許容可能な塩を包含する医薬組成物が提供される。

【0042】

本明細書で使用される「医薬組成物」という語句は、TPEN又はその医薬的に許容可能な塩及び本明細書に記載のアルギネート化合物と、医薬的に許容可能な適切な担体及び賦形剤などの他の化学成分との調製物を指す。医薬組成物の目的は、対象への活性成分の投与を容易にすること、又は場合により、不活発体(an inanimate object)の中又は上

50

にその適用（接触）を容易にすることである。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される「医薬的に許容可能な担体」という用語は、生物に対して有意な刺激を引き起こさず、且つ、分布、治療特性を阻害しないか、又はさもなければ、投与又は適用された化合物の生物学的活性及び特性を無効にしない担体又は希釈剤を意味する。

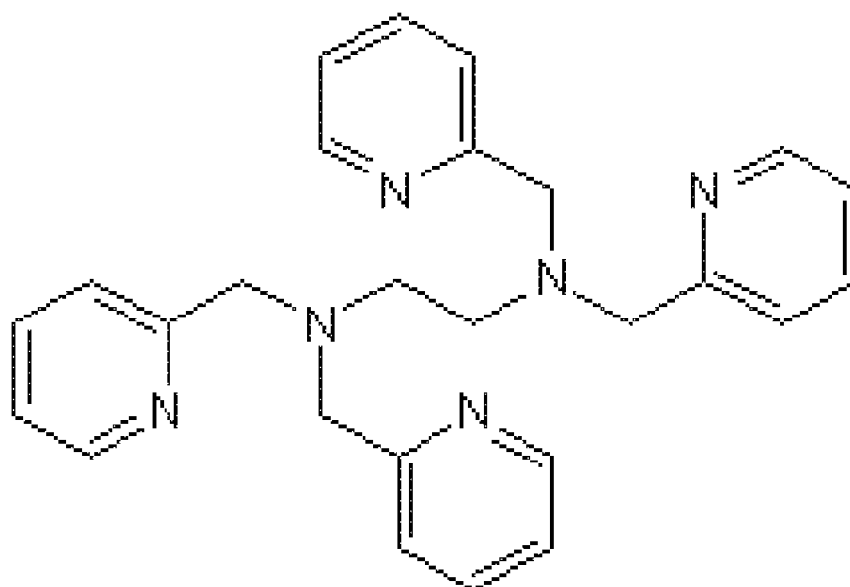
【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される「賦形剤」という用語は、薬剤の投与又は適用をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される T P E N とは、下記構造式を有する化合物 N , N , N ' , N ' -
テトラキス - (2 - ピリジルメチル) - エチレンジアミンを意味する。

【 化 1 】



【 0 0 4 6 】

T P E N は、例えば、Sigma Aldrich Ltd , Germany のようないくつかの商用製造業者から容易に入手可能である。

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用される語句「医薬的に許容可能な塩」は、親化合物及びその対イオンの荷電種を指し、これは、親化合物の溶解特性を改変するために、及び / 又は親化合物による生物へのいずれの有意な刺激を低減するために、典型的に使用される一方で、投与された化合物の生物学的活性及び特性を無効にしない。限定されるものではないが、医薬的に許容可能な塩の例は、カルボン酸塩又は硫酸塩アニオンなどのアニオン及び / 又はアンモニウム、ナトリウム、カリウムなどのカチオンを含む塩を包含するが、これらに限定されない。好適な塩は、例えば、Birge et al . (J . Pharm . Sci . 1977 , 66 : 1 - 19) に記載されている。

【 0 0 4 8 】

本発明の一実施形態において、医薬組成物中の T P E N の最終濃度は、約 1 ~ 50 μ M の範囲である。別の実施形態において、医薬組成物中の T P E N の最終濃度は、約 0 . 1 ~ 約 100 μ M の範囲である。別の実施形態では、医薬組成物中の T P E N の濃度は、約 1 ~ 約 10 μ M の範囲である。別の実施形態において、医薬組成物中の T P E N の最終濃度は、約 3 ~ 約 5 μ M の範囲である。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用される語句「アルギネート化合物」は、海藻（例えば、Laminar

ia hyperborea, *L. digitata*, *Eclonia maxima*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia nigrescens*, *Ascophyllum codosum*, *L. japonica*, *Durvillaea antarctica* 及び *D. pottatorum*) から誘導されたポリアニオン性多糖コポリマーを意味し、且つ、これは - D - マンヌロン酸 (M) 及び - L - グルロン酸 (G) 残基を様々な割合で包含する。

【0050】

本発明の教示によると、好適なアルギネート化合物は、いずれの生体適合性の非免疫原性、且つ好ましくは、生体分解可能な(bio-erodible)アルギネート化合物であり得る。

【0051】

いくつかの実施形態では、本発明のアルギネート化合物は、1 : 1 ~ 3 : 1 の範囲の L - グルロン酸と - D - マンヌロン酸との間のモノマー比、及び約 10 ~ 約 300 kDa の範囲の分子量を有する。いくつかの実施形態では、アルギネート化合物の分子量は、約 10 ~ 約 50 kDa の範囲である。

【0052】

アルギネート化合物は、遊離塩基、酸、塩基性、アニオン塩、又は一価カチオン塩の形態であり得る。いくつかの実施形態では、アルギネート化合物は、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸リチウム、アルギン酸ルビジウム及びアルギン酸のセシウム塩などの可溶性アルギン酸塩、並びにアンモニウム塩及びモノ - 、ジ - 又はトリ - エタノールアミンアルギネート、アニリンアルギネートなどの有機塩基の可溶性アルギネートであるが、これらに限定されない。

