

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4284177号  
(P4284177)

(45) 発行日 平成21年6月24日 (2009. 6. 24)

(24) 登録日 平成21年3月27日 (2009. 3. 27)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/22
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 9/00 (2006. 01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/10 (2006. 01)	A 6 1 P 9/10

請求項の数 14 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2003-522564 (P2003-522564)	(73) 特許権者	500339293
(86) (22) 出願日	平成14年8月20日 (2002. 8. 20)		ツェーエスエル ベリング アーゲー
(65) 公表番号	特表2005-501110 (P2005-501110A)		スイス国 CH-3000ベルン22, ワン
(43) 公表日	平成17年1月13日 (2005. 1. 13)		クドルフストラッセ10番
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/009294	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開番号	W02003/018047		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成15年3月6日 (2003. 3. 6)	(74) 代理人	100096183
審査請求日	平成17年4月27日 (2005. 4. 27)		弁理士 石井 貞次
(31) 優先権主張番号	01120026.8	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成13年8月20日 (2001. 8. 20)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	フーブシュ, アルフォンス
(31) 優先権主張番号	60/313, 605		スイス国 シーエイチ-3052 ゴリコ
(32) 優先日	平成13年8月20日 (2001. 8. 20)		ーフェン, ライヒェンバッハシュトラッセ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		48

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳卒中および他の虚血性症状の治療用HDL

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

虚血または虚血に起因する再灌流損傷の治療用の薬剤を製造するための、HDLの使用。

【請求項 2】

虚血性脳卒中、虚血性組織損傷、心臓虚血、心臓再灌流損傷、および臓器移植または心臓バイパス手術に起因する合併症から選択される障害を治療するための、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

HDLが、静脈内注入および/または注射により投与される、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】

HDLが、虚血開始前および/または虚血時に投与される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 5】

HDLが、再灌流時または再灌流後に投与される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

HDLが、処置1回につき体重1kgあたり、10~200mgのHDL(アポリボタンパク質に基づく重量)の用量で投与される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 7】

HDLが、ボーラス注射としておよび/または注入として臨床上必要な期間にわたり投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8】

HDLのタンパク質とリン脂質とのモル比が、1:50~1:250の範囲であり、場合によりさらなる脂質が、該タンパク質に基づいて1:20までのモル比で存在する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

タンパク質がアポリポタンパク質A-Iである、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

さらなる脂質が、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、および/またはスフィンゴ脂質である、請求項 8 に記載の使用。

10

【請求項 11】

HDLが、新生HDL、再構成HDL(rHDL)、組換えHDL、またはそれらの混合物から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 12】

HDLが、他の薬剤と組み合わせて投与される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 13】

被験体がヒトである、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 14】

活性成分としてHDLを含む、虚血または虚血に起因する再灌流損傷の治療用の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脳卒中および他の虚血性症状を予防および/または処置する方法に関する。この方法は、それを必要とする被験体に再構成HDL(rHDL)粒子により例示されるようなHDL粒子をとくに静脈内注入により投与することを特徴とする。

【背景技術】

【0002】

脳卒中(stroke)は、血栓塞栓型と出血型とに分類することが可能であり、西洋諸国では心臓疾患および癌に次いで3番目に大きな死因である。米国では毎年600,000人が新たな脳卒中または再発性の脳卒中を患い(約500,000は最初の発作である)、その約29%は最初の1年以内に死亡している(文献1)。脳卒中の発生率は加齢に伴って増大し、高齢者では、脳卒中は、米国における重篤な長期廃疾の主原因であり、513億ドル/年の総費用を要する(文献1)。高血圧症、高コレステロール血症、不整脈、または糖尿病のような危険因子に対する意識が向上しより良好に抑制できるようになったことが主な要因となって、脳卒中による死亡率は近年低下してきているが、高齢者の人口が増加しているため、脳卒中による実際の死亡者数は増加している。しかしながら、予防策が失敗した場合、限界のあるかつ危険を伴う血栓溶解法(たとえば、t-PA(組織プラスミノゲンアクチベーター))が存在するにすぎない。神経保護は、将来的には、脳卒中を処置するための新しいより安全なス

30

40

【0003】

循環性ショックの共通した原因の1つは、外傷に伴う重篤な失血である。集中治療医学の改善にもかかわらず、出血性ショックによる死亡率は依然として高い(文献5、6)。したがって、出血性ショックの患者の治療および予後を改善する新しい方法に対する必要性は依然として大きい(文献6)。診療時、出血性ショックが起こると遅延型血管性代償不全を招き(重篤な低血圧症を生じる)、患者の約25%で、肺、腎臓、消化管、肝臓、および脳を含むいくつかの器官の機能不全または障害を生じる(文献7)。器官機能不全はまた、出血とは別に閉塞の結果として血液供給の減少が原因となって虚血事象から生じることもある。再灌流(蘇生時)が多器官機能不全症候群(MODS)の病態生理に関与するという証拠も存在

