

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7280353号

(P7280353)

(45)発行日 令和5年5月23日(2023.5.23)

(24)登録日 令和5年5月15日(2023.5.15)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/51 (2006.01)

A 6 1 K 31/51

A 2 3 L 33/15 (2016.01)

A 2 3 L 33/15

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/02

請求項の数 7 (全17頁)

(21)出願番号	特願2021-518126(P2021-518126)	(73)特許権者	510229201
(86)(22)出願日	令和1年10月30日(2019.10.30)		キョンブク ナショナル ユニバーシティ
(65)公表番号	特表2022-504098(P2022-504098 A)		インダストリー - アカデミック コーオ ペレーション ファウンデーション
(43)公表日	令和4年1月13日(2022.1.13)		大韓民国 7 0 2 - 7 0 1 テグ ブク - グ
(86)国際出願番号	PCT/KR2019/014500		サンヨク - ドン 1 3 7 0 キョンブク
(87)国際公開番号	WO2020/091430		ナショナル ユニバーシティ
(87)国際公開日	令和2年5月7日(2020.5.7)	(74)代理人	100107766
審査請求日	令和3年4月1日(2021.4.1)		弁理士 伊東 忠重
(31)優先権主張番号	10-2018-0133677	(74)代理人	100107515
(32)優先日	平成30年11月2日(2018.11.2)		弁理士 廣田 浩一
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)	(74)代理人	100070150
(31)優先権主張番号	10-2019-0136771		弁理士 伊東 忠彦
(32)優先日	令和1年10月30日(2019.10.30)	(72)発明者	ドンホ・パク
最終頁に続く			大韓民国 4 1 9 4 4 テグ チュン - グ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 黄斑変性予防又は治療用組成物

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

フルスルチアミン(fursultiamine)又はその塩(salts)を含む新生血管性加齢黄斑変性(Neovascular age-related macular degeneration, Neovascular AMD)予防又は治療用薬剤学的組成物(ただし、ピリドキサミン化合物と組み合わせて用いられるものを除く。)

## 【請求項2】

前記薬剤学的組成物は、眼球内(intraocular)、眼球周囲(periorocular)、眼球後ろ(retroorbital)、網膜下(subretinal)、網膜中心(central retinal)、中心窩外部(parafovea)、結膜下(subconjunctival)、硝子体内(intravitreal)、前房内(intracameral)、又は脈絡膜上(suprachoroidal)に投与される、請求項1に記載の薬剤学的組成物。

## 【請求項3】

フルスルチアミン(fursultiamine)又はその塩(salts)を含む新生血管性加齢黄斑変性(Neovascular age-related macular degeneration, Neovascular AMD)予防又は改善用食品組成物(ただし、ピリドキサミン化合物と組み合わせて用いられるものを除く。)

## 【請求項4】

フルスルチアミン(fursultiamine)又はその塩(salts)を含む新

生血管性眼疾患 (neovascular ocular disease) 予防又は治療用薬剤学的組成物 (ただし、ピリドキサミン化合物と組み合わせて用いられるものを除く。 )。

【請求項 5】

前記新生血管性眼疾患は、角膜血管新生 (corneal neovascularization)、網膜血管新生 (retinal neovascularization)、脈絡膜血管新生 (choroidal neovascularization)、眼球内血管新生 (intraocular neovascularization)、新生血管性緑内障 (neovascular glaucoma)、増殖性糖尿病性網膜症 (proliferative diabetic retinopathy)、新生血管性黄斑変性 (neovascular macular degeneration)、又は未熟児網膜病 (retinopathy of prematurity) である、請求項 4 に記載の薬剤学的組成物。

10

【請求項 6】

フルスルチアミン (fursultiamine) 又はその塩 (salts) を含む新生血管性眼疾患 (neovascular ocular disease) 予防又は改善用食品組成物 (ただし、ピリドキサミン化合物と組み合わせて用いられるものを除く。 )。

【請求項 7】

前記新生血管性眼疾患は、角膜血管新生 (corneal neovascularization)、網膜血管新生 (retinal neovascularization)、脈絡膜血管新生 (choroidal neovascularization)、眼球内血管新生 (intraocular neovascularization)、新生血管性緑内障 (neovascular glaucoma)、増殖性糖尿病性網膜症 (proliferative diabetic retinopathy)、新生血管性黄斑変性 (neovascular macular degeneration)、又は未熟児網膜病 (retinopathy of prematurity) である、請求項 6 に記載の食品組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、保健福祉部の支援下で課題番号 H I 1 6 C 1 5 0 1 によってなされたものであり、前記課題の研究管理専門機関は韓国保健産業振興院、研究事業名は“先導型特性化研究開発事業”、研究課題名は“糖尿病性心血管合併症治療剤及び効能評価システム開発”、主管機関はキョンブク大学校病院、研究期間は 2 0 1 6 . 0 4 . 0 1 ~ 2 0 2 1 . 0 3 . 3 1 である。

【0002】

また、本発明は、教育部の支援下で課題番号 2 0 1 7 R 1 D 1 A 1 B 0 3 0 2 7 9 6 6 によってなされたものであり、前記課題の研究管理専門機関は韓国研究財団、研究事業名は“理工学個人基礎研究支援事業”、研究課題名は“Semaphorin 3 A 及び Angiopoietin-like 4 を標的にする microRNA 制御による脈絡膜網膜新生血管及び血管透過性亢進調節効能評価”、主管機関はキョンブク大学校産学協力団、研究期間は 2 0 1 7 . 0 6 . 0 1 ~ 2 0 2 0 . 0 5 . 3 1 である。

40

【0003】

また、本発明は、教育部の支援下で課題番号 2 0 1 9 R 1 A 2 C 1 0 8 4 3 7 1 によってなされたものであり、前記課題の研究管理専門機関は韓国研究財団、研究事業名は“理工学中堅研究者支援事業”、研究課題名は“免疫細胞のミトコンドリアエネルギー代謝リプログラミング及び炎症活性化制御を用いた新生血管性加齢黄斑変性新規治療機転研究”、主管機関はキョンブク大学校産学協力団、研究期間は 2 0 1 9 . 0 9 . 0 1 ~ 2 0 2 4 . 0 2 . 2 9 である。

