

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 1 日(01.09.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/136907 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/428 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/055691
- (22) 国際出願日: 2016 年 2 月 25 日(25.02.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-034737 2015 年 2 月 25 日(25.02.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 Okayama (JP).
- (72) 発明者: 松尾 俊彦(MATSUO, Toshihiko); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP). 内田

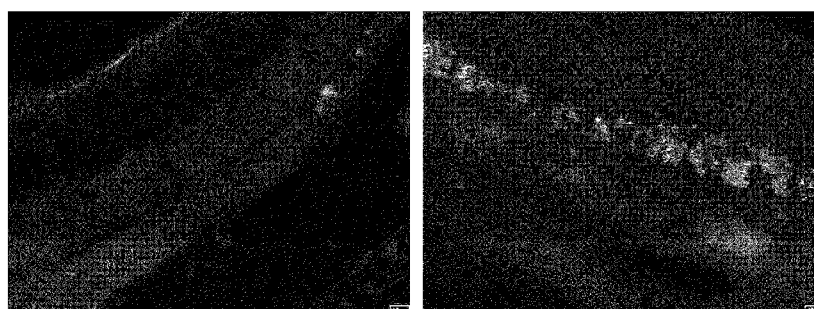
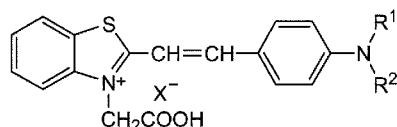
哲也(UCHIDA, Tetsuya); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[続葉有]

(54) Title: APOPTOSIS INHIBITOR

(54) 発明の名称: アポトーシス抑制剤



dye注射眼 RCS2 -鼻側網膜- b
AA BB

saline注射眼 RCS2 -鼻側- b
CC DD

AA Dye injected eye
BB RCS2-nasal retina-b
CC Saline injected eye
DD RCS2-nasal-b

(57) Abstract: Provided is a highly safe apoptosis inhibitor having an excellent effect in inhibiting apoptosis. An apoptosis inhibitor containing as an active ingredient a compound shown by formula (1). (In the formula, R¹ and R² each independently are a C1-10 alkyl group, and X⁻ is a halogen ion.)

(57) 要約: 安全性が高く、アポトーシスを抑制する効果に優れたアポトーシス抑制剤を提供する。下記式(1)で示される化合物を有効成分として含有するアポトーシス抑制剤である。[式中、R¹及びR²は、それぞれ独立して炭素数1~10のアルキル基であり、X⁻はハロゲンイオンである。]

WO 2016/136907 A1



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 添付公開書類:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称：アポトーシス抑制剤

技術分野

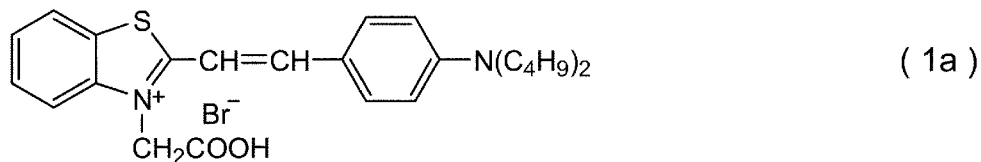
[0001] 本発明は、アポトーシス抑制剤に関する。

背景技術

[0002] アポトーシスは、生体内で予めプログラムされた細胞死であり、個体の発生過程における不要な細胞の除去や、癌化した細胞の除去等に重要な役割を果たしている。しかしながら、様々な疾患にアポトーシスが深く関与していることも知られており、アポトーシスを抑制することができれば、様々な疾患に対する治療薬となり得ることが期待できる。

[0003] 特許文献1には、視神経において、光刺激に応じた受容器電位を誘発する受容器電位誘発剤のための有機色素化合物をスクリーニングする方法が記載されており、前記有機色素化合物の一つとして、下記式(1a)で示される化合物が記載されている。

[0004] [化1]



[0005] 特許文献1では、このような有機色素化合物を含む受容器電位誘発剤は、傷病に伴う網膜の障害に起因する視野狭窄、視力低下、夜盲などの視覚障害や、薬物中毒、視覚中枢の神経障害、網膜の疾患、特定の錘体の欠如に起因する色覚異常を緩和したり解消するための人工網膜をはじめとする網膜代替用材において、視覚関連物質を代替する材料として極めて有用であるとされている。しかしながら、アポトーシスを抑制する効果については、これまで全く知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第5090431号

