

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-521184

(P2019-521184A)

(43) 公表日 令和1年7月25日(2019.7.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 31/198 (2006.01)	A 61 K 31/198	4 C 076
A61P 3/00 (2006.01)	A 61 P 3/00	4 C 206
A61P 3/10 (2006.01)	A 61 P 3/10	
A61P 3/04 (2006.01)	A 61 P 3/04	
A61P 9/10 (2006.01)	A 61 P 9/10 1 O 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-517750 (P2019-517750)	(71) 出願人	518438542 アストゥディージョ デ ラ ベガ、 オ ラシオ メキシコ国 06760 シウダ デ メ ヒコ コロニア ローマ スール トゥス パン ナンバー2-704
(86) (22) 出願日	平成29年6月8日 (2017.6.8)	(74) 代理人	100070024 弁理士 松永 宣行
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月7日 (2019.2.7)	(74) 代理人	100195257 弁理士 大渕 一志
(86) 國際出願番号	PCT/MX2017/000061	(72) 発明者	アストゥディージョ デ ラ ベガ、 オ ラシオ メキシコ国 06760 シウダ デ メ ヒコ コロニア ローマ スール トゥス パン ナンバー2-704
(87) 國際公開番号	W02017/213486		
(87) 國際公開日	平成29年12月14日 (2017.12.14)		
(31) 優先権主張番号	15/176,422		
(32) 優先日	平成28年6月8日 (2016.6.8)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	MX/A/2017/007448		
(32) 優先日	平成29年6月7日 (2017.6.7)		
(33) 優先権主張国	メキシコ(MX)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】糖尿病および他の変性慢性複合疾患によって生じる慢性損傷促進性細胞老化を元の状態に戻すおよび予防するための、代謝バイオエネルギー調節因子とニュートラエピジェネティック調節因子

## (57) 【要約】

本発明は、高レベルのグルコース、コレステロール、尿酸、および体脂肪の低減、損傷を受けた器官の細胞保護、代謝および細胞増殖の活性化のための、天然起源の化合物およびこれらの薬学的に許容される活性な混合物に関する。処方物Iの化合物を薬学的有効量で含む医薬組成物、ならびにin vitro系およびin vivo系におけるその方法が例示される。処方物Iおよびその変形を、高血糖症、痛風、脂質異常症、肥満症、インスリン抵抗性、糖尿病、尿崩症、1型糖尿病、2型糖尿病、微小血管合併症、大血管合併症、脂質障害、糖尿病前症、不整脈、心筋梗塞、腎臓および膵臓合併症、心血管合併症を治療するために使用することができる。

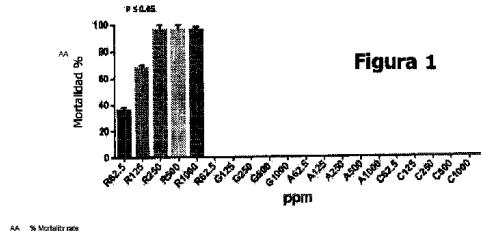


Figura 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

動物およびヒトにおける高レベルの体脂肪、コレステロール、尿酸およびグリセミック指数を低下させるための方法であって、薬学的有効量の、許容される化学形態のアミノ酸グリシン、アルギニンおよびシステイン、ならびに薬学的有効量の、許容される化学形態（水和物、エステル、アミド、多形体、異性体もしくはプロドラッグまたはそれらの組合せ）のレスベラトロールまたはその誘導体を含有する組成物を投与することで、対象におけるメタボリックシンドローム症状の矯正を実現することを含む、方法。

**【請求項 2】**

適用される組成物が、以下の比率の生物学的に活性な成分（処方物Ⅰ）：レスベラトロール 100～2,500mg、グリシン 3,000～7,000mg、アルギニン 300～5,000mg およびシステイン 200～2,500mg を含む、請求項 1 に記載の方法。 10

**【請求項 3】**

生物学的に活性な成分の組成物が、水性懸濁剤、錠剤、ポリマーカプセル剤として適用される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

組成物が、患者の血液中の総血清コレステロールレベルを低下させるのに有効である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

組成物が、患者の血液中の尿酸の濃度を低下させるのに有効である、請求項 1 に記載の方法。 20

**【請求項 6】**

組成物が、患者の動脈中のplaquesの体積を減少させるのに有効な量である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

組成物が、患者の体脂肪の量を減少させるのに有効な量である、請求項 1 に記載の方法。 25

**【請求項 8】**

組成物が、患者の血液中の高グルコース濃度を低下させるのに有効である、請求項 1 に記載の方法。 30

**【請求項 9】**

他のアミノ酸が適用される、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 10】**

疾患が、メタボリックシンドローム、アテローム性動脈硬化症、肥満症、糖尿病、痛風、またはそれらの組合せである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

組成物が、血清コレステロール、グルコース、尿酸、体脂肪、またはそれらの組合せのレベルの異常な上昇に関連する疾患の進行重症度を低下させるのに有効である、請求項 1 に記載の方法。 40

**【請求項 12】**

組成物が、メタボリックシンドローム、アテローム性動脈硬化症、肥満症、糖尿病、老化、またはそれらの組合せにより損傷を受けた器官の細胞保護剤、代謝および細胞増殖刺激物質として作用するのに有効である、請求項 1 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、メタボリックシンドローム、糖尿病および老化を治療するための医薬組成物および提案された方法の定義に焦点を合わせたものである。天然起源の化合物および組成

物が説明において開示される。より詳細には、本発明は、薬学的に許容される用量の、処方物Ⅰの一部である化合物を用いて細胞系および哺乳動物生物体（動物およびヒト）において発生する応答、例えば、代謝および細胞成長の制御などの使用に基づいて疾患を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

以前はシンドロームXとして公知であったメタボリックシンドロームは、正常な代謝と2型糖尿病の中間の状態である。メタボリックシンドロームは、人々を、他の病態の中でも心臓および冠状動脈疾患、ならびに慢性腎不全にかかりやすくする一連の代謝的危険因子であると定義された、新興の流行病である。メタボリックシンドロームは、グルコース障害、すなわち糖尿病を伴うまたは伴わない、腹部肥満、アテローム発生性脂質異常症、高血圧症、炎症促進性および血栓形成促進性の状態に関連付けられる。症状は、高トリグリセリドレベル、低高密度リポタンパク質レベル、血圧の上昇または高血圧症およびグルコースレベルの上昇、ならびに炎症症状に関連する。これらの特性はそれぞれ、血管機能障害および心血管疾患、腎疾患および肝疾患の発生にとって重要な危険因子である（Ecke I R. H et al、Lancet、2005、365: 1415）。メタボリックシンドロームにより、早期死亡のリスクが増大し、したがって、リスクが高い大集団に利益をもたらすためには、心血管代謝変更因子の減少を補助するため、および症候群を制御するための有効かつ手頃な戦略が重要な目標である。

10

【0003】

現在、メタボリックシンドロームの人々を治療するための主要な手法は、根本原因を低減すること、高血圧症および他の心血管危険因子を低減すること、ならびにインスリン抵抗性を制御することを目的とするものである。メタボリックシンドロームの治療は、薬物治療と共に、生活様式の変化を含む。メタボリックシンドロームの基礎をなす多くの機構に取り組むために、食事ガイドラインおよび適切な身体活動を実行するメタボリックシンドロームの治療に加えて、病態の顕在化に伴う代謝産物のレベルの変化を制御するために設計された一連の薬物適用が開発されており、同じ目標をもつ種々の生物学的に活性な栄養化合物が組み入れられている。栄養上の影響、特に、異なる分子標的に対する食事中のアミノ酸およびポリフェノールに関する機能的知見により、肥満症、メタボリックシンドローム、糖尿病および老化を治療するための、天然に存在する化合物の組成物を開発することが可能になっている。本発明の主題に関連するいくつかの概念および特許を下に記載する。

20

【0004】

LodderおよびCassis (Lodder R AおよびCassis L A、米国特許第2015/9060962号、Jun. 23. 2015) は、アテローム性動脈硬化症、メタボリックシンドローム、肥満症または糖尿病を予防または治療するための、スチルベンまたはスチルベノイドを伴ってまたは併わずにD-タガトースをまたはその誘導体を含む、医薬組成物の特許を取得した。植物において産生される天然のフェノールおよびフィトアレキシンの一一種であるレスベラトロール（3, 5, 4-トリヒドロキシ-トランス-スチルベン）などのスチルベノイドが、病原体による攻撃または他の傷害に対する応答中に適用された。異なる種類のベリー、ブドウ、クランベリーなどにおいて大量のレスベラトロールを見出すことができる（Fremont、Life Sci、2000、66: 663）。当該特許の前に、Baur et al (J. A. Baur et al、Nature、2006、444 (7117). 337) およびDo et al (Do G M et al、Biochem Biophys Res Commun、2008、374 (1). 55) により、レスベラトロールの、他の能力の中でも、高カロリー食のマウスの健康および生存を改善する効果、コレステロールレベルの変化を制御する効果が報告された。レスベラトロールと化学的に関連する別の化合物であり、3, 5-ジメトキシ-4'ヒドロキシスチルベンとして知られるプテロスチルベンは、レスベラトロールと同様の効果を示すことを特徴とする。

