(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6858714号
(P6858714)

(45)発行日　令和3年4月14日(2021.4.14)　(24)登録日　令和3年3月26日(2021.3.26)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 31/19	(2006.01)	A61K	31/19
A61K 31/22	(2006.01)	A61K	31/22
A61K 31/365	(2006.01)	A61K	31/365
A61P 3/06	(2006.01)	A61P	3/06
A61P 3/04	(2006.01)	A61P	3/04

請求項の数 16　(全 15 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-562691 (P2017-562691)
(86)(22)出願日　平成28年6月1日(2016.6.1)
(65)公表番号　特表2018-516934 (P2018-516934A)
(43)公表日　平成30年6月28日(2018.6.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/035273
(87)国際公開番号　WO2016/196637
(87)国際公開日　平成28年12月8日(2016.12.8)
審査請求日　令和1年5月15日(2019.5.15)
(31)優先権主張番号　62/169,334
(32)優先日　平成27年6月1日(2015.6.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　512157966
メタボリック・テクノロジーズ，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国アイオワ州５００１０，エームズ，サウス・ループ・ドライブ　２７１１，スイート　４４００
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100118902
弁理士　山本　修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前　徹
(74)代理人　100120112
弁理士　中西　基晴

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脂肪量を低減するためのβ－ヒドロキシ－β－メチルブチレート（ＨＭＢ）の組成物および使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

動物の脂肪組織における細胞内の脂肪分解を増大させるために用いる、０．５ｇから３０ｇまでのβ－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）を唯一の有効成分として含む組成物であって、該組成物はその必要がある動物へ投与され、それにより該動物の脂肪組織での脂肪分解が増大される、前記組成物。

【請求項２】

前記ＨＭＢが、それの遊離酸型、それの塩、それのエステル、およびそれのラクトンからなる群から選択される、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記塩が、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、クロム塩およびカルシウム塩からなる群から選択される、請求項２に記載の組成物。

【請求項４】

前記動物が運動プログラムに参加していない、請求項１に記載の組成物。

【請求項５】

肥満又は過体重の動物に投与される、請求項１に記載の組成物。

【請求項６】

低カロリー食で投与される、請求項１に記載の組成物。

【請求項７】

カロリー制限なしに投与される、請求項１に記載の組成物。

【請求項８】
動物において、細胞内の脂肪分解を増大することによる脂肪減少を誘導するために用いる、０．５ｇから３０ｇまでのβ－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）を唯一の有効成分として含む組成物であって、該組成物はその必要がある動物へ投与され、それにより脂肪分解を増大することによる脂肪減少が誘導される、前記組成物。
【請求項９】
前記ＨＭＢが、それの遊離酸型、それの塩、それのエステル、およびそれのラクトンからなる群から選択される、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記塩が、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、クロム塩およびカルシウム塩からなる群から選択される、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
筋肉量を増大させるための、請求項８に記載の組成物。
【請求項１２】
動物において、細胞内の脂肪分解を増大することによる脂肪細胞からのグリセロール搬出を促進するために用いる、０．５ｇから３０ｇまでのβ－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）を唯一の有効成分として含む組成物であって、該組成物はその必要がある動物へ投与され、それにより脂肪分解を増大することによる脂肪細胞からのグリセロール搬出が促進される、前記組成物。
【請求項１３】
前記ＨＭＢが、それの遊離酸型、それの塩、それのエステル、およびそれのラクトンからなる群から選択される、請求項１２に記載の組成物。
【請求項１４】
前記塩が、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、クロム塩およびカルシウム塩からなる群から選択される、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
動物において、細胞内の脂肪分解を増大することによる肥満症に関連する併存症のうち少なくとも１つを治療または予防するために用いる、０．５ｇから３０ｇまでのβ－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）を唯一の有効成分として含む組成物であって、該組成物はその必要がある動物へ投与され、それにより脂肪分解を増大することによる肥満症に関連する併存症のうち少なくとも１つが治療または予防される、前記組成物。
【請求項１６】
前記併存症が、２型糖尿病、心血管疾患、慢性炎症、および癌からなる群から選択される、請求項１５に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願はUnited States Provisional Patent Application No. 62/169,334, 2015年6月1日出願に基づく優先権を主張し、それを本明細書に援用する。
分野
本発明は、β－ヒドロキシ－β－メチルブチレート（ＨＭＢ）を含む組成物、およびＨＭＢを用いて脂肪分解を増強し、体脂肪減少を増大させ、脂肪細胞サイズを低減し、脂肪細胞の脂肪酸代謝を増大させ、総体重を低減し、脂肪細胞炎症を低減する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
高い肥満症有病率は保健および経済上の大きな負荷であり、肥満症および肥満症関連併存症の効果的な栄養管理に対する緊急のニーズをもたらしている。最近、慢性炎症が、一部は脂肪組織に由来する多くの代謝疾患の発病に関与する因子として認識されるようになった。具体的には、脂肪細胞肥大は代謝機能障害に関連する炎症遺伝子プロファイルを推進する。現在、肥満症および脂肪組織炎症の管理のために有効なツールを開発する国家的

優先事項があり、それには減量に際しての食欲の抑制および最適身体組成の維持のための栄養製品が含まれる。しかし、減量製品を支える科学は、これまで脂肪組織減少に対比した除脂肪組織の維持ではなく、主にカロリー制限のみに基づいていた。理想的な減量プログラムは、筋肉組織より脂肪組織の優先的な減少を推進するであろう。脂肪細胞代謝の改善は、脂肪細胞のサイズ、酸化ストレスおよび炎症の低減、ならびに心臓－代謝健康状態の増進をもたらす。

【０００３】

肥満症有病率の増大は異常な規模の健康危機(health crisis)であり、２０３０年までに成人集団のおおよそ５０％が肥満になると予想されている。肥満症は、２型糖尿病(type 2 diabetes)（Ｔ２Ｄ）、心血管疾患(cardiovascular disease)（ＣＶＤ）、高血圧症、および多くの癌に関連する。肥満症および関連併存症は、クオリティー・オブ・ライフに対する破壊的な影響のほか、一人当たりの平均年間医療コストを正常体重の人々についてのコストと比較して＄２，７４１（２００５ドル）増大させる；それには、入院患者コストの４６％増大、通院患者コストの２７％増加、および処方箋調剤薬に対する費用の８０％増大が含まれる。さらに、フルタイム従業員についての生産性損失に起因するコストは年間＄４２８億と推定される。

