

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6895252号
(P6895252)

(45) 発行日 令和3年6月30日(2021.6.30)

(24) 登録日 令和3年6月9日(2021.6.9)

(51) Int. Cl.		F I
A 6 1 K 9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 31/661	(2006.01)	A 6 1 K 31/661
A 6 1 K 31/683	(2006.01)	A 6 1 K 31/683
A 6 1 K 31/685	(2006.01)	A 6 1 K 31/685
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00

請求項の数 9 (全 65 頁)

(21) 出願番号	特願2016-536919 (P2016-536919)	(73) 特許権者	514306065
(86) (22) 出願日	平成26年12月18日 (2014.12.18)		サインパス ファルマ, インク.
(65) 公表番号	特表2016-540781 (P2016-540781A)		S I G N P A T H P H A R M A , I N C
(43) 公表日	平成28年12月28日 (2016.12.28)		.
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/071246		アメリカ国 ユタ84092 サンディ
(87) 国際公開番号	W02015/095576		ラスキンサークル9710
(87) 国際公開日	平成27年6月25日 (2015.6.25)	(74) 代理人	100107984
審査請求日	平成28年8月3日 (2016.8.3)		弁理士 廣田 雅紀
審査番号	不服2019-4256 (P2019-4256/J1)	(74) 代理人	100102255
審査請求日	平成31年4月2日 (2019.4.2)		弁理士 小澤 誠次
(31) 優先権主張番号	61/977, 417	(74) 代理人	100096482
(32) 優先日	平成26年4月9日 (2014.4.9)		弁理士 東海 裕作
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100188352
			弁理士 松田 一弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心筋 I K R チャンネルの薬剤誘発性阻害のリポソームによる軽減

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト又は動物対象における、1若しくは2以上の心臓チャンネル病、又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態、或いはそれらの両方を予防又は処置するための組成物であって、前記組成物が、

ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) の活性を阻害することによって、I_{Kr} チャンネル阻害又はQT延長のうちの少なくとも1つを引き起こす 1又は2つの 薬理的活性剤であって、クリゾチニブ及びニロチニブからなる群から選択される 前記 1又は2つの 前記薬理的活性剤、及び、

1又は2以上のリポソームからなり、

前記リポソームが、空リポソームであり、かつ前記薬理的活性剤の投与の前、同時又は後に投与され、

前記空リポソームが、前記心臓チャンネル病又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態を予防又は処置するのに有効な量で提供され、

前記空リポソームが、DMP C (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 及び DMP G (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - [1 - グリセロール]) を含み、かつ

前記心臓チャンネル病、又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態、或いはそれらの両方が、前記薬理的活性剤の投与に起因する、

前記組成物。

【請求項 2】

心臓チャネル病又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態が、心臓における遅延整流性 K^+ 電流、多形性心室性頻拍、QTc、LQT2、LQTSの延長、又はトルサード・ド・ポアンツに關与するイオンチャネルの阻害であり、かつ、クリゾチニブ及びニロチニブからなる群から選択される1又は2つの薬理学的活性剤の投与によって誘発される、 I_{Kr} チャネル阻害又はQT延長の予防若しくは処置のために使用される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

組成物が、経腸、非経口、静脈内、腹腔内又は経口投与に適合され；及び/又は前記薬理学的活性剤及び前記空リボソームが、一緒に結合又はコンジュゲートされてもよく；及び/又は

前記空リボソームが、アニオン性、カチオン性、又は中性のリボソームを含み；及び/又は

前記空リボソームが、脂質又はリン脂質壁を含み、前記脂質又は前記リン脂質が、ホスファチジルコリン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、リン酸ジセチル、ホスファチジルコリン、及びジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、パルミチン酸アセチル、レチノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリルポリマー、脂肪酸、脂肪酸アミド、コレステロール、コレステロールエステル、ジアシルグリセロール、及びジアシルグリセロールスクシネートからなる群から選択され；及び/又は

組成物が、薬学的に許容される分散媒、溶媒又は媒体をさらに含み、前記薬理学的活性剤、前記空リボソーム、又はそれらの両方が前記分散媒、前記溶媒又は前記媒体中に溶解、分散又は懸濁しており；及び、

前記空リボソームが、DMPC(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)及びDMPG(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-[1-グリセロール])を含む、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記空リボソームが、9.7:1の比率のDMPC(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)及びDMPG(1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-[1-グリセロール])を含む、請求項1~3のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

ヒトにおける1又は2つの薬理学的活性剤の投与に起因する、ether-a-go-go-関連遺伝子(hERG)の活性の阻害による、 I_{Kr} チャネル阻害又はQT延長のうちの少なくとも1つを予防又は処置するのに適合している請求項1~4のいずれかに記載の組成物であって、

前記空リボソームが、前記薬理学的活性剤の投与に起因する、ether-a-go-go-関連遺伝子(hERG)の活性の阻害による、 I_{Kr} チャネル阻害又はQT延長を低減させるのに有効な量で前記薬理学的活性剤の投与の前、同時又は後に投与され、前記薬理学的活性剤が、クリゾチニブ及びニロチニブからなる群から選択される1又は2つの薬理学的活性剤である、

前記組成物。

【請求項 6】

前記空リボソームが、10nm~200nmの範囲の直径を有する球状である、請求項1~5のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

ether-a-go-go-関連遺伝子(hERG)の活性を阻害することによって、 I_{Kr} チャネル阻害又はQT延長のうちの少なくとも1つを引き起こす、クリゾチニブ及

10

20

30

40

50

びニロチニブからなる群から選択される 1 又は 2 つの薬理的活性剤と、

前記薬理的活性剤、前記空リポソーム又はそれらの両方が溶解、分散又は懸濁している任意選択の薬学的に許容される分散媒、溶媒又は媒体と

によって引き起こされる、1 又は 2 以上の心臓チャンネル病、心パターンにおける異常若しくは変化を予防又は処置する医薬として使用するための空リポソームであって、DMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 及び DMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - [1 - グリセロール]) を含む、前記空リポソーム。

【請求項 8】

心臓チャンネル病又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態が、多形性心室性頻拍、QTc、LQT2、LQTS の延長、又はトルサード・ド・ポアンツを含む I_{Kr} チャンネル阻害である、請求項 7 に記載の空リポソーム。

10

【請求項 9】

前記空リポソームが、9.7 : 1 の比率の DMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 及び DMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - [1 - グリセロール]) を含む、請求項 7 又は 8 に記載の空リポソーム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、一般に、薬理学及び心臓病学に関し、より詳細には、心筋 I_{Kr} チャンネルの遺伝的、薬剤誘発性阻害を治療的に変化させるためリポソームベースの組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明の範囲を限定することなく、その背景を、修正されない場合に心筋細胞活動電位における再分極の延長、トルサード・ド・ポアンツ、及び QT 延長症候群を誘発し得る先天的欠損の修正又は治療薬による機能的介入を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象における心室 QT の再分極の期間を制御するための組成物及び方法に関連して記載する。本発明は、非経口投与（静脈内又は皮下）投与前に QT 延長薬をリポソームと結合させるか、あるいは、QT 延長の高いリスクを有することが知られている治療薬の前若しくは治療薬と同時に、又は毒物注入の直後に空リポソームを投与することのいずれかからなる。

30

【0003】

心臓の鼓動は、心筋の興奮及び収縮の的確に制御された規則的な間隔の波によるものである。イオンベースの脱分極及び再分極の間の電流は、電波を測定する身体の特定の部位に装着した電氣的リード（心電図）により測定することができる。P 波は、心房の脱分極の波を表す。心房全体が脱分極すると、波が 0 に戻る。0.1 秒後、心室が完全に脱分極し、その結果 QRS 群がもたらされる。3 つのピークは、電流が心室の中を広がる様式によるものである。この後、心室の T 波又は再分極が続く。標準 ECG での QRS 群の開始から T 波の終点の間に測定された QT 間隔は、心筋細胞の再分極相（又は心室の脱分極及び再分極）の完了までの期間に相当する。この間隔の期間は、遺伝的差異、心臓病、電解質均衡、毒物注入及び薬剤が原因で変化する可能性がある。QT 間隔の延長は、結果として心室性不整脈及び突然死をもたらす可能性がある。

40

【0004】

薬剤誘発性 QTc 延長症候群（LQTS, long QTc Syndrome）すなわち、活動電位持続時間の延長は、政府が定める薬剤中止の一般的な原因である。QTc 延長は、心室細胞に移行するトルサード・ド・ポアンツ（TdP, Torsades de Pointes）、多形性心室性頻拍の予測不可能な危険因子である。薬剤誘発性 LQTS は、TdP がそれに続く場合に致死性の有害反応を成す可能性があるすべての処方の約 3% を占める。1 又は 2 以上の Q

50

T c 延長薬を同時に服用している患者は、T d P のリスクが高い。T d P の全体の発生頻度は統計的にまれであるが、罹患した個体にとっては臨床的に有意であり、薬剤について臨床試験を開始させる前に、この薬剤の作用についてのアッセイを必須とする。

【 0 0 0 5 】

一般的な構造の多種多様な薬剤は、結果として後天性 L Q T S をもたらすヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子 (K C N H 2 又は *h E R G* , human ether-a-go-go-related gene) コード化 K ⁺ チャネル及び心筋遅延整流性カリウム電流 I _K (K V 1 1 . 1) を遮断する。L Q T S の薬剤が関連した高リスクは、薬剤開発上の主な障害物であり、多くの薬剤が、臨床前開発中に取り止め、承認後黒枠警告を指定され、市場から回収されてきた。カリウムチャネルをコードする 1 0 個の異なる遺伝子における 5 0 0 の可能性がある変異に基づく常染色体劣性又は優性 L Q T S は、米国内で 1 : 3 0 0 0 の発生率又は約 1 0 0 , 0 0 0 名でみられる。Q T 間隔延長又は L Q T S のリスクは、無症状の米国人母集団の 2 . 5 % に発症する。この症候群は、発現した場合、未処置の患者において重篤な不整脈及び突然死をきたすおそれがある。L Q T S 誘発剤による薬剤治療を受けている無症候性先天性 L Q T S 患者における心臓死の確率は高まる。

【 0 0 0 6 】

後天性 L T Q S のウォッシュアウトの大部分は、ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子 (*h E R G*) によりコード化されたカリウムイオンチャネルの閉塞によるものである。高濃度の *h E R G* 遮断薬は一般に Q T c 間隔延長を誘発し、T d P の確率を高める。薬剤誘発性 T d P の症例の 1 0 % までが、1 3 の主要な遺伝的変異、4 7 1 の様々な変異、及び 1 2 4 の遺伝子多型によるものである可能性がある (Chig, C 2006) 。

【 0 0 0 7 】

L Q T S の検出のためのシステム及び方法は、以前に説明されてきた。例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 0 4 5 4 9 号明細書 (Kohls et al. 2010) は、患者から回収した一組の E C G データを回収した E C G データの多数のデータベースと比較することによって、患者において L Q T S を検出するシステム及び方法を開示している。多数のデータベースは、患者の以前の E C G を含有するデータベース、既知の後天性 L Q T S 特性データベース、及び既知の遺伝的 L Q T S 特性データベースを含むものとなる。患者の E C G をこれらのデータベースと比較することは、E C G の成果から Q T 間隔の変化、T 波形態の変化、U 波形態の変化として、そのような発生の検出を容易にし、L Q T S の既知の遺伝的パターンと整合し得る。システム及び方法は、患者の性別及び民族性に感受性があり、これらの因子は L Q T S に影響を及ぼすことが示されていることから、さらに、Q T 持続時間を薬剤作用に関するデータベースに整合させることができる。システム及び方法は、また、現行の E C G 管理システム及び記憶デバイスに容易に統合される。

【 0 0 0 8 】

L Q T S の診断及び処置のためのシステム及び方法は、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 5 5 4 6 4 号明細書 (Michael, 2008) に記載されている。Michael の発明は、患者の心周期における Q T 間隔延長を検出するために、電気的収縮期 (Q T , electrical systole) と機械的収縮期 (Q S 2 , mechanical systole) から Q T / Q S 2 比を導出する Q T 延長症候群 (L Q T S , Long QT Syndrome) を診断するためのシステムを含む。プロセッサは、マイクロホン及び胸部電極から収縮期を得、Q T / Q S 2 比を算出し、ディスプレイに結果を出力する。プロセッサは、患者において L Q T S を診断するために、この Q T / Q S 2 比をメモリに格納された閾値と比較することができる。ユーザーインターフェースは、プログラミング、セットアップ及びディスプレイのカスタマイズを提供する。モードセレクターにより、このシステムが、L Q T S を診断するための心音計、1 2 誘導心電計又は機械として選択的に作動可能となる。L Q T S などの心臓病を診断するための関連した方法は、同じ心周期の間の Q T と Q S 2 を測定すること、Q T / Q S 2 比を算出すること、及び結果を経験的データから導出された閾値と比較することを含む。方法は、安静時と運動中の両方の収縮期を測定することを含んでもよく、薬剤有効性、投与量最適化及び後天性 L Q T S 因果関係に関する各試験に用いてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

不整脈の処置のための方法は、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 4 8 2 8 4 号明細書 (Donahue and Marban, 2007) に提示されている。方法は、心臓の電氣的性質を調整する少なくとも 1 つのある量のポリヌクレオチドを投与することを含む。本発明のポリヌクレオチドはまた、カチオン性リポソームやアデノウイルスベクターなど微小送達系媒体を用いて使用され得る。

【 0 0 1 0 】

不整脈の処置又は予防のための方法、組成物、投与レジーム、及び投与経路は、Fedida et al. (2010) の米国特許出願公開第 2 0 0 1 / 0 0 1 2 0 8 9 0 号明細書に記載されている。Fedida の発明では、イオンチャネル調節化合物をそれを必要とする対象に投与することにより、早期後脱分極及び Q T 間隔延長が低減又は排除され得る。イオンチャネル調節化合物は、シクロアルキルアミンエーテル化合物、特にシクロヘキシルアミンエーテル化合物であってもよい。早期後脱分極、Q T 間隔延長及びノ又はトルサード・ド・ポアンツを誘発するイオンチャネル調節化合物の組成物及び薬剤もまた記載される。Fedida の発明はまた、イオンチャネル調節化合物と併せて提供され得る抗酸化剤を開示し、この抗酸化剤の非限定例としては、ビタミン C、ビタミン E、カロチン、ルテイン、リコピン、ビタミン B 2、コエンザイム Q 1 0、システイン、並びにビルベリー、ターメリック (クルクミン)、ブドウ種子又はマツ樹皮エキス、及びイチヨウなどの薬草が含まれる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 特許文献 1 】 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 0 4 5 4 9 号明細書

【 特許文献 2 】 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 5 5 4 6 4 号明細書

【 特許文献 3 】 米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 4 8 2 8 4 号明細書

【 特許文献 4 】 米国特許出願公開第 2 0 0 1 / 0 0 1 2 0 8 9 0 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 1 2 】

【 非特許文献 1 】 Chig, C 2006

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 3 】

クリゾチニブ (X a l k o r i (登録商標)) 及びニロチニブ (T a s i g n a (登録商標)) はそれぞれ、非小細胞肺癌及び慢性骨髄性白血病の処置のために承認されたチロシンキナーゼ阻害薬である。両方とも、ヒト及び動物における Q T 延長をもたらすことが示されている。リポソームは、ヒト e t h e r - a - g o - g o 関連遺伝子 (h E R G) によりコード化された I K r (K V 1 1 . 1) チャネルに対する薬剤誘発性効果を改善することが示されている。本研究は、リポソームも I K r チャネルに対するクリゾチニブ及びニロチニブの効果を低下させるかどうかを判定するために行った。h E R G で安定的にトランスフェクトしたヒト胎児由来腎臓 (H E K, human embryonic kidney) 2 9 3 細胞を使用した標準インビトロ I K r アッセイにおいて、クリゾチニブ及びニロチニブを試験した。用量反応を判定し、5 0 % 阻害濃度 (I C ₅₀, 50% inhibitory concentration) を算出した。H E K 2 9 3 細胞をリポソームと混合したクリゾチニブ及びニロチニブで処理した場合、これらの 2 つの薬剤の I K r チャネル阻害効果に著しい減少がみられた。リポソーム被包性 Q T 延長薬の使用、又はこれらの薬剤をリポソーム、例えば空リポソームと混合するだけで、これらの心臓易罹性が低下することが見出された。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 4 】

一実施形態では、本発明は、e t h e r - a - g o - g o 関連遺伝子 (h E R G) の活性を阻害することによって、I K r チャネル阻害又は Q T 延長のうちの少なくとも 1 つを引き起こす 1 又は 2 以上の薬理的活性剤と；空リポソームであり、前記薬理的活性剤

10

20

30

40

50

の投与の前、同時又は後に投与される 1 又は 2 以上のリポソームとを含む、ヒト又は動物対象における、1 若しくは 2 以上の心臓チャネル病 (cardiac channelopathies)、又は心パターン (cardiac patterns) における異常若しくは変化に起因する状態、或いはそれらの両方を予防するための組成物を含む。一態様では、心臓チャネル病又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態は、心臓における遅延整流性 K⁺ 電流、多形性心室性頻拍、QTc、LQT2、LQT5 の延長、又はトルサード・ド・ポアンツに關与するイオンチャネルの阻害である。別の態様では、組成物は、心臓關連又は非心臓關連の疾患の処置において使用される 1 又は 2 以上の薬剤の投与により誘発される IKr チャネル阻害の延長又は QT 延長の処置又は予防のために使用される。別の態様では、1 又は 2 以上の活性剤 (active agent) は、クリゾチニブ、ニロチニブ、テルフェナジン、アステミゾール、グリパフロキサシン、テロジリン、ドロペリドール、リドフラジン、レボメタジル、セルチンドイル又はシサプリドのうちの少なくとも 1 つから選択される。別の態様では、1 又は 2 以上の活性剤は：アロキシ；アミオダロン；亜ヒ酸；アステミゾール；ペブリジル；クロロキン；クロルフェニラミン；クロルプロマジン (ソラジン)；シサプリド；セレクサ；シタロプラム；クラリスロマイシン；エリスロマイシン；クルクミン；ジソピラミド；ドフェチリド；ドンペリドン；ドキシソルピシン；ドロネダロン；ドロペリドール；グレパフロキサシン；ハルドール；ハロペリドール；ハロファントリン；イブチリド；レボメタジル；リドフラジン；ロラチジン；ロボスタチン；メソリダゾン；メサドン；メタンスルホンアニリド；モキシフロキサシン；パロナシトロン；ペンタマジン；ピモジド；プレニラミン；プロブコール；プロカインアミド；プロパフェノン；ピリラミン；キニジン；テルフェニジン；セルチンドール；ソタロール；スパルフロキサシン；チオリダジン；又はバンデタニブのうちの少なくとも 1 つから選択される。別の態様では、組成物は、経腸、非経口、静脈内、腹腔内又は経口投与に適応する。一態様では、組成物は、心臓チャネル病又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態を引き起こす 1 又は 2 以上の薬理学的活性剤、及び心臓チャネル病又は活性剤によって引き起こされる心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態を低減させるのに十分な量の空リポソームを含む、治療有効量の組成物から本質的になる。別の態様では、活性剤及びリポソームは、一緒に結合又はコンジュゲートされてもよい。別の態様では、リポソームは、アニオン性、カチオン性、又は中性のリポソームを含む。別の態様では、リポソームは、脂質又はリン脂質壁を含み、ここで、脂質又はリン脂質は、ホスファチジルコリン (レシチン)、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン (セファリン)、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレプロシド、リン酸ジセチル、ホスファチジルコリン、及びジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、パルミチン酸アセチル、レチノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリルポリマー、脂肪酸、脂肪酸アミド、コレステロール、コレステロールエステル、ジアシルグリセロール及びジアシルグリセロールスクシネートからなる群から選択される。別の態様では、組成物は、薬学的に許容される分散媒、溶媒又は媒体をさらに含み、ここで、活性剤、リポソーム、又はそれらの両方が分散媒、溶媒又は媒体中に溶解、分散又は懸濁している。別の態様では、リポソームは、DMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 及び DMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - [1 - グリセロール]) を含む。別の態様では、リポソームは、9.7 : 1 の比率の DMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 及び DMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - [1 - グリセロール]) を含む。

【0015】

一実施形態では、本発明は、IKr チャネル阻害又は QT 延長のうちの少なくとも 1 つを引き起こす 1 又は 2 以上の薬理学的活性剤、並びに空リポソームであり、治療的活性剤

10

20

30

40

50

又は薬剤の投与の前、同時又は後に投与され、I K r チャネル病又はQ T 延長を低減又は排除するのに十分な量で提供される1又は2以上のリポソームを含む、e t h e r - a - g o - g o - 関連遺伝子 (h E R G) の活性を阻害することによってI K r チャネル阻害又はQ T 延長のうちの少なくとも1つを引き起こすヒトにおける治療的活性剤又は薬剤の投与に起因する1又は2以上の有害反応を予防又は処置するための組成物を含む。一態様では、治療的活性剤又は薬剤は、ヒト又は動物対象における1又は2以上の心臓性又は非心臓性疾患の予防又は処置に使用される。別の態様では、心臓チャネル病又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態は、心臓における遅延整流性K + 電流、多形性心室性頻拍、Q T c、L Q T 2、L Q T S の延長、又はトルサード・ド・ポアンツに關与するイオンチャネルの阻害である。別の態様では、組成物は、心臓性又は非心臓性疾患の処置に使用される1又は2以上の薬剤の投与によって誘発されるI K r チャネル阻害の延長又はQ T 延長の処置又は予防のために使用される。別の態様では、1又は2以上の活性剤は、クリゾチニブ、ニロチニブ、テルフェナジン、アステミゾール、グリパフロキサシン、テロジリン、ドロペリドール、リドフラジン、レボメタジル、セルチンドイル又はシサブリドのうちの少なくとも1つから選択される。別の態様では、1又は2以上の活性剤は：アロキシ；アミオダロン；亜ヒ酸；アステミゾール；ペプリジル；クロロキン；クロルフェニラミン；クロルプロマジン（ソラジン）；シサブリド；セレクサ；シタロプラム；クラリスロマイシン；エリスロマイシン；クルクミン；ジソピラミド；ドフェチリド；ドンベリドン；ドキシソルピシン；ドロネダロン；ドロペリドール；グレパフロキサシン；ハルドール；ハロペリドール；ハロファントリン；イブチリド；レボメタジル；リドフラジン；ロラチジン；ロボスタチン；メソリダゾン；メサドン；メタンスルホンアニリド；モキシフロキサシン；パロナシトロン；ペンタマジン；ピモジド；プレニラミン；プロブコール；プロカインアミド；プロパフェノン；ピラミン；キニジン；テルフェニジン；セルチンドール；ソタロール；スパルフロキサシン；チオリダジン；又はバンデタニブのうちの少なくとも1つから選択される。別の態様では、組成物は、経腸、非経口、静脈内、腹腔内又は経口投与に適応する。別の態様では、活性剤及びリポソームは、一緒に結合又はコンジュゲートされてもよい。別の態様では、リポソームは、アニオン性、カチオン性、又は中性のリポソームを含む。別の態様では、リポソームは、脂質又はリン脂質壁を含み、ここで、脂質又はリン脂質は、ホスファチジルコリン（レシチン）、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン（セファリン）、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレプロシド、リン酸ジセチル、ホスファチジルコリン、及びジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、パルミチン酸アセチル、レチノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリルポリマー、脂肪酸、脂肪酸アミド、コレステロール、コレステロールエステル、ジアシルグリセロール及びジアシルグリセロールスクシネート）からなる群から選択される。別の態様では、リポソームは、10 nm ~ 200 nm の範囲の直径を有する球状のリポソームである。別の態様では、リポソームは、D M P C (1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 及び D M P G (1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - r a c - [1 - グリセロール]) を含む。別の態様では、リポソームは、9 . 7 : 1 の比率の D M P C (1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 及び D M P G (1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ - r a c - [1 - グリセロール]) を含む。

