(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118613266 A
(43)申请公布日 2024.09.06

(21)申请号 202280088555.9
(22)申请日 2022.02.07
(30)优先权数据
2022-003851 2022.01.13 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/004661 2022.02.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/135827 JA 2023.07.20
(71)申请人 根津科学文化合同会社
地址 日本
申请人 关根舞 根津生命科学株式会社
(72)发明人 关根舞 西野武士
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 龙淳 王磊
(51)Int.Cl.
A61K 31/7004(2006.01)
A61K 31/4196(2006.01)
A61K 31/426(2006.01)
A61K 31/522(2006.01)
A61K 31/708(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

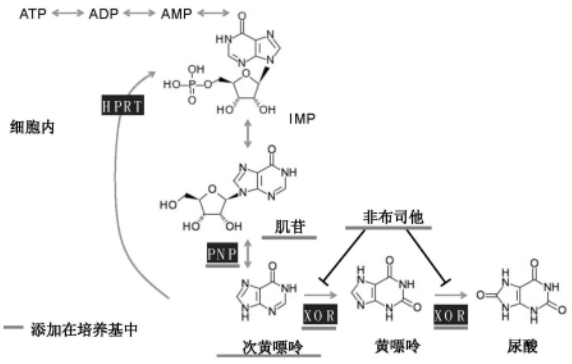
权利要求书2页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

神经变性疾病的进展延缓和防御剂

(57)摘要

本发明的课题在于提供的新型的神经变性疾病预防和/或治疗剂。本发明涉及由(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖组合而成的神经变性疾病预防和/或治疗剂。



CN 118613266 A

1.一种神经变性疾病预防和/或治疗剂,其由(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖组合而成。

2.如权利要求1所述的神经变性疾病预防和/或治疗剂,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

3.如权利要求1或2所述的神经变性疾病预防和/或治疗剂,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

4.如权利要求1～3中任一项所述的神经变性疾病预防和/或治疗剂,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

5.如权利要求1～4中任一项所述的神经变性疾病预防和/或治疗剂,其中,神经变性疾病为选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病和脊髓小脑变性症中的疾病。

6.一种神经细胞内ATP增强剂,其由(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖组合而成。

7.如权利要求6所述的神经细胞内ATP增强剂,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

8.如权利要求6或7所述的神经细胞内ATP增强剂,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

9.如权利要求6～8中任一项所述的神经细胞内ATP增强剂,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

10.(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖的组合在用于制造神经变性疾病预防和/或治疗剂中的应用。

11.如权利要求10所述的应用,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

12.如权利要求10或11所述的应用,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

13.如权利要求10～12中任一项所述的应用,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

14.如权利要求10～13中任一项所述的应用,其中,神经变性疾病为选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病和脊髓小脑变性症中的疾病。

15.(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖的组合在用于制造神经细胞内ATP增强剂中的应用。

16.如权利要求15所述的应用,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

17.如权利要求15或16所述的应用,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

18.如权利要求15～17中任一项所述的应用,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

19.用于在神经变性疾病的预防和/或治疗中使用的、(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类的组合。

20.如权利要求19所述的组合,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

21.如权利要求19或20所述的组合,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

22.如权利要求19～21中任一项所述的组合,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

23.如权利要求19～22中任一项所述的组合,其中,神经变性疾病为选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病和脊髓小脑变性症中的疾病。

24.用于在神经细胞内ATP增强中使用的、(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类的组合。

25.如权利要求24所述的组合,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

26.如权利要求24或25所述的组合,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC－2500。

27.如权利要求24～26中任一项所述的组合,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

28.一种神经变性疾病的预防和/或治疗方法,其特征在于,将(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类组合施用。

29.如权利要求28所述的方法,其中,进一步组合施用(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

30.如权利要求28所述的方法,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC－2500。

31.如权利要求28所述的方法,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

32.如权利要求28所述的方法,其中,神经变性疾病为选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病和脊髓小脑变性症中的疾病。

33.一种神经细胞内ATP的增强方法,其特征在于,将(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类组合施用。

34.如权利要求33所述的方法,其中,进一步组合施用(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

35.如权利要求33所述的方法,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC－2500。

36.如权利要求33所述的方法,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

神经变性疾病的进展延缓和防御剂

技术领域

[0001] 本发明涉及各种神经变性疾病的预防和/或治疗剂。

背景技术

[0002] 神经变性疾病是位于脑和脊髓的神经细胞之中某些特定的神经细胞群(例如与认知功能有关的神经细胞、与运动功能有关的细胞)逐渐受损而脱落的疾病,已知有阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、皮质基底节变性症、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症(Amiotrophic Lateral Scrclosis:ALS)、脊髓小脑变性症等。

[0003] 报道了对ALS的模型小鼠施用作为黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制药的1种的非布司他(Febuxostat)是有效的(专利文献1)。其作用机理如下所示(非专利文献1)。即,黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制药提高血中的作为黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶的底物的次黄嘌呤的浓度。其使被称为补救酶的HPRTase活化,将枯竭的嘌呤核苷酸作为肌苷酸(肌苷—5'—单磷酸:IMP)回收填补到神经细胞。升高的IMP结果上增加了ATP浓度,延迟细胞内的异常蛋白的积累和细胞死亡。但是,同样作为黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制药的别嘌呤醇(allopurinol)没有效果,认为其理由是别嘌呤醇也是HPRTase的底物,因此存在抑制作用。

[0004] 关于认知症的进展延缓或预防,根据使用阿尔兹海默模型小鼠(淀粉样(Amyloid)蛋白和tau蛋白的双突变小鼠)的试验,显示作为黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制药的非布司他和NC—2500显著抑制均为阿尔兹海默疾病的特征的淀粉样蛋白和tau蛋白的细胞内积累(专利文献2和3)。该非布司他和NC—2500的认知症的进展或预防的作用机制也与上述同样,抑制黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶,提高血中的作为黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶的底物的次黄嘌呤的浓度,其使被称为补救酶的HPRTase活化,将枯竭的嘌呤核苷酸作为IMP回收填补到神经细胞。升高的IMP结果上增加了ATP浓度,延迟细胞内的异常蛋白的积累和细胞死亡。

[0005] 其中,黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶(XOR)是将嘌呤环的次黄嘌呤转化为黄嘌呤、进而将黄嘌呤转化为尿酸的酶。XOR中有黄嘌呤脱氢酶(XDH)和黄嘌呤氧化酶(XO型),是相同的基因产物(非专利文献2)。XDH从上述嘌呤环夺去电子,给另一底物NAD两个电子,生成NADH。而XO型是以氧代替NAD为底物,生成过氧化氢(H_2O_2)和超氧化物(superoxide)(O^{2-})(非专利文献2)。各自的三维结构不同,能够从反应机制上进行说明(非专利文献3)。非布司他(非专利文献4)和NC—2500(专利文献3)强烈抑制XOR任一类型的酶反应。虽然有如下假说:XDH转化为XO,其放出活性氧,该活性氧导致细胞损伤,但是,近年来,出于以下的各种理由,否定了由于XOR抑制剂的活性氧引起的细胞杀伤假说。其理由(1):XO在各组织中以XDH的形式存在(非专利文献5、6),有面向专家的教材,其中称,作为提取过程的人工制品转变为XO(非专利文献7)。实际上,为了作为XDH提取需要极其特殊的技术(非专利文献8)。其理由(2):近年来有报道称,在将小鼠的XDH基因取代而转变为活性氧(产生超氧化物和过氧化氢这两者,但前者特别增加)超产生型XO的转基因小鼠中没有观察到任何异常(非专利文献

