

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4746258号
(P4746258)

(45) 発行日 平成23年8月10日 (2011. 8. 10)

(24) 登録日 平成23年5月20日 (2011. 5. 20)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	31/385	(2006. 01)	A 6 1 K	31/385
A 6 1 K	31/137	(2006. 01)	A 6 1 K	31/137
A 6 1 P	3/10	(2006. 01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	29/00	(2006. 01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/02	(2006. 01)	A 6 1 P	37/02

請求項の数 12 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-592909 (P2002-592909)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月27日 (2002. 5. 27)
 (65) 公表番号 特表2004-531567 (P2004-531567A)
 (43) 公表日 平成16年10月14日 (2004. 10. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/005811
 (87) 国際公開番号 W02002/096398
 (87) 国際公開日 平成14年12月5日 (2002. 12. 5)
 審査請求日 平成17年5月17日 (2005. 5. 17)
 (31) 優先権主張番号 101 25 882.8
 (32) 優先日 平成13年5月28日 (2001. 5. 28)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 503437082
 エスバルマ ゲーエムベアー
 ドイツ連邦共和国 オスターページゲン
 D-39171 ラング ゴーレン 3
 (73) 特許権者 503437989
 イーエムティーエム ゲーエムベアー
 ドイツ連邦共和国 マーゲデブルク D-
 39104 ライプツィガー シュトラ-
 セ 44
 (74) 代理人 100082670
 弁理士 西脇 民雄
 (74) 代理人 100114454
 弁理士 西村 公芳

最終頁に続く

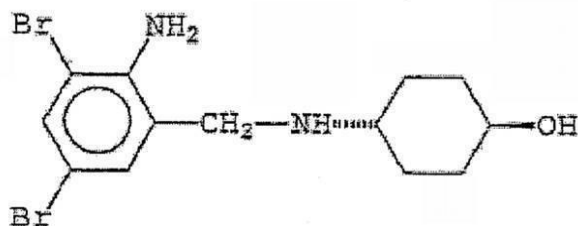
(54) 【発明の名称】 薬剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫細胞のチオールジスルフィド状態のかく乱が生ずる糖尿病を治療するための薬剤であって、 - リポ酸および / 又はその塩と共に、式Iを有するアンプロキシールおよび / 又はその塩を含む薬剤。

【化 I】



【請求項 2】

人間の患者に施すために用いられる - リポ酸および / 又はその塩の投与量は、30 mg / d と 1200 mg / d との間である請求項 1 記載の薬剤。

【請求項 3】

人間の患者に施すために用いられるアンプロキシールおよび / 又はその塩の投与量は、7.5 mg / d と 90 mg / d との間である請求項 1 又は 2 記載の薬剤。

【請求項 4】

経口又は非経口で投与される請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載の薬剤。

【請求項 5】

液状溶媒、安定剤、懸濁剤、分散剤および湿潤剤から成るグループから選択された追加の添加剤を含む請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の薬剤。

【請求項 6】

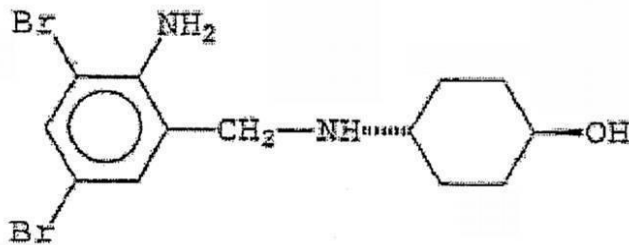
溶液、粒体、粉体、エマルジョン、錠剤及び/又は被覆錠剤の形態にある請求項 1 乃至 5 のいずれか一つに記載の薬剤。

【請求項 7】

免疫を調整しおよび/又は防禦を増大するための薬剤であって、 - リポ酸および/又はその塩並びに式 I を有するアンプロキソールおよび/又はその塩を含む薬剤。

10

【化 I】

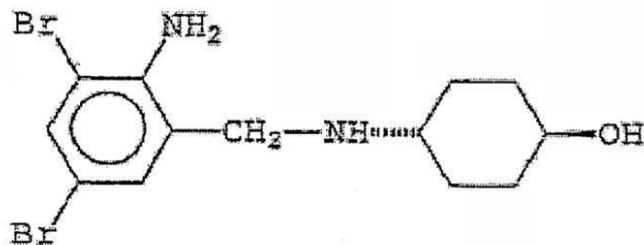


【請求項 8】

20

炎症治療のための薬剤であって、 - リポ酸および/又はその塩並びに式 I を有するアンプロキソールおよび/又はその塩を含む薬剤。

【化 I】



30

【請求項 9】

アンプロキソールおよび - リポ酸および/又はその塩とは、単一の調剤である請求項 7 乃至 8 のいずれか一つに記載の薬剤。

【請求項 10】

アンプロキソールおよび - リポ酸および/又はその塩とは、別個の調剤である請求項 7 乃至 8 のいずれか一つに記載の薬剤。

【請求項 11】

人間の患者に施す - リポ酸および/又はその塩の投与量は、200 mg/d と 600 mg/d との間である請求項 1 記載の薬剤。

40

【請求項 12】

人間の患者に施すために用いられるアンプロキソールおよび/又はその塩の投与量は、60 mg/d と 5 mg/d との間である請求項 1 又は 2 記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞チオール状態のかく乱ないし破壊およびその関連の病気を治療するグルタチオン代謝のエフェクターと - リポ酸との結合の用途に関するものである。

【背景技術】

【0002】

50

チオールジスルフィド状態の正確な調整は、生化学的代謝の最も重要な基本的要件の一つである。このようなシステムにおける主な調整要素は、トリペプチドグルタチオンであり、これは、高い細胞密度（10 mM以上）を減少した状態に下げるものである。

【0003】

グルタチオンに加えて、細胞内、特に、細胞膜結合形態のチオールグループを担持するプロテイングループが、各細胞のチオールジスルフィド状態のための追加の重要な要素である。

【0004】

ジスルフィドのかく乱（破壊）と酵素の種々の分類によって調整されるチオールグループの形成との代謝は、チオールの種々の生化学的機能、特に、全体の細胞保護機構および浄化機構と同様に、プログラム細胞死を含む細胞発育工程および分化工程の結果、任意の正常の細胞機能には本質的なことである。

【0005】

このようなシステムのかく乱（破壊）およびチオールの密度の変化は、分離の場合のみに局所的に限定されたままの細胞機能の深刻なかく乱をもたらす、且つ一般的に全体の有機体に逆効果を与えることになる。

【0006】

かく乱チオールジスルフィド状態が痛みのある慢性病に含まれることが幾つかの実験において証明されてきた。

【0007】

例えば、パーキンソン病の如き神経変性病において、チオール代謝の著しい変化があることが、ある神経細胞において実証されてきた（Brain Res Rev（ブレイン レス 改訂） 1997；25：335-358）。

【0008】

この代謝のかく乱の結果、主に、病気の兆候または症状に対応し得る基本的中枢部、神経節の機能が損なわれた領域に、神経細胞の死滅が増大するという明確な指摘がある（Ann Neurol（アン ニューロル） 1994；36：348-355）。

【0009】

グルタチオンの値が減少することおよび細胞内のグルタチオンの容量が減少することは、血管障害の状態、即ち、血管の内壁に位置する内皮細胞に動脈硬化を生じ、心臓発作になることが判った（Med Sci Res（メド サイエンス 研究） 1998；26：105-106）。