【0004】

50

本特許出願は、2018年11月2日に大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願第10-2018-0133677号に対して優先権を主張し、この特許出願の開示事項は本明細書に参照によって組み込まれる。

【0005】

本発明は、黄斑変性予防又は治療用組成物に関する。より詳細には、本発明は、フルスルチアミン(fursultiamine)又はその塩(salts)を含む黄斑変性予防又は治療用組成物に関する。

【背景技術】

【0006】

黄斑変性(macular degeneration)は、黄斑部分に変性が起きて視力障害を起こす眼球疾患で、発病原因は、加齢、家族力、人種、喫煙と関連があると知られている。発病初期には視野がぼやけ、近くの物が歪んで見えるが、最後には失明に至る。

【0007】

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)は、重症の非可逆的な視力喪失を引き起こし、50歳以上の人口における失明の主要原因と知られている。疫学研究において有病率は、米国内52～64歳人口の1.2%であると報告されており、75歳以上ではその比率が20～37%とより高いと報告され、平均年齢が増加するほど有病率は増加していくと考えられる。

【0008】

加齢黄斑変性には2類型がある。その第一は非新生血管性加齢黄斑変性で、最も通常のものであり、全加齢黄斑変性事例の85%を占める。このような乾性類型は、網膜色素上皮の油カスと萎縮性変化を特徴とする。その第二は新生血管性加齢黄斑変性であり、脈絡膜新生血管を特徴とする。脈絡膜新生血管は新しく形成された血管に血液と体液を流出させる傾向がある。これは、網膜組織に繊維組織が増殖し、光受容体が消失された病変の形成を誘導し、進行し続けて重症且つ非可逆的な視力喪失を招く。

【0009】

特に、2010年に発表された韓国内加齢黄斑変性に対する基礎疫学調査によれば、加齢黄斑変性の有病率は、初期変性が2.92%、後期変性が0.19%であるが、後期黄斑変性のうち、非新生血管性黄斑変性は3.9%で、残りはいずれも新生血管性と観察され、新生血管性黄斑変性の頻度が海外に比べて非常に高いことが分かる。

【0010】

新生血管性加齢黄斑変性の治療法には、光力学療法と血管内皮成長因子を遮断するための薬物を眼球中に注射する方法がある。しかし、多くの大規模多機関臨床研究では、光力学療法に比べて、硝子体腔内血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)注射術を施行する方がより良い結果を示した。

【0011】

これによって、新生血管性加齢黄斑変性の治療のために様々な抗血管内皮成長因子薬物が開発されたが、その代表的な薬剤がラニビズマブ(Ranibizumab, Lucentis(登録商標))であり、細胞外の血管内皮成長因子と結合して活性を抑制させる。ラニビズマブは、様々な臨床研究から、新生血管性加齢黄斑変性患者にとって効果的で安全な治療であることが報告され、全世界的に広く用いられている。

【0012】

しかしながら、病変がよく再発し、注射回数の増加によって患者に相当な負担を与える。一部の患者では、注射術にもかかわらず病変が好転しない場合もある。

【0013】

一方、血管内皮成長因子(VEGF)は強力な血管拡張剤の役割を担い、心臓の冠状動脈の弛緩と血液循環を維持させる。加齢黄斑変性患者たちは高齢で、心血管疾患の危険が高い群であるため、血管内皮成長因子注射術は深刻な副作用の危険性もある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 4 】

そこで、本発明では、副作用の危険性を減らし、黄斑変性に対して効率的な治療効果をもたらす新しい治療組成物を提案しようとする。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 1 5 】

本発明者らは、副作用の危険性が低減した黄斑変性治療剤を開発するために鋭意研究努力した。その結果、本発明者らは、フルスルチアミン ( f u r s u l t i a m i n e ) が網膜色素上皮細胞で増加した H I F - 1 の発現を減少させ、脈絡膜血管内皮細胞成長を抑制することを確認し、本発明を完成するに至った。

10

## 【 0 0 1 6 】

そこで、本発明の目的は、黄斑変性 ( m a c u l a r d e g e n e r a t i o n ) 予防又は治療用薬剤学的組成物を提供することである。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の他の目的は、黄斑変性予防又は改善用食品組成物を提供することである。

## 【 0 0 1 8 】

本発明のさらに他の目的は、新生血管性眼疾患 ( n e o v a s c u l a r o c u l a r d i s e a s e ) 予防又は治療用薬剤学的組成物を提供することである。

## 【 0 0 1 9 】

本発明のさらに他の目的は、新生血管性眼疾患予防又は改善用食品組成物を提供することである。

20

## 【 0 0 2 0 】

本発明のさらに他の目的は、黄斑変性治療方法を提供することである。

## 【 0 0 2 1 】

本発明のさらに他の目的は、新生血管性眼疾患治療方法を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 2 2 】

本発明の一様態は、フルスルチアミン ( f u r s u l t i a m i n e ) 又はその塩 ( s a l t s ) を含む黄斑変性 ( m a c u l a r d e g e n e r a t i o n ) 予防又は治療用薬剤学的組成物に関する。

30

## 【 0 0 2 3 】

本発明者らは副作用の危険性が低減した黄斑変性治療剤を開発するために鋭意研究努力した。その結果、本発明者らは、フルスルチアミンが網膜色素上皮細胞で増加した H I F - 1 の発現を減少させ、脈絡膜血管内皮細胞成長を抑制することを確認した。

## 【発明の効果】

## 【 0 0 2 4 】

本発明の特徴及び利点を要約すると、次の通りである：

( a ) 本発明は、フルスルチアミン ( f u r s u l t i a m i n e ) 又はその塩 ( s a l t s ) を含む、黄斑変性 ( m a c u l a r d e g e n e r a t i o n ) 予防又は治療用薬剤学的組成物に関する。

40

( b ) フルスルチアミンは、網膜色素上皮細胞で増加された H I F - 1 の発現を減少させ、脈絡膜血管内皮細胞成長を抑制する。

( c ) 本発明のフルスルチアミン又はその塩を含む薬剤学的組成物は、様々な新生血管性眼疾患の治療剤にも用いることができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 2 5 】

