

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6820323号
(P6820323)

(45) 発行日 令和3年1月27日 (2021.1.27)

(24) 登録日 令和3年1月6日 (2021.1.6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/736 (2006.01)

A 6 1 K 31/736

A 6 1 K 31/7048 (2006.01)

A 6 1 K 31/7048

A 6 1 P 9/12 (2006.01)

A 6 1 P 9/12

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 11/02 (2006.01)

A 6 1 P 11/02

請求項の数 15 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-514846 (P2018-514846)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月17日 (2016.9.17)
 (65) 公表番号 特表2018-532724 (P2018-532724A)
 (43) 公表日 平成30年11月8日 (2018.11.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2016/055565
 (87) 国際公開番号 WO2017/046777
 (87) 国際公開日 平成29年3月23日 (2017.3.23)
 審査請求日 平成30年5月16日 (2018.5.16)
 (31) 優先権主張番号 918/MUM/2015
 (32) 優先日 平成27年9月19日 (2015.9.19)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 インド (IN)

(73) 特許権者 510294405
 インダス バイオテック プライベート
 リミティド
 インド国, マハーラーシュトラ 411
 O48, プネー, コンドウ, オフ サルン
 ケ ビハル ロード, ラフル レジデンス
 ー, 1, プロット ナンバーズ 6 アン
 ド 7
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組成物及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

任意で医薬的に許容される賦形剤を共に、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維からなる組成物であって、ここで、該トリゴフォエノシド、該ピテキシン、該イソピテキシン、該ピテキシン-2-o-ラムノシド及び該ピセニン-1が、一緒に約8% w/w～約31% w/wの範囲の濃度を有し；該繊維が、約69% w/w～約92% w/wの範囲の濃度で存在し、該トリゴフォエノシドが、0.1% w/w～8% w/wの範囲の濃度で存在し；該ピテキシンが、0.5% w/w～5% w/wの範囲の濃度で存在し；該イソピテキシンが、0.5% w/w～7% w/wの範囲の濃度で存在し；該ピテキシン-2-o-ラムノシドが、0.5% w/w～7% w/wの範囲の濃度で存在し；該ピセニン-1が、0.5% w/w～4% w/wの範囲の濃度で存在し；及び該繊維が、69% w/w～92% w/wの範囲の濃度で存在する、組成物。

【請求項 2】

任意で医薬的に許容される賦形剤を共に、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維からなる組成物を得るための方法であって、前記方法が、

a) 該組成物のフレーク状原料を、第1の溶媒で抽出して第1の抽出されたフレーク状原料を得る工程；ここで、その原料が、トリゴネラフォエナムグラエカム由来であり、前記第1の溶媒が、n-ヘキサン、n-ペンタン及びn-ヘプタンを含む群から選択される脂肪族化合物であり；

b) 該第1の抽出されたフレーク状原料を酢酸エチルで処理して第2の抽出されたフレーク状原料を得る工程；

c) 該第2の抽出されたフレーク状原料をn-ブタノールで再抽出して透明な抽出物を得る工程；

d) 該透明な抽出物を濃縮して固体塊を得る工程；

e) 該固体塊を脱イオン水に溶解して透明な溶液を得る工程；

f) 吸着剤を溶媒で再生・洗浄して、再生・洗浄した吸着剤を得る工程；

g) 該透明な溶液を再生・洗浄した吸着剤に通し、該吸着剤を溶媒で再洗浄し、アルコール溶媒で溶出して溶出液を得る工程；及び

h) 該溶出液を濃縮し、任意で医薬的に許容される賦形剤を加えて該組成物を得る工程からなり、ここで、該吸着剤がAmberlite XAD-16である、方法。

10

【請求項3】

該第1の溶媒による抽出が、約25 ～ 約30 の範囲の温度で、約3.8時間～約4.2時間で実施される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

該酢酸エチルによる処理が、約26 ～ 30 の範囲の温度で実施される、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

溶媒ブタノールによる抽出が、約22 ～ 約27 の範囲の温度で、約7時間～約9時間の範囲の時間で実施される、請求項2に記載の方法。

20

【請求項6】

該濃縮が、真空濃縮によって実施される、請求項2に記載の方法。

【請求項7】

該吸着剤を洗浄するための該溶媒が、イソプロピルアルコール、エタノール及び脱イオン水、又はそれら何れかの組み合わせを含む群から選択され；ここで、該吸着剤を再洗浄するための該溶媒が、塩化ナトリウム生理食塩水及び水、又はそれらの組み合わせを含む群から選択され；及びここで、前記アルコール溶媒が、エタノール及びイソプロピルアルコールを含む群から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項8】

任意で医薬的に許容される賦形剤を共に、治療有効量のトリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維からなる組成物を含む、低酸素症、肺高血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される疾患を処置するための組成物であって、ここで、該トリゴフォエノシド、該ピテキシン、該イソピテキシン、該ピテキシン-2-o-ラムノシド及び該ピセニン-1が、一緒に約8% w/w～約31% w/wの範囲の濃度を有し；該繊維が、約69% w/w～約92% w/wの範囲の濃度で存在し、該トリゴフォエノシドが、0.1% w/w～8% w/wの範囲の濃度で存在し；該ピテキシンが、0.5% w/w～5% w/wの範囲の濃度で存在し；該イソピテキシンが、0.5% w/w～7% w/wの範囲の濃度で存在し；該ピテキシン-2-o-ラムノシドが、0.5% w/w～7% w/wの範囲の濃度で存在し；該ピセニン-1が、0.5% w/w～4% w/wの範囲の濃度で存在し；及び該繊維が、69% w/w～92% w/wの範囲の濃度で存在する、組成物。

30

40

【請求項9】

該医薬的に許容される賦形剤が、ガム、造粒剤、結合剤、潤滑剤、崩壊剤、甘味料、添加剤、溶媒、滑剤、付着防止剤、帯電防止剤、抗酸化剤、界面活性剤、粘度増強剤、植物性セルロース材料、着色剤、香味剤、コーティング剤、可塑剤、防腐剤、懸濁化剤、乳化剤及び球状化剤又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】

該医薬的に許容される賦形剤が、ガム、造粒剤、結合剤、潤滑剤、崩壊剤、甘味料、添加剤、溶媒、滑剤、付着防止剤、帯電防止剤、抗酸化剤、界面活性剤、粘度増強剤、植物性セルロース材料、着色剤、香味料、コーティング剤、可塑剤、防腐剤、懸濁化剤、乳化

50

剤及び球状化剤又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される請求項2に記載の方法。

【請求項 1 1】

該組成物が、固体経口製剤、液体経口製剤、吸入製剤、経鼻製剤、非経口製剤、フィトスーティカル(phytoceutical)、栄養補助食品及び食品、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される剤型に製剤化される、請求項8に記載の組成物。

【請求項 1 2】

該固体経口製剤が、錠剤、カプセル、トローチ、ロゼンジ、分散性粉末、分散性顆粒、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され；該液体経口製剤が、水性若しくは油性懸濁液、乳濁液、ドロップ、硬質若しくは軟質ゲルカプセルの乳濁液、シロップ、エリキシル、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され；該非経口製剤が、静脈内注射、筋肉内注射、筋肉内デポ、皮下注射、経皮注射、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され；該吸入製剤が、吸入器、ドライパウダー吸入器、噴霧器、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され；及び該経鼻製剤が、点鼻薬、鼻スプレー、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される、請求項11に記載の組成物。

10

【請求項 1 3】

該組成物が、前記被験体の体重の約1mg/kg～約100mg/kgの範囲の用量で投与される、請求項8に記載の組成物。

【請求項 1 4】

該組成物が、前記被験体の体重の約1 µg/kg～約100 µg/kgの範囲の用量で、噴霧器又は吸入器を用いて投与される、請求項8に記載の組成物。

20

【請求項 1 5】

該被験体が、ヒトを含む哺乳動物である、請求項8に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、広義には、植物化学、バイオテクノロジー及び生化学の分野に関する。特に、本開示は、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-*o*-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤と共に含む組成物、及び前記化合物を調製する方法に関する。本開示はまた、前記組成物を用いて低酸素症、肺高血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎等の様々な状態を処置する方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

植物化学物質が豊富である、フェヌグリーク(トリゴネラフォエナムグラエカム)(*Trigonella foenum-graecum*)は、伝統的に食物、飼料及び薬用植物として使用されてきている。フェヌグリークは、アーユルヴェーダと中国医学で長い歴史があり、分娩誘発、消化補助を含む多くの効能のために用いられ、及び代謝と健康を改善する一般的な強壮剤として用いられている。

【0003】

フェヌグリークは、その化学成分が豊富である。フェヌグリーク種子は約45～60%の炭水化物、主に粘性性の繊維(ガラクトマンナン)；リシン及びトリプトファンが多いタンパク質；脂質等の不揮発性油；主にトリゴネリン、コリン、ゲンチアニン、及びカルパイン等のピリジン型アルカロイド；アピゲニン、ルテオリン、オリエンチン、ケルセチン、ピテキシン、及びイソピテキシン等のフラボノイド；4-ヒドロキシイソロイシン、アルギニン、ヒスチジン及びリシン等の遊離アミノ酸；カルシウム及び鉄；加水分解でステロイド性サポゲニンを産生するグリコシドのようなサポニン(例えば、ジオスゲニン、ヤモゲニン、チゴゲニン、ネオチゴゲニン)；コレステロール及びシトステロール；ビタミンA、B1、C、及びニコチン酸；*n*-アルカン及びセスキテルペン等の揮発性油；及びラフィノース、スタキオース、スクロース、フルクトース、マンノース、ベルバスコース及びキシロ

40

50

ース等の糖類、を含む。種子はまた、サポニンフェヌグリンB及びクマリン化合物を含む。種子はまた、固定された悪臭油約8%を含む。いくつかのC-グリコシドフラボンはまた、フェヌグリークの種子で同定されている。これらには、ピテキシン、ピテキシングリコシド、及びオリエチン（イソオリエンチン）のアラビノシド、微量のステロイド性サポゲニン（フェヌグリーキン、スミラゲニン、サルササポゲニン、ユッカゲニン）、及び最大50%の粘液性の繊維が含まれる。

【0004】

これらの異なる化学成分は、多様な治療効果を示した。ステロイドサポゲニンペプチドエステルであるフェヌグリーキンと呼ばれる成分は、血糖降下特性を有し、膵臓機能の改善を示した。それは、胃内容排出を遅延させ、炭水化物吸収を緩やかにし、ヒトにおいてグルコース輸送を阻害することを補助する。トリゴネリンは、糖尿病でない健常な患者に血糖降下効果を発揮することが示唆される。ステロイドサポニン（ジオスゲニン、ヤモゲニン、チゴゲニン及びネオジゴゲニン）は、コレステロールの吸収及び合成を阻害し、従って、動脈硬化における、その潜在的役割が考えられている。炎症を治療するため局所的に、及び動物の産後乳分泌を促進するために使用される。現在、ステロイドサポゲニンであるジオゲニンは、避妊薬の製造において用いられる。植物フェノール類は、主に、活性酸素種（ROS）の掃去及び阻害、求電子剤の除去及び金属キレート化等の抗酸化特性のために、潜在的な健康上の利点を有する。それらはまた、抗腫瘍、抗ウイルス、抗菌、抗炎症、低血圧及び抗酸化活性等の薬理作用を示すことが報告されている。

【0005】

そのため、フェヌグリークは、様々な化学成分及び治療活性のため研究される。フェヌグリークは、オーストリア、フランス、ドイツ、ギリシャ、ポルトガル、ロシア、スペイン、スイス、トルコ、イギリス（英国）等のヨーロッパ各地；エジプト、エチオピア、ケニア、モロッコ、スーダン、タンザニア及びチュニジア等の北アフリカ各地；中国、インド、イラン、イスラエル、日本、レバノン及びパキスタン等の西及び南アジア各地；北アメリカ及び南アメリカ、及びオーストラリアで栽培作物として報告されている。