50

する(文献8)。

【0004】

国際公開第01/13939号パンフレットおよび文献21によれば、ラット出血性ショックモデルで使用したrHDLは、器官損傷の有意な減少を示した。出血性ショックには、全身への血液供給の全体的減少が包含され、この全体的減少により、すべての器官および組織に影響を及ぼす低酸素性損傷が起こる。これに対して、虚血は、特定の器官および組織への血液供給の局所的不足を意味するものであり、その結果として、これらの罹患領域で無酸素症が急速に発症する。したがって、損傷の機序はきわめて明瞭である。

【0005】

コレステロール逆輸送としてよく知られている過程でrHDLが末梢細胞からのコレステロール流出を刺激することが明らかにされている。さらに、rHDLは、用量依存的に細菌性リポ多糖(LPS)に結合し、内皮細胞へのPMN(多形核白血球)の付着を阻害するだけでなくLPS誘発サイトカイン産生をも阻害する(文献21)。rHDLは、抗炎症活性および酸素ラジカルスカベンジャー活性を有する。rHDLはまた、血小板凝集の速度および度合を低下させる。最近になって、rHDLは内皮機能を急速に回復させ、さらには、前腕プレチスモグラフィにより決定したとき、一酸化窒素の生物学的利用能を増大させることにより高コレステロール血症患者の血流を正常化させることが実証された(文献9)。

【0006】

脳卒中の病態生理は、塞栓の形成、内皮機能の障害、および炎症カスケードの活性化(すなわち、サイトカイン産生および接着分子発現の増大)のような広範にわたる恒常性異常、血行動態異常、および代謝異常により特性づけられる(文献10~15)。脳卒中の他の顕著な特徴は、疾患を進行させる有害な働きをすると考えられる再灌流後の酸化ストレスの増大である。

【0007】

虚血が長期化すると、細胞内Ca<sup>++</sup>が増え、その結果、プロテアーゼおよびホスホリパーゼが活性化され、損傷を引き起こす可能性のある多数の膜脂質分解産物が生成される。これらの中には、再灌流時に酸素の存在下でラジカル生成源(たとえば、スーパーオキシドアニオンおよびヒドロキシルアニオン)を提供するアラキドン酸代謝産物が包含される。これらの遊離基は、血液脳関門の破壊ならびにニューロンのアポトーシスおよび/またはネクローシスを誘発する。アポトーシスは、欠陥のある細胞または余分な細胞を取り除く細胞死の形態であり、炎症応答を示さず、多くの形態学的および生化学的特性によりネクローシスと区別される。虚血性損傷後、アポトーシスの特徴がニューロンおよびグリアの両方で見いだされることがある。致死性虚血にさらされていない虚血性半影部のニューロンは、遅延型アポトーシスを起こす可能性がある(文献16)。いわゆる半影部は、ニューロンの機能を妨害するレベルまで血流が低下しているが、結果として、電気的活性により依然として膜ポンプの維持およびイオン勾配の保持が可能である脳領域である。この脳領域は、その臨床上重要と思われる点を記述する2つの特性を有する。すなわち、1)この領域を特性づける臨床的および電気的機能の妨害は、基本的に可逆的であるが、2)この可逆性は時間が限られており、再灌流に関係する。

【発明の開示】

【0008】

驚くべきことに、脳卒中(興奮毒性および大脳動脈閉塞)に対する動物モデルにおいて病変のサイズがHDLの投与により減少することを見いだした。これらのデータは、興奮毒性ニューロン損傷および虚血性/再灌流ニューロン損傷、とくに、虚血性領域および半影部のアポトーシスおよび/またはネクローシス後の結果をHDLにより改善できることを示している。さらに、出血性ショックに対する動物モデルにおいて、HDLによりPMN浸潤が減少し、器官の損傷および機能不全が防止されることが判明した。現時点では、作用機序は不明である。理論に拘束されることを望むものではないが、HDLは、酸素ラジカルスカベンジャーとして作用するか、血管拡張剤として作用するか(たとえば、側副枝血流の改善をもたらすNOの生物学的利用能の改善による)、または抗炎症作用を呈する可能性がある。し

たがって、HDLは、とくに脳血管疾患における神経保護薬物として作用し得る。これらの活性をすべて組み合わせると作用させれば、現在の療法でまだ見いだされていない臨床的効能が得られ得る。

