

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6509844号  
(P6509844)

(45) 発行日 令和1年5月8日 (2019.5.8)

(24) 登録日 平成31年4月12日 (2019.4.12)

(51) Int. Cl.

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>31/706</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>31/706</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>17/00</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>8/60</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>8/60</b>
<b>A 6 1 Q</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 Q</b>	<b>19/00</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/16</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>17/16</b>

請求項の数 22 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2016-526337 (P2016-526337)  
 (86) (22) 出願日 平成26年10月30日 (2014.10.30)  
 (65) 公表番号 特表2016-538271 (P2016-538271A)  
 (43) 公表日 平成28年12月8日 (2016.12.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/063260  
 (87) 国際公開番号 W02015/066382  
 (87) 国際公開日 平成27年5月7日 (2015.5.7)  
 審査請求日 平成29年10月27日 (2017.10.27)  
 (31) 優先権主張番号 61/897, 713  
 (32) 優先日 平成25年10月30日 (2013.10.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514064763  
 クロマデックス, インコーポレイテッド  
 ChromaDex, Inc.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 618, アーヴァイン, ミューアランズ  
 10005, スイート ジー  
 (74) 代理人 110001302  
 特許業務法人北青山インターナショナル  
 (72) 発明者 デレンーリス, アン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 618, アーヴァイン, ミューアランズブ  
 ールヴァード 10005, スイート ジ  
 ー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 皮膚症状の治療において局所使用されるニコチンアミドリボシド組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体の皮膚における UV 介在性の DNA 損傷の治療または予防用組成物において、前記組成物が化合物ニコチンアミドリボシドまたはその塩を含み、前記組成物が、前記治療を必要とする前記個体に治療に有効な量、局所的に投与されるものであることを特徴とする、組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物において、前記個体がヒトであることを特徴とする、組成物。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の組成物において、前記組成物が、薬学的に許容できる担体をさらに含むことを特徴とする、組成物。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の組成物において、前記ニコチンアミドリボシド化合物が、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、ギ酸塩、酢酸塩、アスコルビン酸塩、安息香酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、カルバミン酸塩、ギ酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、メチル臭化物、メチル硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、ニリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、およびトリフルオロ酢酸塩からなる群から選択される塩であることを特徴とする、組成物。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の組成物において、前記ニコチンアミドリボシド化合物が塩化物塩であることを特徴とする、組成物。

10

20

## 【請求項 6】

請求項 3 に記載の組成物において、総薬用量としての前記ニコチンアミドリボシド化合物またはその塩の治療に有効な量が、前記組成物の総重量を基準にして約 0.01 重量% ~ 約 50 重量% の範囲であることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 7】

請求項 3 に記載の組成物において、総薬用量としての前記ニコチンアミドリボシド化合物またはその塩の治療に有効な量が、前記組成物の総重量を基準にして約 0.1 重量% ~ 約 10 重量% の範囲であることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の組成物において、シクロブタン - ピリミジン二量体 (CPD) または 6 - 4 光産物 (64pps) の形成によって示される DNA 損傷が、約 10% 超減少することを特徴とする、組成物。

10

## 【請求項 9】

個体の皮膚の酸化損傷の治療または予防用組成物において、前記組成物が化合物ニコチンアミドリボシドまたはその塩を含み、前記組成物が、前記治療を必要とする前記個体に治療に有効な量、局所的に投与されるものであることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の組成物において、前記個体がヒトであることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載の組成物において、前記組成物が、薬学的に許容できる担体をさらに含むことを特徴とする、組成物。

20

## 【請求項 12】

請求項 11 に記載の組成物において、前記ニコチンアミドリボシド化合物が、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、ギ酸塩、酢酸塩、アスコルビン酸塩、安息香酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、カルバミン酸塩、ギ酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、メチル臭化物、メチル硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、ニリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、およびトリフルオロ酢酸塩からなる群から選択される塩であることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 13】

請求項 12 に記載の組成物において、前記ニコチンアミドリボシド化合物が塩化物塩であることを特徴とする、組成物。

30

## 【請求項 14】

請求項 11 に記載の組成物において、総薬用量としての前記ニコチンアミドリボシド化合物またはその塩の治療に有効な量が、前記組成物の総重量を基準にして約 0.01 重量% ~ 約 50 重量% の範囲であることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 15】

請求項 11 に記載の組成物において、総薬用量としての前記ニコチンアミドリボシド化合物またはその塩の治療に有効な量が、前記組成物の総重量を基準にして約 0.1 重量% ~ 約 10 重量% の範囲であることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 16】

請求項 9 に記載の組成物において、細胞死が約 10% 超減少することを特徴とする、組成物。

40

## 【請求項 17】

個体の皮膚の創傷の治療または修復用組成物において、前記組成物が化合物ニコチンアミドリボシドまたはその塩を含み、前記組成物が、前記治療を必要とする前記個体に治療に有効な量、局所的に投与されるものであり、前記皮膚中の皮膚細胞が高い運動性および/または増殖を有することを特徴とする、組成物。

## 【請求項 18】

請求項 17 に記載の組成物において、前記個体がヒトであることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 19】

50

請求項 18 に記載の組成物において、前記組成物が、薬学的に許容できる担体をさらに含むことを特徴とする、組成物。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の組成物において、前記ニコチンアミドリボシド化合物が、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、ギ酸塩、酢酸塩、アスコルビン酸塩、安息香酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、カルバミン酸塩、ギ酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、メチル臭化物、メチル硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、二リン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、およびトリフルオロ酢酸塩からなる群から選択される塩であることを特徴とする、組成物。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の組成物において、前記ニコチンアミドリボシド化合物が塩化物塩であることを特徴とする、組成物。

10

【請求項 22】

請求項 19 に記載の組成物において、総薬用量としての前記ニコチンアミドリボシド化合物またはその塩の治療に有効な量が、前記組成物の総重量を基準にして約 0.01 重量% ~ 約 50 重量% の範囲であることを特徴とする、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

ニコチンアミドリボシド (NR) を含有する組成物は、皮膚および皮膚症状のケアまたは治療に使用することができる。幾つかの実施形態において、本発明は、ニコチンアミドリボシドを含有する医薬組成物および化粧品組成物に関する。さらなる実施形態において、本発明は、細胞および組織の生存と、全体的な細胞および組織の健康状態とを向上させるためにニコチンアミドリボシドを使用して細胞および組織中のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD+) の細胞内の量の増加を促進する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

NAD+ を利用する酵素は、DNA 修復過程に役立つ。具体的にはポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP)、特に PARP-1 は、DNA 鎖の切断によって活性化され、DNA 修復に影響を及ぼす。PARP は、アデノシン二リン酸リボース (ADPR) 供与体として NAD+ を消費し、ヒストンなどの核内タンパク質および PARP 自体の上でポリ (ADP-リボース) を合成する。PARP の活動は DNA 修復を促進するが、PARP の過活性化は細胞 NAD+ の著しい枯渇を引き起こして、細胞の壊死につながる可能性がある。遺伝毒性に対する NAD+ 代謝のその明らかな感受性は薬理的調査につながり、細胞の生存を向上させる手段としての PARP の阻害となった。非常に多くの報告は、PARP の阻害が、結果として起こる細胞壊死の減少と共に、遺伝毒性の影響を受けやすい細胞中の NAD+ 濃度を増加させることを示している。それにもかかわらず、毒性による細胞死は依然として起こり、その原因は、恐らく細胞が遺伝毒性によって活性化されるアポトーシス経路を完結させることができるためである。したがって PARP を阻害したとしても、かなりの細胞死は依然として DNA / 巨大分子の損傷の結果である。この結果は、遺伝毒性における NAD+ 代謝の改善が細胞の生存の向上に部分的には有効であり得るが、アポトーシス感受性を調節する他のプレーヤーもまた遺伝毒性に対する細胞応答において重要な役割を果たす場合があることを示唆する。