30

【0005】

サーチュインは、心血管疾患、老化およびストレス抵抗性の発生に関する代謝経路を

40

50

調節する、ヒストン脱アセチル化酵素活性およびいくつかの転写因子活性を有する酵素である (Jiang W J Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, 373 (3): 341)。レスベラトロールは、SIRT1 (NAD依存性サーチュイン-1脱アセチル化酵素) およびPGC-1 (ペルオキシソーム増殖因子によって活性化されるガンマ受容体活性化補助因子) を直接または間接的に活性化し、ミトコンドリアの機能に影響を及ぼすと考えられている (Lagouge M. et al, Cells, 2006, 127 (6):1109; Alcain F JおよびVillalba J M, Expert Opin Ther Pat, 2009, 19 (4):403; Beher D. et al, Chem Biol Drug Des, 2009, 74 (6):619)。レスベラトロールで処理された細胞では、超酸化物を減少させるSOD2 (MnSOD) 作用 (スーパーオキシドジスムターゼ2、ミトコンドリア、マンガン依存性スーパーオキシドジスムターゼとしても公知) が増大し、これは、いくつかの疾患におけるミトコンドリア機能不全、透過性遷移、およびアポトーシスによる死亡に対する抵抗性に関する。レスベラトロールは、GPERアゴニスト (GPR30) (Gタンパク質共役型エストロゲン受容体1、Gタンパク質共役受容体30としても公知) としても作用することが見いだされている (Prossnitz E. R. およびBarton M., Mol. Cell. Endocrin. 2014, 389 (1-2): 71)。レスベラトロールの可能性のある作用機構は、オートファジー調節 (機能障害性機構成分の排除を目的とするオートファゴサイトーシス) に起因し得る (Ghosh H. S. et al, PLoS ONE, 2010, 5 (2). e9199)。実験動物により、レスベラトロールの抗糖尿病治療としての正の効果が示されている (Baur J A et al, Nature, 2006, 444 (7117):337; Lagouge M. et al, Cells, 2006, 127 (6). 1109.)。この化合物は、PPARガンマアゴニストとして作用し (グリタゾン受容体またはR1C3 (核受容体サブファミリー1、グループC、メンバー3) としても知られるペルオキシソーム増殖因子 (PPAR- またはPPARG) によって活性化されるガンマ受容体はII型核受容体である)、2型糖尿病を治療するための薬理学的標的と考えられている (L. Wang et al, Biochem Pharmacol 2014, 92 (1):73)。ペルオキシソームは、適正に機能しない間に疾患および老化プロセスが引き起こされる可能性がある細胞小器官である。内皮一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性を刺激し、血小板凝集を阻害する能力は、レスベラトロールに起因する (Vita J. A. Duffy S J, Curr Opinion Lipid, 2003, 14 (1). 21; Olas B. およびWachowicz B., Platelets, 2005, 16 (5):251)。

#### 【0006】

植物抽出物は、抗酸化剤の供給源、レスベラトロール類似体と考えられ得る。Romero T. の米国特許第2016/9,278,104号、Mar. 8, 2016では、メタボリックシンドロームに関連する1つまたは複数の危険因子を低減および / または排除するための、*Nelumbo nucifera* の葉抽出物の使用が確立された。当該組成物では、種々の生きている生物体の筋肉および神経細胞に位置する、アミノ酸構造によく似た、窒素を有する有機酸であるクレアチニンの存在が考慮される。クレアチニンは、肝臓、脾臓および腎臓において、アルギニン、グリシンおよびメチオニンなどのアミノ酸から、1日当たりクレアチニン1 g の速度で天然に合成される。クレアチニンは、ATPを輸送し、筋肉の筋原線維にエネルギーを供給するための即時かつ直接のベクターと考えられる。

#### 【0007】

Gokaraju G. R. et alは、米国特許第2016/9,241,964号、Jan. 26, 2016において、*Sphaeranthus indicus* および / または *Garcinia mangostana* に由来する、医薬用途または栄養補助食品としての植物化学物質画分の組成物を確立している。当該組成物は、肥満症、メタボリックシンドローム、糖尿病および他の代謝障害の制御、予防および治療のため、ならびに哺乳動物におけるエネルギー消費量を調節するため、冠状動脈および腹大動脈の動脈硬化巣を予防するため、インスリン感受性を増大させるため、グルコースレベル、トリグリセリドレベルを制御するため、およびグルコースレベルを平衡化するために適用される。他の成分の中でもアミノ酸を含有する抽出物が言及されているが、それらは開示されていない。

#### 【0008】

ヒト代謝に関する種々のタンパク質の合成においてアミノ酸が重要な部分であること

10

20

30

40

50

は広く知られている。この発明は、組成物がメタボリックシンドローム、肥満症、糖尿病、および老化の治療および予防のために選択され得る理由になると考えられる。

#### 【0009】

Varfolomeev S. D. および Gurevich K. G. (Russian Chemical Bulletin, 2001, 50 (10): 1709) は、バイオコンピュータ解析を実施し、それにより、種々の酵素ファミリーにおいて、一次配列の定義された位置にグリシンアミノ酸が最も頻繁に見いだされる (37.5%) ことが実証された。当該著者らは、この性質を、酵素アーキテクチャにおけるグリシンの役割：タンパク質鎖の運動および柔軟性を可能にするキラル原子を有するアミノ酸であることに帰するものとした。これにより、代謝に対するグリシンの重要性が実証される。続く 5 種のアミノ酸は、アスパラギン酸 (12.9%)、システイン (6.7%)、ヒスチジン (6.2%) およびアルギニン (5.5%) である。システインは、硫黄架橋の形成に起因して、種々のタンパク質のコンフォメーションの維持に関与する。ヒスチジンおよびアルギニンは、アスパラギン酸と同じく、触媒部位において中核作用物質および求電子試薬として役割を果たすことにより、酵素活性部位によく見られる。10

#### 【0010】

アルギニンの場合では (Wu G. A. B. et al, Curr Opin Clin Nutr Metabol Care, 2000, 3 (1):59)、インスリン抵抗性の低下を補助する能力が報告されており、それにより、糖尿病の治療においてインスリンの量を減少させること、2 型糖尿病において耐糖能を増大させること、およびインスリン感受性を改善することが可能になる。20

#### 【0011】

システインは、ウイルス、細菌、真菌、発がん物質、ならびに他の病態からの細胞の保護に関するグルタチオン合成の制限基質である。いかなる他の成分も伴わずに適用される経口システインは、胃腸管の通過時に毒性の状態に急速に異化されるので、推奨されない。システインは、酸化還元反応に関するチオールの能力に起因して抗酸化性を有する。これらのシステインの抗酸化性は、大部分はトリペプチドグルタチオンにおいて発現する。経口グルタチオンの利用可能性は不十分なものであり、したがって、それを構成するアミノ酸 - システイン、グリシンおよびグルタミン酸から生合成されなければならず、システインが制限基質になる。実験室での実験により補足された異なる試験により、老化が、血漿システインおよびグルタチオン細胞内濃度の進行性の低下に直接関連することが示された。この低下により、加齢性酸化ストレスが導かれる。通常の食事を上回るシステイン補充により、骨および筋肉系が補助され、それにより炎症およびサイトカインのレベルが低下することによって種々の老化プロセスが低減する (L. Wang et al, Biochem. Pharmacol., 2014, 92 (1):73)。30

#### 【発明の概要】

#### 【0012】

細胞増殖の制御は、あらゆる生物体が適切に機能するために必須である。この調節の変化が、遺伝子突然変異に起因する制限されていないおよび制御されていない細胞増殖を伴うがんなどの疾患の原因である。逆に、細胞増殖ができなくなることは老化を引き起こす要因の 1 つである。40

#### 【0013】

細胞周期マイトジェン、いくつかの増殖因子、ならびに生存因子によって、細胞分裂の細胞外制御を実施することができる。マイトジェンは、細胞分裂を刺激し、それにより、周期進行を遮断する細胞内停止機構 (Rb) を打ち消すタンパク質である。

#### 【0014】

あらゆる生物体または器官の成長は、成長および細胞分裂の両方に依存する。細胞が成長せずに分割する必要がある場合、細胞は毎回小さくなる。増殖因子は、タンパク質および他の巨大分子の合成および阻害を促進することによって細胞成長（細胞塊の増大）を刺激する。細胞成長は細胞周期に依存しない。例えば、神経および筋肉細胞は、特に細胞分裂後に成長する。大多数のマイトジェンと同様に、増殖因子は、細胞表面受容体に結合し、次いでそれにより種々の細胞内シグナル伝達経路が活性化し、それにより、タンパク質50

合成の増大またはタンパク質分解の低減が誘導され得る。これらは全て細胞成長を導くものである。

#### 【0015】

生存因子は、細胞内死プログラムまたはアポトーシスを抑制することによって細胞生存を促進する。生存のための他の細胞からのこれらのシグナルの要求が、細胞が必要な時に必要な場所でのみ生存するのに役立つ。例えば、ニューロンが過剰に產生され、それらが増殖因子を得ることについて互いに競合し、増殖因子を最も大量に有するものが生存する。マイトジエンおよび増殖因子と同様に、生存因子は、細胞膜受容体に結合する傾向があり、それにより、通常は B c l - 2 ファミリーに属するタンパク質を調節することによって細胞死を阻害する細胞内シグナル伝達経路が活性化する。いくつかの生存因子は、 I L - 3 、 S C F 、 I G F - 1 であり、これらは、主に、肝臓により、成長ホルモン ( G H ) からのシグナルに応答して分泌される。

10

#### 【0016】

上記に基づいて、上記の問題を解決するために、本発明の目的は、レスベラトロール、グリシン、アルギニンおよびシステインからなり、成分の濃度の範囲が *Artemia salina* モデルの試験に基づいて設定される処方物の使用を提供することである。この場合に特許を受けるのは、処方物の使用、およびそれを疾患の治療に適用する方法である。処方物は、遺伝毒性の証拠は伴わずに、 *in vitro* における細胞培養物およびリンパ球の増殖を刺激する新規の効果を有し、これにより、糖尿病になるように誘導された健康な実験動物において観察される内臓脂肪の形成を低減する能力、アロキサン誘導性糖尿病のモデルにおいて示された、より少ないインスリンを用いたまたはインスリンを用いないグリセミック指数の可制御性、アロキサンで処置した動物の脾臓において示される治療の細胞保護効果、6ヶ月の期間にわたって治療された患者におけるメタボリックシンドロームおよび肥満症の症状の矯正が明らかになる。下記の実施例では、処方物が、エネルギー生成、酸素代謝の回復、ならびに糖、脂肪酸およびコレステロール代謝に関連する種々の酵素サイクルの再活性化のレベルで作用し、細胞において増殖の増大の観点で表される機能性および生命力の増大のために利用可能なエネルギーを増大させる再活性化成分を有することが実証される。実施例は、前記処方物を動物およびヒトに適用すると、糖尿病、肥満症および / またはメタボリックシンドロームの負の因子に関連する機能が正常化されることを実証するものである。これらの実施例によると、設計された処方物を用いた治療は、老化、メタボリックシンドローム、肥満症および糖尿病を制御する方法である。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図 1】異なる濃度で適用したレスベラトロール ( R ) 、グリシン ( G ) 、アルギニン ( A ) およびシステイン ( C ) 成分によって示された、 *A. salina* の死亡率の観点で表された毒性。

