

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6464277号
(P6464277)

(45) 発行日 平成31年2月6日(2019.2.6)

(24) 登録日 平成31年1月11日(2019.1.11)

(51) Int. Cl.	F 1	
A 6 1 K 31/541 (2006.01)	A 6 1 K 31/541	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
請求項の数 5 (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-543688 (P2017-543688)	(73) 特許権者	510058863
(86) (22) 出願日	平成27年11月3日(2015.11.3)		ザ カトリック ユニバーシティ オブ
(65) 公表番号	特表2017-535604 (P2017-535604A)		コリア インダストリー-アカデミック
(43) 公表日	平成29年11月30日(2017.11.30)		コーオペレーション ファウンデーション
(86) 国際出願番号	PCT/KR2015/011691		大韓民国 06591 ソウル, ソチョー
(87) 国際公開番号	W02016/072692		グ, バンポードロ 222
(87) 国際公開日	平成28年5月12日(2016.5.12)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成29年5月2日(2017.5.2)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	10-2014-0151255	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成26年11月3日(2014.11.3)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100133400
(31) 優先権主張番号	10-2015-0152916		弁理士 阿部 達彦
(32) 優先日	平成27年11月2日(2015.11.2)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ネクロックスを有効成分として含有する粘膜炎予防又は治療用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ネクロックス-7 (NecroX-7)、薬学的に許容されるその塩を有効成分として含有する粘膜炎予防又は治療用薬学組成物。

【請求項 2】

前記粘膜炎は、放射線療法により誘発されるものである、請求項 1 に記載の粘膜炎予防又は治療用薬学組成物。

【請求項 3】

前記粘膜炎は、化学療法により誘発されるものである、請求項 1 に記載の粘膜炎予防又は治療用薬学組成物。

【請求項 4】

ネクロックス-7 (NecroX-7)、薬学的に許容されるその塩を有効成分として含有する粘膜炎予防又は改善用食品組成物。

【請求項 5】

前記粘膜炎は、放射線療法又は化学療法により誘発されるものである、請求項 4 に記載の粘膜炎予防又は改善用食品組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ネクロックスを有効成分として含有する粘膜炎予防又は治療用組成物に関する

。

【背景技術】

【0002】

粘膜炎は、主に癌患者を対象とする放射線療法及び化学療法により発生する副作用であって、粘膜又は消化管を覆っている粘膜内層に炎症が発生した状態を意味する。

【0003】

粘膜炎の症状は、細胞致死により粘膜内層が薄くなり、剥がれ、炎症が生じ、潰瘍が発生するものである。このよう病変は、極めて苦しくて、食道、胃、小腸、大腸及び直腸を含んで、口腔から肛門までの消化管内の部位で発生し得る。粘膜炎の発生は、患者の生活の質を低下させる。粘膜炎による口腔内の深刻な痛みは、不十分な栄養摂取につながり、免疫機能の低下を誘発する。甚だしくは、癌治療を中断しなければならない深刻な状況に至る。しかしながら、現在使用されている治療方法は、粘膜炎を効果的に予防し、克服可能な接近方法が不足な実情である。

10

【0004】

ネクロックス (NecroX) は、LG生命科学で開発したミトコンドリアに特異的な細胞壊死抑制剤であって、毒素やストレスによる細胞死の抑制効果、細胞生存能力の増大効果、抗酸化効果を同時に示す革新的な物質として注目されている。ネクロックスは、ヒト肺線維芽細胞 (LB-HEL cell) に低温損傷を24時間加えた後、ネクロックスを処理した場合、低温損傷により誘発される細胞死に対して保護効果があり、tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) により誘導される細胞壊死を防止する効果があると報告されている [Kim et al., Arch Pharm Res. 2010 Nov; 33(11) 1813-23; Choi et al., Transplant Proc. 2010 Nov; 42(9) 3414-21]。特に、ネクロックス-7は、酸化的ストレスとアセトアミノフェンにより誘導された細胞壊死に対して保護作用があり、マウスモデルで四塩化炭素により誘発された肝損傷を予防する効果があり、虚血性再灌流による肝損傷を効果的に抑制すると報告されている [Park et al., Antioxid Redox Signal. 2013 May 10; 18(14) 1713-22]。

20

【0005】

また、ネクロックスは、癌転移抑制効果も立証されている [韓国特許公開第2013-0088720号公報]。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】韓国特許公開第2013-0088720号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Kim et al., Arch Pharm Res. 2010 Nov; 33(11) 1813-23

【非特許文献2】Choi et al., Transplant Proc. 2010 Nov; 42(9) 3414-21

40

【非特許文献3】Park et al., Antioxid Redox Signal. 2013 May 10; 18(14) 1713-22

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

これより、本発明者は、放射線療法又は化学療法により誘発される粘膜炎モデルでネクロックス (NecroX) の処理による粘膜保護効果、口腔及び腸粘膜の破壊抑制効果、腸に存在する細胞増殖効果を確認することによって、本発明を完成するに至った。

【0009】

50

したがって、本発明の目的は、ネクロックス (N e c r o X)、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を有効成分として含有する粘膜炎予防及び治療用組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記課題を解決するための手段として、本発明は、ネクロックス (N e c r o X)、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を有効成分として含有する粘膜炎予防及び治療用組成物を提供する。

【0011】

前記課題を解決するための他の手段として、本発明は、ネクロックス (N e c r o X)、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を有効成分として含有する抗癌補助剤を提供する。

10

【0012】

前記課題を解決するためのさらに他の手段として、本発明はネクロックス (N e c r o X)、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を有効成分として含有する粘膜炎予防及び治療用食品組成物を提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明は、放射線療法又は化学療法により誘発される粘膜炎モデルでネクロックスの処理による粘膜保護効果を確認した結果、放射線療法又は化学療法による疾病の死亡率をネクロックス投与グループにおいて減少させ、体重減少を減らすのに効能があった。また、腸の機能を確認した結果、大便の生成率が正常グループと同様な程度に保護されており、放射線による腸粘膜の破壊を抑制し、腸に存在する細胞の増殖率にも寄与していた。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1のAは、放射線誘発粘膜炎動物モデルを設立するための実験デザインを示す図表であり、Bは、放射線誘発粘膜炎動物モデルにN e c r o X - 7を投与した後、生存率と体重を示すグラフである。