【 0 0 1 6 】

別の実施形態では、本発明は、ヒト又は動物対象における1又は2以上の心臓チャネル病、心パターンにおける異常若しくは変化又はその両方を予防又は処置する方法であって、1又は2以上の心臓チャネル病、心パターンにおける異常若しくは変化又はその両方の予防又は処置を必要とするヒト又は動物対象を特定するステップと；e t h e r - a - g o - g o 関連遺伝子 (h E R G) の活性を阻害することによりI K r チャネル阻害又はQ

10

20

30

40

50

T延長のうちの少なくとも1つを引き起こす1又は2以上の薬理的活性剤；及び空リポソームであり、1又は2以上の心臓チャネル病、心パターンにおける異常若しくは変化を予防又は処置するのに十分な量の、薬理的活性剤の投与前、同時又は後に投与される1又は2以上のリポソーム；及び、活性剤、リポソーム、又はそれらの両方が溶解、分散又は懸濁している任意選択の薬学的に許容される分散媒、溶媒又は媒体とを含む、治療有効量の組成物をヒト又は動物対象に投与するステップとを含む方法を含む。一態様では、組成物は、*ether-a-go-go*関連遺伝子（*hERG*）の活性を阻害することにより*IKr*チャネル阻害又はQT延長のうちの少なくとも1つを引き起こす1又は2以上の薬理的活性剤及び空リポソームを含む治療有効量の組成物から本質的になり、空リポソームの量は、*IKr*チャネル阻害又はQT延長を抑制するのに十分である。一態様では、心臓チャネル病又は心パターンにおける異常若しくは変化に起因する状態は、心臓における遅延整流性K⁺電流、多形性心室性頻拍、QTc、LQT2、LQTSの延長、又はトルサード・ド・ポアンツに關与するイオンチャネルの阻害である。別の態様では、1又は2以上の活性剤は、クリゾチニブ、ニロチニブ、テルフェナジン、アステミゾール、グリパフロキサシン、テロジリン、ドロペリドール、リドフラジン、レボメタジル、セルチンドイル又はシサプリドのうちの少なくとも1つから選択される。別の態様では、リポソームは、DMP C（1，2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）及びDMP G（1，2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - [1 - グリセロール]）を含む。別の態様では、リポソームは、9.7：1の比率のDMP C（1，2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン）及びDMP G（1，2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - [1 - グリセロール]）を含む。別の態様では、1又は2以上の活性剤は：アロキシ；アミオダロン；亜ヒ酸；アステミゾール；ベプリジル；クロロキン；クロルフェニラミン；クロルプロマジン（ソラジン）；シサプリド；セレクサ；シタロプラム；クラリスロマイシン；エリスロマイシン；クルクミン；ジソピラミド；ドフェチリド；ドンペリドン；ドキシソルピシン；ドロネダロン；ドロペリドール；グレパフロキサシン；ハルドール；ハロペリドール；ハロファントリン；イブチリド；レボメタジル；リドフラジン；ロラチジン；ロボスタチン；メソリダゾン；メサドン；メタンスルホンアニリド；モキシフロキサシン；パロナシトロン；ペントマジン；ピモジド；プレニラミン；プロブコール；プロカインアミド；プロパフェノン；ピリラミン；キニジン；テルフェニジン；セルチンドール；ソタロール；スパルフロキサシン；チオリダジン；又はバンデタニブのうちの少なくとも1つから選択される。

10

20

30

【0017】

さらに別の実施形態では、本発明は、ヒト又は動物対象における治療的活性剤又は薬剤の投与に起因する1又は2以上の有害反応を予防又は処置するための方法であって、*ether-a-go-go*関連遺伝子（*hERG*）の活性を阻害することにより*IKr*チャネル阻害又はQT延長のうちの少なくとも1つを引き起こす治療的活性剤又は薬剤の投与に起因する1又は2以上の有害反応の予防又は治療を必要とするヒト又は動物対象を特定するステップと；空リポソームであり、治療的活性剤又は薬剤の投与前、同時、又は投与後に投与されるか、あるいは治療的活性剤又は薬剤が充填されている1又は2以上のリポソームを含む治療有効量の組成物をヒト又は動物対象に投与するステップと；薬剤誘発性チャネル病に対するリポソームと治療的活性剤又は薬剤との組合せの効果を測定するステップであり、組成物が、治療的活性剤又は薬剤によって誘発されるチャネル病を低減又は排除するステップとを含む方法を含む。一態様では、1又は2以上の活性剤又は薬剤は、アロキシ；アミオダロン；亜ヒ酸；アステミゾール；ベプリジル；クロロキン；クロルフェニラミン；クロルプロマジン（ソラジン）；シサプリド；セレクサ；シタロプラム；クラリスロマイシン；エリスロマイシン；クルクミン；ジソピラミド；ドフェチリド；ドンペリドン；ドキシソルピシン；ドロネダロン；ドロペリドール；グレパフロキサシン；ハルドール；ハロペリドール；ハロファントリン；イブチリド；レボメタジル；リドフラジン；ロラチジン；ロボスタチン；メソリダゾン；メサドン；メタンスルホンアニリド；モキ

40

50

シフロキサシン；パロナシトロン；ペンタマジン；ピモジド；プレニラミン；プロブコール；プロカインアミド；プロパフェノン；ピリラミン；キニジン；テルフェニジン；セルチンドール；ソタロール；スパルフロキサシン；チオリダジン；又はバンダタニブのうちの少なくとも1つから選択される。

【0018】

別の実施形態では、本発明は、ヒト又は動物対象における薬剤誘発性チャネル病を引き起こすクリゾチニブ、ニロチニブ又は任意の他の活性剤の投与に起因するI K rチャネル阻害又はQ T延長のうちの少なくとも1つを予防又は処置するための方法であって、薬剤誘発性チャネル病を引き起こすクリゾチニブ、ニロチニブ又は任意の他の活性剤の投与に起因するI K rチャネル阻害又はQ T延長のうちの少なくとも1つの予防又は処置を必要とするヒト又は動物対象を特定するステップと；空リポソームであり、薬剤誘発性チャネル病を引き起こすクリゾチニブ、ニロチニブ又は任意の他の活性剤の投与前、同時、又は投与後に投与される1又は2以上のリポソームを含む治療有効量の組成物をヒト又は動物対象に投与するステップであり、組成物が、治療的活性剤又は薬剤によって誘発されるチャネル病を低減又は排除するステップとを含む方法を含む。一態様では、活性剤は、薬剤誘発性I K rチャネル阻害又はQ T延長が原因で、以前に臨床試験が不成功であった。別の態様では、方法は、薬剤誘発性I K rチャネル阻害又はQ T延長の副作用が原因で不成功であったか又は限定された臨床使用の履歴のある薬剤を、臨床試験において特定するステップをさらに含む。一態様では、1又は2以上の活性剤は、アロキシ；アミオダロン；亜ヒ酸；アステミゾール；ベプリジル；クロロキン；クロルフェニラミン；クロルプロマジン（ソラジン）；シサプリド；セレクサ；シタロプラム；クラリスロマイシン；エリスロマイシン；クルクミン；ジソピラミド；ドフェチリド；ドンペリドン；ドキシソルピシン；ドロネダロン；ドロペリドール；グレパフロキサシン；ハルドール；ハロペリドール；ハロファントリン；イブチリド；レボメタジル；リドフラジン；ロラチジン；ロボスタチン；メソリダゾン；メサドン；メタンスルホンアニリド；モキシフロキサシン；パロナシトロン；ペンタマジン；ピモジド；プレニラミン；プロブコール；プロカインアミド；プロパフェノン；ピリラミン；キニジン；テルフェニジン；セルチンドール；ソタロール；スパルフロキサシン；チオリダジン；又はバンダタニブのうちの少なくとも1つから選択される。

【0019】

別の実施形態では、本発明は、薬理学的活性剤により引き起こされるチャネル病を低減する候補薬剤を評価する方法であって、(a)患者の第1のサブセットに候補薬剤、及び患者の第2のサブセットにプラセボを投与するステップあり、組成物が、I K rチャネル阻害又はQ T延長のうちの少なくとも1つを引き起こす薬理学的活性剤と、空リポソームであり、治療的活性剤又は薬剤の投与前、同時、又は投与後に投与される1又は2以上のリポソームとを組み合わせて提供されるステップと；(b)ある一組の患者から薬剤誘発性チャネル病に罹患している疑いのある者についてチャネル病を測定するステップと；(c)候補薬剤又はプラセボの投与後にステップ(a)を反復するステップと；(d)組成物が、患者の第2のサブセットにおいて生じる低減と比較して、統計学的に有意な薬剤誘発性チャネル病の低減をもたらすかどうかを判定するステップであり、統計学的に有意な低減が、候補薬剤が前記疾患状態を処置するのに有用であることを示すステップとを含む方法を含む。一態様では、薬剤は、薬剤誘発性I K rチャネル阻害又はQ T延長が原因で、以前に臨床試験が不成功であった。別の態様では、1又は2以上の活性剤は：アロキシ；アミオダロン；亜ヒ酸；アステミゾール；ベプリジル；クロロキン；クロルフェニラミン；クロルプロマジン（ソラジン）；シサプリド；セレクサ；シタロプラム；クラリスロマイシン；エリスロマイシン；クルクミン；ジソピラミド；ドフェチリド；ドンペリドン；ドキシソルピシン；ドロネダロン；ドロペリドール；グレパフロキサシン；ハルドール；ハロペリドール；ハロファントリン；イブチリド；レボメタジル；リドフラジン；ロラチジン；ロボスタチン；メソリダゾン；メサドン；メタンスルホンアニリド；モキシフロキサシン；パロナシトロン；ペンタマジン；ピモジド；プレニラミン；プロブコール；プロ

10

20

30

40

50

カインアミド；プロパフェノン；ピリラミン；キニジン；テルフェニジン；セルチンドール；ソタロール；スパルフロキサシン；チオリダジン；又はバンデタニブのうちの少なくとも1つから選択される。一態様では、方法はインビトロで行われる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

本発明の特徴及び利点のより完全な理解のために、本発明の詳細な説明への参照を以下の添付の図面と併せて行う。

【図1】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するテルフェナジンの効果を示すグラフである。

【図2】テルフェナジンに曝露させたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅の電流 - 電位 (I - V) 関係を示すグラフである。

10

【図3】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するテルフェナジンの効果を示すグラフである。

【図4】テルフェナジンに曝露させたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI - V関係を示すグラフである。

【図5】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するE - 4031の効果を示すグラフである。

【図6】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するクルクミンの効果を示すグラフである。

【図7】クルクミンに曝露させたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI - V関係を示すグラフである。

20

【図8】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するクルクミン (リポソームクルクミンとして) の効果を示すグラフである。

【図9】クルクミン (リポソームクルクミンとして) に曝露させたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI - V関係を示すグラフである。

【図10】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するクルクミン (リポソーム + クルクミン) の効果を示すグラフである。

【図11】クルクミン (リポソーム + クルクミン) に曝露させたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI - V関係を示すグラフである。

【図12】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するリポソームの効果を示すグラフである。

30

【図13】リポソームに曝露させたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI - V関係を示すグラフである。

【図14】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するリポソーム + E - 4031の効果を示すグラフである。

【図15】リポソーム + E - 4031に曝露させたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI - V関係を示すグラフである。

【図16】20 mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するリポソーム + テルフェナジンの効果を示すグラフである。

【図17】リポソーム + テルフェナジンに曝露させたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI - V関係を示すグラフである。

40

【図18A - 18B】クリゾチニブ、リポソーム単独、及びクリゾチニブ + リポソームの存在下で、IKrテールピーク振幅を測定することによって得られる、IKrテール電流密度平均値及び電位依存性を示すグラフである。

【図19A - 19B】ニロチニブ、リポソーム単独、及びニロチニブ + リポソームの存在下で、IKrテールピーク振幅を測定することによって得られる、IKrテール電流密度平均値及び電位依存性を示すグラフである。

【図20】ウサギの心臓のRR間隔 (ms) に対するクリゾチニブ及びリポソーム + クリゾチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

【図21】ウサギの心臓のPR間隔 (ms) に対するクリゾチニブ及びリポソーム + クリ

50

ゾチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

【図22】ウサギの心臓のQRS間隔(ms)に対するクリゾチニブ及びリポソーム+クリゾチニブのインビボの効果を示すグラフである。

【図23】ウサギの心臓のQT間隔(ms)に対するクリゾチニブ及びリポソーム+クリゾチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

【図24】ウサギの心臓のQTc Van der Water間隔に対するクリゾチニブ及びリポソーム+クリゾチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

【図25】ウサギの心臓のRR間隔(ms)に対するニロチニブ及びリポソーム+ニロチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

【図26】ウサギの心臓のPR間隔(ms)に対するニロチニブ及びリポソーム+ニロチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

10

【図27】ウサギの心臓のQRS間隔(ms)に対するニロチニブ及びリポソーム+ニロチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

【図28】ウサギの心臓のQT間隔(ms)に対するニロチニブ及びリポソーム+ニロチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

【図29】ウサギの心臓のQTc Van der Water間隔に対するニロチニブ及びリポソーム+ニロチニブのインビボでの効果を示すグラフである。

【図30A-30B】クリゾチニブ、ニロチニブ、クリゾチニブ+リポソーム、及びニロチニブ+リポソームで処理したウサギにおけるQT延長を示すグラフである。動物に10分間IV負荷用量を投与後、15分間維持用量を投与した。リポソームは、薬剤の負荷用量の前にIVで5分間投与した。クリゾチニブの負荷用量及び維持用量はそれぞれ、1、2及び3mg/kg、並びに0.4、0.8及び1.2mg/kgであった(図30A)。ニロチニブの用量はそれぞれ、2、4及び5.5mg/kg、並びに0.14、0.28及び0.39mg/kgであった(図30B)。リポソームの用量はmg/kgベースで薬剤の用量の9倍とした。プロットした値は、1群当たり3例のウサギに対し、平均値の平均値+標準誤差である。統計学的比較を図23及び28に記載のように行った。

20

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の様々な実施形態の作製及び使用を以下で詳細に論じるが、本発明が、広範囲の具体的な文脈において具現化することができる多くの適用可能な発明的な概念を提供することを認識すべきである。本明細書で取り上げられる具体的な実施形態は、本発明を作製及び使用する具体的な方法についての単なる説明的なものにすぎず、本発明の範囲を定めるものではない。

30

【0022】

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語を以下に定義する。本明細書中で定義される用語は、本発明に関連がある分野の当業者により一般に理解されている意味を持つ。「a」、「an」及び「the」などの語は、単数のもののみを指すことを意図されておらず、説明のために具体的な実施例が使用され得る全体的な集合を含む。本明細書中の専門用語は、本発明の具体的な実施形態を説明するために用いられるが、それらの使用は、特許請求の範囲で略述されていることを除き、本発明の範囲を設定するものではない。

40

【0023】

本明細書では、「クルクミン」、「ジフェルロイルメタン」又は「1,7-ビス(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1,6-ヘプタジエン-3,5-ジオン」という用語は、植物ウコン(*Curcuma longa*)の根茎で発見された主な着色の素である天然に存在する化合物である(例えば、米国特許第5,679,864号明細書、Krackov et alを参照)。

【0024】

「リポソーム」という用語は、その壁又は膜が脂質、とりわけリン脂質で形成されているカプセルを指し、場合によりステロール、とりわけコレステロールの付加を伴う。

50

【 0 0 2 5 】

本明細書では、「インピボ」という用語は、体内であることを指す。本出願中で使用される通りに使用される「インピトロ」という用語は、非生体系で行われる操作を指すものとして理解される。

【 0 0 2 6 】

本明細書では「受容体」という用語は、例えば、細胞の表面に存在し、リガンドを活性化することにより細胞の活性化を媒介する分子を指すが、包括的に、対応物に特異的に結合する任意の分子を意味するためにも用いられる。一組の特異的な結合対は、任意に一方を「受容体」及び他方を「リガンド」と呼ぶ場合がある。特定の生理学的機能がこの特異的な結合に関連していることを要しない。したがって、例えば、「受容体」は、抗体、抗体の免疫学的応答部分、他の分子を補完するように設計された分子などを含む場合がある。実際に、本発明の文脈において、「受容体」と「リガンド」との間の区別は完全に不適切であり、本発明は、他の分子のいずれの結合よりも高い親和性で互いに特異的に結合する対の分子に関する。しかし、説明のために、本発明の方法は、標的受容体（ここで再度、対応物が反応又は結合することを求める相手の分子にすぎない）に関して論じられ、「リガンド」は単に対応物を表すにすぎない。

10

【 0 0 2 7 】

本明細書では、「処置」という用語は、本明細書中で言及される状態、特に疾患又は障害の症状を示す患者における状態の処置を指す。

【 0 0 2 8 】

本明細書では、「処置する」という用語は、本発明の化合物の任意の投与を指し、(i) 疾患の病態又は症状を経験若しくは呈している動物における疾患を抑制すること（すなわち、病態及び/又は症状のさらなる進行を抑止すること）；又は(ii) 疾患の病態又は症状を経験若しくは呈している動物における疾患を改善させること（すなわち、病態及び/又は症状を反転させること）を含む。「制御する」という用語は、予防する、処置する、根絶する、改善させる、又は制御する状態の重症度を低減させることを含む。

20

【 0 0 2 9 】

本明細書に記載の「有効量」又は「治療有効量」という用語は、研究者、獣医、医師又は他の臨床医によって探究中の組織、系、動物又はヒトの生物学的又は医学的な反応を誘発する対象化合物の量を意味する。

30

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用される場合、化合物「の投与」又は「を投与すること」という用語は、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁剤などの経口剤形；I V、I M若しくはI Pなどの注射用剤形；クリーム剤、ゼリー剤、粉末剤又はパッチなどの経皮吸収型剤形；バツカル剤形；吸入粉末剤、噴霧剤、懸濁剤など；及び直腸坐剤を含むが、これらに限られない、治療的に有用な形態及び治療的に有用な量で個体の体内に導入することができる形態で、本発明の化合物を処置を必要とする個体に対して与えることを意味するものとして理解される。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用される場合、「静脈内投与」という用語は、注射及び他の様式の静脈内投与を含む。

40

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用される場合、担体、希釈剤又は賦形剤を記載する際の「薬学的に許容される」という用語は、製剤の他の成分と適合し、製剤のレシピエントにとって有害であってはならない。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される場合、「h E R G」という用語は、K C N H 2 遺伝子によってコードされたh e t h e r - a - g o - g o 関連遺伝子を指す（www.genecards.comを参照）。K C N H 2 遺伝子は、心臓の鼓動を調和させる心臓の電氣的活動に寄与するカリウムイオンチャネルのサブユニットであるK v 1 1 . 1としても知られるタンパク質をコ

50

ードする。具体的に、hERG含有チャンネルが心筋活動電位において再分極 I_{Kr} 電流を媒介する。細胞膜を越えて電流を伝達するイオンチャンネルの能力が阻害されると、QT延長症候群と呼ばれる潜在的に致命的な疾患をきたす。これまでに上市された臨床的に成功したいくつかの薬剤が、hERGを阻害し、したがって、突然死のリスクを生じることが見出された。この薬剤誘発性副作用が、hERG阻害を、薬剤開発中に避けなければならない重要なターゲットにした。

【0034】

本明細書で使用される場合、「 I_{Kr} チャンネル」という用語は、心臓の筋肉細胞（心筋細胞）からカリウム(K^+)イオンを伝達する「急速」遅延整流性電流(I_{Kr})を指す。この電流は、心筋活動電位の間の細胞膜の静止状態（再分極）への回復時を正確に測定するのに重大な意味を持つ。往々にして、「hERGチャンネル」及び I_{Kr} という用語は互換可能に使用されるが、hERGは体内の天然に存在するチャンネルの部分形成し、心臓の場合には I_{Kr} である細胞型において測定された電流の名称により称される場合がより一般的である。

【実施例1】

【0035】

心室QT間隔の再分極持続時間を制御するための組成物及び方法

心室QT間隔の再分極持続時間を制御するための組成物及び方法が本明細書中で開示される。本発明の方法は、修正されない場合に心筋細胞活動電位における再分極の延長、トルサード・ド・ポアンツ及びQT延長症候群を誘発し得る先天性欠損の修正又は治療薬による機能的介入を、それを必要とする対象に投与することを含む。本発明は、非経口投与（静脈内又は皮下）投与前にQT延長薬をリポソームと結合させるか、あるいは、QT延長の高いリスクを有することを知られている1若しくは2以上の治療薬の前若しくは治療薬と同時、又は毒物注入の直後に空リポソームを投与することのいずれかからなる。本発明の知見は、クルクミン及び他のQT延長剤の有害作用が、リポソームクルクミン及び空リポソームのボルテックスされた混合物を用いることで用量依存的に抑止されることを示す。

【0036】

イオンチャンネルは、調節イオンにより、形質膜及び細胞の細胞内小器官にわたって電気化学的勾配（活動電位）を確立及び制御するポア形成内在性膜タンパク質である。このチャンネルは、水で満たされたポアの周りに密接して詰め込まれた環状の配置のタンパク質として集合したものである。イオンは、化学、電氣的信号、温度又は機械力により開口又は閉口し得るチャンネルを一系列で通過する。イオンチャンネル機能障害は、これらのチャンネルをコードする遺伝子の変異又はイオン流動に干渉する薬剤に関連し得る。心筋細胞膜の心電解質カリウム、カルシウム及びナトリウムチャンネルにおける機能障害は、協調的な筋細胞収縮及び正常な血液循環の維持に必要である電流及び正常な活動電位における異常を誘発し、結果的に心臓性の臨床症状をもたらす。40個のメンバーの中心的な役割、及び12個のサブファミリーの電位開口型カリウムチャンネルの(K_v)役割は、活動電位後に細胞膜を再分極することである。心筋細胞 K^+ チャンネルのカリウムイオンの流動は、電解電流、脱分極及び再分極のレベルを調節する。先天性及び/又は薬剤誘発性チャンネル欠陥は、病的状態、及び、もしそうでなければ無症状の個人の死亡に関連している。遺伝子KCNH2又はhERG（ヒトether-a-go-go関連遺伝子）によって適切にコードされたチャンネルは、 $K_v11.1$ 及び急速活性化整流性 K^+ 電流 I_{Kr} の $L_v11.1$ サブユニットと称されるタンパク質を含有する。この細胞膜チャンネルは、心筋細胞から K^+ イオンを伝達することにより「急速」遅延整流性電流 I_{Kr} を媒介し、心筋の電位を静止状態（再分極）に回復させるのにきわめて重要なメカニズムである。

【0037】

hERGチャンネルポアドメインは既知の3次元構造を欠いているものの、その推定上の構造に対する洞察は部位特異的変異誘発データ（Stansfeld PJ, Gedeck P, Gosling M, Cox B, Mitcheson JS, Sutclif MJ: Drug block of the hERG potassium Channel: insight