9、10),否定了产生XO的活性氧假说。其理由(3):神经细胞中,XOR本身无法通过活性测定和免疫印迹检测出来,以及mRNA的表达极低(非专利文献11)。其理由(4):作为XOR抑制剂的别嘌呤醇不显示效果,别嘌呤醇如上所述是HPRTase的抑制剂。其理由(5):是因为肌苷是次黄嘌呤的前体,在包含血液的生物体组织内处于平衡关系(非专利文献12)。如果活性氧是原因,则由于XO的底物增加而形成的活性氧增加,而应当恶化,但是实际上并没有发生恶化。

[0006] 通过联合使用非布司他和肌苷,细胞内增加的ATP通过血液内的ATP显示(专利文献4),但是在该专利文献中,没有显示神经细胞中的作用。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2008/010315号

[0010] 专利文献2:国际公开第2017/142091号

[0011] 专利文献3:国际公开第2016/136727号

[0012] 专利文献4:国际公开第2017/033963号

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:J.Neuro-pathology.Exp.Med.Vol.75,12,2016pp1124-1144

[0015] 非专利文献2:FASEB J.1995;9:995-1003

[0016] 非专利文献3:FEBS J.2008;275:3278-3289

[0017] 非专利文献4:J Biol Chem.2003;278(3):1848-55.

[0018] 非专利文献5:Biochem J.1972;126(3):739-45.

[0019] 非专利文献6:J Biol Chem.1989;264(17):10015-22.

[0020] 非专利文献7:The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.7th ed:McGraw-Hill;1995.p.1781-97.

[0021] 非专利文献8:Arch Biochem Biophys.1986;247(2):254-60.

[0022] 非专利文献9:Nat Commun.2019;10(1):4904.

[0023] 非专利文献10:Front Cell Dev Biol.2021;9:612440.

[0024] 非专利文献11:GTEx Portal[cited 2021December 9].Available from: https://gtexportal.org/home/gene/XDH.

[0025] 非专利文献12:J Clin Invest.1956;35(6):657-63.

[0026] 非专利文献13:Br J Pharmacol.2020;177(10):2274-85.

发明内容

[0027] 发明所要解决的课题

[0028] 本发明的课题在于提供新型的神经变性疾病预防和/或治疗剂。

[0029] 用于解决课题的方法

[0030] 为此,本发明的发明人为了找到比上述非布司他和NC—2500更优异的神经变性疾病预防和/或治疗剂而进行了各种研究,结果,发现了组合(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类时,可以显著增强神经细胞内的ATP,显示优异的神经变性疾病预防和/或治疗效果,并且,在其中进一步组合(C)肌苷和/或次黄嘌呤时,这些效果进一步提高,从而完成了本发明。

[0031] 即,本发明提供下述的发明[1]~[36]。

[0032] [1]一种由(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖组合而成的神经变性疾病预防和/或治疗剂。

[0033] [2]如[1]所述的神经变性疾病预防和/或治疗剂,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

[0034] [3]如[1]或[2]所述的神经变性疾病预防和/或治疗剂,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

[0035] [4]如[1]~[3]中任一项所述的神经变性疾病预防和/或治疗剂,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

[0036] [5]如[1]~[4]中任一项所述的神经变性疾病预防和/或治疗剂,其中,神经变性疾病为选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病和脊髓小脑变性症中的疾病。

[0037] [6]一种由(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖组合而成的神经细胞内ATP增强剂。

[0038] [7]如[6]所述的神经细胞内ATP增强剂,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

[0039] [8]如[6]或[7]所述的神经细胞内ATP增强剂,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

[0040] [9]如[6]~[8]中任一项所述的神经细胞内ATP增强剂,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

[0041] [10](A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖的组合在用于制造神经变性疾病预防和/或治疗剂中的应用。

[0042] [11]如[10]所述的应用,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

[0043] [12]如[10]或[11]所述的应用,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

[0044] [13]如[10]~[12]中任一项所述的应用,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

[0045] [14]如[10]~[13]中任一项所述的应用,其中,神经变性疾病为选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病和脊髓小脑变性症中的疾病。

[0046] [15](A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖的组合在用于制造神经细胞内ATP增强剂中的应用。

[0047] [16]如[15]所述的应用,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

[0048] [17]如[15]或[16]所述的应用,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

[0049] [18]如[15]~[17]中任一项所述的应用,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

[0050] [19]用于在神经变性疾病的预防和/或治疗中使用的、(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类的组合。

[0051] [20]如[19]所述的组合,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

[0052] [21]如[19]或[20]所述的组合,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—

2500。

[0053] [22]如[19]~[21]中任一项所述的组合,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

[0054] [23]如[19]~[22]中任一项所述的组合,其中,神经变性疾病为选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病和脊髓小脑变性症中的疾病。

[0055] [24]用于在神经细胞内ATP增强中使用的、(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类的组合。

[0056] [25]如[24]所述的组合,其中,还组合有(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

[0057] [26]如[24]或[25]所述的组合,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

[0058] [27]如[24]~[26]中任一项所述的组合,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

[0059] [28]一种神经变性疾病的预防和/或治疗方法,其特征在于,将(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类组合施用。

[0060] [29]如[28]所述的方法,其中,进一步组合施用(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

[0061] [30]如[28]所述的方法,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

[0062] [31]如[28]所述的方法,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

[0063] [32]如[28]所述的方法,其中,神经变性疾病为选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病和脊髓小脑变性症中的疾病。

[0064] [33]一种神经细胞内ATP的增强方法,其特征在于,将(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类组合施用。

[0065] [34]如[33]所述的方法,其中,进一步组合施用(C)肌苷和/或次黄嘌呤。

[0066] [35]如[33]所述的方法,其中,成分(A)选自非布司他、托匹司他和NC—2500。

[0067] [36]如[33]所述的方法,其中,成分(B)为选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上。

[0068] 发明的效果

[0069] 根据本发明,可以显著增强神经细胞内的ATP产生,作为其结果,可以改善阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病、脊髓小脑变性症等神经变性疾病的症状或抑制其进展。