【図2】図2は、粘膜炎動物モデルにN e c r o X - 7を投与した後、腸機能保護効果を示す写真である。

30

【図3】図3は、N e c r o X - 7を処理しない粘膜炎動物モデル及びN e c r o X - 7を処理した粘膜炎マウスの各腸 (i n t e s t i n e) 組織のH & E (h e m a t o c y l i n & e o s i n) 染色結果を示すものである。

【図4】図4は、N e c r o X - 7を処理しない粘膜炎動物モデル及びN e c r o X - 7を処理した粘膜炎マウスの各腸 (i n t e s t i n e) 組織を摘出し、免疫組織化学検査 (I H C : i m m u n o h i s t o c h e m i s t r y) を用いて細胞増殖 (B r o m o d e o x y u r i d i n e) を確認した写真である。

【図5】図5は、N e c r o X - 7が放射線の照射による正常細胞と癌細胞に及ぶ影響を確認したものである。

【図6】図6は、N e c r o X - 7が放射線の照射後に細胞の増殖能力に及ぶ影響をMTS分析法とCM-H₂ROS染色を用いたミトコンドリア内における活性酸素を測定した結果を示すものである。

40

【図7】図7は、抗癌剤誘発粘膜炎動物モデルを設立するための実験デザインを示す図表及び抗癌剤誘発粘膜炎動物モデルにN e c r o X - 7を投与した後、生存率と体重を示すグラフである。

【図8】図8は、N e c r o X - 7を処理しない粘膜炎動物モデル及びN e c r o X - 7を処理した粘膜炎マウスの各舌組織のH & E (h e m a t o c y l i n & e o s i n) 染色結果を示すものである。

【図9】図9は、N e c r o X - 7を処理しない粘膜炎動物モデル及びN e c r o X - 7を処理した粘膜炎マウスの各腸 (i n t e s t i n e) 組織のH & E (h e m a t o c y

50

lin & eosin) 染色結果を示すものである。

【図10】図10は、ヒト腫瘍細胞においてNecroXの抗癌補助剤としての効果を示すものであって、NecroX-7を濃度別に単独処理時、抗癌剤5-FU (fluorouracil) を単独処理時、及び5-FUとNecroX-7を併合処理時、腫瘍細胞の生存細胞数を分析した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、ネクロックス (NecroX)、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を有効成分として含有する粘膜炎症予防及び治療用組成物に関する。

【0016】

前記ネクロックス (NecroX) は、韓国特許公開第10-2009-0018593号に開示された化合物であって、その種類において特に限定されるものではないが、好ましくは、ネクロックス-1 (NecroX-1)、ネクロックス-2 (NecroX-2、[5-(1,1-ジオキソ-チオモルフォリン-4-イルメチル)-2-フェニル-1H-インドール-7-イル]- (1-メタンスルホニル-ピペリジン-4-イル)-アミン)、ネクロックス-5 (NecroX-5、[5-(1,1-ジオキソ-チオモルフォリン-4-イルメチル)-2-フェニル-1H-インドール-7-イル]- (テトラヒドロ-ピラン-4-イルメチル)-アミン)、ネクロックス-7 (NecroX-7、テトラヒドロピラン-4-イル)- [2-フェニル-5-(1,1-ジオキソ-チオモルフォリン-4-イル)メチル-1H-インドール-7-イル]アミン) 及びネクロックス-18 (NecroX-18) よりなる群から選択された一つ以上を含むことができる。

【0017】

本明細書において「薬学的に許容される塩」は、薬学的に許容される陰イオンを含有する無毒性酸付加塩を形成する酸、例えば、硫酸、塩酸、硝酸、リン酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸等のような無機酸；タルタル酸、ギ酸、クエン酸、酢酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸、グルコン酸、ベンゾイン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸、サリチル酸等のような有機カルボン酸；メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸等のようなスルホン酸等により形成された酸付加塩が含まれる。また、薬学的に許容される塩基付加塩、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等により形成されたアルカリ金属又はアルカリ土類金属塩；リシン、アルギニン、グアニジン等のアミノ酸塩；ジシクロヘキシルアミン、N-メチル-D-グルカミン、トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン、ジエタノールアミン、コリン、トリエチルアミン等のような有機塩等が含まれる。本発明による化合物(テトラヒドロピラン-4-イル)- [2-フェニル-5-(1,1-ジオキソ-チオモルフォリン-4-イル)メチル-1H-インドール-7-イル]アミンは、当業界に公知された通常の方法によりその塩に転換され得、塩の製造は、別途の説明がなくても、当業者により容易に行われることができる。

【0018】

本明細書において「異性体 (isomer)」は、同一の化学式又は分子式を有するが、光学的又は立体的に異なる化合物又はその塩を意味する。本発明によるネクロックス (NecroX) は、非対称炭素中心を有することができるので、光学異性体 (R又はS異性体)、ラセミ体、部分立体異性体混合物、個々の部分立体異性体等で存在し得、幾何異性体 (トランス、シス型異性体) も存在し得る。これらすべての異性体及びその混合物も、本発明の範囲に含まれる。

【0019】

以下では、別途の説明がない限り、本発明による化合物ネクロックス (NecroX) の薬学的に許容されるその塩及び/又はその異性体は、すべて本発明の範疇に含まれる。

【0020】

本発明では、放射線及び/又は抗癌治療により誘発される粘膜炎症モデルでネクロックスの処理による粘膜保護効果を確認した。その結果、放射線による疾病の死亡率をネクロック

10

20

30

40

50

ス投与グループにおいて減少させ、体重減少を減らすのに効能があった。また、腸の機能を確認した結果、大便の生成率が正常グループと同様な程度に保護されており、放射線による腸粘膜の破壊を抑制し、腸に存在する細胞の増殖率にも寄与していた。

