

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7599219号  
(P7599219)

(45)発行日 令和6年12月13日(2024.12.13)

(24)登録日 令和6年12月5日(2024.12.5)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 35/644 (2015.01)	A 6 1 K	35/644
A 6 1 K 47/10 (2017.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K 8/98 (2006.01)	A 6 1 K	8/98
A 6 1 K 8/86 (2006.01)	A 6 1 K	8/86
請求項の数 27 (全54頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-548196(P2021-548196)	(73)特許権者	521361350
(86)(22)出願日	令和2年2月12日(2020.2.12)		アピオティックス テクノロジーズ ディ .オー.オー. A P I O T I X T E C H N O L O G I E S D . O . O .
(65)公表番号	特表2022-520665(P2022-520665 A)		クロアチア共和国 スプリト 2 1 0 0 0 ,フルヴォイエヴァ 1 2 H r v o j e v a 1 2 , 2 1 0 0 0 S p l i t , C r o a t i a
(43)公表日	令和4年3月31日(2022.3.31)	(74)代理人	110000659
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/053573		弁理士法人広江アソシエイツ特許事務所
(87)国際公開番号	WO2020/169425	(72)発明者	ラディッチ, サシャ
(87)国際公開日	令和2年8月27日(2020.8.27)		クロアチア共和国 スプリト ハエル- 2 1 0 0 0 , プコヴァルスカ 1 0 7 セ
審査請求日	令和5年2月10日(2023.2.10)	(72)発明者	ラディッチ, ボゾ
(31)優先権主張番号	P20190325A		最終頁に続く
(32)優先日	平成31年2月19日(2019.2.19)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	クロアチア(HR)		
(31)優先権主張番号	P20200178A		
(32)優先日	令和2年2月3日(2020.2.3)		

(54)【発明の名称】 液体プロポリス抽出物、その製剤およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(A) 0.1 ~ 10.0 % w / w のプロポリス抽出物；および

(B) 90.0 ~ 99.9 % w / w の抽出溶媒

からなる、医薬品、化粧品もしくは農薬成分または食品成分としての液体プロポリス抽出物であって；

前記抽出溶媒は、

(B.1) 96.5 ~ 99.9 % w / w の1種または複数種の液体ポリエチレングリコール < P E G > 2 0 0 ~ 6 0 0 ；および

(B.2) 0.1 ~ 3.5 % w / w のレシチンまたは加水分解レシチン

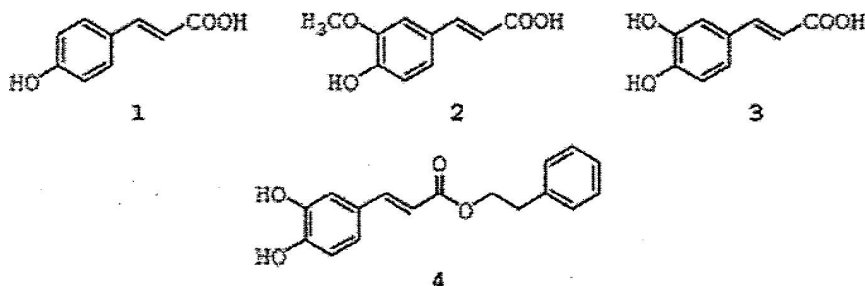
からなり、前記液体プロポリス抽出物は、

(I) 1 : 2 ~ 1 : 2 0 w / w の薬物としての粗プロポリスおよび最終抽出物の定量的重量比 < D E R > ；ならびに

(II) p - クマル酸 < 1 > 、トランス - フェルラ酸 < 2 > 、コーヒー酸 < 3 > および 2 - フェニルエチル 3 , 4 - ジヒドロキシシナメート < 4 > ；

10

## 【化1】



からなる群から選択されるプロポリス活性物質の定量的含有量により標準化され、前記の主要な活性物質の4つのうちの最低2つの定量的組成は、  
 (i) 100 ~ 1,300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のp-クマル酸<1>;  
 (ii) 75 ~ 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のトランスフェルラ酸<2>;  
 (iii) 25 ~ 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のコーヒー酸<3>;および  
 (iv) 40 ~ 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の2-フェニルエチル3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート<4>;CAPE  
 である、液体プロポリス抽出物。

## 【請求項2】

前記液体ポリエチレングリコール<PEG>が、ポリエチレングリコール200、ポリエチレングリコール300、ポリエチレングリコール400、ポリエチレングリコール600、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される、請求項1に記載の医薬品、化粧品もしくは農薬成分、または食品成分としての液体プロポリス抽出物。

## 【請求項3】

前記液体ポリエチレングリコール<PEG>が、ポリエチレングリコール200、ポリエチレングリコール400、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される、請求項2に記載の医薬品、化粧品もしくは農薬成分、または食品成分としての液体プロポリス抽出物。

## 【請求項4】

レシチンまたは加水分解レシチンが、2 ~ 12の親水性-親油性バランス<HLB>因子を特徴とし、大豆レシチン<Glycine max L>、ヒマワリレシチン<Helianthus annuus L>、菜種レシチン<Brassica napus L>;キャノーラレシチン<Brassica rapa L>、ニワトリ(Gallus gallus domesticus L)の卵からのレシチン、前記レシチンの脱油生成物、前記供給源からの水素化レシチン、前記供給源からの加水分解レシチン、前記レシチンの酵素修飾誘導体、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される、請求項1から3に記載の医薬品、化粧品もしくは農薬成分または食品成分としての液体プロポリス抽出物。

## 【請求項5】

レシチンが、大豆<Glycine max L>、ヒマワリ<Helianthus annuus L>、菜種<Brassica napus L>もしくはキャノーラ<Brassica rapa L>由来の天然レシチン、脱油、水素化、加水分解もしくは酵素修飾されたレシチン、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される、請求項4に記載の医薬品、化粧品もしくは農薬成分または食品成分としての液体プロポリス抽出物。

## 【請求項6】

前記抽出溶媒が、  
 (i) 97 ~ 99% w/wのポリエチレングリコール<PEG>200、ポリエチレングリコール300、ポリエチレングリコール400またはそれらの混合物;および  
 (ii) 1 ~ 3% w/wの大豆<Glycine max L>、ヒマワリ<Helia

10

20

30

40

50

nthus annuus L>、菜種<Brassica napus L>もしくはキャノーラ<Brassica rapa L>由来の天然レシチン、脱オレイン化レシチンもしくは加水分解レシチン；またはこれらの物質の混合物

からなる、請求項 1 から 5 に記載の医薬品、化粧品もしくは農薬成分または食品成分としての液体プロポリス抽出物。

【請求項 7】

( I ) 1 : 3 ~ 1 : 5 w / w の比率での最終抽出物に対する薬物としての粗プロポリスの定量的重量比<DER>

；および

( II ) p - クマル酸< 1 >、トランス - フェルラ酸< 2 >、コーヒー酸< 3 >および 2 - フェニルエチル 3 , 4 - ジヒドロキシ - シンナメート< 4 > からなる群から選択されるプロポリス活性物質の定量的組成

で標準化され、前記の主要な活性物質の 4 つのうちの最低 2 つは、以下の定量的含有量：

( i ) 500 ~ 1,300 μg / mL の p - クマル酸< 1 >；

( ii ) 300 ~ 800 μg / mL のトランス - フェルラ酸< 2 >；

( iii ) 100 ~ 300 μg / mL のコーヒー酸< 3 >；および

( iv ) 100 ~ 400 μg / mL の 2 - フェニルエチル 3 , 4 - ジヒドロキシ - シンナメート< 4 ; CAPE >

に対応する、請求項 1 から 3 に記載の医薬品、化粧品もしくは農薬成分または食品成分としての液体プロポリス抽出物。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の液体プロポリス抽出物を生成するための方法であって、

( i ) 粗プロポリスを - 20 で最低 1 時間冷却するステップと；

( ii ) 冷却したプロポリスを 1 ~ 8 mm の細孔でふるいにかけて粉碎するステップと；

( iii ) 以下の条件下：

( a ) 粗プロポリスおよび抽出溶媒の重量比 = 1 : 2 ~ 1 : 20 w / w ；

( b ) 10 ~ 150 の抽出温度；ならびに

( c ) 5 分 ~ 72 時間の抽出時間

で抽出溶媒により粗プロポリスを抽出するステップと；

( iv ) このようにして得られた混合物を、100 μm ~ 5 μm の細孔を有する一連のフィルタを通して濾過し、未溶解残留物および液体プロポリス抽出物を生成するステップと；

( v ) 高速液体クロマトグラフィー<HPLC>により主要な活性プロポリス物質 1 ~ 4 を定量分析するステップと；

( vi ) 活性物質 1 ~ 4 の望ましい含有量までステップ ( iii ) で使用された新鮮な抽出溶媒で希釈することにより、ステップ ( v ) で主要な活性物質 1 ~ 4 の正確な定量的組成が決定された、このようにして得られた液体プロポリス抽出物を標準化するステップとを含む方法。

【請求項 9】

前記抽出ステップ ( iii ) が、以下の条件下：

( a ) 粗プロポリスおよび抽出溶媒の重量比 = 1 : 3 ~ 1 : 5 w / w ；

( b ) 15 ~ 70 の抽出温度；ならびに

( c ) 1 ~ 24 時間の抽出時間

で行われる、請求項 8 に記載の液体プロポリス抽出物を生成するための方法。

【請求項 10】

高速液体クロマトグラフィー<HPLC>法が、以下の条件：

( i ) クロマトグラフィーカラム：Ascendis express ; C18 ; 寸法：15 cm x 3 . 0 mm ; カラム内の粒子径：2 . 7 μm ；

( ii ) 移動相：A = 0 . 1 % ギ酸水溶液、B = メタノール；勾配：0 min、80 %

A、20% B；3 min、70% A、30% B；60 min、20% A、80% B；90 min、20% A、80% B；100 min、70% A、30% B；105 min、80% A、20% B；

(iii) カラム温度：30；

(iv) 流量：0.25 mL/min；

(v) 分析時間：110 min；

(vi) UV-VIS 検出器の波長：検出用：370 nm、積分用：290 nm；

(vii) 注入量：10 µL；

(viii) 圧力：210～290 バール

で主要な活性物質 1～4 の定量に使用される、請求項 8 および 9 に記載の液体プロポリス抽出物を生成するための方法。

10

#### 【請求項 11】

請求項 1 から 7 に記載の標準化された液体プロポリス抽出物の使用であって、該液体プロポリス抽出物が薬物、医療デバイスまたは治療薬からなる群から選択される医薬製品を製造するための活性医薬成分または賦形剤として用いられる使用。

#### 【請求項 12】

請求項 1 から 7 に記載の標準化された液体プロポリス抽出物の使用であって、該液体プロポリス抽出物が化粧品を製造するための活性化粧品成分または賦形剤として用いられる使用。

#### 【請求項 13】

請求項 1 から 7 に記載の標準化された液体プロポリス抽出物の使用であって、該液体プロポリス抽出物が機能性食品、食品サプリメント、および特別な栄養目的のための食品を製造するための食品成分として用いられる使用。

20

#### 【請求項 14】

請求項 1 から 7 に記載の標準化された液体プロポリス抽出物の使用であって、該液体プロポリス抽出物が獣医用医薬製品、動物飼料、動物飼料サプリメント、または獣医学的用途のための治療薬からなる群から選択される獣医学製品を製造するための活性医薬成分または賦形剤として用いられる使用。

#### 【請求項 15】

請求項 1 から 7 に記載の標準化された液体プロポリス抽出物の使用であって、該液体プロポリス抽出物が殺真菌剤、殺細菌剤、殺ウイルス剤、殺虫剤、殺線虫剤および植物強化剤からなる群から選択される農薬製品を製造するための活性農薬成分または賦形剤として用いられる使用。

30

#### 【請求項 16】

(I) 5～95% w/w の請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の液体プロポリス抽出物；および

(II) 最終組成物の最大 100% w/w の、溶液、懸濁液、ゲル、クリーム、軟膏、経口または経鼻適用のためのスプレーからなる群から選択される最終剤形調製に必要な 1 種または複数種の医薬賦形剤

からなる医薬組成物であって、

前記組成物は、以下の値の範囲内の主要な活性プロポリス物質の 4 つ：

(i) 10～1,300 µg/g の p-クマル酸<1>；

(ii) 10～800 µg/g のトランス-フェルラ酸<2>；

(iii) 5～300 µg/g のコーヒー酸<3>；および

(iv) 5～400 µg/g の 2-フェニルエチル 3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート<4>；CAPE>

のうちの最低 2 つの定量的含有量を特徴とする、医薬組成物。

#### 【請求項 17】

前記医薬賦形剤が、希釈剤、保湿剤、保存剤、キレート剤、抗酸化剤、増粘剤、皮膚軟化剤、乳化剤、等張化剤、および pH 制御剤を含む群から選択される、請求項 16 に記載

40

50

の医薬組成物。

【請求項 18】

請求項 16 および 17 に記載の医薬組成物を生成するための方法であって、

(i) 請求項 1 から 7 に記載の標準化された液体プロポリス抽出物を希釈剤に添加し、それらを均質化するステップと；

(ii) 1 種または複数の他の賦形剤を添加し、それらを均質化するステップとを含み；

ステップ (i) および (ii) は、10 ~ 100 の温度で、好ましくは 20 ~ 60 の温度で 1 ~ 5 分間行われ；

続いて、

(iii.a) 溶液もしくはスプレー用溶液の剤形調製の場合、必要に応じて滅菌濾過を含む最終溶液の濾過を実行するステップ；

(iii.b) ゲルもしくは懸濁液の剤形調製の場合、増粘剤の添加およびその均質化を行うステップ；

(iii.c) クリームの剤形調製の場合、皮膚軟化剤および乳化剤を混合し、50 ~ 80 の温度で 1 ~ 15 分間均質化することにより脂肪相の調製を行い、次いでステップ (ii) の溶液を添加し、50 ~ 80 に加熱し、続いて高剪断もしくは高圧ホモジナイザーを使用して、50 ~ 80 、好ましくは 55 ~ 65 の温度で 1 ~ 30 分間乳化し、その後 65 ~ 20 ° の温度で 10 ~ 120 分間均質化するステップ；または

(iii.d) 軟膏の剤形調製の場合、ステップ (ii) の溶液を、事前に溶解した皮膚軟化剤、および最終的には乳化剤の混合物と、50 ~ 70 の温度で 5 ~ 30 分間混合し、続いて 70 ~ 20 の温度で 10 ~ 120 分間均質化するステップとを含む方法。

【請求項 19】

炎症性疾患、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス性疾患、自己免疫疾患、機能性胃腸障害、粘膜再生、熱傷処置および創傷治療、ならびに癌患者の群からのヒトおよび動物の疾患および状態の処置のための、請求項 16 又は 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

歯肉炎、歯周炎、喉頭炎、胃炎、大腸炎、痔核疾患、皮膚炎、外耳炎症、副鼻腔炎、鼻炎、膣炎および乳腺炎の群からの炎症性疾患の処置のための、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

以下の群の細菌：

(i) グラム陽性菌：Staphylococcus spp：Staphylococcus aureus、MRSA <メチシリン耐性Staphylococcus aureus>、MSSA <メチシリン感受性Staphylococcus aureus>、Staphylococcus intermedius、Staphylococcus pseudintermedius；コアグラージェ陰性ブドウ球菌：Staphylococcus epidermidis、Staphylococcus saprophyticus、Staphylococcus hyicus；Streptococcus spp：Streptococcus uberis、Streptococcus bovis、Streptococcus dysgalactiae、Streptococcus agalactiae、Streptococcus canis、Streptococcus pyogenes、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus oralis、Streptococcus thermophilus；Peptostreptococcus spp；Corynebacterium spp：Corynebacterium bovis；Tropheperella pyogenes；Nocardia spp；Bacillus subtilis；Bacillus cereus；腸球菌：Enterococcus faecium、Enterococcus faecalis；バンコマイシン耐性腸

10

20

30

40

50

球菌<VRE>: *Enterococcus casseliflavus*; および

(ii) グラム陰性菌: *Escherichia coli*; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Haemophilus influenzae*; *Salmonella choleraesuis*; *Yersinia enterocolitica*; *Enterobacter* spp<*Enterobacter cloacae*>; *Klebsiella* spp: *Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*; *Shigella flexneri*; *Burkholderia cepacia*; *Proteus mirabilis*; *Proteus vulgaris*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Actinomyces israelii*; *Bacteroides fragilis*; *Helicobacter pylori*; *Campylobacter coli*; *Campylobacter jejuni*; *Porphyromonas gulae*; *Porphyromonas salivosa*; *Porphyromonas denticanis*; *Prevotella intermedia*; *Treponema* spp; *Bacteroides plachnicus*によって引き起こされる細菌感染症の処置のための、請求項19に記載の医薬組成物。

10

【請求項22】

*Candida* spp: *Candida albicans*、*Candida dubliniensis*、*Candida glabrata*、*Candida kruzei*、*Candida tropicalis*、*Candida parapsilosis*; *Aspergillus* spp: *Aspergillus niger*、*Aspergillus versicolor*; *Penicillium pinophilum*; *Paecilomyces variotii*; *Trichoderma virens*; *Chaetomium globosum*; *Malassezia pachydermatis*の群からの真菌によって引き起こされる真菌感染症の処置のための、請求項19に記載の医薬組成物。

20

【請求項23】

単純ヘルペスウイルス<HSV>; ヒトパピローマウイルス<HPV>; エプスタイン-バーウイルス<EBV>; サイトメガロウイルス<CMV>; ポリオウイルス; インフルエンザAおよびBウイルス; レトロウイルス; ワクシニアウイルス; 一般的な風邪ウイルス: ライノウイルス、ピコルナウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス<HPIV>、ヒトメタニューモウイルス<HMPV>、コロナウイルス、アデノウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス<HRSV>、エンテロウイルスの群からのウイルスによって引き起こされるウイルス性疾患の処置のための、請求項19に記載の医薬組成物。

30

【請求項24】

乾癬、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病および多発性硬化症の群からの自己免疫疾患の処置のための、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項25】

皮膚および粘膜のがん、胃腸腫瘍、結腸直腸癌の群からのがん疾患の処置のための、請求項19に記載の医薬組成物。

40

【請求項26】

動物の乳腺炎の処置のための、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項27】

食道、胃、十二指腸、小腸および結腸の障害、中枢性胃腸痛、胆嚢およびオッディ括約筋障害、肛門直腸障害、小児および青年特異的胃腸障害の群から選択される機能性胃腸障害の処置のための、請求項19に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、新規な液体標準化プロポリス抽出物、該抽出物をベースとした新規な医薬組成物への調製方法、およびその使用に関する。

【0002】

技術的課題

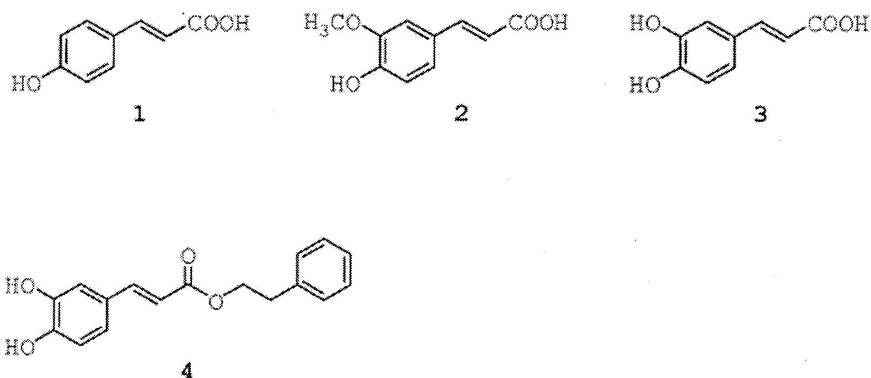
プロポリスが蜜蝋と多数の天然有機化合物との混合物であるという事実に関して、異なる抽出プロセスが非常に異なる組成の活性物質の抽出物をもたらす。適切な分析方法の使用と共に、主にある特定の群の有機化合物を選択的に抽出する能力を有する化学選択的抽出溶媒（ES）を使用すると、一貫した標準化されたプロポリス抽出物組成物を達成することが理論的に可能である。

【0003】

本発明によって解決される技術的課題は、以下を含む：

(i) 人間および動物の両方の生物に対するいくつかの有益な薬理的活性が知られている、フェノール性プロポリス酸、パラ-クマル酸（1）、トランス-フェルラ酸（2）、コーヒー酸（3）、およびコーヒー酸の2-フェニルエチルエステル、2-フェネチル3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート（4；CAPE）の高い標準化された含有量を特徴とする、非アルコール性液体プロポリス抽出物；

【化1】



(ii) その生成プロセス；

(iii) 既知の標準化された含有量のプロポリス活性物質1~4を有する医薬品、化粧品、獣医学製品、農薬、または食品の製造のための使用；ならびに特に、

(iv) 炎症性および感染性疾患や、最先端のある特定の参考文献によって示唆されているように、特定のプロポリス活性物質の抗酸化、抗炎症および免疫調節活性がそれらの発生の病因における重要な役割を果たす疾患および状態の処置に効果的である、前述のプロポリス抽出物をベースとした医薬組成物。