【図 1】図 1 は、A R P E - 1 9 細胞において、フルスルチアミン ( f u r s u l t i a m i n e ) が、低酸素条件によって誘導される H I F - 1 発現を抑制する効果を示すグラフである。

【図 2 a】図 2 a は、脈絡膜スプラウティングアッセイ ( c h o r o i d s p r o u t

50

ing assay) 実験結果を示す。フルスルチアミンによってスプラウティング領域が減少した。(顕微鏡倍率: 40 倍)

【図 2 b】図 2 b は、図 2 a のスプラウティング距離 (Choroid sprouting distance) を定量分析して示すグラフである。

【図 3】図 3 は、ARPE-19 細胞において、フルスルチアミンが、低酸素条件下で増加する VEGF 分泌を抑制することを示すグラフである。

【図 4 a】図 4 a は、レーザー誘導脈絡膜新生血管モデル (laser-induced CNV) において、フルオレセイン血管造影法を用いて血管漏出程度を比較した結果である。フルスルチアミンによって血管漏出程度が減少したことが分かる。0: レーザー斑点がないもの、1: 初期と後期間において蛍光輝度とサイズに変化がないもの、2 A: 初期と後期間において蛍光輝度のみ変化があるもの、2 B: 初期と後期間において蛍光輝度とサイズの両方に変化があるもの。

10

【図 4 b】図 4 b は、レーザー誘導脈絡膜新生血管モデル (laser-induced CNV) において、フルオレセイン血管造影法を用いて血管漏出程度を比較した結果である。フルスルチアミンによって血管漏出程度が減少したことが分かる。0: レーザー斑点がないもの、1: 初期と後期間において蛍光輝度とサイズに変化がないもの、2 A: 初期と後期間において蛍光輝度のみ変化があるもの、2 B: 初期と後期間において蛍光輝度とサイズの両方に変化があるもの。

【図 5】図 5 は、レーザー誘導脈絡膜新生血管モデル (laser-induced CNV) において、フルスルチアミンによる CNV 病変 (lesion) サイズが減少することを示す。白色バー (bar): 100  $\mu$ m。

20

【図 6 a】図 6 a は、ARPE-19 細胞において、ミトコンドリアのエネルギー代謝変化を確認するための酸素消費量変化グラフである。

【図 6 b】図 6 b は、ARPE-19 細胞において、LPS によって減少したミトコンドリアの代謝がフルスルチアミンによって回復することを示す予備容量 (Spare capacity) グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0026】

フルスルチアミン (fursultiamine; thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide, TTFD) は、チアミン欠乏症の治療に用いられるビタミン B<sub>1</sub> の活性ビタミンであり、チアミンジスルフィド誘導体である。ビタミン B<sub>1</sub> に比べて細胞内によく吸収され、多量のコカルボキシラーゼ (co-carboxylase) を生成して、生理学的にビタミン B<sub>1</sub> の欠乏や代謝障害に関連した神経機能障害、心筋代謝障害などを改善させるものと知られている。

30

【0027】

黄斑変性 (Macular degeneration) の発病原因は、加齢、家族力、人種、喫煙などがあるが、主に加齢によって発生する。黄斑変性では網膜色素上皮と脈絡膜との間の黄斑 (網膜の一部) にドルーゼン (drusen、細胞外タンパク質と脂質の蓄積) という黄色沈殿物が蓄積されていく。

【0028】

40

年齢の増加によって発生する加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration, AMD) は、ドルーゼンの程度 (サイズ及び数) に部分的に基づいて初期 (early)、中期 (intermediate)、及び後期 (late) の 3 段階に分けられる。

【0029】

本発明の一具現例によれば、前記黄斑変性は、加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration, AMD) である。

【0030】

本発明の他の具現例によれば、前記黄斑変性は、後期加齢黄斑変性 (late age-related macular degeneration, late AMD) であ

50

る。

【0031】

後期AMDでは、網膜損傷が起き、ドルーゼンの他にも有症状の視力損失が発生する。後期AMDは、損傷類型によって乾式AMDと湿式AMDとに区別される。乾式AMDは、地図状萎縮症(Geographic atrophy)を特徴とし、非血管新生性AMDである。一方、湿式AMDは、脈絡膜新生血管が現れる血管新生性AMD(Neovascular AMD)である。

【0032】

本発明の他の具現例によれば、前記黄斑変性は、新生血管性加齢黄斑変性(Neovascular age-related macular degeneration, Neovascular AMD)又は非血管新生性加齢黄斑変性(Non-neovascular age-related macular degeneration, Non-neovascular AMD)である。

10

【0033】

本発明の他の具現例によれば、前記黄斑変性は、新生血管性加齢黄斑変性である。

【0034】

本発明の薬剤学的組成物は、フルスルチアミン又はその塩の有効量が100mg/60kg/日~240mg/60kg/日である。

【0035】

本発明において有効成分として用いられるフルスルチアミンは、それ自体又は塩の形態、好ましくは薬剤学的に許容可能な塩の形態で用いられてよい。

20

【0036】

前記塩としては、遊離酸(free acid)によって形成された酸付加塩が好ましい。

【0037】

前記遊離酸は、有機酸及び/又は無機酸でよい。

【0038】

前記有機酸は、クエン酸、酢酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、ギ酸、プロピオン酸、シュウ酸、トリフルオロ酢酸、ベンゾ酸、グルコン酸、メタスルホン酸、グリコール酸、コハク酸、4-トルエンスルホン酸、グルタミン酸及びアスパラギン酸などであり得るが、これに制限されない。

30

【0039】

前記無機酸は、塩酸、臭素酸、硫酸及びリン酸などであり得るが、これに制限されない。

【0040】

本発明の薬剤学的組成物は、フルスルチアミン又はその塩の他に、薬剤学的に許容される担体(carrier)を含むことができる。

【0041】

前記薬剤学的に許容される担体は、製剤時に通常用いられるものであり、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアガム、リン酸カルシウム、アルジネート、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸プロピル、滑石、ステアリン酸マグネシウム及びミネラルオイルなどを含むが、これに限定されない。

