

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2022-17332

(P2022-17332A)

(43)公開日 令和4年1月25日(2022.1.25)

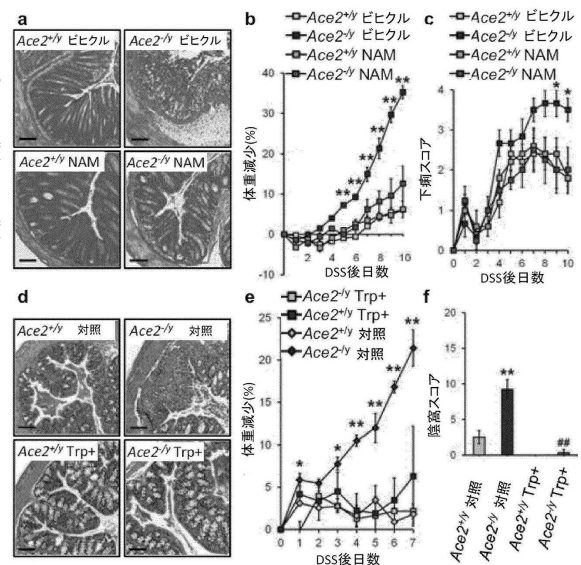
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/405(2006.01)	A 6 1 K	31/405	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	31/455(2006.01)	A 6 1 K	31/455	4 C 0 8 6	
A 6 1 K	31/618(2006.01)	A 6 1 K	31/618		
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
審査請求 有 請求項の数 18 O L 外国語出願 (全23頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2021-169322(P2021-169322)	(71)出願人	505470960		
(22)出願日	令和3年10月15日(2021.10.15)		コナリス リサーチ インスティテュート		
(62)分割の表示	特願2018-233038(P2018-233038)		アーゲー		
	)の分割		ドイツ連邦共和国 キール 2 4 1 1 8		
原出願日	平成25年6月14日(2013.6.14)		シャウエンブルガーシュトラッセ 1 1 6		
(31)優先権主張番号	102012011890.2	(74)代理人	230104019		
(32)優先日	平成24年6月15日(2012.6.15)		弁護士 大野 聖二		
(33)優先権主張国・地域又は機関	ドイツ(DE)	(74)代理人	100119183		
			弁理士 松任谷 優子		
		(74)代理人	100149076		
			弁理士 梅田 慎介		
		(72)発明者	ヴェーツィッヒ, ゲオルク		
			ドイツ連邦共和国 2 4 1 0 6 キール,		
			エルフリーデーディートリッヒーシュト		
			ラーセ 7 7		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファンを含有する、腸内微生物叢による影響を及ぼすための医薬組成物

(57)【要約】 (修正有) 【課題】 ヒトおよび動物において、腸内微生物叢による影響を及ぼすための新規な医薬組成物を提供する。

【解決手段】 ニコチン酸、ニコチンアミド、ニコチン酸エステル、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP)、NADまたはNADPの生合成における中間体、トリプトファン、トリプトファンジペプチド、またはこれらの組合せから選択される活性物質を含み、改変しようとする腸内微生物叢が位置する回腸終末部、結腸またはその両方において局所的に有効であるように前記活性物質を放出するように製剤化された、組成物を使用する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ニコチン酸；ニコチンアミド；トリプトファン；動物体または人体の中でニコチン酸、ニコチンアミドまたはトリプトファンに変換される化合物；ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）；ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸（NADP）；NADまたはNADPの生合成における中間体；トリプトファンジペプチド；またはこれらの組合せから選択される活性物質を含み、回腸終末部、結腸またはその両方において局部的に有効であるように前記活性物質を放出する、腸内微生物叢によい影響を及ぼすための医薬組成物。

【請求項 2】

ニコチン酸、ニコチンアミド、トリプトファンまたはこれらの組合せから選択される活性物質を含み、回腸終末部、結腸またはその両方において局部的に有効であるように前記活性物質を放出する、腸内微生物叢によい影響を及ぼすための医薬組成物。

【請求項 3】

回腸終末部および／または結腸において特定の局所に有効であるように前記活性成分を遅延放出する、経口投与用の、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

回腸終末部および／または結腸において特定の局所に有効であるように前記活性成分を遅延放出する、経口投与用に製剤化された、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

回腸終末部および／または結腸において特定の局所に有効であるように前記活性成分を制御放出する、経口投与用に製剤化された、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

ニコチンアミドを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

小腸の炎症性疾患および／または大腸の疾患の治療または予防のため、および／もしくは結腸癌の予防のため、ならびに／または腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下から生じる他の疾患の治療または予防のために、活性物質を遅延放出する、経口投与用の、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

大腸の炎症性疾患または回腸囊炎の治療のための、結腸または回腸囊における新（直腸）（neo（rectal））投与用の、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

結腸または回腸囊における（新）直腸（（neo）rectal）投与用に製剤化された、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

大腸の炎症性疾患または回腸囊炎の治療または予防に使用するための、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

経口適用が、最終剤形あたり 1 ～ 3000 mg の活性物質含量で実施されることを特徴とする、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

経口適用が、最終剤形あたり 100 ～ 1000 mg の活性物質含量で実施されることを特徴とする、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

経直腸適用が、直腸または回腸囊における炎症の局所的治療のために実施されることを特徴とする、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

経直腸適用が、最終剤形あたり 10 ～ 5000 mg の活性物質含量で実施されることを

10

20

30

40

50

特徴とする、請求項 8、9、10 および 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

ニコチン酸および／またはニコチンアミドに加えて、アセチルサリチル酸および／またはプロスタグランジン D2 拮抗薬を含有することを特徴とする、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

(a) 炎症性腸疾患の治療または予防に使用するため、
(b) 結腸癌の治療または予防に使用するため、または
(c) 腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下から生じる他の体器官疾患の治療または予防に使用するための、
請求項 1 から 14 のいずれかに記載の医薬組成物。

10

【請求項 17】

炎症性腸疾患の治療または予防に使用するための、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎またはクローン病である、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

トリプトファンジペプチドを含む、請求項 1 から 18 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 20】

腸内微生物叢により影響を及ぼす使用のための、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 21】

腸内微生物叢により影響を及ぼすための、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファンを含有し、小腸および／または大腸内に特異的に放出される（たとえば選択的に放出される）、腸内微生物叢により影響を及ぼすための新規な医薬組成物に関する。

30

【背景技術】

【0002】

腸壁の炎症性疾患は、腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下が原因であるか、またはこれらに影響を受けるものが多い。かかる腸炎症、たとえばクローン病または潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患（IBD: inflammatory bowel diseases）はヒトに発生し、他の哺乳動物にも発生する（たとえばイヌにおける慢性の特発性大腸炎）。これらの疾患は、十分に解明されていない複雑な免疫学的プロセスに基づくものである。しかし、腸内微生物叢内の変化、およびその相互作用の低下は、他の複数の疾患における原因因子となり得る。その例として、アトピー性疾患、たとえばアトピー性湿疹、アレルギー状態または喘息（たとえば Bisgaard ら、2011、J. Allergy Clin. Immunol. 128:646; Iebba ら、2011、Dig. Dis. 29:531; Abrahamsson ら、2012、J. Allergy Clin. Immunol. 129:434; Candela ら、2012、BMC Microbiol. 12:95; Olszak ら、2012、Science 336:489 を参照）、ならびに炎症性要素を伴う代謝性疾患、たとえば、結果として冠状動脈性心疾患、脂肪症または糖尿病につながる動脈硬化症が含まれる（Ott ら、2006、Circulation 113:929; Koren ら、2011、PNAS 108 Suppl 1:4592; レビューについては Caesar ら、2010、J. Intern. Med. 268:320; および Vris e ら、2010、Diabetologia 53:606 を参照）。

40

50

【0003】

腸内微生物叢と種々の疾患との関係は既知であるが、関連する疾患によい効果を与えるように微生物叢に影響を及ぼす方法は解明されていない。

【0004】

ニコチン酸（ナイアシン、ビタミンB3）、ニコチンアミド（ニコチン酸アミド）および／またはトリプトファンは、ナイアシン欠乏性疾患（たとえばペラグラ）の治療に数十年間使用されてきた。ペラグラは腸炎症を伴う場合があり、ナイアシン投与後に緩和されるが、その治療原理は、腸炎症の原因となるビタミン欠乏症の除去であることが知られている（Segalら、1986、Int. J. Colorectal Dis. 1: 238；およびClaytonら、1991、Eur. J. Pediatr. 150: 498）。

10

【0005】

ニコチン酸は、血中コレステロールリポタンパク質に対して健康促進効果があることも知られている（HDL／LDL比およびLDLベシクルのサイズ；Wahlbergら、1990、J. Intern. Med. 228: 151；Seedら、1993、Atherosclerosis 101: 61；Elamら、2000、JAMA 284: 1263；McKenneyら、2001、Am. J. Cardiol. 88: 270）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0006】