【0004】

高い標準化された含有量の非常に生物活性の高いプロポリス成分を有する、ごくわずかな蜜蝋含有量のアルコール不含抽出物および他のバラストプロポリス化合物は、非常に価値の高い医薬品、獣医学製品、農薬または機能性食品もしくは食品サプリメントの開発および製造の基礎となる。対照的に、この目的のためのエタノール、グリセロールまたは1,2-プロピレングリコールをベースとした標準的プロポリス抽出物の使用は、上述のプロポリス活性物質の未知の含有量、またはフラボノイドプロポリス成分に対する貴重なフェノール酸およびCAPEの低い定量的組成等の様々な困難を伴う。

【0005】

本発明は、

(i) 粗プロポリスの化学選択的抽出プロセスに役立つ特定の抽出溶媒（ES）製剤の使用；

(ii) 主要な活性物質1~4を含む活性プロポリス成分の定量方法；

( i i i ) このようにして調製された液体プロポリス抽出物の、本発明に従い所望のレベルの活性物質 1 ~ 4 までである特定の量の同じ抽出溶媒で希釈することによる標準化に基づいており、抽出溶媒は、2 種以上の食品および薬学的に許容される物質からなり、また、最終生成物において、液体の標準化されたプロポリス抽出物からなる。この同じ抽出溶媒は、担体または希釈剤の役割を有し、また本発明は、

( i v ) 炎症性および感染性疾患の処置に効果的な薬剤であることが証明された、本発明による標準化プロポリス抽出物をベースとした医薬組成物に基づいている。その広範囲の薬理活性のために、それは、炎症性疾患、細菌および真菌感染、ウイルス性疾患、自己免疫疾患、粘膜再生、火傷および創傷の処置、ならびにがん疾患等の様々な疾患および状態の処置に使用することができる。

10

【背景技術】

【0006】

先行技術

プロポリスは、ハチによって収穫された天然産物であり、ハチにとっては、蜂の巣の小さな望ましくない開口部を閉じるための接着剤として働く。プロポリスは、主成分としての蜜蝋と、多数の各種有機化合物とを含む。それらの多くは、有意な有益な薬理学的効果を示し、例えば参考文献 1 を参照されたい：

【0007】

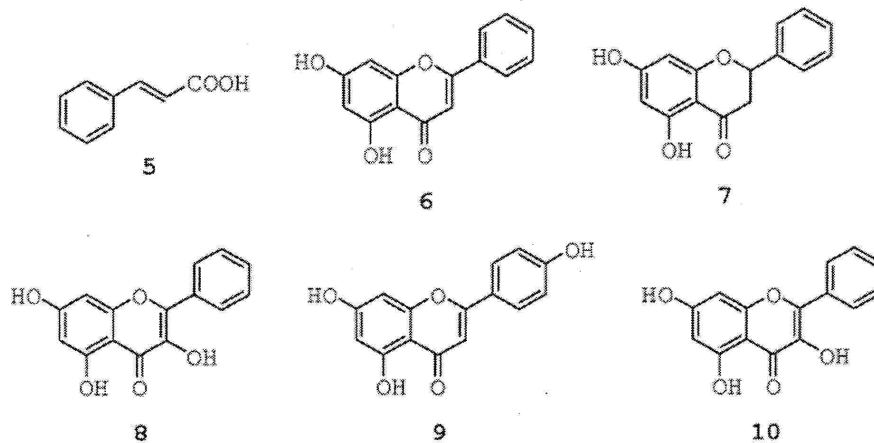
1) 非特許文献 1

【0008】

上述の活性物質 1 ~ 4 の他に、プロポリスは一連の他の天然化合物全体を含有し、例えば、酸の中にはトランス - 桂皮酸 ( 5 )、および比較的豊富な量のクリシン ( 6 )、ピノセンプリン ( 7 )、ガランギン ( 8 )、アピゲニン ( 9 ) およびケンペロール ( 10 ) を含む一連のフラボノイドも含有する。

20

【化 2】



30

【0009】

伝統的に、粗プロポリスは、エタノールまたはエタノールおよび水の混合物で抽出され、いわゆるプロポリスのチンキ剤が得られる。そのような液体プロポリス抽出物は、以下のいくつかの欠点を特徴とする：

( i ) 比較的攻撃的な溶媒 ( エタノール ) の存在；

( i i ) アルコールベースの製品は、子供、妊娠中や授乳中の女性および特定の患者には適していない；ならびに、

( i i i ) そのような抽出物が有効成分として使用される医薬品および他の製品の製造中に、水との混合相を介してその分解を引き起こす比較的高い含有量の蜜蝋。

【0010】

40

50

エタノールの他に、抽出溶媒としては、グリセロール、水、グリセロールおよび水の混合物、ならびに他の有機溶媒が使用されている。

【0011】

このようにして、Tsukadaらは、1 : 2 w / wのプロポリス : 抽出溶媒の比および90 ~ 160 での抽出溶媒としてのグリセロールの使用およびその後の濾過を開示した。そのようなグリセロール抽出物は水溶性であり、活性医薬成分 (API) としての医薬品の製造に適している。参考文献2を参照されたい :

【0012】

2) 特許文献1

【0013】

水性プロポリス抽出物も先行技術において説明されている。ESとしての水による抽出は、30 ~ 50 の温度で6 ~ 8分間実施することができ、これは濾過後に液体プロポリス抽出物を直接与える。後者は、最終的に、マルトデキストリンおよびアラビアガム等の適切な担体上への噴霧乾燥技術によるマイクロカプセル化を介して固体抽出物にさらに処理することができる。参考文献3を参照されたい :

【0014】

3) 特許文献2

【0015】

レシチンを含む抽出溶媒 (ES) の成分としての表面活性剤の使用は、従来技術において一般に知られている。例えば、Paradkarらは、40 ~ 90 で2 ~ 24時間、水性ポリソルベート溶液を使用してプロポリス抽出を行い、液体プロポリス抽出物を得る方法を説明した。参考文献4を参照されたい :

【0016】

4) 特許文献3

【0017】

Sosnowskiは、1, 2 - プロピレングリコール、ポリエチレングリコール (PEG) およびこれらの溶媒と水との混合物を含む様々な有機溶媒を用いたプロポリス抽出のための方法を開示した。参考文献5を参照されたい :

【0018】

5) 特許文献4

【0019】

Chunらは、とりわけ、抽出溶媒としての1, 3 - ブチレングリコール中の液体プロポリス抽出物をベースとした医薬組成物であって、水素化レシチンを他の乳化剤と共に使用することによって、このプロポリス抽出物を含むナノ粒子を含有する医薬剤形に変換される医薬組成物を開示した。参考文献6を参照されたい :

【0020】

6) 特許文献5

【0021】

この文献は、1, 3 - ブチレングリコールによるプロポリス活性物質の抽出を促進するためにレシチンを使用していないという事実にもかかわらず、確かに界面活性剤としてのその使用の可能性を示唆しており、これは最終的にある特定の脂肪活性プロポリス成分のより極性の溶媒における抽出および乳化を改善することができる。

【0022】

プロポリス分析に関して、多数の成分を含む複雑なプロポリス抽出物中のプロポリス活性物質の定量のための分析方法が、先行技術において数多くある。一例として、本発明で使用されるものと同様の分析方法が、中国の著者Cui - Pingらの研究において示されている。彼らは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を介した12種類の異なるフラボノイドおよび8種類のフェノール性プロポリス酸の定量方法を説明した。この方法は、とりわけ、定性的プロポリスマーカーとして言及されるp - クマル酸 (1)、トランス - フェルラ酸 (2) およびコーヒー酸 (3) の決定を可能にする。参考文献7を参照さ

10

20

30

40

50

りたい：

【 0 0 2 3 】

7 ) 非特許文献 2

【 0 0 2 4 】

活性物質 1 ~ 1 0 等の含有量のために、プロポリスおよびプロポリス抽出物は、ヒト、動物および植物の健康に対して一連の非常に価値のある有益な薬理学的効果を示す。先行技術には、広範囲の有益な効果を裏付ける多数の科学文献および特許文献が存在し、その中で最も重要なものは、抗炎症性；抗酸化性；免疫調節性；肝臓保護性；抗細菌性、抗ウイルス性、抗真菌性および抗原虫性を含む抗菌性；ならびに抗がん性である。例えば参考文献 8 ~ 1 2 を参照されたい：

10

【 0 0 2 5 】

8 ) 非特許文献 3

9 ) 非特許文献 4

1 0 ) 非特許文献 5

1 1 ) 非特許文献 6

1 2 ) 非特許文献 7

【 0 0 2 6 】

プロポリス抽出物に加えて、有益な薬理学的効果の全範囲が、例えば以下のようなある特定の単離された（純粋な）プロポリス活性物質について先行技術で説明されている：

( i ) p - クマル酸 ( 1 ) ( 参考文献 1 3 および 1 4 を参照されたい ) ；

20

( i i ) トランス - フェルラ酸 ( 2 ) ( 参考文献 1 5 および 1 6 を参照されたい ) ；

( i i i ) コーヒー酸 ( 3 ) ( 参考文献 1 7 および 1 8 を参照されたい ) ；ならびに

( i v ) 2 - フェニルエチル 3 , 4 - ジヒドロキシ - トランス - シンナメート ( 4 ; C A P E ) ( 参考文献 1 9 および 2 0 を参照されたい ) 。これはとりわけ、免疫調節、抗炎症および抗菌活性を示す。

【 0 0 2 7 】

1 3 ) 非特許文献 8

1 4 ) 非特許文献 9

1 5 ) 非特許文献 1 0

1 6 ) 非特許文献 1 1

30

1 7 ) 非特許文献 1 2

1 8 ) 非特許文献 1 3

1 9 ) 非特許文献 1 4

2 0 ) 非特許文献 1 5

【 0 0 2 8 】

さらに、プロポリス活性物質は殺真菌剤、殺菌剤、殺ウイルス剤、殺虫剤、殺線虫剤であり、植物保護に使用される。

【 0 0 2 9 】

強力な抗酸化活性のために、プロポリスは植物を強化し、非生物学的ストレスに対する耐性を高め、感染症に対抗するのを助ける。参考文献 2 1 ~ 2 5 を参照されたい：

40

2 1 ) 非特許文献 1 6 ；

2 2 ) 非特許文献 1 7

2 3 ) 非特許文献 1 8 ；

2 4 ) 非特許文献 1 9 ；

2 5 ) 非特許文献 2 0

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 3 0 】

【 文献 】 特開平 5 - 9 5 7 号公報

【 文献 】 中国特許出願公開 C N 1 0 3 7 8 3 3 4 9 A 号公報

50

【文献】国際公開WO 2011/092511 A 1号公報

【文献】米国特許第4,382,886号公報

【文献】韓国特許出願公開KR 20130134800 A号公報

【非特許文献】

【0031】

【文献】S. Castaldo, F. Capasso: Propolis, and old remedy used in modern medicine, *Fitoterapia* 73 (2002) S1-6

【文献】Z. Cui-ping, H. Shuai, W. Wen-ting, P. Shun, S. Xiao-ge, L. Ya-jing, H. Fu-liang: Development of high-performance liquid chromatographic for quality and authenticity control of Chinese propolis, *J. Food Sci.* 79 (2014) C1315 - C1322

10

【文献】E. L. Ghisalberti: Propolis: A Review, *Bee World* 60 (1979) 59-84

【文献】A. Banskota, Y. Tezuka, S. Kadota: Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis, *Phytother. Res.* 15 (2001) 561-571

【文献】G. A. Burdock: Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 347-363

20

【文献】J. M. Sforcin: Propolis and the immune system: a review, *J. Ethnopharmacol.* 113 (2007) 1-14

【文献】J. W. Dobrowolski, S. B. Vohora, K. Sharma, S. A. Shah, S. A. H. Naqvi, P. C. Dandiya: Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products, *J. Ethnopharmacol.* 35 (1991) 77-82

30

【文献】T. F. Bachiega, C. L. Orsatti, A. C. Pagliarone, J. M. Sforcin: The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages, *Phytother. Res.* 26 (2012) 1308-1313

【文献】K. Pei, J. Ou, J. Huang, S. Ou: p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities, *J. Sci. Food Agric.* 96 (2016) 2956-2962

40

【文献】N. Kumar, V. Pruthi: Potential applications of ferulic acid from natural sources, *Biotechnol. Rep.* 4 (2014) 86-93

【文献】C. Shi, X. Zhang, Y. Sun, M. Yang, K. Song, Z. Zheng, Y. Chen, X. Liu, Z. Jia, R. Dong, L. Cui, X. Xia: Antimicrobial activity of ferulic acid against *Cronobacter sakazakii* and possible mechanism of action, *Foodborne Pathog.*

50

Dis. 13 (2016) 196 - 204

【文献】H. G. Choi, P. T. Tran, J. H. Lee, B. S. Min, J. A. Kim: Anti inflammatory activity of caffeic acid derivatives isolated from the roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *Arch. Pharm. Res.* (2018) 64 - 70

【文献】V. N. Lima, C. D. Oliveira-Tintino, E. S. Santos, L. P. Morais, S. R. Tintino, T. S. Freitas, Y. S. Geraldo, R. L. Pereira, R. P. Cruz, I. R. Menezes, H. D. Coutinho: Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol, *Microb. Pathog.* 99 (2016) 56 - 61

【文献】K. Frenkel, H. Wei, R. Bhimani, J. Ye, J. A. Zadunaisky, M. - T. Huang, T. Ferraro, A. H. Conney, D. Grunberger: Inhibition of Tumor Promoter-mediated Processes in mouse Skin and Bovine Lens by Caffeic Acid Phenethyl Ester, *Cancer Res.* 53 (1993) 1255 - 1261

【文献】A. Russo, R. Longo, A. Vanella: Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin, *Fitother.* 73 (2002) S21 - S29

【文献】C. A. Guginski-Piva, I. dos Santos, A. W. Junior, D. W. Heck, M. F. Flores, K. Pazolini: Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber, *IDESIA (Chile)* 33 (2015) 39 - 47

【文献】Z. Ararso, G. Legesse: Insecticidal action of honeybees propolis extract against larvae of lesser wax moth, *Agric. Biol. J. North Am.* (2015) doi: 10.5251/abjna.2016.7.6.302.306

【文献】L. Kumar, M. K. Mahatma, K. A. Kalariya, S. K. Bishi, A. Mann: Plant Phenolics: Important Bio-Weapon against Pathogens and Insect Herbivores, *Popular Kheti* 2 (2014) 149 - 152

【文献】E. M. Noweer, M. G. Dawood: Efficiency of propolis extract on faba bean plants and its role against nematode infection, *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 74 (2009) 593 - 603

【文献】K. Kulbat: The role of phenolic compounds in plant resistance, *Biotechnol. Food Sci.* 80 (2016) 97 - 108

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0032】

我々の知る限り、低い(0.1~3.5% m/m) レシチン含有量を含む、液体ポリエチレングリコールをベースとした特定の抽出溶媒(ES)の、プロポリス抽出化学選択性の増強剤としての使用は、先行技術において説明されていない。本発明からのそのよ

10

20

30

40

50

うな特定のESの適用は、粗プロポリス抽出における化学選択性の向上を可能にし、それぞれの活性物質1～4の含有量が著しく向上した対応する液体抽出物をもたらす。

【0033】

また、本発明による医薬組成物中の活性医薬成分(API)としての前述の特定の標準化された液体プロポリス抽出物の使用は、本発明の詳細な説明に記載されているように、その使用のための一連の異なる適応症において予想外の改善を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0034】

本発明は、特定の抽出溶媒(ES)による粗プロポリス抽出の予想外の有効性および化学選択性に基づく。後者は、液体ポリエチレングリコール(PEG)、例えばPEG400、およびレシチンまたは加水分解レシチンの96.5～99.9:0.1～3.5%w/wの比の混合物からなる。

10

【0035】

抽出溶媒(ES)は、プロポリス活性物質であるp-クマル酸(1)、トランス-フェルラ酸(2)、コーヒー酸(3)および2-フェネチル3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート(4;CAPE)を効果的かつ化学選択的に抽出する。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に基づく適切な分析方法の使用は、そのように調製された一次抽出物中の活性物質1～4の定量を可能にする。後者は、本発明による活性物質1～4の所望の含有量まで、抽出ステップで使用したのと同じESで希釈することによってさらに標準化される。このようにして、本発明による、既知の標準化された濃度の主要な活性物質1～4を有する液体プロポリス抽出物が得られる。これは、活性医薬成分(API)、活性化粧品成分(ACI)、または機能性食品および食品サプリメントを製造するための食品成分としてさらに使用される。

20

【0036】

主要な活性物質であるp-クマル酸(1;10～1,300μg/mL)、トランス-フェルラ酸(2;10～800μg/mL)、コーヒー酸(3;5～300μg/mL)、および2-フェネチル3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート(4;5～400μg/mL)を含有する液体プロポリス抽出物をベースとした本発明の組成物は、炎症性疾患、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス性疾患、自己免疫疾患、機能性胃腸障害の治療、粘膜再生、熱傷および創傷の処置、ならびにがん疾患の処置に有効な薬剤である。

30

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】主要なプロポリス成分1～4および付随する成分5～10の典型的なHPLCクロマトグラムを示す図である。

【図2-1】図2.1は、エタノール(96%)、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中のプロポリス活性物質1の定量的組成の結果を示す図である。図2.2は、エタノール(96%)、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中のプロポリス活性物質2の定量的組成の結果を示す図である。図2.3は、エタノール(96%)、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中のプロポリス活性物質3の定量的組成の結果を示す図である。図2.4は、エタノール(96%)、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中のプロポリス活性物質4の定量的組成の結果を示す図である。

40

【図2-2】図2.5は、エタノール(96%)、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質5の定量的組成の結果を示す図である。図2.6は、エタノール(96%)、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質6の定量的組成の結果を示す図である。図2.7は、エタノール(96%)、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの

50

混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 7 の定量的組成の結果を示す図である。図 2 . 8 は、エタノール ( 9 6 % )、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 8 の定量的組成の結果を示す図である。図 2 . 9 は、エタノール ( 9 6 % )、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 9 の定量的組成の結果を示す図である。図 2 . 1 0 は、エタノール ( 9 6 % )、ならびにエタノールと異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 1 0 の定量的組成の結果を示す図である。

【図 3 - 1】図 3 . 1 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中のプロポリス活性物質 1 の定量的組成の結果を示す図である。図 3 . 2 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中のプロポリス活性物質 2 の定量的組成の結果を示す図である。図 3 . 3 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中のプロポリス活性物質 3 の定量的組成の結果を示す図である。図 3 . 4 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中のプロポリス活性物質 4 の定量的組成の結果を示す図である。

【図 3 - 2】図 3 . 5 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 5 の定量的組成の結果を示す図である。図 3 . 6 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 6 の定量的組成の結果を示す図である。図 3 . 7 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 7 の定量的組成の結果を示す図である。図 3 . 8 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 8 の定量的組成の結果を示す図である。図 3 . 9 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 9 の定量的組成の結果を示す図である。図 3 . 1 0 は、ポリエチレングリコール 4 0 0、ならびにポリエチレングリコール 4 0 0 と異なる種類および濃度のレシチンとの混合物での抽出によって得られた液体プロポリス抽出物中の付随する物質 1 0 の定量的組成の結果を示す図である。

【図 4】本発明による標準化された液体プロポリス抽出物を生成するための方法のブロックスキームを示す図である。

【図 5】本発明の医薬製剤、実施例 1 1 の生成物の定量分析の典型的な H P L C クロマトグラムを示す図である。

【 0 0 3 8 】

略語

E S - 抽出溶媒

S L - 大豆レシチン ( G l y c i n e m a x . L . )

R L - 菜種レシチン ( B r a s s i c a n a p u s L . )

H R L - 加水分解大豆レシチン

S U L - 脱油ヒマワリレシチン

E t O H - 9 6 % エタノール

10

20

30

40

50

- P E G - ポリエチレングリコール
- H P L C - 高速液体クロマトグラフィー
- G C - ガスクロマトグラフィー
- T L C - 薄層クロマトグラフィー
- M I C - 最小阻止濃度
- R P M I - ロズウェルパーク記念研究所培地
- T T C - 2, 3, 5トリフェニル - 2 f i - テトラゾリウムクロリド、酸化還元指示薬
- P B S - リン酸緩衝生理食塩水
- C F U - コロニー形成単位；コロニーを形成することができる生存微生物の数
- X T T - X T Tナトリウム塩；2, 3 - ビス(2 - メトキシ - 4 - ニトロ - 5 - スルホフェニル) - 2 f i - テトラゾリウム - 5 - カルボキサニド内部塩、酸化還元指示薬
- M R S A - メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus*
- M S S A - メチシリン感受性 *Staphylococcus aureus*
- C L S I - 臨床および検査標準協会
- E U C A S T - 抗菌剤感受性試験に関する欧州委員会
- A P I - 活性医薬成分 / 物質
- D E R - 薬物対抽出物重量比；出発薬物および最終抽出物の重量比によって表される抽出物強度の尺度
- S C C - 体細胞数
- i . m a m . - 乳房内 (適用)
- A T C C - アメリカ培養細胞系統保存機関；標準参照微生物を収集、保存および配布する非営利組織
- C N S - コアグララーゼ陰性ブドウ球菌

