(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2017-538728
(P2017-538728A)
(43)公表日　平成29年12月28日(2017.12.28)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 9/127	***(2006.01)***	A61K	9/127	4C076
A61P 27/02	***(2006.01)***	A61P	27/02	4C084
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	45/00	4C206
A61K 31/047	***(2006.01)***	A61K	31/047	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 20 頁）

(21)出願番号　特願2017-532767 (P2017-532767)
(86)(22)出願日　平成27年12月21日 (2015.12.21)
(85)翻訳文提出日　平成29年8月15日 (2017.8.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/067125
(87)国際公開番号　WO2016/100972
(87)国際公開日　平成28年6月23日 (2016.6.23)
(31)優先権主張番号　62/094,663
(32)優先日　平成26年12月19日 (2014.12.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500462328
ケミン、インダストリーズ、インコーポレーテッド
ＫＥＭＩＮ　ＩＮＤＵＳＴＲＩＥＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国アイオワ州５０３１７，デ・モイン，モーリー・ストリート　２１００
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100118902
弁理士　山本　修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前　徹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】イオントフォレシスを用いた生物活性分子の眼内送達

(57)【要約】
弱電流を用いてイオン化分子の組織中への浸透を向上させる最小侵襲的方法であるイオントフォレシスは、大きい生物活性分子、具体的にはルテインの眼内送達に有効な方法であることが見出された。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
生物活性分子を眼組織中に沈着させる方法であって、前記生物活性分子を含有するリポソームを製剤する工程、前記生物活性分子含有リポソームの組成物をイオントフォレシスデバイスに投入する工程、前記イオントフォレシスデバイスを対象の眼に適用する工程、及び前記イオントフォレシスデバイスを運転する工程、を含む方法。
【請求項２】
前記生物活性分子が、カロテノイドから成る群より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記カロテノイドが、ルテイン及びゼアキサンチンから成る群より選択される、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記リポソームが、正のゼータ電位を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
生物活性分子を含有するリポソームを製剤する工程、前記生物活性分子含有リポソームの組成物をイオントフォレシスデバイスに投入する工程、前記イオントフォレシスデバイスを対象の眼に適用する工程、及び前記イオントフォレシスデバイスを運転する工程を含む、眼疾患若しくは眼機能障害を治療、寛解、又は予防する方法。
【請求項６】
眼疾患若しくは眼機能障害を治療、寛解、又は予防することが、加齢黄斑変性の発症を遅延することである、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
眼疾患若しくは眼機能障害を治療、寛解、又は予防することが、加齢黄斑変性の進行を予防又は遅延することである、請求項５に記載の方法。
【請求項８】
前記眼疾患又は眼機能障害が、加齢黄斑変性である、請求項５に記載の方法。
【請求項９】
前記眼疾患又は眼機能障害の寛解又は予防が、健康な対象に前記方法を行うことを含む、請求項５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、その全内容が参照により本明細書に援用される２０１４年１２月１９日に出願された米国特許出願第６２／０９４，６６３号の優先権を主張するものである。
【０００２】
本発明は、眼組織への生物活性分子の使用全般に関し、より詳細には、イオントフォレシスを用いたルテインの黄斑への送達に関する。
【背景技術】
【０００３】
ルテイン（及びゼアキサンチン）は、その抗酸化及び光保護効果、並びにそれが眼の黄斑に集中的に分布していることにより、ＡＭＤ（加齢黄斑変性）の発症及び水晶体摘出術のリスクの低減と関連付けられている[1]。加齢は、ＡＭＤにおける最も重要なリスク因子の１つであり、典型的には、５０歳を超えた個体が罹患する[2～4]。ＡＭＤには、「萎縮型ＡＭＤ」及び「滲出型ＡＭＤ」の２種類が存在する。萎縮型ＡＭＤは、「ドルーゼン」と称される老廃物蓄積の結果として黄斑細胞が損傷された場合に発症する。それは、最も一般的で、重篤度が最も低い種類のＡＭＤである。萎縮型ＡＭＤの症状を呈する患者の多くが、滲出型ＡＭＤを発症することになると推計され、それは、黄斑の下から異常な血管が成長し、不可逆的な細胞の損傷を引き起こす場合に発症する[2～4]。
【０００４】

ルテインは、キサントフィル結合タンパク質を通して、全身循環がルテインを脈絡膜循環（coroidalcirculation）へ運び、黄斑へ取り込むことができるという理由で、経口補給によって広く用いられてきた[5]。しかし、いくつかの報告では、少ないパーセントのルテインしか黄斑に到達しないことが示されている[6～8]。さらに、眼関門による限界のために、後眼部の治療的治療は困難である。眼は、涙膜、角膜、硝子体、血液網膜関門、及び血液房水関門によって保護されていることから、眼、特に網膜に、充分な濃度及び最小限の副作用で薬物を送達することは非常に困難である[9，10]。この問題を克服するために、ｉｎ－ｓｉｔｕ適用が用いられてきたが、インプラントなどの徐放システムは、非常に侵襲的であり、高価である。この数年間、多くの研究の結果が、このような治療のリスクを強調している[11、12]。

【０００５】

最近、ルテインの硝子体内注射が、特定の網膜前膜及びその他の眼の構造体を手術中に染色するために用いられている[13～16]。これは、ルテインの固有の染色効果を利用する黄斑へのルテインのｉｎ－ｓｉｔｕ送達に関する最初のデータである。様々な試験で示されたＡＭＤ進行の遅延及び推定される神経保護作用についてのルテインの可能性は、眼内送達に従うｉｎ－ｓｉｔｕ適用によってはまだ証明されていない。予防目的でのルテインの硝子体内注射は、ルテインを黄斑へ送達する戦略としては侵襲的過ぎる可能性があり、患者が許容し難いという欠点を有する。

【０００６】

眼内イオントフォレシスは、経強膜的に及び／又は経角膜的に高濃度のターゲット分子を電気の力によって推進させるために用いられる最小侵襲的方法である。それは、対象の分子及び媒体を含有するイオントフォレシスチャンバーに適用される小電流を用いる[17]。いくつかの報告から、ヒトの眼の黄斑中に高濃度で見られるルテインが、神経保護作用の可能性に加えてＡＭＤの進行を遅延する可能性も有することが明らかにされた[18～20]。

【発明の概要】

【０００７】

ここで、本発明者らは、ルテインを網膜に送達する新規な方法を報告するものであり、従って、傍中心窩の黄斑領域におけるその存在を大きく高めることができ、それによって、ＡＭＤの進行を遅延させ、網膜内皮細胞を保護することができる。眼科的使用のための様々なイオントフォレシス送達システムが作り出されており、それを用いて、ヒトの前眼部及び後眼部の両方に医薬が安全に、効果的に送達されてきた[21]。この技術を用いることで、高分子を含む有意な量の生物活性分子を、角膜及び強膜を通して送達することが可能である。ここで報告される研究では、ルテインエマルジョンが、イオントフォレシスにより、黄斑へ拡散送達されている[22～23]。発想は、高濃度の荷電ルテインを、経強膜的に（transclerally）及び／又は経角膜的に、イオントフォレシスによって推進する最小侵襲的方法を開発することであった。本発明者らは、強膜及び角膜イオントフォレシス適用後に、二光子顕微鏡、ラマン分光分析、及びＨＰＬＣを用いて様々な眼組織中のルテインの分布及び濃度を調べた。この手法の主たる利点は、より安全で、患者コンプライアンスがより容易である医療デバイスを利用し、頻繁な高用量の注射又は外科的インプラント術といった困難を回避することである。この手順は、手術環境の必要がなく、通常の眼の診療予約の過程で、医師の診療所にて素早く行うことができる。

【０００８】

低電流を用いてイオン化化合物の組織への浸透を向上させる最小侵襲的方法であるイオントフォレシスが、ルテインの眼内送達に有効であることが見出された。１４体の有色ウサギを、電流あり又はなし（それぞれ、２０．０及び０．０ｍＡ）で、ルテインエマルジョンを充填したイオントフォレシスリザーバーの角膜及び強膜への適用によって処理した。イオントフォレシス後、両方の眼（試験及びコントロール）からの眼組織を回収し、処理眼と未処理の反対側の眼とを目視で比較することによってルテインの送達を評価した。経角膜的及び経強膜的イオントフォレシス適用の結果、すべての処理眼において、ウサギ