【0021】

したがって、本発明のネクロックスは、放射線療法又は化学療法により誘発される粘膜炎を治療できる。

【0022】

本発明において粘膜炎は、治療対象の消化管(GI)の粘膜の薄膜化と潰瘍化の概念を含み、例えば、紅斑性火傷型病変として、又は不規則的で且つ集中性乃至散在性である潰瘍性病変として現われることを含む。例えば、紅斑性粘膜炎は、化学療法又は放射線療法に露出した後、わずか3日ぶりに、より一般的には、5日~7日以内に現われ、潰瘍性粘膜炎への進行は、通常、化学療法を始めてから7日以内に起こり、場合によっては、薬物治療を中断しなければならないほどにひどくなる。

10

【0023】

本願に使用された用語「粘膜炎」は、口腔と口腔咽頭部はもちろん、口から肛門に至るまでの胃腸管を含めた消化器粘膜炎(alimentary mucositis)及び膣の粘膜炎を含むものであって、消化器粘膜炎は、口腔粘膜炎及び/又は腸炎(腸の炎症、特に小腸の炎症)を含み、消化管粘膜炎は、食道炎(食道の炎症)、咽頭粘膜炎、口内炎(胃の炎症)及び/又は直腸炎(直腸の炎症)を含む。

【0024】

本発明の一具現例として、粘膜炎を保有するか、又は粘膜炎が発生する危険がある対象に対して、本発明の化合物を治療学的有効量で一つ以上の消化管領域に投与することを含む。

20

【0025】

本発明は、抗癌療法(放射線療法又は化学療法)により体重減少がある場合、所望しない体重減少を防止するために、「体重減少の防止及び/又は予防」のために使用され得る。

【0026】

したがって、本発明は、放射線療法及び/又は化学療法を受ける対象の粘膜炎及び/又は体重減少予防まで拡張される。

【0027】

本発明において、粘膜炎及び/又は体重減少は、化学的損傷、生物学的損傷、放射線又はこれらの混合に露出した対象で発生し得、放射線露出は、抗癌治療のための放射線療法等から発生し得、又は偶然な放射線露出又はテロリスト攻撃による放射線露出により発生することもできる。また、本発明の組成物、方法及び用途は、宇宙旅行の前又は後、粘膜炎及び/又は体重減少を予防、治療又は改善するために対象に投与することに関連する。

30

【0028】

対象が粘膜炎及び/又は体重の減少の進行を誘発又は招来できる損傷を被る前に、投与され得、対象が損傷を被った後、粘膜炎及び/又は対象の体重減少の開始及び発生の前に投与され得る。

【0029】

本発明において、「粘膜炎の予防及び治療」は、粘膜炎発病の抑制や予防、治療、以外にも、胃腸管粘膜炎を有しないが、発病の危険がある(例えば放射線及び/又は抗癌療法で以前に治療を受けたか、現在受けているか、及び受ける予定がある癌患者及び他の患者)症状の治療又は予防、その他の癌治療から起因する粘膜炎の悪化の軽減等を含む。

40

【0030】

したがって、本発明は、ネクロックス、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を有効成分として含有する粘膜炎予防及び治療用薬学組成物を提供する。

【0031】

前記薬学組成物の適用対象は、特に限定されるものではないが、好ましくは、家畜、人間等を含む哺乳動物であることができる。

50

【0032】

前記薬学組成物は、人間等を含む哺乳動物に摂取させることによって、粘膜炎を予防でき、また、粘膜炎を治療できる。

【0033】

本発明の有効成分は、組成物の全重量に対して0.1～99重量%で含むことができ、本発明の範囲がこれに限定されるものではない。

【0034】

本発明による薬学組成物は、薬学組成物の製造に通常使用する適切な担体、賦形剤又は希釈剤を含むことができ、当業界において通常製造されるいずれの剤形にも製造され得る（例：文献[Remington's Pharmaceutical Science、最新版；Mack Publishing Company、Easton PA]。 10

【0035】

本発明による薬学組成物は、それぞれ通常の方法によって散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エアロゾル等の経口型剤形、外用剤、坐剤及び滅菌注射溶液の形態に剤形化して使用され得る。製剤化する場合には、通常使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩解剤、界面活性剤等の希釈剤又は賦形剤を使用して調剤される。

【0036】

経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤等が含まれ、このような固形製剤は、前記化合物は、少なくとも一つ以上の賦形剤、例えば、澱粉、カルシウムカーボネート（calcium carbonate）、スクロース（sucrose）又はラクトース（lactose）、ゼラチン等を交ぜて調剤する。また、単純な賦形剤以外にマグネシウムステアレート、タルクのような潤滑剤も使用される。経口のための液状製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤等が該当し、頻繁に使用される単純希釈剤である水、リキッドパラフィンの他、さまざまな賦形剤、例えば湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤等が含まれることができる。 20

【0037】

非経口投与のための製剤には、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤が含まれる。非水性溶剤、懸濁剤としては、プロピレングリコール（propylene glycol）、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物性油、エチルオレートのような注射可能なエステル等が使用され得る。坐剤の基剤としては、ウイテプゾール（witepsol）、マクロゴール、ツイーン（tween）61、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチン等が使用され得る。 30

【0038】

前記薬学組成物は、鼠、マウス、家畜、人間等の哺乳動物に多様な経路で投与され得る。投与のすべての方式は、予想され得るが、一例として、経口、皮膚外用又は腹腔内注射、直腸内注射、皮下注射、静脈注射、筋肉内注射又は胸部内注射注入方式等を選択できる。

【0039】

また、本発明の組成物は、粘膜炎予防及び/又は治療のために、単独で、又は手術、放射線治療、ホルモン治療、化学治療及び生物学的反応調節剤を使用する方法等と併用して使用し得る。 40

【0040】

また、本発明は、治療上の有効量のネクロックス（NecroX）、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を対象体に投与することを含む粘膜炎予防又は治療方法を含む。

【0041】

ここで使用された用語「対象体」は、治療、観察又は実験の対象である哺乳動物を言い、好ましくは、人間を言う。

【0042】

ここで使用された用語「治療上有効量」は、研究者、獣医、医者又はその他臨床医により考えられる組織系、動物又は人間において生物学的又は医学的反応を誘導する有効成分又 50