【0006】

植物の成長及び分布は、環境要因によって制限される。植物の生育及び植物化学物質分布に影響を及ぼす環境面は、光、温度、水（湿度）、栄養である。これら環境条件は、世界各地の地理的位置によって異なる。それらは、植物の成長、有効成分の量と質の見地における化学物質の分布及び遺伝的多様性上においても顕著な効果を示した。

【0007】

しかしながら、開発途上国の人々のニーズがますます高まっているため、いくつかの用途のために、フェヌグリークのような生物学的資源における有用な特定成分を同定及び単離する必要がある。

【0008】

酸素は生物にとって必要不可欠である。炭水化物及び脂肪酸は、動物細胞においてATPを生成するための最も重要な燃料である。動物細胞の呼吸は酸素に依存する。燃料源の化学結合からの電子は、酸素及び水素イオンと結合して水及び二酸化炭素を形成する。細胞は、この反応をATPの産生に結び付ける。ATP形態の高エネルギーリン酸塩は、細胞内の多くの合成及び分解プロセスに必要とされる。これらには、膜輸送、タンパク質合成、脂質生成、及びリン脂質ターンオーバーのための脱アシル化-再アシル化反応が含まれる。体機能は、血液や空気中の酸素レベルが低いことによる影響を受ける。最終的に、この減少した空気及び血流は、肺を通る酸素輸送に影響を及ぼす。肺の酸素レベルの低下は、動脈及び静脈に高い圧力をもたらし、組織の瘢痕化及び異常な動脈・静脈血圧に至る。

【0009】

ATPの長期枯渇又は増加した枯渇に伴い、タンパク質合成器官の崩壊が起こり、粗面小胞体からのリボソームの脱離及びポリソームからモノソームへの解離をもたらし、結果としてタンパク質合成が減少する。最終的に、ミトコンドリア膜及びリソソーム膜に不可逆的な損傷が起こり、細胞は壊死に至る。

【 0 0 1 0 】

低酸素症は、身体又は身体の一部が、適切に酸素供給されていない病的状態である。酸素レベルが長期間低い場合、肺動脈が収縮し、その壁が厚くなる。この収縮及び肥厚は、肺動脈内の圧力を増加させる。肺組織を損傷又はその量減少させる肺疾患（例えば肺気腫）はまた、肺の血管数を減少させる。血管数が減少すると、残りの血管の圧力が上昇して肺高血圧症に至る。

【 0 0 1 1 】

肺高血圧症（PAH）は、肺動脈の血圧が正常レベルをはるかに上回り、生命を脅かす可能性のある稀な肺障害である。これは、末端の肺動脈循環の血管リモデリングによって特徴付けられる。PAHで見られるリモデリングには、肺血管内皮細胞のアポトーシス及び増殖の両方、細胞外マトリックスタンパク質の沈着、及び血管周囲炎症が含まれる。

10

【 0 0 1 2 】

増加した肺静脈圧は、典型的には、心臓の左側に影響を及ぼし、左室圧を上昇させる障害によって引き起こされ、最終的には肺静脈の圧力上昇につながる。上昇した肺静脈圧は、肺胞-毛細血管壁及びその後の浮腫に急な損傷を引き起こす可能性がある。持続的な高圧は、最終的に肺胞-毛細管膜の壁の不可逆的な肥厚をもたらす、肺拡散能力を低下させる可能性がある。殆どの患者において、肺高血圧は最終的に右心室肥大に至り、次いで拡張及び右心室不全を引き起こす。右心室不全は、運動中の心拍出量を制限する。

【 0 0 1 3 】

肺線維症（PF）は、肺の癒着化を指す。肺線維症は肺血管リモデリングと関連し、肺高血圧の発症を促進する。これは、肺胞の壁の肥厚（肺胞と呼ばれる）が組織を傷つけることによって引き起こされ、酸素が血液に入りにくくする肺疾患の群を表す。低酸素レベル（及び硬い癒着組織そのもの）は、特に歩行と運動時に息切れを引き起こす可能性がある。肺線維症は、肺への識別可能な刺激によって引き起こされ得るが、多くの場合、その原因は不明である。

20

【 0 0 1 4 】

気道粘液の過分泌は、粘膜毛様体のクリアランスの障害及び細菌重複感染を経て呼吸不全をもたらす。気道における粘液マトリックス形成ムチンファミリーの主成分は、MUC5AC及びMUC5Bである。粘液の主成分は、粘性、粘着性、及び弾力性を特徴とする気道分泌物を提供する、多量の、高度にグリコシル化されたタンパク質（ムチン）である。

30

【 0 0 1 5 】

活性化された好中球から放出された反応性酸素種（ROS）は、ヒト肺粘膜表皮細胞株における表皮増殖因子受容体のトランス活性化を介してムチンMuc5ac合成を引き起こす。さらに、好中球エラスターゼは、酸化体依存性機構によって、培養ヒト気管支上皮細胞におけるMuc5acの過剰発現を誘導する。副鼻腔炎において、Muc5ac遺伝子によって形成されるムチンが上気道で詰まり、そこで、頬骨(chick bones)及び額が粘液分泌の影響を受ける。

【 0 0 1 6 】

急性副鼻腔炎において、感染は急速(数日にかけて)に進行し、短時間持続する。急性副鼻腔炎の多くの症例は1週間ほどで終わるが、2～3週間持続することは珍しいことではない（すなわち、ほとんどの風邪より長く続く）。時にはより長く持続する。4～30日持続する場合、副鼻腔炎は、急性と呼ばれ、4～12週間持続すると亜急性と呼ばれる。しかしながら、慢性副鼻腔炎では、副鼻腔炎は持続的になり、12週間以上持続する。

40

【 0 0 1 7 】

現在の治療法

PAHの現在の治療法は、1) PDE5を阻害する、2) エンドセリンを拮抗する、又は3) プロスタグランジン経路を外因性プロスタサイクリンで補う薬剤を含む。これらの治療は、PAH患者の寿命の延長と日常生活の活動の改善をもたらすが、肺血管構造を不可逆的に改変する進行中の細胞増殖性プロセスを停止させず、肺移植に至る。

【 0 0 1 8 】

50

肺リハビリテーション - 肺リハビリテーションは、極度の息切れなしで働くために患者の能力を回復させることを目的として、PF及び低酸素症を含む慢性肺疾患を有する人々のための構造化された運動プログラムである。典型的に、肺リハビリテーションは、コンディショニング；運動訓練及び呼吸訓練；不安、ストレス、及び感情的な管理；栄養カウンセリング；教育；及びその他の要素、を含み得る。

【0019】

肺移植 - 現在、肺線維症は、米国における肺移植の主要な適応症であり、2013年にPFは、実施された全ての肺移植のほぼ半分を占めた。移植は、その他の重大な健康上の問題がない患者の寿命及び生活の質を改善することができる。

【0020】

N-アセチルシステイン(NAC)：NACは天然に存在する抗酸化剤である。過去には、NACはいくつかの形態のPFで生じる「酸化傷害」から肺を保護するのに役立つと考えられていた。2014年に、NACが、特発性肺線維症(IPF)に実質的に有益な影響を及ぼさなかったことが臨床試験によって判明した。

【0021】

ニンテダニブ(オフエブ(登録商標))：ニンテダニブは、米国でIPFを治療するために承認された抗線維性薬物である。臨床試験において、ニンテダニブは軽度から中等度のIPFにおける肺機能の低下を遅らせることが示されている。1日2回経口投与される。

【0022】

これらの治療は、PF患者の寿命及び日常生活の活動を改善するが、ILD又はPF及び肺移植に至る空気袋及び気道に影響を及ぼす肺組織の瘢痕化を停止させない。

【0023】

痛みや発熱を和らげるために、パラセタモールやイブプロフェン等の副鼻腔炎用；鼻詰まりを和らげるために、鼻づまり薬及び生理食塩水の鼻スプレー等のオーバーザカウンター(over-the-counter)薬がある。これらの薬物は即時に症状を和らげるが、上気道における粘液形成を止めることは出来ない。副鼻腔炎を引き起こす粘液の形成及び鼻づまりを止める方法によって、疾患の進行を防ぐことが出来る薬物を開発する必要がある。

【0024】

先行技術：

CN103304605 Aは、高速向流クロマトグラフィー(HSCCC)分離技術による、フェヌグリークからフラボノイドグリコシド及びスチルベングルコシドタイプの化合物を調製する方法を開示し、そのため、分離時間が効果的に短縮され、従来の製造方法の複雑な操作、試料脱吸着損失、低収率等の欠点を克服することができる。この方法によれば、この技術は単純であり、再現性が高く、分離効率が高い；及び得られたモノマー含量は、96.0%より高い。この文献は、グリコシド及びグルコシドを得るための効率的なプロセスを中心題目とされている。

【0025】

WO 2009121155 A2は、うつ病及びうつ病に関連する疾患、恐怖症、注意力欠如、薬物乱用、行動不適応、パーキンソン病、アルツハイマー病及び片頭痛等のモノアミンオキシダーゼに関連する疾患、機能不全及び障害の治療に有用な医薬の製造において、式(1)のベンゾピラノン化合物が開示されている。さらにより特定の実施形態において、この疾患は、他の抗うつ剤による従来の治療に応答しない主要なうつ病又はうつ症状を含む。

【0026】

CN 103923074 Aは、フェヌグリークからピテキシン及びトリゴネリンを抽出する方法を開示している。この方法は、特定量のフェヌグリーク種子及びフェヌグリーク葉から、20%~35%の収率でピテキシン及びトリゴネリン含有水抽出物を得る様々な工程を含む。このプロセスは、ピテキシン及びトリゴネリンの抽出速度を増加させ、また、ピテキシン及びトリゴネリンの抽出純度を改善する。そのため、この文献は主に、特許取得プロセスによってより純粋な形態のトリゴネリン及びピテキシンを得ることに焦点を当てている。

【0027】

CN 102920727 Aは、ピテキシンラムノシド及びピテキシングルコシドに富む抽出物を調製するための方法を提供し、サンザシ葉の生薬抽出の分野に関する。この方法によれば、ピテキシンラムノシドは抽出物の30%～55%を構成し、ピテキシングルコシドは抽出物の10%～35%を構成する。この文献は、高純度の2つの成分を得ることに焦点を当てている。

【0028】

Lamia Yacoubi et al (2011年9月)は、ラットにおいてプレオマイシン誘導性肺線維症の阻害のためにフェヌグreek (Trigonella foenum-graecum Linnaeus)、及びそのフェノール抽出物を、試験した。線維症の増加との関係は見いだされないが、肺線維症における炎症と直接的な役割が無い可能性が示唆される。このデータは、直接的に、フェヌグreekのポリフェノールが、強力な抗酸化活性を有し、従って、ラットにおいてプレオマイシン誘導性モデルに対して強力な抗炎症活性を有することを示しており、間接的に、炎症以外に、おそらく他の因子が肺線維症の病因に干渉することを確認させる。

【0029】

Madhesh Murugesan et al (2011年9月)は、フェヌグreekの投与は、ラットのイソプロテレノール誘導性心筋梗塞の罹患中に心筋損傷の程度を低減することに有効であり、酸化ストレスを有意に中和することを明らかにしている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0030】

【特許文献1】CN103304605 A

【特許文献2】WO 2009121155 A2

【特許文献3】CN 103923074 A

【特許文献4】CN 102920727 A

【非特許文献】

【0031】

【非特許文献1】Lamia Yacoubi et al (September, 2011)

【非特許文献2】Madhesh Murugesan et al (September, 2011)

【0032】

しかしながら、先行技術の何れも、単独又は組み合わせで、酸素レベルが、正常より低くなることによって、低酸素症、肺高血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎等の疾患を引き起こす肺における酸素障害を引き起こす病症を治療するための組成物を教示していない。病気の進行を止めるだけでなく、臓器が移植の段階に傷つくことを防ぐ、安全で効果的な管理体制を開発する必要がある。