角膜へのルテインの送達が得られた（時間０時間）。ルテインの適用はまた、強膜縁（sclera limbus）にオレンジ色の痕跡を、及び眼の結膜中に僅かなオレンジ色の着色も作り出し、エマルジョンがこれらの組織にも輸送されたことを示した。この研究では、発明者らは、イオントフォレシスがルテインの眼内送達に有効な技術であることを初めて示した。

【０００９】

本発明では、イオントフォレシス手順後の眼のルテイン分布を評価して、この技術によって高い量のルテインが後部網膜に送達されたことが確認された。結果は、イオントフォレシスが、ルテインの正に荷電したリポソームエマルジョンをウサギの眼に送達する有効な方法であることを示している。さらに、ルテインエマルジョンの最適化された製剤、及び別の選択肢としてのイオントフォレシスプロトタイプを用いて実験を行い、異なる眼組織でのルテイン分布を評価した。

【００１０】

ヒトの死体眼でも試験を行い、低電流を適用して、角膜及び強膜を通してのルテイン送達を評価した。処理及び未処理の眼からの角膜、強膜、脈絡膜、周辺部及び中心部網膜を回収し、ルテイン含有リポソームの分布を可視化するために、二光子顕微鏡で分析した。

【００１１】

経強膜イオントフォレシス適用の結果、後部網膜領域に主としてルテインが送達され、このことから、イオントフォレシス発生後、毛様体／毛様体扁平部を介し、続いて受動拡散によって後部網膜に達するまでのルテインの経路が明らかとなった。脈絡膜にルテインが存在しないことは、網膜色素上皮のタイトジャンクションのサイズが狭いことによって説明することができ、このことが、より大きいリポソーム小胞の通過を妨げ、それによって、網膜内層中にルテインがトラップされる。

【００１２】

この研究により、発明者らは、新規な最小侵襲的方法を通してルテインを後眼部へｉｎｓｉｔｕ送達することを初めて実証した。結果は、ルテインの強膜イオントフォレシスが、ルテインを黄斑へ送達する有効な戦略であることを実証するものであり、これは、ＡＭＤなどの後眼部における疾患を遅延されるために現在用いられている方法の代替法ということになる。

【００１３】

イオントフォレシスは、最小侵襲的方法であるという利点を有しており、従って、化合物の眼内送達の別の選択肢としての方法、すなわち、インプラント及び眼内注射よりも安全である。その結果、イオントフォレシスは、外科的インプラント術又は頻繁な高用量の硝子体内注射といった困難が回避されることから、患者コンプライアンスが高くなる。別の利点は、この技術が、そのような手順よりも安価であり、手術環境の必要なしで、通常の眼の診療予約の過程で、医師の診療所にて素早く行うことができることである。

【００１４】

本特許又は出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも１つの図面を含む。カラーの図面を含む本特許又は特許出願公開のコピーは、特許庁に申請し、必要な料金を支払うことで提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】図１は、０．９％ＮａＣｌ（青色）又は蒸留水（赤色）で１：５０に希釈したＬｉｐｏ＋吸収スペクトル（３００から７５０ｎｍ）のチャートであり、コントロールスペクトル（ルテインなしのリポソーム溶液）も示される。

【図２】図２は、０．９％ＮａＣｌ（青色）又は蒸留水（赤色）で１：５０に希釈したＬｉｐｏ＋蛍光スペクトル（４８０から６５０ｎｍ）のチャートであり、コントロールスペクトル（ルテインなしのリポソーム溶液）も示される。

【図３】図３は、Ｌｉｐｏ＋溶液の粒子サイズ分布及び電荷を算出するための動的光散乱及び電気泳動移動度のチャートであり、蒸留水による１：５０希釈物（赤色）を試験し、

コントロールとして水による１：５０リポソーム希釈物（ルテインなし）も試験した。
【図４】図４は、イオントフォレシス適用後のルテインの投射経路の模式図であり、強膜適用は、眼の後部にルテインを沈積させ、一方角膜適用では、ルテインは角膜上皮細胞上に留まった状態で残されており（オレンジ色の点）、矢印は、イオントフォレシス適用後のルテインの進入を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１６】
化合物の「投与」又は化合物を「投与する」の用語は、本発明の化合物を、治療を必要とする個体に、錠剤、カプセル、シロップ、懸濁液などの経口剤形；ＩＶ、ＩＭ、又はＩＰなどの注射用剤形；クリーム、ゼリー、粉末、又はパッチを含む経皮剤形；頬側剤形；吸入用粉末、スプレー、懸濁液など；並びに直腸坐薬を含むがこれらに限定されない治療的に有用である形態及び治療有効量でその個体の身体に導入することができる形態で提供することを意味するものと理解されるべきである。
【００１７】
本明細書で用いられる場合、「有効量」の用語は、所望される生物学的応答を誘発するのに必要な量を意味する。当業者であれば理解されるように、コンポジット又は生物活性剤の有効量は、所望される生物学的終点、送達されるべき生物活性剤、カプセル化マトリックスの組成、ターゲット組織などの因子に応じて様々であり得る。
【００１８】
本明細書で用いられる場合、「抽出物」の用語は、抽出によって作製された生成物を意味する。抽出物は、溶媒中の溶液の形態であってよく、又は抽出物は、溶媒を含まないか若しくは実質的に含まない濃縮物又はエッセンスであってもよい。抽出物の用語は、特定の抽出工程若しくは一連の抽出工程から得られた単一の抽出物であってよく、又は抽出物は、別々の抽出工程から得られた抽出物の組み合わせであってもよい。例えば、抽出物「ａ」は、クランベリーをアルコール水溶液で抽出することによって得られてよく、一方抽出物「ｂ」は、クランベリーの超臨界二酸化炭素抽出によって得られてよい。続いて、抽出物ａ及びｂは、組み合わされて、抽出物「ｃ」を形成してもよい。そのような組み合わされた抽出物も、従って、「抽出物」の用語に包含される。
【００１９】
本明細書で用いられる場合、「画分」の用語は、特定の物理的、化学的特性、又は物理的若しくは化学的特性を特徴とする化学化合物の特定の群を含む抽出物を意味する。
【００２０】
癌、感染性疾患、又はその他の医学的疾患若しくは病状などの病状に関連して用いられる場合、「予防する」の用語は、本技術分野において良く理解されており、組成物を受けていない対象と比較して、対象における医学的病状の症状の発生頻度を低下させる、又は発症を遅延する組成物の投与を含む。従って、癌の予防は、例えば、未治療のコントロール集団と比較して、予防的治療を受けている患者の集団における検出可能な癌増殖部の数の減少、並びに／又は未治療コントロール集団に対して治療集団における検出可能な癌増殖部の出現の遅延が、例えば、統計的に及び／若しくは臨床的に有意な量で発生することを含む。感染症の予防は、例えば、未治療コントロール集団に対して治療集団における感染症の診断数の減少、及び／又は未治療コントロール集団に対して治療集団における感染症の症状発症の遅延を含む。
【００２１】
「医薬的に許容される」とは、キャリア、希釈剤、又は賦形剤が、製剤の他の成分との適合性を有する必要があり、そのレシピエントに対して有害ではないことを意味する。
【００２２】
「相乗効果的」の用語は、本技術分野において良く理解されており、全体としての効果が成分の合計よりも大きくなるように一緒に作用する２つ以上の成分を意味する。
【００２３】
「治療する」の用語は、本技術分野において良く理解されており、いずれかの病状又は

障害の少なくとも１つの症状を治癒並びに寛解することを意味する。

【００２４】

「予防的又は治療的」治療の用語は、本技術分野において良く理解されており、対象となる組成物の１つ以上をホストへ投与することを含む。望まれない病状（例：ホスト動物の疾患又はその他の望まれない状態）の臨床的発現の前に投与される場合、治療は、予防的であり、すなわち、それは、ホストを望まれない病状の発症から保護するものであり、一方、望まれない病状の発現後に投与される場合、その治療は、治療的である（すなわち、存在する望まれない病状又はその副作用を減少、寛解、又は安定化させることを意図する）。