発明の概要

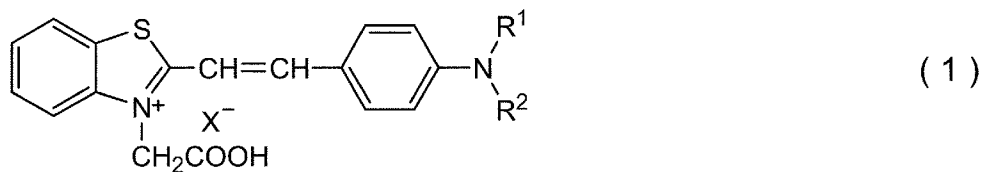
発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は上記課題を解決するためになされたものであり、安全性が高く、アポトーシスを抑制する効果に優れたアポトーシス抑制剤を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題は、下記式(1)で示される化合物を有効成分として含有するアポトーシス抑制剤を提供することによって解決される。

[0009] [化2]



[式中、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して炭素数1～10のアルキル基であり、 X^- はハロゲンイオンである。]

発明の効果

[0010] 本発明のアポトーシス抑制剤は、安全性が高く、アポトーシスを抑制する効果に優れている。網膜の神経細胞に対するアポトーシス抑制剤として好適に使用することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、実施例1において、RCSラットの網膜におけるアポトーシス細胞の顕微鏡写真である。

[図2]図2は、実施例1において、アポトーシス陽性細胞数を計測して得られた結果を示すグラフである。

[図3]図3は、実施例2において、アポトーシス陽性細胞数を計測して得られた結果を示すグラフである。

[図4]図4は、実施例3において、アポトーシス陽性細胞数を計測して得られ

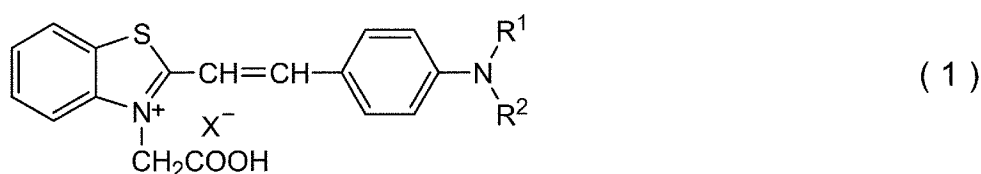
た結果を示すグラフである。

[図5]図5は、実施例4において、アポトーシス陽性細胞数を計測して得られた結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明のアポトーシス抑制剤は、下記式(1)で示される化合物を有効成分として含有するものである。

[0013] [化3]



[式中、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して炭素数1～10のアルキル基であり、 X^- はハロゲンイオンである。]

[0014] 上記式(1)において、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して炭素数1～10のアルキル基である。 R^1 及び R^2 に用いられる炭素数1～10のアルキル基としては、直鎖や分岐鎖のアルキル基であってもよいし、環状のシクロアルキル基であってもよい。例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、*tert*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基、2-エチルヘキシル基、*n*-ヘプチル基、*n*-オクチル基、*n*-ノニル基、*n*-デシル基等の直鎖や分岐鎖のアルキル基；シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプタニル基、シクロオクタニル基、シクロノナニル基、シクロデカニル基等のシクロアルキル基が挙げられる。中でも、 R^1 及び R^2 としては、炭素数1～8のアルキル基が好適であり、炭素数1～6のアルキル基がより好適であり、炭素数1～4のアルキル基が更に好適である。 R^1 及び R^2 に用いられるアルキル基は、それぞれ同じアルキル基であってもよいし、異なるアルキル基であってもよい。

[0015] 上記式(1)において、 X^- はハロゲンイオンである。 X^- に用いられるハロ

ゲンイオンとしては、例えば、フッ素イオン、塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオン等があげられる。中でも、 X^- としては、塩素イオン、臭素イオン及びヨウ素イオンからなる群から選択される少なくとも1種が好適であり、臭素イオン及びヨウ素イオンからなる群から選択される少なくとも1種がより好適である。

