

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7377562号  
(P7377562)

(45)発行日 令和5年11月10日(2023.11.10)

(24)登録日 令和5年11月1日(2023.11.1)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 36/30 (2006.01)	A 6 1 K 36/30
A 6 1 K 36/15 (2006.01)	A 6 1 K 36/15
A 6 1 K 35/644 (2015.01)	A 6 1 K 35/644
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 K 36/18
A 6 1 K 36/14 (2006.01)	A 6 1 K 36/14

請求項の数 2 (全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-523021(P2021-523021)	(73)特許権者	512081166 イエディテペ・ウニヴェルシテシ Y E D I T E P E U N I V E R S I T E S I トルコ34755イスタンブール、カド ウキョイ、アグストス・イエレスミ、イ ノヌ・マハッレシ・カイスダギ・ジャッ デシ26番
(86)(22)出願日	平成31年1月9日(2019.1.9)	(74)代理人	100120891 弁理士 林 一好
(65)公表番号	特表2022-505933(P2022-505933 A)	(74)代理人	100165157 弁理士 芝 哲央
(43)公表日	令和4年1月14日(2022.1.14)	(74)代理人	100205659 弁理士 齋藤 拓也
(86)国際出願番号	PCT/TR2019/050019	(74)代理人	100126000
(87)国際公開番号	WO2020/091703		
(87)国際公開日	令和2年5月7日(2020.5.7)		
審査請求日	令和3年12月28日(2021.12.28)		
(31)優先権主張番号	2018/16367		
(32)優先日	平成30年11月1日(2018.11.1)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	トルコ(TR)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 乾癬の治療のための医薬及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

獣脂800～1000g、カラマツ樹脂250～350g、蜜蝋450～550g、マスティックガム2～3g、プロポリス40～50g、アルカンナ・ティンクトリア200～250g、ミョウバン200～250g、及びジュニパータール150～200gを含むことを特徴とする乾癬の治療のための経口投与用医薬。

【請求項2】

請求項1に記載の乾癬の治療のための経口投与用医薬の製造方法であって、前記獣脂を前記蜜蝋と連続的に混合することにより、前記獣脂を300で溶融させる工程と、  
得られた溶融混合物に、まず前記マスティックガムを加え、次に前記プロポリスを加える工程と、  
粉碎したカラマツ樹脂をミョウバンと一緒に前記混合物に加える工程と、  
最後に、粉碎したアルカンナ・ティンクトリア及びジュニパータールを前記混合物に加える工程と、  
連続的な混合によって、均質な混合物を得る工程と、  
前記均質な混合物を濾過する工程と、  
溶出物の形態の最終生成物である前記乾癬の治療のための経口投与用医薬を得る工程とを備えることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、乾癬の治療のために開発された医薬及びその製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

乾癬は、赤みを帯びた基底部に白みを帯びた皮膚の発疹を特徴とする全身性の炎症性疾患である。乾癬は、主に膝及び肘に見られ、患者に強い痒みを引き起こす。非感染性疾患である乾癬の原因は明らかではないが、身体の生体防御機構が機能しない場合に、ストレス要因が乾癬に対する誘発効果を有することが知られている。

## 【0003】

2008年に、性器疣贅の治療に外用されるイミキモド(IMQ)を活性成分とするクリーム(Aldara(アルダラ)はイミキモドを5%含有する。商品名)がヒトに乾癬様の病変を誘発する副作用を有するということが観察されたこと、及びマウスに対しても同じ効果が認められたことで、このクリームが注目されるようになった[非特許文献1]。IMQはToll様TLR7及びTLR8受容体に結合し、免疫賦活剤として全身の炎症経路を活性化するため、マウスに外用すると全身性の反応が生じ、乾癬が形成されることが研究により明らかにされている[非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6]。現在では、乾癬の前臨床試験の効率化と標準化のために、マウスモデルにおいて6つの主要なポイントを病理組織学的及び免疫組織化学的に示すことが決められている。それらは以下の通りである。

1. 表皮角化細胞の過剰増殖及び表皮の分化の変化を観察する、
2. パピローマの発生、
3. T細胞、樹状細胞、マクロファージ及び好中球の浸潤、
4. T細胞の機能的役割を観察する、
5. 真皮の血管形成の変化、及び
6. この疾患に対する薬剤への反応を示す能力。