【0010】

肺組織の変質を含む肺疾患は、組織のグルタチオン不足に密接に関連している。この形式の肺線維症において、病気の重症度は、チオール不足と平行して生ずる（Clin Chim Acta（クリン チム 議事録） 1997；265：113-119）。

【0011】

成人の急性呼吸困難の例を用いて実証された、重症の炎症性の肺の病気は、関連する炎症細胞（顆粒球）のチオール代謝の無調節によって生ずる（Chest（チェスト） 1996；109：163-166）。

【0012】

著者自身の試験に基づいて、慢性呼吸器閉塞性換気障害病を持つ喫煙者および患者における気管支系（肺泡マクロファージ）の免疫応答性防禦細胞が、著しい細胞チオール不足を表わしている。従って、細胞チオール状態のかく乱の重症度は、肺機能を制限してしまうことに直接関係している（Free Radic BiolMed（フリー ラディック バイオ医学） 2000；29：1160-1165）。

【0013】

ウイルス感染のグルタチオン代謝の意義に関する広範囲な調査では、ウイルスの再生に対抗するグルタチオンの耐ウイルス機能と同様に、細胞防禦不全に基づき細胞がチオール不足になるという予測を行うことはできなかった（Proc Natl Acad Sci USA（プロ

10

20

30

40

50

ック ネイテル アカデミー サイエンス 米国) 1997; 94: 1967-1972)。

【0014】

著者自身の試験は、特に、細胞チオールジスルフィド代謝が、血液透析又は腹膜透析の形態で、腎臓機能が著しく制限され、これによって行われる腎臓交換治療の下で、きわめてかく乱されるというものであった。このかく乱は、特に、腹膜マクロファージ又はリンパ球の活動の食作用能力など、通常の細胞機能の大幅な喪失をもたらす。

白血細胞顆粒球、リンパ球、および単球から成る人体細胞免疫系統は、チオール代謝におけるかく乱に感応的に反応する系統を示している。

【0015】

ある最少の変更、特に、細胞グルタチオンが損失すると、細胞、プログラム細胞死(アポトーシス)の自己かく乱(破壊)のためのカスケード状プログラムを起こす(FASEB J(エフ、エー、エス、イー、ピー ジェー) 1998; 12: 479-486)。この場合に、チオールジスルフィド代謝は、有機体が生存できるように、無傷の免疫系統の主な切り換え機構として作用する。

【0016】

更に、最近、慢性の腎臓病(Ren Fail (レン フェイル) 1998; 20: 117-124)、貧血(Br J Haematol (ハーメトル) 1995; 91: 811-819)、早産新生児(Pediatr Pulmonolペディエータ パルモノル 1995; 20: 160-166)、騒音によって生ずる聴覚喪失(Brain Res (ブレイン レス) 1998; 784: 82-90)、内臓炎症病(Gut (ガト) 1998; 42: 485-492)および特に、(糖尿病; クリニカルおよび実験の代謝 1998; 47(8): 993-997)における損傷チオール代謝について参考にすることが増えつつある。

【0017】

糖尿病の症状およびこれに関連する代謝のかく乱における実験が全体のグルタチオン溜まり(プール)の完全な減少と共に、減少したグルタチオンの消費におけるレドックス(酸化還元)の移動(シフト)を実証してきた(Free Radic BiolMed (フリー ラディック バイオ 医学) 1998; 24: 699-704)。

チオールジスルフィド状態のかく乱の役割に関する上述の文献の概略においては、1型又は2型の糖尿病である主要な病気の結果、含有するSHの不足が生ずるにも拘わらず、チオール代謝の無調節が病気を引き起こす少なくとも一つの因子であると考えられてきた。

【0018】

特に、膵臓の β -細胞の過酷な誘発破壊を検査することによって説得力のある例が提供されてきた(Diabet Med (糖尿病 医学) 2000; 17: 171-180)。

【0019】

この病気が幾つかの免疫学的かく乱によって達成されることも知られている。確認されてきた主な因子は、感染に対する患者の感応性を著しく高め、リンパ球およびマクロファージの機能的かく乱に関連する免疫制御のサイトカインの不均衡さである(Horm Metab Res (ホーム 代謝 研究) 1998; 30: 526-530)。

【0020】

従って、かく乱されたチオール代謝を補正することは、幾つかの異なる遺伝子病の治療における基礎的な治療として、特に糖尿病の症状下で、本質的に重要なことになる。

【0021】

糖尿病性の多発神経障害の状態で知覚障害によって生じた神経麻痺の治療のために神経防禦物質の形態にある α -リボ酸が比較的成功して用いられてきた(Diabetologica (糖尿病論理) 1995; 38: 1425-1433、Diabetes Res Clin Pract (糖尿病 研究 医学治療) 1995; 29: 19-26、Diab Care (糖尿病 治療) 1999; 22: 1296-1301、Drug Metab Rev (薬物 代謝 研究) 1997; 29: 1025-1054、DE4343592C2)。DE4447599C2およびEP0

10

20

30

40

50

5 3 0 4 4 6 B 1 は、また、耳鳴りおよび卒中性の難聴を含むことに加えて、ニューロン（神経）かく乱に - リポ酸を用いることを開示している。

【 0 0 2 2 】

この場合に、耐細胞作用機構は、糖依存プロテインの改善あるいは緩和（プロテイン解糖）の影響、神経麻痺のケトン生成の減少および最終的に - リポ酸およびその代謝の耐酸機能に基づいている（Free Radic BiolMed（フリー ラディック バイオ 医学） 1 9 9 5 ; 1 9 : 2 2 7 - 2 5 0 ）。

【 0 0 2 3 】

この細胞防護機能は、本質的に不飽和の脂肪酸の酸化変質を防ぐ観点から特に実証されてきた。神経防禦剤として、 - リポ酸の用途に加えて脂質過酸化反応を抑制することは、種々の中毒および肝臓病の治療において、肝臓を防護する薬剤として適用する根拠を示している（Bio chemistry（バイオ 化学） 1 9 9 8 ; 3 7 : 1 3 5 7 - 1 3 6 4 ）。

【 0 0 2 4 】

- リポ酸が H I V ウイルスの再生をその成長の異なる段階で抑制し、従って、A I D S 病の進行に対抗することができることが知られてきた。しかし、これらの実験結果は、ある制限された程度のみの医学的研究に適用されてきた（F E B S -Lett（エフ、イー、ビー、エス レット） 1 9 9 6 ; 3 9 4 : 9 - 1 3 ）。このことは、膵臓のインシュリン生成島細胞のための物質の耐炎症機能を検出することが本質的なことである（Agents Actions（用剤の作用） 1 9 9 3 ; 3 8 : 6 0 - 6 5 ）。

【 0 0 2 5 】

E P 0 8 1 2 5 9 0 A 2 および E P 0 4 2 7 2 4 7 B 1 は、神経防護、鎮痛および炎症病の治療の薬剤として、 - リポ酸の用途を開示している。

【 0 0 2 6 】

- リポ酸の耐酸化特性は、金属イオンでキレートを形成してラジカルを直接減少する能力に基づき、更には、強力な分解剤としてのその機能に基づいている。細胞内レベルについてのこの分解能力を達成するため、分解状態にある - リポ酸は、ジヒドロリポ酸の形態で存在しなければならない。分解により - リポ酸が、ジヒドロリポ酸のジチオール形態にその一部で遷移することは、分解等価物を消滅させ、これによってこの処理は、特に、酵素グルタチオン分解剤によって触媒化される（Gen Pharmacol（ゲン ファーマコル） 1 9 9 7 ; 2 9 : 3 1 5 - 3 3 1 ）。この処理は、明らかに、チオール回復について物質の不十分な作用を生じさせる。