30

40

【0003】

組織における化学的および放射線の毒性の影響を決定する生理的および生化学的メカニズムは完璧であり、また証拠は、NAD+ 代謝が細胞のストレス応答の経路において重要なプレーヤーであることを示している。例えば、ニコチンアミド / ニコチン酸モノヌクレオチドの過剰発現による NAD+ 代謝の上方制御が、ニューロン軸索の変性を防護することが示されており、また薬理的に使用されるニコチンアミドが、胎児性アルコール症候群および胎児性局所虚血のモデルにおいてニューロンの防護をもたらすことが最近示された。このような保護効果は、遺伝毒性ストレスの間の枯渇の影響を受けやすい利用可能な

50

NAD<sup>+</sup> プールを増大させる上方制御NAD<sup>+</sup> 生合成に起因する可能性がある。NAD<sup>+</sup> のこの枯渇はPARP酵素が介在し、このPARP酵素はDNA損傷によって活性化され、細胞NAD<sup>+</sup> を枯渇させて壊死につながる可能性がある。上方制御NAD<sup>+</sup> 生合成に呼応して作用する可能性のある高い細胞保護の別のメカニズムは、サーチュイン酵素によって調節される細胞保護転写プログラムの活性化である。

#### 【0004】

NAD<sup>+</sup> およびサーチュインとつながりのある細胞および組織保護の例には、SIRT1が創傷および遺伝毒性に関連のある神経保護にとって必要であるという発見が挙げられる。SIRT1はまた、NFκBシグナル伝達の低減によりアミロイド-ベータのミクログリア依存的な毒性を減少させる可能性もある。SIRT1および高いNAD<sup>+</sup> 濃度は、アルツハイマー病のモデルにおいて神経保護を与える。サーチュインは、ストレス応答経路を上方制御するタンパク質脱アセチル化酵素活性およびADP-リボース転写酵素活性を有するNAD<sup>+</sup> 依存的な酵素である。証拠は、SIRT1が、カロリー制限によって上方制御され、またヒトにおいてはp53およびKu70機能の下方制御によりアポトーシスに対する保護を有する細胞をもたらす可能性がある。これに加えてSIRT1は、MnSODなどの活性酸素種(ROS)の解毒に関与するタンパク質のFOXO依存的な転写を上方制御する。サーチュインSIRT6は、DNA修復経路に関与すること、およびゲノムの安定性を維持するのに役立つことが示されている。ニコチンアミドリボシドを含めたニコチノイルリボシドに関しては、参照により本明細書に援用される米国特許第8,106,184号明細書などで様々な用途が提案されている。

#### 【0005】

##### UV介在性のDNA損傷

紫外(UV)光は、老化から癌へ及ぶ非常に多くの皮膚の病気の発症において欠くことのできない役割を果たす。数十年に及ぶ少なからぬ証拠は、UV線が、複数の独立した細胞応答を引き起こすことを最終的に実証した。UV線は皮膚を貫通し、そこでタンパク質、脂質、およびDNAによって吸収されて、細胞構造および細胞の機能の進行性劣化を引き起こす一連の事象を生じさせることが知られている(Valacchi, et al., "Cutaneous responses to environmental stressors", Ann. N.Y. Acad. Sci. (2012) 1271:75-81)。DNAは生命の構成単位であり、その安定性はすべての生きている細胞の適正な機能にとって最も重要である。UV線は、変異原性かつ細胞毒性のDNA損傷、中でも最も注目すべきはシクロブタン-ピリミジン二量体(CPD)および6-4光産物(64pps)を生じさせることによって広範囲の細胞障害を引き起こす可能性のある最も強力な(また一般的な)環境因子の1つである(Narayanan, et al., "Ultraviolet radiation and skin cancer", Int. J. Dermatol. (2010) 49:978-86)。UV介在性のDNA損傷が多くの増殖性細胞障害における早期の事象であることに注目することが重要である。UV誘導性DNA損傷の2つの主要な種類は、CPDおよび64pp(ならびにそれらのデュア異性体)である(Sinha, R. P. および Hader, D. P., "UV-induced DNA damage and repair: a review", Photochem. Photobiol. Sci. (2002) 1:225-36、および Rastogi, et al., "Molecular mechanism of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair", J. Nucleic Acids (2010) 2010:592980)。修復されない場合、これらの多くのDNA損傷はDNAの複製を妨げ、続いてDNAの突然変異を引き起こす可能性がある。したがってこれらの損傷は変異原性である(場合によっては増殖性疾患につながる)可能性があり、かつ/または細胞毒性である(細胞死を引き起こす)可能性がある。64ppは、CPDの頻度の約3分の1で起こるが、それらはより変異原性である(Sinha & Hader, 2002)。一実施形態では、これらのUV介在性のDNA付加物の防止は、老化から癌へ及ぶ数種類の増殖性疾

患の発病を防ぐことに優先する。

【0006】

UV介在性のバリア機能の喪失

生命体と環境との間に水を通さないバリアを維持することが、皮膚の不可欠な機能である。このバリア機能は、その生命体の死につながる可能性のある脱水を防止するのに役立つ(Jiang, S. J., et al., "Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient", Exp. Dermatol. (2007) 16: 985 - 992)。UV光が線量依存的に表皮の皮膚バリア機能を乱すことが実証されている(Haratake, A, et al., "UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response", J. Invest. Dermatol. (1997) 108: 769 - 775、および先行引用文献)。皮膚バリア機能障害は、皮膚の水分量の尺度である経表皮水分蒸散量(Trans epidermal Water Loss)(TEWL)を測定することによって直接に評価することができる(Oba, C., et al., "Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice", Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. (2013) 29: 204 - 11、および先行引用文献)。

10

20

【0007】

したがって、幾つかのヒトの皮膚疾患に対する化学予防薬は、健康なヒトの皮膚の維持を支援する上で直接のUV介在性のバリア機能の喪失、DNA損傷、または酸化損傷を抑制または防止するのに有効であると仮定される。

【0008】

健康なヒトの皮膚の維持における局所スキンケア組成物にニコチンアミドまたはその塩を使用する方法を見出すことができれば、これは当技術分野に対する有用な貢献であろう。さらに、健康なヒトの皮膚の維持における化粧品組成物または薬用化粧品組成物にニコチンアミドまたはその塩を使用する方法を見出すことができれば、これもまた当技術分野に対する有用な貢献であろう。

30

【発明の概要】

【0009】

スキンケア組成物は、ニコチンアミドリボシドまたはその塩を、任意選択でスチルベノイド(例えばプテロスチルベン)、クルクミン、ペプチド、レチノール、サリチル酸、過酸化ベンゾイル、ビタミンC(L-アスコルビン酸)、アントシアニン、またはこれらの組合せから選択される化合物と組み合わせて含む。

【0010】

一実施形態では、ニコチンアミドリボシドは、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、ギ酸塩、酢酸塩、アスコルビン酸塩、安息香酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、カルバミン酸塩、ギ酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、メチル臭化物、メチル硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、二リン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、またはトリフルオロ酢酸塩から選択される塩の形態である。

40

【0011】

個体における老化または皮膚皺の徴候または症候の治療方法が提供される。この方法は、そのような治療を必要とする個体に化合物ニコチンアミドリボシドまたはその塩の有効量を局所的に投与することを含む。

【0012】

個体の皮膚におけるUV介在性のDNA損傷を治療または予防するための化学保護方法

50

が提供される。この方法は、そのような治療を必要とする個体に化合物ニコチンアミドリボシドまたはその塩の治療に有効な量を局所的に投与することを含む。

【0013】

個体の皮膚の酸化損傷を治療または予防するための細胞保護方法が提供される。この方法は、そのような治療を必要とする個体に化合物ニコチンアミドリボシドまたはその塩の治療に有効な量を局所的に投与することを含む。

