

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4767195号  
(P4767195)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	

請求項の数 10 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-37517 (P2007-37517)	(73) 特許権者	301039505
(22) 出願日	平成19年2月19日(2007.2.19)		ネオケミア株式会社
(62) 分割の表示	特願2005-247050 (P2005-247050) の分割		兵庫県神戸市中央区御幸通四丁目2番20号
原出願日	平成17年8月29日(2005.8.29)	(74) 代理人	100068526
(65) 公開番号	特開2007-137891 (P2007-137891A)		弁理士 田村 恭生
(43) 公開日	平成19年6月7日(2007.6.7)	(74) 代理人	100100158
審査請求日	平成20年2月18日(2008.2.18)		弁理士 鮫島 睦
(31) 優先権主張番号	特願2004-248868 (P2004-248868)	(74) 代理人	100138900
(32) 優先日	平成16年8月27日(2004.8.27)		弁理士 新田 昌宏
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100162684
			弁理士 呉 英燦
		(72) 発明者	田中 雅也
			兵庫県神戸市中央区御幸通四丁目2番20号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸皮膚外用製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

経皮吸収により真皮または表皮組織の細胞内に核酸系薬剤を送達するための、核酸系薬剤、および粘性多糖類、リン酸塩および水からなる医薬組成物であって、核酸系薬剤がデコイオリゴヌクレオチド、アンチセンス、リボザイム、アプタマーまたは siRNA であり、

該核酸系薬剤 0.01 ~ 5 重量%と、

粘性多糖類としてアルギン酸ナトリウムを 0.01 ~ 10 重量%、リン酸塩としてリン酸二水素ナトリウムを 0.01 ~ 10 重量%および水を含む医薬組成物。

【請求項2】

デコイオリゴヌクレオチドが転写因子阻害作用を有する、請求項1記載の組成物。

【請求項3】

デコイオリゴヌクレオチドが NF- B、STAT-1、GATA-3、STAT-6、AP-1、Ets および / または E2F デコイオリゴヌクレオチドである、請求項1または2記載の組成物。

【請求項4】

デコイオリゴヌクレオチドが配列番号1で表される NF- B である、請求項1ないし3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

核酸系薬剤を 0.1 ~ 1 重量%含む、請求項1ないし4のいずれかに記載の組成物。

10

20

## 【請求項 6】

アルギン酸ナトリウムを 0.1 ~ 5 重量% 含む、請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7】

リン酸二水素ナトリウムを 0.1 ~ 5 重量% 含む、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の組成物からなる皮膚疾患の予防、改善または治療剤。

## 【請求項 9】

角質層が剥離した損傷皮膚に対して適用される、請求項 8 の予防、改善または治療剤。

## 【請求項 10】

皮膚疾患がアトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、光過敏性皮膚炎、手と足の慢性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、貨幣状皮膚炎、全身性剥脱性皮膚炎、うっ血性皮膚炎、局所性擦過皮膚炎、薬物性皮膚炎または乾癬である、請求項 8 または 9 記載の予防、改善または治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、核酸を含む医薬品製剤に関する。さらに詳しくは、核酸オリゴヌクレオチドを含有する皮膚外用剤に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

軟膏やローションといった塗布製剤の治療効果は、有効成分（主剤）の適切な透過性コントロールが必要とされる。例えば、多くの皮膚疾患の場合、主剤を皮膚組織の上皮および真皮まで透過させる必要があるが、その際の障壁として、角質・上皮組織で構成される、いわゆる皮膚バリアが挙げられる。一般的に皮膚バリアを通過しやすい主剤の物理化学的性質として、高脂溶性と低分子量（分子量800程度まで）が求められる。例えば、ステロイドやビタミンD等は、皮膚バリアを効率よく透過することが知られているが、これらは比較的分子量かつ高脂溶性である。一方で、高い水溶性かつ高分子量の分子は皮膚バリアを通過することがかなり難しいことが知られている。製剤的な研究も行われているが、十分な透過性を有する製剤はほとんど知られていなかった。

## 【0003】

近年、バイオテクノロジーの進歩に伴って、遺伝子発現を制御することで病気を治療する新しい医薬品の開発が盛んに行われてきている。その一つとしてオリゴヌクレオチド等を用いた核酸医薬が挙げられるが、その多くが分子量5,000以上の高分子であり、また水溶性もきわめて高い。例えばアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患に対して、こういった高水溶性・高分子量の核酸医薬を主剤とした塗布製剤を開発する際、前述のように、皮膚透過性の優れた製剤は報告されておらず、その開発が望まれていた。