は薬学的組成物の量を意味するものであって、これは、治療される疾患又は障害の症状の緩和を誘導する量を含む。本発明の有効成分に対する治療上有効量及び投与回数は、所望の効果によって変化することは、当業者に自明である。したがって、投与される最適の投与量は、当業者により容易に決定され得、疾患の種類、疾患の重症度、組成物に含有された有効成分及び他の成分の含量、剤形の種類、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、排泄率等によってその範囲が多様である。本発明の治療方法において、大人の場合、本発明のネクロックスを1日1回～数回投与時、約0.3～30mg/kg、又は約3～30mg/kgの容量で投与することが好ましい。

【0043】

本発明の治療方法において本発明のネクロックス、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を有効成分として含む組成物は、目的する方法によって経口投与するか、又は非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内又は局所に適用）できる。

10

【0044】

また、本発明は、粘膜炎予防又は治療用組成物の製造のためのネクロックス、薬学的に許容されるその塩又はその異性体の用途を提供する。

【0045】

また、本発明による薬学組成物は、抗癌治療のために、放射線処理又は化学的処理のような抗癌治療中に発生し得る粘膜炎を予防及び/又は治療可能なので、抗癌剤と併用して抗癌補助剤としても使用できる。

【0046】

本発明において、「抗癌補助剤」は、抗癌剤に対する感受性を増進させ、抗癌治療により発生する副作用、例えば、粘膜炎の予防及び/又は治療だけでなく、抗癌治療による活性を増加させるものであって、抗癌活性補助剤としての役目をする事ができる。

20

【0047】

本発明において言及される抗癌剤は、アルキル化剤、抗代謝薬物、抗生剤、植物アルカロイド、分子標的薬物、ホルモン、白金錯体、アンチセンス、抗体及びRNAiよりなる群から選択される。

【0048】

抗癌剤の例示は、アルキル化剤、例えばシクロホスファミド及びブスルファン；抗代謝薬物、例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン（6-MP）、アザチオプリン、フルオロウラシル（5-FU）、テガフル及びシトシンアラビノシド（ara-C）；抗生剤、例えばブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルピシン、アドリアマイシン及びアクチノマイシンD；植物アルカロイド、例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド及びイリノテカン；分子標的薬物、例えばイマチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トラスツズマブ、リツキシマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、ベバシズマブ及びセツキシマブ；ホルモン、例えばプレドニゾロン、ジエチルスチルベストロール及びタモキシフェン；白金錯体、例えばシスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチン；アンチセンス、例えばbc1-2アンチセンス、例えばG3139、hsp27アンチセンス、例えばOGX427、XIAPアンチセンス、例えばAEG35156、PKC-アルファアンチセンス、例えばLY900003、低酸素症誘導性因子アンチセンス、例えばEZN-2968；抗体、例えばCD20抗体、例えばリツキシマブ、Her2抗体、例えばトラスツズマブ、VEGF抗体、例えばベバシズマブ、EGFR抗体、例えばセツキシマブ；RNAi、例えばRNAi標的化リボヌクレオチドレダクターゼ、例えばCALAA-01である。抗癌剤の好ましい例示は、5-FU、テガフル及びシスプラチンを含む。

30

40

【0049】

本発明の組成物とともに使用するに適切な化学治療剤は、例えばビンブラスチン（vinblastine）のような類似分裂抑制剤；シスプラチン、カルボプラチン（carboplatin）及びシクロホスファミド（cyclophosphamide）のようなアルキル化剤；パクリタキセル（paclitaxel）又はその他タキサン（tax

50

anes)のような微小管アセンブリ抑制剤；5-フルオロウラシル、カペシタビン(capcitabine)、シトシンアラビノシド(cytosine arabinoside)及びヒドロキシウレアのような代謝拮抗剤；アドリアマイシン(adriamycin)及びブレオマイシン(bleomycin)のようなインターカレーティング(intercalating)抗生剤；トラスツズマブ(trastuzumab)のような免疫刺激剤；ゲムシタビン(gemcitabine)のようなDNA合成抑制剤；アスパラギナーゼ(asparaginase)のような酵素；エトポシド(etoposide)のようなトポイソメラーゼ(topoisomerase)抑制剤；インターフェロンのような生体反応調節物質；及び抗ホルモン剤、例えばタモキシフェンのようなアンチエストロゲン(antioestrogen)、又は(4'-シアノ-3-(4-フルオロフェニルスルホニル)-2-ヒドロキシ-2-メチル-3'-(トリフルオロメチル)-プロピオンアニリドのようなアンチアンドロゲン(antiandrogens)及びその他治療剤及び例えば[Devita, V. T., Jr., Hellmann, S., Rosenberg, S. A.; in: Cancer: Principles & Practice of Oncology, 5th ed., Lippincott-Raven Publishers (1997)]に記載されている主要成分物質から選択される一つ以上のその他抗癌物質を含む。

10

【0050】

また、本発明は、前記組合医薬の投与方法を提供する。実施例において、本発明の化合物及び化学治療剤を連続的に、同時に又は異なる投与ルートを通じて各々提供される。また、前記化合物及び化学治療剤は、例えば固体及び液体形態のように同一又は相異なる形態であることができる。前記方法は、本発明の化合物を化学治療剤とともに同時に投与することを含むことができる。実施例において、本発明の化合物は、化学治療剤と連続的に対象に投与され得る。同時に投与される場合、一実施例において、本発明の化合物は、化学治療剤より先に投与され得る。また、他の実施例において、本発明の化合物は、化学治療剤より後で投与され得る。一実施例において、化学治療剤は、本発明の化合物と分離して提供される。

20

【0051】

本発明の一具現例として、化学治療剤及び本発明の化合物は、併用投与される。併用投与は、これら成分が組成物として、又は同一の単一投与分の一部として一緒に投与されることを意味する。本願において使用される用語「併用投与」は、また、前記成分が分離されて投与されるが、治療法又は治療プログラムの一部として投与されることをも意味する。一実施例において、前記成分は、同時に対象に投与される。しかし、成分は、分離された投薬又は投薬剤形として分離されて投与されてもよい。成分が分離されて投与される場合、成分の併用投与が、時間、頻度、投薬、又は成分の投与手順に制限を加えない。