30

【図 2】異なる濃度の処方物 I の存在下での *A. salina* の生存率。

【図 3】異なる濃度の処方物 I で処理した試料中のリンパ球の数 ( 上 ) およびそれらの生存率 ( 下 ) 。

40

【図 4】単核細胞 ( リンパ球 ) における、異なる濃度で適用した処方物 I の試験遺伝毒性。上 - 電気泳動プレート ; 中央 - 組み込まれた D N A の百分率 ( 頭部 ) (\* R P M I を用いた対照に対して  $p < 0.05$  ) ; 下 - 電気泳動試料末端の結果に基づく算出 (\* 0.1 mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた陽性対照に対して  $p < 0.05$  ) 。

40

【図 5】ヒト胎児由来腎臓細胞株 H E K - 2 9 3 細胞培養物 ( 上 ) およびアフリカミドリザル ( V e r o ) 腎臓細胞培養物の生存率に対する異なる濃度の処方物 I の効果。

【図 6】処方物 I を用いて処置した動物および処置していない動物における血液化学パラメータの値のグラフ表示である : 上 - 雄ウサギ ; 下 - 雄ラット、単回投薬を適用する前および 1 0 0 0 m g / K g を 1 4 日間適用した後。

【図 7】処置 : I - インスリン、 5 0 m g / k g 、 7 0 m g / k g 、 9 0 m g / k g - 処方物 I 用量 : の処置に供したウサギ目動物の種々の群における体重変化ダイナミクス ( 上 )

50

) およびグルコース濃度(毛細血管血糖)(下)。

【図8】I - インスリン、50mg/kg、70mg/kg、90mg/kg - 処方物I用量: を用いた処置に供した齧歯類の種々の群における体重変化ダイナミクス(上)およびグルコース濃度(毛細血管血糖)(下)。

【図9】処方物Iおよびインスリンを用いて処置した誘導性糖尿病を有するウサギならびに無処置の誘導性糖尿病を有するウサギにおいて臍臓レベルで観察された組織学的变化の比較。上 - インスリンのみで処置した雌臍臓から取り出した組織の組織学的切片、器官の完全な破壊が実証された: 血管がうっ血した脂肪組織および反応性变化を伴う2つのリンパ節のみが見いだされ、可能性のある臍組織を同定せずに意図的な検索を実施した。下 - 処方物Iのみで処置した雌臍組織の組織学的切片(10×)(左)、関連する組織学的变化を伴わない排出部分臍臓保護腺房が同定されるが、内分泌成分は同定されない(臍島細胞); 画像(40×)は、臍臓の排出部分(腺房)を統合するアプローチに対応する(右)。

【図10】処方物Iおよびインスリンを用いて処置した誘導性糖尿病を有するウサギならびに無処置の誘導性糖尿病ウサギにおいて腎臓レベルで観察された組織学的变化の比較。上 - インスリンのみで処置した雌の腎組織の組織学的切片: 糸球体レベルで、硬化した小結節の形成を伴わない血管壁の非定型、限局性肥厚を伴わないメサンギウム細胞の増加を伴い、これは、メサンギウムのわずかな増加を特徴とする初期の糖尿病性腎症に対応する(左); インスリンのみで処置した雄の腎臓カット片、骨皮質の良好な保護、わずかな鬱血を伴い良好な細胞充実性を伴う豊富な糸球体を伴い、硬化の变化はない。尿細管成分では、凝固性壊死および核濃縮による变化が存在する(右)。中央 - インスリンおよび90mg/kgまでの処方物Iで処置した雌の組織学的腎臓カット片、良好な骨皮質保存が示され、ごくわずかな鬱血を伴い良好な細胞充実性を伴う豊富な糸球体が同定され、硬化の变化はない。尿細管成分では、最初の变化は凝固性壊死および核濃縮によって見られる。下 - 70mg/kgまでの処方物Iで処置した雄のうっ血性腎組織の組織学的切片(左 - 10×)、髓質および皮質における赤血球血管外遊出(顕微鏡レベルの出血)が伴う、非定型、わずかな鬱血を伴わない糸球体メサンギウム細胞の増加を示す構造が同定される; 図は、うっ血性糸球体のアプローチに対応する(右 - 40×)。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0018】

本発明の特徴的な詳細は、処方物Iを定義すること、その適用、異なるレベル(細胞、健康な動物または糖尿病が誘導された、ヒト生物体)で生物系における生物学的效果を定義することからなる。以下の段落には、本発明を定義する目的を記載し、本発明の新規性および有用性を例示するが、その範囲を限定せず、それを不当に限定するものではない。以下の実施例は、処方物Iを定義するため、ならびにin vitro系およびin vivo系におけるそれらの効果を試験するために実施された試験に基づく。

##### 【0019】

本発明による、本発明を考慮した基本的な組成物および調製物を含む処方物の説明を表1に示す。

##### 【0020】

10

20

30

40

## 【表1】

表1 処方物 I		
用量サイズ		5 g - 17 g
1袋当たりの用量		1袋
1箱当たりの袋数		90
成分	用量範囲(最小-最大)	純度(%)
グリシン*	3,000-7,000 mg	98.5-101.5%
L-アルギニン HCl*	300-5,000 mg	98.5%
L-システイン HCl*	200-2,500 mg	98.5-101.5%
レスベラトロール*	100-2,500 mg	98%
*食事中の1日摂取量は確立されていない 体重70kgの個体に対するおよその量		

10

20

## 【0021】

請求項1に記載の組成物は、進行疾患の症例に対する治療効果がより高い、本発明の化合物の潜在的な組合せの複数の実施形態のうちの1つを含むこと、ならびに投薬レジメンを低減するナノ粒子の実施形態を統合することをさらに特徴とする。

## 【0022】

## 【表2】

表2		
用量サイズ		6 g-19 g
1袋当たりの用量		1袋
1箱当たりの袋数		90
成分	用量範囲(最小-最大)	純度(%)
L-グリシン*	3,000-7,000 mg	98.5-101.5%
L-アルギニン HCl*	2,000-5,000 mg	98.5%
L-システイン HCl*	1,000-2,500 mg	98.5-101.5%
L-メチオニン*	500-1,500 mg (ナノ 粒子中 500mg)	98.5-101.5%
ビタミンB6 (ピリドキシン-HCl)	500-1,500 mg	98.5-101.5%
レスベラトロール*	500-1,500 mg (ナノ 粒子中 500mg)	98%

\*食事中の1日摂取量は確立されていない  
\*\*20mgが1日必要量の100%である

10

20

30

40

50

## 【0023】

## 実施例1

アッセイを実施して、処方物Iのために提案された成分（レスベラトロール、グリシン、アルギニンおよびシステイン）のArtemia salinaノープリウスに対する毒性を評価した。Artemia salinaは、生物学的活性および全く異なる化学構造を有する広範囲の化合物に感受性の甲殻類である。Michael et al (Michael A. S. et al, Science, 1956, 123:464) およびVanhaecke et al (Vanhaecke et al, Ecotoxicol Environ Saf 1981, 5:382) により、毒性試験のための、その使用が提案された。これは、性質が異なる物質の毒性試験を実際に経済的に行うことを可能にする試験である。他の特定の細胞傷害性試験と非常に良好な相関が存在している。このモデルは、FDA (Food Drug Administration) およびEPA (Environmental Protection Agency in 2002) により、医薬品および/または食品の毒性および生態毒性を評価するための試験として認められている。

## 【0024】

処方物I成分のそれぞれを異なる希釈度で使用し、標準化された方法に従ってアッセイを実施した。Artemia salina孵化器中、Artemia salinaの囊胞0.5gを人工海水中37g/L、温度27度で、一定の通気を伴って24時間にわたって孵化させた。96ウェルプレートのうちの5ウェルそれぞれに、人工海水(37g/L)0.1mLを、孵化器から分離し、10ノープリウスの正確な分離が実現されるように1つずつ計数した10ノープリウスと共にシングルチャネルピペットを用いて適用した。レスベラトロール、グリシン、アルギニンおよびシステインのストック溶液2000ppmから段階希釈物を作製し

た。マルチチャネルマイクロピペットを使用して、プレート中で調製した溶液 0 . 1 mL を添加し、ノープリウスの 5 つのウェルごとに 62 . 5 ppm、125 ppm、250 ppm、500 ppm および 1000 ppm の最終濃度を実現した。ブランク試料として、10 の無処理のノープリウスを 0 . 2 mL 体積の人工海水 (37 g / L) に入れた。マイクロプレートを 25 ℃ で 24 時間インキュベートした。インキュベーション期間後、*A. salina* ノープリウスの生死を実体顕微鏡で計数し、% 死亡率を決定した。Gualdrón et al の尺度を考慮し、毒性を *A. salina* ノープリウスのパーセント死亡率として表した：0 ~ 10 % は無毒性、11 ~ 50 % は中程度の毒性、51 ~ 90 % は強毒性および 100 % は極度の毒性。（Gualdrón R. et al、Chem Rev. Col. Farm. 1997、26:15 to 19）。処方物 I の成分溶液を 5 倍で試験した。Statistical Package Graph Pad Prismバージョン 6 を用い、分散分析 (ANOVA) 試験および Tukey 多重比較 ( $p < 0 . 05$ ) によってデータを解析した。  
10

#### 【0025】

データ解析の結果を ± 標準偏差平均として表し、図 1 に示した。グリシン、アルギニンおよびシステインは、試験したいずれの濃度においても毒性はなく、したがって、毒性が生じたとしても 1000 ppm を上回ってやっとであり得ることが示唆される（図 1）。レスベラトロールについては、62 . 6 ppm 溶液で 38 % の死亡率（中程度の毒性）が存在したが、LC<sub>50</sub>（50 % ノープリウスの致死濃度）は 89 . 48 ppm と推定され、レスベラトロールはこの濃度から強毒性であることが示唆される。このデータを考慮して処方物 I を定義した：レスベラトロール濃度は CL<sub>50</sub> を下回るように選択した；アミノ酸に関しては、1000 ppm を下回る任意の濃度を使用することができる。  
20

#### 【0026】

##### 実施例 2

ここで例示されている処方物 I として、以下の生物学的に活性な成分の組成物を考慮する：哺乳動物（ヒトを含む）または細胞培養物への使用に関して、それぞれ体重 1 kg 当たりまたは溶媒 1 kg 当たり、レスベラトロール 5 . 7 mg、グリシン 74 . 3 mg、アルギニン 5 . 7 mg およびシステイン 2 . 9 mg。レスベラトロール濃度は、実施例 1 において定義された結果を考慮して選択した、すなわち、毒性の顕在化を防止するために、その CL<sub>50</sub> の約 15 分の 1 未満とした。アルギニン重量はレスベラトロールと同等にし、システインはレスベラトロールのおよそ 2 分の 1 未満にし、グリシンはレスベラトロールの重量の 13 倍にした。処方物 I は、生物学的に活性な成分の混合物の例であり、本発明の範囲を限定するべきではない。この場合は、処方物 I 用量は 88 . 6 mg / kg に定義される。  
30