【 0 0 2 7 】

アンブロキシソール、即ち、トランス - 4 - (2 - アミノ - 3、5 - ジブロモベンジルアミノ) - シクロヘキサン塩酸塩が、肺および気管支病の治療における去痰薬として種々の形態で扱われている（W O 9 6 3 3 7 0 4、G B 2 2 3 9 2 4 2、W O 0 1 0 5 3 7 8 ）。高尿酸血の治療の用途もまた D E 3 5 3 0 7 6 1 から知られている。粘液溶解薬としてのアンブロキシソールの作用は、気管支細胞による界面活性剤の生成の活性化および特に自由基を減少する能力に基づいている（Respir Med（改良医学） 1 9 9 8 ; 9 2 : 6 0 9 - 2 3 ）。これらの特性に基づいた物質の耐酸化活性は、主に、肺細胞について（Pharmacol（ファーマコル） 1 9 9 9 ; 5 9 : 1 3 5 - 1 4 1 ）、また、炎症機構の状態においても証明された（Inflamm Res（炎症研究） 1 9 9 9 ; 4 8 : 8 6 - 9 3 ）。高投与量でのアンブロキシソールの用途を通して、グルタチオン代謝を調節する酵素が直接影響されてペルオキシドの過氧化物処理がインビトロ（体外）抑制され得ることが知られている（Arch Vet Pol（アーチ ベット ポル） 1 9 9 2 ; 3 2 : 5 7 - 6 6 ）。

【 0 0 2 8 】

アンギオテンシン変換酵素の抑制剤（アンギオテンシン変換酵素抑制剤、A C E 抑制剤）が広範囲の心臓血管病の治療において大きな成功を収めて用いられてきた。血圧を下げる効果の機構は、アンギオテンシン I のアンギオテンシン II への変換の抑制に基づいている。A C E 抑制剤は、また、グルタチオン代謝のエフェクターとして記載されてい

10

20

30

40

50

る。心臓血管や血管病の治療におけるこの種の効果の研究 (J Cardiovasc Pharmacol (ジェー、心臓血管ファーマコル) 2000; 36: 503-509) に加えて、一般の調整原理が評価されてきた (クリン ネフロール 1997; 47: 243-247)。この場合における評価の効果は、エナラプリル (1 - {N - [(S) - 1 - エトキシカルボニル - 3 - フェニルプロピル] - L - アラニル} - L - プロリン) の如き SH フリーの ACE 抑制剤のカプトプリル (- [(2S) - 3 - メルカプト - 2 - メチルプロピオニル] - L - プロピン) のような SH グループを担持する ACE 抑制剤の効果であった。エナラプリルは、耐酸化的にラジカル (基) の阻止体として直接反応するが、SH フリー (無シ) の ACE 抑制剤は、本質的にそのようにすることはできない。両方のグループに共通の可能性は、グルタチオンレダクターゼおよびグルタチオンペルオキシダーゼ、同様に、スーパーオキシドジスムターゼの調節によってグルタチオンレドックスサイクルへの影響である (Am J, PhysiolRegulatory integrative Comp. Physiol (エイエム ジェー, フジオル レギュレートリ インテグレートリ カンパニー, 生理学) 2000; 278: 572-577)。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0029】

従って、本発明の目的は、糖尿病の治療におけるチオールジスルフィド状態の安定性を改善するためおよび糖尿病によって生じた機能喪失を回復するためのチオール反応物質を含む新規で有用な薬剤を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0030】

本発明は、上記目的が、本発明に従って請求項 1 に記載された特徴を有する薬剤によって達成され得ることを教示している。従属の請求項は、夫々、本発明の有効な改良を述べている。

【0031】

本発明によれば、グルタチオン代謝のエフェクターは、 - リポ酸、その塩および/又はそのプロドラッグと共に用いられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

本発明は、本発明に従って用いられた - リポ酸とグルタチオン代謝のエフェクターとの結合あるいは組み合わせを適用した結果、免疫細胞の主に分解されたチオール状態の標準化が形成されることを教示している。 - リポ酸とエフェクターとの結合のチオール安定作用は、 - リポ酸又はそのエフェクターの個別のチオール安定作用に適切に勝るばかりでなく、それより勝る追加の効果が見出された。これによって、チオール状態の回復は、細胞内チオールおよび膜結合 SH グループの両方を備え、従って、複合バイオ調整が形成される。この現象は、グルタチオン代謝が、一方では、発生するフリーラジカルを媒介的に減少し、他方では、ジスルフィドから分解形態に - リポ酸の変質のための分解等価物の利用可能性を増大し、従って、チオールジスルフィド状態についての - リポ酸の合成誘導効果を高めるという事実に基づいている。

40

【0033】

グルタチオン代謝のエフェクターと - リポ酸との結合のチオール増大効果が、主にチオール欠乏免疫細胞でのみ生じることが明らかになった。チオールジスルフィド状態の任意の変更を持たない健康な免疫細胞は、SH 密度の更なる増大に反応しない。

【0034】

免疫細胞のチオール状態の回復は、機能因子の標準化によって達成された。特に、この現象は、T-リンパ球の活性の状態における免疫変調効果に関連した。

【0035】

本発明に従って用いられた上記エフェクターと - リポ酸との結合は、透析を必要とする患者の腹膜マクロファージの如き付随的な免疫細胞のチオールジスルフィド状態

50

を安定させることが証明された。 -リボ酸/アンブロキソール又は -リボ酸/A C E 抑制剤で処理する前では、高グルコ - ス腹膜透析液からの腹膜マクロファージは、欠乏チオール状態に加えて、その食作用機能をほぼ完全に喪失し、更には、患者の高感染率を発生させる分化およびサイトカイン合成の深刻なかく乱（破壊）を有している。

【 0 0 3 6 】

これら機能の喪失は、本発明によるエフェクターと -リボ酸との結合によって減少された。

【 0 0 3 7 】

本発明の薬剤は、特に、糖尿病、更には、免疫細胞のチオールジスルフィド状態のかく乱がある他の医学的症状の治療に適している。

10

【 0 0 3 8 】

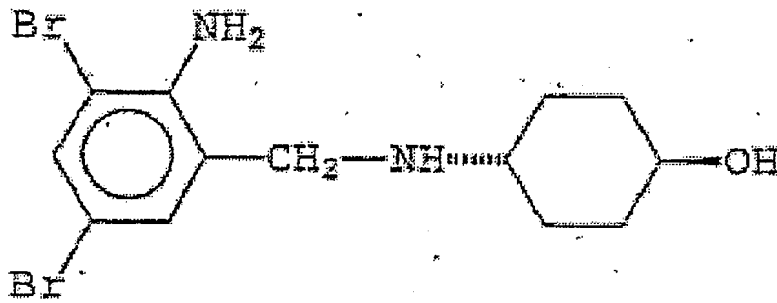
本発明に従って用いられたエフェクターと -リボ酸との結合調剤（製剤）は、薬理の通常の形態あるいは点滴の形態、更には予防的および治療的に投与される。有効な投与量は、ケースバイケースによって決定されなければならない。人間の患者に施す投与量は、好ましくは、30 mg / d と 1200 mg / d との間、特定の選択で、200 mg / d と 600 mg / d との間で与えられる。

【 0 0 3 9 】

一つの例において、アンブロキソールは、次の一般式Iを有する。

【 式 I 】

【 0 0 4 0 】



20

【 0 0 4 1 】

このアンブロキソールの塩およびプロドラッグは、グルタチオン代謝のエフェクターとして用いられる。人体の医薬に施すアンブロキソールの投与量は、好ましくは、7.5 mg / d と 90 mg / d との間、特定の選択で、60 mg / d と 75 mg / d との間で与えられる。