10

20

【発明を実施するための形態】

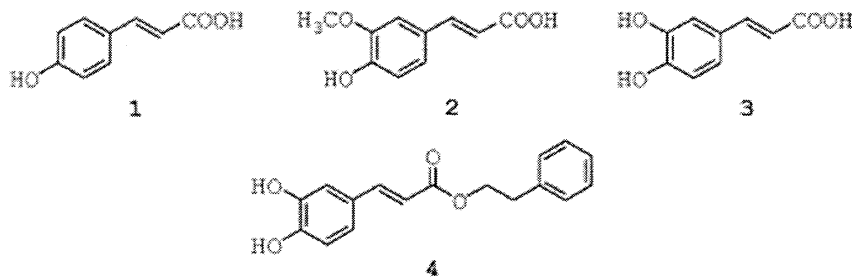
【0039】

発明の詳細な説明

本発明は、p - クマル酸 ( 1 )、トランス - フェルラ酸 ( 2 )、コーヒー酸 ( 3 ) およびコーヒー酸 2 - フェニルエチルエステル、2 - フェネチル 3, 4 - ジヒドロキシ - トランス - シンナメート ( 4 ) からなる群から選択される主要な活性物質の含有量で標準化された新規な液体プロポリス抽出物、その調製方法ならびにその使用に関する。

30

【化3】



40

【0040】

本発明による医薬品、化粧品もしくは農薬成分または食品成分としての液体プロポリス抽出物は、

( A ) 0 . 1 ~ 1 0 . 0 % w / w の乾燥プロポリス抽出物；および

( B ) 9 0 . 0 ~ 9 9 . 9 % w / w の抽出溶媒

からなり、抽出溶媒は、

( B . 1 ) 9 6 . 5 ~ 9 9 . 9 % w / w の 1 種または複数種の液体ポリエチレングリコール ( P E G ) 2 0 0 ~ 6 0 0 ；および

( B . 2 ) 0 . 1 ~ 3 . 5 % w / w のレシチンまたは加水分解レシチン

50

からなり、液体プロポリス抽出物は、

( I ) 1 : 2 ~ 1 : 2 0 w / w の薬物としての粗プロポリスおよび最終抽出物の定量的重量比 ( D E R ) ; ならびに

( I I ) p - クマル酸 ( 1 ) 、トランス - フェルラ酸 ( 2 ) 、コーヒー酸 ( 3 ) および 2 - フェニルエチル 3 , 4 - ジヒドロキシシナメート ( 4 ) からなる群から選択されるプロポリス活性物質の定量的含有量

により標準化され、前述の主要な活性物質の 4 つのうちの最低 2 つの定量的組成は、

( i ) 1 0 0 ~ 1 , 3 0 0 μ g / m L の p - クマル酸 ( 1 ) ;

( i i ) 7 5 ~ 8 0 0 μ g / m L のトランス - フェルラ酸 ( 2 ) ;

( i i i ) 2 5 ~ 3 0 0 μ g / m L のコーヒー酸 ( 3 ) ; および

( i v ) 4 0 ~ 4 0 0 μ g / m L の 2 - フェニルエチル 3 , 4 - ジヒドロキシ - トランス - シナメート ( 4 ; C A P E )

である。

#### 【 0 0 4 1 】

本発明の好ましい実施形態において、抽出溶媒 ( E S ) の成分としての液体ポリエチレングリコール ( P E G ) は、ポリエチレングリコール 2 0 0 、ポリエチレングリコール 3 0 0 、ポリエチレングリコール 4 0 0 、ポリエチレングリコール 6 0 0 、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

#### 【 0 0 4 2 】

具体的には、抽出溶媒 ( E S ) の成分としての液体ポリエチレングリコール ( P E G ) は、ポリエチレングリコール 2 0 0 、ポリエチレングリコール 4 0 0 、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

#### 【 0 0 4 3 】

さらに、レシチンまたは加水分解レシチンは、2 ~ 1 2 の親水性 - 親油性バランス ( H L B ) 因子を特徴とする生成物からなる群から選択され、大豆レシチン ( S L ; G l y c i n e m a x . L . 由来 ) 、ヒマワリレシチン ( S U L ; H e l i a n t h u s a n n u u s L . 由来 ) ; 菜種レシチン ( R L ; B r a s s i c a n a p u s L . 由来 ) ; キャノーラレシチン ( B r a s s i c a r a p a L . ) ; ニワトリ ( G a l l u s g a l l u s d o m e s t i c u s L . ) の卵からのレシチン ; レシチンの脱油生成物 ; 供給源からの水素化レシチン ; 供給源からの加水分解レシチン ; レシチンの酵素修飾誘導体 ; またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

#### 【 0 0 4 4 】

具体的には、本発明におけるレシチンとしては、大豆 ( G l y c i n e m a x . L . ) 、ヒマワリ ( H e l i a n t h u s a n n u u s L . ) 、菜種 ( B r a s s i c a n a p u s L . ) もしくはキャノーラ ( B r a s s i c a r a p a L . ) 由来の天然レシチン、脱油レシチン、水素化レシチン、加水分解レシチンもしくは酵素修飾レシチン、またはこれらの物質の混合物を使用することができる。

#### 【 0 0 4 5 】

「酵素修飾レシチン」という用語は、分子中に残りのリン酸基およびコリン基を有する高級脂肪酸のグリセロール - モノエステル生成を伴う 1 つの高級脂肪酸部分の酵素触媒加水分解によって得られる加水分解レシチンを含む。これにより、そのような加水分解レシチンの H L B 因子が有意に増加する。

#### 【 0 0 4 6 】

好ましくは、本発明による液体プロポリス抽出物の調製のための抽出溶媒 ( E S ) として、

( i ) 9 7 ~ 9 9 % w / w のポリエチレングリコール ( P E G ) 2 0 0 、ポリエチレングリコール 3 0 0 、ポリエチレングリコール 4 0 0 またはそれらの混合物 ; および

( i i ) 1 ~ 3 % w / w の大豆 ( G l y c i n e m a x . L . ) 、ヒマワリ ( H e l i a n t h u s a n n u u s L . ) 、菜種 ( B r a s s i c a n a p u s L . ) もしくはキャノーラ ( B r a s s i c a r a p a L . ) 由来の天然レシチン、脱油レシチン

10

20

30

40

50

ンもしくは加水分解レシチン；またはこれらの物質の混合物の混合物が使用され得る。

【0047】

本発明の好ましい実施形態において、本発明による液体プロポリス抽出物は、(I) 1 : 3 ~ 1 : 5 w / w の比率での最終抽出物に対する薬物としての粗プロポリスの定量的重量比 (DER) ; および

(II) p - クマル酸 (1)、トランス - フェルラ酸 (2)、コーヒー酸 (3) および 2 - フェニルエチル 3, 4 - ジヒドロキシ - シンナメート (4) からなる群から選択されるプロポリス活性物質の定量的組成

で標準化され、前述の主要な活性物質の4つのうちの最低2つは、以下の定量的含有量： 10

(i) 500 ~ 1,300 μg / mL の p - クマル酸 (1) ;

(ii) 300 ~ 800 μg / mL のトランス - フェルラ酸 (2) ;

(iii) 100 ~ 300 μg / mL のコーヒー酸 (3) ; および

(iv) 100 ~ 400 μg / mL の 2 - フェニルエチル 3, 4 - ジヒドロキシ - シンナメート (4 ; CAPE)

に対応する。

【0048】

液体抽出物中のプロポリス活性物質の分析

本発明による新規な標準化された液体プロポリス抽出物の開発のために、

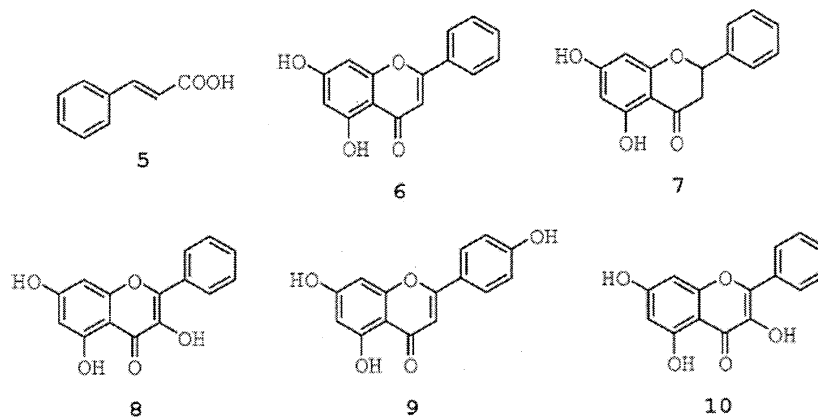
(i) 上記の p - クマル酸 (1)、トランス - フェルラ酸 (2)、コーヒー酸 (3)、および 2 - フェニルエチル 3, 4 - ジヒドロキシ - シンナメート (4) からなる群から選択される主要な活性プロポリス物質 ; ならびに 20

(ii) トランス - 桂皮酸 (5)、クリシン (6)、ピノセンプリン (7)、ガランギン (8)、アピゲニン (9) およびケンペロール (10) からなる群から選択される付随する活性物質

の定量のための適切な分析方法の開発が必須であった。

【0049】

【化4】



30

40

【0050】

前述の分析方法の最初の研究のために、モデル液体プロポリス抽出物を調製する必要があった。エタノール (96%) およびポリエチレングリコール中のモデルプロポリス抽出物を使用した。これらを、室温で24時間の浸軟による標準的な抽出法によって調製した。次いで、未溶解残渣を濾過によって分離し、透明な濾液をさらなる研究のためのモデル液体プロポリス抽出物として使用した。モデル液体ポリエチレングリコールとして、ポリエチレングリコール400 (PEG400) を使用した。古典的な抽出溶媒であるエタノール (96%) およびポリエチレングリコール400中でモデル液体プロポリス抽出物を

50

調製するための手順は、実施例 1 ( 96 % エタノール ) および実施例 2 ( PEG 400 ) に記載されている。

【 0051 】

高速液体クロマトグラフィー ( HPLC ) に基づく適切な分析方法が開発され、それによって 10 種の前述の化合物 1 ~ 10 のすべての分離の成功が達成された。この方法は、実施例 3 に正確に記載されている。

【 0052 】

本分析方法によって得られた典型的な HPLC クロマトグラムを図 1 に示す。化合物 1 ~ 10 の保持時間 (  $t_R$  ) を表 1 に示す。

【 0053 】

【 表 1 】

表 1. 本発明の HPLC 法によるプロポリス活性物質 1 ~ 10 の保持時間。 <sup>a</sup>

番号	プロポリス活性物質	保持時間 ( $t_R$ ) [分]
1	p-クマル酸 ( 1 )	14.13
2	トランス-フェルラ酸 ( 2 )	15.31
3	コーヒー酸 ( 3 )	10.57
4	2-フェニルエチル 3, 4-ジヒドロキシ- トランス-シナメート ( 4 )	48.62
5	トランス-桂皮酸 ( 5 )	29.76
6	クリシン ( 6 )	44.68
7	ピノセンプリン ( 7 )	47.39
8	ガラングイン ( 8 )	49.94
9	アピゲニン ( 9 )	37.72
10	ケンペロール ( 10 )	36.87

クロマトグラフィーカラム : ASCENTIS express ; C18 ; 寸法 : 15cm × 3.0mm ;  
カラム内の粒子径 : 2.7  $\mu$ m ; 移動相 : A=0.1%ギ酸水溶液、B=メタノール ;  
勾配 : 0分、80%A、20%B ; 3分、70%A、30%B ; 60分、20%A、80%B ; 90分、  
20%A、80%B ; 100分、70%A、30%B ; 105分、80%A、20%B ; カラム温度 :  
30°C ; 流量 : 0.25mL/分 ; 分析時間 : 110分 ; UV-VIS 検出器に対する波長 :  
検出用 : 370nm、積分用 290nm ; 注入量 : 10  $\mu$ L ; 圧力 : 210~290 バール。

【 0054 】

プロポリス活性物質 1 ~ 4 の抽出の有効性に対するレシチンの影響の研究

この研究を続けるに当たり、様々な種類 ( SL、RL、HRL ) の含量および濃度 ( 1 ~ 30 % w/w ) のレシチンを含む異なる抽出溶媒 ( ES ) の、プロポリス活性物質 1 ~ 4 抽出の有効性に対する効果を研究した。表 2 を参照されたい。

【 0055 】

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表 2. プロポリスからの活性物質 1 ~ 4 の抽出について試験された抽出溶媒 (E S) 系。

番号	溶媒	レシチン	溶媒：レシチン重量比 (w/w)	実験
1	EtOH	-	-	実施例 1
2	EtOH	SL	97 : 3	実施例 4、E 1
3	EtOH	SL	90 : 10	実施例 4、E 2
4	EtOH	SL	80 : 20	実施例 4、E 3
5	EtOH	SL	70 : 30	実施例 4、E 4
6	EtOH	SL	98.9 : 1.1	実施例 4、E 5
7	EtOH	SL	96 : 4	実施例 4、E 6
8	EtOH	HRL	97.8 : 2.2	実施例 4、E 7
9	EtOH	HRL	92.3 : 7.7	実施例 4、E 8
10	PEG 400	-	-	実施例 2
11	PEG 400	SR	97 : 3	実施例 5、E 1
12	PEG 400	SR	90 : 10	実施例 5、E 2
13	PEG 400	RL	98.9 : 1.1	実施例 5、E 3
14	PEG 400	RL	96 : 4	実施例 5、E 4
15	PEG 400	HRL	97.8 : 2.2	実施例 5、E 5
16	PEG 400	HRL	92.3 : 7.7	実施例 5、E 6

EtOH=96%エタノール；PEG400=ポリエチレングリコール400；  
SL=大豆レシチン；RL=菜種レシチン；HRL=加水分解菜種レシチン

## 【0056】

このようにして調製された液体プロポリス抽出物を、主要な活性物質 1 ~ 4 および付随する活性物質 5 ~ 10 の含有量に対して定量分析に供した。結果を表 3 ~ 6 に示す。

## 【0057】

96%エタノール (EtOH)、ならびに EtOH と異なる種類 (SL、RL、HRL) および濃度 (ES 組成物中 1 ~ 30% w/w) のものとの混合物をベースとした抽出溶媒 (ES) を使用する場合、一次液体プロポリス抽出物は、p-クマル酸 (1; 約 800 ~ 1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、トランス-フェルラ酸 (2; 約 485 ~ 770  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、コーヒー酸 (3; 約 185 ~ 290  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および 2-フェニルエチル 3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート (4; CAPE; 約 215 ~ 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を主要有効成分として含む。表 3 を参照されたい。

## 【0058】

10

20

30

40

50

## 【表 3】

表 3. エタノール系抽出溶媒 (ES) を用いて得られた液体プロポリス抽出物中の活性物質 1~4 の定量的組成。

E S	p-クマル酸(1)	トランス-フェルラ酸(2)	コーヒー酸(3)	2-フェネチル-3,4-ジヒドロキシシンナメート(4)
	$\gamma$ [ $\mu\text{g/mL}$ ] (図 2.1)	$\gamma$ [ $\mu\text{g/mL}$ ] (図 2.2)	$\gamma$ [ $\mu\text{g/mL}$ ] (図 2.3)	$\gamma$ [ $\mu\text{g/mL}$ ] (図 2.4)
1	916.32	559.26	209.49	236.68
2	820.35	501.87	186.22	216.63
3	872.51	533.16	204.30	232.98
4	1116.27	679.58	251.24	289.45
5	1248.16	770.88	288.66	320.75
6	808.30	485.32	185.58	231.19
7	981.25	596.21	225.33	266.46
8	861.11	516.41	196.96	248.14
9	945.73	582.69	228.69	263.48
抽出溶媒 (E S)				
1・EtOH			6・EtOH + 1.1% RL	
2・EtOH + 3% SL			7・EtOH + 4% RL	
3・EtOH + 10% SL			8・EtOH + 2.2% HRL	
4・EtOH + 20% SL			9・EtOH + 7.7% HRL	
5・EtOH + 30% SL				
ES=抽出溶媒；EtOH=96%エタノール；SL=大豆レシチン； RL=菜種レシチン；HRL=加水分解菜種レシチン。				

## 【0059】

ここで、補助活性物質 5~10 の濃度は以下のレベルであった：トランス-桂皮酸 (5；約 40~65  $\mu\text{g/mL}$ )、クリシン (6；約 500~690  $\mu\text{g/mL}$ )、ピノセンブリン (7；約 440~670  $\mu\text{g/mL}$ )、ガラギン (8；約 210~300  $\mu\text{g/mL}$ )、アピゲニン (9；約 90~150  $\mu\text{g/mL}$ ) およびケンペロール (10；約 45~90  $\mu\text{g/mL}$ )。表 4 を参照されたい。

## 【0060】

ポリエチレングリコール (PEG 400)、ならびに PEG 400 と様々な種類 (SL、RL、HRL) および濃度 (ES 組成物中 1~10% w/w) のレシチンとの混合物をベースとした抽出溶媒 (ES) を使用する場合、一次液体抽出物はまた、p-クマル酸 (1；約 750~1300  $\mu\text{g/mL}$ )、トランス-フェルラ酸 (2；約 400~800  $\mu\text{g/mL}$ )、コーヒー酸 (3；約 140~300  $\mu\text{g/mL}$ ) および 2-フェニルエチル 3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート (4；CAPE；約 190~370  $\mu\text{g/mL}$ ) を含有する。表 5 を参照されたい。

## 【0061】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. エタノール系抽出溶媒 (E S) を用いて得られた液体プロポリス抽出物中の付随する活性物質 5 ~ 10 の定量的組成。

E S	トランス- 桂皮酸(5)	クリシン (6)	ピノセンプリン (7)	ガラングン (8)	アピゲニン (9)	ケンペロール (10)
	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
1	48.88	521.03	496.38	232.36	103.38	54.00
2	43.06	463.66	444.22	208.74	93.41	47.72
3	46.60	499.97	479.67	224.56	100.84	74.08
4	58.37	623.32	594.05	267.18	127.17	62.16
5	65.92	685.81	665.44	297.85	146.91	71.11
6	40.53	500.50	477.17	226.86	96.11	79.10
7	51.21	576.39	552.12	263.99	115.45	87.40
8	43.15	534.08	510.26	245.27	102.79	85.78
9	51.21	557.42	535.33	256.51	111.98	88.93
抽出溶媒 (E S)						
1 - EtOH			6 - EtOH + 1.1% RL			
2 - EtOH + 3% SL			7 - EtOH + 4% RL			
3 - EtOH + 10% SL			8 - EtOH + 2.2% HRL			
4 - EtOH + 20% SL			9 - EtOH + 7.7% HRL			
5 - EtOH + 30% SL						
ES = 抽出溶媒 ; EtOH = 96% エタノール ; SL = 大豆レシチン ; RL = 菜種レシチン ; HRL = 加水分解菜種レシチン。						

【0062】

【表 5】

表 5. ポリエチレングリコール 400 ベースの抽出溶媒 (E S) を用いて得られた液体プロポリス抽出物中の活性物質 1 ~ 4 の定量的組成。

E O	p-クマル酸(1)	トランス- フェルラ酸(2)	コーヒー酸(3)	2-フェネチル・3,4-ジヒドロキシ シンナメート(4)
	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (図 3.1)	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (図 3.2)	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (図 3.3)	$\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] (図 3.4)
1	750.57	458.93	167.79	226.14
2	1112.08	685.14	249.67	329.41
3	781.98	485.75	171.88	223.99
4	1215.61	745.35	274.49	366.41
5	659.80	405.60	146.30	194.79
6	1294.35	792.50	292.18	392.23
7	806.44	495.64	182.80	236.48
抽出溶媒 (E S)				
1 - PEG 400			5 - PEG 400 + 4% RL	
2 - PEG 400 + 3% SL			6 - PEG 400 + 2.2% HRL	
3 - PEG 400 + 10% SL			7 - PEG 400 + 7.7% HRL	
4 - PEG 400 + 1.1% RL				
ES = 抽出溶媒 ; PEG400 = ポリエチレングリコール 400 ; SL = 大豆レシチン ; RL = 菜種レシチン ; HRL = 加水分解菜種レシチン。				

【0063】

10

20

30

40

50

この場合、補助活性物質 5 ~ 10 の濃度は以下のレベルであった：トランス - 桂皮酸 ( 5 ; 約 30 ~ 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  )、クリシン ( 6 ; 約 400 ~ 830  $\mu\text{g}/\text{mL}$  )、ピノセブリン ( 7 ; 約 390 ~ 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  )、ガラングイン ( 8 ; 約 190 ~ 360  $\mu\text{g}/\text{mL}$  )、アピゲニン ( 9 ; 約 80 ~ 170  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ) およびケンペロール ( 10 ; 約 40 ~ 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  )。表 6 を参照されたい。

【 0064 】

【表 6】

表 6. ポリエチレングリコール 400 ベースの抽出溶媒 ( E S ) を用いて得られた液体プロポリス抽出物中の付随する活性物質 5 ~ 10 の定量的組成。

ES	トランス - 桂皮酸 (5) $\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	クリシン (6) $\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	ピノセブリン (7) $\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	ガラングイン (8) $\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	アピゲニン (9) $\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	ケンペロール (10) $\gamma$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
1	38.40	476.77	457.71	208.31	97.03	80.18
2	57.81	681.36	649.38	293.11	145.59	68.23
3	39.28	456.61	437.36	196.76	103.89	43.00
4	62.14	772.55	736.93	329.80	157.13	130.60
5	32.92	412.97	391.23	172.80	84.25	44.46
6	66.58	824.77	794.67	354.62	171.29	138.94
7	40.75	499.97	473.43	210.09	103.22	54.16
抽出溶媒 ( E S )						
1 - PEG 400			5 - PEG 400 + 4% RL			
2 - PEG 400 + 3% SL			6 - PEG 400 + 2.2% HRL			
3 - PEG 400 + 10% SL			7 - PEG 400 + 7.7% HRL			
4 - PEG 400 + 1.1% RL						
ES = 抽出溶媒 ; PEG 400 = ポリエチレングリコール 400 ; SL = 大豆レシチン ; RL = 菜種レシチン ; HRL = 加水分解菜種レシチン。						