附图说明

[0070] 图1是表示细胞内的非布司他(Febuxostat)和嘌呤体的作用通路的图。

[0071] 图2是表示由iPS细胞制成的神经细胞和通过免疫染色得到的神经细胞标记物表达的图。

[0072] 图3是由iPS细胞制成的神经细胞利用免疫印迹得到的XOR和HPRTase的表达的图。

[0073] 图4是表示在不添加药剂时由线粒体解偶联剂(FCCP)引起的ATP的减少和神经细胞的崩解的关系的图。

[0074] 图5是表示使用了6孔(各孔2ml培养液)容器的实验体系(A、B、C)的示意图。

[0075] 图6是表示在ATP减少的应激环境下(FCCP存在下)在细胞的培养基中添加肌苷和非布司他(Febuxostat)时的效果的图。

[0076] 图7是表示在ATP减少的应激环境下(FCCP存在下)在细胞的培养基中添加次黄嘌呤、非布司他(Febuxostat)和木酮糖时的效果的图。

[0077] 图8是表示ATP减少的应激环境下的药剂的细胞形态维持效果的图。

具体实施方式

[0078] 本发明的神经变性疾病预防和/或治疗剂的有效成分是(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂与(B)五碳糖类的组合。另外,本发明的神经变性疾病预防和/或治疗剂的有效成分是(A)黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂、(B)五碳糖类与(C)肌苷和/或次黄嘌呤的组合。

[0079] 成分(A)是黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂。如上所述,成分(A)通过提高血中的作为黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶的底物的次黄嘌呤的浓度,使被称为补救酶(salvage enzyme)的HPRTase活化,将枯竭的嘌呤核苷酸作为肌苷酸(IMP)回收填补到神经细胞。升高的IMP结果上增加了ATP浓度,具有延迟细胞内的异常蛋白的积累和细胞死亡的作用。

[0080] 黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂之中,优选不成为HPRTase的底物的成分,更优选选自非布司他(Febuxostat)、托匹司他(Topiroxostat)、NC—2500,进一步优选非布司他、NC—2500(5—(7—羟基噻唑并[5,4—d]嘧啶—2—基)—2—苯氧基—苯甲腈)。

[0081] 肌苷和次黄嘌呤如上所述,均是嘌呤补救合成途径(Salvage pathway)的一种成分,当这些成分的细胞内浓度上升,代谢为尿酸受阻时,细胞内ATP浓度上升。因此,联合使用成分(A)和肌苷时,细胞内ATP浓度上升,应当能够推迟异常蛋白在细胞内的积聚和细胞死亡。但是,本发明的发明人的研究表明,联合使用这2种成分时,神经细胞内的ATP浓度没有充分上升,没有得到充分的神经变性疾病治疗作用(参照图1)。

[0082] 在成分(A)中添加能够表现出效果的是(B)五碳糖类。作为五碳糖类,可以列举核糖、阿拉伯糖、木酮糖、来苏糖、木糖、核酮糖等。更具体而言,可以列举D—核糖、L—核糖、D—阿拉伯糖、L—阿拉伯糖、D—木酮糖、L—木酮糖、D—来苏糖、L—来苏糖、D—木糖、D—核酮糖。其中,优选选自核糖、木酮糖和核酮糖中的1种以上,更优选选自L—核糖、L—木酮糖和D—核酮糖中的1种以上。

[0083] 根据本发明的发明人的研究发现,联用上述成分(A)和成分(B)时,神经细胞内ATP浓度显著上升,其结果,可以得到优异的神经变性疾病预防治疗效果。

[0084] 另外,在本发明中,除了上述成分(A)和成分(B)以外,还联用成分(C)次黄嘌呤和/或肌苷时,神经细胞内的ATP浓度进一步上升,能够推迟作为神经变性疾病的原因的异常蛋白的积累和细胞死亡。

[0085] 联用成分(A)和成分(B)这2个成分、或成分(A)、成分(B)和成分(C)这3个成分时,神经细胞内的ATP浓度显著上升,能够推迟作为神经变性疾病的原因的异常蛋白的积累和细胞死亡。因此,成分(A)和成分(B)的组合、或成分(A)、成分(B)和成分(C)的组合作为神经变性疾病的预防和/或治疗剂有用。

[0086] 作为神经变性疾病,可以列举阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、线粒体病、脊髓小脑变性症等。

[0087] 另外,本发明的神经变性疾病的预防和/或治疗中,包括改善上述各种神经变性疾病的各种症状和推迟症状的进展。

[0088] 本发明的神经变性疾病的预防和/或治疗剂是组合成分(A)和成分(B)而成的药品、或组合成分(A)、成分(B)和成分(C)而成的药品,只要是能够联用这些成分的形态即可。具体而言,可以基于各成分的优选给药形态和给药方案,将各成分分成各自的剂型进行制剂化,也可以为含有上述2个成分的制剂和含有另外1个成分的制剂的组合,还可以包含在一个剂型中进行制剂化(即,制剂化为复方制剂),可以进一步将各制剂包含在适于联用的1个包装中来制造销售,也可以将各制剂分成单独的包装制造销售。将各制剂制成1个包装或单独的包装时,也能够制成包括记载了联合施用成分(A)和成分(B)、或联合施用成分(A)、成分(B)和成分(C)的使用说明书的药盒制剂。这里,“使用说明书”只要记载有给药量即可。具体而言,可以例示包装插页、小册子等。另外,包括使用说明书的药盒制剂是指在药盒制剂的包装印刷或附带有使用说明书的药盒制剂,也可以在药盒制剂的包装中与本发明的癌的预防或治疗剂一起装有使用说明书。

[0089] 本发明的上述各成分的给药方式没有特别限定,可以口服或非口服给药。作为非口服给药,可以列举对髓腔内、静脉内、动脉内、肌肉内、皮下或皮内等的注射、吸入、直肠内、鼻腔内给药和滴鼻、滴耳、滴眼、外用给药等。

[0090] 作为本发明的药品,可以将作为有效成分的上述各成分直接对患者给药,优选应作为包含上述各成分和药学上可接受的添加物的医药组合物的形态的制剂给药。作为药学上可接受的添加物,例如,能够使用赋形剂、崩解剂或崩解助剂、结合剂、润滑剂、包衣剂、色素、稀释剂、基剂、溶解剂或溶解助剂、等渗剂、pH调节剂、稳定剂、喷射剂和粘合剂等。

[0091] 作为适于口服给药的制剂的例子,例如,能够列举片剂、胶囊剂、散剂、细粒剂、颗粒剂、液剂、或糖浆剂等,作为适于非口服给药的制剂,例如,能够列举注射剂、点滴剂、栓剂、吸入剂、滴鼻剂、滴耳剂、滴眼剂、或外用剂(包括贴剂、软膏、霜、凝胶、乳液、喷雾等)等。