30

【 0 0 4 2 】

追加例において、アンギオテンシン変換酵素の抑制剤（A C E 抑制剤）は、グルタチオン代謝のエフェクターとして用いられる。この場合に、人体医薬に施す好ましい投与量は、0.2 mg / d と 20 mg / d との間である。

【 0 0 4 3 】

例えば、次の化合物をA C E 抑制剤として用いることができる。

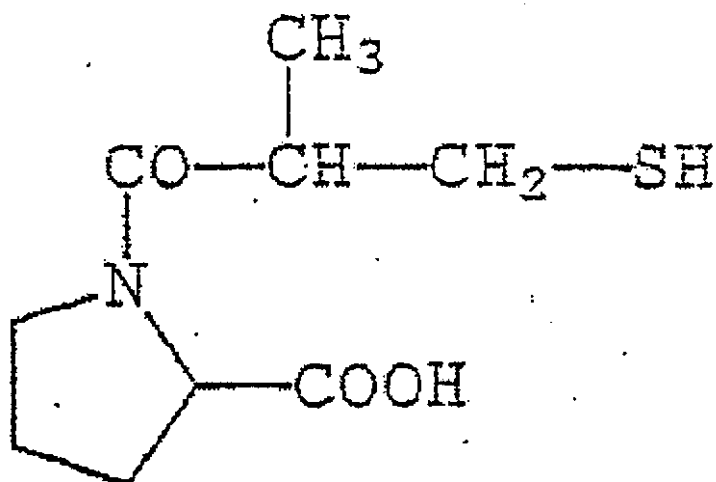
40

A) 以下の式IIを有する

1 - [(2 S) - 3 - メルカプト - 2 - メチルプロピオニル] - L - プロリン（カプトプリル）

【 式 II 】

【 0 0 4 4 】



10

【0045】

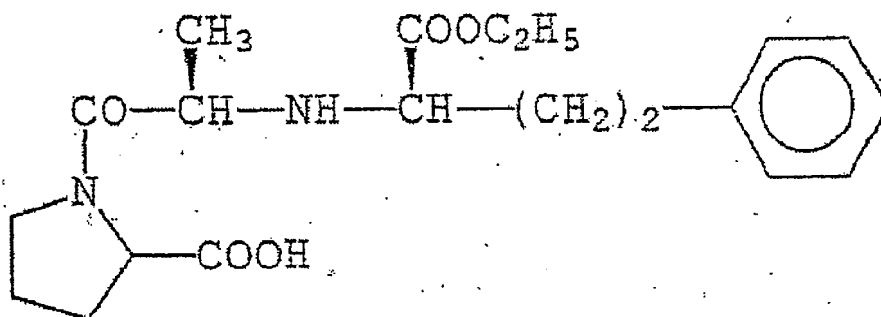
B) 以下の式IIIを有する

1 - {N - [(S) - 1 - エトキシカルボニル - 3 - フェニルプロピル] - L - アラニル}
 - L - プロリン (エナラプリル)

【式III】

【0046】

20



30

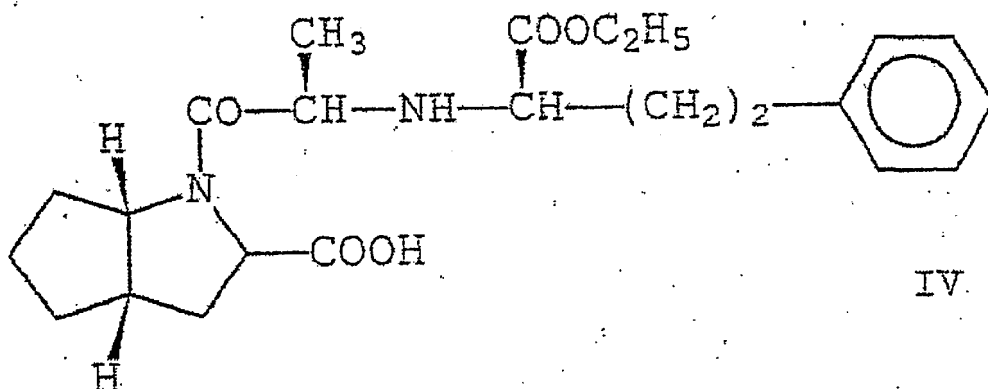
【0047】

C) 以下の式IVを有する

(2S, 3aS, 6aS) - 1 - {(S) - N - [(S) - 1 - エトキシカルボニル - 3 - フェニルプロピル] - アラニル} オクタヒドロシクロペンタ[b] - ピロ - ル - 2 - カルボン酸 (ラミプリル)

【式IV】

【0048】



IV

40

50

【 0 0 4 9 】

従って、この薬剤は、経口および/又は非経口で投与され得る。

【 0 0 5 0 】

この薬剤は、また、通常の添加剤を含むことができる。このような添加剤は、例えば、液状溶媒、安定剤、懸濁剤、分散剤および湿潤剤である。この薬剤は、任意の所望の調合で作ることができる。例として、許容できる調合の形態は、溶液、粒体、粉体、エマルジョン、錠剤および/又は被覆錠剤等から成る。

【 0 0 5 1 】

本発明によれば、糖尿病の治療における免疫細胞チオールジスルフィド状態のかく乱を治療するための薬剤を製造するのに、 γ -リポ酸、その塩および/又はそのプロドラッグと共にグルタチオン代謝のエフェクターが用いられる。

10

【 0 0 5 2 】

同様に、 γ -リポ酸、塩および/又はプロドラッグと共にグルタチオン代謝のエフェクターを、免疫を調整し、防禦を増大し、炎症を抑制する治療の薬剤を製造するために用いることができる。

【 0 0 5 3 】

このためエフェクターと γ -リポ酸との結合調剤は単一の調剤又は別個の調剤にすることができる。

【 0 0 5 4 】

本発明に係る、 γ -リポ酸とグルタチオン代謝のエフェクターとの結合の用途は、実施例と添付図面を参照して以下に詳細に述べられる。

20

【発明の実施例】

【 0 0 5 5 】

実施例 1

人体の末梢免疫細胞の細胞チオール状態についての影響

健康なドナー（9人）から周囲の免疫細胞をその周囲の血液から採取した。一人のドナーについて、全体の免疫細胞のうち、単核細胞の大きな破片が、約90%の相対パーセントのリンパ球を正確に表し、単核細胞の10%は単球によって表された。

【 0 0 5 6 】

得られた単核細胞は、37度Cの温度、98%の相対湿度、5%の相対空気-CO₂量のガス化培養キャビネット内で特別の細胞培養媒体に吸収されて培養された。主要な不活性免疫細胞の代謝は、マイトジェン活性剤（0.5 μ g/ml フィトヘムアグルチニン）によって活性化された。チオール欠乏免疫細胞のチオール状態についての本発明によって用いられた結合の影響を試験するため、これらの細胞は、人工的にチオール消滅された。この処理は、チオール欠乏媒体（RPMI 1603）における培養によって証明された方法を用いて行われた。完全な媒体（RPMI）1640を用いる比較培養剤が、培養状態の下で、最良の可能性のある通常の値を形成するために用いられた。