【００２５】

本発明の化合物は、そのような治療を必要とする対象（ヒト、並びにイヌ、ネコ、及びウマなどの愛玩動物を含む動物）に、最適な医薬的効果を提供する用量で投与されてよい。特定のいずれかの用途での使用に必要とされる用量は、患者によって様々であり、選択された特定の化合物若しくは組成物だけでなく、投与経路によっても、治療されるべき病状の性質、患者の年齢及び病状、併用薬物療法若しくはその場合に患者が従うべき特別な食事制限、並びに当業者であれば認識されるその他の因子に応じて様々であることは理解され、適切な用量は、最終的には、担当医の判断である。

【００２６】

実施例

例１－ウサギの眼におけるルテインの眼内送達

物質及び方法

製剤研究．　化合物の安定性を改善するために現在用いられている様々な送達システムの中でも、リポソームは、その生体適合性、持続的放出の可能性、及び疎水性及び親水性化合物の両方を運搬する能力に起因する利点を有している[16]。この研究では、結晶ルテイン（Ｋｅｍｉｎ　Ｆｏｏｄｓ、ＦｌｏｒａＧＬＯ（登録商標）結晶ルテイン　ロット１４０１１０３３０２）を、リン脂質９０Ｈ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＧｍｂＨ、ロット　５２９４００－２１２００４６－１２－１１２、ＣＡＳ　３０８０６８－１１－３）及びオクタデシルアミン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　ロット　ＢＣＢＫ６３４０Ｖ、ＣＡＳ　１２４－３０－１）を用いてリポソームにカプセル化した。脂質膜を、９０Ｈリン脂質、オクタデシルアミン、及び$CHCl_3$／ＭｅＯＨ（２：１）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ロット　ＳＨＢＣ４９８２Ｖ、ＣＡＳ　６７－６６－３／Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ロット　ＳＺＢＣ２３７ＢＶ、ＣＡＳ　６７－５６－１）に溶解したルテインを用いて作製した。溶媒を回転蒸発によって真空除去したが；溶液を、Ｈｅｉｄｏｌｐｈロータリーエバポレーター（rotavapor）により４０℃で真空乾燥し、ロータリーエバポレーターの速度は、生成物のロスを引き起こす可能性のある気泡形成及び飛び散りを低減するために調節し、乾燥薄膜は、１～２時間後に得られた。微量の溶媒をも除去するために、この薄膜を、室温で真空下に少なくとも１６時間置いた。脂質膜の水和を、４０～４５℃で蒸留水（超純水－ＡｑｕａＭａｘによるＭｉｌｌｉＱ－導電率０．０５４ｕＳ／ｃｍ）を脂質膜へ添加して脂質を水和することによって行い、大きいリポソーム小胞を形成した。大きいリポソーム小胞のホモジナイゼーションを、Ｉｋａ　Ｗｏｒｋｓ　ＵＬＴＲＡ－ＴＵＲＲＡＸ　Ｔ　２５デジタルホモジナイザー（スタウフェン、ドイツ）を用いて達成し、リポソーム小胞のナノサイズ範囲へのサイズ低下は、大型Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ（登録商標）高流体プロセッサー（high fluid processor）Ｍ－１１０ＥＨを用いて、５０～６０℃及び１２００バールで押出すことによって行った。このプロセスを５回繰り返した。エマルジョンの滅菌は、１２１℃、１気圧で２０分間行った。表１は、リポソームエマルジョンの組成を示す。最終生成物のサイズ分布、ゼータ電位、重量モル浸透圧濃度、及びｐＨを滅菌後に分析し、表２にまとめる。

【００２７】

【表１】

表１．ルテインリポソームエマルジョン組成

組成	% w/w
９０Ｈリン脂質	1.000
オクタデシルアミン	0.005
ルテイン結晶	0.050
蒸留水	100gとなる量

【００２８】

【表２】

表２．滅菌後のリポソームの特性

pH	重量モル浸透圧濃度 (mOsM/kg)	平均径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
6.84	15	194	+36.93

【００２９】

眼内イオントフォレシスデバイス．　イオントフォレシスデバイスは、２つの使い捨てコンポーネント：眼内アプリケータ及びリターン電極から構成されていた。これら２つのコンポーネントは、再使用可能ジェネレータと接続されていた。眼内アプリケータは、ポリカーボネートリザーバー（直径９ｍｍ、高さ４．５ｍｍ、容積０．５ｍｌ）及びリード線でジェネレータと接続されたステンレス鋼電極（ＡＩＳＩ　３０４）（アノード－陽極）から構成されていた。リターン電極は、２５Ｇ皮内針（intradermic needle）であり、首（前側）に挿入して、ワニ口クリップ及びリード線でジェネレータと接続した（カソード）。ジェネレータ（ＥＹＥＧＡＴＥ　ＣＣＩ　Ｇｅｎｅｒａｔｏｒ　６１２１－ＥＹＥ、Ｅｙｅｇａｔｅ　Ｐｈａｒｍａ、パリ、フランス）は、定電流タイプであり、電流の設定範囲は、０．２５ｍＡ～２．５ｍＡ（０．２５ｍＡずつ１０段階）、時間の設定範囲は、０．５分間～５分間（０．５分ずつ１０段階）であった。得られた印加電圧は、実験の過程でマルチメーターで測定した。

【００３０】

動物．　１４体の有色ウサギ系ＨＹ７９ｂ（ブリーダー：「ＨＹＰＨＡＲＭ」－フランス、４９４５０　ルセイ（ROUSSAY））を本実験で用いた。すべての動物は、組み入れ検査（inclusion examination）後、耳タグを用い、及び耳のマーカーを用いて個体識別した。動物は、到着後３日間観察を続け、特に眼に注意して、病気の徴候について毎日観察した。動物は、同一環境条件下の標準的なケージに個別に収容した。温度は１５～２１℃に、相対湿度は５５±１０％に保持した。部屋は継続的に換気した（毎時≧１５空気量）。温度及び相対湿度は、継続的に制御し、記録した。動物は、１２時間の明期（午前７：００から午後７：００）及び１２時間の暗期の制御されたサイクルで、定期的に１０～２００１ｘの光に暴露した（ケージ内）。実験全体を通して、動物は、餌及び水に自由にアクセス可能とした。動物には、標準的なドライペレットタイプの餌（１５０ｇ／日）、ＬＡＳＱＣｄｉｅｔ（登録商標）Ｒａｂ－１４Ｈ（ＬＡＳＶＥＮＤＩ　ＧＭＢＨ、ゾースト、ドイツ）を与えた。定期的に分析を行った水道水を、プラスチックボトルから自由に利用可能とした。本実験計画で述べるすべての標準的な操作手順及びプロトコルは、認可された倫理委員会によるレビューを受けた。すべての動物は、実験及びその他の科学的目的に用いられる脊椎動物の保護に関する指令２０１６／６３／ＵＥ　欧州代表者会議[17]、並びに眼科及び視覚研究における動物の使用に関する視覚と眼科学研究協会会議（ＡＲＶＯ）声明[18]に従って取り扱った。

【００３１】

実験手順．　ＨＹ７９ｂ系からの１４体の有色ラビットを、コントロールグループ（受動的適用：電流なし；動物番号９～１４）及び試験グループ（イオントフォレシス適用；

電流あり；動物番号１～８）の２つのグループにランダムに分割した。これら２つのグループは、２つの時間点（０及び２時間）にサブ分割した。表３に実験設計をまとめる。

【００３２】

【表３】

表３．実験設計

グループ番号	薬物	投与	時間点	動物識別番号
1	ルテイン エマルジョン	イオントフォレシス送達（通電＝20.0 mA）	０時間	1, 2, 3, 4
2			２時間	5, 6, 7, 8
3		イオントフォレシス送達（通電＝0.0 mA）	０時間	9, 10, 11
4			２時間	12, 13, 14

【００３３】

ルテインエマルジョンを、麻酔下（キシラジン／ケタミン混合物の筋肉内注射）の動物に、開瞼器で補助しながら、局所麻酔下で（Ｃｅｂｅｓｉｎｅ（登録商標）１滴：０．４％　オキシブプロカイン、Ｔｈｅａ、ロット　Ｆ６７５７）適用の約１０分前）、イオントフォレシスで投与した。動物を、ルテインを充填した９ｍｍイオントフォレシスアプリケータを右眼の角膜及び強膜上に１０分間適用することで処理した。グループに応じて（表３参照）、０．０ｍＡ又は２０．０ｍＡの通電を各々の眼に適用した。イオントフォレシスアプリケータは、投与の直前に０．５ｍＬのルテインリポソームエマルジョンで含浸させ、デバイスの電極は、ルテインエマルジョンで覆われていた。すべての投与の後に、平衡塩類溶液（ＢＳＳ）洗浄を行った。