【０００４】

分枝鎖アミノ酸、特にロイシンは、タンパク質代謝の重要な調節物質として認識されている。幾つかの研究が、ロイシンの天然代謝産物であるβ－ヒドロキシ－β－メチルブチレート（ＨＭＢ）はロイシンより有効であることを示した；それは筋タンパク質分解の低減および筋タンパク質合成の促進をもたらし、これは健康および疾患状態の青少年および高齢者の両方において除脂肪体重の増大および筋肉機能の改善に転化される。

【０００５】

ロイシン欠乏食は腹部の脂肪量(fat mass)を劇的に低減することが示されており(Cheng et al., Diabetes, 2010 Jan, 59(1):17-25)、本発明の知見は驚異的かつ予想外のものになる。

【０００６】

ＨＭＢ

アルファ－ケトイソカプロエート(Alpha-ketoisocaproate)（ＫＩＣ）は、ロイシンの主要な第１活性代謝産物である。ＫＩＣ代謝の少量産物がβ－ヒドロキシ－β－メチルブチレート（ＨＭＢ）である。ＨＭＢは多様な用途に関して有用であることが見出されている。具体的には、U.S. Patent No. 5,360,613 (Nissen)に、ＨＭＢは総コレステロールおよび低密度リポタンパク質コレステロールの血中レベルを低減するのに有用であると記載されている。U.S. Patent No. 5,348,979 (Nissen et al.)には、ＨＭＢがヒトにおいて窒素保持を促進するのに有用であると記載されている。U.S. Patent No. 5,028,440 (Nissen)は、動物において除脂肪組織の発達を増大させるためのＨＭＢの有用性について考察している。同様にU.S. Patent No. 4,992,470 (Nissen)には、ＨＭＢが哺乳類の免疫応答を増強させるのに有効であると記載されている。U.S. Patent No. 6,031,000 (Nissen et al.)には、疾患関連の衰弱を治療するためのＨＭＢおよび少なくとも１種類のアミノ酸の使用が記載されている。

【０００７】

タンパク質分解を抑制するためのＨＭＢの使用は、ロイシンがタンパク質節約特性(protein-sparing characteristics)をもつという所見に由来する。必須アミノ酸であるロイシンは、タンパク質合成のために使われるか、あるいはアミノ基転移してα－ケト酸（α－ケトイソカプロエート，ＫＩＣ）になる可能性がある。一経路において、ＫＩＣは酸化されてＨＭＢになる可能性があり、これはロイシン酸化のおおよそ５％を占める。ＨＭＢは筋肉の量および強度の増強においてロイシンに勝る。ＨＭＢの最適効果は、ＨＭＢのカルシウム塩として投与した場合に３．０グラム／日、または０．０３８ｇ／ｋｇ体重／日で達成でき、一方、ロイシンの場合は３０．０グラム／日以上が必要である。

【０００８】

産生または摂取されると、ＨＭＢは２つの結末をもつと思われる。第１の結末は尿中における単純な排出である。ＨＭＢが供給された後、尿濃度が上昇し、その結果、おおよそ２０～５０％のＨＭＢが尿中へ失われる。もうひとつの結末は、ＨＭＢからＨＭＢ－ＣｏＡへの活性化に関係する。ＨＭＢ－ＣｏＡに変換されると、さらなる代謝、すなわちＨＭＢ－ＣｏＡからＭＣ－ＣｏＡへの脱水またはＨＭＢ－ＣｏＡからＨＭＧ－ＣｏＡへの直接変換のいずれかが起きる可能性があり、それにより細胞内コレステロール合成のための基質が提供される。幾つかの研究により、ＨＭＢがコレステロール合成経路に取り込まれ、損傷を受けた細胞膜の再生に使われる新たな細胞膜の供給源となる可能性があることが示された。ヒトの研究は、激しい運動に伴う血漿ＣＰＫ(creatine phosphokinase)（クレアチニンホスホキナーゼ）上昇により測定される筋損傷が、最初の４８時間以内のＨＭＢ補給で低減することを示した。ＨＭＢの保護効果は、毎日の連続使用で最大３週間持続する。多数の研究により、ＨＭＢの有効量はＣａＨＭＢ（ＨＭＢカルシウム）として３．０グラム／日（約３８ｍｇ／ｋｇ体重／日）であることが示された。この用量で、レジスタンストレーニング(resistance training)に伴う筋肉の量および強度の増加が増大し、一方で激しい運動(strenuous exercise)に伴う筋損傷が最小限に抑えられる。ＨＭＢは安全性について試験され、健康な青少年または高齢者において副作用を示さなかった。ＨＭＢとＬ－アルギニンおよびＬ－グルタミンとの組合わせも、エイズおよび癌の患者に補給した際、安全であることが示された。

【０００９】

最近、ＨＭＢの新たな送達形態であるＨＭＢ遊離酸が開発された。この新たな送達形態はＣａＨＭＢより速やかに吸収され、より大きな組織クリアランスをもつことが示された。この新たな送達形態はU.S. Patent Publication Serial No. 20120053240に記載されており、それの全体を本明細書に援用する。

【００１０】

現在の証拠は、ＨＭＢが高強度または長期間の運動後の骨格筋の再生能力を加速することにより作用することを示唆している。トレーニングおよび／または食事を制御すると、ＨＭＢは用量依存性で骨格筋損傷およびタンパク質分解の指標を低減できる。最近、改善された生物学的利用能をもつ遊離酸型ＨＭＢ（ＨＭＢ－ＦＡ）が開発された。初期の研究により、この形態のＨＭＢ補給は、現在用いられている形態であるＨＭＢカルシウムと比較すると、投与後ほぼ四分の一の時間でおおよそ２倍の血漿ＨＭＢレベルになることが示された。さらに、急激な１回の高負荷(high volume)レジスタンストレーニングを行なう３０分前に投与したＨＭＢ－ＦＡが、レジスタンストレーニングした運動選手の筋損傷の指標を低下させ、回復感覚を改善することができた。さらに、２．４グラムのＨＭＢ－ＦＡの短期摂取は骨格筋タンパク質合成を増大させ、タンパク質分解を低減する；それぞれ、＋７０％および－５６％。