10

20

30

40

50

t from modeling. *Proteins* 2007 68(2): 568-580) から得られている。hERGチャネルポアキャビティ内で、イオン流動及び電流は、開口又は閉口状態に応じて及び重要な高親和性薬剤結合部位での薬剤相互作用により修正され得る。これらの部位は、ポアの内部ヘリックス上の芳香族アミノ酸残基 (Y652及びF656) である。薬剤により媒介される最も重要な電流、心筋細胞を再分極する感受性遅延性 I_{Kr} (急速) 電流及び I_{Ks} (遅延) 整流性電流は、標準的な心電図 (ECG, electrocardiogram) 上にQT間隔として表示され、これが心拍数について補正された場合には慣習的にQTcとして定義される。

【0038】

Jervell A, Lang-Nielson F: Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval and sudden death. *Am Heart J.* 1957 54: 59-68

によって最初に記載されたイオンチャネルにおける先天的欠損は、活動電位の再分極を決定する電流のバランスを変更し、LQTS不整脈及び突然の心臓死の素因になる。異常なイオンチャネル機能、遅延性再分極、心電図でのQT間隔延長、及びトルサード・ド・ポアンツとして知られている重篤な多形性心室性頻拍によって特徴付けられる先天性LQTS、家族性不整脈原性症候群のサブタイプを生じる変異が特定されてきた。hERG遺伝子の様々な変異及びそのコード化タンパク質は、チャネル機能の欠陥及びいくつかの臨床症候群へと移行する。2型先天性QT延長症候群 (LQT2, Type 2 congenital long-QT syndrome) は、KCNH遺伝子におけるA614Vミスセンス変異に起因し、Kv11.1タンパク質の欠失及びその結果としてのチャネル機能障害の4つのクラスによって特徴付けられる。これらの異常なKv11.1チャネルは(クラス1)、優性細胞内輸送欠損性イオンチャネルタンパク質: 通常、ミスセンス変異を原因とする、(クラス2)、細胞を24時間27でインキュベートする又は薬剤E-4031に曝露する場合、補正可能な表現型 (Zhou Z, Gong Q, January CT: Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome: Pharmacological and temperature effects. *J Biol Chem.* 1999 274: 31123-31126)、(クラス3)チャネル開閉、及び(クラス4)浸透 (Anderson CL, Delisle BP, Anson BD, et al.: Most LQT2 Mutations Reduce Kv11.1 (hERG) Current by a Class2 (Trafficking Deficient) Mechanism. *Circulation* 2006 113:365-373) を含む。これらのうちの任意のもの、特に「急速」電流による遮断は、活動電位を延長し、ECG上にQT間隔延長及び他のT波又はU波の異常の出現として表われる。このような状況において、内向き脱分極電流の活性化が再分極の分散の増強を誘発する。後者は、不均一な興奮性の回復、及びトルサード・ド・ポアンツ (TdP) の誘発、早期心室性期外収縮 (PVC, premature ventricular contraction) をもたらす。(R-on-T)。これは、心室脱分極、すなわちR波が再分極の終点での相対不応期 (T波の後半) と同時に生じ、病的なT-U波及びトルサードを惹起する状況である。持続性TdPは、心筋の機能的な不応状態のゾーン及び心不整脈 (cardiac arrhythmias) を引き起こす。トルサードにおけるECG読み取り値は、等電基線の辺りのQRS群の特徴的なねじれを伴う急速多形性心室性頻拍を示す。これは心臓の電気軸の180°もの回転、長期及び短期RR-間隔として特徴付けられ、これは臨床的に、動脈圧の低下、失神、心室細動及び突然死に至る逆行変性を引き起こす。

【0039】

ECGにおいて、 I_{Kr} 電流間隔の遅延は、男性で440ms超、女性で460ms超である場合、QT延長と同義である。構造上及び治療上、多種多様な薬剤によるhERG K^+ チャネルの薬理的阻害は、QT延長症候群 (LQTS) の臨床的に後天性の形態に移行する。先進諸国においてQT延長薬剤が処方全体の2~3%を占める一方、QT延長の報告発生率及び投与量は、それぞれの薬剤の種類の中で著しく異なる。後者は、クラス1A及びクラスIII抗不整脈薬、抗ヒスタミン薬、抗菌薬、抗精神病薬、三環系抗うつ薬、消化管運動改善薬、及び抗狭心症薬を含む。近年、クルクミノイドがヒト心臓性 K^+ チャネルを遮断すると報告された (Moha ou Maati H, Ducroq J, Rivet J Faivre J.F. Le Grande M, Bois P: Curcumin blocks the recombinant human cardiac KCNQ1/ KCNE1 c

10

20

30

40

50

hannels (IKs) stably expressed in HEK 293 cells. Congress de Physiologie, de Pharmacologie et de Therapeutique, Clermont-Ferrand, France, 9-11 Avril. 2008 Fund. Clin. Pharmacol. 22(Suppl.1)。

【 0 0 4 0 】

QT延長の発生率の上昇は、低マグネシウム血症、低カリウム血症、低カルシウム血症 (hypocalcemia)、低酸素症、アシドーシス、心不全、左室肥大、低心拍、性別が女性であること、低体温症及びくも膜下出血の存在下でも生じる場合がある。所与のQT間隔での不整脈の重症度、及びTdPの発症は、薬剤ごと及び患者ごとに異なり、特定の薬剤の用量又は血漿中濃度と直線的に相関していない場合もある。一方、QT間隔の延長により測定される再分極を著しく変化させる、カリウム (K^+) 流出に影響する抗不整脈心臓薬 (クラスIII) 及び非心臓薬は、患者をトルサードに罹患しやすくする。TdPへの傾向の増大に関連している付加的な要因としては、家族性QT延長症候群 (LQTS) が含まれる。家族性LQTSの最も一般的な原因は、遺伝子の変異である。

10

【 0 0 4 1 】

KvLTQ1のためのKCNQ1コード、低速遅延性カリウム整流カリウムチャネルのサブユニットは、心臓で高発現する。ヘテロマーチャネルを通る電流は、 $minK$ サブユニットと相互作用する場合、 I_{Ks} として知られている。ミスセンス変異すると、それは活動電位を終了するために必要な再分極電流の量を低減させる。これらのLTQ1変異は全症例の35%に相当し、重症度が最も少なく、通常、失神を引き起こす。

20

【 0 0 4 2 】

KCNH2又はhERG遺伝子は、変異した場合、すべての遺伝的症例の30%に相当し、急速遅延整流カリウムチャネルhERG+MiRP1のサブユニットである。 I_{Kr} として知られるこのチャネルを通る電流は、活動電位の終了及びQT間隔の長さに関与している。この電流が低減すると、LQT2をもたらす。急速電流は、薬剤感受性が最も高いだけでなく、そのヒス-プルキンエ細胞及び中心室筋中のM細胞での不整脈促進性作用に関連している。薬剤誘発性LQTSは、抗不整脈薬、抗ヒスタミン薬、抗精神病薬及び他の薬剤を用いた場合に生じる。遺伝的LQTS及びLQTS誘発性薬剤の組合せは、致死的な副作用への易罹患性を高める。LQTSを引き起こす薬剤のほとんどは、hERG遺伝子を介して I_{Kr} 電流を遮断する。このチャネルは、結合した場合、電流伝達を遮断するチロシン652及びフェニルアラニン656において意図しない薬剤結合を呈する。遺伝子SCN5Aのまれではあるが致死的な変異は、ナトリウムチャネルのサブユニットの不活性化、脱分極中の Na^+ 流入及び電流 I_{Na} 延長を遅くする。活動電位において遅発のチャネルを通る電流の継続した脱分極は、遅発性のバースト状電流を誘発する (LQT3)。

30

【 0 0 4 3 】

L型カルシウムチャネルは、「早期後脱分極」として、LQTS後、活動電位の定常期中、再開する。それらの活性は、アドレナリン性の刺激に感受性があり、再分極障害の下、アドレナリン作動性の状態中、突然死のリスクを高める。このような対象では、運動後、又は薬剤とは無関係である感情的な驚き後、TdPが誘発され得る。LQT4-13と称される付加的で珍しくまれな変異が存在する。

40

【 0 0 4 4 】

心拍数の他に、QT持続時間は、記録及び測定技術、交感-迷走神経活性、薬剤、電解質障害、心臓性又は代謝性疾患、日内変動及び遺伝子LQT2変異で変化する。これらのパラメータは、薬剤誘発性TdPの既報告の発生頻度を、薬剤開発中の臨床研究、市販後調査、疫学調査及び症例報告と緩やかに関連付ける。臨床前薬剤開発中のQT延長の検出は、中止につながる可能性があり、薬剤関連のQT延長の実際の発生頻度についてのあらゆる包括的な理由を排除する (Yap YG, Camm A J. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. Heart. 2003;89:1363-1372)。いくつかのQT延長薬が、開発中又は上市後に回収されてきた。これらには、テルフェナジン、アステミゾール、グリパフロキサシン、テロジリン (Terodilene)、ドロペリドール、リドフラジン、レボメタジル

50

、セルチンドイル、レボメタジル及びシサプリドが含まれる。

【0045】

遺伝子及び年齢に関連した易罹患者性：QT延長薬剤事象に対する素因が存在する：これには、肝C450阻害薬を服用中で、遺伝的な素因を持っている又はDNA多型のある器質的心疾患患者が含まれる。高齢の女性では一般に若年の女性よりも易罹患者性が高く、一方、若年の男性では、高齢の男性に比して易罹患者性が高い。

【0046】

QT延長薬についての現在の治療法、及び遺伝子型のQT感受性：薬理的療法：LQTSの第一選択処置、心停止及び突然死の13%の発生率を伴う潜在的な致死性疾患。(i)デクスラゾキサソール：(エデト酸のピペラジンジオン環状誘導体)。同剤は、乳がん患者に300mg/M²を超えて投与されるエピルピシンに関連したアントラサイクリン誘発性心毒性の可能性を減じるが、排除しない。静脈内デクスラゾキサソールの使用は、アントラサイクリンのみに限定される。すなわち、それは、アントラサイクリン含有しない化学療法レジメンでは禁忌となる。(ii)遮断薬：交感神経性刺激療法としてのプロプラノロールは、LQT1において心事象のリスクを81%低下させる可能性があり、また貫壁性再分極分散(TDR, transmural dispersion of repolarization)のイソプロテレノール増大及びTdPを抑制する可能性がある。但し、適切なプロプラノロール処置においては、なおも10%が心事象を発症する。LQT2対象では、心事象リスクは59%減少するが、一方で23%が依然として心事象を発症する。(iii)ナトリウムチャンネル遮断薬：LQT3対象のうち32%が、適切なプロプラノロールで心事象を発症する。心拍数の低いこれらの患者においては、遮断薬は、再分極の分散及びTdPのリスクを上昇させる場合がある。活動電位のフェーズ2の間の不活性化を防止し、遅発性のI_{Na}の持続的増加を誘発するナトリウムチャンネル変異を伴うLQT3対象、メキシレチン(Shimizu W Antzelevitch C: Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade de pointes in LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. 1997 Circulation 96: 2038-2047)クラスIBナトリウムチャンネル遮断薬を使用するQT延長の原因となるものは、TDRの低減によりQT間隔を短縮させる。(iv)カリウム補充：I_{Kr}及びI_{K1}の両方は、細胞外カリウムレベルに感受性がある。血漿中濃度をベースラインよりも1.5mEq/L上昇させることで、QTc間隔が24%低減し得る(Compton SJ, Lux RL, Ramsey MR, et al.: Genetically defined therapy of inherited long QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. 1996 94:1018-1022)及び(Etheridge SP, Compton SJ, Tristani-Firouzi M, Mason JW: A new oral therapy for long QT syndrome: long term oral potassium improves repolarization in patients with hERG mutations. J AM Coll Cardiol 2003 42:1777-1782)が、不整脈防止につながるというエビデンスはない。(v)カリウムチャンネル開口薬：ニコランジル、2~20umol/Lで静脈内投与されるカリウムチャンネル開口薬は、LQT1及びLQT2対象のQT間隔を短縮させる(Shimizu W Antzelevitch C: Effects of a K(+) channel opener to reduce transmural dispersion of repolarization and prevent torsade de pointes LQT1, LQT2, and LQT3 models of the long QT syndrome. Circulation, 2000 102: 702-712)。(vi)hERG電流エンハンサー：RPR 260243は、モルモットの筋細胞におけるドフェタリド誘発性活動電位延長を反転させる(Kang J, Chen XL, Wang H, et al.: Discovery of a small molecule activator of the human ether-a-go-go-related gene(HERG) cardiac K+ channel. Mol Pharmacol 2005 67: 827-836)。(vii)カルシウムチャンネル遮断薬：L型カルシウムチャンネルを介したカルシウム流入は、定常期、活動電位の持続時間及び活動電位のQT間隔を維持する。ベラパミル、L型カルシウムチャンネル遮断薬、及びI_{Na}の阻害薬は、QT間隔を短縮させ、LQTSモデルにおいてTdPを抑制する。低い心拍数でQTが大幅に短縮された、発作性心房心室結節性リントリー性頻拍のある患者において使用される。hERG阻害EC₅₀は、83uMである。ベラパミルを適切な投与量で投与した場合、トルサード・ド・ポアンツが回避され得る(Fauchier L, Babuty D Poret P

10

20

30

40

50

, Autret ML, Cosnay P, Fauchier JP: Effect of Verapamil on QT interval dynamicity. AM J Cardiol. 1999 83(5):807-808 A10-1)。 (viii) 輸送異常補正：心筋細胞膜の膜貫通イオンポアを形成するタンパク質及び糖タンパク質の輸送の異常は、対応する電流の振幅を低減させ、L Q T Sにおいて役割を果たす。テルフェナジン又はタブシガルジンの代謝産物であるフェキソフェナジンは、L Q T 2に関連した選択的ミスセンス変異におけるh E R Gを遮断することなく、そのような異常な輸送を回復することができる。(ix) ギャップ結合カップリングエンハンサー：ギャップ結合は、小分子と電流の両方が心筋細胞間で移されることを可能にする細胞間チャネルである。心不全及び肥大は、ギャップ結合の脱共役に関連している。ギャップ結合を増強することで、L Q T Sにおいて再分極の分散が増強される抗不整脈作用を引き起こすことができる。合成ペプチドA A P 1 0 ギャップ結合エンハンサーの注入は、ウサギ左室標本におけるQ T 間隔を低減させる (Quan XQ, Bai R, Liu N, Chen BD, Zhang CT. Increasing gap junction coupling reduces transmural dispersion of repolarization and prevents torsades de points in rabbit LQT3 model. J Cardiovasc Electrophysiol 2007 18:1184-1189)。

【 0 0 4 7 】

本発明に記載のこの非臨床試験は、米国食品医薬品局 (F D A , United States Food and Drug Administration) 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 2 1 C F R P a r t 5 8、経済開発協力機構 (O E C D , Organization for Economic Cooperation and Development) 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 [C (9 7) 1 8 6 / F i n a l] (1 9 9 7 年 1 1 月 2 6 日 発表) 及び日本国厚生労働省 (M H L W , Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare) 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令第 2 1 号 (1 9 9 7 年 3 月 2 6 日) に従って実施した。

【 0 0 4 8 】

研究の概要： 1) 被験物：クルクミン、空リボソーム、リボソームクルクミン (0 . 0 1 4、0 . 2 0、3 . 4 及び 1 1 . 4 μ M) ; 2) 試験の方式：h E R G 発現 H E K 2 9 3 トランスフェクト細胞株 ; 3) 実施する試験：ホールセルパッチクランプによる電流取得及び解析 ; 4) 実験温度：3 5 \pm 2 。

【 0 0 4 9 】

被験物の適用： 1) 閉鎖循環式灌流下 (2 m L / 分) で、各濃度に 5 分間曝露 ; 2) フロースルー灌流下 (2 m L / 分) でウォッシュアウト期間、さらに閉鎖循環式灌流 (2 m L / 分) で 5 分間、 ; 3) 陽性対照、 (1 0 0 n M E - 4 0 3 1 及びテルフェナジン (0 . 0 1、0 . 0 3、0 . 1 μ M) を、同じ細胞株及び同じ継代から得た未処置の細胞に、閉鎖循環式灌流下 (2 m L / 分) で 5 分間加えた ; 4) クルクミン、テルフェナジン及び E - 4 0 3 1 をそれぞれ、空リボソームで 1 5 分間ボルテックスし、その後試験した。研究全体を通じて、細胞をパルスプロトコルの持続的な刺激の下に置き、それぞれの条件について 5 分間の曝露後、細胞電流を記録した。

【 0 0 5 0 】

データ取得デザイン：取得値：1 . 0 k H z。化合物又は媒体 / 溶媒等価物を試験する際の取得のためのデザイン：ベースライン条件で行った 1 回の記録、濃度 1、2、3 又は 4 の下で行った 1 回の記録、及びウォッシュアウト後 (第 4 の濃度後に限る) に行った 1 回の記録。陽性対照を試験する際の取得のためのデザイン：ベースライン条件で行った 1 回の記録、陽性対照の存在下で行った 1 回の記録、及び n = 上記のプロトコル全体が適用された可能性のあるパッチを適用した応答性の細胞の数。

【 0 0 5 1 】

統計解析：対応のあるステューデント t 検定を用いて統計的比較を行った。被験物について、様々な被験物濃度への曝露後に記録した電流を、ベースライン条件で記録した電流と統計的に比較した。ウォッシュアウト後に記録した電流を、最大濃度の被験物後に測定した電流と統計的に比較した。同様に、陽性対照後に記録した電流を、ベースライン条件で記録した電流と比較した。p が 0 . 0 5 以下の場合、有意差があると判断した。

【 0 0 5 2 】

データ除外基準：1) 薬剤曝露の時間枠が守られていない；2) 不安定な封；3) パッチを適用した細胞がテール電流を生じない；4) 陽性対照に有意な効果がみられない；及び5) 試験の期間を通じて、容量の一過性振幅の変位が10%超。

【0053】

クルクミン、リポソームクルクミン、空リポソーム及び陽性対照 E - 4031 及びテルフェナジンのインビトロでの効果を、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (HERG) でトランスフェクトしたヒト胎児由来腎臓 (HEK) 293 細胞を使用したヒト遅延整流電流で判定した。

【0054】

I_{Kr} チャネル阻害及び心毒性は、一部のクラスの薬剤、特に I_{Kr} チャネル阻害及び / 又はインビボでの QT 延長を引き起こす薬剤にとって、主な不都合なものとなってきた。前臨床の薬剤開発中、多くの薬剤にこの活性が見出され、その結果、多くの有望な薬剤のクラスが中止となった。この活性の結果として、いくつかの QT 延長薬剤は中止され、非常に制限的に使用される。例としては、以下に限定されないが、クリゾチニブ、ニロチニブ、テルフェナジン、アステミゾール、グレパフロキサシン、テロジリン、ドロペリドール、リドフラジン、レボメタジル、セルチンドイル及びシサプリドが含まれる。

【0055】

LQTS 及び TdP のリスクを高める、現在市販されている多数の薬剤がある。一部の非限定例を以下に示す：

【0056】

アロキシ又はパロナシトロン HCL : 5 - ヒドロキシトリプタミン - 3 受容体アンタゴニスト、術後悪心及び嘔吐用静脈注射薬。(Eisai社, Helsinn, Switz.) 有害作用としては、2.25mg 超の用量で EKG 2% 超、QT 延長 5% 超、徐脈 4% 超が含まれる。

【0057】

アミオダロン (コルドロン X) クラス III 抗不整脈薬、WPW 症候群向け、心室性不整脈向け：男性に比し女性の方がリスクは低いとされる。1 ~ 3% が主にクラス III 効果を有する。洞房結節機能障害、及び心不整脈亢進。MOA は、心筋細胞 - 活動電位持続時間、及び不応期の延長、不整脈及び TdP の悪化に関連がある QT 間隔の 10% 増加、並びに非競合的 - 及び - アドレナリン阻害である。TdP の有り無し両方で、フルオロキノロン、マクロライド系抗生物質又はアゾールの同時投与による QTc 延長。TEVA Pharmaceuticals IND. 社。

【0058】

亜ヒ酸：無効性の HERG 遮断薬 (IC_{50} は 300 μ M を超える) は、HERG 電流に間接的効果を有する場合がある、抗がん剤。製造元は、Cephalon 社である。

【0059】

アステミゾール* : Janssen 社より市販されている第 2 世代のヒスタミン H1 及び H3 受容体アンタゴニスト、並びに抗マラリア剤。テルフェニジン及びハロペリドールに対して構造的に類似。本来はアレルギー性鼻炎に使用：まれではあるが致命的な不整脈を理由に、米国内ではもはや入手不可。 IC_{50} は、50 nM での HERG テール電流である。

【0060】

ベプリジル：低い効力の持効性カルシウムチャネル遮断薬である (EC_{50} は 10 μ M である)。両方の K^+ チャネルは、カルシウムチャネル遮断薬に対し感応性の標的である。それは、濃度依存的に急速成分 HERG を遮断し (EC_{50} は 0.55 μ M である)、心筋遅延整流 K^+ 電流の低速成分を生じる $KvLQT1 / Isk$ K^+ チャネルも阻害する。これらの変化は、QT 延長をもたらす可能性がある。それはまた、重大な抗労作性関連狭心症、及び降圧活性を持つカルモジュラムアンタゴニストである。製造元 TOCRIS Bioscience Inc 社。

【0061】

クロロキン：抗マラリア薬：Novartis Pharma AG 社、濃度及び時間依存的に HERG チャネルを阻害する。最大半量の阻害濃度 (IC_{50}) 2.5 μ M。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

クロルフェニラミン：QT延長を誘発する低い効力の第1世代の抗ヒスタミンH1遮断薬、すなわち、濃度依存的なhERG遮断薬。同薬は、活性化及び不活性化状態においてチャンネルに作用するが、閉塞状態では作用しない。第1及び第2世代の抗ヒスタミン薬の過剰投与は、K⁺電流に作用することにより不整脈性作用を及ぼす。

【 0 0 6 3 】

クロルプロマジン（ソラジン）：1950年にRhone-Poulec社によって開発された抗精神病薬/制吐薬/統合失調症薬。同薬は、心不整脈を引き起こす（Fowler NO, McCall D, Chou TC, Hilmes JC, Hanenson IB,: Electrocardiographic changes and cardiac arrhythmias in patients receiving psychotropic drugs. Am J Cardiol 1976 37(2): 223-230）。

10

【 0 0 6 4 】

シサプリド：Janssen社により消化管運動改善薬として使用：同薬は、そのQT延長副作用のために2000年に中止された（Layton D, Key C, Shakir SA: Prolongation of the QT interval and cardiac arrhythmias associated with cisapride: limitations of the pharmacoepidemiological studies conducted and proposals for the future. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2003 12(1):31-40）。

【 0 0 6 5 】

セレキサ（シタロプラム）QT prolonger Forest Labs社：カリウムhERGチャンネルの直接的な遮断を介してQTc間隔を延長し、hERGカリウムチャンネルの数を効果的に減少する細胞膜のhERGタンパク質発現を妨害し、及び、脱分極延長をもたらすI型カルシウム電流を遮断する選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor）（Witchel, H. J. (2011). Drug-induced hERG block and QT syndrome. Cardiovasc Ther. 29(4):251-259）。

