

(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2013-544838

(P2013-544838A)

(43) 公表日 平成25年12月19日 (2013. 12. 19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/5517 (2006.01)	A 6 1 K 31/5517	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/5513 (2006.01)	A 6 1 K 31/5513	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 39/06 (2006.01)	A 6 1 P 39/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2013-542043 (P2013-542043)	(71) 出願人	390040637
(86) (22) 出願日	平成23年11月18日 (2011. 11. 18)		アレルギー インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成25年7月29日 (2013. 7. 29)		ALLERGAN, INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/061370		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
(87) 国際公開番号	W02012/074788		612 アーヴィン デュポント ドライ
(87) 国際公開日	平成24年6月7日 (2012. 6. 7)		ヴ 2525
(31) 優先権主張番号	61/419, 660	(74) 代理人	100092093
(32) 優先日	平成22年12月3日 (2010. 12. 3)		弁理士 辻居 幸一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

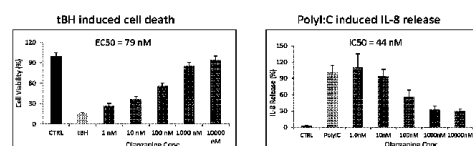
(54) 【発明の名称】 網膜の疾患を治療するための方法

(57) 【要約】

本明細書に開示されるのは、網膜の疾患の治療方法であって、オランザピン、あるその代謝産物、クロザピン、および n - デスメチルクロザピンから成る群から選択される、化合物のそのような治療の必要がある患者への投与を含む、方法である。

【選択図】 図 1

Figure 1

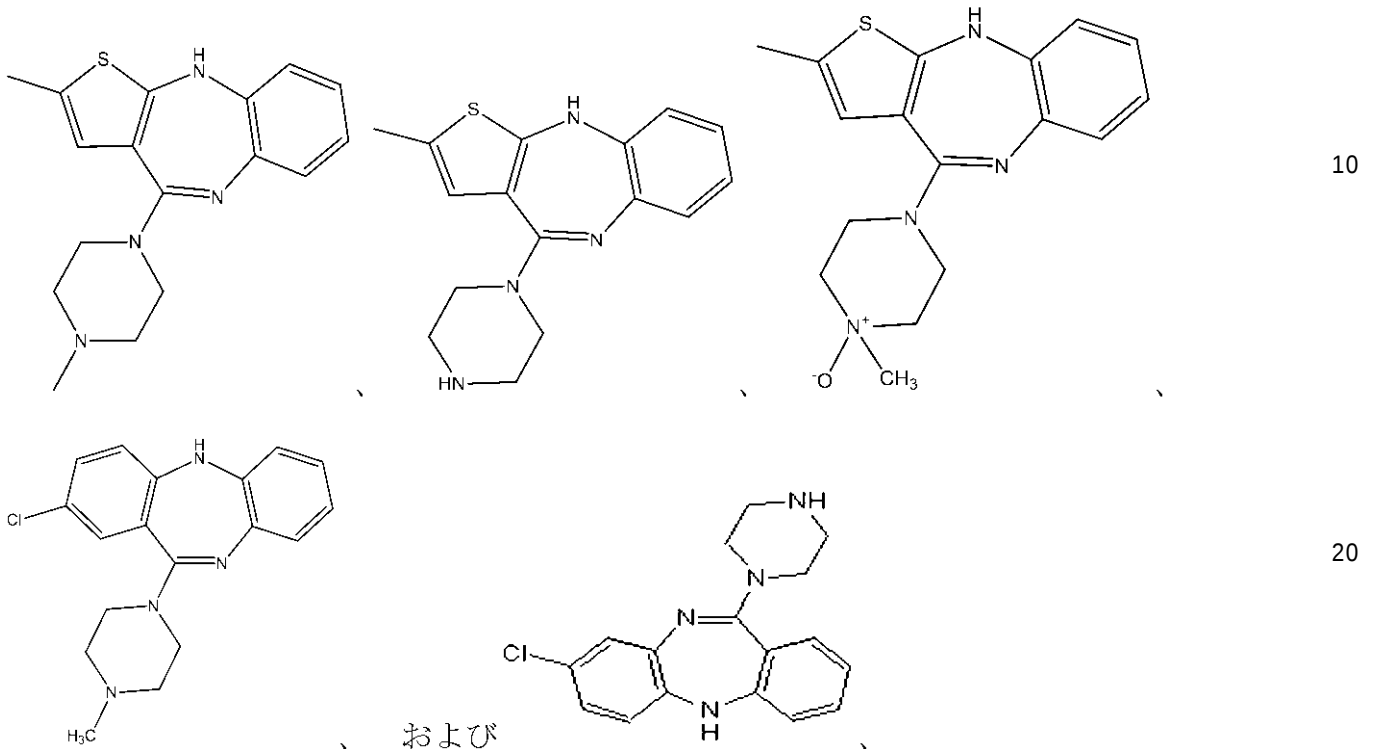


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酸化ストレスによって生じる、または悪化される、網膜障害を治療するための方法であって、

【化 1】



またはその薬学的に許容される塩

から成る群から選択される化合物を、それを必要とする患者に投与することを含む、方法

【請求項 2】

前記網膜障害は、湿潤および乾燥型加齢黄斑変性、網膜色素変性、スターガルト病錐体ジストロフィおよび網膜色素上皮のパターンジストロフィ、黄斑浮腫、網膜剥離、網膜の外傷、腫瘍と関連付けられた網膜腫瘍および網膜疾患、網膜色素上皮の先天性肥大、急性後部多発性斑状網膜色素上皮症、ならびに急性網膜色素上皮炎から成る群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記網膜障害は、湿潤および乾燥型加齢黄斑変性、網膜色素変性、スターガルト病錐体ジストロフィおよび網膜色素上皮のパターンジストロフィ、網膜色素上皮の先天性肥大、急性後部多発性斑状網膜色素上皮症、ならびに急性網膜色素上皮炎から成る群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記化合物は、経口投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記化合物は、眼内にそれを注入することによって投与される、請求項 1 に記載の方法

【請求項 6】

前記化合物は、眼に局所的に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

関連出願の相互参照

本願は、2010年12月3日出願の米国特許仮出願第61/419,660号の利益を請求し、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0002】

網膜の疾患を治療するための方法

本明細書に開示されるのは、網膜の疾患の治療方法であって、クロザピン、n-デスメチルクロザピン、オランザピン、オランザピンのある代謝産物、および後述の本明細書に記載されるような種々の他の化合物を、そのような治療の必要がある患者へ投与することによって、網膜に作用する方法である。

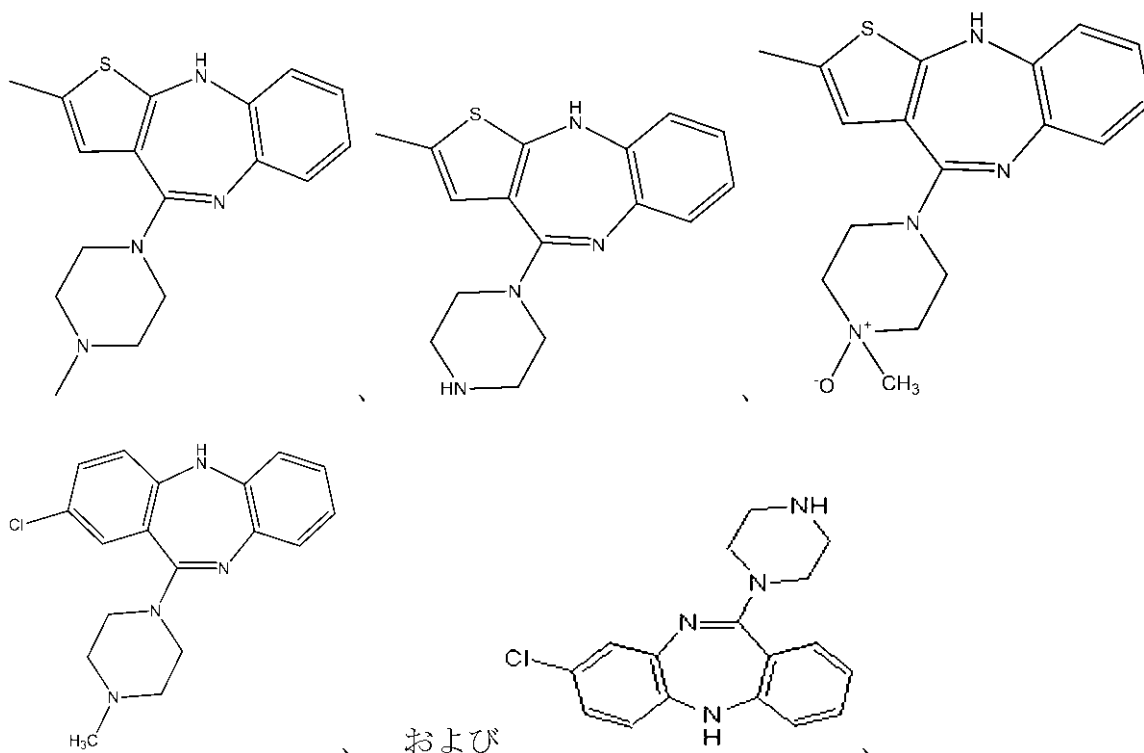
【発明の概要】

10

【0003】

本発明は、酸化ストレスによって生じる、または悪化される、網膜障害の治療方法であって、

【化1】



20

30

またはその薬学的に許容される塩

から成る群から選択される化合物を、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を開示する。

【0004】

別の実施形態では、治療が試みられる網膜障害は、湿潤および乾燥型加齢黄斑変性、網膜色素変性、スターガルト病錐体ジストロフィおよび網膜色素上皮のパターンジストロフィ、黄斑浮腫、網膜剥離、網膜の外傷、腫瘍と関連付けられた網膜腫瘍および網膜疾患、網膜色素上皮の先天性肥大、急性後部多発性斑状網膜色素上皮症、ならびに急性網膜色素上皮炎から成る群から選択される。

40

【0005】

別の実施形態では、網膜障害は湿潤および乾燥型加齢黄斑変性網膜色素変性、スターガルト病錐体ジストロフィおよび網膜色素上皮のパターンジストロフィ、網膜色素上皮の先天性肥大、急性後部多発性斑状網膜色素上皮症、ならびに急性網膜色素上皮炎から成る群から選択される。

【0006】

50

別の実施形態では、投与される化合物は、経口投与される。

【0007】

別の実施形態では、投与される化合物は、眼内にそれを注入することによって投与される。

【0008】

別の実施形態では、投与される化合物は、眼に局所的に投与される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】オランザピンが、用量応答性様式において、網膜色素上皮（RPE）細胞を酸化ストレス（tBH）誘発アポトーシス（A）から有意に保護し、RPE細胞（B）からのPoly I:C誘発IL-8分泌を阻害することを示す。エラーバーは、SEMである。