#### 【0027】

処方物 I を使用し、実施例 1 に記載のものと同様のアッセイを実施して、その毒性の範囲を定義した。結果を図 2 に示す。500 ppm 以下の濃度では、*A. salina* ノープリウスの 100 % が生存し続け、1000 ppm の処方物 I では 58 % のみが生存することが示されている。これにより、適用されたモデルによると、処方物 I は最大 500 ppm の濃度までは非毒性であるが、最大 1000 ppm の高濃度では中程度の毒性挙動が示される。これにより、処方物 I を使用することにより、その濃度は、毒性がないことを考慮して広範囲の濃度および用量で変動し得ることが実証される。  
40

#### 【0028】

##### 実施例 3

処方物 I を、ヒト細胞に対するそれらの効果、すなわち、成長効果を刺激する（分裂促進効果）または細胞死を引き起こす（細胞傷害効果）効果を決定するための試験に適用した。

#### 【0029】

このアッセイのために、末梢血単核細胞 - 末梢ヒトリンパ球に由来する単核細胞培養物を使用する生物学的 *in vitro* 系を使用した。この系は、白血球の 25 % から 35 % までを形成し、また、外来抗原を認識し、細胞免疫応答メディエーターを活性化し、そ  
50

れにより、内因性または外因性の刺激の前に増殖または抑制現象を引き起こすことから主要な免疫応答促進細胞であるので、この系を選択した。これらの培養物は、様々な化合物の効果を評価するための研究に広く使用されている (Marti-Centelles R. et al, J. Med Chem Eur, 2015, 103:488)。細胞増殖に対する効果を評価し、*in vitro*におけるヒトリンパ球に対する処方物IのLC<sub>50</sub>およびLC<sub>100</sub>（生細胞の量がそれぞれ50%および100%減少する濃度）を決定した。陽性対照として、リンパ球における有糸分裂を誘導し、クローン増殖をそれにより引き起こす植物起源の球状タンパク質であるコンカナバリンA (Con A) を用いた試験を実施した (Ganem and Martin Gonzalez Baez F A O., Universo Diagnostico, 2000, 1 (1):1)。RPMI-1640 (処理を伴わない培地) を用いたアッセイをプランクとして実施した。200 ppmから2000 ppmまでの濃度範囲で適用した処方物Iの効果を、トリパンブルー色素で染色した細胞および死細胞の総数を計数することによって評価した。

#### 【0030】

10 %FBSを補充し、ストレプトマイシンおよびアンホテリシンB (SIGMA社製) の1×溶液1 mLを添加し、0.22ミクロンのメンブレンを使用した濾過滅菌ユニット (Coring社製) を通して滅菌してRPMI-1640培地培養物 (SIGMA社製) 1 Lを調製した。2000 ppmの処方物Iのストック溶液からの段階希釈物、200 ppm、400 ppm、600 ppm、800 ppm、1000 ppmおよび2000 ppmを調製した。

#### 【0031】

20 健康な志願者ドナーから末梢血30 mLを静脈穿刺によって得、これを、抗凝固薬としてEDTAを含有するプラスチックチューブ中に収集した。次いで、25°、毎分1200回転 (rpm) で30分間遠心分離することにより、Ficoll-Hypaque密度勾配 (Sigma-Aldrich社製) によって単離した末梢血 (PBMC) 由来の単核細胞を得た。PBMCをPBS1×で2回洗浄し、最終的な細胞ペレットを培養培地に再懸濁させた。PBMCは単球およびリンパ球からなった。単核球細胞は、増殖潜在性を欠く付着細胞であることを特徴とする。他の点では、これらは、懸濁液中で、内因性または外因性の刺激後に増殖することが可能な細胞であるリンパ球である。リンパ球から単球を分離するために、得られたPBMCを25 cm<sup>3</sup>の箱の中で、単球が表面に接着するように、37°、加湿雰囲気、5%CO<sub>2</sub>雰囲気中で5時間にわたって水平方向に培養した。インキュベート時間後、リンパ球 - 懸濁液中の残りの細胞を滅菌1.5 mLチューブ中に分離し、1200 rpmで10分間遠心分離し (Eppendorf Centrifuge 5810-R)、次いで、培養培地1 mLを細胞パッケージに添加した。エッペンドルフチューブ中、1 mL当たり細胞500,000個の懸濁液を調製し、それに異なる濃度の処方物I (200 ppm、400 ppm、600 ppm、800 ppm、1000 ppmおよび2000 ppm) を添加し、加えて、1.25 mg / mLの陽性対照コンカナバリンA - 細胞増殖の誘導因子およびプランク - 無処理の細胞、培養培地を添加した。試料を37°、加湿雰囲気中、5%CO<sub>2</sub>で48時間にわたって、リンパ球が完全に細胞分裂し、産物により同様の陽性対照増殖 (Con A) が示されるまたはそうでなければ細胞毒性が引き起こされるのに十分にインキュベートした。インキュベーションを終了したら、異なる試料を含有するエッペンドルフチューブを1200 rpmで10分間遠心分離し、上清をデカントし、細胞パックをRPMI-1640 1 mLに再懸濁させた。

#### 【0032】

40 × 対物レンズを備えた光学顕微鏡を使用した。Neubauerチャンバーを用い、PBS 1 × 0.4 mLに再懸濁させた試料それぞれの懸濁液0.05 mLおよびトリパンブルー0.05 mLを使用して細胞を計数した。アッセイを3つの独立した事象で3連で実施した。結果を、SPSSバージョン16を用いて分散分析試験 (ANOVA) によって分析し、次いで、ダネット検定を適用して、p < 0.05の値を有意とみなし、対照と実験処置の間に差異が存在するかどうかを見分けた。

#### 【0033】

図3に、試験結果を示す。200 ppmで適用した処方物Iの細胞の濃度の上昇に対す

10

20

30

40

50

る効果は、ブランク無処置と比較すると、15%まで有意( $p < 0.05$ )であることが明らかであった(1ミリリットル当たりの細胞の数):それぞれ6,372,333 cells / mLおよび5,518,333 cells / mL。コンカナバリンAでは65%までの細胞の数の増加が計数されて1mL当たり細胞9,101,667個が得られ(図3)、これにより、その分裂促進活性が確認される。他方では、1000 ppmおよび2000 ppmの濃度の処方物I存在下では、細胞数の減少が観察された:それぞれ1mL当たり細胞4,291,667個および1mL当たり細胞3,540,333個。

相対的な細胞生存率(VCR)の百分率を算出し、200 ppm、400 ppmおよび600 ppmの濃度の存在下では、細胞の97%がブランクおよび陽性対照におけるものと同様に生存することが見出された。800 ppmから、ならびに1000 ppmおよび2000 ppmの処方物Iによりヒトリンパ球の細胞生存率は有意に低下し(図3、下)、それぞれ百分率は90.58%、84.38%および64.96%であった。処方物IのLC<sub>50</sub>およびLC<sub>100</sub>はそれぞれ2,726.8 ppmおよび5,165.82 ppmと推定された。この値は、*A. salina*を用いた試験において検出された値よりも有意に高く、これにより、適用した用量の処方物Iには細胞傷害性がないことが証明される。両方の試験によると、処方物Iは、50~90 ppmの用量では細胞傷害性ではない。これらの用量は、リンパ球増殖を刺激する範囲内であり、これにより、老化治療の方法に対するその重要な効果が確認される。

#### 【0034】

##### 実施例4

以下の実施例は、実施例3において示された増殖効果および阻害効果が、DNA(デオキシリボ核酸)損傷のレベルには関連しないことを示すものである。この目的のために、損傷の程度をデオキシリボ核酸(DNA)のレベルで測定するための、迅速であり、感度が高く、単純かつ数量化可能な方法であるコメットアッセイを開発した。このアッセイは、DNA修復に対して有害な化合物または作用を調査するためのツールとして認められている(Azqueta A.およびA. R. Arch Toxicol Collins, 2013, 87:949)。このアッセイは、異なる科学的学問分野において、遺伝毒性試験、前臨床試験および臨床試験、生態毒性遺伝子検査、細胞遺伝学的検査、光遺伝毒性検査などのために、in vivo、in vitro、ex vivoにおける系で使用されている。

#### 【0035】

単核細胞およびヒト末梢血リンパ球を、実施例3に記載されているものと同じ方法体系に従って分離した。培養培地を使用することにより、細胞濃度を1mL当たり細胞 $1 \times 10^6$ 個に調整した。得られた細胞をEppendorfバイアルに1mL当たり細胞 $3 \times 10^4$ 個の密度で播種し、37、および5%CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートして安定化させた。その後、バイアルを22、1250 rpmで5分間遠心分離し、上清を7.81 ppm、15.63 ppm、31.25 ppm、62.50 ppm、125 ppm、250 ppm、500 ppm、および1000 ppm(それぞれn=4)の処方物Iの溶液で置き換えた。ブランク試験細胞を培養培地に再懸濁させ(n=8)、他のものを0.1 mMの過酸化水素に再懸濁させた(陽性対照、n=8)。細胞を24時間インキュベートし、その後、1200 rpmで5分間遠心分離することによって沈殿させ、37および5%CO<sub>2</sub>でトリプシン(0.25%)0.1 mLを用いて3分間処理した。細胞をRPMI 1640培地1mLに再懸濁させ、1200 rpmで5分間再遠心分離し、上清を廃棄し、細胞を溶解溶液(2.5 MのNaCl、100 mMのNa<sub>2</sub>EDTA、10 mMのTris-HCl、および1%Triton)1mLと一緒に4で24時間インキュベートした。24時間後に、バイアルを1200 rpm、4で遠心分離した。上清を廃棄し、細胞を、中和緩衝液(0.4 MのTris、pH 7.5)1mLを用いて4で5分間処理し、バイアルを4、1200 rpmで5分間遠心分離し、細胞をローディング緩衝液(プロモフェノールブルー0.25%、グリセロール50%、10 mMのTris-HClおよび50 mMのNa<sub>2</sub>EDTA)0.02 mLに再懸濁させた。アガロースゲルを、加熱プレート中、100で1%をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解させることによって調製した

