

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6716468号
(P6716468)

(45) 発行日 令和2年7月1日(2020.7.1)

(24) 登録日 令和2年6月12日(2020.6.12)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 31/19	(2006.01)
A 6 1 K 31/05	(2006.01)
A 6 1 P 3/04	(2006.01)
A 6 1 P 3/10	(2006.01)
A 6 1 P 11/00	(2006.01)
	A 6 1 K 31/19
	A 6 1 K 31/05
	A 6 1 P 3/04
	A 6 1 P 3/10
	A 6 1 P 11/00

請求項の数 21 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-566672 (P2016-566672)
(86) (22) 出願日	平成27年5月5日(2015.5.5)
(65) 公表番号	特表2017-514858 (P2017-514858A)
(43) 公表日	平成29年6月8日(2017.6.8)
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/029224
(87) 國際公開番号	W02015/171598
(87) 國際公開日	平成27年11月12日(2015.11.12)
審査請求日	平成30年4月27日(2018.4.27)
(31) 優先権主張番号	61/988, 859
(32) 優先日	平成26年5月5日(2014.5.5)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	508152917 ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティー オブ テキサス システム アメリカ合衆国 78701 テキサス, オースティン, ウエスト 7番 スト リート 210
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肥満、糖尿病、または癌を治療するためのウルソル酸および/またはレスベラトロールを含む方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量のウルソル酸を含む、対象における肥満を治療するための組成物であって、該ウルソル酸が有効量のレスベラトロールと組み合わせて投与されるように用いられる、組成物。

【請求項 2】

有効量のレスベラトロールを含む、対象における肥満を治療するための組成物であって、該レスベラトロールが有効量のウルソル酸と組み合わせて投与されるように用いられる組成物。

【請求項 3】

200～400mg / 日の用量でウルソル酸が投与されるように用いられる、請求項1または2記載の組成物。

【請求項 4】

200～600mg / 日の用量でレスベラトロールが投与されるように用いられる、請求項1または2記載の組成物。

【請求項 5】

ウルソル酸のレスベラトロールに対する比率が3：1～1：3の範囲である、請求項1または2記載の組成物。

【請求項 6】

ウルソル酸およびレスベラトロールが錠剤、カプセル、濃縮物、粉末、飲み物、焼き菓

10

20

子、チョコレート、キャラメル、および／またはスナックとして製剤化される、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 7】

レスベラトロールの投与前にウルソル酸が投与されるように用いられる、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 8】

ウルソル酸がレスベラトロールと同時に投与されるように用いられる、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 9】

ウルソル酸およびレスベラトロールが同じ組成物において投与されるように用いられる 10 、請求項 8 記載の組成物。

【請求項 10】

レスベラトロールの投与後にウルソル酸が投与されるように用いられる、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 11】

レスベラトロールの投与の 1 日以内にウルソル酸が投与されるように用いられる、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 12】

ウルソル酸およびレスベラトロールが経口で投与されるように用いられる、請求項 1 または 2 記載の組成物。 20

【請求項 13】

ウルソル酸およびレスベラトロールが 1 日 1 回投与されるように用いられる、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 14】

対象が 30 またはそれを上回るボディマス指数（B M I）を有する、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 15】

対象が前糖尿病と診断されている、請求項 1 または 2 記載の組成物。

【請求項 16】

有効量のウルソル酸を含む、対象における前糖尿病を治療するための組成物であって、該ウルソル酸が有効量のレスベラトロールと組み合わせて投与されるように用いられる、組成物。 30

【請求項 17】

有効量のレスベラトロールを含む、対象における前糖尿病を治療するための組成物であって、該レスベラトロールが有効量のウルソル酸と組み合わせて投与されるように用いられる、組成物。

【請求項 18】

有効量のウルソル酸を含む、対象における糖尿病を治療するための組成物であって、該ウルソル酸が有効量のレスベラトロールと組み合わせて投与されるように用いられる、組成物。 40

【請求項 19】

有効量のレスベラトロールを含む、対象における糖尿病を治療するための組成物であって、該レスベラトロールが有効量のウルソル酸と組み合わせて投与されるように用いられる、組成物。

【請求項 20】

2 0 0 ~ 4 0 0 m g / 日の用量でウルソル酸が投与されるように用いられる、請求項 1 6 ~ 1 9 のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 21】

2 0 0 ~ 6 0 0 m g / 日の用量でレスベラトロールが投与されるように用いられる、請求項 1 6 ~ 1 9 のいずれか一項記載の組成物。 50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2014年5月5日に出願された米国特許仮出願第61/988,859号に対する優先権を主張する。

【0002】

連邦政府の資金による研究に関する陳述

本発明は、米国国立衛生研究所により与えられた第CA54174号の下で政府の助成を受け行なわれた。本発明においては該政府が一定の権利を有する。

【背景技術】

10

【0003】**背景**

米国における近年の肥満、II型糖尿病、心疾患、および一部の癌の激増は、周知の2つの主要因、すなわち健康的な食事の欠如と身体活動の不足に大きく起因し得る。II型糖尿病、高血圧、および心疾患は、過体重／肥満および運動不足の結果として典型的に発達する病気の総称「メタボリック症候群」の構成要素である。身体活動や、カロリー摂取の抑制または「カロリー制限」により、変性疾患や慢性疾患、特にメタボリック症候群や癌の疾患が抑制されることが研究によって示されてきた。

【0004】

20

肥満は近代社会において蔓延している慢性疾患であり、社会的烙印だけではなく寿命の短縮や多数の医学的問題とも関連する - 肥満はII型真性糖尿病の主なリスク因子であり、心血管疾患および癌にとっても大きなリスク因子である。肥満に誘導されるこの病状の多くは脂質異常症、高血圧、およびインシュリン抵抗性との強い関連性に起因し得る。多くの研究から、食事療法や運動による肥満の減少がこれらのリスク因子を劇的に減少させることができた。残念ながらこれらの治療法は95%に達するほどの失敗率でほとんど成功しない。この失敗は、食欲増進、高カロリー食への強い嗜好、身体活動不足、および脂質合成代謝の亢進の一因となる遺伝的要因がその状態と強く関連していることから起こり得る。このことから、これらの遺伝的形質を遺伝している人がその状態と闘おうとする努力に関わらず肥満になりやすいことが示される。

【0005】

30

肥満の既存の療法は、標準的な食事療法および運動、超低カロリー食療法、行動療法、食欲抑制剤、熱発生薬、および食物吸収阻害剤に関する薬物療法、顎ワイヤー矯正、ウエスト矯正ひも、バルーンのような機械的装置、ならびに外科手術を含む (Jung and Chong. Clinical Endocrinology. 1991, 35:11-20 (非特許文献1) ; Bray. Am J Clin Nutr. 1992, 55:538S-544S (非特許文献2))。食事療法および運動ではわずかな結果しか生じないため、研究者らは体脂肪の減少を促進する化合物を探求してきた。しかし現在のところ、長期間に渡って使用が認められている薬剤のうち、食欲抑制薬であるシブトラミンおよびリバーゼ阻害剤であるオルリストットにはそれぞれ、頭痛、多飲症(異常な渴き)、不眠症、便秘、高血圧および脈拍数の増加、ならびに便失禁、頻繁または急な便通、脂肪便および脂溶性ビタミン類の吸収の減少を含む副作用がある。

40

【0006】

肥満、糖尿病、および様々な癌の治療法のためのさらなる組成物および方法が必要とされている。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0007】**

【非特許文献1】Jung and Chong. Clinical Endocrinology. 1991, 35:11-20

【非特許文献2】Bray. Am J Clin Nutr. 1992, 55:538S-544S

【発明の概要】**【0008】**

50

概要

ある態様は、ウルソル酸およびレスベラトロールの組み合わせを用いた肥満、糖尿病、および／または癌を治療するための方法および組成物に関する。ある態様はヒトの食事を補足するための組成物に関する。ウルソル酸は、様々な食品およびハーブ、特にリンゴ、オリーブ、およびローズマリーにおいて認められる植物栄養素(phytonutrient)である。本明細書において説明されるように、ウルソル酸の投与によってカロリー制限および運動の効果を模倣および増強できることが研究によって示される。ウルソル酸は慢性炎症を抑制し、インスリン抵抗性脂肪細胞へのグルコース吸収に対するロシグリタゾンおよびメトホルミンのような抗糖尿病薬の有効性を増強する。レスベラトロールは赤ブドウや他の果実の果皮に認められる植物栄養素である。レスベラトロールはカロリー制限および運動の効果を模倣および増強できる能力によって、その有益な作用の多くを発揮する。