[0092] 在适于口服给药的制剂中,作为添加物,例如,能够使用葡萄糖、乳糖、D—甘露醇、淀粉、或结晶纤维素等的赋形剂;羧甲纤维素、淀粉、或羧甲纤维素钙等的崩解剂或崩解助剂;羟丙纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯聚吡咯烷酮、或明胶等的结合剂;硬脂酸镁或滑石等的润滑剂;羟丙基甲基纤维素、白糖、聚乙二醇或氧化钛等的包衣剂;凡士林、液体石蜡、聚乙二醇、明胶、高岭土、甘油、纯水、或硬脂(Hard fat)等的基剂。适于注射、点滴用、滴鼻剂、滴耳剂或滴眼剂的制剂中,能够使用:注射用蒸馏水、生理盐水、丙二醇等的可构成水性或使用时溶解型注射剂的溶解剂或溶解助剂;葡萄糖、氯化钠、D—甘露醇、甘油等的等渗剂;无机酸、有机酸、无机碱或有机碱等的pH调节剂等的制剂用添加物。适于栓剂的制剂中,例如,能够使用聚乙二醇、羊毛脂、可可脂、脂肪酸甘油三酯等的基剂、和根据需要的如非离子表面活性剂这样的表面活性剂等的添加物。

[0093] 适于软膏剂的制剂中,可以根据需要使用通常所使用的基剂、稳定剂、湿润剂、保存剂等。作为基剂,可以列举液体石蜡、白凡士林、白蜂蜡、辛基十二烷醇、石蜡等。作为保存剂,可以列举对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯等。

[0094] 作为适于贴剂的制剂,可以列举在通常的支撑体通过通常方法涂布上述软膏、霜、凝胶、糊等而得到的制剂。作为支撑体,由棉、人造纤维、化学纤维得到的纺织布、无纺布、软质氯乙烯、聚乙烯、聚氨酯等的膜或发泡体片材是适合的。

[0095] 本发明的上述各成分的给药量能够根据疾病的进展状况或症状的程度、患者的年龄、体重等的各条件适当选择。另外,本发明的上述各成分的给药时期可以是同时,也可以错开时间带给药。例如,成分(A)可以以1天2次、成分(B)可以以1天3次等的方式给药。此外,成分(A)的给药量优选为1天1～100mg左右,在为非布司他时优选为10～80mg。成分(B)的给药量根据所选择的物质和给药法,优选为1天10g以下。关于成分(C)的给药量,在为肌苷时优选为1天1000mg以下,在为次黄嘌呤时优选为1天500mg以下。

[0096] 实施例

[0097] 以下,利用实施例具体说明本发明,但是本发明不受其任何限制。

[0098] 实施例

[0099] (1)人神经细胞的制备:

[0100] ATP上升根据动物种类、脏器不同而不同。特别是,根据动物种类,通过HPRTase摄入嘌呤核苷酸大幅不同。即,人的嘌呤代谢显著高于小鼠等(非专利文献13)。为此,在黄嘌呤氧化酶/黄嘌呤脱氢酶抑制剂(也称为XOR抑制剂)的解析中,被认为需要使用人的正常细胞以及与其相关的新信息。

[0101] 为此,使用导入人iPS细胞并通过分化诱导而得到的神经细胞进行解析。作为神经细胞标记物使用NeuN和TUJ1(绿),在核染色中使用DAPI(蓝),进行免疫染色。

[0102] (未分化维持培养)

[0103] 对通过玻璃化法冻结的来自健康人的iPS细胞201B7株(RIKEN BRC Cell Bank),在涂有基质胶(Matrigel,Corning)的35mm培养皿(Corning)中使用Essential 8培养基(Thermo Fisher Scientific)进行无滋养层培养。传代时,用包含0.5%EDTA的PBS剥离细胞集落,在培养基中添加10μM的Y－27632(wako)。在大气下、37℃、5%CO_2培养箱内进行培养。

[0104] (向神经干细胞的分化诱导)

[0105] 使用神经诱导培养基(Thermo Fisher Scientific),按照企业操作规程,进行7天培养(37℃、大气下5%CO_2)。

[0106] (向神经细胞的分化诱导)

[0107] 在涂有基质胶的6孔板接种神经干细胞,在包含Neurobasal培养基、B－27添加剂和GlutaMAX(Thermo Fishier Scientific)、青霉素/链霉素/两性霉素B(wako)、各10ng/ml的重组人BDNF、GDNF和NT－3(peprotech公司)的培养基中进行培养。每隔2－3天更换一半培养基。细胞的增殖快时,添加2μM的Ara－C(wako),并通过培养基更换除去。成熟神经分化持续培养14天以上。用显微镜观察细胞,用智能手机拍摄(图2－左)。

[0108] (通过免疫染色确认神经细胞标记物的表达)

[0109] 一次抗体(一抗)使用小鼠单克隆抗NeuN克隆A60(NeuN)、小鼠单克隆抗微管蛋白βIII亚型C末端克隆TU－20(similar to TUJ1)(Merck Millipore),二次抗体(二抗)使用山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor488)(Abcam)。

[0110] 对细胞在除去培养基后,用5%甘露醇清洗2次,添加甲醇,在4℃固定30分钟。用PBS清洗,添加包含0.2%TritonX－100的PBS,在室温孵育15分钟。用包含2%FBS的PBS(washing buffer,清洗缓冲液)清洗。对于一次抗体,TUJ1用清洗缓冲液以1:500稀释,NeuN用清洗缓冲液以1:200稀释。添加一次抗体,在4℃孵育过夜。用清洗缓冲液清洗,添加以1:

500稀释的二次抗体,在室温静置1小时。用清洗缓冲液清洗后,进行DAPI染色,用All-in-One荧光显微镜(Keyence)观察(图2－右)。

[0111] 如图2－左所示,显微镜观察中观察到神经突起伸出,与周围的细胞形成网络的样子。使用神经细胞标记物的NeuN和TUJ1进行表达的确认。NeuN是在成熟神经细胞表达的核蛋白,且在位于中枢神经系统的神经细胞中被确认到。TUJ1(微管蛋白βIII)在中枢神经系统的神经细胞中在全部发育阶段表达。NeuN和TUJ1分别在核和神经突起确认到阳性反应(图2－右)。另外,在神经细胞内未检测出尿酸,XOR使用灵敏度良好的HPLC分析方法进行测定也没有确认到XOR的存在。通过免疫印迹也没有检测到相当于150kDa的XOR(图3)。在神经细胞中XDH的mRNA几乎不表达,而通过免疫印迹确认了HPRTase的存在(图3)。该实验体系相当于无XOR的体系、即XOR被完全抑制且存在HPRTase的体系,即以下的(3)所示的存在非布司他的体系。

[0112] (2)利用线粒体解偶联剂观察ATP减少和神经细胞的崩解:

[0113] 在涂有基质胶的6孔板(corning)的各孔中接种神经干细胞。神经分化培养基包含Neurobasal plus培养基、B－27plus添加剂、GlutaMAX和Culture one添加剂(Thermo Fisher Scientific)、青霉素/链霉素/两性霉素B(wako)、各10ng/ml的重组人BDNF、GDNF和NT－3(peprotech),每隔2－3天更换一半培养基,培养直至14天(37℃、大气下5％CO_2)。

[0114] 在作为用于抑制线粒体的ATP产生的解偶联剂的FCCP时,确认到的神经突起在添加0.01mg/mL时消失(图4)。

[0115] (3)在ATP减少细胞的培养基中添加肌苷的效果观察:

