

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7042262号

(P7042262)

(45)発行日 令和4年3月25日(2022.3.25)

(24)登録日 令和4年3月16日(2022.3.16)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/7068(2006.01)

A 6 1 K 31/7068

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 9/127(2006.01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 9/12 (2006.01)

A 6 1 K 9/12

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 K 47/24

請求項の数 18 (全12頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-520647(P2019-520647)

(86)(22)出願日 平成29年10月16日(2017.10.16)

(65)公表番号 特表2019-530729(P2019-530729
A)

(43)公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(86)国際出願番号 PCT/IB2017/056400

(87)国際公開番号 WO2018/073720

(87)国際公開日 平成30年4月26日(2018.4.26)

審査請求日 令和2年9月17日(2020.9.17)

(31)優先権主張番号 102016000103956

(32)優先日 平成28年10月17日(2016.10.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
イタリア(IT)

(73)特許権者 512216931

オミクロン イターリア エス・アール・
エル・イタリア国 アイ - 0 0 1 9 7 ローマ
、ヴィアーレ ブルーノ プオッツィ 5

(74)代理人 110000855

特許業務法人浅村特許事務所

(72)発明者 ビルノ、クリスチアーノ

イタリア国、ローマ、ローマ、ピアレ

ブルーノ プオッツィ 5、オミクロン

イターリア エス・アール・エル・気付

(72)発明者 マリツィア、マルコ

イタリア国、ローマ、ピアレ デラルテ
8 5

審査官 鶴見 秀紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 緑内障の治療のための、リポソームによって担持されるシチコリンを含む眼科用処方

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リポソームを含む眼科用使用のための組成物であって、前記リポソームがシチコリン又はその塩を含むという点、前記組成物が緑内障の治療において眼の局所投与によって使用されるという点、及び前記組成物が塩化ベンザルコニウム（B A K）を含まないという点で特徴づけられる、前記組成物。

【請求項 2】

前記リポソームが、リン脂質の二重層及び水性コアを含むか又はそれらからなる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記リポソームが水素添加リン脂質から構成される、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

ヒアルロン酸及び / 又はステアリルアミンをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記シチコリンが、重量で 0 . 5 ~ 3 % の間の濃度を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

溶液、軟膏、懸濁物、点眼剤、ゲル、クリーム、泡、又はスプレーから選択される形態での、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

7 ~ 7 . 4 の間の pH 及び 2 8 0 ~ 3 0 0 m O s m l / k g の間のモル浸透圧濃度を備えた、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記リポソームが、2 5 n m ~ 1 μ m の間のサイズのサイズを有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

緑内障の治療における局所使用のための 1 つ又は複数の活性成分をさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

リポソームならびにヒアルロン酸及び / 又はステアリルアミンを含む眼科用使用のための組成物であって、前記リポソームがシチコリン又はその塩を含むという点、及び前記組成物が塩化ベンザルコニウム (B A K) を含まないという点で特徴づけられる、上記組成物。

【請求項 11】

前記リポソームが、リン脂質の二重層及び水性コアを含むか又はそれらからなる、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記リポソームが水素添加リン脂質からなる、請求項 10 又は 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記シチコリンが、重量で 0 . 5 ~ 3 % の間の濃度を有する、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

溶液、軟膏、懸濁物、点眼剤、ゲル、クリーム、泡、又はスプレーから選択される形態での、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

7 ~ 7 . 4 の間の pH 及び 2 8 0 ~ 3 0 0 m O s m l / k g の間のモル浸透圧濃度を備えた、請求項 10 ~ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記リポソームが、2 5 n m ~ 1 μ m の間のサイズのサイズを有する、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

緑内障の治療における局所使用のための 1 つ又は複数の活性成分をさらに含む、請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記活性成分が局所用抗高眼圧薬である、請求項 9 又は 17 に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、シチコリン又はその塩を含有するリポソームを含む眼科用処方ならびにその緑内障の治療における使用に関する。リポソームは、後眼部（硝子体腔）中でのシチコリンの担持ならびに網膜及び視神経頭への到着において非常に有効であるという結果が、見出された。