【0033】

故に、本開示は、従来技術において見られる様々な欠点を克服し、限定されないが、フェヌグreek等の原料から特定の活性成分を有する組成物に到達し、且つ、アミノ酸、アルカロイド、サポニン等の他の全ての有効成分を除去する方法を提供する。本開示の組成物は、限定されないが、低酸素症、肺血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎等の状態を管理することに有効である。

【0034】

開示の説明

従って、本開示は、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセネン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤、を含む組成物；トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセネン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤、を得るための方法に関連し；前記方法は、(a) 組成物のフレーク状原料を、第1の溶媒で抽出して第1の抽出物を得る工程、(b) 第1の抽出物を第2の溶媒で処理して第2の抽出物を得る工程、(c) 第2の抽出物を第3の溶媒で再抽出して透明な抽出物を得る工程、(d) 透明な抽出物を濃縮して固体塊を得る工程、(e) 固体塊を水性溶媒に溶解して透明な溶液を得る工程、(f) 吸着剤を再生・洗

浄して、再生・洗浄した吸着剤を得る工程、(g)透明な溶液を再生し洗浄した吸着剤に通し、吸着剤を溶媒で再洗浄し、アルコール溶媒で溶出して溶出液を得る工程、及び(h)溶出液を濃縮する工程及び任意で医薬的に許容される賦形剤を加えて組成物を得る工程の行為を含み；低酸素症、肺高血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎、又はそれらの何れかの組み合わせ、を含む群から選択される疾患を処置する方法、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤を共に含む組成物を、それを必要とする被験体に投与する行為を含む前記方法に関する。

【0035】

開示が容易に理解され、実用的にされるように、添付図面を参照して例示される典型的な実施形態を参照する。以下の詳細な説明と共に図面は、本明細書に組み込まれ、本開示に従って、実施形態をさらに説明し、様々な原理及び利点を説明する役割を果たす。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1a】図1aは、一実施形態による、本組成物中のトリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1の存在を示すHPLCグラフである。

【図1b】図1bは、一実施形態による、本組成物中のトリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1の存在を示すHPLCグラフである。

【図2a】図2aは、標準的なトリゴフォエノシドのHPLCグラフを示す。

【図2b】図2bは、標準的なピセニン-1のHPLCグラフを示す。

【図2c】図2cは、標準的なピテキシン-2-o-ラムノシドのHPLCグラフを示す。

【図2d】図2dは、標準的なピテキシンのHPLCグラフを示す。

【図2e】図2eは、標準的なイソピテキシンのHPLCグラフを示す。

【図3】図3は、一実施形態による、末梢血酸素含量（パルスOx）におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図4】図4は、一実施形態による、呼吸回数（f）におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図5】図5は、一実施形態による、エンハンスドポーズ（ P_{enh} ）におけるMCT誘導変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図6a】図6aは、右心室 dP/dt_{min} におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図6b】図6bは、一実施形態による、右心室 dP/dt_{max} におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図7a】図7aは、収縮力指数におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図7b】図7bは、一実施形態による、タウにおけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図8】図8は、一実施形態による、プレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の影響を吸気時間（ T_i ）で示すグラフである。

【図9】図9は、一実施形態による、呼気時間（ T_e ）におけるプレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果を示すグラフである。

【図10】図10は、一実施形態による、プレオマイシン誘導性変化のエンハンスドポーズ（ P_{enh} ）における本組成物の効果を示すグラフである。

【図11】図11は、一実施形態による、プレオマイシン誘導性変化の末梢血酸素含有量（パルスOx）における本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図12】図12は、一実施形態による、肺におけるMuc5ac mRNA発現のプレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【図13】図13は、一実施形態による、肺におけるNF- κB mRNA発現のプレオマイシン誘

10

20

30

40

50

導性変化に対する本組成物の効果を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0037】

本開示は、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-*o*-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤を共に含む組成物に関する。

【0038】

本開示はまた、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-*o*-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤を共に含む組成物を得る方法であって、前記方法は、

- a) 組成物のフレーク状原料を第1溶媒で抽出して第1抽出物を得る工程；
- b) 第1の抽出物を第2の溶媒で処理して第2の抽出物を得る工程；
- c) 第2の抽出物を第3の溶媒で再抽出して透明な抽出物を得る工程；
- d) 透明な抽出物を濃縮して固体塊を得る工程；
- e) 固体塊を水性溶媒に溶解して透明な溶液を得る工程；
- f) 吸着剤を再生・洗浄して、再生・洗浄した吸着剤を得る工程；
- g) 透明な溶液を再生し洗浄した吸着剤に通し、吸着剤を溶媒で再洗浄し、アルコール溶媒で溶出して溶出液を得る工程；及び
- h) 溶出液を濃縮する工程及び任意で医薬的に許容される賦形剤を加えて組成物を得る工程、の行為を含む。

【0039】

本開示の一実施形態において、前記原料材料は、植物原料、好ましくは、*Trigonella foenum graecum*由来である。

【0040】

本開示の別の実施形態において、第1の溶媒による抽出が、約25 ~ 約30、好ましくは約25 ~ 約27の範囲の温度で、約3.8時間 ~ 約4.2時間、好ましくは約4時間の時間で実施され；前記第1の溶媒は、*n*-ヘキサン、*n*-ペンタン及び*n*-ヘプタンを含む群から選択される脂肪族化合物、好ましくは、*n*-ヘキサンである。

【0041】

本開示のさらに別の実施形態において、第2の溶媒による処理が、約26 ~ 約30、好ましくは、約27 ~ 約29の範囲の温度で実施され、前記第2の溶媒は、酢酸エチルである。

【0042】

本開示のさらに別の実施形態において、第3の溶媒による抽出が、約22 ~ 約27、好ましくは約22 ~ 約25の範囲の温度で、約7時間 ~ 約9時間の範囲、好ましくは約8時間の時間で実施され；及び前記第3の溶媒は、*n*-ブタノールである。

【0043】

本開示のさらに別の実施形態において、濃縮は真空濃縮によって行われる。

【0044】

本開示のさらに別の実施形態において、前記水性溶媒は、脱イオン水である。

【0045】

本開示のさらに別の実施形態において、前記吸着剤は樹脂ベッド、好ましくはAmberlite XAD-16であり；ここで、吸着剤を洗浄するための溶媒が、イソプロピルアルコール、エタノール及び脱イオン水、又はそれら何れかの組み合わせを含む群から選択され；吸着剤を再洗浄するための溶媒は、塩化ナトリウム生理食塩水及び水、又はそれらの組み合わせを含む群から選択され；及び前記アルコール溶媒は、エタノール及びイソプロピルアルコールを含む群から選択され、好ましくはイソプロピルアルコールである。

【0046】

本開示はさらに、低酸素症、肺高血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎、又はそれらの任意の組み合わせを含む群から選択される疾患を処置する方法であって、前記方法は、トリゴフ

10

20

30

40

50

オエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤を共に含む組成物を、それを必要とする被験体に投与する行為を含む。

【0047】

本開示の一実施形態において、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド及びピセニン-1が、一緒になって約8%w/w～約31%w/wの範囲の濃度であり、繊維は、約69%w/w～約92%w/wの範囲の濃度で存在する。

【0048】

本開示の別の実施形態において、トリゴフォエノシドが、約0.1%w/w～約8%w/wの範囲の濃度で存在し；ピテキシンが、約0.5%w/w～約5% w/wの範囲の濃度で存在し；イソピテキシンが、約0.5% w/w～約7% w/wの範囲の濃度で存在し；ピテキシン-2-o-ラムノシドが、約0.5% w/w～約7% w/wの範囲の濃度で存在し；ピセニン-1が、約0.5% w/w～約4% w/wの範囲の濃度で存在し；及び繊維が、約69% w/w～約92% w/wの範囲の濃度で存在する。

10

【0049】

本開示のさらに別の実施形態において、医薬的に許容される賦形剤は、ガム、造粒剤、結合剤、潤滑剤、崩壊剤、甘味料、添加剤、溶媒、滑剤、付着防止剤、帯電防止剤、抗酸化剤、界面活性剤、粘度増強剤、植物性セルロース材料、着色剤、香味剤、コーティング剤、可塑剤、防腐剤、懸濁化剤、乳化剤及び球状化剤又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される。

20

【0050】

本開示のさらに別の実施形態において、組成物は、固体経口製剤、液体経口製剤、吸入製剤、経鼻製剤、非経口製剤、フィトスーティカル(phytoceutical)、栄養補助食品及び食品、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される剤型に製剤化される。

【0051】

本開示のさらに別の実施形態において、固体経口製剤は、錠剤、カプセル、トローチ、ロゼンジ、分散性粉末、分散性顆粒、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され、液体経口製剤は、水性又は油性懸濁液、乳濁液、ドロップ、硬質又は軟質ゲルカプセル乳の乳濁液、シロップ、エリキシル、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され、非経口製剤は、静脈内注射、筋肉内注射、筋肉内デポ、皮下注射、経皮注射、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され、吸入製剤は、吸入器、ドライパウダー吸入器、噴霧器、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され、及び経鼻製剤は、点鼻薬、鼻スプレー、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される。

30

【0052】

本開示のさらに別の実施形態では、組成物は、前記被験体の体重の約1mg/kg～約100mg/kgの範囲の用量で投与され、好ましくは、前記被験体の体重の約1mg/kg～約40mg/kgの範囲の用量で投与される。

【0053】

本開示のさらに別の実施形態では、組成物は、前記被験体の体重の約1µg/kg～約100µg/kgの範囲の用量で、好ましくは、前記被験体の体重の約1µg/kg～約25µg/kgの範囲の用量で、噴霧器又は吸入器を用いて投与される。

40

【0054】

本開示のさらに別の実施形態では、被験体は、ヒトを含む哺乳動物である。

【0055】

本開示は、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤を共に含む組成物に関連し、本明細書を通じて「本組成物(instant composition)」とも呼ばれる。

【0056】

本開示の一実施形態において、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1は、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピ

50

キシ、ピテキシ、-2-*o*-ラムノシド及びピセニン-1は、共に約8% w/w ~ 約31% w/wを構成し、繊維は、約69% w/w ~ 約92% w/wを構成する。

【0057】

本開示の他の一実施形態において、組成物は、約0.1%w/w ~ 約8%w/wのトリゴフォエノシド、約0.5%w/w ~ 約5% w/wのピテキシ、約0.5% w/w ~ 約7% w/wのイソピテキシ、約0.5% w/w ~ 約7% w/wのピテキシ、-2-*o*-ラムノシド、約0.5% w/w ~ 約4% w/wのピセニン-1、及び約69% w/w ~ 約92% w/wの繊維を含む。

【0058】

本開示の他の一実施形態において、医薬的に許容される賦形剤は、約10% w/w ~ 約70% w/wの範囲の濃度で存在する。

10

【0059】

本開示の他の一実施形態において、医薬的に許容される賦形剤は、ガム、造粒剤、結合剤、潤滑剤、崩壊剤、甘味料、添加剤、溶媒、滑剤、付着防止剤、帯電防止剤、抗酸化剤、界面活性剤、粘度増強剤、植物性セルロース材料、着色剤、香味剤、コーティング剤、可塑剤、防腐剤、懸濁化剤、乳化剤及び球状化剤又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される。

【0060】

本開示の一実施形態において、組成物は、生物学的原料物質から得られる。典型的な実施形態において、組成物は、植物原料、好ましくはフェヌグリーク (*Trigonella foenum-graecum*) から得られる。

20

【0061】

本開示の非限定的な実施形態において、組成物は、限定されないが、フェヌグリークに基づく抽出物を含む植物抽出物の形態である。

【0062】

本開示は、トリゴフォエノシド、ピテキシ、イソピテキシ、ピテキシ、-2-*o*-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維を含む組成物/抽出物を得るための単純で費用効果が高く、効率的な方法を提供する。