40

【0042】

本発明の薬剤学的組成物は、これらの成分の他に、潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤などをさらに含むことができる。好適な薬剤学的に許容される担体及び製剤はRemington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)に詳細に記載されている。

【0043】

本発明の薬剤学的組成物は、経口又は非経口で投与できる。

50

## 【0044】

非経口投与では、静脈内注入、皮下注入、筋肉注入、腹腔注入、経皮投与、眼球投与又は眼球局所投与などで投与できる。

## 【0045】

眼球局所投与は、例えば、直接に眼球内投薬されたり、眼球周囲、眼球後ろ、網膜下(subretinal)、網膜中心(central retinal)、中心窩(fovea)外部、結膜下(subconjunctival)、硝子体内(intravitreal)、前房内(intracameral)又は脈絡膜上(suprachoroidal)などに投与することを含む。

## 【0046】

本発明の薬剤学的組成物は、挿入装置を介して投薬されてもよい。

## 【0047】

本発明の薬剤学的組成物の好適な投与量は、製剤化方法、投与方式、患者の年齢、体重、性別、病的状態、飲食、投与時間、投与経路、排泄速度及び放射線反応感应性のような要因によって様々であり、通常熟練した医師は所望の治療に効果的な投与量を容易に決定及び処方できる。

## 【0048】

本発明の薬剤学的組成物は、当該発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が容易に実施できる方法によって、薬剤学的に許容される担体及び/又は賦形剤を用いて製剤化することによって、単位容量形態で製造されてもよく、又は多回容量容器内に内入して製造されてもよい。このとき、剤形は、オイル又は水性媒質中の溶液、懸濁液又は乳化液の形態であるか、軟膏剤、エキス剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤又はカプセル剤の形態であってもよく、分散剤又は安定化剤をさらに含むことができる。

## 【0049】

本発明の他の様態は、フルスルチアミン又はその塩を含む黄斑変性(macular degeneration)予防又は改善用食品組成物に関する。

## 【0050】

本発明の組成物が食品組成物である場合には、粉末、顆粒、錠剤、カプセル又は飲料などの形態で製造されてよい。

## 【0051】

本発明において、前記食品は、キャンディ類、飲料、ガム、茶、ビタミン複合剤、又は健康補助食品類でよい。

## 【0052】

本発明の食品組成物は、有効成分としてフルスルチアミン又はその塩の他にも、食品製造時に通常添加される成分を含むことができ、例えば、タンパク質、炭水化物、脂肪、栄養素、調味剤及び香味剤を含む。上述した炭水化物の例は、モノサッカライド、例えば、ブドウ糖、果糖など；ジサッカライド、例えば、マルトース、スクロース、オリゴ糖など；及びポリサッカライド、例えば、デキストリン、シクロデキストリンなどのような通常の糖、及びキシリトール、ソルビトール、エリトリトールなどの糖アルコールである。

## 【0053】

香味剤として天然香味剤[タウマチン、ステビア抽出物(例えば、レバウジオシドA、グリチルリチンなど)]及び合成香味剤(サッカリン、アスパルテムなど)を用いることができる。

## 【0054】

本発明の食品組成物がドリンク剤として製造される場合には、フルスルチアミン又はその塩の他に、クエン酸、液状果糖、砂糖、ブドウ糖、酢酸、リンゴ酸、果汁、杜冲抽出液、ナツメ抽出液、甘草抽出液などをさらに含むことができる。

## 【0055】

本発明のさらに他の態様は、フルスルチアミン又はその塩を含む新生血管性眼疾患(neovascular ocular disease)予防又は治療用薬剤学的組成物に

10

20

30

40

50

関する。

【0056】

本発明のさらに他の態様は、フルスルチアミン又はその塩を含む新生血管性眼疾患予防又は改善用食品組成物に関する。

【0057】

本発明の新生血管性眼疾患予防又は治療用薬剤学的組成物及び食品組成物は、上述した本発明の黄斑変性予防又は治療用薬剤学的組成物と同じ有効成分であるフルスルチアミン又はその塩を含むので、この両者に共通する内容は、反復記載による明細書の過度な複雑性を避けるために、その記載を省略する。

【0058】

本明細書において用語“新生血管性眼疾患”は、眼球で発生する病理学的血管新生関連疾患であり、例えば、角膜血管新生(corneal neovascularization)、網膜血管新生(retinal neovascularization)、脈絡膜血管新生(choroidal neovascularization)、眼球内血管新生(intraocular neovascularization)、新生血管性緑内障(neovascular glaucoma)、増殖性糖尿病性網膜症(proliferative diabetic retinopathy)、新生血管性黄斑変性(neovascular macular degeneration)、及び未熟児網膜病症(retinopathy of prematurity)を含む。

【0059】

本発明のさらに他の態様は、フルスルチアミン又はその塩を含む薬剤学的組成物をそれを必要とする個体(subject)に投与する段階を含む黄斑変性(macular degeneration)治療方法に関する。

【0060】

本発明のさらに他の態様は、フルスルチアミン又はその塩を含む薬剤学的組成物をそれを必要とする個体(subject)に投与する段階を含む新生血管性眼疾患治療方法に関する。

【0061】

本明細書において用語“投与”は、任意の適切な方法で個体に所定の物質を提供することを意味する。本発明の薬剤学的組成物の投与経路は、目的組織に到達できる限り、通常のいかなる経路を通じて経口又は非経口投与できる。また、本発明の薬剤学的組成物は、有効成分を標的細胞又は器官に伝達できる任意の装置を用いて投与されてもよい。

【0062】

本明細書において用語“個体(subject)”は、特に限定されるものではないが、例えば、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、シチメンチョウ、ウズラ、ネコ、イヌ、マウス、ネズミ、ウサギ又はギニアピッグを含み、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトを意味する。

【0063】

本発明は、フルスルチアミン(fursultiamine)又はその塩(salts)を含む黄斑変性(macular degeneration)予防又は治療用薬剤学的組成物に関する。

【実施例】

【0064】

以下、本発明を下記の実施例によってさらに詳しく説明する。ただし、これらの実施例は本発明を例示するためのものに過ぎず、本発明の範囲がこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0065】