20

【 0 0 6 6 】

クラリスロマイシン及びエリスロマイシン：抗生物質、男性よりも女性が感受性が高い。両方ともQT延長及びTdPを引き起こす。エリスロマイシンは、IC₅₀ 38.9で濃度依的にhERG電流を低減させ（reduces）、クラリスロマイシンは45.7 uMで臨床的に適切な濃度で低減させる。

【 0 0 6 7 】

クルクミン（ジフェルロイルメタン）：hERG電流を阻害する（Moha ou Maati H, Ducroq J, Rivet J Faivre J.F. Le Grande M, Bois P: Curcumin blocks the recombinant human cardiac KCNQ1/ KCNE1 channels (IKs) stably expressed in HEK 293 cells. Congress de Physiologie, de Pharmacologie et de Therapeutique, Clermont-Ferrand, France, 9-11 Avril. 2008 Fund. Clin. Pharmacol. 22(Suppl.1)）。クルクミンは、IC₅₀ 3.5 uMで、中程度の効力のある分子である（Katchman AN, Koerner J, Tosa ka T, Woosley RL, Eberty SN: Comparative evaluation of HERG currents and QWT intervals following challenge with suspected torsadogenic and non-torsadogenic drugs. J Pharmacol Exp Ther. 2006 316(3):1098-1106）。

30

【 0 0 6 8 】

ジソピラミド：後天性LQTSに関連しているクラス1抗不整脈薬（Vaughan Williams分類）。用量依的にQT間隔を延長し、QRS群QTを拡張する（IC₅₀ 7.23 uM）。ナトリウム及びカリウムの両方のチャンネルを遮断し、フェーズ「O」脱分極を抑制し、心房及び心室の組織の活動電位の持続時間を延長する。

40

【 0 0 6 9 】

ドフェチリド：Pfizer社よりタイコシン経口カプセル剤として名前を記された、洞調律及び心房細動の維持のために使用されるクラスIII抗不整脈薬。選択的にIKr、外向き遅延整流カリウム電流を遮断する。TdPは、用量関連発生率が0.3~10.5%の重篤な副作用である。これは、処置前QTcが479msを上回る場合には、死亡リスクの上昇が2倍となる。強力なhERG遮断薬：IC₅₀は10nMである。

50

【0070】

ドンペリドン：制吐薬として使用される抗ドパミン作用薬。Janssen Pharmaceuticals社。米国内では入手不可。心停止及び不整脈、及び新生児におけるQT延長の増加に関連している(Djeddi D, Kongolo G, Lefaix C, Mounard J, Leke A: Effect of domperidone on QT interval in neonates. J Pediatrics 2008 153(5): 596-598)。

【0071】

ドキシソルピシン：30 uMでQTcが13%延長する；hERGチャネルを有意に遮断することなく急性QT延長を引き起こすが、IKsを阻害する(IC₅₀：4.78 uM)。

【0072】

ドロネダロン：アミオダロンの非ヨウ素化アナログ。(IC₅₀ 70 nMでhERGを遮断)心房細動患者40,000名超に使用。+30 mVで活性化後、-40 mVで測定された野生型hERGテールは、IC₅₀値59 nMで遮断された。チャネル活性化高外部[K⁺] (94 mM)に非依存的な膜脱分極に生じる遮断を伴うhERG阻害に続くチャネル開閉が、I(hERG)阻害の効力を抑制し、Y652及びF656芳香族酸残基に依存しない。Chemsky (Shanghai) International社及びSanofi-Avantis社により「Muttag」として製造。英国国立衛生研究所は2010年、費用に基づき同薬をブロックした。

10

【0073】

ドロペリドール：中枢鎮静、制吐、麻酔補助剤であり、QT間隔延長、TdP及び突然死に関連。test pulseを50 mVとした後、hERGテール電流は、IC₅₀ 77.3 nMで阻害された。hERGチャネルは、開口及び不活性化状態において影響を受けた。効力は、Phe-656からThr又はSer-631からAlaの変異に伴って低下する。本化合物について14社がリストアップされる。

20

【0074】

グレパフロキサシン：PQTSを含むいくつかの重篤な心血管事象を引き起こす経口フルオロキノロン系抗菌薬であり、市場から自主的に回収された(WHO 1999)。

【0075】

ハルドール、ハロペリドール：強力なhERG遮断薬、統合失調症治療薬、激越、静脈内又は推奨用量を上回って投与された場合、突然死、QT延長及びTdP上昇のリスクあり。Janssen-Silag社

30

【0076】

ハロファントリン：抗マラリア薬、心不整脈及び有意なQT延長に関連あり。男性に比べて女性により高い感受性がある。Glaxo-Smith-Kline社

【0077】

イブチリド：Pfizer社によりカヴァート(convert)。心房粗動及び細動向けの純クラスIII抗不整脈薬、男性に比べて女性により高い感受性がある。緩徐型内向きナトリウム電流を誘発。K電流を遮断しないが、活動電位を延長する。

【0078】

レボメタジル：オピエートアゴニスト/鎮痛薬、麻薬性依存。メサドンと同様、Roxane Labs社は、心室調律障害を理由に市場から回収した。

40

【0079】

リドフラジン：抗不整脈活性を伴うピペラジン系カルシウムチャネル遮断薬。カリウムチャネルのサブユニットの強力なhERG遮断薬(IC₅₀ 16 nM)。開口活性化状態を優先的に阻害する。hERGに対してベラパミルに比し13倍超強力。

【0080】

ロラチジン、クラリチン：第2世代の抗ヒスタミン薬。hERG遮断薬としてIC₅₀ 173 nMでhERG再分極電流に間接的効果を及ぼし得る。Schering-Plough社により市販。

【0081】

50

ロボスタチン：低い効力のhERG合成遮断薬。

【0082】

メソリダゾン：統合失調症治療薬。

【0083】

メサドン：濃度依存的に電位開口型心筋カリウムチャンネルと相互作用し、メサドンを服用している患者に、重篤な心不整脈、並びにTdP及び心室細動による死亡を引き起こす。IC₅₀は、4.8 μM（ヘロインについては427 μMと比較して）の抗ドパミン薬である。メサドン関連TdP素因は、女性、高投与量、S-メサドンのCYP2B6低代謝群及びDNA多型である。非経口の（parenteral）メサドン及びクロロプロタノールの組合せは禁忌となる。QT延長活性は、主として、R-メサドンよりも3～5倍強力にhERG電流を遮断するS-メサドンによるものである。

10

【0084】

メタンスルホンアニリド（E-4031）：きわめて強力な化合物であり、nM濃度でhERGを阻害する。標準アッセイで陽性対照として使用。

【0085】

モキシフロキサシン：hERGチャンネル遮断薬：100 μMでQTcを22%延長し、一方、デクスラゾキサシンにより防止されず。

【0086】

ペントマジン：無効性のhERG遮断薬（IC₅₀は300 μMを超える）、抗感染性、ニューモシスチス肺炎。QT間隔延長及びTdPに関連しており、それ故、hERG再分極に対して未知の間接的効果を及ぼし得る。

20

【0087】

ピモジド：統合失調症治療薬、トゥレットチック症。

【0088】

プレニラミン：中等度のhERG遮断薬

【0089】

プルブコール：抗高脂血症薬、高コレステロール治療薬、米国内ではすでに入手不可。

【0090】

プロカインアミド：抗不整脈薬。

【0091】

プロパフェノン：低い効力のhERG遮断薬（IC₅₀は1 μMを超える）。

30

【0092】

ピリラミン：低い効力のhERG遮断薬。

【0093】

キニジン：抗不整脈薬 女性の方が男性よりも高い感受性がある。

【0094】

セルデー（テルフェニジン）：強力なhERG遮断薬。

【0095】

セルチンドール：中等度の効力のhERG遮断薬。

【0096】

ソタロール：LQT2モデル、カリウムチャンネル拡張薬であるニコランジル拡張薬によって、作用が阻止される。同薬は心室頻拍、心房細動について抗不整脈薬、遮断薬として作用し得る（Ducroq J., Printemps R, Le Grand M.: Additive effects ziprasidone and D,L-sotalol on the action potential in rabbit purkinje fibers and on the hERG potassium current. J.Pharmacol. Toxicol Methods 2005 52:115-122）。1288例の患者の2%がQT延長を示した。455 msを超えるQTcはTdPをもたらす。

40

【0097】

スパルフロキサシン：抗菌薬。

【0098】

チオリダジン：中等度の効力のhERG遮断薬。

50

【 0 0 9 9 】

バンデータニブ：Astra-Zeneca社により市販されている経口キナーゼ阻害薬は、進行性転移性又は局所進行性甲状腺髄様がん承認されている。QT延長、TdP及び突然死が枠組み警告に含まれている。最も一般的な（5%を超える）グレード3/4の有害反応としては、QT延長疲労及び発疹が含まれる。

【 0 1 0 0 】

活性型フェキソフェナジンの抗ヒスタミンプロドラッグであるテルフェナジン、及びE-4031を、本研究の基準化合物として選択した。テルフェナジンは、特にマクロライド系抗生物質又はケトコナゾールと組み合わせる場合、心室性不整脈心毒性作用が報告されている。本研究の被験物として使用されたものと同じ細胞株において入手したデータからIC₅₀ hERG阻害作用の値99nMを算出した。クラスIII抗不整脈薬であるE-4031は、1つの臨床的な例外を除き、専ら研究目的のために使用される合成毒物である（Okada Y., 1996）。その作用機序は、hERG電位開口型カリウムチャネルを遮断することである。E-4031は、100nMで電流密度の90.6%を阻害した。観察された阻害は、同一の条件で作成された内部検証データに一致し、本化合物について公表された阻害値とも一致する。これらの結果は、hERG-選択的阻害剤、本事例ではテルフェナジン及びE-4031に対する試験の方式の感応性を確認する。

【 0 1 0 1 】

ホールセルIKr hERG電流に対するクルクミンの効果：選択した濃度のクルクミンの適用後及びウォッシュアウト期間後、電位パルス間に誘発されたホールセル電流をベースライン条件下で記録した。プロトコルに従って、4通りの濃度のクルクミンをhERG電流阻害について分析した。細胞は1秒間で脱分極し、保持電位（-80mV）から最大値+40mVまで、-40mVで開始して10mVずつ漸増した。膜電位はその後1秒間で-55mVに再分極し、最終的に-80mVに回復した。

【 0 1 0 2 】

ホールセルテール電流振幅は、-40から+40mVまでの電流の活性化後、-55mVの保持電位で測定した。電流振幅をこのテール電流の最大値（ピーク）で測定した。電流密度は、一過性の容量極小化前に測定したセルキャパシタンスにより電流振幅を分割することで得た。

【 0 1 0 3 】

電流減弱及び溶媒効果補正：すべてのデータポイントを溶媒効果及び時間依存電流減弱について補正した。被験物で実施したのと同じ時間枠にわたり被験物不含条件（DMSO）で実験デザインを適用することで電流減弱及び溶媒効果を同時に測定した。これらのいわゆる媒体実験中に測定した電流振幅の減少（溶媒効果及び時間依存的減弱の両方に相当）は、溶媒の効果及び経時的な電流振幅の必然的な減弱を除いて、被験物の影響を区別するために被験物の存在下で測定した振幅の減少分から減算した。

【 0 1 0 4 】

本明細書中で示した研究は、IKrに関してDMSO中で可溶化されたクルクミンの効果を実験的に定量化した。クルクミンの濃度（0.014、0.2、3.4及び11.4µM）は本研究の設計時に入手可能な情報に基づいた。濃度は：（1）計画された最小のフェーズ1用量レベルでの予測ヒト血漿中レベル；（2）計画された最高のフェーズ1用量レベルでの予測ヒト血漿中濃度；（3）予測ヒト治療域血漿中レベルの30倍；及び（4）予測ヒト治療域血漿中レベルの100倍に基づき選択した。これらの選択した濃度は、クルクミンのヒト心臓電気生理学に対する効果についての有用な予測を与えるものと思われる。Sami Labs社（インド、バンガロール）で、クルクミン99.2%純度を、GMP条件で合成し、遮光して4℃で保管した。本研究に含まれる細胞に曝露させるために用いられる各クルクミン濃度の1mLのアリコートは、そのクルクミン含有量について独立して分析した。後続の研究のために、GMPグレードのリポソームクルクミンをPolymun GmbH社（オーストリア、ウィーン）で製剤化し、4℃で保管した。リポソームはPolymun GmbH社から入手し、テルフェナジン及びE-4031はSigma Aldrich Fine Chemicals社から購入

10

20

30

40

50

した。

【0105】

【表1】

表1:20mVでのトランスフェクトHEK293からのhERG電流密度に対するテルフェナジン、正の対照の効果

	正規化 電流密度	補正済 正規化 電流密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	3
テルフェナジン、0.01 μ M*	0.645	0.767	0.090	0.122	3
テルフェナジン、0.03 μ M**	0.650	0.772	0.073	0.088	3
テルフェナジン、0.1 μ M**	0.362	0.483*	0.063	0.015	3

*10nM、**30nM、***100nM.

10

20

【0106】

テルフェナジンは、 IC_{50} 0.065 μ mol/L (65 nM) の効力でIKrを阻害した。

【0107】

【表2】

表2:20mVでのトランスフェクトHEK293からのhERG電流密度に対するテルフェナジンの効果

	正規化 電流密度	補正済 正規化 電流密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	3
テルフェナジン、30nM	0.469	0.548	0.080	0.111	2
テルフェナジン、100nM	0.399	0.478*	0.072	0.018	3
テルフェナジン、300nM	0.043	0.122*	0.004	0.000	3

*被験物濃度への曝露後に記録した電流はベースライン条件で記録した電流とは有意に異なっていた。p \leq 0.05の場合、差は統計的に有意であると判断した。

30

40

【0108】

図1は、表2で示されたデータのグラフによる表示である。図2は、テルフェナジンに曝されたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅の電流-電位(I-V)関係のグラフである。図3は、20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するテルフェナジンの効果のグラフである。図4は、テルフェナジンに曝されたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI-V関係のグラフである。

50

【 0 1 0 9 】

【 表 3 】

表3:20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するE-4031の効果

	正規化 電流密度	補正済 正規化 電流密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	3
E-4031、100nM	0.124	0.094*	0.067	0.0055	3

10

【 0 1 1 0 】

E - 4 0 3 1 は IC_{50} 5 0 n M で I K r を 阻 害 し た 。 図 5 は 、 2 0 m V で の ト ラ ン ス フ ェ ク ト H E K 2 9 3 細 胞 か ら の h E R G 電 流 密 度 に 対 す る E - 4 0 3 1 の 効 果 を 示 す グ ラ フ で あ る 。

【 0 1 1 1 】

【 表 4 】

20

表4:20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するクルクミンの効果

	正規化 電流密度	補正済 正規化 電流密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	7
クルクミン、0.014 μ M	0.892	0.862	0.084	0.1521	7
クルクミン、0.2 μ M	0.773	0.744*	0.070	0.0107	7
クルクミン、3.4 μ M	0.642	0.612*	0.095	0.0064	7
クルクミン、11.4 μ M	0.234	0.204*	0.016	0.0000	7
ウォッシュアウト	0.489	0.459	0.127	0.2036	3

30

【 0 1 1 2 】

1 1 . 4 μ M の 濃 度 で 、 ク ル ク ミ ン は 、 I + 2 0 で h E R G テ ー ル 電 流 密 度 の 7 9 . 6 % の 阻 害 を 引 き 起 こ し た (n = 7) 。 対 応 の あ る ス テ ー デ ン ト の t 検 定 に よ り 、 ベ ー ス ラ イ ン 時 及 び 0 . 2 ~ 1 1 . 4 μ M の ク ル ク ミ ン 存 在 下 で 測 定 し た 正 規 化 電 流 密 度 に お け る 差 異 が 、 統 計 学 的 に 有 意 な 所 定 の 閾 値 (p 0 . 0 5) に 達 し た こ と が 確 認 さ れ た 。 表 3 は 、 統 計 解 析 か ら 得 ら れ た p 値 を 提 供 す る 。 電 流 の 5 0 % の 阻 害 が 、 本 研 究 で 選 択 さ れ た 濃 度 の 範 囲 内 (0 . 0 1 4 ~ 1 1 . 4 μ M) で 達 成 さ れ た 。 4 . 9 μ M の IC_{50} 値 は 、 得 ら れ た デ ー タ か ら 算 出 し た 。 図 6 は 、 表 4 で 示 さ れ た デ ー タ の グ ラ フ で あ る 。 図 7 は 、 ク ル ク ミ ン に 曝 さ れ た ト ラ ン ス フ ェ ク ト H E K 2 9 3 細 胞 か ら の h E R G 電 流 振 幅 の I - V 関 係 の グ ラ フ で あ る 。

40

50

【 0 1 1 3 】

【表 5】

表5:20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するクルクミン(リポソームクルクミンとして)の効果

	正規化 電流 密度	補正済 正規化 電流 密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	7
クルクミン(リポソームクルクミン)、(0.014 μ M)	0.854	0.934	0.039	0.142	7
クルクミン(リポソームクルクミン)、(0.2 μ M)	0.838	0.918	0.092	0.408	7
クルクミン(リポソームクルクミン)、(3.4 μ M)	0.769	0.848	0.072	0.079	7
クルクミン(リポソームクルクミン)、(11.4 μ M)	0.716	0.795*	0.082	0.046	7
ウォッシュアウト	0.474	0.554*	0.101	0.020	4

10

20

【 0 1 1 4 】

統計解析から得られたp値は、ベースラインから11.4 μ Mでの電流密度のボーダーラインの有意差を示すが、電流障害の程度はIC₅₀未満であった。

【 0 1 1 5 】

図8は、20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するクルクミン(リポソームクルクミンとして)の効果を示すグラフであり、図9はクルクミン(リポソームクルクミンとして)に曝されたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI-V関係のグラフを示すグラフである。

30

【 0 1 1 6 】

表5において、整流内向き電流は、hERGテール電流に対するクルクミンの阻害効果が、正の保持電位でより高い効力を持つ、電位依存的であることを示した。ウォッシュアウト後に記録した電流は、クルクミン(リポソームクルクミン)の最高濃度(11.4 μ M)後に記録した電流と統計的に比較した。

【 0 1 1 7 】

【表 6】

表6:20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対する、クルクミンでボルテックスした空リポソームの効果

	正規化 電流 密度	補正済 正規化 電流 密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	3
クルクミン(リポソームクルクミン)、0.2 μ M	0.937	0.994	0.073	0.946	3
クルクミン(リポソームクルクミン)、3.4 μ M	0.738	0.796	0.055	0.064	3
クルクミン(リポソームクルクミン)、11.4 μ M	0.498	0.555	0.119	0.064	3
ウォッシュアウト	0.479	0.536	0.145	0.899	3

10

【0118】

リポソーム濃度は0.7、12、41 ng/mlであった。いずれの用量レベルでのクルクミンからも有意差はなかった。

20

【0119】

図10は、20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するクルクミン(リポソーム+クルクミン)の効果を示すグラフであり、図11はクルクミン(リポソーム+クルクミン)に曝されたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI-V関係のグラフである。ウォッシュアウト後に記録した電流は、11.4 μ Mのクルクミンの最高濃度後に記録した電流と同様に統計的に比較した。電流IC₅₀は到達されなかった。

【0120】

30

【表 7】

表7:20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するリポソームの効果

	正規化 電流密度	補正済 正規化 電流密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	3
リポソーム、0.7227ng/mL	0.921	1.041	0.037	0.379	3
リポソーム、12.285ng/mL	0.805	0.926	0.065	0.374	3
リポソーム、41.193ng/mL	0.888	1.009	0.075	0.919	3
ウォッシュアウト	0.817	0.938	0.151	0.734	3

40

【0121】

リポソームは、インビトロでのhERGチャネルに対する阻害効果を示さない。ウォッ

50

シュアウト後に記録した電流は、リポソームの最高濃度（41.193 ng/mL）後に記録した電流と統計的に同等であった。図12は、表7で示されたデータのグラフであり、図13は、リポソームに曝されたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI-V関係のグラフである。

【0122】

【表8】

表8:20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するリポソーム+E-4031の効果

	正規化 電流密度	補正済 正規化 電流密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	3
リポソーム、0.72ng/mL+E-4031、30nM	0.489	0.610	0.115	0.077	3
リポソーム、12.29ng/mL+E-4031、100nM	0.219	0.339*	0.067	0.010	3
リポソーム、41.19ng/mL+E-4031、300nM	0.171	0.292*	0.022	0.001	3
ウォッシュアウト	0.130	0.251	0.037	0.675	2

*被験物濃度に曝露後に記録した電流は、ベースライン条件で記録した電流と統計的に異なっていた($p \leq 0.05$)。

【0123】

図14は、20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するリポソーム+E-4031の効果を示すグラフであり、図15はリポソーム+E-4031に曝されたトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流振幅のI-V関係のグラフである。

【0124】

30~300nMの濃度でE-4031でボルテックスした場合、空リポソームは、E-4031の抗hERG効果、E-4031阻害を妨げない。ウォッシュアウト後に記録した電流は、リポソーム+E-4031の最高濃度後に記録した電流と統計的に比較した。

【0125】

10

20

30

【表 9】

表9:20mVでのトランスフェクトHEK293細胞からのhERG電流密度に対するリポソーム+テルフェナジンの効果

	正規化 電流密度	補正済 正規化 電流密度	SEM	p値	n=
ベースライン	1.000	1.000	n/a	n/a	3
テルフェナジン(リポソーム+テルフェ ナジン)、30nM	0.298	0.392*	0.065	0.011	3
テルフェナジン(リポソーム+テルフェ ナジン)、100nM	0.122	0.216*	0.073	0.008	3
テルフェナジン(リポソーム+テルフェ ナジン)、300nM	0.117	0.211*	0.032	0.000	4
ウォッシュアウト	0.276	0.369	0.017	0.081	2

*被験物濃度に曝露後に記録した電流が、ベースライン条件で記録した電流と、統計的に異なっていたことを意味する。p≤0.05の場合、差は統計的に有意であると判断した。

【 0 1 2 6 】

本明細書中の上記の表 9 で示したデータを、図 1 6 にグラフにより表示し、図 1 7 は、リポソーム + テルフェナジンに曝されたトランスフェクト H E K 2 9 3 細胞からの h E R G 電流振幅の I - V 関係を示すグラフである。3 0 ~ 3 0 0 n M の濃度でテルフェナジンでボルテックスした場合、h E R G 電流密度のテルフェナジン阻害に対する空リポソームの影響はみられなかった。

【 0 1 2 7 】

本明細書中の上記で示したデータは、試験の対象となる濃度の範囲内で及び本研究の特定の文脈において、クルクミンが I K r 電流をダウンモジュレートする、すなわち、クルクミンが h E R G 遺伝子によってコード化されたタンパク質と相互作用し、チャネル開閉機能を活性化し、イオンフローを減少させることを示唆する。クルクミノイド混合物 (7 8 % クルクミン) による同様の観察結果が発表された (Moha ou Maati H, Ducroq J, Riv et J Faivre J.F. Le Grande M, Bois P: Curcumin blocks the recombinant human cardiac KCNQ1/ KCNE1 channels (IKs) stably expressed in HEK 293 cells. Congress de Physiologie, de Pharmacologie et de Therapeutique, Clermont-Ferrand , France, 9-1 1 Avril. 2008 Fund. Clin. Pharmacol. 22(Suppl.1))。これらのデータは、それらの当初の知見を支持するものであり、クルクミン (ジフェルロイルメタン) 分子が、すべてではないが支配的な I K r 阻害を示すことを強調する。