【 0065 】

結果から分かるように、抽出溶媒 ( E S ) 組成物中 1 ~ 3 % w / w のより低い濃度で使用される場合、任意の純粋な溶媒、96 % エタノールまたはポリエチレングリコール 400 ( PEG 400 ) と組み合わせた全ての試験レシチン ( SL、RL、HRL ) は、純粋な溶媒と比較して、活性物質 1 ~ 4 の抽出化学選択性の増加に有意に寄与する。

【 0066 】

PEG 400 およびレシチン ( SL、RL、HRL ) の組み合わせの予想外の効果は、PEG 400 が、純粋な溶媒としてであっても、96 % エタノールよりも著しく弱い活性物質 1 ~ 4 を抽出するという事実で明らかになる ( 表 3 ; 1 行 2 列 )。1 ~ 3 % w / w の濃度のレシチン ( SL、RL、HRL ) と組み合わせて使用すると、同じレシチンを用いた 96 % エタノールの類似の組み合わせと比較して、化合物 1 ~ 4 を有意により効果的に抽出する。例えば、抽出溶媒として 100 % の PEG 400 を用いて得られた抽出物中の達成された p - クマル酸 ( 1 ) の濃度は、750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( 表 5 ; 1 行 2 列 ) の範囲であり、ES として 96 % の EtOH を用いると 916  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( 表 3 ; 1 行 2 列 ) の範囲であったが、PEG 400 中 3 % w / w の SL の使用は、3 % w / w の SL を含む 96 % エタノールに基づく ES の使用の場合の 820  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( 表 5 ; 2 行 2 列 ) のレベルに対して、1.112  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( 表 3 ; 2 行 2 列 ) の濃度をもたらした。

【 0067 】

この典型的な例から、抽出溶媒 ( E S ) 中 1 ~ 3 % w / w の濃度のポリエチレングリコールおよびレシチンの組み合わせの全く予想外の効果が明らかに見て取れる。これは、ES 組成物中の 0.1 ~ 3.5 % w / w の最適レシチン重量パーセンテージの許容範囲まで、当業者によって推定することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 8 】

抽出溶媒 ( E S ) 組成物中でより高い重量パーセントのレシチンを使用すると、エタノールに基づく類似の系と比較して、プロポリス抽出の化学選択性に対するレシチンの有益な効果が失われる。例えば、 E S 中 4 % の R L 、 7 . 7 % の H R L または 1 0 % の S L の濃度でレシチンを使用することにより、類似のエタノールベース E S 系の使用と比較して、より低い濃度の主要な活性物質 1 ~ 4 が記録された。 2 つの最も豊富に存在する活性物質、 p - クマル酸 ( 1 ) およびトランス - フェルラ酸 ( 2 ) についての典型的な結果を表 7 および 8 に示す。

## 【 0 0 6 9 】

## 【表 7】

表 7 . 本発明による異なる抽出溶媒を用いて得られた液体プロポリス抽出物中の p - クマル酸 ( 1 ) の定量的組成。

E S	p-クマル酸 (1) γ [μg/mL]	EtOH ベース ES と比較した PEG400 ES 系における パーセント変化 (%) <sup>a</sup>	PEG400 ベース ES と比較した EtOH ES 系における パーセント変化 (%) <sup>b</sup>
1	916.32	-	+22.1
2	750.57	-18.1	-
3	820.35	-	-26.2
4	1112.08	+35.6	-
5	872.51	-	+11.6
6	781.98	-10.4	-
7	808.30	-	-33.5
8	1215.61	+50.4	-
9	981.25	-	+48.7
10	659.80	-32.8	-
11	861.11	-	-33.5
12	1294.35	+50.3	-
13	945.73	-	+17.3
14	806.44	-14.7	-
抽出溶媒 ( E S )			
1 · EtOH	8 · PEG 400 + 1.1% RL		
2 · PEG 400	9 · EtOH + 4% RL		
3 · EtOH + 3% SL	10 · PEG 400 + 4% RL		
4 · PEG 400 + 3% SL	11 · EtOH + 2.2% HRL		
5 · EtOH + 10% SL	12 · PEG 400 + 2.2% HRL		
6 · PEG 400 + 10% SL	13 · EtOH + 7.7% HRL		
7 · EtOH + 1.1% RL	14 · PEG 400 + 7.7% HRL		
ES = 抽出溶媒 ; EtOH = 96% エタノール ; PEG400 = ポリエチレングリコール 400 ; SL = 大豆レシチン ; RL = 菜種レシチン ; HRL = 加水分解菜種レシチン。			
<sup>a</sup> 類似のエタノールベース ES と比較した、PEG400 ベース ES で得られた抽出物中の p - クマル酸 ( 1 ) 濃度の増減パーセンテージ (%)。			
<sup>b</sup> 類似の PEG400 ベース ES と比較した、エタノールベース ES で得られた抽出物中の p - クマル酸 ( 1 ) 濃度の増減パーセンテージ (%)。			

## 【 0 0 7 0 】

表 7 において、 8 行 3 列の本発明の典型的な予想外の結果を見ることができ、類似の E t O H ベース E S ( E t O H + R L = 9 8 . 9 : 1 . 1 , w / w ) と比較して、抽出溶媒 ( E S ) 、 P E G 4 0 0 + R L ( 9 8 . 9 : 1 . 1 , w / w ) を使用した場合、 p - クマル酸 ( 1 ) 濃度の 5 0 % の増加が観察された。

【 0 0 7 1 】

【 表 8 】

表 8 . 本発明による異なる抽出溶媒を用いて得られた液体プロポリス抽出物中のトランスフェルラ酸 ( 2 ) の定量的組成。

ES	トランス・フェルラ酸(2) γ [µg/mL]	EtOH ベース ES と比較した PEG400 ES 系における パーセント変化 (%) <sup>a</sup>	PEG400 ベース ES と比較した EtOH ES 系における パーセント変化 (%) <sup>b</sup>
1	559.26	-	+21.9
2	458.93	-17.9	-
3	501.87	-	-26.7
4	685.14	+36.5	-
5	533.16	-	+9.8
6	485.75	-10.4	-
7	485.32	-	-33.5
8	745.35	+50.4	-
9	596.21	-	-19.3
10	405.60	+23.9	-
11	516.41	-	-34.8
12	792.50	+53.5	-
13	582.69	-	+17.6
14	495.64	-14.9	-
抽出溶媒 ( ES )			
1・EtOH		8・PEG 400 + 1.1% RL	
2・PEG 400		9・EtOH + 4% RL	
3・EtOH + 3% SL		10・PEG 400 + 4% RL	
4・PEG 400 + 3% SL		11・EtOH + 2.2% HRL	
5・EtOH + 10% SL		12・PEG 400 + 2.2% HRL	
6・PEG 400 + 10% SL		13・EtOH + 7.7% HRL	
7・EtOH + 1.1% RL		14・PEG 400 + 7.7% HRL	
ES = 抽出溶媒 ; EtOH = 96% エタノール ; PEG400 = ポリエチレングリコール 400 ; SL = 大豆レシチン ; RL = 菜種レシチン ; HRL = 加水分解菜種レシチン。			
<sup>a</sup> 類似のエタノールベース ES と比較した、PEG400 ベース ES で得られた抽出物中のトランス・フェルラ酸 ( 2 ) 濃度の増減パーセンテージ (%)。			
<sup>b</sup> 類似の PEG400 ベース ES と比較した、エタノールベース ES で得られた抽出物中のトランス・フェルラ酸 ( 2 ) 濃度の増減パーセンテージ (%)。			

【 0 0 7 2 】

予想外の結果のさらなる典型的な例として、類似の 96% エタノールベース ES と比較して、抽出溶媒 ( ES ) PEG 400 + HRL ( 97.8 : 2.2, w/w ) を使用した場合トランス・フェルラ酸 ( 2 ) 濃度の 53.5% の増加が記録された表 8 の 12 行 3 列のデータを本明細書に示す。

【 0 0 7 3 】

本発明による標準化された液体プロポリス抽出物を生成するための方法

【 0 0 7 4 】

本発明による液体プロポリス抽出物を生成するための方法は、

- ( i ) 粗プロポリスを - 20 で最低 1 時間冷却するステップと ;
- ( i i ) 冷却したプロポリスを 1 ~ 8 mm の細孔でふるいにかけて粉碎するステップと ;
- ( i i i ) 以下の条件下 :

10

20

30

40

50

( a ) 粗プロポリスおよび抽出溶媒の重量比 = 1 : 2 ~ 1 : 2 0 w / w ;

( b ) 1 0 ~ 1 5 0 の抽出温度 ; ならびに

( c ) 5 分 ~ 7 2 時間の抽出時間

で抽出溶媒により粗プロポリスを抽出するステップと ;

( i v ) このようにして得られた混合物を、1 0 0 μ m ~ 5 μ m の細孔を有する一連のフィルタを通して濾過し、未溶解残留物および液体プロポリス抽出物を生成するステップと ;

( v ) 高速液体クロマトグラフィー ( H P L C ) により主要な活性プロポリス物質 1 ~ 4 の定量分析するステップと ;

( v i ) 活性物質 1 ~ 4 の望ましい含有量までステップ ( i i i ) で使用された新鮮な抽出溶媒で希釈することにより、ステップ ( v ) で主要な活性物質 1 ~ 4 の正確な定量的組成が決定された、このようにして得られた液体プロポリス抽出物を標準化するステップとを含む。

10

#### 【 0 0 7 5 】

本発明による液体プロポリス抽出物を調製するための方法の実現の好ましい実施形態において、抽出ステップ ( i i i ) は、以下の条件下 :

( a ) 粗プロポリスおよび抽出溶媒の重量比 = 1 : 3 ~ 1 : 5 w / w ;

( b ) 1 5 ~ 7 0 の抽出温度 ; ならびに

( c ) 1 ~ 2 4 時間の抽出時間

で行われる。

20

#### 【 0 0 7 6 】

また、主要な活性物質 1 ~ 4 の定量ステップ、および補助活性物質 5 ~ 1 0 の付随するモニタリングのための、この目的で開発された分析高速液体クロマトグラフィー法 ( H P L C ) は、以下の条件 :

( i ) クロマトグラフィーカラム : A s c e n t i s e x p r e s s ; C 1 8 ; 寸法 : 1 5 c m x 3 . 0 m m ; カラム内の粒子径 : 2 . 7 μ m ;

( i i ) 移動相 : A = 0 . 1 % ギ酸水溶液、B = メタノール ; 勾配 : 0 分、8 0 % A、2 0 % B ; 3 分、7 0 % A、3 0 % B ; 6 0 分、2 0 % A、8 0 % B ; 9 0 分、2 0 % A、8 0 % B ; 1 0 0 分、7 0 % A、3 0 % B ; 1 0 5 分、8 0 % A、2 0 % B ;

( i i i ) カラム温度 : 3 0 ;

( i v ) 流量 : 0 . 2 5 m L / 分 ;

( v ) 分析時間 : 1 1 0 分 ;

( v i ) U V - V I S 検出器の波長 : 検出用 : 3 7 0 n m、積分用 : 2 9 0 n m ;

( v i i ) 注入量 : 1 0 μ L ;

( v i i i ) 圧力 : 2 1 0 ~ 2 9 0 バール

で使用される。

30

#### 【 0 0 7 7 】

本発明による液体プロポリス抽出物を調製するための実験手順は、実施例 4 ~ 9 に開示されている。実施例 9 では、本発明によるパラメータ薬物対抽出物比 ( D E R ) 重量パーセンテージ 1 : 2 によって表される、強度の標準化された液体抽出物の調製プロセスの最適化されたバージョンが記載されている。

40

#### 【 0 0 7 8 】

主要な活性物質 1 ~ 4 および補助活性物質 5 ~ 1 0 の定量のための分析方法は、実施例 3 に記載されている。

#### 【 0 0 7 9 】

本発明による標準化された液体抽出物の抗菌効果の決定。モデル病原微生物に対する最小阻止濃度 ( M I C ) の決定

#### 【 0 0 8 0 】

プロポリス抽出物の抗菌効果を、クロアチアのザグレブにある R u d j e r B o s k o v i c I n s t i t u t e の分子医学部門で測定した。本発明による標準化された液

50

体プロポリス抽出物の最小阻止濃度 (MIC) を、参考文献 26 ~ 29 に記載されているように、CLSI (臨床および検査標準協会) および EUCAST (抗菌剤感受性試験に関する欧州委員会) 法の指示によって決定した。実施例 9 の生成物を使用した。

【0081】

26) M. Balouiri, M. Sadiki, S. K. Ibnsouda: Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, J. Pharm. Anal. 6 (2016) 71 - 79

27) CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012

10

28) CLSI, Reference Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard, 2nd ed., NCCLS document M27-A2. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 - 1898, USA, 2002

20

29) CLSI, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 1998

【0082】

以下のモデル病原性微生物 (M) の ATCC 株に対してインビトロ条件下で抗菌効果を試験した:

30

- (i) Staphylococcus aureus ATCC 29293 (M1);
- (ii) メチシリン耐性 Staphylococcus aureus; MRSA (MFBF コレクション; M2);
- (iii) メチシリン感受性 Staphylococcus aureus; MSSA (MFBF コレクション; M3);
- (iv) Enterococcus faecalis ATCC 9212 (M4);
- (v) Enterococcus faecalis VRE (MFBF コレクション) (M5);
- (vi) Escherichia coli ATCC 10536 (M6);
- (vii) Acinetobacter baumannii ATCC 43498 (M7);
- (viii) Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 (M8); および
- (ix) Candida albicans ATCC 90028 (M9)。

40

【0083】

抽出物の最小阻止濃度 (MIC) を決定するために、連続微量希釈手順を行った。MIC 値は、細菌または真菌数の 80% の減少が生じたプロポリス抽出物濃度 (MIC 80) として決定された。表 9 に示される最小阻止濃度 (MIC 80) は、所与の溶媒中の対応する液体抽出物の希釈 (%) の形式で示される。出発液体プロポリス抽出物は、粗プロポリスと最終抽出物との比 (DER) が 1 : 2 で得られた。これは実施例 9 の生成物である

50

。液体抽出物の希釈がより大きい場合、すなわち活性物質 1 ~ 10 の濃度が M I C に対してより低い場合、試験された抽出物の得られる抗菌効果はより高い。

【 0 0 8 4 】

M I C 決定のための実験手順の詳細な説明は実施例 10 に開示されており、結果は表 9 に示される。

【 0 0 8 5 】

【表 9】

表 9. 抽出溶媒として 96%エタノール（実施例 1）又はポリエチレングリコール 400（実施例 2）を用いて得られた液体抽出物と比較した、実施例 9 の生成物である希釈プロポリス抽出物の最小阻止濃度（M I C ; %）決定の結果。

番号	モデル微生物	M I C <sub>80</sub> (%) <sup>a</sup>		
		ES1 に基づく 液体抽出物 <sup>b</sup>	ES2 に基づく 液体抽出物 <sup>c</sup>	ES3 に基づく 液体抽出物 <sup>d</sup>
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29293 (M1)	40	10	40
2	MRSA (M2)	20	10	40
3	MSSA (M3)	52.5	10	51.5
4	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 9212 (M4)	10	5	10
5	<i>Enterococcus faecalis</i> VRE (M5)	0	0	2.5
6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 (M6)	10	10.85	12.8
7	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 43498 (M7)	20	10	20
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 (MB)	0	0	1.85
9	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028 (M9)	0	0	12.85

ES=抽出溶媒；ES1=96%エタノール；ES2=ポリエチレングリコール 400 (PEG400)；ES3=PEG 400 + 3%大豆レシチンの混合物

<sup>a</sup> M I C<sub>80</sub>は、生きているモデル微生物の濃度が 80%低下する試験物質の最小阻止濃度である。M I C<sub>80</sub> = 0 の場合、抽出物は効果を示さない。

<sup>b</sup> 実施例 1 の生成物。

<sup>c</sup> 実施例 2 の生成物。

<sup>d</sup> 実施例 9 の生成物。

【 0 0 8 6 】

表 10 ~ 15 に、3つの試験した抽出溶媒系のそれぞれにおけるプロポリス抽出物の有効希釈物中の活性物質 1 ~ 10 の質量濃度（これらは、

( i ) 96%エタノール；実施例 1 の生成物、

( i i ) ポリエチレングリコール 400 ( P E G 400 ) ；実施例 2 の生成物；および

( i i i ) P E G 400 ( 97% w / w ) および大豆レシチン ( 3% w / w ) の混合物；実施例 9 の生成物

を使用して得られる)；

または、各特定の液体抽出物が M I C に達した対応する活性物質 1 ~ 10 の質量濃度が示されている。これは、D E R が 1 : 2 である一次液体抽出物から、M I C が達成される希釈で除して決定された。

【 0 0 8 7 】

## 【表 10】

表 10. 96%エタノールを用いて得られた液体プロポリス抽出物の有効希釈におけるプロポリス活性物質 1~4 の質量濃度 ( $\gamma$ ) [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]; 実施例 1 の生成物。

モデル微生物	活性物質 1~4			
	1	2	3	4
M1	22.91	13.98	5.24	5.92
M2	45.82	27.96	10.47	11.83
M3	17.41	10.63	3.98	4.50
M4	90.91	55.48	20.78	23.48
M5	916.32	559.26	209.49	236.68
M6	91.63	55.93	20.95	23.67
M7	45.82	27.96	10.47	11.83
M8	916.32	559.26	209.49	236.68
M9	916.32	559.26	209.49	236.68

活性物質：パラクマル酸 (1)、トランスフェルラ酸 (2)、コーヒー酸 (3)、  
2-フェニルエチル 3, 4-ジヒドロキシトランス-シンナメート (4)

モデル微生物：S. aureus ATCC 29293 (M1)、MRSA (M2)、  
MSSA (M3)、E. faecalis ATCC 9212 (M4)、E. faec  
alis VRE (M5)、E. coli ATCC 10536 (M6)、A. bau  
mani ATCC 43498 (M7)、P. aeruginosa ATCC 90  
27 (M8)、C. albicans ATCC 90028 (M9)

10

20

## 【0088】

## 【表 11】

表 11. 96%エタノールを用いて得られた液体プロポリス抽出物の有効希釈におけるプロポリス活性物質 5~10 の質量濃度 ( $\gamma$ ) [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]; 実施例 1 の生成物。

モデル微生物	活性物質 5~10					
	5	6	7	8	9	10
M1	1.22	13.03	12.41	5.81	2.59	1.35
M2	2.44	26.05	24.82	11.62	5.17	2.70
M3	0.93	9.90	9.43	4.42	1.96	1.03
M4	4.85	51.69	49.24	23.05	10.26	5.36
M5	48.88	521.03	496.38	232.36	103.38	54.00
M6	4.89	52.10	49.64	23.24	10.34	5.40
M7	2.44	26.05	24.82	11.62	5.17	2.70
M8	48.88	521.03	496.38	232.36	103.38	54.00
M9	48.88	521.03	496.38	232.36	103.38	54.00

活性物質：桂皮酸 (5)、クリシン (6)、ピノセンプリン (7)、ガラングイン (8)、  
アピゲニン (9)、ケンペロール (10)

モデル微生物：S. aureus ATCC 29293 (M1)、MRSA (M2)、  
MSSA (M3)、E. faecalis ATCC 9212 (M4)、E. faec  
alis VRE (M5)、E. coli ATCC 10536 (M6)、A. bau  
mani ATCC 43498 (M7)、P. aeruginosa ATCC 90  
27 (M8)、C. albicans ATCC 90028 (M9)

30

40

50

【 0 0 8 9 】

【 表 1 2 】

表 1 2 . ポリエチレングリコール 400 (PEG400) を用いて得られた液体プロポリス抽出物の有効希釈におけるプロポリス活性物質 1 ~ 4 の質量濃度 (  $\gamma$  ) [  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ]; 実施例 2 の生成物。

モデル微生物	活性物質 1 ~ 4			
	1	2	3	4
M1	75.06	45.89	16.78	22.61
M2	75.06	45.89	16.78	22.61
M3	75.06	45.89	16.78	22.61
M4	433.08	264.80	96.81	130.63
M5	750.57	458.93	167.79	226.14
M6	69.05	42.22	15.44	20.81
M7	75.06	45.89	16.78	22.61
M8	>750.57	>458.93	>167.79	>226.14
M9	>750.57	>458.93	>167.79	>226.14
活性物質：パラクマル酸 ( 1 )、トランスフェルラ酸 ( 2 )、コーヒー酸 ( 3 )、2-フェニルエチル 3, 4-ジヒドロキシトランス-シンナメート ( 4 )				
モデル微生物： <i>S. aureus</i> ATCC 29293 ( M1 )、MRSA ( M2 )、MSSA ( M3 )、 <i>E. faecalis</i> ATCC 9212 ( M4 )、 <i>E. faecalis</i> VRE ( M5 )、 <i>E. coli</i> ATCC 10536 ( M6 )、 <i>A. baumannii</i> ATCC 43498 ( M7 )、 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 ( M8 )、 <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ( M9 )				