10

【図2】オランザピン、その代謝産物、およびクロザピンが、tBH誘発細胞死からRPEを保護することを示す。エラーバーは、SEMである。

【図3】オランザピンが、青色光に暴露されたラットの上側網膜の厚さを有意に保護することを示す。薬物治療は、青色光暴露の2日前に開始された。動物は、3日間、1日に1度、オランザピンIP注入を受け、最後の投薬は、青色光暴露の1時間前であった。ラットは、4時間、約6～7キロのルクス強度を伴う青色光に暴露される前、24時間、暗順応させた。青色光暴露の直後、通常の室内灯に戻す前（12時間点灯/12時間暗闇）、ラットは、さらに3日間、再び暗順応させた。光干渉断層撮影（OCT）は、青色光暴露後、7～10日において、青色光によって生じた網膜の厚さの変化を評価するために使用された。エラーバーは、SEMである。OSは、左目で、ODは、右目である。

20

【図4】オランザピンが、青色光に暴露されたラットの網膜のaおよびb波を有意に保護することを示す。薬物治療および暗順応は、図3に説明されたものと同様であった。網膜電図は、青色光暴露後、7～10日において、記録された。エラーバーは、SEMである。BLは、青色光である。

【図5】オランザピンが、青色光に暴露されたラットの外核層を有意に保護することを示す。薬物治療および暗順応は、図3に説明されたものと同様であった。H&E染色は、青色光暴露後、2～3週間、行われた。B-Lは、青色光である。ONHは、神経経頭である。

【図6】オランザピンが、青色光暴露によって生じる、網膜のロドプシンの損失を有意に保護することを示す。薬物治療および暗順応は、図3において説明されたものと同様であった。免疫組織化学研究は、青色光暴露後、2～3週間行われた。B-Lは、青色光である。ONHは、神経経頭である。

30

【図7】オランザピンが、有意にRPE65損失を保護し、かつ部分的に、GFAP発現増加を阻害することを示す。薬物治療および暗順応は、図3において説明されたものと同様であった。免疫組織化学研究は、青色光暴露後、2～3週間行われた。B-Lは、青色光である。ONHは、神経経頭である。

【図8】オランザピンの硝子体内注射が、青色光に暴露されたラットのERGの改変を有意に防ぐことを示す。硝子体内注射（IVT）のために、動物は、青色光暴露前、1時間オランザピンを受けた。水は、IVT注入の間、並行対照溶媒として使用された。ラットは、4時間、約6～7キロのルクス強度を伴う青色光に暴露される前、24時間、暗順応させた。青色光暴露の直後、通常の室内灯に戻す前（12時間点灯/12時間暗闇）、ラットは、さらに3日間、再び、暗順応させた。CTRLは、未投薬対照であって、Vehは、水であって、0.04、0.2、または1マイクログラムのオランザピン/眼である。左パネルは、各眼からのデータの散布図であって、右パネルは平均結果の棒図表である。網膜電図は、青色光暴露後、7～10日において、記録された。エラーバーは、SEMである。

40

【図9】オランザピンの局所的な眼の投薬が、青色光に暴露されたSDラットの網膜のaおよびb波信号を有意に保護することを示す。局所投与のために、薬物は、青色光暴露前、24時間（BID）および1時間（QI）与えられた。水は、局所投与の間、並行対照

50

溶媒として使用された。ラットは、4時間、約6～7キロのルクス強度を伴う青色光に暴露される前、24時間、暗順応させた。青色光暴露の直後、通常の室内灯に戻す前（12時間点灯／12時間暗闇）、ラットは、さらに3日間、再び暗順応させた。網膜電図は、青色光暴露後7～10日において、記録された。エラーバーは、SEMである。

【図10】オランザピンが、高酸素誘発網膜血管新生を有意に減衰させることを示す。同腹新生マウスおよびその雌親は、P7からP12において、75%の酸素チャンバ内に置かれた。チャンバは、5日間、十分な食物および水を含有し、かつ薬物投与を動物に許可するためのみ開放された。マウスは、P12において、通常の酸素含有量を伴う室内空気に戻された。水中のオランザピンまたはVEH（水）は、P10から開始し、P16まで継続的に、強制栄養によって1日1回投与された。網膜新生血管は、室内空気への動物の暴露5日後、P17において評価された。エラーバーは、SEMである。

【図11】オランザピンが、有意にレーザを阻害し、ラットの脈絡膜血管新生を誘発したことを示す。エラーバーは、SEMである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

網膜の病気

本発明の化合物は、網膜の疾患を治療するために使用されてもよい。出願人による「網膜の疾患」とは、酸化ストレスによって生じる、または悪化される、網膜またはそれを囲繞する組織の任意の病気を意味する。これらは、黄斑変性、糖尿病性網膜症、脈絡膜新生血管膜、黄斑浮腫（類嚢胞黄斑浮腫および黄斑の腫れとも称される）、網膜上膜（黄斑ひだ）、黄斑円孔、網膜色素変性、黄斑変性（スターガルト病若年性黄斑変性、ベスト卵黄状ジストロフィ、錐体ジストロフィ、および網膜色素上皮のパターンジストロフィ等）、網膜剥離、網膜の外傷、それらと関連付けられた網膜腫瘍および網膜疾患、網膜色素上皮の先天性肥大、急性後部多発性斑状網膜色素上皮症、ならびに急性網膜色素上皮炎を含む。

【0011】

加齢黄斑変性とも称される黄斑変性は、米国における50歳以上の人の失明の最も一般的な原因であり、その有病率は、年齢とともに増加する。AMDは、湿潤（新生血管）または乾燥（非新生血管）型のいずれかとして分類される。疾患の乾燥型が、最も一般的である。中心網膜が、歪曲、着色、または最も一般には、薄くなる時、網膜色素上皮の萎縮および黄斑光受容体の損失と関連付けられたプロセスを引き起こす。その結果は、中心地凹状萎縮である。疾患の湿潤型は、最も深刻な視力喪失に關与する。湿潤型は、通常、老化と関連付けられるが、AIDSを伴う個人において悪化され得る、ヒストプラズマ症等の深刻な近視およびいくつかの眼内感染症を含む、湿潤型黄斑変性を引き起こし得る、他の疾患とも関連付けられる。湿潤型は、網膜色素上皮を通して成長する異常血管を特徴とし、出血、滲出、瘢痕化、または網膜剥離をもたらす。

【0012】

糖尿病と関連付けられた網膜症は、1型糖尿病の失明の主要原因であって、かつ2型糖尿病でもよく見られる。網膜症の程度は、糖尿病の持続時間に依存し、概して、糖尿病の発病から10年以上後に生じ始める。糖尿病性網膜症は、（1）毛細血管透過性の増加、浮腫、出血、微細動脈瘤、および滲出液を特徴とする、非増殖性または背景糖尿病網膜症、または2）網膜から硝子体に延在する新血管形成、瘢痕化、線維組織形成、および網膜剥離の潜在性を特徴とする増殖性網膜症として、分類され得る。糖尿病性網膜症は、少なくとも部分的に、高血糖に起因する糖化タンパク質の発達によって生じると考えられている。糖化タンパク質は、遊離基を生成し、酸化組織損傷およびグルタチオン等の細胞の活性酸素種（ROS）スカベンジャーの消耗をもたらす。

【0013】

脈絡膜新生血管膜において、脈絡膜に起因する異常血管は、網膜の層を通して成長する。もろい新しい血管は、容易に壊れ、血液および流体を網膜の層内に鬱血させる。

【0014】

疾患、損傷、または手術の結果として生じ得る黄斑浮腫において、流体は、中心視のぼやけ、乱れを生じる、黄斑の層内に集まる。

【 0 0 1 5 】

網膜上膜は、黄斑にわたって形成するセロハン状の膜であり、ぼやけおよび乱れを生じさせることによって、中心視に影響を及ぼす。それが進むにつれて、黄斑上の薄膜の牽引は、腫れを引き起こし得る。疾患は、ほとんどの場合、75歳を超える人々において見られる。

【 0 0 1 6 】

網膜色素変性は、夜盲症および進行性の周辺視野の喪失を特徴とする網膜変性であって、最終的に、完全失明をもたらす。検眼鏡での変化は、暗いモザイク状のレチナール色素沈着、網膜血管の減衰、視神経乳頭の蠟様蒼白、および進行型の黄斑変性を含む。色素沈着の欠如があり得る、ある場合には、網膜色素変性は、硝子体の変性混濁および白内障と関連付けられることができる。

【 0 0 1 7 】

黄斑ジストロフィは、集合的に、多数の人々における深刻な視力喪失の原因である、疾患の異種群に適用される用語である。黄斑ジストロフィの共通する特性は、網膜の黄斑における光受容細胞の変性に起因する、中心視の進行性喪失である。黄斑ジストロフィの多くの形態において、疾患の末期は、法的盲をもたらす。20を超える黄斑ジストロフィの型が、公知である。これらのいくつかは、例えば、加齢黄斑変性、スターガルト病様優性黄斑変性、劣性スターガルト病、否定型卵黄状黄斑ジストロフィ（VMD1）、アッシャー症候群1B型、常染色体優性新生血管炎症性硝子体網膜症、家族性滲出性硝子体網膜症、およびベスト病黄斑ジストロフィ（遺伝性黄斑ジストロフィ、またはベスト病卵黄状黄斑ジストロフィ（VMD2）としても公知）である。

【 0 0 1 8 】

スターガルト病様優性黄斑ジストロフィ（染色体優性斑状皮膚萎縮とも呼ばれる）は、若年発症黄斑変性である。本疾患に苦しむ患者は、概して、幼児期、通常の視力を有するが、小児期の間、視力喪失が始まると、法的盲へと急速に進行する。臨床的に、鮮明な境界を伴う萎縮性黄斑病変の存在を特徴とし、多くの場合、黄色眼底斑点と関連付けられる。

【 0 0 1 9 】

ベスト病黄斑ジストロフィは、未知の生化学的要因の遺伝性常染色体優性黄斑ジストロフィである。疾患は、小児期から40歳に及び得る、発病の年齢を有する。臨床症状は、初期段階では、黄斑の下にある網膜色素上皮（RPE）内に黄色がかった有形リポフスチンの異常蓄積を含む。これは、RPEの特徴的「卵黄」外観および段階的な視力の喪失を引き起こす。加齢とともに、RPEは、リポフスチンの蓄積が、消散し、瘢痕化および新血管形成が生じるのに伴って、ますます破壊される。これらの変化は、さらなる視力喪失に付随して起こる。

【 0 0 2 0 】

スターガルト病様優性黄斑ジストロフィおよびベスト病黄斑ジストロフィに見られる病理学的特徴は、先進国における高齢患者の失明の主な原因である、加齢黄斑ジストロフィ（AMD）において見られる特徴と同様に様々である。