【 0 1 2 8 】

リポソームクルクミン又はリポソームとクルクミンとのボルテックスされた混合物が、正常な開閉機能が生じることを可能にするクルクミンにより、I K r ダウンモジュレートを妨げたとする本発明の知見は、クルクミンのリポソーム封入が必ずしもチャネル薬受容体部位との相互作用を阻止しないことを示唆する。K + チャネルの受容体の親和性の特異性及び程度、又は優先的な相互作用に関する疑問に関連するが、空リポソームは、クルク

ミンがない状態で、又はE - 4 0 3 1及びテルフェナジンの存在下で、h E R G遺伝子によりコード化されたタンパク質と相互作用しないように思われた (Zavhariae U, Giordanetto F, Leach AG: Side chain flexibilities in the human ether-a-go-go related potassium channel (hERG) together with matched-pair binding studies suggest a new binding mode for channel blockers. J Med Chem 2009 52(14): 4266-4276)。

【0129】

クルクミンにより誘発された I_{Kr} /hERG抑制は、クルクミンがリポソーム中に内包された場合、又は、曝露前に単にリポソームでボルテックスされただけの場合、軽減される。このリポソームとクルクミン以外の静脈内QT延長薬との組合せ静脈内投与は、インビボでのQT遅延を軽減し得る。

10

【実施例2】

【0130】

リポソームは、心筋 I_{Kr} チャネルの薬剤誘発性阻害を改善する。

クリゾチニブ (Xalkori (登録商標)) 及びニロチニブ (Tasigna (登録商標)) はそれぞれ、非小細胞肺癌及び慢性骨髄性白血病の処置のために承認されたチロシンキナーゼ阻害薬である。両方とも、ヒト及び動物におけるQT延長をもたらすことが示されている。リポソームは、ヒトether-a-go-go関連遺伝子 (hERG) によりコード化された I_{Kr} ($K_{v}11.1$) チャネルに対する薬剤誘発性効果を改善することが示されている。本研究は、リポソームも I_{Kr} チャネルに対するクリゾチニブ及びニロチニブの効果を低下させるかどうかを判定するために行った。hERGで安定的にトランスフェクトしたヒト胎児由来腎臓 (HEK) 293細胞を使用した標準インビトロ I_{Kr} アッセイにおいて、クリゾチニブ及びニロチニブを試験した。用量反応を判定し、50%阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。HEK 293細胞をリポソームと混合したクリゾチニブ及びニロチニブで処理した場合、これらの2つの薬剤の I_{Kr} チャネル阻害効果に著しい減少がみられた。リポソーム被包性QT延長薬の使用、又はこれらの薬剤をリポソームと混合するだけで、これらの心臓性の傾向が低下することが見出された。

20

【0131】

クリゾチニブ (Xalkori (登録商標)) は、ALK陽性腫瘍の患者における非小細胞肺癌の処置のために承認された未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 阻害薬である。ニロチニブ (Tasigna (登録商標)) は、フィラデルフィア染色体陽性慢性骨髄性白血病のために承認されたBCR-ABLキナーゼ阻害薬である。両方の薬剤ともに、ヒトether-a-go-go関連遺伝子 (hERG) によりコード化された、心臓における遅延整流性 K^+ 電流 (I_{Kr} 又は $K_{v}11.1$) に関与するイオンチャネルを阻害する。 I_{Kr} チャネルの阻害は、重篤な多形性心室性頻拍又はトルサード・ド・ポアンツにつながりかねないQTcの延長をもたらし得る (Yap YG, Camm A J. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. Heart. 2003;89:1363-1372)。クリゾチニブはヒト及び動物におけるQT延長を引き起こし、一方、ニロチニブはヒトにおけるQT延長を引き起こすことが示されているのみである。

30

【0132】

I_{Kr} チャネル阻害及び心毒性は、一部の分類の薬剤にとって、主な不都合なものとなり得る。臨床試験前の医薬品開発の間の I_{Kr} チャネル阻害及び/又はインビボでのQT延長の検出は、有望な薬剤群の開発の断念につながり得る。いくつかのQT延長薬が、開発中又は上市後に回収されてきた。これらには、テルフェナジン、アステミゾール、グリパフロキサシン、テロジリン、ドロペリドール、リドフラジン、レボメタジル、セルチンドイル及びシサブリドが含まれる。

40

【0133】

開発中、クリゾチニブは、 $1.1 \mu M$ の50%阻害濃度 (IC_{50}) で I_{Kr} チャネルを阻害することが示されたことから (FDA Pharmacology Review of Xalkori(R) (crizotinib), IND No. 202570, 2011a, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000PharmR.pdf (accessed October 9, 2013))、QT間隔延長の可能性が示唆

50

された。IC₅₀値は、臨床関連用量でヒトにおいてみられるC_{max}未満であるか同等であった。クリゾチニブを静脈内で処理されたイヌは、心拍及び収縮力の低下、左室拡張末期圧の上昇、並びにP R、Q R S及びQ T間隔の増加を示した(FDA Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Xalkori(R) (crizotinib), IND No. 202570, 2011b, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000ClinPharmR.pdf (accessed October 9, 2013))。これらの前臨床の知見は、臨床試験において時折観察されたQ T c延長、徐脈及び心停止と関連する(FDA Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Xalkori(R) (crizotinib), IND No. 202570, 2011b, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000ClinPharmR.pdf (accessed October 9, 2013)、Xalkori (2013) [package insert], Pfizer Laboratories, New York, NY, revised February 2013)。ニロチニブは、0.13 μMのIC₅₀でI_{Kr}チャネルを阻害することが示された(FDA Pharmacology Review of Tassigna(R) (nilotinib), IND No. 22-068, 2007a, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_PharmR_P1.pdf and www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_MedR_P2.pdf, (accessed October 25, 2013))。しかし、クリゾチニブとは対照的に、600 mg/kgまでを経口処置されたイヌは、Q T延長を示さなかった(FDA Pharmacology Review of Tassigna(R) (nilotinib), IND No. 22-068, 2007a, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_PharmR_P1.pdf and www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_MedR_P2.pdf, (accessed October 25, 2013))。クリゾチニブ及びニロチニブによるイヌを対象とした各試験の1つの違いとは、クリゾチニブは静脈内投与したのに対し、ニロチニブは経口投与したことである。クリゾチニブを用いた場合、臨床試験は、治療用量のニロチニブとQ T c延長との関連性を示した。(FDA Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Tassigna(R) (nilotinib), IND No. 22-068, 2007b, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_ClinPharmR.pdf, (accessed October 24, 2013)、Tassigna (2013), Package insert, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ, revised September 2013)。

【0134】

Dohertyらによる研究(Doherty KR, Wappel RL, Talbert DR, Trusk PB, Moran DM, Kramer JW, Brown AM, Shell SA, Bacus S. Multi-parameter in vitro toxicity testing of crizotinib, sunitinib, erlotinib, and nilotinib in human cardiomyocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 2013;272(1):245-55)は、インビトロでヒト心筋細胞に対するクリゾチニブ及びニロチニブの複数の効果を明らかにした。これらの効果としては、心臓細胞死、カスパーゼ活性化の増加、及びスーパーオキシド産生の増加が含まれた。心臓細胞の形態は、個々の心臓細胞の正常な拍動パターンの乱れに伴って変化した。クリゾチニブについては、心筋イオンチャネルI_{Kr}、NaV1.5及びCaVがそれぞれ1.7、3.5及び3.1 μMのIC₅₀で阻害された。ニロチニブについては、IC₅₀はそれぞれ、0.7、3 μM超及び3 μM超であった。

【0135】

本発明者らは以前、リポソームがI_{Kr}チャネルのクルクミン誘発性阻害を軽減することを明らかにしている(Helson L, Shopp G, Bouchard A, Majeed M. Liposome mitigation of curcumin inhibition of cardiac potassium delayed-rectifier current. J Recept Ligand Channel Res. 2012;5:1-8)。本研究は、I_{Kr}チャネルに対するクリゾチニブ及びニロチニブの効果に関する結果を示し、リポソームの添加がこれらの効果を改善するかどうかを判定する。

【0136】

クリゾチニブは、11及び56 μMの濃度で、それぞれ、20 mVでのI_{Kr}テール電流密度の56及び89%の阻害を引き起こした(図18A)。対応のある学生t検定は、ベースライン時並びに11及び56 μMのクリゾチニブの存在下で測定した正規化電流密度の差異が、統計学的に有意な所定の閾値(p=0.05)に達したことを確認した(図10)。IC₅₀はクリゾチニブ単独で8.9 μMであった(表10)。ク

リゾチニブを室温で10分間リボソームと9:1の比率で(例えば、クリゾチニブ56 μM [25 $\mu\text{g}/\text{mL}$] に対しリボソーム225 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ボルテックスした場合、56 μM の最高濃度のクリゾチニブのみが統計的に有意な阻害(59%)に達した。IC₅₀は44 μM であった(表10)。リボソーム単独は、I_{Kr} テール電流密度に何ら効果を及ぼさなかった(図18A)。

【0137】

ニロチニブは、0.1及び1 μM の濃度で、それぞれ、54%及び74%と、20mVでのI_{Kr} テール電流密度の統計的に有意な阻害を引き起こした(図19A)。IC₅₀はニロチニブ単独で0.08 μM であった(表10)。ニロチニブを室温で10分間リボソームと9:1の比率で(例えば、ニロチニブ1 μM [0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$] に対しリボソーム4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ボルテックスした場合、1 μM の最高濃度であってもニロチニブのI_{Kr} チャネルに対する効果はみられなかった。IC₅₀は1 μM を超えた(表10)。リボソーム単独は、I_{Kr} テール電流密度に何ら効果を及ぼさなかった(図19A)。

10

【0138】

整流内向き電流の電流-電位関係は、テール電流で観察された阻害が、クリゾチニブ及びニロチニブの両方について電位依存的ではなかったことを示した(それぞれ図18B及び図19B)。

【0139】

図18A及び図18Bはそれぞれ、ベースライン条件下、並びにクリゾチニブ単独、リボソーム単独、及びクリゾチニブ+リボソーム存在下で、20mVでのI_{Kr} テールピーク振幅を測定することで得られたI_{Kr} テール電流密度平均値及び電位依存性を示す。クリゾチニブ+リボソームについては、クリゾチニブをリボソームと9:1の比率で、例えばクリゾチニブ56 μM (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に対しリボソーム225 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で混合し、ボルテックスした。図18Aは、ベースライン電流密度に対して平均化、正規化し、時間及び溶媒の影響を補正した、3~4個の細胞から測定された電流密度を示すグラフである。プロットした値は、平均値の平均値±標準偏差である。薬剤曝露後及びベースライン時の電流密度レベルの統計的比較を、反復の対応のあるステューデントのt検定(*)を用いて行った。p=0.05である場合、有意差ありと判断した。図18Bは、クリゾチニブの試験した最高濃度(56 μM)でのI_{Kr} テール電流阻害の電位依存性を示すグラフである。

20

30

【0140】

図19A及び図19Bはそれぞれ、ベースライン条件下、並びにニロチニブ単独、リボソーム単独、及びニロチニブ+リボソーム存在下で、20mVでのI_{Kr} テールピーク振幅を測定することで得られたI_{Kr} テール電流密度平均値及び電位依存性を示す。ニロチニブ+リボソームについては、ニロチニブをリボソームと9:1の比率で、例えばニロチニブ1 μM (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に対しリボソーム4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で混合し、ボルテックスした。図19Aは、ベースライン電流密度に対して平均化、正規化し、時間及び溶媒の影響を補正した、3個の細胞から測定された電流密度のグラフである。プロットした値は、平均値の平均値±標準偏差である。薬剤曝露後及びベースライン時の電流密度レベルの統計的比較を、反復の対応のあるステューデントのt検定(*)を用いて行った。pが0.05以下の場合、有意差ありと判断した。図19Bは、ニロチニブの試験した最高濃度(1 μM)でのI_{Kr} テール電流阻害の電位依存性を示すグラフである。

40

【0141】

【表 10】

表10.hERGで安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞において I_{Kr} 電流密度の50%阻害(IC_{50})を引き起こす濃度

試験薬	処置	I_{Kr} IC_{50} (リポソーム濃度)
クリゾチニブ	リポソーム単独	>225 μ g/mL
	クリゾチニブ	8.9 μ M
	クリゾチニブ+リポソーム	44 μ M (180 μ g/mL)
ニロチニブ	リポソーム単独	>4.5 μ g/mL
	ニロチニブ	0.08 μ M
	ニロチニブ+リポソーム	>1 μ M (>4.5 μ g/mL)

10

20

【0142】

陽性対照 E - 4031 は、100 nM の濃度で電流密度に統計的に有意な減少をもたらした。E - 4031 を2回試験し、67及び79%阻害という観察結果を得た(データは示されず)。これらの結果は、本実験室の内部検証データの範囲内であった。

【0143】

試薬。クリゾチニブ及びニロチニブは、Reagents Direct社から入手した。陽性対照 E - 4031 (N - [4 - [[1 - [2 - (6 - メチル - 2 - ピリジニル) エチル] - 4 - ピペリジニル] カarbon - イル] フェニル] 無水メタンスルホンアミドジヒドロクロライド) は、Sigma-Aldrich社から入手した。空リポソームは、Polymun GmbH社から入手した。リポソームは、9.7 : 1 の比率のDMPC (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン) 及びDMPG (1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - rac - [1 - グリセロール]) からできている。クリゾチニブ又はニロチニブ + リポソームについては、クリゾチニブ又はニロチニブをリポソームと9 : 1 の比率で混合し、10分間室温でボルテックスした; 例えば、クリゾチニブ56 μ M (25 μ g/mL) をリポソーム225 μ g/mL でボルテックスした。内部ピペット溶液の組成は、140 - mM KCl、1.0 - mM $MgCl_2$ 、4.0 - mM Mg - ATP、5.0 - mM EGTA、10 - mM HEPES及び10 - mM スクロースであった (pH 7.4 \pm 0.05)。hERG外部溶液の組成は140.0 - mM NaCl、5.0 - mM KCl、1.8 - mM $CaCl_2$ 、1.0 - mM $MgCl_2$ 、10.0 - mM HEPES及び10.0 - mM デキストロースであった (pH 7.3 \pm 0.05)。

30

40

【0144】

細胞培養。hERGを安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞を、10%ウシ胎仔血清 (Wisent社、St. Bruno, Quebec, Canada)、1%最小必須培地ピルビン酸ナトリウム、1%非必須アミノ酸、1%L - グルタミン、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、及び選択薬物として400 μ g/mL G - 418 (ジェネテシン) (すべての成分をGibco/Invitrogen社、Burlington, Ontario, Canadaから入手) で補充した最小必須培地で維持し、継代数12及び16の間を使用した。ギガオーム (GD) シールが得られなかったか又は特徴的なテール電流を伴う電流を生じなかった細胞については、平衡化期間中に排除した。

50

【 0 1 4 5 】

手順。ホールセルパッチクランプ法を用いて、イオンチャンネルとの薬剤相互作用を機能的に評価した。35 mmペトリ皿に置いたHEK293細胞を、1 mLのhERG外液で2回洗浄し、その後、2 mLのhERG外液を加えた。ペトリ皿は倒立位相差顕微鏡のステージ上に載せ、一定温度(35 ± 2)で維持した。Eppendorf PatchManマイクロマニピュレーター(Eppendorf Canada社、Mississauga, Ontario, Canada)を用いて、内部ピペット溶液を充填したホウケイ酸塩ガラスマイクロピペットを、単一細胞上に配置した。密接な接触が得られるまで、マイクロピペットを細胞に向けて下げた。その後、わずかな陰圧をかけることで、GD-レンジ膜ピペットシールを作成した(抵抗は、5 mV方形波を用いて測定した)。細胞キャパシタンスを直ちに測定し、換算率1 pF / μm²を用いて細胞表面積を評価した。この細胞表面積を後に正味電流密度を算出するのに用いた。

10

【 0 1 4 6 】

アナログフィルタリング後、1 kHzに設定した4 - ポールベッセルフィルタ(Frequency Devices社, Haverhill, Massachusetts)を使用して、すべての電流を記録した。コンピュータ制御された増幅器を通じて、細胞を1秒間で、-10 mVで開始して10 mVずつ漸増し、最大値+40 mVまで脱分極した(培養細胞)。その後、膜電位(mV)を1秒間で-55 mVに回復させ、最終的に静止電位に再分極した。これにより、チャンネルが活性化モードから非活性化モードへ移行し、再び活性化モードに戻ることで、エラー強さのあるテール電流を測定することが可能となった。hERGチャンネルを通過するすべてのK⁺選択的チャンネルを、Axopatch-1D又はAxopatch 200B増幅器を用いて記録し、Digidata 1322A又は1440A AD-DAインターフェース(Axon Instruments社, Foster City, California、現在Molecular Devices社)でデジタル化した。細胞電流の記録を、-40 mVへの細胞脱分極の前に500 msで開始し、細胞が-80 mVに再分極した後、500 msまで継続した。

20

【 0 1 4 7 】

ベースライン時の記録を入手した後、被験薬物クリゾチニブ及びニロチニブを単独で、又はリポソームとの混合して、漸増濃度で、20 μLのアリコートで直接実験容器に加え、小型ぜん動ポンプ(MP-1, Harvard Instruments社, Holliston, Massachusetts)を使用して閉鎖循環式灌流システムに分散させた。各濃度への曝露時間は5分間を限度とした。最高濃度の被験薬物の存在下での電流の記録後、フロースルー灌流システムを使用して、被験物を洗い流し、前に記載した通りの同じやり方で曝露後hERG電流を得た。最後に3つの未処置の細胞を100 nMのE-4031に曝した。E-4031の濃度は、被験物について行ったように実験容器に加えた。

30

【 0 1 4 8 】

HEK293など異種発現系により生じたhERG電流は、長期間の記録の間に減弱することが知られている。したがって、電流減弱として知られる電流密度の時間依存的低下を補正するべく、被験薬物の非存在下及び溶媒の存在下で、並行実験を行った。

【 0 1 4 9 】

統計解析。電流密度の時間依存的低下の補正は、時間及び溶媒に関連する電流密度における変化を平均化すること、並びに「被験物」の結果を、結果として生じる補正率で掛け合わせることを伴っていた。すべての結果を、媒体の効果及び電流密度の時間依存的変化について補正した。

40

【 0 1 5 0 】

本研究で使用した細胞集団内の細胞サイズの差異を補正するために、hERG電流振幅を電流密度(ナノアンペア/ピコファラド[nA/pF])として表した。電流をpClamp 10.0ソフトウェア(Axon Instruments社)のClampfit 10.0モジュールを使用して解析した。各濃度の存在下で得られた結果を、ベースライン条件で測定した電流密度に対し正規化した正味電流密度として表した。

【 0 1 5 1 】

IKrテール電流の振幅を、-40 mVへの脱分極パルス前に記録した平均電流と、-

50

55 mVへの再分極パルスの開始時に記録した最大の一過的な電流との差異として算出した。被験物への細胞の曝露前後で得られた電流密度の差異の統計学的有意性を判断するために対応t検定を行った。有意性はpが0.05未満として設定し、ここでpは電流密度レベルの差異が偶然のみによる確率である。

【実施例3】

【0152】

ウサギの心臓の心臓電気生理学的パラメータに対するクリゾチニブ及びリポソーム+クリゾチニブの効果に関するインビボでの評価

ウサギの心臓の心臓電気生理学的パラメータに対するクリゾチニブ及びリポソーム+クリゾチニブの効果に関するインビボでの評価。本研究の目的は、ウサギ心臓の心臓電気生理学的(P R、Q R S、R R、Q T及びQ T c間隔)パラメータに対するクリゾチニブ及びリポソーム+クリゾチニブのインビボでの効果を定量化することである。

10

【0153】

体重3kg~4kgの成体の雄ウサギ。クリゾチニブを、10分間の注入時間にわたって1、2及び3mg/kg(負荷用量)を0.057mL/kg/分で、その後、それぞれ0.4、0.8及び1.2mg/kg(維持用量)を0.037mL/kg/分で15分間の維持注入で試験した。各濃度は、本研究の設計時に入手可能な情報に基づき選択した。

【0154】

リポソームを、クリゾチニブの全用量に対して9:1の比率で静脈内ボラス投与として注入した。

20

【0155】

【表11】

表11:被験用量

クリゾチニブ負荷用量 (mg/kg)	クリゾチニブ維持用量 (mg/kg)	リポソーム用量 (mg/kg)
1	0.4	12.6
2	0.8	25.2
3	1.2	28.8

30

【0156】

ECGリードを装着したウサギに麻酔を施す。95%O₂及び5%CO₂中2.5%イソフルランUSP(Abbot Laboratories社, Montreal Canada)の混合物でウサギに麻酔した。左頸静脈を被験物の静脈内注入としてカニューレ処置した。ECGリードを動物に装着した。ECGによる継続的な記録を開始し、被験物の最終濃度の注入終了時に記録を終了した。

40

【0157】

各負荷用量(1、2及び3mg/kg)での注入を10分間継続し、その後、各維持用量(0.4、0.8及び1.2mg/kg)での注入を15分間行った。負荷用量の注入速度は0.057mL/kg/分、維持用量については0.037mg/kg/分とした。3例のウサギをクリゾチニブに曝露させた(n=3)。

【0158】

各負荷用量の注入開始5分前、リポソームを注射した。リポソームは9:1の比率で左耳静脈に静脈内ボラス投与した。3例のウサギをリポソーム+クリゾチニブに曝露させた(n=3)。実験手順全体を通じて継続的に記録。有意性検定を行った:有意性の閾値をp=0.05に設定した対応のある学生t検定。n=3。

50

【 0 1 5 9 】

クリゾチニブ。クリゾチニブは、心拍数について統計学的に有意な用量依存的な低下（RR間隔の延長）を引き起こした。2及び3 mg / kg は、RR間隔をそれぞれ67及び110 ms 増大した。2 mg / kg とした場合のクリゾチニブは、PR及びQRS間隔の統計学的に有意な延長を引き起こした。3 mg / kg のクリゾチニブへの曝露後、PR間隔が23 ms、QRS間隔が13 ms 増大した。クリゾチニブは、QT間隔の統計学的に有意な用量依存的な延長を引き起こした。

【 0 1 6 0 】

2及び3 mg / kg で与えられた場合、それぞれ34及び48 ms のQT間隔の延長を引き起こした。Van der Water 補正率を用いて心拍数の変化について補正を行った場合、クリゾチニブは依然として、緩徐な心拍数によって説明のつかない統計学的に有意な38 ms のQT間隔の延長を引き起こした。

10

【 0 1 6 1 】

リポソーム＋クリゾチニブ。2 mg / kg とした場合のリポソーム＋クリゾチニブ（比率9：1）は、心拍数について統計学的に有意な低下（RR間隔の延長）を引き起こした。2及び3 mg / kg のクリゾチニブへの曝露後、RR間隔がそれぞれ61及び90 ms 増大した。

【 0 1 6 2 】

リポソーム＋クリゾチニブは、PR及びQRS間隔の延長を引き起こした。リポソーム＋クリゾチニブのPR及びQRS間隔に対する効果は、3 mg / kg の用量でのみ統計学的に有意であり、PR間隔については15 ms 及びQRS間隔については7 ms の延長をもたらした。