10

【0009】

ある態様は、有効量のウルソル酸および有効量のレスベラトロールを肥満の対象に投与する段階を含む、肥満を治療するための方法に関する。ある局面においては、ウルソル酸は50、100、150、200、250、300 mg/日から250、300、350、400、450、500、550、600 mg/日の間の、全ての値と範囲を含む用量で投与される。ある局面においては、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600 mgのウルソル酸が投与される。さらなる局面においては、前記用量のウルソル酸は単回投与または複数回投与で0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日に渡って投与される。ある局面においては、レスベラトロールは50、100、150、200、250、300 mg/日から250、300、350、400、450、500、550、または600 mgのレスベラトロールが投与される。さらなる局面においては、前記用量のレスベラトロールは単回投与または複数回投与で0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日に渡って投与される。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、または1:4の間の、全ての値と範囲を含む比率で投与される。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは別々に投与される。別々の投与とは、製剤化される化合物が別個の製剤であることを指す。化合物は、別々に投与される場合、同時または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日以内に投与することができる。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは同じ組成物に製剤化される。ウルソル酸および／またはレスベラトロールは錠剤、カプセル、濃縮物、粉末、飲料、焼き菓子、チョコレート、キャラメル、クッキー、バー、および／またはスナックとして製剤化されることが可能である。ある局面においては、ウルソル酸および／またはレスベラトロールは経口投与される。

20

【0010】

ある局面においては、ウルソル酸の投与はレスベラトロールの投与前に行われる。さらなる局面においては、ウルソル酸の投与はレスベラトロールと同時に行われる。なおもさらなる局面においては、レスベラトロールの投与はウルソル酸の投与前に行われる。

30

【0011】

ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールはボディマス指数(BMI)が25、30、40、50またはそれを上回る指数である対象に投与される。該対象は前糖尿病と診断することができる。

【0012】

ある態様は、有効量のウルソル酸を有効量のレスベラトロールと組み合わせて対象に投与する段階を含む、糖尿病を治療するための方法および組成物に関する。ある局面においては、ウルソル酸は50、100、150、200、250、300 mg/日から250、300、350、400、450、500、550、600 mg/日の間の、全ての値と範囲を含む用量で投与される。ある局面におい

40

50

ては、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600 mgのウルソル酸が投与される。さらなる局面においては、前記用量のウルソル酸は単回投与または複数回投与で0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日に渡って投与される。ある局面においては、レスベラトロールは50、100、150、200、250、300 mg/日から250、300、350、400、450、500、550、600 mg/日の間の、全ての値と範囲を含む用量で投与される。ある局面においては、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600 mgのレスベラトロールが投与される。さらなる局面においては、前記用量のレスベラトロールは単回投与または複数回投与で0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日に渡って投与される。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、または1:4の間の、全ての値と範囲を含む比率で投与される。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは別々に投与される。別々の投与とは、製剤化される化合物が別個の製剤であることを指す。化合物は、別々に投与される場合、同時または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日以内に投与することができる。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは同じ組成物に製剤化される。ウルソル酸および/またはレスベラトロールは錠剤、カプセル、濃縮物、粉末、飲料、焼き菓子、チョコレート、キャラメル、クッキー、バー、および/またはスナックとして製剤化することが可能である。ある局面においては、ウルソル酸および/またはレスベラトロールは経口投与される。

【0013】

ある局面においては、ウルソル酸の投与はレスベラトロールの投与前に行われる。さらなる局面においては、ウルソル酸の投与はレスベラトロールと同時に行われる。なおもさらなる局面においては、レスベラトロールの投与はウルソル酸の投与前に行われる。

【0014】

ある態様は、有効量のウルソル酸を有効量のレスベラトロールと組み合わせて対象に投与する段階を含む、前糖尿病を治療するための方法および組成物に関する。ある局面においては、ウルソル酸は50、100、150、200、250、300 mg/日から250、300、350、400、450、500、550、600 mg/日の間の、全ての値と範囲を含む用量で投与される。ある局面においては、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600 mgのウルソル酸が投与される。さらなる局面においては、前記用量のウルソル酸は単回投与または複数回投与で0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日に渡って投与される。ある局面においては、レスベラトロールは50、100、150、200、250、300 mg/日から250、300、350、400、450、500、550、600 mg/日の間の、全ての値と範囲を含む用量で投与される。ある局面においては、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600 mgのレスベラトロールが投与される。さらなる局面においては、前記用量のレスベラトロールは単回投与または複数回投与で0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日に渡って投与される。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、または1:4の間の、全ての値と範囲を含む比率で投与される。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは別々に投与される。別々の投与とは、製剤化される化合物が別個の製剤であることを指す。化合物は、別々に投与される場合、同時または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日以内に投与することができる。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは同じ組成物に製剤化される。ウルソル酸および/またはレスベラトロールは錠剤、カプセル、濃縮物、粉末、飲料、焼き菓子、チョコ

10

20

30

40

50

レート、キャラメル、クッキー、バー、および／またはスナックとして製剤化されることが可能である。ある局面においては、ウルソル酸および／またはレスベラトロールは経口投与される。

【0015】

ある局面においては、ウルソル酸の投与はレスベラトロールの投与前に行われる。さらなる局面においては、ウルソル酸の投与はレスベラトロールと同時に行われる。なおさらなる局面においては、レスベラトロールの投与はウルソル酸の投与前に行われる。

【0016】

なおさらなる態様は、有効量のウルソル酸を有効量のレスベラトロールと組み合わせて投与する段階を含む、皮膚癌を治療するための組成物および方法に関する。ある局面においては、ウルソル酸は50、100、150、200、250、300 mg/日から250、300、350、400、450、500、550、600 mg/日の間の、全ての値と範囲を含む用量で投与される。10
ある局面においては、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600 mgのウルソル酸が投与される。さらなる局面においては、前記用量のウルソル酸は単回投与または複数回投与で0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日に渡って投与される。ある局面においては、レスベラトロールは50、100、150、200、250、20
300 mg/日から250、300、350、400、450、500、550、600 mg/日の間の、全ての値と範囲を含む用量で投与される。ある局面においては、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600 mgのレスベラトロールが投与される。さらなる局面においては、前記用量のレスベラトロールは単回投与または複数回投与で0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日に渡って投与される。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、または1:430
の間の、全ての値と範囲を含む比率で投与される。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは別々に投与される。別々の投与とは、製剤化される化合物が別個の製剤であることを指す。化合物は、別々に投与される場合、同時または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10分、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10時間、または0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10日以内に投与することができる。ある局面においては、ウルソル酸とレスベラトロールは同じ組成物に製剤化される。ウルソル酸および／またはレスベラトロールは局所用溶液（クリーム、軟膏、ゲル等）、錠剤、カプセル、濃縮物、粉末、飲料、焼き菓子、チョコレート、キャラメル、クッキー、バー、および／またはスナックとして製剤化されることが可能である。ある局面においては、ウルソル酸および／またはレスベラトロールは局所投与される。ある局面においては、ウルソル酸および／またはレスベラトロールは経口投与される。

【0017】

ある局面においては、ウルソル酸の投与はレスベラトロールの投与前に行われる。さらなる局面においては、ウルソル酸の投与はレスベラトロールと同時に行われる。なおさらなる局面においては、レスベラトロールの投与はウルソル酸の投与前に行われる。

【0018】

「単離された」という用語は、実質的に細胞物質、細菌物質、ウイルス物質、培養培地（組み替えDNA技術で作製された場合）、化学物質前駆体または他の化学物質（化学的に合成された場合）を含まない化合物を指すことが可能である。さらに、単離された化合物は単離化合物として対象に投与できるものを指す；言い換えると、カラムに吸着されている、またはアガロースゲル中に包埋されている場合、その化合物は単純に「単離された」とはみなされない。

【0019】

本発明の他の態様については、本明細書を通して論じられる。本発明のある局面について論じられる任意の態様は、本発明の他の局面にも適用され、その逆もまた同様である。本明細書において説明される各態様は、本発明の他の局面にも適用可能な本発明の1つの4050

態様であると理解される。本明細書において論じられる任意の態様は本発明の任意の方法または組成物に関して実施することができ、その逆も同様であることが企図される。さらに、本発明の組成物およびキットは本発明の方法を達成するために使用することができる。

【0020】

特許請求の範囲および／または本明細書において「～を含む」という用語と関連して使用された場合、「a」または「an」という単語の使用は「1つの」ということを意味し得るが、「1つまたは複数の」「少なくとも1つの」および「1つまたは1つより多くの」という意味とも矛盾しない。

【0021】

本出願を通して、「約」という用語は、ある値を測定するために使用される装置または方法についての誤差の標準偏差を該値が含むことを意味するように使用される。

10

【0022】

特許請求の範囲における「または」という用語は、本開示は選択肢のみおよび「および／または」を指すという定義に従うが、選択肢のみを、または選択肢が相互排他的であることを指すと明確に指示されない限り、「および／または」を意味するように使用される。

【0023】

本明細書および請求項において使用されるように、「～を含んでいる」（および「～を含む」など含んでいるの任意の形態）、「～を有している」（および「～を有する」など有しているの任意の形態）、「～を含有している」（および「～を含有する」など含有しているの任意の形態）、または「～を包含している」（および「～を包含する」など包含しているの任意の形態）という単語は包括的または無制限であり、追加の、列挙されていない要素または方法工程を排除するものではない。

20

【0024】

[本発明1001]

有効量のウルソル酸および有効量のレスベラトロールを肥満の対象に投与する段階を含む、肥満を治療するための方法。

[本発明1002]

200～400 mg/日の用量でウルソル酸が投与される、本発明1001の方法。

30

[本発明1003]

200～600 mg/日の用量でレスベラトロールが投与される、本発明1001の方法。

[本発明1004]

ウルソル酸のレスベラトロールに対する比率が3:1～1:3の範囲である、本発明1001の方法。

[本発明1005]

