

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6235603号
(P6235603)

(45) 発行日 平成29年11月22日 (2017.11.22)

(24) 登録日 平成29年11月2日 (2017.11.2)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/352 (2006.01)	A 6 1 K 31/352
A 6 1 K 47/40 (2006.01)	A 6 1 K 47/40
A 6 1 K 47/69 (2017.01)	A 6 1 K 47/69
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06

請求項の数 22 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-542208 (P2015-542208)	(73) 特許権者	512185235
(86) (22) 出願日	平成25年11月1日 (2013.11.1)		ザビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・
(65) 公表番号	特表2016-503416 (P2016-503416A)		ベシュレンクテル・ハフツング
(43) 公表日	平成28年2月4日 (2016.2.4)		S A P I O T E C G m b H
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/072856		ドイツ97082ヴュルツブルク、ニコラ
(87) 国際公開番号	W02014/075935		ウスシュトラーセ18番
(87) 国際公開日	平成26年5月22日 (2014.5.22)	(74) 代理人	100101454
審査請求日	平成28年9月15日 (2016.9.15)		弁理士 山田 卓二
(31) 優先権主張番号	12192717.2	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成24年11月15日 (2012.11.15)		弁理士 青山 篠
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100156144
			弁理士 落合 康

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 消炎性および／または免疫抑制性活性成分としてのデルフィニジン複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル β-シクロデキストリンの複合体を含む、消炎剤および／または免疫抑制剤として使用するための組成物。

【請求項2】

当該使用が、脳虚血および／または心筋虚血のとき、または、脳虚血および／または心筋虚血の結果として、組織および／または臓器を保護することを包含することを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

当該使用が、切迫性再灌流傷害のときに組織および／または臓器を保護することを包含することを特徴とする、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

脳虚血および心筋虚血が卒中および心筋梗塞の臨床的症状と相関することを特徴とする、請求項2または3に記載の組成物。

【請求項5】

当該使用が、

- ・炎症状態または炎症性疾患
- ・炎症性組織変化に関係する疾患
- ・移植後の拒絶反応、および、
- ・自己免疫疾患

からなる群から選択される徴候の予防および／または処置を包含することを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

炎症状態または炎症性疾患が、関節リウマチ；慢性多発性関節炎；若年性特発性関節炎；脊椎炎；変形性関節症；敗血症；敗血症性ショック；脳性マラリア；慢性炎症性肺疾患；珪肺症；サルコイドーシス；再灌流症候群；クローン病、多発性硬化症およびパーキンソン病を含む炎症性神経変性疾患；潰瘍性大腸炎；抑鬱；ならびに感染症のときの発熱からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

炎症性組織変化に関係する疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病および癌からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 5 に記載の組成物。

10

【請求項 8】

スルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンが、スルホブチル エーテル β -シクロデキストリンまたはスルホエチル エーテル β -シクロデキストリンである、請求項 1～7 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

スルホアルキルエーテル基によるシクロデキストリンの置換度が、3～8であることを特徴とする、請求項 1～8 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

スルホアルキルエーテル基によるシクロデキストリンの置換度が、4～8であることを特徴とする、請求項 1～9 の何れか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 11】

スルホアルキルエーテル基によるシクロデキストリンの置換度が、5～8であることを特徴とする、請求項 1～10 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

スルホアルキルエーテル基によるシクロデキストリンの置換度が、6～7であることを特徴とする、請求項 1～11 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

組成物が、デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンの複合体を治療有効量含むことを特徴とする、請求項 1～12 の何れか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 14】

組成物を単剤として使用することを特徴とする、請求項 1～13 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

組成物が、少なくとも 1 種のさらなる治療活性物質を含むことを特徴とする、請求項 1～13 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

少なくとも 1 種のさらなる治療活性物質が、消炎剤、炎症性サイトカインに対する抗体、炎症性サイトカインの可溶性受容体または免疫抑制剤の群から選択されることを特徴とする、請求項 15 に記載の組成物。

40

【請求項 17】

少なくとも 1 種のさらなる治療活性物質が、アセチルサリチル酸、ジクロフェナク、インドメタシン、シクロスポリン、アザチオプリン、ボルテゾミブ、メルファラン、プレドニゾン、ビンクリスチン、カルムスチン、シクロホスファミド、デキサメタゾン、サリドマイド、ドキシソルビシン、シスプラチン、エトポシドおよびシタラビンからなる群から選択されることを特徴とする、請求項 15 または 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

1 種以上の薬学的な助剤および／または添加物をさらに含む、請求項 1～17 の何れか 1 項に記載の組成物。

50

【請求項 19】

1 種以上の薬学的な助剤および／または添加物が、薬学的に許容される担体、充填剤、香料および安定剤からなる群から選択される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

経口投与、直腸投与、ならびに腹腔内投与、経皮投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、眼への投与、肺への投与および鼻腔への投与を含む非経腸投与からなる群から選択される投与用の製剤形態である、請求項 1～19 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 21】

錠剤、カプセル剤、懸濁剤、エアロゾル剤、液剤、クリーム剤、ペースト剤、ローション剤、ゲル剤および軟膏剤からなる群から選択される投与用形態である、請求項 20 に記載の組成物。

10

【請求項 22】

デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンの複合体が、デルフィニジンの制御放出および／または遅延放出用医薬製剤に使用されることを特徴とする、請求項 1～21 の何れか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、

・デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンからなる複合体、および／または

20

・デルフィニジンまたはその塩

を消炎剤および／または免疫抑制剤として含む組成物の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫系の応答は、自然免疫系と獲得免疫系の構成成分によって媒介される。非特異的自然免疫系は、マクロファージ、単球および顆粒球から始まる、抗原および外因性刺激(細菌、ウイルス、真菌など)に対する全ての応答、ならびに、インターフェロン、デフェンシンおよび急性期タンパク質を含む体液系防御機構を包含する。獲得免疫系または適応免疫系は、リンパ球、より具体的には B リンパ球(B細胞)および T リンパ球(T細胞)から始まる全ての特異的防御応答を包含する。或る条件下では、免疫系自体の応答が、疾患または疾患関連状態の原因であり得る。当該疾患または状態は、例えば急性および慢性炎症、敗血症、自己免疫疾患、または、臓器、細胞または組織移植後の拒絶反応などである。不適切なまたは望ましくない免疫応答であるこれらの状態および他の状態の発症において、臨床的な観点から、消炎剤またはむしろ免疫抑制剤による免疫抑制が必要である。

30

【0003】

消炎性または抗炎症性物質は、炎症またはその徴候の 1 つを、一部または完全に、すぐにまたは遅れて、軽減または阻止できる物質である。抗炎症作用性物質は、サイトカインのような可溶性メディエーターに指向性であり得るか、または、MHC クラス II 分子などの炎症反応に関与する特定の細胞表面受容体の発現を調節できる。免疫抑制作用性物質は、免疫系に作用し、その結果、免疫系の活性をすぐにまたは遅れて減少させる物質である。免疫抑制作用性物質は、例えば外因性分子または組織に対する、または移植された組織に対する過度の免疫応答、例えば自己免疫疾患、I 型糖尿病、多発性硬化症または関節リウマチのときに使用される。現在使用されている消炎剤は、例えば、アセチルサリチル酸、ジクロフェナク、インドメタシンまたはグルココルチコイドである。免疫抑制剤、細胞分裂阻害剤(アザチオプリン)、カルシニューリン阻害剤(タクロリムス、シクロスポリン、ピメクロリムス)およびヒドロコルチゾンの群が使用される。