30

【 0 0 5 7 】

単一の細胞レベルについての細胞内チオール量の決定は、フロー細胞蛍光分析における5-クロメチルフルオレセインジアセテート（CMFDA）を用いて行われた。

40

【 0 0 5 8 】

従って、主に、非フルオロ遺伝子（CMFDA）は、細胞によって抵抗なく吸収される。クロロメチルグループによって、細胞原形質チオールグループへの結合が生じる。非特定の細胞エステラーゼによるアセテートグループの破壊後、結合された新しい細胞膜であるこの複合物は、放出波長 $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ を有する励起波長 $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ でフルオロ遺伝子になる。試料（10、000細胞）の中間の蛍光強度は、細胞内チオールグループの濃度（密度）に直接比例する。

【 0 0 5 9 】

膜結合チオールグループの発現は、また、フロー細胞蛍光分析を用いて決定された。この場合に、クロロメチルテトラメチルローダミン（CMTMR）が、膜のポテンシ

50

ヤルを阻止し、且つ細胞の拡散能力を抑制する状態の下にチオール共役として用いられた。細胞膜に結合された蛍光色素分子の蛍光強度は、同様に、細胞面上のチオールグループの数に比例する。

【 0 0 6 0 】

図 1 は、リンパ球の細胞内チオール発現における α -リボ酸とアンブロキソールとの結合および α -リボ酸とエナラプリル (図 1b) との結合効果を示す。

【 0 0 6 1 】

以下の表 1 は、 α -リボ酸とカプトプリルとの結合の結果を示す。データは、同時に解析された各校正粒子 (ビード) に対する細胞蛍光強度の比率として提示されている。上記それぞれの結合の活性濃度は、個々の化合物の濃度と同一である。

【 0 0 6 2 】

【表 1】

細胞内チオールの出現[mfi ビーズ/比]				
培養の長さ	制御	α -リボ酸 [50 μ M]	カプトプリル [10 μ M]	α -リボ酸 +カプトプリル
0	2.88 \pm 0.20	2.88 \pm 0.20	2.88 \pm 0.20	2.88 \pm 0.20
1	2.31 \pm 0.20	2.81 \pm 0.23	2.80 \pm 0.21	2.89 \pm 0.31
2	1.98 \pm 0.16	2.76 \pm 0.50	2.76 \pm 0.22	2.92 \pm 0.32
3	1.63 \pm 0.15	2.63 \pm 0.60	2.49 \pm 0.26	2.88 \pm 0.41
4	1.30 \pm 0.16	2.41 \pm 0.40	2.21 \pm 0.36	2.91 \pm 0.39
6	1.10 \pm 0.13	2.23 \pm 0.50	1.83 \pm 0.33	2.93 \pm 0.35
8	0.95 \pm 0.10	2.02 \pm 0.30	1.02 \pm 0.39	2.93 \pm 0.41
10	0.81 \pm 0.10	1.89 \pm 0.30	0.91 \pm 0.46	2.90 \pm 0.45
12	0.69 \pm 0.10	1.86 \pm 0.68	0.76 \pm 0.49	2.88 \pm 0.49
14	0.65 \pm 0.08	1.83 \pm 0.60	0.75 \pm 0.56	2.86 \pm 0.47

【 0 0 6 3 】

周囲の免疫細胞は、10-20%のチオール分解を誘発するため標準 (制御 1604) またはチオール欠乏状態 (1603) の下に、4日間に亘って培養された。図 1a に示したように、治療の48時間後に開始するアンブロキソールを α -リボ酸と結合して添加することは、細胞内のチオール欠乏の全補償を行うことになる。 α -リボ酸、非SH-ACE 抑制剤カプトプリルおよびSH担持ACE 抑制剤カプトプリルの結合を用いると、これらの効果は、更にきわめて増大し、24時間後に顕在化させることができた。

【 0 0 6 4 】

α -リボ酸のみの場合またはエフェクターの個々の適用を伴う場合のいずれかをを用いてチオール欠乏の完全な補償を達成することはできなかった。

【 0 0 6 5 】

細胞膜結合チオールの発現に関する本発明による結合の影響のこの実験的な評価で得られた結果は、 α -リボ酸とアンブロキソールとの結合 (図 2a) および α -リボ酸とエナラプリルとの結合 (図 2b) として図 2 に示されている。

【 0 0 6 6 】

以下の表 2 は、 α -リボ酸とカプトプリルとの結合の結果を示す。

【 0 0 6 7 】

【表 2】

膜-抵抗チオールの出現[mfi ビーズ/比]				
培養の長さ	制御	α -リボ酸 [50 μ M]	カプトプリル [10 μ M]	α -リボ酸 +カプトプリル
0	2.37 \pm 0.45	2.37 \pm 0.45	2.37 \pm 0.45	2.37 \pm 0.39
1	2.79 \pm 0.50	2.65 \pm 0.39	2.63 \pm 0.39	2.38 \pm 0.38
2	2.35 \pm 0.45	2.43 \pm 0.52	2.54 \pm 0.41	2.42 \pm 0.41
3	1.98 \pm 0.43	2.31 \pm 0.36	2.52 \pm 0.38	2.49 \pm 0.46
4	1.63 \pm 0.43	2.26 \pm 0.20	2.50 \pm 0.41	2.39 \pm 0.52
6	1.10 \pm 0.46	2.19 \pm 0.13	2.46 \pm 0.50	2.40 \pm 0.50
8	0.98 \pm 0.31	1.93 \pm 0.20	2.01 \pm 0.39	2.40 \pm 0.53
10	0.96 \pm 0.32	1.63 \pm 0.16	1.68 \pm 0.29	2.36 \pm 0.52
12	0.95 \pm 0.33	1.32 \pm 0.21	1.02 \pm 0.51	2.38 \pm 0.49
14	0.98 \pm 0.33	1.34 \pm 0.20	0.99 \pm 0.46	2.36 \pm 0.55

10

20

【 0 0 6 8 】

α -リボ酸とアンブロキシソールとの結合を用いる治療において、膜結合チオール現出における著しい改善が 4 8 時間後に再度もう一回生じた。この場合に、個々の物質の添加は、いつでも顕著な効果をもたなかったことが特に注目すべきである。 α -リボ酸とそれぞれの ACE 抑制剤との結合を添加すると、エナラプリルおよびカプトプリルの両方の超添加効果が生じた。

30

実施例 2

人体周囲の T リンパ球の細胞活性状態の影響

実施例 1 について述べられた培養実験において、人体の T リンパ球は、1 . 0 μ g /ml のフィットヘムアグルチニンで模擬実験され、7 2 時間の培養時間において、細胞活性の特定のマーカーは、単クローン性抗体によって細胞蛍光分析を用いて量的に検出された。T-リンパ球の活性マーカーである CD 6 9 (早期の活性抗原)、CD 2 5 (中期の活性抗原)、および CD 7 1 (後期の活性抗原) についての本発明に係る結合の影響が測定された。図 3 は、 α -リボ酸とアンブロキシソールとの結合 (図 3 a) および α -リボ酸とエナラプリルとの結合 (図 3 b) の T-リンパ球の活性インデックスについての効果を示している。通常の T-リンパ球 (活性インデックス = 1 . 0) と比較して、チオール欠乏細胞では、細胞機能のかく乱を示す活性の明らかな減少 (分解) が生ずる。 α -リボ酸の添加後、細胞活性のわずかな改善の周知の効果が生じたが、これは、通常の制御グループから任意の顕著な相違を起した場合でない。アンブロキシソールは、3 つの活性マーカーの一つに任意の影響を与えない。ACE 抑制剤エナラプリルは、CD 2 5 抗原の効果の場合にのみにおいて α -リボ酸と等価である。他方、 α -リボ酸とアンブロキシソール、 α -リボ酸とエナラプリルの両方の結合を用いると、通常の範囲の T 細胞活性インデックスに顕著な増大が生じた。この効果は、早期、中間、後期の活性マーカーにおいて観察された。従って、結論されることは、グルタチオン代謝の α -リボ酸およびエフェクターの結合使用によって達成された細胞チオール状態の標準化が細胞機能の回復によって行われたことである。