【背景技術】

【0002】

緑内障は、網膜神経節細胞の進行性喪失及び視神経頭における構造的な変化によって特徴づけられる慢性的な神経変性病理である。それは、世界中の失明の第 2 の主要原因を示し、したがって非常に心配な問題である。最も一般的な形態（原発性開放隅角緑内障）は、主要なリスクファクターとして眼内圧（IOP）の増加を有し、したがって第 1 の治療法のアプローチは眼圧を低下させる（hypotonizing）局所用薬物に代表されるものである。しかしながら、患者の 3 分の 1 以上では、良好な眼圧制御下であるにもかかわらず

10

20

30

40

50

わらず、視覚損傷進行は遅延するが停止しないので、他の非眼圧依存性機構が関与すると考えられる (Grieb P et al. J Neurosci Res 2002)。具体的には、高圧性質の一次傷害に後続して、ニューロンアポトーシスの引き金が引かれ、それはこの構造の毛細管区域のレベルでの正常な血液供給及び通常の軸索内輸送、代謝物質の順行性に加えて逆行性を妨害し、神経節細胞生存のために不可欠なニューロトロフィンが損なわれる。アポトーシスは、アポトーシス性細胞から遊離されたグルタメートによる NMDA 受容体の過剰刺激に起因する局所的な興奮毒性機構にリンクする二次傷害を説明できる。グルタメートは、細胞外空間中で過剰な濃度で存在する場合に、実際、周囲のニューロンの表面上の NMDA 受容体を過剰刺激し、それは Ca^{++} チャンネルの開口を引き起こす。細胞中での Ca^{++} イオンの過剰流入は、ニューロンそれ自体のアポトーシスを導き、一次傷害の非存在下においても自動補給が可能になる機構を構成する、生化学的なカスケードの引き金を表す。アポトーシスの過程での細胞損傷機構における別の鍵となるステップは、ホスホリパーゼ A2 (細胞膜を、その主要な構成物 (ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine) リン脂質) の異化作用を介して、不安定化及び分解できる酵素) の過剰活性化によって代表される (Burgoyne F C et al. Prog Retin Eye Res 2005; 24)。明らかに、眼圧低下は、二次傷害 (損傷進行について責任のある実際の死カスケードを表す) に対して不十分な効果を有する。

【0003】

神経保護分野において、緑内障患者に対しての実験的研究から臨床試験における作用機序及び科学的証拠のために、シチコリン (シチジン - 5' - ジホスホコリン) 分子に、特定の興味を持たれる。

【0004】

シチコリン (シチジン - 5' - ジホスホコリン) は、ホスファチジルコリン (ニューロン膜及びミトコンドリア膜の主要構成要素) の天然の前駆体である。経口服用すると、それは迅速に吸収され、1%未満が糞便中で排泄される。摂取の1時間後に血漿ピークに到達し、後続して、24時間後により大きなピークがある。それは腸壁及び肝臓中で代謝される。同じ分子の加水分解に由来するコリン (choline) 及びシチジン (citidine) は、全身循環によって吸収され、脳レベルでシチコリン (シチジン - 5' - ジホスホコリン) への再合成のために、別々に血液脳関門 (BBB) を横切る。排出は呼吸器経路及び尿中排泄経路でほとんど起こり、2つの血漿ピーク (すなわち第1の急速な排出、後続してより遅いもの) を反映する (Citicoline, monograph Altern Med Rev 2008)。

【0005】

脳レベルでのシチコリンは、ホスファチジルコリン形成のための基質、及びホスホリパーゼ A2 阻害剤として主に作用し、したがって、まだ生存可能なニューロンの膜損傷に対する直接的な作用を有する。さらに、この分子は主としてドーパミン作動性系のレベルで神経修飾作用を示し、このことはパーキンソン病に加えて緑内障の治療におけるシチコリン使用のために論理的根拠を提供する。ドーパミンは、網膜レベル及び網膜後のレベルの両方で視覚信号の伝達に関与する主要な神経伝達物質のうちの1つである。

【0006】

文献中の多数の研究から、コンピューター化視野測定によって視野 (Pecori Giral di et al 1989)、ならびにパターン網膜電図 (PERG) 及び視覚誘発電位 (PEV) の使用によって全体の視覚伝導路 (Parisi et al 1999、2005、2008、Rejadak et al 2003) の両方で、緑内障患者に対するシチコリンのポジティブな効果が実証される。

【0007】

特に、Parisi 及び共同研究者による研究から、眼圧を低下させる治療法のための緑内障患者に比べて、眼圧を低下させる治療法下の緑内障患者においてシチコリンの筋肉内投与 (1000 mg / 日) 及び経口的投与 (1600 mg / 日) の両方で同じ結果であるこ