【 0 0 2 1 】

網膜剥離は、網膜の感覚層が、網膜色素上皮および脈絡膜のその下層の支持組織から分離される時、生じる。概して、網膜剥離は、自然発症的に生じ得る、または外傷に起因し得るかのいずれかである、網膜裂傷または硝子体牽引の存在によって引き起こされる。網膜剥離はまた、早産児の未熟児網膜症または糖尿病患者の糖尿病性網膜症等の病理に起因し得る。網膜剥離の症候は、無痛であって、片目の突発性の部分または完全視力喪失である。裂傷がある時、または、その下層構造から網膜の分離を生じさせる牽引がある時、液体硝子体は、開口部を通して、網膜下腔内へと通過し、さらなる網膜下腔内の滲出を誘発する。網膜は、徐々に、下層の網膜色素上皮から分離および剥離する。これは、外側網膜

10

20

30

40

50

から、脈絡膜からの酸素および栄養素のその通常供給を奪う。時間とともに、網膜剥離はまた、網膜の外側部分に位置付けられる光受容細胞の喪失に起因する、視力喪失をもたらす。

【 0 0 2 2 】

出願人による「治療」とは、医学的に処置することを意味する。本用語は、黄斑変性に付随する、視力の低下等の網膜疾患の症状を軽減するため、ならびにその病気に付随する異常血管増大等の疾患と関連付けられた、生理学的変化に対処するために、本発明の化合物を投与することを含む。

【 0 0 2 3 】

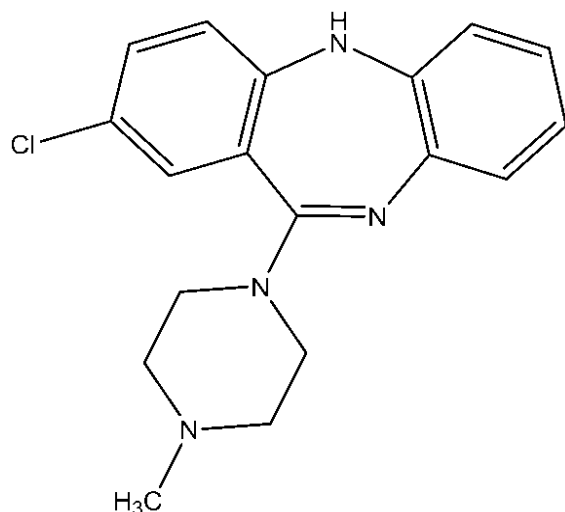
本発明の化合物

本発明の方法は、クロザピン、オランザピン、またはオランザピンのある代謝産物を治療の必要がある患者へ投与することによって、網膜の疾患を治療する。本化合物は、よく知られている。

【 0 0 2 4 】

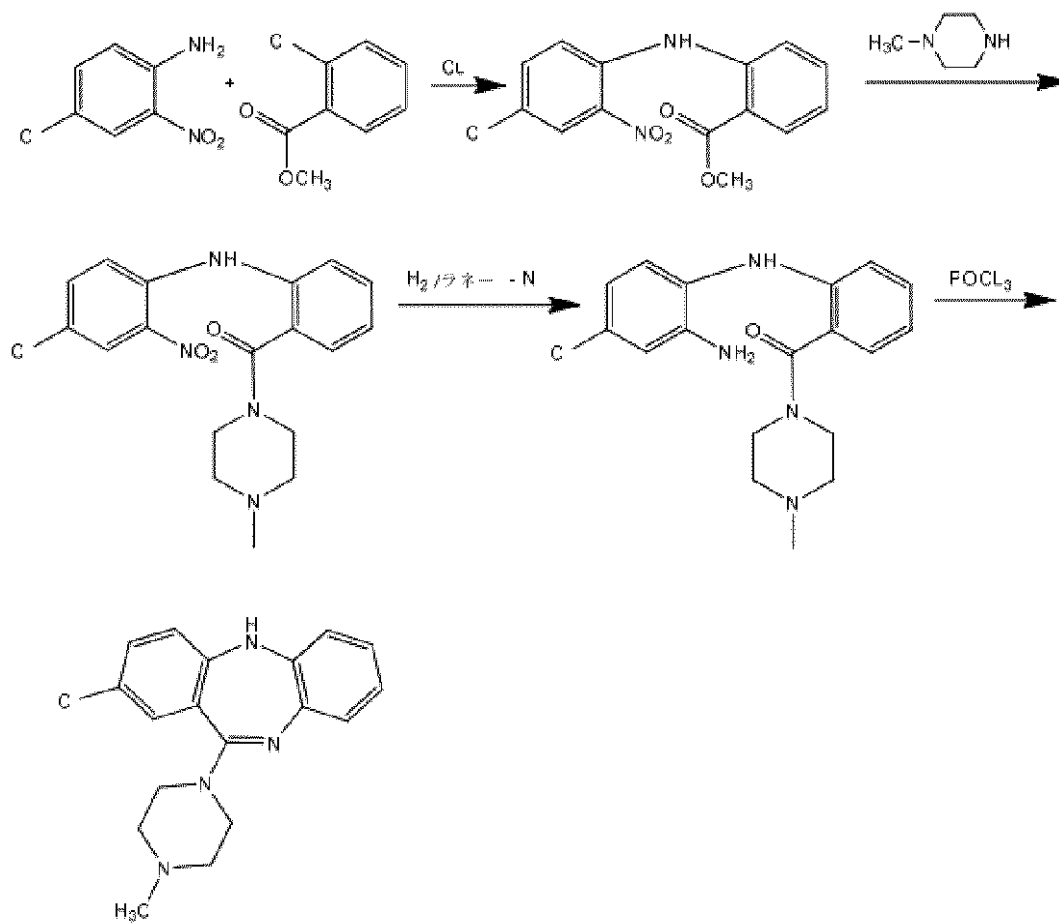
クロザピンは、抗精神病薬として、1970年から処方されてきた。以下の構造を有する。

【化 2】



その化学名は、2 - クロロ - 11 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イル) - 5 H - ジベンゾ [b , e] [1 , 4] ジアゼピンである。これは、種々の方法で合成されてもよい。ある方法は、以下の通りである。