【0063】

非限定的な実施形態において、組成物/抽出物は、フェヌグリーク (*Trigonella foenum-graecum*) から得られ、組成物/抽出物を調製する方法は、大まかに、フレイカー内でフェヌグリークの種子を剥き出しにして、平均2mmの大きさのフレイクが生じ、フレイク状の種子を一連の抽出工程に供した後、抽出物の濃縮、希釈、吸着、クロマトグラフィー、溶出及び濃縮、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される行為を行うことを含む。

30

【0064】

本開示の一実施形態において、フレーキングの後、フェヌグリーク種子を脂肪族化合物である第1の溶媒で抽出する。典型的な実施形態において、溶媒は、*n*-ヘキサン、*n*-ペンタン、*n*-ヘプタン、を含む群から選択される*n*-アルカンであり、好ましくは*n*-ヘキサンである。この工程は、約3.8時間 ~ 約4.2時間、好ましくは約4時間の時間で約25 ~ 約30、好ましくは約25 ~ 約27 の室温で実施され、脂質及びオイルの除去を可能にさせる。

40

【0065】

第1の溶媒で抽出後、得られた抽出物を第2の溶媒、好ましくは酢酸エチルで処理する。この工程は、約26 ~ 約30、好ましくは約27 ~ 約29 の範囲の温度で実施され、アルカロイド及び他の着色不純物の除去を可能にする。これに続いて、約22 ~ 約27 の範囲の温度、好ましくは約22 ~ 約25 の温度で、約7時間 ~ 約9時間、好ましくは約8時間で第3の溶媒、好ましくは*n*-ブタノールで、向流様式で再抽出する。次いで、得られた抽出物を真空濃縮し、脱イオン水に溶解し、得られた透明溶液を、イソプロピルアルコール、エタノール及び脱イオン水、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される溶媒で再生・洗浄された吸着樹脂に通す。カラム/樹脂の出口を、クロマトグラフィー、好ましくは薄層クロマトグラフィーを用いてモニターする。透明溶液全体が吸着樹脂を通過

50

する際、樹脂/カラムは、塩化ナトリウム及び水、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される溶媒で洗浄され、及びエタノール及びイソプロピルアルコールを含む群から選択される溶媒、好ましくはイソプロピルアルコールで溶出される。次いで、溶出液を回収し、濃縮して本発明の組成物を得る。賦形剤は、任意で最終産物に添加され得る。

【0066】

本開示の別の非限定的な実施形態において、組成物を得る方法は、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-*o*-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維、任意で医薬的に許容される賦形剤を共に、本組成物を得るために連続的に加え、混合することを含む。

10

【0067】

典型的な実施形態において、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-*o*-ラムノシド、ピセニン-1は、それらが一緒になって組成物の約8% w/w ~ 約31% w/wを構成するように加えられ、繊維は、組成物の約69% w/w ~ 約92% w/w構成するように加えられる。

【0068】

他の典型的な実施形態において、本方法は、約0.1% w/w ~ 約8% w/wのトリゴフォエノシド、約0.5% w/w ~ 約5% w/wのピテキシン、約0.5% w/w ~ 約7% w/wのイソピテキシン、約0.5% w/w ~ 約7% w/wのピテキシン-2-*o*-ラムノシド、約0.5% w/w ~ 約4% w/wのピセニン-1及び約69% w/w ~ 約92% w/wの繊維を組み合わせる組成物を得ることを含む。

20

【0069】

本開示の別の実施形態において、本組成物は、化学合成によって得ることができる。

【0070】

典型的な実施形態において、本開示の組成物は、低酸素症、肺高血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎、又はそれら何れかの組み合わせ等の疾患状態を処置するために使用される。

【0071】

本開示はさらに、本組成物を、それを必要とする被験体に投与することにより、低酸素症、肺高血圧、肺線維症及び副鼻腔炎、又はそれら何れかの組み合わせを含む群から選択される疾患状態を処置する方法を提供する。

【0072】

本開示の一実施形態において、用語「処置する(managing)」又は「処置(management)」は、疾患状態又は障害又は有害作用又は副作用の予防、治療及び治癒を含む。この用語はまた、最適状態の維持及び疾患状態又は障害又は有害作用又は副作用のさらなる進行の防止を包含する。本開示の別の実施形態において、被験体はヒトを含む哺乳動物である。

30

【0073】

本開示のさらに別の実施形態において、組成物は、固体経口製剤、液体経口製剤、吸入製剤、経鼻製剤、非経口製剤、フィトスーティカル(phytoceutical)、栄養補助食品及び食品、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される剤型に製剤化される。固体経口製剤は、錠剤、カプセル、トローチ、ロゼンジ、分散性粉末、分散性顆粒、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され；液体経口製剤は、水性若しくは油性懸濁液、乳濁液、ドロップ、硬質若しくは軟質ゲルカプセルの乳濁液、シロップ、エリキシル、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され；非経口製剤は、静脈内注射、筋肉内注射、筋肉内デポー、皮下注射、経皮注射、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され；吸入製剤は、吸入器、ドライパウダー吸入器、噴霧器、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択され；及び経鼻製剤は、点鼻薬、鼻スプレー、又はそれら何れかの組み合わせ、を含む群から選択される。

40

【0074】

本開示の非限定的な実施形態において、組成物の投与は、経口的に行われる。

【0075】

本開示のさらに別の実施形態において、本発明の組成物は、治療効果を得るための適切

50

な投与製剤に製剤化される。本開示の一実施形態において、被験体のための本組成物の用量は、業界のためのUSFDAガイドラインに従って計算される。

【0076】

典型的な実施形態において、組成物は、被験体の体重の約1mg/kg～約100mg/kgの範囲、好ましくは被験体の体重の約1mg/kg～約40mg/kgの範囲の用量で投与される。

【0077】

他の典型的な実施形態において、組成物は、被験体の体重の約1μg/kg～約100μg/kgの範囲、好ましくは被験体の体重の約1μg/kg～約25μg/kgの範囲でスプレー又は吸入器で投与される。

【0078】

本開示は、以下の実施例を通じてさらに詳述される。しかしながら、これらの実施例は、本開示の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0079】

実施例1(a): フェヌグreekからの本組成物の調製

500gのフェヌグreekの種子を、約2mmの厚さのフレークにし、約3000mlのn-ヘキサンにより、室温で約4時間抽出し、脂質及び油分を除去する。抽出物を約2000mlの酢酸エチルで処理してアルカロイド及び他の着色不純物を除去する。これら抽出されたフェヌグreekフレークを約2000mlのn-ブタノールを用い、向流様式で約8時間再抽出する。この透明n-ブタノール抽出物を濃縮して重量約6.5gの固体塊を得、これを250mlの脱イオン水に溶解して透明な溶液を得る。次いで、この溶液を、イソプロピルアルコール、続いて脱イオン水によって再生・洗浄した約25mlのAmberlite xad-16樹脂を含む吸着樹脂ベッドに通す。カラムの出口は、以下のシステム-クロロホルム（約8ml）：メタノール（約2ml）：約1滴の水の薄層クロマトグラフィーを使用して化合物の不在をモニターする。全量を通過させた後、カラムを0.9%塩化ナトリウム生理食塩水で洗浄し、約250mlの水で洗浄する。カラムを約250mlのイソプロピルアルコールで溶出し、その後溶出液を集め、濃縮して約1.4gの流動性のパールブラウン粉末を得、これは、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1及び繊維を含む本組成物である。

【0080】

さらに、粉末が上記成分を含むことを確認するために、粉末をHPLC及び重量測定法を用いて分析する。

【0081】

HPLC方法

サンプル名: RD # FE 691

バイアル: 1:A, 1

インジェクション#: 1

インジェクションボリューム: 20.00 μl

ランタイム: 10:00分

【0082】

HPLCを実施すると、5つのピークが得られる。本組成物のHPLCグラフを図1aに示す。ピークは、標準のHPLCグラフ（図2a～2e）と比較することにより、活性成分、トリゴフォエノシド、ピテキシン、イソピテキシン、ピテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1に対応することが見出されている。

【0083】

HPLCを用いて分析した5つの成分の濃度を、標準的なプロトコルを用いたHPLCグラフから計算し、以下の表1に示す。

表1: 本組成物の成分の濃度

【表 1】

S. No.	成分	濃度(%)
1	トリゴフォエノシド	4.075
2	ビテキシン	3.415
3	イソビテキシン	2.800
4	ビテキシン-2-o-ラムノシド	3.369
5	ビセニン-1	1.554

10

【0084】

重量測定法

プロトコル

得られた粉末約1gにイソプロピルアルコール（IPA）約40mlを加え、室温で約30分間攪拌する。溶液を濾過し、その後、透明なIPA抽出物が得られ、これを蒸発させて水浴上の残渣とし、室温に冷却する。約100mlのアセトンを上記残渣に加え、室温で約30分間攪拌する。この溶液をワットマンの濾紙（予め秤量）で濾過する。沈殿物を約100 で約2時間乾燥させた後、沈殿物及び濾紙を再度秤量する。

【0085】

繊維の濃度を決定するための計算：

20

沈殿物の重量 = 沈殿物を含む濾紙の重量 - 濾紙の重量

可溶性繊維の濃度 = [(サンプルの初期重量 - 沈殿物の重量) / サンプルの初期重量] × 1

00

【0086】

これに基づき、得られる可溶性繊維の濃度は約77%であると決定される。

【0087】

実施例1(b)：フェヌグリークからの本組成物の調製の方法

500gのフェヌグリークの種子を、約2mmの厚さのフレークにし、約3000mlのn-ヘプタン、室温で約3.8時間抽出し、脂質及び油分を除去する。抽出物を約2000mlの酢酸エチルで処理してアルカロイド及び他の着色不純物を除去する。これら抽出されたフェヌグリークフレークを約2000mlのn-ブタノール、向流様式で約8時間再抽出する。この透明n-ブタノール抽出物を濃縮して重量約6.5gの固体塊を得、これを250mlの脱イオン水に溶解して透明な溶液を得る。次いで、この溶液を、イソプロピルアルコール、続いて脱イオン水によって再生・洗浄した約25mlのAmberlite xad-16樹脂を含む吸着樹脂ベッドに通す。カラムの出口は、以下のシステム-クロロホルム（約8ml）：メタノール（約2ml）：約1滴の水の薄層クロマトグラフィーを使用して化合物の不在をモニターする。全量を通過させた後、カラムを0.9%塩化ナトリウム生理食塩水で洗浄し、約250mlの水で洗浄する。カラムを約250mlのイソプロピルアルコールで溶出し、その後溶出液を集め、濃縮して約1.4gの流動性のパールブラウン粉末を得、これは、トリゴフォエノシド、ビテキシン、イソビテキシン、ビテキシン-2-o-ラムノシド、ビセニン-1及び繊維を含む本組成物である。

30

40

【0088】

HPLC方法

サンプル名：IND 830 植物バッチ

バイアル：1:A, 7

インジェクション#: 1

インジェクションボリューム：20.00 µl

ランタイム：10:00分

【0089】

HPLCを実施すると、5つのピークが得られる。本組成物のHPLCグラフを図1bに示す。ピークは、標準のHPLCグラフ（図2a～2e）と比較することにより、活性成分、トリゴフォエ

50

ノシド、ビテキシン、イソビテキシン、ビテキシン-2-o-ラムノシド、ピセニン-1に対応することが見出されている。

【 0 0 9 0 】

HPLCを用いて分析した5つの成分の濃度を、標準的なプロトコルを用いたHPLCグラフから計算し、以下の表2に示す：

表2：本組成物の成分の濃度

【表 2】

S. No.	成分	濃度(%)
1	トリゴフォエノシド	3.259
2	ビテキシン	1.300
3	イソビテキシン	2.094
4	ビテキシン-2-o-ラムノシド	2.022
5	ピセニン-1	0.679

10

【 0 0 9 1 】

重量測定法

プロトコル

得られた粉末約1gにイソプロピルアルコール（IPA）約40mlを加え、室温で約30分間攪拌する。溶液を濾過し、その後、透明なIPA抽出物が得られ、これを蒸発させて水浴上の残渣とし、室温に冷却する。約100mlのアセトンを上記残渣に加え、室温で約30分間攪拌する。この溶液をワットマンの濾紙（予め秤量）で濾過する。沈殿物を約100 で約2時間乾燥させた後、沈殿物及び濾紙を再度秤量する。