30

【0052】

本発明において抗癌補助剤投与対象の癌腫は、頭頸部癌、非ホジキンリンパ腫(non-Hodgkin's lymphoma)、白血病(leukemia)、大腸癌(colon cancer)、膀胱癌(bladder cancer)、卵巣癌(ovarian cancer)、胃癌(gastric cancer)、肺癌(lung cancer)、前立腺癌(prostate cancer)、膵臓癌(pancreatic cancer)及び大腸癌(colorectal cancer)等であることができるが、これに制限されない。

40

また、本発明は、ネクロックス、薬学的に許容されるその塩又はその異性体を有効成分として含有する粘膜炎予防又は改善用食品組成物を提供する。

【0053】

前記食品組成物の適用対象は、特に限定されるものではないが、好ましくは、家畜、人間等を含む哺乳動物であることができる。

【0054】

前記有効成分を添加できる食品としては、一例として、各種食品類、飲料、ガム、お茶、

50

ビタミン複合剤、健康機能性食品類等がある。

【0055】

食品又は飲料中の前記ネクロックスの量は、全体食品重量の0.01～50重量%で加えることができ、健康飲料組成物は、100mlを基準に0.01～50gの比率で加えることができるが、本発明の範囲がこれに限定されるものではない。

【0056】

本発明の健康機能性飲料組成物は、有効成分を含有すること以外には、他の成分には特別な制限がなく、通常の飲料のように、さまざまな香味剤又は天然炭水化物等を追加成分として含有できる。前記以外に、本発明の組成物は、さまざまな栄養剤、ビタミン、鉱物（電解質）、合成風味剤及び天然風味剤等の風味剤、着色剤及び充填剤（チーズ、チョコレート等）、ペクチン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、有機酸、保護性コロイド性増粘剤、pH調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲料に使用される炭酸化剤等を含有できる。

10

【0057】

前記食品組成物には、人間が摂取する食品だけでなく、動物の飼料組成物を含むことができる。

【0058】

前記飼料添加剤は、さらに、家畜類及び家畜等に許容される担体を含有できる。本発明においては、前記飼料添加剤をそのまま、又は公知の担体、安定剤等を添加でき、必要に応じて、ビタミン、アミノ酸類、ミネラル等の各種養分、抗酸化剤、抗生物質、抗菌剤及びその他の添加剤等を添加することもでき、その形状としては、粉体、顆粒、ペレット、懸濁液等の適当な状態であることができる。

20

【0059】

本発明の飼料添加剤を供給する場合は、家畜類及び家畜等に対して単独で又は飼料に混合して供給し得る。

【実施例】

【0060】

以下、本発明に係る実施例により本発明を詳しく説明するが、本発明の範囲が下記提示された実施例によって制限されるものではない。

【0061】

実施例1：粘膜炎マウスモデル設立及びNecroX治療効果

NecroX-7（（テトラヒドロピラン-4-イル）-[2-フェニル-5-（1,1-ジオキソ-チオモルフォリン-4-イル）メチル-1H-インドール-7-イル]アミン）をLG生命科学から入手した。動物モデルとしては、C57BL/6（H-2k）マウス7～9週齢を使用し、1100cGyで全身放射線を照射し、腸粘膜の損傷を起こす粘膜炎モデルを設立した。このような粘膜炎モデルにNecroX-7投与による効果を生存率、体重、腸機能に関して比較分析した。

30

【0062】

本実験では、放射線誘発粘膜炎マウスモデルを用いてNecroXによる粘膜炎の抑制効果を観察した。

40

【0063】

（A）C57BL/6（H-2k）マウスを使用して粘膜炎を誘導するために、1Gy/min線量率で1100cGy（放射線ソース：X-ray Mevatron MXE-2）の強力な放射線の照射を実施した。また、NecroX-7を0.3mg/kg、3mg/kg又は30mg/kgの容量で5回投与して比較した。このような実験結果より、NecroX-7を処理したグループが、そうでないグループに比べて生存率が増加し、体重減少を抑制したことが分かる〔図1〕。

【0064】

放射線による腸粘膜炎の誘導は、腸出血及び大便生成障害という副作用が発生する。したがって、本実験では、高線量の1100cGyの放射線を照射し、粘膜炎モデルを設立し

50

、NecroX-7を容量別に総5回処理し、NecroX-7を処理しないグループと比較した。NecroX-7による放射線誘導腸粘膜炎に対する保護効果を確認した。

【0065】

その結果、NecroX-7を処理せず、放射線の照射（粘膜炎）を受けたグループでは、腸の長さが減少し、大便の生成が大きく減少することを確認した。これに対し、NecroX-7を処理したグループでは、正常腸と同様な程度に腸が保護されていることを確認した〔図2〕。

【0066】

実施例2：組織学的腸機能保護効果確認

パラフィンに包埋された組織から4 μ mの連続切片を得て、キシレン(xylene)で3回処理し、パラフィンを除去し、95%、90%、70%エタノールで段階的に含水した。0.5%過酸化水素で内因性過酸化酵素(endogenous peroxidase)を除去した後、正常ヤギの血清(goat serum)で30分間処理し、一次抗体を3%BSA(bovine serum albumin)が含まれたPBS(phosphate buffer saline)に製造会社の指示に基づいて希釈し、1時間反応させた。前記研究で発現の差異を示す遺伝子に対して発現蛋白に対する一次抗体反応後、TBS(Tris-buffer saline)で3回洗浄し、3%BSAに希釈した5 μ g/ml biotinylated anti-mouse/anti-rabbit IgGに30分間反応させ、3回TBSで洗浄した。3 μ g/ml HRP(horseradish peroxidase)ストレプトアビジン(streptoavidin)で30分間放置させ、DABと過酸化水素を利用して発色した後、マイヤー(Mayer)のヘマトキシリン(hematoxylin)や1%メチルグリーン(methyl green)で対比染色した。