【化 3】



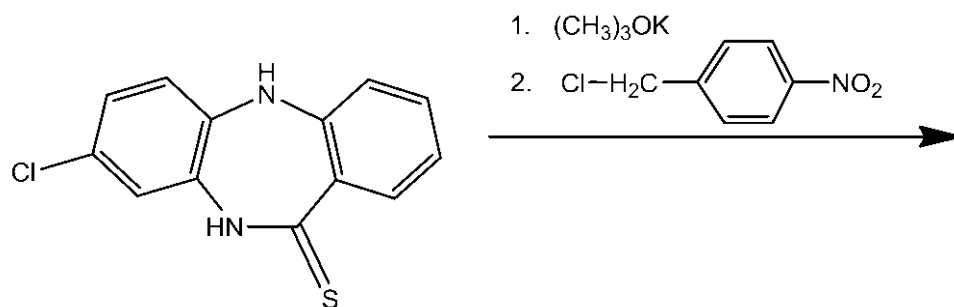
10

20

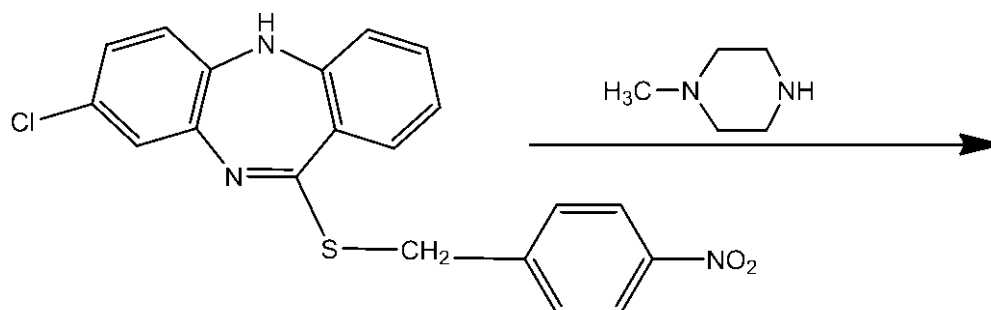
別の方法は、以下の通りである。

30

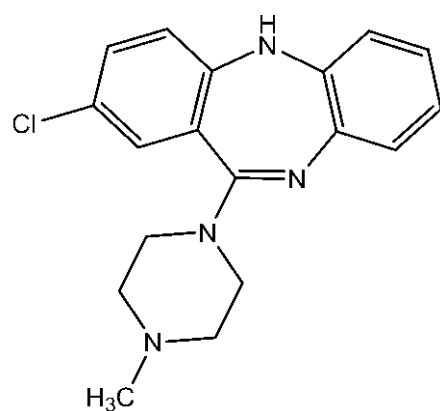
【化 4】



10



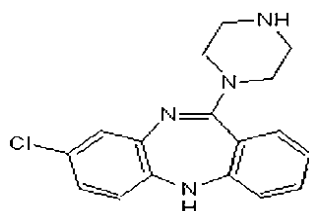
20



30

以下の構造を有する、N - デスメチルクロザピンは、

【化 5】



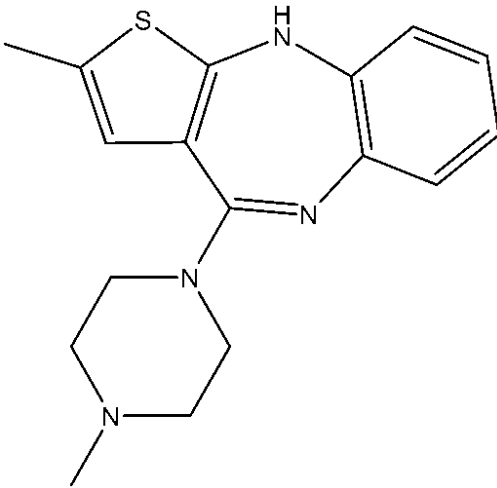
40

Tocris から得られることができる。

【0025】

オランザピンは、別のよく知られている抗精神病薬である。以下の構造を有する。

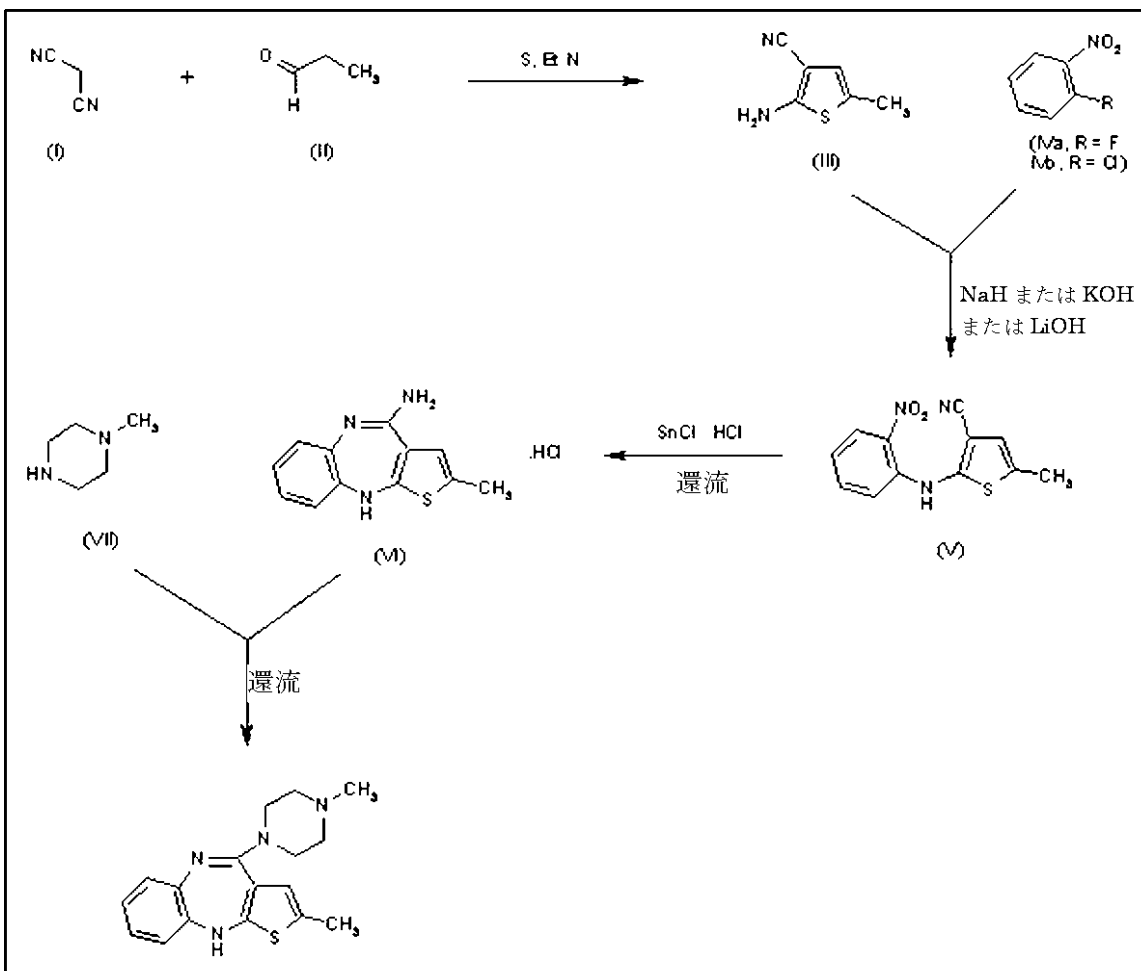
【化 6】



10

その化学名は、2 - メチル - 4 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イル) - 10 H - ベンゾ [b] チエノ [2 , 3 - e] [1 , 4] ジアゼピンである。E l l i L i l l y a n d C o m p a n y は、本薬物を Z y p r e x a という商標名で販売している。オランザピンの製造のある方法は、次の通りである。これは、米国特許第 5 , 6 3 1 , 2 5 0 号において開示されており、その内容は、参照することによって本明細書に組み込まれる。

【化 7】



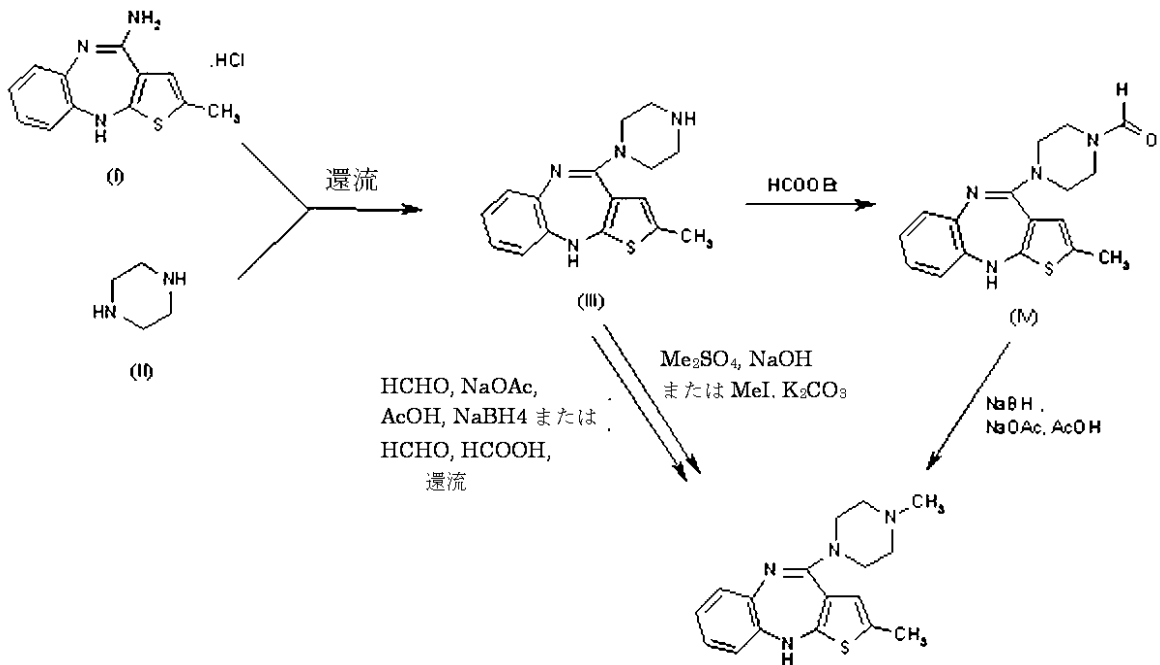
20

30

40

別の方法は、次の通りである。それは、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 3 5 8 8 7 号において開示されており、その内容は、参照することによって本明細書に組み込まれる。

【化 8】



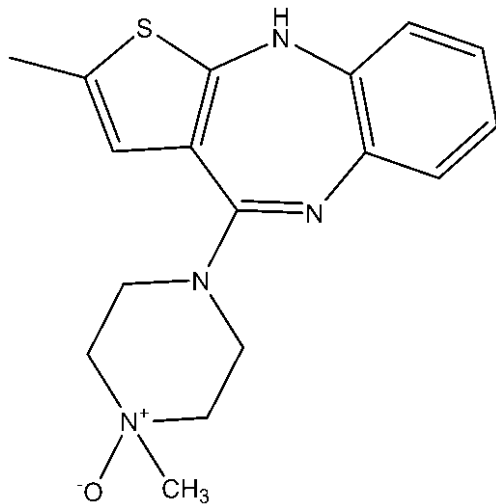
10

【 0 0 2 6 】

20

オランザピンは、以下の化合物に代謝され、その両方はまた、本発明の方法において使用されてもよい。

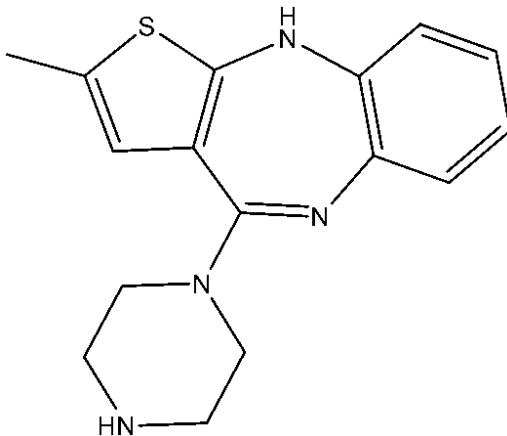
【化 9】



30

代謝産物 A

【化 1 0】



10

代謝産物 B

【0027】

オランザピン - N - 酸化物（代謝産物 A）、および N - デメチルオランザピン（代謝産物 B）は、Toronto Research Chemical から得られることができる。

【0028】

一実施形態では、薬学的に許容される塩として、本発明の化合物を投与する。薬学的に許容される塩は、動物またはヒトへの投与に好適である、親化合物の任意の塩である。薬学的に許容される塩はまた、酸、別の塩、あるいは酸または塩に変換されるプロドラッグの投与の結果として、生体内で形成される任意の塩を指す。塩は、1つ以上の対応する対イオンと関連付けられた、共役酸または塩基等の化合物の1つ以上のイオン型を備える。塩は、1つ以上の脱プロトン化酸性基（例えば、カルボン酸）、1つ以上のプロトン化塩基性基（例えば、アミン）、あるいは両方（例えば、両性イオン）から形成または組み込むことができる。

20

【0029】

酸性官能基の薬学的に許容される塩は、有機または無機塩基から誘導されてもよい。塩は、一価または多価イオンを備えてもよい。特に興味深いのは、無機イオン、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、およびマグネシウムである。有機塩は、アミン、特に、モノアルキル、ジアルキル、およびトリアルキルアミン、またはエタノールアミン等のアンモニウム塩で構成されてもよい。好適な塩の考察は、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH、2002)を参照されたい。

30

【0030】

製剤および投与

本発明の化合物は、経口、経皮（例えば、パッチの使用を通して）、経鼻、舌下、直腸、または非経口経路のいずれかを介して投与されてもよい。ある好ましい実施形態では、化合物は、眼内への注入によって送達される。

40

【0031】

一実施形態では、化合物は、1日あたり約0.25mgから約1500mgに及ぶ用量で投与され、別の実施形態では、化合物は、単回または分割量において、1日あたり0.25から約300mgの用量で投与され、別の実施形態では、化合物は、1日に体重のkgあたり0.01mgから約10mgの用量で投与されるが、必然的に治療される対象者の体重および健康状態および選択される特定の投与経路、ならびに治療に対する個人の反応、選択される製剤、および患者が治療される時間の長さに応じて、変形例が生じるであろう。いくつかの事例では、1日あたり0.25mg未満の用量が、適度であり得る一方、他の場合では、依然として、より大量の用量が、いかなる有害な副作用も生じさせるこ

50

となく、採用され得るが、そのようなより大量の用量は、最初に、1日を通して投与されるために、いくつかの少量の用量に分割されることを前提とする。

【0032】

活性化合物は、以前に示されたいくつかの経路のいずれかによって、単独で、あるいは薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせて投与されることができる。より具体的には、活性化合物は、多種の異なる剤形で投与されることができ、例えば、それらは、錠剤、カプセル、溶液、懸濁液、および同等物の形式の種々の薬学的に許容される不活性担体と組み合わせられてもよい。そのような担体は、固体希釈剤または充填剤、滅菌水性媒体、および種々の非毒性有機溶剤を含む。加えて、経口医薬品は、好適に加糖および/または風味付けされることができる。一般に、活性化合物は、体重あたり約5.0%から約70%に及ぶ濃度レベルでそのような剤形において存在する。