【 0 0 0 9 】

本発明は、一般的には、虚血または再灌流損傷を予防および/または治療するためのHDLの使用に関する。器官に対する虚血は、その血液供給の妨害の結果として起こり、最も広い観点からみると、器官(とくに、心臓、大脳、腎臓、肝臓、または肺)の機能不全または損傷を引き起こす可能性がある。虚血は、完全な損傷または部分的な損傷、場合により可逆的な損傷をもたらす局所的事象/妨害である。再灌流損傷は、虚血後の領域に酸素化血液を急速に戻した結果として生じ、心臓血管および大脳の偶発事故に起因することが多い。

10

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明の主題は、虚血または再灌流損傷の予防および/または治療用の薬剤を製造するためのHDLの使用である。とくに、HDLは、虚血性脳卒中、虚血性組織損傷(たとえば、器官の虚血性損傷)、心臓虚血、心臓再灌流損傷、および器官移植(たとえば、腎臓、心臓、および肝臓の移植)または心肺バイパス手術に起因する合併症から選択される障害ならびに他の障害を予防および/または治療するために使用しうる。さらに驚くべきことに、一過性閉塞または永久閉塞が所定の位置にあるときにHDLが有益な効果をもたらすことを見いだした。その結果として、血餅または閉塞を引き起こす他の要素を溶解させるか、または他の方法で除去することは、効能の前提条件ではない。さらに、HDLの投与は、虚血事象の6時間以上後でさえも有益である。さらに驚くべき観測結果として、虚血事象の前のHDL投与が有益な効果を示した。

20

【 0 0 1 1 】

本発明のさらなる実施形態は、一過性脳虚血発作(TIA)を予防および/または治療するためのHDLの使用に関する。TIAは、多く見うけられ、罹患者の約1/3は、しばらくして脳卒中を起こす。TIAの最も多く見られる原因は、大血管(典型的には、狭窄したアテローム動脈)中のアテローム性動脈硬化斑由来の血栓による塞栓形成である。一酸化窒素の生物学的利用能の回復、血管の緊張および構造の調節により内皮機能を調べる試験で示されるように、HDLは抗アテローム性動脈硬化特性を有するので(文献9)、TIAを引き起こすアテローム斑を安定化させることにより主要な脳卒中のリスクを低減させる役割をHDLが担っているものと考えられる。TIAに対する現在の治療法としては、抗血小板療法、アスピリン、チクロピジンおよび動脈内膜剥離術のような外科的介入が挙げられる。しかしながら、これらのいずれを用いても、いまだに、罹患者の大幅な減少は達成されていない。

30

【 0 0 1 2 】

このほかのさらなる実施形態は、手術を受ける患者のようなリスク患者群へのHDLの予防的投与に関する。HDLを投与すれば、新脳卒中の発生率および/または重症度を減少させることができる。HDLの予防的投与はまた、TIA、心房細動、および無症候性頸動脈狭窄の患者においても有用であり得る。

【 0 0 1 3 】

上記の疾患を治療するために、とくに、脳卒中および一過性脳虚血発作を治療するために、HDLを使用すると、今まで満たされていなかった臨床的要求が満たされる。HDLの使用は、外傷性脳損傷を有する個体に対して臨床的に有効な神経保護療法を提供する。

40

【 0 0 1 4 】

本発明で使用される「HDL」という用語は、高密度リポタンパク質と同様の粒子を指し、新生(nascent)HDLもしくは再構成(reconstituted)HDL(rHDL)または任意のそれらの混合物を包含する。そのような粒子は、タンパク質またはペプチド成分と脂質とから生成させることができる。「HDL」という用語は、その範囲内に、新生HDLまたは再構成HDLと機能的に関係した任意の組換えHDLまたはその類似体をも包含する。

【 0 0 1 5 】

タンパク質は、好ましくは、アポリポタンパク質、たとえば、ヒトアポリポタンパク質

50

もしくは組換えアポリタンパク質、または同様の性質を有するペプチドである。好適な脂質は、リン脂質、好ましくはホスファチジルコリンであり、場合により、他の脂質(コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、または他の脂質)と混合されていてもよい。脂質は、合成脂質であっても、天然に存在する脂質であっても、それらの組合せであってもよい。

#### 【0016】

HDLを投与すると、一方では、短期的効果が得られ、すなわち、いくつかの臨床的パラメーターに関して有益な効果が即座に観測され、これは脳卒中の発症の3時間以内だけでなく、6時間後でさえも、さらにはそれ以上経過した後でも得られ得るものであり、他方では、長期的効果が得られ、脂質プロファイルの有益な変化が得られ得る。さらに、HDLは、生体中に天然に存在する物質にきわめてよく類似しているため、HDLの投与は、副作用を伴わない。