【００１１】

筋肉に対するＨＭＢの作用については十分な文献がある。ＨＭＢ補給は筋肉の量および強度の増大をもたらし、有酸素性改善(aerobic improvement)をもたらす可能性があることが知られている。除脂肪筋肉量(lean muscle mass)の増大は全体的な身体組成を変化させるが、ＨＭＢは筋細胞に作用して筋肉量を増大させるにすぎず、それが次いで身体組成を変化させると推定されてきた。本発明に記載する知見以前には、ＨＭＢが脂肪細胞および脂肪組織に対する何らかの直接作用をもつことは知られていなかった。

【００１２】

大部分の減量は低カロリー食により開始される。この減量は、脂肪量および除脂肪体重（すなわち、骨格筋）の両方を、２：１と推定される比率で減少させることを含む。運動の結果、体重が減少し、それは主に脂肪量減少が占め、わずかまたは著しい
筋肉量増加を伴う。運動に際して起きる著しい数の身体量変化は、現在では古典的な（有益な）ＩＬ－６経路により仲介されると考えられている。意外にも、ＨＭＢは運動の効果と類似の効果をもつ（ただし運動を変量とせずに）；脂肪量減少は運動しなくてもみられる。

【００１３】
本発明は、ＨＭＢの組成物、ならびにＨＭＢを用いて脂肪分解の増強、脂肪細胞の脂肪酸化の増大、脂肪細胞および筋肉ミトコンドリアの生物発生の誘導、エネルギー消費の増大、体重の低減、ならびに体脂肪減少の増大をもたらす方法を含む。よって、ＨＭＢは脂肪量低減と合わせた除脂肪体重の増大により規定される体形(body contour)改善のために使用できる。その結果、総体重を低減させることができる。これらの効果は、カロリー制限を伴う場合および伴なわない場合に、ならびに運動を必要とせずにみられる。
【００１４】
脂肪分解の増大および／または脂肪量低減のためのＨＭＢの使用は、肥満症関連の罹病率、たとえば２型糖尿病、心血管疾患、慢性炎症、癌、および他の関連併存症も低減する。
【００１５】
脂肪細胞、脂肪組織および脂肪減少に対する前記の効果をもたらすためにＨＭＢをヒトに投与するほか、本発明は、脂肪細胞、脂肪組織および脂肪減少に対する同じ効果でＨＭＢの組成物を動物に投与することを含む。コンパニオンアニマルに高い率の肥満症がある；米国で推定５４％のネコおよびイヌが過体重または肥満症である。よって、動物において脂肪を減少させるための組成物およびこれらの組成物の使用方法に対するニーズがある。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１６】
【特許文献１】U.S. Patent No. 5,360,613
【特許文献２】U.S. Patent No. 5,348,979
【特許文献３】U.S. Patent No. 5,028,440
【特許文献４】U.S. Patent No. 4,992,470
【特許文献５】U.S. Patent No. 6,031,000
【特許文献６】U.S. Patent Publication Serial No. 20120053240
【非特許文献】
【００１７】
【非特許文献１】Cheng et al., Diabetes, 2010 Jan, 59(1):17-25
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１８】
本発明の一目的は、脂肪を減少させ、および／または体重を低減させるのに使用するための組成物を提供することである。
本発明のさらなる目的は、脂肪細胞および／または脂肪組織の脂肪酸化を増大させるのに使用するための組成物を提供することである。
【００１９】
本発明の他の目的は、脂肪細胞および筋肉ミトコンドリアの生物発生を誘導する組成物を提供することである。
本発明のさらに他の目的は、エネルギー消費を増大させる組成物を提供することである。
【００２０】
さらに、本発明の目的は、脂肪分解を増強させるのに使用するための組成物を提供することである。
本発明の他の目的は、脂肪を減少させるのに使用するための組成物を投与する方法を提供することである。
【００２１】
本発明のさらに他の目的は、脂肪細胞および筋肉の脂肪酸化を増大させるための組成物を投与する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、脂肪細胞および筋肉ミトコンドリアの生物発生を誘導するのに使用するための組成物を投与する方法を提供することである。

【００２２】

本発明のさらなる目的は、エネルギー消費を増大させるのに使用するための組成物を投与する方法を提供することである。

さらに、本発明の他の目的は、脂肪を減少させるのに使用するための組成物を投与する方法を提供することである。

【００２３】

本発明の他の目的は、体重を低減させるのに使用するための組成物を投与する方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、脂肪分解を増強させるのに使用するための組成物を投与する方法を提供することである。

【００２４】

本発明のさらに他の目的は、２型糖尿病、心血管疾患、慢性炎症、癌、および他の関連併存症を含めた肥満症関連の罹病率を低減するのに使用するための組成物を投与する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【００２５】

本発明のこれらおよび他の目的は、以下の明細書、図面、および特許請求の範囲を参照すると当業者に明らかになるであろう。

本発明は、これまで遭遇してきた困難を克服することを意図する。そのために、ＨＭＢを含む組成物を提供する。この組成物をその必要がある対象に投与する。すべての方法が、動物にＨＭＢを投与することを含む。本発明に含まれる対象には、ヒトおよび非ヒト哺乳類が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】図１は、３Ｔ３－Ｆ４４２Ａ脂肪細胞における脂肪分解を示すグラフである。

【図２】図２は、ヒト皮下脂肪細胞における脂肪分解を示すグラフである。

【図３】図３は、遺伝子発現を示す。

【図４】図４は、ＯＰ９脂肪細胞における脂肪分解を示すグラフである。

【図５】図５は、基礎脂肪分解を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００２７】

意外にもＨＭＢが脂肪細胞および脂肪組織に影響を及ぼすことが予想外に見出された。本発明は、ＨＭＢの組成物、ならびに脂肪分解の増強、脂肪細胞の脂肪酸化の増大、脂肪細胞および筋肉ミトコンドリアの生物発生の誘導、エネルギー消費の増大、体重の低減、ならびに脂肪減少の増大をもたらすためにＨＭＢを使用する方法を含む。これらの効果は、カロリー制限を伴う場合および伴なわない場合に、ならびに運動を必要とせずにみられるが、本発明組成物の補給および本発明方法と併せて運動を行なってもよい。

【００２８】

この組成物は、脂肪減少を求めるあらゆる年齢のグループに使用できる。この組成物は、ヒトおよび非ヒト哺乳類（コンパニオンアニマルを含むが、それらに限定されない）に使用できる。