10

【0033】

本発明の一実施形態では、クロザピンは、眼に局所的に、または眼内に注入することによって、送達されてもよい。本目的の好適な製剤は、液体、懸濁液、乳剤、および同等物を含む。眼の薬物製品の局所用製剤は、当技術分野においてよく知られており、例えば、米国特許出願公開第20050059583号、第20050277584号、第20070015690号、および第20070015691号、ならびに米国特許第5,474,979号および第6,582,718号において説明されており、その全ての開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0034】

一実施形態では、クロザピン製剤は、点眼薬として投与され、典型的投与では、製剤の25から50 μ lが、眼に投与される。そのような製剤は、1日1回、2回、3回、4回、またはそれ以上、投与されてもよい。

【実施例】

【0035】

本発明は、以下の実施例によって例証される。

【0036】

ATCCからのARPE-19細胞を、10%ウシ胎児血清(FBS)を補充したDMEM/F12培地中に増殖させ、96ウェルプレート中に、1ウェル当たり10,000細胞の密度で分割した。細胞を、0.1%FBS培地中で一晚培養した後、化合物/薬物の添加を行った。目的の化合物の原液を、異なる濃度で作製し、0.1%FBS培地中のARPE-19細胞に1時間添加した。

30

【0037】

細胞生存率アッセイ：化合物/薬物前処理の1時間後、細胞は、3時間、0.3mMのtert-ブチルヒドロペルオキシド(tBH)での培養に続き、3回洗浄され、一晚新たな薬物および媒体(0.1%FBS媒体)と置換された。細胞生存率は、細胞増殖分析キット(Millipore、2210)によって判定された。エラーバーは、SEMである。nは、3である。その結果は、図1、2、および12において示される。

【0038】

IL-8アッセイ：薬物前処理の1時間後、細胞は、24時間、1 μ g/mlのpoly I:Cで培養された。細胞培養上清は、IL-8 ELISA Kit(R&D Systems、D8000C)でIL-8生産を測定するために使用された。エラーバーは、SEMである。nは、3である。その結果は、図1において示される。

40

【0039】

青色光研究：4から5月齢のSprague-Dawley(SD)雄ラットが、以下の研究において使用された。薬物治療は、青色光暴露前の2日前に開始された。動物は、3日間、1日に1度、オランザピンIP注入を受け、最後の投薬は、青色光暴露の1時間前であった。

硝子体内注射(IVT)のために、動物は、青色光暴露の1時間前にオランザピン(以下で示される構造を有する)を受けた。局所投与のために、薬物は、24時間(BID)

50

および青色光暴露の1時間前(QI)に与えられた。水は、並行対照溶媒IP/IVT注入または局所投与のために使用された。ラットは、4時間、約6~7kのルクス強度を伴う青色光に暴露される前、24時間、暗順応させた。青色光暴露の直後、通常の室内灯に戻す前、ラットは、さらに3日間、再び暗順応させた(12時間点灯/12時間暗闇)。光干渉断層撮影(OCCT)が、青色光暴露後、7~10日において、青色光によって生じた網膜の厚さの変化を評価するために使用された。エラーバーは、SEMである(図3)。

【0040】

網膜電図写真(ERG)アッセイ: 両眼性フラッシュ網膜電図が、Espion E² 網膜電図写真システムを使用して、SDラットにおいて記録された。ERG当日、動物は、少なくとも30分間、暗順応させた。その眼は、トロピカミドHCL(1%)およびAk-dilate(10%)で拡張された。ERG記録に先立って、動物は、40mg/ml ケタミンHCLおよび12mg/ml キシラジンHCLの筋肉注射で麻酔され、かつ加熱された台の上に置かれた。接地用ニードルが、腕の下の皮膚に置かれ、基準ニードルが、頭の上の皮膚に置かれた。網膜は、0.1Hzで平均10回のトレースの間、1cd・s/m²フラッシュを使用して刺激された。記録フィルタは、300Hzに設定された。ERG反応は、Espion E²およびMicrosoftのエクセルプログラムを使用して分析された。b波の振幅は、a波のトラフからb波のピークまで測定され、a波は、開始時の記録と負のふれのトラフとの間の振幅の差異として測定された。エラーバーは、SEMである。(図4、8、および9)

【0041】

ラット眼組織処理およびH&E染色: 青色光暴露2~3週間後のSprague-Dawley雄ラットは、CO₂で安楽死され、眼窩が、摘出された。眼は、Davidsong固定剤中において一晚室温で固定され、24時間、70%のエタノールに移入された。さらなる組織処理が、80%、95%、および100%のアルコールならびにPropar中における連続脱水に続き、パラフィンに包埋された。ラットの眼全体は、ミクローム(RM2255; Leica Microsystem)を使用して、鼻から側頭側に垂直経線で横方向に切断された。指標として神経経頭を使用して、5ミクロン/切片を伴う合計45の連続切片が、15個のスライドガラス上に収集された。スライド#1、5、10、および15は、脱パラフィン(diparaffinized)され、連続して、実験群間の光受容体/RPE病変を比較するための標準的プロトコルのように、ヘマトキシリン(核)およびエオシン(細胞質)を使用して着色された。スライドの残りは、標準的免疫組織化学技法による特異抗体を使用して、ロドプシン、RPE65、およびGFAPの発現を判定するために使用された。その結果は、図5~7において示される。

【0042】

酸素誘発網膜症: 酸素誘発網膜症(OIR)/酸素過剰症が、Smith et alによって報告されたプロトコルを使用して、C57B6マウスにおいて誘発された。(Smith LE、Wesolowski E、McLellan A、et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35(1):101-111)。同腹新生マウスおよびその雌親は、P7からP12において、75%の酸素チャンバに置かれた。チャンバは、5日間、十分な食料および水を含み、かつ薬物投与を動物に許可するためのみ開放された。マウスは、P12において、通常の酸素含有量を伴う室内空気に戻された。水中のオランザピンまたはVEH(水)は、P10から開始し、P16まで継続的に、強制栄養によって1日1回投与された。網膜新生血管は、室内空気への動物の暴露5日後、P17において評価された。

【0043】

網膜の血管造影および定量化: 網膜新生血管は、以前説明されたように、OIRに曝されたマウスにおける血管造影によって評価された(Smith LE、Wesolowski E、McLellan A、et al. Oxygen-induced re

tinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994; 35 (1): 101 - 111)。P17において、マウスは、深く麻酔がかけられ、次いで、50mgの高分子量(2000kDa)フルオレsein-デキストラン(Sigma, St. Louis, MO)を含有する1mLのPBSによって、左心室を通して灌流させた。眼が、摘出され、24時間、4%のバラホルムアルデヒド中で固定された。水晶体の除去後、網膜が、解剖され、グリセロール-ゼラチンで全組織標本化された。網膜新生血管の定量化は、以前説明されたように行われた(Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LE. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. J Clin Invest. 2008; 118 (2): 526 - 533)。落射蛍光顕微鏡(Olympus, Center Valley, PA)上において、4倍率で撮られた網膜の全組織標本の画像が、Adobe Photoshop 7.0ソフトウェア(Adobe Systems, Mountain View, CA)に取り込まれ、網膜全体の画像を作成するために統合された。新血管形成は、以前説明されたように、定量化された(Bai Y, Ma JX, Guo J, et al. Muller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. J Pathol. 2009; 219 (4): 446 - 454)。Photoshopのフリーハンドツールは、新生血管の房状分岐形成の面積の輪郭を描くために使用され、新血管形成の面積(ピクセル単位)が、網膜全体の面積(ピクセル単位)の割合として表現された。バイアスを回避するために、新血管形成の定量化は、動物治療に対して盲検化された観察者によって行われた。その結果は、図10において示される。

【0044】

脈絡膜血管新生(CNV)アッセイ：それぞれ250～300グラムの重さのあるBrown Norwayラット(Charles Rivers)が、研究に使用された。薬物治療は、レーザ治療より2日前に開始された。オランザピンは、3日(2、1、および0日)間、1日に1度、i.p.(1mg/kg)で与えられた。0日目の最後の用量は、レーザ治療の約1時間前に、送達された。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)は、並行対照溶媒IP注入のために使用された。レーザ手技の0日目において、ラットの眼(瞳孔)は、トロピカミドHCl(1%)およびAk-dilate(10%)で拡張された。ラットは、次いで、40mg/mlのケタミンHClおよび12mg/mlのキシラジンHClの筋肉(intramuscular)注射で麻酔された。眼底は、光学結合剤としてRefresh Liquigel点眼薬を伴う顕微鏡スライドカバースリップを使用して、可視化された。各動物に対して、各眼に6つのレーザスポット(360mW電力、持続時間0.07秒、50μmスポットサイズ)が、網膜血管2本毎の間に、視神経乳頭の周囲にほぼ等距離で同心円状にアルゴンレーザ(Coherent Inc.; Santa Clara, Ca.)で構成された。薬物(オランザピン)またはPBSの単一5μl体積が、レーザ光凝固手技後、1、4、および6日において硝子体空洞内に注入された。レーザ治療後11日目において、動物は、CO₂暴露によって犠牲にされ、CNV形成が、以前説明されたように、アッセイされた。すぐに、眼が、摘出され、1時間、10%のホルマリン溶液中で固定された。眼は、5分×2回、PBS中で漱がれた、または一晚PBS中に保持された。眼は、完全に、清浄され、眼杯および取着した網膜を定位置に残したまま、ペトリ皿内で半分に切断した。眼杯網膜は、PBS中で洗浄され、網膜は、脈絡膜から分離および除去された。眼杯脈絡膜(cup-choriod)は、PBS/0.5%トリトンX100中イソレクチンIB₄コンジュゲート(10ug/ml)において一晚培養された。眼杯/脈絡膜は、20分×3回、PBS中で洗浄され、4箇所において切断され、水性土台媒体を使用して、平坦に搭載された。蛍光の面積は、Metamorph画像分析ソフトウェア(RPI, Natick, MA)を使用して定量化された。その結果は、図11において示される。

【 0 0 4 5 】

結果は、本発明の化合物が、R P E を酸化ストレスおよびそのようなストレスを生じさせる疾患から保護すること（以下に要約されるように）を証明する。

化合物	10UMにおける保護（％）
オランザピン	116
代謝産物A	103
代謝産物B	129
クロザピン	99
n-デスメチル（desmethly）クロザピン	77