10

#### 【0017】

HDLは、好ましくは注入により、たとえば、動脈、腹腔内、好ましくは静脈内への注射および/または注入により、所望の薬理学的効果を得るのに十分な用量で投与される。たとえば、HDLは、虚血開始前(予測可能な場合、たとえば、器官移植前)および/または虚血時、再灌流前および/または再灌流直後、とくに24時間~48時間以内に、投与すればよい。

#### 【0018】

HDL用量は、処置1回につき体重1kgあたり、好ましくは10~200mg、より好ましくは40~80mg (HDLのアポリタンパク質に基づく重量)の範囲である。たとえば、投与されるHDLの用量は、临床上必要な時間にわたり、たとえば、数分間~数時間にわたり、たとえば、24時間までの時間にわたり、注入としておよび/またはボーラス注射として投与する場合、体重1kgあたり約20~100mg (HDLのアポリタンパク質に基づく重量)であり得る。必要に応じて、HDL投与は、1回または数回行うことが可能である。

20

#### 【0019】

再構成高密度リポタンパク質(rHDL)は、たとえばヒト血漿から単離されたヒトアポリタンパク質A-I(apoA-I)とダイズ由来のホスファチジルコリン(PC)とを約1:150 apoA-1:PCのモル比で混合することにより調製することが可能である。

#### 【0020】

本発明によれば、タンパク質(たとえば、アポリタンパク質A-1)とリン脂質とのモル比が1:50~1:250の範囲、とくに約1:150であるHDL、たとえば、新生HDL、rHDL、組換えHDL、またはHDL様粒子がとくに好ましい。さらに、rHDLは、場合により、コレステロール、コレステロールエステル、トリグリセリド、および/またはスフィンゴ脂質のようなさらなる脂質を、アポリタンパク質に基づいて、好ましくは1:20までのモル比、たとえば1:5~1:20のモル比で含有する。好ましいrHDLは、欧州特許出願公開第0663407号公報に記載されている。

30

#### 【0021】

HDLの投与は、血栓溶解剤、抗炎症剤、神経保護剤、および/または心臓保護剤のような他の薬剤の投与と組み合わせることも可能である。

40

#### 【0022】

さらに、本発明は、虚血または再灌流損傷を予防および/または治療する方法に関する。この方法は、そのような予防および/または治療を必要とする被験体に有効量のHDLを投与することを含む。好ましくは、HDLはヒト患者に投与される。

#### 【0023】

さらに、以下の実施例により本発明について詳細に説明する。

#### 【実施例】

#### 【0024】

##### 実施例1

##### 興奮毒性病変:

50

抱水クロラル(400mg/kg腹腔内投与)で麻酔したSprague-Dawleyラットを用いて実験を行った。rHDLを注入するために大腿静脈にカニューレを挿入した。ラットを定位固定装置中に配置し、正中切開後、ブレグマの後方0.2mm、側方3mm、腹側5.5mmの位置で右側線条体中にN-メチル-D-アスパルテート(NMDA)またはビヒクルを片側注射した。針挿入5分後、Hamiltonシリンジポンプを用いて0.5ml/分の速度で6分間かけて溶液を注入した。注射終了から5分後、針を除去した。

#### 【0025】

この一連の実験では、ラットに塩類溶液(n=5)(5μl/分)の静脈内注入を4時間かけて行った。2時間後、NMDA(75nMを3mlのリン酸塩緩衝食塩水pH7.4に加えたもの)を右側線条体中に片側注射した。24時間後、ラットを屠殺し、脳を取り出して組織学的分析にかけた。他の群の実験では、ラットにrHDL(n=5)(5μl/分)の静脈内注入を120mg/kgの用量で4時間かけて行った。2時間後、NMDA(75nMを3mlのリン酸塩緩衝食塩水pH7.4に加えたもの)を右側線条体中に片側注射し、rHDLの静脈内注入をさらに2時間継続させた。24時間後、ラットを屠殺し、脳を取り出して組織学的分析にかけた。結果を表1に示す。

#### 【表1】

表1:病変体積 (mm<sup>3</sup>)

ラット	対照	rHDL
1	50.27	16.54
2	47.05	18.86
3	41.28	17.44
4	38.5	17.51
5	51.66	19.86
n	5	5
平均値	45.75	18.04
標準偏差	5.69	1.31
標準誤差	2.55	0.59

