

(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
2018年7月5日(05.07.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/124236 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/06 (2006.01) A61L 15/64 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01) A61P 9/04 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01) A61P 9/06 (2006.01)
A61K 31/24 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/4174 (2006.01) C07D 209/34 (2006.01)
A61K 31/4418 (2006.01) C07D 213/64 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01) C07D 233/60 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) C07D 309/30 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) C07D 401/12 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01) C07D 473/08 (2006.01)
A61L 15/40 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01)

(72) 発明者: 澤 芳樹(SAWA, Yoshiki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 宮川 繁(MIYAGAWA, Shigeru); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 酒井 芳紀(SAKAI, Yoshiki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 柳 裕啓(YANAGI, Yasuhiro); 〒6580063 兵庫県神戸市東灘区住吉山手5丁目5番1-406号 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜T N Kビル Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/047100

(22) 国際出願日: 2017年12月27日(27.12.2017)

(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 2016-254279 2016年12月27日(27.12.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 株式会社カルディオ(CARDIO INCORPORATED) [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町一丁目5-5 神戸バイオメディカル創造センター (BMA) 2階 Hyogo (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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,

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITION FOR TREATING INTRACTABLE HEART DISEASE

(54) 発明の名称: 難治性心疾患治療用医薬組成物

(57) Abstract: Provided is a medicinal composition to be used for treating an intractable heart tissue fibrosis disease accompanying chronic heart failure. The medicinal composition, which is to be used for treating an intractable heart tissue fibrosis disease accompanying chronic heart failure, comprises as an active ingredient at least one member selected from the group consisting of a protease inhibitor, a thromboxane A2 synthase inhibitor and an antagonist thereof, a phosphodiesterase (PDE) inhibitor, a tyrosine kinase inhibitor, an HMG-CoA reductase inhibitor and an anti-fibrosis agent. (Said medicinal composition includes a sustainable preparation thereof enclosed in a biodegradable polymer.)

(57) 要約: 慢性心不全を伴う難治性心臓組織線維化心疾患の治療のために用いられる医薬組成物を提供する。有効成分として、蛋白分解酵素阻害剤、トロンボキサンA2合成酵素阻害剤及びその拮抗剤、ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、並びに抗線維化剤からなる群より選択される少なくとも一種を用いる、慢性心不全を伴う難治性心臓組織線維化疾患の治療のために用いられる医薬組成物 (これらの生体分解性高分子内包持続性製剤を含む)。

WO 2018/124236 A1

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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称： 難治性心疾患治療用医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、難治性心疾患治療用医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 希少疾病医薬品指定疾患である拡張型心筋症（DCM）は、末期心不全にあっては1年死亡率が75%とされる。DCMに対する根本治療は心臓移植であるが、臓器移植法改定後においてもドナーの絶対的不足状態は変わらない。薬物療法としては、 β ブロッカー、アンギオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）、ACE阻害薬、利尿薬、ジギタリス、抗アルドステロン薬、及び経口強心薬等が広く用いられているが、その効果は十分ではない。心臓移植適応患者には、待機的治療として補助人工心臓（LVAD）が施行されるが、合併症（脳梗塞、感染症等）の危険性も高く、待機死する患者も多い。我が国における深刻なドナー不足を鑑みると、早期治療介入による心臓移植・LVAD装着の回避及び遅延を目指した新しい再生創薬医薬品の開発は喫緊の課題である。

[0003] また、冠動脈硬化症に伴う心筋梗塞は、我が国における3大疾患のうちの1つであるが、世界に類を見ない高齢化社会を迎えた日本においては、今後さらに患者数の増加が予想されている。厚生労働省の「患者調査」においては、2011年度の虚血性心疾患は756,000症例、狭心症は558,000症例、急性心筋梗塞は41,000症例、陳旧性心筋梗塞は110,000症例と報告されている。虚血性心筋症の具体的な数字は示されていないが、陳旧性心筋梗塞の10-20%程度を占めるものと考えられる。

[0004] 虚血性心筋症は、罹患頻度が多く、今後増加が予想される進行性、予後不良の難治性疾患である。薬物治療を中心とした非侵襲治療と血行再建が標準治療として行われているものの、いずれも決定的な治療とは言い難く、これまでの治療とは異なるアプローチによる新規治療の開発が望まれている。

[0005] 虚血性心筋症は、冠動脈硬化症が原因となり、広範囲に及ぶ心筋虚血ある

いは心筋梗塞を来したために左心室壁運動が重度に低下し、慢性的にうっ血性心不全を呈している病態である。『重症心不全に対する植込型補助人工心臓治療ガイドライン 2013』では、虚血性心筋症を『広範に及ぶ心筋梗塞や多枝病変例で、壁運動異常があり、心機能が高度に低下している病態』と定義されている。心筋虚血あるいは心筋梗塞を生じた部位では、左心室の収縮機能および拡張機能が低下するために、心拍出量の低下、左室拡張末期圧の上昇から肺うっ血を来す。また代償性に左心室の拡大が生じ、これが進行することにより左室リモデリングと呼ばれる左心室の進行性の拡大および機能低下に陥る。

[0006] 虚血性心筋症の標準的治療法は、非侵襲的治療と侵襲的治療の組み合わせで行われている。非侵襲的治療は、薬物療法が中心であり、 β ブロッカー、アンジオテンシンII受容体拮抗剤（ARB）、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、抗血小板薬、硝酸薬、Ca拮抗薬が広く用いられており、心臓リハビリテーションや適応補助換気（ASV）なども併用されている。一方、侵襲的治療には、冠動脈バイパス手術と経皮的冠動脈形成術が中心となるが、これらの適応は中枢性の高度狭窄あるいは閉塞病変があり、かつその末梢側に十分な灌流領域を有する症例に限られる。

[0007] 非侵襲治療は虚血性心筋症の全症例に行われるものの、これらのみでは、心臓超音波検査上の左室駆出率が40%以下の症例における5年生存率は50%程度であることが報告されている。これに、侵襲的治療が加わった症例においては、5年生存率は60-70%と改善するものの、依然としてその予後は不良と言わざるを得ない。

[0008] これらの治療が十分に行われたにもかかわらず、病変の進行が見られ末期的な症状を呈する症例は、年齢や合併症の制限があるものの、心臓移植、植込み型人工心臓（LVAD）の適応となる。

[0009] 本発明者らはすでに重症心筋症患者に対して、自己骨格筋筋芽細胞シートを心臓貼付する治療法（ハートシート）を開発（非特許文献1）し、2015年に本邦にて「再生医療等製品」として承認を得ている。また、本治療法は、

細胞シートから分泌される各種体内再生因子（HGF、VEGF、SDF-1等）による血管新生・心筋再生効果であること（非特許文献2）を解明した。

[0010] また、本発明者らは、新しく同作用機序を有する低分子合成化合物として、ONO-1301（（E）- [5 - [2 - [1 - フェニル - 1 - （3 - ピリジル）メチリデンアミノオキシ] エチル] - 7, 8 - ジヒドロナフタレン - 1 - イルオキシ] 酢酸）を見出した。即ち、オキシム誘導体であるONO-1301は、当初プロスタグランジン（PG）I₂受容体作動薬として見出され、経口抗血栓薬として開発された（特許文献1）が、臨床試験において副作用（血管拡張作用、下痢等）と有効性（血小板凝集抑制作用）との乖離が狭いことから、開発が中止されていた。

[0011] 本発明者らは、ONO-1301、ベラプロスト、セレキシパグ（NS-304）等を含むプロスタグランジン（PG）I₂受容体（IP）作動薬、EP₂作動薬、及びEP₄作動薬が、血小板凝集抑制作用を示す濃度より低濃度で、線維芽細胞等に作用し、各種の体内再生因子、例えば肝細胞増殖因子（HGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、ストローマ細胞由来因子（SDF-1）、及びhigh mobility group box protein1（HMGB1）、線維芽細胞増殖因子（a/bFGF）、上皮細胞増殖因子（EGF）、低酸素誘導因子（HIF）、及び顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）等の多くの体内再生因子を産生促進することから、再生創薬として難治性心疾患を含む新しい適応症を見出した（特許文献2）。このことは、炎症、虚血等に伴う創傷治癒過程において、PGI₂、及びPGE₂がその初期において関与している。即ち、虚血や炎症部位局所にてシクロオキシゲナーゼ（COX II）が誘導され、PGs（PGI₂及びPGE₂等）が生合成されることにより、多くの体内再生因子が誘導され、創傷治癒することが示唆されている。

[0012] また、ONO-1301を生体分解性高分子（乳酸・グリコール酸共重合体；PLGA）に内包した徐放性マイクロイスフェア製剤（YS-1402）を開発し、本製剤の新しく心臓貼付投与方法を確立した（特許文献3、特許文献4）。

[0013] 現在、YS-1402をゼラチンシートに含ませて心臓貼付投与することにより、体内誘導型心臓再生治療法として虚血性心筋症及び拡張型心筋症を対象とし

て医師主導治験（P-IIIa試験）を実施中（非特許文献3）である。また、本発明者らは、ON0-1301等を含有する疾患局所特異的リポソームナノスフェア製剤も開発している。また、本発明者らは、iPS心筋細胞シート心臓貼付療法での治験も計画している。しかし、これらの細胞療法や心臓貼付投与法は、心臓局所投与である分選択的効果は期待できるが、侵襲性、経済性、安全性、汎用性等に問題点も多い。

[0014] 一方、YS-1402製剤を少量静注投与することにより、肺臓にYS-1402製剤を集積させ、肺臓にて徐々に薬剤を放出することにより肺臓内での薬剤濃度の高濃度維持を目的とした肺疾患部位特異的治療剤（特許文献5）が知られている。しかし、本法は、大量投与による肺塞栓症の発症が危惧され、安全性に問題がある。

先行技術文献

特許文献

- [0015] 特許文献1：特許第2691679号
特許文献2：W02004/032965
特許文献3：W02008/047863
特許文献4：W02014/046065
特許文献5：W02014/069401

非特許文献

- [0016] 非特許文献1：Surg Today (2012) 42:181-184
非特許文献2：Ann Thorac Surg (2011) 91:320-9
非特許文献3：Heart Fail Rev (2015) 20:401-413

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0017] 本発明者らが、LVAD装着、心臓移植、開胸手術を伴う細胞シート療法等に代わり、経口投与や間歇皮下投与等非侵襲的で汎用性ある投与法での早期治療介入により、難治性心疾患の重症化を抑制し、LVAD装着や心臓移植の遅延

及び回避を目指して、汎用性、経済性、安全性、及び低侵襲性の心血管・心筋再生療法剤を検討した結果、驚くことにすでに市販されている医薬品の中で、その安全量での投与にて本疾患に効果を示す化合物が幾つか新しく見出された。

[0018] 本発明者らは、難治性心疾患患者の「メタボローム・プロテオソーム病態解析」、及び「疾患特異的iPS細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発」や「循環器疾患におけるiPS細胞由来心筋細胞を用いた再生創薬に関する研究」等の研究テーマを掲げ、血管内皮細胞、線維芽細胞、iPS心筋細胞等を用いたin vitro系にて難治性心疾患治療薬の検索スクリーニングを行ってきた。

[0019] これらのin vitroスクリーニングにて、ドラッグリポジショニングの観点から選択された幾つかの医薬品類を中心として、自然発症拡張型心筋症ハムスターモデル、ラット冠動脈虚血モデル、及びイヌ高速ペースング拡張型心筋症モデル等を用いてin vivoスクリーニングを実施した結果、幾つかの医薬品がその安全量にて効果を有することが確認された。これらの選択された医薬品類は、降圧作用を有しないため、現在降圧作用を有する心不全治療薬として使用されている、 β ブロッカー、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、及びアンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）等との併用投与が可能となるという点において画期的である。

[0020] 選択された作用機序としては、蛋白分解酵素阻害剤、トロンボキサン A_2 生合成酵素阻害剤、およびその拮抗剤、ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤、キナーゼ阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、及び抗線維化剤等が含まれる。PDE阻害剤には、非選択的PDE阻害剤、PDEIII阻害剤、及びPDEV阻害剤等が含まれ、キナーゼ阻害剤にはチロシンキナーゼ阻害剤が含まれる。

[0021] また、本発明者らは、これらの選択された薬剤が生体分解性高分子に内包されたマイクロスフェア製剤を新たに作製した。これらは、1週間～3ヶ月に1回程度、皮下投与又は筋注投与により長期間、安定的に点滴静注様の血中動態を示すことが可能となる。これらの製剤は、毎日の経口投与に比し

、間歇投与における投与利便性が増し、点滴静注様の血中動態を示すため高い血中濃度回避における副作用回避、及び長期間持続した血中動態による効果の持続が期待できる。

[0022] よって、本発明は、慢性心不全を伴う難治性心臓組織線維化疾患治療対象疾患が、拡張型心筋症、虚血性心筋症、心筋梗塞、狭心症、動脈硬化症、血管炎症候群、心筋炎、肥大型心筋症、大動脈弁狭窄症、弁膜症、大動脈弁閉鎖不全、HFpEF (heart failure with preserved ejection fraction)、拡張不全、収縮不全、上室性頻脈性不整脈、うっ血性心不全、冠動脈疾患、特発性心筋症、心房細動である難治性心臓組織線維化疾患治療に有効な医薬組成物を提供することを課題とする。

[0023] より具体的には、本発明の課題は、降圧作用を示さない選択された既存の医薬品類を早期治療介入として非侵襲的に投与することにより、現在、慢性心不全薬として使用されている降圧剤であるACE阻害剤、ARB及び β ブロッカー等と併用することが可能な汎用性ある医薬品を提供することにより、人工心臓装着、及び心臓移植の遅延、回避を目指した新しい画期的心臓組織線維化疾患治療薬を提供することである。

課題を解決するための手段

[0024] 本発明者らは、本邦で市販されている約16,000種の医薬品から約2,000種を選択し、心臓疾患に対する病態解析、及びiPS細胞等を用いたin vitro系にて鋭意評価した。その結果、幾つかの医薬品類が、血管新生作用、抗線維化作用、抗アポトーシス作用、細胞保護作用、リバーズ・リモデリング作用、間葉系幹細胞分化・誘導作用、体内再生因子誘導作用、抗炎症作用、循環改善作用等が心臓疾患に対して有効であることを見出した。これらをメルクマールとして心臓疾患治療薬のin vitro検索スクリーニングを実施した。これらのin vitroスクリーニングから、ドラッグリポジショニング（既存薬再開発）として選択された幾つかの医薬品類を中心として、自然発症拡張型心筋症ハムスターモデル、ラット冠動脈虚血モデル、及びイヌ高速ペーシング拡張型心筋症モデル等を用いてin vivoスクリーニングを実施した。これらの疾患

モデルへの投与量は、長期毒性試験における無毒性量（NOAEL）及び臨床投与量を基準として反復経口投与にて *in vivo* 評価した。新しく有効性を示した医薬品類は、（１）蛋白分解酵素阻害剤、（２）ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤、（３）チロシンキナーゼ阻害剤、（４）トロンボキサン（TX） A_2 生合成酵素阻害剤、（５）HMG-CoA還元酵素阻害剤、及び（６）抗線維化剤であった。尚、プロスタグランジンIP受容体作動薬も同様に効果を示したが、これらは、すでに本発明者らが見出している公知の薬剤（特許文献２）である。

[0025] またこれらの見出された薬剤群を生体分解性高分子である乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）に内包させたマイクロスフェア（MS）製剤が、総経口投与量の1/10以下の2週～3ヶ月に1回程度の間歇皮下注投与又は筋注投与において、効果を示すことは画期的である。

[0026] 本発明者らは、鋭意研究を行った結果、驚くことに、上記6種の作用機序を有する医薬品類が上記目的を達成することを新しく見出した。また、これらの生体分解性内包マイクロスフェア持続性製剤が間歇投与においてもさらに有用であることを見出し、本発明を完成した。

[0027] すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] 慢性心不全を伴う難治性心臓組織線維化疾患の予防及び／又は治療のために用いられる医薬組成物。

[2] 蛋白分解酵素阻害剤を含む、[1]に記載の医薬組成物。

[3] トロンボキサン A_2 生合成酵素阻害剤及び／又はその拮抗剤を含む、[1]に記載の医薬組成物。

[4] ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤を含む、[1]に記載の医薬組成物。

[5] チロシンキナーゼ阻害剤を含む、[1]に記載の医薬組成物。

[6] HMG-CoA還元酵素阻害剤を含む、[1]に記載の医薬組成物。

[7] 抗線維化剤を含む、[1]に記載の医薬組成物。

[8] 蛋白分解酵素阻害剤、トロンボキサン A_2 生合成酵素阻害剤及びその拮

抗剤、ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、並びに抗線維化剤からなる群より選択される少なくとも2種を含む、[1]に記載の医薬組成物。

[9] 以下（1）～（6）の化合物及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種を含む、[1]～[8]のいずれか一項に記載の医薬組成物：

- （1）蛋白分解酵素阻害剤として、カモスタット；
- （2）トロンボキサン_{A2}合成酵素阻害剤として、オザグレール；
- （3）ホスホジエステラーゼ阻害剤として、テオフィリン、シロスタゾールおよびシルデナフィル；
- （4）チロシンキナーゼ阻害剤として、ニンテダニブ；
- （5）HMG-CoA還元酵素阻害剤として、ロバスタチン；及び
- （6）抗線維化剤として、ピルフェリドン。

[10] さらに、生体分解性高分子を含有する持続性製剤である、[1]～[9]のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[11] 持続性製剤が、マイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤、またはナノスフェア製剤である、[10]に記載の医薬組成物。

[12] 前記生体分解性高分子が、乳酸-グリコール酸共重合体であり、かつマイクロスフェア製剤である、項10に記載の医薬組成物。

[13] 以下（1）～（5）の化合物及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種を含む、項11に記載の医薬組成物：

- （1）蛋白分解酵素阻害剤として、カモスタット；
- （2）トロンボキサン_{A2}合成酵素阻害剤として、オザグレール；
- （3）ホスホジエステラーゼ阻害剤として、シロスタゾール及びシルデナフィル；
- （4）チロシンキナーゼ阻害剤として、ニンテダニブ；
- （5）抗線維化剤として、ピルフェリドン。

[14] 経口投与用、静脈内投与用、冠動脈内投与用、吸入用、筋注投与

用、皮下投与用、経粘膜投与用、経皮投与用、又は心臓貼付投与用である、
[1] ~ [13] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[15] 慢性心不全を伴う難治性心臓組織線維化疾患が、拡張型心筋症、
虚血性心筋症、心筋梗塞、狭心症、動脈硬化症、血管炎症候群、心筋炎、肥
大型心筋症、大動脈弁狭窄症、弁膜症、大動脈弁閉鎖不全、HFpEF (heart fa
ilure with preserved ejection fraction)、拡張不全、収縮不全、上室性
頻脈性不整脈、うっ血性心不全、冠動脈疾患、特発性心筋症、又は心房細動
である、[1] ~ [14] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

発明の効果

[0028] 6種の作用機序を有する医薬品類を代表とする化合物群は、すでに上市さ
れている同種の医薬品類でもよく、また今後開発される同作用機序を有する
新しい化合物類でもよい。

またこれらの化合物を含む製剤は、市販品製剤や新しい製剤としてもよい。
新しい製剤とは、改良型経口製剤や配合剤、及び各種製法における生体分解
性高分子内包の徐放性マイクロスフェア製剤や、ナノスフェア製剤等
でもよい。各種これらを含む本発明の薬剤類は、経口投与、静脈内投与、
動脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、吸入投与、貼付投与、又は軟膏剤等
でもよいが、基本的には投与コンプライアンスにすぐれたこれらの化合物を
含む改良型経口剤、市販品製剤、又はこれらの生体分解性高分子内包の徐
放性製剤であって、皮下投与、筋注投与、臓器貼付投与、静注投与又は吸入
投与のために使用される製剤である。

[0029] プロスタグランジンIP受容体作動薬の心臓疾患に対する有用性に関しては
、本発明者らは、すでに特許文献2 W02004/032965にて詳細に報告している
。また、プロスタグランジンに対する効果としては、IP受容体作動薬以外に
、EP2受容体作動薬、EP4受容体作動薬、及びPGI2誘導体、PGE1誘導体、PGE2
誘導体でも有用であることが記載されている。

[0030] これらの6種の医薬品（生体分解性高分子内包の徐放性製剤を含む）は、
原則として、現在降圧剤等として使用されている治療薬である、 β ブロッカ

一、ARB、及びACE阻害剤や利尿剤等と併用投与することが好ましい。また、6種の中でも、1種又は2種以上、効果が期待でき、副作用が発症しない範囲において併用投与することが好ましい。また、投薬利便性及び効果増強作用から、現在使用されている降圧剤に加えて、6種の作用機序を有する医薬品の2種又は3種以上との配合剤を作製して使用してもよい。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]長期投与における生存率変化の結果を示すグラフである。

[図2]生存率曲線を示すグラフである (Control: 非投与、ONO-1301: 経口投与 (1回/2日、26週間)、*: $P < 0.05$ 有意差 (ControlとONO-1301 3mg/kg (Log rank test)))。

[図3]体重変化の結果を示すグラフである ([]: 投与後の時間、Control: 非投与; ONO-1301: 経口投与 (1回/2日、26週間); それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす; **: コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student's t-test)))。

[図4]心機能 (EF) 変化 (群分け時との変化量; Δ) の結果を示すグラフである (Control: 非投与; ONO-1301: 経口投与 (1回/2日、26週間); それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす; *: コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student's t-test)))。

[図5]オザグレル塩酸塩の光学顕微鏡観察写真である。

[図6]オザグレル塩酸塩のUV吸収スペクトルである。

[図7]カモスタットメシル酸塩の光学顕微鏡観察写真である。

[図8]カモスタットメシル酸塩のUV吸収スペクトルである。

[図9]シルデナフィルクエン酸塩の光学顕微鏡観察写真である。

[図10]シルデナフィルクエン酸塩のUV吸収スペクトルである。

発明を実施するための形態

[0032] 1. 蛋白分解酵素阻害剤

蛋白質分解酵素には、主に、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、及びアスパラギン酸プロテアーゼ等が存在する。

- [0033] 蛋白分解酵素阻害剤としては、カモスタットメシル酸は経口剤として慢性膵炎における急性症状の緩解、及び術後逆流性食道炎に対して使用されている。カモスタットはトリプシン、血漿カリクレイン、プラスミン、トロンビン、プロスタシン、C1r、C1エステラーゼに対して強い阻害作用を示す。一方、パンクレアチン、膵臓カリクレインに対する阻害作用は弱く、 α -キモトリプシン、ペプシン、ブロメライン、セラチオペプチダーゼ、エラスターゼ5に対しては阻害作用を示さない (in vitro)。
- [0034] 一方、注射剤としては、ガベキサートメシル酸が蛋白分解酵素（トリプシン、カリクレイン、プラスミン等）逸脱を伴う諸疾患（急性膵炎、慢性再発性膵炎の急性増悪期、術後の急性膵炎）、及び汎発性血管内血液凝固症（DIC）として使用されている。本剤はトリプシン、カリクレイン（キニン系）、トロンビン（凝固系）、活性化第X因子（凝固系）、プラスミン（線溶系）、C1-エステラーゼ（補体系）等を阻害する (in vitro)。
- [0035] ナファモスタットメシル酸塩は、膵炎の急性症状の改善、汎発性血管内血液凝固症（DIC）、及び出血性病変又は出血傾向を有する患者の血液体外循環時の灌流血液の凝固防止に対して使用されている。本剤は、血液凝固・線溶系（トロンビン、XIIa、Xa、VIIa、プラスミン）、カリクレイン-キニン系（カリクレイン）、補体系（C1r、C1s、B、D）及び膵酵素（トリプシン、膵カリクレイン）に対して強力な阻害作用を有している (in vitro)。
- [0036] また、シベレスタットナトリウム水和物は、好中球エラスターゼ阻害剤として、全身性炎症反応症候群（Systemic Inflammatory Response Syndrome；SIRS）伴う急性肺障害の改善薬として使用されている。
- [0037] 種々検討した結果、セリンプロテアーゼ阻害剤、及びエラスターゼ阻害剤が心疾患に対して有効であり、特に、プラスミン阻害剤、血漿カリクレイン阻害剤、トロンビン阻害剤、プロスタシン阻害剤、及びエラスターゼ阻害剤が有効であることが判った。
- [0038] これらの標的蛋白分解酵素に選択的な阻害剤であってもよく、また複数の蛋白分解酵素に対して阻害作用を有していても有効である。本発明の完成に