ウルソル酸およびレスベラトロールが錠剤、カプセル、濃縮物、粉末、飲み物、焼き菓子、チョコレート、キャラメル、および／またはスナックとして製剤化される、本発明1001の方法。

[本発明1006]

40

レスベラトロールの投与前にウルソル酸が投与される、本発明1001の方法。

[本発明1007]

ウルソル酸がレスベラトロールと同時に投与される、本発明1001の方法。

[本発明1008]

ウルソル酸およびレスベラトロールが同じ組成物において投与される、本発明1007の方法。

[本発明1009]

レスベラトロールの投与後にウルソル酸が投与される、本発明1001の方法。

[本発明1010]

レスベラトロールの投与の1日以内にウルソル酸が投与される、本発明1001の方法。

50

[本発明1011]

ウルソル酸およびレスベラトロールが経口で投与される、本発明1001の方法。

[本発明1012]

ウルソル酸およびレスベラトロールが1日1回投与される、本発明1001の方法。

[本発明1013]

対象が30またはそれを上回るボディマス指数（BMI）を有する、本発明1001の方法。

[本発明1014]

対象が前糖尿病と診断されている、本発明1001の方法。

[本発明1015]

前糖尿病対象に有効量のウルソル酸および有効量のレスベラトロールを投与する段階を含む、前糖尿病を治療するための方法。

10

[本発明1016]

糖尿病を有する対象に有効量のウルソル酸を有効量のレスベラトロールと組み合わせて投与する段階を含む、糖尿病を治療するための方法。

[本発明1017]

200～400 mg/日の用量でウルソル酸が投与される、本発明1015の方法。

[本発明1018]

200～600 mg/日の用量でレスベラトロールが投与される、本発明1015の方法。

[本発明1019]

200 mg/日のウルソル酸および400 mg/日のレスベラトロールを含む組成物。

20

[本発明1020]

皮膚癌を有する対象に有効量のウルソル酸を有効量のレスベラトロールと組み合わせて投与する段階を含む、皮膚癌を治療するための方法。

[本発明1021]

200～400 mg/日の用量でウルソル酸が投与される、本発明1019の方法。

[本発明1022]

200～600 mg/日の用量でレスベラトロールが投与される、本発明1019の方法。

[本発明1023]

肺癌を有する対象に有効量のウルソル酸を有効量のレスベラトロールと組み合わせて投与する段階を含む、肺癌を治療するための方法。

30

[本発明1024]

200～400 mg/日の用量でウルソル酸が投与される、本発明1022の方法。

[本発明1025]

200～600 mg/日の用量でレスベラトロールが投与される、本発明1022の方法。

本発明の他の目的、特徴および利点は以下の詳細な説明から明らかとなる。しかし、詳細な説明および特定的な実施例は、本発明の特定的な態様を示すものの、ただ例証として与えられるのであって、当業者にはこの詳細な説明から本発明の精神および範囲内における様々な変更および改変が明らかになると理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】【0025】

40

図面の説明

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書において提示される特定の態様の詳細な説明と合わせて、1つまたは複数のこれらの図面を参照することによりさらによく理解され得る。

【0026】

【図1】ウルソル酸(UA)およびレスベラトロール(RES)は細胞のグルコース取り込みを相乗的に増加させる。

【図2】皮膚癌のマウスモデルにおいて、RESおよびUAはAMPKを相乗的に活性化する。

【図3】RESはMT1/2マウス乳頭腫細胞およびCa3/7マウス扁平上皮癌細胞をUAに対して感受性にする。(A) UAおよびRESによって共処理されたMT1/2細胞では、UA単独での処理と

50

比較して IC_{50} 値がより低かった。(B) UAおよびRESで共処理されたCa3/7細胞では、UA単独での処理と比較して IC_{50} 値がより低かった(AおよびBについてn=3、*はUA+vehとUA+50 μM RESの間でp<0.05であることを示す、\$はUA+vehとUA+100 μM RESの間でp<0.05であることを示す)。

【図4】より高い濃度のRESはCa3/7細胞のUAに対する感受性を増強する(n=3、*はp<0.05であることを示す)。

【図5】UAおよびRESはヒト肺腺癌細胞株A549の生存率を相乗的に低下させる(n=3、*はUA+vehとUA+10 μM RESの間でp<0.05であることを示す、\$はUA+vehとUA+25 μM RESの間でp<0.05であることを示す)。

【発明を実施するための形態】

10

【0027】

説明

ある態様は、ウルソル酸とレスベラトロールの組み合わせを用いた肥満、糖尿病、および癌の治療に関する。ウルソル酸は慢性炎症を抑制する。糖尿病ラットにおいては、食餌のウルソル酸によって安静時グルコース値が減少し、耐糖能およびインスリン感受性が改善される。また、高血圧のラットモデルにおいても、ウルソル酸は血圧、安静時グルコース、LDLコレステロール、およびトリグリセリドを対照レベル近くまで低減させる。さらに、ウルソル酸を含む高脂肪食を与えたマウスでは、肥満および糖尿病になった対照マウスと比較して、体重の減少、グルコース値の正常化、血中インスリンレベルの上昇、および肝臓脂質の劇的な減少が示された。これらの結果から、ウルソル酸が肥満および糖尿病のリスクを低減させる潜在性があることが示唆される。加えて、ウルソル酸はロシグリタゾンやメトホルミンのような抗糖尿病薬の、インスリン抵抗性脂肪細胞へのグルコース吸収に対する有効性を高める。ウルソル酸は摂食状態の場合、脂肪の蓄積を減少させて筋肉量を増加させることができ、絶食状態の場合、脂肪燃焼を誘導し、筋肉量を維持させることができる。実験動物においては、ウルソル酸はその抗炎症作用によって、皮膚癌、乳癌、前立腺癌、および大腸癌の誘導を妨げることにおいても有効である。

20

【0028】

レスベラトロールは赤ブドウおよび他の果実の果皮において認められる植物栄養素である。ウルソル酸のように、レスベラトロールもカロリー制限および運動を模倣するその能力によって有益な作用の多くを発揮する。レスベラトロールの作用は現在、動物やヒトでの多数の研究におけるトピックとなっている。実験動物での研究においては、レスベラトロールに抗炎症作用、血中糖度低下作用、および他の有益な心血管作用があることが示された。レスベラトロールは、アテローム生成食(1%コレステロール)を与えたラットにおいて、肝臓の炎症の低減を伴いながら体重増加を抑制した。メタボリック症候群に関しては、レスベラトロールは高カロリー食を与えたマウスにおけるインスリン感受性を改善する。II型糖尿病のヒトにおいては、レスベラトロールの毎日摂取開始後第4週までにインスリン感受性が改善された。しかし、幾つかのヒトの治験で概して正の効果が報告されている一方、非常に高い用量でない限りレスベラトロールには効果が少ない可能性がある。レスベラトロールはウルソル酸のように抗糖尿病薬の活性を増強すると考えられる。加えて、レスベラトロールは皮膚癌および乳癌の誘導を抑制することが示された。

30

【0029】

ウルソル酸またはレスベラトロールのいずれかを用いた動物実験では、同じ正の効果 - 肥満、糖尿病および癌の予防効果 - が示される。近年、本発明者らは、ウルソル酸とレスベラトロールの双方の組み合わせが、肥満、II型糖尿病および癌に関する幾つかの重要な診断マーカーに対して非常に強力な相乗作用を有することを見出した。最近の研究結果からは、ウルソル酸とレスベラトロールが相乗的に相互作用し、エネルギー感知経路(AMPK)を劇的におよび有意に増強し、MTOR経路を抑制することが示される。カロリー制限および運動はいずれも、これらの経路に対して強い効果がある。加えて、ウルソル酸とレスベラトロールの組み合わせは、高脂肪食によって誘導される肝臓および脾臓における炎症経路(NFKB)を強力にかつ有意に抑制する。また糖尿病実験動物においてウルソル酸とレス

40

50

ペラトロールの双方は、筋細胞へのグルコースの輸送を相乗的に増加させ、脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌を増加させる。これらの活性はいずれもインスリン抵抗性、肥満、および糖尿病に対抗するものである。本発明者らはまた、ウルソル酸とレスベラトロールによって、炎症経路の活性が増強されるように処理されたヒトの単球で該経路が相乗的に抑制され得ることを見出した。また、ウルソル酸とレスベラトロールの組み合わせは、部分的なカロリー制限および適度の運動と共に与えられた場合に、より一層強い効果がある。

【0030】

I. 前糖尿病症候群

前糖尿病は、空腹時高血糖または空腹時血糖値異常（IFG）および耐糖能異常（IGT）を含む、全てではないが一部の糖尿病診断基準を満たしている状態である。IFGは、空腹時血糖値が正常値と考えられる値を超えて上昇しているが、真性糖尿病と分類するほど高くはない状態を指す。空腹時血糖値は連続して所定の母集団内にあり、より高いほど高血糖値に起因する合併症リスクが高くなる。IFGは正常域の上限値より高いが、真性糖尿病と分類されるほど高くはない空腹時血糖値と定義される。空腹時血糖値異常を有する患者は下記に説明されるようにIGTと診断される可能性もあるが、多くは耐糖能試験に対しては正常な反応を示す。