40

50

【 0 0 6 9 】

実施例 3

腎臓交換治療の状態における腹膜マクロファージの細胞チオール状態についての影響

腹膜マクロファージは、高度の不十分な腎臓を有する患者の腹膜透析の廃液から分離され、細胞培養媒体に吸収され、37℃、98%の相対湿度、7.5%の相対空気-CO₂含有量のガス化培養キャビネット内で培養された。腹膜マクロファージのチオール状態についての本発明によって用いられた結合剤の影響を評価するために、

-リポ酸、グルタチオン代謝のアンプロキシソール、又はACE抑制剤エナラプリルおよび -リポ酸/アンプロキシソール、又は -リポ酸/エナラプリルのエフェクターで個々の破片又は断片が処理されたが、追加の破片が非処理として管理維持された。細胞チオール状態は、実施例 1 で述べられた測定方法を用いて決定された。

【 0 0 7 0 】

図 4 は、14日間(n=12)に亘る活動時間における -リポ酸とアンプロキシソールとの結合(図 4a)および -リポ酸とエナラプリルとの結合(図 4b)の効果を示している。

【 0 0 7 1 】

個々の物質が添加されたとき、 -リポ酸が用いられた場合のみ、細胞チオールの出現の増大が再び生じたが、アンプロキシソールおよびACE抑制剤は効果を持たなかった。他方、72時間後に開始する -リポ酸とアンプロキシソールとの結合では、細胞チオール出現の著しい増大があり、これは、治療の4日後、超添加効果を達成し、3つの因子によって開始から、即ち、制御日を超えた8日後、最大になった(図 4a)。 -リポ酸とACE抑制剤との結合(図 4b)では、これと同様であったが、著しく短い作用時間で再度、細胞チオール効果が生じた。この場合に、超添加効果の最大には、治療の48~72時間のみの後に到達した。図 5 は、上述した実験系統における腹膜マクロファージの膜耐性チオール出現についての -リポ酸、エナラプリルの結合(図 5b)の効果を示している。チオールの膜の出現は、クロルメチル蛍光色素派生物に結合後、標本(3000細胞/測定)の中間の蛍光強度(mfi)に基づいて決定された。細胞内チオールの結果と比較すると、この場合には、 -リポ酸の添加におけるそれ自体の明白な効果(これは治療の4日後に消失したが)がある。これに対して、 -リポ酸とアンプロキシソールとの結合(図 5a)又は -リポ酸とACE抑止剤との結合(図 5b)を適用すると、膜結合チオールの出現の主により顕著な超添加増大と観察期間に亘る安定化がもたらされた。

【 0 0 7 2 】

実施例 4

腹膜マクロファージの食作用能力の影響

食作用の容量は、腹膜マクロファージにその元の機能についての特徴を与えることを可能にさせるように、ある測定値として選択された。

【 0 0 7 3 】

腹膜マクロファージは、実施例 3 に述べられた方法に類似した方法を用いて分離され、培養された。

【 0 0 7 4 】

この食作用容量は、単一の細胞レベルについての細胞蛍光によって決定された。従って、マクロファージは、蛍光色素マークのバクテリアによって共通培養された。限定された期間中、吸収されたバクテリアの数は、マクロファージの蛍光強度によって量的に決定され、その食作用容量のための測定値として用いられた。

【 0 0 7 5 】

6日の治療時間後、腹膜マクロファージの食作用容量に対する本発明の結合の影響は、以下の表 3 に提示されている。

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 3】

	含作用比 (mfi / 10,000 細胞)
制御	371±39
α - リポ酸 [50 μ M]	687±59
アンブロキシソール [10 μ M]	501±52
α - リポ酸+アンブロキシソール	1,398±286
	(p<0.05)
エナラプリル [5 μ M]	567±59
α - リポ酸+エナラプリル	1,698±241
	(p<0.05)
カプトプリル [10 μ M]	653±43
α - リポ酸+カプトプリル	1,589±176
	(p<0.05)

10

20

【 0 0 7 7 】

- リポ酸、アンブロキシソールおよびエナプリルでの培養後、食作用の割合は、1 . 8 5 (- リポ酸)、1 . 3 5 (アンブロキシソール) および 1 . 5 3 (エナラプリル) の因数までの未治療制御の場合よりも高かった。他方、 - リポ酸とアンブロキシソールとの結合が用いられたとき、3 . 7 の因数まで食作用に増大が生じた。

【 0 0 7 8 】

- リポ酸と ACE 抑制剤との結合が用いられたとき、4 . 6 (エナラプリル) および 4 . 3 (カプトプリル) の因数までの増大があった。

30

【 0 0 7 9 】

更に、 - リポ酸とアンブロキシソールとの結合 ($r = 0 . 7 9$; $p < 0 . 0 1$)、 - リポ酸とカプトプリルとの結合 ($r = 0 . 8 6$; $p < 0 . 0 1$) および - リポ酸とエナラプリルとの結合 ($r = 0 . 8 2$; $p < 0 . 0 1$) のために、食作用の割合と腹膜マクロファージの細胞内チオール容量との間に、ある直接の相互関係が確立された。

【 0 0 8 0 】

実施例 5

腹膜マクロファージの分化、活性およびサイトカイン合成の程度についての影響

40

腹膜マクロファージは、腎臓交換治療中の患者から実施例 3 に述べられた方法を用いて分離され、本発明に係る、 - リポ酸とグルタチオン代謝のエフェクターとの結合の存在において培養された。培養の 6 日後、腹膜マクロファージの分化の程度が細胞表面の抗原 CD 1 5 および CD 1 1 c の出現によって決定され、且つ細胞活性の程度が、活性抗原 CD 6 9 乃至 CD 1 5 の陽性細胞および CD 1 1 c の陽性細胞の共通の出現によって蛍光分析を用いて決定された。その結果が次の表 4 に示されている。

【 0 0 8 1 】

【表 4】

	CD15	CD11c	CD15/69	CD11c/71
制御	1.0	1.0	1.0	1.0
α - リポ酸 [50 μ M]	1.18 \pm 0.16	1.21 \pm 0.11	1.09 \pm 0.08	1.08 \pm 0.09
アンブロキシソール [10 μ M]	0.98 \pm 0.13	1.01 \pm 0.09	0.09 \pm 0.11	0.96 \pm 0.1
α - リポ酸 + アンブロキシソール	1.29 \pm 0.21	1.65 \pm 0.21	1.49 \pm 0.13	1.83 \pm 0.14
エナラプリル [5 μ M]	1.21 \pm 0.22	1.23 \pm 0.22	1.19 \pm 0.12	1.10 \pm 0.14
α - リポ酸 + エナラプリル	2.12 \pm 0.16 (p < 0.05)	1.99 \pm 0.15 (p < 0.05)	1.69 \pm 0.2	1.58 \pm 0.12
カプトプリル [10 μ M]	1.19 \pm 0.14	1.26 \pm 0.24	1.69 \pm 0.21	1.52 \pm 0.16
α - リポ酸 + カプトプリル	2.25 \pm 0.2 (p < 0.05)	2.63 \pm 0.23 (p < 0.05)	1.74 \pm 0.19	1.61 \pm 0.18