【0014】

個体の皮膚の創傷を治療または修復するための方法が提供される。この方法は、そのような治療を必要とする個体に化合物ニコチンアミドリボシドまたはその塩の治療に有効な量を局所的に投与することを含む。この場合、その皮膚中の皮膚細胞は高い運動性および / または増殖を有する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、成長停止条件（1%ウシ胎児血清（FBS））下で1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（対照、+0.2mM NR、+1mM NR、および+5mM NR）と共にインキュベートしたヒトの類表皮腫（epidermoid）A431細胞の酸化損傷保護アッセイを示す。生細胞は反射蛍光単位（RFU）で示される。

【図2】図2は、通常の成長条件（10%FBS）下で1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（対照、+0.04mM NR、+0.2mM NR、および+1mM NR）と共にインキュベートした図1の実験を示す。

【図3】図3は、細胞用培地で前処理し、次いですべての試料をUV-C線に10J/m<sup>2</sup>で曝露したヒトの類表皮腫A431細胞（対照、+1mM NR、および+5mM NR）のUV損傷アッセイを示す。UV誘導性のDNA損傷は、シクロブタン-ピリミジン二量体（CPD）の量に反映される。

【図4A】図4Aは、1%FBSと共にインキュベート（0時間）したマウスのNIH 3T3繊維芽細胞の第一の掻創の回復アッセイを示す倍率40Xの顕微鏡写真である。

【図4B】図4Bは、1%FBSと共にインキュベート（24時間）した図4Aの掻創の回復アッセイを示す倍率40Xの顕微鏡写真である。これは細胞の遊走による裂孔閉鎖（gap closure）を実証する。

【図5A】図5Aは、5%FBS（対照）と共にインキュベート（0時間）したマウスのNIH 3T3繊維芽細胞の最初の掻創の回復アッセイを示す倍率40Xの顕微鏡写真である。

【図5B】図5Bは、5%FBS（対照）と共にインキュベート（24時間）した図5Aの掻創の回復アッセイを示す倍率40Xの顕微鏡写真である。これは細胞の遊走による裂孔閉鎖を実証する。

【図6A】図6Aは、1%FBS+1mM NRと共にインキュベート（0時間）したマウスのNIH 3T3繊維芽細胞の第二の掻創の回復アッセイを示す倍率40Xの顕微鏡写真である。

【図6B】図6Bは、1%FBS+1mM NRと共にインキュベート（24時間）した図6Aの掻創の回復アッセイを示す倍率40Xの顕微鏡写真である。これは細胞の遊走による裂孔閉鎖を実証する。

【発明を実施するための形態】

【0016】

幾つかの実施形態ではニコチンアミドリボシド（NR）またはその塩は、NAD<sup>+</sup>活性を増加させることができる。またNAD<sup>+</sup>はSIRT1の基質として作用することができるため、NAD<sup>+</sup>活性を増加させることによりサーチュイン活性を増加させることができると考えられる。このような物質には、NAD<sup>+</sup>またはNADH、NAD<sup>+</sup>の前駆体、NAD<sup>+</sup>再生経路における中間体、あるいはNAD<sup>+</sup>を生じさせる基質、例えばニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリル転移酵素（NMNAT）またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリル転移酵素をコードする核酸などを挙げることができる。ニコチンアミ

10

20

30

40

50

ドモノヌクレオチドアデニリル転移酵素は、NMNAT1タンパク質であることができる。他の有用なNAD<sup>+</sup>前駆体には、ニコチンアミドおよびニコチン酸が挙げられる。参照により本明細書に援用されるMilbrandtらの米国特許第7,776,326号明細書は、NAD生成経路について考察している。

【0017】

一実施形態では、細胞をニコチンアミドリボシドまたはその塩と接触させることによって細胞の寿命を延ばす、細胞の増殖能力を伸ばす、細胞の老化を遅らせる、細胞の生存を促進する、細胞における細胞性老化を遅らせる、カロリー制限の効果に似せる、ストレスに対する細胞の抵抗を増加させる、または細胞のアポトーシスを防止する方法が提供される。典型的な実施形態ではその方法は、皮膚細胞をニコチンアミドリボシドまたはその塩と接触させることを含む。

10

【0018】

別の実施形態では長時間保存することを意図している細胞をニコチンアミドリボシドで処理することができる。その細胞は、懸濁状態（例えば血液細胞、血清、生物学的増殖培地など）であることも、また組織または器官の状態であることもできる。例えば、輸血の目的で個体から収集された血液は、ニコチンアミドリボシドまたはその塩で処理して血液細胞をより長時間保存することができる。これに加えて科学捜査の目的で使用される血液もまた、ニコチンアミドリボシドまたはその塩を使用して保存することができる。

【0019】

細胞の寿命を延ばす、またはアポトーシスから守るためにニコチンアミドリボシドまたはその塩で保護または処理することができる特定の細胞には、ケラチン生成細胞、メラミン細胞、真皮細胞、表皮細胞、樹状突起（ランゲルハンス）細胞、基底細胞、扁平上皮細胞、幹細胞、表皮幹細胞、毛包などの皮膚細胞が挙げられる。

20

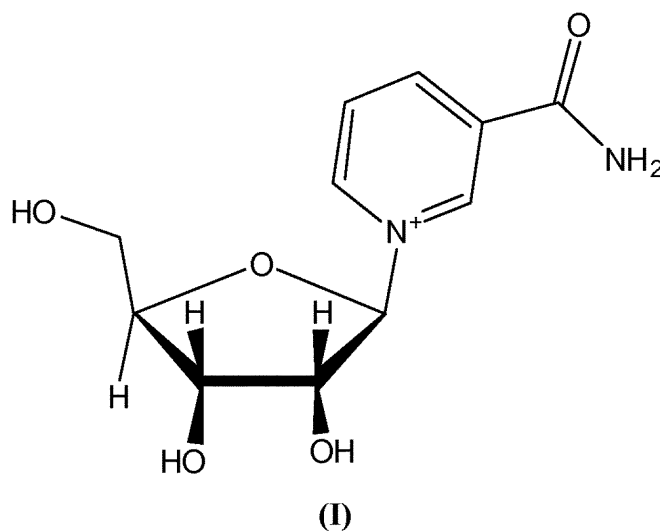
【0020】

細胞の寿命を延ばす、またはアポトーシスから守るために処理することができる他の細胞には、生産、消費、または食料用の細胞、例えば非ヒト哺乳動物由来の細胞（食肉など）または植物細胞（野菜など）が挙げられる。

【0021】

ニコチンアミドリボシド（NR）は、式（I）

30



40

を有するピリジニウム化合物である。

【0022】

式（I）の化合物には、これらに限定されないが、例えばハロゲン化物（塩化物、フッ化物、ヨウ化物などを含めた）、ギ酸塩、酢酸塩、アスコルビン酸塩、安息香酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、カルバミン酸塩、ギ酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、メチル臭化物、メチル硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、二リン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、トリフルオロ酢酸塩、

50

ベシル酸塩、トシル酸塩、トリフリン酸塩、メシル酸塩などの塩の対イオン (salt counterion) を挙げることができる。Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA) の最新版、および S. Berge らによる論文、J. Pharmaceut. Sci. (1977) 66: 1 - 19 (およびその中で引用されている参考文献)、および Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, J. Swarbrick, Ed., Vol. 13, pp. 453 - 499 (New York: Marcel Dekker, Inc., 1996) 中の L. D. Bighley らによる章、「Salt Forms of Drugs and Absorption」(およびその中に引用されている参考文献) を参照されたい。これらはすべて参照により本明細書に援用される。

10

#### 【0023】

塩化物塩としてのニコチンアミドリボシド (NR) は、ChromaDex Inc. (Irvine, California) から NIAGEN (商標) として市販されている。

#### 【0024】

単独または NR と組み合わせる局所塗布用の他の有用な化合物には、ニコチン酸リボシド (NAR)、1, 4 - ジヒドロ還元型 NR または NAR (すなわち、還元型ニコチンアミドリボシド (NRH) または還元型ニコチン酸リボシド (NARH)) などが挙げられる。

20

#### 【0025】

ニコチンアミドリボシドまたはその塩はまた、哺乳動物、植物、昆虫、または微生物の発生および成長段階の間に、例えばその発生および / または成長過程を変え、遅らせ、または加速するために施用することができる。

