(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2008-534520
(P2008-534520A)
(43)公表日　平成20年8月28日(2008.8.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 31/353	(2006.01)	A61K	31/353		4C076
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111	4C086
A61P 9/12	(2006.01)	A61P	9/12		
A61P 9/10	(2006.01)	A61P	9/10		
A61P 9/00	(2006.01)	A61P	9/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）　最終頁に続く

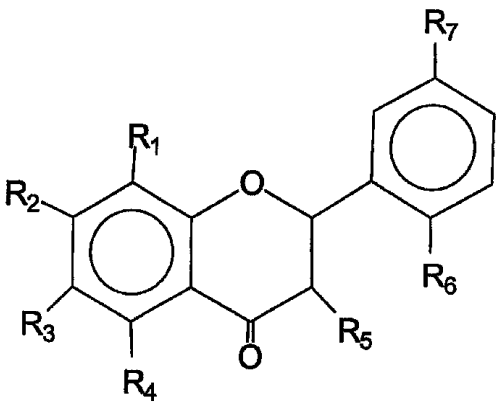
(21)出願番号　特願2008-503326 (P2008-503326)
(86)(22)出願日　平成18年3月30日 (2006.3.30)
(85)翻訳文提出日　平成19年11月28日 (2007.11.28)
(86)国際出願番号　PCT/BR2006/000060
(87)国際公開番号　WO2006/102728
(87)国際公開日　平成18年10月5日 (2006.10.5)
(31)優先権主張番号　PI0502411-0
(32)優先日　平成17年3月31日 (2005.3.31)
(33)優先権主張国　ブラジル(BR)

(71)出願人　507325334
ユニベルシダデ　フェデラル　デ　ミナス　ジェライス
ブラジル国　３１２７０－９０１　ミナス　ジェライス、　ベロ　ホリゾンテ、パムプルハ、アベニダ　アントニオ　カルロス、　６６２７
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫
(74)代理人　100102897
弁理士　池田　幸弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ジオクレイン、フロラノール又は類似体ベースの、ホスホジエステラーゼのタイプ１から５のアイソフォーム（ＰＤＥ１、ＰＤＥ２、ＰＤＥ３、ＰＤＥ４、ＰＤＥ５）の強力で選択的な阻害剤

(57)【要約】
本発明は、ジオクレイン（ｄｉｏｃｌｅｉｎ）、フロラノール（ｆｌｏｒａｎｏｌ）又は天然若しくは合成の類似体に関するものであり、シクロデキストリンとの包接化合物、及びＰＬＧＡ、ＰＬＡ、ＰＧＡ又はそれらの混合物などの生分解性又は非生分解性ポリマーを使用する制御放出デバイス、心血管疾患の研究及び治療のためのそれらの各医薬組成物及び関連製品に関係する。本発明で開発される薬物を、ＰＤＥ類の異なるアイソフォームを阻害するそれらの能力について試験した。これらは、また、ホスホジエステラーゼのタイプ１のアイソフォーム（ＰＤＥ１）を強力で選択的な方式で阻害する能力のある治療兵器における重要な薬剤及びそれらの医薬組成物である。本発明は、タイプ１～５のホスホジエステラーゼを阻害する形態として２種のフラボノイド、すなわちジオクレイン及びフロラノール及びそれらの類似体、並びにシクロデキストリン及びそれらの包接化合物、加えて薬学的に及び薬理学的に許容される賦形剤を使用する医薬組成物を使用する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ホスホジエステラーゼのタイプ１から５のアイソフォーム（ＰＤＥ１、ＰＤＥ２、ＰＤＥ３、ＰＤＥ４及びＰＤＥ５）の強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法であって、
ａ）図１に記載の一般式の、ＰＤＥ類に対して阻害活性を有するジオクレイン、フロラノール又は類似体をベースにした薬物（式中、R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6及びR^7は、同一又は異なってよい官能基であり、水素、ヒドロキシル、メトキシル及びプレニルを挙げることができる）、
ｂ）ジオクレイン、フロラノール又は類似体とシクロデキストリン及びその誘導体との間の包接化合物、
ｃ）薬学的に及び薬理学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物、
ｄ）ジオクレイン、フロラノール又は類似体と、それらのシクロデキストリン、及びその誘導体の包接化合物の、ＰＬＧＡ、ＰＧＡ、ＰＬＡ及びそれらの混合物などの生分解性ポリマーからの制御放出システム
を含むことを特徴とする方法。
【請求項２】
フラボノイド、ジオクレイン及びフロラノール又は類似体の使用を特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法。
【請求項３】
医薬組成物を得るための、ジオクレイン及びフロラノール又は類似体とシクロデキストリン及びその誘導体との間の包接化合物の調製及び使用を特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法。
【請求項４】
経口使用の医薬組成物における、ジオクレイン及びフロラノール又は類似体とシクロデキストリン及びその誘導体との間の医薬組成物の獲得及び使用を特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法。
【請求項５】
生分解性ポリマーＰＬＡ、ＰＧＡ、ＰＬＧＡ及びそれらの誘導体を使用する制御放出システムによる、ジオクレイン及びフロラノール又は類似体とシクロデキストリン及びその誘導体との間の医薬組成物の獲得及び使用を特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法。
【請求項６】
シクロデキストリン中に包接された又は包接されていない場合の、ジオクレイン及びフロラノール又は類似体のPDE_1に対する選択的阻害能力及び活性を特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法。
【請求項７】
薬学的に及び薬理学的に許容される賦形剤を含む、ジオクレイン及びフロラノール又は類似体のＰＤＥ１に対する選択的阻害活性及び能力を特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法。
【請求項８】
シクロデキストリン中に包接された又は包接されていないジオクレイン及びフロラノール又は類似体を使用する場合の、プロテインキナーゼＡ及びプロテインキナーゼＧの活性化を介するヒト動脈及び静脈に対する血管拡張活性を特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方

法。
【請求項９】
ジオクレイン及びフロラノール又はそれらの天然若しくは合成の類似体を薬学的に及び薬理学的に許容される賦形剤と共に使用する場合の、プロテインキナーゼＡ及びプロテインキナーゼＧの活性化を介するヒト動脈及び静脈に対する血管拡張活性を特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法。
【請求項１０】
プロテインキナーゼＡ及びプロテインキナーゼＧの活性化を介して耐性を有する動脈に対し血管拡張活性を示すことを特徴とする、請求項１に記載の、ホスホジエステラーゼのアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法。
【請求項１１】
化合物ジオクレイン及びフロラノール又はその類似体をベースにした医薬及び／又は医薬組成物の開発のための分子モデルとしての医薬組成物の使用を特徴とする、動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症、再狭窄の研究及び治療のための、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
シクロデキストリン又はその誘導体中に包接された、或いは担体及び／又は薬学的に許容される賦形剤と隔離又は混合状態で合わせられた又は包接された場合の、前記化合物ジオクレイン及びフロラノール又はそれらの類似体の生物学的利用能の増大を特徴とする、筋内、経口、静脈内、皮下、局所、吸入（肺、鼻腔内、口内）経路を経由して、或いは埋め込み又は注入可能なデバイスとして使用されることを意図した、請求項１に記載の組成物及び製剤。
【請求項１３】
シクロデキストリン又はその誘導体中に包接された、或いは担体及び／又は薬学的に許容される賦形剤と隔離又は混合状態で合わせられた又は包接された場合の、化合物ジオクレイン及びフロラノール又はそれらの天然若しくは合成の類似体の使用を特徴とする、筋内、経口、静脈内、皮下、局所、吸入（肺、鼻腔内、口内）経路を経由して、或いは埋め込み又は注入可能なデバイスとして使用されることを意図した、請求項１に記載の組成物及び製剤。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ジオクレイン（ｄｉｏｃｌｅｉｎ）、フロラノール（ｆｌｏｒａｎｏｌ）又は天然若しくは合成の類似体をベースにした、ホスホジエステラーゼのタイプ１から５（ＰＤＥ１、ＰＤＥ２、ＰＤＥ３、ＰＤＥ４、ＰＤＥ５）のアイソフォームの強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法に関するものであり、シクロデキストリンとの包接化合物、及びＰＬＧＡ、ＰＬＡ、ＰＧＡ又はこれらの混合物などの生分解性若しくは非生分解性ポリマーを使用する制御放出デバイス；心血管疾患の研究及び治療のためのそれらの各医薬組成物及び関連製品に関係する。
【背景技術】
【０００２】
本発明で開発された薬物は、ＰＤＥ類の様々なアイソフォームを阻害するそれらの能力について試験された。これらは、また、強力で選択的にホスホジエステラーゼのタイプ－１のアイソフォーム（ＰＤＥ１）を阻害する能力のある治療兵器（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃａｌ　ａｒｓｅｎａｌ）における最初の薬物、及びそれらの医薬組成物である。
【０００３】
本発明は、タイプ１から５のホスホジエステラーゼを阻害する形態として２種のフラボノイド、すなわちジオクレイン及びフロラノール、並びにそれらの類似体、及びシクロデ

キストリン及びそれらの包接化合物、及び薬学的に及び薬理学的に許容される賦形剤を使用する医薬組成物を採用する。

【０００４】

ホスホジエステラーゼは、環状ヌクレオチドであるＡＭＰｃ（サイクリックアデノシンモノホスフェート）及びＧＭＰｃ（サイクリックグアノシンモノホスフェート）の分解を触媒する非特異的酵素であり、人体及びその他哺乳動物のいくつかの器官で作用する。

【０００５】

ＡＭＰｃ及びＧＭＰｃは、心血管系の細胞を含め実際上すべてのタイプの細胞における代謝、収縮性、運動性及び転写などの無数の細胞機能を調節する上で重要な役割を果たす第２メッセンジャーである。ＰＤＥは、ＡＭＰｃ及びＧＭＰｃを分解する唯一の手段であり、従って、細胞機能の重要なレギュレーターである［Ｐｏｌｓｏｎ　Ｊ．Ｂ．ａｎｄ　Ｓｔｒａｄａ　Ｓ．Ｊ．、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．、（１９９６）３６、４０３～４２７］。

【０００６】

ＡＭＰｃは、細胞表面受容体のホルモン刺激に応答してＡＴＰから作られるヌクレオチドである。ＡＭＰｃは、細胞内シグナルの伝達において重要な分子である。ＡＭＰｃは、シグナル伝達分子として作用し、プロテインキナーゼＡを活性化し、ホスホジエステラーゼで加水分解されるとＡＭＰを生成する。いったん形成されると、ＡＭＰｃは、細胞内効果を引き起こし、そのため細胞間ホルモンメディエーターと考えられる。