## 【0004】

皮膚疾患は、その患部が外部に露出することから、肉体的のみならず、精神的にもダメージを受けやすい疾患である。例えば、近年増加しているアトピー性皮膚炎は、患部が体の広範囲にわたることも多く、難治性で患者は長期間悩まされる。これは小児から大人まで幅広い年齢層にみられるアレルギー疾患である。皮膚には体を外部の物質や刺激から保護するバリアの役割があるが、アトピー性皮膚炎ではこの皮膚のバリア機能が低下すると、ダニなどの環境抗原が皮膚に侵入しやすくなり、その結果アレルギー反応が生じる。しかし、アトピー性皮膚炎の治療によく用いられるステロイド軟膏は、アレルギー反応は抑えるが、この皮膚のバリア機能を低下させる危険性もあり、長期の使用には適していない。

## 【0005】

皮膚外用剤は皮膚を透過して薬効を発揮するため、このバリアを破って真皮に浸透する

10

20

30

40

50

ことが必須である。しかし、皮膚外用剤の有効成分が、例えば核酸のような巨大分子である場合、そのまま皮膚に浸透させることは更に難しかった。このような理由から、核酸のような巨大分子を有効成分とする皮膚外用剤の開発は困難であった。

【0006】

以上のような背景から、皮膚のバリア機能は保持したまま皮膚に浸透し、薬効を発揮する薬剤の開発が望まれていた。

【0007】

本発明者らは、これらの課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、意外にも粘性多糖類が浸透促進剤として優れることを見だし、さらに化粧品において保湿剤として使用されているアルギン酸またはその薬理的塩が最も効果的に目的を達成できることを見だし、本発明を完成するに至った。

10

【0008】

アルギン酸は海藻由来の多糖類で、増粘剤や被覆剤、保湿剤として食品や化粧品に用いられているが、浸透促進剤としての効果は全く知られていなかった。

【0009】

特許文献1は、非ステロイド性抗炎症剤(non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID))のアルギナート等の多糖類ガム製剤を開示している。しかしこれは低分子化合物をアルギナート(アルギン酸塩)との混合製剤としているが、核酸のような高分子化合物の皮膚透過性について検討していなかった。

【0010】

20

特許文献2は、アルギン酸とオリゴヌクレオチドを組み合わせた肺の徐放製剤について開示している。これはアルギン酸と核酸の製剤ではあるが、肺を対象とした薬剤であり、皮膚の透過性については言及していなかった。

【0011】

【特許文献1】特表2001-521887号公報

【0012】

【特許文献2】W002/066077号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

30

近年、遺伝子・核酸医薬が注目され、数々の遺伝子治療が試みられている。しかし、皮膚疾患治療薬として確立された核酸医薬品はなく、これが実現すれば、従来の薬剤では効果がなかった疾患にも適用できる可能性がある。

【0014】

本発明が解決しようとする課題は、核酸を有効成分とした皮膚外用製剤を提供することである。特にこれは皮膚バリア機能を保護しながら高い皮膚透過性を持つ必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、NF- B デコイオリゴヌクレオチド等の核酸系薬剤を用い、それをアルギン酸ナトリウムとの混合製剤とすることで、オリゴヌクレオチドが高い皮膚透過性を示すことを見出した。即ち、本発明は核酸を有効成分とする高皮膚透過性の皮膚外用製剤を提供するものである。

40

【0016】

その要旨は、

(1) 真皮または表皮組織の細胞内に核酸系薬剤を送達するための、核酸系薬剤および粘性多糖類からなる医薬組成物、

(2) 核酸系薬剤が遺伝子またはその類似体である、(1)記載の組成物、

(3) 遺伝子またはその類似体がポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、(1)または(2)記載の組成物、

(4) オリゴヌクレオチドがデコイ(おとり分子)、アンチセンス、リボザイム、アプタマ

50

-またはsiRNAである、(1)~(3)記載の組成物、  
 (5)デコイが転写因子阻害作用を有する、(1)~(4)記載の組成物、  
 (6)デコイがNF- $\kappa$ B、STAT-1、GATA-3、STAT-6、AP-1、Ets、E2Fデコイオリゴヌクレオチドである、(1)~(5)記載の組成物、  
 (7)デコイが配列番号1で表されるNF- $\kappa$ Bデコイオリゴヌクレオチドである、(1)~(6)記載の組成物、  
 (8)核酸系薬剤を0.01~5重量%含む、(1)~(7)記載の組成物、  
 (9)核酸系薬剤を0.1~1重量%含む、(1)~(8)記載の組成物、  
 (10)粘性多糖類がアルギン酸またはその薬理的に許容される塩である、(1)~(9)記載の組成物、  
 (11)粘性多糖類がアルギン酸ナトリウムである、(1)~(10)記載の組成物、  
 (12)粘性多糖類を0.01~10重量%含む、(1)~(11)記載の組成物、  
 (13)粘性多糖類を0.1~5重量%含む、(1)~(12)記載の組成物、  
 (14)さらにリン酸塩を含む、(1)~(13)記載の組成物、  
 (15)リン酸塩がリン酸二水素ナトリウムである、(1)~(14)記載の組成物、  
 (16)リン酸塩を0.01~10重量%含む、(1)~(15)記載の組成物、  
 (17)リン酸塩を0.1~5重量%含む、(1)~(16)記載の組成物、  
 (18)(1)~(17)記載の組成物からなる皮膚疾患の予防、改善、治療剤、  
 (19)皮膚疾患がアトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、光過敏性皮膚炎、手と足の慢性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、貨幣状皮膚炎、全身性剥脱性皮膚炎、うっ血性皮膚炎、局所性擦過皮膚炎、薬物性皮膚炎または乾癬である、(18)記載の予防、改善、治療剤、  
 に関する。