10

【 0 0 4 6 】

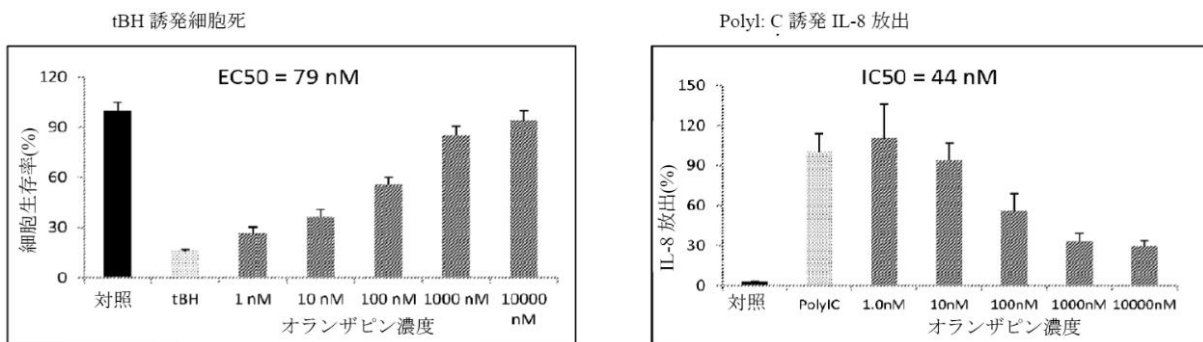
本明細書に開示されるあらゆる参照は、非特許（例えば、科学論文、雑誌参考文献）または特許（認定された特許または公開された特許出願）にかかわらず、参照することによって、全目的のために全体として本明細書に組み込まれる。

【 0 0 4 7 】

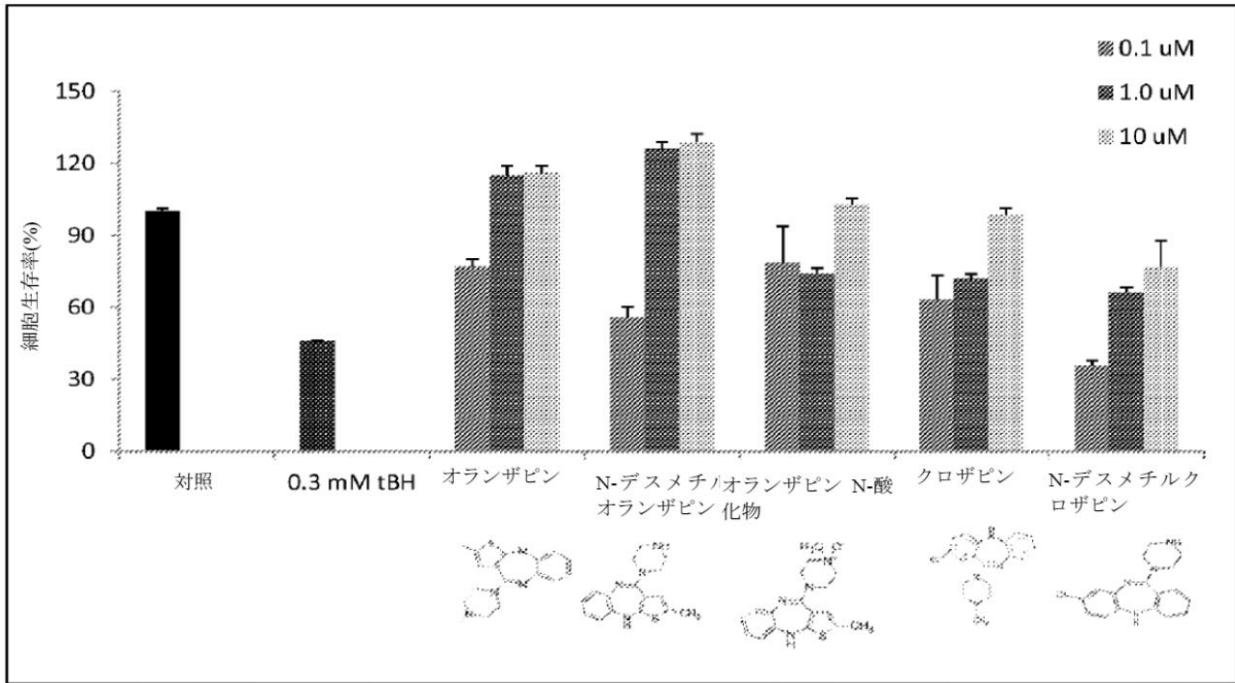
前述の説明は、本発明を実施するために採用されることができる、具体的方法および組成物を詳述し、想定される（c o m t e m p l a t e d）最良の形態を表す。これに関して全体的範囲を制限するものとして解釈されるべきではなく、むしろ本発明の範囲は、添付の請求項の合法の構造物によってのみ準拠される。

20

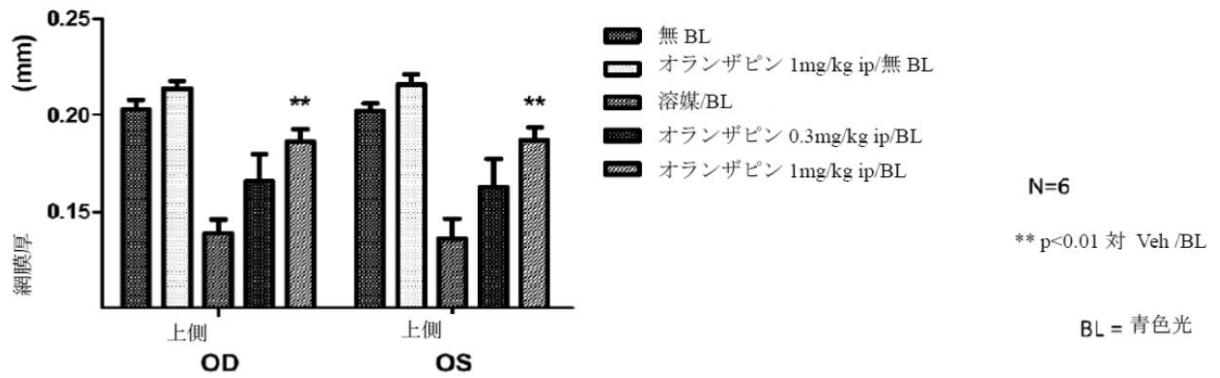
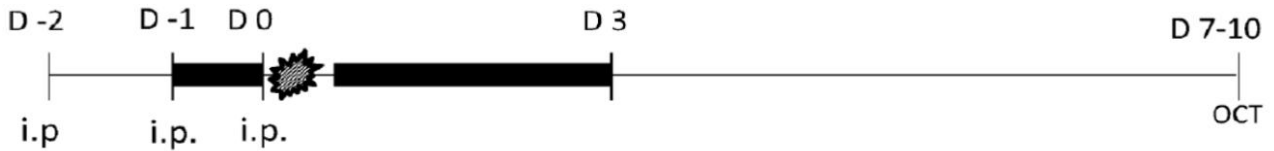
【 図 1 】



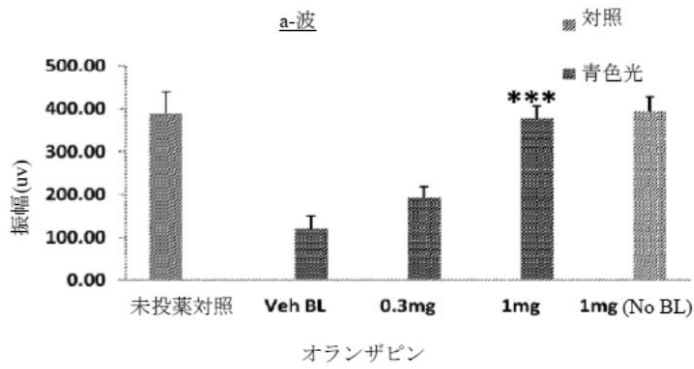
【図 2】



【図 3】

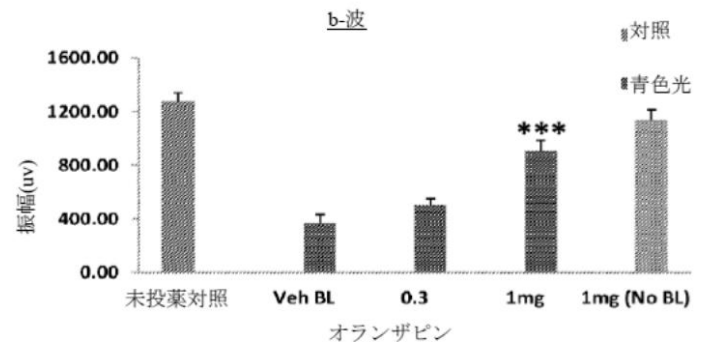


【 図 4 】

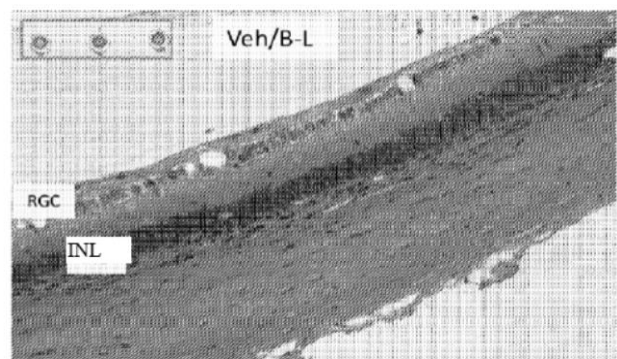
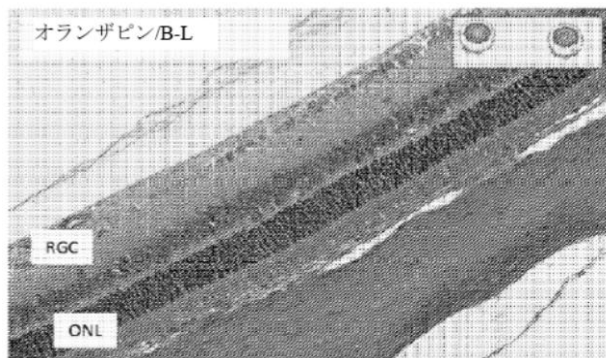
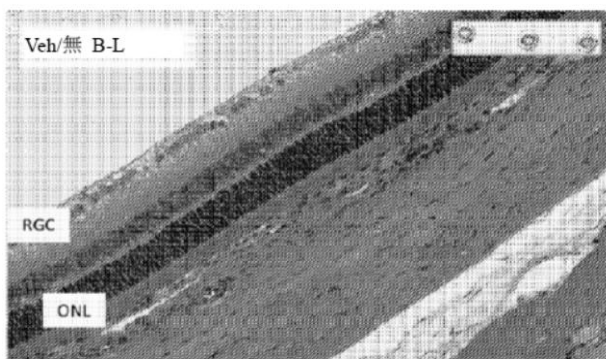