おいては、主にセリンプロテアーゼを阻害するカモスタットメシル酸を代表として検討した（実施例参照）が、すでに公知の阻害剤であってもよく、また、今後開発されるこれらのプロテアーゼに対する阻害剤であってもよい。

[0039] また、これらの生体分解性高分子内包徐放性製剤も有効であり、特に、カモスタットメシル酸、及びシベレスタットナトリウム水和物の乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）マイクロスフェア（MS）製剤が有効である。

[0040] 2. ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤

ホスホジエステラーゼ（PDE）は、細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMP およびcGMP をそれぞれ5'-AMP 及び5'-GMP に加水分解することにより、細胞内のシグナル伝達を調節する酵素である。PDE は、現在までに21 種の遺伝子がクローニングされ、これらはアミノ酸配列の相同性、生化学的特性及び阻害薬に対する感受性の違いから11 種類のファミリー（PDE1～PDE11）に分類されている。

[0041] テオフィリンやアミノフィリンは、非選択的PDE阻害剤として、気管支喘息、喘息性（様）気管支炎、慢性気管支炎、肺気腫に対して使用されている。

[0042] シロスタゾールはPDEIII阻害剤であり、経口剤として、慢性動脈閉塞症に基ずく潰瘍、疼痛及び冷感等の虚血性諸症状の改善、及び脳梗塞（心原性脳塞栓症を除く）発症後の再発抑制剤として使用されている。一方、アムリノン、ミルリノン、及びオルプリノン塩酸塩水和物も選択的PDEIII阻害剤であり、注射剤として急性心不全薬として使用されている。

[0043] シルデナフィルクエン酸塩はPDEV阻害剤であり、勃起不全治療薬として使用されている。その他、PDEIV阻害剤はアトピー性皮膚炎や慢性閉塞性肺疾患（COPD）薬として検討されている。

[0044] 本発明は、各々の代表として、非選択的PDE阻害剤として、テオフィリンを、PDEIII阻害剤としてシロスタゾールを、また、PDEV阻害剤としてシルデナフィルクエン酸塩を用いて評価した（実施例参照）。これらは、急性心不全や強心剤としても使用されているが、拡張型心筋症治療剤等の心臓組織線維

化疾患治療薬としては使用されていない。

[0045] PDE阻害剤は、すでに公知の阻害剤であってもよく、また、今後開発されるPDEに対する阻害剤であってもよい。

[0046] また、これらの生体分解性高分子内包徐放性製剤も有効であり、特に、シルデナフィルクエン酸塩、テオフィリン及びシロスタゾールの乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）マイクロスフェア（MS）製剤が有効である。

[0047] 3. チロシンキナーゼ阻害剤

チロシンキナーゼ型受容体は増殖因子の受容体である。リン酸化されうるアミノ酸（セリン、スレオニン、チロシン）の中のチロシンをリン酸化することでシグナル伝達を進行させ、細胞を増殖させる。このシグナル伝達系を阻害すれば、細胞増殖を抑制することが可能となる。チロシンキナーゼ酵素には多くの種類があるが、どれもチロシタンパク質を変化させる役割をもっている（自己リン酸化）。多くのがんではチロシンキナーゼが異常に活性化しており、それによって変化したタンパクであるチロシンが、細胞内にあるシグナル伝達物質と結合し、細胞増殖や、浸潤、転移、血管新生などが引き起こされると考えられている。よって、多くのチロシンキナーゼ阻害剤が抗がん剤として開発されている。

[0048] ゲフィチニブ（非小細胞肺癌）、エルロチニブ塩酸塩（肺癌、膵癌）、アファチニブ マレイン酸塩（非小細胞肺癌）、及びオシメルチニブ（非小細胞肺癌）等が知られている。一方、ニンテダニブエタンスルホン酸塩は、特発性肺線維症に使用されている。

[0049] 本発明の完成においては、代表として、ニンテダニブエタンスルホン酸塩を用いて評価した（実施例参照）が、すでに公知の阻害剤であってもよく、また、今後開発されるチロシンキナーゼに対する阻害剤であってもよい。

[0050] また、これらの生体分解性高分子内包徐放性製剤も有効であり、特に、ニンテダニブエタンスルホン酸塩の乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）マイクロスフェア（MS）製剤が有効である。

[0051] 4. TXA₂合成酵素阻害薬、及びTXA₂受容体拮抗剤

細胞膜リン脂質から遊離されたアラキドン酸は、アラキドン酸カスケードに従い、シクロオキシゲナーゼ (COX) によりプロスタグランジン (PG) G₂に酸化され、さらにペルオキシダーゼ活性によりPGH₂へと変換される。その後細胞質へ移動したPGH₂は各種酵素により種々のプロスタグランジン (PG) 類及びトロンボキサン (TX) A₂ へ代謝され、種々の生理活性を示す。TXA₂は主に血小板にて産生され、血小板の凝集作用、血管透過性亢進作用、及び血管壁の収縮を引き起こす物質である。また、TXA₂は、主に血管内皮細胞で産生されるPGI₂と相反する作用を有している。例えば、PGI₂は血小板凝集抑制作用や血管拡張作用等を有しており、TXA₂とPGI₂とのバランスにより、恒常性が維持されている。

[0052] また、これらの生体分解性高分子内包徐放性製剤も有効であり、特に、塩酸オザグレル、オザグレルナトリウム、及びセラトロダストの乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) マイクロスフェア (MS) 製剤が有効である。

[0053] 塩酸オザグレル (経口剤) は、TXA₂生合成酵素を阻害し、TXA₂の産生を抑制することにより気管支喘息の薬として、オザグレルナトリウム (静注剤) はクモ膜下出血術後の脳血管攣縮およびこれに伴う脳虚血症状の改善、及び脳血栓症 (急性期) に伴う運動障害の改善剤として用いられている。また、セラトロダスト、及びラマトロバンは、トロンボキサンA₂受容体を拮抗的に阻害することで気管支喘息、又はアレルギー性鼻炎の薬として用いられる。本発明の完成においては、代表として、塩酸オザグレルを用いて評価した (実施例参照) が、すでに公知の阻害剤や拮抗剤であってもよく、また、今後開発される阻害剤や拮抗剤であってもよい。

[0054] 5. HMG-CoA還元酵素阻害剤

HMG-CoA還元酵素阻害剤はメバロン酸経路の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の働きを阻害することで、肝臓でのコレステロール生合成を低下させる。その結果、コレステロール恒常性維持のため肝臓でのLDL受容体発現が上昇し

、血液から肝臓へのLDLコレステロールの取り込みが促進される。LDLは、血管壁にアテロームを形成して動脈硬化症の原因となる。コレステロール生合成の抑制を持続することにより、血液中へのVLDL分泌も低下するため、血漿トリグリセリド値も低下する。

[0055] HMG-CoA還元酵素阻害剤としては、ロスバスタチン、ピタバスタチン、アトロバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、及びロバスタチン等が高コレステロール血症、及び家族性高コレステロール血症薬として使用されている。

[0056] 本発明の完成においては、代表として、ロバスタチンを用いて評価した（実施例参照）が、すでに公知の阻害剤であってもよく、また、今後開発される阻害剤であってもよい。

[0057] また、これらの生体分解性高分子内包徐放性製剤も有効であり、特に、アトロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン及びロバスタチンの乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA）マイクロスフェア（MS）製剤が有効である。

[0058] 6. 抗線維化剤

特発性肺線維症の薬剤として、ピルフェリドンが市販されている。ピルフェリドンは抗線維化作用のほか、抗炎症作用や抗酸化作用など多様な薬理作用を示すことが明らかになっているが、その作用機序はいまだ不明な点が多い。マウスのブレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いた検討では、線維化形成に關与する TGF- β (Transforming Growth Factor- β) などの増殖因子の産生抑制に加え、肺線維化の進行に伴うインターフェロン (IFN) - γ の低下を抑制することが明らかになっており、このような多様な作用の複合的關与により抗線維化作用を示すと考えられる。

[0059] 本発明の完成においては、代表としてピルフェリドンを用いて評価した（実施例参照）が、すでに公知の抗線維化剤であってもよく、また、今後開発される抗線維化剤であってもよい。

[0060] また、体内再生因子誘導に伴う抗線維化剤としては、コレラ毒素 (Cholera toxin)

lera toxin)、8-ブロモ-cAMP、ジブチリル-cAMP、ホルスコリン (Forskolin) 等に加えて、AT1受容体拮抗剤 (ARB)、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ (PPAR γ) 作動薬、IL-1、TNF- α 、INF等がある。

[0061] また、これらの生体分解性高分子内包徐放性製剤も有効であり、特に、アトロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン及びロバスタチンの乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) マイクロスフェア (MS) 製剤が有効である。

[0062] 7. 本発明に係る化合物の製造方法

本発明に係る化合物類は、すでに医薬品として使用されており、一般に試薬又は医薬品として購入することが可能である。また、これらの生体分解性高分子内包の徐放性製剤は、公知の方法により製造することが可能である (国際公開第WO2004/032965号)

[0063] 8. 本発明の医薬組成物の投与対象

本発明の医薬組成物の投与対象としては、慢性心不全を伴う難治性心臓組織線維化疾患治療対象疾患が、拡張型心筋症、虚血性心筋症、心筋梗塞、狭心症、動脈硬化症、血管炎症候群、心筋炎、肥大型心筋症、大動脈弁狭窄症、弁膜症、大動脈弁閉鎖不全、HFpEF (heart failure with preserved ejection fraction)、拡張不全、収縮不全、上室性頻脈性不整脈、うっ血性心不全、冠動脈疾患、特発性心筋症、心房細動等を発症している哺乳動物が好適である。哺乳動物としては、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット等が挙げられ、特に心臓組織線維化循環器系疾患を発症しているまたは発症していることが疑われるヒトが好ましい。

[0064] 本発明の医薬組成物の投与方法は、有効成分が疾患部位に到達できる方法であれば特に限定されないが、経口投与、静脈内投与、点滴・輸液投与、冠動脈内投与、吸入投与、筋肉内投与、皮下投与、座剤、腹腔・胸腔内投与、経粘膜投与、経皮投与、臓器用の注射用製剤、又は貼付投与等があるが、一

一般的には経口投与である。また、これらの医薬組成物含有する生体分解性高分子を用いたマイクロスフェア徐放性製剤、及びナノスフェア製剤の場合には、静脈内投与、点滴・輸液投与、動脈内投与、吸入投与、筋肉内投与、皮下投与、座剤、腹腔・胸腔内投与、経粘膜投与、経皮投与、貼付剤、臓器用の注射用製剤、又は臓器貼付投与等であるが、一般的には皮下投与、筋注投与、臓器貼付投与、静注投与、又は吸入投与である。

[0065] 9. 本発明の医薬組成物の投与方法

本発明の医薬組成物に含まれる本薬剤等の量は、本薬剤の種類とその剤形、年齢、体重、症状、治療効果、投与間隔、または投与経路によって異なるが、経口剤の場合、各々の長期毒性試験結果、及び第Ⅰ相臨床試験における最大耐量の範囲から適宜選択することができる。下限は特に限定されず目的の効果が得られる投与量であればよい。

[0066] 例えば、通常、臨床における最大投与量として、(B) カモスタットメシル酸塩は1日量として600mg (10mg/kg) を3回に分けて、(C) オザグレル塩酸塩水和物は1日量400mg (6.7mg/kg) を2回に分けて、(D) シロスタゾールは1日量200mg (3.3mg/kg) を2回に分けて、(E) ピルフェリドンは、1日量1,800mg (30mg/kg) を3回に分けて (G) ニンテダニブエタンスルホン酸塩は1日量300mg (5mg/kg) を2回に分けて経口投与されている。

[0067] また、(H) テオフィリンは、1日量400mg (6.7mg/kg) を2回に分けて、(I) シルデナフィルは、50mg (0.83mg/kg) を1日1回、(J) ロバスタンは1日20mg (0.33mg/kg) にて経口投与されている。

[0068] 投与期間は、疾患とその治療法により、安全性、利便性、患者負担、コンプライアンス等を考慮して適宜決定される。効果が期待でき、利便性のよい投与間隔であればいずれでもよいが、経口剤の場合は、1日1回、1日2回、又は1日3回が好ましいが、1日に1回から2回の範囲がより好ましい。

[0069] 臨床試験における副作用は、以下の通りである。

[0070] (B) カモスタットメシル酸塩は1日量として600mgでも認めなかったが、慢性膵炎における急性症状の緩解における承認時までの調査及び市販後調査

において副作用集計の対象となった3,806例中69例（1.8%）に83件の副作用（臨床検査値の異常を含む）が認められた。主なものは発疹15件（0.4%）、そう痒9件（0.2%）、嘔気10件（0.3%）、腹部不快感7件（0.2%）、腹部膨満感6件（0.2%）等であった（再審査終了時）。

[0071] (C) オザグレル塩酸塩水和物は1日量400mgでも出血時間の軽度延長を認めただけ以外は安全性に問題ないことが確認されている。承認時までの調査及び市販後調査において副作用集計の対象となった7,694例中154例（2.0%）に194件の副作用（臨床検査値の異常を含む）が認められた。主なものはAST（GOT）・ALT（GPT）の上昇等25件（0.3%）、嘔気21件（0.3%）、そう痒16件（0.2%）、発疹12件（0.2%）、胃・腹部不快感9件（0.1%）、出血傾向9件（0.1%）等であった（再審査終了時）。

[0072] (D) シロスタゾールは、慢性動脈閉塞症に基づく潰瘍、疼痛及び冷感等の虚血性諸症状の改善における使用成績調査では、安全性解析の対象となった3,335例中、臨床検査値の異常を含む副作用が209例（6.3%）に認められた。主な副作用は、頭痛・頭重感（3.4%）、動悸（0.7%）、めまい（0.5%）、下痢（0.3%）、悪心・嘔吐（0.3%）であった（プレタール錠再審査終了時）。

[0073] (E) ピルフェリドンは、承認時における安全性評価対象例265例中、副作用は233例（87.9%）に認められた。主なものは、光線過敏症137例（51.7%）、食欲不振61例（23.0%）、胃不快感37例（14.0%）、嘔気32例（12.1%）であった。また、臨床検査値の異常変動は安全性評価対象例265例中120例（45.3%）に認められた。主なものは、 γ -GTP上昇53例（20.0%）であった。

[0074] (G) ニンテダニブエタンスルホン酸塩は、第III相国際共同試験の2試験は1061例を対象に実施され、638例に本剤が投与された。これらの2試験は、本剤150mgの1日2回投与で52週間の無作為化、二重盲検のプラセボ対照試験全体での主な副作用は、下痢342例（53.6%）、悪心122例（19.1%）、肝酵素上昇67例（10.5%）及び腹痛65例（10.2%）であった（承認申請時）。

- [0075] (H) テオフィリンは、承認時の安全性解析対象症例939 例中85 例 (9.05%) に副作用が認められ、主な副作用は悪心・嘔気38 件 (4.05%)、頭痛24 件 (2.56%)、腹痛14 件 (1.49%)、食欲不振12 件 (1.28%)、動悸11 件 (1.17%) であった。
- [0076] (I) シルデナフィルは、承認時の国内臨床試験157 例において、65 例 (41.40%) に副作用又は臨床検査値異常が認められた。主な副作用又は臨床検査値異常は、血管拡張 (ほてり、潮紅) 17 例 (10.83%)、頭痛17 例 (10.83%)、CK (CPK) 増加9 例 (5.73%) 等であった。
- [0077] また、(J) ロバスタチンでは、国内・外の臨床試験において、副作用評価対象例10380例中1950例 (18.8%) に臨床検査値異常を含む副作用が認められた。主な副作用は筋肉痛335例 (3.2%)、ALT(GPT)上昇179例 (1.7%)、CK(CPK)上昇171例 (1.6%) であった (承認時)。
- [0078] 一方、本薬剤を含有するマイクロイスフェア徐放性製剤の場合は、1 週間に1 回、2 週間に1 回、4 週間に1 回、又は3 ヶ月に1 回程度の皮下投与、又は筋注投与が好ましい。
- [0079] また、本薬剤を含有するナノイスフェア製剤の場合には、1 日に1 回、3 日に1 回、1 週間に1 回、2 週間に1 回、又は4 週間に1 回程度の静注投与、又は皮下投与が好ましい。
- [0080] 本発明の薬剤、又は本発明の薬剤と他の薬剤の併用剤を投与する際には、経口投与のための内服固形剤、内服用液剤、及び非経口投与のための注射剤、皮下・筋注剤、外用剤、座剤、吸入剤等として用いられる。
- [0081] これらの徐放性製剤の間歇投与における1 回投与量は、経口投与での総投与量以下であればよく、一般的には総投与量の1/10以下の投与量が用いられる。
- [0082] 本発明の経口剤の場合には、市販されている医薬品製剤をそのまま使用してもよい。経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。また、カプセル剤には、ハードカプセル、及びソフトカプセルが含まれる。

このような内服用固形剤においては、1つまたはそれ以上の活性物質はそのままか、又は各種塩の形にて、賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定化剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒソロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆してもよく、また2以上の層で被覆してもよい。さらにゼラチンの様な吸収されうる物質のカプセルも包含される。

[0083] 経口投与のための内服用液剤は、薬剂的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、1つまたはそれ以上の活性物質、又は各々の塩の形で、一般に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁、又は乳化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁剤、乳化剤、甘味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

[0084] 本発明の持続性製剤としては、有効成分を血中濃度、もしくは心臓組織にて持続的に供給できればよく、その製剤形態は限定されない。例えば、徐放性製剤（例えば、マイクロカプセル製剤、マイクロスフェア製剤、ナノスフェア製剤等）の皮下注投与、筋注投与、静注投与、及び心臓貼付投与等が挙げられる。

[0085] 本発明のマイクロカプセル製剤、マイクロスフェア製剤、ナノスフェア製剤とは、好ましくは、活性成分として任意の有効成分と、生体内分解性高分子とを含有する、微粒子状の医薬組成物である。

[0086] 本発明の薬物徐放システムは、生体吸収性高分子を含み、具体的には、天然高分子、または合成高分子を含む。これらからの徐放速度の制御機構には、分解制御型、拡散制御型、および膜透過制御型等がある。

[0087] 本発明の生体吸収性高分子である天然高分子では、植物産生多糖（例えば、セルロース、デンプン、アルギン酸等）、動物産生多糖およびタンパク質（例えば、キチン、キトサン、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、グルコサミノグリカン等）、微生物産生ポリエステルおよび多糖（例えば、ポリ-3-ヒドロキシアルカノエート、ヒアルロン酸等）等が用いられる。

[0088] また、生体内分解性重合体とは、脂肪酸エステル重合体またはその共重合体、ポリアクリル酸エステル類、ポリヒドロキシ酪酸類、ポリアルキレンオキサレート類、ポリオルソエステル、ポリカーボネートおよびポリアミノ酸類が挙げられ、これらは1種類またはそれ以上混合して使用することができる。脂肪酸エステル重合体またはその共重合体とは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリクエン酸、ポリリンゴ酸、ポリエチレンサクシネート、ポリブチレンサクシネート、ポリ- ϵ -カプロラクトン、ポリブチレンテレフタレート・アジペートまたは乳酸-グリコール酸共重合体が挙げられ、これらは1種類またはそれ以上混合して使用することができる。その他に、ポリ α -シアノアクリル酸エステル、ポリ β -ヒドロキシ酪酸、ポリトリメチレンオキサート、ポリオルソエステル、ポリオルソカーボネート、ポリエチレンカーボネート、ポリ γ -ベンジル-L-グルタミン酸、ポリビニルアルコール、ポリエステルカーボネート、ポリ酸無水物、ポリシアノアクリレート、ポリホスファゼンまたはポリ-L-アラニンの1種類またはそれ以上混合も使用することができる。好ましくは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸または乳酸-グリコール酸共重合体であり、より好ましくは、乳酸-グリコール酸共重合体である。

[0089] 本発明に使用されるこれらの生体内分解性高分子重合体の平均分子量は約2,000ないし約800,000のものが好ましく、より好ましくは約5,000ないし約200,000である。例えば、ポリ乳酸において、その重量平均分子量は約5,000から約100,000のものが好ましい。さらに好ましくは約6,000から約50,000である。ポリ乳酸は、自体公知の製造方法に従って合成できる。乳酸-グリコール酸共重合体において

は、その乳酸とグリコール酸との組成比は約100/0から約50/50 (W/W) が好ましく、特に約90/10から50/50 (W/W) が好ましい。乳酸-グリコール酸共重合物の重量平均分子量は約5,000から約100,000が好ましい。さらに好ましくは約10,000から80,000である。乳酸-グリコール酸共重合物は、自体公知の製造方法に従って合成できる。また初期バーストを抑制するために、塩基性アミノ酸類（例えばアルギン酸等）等を添加してもよい。

[0090] 本明細書中、重量平均分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）で測定したポリスチレン換算の分子量をいう。

[0091] 前記した生体内分解性高分子重合物は、本発明の目的が達成される限り、有効成分の薬理活性の強さと、目的とする薬物放出によって変えることができ、例えば当該生理活性物質に対して約0.2ないし10,000倍（質量比）の量で用いられ、好ましくは約1ないし1,000倍（質量比）、さらに好ましくは約1ないし100倍（質量比）の量で用いるのがよい。

[0092] 本発明のマイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノカプセルの製造方法としては、例えば水中乾燥法（例えば、o/w法、w/o法、w/o/w法等）、相分離法、噴霧乾燥法、超臨界流体による造粒法あるいはこれらに準ずる方法などが挙げられる。

[0093] 以下に水中乾燥法（o/w法）と噴霧乾燥法について、具体的な製造方法を記述する。

[0094] (1) 水中乾燥法（o/w法）本方法においては、まず生体内分解性重合物の有機溶媒溶液を作製する。本発明のマイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノカプセルの製造の際に使用する有機溶媒は、沸点が120℃以下であることが好ましい。有機溶媒としては、例えばハロゲン化炭化水素（例、ジクロロメタン、クロロホルム等）、脂肪族エステル（例、酢酸エチル等）、エーテル類、芳香族炭化水素、ケトン類（アセトン等）等が挙げられる。これらは2種以上適宜の割合で混合して用いてもよい。好ましい有機溶媒は、ジクロロメタン、アセトニトリルである。有機溶媒は、好ましくはジクロ

ロメタンである。

生体内分解性重合物の有機溶媒溶液中の濃度は、生体内分解性重合物の分子量、有機溶媒の種類などによって異なるが、一般的には約0.01～約80% (v/w) から選ばれる。