【０００７】

ＧＭＰｃは、グアニル酸シクラーゼによってＧＴＰから作られるヌクレオチドである。グアニル酸シクラーゼは、いくつかの手段で活性化されることができ、それら手段の１つが、血管の内皮から平滑筋細胞に拡散する一酸化窒素によるものである。心房性ナトリウム利尿ペプチドも、ＧＭＰｃの形成を刺激する。ＧＭＰｃは、プロテインキナーゼＧを活性化し、次には、そのプロテインキナーゼＧが、平滑筋中で作用し、カリウムチャネルの開口を刺激し、細胞の過分極を引き起こすことができる。それは、カルシウムの細胞質から細胞外媒質への、及び細胞質から筋小胞体への移動を引き起こすポンプCa^{2+}／K^{+}－ＡＴＰアーゼを活性化することによっても作用できる。このことは、細胞内の遊離カルシウムの低下を引き起こす。さらに、プロテインキナーゼＧは、収縮性線維をリン酸化して、それらをカルシウムに対してより感じ難くする。これらの効果は、ＧＭＰｃを、明らかにカルシウムに依存する筋収縮を低下させるメッセンジャー分子にする。ＧＭＰｃの濃度は、血管緊張の変化、勃起及び細胞増殖などの無数の生理学的事象において重要である。ホスホジエステラーゼは、ＧＭＰｃの寿命を低下させるように作用する。

【０００８】

今日まで、１１種の異なるファミリーのＰＤＥアイソザイムが発表されており、それらの各アイソザイムが果たす厳密な生理学的役割を知ることは、いまなお複雑であり研究中である［Ｓｏｄｅｒｌｉｎｉｎｇ　Ｓ．Ｈ．ａｎｄ　Ｂｅａｖｏ　Ｊ．Ａ．、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．、（２０００）１２、１７４～１７９］。各ファミリーには、複数の遺伝子及び選択的「スプライシング」の存在の結果として複数のアイソフォームが存在する。存在する各種ホスホジエステラーゼは、それらの一次構造、ＡＭＰｃ及びＧＭＰｃを加水分解する能力、組織及び細胞内分布、並びに薬理学的モジュレーター及び阻害剤に対する感度を異にする［Ｏ’Ｄｏｎｎｅｌ　Ｊ．Ｍ．ａｎｄ　Ｚｈａｎｇ　Ｈ．Ｔ．、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．、（２００４）２５、１５８～１６３］。

【０００９】

ＰＤＥ１は、心血管系（血管及び心筋細胞）、脳、及びその他の神経組織中に、また腎臓及び副腎髄質中に存在する。それらは、Ca^{+2}及びカルモジュリン（ＣａＭ）によって活性化される。変種ＰＤＥ１Ａ及びＰＤＥ１Ｂは、ＧＭＰｃを選択的に加水分解するが、変種ＰＤＥ１Ｃは、ＡＭＰｃ及びＧＭＰｃの双方を加水分解する。ＰＤＥ１Ａは、有機ナイトレートに対して血管によって発現される耐性において暗示されており、従って、こ

のアイソザイムの選択的阻害剤は、ナイトレートに対する耐性を制限するための治療ツールとして使用される可能性がある。ＰＤＥ１Ｃは、血管平滑筋細胞の増殖において暗示されている。この後者のアイソフォームに対する選択的阻害剤の使用は、血管形成術によって引き起こされる損傷及び炎症、アテローム性動脈硬化症、動脈性高血圧などで見出される増殖応答を最小にする可能性がある。ＰＤＥ１Ｃは、インスリンの分泌においても暗示されている。心血管系で、ＰＤＥ１は、脳循環の調節においても暗示されている［Ｍａｕｒｉｃｅ　Ｄ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（２００３）６４、５３３～５４６］。

【００１０】

ＰＤＳ２は、ＧＭＰｃによって刺激され、ＡＭＰｃ及びＧＭＰｃの双方を加水分解する。それらは、血小板、心筋細胞、内皮及び血管細胞、並びに副腎顆粒細胞中に見出される。ナトリウム利尿ペプチド及び一酸化窒素供与体は、細胞性ＧＭＰｃを増加させ、これら細胞の一部においてＰＤＥ２を活性化する［Ｍａｕｒｉｃｅ　Ｄ．Ｈ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（１００３）６４、５３３～５４６］。

【００１１】

ＰＤＥ３は、血管、心臓、巨核球、卵母細胞、肝臓、脂肪細胞、脳、腎集合管、及び発育している精子中に存在する。それらは、ＡＭＰｃ及びＧＭＰｃの双方を加水分解する。それらは、プロテインキナーゼＡ及びプロテインキナーゼＢによって活性化されるか、又はインスリン活性化キナーゼによって活性化され、ＧＭＰｃによって阻害される。細胞レベルで、ＰＤＥ３は、脂質及び炭水化物の代謝に対するインスリンの効果のレギュレーターとして重要な役割を果たし、心筋細胞のＬタイプCa^{2+}チャネルの活性を調節することにおいて作用し、筋肉緊張及び血管増殖の調節過程、並びに炎症過程において暗示される［Ｍａｕｒｉｃｅ　Ｄ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（２００３）６４、５３３～５４６］。

【００１２】

ＰＤＥ４は、血小板を除く殆どすべてのタイプの細胞中に見出される。それらは、ＡＭＰｃを特異的に加水分解することで特徴付けられる。このファミリーのＰＤＥは、４タイプの独立にコードされた酵素（ＰＤＥ４Ａ～ＰＤＥ４Ｄ）からなる。分子レベルで、それらは、ＡＭＰｃの濃度を高めるように作用する。ＰＤＥ４は、免疫学的及び炎症性疾患、並びにうつ病の生理病理学において広く暗示される［Ｍａｕｒｉｃｅ　Ｄ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（２００３）６４、５３３～５４６］。

【００１３】

ＰＤＥ５は、ＧＭＰｃを特異的に加水分解する。このファミリーは、３種の異なるタンパク質（ＰＤＥ５Ａ１～３）をコードしている単一の遺伝子からなる。ＰＤＥ５は、脳、肺、血小板、内臓及び血管の平滑筋、並びに腎臓のような無数の組織中に存在する。ＰＤＥ５の阻害剤の中で、シルデナフィル（ｓｉｌｄｅｎａｆｉｌ）（Ｖｉａｇｒａ（登録商標））などは、勃起機能不全及び肺高血圧で使用される［Ｌｉｎ　Ｃ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．、Ｕｒｏｌｏｇｙ、（２００３）６１、６８５～６９２］。

【００１４】

ホスホジエステラーゼの作用機序に関連した多くの病理が研究されており、既知アイソフォームの阻害が、各種疾患の治療機序であることが知られている。そのため、ＰＤＥ１～ＰＤＥ５阻害剤は、勃起機能不全問題の治療に［Ｒｏｓｅｎ　Ｒ．Ｃ．ａｎｄ　Ｋｏｓｔｉｓ　Ｊ．Ｂ．、Ａｍ．Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｌ．、（２００３）９２、９Ｍ～１８Ｍ］、喘息及びその他の炎症性疾患の治療で［Ｔｏｒｐｈｙ　Ｔ．Ｊ．、Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ、Ｍｅｄ．、（１９９７）１５７、３５１～３７０］使用されてきた。

【００１５】

フラボノイドは、数１０億年来存在している化合物であり、広範な種類の植物中に見出すことができる。それらは、葉及び花の色彩に富む態様の原因であり、植物のその他の部分にも存在する場合がある。６つの部類のフラボノイド、すなわち、フラバノン、フラボ

ン、フラバン、フラボノール、イソフラボノイド、アントシアニンが存在し、それらは、複素環式酸素環の周りの構造的特徴を異にする。その相違は、各クラスでの吸収に見出される［Ｐｅｔｅｒｓｏｎ　Ｊ．ａｎｄ　Ｄｗｙｅｒ　Ｊ．、Ｎｕｔｒ．Ｒｅｓ．、（１９９８）１８、１９９５～２０１８］。

【００１６】

天然起源のこの広いクラスの物質は、その合成がヒト種では起こらず、生体系に対して作用する重要な薬理学的特性を有する。結果として、これらの特性の多くは、ヒトの健康に関して有益な方式で作用する。

【００１７】

４０００種を超える様々なフラボノイドが存在し、それらは、抗酸化、抗炎症、抗アレルギー、抗ウイルス及び抗腫瘍形成作用などの種々の生物化学的及び薬理学的活性を示す。植物中では、生物化学的活性に加え、フラボノイドは、毒性薬物、色素及び光保護材の前駆体として作用する。

【００１８】

フラボノイドに帰すことのできるいくつかの薬理学的活性の中でも、抗酸化能力、抗炎症活性及び血管拡張効果、抗アレルギー作用、腫瘍の発育に対抗する活性、抗肝毒性、抗潰瘍誘発性、抗血小板、並びに抗微生物及び抗ウイルス作用が指摘される。フラボノイドは、また、血中脂質低下活性を有すること［Ｍａｔｓｕｄａ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｔｈｎｏｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（１９８６）１７、２１３～２４］及びＬＤＬ受容体の活性を増大させること［Ｋｉｒｋ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｎｕｔｒ．、（１９９８）１２８、９５４～９５９；ｗｗｗ．ｐｏｌｙｍａｒ．ｃｏｍ．ｂｒ／ｓａｕｄｅ／ｓ　ｆｌａｖｏｎｏｉｄｅｓ．ｐｈｐ］に加え、白血球の活性化、血小板の接着、凝集及び分泌のようなアテローム性動脈硬化症の始まりに直接関連している過程の各種段階を阻害できること［Ｈｌａｄｏｖｅｃ　Ｊ．、Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｂｏｈｅｍｏｓｌｏｖ．（１９８６）３５、９７～１０３］も知られている。

【００１９】

フラボノイドは、酵素作用の阻害剤としても研究されている。文献は、いくつかのタイプの酵素、例えば、シクロオキシゲナーゼ、エストロゲンシンターゼ、グルタチオンシンターゼ、リポキシゲナーゼ、キサンチンオキシダーゼ、及びホスホジエステラーゼに対するフラボノイドの阻害活性を報告している［Ｐｅｔｅｒｓｏｎ　Ｊ．ａｎｄ　Ｄｗｙｅｒ　Ｊ．、Ｎｕｔｒ．Ｒｅｓ．、（１９９８）、１８、１９９５～２０１８］。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００２０】

ホスホジエステラーゼのアイソフォーム、ＰＤＥ１、ＰＤＥ２、ＰＤＥ３、ＰＤＥ４及びＰＤＥ５の阻害剤として、及び新規医薬開発のためのモデルとしてのジオクレイン、フロラノール及び類似体の使用は、従来技術中に見出されなかった。さらに、それらのアイソフォーム１、２、３、４及び５のホスホジエステラーゼの阻害剤として経口製剤中で使用するための、及びアテローム性動脈硬化症、高血圧及び関連する心血管疾患などの変性慢性疾患の研究及び治療のための、ジオクレイン及びフロラノールとシクロデキストリンとの間の包接化合物を調製する方法、並びに新規医薬を開発するためのモデル及びそれらの医薬組成物としてのそれらの使用は、従来技術中に見出されなかった。