20

【 0 1 6 3 】

3 mg / kg でのリポソーム＋クリゾチニブは、24 ms のQT間隔の延長を引き起こした。一方、QT間隔に対するこの効果は、ベースライン条件で測定したQT間隔と比較して統計学的に有意ではなかった。Van der Water 補正率を用いて心拍数の変化について補正を行った場合、3 mg / kg は、QT間隔の15 ms の延長を引き起こしたが、それは依然として統計学的に有意ではなかった。

【 0 1 6 4 】

本研究は、インビボでのウサギの心臓の心臓電気生理学的パラメータに対するクリゾチニブ及びリポソーム＋クリゾチニブの効果を評価することを目的とした。クリゾチニブ単剤が、インビボでのウサギの心臓のRR、PR、QRS及びQT間隔の用量依存的な延長を引き起こした。クリゾチニブのRR及びQT間隔に対する効果は1 mg / kg の場合、PR及びQRS間隔に対しては2 mg / kg の場合に統計学的に有意であった。

30

【 0 1 6 5 】

リポソーム＋クリゾチニブが、インビボでのウサギの心臓のRR、PR及びQRS間隔の延長を引き起こした。リポソーム＋クリゾチニブのRR間隔に対する効果は2 mg / kg の場合に統計学的に有意であったが、一方、PR及びQRS間隔に対しては3 mg / kg でのみ統計学的に有意であった。リポソーム＋クリゾチニブは、インビボでのウサギの心臓のQT間隔に統計学的に有意な延長を何ら引き起こさなかった。

40

【 0 1 6 6 】

以下の表は、リポソームの存在によって提供される保護作用の指標を要約したものである。

【 0 1 6 7 】

【表 1 2】

表12.クリゾチニブ3mg/kg対リポソームの静脈内注射後のクリゾチニブ3mg/kgにより引き起こされる心臓の電気生理学的パラメータに対するインビボでの最大の効果の比較

	クリゾチニブ	リポソーム+クリゾチニブ	保護作用率
RR間隔 延長(ms)	110	91	1.2
PR間隔 延長(ms)	23	15	1.5
QRS間隔 延長(ms)	13	7	1.9
QTc間隔 延長(ms)	38	16	2.4

10

20

【 0 1 6 8 】

【表 1 3】

表13.クリゾチニブのウサギの心臓のRR間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	RR間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	257	22.79	n/a	3
クリゾチニブ、1mg/kg	294*	27.28	0.040	3
クリゾチニブ、2mg/kg	324*	26.12	0.004	3
クリゾチニブ、3mg/kg	367*	34.77	0.013	3

30

*被験物濃度に曝露後に得られた値は、ベースライン条件での値と統計学的に異なっていたことを意味する。p≤0.05の場合、差は統計的に有意であると判断した。

40

【 0 1 6 9 】

【表14】

表14.リボソーム+クリゾチニブのウサギの心臓のRR間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	RR間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リボソーム)	226	12.48	n/a	3
リボソーム+クリゾチニブ、1mg/kg	247	12.12	0.083	3
リボソーム+クリゾチニブ、2mg/kg	287*	13.53	0.003	3
リボソーム+クリゾチニブ、3mg/kg	317*	13.97	0.000	3

10

【0170】

図20：クリゾチニブ及びリボソーム+クリゾチニブのウサギの心臓のRR間隔(ms)に対するインビボでの効果

【0171】

【表15】

20

表15.クリゾチニブのウサギの心臓のPR間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	PR間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	78	3.71	n/a	3
クリゾチニブ、1mg/kg	81	4.14	0.280	3
クリゾチニブ、2mg/kg	92*	4.35	0.004	3
クリゾチニブ、3mg/kg	101*	8.49	0.048	3

30

【0172】

【表16】

表16.リボソーム+クリゾチニブのウサギの心臓のPR間隔(ms)に対するインビボでの効果

40

条件	PR間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リボソーム)	65	2.31	n/a	3
リボソーム+クリゾチニブ、1mg/kg	70	3.67	0.096	3
リボソーム+クリゾチニブ、2mg/kg	75	2.82	0.140	3
リボソーム+クリゾチニブ、3mg/kg	80*	3.01	0.011	3

50

【 0 1 7 3 】

図 2 1 : クリゾチニブ及びリポソーム + クリゾチニブのウサギの心臓の P R 間隔 (m s) に対するインピボでの効果

【 0 1 7 4 】

【 表 1 7 】

表17.クリゾチニブのウサギの心臓のQRS間隔(ms)に対するインピボでの効果

条件	QRS間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	43	4.56	n/a	3
クリゾチニブ、1mg/kg	48	5.68	0.178	3
クリゾチニブ、2mg/kg	53*	3.44	0.033	3
クリゾチニブ、3mg/kg	56*	3.85	0.006	3

10

20

【 0 1 7 5 】

【 表 1 8 】

表18.リポソーム+クリゾチニブのウサギの心臓のQRS間隔(ms)に対するインピボでの効果

条件	QRS間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リポソーム)	44	2.03	n/a	3
リポソーム+クリゾチニブ、1mg/kg	43	2.36	0.438	3
リポソーム+クリゾチニブ、2mg/kg	45	3.07	0.578	3
リポソーム+クリゾチニブ、3mg/kg	51*	2.91	0.039	3

30

【 0 1 7 6 】

図 2 2 : クリゾチニブ及びリポソーム + クリゾチニブのウサギの心臓の Q R S 間隔 (m s) に対するインピボでの効果

【 0 1 7 7 】

40

【表 19】

表19.クリゾチニブのウサギの心臓のQT間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	QT間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	171	13.75	n/a	3
クリゾチニブ、1mg/kg	189*	12.88	0.012	3
クリゾチニブ、2mg/kg	205*	12.87	0.016	3
クリゾチニブ、3mg/kg	218*	13.06	0.000	3

10

【 0 1 7 8 】

【表 20】

表20.リポソーム+クリゾチニブのウサギの心臓のQT間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	QT間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リポソーム)	175	8.92	n/a	3
リポソーム+クリゾチニブ、1mg/kg	181	8.57	0.415	3
リポソーム+クリゾチニブ、2mg/kg	190	5.10	0.175	3
リポソーム+クリゾチニブ、3mg/kg	199	4.30	0.074	3

20

30

【 0 1 7 9 】

図 2 3 : クリゾチニブ及びリポソーム + クリゾチニブのウサギの心臓の Q T 間 隔 (m s) に対するインビボでの効果

【 0 1 8 0 】

【表 2 1】

表21.クリゾチニブのウサギの心臓のQTc Van der Water間隔に対するインビボでの効果

条件	QTc間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	235	11.77	n/a	3
クリゾチニブ、1mg/kg	251*	10.55	0.013	3
クリゾチニブ、2mg/kg	264*	10.93	0.026	3
クリゾチニブ、3mg/kg	273*	10.18	0.003	3

40

50

【 0 1 8 1 】

【表 2 2】

表22.リポソーム+クリゾチニブのウサギの心臓のQTc Van der Water間隔に対するインビボでの効果

条件	QTc間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	243	7.84	n/a	3
リポソーム+クリゾチニブ、1mg/kg	246	7.53	0.526	3
リポソーム+クリゾチニブ、2mg/kg	252	4.30	0.309	3
リポソーム+クリゾチニブ、3mg/kg	259	3.58	0.150	3

10

【 0 1 8 2 】

図 2 4 : クリゾチニブ及びリポソーム + クリゾチニブのウサギの心臓の Q T c V a n d e r W a t e r 間隔に対するインビボでの効果

【実施例 4】

20

【 0 1 8 3 】

ウサギの心臓の心臓電気生理学的パラメータに対するニロチニブ及びリポソーム + ニロチニブのインビボでの効果に関するインビボでの評価

ウサギの心臓の心臓電気生理学的パラメータに対するニロチニブ及びリポソーム + ニロチニブのインビボでの効果に関するインビボでの評価。本研究の目的は、ウサギの心臓からの心臓電気生理学的 (P R、Q R S、R R、Q T 及び Q T c 間隔) パラメータに対するニロチニブ及びリポソーム + ニロチニブのインビボでの効果を定量化することである。

【 0 1 8 4 】

試験の方式。体重 3 k g ~ 4 k g の成体の雄ウサギ。

【 0 1 8 5 】

30

被験用量。ニロチニブを、10分間の注入時間にわたって2、4及び5.5mg/kg (負荷用量) を 0 . 0 5 7 m L / k g / 分 で、その後、それぞれ 0 . 1 4、0 . 2 8 及び 0 . 3 9 m g / k g (維持用量) を 0 . 0 3 7 m L / k g / 分 で 1 5 分間の維持注入で試験した。各濃度は、本研究の設計時に入手可能な情報に基づき選択した。リポソームを、ニロチニブの全用量に対して 9 : 1 の比率で静脈内ボラス投与として注射した。

【 0 1 8 6 】

実施された試験。ECGリードを装着したウサギに麻酔を施す。手順。インビボでのウサギ。95% O₂ 及び 5% CO₂ で 2 . 5 % イソフルラン U S P (Abbot Laboratories 社 , Montreal Canada) の混合物でウサギに麻酔した。左頸静脈を被験薬物の静脈内注入としてカニューレ処置した。ECGリードを動物に装着し、I s o - D A M 8 A (Word Precision Instrument 社製 , Sarasota, FL, USA) を使用して 5 0 0 H z で E C G 信号を選別し、D i g i d a t a 1 3 2 2 A インターフェース (Axon Instruments 社製 , Foster City, CA, USA , (現在 Molecular Devices 社)) を使用して 2 . 0 k H z のサンプリングレートでデジタル化した。初回投与分の化合物の注入を開始する前、5分間 E C G の継続的な記録を開始し、最終投与分の注入終了時に記録を終えた。ベースライン E C G 記録後、化合物の初回負荷用量の注入を開始した。初回負荷用量の終了時、注入を初回維持用量へ切り替えた。各用量にウサギを 2 5 分間 (1 0 分間の負荷用量後、1 5 分間の維持用量) 曝露させた。選択したすべての用量の被験薬物又は媒体等価物にウサギを暴露させるまで、同一の手順を適用した。各負荷用量の注入の開始 5 分前、リポソームを注射した。リポソームは 9 : 1 の比率 (μ g / m L ベース) で左耳静脈に静脈内ボラス投与した。イ

40

50

ンビトロでの心臓での実験のものと同じ方法で、ECGパラメータを解析し提示した。

【0187】

【表23】

表23:被験用量

ニロチニブ負荷用量 (mg/kg)	ニロチニブ維持用量 (mg/kg)	リポソーム用量 (mg/kg)
2	0.14	25.6
4	0.28	51.1
5.5	0.39	70.7

10

【0188】

データ解析及び取得。実験手順全体を通じて継続的に記録。統計解析。各処置と比較したベースラインの値の差異の統計学的有意性を判定するために、対応一元配置t検定を行った。クリゾチニブ若しくはニロチニブ単独と、クリゾチニブ若しくはニロチニブ+リポソームとを比較するために、不均一な分散を仮定した独立一元配置t検定を行った。有意性検定を行った：有意性の閾値を $p = 0.05$ に設定した対応のあるスチューデントのt検定。 $n = 3$ 。

20

【0189】

ニロチニブは、心拍数の用量依存的な低下（RR間隔の延長）を引き起こした。5.5 mg/kgのニロチニブは、78msのRR間隔の統計学的に有意な延長を引き起こした。

【0190】

5.5 mg/kgまでの濃度でのリポソーム+ニロチニブは、PR間隔に何ら統計学的に有意な効果をもたらさなかった。

30

【0191】

2 mg/kgとした場合のニロチニブは、QRS間隔の統計学的に有意な延長を引き起こした。5.5 mg/kgのニロチニブは、7msのQRS間隔の延長を引き起こした。

【0192】

ニロチニブは、QT間隔の統計学的に有意な用量依存的な延長を引き起こした。4及び5.5 mg/kgは、それぞれ41及び66msのQT間隔の延長を引き起こした。Vander Water補正率を用いて心拍数の変化について補正を行った場合、ニロチニブは依然として、緩徐な心拍数では説明のつかないQT間隔の統計学的に有意な延長を引き起こした。

40

【0193】

リポソーム+ニロチニブ。5.5 mg/kgでのリポソーム+ニロチニブ（比率9:1）は、心拍数の統計学的に有意な低下（RR間隔の延長）を引き起こした。5.5 mg/kgのニロチニブへの曝露後、RR間隔が69msだけ増大した。

【0194】

5.5 mg/kgまでの濃度でのリポソーム+ニロチニブは、PR及びQRS及びQT間隔に対して何ら統計学的に有意な効果をもたらさなかった。

【0195】

本研究は、インビボでのウサギの心臓の心臓電気生理学的パラメータに対するニロチニブ及びリポソーム+ニロチニブの効果を評価した。

50

【 0 1 9 6 】

ニロチニブ単剤が、インビボでのウサギの心臓のRR、QRS及びQT間隔の用量依存的な延長を引き起こした。ニロチニブのRR間隔に対する効果は5.5mg/kgでのみ統計的に有意であったが、一方、QRS及びQT間隔については2mg/kgの場合に統計学的に有意であった。

【 0 1 9 7 】

リポソーム+ニロチニブが、インビボでのウサギの心臓のRR間隔の延長を引き起こした。リポソーム+ニロチニブのRR間隔に対する効果は5.5mg/kgの場合に統計学的に有意であった。リポソーム+ニロチニブは、インビボでのウサギの心臓のPR、QRS及びQT間隔に統計学的に有意な延長を一切もたらさなかった。

10

【 0 1 9 8 】

以下の表は、リポソームの存在によって提供される保護作用の指標を要約したものである。

【 0 1 9 9 】

【表 2 4】

表24.ニロチニブ4mg/kg対リポソームの静脈内注射後のニロチニブ4mg/kgにより引き起こされる心臓の電気生理学的パラメータに対するインビボでの最大の効果の比較

20

	ニロチニブ	リポソーム+ ニロチニブ	保護作用率
RR間隔 延長(ms)	54	37	1.5
QRS間隔 延長(ms)	6	3	2
QTc間隔 延長(ms)	36	8	4.5

30

【 0 2 0 0 】

【表 2 5】

表25.ニロチニブのウサギの心臓のRR間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	RR間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	253	15.10	n/a	3
ニロチニブ、2mg/kg	273	4.68	0.265	3
ニロチニブ、4mg/kg	307	9.31	0.132	3
ニロチニブ、5.5mg/kg	331*	2.70	0.047	3

10

*被験物濃度に曝露後に得られた値は、ベースライン条件での値と統計学的に異なっていたことを意味する。p≤0.05以下の場合、差は統計的に有意であると判断した。

【 0 2 0 1】

【表 2 6】

20

表26.リポソーム+ニロチニブのウサギの心臓のRR間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	RR間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リポソーム)	213	12.00	n/a	3
リポソーム+ニロチニブ、2mg/kg	217	5.89	0.590	3
リポソーム+ニロチニブ、4mg/kg	250	14.66	0.068	3
リポソーム+ニロチニブ、5.5mg/kg	282*	21.52	0.041	3

30

【 0 2 0 2】

図 2 5 は、ニロチニブ及びリポソーム + ニロチニブのウサギの心臓の R R 間 隔 (m s) に対するインビボでの効果を示すグラフである。

【 0 2 0 3】

【表 2 7】

表27.ニロチニブのウサギの心臓のPR間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	PR間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	79	7.85	n/a	3
ニロチニブ、2mg/kg	78	5.74	0.632	3
ニロチニブ、4mg/kg	80	5.00	0.947	3
ニロチニブ、5.5mg/kg	82	6.84	0.159	3

10

【 0 2 0 4】

【表 2 8】

表28.リポソーム+ニロチニブのウサギの心臓のPR間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	PR間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リポソーム)	65	2.22	n/a	3
リポソーム+ニロチニブ、2mg/kg	65	0.91	0.890	3
リポソーム+ニロチニブ、4mg/kg	68	1.15	0.076	3
リポソーム+ニロチニブ、5.5mg/kg	71	1.42	0.055	3

20

30

【 0 2 0 5】

図 2 6 は、ニロチニブ及びリポソーム + ニロチニブのウサギの心臓の P R 間隔 (m s) に対するインビボでの効果を示すグラフである。

【 0 2 0 6】

【表 2 9】

表29.ニロチニブのウサギの心臓のQRS間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	QRS間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	40	5.96	n/a	3
ニロチニブ、2mg/kg	44*	6.66	0.046	3
ニロチニブ、4mg/kg	46*	6.23	0.014	3
ニロチニブ、5.5mg/kg	47*	6.07	0.000	3

10

【 0 2 0 7】

【表 3 0】

表30.リポソーム+ニロチニブのウサギの心臓のQRS間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	QRS間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リポソーム)	36	1.35	n/a	3
リポソーム+ニロチニブ、2mg/kg	37	1.74	0.069	3
リポソーム+ニロチニブ、4mg/kg	39	2.14	0.086	3
リポソーム+ニロチニブ、5.5mg/kg	40	2.01	0.069	3

20

30

【 0 2 0 8】

図 2 7 は、ニロチニブ及びリポソーム + ニロチニブのウサギの心臓の Q R S 間隔 (m s) に対するインビボでの効果を示すグラフである。

【 0 2 0 9】

【表 3 1】

表31.ニロチニブのウサギの心臓のQT間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	QT間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	161	2.26	n/a	3
ニロチニブ、2mg/kg	182*	4.14	0.042	3
ニロチニブ、4mg/kg	201*	5.17	0.025	3
ニロチニブ、5.5mg/kg	227*	12.37	0.040	3

10

【 0 2 1 0】

【表 3 2】

表32.リポソーム+ニロチニブのウサギの心臓のQT間隔(ms)に対するインビボでの効果

条件	QT間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リポソーム)	153	6.73	n/a	3
リポソーム+ニロチニブ、2mg/kg	148	1.53	0.473	3
リポソーム+ニロチニブ、4mg/kg	164	9.17	0.429	3
リポソーム+ニロチニブ、5.5mg/kg	185	9.83	0.089	3

20

30

【 0 2 1 1】

図 2 8 は、ニロチニブ及びリポソーム + ニロチニブのウサギの心臓の Q T 間隔 (m s) に対するインビボでの効果を示すグラフである。

【 0 2 1 2】

【表 3 3】

表33.ニロチニブのウサギの心臓のQTc Van der Water間隔に対するインビボでの効果

条件	QTc間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン	226	1.27	n/a	3
ニロチニブ、2mg/kg	245*	3.91	0.029	3
ニロチニブ、4mg/kg	262*	4.42	0.016	3
ニロチニブ、5.5mg/kg	285*	12.14	0.039	3

10

【 0 2 1 3】

【表 3 4】

表34.リポソーム+ニロチニブのウサギの心臓のQTc Van der Water間隔に対するインビボでの効果

条件	QTc間隔 (ms)	SEM	p値	n=
ベースライン(リポソーム)	221	5.73	n/a	3
リポソーム+ニロチニブ、2mg/kg	216	1.25	0.409	3
リポソーム+ニロチニブ、4mg/kg	230	8.71	0.531	3
リポソーム+ニロチニブ、5.5mg/kg	247	8.69	0.113	3

20

30

【 0 2 1 4】

図 2 9 は、ニロチニブ及びリポソーム + ニロチニブのウサギの心臓のQTc Van der Water間隔に対するインビボでの効果を示すグラフである。

【 0 2 1 5】

表 3 5 及び 3 6 は、上記の結果を要約し、本発明の効果に関するさらなる情報を提供する。

【 0 2 1 6】

40

【表 3 5】

表35.hERGで安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞における I_{Kr} 電流密度の50%阻害をもたらす濃度

処置	薬剤	
	クリゾチニブ	ニロチニブ
リポソーム単独	>225 $\mu\text{g}/\text{mL}^a$	>4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}^a$
薬剤単独	8.9 μM	0.08 μM
薬剤+リポソーム	44 μM	>1 μM

10

【0 2 1 7】

I_{Kr} 電流密度の50%阻害(IC_{50})をもたらした濃度を、図18A-B及び図19A-Bに示したデータから算出した。^aクリゾチニブ及びニロチニブについて、それぞれ、225及び4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が、本アッセイで試験したリポソーム単独の最高濃度であった。

20

【0 2 1 8】

【表 3 6】

表36.インビトロでのウサギの心臓における、クリゾチニブ及びニロチニブの単独及びリポソームとの組合せの左室圧に対する効果

	薬剤の濃度	リポソーム単独	薬剤単独	リポソーム+薬剤
	(μM)			
クリゾチニブ	11	1.25 (2.10)	-7.34 (6.19)	-1.03 (0.62)
	56	0.67 (1.87)	-8.22 (6.23)	-1.15 (0.37)
ニロチニブ	14	-0.98 (1.56)	-0.45 (1.51)	-0.32 (0.93)
	28	0.47 (2.01)	-9.80 (0.19)	-3.30 (0.34)

30

値はベースラインからの変化である(mmHg)。

値は、1群当たり3例の心臓の平均値(SEM)である。

【0 2 1 9】

インビトロでの I_{Kr} 電流

クリゾチニブは、11及び56 μM の濃度で、それぞれ、20mVでの I_{Kr} テール電流密度の57及び89%の阻害を引き起こしたことが見出された(図18A)。対応のあるステューデントのt検定は、ベースライン時並びに11及び56 μM のクリゾチニブの存在下で測定した正規化電流密度の差異が、統計学的に有意な所定の閾値($p < 0.05$)に達したことを示した。 IC_{50} はクリゾチニブ単独で8.9 μM であった(表35)。クリゾチニブをリポソームと9:1の比率で混合した場合、56 μM の最高濃度のクリゾチニブのみがベースラインに比し統計的に有意な阻害(59%)に達した。 IC_{50} は44 μM であった。11 μM でのリポソーム+クリゾチニブは、 I_{Kr} テール電流密度に何ら効果を及ぼさなかった。56 μM でのリポソーム+クリゾチニブは、ベースラインに比し I_{Kr} テール電流密度に何ら有意な効果を及ぼさなかった。一方、11及び56 μM

40

50

でのクリゾチニブとリポソーム + クリゾチニブとの間の電流密度を比較すると、リポソームと混合した場合、クリゾチニブの効果である有意な阻害がみられた。リポソーム単独は、 I_{Kr} テール電流密度に何ら効果を及ぼさなかった (図 18 A)。

【0220】

ニロチニブは、0.1 及び $1 \mu\text{M}$ の濃度で、ベースラインに比し、それぞれ 54% 及び 74% と、20 mV での I_{Kr} テール電流密度の統計的に有意な阻害を引き起こした (図 19 A)。 IC_{50} はニロチニブ単独で $0.08 \mu\text{M}$ であった (表 35)。ニロチニブを 10 分間室温でリポソームと 9:1 の比率でボルテックスした場合、 $1 \mu\text{M}$ の最高濃度であってもニロチニブの I_{Kr} チャネルに対する効果はみられなかった。 IC_{50} は $1 \mu\text{M}$ を超えた。ニロチニブとリポソーム + ニロチニブとの間の電流密度を比較すると、リポソームと混合した場合、0.1 及び $1 \mu\text{M}$ でのニロチニブの効果である有意な阻害がみられた。リポソーム単独は、 I_{Kr} テール電流密度に何ら効果を及ぼさなかった (図 19 A)。

10

【0221】

整流内向き電流の電流 - 電位関係は、テール電流で観察された阻害が、クリゾチニブ及びニロチニブの両方について電位依存的ではなかったことを示した (それぞれ図 18 B 及び図 19 B)。