【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 3】

表 1 3. ポリエチレングリコール 400 (PEG400)を用いて得られた液体プロポリス抽出物の有効希釈におけるプロポリス活性物質 5～10 の質量濃度 ( $\gamma$ ) [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]; 実施例 2 の生成物。

モデル微生物	活性物質 5～10					
	5	6	7	8	9	10
M1	3.84	47.68	45.77	20.83	9.70	8.02
M2	3.84	47.68	45.77	20.83	9.70	8.02
M3	3.84	47.68	45.77	20.83	9.70	8.02
M4	22.16	275.10	264.10	120.20	56.05	46.26
M5	38.40	476.77	457.71	208.31	97.03	80.18
M6	3.53	43.86	42.11	19.17	8.93	7.38
M7	3.84	47.68	45.77	20.83	9.70	8.02
M8	>38.40	>476.77	>457.71	>208.31	>97.03	>80.18
M9	>38.40	>476.77	>457.71	>208.31	>97.03	>80.18

活性物質：桂皮酸 (5)、クリシン (6)、ピノセンプリン (7)、ガラングイン (8)、アピゲニン (9)、ケンペロール (10)

モデル微生物：*S. aureus* ATCC 29293 (M1)、MRSA (M2)、MSSA (M3)、*E. faecalis* ATCC 9212 (M4)、*E. faecalis* VRE (M5)、*E. coli* ATCC 10536 (M6)、*A. baumannii* ATCC 43498 (M7)、*P. aeruginosa* ATCC 9027 (M8)、*C. albicans* ATCC 90028 (M9)

10

20

## 【0091】

## 【表 1 4】

表 1 4. ポリエチレングリコール 400 (PEG400; 97% w/w) および大豆レシチン (3% w/w) の混合物を用いて得られた液体プロポリス抽出物の有効希釈におけるプロポリス活性物質 1～4 の質量濃度 ( $\gamma$ ) [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]; 実施例 9 の生成物。

モデル微生物	活性物質 1～4			
	1	2	3	4
M1	27.80	17.13	6.24	8.24
M2	27.80	17.13	6.24	8.24
M3	27.80	17.13	6.24	8.24
M4	111.21	68.51	25.00	32.94
M5	547.05	337.03	122.82	162.05
M6	86.50	53.29	19.42	25.62
M7	55.60	34.26	12.48	16.47
M8	603.22	371.64	135.42	178.68
M9	864.95	532.89	194.19	256.21

活性物質：パラークマル酸 (1)、トランスフェルラ酸 (2)、コーヒー酸 (3)、2-フェニルエチル 3, 4-ジヒドロキシトランス-シンナメート (4)

モデル微生物：*S. aureus* ATCC 29293 (M1)、MRSA (M2)、MSSA (M3)、*E. faecalis* ATCC 9212 (M4)、*E. faecalis* VRE (M5)、*E. coli* ATCC 10536 (M6)、*A. baumannii* ATCC 43498 (M7)、*P. aeruginosa* ATCC 9027 (M8)、*C. albicans* ATCC 90028 (M9)

30

40

50

【 0 0 9 2 】

【 表 1 5 】

表 1 5 . ポリエチレングリコール 4 0 0 ( P E G 4 0 0 ; 9 7 % w / w ) および大豆レシチン ( 3 % w / w ) の混合物を用いて得られた液体プロポリス抽出物の有効希釈におけるプロポリス活性物質 5 ~ 1 0 の質量濃度 (  $\gamma$  ) [  $\mu$  g / m L ] ; 実施例 9 の生成物。

モデル微生物	活性物質 5 ~ 1 0					
	5	6	7	8	9	10
M1	1.45	17.03	16.24	7.33	3.64	1.71
M2	1.45	17.03	16.24	7.33	3.64	1.71
M3	1.45	17.03	16.24	7.33	3.64	1.71
M4	5.78	68.14	64.94	29.31	14.60	6.82
M5	28.44	335.17	319.44	144.19	71.62	33.56
M6	4.50	53.00	50.51	22.80	11.32	5.31
M7	2.89	34.07	32.47	14.66	7.28	3.41
M8	31.36	369.59	352.24	158.99	78.97	37.01
M9	44.96	529.95	505.08	227.98	113.23	53.07

活性物質 : 桂皮酸 ( 5 ) 、 クリシン ( 6 ) 、 ピノセンプリン ( 7 ) 、 ガランギン ( 8 ) 、 アピゲニン ( 9 ) 、 ケンペロール ( 1 0 )

モデル微生物 : *S. aureus* ATCC 29293 ( M 1 ) 、 MRSA ( M 2 ) 、 MSSA ( M 3 ) 、 *E. faecalis* ATCC 9212 ( M 4 ) 、 *E. faecalis* VRE ( M 5 ) 、 *E. coli* ATCC 10536 ( M 6 ) 、 *A. baumannii* ATCC 43498 ( M 7 ) 、 *P. aeruginosa* ATCC 9027 ( M 8 ) 、 *C. albicans* ATCC 90028 ( M 9 )

10

20

【 0 0 9 3 】

試験された液体プロポリス抽出物のそれぞれの全体的な抗菌効果 ( M I C ) は、いくつかの活性物質 1 ~ 1 0 の相乗効果によって達成される。興味深い全く予想外のことは、低濃度の活性物質 1 ~ 1 0 の混合物が、はるかに高濃度のある特定の ( 純粋な ) 活性物質 1 ~ 1 0 の混合物よりも効果的であることである。

30

【 0 0 9 4 】

本発明の製剤は、*Staphylococcus spp.* 等のグラム陽性微生物に対して最も効果的であるが、表 9 から分かるように、より高い濃度では、一部のグラム陰性細菌 : *E. coli* および *A. baumannii* 、ならびに真菌 *C. albicans* に対しても効果的である。

【 0 0 9 5 】

本発明による標準化された液体プロポリス抽出物の使用

【 0 0 9 6 】

本発明による医薬品、化粧品もしくは農薬成分または食品成分としてのプロポリス抽出物は、標準化された濃度の高生物活性物質 :

40

( i ) 1 0 0 ~ 1 , 3 0 0  $\mu$  g / m L の p - クマル酸 ( 1 ) ;

( i i ) 7 5 ~ 8 0 0  $\mu$  g / m L のトランス - フェルラ酸 ( 2 ) ;

( i i i ) 2 5 ~ 3 0 0  $\mu$  g / m L のコーヒー酸 ( 3 ) ; および

( i v ) 4 0 ~ 4 0 0  $\mu$  g / m L の 2 - フェニルエチル 3 , 4 - ジヒドロキシ - トランス - シンナメート ( 4 ; C A P E )

を含む。

【 0 0 9 7 】

主要な活性物質 1 ~ 4 の標準化された含有量により、本発明による液体プロポリス抽出物は、ヒトおよび動物で使用するための活性医薬成分 ( A P I ) 、 活性化粧品成分 ( A C I ) 、 または食品もしくは動物用飼料の機能性成分となり、これは以下の有益な薬理効果

50

を特徴とする：

( i ) 抗炎症性 ( 参考文献 1、8、9、11、12、13、17 を参照されたい ) ；

( i i ) 抗酸化性 ( 参考文献 8、9、14、15、20 を参照されたい ) ；

( i i i ) 免疫調節性 ( 参考文献 1、8、11、13、15、17、18、19、20 を参照されたい ) ；

( i v ) 肝臓保護性 ( 参考文献 9 を参照されたい ) ；

( v ) 抗細菌性、抗ウイルス性、抗真菌性および抗原虫性も含む抗菌性 ( 参考文献 9、10、12、15、16、18 を参照されたい ) ；

( v i ) 抗腫瘍性 ( 参考文献 9、10、11、14、19 を参照されたい ) ；ならびに

( v i i ) 抗がん性 ( 参考文献 11、14 を参照されたい ) 。

10

#### 【 0 0 9 8 】

本発明による液体プロポリス抽出物の他の有益な効果は、植物保護における殺真菌、殺細菌、殺ウイルス、殺虫および殺線虫効果である。強力な抗酸化活性のために、本発明による液体プロポリス抽出物は、植物および非生物的ストレス因子に対するそれらの耐性を間接的に強化し、感染症に対抗するのを助ける。このため、これは植物強化剤として使用される。参考文献 21 ~ 25 を参照されたい。

#### 【 0 0 9 9 】

本発明による液体プロポリス抽出物は、

( i ) 薬物、医療デバイスもしくは治療薬からなる群から選択される医薬品を製造するための活性医薬成分もしくは賦形剤；

20

( i i ) 化粧品を製造するための活性化粧品成分もしくは賦形剤；

( i i i ) 機能性食品、食品サプリメントもしくは特別な栄養目的のための食品を製造するための食品成分；

( i v ) 獣医用医薬製品、動物飼料、動物飼料サプリメント、もしくは獣医学的用途のための治療薬からなる群から選択される獣医学製品を製造するための活性医薬成分もしくは賦形剤；または

( v ) 殺真菌剤、殺細菌剤、殺ウイルス剤、殺虫剤、殺線虫剤および植物強化剤からなる群から選択される農薬製品を製造するための活性農薬成分もしくは賦形剤、特に生態系農業に特に適しているもの

として使用される。

30

#### 【 0 1 0 0 】

本発明による標準化された液体プロポリス抽出物に基づく医薬組成物

#### 【 0 1 0 1 】

さらに、本発明は、活性医薬成分 ( A P I ) としての標準化された液体プロポリス抽出物に基づく医薬組成物を開示する。本発明による医薬組成物は、

( I ) 5 ~ 9 5 % w / w の本発明による液体プロポリス抽出物；および

( I I ) 最終組成物の最大 1 0 0 % w / w の、溶液、懸濁液、ゲル、クリーム、軟膏、経口または経鼻適用のためのスプレーからなる群から選択される最終剤形調製に必要な 1 種または複数種の医薬賦形剤

からなり、

40

前述の組成物は、以下の値の範囲内の 4 つの主要な活性プロポリス物質：

( i ) 1 0 ~ 1 , 3 0 0 μ g / g の p - クマル酸 ( 1 ) ；

( i i ) 1 0 ~ 8 0 0 μ g / g のトランス - フェルラ酸 ( 2 ) ；

( i i i ) 5 ~ 3 0 0 μ g / g のコーヒー酸 ( 3 ) ；および

( i v ) 5 ~ 4 0 0 μ g / g の 2 - フェニルエチル 3 , 4 - ジヒドロキシ - トランス - シンナメート ( 4 ; C A P E )

のうちの最低 2 つの定量的含有量を特徴とする。

#### 【 0 1 0 2 】

それにより、医薬賦形剤 ( 補助物質 ) は、希釈剤、保湿剤、保存剤、キレート剤、抗酸化剤、増粘剤、皮膚軟化剤、乳化剤、等張化剤、および pH 制御剤からなる群から選択さ

50

れる。

【0103】

希釈剤は、精製水、エタノール、1,2-プロピレングリコール、PEG200、PEG400もしくはPEG600等の液体ポリエチレングリコール(PEG)、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される薬学的に許容される液体である。

【0104】

保湿剤は、グリセロール、ソルビトール、1,2-プロピレングリコール、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

【0105】

保存剤は、4-ヒドロキシ安息香酸メチル、4-ヒドロキシ安息香酸エチル、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、4-ヒドロキシ安息香酸ブチル等のパラベン；4-クロロ-m-クレゾール；トリクロサン；ベンジルアルコール；2-フェノキシエタノール；安息香酸およびその塩、例えば安息香酸ナトリウム；ソルビン酸またはその塩、例えばソルビン酸カリウム；デヒドロ酢酸(3-アセチル-2-ヒドロキシ-6-メチル-4H-ピラン-4-オン)；クロルヘキシジンおよびその塩、例えばクロルヘキシジンジグルコン酸塩；塩化ベンザルコニウムもしくは臭化セトリモニウム等の四級アンモニウム塩；またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

10

【0106】

キレート剤は、エチレンジアミノ四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミノ五酢酸(DTPA)、ニトリロ三酢酸(NTA)のナトリウム塩またはカリウム塩；クエン酸三ナトリウム二水和物( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )等の可溶性クエン酸塩；またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。典型的なキレート剤は、エデト酸二ナトリウム二水和物( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )である。

20

【0107】

抗酸化剤は、-トコフェロールおよびそのエステル、例えば-トコフェリルスクシネート；アスコルビン酸およびその塩、例えばアスコルビン酸ナトリウム；2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール(BHT)；tert-ブチル-アニソール(BHA)；またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

【0108】

増粘剤は、セルロースガム、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、ヒドロキシアセチルセルロース(HEC)、メチルセルロース(MC)、カルボキシメチルセルロースナトリウム(NaCMC)；合成ポリマー、例えばポリビニルアルコール(PVA)、ポリアクリル酸(PAA)およびそのコポリマー、ポリビニルピロリドン(PVP)；各種ガム、例えばアラビアガム、キサンタンガム、トラガカント；アルギン酸およびその塩、例えばアルギン酸ナトリウム；高級脂肪酸の金属塩、例えばモノステアリン酸アルミニウム、ジステアリン酸アルミニウム、トリステアリン酸アルミニウム；またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

30

【0109】

皮膚軟化剤は、ワセリン；鉱物油；植物油、例えばアーモンド、ヒマワリもしくはオリーブ油；中鎖トリグリセリド；高級脂肪酸および一価アルコールの天然もしくは合成エステル、例えばミリスチン酸イソプロピルもしくはホホバ油；ワックス、例えば蜜蝋；シリコン油；高級脂肪酸、例えばオレイン酸もしくはステアリン酸；高級脂肪アルコール、例えばセチルアルコール；またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

40

【0110】

乳化剤は、ラノリン；エトキシ化ラノリン；ラノリンアルコール；エトキシ化ラノリンアルコール；レシチン；加水分解レシチン；グリセロールおよび高級脂肪酸のモノおよびジエステル、例えばグリセロールモノステアレート；高級脂肪酸のソルビタンエステル、例えばソルビタンモノステアレート；エトキシ化高級脂肪アルコール、例えばポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテルもしくはポリオキシエチレン(2)オレエート

50

(数字 2 3 もしくは 2 はエチレンオキシド単位の数を表す) ; エトキシ化ソルビタンエステル、例えばポリソルベート 60 ; 水溶性石鹼、例えばステアリン酸ナトリウム ; 高級脂肪アルコールの水溶性硫酸塩、例えばラウリル硫酸ナトリウム ; 脂肪アルコールの水溶性リン酸塩、例えばセチルリン酸カリウム ; またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

【 0 1 1 1 】

等張化剤は、主に、粘膜、例えば鼻粘膜に適用される医薬剤形で使用され、塩化ナトリウム (NaCl)、グリセロール、1, 2 - プロピレングリコールまたはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

【 0 1 1 2 】

pH 制御剤は、pH 値を低下または上昇させるための薬学的に許容される酸および塩基ならびに緩衝系を含む。これは、塩酸 (HCl)、硫酸 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、リン酸 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)、クエン酸、酢酸、水酸化ナトリウム (NaOH)、水酸化カリウム (KOH)、水酸化アンモニウム (NH<sub>4</sub>OH)、リン酸二水素ナトリウム (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、リン酸水素ナトリウム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、クエン酸二水素ナトリウム (NaH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)、クエン酸水素ナトリウム (Na<sub>2</sub>HC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)、クエン酸ナトリウム (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)、またはこれらの物質の混合物からなる群から選択される。

【 0 1 1 3 】

本発明による医薬組成物の調製

【 0 1 1 4 】

本発明による医薬組成物は、

(i) 本発明による標準化された液体プロポリス抽出物を希釈剤に添加し、それらを均質化するステップと ;

(ii) 1 種または複数の他の賦形剤を添加し、それらを均質化するステップとを含み ;

ステップ (i) および (ii) は、10 ~ 100 の温度で、好ましくは 20 ~ 60 の温度で 1 ~ 5 分間行われ ;

続いて、

(iii . a) 溶液もしくはスプレー用溶液の剤形調製の場合、必要に応じて滅菌濾過を含む最終溶液の濾過を実行するステップ ;

(iii . b) ゲルもしくは懸濁液の剤形調製の場合、増粘剤の添加およびその均質化を行うステップ ;

(iii . c) クリームの剤形調製の場合、皮膚軟化剤および乳化剤を混合し、50 ~ 80 の温度で 1 ~ 15 分間均質化することにより脂肪相の調製を行い、次いでステップ (ii) の溶液を添加し、50 ~ 80 に加熱し、続いて高剪断もしくは高圧ホモジナイザーを使用して、50 ~ 80 、好ましくは 55 ~ 65 の温度で 1 ~ 30 分間乳化し、その後 65 ~ 20 ° の温度で 10 ~ 120 分間均質化するステップ ; または

(iii . d) 軟膏の剤形調製の場合、ステップ (ii) の溶液を、事前に溶融した皮膚軟化剤、および最終的には乳化剤の混合物と、50 ~ 70 の温度で 5 ~ 30 分間混合し、続いて 70 ~ 20 の温度で 10 ~ 120 分間均質化するステップと

を含む方法により調製される。

【 0 1 1 5 】

本発明の医薬組成物を調製するための手順はまた、医薬技術の当業者に知られているように、前述の剤形を製造するための様々な代替の一般的な技術的手順を含み得る。

【 0 1 1 6 】

本発明による医薬組成物の製造の代表的な例は、実施例 11 ~ 16 に記載されている。

【 0 1 1 7 】

特別な例として、ここでは、実施例 11 に開示されている、乳房内適用のための溶液の最終剤形が概説される。この場合、調製が実施例 9 に記載されている一次標準化液体プロポリス抽出物は、本発明による抽出溶媒、この場合ポリエチレングリコール 400 (97

10

20

30

40

50

% w / w ) および大豆レシチン ( 3 % w / w ) との混合物で希釈されるだけであり、これはここでは希釈剤の機能である。このようにして得られた乳房内適用のための溶液は、上述の限度内の主要な活性物質 1 ~ 4 の定量的含有量を与える。表 1 6 を参照されたい。

【 0 1 1 8 】

【 表 1 6 】

表 1 6 . 本発明の医薬組成物の高速液体クロマトグラフィー ( H P L C ) による活性物質 1 ~ 1 0 の定量分析の結果 ; 乳房内適用のための溶液の剤形 ; H P L C 分析の目的で 1 0 倍希釈した、薬物対抽出物 ( D E R ) 重量比 1 : 2 を特徴とする、実施例 1 1 の生成物。<sup>a</sup>

番号	プロポリス活性物質 1 ~ 1 0	濃度 [µg/g]
1	パラークマル酸 ( 1 )	40.97
2	トランスフェルラ酸 ( 2 )	52.18
3	コーヒー酸 ( 3 )	17.73
4	C A P E ( 4 )	52.25
5	桂皮酸 ( 5 )	6.99
6	クリシン ( 6 )	84.70
7	ピノセンブリン ( 7 )	77.36
8	ガラングイン ( 8 )	43.37
9	アピゲニン ( 9 )	15.24
10	ケンペロール ( 1 0 )	4.76
a H P L C 分析方法は、実施例 3 に記載される。		

10

20

【 0 1 1 9 】

本組成物の定量分析からの典型的な H P L C クロマトグラムを図 5 に示す。

【 0 1 2 0 】

本発明の医薬組成物の薬理効果の研究

【 0 1 2 1 】

実施例 1 1 の生成物である溶液からの投与量における本発明の組成物の選択された薬理学的効果を、

30

- ( i ) ウシの乳腺炎、乳房炎 ;
  - ( i i ) ヤギの乳腺炎 ; および
  - ( i i i ) ウマの創傷治療
- の治療における臨床試験で研究した。

【 0 1 2 2 】

ウシの乳腺炎治療の研究

【 0 1 2 3 】

ウシの乳腺炎処置の研究を、ホルスタイン種の乳牛を有する 5 つの飼育場で行った。合計 8 6 頭のウシまたは 3 3 9 の分房が研究に含まれ、乳房の分房が統計単位として使用された。動物を深い寝床で自由に飼育し、抗生物質を添加せずに乳牛用の標準的なプレミックスを与えた。この試験は獣医学倫理委員会によって承認された。2 0 0 , 0 0 0 / m L 未満の体細胞数 ( S C C ) を有する乳腺炎の臨床症状のない健康な動物および分房、ならびに 2 0 0 , 0 0 0 / m L を超える S C C を有する感染した分房を含めた。安全性および有効性の無作為化クロスオーバー臨床試験を、地形条件下で溶液の形態の本発明の組成物の乳房内 ( i . m a m . ) 適用で行った。朝の搾乳中、夕方の搾乳中および翌日の朝の搾乳後に、実施例 1 1 の本発明の組成物を、牛の乳房の 4 つ全ての分房に 3 回適用した。詳細な手順は実施例 1 7 に記載されるが、表 1 7 は、最初の i . m a m . 適用前の一定数の分房で特定された各病原体の細菌学的治療を表す。