【課題を解決するための手段】

【００２１】

本発明は、ＰＤＥ１～５の強力で選択的な阻害剤としての式Ｉの化学構造をもつ新規薬物の開発によって特徴付けられる。本発明は、また、細胞増殖に対する予防薬、血管拡張薬、抗高血圧薬、抗炎症薬としての、及びアテローム性動脈硬化症に対する予防薬としての図１の化合物の効果を目的とする。

【００２２】

図１の式で、R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6及びR^7は、同一又は異なってよい

官能基であり、限定はしないが、水素、ヒドロキシル、メトキシル及びプレニルを挙げることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２３】

ジオクレイン（５，２’，５’－トリヒドロキシ－６，７－ジメトキシフラバノン）、図１は、フラバノンのクラスのフラボノイドであり、カンキツ類果実中に高濃度で見出される一群の化合物である。フラバノン類は、特定タイプの癌、特に結腸癌及び乳癌に対するそれらの生物活性に関して傑出しており、それらの血小板抗凝集、血管拡張特性、及び血漿レベルでの細胞接着阻害によって静脈及び動脈の循環を改善する。さらに、それらは、鎮痛、抗アレルギー及び抗炎症特性を示す。

【００２４】

ジオクレインは、Ｓｐｅａｒｉｎｇ　Ｐ．らが記述している方法を利用するその合成から得られている［Ｊ．Ｎａｔ．Ｐｒｏｄ．、（１９９７）６０、３９９～４００］。このフラボノイドは、最初は、ジオクレアグランジフローラ（Ｄｉｏｃｌｅａ　ｇｒａｎｄｉｆｌｏｒａ）のエタノール抽出物からのその単離に関して発表された。この植物は、その医学的価値について知られており、ブラジル北東部、特にいわゆる「カアテンガ（ｃａａｔｉｎｇａ）」（発育を阻害された貧弱な森林）及び「セラド（ｃｅｒｒａｄｏ）」（発育を阻害された植生をもつ小区画）の地域に生育している［Ｊｅｎｋｉｎｓ　Ｔ．ｅｔａｌ．、Ｐｈｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、（１９９９）５２、７２３～７３０］。それらの血管拡張特性［Ｌｅｍｏｓ　Ｖ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（１９９９）３８６、４１～４６］に加え、ジオクレインの鎮痛効果も知られている［Ｂａｔｉｓｔａ　Ｊ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｔｈｎｏｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（１９９５）４５、２０７～２１０］。その３つのヒドロキシルにもかかわらず、芳香族環及び複素環は、それに非極性の性質を付与し、水に対する溶解性が低く、ＤＭＳＯ及びメタノールに可溶である。

【００２５】

ジオクレインは、その疎水性、不安定性、及び経口で投与された場合に活性が殆どないか皆無であることのため、その使用に制約がある。それゆえ、本発明は、シクロデキストリン類及びそれらの誘導体との包接化合物の形成、及び経口形態で適用された場合に高い生物学的利用能を有する活性のある医薬組成物の獲得を利用する、従来技術に対する解決策を提案する。

【００２６】

フロラノールは、その化学式が図１に記載されているが、フラボノン類のクラスに属するフラボノイドであり、血管拡張活性を示す［Ｒｅｚｅｎｄｅ　Ｂ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．、Ｐｌａｎｔａ　Ｍｅｄ．、（２００４）７０、４６５～４６７］。

【００２７】

アイソフォーム２及び５に対するその他のホスホジエステラーゼ阻害剤も周知ではあるが、いくつかの理由、研究の高コスト又は望ましくない副作用のため、市場では殆ど入手できない。

【００２８】

ＰＤＥ２阻害剤は殆ど知られていない。酵素アデノシンデアミナーゼの強力な阻害剤であるエリスロ－９－（２－ヒドロキシル－３－ノニル）アデニンは、ＧＭＰｃによるＰＤＥ２の活性化を阻害する。この物質は、各種の組織に対して試験されたが、その潜在的な臨床上の用途は未だ知られていない。

【００２９】

ホスホジエステラーゼ３及び４の阻害は、気管支及び肺動脈の平滑筋を弛緩させ、免疫調節及び抗炎症作用は、アイソザイム－４の阻害に起因する。肥満細胞、リンパ球Ｔ、マクロファージ、好酸球及び上皮細胞によって放出される炎症メディエーターは、ＰＤＥ４によって阻害される可能性がある。

【００３０】

ＰＤＥ３阻害剤は、主として不整脈における心血管問題との関連のため臨床実践で利用されていない。ＰＤＥ４はまた、それらの副作用、主として悪心及び嘔吐のため大きな制約を有する。嘔吐中心が、脳血液関門の外にあり、その作用は、抗炎症効果から分離されないからである［ｗｗｗ．ａｓｍａｂｒｏｎｑｕｉｃａ．ｃｏｍ．ｂｒ／ｐｉｅｒｒｅ／３３ｔｅｏｆｉｌｉｎａ．ｐｄｆ］。

【００３１】

既知のＰＤＥ３阻害剤は、シロスタミド（ｃｉｌｏｓｔａｍｉｄｅ）、ミルリノン（ｍｉｌｒｉｎｏｎｅ）、アムリノン（ａｍｒｉｎｏｎｅ）、エノキシモン（ｅｎｏｘｉｍｏｎｅ）、イマゾダン（ｉｍａｚｏｄａｎ）インドリダン（ｉｎｄｏｌｉｄａｎ）、シロスタゾール（ｃｉｌｏｓｔａｚｏｌ）及びオルプリノン（ｏｌｐｒｉｎｏｎｅ）などの筋収縮作用薬及び血管拡張薬である［Ｍａｎｇａｎｉｅｌｌｏ Ｖ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．、（１９９５）３２２、１～１３］。オルプリノンは、筋内胃アシドーシス、及び心肺「バイパス形成手術」後の全身性炎症の治療に関して臨床的に試験されている。シロスタゾールは、抗血小板、血管拡張及び抗血栓作用を有する。それは、血管形成再狭窄の治療に関して臨床的に試験されている。しかし、それは、費用がかかり、また、頭痛、下痢、動悸、頻脈のような有害反応を有し、その使用は、なんらかのタイプの心臓問題を有する患者に対して不適当である［ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｋｍｉ－ｎｈｓ．ｕｋ／ＮｅｗＭａｔｅｒｉａｌ／ｈｔｍｌ／ｄｏｃｓ／Ｃｉｌｏｓｔａｚｏｌ．ｐｄｆ］。

【００３２】

最も広く知られたＰＤＥ４阻害剤は、ロリプラム（ｒｏｌｉｐｒａｍ）であり、これは重大な副作用を示し、その使用は制限されている［Ｍａｎｇａｎｉｅｌｌｏ Ｖ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．、（１９９５）３２２、１～１３］。また、気管支の炎症、喘息及び慢性冠動脈閉塞などの肺疾患に使用される、タイプ４のホスホジエステラーゼを阻害する新規な薬剤、すなわちＢＡＹ １９－８００４が存在するが、それは、この後者の疾患に関してのみ重大な副作用を提示し、その副作用は、殆ど知られていない［Ｇｒｏｏｔｅｎｄｏｒｓｔ Ｄ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．、Ｐｕｌｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．、（２００３）１６、３４１～３４７］。

【００３３】

シロミラスト（ｃｉｌｏｍｉｌａｓｔ）及びロフルミラスト（ｒｏｆｌｕｍｉｌａｓｔ）は、その他の２つのＰＤＥ阻害剤であり、喘息、慢性閉塞性肺疾患及びアレルギー性鼻炎に対する使用に関して臨床的に試験されている。

【００３４】

市場で最もよく知られている阻害剤は、ＰＤＥ５に作用するのに適し、勃起機能不全に関連した問題に対して主として作用する阻害剤、すなわち、シルデナフィル（ｓｉｌｄｅｎａｆｉｌ）、バルデナフィル（ｖａｒｄｅｎａｆｉｌ）及びタダラフィル（ｔａｄａｌａｆｉｌ）、エクシスリンド（ｅｘｉｓｕｌｉｎｄ）及びＣＰ４６１である。これらのすべての薬剤は、それらの使用に関してやはり欠点を有する。比較分析において、後者の２薬剤は、シルデナフィルと比較した場合、より大きな効力を示すが、バルデナフィル及びタダラフィルの反復使用の長期効果は知られていない－シルデナフィルをより広範に使用されるようにしている１つの理由である［Ｇｒｅｓｓｅｒ Ｕ．ａｎｄ Ｇｌｅｉｔｅｒ Ｃ．Ｈ．、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｒｅｓ．、（２０００）２７、４３５～４４６］。しかし、バイアグラ（Ｖｉａｇｒａ（登録商標））の活性成分であるシルデナフィルは、やはり、瞬間的な視覚のかすみの他にも、頭痛、逆流及び発赤の可能性を伴う消化不良などの副作用を示す［Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ Ｉ．ｅｔ ａｌ．、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．、（１９９８）３３８、１３９７～１４０４］。シルデナフィルは、また、肺高血圧の治療に対して使用される。エクシスリンド及びＣＰ４６１は、各種タイプの癌の治療に関して試験されている。

【００３５】

その他のホスホジエステラーゼ阻害剤（それらの中には天然の阻害剤もある）も知られ

ているが、中でも、過度の副作用、各種のアイソフォームを阻害する選択性の低さ、高投与量の必要性などのいくつかの理由のため臨床では殆ど使用されていない。

【００３６】

パラベリン（ｐａｒａｖｅｒｉｎ）は、非特異的ＰＤＥ阻害剤であるが、特に勃起機能不全のための血管拡張薬として臨床で使用される。それは、極めて安価で有効な薬剤であるが、強い副作用を有する。単一での適用は、ペニス海綿体の繊維症を引き起こす可能性がある。さらに、持続勃起、性的欲求を伴わないしばしば苦痛でもある持続性勃起（４時間を超える）が、かなり起こる［ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｌｉｎｃｘ．ｃｏｍ．ｂｒ／ｌｉｎｃｘ／ａｔｕａｌｉｚａｃａｏ／ａｒｔｉｇｏｓ／ｄｉｓｆｕｎｃａｏ＿ｓｅｘｕａｌ．ｈｔｍｌ］。それは、また、心血管再生術の手術における血管拡張薬として局所的に使用される。