10

20

30

40

50

と、ならびに視覚機能に対するポジティブな効果を維持するために治療を周期的に反復する必要があること（全体的な研究時間は8年間）が、確認される。

【0008】

2009年に、Chan et al. はラットの緑内障の実験モデルで磁気共鳴スペクトロスコピー（プロトン核磁気共鳴スペクトロスコピー¹H MRS）をインビボで使用した結果を公表し、緑内障は視覚野のレベルでもコリン（coline）代謝の改変によって特徴づけられ、ニューロン膜の構造的完全性の侵害を反映することを実証した。緑内障の治療のためのシチコリンの筋肉内投与は患者にとって明らかに非常に不快であり、研究によるポジティブな結果を観察するのに必要とされる長期間にわたる物質の使用を可能にしない。筋肉内投与は、自身でできないという不便さ、及び患者が人に利用可能な筋肉内注射を行ってもらおうという付随の必要性（とりわけ加齢した患者で満たすことが困難であろう必要性）の他に、長期治療後に感染合併症のリスクにさらされ得る。

10

【0009】

緑内障の治療のためのシチコリンの経口投与（筋肉内治療法に比べて一步前進したことを表わすが）は、胃又は腸の病変を有する被験者における使用が不可能であることに起因する難点に加えて、視神経頭のレベルに到達する活性成分が低濃度であること（神経構造の多くは肝臓における代謝に起因する緑内障病変によって損傷される）に左右される。

【0010】

Oshitari et al. (Neuroreport 2002) は、体外培養されたマウス網膜から採取された培養網膜神経節細胞（RGC）へのシチコリンの添加によって得られた、インビトロでの軸索再生効果を評価した。

20

【0011】

同じ発明者によって出願された特許EP 2 538 918は、緑内障の治療における局所使用のためのシチコリン、ヒアルロン酸及び塩化ベンザルコニウム（benzalkonium chloride）を含む眼科用処方を、好ましい実施形態として記載する。ヒアルロン酸は、解剖学的・機能的な眼表面/涙膜単位のレベルで滞留時間を増加させ、薬物/眼の接触時間を至る所で増加させることを可能にし；塩化ベンザルコニウム（BAK）は、角膜上皮バリアを一時的且つ可逆的に弱化させて薬物・経角膜通過をさらに支援する。角膜のギャップジャンクションの刺激は、シチコリンが硝子体腔中で通過し、硝子体液及びぶどう膜強膜流出路を介して、網膜神経節細胞及び視神経頭まで広がることを可能にする。次いで最終効果は治療標的に向けた活性成分の輸送を最大化することである。しかしながら、とりわけ決定されたタイプの患者（例えば重症の眼球乾燥のある患者）における角膜上皮のレベルでの時間内の慢性使用については、特に慢性的な病変（緑内障等）の事例において起こるような連続使用に後続して、BAKはわずかな細胞毒性を引き起こし得ると考えられる。

30

【発明の概要】

【0012】

インビボの実験モデルで本発明者によって遂行された研究は、リポソーム中に取り込まれたシチコリンを含む眼科用処方の眼表面上の投与が、後眼部（硝子体腔）における活性成分の通過ならびに網膜及び視神経頭への到着を確実にするのに理想的であることを意外にも実証した。本発明者は、リポソーム中に取り込まれたシチコリンの眼科用処方における使用が、BAK及び増粘剤（ヒアルロン酸等）の非存在下においてさえ高い効率で活性成分を担持することを可能にすることを見出した。次いで本発明は、標的に向けた活性成分を有効に担持するために処方中でBAKを使用する必要がないという利点がある。

40

【0013】

さらに、本発明者によって得られ、本明細書の実験セクション中に記載される実験結果は、意外にも以下のことを明らかにした。

- ・リポソームにより好適には担持されたシチコリンの溶液は、角膜バリアを横切ること、及び後眼部（硝子体腔）へ到着することに成功する。

- ・リポソーム中のシチコリンの処方、高濃度で硝子体液を透過することが可能である。

50

先行技術においては、浸透促進物質（ＢＡＫ等）と組み合わせて増粘剤（ヒアルロン酸等）の両方を使用することが必要であった。

・血流中で検出されたシチコリンの量は非常に低減され（及び、その濃度を決定することは非常に複雑であり）、したがってシチコリンの全身的な効果を除外することは可能である。