【0031】

IFGは、IGTよりリスクは低いが、インスリン抵抗性、死亡率の増加、および心血管病態のリスクの上昇と関連した前糖尿病状態と考えられる（Barr et al. Circulation. 2007, 116(2):151-157）。10年間に渡って顕性糖尿病に進行するリスクは50%であるが、新規に診断された多くのIFG患者は3年未満で糖尿病に進行する（Nichols et al. Diabetes Care. 2007, 30(2):228-233）。

【0032】

IGTは、インスリン抵抗性および心血管病態のリスクの上昇と関連する血糖異常の前糖尿病状態である。IGTは2型真性糖尿病に何年も先行し得る。IGTはまた、死亡リスク因子でもある（Nichols et al. Diabetes Care. 2007, 30(2):228-233）。

【0033】

ADA診断基準に従い、前糖尿病は血液検査によって以下の結果のうち任意のものを用いて診断することができる：（1）空腹時血糖（グルコース）値が100～125 mg/dL（5.6～6.9 mM）；（2）ブドウ糖負荷試験において、75グラム標準グルコース溶液を摂取した2時間後に血糖値が140～199 mg/dL（7.8～11.0 mM）；（3）糖化ヘモグロビンが5.7～6.4%。

【0034】

糖尿病は血液検査によって以下の結果のうち任意のものを用いて診断することができる：（1）空腹時血糖（グルコース）値 126 mg/dL（7.0 mM）；（2）ブドウ糖負荷試験において、75グラム標準グルコース溶液を摂取した2時間後に血糖値 200 mg/dL（11.1 mM）；（3）糖化ヘモグロビン 6.5%；（4）高血糖の症状および随時血糖値 200 mg/dL（11.1 mM）。

【0035】

II. 肥満

肥満は過剰な脂肪が体内に蓄積する状態を指す。一般に、ヒトのボディマス指数（BMI）が30より大きい場合には肥満と診断される。ボディマス指数（BMI）は体脂肪量を評価するために広く使用される方法であり、成人集団の大部分において体脂肪率を正確に反映する。BMIは対象の体重をその身長を二乗した数値で割ることによって算出され、典型的にはメートル法または米国「慣用」単位で kg/m^2 または $\text{ポンド} \times 703/\text{インチ}^2$ のいずれかで表される。BMI値が30.0またはそれを上回るヒトは肥満と定義され、より高いBMI値を有するヒトは重篤な肥満（35.0～40）、病的肥満（40.0～45）、および超肥満（BMI 45）とさらに分類される。

【0036】

肥満は、消費されるエネルギー量の割に過剰な量のカロリーが摂取された場合に、長期

10

20

30

40

50

に渡るエネルギーのアンバランスによって起こる。肥満の治療には通常、行動療法および摂取カロリーの減少および／または消費カロリー量の増加が必要とされる。

【 0 0 3 7 】

タンパク質アディポネクチンレベルが低いことは、肥満のようなメタボリック症候群を発達させるより高いリスクと関連している。ある局面においては、本明細書において説明される方法はアディポネクチンのアップレギュレーションをもたらす。アディポネクチン（GBP-28、apM1、AdipoQおよびAcrp30とも称される）は、ヒトにおいてはADIPOQ遺伝子によってコードされる244アミノ酸からなるタンパク質である。それは、グルコースの制御および脂肪酸の酸化を含む多くの代謝過程を調節するタンパク質ホルモンである。アディポネクチンは脂肪組織から、および妊娠中は胎盤からも血流に分泌される（Chen et al. *Diabetologia*. 2006, 49(6):1292-1302）。血流においては、アディポネクチンは約5~10 μg/mLで全血漿タンパク質のおよそ0.01%を占め、多くのホルモンと比べて血漿中に非常に豊富である。該ホルモンのレベルは成人における体脂肪率と逆の相関関係がある一方、乳児および幼児においては関連性があまり明確ではない（Ukkola and Santaniemi. *J Mol Med.* 2002, 80(11):696-702）。

【 0 0 3 8 】

アディポネクチンを増加させたトランスジェニックマウスは脂肪細胞分化異常およびタンパク質の脱共役と関連したエネルギー消費の増加を示す（Bauche et al. *Endocrinology*. 148(4):1539-1549）。該ホルモンは、II型糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）およびメタボリック症候群の独立したリスク因子をもたらし得る代謝異常の抑制において役割の一端を担う（Diez and Iglesias. *Eur J Endocrinol.* 2003, 148(3):293-300；Ukkola and Santaniemi. *J Mol Med.* 2002, 80(11):696-702；Renaldi et al. *Acta Med Indones.* 2009, 41(1):20-24）。マウスにおいては、アディポネクチンをレプチニンと組み合わせることにより、インスリン抵抗性が完全に逆転することが示された（Yamauchi et al. *Nat Med.* 2001, 7(8):941-946）。糖尿病患者においては、非糖尿病患者と比較してアディポネクチン濃度が減少する。体重の減少によりその血中濃度は有意に増加する（Coppola et al. *Int J Cardiol.* 2008, 134(3):414-416）。

【 0 0 3 9 】

III. 皮膚癌

米国においては新規に診断される皮膚癌症例が毎年100万例を超える（Rogers et al. *Arch. Dermatol.* 2010, 146(3):283-287）。加えて、皮膚癌は他の形態の癌にかかるリスクの15~30%の上昇と関連する（Kahn et al. *JAMA*. 1998, 280(10):910-912；Krueger et al. *Can.J.Publ Health.* 2010, 101(4):123-27）。このことは、皮膚癌を予防または治療するメカニズムの重要性を示している。皮膚癌は主にメラノーマ、基底細胞癌、および扁平上皮癌からなる。皮膚癌はUVへの曝露が多いほどリスクが高まり（Boscoe and Schymura. *BMC Cancer.* 2006, 6:264；Lea et al. *Ann.Epidemiol.* 2007, 17(6):447-453）、炎症障害のある個体において有病率がより高くなる（Frentz and Olsen. *Br.J.Dermatol.* 1999, 140(2):237-242；Long et al. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.* 2010, 8(3):268-274）。

【 0 0 4 0 】

癌はイニシエーション、プロモーション、およびプログレッションの3つの相を通して発達する。イニシエーションの間、DNA変異によって癌遺伝子の活性化および癌抑制遺伝子の不活性化が導かれる。皮膚癌におけるDNA変異はUVへの曝露および多環芳香族炭化水素（PAH）のような周囲から受ける損傷によって起こる。PAHはタバコの煙の中に存在し、代謝された場合にDNA付加体を形成する可能性がある（Baird et al. *Environ. Mol.Mutagen.* 2005, 45(2-3):106-144；Boffetta et al. *Cancer Causes Control.* 1997, 8(3):444-472）。発癌プロモーションにおいては、活性化癌遺伝子および不活性化癌抑制遺伝子が発癌促進シグナル伝達経路の構成的な活性化を引き起こす。これらの経路は細胞増殖、細胞成長、アポトーシスへの抵抗性、および血管新生の因子を増加させる（Walaszek et al. *Chem.* 2004, 125(5 Suppl.):128S-133S）。最終的に、付加的な遺伝子の変化によって腫瘍細

胞が血流に入り、離れた器官の部位に転移した場合に発癌プログレッションが起こる (Gi aleli et al. FEBS J. 2011, 278(1):16-27)。

【0041】

発癌プロモーション期は、核内因子 B (NFKB) 経路を含む、多くのシグナル伝達経路の異常な活性に特徴付けられる。NFKBは典型的にp65サブユニットおよびp50サブユニットのヘテロ二量体として存在する転写因子である。UV光 (Kato et al. Mol Cell 2003, 12(4):829-839 ; Lee et al. Int J Mol Med 2009, 23(5):679-684) および様々なタバコの成分 (Rajendrasozhan et al. Pulm Pharmacol Ther 2010, 23(3):172-181 ; Tsurutani et al. Carcinogenesis 2005, 26(7):1182-1195) を含む多くの発癌促進因子がNFKB経路を活性化する。これらの刺激は、NFKB阻害物質IKBaをリン酸化するキナーゼをリン酸化および活性化し、それをプロテアソームによる分解の標的にする。UV光 (Laszlo and Wu. Photo chem Photobiol 2008, 84(6):1564-1568) 、タバコの煙 (Rajendrasozhan et al. Pulm Pharmacol Ther 2010, 23(3):172-181) 、または炎症性物質 (Hsing et al. PLoS One 2011, 6(3):e17598) を含む刺激はまた、NFKBの活性p65サブユニットをセリン536および / または276においてリン酸化し、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) に動員できるようにする (Chen et al. Mol Cell Biol 2005, 25(18):7966-7975)。これらのHATは多数のリシン残基においてp65をアセチル化し、その結果NFKBをその阻害物質IKBaから解離させる (Chen et al. EMBO J 2002, 21(23):6539-6548 ; Kiernan et al. J Biol Chem 2003, 278(4):2758-2766)。IKBaから一旦離されると、NFKBは核内に移行することができ、そこで細胞増殖、炎症、アポトーシスへの抵抗性、血管新生、および転移についての因子を転写する (Kundu and Surh. Mutat Res 2008, 659(1-2):15-30)。