n = 4-6

*** p<0.01 対 Veh /BL



【 図 5 】

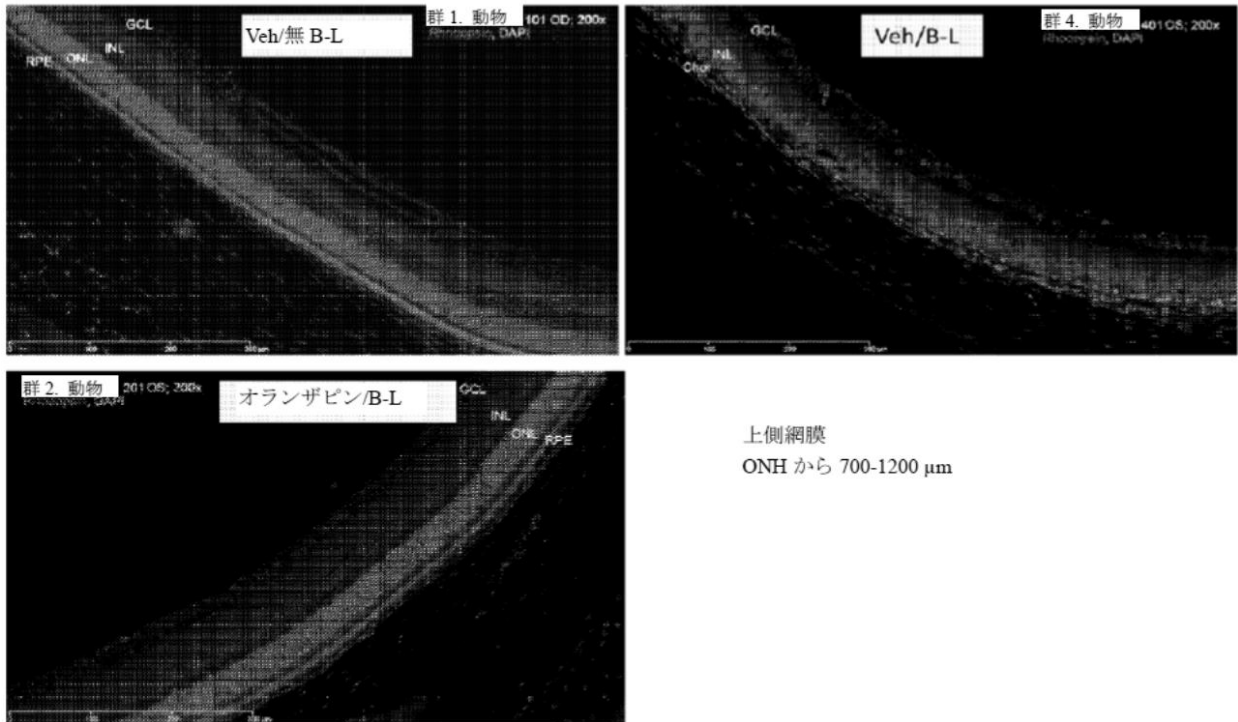


上側網膜; ONH 約 250-300μm

画像; ONH から約 1.5 -2 mm

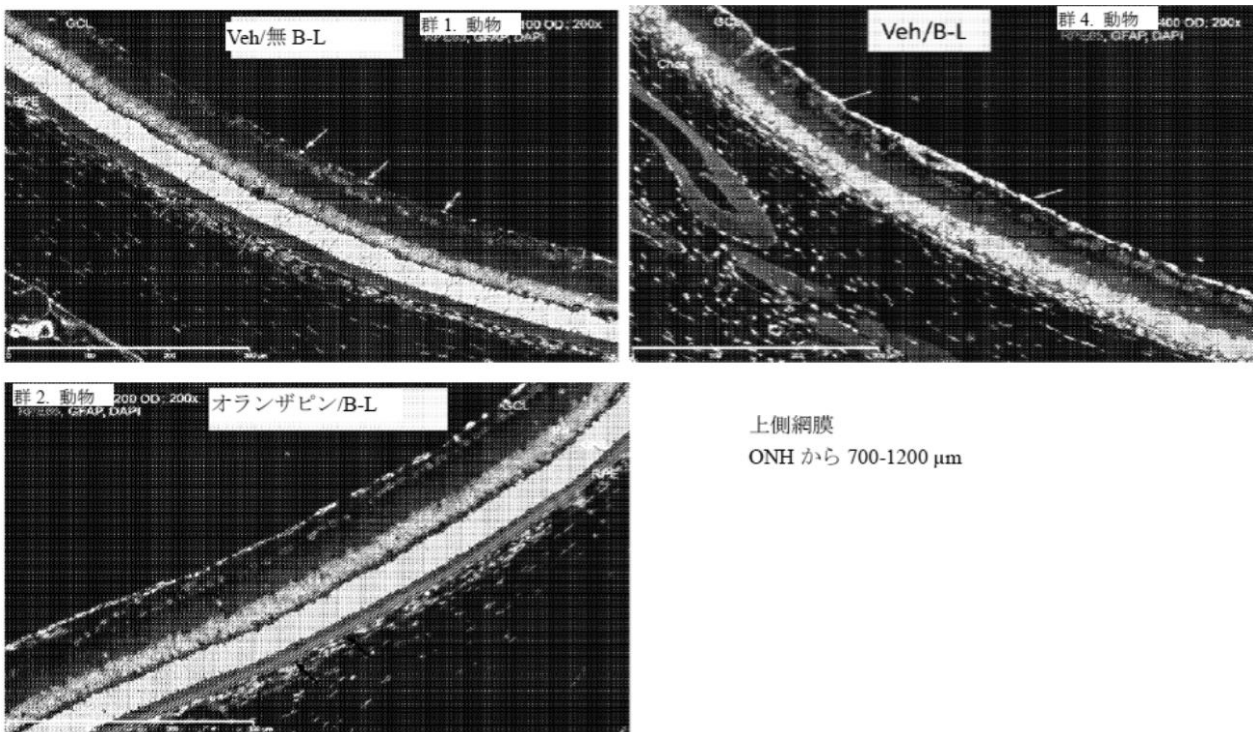
倍率 20 倍

【図 6】



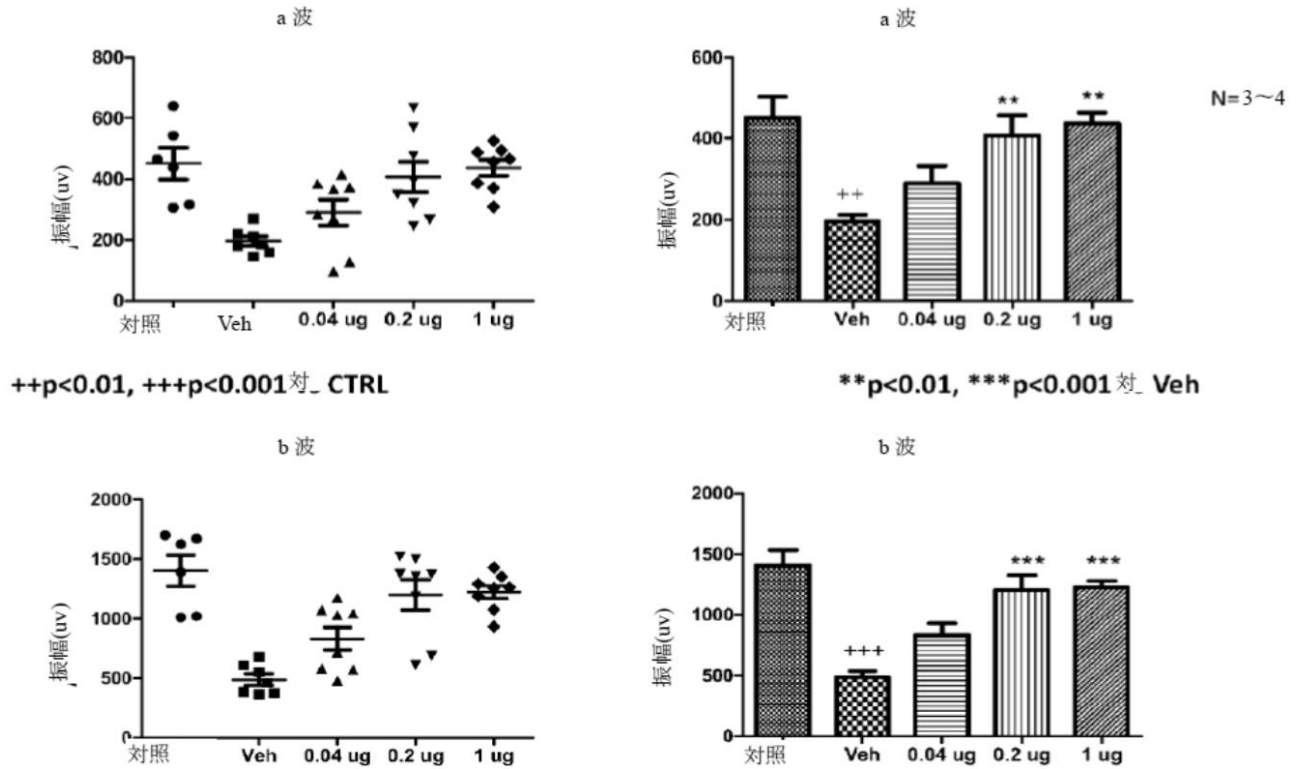
上側網膜
ONH から 700-1200 μm

【図 7】

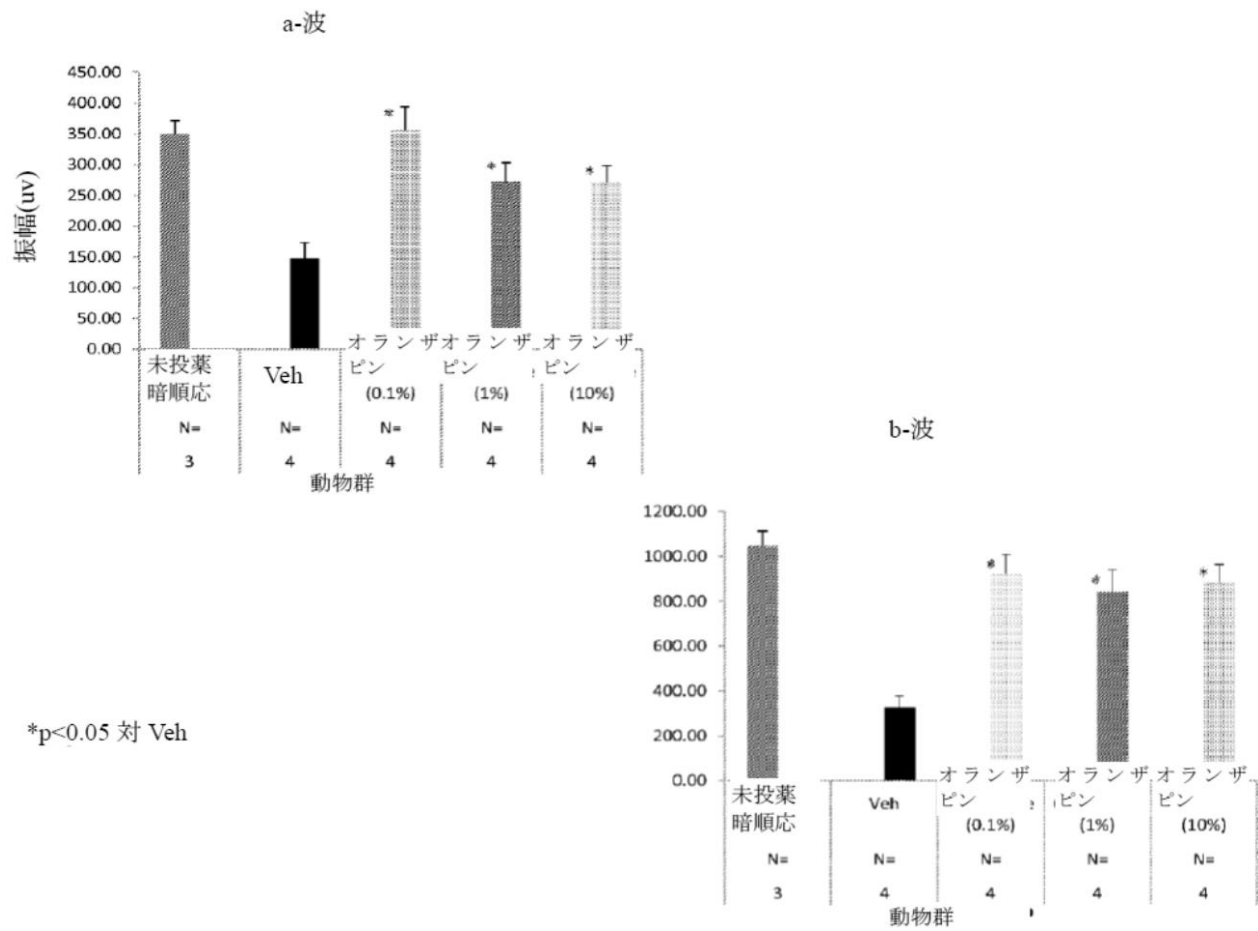


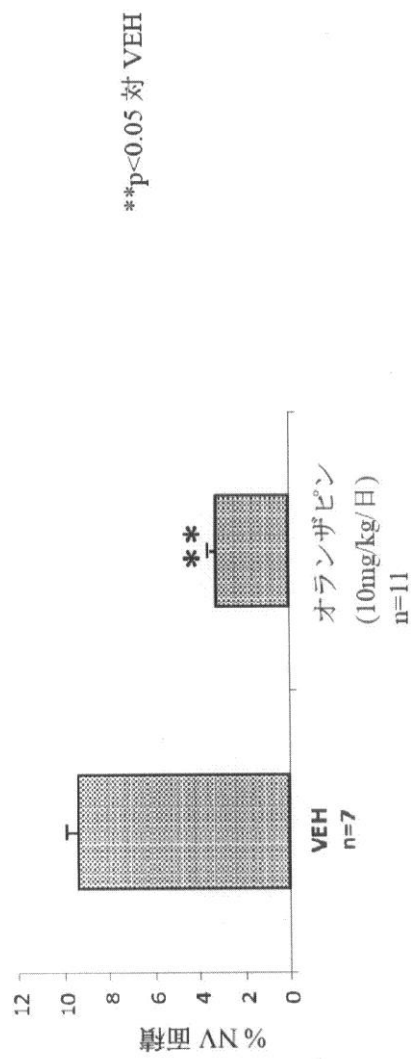
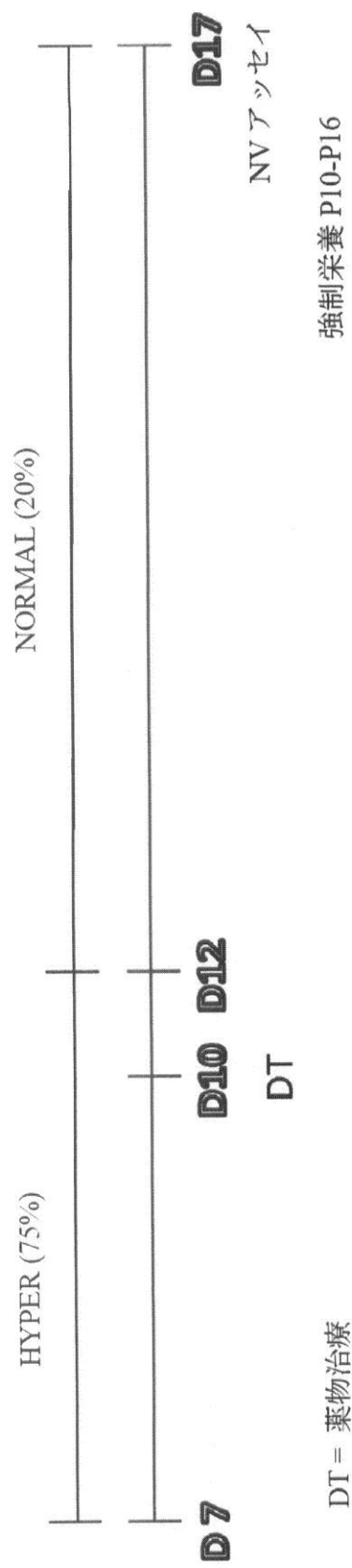
上側網膜
ONH から 700-1200 μm

【 図 8 】

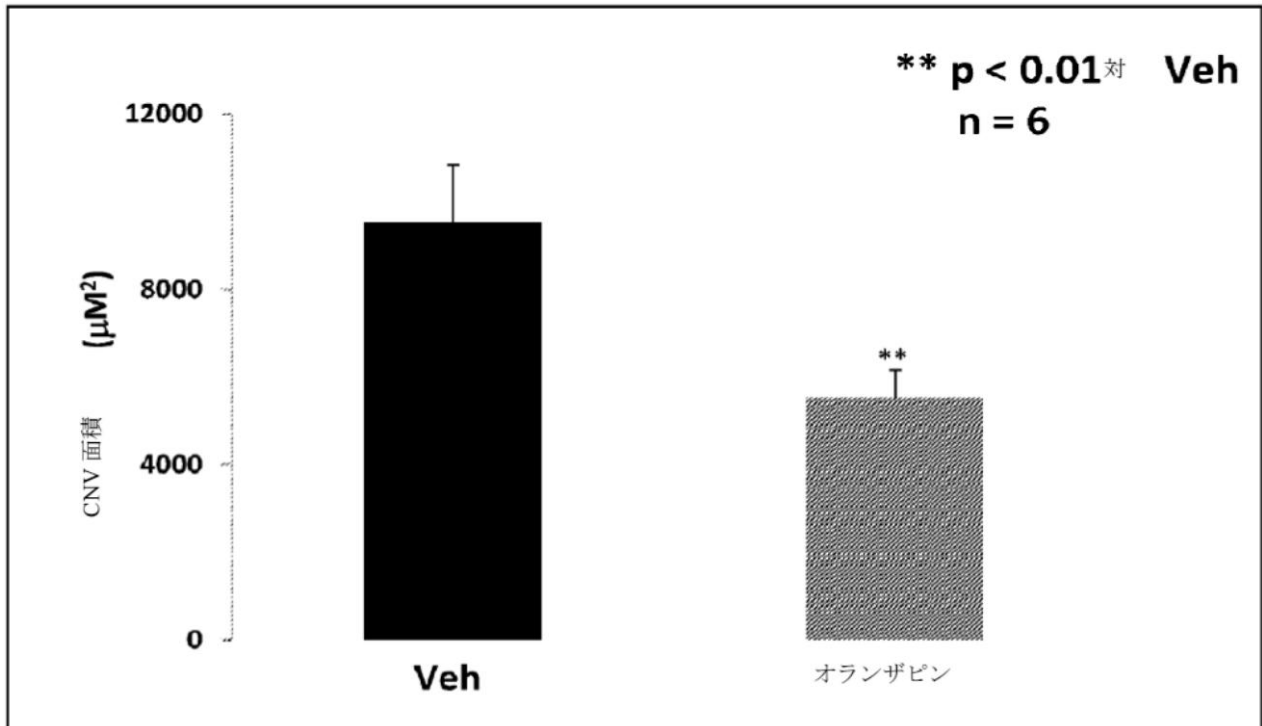


【 図 9 】





【図 1 1】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/061370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/5513 A61P27/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/210604 A1 (DADEY ERIC [US] ET AL) 21 September 2006 (2006-09-21) paragraphs [0049], [52164] claims 37,98,98 -----	1-6
X	WO 2004/103263 A2 (YEDA RES & DEV [IL]; EISENBACH-SCHWARTZ MICHAL [IL]; KIPNIS JONATHAN []) 2 December 2004 (2004-12-02) page 7, line 22 - line 26 page 18, line 17 - line 22 page 41; example 12 claims 15,37, 5765,68 -----	1-3,5
X	EP 1 478 365 A1 (NOWAK GOETZ [DE]) 24 November 2004 (2004-11-24) paragraphs [0005], [0006], [0010], [0011], [0013], [0014] claims 2,8 -----	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document 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

20 February 2012

Date of mailing of the international search report

29/02/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Terenzi, Carla