## 【0004】

現在、この6つのポイントを満たす理想的な前臨床モデルとして、IMQ誘導マウスモデルが用いられている。

## 【0005】

乾癬を完全に治す治療法はまだないが、皮膚科医は様々な薬物を用いて乾癬をコントロールしようとしている。近年使用され始めた皮下免疫剤は、重篤な副作用(免疫抑制、毒性等)、入院やフォローアップの困難さ、深刻なコスト、疾患の再発を防ぐことができないなどの理由から、残念ながらこの疾患の治療において一般的で好ましい選択肢とはなっていない[非特許文献7]。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0006】

【文献】Walter, A., Schaefer, M., Cecconi, V., Matter, C., Urosevic-Maiwald, M., Belloni, B., Schoenewolf, N., Dummer, R., Bloch, W., Werner, S., Beer, H.D., Knuth, A.及びvan den Broek, M., 2013. Nature Communications, 4, 1560

【文献】Nadeem, A., Al-Harbi, N.O., Al-Harbi, M.M., El-Sherbeeny, A.M., Ahmad, S.F., Siddiqui, N., Ansari, M.A., Zoheir, K.M., Attia, S.M., Al-Hosaini, K.A.及びAl-Sharary, S.D., 2015. Pharmacological Research, 99, 248-257

【文献】Arora, N., Shah, K.及びPandey-Rai, S., 2016. Protoplasma, 253(2), 503-515

10

20

30

40

50

【文献】Chen, H. H., Chao, Y. H., Chen, D. Y., Yang, D. H., Chung, T. W., Li, Y. R. 及び Lin, C. C., 2016. International immunopharmacology, 33, 70 - 82

【文献】Di, T. T., Ruan, Z. T., Zhao, J. X., Wang, Y., Liu, X., Wang, Y. 及び Li, P., 2016. International immunopharmacology, 32, 32 - 38

【文献】Jia, H. Y., Shi, Y., Luo, L. F., Jiang, G., Zhou, Q., Xu, S. Z. 及び Lei, T. C., 2016. International journal of molecular medicine, 37(2), 359 - 368

【文献】Krueger, J. G. 及び Bowcock, A., 2005. Ann Rheum Dis, 64, i130

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、乾癬の治療のための薬物製剤を開発することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の目的を達成するために開発された「乾癬の治療のための医薬及びその製造方法」は、添付の図に示されている。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、表皮の厚さのグラフ表示である。

【図2】図2は、リンパ球増殖の分析のグラフ表示である。

【図3】図3は、リンパ球の培養における制御性T細胞の分析のグラフ表示である。

【図4】図4は、脾臓对身体の重量の比率のグラフ表示である。

【図5】図5は、実験期間中の耳の厚さの変化のグラフ表示である。

【図6】図6は、実験期間中の皮膚の赤みの変化のグラフ表示である。

【図7】図7は、実験期間中の皮膚の厚さの変化のグラフ表示である。

【図8】図8は、実験期間中の皮膚上のプラーク形成の変化のグラフ表示である。

【図9】図9は、実験期間中のトータルの乾癬面積及び重症度指標 (Psoriasis Area Severity Index, PASI) の変化のグラフ表示である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の乾癬医薬は、獣脂800～1000g、カラマツ樹脂250～350g、蜜蝋450～550g、マスティックガム2～3g、プロポリス40～50g、アルカンナ・ティンクトリア (Alkanna tinctoria) 200～250g、ミョウバン200～250g、及びジュニパータール150～200gを含む。本発明の乾癬医薬の製造方法は、

- ・獣脂を蜜蝋と連続的に混合することにより、300 で獣脂を溶融させる工程と、
- ・得られた溶融混合物に、まずマスティックガムを加え、次にプロポリスを加える工程と、
- ・粉碎したカラマツ樹脂をミョウバンと一緒に上記混合物に加える工程と、
- ・最後に、粉碎したアルカンナ・ティンクトリア及びジュニパータールを上記混合物に加える工程と、
- ・連続的な混合によって均質な混合物を得る工程と、
- ・上記均質な混合物を濾過する工程と、
- ・溶出物の形態の最終生成物である乾癬の治療のための医薬を得る工程とを備える。