実施例1：フルスルチアミンの新生血管抑制効果 - HIF - 1 減少

新生血管性加齢黄斑変性は、脈絡膜新生血管を特徴とする。網膜又は脈絡膜の低酸素(hypoxia)環境がHIF - 1 (hypoxia inducible facto

10

20

30

40

50



r 1 a l p h a ) を発現させ、これが血管内皮細胞因子を促進させて脈絡膜の新生血管の発生を誘導すると知られている。このような脈絡膜内新生血管の発生は、結局、視力損傷を引き起こす。

【 0 0 6 6 】

本発明では、チアミン誘導体であるフルスルチアミンによる H I F - 1 抑制及びフルスルチアミンの脈絡膜内新生血管発生予防効果を確認しようとした。網膜細胞 A R P E - 1 9 ( A d u l t R e t i n a l P i g m e n t E p i t h e l i a l c e l l l i n e - 1 9 ) を用いたインビトロ実験を行った。

【 0 0 6 7 】

A R P E - 1 9 細胞を 6 0 m m 皿 ( d i s h ) に分注し、1 日程度付着するようにした。翌日、フルスルチアミン塩酸塩 ( T o r o n t o r e s e a r c h c h e m i c a l , F 8 6 5 2 3 0 ) 0  $\mu$  M、2 0  $\mu$  M、5 0  $\mu$  M 及び 1 0 0  $\mu$  M とビークル ( v e h i c l e ) ( D i m e t h y l s u l f o x i d e ( D M S O )、S i g m a - A l d r i c h ) を各細胞に濃度別に処置した。1 時間後に、低酸素チャンバー ( I N V I V O <sub>2</sub> 4 0 0 , B a k e r ) に入れて 1 % 酸素条件に露出させた。そして、4 時間 ~ 6 時間後に細胞を取り出してタンパク質溶解バッファー ( p r o t e i n l y s i s b u f f e r ) を処理し、細胞を溶解後にタンパク質を分離した。

【 0 0 6 8 】

B C A タンパク質分析キット ( P i e r c e B C A p r o t e i n a s s a y k i t , T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) を用いてタンパク質を定量分析した後、同一のタンパク質の量のサンプルと 4 X ローディングバッファーと混ぜて加熱してタンパク質を 1 次構造に変性させた。S D S - P A G E ゲルに同一量のタンパク質サンプルをローディングし、P V D F メンブレン ( m e m b r a n e ) に伝達 ( t r a n s f e r ) させた。H I F - 1 a 抗体 ( N o v u s , N B 1 0 0 - 4 7 9 ) を 5 % B S A ( b o v i n e s e r u m a l b u m i n ) 溶液に希釈して 4 で一晩インキュベートした。

【 0 0 6 9 】

翌日、メンブレンを、H R P ( H o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e ) が結合している 2 次抗体とインキュベートし、E C L ( e n h a n c e d c h e m i l u m i n e s c e n c e ) 溶液と反応させて化学発光を誘導した。化学発光イメージ分析装置 ( G E H e a l t h c a r e , L A S - 4 0 0 0 ) でタンパク質の量に従う発光程度を探知し、イメージを得た。ローディングコントロール ( l o a d i n g c o n t r o l ) 遺伝子としては、 $\alpha$ -チューブリンを用いて同一の量のタンパク質がローディングされたことを示した。

【 0 0 7 0 】

その結果、低酸素条件 ( 1 % 酸素 ) で増加する H I F - 1 の発現がフルスルチアミン処置時に減少することを確認した ( 図 1 )。

【 0 0 7 1 】

実施例 2 : フルスルチアミンの新生血管抑制効果 - 脈絡膜血管内皮細胞成長減少

加齢黄斑変性の e x v i v o モデルであるマウス脈絡膜スプラウティングアッセイ ( m o u s e c h o r o i d s p r o u t i n g a s s a y ) から、脈絡膜血管内皮細胞成長に及ぼすフルスルチアミンの効果を確認した。

【 0 0 7 2 】

3 週齢又は 4 週齢の J a c k s o n L a b o r a t o r y 社の C 5 7 ブラック / 6 J ( C 5 7 B L / 6 J ) の眼球を摘出して脈絡膜 / 鞏膜を分離し、1 m m x 1 m m のサイズに切断した。一方、氷で溶かして液体状態であるマトリゲル ( B e c t o n D i c k i n s o n , B D m a t r i g e l ) を 2 4 ウェルプレートに 3 0 0  $\mu$  l ずつ入れ、切断しておいた脈絡膜 / 鞏膜を 1 枚ずつ植えた。その後、3 7  $^{\circ}$ C インキュベーターに 1 0 分間置いてマトリゲルを固めた後、E G M 培地 ( L o n z a , E n d o t h e l i a l G r o w t h M e d i u m ) を 5 0 0  $\mu$  l ずつ入れた。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 3 】

その後、37 インキュベーターで血管内皮細胞の成長を誘導した。2日に1回ずつ培地を交換し、この時、フルスルチアミン塩酸塩を20  $\mu$ M又は50  $\mu$ M濃度で処置した。脈絡膜/鞏膜を植えた日から3日～5日後に観察し、脈絡膜から生長した血管内皮細胞の成長を確認した。組織からスブラウティングした範囲までの距離を、イメージJ (ImageJ) プログラムを用いて総4ヶ所の位置における距離を測定して平均した。統計処理は、Prismプログラムを用いて、p値0.05以下 ( $p < 0.05$ ) の場合を有意性があると表示した。

## 【 0 0 7 4 】

その結果、血管内皮細胞成長がフルスルチアミンによって減少することを確認した (図2a～図2b及び表1)。

## 【 0 0 7 5 】

## 【表1】

フルスルチアミン ( $\mu$ M)	0	20	50
スブラウティング範囲 (pixels)	398.417 $\pm$ 40.827	229.926 $\pm$ 28.348	126.713 $\pm$ 22.810