10

20

#### 【発明の効果】

##### 【0017】

本発明の核酸皮膚外用剤は、高い皮膚透過性を有するため、効率よく有効成分である核酸を患部に送達できる。皮膚透過性が高いため、核酸は低用量でよく、安全性、経済性にも優れている。また、現在用いられている抗炎症剤である低分子医薬とは作用メカニズムが異なるため、低分子医薬が効かないケースにも効果を期待できる。

##### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0018】

本発明は真皮または表皮組織の細胞内に核酸系薬剤を送達するための、核酸系薬剤および浸透促進剤からなる医薬組成物を提供するものである。

30

##### 【0019】

本発明で使用される核酸系薬剤は、通常はデコイ、アンチセンス、リボザイム、アプタマ、siRNAなどが対象となるが、好ましくはデコイである。デコイとは、転写調節因子が核酸に結合するとき、その核酸結合配列と競合する二本鎖オリゴヌクレオチドのことをいう。デコイ、デコイオリゴヌクレオチド、デコイODNは同義に用いられる。核酸系薬剤は単独又は二種以上を混合して用いることができ、本発明の皮膚外用剤に0.01~5重量%(以下、「%」で示す)、特に0.1~1%配合されるのが好ましい。

##### 【0020】

40

本発明の核酸系薬剤は、例えばNF- $\kappa$ B、STAT-1、GATA-3、STAT-6、AP-1、Ets、E2F等のデコイを挙げることができるが、NF- $\kappa$ Bが好適対象である。好ましいデコイの例としては、5'-ccttgaagggatttccctcc-3'(配列番号1)(NF- $\kappa$ Bデコイ)、5'-gatctagggatttcgggaaatgaagct-3'(配列番号2)(STAT-1デコイ)、5'-agcttgagatagagct-3'(配列番号3)(GATA-3デコイ)、5'-gatcaagacctttcccaagaaatctat-3'(配列番号4)(STAT-6デコイ)、5'-agcttgtgagtcagaagct-3'(配列番号5)(AP-1デコイ)、5'-aattcaccggaagtatttcca-3'(配列番号6)(Etsデコイ)、5'-ctagatttcccgcg-3'(配列番号7)(E2Fデコイ)、またはこれらの相補体を含むオリゴヌクレオチド、これらの変異体、またはこれらを分子内に含む化合物が挙げられる。オリゴヌクレオチドはDNAでもRNAでもよく、またはそのオリゴヌクレオチド内に核酸修飾体および/または擬核酸を

50

含むものであってもよい。これらの核酸系薬剤は上記核酸配列を一つまたは複数含む二本鎖オリゴヌクレオチドまたはその変異体が挙げられる。

【0021】

また、本発明における浸透促進剤としては、粘性多糖類、リン酸塩等が用いられるが、好ましくは粘性多糖類、リン酸塩を単独あるいは混合して用いる。さらに好ましくは粘性多糖類とリン酸塩の混合物を用いる。

【0022】

粘性多糖類は通常アルギン酸、ラミラン、カラギーナン、フルセフラン、ポルフィラン、グラテロピラン、グルサン、フコイダン、ヒアルロン酸などを用いることができるが、好ましくはアルギン酸、およびカラギーナン、より好ましくはアルギン酸を用いる。アルギン酸はアルギン酸またはその薬理的に許容される塩を用いることができるが、通常アルギン酸ナトリウムが好ましい。アルギン酸は「キミカアルギン」（キミカ製）などの市販されているものを使用することができる。

10

【0023】

これらの粘性多糖類は単独又は二種以上を混合して用いることができ、本発明の皮膚外用剤に0.01～10重量%（以下、「%」で示す）、特に0.1～5%配合されるのが好ましい。