[0016] 本発明のアポトーシス抑制剤は、式(1)で示される化合物を単独で投与する実際態様であってもよいし、式(1)で示される化合物と薬理学的に許容される担体とを含有する製剤を投与する実施態様であってもよい。前記担体としては、蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液等の溶媒；デンプン、デキストリン、ゼラチン等の結合剤；殺菌剤；界面活性剤；pH調整剤；乳化剤；酸化防止剤；増粘剤等が挙げられる。

[0017] また、当該製剤としては、錠剤、徐放剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、フィルム剤、シロップ剤、懸濁剤、注射剤、点眼剤、外用剤、坐剤、経鼻剤等が挙げられる。中でも、式(1)で示される化合物を生理食塩水等の溶媒に加えて色素溶液を調製し、前記色素溶液を投与する方法が好適に採用される。すなわち、式(1)で示される化合物と薬理学的に許容される溶媒とを含有するアポトーシス抑制剤が本発明の好適な実施態様である。また、式(1)で示される化合物を高分子フィルム等に担持させたアポトーシス抑制剤を徐放剤として好適に用いることもできる。

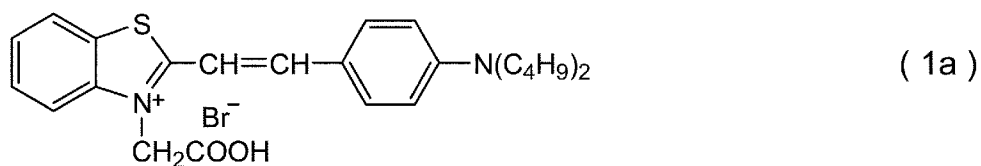
[0018] 後述する実施例からも分かるように、コントロールとして生理食塩水のみを網膜色素変性ラット(RCSラット)の一方の眼に対して注射した結果と比較して、式(1a)で示される化合物を含む色素溶液を同じラットの他方の眼に注射した場合には、網膜神経細胞のアポトーシスが有意に低下していたことが本発明者らにより確認された。したがって、本発明のアポトーシス抑制剤は、優れたアポトーシス抑制効果を有することが分かる。中でも、網膜の神経細胞に対するアポトーシス抑制剤であることが本発明の好適な実施態様である。また、本発明者らは、式(1a)で示される化合物について生物学的安全性評価を行った結果、毒性を有さなかったことを検証している。

このことから、本発明のアポトーシス抑制剤は、安全性の高いものであることが分かる。

実施例

[0019] 以下、実施例を用いて本発明を更に具体的に説明する。実施例中、有機色素化合物は、株式会社林原から「NK-5962」として報告、製造されている下記式(1a)で示されるポリメチン系の有機色素化合物を使用した。

[0020] [化4]



[0021] [アポトーシス抑制試験]

実施例 1

式(1a)で示される有機色素化合物(NK-5962)を生理食塩水に濃度 $8.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加して色素溶液を調製した。前記色素溶液を4週令の網膜色素変性ラット(RCSラット)の一眼の硝子体内に $10 \mu\text{L}$ 注射した。反対眼の硝子体内に生理食塩水のみを同量注射してコントロールとした。2週間後にRCSラットから眼球摘出を行い、凍結切片を作成した。Roche Diagnostics社製「In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein」を用いてTUNEL法によりアポトーシス細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。得られた結果を図1に示す。図1で示されるように、生理食塩水のみを注射したコントロール眼(saline注射眼)において、アポトーシス陽性細胞が緑色蛍光として多数観察された。これに対し、前記色素溶液を注射したdye注射眼においては、アポトーシス陽性細胞の数が顕著に抑制されていた。また、網膜 $100 \mu\text{m}$ あたりのアポトーシス陽性細胞数を計測して得られた結果を図2に示す。生理食塩水のみを注射したコントロール眼と比べて、有機色素化合物を注射した眼では、網膜神経細胞のアポトーシスが有意に低下していた。したがって、アポトーシス抑制剤として非常に有用であることが分かる。

[0022] 実施例 2

実施例 1 において、色素溶液の濃度を 10 倍に希釈して使用した以外は、実施例 1 と同様にして TUNEL 法によりアポトーシス細胞を染色し、網膜 100 μm あたりのアポトーシス陽性細胞数を計測した。得られた結果を図 3 に示す。

[0023] 実施例 3

実施例 1 において、色素溶液の濃度を 100 倍に希釈して使用した以外は、実施例 1 と同様にして TUNEL 法によりアポトーシス細胞を染色し、網膜 100 μm あたりのアポトーシス陽性細胞数を計測した。得られた結果を図 4 に示す。