本発明の目的は、ヒトおよび動物において、腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下に関連する疾患を治療および／または予防するための処置の新規な形態を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明によれば、上記の課題は、ニコチン酸、ニコチンアミド、トリプトファンまたは本明細書に記載する別の化合物を含有し、腸内微生物叢によい影響を及ぼすと考えられる医薬組成物によって解決される。好ましい実施形態において、ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファンが投与されて、腸粘膜および腸内微生物叢に局所的に影響を及ぼす。たとえば、活性物質が製剤化されて、改変しようとする腸内微生物叢が位置する回腸終末部または結腸に選択的に投与される。動物体（たとえば人体）内でニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファンに変換される他の活性物質も、本発明が企図するものである。

30

【0008】

したがって、ニコチン酸（ナイアシン、ビタミンB3）および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファンを含有する医薬組成物を提供する。これら3種の物質は、個別に、または互いに組み合わせられて（2種または3種の組合せ）、小腸および／または大腸内の微生物叢に、抗炎症的にかつ／または有益であるように作用する。組成物は、回腸終末部および／または結腸において特定の局所的（local）または局部的（topical）有効性のために活性成分を制御放出および／または遅延放出する経口投与に好適である。処置を受ける例示的な状態には、小腸の炎症性疾患、大腸の炎症性疾患の治療または予防、結腸癌の予防、および腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下から生じる他の疾患の治療または予防が含まれる。組成物は、大腸の炎症性疾患または回腸囊炎の局所的および／または局部的治療のための、結腸または回腸囊における（新）直腸（(neo)rectal）投与にも好適である。

40

【0009】

本発明は、本明細書に記載する疾患および状態のうち1種または複数種を、本明細書に記載する医薬組成物で処置する方法をさらに含む。加えて、本発明は、本明細書に記載する疾患および状態のうち1種または複数種を処置するための薬剤の製造における、本明細

50

書に記載する医薬組成物の使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】ニコチンアミドまたはトリプトファンによる、ACE2欠損マウスにおけるDSS大腸炎の悪化の防止を示す。上段：ビヒクルまたはニコチンアミド（NAM：nicotinamide）の飲料水溶液を与えた、DSS負荷のACE2正常（ACE2+/y）マウスおよびACE2欠損（ACE2-/y）マウスにおける、結腸の病理組織（DSS投与10日後にヘマトキシリンエオシン染色、バー：100μm（a））、体重減少、単位パーセント（b）、および下痢スコア（c）。NAM投与はDSS投与の3日前に開始した。下段：正常な食餌（対照）またはトリプトファン・ジペプチドの食餌（Trp+）を与えた、DSS負荷のACE2正常（ACE2+/y）マウスおよびACE2欠損（ACE2-/y）マウスにおける、結腸の病理組織（DSS負荷7日後にヘマトキシリンエオシン染色、バー：100μm（d））、体重減少、単位パーセント（e）、および結腸の陰窩の損傷（f）。すべての値は、1グループにつきマウス3～10匹の標準誤差を伴う平均値である。*：P<0.05、**または##：P<0.01。

10

【図2】患者3名における、ニコチンアミド（1日2×600mg）を投与しながらの0週目（wk）～4週目のクローン病活動性指数（CDAI）の動向を示す。

【図3】デキストラン硫酸ナトリウム（DSS：dextrane sodium sulfate）大腸炎を負荷し、ニコチンアミド（NAM）の強制投与水溶液、もしくは食餌中に混合したNAMの制御放出ミニ錠剤製剤、または5-アミノサリチル酸の0.5%メチルセルロース中強制投与懸濁剤で処置したマウスの、結腸粘膜の組織学的スコアを示す。

20

【図4】デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）大腸炎を負荷し、（1）ニコチンアミド（NAM）の強制投与水溶液もしくは（2）食餌中に混合した対照顆粒剤もしくは（3）3種の用量で食餌中に混合したNAMの制御放出顆粒剤、または（4）食餌中に混合した5-アミノサリチル酸の制御放出顆粒剤（5-ASA顆粒剤）で処置したマウスの、疾患活動性指数（DAI：disease activity index）のデータを示す。*、p<0.05 vs. 対照顆粒剤；**、p<0.01 vs. 対照顆粒剤；***、p<0.001 vs. 対照顆粒剤；###、p<0.001 vs. 同用量のNAMの水溶液。

30

【図5】デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）大腸炎を負荷し、（1）ニコチンアミド（NAM）の強制投与水溶液もしくは（2）食餌中に混合した対照顆粒剤もしくは（3）3種の用量で食餌中に混合したNAMの制御放出顆粒剤、または（4）食餌中に混合した5-アミノサリチル酸の制御放出顆粒剤（5-ASA顆粒剤）で処置したマウスの、結腸組織ホモジネートのミエロペルオキシダーゼ（MPO：myeloperoxidase）含量を示す。*、p<0.05 vs. 対照顆粒剤；***、p<0.001 vs. 対照顆粒剤。

【図6】トリプトファンもニコチン酸もニコチンアミドも欠乏した食餌（Trp/Nia/NAM不含の食餌）の開始前と12日後における、1グループにつきマウス5～8匹の糞便試料中の主要細菌の門、Bacteroidetes門およびFirmicutes門の相対的存在比を示す。Trp/Nia/NAM不含の食餌には、（1）NAMも5-アミノサリチル酸（5-ASA）も不含の対照顆粒剤、（2）3種の用量で食餌中に混合したNAMの制御放出顆粒剤、または（3）食餌中に混合した5-アミノサリチル酸の制御放出顆粒剤（5-ASA顆粒剤）を含有させた。

40

【図7】トリプトファンもニコチン酸もニコチンアミドも欠乏した食餌（Trp/Nia/NAM不含の食餌）の開始前と12日後における、1グループにつきマウス5～8匹の糞便試料中の微生物叢組成物の類似度百分率分析（SIMPER）を示す。Trp/Nia/NAM不含の食餌には、（1）NAMも5-アミノサリチル酸（5-ASA）も不含の対照顆粒剤、または（2）3種の用量で食餌中に混合したNAMの制御放出顆粒剤、もしくは（3）食餌中に混合した5-アミノサリチル酸の制御放出顆粒剤（5-ASA

50

顆粒剤)を含有させた。未分類の *Bacteroidales* 目および *Bacteroidales* 目 *Paraprevotella* 属の増殖が、棒の、線影をつけた部分により可視化されている。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の核心は、腸内微生物叢によい影響を及ぼすために、ニコチン酸；ニコチンアミド；トリプトファン；動物体（たとえば人体）の中でニコチン酸、ニコチンアミドまたはトリプトファンに変換される化合物；ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（*NAD: nicotinamide adenine dinucleotide*）；ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸（*NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*）；*NAD*または*NADP*の生合成における中間体；およびトリプトファンジペプチドから選択される1種または2種以上の活性物質を含み、下部小腸、結腸またはその両方において放出（たとえば部分的に放出、選択的に放出）するように遅延放出用に設計されている医薬組成物である。

10

【0012】

本発明者らは、ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファンが、腸内の抗微生物ペプチドの分泌パターンを変えらるといふ点で、腸内微生物叢（腸内のすべての微生物、特に細菌の全体）に影響を及ぼすことによつて抗炎症効果を有することを認識した。本発明による医薬組成物の投与後に変化した腸内微生物叢は、炎症促進効果が少ないか、または抗炎症性となり、このため、ヒトにおけるクローン病または潰瘍性大腸炎などの*IBD*、または他の哺乳動物における*IBD*（たとえばイヌにおける慢性の特発性大腸炎）の症状に明らかな低減をもたらし、かつ／またはこれを支援する。さらに、本明細書において、胃腸管の患部に活性物質の少なくとも一部を放出する医薬組成物の有効性は、患部に到達する前に大部分が吸収される医薬組成物より大幅に良好であることが初めて実証された。

20

【0013】

したがって、本明細書で使用する場合、「腸内微生物叢によい影響を及ぼす」とは、健康に、特に本明細書に記載する疾患および状態のうち1種または複数種によい効果を与える、腸内微生物叢内の変化をもたらすことを指す。たとえば、よい効果とは、病原細菌の数の低減、病原細菌対有益な細菌の比の低減、微生物叢の多様性の増加、微生物叢が腸内に誘発する炎症の量の低減、および微生物叢のエンテロタイプ（たとえば*Bacteroides*、*Prevotella*および*Ruminococcus*に関連するエンテロタイプ）における病理学的な変化の部分的または完全な回復に結びついている。炎症性腸疾患において一般に病原性とみなされる細菌には、たとえば、侵入特性または毒性因子のある*Enterobacteriaceae*（たとえば*Escherichia coli*）、硫化物を生成する*Desulfovibrio*菌種、および侵入特性のある*Fusobacterium*菌種が含まれる。一般に有益であるとみなされる細菌には、*Lactobacillus*属、*Bifidobacterium*属および*Faecalibacterium*属からの種、たとえば*L. casei*、*L. plantarum*および*F. prausnitzii*が含まれる。炎症性腸疾患における消化管の微生物叢の最近の概要については、*Manichanhら*、2012、*Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9:599を参照されたい。