【0024】

リン酸塩は、通常はリン酸二水素ナトリウム、リン酸一水素カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸水素二アンモニウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸二水素カルシウム、などを用いるが、好ましくはリン酸二水素ナトリウムを用いる。これらのリン酸塩は、単独又は二種以上を混合して用いることができ、本発明の皮膚外用剤に0.01～10重量%、特に0.1～5%配合されるのが好ましい。

20

【0025】

本発明の皮膚外用剤には、上記必須成分の他、必要に応じて本発明の効果に影響しない質的、量的範囲内で、水、油剤、ワックス、シリコーン、界面活性剤、アルコール、多価アルコール、水溶性高分子増粘剤、pH調節剤、香料、酸化防止剤、キレート剤、色素、顔料、防腐剤、他の薬効成分、紫外線吸収剤等、医薬品、化粧品に用いられる成分の他、無機あるいは有機成分も配合することができる。

30

【0026】

本発明の皮膚外用剤の対象疾患は、例えば皮膚疾患がアトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、光過敏性皮膚炎、手と足の慢性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、貨幣状皮膚炎、全身性剥脱性皮膚炎、うっ血性皮膚炎、局所性擦過皮膚炎、薬物性皮膚炎または乾癬などである。

【0027】

本発明の皮膚外用剤は、上記必須成分と必要に応じた任意成分を用い、常法に従って調製することができる。液剤、ローション、油剤、クリーム、軟膏等、様々な剤型とすることができる。

【0028】

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等によって異なるが、通常は患部を覆うことが出来る量を、一日あたり1～3回塗布する。

40

【0029】

続いて本発明を具体的に説明するため、以下に実施例を掲げるが、本発明はこれらに限定されない。

【実施例】

【0030】

1. 皮膚透過性試験1-1. ラットにおけるNF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチド単回経皮投与時の皮膚透過性について明らかにするため、 $^{35}\text{S}$ で標識した $^{35}\text{S}$ -NF- $\kappa$ B デコイオリゴヌクレオチド（以後 $^{35}\text{S}$ -NF- $\kappa$ B デコイと略す）を用いて、血液、皮膚中放射能濃度を測定した。

50

$^{35}\text{S}$ -NF- Bデコイの化学構造およびラベル位置を以下に示す。

$^{35}\text{S}$ -5' -CCTTGAAGGGATTTCCCTCC-3'

$^{35}\text{S}$ -3' -GGAAGTTCCCTAAAGGGAGG-5'

【 0 0 3 1 】

$^{35}\text{S}$ -NF- Bデコイは、Agrawalらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7595-7599, 1991) に従い、次のように調製した。目的の塩基配列のH-phosphonate型オリゴヌクレオチドを作成、脱保護前に $^{35}\text{S}_8$  (elemental sulfur) にてH-phosphonateのHを $^{35}\text{S}$ に酸化、通常の脱保護反応を行い、目的の $^{35}\text{S}$ 標識オリゴヌクレオチドを得た。

【 0 0 3 2 】

(1) 投与製剤の調製

所定量の $^{35}\text{S}$ -NF- B デコイ原液および非標識NF- B デコイをメノウ乳鉢上あるいはポリ容器内に採取したのち、大過剰のエタノールを加えてNF- B デコイを沈殿させた。ついで、上清を除去後、窒素ガス気流下にて溶媒を完全に除去し、 $^{35}\text{S}$ - NF- B デコイ原体を調製した。

【 0 0 3 3 】

製剤 A (ワセリン単独)

$^{35}\text{S}$ -NF- B デコイ 0.5% 2.0 mg

ステアリルアルコール 5.0% 20.0 mg

白色ワセリン 94.5% 378.0 mg

計 100.0% 400.0 mg

【 0 0 3 4 】

予め、所定分量のステアリルアルコールおよび白色ワセリンを70~80 の水浴中で熔融混合し、室温になるまで放冷したものを混合基剤とした。先に調製した $^{35}\text{S}$ - NF- B デコイ原体に規定量の混合基剤を少量ずつ加えながら混和し、NF- B デコイとして0.4 mg (非標識NF- B デコイの含量 : 78.88%) /500 kBq/100 mgの製剤 A を調製した。

【 0 0 3 5 】

水溶製剤 A (1%アルギン酸製剤)

$^{35}\text{S}$ -NF- B デコイ 0.5% 2.0 mg

アルギン酸基剤 (1%アルギン酸ナトリウム /

リン酸二水素ナトリウム水溶液 適量) 99.5% 398.0 mg

計 100.0% 400.0 mg

【 0 0 3 6 】

$^{35}\text{S}$ - NF- B デコイ原体に所定分量のアルギン酸基剤を加えて溶解後、ボルテックスミキサーにて十分攪拌し、その後マイクロピペットにて十分にピペッティングを行い均一に分散させ、 $^{35}\text{S}$ -NF- B デコイとして0.4 mg (非標識NF- B デコイの含量 : 78.88%) /500 kBq/100 mgの水溶製剤 A を調製した。