## 【 0 0 7 6 】

実施例3：フルスルチアミンのVEGF分泌抑制効果

ARPE-19細胞を60mm皿 (dish) に分注し、1日程度付着するようにした。翌日、無血清 (serum-free) 培地に交換した後、フルスルチアミン塩酸塩0  $\mu$ M、50  $\mu$ M、及び100  $\mu$ M (Toronto research chemical) とピークル (DMSO, Sigma-Aldrich) を各細胞に濃度別に処置し、低酸素チャンバー (INVIVO<sub>2</sub> 400, Baker) に入れて1%酸素条件に露出させた。

## 【 0 0 7 7 】

そして、12時間後に培地を回収し、ヒトVEGF酵素免疫測定キット (Enzyme linked immunoassay (ELISA), R&D systems) で培地に分泌されたVEGFの量を測定した。測定方法及び濃度計算は、キットに提供されたマニュアルに従った。統計処理は、Prismプログラムを用いて、p値0.05以下 ( $p < 0.05$ ) の場合を有意性があると表示した。

## 【 0 0 7 8 】

その結果、フルスルチアミンが低酸素条件 (1%酸素) によって増加するVEGF分泌を抑制することを確認した (図3及び表2)。

## 【 0 0 7 9 】

## 【表2】

-	ピークル	1	2	3
酸素条件	21% O <sub>2</sub>	1% O <sub>2</sub>	1% O <sub>2</sub>	1% O <sub>2</sub>
フルスルチアミン ( $\mu$ M)	0	0	50	100
VEGF (pg/mL)	86.6 $\pm$ 3.2	184.2 $\pm$ 12.7	163.4 $\pm$ 7.4	47.4 $\pm$ 4.6

## 【 0 0 8 0 】

実施例 4：フルオレセイン血管造影法を用いて血管漏出程度比較

黄斑変性の動物モデルであるレーザー誘導脈絡膜網膜病症モデルにおける薬物効能を調べるために、7～8週齢のC57ブラック/6J(C57BL/6J)マウスを使用した。フルスルチアミン(Fursultiamine)投与群と対照群(Control)をそれぞれ10匹ずつ使用し、レーザー照射1日前からレーザー照射後1週までの総8日間フルスルチアミン50mg/kgを経口投与した。対照群は、溶媒として用いた滅菌蒸留水を同じ方法で投与した。

## 【 0 0 8 1 】

アバチン(Avertin, Sigma-Aldrich)でマウスを麻酔し、両眼に散瞳剤(ミドリンP、テジュン製薬)を投与して瞳孔を拡張させた。アルゴンレーザー(Oculight GL, IRIDEX)を両眼に照射して1眼球あたりに4個のレーザー斑点(spot)を作った。

10

## 【 0 0 8 2 】

1週後にマウスを麻酔後に、フルオレセイン(AK-FLUOR 10%, Akorn)を腹腔に投与し、MICRON IV Basic System(Phoenix Research Labs)を用いて網膜基底部及びフルオレセイン血管造影イメージを撮影した。

## 【 0 0 8 3 】

フルオレセイン注射後、3分以内に現れる初期(early phase)と7分程度で現れる後期(late phase)に血管漏出(vascular leakage)程度を撮影し、両時期に見られる蛍光輝度とサイズの変化程度を確認した。

20

## 【 0 0 8 4 】

斑点の蛍光輝度とサイズの両方とも増加すれば2B、輝度だけ増加すれば2A、差異がなければ1、斑点が出来なければ0とスコア(scoring)して比較した。2Bとスコアされた斑点が多いほど新生血管漏出が増加したことを意味する。統計処理は、Prismプログラムを用いて、p値0.05以下( $p < 0.05$ )の場合を有意性があると表示した。

## 【 0 0 8 5 】

その結果、脈絡膜網膜病症モデルにおいて、フルスルチアミン処理時に新生血管漏出程度が後期(late phase)で減少し、この結果から、フルスルチアミンによって血管漏出程度が減少することを確認した(図4a及び図4b)。

30

## 【 0 0 8 6 】

実施例 5：レーザー誘導脈絡膜新生血管モデル(laser-induced CNV)においてフルスルチアミンによるCNV病変サイズ確認

レーザー誘導脈絡膜網膜病症モデル誘導のために、7～8週齢のC57ブラック/6J(C57BL/6J)マウスをアバチン(Avertin, Sigma-Aldrich)で麻酔し、両眼に散瞳剤(ミドリンP、テジュン製薬)を投与して瞳孔を拡張させた。アルゴンレーザー(Oculight GL, IRIDEX)を両眼に照射して1眼球あたりに4個のレーザー斑点(spot)を作った。フルスルチアミン(Fursultiamine)投与群と対照群(Control)をそれぞれ10匹ずつ使用し、レーザー照射1日前からレーザー照射後1週までの8日間フルスルチアミン50mg/kgを経口投与した。対照群は、溶媒として用いた滅菌蒸留水を同じ方法で投与した。

40

## 【 0 0 8 7 】

レーザー照射1週後にマウスを麻酔後、フルオレセイン血管造影撮影後に組織染色のために眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド(4% PFA, EMS)に30分間固定した。角膜とレンズを除去した後、網膜と脈絡膜を分離した。分離された脈絡膜をブロッキングバッファー(blocking buffer, 0.2%ウシ血清アルブミン、5%正常ヤギ血清、0.5% Triton X-100)に入れて1時間反応させた。血管のマーカーの一つであるイソレクチン(isolectin)抗体(Isolectin

50

IB4-Alexa Fluor 488, Invitrogen) をブロッキングバッファーに希釈した後、組織に入れて反応させた。その後、脈絡膜を扁平に展開し、その上にマウント溶液 (Mountant, Thermo scientific) を置き、カバーガラスを覆って安定化させた。

【0088】

翌日、共焦点顕微鏡 (LSM800, Zeiss) を用いて100倍の倍率で撮影した。各レーザー斑点のサイズは、イメージJ (Image J) プログラムを用いて定量化した。統計処理は、Prismプログラムを用いて、p値0.05以下 ( $p < 0.05$ ) の場合を有意性があると表示した。

【0089】

その結果、フルスルチアミンによってCNV病変サイズが減少することを確認した (図5及び表3)。

【0090】

【表3】

-	対照群	フルスルチアミン投与群
フルスルチアミン (mg/kg)	0	50
病変サイズ ( $10^{-3}\text{mm}^2$ )	$23.9 \pm 2.4$	$15.7 \pm 1.0$