【００３７】

テオフィリン（ｔｅｏｆｉｌｉｎ）は、タイプ３，４及び５のＰＤＥ酵素を阻害するように作用する。それは、当初、紅茶葉から抽出された化合物である。ＰＤＥ３及び４の阻害は、ＡＭＰｃの細胞内濃度を増大させ、ＰＤＥ５の阻害は、気管支平滑筋肉組織及び炎症細胞中のＧＭＰｃ濃度を増大させる。それは５０年に渡って使用されているが、使用される治療用量は不十分で且つ殆ど選択性がないので、その重要性は減少している。

【００３８】

カフェイン（ｃａｆｆｅｉｎｅ）は、環状ヌクレオチド、特にＡＭＰｃのホスホジエステラーゼに対する阻害効果で知られているメチルキサンチンの群に属し、ＡＭＰｃの代謝を妨害する。カフェインの長期使用は、不安、神経質、不眠、震顫、集中問題、心臓及び胃腸管障害、並びにパニック及びうつ症候群に関係している。従って、カフェインは、医薬の生産で殆ど使用されない［Ｄａｌｙ　ＪＷ．Ｊ．Ａｕｔｏｎ．Ｎｅｒｖ．Ｓｙｓｔ．（２０００）８１、４４～５２］。

【００３９】

フラボノイドの使用を伴うホスホジエステラーゼ阻害剤に関係した若干の論文及び特許が従来技術中に見出された。しかし、ジオクレイン、フロラノール及び類似体、並びにシクロデキストリンを使用するそれらの経口製剤の使用は、見出されなかった。

【００４０】

米国特許出願公開第２００２／０１３２８４５号（Ｇｕｙ　Ｍｉｃｈａｅｌ　Ｍｉｌｌｅｒ、２００２年）は、哺乳動物の組織、特に脳組織の虚血症状を、この目的のためにフラボノイドを使用して予防又は緩和する組成物及び方法を開示している。しかし、ジオクレイン、フロラノール及び類似体、並びにそれらの医薬組成物の使用は開示されていない。

【００４１】

従来技術中に見出される特許を分析すると、それらのいずれも、シクロデキストリン中に包接された本明細書に記載のフラボノイド、及び経口使用（好ましくは、それに限定はされないが）のための医薬組成物、並びにタイプ１から５のホスホジエステラーゼの阻害剤として使用していないことがわかる。

【００４２】

本発明は、また、動脈性高血圧、アテローム性動脈硬化症及び再狭窄などの疾患の機序研究で使用するためのモデルとしての、例えば、制限しないジオクレイン及びフロラノール分子、並びにホスホジエステラーゼ１～５、しかし好ましくはホスホジエステラーゼ１（ＰＤＥ１）を阻害するための新規な医薬の開発を提案することによって特徴付けられる。従って、ＰＤＥ１を阻害する医薬及びそれらの医薬組成物は、それらが、その関与を暗示する疾患の治療に対して潜在的治療能力を有するので、医薬産業にとって大きな関心がある。

【００４３】

本発明で使用される双方のフラボノイドは、水への低い溶解性、不安定性、及び経口形態で適用した場合の低い活性又は無活性を示す。それゆえ、本技術の特徴の１つは、シク

ロデキストリン中に包接された場合の、及び生分解性ポリマー中にマイクロカプセル化された場合の、溶解性、安定性及び経口経路を介した活性の増加である。

【００４４】

医薬を化学的に修飾して、その生体分布、薬物動態及び溶解性などの特性を変更できる。薬物の溶解性及び安定性を増すために、いくつかの方法が使用され、中でも、有機溶媒、エマルジョン、リポソーム、ｐＨ調整、化学修飾、及びシクロデキストリンなどの適切なカプセル化剤を用いる薬剤の複合化が使用されてきた。シクロデキストリンは、６、７又は８個のグルコピラノース単位を含む環状オリゴ糖のファミリーに属する。立体相互作用のため、シクロデキストリンは、非極性の内部空洞を有し先端を切り取った円錐形態の環状構造を形成する。これらは、位置選択的な方式で修飾できる化学的に安定な化合物である。

【００４５】

シクロデキストリン（ホスト）は、各種の疎水性分子（ゲスト）と、該疎水性分子を空洞中に完全に又は部分的に包接している複合体を形成する。シクロデキストリンは、Ｓｚｅｊｔｌｉが発表しているように、薬剤、香料及び調味料の可溶化及びカプセル化に使用されている［Ｓｚｅｊｔｌｉ　Ｊ．、Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．、（１９９８）９８、１７４３～１７５３；Ｓｚｅｊｔｌｉ　Ｊ．、Ｊ．Ｍａｔｅｒ．Ｃｈｅｍ．、（１９９７）７、５７５～５８７］。シクロデキストリンに関する毒性、変異原性、催奇形性、及び発癌性の詳細な研究［Ｒａｊｅｗｓｋｉ　Ｒ．Ａ．ａｎｄ　Ｓｔｅｌｌａ　Ｖ．、Ｊ．Ｐｈａｒ．Ｓｃｉ．、（１９９６）８５、１１４２～１１６９］によれば、これらは、特にヒドロキシプロピル－ｐ－シクロデキストリンは、Ｓｚｅｊｔｌｉが報告しているように、毒性が低い［Ｓｚｅｊｔｌｉ　Ｊ．、Ｄｒｕｇ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．、（１９９０）２、１１～２１］。赤血球に傷害を引き起こす高濃度の若干の誘導体を除き、これらの製品は、一般に、健康に対する危険を伴わない。

【００４６】

食物中の添加剤としてのシクロデキストリンの使用は、日本及びハンガリーなどの国々で、そしてより特定の応用分野ではフランス及びデンマークで既に認められている。加えて、それらは、デンプン分解からの再生可能供給源から得られる。これらすべての特徴は、新規応用の発見に対する誘因を大きくする。シクロデキストリン分子の構造は、頭端を切り取られた円錐の構造に類似し、対称性が低くほぼＣｎである。第１級ヒドロキシルは、円錐の狭い側に配置され、第２級ヒドロキシルは、より広い方の側に配置される。分子内水素結合によって円錐に付与された安定性にもかかわらず、後者は、規則的形態からの著しい逸脱を可能にするに十分な可撓性がある。

【００４７】

シクロデキストリンは、水、メタノール及びエタノールに適度に可溶であり、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド及びピリジンなどの非プロトン性極性溶媒に易溶である。

【００４８】

文献中には、水に難溶であるゲストの水溶性を、包接化合物を介してシクロデキストリンを使用して増大させることの効果、及び包接複合体の安定性についての考察に関する論文が無数にあり、これらの物理－化学的特徴が記載されている［Ｓｚｅｊｔｌｉ　Ｊ．、Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．、（１９９８）９８、１７４３～１７５３；Ｓｚｅｊｔｌｉ　Ｊ．、Ｊ．Ｍａｔｅｒ．Ｃｈｅｍ．、（１９９７）７、５７５～５８７］。

【００４９】

シクロデキストリンに加え、制御放出デバイスにより生物体中での医薬の吸収速度を低下させる生分解性ポリマーも使用される。これらのシステムで、薬剤は、微小球中への薬剤のカプセル化をベースにしたポリマーマトリックス中に組み込まれ、微小球は、薬剤を生物体内部に少量且つ制御可能な１日量で数日、数ヶ月さらには数年の間放出する。

【００５０】

いくつかのポリマーが、制御放出システムで試験されている。多くは、それらの物理的

特性により、例えば、ポリ（ウレタン）ではそれらの弾性に関し、ポリ（シロキサン）又はシリコーンではそれらの良好な遮断材に関し、ポリ（メタクリル酸メチル）ではその物理的強度に関し、ポリ（ビニルアルコール）ではその疎水性及び耐性に関し、ポリ（エチレン）ではその硬度及び不浸透性に関し試験されている［Ｇｉｌｄｉｎｇ，Ｄ．Ｋ．Ｂｉｏｄｅｇ．Ｐｏｌｙｍ．Ｂｉｏｃｏｍｐａｔ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｐｌａｔ．Ｍａｔｅｒ．、（１９８１）２、２０９～２３２］。

【００５１】

しかし、ヒトに使用するには、材料は、化学的に不活性で、且つ不純物を含んではならない。放出システムで使用される材料の中には、ポリ（メタクリル酸２－ヒドロキシエチル）、ポリアクリルアミド、乳酸をベースにしたポリマー（ＰＬＡ）、グリコール酸をベースにした（ＰＧＡ）ポリマー、及び各々のコポリマー（ｐＬＧＡ）、セバシン酸をベースにしたポリマー（ＰＳＡ）などのポリ（無水物）、並びにより疎水性であるポリマーとのコポリマーがある。

【００５２】

新規医薬製剤の開発は、薬剤に関する現在の概念を変更する傾向にある。それゆえ、この数年、放出速度を適度にするように、吸収を改善するように、医薬の安定性を増すように、又は定められた細胞集団に送達するように医薬を投与するために、いくつかのシステムが開発されている。かくして、活性成分に対する担体として役立つ、ポリマー組成物、シクロデキストリン、リポソーム、エマルジョン、多相エマルジョンが現われている。これらの製剤は、筋内注射、静脈内、皮下注射、経口製剤、吸入により、或いは埋め込み又は注入可能なデバイスとして投与できる。

【００５３】

ジオクレインの包接化合物、非限定的であるシクロデキストリンは、赤外領域での吸収分光法（ＩＲ）、熱分析（ＴＧ／ＤＴＧ）、Ｘ線回折、及び^{1}Ｈ及び^{13}Ｃの核磁気共鳴のような物理－化学的分析技術によって特徴付けた。

【００５４】

ジオクレイン及びフロラノールの阻害活性、並びにシクロデキストリンとの包接化合物の阻害活性は、以下の説明からより良く理解できる。

【００５５】

ＰＤＥ１の阻害の最良結果を、後記の表Ｉに示す。ＰＤＥ１の生理学的役割は、未だ殆ど知られていない。ＰＤＥ１の生理学的役割及びその阻害の治療上の可能性をより良く把握するための大きな問題は、市場に特異的阻害剤が存在しないことである。２種のＰＤＥ１阻害剤、すなわち、ビンポセチン（Ｖｉｎｐｏｃｅｔｉｎｅ）及び８－メトキシメチル－ＩＢＭＸ（８－ＭＭ－ＩＢＭＸ）が、現在、市場で入手できる。ビンポセチンは、ウシ組織のＰＤＥ１に対して３０μＭを超える濃度で阻害効果を示し［Ｙｕ　Ｊ．ｅｔ　ａｌ．、Ｃｅｌｌ．Ｓｉｇｎａｌ．、（１９９７）９、５１９～２９］、また、同濃度で、ＰＤＥ７を阻害する［Ｓａｓａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．、２０００］。さらに、ビンポセチンは、高伝導性カルシウムに敏感なタイプのカリウムチャネルを直接活性化する能力がある［Ｗｕ　Ｓ．Ｎ．ｅｔ　ａｌ．、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（２００１）６１、８７７～９２］。８－ＭＭ－ＩＢＭＸ（IC_{50}＝８μＭ）は、PDE_5をも１０μＭのIC_{50}で阻害するので、ＰＤＥ１に対する選択性が乏しい［Ａｈｎ　Ｈ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、（１９９７）４０、２１９６～２１０］。ジオクレインは、１．４μＭのIC_{50}を有し、ビンポセチンより約３０倍、８－ＭＭ－ＩＢＭＸより８倍より強力である。