[0116] 从牛奶中纯化XOR。根据上述结果,在作为抑制线粒体的ATP产生的线粒体的解偶联剂FCCP的存在下,在图5所示的6孔(各孔2ml培养液)容器中构建中央示意图所示的A、B、C的实验体系(各n＝3)。在第14天在2mL的培养基中,将1μM非布司他(TCI)、10nM XOR、100μM肌苷(wako)、0.01mg/ml FCCP(Cayman)、PNP(purine nucleoside phosphorylase,嘌呤核苷磷酸化酶)、人重组E.coli(Merck Millipore)101.64U/mg以稀释为1/100,000的方式,在各孔的培养基中同时添加。在37℃、5％CO_2培养箱培养18小时后,在50μL培养基上清中添加2μL PCA,用3M K_2CO_3中和。用下述所示的HPLC系统测定肌苷和UA(尿酸)。另外,细胞用PBS清洗后,用5％PCA 200μL进行处理,同样地用HPLC测定细胞中的腺苷酸(ATP)。

[0117] (HPLC测定法)

[0118] 使用岛津HPLC测定。岛津HPLC具有CBM－20A控制器、LC－20AD泵、SIL－20AC自动进样器(15℃)、CTO－20A柱温箱(40℃)和SPD－M20A二极管阵列检测器。峰值分析使用LC solution software。将SUPELCOSIL ™ LC－18－T柱(25cm×4.6mm id 5μm粒径)与SUPELCOSIL ™ LC－18－T Supelguard ™保护柱连接,以流速0.8ml/min注入20μL样品。流动相使用A:0.1M KPB和4mM四丁基硫酸氢铵(pH5.5)、B:70％缓冲液A和30％甲醇(v/v)。梯度条件以0min(0％B)、2min(0％B)、4min(30％B)、12min(60％B)、15min(100％B)、19min(100％B)、20min(0％B)和30min(0％B)进行。检测波长使用254nm、268nm和295nm。

[0119] 如上所述,肌苷在红细胞中由于嘌呤核苷磷酸化酶(purine nucleoside phosphorylase,PNPase)而与次黄嘌呤和核糖－1p处于平衡关系。因此,肌苷可以认为是次黄嘌呤的转运型。其中的次黄嘌呤由于HPRTase而以IMP的形式被摄入到红细胞或神经细胞(参照图1)。

[0120] 使用了来自人iPS的神经细胞的本实验中,在溶剂中假定为全身多脏器的XOR和PNPase,添加到培养基中。在培养时间18小时观察进一步添加非布司他的XOR抑制效果和作为底物的肌苷(与次黄嘌呤等价)的添加所引起的变化。在不添加非布司他的培养基中几乎检测不出肌苷,但检测出了尿酸(图6)。即,肌苷如上所述由于PNPase而与次黄嘌呤处于平衡体系,显示其全部形成为尿酸。另一方面,存在非布司他的培养基中几乎检测不出尿酸(图6)。

[0121] 这显示在该体系中非布司他几乎完全抑制了从次黄嘌呤向尿酸的转化。

[0122] ATP在非布司他存在下,ATP显著增加(n=3,p=0.028)。

[0123] (4)添加各种五碳糖的效果:

[0124] 在添加了XO的实验体系中,非布司他用于抑制与肌苷处于平衡体系的次黄嘌呤的减少,进而,为了使肌苷与次黄嘌呤处于平衡,代替不添加PNP,而直接使用50μM的次黄嘌呤(基本相当于处于平衡下的量),或者不添加XO(因此不添加非布司他),在培养体系中分别添加五碳糖进行检查。

[0125] D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-来苏糖、L-来苏糖、D-核糖和L-核糖从富士胶片和光纯药株式会社购入,D-木酮糖和D-核酮糖从Cayman公司购入,L-木酮糖从Santa Cruz Biotechnology公司购入。

[0126] 在与上述同样进行成熟神经分化而得到的细胞的培养第14天,在培养基2mL中添加次黄嘌呤和各种五碳糖。该添加条件与上述(3)的实验体系中不添加XOR的条件(非布司他用于完全抑制XOR)同样。此外,肌苷由于PNP而被分解为次黄嘌呤,因此,仅使用次黄嘌呤作为底物来进行。添加后的细胞在37℃、大气下5%CO_2条件孵育。12小时后,与上述(3)同样,通过PCA进行提取,用HPLC进行测定。

[0127] 将其结果示于表1。使用了D-核糖、L-核糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-木酮糖、L-木酮糖、D-来苏糖、L-来苏糖、D-木糖、D-核酮糖。核糖、木酮糖和核酮糖优异,L-核糖、L-木酮糖和D-核酮糖特别优异。

[0128] [表1]

[0129] 细胞中ATP的测定结果

[0130]

	与无添加的比	与 Hx 添加的比
无添加	1.00	
50 μM Hx 添加	5.86	1.00
50 μM Hx + 0.1 mg/ml D-核糖	7.24	1.24
50 μM Hx + 0.1 mg/ml L-核糖*	11.80	2.01
50μM Hx+0.1 mg/ml D-阿拉伯糖	13.31	2.27
50μM Hx+0.1 mg/ml L-阿拉伯糖	10.06	1.72
50 μM Hx + 0.7 mg/ml D-木酮糖	15.80	2.70
50μM Hx + 0.0015mg/mlL-木酮糖*	16.92	2.89
50 μM Hx + 0.1 mg/ml D-来苏糖	5.12	0.87
50 μM Hx + 0.1 mg/ml L-来苏糖	8.78	1.50
50 μM Hx + 0.1 mg/ml D-木糖	9.66	1.65
50μMHx+0.025mg/ml D-核酮糖*	10.43	1.78

[0131] *与50μM次黄嘌呤(Hx)添加相比可见显著差异的ATP增加的五碳糖为L-核糖、L-木酮糖和D-核酮糖(50μM Hx vs 50μM Hx+L-核糖:p＝0.057、50μM Hx vs 50μM Hx+L-木酮糖:p＝0.097、50μM Hx vs 50μM Hx+D-核酮糖:p＝0.062)

[0132] 基于上述结果,在作为抑制线粒体的ATP产生的线粒体的解偶联剂的FCCP的存在下,在图5所示的6孔(各孔2ml培养液)容器的实验体系(各n＝3)中组合入木酮糖添加。

[0133] 将由上述的方法所得到的第14天的神经细胞,以表2所示的实验体系添加在培养基2mL中,通过37℃、5％CO_2孵育器培养18小时。

[0134] [表2]

[0135]

	0.01 mg/ml FCCP	10 nM XOR	10 μM Hx	L-木酮糖 (μM)	1 μM 非布司他
①	○	○	○	0	—
②	○	○	○	1	—
③	○	○	○	10	—
④	○	○	○	0	○
⑤	○	○	○	1	○
⑥	○	○	○	10	○