【 0 0 3 7 】

投与製剤調製用媒体には、次に挙げるものを用いた。ステアリルアルコール (Lot No.20714C, 日本薬局方収載品, 日本油脂)、白色ワセリン (Lot No.662275, 日本薬局方収載品, 日興製薬)、精製水素添加大豆リン脂質 (Lot No.3228, NIKKOL レシノール S-10E, 日光ケミカルズ)、ミリスチン酸イソプロピル (Lot No.WAE 5335, 化学用, 和光純薬工業)、注射用蒸留水 (Lot No.3B76N, 日本薬局方収載品, 大塚製薬)、アルギン酸基剤 (1%アルギン酸ナトリウム /リン酸二水素ナトリウム水溶液 適量)。

【 0 0 3 8 】

(2) 動物

動物は7週齢の雄性Crj:CD(SD)ラットを1群1匹ずつ用いた。ラットは体重範囲220~330gのものを用いた。

【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

## (3) 塗布部位の調製

投与前日にラットをエーテル軽度麻酔下において、電気バリカンおよび電気シェーバーを用いて皮膚を傷つけないように剃毛した。なお、投与当日に剃毛部位の確認を行い、炎症や発赤がないことを確認した。これを「正常皮膚」とした。さらに投与当日に剃毛部位をセロファンテープで圧着・剥離する操作を10回行い、角質層を剥離したものを「損傷皮膚」とした。動物を表1に示されたように分けて用いた。

【0040】

表1

試験動物番号	投与製剤	皮膚の状態
1	製剤A	正常
2	"	損傷
3	水溶製剤A	正常
4	"	損傷

10

【0041】

## (4) 塗布と塗布部位の保護方法

<sup>35</sup>S-NF- B デコイ製剤を背部皮膚に、塗布面積が横3cm×縦3cmになるよう塗布した。製剤の投与量は0.4 mg/head、投与製剤量は100 mg/head、投与放射エネルギーは500 kBq/head、投与回数は1回とした。

20

その後、塗布部を囲むように紙製箱型枠(横4 cm×縦4 cm×高さ1 cm)を置き、粘着性伸縮テープ(エラストポア, ニチバン)を用いて、箱型枠を囲むように固定して塗布部を保護した。塗布時間は24時間とした。

【0042】

## (5) 投与製剤の除去方法

微温水で湿らせたのち、固く搾った脱脂綿(4 cm×5 cm)1枚につき1回ずつ、計5枚を用いて、力を加えない状態で塗布部位の拭き取りを行った。

【0043】

## (6) 皮膚中放射能濃度の測定

30

<sup>35</sup>S-NF- B デコイを0.4 mg/headの用量で単回経皮投与した動物をエーテル麻酔死させたのち、投与部位皮膚を採取し、皮膚中放射能濃度を測定した。

【0044】

投与部位皮膚中放射能濃度は次のように測定した。投与製剤除去後の投与部位皮膚を、中心部より厚さ2 mm, 2.5×2.5 cmで摘出後、スライドガラス2枚の間で軽く圧着した状態で、-20 前後で凍結した。ついで、各切片を1 cm<sup>2</sup>となるように真皮側より2部位分をパンチしたのち、凍結後の真皮側をOCTコンパウンドで液体窒素下にてステージに固定した。固定後、凍結下にてクライオスタットを用いて、表皮側より厚さ10 μmで薄切した。薄切後の切片は4枚毎(40 μm相当分)にバイアルに採取したのち、組織溶解剤SOLUENE-350 (2 mL)を加えて加温・溶解後、シンチレーター10 mLを加え、室温で静置したのち、液体シンチレーションカウンターを用いて放射能の計測を行い、得られた値より各層の放射能濃度を算出した。塗布後24時間に塗布部残存製剤の拭き取りを実施した。

40

【0045】

結果) 皮膚透過性試験(表2~4、図1~2参照)

皮膚中放射能濃度は、水溶性ゲルである水溶製剤A(アルギン酸製剤)が製剤A(ワセリン単独製剤)に比べ、顕著に皮膚透過性を高める効果が確認された。

【0046】

表2

正常皮膚 放射能 (ng eq. of NF- B Decoy ODNs/cm<sup>3</sup>)