【0011】

本発明の好ましい実施形態では、得られた溶出物は、病変が観察される乾癬患者の皮膚の表面にそれを広げることにより、軟膏として施用される。

【実施例】

【0012】

実験による研究

マウスにおける乾癬のモデル化及び当該薬物の施用

8～11週齢の成体の雄BALB/cマウスの背部と右耳の剃毛部に、イミキモド（IMQ）を5%含有するAldaraという名称のクリーム（Meda Pharma（メダ・ファーマ）、3M Health Care（スリーエム・ヘルスケア））を1日1回、6日間塗布し、1匹あたり1日あたり合計62.5mgのクリームを塗布することで、この動物モデルにおいて乾癬の炎症を起こさせた。対照群の動物は、剃毛した部分にワセリンを塗布した。陽性対照群には、Mtx（メトトレキサート）を1日1mg/kg経口投与した。実験中は、上記薬物を1日1回、5mg/kgの用量で経口投与した。当該薬物の半治療効果を検証する群の動物への当該薬物の投与は、IMQによる乾癬の誘発開始から1日後に開始し、実験期間終了まで継続した。体重、並びに皮膚の赤み、白点形成（剥がれ）及び肥厚を毎日測定し、乾癬面積及び重症度指標（PASI）に従ってスコア化して、動物の全般的な健康状態及びIMQによる乾癬の誘発をモニターした。モデルで必要とされるように、右耳の皮膚の肥厚も実験開始日から定期的に記録した。

10

【0013】

施用終了時に、動物をイソフルランで麻酔した後、頸椎脱臼により安楽死させた。脾臓組織のサイズ及び重量を記録した。

20

【0014】

表皮の厚さの分析

解剖後にマウスのIMQ処置した背部から採取した皮膚試料をホルマリン中で固定し、パラフィンブロックを調製した。各動物から等間隔で厚さ10ミクロン（10μm）の切片を10枚採取した。この切片をマッソントリクローム（Masson Trichrome）で染色し、顕微鏡で撮影した。表皮の厚さは、各切片につき5箇所を得た測定値の平均をとって算出した。

【0015】

脾臓組織からのTリンパ球の単離、染色及び刺激

解剖後、RPMI培地を入れたシャーレの中で脾臓組織をメスで小分けにした後、その脾臓組織をパスツールピペットで十分に粉碎し、崩壊させないように洗浄した。この細胞懸濁液を70μmのフィルタに通した後、その細胞懸濁液をPBSに取り込み、2000rpmで10分間遠心分離した。沈殿した細胞を、0.037g/L EDTA、1g/L 炭酸水素カリウム及び8.29g/L 塩化アンモニウムを含む滅菌済み溶解液に溶解し、室温で10分間インキュベートした。800rpmで10分間遠心分離して得られた上清をPBSに溶解し、2000rpmで10分間遠心分離した。沈殿した細胞を10mlのcRPMI培地に溶解し、細胞数を測定した。

30

【0016】

染色のため、単離した細胞にCFSEを載せた。これ以降のプロセスは、暗所環境下で行った。次いで+4で6分間インキュベートした細胞をcRPMIに入れ、2000rpmで5分間遠心分離した。沈殿した細胞にcRPMIを加え、再び1200rpmで5分間遠心分離した。沈殿した細胞をcRPMI培地に再懸濁し、細胞数を測定した。各ウェルに55×10<sup>5</sup>個の細胞を播種した。このリンパ球をCD3及びCD28で刺激した。培養液を37のインキュベーターに3日間置いた。

40

【0017】

リンパ球の増殖分析

単離したリンパ球を、48ウェルプレートの各ウェルに、1ウェルあたり5×10<sup>5</sup>細胞の濃度で散布した。CFSEで染色したリンパ球を、増殖解析のために3日間培養した。各群のリンパ球細胞の非刺激培養と抗CD3+CD28（CDmix）刺激培養を行っ

50

た。3日目に、リンパ球細胞の増殖分析をフローサイトメトリーで調べた。CFSE蛍光染色は、フローサイトメトリーにおいてFL-1で表示することができる。分析後、T細胞の増殖を刺激の有無で比較した。

#### 【0018】

##### リンパ球培養液における制御性T細胞の分析

単離したリンパ球細胞を3日間培養した後、 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 細胞数を調べた。ウェル内でピペティングにより細胞を均一に解した後、この均一な溶液から細胞を取り出し、フローチューブに入れた。この細胞にPBSを加え、その細胞を、1200rpmで5分間遠心分離した。CD4とCD25をチューブに加えてボルテックスし、暗所にて室温で20分間インキュベートした。その後、染色用緩衝液を加え、250gで10分間遠心分離した。沈殿した細胞にFoxP3緩衝液を加えてそれらをボルテックスし、暗所にて室温で10分間インキュベートした。その後、この細胞を500gで5分間、遠心分離した。沈殿した細胞に染色用緩衝液を加え、ボルテックスした後、500gで5分間遠心分離した。沈殿した細胞にFoxP3緩衝液Cを加え、それらをボルテックスして、暗所にて室温で30分間インキュベートした。その後、染色用緩衝液を加え、500gで5分間遠心分離した。沈殿した細胞に対して、このプロセスをもう一回繰り返した。その後、FoxP3抗体を加え、ゆっくりとボルテックス処理を行った。それらを暗所にて室温で30分間インキュベートした後、染色用緩衝液を加え、500gで5分間遠心分離した。沈殿した細胞に染色用緩衝液を加え、それらをフローサイトメトリー装置で分析した。