#### 【0026】

有効量の NR を使用することによって紫外 (UV) 光により引き起こされる皮膚中の DNA 損傷を抑制または防止する、あるいは酸化損傷を抑制または防止するための化学保護方法が発見された。後続の皮膚中の UV 介在性の DNA 損傷または酸化損傷を予防するために個体に投与するのに適したプテロスチルベンを含有する医薬組成物および機能性食品組成物について述べる。

30

#### 【0027】

別の実施形態ではニコチンアミドリボシドまたはその塩を使用して、例えば固形組織移植片、器官移植片、細胞懸濁液、幹細胞、骨髓細胞などを含めた移植または細胞療法に有用な細胞を処理することができる。これら細胞または組織は、自家移植片、同種異系移植片、同種移植片、または異種移植片であることができる。これら細胞または組織は、被験者への投与 / 埋込みの前に、投与 / 埋込みと同時に、かつ / または投与 / 埋込み後にニコチンアミドリボシドまたはその塩で処理することができる。これら細胞または組織は、ドナーの個体から細胞を取り出す前に、ドナーの個体から細胞または組織を取り出した後に生体外で、または受容個体への埋め込みの後に処理することができる。例えば、ドナーまたは受容個体は、ニコチンアミドリボシドまたはその塩で全身的に処理されてもよく、またそれらの細胞 / 組織のサブセットがニコチンアミドリボシドまたはその塩で局所的に処理されてもよい。幾つかの実施形態では細胞または組織 (またはドナー / 受容個体) を、例えば免疫抑制剤、サイトカイン、血管新生促進因子などの移植片の生存を引き延ばすのに役立つ 1 種類または複数種類の追加の治療剤で処理することができる。

40

#### 【0028】

さらに別の実施形態では細胞を、生体内の NAD<sup>+</sup> の量を増加させるニコチンアミドリボシドまたはその塩で処理して、例えばそれらの寿命を増す、またはアポトーシスを防ぐことができる。例えば主要な実施形態では、細胞内 NAD<sup>+</sup> の量を増加させるニコチンアミドリボシドまたはその塩で皮膚または上皮細胞を処理することによって老化 (例えば皺の発生、弾力性の喪失) から皮膚を守ることができる。典型的な実施形態では皮膚を、細

50



胞内NAD<sup>+</sup>の量を増加させるニコチンアミドリボシドまたはその塩を含む医薬組成物または化粧品組成物と接触させる。本明細書で述べる方法に従って処理することができる皮膚の悩みまたは皮膚の状態の実例には、炎症、日焼けによる損傷、または自然老化に係る、またはそれによって引き起こされる障害または疾患が挙げられる。例えばこれら組成物は、接触皮膚炎（刺激性接触皮膚炎およびアレルギー性接触皮膚炎を含めた）、アトピー性皮膚炎（アレルギー性湿疹としても知られる）、光線性角化症、角質化障害（湿疹を含めた）、表皮水泡疾患（天疱瘡を含めた）、剥落性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、紅斑（多形性紅斑および結節性紅斑を含めた）、日光または他の光源によって引き起こされる損傷、円盤状紅斑性狼瘡、皮膚筋炎、乾癬、皮膚癌、および自然老化の影響の予防または治療に利用できる。別の実施形態では、細胞内NAD<sup>+</sup>の量を増加させるニコチンアミドリボシドまたはその塩を、例えば第1度、第2度、または第3度熱傷、および/または熱傷、化学火傷、または電気熱傷を含めた創傷および/または熱傷の治療のために使用して治癒を促進することができる。それらの製剤は、所望の結果をもたらすのに有効な投与計画に関連して本明細書中でさらに述べるように、軟膏、ローション、クリーム、マイクロエマルジョン、ジェル、溶液などとして皮膚または粘膜に局所投与することができる。

10

#### 【0029】

細胞内NAD<sup>+</sup>の量を増加させる1種類または複数種類のニコチンアミドリボシドまたはそれらの塩を含む局所製剤はまた、予防組成物、例えば化学予防組成物として使用することができる。化学予防法で使用する場合、特定の個体では敏感な皮膚は目に見える状態になる前に処理される。

20

#### 【0030】

局所製剤は、他のNAD<sup>+</sup>前駆体、または生体内でNAD<sup>+</sup>を増加させることができる化合物、例えばこれらに限定されないがニコチンアミドまたはニコチン酸を含むことができる。

#### 【0031】

局所組成物中のNRまたはその塩の有用な範囲には、組成物の総重量を基準にして約0.001重量%～約50重量%が挙げられる。NRの別の好適な範囲は、組成物の総重量を基準にして約0.1重量%～約10重量%である。NRの別の好適な範囲は、組成物の総重量を基準にして約0.5重量%～約5重量%である。

#### 【0032】

30

NRの経口製剤も考えられる。NRの有用な薬用量は、これらに限定されないがヒトの個体では約1mg～約5000mgの範囲であることができる。別の好適な用量範囲は、約5mg～約500mgである。別の好適な用量範囲は、約50mg～約500mgである。NRは、医薬または機能性食品で容認できる担体をそれぞれ含む医薬組成物または機能性食品組成物として経口用または局所用に調合することができる。NRを含有する医薬組成物の一実施形態ではNRの適切な量は、組成物の総重量を基準にして約0.01重量%～約50重量%の範囲であることができる。NRを含有する医薬組成物の別の実施形態ではNRの適切な量は、組成物の総重量を基準にして約0.1重量%～約10重量%の範囲であることができる。

#### 【0033】

40

ヒトの皮膚は、下の真皮層（真皮）の上に載っている一番上の表皮層（表皮）を含む。表皮は、主としてケラチン生成細胞から構成され、それは底部で発生し、頂部へ移動し、絶えず置き換えられる。古い死細胞は脱落するに従ってそれらは置き換えられ、したがってその層は絶えず自己更新している。表皮はまた、一般にはこの層の底部近傍に位置するメラニン細胞を含有する。これは、皮膚の色に寄与し、かつまたUV保護を与える色素メラニンを生成する。表皮はまた、樹状突起（ランゲルハンス）細胞を含有し、これは免疫系と、層の底部に見出される基底細胞とに関与する。表皮はまた、扁平上皮細胞を含む。表皮層および真皮層はまた、幹細胞および毛包を含有する。哺乳動物ではメラニン細胞はまた、他の組織の中でもとりわけ、脳、眼、耳、および心臓に寄与する。

#### 【0034】

50

上記皮膚細胞は、UV光誘導性の損傷、DNA損傷、および発癌を起こしやすい。また、通常の老化は、皺の形成、染み、皮膚の弾力性の喪失、および老化の他の徴候（これには表面の皺、きめの粗い深い皺、拡大した毛穴、光傷害、うろこ状、薄片状、乾燥、皮膚のたるみ、目の周りの皮膚の腫脹、あごの周りの皮膚の腫脹、皮膚のかたさの喪失、皮膚の緊張の喪失、バリア機能の喪失、変形からの皮膚のはね返りの喪失、変色、そばかす（*blotch*ing）、黄ばみ、色素過剰、角化症、過角化症、弾性線維症またはコラーゲン分解、およびセルライト、またはこれらの組合せが挙げられる）の一因となる。

【0035】

したがって或る実施形態ではNRおよびその塩を下記のように使用して、表面の皺、きめの粗い深い皺、拡大した毛穴、染み、光傷害、うろこ状、薄片状、乾燥、皮膚のたるみ、目の周りの皮膚の腫脹、あごの周りの皮膚の腫脹、皮膚の弾力性の喪失、皮膚のかたさの喪失、皮膚の緊張の喪失、バリア機能の喪失、変形からの皮膚のはね返りの喪失、変色、そばかす、黄ばみ、色素過剰、角化症、過角化症、弾性線維症またはコラーゲン分解、およびセルライト、またはこれらの組合せを含めた老化の徴候を改善することができる。