30

【0014】

*Hashimotoら*の論文（*Nature* 2012, 487:477）は、本願の優先日以降に発表され、その内容を参照により本明細書に組み込むものとするが、本明細書に記載する発明に関する追加の証拠を提供している。*Hashimotoら*は、マウスにおけるトリプトファンの吸収不良によつて、刺激源のデキストラン硫酸ナトリウム（*DSS*）で誘発した大腸炎の重症度が著しく増加することを示した。トリプトファンまたはニコチンアミドの栄養素補充をすると、大腸炎におけるこの増加が防止された。*Hashimotoら*は、重度の大腸炎に対する感受性が増加した原因は、消化管の微生物叢が変

40

50

化したことであり、この変化した微生物叢を他のマウスに移植すると、レシピエントにおいても大腸炎の重症度が増加することを実証した。消化管の微生物叢内の有害な変化の原因は、一定の抗微生物ペプチド（AMP）、特に α -ディフェンシンの量が大いに低下することであり、回腸終末部の上皮細胞におけるその発現は、トリプトファンまたはニコチンアミドが誘導するmTORシグナル伝達によって大部分が制御されていることがわかった。

【0015】

慢性腸炎症は結腸癌の発症リスクを大いに高めるため（レビューについては、たとえば Ullman & Itzkowitz 2011、Gastroenterology 140:1807を参照）、本発明による組成物を使用すると、慢性または再発性の腸炎症の症例において結腸癌の予防にもなる。

10

【0016】

正常な消化管の微生物叢の確立もしくは再建、または有益な細菌の補充による治療介入は、多種多様な疾患モデルおよびそれぞれのヒト疾患において有効であることがわかっている。たとえば、Olszakら（Science 2012、336:489）は、最近、IBDまたは喘息の無菌マウスモデルの患部器官におけるインバリアントナチュラルキラーT細胞の病理学的な滞留が、新生仔マウスに正常な微生物叢をコロニー形成することによって防止することができることを実証した。種々の疾患において、諸研究は、一定のプレバイオティクス、プロバイオティクスまたはシンバイオティクスの有益な効果を実証している。たとえば、lactobacilliは肥満症において血中コレステロールレベルを低下させることができるが、その機序はまだ完全に明らかではない（Caesarらによるレビュー、2010、J. Intern. Med. 268:320）。炎症性腸疾患において、一部のプロバイオティクス、たとえばVSL#3（Bifidobacterium breve、Bifidobacterium longum、Bifidobacterium infantis、Lactobacillus acidophilus、Lactobacillus plantarum、Lactobacillus paracasei、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricusおよびStreptococcus thermophilusの混合物）が、数が限られた臨床研究において使用され、成功している。少なくとも数菌種の細菌を補充することが、通常、有意な治療有益性を提供するために必須であるようである。複雑な細菌による介入の目覚ましい有効性を示す最近の例は、Clostridium difficileに対する糞便移植の使用成功例である（van Noodら、2013、New Engl. J. Med. 368:407）。

20

30

【0017】

腸内微生物叢内の病理学的な変化は、アトピー性障害由来の他の多数の疾患においても、炎症性要素を伴う代謝性疾患においても、その原因となり得るため、かかる疾患の治療および／または予防も本発明の範囲内である。特に、次の疾患がかかる適応症の例である。

- ー 皮膚：アレルギー、アトピー性湿疹、乾癬、
- ー 肺：嚢胞性線維症、喘息、COPD、
- ー 血管：冠状動脈性心疾患、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、
- ー 内分泌系：糖尿病、脂肪症。

40

【0018】

腸粘膜および腸内微生物叢、腸炎症に局所的に影響を及ぼすための、ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファン（ならびに関連活性物質）の、本発明の特定の局所的使用、および腸粘膜の直接的な治療は、以前は知られておらず、予想外であったこれらの化合物の役割に対して、本明細書に記載した洞察を行った結果、生み出されたものである。この使用は当該活性物質の従来の使用とは大きく異なる。従来、これらの物質は吸収され、全身的に作用することになっていた。ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファン（ならびに本明細書に記載する他

50

の化合物)は、その新規な抗炎症効果および／またはその腸内微生物叢を改変する効果のゆえに、小腸および／または大腸の炎症性疾患を処置するための活性物質として好適である。具体的な状態には、腸炎症の処置、結腸癌の予防、ならびに腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下から生じる他の疾患の治療または予防が含まれる。好ましくは、これらの活性物質は、可能な限り最大量の活性物質を、上部小腸において身体に吸収されないように保護し、むしろ、改変しようとする腸内微生物叢が位置する回腸終末部または結腸内に放出(たとえば制御放出および／または遅延放出)する薬理学的な製剤で使用される(たとえば活性物質は回腸終末部および／または結腸に選択的に放出される)。

10

【0019】

したがって、とりわけ、本明細書に記載する活性物質は、クローン病、潰瘍性大腸炎、回腸囊炎、大腸のさらなる慢性疾患または大腸の炎症、空置腸管に発生する腸炎(diversion colitis)、感染性腸炎、抗生物質関連の下痢症、たとえばC. difficile関連の下痢症、感染性大腸炎、憩室炎、および照射、抗生物質、化学治療薬、医薬製品または化学物質によって形成される炎症の治療のため、結腸癌の予防のため、ならびに腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下から生じる他の疾患の治療または予防のために、局所的放出(たとえば制御放出および／または遅延放出)する薬剤中に使用されるのに好適である。

20

【0020】

特許請求した物質は、ヒトおよび他の哺乳動物の両者において、特に家畜および有用な動物において、発生源が同じ疾患の治療または予防に等しく使用可能である。かかる動物の例には、限定する目的はないが、イヌ、ネコ、ウマ、ラクダまたはウシがある。

【0021】

活性物質、すなわち、ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファンは、市場で入手可能ないずれの形態でも使用することができ、たとえばMerck KGaA製のものがある。トリプトファンは、単一アミノ酸としてもジペプチドとしても、たとえばGly-Trpジペプチドとしても使用することができる。

【0022】

ニコチン酸、ニコチンアミドおよびトリプトファンに加えて、他の関連化合物を、本明細書に記載する発明において活性物質として使用することができる。たとえば、人体または動物体の中で、これらの作用剤のうちの1種に(たとえば加水分解、代謝によって)変換される化合物、たとえばニコチン酸エステルが好適である。さらに、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)またはNADリン酸(NADP)の合成中の中間体、たとえばN-ホルミルキヌレニン、L-キヌレニン、3-ヒドロキシ-L-キヌレニン、3-ヒドロキシアントラニラート、2-アミノ-3-カルボキシムコン酸セミアルデヒド、キノリナートおよびβ-ニコチナートD-リボヌクレオチドを使用することができる。さらなる例にはNADおよびNADPが含まれる。

30

【0023】

ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファン(または上記の他の物質のうちの1種)を含有する医薬組成物は、経口投与して活性物質を遅延放出することができ、経直腸投与方式(たとえば浣腸剤または坐剤)でも投与することができる。活性物質の送達部位は、炎症過程を抑制するために、好ましくは小腸の下部および／または結腸であり、このため、たとえばペラグラの治療のために、生体における極大の吸収および代謝(要するに全身性の効果)を追求する投与方式とは基本的に異なる。さらに、本発明による投与方式および本発明による投与量は、たとえばニコチン酸の全身投与に関して記載したとおり、副作用の発現の確率を最小限に抑える。

40

【0024】

本明細書で使用する場合、「下部小腸」とは小腸の後半部であり、「回腸終末部」とは回腸の後半部である。

【0025】

50

この点で、本発明は、組合せ調製物、たとえば、ニコチン酸および／またはニコチンアミドと、アセチルサリチル酸および／またはプロスタグランジンD2拮抗薬、たとえばニコチン酸に特有の副作用を低減するラロピプラントとの組合せも含む。かかる組合せの組成物および投与量は当業者に公知である。さらに、ニコチン酸よりニコチンアミドの使用が本発明によれば好ましく、副作用の発現の確率を最小限に抑える。

【0026】

回腸終末部および／または結腸において、腸内微生物叢に対する抗炎症性効果および／または改変効果を有する、活性物質の経口投与製剤を製造するため、このように制御放出方式および／または遅延放出方式を使用することは、有利であり、革新的である。従来の最適な補充のための（場合により、やはり遅延）放出方式、たとえばペラグラの症例における放出方式とは対照的に、本発明の一定の実施形態は、胃および小腸の上部における吸収を部分的にまたは実質的に回避する。

10

【0027】

クローン病または潰瘍性大腸炎を処置するには、経口および／または経直腸（たとえば浣腸剤として）の適用方式が好適である。潰瘍性大腸炎の症例における回腸嚢炎を処置するには、経直腸適用（たとえば浣腸剤として）が好ましい。これは、上記の経口製剤、たとえば遅延放出調製物の経口投与によっても支援することができる。他の任意の形態の大腸炎の対症療法には、腸内微生物叢を治療的に改変するために、経口および経直腸適用の両方を選ぶことができる。経口適用は、特に潰瘍性大腸炎の症例における結腸癌の予防のため、ならびに腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下から部分的にまたは実質的に生じる他の疾患の治療および／または予防のために好ましい。