40

【 0 1 2 4 】

50

## 【表 17】

表 17. 実施例 11 からの本発明の製剤の i. m a m. 適用後のウシ乳腺炎の細菌学的処置／治癒の有効性。<sup>a</sup>

番号	病原体	実施例 11 からの製剤		
		処理された分房の数 (N)	細菌学的に治癒した分房の数	治癒 %
1	<i>Streptococcus uberis</i>	9	9	100
2	<i>Streptococcus spp.</i>	2	2	100
3	CNS	1	1	100
4	<i>Enterococcus sp.</i>	2	2	100
5	<i>E. coli</i>	3	3	100
6	<i>Corynebacterium spp.</i>	4	4	100
7	<i>Pasteurella spp.</i>	2	2	100
8	<i>Citrobacter spp.</i>	1	1	100
9	<i>Serratia</i>	1	1	100
10	<i>Bacillus</i>	1	1	100
合計 :		26	26	100
<sup>a</sup> 研究を行うための手順は、実施例 17 に記載されている。				

## 【0125】

実施例 11 からの組成物の 3 回 (2 日) 投与レジメンは、わずか 7 日以内に 100% の症例で細菌学的治癒をもたらした。

## 【0126】

比較すると、セファロスポリン型抗生物質セフトオフルは、66% の細菌学的治癒を達成するが、8 日間の毎日の i. m a m. 適用後にのみ達成され、一方 5 日後では、治癒は 54% の症例にのみ生じる。参考文献 30 を参照されたい。S. u b e r i s によって引き起こされた不顕性乳腺炎では、ピルリマイシンを用いた 2 日間の処置は 58.1% の症例で治癒をもたらしたが、5 日間および 8 日間の治療は 68.8% および 80% の症例で治癒をもたらした。参考文献 30 を参照されたい。

## 【0127】

30) S. P. Oliver, B. E. Gillespie, S. J. Headrick, H. Moorehead, P. Lunn, H. H. Dowlen, D. J. Johnson, K. C. Lamar, S. T. Chester, W. M. Moseley: Efficacy of extended Ceftriaxone intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 2393 - 2400

## 【0128】

代替として、ウシの乳腺炎治療では、実施例 12 に記載されているように、乳房内適用のための懸濁液の剤形の本発明の組成物も、成功裏に使用することができる。

## 【0129】

ヤギの乳腺炎治療の研究

## 【0130】

クロアチア、Sigetec Ludbreski の OPG Matijasec におけるアルペンヤギ飼育場で、25 頭のヤギに対しヤギの乳腺炎処置の研究を行った。全てのヤギは、左右の乳房半体において不顕性乳腺炎と診断された。乳が微生物学的調査に対して陽性の試験結果であったヤギを 2 つの群に分けた。一方の群には、実施例 11 からの本発明の組成物を適用し、他方の群には、アモキシシリンおよびクラバン酸の乳房内懸濁

液（クラブキシル（登録商標）；Genera、クロアチア）を適用した。すべて3回の適用レジメンによる。半体の忍容性および細菌学的治癒を、実施例11からの組成物のi . m a m . 適用後に並行してモニタリングした。本発明の製剤の3回（2日間）の適用は、75%の感染した半体、および14日後に85%の細菌学的治癒をもたらした。これは、73.3%の症例において細菌学的治癒を可能にした乳房内抗生物質投与よりも有効であることが判明した。研究の結果は、ヤギにおける実施例11の組成物による乳腺炎処置が、抗生物質を使用せずに、時間通りに細菌学的治癒をもたらし得ることを示した。

【0131】

研究の詳細な手順は実施例18に記載されており、細菌学的治癒の結果は表18に示される。

【0132】

【表18】

表18. 抗生物質（アモキシシリンおよびクラブラン酸の固定された組み合わせ）と比較した、実施例11からの本発明の製剤のi . m a m . 適用後のヤギ乳腺炎の細菌学的処置/治癒の有効性。<sup>a</sup>

番号	病原体	処置された乳房半体の数 (N)	7日後の細菌学的に治癒した乳房半体の数	14日後の細菌学的に治癒した乳房半体の数	治癒 %
抗生物質 (アモキシシリン+クラブラン酸)					
1	<i>Staphylococcus spp.</i>	8	2	4	50
2	<i>S. aureus</i>	1	1	1	100
3	<i>Streptococcus spp.</i>	3	3	3	100
4	<i>S. uberis</i>	2	2	2	100
5	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	2	2	100
合計 :		15	9	11	73,3
実施例11からの製剤					
1	<i>Staphylococcus spp.</i>	8	6	7	87,5
2	<i>S. aureus</i>	7	4	6	85,7
3	<i>Streptococcus spp.</i>	2	2	2	100
4	<i>S. uberis</i>	2	2	2	100
5	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	1	1	100
合計 :		20	15	17	85
<sup>a</sup> 研究を行うための手順は、実施例18に記載されている。					

【0133】

乳試料に見られる病原体によって引き起こされる乳腺炎の処置に適した広域抗生物質としてのアモキシシリン、および実施例11からの組成物のi . m a m . 塗布の活性を比較すると、後者のより強い活性が証明された。アモキシシリンの適用から7日後、60%の半体のみが治癒したが、実施例11の組成物の結果は75%であった。最初の適用から14日後、抗生物質適用で細菌学的に治癒した半体の全パーセンテージは73.3%であったが、試験組成物については85%であった。

【0134】

前述の結果から、乳腺炎の処置において、本発明の組成物の抗炎症および抗菌活性において高い有効性を認めることができる。有効性は、広域抗生物質としてアモキシシリンおよびクラバン酸の固定された組み合わせを有するもの等の古典的な治療の有効性よりも高い。

【0135】

代替として、ヤギの乳腺炎治療では、実施例12に記載されているように、乳房内適用のための懸濁液の剤形の本発明の組成物も、成功裏に使用することができる。

【0136】

本発明の組成物は、その他の特性に加えて、一連の細菌および真菌に対する抗菌活性を特徴とし、抗菌効果は、古典的な抗生物質と比較して、インビトロ条件下よりもインビボで高いと結論付けることができる。それは抗菌剤だけでなく、抗炎症剤および免疫調節剤でもある。

10

【0137】

免疫調節プロポリス効果はその抗酸化効果と密接に関連しており、酸化ストレスは乳腺炎の病因の不可欠な部分である。例えば、参考文献31を参照されたい：

【0138】

31) O. Atakisi, H. Oral, E. Atakisi, O. Merhan, S. Metin Pancarci, A. Ozcan, S. Marasli, B. Polat, A. Colak, S. Kaya: Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk, Res. Vet. Sci. 89 (2010) 10 - 13

20

【0139】

ウマの創傷治癒症例の総説

【0140】

雌ウマの前脚の創傷治癒の場合を説明する。これは前脚のエルゴット領域の深い創傷であり、着地中に後脚が前脚をグリップしたときに生じた。実施例11からの組成物の投与を開始する前に、創傷は、異なる調製物で保存的に処置されたが成功しなかった。

【0141】

次いで、創傷を生理溶液で洗浄し、乾燥させ、実施例11からの組成物で1日1回5日間処置した。48時間後に上皮化のような改善が見られ、96時間後に創傷の完全な治癒が生じた。雌ウマは数日間にわたって激しく肢を引きずっていたが、その後は跛行の徴候は観察されなかった。回復は完了した。この症例の詳細な説明は、実施例19に記載されている。

30

【0142】

より正確な結論のためには詳細な臨床研究を行う必要があるものの、本組成物が創傷治癒剤として効果的に作用することは当業者には明らかである。抗炎症活性、抗酸化活性および上皮化活性が創傷治癒プロセスに重要であることが文献から知られているため、コラーゲン合成の刺激が、本発明の組成物のように、証明された抗菌活性と共に、薬理学的効果の範囲の一部である。比較のために、参考文献32を参照されたい：

40

【0143】

32) S. Marinotti, E. Ranzato: Propolis: a new frontier for wound healing, Burns Trauma (2015) 3: 9, doi 10.1186/s41038-015-0010-z.

【0144】

本発明による医薬組成物の使用

【0145】

本明細書の医薬組成物は、炎症性疾患、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス性疾患、自己免疫疾患、機能的胃腸障害、粘膜再生、熱傷処置および創傷治癒、ならびに癌疾患の群からのヒトおよび動物の疾患および状態の処置に使用される。

50

## 【0146】

含まれる炎症性疾患および状態は、歯肉炎、歯周炎、喉頭炎、胃炎、大腸炎、痔核疾患、皮膚炎、外耳炎症、副鼻腔炎、鼻炎、膣炎および乳腺炎である。

## 【0147】

本発明の医薬組成物は、

(i) グラム陽性菌: *Staphylococcus* spp.: *Staphylococcus aureus*、MRSA (メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus*)、MSSA (メチシリン感受性 *Staphylococcus aureus*)、*Staphylococcus intermedius*、*Staphylococcus pseudintermedius*; コアグラゼ陰性ブドウ球菌: *Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus saprophyticus*、*Staphylococcus hyicus*; *Streptococcus* spp.: *Streptococcus uberis*、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus dysgalactiae*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus canis*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus oralis*、*Streptococcus thermophilus*; *Peptostreptococcus* spp.; *Corynebacterium* spp.: *Corynebacterium bovis*; *Trueperella pyogenes*; *Nocardia* spp.; *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus*; 腸球菌: *Enterococcus faecium*、*Enterococcus faecalis*; バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE): *Enterococcus casseliflavus*;

10

20

(ii) グラム陰性菌: *Escherichia coli*; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Haemophilus influenzae*; *Salmonella choleraesuis*; *Yersinia enterocolitica*; *Enterobacter* spp. (*Enterobacter cloacae*); *Klebsiella* spp.: *Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*; *Shigella flexneri*; *Burkholderia cepacia*; *Proteus mirabilis*; *Proteus vulgaris*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Actinomyces israelii*; *Bacteroides fragilis*; *Helicobacter pylori*; *Campylobacter coli*; *Campylobacter jejuni*; *Porphyromonas gulae*; *Porphyromonas salivosa*; *Porphyromonas denticanis*; *Prevotella intermedia*; *Treponema* spp.; *Bacteroides splanchnicus*

30

の群からの細菌によって引き起こされる細菌感染症の処置に使用される。

40

## 【0148】

さらに、本医薬組成物は、*Candida* spp.: *Candida albicans*、*Candida dubliniensis*、*Candida glabrata*、*Candida kruzei*、*Candida tropicalis*、*Candida parapsilosis*; *Aspergillus* spp.: *Aspergillus niger*、*Aspergillus versicolor*; *Penicillium pinophilum*; *Paecilomyces variotii*; *Trichoderma virens*; *Chaetomium globosum*; *Malassezia pachydermatis*; および *Malassezia pachydermatis* 等の真菌によって引き起こされる真菌感染症の処置に使用される。

50

## 【0149】

また、本発明の組成物は、単純ヘルペスウイルス（HSV）；ヒトパピローマウイルス（HPV）；エプスタイン-バーウイルス（EBV）；サイトメガロウイルス（CMV）；ポリオウイルス；インフルエンザAおよびBウイルス；レトロウイルス；ワクシニアウイルス；一般的な風邪ウイルス：ライノウイルス、ピコルナウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス（HPIV）、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）、コロナウイルス、アデノウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス（HRSV）、エンテロウイルス等のウイルスによって引き起こされるウイルス性疾患の処置に使用される。

## 【0150】

代替として、本発明による医薬組成物は、乾癬、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、炎症性腸疾患、セリアック病および多発性硬化症等の自己免疫疾患の処置に使用される。

10

## 【0151】

さらに、本発明の医薬組成物は、皮膚および粘膜のがん、胃腸腫瘍、結腸直腸癌等のがん疾患の処置に使用される。

## 【0152】

本発明の医薬組成物は、食道、胃、十二指腸、小腸および結腸の障害、中枢性胃腸痛、胆嚢およびオッディ括約筋障害、肛門直腸障害、小児および青年特異的胃腸障害のような機能性胃腸障害の処置に使用される。

## 【0153】

具体的には、本発明の組成物は、動物の乳腺炎の処置に使用される。

20

## 【実施例】

## 【0154】

概論

## 【0155】

一次プロポリスとして、Hedera Ltd製のポプラ型の粗プロポリスを使用した。エタノール（96%）およびポリエチレングリコール200、400および600、ならびに粉末大豆レシチン（SL）は、Fagron Croatia Ltd（HR）から購入した。菜種レシチン（RL）および加水分解菜種レシチン（HRL）は、Pfannenschmidt（DE）から購入した。脱油ヒマワリレシチン（SUL）は、Barrentz（NL）から購入した。ジステアリン酸アルミニウムは、Sigma-Aldrich（US）から購入した。他の全ての出発原料は、現地の供給業者から購入した。

30

分析目的の化学的に純粋な化合物の試料：p-クマル酸（1；98% HPLC）、トランス-フェルラ酸（2；99%）、コーヒー酸（3；98% HPLC）、2-フェネチル3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート（CAPE；4；97% HPLC）、トランス-桂皮酸（5；>96.5% GC）、クリシン（6；98% HPLC）、ピノセンブリン（7；95% TLC）、ガランギン（8；95% HPLC）、アピゲニン（9；99% HPLC）およびケンペロール（10；90% HPLC）は、液体プロポリス抽出物中のそれらの定量的含有量を決定するための定量的分析標準として機能し、Sigma-Aldrich社（US）から購入した。

40

## 【0156】

室温という用語は、20~25の温度間隔を指す。略称「min」は、分を表す。収率（理論収率からの%）は、出発抽出溶媒（エタノール、PEG、エタノール+レシチン、PEG+レシチン）の質量に対する単離された液体プロポリス抽出物の重量（% w/w）パーセントとして表される。

## 【0157】

液体プロポリス抽出物中の活性物質1~10の定量的含有量は、1ミリリットル当たりのマイクログラム [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]の質量濃度（ ）として表されるが、本発明の医薬組成物中のその定量的組成は、最終生成物（剤形）1グラム当たりのマイクログラム [ $\mu\text{g}/\text{g}$ ]で表される。

50

## 【 0 1 5 8 】

実施例 1：抽出溶媒として 96% エタノールを使用することによる液体プロポリス抽出物の調製

## 【 0 1 5 9 】

抽出前のプロポリスの前処理：粗プロポリスの試料（ポプラ型；1 kg）を -20 の冷蔵庫で最低 1 時間冷却した。次いで、試料をミルで粉碎した。

## 【 0 1 6 0 】

96% エタノールによる抽出：エタノール（96%；70.00 g）を粉碎プロポリス（30.00 g）に添加した。このようにして得られた混合物を、周期的に撹拌しながら室温で 72 時間放置した。次いで、濾紙（黒色リボン）を通して混合物を濾過し、わずかに強いプロポリス臭を有する深褐色溶液の形態の 60.00 g（85.7%）の液体プロポリス抽出物を得た。

10

## 【 0 1 6 1 】

実施例 10 に記載されているアルコールプロポリス抽出物の最小阻止濃度（MIC）を試験する目的で、薬物対抽出物（DER）比 1：2 で同じ手順を繰り返した。

## 【 0 1 6 2 】

実施例 2：抽出溶媒としてポリエチレングリコール 400 を使用することによる液体プロポリス抽出物の調製

## 【 0 1 6 3 】

実施例 1 に前処理が記載されている粉碎プロポリス（30.00 g）を、ポリエチレングリコール 400（PEG 400；70.00 g）と混合した。このようにして得られた混合物を、周期的に撹拌しながら室温で 72 時間放置した。次いで、濾紙（黒色リボン）を通して混合物を濾過した。これにより、プロポリスに似たわずかに強い臭気のある深褐色の粘性液体の形態の液体プロポリス抽出物 55.00 g（78.6%）が得られた。

20

## 【 0 1 6 4 】

実施例 10 に記載のポリエチレングリコールプロポリス抽出物の最小阻止濃度（MIC）を試験する目的で、薬物対抽出物（DER）比 1：2 で同じ手順を繰り返した。

## 【 0 1 6 5 】

実施例 3：液体プロポリス抽出物中の活性物質 1～10 を定量するための HPLC 分析方法

## 【 0 1 6 6 】

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による定量分析は、特にプロポリスからの主要な活性物質 1～4 および付随する活性成分 5～10 をモニタリングする目的で開発された方法と共に行った。

30

## 【 0 1 6 7 】

活性物質 1～10 の市販の標準の試料を、100 μg/mL の濃度までエタノール：水混合物、75：25、V/V で希釈することにより、分析用に調製する。

## 【 0 1 6 8 】

本発明による液体プロポリス抽出物の試料（100 μL）を、分析前にエタノール：水混合物、75：25、V/V（900 μL）で 1：10 w/w の比（10 倍希釈）で希釈した。

40

## 【 0 1 6 9 】

オートサンプラー、ポンプ、脱気装置、カラムオープンおよび UV-VIS 検出器を備えた Shimadzu LC201CHT 機器で、以下の条件下で分析を行った：

(i) クロマトグラフィーカラム：Ascendis express；C18；寸法：15 cm × 3.0 mm；カラム内の粒子径：2.7 μm；

(ii) 移動相：A = 0.1% ギ酸水溶液、B = メタノール；勾配：0 min、80% A、20% B；3 min、70% A、30% B；60 min、20% A、80% B；90 min、20% A、80% B；100 min、70% A、30% B；105 min、80% A、20% B；

(iii) カラム温度：30 ；

50

- ( i v ) 流量 : 0 . 2 5 m L / m i n ;  
 ( v ) 分析時間 : 1 1 0 m i n ;  
 ( v i ) U V - V I S 検出器の波長 : 検出用 : 3 7 0 n m 、 積分用 : 2 9 0 n m ;  
 ( v i i ) 注入量 : 1 0 μ L ;  
 ( v i i i ) 圧力 : 2 1 0 ~ 2 9 0 バール。

## 【 0 1 7 0 】

前述の条件下で、主要な活性物質 1 ~ 4 および付随する成分 5 ~ 1 0 は、以下の保持時間 ( t<sub>R</sub> ) を有する :

( i ) t<sub>R</sub> [ p - クマル酸 ( 1 ) ] = 1 4 . 1 3 m i n ; t<sub>R</sub> [ トランス - フェルラ酸 ( 2 ) ] = 1 5 . 3 1 m i n ; t<sub>R</sub> [ コーヒー酸 ( 3 ) ] = 1 0 . 5 7 m i n ; t<sub>R</sub> [ 2 - フェネチル 3 , 4 - ジヒドロキシ - トランス - シンナメート ; C A P E ( 4 ) ] = 4 8 . 6 2 m i n ; ( i i ) t<sub>R</sub> [ トランス - 桂皮酸 ( 5 ) ] = 2 9 . 7 6 m i n ; t<sub>R</sub> [ クリシン ( 6 ) ] = 4 4 . 6 8 m i n ; t<sub>R</sub> [ ピノセンブリン ( 7 ) ] = 4 7 . 3 9 m i n ; t<sub>R</sub> [ ガランギン ( 8 ) ] = 4 9 . 9 4 m i n ; t<sub>R</sub> [ アピゲニン ( 9 ) ] = 3 7 . 7 2 m i n ; t<sub>R</sub> [ ケンペロール ( 1 0 ) ] = 3 6 . 8 7 m i n .

10

## 【 0 1 7 1 】

主要なプロポリス活性物質 1 ~ 4 および付随する活性成分 5 ~ 1 0 の保持時間を表 1 に示す。

## 【 0 1 7 2 】

実施例 4 : エタノールおよびレシチンの混合物をベースとした抽出溶媒の使用による標準化された液体プロポリス抽出物の調製

20

## 【 0 1 7 3 】

前処理が実施例 1 に記載されている粉碎されたプロポリス ( 3 0 . 0 0 g ) を、以下の組成の抽出溶媒と混合した ( 実験 E 1 ~ 8 ) :

E 1 : 9 6 % エタノール ( 6 7 . 0 0 g ; 9 5 . 7 % ) および大豆レシチン ( S L ; 3 . 0 0 g ; 4 . 3 % ) ;

E 2 : 9 6 % エタノール ( 6 0 . 0 0 g ; 8 5 . 7 % ) および大豆レシチン ( S L ; 1 0 . 0 0 g ; 1 4 . 3 % ) ;

E 3 : 9 6 % エタノール ( 5 0 . 0 0 g ; 7 1 . 4 % ) および大豆レシチン ( S L ; 2 0 . 0 0 g ; 2 8 . 6 % ) ;

30

E 4 : 9 6 % エタノール ( 4 0 . 0 0 g ; 5 7 . 1 % ) および大豆レシチン ( S L ; 3 0 . 0 0 g ; 4 2 . 9 % ) ;

E 5 : 9 6 % エタノール ( 6 7 . 0 0 g ; 9 8 . 9 % ) および菜種レシチン ( R L ; 3 . 0 0 g 2 5 % - 調製 ; 0 . 7 5 g レシチン ; 1 . 1 % ) ; E 5 での理論収量 = 6 7 g エタノール + 0 . 7 5 g レシチン = 6 7 . 7 5 g ;

E 6 : 9 6 % エタノール ( 6 0 . 0 0 g ; 9 6 . 0 % ) および菜種レシチン ( R L ; 1 0 . 0 0 g 2 5 % - 調製 ; 2 . 5 0 g レシチン ; 4 . 0 % ) ; E 6 での理論収量 = 6 0 g エタノール + 2 . 5 0 g レシチン = 6 2 . 5 0 g ;

E 7 : 9 6 % エタノール ( 6 7 . 0 0 g ; 9 7 . 8 % ) および加水分解菜種レシチン ( H R L ; 3 . 0 0 g 5 0 % - 調製 ; 1 . 5 0 g 加水分解菜種レシチン ; 2 . 2 % ) ; E 7 での理論収量 = 6 7 g エタノール + 1 . 5 0 g レシチン = 6 8 . 5 0 g ;

40

E 8 : 9 6 % エタノール ( 6 0 . 0 0 g ; 9 2 . 3 % ) および加水分解菜種レシチン ( H R L ; 1 0 . 0 0 g 5 0 % - 調製物 ; 5 . 0 0 g レシチン ; 7 . 7 % ) ; E 8 での理論収量 = 6 0 g エタノール + 5 . 0 0 g レシチン = 6 5 . 0 0 g .