【００５６】

ジオクレインは、また、ＰＤＥ２、ＰＤＥ３、ＰＤＥ４及びＰＤＥ５を阻害するのに必要な濃度よりも２０～１００分の１の小さな濃度でＰＤＥ１を阻害するのでより選択的である。従って、ジオクレインは、市場で現在入手できるＰＤＥ１阻害剤よりもより選択的で強力である。かくして、選択的なＰＤＥ１阻害特性をもつ新規物質の開発は、ＰＤＥ１の生理学的役割、及びＰＤＥのこのアイソフォームを阻害することの治療的可能性を把握

するのに寄与するであろう。現在、ビンポセチンは、尿失禁問題及び脳卒中で惹起される急性虚血に対して臨床的に試験されている。

【００５７】

さらに、いくつかの既知の生理学的現象におけるＰＤＥの関与により、ＰＤＥ１阻害剤は、再狭窄、アテローム性動脈硬化症及び動脈性高血圧のような増殖性炎症を伴う心血管疾患への治療的適用の可能性を有する。それは、また、脳循環を増大するための、ナイトレートに対する耐性を制限するための潜在的な治療的用途を有する。カルモジュリン阻害剤も、ＰＤＥ１の活性を阻害する。しかし、ＰＤＥに対するその乏しい選択性がその使用を制約する。

【００５８】

それにも拘らず、本発明の結果は、ＰＤＥ１のアイソフォームの阻害に限定されず、それらの結果は、これらのフラボノイドを使用して、しかし若干より高い濃度で、タイプ２から５のホスホジエステラーゼを阻害する可能性を示している。

【００５９】

また、本発明は、タイプ１、２、３、４及び５のホスホジエステラーゼの作動を研究すること／阻害することを目的として、シクロデキストリン及び生分解性ポリマーを使用する、ジオクレイン、フロラノール及び類似体の徐放及び制御放出デバイスを調製することによって特徴付けられる。

【００６０】

図８及び図９は、本発明の薬剤は、経口経路で使用した場合に活性でないことを明瞭に示している。本発明の薬物は、どちらも水溶性でない。従って、シクロデキストリン中にジオクレインを包接することは、水に対するその溶解、及び経口経路による活性を可能にしている。

【００６１】

本発明は、以下の非制限的実施例の助力でより完全に理解されるであろう。

【実施例】

【００６２】

（実施例１）

シクロデキストリン中に包接された又は包接されていないフラボノイドのＰＤＥ阻害効果の評価（非制限的実施例として）

本発明中で開発された薬物をＰＤＥの各種アイソフォームを阻害するそれらの能力について試験した。

【００６３】

表１に、本発明の分子、ジオクレイン及びフロラノールの、ウシ大動脈の平滑筋から単離されたＰＤＥ１、ＰＤＥ３、ＰＤＥ４及びＰＤＥ５に対する、並びにヒト血小板から単離されたＰＤＥ２に対する阻害効果を示す。

【００６４】

表Ｉ－血管平滑筋肉組織中に存在するホスホジエステラーゼの各種アイソフォームに対するジオクレイン及びフロラノールのＩＣ$_{50}$値

【表１】

各種アイソフォーム	ジオクレイン(μM)	フロラノール μM)
PDE1 – カルモジュリン	2,47±0.26; Ki=0.62	2.75±0.20
PDE1 + カルモジュリン	1.44±0.35, Ki=0.59	3.06±0.14
基本 PDE2	100.0±0.50	26.8±4.62
活性化 PDE2 (+GMPc)	38.15±8.92	65.3±6.87
PDE3	28.07±0.43	47.07±5.25
PDE4	16.78±1.42	11.0±2.31
PDE5	23.0±5.50	7.14±39

【００６５】
ジオクレイン及びフロラノールは、強力で選択的なＰＤＥ１阻害剤であることがわかる。本発明の化合物は、市場で現在入手できるその他の２つの単一ＰＤＥ１阻害剤、ビンポセチン及び８－メトキシメチル－ＩＢＭＸ（８－ＭＭ－ＩＢＭＸ）よりも効能及び選択性に関してより効果的である。ビンポセチンは、ウシ組織のＰＤＥ１において３０μＭを超える濃度で阻害効果を示し［Ｙｕ　Ｊ．ｅｔ　ａｌ．、Ｃｅｌｌ．Ｓｉｇｎａｌ．、（１９９７）９、５１９～２９］、また、同濃度でＰＤＥ７を阻害する［Ｓａｓａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．、２０００］。さらに、ビンポセチンは、高伝導性カルシウムに対して敏感なタイプのカリウムチャネルを直接活性化する能力がある［Ｗｕ　Ｓ．Ｎ．ｅｔ　ａｌ．、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、（２００１）６１、８７７～９２］。８－ＭＭ－ＩＢＭＸ（$ＩＣ_{５０}$＝８μＭ）は、１０μＭの$ＩＣ_{５０}$でＰＤＥ５をも阻害するので、ＰＤＥ１への選択性に乏しい［Ａｈｎ　Ｈ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、（１９９７）４０、２１９６～２１０］。ジオクレインは、１．４μＭの$ＣＩ_{５０}$を有し、ビンポセチンより約３０倍、８－ＭＭ－ＩＢＭＸより約８倍より強力である。
【００６６】
ジオクレインは、また、ＰＤＥ２、ＰＤＥ３、ＰＤＥ４、及びＰＤＥ５を阻害するために必要な濃度よりも２０～１００分の１の小さな濃度でＰＤＥ１を阻害するのでより選択的である。従って、ジオクレインは、市場で現在入手できるＰＤＥ１阻害剤よりもより選択的でより強力である。
【００６７】
（実施例２）
ＰＤＥの阻害によるジオクレインの血管拡張効果の評価（非制限的実施例として）
図２は、ヒト伏在静脈に対する本発明のフラボノイド類の効果を例示している。このグラフは、機能性内皮の存在下における（$ＣＩ_{５０}$＝３．０±０．２μＭ）又は不存在下における（$ＣＩ_{５０}$＝１１±０．４μＭ）ジオクレインの血管拡張効果を示す。図３は、ＡＭＰｃの細胞内受容体であるプロテインキナーゼＡに選択的である阻害剤の不在及び存在下における、機能性内皮を伴わないヒト伏在静脈に対するジオクレインの効果を例示している。ジオクレインの血管拡張効果は、Ｈ－８９（プロテインキナーゼＡの阻害剤）の存在下で右に移動し、ＡＭＰｃがその血管拡張効果に関与していることを示した。
【００６８】
図４は、ヒト伏在静脈に対する本発明のフラボノイドの血管拡張効果が、プロテインキナーゼＧに選択的な阻害剤（Ｒｐ－８－ｐＣＰＴ－ｃＧＭＰＳ）の存在下で殆ど完全に遮断されたことを示している。プロテインキナーゼＧは、ＧＭＰｃの細胞内受容体である。図３及び４の結果は、ヒト伏在静脈に対するジオクレインの血管拡張効果が環状ヌクレオチドの細胞内増加によって影響されることを示している。これらの結果は、表１の結果と

一緒になって、ヒト伏在静脈に対するジオクレインの血管拡張効果がＰＤＥ類の阻害によることを示している。ヒト伏在静脈に対するジオクレインの血管拡張効果のCI_{50}、３．０±０．２μＭは、ＰＤＥ１に対するその阻害効果のCI_{50}、１．４４±０．３５μＭにかなり対応している。ジオクレインの血管拡張効果がＧＭＰｃ及びＡＭＰｃにより影響されるという事実は、２つのタイプの環状ヌクレオチドを加水分解するＰＤＥ１の特徴ともかなり対応している。ヒト伏在静脈において、記載されているＰＤＥの１つはＰＤＥ１であり［Ｗａｌｌｉｓ Ｒ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．、Ａｍ．Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｌ．、（１９９９）８３、３Ｃ～１２Ｃ］、それは、手技後の血管の狭窄及び閉塞過程に関連するアイソフォームでもある［Ｒｙａｂａｋｌｉｎ Ｓ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、（１９９７）１００、２６１１～１６２１］。

【００６９】

図５は、ヒト伏在静脈に対するジオクレインの血管拡張効果をビンポセチン及び８－ＭＭ－ＩＢＭＸのそれと比較している。ジオクレインは、従来からの２つのＰＤＥ１阻害剤よりもはるかにより強力であることがわかる。ジオクレインは、ヒト伏在静脈に１１．１±２．７μＭのCI_{50}で弛緩を引き起こす（機能性内皮の不存在下）が、８－ＭＭ－ＩＢＭＸは、３０．９±１６．０μＭのCI_{50}を有した。ビンポセチンは、最大効果の３０％のみのを作り出した。

【００７０】

図６は、ラットの腸間膜動脈に対する本発明のフラボノイドの血管拡張効果は、また、（ａ）Ｈ－８９及び（ｂ）Ｒｐ－８－ｐＣＰＴ－ｃＧＰＭＳの存在下で低下し、従って、環状ヌクレオチドＡＭＰｃ及びＧＭＰｃにより影響されることを示している。

【００７１】

（実施例３）

ジオクレインとβ－シクロデキストリンとの１：１包接化合物の調製

使用するジオクレイン（ＤＣ）（分子質量、MM_{DC}＝３３２．３１ｇ／モル）は、Ｓｐｅａｒｉｎｇ Ｐ．らが発表している技術［Ｊ．Ｎａｔ．Ｐｒｏｄ．、（１９９７）６０、３９９～４００］に従って合成し、β－シクロデキストリン（β－ＣＤ）（$MM_{\beta-CD}$＝１，１３５．０１ｇ／モル）は、米国、Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙから入手した。

【００７２】

１０２．５ｍｇのβ－ＣＤを秤量し、ビーカー中、５ｍＬの蒸留水で（わずかに温めながら、最大５０℃で）溶解した。自然冷却の後、３０．０ｍｇのＤＣを添加し、約２時間（磁気撹拌機で）撹拌した。ビーカーは、光から保護した（薬剤は容易に分解及び酸化される）。化合物を、窒素中で凍結した後４８時間凍結乾燥し、物理－化学的分析技術で特定した。