好ましくは約0.1～約70% (v/w)、さらに好ましくは約1～約60% (v/w) である。

[0095] このようにして得られた生体内分解性重合物の有機溶媒溶液中に、有効成分を添加し、溶解させる。この有効成分の添加量は、薬物の種類、血管形成作用および効果の持続時間等により異なるが、生体内分解性高分子重合物の有機溶媒溶液中の濃度として、約0.001%～約90% (w/w)、好ましくは約0.01%～約80% (w/w)、さらに好ましくは約0.3～30% (w/w) である。

[0096] 次に、このようにして調製された有機溶媒溶液をさらに水相中に加えて、攪拌機、乳化機などを用いてo/wエマルジョンを形成させる。この際の水相体積は一般的には油相体積の約1倍～約10,000倍から選ばれる。さらに好ましくは、約2倍～約5,000倍から選ばれる。特に好ましくは、約5倍～約2,000倍から選ばれる。前記外相の水相中に乳化剤を加えてもよい。乳化剤は、一般的に安定なo/wエマルジョンを形成できるものであれば何れでもよい。乳化剤としては、例えばアニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチンなどが挙げられる。これらは適宜組み合わせ使用してもよい。外水相中の乳化剤の濃度は、好ましくは約0.001%～約20% (w/w) である。さらに好ましくは約0.01%～約10% (w/w)、特に好ましくは約0.05%～約5% (w/w) である。

[0097] 油相の溶媒の蒸発には、通常用いられる方法が採用される。その方法としては、攪拌機、あるいはマグネチックスターラー等で攪拌しながら常圧もしくは徐々に減圧して行なうか、ロータリーエバポレーターなどを用いて、真

空度を調節しながら行なう。このようにして得られたマイクロスフェアは遠心分離法あるいはろ過して分取した後、マイクロスフェアの表面に付着している遊離の有効成分、乳化剤などを、例えば界面活性剤溶液またはアルコール等で数回繰り返し洗浄した後、再び、蒸留水または賦形剤（マンニトール、ソルビトール、ラクトース等）を含有した分散媒などに分散して凍結乾燥する。前記した o/w 法においては、有効成分を生体内分解性重合物の有機溶媒溶液中に分散させる方法、すなわち $s/o/w$ 法によりマイクロスフェアを製造してもよい。

[0098] (2) 噴霧乾燥法によりマイクロスフェアを製造する場合には、生体内分解性重合物と有効成分を溶解した有機溶媒またはエマルジョンを、ノズルを用いてスプレードライヤー装置（噴霧乾燥機）の乾燥室内へ噴霧し、きわめて短時間に微粒化液滴内の有機溶媒または水を揮発させマイクロスフェアを調製する。ノズルとしては、二液体ノズル型、圧力ノズル型、回転ディスク型等がある。このとき、所望により、 o/w エマルジョンの噴霧と同時にマイクロスフェアの凝集防止を目的として、有機溶媒または凝集防止剤（マンニトール、ラクトース、ゼラチン等）の水溶液を別ノズルより噴霧することも有効である。このようにして得られたマイクロスフェアは、必要があれば加温し、減圧化でマイクロスフェア中の水分及び溶媒の除去をより完全に行なう。

[0099] フィルム製剤とは、前記の生体内分解性重合物と有効成分を有機溶媒に溶解した後、蒸留乾固し、フィルム状としたものまたは生体内分解性重合物と有効成分を適当な溶剤に溶かした後、増粒剤（セルロース類、ポリカーボネート類等）を加えて、ゲル化したもの等がある。

[0100] 本発明のマイクロスフェア、マイクロカプセル、ナノスフェアは、例えばそのまま、あるいは球状、棒状、針状、ボルト状、糸状、ペレット状、フィルム状、クリーム状の医薬組成物を原料物質として種々の剤型に製剤化することもできる。

[0101] また、この製剤を用いて、局所投与用の非経口剤（例えば、筋肉内、皮下

、皮内、心筋内、腹腔内、気管支内、血管内、肺胞内、血管内皮損傷部位、脳内、髄内、硬膜内、硬膜外、関節内、脊椎内、骨部位、歯周部位および各種臓器内又は臓器表面などへの注射剤、埋め込み剤、顆粒剤、散剤等の固形製剤、懸濁剤等の液剤、貼付剤、フィルム製剤、軟膏剤等、医療用具（ステント、ボルト、縫合糸等）に有効成分を含有させた医療用具含有剤、またはコーティングしたコーティング剤等）などとして投与することもできる。また、血管カテーテル等を用いて、例えば、心筋虚血部等に直接投与することが出来る。

[0102] 例えば、マイクロスフェアを注射剤とするには、マイクロスフェアを分散剤、保存剤、等張化剤、緩衝剤、pH調整剤等と共に水性懸濁剤とすることにより実用的な注射用製剤が得られる。また、植物油あるいはこれにレシチンなどのリン脂質を混合したもの、あるいは中鎖脂肪酸トリグリセリド（例、ミグリオール812等）と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる注射剤とする。

[0103] マイクロスフェアの粒子径は、例えば懸濁注射剤として使用する場合にはその分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば平均粒子径として約0.1～約300 μ mの範囲が挙げられる。好ましくは、約1～150 μ m、さらに好ましくは、約2～100 μ mの範囲の粒子径である。本発明の医薬組成物は、前記のように懸濁液であることが好ましい。本発明の医薬組成物は微粒子状であることが好ましい。なぜならばその医薬組成物は、通常の皮下あるいは筋肉内注射に使用される注射針を通して投与される方が、患者に対し過度の苦痛を与えることがないからである。本発明の医薬組成物は特に注射剤として好ましい。マイクロスフェアを無菌製剤にするには、製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

[0104] 本発明の医薬組成物は、有効成分の作用が徐放性を有し、生体内分解性重合物の種類、配合量などによりその徐放期間は異なるが、通常1週から3カ月の徐放期間を有するので、（虚血性）臓器障害部において各種化合物を徐

々に放出し、障害部位で高濃度の維持製剤として用いることができる。

[0105] 本発明の医薬組成物の投与量は、有効成分の種類と含量、剤型、薬物放出の持続時間、投与対象動物などにより異なるが、有効成分の有効量であればよい。例えばマイクロスフェアとして虚血部位に使用する場合、1回当りの投与量として、成人（体重50kg）当たり、有効成分として約0.001mgから500mg、好ましくは約0.01mgから100mgを1日ないし3カ月に1回投与すればよい。

[0106] 本発明においては、目的に応じて、これらの化合物類、現在使用されているβブロッカー、ARB、ACE阻害剤等との降圧剤、及びPGのIP受容体作動薬、同EP2及び同EP4受容体作動薬から選択される2種以上の薬物を組み合わせて併用投与することも好ましい。なお、上記薬物は市販品として入手するか、もしくは公知の方法に準じて容易に製造することができる。

[0107] 本発明の投与形態としては、長期投与となるため、経口投与が主となるが、各々の活性体のマイクロスフェア製剤の場合は非経口投与である間歇皮下投与、または間歇筋注投与等であり、ナノスフェア製剤の場合は、間歇静注投与、間歇皮下注投与、及び間歇筋注投与等が主となる。

[0108] 徐放性製剤であるマイクロスフェア製剤、及びナノスフェア製剤等は非経口投与であるため、経口投与での生物学的利用度（BA）、及び吸収率の低い化合物に対して応用が適している。また、点滴静注が必要な化合物の場合は、間歇皮下投与、又は間歇筋注投与等により長期間点滴静注様の血中動態を示すため、投与利便性の向上、副作用回避、及び効果持続性により有用性が増加する。

[0109] 一方、ナノスフェアの場合には、経口吸収性の向上も期待できる。

[0110] 例えば、カモスタットメシル酸塩は消化管内エステラーゼにより多くが失活するため、自体プロドラッグに修飾されているが、尚、活性体の吸収率は低い。よって、乳酸-グリコール酸共重合体マイクロスフェア（PLGA・MS）製剤の間歇皮下投与又は筋注投与は持続した活性体の血中濃度維持のため有効性が飛躍的に向上する。

- [0111] また、点滴注射剤であるシベレスタットナトリウム水和物は、同様にPLGA・MS製剤として間歇皮下投与することにより長期間点滴静注様の血中動態が得られ、利便性が向上し、例えば慢性閉塞性肺疾患（COPD）の様な慢性疾患に対しても有用性が発揮される。一方、ナノスフェアーの場合には、経口吸収性の向上及び疾患局所集積性も期待できる。
- [0112] 本発明は、重症心臓疾患患者に対する新たな治療法として、生命予後を改善し、QOLを飛躍的に高めることが期待できる。また、これらの薬剤の組み合わせにより、心不全の進行を遅らせることにより、心臓移植やLVAD装着の回避や遅延を可能とする心血管・心筋再生療法は、画期的な新しい心不全治療法となる。加えて、早期治療介入により、疾患の重症化を抑制すると共に、心臓移植やLVADと比較して安価で根治的治療が可能となり、医療経済へも貢献すると期待される。
- [0113] 拡張型心筋症等である特定疾患・難治性疾患治療研究は陽の目を見てこなかった。これまでは希少疾病であるが故に取り残されてきたが、本発明は、かかる未解決の課題の解決に資するものである。
- [0114] 本発明は、希少疾病疾患である拡張型心筋症や難治性心疾患の治療法である人工心臓、心臓移植、及び細胞療法に代わり、経口投与での早期治療介入にて、低侵襲性、汎用性、経済性ある心血管・心筋再生療法剤を開発することにより、心臓移植やLVAD装着を遅らせたり回避することが可能となる。また、LVAD装着後のLVAD離脱促進、虚血性心筋症におけるバイパス手術後の維持療法としても有用である。
- [0115] 本発明化合物である蛋白分解酵素阻害剤、ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、トロンボキサン（TX） A_2 生合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、及び抗線維化剤は、ラット長期経口投与毒性試験での最大安全量（NOAEL）及び臨床投与量を基準とした投与量にて、ラット冠動脈完全虚血モデル、自然発症拡張型心筋症ハムスターの心疾患モデル動物にて評価した結果、これらは全て媒体対照群に対して有意な有効性を示した。また、これらのPLGA・MS製剤は、反復経口投与での総投与量

の1/10以下で4週間に1回の間歇皮下投与において有効性を示した。これらの化合物は、現在降圧剤として臨床使用されている、 β ブロッカー、ARB、及ACE阻害剤等との併用投与が可能であり、全て経口医薬品製剤として市販されており、ヒトに対して安全であることが確認されている。

実施例

[0116] 以下、実施例によって本発明を具体的に詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0117] 尚、実施例に示した医薬品類及び化合物類を以下に示す。尚、実施例記載においては、これらの略語（塩を含まない一般名）又は化合物記号（A~O及びB・MS、C・MS、I・MS）にて記載する場合もある。

これ等は、下記記載会社から市販されており、一般に購入することができる。各被験物質名、作用機序、適応症、及び市販会社名を表1に示す。

[0118] （被験物質）

（1）プロスタグランジンI P受容体作動薬

i) (A) ONO-1301 (CAS : 176391-41-6) (小野薬品/Sigma-Aldrich)

ii) (F) ベラプロストナトリウム (CAS : 88475-69-8) (アステラス/Cayman社)

（2）蛋白分解酵素阻害剤；（B）カモスタットメシル酸塩CAS : 59721-29-8）（小野薬品/和光純薬）

（3）トロンボキサンA2合成酵素阻害剤；（C）オザグレル塩酸塩水和物（CAS : 78712-43-3）（小野薬品/東京化成工業）

（4）ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤；

i) PDE III阻害剤；（D）シロスタゾール（CAS : 73963-72-1）（大塚製薬/東京化成工業）

ii) PDEV阻害剤；（I）シルデナフィルクエン酸塩（CAS : 171599-83-0）（ファイザー/SIGMA）

iii) 非選択的PDE阻害剤；（H）テオフィリン（CAS : 58-55-9）（大塚製薬/ナカライテスク）

(5) 抗線維化剤；(E)ピルフェニドン (CAS : 53179-13-8) (塩野義製薬/東京化成工業)

(6) チロシンキナーゼ阻害剤；(G) ニンテダニブエタンスルホン酸塩 (CAS : 656247-18-6 (日本ベーリンガーインゲルハイム/LCラボラトリーズ)

(7) HMG-CoA還元酵素阻害剤；(J) ロスバスタチンカルシウム (CAS : 147098-20-2)

(アストラゼネカ/ 東京化成)

(8) (K) カンデサルタンシレキセチル (ARB) (CAS : 145040-37-5) (武田薬品/東京化成)

(9) (0) カルベジロール (CAS : 72956-09-3) (ファイザー/東京化成)

[0119] [表1]

一般名	作用機序	対象疾患	
(B)カモスタット	蛋白分解酵素阻害剤	慢性膵炎における急性症状の緩解、及び術後逆流性食道炎	小野薬品等
(E)ピルフェリドン	TGF-β減少	特発性肺線維症	塩野義製薬
(G)ニンテダニブ	チロシンキナーゼ阻害剤	特発性肺線維症	ベーリンガー・インゲルハイム
(D)シロスタゾール	PDE III 阻害剤	慢性動脈閉塞症に基づく潰瘍、疼痛及び冷感等の虚血性諸症状の改善、及び脳梗塞(心原性脳塞栓症を除く)発症後の再発抑制剤	大塚製薬等
(C)オザグレル	TXA2合成酵素阻害剤	気管支喘息	キッセイ/小野薬品等
(I)シルデナフィル	PDE V 阻害剤	勃起不全治療薬	ファザー
(H)テオフィリン	非選択的PDE阻害剤	気管支喘息、喘息性(様)気管支炎、慢性気管支炎、肺気腫	大塚製薬等
(J)ロバスタチン	HMG-CoA還元酵素阻害剤	高コレステロール血症、及び家族性高コレステロール血症薬	アストラゼネカ等

[0120] (投与量設定根拠)

薬効薬理試験に使用した被験物質の投与量設定根拠を以下に示す。各々の根拠となるデータは、本発明者自身のバックグラウンド資料、及び各々のインタ

ビューフォームから引用した。

(A) ONO-1301 ; 自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターを用いた最小有効投与量は、0.3~1 mg/kgであった。また、ラット及びイヌ反復経口投与における無毒性量は、3 mg/kgであるため、確実に効果が確認出来る投与量として、3 mg/kg × 2回/日を設定した。

(B) カモスタットメシル酸塩 ; コリン欠乏食で飼育したマウスにエチオニンの投与により作成したエチオニン膵炎に20~300mg/kgを1日2回経口投与すると、膵臓内の蛋白分解酵素活性の上昇を抑制 (300mg/kg) し、死亡率を低下 (20~300mg/kg) させた。

また、ラット6箇月反復経口投与において、550 mg/kg以上で体重増加抑制が認められたので、最大安全量は235 mg/kg~550 mg/kgである。よって、投与量として150 mg/kg × 2回/日を設定した。

(C) オザグレル塩酸塩水和物 ; 感作ラット及び感作モルモットの抗原誘発気道収縮を100mg/kg、及び300mg/kgの経口又は十二指腸内投与で抑制した。

[0121] また、ラット3箇月反復経口投与において、500 mg/kg以上で尿中Na、K及び白血球の増加、血清Caの減少が認められ、無影響量は150 mg/kgであるため、投与量として50 mg/kg × 2回/日を設定した。

(D) シロスタゾール ; ADPあるいはコラーゲン注入により誘導されるマウス肺塞栓モデルにおいて、シロスタゾールはADPに対しては30mg/kg、コラーゲンに対しては10mg/kgの前投与 (経口) により有意に肺塞栓死を抑制した。

[0122] また、ラット13週間反復経口投与では高用量で肝重量の増加が認められ、無毒性量は30 mg/kgであるため、投与量として30 mg/kg × 2回/日を設定した。

(E) ピルフェニドン ; BLM誘発マウス肺線維症モデルにおいて、ピルフェニドンはBLM投与に伴うヒドロキシプロリン量の増加が用量依存的に抑制され、抗線維化における最小有効投与量は30 mg/kg/日であった。

また、ラット1箇月反復経口投与では100 mg/kg以上で肝薬物代謝酵素活性の上昇が認められ、無毒性量は100 mg/kgであるため、投与量として50 mg/kg ×

2回/日を設定した。

(F) ベラプロストナトリウム；ラウリン酸誘発ラット後肢循環障害モデルにおいて、300 μ g/kg/日7日間連続経口投与で後肢の障害を有意に改善した。

[0123] また、ラットにおける12箇月間反復経口投与毒性試験において、0.1 mg/kg/日以上で四肢、耳介及び鼻端の紅潮等が認められ、無影響量は0.01 mg/kg/日であった。よって、最大投与量として0.1 mg/kg \times 2回/日を設定した。

(G) ニンテダニブエタンスルホン酸塩；ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける、ニンテダニブの予防的投与（ブレオマイシン投与後0日目から14日目に投与）及び治療的投与（ブレオマイシン投与後7日目から21日目に投与）による肺線維症及び肺炎症抑制作用が検討されている。ニンテダニブは30及び60 mg/kgの用量で1日1回強制経口投与した結果、予防的投与では肺線維症に対する阻害効果は、30 mg/kg投与より60 mg/kg投与の方がわずかに高かった。治療的投与では、60 mg/kg投与のみで炎症及び線維化の両方に対する明らかな作用が認められている。

また、ラット6ヵ月間反復投与毒性試験において、20 mg/kg/日で赤血球数減少、PCV減少、ヘモグロビン減少、器官重量減少（胸腺，副腎）等が見られ、無毒性量は5 mg/kgであった。よって、投与量として、5 mg/kg \times 2回/日を設定した。

(H) テオフィリン；Fischer344系ラットにテオフィリンを13週間経口投与したところ、37.5 mg/kgより腸間膜リンパ節付近の動脈の動脈周囲炎の増加とMCH（平均赤血球血色素量）の増加が認められた。よって、最大投与量として、20 mg/kg \times 2回/日を設定した。

(I) シルデナフィルクエン酸塩；SD系ラットにシルデナフィルを6ヵ月間経口投与した結果、60 mg/kg 群では肝臓重量の増加、小葉中心性の肝細胞の肥大、甲状腺濾胞上皮の肥大が認められた。無毒性量は60 mg/kg/日であった。よって、投与量として、30 mg/kg \times 2回/日を設定した。

(J) ロスバスタチンカルシウム；ラット1ヵ月、3ヵ月及び6ヵ月の反復経口投与試験の無毒性量は、それぞれ15 mg/kg、10 mg/kg及び2 mg/kgであった。

よって、投与量として、5 mg/kg×2回/日を設定した。

(K) カンデサルタンシレキセチル；高血圧自然発症ラット（SHR）に0.1、1及び10mg/kgを2週間経口投与すると、用量に依存して血圧を下げ、血漿レニン濃度を上昇させた。また、ラット6ヶ月毒性試験での無毒性量は10mg/kg、イヌ6ヶ月毒性試験での無毒性量は20mg/kgであった。よって、安全量として、3mg/kg×1回/日を設定した。

(O) カルベジロール；カルベジロールは、 $\alpha 1$ 受容体と β 受容体の両者を遮断する作用を有し、高血圧と狭心症の治療薬として開発された。その後、更なる開発により慢性心不全及び頻脈性心房細動への作用が確認された。主体は β 遮断作用で降圧作用は主としてこれに基づくが、 β 受容体を遮断することにより、内因性的カテコールアミンの $\alpha 1$ 受容体作用が強まり血管収縮が起こることがあるため、その抑制を目的に $\alpha 1$ 受容体遮断作用が付加された薬物である。投与量は臨床投与量とした。

[0124] また、以下の生体分解性高分子内包マイクロスフェア製剤は、以下PLGA・MS持続性製剤の製造例において、製剤1～3として製造することが可能である。

[0125] 投与量設定根拠を以下に示す。

(B・MS) カモスタットMS（製剤2）

カモスタットのラット皮下投与におけるLD50；1329 mg/kgであるため、その約1/10量の100 mg/kgの4週に1回の間歇皮下投与を設定した。また、臨床投与量としては、活性体であるカモスタットの臨床投与量は200 mg×3回/日で計600 mg/日であるため、その1/28である10 mg/kgの4週に1回の間歇皮下投与を設定した。

[0126] (C・MS) オザグレルMS（製剤1）

オザグレルのラット皮下投与におけるLD50；2049 mg/kgであるため、その1/40量である50 mg/kgの4週に1回の間歇皮下投与を設定した。

[0127] (I・MS) シルденаフィルMS（製剤3）

シルденаフィルのラット静注投与における致死量は10 mg/kg以上であり、経

口投与では1000 mg/kg以上であるためその1/30である30 mg/kgの4週に1回の間歇皮下投与を設定した。

[0128] [表2]

表2: 降圧作用を示さない候補薬剤群(α_1 βブロッカーとの併用)

記号	一般名 (経口剤)	最大臨床投与 量 mg/人/日 (P.O.)	臨床投与量 mg/kg/日	最大安全量* mg/kg×2回/日 (スクリーニング1)	最小有効投与量** mg/kg×2回/日 (スクリーニング2)
B	カモスタット	600 200mg×3回	10mg/kg	150mg/kg	5mg/kg
G	ニンテダニブ	300 150mg×2回	5mg/kg	5mg/kg	2.5mg/kg
E	ピルフェリドン	1800 600mg×3回	30mg/kg	50mg/kg	15mg/kg
C	オザグレール	400 200mg×2回	6.7mg/kg	50、10mg/kg	3.3mg/kg
D	シロスタゾール	200 100mg×2回	3.3mg/kg	30mg/kg	1.7mg/kg
I	シルденаフィル	50 50mg×1回	0.83mg/kg	30mg/kg	0.4mg/kg
B・MS	カモスタットMS	—	—	100mg/kg/4w (s.c.)	MS: 10mg/kg/4W (s.c.)
O	カルベジロール	20 20mg×1回	0.33mg/kg	—	0.17mg/kg

[0129] 以下、各種薬効薬理試験結果例を具体的に詳述する。

[0130] 1. 自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルでの効果の検討

各種医薬品の投与量はラットを用いた長期毒性試験での無毒性量を根拠として設定した。 δ -筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) 雄性ハムスター(日本SLC株式会社)を18週齢にて納入し、2週間の検疫・馴化後、心エコー検査を行った。EF値が25%以下、及び55%以上の動物は除外とし、他をEF値及び体重を指標にして層別無作為化割付法により各投与群が均等になるように振り分けた。

[0131] 各種医薬品 (A~K, O) を1日2回 (8時間以上の間隔)、強制経口投与を行い、4週及び8週後 (解剖前) に心エコー検査を行い、各群の投与開始前 (群分け) との差 (変化量; Δ)、及び媒体群 (1群) における心機能 (EF値

及びFS%等)と比較検討した。また、投与8週間後に心臓を摘出し、電顕、RNA・蛋白測定、及び各種免疫病理用標本を採取し、評価した。

[0132] 以下、3試験の体重変化及び心機能変化を詳述する。

1) 試験1 (A~E) の無毒性量における効果を検討した。

[0133] 2) 群構成を表3に示す。

[表3]

群	被験物質	投与量 (×2回/日) *	動物数
1	Control (媒体)	-	8~10
2	A (ONO-1301)	3 mg/kg	8
3	B (カモスタット)	150 mg/kg	8
4	C (オザグレレ)	50 mg/kg	8
5	D (シロスタゾール)	30 mg/kg	8
6	E (ピルフェリドン)	50 mg/kg	8