[0136] ○添加

[0137] —不添加

[0138] 根据由FCCP引起的细胞内ATP浓度和显微镜观察的变化比较研究了防御的程度。使用岛津HPLC－二极管阵列/UV系统测定了神经细胞内的ATP的浓度、培养液中的次黄嘌呤和尿酸的浓度。其结果,得到了以下的结果。

[0139] 1)在不添加非布司他时,ATP浓度以依赖于木酮糖浓度的方式增加(图7)。

[0140] 2)添加非布司他时,通过添加10μM的木酮糖,ATP浓度几乎达到了无应激(不添加FCCP)的浓度约5μM(图7)。即,该状态下,ATP浓度维持为正常细胞的80—100%,可以认为基本饱和。

[0141] 3)在利用显微镜的观察中,在非布司他存在下,保持了ATP浓度以及正常形态(图8)。

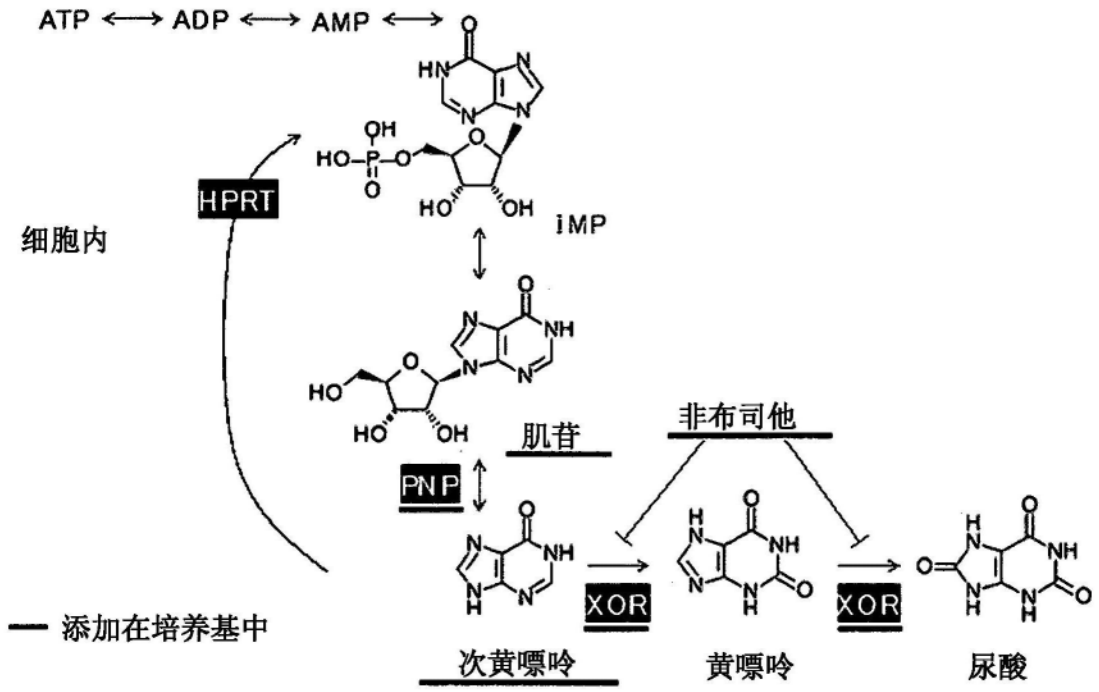

ATP ⟷ ADP ⟷ AMP ⟷
HPRT
细胞内
iMP
肌苷
非布司他
PNP
XOR
XOR
次黄嘌呤
黄嘌呤
尿酸
添加在培养基中

图1

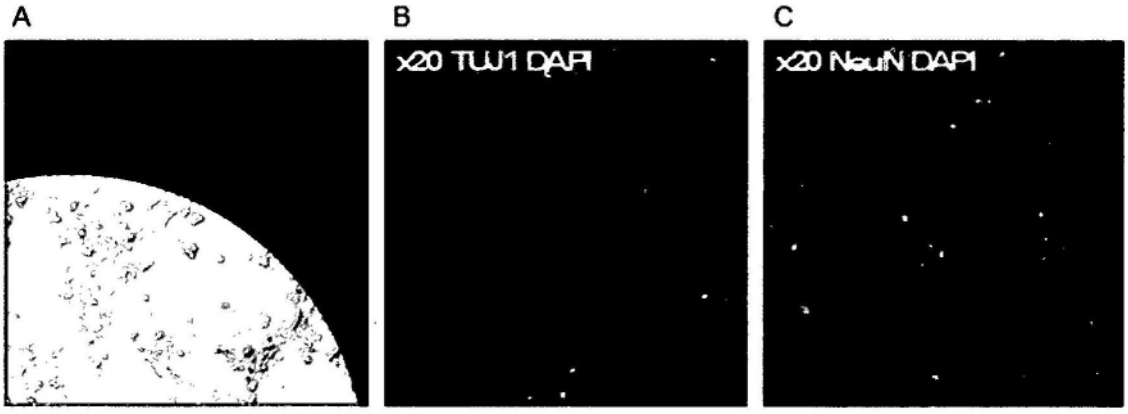

A
B
C
x20 TUJ1 DAPI
x20 NeuN DAPI

图2

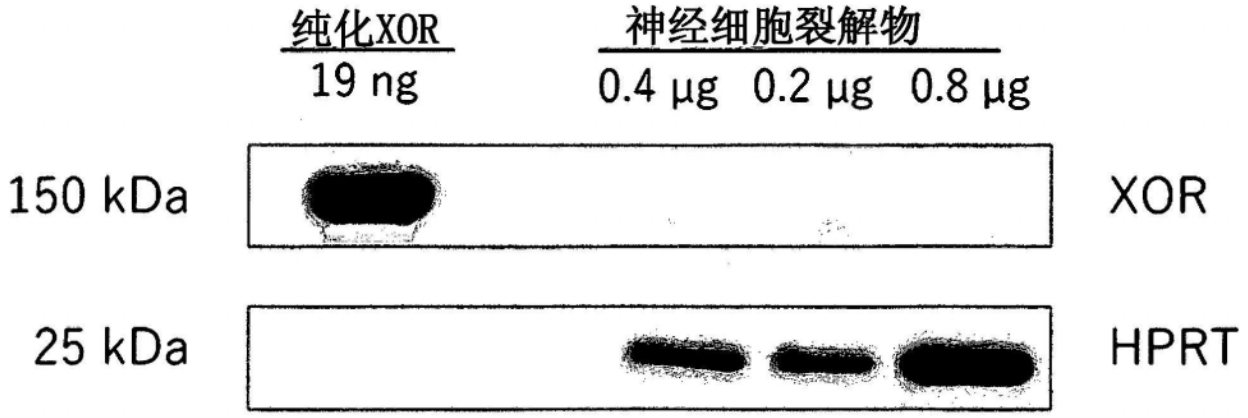

纯化XOR
19 ng
神经细胞裂解物