40

【0004】

日常の診療において、ヒドロコルチゾンは炎症阻止および免疫抑制に使用され、例えば炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎、クローン病の症例で、または腸下部の他の炎症、例

50

えば直腸S状結腸炎の症例で、炎症の症状を緩和するために、直腸に局所適用される。同様に、炎症性またはアレルギー性皮膚疾患、例えば湿疹、神経皮膚炎、乾癬、日焼け、皮膚感染および昆虫刺傷の症例で、掻痒または炎症のような愁訴の緩和のために、皮膚に適用するためのクリーム剤および軟膏におけるヒドロコルチゾンの使用が知られている。

【0005】

高用量ヒドロコルチゾンの短期間投与は一般的に身体の耐容性が高いが、長期処置の場合に望ましくない有害作用が起こり、より具体的には、活性成分の体内投与の場合に起こる。活性成分の体内投与は、実質的に2種の有害作用を有する。第1に、ヒドロコルチゾンは、尿から血液への水再取り込みを促進する。これは、血液の量を増やし、血管の圧力を上げ、従って血圧を上げる。これによって、長期間高血圧が生じることもあり得る。第2に、ヒドロコルチゾンは不整脈を引き起こし得る。ヒドロコルチゾンは尿によるカリウム排出を増加させる。これは、不整脈を促進するカリウム欠乏をもたらし得る。そのため、当該製剤は、典型的に6歳からの診療でのみ適用され、2週より長く適用しない。

10

【発明の概要】

【0006】

ヒドロコルチゾンなどの先行技術で知られている消炎剤または免疫抑制剤の代替物または補助剤として有効な消炎剤および／または免疫抑制剤を提供することが本発明の目的である。

【0007】

この目的は、独立請求項に記載された、および本発明の有益な態様であると開示された、本発明の組成物および使用によって達成される。この目的が実際に達成されたという事実は、本発明の実施例6～11に記載のデルフィニジンおよびデルフィニジン／スルホエチル エーテル β -シクロデキストリンの消炎作用および抗炎症作用に関するインビトロおよびインビボ実験結果によって証明される。

20

【発明を実施するための形態】

【0008】

第一に、本明細書で使用する幾つかの用語を説明する。

本発明の複合体または本発明の組成物は、好ましくは

- ・炎症状態または炎症性疾患、
- ・炎症性組織変化に関係する疾患、
- ・移植後の拒絶反応、および、
- ・自己免疫疾患

30

からなる群から選択される徴候を示すおよび／または予防処置を必要とする対象または個体を処置するために使用される。

【0009】

“炎症状態または炎症性疾患”は、本発明の内容において、関節リウマチ、慢性多発性関節炎、若年性特発性関節炎、脊椎炎、変形性関節症、敗血症、敗血症性ショック、脳性マラリア、慢性炎症性肺疾患、珪肺症、サルコイドーシス、再灌流症候群、神経変性疾患または神経炎症性疾患、例えばクローン病、多発性硬化症およびパーキンソン病、潰瘍性大腸炎、感染症の発熱、およびまた炎症性組織反応によって起こる抑鬱[Pace et al. (2006), Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. Am. J. Psychiatry. 163(9): 1630-3]などの徴候を包含する。

40

【0010】

炎症反応は、心筋および／または脳血液供給減少の症例(虚血)、より具体的には、血液供給が回復した後(再灌流)でも観察でき、細胞の壊死性膨潤により細胞膜が壊され、それに伴って細胞質の構成成分が放出され、炎症反応を起こす。本発明の複合体または本発明の組成物は、本発明によると、脳および／または心筋虚血の場合には組織および／または臓器の保護と考えられ、卒中および心筋梗塞の臨床的症状と相関するものである使用ができると考えられる。本発明の好ましい態様において、本発明の複合体または本発明の組成

50

物の罹患組織または臓器への使用は、実施例 10 で証明されるように、さらなる損傷(再灌流パラドックス)を回避するまたは緩和する。

【0011】

特に卒中、冠動脈心疾患(CHD)および末梢動脈閉塞性疾患を含むアテローム動脈硬化症関連疾患は、先進国で罹患している人が多い。現在、年間700万人を越える人が、虚血性心疾患を原因として死亡している。CHDは、不十分な血液供給を起こし、心筋への不十分な酸素供給に関連し(心筋虚血)、その結果、心筋梗塞や心臓死を起こし得る。CHDは、安定狭心症、急性冠症候群(不安定狭心症および急性心筋梗塞)、心臓突然死、慢性心不全、不整脈および無症候性心筋虚血の6種の進行型に分類される。進行型心筋虚血では、心筋細胞の細胞死が、“ランダム”細胞死(壊死)および“プログラム”細胞死(アポトーシス)により起こり、細胞質成分の放出を伴う細胞膜の破壊を起こす細胞の壊死性膨潤は、炎症反応の原因となる。

10

【0012】

“炎症性組織変化に関係する疾患”は、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病および癌からなる群の徴候を含む。

【0013】

用語“対象”は、生存する動物およびヒトを包含する。

【0014】

用語“デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンからなる複合体および／またはデルフィニジンまたはその塩を含む組成物”は、単剤、すなわち、さらなる治療活性成分を含まない組成物を含む。あるいは、本組成物は、少なくとも1種のさらなる治療活性物質を含み得る。さらなる治療活性物質は、好ましくは、消炎剤、炎症性サイトカインに対する抗体、炎症性サイトカインの可溶性受容体または免疫抑制剤の群から選択され、特に好ましくは、アセチルサリチル酸、ジクロフェナク、インドメタシン、シクロスポリン、アザチオプリン、ボルテゾミブ、メルファラン、プレドニゾン、ビンクリスチン、カルムスチン、シクロホスファミド、デキサメタゾン、サリドマイド、ドキソルビシン、シスプラチン、エトポシドおよびシタラビンからなる群から選択される。

20

【0015】

本発明は、治療有効量の本発明の組成物を対象に投与することにより、炎症状態または炎症性疾患、炎症性組織変化に関係する疾患、移植後の拒絶反応、または自己免疫疾患に罹患している対象を処置する方法も提供する。前述の通り、本発明の組成物を、単独でまたは少なくとも1種の他の治療薬と組み合わせて投与できる。本発明の組成物は、同一組成物の構成成分であるかまたは他の組成物で提供される他の治療薬と同時に投与できる。あるいは、他の治療薬の投与前または投与後に、本発明の組成物を投与できる。他の治療薬と同じ投与経路または他の投与経路によって、本発明の組成物を投与できる。

30

【0016】

本発明の内容において、用語“処置”は、症候を完全にまたは一部軽減する；臨床的症状または疾患関連徴候の少なくとも1つを改善する；疾患の進行を遅らせ、抑制し、またはそれから保護する；あるいは、疾患の発症を完全にまたは一部遅らせ、抑制し、またはそれから保護するという結果を完全にまたは一部達成することを意味する。処置される対象は、ヒトまたは動物であり、好ましくは哺乳動物である。獣医学的処置は、家畜または野生動物(例えばヒツジ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ)のみならず、実験動物(例えばラット、マウス、モルモット、類人猿)の処置も包含する。