#### 【0026】

この実験では、rHDLで処置した動物の脳ネクロシス体積は、対照と比較して60.6%の劇的な減少が観測された。

#### 【0027】

さらなる一連の実験では、NMDA注射の3時間後から4時間かけてrHDL(120mg/kg)またはブラセボ(塩類溶液)の注入を行った。24時間後、梗塞サイズを組織学的に測定した。結果を表2に示す。

【表 2】

表2

塩類溶液 + NMDA		rHDL + NMDA	
病変体積 (mm <sup>3</sup> )		病変体積 (mm <sup>3</sup> )	
175		77	
101		83	
105		133	
180		121	
149		51	
115		66	
平均値	137		88
標準偏差	35		32
減少%		-36%	
p (スチューデントのt - 検定)		0.03	

## 【0028】

この実験では、36%の梗塞サイズの減少がみられた。

## 【0029】

## 実施例2

## 中大脳動脈閉塞:

## 2.1 閉塞前投与

抱水クロラル(400mg/kg腹腔内投与)で麻酔したSprague-Dawleyラットを用いて実験を行った。気管にカニユーレを挿入し、動物に空気および補足酸素を機械的に通して血液ガスを正常範囲内に保持した。直腸温度を連続的にモニターし、37℃に保持した。カテーテルを大腿動脈中に入れて、体血圧を測定し、血液ガスをモニターした。薬物を注入するために大腿静脈にカニユーレを挿入した。頸部正中切開を行って、右総頸動脈を露出させた。その分枝を凝固させた後、外頸動脈(ECA)を遠位で開放した。熱溶融性グルーの遠位円筒状シリコン(長さ2mm、直径0.38mm)を有するナイロン糸(直径0.22mm)をECAの内腔に挿入し、MCAの源まで内頸動脈中を前進させた。MCAの血流を回復するために、30分後にナイロン糸を取り出してカットした。

## 【0030】

組織学的分析:手術の24時間後、安楽死させた。脳を迅速に取り出し、-50℃のイソペンタン中で凍結させ、-80℃で保存した。クライオスタットでカットした冠状脳断面(20μm)をチオニンで染色し、イメージアナライザーを用いて分析した。病変領域の境界は、健常組織の色と比較して変質組織の組織学的染色の淡色度により定めた。ラットの定位地図を用いて対象領域を決定し、画像解析システムを用いて病変領域を計測した。

## 【0031】

この一連の実験では、ラットに塩類溶液(n=5)(5μl/分)の静脈内注入を4時間かけて行った。2時間後、ラットのMCAを30分間閉塞させ、その後、再灌流させた。24時間後、ラットを屠殺し、脳の組織学的分析にかけた。他の群の実験では、ラットにrHDL(n=5)(5μl/分)の静脈内注入を120mg/kgの用量で4時間かけて行った。2時間後、ラットのMCAを30分間閉塞させ、その後、再灌流させた。24時間後、ラットを屠殺し、脳の組織学的分析にかけ

た。

【 0 0 3 2 】

結果を表3に示す。

【 0 0 3 3 】

MCA閉塞モデルにおいて、以下の結果を得た。

【表 3】

表3:病変体積 (mm<sup>3</sup>)

ラット	対照	rHDL
1	158.94	54.18
2	229.78	35.27
3	201.52	37.64
4	193.02	34.64
5	210.24	76.74
n	5.00	5.00
平均値	198.70	47.69
標準偏差	26.08	18.11
標準誤差	11.66	8.10

【 0 0 3 4 】

rHDLにより、脳ネクロシス体積は対照ラットと比較して76%減少した。

【 0 0 3 5 】

## 2.2 閉塞後投与

MCAo(中大脳動脈閉塞)モデルで、損傷の3時間後にrHDLを投与した。12匹のラットで、ナイロン糸を頸動脈中に挿入することにより中大脳動脈(MCA)の一時的閉塞を達成し、30分後に血流を回復させた。3時間後、rHDL(4時間かけて120mg/kg、4時間かけて6ml/kg)または塩類溶液(4時間かけて6ml/kg)のいずれかの静脈内注入を行った。ラットをrHDL群または対照群にランダムに割り当てた。4匹のさらなるラットで、同一のMCA閉塞手順を踏んだ。ただし、頸動脈血流を妨害することなくナイロン糸を内頸動脈中に停止させ、30分後に取り出した(擬似MCAo群)。3時間後、この群のうちの2匹のラットにrHDLを投与し、2匹のラットに塩類溶液を静脈内投与した(4時間かけて6ml/kg)。24時間後、すべてのラットを屠殺し、脳を取り出して組織学的分析にかけた。ネクロシス領域の境界は、健常組織の色と比較して組織学的染色の淡色度により定めた。ラットの定位地図を用いて対象領域を決定し、画像解析システム(NIH Image)を用いてネクロシス領域を計測した。