[0134] * : 記載投与量×2回/日の8週間反復強制経口投与を行い、1回目と2回目の投与には8時間以上間隔を設けた。尚、投与容量は5 mL/kg (1回あたり) とした。

[0135] 各医薬品は、0.5%CMC-Na (カルボキシメチルセルロースナトリウム ; 和光純薬) に用時懸濁して投与した。尚、Bは、0.5%MC (メチルセルロース400 ; 和光純薬) にて用時懸濁して投与した。1群 (Control) は、0.5%CMC-Na (媒体) を投与した。

[0136] 結果 ; (1) 体重変化 (表4)

(A) ONO-1301投与群、(B) カモスタットメシル酸塩投与群、(C) オザグレレ塩酸塩水和物投与群、(D) シロスタゾール投与群及び (E) ピルフェリドン投与群は、いずれも被験物質投与8週間後までControl群とほぼ同様の体重推移を示し、毒性は発現していないことが確認された。

[0137]

[表4]

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	Body weight (g)								
			0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W
Control	-	9	110.0 ±14.5	114.2 ±9.0	117.7 ±7.9	119.8 ±8.2	121.9 ±8.2	122.7 ±7.9	124.3 ±7.3	123.5 ±8.4	123.3 ±9.3
ONO-1301	3	8	112.5 ±6.5	115.0 ±7.1	118.0 ±7.3	119.1 ±7.3	120.2 ±6.9	120.7 ±6.6	121.9 ±6.6	122.1 ±6.6	120.6 ±7.2
カモスタットメシル塩酸	150	8	113.1 ±9.8	114.4 ±9.5	117.7 ±9.1	119.0 ±9.8	121.3 ±10.1	121.9 ±11.1	122.2 ±12.0	120.9 ±11.7	118.1 ±11.3
オザグレル塩酸塩 水和物	50	8	114.6 ±13.6	118.8 ±10.0	121.1 ±8.7	123.1 ±8.6	124.0 ±9.0	125.0 ±9.4	125.5 ±10.0	125.4 ±10.6	125.0 ±11.2
シロスタゾール	30	8	111.3 ±4.9	112.6 ±4.9	114.6 ±5.7	116.6 ±5.4	118.0 ±5.4	118.5 ±5.4	120.3 ±5.4	120.9 ±6.1	120.6 ±7.0
ピルフェエドソン	50	8	116.1 ±9.2	116.3 ±9.9	118.3 ±10.5	119.5 ±10.7	121.4 ±11.7	122.7 ±12.4	123.5 ±13.1	123.7 ±12.2	121.5 ±11.8

[0138] それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

コントロールと比較して有意な差は認められなかった (Student' s t-test 又はAspin-Welch' s test)。

[0139] (2) 心機能検査 (EF値) ; (表5)

群分け時 (0W) ; A~Eのいずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。

4 W値 ; 実測値、変化量ともにA~Eの各投与群は、Control群と比較して有意な増加 (P<0.01 vs Cont群) が認められた。

8 W値 ; 実測値、変化量ともにA~Eの各投与群は、Control群と比較して有意な増加 (P<0.01 vs Cont群) が認められた。

[0140] [表5]

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	EF (%)		
			0 W	4 W	8 W
Control	-	9	43 ± 2	36 ± 2 < -7 ± 2 >	31 ± 4 < -12 ± 4 >
ONO-1301	3	8	43 ± 2	45 ± 3 ** < 2 ± 4 > **	43 ± 3 ** < 1 ± 4 > **
カモスタットメシル塩酸	150	8	43 ± 2	42 ± 3 ** < -1 ± 3 > **	41 ± 3 ** < -3 ± 4 > **

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	EF (%)		
			0 W	4 W	8 W
オザグレル塩酸塩 水和物	50	8	43 ± 3	43 ± 3 ** < -1 ± 3 > **	43 ± 2 ** < -1 ± 4 > **
シロスタゾール	30	8	43 ± 2	43 ± 3 ** < 0 ± 3 > **	41 ± 3 ** < -2 ± 4 > **
ビルフェニドン	50	8	43 ± 2	42 ± 3 ** < -1 ± 2 > **	40 ± 3 ** < -3 ± 3 > **

[0141] <> : 0Wと比較した変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

E.F. : 左室駆出分画 (ejection fraction)

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test) 。

[0142] (3) 心機能検査 (FS%) ; (表6)

群分け時 (0W) ; A~Eのいずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。

4W値 ; 実測値、変化量ともにA~Eの各投与群は、Control群と比較して有意な増加 ($P < 0.01$ vs Cont群) が認められた。

8W値 ; 実測値、変化量ともにA~Eの各投与群は、Control群と比較して有意な増加 ($P < 0.01$ vs Cont群) が認められた。

[0143] [表6]

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	%FS		
			0 W	4 W	8 W
Control	-	9	17 ± 1	14 ± 1 < -3 ± 1 >	12 ± 2 < -6 ± 1 >
ONO-1301	3	8	17 ± 1	18 ± 2 ** < 1 ± 2 >	17 ± 2 ** < 0 ± 2 >
カモスタットメシル塩酸	150	8	17 ± 1	17 ± 1 ** < 0 ± 1 >	16 ± 2 ** < -1 ± 2 >

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	%FS		
			0 W	4 W	8 W
オザグレル塩酸塩 水和物	50	8	17 ± 2	17 ± 1 ** < -1 ± 1 >	17 ± 1 ** < 0 ± 2 >
シロスタゾール	30	8	17 ± 1	17 ± 1 ** < 0 ± 2 >	16 ± 2 ** < -1 ± 2 >
ビルフェニドン	50	8	17 ± 1	17 ± 1 ** < 0 ± 1 >	16 ± 1 ** < -1 ± 1 >

[0144] <> : 0Wと比較した変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

%F.S. : 左室内径短縮率% (fractional shortening)

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test)。

[0145] (4) 内腔壁厚 (LVIDs ; 左室収縮末期径) ; (表7)

LVIDs においては、(B) カモスタット、(C) オザグレール、及び (E) ピルフェリドンの実測値において、Control群と比較して有意な低下が認められた。

[0146]

[表7]

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	LVIDd (mm)			LVIDs (mm)		
			0 W	4 W	8 W	0 W	4 W	8 W
Control	- ^{a)}	9	6.4 ±0.6	6.9 ±0.6	7.6 ±0.7	5.3 ±0.5	5.9 ±0.5	6.7 ±0.7
Compound A	3	8	6.2 ±0.6	6.9 ±0.4	7.6 ±0.5	5.1 ±0.5	5.6 ±0.4	6.2 ±0.6
Compound B	150	8	6.3 ±0.4	6.8 ±0.4	7.3 ±0.3	5.2 ±0.4	5.6 ±0.3	6.1 ±0.3 [*]
Compound C	50	8	6.2 ±0.5	7.1 ±0.4	7.4 ±0.3	5.2 ±0.5	5.9 ±0.3	6.1 ±0.2 [*]
Compound D	50	8	6.4 ±0.3	7.1 ±0.5	7.5 ±0.5	5.3 ±0.3	5.9 ±0.4	6.3 ±0.4
Compound E	50	8	6.3 ±0.4	6.9 ±0.3	7.3 ±0.2	5.2 ±0.4	5.7 ±0.3	6.1 ±0.2 [*]

[0147] a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

LVIDd : diastolic left ventricular internal dimension

LVIDs : systolic left ventricular internal dimension

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test又はAspin-Welch' s test)。

[0148] 自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルで病態発症 20 週齢から 28 週齢まで各種医薬品 (A~E) を 1 日 2 回、8 週間反復経口投与した結果、心機能の EF 及び FS% において、いずれも有意な心機能の改善、又は悪化抑制作用を示した。またいずれも体重への有意な影響は認められなかった。

[0149] 尚、被験物質として使用した (A) ONO-1301 は、本モデルにおける陽性対照として設定した。また、(B) カモスタットメシル塩酸、(C) オザグレール塩酸塩水和物、(D) シロスタゾール、及び (E) ピルフェニドンは、すでに各種疾患に対して医薬品として使用されており、各々の毒性試験から求めた安全量を基準にして投与した結果、拡張型心筋症に対しても有用であることが確認された。

[0150] 1) 試験 2 ; F~J の無毒性量における効果を検討した。

2) 群構成を表 8 に示す。

[0151] [表8]

群	被験物質	投与量 (×2 回/日) *	動物数
1	Control (媒体)	(媒体×2 回)	8~10
2	F (ベラプロスト)	0.1 mg/kg	8
3	G (ニンテダニブ)	5 mg/kg	8
4	H (テオフィリン)	20 mg/kg	8
5	I (シルデナフィル)	30 mg/kg	8
6	J (ロバスタチン)	5 mg/kg	8

[0152] * : 記載投与量×2回/日の8週間反復強制経口投与を行い、1回目と2回目の投与には8時間以上間隔を設けた。なお、投与容量は5 mL/kg (1回あたり) とした。

[0153] 各医薬品は、0.5%CMC-Na (カルボキシメチルセルロースナトリウム ; 和光純薬) に用時懸濁して投与した。尚、Gは、蒸留水にて用時懸濁して投与した

。

[0154] 結果；（１）体重変化（表９）

（F）ベラプロスト投与群、（G）ニンテダニブ投与群、（H）テオフィリン投与群、及び（I）シルデナフィル投与群は、被験物質投与8週間後までControl群とほぼ同様の体重推移を示し、副作用は発現していないことが確認された。一方、（J）ロバスタチンは、被験物質投与後、5週間目から体重減少が確認され、8週においても10%程度の有意な体重減少が認められた。

[0155]

[表9]

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	Body weight (g)								
			0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W
Control	- ^{a)}	10	121.1 ±11.1	122.1 ±10.1	123.8 ±10.1	125.6 ±9.3	127.6 ±9.7	128.8 ±8.4	130.2 ±8.2	131.3 ±8.1	131.1 ±7.7
Compound F	0.1	8	119.9 ±8.6	120.8 ±9.0	122.7 ±9.0	124.9 ±9.3	127.1 ±9.0	128.2 ±9.2	129.6 ±9.3	129.9 ±9.8	130.0 ±10.2
Compound G	5	8	121.6 ±12.3	121.3 ±11.0	122.0 ±11.2	123.8 ±11.7	126.1 ±10.8	127.1 ±10.5	128.5 ±11.3	129.2 ±11.8	128.9 ±12.2
Compound H	20	8	121.4 ±10.5	120.2 ±9.8	120.2 ±9.7	121.0 ±10.0	122.4 ±9.5	122.8 ±9.6	122.6 ±9.9	123.1 ±9.4	123.6 ±9.9
Compound I	30	8	120.4 ±7.9	120.6 ±7.3	122.3 ±7.6	123.7 ±7.7	125.5 ±8.0	126.9 ±8.0	128.9 ±8.6	130.5 ±8.1	130.6 ±8.6
Compound J	5	8	122.9 ±8.4	115.9 ±9.3	118.5 ±8.5	120.8 ±8.5	119.9 ±9.3	120.3 [*] ±8.1	122.2 ±8.1	118.7 ^{**} ±10.0	118.0 [*] ±11.5

[0156] a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d..

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test)。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test)。

[0157] (2) 心機能検査 (EF値) ; (表10)

群分け時 (OW) ; F~Jのいずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。

4 W値 ; (H) テオフィリン及び (J) ロバスタチン以外の (F) ベラプロスト投与群、 (G) ニンテダニブ投与群、及び (I) シルデナフィル投与群の実測値においては、Control群と比較して有意な増加が認められた。変化量においては、 (H) テオフィリン以外の全ての検体においてControl群と比較して有意な増加が認められた。

8 W値 ; 実測値、変化量ともにF~Jの各投与群は、Control群と比較して有意な増加が認められた。

[0158]

[表10]

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	EF (%)		
			0 W	4 W	8 W
Control	- ^{a)}	10	44 ± 2	38 ± 2 < -6 ± 1 >	33 ± 2 < -11 ± 3 >
Compound F	0.1	8	43 ± 3	41 ± 3 < -1 ± 2 >	39 ± 3 < -3 ± 2 >
Compound G	5	8	44 ± 3	41 ± 4 < -2 ± 2 >	39 ± 2 < -5 ± 2 >
Compound H	20	8	43 ± 2	38 ± 2 < -5 ± 2 >	36 ± 3 < -7 ± 4 >
Compound I	30	8	43 ± 2	43 ± 3 < -1 ± 2 >	39 ± 2 < -5 ± 2 >
Compound J	5	8	43 ± 3	39 ± 2 < -4 ± 1 >	37 ± 2 < -6 ± 3 >

[0159] a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p.o., b.i.d.

<> : 0Wと比較した変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

E.F. : 左室駆出分画 (ejection fraction)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test) 。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test) 。

[0160] (3) 心機能検査 (FS%) ; (表 1 1)

群分け時 (OW) ; F~Jのいずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。

4 W値 ; (H) テオフィリンの実測値及び変化量、及び (J) ロバスタチンの実測値以外の (F) ベラプロスト投与群、(G) ニンテダニブ投与群、及び (I) シルデナフィル投与群は実測値及び変化量において、Control群と比較して有意な増加が認められた。(J) ロバスタチンは変化量においてのみ、Control群と比較して有意な増加が認められた。

8 W値 ; 実測値、変化量ともにF~Jの各投与群は、Control群と比較して有意な増加が認められた。

[0161]

[表11]

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	%FS		
			0 W	4 W	8 W
Control	- ^{a)}	10	18 ± 1	15 ± 1 < -3 ± 1 >	12 ± 1 < -5 ± 1 >
Compound F	0.1	8	17 ± 1	16 ± 1 * < -1 ± 1 > **	15 ± 1 ** < -2 ± 1 > **
Compound G	5	8	17 ± 2	16 ± 2 * < -1 ± 1 > **	15 ± 1 ** < -2 ± 1 > **
Compound H	20	8	17 ± 1	15 ± 1 < -2 ± 1 >	14 ± 1 ** < -3 ± 2 > *
Compound I	30	8	17 ± 1	17 ± 1 ** < 0 ± 1 > **	15 ± 1 ** < -2 ± 1 > **
Compound J	5	8	17 ± 2	15 ± 1 < -2 ± 1 > *	14 ± 1 ** < -3 ± 1 > **

[0162] a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

<> : 0Wと比較した変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

%F.S. : 左室内径短縮率% (fractional shortening)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test) 。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test) 。

[0163] (4) 内腔壁厚 (LVIDs ; 左室収縮末期径) ; (表 1 2)

LVIDs においては、(G) ニンテダニブ、(I) シルデナフィル、及び (J) ロバスタチンの実測値において、Control群と比較して有意な低下が認められた

。

[0164]

[表12]

Group	Dose (mg/kg, b.i.d., p.o.)	No. of animals	LVIDd (mm)			LVIDs (mm)		
			0 W	4 W	8 W	0 W	4 W	8 W
Control	- ^{a)}	10	6.6 ±0.3	7.2 ±0.3	7.5 ±0.2	5.4 ±0.3	6.1 ±0.2	6.6 ±0.2
Compound F	0.1	8	6.6 ±0.5	7.1 ±0.3	7.5 ±0.4	5.5 ±0.5	5.9 ±0.4	6.3 ±0.4
Compound G	5	8	6.6 ±0.5	6.9 ±0.4	7.2 ±0.5	5.4 ±0.5	5.7* ±0.4	6.1 [#] ±0.4
Compound H	20	8	6.6 ±0.3	7.0 ±0.3	7.3 ±0.4	5.5 ±0.2	5.9* ±0.2	6.3 ±0.4
Compound I	30	8	6.7 ±0.4	7.1 ±0.4	7.3 ±0.3	5.5 ±0.4	5.9 ±0.4	6.2** ±0.3
Compound J	5	8	6.7 ±0.4	7.1 ±0.3	7.4 ±0.2	5.6 ±0.4	6.0 ±0.3	6.3** ±0.2

[0165] a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

LVIDd : diastolic left ventricular internal dimension

LVIDs : systolic left ventricular internal dimension

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test) 。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test) 。

: コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Aspin-Welch' s test) 。

[0166] 自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルで病態発症 20 週齢から 28 週齢まで各種医薬品を 1 日 2 回、8 週間反復経口投与した結果、F~J の EF 及び FS% のいずれも有意な心機能の悪化抑制作用を示した。一方、体重においては、(J) ロバスタチンは Control 群と比較して 10% 程度の有意な体重減少が認められたが、その他の F~I はいずれも Control 群と比較して変化は認められなかった。

[0167] 5) 試験 3)

試験 3 は、試験 1 及び試験 2 で選択された医薬品類を臨床投与量において比較検討した。群構成を表 13 に示す。

[0168] [表13]

群	投与量	投与期間又は回数
Control	媒体 (0.5%CMC-Na.) 5 mL/kg, p.o., b.i.d.	8 週間
被験物質 C (オザグレール ; OZ)	3.3 mg/kg, p.o., b.i.d.	
被験物質 D (シロスタゾール ; CS)	1.7 mg/kg, p.o., b.i.d.	
被験物質 E (ピルフェリドン ; PF)	15 mg/kg, p.o., b.i.d.	
被験物質 G (ニンテダニブ ; OB)	2.5 mg/kg, p.o., b.i.d.	
被験物質 O (カルベジロール ; CV)	0.17 mg/kg, p.o., b.i.d.	
被験物質 ; 製剤 2 (カモスタット・MS ; B・MS)	10 mg/kg, s.c., 1 回/4W	0W、4W の各 1 回、 計 2 回

[0169] 投与量の設定期理由 (成人体重を 60 kg とし、最大臨床投与量と同量を設定した)

1) C (オザグレール ; OZ) の臨床投与量は、200 mg × 2 回/日であるため、3.3 mg/kg × 2 回/日投与量とした。

2) D (シロスタゾール ; CS) の臨床投与量は、100 mg × 2 回/日であるため、1

.7 mg/kg×2回/日投与量とした。

3) E (ピルフェリドン ; PF) の臨床投与量は、600 mg×3回/日で計1800 mg/日であるため、15 mg/kg×2回/日投与量とした。

4) G (ニンテダニブスルホン酸塩 ; 0B) の臨床投与量は、150 mg×2回/日であるため、2.5 mg/kg×2回/日投与量とした。

5) P (カルベジロール ; CV) の臨床投与量は、10 mg×2回/日であるため、0.17 mg/kg×2回/日投与量とした。

6) 製剤2 ; カモスタットのPLGA・MS製剤 ; B・MS) は、活性体であるカモスタットの臨床投与量は200 mg×3回/日で計600 mg/日であるため、1日投与量である10 mg/kgの4週間に1回、計2回の間歇皮下投与とした。本投与量は総経口投与量の1/28となる。

経口投与の投与容量は、5 mL/kg (個体別の投与液量は最新の体重に基づいて算出した) とし、ポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒及びラット用胃ゾンデを用いて強制投与した。

[0170] いずれも投与期間は8週間とした。

結果 ; (1) 体重変化 (表14)

いずれの投与群も被験物質投与8週間後までControl群とほぼ同様の体重推移を示し、副作用は発現していないことが確認された。

[0171]

[表14]

Group	Dose	No. of animals	Body weight (g)								
			0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W
Control	- ^{a)}	8	119.4 ±7.6	119.3 ±7.4	119.2 ±9.0	120.4 ±9.2	122.1 ±8.7	123.5 ±8.5	126.2 ±7.9	126.4 ±7.3	126.8 ±7.4
Compound C (OZ)	3.3 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	119.0 ±11.0	118.6 ±10.8	119.7 ±10.6	120.9 ±9.8	122.5 ±10.1	123.9 ±10.4	125.4 ±11.7	125.8 ±12.3	125.5 ±12.2
Compound D (CS)	1.7 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	119.4 ±6.3	119.0 ±7.0	120.0 ±7.0	121.8 ±7.2	123.3 ±7.3	124.7 ±7.1	125.0 ±7.4	125.2 ±7.3	125.4 ±6.9
Compound E (PF)	15 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	119.0 ±11.9	119.3 ±12.1	120.1 ±12.1	121.7 ±12.8	122.9 ±14.5	123.3 ±15.3	123.6 ±16.6	123.3 ±16.9	123.7 ±16.0
Compound G (OB)	2.5 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	118.8 ±4.8	119.3 ±4.1	120.0 ±4.2	121.3 ±4.5	123.4 ±4.5	124.7 ±5.0	127.1 ±3.0	128.3 ±5.0	127.9 ±4.9
Compound O (CV)	0.17 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	119.4 ±5.6	119.6 ±5.4	121.0 ±4.8	123.0 ±4.9	123.9 ±5.4	125.8 ±5.4	126.5 ±5.8	127.2 ±6.0	127.6 ±5.5
Compound 製劑2 (B・MS)	10 mg/kg/4 W, s.c.	7	118.9 ±5.8	120.9 ±5.3	123.2 ±5.8	124.4 ±5.6	126.5 ±5.0	128.4 ±5.2	130.2 ±5.1	131.2 ±4.9	131.7 ±5.0

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p.o., b.i.d.