40

【0017】

本発明の組成物は、好ましくは、医薬組成物として提供され、投与される。用語“医薬組成物”は、1種以上の有効成分、および、有効成分の担体として作用する1種以上の不活性成分を含む。医薬組成物は、本発明の複合体または本発明の組成物を、経口投与、直腸投与、腹腔内投与、経皮投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、眼への投与、肺への投与、または鼻腔への投与を含む非経腸投与することを可能にする。経口投与形は、例

50

例えば、錠剤、カプセル剤、溶液、懸濁液または分散液であり得る。眼、肺または鼻腔への投与形は、例えば、エアロゾル、溶液、クリーム剤、ペースト剤、ローション剤、ゲル剤、軟膏、懸濁液または分散液であり得る。対応する製剤方法および投与方法は、先行技術で知られている。例えば“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Publishing Co., Easton Pa.)を参照のこと。例えば、本発明の組成物は、標的に、薬学的に許容される担体(例えば生理学的塩溶液)を用いて静脈内投与できる。注射のときに選択できるのは、水溶液、好ましくは生理学的に許容される緩衝液(例えばハanks溶液、リンゲル溶液または生理学的緩衝食塩水溶液)の製剤である。静脈内、皮下、筋肉内および腹腔内投与を含む非経腸投与のときは、水性または油性溶液または固体製剤も可能である。医薬組成物中の有効成分の割合は変更でき、典型的には、投与単位の重量に対して2～60重量%の間である。有効成分の割合は、有効投与量を達成するよう適切に選択される。本発明の好ましい態様において、デルフィニジンまたはその塩、および／または、デルフィニジンおよびスルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンからなる複合体は、デルフィニジンの制御および／または遅延放出のための医薬製剤に使用される。

10

【0018】

“塩”または“薬学的に許容される塩”は、投与後に薬学的に有効な活性成分またはその活性な代謝物を放出できる、本発明の化合物の薬学的に許容される塩の何れかを意味する。本発明の塩の組成物および複合体は、無機酸または無機塩基、有機酸または有機塩基から誘導できる。

20

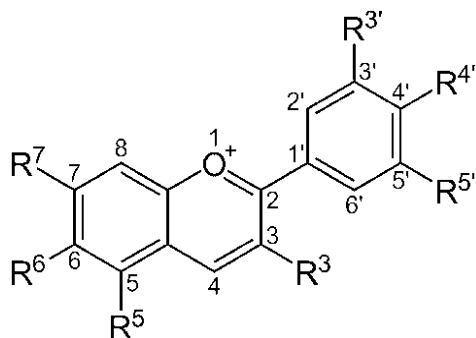
【0019】

アントシアニジン類のデルフィニジンは、“純粋な形態”または“精製された形態”で使用でき、これは望ましくない成分が除去されたものを意味する。

【0020】

“アントシアニジン”は、

【化1】



30

の基本構造を有する。

式中の置換基は、水素、ヒドロキシル基およびメトキシ基からなる群から選択される。

【0021】

本発明でアントシアニジン類のデルフィニジンと複合体形成できるシクロデキストリンは、 α -1, 4-グリコシド結合によって結合しているグルコース分子からなる環状オリゴ糖である。 β -シクロデキストリンは、7個のグルコース単位を有する。スルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンの場合は、グルコース単位のヒドロキシル基が、スルホアルキルアルコールでエーテル化される。本発明によると、一般的に、 β -シクロデキストリンの21個のヒドロキシル基の幾つかだけがエーテル化されている。スルホアルキルエーテルシクロデキストリンの製造は、当業者によく知られており、例えばUS 5,134,127またはWO 2009/134347 A2に記載されている。

40

【0022】

スルホアルキルエーテル基は、シクロデキストリンの場合は、先行技術において、親水性を高めるまたは水への溶解度を上げるために使用される。スルホアルキルエーテル基は、アントシアニジンおよび適切に置換された β -シクロデキストリンからなる複合体の安定性を高めるのに特に寄与し、従って、実質的に、特に酸化されやすいアントシアニジン

50

の保存安定性および製剤可能性を改善する。本発明の複合体は、下により詳細に示す通り、保存安定な水溶液または固体として製剤化できる。

【0023】

本発明によると、特に好ましいのは、活性成分デルフィニジンのスルホエチルエーテル β -シクロデキストリンとの複合体であり、驚くべきことに、これは、活性成分の溶解度および安定性を高める。この保護範囲を限定しない説明は、負に荷電したスルホエチル単位が、正に荷電したアントシアニジン類であるデルフィニジンと静電的に相互作用し、アルキル基のうち、エチル基が、立体的な観点から適切な相互作用を許容するのに最適な長さを有することである。ここで、例えばスルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンとの複合体中で、デルフィニジンなどの望ましい活性成分は何れも、溶解度および安定性が改善するという一般的な価値のある記載ができないことに注意すべきである。例として、この点について、Ueda et al., “Evaluation of a Sulfobutyl Ether β -Cyclodextrin as a Solubilizing/Stabilizing Agent for Several Drugs”, Drug Development and Industrial Pharmacy, 24(9), 863-867 (1998)の表1を引用する。これには、様々な活性成分の、単独、スルホブチルエーテル β -シクロデキストリンとの複合体および β -シクロデキストリンとの複合体の溶解度を対比してある。ここに示された溶解度の値(SBE 7- β -CD 対 β -CD)から、調べた活性成分の3分の1がスルホブチルエーテル β -シクロデキストリンとの複合体のときは全く反対であり、すなわち、活性成分およびスルホブチルエーテル β -シクロデキストリンからなる複合体は、結果として、 β -シクロデキストリンとの複合体よりもかなり低い溶解度となることが分かる。

【0024】

好ましくは、スルホアルキルエーテル基によるシクロデキストリンの置換度は、3～8、より好ましくは4～8、より好ましくは5～8、より好ましくは6～7である。同様に、同程度の置換度合を有するスルホブチルエーテル β -シクロデキストリンが使用可能である。例えば、適切な中程度の置換度6～7を有するシクロデキストリンは、例えば、上記WO 2009/134347 A2に記載され、商品名Captisol(登録商標)として商業的に利用可能である。同様に、4～5の、例えば4.2の置換度を有する適切なシクロデキストリンが使用可能である。

【0025】

本発明に使用するアントシアニジンは、純粋な形態、塩形または複合体化された形態のデルフィニジンである。化学構造は、下記の置換パターンを有する上記の式に対応する。

【表1】

	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷
デルフィニジン	—OH	—OH	—OH	—OH	—OH	—H	—OH

【0026】

本発明は、さらに、本発明の医薬として使用するための本発明の組成物の水溶液を提供する。

【0027】

本発明の複合体および適切な水溶液の製造は、

- スルホアルキルエーテル β -シクロデキストリンの水溶液を得る
- アントシアニジンであるデルフィニジンを添加して混合し、複合体を得る工程を含む。

【0028】

工程a)では、5～10重量%の使用するシクロデキストリンを含む水溶液を得ることが好ましい。本発明の内容において、デルフィニジンの添加後、好ましくは添加前に、水溶液のpHを、pH 7未満、好ましくは6未満、より好ましくは5未満、より好ましくは4～5に調節することが特に好ましい。当該pHでは、水溶液中の複合体の濃度を比較