[0024] 実施例 4

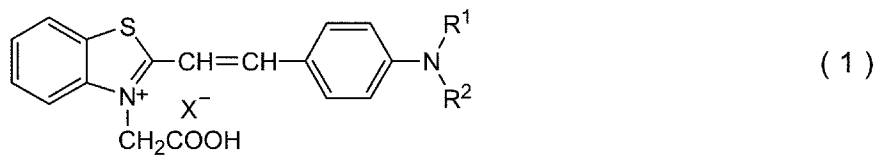
実施例 1 において、色素溶液の濃度を 1000 倍に希釈して使用した以外は、実施例 1 と同様にして TUNEL 法によりアポトーシス細胞を染色し、網膜 100 μm あたりのアポトーシス陽性細胞数を計測した。得られた結果を図 5 に示す。

[0025] 図 3～5 の結果から分かるように、色素溶液の濃度を変更した実施例 2～4 においても、生理食塩水のみを注射したコントロール眼と比べて、有機色素化合物を注射した眼では、網膜神経細胞のアポトーシスが有意に低下していた。したがって、アポトーシス抑制剤として非常に有用であることが分かる。

請求の範囲

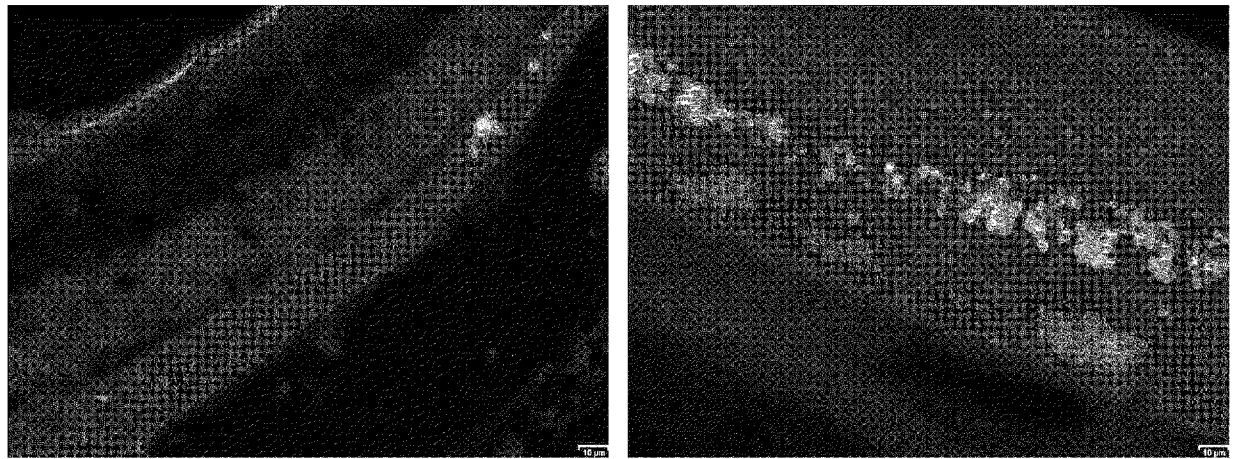
【請求項1】 下記式（１）で示される化合物を有効成分として含有するアポトーシス抑制剤。

【化1】



〔式中、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して炭素数１～１０のアルキル基であり、 X^- はハロゲンイオンである。〕