【0222】

陽性対照、E-4031 は、100 nM の濃度で電流密度に統計的に有意な減少をもたらした。E-4031 を 2 回試験し、67 及び 79% という観察結果を得た (データは示されず)。

20

【0223】

インビトロでのウサギの心臓の QTc 間隔

クリゾチニブは、11 及び $56 \mu\text{M}$ の濃度で、QTc 間隔の用量依存的な延長を引き起こした (図 30 A)。クリゾチニブをリポソームと 9:1 の比率で混合すると、クリゾチニブ誘発性 QTc 延長の有意な阻害をもたらした。ニロチニブもまた、14 及び $28 \mu\text{M}$ の濃度で、QTc 間隔の用量依存的な延長を引き起こした (図 30 B)。クリゾチニブの場合と同様、ニロチニブをリポソームと混合すると、ニロチニブ誘発性 QTc 延長の有意な阻害をもたらした。シサブリド陽性対照は、QTc 間隔の予想された延長を示した。

【0224】

30

クリゾチニブ及びニロチニブの ECGs に対する効果は、LVP に対する効果に関連していた (表 36)。心臓をクリゾチニブ又はニロチニブ単独に曝露させると、LVP の低下がみられた。リポソームをクリゾチニブ又はニロチニブと混合すると、LVP に対する効果が元に戻った。

【0225】

インビボでの投与後のウサギの QTc 間隔

10 分間にわたって静脈内注入により 1、2 及び 3 mg/kg でクリゾチニブを投与し、その後 15 分間維持用量を投与したウサギは、QT 間隔の用量依存的な延長を示した (図 23)。クリゾチニブでの処理 5 分前、リポソームを注入すると、クリゾチニブ誘発性 QTc 延長の有意な阻害がもたらされた。10 分間にわたって静脈内注入により 2、4 及び 5.5 mg/kg でニロチニブを投与し、その後 15 分間維持用量を投与したウサギは、QT 間隔の用量依存的な延長を示した (図 28)。クリゾチニブの場合と同様、ニロチニブでの処理 5 分前、リポソームを注入すると、ニロチニブ誘発性 QTc 延長の有意な阻害がもたらされた。

40

【0226】

これらのデータは、リポソームが、安定的に hERG トランスフェクトした HEK293 細胞を使用した I_{Kr} チャネルをこれらのキナーゼ阻害薬の阻害効果から保護し、インビトロ及びインビボでの両方の曝露に起因する心 QTc 延長を改善することを立証する。これらの結果は、上記の薬剤をリポソームと混合することで、これらの阻害薬と I_{Kr} チャネルとの相互作用が防止され、より正常なゲーティングキネティクスが生じるようにな

50

り、並びに臨床で生じ得るQTc延長の程度及び発生頻度を低下させることを立証する。

【0227】

ラパチニブ、スニチニブ及びバンデタニブを含む他のチロシンキナーゼ阻害薬もまた、QTc間隔に影響を及ぼすことが示されている (Shah, R. R., Morganroth, J., and Shah, D. R. (2013). Cardiovascular safety of tyrosine kinase inhibitors: with a special focus on cardiac repolarization (QT interval). *Drug Saf.* 36(5):295-316)。インビトロで最も研究されたものは、ラパチニブである (Lee, H. A., Kim, E. J., Hyun, S. A., Park, S. G., and Kim, K. S. (2010). Electrophysiological effects of the anti-cancer drug lapatinib on cardiac repolarization. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107(1):614-618)。ラパチニブは、5 μ Mで、単離したウサギのブルキンエ線維の活動電位持続時間を延長することが示された。このことは、IC₅₀ 0.8 μ MでI_{K_e}チャンネルに対する阻害効果、及び5 μ MでI_{K_s}振幅に対する軽微な効果と関連していた。I_{N_a}、I_{K₁}又はI_{C_a}チャンネルに対する効果は何ら観察されなかった。

【0228】

臨床では、クリゾチニブは、約4.2 mg/kg又は156 mg/m²、BIDに相当する500 mg/日(1回250 mg 1日2回(BID))の用量で投与される。クリゾチニブについての新薬承認申請のFDAのレビューから、500 mg BIDを投与されたがん患者の定常状態C_{max}は、平均で650 ng/mL又は1.5 μ Mであった (Xalkori. (2011b). FDA Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Xalkori (crizotinib), IND No. 202570, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000ClinPharmR.pdf (accessed October 9, 2013))。Mosseら (Mosse, Y. P., Lim, M. S., Voss, S. D., et al. (2013). Safety and activity of crizotinib for pediatric patients with refractory solid tumors or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol.* 14(16): 472-480)は、小児がん患者の定常状態C_{max}が、280 mg/m² BID投与後、630 ng/mL(1.4 μ M)となると報告した。これは、IC₅₀が本試験で報告された8.9 μ M及びクリゾチニブの開発中に報告された1.1 μ Mで、インビトロでのI_{K_r}チャンネルに対する効果の完全な範囲内である (Xalkori(R). (2011a). FDA Pharmacology Review of Xalkori(R) (crizotinib), IND No. 202570, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000PharmR.pdf (accessed October 9, 2013))。ニロチニブは、約5 mg/kg又は188 mg/m²、BIDに相当する600 mg/日(300 mg BID)の用量で投与される。400 mg BIDを投与されたがん患者の定常状態C_{max}は1754 ng/mL又は3.3 μ Mであった (Kim, K. P., Ryu, M. H., Yoo, C., et al. (2011). Nilotinib in patients with GIST who failed imatinib and sunitinib: importance of prior surgery on drug availability. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68(2):285-291)。400 mg BIDを投与された中国人患者の定常状態C_{max}は2161 ng/mL又は4.1 μ Mであった (Zhou, L., Meng, F., Yin, O., et al. (2009). Nilotinib for imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in chronic phase, accelerated phase, or blast crisis: a single- and multiple-dose, open-label pharmacokinetic study in Chinese patients. *Clin. Ther.* 31(7):1568-1575)。本研究では、I_{K_r}アッセイにおいてIC₅₀が0.08 μ Mを示し、ニロチニブの開発中に0.13 μ Mが報告された (Tasigna(R). (2007a). FDA Pharmacology Review of Tasigna(R) (nilotinib), IND No. 22-068, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_PharmR_P1.pdf and http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_MedR_P2.pdf, (accessed October 25, 2013))。

【0229】

リポソームがクルクミンのI_{K_r}チャンネルに対する阻害効果を軽減することが以前報告されている (Helson L, Shopp G, Bouchard A, Majeed M. Liposome mitigation of curcumin inhibition of cardiac potassium delayed-rectifier current. *J Recep Lig Chan*

10

20

30

40

50

nel Res. 2012;5:1-8)。クルクミン単独では、 $4.9 \mu\text{M}$ の IC_{50} で I_{Kr} チャネルを阻害し、試験した最高濃度($11.4 \mu\text{M}$)で80%の阻害をもたらした。本研究でのものと同じように、同一のリポソームを同一の比率で混合すると、試験した最高濃度クルクミン($11.4 \mu\text{M}$)単独では45%の阻害を達成した。混合しただけではなく、リポソームで封入したクルクミンもまた、クルクミン誘発性 I_{Kr} 阻害の阻害; $11.4 \mu\text{M}$ の最高濃度で25%の阻害をもたらした。本研究は、陽性対照E-4031を単独で試験した場合、 IC_{50} は56 nMであった。E-4031をリポソームと混合した場合、 IC_{50} は210 nMに上昇した。

【0230】

吐酒石は、ラット及びヒトにQT間隔延長を引き起こす三価のアンチモン薬である。吐酒石をリポソームで封入した場合、QT効果は消失する(Maciél NR, Reis PG, Kato KC, et al. Reduced cardio-vascular alterations of tartar emetic administered in long-circulating liposomes in rats. Toxicol Lett. 2010;199(3): 234-238)。吐酒石研究と本研究との間の1つの重要な差異は、使用されたりポソームの組成である。吐酒石研究で使用されたりポソームは、L-α-ジステアロイルホスファチジルコリン、コレステロール及びポリエチレングリコール2000ジステアロイルホスファチジル-エチアノールアミン(ethanolamine)からなっていた。別の差異は、本研究が、単に薬剤をリポソームに混合するだけか又はQT延長薬による処理前にリポソームを注入するだけで、薬剤を封入せずに、阻害効果をもたらしたことを示したことである。

【0231】

健常ボランティアにおける1つの臨床試験は、リポソームでの封入がQT延長効果を消失させたことを示した。ヒト及び実験動物においてQT間隔を増大させるブピバカインをリポソーム(Exparel(登録商標))中に封入した場合、同剤は750 mgの高用量で皮下投与されてもQT延長を引き起こさなかった(Naseem A, Harada T, Wang D, Arzina R, Lorich U, Onel E, Camm AJ, Taubel J. Bupivacaine extended release liposome injection does not prolong QTc interval in a thorough QT/QTc study in healthy volunteers. J Clin Pharmacol. 2012;52(9):1441-7)。吐酒石研究での場合と同様、ここでは薬剤を封入し、リポソームの組成は本研究とは異なっていた:コレステロール、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-(1-グリセロール)、トリカプリリン及び1,2-ジエルコイルホスファチジルコリン。

【0232】

薬剤の I_{Kr} (hERG)電流に対する効果を評価するインビトロでのアッセイは、薬剤の臨床でのQTc間隔に対する潜在的な効果を予測しやすくするために広範に用いられている(Witchel, H. J. (2011). Drug-induced hERG block and QT syndrome. Cardiovasc Ther. 29(4):251-259)。これは有用なアッセイではあったが、時折、偽陽性の結果を生じた。本研究は、このインビトロでのアッセイが、ヒト及び動物の両方におけるインビボでのQTc延長のすぐれた予測となる例を示す。

【0233】

驚くべきことに、本研究のデータ、及びクルクミンについてのデータ(Helson L, Shop p G, Bouchard A, Majeed M. Liposome mitigation of curcumin inhibition of cardiac potassium delayed-rectifier current. J Recep Lig Channel Res. 2012;5:1-8)に基づくと、クリゾチニブ及びニロチニブ並びにおそらくは他のQTc延長薬による I_{Kr} 抑制を軽減するために、DMP C / DMP Gリポソーム内に薬剤を封入する必要はないように思われる。化合物をリポソームと単に混合するだけで十分であり得る。本発明は、経口投与されたQT延長薬について、リポソームの徐放剤の同時皮下投与で十分であり得ることを立証する。本明細書中で立証される方法及び技術を使用することで、QTc延長に関するインビボでの動物モデルでのQT延長薬を研究することが可能となる。

【0234】

本明細書で論じられたいずれの実施形態も、本発明の任意の方法、キット、試薬、又は組成物に関して実施することが可能で、その逆もまた同様であることが企図される。さら

10

20

30

40

50

に、本発明の組成物は、本発明の方法を達成するのに使用することができる。

【0235】

本明細書に記載された個々の実施形態は、説明として示されたものであり、本発明の制限として示されるものではないことが理解される。本発明の主な特徴は、本発明の範囲から逸脱することなく様々な実施形態で使用することができる。当業者は、本明細書に記載された具体的な手順に対する多数の等価物を認識し、又は単なる通常の実験を用いて確認することができる。このような等価物は、本発明の範囲内であるとみなされ、請求項に含まれる。

【0236】

本明細書で言及されたすべての出版物及び特許出願は、本発明が関連する当業者の技術のレベルにおいて表示される。すべての出版物及び特許出願は、それぞれの個々の出版物又は特許出願が参照により組み込まれることを具体的に及び個別に示される場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0237】

単語「a」又は「an」の使用は、請求項及び/又は本明細書において用語「含む (comprising)」と共に使用される場合、「1つの (one)」を意味し得るが、「1又は2以上 (one or more)」、「少なくとも1つ (at least one)」、及び「1又は1を超える (one or more than one)」の意味とも一致する。請求項における用語「又は (or)」の使用は、代替物のみを指すことが明確に示されない、又は代替物が相互に排他的でない限り、「及び/又は (and/or)」を意味するように使用されるが、開示は、代替物のみ及び「及び/又は」を指す定義を支持する。本出願を通して、用語「約 (about)」は、値が、その値を決定するために用いられているデバイス、方法に固有の誤差のばらつき、又は試験対象の間に存在するばらつきを包含することを示すために使用する。

【0238】

本明細書及び請求項で使用される場合、単語「含む (comprising)」(並びに「含む (comprise)」及び「含む (comprises)」などの、含む (comprising) の任意の形態)、「有する (having)」(並びに「有する (have)」及び「有する (has)」などの、有する (having) の任意の形態)、「含む (including)」(並びに「含む (includes)」及び「含む (include)」などの、含む (including) の任意の形態)又は「含有する (containing)」(並びに「含有する (contains)」及び「含有する (contain)」などの、含有する (containing) の任意の形態)は、包含的又は非限定的であり、別の、列挙されていない要素又は方法ステップを除外しない。本明細書で提示される組成物及び方法のいずれかの実施形態において、「含む (comprising)」は、「本質的に～からなる (consisting essentially of)」又は「～からなる (consisting of)」に取って替わられる場合がある。本明細書で使用される場合、句「本質的に～からなる (consisting essentially of)」は、所定の完全なるもの(複数可)又はステップ、並びに請求される本発明の特徴又は機能に著しく影響を及ぼさないものを必要とする。本明細書で使用される場合、用語「なる (consisting)」は、列挙される完全なるもの(例えば、特徴、要素、特質、特性、方法/方法ステップ若しくは限定)又は完全なるものの群(例えば、特徴(複数可)、要素(複数可)、特質(複数可)、特性(複数可)、方法/方法ステップ若しくは限定(複数可))の存在を表すのに使用される。

【0239】

本明細書で使用される場合、用語「又はこれらの組合せ (or combinations thereof)」は、用語に先行する列挙されたアイテムのすべての順列及び組合せを指す。例えば、「A、B、C、又はこれらの組合せ」は、A、B、C、AB、AC、BC、又はABCの少なくとも1つ、及び特定の文脈において順番が重要である場合は、同様にBA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC、又はCABの少なくとも1つを含むことが意図される。この例に続いて、明示的に含まれるのは、BB、AAA、AB、BBC、AAAABC、CBBAAA、CABABB等などの1又は2以上のアイテム又は用語の反復を含有する組合せである。当業者は、文脈から特に明白でない限り、いずれの組合せでも

10

20

30

40

50

典型的にはアイテム又は用語の数に制限はないことを理解する。

【0240】

本明細書で使用される場合、近似値を表す語句、限定されないが、「約 (about)」、「実質的 (substantial)」又は「実質的に (substantially)」などの語句は、そのように修飾した場合、必ずしも絶対又は完全ではないと理解されるものの、そのような状況が存在していると当業者が明示する旨を保証するには十分近いとみなされる状況を指す。記載が変動し得る範囲は、変化がどの程度大きいかにより左右され、上記の語句で修飾されていない特徴に要求される特徴及び能力が依然として修飾された特徴にも備わっていると当業者に認識させるものとする。前述の議論によるが、一般に、本明細書において「約 (about)」などの近似を示す語句で修飾された数値は、記載の数値から少なくとも ± 1 、2、3、4、5、6、7、10、12 又は 15% だけ変動し得る。

10

【0241】

さらに、本明細書における項目の見出しは、37 CFR 1.77 の推奨に従うべく、あるいは体系上の手掛かりを提供するべく付与されている。これらの見出しは、本開示から公表されるであろういずれの請求項において記載される発明を限定又は特徴付けたりするものではない。具体的に、また例として、その見出しが「発明の分野」に言及していたとしても、いわゆる技術分野を記載するためにこの見出しの項において選択されている文言により請求項は限定されることはない。さらに、「背景技術」における技術の記載は、その技術が、本開示のいずれかの発明にとって先行する技術であると承認したものと解されるべきではない。同様に「概要」も、公表される請求項に記載の発明を特徴付けるものとみなされるべきではない。さらに、本開示において単数形で「発明」と言及するいずれの箇所も、本開示には新規な点が1つだけしかないと主張するべく用いられるべきではない。本開示から公表される複数の請求項の限定に従って複数の発明が述べられるので、このような請求項により、保護される発明及びその等価物が定義される。あらゆる例において、このような請求項の範囲は、本開示に照らして内容本位で考慮されるべきであり、本開示において記載される見出しにより限定されるべきではない。

20

【0242】

本明細書に開示及び請求された組成物及び/又は方法のすべては、本開示に照らして過度な実験をすることなく作製し実行することができる。本発明の組成物及び方法は、好ましい実施形態の観点から記載されたが、変形形態が、本発明の概念、趣旨及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載された組成物及び/又は方法、並びに方法のステップ又は方法のステップの順序に適用され得ることが、当業者には明らかとなる。当業者に明らかかなこのような類似の置換及び変更はすべて、添付の特許請求の範囲により定義されるような本発明の趣旨、範囲及び概念の範囲内であるとみなされる。

30

【0243】

参考文献 - 実施例 1

U.S. Patent Application Publication No. 2010/0004549: System and Method of Serial Comparison for Detection of Long QT Syndrome (LQTS)

U.S. Patent Application Publication No. 2008/0255464: System and Method for Diagnosing and Treating Long QT Syndrome

40

U.S. Patent Application Publication No. 2007/0048284: Cardiac Arrhythmia Treatment Methods

U.S. Patent Application Publication No. 2001/00120890: Ion Channel Modulating Activity I

Anderson CL, Delisle BP, Anson BD, et al.: Most LQT2 Mutations Reduce Kv11.1 (hERG) Current by a Class2 (Trafficking Deficient) Mechanism. Circulation 2006 113:365-373

Compton SJ, Lux RL, Ramsey MR, et al.: Genetically defined therapy of inherited long QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. 1996 94:1018-1022

50

- Djeddi D, Kongolo G, Lefaix C, Mounard J, Leke A: Effect of domperidone on QT interval in neonates. *J Pediatrics* 2008 153(5): 596-598
- Ducroq J., Printemps R, Le Grand M.: Additive effects ziprasidone and D,L-sotalolol on the action potential in rabbit Purkinje fibers and on the hERG potassium current. *J. Pharmacol. Toxicol Methods* 2005 52:115-122
- Etheridge SP, Compton SJ, Tristani-Firouzi M, Mason JW: A new oral therapy for long QT syndrome: long term oral potassium improves repolarization in patients with hERG mutations. *J Am Coll Cardiol* 2003 42:1777-1782
- Fauchier L, Babuty D, Poret P, Autret ML, Cosnay P, Fauchier JP: Effect of Verapamil on QT interval dynamics. *Am J Cardiol.* 1999 83(5):807-808 A10-1 10
- Fowler NO, McCall D, Chou TC, Hilmes JC, Hanenson IB,: Electrocardiographic changes and cardiac arrhythmias in patients receiving psychotropic drugs. *Am J Cardiol* 1976 37(2): 223-230
- Jervell A, Lang-Nielsen F: Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval and sudden death. *Am Heart J.* 1957 54: 59-68
- Kang J, Chen XL, Wang H, et al.: Discovery of a small molecule activator of the human ether-a-go-go -related gene (HERG) cardiac K⁺ channel. *Mol Pharmacol* 2005 67: 827-836
- Katchman AN, Koerner J, Tosaka T, Woosley RL, Eberty SN: Comparative evaluation of HERG currents and QWT intervals following challenge with suspected torsadogenic and non-torsadogenic drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 316(3):1098-1106 20
- Layton D, Key C, Shakir SA: Prolongation of the QT interval and cardiac arrhythmias associated with cisapride: limitations of the pharmacoepidemiological studies conducted and proposals for the future. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2003 12(1):31-40
- Maciel NR, Reis PG, Kato KC et al: Reduced cardio-vascular alterations of tarter emetic administered in long-circulating liposomes in rats. *Toxicology Letters.* 2010 199 (3): 234-238
- Mehta RT, Hopfer RL, Gunner LA, Juliano RL, Lopez-Berestein G: Formulation, toxicity, and antifungal activity in vitro of liposomal-encapsulated nystatin as the therapeutic agent for systemic candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987 31(12):1897-1900 30
- Mohammedi Maati H, Ducroq J, Rivet J, Faivre J.F, Le Grande M, Bois P: Curcumin blocks the recombinant human cardiac KCNQ1/ KCNE1 channels (IKs) stably expressed in HEK 293 cells. *Congress de Physiologie, de Pharmacologie et de Therapeutique, Clermont-Ferrand, France, 9-11 Avril.* 2008 *Fund. Clin. Pharmacol.* 22(Suppl.1)
- Shimizu W, Antzelevitch C: Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade de pointes in LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. 1997 *Circulation* 96: 2038-2047
- Shimizu W, Antzelevitch C: Effects of a K(+) channel opener to reduce transmural dispersion of repolarization and prevent torsade de pointes LQT1, LQT2, and LQT3 models of the long QT syndrome. *Circulation,* 2000 102: 702-712 40
- Stansfeld PJ, Gedeck P, Gosling M, Cox B, Mitcheson JS, Sutcliffe MJ: Drug block of the hERG potassium channel: insight from modeling. *Proteins* 2007 68(2): 568-580
- Quan XQ, Bai R, Liu N, Chen BD, Zhang CT. Increasing gap junction coupling reduces transmural dispersion of repolarization and prevents torsades de pointes in rabbit LQT3 model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2007 18:1184-1189
- Zavhariae U, Giordanetto F, Leach AG: Side chain flexibilities in the human ether-a-go-go related potassium channel (hERG) together with matched-pair binding st 50

udies suggest a new binding mode for channel blockers. *J Med Chem* 2009 52(14): 4266-4276

Zhou Z, Gong Q, January CT: Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome: Pharmacological and temperature effects. *J Biol Chem.*1999 274: 31123-31126

参考文献 - 実施例 2

1. Yap YG, Camm A J. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart.* 2003;89:1363-1372

2. FDA Pharmacology Review of Xalkori(R) (crizotinib), IND No. 202570, 2011a, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000PharmR.pdf (accessed October 9, 2013) 10

3. FDA Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Xalkori(R) (crizotinib), IND No. 202570, 2011b, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000ClinPharmR.pdf (accessed October 9, 2013)

4. Xalkori (2013) [package insert], Pfizer Laboratories, New York, NY, revised February 2013

5. FDA Pharmacology Review of Tasigna(R) (nilotinib), IND No. 22-068, 2007a, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_PharmR_P1.pdf and www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_MedR_P2.pdf, (accessed October 25, 2013) 20

6. FDA Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Tasigna(R) (nilotinib), IND No. 22-068, 2007b, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_ClinPharmR.pdf, (accessed October 24, 2013)

7. Tasigna (2013), Package insert, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ, revised September 2013

8. Doherty KR, Wappel RL, Talbert DR, Trusk PB, Moran DM, Kramer JW, Brown AM, Shell SA, Bacus S. Multi-parameter in vitro toxicity testing of crizotinib, sunitinib, erlotinib, and nilotinib in human cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(1):245-55

9. Helson L, Shopp G, Bouchard A, Majeed M. Liposome mitigation of curcumin inhibition of cardiac potassium delayed-rectifier current. *J Recep Lig Channel Res.* 2012;5:1-8 30

10. Maciel NR, Reis PG, Kato KC, et al. Reduced cardio-vascular alterations of arter emetic administered in long-circulating liposomes in rats. *Toxicol Lett.* 2010;199(3): 234-238