・リポソーム中のシチコリンの処方は特に時間内で安定的であるという結果であった。

【００１４】

本発明の利点、特色及び使用モードは、一例として与えられ、限定する目的のためではなく、以下のそのいくつかの実施形態の詳細な記載から明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１Ａ】シチコリンの基準サンプル及びリポソーム中に取り込まれたシチコリンの基準サンプルの分析によって得られたＨＰＬＣ溶出プロファイル。

【図１Ｂ】リポソーム中に取り込まれたシチコリンの基準サンプルの分析によって得られた吸収スペクトル。

【図２】図２のＨＰＬＣ溶出プロファイルは、シチコリンが局所的に処理された動物の眼からの硝子体液中でのみ高濃度で存在することを示すが、処理していない眼中の硝子体液は微量のシチコリンも示さない。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

本発明は、シチコリン又はその塩を含有するリポソームを含む眼科用処方ならびにその緑内障の治療における使用に関する。すべての異なる型の緑内障（例えば先天性緑内障、開放隅角緑内障、閉塞隅角緑内障、及び高眼圧を伴わない緑内障等）の治療において、本発明の組成物は使用され得る。本明細書において、リポソームという用語の下で、ナノメートルサイズのリン脂質小胞が意味され、好ましくはかかるリポソームはリン脂質二重層からなる。本明細書に記載の組成物中でシチコリンは好適に担持されるようにリポソームの内部に取り込まれる。一実施形態によれば、リポソームのサイズは、 $25\text{ nm} \sim 1\text{ }\mu\text{ m}$ の間、好ましくは $25\text{ nm} \sim 200\text{ nm}$ の間、より好ましくは $100 \sim 150\text{ nm}$ の間である。好ましい実施形態によれば、かかるリポソームは水素添加リン脂質のリン脂質二重層からなる。

【００１７】

かかる組成物は、もちろん眼科用組成物の調製のために好適な１つ又は複数の担体、希釈物質及び／又は賦形剤をさらに含み得る。眼に忍容されるすべての担体、希釈物質又は賦形剤は、眼科用組成物の調製のために好適である。組成物は、ヒアルロン酸及び／又はステアリルアミンをさらに含み得る。ヒアルロン酸（特に高分子量を有するもの）は、粘膜付着特性及び粘液模倣特性のために、解剖学的・機能的な眼表面／涙膜単位のレベルで滞留時間を増加させ、したがって薬物／眼の接触時間を増加させることを可能にする。ステアリルアミンは、溶液の眼付着をさらに改善でき、次いでそれはシチコリンのより高い吸収を支援できる分子である。

【００１８】

本発明によれば、組成物中で使用されるシチコリン（シチジン - 5' - ジホスホコリン）又はその塩（例えば一ナトリウム塩等）は、購入、又は公知の技術分野において記載されるプロトコル（例えばKyowa production protocol (Drug Master File citicoline Kyowa Haakko Kogyo Co., Ltd) 等）に従って、調製することができる。前記組成物中のシチコリンの濃度は、好ましくは $1\text{ }\mu\text{ g}$ 又は 1 ml の組成物あたり $5 \sim 30\text{ mg}$ の間に範囲中で含まれる。本発明によれば、シチコリンは、好ましくは約 $0.0035 \sim$ 約 1.5 mg ／日の間の単位用量あたりの濃度で使用される。「単位用量」の下で、用量は、その日の間ならびに毎日及び数日の間隔の両方で複数の投与へと分割されて、各々の時に患者へ投与されるものを意味する。本明細書において記載される組成物は、シチコリン以外に、緑内障の