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/061370

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006210604	A1	21-09-2006	NONE
WO 2004103263	A2	02-12-2004	NONE
EP 1478365	A1	24-11-2004	AT 441416 T 15-09-2009
		AU 2003229548 A1 09-09-2003	
		DE 10206941 A1 25-09-2003	
		EP 1478365 A1 24-11-2004	
		WO 03070249 A1 28-08-2003	

フロントページの続き

(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, MD, 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, 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, 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, VN

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(72)発明者 クサリ ジョティルモイ エックス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 0 3 アーヴィン キャノピー 1 0 5

(72)発明者 チョウ シーラ エックス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 0 3 アーヴィン シエラ パロス ロード 6 1 7
2

(72)発明者 ティエン ミンティン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 0 2 アーヴィン パシフィック クレスト 5 7

(72)発明者 バディロ エドウィン ユー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 8 6 9 オレンジ イースト シャパラル コート 5
9 2 1

(72)発明者 ラオ サンディア エス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 0 6 アーヴィン デル カンブレア 4 3

(72)発明者 ジル ダニエル ダブリュ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 2 5 コロナ デル マル ポイント デル マル
2 5 4 1

(72)発明者 ウィーラー ラリー エイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 1 2 アーヴィン ヴァレー ビュー 1 8

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC56 CB30 GA07 MA01 MA04 MA52 MA58 NA14

ZA33 ZB11 ZB26