10

【0036】

NRまたはその塩は、1種類または複数種類のスチルベノイドと組み合わせて使用することができる。スチルベノイド化合物の実例は、プテロスチルベン（3,5-ジメトキシ-4'-ヒドロキシ-トランススチルベン）であり、血中で約105分の半減期 $t_{1/2}$ を有する経口による生物学的に利用可能な化合物である。プテロスチルベンは、ニコチンアミドリボシドまたはその塩と組み合わせて皮膚の状態を治療するための有用な化合物である。

20

【0037】

任意選択でNRまたはその塩は、プテロスチルベンと組み合わせ、さらにクルクミンと組み合わせて使用することもできる。

【0038】

任意選択でNRまたはその塩は、ペプチド、レチノール、サリチル酸、過酸化ベンゾイル、ビタミンC（L-アスコルビン酸）、アントシアニン、またはこれらの組合せを含めた1種類または複数種類の化合物と組み合わせて使用することもできる。1つの有用なアントシアニンは、シアニジン-3-グルコシド（「C3G」）である。

【0039】

30

本発明の化粧品組成物または薬用化粧品組成物は、機能性食品で容認できる担体と組み合わせて投与することができる。このような製剤中の有効成分は、1重量%~99重量%、あるいは0.1重量%~99.9重量%を構成することができる。「機能性食品で容認できる担体」とは、その製剤の他の成分と共存でき、かつ利用者に有害でない任意の担体、増量剤、または医薬品添加剤を意味する。有用な医薬品添加剤には、微晶質セルロース、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、任意の容認できる糖（例えばマンニトール、キシリトール）が挙げられ、また化粧用途の場合には油性が好ましい。

【0040】

本発明の局所医薬組成物は、薬学的に許容できる担体と組み合わせて投与することができる。このような製剤中の有効成分は、1重量%~99重量%、またはあるいは0.1重量%~99.9重量%を構成することができる。「薬学的に許容できる担体」とは、その製剤の他の成分と共存でき、かつ利用者に有害でない任意の担体、増量剤、または医薬品添加剤を意味する。

40

【0041】

幾つかの実施形態に従って、本明細書中で開示する化粧品組成物および/または局所医薬組成物は、軟膏、クリーム、ローション、ジェル、または参照により本明細書に援用されるL.V.Allen, Jr., et al., *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 9th Ed., pp. 272-293 (Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 20

50

11) 中に記載されている他の経皮送達システムの形態で提供することができる。

【0042】

本明細書中で使用される軟膏とは、その中に1種類または複数種類の有効成分が混合または融解されている（すなわちその製剤の他の成分と一緒に溶解し、常に攪拌しながら冷却して凝結調合物を形成する）軟膏基剤を含む半固形調合物を指す。軟膏基剤は、油性または炭化水素基剤（例えば、石油または石油/ワックスの組合せ）、あるいは油中水型エマルションの形成を生じさせる水溶液の取込みを可能にする吸収基剤（例えば親水性ペトロラタム）か、追加の量の水溶液の取込みを可能にする油中水型エマルションである吸収基剤（例えばラノリン）、あるいは水または水溶液で希釈することができる水中油型エマルションである水除去性基剤（例えば親水性軟膏、USP）、あるいは油性成分を含有しない水溶性基剤（例えば、600未満の平均分子量を有するポリエチレングリコール（PEG）を1,000を超える平均分子量を有するPEGと組み合わせたPEG製剤）などの形態であることができる。

10

【0043】

本明細書中で使用されるクリームとは、油中水型エマルションまたは水中油型エマルションのいずれかの中に、あるいは別の種類の水洗性基剤中に溶解または分散させた1種類または複数種類の活性薬剤または医薬品を含有する半固形調合物を指す。一般にクリームは、それらが皮膚などの表面に塗布される/広げられる容易さによって、またそれらが処理表面から除去される容易さによって軟膏と区別される。

20

【0044】

本明細書中で使用されるローションとは、水性媒体に溶かした固形物質の懸濁液を指す。一般にローションは、べたべたしない特徴と、軟膏、クリーム、およびジェルよりも皮膚の広い面積を覆うような高い展延性とを有する。

【0045】

本明細書中で使用されるジェルとは、水性液状媒体に溶かした小分子および/または高分子の分散物を含み、ゲル化剤の添加によってゼリー状にされた半固形系を指す。好適なゲル化剤には、これらに限定されないが合成巨大分子（例えばカルボマーポリマー）、セルロース誘導体（例えばカルボキシメチルセルロースおよび/またはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、および天然ゴム（例えばトラガカントゴム、カラゲーニンなど）が挙げられる。ジェル調合物は、活性または薬用成分が液状媒体全体にわたって均質に分散し、目に見える境界線のない単相ゲル、あるいは凝集剤もしくは活性または薬用成分の小さな明確に識別できる粒子が液状媒体中に分散している二相ゲルの形態であることができる。

30

【0046】

経皮調合物は、浸透促進剤と組み合わせた軟膏、クリーム、またはジェルから形成することができ、活性または薬用成分を全身的に送達するように設計される。浸透促進剤には、とりわけ、例えばジメチルスルホキシド、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、PEG、尿素、ジメチルアセトアミド、ラウリル硫酸ナトリウム、ポロキサマー、スパン類、トゥイーン類、および/またはテルペン類が挙げられる。

【0047】

化粧品組成物および/または局所医薬組成物として使用される他の好適な半固形形態には、ペースト（それらを軟膏よりもかたくする、より高比率の固形物質を含有する調合物）およびグリセロゼラチン（ゼラチン、グリセリン、水、および活性または薬用成分を含有する塑性の塊）が挙げられる。

40

【0048】

他の実施形態では局所組成物および/または化粧品組成物は、参照により本明細書に援用される、Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms, B. Nickerson, Ed. (New York: Springer, 2011)中に記載されている剤形に従って調製することができる。

【0049】

50

プテロスチルベンは、例えばヒトの患者では約10mg～約250mgの1日当たり局所塗布量で施用される。別の好適な局所塗布量の範囲は、1日当たり約50mg～約150mgである。別の好適な局所塗布量の範囲は、1日当たり約50mg～約100mgである。特に好適な用量は、1日当たり約100mgの投与である。

#### 【0050】

##### 投与経路

これら化合物は、これらに限定されないが経口、舌下、口内、目、肺、直腸、および非経口投与を含めた任意の経路によって、あるいは口腔または鼻腔スプレー（例えば、霧状蒸気、液滴、または固体粒子の吸入）として投与することができる。非経口投与には、例えば静脈内、筋内、動脈内、腹膜内、鼻腔内、腔内、膀胱腔内（例えば膀胱へ）、皮内、  
10 経皮、局所、または皮下投与が挙げられる。また本発明の範囲内では、薬物の全身的または局所的放出が後に起こるコントロール製剤（controlled formulation）での患者の体内へのNRの点滴注入も考えられる。例えば、循環させるためにこの薬物を制御放出用のデポ製剤中に局在化させることができる。

#### 【0051】

上記方法は、下記の実施例と関連させてさらに理解することができる。これら実施例のそれぞれにおいてNRまたはその塩を使用することを考えている。

#### 【実施例】

#### 【0052】

##### 実施例1

一実施形態では、NRは、化合物および/または医薬製品の経皮送達のための媒体として使用される。

#### 【0053】

別の実施形態では、NRは、表面の皺、きめの粗い深い皺、拡大した毛穴、染み、光傷害、うろこ状、薄片状、乾燥、皮膚のたるみ、目の周りの皮膚の腫脹、あごの周りの皮膚の腫脹、皮膚の弾力性の喪失、皮膚のかたさの喪失、皮膚の緊張の喪失、バリア機能の喪失、変形からの皮膚のはね返りの喪失、変色、そばかす、黄ばみ、色素過剰、角化症、過角化症、弾性線維症またはコラーゲン分解、およびセルライト、またはこれらの組合せを含めた老化の徴候を改善するために使用される。