0.4 μg 0.2 μg 0.8 μg
150 kDa
XOR
25 kDa
HPRT

图3

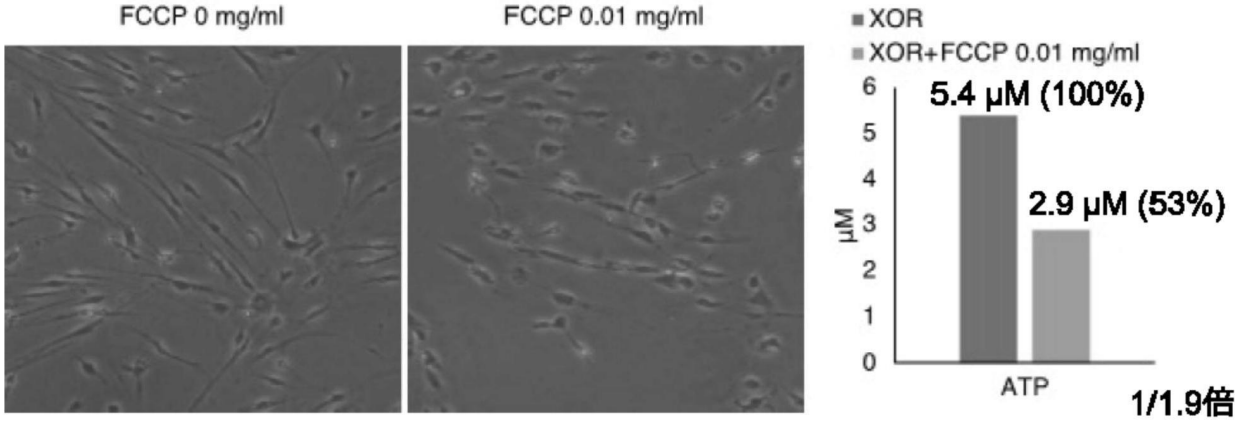

FCCP 0 mg/ml
FCCP 0.01 mg/ml
XOR
XOR+FCCP 0.01 mg/ml
5.4 μM (100%)
2.9 μM (53%)
μM
ATP
1/1.9倍

图4

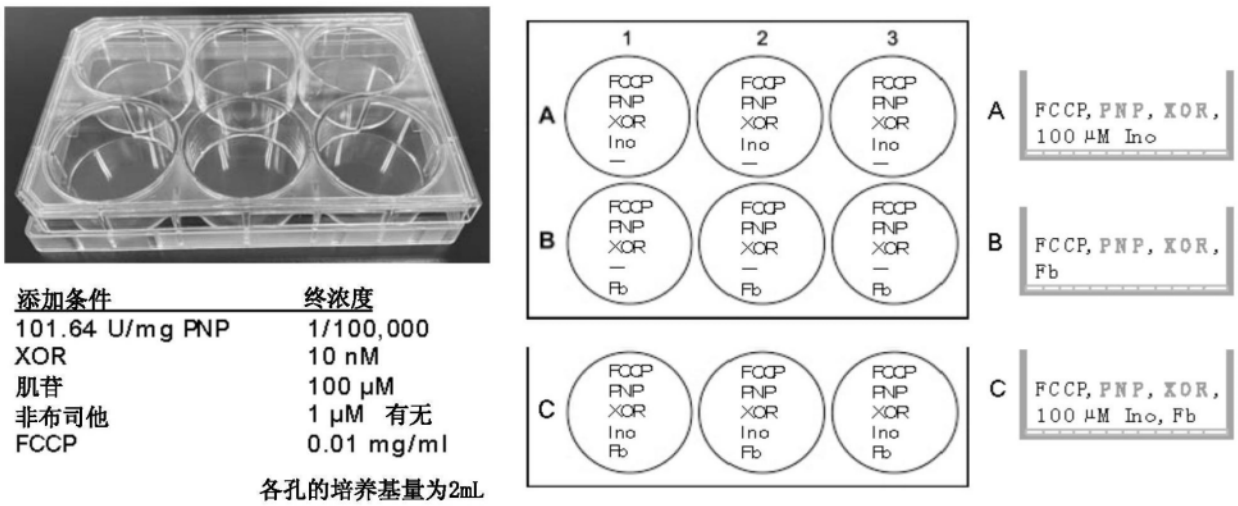

添加条件 终浓度
101.64 U/mg PNP 1/100,000
XOR 10 nM
肌苷 100 μM
非布司他 1 μM 有无
FCCP 0.01 mg/ml
各孔的培养基量为2mL
1
2
3
A
B
C
FCCP
PNP
XOR
Ino
Fb
—
A FCCP, PNP, XOR, 100 μM Ino
B FCCP, PNP, XOR, Fb
C FCCP, PNP, XOR, 100 μM Ino, Fb

图5

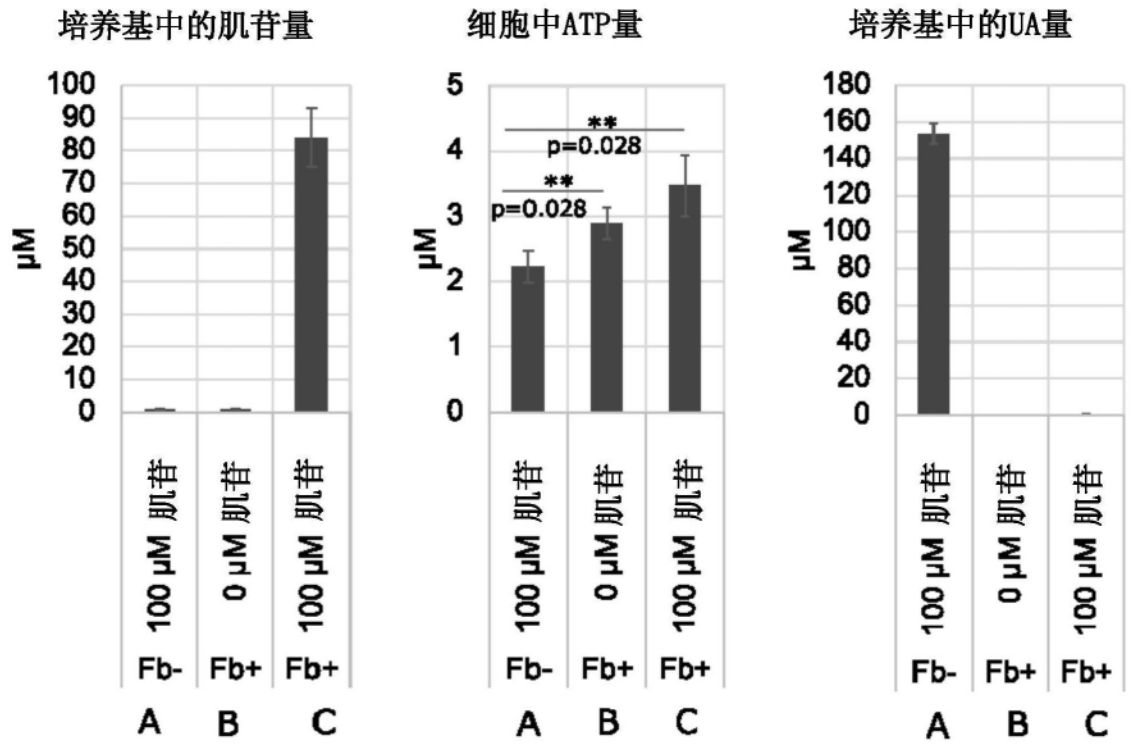

培养基中的肌苷量
细胞中ATP量
培养基中的UA量
μM
100 μM 肌苷
0 μM 肌苷
100 μM 肌苷
Fb-
Fb+
Fb+
A
B
C
**
p=0.028
**
p=0.028