10

20

30

40

50

治療における局所使用のための他の活性成分（例えば局所用抗高眼圧薬のような）を含み得る。局所使用のための前記組成物は、眼表面上で直接適用されることが当業者によって好適であると考えられる任意の形態（例えば溶液、軟膏、懸濁物、点眼剤、ゲル、クリーム、泡、スプレー、軟膏のような）であり得る。点眼剤は、塩（リン酸ナトリウム一塩基性一水和物、リン酸ナトリウム二塩基性十二水和物、塩化ナトリウム、又はその組み合わせ等）を含み、好ましくは、それは、生理的 pH（ $\text{pH } 7.0 \sim 7.4$ ）及び生理的モル浸透圧濃度（ $280 \sim 300 \text{ mOsm/kg}$ ）で、 0.9% の NaCl を備えた生理溶液であり得る。好ましい実施形態において、点眼剤は、 $0.5\% \sim 3\%$ （ $\% \text{ p/p}$ ）の間、好ましくは 2% のシチコリンを含む。本明細書は、有効量の本明細書において記載されるような組成物をそれを要求する患者へ投与することを含む、緑内障の治療のための方法までも提供する。治療方法において、組成物の投与のための正確な投薬量及び頻度は、当業者に周知であるように、治療される病態の特定の重症度、特定の患者の年齢、体重及び一般的な身体条件に依存するであろう。投与することができるいくつかの有効用量は以下で言及される。緑内障の治療のための 1 つ又は複数の化合物（例えば局所用抗高眼圧薬のような）と組み合わせて、約 $0.0035 \sim 1.5 \text{ mg/日}$ の間で随意に含まれる単位用量で、それらを投与することができ、その単位用量は、緑内障に対する治療法において一般に使用される単位用量に関して、約 100% 、約 90% 、約 80% 、約 70% 、約 60% 、約 50% 、約 40% 、約 30% 以下であり得る。

10

【0019】

本発明は、以下の、

20

- a) シチコリンと可溶化した脂質を混合するステップと；
- b) 蒸発によって混合物を濃縮するステップと；
- c) ステップ b) で濃縮混合物を水溶液へと再水和するステップと；
- c) ステップ b) の混合物を高圧で押出しするステップと、

を含む、本明細書において記載される眼科用組成物を調製する方法にも関する。方法は、 $0.2 \mu\text{m}$ の濾過を用いた滅菌の追加のステップを含み得る。

【0020】

本発明は、付与された保護範囲を限定せずに、純粋に例示的な目的を有する以下の実施例中で詳細に以後記載されるだろう。

【実施例】

30

【0021】

例 1 処方 A

水素添加リポソーム / 2.0% のシチコリン / 0.075% のヒアルロン酸

40

50

【表 1】

| %組成 | | |
|-------------------|-------|-----------------------------------|
| 原材料 | %p/p | |
| シチコリンーナトリウム塩 | 2.000 | 活性成分 |
| リン脂質90H | 2.000 | 水素添加リン脂質 酸化に対して非常に安定であり、 白色 |
| リン酸ナトリウム二塩基性十二水和物 | 0.685 | バッファー系 |
| リン酸ナトリウム一塩基性脱水物 | 0.225 | バッファー系 |
| 塩化ナトリウム | 0.246 | 等張性修飾物質 |
| ヒアルロン酸ナトリウム塩 | 0.075 | 粘膜付着性増粘剤 |
| 必要に応じて水 | 100 | |

10

| 処方特性 | | |
|-----------------------|---------|-------|
| | 合格限界 | 結果 |
| pH | 7-7.4 | 7.19 |
| モル浸透圧濃度 (mOsmol/kg) | 280-300 | 289 |
| 平均径 (μm) | < 0.2 | < 0.2 |
| 0.2ミクロンでの濾過によって滅菌する | 準拠している | |

20

【 0 0 2 2 】

例 2 処方 B

30

2.0%のステアリルアミン / シチコリン / 0.075%のヒアルロン酸を備えた水素添加リポソーム

40

50

【表 2】

| %組成 | | |
|-------------------|-------|-----------------------------------|
| 原材料 | %p/p | |
| シチコリンーナトリウム塩 | 2.000 | 活性成分 |
| リン脂質90H | 2.000 | 水素添加リン脂質 酸化に対して非常に安定であり、 白色 |
| ステアリルアミン | 0.005 | 正電荷修飾物質 |
| リン酸ナトリウム二塩基性十二水和物 | 0.685 | バッファー系 |
| リン酸ナトリウム一塩基性脱水物 | 0.225 | バッファー系 |
| 塩化ナトリウム | 0.246 | 等張性修飾物質 |
| ヒアルロン酸ナトリウム塩 | 0.075 | 粘膜付着性増粘剤 |
| 必要に応じて水 | 100 | |