【００３４】

右眼のイオントフォレシス適用の直後、又は適用の２時間後（表３参照）、欧州当局によって推奨される方法[17]の１つである過剰用量のペントバルビタールの静脈内投与によって動物を安楽死させた。両眼から角膜（Ｃ）、眼房水（ＡＨ）、毛様体（ＣＢ）、網膜（Ｒ）、硝子体（Ｖ）、及び強膜（ＳＣ）をサンプリングし、秤量した。サンプルの着色を目視検査した後、その後のＨＰＬＣ（高速液体クロマトグラフィ）分析のために－８０℃で保存した。

【００３５】

結果

有色ウサギにおけるルテインエマルジョンの眼内イオントフォレシス送達．　イオントフォレシスによるルテイン送達の能力を評価するために、発明者らは、ルテインを有するリポソームを作製し（正に荷電）、このエマルジョンを、２．０ｍＡで１０分間、有色ウサギの角膜／強膜に適用した。イオントフォレシスによる送達の効果を、採取した組織の目視検査によって評価した。電流あり及びなしでのルテインエマルジョン適用後の結果を表４にまとめる。

【００３６】

【表４】

表４．イオントフォレシス適用後の着色

ウサギ識別番号	イオントフォレシス	組織採取時間点	眼組織着色（サンプリング時）	
			未処理眼（左）	処理眼（右）
1	１０分間 ２．０ｍＡ通電	０時間	着色なし	角膜：僅かな円形オレンジ色跡
2			着色なし	角膜：円形オレンジ色跡 ＳＣ：縁にオレンジ色跡 ＣＪ：僅かなオレンジ色着色
3			着色なし	角膜：円形オレンジ色跡 ＳＣ：縁にオレンジ色跡 ＣＪ：僅かなオレンジ色着色
4			着色なし	角膜：円形オレンジ色跡
5		２時間	着色なし	角膜：円形オレンジ色跡
6			着色なし	着色なし
7			着色なし	着色なし
8			着色なし	角膜：円形オレンジ色跡
9	通電なしで １０分間適用	０時間	着色なし	着色なし
10			着色なし	着色なし
11			着色なし	着色なし
12		２時間	着色なし	着色なし
13			着色なし	着色なし
14			着色なし	着色なし

注：Ｃ＝角膜；ＳＣ＝強膜；ＣＪ＝結膜

【００３７】

イオントフォレシス適用後、２０．０ｍＡの電流で処理したすべての眼は（時間点　０時間）は、円形のオレンジ色を角膜に出現させ、この組織中にルテインエマルジョンが存在することが明らかとなった。ルテインの適用はまた、２つの眼（番号２及び３）において、強膜縁にオレンジ色跡を、結膜に僅かなオレンジ色着色を起こした。処理の２時間後、角膜にこの着色を示したのは処理眼の半分のみであり（番号５及び８）、この事象は、適用後にエマルジョンが眼に拡散することを示すものであり得る。電流なしの場合、様々な眼組織への送達は観察されなかった。

【００３８】

考察

世界中で６５歳以上の人のおよそ１０％がＡＭＤ疾患に罹患している[19]。様々な試験から、ルテインのＡＭＤ進行の遅延剤としての可能性、及び神経保護分子としての可能性も示されている[13、20～22]。さらに、ルテインは、固有の黄斑指向性を有する眼の天然成分であり、それが先天的に存在する傍中心窩領域に特異的に沈積される[1]。これらの特徴は、ＡＭＤの制御に用いられる現行品に対する利点であり得る。この病態に利用可能である治療は、副作用を有し、患者にとって困難であり、高価である眼内注射を含み、従って、より安全で有効な治療の開発が極めて重要である。この数年の間、多くの研究結果により、硝子体内注射のリスクが強調されてきた。硝子体内注射によって薬物を高頻度で投与する必要があることにより、網膜剥離、眼内炎、及び眼圧上昇が引き起こされ得る。非感染性及び感染性炎症の両方が、硝子体内注射の合併症として報告されている。その使用承認以来、硝子体内注射の比率の高まりと共に、感染性眼内炎の発生率が広く研究されてきた[23、23]。本研究において、本発明者らは、ルテインをｉｎ－ｓｉｔｕで送達するための最小侵襲的技術を初めて試験した。イオントフォレシスは、最小侵襲的方法であるという利点を有し、従って、外科的インプラント術又は頻繁な高用量の硝子体内注射といった困難を回避することでから、より安全であり、患者コンプライアンスの改善がより容易である[12]。実際、様々な前臨床及び臨床試験から、繰り返し行われた眼内イオン

トフォレシス適用の安全性が報告されている[14、25、26]。別の利点は、この方法が、それほど高価ではなく、手術環境の必要がなく、通常の眼の診療予約の過程で、医師の診療所にて素早く行うことができることである。様々な研究が、能動的（active）角膜移植片拒絶反応の管理[27]、ドライアイ疾患の治療[14、28]、非感染性前部ぶどう膜炎[15]、及び円錐角膜疾患[29]を例とするヒトの眼疾患の治療のためのイオントフォレシスの使用を確立した。

【００３９】

本研究では、本発明者らは、荷電分子を眼組織を通って移動させる１０分間にわたる弱電流の適用を含むイオントフォレシスを用いた。イオントフォレシス適用の結果、ルテイン（イオン化薬物）を有するリポソームのエマルジョンが、眼の角膜部を通って浸透した。

【００４０】

本実験は、イオントフォレシス技術によるルテインエマルジョンの眼内送達を明らかに示す有効な概念実証である。

【００４１】

例２－死体眼におけるルテインの眼内送達

物質及び方法

製剤研究．　眼組織中へのより高い浸透のために、負に荷電した粒子よりも正の粒子の方が、イオントフォレシス適用のためのドラッグキャリアとしてのより良好な候補であることが示されている[38]。さらに、電界は、正に荷電した分子を強制的に眼膜（負に荷電）中へと移動させる[39]。本研究では、発明者らは、ヒトの眼に存在する膜が、生理学的ｐＨにおいて負に荷電しており、イオントフォレシス適用によって送達されるべき正に荷電したルテインのエマルジョンの開発に適しているという事実を利用した。ルテインが高い分子量で、親油性であり、水に不溶な分子であることから、修飾を行わずにこのカロテノイドをイオントフォレシスで送達することは、ほぼ不可能である[1]。これを克服するために、ルテイン分子のキャリアとして挙動する正に荷電したリポソーム小胞で製剤を作製した（Ｌｉｐｏ＋）。脂質膜を、ｐｈｏｓｐｈｏｌｉｐｏｎ　９０Ｈ（Ｌｉｐｏｉｄ　ＧｍｂＨ、ロット　５２９４００－２１２００４６－１２－１１２、ＣＡＳ　３０８０６８－１１－３）、オクタデシルアミン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　ロット　ＢＣＢＫ６３４０Ｖ、ＣＡＳ　１２４－３０－１）、結晶ルテイン（Ｋｅｍｉｎ　Ｈｅａｌｔｈ、ＦｌｏｒａＧＬＯ（登録商標）結晶ルテイン　ロット　１４０１１０３３０２）を用いて作製した。４～５Ｌの作製のために、これらの化合物を、５００～８００ｍＬのＣＨＣｌ$_3$／ＭｅＯＨ（１：１　体積／体積）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ロット　ＳＨＢＣ４９８２Ｖ、ＣＡＳ　６７－６６－３／Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ロット　ＳＺＢＣ２３７ＢＶ、ＣＡＳ　６７－５６－１）中に、３０～３５℃に加熱することによって溶解した。表５の製剤組成を参照されたい。溶媒を回転蒸発によって真空除去したが；溶液を、Ｈｅｉｄｏｌｐｈロータリーエバポレーターにより４０℃で真空乾燥し、乾燥薄膜は、１～２時間後に得られた。微量の溶媒をも完全に確実に除去するために、この薄膜を、室温で真空下に少なくとも１６時間置いた。有機溶媒の含有量をガスクロマトグラフィ（ＧＣ）で分析し、２５ｐｐｍ未満であることを確認した。脂質膜の水和を、６５℃で蒸留水（超純水－ＡｑｕａＭａｘによるＭｉｌｌｉＱ－導電率０．０５４ｕＳ／ｃｍ）を脂質膜へ添加することによって行い、大きいリポソーム小胞を形成した。これらの大きいリポソーム小胞のホモジナイゼーションを、Ｉｋａ　Ｗｏｒｋｓ　ＵＬＴＲＡ－ＴＵＲＲＡＸ　Ｔ２５デジタルホモジナイザー（スタウフェン、ドイツ）を２０００～４０００ｒｐｍで用いて達成し、リポソーム小胞のナノサイズ範囲へのサイズ低下は、大型Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ（登録商標）高流体プロセッサーＭ－１１０ＥＨを用いて、５０～６０℃及び１２００バールで押出すことによって行った。このプロセスを５回繰り返した。エマルジョンの滅菌は、１２１℃、１気圧で２０分間行った。滅菌プロセスの後、リポソーム製剤の以下の特性を記録した：ｐＨ（装置Ｍｅｔｔｌｅｒ　Ｔｏｌｅｄｏ　Ｓ２０を用いる）、重量モル浸透圧濃度（Ｏｓｍｏｍａｔ　３０００を用いる）、粒子サイズ及びゼー