图6

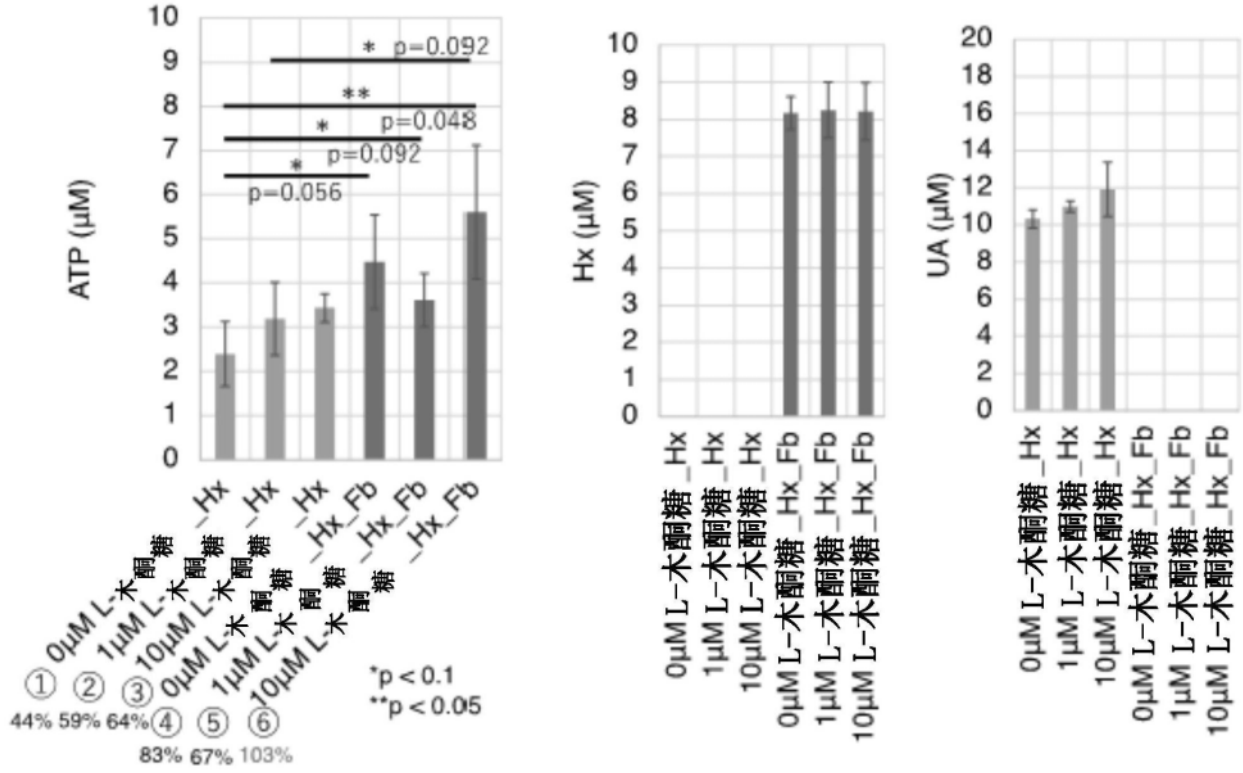

ATP (μM)
* p=0.092
** p=0.048
* p=0.092
* p=0.056
_Hx
_Hx_Fb
0μM L-木酮糖
1μM L-木酮糖
10μM L-木酮糖
①
②
③
④
⑤
⑥
44%
59%
64%
83%
67%
103%
*p < 0.1
**p < 0.05
Hx (μM)
UA (μM)

图7

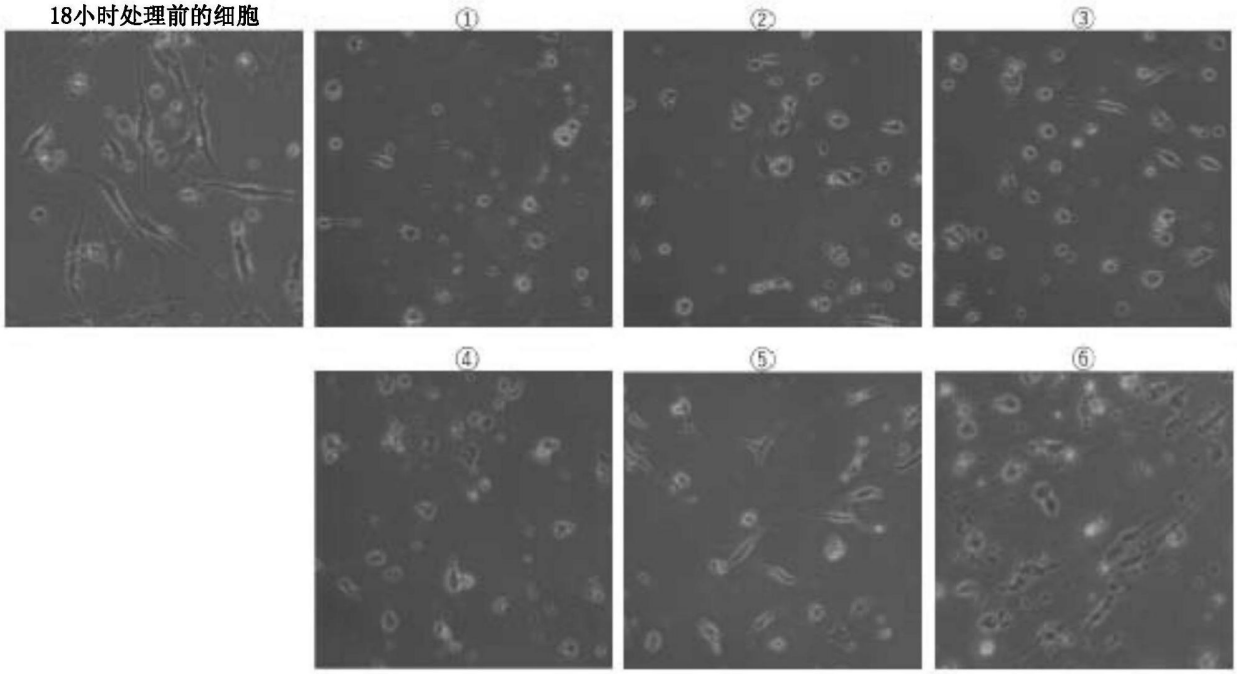


图8