【0053】

一実施形態では、アルギネート化合物はアルギン酸ナトリウムである。欧州及びアメリカ合衆国 (USA) の薬理学的規制当局のすべての品質及び安全性要件を満たす医薬品グレードのアルギン酸ナトリウムは、例えば *Novamatrix FMC Biopolymers* (Drammen, Norway) 又は *Qingdao Rongde Seaweed Co., Ltd.* (青島、中国) など、いくつかの商用製造業者から容易に入手可能である。

【0054】

一実施形態では、本発明の医薬組成物中のアルギネート化合物の最終濃度は、約 0.1 ~ 約 10 % (w/v) の範囲である。別の実施形態において、医薬組成物中のアルギネート化合物の最終濃度は、約 1 ~ 約 4 % (w/v) の範囲である。別の実施形態では、医薬組成物中のアルギネート化合物の最終濃度は約 2 % (w/v) である。別の実施形態において、医薬組成物中のアルギネート化合物の最終濃度は、約 1 % (w/v) である。

【0055】

場合により、本発明の医薬組成物は、少なくとも 1 つの治療剤をさらに包含する。本発明の医薬組成物に含まれ得る好適な治療剤は、例えば成長因子 (例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor); bFGF)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF)、TGFファミリーのメンバー、骨形成タンパク質 (bone morphogenic proteins, BMP)、血小板由来増殖因子、アンジオポイエチン、及び筋原性因子、転写因子、サイトカイン、及びホメオボックス遺伝子産物などの他の因子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ホルモン、抗炎症薬、抗アポトーシス剤又は抗生物質剤であり得る。

【0056】

有利には、前記 1 以上の治療薬(agent or agents)は、本発明のアルギネート化合物と化学的に結合することができる。そのような結合は、いずれの公知の化学結合アプローチ、好ましくは共有結合を介して行うことができる。好適な共有結合は、例えば、エステル結合 (例えば、カルボン酸エステル結合、オキシアルキルカルボン酸エステル結合、アミド結合又はチオエステル結合)、グリコシド結合、カーボネート結合、カルバメート結

10

20

30

40

50

合、チオカルバメート結合、尿素結合又はチオ尿素結合であり得る。

【0057】

薬物の処方及び投与のための技術は、参照により本明細書に組み込まれる、“Remington's Pharmaceutical Sciences” Mack Publishing Co., Easton, PA最新版に見ることができる。

【0058】

したがって、本発明による使用のための医薬組成物は、活性成分（複数可）の医薬的に使用可能な調製物への加工を促進する賦形剤及び助剤を含む1以上の医薬的に許容可能な担体を用いて、従来の方法で製剤化することができる。適切な製剤(formulation)は、選択された投与経路に依存する。投与量は、使用される剤形及び利用される投与経路に依存して変化し得る。正確な製剤、投与経路及び投与量は、患者の状態を考慮して、個々の医師が選択することができる（例えば、Finglet al., 1975, in “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, Ch. 1 p. 1を参照）。

【0059】

医薬組成物は、局所的もしくは全身的処置又は投与が選択されるかどうか、及び処置されるべき領域に応じて、1つ又は複数の経路のいずれかで投与するために製剤化することができる。投与は、経口的に、吸入によって、又は非経口的に、例えば静脈内点滴又は腹腔内、皮下、筋肉内もしくは静脈内注射によって、又は局所的に（経皮的に、眼科的に、腔内に、直腸内、鼻腔内に、を含む）行うことができる。

【0060】

本発明の一実施形態では、医薬組成物は、注射又は非経口投与に適した溶液として製剤化される(formulated)。

【0061】

別の実施形態において、本発明の医薬組成物は、局所投与のために製剤化される。

【0062】

別の実施形態において、本発明の医薬組成物は、眼科投与用に製剤化される。

【0063】

別の実施形態において、本発明の医薬組成物は点眼剤として製剤化される。

【0064】

投与されるか、さもなければ適用される医薬組成物の量は、もちろん、治療される対象、苦痛の重篤度、投与様式、処方する医師の判断などに依存するであろう。

【0065】

本発明の組成物は、必要に応じて、有効成分を含有する1つ以上の単位投与形態を含有し得るFDA（米国食品医薬品局）承認キットのようなパック又はディスペンサー装置で提供され得る。パックは、例えば、ブリストアパック又は（吸入のための）加圧容器などであるが、これに限定されない金属又はプラスチックホイルを含むことができる。パック又はディスペンサー装置は、投与のための指示書を伴ってもよい。パック又はディスペンサーはまた、医薬品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形態の容器に関する通知を添付することができ、この通知には、ヒト又は獣医学的投与のための組成物の形態の政府機関(the agency)による承認が反映される。このような通知は、例えば、処方薬のための米国食品医薬品局(FDA)の承認を受けたラベル表示、又は承認済み製品インサートであってもよい。適合性のある(compatible)医薬担体中に配合された(formulated)本発明の実施形態による活性成分（複数可）を含む組成物はまた、調製され、適切な容器に入れられ、且つ、特定の明細書に詳述されたような医学的状态、疾患又は障害の治療のために標識され得る。

【0066】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提示される医薬組成物は包装材料に包装され、且つ、低酸素関連疾患の治療に使用するために、包装材料の中又は上に印刷で識別される。

【 0 0 6 7 】

上記のように、本発明の医薬組成物は、低酸素傷害から生きている細胞及び体組織を保護するために使用することができる。したがって、本発明の一態様によれば、低酸素関連疾患を治療する方法が提供される。この方法は、本発明の医薬組成物の治療有効量を、それを必要とする対象に投与するステップを包含する。

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される「低酸素」(hypoxia, 低酸素症)という用語は、酸素含有量(O_2)が約5%以下となるように、生理学的レベル未満の(below)酸素欠乏又は不適切な酸素供給の環境を指す。ほとんどの場合、低酸素組織は約2%以下である酸素含有量を有する。低酸素症は、例えば15 mmHg未満、10 mmHg未満、5.0 mmHg未満などの、20 mmHg (mm水銀)未満の低 O_2 分圧(pO_2)と関連付けることができる。