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

括弧内の数字は動物の数を表す。

Student' s t-test)。

コントロールに対する有意差は観察されなかった (Student' s t-test又はAspin-Welch' s test)

[0172] (2) 心機能検査 ; EF値 (表 1 5) 及びFS%値 (表 1 6)

群分け時 (OW) は、いずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。

4 W値では、(C) オザグレル、(D) シロスタゾール、(E) ペリフェニドン、及び (P) カルベジロールの 1 日 2 回反復経口投与、及び (B・MS) カモスタットMS投与の 4 週に 1 回、計 2 回の皮下投与において、各群の実測値又は変化率において、Control群と比較して有意な心機能の改善効果が認められた。8 W値では、(D)、(E)、(G)、及び (P) の実測値、及び/又は変化量においてControl群と比較して心機能の有意な改善効果が認められた。

[0173]

[表15]

Group	Dose	No. of animals	EF (%)			
			0 W	4 W	8 W	
Control	- ^{a)}	8	45.4 ± 2.5	39.3 ± 1.4 < -6.1 ± 1.8 >	35.3 ± 2.1 < -10.3 ± 2.5 >	(7)
Compound C (OZ)	3.3 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	44.9 ± 2.8	41.0 ± 1.7 < -3.9 ± 1.9 > *	37.5 ± 2.1 < -7.4 ± 2.4 >	
Compound D (CS)	1.7 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	45.7 ± 3.4	42.1 ± 3.7 < -3.6 ± 1.2 > **	38.7 ± 3.3 < -7.0 ± 1.3 >	* **
Compound E (PF)	15 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	45.5 ± 3.1	42.0 ± 1.9 < -3.5 ± 3.1 >	38.8 ± 2.8 < -6.7 ± 4.2 >	* **
Compound G (OB)	2.5 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	45.1 ± 2.4	41.4 ± 4.2 < -3.7 ± 2.8 >	39.1 ± 3.7 ⁽⁶⁾ < -6.2 ± 2.5 >	* *
Compound O (CV)	0.17 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	45.3 ± 1.9	42.2 ± 2.5 < -3.1 ± 1.4 > **	40.0 ± 3.2 < -5.3 ± 2.8 >	** **
Compound 製剤2 (B・MS)	10 mg/kg/4 W, s.c.	7	45.2 ± 2.4	41.3 ± 3.4 < -3.9 ± 1.6 > *	36.9 ± 1.8 < -8.3 ± 1.2 >	* *

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

<> : 0Wと比較したE. F. の変化値

それぞれの値は、平均値±S. D. を表わす。

括弧内の数字は動物の数を表す。

E. F. : 左室駆出分画 (ejection fraction)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test) 。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test) 。

[0174]

[表16]

Group	Dose	No. of animals	%FS		
			0 W	4 W	8 W
Control	- ^{a)}	8	18.3 ± 1.2	15.3 ± 0.7 < -3.0 ± 0.9 >	13.5 ± 1.0 < -4.9 ± 1.2 >
Compound C (OZ)	3.3 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	18.0 ± 1.3	16.1 ± 0.8 < -1.9 ± 0.9 > *	14.5 ± 0.9 < -3.5 ± 1.2 >
Compound D (CS)	1.7 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	18.4 ± 1.7	16.7 ± 1.9 < -1.8 ± 0.6 > *	15.1 ± 1.6 < -3.4 ± 0.7 > *
Compound E (PF)	15 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	18.4 ± 1.6	16.6 ± 0.9 < -1.7 ± 1.6 >	15.1 ± 1.3 < -3.3 ± 2.1 >
Compound G (OB)	2.5 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	18.1 ± 1.2	16.3 ± 2.0 < -1.8 ± 1.3 >	15.3 ± 1.7 ^(b) < -3.0 ± 1.1 > *
Compound O (CV)	0.17 mg/kg, p.o., b.i.d.	7	18.3 ± 1.0	16.7 ± 1.2 < -1.6 ± 0.7 > **	15.7 ± 1.5 < -2.6 ± 1.4 > **
Compound 製剤2(B・MS)	10 mg/kg/4 W, s.c.	7	18.2 ± 1.2	16.3 ± 1.6 < -1.8 ± 0.7 > *	14.2 ± 0.8 < -3.9 ± 0.7 >

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

<> : 0Wと比較したF.S.の変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

括弧内の数字は動物の数を表す。

%F.S. : 左室内径短縮率% (fractional shortening)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test)。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test)。

[0175] (C) オザグレル、(D) シロスタゾール、(E) ペリフェニドン、及び (P) カルベジロールの1日2回反復経口投与、及び (B・MS) カモスタットMS投与の4週に1回、計2回の皮下投与において、心機能の改善効果が認められた。

[0176] 6) 試験4 ; 幼若動物における併用投与効果の検討

δ -筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) 雄性ハムスター(日本SLC株式会社)を4週齢にて納入し、1週間の検疫・馴化後、心エコー検査を行い、EF値、及び体重を指標にして層別無作為化割付法により各投与群が均等になるように振り分けた。

各種被験物質を1日2回(8時間以上の間隔)、強制経口投与を行い、投与4週及び8週後(解剖前)に心エコー検査を行い、各群の投与開始前(群分け)との差(変化量; Δ)、及び媒体群(1群)における心機能(EF値及びFS%等)と比較検討した。

(1) 試験4)の群構成を表17に示す。

[0177]

[表17]

群	投与量	投与期間	動物数 (動物番号)
Control	媒体 (0.5%CMC-Na, 5 mL/kg, p.o., b.i.d.	8 週間	8 (101-108)
被験物質 O (CV)	0.17 mg/kg, p.o., b.i.d.		7 (201-207)
被験物質 C (OZ)	3.3 mg/kg, p.o., b.i.d.		7 (301-307)
被験物質 E (PF)	15 mg/kg, p.o., b.i.d.		7 (401-407)
被験物質 O+C (CV+OZ)	0.17 mg/kg + 3.3mg/kg, p.o., b.i.d.		7 (501-507)
被験物質 O+E (CV+PF)	0.17 mg/kg + 15mg/kg, p.o., b.i.d.		7 (601-607)
被験物質 O+C+E (CV+OZ+PF)	0.17 mg/kg + 3.3mg/kg + 15mg/kg, p.o., b.i.d.		7 (701-707)

[0178] 試験4は、試験1、2及び試験3で選択されたO (CV ; カルベジロール) 、
C (OZ ; オザグレール) 、及びE (PF ; ピルフェニドン) の3種の医薬品類を臨
床投与量における単独及び併用効果について比較検討した。

[0179] 投与量設定根拠は、試験3に従い設定し、同様に1日2回経口投与した。
臨床的に汎用されているβブロッカーであるカルベジロールを基準として
、オザグレール及びピルフェニドンとの2種及び3種併用投与の効果を確認し
た。

[0180] 結果 ; (1) 体重変化 (表18)

いずれの投与群も被験物質投与8週間後までControl群とほぼ同様の体重推移
を示し、副作用は発現していないことが確認された。

[0181]

[表18]

Group	Dose (mg/kg, p.o., b.i.d.)	No. of animals	Body weight (g)								
			0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W
Control	a)	8	71.1 ±4.4	77.4 ±5.7	83.1 ±6.7	88.0 ±7.8	92.3 ±8.1	96.8 ±8.7	100.1 ±8.8	102.6 ±8.7	104.5 ±8.0
Compound O (CV)	0.17	7	71.5 ±7.0	78.2 ±7.1	84.2 ±8.1	89.0 ±8.4	92.6 ±8.4	97.8 ±8.2	101.3 ±8.8	104.0 ±9.5	106.1 ±9.3
Compound C (OZ)	3.3	7	71.1 ±4.4	76.2 ±3.8	80.6 ±5.2	85.4 ±6.3	89.0 ±7.5	93.1 ±8.5	97.3 ±9.0	100.4 ±9.0	103.5 ±8.2
Compound E (PF)	15	7	71.7 ±8.0	78.8 ±6.8	84.4 ±6.4	89.2 ±6.2	92.4 ±6.0	96.6 ±4.8	99.8 ±6.0	102.0 ±6.4	104.6 ±6.8
Compound O+C (CV+OZ)	A: 0.17 B: 3.3	7	71.9 ±8.3	79.2 ±5.6	84.8 ±5.5	89.2 ±4.7	93.1 ±4.6	97.9 ±5.1	101.6 ±5.3	105.1 ±6.2	109.0 ±5.9
Compound O+E (CV+PF)	A: 0.17 C: 15	7	71.3 ±5.2	79.1 ±5.1	84.7 ±4.6	89.0 ±4.8	92.8 ±5.4	97.2 ±6.0	101.2 ±6.4	102.9 ±7.0	105.7 ±7.4
Compound O C E (CV+OZ+PF)	A: 0.17 B: 3.3 C: 15	7	71.3 ±4.7	77.9 ±5.7	83.3 ±5.1	88.0 ±5.3	91.8 ±5.2	96.6 ±5.2	99.8 ±5.5	103.0 ±5.4	105.6 ±5.2

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p.o., b.i.d.

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

コントロールに対する有意差は観察されなかった (Student' s t-test又は

Aspin-Welch' s test)

[0182] 心機能検査 ; EF値 (表 19) 及びFS% (表 20)

カルベジロール及びオザグレル塩酸塩水和物の単独投与は、臨床投与量においても左室収縮機能の有意な低下抑制作用が見られた。更に、カルベジロールとオザグレル塩酸塩水和物の2剤併用投与では、さらに効果が増強し、及びカルベジロールとオザグレル塩酸塩水和物、及びピルフェニドンの3剤併用投与により、さらに相乗的な左室収縮機能の低下抑制作用が認められた。

[0183]

[表19]

Group	Dose (mg/kg, p.o., b.i.d.)	No. of animals	EF (%)		
			0 W	4 W	8 W
Control	- ^{a)}	8	77.4 ± 2.6	70.6 ± 2.9 < -6.8 ± 2.2 >	63.2 ± 2.2 < -14.2 ± 2.5 >
Compound O (CV)	0.17	7	76.9 ± 3.4	71.7 ± 2.3 < -5.2 ± 2.3 >	65.8 ± 1.9 < -11.1 ± 3.8 >
Compound C (OZ)	3.3	7	77.3 ± 2.9	72.3 ± 2.0 < -5.0 ± 1.4 >	66.6 ± 2.8 < -10.7 ± 2.0 >
Compound E (PF)	15	7	77.1 ± 3.4	71.3 ± 2.4 < -5.8 ± 1.9 >	65.2 ± 2.6 < -11.9 ± 2.8 >
Compound O+C (CV+OZ)	A: 0.17 B: 3.3	7	77.4 ± 2.2	71.7 ± 2.7 < -5.6 ± 2.5 >	66.5 ± 2.0 < -10.9 ± 3.1 >
Compound O+E (CV+PF)	A: 0.17 C: 15	7	77.2 ± 2.2	72.1 ± 2.9 < -5.0 ± 1.9 >	66.5 ± 2.0 < -10.6 ± 3.2 >
Compound O+C+E (CV+OZ+PF)	A: 0.17 B: 3.3 C: 15	7	76.7 ± 3.3	72.0 ± 2.8 < -4.7 ± 1.9 >	67.5 ± 2.4 < -9.2 ± 2.1 >

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

<> : 0Wと比較したE.F. の変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

E.F. : 左室駆出分画 (ejection fraction)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test) 。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test) 。

[0184]

[表20]

Group	Dose (mg/kg, p.o., b.i.d.)	No. of animals	%FS		
			0 W	4 W	8 W
Control	_{a)}	8	39.2 ± 2.3	33.6 ± 2.1 <-5.6 ± 1.8>	28.4 ± 1.4 <-10.8 ± 2.2>
Compound O (CV)	0.17	7	38.8 ± 3.0	34.4 ± 1.8 <-4.4 ± 2.1>	30.1 ± 1.3 <-8.7 ± 3.2>
Compound C (OZ)	3.3	7	39.1 ± 2.7	34.9 ± 1.5 <-4.2 ± 1.4>	30.7 ± 2.0 <-8.4 ± 1.6>
Compound E (PF)	15	7	39.0 ± 3.0	34.1 ± 1.9 <-4.8 ± 1.7>	29.7 ± 1.8 <-9.2 ± 2.4>
Compound O+C (CV+OZ)	A: 0.17 B: 3.3	7	39.1 ± 2.0	34.5 ± 2.1 <-4.6 ± 2.0>	30.6 ± 1.4 <-8.5 ± 2.5>
Compound O+E (CV+PF)	A: 0.17 C: 15	7	38.9 ± 1.9	34.7 ± 2.2 <-4.2 ± 1.5>	30.6 ± 1.4 <-8.3 ± 2.5>
Compound O+C+E (CV+OZ+PF)	A: 0.17 B: 3.3 C: 15	7	38.6 ± 2.7	34.7 ± 2.1 <-3.9 ± 1.6>	31.3 ± 1.6 <-7.3 ± 1.8>

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

<> : 0Wと比較したF. S. の変化値

それぞれの値は、平均値±S. D. を表わす。

%F. S. : 左室内径短縮率% (fractional shortening)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test) 。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test) 。

[0185] 以上の結果より、自然発症拡張型心筋症J2N-k幼若ハムスターに対する (0) カルベジロール及び (C) オザグレル塩酸塩水和物の単独投与は、臨床投与量においても左室収縮機能の有意な低下抑制作用が見られ、心筋症の悪化を抑制する効果が確認された。更に、(0) カルベジロール、(C) オザグレル塩酸塩水和物、及び (E) ピルフェニドンの3剤併用投与により、さらに相乗的な左室収縮機能の低下抑制作用が認められた。

[0186] 各々の毒性試験から求めた安全量を基準にして投与した結果、拡張型心筋症に対して、A~Jのいずれも心機能悪化抑制作用において有効であることが確認された。

[0187] 2. ラット冠動脈完全結紮による虚血 (M I) モデルに対する効果の検討

ラットの冠動脈完全虚血モデルを作製し、各被験物質投与における心機能変化について比較検討した。

[0188] ラットの左冠動脈前下行枝 (LAD) を完全閉塞し、冠動脈完全虚血モデルを作製した。

モデル作製翌日 (24時間後) から各被験物質を1日2回経口投与し、投与1、2及び4週間後に体重測定及び心エコー検査を行った。また、投与4週間後に心臓を摘出し、電顕、RNA・蛋白測定、及び各種免疫病理用標本を採取し、評価した。

[0189] (1) 心筋虚血モデルの作製

ラットをペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共立製薬 (株)) : 35~45 mg/kg、i. p.) で麻酔する。麻酔後、背位に固定し、気道に気管チューブを経口的に挿入し、小動物用人工呼吸器 (Model 683、HARVARD Appa

ratus, Inc.) により人工呼吸 (Tidal volume : 1.5~2.0 mL/stroke、呼吸回数 : 70 strokes/min) を施し、胸部側壁を開胸して心臓を露出する。糸付縫合針 (ELP、エルプ糸付縫合針 : M10-60B2) を用いて左冠動脈前下行枝 (LAD) を完全閉塞する。この時、心電図用アンプ (AC-601G、日本光電工業 (株)) を介して心電図 (第II誘導、ただし測定困難な場合はaVR誘導) を測定し、ST電位の上昇及び心筋の白色化を肉眼的に観察し、閉塞の有無 (心筋虚血の発生) を確認する。なお、心室細動 (ventricular fibrillation : VF) が出現した場合は、リング鑷子により心臓を直接刺激することにより蘇生処置を行い、VF が消失すれば採用とする。その後、閉胸して切開部を縫合し、動物用イソジン液 (Meiji Seikaファルマ (株)) を用いて消毒する。なお、冠動脈完全虚血モデル作製翌日を1日後とする。

[0190] (2) 群分け

冠動脈完全虚血モデル作製翌日に一般症状観察で病態による衰弱 (自発運動低下、呼吸促迫、耳介蒼白 (体温低下) など) の見られない個体を抽出した。冠動脈完全結紮翌日に心エコー検査を実施し、正常動物 (EF 90%) の左室駆出率 (EF) から25%以上低下した動物を選択した。群分けは、心エコー検査の内、駆出率 (EF) 及び体重を指標にして層別無作為化割付法により各投与群均等になるように振り分けた。

[0191] (3) 心エコー検査

実験動物用吸入麻酔器 (TK-5、(株) バイオマシナリー) 及び小動物用麻酔器 (MK-A110S、室町機械 (株)) にて2.0%イソフルラン (イソフルラン吸入麻酔液、ファイザー (株)) 麻酔下で背位に固定し、超音波画像診断装置 (Nemio SSA-550A、東芝メディカルシステムズ (株)) を用いて心エコーを測定した。ラットの胸部にリニアプローブ (14MHz) を当て、左室内径短縮率 [%S=(LVIDd-LVIDs)×100/LVIDd] 及び駆出率 [EF=(LVIDd3-LVIDs3)/LVIDd3] を算出した。測定は、1画像で3心拍分計測し、その平均値を測定値とした。

[0192] 測定時期は、冠動脈完全結紮翌日 (群分け時 ; 1 Day)、冠動脈完全結紮7日後 (投与7日目1回目の投与前 ; 7 Day)、冠動脈完全結紮14日後 (投与14日

目1回目の投与前；14 Day）、及び冠動脈完全結紮29日後（最終投与28日目の翌日の解剖前；29 Day）の4回測定した。

[0193] 最終体重測定、心エコー検査終了後、イソフルラン麻酔下に腹部大動脈よりディスポーザブル注射筒（ニプロシリンジ）を用いて約3 mL採血した。血液はヘパリン処理（ベノジェクト真空採血管）し、高速冷却遠心機（Model 6000、久保田商事（株））により遠心分離（3000 rpm、4℃、10分）し、血漿を採取した。

[0194] 採血終了後、放血致死により安楽死させて心臓を摘出した。心臓は心臓重量測定後、梗塞領域を左室及び右室を含めて、短軸の3分割し短軸断面の写真を撮影した。すなわち、Apical部を除き、Middle領域を約2 mm間隔で2分割した後、Apical側とBasals側の2切片の写真を撮影し記録した。写真撮影後、Apical側（最下部）及びBasal側（最上部）を緩衝ホルマリンにて保存した。また、Middle部から梗塞周辺部の1片を採取し、RNALaterに浸けて冷蔵庫（5℃）に一晩保存した。翌日にRNALaterを除いた後、そのまま液体窒素で凍結し、-64.5℃以下〔超低温槽（CLN-35C、日本フリーザー（株））：設定温度-80℃〕で凍結保存した。Middle部の残りはそのまま凍結保存した。

[0195] 試験1）安全量（NOAEL）投与におけるMIモデル試験1

[0196] 試験1の群構成を表21に示す。

[0197] [表21]

群	被験物質	投与量（×2回/日）*	動物数
1	Control（媒体）	-	8
2	A（ONO-1301）	3 mg/kg	8
3	F（ベラプロスト）	0.1 mg/kg	8
4	C（オザグレール）	50 mg/kg	8
5	F（ベラプロスト） + C（オザグレール）	0.1 mg/kg + 50 mg/kg	8
6	D（シロスタゾール）	30 mg/kg	8
7	E（ピルフェニドン）	50 mg/kg	8

[0198] *：記載投与量×2回/日の28日間反復経口投与を行った。1日2回の投与間で

は8時間以上の間隔を空けた。

[0199] 結果；（1）体重変化を表22に示す。

（A）ON0-1301投与群、（C）オザグレル塩酸塩水和物投与群、（F）ベラプロスト+（C）オザグレル塩酸塩水和物投与群、（D）シロスタゾール投与群及び（E）ピルフェニドン投与群は、29 DayまでControl群とほぼ同様の体重推移を示した。

[0200] （F）ベラプロスト投与群はControl群に比べて、14 Dayから29 Dayに亘って有意な体重の増加抑制（いずれも $P < 0.05$ vs. Control群）が観察された。なお、体重に有意な変化（測定2時点）が認められたが、変化量としては軽微であり生物学的意義はないものと考えられた。

[0201]

[表22]

Group	Body weight (g)				
	1 Day	7 Day	14 Day	21 Day	29 Day
Control	235.1 ±5.3	244.6 ±15.7	268.2 ±13.8	285.1 ±14.0	301.7 ±16.7
ONO-1301	231.4 ±4.9	237.8 ±15.0	257.1 ±20.7	277.1 ±17.3	293.6 ±18.9
ペラプロスト	230.4 ±3.3	232.3 ±10.0	252.6 ±9.8 *	272.9 ±7.7 *	295.4 ⁽⁷⁾ ±8.6
オザグレール塩酸塩水和物	234.8 ±8.3	240.0 ±9.3	261.2 ±10.8	278.9 ±12.5	299.8 ±13.9

Group	Body weight (g)				
	1 Day	7 Day	14 Day	21 Day	29 Day
ペラプロスト + オザグレール塩酸塩水和物	231.8 ±6.0	234.1 ±7.9	257.3 ⁽⁷⁾ ±9.7	271.3 ⁽⁷⁾ ±10.9	288.0 ⁽⁷⁾ ±13.4
シロスタゾール	232.4 ±4.9	239.9 ⁽⁷⁾ ±9.3	266.5 ⁽⁷⁾ ±10.8	281.1 ⁽⁷⁾ ±15.2	299.1 ⁽⁷⁾ ±15.9
ビルフェニドン	232.0 ±3.9	236.7 ±5.3	257.7 ±10.1	272.4 ±10.5	287.5 ±16.2

[0202] a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test)。

[0203] (2)心機能検査 (EF値) ; (表13)

群分け時 (1 day) は、いずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。

[0204] 7 dayでは、実測値ではシロスタゾール投与群が $P < 0.05$ vs Cont群、シロスタゾール以外の投与群は $P < 0.01$ vs Cont群で有意な増加が認められた。

[0205] 変化量ではシロスタゾール投与群のみ有意な増加が認められなかったが、シロスタゾール以外の投与群は $P < 0.05$ vs Cont群で有意な増加が認められた。

[0206] 14dayでは、実測値、変化量ともに各投与群は、Control群と比較して有意な増加 ($P < 0.01$ vs Cont群) が認められた。

[0207] 29day (最終日) では、実測値、変化量ともに各投与群は、Control群と比較して有意な増加 ($P < 0.01$ vs Cont群) が認められた。

[0208] [表23]

Group	EF (%)			
	1 Day	7 Day	14 Day	29 Day
Control	58 ± 5	51 ± 3 < -7 ± 6 >	45 ± 3 < -12 ± 3 >	42 ± 3 < -15 ± 4 >
ONO-1301	57 ± 5	59 ± 4 < 1 ± 5 >	58 ± 3 < 0 ± 5 >	51 ± 3 < -6 ± 6 >
ベラプロスト	58 ± 5	58 ± 4 < 0 ± 4 >	55 ± 3 < -3 ± 5 >	52 ± 3 < -6 ± 6 >
オザグレルレル塩酸塩水和物	58 ± 5	57 ± 4 < -1 ± 4 >	56 ± 3 < -2 ± 4 >	52 ± 4 < -5 ± 5 >

Group	EF (%)			
	1 Day	7 Day	14 Day	29 Day
ベラプロスト	57 ± 4	57 ± 3 < 0 ± 4 >	56 ± 3 < -1 ± 4 >	50 ± 5 < -6 ± 6 >
シロスタゾール	58 ± 3	56 ± 3 < -1 ± 5 >	54 ± 5 < -3 ± 5 >	48 ± 3 < -9 ± 3 >
ピルフェニドン	57 ± 3	56 ± 3 < -1 ± 3 >	53 ± 5 < -4 ± 6 >	49 ± 4 < -8 ± 4 >

[0209] a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

<> : 1 Dayと比較した変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

E.F. : 左室駆出分画 (ejection fraction)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test)。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test)。

[0210] (3) 心機能検査 (%FS) ; (表 14)

群分け時 (1 Day) は、いずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。

[0211] 7 Dayでは、実測値ではシロスタゾール投与群のみ $P < 0.05$ vs Cont群、シロスタゾール以外の投与群は $P < 0.01$ vs Cont群で有意なEF値の増加が認められた。変化量ではシロスタゾール投与群のみ有意な増加が認められなかったが、シロスタゾール以外の投与群は $P < 0.05$ vs Cont群で有意なEF値の増加が認められた。

[0212] 14 Dayでは、実測値、変化量ともに各投与群は、Control群と比較して有意なEF値の増加 ($P < 0.01$ vs Cont群) が認められた。

[0213] 29 Dayでは、実測値では各投与群は、Control群と比較して有意な増加 ($P < 0.01$ vs Cont群) が認められた。変化量ではシロスタゾール投与群が $P < 0.05$ vs Cont群、シロスタゾール以外の投与群は $P < 0.01$ vs Cont群で有意な増加が認められた。

[0214]

[表24]

Group	%FS			
	1 Day	7 Day	14 Day	29 Day
Control	25 ± 3	21 ± 2 <-4 ± 3 >	18 ± 1 <-6 ± 2 >	17 ± 1 <-8 ± 2 >
ONO-1301	25 ± 3	25 ± 3 <1 ± 3 >	25 ± 2 <0 ± 3 >	22 ± 2 <-3 ± 3 >
ベラプロスト	25 ± 3	25 ± 3 <0 ± 2 >	23 ± 2 <-2 ± 3 >	22 ± 2 <-3 ± 3 >
オザグレル塩酸塩水和物	25 ± 2	25 ± 3 <0 ± 2 >	24 ± 2 <-1 ± 2 >	22 ± 2 <-3 ± 3 >

Group	%FS			
	1 Day	7 Day	14 Day	29 Day
ベラプロスト + オザグレル塩酸塩水和物	25 ± 2	25 ± 2 <0 ± 2 >	24 ± 2 <0 ± 2 >	21 ± 3 <-3 ± 3 >
シロスタノール	25 ± 2	24 ± 2 <-1 ± 3 >	23 ± 3 <-2 ± 3 >	20 ± 1 <-5 ± 2 >
ピルフェニドン	25 ± 2	24 ± 2 <0 ± 2 >	22 ± 3 <-2 ± 3 >	20 ± 2 <-4 ± 2 >