20

【 0 0 9 2 】

繊維の濃度を決定するための計算：

沈殿物の重量 = 沈殿物を含む濾紙の重量 - 濾紙の重量

可溶性繊維の濃度 = $[(\text{サンプルの初期重量} - \text{沈殿物の重量}) / \text{サンプルの初期重量}] \times 100$

【 0 0 9 3 】

これに基づき、得られる可溶性繊維の濃度は約79%であると決定される。

30

【 0 0 9 4 】

実施例2：本組成物の調製方法

約0.1% w/w～約8% w/wのトリゴフォエノシド、約0.5% w/w～約5% w/wのビテキシン、約0.5% w/w～約7% w/wのイソビテキシン、約0.5% w/w～約7% w/wのビテキシン-2-o-ラムノシド及び約0.5% w/w～約4% w/wのピセニン-1を連続的に加えて組み合わせ、その後、約69% w/w～約92% w/wの繊維を、任意で医薬的に許容される賦形剤と共にコンプレクションに加え、本組成物を得た。

【 0 0 9 5 】

実施例3：低酸素症、肺高血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎に対する本組成物の評価

40

肺高血圧（PAH）を、麻酔下のモノクロタリン（MCT）（60mg / kg）の皮下投与によって、約200～220gの体重の雄スプラグドーリーラット（Sprague Dawley rats）に誘導する。モノクロタリン（MCT）を投与された動物は、ビヒクル（10mg/kg蒸留水、p.o.）又は本組成物（10mg/kg、20mg/kg及び40mg/kg、p.o.）の何れかで28日処理する。必要なパラメータは、様々な日に評価される。

【 0 0 9 6 】

動物モデル

肺動脈高血圧症（PAH）は、内皮増殖、平滑筋肥厚及び肥大、並びに外膜マトリックスの拡張を伴う肺動脈のリモデリングによって特徴付けられる。肺動脈圧、右心室肥大、及び最終的な肺性心の増加は、この疾患を構成する複雑な病態生理の徴候である。右心室（RV

50

補償肥大及びRV不全に関連する機能的、構造的及び分子的变化の研究のために頻繁に使用されるモデルは、ラットをモノクロタリン(MCT)で処置することである。MCTは、クロタリラスペクタビリス(*Crotalaria spectabilis*)の種子に由来する植物毒素であり、肝臓の混合機能オキシダーゼによってin vivoで活性化されて、反応性二官能性架橋化合物であるMCTピロールを形成する。MCTは、肺が肝臓に対し遠位の最初の主要な血管床を務めるので、全身性血管に何ら影響を及ぼさずに、肺血管に対する選択的毒性効果を示す。

【0097】

実施例3.1: 低酸素症における本組成物の評価

実施例1(a)で得られた本組成物を以下の実験に使用する。

【0098】

低酸素症の評価は、以下のパラメータを用いて行われる。

- a. 末梢血酸素量
- b. 肺機能測定
 - i. 呼吸数
 - ii. エンハンスドポーズ

【0099】

ラットの末梢血酸素含量(パルスOx)におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果:

【0100】

パルスオキシメトリは、非侵襲的な連続的な血中酸素飽和度測定に特に有益である。血液酸素モニターは、酸素が充填されている血液の割合を表示する。より詳細には、酸素を運ぶ血液中のタンパク質であるヘモグロビンの何%が負荷されているかを測定する。

【0101】

データは、One-Way ANOVA、続いてダネットポストテスト(Dunnett's post tests)によって分析される。正常群と比較して $^{###}P<0.001$ 、及びMCTコントロール群と比較して $^{**}P<0.01$ 、 $^{***}P<0.001$ 。結果を以下の表3及び図3(28日目の結果)に示す。

表3: 末梢血酸素含量(パルスOx)におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果

【表3】

	正常	MCT コントロール	本組成物C1(10) (10 mg/kg)	本組成物C1(20) (20 mg/kg)	本組成物C1(40) (40 mg/kg)
パルスOx (% O ₂ 飽和)	94.43 ± 0.57	90.57 ± 0.36 ^{###}	91.57 ± 0.75	93.57 ± 0.57 ^{**}	93.57 ± 0.36 ^{**}

【0102】

観察されるように、末梢血酸素含量は、28日目の正常群と比較して、MCTコントロール群において有意に($P<0.001$)低下する。本組成物、特に20mg/kg及び40mg/kgの濃度での処置は、MCTコントロールラットが正常レベルに達することに比較して、末梢血酸素含量の有意な増加($P<0.01$)を生じる。

【0103】

ラットの呼吸回数(f)におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果

データは、Two-Way ANOVA、続いてボンフェローニポストテスト(Bonferroni's post tests)によって分析される。正常群と比較して $^{\#}P<0.05$ 、 $^{##}P<0.01$ 、及び各々の日におけるMCTコントロール群と比較して $^{*}P<0.05$ 、並びに結果を下記の表4及び図4に示す。

表4: ラットの呼吸回数(f)におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果

【表 4】

時間 (日)	正常	MCT コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/kg)	本組成物C1 (20) (20 mg/kg)	本組成物C1 (40) (40 mg/kg)
0	222.67 ± 8.27	219.11 ± 11.92	222.30 ± 13.59	224.94 ± 8.63	235.67 ± 8.09
14	222.07 ± 9.59	182.71 ± 11.26 [#]	205.19 ± 13.32	196.93 ± 10.15	183.33 ± 10.32
28	224.04 ± 16.78	170.37 ± 11.25 ^{##}	200.86 ± 10.77	214.93 ± 8.90 [*]	215.56 ± 6.05 [*]

【0104】

10

0日目のMCTコントロール群並びに正常群の呼吸回数に有意差は認められなかった。呼吸回数は、MCTコントロールラットにおいて、14日後及び28日後の皮下MCT投与の場合、正常群と比較して有意に減少する ($P<0.05$ 及び $P<0.01$)。MCTコントロール群と比較した場合、この呼吸回数は、処置後28日の本組成物処置群 (20mg/kg 及び 40mg/kg) において、有意に増加する ($P<0.05$)。

【0105】

ラットのエンハンスドポーズ (P_{enh}) におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果
 P_{enh} は、動物が呼吸する際に全身フロープレチスモグラフに出入りする気流パターンの形状の変化を評価するために通常使用される無次元指標である。指数は、呼気中の波形下の面積分布の変化に敏感であり、曲線の開始付近で正規化された面積が増加すると非線形に増加する。

20

【0106】

データは、Two-Way ANOVA、続いてボンフェローニポストテストによって分析される。正常群と比較して^{##} $P < 0.01$ 、及び各々の日におけるMCTコントロール群と比較して^{*} $P<0.05$ 、^{**} $P<0.01$ 、並びに結果を下記の表5及び図5に示す。

表5: ラットのエンハンスドポーズ (P_{enh}) におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果

【表 5】

時間 (日)	正常	MCT コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/kg)	本組成物C1 (20) (20 mg/kg)	本組成物C1 (40) (40 mg/kg)
0	0.89 ± 0.04	0.90 ± 0.04	0.93 ± 0.07	0.95 ± 0.08	0.96 ± 0.05
14	0.97 ± 0.12	1.28 ± 0.14	1.08 ± 0.21	1.15 ± 0.16	1.21 ± 0.19
28	0.89 ± 0.05	1.48 ± 0.18 ^{##}	1.22 ± 0.09	0.97 ± 0.20 [*]	0.93 ± 0.08 ^{**}

30

【0107】

観察されるように、0日目に、MCTコントロール群並びに正常群及び本組成物 (10mg/kg、20mg/kg 及び 40mg/kg) 処置群のエンハンスドポーズに有意差はない。MCTコントロールラットでは、MCT投与28日後に、正常群と比較して、エンハンスドポーズが、有意に増加する ($P<0.01$)。MCTコントロール群と比較した場合、このエンハンスドポーズは、本組成物投与後28日の (20mg/kg 及び 40mg/kg) 処置群において有意且つ、用量依存的に減少した ($P<0.05$ 及び $P<0.01$)。

40

【0108】

結論

以上の結果から、本組成物が、血中酸素飽和度を効果的に正常化し、血液中の酸素を運ぶヘモグロビンの割合が回復することは明らかである。呼吸速度の正常化は、本組成物による適切な酸素供給の指標である。また、低酸素レベルの場合、全身の流れに出入りする気流パターンの形状の変化を正常化する。従って、上記知見の全ては、本組成物が、低酸素症に対し安全且つ、有効な薬物であることを証明する。

50

【 0 1 0 9 】

実施例3.2: 血行動態計測を用いた肺高血圧に対する本組成物の効果

実施例1(a)で得られた本組成物を以下の実験に使用する。

【 0 1 1 0 】

血行動態計測は、 dP/dt_{max} 、 dP/dt_{min} 、収縮力指数及びタウ(tau)等の多くのパラメータを含む。これらのパラメータは、時間の経過とともに、収縮期血圧と拡張期血圧の比等の気流圧力を詳述するのに役立つ。また、心筋リラクゼーションの経過を説明できる時定数(タウ(tau))によって、圧力降下及びその解析についても詳述する。

【 0 1 1 1 】

収縮期性能は、 dP/dt_{max} の収縮力指数によって評価されるが、拡張機能障害は、後負荷の増加にตอบสนองして誘発される。拡張期は、等容弛緩(タウ)(iso volumetric relaxation)の時定数及び拡張終期圧-直径関連(EDPDR)-を評価し、前者は活動的な弛緩を評価し、後者は心筋の硬さのin vivoでの評価である。心筋弛緩の動的過程は、駆出期から早期充満期に移行する。

【 0 1 1 2 】

ラットの右心室 dP/dt_{max} 及び右心室 dP/dt_{min} におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果

【 0 1 1 3 】

データは、One-Way ANOVA、続いてダネットポストテストによって分析される。正常群と比較して $^{##}P<0.01$ 、 $^{###}P<0.001$ 、及び各々の日におけるMCTコントロール群と比較して $^{*}P<0.05$ 、 $^{**}P<0.01$ 、 $^{***}P<0.001$ 並びに結果を下記の表6及び図6a及び図6bに示す。

【 0 1 1 4 】

表6: ラットの右心室 dP/dt_{max} 及び右心室 dP/dt_{min} におけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果

【表 6】

	正常	MCT コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/kg)	本組成物C1 (20) (20 mg/kg)	本組成物C1 (40) (40 mg/kg)
dP/dt_{max} (mm Hg)	982.3 ± 46.15	1376.00 ± 94.80 $^{##}$	1254.00 ± 66.92	1090.00 ± 55.16 *	1042.00 ± 65.86 **
dP/dt_{min} (mm Hg)	-746.6 ± 76.15	-1356.00 ± 66.02 $^{###}$	-1105.00 ± 39.62 *	-1041.00 ± 33.43 **	-1021.00 ± 46.38 ***

【 0 1 1 5 】

観察されるように、MCTの皮下投与後28日の正常群と比較して、MCTコントロール群における dP/dt_{max} 並びに dP/dt_{min} が有意に増加した($P<0.01$ 及び $P<0.001$)。本組成物の投与(20mg/kg及び40mg/kg)は、MCTコントロール群と比較して、有意且つ、用量依存的に dP/dt_{max} を減少させる($P<0.05$ 及び $P<0.01$)。一方、本組成物の3つ全ての投薬量での投与は、MCTコントロール群と比較して有意且つ、用量依存的に dP/dt_{min} を減少させる。

【 0 1 1 6 】

ラットの収縮力指数及びtauにおけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果:

データは、One-Way ANOVA、続いてダネットポストテストによって分析される。正常群と比較して $^{###}P<0.001$ 、及び28日目におけるMCTコントロール群と比較して $^{*}P<0.05$ 、 $^{***}P<0.001$ 並びに結果を下記の表7及び図7a及び図7bに示す。