的高濃度にすることが可能であることが分かった。

【0029】

塩化物として計算されるデルフィニジンの濃度は、好ましくは少なくとも0.5mg/mlであり、より好ましくは少なくとも1.0mg/mlであり、より好ましくは少なくとも1.5mg/mlであり、より好ましくは2.0mg/mlである。特に好ましい濃度範囲は、pH 4～5を有する水溶液で少なくとも2.0mg/mlの濃度範囲を設定し得る。

【0030】

製造工程の一部として、水溶液の成分の混合を、攪拌によって行うことができる。好ましい混合時間は2～20時間である。光誘起酸化を避けるために暗所で行うことが好ましい。

10

【0031】

本発明は、さらに、本発明の上記水溶液から溶媒を除去することによって、本発明に従って得られる固体である、医薬として使用するための固体を提供する。除去は、好ましくは、凍結乾燥によって行うことができる。本発明の医薬の水溶液および固体は、高い保存安定性を有する。

【0032】

本発明は、添付の図面の記載と共に、下記の実施例で詳細に記載されるが、それらに限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0033】

20

【図1】図1は、LPSのみで処置した細胞(対照)と比較した、デルフィニジンおよび/またはそれとリポ多糖(LPS)の同時投与の予防的投与の細胞へのインビトロ有効性プロファイルを示す。

【図2a】図2aは、LPSのみで処置した細胞(対照)と比較した、デルフィニジンまたはヒドロコルチゾンとリポ多糖(LPS)との同時投与の細胞へのインビトロ有効性プロファイルを示す。

【図2b】図2bは、LPSのみで処置した細胞(対照)と比較した、デルフィニジンとリポ多糖(LPS)の同時投与の細胞へのインビトロ有効性プロファイルを示す。

【図3】図3は、ヒドロコルチゾンで処置した細胞と比較した、変化させた濃度のデルフィニジンを使用したときのデルフィニジンの細胞へのインビトロ有効性プロファイルを示す。

30

【図4】図4は、TNF α [腫瘍壊死因子 α]処置後のcEND細胞または未処置細胞中のインビトロでのCc17[ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド7]のmRNA発現に対するデルフィニジンおよびデキサメタゾンの影響を示す。

【図5】図5は、TNF α [腫瘍壊死因子 α]処置後のcEND細胞または未処置細胞中のインビトロでのタイトジャンクション構成タンパク質クローディン-5のmRNA発現に対するデルフィニジンの影響を示す。

【図6】図6は、ラットの後肢のCFA(完全フロイントアジュバント)誘発炎症に対するデルフィニジン/スルホエチル エーテル β -シクロデキストリンの足底投与のインビボでの影響を示す。

40

【図7】図7は、実施例10で使用したインビボ急性心筋梗塞モデルの時間経過および冒された心臓領域を示す。

【図8】図8は、デルフィニジンSBECDの溶解度を示す。

【図9】図9は、図7のモデルにおけるデルフィニジンSBECDの使用の実験プロトコルを示す。

【図10】図10は、対照群と比較したデルフィニジンSBECDにおける虚血領域のパークセンテージとしての梗塞サイズを示す。

【実施例】

【0034】

I. デルフィニジンおよびシクロデキストリンからなる複合体の製造

50

1. 使用される物質：

下記のシクロデキストリンを使用する：

【表 2】

α -CD	I D 番号 : CYL-2322
β -CD	I D 番号 : CYL-3190
γ -CD	I D 番号 : CYL-2323
(2-ヒドロキシプロピル)- β -CD	I D 番号 : L-043/07
スルホブチル エーテル β -CD	I D 番号 : 47K010111

10

塩化デルフィニジンをExtrasynthese社から購入した。

【0035】

2. デルフィニジン含量の測定

デルフィニジン含有組成物中の塩化デルフィニジンの含量を、逆相HPLC法を使用することによって測定した。当該方法は、下記の試薬を使用した。

精製水

クロマトグラフィー用メタノール

分析用蟻酸

容量測定用溶液としての1M 塩酸。

【0036】

20

使用したカラムは、Waters X Bridge(商標) C18, 35 μ l, 150mm $\times$ 4.6mmであった。

移動相は下記の通りであった：

チャンネルA：水(950ml)、メタノール(50ml)、蟻酸(10ml)

チャンネルB：水(50ml)、メタノール(950ml)、蟻酸(10ml)

【0037】

下記の濃度勾配プログラムを使用した：

【表 3】

時間[分]	%チャンネルB
0	0
5	0
25	60
30	100

30

停止時間：35分

ポストタイム：8分

流速：1ml/分

注入体積：20 μ lカラム温度：30 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ CUV/VIS 検出器：アッセイ用530 μ m、不純物検出用275 μ m

40

積分：面積

【0038】

溶液およびサンプル調製：

希釈溶液1：100mlのメタノールおよび2.6mlのM HClの混合物

希釈溶液2：100mlの40%メタノールおよび2.6mlの1M HClの混合物

校正溶液：デルフィニジン参照溶液は以下のとおり調製した：10mgの塩化デルフィニジンを10mlのフラスコに秤量し、希釈溶液1に溶解した。それを溶解した後、希釈溶液2を用いて約10倍に希釈し、適切な濃度0.1mg/mlとした。

対照の校正溶液を同じ方法で調製した。塩化デルフィニジンは溶液中で不安定なため、校正溶液をすぐにHPLCによって分析した。

50

【0039】

試験溶液の調製：

本発明の固体のデルフィニジン(製造については、さらに下を参照のこと)の含量を測定するために、約50mgの本組成物を10mlのフラスコに秤量した。次いでこれを希釈溶液2に溶解し、さらに、適切なデルフィニジン濃度0.1mg/mlとなるまで、同じ希釈溶液2で希釈した。

【0040】

サンプル中のデルフィニジン含量の決定は、記載された外部標準による較正を用いて、Agilent ChemStation softwareによって計算した。

【0041】

実施例1：デルフィニジンのSBE- β -CDとの複合体形成

本実施例は、様々なシクロデキストリンによるデルフィニジンの複合体形成および水溶液中の複合体の溶解度を調べる。

【0042】

10重量%の特定のシクロデキストリンを含む中性水溶液を調製した。 β -CDの場合では、溶解度が不十分なため、2重量%の濃度のみを選択した。

5mlの各シクロデキストリン水溶液および純水をガラスフラスコに入れた。過剰な塩化デルフィニジンを添加した。必要とされる過剰量は、 α -、 β -および γ -シクロデキストリンの溶液では10mg、HPBCD(2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン)およびSBE- β -CDの溶液では15mgであった。

懸濁液を暗所で30℃で20時間攪拌した。続いてこれを孔径0.22 μ mを有する膜フィルターで濾過した。

【0043】

得られた溶解度を下の表1に示す。

【表4】

表1：

シクロデキストリン	シクロデキストリン濃度	塩化デルフィニジン
—	0	0.07 mg/ml
α -CD	10%	0.14 mg/ml
β -CD	2%	0.05 mg/ml
γ -CD	10%	0.21 mg/ml
HPBCD	10%	0.19 mg/ml
SBE- β -CD	10%	0.66 mg/ml