【００７３】

赤外領域の吸収スペクトルは、分光計ＩＲＴＦ Ｇａｌａｘｙ３０００ Ｍａｔｔｓｏｎで、ＫＢｒ錠を使用して４０００～４００cm^{-1}の範囲で記録した。ＴＧ／ＤＴＧ曲線は、島津製熱天秤ＴＧＡ－５０Ｈで、アルミナ溶融ポットを使用し、流速がほぼ１００ｍＬ／分の流動N_2雰囲気下に、１０℃／分の加熱速度で得た。サンプルは２５℃から７５０℃まで加熱した。ＤＳＣ曲線は、島津のＤＳＣ－５０装置を使用し、アルミナ溶融ポットを使用し、流速が５０ｍＬ／分の流動N_2雰囲気下に、１０℃／分の加熱速度で得た。Ｘ線回折は、Ｒｉｇａｋｕ Ｇｅｉｇｅｒ－ｆｌｅｘ２０３７装置で、Ｃｕ管及びＣｕ Ｋα＝１．５４０５１の線、２～６０°の範囲の２θ角を使用して記録した。ＮＭＲスペクトルは、分光計Ｂｒｕｋｅｒ ＤＰＸ－２００（２００ＭＨｚ）を使用し、溶媒としてＤＭＳＯ又はD_2Oを、内部標準としてＴＭＳを使用して記録した。

【００７４】

ＤＣを特定するために、赤外領域の吸収分光技術（ＩＲ）、熱分析（ＴＧＡ／ＤＴＧ）、Ｘ線回折、並びに^{1}H及び^{13}Cの核磁気共鳴（ＮＭＲ）を使用した。

【００７５】

主な特定バンドを表ＩＩに示すが、そこで、帰属は文献［Ｓｉｌｖｅｒｔｅｉｎ，Ｒ．Ｍ．、Ｗｅｇｓｔｅｒ、Ｆ．Ｘ．、Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｃａｏ Ｅｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｉｃａ ｄｅ Ｃｏｍｐｏｓｔｏｓ Ｏｒｇａｎｉｃｏｓ、6th ed．Ｌｉｖｒｏｓ Ｔｅｃｎｉｃｏｓ ｅ Ｃｉｅｎｔｉｆｉｃｏｓ Ｅｄｉｔｏｒａ Ｓ．Ａ、２００］を参考にして行った。

【００７６】

この表を調べて、ＤＣ分子中に存在する主な官能基を同定できる。

【００７７】

ＤＣに対するＴＧＡ及びＤＴＧ曲線を調べて、最初に、２５～２００℃の温度範囲における熱安定性の程度を判断できる。続いて、２４０～７００℃の温度範囲における、７１％の質量損失に相当する強烈な熱分解の過程が観察される。重要なことであるが、得られる残留物は、かなり目立ち、有機化合物である。現在、この残留物の性質をより十分に把握するために物理－化学的分析を実施している。

【００７８】

表ＩＩ：ＤＣのＩＲにおける主な吸収バンド

【表２】

シグナル (cm^{-1})	帰　属 (試行)	シグナル (cm^{-1})	帰　属 (試行)
3,500	νOH	1,500	νC=C
3,200	νOH	1,310	δOH (フェノール)
3,050	νC-H	1.200	νC-H (フェノール)
1,660	νC=O(ケトン)	800	δC-H (芳香族)

【００７９】

４～６０°の２θでのＤＣのＸ線回折図は、その半結晶構造を示唆し、１５～４０°の２θに顕著なピーク及び非晶質ハローを示す。

【００８０】

ジオクレインのＤＭＳＯ中で得られた^{1}Ｈ及び^{13}ＣのＮＭＲスペクトルデータを、下表ＩＩＩ及びＩＶに示す。

【００８１】

表ＩＩＩ：ＤＭＳＯ中でのＤＣの^{1}ＨのＮＭＲ（４００ＭＨｚ）の化学シフト及び緩和時間

【表３】

水　素	δ(ppm)	T1 (s)
2 (OCH_3)*	3.66 (s)	0.956
3 (OCH_3)*	3.85 (s)	0.658
1 (OH)	11.92 (sd)	1.892
H_4	6.29 (s)	1.369
$H_{8(axial)}$	2.75 (dd)	0.381
$H_{8(eq)}$	3.16 (dd)	0.366
H_9	5.67 (dd)	1,502
$H_{2'}$	6.87 (d)	1.465
$H_{4'}$	6.61 (dd)	1.639
$H_{5'}$	6.69 (d)	1.153
3' (OH)	8.81 (sd)	1.596
6' (OH)	9.07 (sd)	1.612

＊ＮＯＥで確認

【００８２】

表ＩＶ：ＤＭＳＯ中でのＤＣの^{13}ＣのＮＭＲの化学シフト及び緩和時間

【表４】

炭　素	δ(ppm)	炭　素	δ (ppm)
C_1 (--C)	154.254	2 (OCH_3)	60.053
C_2 (--C)	129.678	3 (OCH_3)	56.297
C_3 (--C)	160.707	$C_{1'}$ (--C)	146.446
C_4 (CH)	91.992	$C_{2'}$ (CH)	113.179
C_5 (--C)	158.958	$C_{3'}$ (--C)	150.061
C_6 (--C)	102.567	$C_{4'}$ (CH)	115.811
C_7 (C=O)	197.491	$C_{5'}$ (CH)	116.239
C_8 (CH_2)	41.27	$C_{6'}$ (--C)	125.285
C_9(CH)	74.293		

【００８３】

ＤＣに関するＮＭＲの分析結果は、文献と適合した［Ｓｉｌｖｅｒｔｅｉｎ、Ｒ．Ｍ．、Ｗｅｂｓｔｅｒ、Ｆ．Ｘ．、Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｃａｏ Ｅｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｉｃａ ｄｅ Ｃｏｍｐｏｔｏｓ Ｏｒｇａｎｉｃｏｓ，６ａａ ｅｄ、Ｌｉｖｒｏｓ Ｔｅｃｎｉｃｏｓ ｅ Ｃｉｅｎｔｉｆｉｃｏｓ Ｅｄｉｔｏｒａ Ｓ．Ａ．２０００］。

【００８４】
（実施例４）
包接化合物の物理－化学的同定
包接化合物（ＩＣ）を特定するために、ＩＲ領域の吸収分光法、熱分析（ＴＧ及びＤＴＧ）、粉末Ｘ線回折、及び^{1}Ｈ－ＮＭＲの技術を使用した。
【００８５】
ＤＣ、β－ＣＤ、ＩＣ、及びＭＭ（β－ＣＤとＤＣの機械的混合物）のＩＲ領域での吸収スペクトルを調べて、ＤＣのより特徴的な吸収は既に考察されていることがわかる。β－ＣＤの場合、スペクトルは、それらの多くが水素結合に関係する各種Ｏ－Ｈ結合の伸縮に帰属される３，５００ｃｍ$^{-1}$付近に幅広のバンドを呈示する。また、ν_{C-H}に関連している２，９１０ｃｍ$^{-1}$、δ_{OH}に対応する１，６４０ｃｍ$^{-1}$、及びＣ－Ｏ－Ｃ基の振動周波数に対応する１，１００ｃｍ$^{-1}$のバンドを観察することができる［Ｓｚｅｊｔｉ　Ｊ．、Ｃｈｅｍ．、Ｒｅｖ．、（１９９８）９８、１７４３～１７５３］。
【００８６】
ＩＣのスペクトルをβ－ＣＤのそれと比較すると、β－ＣＤに特徴的な若干のバンド、ＯＨ及びＣ－Ｈの伸縮、ＯＨの変角、及びＣ－Ｏ－Ｃの伸縮は、化学シフトなしにＩＣのスペクトル中にやはり現われることがわかる。しかし、３，５００ｃｍ$^{-1}$のν_{OH}の減衰及び１．１００ｃｍ$^{-1}$付近のν_{c-o-c}のバンドの変化のような小さな変化を観察できる。対照的に、ＩＣ及び遊離ＤＣのスペクトルを比較すると、３，５００ｃｍ$^{-1}$のν_{OH}バンド、及び１，６００～８００ｃｍ$^{-1}$の領域でのジオクレイン芳香族のＣ＝Ｃ伸縮、Ｃ－Ｈ及びＯＨ変角に関連するバンドにおける大きな変化が観察される。しかし、ＭＭのスペクトルとβ－ＣＤ及びＤＣのスペクトルとの比較において、基本的に気づくことは、２つのスペクトル（β－ＣＤ、ＤＣ）の重なりあいである。さらに、β－ＣＤの１，１００ｃｍ$^{-1}$のＣ－Ｏ－Ｃ基の振動周波数に対応するバンド、及びジオクレイン芳香族のＣ＝Ｃ伸縮、Ｃ－Ｈ及びＯＨの変角に関連するバンドを包含する１，６００～８００ｃｍ$^{-1}$の領域に小さく限定された重なり合いを指摘できる。
【００８７】
なされた観察から、このＩＲ分析の結果は、提案された包接化合物において、ＤＣの特徴的バンドが、機械的混合物に関して観察されるバンドと比較した場合に大きな変化を受けているので、新規な化合物の形成を示しているということができる。
【００８８】
β－ＣＤに対応するＴＧ曲線において、最初に、２５～１００℃の領域で水の放出に関連する質量損失を観察できる。次いで、１００～３００℃の間で安定した水平線が現われ、３３０℃の温度で最大の質量損失を伴う完全な分解が始まる。得られる残留物は、総質量の３％未満に相当する。β－ＣＤのこの熱挙動をＩＣ及びＭＭのＴＧ曲線と比較すると、ＩＣの下降曲線の湾曲部でのせいぜい約２０℃の増加、すなわち、その熱安定性の増加に気づく。ところが、ＭＭの挙動は、９％に近い最終残留物の多さを除けば、β－ＣＤのそれにかなり類似している。これらの結果は、新規化合物の形成を暗示している。
【００８９】
ＤＳＣ曲線を分析すると、β－ＣＤの場合、３つの熱事象が存在することを観察することができ、その２つは吸熱で、もう１つは発熱であり、それぞれ、７０℃、２７０～３００℃及び３２０℃で起こり、水分子の放出、β－ＣＤのカラメル化を伴う融解及びその分解に関連している。他方、ジオクレインのＤＳＣ曲線は、１つは２５０℃での吸熱、もう１つは２７０℃での発熱である２つの事象を有し、最初の１つはＤＣの融解に関連し、２番目のものは熱分解に対応している。
【００９０】
包接化合物のＤＳＣ曲線は、遊離の材料及びそれぞれの機械的混合物と異なる熱分解プロフィールを有するが、２５０℃のＤＣの融解ピークは観察されず、このことは、ＤＣとβ－ＣＤとの相互作用後の新規結晶相の形成を示唆している。
【００９１】