【0067】

放射線の照射による粘膜炎は、腸組織の絨毛破壊を誘発する。組織学的所見でも、腸組織のH&E染色(パラフィン包埋組織を3 μ mの切片に薄切し、スライドに付着した後、キシレン(xylene)に5分ずつ2回漬ける脱パラフィン過程後、100%エタノールに5分間2回、90%、80%、70%エタノールに5分ずつ漬けた後、流水中で水洗した。マイヤーのヘマトキシリン溶液で8分間染色し、流水中で水洗したあと、70%、80%、90%、100%エタノールに漬けた後、100%エタノールに5分、キシレンに5分ずつ2回漬けた後、封入し、顕微鏡で観察)結果、NecroXを処理しない粘膜炎グループでは、腸の絨毛及び粘膜破壊所見(Hematoxylin&Eosin染色を実施し、光学顕微鏡で観察した結果、放射線の照射後、腸で絨毛(villi)が破壊され、陰窩(crypt)部位内の細胞における核萎縮、染色質の凝縮と細胞性分節等の形態学的変化を示す)を示したが、NecroX-730mg/kgを処理したグループでは、正常な腸組織所見と同様であることを観察した〔図3〕。

【0068】

実施例3：放射線による細胞増殖抑制に対するNecroXの効果

IHC染色を用いて細胞増殖(Bromodeoxyuridine)を確認した。マウス組織を得る前に、マウスにBrdU標識試薬(5-bromo-2'-deoxyuridine and 5-fluoro-2'-deoxyuridine)をmice当たり20g注射した後、2時間以内に腸組織を摘出し、パラフィンブロックを製作した。パラフィンに包埋された組織から4 μ mの連続切片を得て、キシレン(xylene)で3回処理してパラフィンを除去し、95%、90%、70%エタノールで段階的に含水する。0.3%過酸化水素で内因性過酸化酵素(endogenous peroxidase)を除去した後、正常ヤギの血清で30分間処理し、一次抗体を3%BSA(bovine serum albumin)が含まれたPBS(phosphate buffer saline)に製造会社の指示に基づいて希釈し、1時間反応させた。前記研究で発現の差異を示す遺伝子に対して発現蛋白に対する一次抗体反応後、TBS(Tris-buffer saline)で3回洗浄し、3%BSAに希釈した5 μ g/ml

10

20

30

40

50

biotinylated anti-mouse / anti-rabbit IgGに30分間反応させ、3回TBSで洗浄した。3 μ g/ml HRP (horseradish peroxidase) ストレプトアビジン (streptavidin) で30分間放置させ、DABと過酸化水素を利用して発色した後、ヘマトキシリンや1%メチルグリーンで対比染色した。その結果、対照群と異なって、NecroX-7 30 mg/kgで細胞増殖が円滑に行われていることを確認した [図 4]。

【 0 0 6 9 】

実施例 4 : 生体外で放射線の照射による正常細胞及び腫瘍細胞に及ぶ影響
 粘膜炎は、腫瘍治療のための放射線又は抗癌治療により誘発される一般的な副作用である。そのため、粘膜炎治療剤の有効性を確認するためには、腫瘍の増殖に及ぶ影響を評価しなければならぬ。正常細胞、腫瘍細胞を、それぞれ800 cGy放射線照射をした後、NecroX-7を容量別に処理し、96-well plateに接種した後、37、5%CO₂で3日間培養した後、細胞の増殖をMTT分析を用いて確認した。3日培養後、MTT溶液を入れ、3時間反応し、540 nM吸光度で測定した

10

【 0 0 7 0 】

その結果、NecroX-7を処理したとき、大部分の癌細胞株においては、腫瘍細胞の増殖が抑制されるか又は減少するが、正常細胞においては、放射線誘導 - 細胞死を保護することを確認した [図 5]。

【 0 0 7 1 】

実施例 5 : NecroX-7によるミトコンドリア内での酸化的ストレス調節
 活性酸素 (ROS) は、一般的に細胞内ミトコンドリア呼吸過程に酸素の不完全燃焼により生じるが、放射線又は抗癌治療を受ける場合、ROSが大きく増加する。これより、本研究者は、放射線治療により増加したROSにNecroX-7が及ぶ影響を腸上皮細胞 (IEC-6) で確認した。

20

【 0 0 7 2 】

NecroX-7が正常環境でIEC-6細胞増殖能力に及ぶ影響を把握するために、IEC-6細胞を各濃度 (5 μ M、10 μ M、20 μ M、40 μ M) で30分間NecroX-7を処理した後、培地を交替し、2日後、生存細胞数をMTS (3 - (4, 5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 5 - (3 - carboxymethoxyphenyl) - 2 - (4 - sulfophenyl) - 2 H - tetrazolium) 分析法で測定した。NecroX-7の濃度によって細胞の増殖にほとんど影響がなかった。

30

【 0 0 7 3 】

NecroX-7が、放射線の照射後、細胞の増殖能力に及ぶ影響を照射するために、NecroX-7を濃度別に30分間処理した後、培地を交替し、放射線を照射した2日後、MTS分析法で測定した結果、NecroX-7 20 μ M、40 μ Mで生存細胞の数が有意に増加した。CM-H2ROS染色を用いたミトコンドリア内における活性酸素を測定した結果、放射線により増加したミトコンドリア内における活性酸素をNecroX-7が大きく抑制していることを確認した [図 6]。

【 0 0 7 4 】

実施例 6 : 抗癌治療による粘膜炎マウスモデル設立及びNecroX治療効果
 動物モデルとしては、C57BL/6 (H-2k) マウス7~9週齢を使用し、5-FU (5-fluorouracil) 50 mg/kgを5日間毎日腹腔内注射し、口腔及び腸粘膜の損傷を起こす粘膜炎モデルを設立した。このような粘膜炎モデルにNecroX-7投与による効果を生存率、体重、腸機能に関して比較分析した。

40

【 0 0 7 5 】

本実験では、抗癌剤誘発粘膜炎マウスモデルを用いてNecroX-7による粘膜炎の抑制効果を観察した。

【 0 0 7 6 】

C57BL/6 (H-2k) マウスを使用して口腔及び腸粘膜炎を誘導するために、5 -

50

FUを50mg/kgの容量で5回腹腔内注射した。また、NecroX-7を0.3mg/kg、3mg/kg又は30mg/kgの容量で5回静脈投与して比較した。このような実験結果より、NecroX-7を処理したグループが、そうでないグループに比べて生存率が増加し、体重減少を抑制したことが分かる[図7]。