他のシクロデキストリンよりも、SBE- β -CDで、複合体形成により溶解度がかなり良くなることが明らかである。

【0044】

実施例2：pHの影響

本実施例では、水溶液中でのデルフィニジン/SBE- β -CDの溶解度に対するpHの影響を調べた。1M HClで表2に記載した酸性pHレベルに調節した以外、実施例1の記載に従って、SBE- β -CD水溶液を調製した。次いで塩化デルフィニジンを加え、さらに、攪拌時間を2.5時間に限定した以外、実施例1の記載に従って処理した。結果を下の表2に示す。

【0045】

10

20

30

40

【表 5】

p H	塩化デルフィニジン
6.0	0.60 mg/ml
4.8	2.12 mg/ml
4.1	2.03 mg/ml

p Hレベル 4～5 において、塩化デルフィニジン複合体の溶解度は、中性 p H の約 3 倍まで増大することが明らかである。

【0046】

10

実施例 3：本発明の固体の製造

本実施例では、本発明の複合体を固体として製剤化する。比較のために、デルフィニジン／HPBCD 複合体およびデルフィニジン／澱粉製剤を固体として製造する。

【0047】

実施例 3. 1：デルフィニジン／SBE-β-CD

5 g の SBE-β-CD を 40 ml の蒸留水に溶解し、透明な溶液を得た。1 M HCl を用いて、溶液の p H を 4. 8 に調節した。次いで、0. 11 g の塩化デルフィニジンを加え、暗所で 27℃ で 2 時間攪拌した。均一な液体を、孔径 0. 45 μm を有する硝酸セルロース膜フィルターで減圧濾過した。溶液を凍結し、-48℃ および圧力約 10. 3 Pa (77 mTorr) で凍結乾燥した。凍結乾燥物をすりつぶし、メッシュサイズ 0. 3 mm の篩いで篩過した。

20

【0048】

実施例 3. 2：デルフィニジン／HPBCD

かなりの量の物質を濾過する以外、実施例 3. 1 と同じ手順を行った。これは、実施例 3. 1 により SBE-β-CD を使用したときより、明らかに溶解度が低いことを示す。

【0049】

実施例 3. 3：デルフィニジン／澱粉製剤

5 g の澱粉を 40 ml の蒸留水に懸濁した。白色の懸濁液を得た。1 M HCl を用いて溶液の p H を 4. 6 に調節した。次いで 0. 11 g の塩化デルフィニジンを加え、暗所で 27℃ で 2 時間攪拌した。得られた均一な液体を、実施例 3. 1 の通りに、凍結乾燥し、すりつぶし、篩過した。

30

実施例 3. 1 は本発明によるものであり、実施例 3. 2 および 3. 3 は比較例である。

【0050】

実施例 4：安定性試験

実施例 3. 1～3. 3 の固体を下記の条件下で保存した：

- ・褐色のねじ式ガラス容器中、室温で 8 日間
- ・続いてガラス容器中、暗所で、酸素雰囲気下、室温で 22 日間。

上記保存の最後の 22 日間は、容積 20 ml を有するガラスバイアル中で行った。予め 8 日間保存した 250 mg の各サンプルを、当該バイアルに充填し、これらをゴム栓を用いて密封した。2 本の注射針によって、バイアルのヘッドスペースを純粋な酸素でフラッシュした。次いでサンプルを暗所で保存した。

40

【0051】

固体のデルフィニジン含量(塩化デルフィニジンとして計算し、重量％で表す)を、上記 HPLC 法によって測定した。結果は下の表 3 である。

【表 6】

	経過時間[日数]				
	開始時	2	8	19	30
実施例3.1	1.69	1.52	1.55	1.40	0.93
実施例3.2	1.30	1.20	1.14	1.03	0.68
実施例3.3	1.60	1.59	1.56	1.53	1.15

【0052】

この結果は、本発明によれば、高い安定性を有し、純粋な酸素雰囲気下でさえ良好な保存寿命を有するデルフィニジン複合体が得られることを示す。複合体は、さらに、水溶液中で、より具体的には僅かに酸性の溶液中、良好な溶解度を有する。これにより、本発明によれば、様々な方法でデルフィニジンを製剤化することが可能となる。本発明の固体の安定性は、澱粉を含む製剤(実施例3.3)と同程度に良好であるが、この比較例は、水溶液中で製剤化できない。

【0053】

実施例5：水溶液中での安定性試験

デルフィニジン含有溶液中の塩化デルフィニジン含量を、上記と類似した逆相HPLC法を用いることによって測定した。逆相HPLC法には、下記の試薬を使用した：

精製水

クロマトグラフィー用メタノール

分析用蟻酸

容量測定用溶液としての1M 塩酸。

【0054】

使用したカラムは、Waters X Bridge(商標) C18, 35 μ l, 150mm $\times$ 4.6mmであった。

移動相は下記の通りであった：

チャンネルA：水(770ml)、メタノール(230ml)、蟻酸(10ml)

チャンネルB：水(50ml)、メタノール(950ml)、蟻酸(10ml)

【0055】

下記の濃度勾配プログラムを使用した：

【表 7】

時間[分]	%チャンネルB
0	0
5	0
20	20
25	100

停止時間：25分

ポストタイム：8分

流速：1ml/分

注入体積：20 μ l

カラム温度：30 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C

UV/VIS 検出器：アッセイ用530 μ m、不純物検出用275 μ m

積分：面積

【0056】

溶液およびサンプル調製：

希釈溶液1：100mlのメタノールおよび2.6mlの1M HClの混合物

希釈溶液2：100mlの50% メタノールおよび2.6mlの1M HClの混合物

校正溶液：デルフィニジン参照溶液は以下のとおり調製した：10mgの塩化デルフィニジ

ンを10mlのフラスコに秤量し、希釈溶液1に溶解した。それを溶解した後、希釈溶液2を用いて約10倍に希釈し、適切な濃度0.1mg/mlとした。

対照の較正溶液を同じ方法で調製した。塩化デルフィニジンは溶液中で不安定なため、較正溶液をすぐにHPLCによって分析した。

【0057】

試験溶液の調製：

本発明の水溶液のデルフィニジン含量を測定するために、1.584mg/ml(本発明の実施例)または0.0216mg/ml(比較例)の開始濃度(デルフィニジンに基づく)となるまで、実施例3.1のデルフィニジン/SBE- β -CD(本発明による)およびデルフィニジン(比較例)を0.9% NaCl溶液に溶解した。溶液は、室温で調製し、密閉バイアル中、暗所で37℃で保存した。

【0058】

1時間後、2時間後、3時間後および4時間後、デルフィニジン含量を測定した。下の表は、上記開始濃度に対するパーセンテージとして調べた含量を示す。

【表8】

時間	デルフィニジン, 非複合体	デルフィニジン/SBE- β -CD
0	100%	100%
1	8.3%	80.7%
2	6.5%	74.5%
3	5.6%	64.7%
4	5.1%	62.8%

サンプル中のデルフィニジン含量の決定は、記載された外部標準による較正を用いて、Agilent ChemStation softwareによって計算した。

【0059】

II. インビトロおよびインビボにおけるデルフィニジンおよびデルフィニジン/スルホエチル エーテル β -シクロデキストリンの消炎作用および抗炎症作用

実施例6：LPSのみで処置した細胞(対照)と比較した、デルフィニジンおよび/またはそのリポ多糖(LPS)との同時投与の予防的投与の細胞へのインビトロ有効性プロファイル