【0091】

実施例6：網膜色素上皮においてフルスルチアミンによるミトコンドリア代謝変化確認  
新生血管性加齢黄斑変性は炎症が主要病理的メカニズムであると知られており、フルスルチアミン処理によるミトコンドリア代謝回復の有無とこれによる炎症抑制効果を確認した。ミトコンドリアの代謝変化は炎症の誘発又は悪化を引き起こすこともあるので、フルスルチアミンがミトコンドリアの代謝を回復させる場合、それを炎症を伴う新生血管性眼疾患の予防又は治療に適用できると予測した。

【0092】

具体的に、ARPE-19細胞を96ウェルXFプレート (plate) に分注し、2日に1回ずつ培地を交換した。細胞を植えて5日目にLPS (Lipopolysaccharides, Sigma-Aldrich) を  $10 \mu\text{g/ml}$  処理し、6日目にフルスルチアミンを  $50 \mu\text{M}$  処理した。7日目にXF培地 (Seahorse XF DMEM medium, Agilent) に交換し、37℃、Non-CO<sub>2</sub>インキュベーター (incubator) に30分間置いた。

【0093】

ミトコンドリア予備容量 (Spare capacity) を確認するために、ミトコンドリア電子伝達抑制剤 (Inhibitor) 及び細胞呼吸阻害剤としてオリゴマイシン (Oligomycin)  $2 \mu\text{M}$ 、FCCP  $0.5 \mu\text{M}$ 、ロテノン (Rotenone)  $2 \mu\text{M}$ 、アンチマイシン (Antimycin) A  $2 \mu\text{M}$  をそれぞれ段階別に使用した。

【0094】

Seahorse XF分析機 (Seahorse XFe 96 analyzer, Agilent) で細胞内酸素消耗率 (Oxygen Consumption Rate, OCR) を測定した。測定方法は、Seahorse XF分析機 (Seahorse XFe 96 analyzer, Agilent) で提供されたマニュアルに従って行った。

【0095】

その結果、LPSによって減少したミトコンドリア予備容量 (Spare capacity) が、フルスルチアミン処置時に回復することを確認した。このことから、フルス

10

20

30

40

50

ルチアミンによるミトコンドリアエネルギー代謝の変化が炎症抑制効果に関与できるという点を確認した（図 6 a ~ 図 6 b 及び表 4 ）。

【 0 0 9 6 】

【表 4 】

	Con	LPS (48h)	LPS+Fur 50uM (24h)
LPS (ug/ml)	-	10	10
フルスルチアミン (uM)	-	-	50
OCR (%)	153. 614±36. 221	96. 3486±46. 440	189. 438±21. 392

【 0 0 9 7 】

以上の結果は、新生血管性加齢黄斑変性発病メカニズムにおいてフルスルチアミンの阻害効果を示し、フルスルチアミンを含む組成物の処置時に黄斑変性の予防及び治療効果を奏することを示唆する。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 9 8 】

本発明は、黄斑変性予防又は治療用組成物に関する。より詳細には、本発明は、フルスルチアミン ( f u r s u l t i a m i n e ) 又はその塩 ( s a l t s ) を含む黄斑変性予防又は治療用組成物に関する。