## 【 0 1 7 4 】

このようにして得られた混合物を室温で 1 時間攪拌し、周期的に攪拌しながら室温で 7 2 時間放置した。次いで、濾紙 ( 黒色リボン ) を通して混合物を濾過した。これにより、プロポリスに似たわずかに強い臭気のある深褐色の粘性液体の形態の液体プロポリス抽出物 5 0 ~ 6 0 g ( 7 1 . 0 ~ 8 5 . 7 % ) が得られた。

## 【 0 1 7 5 】

50

このようにして調製された一次液体プロポリス抽出物を、実施例 3 に記載の分析方法に従って、主要な活性物質 1 ~ 4 および付随する成分 5 ~ 10 の含有量の定量分析に供した。結果を表 3 および表 4 に示す。

## 【0176】

既知の定量的含有量の活性物質 1 ~ 4 を有する実験 E 1 ~ E 8 に記載された抽出溶媒 (ES) 中のそのように調製された一次液体プロポリス抽出物を、本発明による活性物質 1 ~ 4 の定量的組成物の所望のレベルまで、抽出ステップで使用されたのと同じ ES で希釈することによって標準化した。

## 【0177】

実施例 5 : ポリエチレングリコール 400 およびレシチンの混合物をベースとした抽出溶媒の使用による標準化された液体プロポリス抽出物の調製

10

## 【0178】

前処理が実施例 1 に記載されている粉碎されたプロポリス (30.00 g) を、以下の組成の抽出溶媒と混合した (実験 E 1 ~ E 8)。

E 1 : ポリエチレングリコール 400 (PEG 400 ; 67.00 g ; 97%) および大豆レシチン (SL ; 3.00 g ; 3%) ;

E 2 : ポリエチレングリコール 400 (PEG 400 ; 60.00 g ; 90%) および大豆レシチン (SL ; 10.00 g ; 10%) ;

E 3 : ポリエチレングリコール 400 (PEG 400 ; 67.00 g ; 98.9%) および菜種レシチン (RL ; 3.00 g 25% - 調製 ; 0.75 g レシチン ; 1.1%) ; E 3 の理論収量 = 67 g PEG 400 + 0.75 g レシチン = 67.75 g ;

20

E 4 : ポリエチレングリコール 400 (PEG 400 ; 60.00 g ; 96.0%) および菜種レシチン (RL ; 10.00 g 25% - 調製 ; 2.50 g レシチン ; 4.0%) ; E 4 での理論収量 = 60 g PEG 400 + 2.50 g レシチン = 62.50 g ;

E 5 : ポリエチレングリコール 400 (PEG 400 ; 67.00 g ; 97.8%) および加水分解菜種レシチン (HRL ; 3.00 g 50% - 調製 ; 1.50 g 加水分解レシチン ; 2.2%) ; E 5 での理論収量 = 67 g PEG 400 + 1.50 g レシチン = 68.50 g ;

E 6 : ポリエチレングリコール 400 (PEG 400 ; 60.00 g ; 92.3%) および加水分解菜種レシチン (HRL ; 10.00 g 50% - 調製物 ; 5.00 g レシチン ; 7.7%) ; E 6 での理論収量 = 60 g PEG 400 + 5.00 g レシチン = 65.00 g。

30

## 【0179】

このようにして得られた混合物を室温で 1 時間攪拌し、周期的に攪拌しながら室温で 72 時間放置した。次いで、濾紙 (黒色リボン) を通して混合物を濾過した。これにより、プロポリスに似たわずかに強い臭気のある深褐色の粘性液体の形態の液体プロポリス抽出物 45 ~ 55 g (69.0 ~ 78.6%) が得られた。

## 【0180】

このようにして調製された一次液体プロポリス抽出物を、実施例 3 に記載の分析方法に従って、主要な活性物質 1 ~ 4 および付随する成分 5 ~ 10 の含有量の定量分析に供した。結果を表 5 および表 6 に示す。

40

## 【0181】

既知の定量的含有量の活性物質 1 ~ 4 を有する実験 E 1 ~ E 6 に記載された抽出溶媒 (ES) 中のそのように調製された一次液体プロポリス抽出物を、本発明による活性物質 1 ~ 4 の定量的組成物の所望のレベルまで、抽出ステップで使用されたのと同じ ES で希釈することによって標準化した。

## 【0182】

実施例 6 : ポリエチレングリコール 200 および大豆レシチンの混合物をベースとした抽出溶媒の使用による標準化された液体プロポリス抽出物の調製

## 【0183】

50

前処理が実施例 1 に記載されている粉碎されたプロポリス (30.00 g) を、抽出溶媒、ポリエチレングリコール 200 (149.85 g; 99.9%) および大豆レシチン (SL; 0.15 g; 0.1%) の混合物と混合した。このようにして得られた混合物を室温で 1 時間攪拌し、周期的に攪拌しながら室温で 4 8 時間放置した。次いで、濾紙 (黒色リボン) を通して混合物を濾過した。これにより、プロポリスに似たわずかに強い臭気のある深褐色の粘性液体の形態の液体プロポリス抽出物 137.00 g (91.3%) が得られた。

【0184】

次いで、実施例 3 に記載の方法による定量的 HPLC 分析を行って、主要な活性物質 1 ~ 4 の定量的含有量を得た。濾液を同じ抽出溶媒、ポリエチレングリコール 200 および大豆レシチン (SL) の混合物、99.9:0.1 w/w で、標準化された本発明の液体抽出物の仕様に従って、活性物質 1 ~ 4 含有量の合計レベルまで希釈した。

10

【0185】

実施例 7: ポリエチレングリコール 600 および脱油ヒマワリレシチンの混合物をベースとした抽出溶媒の使用による標準化された液体プロポリス抽出物の調製

【0186】

前処理が実施例 1 に記載されている粉碎されたプロポリス (30.00 g) を、抽出溶媒、ポリエチレングリコール 600 (PEG 600; 297.00 g; 99%) および脱油ヒマワリレシチン (SUL; 3.00 g; 1.0%) の混合物と混合した。このようにして得られた混合物を 70 に加熱し、3 時間激しく攪拌した。次いで、混合物を室温に冷却し、濾紙 (黒色リボン) を通して濾過した。これにより、プロポリスに似たわずかに強い臭気のある深褐色の粘性液体の形態の液体プロポリス抽出物 261.00 g (87.0%) が得られた。

20

【0187】

次いで、実施例 3 に記載の方法による定量的 HPLC 分析を行って、そこから主要な活性物質 1 ~ 4 の定量的含有量を決定した。濾液を、本発明の標準化された液体抽出物の仕様に従って、同じ抽出溶媒、ポリエチレングリコール 600 および脱油ヒマワリレシチン (SUL) の混合物、99:1 w/w で、活性物質 1 ~ 4 の含有量の合計レベルまで希釈した。

【0188】

実施例 8: ポリエチレングリコール 200、ポリエチレングリコール 600 および加水分解菜種レシチンの混合物をベースとした抽出溶媒の使用による標準化された液体プロポリス抽出物の調製

30

【0189】

前処理が実施例 1 に記載されている粉碎されたプロポリス (30.00 g) を、抽出溶媒、ポリエチレングリコール 200 (PEG 200; 150.00 g; 50%)、ポリエチレングリコール 600 (139.50 g; 46.5%) および加水分解菜種レシチン (HRL; 10.50 g; 3.5%) の混合物と混合した。このようにして得られた混合物を、3 時間激しく攪拌しながら 100 で加熱した。次いで、混合物を室温に冷却し、濾紙 (黒色リボン) を通して濾過した。これにより、プロポリスに似たわずかに強い臭気のある深褐色の粘性液体の形態の液体プロポリス抽出物 245.00 g (81.7%) が得られた。

40

【0190】

次いで、実施例 3 に記載の方法による定量的 HPLC 分析を行って、そこから主要な活性物質 1 ~ 4 の定量的含有量を決定した。濾液を、本発明の標準化された液体抽出物の仕様に従って、同じ抽出溶媒、ポリエチレングリコール 200、ポリエチレングリコール 600 および加水分解菜種レシチン (HRL) の混合物、50:46.5:3.5 (w/w/w) で、活性物質 1 ~ 4 の含有量の合計レベルまで希釈した。

【0191】

実施例 9: ポリエチレングリコール 400 および大豆レシチン混合物の使用による標準化

50

## された液体プロポリス抽出物の調製

### 【0192】

前処理が実施例1に記載されている粉碎されたプロポリス(30.00g)を、抽出溶媒、ポリエチレングリコール400(PEG400; 87.30g; 97% m/m)および大豆レシチン(SL; 2.70g; 3% w/w)の混合物と混合した。このようにして得られた混合物を、72時間定期的に攪拌しながら静置して浸軟させた。次いで、濾紙(800個の細孔/cm<sup>2</sup>)を通して混合物を濾過した。これにより、プロポリスに似た強い臭気の50~55gの深褐色の粘性液体が得られた。このようにして得られた生成物を、同じ抽出溶媒で60.00gの質量まで希釈した。このようにして、薬物対抽出物(DER)比1:2の最終的な抽出物、または30gの出発プロポリスから前述の60gの抽出物が得られた。

10

### 【0193】

そのように調製された液体プロポリス抽出物を、本発明の医薬組成物調製の目的で、

(I) 活性物質1~4を決定するために実施例3に記載の方法に従い定量的HPLC分析に供し、その後、そのような調製された抽出物中の活性物質1~4の実際の質量濃度に関して、

(II) 純粋な(新鮮な)溶媒混合物: ポリエチレングリコール400(97% w/w)および大豆レシチン(3% w/w)で、活性物質1~4:

(i) 10~1, 300 μg/mLのp-クマル酸(1);

(ii) 10~800 μg/mLのトランス-フェルラ酸(2);

(iii) 5~300 μg/mLのコーヒー酸(3); および

(iv) 5~400 μg/mLの2-フェネチル3,4-ジヒドロキシ-トランス-シナメート(4; CAPE);

20

の質量濃度を係数X/100(X=医薬組成物の製剤中の前述の標準化された液体プロポリス抽出物の重量パーセント%、w/w)で除した値まで希釈することによって標準化した。

### 【0194】

実施例10: 本発明による標準化された液体抽出物の抗菌効果の決定。モデル病原微生物に対する最小阻止濃度(MIC)の決定

### 【0195】

本発明による標準化された液体プロポリス抽出物の最小阻止濃度(MIC)を、実施例9の生成物を使用して、CLSIおよびEUCAST法の指示に従って、96%エタノール(実施例1からの生成物)またはPEG400(実施例2からの生成物)を用いて得られた類似の液体プロポリス抽出物と比較して決定した。参考文献26~29を参照されたい。

30

### 【0196】

以下のモデル病原性微生物(M)のATCC株に対してインビトロ条件下で抗菌効果を試験した: *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (M1); メチシリン耐性*Staphylococcus aureus*; MRSA (MFBFコレクション; M2); メチシリン感受性*Staphylococcus aureus*; MSSA (MFBFコレクション; M3); *Enterococcus faecalis* ATCC 9212 (M4); *Enterococcus faecalis* VRE (MFBFコレクション) (M5); *Escherichia coli* ATCC 10536 (M6); *Acinetobacter baumannii* ATCC 43498 (M7); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (M8); および *Candida albicans* ATCC 90028 (M9)。

40

### 【0197】

抽出物の最小阻止濃度(MIC)を決定するために、連続微量希釈手順を行った。細胞懸濁液をPBS緩衝液(pH7.4)中の親培養物から調製し、これらを比濁法によって0.5マクファーランド単位に調整した。ミューラー-ヒントンプロスに溶解したプロポリ

50

ス抽出物の溶液 100  $\mu\text{L}$  を添加することによって、100 から 0.7125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲の 96 ウェルマイクロタイタープレートで段階希釈して試験を実施した。105 cfu/mL に調整した各細菌培養物 100  $\mu\text{L}$  を播種した後、プレートを 37 で 24 時間インキュベートした。単一ウェル当たり 10  $\mu\text{L}$  の 2, 3, 5 - トリフェニル - 2 H - テトラゾリウムクロリド (TTC; 酸化還元指示薬) の 0.5  $\text{mg}/\text{mL}$  溶液を添加することによって MIC を決定し、30 で 4 時間のインキュベーション後、波長 490 nm で分光光度法によって吸光度を決定した。

【0198】

MIC 値は、細菌の 80% の減少が生じたプロポリス抽出物濃度 (MIC80) として決定された。

10

【0199】

真菌種については、細菌と同じスキームによって、追加のグルコースを含む RPMI 培地で MIC 値を決定した。インキュベーション (48 時間、37、好気条件、暗所) 後、XTT (酸化還元指示薬) をメナジオンと組み合わせて添加し、波長 540 nm で分光光度法によって吸光度を決定した。

【0200】

MIC 値は、細菌または真菌の 80% の減少が生じたプロポリス抽出物濃度 (MIC80) として決定された。

【0201】

陰性対照は培地および溶媒のみを含有し (微生物およびプロポリスは添加されない)、陽性対照は抗生物質または抗真菌剤に曝露された。

20

【0202】

プロポリス溶液の抗菌活性をインビトロで決定することにより最小阻止濃度 (MIC80) を測定し、液体抽出物を所与の溶媒に希釈した形態 (%) として表 9 に示した。出発液体プロポリス抽出物は、薬物対抽出物 (DER) 重量比 1 : 2 で得られた。これは実施例 9 からの生成物である。液体抽出物の希釈がより大きい場合、すなわち活性物質 1 ~ 10 の濃度が MIC に対してより低い場合、試験された抽出物の得られる抗菌効果はより高い。

【0203】

結果を表 9 に示す。

【0204】

表 10 ~ 15 には、各特定の活性物質 1 ~ 10 の [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] での質量濃度 ( ) の計算値が示されており (3 つの試験した液体プロポリス抽出物のそれぞれから)、各特定の抽出物が MIC を達成した。以下の抽出溶媒 (ES) を用いて抽出物を得た: 96% エタノール (実施例 1 からの生成物)、ポリエチレングリコール 400 (PEG 400; 実施例 2 からの生成物)、ならびに PEG 400 (97% w/w) および大豆レシチン (3% w/w) の混合物 (実施例 9 からの生成物)。これらは、DER が 1 : 2 である一次液体抽出物から決定され、対応する MIC が達成された希釈 (係数) で除した値である。

30

【0205】

実施例 11: 最低 150  $\mu\text{g}/\text{g}$  の活性物質 1 ~ 4 を含む乳房内適用のための溶液の剤形の本発明の組成物の調製

40

【0206】

製剤 (100 g 溶液用):

(1) 最低 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の活性物質 1 ~ 4 で標準化された、実施例 9 の生成物である本発明による 50.00 g (50.00% w/w) の液体プロポリス抽出物

(2) 50.00 g (20.00% w/w) のポリエチレングリコール 400

【0207】

調製: 成分 (1) および (2) を混合し、室温で 5 分間攪拌することによって均質化した。溶液を濾紙で濾過し、4 ~ 8 g ごとに乳房内注入器に充填した。

溶液組成: 最低 150  $\mu\text{g}/\text{g}$  の活性物質 1 ~ 4 の総濃度。定量的 HPLC 分析の結果を表 16 に示し、対応する典型的な HPLC クロマトグラムを図 5 に示す。

50

## 【0208】

実施例12：最低100 $\mu$ g/gの活性物質1～4を含む乳房内適用のための懸濁液の剤形の本発明の組成物の調製

## 【0209】

製剤(100g懸濁液用)：

(1)最低150 $\mu$ g/mLの活性物質1～4で標準化された、実施例9の生成物である本発明による77.00g(77.00%w/w)の液体プロポリス抽出物

(2)20.00g(20.00%w/w)のポリエチレングリコール4000

(3)3.00g(3.00%w/w)のジステアリン酸アルミニウム

## 【0210】

調製：ポリエチレングリコール(2)を60 $^{\circ}$ Cで溶融し、ジステアリン酸アルミニウム(3)を添加し、この温度で15分間均質化した。次いで、混合物を攪拌しながら冷却し、プロポリス抽出物(1)を40～45 $^{\circ}$ Cで添加した。混合物を攪拌しながら室温にさらに冷却し、加えて室温で15分間均質化した。淡黄色の粘性懸濁液が得られ、これを4～8gごとに乳房内注入器にさらに充填した。

## 【0211】

懸濁液組成：最低100 $\mu$ g/gの活性物質1～4の総濃度

## 【0212】

実施例13：最低250 $\mu$ g/gの活性物質1～4を含むゲルの剤形の本発明の組成物の調製

## 【0213】

製剤(100gゲル用)：

(1)最低850 $\mu$ g/mLの活性物質1～4で標準化された、実施例9の生成物である本発明による30.00g(30.00%w/w)の液体プロポリス抽出物

(2)2.00g(2.00%w/w)のCarbopol940

(3)1.00g(1.00%w/w)のポリソルベート60

(4)0.20g(0.20%w/w)のソルビン酸カリウム

(5)0.30g(0.30%w/w)の安息香酸ナトリウム

(6)0.30g(0.30%w/w)のクエン酸、無水

(7)適量の水酸化ナトリウム(20%溶液)

(8)100%までの精製水

## 【0214】

調製：本発明による液体プロポリス抽出物30gに(2)を添加し、室温で20分間攪拌することによって均質化した。次いで、50gの精製水(8)を添加し、室温で5分間攪拌することによって均質化した。その後、成分(3～6)を添加し、10分間攪拌して溶解した。次いで、(7)でpH値を5.5～6に調整した。このようにして得られたゲルに、残りの量の精製水を合計質量100gまで添加し、室温で15分間攪拌することによって均質化し、最終的に生成物を脱気した。

## 【0215】

ゲル組成：最低250 $\mu$ g/gの活性物質1～4の総濃度。

## 【0216】

実施例14：最低100 $\mu$ g/gの活性物質1～4を含むクリーム剤形の本発明の組成物の調製

## 【0217】

製剤(100gクリーム用)：

(1)最低500 $\mu$ g/mLの活性物質1～4で標準化された、実施例9の生成物である本発明による20.00g(20.00%w/w)の液体プロポリス抽出物

(2)5.00g(5.00%w/w)のポリソルベート60

(3)5.00g(5.00%w/w)のラノリン、無水

(4)2.00g(2.00%w/w)の蜜蝋、白色

10

20

30

40

50

- (5) 8.00 g (8.00% w/w) のセチルアルコール
- (6) 8.00 g (8.00% w/w) ワセリン、白色
- (7) 10.00 g (10.00% w/w) の鉱油、濃厚
- (8) 0.20 g (0.20% w/w) の4-クロロ-m-クレゾール
- (9) 100%までの精製水

## 【0218】

調製：成分(2~7)の混合物を65~70 で15~20分間、ほぼ無色の油性液体が形成されるまで溶解することによって油相を調製した。(8)および(1)を精製水に溶解し、その後攪拌しながら65~70 に加熱することによって水相を調製した。次いで、水相を、好ましくは1,000~3,000回転/分(r.p.m.)の高剪断均質化を可能にするホモジナイザーを用いて、激しく混合しながら15~20分間油性相にゆっくりと添加した。このようにして得られたエマルジョンをさらに激しく攪拌し、65~20 の温度で30分間徐々に冷却した。

10

## 【0219】

クリーム組成：最低100 μg/gの活性物質1~4の総濃度

## 【0220】

実施例15：最低500 μg/gの活性物質1~4を含む軟膏の剤形の本発明の組成物の調製

## 【0221】

製剤(100g軟膏用)：

- (1) 最低1,000 μg/mLの活性物質1~4で標準化された、実施例9の生成物である本発明による50.00 g (50.00% w/w)の液体プロポリス抽出物
- (2) 10.00 g (10.00% w/w)のポリエチレングリコール400
- (3) 40.00 g (40.00% w/w)のポリエチレングリコール4000

20

調製：成分(1~3)を慎重に混合し、60 に加熱し、5分間攪拌することによって均質化し、混合しながら室温に徐々に冷却した。

## 【0222】

軟膏組成：最低500 μg/gの活性物質1~4の総濃度

## 【0223】

実施例16：最低50 μg/gの活性物質1~4を含む経鼻スプレーの剤形の本発明の組成物の調製

30

## 【0224】

製剤(スプレー用の100g溶液用)：

- (1) 最低1,000 μg/mLの活性物質1~4で標準化された、実施例9の生成物である本発明による5.00 g (5.00% w/w)の液体プロポリス抽出物
- (2) 0.60 g (0.60% w/w)の塩化ナトリウム
- (3) 0.10 g (0.10% w/w)のポリソルベート60
- (4) 0.10 g (0.10% w/w)のソルビン酸カリウム
- (5) 0.10 g (0.10% w/w)の安息香酸ナトリウム
- (6) 0.20 g (0.20% w/w)のクエン酸、無水
- (7) 0.01 g (0.01% w/w)のエデト酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O)