【 0 1 1 7 】

表7: ラットの収縮力指数及びタウにおけるMCT誘導性変化に対する本組成物の効果

【表 7】

	正常	MCT コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/ml)	本組成物C1 (20) (20 mg/ml)	本組成物C1 (40) (40 mg/ml)
収縮力指数	17.71 ± 0.91	8.28 ± 0.77 ^{###}	9.28 ± 0.42	11.57 ± 0.52*	13.71 ± 0.71 ^{***}
タウ(ms)	14.71 ± 1.12	26.14 ± 1.10 ^{###}	25.00 ± 0.97	21.29 ± 0.86*	18.57 ± 0.89 ^{***}

【0118】

観察されるように、正常群と比較して、MCTコントロール群における収縮指数は有意に減少し ($P<0.001$)、及びタウは有意に増加 ($P<0.001$) する。本組成物の投与 (20mg/kg 及び40mg/kg) は、MCTコントロール群と比較して、有意且つ、用量依存的に収縮力指数を正常化する ($P<0.05$ 及び $P<0.001$)。一方、28日目の本組成物の処置 (20mg/kg 及び40mg/kg) は、MCTコントロール群と比較して、タウの有意且つ、用量依存的回復が生じる ($P<0.05$ 及び $P<0.001$)。

10

【0119】

結論:

本組成物は、収縮期血圧と拡張期血圧を効果的に正常化し、収縮力指数及びタウを回復させるのに役立ち、肺高血圧症におけるその有意な活性を示す。

【0120】

20

実施例3.3: プレオマイシン誘導性肺線維症における本組成物の評価

実施例1(b)で得られた本組成物を以下の実験に使用する。

プレオマイシン誘導性肺線維症 [PF] における本組成物の評価は、以下のパラメータを用いて行う:

- a. 肺機能測定
 - i. 吸息時間
 - ii. 呼気時間
 - iii. エンハンスドポーズ (Penh)
- b. 末梢血酸素量

【0121】

30

プロトコル:

PFを、プレオマイシン (BLM) (6 IU/kg) をケタミン麻酔下で気管内投与することにより、雄スブラグドローラット (180 ~ 220gm) に誘導する。プレオマイシンを投与された動物を、ビヒクル (10mg/kg 蒸留水、p.o.) 又は本組成物 (10mg/kg、20mg/kg 及び40 mg/kg、p.o.) の何れかで28日間処理する。偽の群は、ケタミン麻酔下でビヒクル (10mg/kg 蒸留水、p.o.) の気管内投与に供した動物を含む。必要なパラメータは、様々な日に評価される。肺機能テスト及び血液学の改変されたレベルは、本組成物 (20mg/kg 及び40mg/kg、p.o.) 処置によって有意に回復することが見出されている ($P < 0.01$ 及び $P < 0.001$)。

【0122】

40

動物モデル:

肺線維症のプレオマイシン-げっ歯類パラダイムは、ヒト肺線維症において確立され、広く使用されている代理モデルである。プレオマイシン誘導性肺傷害の広く認識されているメカニズムの1つは、ROSを生成する能力である。プレオマイシンは、DNA/Fe²⁺と結合して複合体を形成することが知られている。このDNA/Fe²⁺/プレオマイシン複合体は、レドックスサイクリングを受け、スーパーオキシドやヒドロキシラジカル等のROSを生成し、線維化の開始をもたらす。

【0123】

ラットの吸気時間 (Ti) におけるプレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

データは、Two-Way ANOVA、続いてボンフェローニポストテストによって分析される。

正常群と比較して^{##} $P<0.01$ 、^{###} $P<0.001$ 、偽の群と比較して^{\$} $P<0.01$ 、^{\$\$\$} $P<0.001$ 及び各

50

々の日におけるBLMコントロール群と比較して* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 並びに結果を下記の表8及び図8に示す。

【 0 1 2 4 】

表8: ラットの吸気時間(Ti)におけるブレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

【表 8】

時間 (日)	正常	偽	BLM コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/kg)	本組成物C1 (20) (20 mg/kg)	本組成物C1 (40) (40 mg/kg)
0	165.89 ± 14.77	152.02 ± 6.59	167.04 ± 8.98	130.65 ± 7.30	149.60 ± 9.69	137.16 ± 11.42
7	157.52 ± 16.55	166.34 ± 15.32	243.87 ± 11.30 ^{##, \$\$\$}	238.76 ± 14.36	231.27 ± 27.47	226.60 ± 21.74
14	168.70 ± 16.85	185.31 ± 13.52	277.20 ± 33.03 ^{##, \$\$\$}	243.56 ± 28.10	220.63 ± 30.96	278.12 ± 11.08
21	161.75 ± 5.49	166.92 ± 7.63	302.64 ± 22.99 ^{###, \$\$\$}	265.76 ± 7.34	234.43 ± 16.95	257.66 ± 17.99*
28	161.35 ± 12.37	169.21 ± 9.59	310.38 ± 24.17 ^{###, \$\$\$}	241.26 ± 20.53**	220.75 ± 6.74**	220.87 ± 8.09**

10

20

【 0 1 2 5 】

観察されるように、0日目の正常及び偽の群と比較して、BLMコントロール群の吸気時間に有意差はない。BLMの気管内投与は、BLMコントロールラットの吸気時間を7日以降の正常群と偽の群との比較において、有意に増加させる ($P<0.001$)。28日目のBLMコントロールラットと比較して、本組成物 (10mg/kg、20mg/kg及び40mg/kg) による28日の処置は、吸気時間を有意に減少させる ($P<0.01$)。

【 0 1 2 6 】

ラットの呼気時間(Te)におけるブレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

データは、Two-Way ANOVA、続いてボンフェローニポストテストによって分析される。正常群と比較して^{###} $P<0.001$ 、偽の群と比較して^{\$\$\$} $P<0.001$ 及び各々の日におけるBLMコントロール群と比較して* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 並びに結果を下記の表9及び図9に示す。

【 0 1 2 7 】

表9: ラットの呼気時間(Te)におけるブレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

30

【表 9】

時間 (日)	正常	偽	BLM コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/kg)	本組成物C1 (20) (20 mg/kg)	本組成物C1 (40) (40 mg/kg)
0	202.57 ± 8.37	211.18 ± 12.50	242.41 ± 21.77	219.70 ± 16.18	199.82 ± 14.83	204.33 ± 28.00
7	219.74 ± 21.55	223.35 ± 18.16	95.17 ± 15.14 ^{###, \$\$\$}	89.27 ± 6.75	104.56 ± 19.25	105.34 ± 10.25
14	188.33 ± 22.88	213.13 ± 5.44	95.10 ± 9.77 ^{###, \$\$\$}	112.00 ± 11.25	123.26 ± 37.88	115.38 ± 7.21
21	198.96 ± 15.80	227.40 ± 18.94	62.87 ± 13.15 ^{###, \$\$\$}	122.97 ± 18.00*	127.23 ± 15.92*	143.64 ± 17.06**
28	203.94 ± 6.11	195.54 ± 10.60	62.42 ± 10.09 ^{###, \$\$\$}	142.87 ± 15.50**	132.85 ± 17.11*	170.43 ± 12.19***

10

【0128】

観察されるように、呼気時間は、0日目のBLMコントロール群、並びに正常群及び偽の群において、有意差はない。しかしながら、BLMの期間内投与7日後のBLMコントロールラットの呼気時間は、正常群及び偽の群と比較して有意に減少する ($P<0.001$)。この減少した呼気時間は、BLMコントロールラットと比較して、本組成物 (10、20及び40mg/kg) による28日処理で有意に増加した ($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 及び $P<0.001$)。

20

【0129】

ラットのエンハンスドポーズ (P_{enh}) におけるブレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

データは、Two-Way ANOVA、続いてボンフェローニポストテストによって分析される。正常群と比較して^{###} $P<0.001$ 、偽の群と比較して^{\$\$\$} $P<0.001$ 及び各々の日におけるBLMコントロール群と比較して^{***} $P<0.001$ 。結果を下記の表10及び図10に示す。

【0130】

表10: ラットのエンハンスドポーズ (P_{enh}) におけるブレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

30

【表 10】

時間 (日)	正常	偽	BLM コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/kg)	本組成物C1 (20) (20 mg/kg)	本組成物C1 (40) (40 mg/kg)
0	0.81 ± 0.04	0.80 ± 0.04	0.97 ± 0.11	0.82 ± 0.07	0.77 ± 0.04	0.75 ± 0.04
7	1.0 ± 0.19	1.03 ± 0.18	1.28 ± 0.11	1.15 ± 0.15	1.00 ± 0.19	1.42 ± 0.08
14	0.93 ± 0.16	0.88 ± 0.07	1.36 ± 0.12	1.38 ± 0.22	1.42 ± 0.03	1.09 ± 0.19
21	1.02 ± 0.14	0.85 ± 0.09	1.80 ± 0.25 ^{###, \$\$\$}	1.97 ± 0.11	1.46 ± 0.29	1.41 ± 0.14
28	1.04 ± 0.05	1.15 ± 0.04	2.71 ± 0.19 ^{###, \$\$\$}	1.82 ± 0.22***	1.74 ± 0.04***	1.64 ± 0.10***

40

【0131】

観察されるように、0日目、7日目及び14日目に、BLMコントロール群並びに正常群及び偽の群のエンハンスドポーズに有意差はない。エンハンスドポーズは、正常群及び偽の群

50

と比較して、BLMの気管内投与後21日のBLMコントロールラットにおいて有意に増加する（ $P<0.001$ ）。BLMコントロール群と比較した場合、このエンハンスドポーズは、本組成物（10mg/kg、20mg/kg及び40mg/kg）の投与後28日において有意に正常化された（ $P<0.001$ ）。

【0132】

ラットの末梢血酸素量（パルスOx）におけるブレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

データは、Two-Way ANOVA、続いてボンフェローニテストによって分析される。正常群と比較して $^{\#}P<0.05$ 、 $^{###}P<0.001$ 、偽の群と比較して $^{\$}P<0.05$ 、 $^{$$$}P<0.001$ 及び各々の日におけるBLMコントロール群と比較して $^*P<0.05$ 、 $^{**}P<0.01$ 、 $^{***}P<0.001$ 。結果を下記の表11及び図11に示す。

【0133】

表11: ラットの末梢血酸素量（パルスOx）におけるブレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

【表11】

時間 (日)	正常	偽	BLM コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/ml)	本組成物C1 (20) (20 mg/ml)	本組成物C1 (40) (40 mg/ml)
14	95.75 ± 0.47	95.25 ± 0.62	91.50 ± 0.64 ^{#, \$}	92.50 ± 1.32	94.25 ± 0.47	92.00 ± 1.35
28	96.00 ± 0.40	95.00 ± 0.70	87.75 ± 1.31 ^{###, \$\$\$}	92.00 ± 1.47 [*]	93.00 ± 1.08 ^{**}	92.75 ± 1.10 ^{**}

【0134】

観察されるように、末梢血酸素量は、14日目及び28日目にそれぞれ正常群及び偽の群と比較して、BLMコントロール群において有意に減少する（ $P<0.05$ 及び $P<0.001$ ）。本組成物（10mg/kg、20mg/kg及び40mg/kg）での処置は、BLMコントロールラットと比較して、14日目に末梢血酸素量の有意な増加をもたらさない。しかしながら、本組成物（10mg/kg、20mg/kg及び40mg/kg）の28日投与は、28日目のBLMコントロールラットと比較して、末梢血酸素量のBLM誘導性低下を有意且つ、用量依存的に阻害及び回復させた（ $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 及び $P<0.01$ ）。