#### 【0054】

別の実施形態では、NRは、酒さ、皮膚炎、乾癬、にきび、およびUV誘導性の損傷（例えば日焼けを含めた）、またはこれらの合併症の治療方法において使用される。

#### 【0055】

別の実施形態では、NRは、酸化ストレスの影響を減らして老化の徴候の予防を促進するために使用することができる。

#### 【0056】

##### 実施例2

或る実施形態では、NRは、プテロスチルベンと組み合わせて、任意選択でさらにクルクミンと組み合わせて使用される。

#### 【0057】

この実施例では、NRを含有する合剤は、皮膚の淡色化（skin lightening）、炎症、および日焼けによる初赤を含めた、例えばUV/放射線による老化および損傷の徴候に影響を与える、UV誘導性の炎症のモジュレーターの役割を果たす。

#### 【0058】

さらに、別の実施形態では、NRを含有する合剤は、にきび、酒さ、乾癬、放射線皮膚炎、および創傷の治療に関連した初赤および炎症の治療に使用することができる。

#### 【0059】

別の実施形態では、NRを含有する合剤は、表面の皺、きめの粗い深い皺、拡大した毛穴、染み、光傷害、うろこ状、薄片状、乾燥、皮膚のたるみ、目の周りの皮膚の腫脹、あごの周りの皮膚の腫脹、皮膚の弾力性の喪失、皮膚のかたさの喪失、皮膚の緊張の喪失、  
50

バリア機能の喪失、変形からの皮膚のはね返りの喪失、変色、そばかす、黄ばみ、色素過剰、角化症、過角化症、弾性線維症またはコラーゲン分解、またはこれらの組合せを含めた老化の徴候を改善するために使用される。

【0060】

別の実施形態では、NRを含有する合剤は、皮膚におけるDNAを修復するために、皮膚におけるDNAの修復を改善するために、かつ/またはDNA修復過程の改善を可能するために使用される。

【0061】

実施例3

或る実施形態では、NRは、1種類または複数種類のスチルベノイド（すなわちスチルベン化合物）と組み合わせて使用される。スチルベノイドの実例は、別の用途の場合ではあるが、Josephらの米国特許出願公開第2009/0069444号明細書（参照により本明細書に援用される）中で考察されている。

【0062】

この実施例では、NRを1種類または複数種類のスチルベノイドと共に含有する合剤は、皮膚の淡色化、炎症、にきび、および酒さを含めた、例えばUV/放射線による老化および損傷の徴候に影響を与える、UV誘導性の炎症のモジュレーターの役割を果たす。

【0063】

別の実施形態では、NRを1種類または複数種類のスチルベノイドと共に含有する合剤は、表面の皺、きめの粗い深い皺、拡大した毛穴、染み、光傷害、うろこ状、薄片状、乾燥、皮膚のたるみ、目の周りの皮膚の腫脹、あごの周りの皮膚の腫脹、皮膚の弾力性の喪失、皮膚のかたさの喪失、皮膚の緊張の喪失、バリア機能の喪失、変形からの皮膚のはね返りの喪失、変色、そばかす、黄ばみ、色素過剰、角化症、過角化症、弾性線維症またはコラーゲン分解、またはこれらの組合せを含めた老化の徴候を改善するために使用される。

【0064】

別の実施形態では、NRを1種類または複数種類のスチルベノイドと共に含有する合剤は、皮膚におけるDNAを修復するために、皮膚におけるDNAの修復を改善するために、かつ/またはDNA修復過程の改善を可能するために使用される。

【0065】

実施例4

一実施形態では、NRは、化合物および/または医薬製品もしくは調合物の経皮送達を向上させるために1種類または複数種類のペプチドと組み合わせて使用される。

【0066】

実施例5

一実施形態では、NRは、1種類または複数種類のレチノール、サリチル酸、過酸化ベンゾイル、またはビタミンC（L-アスコルビン酸）と組み合わせて、にきび、酒さ、角化症、乾癬、皮膚炎などから選択される皮膚の状態を治療するために使用される。

【0067】

下記のプロトコルでは、NRは塩化物塩（N I A G E N（商標））として使用される。

【0068】

実施例A

ヒトの皮膚細胞の酸化損傷を防止するNR処理である。

【0069】

A431ヒト類表皮腫細胞（ATCC#CRL1555）を、培養に関する提案（culture recommendations）に基づき、T75フラスコ中において10%FBSおよび1%PenStrepで補ったDMEM培地中で成長させた。培地は、>80%の密集度が達成されるまで2~3日ごとに交換した。細胞が取り除かれるまで細胞を0.25%トリプシンEDTA溶液で2~3分間トリプシン処理した。細胞を、さらなる成長およびアッセイ用のスケールアップのために1:3の比率で継代培養した。細胞

10

20

30

40

50

をトリプシン処理し、5,000個または15,000個の細胞密度まで計数し、96ウェルの平底黒クリアボトムプレート中でウェル当たり100 $\mu$ Lの培地中に接種した。これらのプレートの周囲にある外側のウェルを接種しないまま残し、その代わりに培地で満たしてインキュベーションの間のエッジ効果を減らした。細胞の付着を確かにするためにプレートを、37 / 5%CO<sub>2</sub>の加湿したインキュベーター中で一晩インキュベートした。8時間での培地補充を伴う、または1%FBSを用いた成長に同時性を持たせた条件下のいずれかの37 / 5%CO<sub>2</sub>の加湿したインキュベーター中での20時間のインキュベーションに対して、塩化ニコチンアミドリボシド(塩化NR)を、24時間の前処理の下(過酸化水素なし)で、または1mM過酸化水素と一緒にいずれかで、指定の最終アッセイ濃度で培地に加えた。各濃度を6回の繰返しで試験した。適切な対照、すなわち化合物および過酸化水素なしの細胞(細胞毒性なし;陰性対照)、化合物なしであるが、1mM過酸化水素の存在下の細胞(陽性対照)、アラマブルーのみを含むウェル(ブランク)を各アッセイに入れた状態に保った。

10

#### 【0070】

細胞の生存能力をグラフに描き、データを陰性(未処理対照)細胞については所定のアッセイ条件下での1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の細胞毒性%として、または陽性(1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)対照については計算されたテスト化合物の存在下での細胞保護%として表した。

#### 【0071】

成長に同時性を持たせた試料の場合、陰性対照と陽性対照との比較は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理後に75%の細胞毒性を示し、一方、0.2mM、1mM、および5mMでの塩化NRによる処理は、対照と比較してそれぞれ2%、15%、および38%の細胞保護を示した(図1参照)。

20

#### 【0072】

通常の成長試料の場合、陰性対照と陽性対照との比較は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理後に53%の細胞毒性を示し、一方、0.04mM、0.2mM、および1mMでの塩化NRによる処理は、対照と比較してそれぞれ-1%、8%、および23%の細胞保護を示した(図2参照)。

#### 【0073】

結論として、NRの存在は、成長を停止させた状態においてさえ酸化損傷介在性の細胞死を10~40%減らしたことが分かった。さらに、塩化NRによる処理は、酸化損傷介在性の細胞死を少なくとも約10%以上減らすのに有効であると予想される。

30

#### 【0074】

#### 実施例B

ヒトの皮膚細胞において有害なUV-C介在性の損傷を防止するNR処理である。

#### 【0075】

A431細胞系を、6ウェルプレート中にウェル当たり4 $\times$ 10<sup>5</sup>個の細胞の接種密度で10%FBSを含有する2mLの培地に接種した。細胞は、対照として未処理のまま残すか、または培地中の様々な濃度の塩化NR(5mMおよび1mM)で、5%のCO<sub>2</sub>を含有する37の十分に加湿した雰囲気下で2時間処理した。インキュベーション後、培地をPBSで置き換え、細胞を10J/m<sup>2</sup>のUV-C照射に曝した。プレートを、UV-C照射の直後にそれぞれの対照と共に集めた(陰性対照はUV-Cに曝さない細胞であり、一方、陽性対照はUV-Cに曝した未処理細胞であった)。各条件における細胞由来のDNAを抽出し、NanoDropにより定量化した。次いでDNA試料をELISAプレートに100ng/ウェルの濃度で加え、DNA試料中のシクロブタンピリミジン二量体(CPD)の量を、CPD-DNA測定キット(OxiSelect(商標), Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA)を製造業者のプロトコルどおりに使用して測定した。