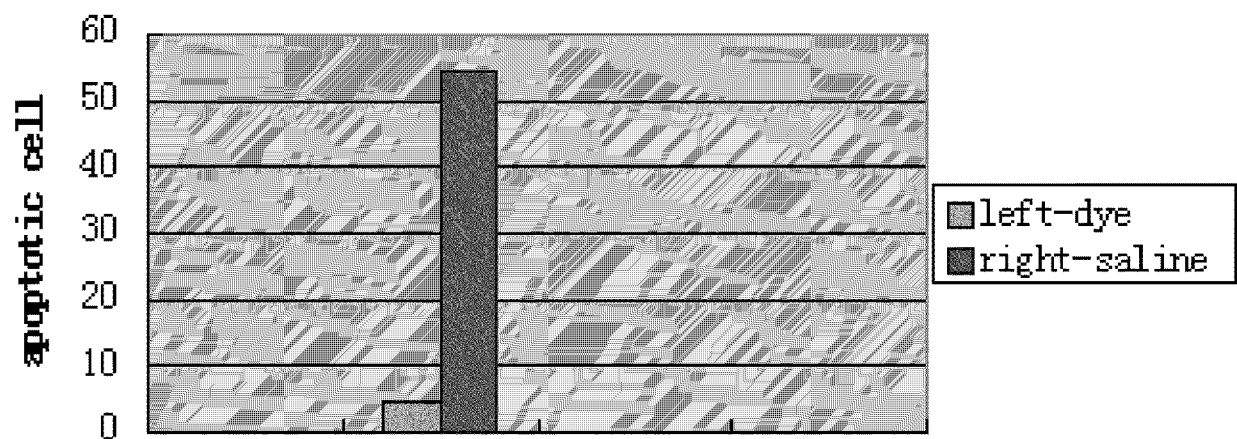
[図1]



dye注射眼 RCS2 -鼻側網膜- b

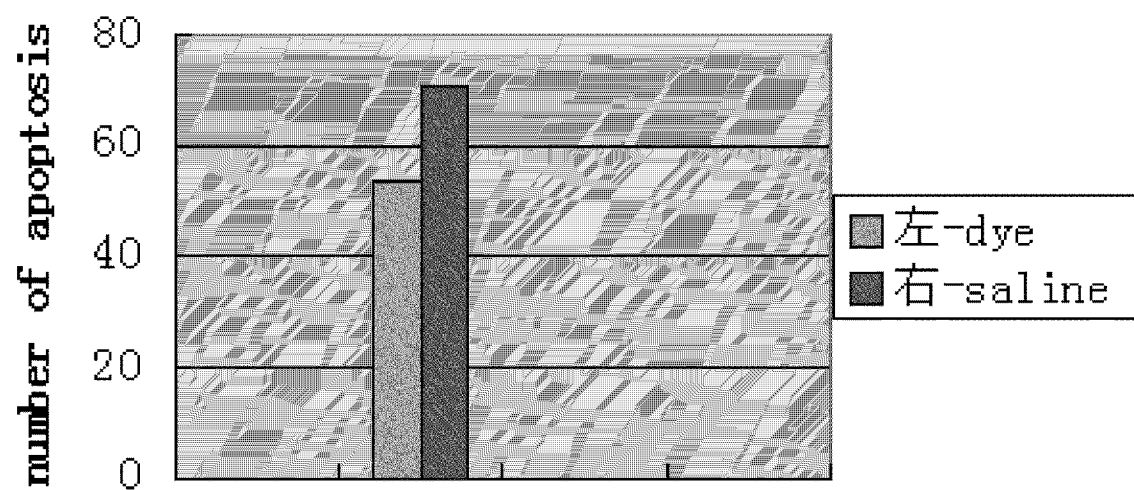
saline注射眼 RCS2 -鼻側- b

[図2]



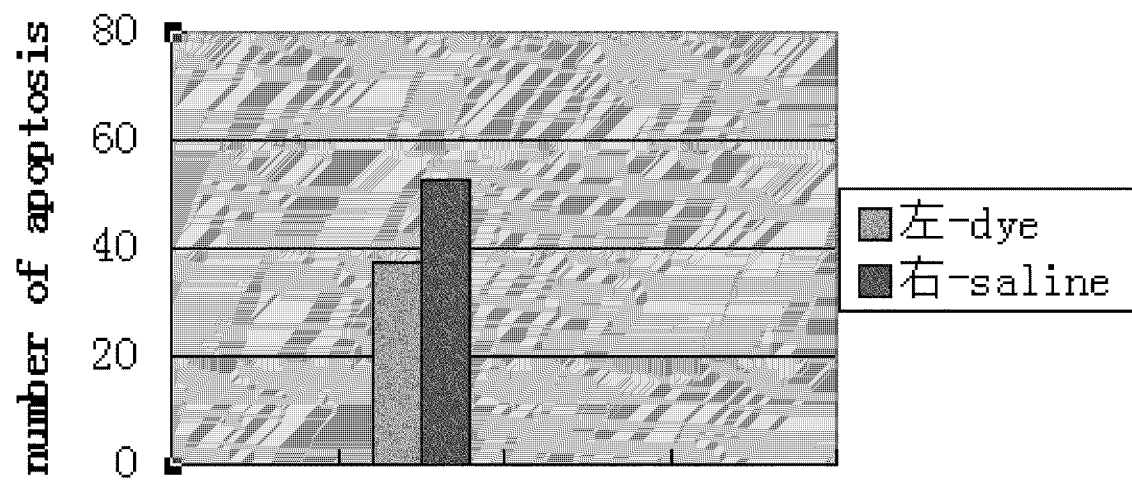
superonasal retina

[図3]