10

20

30

40

50

。溶解したら、60度で、Gelred(蛍光色素DNA化合物)0.01mLを添加した。この混合物を水平電気泳動チャンバーに入れて60分間置いた。溶解した細胞をアガロースゲルにローディングし、電気泳動溶液(1mMのNa<sub>2</sub>EDTAおよび300mMのNaOH、pH13.5)と一緒に4度20分間インキュベートした。電気泳動を4、25Vおよび300mAで30分間実施した。ゲルを電気泳動チャンバーから取り出し、蛍光シグナル分析チャンバー中で明らかにした。生成した画像を高分解能デジタルカメラで取得し(図4、上)、ImageQuant TL v8.1ソフトウェアで解析した。インタクトなDNAを表すコメット頭部の面積を濃度測定分析によって数量化し、陰性対照(培養培地)に対する百分率としてプロットした(図4、中央)。損傷を受けたDNAを表すコメットの尾部をミリメートル単位で測定し、陽性対照(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)に対する百分率として表した。データを、平均±平均標準偏差として表した(図4、下)。得られたデータを、GraphPad Prism v6.0ソフトウェアを使用して分散分析(ANOVA)によって分析し、何らかの差異があった場合にはポストホックチューキー検定を使用し p < 0.05とした。

10

20

30

40

50

#### 【0036】

結果(図4)から、10%FBSを補充したRPMI 1640培養培地中、種々の濃度の処方物Iで処理したヒト末梢血单核細胞がdsDNA(dsDNA)の損傷を示さなかつたことが示される。コメット頭部(インタクトなDNA)には明らかな損傷は生じなかつた(図4、中央)。対照的に、遺伝毒性作用を発揮することが知られる過酸化水素(0.1mM)では、はるかに迅速なdsDNA拡散(図4、上下)が検出される挙動が示され、これは、遺伝毒性を指し示すものであり、この現象に起因して、読み取り測定面積はブランクと比較してはるかに大きくなる(図4、下)。処方物Iで処理した試料の挙動はブランクと同様であり、これにより、処方物Iで24時間処理することにより单核末梢血液細胞DNAに対する有害作用は生じないことが示される(図4)。さらに、過酸化水素によって誘導される遺伝毒性作用(Azqueta A.およびA. R. Collins, Arch Toxicol, 2013, 87:949)が再現され、これにより、実験条件下で、開発された方法体系が、感度が高く信用できるものであることが示される。処方物Iは、ヒト单核細胞DNAに対する有害作用を生じさせることなく細胞成長に対する効果を引き起こすものである。

#### 【0037】

##### 実施例5

異なる濃度の処方物Iの効果をヒト胎児由来腎臓(HEK-293)細胞株およびVero細胞株(アフリカミドリザル腎臓細胞)において3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(MTT)を用いた微量希釈アッセイを使用して評価した(Mosmann T., J. Immunol Methods, 1983, 65(1-2):55)。MTT法は、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミドの還元に基づき、細胞代謝機能を反映するアッセイである。MTTは、黄色の色素であり、生存細胞の呼吸鎖の一部であるミトコンドリアデヒドロゲナーゼにより還元されてホルマサン(青色の色素)になる(Hwa et al, 2015)。MTTは、哺乳動物細胞の生存および増殖能力を決定するために適用される定量的比色定量微量希釈法に使用される(Mosmann T., J. Immunol Methods, 1983, 65(1-2):55)。これは、生存細胞集団に関して単純であり、効率的であり、経済的であり、再現性があり、感度が高く、安全であり、かつ有効であるので、細胞増殖および細胞傷害性の評価に適したin vitro試験である。

#### 【0038】

10%ウシ胎仔血清(FBS)および抗生物質の混合物(200,000IUのペニシリンおよび0.5gのストレプトマイシン)1mLを補充したダルベッコ変形イーグル最小必須培養培地/F12(DMEM/F12)を使用した。トリプシン溶液(Difco)0.25%を調製した。2000ppmの処方物Iのストック溶液およびTriton X-100からDMEM/F12を溶媒として段階希釈物を調製した。1.95ppm、3.91ppm、7.81ppm、15.63ppm、31.25ppm、62.50ppm、125ppm、250ppm、500ppmおよび1000ppmの濃度が得られるように各希釈物1mLを調製した。各

細胞培養物の細胞を、DMEM/F12 25 cm<sup>3</sup> 培養プレートを使用してプレート表面上に集密な単層が得られるまで成長させた。細胞培養のために使用した条件は、37℃、加湿雰囲気中、5% CO<sub>2</sub>であった。集密な細胞単層を25 cm<sup>3</sup> プレートから0.25%トリプシンを使用して取り出した。これは以下の通り行った：DMEM/F12培地を除去し、次いで、単層をリン酸緩衝生理食塩水1×で1～3回洗浄し、次いで、0.25%トリプシン0.5 mLを添加し、内容物を37℃、加湿雰囲気中、5% CO<sub>2</sub>で5分間インキュベートした。DMEM/F12 3 mLを取り出した細胞に添加し、細胞を0.1～1 mLのマイクロビペットで再懸濁させ、15 mLの滅菌円錐管に入れ、その後、1000 rpmで5分間遠心分離した。DMEM/F12を円錐管から除去した。DMEM/F12 3 mLを細胞パックに添加し、細胞を再懸濁させ、Neubauerチャンバー中で計数を行った。次いで、1 mL当たり細胞250,000個の細胞懸濁液を調製した。ウェルマイクロプレート細胞懸濁液当たり、1 mL当たり細胞250,000個0.1 mLを96ウェルマイクロプレートの全てのウェルに添加し、マイクロプレートを37℃、加湿雰囲気中、5% CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした。各ウェルのDMEM/F12培地を真空中で取り出し、単層を各ウェルの底部で維持し、次いで、処方物IおよびTriton X-100から調製した各希釈物(1.95 ppm、3.91 ppm、7.81 ppm、15.63 ppm、31.25 ppm、62.50 ppm、125 ppm、250 ppm、500 ppm、1000 ppmおよび2000 ppm)0.1 mLを添加した。さらに8ウェルに無処理の細胞を残し、細胞生存率についての対照として使用し(無処理の細胞培養培地-プランク)、それに、DMEM/F12 0.1 mLを添加した。その後、マイクロプレートを37℃、加湿雰囲気中、5% CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした。次いで、DMEM/F12培地を処方物IおよびTriton X-100の試料と共に取り出し、ウェルをリン酸緩衝生理食塩水で1回洗浄した。0.02 mLを5 mg/mLのMTT溶液に添加し、内容物を37℃で2時間インキュベートして、生細胞ミトコンドリアデヒドロゲナーゼによるMTTのホルマザンへの完全な還元プロセスを行った。その後、MTT溶液を取り出し、形成されたホルマザン塩を保持し、次いで、それにイソプロピルアルコール0.1 mLを添加し、540 nmにおける吸光度をSynergy HTマイクロプレートリーダーでGEN5埋込式ソフトウェアを用いて読み取った。細胞生存率の百分率の算出において、無処理の培養培地で増殖した細胞を伴うウェルにおいて検出された吸光度を生細胞100%とみなした。処方物I溶液は5連で試験し、陽性対照溶液は3連で試験した。試験を3つの別々の事象で行った。処方物IおよびTriton X-100のLC<sub>50</sub>データを、Graph Pad Prismバージョン6統計学的パッケージを使用し、スチュードントt検定(p<0.05)によって推定した。データ解析の結果が平均±標準偏差として表されている(図5)。

#### 【0039】

500 ppmよりも低い濃度の処方物Iに関しては、HEK-293細胞株およびVero細胞株の増殖およびミトコンドリア活性の刺激が観察されたことが示された。増大は、HEK-293株では1.95 ppmで140%であり、62.5 ppm濃度では40%を超えたが、Vero細胞の場合では、プランクと比較してたった10%であった。この結果から、処方物Iの細胞増殖を刺激する効果が証明される。

#### 【0040】

500 ppmを超えると、処方物I濃度が上昇するにしたがって細胞生存率の低下(図5)が観察されたことから、用量依存的な細胞傷害効果が観察された。

#### 【0041】

どちらの細胞株においても、陽性対照(Triton X-100)では、この物質が細胞傷害性化合物であることから予測されたものと一致して、この物質の濃度の上昇によって吸光度の低減が観察されたので、用量依存的効果が示され、試験したいずれの濃度でも生存率のいかなる増大(100%を超える値)も伴わなかつたが、プランク(無処理)と比較して吸光度の低減が検出された。

#### 【0042】

処方物IおよびTriton X-100のLC<sub>50</sub>は、それぞれHEK-293細胞株については

10

20

30

40

50

2,417.00 ± 65.77 ppm および 764.10 ± 21.93 ppm の値、ならびに Vero 細胞株については 4,289.00 ± 289.90 ppm および 42.80 ± 1.60 ppm の値であると推定された。

#### 【0043】

得られた結果から、50 ~ 90 ppm の範囲の濃度で処方物 I の細胞傷害性は観察されないことが証明される。この用量では、細胞代謝刺激が観察される。観察された現象は、実施例 3 に記載されているものと同様であり、処方物 I が成長および細胞代謝因子・促進剤であるとみなさるべきであることを実証するものである。

#### 【0044】

##### 実施例 6

高用量 - 実施例 2 に記載されている *A. salina* アッセイの LC<sub>50</sub> (1000 mg / kg および 1350 mg / kg) よりも高い用量を用いた急性毒性アッセイ（単回適用、14 日間のモニタリング）、ならびに亜慢性毒性試験（毎日適用、1 日 2 回、90 日間、50 mg / kg、70 mg / kg および 90 mg / kg 用量）において、齧歯類およびウサギ目モデル（ウイスター ラットおよびニュージーランドウサギ）などの健康な実験動物における処方物 I の効果が観察された。各動物種の陰性対照動物においてプラセボ（精製水）の添加、体重および血糖の測定の同じ手順を並行して実施した。

#### 【0045】

実験動物に対して実施した全ての試験において、処置は、それぞれ齧歯類およびウサギ目に対する通常飼育による飼料消費後に、体重依存的に、経口胃カニューレを通じて経口投与で行った (Commission of the European Communities in Off. J. Eur. Comm (L 383 A), 1992, 35:110)。