40

#### 【0076】

UV誘導性のDNA損傷は、シクロブタンピリミジン二量体(CPD)の量に反映し、1.2 $\mu$ g/mLのDNA対照では、+1mM塩化NR(対照と比べて-32%)、+5

50

mM塩化NR（対照と比べて - 34 %）、また  $2.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  のDNA対照では、+ 1 mM塩化NR（対照と比べて - 41 %）、+ 5 mM塩化NR（対照と比べて - 50 %）である。図3を参照されたい。

#### 【0077】

結論として、NRは、未処理のUV曝露した対照と比べてCPDの量を32%～50%の範囲で減らすのに有効であることが分かった。さらに、塩化NRによる処理は、CPDの量を少なくとも約10%以上低減させるのに有効であると予想される。

#### 【0078】

##### 実施例C1（対照実験）

マウスの皮膚細胞中における細胞の成長および遊走を促進させるNR処理である。

10

#### 【0079】

NIH 3T3 繊維芽細胞をATCCから入手（#CRL - 1658（商標））し、10%ウシ胎児血清（FBS）、4 mM L - グルタミン、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補ったダルベッコ変性イーグル培地（DMEM）中において、5%のCO<sub>2</sub>を含有する37 °Cの十分に加湿した雰囲気下で培養した。実験のために細胞を、トリプシン/EDTAで準集密（subconfluent）の単層から収集した。トリパンブルー色素排除染色（trypan blue dye exclusion staining）を使用した細胞の生存能力は、95%もの高さであった。この検討は、1%FBSを含有するDMEM培地中での4～7回の継代由来の細胞を使用して行った。未処理細胞（1%FBS）を陰性対照として使用した。NIH 3T3 繊維芽細胞における創傷閉鎖に与える塩化ニコチンアミドリボシド（塩化NR）の効果を調べた。

20

#### 【0080】

細胞の生存能力は、cell titer blue（Promega）と、Cytoselect（商標）Wound Healing Assay Kit（Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA）による創傷閉鎖とにより求めた。すべての条件は、3つの独立した対照実験で行われた。すなわち、10%FBSを含有するDMEM中のNIH 3T3 繊維芽細胞（ $2.5 \times 10^5$  個/500  $\mu\text{L}$ ）を、各ウェル中に処理された挿入断片を含有する24ウェルの組織培養プレートに、それらの創傷領域を24時間、同じ向きに整列させた状態で接種して、細胞を接着させ、かつ約70～80%の集密状態に至らせた。24時間後、ウェル由来の挿入断片を取り出し、細胞を阻害することなく培地を慎重に吸引し、続いてウェルを試験培地（1%FBSを含有するDMEM）で洗浄して、死細胞およびデブリを除去した。洗浄の後、細胞を、1%FBSを含有する培地中で様々な濃度の試験化合物でさらに24時間処理した。一方、創傷領域中のNIH 3T3 細胞の遊走を、製造業者の取扱説明書に従って光学顕微鏡下での目視検査によって調べた。創傷の中心部に焦点を合わせた代表的画像を写真に撮った。創傷閉鎖の顕微鏡の結像を、ソフトウェア「Image J」を使用して分析した。創傷閉鎖に与える試験化合物の効果を、「0分」および化合物処理後24時間において1%FBS対照ウェルと比較した。5%FBSを含むDMEMを陽性対照として使用した。生成創傷部分（集密部分）のないウェル中の細胞密度を100%創傷閉鎖として使用した。顕微鏡観察は別として、その確定した創傷部分の総表面積を求めるためにソフトウェア「Image J」を使用してデータを分析した。創傷部分へ遊走した細胞の表面積を、「0分」における創傷の総表面から24時間後の表面積を引くことによって計算した。閉鎖パーセント（%）を、総面積に対する遊走した細胞表面積の比率として計算し、一方、裂孔閉鎖（%）を、対照の未処理試料の存在下での閉鎖パーセントを、処理された試験試料の閉鎖パーセントからを引くことによって求めた。

30

40

#### 【0081】

裂孔閉鎖は、24時間インキュベーション後には、図4および5にそれぞれ示すように、1%FBSの存在下での20%と比較して5%FBSの存在下では51%であることが分かった。

#### 【0082】

50

## 実施例 C 2 (NR の用量応答)

マウスの皮膚細胞において細胞の成長および遊走を促進させる NR 処理である。

### 【0083】

実施例 C 1 で述べたものと同じ実験条件を使用して、創傷閉鎖に与える培地中の塩化ニコチンアミドリボシド (1 mM および 0.2 mM) の効果を、Cytoselect (商標) Wound Healing Assay Kit により調べた。

### 【0084】

裂孔閉鎖は、24 時間インキュベーション後には、図 6 に示すように、1% FBS 単独の存在下での 20% (実施例 C 1) と比較して 1 mM 塩化 NR + 1% FBS の存在下では 46% であることが分かった。したがって NR の存在下での細胞運動を暗示する裂孔閉鎖は、実施例 C 1 における対照としての 5% FBS に匹敵することが分かった。さらに 13% の裂孔閉鎖が、0.2 mM NR (+ 1% FBS) の存在下において観察され、これは用量応答効果を実証する。

### 【0085】

哺乳動物組織の創傷は、組織を修復するのに複雑かつ順序付けられた一連の事象を経験する。修復する 2 つの重要な構成要素は、細胞運動性および増殖である。ここに提示されたデータは、NR が哺乳動物の皮膚細胞の細胞運動性および増殖を促進させて「創傷」に送り込むことを明確に実証している。

### 【0086】

## 実施例 D

ヒト皮膚細胞における有害な UV 介在性の損傷を防止する NR 処理である。

### 【0087】

この実施例ではニコチンアミドリボシド (NR) を使用して、皮膚の健康なバリア機能の維持を促進する。バリア機能は、皮膚の最も重要な機能である。皮膚は、太陽の紫外 (UV) 線を含めた環境曝露に対するヒトの体の第一かつ最善の防御手段である。UV 光に対する曝露は、多くの皮膚疾患の発症における重要な因子である。中心的な要素である UV 介在性の皮膚の損傷は、バリア機能の喪失である。

### 【0088】

本明細書中で述べた薬用量での局所的 NR 塗布は UV 介在性のバリア機能の喪失を防止することが期待される。NR が UV 介在性のバリア機能の喪失を防止する 1 つの方法は、既知の UV 介在性の経表皮水分散量 (TEWL) の増加を防止することによるものである。これに加えて NR の経口投与は、皮膚の健康なバリア機能の維持に有効であると予想される。

### 【0089】

例えば、皮膚バリア機能障害は、皮膚の水分量の尺度である経表皮水分蒸散量 (TEWL) を測定することによって直接に判断することができる (Oba, C, et al., "Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice", Photodermatol. Photomed. (2013) 29:204-11 (およびその中で引用されている参考文献)、および Jiang, S. J., et al., "Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient", Exp. Dermatol. (2007) 16:985-992、および Haratake, A., et al., "UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response", J. Invest. Dermatol. (1997) 108:769-775)。