20

【0028】

経口投与には、特殊なガレヌス製剤（galenics）により活性物質の放出を制御し、かつ／または遅延させる特定の剤形（いわゆる制御放出、緩効性放出または遅延放出の各形態）が特に好適である。かかる剤形は、単純な錠剤およびコーティング錠、たとえばフィルム錠または糖衣錠とすることもできる。錠剤は通常丸いか、または両凸である。分離することができる細長い錠剤の形態も使用可能である。さらに、顆粒剤、長球型剤、ペレット剤またはマイクロカプセル剤が使用可能であり、これらは適宜小袋またはカプセルに充填される。

30

【0029】

「遅延放出」という用語は、好ましくは、時間を遅らせてから活性成分を放出する医薬製剤に関する。一定の実施形態において、遅延は、製剤中の活性物質の少なくとも一部が下部小腸（たとえば回腸終末部）および／または結腸で放出されれば十分である。

【0030】

「制御放出」という用語は、好ましくは、1種または複数種の活性成分を長時間にわたって放出または送達する医薬製剤またはその成分に関する。一定の実施形態において、その時間は、製剤中の活性物質の少なくとも一部が下部小腸（たとえば回腸終末部）および／または結腸で放出されれば十分である。

【0031】

遅延は、たとえば、胃液に対して抵抗性があり、pHに依存して溶解するコーティング材によって、微細セルロースおよび／またはマルチマトリックス（MMX：multimatrix）技術を用いて、種々の担体マトリックスまたはこれらの技術の組合せを使用して、有利に実現される。その例として、制御放出および／または遅延放出のために、アクリルポリマーおよび／またはメタクリレートポリマーを種々の混合物で含有するフィルムコーティング材が含まれる。たとえば、活性物質を、従来の微結晶セルロースもしくはゼラチンのマトリックスまたはMMX技術で含有することができ、活性物質を遅延放出させる材料でこれをコーティングする。既知の方法を用いてコーティングされる大容量カプセル（たとえば内容量0.68mlのゼラチン）中に活性物質を導入することが好ましい。好適なコーティング材は、水不溶性ワックスおよびポリマー、たとえばポリメタクリ

40

50

ラート（たとえば製品目録で商標名 Eudragit（登録商標）のもの、特に Eudragit（登録商標）S および Eudragit（登録商標）L、Evonik Industries AG、Essen、Germany）ならびに水不溶性セルロース（たとえばメチルセルロース、エチルセルロース）である。必要に応じて、水溶性ポリマー（たとえばポリビニルピロリドン）、水溶性セルロース（たとえばヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはヒドロキシプロピルセルロース）、ポリソルベート 80、ポリエチレングリコール（PEG）、ラクトースまたはマンニトールをコーティング材料中に含有させることもできる。

【0032】

たとえば、Eudragit（登録商標）S 化合物と L 化合物との組合せ（たとえば Eudragit（登録商標）L/S100）は、回腸終末部で生じる $\text{pH} > 6.4$ で、本発明による活性物質の制御放出を実現する。Eudragit（登録商標）調製物およびその（L、S および R の各化合物）混合物を、活性物質の包装にさらに使用することも考えられ、したがって、胃腸管全体の選択された部分での局部的使用を、一定の pH 値で制御放出によって実現することができる。

10

【0033】

医薬組成物は、さらなる医薬品添加剤物質、たとえば結合剤、充填剤、滑剤、滑沢剤および流動制御剤を含有することもできる。本発明による化合物は、適宜、さらなる活性物質および医薬組成物に慣用の添加剤、たとえば、タルク、アラビアガム、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、カカオ脂、水性および非水性担体、動物または植物由来の脂質成分、パラフィン誘導体、グリコール（特にポリエチレングリコール）、種々の可塑剤、分散剤、乳化剤および／または防腐剤と一緒に製剤化することができる。

20

【0034】

経直腸適用のための浣腸剤または坐剤を製造するために、活性物質の調製物を好適な溶媒に溶解し、既知の製薬法に従ってさらに加工して浣腸剤または坐剤にすることができる。

【0035】

最終剤形中の活性物質の含量は、経口投与の場合は $1 \sim 3000 \text{ mg}$ 、好ましくは $100 \sim 1000 \text{ mg}$ であり、浣腸剤および／または坐剤は $10 \text{ mg} \sim 5000 \text{ mg}$ の量の活性物質を含有することができる。炎症性疾患の強さおよび重症度に依存して、剤形は 1 日 1 回もしくは数回、または医師が選ぶ別の投与レジメンで投与される。

30

【0036】

本明細書で使用する場合、「処置（treatment）」、「処置する（treat）」および「処置している（treating）」という用語は、本明細書に記載するおりの疾患もしくは障害、またはこれらの 1 種もしくは複数種の症状発現の抑制、緩和、遅延、またはそれらの進行の抑制を指す。一部の実施形態では、処置は、1 種または複数種の症状が発症してから施してもよい。他の実施形態では、処置は、症状がなくても施してもよい。たとえば、処置は、感受性のある個体に、症状が発現する前に（たとえば、症状の経歴に照らして、かつ／または遺伝的もしくは他の感受性因子を考慮して）施してもよい。処置は、症状が回復した後に、たとえばその再発の防止または遅延のために継続することもできる。

40

【0037】

本明細書で使用する場合、「予防」および「防止する」という用語は、未処置の対照集団と比較しての、疾患もしくは障害、またはその 1 種もしくは複数種の症状発現の遅延、またはそれらの進行の可能性の低減を指す。

【0038】

本明細書に記載する発明のさらなる態様は、処置対象の個体の遺伝的および／または微生物学的データおよび特定のニーズに基づく、特許請求した薬剤の効率的な使用である。すべてのタイプの疾患（特に、腸内微生物叢と腸との相互作用が低下している疾患も）に対する個体の遺伝的素因、および薬理遺伝学についての新たな洞察は、次のことを示して

50

いる。すなわち、根拠に基づく個別化医療（関連リスク遺伝子と、さらには薬剤および／もしくはその代謝生成物および／もしくはその下流エフェクターと相互作用する、たとえば細胞表面受容体、輸送タンパク質、代謝酵素またはシグナル伝達タンパク質をコードする遺伝子との、遺伝学的分析を含む）は、本明細書に記載する薬剤の、使用の種類、投与方式、使用時間、用量および／または投与レジメンに関して、情報および改善を提供することができる、ということである。この個別化処置により利益を受けることができる個体には、血清トリプトファンが減少した個体、B⁰AT1（たとえば腸上皮細胞の）およびB⁰AT1多型の発現が変化した個体が含まれる。これは、特に糞便試料が微生物叢内の変化を示している場合に、腸内微生物叢の分析に同様に適用される。したがって、本発明は、本発明による薬剤に特に感受性のある個体を識別するため、および／または本発明による薬剤の使用を個体の事情に適合させるために好適な、遺伝学的および／または微生物学的試験方法の使用も含む。本発明は、個体の遺伝学的および微生物学的特性に依存する、種々の投与方式での種々の物質（ニコチン酸および／もしくはニコチンアミドならびに／またはトリプトファン）の使用も特に含む。これらの目的のために、実験室試験および／または好適な試験キット、さらには医師、ユーザーおよび／または患者が利用することになる測定方法、器具および／またはキットを使用して、たとえば糞便試料を採取したり、血液、尿または他の体液中の適切なパラメーターを分析したりすることが可能である。

10

【実施例】

【0039】

(EXEMPLIFICATION)

20

本発明の教示を有利に発展させ、さらに発展させる種々の可能性がある。このため、代表して本発明を説明する以下の実施例について記載する。

【実施例1】

【0040】

優先権出願を提出した時点では新規なおよび未発表であった知見が本発明の教示を裏付けており、Hashimotoらの論文（Nature 2012、487：477）として発表されたため、説明のためにここに簡単に記載することにする。中性アミノ酸のトランスポーター、B⁰AT1（トリプトファンを輸送する）の腸上皮細胞の表面での発現は、アンジオテンシン変換酵素2（ACE2：angiotensin converting enzyme 2）の存在に結びついていることが知られている（Kowalcukら、2008、FASEB J. 22：2880；Camargoら、2009、Gastroenterology 136：872）。ACE2に欠陥があると、アミノ酸欠乏性疾患（いわゆるハートナップ病）を生じ、その疾患パターンはペラグラと類似しており、トリプトファンおよびニコチンアミドの補充の増加によって処置することができる。今では、物質、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を与えると、ACE2が機能しないマウス（遺伝子型：Ace2⁻/y）は、正常遺伝子型のマウス（Ace2⁺/y）より大幅に重度の、人工的に誘発した腸炎症に罹患したことが、マウスモデルによって示されている。きわめて興味深いことに、この効果を、ニコチンアミド（NAM）の予防的および永続的な投与によって、またはトリプトファンジペプチドの給餌（B⁰AT1以外のトランスポーターによって取り込まれるが、本明細書では利用不可）によって、遺伝的に正常なマウスの値まで低減することが可能であった。添付のデータは図1に要約されており、内容に関して、マウスモデルの観点から、ヒトおよび動物に使用するための本発明の発見および特許請求の範囲を裏付けている。