11. Naseem A, Harada T, Wang D, Arezina R, Lorch U, Onel E, Camm AJ, Taubel J. Bupivacaine extended release liposome injection does not prolong QTc interval in a thorough QT/QTc study in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2012;52(9):1441-7

追加の参考文献

 40

Crouch, M. A., Limon, L., and Cassano, A. T. (2003). Clinical relevance and management of drugs-related QT interval prolongation. *Pharmacotherapy.* 23(7):881-908

Kim, K. P., Ryu, M. H., Yoo, C., et al. (2011). Nilotinib in patients with GIST who failed imatinib and sunitinib: importance of prior surgery on drug availability. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68(2):285-291

Lee, H. A., Kim, E. J., Hyun, S. A., Park, S. G., and Kim, K. S. (2010). Electrophysiological effects of the anti-cancer drug lapatinib on cardiac repolarization. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107(1):614-618

Mosse, Y. P., Lim, M. S., Voss, S. D., et al. (2013). Safety and activity of crizotinib for pediatric patients with refractory solid tumors or anaplastic large- 50

cell lymphoma: a Children ' s Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol.* 14(16): 472-480

Shah, R. R., Morganroth, J., and Shah, D. R. (2013). Cardiovascular safety of tyrosine kinase inhibitors: with a special focus on cardiac repolarization (QT interval). *Drug Saf.* 36(5):295-316

Tasigna(R). (2007a). FDA Pharmacology Review of Tasigna(R) (nilotinib), IND No. 22-068, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_PharmR_P1.pdf and http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_MeDR_P2.pdf, (accessed October 25, 2013)

Tasigna. (2007b). FDA Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Tasigna (nilotinib), IND No. 22-068, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022068s000_ClinPharmR.pdf, (accessed October 24, 2013)

Van de Water, A., Verheyen, J., Xhonneux, R., and Reneman, R. S. (1989). An improved method to correct the QT interval of the electrocardiogram for changes in heart rate. *J.Pharmacol. Methods*, 22, 207-217

Witchel, H. J. (2011). Drug-induced hERG block and QT syndrome. *Cardiovasc Ther.* 29(4):251-259

Xalkori(R). (2011a). FDA Pharmacology Review of Xalkori(R) (crizotinib), IND No. 202570, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000PharmR.pdf (accessed October 9, 2013)

Xalkori. (2011b). FDA Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review of Xalkori (crizotinib), IND No. 202570, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202570Orig1s000ClinPharmR.pdf (accessed October 9, 2013)

Zhou, L., Meng, F., Yin, O., et al. (2009). Nilotinib for imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in chronic phase, accelerated phase, or blast crisis: a single- and multiple-dose, open-label pharmacokinetic study in Chinese patients. *Clin. Ther.* 31(7):1568-1575

10

20

【 図 1 】

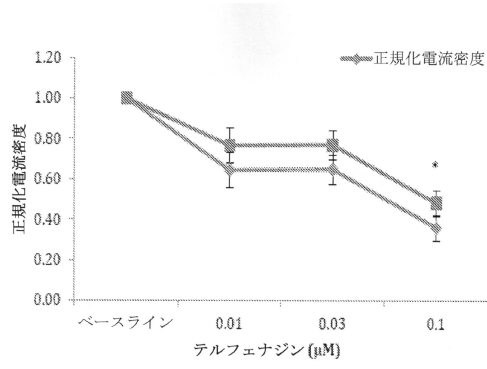


FIG. 1

【 図 2 】

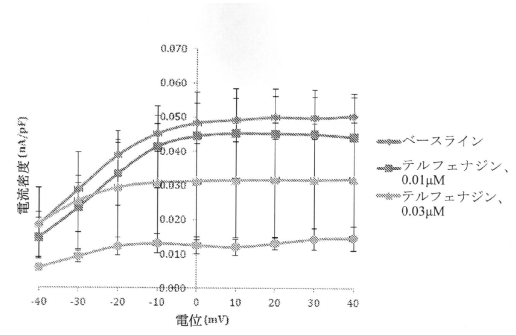


FIG. 2

【 図 3 】

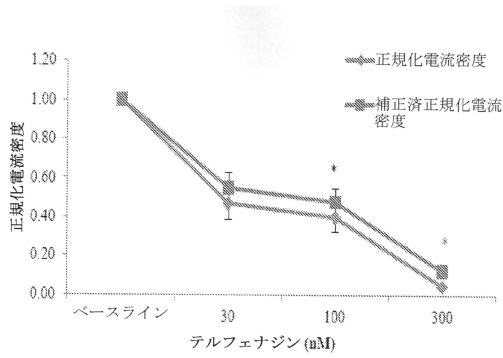


FIG. 3

【 図 4 】

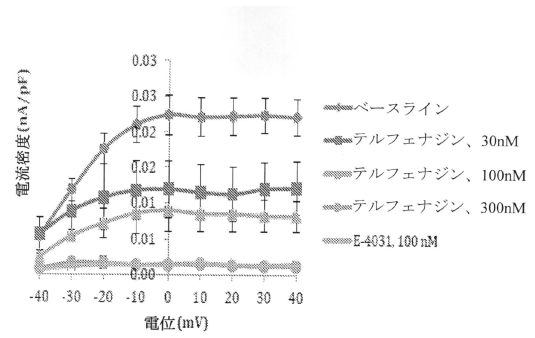


FIG. 4

【 図 5 】

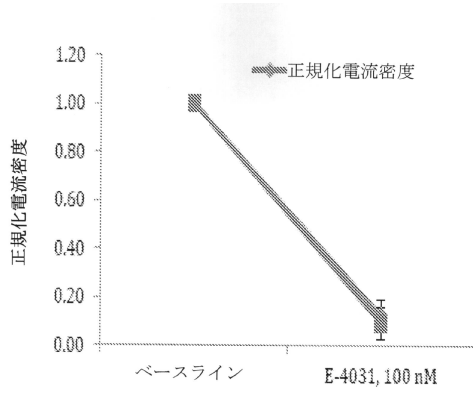


FIG. 5

【 図 6 】

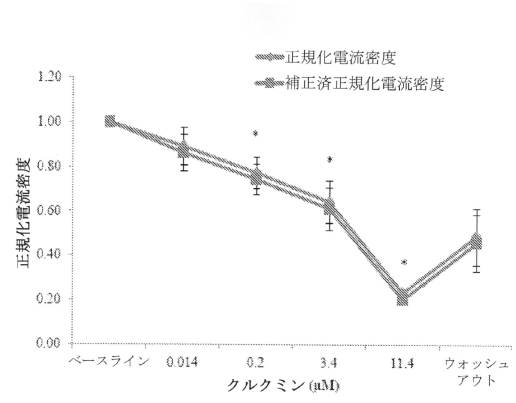


FIG. 6

【 図 7 】

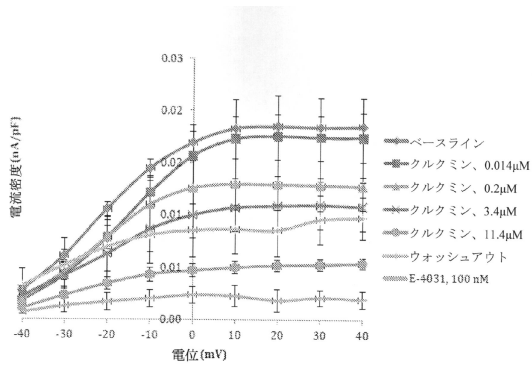


FIG. 7

【 図 8 】

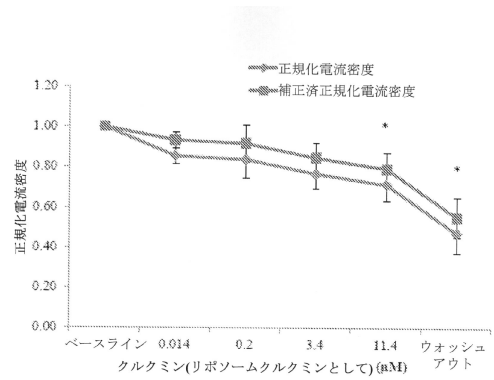


FIG. 8

【 図 9 】

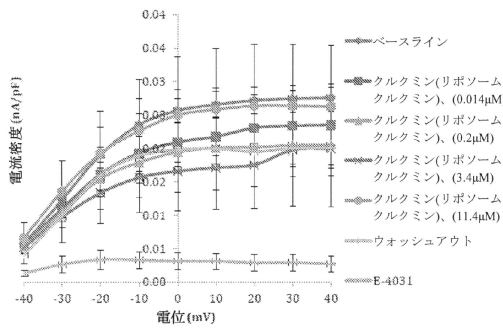


FIG. 9

【 図 10 】

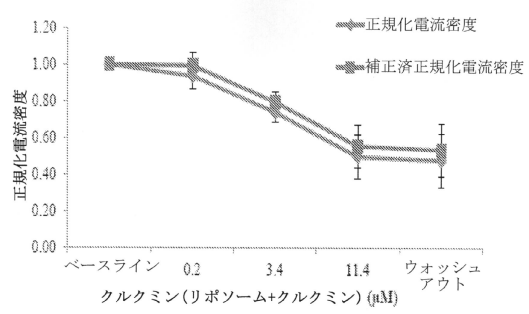


FIG. 10

【 図 11 】

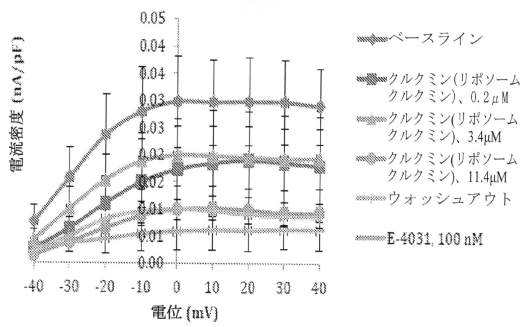


FIG. 11

【 図 12 】

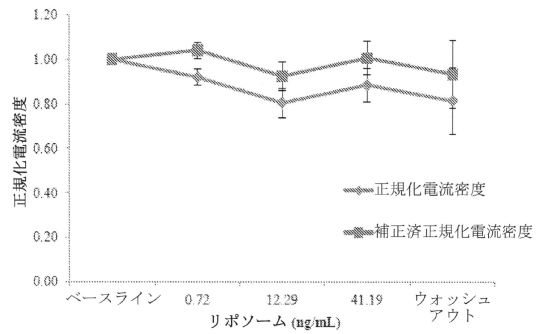


FIG. 12

【 図 13 】

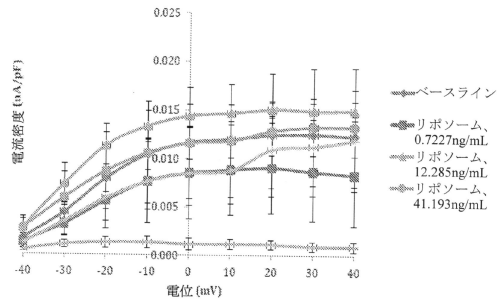


FIG. 13

【 図 14 】

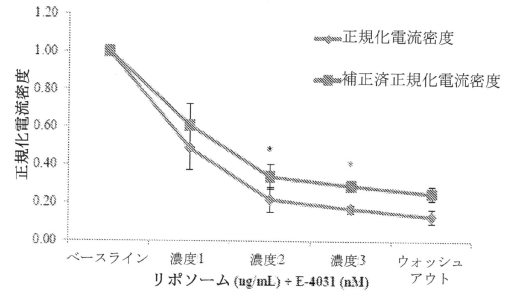


FIG. 14

【 図 15 】

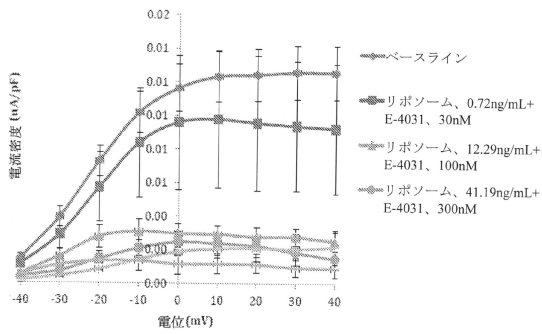


FIG. 15

【 図 16 】

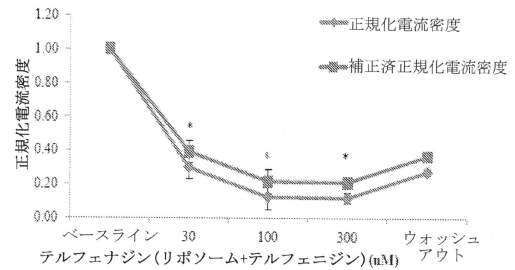


FIG. 16

【 図 17 】

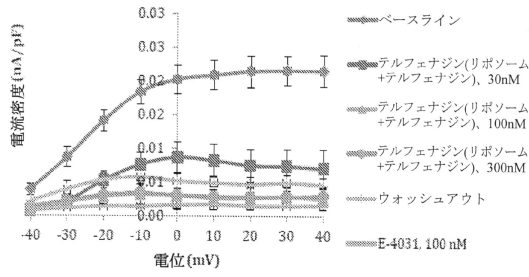


FIG. 17

【 図 18 B 】

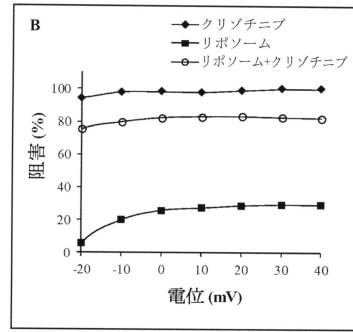


FIG. 18B

【 図 18 A 】

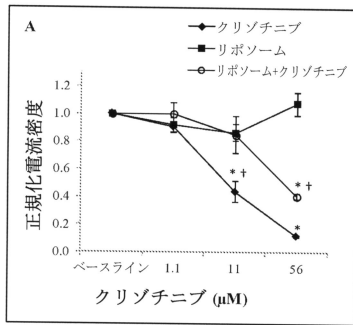


FIG. 18A

【 図 19 A 】

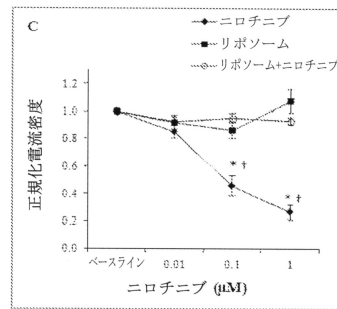


FIG. 19A

【 図 19 B 】

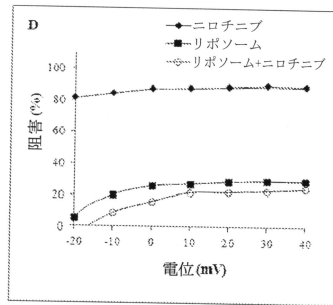


FIG. 19B

【 図 21 】

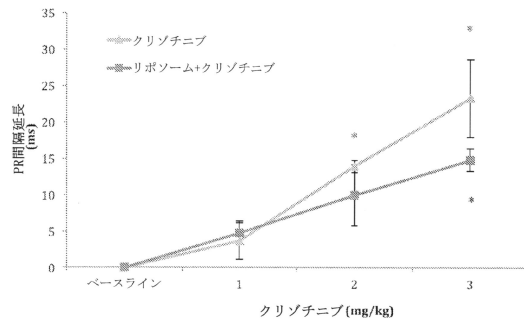


FIG. 21

【 図 20 】

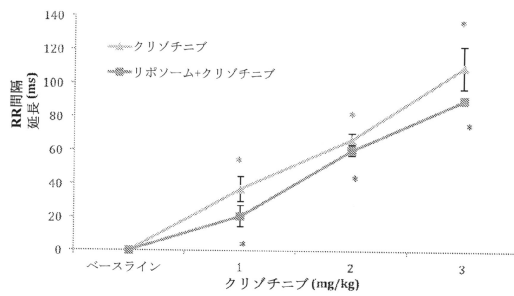


FIG. 20

【 図 22 】

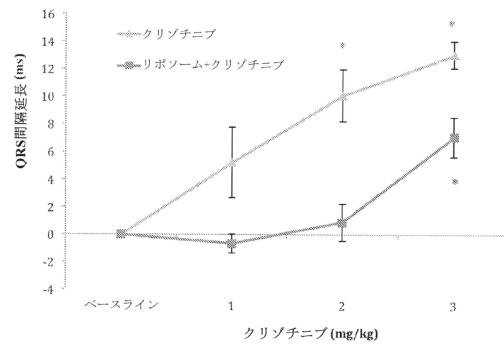


FIG. 22

【 図 2 3 】

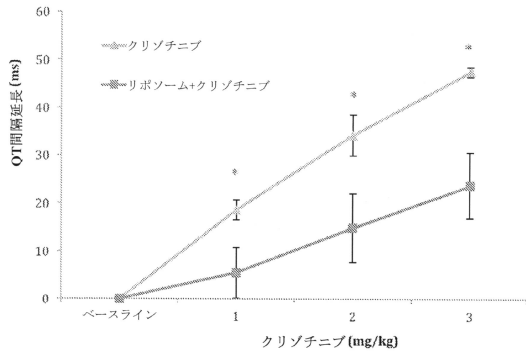


FIG. 23

【 図 2 4 】

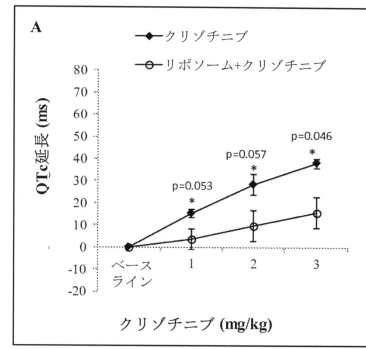


FIG.24

【 図 2 5 】

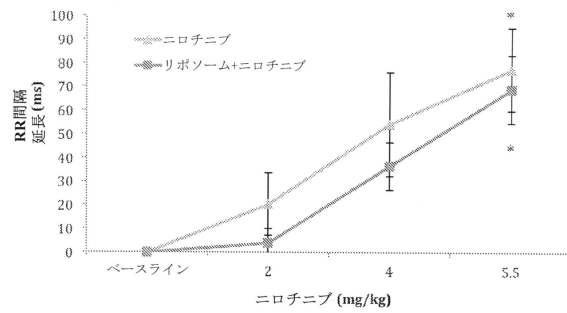


FIG.25

【 図 2 6 】

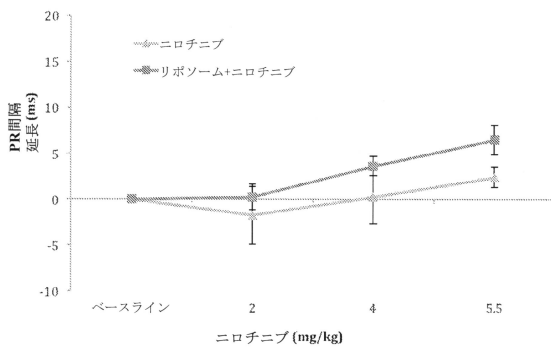


FIG.26

【 図 2 8 】

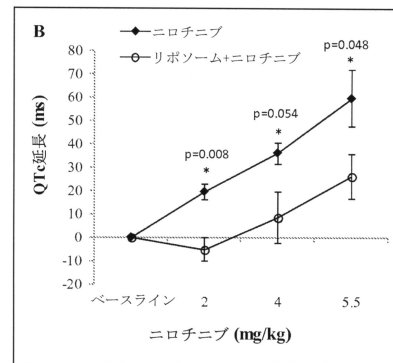


FIG.28

【 図 2 7 】

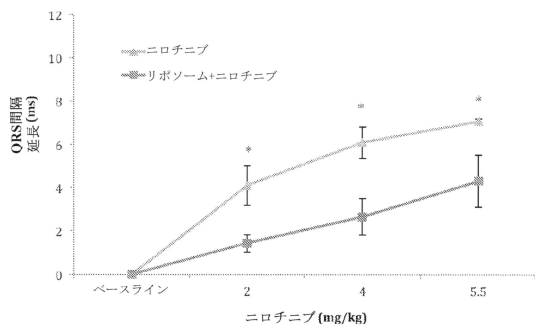


FIG.27

【 図 2 9 】

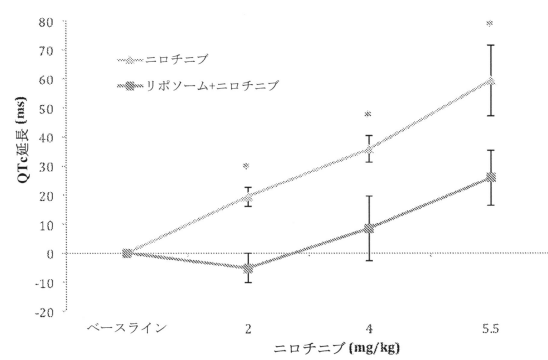


FIG. 29

【 図 30 A 】

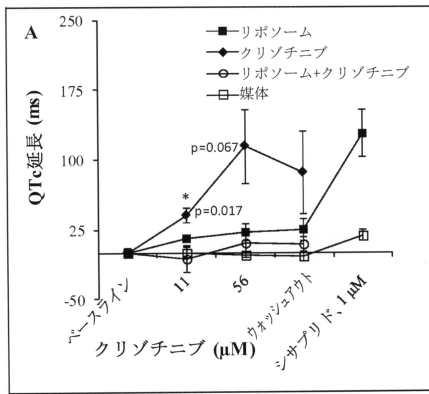


FIG. 30A

【 図 30 B 】

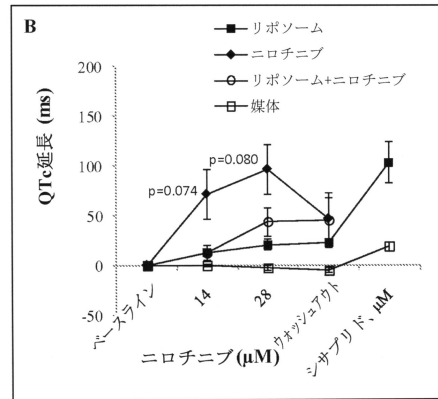


FIG. 30B

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 14/575,644
(32)優先日 平成26年12月18日(2014.12.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/917,426
(32)優先日 平成25年12月18日(2013.12.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (74)代理人 100113860
弁理士 松橋 泰典
- (74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真
- (74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子
- (74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
- (74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
- (74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
- (72)発明者 ヘルソン ローレンス
アメリカ国 ペンシルベニア18951 クエーカータウン カリフォルニアロード1375
- (72)発明者 ショップ ジョージ エム.
アメリカ国 コロラド80302 ボルダール ウィローブルックロード860
- (72)発明者 ブシャル アンニ
カナダ国 ジェイ0ビー 3ジー0 ケベック ストック リュドラボメライエ16

合議体

審判長 井上 典之
審判官 前田 佳与子
審判官 小川 知宏

- (56)参考文献 国際公開第2012/167212(WO,A2)
米国特許出願公開第2010/0291043(US,A1)
特表2003-535110(JP,A)
国際公開第2013/166249(WO,A1)
特表2009-536186(JP,A)
Journal of Receptor, Ligand and Channel Research, 2012年, vol. 5, p. 1-8
Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999年, vol. 88, no. 1, p. 96-102
CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH: CLINICAL PHARMACOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS REVIEW(S), 2011年, APPLICATION NUMBER: 202570

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K

STN(CAp1us ,MEDLINE ,BIOSIS ,EMBASE)