50

深さ ( $\mu\text{m}$ )	製剤A	水溶製剤A	
40	127723	305858	
80	176569	456038	
120	195258	449339	
160	160645	356230	
200	122080	245652	
240	103637	135583	
280	67479	75834	
320	34559	42958	10
360	14894	21062	
400	5278	8044	
440	2269	2884	
480	533	1413	
520	228	1130	
560	165	379	
600	150	492	
640	202	285	
680	0	399	
720	0	163	20
760	0	163	
800	0	143	
840	125	143	
880	220	0	
920	165	0	
960	0	118	
1000	0	0	
1040	0	0	
1080	0	0	
1120	0	0	30
1160	0	0	
1200	0	0	
1240	0	0	
1280	0	0	
1320	0	0	
1360	0	0	
1400	0	0	
1440	0	0	
1480	160	0	
1520	0	0	40
1560	119	0	
1600	0	0	
1640	0	0	
1680	0	0	
1720	0	0	
1760	0	-	
1800	0	-	

( 製剤A : ワセリン単独、水溶製剤A : アルギン酸ナトリウム、0 : 検出限界以下、- : 測定せず )



【 0 0 4 7 】

表 3

損傷皮膚 放射能 (ng eq. of NF- B Decoy ODNs/cm<sup>3</sup>)

深さ ( μ m)	製剤A	水溶製剤A	
40	151237	332272	
80	328816	599862	
120	496468	744654	
160	482113	905723	10
200	300313	1227719	
240	200318	958660	
280	126664	602954	
320	69206	214862	
360	32528	38100	
400	14366	10253	
440	6132	5402	
480	3148	3394	
520	1360	6428	
560	731	2011	20
600	753	3392	
640	422	3124	
680	546	5698	
720	929	2787	
760	779	2580	
800	2136	4018	
840	923	2534	
880	465	2108	
920	257	651	
960	0	517	30
1000	150	381	
1040	131	263	
1080	0	121	
1120	0	0	
1160	0	132	
1200	174	124	
1240	0	0	
1280	0	157	
1320	0	0	
1360	0	0	40
1400	144	991	
1440	0	233	
1480	0	879	
1520	122	215	
1560	144	1251	
1600	0	609	
1640	0	172	
1680	148	0	
1720	0	0	
1760	0	0	50

1800 0 0

(製剤A:ワセリン単独、水溶製剤A:アルギン酸ナトリウム、0:検出限界以下、-:測定せず)

【0048】

表4

放射能濃度 (投与量に対する%)

製剤の種類	正常皮膚	損傷皮膚
製剤 A	9.18 (0-640 μm)	20.36 (0-920 μm)
	4.65 (121-640 μm)	11.39 (121-800 μm)
水溶製剤 A	19.30 (0-840 μm)	52.62 (0-1080 μm)
	8.19 (121-800 μm)	37.03 (121-800 μm)

10

(各製剤の上段は皮膚に浸透した全放射能を表す。下段は真皮内に浸透した放射エネルギーを表す。)

【0049】

また、同様の試験をブタ皮膚において行ったところ、以下のような結果が得られた。

【0050】

表5

放射能濃度 (投与量に対する%)

製剤の種類	正常皮膚	損傷皮膚
製剤 A	4.95 (0-880 μm)	3.35 (0-640 μm)
	2.83 (121-880 μm)	2.73 (121-640 μm)
水溶製剤 A	33.78 (0-1440 μm)	41.59 (0-2440 μm)
	22.57 (121-1440 μm)	34.76 (121-2440 μm)

20

30

(各製剤の上段は皮膚に浸透した全放射能を表す。下段は真皮内に浸透した放射エネルギーを表す。)

【0051】

以上より、皮膚透過性の観点からは、水溶製剤A(アルギン酸製剤)がより好ましい。

【0052】

水溶製剤Aを用いることによりNF-B デコイ原薬必要量は従来の1/13(0.15%濃度)程度に低減できる。

【0053】

2. 皮膚累積刺激性試験

<sup>35</sup>S-NF-B デコイを含有する水溶製剤A(アルギン酸製剤)およびアルギン酸基剤のみを、ウサギの背部皮膚に14日間投与した時の皮膚累積刺激性を検討した。

【0054】

(1) 動物

背部を除毛した日本白色雌ウサギ(KbI:JW, SPF)を北山ラベス(株)箕輪生産場より購入した。薬剤投与時の週齢は17週齢で体重は3.10~3.74kgであった。