方法

健康な試験対象において、LPSおよび/またはデルフィニジンで刺激した後の単球の核中のNF κ B濃度を、NF κ Bについての免疫蛍光核染色によって分析し、不刺激細胞に対して表した。NF κ Bは様々な刺激、特に炎症性刺激およびストレス関連刺激によって活性化される。不活性NF κ Bタンパク質は、細胞基質において、IKBファミリーの阻害性タンパク質に結合し(Baeuerle and Baltimore, 1988, Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor, Cell (53), 211-7; Baeuerle and Baltimore, 1988, I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor, Science (242), 540-6)、様々なIKBメンバーの刺激依存性タンパク質分解は、NF κ Bの核移入を起こし(Ghosh et al., 1988, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, Annu Rev Immunol (16), 225-60)、そのため、細胞基質から核へのNF κ B移行の程度を測定することが、試験組成物の炎症性または抗炎症性作用を適切に検出する方法となる。

【0060】

下記の手順を行い、図1の左から右に示すが、細胞の刺激/インキュベーション(各場合で、1mlの指数関数的増殖相の100万個の細胞を含むRPMI-1640)は、37℃で、24ウェルのポリスチレン細胞培養皿のウェル中で行った。記載した濃度は最終濃度である。

【表 9】

“1.5時間 10 μ g LPS”	10 μ g/mlのLPSで1.5時間細胞を刺激(対照)
“24時間予備刺激 5 μ M Del-Cl; 1.5時間 10 μ g LPS”	5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で細胞を予備刺激24時間、次に10 μ g/ml LPSで1.5時間刺激
“1.5時間 5 μ M Del-Cl+10 μ g LPS”	10 μ g/ml LPSおよび5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で1.5時間細胞を刺激
“24時間予備刺激 5 μ M Del-Cl; 1.5時間 5 μ M Del-Cl”	5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で細胞を予備刺激24時間、次に新たな5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で1.5時間刺激
“24時間予備刺激 5 μ M Del-Cl; 1.5時間 5 μ M Del-Cl+10 μ g LPS”	5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で細胞を予備刺激24時間、次に新たな5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)および10 μ g/ml LPSで1.5時間刺激

10

20

【0061】

結果

図1から明らかな通り、LPSによる細胞免疫応答の刺激(弱)前24時間での5 μ M デルフィニジンの予防的投与は、その後の1.5時間のLPS媒介免疫応答を阻害する(“24時間予備刺激 5 μ M Del-Cl; 1.5時間 10 μ g LPS”対“1.5時間 10 μ g LPS”); 免疫応答の阻害は、LPSと組み合わせたデルフィニジンの同時投与の場合(“1.5時間 5 μ M Del-Cl+10 μ g LPS”)よりも低く、LPSの添加と合わせた5 μ M デルフィニジンの予防的および反復添加(“24時間予備刺激 5 μ M Del-Cl; 1.5時間 5 μ M Del-Cl+10 μ g LPS”)によって、さらに増大する(相加効果)。

30

【0062】

実施例7: LPSのみで処置した細胞(対照)と比較した、デルフィニジンまたはヒドロコルチゾンとりポ多糖(LPS)との同時投与の細胞へのインビトロ有効性プロファイル方法

実施例5の方法と類似の手順を行い、図2aおよび2bの左から右に示すが、細胞の刺激/インキュベーション(各場合で、1mlの指数関数的増殖相の100万個の細胞を含むRPMI-1640)は、37℃で、24ウェルのポリスチレン細胞培養皿のウェル中で行った。記載した濃度は最終濃度である。

【0063】

【表10】

40

図2a:

“1.5時間 10 μ g LPS”	10 μ g/ml LPSで1.5時間細胞を刺激(対照)
“1.5時間 5 μ M Del-Cl+10 μ g LPS”	10 μ g/ml LPSおよび5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で1.5時間細胞を刺激
“1.5時間 ヒドロコルチゾン+10 μ g LPS”	10 ⁻⁵ M ヒドロコルチゾンおよび10 μ g/ml LPSで1.5時間細胞を刺激

【0064】

50

【表 1 1】

図 2 b :

“1.5時間 10 μ g LPS”	10 μ g/ml LPSで1.5時間細胞を刺激(対照)
“1.5時間 10 μ M Del-Cl+10 μ g LPS”	10 μ g/ml LPSおよび10 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で1.5時間細胞を刺激

【0065】

結果

図 2 a から明らかな通り、細胞の L P S 媒介免疫応答は、5 μ M デルフィニジンの同時投与の場合(“ 1. 5 時間 5 μ M D e l - C l + 1 0 μ g L P S ”)、比較に使用するヒドロコルチゾンの添加(“ 1. 5 時間 ヒドロコルチゾン+1 0 μ g L P S ”)と少なくとも同様に阻害される。図 2 b に示した反復実験において、細胞の L P S 介在免疫応答は、1 0 μ M デルフィニジンの同時投与の場合(“ 1. 5 時間 1 0 μ M D e l - C l + 1 0 μ g L P S ”)、著しく減少することを確認した。

【0066】

実施例 8 : ヒドロコルチゾンで処置した細胞と比較した、変化させた濃度のデルフィニジンを使用したときのデルフィニジンの細胞へのインビトロ有効性プロファイル

方法

実施例 5 および 6 の方法と類似の手順を行い、図 3 の左から右に示すが、細胞の刺激／インキュベーション(各場合で、1 ml の指数関数的増殖相の 1 0 0 万個の細胞を含む R P M I - 1 6 4 0) は、3 7 °C で、2 4 ウェルのポリスチレン細胞培養皿のウェル中で行った。記載した濃度は最終濃度である。

【表 1 2】

“1.5時間 2.5 μ M Del-Cl”	2.5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で1.5時間細胞を刺激
“1.5時間 5 μ M Del-Cl”	5 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で1.5時間細胞を刺激
“1.5時間 10 μ M Del-Cl”	10 μ M 塩化デルフィニジン(RPMI-1640細胞培地に溶解)で1.5時間細胞を刺激
“1.5時間 ヒドロコルチゾン”	10 ⁻⁵ μ M ヒドロコルチゾンで1.5時間細胞を刺激

【0067】

結果

図 3 から明らかな通り、デルフィニジン濃度の増大に伴い、デルフィニジン媒介細胞免疫応答阻害(用量効果)も増大し、適切に高い濃度での阻害効果は、ヒドロコルチゾンの阻害効果に匹敵する。

【0068】

実施例 9 : デルフィニジンの血液脳関門に対する細胞保護作用(抗炎症作用／消炎作用)、より具体的には、デキサメタゾンと比較した、T N F α [腫瘍壊死因子 α] 処置後の c E N D 細胞または未処置細胞中のインビトロでの C c 1 7 [ケモカイン(C - C モチーフ)リガンド 7] の m R N A 発現に対するデルフィニジンの影響

方法

デルフィニジンの抗炎症作用を調べるために、血液脳関門、c E N D 細胞のインビトロモデルを使用した(Forster, C. et al., Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro System. J Physiol 565 (Pt 2), 475 (2005)). 当該インビトロモデルは、マウスの脳毛細血管から摘出し、不死化した微小血管内皮細胞からなる。細胞を、コラーゲンIV(脳毛細血