10

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される「低酸素関連疾患」という語句は、対象の組織における低酸素(hypoxia)が関与する疾患、障害又は状態を指す。低酸素症(hypoxia)は、症状であるか、又は前記疾患、障害又は状態の原因、発症、進行、改善又は治癒において役割を果たすことができるか、のいずれかである。低酸素関連疾患は、限定されないが、虚血-再灌流傷害に起因するか又は関連する疾患、障害又は状態であり得るが、それらに限定されない。

【 0 0 7 0 】

本発明の教示による低酸素症関連疾患は、心血管疾患、虚血性心疾患、急性心筋梗塞(AMI)、虚血性脳症、虚血性脳卒中、黄斑変性、眼の虚血性症候群(ocular ischemic syndrome)、虚血性視神経症(ischemic optic neuropathy, ION)、糖尿病性網膜症、関節炎、炎症、敗血症、敗血症誘発ショック、腎臓疾患、組織線維症、胃腸疾患、神経変性疾患、呼吸窮迫症候群、気管支肺異形成症、肺高血圧、低酸素性肺高血圧、重症肺高血圧症、COPD、糖尿病網膜症、糖尿病、角膜血管新生、病理性血管成長及び筋骨格障害、急性虚血性症候群、心筋低酸素症、心肥大、虚血再灌流傷害(IRI)、

20

心臓の(cardiac)心臓手術、冠動脈インターベンション(バルーン及びステント)、不整脈の管理及び臓器移植、冠動脈ステント留置のための血管形成術中の不整脈、又は心臓弁膜インターベンションから生じるIRI、

であり得るが、これらに限定されない。

【 0 0 7 1 】

30

本明細書で使用される「治療する」という語句は、病理の発達を阻害、防止もしくは抑止すること、及び/又は病理の軽減、寛解もしくは退行を引き起こすことを指す。当業者は、様々な方法論及びアッセイが病理の発達を評価するために使用され得、且つ同様に、様々な方法論及びアッセイが病理の軽減、寛解又は退行を評価するために使用され得ることを理解するであろう。

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用される「それを必要とする対象」という語句は、低酸素関連疾患と診断された哺乳類の男性または女性の対象(例えば、ヒト)を指す。特定の実施形態では、この用語は、低酸素症関連疾患を発症する危険性のある個体を包含する。獣医学的用途も考慮される。対象は、新生児、乳児、若年者、青年期、成人及び高齢の成人を包含するいずれの性別又はいずれの年齢であり得る。

40

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用される「有効量」という語句は、有意な治療上の利益を提供するために有効な量を指す。投与される組成物の量は、もちろん、治療される対象、苦痛の重症度、投与方法、処方する医師の判断などに依存するであろう。有効量は、約0.1~約10%(w/v)、好ましくは約0.2~約5%(w/v)、好ましくは約0.3~約2%(w/v)、好ましくは約0.5~約1.5%(w/v)の範囲、好ましくは約2%(w/v)、好ましくは約1%(w/v)の濃度について、約0.1~約10 ml(1~1000 mgのdw t)、好ましくは約1~5 ml(10~500 mgのdw t)の範囲である。

【 0 0 7 4 】

50

本明細書で使用される「治療上有効な量」という語句は、有意な治療上の利益を提供するために有効な量を指す。投与される組成物の量はもちろん、治療される対象、苦痛の重篤度、投与方法、処方する医師の判断などに依存するであろう。有効量は、約 0.1 ~ 約 10% (w/v)、好ましくは約 0.2 ~ 約 5% (w/v)、好ましくは約 0.3 ~ 約 2% (w/v)、好ましくは約 0.5 ~ 約 1.5% (w/v) の範囲、好ましくは約 2% (w/v)、好ましくは約 1% (w/v) の濃度について、約 0.1 ~ 約 10 ml (1 ~ 1000 mg の dwt)、好ましくは約 1 ~ 5 ml (10 ~ 500 mg の dwt) の範囲である。

【0075】

本発明の医薬組成物は、それを必要とする対象に、梗塞した心筋内又はその周囲に本発明の医薬組成物の治療上有効量を提供することによって、心筋梗塞を治療するために使用することができる。

10

【0076】

急性心筋梗塞 (AMI) を治療するために、医薬組成物は、バルーンカテーテルなどの好適なカテーテルを介して、動脈内、好ましくは冠状動脈内に投与することができる (例えば、Knight et al., Circulation 95: 2075 - 2081, 1997 を参照)。

【0077】

本発明の医薬組成物は、AMI の同じ日に、再灌流の開始中又は開始後に投与することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、AMI 後約 1 日で、AMI 後約 1 日後、AMI 後約 2 日後、AMI 後約 3 日後、AMI 後約 4 日後、約 5 日後に投与される AMI 後の約 6 日後、又は AMI 後約 7 日後に投与される。

20

【0078】

虚血性脳卒中を治療するために、本発明の医薬組成物は、好ましくは、好適なカテーテルを介して動脈内に投与される。投与は、再灌流の開始時、その間、又はその後に行うことができる。

【0079】

このようなカテーテルは、典型的には、1 つ以上の内部通路 (内腔 (lumens)) を含有する細長い可撓性カテーテル本体と、材料を前記カテーテル本体に導入し、且つ、前記内腔を通して流れることを可能にする近位部分と、遠位部分であって、好ましくは、適用された圧力にตอบสนองして材料がカテーテルを出ることを可能にする前記遠位部分の端部又はその近くに、テーパエンド及び 1 以上の出口ポートを有する、遠位部分と、を含む。