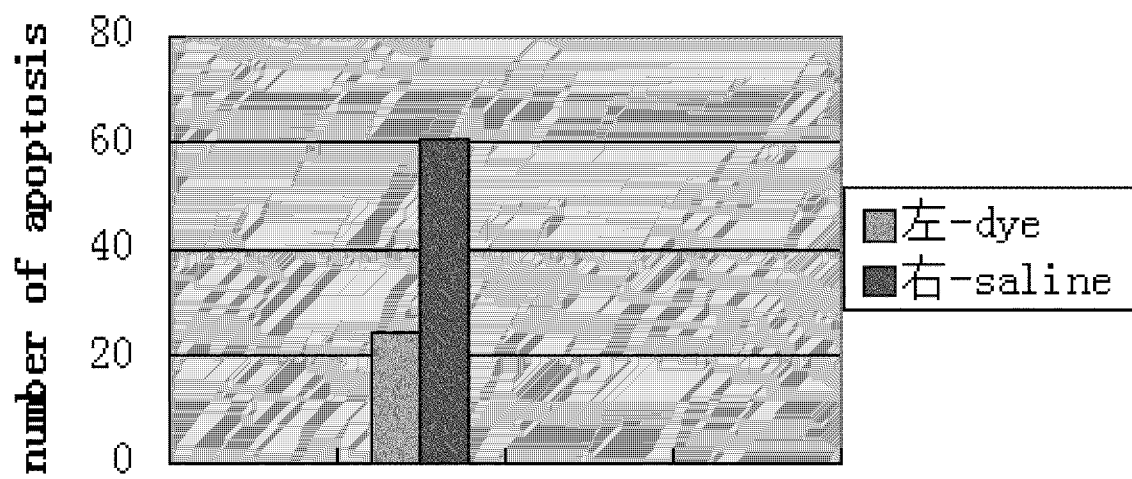
superonasal retina

[図4]



superonasal retina

[図5]



superonasal retina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/428(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/00-31/80, A61P1/00-43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Alamusi et al., The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs Tominaga Award 2012 Jusho Report, "Behavior tests and immunohistochemical retinal response analyses in RCS rats with subretinal implantation of Okayama-University-type retinal prosthesis", The Japanese Journal of Artificial Organs, 15 June 2014 (15.06.2014), vol.43, no.1, pages 31, 32, particularly, page 31, right column, 2nd paragraph, page 32, left column, 2nd paragraph to right column, 1st paragraph	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 May 2016 (10.05.16)

Date of mailing of the international search report
24 May 2016 (24.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055691

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALAMUSI, et al., Behavior tests and immunohistochemical retinal response analyses in RCS rats with subretinal implantation of Okayama-University-type retinal prosthesis, J Artif Organs, 2013.03.26, Vol.16, No.3, p343-351, particularly, Abstract, page 344, left column, 1st paragraph to right column, 1st paragraph	1

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/428(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/00-31/80, A61P1/00-43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	アラ木斯、他 4 名, 第 51 回日本人工臓器学会大会 Tominaga Award 2012 受賞レポート Behavior tests and immunohistochemical retinal response analyses in RCS rats with subretinal implantation of Okayama-University-type retinal prosthesis, 人 工臓器, 2014.06.15, 43 巻 1 号, p31, 32, 特に p31 右欄第 2 段落、 p32 左欄第 2 段落—右欄第 1 段落	1
X	ALAMUSI, et al., Behavior tests and immunohistochemical retinal response analyses in RCS rats with subretinal implantation of	1

☑ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

1 0 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山中 隆幸

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

5 8 0 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	Okayama-University-type retinal prosthesis, J Artif Organs, 2013.03.26, Vol.16, No.3, p343-351, 特に Abstract、p344 左欄第 1 段落－右欄第 1 段落	