【0135】

結論：吸気時間、呼気時間及び血中酸素量の正常化等の肺機能及び本組成物によるエンハンスドポーズの回復は、肺線維症の治療において有効性を証明する。

【0136】

実施例3.4: ブレオマイシン誘導性副鼻腔炎における本組成物の評価

実施例1(b)で得られた本組成物を以下の実験に使用する。

【0137】

ブレオマイシン誘導性肺線維症における本組成物の評価は、以下のパラメータを用いて行われる：

a. 肺における遺伝子のRT-PCR解析

i. Muc5ac

ii. NF-κB

【0138】

ラットの肺におけるMuc5ac mRNA発現のブレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果：

Muc5acは表面上皮の杯細胞から分泌される主要なムチンであると考えられている。粘液の過剰産生は、呼吸器疾患における粘膜毛様体機能不全の要素となり、Muc5acは、これらの疾患における気道上皮に沿って顕著に発現される。ブレオマイシンに応答して生成された酸化ストレスは、気管支上皮細胞におけるMuc5ac産生を増大させることが示されており

、このプロセスは、表皮成長因子受容体の活性化を含み得る。ここで、本発明において、プレオマイシンは、Muc5acの肺mRNAを増大させ、気管支上皮層の粘液形成細胞を増加させる。本組成物は、プレオマイシン誘導性肺Muc5ac形成及び上皮粘液形成細胞を用量依存的に減少させることが見出されている。

【0139】

データは、One-Way ANOVA、続いてダネットポストテストによって分析される。正常群と比較して $###P<0.0001$ 、偽の群と比較して $$$$P<0.001$ 及び28日目のBLMコントロール群と比較して $*P<0.05$ 、 $***P<0.001$ 。結果を下記の表12及び図12に示す。

【0140】

表12: ラットの肺におけるMuc5ac m-RNA発現のプレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

【表12】

	正常	偽	BLM コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/kg)	本組成物C1 (20) (20 mg/kg)	本組成物C1 (40) (40 mg/kg)
Muc5ac/ β-アクチン	0.36 ± 0.04	0.48 ± 0.09	2.17 ± 0.21 $###, $$$$	1.41 ± 0.13*	1.04 ± 0.17***	0.63 ± 0.08***

【0141】

観察されるように、Muc5ac m-RNA発現は、28日目の正常群及び偽の群と比較して、BLMコントロールラットにおいて有意に上方調節される ($P<0.001$)。本組成物 (10mg/kg、20mg/kg及び40mg/kg) の28日処理は、BLMコントロールラットと比較して、肺におけるMuc5ac m-RNAを有意に且つ、用量依存的に下降調節させる ($P<0.05$ 、 $P<0.001$ 及び $P<0.001$)。

【0142】

ラットの肺におけるNF-κB m-RNA発現のプレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果:

プレオマイシンによって生成されるROSの別の標的は、本発明によって試験したTNF-α、IL-1β、IL-6及びIL-8を含む多くのサイトカイン遺伝子を調節する転写因子である、NF-κBの活性化である。TNF-α及びIL-1βもまた、NF-κBを活性化し得る。プレオマイシンは、肺におけるNF-κB活性を活性化し、肺上皮細胞がNF-κBp65を分泌することを示唆している (Chitra et al., 2013)。本発明において、本組成物の処置は、酸化剤誘導性NF-κB活性化を阻害する抗酸化能を介してその効果を発揮し、それによって肺線維症のプレオマイシンモデルにおいて抗線維症効果を発揮することが見出されている。

【0143】

データは、One-Way ANOVA、続いてダネットポストテストによって分析される。正常群と比較して $##P<0.01$ 、 $###P<0.001$ 、偽の群と比較して $$$P<0.01$ 、 $$$$P<0.001$ 及び28日目のBLMコントロール群と比較して $*P<0.05$ 、 $***P<0.001$ 。結果を下記の表13及び図13に示す。

【0144】

表13: ラットの肺におけるNF-κB m-RNA発現のプレオマイシン誘導性変化に対する本組成物の効果

【表13】

	正常	偽	BLM コントロール	本組成物C1 (10) (10 mg/kg)	本組成物C1 (20) (20 mg/kg)	本組成物C1 (40) (40 mg/kg)
NF-κB/ β-アクチン	1.04 ± 0.65	0.67 ± 0.12	2.99 ± 0.21 $###, $$$$	1.72 ± 0.14*	0.95 ± 0.28***	0.97 ± 0.16***

【0145】

観察されるように、28日目の正常群及び偽群と比較してBLMコントロール群の肺NF- κ B mRNA発現は、有意に上方調節される ($P < 0.001$ 及び $P < 0.01$)。しかしながら、本組成物(10mg/kg、20mg/kg及び40mg/kg)の処置は、BLMコントロールラットと比較して、上方調節されたBLM誘導性肺NF- κ B mRNA発現を有意に下降調節させる ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 及び $P < 0.001$)。

【 0 1 4 6 】

結論：

粘液形成遺伝子 (Muc5ac、NF- κ B) は、上気道の気道経路において副鼻腔炎を活性化する。これらの遺伝子の用量依存性発現減少は、副鼻腔炎の治療における本組成物の有効性を示す。

10

【 0 1 4 7 】

従って、本開示の実施例は、低酸素症、肺高血圧症、肺線維症及び副鼻腔炎等の疾患状態を治療する際の本組成物の有効性を示す。

【 0 1 4 8 】

本開示のさらなる実施形態及び特徴は、本明細書で提供される説明に基づき、当業者に明らかである。本明細書の実施形態は、本明細書の様々な特徴及び利点の詳細を提供する。周知の/従来の方法及び技術の説明は、本明細書の実施形態を不必要に不明瞭にしないために省略される。特定の実施形態の前述の説明は、本明細書の実施形態の一般的な性質を完全に明らかにし、他は、現在の知見を適応することによって、そのような特定の実施形態を一般的な概念から逸脱することなく、様々な用途に対して容易に変更及び/又は適応させることができ、故に、そのような適応及び変更は、開示された実施形態の均等物の意味及び範囲内で理解されるべきであり、それらを包含することが意図される。本明細書で使用される表現又は用語は、説明のためであって限定のためではないことを理解されたい。従って、本開示の実施形態は、好ましい実施形態に関して記載されているが、当業者であれば、本明細書の実施形態は、本明細書に記載の実施形態の本質及び範囲内の修正を加えて実施できることを認識出来るであろう。本明細書を通じて、用語「含む (comprise)」、又は「含む (comprises)」又は「含む (comprising)」などの変形は、使用される場合はいつでも、記載された要素、完全なもの(integer)若しくは工程の存在、又は要素、完全なもの若しくは工程の群を意味すると理解され得るが、他の何れかの要素、完全なもの若しくは工程の、又は要素、完全なもの若しくは工程の群を除外するものではない。本明細書において実質的に任意の複数形及び/又は単数形の用語の使用に関して、当業者であれば、内容及び/又は用途において適切に、複数形から単数形及び/又は単数形から複数形に翻訳することが出来る。様々な単数/複数の置換は、明瞭にするために本明細書に明示的に記載されてもよい。「少なくとも」又は「少なくとも1つの」という表現の使用は、1つ又はそれ以上の所望の目的又は結果を達成するために本開示の実施形態において使用され得るので、1つ又はそれ以上の要素又は成分又は量の使用を示唆する。本明細書に含まれている文書の議論、行為、材料、装置、文献及び同様のものの何れかは、本開示の内容を提供する目的のためのみである。これらの事項の何れか又は全部が、本出願の優先日の前に何処かに存在していたとしても、先行技術を基に一部を構成するか、又は本開示に関連する分野において一般的な知識であることを認めてはならない。本明細書では、この開示の特定の特徵に重点を置いているが、様々な変更が可能であり、本開示の原理から逸脱することなく、好ましい実施形態において多くの変更を行うことができることは理解されよう。本開示又は好ましい実施形態の性質におけるこれらの改変及び他の改変は、本明細書の開示から当業者には明らかであり、従って、前述の説明的な事項は、単に本開示の例示と解釈されるべきであり、限定的なものではないと明確に理解されるべきである。