タ電位（動的光散乱（ＤＬＳ）、光子相関分光分析法としても知られる－Ｎｉｃｏｍｐ３８０ＤＬＳを用いる。

【００４２】

【表５】

表５．ルテインリポソームエマルジョン組成

組成	% w/w
９０Ｈリン脂質	2.000
オクタデシルアミン	0.007
ルテイン結晶	0.100
蒸留水	100gとなる量

【００４３】

製剤の分光光度分析による評価．　分光光度分析を用いて、Ｌｉｐｏ＋溶液（水又は０．９％　ＮａＣｌによる１：５０希釈）の吸光度及び蛍光特性を測定した。リポソームのみを含む溶液（ルテインなし）を、コントロールとして用いた。各サンプルに対して、吸光度スペクトルを、３００から７５０ｎｍで、蛍光スペクトルを、３７０ｎｍでの励起（吸光度スペクトルの結果から選択）による４８０から６５０ｎｍでトレースした。

【００４４】

粒子サイズ及びゼータ電位．　動的光散乱を用いて、Ｌｉｐｏ＋溶液中の成分のサイズ分布を評価した。電気泳動を行って、溶液のゼータ電位を評価した。

【００４５】

眼内イオントフォレシスデバイス．　眼内イオントフォレシスの原理は、少なくとも１つの生成物を含有する電解質物質に、治療されるべき身体又は器官中に眼の生物学的膜を介してその生成物を輸送する目的で電界を印加することである[1 2]。

【００４６】

典型的なイオントフォレシス装置は、いずれもジェネレータと接続された眼内アプリケータ及びリターン電極の２つのコンポーネントから成る。本実験では、眼内アプリケータは、独立して角膜及び強膜組織を扱う２つの電極を備えていた。眼内アプリケータ（ＯＰＩＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　ＳＡＳ、パリ、フランス）は、ポリウレタン樹脂製であり、角膜に適用される中央円形状リザーバー（直径８ｍｍ、高さ４．５ｍｍ、容積１ｍｌ）及びステンレス鋼電極、並びにそれを取り囲み、強膜（縁周囲の毛様体扁平部領域）に適用される環状リザーバー（内径１２．５ｍｍ、外径１８ｍｍ、高さ４．５ｍｍ、容積１ｍｌ）及びステンレス鋼電極の２つのリザーバーを備えている。各ステンレス鋼電極は、リード線により、異なる定電流ジェネレータに接続した（アノード－陽極）。リターン電極は、各ジェネレータに割り当てられ、それぞれ、視神経（角膜電極用）及び強膜の赤道領域（equator region）（強膜電極用）に取り付けて、各電気回路を独立して閉じた。ジェネレータ（ＩＯＮＯ－２５、Ｉａｃｅｒ　Ｓｒｌ、イタリア）は、定電流タイプで、電流の設定範囲は、０．２５ｍＡ～２．５ｍＡ（０．５ｍＡずつ５段階）であり、時間は、２０ｍＡ・分の合計電流量が給電されるように自動的に調節された。得られた印加電圧は、実験の過程で、２つのマルチメーターで各回路に対して測定した。

【００４７】

死体眼．　異なる健康ドナーからの６つのヒト死体眼球を、ベネトアイバンク（ベネチア　ゼラリーノ、イタリア）から入手した。ヒトの眼は、ヒト組織の使用を伴う研究に関するヘルシンキ宣言のガイドラインに従って用い、死亡の３から１６時間後に摘出し、直ちに、６％デキストランで強化した角膜保存媒体中に４℃で保存した。ドナーの平均年齢は、６３．６±５．９歳であった。平均内皮細胞密度は、２１２５±３８９細胞／ｍｍ^{2}であった。各眼球は、デキストラン強化溶液に浸漬した状態で、５日以内に研究室へ輸送した。４つの眼球に、角強膜イオントフォレシスを施して、０．１％ルテイン点眼液を網膜組織中に送達した。２つの眼球をコントロールとして用い、製剤の非存在下でイオントフォレシスを行った。

【００４８】
眼の調製．　各眼球を、特別に設計されたホルダー中に、上向きに静かに載せた。強膜及び角膜のパッシブ電極を、それぞれ、視神経及び強膜に適用した。実験中の眼の内部の圧力を１５ｍｍＨｇに維持するために、眼を、０．９％塩化ナトリウム溶液を充填した管で液柱型マノメーターに接続した。眼球には、まず、実験中の眼組織及び機構を安定化させるために、１５から４２ｍｍＨｇでのプレコンディショニングを３サイクル施した。このプレコンディショニングにより、各実験の開始時に独特のレファレンス状態を達成すること、並びに角膜及び強膜の厚さを生理学的レベルに回復させることが確実に行われた。プレコンディショニングの後、超音波角膜パキメータ（Ｐａｃｈｍａｔｅ、ＤＧＨ、エクストン、米国）を用いて、中心角膜厚（ＣＣＴ）を測定した。これらのサンプルにおいて、平均ＣＣＴは、５５８±１９μｍであった。

【００４９】
溶液による含浸．　プラスチック槽中のアクティブ電極（カソード）を角膜及び強膜表面に適用した。プラスチック管にフォームを充填し、Ｌｉｐｏ＋に２０分間浸漬した。この予備浸漬処理後、管を静かに眼球の前部表面に適用し、再度２ｍＬのＬｉｐｏ＋溶液を充填した。電流密度を２．５ｍＡに設定し、角膜及び強膜に接続された両方のジェネレータに対して５分間給電した。角強膜イオントフォレシスの後、眼球を、眼ホルダー中、上向きで、眼の内部の圧力１５ｍｍＨｇで８０分間維持した。この間に、経強膜イオントフォレシスによって網膜に到達したルテインは、網膜組織を通して受動的に拡散し、黄斑へ、特に傍中心窩領域へ向かうことができた。本実験で用いた６つの眼のうちの２つは、コントロールとして用いたため、製剤による含浸は行わなかった。

【００５０】
組織の評価．　８０分後、網膜組織を、高解像度二光子イメージングでの使用に支障をきたし得る全体的な損傷を誘発することなく単離した。網膜、脈絡膜、角膜、及び強膜組織の切除は、標準化されたプロトコルを用いて行った[47]。二光子顕微鏡を用いて、網膜の黄斑領域でのルテインの浸透を評価した。眼組織に対する画像取得を開始する前に、ルテインから発せられる二光子蛍光（ＴＰＦ）シグナルを高めるために適用するのに最適なフィルターを知るために、Ｌｉｐｏ＋溶液（０．９％塩化ナトリウム中の０．００５％、０．００２％、及び０．００１％希釈）に対して複数のスタック画像を取得した。フィルター５５０／８０ｎｍ（Ｓｅｍｒｏｃｋ）が、ルテインの実験に最も適していたが（分光光度分析に基づいて）、フィルター５２５／２０ｎｍ（Ｓｅｍｒｏｃｋ）が、シグナル対ノイズ比（ＳＮＲ）という意味で良好な結果を与えることが見出された。従って、眼組織評価に用いた励起は、８３５ｎｍであり、眼組織成分から発せられたＴＰＦ光は、反射光反射のためのノンデスキャン検出器（non-descanned detector）（ＮＤＤ１）によって逆方向に集めた。