#### 【0046】

動物を個々のケージ内に保持し、処方物 I の投与後最初の 24 時間にわたって持続的に観察し、観察を継続し、あらゆる動物応答について各試験期間に必要であった中間の獣医学的ケアを日誌に記録した。実験の開始時および実験の終了時に体重を測定し、記録した。ウサギの場合にはまた、各試験の前後に臨床検査を実施した：血液生体計測、血液化学ならびにトランスアミナーゼ酵素：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (TGP) およびトランスペプチダーゼガンマグルタミルトランスアミナーゼ (GGT) の活性。ラットでは、失血を防ぐためにこれらのパラメータを試験の最後にだけ決定した。最後に、動物に一連の麻酔薬および塩化カリウム (KC1) を適用する安樂死ステップを進行した。その後、それぞれの場合に応じて、心臓、腎臓、脾臓、肺臓、肝臓、卵巣および精巣を主に含む器官および基本組織の肉眼検査および剖検を行った。取得した試料を、病理組織学的試験を実施するために送付した。

#### 【0047】

急性毒性アッセイにおいて試験した最大用量は 1350 mg / kg であった。これは、経口胃カニューレによって適用される最大体積が、齧歯類およびウサギ目に対して、それぞれ 1 ml または 3 ml であり、また、高用量の使用では、経口胃カニューレを通過させるのが難しい粘性の高い溶液が得られることが理由であった。試験した濃度では、実験動物のいかなる死亡も観察されず、したがって、LD<sub>50</sub> 値は決定されなかった。本発明に関して、肝酵素の重量および活性ならびに血液生体計測を含む評価されたパラメータの大部分について、処置前と処置後で、ならびにプランク（無処置）と比較して、有意差は示されないことが示された。しかし、処置した動物では、グルコースレベルの低下、尿酸およびコレステロールの減少（図 6）が認められた。これらのパラメータはメタボリックシンドローム、痛風および糖尿病に関連するので、この試験結果により、単回、高用量の処方物 I を適用することにより、上記の代謝産物レベルの低下が導かれることが示され、言及された病状に対してこの処置を使用することの効果が確認される。

#### 【0048】

亜慢性毒性試験の結果の場合にも同じ傾向が観察された。処方物 I を種々の用量で適用することで、グルコース、コレステロール、尿酸、クレアチニンおよび肝酵素のレベルの

10

20

30

40

50

低下が観察された。しかし、統計学的に証明される差異はグルコース制御でのみ得られ、一方、他のパラメータの変化は、試験される動物の個体差に関連して標準偏差が大きいことを特徴とする。処置した動物の場合、体重の増加は対照よりも少なかった。さらに、肝酵素活性の反復的な低下が観察され、これは、処方物Iの肝臓活性を改善する効果の証拠と考えることができる。剖検実施中の特徴的な観察は、処方物Iで処置した動物では肉眼評価で顕著な筋肉の発達および体脂肪のわずかな発達が見られ、同様に、脂肪肝は示されなかった。90日間にわたってケージ内での非常にわずかな動きで、すなわち、運動を伴わず体重および年齢に応じた通常の食物摂取で保持されたにもかかわらず全てこうであった。これらの結果からも、処方物Iの適用により、健康な哺乳動物において血液生体計測および肝機能を変化させることなく、脂肪組織の量の減少、グルコース制御、および時には血液化学の他の特性によって媒介される体重制御が可能になることが確認される。

10

## 【0049】

## 実施例7

さらに、アロキサン誘導性糖尿病を有するラットおよびウサギにおける試験を実施した。この試験、ならびに亜慢性毒性試験では、処置は、3つの用量の処方物I（50mg/kg、70mg/kgおよび90mg/kg）を適用した。処置を伴う動物の5つの群（インスリン+3つの言及された用量の処方物I、70mg/kgの処方物Iおよびインスリン単独）を調査した。インスリングラルギンを0.7U/kgの用量、24時間ごとに単回の朝投与で皮下投与した。

20

## 【0050】

アッセイの開始時および終了時の、糖尿病が誘導されたウサギにおける血液化学の分析結果の比較により、処置下であっても血糖が高レベルで顕在化することが見出された。尿素およびクレアチニンの増加が観察され、これにより、腎損傷が確認される。しかし、処方物Iを用いて処置したウサギの場合では、尿酸およびコレステロールのレベルの低下が観察された。

## 【0051】

処置を適用する前および21日間適用した後のウサギ血液の血液生体計測結果により、動物における誘導性糖尿病の結果として単球および血小板およびヘモグロビンが存在することに関連するパラメータの低減が示された。単球増加症は、単球として知られる白血球細胞の一種の存在が増大する状態である。単球は、骨髄において形成され、免疫系の正常な機能において重要な役割を果たす。血小板は、血液凝固に関与し、傷害の場合に出血を止めるのに役立つ。観察された変化により、アロキサン誘導性糖尿病の治療の間、血液障害または骨髄が形成された。

30

## 【0052】

臨床的モニタリングの間、いくつかのウサギ検体で、あらゆる糖尿病の体で予測される臨床データである、食物および水の摂取の変化に伴う体重減少（多飲症を伴う食欲不振の期間）が示された。90mg/kgの処方物Iおよびインスリンを用いて処置した動物の群の一部のウサギでは、全ての他の動物と同様に体重減少は検出されず、体重増加の証拠さえあり、これにより、処方物Iが臓器保護を示すことが示される。図7（上）は、本試験で試験した動物の種々の群における体重変化の傾向を示す。処方物Iの適用により、体重減少の低減が導かれることが理解される。処方物Iおよびインスリンを用いて処置した群に関しては、90mg/kgの適用群においてより大きな体重増加が観察される。これにより、効果が用量依存的であることが示される。

40

## 【0053】

同様に、インスリンおよび処方物Iを用いて処理した全ての検体では、実施例5および6と同様に、低血糖効果が示されることが確認された。図7（下）は、処置を適用してからの異なる日数での毛細血管グルコースレベルの平均値を示す。効果が、用量が異なると変動し、50mg/kgおよび70mg/kgでは90mg/kgと比較して大きいことが示されている。

## 【0054】

50

図8(上)は、誘導性糖尿病を有するラットの群当たりの体重変化の平均値を示す。純粋なインスリン(I)を用いて処置した動物の群の場合では、体重減少の低減の傾向は、試験処置を用いて試験した他の群と比較してはるかに目に見えるものである。図8(下)は、グルコース濃度(毛細血管グルコース)の変化の平均値を示す。インスリンのみで処置したラットに関しては、19日間の処置まで毛細血管グルコースが増加する傾向が見られた。この期間に、70mg/kgの処方物Iのみを適用することによりグルコースの増加がより効率的に制御されることが理解される。1型糖尿病動物におけるグルコースレベルの最も大きな低下は70mg/kgの用量で観察された。

#### 【0055】

誘導性糖尿病(1型糖尿病)を有するラットの臨床的モニタリングにおいて、インスリンのみまたは処方物Iのみで処置した群の検体では、ウサギの場合と同様に食物および水の摂取の変化が示され(多飲症を伴う食欲不振の期間)、これらの臨床データはあらゆる糖尿病の体で予測される。しかし、処方物I+インスリンを用いた処置に供した群ではこれらの臨床データは示されず、したがって、言い換えれば、処置の適用が動物の生活の質の改善に役立ったこと、および、インスリンと併せた管理により、糖尿病を有する動物の臨床的な状態を改善することができたことが明らかであり、本発明において特許請求された効果が示される。

10

#### 【0056】

50mg/kgおよび70mg/kgの処方物I+インスリン(グラルギン)を用いて処置したラットにおけるグルコースレベルは正常化する傾向があった(図8、下)。90mg/kgおよびインスリン(グラルギン)で処置した群のモニタリングに関しては、この短期間の曝露では血糖が正常化する傾向はなかったが、同じ用量の処置を行ったウサギ目種で得られたデータと非常に類似したデータが観察された(図7)。どちらの場合でも、結果から、処方物Iが糖尿病を有する哺乳類の臓器保護を示すことが実証される。

20

#### 【0057】

本試験のラットの種々の群間での血液化学分析結果の比較により、まだ処置中でも、血糖が高レベルで顕在化し、高い値の尿素およびクレアチニンが観察されたことが判明し、これにより、腎臓に対する損傷が確認される。血液生体計測結果から、試験した種々の群間で有意差は示されなかった。

30

#### 【0058】

1型糖尿病を有するウサギおよびラットの剖検後の肉眼試験では、サプリメントまたはインスリンのみで処置した群では最も重症の臓器の変化が示されたことが観察され、病理組織学的切片において確認されている(図9)。したがって、アロキサンは糖尿病誘導因子として、この器官に影響を及ぼし、変化は全ての動物において予測されるものであった。しかし、処方物Iおよびインスリンを用いて処置した動物では、肉眼で検出可能な変化は示されなかった。レスベラトロールの、インスリン受容体の感受性を増大させる効果が知られている(Chachay V. S. et al, Br J Clin Pharmacol, 2011, 72 (1):27)。しかし、本発明の説明では、処方物Iは、インスリンの存在下で作用した場合に、動物器官に対するさらなる細胞保護効果および損傷を受けた組織の回復効果も示す。

40

#### 【0059】

糖尿病を誘導した動物の試料を用いて実施した病理組織検査結果によると、腎損傷(結果は血液化学分析と整合性があった)が観察される。しかし、インスリンおよび処方物Iを用いて処置した群の検体では、処方物Iまたはインスリン単独のみで処置した検体よりも少ない腎損傷が観察された。体重制御および毛細血管血糖の結果と共に、これらの結果により、試験期間(21日)の間、処方物Iとインスリンと一緒に適用した処置により、腎臓および臍臓などの器官の、糖尿病によって引き起こされる変化からの保護が導かれることが証明される。