30

40

【実施例2】

【0041】

ニコチンアミドを与えたときの腸内微生物叢内の変化を分析するため、ゲノムDNAを従来技術に従って糞便試料から単離して定量し、細菌の16-S-rRNA遺伝子の可変領域を増幅し、同定のために好適なマーキングをアンプリコンに付与する。アンプリコンのハイスループットパイロシーケンスの後、得られたすべての配列に品質管理を施し、細菌のDNA配列の精選されたデータベースとの多段階の配列比較によって分析する。処

50

置した個体と未処置の個体との糞便試料中の腸内微生物叢の、得られた代表的な断面の差異を、観察および測定した各個体の疾患の症状ならびに関連する遺伝因子と関係づけ、評価する。

【0042】

図2は、クローン病活動性指数（CDAI）の動向、すなわち、クローン病に罹患し、従来どおりに製剤化した高用量のニコチンアミドで4週間（1日2×600mg）処置した患者3名の、種々の疾患パラメーターから確認された基準によって計算した疾患活動性を示す。CDAI値<150が寛解に相当する。クローン病に罹患している患者3名の全員が、ニコチンアミドの投与に明らかな反応を示し、そのうち2名が治療期間内に寛解に至った。

【0043】

マウスの大腸炎モデルについてHashimotoら、2012（Nature 487：477）が記載した、根底にあるニコチンアミドの機序および有益な効果（実施例1を参照）は、この実施例において見られるように、ヒトクローン病患者のニコチンアミド補充に反応しての臨床的な改善と一致している。

【実施例3】

【0044】

驚くべきことに、クローン病および潰瘍性大腸炎に罹患している患者の腸粘膜内のACE2発現は、健常な個体の値との有意差はなかった（データは示さず）が、粘膜の炎症性部位でのBAT1の発現は、きわめて大幅にかつ統計的に有意に（P値<0.05）低減していたことがわかった（表1を参照）。さらに、異なる発生源の腸炎症に罹患している患者の対照試料（いわゆる疾患特異性対照）は、入院させた正常人（HN）と有意な偏差を示さなかった。これは、一般の非特異的な欠乏性疾患またはアミノ酸欠乏症に対しては裏付けとならないが、本発明において新規に観察された、IBDの処置におけるニコチン酸、ニコチンアミドおよび／またはトリプトファン（ならびに関連化合物）の特異的な効果については裏付けとなる。

【0045】

【表1】

	クローン病		潰瘍性大腸炎		すべてのIBD試料	すべての炎症性IBD試料	すべての非炎症性IBD試料	他の腸疾患の炎症性試料	他の腸疾患の非炎症性試料
	炎症性	非炎症性	炎症性	非炎症性					
HNに対する偏差	-8.77	-1.55	-31.02	-2.15	-5.44	-18.43	-1.92	-1.52	-1.01
P値	0.0002	0.2772	0.0000	0.0207	0.0000	0.0000	0.0485	0.1093	0.3632

表1:基準値(入院させた正常対照、HN、すなわち腸炎症ではない患者の試料から)に対するBAT1のmRNA発現

【0046】

この実施例で観察したIBD患者において観察されたトリプトファントランスポーターの欠乏は、トリプトファントランスポーターの欠乏が原因で大腸炎が増悪したマウスにおける状況に相当する（Hashimotoら、2012、Nature 487：477；実施例1を参照）。

【実施例4】

【0047】

腸上皮を標的としてニコチンアミドを送達するための制御放出製剤の、利点の特性を明らかにするために、概念実証試験を、マウスのデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）大腸炎モデルで実施した。DSS大腸炎は、ヒト炎症性腸疾患の薬物候補の有効性を評価す

るための標準大腸炎モデルである。D S S大腸炎において通常有効な処置対照として、5-アミノサリチル酸（5-ASA：5-aminosalicylic acid）を使用した。5-ASAは、生理的pHでほぼ不溶性であり、したがって、0.5%メチルセルロース中懸濁剤として投与した。

【0048】

胃腸管には、長さ、通過時間およびpH環境について種特異的な差異があるため、制御放出製剤を、処置しようとする生体に適合させた。マウスの胃腸管のパラメーター（Koopmanら、1978、Lab. Anim. 12:223; McConnellら、2008、J. Pharm. Pharmacol. 60:63）に基づき、マウスに特異的な製剤を、マウスでの概念実証試験用に製造した。

10

【0049】

制御放出ミニ錠剤を、99%NAMと、滑沢剤として1%ステアリン酸マグネシウム（両者ともCaelo製、Hilden, Germany）とを混合した粉末で製造した。ブレンドしてから、粉体流（安息角； $<35^{\circ}$ ）および粒度分布（レーザー回折；主な粒子画分：100~200 μm ）について粉末の特性を決定して、良好な粉体流を確実に得た。次いで、ミニ錠剤を回転式プレス機で製造し、フィルムを通してNAMを拡散させることによってNAMの放出を制御するために、水不溶性のポリマーKollidon SR 30D（BASF, Ludwigshafen, Germany）のフィルムでコーティングした。コーティング製剤は次のとおりとした。Kollicoat SR 20D（49.9%）、モノステアリン酸グリセリン60（0.743%）、プロピレングリコール（0.743%）、赤色酸化鉄（0.4%）、ポリソルベート80（0.314%）、および水を100%まで。

20

【0050】

モノステアリン酸グリセリン60（Caelo）を半量の水と一緒に80℃まで加熱し、Ultraturrax（IKA, Staufen, Germany）で乳化した。次に、赤色酸化鉄（Caelo）を添加し、さらに5分間分散させた（第1の容器）。ポリソルベート80（Caelo）、プロピレングリコール（Caelo）およびポリマー分散液を組み合わせ第2の容器に入れ、マグネチックスターラーで攪拌した。第1の容器の冷ました（ $<30^{\circ}\text{C}$ ）エマルジョンを、第2の容器のポリマー分散液と組み合わせ、残りの水を添加した。分散液を1時間攪拌してから濾過した（ $<500 \mu\text{m}$ ）。ミニ錠剤を、バッチサイズ50gで流動床装置（MycroLab, Huttlin, Schopfhelm, Germany）に入れ、液体の送り速度約1ml/minおよび噴霧圧0.7 barにてコーティングした。噴霧する前に、錠剤を体積流量8 m^3 で45℃にて予熱した。噴霧中に、体積流量を45℃で16 m^3 まで増加した。生成物の温度は約38℃と観察された。噴霧後、錠剤を16 m^3 でさらに10分間45℃で流動させ、硬化させた。最終工程段階で、加熱のスイッチを切り、錠剤床を $<30^{\circ}\text{C}$ まで冷却して固着を回避した。錠剤を6.2 $\pm$ 0.04 mg/cm²でコーティングした。薬物放出を、パドル装置（DT6, Erweka, Heusenstamm, Germany）内でPh. Eur.に従って50 rpmで測定した。リン酸緩衝液（pH 4）を溶出溶媒として使用した。その理由は、ほぼこのpHの弱酸性の胃腸液がマウスにおいて想定されるからである（McConnellら、2008、J. Pharm. Pharmacol. 60:63~70）。薬物の濃度をUV吸収によって262 nmで測定した。非コーティング錠剤は、錠剤のサイズが極小で、ニコチンアミドの水溶解性が高いため、瞬時の薬物放出を示した。Kollidon SRコーティングを使用して、薬物放出がマウスの小腸内の標的部位に及ぶように最適化した（少なくとも15分の時間のずれ、3時間にわたる持続的な薬物放出）。ミニ錠剤をトリプトファン/ナイアシン不含の食餌粉末と均質に混合した。長さ約2 cmで直径1 cmのペレットを最小限の量の滅菌水で形成し、単回使用のアリコートにして-20℃で凍結して貯蔵し、毎日新たに解凍してマウスに給餌した。

30

40

【0051】

雄C57BL/6Jマウス（特定病原体未感染；Taconic Europe, Ry

50

、Denmark) を6～7週齢で試験設備に入れ、2週間順化させた。順化段階中の食餌はAltromin製 (Lage, Germany) のAltromin 1324とした。2週間の順化の後、食餌を、トリプトファンもニコチン酸もニコチンアミドも不含の、Ssniff製 (Soest, Germany) の特別仕様の食餌 (Trp/Nia/NAM不含の食餌) に変更した。食餌を変更した日に、以下に明細に記載するとおりの処置レジメンを開始した。Trp/Nia/NAM不含の食餌と処置との両方を、マウスを処分するまで施した。Trp/Nia/NAM不含の食餌開始の12日後、マウスに1.5% DSS (MP Biomedicals, Illkirch, France) の飲料水溶液で4日間負荷し、その後処分した。