#### 【0019】

文献では、乾癬に伝統的な方法で調製された薬剤を使用していることが頻繁に見られる[3]。とりわけ中国やインドの医学では、ある種のハーブ混合物が何世紀にもわたってこの分野で使用されてきた。最近では、これらの伝統的な薬物がコントロールされた前臨床研究で試験されていることが観察されている。その重要な理由は、乾癬におけるエビデンスに基づく医療の実践に広く好まれるようになった、標準化されたIMQ-マウスモデルの使いやすさにある。乾癬や類似の皮膚疾患に伝統的に使用されるこれらのハーブ化合物の化学的挙動を調べると、これらの混合物の強い抗炎症特性が際立っている。これらの抗炎症性の全身的特徴は、前臨床及び臨床の両方の組織病理学において、限られた数ではあるが、有望なポジティブなデータを示す[3]。本発明者らは、IMQ-マウスモデルに対して文献上の試料と同様の方法で試験することにより、乾癬の治療のために開発され上記の製剤で調製された薬物が乾癬の病態生理に有効であることを示した。

#### 【0020】

本生成物の活性は、本発明の開発中に作成されたグラフ表示によって実証することができる。

#### 【0021】

図1。マウスに対して行った実験では、IMQを投与した皮膚から採取した試料に対して行った測定において、当該薬剤投与の結果、対照群と比較して表皮の厚さに有意な減少が認められた。この減少は、MTXを投与したマウスに比べてより有意であると報告された。

#### 【0022】

図2。リンパ球の増殖は乾癬の病態と一致している。当該薬物投与マウスにおける細胞増殖は、IMQ投与及びMTX投与のマウスに比べて有意に減少することが認められた。

#### 【0023】

図3。制御性T細胞分析を行ったリンパ球培養液では、 $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ 細胞の数がIMQ投与マウスよりも当該薬物投与マウスの方が多いことが見出された。

#### 【0024】

図4。身体/脾臓の重量指標では、各群間に有意差は認められなかった。

#### 【0025】

10

20

30

40

50

図5。実験期間中、マウスの耳のIMQ投与部位で行った測定の結果、ワセリン塗布群では変化が検出されなかったのに対し、他の群では肥厚が起こったが、各群間に有意な差は認められなかった。

【0026】

図6。マウスの背部のIMQ投与部位の赤みのPASIスコア評価によれば、当該薬物投与マウスでは6日目に赤みが減少していることが確認された。マウスの背部のIMQ投与部位の厚さPASIスコア評価によれば、MTX群(5日目)、薬物群(4日目)ともに厚さが減少していると判定された。

【0027】

図7。マウスの背部のIMQ投与部位のプラーク形成PASIスコア評価によれば、4日目の時点でMTX群、薬物群ともに鱗屑が減少していることが認められた。

10

【0028】

図8。トータルPASIスコアの評価によれば、MTX群、薬物群ともに4日目の時点で減少が認められた。

【0029】

#### 参考文献一覧

[1]. Walter, A., Schaefer, M., Cecconi, V., Matter, C., Urosevic-Maiwald, M., Belloni, B., Schoenewolf, N., Dummer, R., Bloch, W., Werner, S., Beer, H.D., Knuth, A. 及び van den Broek, M., 2013. Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nature Communications*, 4, 1560.

20

[2]. Nadeem, A., Al-Harbi, N.O., Al-Harbi, M.M., El-Sherbeeney, A.M., Ahmad, S.F., Siddiqui, N., Ansari, M.A., Zoheir, K.M., Attia, S.M., Al-Hosaini, K.A. 及び Al-Sharary, S.D., 2015. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation is suppressed by BET bromodomain inhibitor in mice through RORC/IL-17A pathway modulation. *Pharmacological Research*, 99, 248-257.