[0215] a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

<> : 1 Dayと比較した変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

%F.S. : 左室内径短縮率% (fractional shortening)

* : コントロールと比較した有意差 P<0.05 (Student' s t-test)。

** : コントロールと比較した有意差P<0.01 (Student' s t-test)。

[0216] 以上の結果より、本試験で作製した冠動脈完全虚血モデル (Control群) では、左室収縮機能不全 (駆出率 ; EFの低下、左室内径短縮率 ; %FSの低下) が

観察され心筋梗塞モデルであることが確認された。

[0217] 被験物質A (ONO-1301)、被験物質F (ベラプロスト)、被験物質C (オザグレル塩酸塩水和物)、被験物質F + C (ベラプロスト + オザグレル塩酸塩水和)、被験物質D (シロスタゾール) 及び被験物質E (ピルフェニドン) とともに、左室収縮機能の悪化抑制作用が見られ、心筋梗塞を改善する作用を示した。

[0218] 一方、被験物質F (ベラプロスト) と被験物質C (オザグレル塩酸塩水和物) の併用投与ではControl群に比べ、左室収縮機能の有意な改善が認められたが、F及びC単独投与に比し、併用投与における効果増強作用は認められなかった。本試験系においては、すでに単独投与においてほぼ最大効果を発揮していることが示唆された。

[0219] 2) 試験2

B、G、I、及びCの反復経口投与及びB、C、Iの徐放性 (製剤1～製剤3) 製剤の単回皮下投与での効果の検討を行った。

(1) 群構成を表25に示す。

[0220] [表25]

群	被験物質	投与量	投与経路	動物数
1	Control (媒体)	-	経口	6
2	B (カモスタット)	150 mg/kg	経口	5
3	G (オフエブ)	5 mg/kg	経口	6
4	I (シルデナフィル)	30 mg/kg	経口	5
5	C (オザグレル)	10 mg/kg	経口	5
6	B・MS (製剤2 ; カモスタット・MS)	100 mg/kg	単回皮下	5
7	C・MS (製剤1 ; オザグレル・MS)	50 mg/kg	単回皮下	6
8	I・MS (製剤3 ; シルデナフィル・MS)	30 mg/kg	単回皮下	6

[0221] 経口投与群 : 記載投与量×2回/日の28日間反復経口投与を行った。なお、1日2回の投与間では8時間以上の間隔を空けた。 Control群は媒体 (CMC-Na) を経口投与した。

皮下投与群：冠動脈完全結紮24時間後に各々の投与量を単回皮下投与を行った。

[0222] 投与量設定根拠；

投与量設定理由

各被験物質の投与量は、無毒性量から最大投与可能量を設定した。

B（カモスタットメシル酸塩）は、ラット6箇月反復経口投与において、550 mg/kg以上で体重増加抑制が認められたので、最大安全量は235 mg/kg～550 mg/kgである。よって、最大投与可能量として150 mg/kgを設定した。

G（ニンテダニブエタンスルホン酸塩）は、ラット6箇月間反復投与毒性試験において、20 mg/kg/日で副作用が発現し、無毒性量は5 mg/kgである。よって、最大投与量として、5 mg/kg×2回/日を設定した。

I（シルデナフィルクエン酸塩）は、SD系ラットにシルデナフィルを6箇月間経口投与した結果、60 mg/kg群で副作用が認められた。無毒性量は60 mg/kg/日である。よって、最大投与量として、30 mg/kg×2回/日を設定した。

C（オザグレル塩酸塩水和物）は、ラット3箇月反復経口投与において、500 mg/kg以上で副作用が認められ、無影響量は150 mg/kgであるため、その1では、安全量として50 mg/kgを設定した。試験1では50 mg/kgで十分効果が確認できたため、試験2では、臨床投与量（6.7 mg/kg）に近い、10 mg/kgを設定した。

B・MS（製剤2；カモスタット・MS）は、カモスタットのラット皮下投与におけるLD50；1329 mg/kgであるため、その約1/10量の100 mg/kgを設定した。また、ハムスター試験1の2群（被験物質B）の1日投与量は300 mg/kg（150 mg/kg×2回）であり、その1/3量を設定した（総投与量比率； $150 \times 2 \times 28 / 100$ にて1/84となる）。

C・MS（製剤1；オザグレル塩酸塩・MS）は、オザグレルのラット皮下投与におけるLD50；2049 mg/kgであるため、その1/40量である50 mg/kgを設定した。また、ハムスター試験1の4群では、50 mg/kg×2回/日投与で有効性が確認されているため、その1回量である50 mg/kgを設定した。一方、本試験5群

(被験物質L) の1日投与量は20 mg/kg (10 mg/kg×2回/日) であった (総投与量 ; $10 \times 2 \times 28/50$ にて1/11.2となる) 。

I・MS (製剤3 ; シルデナフィル・MS) は、シルデナフィルのラット静注投与における致死量は10 mg/kg以上であり、経口投与では1000 mg/kg以上であるため30 mg/kgを設定した。また、ハムスター試験2の5群では、30 mg/kg×2回/日投与で有効性が確認されているため、その1回量である30 mg/kgを設定した。また、本試験4群 (被験物質I) の投与量も30 mg/kg×2回/日であった (総投与量 ; $30 \times 2 \times 28/30$ にて1/56となる) 。

[0223] 結果 ; (1) 体重変化 (表26)

B (カモスタット) 投与群、G (オフエブ) 投与群、I (シルデナフィル) 投与群、C (オザグレル) 投与群、B・MS (カモスタット・MS) 投与群、C・MS (オザグレル・MS) 投与群及びI・MS (シルデナフィル・MS) 投与群は、29 DayまでControl群とほぼ同様の体重推移を示した。

[0224]

[表26]

Group	Dose	No. of animals	Body weight (g)				
			1 Day	7 Day	14 Day	21 Day	29 Day
Control	a)	6	238.7 ±5.3	243.3 ±22.0	257.1 ±37.3	269.3 ±43.6	305.3 ±34.8
Compound B	150 mg/kg, p.o., b.i.d.	5	243.5 ±10.6	249.1 ±8.8	262.4 ±11.5	273.9 ±18.3	293.5 ±20.3
Compound G	5 mg/kg, p.o., b.i.d.	6	240.9 ±7.3	248.1 ±6.3	273.9 ±5.8	290.5 ±7.9	311.0 ±10.9
Compound I	30 mg/kg, p.o., b.i.d.	5	240.3 ±6.8	237.3 ±15.7	263.0 ±19.1	278.3 ±20.3	297.5 ±20.3
Compound C	10 mg/kg, p.o., b.i.d.	5	240.1 ±6.4	245.7 ±24.9	273.3 ±28.8	292.8 ±31.3	310.4 ±32.7
Compound B・MS	100 mg/kg, s.c., single injection	5	245.2 ±4.1	247.4 ±18.9	278.4 ±21.9	296.7 ±15.8	310.6 ±17.1
Compound C・MS	50 mg/kg, s.c., single injection	6	240.0 ±8.0	253.2 ±13.0	285.9 ±14.8	302.5 ±19.0	330.2 ±18.8
Compound I・MS	30 mg/kg, s.c., single injection	6	243.2 ±7.8	246.7 ±17.4	275.6 ±18.2	291.6 ±16.7	312.7 ±16.6

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p.o., b.i.d.

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

括弧内の数字は動物の数を表す。

コントロールに対する有意差は観察されなかった (Student' s t-test又はAspin-Welch' s test)

[0225] (2)心機能検査 (EF値) ; (表27)

群分け時 (1 day) は、いずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。14day、及び29day共に、B、G、I、及びCの1日2回反復経口投与群は、いずれもControl群に比し実測値及び/又は変化量で有意な増加を認めた。また、B・MS (製剤2)、C・MS (製剤1)、及びI・MS (製剤3) は、いずれも単回皮下投与において、14day、及び29day共に、いずれもControl群に比し実測値及び/又は変化量で有意な増加を認めた。

[0226]

[表27]

Group	Dose	No. of animals	EF (%)		
			1 Day	14 Day	29 Day
Control	- ^{a)}	6	54.9 ± 2.5	44.3 ± 1.9 <-10.6 ± 2.6 >	40.5 ± 2.5 <-14.0 ± 2.4 >
Compound B	150 mg/kg, p.o., b.i.d.	5	54.8 ± 2.6	50.6 ± 4.4 <-4.2 ± 2.5 >	47.5 ± 4.9 <-7.3 ± 4.2 >
Compound G	5 mg/kg, p.o., b.i.d.	6	55.7 ± 3.6	49.4 ± 2.8 <-6.2 ± 1.8 >	44.7 ± 1.3 <-11.0 ± 2.7 >
Compound I	30 mg/kg, p.o., b.i.d.	5	55.4 ± 2.9	50.3 ± 1.8 <-5.1 ± 2.5 >	47.7 ± 2.6 <-7.6 ± 4.3 >
Compound C	10 mg/kg, p.o., b.i.d.	5	55.3 ± 3.4	50.4 ± 1.6 <-4.9 ± 2.3 >	45.3 ± 3.7 <-10.0 ± 3.9 >
Compound B・MS	100 mg/kg, s.c., single injection	5	55.1 ± 1.5	50.1 ± 2.2 <-5.0 ± 1.2 >	46.6 ± 2.0 <-8.5 ± 1.2 >
Compound C・MS	50 mg/kg, s.c., single injection	6	54.5 ± 4.3	48.8 ± 2.2 <-5.8 ± 3.8 >	46.7 ± 2.9 <-7.8 ± 4.0 >
Compound I・MS	30 mg/kg, s.c., single injection	6	55.7 ± 3.9	51.7 ± 2.6 <-4.0 ± 1.7 >	46.9 ± 1.1 <-8.8 ± 3.3 >

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p. o., b. i. d.

<> : 1 Dayと比較したE.F.変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

括弧内の数字は動物の数を表す。

E.F. : 左室駆出分画 (ejection fraction)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test)。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test)。

[0227] (3) 心機能検査 (%FS) ; (表 28)

群分け時 (1 day) は、いずれの投与群もControl群と比較して有意な差は認められなかった。14day、及び29day共に、EFと同様に被験物質投与群は、いずれもControl群に比し実測値及び/又は変化量で有意な増加を認めた。

[0228]

[表28]

Group	Dose	No. of animals	%FS		
			1 Day	14 Day	29 Day
Control	a)	6	233 ± 14	17.7 ± 1.0 <-5.6 ± 1.5 >	15.9 ± 1.2 <-7.2 ± 1.2 >
Compound B	150 mg/kg, p.o., bid.	5	233 ± 15	21.0 ± 2.4 <-2.3 ± 1.3 >	19.4 ± 2.5 <-3.9 ± 2.2 >
Compound G	5 mg/kg, p.o., bid.	6	238 ± 21	20.3 ± 1.5 <-3.4 ± 1.1 >	18.0 ± 0.6 <-5.8 ± 1.6 >
Compound I	30 mg/kg, p.o., bid.	5	236 ± 1.6	20.8 ± 1.0 <-2.8 ± 1.4 >	19.5 ± 1.4 <-4.1 ± 2.3 >
Compound C	10 mg/kg, p.o., bid.	5	235 ± 1.9	20.9 ± 0.9 <-2.7 ± 1.3 >	18.2 ± 1.9 <-5.3 ± 2.1 >
Compound B+MS	100 mg/kg, s.c., single injection	5	235 ± 0.8	20.7 ± 1.2 <-2.7 ± 0.6 >	18.9 ± 1.0 <-4.6 ± 0.6 >
Compound C+MS	50 mg/kg, s.c., single injection	6	232 ± 2.5	20.0 ± 1.1 <-3.2 ± 2.2 >	18.9 ± 1.5 <-4.2 ± 2.2 >
Compound I+MS	30 mg/kg, s.c., single injection	6	238 ± 2.3	21.5 ± 1.4 <-2.3 ± 1.0 >	19.0 ± 0.6 <-4.8 ± 2.0 >

a) : 0.5%CMC-Na 5mL/kg, p.o., b. i. d.

<> : 1 Dayと比較したF.S.変化値

それぞれの値は、平均値±S.D.を表わす。

括弧内の数字は動物の数を表す。

%F.S. : 左室内径短縮率% (fractional shortening)

* : コントロールと比較した有意差 $P < 0.05$ (Student' s t-test)。

** : コントロールと比較した有意差 $P < 0.01$ (Student' s t-test)。

[0229] B、G、I、及びCの1日2回の4週間反復経口投与群、及びB・MS (製剤29)、C・MS (製剤1)、及びI・MS (製剤3)の単回皮下投与において、いずれもControl群に比し心機能 (EF、FS%)の有意な増加を認めた。特に、B・MSはBに対して1/84、C・MSはCに対して1/11.2、及びI・MSはIに対して1/56投与量で有効性を認めたことは、画期的である。

[0230] 3. 自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルでの長期効果の比較検討

δ -筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルに、病態発症後 (20週齢) から、ONO-1301及びARBである (K) カンデサルタンを1日2回、36週間反復経口投与し、長期投与での心機能変化、及び生存率にて比較評価した。即ち、病態発症後 (20週齢) にて心エコー測定を行い、駆出率 (EF値) 及び体重にて等しく群分け (表15) を行い、36週間被験物質を投与した。

[0231] 被験物質は、(A) ONO-1301、及びARBとして (K) カンデサルタンにて比較検討した。

試験方法は「1. 自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルでの効果の検討」と同様に実施した。

[0232] [表29]

	試験群	投与	動物数 (匹)
1	Control	媒体 2回/日	10
2	(A) ONO-1301 3.0 mg/kg	ONO-1301- 0.6 mg/mL×2回/日	10
3	(K) カンデサルタン 3.0 mg/kg	・カンデサルタン 0.6 mg/mL (1回目) ・媒体 (2回目)	10

[0233] ONO-1301は3 mg/kg × 2回/日、カンデサルタンは、3 mg/kg × 1回/日投与し、2回目は媒体のみを投与した。Contは、媒体（0.5%CMC-Na）を1日2回投与した。

[0234] （2）心機能検査（EF値）；（表16）

ONO-1301-3.0mg/kg群は、投与期間を通じていずれもControl群に比し有意な改善効果を示した。一方、カンデサルタン-3.0 mg/kg群は、投与20週まではONO-1301-3.0mg/kg群と同等の効果を示したが、以降効果が減弱し、30週および36週（final）では有意差は消失した。

[0235]

[表30]

EF(%)	After administration (week)							
	0	4	8	12	16	20		
Groups						26		
Control	N	43.2 ± 2.8 (10)	35.4 ± 1.6 (10)	35.0 ± 1.7 (10)	34.7 ± 2.1 (10)	29.8 ± 1.0 (10)	29.6 ± 1.3 (9)	28.2 ± 1.2 (9)
ONO-1301 - 3.0 mg/kg	N	43.2 ± 2.3 (10)	47.9 ± 2.0 *** (10)	52.8 ± 0.9 *** (9)	51.5 ± 1.5 *** (9)	49.5 ± 1.1 aaa (9)	48.3 ± 1.9 *** (9)	43.2 ± 1.5 *** (9)
Candesartan - 3.0 mg/kg	N	42.7 ± 0.9 (10)	46.3 ± 2.0 *** (10)	51.6 ± 1.8 *** (10)	49.3 ± 1.5 *** (10)	50.2 ± 1.0 aaa (10)	47.4 ± 1.1 *** (10)	39.7 ± 1.2 *** (10)

Groups	After administration (week)			
	30	34 (final)		
Control	N	29.2 ± 1.6 (7)	29.7 ± 1.5 (7)	27.9 ± 3.0 (7)
ONO-1301 - 3.0 mg/kg	N	43.7 ± 2.0 *** (8)	42.6 ± 1.6 *** (8)	41.3 ± 2.3 ** (7)
Candesartan - 3.0 mg/kg	N	40.7 ± 1.3 *** (9)	39.7 ± 1.9 ** (7)	37.1 ± 5.3 (4)

[0236] それぞれの値は、平均値±S.E.を表わす。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、コントロールと比較した有意差 (Dunnett-test)。

a : $p < 0.05$ 、aaa : $p < 0.001$ 、コントロールと比較した有意差 (Steel-test)

。

[0237] (3) 心機能検査 (FS%) ; (表 17)

ON0-1301-3.0mg/kg群の投与1, 2, 3, 4, 5, 6, 7および8ヶ月 (34および36週), 及びCandesartan-3.0 mg/kg群の投与1, 2, 3, 4, 5, 6, 7および8ヶ月 (34週) はControl群と比較して有意な高値を示したが、カンデサルタンの36週 (final) では有意差が消失した。

[0238]

[表31]

FS(%)	After administration (week)							
	0	4	8	12	16	30	26	
Groups								
Control	N	17.3 ± 1.3 (10)	13.7 ± 0.7 (10)	13.5 ± 0.8 (10)	13.3 ± 0.9 (10)	11.2 ± 0.4 (10)	11.1 ± 0.5 (9)	10.5 ± 0.5 (9)
ONO-1301 - 3.0 mg/kg	N	17.3 ± 1.2 (10)	19.7 ± 1.0*** (10)	22.2 ± 0.5*** (9)	21.6 ± 0.8*** (9)	20.4 ± 0.6*** (9)	19.9 ± 1.0*** (9)	17.3 ± 0.7*** (9)
Candesartan - 3.0 mg/kg	N	17.0 ± 0.4 (10)	18.8 ± 1.0*** (10)	21.5 ± 0.9*** (10)	20.3 ± 0.8*** (10)	20.7 ± 0.5*** (10)	19.4 ± 0.6*** (10)	15.5 ± 0.5*** (10)
Groups		After administration (week)						final
		30	34					
Control	N	10.9 ± 0.7 (7)	11.1 ± 0.6 (7)	10.4 ± 1.2 (7)				
ONO-1301 - 3.0 mg/kg	N	17.6 ± 1.0*** (8)	17.0 ± 0.8*** (8)	16.4 ± 1.1** (7)				
Candesartan - 3.0 mg/kg	N	16.0 ± 0.6*** (9)	15.6 ± 0.9** (7)	14.5 ± 2.4 (4)				

[0239] それぞれの値は、平均値±S.E.を表わす。

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$ 、コントロールと比較した有意差 (Dunnett-test)。

[0240] (4) 生存率 ; (図 1)

生存率については、Cont群の死亡率が低かったため、被験物質投与群との間に有意な差はみられなかったが、被験物質投与群においては、カンデサルタン群は被験物質投与開始29週から急激な生存率の低下が見られ、ON0-1301-3.0 mg/kg群との間で生存率の開きが確認された。

[0241] 心エコーによる左室機能測定では、心不全の指標とされるEF (左室駆出率) 値において、ON0-1301-3.0 mg/kg群では、改善効果が認められた。また、対照物質 (ARB) のカンデサルタン-3.0 mg/kg群においても、投与20週頃までは同様の改善効果が認められたが、投与5ヶ月頃から心機能に翳りがみえ始め、終盤には死亡例の増加がみられた。

このことからON0-1301には、長期投与においても、拡張型心筋症に対して降圧剤として通常使用されているカンデサルタンより勝った効果があることが確認された。

[0242] 以上のことから、ON0-1301は、現在の拡張型心筋症での第一選択薬の1つであるARBのカンデサルタンに比し、長期に渡り、拡張型心筋症から心不全への移行、すなわち心機能の悪化を抑制し、死亡率を抑制することが確認された。

[0243] 4. イヌ高速ペーシング重症拡張型心筋症モデルにおける長期反復経口投与における効果の検討

本試験は、拡張型心筋症患者に早期治療介入としてON0-1301を長期間反復経口投与することにより、DCMの重症化を抑制し、心臓移植や人工心臓の装着を遅らせたり、回避することを目的とした汎用性ある心血管・心筋再生療法剤の開発を検討するために実施した。

即ち、イヌ高速ペーシング重症拡張型心筋症モデルを用いて、長期間でのON0-1301反復経口投与による心機能改善効果と生存率延長効果について検討した

。

[0244] 1) 高速ペーシング誘発イヌ心不全モデルの作製と被験物質投与

(1) ペースメーカーの埋め込み手術；

麻酔下、動物の右側頸部を切開し、動物用体内式心臓ペースメーカー（以下ペースメーカー、SIP-501、スターメディカル（株））を皮下に埋め込み、X線透視診断装置で右頸静脈よりリトラクタブルスクリーインリード（TEND RIL™STS 2088TC、58cm 6Fr：セント・ジュード・メディカル（株））を挿入し、先端を右心室壁に留置した。Sham群については偽手術を行った。ペースメーカーを作動させパルスレートに連動した心臓の拍動が得られることを心電図（第II誘導）にて確認後、切開部を縫合した。

(2) 高速ペーシングと被験物質投与；

イヌに高速ペーシング（拍動数：226～240 beats/min）を行うことにより誘発させた重症拡張型心筋症モデルを用い、高速ペーシング4週後に心機能（EF）により等しく群分けを行い、ON0-1301（3 mg/kg）の1日2回、6ヶ月（26週）間反復経口投与（モデル作製後30週）による長期有効性（生存率）に対する効果について検討した。尚、ON0-1301は、直近の体重により投与量を設定（1週間に1回）し、ON0-1301をカプセルに充填し、強制経口投与を行った。対照群には同様に空カプセルを投与した。

(3) ペースメーカー作動状態の確認；

心電図（第II誘導）検査として、病態作製期間（4週間）は、週に1回の頻度で測定した。なお、被験物質投与後は心エコー測定時に実施した。また、聴診器の検査は毎日実施した。即ち、毎日、10秒間の拍動数を測定し、聴診器の検査で異常があった場合は、心電図を測定し、ペーシングエラーの有無を確認した。

[0245] 2) 症状観察；

毎日（朝夕投与時の2回）、動物の一般状態（死亡の有無、姿勢、活動性、歯茎の色、腹水貯留の有無、便等）及び摂餌量を観察した。生存率の算出は、試験中は、動物の死亡の有無を観察し、各投与群における生存率を算出し

た。生存率は被験物質投与開始日を起算日とし、1日2回、6箇月間観察した。なお、瀕死状態は耳介反射、聴覚反射、痛覚反射の検査において1項目でも反応しない場合をもって死亡と判断した。

3) 体重測定；ペースメーカー埋め込み日、ペースメーカー作動日及びそれ以降1週間毎に行った。

4) 心エコーの測定；

心エコーの測定は、測定ポイントとして、モデル作製前 (Pre)、4週 [群分け時 (被験物質投与前)、被験物質投与後2週、4週 (1ヶ月)、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月 (解剖時)] に実施した。

[0246] 測定は、無麻酔下、超音波画像診断装置を用いて心エコーを測定した。胸部にセクタープローブ (10 MHz) を当てM-modeで左室拡張末期径 (LVIDd) 及び左室収縮末期径 (LVIDs)、心室中隔壁厚 (IVSTd)、左室後壁拡張末期厚 (LVPWd) を測定した。また駆出率 $[EF=(LVIDd^3-LVIDs^3)/LVIDd^3]$ 及び左室内径短縮率 $[\%FS=(LVIDd-LVIDs) \times 100/LVIDd]$ を算出した。

[0247] 5) 結果；1) 生存率 (図2)

Control群は、投与後13日から死亡例が出現し、投与後61日目に全例 (6/6例) が死亡した。

[0248] 投与後26週時点における生存率は0% (生存数：0/6例) であった。一方、0N0-1301反復経口投与群は、投与後44日で初めて死亡例が確認された。その後、92日までに4例の死亡が観察されたが、1例については、投与後26週時点において生存した (生存数：1/6例)。