10

| 処方特性 | | |
|---------------------|---------|-------|
| | 合格限界 | 結果 |
| pH | 7-7.4 | 7.19 |
| モル浸透圧濃度 (mOsmol/kg) | 280-300 | 289 |
| 平均径 (μm) | < 0.2 | < 0.2 |
| 0.2ミクロンでの濾過によって滅菌する | 準拠している | |

20

【0023】

30

例3 リポゾーム中に取り込まれたシチコリンを含む組成物の調製

ガラスフラスコ中で、脂質（リン脂質90H）及び粉碎活性成分（すなわちシチコリン）を、有機溶媒混合物により可溶化する。次いで、溶液をフィルムが形成されるまでrotavaporを用いて真空下で蒸発させ、それが一旦形成されたならば、真空下でさらに放置して最後の微量の溶媒を除去する。続いて、脂質のフィルムを好適な溶液（水、バッファーなど）により再水和する。次いで混合物に、沈降物無しの均一の外観が想定されるまで攪拌を行う。次いで多層小胞（MLV）の形成が得られる。水和させ好適に混合した後のリン脂質及び活性成分の混合物に高圧押出し（これはリポソームの形成及びそのサイズの減少を引き起こす）を行う。押出しサイクルの数はリポソームのサイズを修飾し、次いでリポソームは、0.2ミクロンでの濾過によって滅菌することによって、200nm以下のサイズに到達することができる。

40

【0024】

実験データ

実験群のために、12匹の動物を、結果の適切な統計的な管理（平均、標準偏差及び有意性）のために使用した。統計的評価に従って使用された動物の数は、そこから有意なデータを得ることが可能な最小数を表わす。この研究において、Wistar-Kyoto系統のオスマウスを、研究グループによって遂行された以前の実験に従って使用した。

【0025】

動物を、最適条件（温度、湿度、換気、衛生の条件）下で動物を維持するために好適な構造物中で飼育及び操作した。この研究において、眼科用使用のための溶液における処方

50

、2%のシチコリンナトリウム塩を含む200mmのリボソームによって構成されたものを利用した。特に、調製組成物は、以下のものである（g/100gの溶液で）。

シチコリンナトリウム塩 2.0

リン脂質 90H 2.0

リン酸ナトリウム二塩基性二水和物 0.685

リン酸ナトリウム一塩基性二水和物 0.225

塩化ナトリウム 0.246

【0026】

実験を、以下の通りに分けた12匹のオスマウス（各々のマウスの重量は約250g）で実行した。

a) 4匹のマウスをリボソームにより両眼を処理した（マウス1-2-3-4）；

b) 4匹のマウスをリボソームにより右眼のみ処理した（5-6-7-8）；

c) 4匹の対照マウス（マウス9-10-11-12）；

【0027】

処理は、リボソーム溶液1日2回の3日間の2gtによる滴下を提供する。第4日に、動物を殺した後に、眼を収集し、生理溶液中でリンスし、そして冷凍するだろう。

a. マウス1-2-3-4、PBS溶液中に両方の全眼。

b. マウス5-6-7-8、左眼（Le）（これもPBS中に浸す）から分離してPBS溶液中で右全眼（Re）を処理した。

c. マウス9-10-11-12、PBSの溶液中に両方の全眼。

【0028】

さらに、各々の動物で、心臓内血液サンプルを、EDTAを備えた試験管の使用によって、処理の前及び後（殺の直前）の両方で、全身麻酔後に採取した。かかるサンプルで、各々の動物について、血球数カウント及びシチコリン存在を決定した。

【0029】

100µLシリンジに接続された真空吸引系を備えた研究室において、硝子体液を採取し、50µLの0.6Mの過塩素酸の溶液により希釈して可能性のあるタンパク質の存在を除去し、150µLの最終体積にした。次いでサンプルを炭酸カリウムにより中和し、150µLのクロロホルムにより処理して可能性のある微量の脂質の物質を除去した。

【0030】

抽出及び後続する5で5分間13,000rpmでの遠心分離後に、上清を採取し、紫外吸収検出器ダイオードアレイ及びクロマトカラムC18（5µm粒子によるKromasil 250×4.6mm）を装備したHPLC系へと注入した。もちろん、すべてのサンプル（チェックでさえ）に、HPLCにおける分析の前に同じ種類の処理を行った。

【0031】

血液に関する限り、血球数測定を実行した後に、500µLの懸濁物を過塩素酸により脱タンパク質し、クロロホルムにより中和及び抽出し、5分間13,000rpmでの遠心分離後にHPLCで分析した。