#### 【0060】

ここに示す実施例では、処方物Iの、インスリンと共に適用した場合に1型糖尿病哺乳動物の器官を悪化から保護する能力が確認される。さらに、血糖を制御する能力が認めら

50

れ、これは、インスリンの存在下で増強され、また、この効果により、コレステロールおよび尿酸は低減しながら、体重増加が維持されることが認められる。

#### 【0061】

##### 実施例8

48歳の男性が胸部不快感を示し、その後、メタボリックシンドロームを有すると診断された。身体検査により、その人物は、体重87kg、身長170cm、BMI 32kg/m<sup>2</sup>の肥満であることが示された。血圧(BP)は160/110mmHg、であり、空腹時血漿グルコース(GA)は150mg/dLであり、トリグリセリド(Tg)は215mg/dLであり、総コレステロール(TC)は320mg/dLであり、LDL-Cは212mg/dLであり、HDL-Cは37mg/dLであり、HbA1cは8.46%であった。この患者を、次の6カ月にわたって実施例2に記載の処方物Iを1日3回、各食物摂取後に用いた処置に供した。処方物Iの適用形態をコップ1杯の水またはジュース懸濁液として調製した。療法の親和性を推定するためおよびあらゆる副作用を回避するために周期的な評価を行った。この処方物Iを用いた処置期間の後、生化学的試験の実施に進んだ。検出された値は、GA 115mg/dL、HbA1c 6.69%、TC 235mg/dL、LDL-C 123.7mg/dL、HDL-C 40mg/dL、Tg 119mg/dLであり、彼の体重は74kgに減少した。11-デヒドロトロンボキサンB2および血小板凝集のレベルは、ベースラインと比較してそれぞれ75%および90%低下した。療法に対する応答は100%であった。この手順により、患者のメタボリックシンドロームの危険因子が相当に修正された。

#### 【0062】

最後に、メタボリックシンドローム、糖尿病、肥満症を治療または予防するため、ならびに抗老化治療としての、グリシン、システイン、アルギニンおよびレスベラトロールの使用は上記の処方物Iおよび実施形態に限定されず、当業者は、本明細書に記載の教示により、範囲が特許請求の範囲によってのみ確立される本発明の治療用組成物を変化させるように訓練される。

#### 【0063】

##### 参考文献

#### 【0064】

10

20

Alcaín, F. J., Villalba, J. M. (2009). "Sirtuin activators". Expert Opin Ther Pat., 19(4): 403-414. doi:10.1517/13543770902762893. PMID 19441923.

Azqueta, A., Collins A. R. (2013). "The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair". Archives of toxicology, 87: 949-968.

Baur, J. A. et al., (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high calorie diet". Nature, 444 (7117): 337-342.

Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K. W., Lu, S. C., Atangan, L., Wang, M. (2009). "Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity". Chem Biol Drug Des., 74 (6): 619-624. doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00901.x. PMID 19843076.

Chachay, V. S, Kirkpatrick, C. M. J., Hickman, I. J., Ferguson, M., Prins, J. B., Martin, J. M. (2011). "Resveratrol—pills to replace a healthy diet?" Br J Clin Pharmacol. 72(1): 27-38

Commission of the European Communities. (1992). "Annex to Commission Directive 92/69/EEC of 31 Jul. 1992 adapting to technical progress for the seventeenth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. B.1 Acute toxicity (oral)". Off. J. Eur. Comm. (L 383 A) 35: 110-112.

10

20

30

40

Do, G. M. et al., (2008). "Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374(1): 55-59.

Duffy, S. J., Vita, J. A. (2003). "Effects of phenolics on vascular endothelial function". *Current Opinion in Lipidology*, 14 (1): 21-27. doi:10.1097/01.mol.0000052857. 26236.f2, PMID 12544657.

10

Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z. (2005). "The metabolic syndrome". *Lancet*, 365: 1415-1428.

Environmental Protection Agency (2002). "Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms". Fifth Edition. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, D.C. 20460 PP. 178-184.

20

Fremont, L. (2000). "Biological effects of resveratrol". *Life Sci.*, 66: 663-673.

Ganem Baez, F. A., Martin Gonzalez, O. (2000). "Lectina concanavalina A: obtención y purificación". *Universo Diagnóstico*. 1(1):1-41.

30

Ghosh, H. S., McBurney, M., Robbins, P. D., McBurney, R. (2010). "SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin". *PLoS ONE* 5 (2): e9199. Bibcode:2010PLoS...5.9199G. doi:10.1371/journal.pone.0009199. PMC 2821410. PMID 20169165.

40

Gokaraju G. R., Gokaraju, R. R., Golakoti, V. K. R. R., Bhupathiraju, T., Sengupta, K., Alluri, K., Raju, V. K. (2016). Composition from Sphaeranthus indicus and Garcinia mangostana for the control of metabolic syndrome. Patent US 2016/9,241,964, Jan. 26, 2016.

Gualdrón, R., López, S., Sanabria, A. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre Artemia salina de plantas colombianas. Rev. Col. Quím. Farm. 26:15-19.

Jiang, W. J. (2008). "Sirtuins: novel targets for metabolic disease in drug development". Biochem. Biophys. Res. Commun. 373(3): 341-344.

Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J. (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha". Cell 127 (6): 1109-1122.

doi:10.1016/j.cell.2006.11.013. PMID 17112576.

Lodder, R. A., Cassis L. A. (2016). D-tagatose-based compositions and methods for preventing and treating atherosclerosis, metabolic syndrome, and symptoms thereof. Patent US 2015/9,060,962, Jun. 23, 2015.

Martí-Centelles, R., Falomir, E., Murga, J., Carda, M., Marco, J. A. (2015). Inhibitory effect of cytotoxic stilbenes related to resveratrol on the expression of the VEGF, hTERT and c-Myc genes. Eur J Med Chem. 103: 488-496.

Michael, A. S., Thompson, C. G., Abramovitz, M. (1956). Artemia salina as test organisms for a bioassay. *Science.* 123: 464.

Mosmann, T. (1983). Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2): 55-63.

Olas, B., Wachowicz, B. (2005). "Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions". *Platelets* 16 (5): 251-260.

Prossnitz, E. R., Barton, M. (2014). "Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities". *Molecular and Cellular Endocrinology.* 389 (1-2): 71-83. doi: 10.1016/j.mce.2014.02.002. ISSN 0303-7207.

Romero, T. (2016). Methods and materials for reducing multiple risk factors associated with the metabolic syndrome. Patent US 2016/9,278,104, Mar. 8, 2016.

Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., Sorgeloos, P. (1981). "Proposal for a short-term toxicity test with Artemia nauplii". *Ecotoxicol Environ Saf.* 5: 382-387.

Varfolomeev, S. D., Gurevich, K. G. (2001). Enzyme active sites: bioinformatics, architecture, and mechanisms of action. *Russian Chemical Bulletin.* 50 (10): 1709-1717.

10

20

30

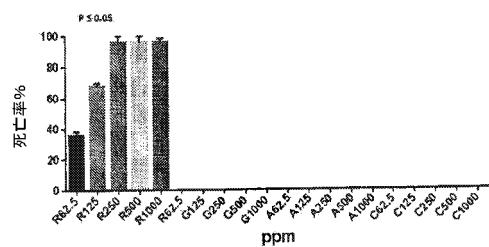
Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., Blazevic, T., Schwaiger, S., Rollinger, J. M., Heiss, E. H., Schuster, D., Kopp, B., Bauer, R., Stuppner, H., Dirsch, V. M., Atanasov, A. G. (2014). "Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ): a review". Biochem Pharmacol 92 (1): 73-89. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.018. PMC 4212005. PMID 25083916.

Wu, G. A. B., Meininger, C. J., Knabe, D. A., Baze, F. W. A., Rhoads, J. M. (2000) "Arginine nutrition in development, health and disease". Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. 3 (1): 59-66.