【0052】

処置レジメンを、それぞれマウス10匹ずつの4グループで実施し、以下のように処置した。

グループ1：0.25mLのビヒクル (滅菌水) の毎日強制経口投与。

グループ2：0.25mLのニコチンアミド (Cat. No. 4488; Caelo) の滅菌水溶液 (6mg/mL、最終用量：約60mg/kg体重) の毎日強制経口投与。

グループ3：食餌中に均質に分散した制御放出NAMミニ錠剤 (最終用量：マウス1匹につき1日2.5gの飼料摂取を基準にして、約60mg/kg体重)。

グループ4：0.5%メチルセルロース (Cat. No. M7140, Sigma-Aldrich) 中に濃度15mg/mLで懸濁した0.25mLの5-アミノサリチル酸 (5-ASA; Cat. No. A3537, Sigma-Aldrich, Brondby, Denmark) の毎日強制経口投与 (最終用量：約150mg/kg体重)。

投与溶液は、毎日投与直前に同じストック溶液から新たに調製した。

【0053】

食餌の変更の直前、DSS大腸炎の誘発の前、および処分の前に、微生物叢分析のため、2つの糞塊に相当する新鮮な糞便試料を各動物から採取した。糞便試料を直ちに液体窒素で瞬間凍結し、-80℃で貯蔵した。瞬間凍結を実施して、周囲条件で多様な増殖特性をもつ種々の細菌間の比率を保持した。

【0054】

動物を処分した直後、結腸を0.9%生理食塩水で洗浄し、「スイスロール」試料を調製した (MoolenbeekおよびRuitenberg, 1981: Lab. Anim. 15:57)。要するに、標準手順に従って、洗浄した結腸を長軸方向に切り開き、絨毛を外側に向けて巻き上げ、得られたロールをホルムアルデヒド中に固定し、パラフィンに包埋した。「スイスロール」の調製により、同じ切片スライドで、完全な結腸粘膜の長軸方向の定量的、組織学的評価が可能となる。標準手順に従って、切片をヘマトキシリン-エオシンで染色した。独立の盲検化された研究者2名が試料を評価し、3つのパラメーターに基づく以下のシステムに従ってスコアをつけた。

【0055】

炎症の重症度：0、粘膜固有層内に炎症性細胞がきわめて少ない；1、粘膜固有層内に顆粒球の数が多い、粘膜下浮腫；2、粘膜下層中に伸展する炎症性細胞の集密；3、炎症性浸潤の経壁伸展。

【0056】

陰窩損傷：0、陰窩が無傷；1、底部の3分の1の欠損；2、底部の3分の2の欠損；3、陰窩全体の欠損；4、びらんを伴う上皮表面の変化；5、融合性びらん。

【0057】

潰瘍化：0、潰瘍なし；1、潰瘍化の病巣が1つまたは2つ；2、潰瘍化の病巣が3つまたは4つ；3、融合性または伸展性潰瘍化。

【0058】

組織学的スコアの最大値は3+5+3=11とした。

完全な結腸粘膜の盲検化した組織学的評価を、特許請求したNAM製剤の治療効果のハードエンドポイントとして選んだ。

10

20

30

40

50

【0059】

4グループの組織学的スコアを図3に、平均および標準偏差として示している。最適に保存し調製した結腸試料および切片のみを使用した（以下の記載の括弧内に表した動物の数）。スコアは以下のとおりであった。

グループ1（水対照）：6.25±1.39（n=8）、

グループ2（NAM水溶液）：5.14±1.07（n=7）、

グループ3（NAM制御放出錠剤）：3.38±0.92（n=8）、

グループ4（5-ASA）：6.50±1.60（n=8）。

【0060】

NAMの飲料水溶液は、組織学的炎症スコアにおいて、水対照と比較して低減の傾向を導いたのみであった（ $p=0.1$ ）が、高い有意差が、NAM制御放出錠剤と水対照グループとの間に（ $p<0.001$ ）見られ、さらに、重要なことであるが、NAMの水溶液とNAM制御放出との間にも（ $p<0.01$ ）見られた。興味深いことに、処置対照の5-ASA（通常のDSS大腸炎を緩和し、ヒトにおける炎症性腸疾患の治療に広く使用されている）は、トリプトファンもナイアシンも不在ではDSS大腸炎を緩和することが不可能であった（図3）。これらの発見は、NAMに対する、腸内微生物叢および大腸炎に対する有益な効果は、強制経口投与による全身性送達では最適に利用されないが、むしろ腸内での制御放出製剤では最適に利用され、NAMの主要な効果は腸内の局所的環境に対するものである、という本発明の概念を裏付けるものである。

【実施例5】

【0061】

腸上皮を標的としてニコチンアミドを送達するための制御放出製剤の、さらなる特性を明らかにするために、第2の概念実証試験を、マウスのデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）大腸炎モデルで実施した。この第2の、より大規模な概念実証試験において、NAMの制御放出顆粒製剤を3種の異なる用量で試験した。DSS大腸炎に通常有効な処置対照として、5-アミノサリチル酸を含有する制御放出顆粒剤を使用した（5-ASA顆粒剤；PENTASA、Ferring Pharmaceuticals、Saint-Prex、Switzerland）。

【0062】

NAMの制御放出製剤は、25%ニコチンアミド、70%第二リン酸カルシウムおよび5%ポビドンK30の粒状体である。平均粒径は234 μm とした。次に粒状体をエチルセルロース7でフィルムコーティングして、30%重量増加し、平均粒径を640 μm にした。ふるい分けをして径が355 μm 未満の粒子を除去した。対照顆粒剤ではNAMを同量の第二リン酸カルシウムに置換した。

【0063】

雄C57BL/6Jマウス（特定病原体未感染；Charles River Laboratories、Saint-Germain-sur-l'Arbresle、France）を>12週齢で試験設備に入れ、その微生物叢を強化し、安定させるために、1.5か月間順化させた。順化段階中の食餌は、SAFE製（Scientific Animal Food and Engineering、Augy、France）の食餌A4とした。順化の後、食餌を、トリプトファンもニコチン酸もニコチンアミドも不含の、Ssniff製（Soest、Germany）の特別仕様の食餌（Trp/Nia/NAM不含の食餌）に変更した。Trp/Nia/NAM不含の食餌を粉末として得て、これを使用して、顆粒剤なし、NAMも5-ASAも不含の対照顆粒剤、NAM顆粒剤、または5-ASA顆粒剤のいずれかを伴う飼料ペレットを調製した。顆粒剤を食餌中に均質に分散した。長さ約2cmで直径1cmの飼料ペレットを最小限の量の滅菌水で形成し、単回使用のアリコートにして-20℃で凍結して貯蔵し、毎日新たに解凍してマウスに給餌した。飼料ペレットの顆粒剤含量は、体重30gおよび1日3gの飼料摂取を基準に計算して、次のように定義した。

【0064】

5-ASA顆粒剤（5-ASAの標的用量：150mg/kg体重、5-ASA含量：52%）：飼料3g中5-ASA4.5mgが必要、飼料3g中顆粒剤8.65mgが必要、飼料1kgにつき顆粒剤2.88gを添加。他の顆粒剤の固定用量を同様に計算した。

【0065】

NAM顆粒剤（NAMの標的用量：30、60または120mg/kg体重、NAM含量：19.1%）：30mg/kg NAMには、飼料1kgにつき顆粒剤1.57g、60mg/kg NAMには、飼料1kgにつき顆粒剤3.14g、120mg/kg NAMには、飼料1kgにつき顆粒剤6.28g。

【0066】

対照顆粒剤を、120mg/kg用量グループのNAM顆粒剤と同じ比にて、すなわち飼料1kgにつき顆粒剤6.28gを飼料に添加した。

【0067】

食餌を、顆粒剤含有または不含でTrp/Nia/NAM不含の食餌に変更した日に、強制経口投与処置レジメンを、下記で特定したグループ1および2について開始した。顆粒剤含有または不含でTrp/Nia/NAM不含の食餌と、強制投与処置との両方を、マウスを処分するまで施した。Trp/Nia/NAM不含の食餌開始の12日後、マウスに1.5%DSS（TDB Consultancy, Uppsala, Sweden）の飲料水溶液で5日間負荷し、さらに2日間通常の飲料水を与えた後に処分した。

【0068】

処置レジメンを、それぞれマウス10匹ずつの7グループで実施し、次のように処置した。

グループ1：0.1mLのビヒクル（滅菌水）の毎日強制経口投与。

グループ2：0.1mLのNAM（Sigma-Aldrich、Brøndby、Denmark）滅菌水溶液（18mg/mL、最終用量：約60mg/kg体重）の毎日強制経口投与。

グループ3：食餌中対照顆粒剤（顆粒剤含量はグループ6に相当）。

グループ4：食餌中NAM顆粒剤（最終用量：30mg/kg体重）。

グループ5：食餌中NAM顆粒剤（最終用量：60mg/kg体重）。

グループ6：食餌中NAM顆粒剤（最終用量：120mg/kg体重）。

グループ7：食餌中5-ASA顆粒剤（最終用量：150mg/kg体重）。

【0069】

投与溶液は、毎日投与直前に同じストック溶液から新たに調製した。

【0070】

食餌の変更の直前、DSS大腸炎の誘発の前、および処分の前に、微生物叢分析のため、2つの糞塊に相当する新鮮な糞便試料を各動物から採取した。糞便試料を直ちに液体窒素で瞬間凍結し、-80℃で貯蔵した。瞬間凍結を実施して、周囲条件で多様な増殖特性をもつ種々の細菌間の比率を保持した。