10

20

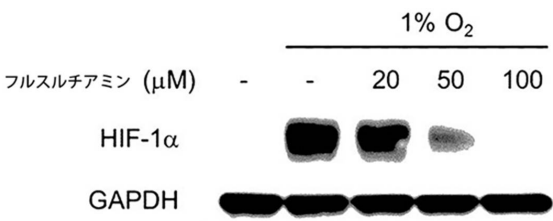
30

40

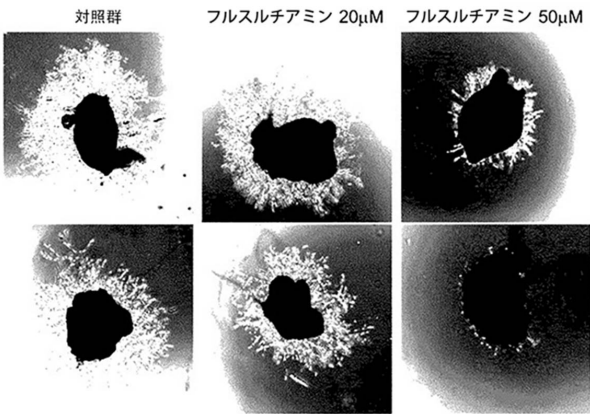
50

【図面】

【図 1】

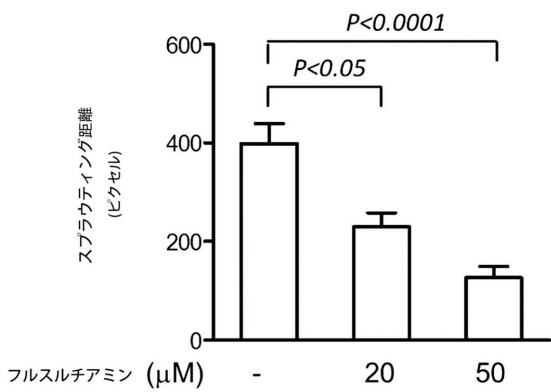


【図 2 a】

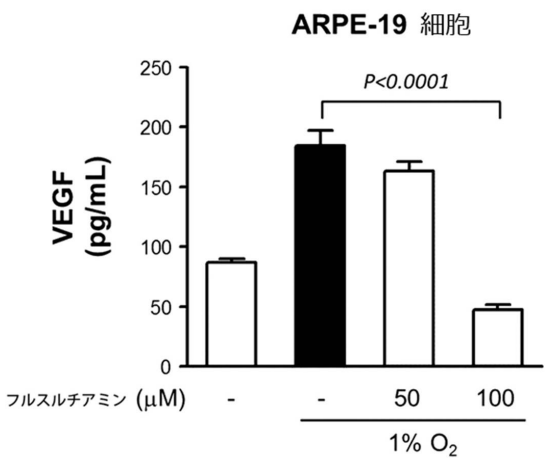


10

【図 2 b】



【図 3】



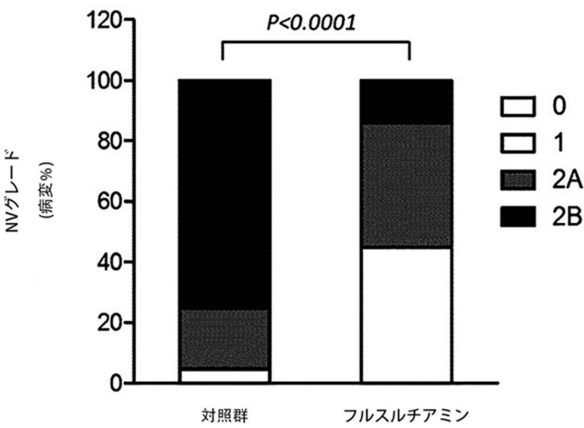
20

30

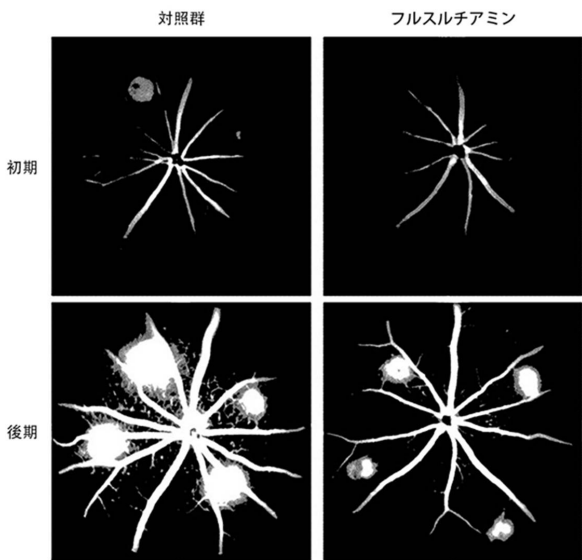
40

50

【図 4 a】

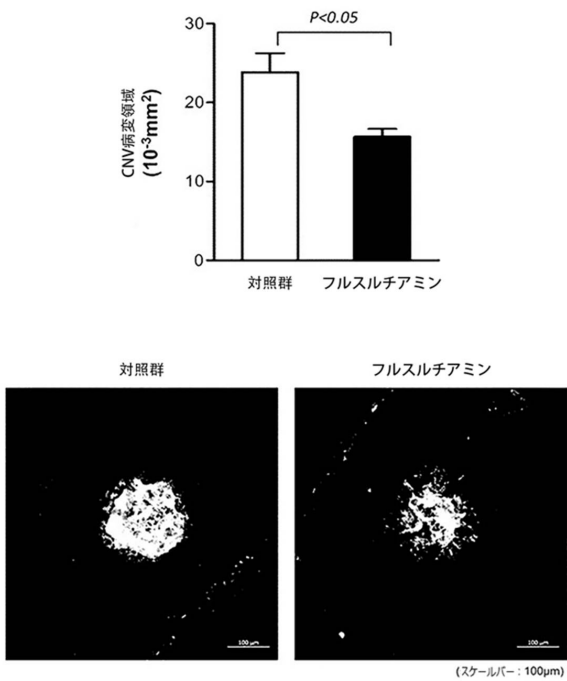


【図 4 b】

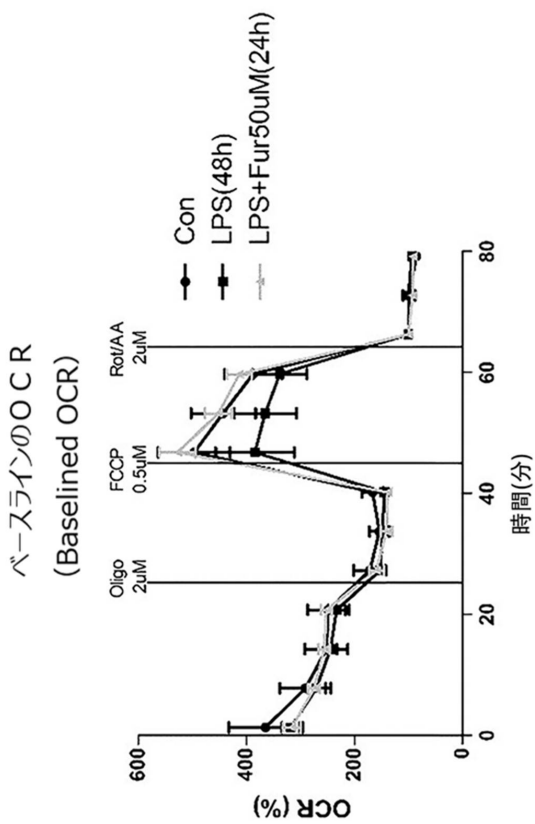


10

【図 5】



【図 6 a】



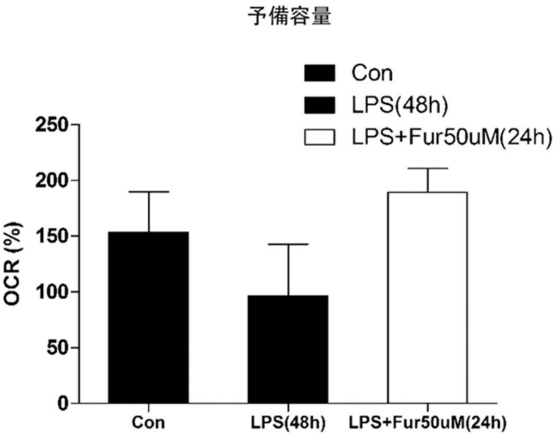
20

30

40

50

【 図 6 b 】



10

20

30

40

50



---

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

前置審査

トンドク - ロ 130

(72)発明者 インキュ・リ

大韓民国 41944 テグ チュン - グ トンドク - ロ 130

審査官 梅田 隆志

(56)参考文献 国際公開第2016/031839(WO, A1)

石橋 達朗ほか, 日本血栓止血学会誌, 1996年, Vol.7, No.2, pp.123-129.

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 31/51

A23L 33/15

A61P 27/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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