30

【0080】

本発明の医薬組成物の注射の前又は同時に、虚血を引き起こす血栓は、例えば、血栓溶解、機械的再疎通又は塞栓摘出を介して除去されなければならない。

【0081】

血栓溶解は、t-PA などのプラスミノーゲン活性化因子を静脈内又は動脈内投与することを伴う。動脈内血栓溶解は、例えば米国特許公開第 20080095760 号、Furlan et al. (JAMA 282: 2003 - 11, 1999)、Arnold et al. (J Neurol Neurosurg Psych 75: 857 - 62, 2004) 及び Lindsberg and Mattle (Stroke 37: 922 - 8, 2006) に記載されているような当該技術分野で知られている手順を用いて、閉塞した動脈の直接的カテーテル法及びカテーテルによる血栓溶解剤の局所投与を伴う。

40

【0082】

好適な機械的再疎通及び塞栓摘出術の手順は、例えば、Bergui et al. (Stroke 37: 145 - 50, 2006)、Smith et al. (Stroke 36: 1432 - 8, 2005) 及び米国特許出願第 20090105737 号及び第 20050277979 号に記載されている。

【0083】

50

脳卒中を引き起こす閉塞部位のような脳動脈の正確な所望の位置に本発明の医薬組成物を送達することは、例えば、米国特許第4,995,862号、第6,379,373号、米国特許出願公開番号第20050228359号「偽y」に記載されているような、当該技術で知られている手順を使用して行うことができる。

【0084】

本発明の医薬組成物及びそれを大脳動脈内の所定の位置に投与するのに好適なカテーテルは、必要に応じて、虚血性の脳の症状の治療に用いるための医薬組成物を識別するパッケージング材料をさらに含むキットに含めることができる。

【0085】

本発明の医薬組成物はまた、虚血筋組織に医薬組成物の治療上有効量を提供することにより、虚血横紋筋などの虚血筋組織に関連する疾患及び状態を治療するために使用することができる。

【0086】

本発明の医薬組成物は、医薬組成物の有効量に体外の組織もしくは器官もしくは細胞を浸漬又は入浴させることにより、体外の組織もしくは器官を虚血及び酸素ラジカル関連の損傷から保護及び保存するために使用することもできる。

【0087】

単一の医薬組成物中に組み合わせたTPEN及びアルギネート化合物の投与が好ましいが、本発明の活性成分は別々に投与することができる。したがって、低酸素関連疾患は、以下のステップ：

(a) 治療有効量のTPEN又はその医薬的に許容可能な塩を、それを必要とする対象に投与するステップと、

(b) 治療有効量のアルギネート化合物を前記対象に投与するステップと、
により治療することができる。一実施形態では、ステップ(a)及び(b)は同時に実施される。別の実施形態において、ステップ(a)及び(b)は順次行われる。

【0088】

本明細書で使用される用語「約」は、 $\pm 10\%$ を意味する。

【0089】

用語「comprises」、「comprising」、「includes」、「including」、「having」及びそれらの活用形は、「含むがこれに限定されない」を意味する。

【0090】

「consisting of」という用語は、「含み、且つ、これに限定された」を意味する。

【0091】

「consisting essentially of」という用語は、追加の成分、ステップ及び/又は部分が特許請求された組成物、方法もしくは構造の基本的及び新規な特徴を実質的に変えない限り、組成物、方法もしくは構造が追加の成分、ステップ及び/又は部分を包含してよいことを意味する。

【0092】

本明細書で 사용되는ように、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上、他に明確に指示されない限り、複数の言及を包含する。例えば、「化合物」又は「少なくとも1の化合物」という用語は、その混合物を包含する複数の化合物を包含し得る。

【0093】

本願を通して、本発明の様々な実施形態を範囲形式で提示することができる。範囲形式での記載は、便宜上及び簡潔さのためであること、及び、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の記載は、すべての可能な部分範囲、並びにその範囲内の個々の数値を具体的に開示したものとなされるべきである。例えば、1～6のような範囲の記載は、1～3, 1～4, 1～5, 2～4, 2～6, 3～6等のような下位範囲、並びにその範囲内の個々の数字、例えば1

10

20

30

40

50

、2、3、4、5及び6を具体的に開示したものと考えるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0094】

本明細書において数値範囲が示されるときはいつでも、示された範囲内にいずれの引用数字（分数又は整数）を含むことを意味する。第1の指示番号と第2の指示番号との「間の範囲である／範囲であること」、及び第1の指示番号「から」第2の指示番号「までの範囲である／範囲であること」なる語句は、本明細書では交換可能に使用され、且つ、第1の指示番号及び第2の指示番号と、その間の全ての分数及び整数とを包含することを意味する。

【0095】

本明細書中で使用される場合、用語「方法」とは、与えられたタスクを達成するためのやり方、手段、技術及び手順を意味する。既知のやり方、手段、技術及び手順であるか、又は、化学、薬理学、生物学、生化学及び医学技術の実践者により、既知のやり方、手段、技術及び手順から容易に開発されたか、のいずれかであるやり方、手段、技術及び手順を包含するが、これらに限定されない。

【0096】

明確さのため、別個の実施形態の文脈で説明される本発明の特定の特徴は、単一の実施形態において組み合わせて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔さのため、単一の実施形態の文脈で説明される本発明の様々な特徴は、別個に又はいずれの好適なサブコンビネーションで、又は本発明のいずれの他の記載された実施形態において好適に提供され得る。様々な実施形態の文脈で説明される特定の特徴は、実施形態がそれらの要素なしで動作不能でない限り、それらの実施形態の本質的な特徴と見なすべきではない。