【0071】

DSS負荷の開始から、マウスを、その全般的な健康状態および疾患活動性指数（DAI）に適切なパラメーター、すなわち下痢および可視の糞便の血液について、毎日モニターした。処分後、結腸の炎症の肉眼でのスコア付けを実施した。DAIを、Melgarrá、2005（Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288:G1328）に従って計算したが、その理論上の最大値は9である。表2および図4にまとめたDAIのデータは、実施例4のデータと同様に、NAMの水溶液はこの実験の設定における改善に対して有意でない傾向しか示さなかったが、NAMの制御放出製剤（NAM顆粒剤）は有意差が高く用量依存的なDAIの低減をもたらしたことを示す。重要なことであるが、60mg/kg NAMを投与したNAM顆粒剤のグループは、60mg/kg NAMの水溶液を投与したグループよりDAIが顕著に低かった（表2）。5-ASA顆粒剤は、治療有効性に対して有意な傾向を示さなかった。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

【 表 2 】

グループ	DAI	統計的有意差
水	5.70±0.24	適用不可
NAMの水溶液 (60mg/kg)	5.40±0.25	有意差なしvs.水
対照顆粒剤	5.00±0.25	適用不可
NAM顆粒剤 (30mg/kg)	3.56±0.35	p=0.03vs.対照顆粒剤
NAM顆粒剤 (60mg/kg)	2.11±0.35	p<0.01vs.対照顆粒剤; p<0.001vs.NAMの水溶液(60mg/kg)
NAM顆粒剤 (120mg/kg)	1.90±0.23	p<0.001vs.対照顆粒剤
5-ASA顆粒剤 (150mg/kg)	4.67±0.42	有意差なしvs.水または対照顆粒剤

10

表2:疾患活動性指数(DAI)データおよびその統計的評価。

【 0 0 7 3 】

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は多形核好中性顆粒球の顆粒中に含有される酵素で、その量は、好中球動員の定量的な組織マーカーであり、DSS大腸炎において好中球が媒介する急性結腸炎症を定量することを間接的に可能にする。

20

【 0 0 7 4 】

マウスの結腸組織のMPO含量をアッセイするため、代表結腸組織試料を、Hycult MPOマウスELISAキット (Cat. No. HK210; Hycult Biotech; Clinisciencences, Nanterre, France) で、製造元の推奨に従って分析した。

【 0 0 7 5 】

NAMの水溶液は、MPOの低減に対して有意でない傾向しか示さなかったが、MPOレベルの有意な低減が、NAM顆粒剤を60および120mg/kgの用量で投与したマウスのグループに観察された。やはりNAMの有意な治療効果は、制御放出製剤として投与されたときにのみ示されている (表3、図5)。

30

【 0 0 7 6 】

【 表 3 】

グループ	MPO	統計的有意差
水	236.41±9.1	適用不可
NAMの水溶液 (60mg/kg)	219.71±12.16	有意差なしvs.水
対照顆粒剤	240.25±5.18	適用不可
NAM顆粒剤 (30mg/kg)	234.61±21.96	有意差なしvs.対照顆粒剤
NAM顆粒剤 (60mg/kg)	212.42±10.08	p<0.05(p=0.036)vs.対照顆粒剤
NAM顆粒剤 (120mg/kg)	202.76±4.97	p<0.001vs.対照顆粒剤
5-ASA顆粒剤 (150mg/kg)	232.69±6.73	有意差なしvs.水または対照顆粒剤

40

表3:結腸内ミエロペルオキシダーゼ(MPO)レベルの定量および統計分析

【 実施例 6 】

【 0 0 7 7 】

50

実施例 4 および 5 に記載した両動物試験の結果が、NAM 制御放出製剤の有意な治療有効性を示唆したため、実施例 5 に記載した試験のマウスの腸内微生物叢を、Hashimoto ら、2012 (Nature 487: 477) に記載されているものとまさに同じ方法および装置 (16srDNA 系統樹および 454 タグシーケンス) で分析した。制御放出顆粒剤を投与した 5 グループ (グループ 3 ~ 7) から、動物 8 匹を盲検的に選択してから実施例 5 に記載した疾患パラメーターを分析した。これらのすべてのマウスの糞便試料を、栄養介入前 (基準点としての、正常な、腸炎非惹起性の細菌叢) と、Trp / Nia / NAM 不含の食餌開始の 12 日後 (DSS 負荷の直前、実施例 5 を参照) とで比較した。

【0078】

図 6 は、12 日間の Trp / Nia / NAM 不含の食餌によって、優勢な門が Bacteroidetes 門から Firmicutes 門へ劇的に転換したことを示す。これは NAM 制御放出顆粒剤によって部分的および用量依存的に防止することができた。5-A SA 制御放出顆粒剤は同じ向きの傾向を示した (図 6)。さらに、細菌グループのより詳細な類似度百分率分析 (SIMPER) によって、NAM 制御放出が、未分類の Bacteroidales 目および Bacteroidales 目 Paraprevotella 属の増殖を誘導したことが示された (図 7 ; 棒の、線影をつけた部分)。

【0079】

Bacteroidales 目に属する有益な共生者は、哺乳動物の消化管内の圧倒的に代表的な属に属し、栄養素の処理のために重要である。なぜなら、これは食事性の多糖を加水分解し、短鎖脂肪酸 (SCFA) に変換し、それを宿主が利用することができるからである。NAM 制御放出顆粒剤による処置の下で増殖する Bacteroidales 群に見られるものに最も相同性の高いゲノムは、かかる SCFA を産生するものに属していた。特に関連性が高いのは、これらの有益な共生者の優勢およびその結果としての腸内 SCFA のレベルが、ヒト炎症性腸疾患においては減少するということである (Frank ら、2007、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 13780)。プレバイオティクスまたはプロバイオティクスおよびこれらの SCFA 生成物による、かかる微生物叢の増殖は、齧歯類の DSS 大腸炎において治療的に有効であると示されている (Osman ら、2006、BMC Gastroenterol. 28; 6: 31; Maslowski ら、2009、Nature 461: 1282)。さらに、Bacteroidales は免疫調節性の炭水化物構造物 (多糖 A) を分泌することがわかっており、これは炎症反応を抑制することができる (Mazmanian ら、2008、Nature 453: 620)。