【0032】

結果

マウスをリボソーム製剤による局所経路によって3日間処理した。参照基準を決定するために、処理前に2%のシチコリン懸濁物（重量/体積濃度）の特徴をHPLCによって決定した。結果を、HPLC溶出プロファイル（図1A）及び吸収スペクトル（図1B）の両方に関して図1中に示す。かかる要素に基づいて、シチコリンの量（硝子体液及び血液の両方中に存在する）を決定する。処理の終了時に、動物のどれも挙動異常又は皮膚もしくは眼についての全身的な病変を示さなかった。

【0033】

得られた結果は、以下のことを示した。

1) シチコリンは局所的に処理された眼からの硝子体液中のみに、0.065g（±0.01）%（局所的に適用された量の13%に対応する）の平均濃度（重量/体積）で、

10

20

30

40

50

存在するが、処理していない眼の硝子体液は微量のシチコリンを示さない（図2）。

2）血液中に存在するシチコリンの量は硝子体液中に存在するものよりもはるかに低く、その濃度（重量／体積）を決定することは難しく（約0.01g（±0.002）%をもたらず）、それは、いくつかの事例において、かかる量は系の検出感度未満であるからである。

【0034】

結論として、リポソーム製剤での点眼薬は、溶液で投与されて観察されたものに対して、硝子体液中でより高い程度で浸透することを可能にする（Parissi et al., 2015; Roberti et al., 2015）（約0.07g（±0.01）%の濃度（重量／体積）に到達）（それは眼のレベルで高濃度である）。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

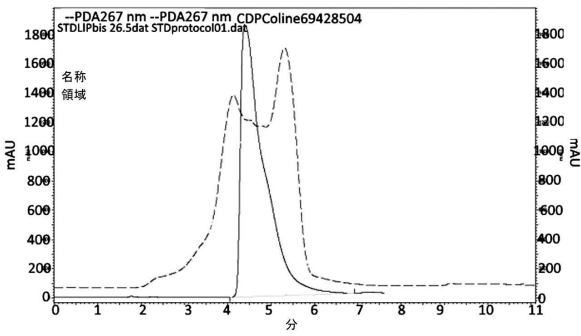


図 1A

【図 1 B】

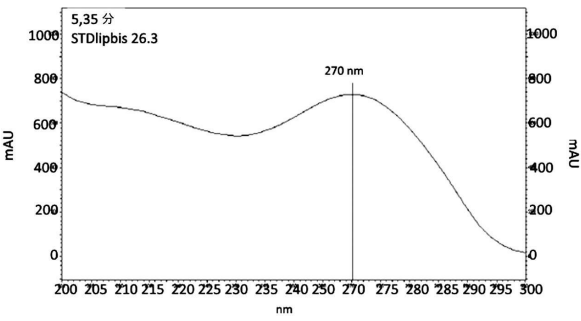


図 1B

10

【図 2】

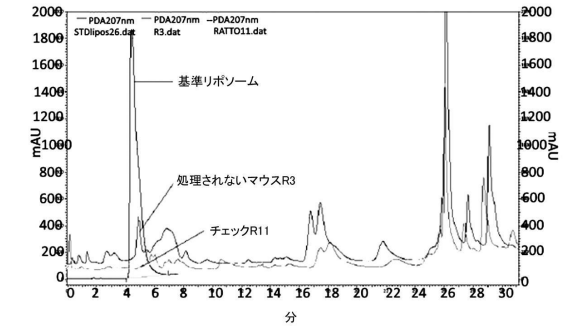


図 2

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

| | | | | |
|---------|-------|-----------|---------|-------|
| A 6 1 K | 47/36 | (2006.01) | A 6 1 K | 47/36 |
| A 6 1 K | 47/18 | (2006.01) | A 6 1 K | 47/18 |
| A 6 1 P | 27/06 | (2006.01) | A 6 1 P | 27/06 |

(56)参考文献

特表 2 0 1 3 - 5 2 0 4 0 6 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 1 6 6 0 6 (U S , A 1)
再公表特許第 2 0 0 2 / 0 3 4 2 5 2 (J P , A 1)
特表 2 0 1 2 - 5 1 7 4 2 1 (J P , A)
特表 2 0 1 3 - 5 3 2 1 5 9 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9
A 6 1 P 2 7 / 0 6
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)