【0042】

果実や野菜に存在するある特定の植物性化学物質 (phytochemical) は、多くの実験モデルにおいて癌の形成および増殖を抑制し得る。また、疫学的研究は、植物性化学物質を豊富に含む果実や野菜を摂取することにより皮膚癌を含む多くの癌タイプのリスクが低減することを示す (Ibiebele et al. Am J Clin Nutr 2007, 85(5):1401-1408 ; Kune et al. Nutr Cancer 1992, 18(3):237-244)。レスベラトロールは動物モデルにおいて皮膚の腫瘍を含む多くの腫瘍タイプの形成を抑制する (Aziz et al. FASEB J 2005, 19(9):1193-1195 ; Kapadia et al. Pharmacol Res 2002, 45(6):499-505)。ウルソル酸 (UA) もまた、化学物質に誘導される皮膚癌を含む多くのモデルにおいて腫瘍の形成を抑制する (Huang et al. Cancer Res 1994, 54(3):701-708 ; Tokuda et al. Cancer Lett 1986, 33(3):279-285)。レスベラトロールおよびUAはまた、NFKBシグナル伝達をも抑制する。

【0043】

それらの抗癌作用に加えて、様々な植物性化学物質および植物抽出物によってインスリン抵抗性および糖尿病を含むメタボリック症候群が抑制されることも示された (Xia and Weng. J Diabetes 2010, 2(4):243-249 ; Graf et al. Curr Opin Investig Drugs 2010, 11(10):1107-1115 ; Cherniack. Nutrition 2011, 27(6):617-623 ; Leicherer et al. Vascu l Pharmacol 2013, 58(1-2):3-20)。これらの作用は多くの場合、メトホルミンのような抗糖尿病処方薬の活性を同様に媒介するAMP活性化キナーゼ (AMPK) と関連している (Hattori et al. Hypertension 2006, 47(6):1183-1188 ; Musi et al. Diabetes 2002, 51(7):2074-2081 ; Zhou et al. J Clin Invest 2001, 108(8):1167-1174 ; Hardie et al. Chem Biol 2012, 19(10):1222-1236)。AMPKはスレオニン172のリン酸化の増加によって示されるように、ヒトや動物においては運動によって活性化される (Birk and Wojtaszewski. J Physiol 2006, 577(Pt 3):1021-1032 ; Hoene et al. J Physiol 2009, 587(Pt 1):241-252 ; Koopman et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2006, 290(6):E1245-1252)。AMPKはまた、糖尿病を治療するために使用される異なった化合物によるNFKB抑制においても重要な役割を担う (Hattori et al. Hypertension 2006, 47(6):1183-1188 ; Tomizawa et al. Metabolism 2011, 60(4):513-522)。

【0044】

レスベラトロールおよびUAは、動物およびヒトのいずれにおいてもメタボリック症候群

および糖尿病の症状を改善する (Baur et al. *Nature* 2006, 444(7117):337-342 ; Brasnyo et al. *Br J Nutr* 2011, 106(3):383-389 ; Jang et al. *Int Immunopharmacol* 2009, 9(1):113-119 ; Somova et al. *Phytomedicine* 2003, 10(2-3): 115-121)。ヒトを含む多くの生物においてレスベラトロールはAMPKを活性化させ (Timmers et al. *Cell Metab* 2011, 14(5):612-622 ; Xu and Si. *Nutr Res* 2012, 32(9):648-658)、メタボリック症候群に対するレスベラトロールの最大効果はAMPK活性に依存する (Um et al. *Diabetes* 2010, 59(3):554-563)。異なる癌細胞株におけるUAの細胞毒性作用もまた、AMPK活性化に依存する (Son et al. *Phytother Res* 2013 ; Zheng et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 419(4):741-747)。最終的に、腫瘍になりやすい動物においてはAMPK活性により腫瘍形成が抑制される (Huang et al. *Biochem J* 2008, 412(2):211-221 ; Faubert et al. *Cancer Metab* 2013, 17(1):113-124)。これらの結果は、レスベラトロールやUAのような多くの天然化合物の抗癌作用および抗糖尿病作用がAMPK活性化によって媒介される可能性があることを示す。

【 0 0 4 5 】

異なる植物性化学物質の組み合わせについては多くの潜在的な相乗的メカニズムがある。ある薬剤は他の薬剤の代謝を調節することができ (Kimura et al. *Food Chem Toxicol* 2010, 48(1):429-435 ; Taesotikul et al. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011, 26(2):154-161)、または血流 (Lu et al. *J Nutr Biochem* 2005, 16(1):23-30) もしくは細胞 (Suganuma et al. *Cancer Res* 1999, 59(1):44-47) に入るその能力に影響を与える。薬剤はまた、細胞制御系に対して異なる時点で作用することによって何回も同様の下流効果を誘導して互いの能力を増強し合うことも可能である (Khafif et al. *Carcinogenesis* 1998, 19(3):419-424 ; Saw et al. *Biopharm Drug Dispos* 2011, 32(5):289-300)。

【 0 0 4 6 】

レスベラトロールは、異なるメカニズムを介して腫瘍細胞の増殖を相乗的に抑制することが示されている。レスベラトロールは、MCF-7乳癌細胞においてドキソルビシンおよびドセタキセルの細胞毒性作用を増強し、他の癌細胞株においてはドキソルビシン濃度を増加させることができ (Al-Abd et al. *Cell Prolif* 2011;44(6):591-601)。レスベラトロールはまた、薬剤抵抗性のヒト類表皮癌株KBv200においてビンクリスチン、パクリタキセル、およびドキソルビシンの細胞毒性作用を増強することも示されている。レスベラトロールはまた、これら化学療法抵抗性の細胞において抗アポトーシスbcl-2および薬物排出ポンプp-糖タンパク質の発現を減少させることも示されている (Quan et al. *Biomed Pharmacother* 2008;62(9):622-629)。

【 0 0 4 7 】

ウルソル酸は、多くの化学療法抵抗性の癌細胞タイプの生存率を下げる事が示されているが、UAのIC50は、p-糖タンパク質レベルがより低い (Zhang et al. *Int J Biochem Cell Biol* 2012, 44(8):1244-1253 ; Shi et al. *Eur J Pharmacol* 2011;669(1-3):38-44) 親細胞においていっそう低かった (Shan et al. *Chin J Integr Med* 2011, 17(8):607-611)。ここで説明されるこれらの結果は、レスベラトロールのような化合物によってUAの作用が従来的な抵抗性表現型を覆すように増強され得ることを示す。UAとレスベラトロールの作用について、この組み合わせが相乗効果を有するかどうかを決定するために、インビボのマウス皮膚、ヒトケラチノサイト、および皮膚癌細胞株を含む様々な皮膚関連系で試験を行った。

【 0 0 4 8 】

IV. 製剤化および投与

ウルソル酸およびレスベラトロールは経口、非経口（例えば静脈内、筋肉内、または皮下）、腹腔内、または局所（例えば粉末、軟膏または滴薬）のいずれかで対象に投与することができる。ある局面においては、化合物は栄養補助剤として提供される。栄養補助剤は例えば液体、固体、ゲル、乳剤、粉末、錠剤、カプセル、またはゲルカプセル（例えばソフトゲルカプセルもしくはハードゲルカプセル）の任意の形態にあることが可能である。栄養補助剤は典型的に（例えば植物から）精製、単離、もしくは抽出された、または合

成された、食事において食物を補足するために使用された際に利益（例えば栄養的な利益に加えて健康面の利益）を与えるよう組み合わされた、1つまたは複数の組成物を含有する。

【0049】

注射剤に好適な組成物は、生理学的に許容される滅菌水性溶液もしくは滅菌非水性溶液、分散剤、懸濁剤、もしくは乳剤を含み得るか、または、滅菌の注射用溶液もしくは分散剤に再構成するための滅菌粉末を含み得る。好適な水性担体および非水性担体、希釈剤、溶剤、または溶媒の例は、水、エタノール、ポリオール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロールなど）、その好適な混合物、オリーブ油のような植物油を含むトリグリセリド、またはオレイン酸エチルのような注射可能な有機エステルを含む。10 例えればレシチンのようなコーティングを使用することによって、分散剤の場合は必要とされる粒子サイズを維持することによって、および／または界面活性剤を使用することによって、適切な流動性を維持することができる。

【0050】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および／または分散剤のようなアジュvantを包含することもできる。組成物への微生物の混入の防止は、例えればパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等のような、様々な抗菌剤および抗真菌薬の添加によってなすことができる。例えれば糖類、塩化ナトリウム等のような等張剤を含有することもまた望ましい。例えればモノステアリン酸アルミニウムおよび／またはゼラチンのような、吸収を遅くすることができる作用物質を使用することによって、注射可能な薬学的組成物の持続的な吸収をもたらすことができる。20