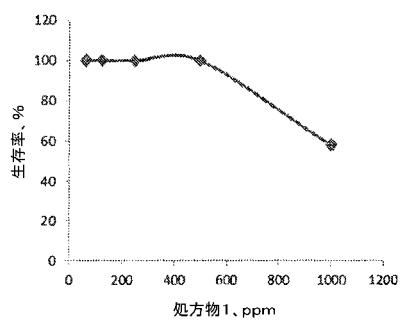
10

20

【 义 1 】



【 図 2 】



**Figura 1**

**Figura 2**

【図3】

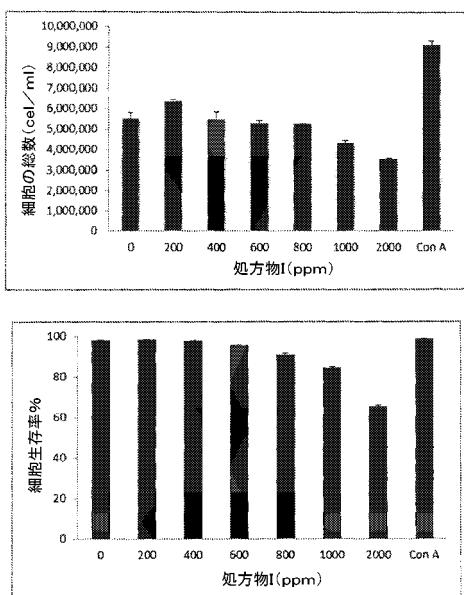


Figura 3

【図4】

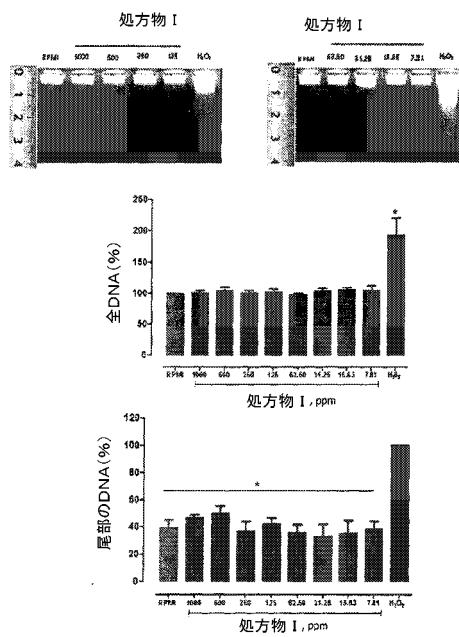


Figura 4

【図5】

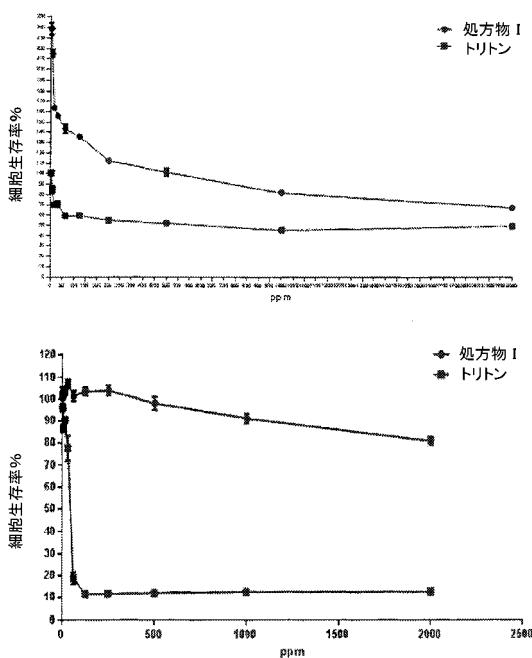


Figura 5

【図6】

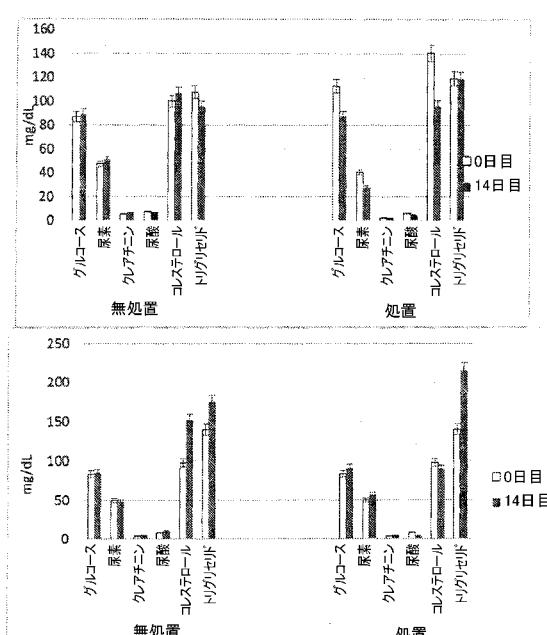


Figura 6

【図7】

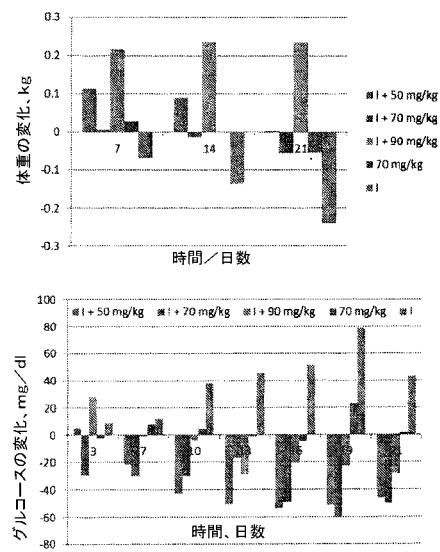


Figura 7

【図8】

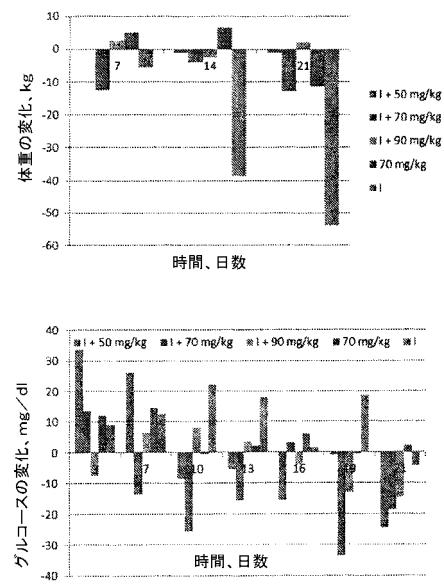


Figura 8

【図9】

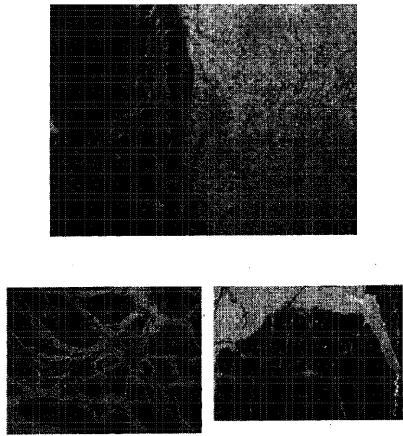


Figura 9

【図10】

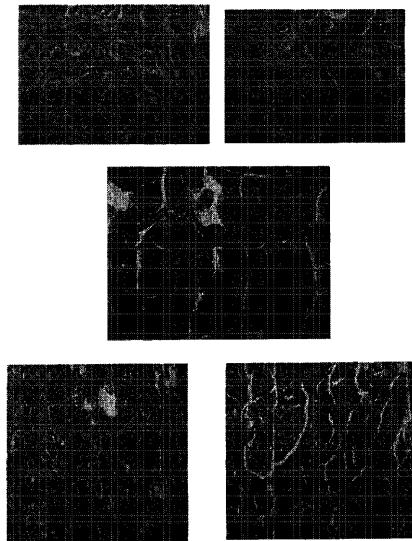


Figura 10

## 【国際調査報告】

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PC1/MX17/00061

<b>A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD</b> <b>A61K 9/10, 31/05, 31/198, 47/02 (2017.01)</b> <b>CPC - A61K 9/10, 31/05, 31/198, 47/02</b> De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.		
<b>B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA</b>  Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)		
 Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
 Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)		
<b>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</b>		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	US 2008/0286254 A1 (SAKAMOTO, H et al.) 20 Noviembre 2008; párrafos [0012], [0014], [0021], [0026], [0099], [0114]	1-12
A	WO 2015/017625 A1 (WIKIFOODS, INC.) 5 Febrero 2015; página 7, 4º -5º párrafos; página 10, 7º párrafo; página 19, 2º párrafo; página 46, 3º párrafo; página 75, 2º párrafo	1-12
A	(LAGOUGE, M et al.) Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 y PGC-1[alpha]. Cell. 15 Diciembre 2006, Epub 16 Noviembre 2006, Vol. 126, No. 6; páginas 1109-1122; página 1110, 1º columna, 1st párrafo, Y 2º columna . 1º párrafo ; DOI: 10.1016/j.cell.2206.11.013	1-12
P, X	US 2016/0354331 A1 (ASTUDILLO DE LA VEGA, H) 8 Diciembre 2016; todo el documento	1-12
<input type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos <input type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo		
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 07 Diciembre 2017 (07.12.2017)		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 08 Enero 2018
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 Nº de fax		Funcionario autorizado Shane Thomas Nº de teléfono

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/MX17/00061															
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC - A61K 9/10, 31/05, 31/198, 47/02 (2017.01) CPC - A61K 9/10, 31/05, 31/198, 47/02																	
<b>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</b> <b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">US 2008/0286254 A1 (SAKAMOTO, H et al.) 20 November 2008; paragraphs [0012], [0014], [0021], [0026], [0099], [0114]</td> <td style="padding: 5px;">1-12</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">WO 2015/017625 A1 (WIKIFOODS, INC.) 5 February 2015; page 7, 4th-5th paragraphs; page 10, 7th paragraph; page 19, 2nd paragraph; page 46, 3rd paragraph; page 75, 2nd paragraph</td> <td style="padding: 5px;">1-12</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">(LAGOUGE, M et al.) Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1[alpha]. Cell. 15 December 2006. Epub 16 November 2006, Vol. 126, No. 6; pages 1109-1122; page 1110, 1st column, 1st paragraph, and 2nd column, 1st paragraph; DOI: 10.1016/j.cell.2206.11.013</td> <td style="padding: 5px;">1-12</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">P, X</td> <td style="padding: 5px;">US 2016/0354331 A1 (ASTUDILLO DE LA VEGA, H) 8 December 2016; entire document</td> <td style="padding: 5px;">1-12</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	US 2008/0286254 A1 (SAKAMOTO, H et al.) 20 November 2008; paragraphs [0012], [0014], [0021], [0026], [0099], [0114]	1-12	A	WO 2015/017625 A1 (WIKIFOODS, INC.) 5 February 2015; page 7, 4th-5th paragraphs; page 10, 7th paragraph; page 19, 2nd paragraph; page 46, 3rd paragraph; page 75, 2nd paragraph	1-12	A	(LAGOUGE, M et al.) Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1[alpha]. Cell. 15 December 2006. Epub 16 November 2006, Vol. 126, No. 6; pages 1109-1122; page 1110, 1st column, 1st paragraph, and 2nd column, 1st paragraph; DOI: 10.1016/j.cell.2206.11.013	1-12	P, X	US 2016/0354331 A1 (ASTUDILLO DE LA VEGA, H) 8 December 2016; entire document	1-12
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
A	US 2008/0286254 A1 (SAKAMOTO, H et al.) 20 November 2008; paragraphs [0012], [0014], [0021], [0026], [0099], [0114]	1-12															
A	WO 2015/017625 A1 (WIKIFOODS, INC.) 5 February 2015; page 7, 4th-5th paragraphs; page 10, 7th paragraph; page 19, 2nd paragraph; page 46, 3rd paragraph; page 75, 2nd paragraph	1-12															
A	(LAGOUGE, M et al.) Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1[alpha]. Cell. 15 December 2006. Epub 16 November 2006, Vol. 126, No. 6; pages 1109-1122; page 1110, 1st column, 1st paragraph, and 2nd column, 1st paragraph; DOI: 10.1016/j.cell.2206.11.013	1-12															
P, X	US 2016/0354331 A1 (ASTUDILLO DE LA VEGA, H) 8 December 2016; entire document	1-12															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search  07 December 2017 (07.12.2017)		Date of mailing of the international search report  <b>08 JAN 2018</b>															
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer  Shane Thomas <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>															

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 K 31/197 (2006.01)	A 6 1 K 31/197	
A 6 1 K 31/05 (2006.01)	A 6 1 K 31/05	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
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 P 43/00	1 0 5
	A 6 1 P 43/00	1 0 7

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,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

(特許序注：以下のものは登録商標)

1 . TRITON

F ターム(参考)	4C076	AA22	AA36	AA53	BB01	CC11	CC21	CC26			
	4C206	AA01	AA02	CA20	FA53	HA32	JA58	MA02	MA03	MA04	MA43
		MA55	MA57	MA72	NA05	ZA42	ZA45	ZA70	ZB21	ZB22	ZC21
		ZC31	ZC33	ZC35	ZC52	ZC75					

(54)【発明の名称】糖尿病および他の変性慢性複合疾患によって生じる慢性損傷促進性細胞老化を元の状態に戻すおよび予防するための、代謝バイオエネルギー調節因子とニュートラエピジェネティック調節因子の組合せ、従来技術とナノテクノロジーを組み合わせた栄養補助化合物