【 0 0 3 6 】

擬似MCAo群では、病変は存在しなかった。

【 0 0 3 7 】

塩類溶液またはrHDLの静脈内投与により処置された他の12匹のラットでMCA閉塞後に画像解析から得られた結果を表4に示す。この結果は、閉塞の3時間後にrHDLの注入を行うことにより梗塞体積(mm<sup>3</sup>)が60%減少したことを示している。



【表 4】

表4

病変面積 (mm <sup>3</sup> )			
	対照		rHDL
ラット			
1	88.94		87
2	118.9		46.91
3	110.06		43.91
4	121.09		43.13
5	224.14		36.65
6	157.45		35.63
平均値	136.8		48.9
標準偏差	48.2		19.2
		減少%	64%
		p (スチューデントのt - 検定)	0.0020

【 0 0 3 8 】

ネクローシス体積は、対照ラットと比較して64%減少した。

【 0 0 3 9 】

結論：いずれのモデルにおいても、プラセボ処置された対照と比較して、rHDLで処置した動物で、梗塞体積の劇的な減少がみられた。興奮毒性モデル：60.6%または36%のネクローシス体積の減少；MCA閉塞モデル：76%または60%の減少。

【 0 0 4 0 】

### 実施例3

#### 脳卒中のラットモデル(MCA閉塞モデル)におけるrHDLの投与方法

この試験では120匹の雄Sprague Dawleyラットを使用した。100匹のラットに一過性閉塞または永久閉塞のいずれかを行った。20匹のラットを外科的対照およびrHDL対照として利用した。脳卒中誘発の2時間前または3もしくは6時間後、rHDL(120mg/kg/4時間)を注入した。実施例2のときと同一の糸閉塞法を使用した。

【 0 0 4 1 】

ラットを3つの処置集団に分けた。第1群には、予防用量のrHDLを投与し、その2時間後に一過性MCA閉塞(2時間)を行い、閉塞時、処置を継続して行った。次に、動脈を再灌流させた。第2群には、一過性MCA閉塞を行い、その後、再灌流を行った。3時間後または6時間後のいずれかで、HDLによる処置を行った。第3群には、永続的MCA閉塞を行い、閉塞の3時間後または6時間後に処置を行った。

【 0 0 4 2 】

上記のプロトコールに従って、4つの標準的運動神経学的試験、すなわち、前肢屈曲試験、胴体捻り(torso twisting)試験、側方押出し(lateral push)試験、および可動性試験により、ラットの神経学的変化を調べた。各試験のスコアを合計し、結果を図1に示した。

#### 【 0 0 4 3 】

この図から明らかなように、前処置としておよび閉塞(一過性閉塞および永久閉塞の両方)の3または6時間後の投薬としてrHDLを与えたいずれの場合についても、未処置のラットの場合よりも良好な神経学的スコアを呈した。

#### 【 0 0 4 4 】

神経学的分析後、ラットを屠殺し、それらの脳を取り出した。光の反射により梗塞面積を測定するバリスティックライト(ballistic light)法を用いて、ラットの脳の断面を調べた。rHDLで処置した永久MCAoおよび一過性MCAoの結果を図2および3に示す。

#### 【 0 0 4 5 】

これらのグラフからわかるように、ラットへのrHDLの投与を、(i)閉塞の2時間前に行った場合、全梗塞体積は、54%減少し、(ii)一過性閉塞の3時間後に行った場合、65%減少し、(iii)一過性閉塞の6時間後に行った場合、62%減少する。永久閉塞の場合にも、59%という類似の減少が両方の処置時間で観測された。

#### 【 0 0 4 6 】

したがって、rHDLの投与は、閉塞前の予防的処置として、および閉塞後の異なる2つの時点での治療的処置として、効能がある。より特定的には、予防的処置と治療的処置とを組み合わせることが可能である。

#### 【 0 0 4 7 】

#### 参考文献：

文献 1 : American Heart Association (AHA), 2000

文献 2 : Hays SJ. 神経炎症性疾患を処置する治療法(Therapeutic approaches to the treatment of neuroinflammatory diseases). Curr Pharm Des 4:335-348, 1998

文献 3 : Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low WC, 病巣脳虚血後の再灌流損傷：炎症の役割および治療限界(Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon). Neurosurgery 43:1382-1396, 1998