【0051】

経口投与のための固体剤形はカプセル、錠剤、粉末、および顆粒を含む。そのような固体剤形においては、クエン酸ナトリウムまたは第二リン酸カルシウムまたは（a）充填剤もしくは增量剤、例えはデンプン、ラクトース、スクロース、マンニトール、もしくはケイ酸；（b）結合剤、例えはカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、もしくはアラビアゴム；（c）保湿剤、例えはグリセロール；（d）崩壊剤、例えは寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカのデンプン、アルギン酸、ある特定の複雑ケイ酸塩、もしくは炭酸ナトリウム；（e）溶解遅延剤、例えはパラフィン；（f）吸収促進剤、例えは第四級アンモニウム化合物；（g）湿潤剤、例えはセチルアルコールもしくはグリセロールモノステアレート；（h）吸収剤、例えはカオリンもしくはベントナイト；および／または（i）潤滑剤、例えはタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、またはその混合物のような、少なくとも1つの、不活性な慣用の賦形剤（または担体）と活性化合物とを混合する。カプセルおよび錠剤の場合、剤形は緩衝剤をも含み得る。30

【0052】

ラクトースまたは乳糖、および高分子量ポリエチレングリコール等のような賦形剤を使用して、充填ソフトゼラチンカプセルまたは充填ハードゼラチンカプセルにおいて、同様のタイプの固体組成物を充填剤として使用することもできる。40

【0053】

錠剤、カプセル、および顆粒のような固体剤形は、腸溶コーティングや当技術分野において周知の他のコーティングのような、コーティング剤または外殻を用いて調製することができる。それらはまた、乳白剤を包含することが可能であり、徐放型の方式で活性化合物を放出するような組成物であることも可能である。使用できる包埋組成物の例は、高分子物質およびワックスである。活性化合物はまた、適切であれば、1つまたは複数の上記に言及の賦形剤を用いたマイクロカプセル形態にあることも可能である。

【0054】

経口投与のための液体剤形は許容される乳剤、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル剤を含む。活性化合物に加えて、液体剤形は水または他の溶剤、可溶化剤および乳化50

剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油、特に綿実油、落花生油、トウモロコシ胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、ゴマ油、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、ソルビタン脂肪酸エステル、またはそれらの物質の混合物等のような、当技術分野において一般に使用される不活性希釈液を含有することができる。

【0055】

懸濁液は、活性化合物に加えて、懸濁剤、例えばエトキシリ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールまたはソルビタンエステル、結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロオキシド、ベントナイト、寒天、またはトラガント、またはこれらの物質の混合物等を含有することが可能である。 10

【0056】

ウルソル酸およびレスベラトロールの局所投与のための剤形は、軟膏、粉末、スプレーおよび吸入剤を含む。化合物は生理学的に許容される担体、ならびに必要とされ得る任意の保存剤、緩衝液、および／または噴霧剤と混合する。

【0057】

本発明の化合物については、単独または補足組成物の一部としての用量は約1、100、200、300、400、500、600 mgから500、600、700、800、900、1000 mgの間であり、好ましくは200～600 mgである。ある局面においては、ウルソル酸のレスベラトロールに対する比率は約4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3から1:4の間で変化させてよい。ある局面においては、化合物は1日に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回投与される。ある局面においては、化合物は1、2、3、4、5、6、または7日に1回投与される。 20

【0058】

「有効量」という用語は、所望の治療的または予防的な結果を得るために必要な用量および期間で有効な量を意味する。

【0059】

癌細胞の増殖を減少させることに関する「有効量」は、ある癌細胞または腫瘍細胞の増殖をある程度低減させることができる量を意味する。該用語は、癌細胞または腫瘍細胞の増殖の阻害、細胞増殖抑制効果および／もしくは細胞毒性効果、ならびに／またはアポトーシスを誘導できる量を含む。有効用量は当業者によって容易に決定することができ、それは疾患の重篤度および経過、患者の健康状態および治療への反応性、患者の年齢、体重、身長、性別、既往歴、ならびに治療に当たる医師の判断に依存する。 30

【0060】

「対象」という用語は、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ガチョウ、およびヒトなどの動物を意味する。特に好ましい患者は男女のヒトを含む哺乳動物である。

【0061】

「治療すること」、「治療」および／または「治療法」という用語は、予防の（例えば予防的な）および対症療法的な治療法を含む。

【実施例】

【0062】

V. 実施例

以下の実施例および図面は、本発明の態様を実証するために含まれる。実施例または図面において開示される技術は、本発明の実施において十分機能するように本発明者らによって発見された技術を表すものであり、したがってその実施についての好適な方法を構成するものとみなされると、当業者には理解されるべきである。しかし本開示に照らして、開示される特定の態様においては多くの変更を行うことが可能であり、本発明の精神および範囲から逸脱せずになおも類似または同様の結果が得られることが当業者には理解されるべきである。 40

【0063】

実施例1

50

ウルソル酸およびレスベラトロールは骨格筋においてインスリンシグナル伝達経路およびAMPKシグナル伝達経路を活性化する

骨格筋はインスリンによって誘導されるグルコース吸収のための主要な部位である。インスリンは筋細胞表面のインスリン受容体に結合し、AktおよびAkt基質160 (AS160) を含む幾つかの細胞キナーゼの活性化を導き、グルコース輸送体GLUT4の筋細胞表面への移行を促進する。そしてグルコースがGLUT4を通して筋細胞に入る。加えて、骨格筋AMP活性化タンパク質キナーゼ (AMPK) の活性化によって、グルコース吸収およびインスリン感受性が亢進される。しかし、主にインスリンシグナル伝達異常およびグルコース輸送異常によって、2型真性糖尿病 (T2DM) を有する個体の筋肉はインスリンに対して抵抗性である。リンゴおよびベリー類に認められるウルソル酸 (UA) ならびにピーナッツおよびブドウに認められるレスベラトロール (RES) のような植物栄養素には、潜在的な抗糖尿病誘発特性および抗炎症特性があることが、多くのデータから示される。

【 0 0 6 4 】

本研究の目的は、UAがインスリンシグナル伝達経路を活性化するかどうか、そしてUAとRESの組み合わせが相乗的にAMPKを活性化して、その結果GLUT4の移行が起こり、筋細胞におけるグルコース吸収を増加させるかどうかを調べることであった。異なる時点で加えたUA (10 μ M) と共にL6筋管をインキュベートした。ウルソル酸は30、45、および60分において1.8、1.7、および1.8倍増のAktリン酸化を誘導した。ウルソル酸はまた、AS160リン酸化をも、15、30、45、および60分において各々1.3、2.5、1.6、および2.3倍増加させた。UA (10 μ M) またはRES (100 μ M) を30分間用いたL6筋管の処理では、AMPKリン酸化が各々1.7倍、5.3倍に増加した。UA (10 μ M) とRES (100 μ M) を組み合わせて30分間使用したところ、AMPKリン酸化が7.1倍増に相乗的に誘導され、それはUA単独処理よりも76%増、RES単独処理よりも26%増であった (図1) 。

【 0 0 6 5 】

したがって、ウルソル酸は筋細胞においてインスリンシグナル伝達経路およびAMPKシグナル伝達経路を活性化し、ウルソル酸とレスベラトロールの組み合わせは筋細胞のAMPKを相乗的に活性化する。これにより、UAおよびRESが、グルコースの吸収のために細胞膜に移行され得るGLUT4輸送体の利用可能性を増大させることが示される。肥満や2型糖尿病の個体はインスリンシグナル伝達異常やグルコース吸収異常を有するため、ウルソル酸やレスベラトロールのような植物栄養素が、このような個体においてインスリンの作用やグルコース吸収を改善するための新しい治療的アプローチとなる可能性がある。

平均 [3H] - DPM CYTO B について 補正 (DPM / mg)	SE	1分当たり、タンパク質当たりの平均 [3H] -2DG [] (pmol / mg / 分)	SE	DMSO からの変化 (倍)
基底	15748.17	2808.04	185.44	33.06
DMSO	10151.45	2221.79	119.53	26.16
Ins 100 nM	62423.24	11708.83	598.77	29.67
Met 1 mM	19718.32	4818.90	232.19	56.74
UA 10 μ M	21855.37	2248.08	257.35	26.47
RES 100 μ M	37819.44	17343.41	244.97	55.90
UA + RES	34038.17	8303.67	492.64	47.44
				4.12

【 0 0 6 6 】

実施例2

皮膚関連系におけるレスベラトロールとウルソル酸の相乗作用

材料および方法

試薬：ウルソル酸 (UA) 、レスベラトロール (RES) 、チアゾリルブルーテトラゾリウ

10

20

30

40

50

ムプロミド（MTT試薬）、およびアネキシンV／ヨウ化プロピジウム染色キットはSigma (St.Louis, MO) から入手した。インビボおよびケラチノサイトの研究については、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) からUAを入手した。ヒト組み替えTNF はR&D Systems (Minneapolis, MN) から得た。12-0-テトラデカノイルホルボール-13アセタート (TPA) をLC Laboratories (Woburn, MA) から入手した。CBAマウスTh1/Th2/Th17サイトカインキットはBecton Dickinson (Franklin Lakes, NJ) から入手した。