【0080】

要約すると、腸内での NAM の制御放出は、有益な微生物叢の用量依存的な増加をもたらし、大腸炎を軽減する。

【0081】

上記の実施例は本発明を説明する役目をするが、その範囲を限定するものではない。

10

20

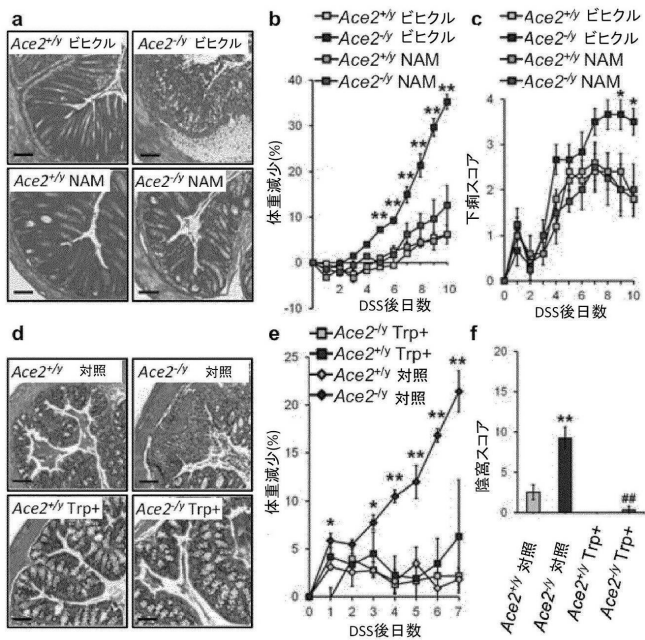
30

40

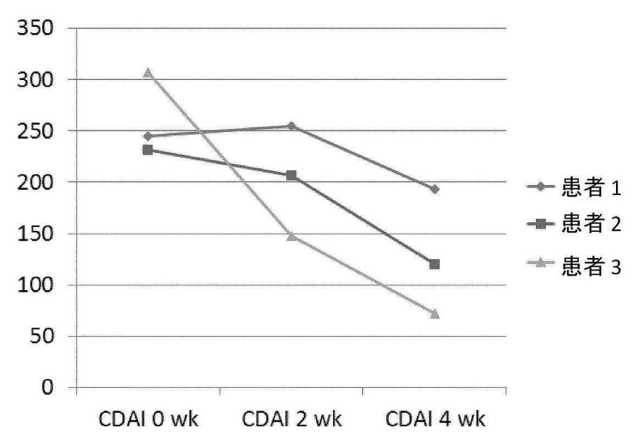
50

【図面】

【図 1】



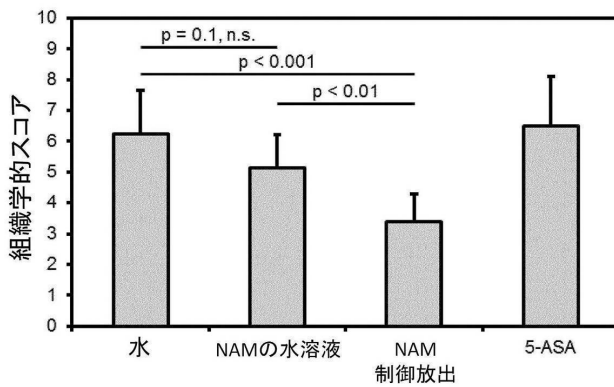
【図 2】



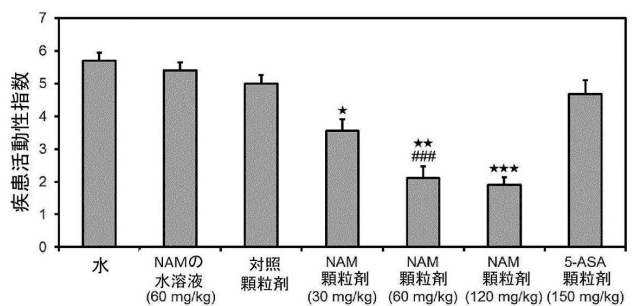
10

20

【図 3】



【図 4】

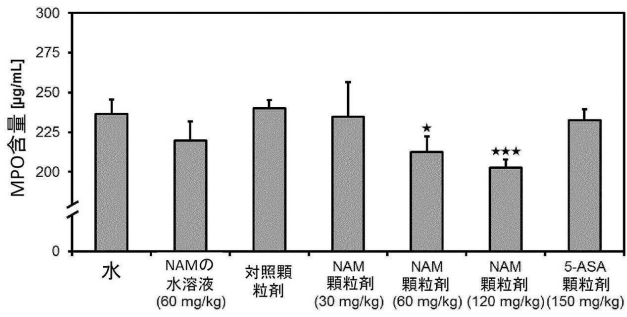


30

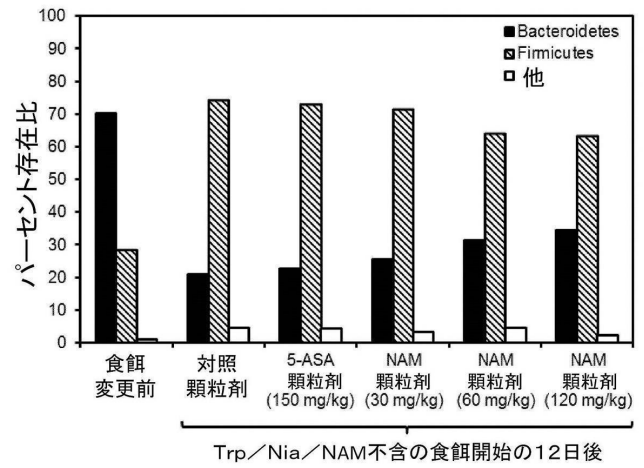
40

50

【図 5】

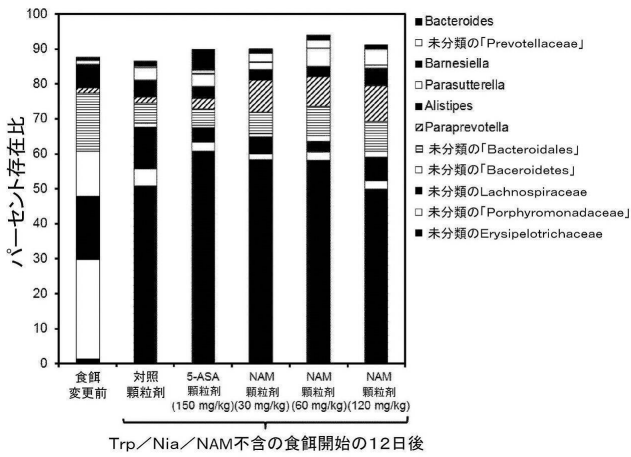


【図 6】



10

【図 7】



20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和3年11月11日(2021.11.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ニコチン酸、ニコチンアミド、ニコチン酸エステル、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸(NADP)、NADまたはNADPの生合成における中間体、トリプトファン、トリプトファンジペプチド、またはこれらの組合せから選択される活性物質を含み、
改変しようとする腸内微生物叢が位置する回腸終末部、結腸またはその両方において局部的に有効であるように前記活性物質を放出するように製剤化された、組成物。

【請求項2】

ニコチン酸、ニコチンアミド、ニコチン酸エステル、トリプトファン、トリプトファンジペプチド、またはこれらの組合せから選択される活性物質を含み、
改変しようとする腸内微生物叢が位置する回腸終末部、結腸またはその両方において局部的に有効であるように前記活性物質を選択的に放出するように製剤化された、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

回腸終末部および／または結腸において特定の局所に有効であるように前記活性物質を遅延放出する、経口投与用に製剤化された、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

回腸終末部および／または結腸において特定の局所に有効であるように前記活性物質を制御放出する、経口投与用に製剤化された、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項5】

ニコチンアミドを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

トリプトファンジペプチドを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

小腸の炎症性疾患および／または大腸の疾患の治療または予防、および／もしくは結腸癌の予防における使用、ならびに／または
腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下から生じる疾患の治療または予防における使用のために、
活性物質を遅延放出または制御放出する、経口投与用に製剤化された、請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

結腸または回腸囊における新(直腸)(neo(rectal))投与用に製剤化された、請求項1、2、5および6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

大腸の炎症性疾患または回腸囊炎の治療または予防における使用のための、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

最終剤形あたり1～3000mgの活性物質含量での経口適用用に製剤化されることを特徴とする、請求項7に記載の組成物。

【請求項11】

最終剤形あたり100～1000mgの活性物質含量での経口適用用に製剤化されることを特徴とする、請求項10に記載の組成物。

【請求項 1 2】

直腸または回腸囊における炎症の局所的治療における使用のために経直腸適用に製剤化されることを特徴とする、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

最終剤形あたり 1 0 ～ 5 0 0 0 m g の活性物質含量での経直腸適用用に製剤化されることを特徴とする、請求項 8、9 および 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

ニコチン酸および／またはニコチンアミドに加えて、アセチルサリチル酸および／またはプロスタグランジン D 2 拮抗薬を含有することを特徴とする、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 1 5】

(a) 炎症性腸疾患の治療または予防における使用のため、

(b) 結腸癌の治療または予防における使用のため、または

(c) 腸内微生物叢内の変化および／または腸内微生物叢と腸との相互作用の低下から生じる体器官疾患の治療または予防における使用のための、

ここで、該疾患は、

アトピー性疾患および／または炎症性要素を伴う代謝性疾患に由来するものである、および／または、

皮膚アレルギー、アトピー性湿疹、乾癬、嚢胞性線維症、喘息、C O P D、冠状動脈性心疾患、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、糖尿病および脂肪症からなる群から選択される、

20

請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

炎症性腸疾患の治療または予防における使用のための、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎またはクローン病である、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

(a) 小腸の炎症性疾患および／または大腸の疾患の治療または予防、および／または結腸癌の予防、および／または腸内微生物叢内を少ない炎症促進効果を有するようにまたは抗炎症性であるように変化させることによる他の疾患の治療および／または予防、および／または腸内微生物叢の病理学的な変化の治療および／または予防において、または、

30

(b) 病原細菌の数の低減、有益な細菌に対する病原細菌の比の低減、微生物叢の多様性の増加、微生物叢が腸内に誘発する炎症の量の低減、および／または微生物叢のエンテロタイプにおける病理学的な変化の部分的または完全な回復により、健康によい効果を与える腸内微生物叢内の変化をもたらすことによる、

腸内微生物叢によい影響を及ぼすことに使用するための、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【外国語明細書】

2022017332000012.pdf

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	38/05	(2006.01)	A 6 1 K	38/05	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
			A 6 1 P	9/10	1 0 3
			A 6 1 P	29/00	

(72)発明者 ゼーゲルト, ディルク

ドイツ連邦共和国 2 4 2 2 9 デーニッセンハーゲン, パウルーシュレーダーシュトラッセ
3 0

F ターム (参考)

4C084 AA02 AA19 BA01 BA08 BA23 CA59 MA02 MA52 NA05 NA14
ZA36 ZA45 ZA59 ZA62 ZA68 ZA89 ZB11 ZB13 ZB26 ZC33 ZC35
4C086 AA01 AA02 BC14 BC17 BC19 DA17 EA18 MA01 MA02 MA03
MA04 MA52 NA14 NA15 ZA36 ZA45 ZA59 ZA62 ZA68 ZA89 ZB11
ZB13 ZB26 ZC33 ZC35