【００２９】

ＨＭＢ

β－ヒドロキシ－β－メチル酪酸、またはβ－ヒドロキシ－イソ吉草酸は、それの遊離酸型で（CH_3）$_2$（ＯＨ）ＣＣＨ$_2$ＣＯＯＨとして表わすことができる。用語“ＨＭＢ”は、上記の化学式をもつ化合物（それの遊離酸型および塩型の両方）、およびその誘導体を表わす。いかなる形態のＨＭＢも本発明の状況で使用できるが、好ましくはＨＭＢは遊離酸、塩、エステル、およびラクトンからなる群から選択される。ＨＭＢエステルには

、メチルおよびエチルエステルが含まれる。ＨＭＢラクトンには、イソバレリルラクトンが含まれる。ＨＭＢ塩には、ナトリウム塩、カリウム塩、クロム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アルカリ金属塩、および土類金属塩が含まれる。

【００３０】

ＨＭＢおよびそれの誘導体を製造する方法は当技術分野で周知である。たとえば、ＨＭＢはジアセトンアルコールの酸化により合成できる。適切な１方法がCoffman et al., J. Am. Chem. Soc. 80: 2882-2887 (1958)により記載されている。そこに記載されるように、ＨＭＢはジアセトンアルコールのアルカリ性次亜塩素酸ナトリウム酸化により合成される。生成物は遊離酸型で回収され、それを塩に変換することができる。たとえば、Coffman et al. (1958)のものと類似の方法により、ＨＭＢをそれのカルシウム塩として製造でき、その際、ＨＭＢの遊離酸を水酸化カルシウムで中和し、エタノール水溶液から結晶化により回収する。カルシウム塩および遊離酸型のＨＭＢがＭｅｔａｂｏｌｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（アイオワ州エイムズ）から販売されている。

【００３１】

β-ヒドロキシ-β-メチル酪酸（ＨＭＢ）カルシウム補給

２０年以上前、ＨＭＢのカルシウム塩がヒト用の栄養補助剤(nutritional supplement)（サプリメント）として開発された。多数の研究により、ＣａＨＭＢ補給は、レジスタンス運動(resistance-exercise)トレーニングとの併用で筋肉の量および強度の増加を改善し、癌およびエイズなどの状態における筋肉量の減少を減弱化することが示された。NissenおよびSharpはレジスタンストレーニングと併用したサプリメントのメタ解析を実施し、ＨＭＢがレジスタンストレーニングで強度および除脂肪量の著しい増大を示した臨床試験のわずか２つのサプリメントのうちの１つであることを見出した。試験は、３８ｍｇのＣａＨＭＢ／ｋｇ体重／日が平均的な者に有効な投与量であると思われることを示した。

【００３２】

強度および筋肉量の増加に加えて、ＣａＨＭＢ補給は筋損傷および筋タンパク質分解の指標も低下させる。ヒトの試験は、血漿ＣＰＫ（クレアチニンホスホキナーゼ）増大により測定した激しい運動後の筋損傷がＨＭＢ補給で低減することを示した。ＨＭＢの保護効果は、毎日の継続使用で少なくとも３週間は持続することが示された。分離したラット筋肉におけるインビトロ試験は、ＨＭＢが特にストレス期間中の筋タンパク質分解の有効な阻害剤であることを示す。これらの所見はヒトにおいて確認された；たとえば、ＨＭＢはレジスタンストレーニングを行なっている対象における筋タンパク質分解を阻害する。

【００３３】

ＨＭＢがタンパク質分解を低減し、タンパク質合成を増大させる分子機構が、レポートされた。Eleyらは、ＨＭＢがｍＴＯＲリン酸化によりタンパク質合成を刺激することを示すインビトロ試験を実施した。他の試験は、タンパク質分解誘導因子(proteolysis inducing factor)（ＰＩＦ）、リポ多糖（ＬＰＳ）、およびアンジオテンシンＩＩによって筋タンパク質異化を刺激した際、ＨＭＢがユビキチン－プロテオソームタンパク質分解経路の誘導を減弱化することによってタンパク質分解を低減することを示した。さらに他の試験は、ＨＭＢがカスパーゼ－３および－８プロテアーゼの活性化も減弱化することを立証した。これらの試験を合わせると、ＨＭＢ補給はタンパク質分解の低減とタンパク質合成の増大の組合わせによって除脂肪量の増大および付随する強度増加をもたらすことが指摘される。

【００３４】

ＨＭＢ遊離酸型

大部分の場合、臨床試験に用いられ、エルゴジェニックエイド（強壮剤）(ergogenic aid)として市販されているＨＭＢは、カルシウム塩型であった。最近の進歩によりＨＭＢを栄養補助剤として使用するために遊離酸型として製造できるようになった。最近、新たな遊離酸型のＨＭＢが開発され、それはＣａＨＭＢより速やかに吸収されて、より急速かつより高いピーク血清ＨＭＢレベルおよび組織に対する改善された血清クリアランスをもたらすことが示された。

【００３５】
したがって、特に激しい運動の直前に投与する場合、ＨＭＢ遊離酸はカルシウム塩型より有効なＨＭＢ投与方法の可能性がある。急激な１回の運動の３０分前に開始したＨＭＢ遊離酸は、筋損傷の減弱化および炎症性応答の軽減においてＣａＨＭＢより有効であった。しかし、本発明がいかなる形態のＨＭＢをも包含することは当業者に認識されるであろう。

【００３６】
いずれの形態のＨＭＢも、約０．５グラムのＨＭＢ～約３０グラムのＨＭＢの一般的投与範囲になる様式で送達および／または投与形態に取り込むことができる。
組成物を食用形態で経口投与する場合、組成物は好ましくは栄養補助食品(dietary supplement)、食品または医薬(pharmaceutical medium)の形態、より好ましくは栄養補助食品または食品の形態である。組成物を含むいずれか適切な栄養補助食品または食品を本発明の状況で使用できる。組成物が形態（たとえば、栄養補助食品、食品または医薬）に関係なくアミノ酸、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂肪、糖類、無機質および／または微量元素を含有できることは、当業者には理解されるであろう。

【００３７】
組成物を栄養補助食品または食品として調製するために、組成物は普通は組成物が栄養補助食品または食品中に実質的に均一に分布するように混和または混合されるであろう。あるいは、組成物を液体、たとえば水に溶解することができる。