【 0 0 6 7 】

細胞培養：10% ウシ胎仔血清、50 U/ml ペニシリン、および50 ng/ml ストレプトマイシンを含む高グルコースDMEMにおいてHaCaTヒトケラチノサイトを維持した。8% FBS、50 U/ml ペニシリン、50 ng/ml ストレプトマイシン、10 µg/ml トランスフェリン、50 µg/ml 硫酸ゲンタマイシン、5 µg/ml インスリン、5 ng/ml EGF、10 µM o-ホスホリルエタノールアミン、および10 µM 2-アミノエタノールを含むJoklik MEMにおいてMT1/2マウス皮膚乳頭腫細胞およびCa3/7マウス皮膚癌細胞を維持した。10% FBS、50 U/ml ペニシリン、50 ng/ml ストレプトマイシンを含むDMEMにおいてB16F10転移性マウスマラノーマ細胞を増殖させた。10% FBS、50 U/ml ペニシリン、および50 ng/ml ストレプトマイシンを含むDMEM/F12においてA549ヒト肺腺癌細胞を増殖させた。全ての細胞を5% CO₂、37 ℃でインキュベーターにおいて増殖させた。

【 0 0 6 8 】

動物個体および投与法：6～7週齢のSENCAR雌マウスをNCI Frederick (Frederick, MD) から購入した。SENCARマウスの背部皮膚を剪毛し、200 µL アセトン溶媒または1～3 µmol UA、1～3 µmol RES、または等モルのRESとUAの組み合わせを週2回、2週間、局所的に投与した。各投与の30分後に、200 µL のアセトン溶媒または1～2 µg の発癌プロモーターTPAを局所投与した。

【 0 0 6 9 】

インビボのサンプル採取：最終TPA投与6時間後にウエスタンプロット法のために、そして最終TPA投与48時間後に組織学的検査のために動物個体を屠殺した。表皮増殖の免疫組織化学的 (IHC) 分析のため、1群当たり5個体のマウスに100 mg/kg プロモデオキシリジン (BrdU) PBS溶液の腹腔内注射を屠殺30分前に行った。投与した部分からのマウスの皮膚1 cm²をホルマリン中にて固定し、IHCによって分析するためにパラフィン包埋した。

【 0 0 7 0 】

免疫組織化学的検査 (IHC) : 抗BrdU抗体を用いてスライドを免疫染色した。スライドごとに少なくとも10個の無作為選択部位での、基底細胞層におけるBrdU陽性細胞の割合を測定した (マウス5個体/群)。さらに、Media Cybernetics (Bethesda, MD) のImage Pro-Discoveryを用いて、マウス5個体/群について10個の無作為選択部位で、各皮膚サンプルの表皮の厚さをも測定した。

【 0 0 7 1 】

ウエスタンプロット法：HaCaT細胞をRES、UA、またはRES+UAの最適以下の量で処理し、10 ng/ml ヒト腫瘍壞死因子 (TNF) で30分間刺激した。細胞をスクレイピングして、1 % Triton X-100、0.5 % IGEPAL、0.05 M TrisHCl および0.1 M NaCl およびプロテアーゼ / ホスファターゼ阻害剤および5 mM EDTAを含む溶解緩衝液に入れた。インビボ試験については、皮膚全体を氷上でガラスに置き、表皮をスクレイピングによって取り除き、プロテアーゼ / ホスファターゼ阻害剤と共にRIPA緩衝液中に入れた。ライセートをホモジナイズし、遠心分離によってタンパク質を抽出した。Bis-Trisゲル上に20 µgのタンパク質を分散させ、PVDF膜上に移した。膜を5% 粉乳またはBSAにおいてブロッキングし、一次抗体と共に4 ℃で一晩インキュベートした。対応するHRP結合二次抗体と共に膜を1時間インキュベートし、現像した。

【 0 0 7 2 】

サイトカイン分析：各処理群についての表皮サンプルをプールし、乳鉢と乳棒によって破碎し、0.05% tween-20の10 mM PMSF含有PBSに溶解した。遠心分離によってタンパク質を抽出し、Bradford法により定量した。サンプル当たり同量のタンパク質 (100 µg または

10

20

30

40

50

150 μg)を、製造業者の使用説明書に従ってCBAマウスTh1/Th2/Th17サイトカインキットおよびLSR IIフローサイトメーター(Becton Dickinson)を用いて、インターロイキン-2、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-10、インターロイキン-17A、インターフェロン-、および腫瘍壞死因子を含む炎症性サイトカインのレベルについて3通り分析した。各実行からのデータをTPA群に正規化した。フローサイトメトリーのデータはFlow Cytometry Shared Resource Facilityにおいて得られた。

【0073】

NFKB活性についてのルシフェラーゼアッセイ：製造業者の使用説明書によってAttractaneトランスフェクション試薬を使用し、QiagenのNFKB Cignal Reporter Assay Kitを用いてHaCaT細胞のトランスフェクションを行った。トランスフェクション中、96ウェルプレートにおいて 1.5×10^4 細胞/ウェルで細胞をブレーティングした。16時間のトランスフェクション後、0.5% FBS、1%非必須アミノ酸、50 U/ml ペニシリン、および50 ng/mlストレプトマイシンを含むOptiMEMを細胞に24時間再供給した。様々な用量のRESまたは溶媒で1時間、その後UAまたは溶媒で1時間、細胞を前処理した。10 ng/mlのTNF を加え、細胞を4時間インキュベートした。PromegaのDual-Luciferase Reporter Assay Systemを用いて、TNF 誘導のホタルルシフェラーゼおよびトランスフェクション対照のウミシイタケルシフェラーゼの双方の発光を測定し、Bioteck Synergy HT分光光度計を用いて定量した。

【0074】

細胞の生存率についてのMTTアッセイ：96ウェルプレートにおいて 1.5×10^4 細胞/ウェルで細胞をブレーティングした。RESまたは0.1%溶媒で1時間、その後様々な用量のUAまたは0.1%のDMSO溶媒で24時間、細胞を前処理した。A549細胞を用いた実験においては、 5.0×10^3 細胞/ウェルでブレーティングし、RESまたは溶媒を用いた1時間の前処理後、UAまたは0.1%のDMSOで48時間、細胞を処理した。MTT試薬(0.5 mg/ml)を加え、細胞をさらに2.5時間インキュベートした。培地を除去し、100 μlのDMSOでホルマザン結晶を溶解した。Bioteck Synergy HT分光光度計を使用し、650 nmにおけるバックグラウンド補正を用いて、570 nmにおいてプレートの測定を行った。

【0075】

アポトーシス/壊死細胞についてのアネキシンV/ヨウ化プロピジウム染色：6ウェルプレートにおいて 2.5×10^5 細胞/ウェルでCa3/7細胞をブレーティングした。指示された用量のRES、UA、または0.1%のDMSO溶媒で細胞を12時間処理した。培地およびトリプシン処理細胞を採取し、150 × gで3分間遠心し、洗浄して再度遠心し、製造業者の使用説明書に従ってアネキシンVおよびヨウ化プロピジウムを含有する1×結合緩衝液に再懸濁した。LSR IIフローサイトメーターにおいて死細胞をゲートアウト(gate out)し、細胞を解析した。フローサイトメトリーのデータはFlow Cytometry Shared Resource Facilityにおいて得られた。

【0076】

統計解析：個々の群間の相違をANOVAによって決定した。GraphPad PrismによってIC50値を計算した。UA+溶媒群のIC50値をUA+RES群のIC50値で割ることによって耐性逆転(Resistance Reversal: RR)を計算した。

【0077】

結果

RESおよびUAはマウスの表皮においてTPAに媒介される過形成および増殖を相加的に妨げる
本研究においては、マウスに発癌プロモーターTPAを局所的に投与した。本研究では、化学発癌イニシエーター、通常はPAH 7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン(DMBA)、および後にプロモーターがマウスの背中に施用される、マウスにおける二段階化学発癌モデルのプロモーション期を模倣している。これらの研究のために、本発明者らは予備研究においてTPA誘導の変化に対して適度の効果があったUAの用量を選択した。結果から、総用量1、2、3 μmolのRESには効果がない一方、同量のUAは2 μgのTPAに媒介される表皮肥厚を用量依存的に逆転させることができた。本研究において、UAの効果は2 μmolのRE

Sの追加によってのみ有意に増強された。また、これらの用量のRESおよびUAは、最終TPA投与48時間後にアッセイした表皮増殖に対しては限られた効果しかなかった。3 μmolのUA単独投与のみがTPA誘導の表皮増殖を有意に減少させた。

【 0 0 7 8 】

本発明者らはまた、1 μg TPAを促進刺激として用いた同様の実験も行った。2 μgのTPA誘導の表皮増殖に対してRESおよびUAの効果がないのは、この高い用量の飽和効果による可能性がある。UAは1 μgのTPAの表皮肥厚に対する効果を用量依存的に低減させた。加えて、2 μmolおよび3 μmol用量のRESは、それ自体は効果が全くないが、等モル用量のUAの抗過形成作用を有意に増強した。また、UAは1 μgのTPAに誘導された表皮増殖を用量依存的に減少させた一方、2 μmolのRESは2 μmol UAの効果を有意に増強した。2 μmol RES + 2 μmol UAの組み合わせ、および、3 μmol RES + 3 μmol UAの組み合わせもまた、1 μg TPA刺激による表皮増殖および過形成を溶媒対照レベルにまで逆行させた。これらの結果から、RESの、UAの抗発癌促進作用を増強する潜在性が示される。10