Kaplan-Meier曲線における0N0-1301反復経口投与群は、Control群に比し、有意 (* : $P < 0.05$) な生存率の延長効果を認めた。

[0249] 2) 体重変化；(図3)

0N0-1301投与群は、投与後6週及び8週で体重増加がControl群に比し抑制されていたが、Control群における投与後6週及び8週の体重増加は、腹水貯留によるものと考えられることから、0N0-1301投与により、腹水貯留が抑制されていることが確認された。

[0250] 3) 心機能検査 (EF) ; (図4)

Control群は、モデル作製前のEFは $72 \pm 5\%$ (N=6) であった。モデル作製後6週 (投与後2週) のEFは $43 \pm 3\%$ (N=5) 、モデル作製後8週 (投与後4週) のEFは $41 \pm 5\%$ (N=5) であり、病態によるEF低下が認められた。一方、ON0-1301投与群はモデル作製後6週 (投与後2週) 及びモデル作製後8週 (投与後4週) におけるEFは、Control群と比較してEF変化量 (Δ) にて有意な上昇 (いずれも $P < 0.05$ vs. Control群) が認められた。

[0251] 4) 心拍数 (心エコー検査)

ON0-1301 ; 3 mg/kg経口投与でのTmax時 (経口投与後1.5~2.5時間の間) においては、心エコー検査における心拍数に影響を与えなかった。このことは、本投与量においては、Tmax (Cmax) においても血管拡張作用に伴う降圧作用は発現しないことが確認された。

[0252] 以上、ON0-1301の3 mg/kg×2回/日反復経口投与群では、投与後44日で初めて死亡例が認められ、投与後26週 (モデル作製後30週後の最終評価時点) においても1例生存 (生存数 : 1/6例) していた。なお、本個体におけるペースメーカーの作動状況に問題はなかった。また、心不全による死亡時期がControl群に比べ遅延したことにより、生存率の有意な延長効果が認められた。さらに、ON0-1301反復経口投与では、心不全時の左室収縮機能不全に対して、Control群に比し、投与後2週及び4週でEF値の有意な改善効果が認められた。また、有意ではないが、腹水貯留による体重増加も抑制されていた。

[0253] ON0-1301の反復経口投与群はイヌ高速ペーシング誘発重症拡張型心筋症長期モデルに対して、Kaplan-Meier曲線はControl群に比べ有意な生存率の延長を示すこと及び心不全時の左室収縮機能不全に対して有意な改善効果を示すことが明らかとなった。

[0254] ON0-1301反復経口投与での早期治療介入は、拡張型心筋症の心機能の重症化を抑制し、生存率を延長させることにより、心不全の悪化を予防することが確認された。

[0255] 5. PLGA・MS持続性製剤の製造

1) オザグレル塩酸塩、カモスタットメシル酸塩及びシルデナフィルクエン酸塩の3化合物の乳酸・グリコル酸共重合体 (PLGA) マイクロイスフェアー (MS) 製剤を作製した。

[0256] 2) 製造方法

各化合物1.0g、PLGA5-50 (三井化学製) 4.0gをジクロロメタン40mL/メタノール16mLの混液に溶解し、0.5%PVA水溶液 (ポリビニルアルコール; 日本合成化学工業製) を400mL/min、化合物溶液を2mL/minにてホモミクサーに送液、ホモミクサー (プライミクス製) を3500rpmにて攪拌した。その後、水中乾燥3時間、静置2時間、上清1/4廃棄、冷蔵静置一晚の後、遠心処理によって、粒子の洗浄 (MilliQ水2回) を行い、粒子を回収した。回収後の粒子は凍結乾燥した。凍結乾燥後の粒子は、UV吸収測定により含有化合物の濃度を測定し、光学顕微鏡観察により粒子形成の状態と平均粒子径を確認した。また、PLGA5-50 (分子量5万の乳酸/グリコル酸 = 50/50) を用いたPLGA・MSの徐放性は約4週間であることが確認されている。

[0257] 3) 製造結果

(1) C・MS; オザグレル塩酸塩PLGA・MS (製剤1)

本製造にて、表18に示す通り粒子総重量3.31g、化合物含有量0.24g、内包効率7.4%の粒子を得た。内包率 (含有量) 測定時のUV吸収スペクトルを図6に示す。図5に示す通り光学顕微鏡観察の結果より平均粒子径約30 μ mの粒子径を有する事が確認された。

[0258] [表32]

仕込み量 (g)	総重量 (g)	含有化合物量 (g)	内包率 (%)	外観	粒子回収率 (%)
5.00	3.31	0.24	7.4	白色粉末	66.2

[0259] (2) B・MS; カモスタットメシル酸塩PLGA・MS (製剤2)

本製造にて、表19に示す通り粒子総重量3.47g、化合物含有量0.20g、内包効率5.8%の粒子を得た。内包率 (含有量) 測定時のUV吸収スペクトルを図8に示す。図7に示す通り光学顕微鏡観察の結果より平均粒子径約30 μ mの粒子径を有する事が確認された。

[0260] [表33]

仕込み量 (g)	総重量 (g)	含有化合物量 (g)	内包率 (%)	外観	粒子回収率 (%)
5.00	3.47	0.20	5.8	白色粉末	69.4

[0261] (3) I・MS ; シルデナフィルクエン酸塩PLGA・MS (製剤3)

本製造にて、表20に示す通り粒子総重量3.98g、化合物含有量0.45g、内包効率11.2%の粒子を得た。内包率(含有量)測定時のUV吸収スペクトルを図9に示す。図10に示す通り光学顕微鏡観察の結果より平均粒子径約30 μ mの粒子径を有する事が確認された。

[0262] [表34]

仕込み量 (g)	総重量 (g)	含有化合物量 (g)	内包率 (%)	外観	粒子回収率 (%)
5.00	3.98	0.45	11.2	白色粉末	79.6

請求の範囲

- [請求項1] 慢性心不全を伴う難治性心臓組織線維化疾患の予防及び／又は治療のために用いられる、医薬組成物。
- [請求項2] 蛋白分解酵素阻害剤を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] トロンボキサン₂合成酵素阻害剤及び／又はその拮抗剤を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項4] ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項5] チロシンキナーゼ阻害剤を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項6] HMG-CoA還元酵素阻害剤を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 抗線維化剤を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項8] 蛋白分解酵素阻害剤、トロンボキサン₂合成酵素阻害剤及びその拮抗剤、ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、並びに抗線維化剤からなる群より選択される少なくとも2種を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項9] 以下（1）～（6）の化合物及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物：
- （1）蛋白分解酵素阻害剤として、カモスタット；
 - （2）トロンボキサン₂合成酵素阻害剤として、オザグレール；
 - （3）ホスホジエステラーゼ阻害剤として、テオフィリン、シロスタゾールおよびシルデナフィル；
 - （4）チロシンキナーゼ阻害剤として、ニンテダニブ；
 - （5）HMG-CoA還元酵素阻害剤として、ロバスタチン；及び
 - （6）抗線維化剤として、ピルフェリドン。
- [請求項10] さらに、生体分解性高分子を含有する持続性製剤である、請求項1～9のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項11] 持続性製剤が、マイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤、ま

たはナノスフェア製剤である、請求項10に記載の医薬組成物。

[請求項12] 前記生体分解性高分子が、乳酸-グリコール酸共重合体であり、かつマイクロスフェア製剤である、請求項10に記載の医薬組成物。

[請求項13] 以下(1)～(5)の化合物及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種を含む、請求項11に記載の医薬組成物：

(1) 蛋白分解酵素阻害剤として、カモスタット；

(2) トロンボキサンA₂合成酵素阻害剤として、オザグレル；

(3) ホスホジエステラーゼ阻害剤として、シロスタゾール及びシルデナフィル；

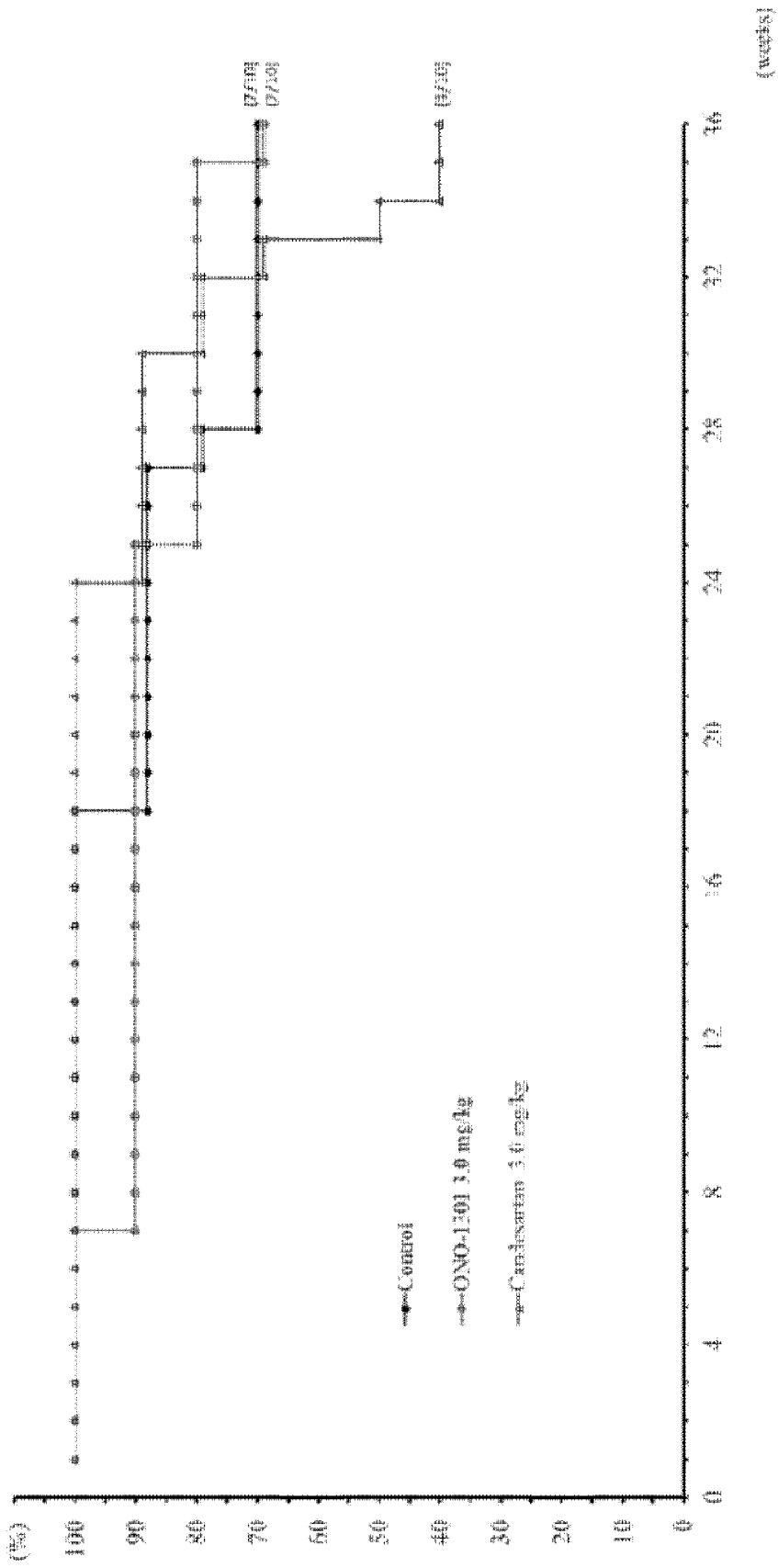
(4) チロシンキナーゼ阻害剤として、ニンテダニブ；

(5) 抗線維化剤として、ピルフェリドン。

[請求項14] 経口投与用、静脈内投与用、冠動脈内投与用、吸入用、筋注投与用、皮下投与用、経粘膜投与用、経皮投与用、又は心臓貼付投与用である、請求項1～13のいずれか一項に記載の医薬組成物。

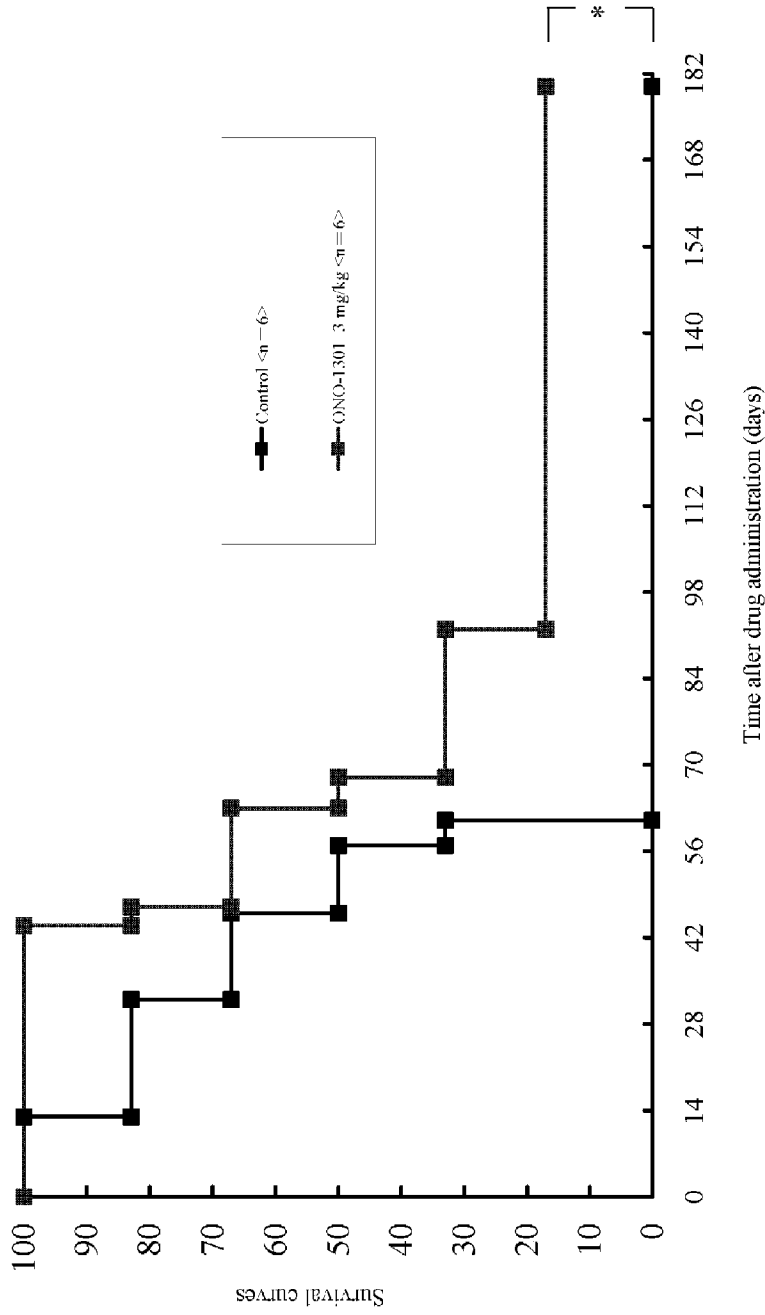
[請求項15] 慢性心不全を伴う難治性心臓組織線維化疾患が、拡張型心筋症、虚血性心筋症、心筋梗塞、狭心症、動脈硬化症、血管炎症候群、心筋炎、肥大型心筋症、大動脈弁狭窄症、弁膜症、大動脈弁閉鎖不全、HFpEF (heart failure with preserved ejection fraction)、拡張不全、収縮不全、上室性頻脈性不整脈、うっ血性心不全、冠動脈疾患、特発性心筋症、又は心房細動等である、請求項1～14のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[図1]



[図2]

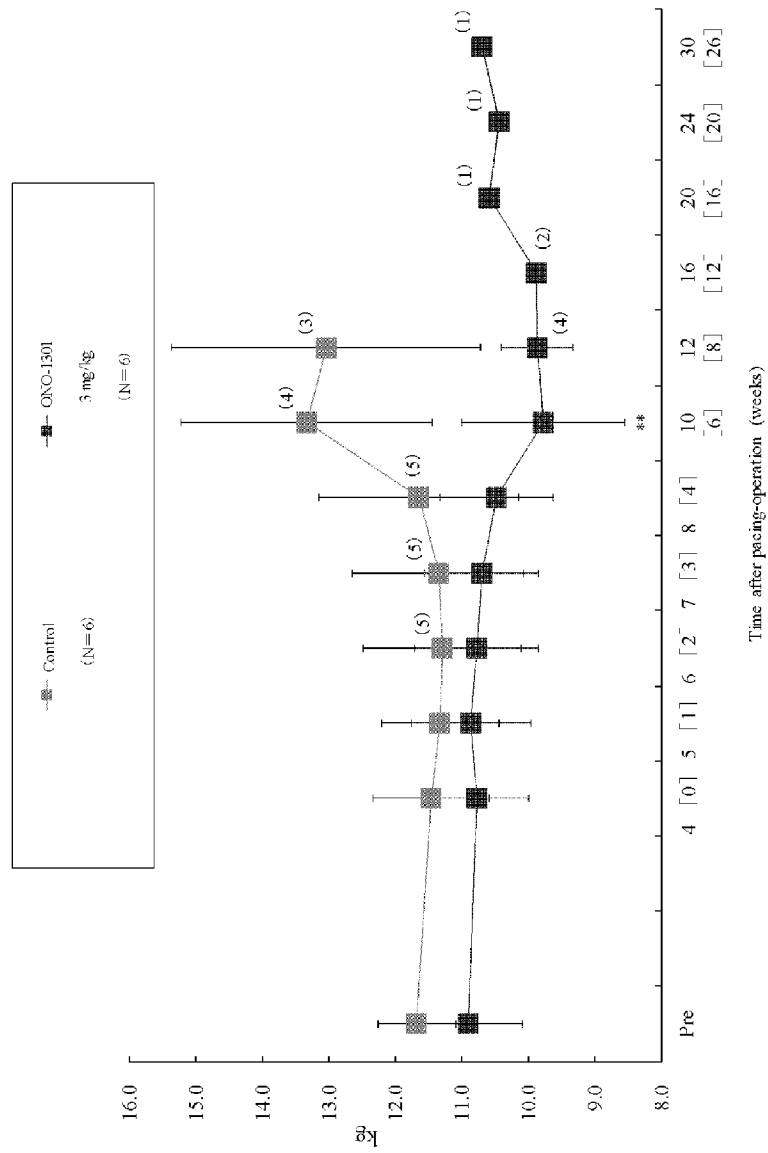
生存率曲線 (Control vs. ONO-1301)



[3]

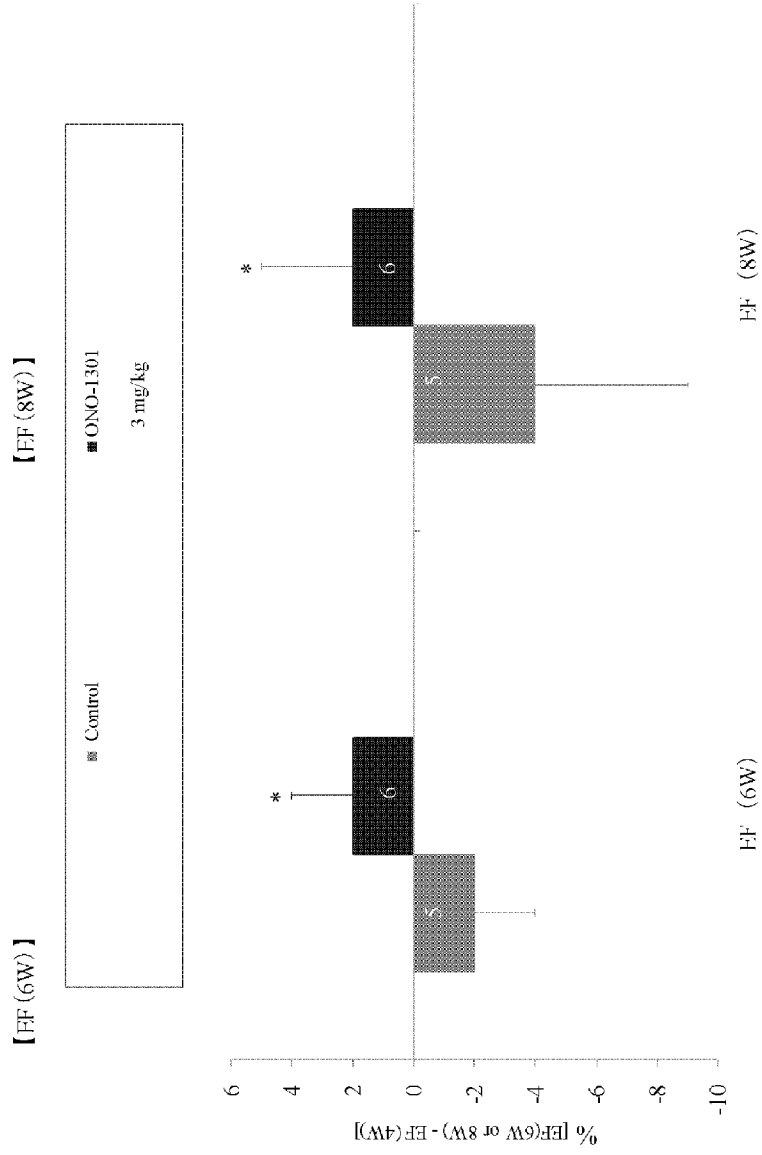
体重 (Control vs. ONO-1301)

[BW]

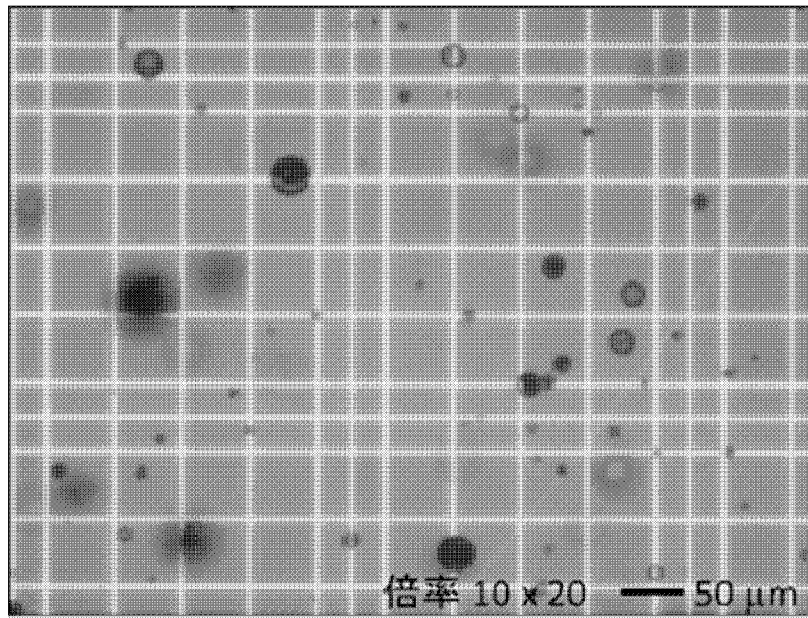


[図4]