【0097】

本明細書に上述され、請求項部分で特許請求される本発明の様々な実施形態及び態様は、以下の実施例において実験的支持を見出す。

【実施例】

【0098】

以下の実施例を参照するが、これらの実施例は上記の説明と共に本発明を非限定的に説明するものである。

【0099】

実施例1

低酸素下ラット初代(primary)心臓細胞により放出されるCK及びLDHの量に対するTPEN及びアルギン酸ナトリウムの効果

材料及び方法

化合物

N,N,N',N'-テトラキス-(2-ピリジルメチル)-エチレンジアミン(TPEN)は、Sigma Aldrich, Germanyから購入した。

【0100】

アルギン酸ナトリウム(UP-VLVG医薬品グレード、Mw=20~50kDa)は、Qingdao Rongde Seaweed Co., Ltd(青島、中国)から購入した。

【0101】

ラット初代心臓細胞培養物の調製

Sprague Dawleyラット心臓(1~2日齢)を滅菌除去し、そして余分な血液細胞を除去するために、Ca⁺⁺及びMg⁺⁺を含まない(-free)PBSに3回浸した(bathed)。心臓を小さな断片に切り刻み、及びその後、以前に記載されているように、イチジクの抽出物から調製したタンパク質分解酵素-RDB溶液(Life Science research, Inst., Nes Ziona, Israel)中で攪拌した(Brik et al., Basic Res. Cardiol. 85:237-246, 1990), Shneyvays et al., J Mo

10

20

30

40

50

1 Cell Cardiol. 33: 1249-1261, 2001)。その後、RDB溶液を25でPBSで1:200に希釈し、それぞれ10分間ずつ数サイクル行った。10%ウマ血清を含有する培地を加えた、解離細胞を含有する上清懸濁液を500gで5分間遠心分離した。遠心分離後、上清相を捨て、そして、10%熱不活性化ウマ血清及び0.5%ニワトリ胚抽出物を補充したダルベッコ変法イーグル培地に細胞を再懸濁した。細胞懸濁液を 1×10^6 細胞/mlに希釈し、そして300 μ Lのサンプルを24ウェルプレート(4プレート)のコラーゲン/ゼラチン被覆プラスチック培養皿に入れた。各ウェルに自然収縮を示すコンフルエントな単層が2日以内に培養液中に発生した。翌日、死細胞を除去するために細胞を洗浄し、そして増殖培地を、今度はグルコースを含まないPBSを用いて、実験開始の2日ごと及び実験開始前に交換した。次いで、手順開始の日の5日後にこれらの心筋細胞培養物についてin vitroで実験を行った。低酸素実験の直前に、培養ウェルを、5%CO₂及び95%空気の加湿雰囲気インキュベーター中、37で30分間定常状態で、インキュベートした。

10

【0102】

低酸素誘導

新生仔ラットの心臓から約 3×10^5 個の心筋細胞をグルコース不含PBSと共に培養し、低酸素(酸素及びグルコース欠乏)に180分間暴露した。O. Golan et al. (Biochemical pharmacology, 81 (2011), pp. 1219-1227)によって本質的に記載される手順を使用した。

【0103】

20

手短に言えば、酸素を100%アルゴンで置換することにより、閉鎖チャンバ内で低酸素を実施した。低酸素の間、N₂雰囲気中の酸素レベルは1%未満(below)であった。そして180分後、低酸素症の場合、PBS中のpO₂は<0.4 Torrであった。低酸素ストレス傷害は、細胞から放出された乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)及びクレアチンキナーゼ(CK)の活性に基づいて、3時間の低酸素相の終わりに、及びしたがって再酸素化のさらに2時間後に、決定された。

【0104】

酵素放出測定

LDH及びCK測定の両方のために、低酸素下で180分間インキュベートし各ウェルの25の μ Lアリコートをし、きれいな24ウェルトレイに移し、これらを自動分光光度計内に配置し、且つ、酵素活性の生成物は30、振とう下で340nmの波長を介して測定された。結果はコントロール(control)と比較して表した。

30

【0105】

CK活性測定

クレアチンキナーゼ(Creatine Kinase, CK)活性は、Thermo Fisher Scientific Inc., Middletown, VA 22645-1905, USAからのCK-NAC試薬(N-アセチルシステインにより活性化されたクレアチンキナーゼ)を用いて、心筋細胞培地(PBS)内で決定した。中程度の(PBS)サンプル(25 μ L)を低酸素傷害の終わりに採取した(180分後)。

【0106】

40

LDH活性測定

LDH-Lキット(Thermo Trace, Melbourne, Australia)を使用して、心臓細胞培地(PBS)内で乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase, LDH)活性を測定した。中程度の(PBS)サンプル(25 μ L)を低酸素傷害の終わりに採取した(180分後)。

【0107】

結果

以下の表1~10は、アルギン酸ナトリウムと組み合わせたTPENが培養心臓細胞を低酸素傷害から効果的に保護することを示している。

【0108】

50

低酸素に曝露された心臓細胞に 0.3 及び 1 % の濃度で投与されたアルギン酸ナトリウムは、それぞれ、前記細胞から放出された CK の 44.7 及び 81.9 % の減少をもたらした (表 1)。観察された CK 低下は、アルギン酸ナトリウムが培養心臓細胞を低酸素傷害から保護することができるという指標である。この観察は非常に驚くべきことであった。なぜなら、20 ~ 50 kDa の分子量を有するアルギン酸分子は、培養細胞に浸透したり、又はそこで相互作用したりすることは期待できなかったためである。

【0109】

0.1 ~ 0.3 % のアルギン酸ナトリウム濃度を増加させると、細胞から放出される CK 及び LDH のそれぞれの減少がもたらされた。例えば、0.1 及び 0.3 % の濃度で提供されるアルギン酸ナトリウム (3 μ M TPEN と組み合わせる) は、それぞれ 65.5 及び 74.3 % の CK 低下をもたらした (表 2 ~ 3)。同様に、0.1 % 及び 0.3 % の濃度でアルギン酸ナトリウム単独 (TPEN なし) を投与すると、それぞれ CK が 8.7 及び 64.5 %、LDH が 13.8 及び 28.7 % 減少した (表 7 ~ 9)。