【0055】

(2) 塗布部位の調製と塗布

一匹につき、正常部位を損傷部位を二箇所ずつ設け、各投与物質の例数が6匹ずつになるように投与部位を設定した。

【0056】

40

50

投与開始前日に背部の細かい毛生を電気バリカンで除去し、Draize法 (Draize, J.H., et al, J. Pharmacol. Exp. Ther., 82, 377-390 (1944)) に従い投与部位を4ヶ所設定した (図5参照)。点対称となる二箇所を正常皮膚とし、残りの二箇所は府川らの方法 (府川和永ら、薬学雑誌 102, 89-98 (1982)) に基づき、投与日にシェーバーで軽く剃毛してからセロファンテープでストリッピングして損傷皮膚とした。被験製剤A~Dに関しては0.2gを秤取して2.5×2.5cmに裁断したリント布に均一に塗り広げて皮膚に塗布し、その上から5×5cmのテーピングテープを貼付して固定した。更に布製カバー (ストッキネット、アルケア (株)) 及びチューブ型ネット包帯 (プレスネット、アルケア (株)) を用いて被覆固定した。水溶製剤基材及び水溶製剤Aに関しては、皮膚への浸透を確認しながらピペット及びスパーテルを用いて0.2mLを投与し、その上から2.5×2.5cmに裁断したリント布及び5×5cmのテーピングテープを貼付して固定した。布製カバー及びチューブ型ネット包帯による被覆固定も同様に行った。投与終了後はリント布及びテーピングテープを除去し、投与部位を微温湯にて清拭した。

10

## 【0057】

なお、投与初日にはアルギン酸基材および水溶製剤Aの投与量を0.5mLに設定して投与を開始したが、2.5×2.5cmの区画に投与することが困難であった。そこで、投与初日の途中から、投与量を投与可能な最大量である0.2gおよび0.2mLにそれぞれ変更した。動物番号1番については、投与初日にアルギン酸基材を正常皮膚および損傷皮膚ともに0.5mL、水溶製剤Aを正常皮膚に0.5mL、損傷皮膚に0.2mL投与した。他の動物には、アルギン酸基材および水溶製剤A共に、投与初日より正常皮膚および損傷皮膚のいずれにも0.2mL投与した。

20

## 【0058】

## (3) 刺激性の判定

毎日の投与前及び最終投与の終了時 (投与物質除去1時間後) に肉眼的判定を行った。判定はDraizeの判定基準に準拠して、投与部位の紅斑 (痂皮形成) 及び浮腫についてそれぞれ評価した。判定結果はDraizeの判定基準に基づいたスコアで記録した。更に正常皮膚と損傷皮膚に分けて、各観察時点の紅斑 (痂皮形成)、浮腫およびそれらの合計評点について平均値と標準偏差を算出した。なおスコアは、低いほど刺激性が少ないことを意味する。

## 【0059】

結果) アルギン酸基剤のみ (水溶製剤Aのみ) および水溶製剤A (アルギン酸製剤) はウサギの正常皮膚に対しては刺激性を示さなかった。損傷皮膚では紅斑や浮腫が発現したが、その程度は軽く、投与を継続しても回復する一過性の変化であった。(表6、図4~5参照)

30

## 【0060】

【表 6】

投与部位の紅斑及び浮腫スコアの平均値 (Draize の判定基準に準拠)

製剤	皮膚													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
水溶製剤 A のみ 正常	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
水溶製剤 A のみ 損傷	1.2	1.0	1.0	1.0	0.7	0.3	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SD	0.8	0.6	0.6	0.6	0.8	0.5	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
水溶製剤 A 正常	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
水溶製剤 A 損傷	1.2	1.2	0.8	0.8	0.7	0.5	0.3	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.2	0.2
SD	0.8	1.2	1.3	1.3	1.2	0.8	0.5	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.4	0.4

10

20

30

40

## 【産業上の利用可能性】

【0061】

高皮膚透過性でかつ低刺激性の核酸皮膚外用製剤を提供する。

## 【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】ラット正常皮膚を用いたNF- Bデコイオリゴヌクレオチドの皮膚透過性試験の結果を表したグラフである。製剤A、水溶製剤Aを比較している。

50

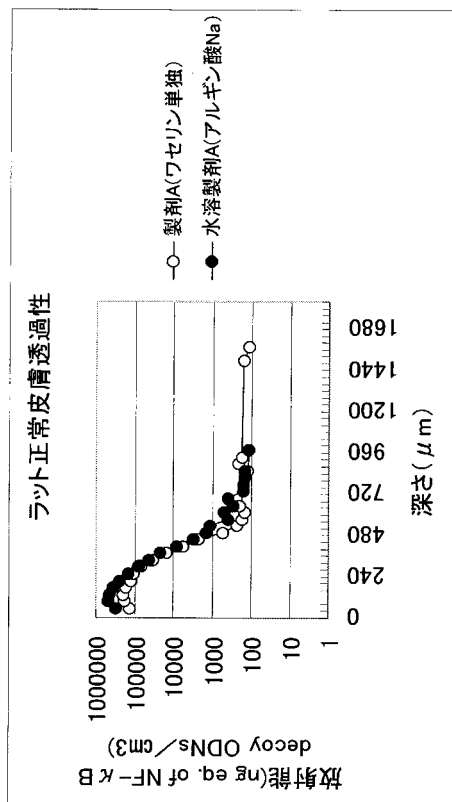
【図2】ラット損傷皮膚を用いたNF- Bデコイオリゴヌクレオチドの皮膚透過性試験の結果を表したグラフである。製剤A、水溶製剤Aを比較している。