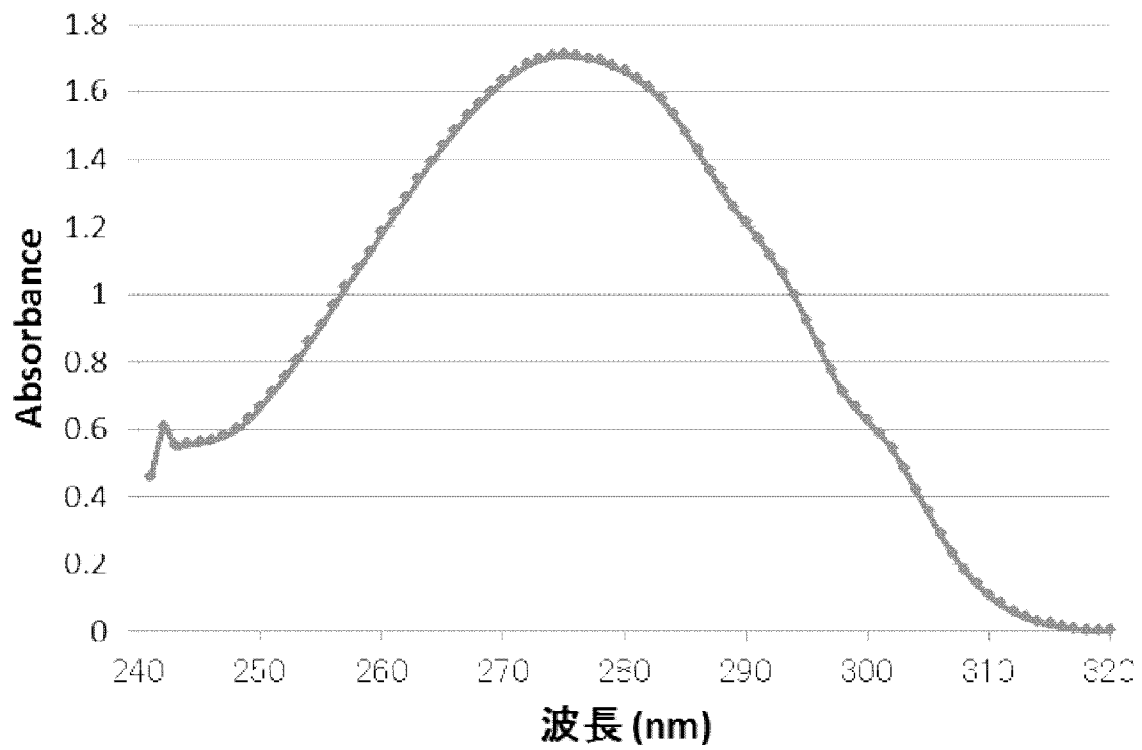
EF (Δ値 : Control vs. ONO-1301)



[図5]

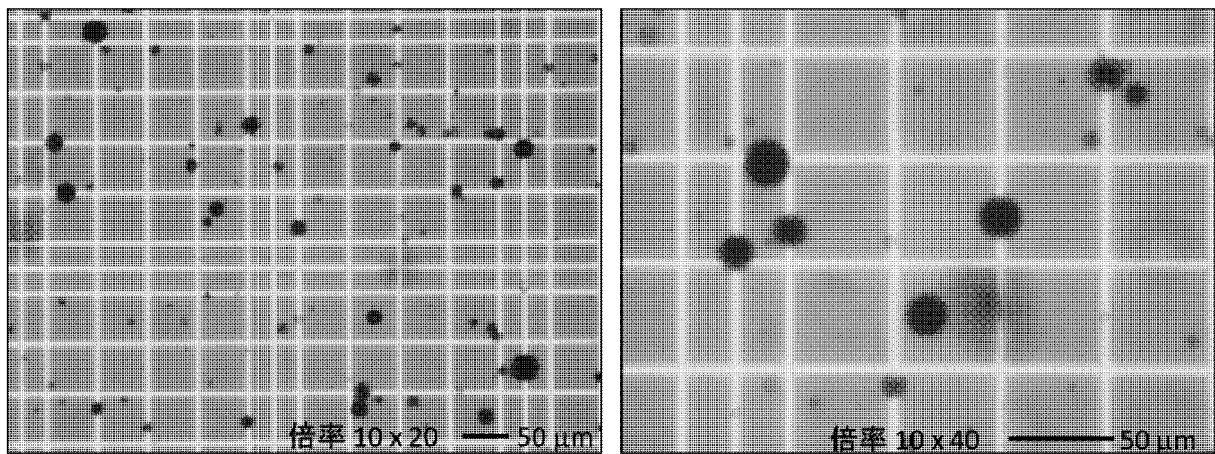


[図6]

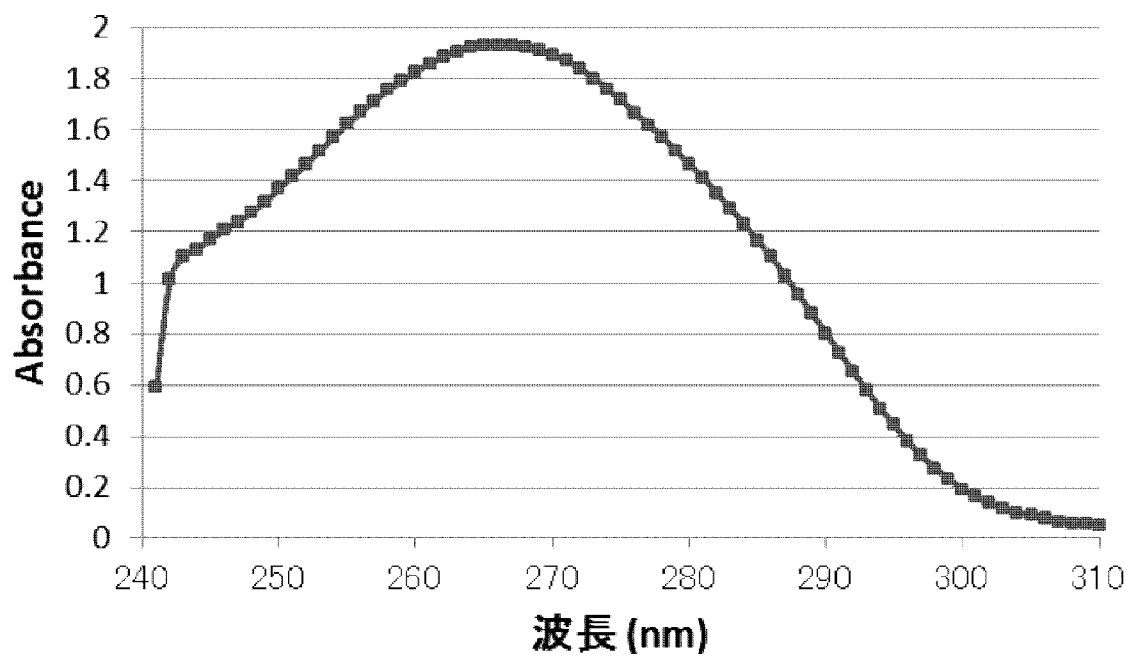


終濃度	0.02 mg/ml
最大吸収波長	275 nm

[図7]

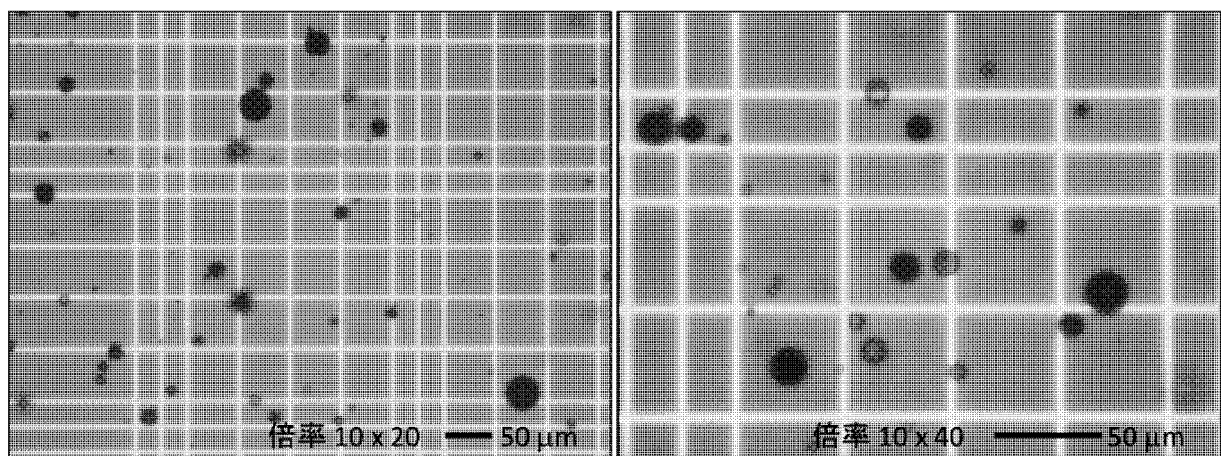


[図8]

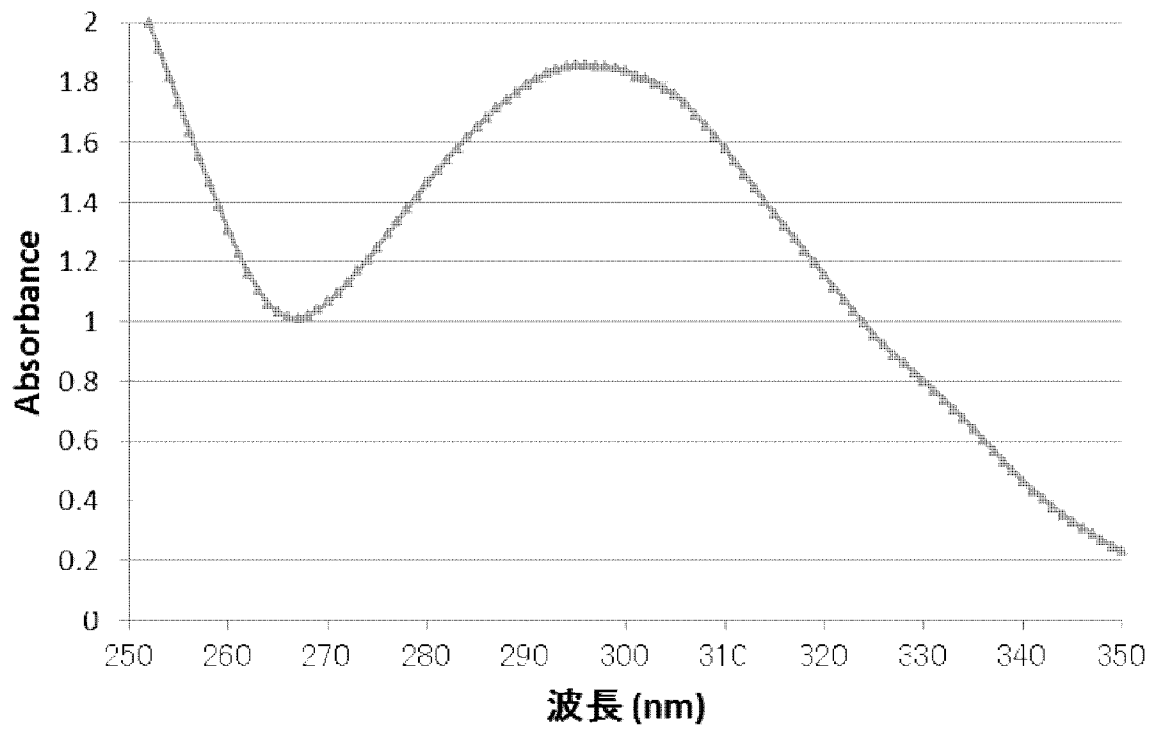


終濃度	0.05 mg/ml
最大吸収波長	266 nm

[図9]



[図10]



終濃度	0.1 mg/ml
最大吸収波長	296 nm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/047100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. see extra sheet

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)

Int.Cl. see extra sheet

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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 Y	JP 2012-515800 A (INTERMUNE, INC.) 12 July 2012, claims, examples & US 2011/0218515 A1, claims, examples & WO 2010/085805 A1 & EP 2389227 A1	1, 7, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2009-513713 A (INTERMUNE, INC.) 02 April 2009, claims, examples & US 2010/0029578 A1, claims, examples & WO 2007/053685 A2 & EP 1948178 A1	1, 7, 9, 14, 15 8-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 05 March 2018	Date of mailing of the international search report 20 March 2018
--	---

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/JP2017/047100

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2008-510705 A (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 10 April 2008, claims, examples & WO 2006/023603 A2, claims, examples & US 8299083 B2 & EP 1786428 A1	1, 4, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2011-510976 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 07 April 2011, claims, examples & WO 2009/096616 A1, claims, examples & US 2011/0039869 A1 & KR 10-2009-0084150 A	1, 4, 9, 14, 15 8-15
X Y	矢田部左近, シロスタゾールが徐脈性不整脈に効果を示し, 心不全が改善した 1 例, 日本臨床内科医会誌, 2006, vol. 21, no. 4, pp. 426-430, particularly, 結果, 考察参照 (YATABE, Sakon, Effect of cilostazol in a patient with heart failure caused by bradyarrhythmia, Journal of Japan Physicians Association), non-official translation (reference to Result, Investigation)	1, 4, 9, 14, 15 8-15
X Y	土谷健, Cilostazol 投与により洞徐脈と伴に心不全が改善した拡張相肥大型心筋症の一例, 臨床と研究, 2006, vol. 83, no. 5, pp. 753-758, particularly, 症例, 考察参照 (TSUCHIYA, Ken, A patient with dilated hypertrophic cardiomyopathy who improved sinus bradycardia and heart insufficiency after prescription of cilostazol, The Japanese Journal of Clinical and Experimental Medicine), non-official translation, (reference to Cases, Investigation)	1, 4, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2002-145770 A (SANKYO CO.) 22 May 2002, claims, examples & WO 2002/017913 A1, claims, examples & US 2003/0181500 A1 & EP 1314425 A1	1, 6, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2009-502773 A (PROCTER & GAMBLE CO.) 29 January 2009, claims, paragraph [0005], examples & WO 2007/010498 A2, claims, page 2, lines 9-13, examples & US 2007/0021395 A1 & EP 1906966 A1	1, 6, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2005-504064 A (LONGWOOD PHARMACEUTICAL RESEARCH, INC.) 10 February 2005, claims, paragraph [0092], examples & US 2003/0068366 A1, claims, paragraph [0107], examples & WO 2003/020243 A1 & EP 1429729 A1	1, 6, 9, 14, 15 8-15
X Y	OGURA, Toshitsugu et al, Effects of oky-046, a selective thromboxane A2 synthetase inhibitor, on ventricular arrhythmias and prostaglandins during coronary artery ligation and reperfusion in anesthetized dogs., Japan. J. Pharmacol, 1988, vol. 47, no. 1, pp. 95-98, particularly, abstract, fig 1	1, 3, 9, 14, 15 8-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/047100

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	藤村政樹, 薬物療法 トロンボキサン A2 阻害剤, 呼吸, vol. 9, no. 9, pp. 1114-1120, particularly, abstract, p. 1118 (FUJIMURA, Masaki), non-official translation (Medical treatment-thromboxane A2 inhibitor, Respiration)	1, 3, 9, 14, 15 8-15
X Y	WO 2004/100988 A1 (MIYAZAKI, Mizuo) 25 November 2004, claims, examples & US 2006/0234916 A1, claims, examples & JP 4-100988 A & EP 1640020 A1	1, 2, 14, 15 8-15
X Y	JP 2007-532483 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 15 November 2007, claims, examples & WO 2005/089366 A3, claims, examples & US 2004/0214836 A1 & EP 1905457 A1	1, 5, 14, 15 8-15
Y	WO 2008/047863 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 24 April 2008, claims, examples & US 2010/0323026 A1, claims, examples & EP 2087890 A1 & JP 8-47863 A	10-15
Y	佐々木信一, 特発性間質性肺炎と難病医療費助成制度, 最新医学, July 2016, vol. 71, no. 7, pp. 128-137, particularly, p. 130, right column, l. 5 to p. 131, left column, l. 12 (SASAKI, Shinichi, The specified disease treatment research program in terms of idiopathic interstitial pneumonias, The Medical Frontline)	9-15
Y	奥野正隆 他, セリンプロテアーゼ阻害剤の肝線維化抑制・肝再生促進効果, 肝臓, 2002, vol. 43, supplement, p. A269, particularly, 目的、方法と成績参照 (OKUNO, Masataka et al.), non-official translation (Effect of liver fibrosis inhibition and liver reproduction promotion with serine protease inhibitors, Liver, Purpose, Method and Achievement)	9-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/047100

(Continuation of Box No. A)

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/06(2006.01)i, A61K9/14(2006.01)i, A61K9/50(2006.01)i, A61K9/70(2006.01)i,
A61K31/24(2006.01)i, A61K31/366(2006.01)i, A61K31/4174(2006.01)i,
A61K31/4418(2006.01)i, A61K31/4709(2006.01)i, A61K31/496(2006.01)i,
A61K31/519(2006.01)i, A61K31/522(2006.01)i, A61L15/40(2006.01)i,
A61L15/64(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/06(2006.01)i,
A61P9/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D209/34(2006.01)n,
C07D213/64(2006.01)n, C07D233/60(2006.01)n, C07D309/30(2006.01)n,
C07D401/12(2006.01)n, C07D473/08(2006.01)n, C07D487/04(2006.01)n

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/047100

(Continuation of Box No. B)

FIELDS SEARCHED

A61K45/06, A61K9/14, A61K9/50, A61K9/70, A61K31/24, A61K31/366, A61K31/4174, A61K31/4418, A61K31/4709, A61K31/496, A61K31/519, A61K31/522, A61L15/40, A61L15/64, A61P9/00, A61P9/04, A61P9/06, A61P9/10, A61P43/00, C07D209/34, C07D213/64, C07D233/60, C07D309/30, C07D401/12, C07D473/08, C07D487/04

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. 特別ページ参照		
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（IPC）） Int.Cl. 特別ページ参照		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018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), CPlus/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 Y	JP 2012-515800 A (インターミューン, インコーポレイテッド) 2012.07.12, 【特許請求の範囲】, 実施例 & US 2011/0218515 A1 Claims, Examples & WO 2010/085805 A1 & EP 2389227 A1	1, 7, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2009-513713 A (インターミューン インコーポレイテッド) 2009.04.02, 【特許請求の範囲】, 実施例 & US 2010/0029578 A1 Claims, Examples & WO 2007/053685 A2 & EP 1948178 A1	1, 7, 9, 14, 15 8-15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 「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 「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） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05.03.2018	国際調査報告の発送日 20.03.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 石井 裕美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 3402

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
X Y	JP 2008-510705 A (ザ・ジョーンズ・ホプキンス・ユニバーシティ) 2008.04.10, 【特許請求の範囲】, 実施例 & WO 2006/023603 A2 Claims, Examples & US 8299083 B2 & EP 1786428 A1	1, 4, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2011-510976 A (韓国科学技術研究院) 2011.04.07, 【特許請求の範囲】, 実施例 & WO 2009/096616 A1 Claims, Examples & US 2011/0039869 A1 & KR 10-2009-0084150 A	1, 4, 9, 14, 15 8-15
X Y	矢田部左近, シロスタゾールが徐脈性不整脈に効果を示し、心不全が改善した 1例, 日本臨床内科医会誌, 2006, Vol.21, No. 4, pp. 426-430, 特に、結果、 考察参照	1, 4, 9, 14, 15 8-15
X Y	土谷健, Cilostazol 投与により洞徐脈と伴に心不全が改善した拡張相肥大型 心筋症の一例, 臨床と研究, 2006, Vol. 83, No. 5, pp. 753-758, 特に、症例、考 察参照	1, 4, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2002-145770 A (三共株式会社) 2002.05.22, 【特許請求の範囲】, 実施例 & WO 2002/017913 A1 Claims, Examples & US 2003/0181500 A1 & EP 1314425 A1	1, 6, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2009-502773 A (ザ プロクター アンド ギャンブル カンパニー) 2009.01.29, 【特許請求の範囲】, 【0005】, 実施例 & WO 2007/010498 A2 Claims, 第2頁第9-13行, Examples & US 2007/0021395 A1 & EP 1906966 A1	1, 6, 9, 14, 15 8-15
X Y	JP 2005-504064 A (ロングウッド ファーマシューティカル リサーチ, イン コーポレイテッド) 2005.02.10, 【特許請求の範囲】, 【0092】, 実施例 & US 2003/0068366 A1 Claims, [0107], Examples & WO 2003/020243 A1 & EP 1429729 A1	1, 6, 9, 14, 15 8-15
X Y	OGURA, Toshitsugu et al, Effects of OKY-046, a Selective Thromboxane A2 Synthetase Inhibitor, on Venticular Arrhythmias and Prostaglandins during Coronary Artery Ligation and Reperfusion in Anesthetized Dogs., Japan. J. Pharmacol, 1988, Vol. 47, No. 1, pp. 95-98, 特に、Abstract, Fig 1 参 照	1, 3, 9, 14, 15 8-15
X Y	藤村政樹, 薬物療法 トロンボキサンA2阻害剤, 呼吸, Vol. 9, No. 9, pp. 1114-1120, 特に、要旨、第1118頁参照	1, 3, 9, 14, 15 8-15

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
X Y	WO 2004/100988 A1 (宮崎瑞夫) 2004. 11. 25, 特許請求の範囲, 実施例 & US 2006/0234916 A1 Claims, Examples & JP 4-100988 A & EP 1640020 A1	1, 2, 14, 15 8-15
X Y	JP 2007-532483 A (ザ・スクリプス・リサーチ・インスティテュート) 2007. 11. 15, 【特許請求の範囲】, 実施例 & WO 2005/089366 A3 Claims, Examples & US 2004/0214836 A1 & EP 1905457 A1	1, 5, 14, 15 8-15
Y	WO 2008/047863 A1 (小野薬品工業株式会社) 2008. 04. 24, 請求の範囲, 実施例 & US 2010/0323026 A1 Claims, Examples & EP 2087890 A1 & JP 8-47863 A	10-15
Y	佐々木信一, 特発性間質性肺炎と難病医療費助成制度, 最新医学, 2016. 07, Vol. 71, No. 7, pp. 128-137, 特に、第 130 頁右欄第 5 行-第 131 頁左欄 12 行参照	9-15
Y	奥野正隆 他, セリンプロテアーゼ阻害剤の肝線維化抑制・肝再生促進効果, 肝臓, 2002, Vol. 43, Supplement, p. A269, 特に、目的、方法と成績参照	9-15

発明の属する分野の分類

A61K45/06(2006.01)i, A61K9/14(2006.01)i, A61K9/50(2006.01)i, A61K9/70(2006.01)i,
A61K31/24(2006.01)i, A61K31/366(2006.01)i, A61K31/4174(2006.01)i,
A61K31/4418(2006.01)i, A61K31/4709(2006.01)i, A61K31/496(2006.01)i,
A61K31/519(2006.01)i, A61K31/522(2006.01)i, A61L15/40(2006.01)i,
A61L15/64(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/06(2006.01)i,
A61P9/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D209/34(2006.01)n, C07D213/64(2006.01)n,
C07D233/60(2006.01)n, C07D309/30(2006.01)n, C07D401/12(2006.01)n,
C07D473/08(2006.01)n, C07D487/04(2006.01)n

調査を行った最小限資料

A61K45/06, A61K9/14, A61K9/50, A61K9/70, A61K31/24, A61K31/366, A61K31/4174,
A61K31/4418, A61K31/4709, A61K31/496, A61K31/519, A61K31/522, A61L15/40, A61L15/64,
A61P9/00, A61P9/04, A61P9/06, A61P9/10, A61P43/00, C07D209/34, C07D213/64, C07D233/60,
C07D309/30, C07D401/12, C07D473/08, C07D487/04