【0077】

実施例7：組織学的口腔及び腸保護効果確認

パラフィンに包埋された組織から4µmの連続切片を得て、キシレン(xylene)で3回処理してパラフィンを除去し、95%、90%、70%エタノールで段階的に含水した。0.5%過酸化水素で内因性過酸化酵素(endogenous peroxidase)を除去した後、正常ヤギの血清(goat serum)で30分間処理し、一次抗体を3%BSA(bovine serum albumin)が含まれたPBS(phosphate buffer saline)に製造会社の指示に基づいて希釈し、1時間反応させた。前記研究で発現の差異を示す遺伝子に対して発現蛋白に対する一次抗体反応後、TBS(Tris-buffer saline)で3回洗浄し、3%BSAに希釈した5µg/ml biotinylated anti-mouse/anti-rabbit IgGに30分間反応させ、3回TBSで洗浄した。3µg/ml HRP(horseradish peroxidase)ストレプトアビジン(streptoavidin)で30分間放置させ、DABと過酸化水素を利用して発色した後、マイヤー(Mayer)のヘマトキシリン(hematoxylin)や1%メチルグリーン(methyl green)で対比染色した。

【0078】

抗癌剤による粘膜炎は、舌と口腔粘膜の表皮層を萎縮させ、炎症細胞及び壊死細胞の浸潤を示す。また、腸出血及び腸組織の絨毛破壊を誘発する。組織学的所見でも、舌と腸組織のH&E染色(パラフィン包埋組織を3µmの切片に薄切し、スライドに付着した後、キシレン(xylene)に5分ずつ2回漬ける脱パラピン過程後、100%エタノールに5分間2回、90%、80%、70%エタノールに5分ずつ漬けた後、流水中で水洗した。マイヤーのヘマトキシリン溶液で8分間染色し、流水中で水洗後、70%、80%、90%、100%エタノールに漬けた後、100%エタノールに5分、キシレンに5分ずつ2回漬けた後、封入し、顕微鏡で観察)結果、NecroX-7を処理しない粘膜炎グループでは、舌と口腔粘膜の表皮層が萎縮され、炎症細胞及び壊死細胞の浸潤が現われたが、NecroX-7 30mg/kgを処理したグループでは、正常な組織と同様な所見を観察した。また、NecroX-7を処理しない粘膜炎グループでは、腸の絨毛及び粘膜破壊所見を示したが、NecroX-7を処理したグループでは、正常な舌及び腸組織所見と同様であることを観察した[図8、図9]。

【0079】

実施例8；NecroX-7と化学治療剤との併用投与効果確認

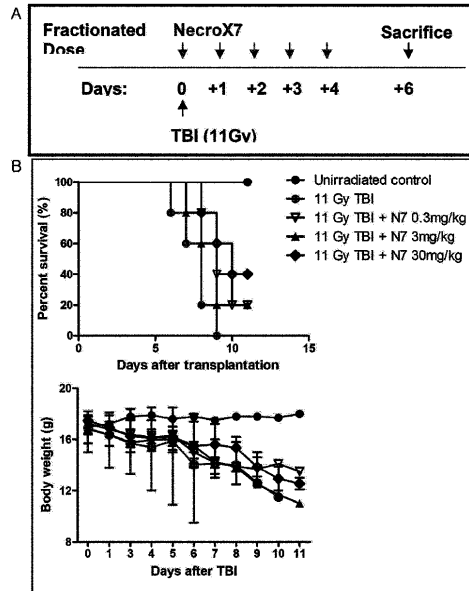
ヒト腫瘍細胞を各濃度(5µM、10µM、20µM、40µM)で30分間NecroX-7を処理した後、化学治療剤である5-FU(flourouracil)が含まれているか、又は含まれない培地に交替し、96-ウェル(well)型プレートに敷設し、3日後、生存細胞数をMTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium)分析法で測定した。

【0080】

その結果、図10に示されたように、NecroX-7単独処理時、濃度依存的に抗癌効果が現われた。また、5-FU単独で処理した腫瘍細胞株よりNecroX-7と5-FUを併合処理した腫瘍細胞株において単独よりさらに高い細胞死滅効果を示している。

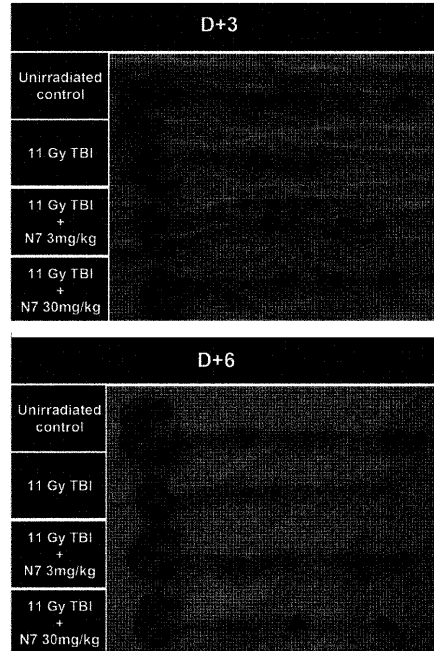
【 図 1 】

[Fig. 1]

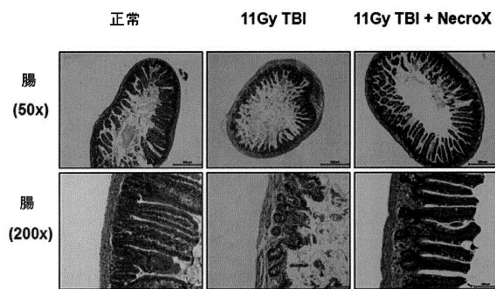


【 図 2 】

[Fig. 2]

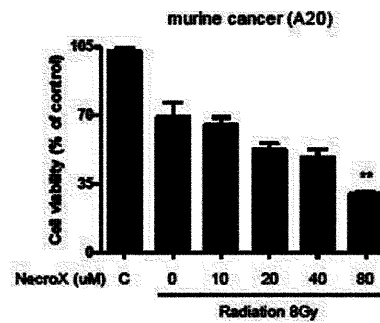
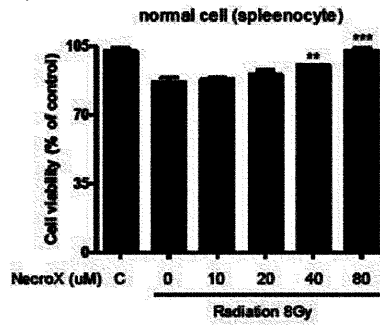