【0110】

0.3 ~ 3 μ M の濃度で TPEN を投与すると、細胞から放出された CK 及び LDH がそれぞれ減少した。例えば、0.3, 1 及び 3 μ M で提供された TPEN は (0.1 % アルギン酸ナトリウムと組み合わせる)、それぞれ 20.5, 60.8 及び 65.5 % の CK 低下をもたらした (表 2)。しかし、TPEN が上記最適濃度 (above-optimal concentrations) 投与された場合、CK 及び LDH 低下に対する TPEN 効果は低下していた。例えば、7.5 μ M で投与された TPEN は (0.1 % アルギン酸ナトリウムと組み合わせる)、TPEN を 3 μ M の濃度で投与した結果の 65.5 % の CK 低下と比較して、わずか 46.2 % の CK 低下をもたらした (0.1 % アルギン酸ナトリウムと組み合わせる; 表 2)。

【0111】

興味深いことに、上記の最適濃度で投与した場合の TPEN の低下した有効性は、アルギン酸ナトリウムの量を増加させることによって無効にされた。したがって、7.5 μ M の濃度で投与された TPEN は、0.3 % の濃度のアルギン酸ナトリウムと組み合わせる 71.2 % の CK 減少をもたらした (表 3)。

【0112】

したがって、結果は、アルギン酸ナトリウムと組み合わせる TPEN の使用が、低酸素傷害からの心臓細胞の保護においていずれかの化合物単独の使用よりも実質的に優れていることを示している。

【0113】

表 1

低酸素下でラット心臓細胞から放出される CK の量に対するアルギン酸ナトリウムの影響 *

【表 1】

Environment*	Sodium Alginate (%)	Mean	SD	CK Reduction (%)**
Hypoxia*	1	0.0064	0.0011	81.9
Hypoxia*	0.3	0.0099	0.0023	44.7
Hypoxia*	0.1	0.0143	0.0019	-2.1
Hypoxia*	0	0.0141	0.0011	n/a
Control (Normoxia)	0	0.0047	0.0008	n/a

10

20

30

40

50

* 細胞を低酸素状態に3時間曝した。

* * 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定されたCK活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定されたCK活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定されたCK活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定されたCK活性} \right] \right) \right] \times 100。$$

Environment: 環境

Hypoxia: 低酸素

Control(normoxia): コントロール(酸素正常状態)

Sodium Alginate(%): アルギン酸ナトリウム

Mean: 平均

SD: 標準偏差

CK Reduction(%): CK減少(%)

【0114】

表2

低酸素下ラット心臓細胞から放出されたCKの量に対するアルギン酸ナトリウム及びTPENの効果*

【表2】

Environment*	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	CK Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0039	0.0018	n/a
Hypoxia	0	0	0.0610	0.0093	n/a
Hypoxia	0.1	0	0.0578	0.0094	5.6
Hypoxia	0.1	0.3	0.0493	0.0122	20.5
Hypoxia	0.1	1	0.0263	0.0052	60.8
Hypoxia	0.1	3	0.0236	0.0124	65.5
Hypoxia	0.1	7.5	0.0346	0.0031	46.2

* 細胞を低酸素状態に3時間曝した。

* * 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定されたCK活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定されたCK活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定されたCK活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定されたCK活性} \right] \right) \right] \times 100。$$

【0115】

表3

低酸素下でのラット心臓細胞から放出されるCKの量に対するアルギン酸ナトリウム及びTPENの効果*

10

20

30

40

【表 3】

Environment*	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	CK Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0039	0.0018	n/a
Hypoxia	0	0	0.0587	0.0118	n/a
Hypoxia	0.3	0	0.0418	0.0075	30.8
Hypoxia	0.3	0.3	0.0341	0.0080	44.9
Hypoxia	0.3	1	0.0223	0.0079	66.4
Hypoxia	0.3	3	0.0180	0.0044	74.3
Hypoxia	0.3	7.5	0.0197	0.0084	71.2

* 細胞を低酸素状態に 3 時間曝した。

** 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定された CK 活性} \right] \right) \right] \times 100。$$

【 0 1 1 6 】

表 4

低酸素下でのラット心臓細胞からの LDH 放出に対するアルギン酸ナトリウム及び TPEN の効果 *

【表 4】

Environment *	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	LDH Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0068	0.0056	n/a
Hypoxia	0	0	0.0642	0.0187	n/a
Hypoxia	1	0	0.0135	0.0031	88.3
Hypoxia	1	0.3	0.0140	0.0012	87.5
Hypoxia	1	1	0.0132	0.0010	88.9
Hypoxia	1	3	0.0109	0.0021	92.9
Hypoxia	1	7.5	0.0174	0.0034	81.5

* 細胞を低酸素状態に 3 時間曝した。

** 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定された CK 活性} \right] \right) \right] \times 100。$$

【 0 1 1 7 】

表 5

低酸素下でラット心臓細胞から放出される LDH の量に対するアルギン酸ナトリウム及び TPEN の効果 *

【表 5】

Environment*	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	LDH Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0039	0.0018	n/a
Hypoxia	0	0	0.0610	0.0093	n/a
Hypoxia	0.1	0	0.0578	0.0094	5.6
Hypoxia	0.1	0.3	0.0493	0.0122	20.5
Hypoxia	0.1	1	0.0263	0.0052	60.8
Hypoxia	0.1	3	0.0236	0.0124	65.5
Hypoxia	0.1	7.5	0.0346	0.0031	46.2