10

20

【0082】

成熟したマーカーCD15およびCD11cが α -リポ酸とアンブロキシソールとの結合を用いてきわめて増大し、また、 α -リポ酸とACE抑制剤との結合によって著しく増大した。更に、それぞれの細胞集団における活性抗原CD69およびCD71に著しい増大があった。単一の物質の適用は、効果なく、腹膜マクロファージの分化および活性にわずかな効果のみがあった。

30

【0083】

同時に、この実験アプローチにおいて、細胞培養残余物が集められ、その残余物に含まれた腹膜マクロファージによって合成され且つ分泌されたサイトカインインターロイキン-6(IL-6)およびインターロイキン-1受容体抑制因子(IL-1ra)が決定された。その分析が、標準の測定システムを有する酵素免疫学的検定技術を用いて行われた。

【0084】

α -リポ酸とアンブロキシソールとの結合および α -リポ酸と異種のACE抑制剤との結合の存在においてIL-6合成の顕著な減少あるいは分解があった。同様に、この効果は、個々の物質によって達成された分解の合計を超えて顕著に生じた。これらの状態下のIL-1raの合成は、著しく誘発された。この場合にもまた、 α -リポ酸とアンブロキシソール又はACE抑制剤との結合の超添加効果があった。

40

【0085】

実施例 6

透析モデルにおける腹膜マクロファージのチオール回復の安定性についての影響
本発明に従って用いられたチオール回復の腹膜マクロファージの結合は、6日後、この試験システムから抽出され、14日の期間に亘って透析モデルにおいて培養された

50

。この目的のため腹膜マクロファージは、一日3回、各時間60分間で、コラーゲンIVで被覆され且つ通常の高グルコース透析溶液に接触しておかれたマトリックスに適用された。この場合に、このモデルは、結合された高血糖性/浸透応力を起こすように用いられた。図6は、作用時間における腹膜マクロファージの内細胞チオール出現についての α -リポ酸とアンブロキシソールとの結合(図6a)および α -リポ酸とエナラプリルとの結合(図6b)の効果を示している。チオールの膜の出現は、クロメチル蛍光色素派生物に結合後、標本(3000細胞/測定)の中間の蛍光強度(mfi)に基づいて決定された。この透析モデルで処理されなかった主要なチオール回復制御では、最初の4日以内に細胞内チオール濃度における直線状の実際の減少があったが、 α -リポ酸とアンブロキシソール、 α -リポ酸とエナラプリルの結合添加が、主に回復レベルでの一定の細胞内チオール状態を生じさせた。ここで、また、 α -リポ酸の単独の効果があり、これは、簡単にいえば、透析モデルにおいて約4日後、結合剤のような効果として、約50%だけであった。

【0086】

同様な結果が、図7に示された膜結合チオールの出現の曲線で明らかである。ここで再び、主なチオール回復によって得られた量が、 α -リポ酸とアンブロキシソールとの結合(図7a)又は α -リポ酸とACE抑制剤との結合(図7b)の用途によって一定に保持されているが、個々の物質の添加によって、仲介物(α -リポ酸)のみの又は重要でないものの(アンブロキシソール、エナラプリル)効果が見られた。

【0087】

6日(n=10)の処理後、腹膜マクロファージのサイトカイン合成についての α -リポ酸および細胞グルタチオン代謝のエフェクターの効果が次の表5に示されている。

【0088】

【表5】

	IL-6 [ng/10 ⁶ 細胞]	IL-1ra [ng/10 ⁶ 細胞]
制御	53.1±8.9	115.2±23.4
α -リポ酸 [50 μ M]	46.9±6.7	119.8±19.5
アンブロキシソール [10 μ M]	51.8±8.1	118.6±21.3
α -リポ酸+	31.5±9.2	126.8±15.3
アンブロキシソール	(p<0.05)	(p<0.05)
エナラプリル [5 μ M]	41.7±7.3	121.1±16.9
α -リポ酸+エナラプリル	22.3±8.8	139.8±22.1
	(p<0.05)	(p<0.05)
カプトプリル [10 μ M]	42.9±7.7	129.4±25.1
α -リポ酸+カプトプリル	28.1±6.1	143.5±18.7
	(p<0.05)	(p<0.05)

【0089】

全体に、これらの試験は、 α -リポ酸とグルタチオン代謝アンブロキシソールおよびACE抑制剤のエフェクターとの結合の適用が、異なる細胞システムの主に、大規模に損傷したチオール状態を安定にすることを明らかにしている。この標準化の結果、このような処理なく達成されなかった主要な細胞免疫機能の再設定が可能である。