10

20

30

40

50

管周辺の基底膜の構成成分)でコートされた細胞培養容器に播種する。

【0069】

c E N D細胞の腫瘍壊死因子 α (T N F α)への曝露および炎症マーカーとしてC c l 7 m R N A発現の測定。抗炎症作用について選択された参照物質は、強い抗炎症作用を有する合成ステロイドホルモンであるデキサメタゾン、デキサメタゾンの作用に対するデルフィニジンの作用を、図4に示したグラフにプロットした。続いて、M c p - 3 (単球走化性タンパク質-3)としても知られる炎症促進性サイトカインであるC c l 7 (ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド7)のR N A単離およびq P C R分析を行った。

【0070】

下記の手順を行い、図4の左から右に示す。

【表13】

“未処置”	刺激しない対照
“dex”	デキサメタゾン
“Del-Cl 0.1 μ M”	デルフィニジン(0.1 μ mol)
“Del-Cl 1 μ M”	デルフィニジン(0.1 μ mol)
“TNF α 24時間”	TNF α に24時間曝露
“TNF α 48時間”	TNF α に48時間曝露
“TNF α 次にdex”	TNF α に24時間曝露、次にデキサメタゾン添加およびさらに24時間曝露
“TNF α 次にDel-Cl 0.1 μ M”	TNF α に24時間曝露、次にデルフィニジン(0.1 μ mol)添加およびさらに24時間曝露
“TNF α 次にDel-Cl 1 μ M”	TNF α に24時間曝露、次にデルフィニジン(1 μ mol)添加およびさらに24時間曝露

【0071】

結果

T N F α による処置は、未処置細胞と比較してC c l 7 m R N A発現量の2倍増加をもたらす。0.1 μ Mおよび1 μ Mの選択された2種の濃度のデルフィニジンの添加は、T N F α 誘発C c l 7 m R N A発現の異なる抑制または阻害をもたらす。興味深いことに、T N F α 曝露前の細胞培養培地へのデルフィニジンのみの添加も、c E N D細胞のC c l 7発現抑制をもたらす。比較として使用したデキサメタゾンの場合も同様に強い効果を検出した。

【0072】

測定結果から、炎症後の血液脳関門に対するデルフィニジンの抗炎症作用は、ここで“代表的”デキサメタゾンと少なくとも等価であることが結論付けられる。

【0073】

実施例10：血液脳関門のバリア特性に対するデルフィニジンの効果、より具体的にはT N F α [腫瘍壊死因子 α]処置後のc E N D細胞または未処置細胞中のインビトロでのタイトジャンクション構成タンパク質クロードイン-5のm R N A発現に対するデルフィニジンの影響

方法

障壁の堅固さについて使用される代理マーカーは、タイトジャンクション構成タンパク質クロードイン-5の発現(Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. Histochem Cell Biol. 2008; 130: 55-70)であり、その手順は実施例8と類似の手順で行った。

【0074】

結果

T N F α 処置が、クロードイン-5 m R N A発現減少を起こし、デルフィニジン添加

24時間後、図5に示された通り、2種の選択された濃度(0.1 μ Mおよび1 μ M)でのTNF α 介在クローディン-5 mRNA発現減少を相殺した。興味深いことに、TNF α 曝露前のデルフィニジン単独の細胞培養培地への添加も、クローディン-5 mRNA発現増大をもたらす。

【0075】

測定結果より、炎症後の血液脳関門のバリア特性は、デルフィニジンの影響下でかなり増大することが結論付けられる。

【0076】

実施例11：ラットの後肢のCFA(完全フロイントアジュバント)誘発炎症に対するデルフィニジン／スルホエチル エーテル β -シクロデキストリンのインビボでの影響

10

方法

a) ラットの後肢のCFA誘発炎症

CFAをイソフルラン麻酔下でラットの右後肢に150 μ lで足底投与して誘発する。炎症および炎症を起こした肢に生じる疼痛は、2～96時間以内に発症する。この時間点まで、未処置動物と比べて、食事パターン、体重、中核温または全般的活動レベルに有意な違いはない(Stein et al., Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds, Pharmacol Biochem Behav., 1988; 31(2): 445-51)。

【0077】

b) 異なる投与量でのH₂O(対照)およびデルフィニジン／スルホエチル エーテル β -シクロデキストリン(デルフィニジン／SE β CD)の投与

20

上記工程a)の96時間後、ラットに、イソフルラン麻酔下で、100 μ lのH₂O(対照)または異なる投与量の100 μ lのデルフィニジン／SE β CD(2.50 mg/mlおよび5.00 mg/ml)を、右後肢の足底に注射する。

【0078】

c) 疼痛計測定法

ラットを下記の通り対応する実験条件下に馴化させた：

ランダル・セリット試験への馴化のため、動物を、実験状況下に馴らすために、最初の3日間は1日3回ウッドパルプの下でリラックスさせた。

【0079】

30

上記処置工程b)を4日目に行い、注射後の時間点ゼロから開始して、5分後、15分後、30分後、60分後、120分後および240分後に、脚圧力閾値をランダル・セリット試験(Ugo Basileの装置)によって測定した。

【0080】

同じ側および反対側の足それぞれを、少なくとも10秒の間隔で3回測定する。ランダル・セリット試験において、ラットをウッドパルプの下でリラックスさせ、足を小さいプラットホームに置く。次いで、ラットが足を引くまで、刻印機を介して脚に上側から圧力を上げながらかける(Stein et al., Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin, J Neurosci. 1990; 10(4): 1292-8; Rittner et al., Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells, FASEB J. 2006; 20(14): 2627-9)。

40

【0081】

結果

ラットの足におけるFAC誘発炎症性刺激に関して、機械的疼痛閾値を調べた。図6に示した足の圧力の閾値より、デルフィニジン／SE β CDを投与したとき、より具体的には最初の120分で、H₂Oでの対照注射よりも著しく軽減し、デルフィニジン／SE β CDの投与後5分で最も強い効果を示すことが推測できる。これを2.5 mg/mlおよび5.00 mg/mlのデルフィニジン／SE β CDの2種の用量の測定に適用すると、同様に、最初の30分の測定点で、より高い濃度で、かなり強い効果があることから、用量依存性

50

が推測できる。

【0082】

実施例 1 2：デルフィニジン／スルホブチル エーテル β -シクロデキストリン(デルフィニジン S B E C D)による心保護

方法および結果

実施例 1 1 において、デルフィニジン S B E C D のポストコンディショニングの潜在的な効果を対照群と比較して調べた。この目的のために、Redel et al., 2008 [Redel et al., Impact of Ischemia and Reperfusion Times on Myocardial Infarct Size in Mice In Vivo. Experimental Biology and Medicine (2008), 233:84-93] および Stumpner et al., 2012 [Stumpner et al., Desflurane-induced post-conditioning against myocardial infarction is mediated by calcium-activated potassium channels: role of the mitochondrial permeability transition pore. British Journal of Anaesthesia (2012), 108(4): 594-601] に記載された方法を使用した、インビボでの図 7 および図 9 に示した経過時間でのインサイツ心筋梗塞モデルにおいて、得られた梗塞サイズを評価し、図 10 に図示した。図 10 は、平均値 $\pm$ S E M で示し；I S = 梗塞サイズ；A A R = リスク領域、および、* = 対照群と有意に異なるもの。p < 0. 0 5。データを平均値 $\pm$ 平均値の標準誤差 (S E M) として示す。

【0083】

図 10 に示された I S および % A A R の値より、デルフィニジン S B E C D の投与が、対照群に対して梗塞サイズの著しい減少をもたらすことが推測できる。