文献 4 : Barone FC, Feuerstein GZ. 炎症性メディエーターおよび脳卒中：新規治療法の新たな可能性(Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics). J Cereb Blood Flow Metab 19:819-834, 1999

文献 5 : Morgan WM, and O'Neill JA. 小児患者の出血性および閉塞性ショック(Hemorrhagic and obstructive shock in pediatric patients). New Horiz 6: 150-154, 1998

文献 6 : Demetriades D, Smith JS, Jacobson LE, Moncure M, Minei J, Nelson BJ and Scannon PJ. 外傷による出血を有する患者における殺細菌性/透過度増大性タンパク質(rBP121)：多重癌第II相臨床試験の結果(Bactericidal/permeability-increased protein (rBP121) in patients with hemorrhage due to trauma: results of a multicancer phase II clinical trial). RBP121 Acute Hemorrhage Trauma Study Group. J Trauma 46: 667-676, 1999

文献 7 : Regel G, Gotz M, Weltner T, Sturm JA and Tscherne H. 重篤な外傷後の器官障害のパターン(Pattern of organ failure following severe trauma). World J Surg 20: 422-429, 1996

文献 8 : Cryer HG. 臨床的虚血および再灌流損傷の治療法(Therapeutic approaches for clinical ischaemia and reperfusion injury). Shock 8: 26-32, 1997

文献 9 : Spieker LE, Sudano I, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Luscher TF, Noth G. 高密度リポタンパク質は高コレステロール血症の男性の内皮機能を回復させる(High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men). N Engl J Med, 2000. (in preparation)

文献 10 : Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. 脳卒中および神経外傷の神経病理におけ

10

20

30

40

50

るサイトカインの役割(The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma). Neuroimmunomodulation 5:143-159, 1998

文献 1 1 : DeGraba TJ. 急性脳卒中後の炎症の役割: 抗接着分子療法探求の有用性(The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy). Neurology 51:62-68, 1998

文献 1 2 : Benveniste EN. 中枢神経系におけるサイトカインの作用(Cytokine actions in the central nervous system). Cytokine Growth Factor Rev 9:259-275, 1998

文献 1 3 : Van Wagoner NJ, Benveniste EN. 星状細胞におけるインターロイキン6の発現および調節(Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes). J. Neuroimmunol 100:124-139, 1999

文献 1 4 : Touzani O, Boutin H, Chuquet J, Rothwell N. 脳虚血へのインターロイキン-1の関与の可能性のある機序(Potential mechanism of interleukin-1 involvement in cerebral ischemia). J Neuroimmunol 100:203-215, 1999

文献 1 5 : del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. 炎症および脳卒中: 虚血に対する脳応答におけるサイトカイン、接着分子、およびiNOSの推定上の役割(Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain responses to ischemia). Brain Pathol 10:95-112, 2000

文献 1 6 : Du C, R Hu, CA Csernansky, CY Hsu, DW Choi. 緩和な病巣脳虚血後の極遅延型の梗塞: アポトーシスの役割?(Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: A role for apoptosis?) J Cereb Blood Flow Metab 16:195-201, 1996

文献 1 7 : Matsuda Y, Hirata K, Inoue N, Suematsu M, Kawahima S, Akita H, Yokoyama M. 高密度リポタンパク質は、内皮依存性動脈弛緩に及ぼす酸化型低密度リポタンパク質の阻害効果を逆転させる(High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation). Circ Res 72(5):1103-1109, 1993

文献 1 8 : Chander R, Kapoor NK. 高密度リポタンパク質はスーパーオキシドアニオンのスカベンジャーである(High density lipoprotein is a scavenger of superoxide anions). Biochem Pharmacol 40(7):1663-1665, 1990

文献 1 9 : Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhao RC, Abdalla DS.

高脂血症患者における酸化ストレスの評価(Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia). Atherosclerosis 117(1):61-71, 1995

文献 2 0 : Huang JM, Huang ZX, Zhu W. 高密度リポタンパク質サブ画分による低密度リポタンパク質の銅触媒酸化の阻害機序(Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein). Clin Biochem 31(7):537-543, 1998

文献 2 1 : Cockerill GW et al. 高密度リポタンパク質は、出血性ショックのラットモデルにおいて末期器官障害をレスキューする(High-density lipoproteins rescue end-stage organ failure in a rat model of haemorrhagic shock). J. Submicroscopic Cyt. Path. 32(3): 353, 2000