30

[3]. Arora, N., Shah, K. 及び Pandey-Rai, S., 2016. Inhibition of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice by herbal extracts from some Indian medicinal plants. *Protoplasma*, 253(2), 503-515.

[4]. Chen, H.H., Chao, Y.H., Chen, D.Y., Yang, D.H., Chung, T.W., Li, Y.R. 及び Lin, C.C., 2016. Oral administration of acarbose ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in a mouse model. *International immunopharmacology*, 33, 70-82.

40

[5]. Di, T.T., Ruan, Z.T., Zhao, J.X., Wang, Y., Liu, X., Wang, Y. 及び Li, P., 2016. Astilbin inhibits Th17 cell differentiation and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice via Jak3/Stat3 signaling pathway. *International immunopharmacology*, 32, 32-38.

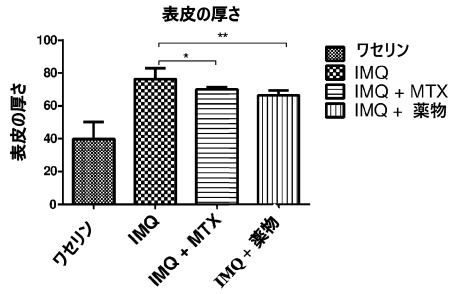
50

[ 6 ] . J i a , H . Y . , S h i , Y . , L u o , L . F . , J i a n g , G . , Z h o u , Q . , X u , S . Z . 及 び L e i , T . C . , 2 0 1 6 . A s y m m e t r i c s t e m - c e l l d i v i s i o n e n s u r e s s u s t a i n e d k e r a t i n o c y t e h y p e r p r o l i f e r a t i o n i n p s o r i a t i c s k i n l e s i o n s . I n t e r n a t i o n a l j o u r n a l o f m o l e c u l a r m e d i c i n e , 3 7 ( 2 ) , 3 5 9 - 3 6 8 .

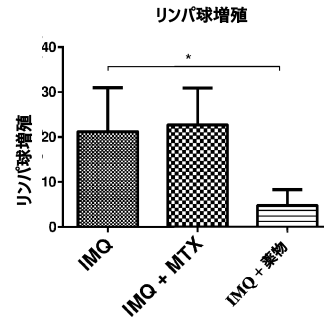
[ 7 ] . K r u e g e r , J . G . 及 び B o w c o c k , A . , 2 0 0 5 . P s o r i a s i s P a t h o p h y s i o l o g y : C u r r e n t C o n c e p t s o f P a t h o g e n e s i s . A n n R h e u m D i s , 6 4 , i 1 3 0 .

【 図 面 】

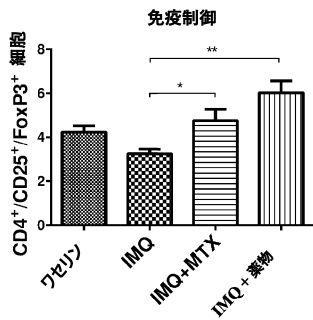
【 図 1 】



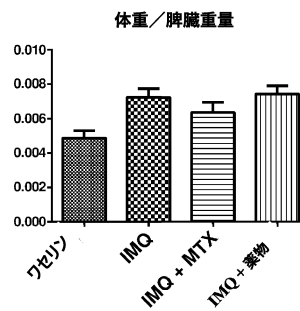
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