【００３８】
栄養補助食品の組成物は、粉末、ゲル、液体であってもよく、あるいは打錠またはカプセル封入されてもよい。
組成物を含むいずれか適切な医薬を本発明の状況で使用できるが、好ましくは組成物を適切な医薬用キャリヤー、たとえばデキストロースまたはスクロースと混和する。

【００３９】
組成物は、錠剤、カプセル剤、ソフトゲル剤、丸剤、舌下ゲル剤、または液剤として経口投与することができる。組成物を他の成分、たとえばタンパク質、遊離型アミノ酸、炭水化物、糖類、ビタミン（たとえば、ビタミンＤ、ビタミンＣ、ビタミン$Ｂ_{12}$、ビタミン$Ｂ_{6}$、ビタミンＥ、および／またはビタミンＫ）および／または無機質と共に投与することができる。

【００４０】
さらに、医薬組成物をいずれか適切な様式で静脈内投与することができる。静脈内注入により投与するためには、組成物は好ましくは水溶性、無毒性の形態である。静脈内投与は、特に静脈内（ＩＶ）療法を受けている入院患者に適切である。たとえば、患者に投与されるＩＶ溶液（たとえば、生理食塩水またはグルコース溶液）に組成物を溶解することができる。アミノ酸、ペプチド、タンパク質および／または脂質を含有してもよい栄養補給ＩＶ溶液に組成物を添加することもできる。静脈内投与する組成物の量は、経口投与に用いるレベルと同様であってもよい。静脈内注入は経口投与よりいっそう制御されかつ正確である可能性がある。

【００４１】
組成物を投与する頻度を計算する方法は当技術分野で周知であり、本発明の状況でいずれか適切な投与頻度（たとえば、１日当たり６ｇ用量を１回、または１日当たり３ｇ用量を２回）を、いずれか適切な期間にわたって採用できる（たとえば、１回量を５分間にわたって、または１時間にわたって投与でき、あるいは多数回量を長期間にわたって投与できる）。ＨＭＢは長期間、たとえば数週間、数か月間または数年間にわたって投与できる。

【００４２】
いずれか適切な用量のＨＭＢを本発明の状況で使用できる。適量を計算する方法は当技術分野で周知である。
一般に、ＨＭＢの量は、脂肪分解の増強、脂肪細胞の脂肪酸化の増大、脂肪細胞および

筋肉ミトコンドリアの生物発生の誘導、エネルギー消費の増大、および脂肪減少の増大をもたらすのに十分なレベルである。これらの効果は、カロリー制限を伴う場合および伴わない場合に、ならびに運動を必要とせずにみられる。

【実施例】

【００４３】

以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。本明細書中に一般的に記載した、および実施例中に説明する本発明の組成物を、多様な配合物および剤形で調製できることは容易に理解されるであろう。よって、以下の現在好ましい本発明の方法、配合物および組成物のより詳細な記載は特許請求の範囲の本発明の範囲を限定するためのものではなく、現在好ましい本発明の態様の代表例にすぎない。

【００４４】

３Ｔ３－Ｆ４４２Ａ脂肪細胞における脂肪分解

方法．　ネズミ３Ｔ３－Ｆ４４２Ａ前駆脂肪細胞をコンフルエンスまで増殖させた。コンフルエンス後、３Ｔ３－Ｆ４４２Ａ細胞を脂肪細胞に分化させ、トリグリセリドで満たされた状態にした。脂肪分解をウェルプレート内で３Ｔ３－Ｆ４４２Ａ脂肪細胞からのグリセロール放出として査定した。Ｈｅｐｅｓ含有クレブス－リンガー(Krebs-Ringer)緩衝液（ＫＲＨ）に２％の無脂肪酸ＢＳＡ、５ｍＭのグルコース、ＡＤＡおよびＰＩＡを補給したものと共に、脂肪細胞単層をインキュベートした。さらに、細胞を０（対照）、０．１、１、または６ｍＭのいずれかの濃度のβ－ヒドロキシ－β－メチルブチレート（ＨＭＢ）で処理した。細胞を０．１μＭイソプロテレノールの非存在下（基礎）または存在下で１時間インキュベートした。アリコートのインキュベーション培地を取り出してグリセロール測定まで凍結しておいた。グリセロールを市販の酵素法により測定した。データを対照より増加した倍率として提示した。

【００４５】

結果．　分化した３Ｔ３－Ｆ４４２Ａ脂肪細胞における脂肪分解にＨＭＢが及ぼす作用を図１に示す。基礎条件下で、０．１および１ｍＭ濃度のＨＭＢが脂肪分解を対照より増大させたが、ＨＭＢは６．０ｍＭの含有レベルでは脂肪分解を低減した。イソプロテレノール刺激に応答して、０．１ｍＭ　ＨＭＢは脂肪分解を増大させたが、ＨＭＢは６．０ｍＭの含有レベルでは脂肪分解を低減した。これらのデータは、ＨＭＢが基礎状態および刺激状態の両方において用量応答様式で脂肪分解活性を増大させることにより脂肪細胞のトリグリセリド含量を調節できることを指摘する。

【００４６】

ヒト皮下脂肪細胞における脂肪分解

方法．　ヒト皮下脂肪細胞をドナーから入手し、インビトロでインキュベートした。脂肪分解をウェルプレート内でグリセロール放出として査定した。Ｈｅｐｅｓ含有クレブス－リンガー緩衝液（ＫＲＨ）に４％の無脂肪酸ＢＳＡ、５ｍＭのグルコース、ＡＤＡおよびＰＩＡを補給したものと共に、脂肪細胞をインキュベートした。さらに、細胞を０（対照）、０．１、または１ｍＭのいずれかの濃度のβ－ヒドロキシ－β－メチルブチレート（ＨＭＢ）で、１．０μＭイソプロテレノールの存在下に２時間処理した。アリコートのインキュベーション培地を取り出してグリセロール測定まで凍結しておいた。グリセロールを市販の酵素法により測定した。データを対照より増加した倍率として提示した。

【００４７】

結果．　ヒト皮下脂肪細胞における脂肪分解にＨＭＢが及ぼす作用を図２に示す。イソプロテレノール刺激に応答して、０．１および１ｍＭ　ＨＭＢは、対照補給脂肪細胞のものより脂肪分解を増大させた。これらのデータは、ＨＭＢが脂肪分解活性を増大させることにより脂肪細胞のトリグリセリド含量を調節できることを指摘する。これらの所見は、ＨＭＢはヒトにおいて脂肪含量を低減するために使用でき、肥満症のヒトにおいて減量を促進できることを立証する。