40

(8) 100%までの精製水

## 【0225】

調製：90gの精製水(1)に、成分(2~7)を添加し、室温で15分間攪拌することによって溶解した。次いで、(1)を添加し、混合物を室温で15分間均質化した。その後、溶液を滅菌0.2 μmフィルタで濾過し、鼻への適用のためのクロージャおよびスプレーポンプを備えた適切な滅菌ボトルに充填した。

## 【0226】

溶液組成：最低50 μg/gの活性物質1~4の総濃度

50

## 【0227】

実施例17：乳牛の乳腺炎処置における実施例11の乳房内溶液の形態の本発明の組成物の抗炎症活性の研究

## 【0228】

ウシにおける乳腺炎処置の研究を、ホルスタイン種の乳牛の5つの飼育場で行った。合計86頭のウシまたは339の分房が研究に含まれ、乳房の分房が統計単位として使用された。動物を深い寝床で自由に飼育し、抗生物質を添加せずに乳牛用の標準的なプレミックスを与えた。この試験は獣医学倫理委員会によって承認された。200,000/mL未満の体細胞数(SCC)を有する乳腺炎の臨床症状のない健康な動物および分房、ならびに200,000/mLを超えるSCCを有する感染した分房を含めた。安全性および有効性の無作為化クロスオーバー臨床試験を、地形条件下で溶液の形態の本発明の組成物の乳房内(i.mam.)適用で行った。朝の搾乳中、夕方の搾乳中および翌日の朝の搾乳後に、実施例11の本発明の組成物を、牛の乳房の4つ全ての分房に3回適用した。最初に、乳房内適用における組成物の耐容性を試験した。ウシの行動の変化、ならびに乳房の肉眼的外観(浮腫および発赤)、乳および触覚に対する乳房の感度をモニタリングした。乳中の体細胞数(SCC)の変化を、組成物の最初のi.mam.適用前の期間から最初の適用から7日後までモニタリングした。乳試料およびさらに分房を、SCCが上昇または200,000/mL未満であるかどうか、および試料が細菌学的調査に対して陽性または陰性であるかどうかに応じて群分けした。参考文献33を参照されたい：

10

## 【0229】

33) European Medicines Agency (1992): Local Tolerance of Intramammary Preparations in Cows. Directive 81/852/EEC

20

## 【0230】

次いで、細菌学的治癒の有効性試験を、不顕性乳腺炎の処置におけるi.mam.製剤の唯一の有効性尺度である欧州医薬品庁(EMA)の指示に従って、プロポリス組成物を用いて行った。これは、所与の製剤のi.mam.適用後のある特定の期間内に収集された乳の試料中に、以前に確認された病原体が存在しないこととして定義される。参考文献34を参照されたい：

## 【0231】

34) European Medicines Agency (2017): Guideline on the conduct of efficacy studies for intramammary products for use in cattle. CVMP. EMA/CVMP/344/1999-Rev.2

30

## 【0232】

乳試料採取は、標準的な方法で行った。微生物学的調査は、標準的な指示に従って行った。参考文献35を参照されたい：

## 【0233】

35) J.W.Hogan: Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council (1999) Madison, Wisconsin, SAD

40

## 【0234】

ウシの乳腺炎からの細菌学的治癒の結果を、表17に示す。

## 【0235】

実施例18：ヤギの乳腺炎処置における実施例11の乳房内溶液の形態の本発明の組成物の抗炎症活性の研究

## 【0236】

ヤギにおける乳腺炎処置の研究を、左右の乳房半体に不顕性乳腺炎と診断された25匹のヤギで行った。乳が微生物学的調査に対して陽性であったヤギを2つの群に分けた。一方の群には、実施例11からの本発明の組成物を適用し、他方の群には、アモキシシリン

50

およびクラバン酸の乳房内懸濁液（クラブキシル（登録商標）；Genera、クロアチア）を適用した。すべて3回の適用レジメンによる。

【0237】

半体の忍容性および細菌学的治癒を、実施例11からの組成物のi.m.a.m.適用後に並行してモニタリングした。調製物を、前述の抗生物質または実施例11からの組成物を用いて3回（2日）レジメンによって適用した。

【0238】

研究中、ヤギを小屋の深い寝床の中に保った。授乳期間中のヤギは170匹であり、約300日間継続する1回の授乳期間中のヤギ当たりの乳の平均生産量は500～600kgであった。それらには、必要に応じて、ヤギ1匹当たり最低2kgの干し草を与え、ヤギ1匹当たり約1kgの約16%タンパク質を含有するプレミックスを与えた。朝と夕方の搾乳中に2つの部分に分けた。2%ビタミン-ミネラルプレミックスOvisan（登録商標）（Sano Company、クロアチア）を、プレミックスに添加した。細菌検査で乳が陽性であったヤギを2つの群に分けた。一方の群（処置された半体の数、N=20）には、実施例11からの組成物を適用し、他方の群（N=15）では、アモキシシリンとクラバン酸との乳房内懸濁液（クラブキシル（登録商標）；Genera Company、クロアチア）を適用した。すべて3回の適用レジメンによる。

【0239】

実施例11からの組成物の忍容性の試験中、ヤギの行動変化も、乳房（浮腫および発赤）ならびに乳の肉眼的な外観も、触覚に対する乳房感受性も観察されなかった。最初の数回のジェットの搾乳後に、左右の乳房の半体からの乳試料を、予め印を付けた滅菌プラスチックチューブに採取した。試料は、実施例11からの製剤の最初の適用前、最初の適用から12時間後、最初の適用から24時間後、および組成物の最初の適用後7日目に採取した。乳試料を翌日まで4に保ち、Croatian Veterinary Instituteで乳腺炎および生乳の品質について実験室で分析した。

【0240】

細菌学的治癒の有効性の試験は、欧州医薬品庁（EMA）の指示に従って行った。参考文献34を参照されたい。乳試料採取は標準的な方法で行い、微生物学的検査は標準的な手順に従って行った。参考文献35を参照されたい。

【0241】

ヤギの乳腺炎からの細菌学的治癒の結果を、表18に示す。

【0242】

実施例19：溶液の形態での実施例11からの本発明の組成物の投与による雌ウマの脚の創傷治癒の成功の総説

【0243】

雌ウマの前肢の創傷治癒の場合について説明する。それは、雌ウマの後脚がダウンホール中に前脚をグリップしたときに生じた前脚のエルゴット領域の深い創傷であった。実施例11からの組成物の投与を開始する前に、創傷は、異なる調製物で保存的に処置されたが成功しなかった。

【0244】

雌ウマがギャロップする間、雌ウマが後肢を伸ばしすぎたときに創傷が形成された。次いで、後肢の蹄および馬蹄の頭部が前足の指関節領域を損傷した。これにより、2×4cmの寸法を有する楕円形状の創傷が生じた。雌ウマは、損傷直後に跛行の徴候を示し、4/5としてスコア化された（米国ウマ科医師会）。損傷直後に創傷部を剃毛し、通常の冷水で洗い流し、その後、ヨウ素（ポビドンヨード、0.01%）で処置し、硝酸銀スプレーを噴霧した。感染性汚染を回避するために創傷部を閉じた。雌ウマは破傷風に対して既にワクチン接種されていたため、TAT血清は適用しなかった。雌ウマを2週間安静にし、創傷を機械的洗浄によって毎日処置し、清潔かつ乾燥状態に保った。創傷をヨウ素および硝酸銀スプレーで48時間毎に処置した。5日後、創傷は治癒し始め、回復しつつあった。次いで、亜鉛-ビタミン軟膏での創傷の処置を開始した。2週間後、雌ウマを再び作

10

20

30

40

50

業に導入した。しかしながら、雌ウマがギャロップを開始するとすぐに、創傷は出血し始めた。創傷を再びヨウ素で消毒し、乳房内適用のための製剤中のセファロスポリンベースの局所抗生物質を適用した（C o b a c t a n（登録商標））。機械的創傷洗浄と共に、創傷を抗生物質でさらに5日間局所的に処置した。次いで、雌ウマでさらに作業を試みたが、創傷は再び出血し始めた。

【0245】

その後、創傷部を生理溶液で洗浄し、乾燥させ、実施例11の組成物で1日1回、5日間処置した。上皮化により視認され得る改善は48時間後に観察することができたが、完全な治癒は96時間後に生じた。雌ウマは最初の数日間だけ跛行していたが、その後、跛行の徴候は観察されなかった。回復は完了した。

【0246】

結論

【0247】

実験結果は、抽出溶媒（ES）の0.1～3.5質量%の量のレシチンと組み合わせたPEG400等の液体ポリエチレングリコール（PEG）の特定の混合物が、予想外にも、96%エタノール、PEG400等の純粋な溶媒、またはEtOHおよび同じレシチンの混合物と比較して、活性プロポリス物質であるp-クマル酸（1）、トランス-フェルラ酸（2）、コーヒー酸（3）および2-フェネチル3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート（4）を効果的および化学選択的に抽出することを示した。

【0248】

一次液体プロポリス抽出物中の主要な活性物質1～4および付随する成分5～10の正確な定量的組成は、本発明において開発された適切な分析HPLC法の使用によって決定される。次いで、そのような一次抽出物は、抽出ステップで使用したのと同じ抽出溶媒（ES）で標準化される。これにより、既知の標準化された濃度の主要な活性物質1～4を含む、本発明による液体プロポリス抽出物が得られる。このようにして調製された標準化プロポリス抽出物は、活性医薬成分（API）、活性化粧品成分（ACI）、または機能性食品および食品サプリメントを製造するための食品成分として使用される。

【0249】

主要な活性物質であるp-クマル酸（1；10～1,300μg/g）、トランス-フェルラ酸（2；10～800μg/g）、コーヒー酸（3；5～300μg/g）、および2-フェネチル3,4-ジヒドロキシ-トランス-シンナメート（4；5～400μg/g）を含有する前述の液体プロポリス抽出物をベースとした本発明の組成物は、炎症性疾患、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス性疾患、自己免疫疾患、機能性胃腸障害の治療、粘膜再生、熱傷の処置および創傷治癒、ならびにがん疾患の処置に有効な薬剤である。

【産業上の利用可能性】

【0250】

液体プロポリス抽出物およびそれをベースとした医薬組成物の広範な実用的用途により、本発明の産業上の利用可能性は明らかである。

10

20

30

40

50

【 図 面 】  
【 図 1 】

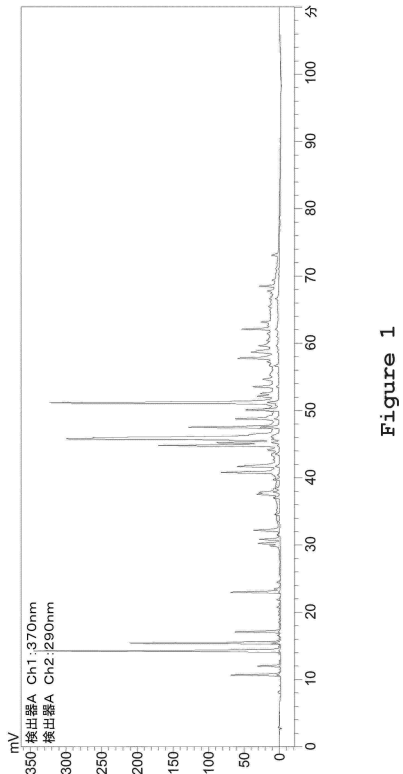


Figure 1

【 図 2 . 1 - 4 】

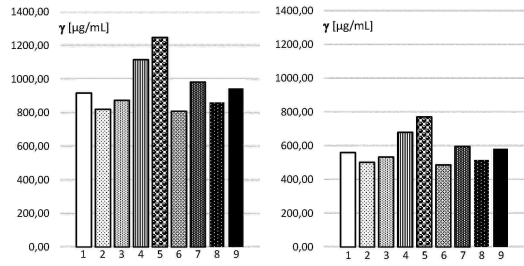


Figure 2.1

Figure 2.2

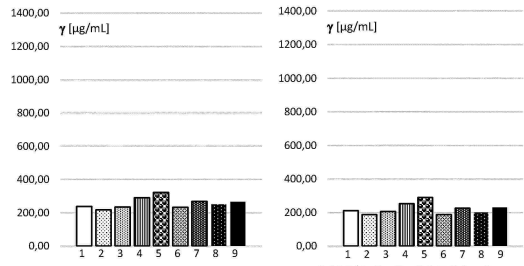


Figure 2.3

Figure 2.4

図2. 1～図2. 10の抽出溶媒

- 1-エタノール
- 2-エタノール+3%大豆レシチン(SL)
- 3-エタノール+10%大豆レシチン(SL)
- 4-エタノール+20%大豆レシチン(SL)
- 5-エタノール+30%大豆レシチン(SL)
- 6-エタノール+1. 1%葉種レシチン(RL)
- 7-エタノール+4%葉種レシチン(RL)
- 8-エタノール+2. 2%加水分解RL(HRL)
- 9-エタノール+7. 7%加水分解RL(HRL)

10

20

【 図 2 . 5 - 10 】

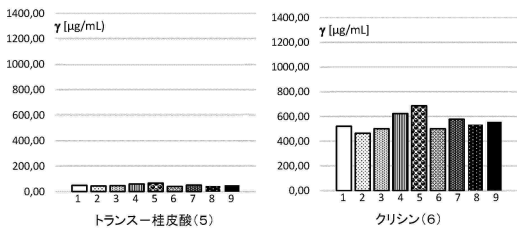


Figure 2.5

Figure 2.6

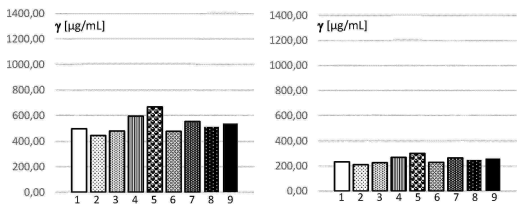


Figure 2.7

Figure 2.8

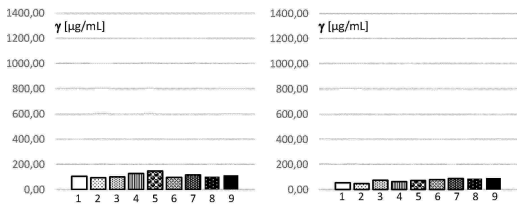


Figure 2.9

Figure 2.10

【 図 3 . 1 - 4 】

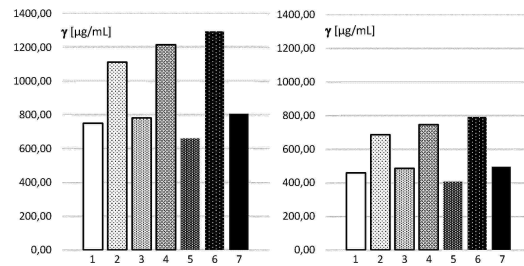


Figure 3.1

Figure 3.2

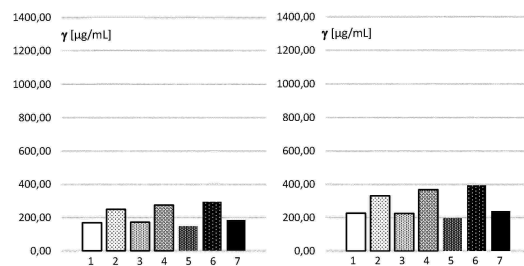


Figure 3.3

Figure 3.4

図3. 1～図3. 10の抽出溶媒

- 1-PEG400
- 2-PEG400+3%大豆レシチン(SL)
- 3-PEG400+10%大豆レシチン(SL)
- 4-PEG400+1. 1%葉種レシチン(RL)
- 5-PEG400+4%葉種レシチン(RL)
- 6-PEG400+2. 2%加水分解RL(HRL)
- 7-PEG400+7. 7%加水分解RL(HRL)

30

40

50

【 図 3 . 5 - 1 0 】

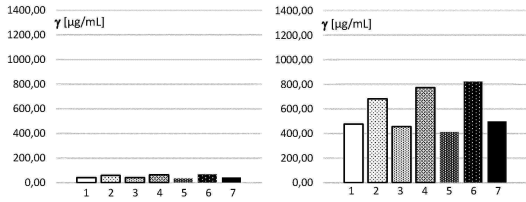


Figure 3.5

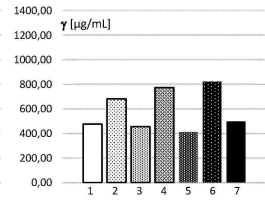


Figure 3.6

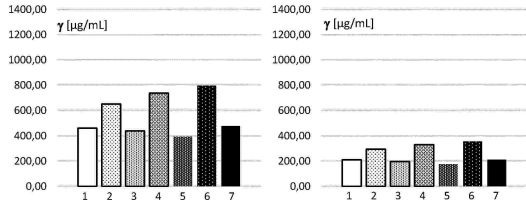


Figure 3.7

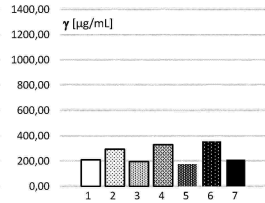


Figure 3.8

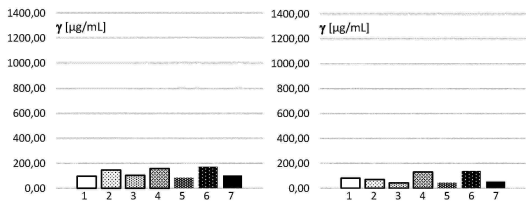


Figure 3.9

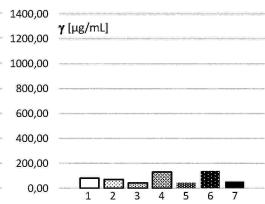
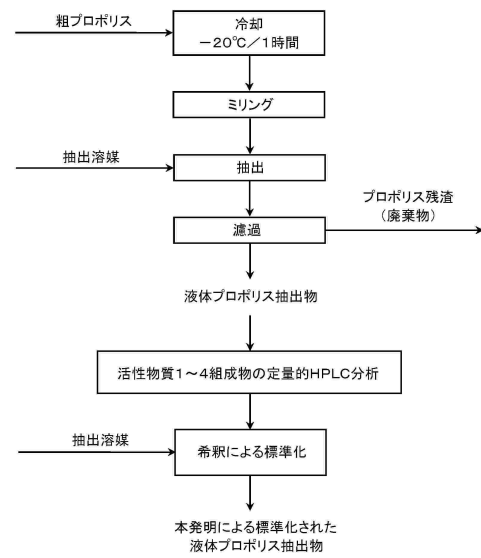


Figure 3.10

【 図 4 】



抽出溶媒、定義:  
 A: B=96.5~99.9:0.1~3.5, w/w  
 A=PEG200~600  
 B=レシチンまたは加水分解レシチン

Figure 4

【 図 5 】

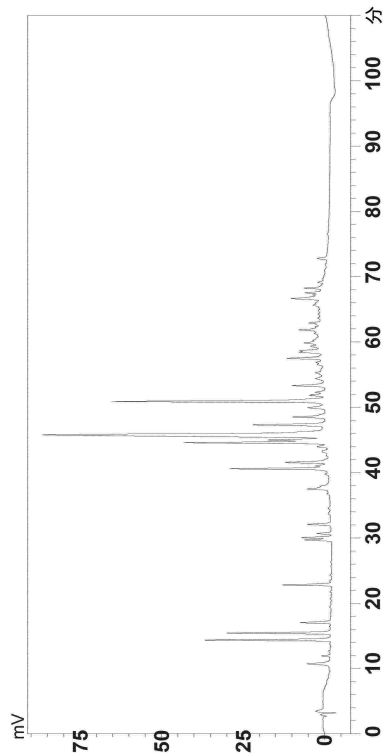


Figure 5

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I
A 6 1 K 8/55 (2006.01)	A 6 1 K 8/55
A 6 1 K 8/36 (2006.01)	A 6 1 K 8/36
A 6 1 K 8/37 (2006.01)	A 6 1 K 8/37
A 6 1 Q 17/00 (2006.01)	A 6 1 Q 17/00
A 6 1 K 31/201 (2006.01)	A 6 1 K 31/201
A 6 1 K 31/231 (2006.01)	A 6 1 K 31/231
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 2 3 L 33/10 (2016.01)	A 2 3 L 33/10
A 2 3 L 21/20 (2016.01)	A 2 3 L 21/20
A 0 1 P 3/00 (2006.01)	A 0 1 P 3/00
A 0 1 N 63/14 (2020.01)	A 0 1 N 63/14

## (33)優先権主張国・地域又は機関

クロアチア(HR)

クロアチア共和国 ザグレブ ハエル - 1 0 0 0 0 , ウリカ イヴァナ ザハラ 3

## (72)発明者 スラン, イエレナ

クロアチア共和国 ザグレブ ハエル - 1 0 0 0 0 , ウリカ イヴァナ ザハラ 3

審査官 佐々木 大輔

## (56)参考文献 特開昭61-197523(JP,A)

BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015年, Vol.15, Article No.156, pp.1-7

Journal of Food Science, 2014年, Vol.79, No.7, pp.C1315-C1322

Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2017年, Vol.64, pp.13-20

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 3 2 7

A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9

A 6 1 Q 1 7 / 0 0 - 1 7 / 0 4

A 2 3 L 3 3 / 0 0 - 3 3 / 2 9

A 2 3 L 2 1 / 2 0

A 0 1 P 3 / 0 0

A 0 1 N 6 3 / 0 0 - 6 3 / 6 0

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 )