【図面の簡単な説明】

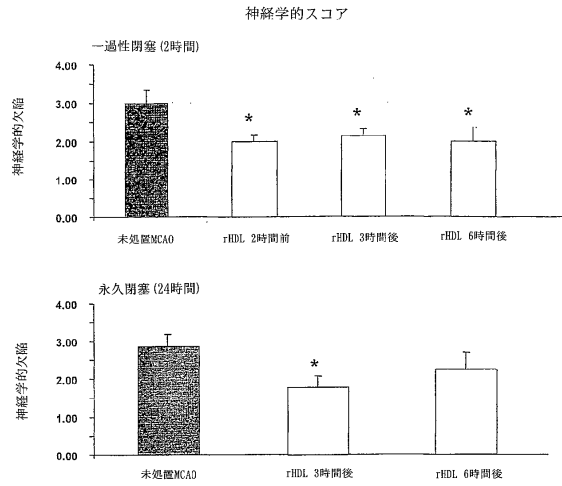
【 0 0 4 8 】

【図 1】実施例 3 における神経学的試験の結果を示す図である。

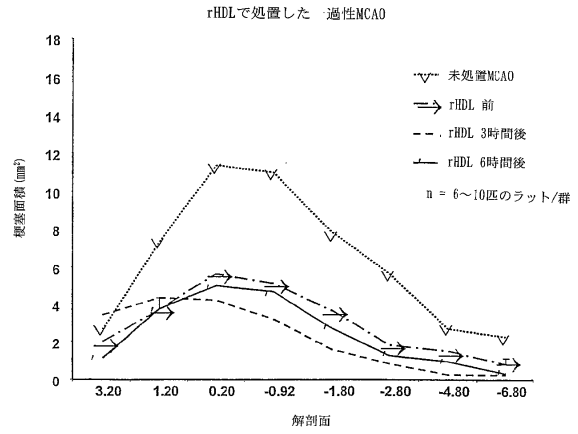
【図 2】実施例 3 における rHDL による処置前後の永久MCAoの梗塞面積を測定した結果を示す図である。

【図 3】実施例 3 における rHDL による処置前後の一過性MCAoの梗塞面積を測定した結果を示す図である。

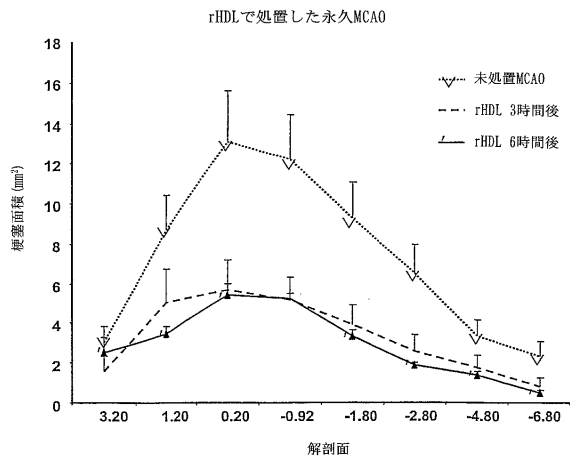
【図 1】



【図 2】



【図 3】



## フロントページの続き

- (72)発明者 ラング, マルクス, ジー .  
スイス国 シーエイチ - 4 1 0 5 ピエル - ベンケン, ヴィンケルヴェーク 8
- (72)発明者 レルヒ, ペーター, ジー .  
スイス国 シーエイチ - 3 0 0 7 ベルン, ローゼンヴェーク 2 0
- (72)発明者 パテルノ, ロベルト  
イタリア国 アイ - 8 0 1 3 2 ナポリ, ヴィア ジェンナーロ セーラ 7 5

審査官 長部 喜幸

- (56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 1 3 9 3 9 (WO, A 1 )  
国際公開第 0 1 / 0 3 8 3 9 5 (WO, A 1 )  
特開平 0 9 - 1 8 8 6 5 8 (JP, A )  
国際公開第 0 1 / 0 0 3 7 0 5 (WO, A 1 )  
G. W. Cockerill, HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS RESCUE END-STAGE ORGAN FAILURE IN A RAT MODEL OF HAEMORRHAGIC SHOCK, JOURNAL OF SUBMICROSCOPIC CYTOLOGY AND PATHOLOGY, 2 0 0 0 年, Vol.32, No.3, Abstract A055  
Juan Jose Badimon, Regression of Atherosclerotic Lesions by High Density Lipoprotein Plasma Fraction in the Cholesterol-fed Rabbit, J. Clin. Invest., 1 9 9 0 年, Vol.85, Pages 1234-1241

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00  
A61K 45/00  
BIOSIS(STN)  
CAplus(STN)  
EMBASE(STN)  
MEDLINE(STN)  
JSTPlus(JDreamII)  
JMEDPlus(JDreamII)  
JST7580(JDreamII)