ＤＣ、β－ＣＤ、ＭＭ及びＩＣのＸ線回折図は、ＩＣが１５～４０°の２θ領域に観察される顕著な非晶質ハローにより非晶質構造を有することの観察を可能にする。このハローは、ＤＣの回折図にも現われるが、強度は弱く、ＩＣでは、強い結晶性のピークは観察されない。比較的より非晶質であるこの構造は、ＭＭの回折図がＤＣの非晶質ハローに加え、β－ＣＤの結晶性のピークを有するので、新規化合物の形成を示唆している。

【００９２】

表Ｖ：ＤＭＳＯ中でのβ－ＣＤの^{1}Ｈ－ＮＭＲの化学シフト及び緩和時間

【表５】

水　素	δ(ppm)	T_1(s)
H_1	4.84 (d; 3.28)	1.049
H_2	3.31	1.182
H_3	3.64	0.969
H_4	3.34	1.009
H_5	3.58	1.036
H_6(a, b)	3.64	0.969
OH (2)	5.70	1.169
OH (3)	5.66	1.146
OH (6)	4.43	1.165

【００９３】

結果によれば、ＩＣ中で、T_1は、β－ＣＤ単独の値に比較した場合、H_1に関して増加し、ＯＨ（２）、ＯＨ（３）、ＯＨ（６）に関して減少したことが観察できる。このことは、複合化の結果としてのピラノース環の激しい運動の緩和を示している。T_1値の減少は、ＤＣとの相互作用による分子運動の低下を示唆している。

【００９４】

また、ＩＣ中のＤＣ、及び遊離ＤＣに対するT_1値の比較において、ＤＣとβ－ＣＤ間の相互作用の発生を裏付ける正及び負の変動が認められる。

【００９５】

表ＶＩ：ＩＣ中のＤＣ及びβ－ＣＤの^{1}ＨのＮＭＲの化学シフト及び緩和時間（T_1）、並びにT_1間のそれぞれの変化

【表６】

IC中のDCの^{1}H	δ(ppm)	T_1(s)	$T1_{(CI)}$-$T_{1(DC)}$
2 (OCH_3)	3.66 (s)	--	--
3 (OCH_3)	3.86 (s)	0.93	0.272
1(OH)	11.917 (s)	1.74	-0.1525
H_4	6.29 (s)	1.14	-0.229
$H_{8(ax)}$	2.75 (dd)	0.36	-0.021
$H_{8(eq)}$	3.16 (dd)	0.42	0.054
H_9	5.67 (dd)	*	0.0
$H_{2'}$	6.87 (d)	1.35	-0.115
$H_{4'}$	6.61 (dd)	1.53	-0.109
$H_{5'}$	6.69 (d)	1.15	-0.003
3' (OH)	8.82 (s)	1.47	-0.126
6' (OH)	9.08 (s)	1.40	-0.212
IC中のβ-CDの^{1}H	δ(ppm)	T_1 (s)	T_1 (IC) – T_1 (β-CD)
H_1	4.84 (d)	1.16	0.111
H_2	3.31	**	--
H_3	3.64	**	--
H_4	3.34	**	--
H_5	3.58	**	--
H_6 (a,b)	3.64	**	--
OH (2)	5.70	1.09**	-0.079
OH (3)	5.66	0.99**	-0.156
OH(6)	4.43	0.70	-0.465

β－ＣＤのシグナルで覆われている；＊＊重なり合った複数シグナル（T_1のエラー）

【００９６】

（実施例５）

生分解性ポリマーＰＬＧＡの微小球を使用する、ジオクレインの及びシクロデキストリン包接化合物の制御放出デバイスの調製（非制限的実施例として）

最初に、例として、ジクロロメタンに溶解したポリ（乳酸－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）で構成される有機相、並びにフラボノイド、ジオクレイン及びフロラノールで構成される水相で構成されるエマルジョンを調製する。次いで、このエマルジョンを３０秒間超音波処理にかけ、次いで、１％ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）溶液を添加し、かくして第２エマルジョンを形成し、これを、エマルジョンの完全な均質化のために１分間撹拌する。溶媒が蒸発できるように、系を加熱しないで２時間撹拌下に保持する。次いで、混合物を２～３回遠心し、上清液を除去し、水での洗浄を実施する。結局、１～２ｍＬの水が残り、得られた系を２４～４８時間の凍結乾燥にかける。

【００９７】
次いで、微小球を、熱分析により特定する。ガラス転移に由来するＤＳＣ曲線は、ポリマー（ＰＬＧＡ）のそれに近い値を示す。走査電子顕微鏡法（ＳＥＭ）で得られる顕微鏡写真により、１０～３０ミクロンの平均粒径を立証できた（図１０）。さらに、微小球の平滑な表面が観察される。画像は、ＪＦＭ４８０Ａ型電子顕微鏡を用いて得た。サンプルは、２４０秒間９９％ゴールドで覆った。
【００９８】
使用される各種系のカプセル化能力を判定するため、ＵＶ－ＶＩＳ較正曲線を構築し、濃度と吸光度の関係を把握すると、生分解性ポリマーの微小球中に組み込まれたフラボノイドの量を測定できる。
【００９９】
ＤＣ、及び生分解性ポリマーをベースにしたデバイスからのシクロデキストリン中のその各包接化合物の制御放出についての試験を実施した。
【０１００】
（実施例６）
シクロデキストリン中に包接された又はされていないフラボノイドの血圧降下効力の評価（非制限的実施例として）
本発明で開発された薬物を、動物モデルに血圧降下を生じさせるそれらの能力について試験した。
【０１０１】
図７は、ＤＭＳＯの助けで溶解した、ジオクレイン、及びシクロデキストリン中に包接されたジオクレインのマウス動脈圧に対する効果を例示している。腹膜内経路で投与した場合、ジオクレイン及びジオクレイン包接化合物の双方がマウスの動脈圧を低下させたことを観察できる。しかし、包接物の効果は、より顕著で、且つより長期であり、シクロデキストリンはジオクレインの生物学的利用能を改善することを示した。図８は、ＤＭＳＯの助けで溶解した、ジオクレイン、及びシクロデキストリン中に包接されたジオクレインの、経口経路（胃管栄養法）で適用した場合のマウス動脈圧に対する効果を例示している。ジオクレインは、経口経路を通過すると活性でないことが観察される。しかし、包接化合物は、経口経路で投与された場合でさえも活性がある。図９は、水に溶解した包接ジオクレインの効果を例示している。シクロデキストリン中へ包接していないジオクレインは、その水に対する不溶性のため試験できない。シクロデキストリン中に包接されたジオクレインは、それを溶解するための担体として水を使用した場合でさえ、経口経路でその効果を維持することがわかる。
【図面の簡単な説明】
【０１０２】
【図２】機能性内皮の存在又は不存在下でフェニレフリン（３×１０$^{-6}$Ｍ）で事前収縮されたヒト伏在静脈におけるジオクレインの血管拡張効果を表す図である。弛緩データは、フェニレフリンによる収縮のジオクレインに応答した低下率を表し、平均値±ＳＥＭで表現されている。＊Ｐ＜０．０５（試験後ボンフェローニ（ＢＯＮＦＥＲＲＯＮＩ）比較を用いる二元ＡＮＯＶＡ）。機能性内皮を伴う８人及び伴わない８人の患者の血管を分析した。
【図３】フェニレフリン（３×１０$^{-6}$Ｍ）で事前収縮された、機能性内皮を伴わないヒト伏在静脈に対してジオクレインで誘発される弛緩に対するＨ－８９（１μＭ）の効果を示す図である。データは、フェニレフリンによる収縮のジオクレインに応答した低下率を表し、平均値±ＳＥＭで表現されている。＊Ｐ＜０．０５、＊＊＊Ｐ＜０．００１（試験後ボンフェローニ比較を用いる二元ＡＮＯＶＡ）。対照群の８血管、Ｈ－８９と共にインキュベートされた群の５血管を分析した。
【図４】フェニレフリン（３×１０$^{-6}$Ｍ）で事前収縮された、機能性内皮を伴わないヒト伏在静脈に対してジオクレインで誘発された弛緩に対するＲｐ－８－ｐＣＰＴ－ｃＧＭＰＳ（１０μＭ）の効果を示す図である。データは、フェニレフリンによる収縮のジオク

レインに応答した低下率を表し、平均値±ＳＥＭで表現されている。＊＊＊Ｐ＜０．００１（試験後ボンフェローニ比較を用いる二元ＡＮＯＶＡ）。対照群の８血管、Ｒｐ－８－ｐＣＰＴ－ｃＧＭＰＳと共にインキュベートされた群の５血管を分析した。

【図５】フェニレフリン（３×１０$^{-6}$Ｍ）で事前収縮された、機能性内皮を伴わないヒト伏在静脈に対するビンポセチン（ｖｉｎｐｏｃｅｔｉｎｅ）の効果及び８－ＭＭ－ＩＢＭＸの効果との比較でジオクレインの血管拡張効果を示す図である。データは、フェニレフリンによる収縮のジオクレインに応答した低下率を表し、平均値±ＳＥＭで表現されている。ジオクレイン群の８血管、８－ＭＭ－ＩＢＭＸ群の７血管、及びビンパセチン群の９血管を分析した。

【図６】フェニレフリン（３×１０$^{-6}$Ｍ）で事前収縮された、ラット腸間膜動脈のジオクレインで誘発された弛緩に対する（ａ）Ｈ－８９（１μＭ）及び（ｂ）Ｒｐ－８－ｐＣＰＴ－ｃＧＭＰＳ（３μＭ）の効果を証明するグラフである。データは、フェニレフリンによる収縮のジオクレインに応答した低下率を表し、平均値±ＳＥＭで表現されている。（試験後ボンフェローニ比較を用いる二元ＡＮＯＶＡ）。対照群からの７脈管、Ｈ－８９と共にインキュベートされた群の７血管、及びＲｐ－８－ｐＣＰＴ－ｃＧＭＰＳと共にインキュベートされた５血管を分析した。

【図７】腹膜内経路で適用されたジオクレイン（２．５ｍｇ／ｋｇ）及びシクロデキストリン中のジオクレイン包接生成物（包接体：２．５ｍｇ／ｋｇ）のマウス動脈圧に対する効果に関する代表例を示す図である。挿入のグラフで、６尾の異なるマウスで達成された最大効果の平均値±ＳＥＭを観察できる。これらの実験で、ジオクレイン、及びシクロデキストリン中のジオクレイン包接生成物は、ＤＭＳＯの助けを用いて溶解した。