【 0 0 9 0 】

【図面の簡単な説明】

【 0 0 9 1 】

【図 1 A】

【図 1 B】

【図 2 A】

【図 2 B】

【図 3 A】

【図 3 B】

【図 4 A】

【図 4 B】

【図 5 A】

【図 5 B】

【図 6 A】

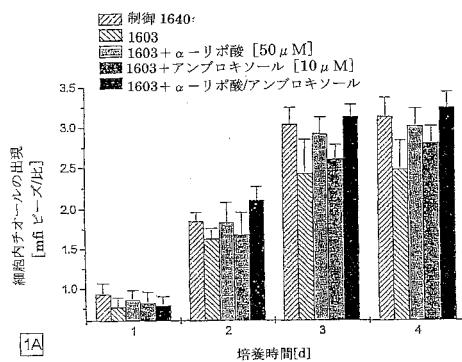
【図 6 B】

【図 7 A】

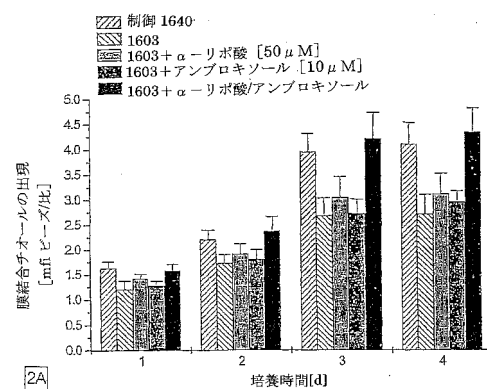
【図 7 B】

10

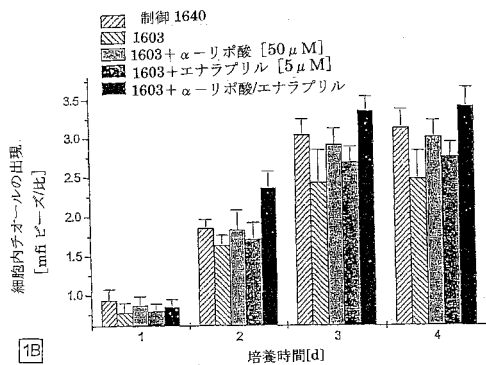
【図 1 A】



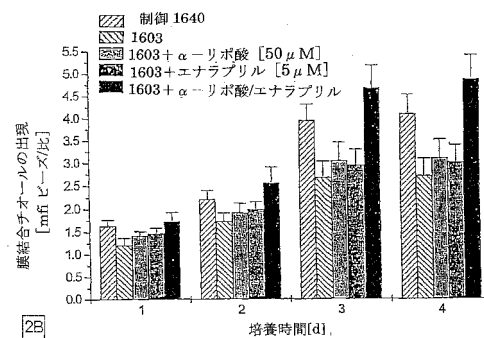
【図 2 A】



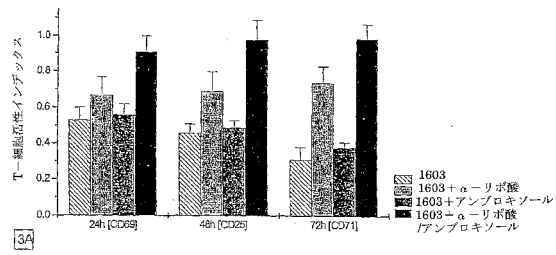
【図 1 B】



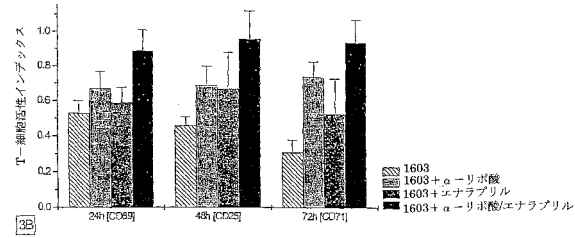
【図 2 B】



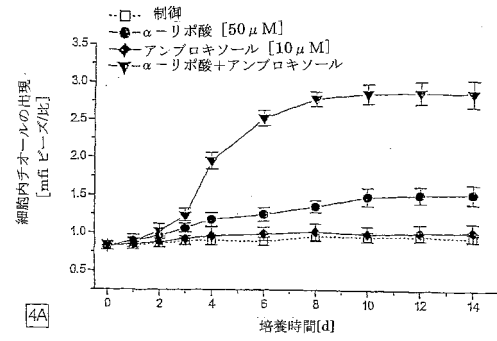
【図 3 A】



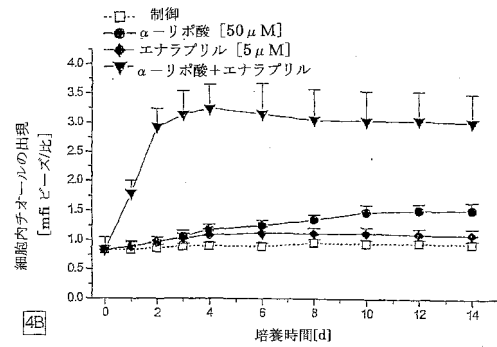
【図 3 B】



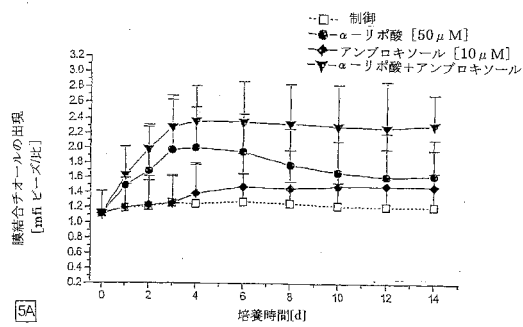
【図 4 A】



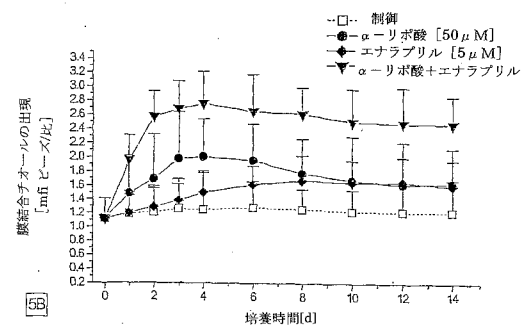
【図 4 B】



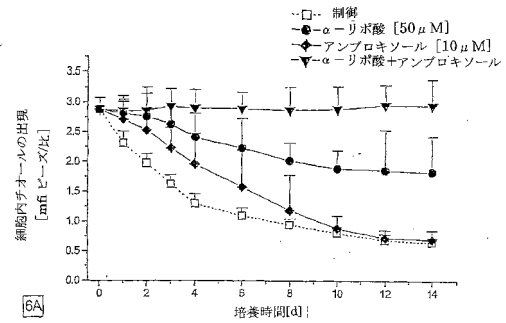
【図 5 A】



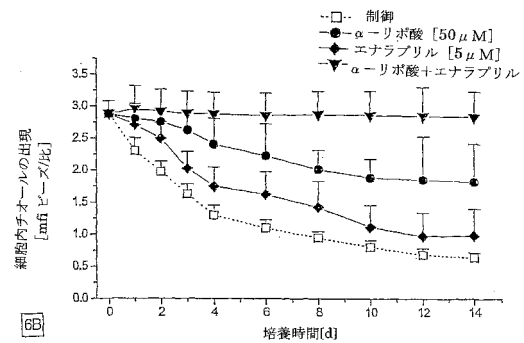
【図 5 B】



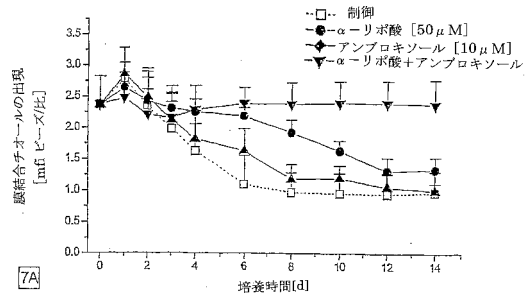
【図 6 A】



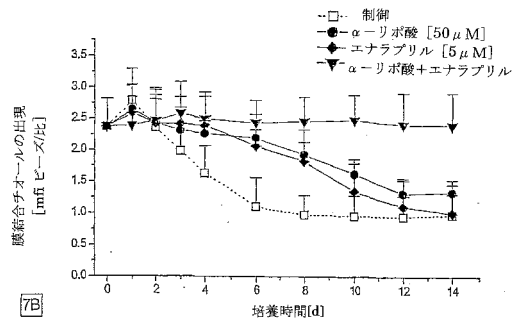
【図 6 B】



【図 7 A】



【図 7 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 P 37/04
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 P 43/00 1 1 1

(72)発明者 テーゲル ミヒャエル
 ドイツ連邦共和国 ハイネリッヒベルク D - 3 9 3 2 6 アカツィエン シュトラーセ 2 9
 (72)発明者 アンゾルゲ ジークフリート
 ドイツ連邦共和国 ホーエンヴァルテ D - 3 9 2 9 1 アム スポーツプラツ 1 7
 (72)発明者 フリース ゲールハルト
 ドイツ連邦共和国 ヴァリッツ D - 3 9 1 7 5 イム ハイデフェルト 1 8
 (72)発明者 コーグス ディーター
 ドイツ連邦共和国 ヴァリッツ D - 3 9 1 7 5 イム ハイデフェルト 5 7

審査官 原口 美和

(56)参考文献 特開 2 0 0 0 - 3 0 9 5 4 3 (J P , A)
 特開平 0 7 - 2 0 6 6 7 6 (J P , A)
 特開平 0 6 - 1 3 5 8 3 2 (J P , A)
 国際公開第 9 9 / 0 0 4 7 8 2 (W O , A 1)
 特許第 4 2 4 5 9 2 6 (J P , B 2)
 A. Gillissen et al. , Antioxidant Function of Ambroxol in Mononuclear and Polymorphonuclear Cells in Vitro , Lung , 1 9 9 7 年 , Vol. 175, No. 4 , pp. 235-242
 A. Gillissen et al. , Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy , Respiratory Medicine , 1 9 9 8 年 4 月 , Vol. 92, No. 4 , pp. 609-623
 S. Jablonka et al. , The influence of Ambroxol on peroxidative processes in lung and plasma in dogs after pulmonectomy , Archivum Veterinarium Polonicum , 1 9 9 2 年 , Vol. 32, No. 1-2 , pp. 57-66

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 31/385
 A61K 31/137
 A61P 3/10
 A61P 29/00
 A61P 37/02
 A61P 37/04
 A61P 43/00
 CA/REGISTRY(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)