【００５１】
共鳴ラマン分光分析．　死体眼におけるヒト網膜へのルテインのイオントフォレシス送達の効果を評価するために、共鳴ラマン散乱を用いた。中心波長４７３．５ｎｍの単一モードレーザー源（５０ｍＷ出力）を励起源として用いて、共鳴ラマン分光分析測定を行った。レンズの組み合わせ及び顕微鏡対物レンズ（ＮＡ＝０．２５）によって、照射された網膜領域が１ｍｍ径となるようにレーザービームの焦点を眼組織上に合わせ、レーザー出力は、ニュートラルフィルターを用いて網膜面で１ｍＷまで低下させた。ラマン散乱光を、光電子増倍管（ＰＭＴ）により、$10 cm^{-1}$のスペクトル解像度及び平均ダークカウントレート８０で集めた。ラマンシグナル強度は、秒あたりの光子カウント（ｃｐｓ）として記録した。測定は、イオントフォレシス送達部位の内側強膜（inner sclera）（すなわち、毛様体の方に向いている角膜縁周囲強膜（perilimbal sclera））；血管アーケード及び視神経乳頭を取り囲む網膜の領域を含む中周辺部網膜：並びに黄斑の３つの網膜領域で行った。測定は、実験及びコントロール眼において正確にデータを推計するのに充分なデータを収集するために、各々の領域全体で４つのエリアにおいて行った。実験の前に、ラマン読み取り値と眼組織の実際のルテイン含有量との間の相関を見つけ出すために、

異なる濃度のルテインを充填した薄い石英キュベットを用いた検量実験を行った。

【００５２】

結果

Ｌｉｐｏ＋分光特性．　本実験では、二光子励起波長を決定するために、Ｌｉｐｏ＋溶液の吸光度及び蛍光スペクトルを最初に取り扱った。吸収スペクトルは、３００から７５０ｎｍでトレースし、図１に示す。Ｌｉｐｏ＋溶液は、３７０ｎｍに吸収ピークを示し、これを、４８０から６５０ｎｍのＬｉｐｏ＋蛍光スペクトルのトレースのための励起波長として用いた（図２）。Ｌｉｐ＋は、５００～５３０ｎｍ及び５４０～５７０ｎｍの２つの蛍光バンドピークを示した。これらの結果に基づいて、二光子実験のために選択したフィルターは、５５０／８８であった。

【００５３】

Ｌｉｐｏ＋物理的特性．　Ｌｉｐｏ＋の正荷電及びサイズを確認するために、イオントフォレシス試験の前に、粒子サイズ及びゼータ電位も特定した。これらの特定は、それぞれ、蒸留水による１：５０　Ｌｉｐｏ＋希釈物に対する動的光散乱及び電気泳動を通して行い、ルテインを含まないリポソーム溶液（コントロールとして）との比較も行った。図３によると、Ｌｉｐｏ＋集合体は、３．５μｍ（平均で）にピークを有し、より小さいピークが３００ｎｍ（平均で）にも見られ、これは、個別のリポソームを示している。また、ゼータ電位特定は、Ｌｉｐｏ＋溶液に対して＋５ｍＶの荷電を示した。

【００５４】

イオントフォレシス適用後の死体眼におけるルテイン分布．　二光子実験のために選択したフィルターは、５５０／８８であったが（これまでの蛍光実験に基づいて）、ルテインリポソーム製剤の初期分析から、５２５／２０フィルターが、ＳＮＲという点でより良好な結果を与えることが明らかとなった。この初期較正において（０．９％ＮａＣｌによる０．００５、０．００２、及び０．００１％Ｌｉｐｏ＋希釈）、リポソームは球状の小胞として観察されており、顕微鏡は正しく較正されていた（データ示さず）。これは、網膜色素細胞が、ルテインと同じ波長で励起する色素であるメラニンを多く含んでいることから、非常に重要なコントロールである。さらに、このコントロールにより、ルテインリポソームと色素とを区別することができる。

【００５５】

イオントフォレシス適用後のヒトの眼におけるルテインを有するリポソームの分布を評価するために、５つの死体眼を、角膜／強膜への２．５ｍＡの電流に５分間暴露し、８０分間放置し（１５ｍｍＨｇの制御された眼内圧力）、眼の様々な構造部：角膜、強膜、脈絡膜、周辺部及び中心部網膜を回収した。リポソームの分布を、二光子顕微鏡（８３５ｎｍで励起）によって評価した。６つ目の死体眼をコントロールとして用い、この眼は、リポソーム製剤と接触させなかった。この場合、８３５ｎｍレーザー照射時にリポソームは検出されず、シグナルは、外来性ルテインに特異的であることが示された（データ示さず）。

【００５６】

様々な眼組織の分析から、組み合わされた角強膜イオントフォレシスの後、製剤による試験眼のすべてにおいて、ルテインは網膜中に豊富に存在し、一方脈絡膜組織中には、ルテインリッチリポソームは見られなかった。

【００５７】

また、網膜を調べた結果から、リポソームが血管を取り囲む組織にしか見られなかったことから、Ｌｉｐｏ＋溶液は、網膜血管壁を透過することができなかった。

【００５８】

前眼部での特定では（強膜及び角膜）、角膜実質又は強膜組織のいずれにもルテインリッチリポソームは見られなかったが、角膜上皮細胞には見られた。

【００５９】

網膜では、網膜の内側部分である神経節細胞よりも、光受容細胞に近い外側部分にルテインをより多く観察することもできた。

【００６０】
脈絡膜の分析から、電流印加後、この領域にリポソームが存在しないことが明らかとなり、これらの結果は、毛様体／毛様体扁平部を介するイオントフォレシスによるルテインの経強膜適用後、ルテインリポソームは、眼膜を通して受動拡散し、中心窩に近い後部網膜に達することを示している。図４は、眼の中でのルテイン経路の模式図を示す。角膜イオントフォレシス適用後の角膜組織の分析から、リポソームが、この組織の上皮細胞上に留まっていることが明らかとなった。
【００６１】
様々な眼組織の共鳴ラマン分光分析も行った。ラマンシグナルは、固有のカロテノイドフルオレセイン及びリポフスチン蛍光に恐らくは由来すると思われる蛍光バックグラウンド上に重なり合った。バックグラウンドシグナルを含まないラマンピーク高さの正確な読み取りを得るために、各測定したスペクトルについて、測定したラマンの線形状の多項式フィッティング（５次まで）により、スペクトル中の重なり合っている可能性のあるノイズスパイクの影響を差し引いた。１５３０ｃｍ－１でのＣ＝Ｃ二重結合シグナルの最終ピーク高さを、ルテインの存在のシグネチャとして選択した。
【００６２】
内側強膜では、処理眼における１５３０ｃｍ－１でのラマンピークは、コントロール眼よりも７倍大きく、無傷の強膜を通しての眼へのルテイン送達におけるイオントフォレシスの効果の証拠が提供される。中周辺部網膜では、処理眼で測定された１５３０ｃｍ－１でのラマンピークは、コントロール眼よりも１．７倍大きく、このことは、イオントフォレシス処理の終了後、大量のルテインが、網膜の後極部に到達したことを示していた。黄斑では、処理眼で測定された１５３０ｃｍ－１でのラマンピークは、コントロールの場合よりも１．３倍大きく、このことは、イオントフォレシスが、黄斑へのルテインの送達に有効であることを示していた。
【００６３】
考察
加齢黄斑変性（ＡＭＤ）は、先進国の５０歳以上の人における不可逆的失明原因の第１位である[40、41]。８００万人を超えるアメリカ人がＡＭＤを有しており、この疾患の全体としての罹患率は、２０２０年までに５０％超増加することが予測されている[37]。いくつかの疫学的研究により、ルテインの補給が、初期段階のＡＭＤ患者における黄斑色素光学密度（ＭＰＯＤ）レベルの増加に繋がることが強調され、黄斑疾患からの保護と関連付けられている[42、21]。実際、ルテインは、網膜中に自然に濃縮されており、そこで、ゼアキサンチンと共に黄斑色素を形成する。青色光フィルターとして作用することで、ルテインは、下にある黄斑中心部の光受容細胞を光化学的損傷から保護することができる[43]。ルテインの抗酸化特性も、黄斑を酸化ストレスから保護し得る[44]。
【００６４】
ＡＭＤの進行を遅延する利用可能なソリューションは、眼内注射又は外科手術に基づいており、裏付けられている副作用、並びに網膜剥離、眼圧上昇、さらには非感染性及び感染性炎症などの合併症の可能性を包含する[23、33]。この研究では、本発明者らは、ヒトの後眼部へのルテインの最小侵襲的ｉｎ　ｓｉｔｕ送達を用いた。イオントフォレシスは、患者コンプライアンスが良好で、高濃度の対象品を網膜に到達するまで様々な眼の層を通して推進するより安全で容易な方法であるという利点を有する。様々な報告から、ドライアイ、非感染性ぶどう膜炎、及び円錐角膜などの様々な疾患の治療のために眼内イオントフォレシスを繰り返し用いた治療の安全性が確立されている[14、15、25、26、28、29]。
【００６５】
本明細書にて、死体眼を前臨床モデルとして用いて、本発明者らは、弱電流を印加して、副作用なしでルテインを眼に推進させた。本発明者らの観察によると、ルテインリポソームは、周辺部網膜及び中心窩に近い中心部網膜に主として沈積されるが、脈絡膜領域には存在しなかった。この観察結果から、経強膜適用後、毛様体／毛様体扁平部を介し、続