【図８】経口経路で適用されたジオクレイン（１０ｍｇ／ｋｇ）及びシクロデキストリン中のジオクレイン包接生成物（包接体：１０ｍｇ／ｋｇ）のマウス動脈圧に対する効果に関する代表例を示す図である。挿入のグラフで、３尾の異なるマウスで達成された最大効果の平均値±ＳＥＭを観察できる。これらの実験で、ジオクレイン、及びシクロデキストリン中のジオクレイン包接生成物は、ＤＭＳＯの助けを用いて溶解した。

【図９】経口経路で適用された、水に可溶化された、シクロデキストリン中のジオクレイン包接生成物（包接体：１０ｍｇ／ｋｇ）のマウス動脈圧に対する効果に関する代表例を示す図である。ジオクレインは、水に対するその極めて低い溶解性のため、試験できない。

【図１】

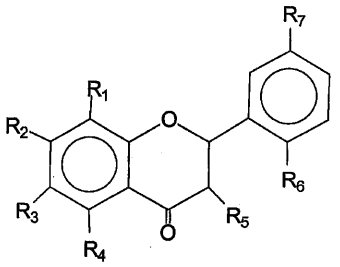
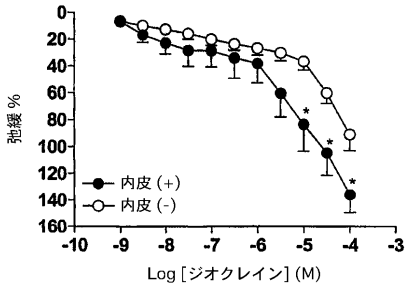
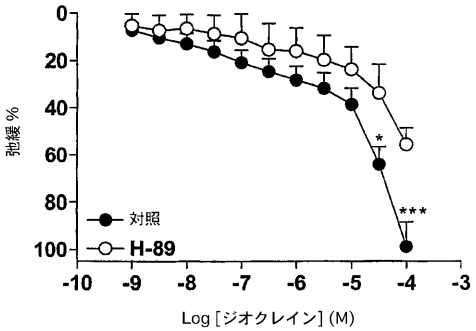


Figure 1

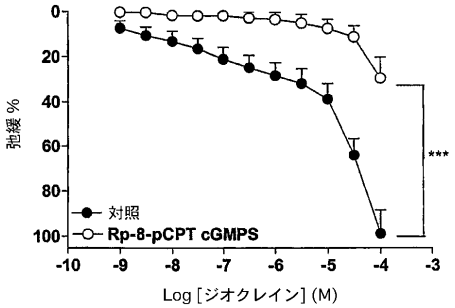
【図２】



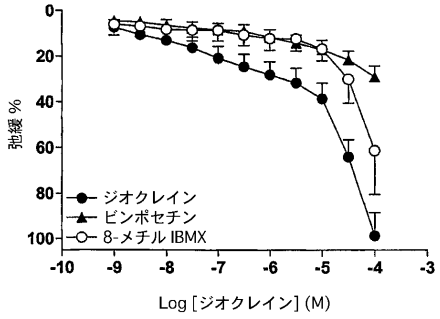
【図３】



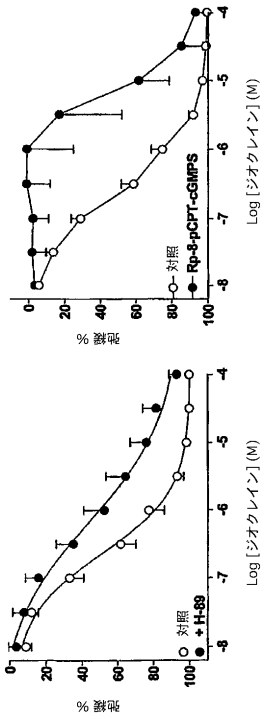
【図４】



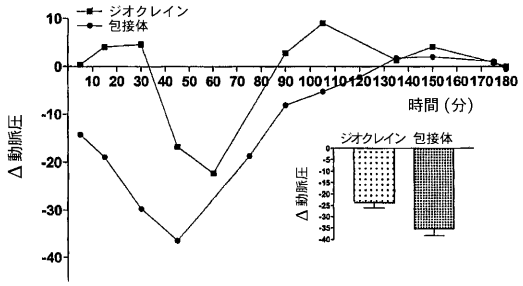
【図５】



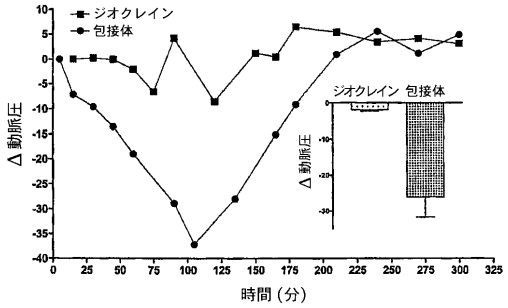
【図６】



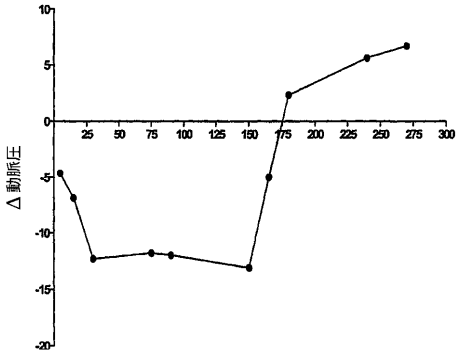
【図７】



【図８】

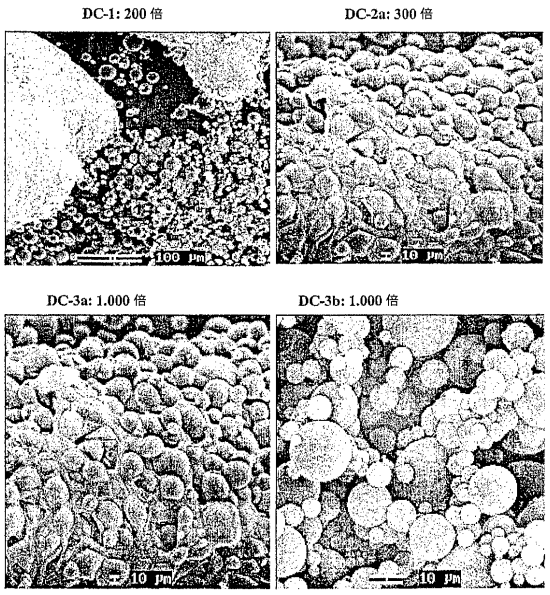


【図９】



【図１０】

走査電子顕微鏡法



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/BR2006/000060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/352 A61K47/40 A61K47/34 A61K9/16 A61P9/00

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)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOMMASINI SILVANA ET AL: "Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin." JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 16 APR 2004, vol. 35, no. 2, 16 April 2004 (2004-04-16), pages 379-387, XP002433373 ISSN: 0731-7085 abstract page 379, column 1 - page 380, column 1 page 386, column 2 ----- -/--	1-13

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* 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 document 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
14 May 2007	11/06/2007

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Nyeki, Agnes

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/BR2006/000060

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CALDERONE VINCENZO ET AL: "Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels." NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY OCT 2004, vol. 370, no. 4, October 2004 (2004-10), pages 290-298, XP002433370 ISSN: 0028-1298 the whole document	1-13
Y	REZENDE BRUNO A ET AL: "Mechanisms involved in the vasodilator effect of the flavanol floranol in rat small mesenteric arteries." PLANTA MEDICA MAY 2004, vol. 70, no. 5, May 2004 (2004-05), pages 465-467, XP002433371 ISSN: 0032-0943 the whole document	1-13
Y	FREIBERG S ET AL: "Polymer microspheres for controlled drug release" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, AMSTERDAM, NL, vol. 282, no. 1-2, 10 September 2004 (2004-09-10), pages 1-18, XP004543665 ISSN: 0378-5173 the whole document	1-13

International Application No. PCT/BR2006 /000060

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-13 (claims searched incompletely)

The subject-matter of Claims 1-13 is not clear in the sense of Article 6 PCT. Claims 1-13 relate to processes and to compositions obtained by these processes. However, Claim 1 does not define clear process steps and therefore do not allow the skilled man to determine the scope of this claim. The search was consequently limited to pharmaceutical compositions comprising the complex of the compound of Figure 1. and cyclodextrin and to the use of such a complex for the treatment of cardiovascular diseases. The controlled-release formulation of such a complex comprising PLGA, PGA or PLA has been also included in the scope of the search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR2006/000060

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-13 (claims searched incompletely)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 47/40	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/40	
Ａ６１Ｋ 47/34	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/34	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ソアレス レモス、バージニア
ブラジル国、ミナス ジェライス、ベロ ホリゾンテ、 バイロ カステロ、ルア カステロ デ ギマレス、１６５／３０２
(72)発明者 デ フランカ コルテス、ステイナー
ブラジル国、ミナス ジェライス、ベロ ホリゾンテ、 バイロ カステロ、ルア カステロ デ ギマレス、１６５／３０２
(72)発明者 アルメイダ レゼンデ、ブルーノ
ブラジル国、ミナス ジェライス、ベロ ホリゾンテ、 バイロ カステロ、ルア アドルフ シオレッティ、５１９
(72)発明者 リンス ゴンサルベス、ロベルタ
ブラジル国、ミナス ジェライス、ベロ ホリゾンテ、 バイロ サグラダ ファミリア、ルア サオ マテウス、２９１／４０２
(72)発明者 シニステーラ ミラン、ルーベン ダリオ
ブラジル国、ミナス ジェライス、ベロ ホリゾンテ、 オーロンプレト、ルア ジョアオ アントニオ カルドソ、６４、 アパルトメント ３０１
(72)発明者 シュミット、マルティーヌ
フランス国、ストラスブール、リュ ルイ アドフェル、１９
(72)発明者 リュグニー、クレール
フランス国、ストラスブール、リュ ディプレス、３７
(72)発明者 ブルギニョン、ジャン － ジャーク
フランス国、イルカーク、 リュ ルートゥ ドゥ リヨン ナンバー ２２５ベ

Ｆターム(参考) 4C076 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB22 BB25 BB27
BB32 CC11 EE24 EE39 FF31
4C086 AA01 AA02 BA08 MA02 MA03 MA05 MA52 MA55 MA57 MA59
MA66 MA67 NA14 ZA36 ZA42 ZA45 ZC20

(54)【発明の名称】ジオクレイン、フロラノール又は類似体ベースの、ホスホジエステラーゼのタイプ１から５のアイソフォーム（ＰＤＥ１、ＰＤＥ２、ＰＤＥ３、ＰＤＥ４、ＰＤＥ５）の強力で選択的な阻害剤としての薬物を開発する方法並びに心血管疾患の研究及び治療のためのそれらの医薬組成物及び関連製品