20

30

40

【図 1 a】

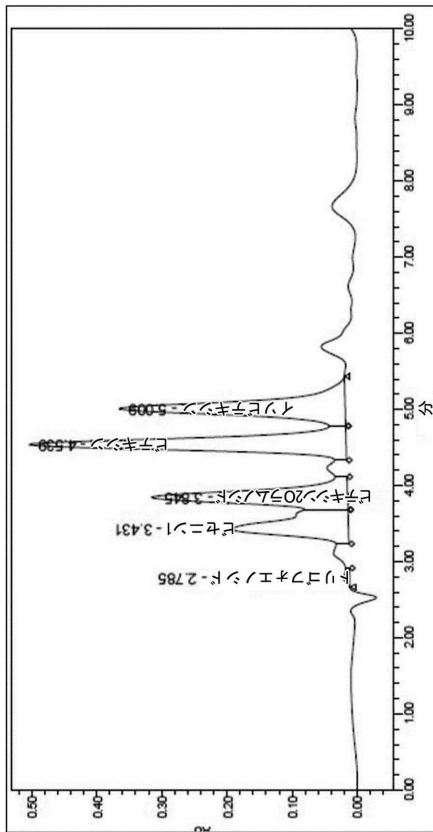


Figure 1a

【図 1 b】

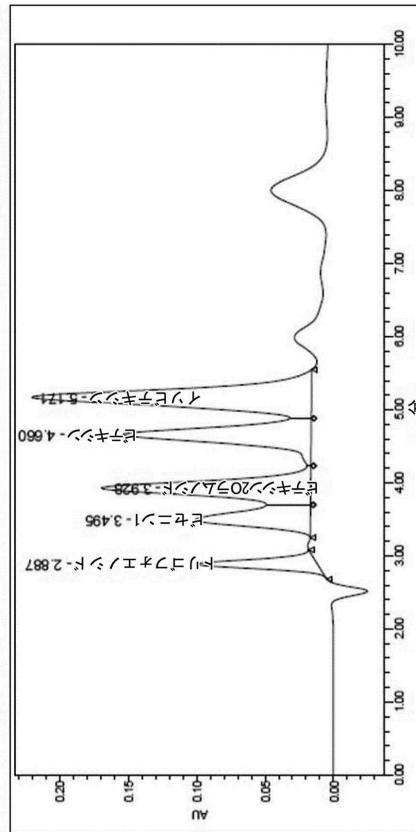


Figure 1b

【図 2 a】

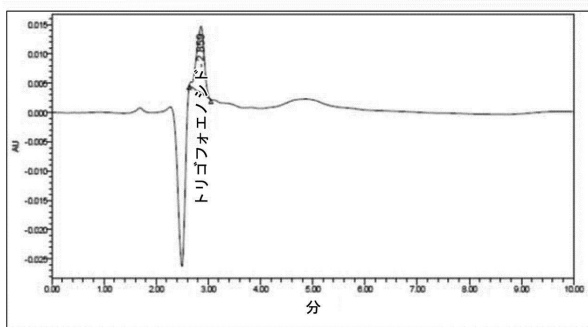


Figure 2a

【図 2 c】

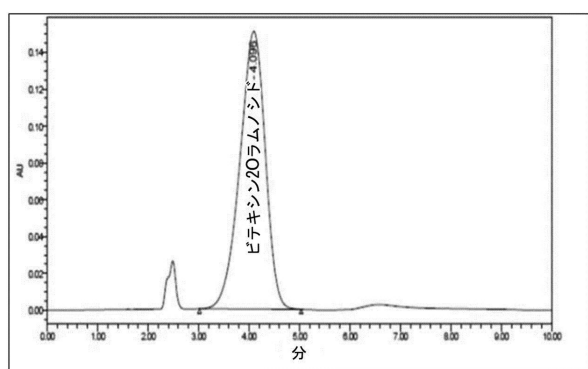


Figure 2c

【図 2 b】

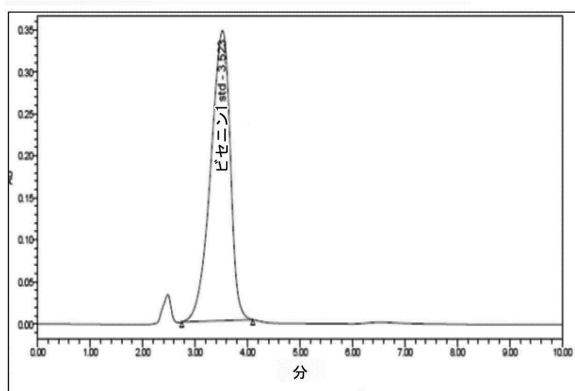


Figure 2b

【図 2 d】

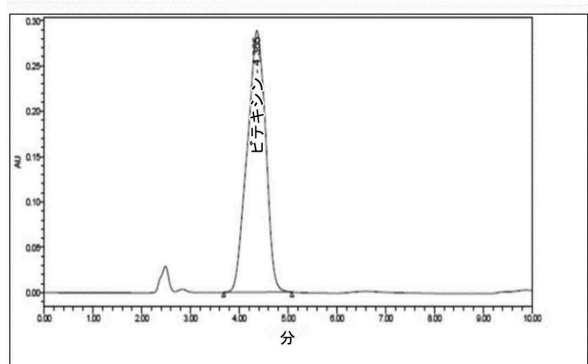


Figure 2d

【図 2 e】

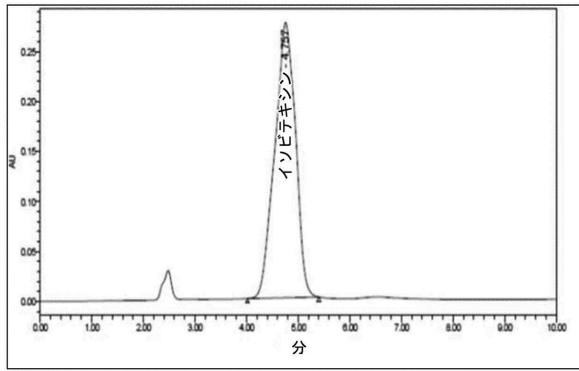


Figure 2e

【図 3】

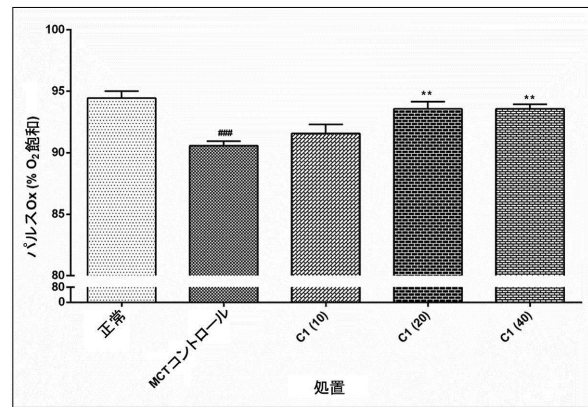


Figure 3

【図 4】

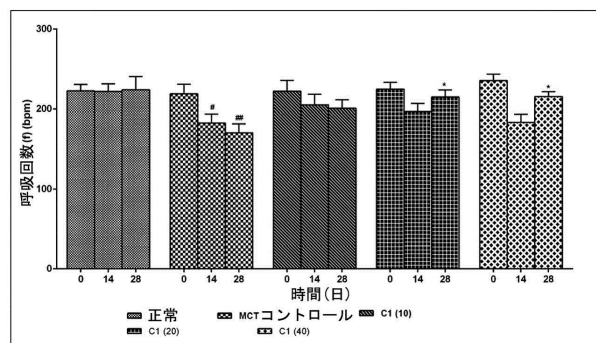


Figure 4

【図 5】

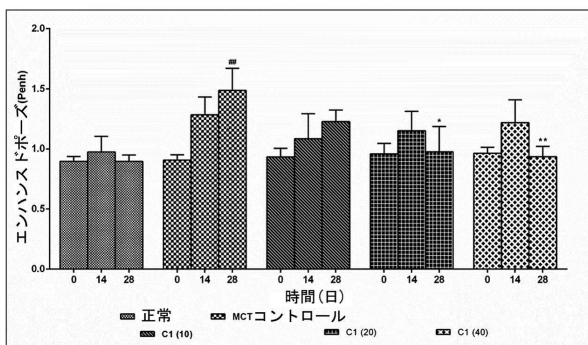


Figure 5

【図 6 b】

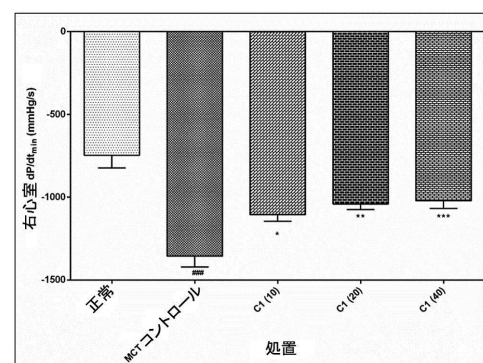


Figure 6b

【図 6 a】

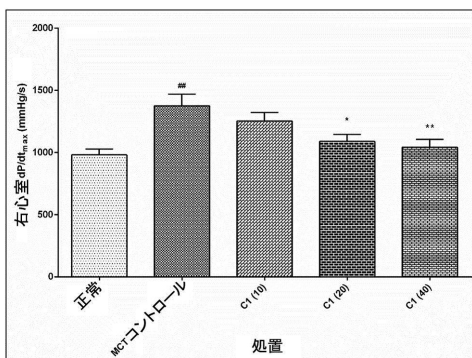


Figure 6a

【図 7 a】

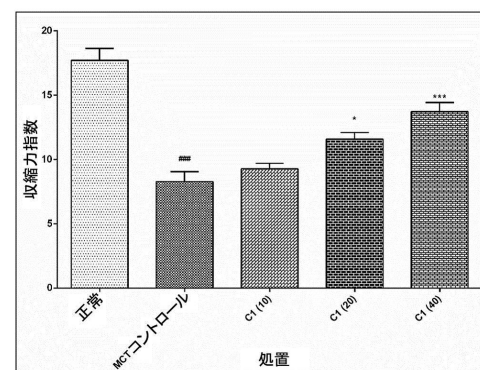


Figure 7a

【図 7 b】

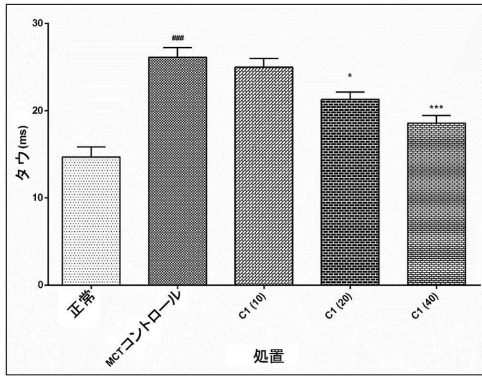


Figure 7b

【図 9】

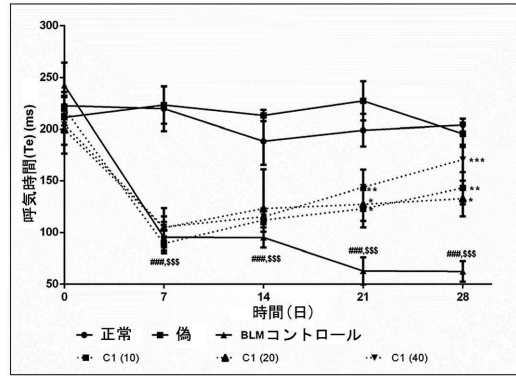


Figure 9

【図 8】

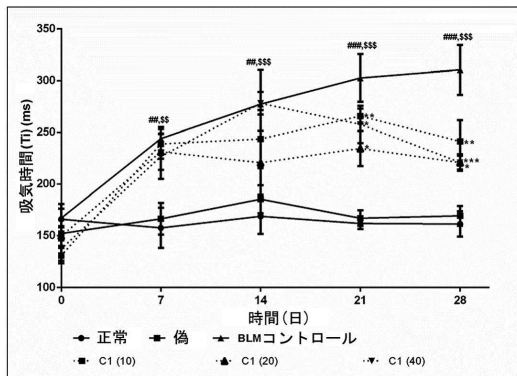


Figure 8

【図 10】

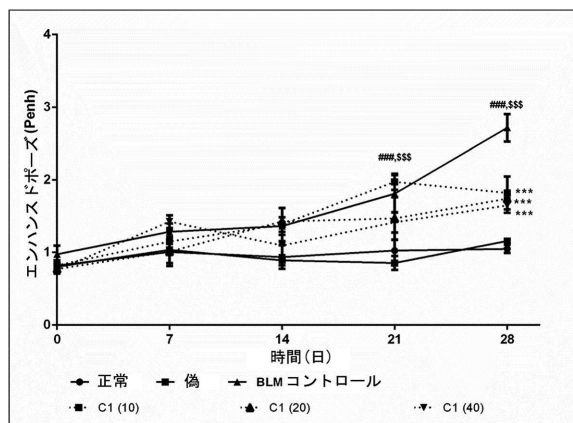


Figure 10

【図 12】

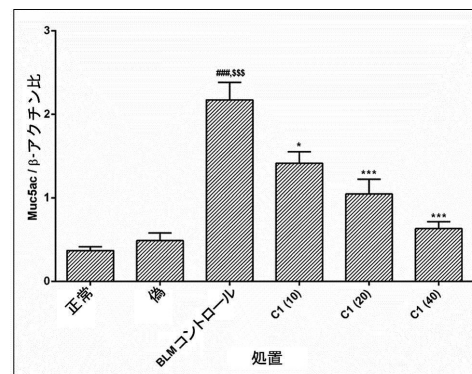


Figure 12

【図 11】

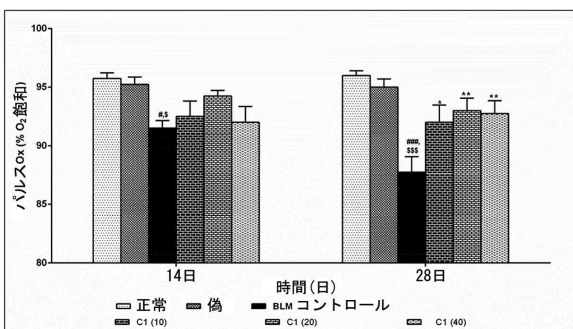


Figure 11

【図 13】

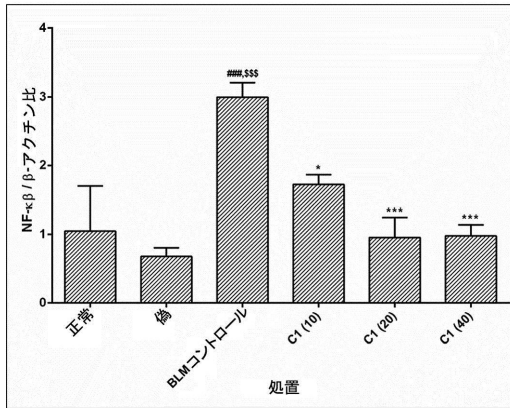


Figure 13

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 31/352 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 36/48 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	
A 2 3 L 33/105 (2016.01)	A 6 1 K 31/352	
A 2 3 L 33/125 (2016.01)	A 6 1 K 36/48	
A 6 1 K 131/00 (2006.01)	A 2 3 L 33/105	
	A 2 3 L 33/125	
	A 6 1 K 131:00	

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 スニル バースカラン

インド国, マハーラーシュトラ 4 1 1 0 4 8, プネー, コンドワ, エヌアイビーエム アンドリ
ロード, クローバー ヒル, ロー ハウス ナンバー 1 2 9

(72)発明者 モハン ピシュワラマン

インド国, マハーラーシュトラ 4 1 1 0 4 8, プネー, コンドワ, サランケ ビハール ロード
, グラジオリ ニブディータ ガーデنز, ディー - 3 0 1

審査官 井上 能宏

(56)参考文献 中薬大辞典, 1 9 9 8 年, 第二巻, 第879-881頁

European Respiratory Journal, 2 0 1 1 年, Vol.38, Suppl.55, p.676

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K、A 6 1 P

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)