【 図 3 】

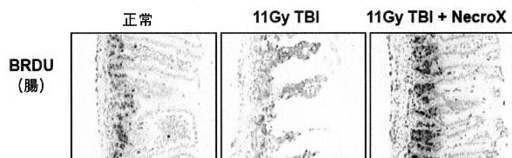


【 図 5 】

[Fig. 5]

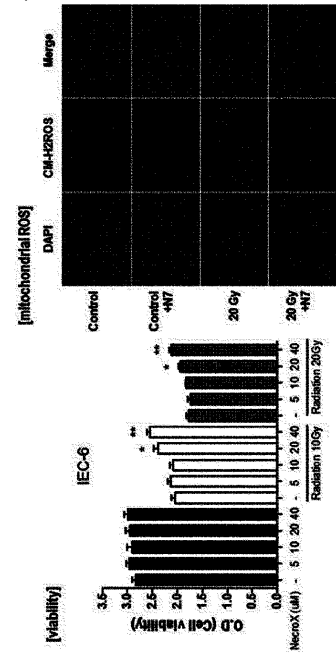


【 図 4 】



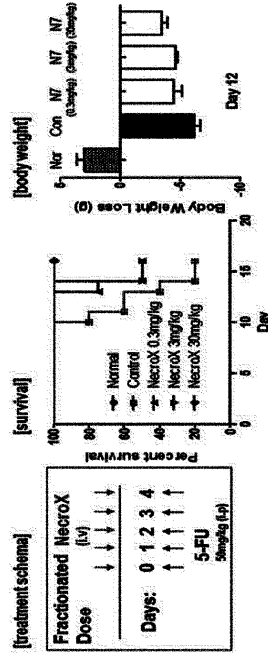
【 6 】

[Fig. 6]



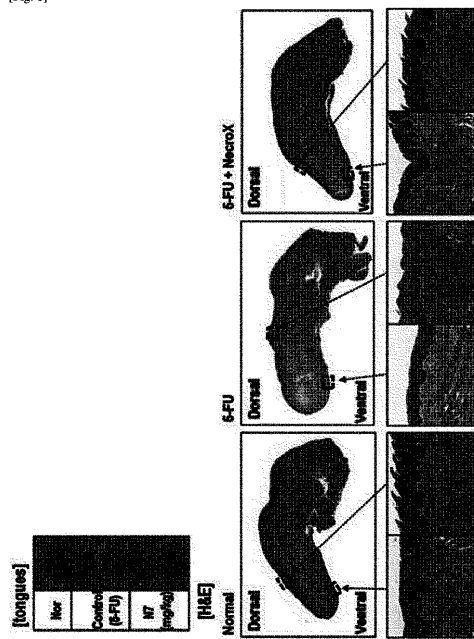
【 7 】

[Fig. 7]



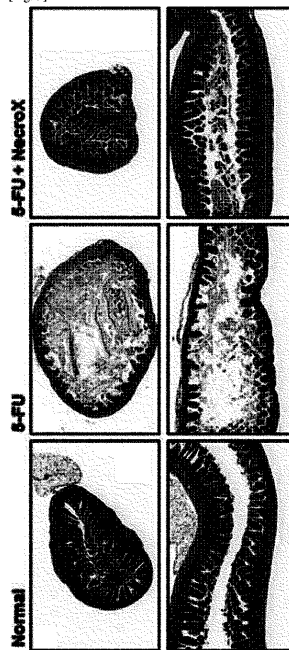
【 8 】

[Fig. 8]



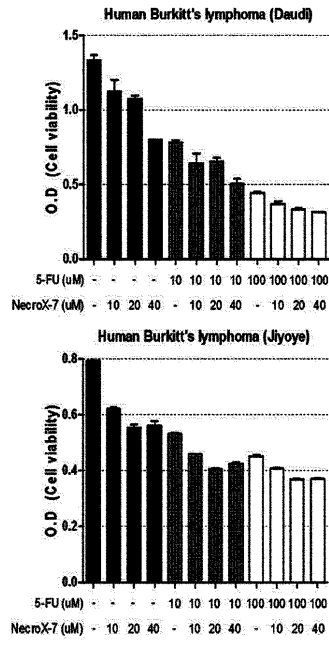
【 9 】

[Fig. 9]



【 10 】

[Fig. 10]



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 2 3 L 33/10 (2016.01) A 2 3 L 33/10

- (72)発明者 ソク・グ・チョ
 大韓民国・ソウル・06270・カンナム-グ・ノンヒョン-ロ・205・1-207・(ドゴク
 ・1-ドン・ドゴク・ハンシン・アパート)
- (72)発明者 コン・イル・イム
 大韓民国・ソウル・07984・ヤンチョン-グ・モクドンドン-ロ・401・ディー-2009
 ・(モク・5-ドン・ブヨン・グリーン・タウン・2・チャ)
- (72)発明者 ジュン・ヨン・リム
 大韓民国・ソウル・06088・カンナム-グ・ソルルン-ロ・130-ギル・19・102-8
 02・(サムソン-ドン・ソグワン・アパート)
- (72)発明者 ナヨン・キム
 大韓民国・ソウル・06568・ソチョ-グ・ソチョ-デロ・3-4・1002・(バンベ-ドン
 ・バンベ・ディオ・スプリーム・1・チャ・アパート)
- (72)発明者 ヨン・スン・ナム
 大韓民国・キョンギ-ド・11947・グリ-シ・ジャンジャ-デロ・111ボン-ギル・12・
 303-804・(トピョン-ドン・サムスン・アパート)
- (72)発明者 ウン・ソル・イ
 大韓民国・キョンギ-ド・12137・ナムヤンジュ-シ・ジンゴン-ウブ・サルン-ロ・470
 ・102-312・(ドンソン・アパート)

審査官 岩下 直人

(56)参考文献 韓国公開特許第10-2013-0088720(KR,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 5 4 1

A 2 3 L 3 3 / 1 0

A 6 1 P 1 / 0 0

A 6 1 P 1 / 0 4

A 6 1 P 2 9 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / W P I D S / B I O S I S
 (S T N)