## 【 0 0 9 0 】

現在特許請求されている本発明を記述する文脈中（特に、特許請求の範囲の文脈中）での用語「1つの（a）」、「1つの（an）」、「その（the）」、および類似の指示物の使用は、本明細書中で別段の指定がない限り、または文脈によって明確に否定されない限り、単数形および複数形の両方を包含するものと解釈されたい。本明細書における範囲の値の列挙は、本明細書中で別段の指示がない限り、その範囲内にあるそれぞれ別々の値を個々に指す簡便な方法としての役割を果たすことを単に意図しており、またそれぞれ別々の値は、それがあたかも本明細書中に個々に列挙されているかのように本明細書中に組み込まれる。用語「約」の使用は、およそ±10%の範囲でその表示値を超えるまたはその表示値未満のいずれかの値を表現することを意図しており、他の実施形態ではそれらの値は、およそ±5%の範囲でその表示値を超えるまたはその表示値未満のいずれかの値の範囲に及ぶこともあり、他の実施形態ではそれらの値は、およそ±2%の範囲でその表示値を超えるまたはその表示値未満のいずれかの値の範囲に及ぶこともあり、他の実施形態ではそれらの値は、およそ±1%の範囲でその表示値を超えるまたはその表示値未満のいずれかの値の範囲に及ぶこともある。前述の範囲は、文脈によって明白にされるものであり、さらなる限定を意味しない。本明細書中で述べる方法はすべて、本明細書中で別段の指定がない限り、または文脈によって明確に否定されない限り、任意の適切な順序で行うことができる。本明細書中で提供される任意のおよびすべての例、または例示的な言い回し（「など」）の使用は、単に本発明をより良く明らかにすることを意図しており、別段の要求がない限り本発明の範囲に限定を課さない。本明細書中の言い回しは、本発明の実施に不可欠な任意の特許請求されていない要素を指すものと解釈されるべきではない。

10

20

## 【 0 0 9 1 】

前述の本明細書中で本発明をその幾つかの実施形態に関して記述し、多くの細部を例示の目的で述べてきたが、本発明は追加の実施形態を受け入れることができること、また本明細書中で述べた細部の幾つかは、本発明の基本原則から逸脱することなく相当に変更され得ることが当業者には明らかであろう。

## 【 0 0 9 2 】

本明細書中で引用されるすべての参考文献は、それらの全体が参照により援用される。本発明を、その趣旨または必須の属性から逸脱することなく他の特定の形態で実施することができ、したがって前述の本明細書よりはむしろ本発明の範囲を示す別添の特許請求の範囲を参照すべきである。

30

【図 1】

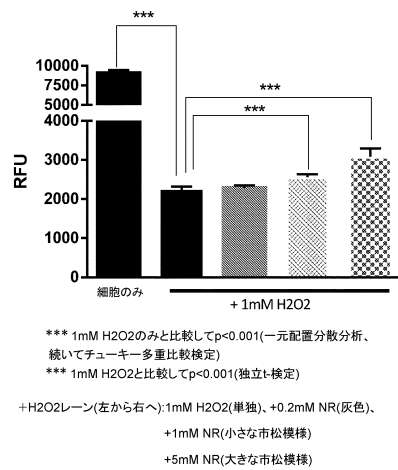


図 1

【図 2】

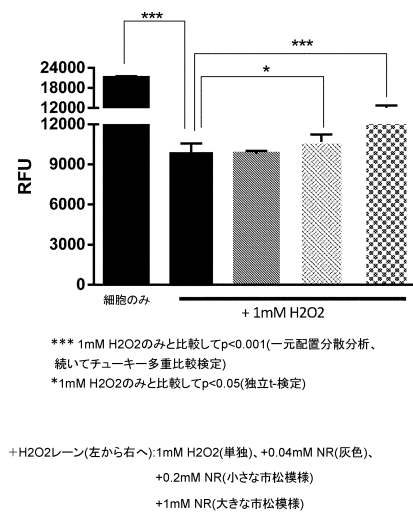


図 2

【図 3】

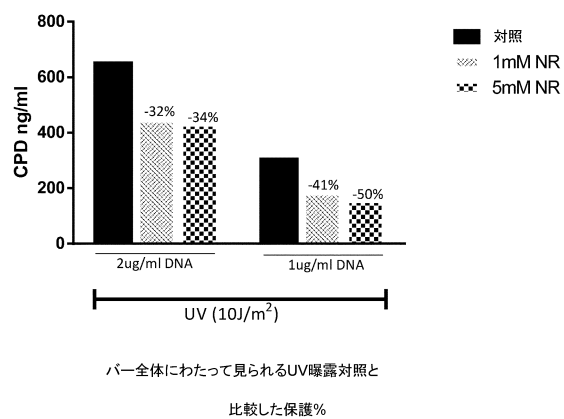


図 3

【図 4 B】

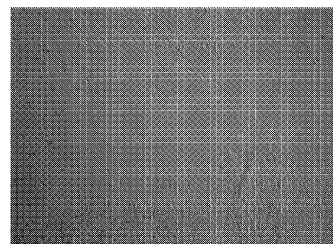


FIG. 4B

【図 5 A】

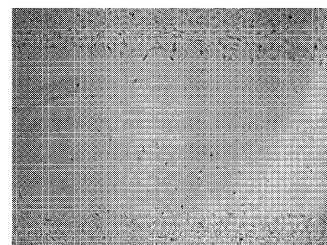


FIG. 5A

【図 4 A】

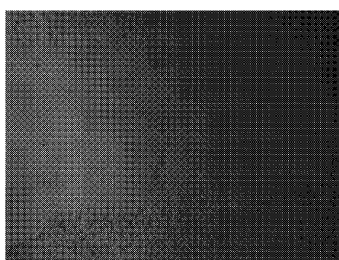


FIG. 4A

【図 5 B】

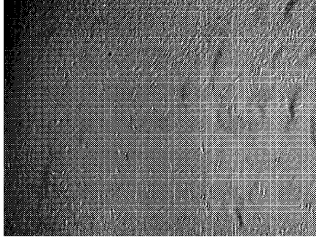


FIG. 5B

【図 6 B】

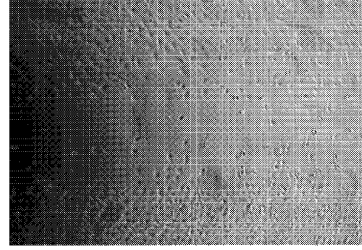


FIG. 6B

【図 6 A】

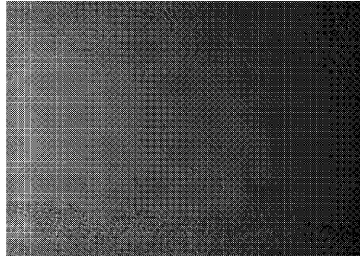


FIG. 6A

## フロントページの続き

(72)発明者 ローンマス, トロイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92691, ミッションヴィエホ, モロ アズール 26991

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 特表2008-529502(JP, A)

米国特許出願公開第2012/0172584(US, A1)

DEVITA SURJANA. et al., Nicotinamide enhances repair of ultraviolet radiation-induced DNA damage in human keratinocytes and ex vivo skin, Carcinogenesis, 2013年 1月24日, Vol.34, No.5, 1144-1149

BRIGITTE BALARD AND PAOLO U. GIACOMONI, Nicotinamide adenosine dinucleotide level in demethylsulfate-treated or UV-irradiated mouse epidermis, Mutation Research, 1989年, Vol.219, 71-79

FEDERICO LICASTRO and ROY L. WALFORD, MODULATORY EFFECT OF NICOTINAMIDE ON UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS IN LYMPHOCYTES FROM YOUNG AND OLD MICE, Mechanisms of Ageing and Development, 1986年, Vol.35, 123-131

H.A. Rovito and J.E. Oblong, Nicotinamide preferentially protects glycolysis in dermal fibroblasts under oxidative stress conditions, British Journal of Dermatology, 2013年 3月 4日, Vol.169, Suppl.2, 15-24

NOBUMASA HARA. et al., Nicotinic acid elevates cellular NAD levels and protects cells against oxidative stress, 生化学, 2007年, 1P-0269

ALESSANDRA MOCALI. et al., Induction, Effects, and Quantification of Sublethal Oxidative Stress by Hydrogen Peroxide on Cultured Human Fibroblasts, EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 1995年, Vol.216, 388-395

Anthony A. Sauve, Pharmaceutical Strategies for Activating Sirtuins, Current Pharmaceutical Design, 2009年, Vol.15, 45-56

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/706

A61K 8/60

A61P 17/00

A61P 17/16

A61Q 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)