いて後部網膜領域に達するまで眼膜を通して受動拡散するというルテインの経路を外挿することが可能である（図４）。本発明者らは、経強膜イオントフォレシスが、ヒトの眼の網膜にルテインを運ぶ有効な方法であり、黄斑色素を強化する新規な方法を提供することを初めて証明した。後部領域に沈積後、ルテインは、受動拡散／タンパク質勾配によって、光受容細胞が存在する網膜の外側部分に到達することができるものと想定される。脈絡膜にルテインが観察されなかった理由は、メッシュサイズが８０～９０ｎｍである神経網膜関門に起因するものであると論ずることができる（リポソームは、３４１ｎｍのサイズであり、時に２～３μｍのクラスターを形成する場合もあり、ルテインリポソームが網膜中にトラップされたままになることが示唆される（図４）[4 5]。重要なことには、共鳴ラマン分光分析から、イオントフォレシス後に、黄斑中のルテイン濃度が上昇することが明らかとなった。この観察結果は、経強膜イオントフォレシスが、黄斑へのルテイン送達の有効な方法であり、ＡＭＤ発症の予防、その進行の予防、及び／又は発症した疾患の治療のための現行の方法に対する妥当な代替法であることを明らかに実証するものである。

【００６６】

角膜イオントフォレシス適用後、角膜実質中にリポソームは存在しなかった。この事実は、ルテインが疎水性であり、角膜実質は７０％の水を含むために非常に親水性であり[4 6]、このことによって、ルテインがこの組織を透過することが不可能であることで説明することができる。

【００６７】

上記の記述及び図面は、本発明の実例としての実施形態を含む。本明細書で述べる上記の実施形態及び方法は、当業者の能力、経験、及び選択に応じて変動し得る。方法の工程の特定の順序での単なる列挙は、方法の工程の順序に関するいかなる限定も構成しない。上記の記述及び図面は、単に本発明を説明し、例証するだけのものであり、請求項がそのように限定されない限りにおいて、本発明はそれに限定されない。本開示を面前に有する当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、それに改変及び変更を行うことができる。

【００６８】

参考文献

1. Kijlstra A., Tian Y., Kelly E. R., Berendschot T. T. 2012. Lutein: more than just a filter for blue light. Prog Retin Eye Res. 31:303-315.

2. Yemelyanov A. Y., Katz N. B., Bernstein P. S. 2001. Ligand-binding characterization of xanthophyll carotenoids to solubilized membrane proteins derived from human retina. Exp Eye Res. 72:381-392.

3. Bone R. A., Landrum J. T., Guerra L. H., Ruiz C. A. 2003. Lutein and zeaxanthin in dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. J Nutr. 133:992-998.

4. Landrum J. T., Bone R. A., JoaH., Kilburn M. D., Moore L. L., Sprague K. E. 1997. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. Exp Eye Res. 65:57-62.

5. Ma L., Lin X. M. 2010. Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. J Sci Food Agric. 90:2-12.

6. Barar J., Javadzadeh A. R., Omidi Y. 2008. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. Expert Opin Drug Deliv. 5:567-581.

7. de la Fuente M., RavinaM., Paolicelli P., Sanchez A., SeijoB., Alonso M. J. 2010. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics. Adv Drug DelivRev. 62: 100-117.

8. Sousa-Martins D., Maia M., MoraesM., Lima-Filho A. A., Rodrigues E. B., Chen J., Farah M. E., Santos L. B., Belfort R., Jr. 2012. Use of lutein and zeaxanthin alone or combined with Brilliant Blue to identify intraocular structures intraoperatively. Retina. 32: 1328-1336.

9. Rodrigues E. B., Costa E. F., Penha F. M., Melo G. B., Bottos J., Dib E., Furlani B., Lima V. C, Maia M., Meyer C. H., Hofling-Lima A. L., Farah M. E. 2009. The use of vital dyes in ocular surgery. Surv Ophthalmol. 54:576-617.
10. Maia M., Furlani B. A., Souza-Lima A. A., Martins D. S., Navarro R. M., Belfort R., Jr. 2014. Lutein: a new dye for chromovitrectomy. Retina. 34:262-272.
11. Badaro E., Furlani B., Prazeres J., Maia M., Lima A. A., Souza- Martins D., Muccioli C, Lucatto L. F., Belfort R., Jr. 2014. Soluble lutein in combination with brilliant blue as a new dye for chromovitrectomy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 252: 1071-1078.
12. Eljarrat-Binstock E., Domb A. J. 2006. Iontophoresis: a non-invasive ocular drug delivery. J Control Release. 110:479-489.
13. Izumi-Nagai K., Nagai N., OhgamiK., Satofuka S., Ozawa Y., TsubotaK., Umezawa K., Ohno S., Oike Y., Ishida S. 2007. Macular pigment lutein is antiinflammatory in preventing choroidal neovascularization. Arterioscler ThrombVasc Biol. 27: 2555-2562.
14. Patane M. A., Cohen A., From S., Torkildsen G., Welch D., Ousler G. W., 3rd. 2011. Ocular iontophoresis of EGP-437 (dexamethasone phosphate) in dry eye patients: results of a randomized clinical trial. Clin Ophthalmol. 5:633-643.
15. Cohen A. E., Assang C, Patane M. A., From S., KorenfeldM., Avion Study I. 2012. Evaluation of dexamethasone phosphate delivered by ocular iontophoresis for treating noninfectious anterior uveitis. Ophthalmology. 119:66-73.
16. Tan C, Xia S., Xue J., Xie J., Feng B., Zhang X. 2013. Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. J Agric Food Chem. 61:8175-8184.
17. French Decree n° 2013-118. 2013 European directive 2010/63/UE. J. Offic. Rep. Fr Text 24 out of 130.
18. ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY (ARVO). 1995. Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.
19. Ratnapriya R., Chew E. Y. 2013. Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update. Clin Genet. 84: 160-166.
20. Age-Related Eye Disease Study 2 Research G. 2013. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2
(AREDS2) randomized clinical trial. JAMA. 309:2005-2015.
21. Richer S., Stiles W., StatkuteL., Pulido J., Frankowski J., Rudy D., Pei K., Tsipursky M., Nyland J. 2004. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). Optometry. 75:216-230.
22. Zhao L., Sweet B. V. 2008. Lutein and zeaxanthin for macular degeneration. Am J Health Syst Pharm. 65: 1232-1238.
23. Simunovic M. P., Rush R. B., Hunyor A. P., Chang A. A. 2012. Endophthalmitis following intravitreal injection versus endophthalmitis following cataract surgery: clinical features, causative organisms and post-treatment outcomes. Br J Ophthalmol. 96:862-866.
24. Irigoyen C, ZiahosseiniK., Morphis G., StapplerT., Heimann H. 2012. Endophthalmitisfollowing intravitreal injections. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 250: 499-505.
25. Patane M. A., Schubert W., Sanford T., Gee R., Burgos M., Isom W. P., Ruiz-Perez B. 2013. Evaluation of ocular and general safety following repeated dosing