* 細胞を低酸素状態に 3 時間曝した。

** 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定された CK 活性} \right] \right) \right] \times 100.$$

【 0 1 1 8 】

表 6

低酸素下でラット心臓細胞から放出される LDH の量に対するアルギン酸ナトリウム及び TPEN の効果 *

【表 6】

Environment*	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	LDH Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0039	0.0018	n/a
Hypoxia	0	0	0.0587	0.0118	n/a
Hypoxia	0.3	0	0.0418	0.0075	30.3
Hypoxia	0.3	0.3	0.0287	0.0125	54.7
Hypoxia	0.3	1	0.0223	0.0079	66.4
Hypoxia	0.3	3	0.0180	0.0044	74.3
Hypoxia	0.3	7.5	0.0230	0.0065	65.0

* 細胞を低酸素状態に 3 時間曝した。

** 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定された CK 活性} \right] \right) \right] \times 100.$$

【 0 1 1 9 】

表 7

低酸素下でのラット心臓細胞から放出される CK の量に対するアルギン酸ナトリウム及び TPEN の効果 *

【表 7】

Environment*	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	CK Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0052	0.0019	n/a
Hypoxia	0	0	0.0750	0.0060	n/a
Hypoxia	0.1	0	0.0685	0.0026	8.7
Hypoxia	0	1	0.0643	0.0171	14.3
Hypoxia	0.1	1	0.0605	0.0124	19.3
Hypoxia	0.3	1	0.0358	0.0123	52.3

10

* 細胞を低酸素状態に 3 時間曝した。

** 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定された CK 活性} \right] \right) \right] \times 100$$

【 0 1 2 0 】

表 8

20

低酸素下でのラット心臓細胞から放出される CK の量に対するアルギン酸ナトリウム及び TPEN の効果 *

【表 8】

Environment*	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	CK Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0052	0.0019	n/a
Hypoxia	0	0	0.0770	0.0182	n/a
Hypoxia	0.3	0	0.0468	0.0068	64.5
Hypoxia	0	0.3	0.0411	0.0192	46.6
Hypoxia	0.3	0.3	0.0192	0.0077	75.1
Hypoxia	0.1	0	0.0160	0.0047	79.2
Hypoxia	0.1	0.3	0.0187	0.0090	74.7

30

* 細胞を低酸素状態に 3 時間曝した。

** 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定された CK 活性} \right] \right) \right] \times 100$$

40

【 0 1 2 1 】

表 9

低酸素下でラット心臓細胞から放出される LDH の量に対するアルギン酸ナトリウム及び TPEN の効果 *

【表 9】

Environment*	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	LDH Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0096	0.0071	n/a
Hypoxia	0	0	0.0719	0.0036	n/a
Hypoxia	0.1	0	0.0620	0.0044	13.8
Hypoxia	0	1	0.0647	0.0178	10.0
Hypoxia	0.1	1	0.0647	0.0117	10.0
Hypoxia	0.3	1	0.0298	0.0062	58.6

10

* 細胞を低酸素状態に 3 時間曝した。

** 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定された CK 活性} \right] \right) \right] \times 100。$$

【0122】

表 10

20

低酸素下でラット心臓細胞から放出される LDH の量に対するアルギン酸ナトリウム及び TPEN の効果 *

【表 10】

Environment*	Sodium Alginate (%)	TPEN (μM)	Mean	SD	LDH Reduction (%)**
Control (normoxia)	0	0	0.0096	0.0071	n/a
Hypoxia	0	0	0.0676	0.0226	n/a
Hypoxia	0.3	0	0.0482	0.0061	28.7
Hypoxia	0	0.3	0.0409	0.0105	39.5
Hypoxia	0.3	0.3	0.0245	0.0105	63.8
Hypoxia	0.1	0	0.0158	0.0057	76.7
Hypoxia	0.1	0.3	0.0352	0.0218	47.9

30

* 細胞を低酸素状態に 3 時間曝した。

** 値は以下のように算出した：

$$\left[\left(\text{処理された細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) \right] / \left[\left(\text{未処理細胞培養物中の測定された CK 活性} \right) - \left(\left[\text{低酸素に曝されていないコントロール細胞培養中の測定された CK 活性} \right] \right) \right] \times 100。$$

40

【0123】

実施例 2

梗塞した心筋組織誘導イヌへの TPEN とアルギン酸ナトリウムの冠動脈内投与

材料と方法

試験組成：

試験組成物は、食塩水（ネガティブコントロール）及び食塩水中 3 μM の TPEN 及び 1 % (w/v) アルギン酸ナトリウム（UP-VLVG, Mw 20 ~ 50 kDa）から構成される TPEN / アルギネート溶液である。

【0124】

50

急性心筋梗塞 (AMI) の誘発

2歳(20~25kg)のイヌを麻酔及び挿管し、そして室内空気で呼吸する。動物を静脈内オキシモルフォン塩酸塩(0.22mg/kg)及びジアゼパム(0.17mg/kg)で鎮静させ、そして1~2%イソフルランで麻酔面を維持する。この処置は、胸を閉じた状態で及び無菌条件下で行う。冠動脈閉塞を生じさせるために、2.7フレンチのPTCAバルーンカテーテルを、大腿動脈切開を介して4JLガイディングカテーテルを通して0.014インチワイヤー上に導入する。4.0mm直径、15mmバルーンを使用する。ガイドカテーテルを左主冠動脈に配置し、且つ、透視誘導下で前進させたワイヤーを遠位回旋(Circumflex)冠動脈に配置する。バルーンカテーテルは、ワイヤーを介して冠動脈内に進められ、第1の周辺ブランチの近位に配置される。全ての場合において、動物は静脈内ナトリウムヘパリン750~1000USP単位で抗凝固される。