【００４８】

分化した脂肪細胞の遺伝子発現に対するＨＭＢの作用

ＳＧＢＳヒト前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化させ、１ｍＭ　ＨＭＢで４日間処理した。ヒトのシンプソン－ゴラビ－ベーメル症候群(Simpson-Golabi-Behmel syndrome)（ＳＧＢＳ）前駆脂肪細胞の細胞株細胞は、ＧＳＢＳを伴う患者の脂肪組織検体に由来する。マイクロアレイ（ｍＲＮＡ）を実施した。データは、抗炎症性かつ防御性であることが最近示された標準的(canonical)（古典的）ＩＬ６シグナル伝達経路における有意の増大（２．５３倍）を示す。同様に、サイトカイン受容体相互作用およびカルシウムシグナル伝達経路も、ｍＲＮＡにより測定して増大した。表１に結果を記載する。

【００４９】

【表１】

表 1

経路:	作用	p
IL6 シグナル伝達	2.53	0.011
サイトカイン・サイトカイン受容体 相互作用	2.37	0.018
カルシウムシグナル伝達経路	2.09	0.037

【００５０】

遺伝子発現

分化した脂肪細胞を１ｍＭのＨＭＢと共に４日間インキュベートした。ＲＮＡを抽出し、遺伝子発現をｑＰＣＲにより測定した。ＡＴＧＬ、ＡＣＯＸ、ＰＧＣ１ａ、ＡＴＧ７およびＢＮＩＰ３の遺伝子発現を分析した。ＡＴＧＬは脂肪組織トリグリセリドリパーゼ(adipose triglyceride lipase)（ＡＴＧＬ）であり、トリグリセリド加水分解の最初の工程を触媒する主要な役割を果たすことが見出された。ＡＴＧＬはヒトおよびマウスの脂肪組織に高度に発現する。ＡＣＯＸ１、すなわちアシル－ＣｏＡオキシダーゼ１はペルオキシソーム脂肪酸酸化に関与する最初の酵素である。これはミトコンドリアが扱うのに脂肪酸鎖が長すぎる場合に起きる。発生した高ポテンシャル電子はO_2→H_2O_2（＋熱）に伝達され、それはカタラーゼの存在下で→H_2OおよびO_2になる。ＰＧＣ１αはエネルギー代謝の鍵となる調節物質であり、高エネルギー産生脂肪組織である褐色脂肪組織の発達においてきわめて重要であることが見出された。オートファジー関連タンパク質７(Autophagy-related protein 7)（ＡＴＧ７）は脂肪量を調節する。ＡＴＧ７ノックダウンは機能しない異常な脂肪組織を生じるであろう。レベル上昇は組織再循環を増大させる。ＢＮＩＰ３はＡＴＧ７と同様に重要と思われるもうひとつのオートファジー関連タンパク質である。遺伝子発現結果を図３に示す。

【００５１】

ＨＭＢで処理したＳＧＢＳ脂肪細胞のホスホキナーゼタンパク質アレイ

重要なシグナル伝達タンパク質の活性に影響を及ぼすことが知られているタンパク質リン酸化における変化をバイアスのかからない方法で判定するためにこのアプローチを用いた。分化したヒト脂肪細胞をＨＭＢ（１ｍＭ）で４日間処理し、または処理しなかった。

【００５２】

列記したタンパク質の指示したリン酸化部位（複数でもよい）のリン酸化における、非処理細胞を上回る有意の増大のみを示す。タンパク質アレイを実施し、分化した脂肪細胞をＨＭＢと共にインキュベートした後にアップレギュレートされたリン酸化タンパク質を表２に示し、ダウンレギュレートされたタンパク質を表３に示す。

【００５３】

【表２】

表 2

HMBでアップレギュレートされるヒト脂肪細胞遺伝子			
HMBによる変化倍率	タンパク質	リン酸化部位	注釈
1.255	GSK-3a/b	S21/S9	• グリコーゲンシンターゼキナーゼ. インスリンによるリン酸化
1.233	CREB	S133	• 脂肪生成を増強
1.335	Lyn	Y397	• Srcキナーゼ(脂質代謝)
1.400	Fyn	Y420	• Srcキナーゼ(FA代謝を調節).
1.224	Yes	Y426	• Srcキナーゼ(エンドサイトーシス、たとえばEGFRを調節)
1.262	FGR	Y412	• Srcキナーゼ, 細胞接着/移動に対してネガティブ

【００５４】

【表３】

表 3

HMBでダウンレギュレートされるヒト脂肪細胞遺伝子			
HMBによる変化倍率	タンパク質	リン酸化部位	注釈
0.804	STAT5a/b	Y694/Y699	• IL7により活性化, FAS
0.665	Stat3	Y705	• IL6により活性化, レプチン
0.732	RSK1/2/3	S380/S386/S377	• 高度に保存されたSer/Thrキナーゼ, 多様な細胞プロセスを調節: 増殖, 運動性, 生存など • (ERK)/分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)シグナル伝達のエフェクター. グルコース輸送阻害の可能性
0.621	p53	S15	• 細胞周期を調節. 脂肪細胞分化を増強
0.834	P53	S46	• 細胞周期を調節. 脂肪細胞分化を増強
0.711	AKT1/2/3	S473	• AKTは細胞増殖に対する多くのインスリン作用および他の調節物質(たとえば増殖因子)の作用などを仲介する. S473は2つの活性化部位のうちの1つ. S473リン酸化は、PDK1を介してインスリンにより誘導され、細胞外シグナル(マトリックス、細胞相互作用からのもの)に応答して局所接着キナーゼ(FAK)により誘導される