of dexamethasone phosphate delivered by transscleraliontophoresis in rabbits. J Ocul PharmacolTher. 29:760-769.
26. Patane M. A., Cohen A., Assang C, From S. 2010. Randomized, double-masked study of EGP-437 in subjects with non-infectious anterior segment uveitis. Poster presented at: American Academy of Ophthalmology annual meeting.
27. Halhal M., Renard G., Courtois Y., BenEzraD., Behar-Cohen F. 2004. Iontophoresis: from the lab to the bed side. Exp Eye Res. 78:751-757.
28. Horwath-Winter J., SchmutO., Haller-Schober E. M., Gruber A., Rieger G. 2005. Iodide iontophoresis as a treatment for dry eye syndrome. Br J Ophthalmol. 89: 40-44.
29. Arboleda A., Kowalczuk L., Savoldelli M., Klein C, Ladraa S., Naud M. C, Aguilar M. C, Parel J. M., Behar-Cohen F. 2014. Evaluating in vivo delivery of riboflavin with coulomb-controlled iontophoresis for corneal collagen cross-linking: a pilot study. Invest OphthalmolVis Sci. 55:2731-2738.
30. Lim L. S., Mitchell P., Seddon J. M., Holz F. G., Wong T. Y. Age-related macular degeneration. The Lancet. 379: 1728-1738.
31. de Jong P. T. V. M. 2006. Age-Related Macular Degeneration. New England Journal of Medicine. 355: 1474-1485.
32. Jager R. D., Mieler W. F., Miller J. W. 2008. Age-Related Macular Degeneration. New England Journal of Medicine. 358:2606-2617.
33. Irigoyen C, ZiahosseiniK., Morphis G., StapplerT., Heimann H. 2012. Endophthalmitisfollowing intravitreal injections. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 250: 499-505.
34. Ozawa Y., Sasaki M., Takahashi N., Kamoshita M., Miyake S., Tsubota K. 2012. Neuroprotective effects of lutein in the retina. CurrPharm Des. 18:51-56.
35. Sasaki M., Ozawa Y., KuriharaT., Noda K., Imamura Y., Kobayashi S., Ishida S., TsubotaK. 2009. Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50: 1433-1439.
36. Woo T. T., Li S. Y., Lai W. W., Wong D., Lo A. C. 2013. Neuroprotective effects of lutein in a rat model of retinal detachment. Graefes Arch ClinExp Ophthalmol. 251:41-51.
37. Friedman D. S., O'ColmainB. J., Munoz B., Tomany S. C, McCarty C, de Jong P. T., Nemesure B., Mitchell P., KempenJ., Eye Diseases Prevalence Research G. 2004. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. Arch Ophthalmol. 122:564-572.
38. Eljarrat-Binstock E., Orucov F., Aldouby Y., Frucht-Pery J., Domb A. J. 2008. Charged nanoparticles delivery to the eye using hydrogel iontophoresis. J Control Release. 126:156-161.
39. Gungor S., Delgado-Charro M. B., Ruiz-Perez B., Schubert W., Isom P., Moslemy P., Patane M. A., Guy R. H. 2010. Trans-scleral iontophoretic delivery of low molecular weight therapeutics. J Control Release. 147:225-231.
40. Pascolini D., Mariotti S. P., Pokharel G. P., Pararajasegaram R., Etya'ale D., Negrel A. D., Resnikoff S. 2004. 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. Ophthalmic Epidemiol. 11:67-115.
41. Congdon N., O'ColmainB., Klaver C. C, Klein R., Munoz B., Friedman D. S., Kempen J., Taylor H. R., Mitchell P., Eye Diseases Prevalence Research G. 2004. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. Arch Ophthalmol. 122:477-485.
42. Seddon J. M., Ajani U. A., SperdutoR. D., Hiller R., Blair N., Burton T. C,

Farber M. D., GragoudasE. S., Haller J., Miller D. T., et al. 1994. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. JAMA. 272:1413-1420.
43. van de Kraats J., Kanis M. J., Genders S. W., van NorrenD. 2008. Lutein and zeaxanthin measured separately in the living human retina with fundus reflectometry. Invest Ophthalmol Vis Sci. 49:5568-5573.
44. Barker F. M., 2nd, SnodderlyD. M., Johnson E. J., Schalch W., Koepcke W., Gerss J., Neuringer M. 2011. Nutritional manipulation of primate retinas, V: effects of lutein, zeaxanthin, and n-3 fatty acids on retinal sensitivity to blue-light-induced damage. Invest Ophthalmol Vis Sci. 52:3934-3942.
45. Cunha-Vaz J., Bernardes R., Lobo C. 2011. Blood-retinal barrier. Eur J Ophthalmol. 21 Suppl 6:S3-9.
46. Prausnitz M. R., Noonan J. S. 1998. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. J Pharm Sci. 87:1479-1488.
47. www.jove.com/video/3765

【図１】

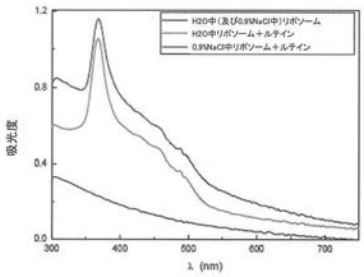

図1

【図２】

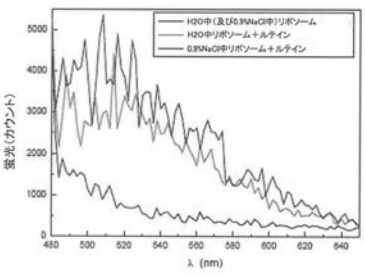

図2

【図３】

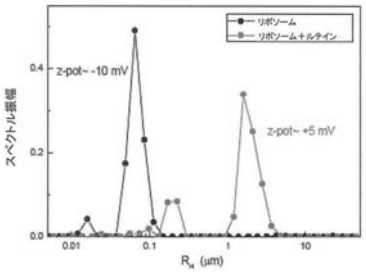

図3

【図４】

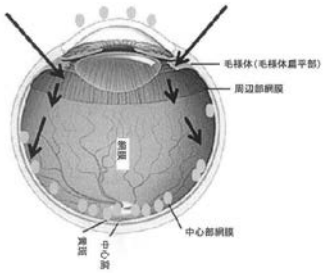

図4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/67125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61M 31/00; A61N 1/30; C07C 403/24 (2016.01)
CPC - A61M 31/00; A61F 9/00; A61N 1/30; C07C 403/24
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)
IPC(8) - A61M 31/00; A61N 1/30; C07C 403/24 (2016.01)
CPC - A61M31/00; A61F9/00; A61N1/30; C07C403/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Patents and NPL (classification, keyword; search terms below)
USPC - 604/521; 604/501; 604/294

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase (AU BE BR CA CH CN DE DK EP ES FI FR GB IN JP KR SE TH TW US WO), PubWest, Google Web
search terms: iontophoresis drug delivery carotenoid lutein zeaxanthin age-related macular degeneration disease dysfunction ocular eye intraocular liposome zeta potential

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2010/0093648 A1 (Cruz) 15 April 2010 (15.04.2010), para [0015]-[0016], [0096], [0106], [0123], [0168], [0194]	1-9
Y	US 2003/0181531 A1 (Sherris et al.) 25 September 2003 (25.09.2003), para [0053], [0067], [0146]-[0147]	1-9
Y	US 2010/0034749 A1 (Schulze et al.) 11 February 2010 (11.02.2010), para [0040]	4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
23 May 2016 (23.05.2016)	09 JUN 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

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,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100120112
弁理士 中西 基晴
(74)代理人 100133765
弁理士 中田 尚志
(72)発明者 デ・ソウザ・マーティンズ, ジオゴ
ブラジル国サン・パウロ ０１４０４－０００, ジャルディン・パウリスタ, アーペー １１ ５５７, アラメダ・カンピナス
(72)発明者 ロワ, ピエール
フランス国 ７５０１９ パリ, パサージュ・デュ ８
(72)発明者 カヴァッロ, ジョヴァンニ
イタリア国 ００１２２ ローマ, ヴィア・デル・タルタネ ４５
(72)発明者 フォシーニ, フルヴィオ
イタリア国 ００１２４ ローマ, ヴィア・ピローン ９／１１

Ｆターム(参考) 4C076 AA19 AA95 BB24 CC10 DD49 DD63 FF34
4C084 AA17 MA24 MA58 NA11 NA13 ZA331
4C206 AA01 AA02 CA13 KA01 KA18 MA01 MA04 MA44 NA11 NA13
ZA33