【 0 0 7 9 】

RESおよびUAはマウス表皮におけるTPA媒介炎症シグナル伝達を抑制する

RESとUAが、NFkBサブユニットp65のリン酸化および総COX-2レベルによって測定されたインビオのTPA媒介NFkBシグナル伝達に対し、少なくとも相加的な抑制作用を有することが認められた。反復試験によって、TPAで増強されたp65のリン酸化およびCOX-2レベルに対するRESとUAの相加的な抑制作用が実証された。20

【 0 0 8 0 】

RESおよびUAはマウス表皮においてAMPKを相乗的に活性化する

RESおよびUAは、それらの抗炎症作用、抗糖尿病作用、および／または抗癌作用に寄与する可能性のある、AMPKの活性化を行うことが示された。マウス表皮において、RESおよびUAがAMPKを相乗的に活性化することが認められた（図2）。反復実験でも、RESとUAの組み合わせが表皮においてAMPKを活性化することが示された。AMPKの活性化は、RESとUAの組み合わせによって媒介される表皮増殖、過形成、および炎症シグナル伝達の減少に寄与する可能性がある。加えてこれらの結果は、RESとUAの組み合わせがインスリン抵抗性のような、AMPKシグナル伝達と逆の相関関係がある疾患を相乗的に改善する可能性もあることを示す。20

【 0 0 8 1 】

RESとUAはヒトケラチノサイトにおいてTNF に媒介されるNFkB活性を相加的に抑制する

以前に言及されたように、NFkB活性は発癌プロモーション期において重要である。本発明者らは、HaCaTヒトケラチノサイトにおいて、RESとUAが相加的にまたは相乗的にNFkB活性を抑制できるかどうかを決定するための研究を行った。予備実験においてTNF 誘導のNFkB活性に対して適度の効果（活性サブユニットp65のリン酸化によって測定した）があった用量のRES（100 μMおよび200 μM）およびUA（10 μMおよび20 μM）で細胞を前処理した。RESとUAの組み合わせは概ね、TNF に媒介されるp65のリン酸化に対して相加的な抑制作用を有していた。30

【 0 0 8 2 】

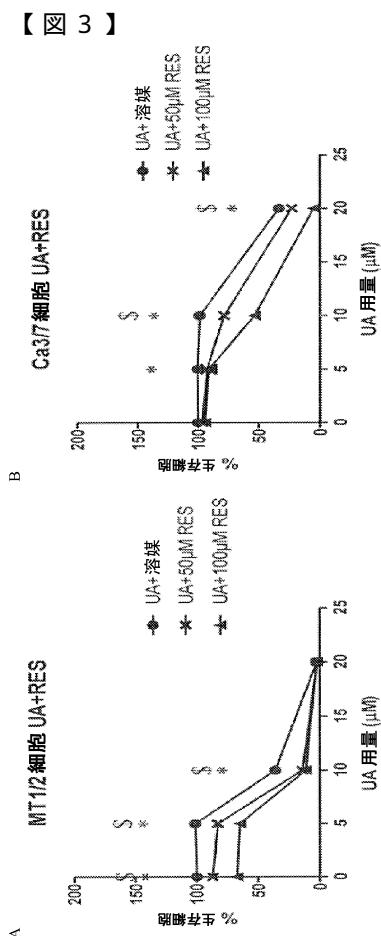
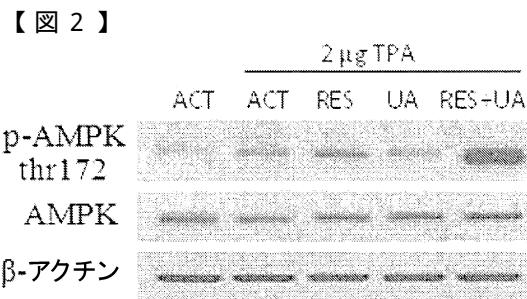
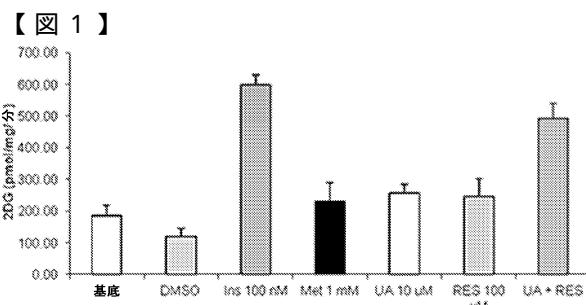
ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによって下流のNFkB転写活性をも分析した。組み合わせ実験については、TNF 誘導のNFkB活性に対して適度の効果があったUAの用量を選択した。UAはTNF に刺激されたNFkB活性を用量依存的に低減させ、この効果は100 μM RESによって少なくとも部分的に逆転させられた。別の実験においては、20 μM UAと組み合わせるRESの用量を増加させた。RESの用量がより多いときには（100 μMおよび200 μM）NFkB自体が部分的に抑制され、RESとUAの組み合わせには相加的な作用がある。本発明者らは、低用量のRES（50 μM）とUAとの拮抗作用を認めた。40

【 0 0 8 3 】

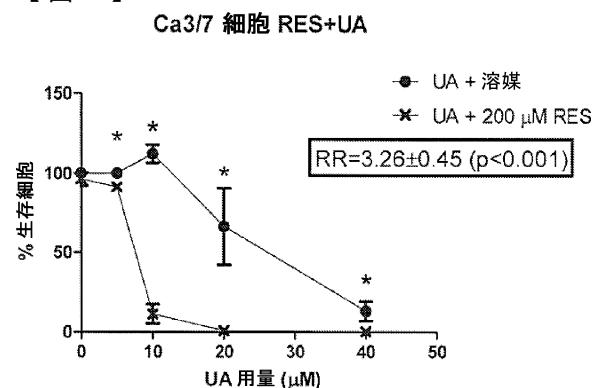
RESは皮膚癌細胞株においてUAの細胞毒性作用を増強する

MT1/2マウス乳頭腫細胞およびCa3/7マウス扁平上皮癌細胞の双方において、RESの用量を増加させるとUAのIC50値が下がった。IC50の低下率は、耐性逆転によって示され（図350

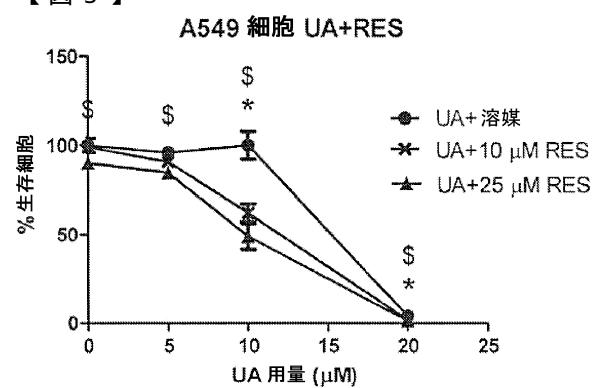
)、これはRESによって用量依存的に増強される。別の研究において、200 μ M RESがUA媒介増殖抑制を増強する能力について試験した。RESは強力におよび有意にUAと相乗作用した(図4)。Ca3/7細胞株におけるRESとUAの相乗作用は、フローサイトメトリーによって確認され、アポトーシス / 壊死の混ざった細胞死の増大が示された。加えて、RESとUAの相乗作用は高転移性のマウスマラノーマ細胞株B16F10およびヒト肺腺癌細胞株A549でも明らかであった(図5)。



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 9/20 (2006.01)	A 6 1 K 9/20
A 6 1 K 9/48 (2006.01)	A 6 1 K 9/48
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14
A 2 3 L 33/10 (2016.01)	A 2 3 L 33/10

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 スラガ トーマス ジェイ.

アメリカ合衆国 7 8 2 2 9 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 8 4
0 3

(72)発明者 ジュンコ ジェイコブ

アメリカ合衆国 7 8 2 2 9 テキサス州 サンアントニオ ボン シューレ ドライブ 5 0 5
5

(72)発明者 リヤン フイユン

アメリカ合衆国 7 8 2 4 0 テキサス州 サンアントニオ ケントン ハーバー 5 0 2 3

(72)発明者 レイナ サラ

アメリカ合衆国 7 8 2 2 9 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 8 4
0 3

審査官 梅田 隆志

(56)参考文献 中国特許出願公開第1 0 1 0 3 2 5 6 4 (CN, A)

PLOS ONE, 2 0 1 3 年 7 月, 8(7):e70135.

Cell Metabolism, 2 0 1 1 年 1 1 月 2 日, 14(5):612-622.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2 0 0 6 年 1 月, 54(1):243-248.

Journals of Gerontology : Medical Sciences, 2 0 1 2 年 1 2 月, 67(12):1307-1312.

Diabetes Care, 2 0 1 0 年 1 月, 33(Supplement 1):S62-S69.

Journal of Natural Products, 2 0 1 3 年 1 1 月, 76(11):2080-2087.

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2 0 1 1 年 5 月, 48(3):237-244.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 1 9

A 2 3 L 3 3 / 1 0
A 6 1 K 9 / 0 8
A 6 1 K 9 / 1 4
A 6 1 K 9 / 2 0
A 6 1 K 9 / 4 8
A 6 1 K 3 1 / 0 5
A 6 1 P 3 / 0 4
A 6 1 P 3 / 1 0
A 6 1 P 1 1 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)