10

【0125】

冠動脈内投与

いったん配置されると、冠動脈を閉塞するため、PTCAバルーンが膨張する。冠動脈の完全閉塞は、心電図上のSTセグメント上昇と、経胸腔2次元心エコー検査によって評価されたLV後壁運動のほぼ欠如(near absence)で確認される。すべての場合において、冠動脈閉塞は3~5時間維持される。閉塞の終わりに、冠動脈再灌流を可能にするため、バルーンを収縮させる。

【0126】

試験溶液(2ml容量)を動物の回旋冠動脈に注入する。試験溶液を使用する可能性のある臨床設定をシミュレートするために、試験溶液の冠動脈注射は、AMIの同じ日(再灌流開始後約1時間)又はAMI後2~5日のいずれかで行う。犬はテスト溶液のいずれかを受けるようにランダムに割り当てられる。すべての動物は、AMI後4ヶ月間追跡される。血管造影及び心エコー検査は、ベースラインで、AMIを誘導する前に、試験溶液を投与する直前に、及び2~4ヶ月後に、行う。

20

【0127】

エンドポイント

1. 左室収縮終期容積及び拡張終期容積の心室造影計測に基づく進行性LV拡張の予防または減弱

2. LV駆出率(ejection fraction, EF)の心室造影計測及び左室内径短縮率(LV fractional area of shortening, FAS)の心エコー測定に基づくLV収縮機能の進行性低下の防止。

30

3. 梗塞したLV壁の収縮期肥厚の心エコー測定に基づく梗塞拡大の予防又は減弱。

【0128】

血管造影及び心エコー測定

血管造影及び心エコー計測はすべて、全身麻酔及び無菌条件下での心臓カテーテル検査中に行われる。犬をその右側に置き、且つ、造影剤(RENO-M-60 Squibb, Princeton, NJ)の注射中にデジタルで記録した左心室造影図を得る。画像倍率の補正は、LVのレベルに配置された放射線不透過の較正グリッドを用いて行われる。面積長さ法を用いて、LV収縮期の体積(end-systolic volumes, ESV)及び拡張終期の体積(end-diastolic volumes, EDV)をLVシルエットから計算する(Dodge et al., Am J Cardiol. 1966; 18:10-24, 1966)。左心室EFは、拡張終期容積(EDV)と収縮終期容積(ESV)の差と拡張終期容積(EDV)との比 $\times 100$ (times 100)として計算される(Sabbah et al., Circulation 89:2852-2859, 1994)。

40

【0129】

すべての2次元心エコー測定は、右臥位に配置された犬を用いて行われる。心エコー検査は、3.5MHzトランスデューサを備えたGeneral Electric VIVID 7 Dimension超音波システムを使用して実行され、且つ、オフライン解析のためにMitsubishi MD3000 VHSレコーダに記録される。乳頭

50

部の中間の筋肉レベルのLV短軸像を記録し、そして%内径短縮率(percent fractional shortening, FAS; Kono et al., J Am Coll Cardiol 1992; 19: 1101-1105, 1992)の計算に使用する。%内径短縮率は、拡張終期領域と収縮終期領域との差を拡張終期領域で割ったもの $\times 100$ (times 100)として定義される。LV前壁、後壁及び心室内隔壁の%収縮期壁の肥厚も、短軸図を用いて測定される。それぞれは、拡張終期における壁厚と拡張終期の壁厚との比を、拡張終期の壁厚で割ったもの $\times 100$ (time 100)として計算される。収縮期および収縮後の拍動は、すべての分析から除外される。

【0130】

統計分析

グループ内の血管造影及び心エコー検査のデータは、0.05におけるアルファセットにより反復測定分散分析(analysis of variance, ANOVA)を用いて分析される。全体的なANOVAが有意である場合、前処置(pre-treatment, PRE)と2ヶ月及び4ヶ月とのペアワイズ比較を、Student-Newman-Keuls検定を用いて行う。この試験では、0.05未満のp値が有意であるとみなされる。治療効果を評価するために、PREから処理後2ヶ月まで及びPREから処理後4ヶ月までの各測定における変化()が、2つの試験アーム(arms)のそれぞれについて計算される。対照群とTPEN/アルギネート処置群との間に有意差が存在するかどうかを判定するために、2つの手段についてt統計量(t-statistic)を使用し、ここで $p < 0.05$ を有意と見なした。

【0131】

本発明は、その特定の実施形態と関連して記載されているが、当業者には多くの代替、変更及び変形が明らかであることは明らかである。したがって、添付の特許請求の範囲の精神及び広範な範囲内にあるそのような代替物、改変物及び変形物の全てを包含することが意図される。

【0132】

個々の刊行物、特許又は特許出願が、具体的かつ個々に参照により本明細書に組み込まれると示されているのと同程度に、本明細書中で言及されたすべての刊行物、特許及び特許出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。さらに、本出願における任意の参考文献の引用又は識別は、そのような参照が本発明の先行技術として利用可能であることを認めるものと解釈されてはならない。セクション見出しが使用される限り、それらは必ずしも限定的であると解釈されるべきではない。

10

20

30

フロントページの続き

(74)代理人 100107766

弁理士 伊東 忠重

(74)代理人 100070150

弁理士 伊東 忠彦

(74)代理人 100091214

弁理士 大貫 進介

(72)発明者 アップルbaum, エラシュミエル ヨリ

イスラエル国 エルサレム 93543, アイン ロゲル ストリート 7

審査官 新熊 忠信

(56)参考文献 特表2010-521215(JP, A)

米国特許出願公開第2012/0276152(US, A1)

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005年, Vol.313, No.3,
pp.1046-1057

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00 - 33/44

A61K 9/00 - 9/72

A61K 47/00 - 47/69

A61P 9/00

A61P 43/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)