【００５５】
１つの注目すべき所見は、有益なＩＬ－６経路に関与するＳｔａｔ　３における低減の所見である。さらに、ＡＫＴ１／２／３転写産物における低減がみられた；これは、セリン４７３においてリン酸化され、ｍＴＯＲ経路と密接に関係するタンパク質である。これは、トレオニン３０８においてインスリンシグナル伝達に関与するＡＫＴ１／２／３に変化がなかったのと対照的である。ＳＲＣキナーゼであるＦｙｎ、ｙｅｓおよびｌｙｎは脂肪酸代謝に関与する。
【００５６】
これらの試験は運動をシミュレートする電気刺激の非存在下で実施され、運動しない状態ですらＨＭＢ補給が脂肪減少のために効果的であることを立証した。
種々の脂肪細胞における、基礎状態およびイソプロテレノール刺激状態での脂肪分解のＨＭＢ調節
前記のように、ＨＭＢで処理した細胞におけるＡＴＧＬの発現の増大を観察し、それによりＨＭＢ処理が基礎状態およびイソプロテレノール刺激状態の脂肪分解に及ぼす作用を培養脂肪細胞において直接判定した。マウス初代脂肪細胞において脂肪分解を測定するための条件の最適化にViswanadhaおよびLondosのプロトコルを用いた(J. Lipid Res. 2006. 47: 1859-1864)；それは、内因性アデノシンを除去するためのアデノシンデアミナーゼ(adenosine deaminase)（ＡＤＡ）による処理、次いでＡＤＡ抵抗性ＰＩＡ(phenylisopropyl-adenosine)（フェニルイソプロピル－アデノシン）の添加を含む。
【００５７】
下記の処理戦略を試験した：ＨＭＢ用量０．１、１および６ｍＭ；ベーター－アドレナリン作動性アゴニストであるイソプロテレノールの２種類の濃度０．１および１μＭ；ならびに短期（脂肪分解アッセイ直前）－対－長期（４８時間）ＨＭＢ処理（処理当たりｎ＝４）。ＳＧＢＳ細胞は分化するのに長時間（数週間）かかるため使用するのに不便なので、Ｏｐ９脂肪細胞を用いた。
【００５８】
細胞をＯＰ９増殖培地中、多様な濃度のＨＭＢで、４８時間、前処理した。前処理の後、細胞を洗浄し、イソプロテレノール（０．１または１．０μＭ）と共に脂肪分解緩衝液：４％のＢＳＡを含むクレブス・リンガー・バイカーボネート（ＫＲＢ）中でインキュベートした。培地はアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）およびフェニルイソプロピル－アデノシン（ＰＩＡ）も含有していた；３７℃で２時間。ＡＤＡは内因性アデノシンを除去するために添加され、ＡＤＡ抵抗性であるＰＩＡは標準基礎脂肪分解を低くするために用いられた。処理後、培地をグリセロール含量についてアッセイし、ＲＩＰＡ緩衝液で細胞を溶解して、タンパク質濃度を決定した；＊ｐ＜０．０５，＊＊ｐ＜０．０１。Ｎ＝４。
【００５９】
結果を図４および５に示す：
ａ）ＨＭＢで４８時間の前処理は、分化したＯＰ９脂肪細胞において劇的にイソプロテレノール－刺激による脂肪分解を増強した（２～４倍）（図４）
ｂ）０．１ｍＭ　ＨＭＢでは、脂肪分解は０．１μＭイソプロテレノールに応答して２倍増強された（図４および５）
ｃ）１ｍＭ　ＨＭＢでは、０．１μＭイソプロテレノールで、ＨＭＢが無い場合より４倍の増大がみられた（図４および５）
ｄ）６ｍＭでは、０．１μＭイソプロテレノールに対する応答は３倍増強された；したがって、用量１ｍＭのＨＭＢが最適と思われる（図４）
ｅ）アドレナリン受容体の脱感作により推測されるように、高い方の濃度のイソプロテレノールは最大脂肪分解を低減した（図５）
ｆ）脂肪分解アッセイに用いた前記条件下で、すなわちＡＤＡに続いて基礎脂肪分解を低レベルに留めるためのＰＩＡの添加により、ＨＭＢ前処理は基礎脂肪分解も増大させた：約２倍（図４）
これらの実験例は、ＨＭＢが脂肪細胞および脂肪組織に対して直接作用をもつことを立

証し、ＨＭＢの補給が脂肪を減少させるために使用できることを示す。

【００６０】

以上の記述および図面は本発明の具体的態様を含む。本明細書に記載する以上の態様および方法は、当業者の能力、経験および好みに基づいて変更できる。本方法の工程を特定の順序で単に列記したものは、本方法の工程の順序に対する限定となるものではない。以上の記述および図面は本発明を説明および図示するにすぎず、特許請求の範囲でそのように限定しない限り、本発明はそれらに限定されない。開示内容を見た当業者は、本発明の範囲から逸脱することなくそれらを改変および変更できるであろう。

（１）　約０．５ｇから約３０ｇまでのβ－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）を含む組成物であって、その必要がある動物への組成物の投与が脂肪分解の増強、脂肪細胞の脂肪酸化の増大、脂肪細胞の生物発生の誘導、エネルギー消費の増大、脂肪量の低減、総体重の低減、および脂肪減少の増大を含む群から選択される少なくとも１つの効果を有する組成物。

（２）　ＨＭＢが、それの遊離酸型、それの塩、それのエステル、およびそれのラクトンからなる群から選択される、（１）に記載の組成物。

（３）　塩が、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、クロム塩およびカルシウム塩からなる群から選択される、（２）に記載の組成物。

（４）　動物の身体における脂肪の量を低減するための組成物であって、約０．５ｇから約３０ｇまでのβ－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）を含み、動物の身体における脂肪分解を促進する組成物。

（５）　ＨＭＢの投与が動物の身体における筋肉量を増大させる、（４）に記載の組成物。

（６）　その必要がある動物の脂肪組織における脂肪分解を増大させる方法であって、約０．５ｇから約３０ｇまでのβ－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）の組成物を動物に投与し、それによって動物の脂肪分解を増大させることを含む方法。

（７）　ＨＭＢが、それの遊離酸型、それの塩、それのエステル、およびそれのラクトンからなる群から選択される、（６）に記載の方法。

（８）　塩が、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、クロム塩およびカルシウム塩からなる群から選択される、（７）に記載の方法。

（９）　動物が運動プログラムに参加していない、（６）に記載の方法。

（１０）　その必要がある動物において脂肪減少を誘導する方法であって、β－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）を含む有効量の組成物を動物に投与することを含む方法。

（１１）　ＨＭＢが、それの遊離酸型、それの塩、それのエステル、およびそれのラクトンからなる群から選択される、（１０）に記載の方法。

（１２）　塩が、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、クロム塩およびカルシウム塩からなる群から選択される、（１１）に記載の方法。

（１３）　ＨＭＢの組成物の投与が筋肉量を増大させる、（１０）に記載の方法。

（１４）　その必要がある動物において脂肪細胞からのグリセロール搬出を促進する方法であって、β－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）を含む有効量の組成物を動物に投与することを含む方法。