10

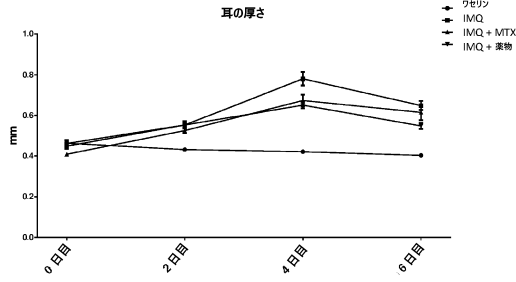
20

30

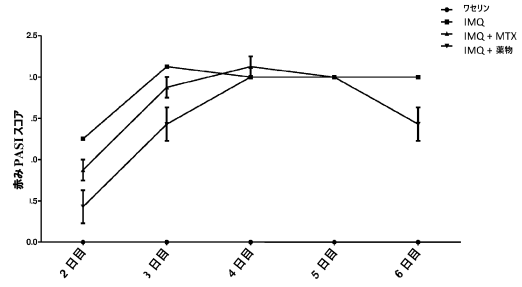
40

50

【 図 5 】

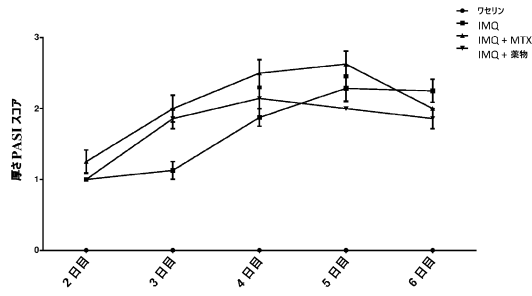


【 図 6 】

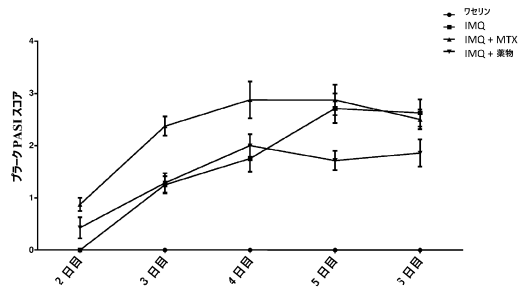


10

【 図 7 】

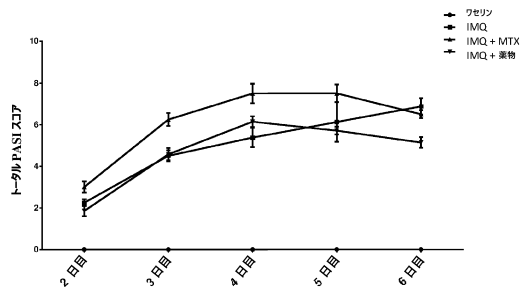


【 図 8 】



20

【 図 9 】



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 33/06 (2006.01) A 6 1 K 33/06  
 A 6 1 K 35/12 (2015.01) A 6 1 K 35/12  
 A 6 1 P 17/06 (2006.01) A 6 1 P 17/06  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 2 1

弁理士 岩池 満

(74)代理人 100185269

弁理士 小菅 一弘

(72)発明者 サヒン フィクレッティン

トルコ国 イスタンブール アグストス イェレスミ イノヌ マハッレシ カイスダギ キャッデシ 2 6

(72)発明者 カサボグル ブルク

トルコ国 3 4 7 5 5 イスタンブール アグストス イェレスミ イノヌ マハッレシ カイスダギ  
 キャッデシ 2 6 イェディテペ ウニヴェルシテシ ムヘンディスリク ファクルテシ ジェネティク  
 ヴェ ビヨムヘンヘンディスリク ボルム

(72)発明者 ターケル セスリ ネザケット

トルコ国 イスタンブール アグストス イェレスミ イノヌ マハッレシ カイスダギ キャッデシ 2 6

(72)発明者 サフバズ シグデム ディレク

トルコ国 イスタンブール シシュリ テスヴィキイエ エムエイチ . ニサントシ - イフラムール  
 ヨル エスケ . イハラムール パラス アパートメント ナンバー : 4 7 カット : 3 ディー : 1 1

(72)発明者 ターグト センギズ

トルコ国 バイブルト アサギ キラトリ コユ ナンバー : 4 メルケズ

審査官 横田 倫子

## (56)参考文献

特表平 0 4 - 5 0 1 4 1 5 ( J P , A )  
 特開昭 6 3 - 2 8 4 1 3 1 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 3 - 5 1 5 6 1 5 ( J P , A )  
 中国特許出願公開第 1 0 7 0 9 5 9 0 0 ( C N , A )  
 独国特許出願公開第 0 4 2 3 6 3 4 6 ( D E , A 1 )  
 独国実用新案第 2 0 2 0 0 5 0 0 9 8 1 3 ( D E , U 1 )  
 中国特許出願公開第 1 0 4 6 2 3 3 0 7 ( C N , A )  
 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 3 9 9 9 2 ( U S , A 1 )  
 特開昭 5 6 - 0 5 9 7 1 0 ( J P , A )  
 特開昭 5 2 - 0 4 4 2 4 2 ( J P , A )  
 中国特許出願公開第 1 5 4 3 9 9 5 ( C N , A )  
 国際公開第 2 0 1 4 / 0 7 1 4 2 6 ( W O , A 1 )  
 特開 2 0 0 1 - 0 1 0 9 4 5 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 8 - 5 3 4 6 1 4 ( J P , A )  
 中国特許第 1 0 7 0 9 5 9 0 0 ( C N , B )

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 6 / 0 0  
 A 6 1 K 3 5 / 0 0  
 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 )