【図3】ウサギの皮膚累積刺激性試験において用いたDraize法による塗布部位の調製部位を示している。ウサギ背部を上から見た図である。

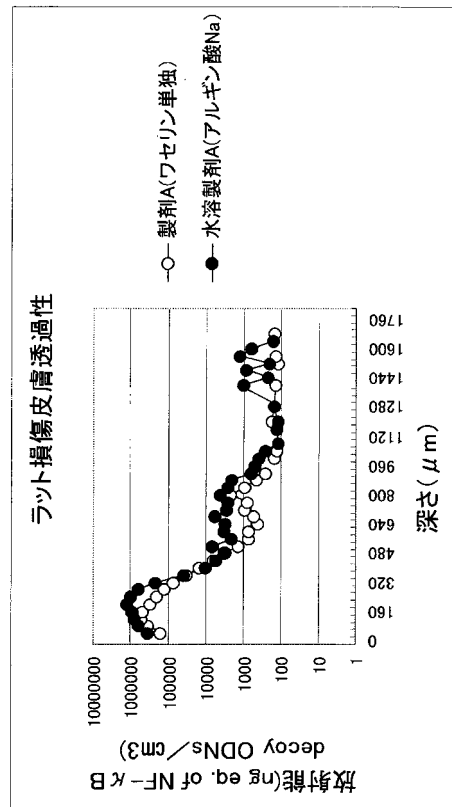
【図4】ウサギを用いたNF- Bデコイオリゴヌクレオチドの投与部位の紅斑及び浮腫スコアの平均値を経時的に表したグラフである。水溶製剤Aの基剤のみ（核酸なし）を正常皮膚と損傷皮膚に投与した場合を比較している。図中エラーバーは標準偏差を表す。

【図5】ウサギを用いたNF- Bデコイオリゴヌクレオチドの投与部位の紅斑及び浮腫スコアの平均値を経時的に表したグラフである。水溶製剤Aを正常皮膚と損傷皮膚に投与した場合を比較している。図中エラーバーは標準偏差を表す。

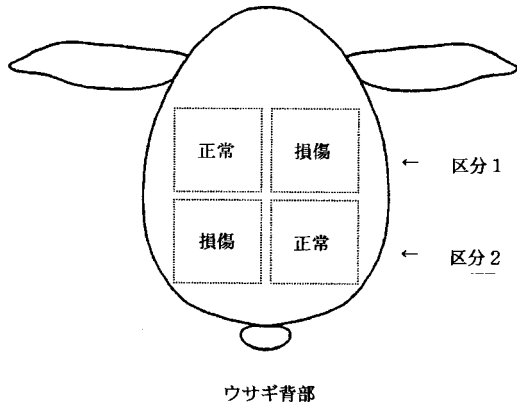
【図1】



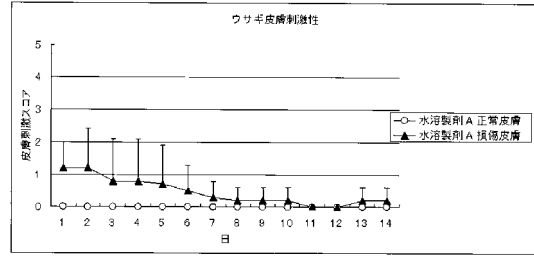
【図2】



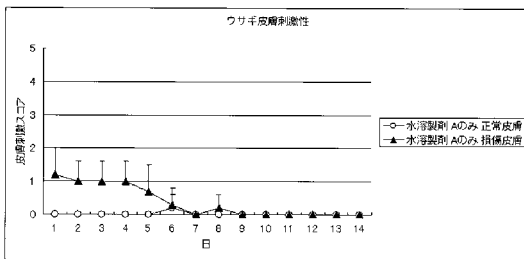
【図3】



【図5】



【図4】



【配列表】

0004767195000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査官 横井 宏理

(56)参考文献 特開2001-199903(JP,A)  
特開2002-193813(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 8 / 0 0  
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 7 0 8 8  
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 3 6  
A 6 1 P 1 7 / 0 0 - 0 6  
A 6 1 P 3 7 / 0 0 - 0 8  
A 6 1 P 4 3 / 0 0  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 0 9  
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)