（１５）　ＨＭＢが、それの遊離酸型、それの塩、それのエステル、およびそれのラクトンからなる群から選択される、（１４）に記載の方法。

（１６）　塩が、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、クロム塩およびカルシウム塩からなる群から選択される、（１５）に記載の方法。

（１７）　その必要がある動物において肥満症に関連する併存症のうち少なくとも１つを治療または予防する方法であって、約０．５ｇから約３０ｇまでのβ－ヒドロキシ－β－メチル酪酸（ＨＭＢ）の組成物を動物に投与することを含む方法。

（１８）　併存症が、２型糖尿病、心血管疾患、慢性炎症、および癌からなる群から選択される、（１７）に記載の方法。

【図１】

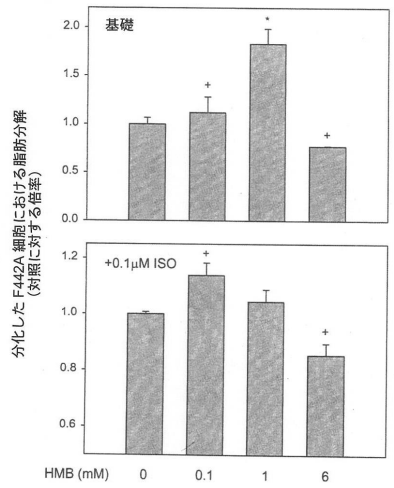
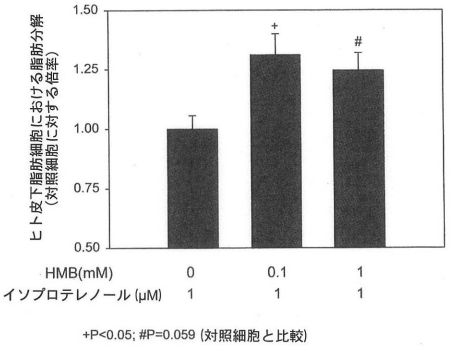


図１：3T3-F442A 脂肪細胞における脂肪分解

【図２】

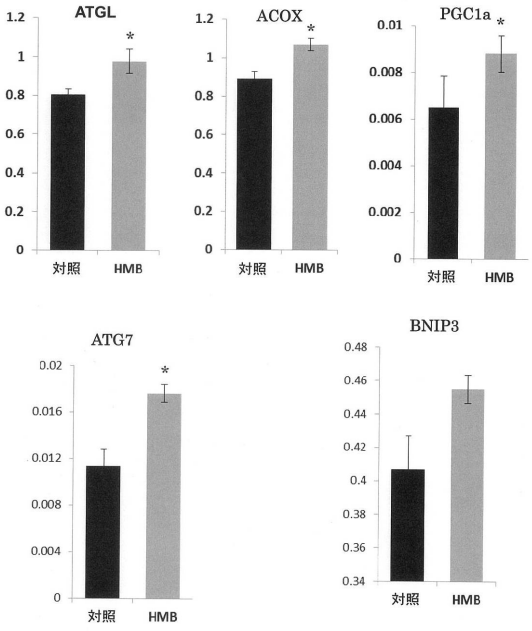


+P<0.05; #P=0.059 (対照細胞と比較)

図２．ヒト皮下脂肪細胞における脂肪分解

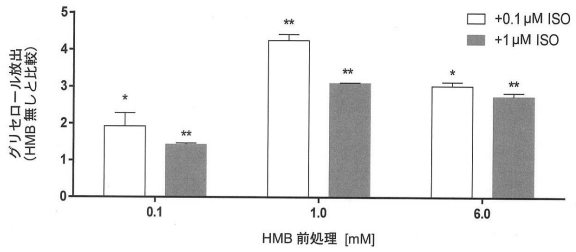
【図３】

図３：遺伝子発現



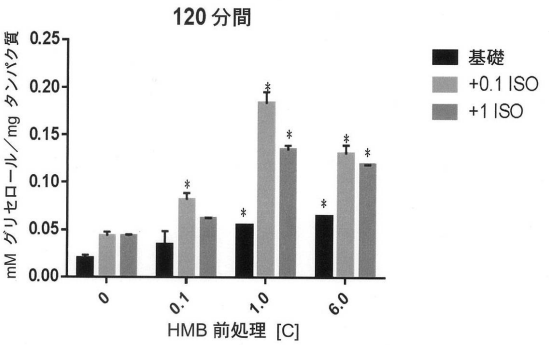
【図４】

図４：48 時間の HMB 処理は OP9 脂肪細胞におけるベータアドレナリン刺激による脂肪分解を増大させる



【図５】

図５： HMB 前処理は基礎脂肪分解を増大させる



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
A61P	***3/10***	***(2006.01)***	A61P	3/10
A61P	***9/00***	***(2006.01)***	A61P	9/00
A61P	***29/00***	***(2006.01)***	A61P	29/00
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	A61P	35/00
A23L	*33/10*	*(2016.01)*	A23L	33/10

(74)代理人 100122644
弁理士 寺地 拓己
(74)代理人 100203769
弁理士 大沢 勇久
(72)発明者 ラスメイチャー, ジョン
アメリカ合衆国アイオワ州５０２４８, ストーリー・シティ, グランド・アベニュー ７１９
(72)発明者 アブムラド, ナジ
アメリカ合衆国テネシー州３７２２０, ナッシュヴィル, トラベラーズ・コート ９３３
(72)発明者 ベイアー, ショーン
アメリカ合衆国アイオワ州５０２２６, ポルク・シティ, ノースウエスト・ナインティサード・アベニュー ３２６５

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表２０１４－５２０８６４（ＪＰ, Ａ）
国際公開第２０１４／０７８４５９（WO, Ａ１）
米国特許第０８８１５２８０（ＵＳ, Ｂ１）
特開２０１２－２２９２２７（ＪＰ, Ａ）
国際公開第２０１５／０５２０８６（WO, Ａ１）
国際公開第２０１５／１０５９８１（WO, Ａ１）
特表２０１３－５１５００９（ＪＰ, Ａ）
Sports Med., ２０００年, Vol.30,No.2, p.105-116
Experimental Gerontology, ２０１５年 4月, Vol. 64, pp. 33-34

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３１／００－３３／４４
Ａ２３Ｌ ５／４０－５／４９
Ａ２３Ｌ ３１／００－３３／２９
ＷＰＩ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）