【図 1】

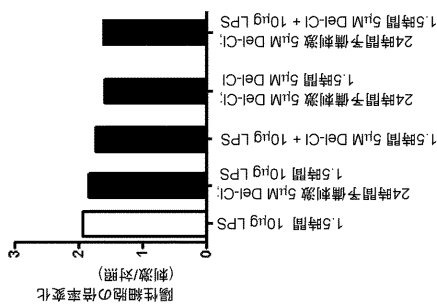


FIG. 1

【図 2 a】

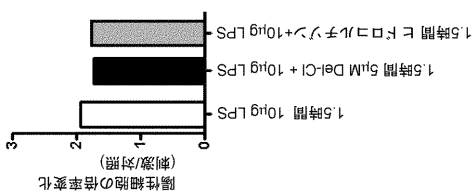


FIG. 2a

【図 2 b】

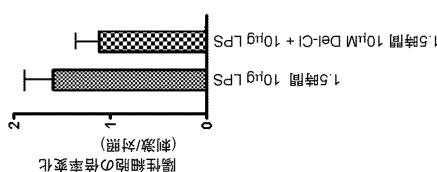


FIG. 2b

【図 3】

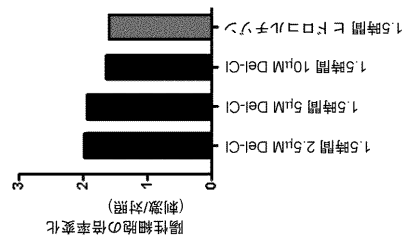


FIG. 3

【図 4】

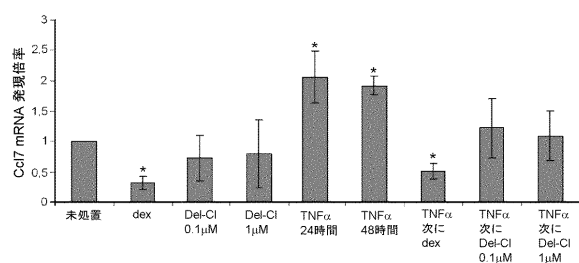


FIG. 4

【図 5】

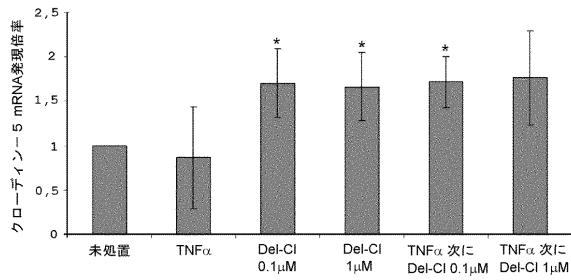


FIG. 5

【図 6】

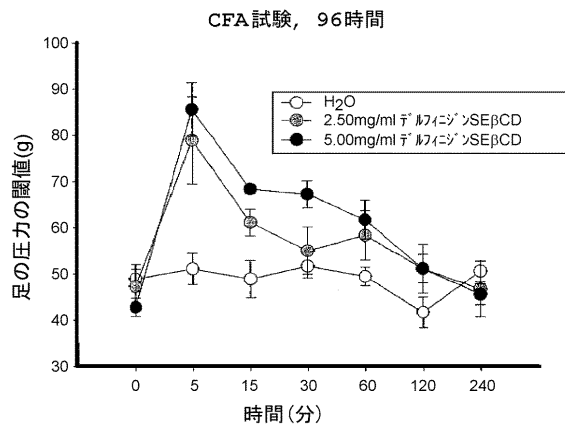


FIG. 6

【図 7】

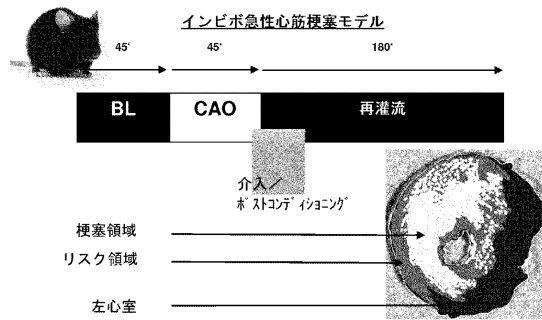


FIG. 7

【図 8】

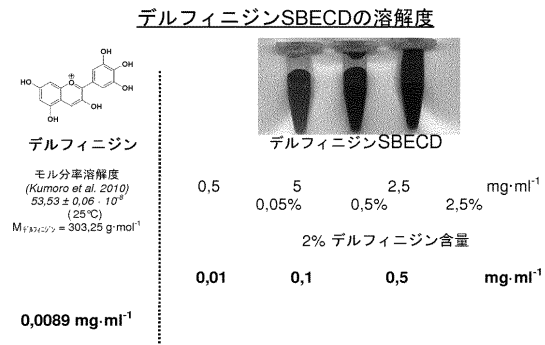


FIG. 8

【図 9】

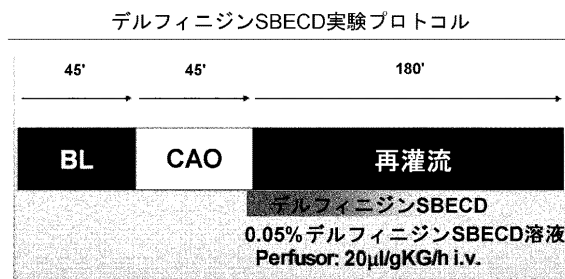


FIG. 9

【図 10】

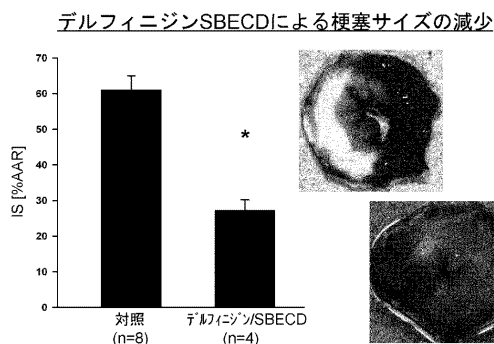


FIG. 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	33/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P 33/06
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/24
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
C 0 7 D	311/62	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
C 0 8 B	37/16	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
			C 0 7 D 311/62
			C 0 8 B 37/16

- (72)発明者 ノルベルト・レーヴァー
 ドイツ97082ヴェルツブルク、ニコラウスシュトラッセ20番
- (72)発明者 イェンス・プロシャイト
 ドイツ97209ヴェルツブルク、ケルツェンライテ35番

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 韓国公開特許第10-2007-0028640 (KR, A)
 国際公開第2008/126979 (WO, A1)
 特表2010-539193 (JP, A)
 特表平06-511513 (JP, A)
 特表2005-530744 (JP, A)
 特開2004-238336 (JP, A)
 米国特許出願公開第2011/0224168 (US, A1)
 特表2015-534970 (JP, A)
 BERTUGLIA S, PHARMACOLOGICAL RESEARCH, 英国, ACADEMIC PRESS, 1990年 9月 1日, V 22, P52
 SCARABELLI TIZIANO M, FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER, 2009年 2月 4日, V583 N3, P531-541
 UEDA H, DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, 米国, 1998年 9月 1日, V24 N9, P863-867

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 9/00-9/72
 A 6 1 K 31/00-33/44
 A 6 1 K 47/00-47/69
 WPI
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)

