

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5057353号  
(P5057353)

(45) 発行日 平成24年10月24日 (2012.10.24)

(24) 登録日 平成24年8月10日 (2012.8.10)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 31/455 (2006.01)	A 6 1 K 31/455
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02

請求項の数 5 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2002-571051 (P2002-571051)	(73) 特許権者	500505968
(86) (22) 出願日	平成14年3月8日 (2002.3.8)		ユニバーシティー オブ ケンタッキー
(65) 公表番号	特表2004-519488 (P2004-519488A)		リサーチ ファウンデーション
(43) 公表日	平成16年7月2日 (2004.7.2)		アメリカ合衆国 ケンタッキー、レキシントン、
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/007256		アドミニストレーション ビルディング 207
(87) 国際公開番号	W02002/072092		
(87) 国際公開日	平成14年9月19日 (2002.9.19)		
審査請求日	平成16年6月30日 (2004.6.30)		
審判番号	不服2009-3384 (P2009-3384/J1)		
審判請求日	平成21年2月16日 (2009.2.16)		
(31) 優先権主張番号	60/274,349		
(32) 優先日	平成13年3月8日 (2001.3.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニコチン酸化合物を使用するレプチンレベル増大のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全層の創傷を患う対象体におけるレプチンレベルを増大させるための医薬組成物であって、アルキル鎖が 8 ~ 22 の炭素原子を含むニコチン酸アルキルエステルを含む医薬組成物。

【請求項 2】

前記アルキル鎖が、12 又は 14 の炭素原子を含む請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

経口投与用製剤である請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

局所投与用製剤である請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

一種類以上のニコチン酸アルキルエステルを含む請求項 1 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2001年3月8日に出願された、仮出願番号 60 / 274 , 349 に基づく優先権を主張し、これを参考として援用する。

【0002】

## (発明の分野)

本発明は、レプチン変調型経路の調節におけるナイアシン誘導体およびナイアシンの使用に関する。特に、ニコチン酸エステルのようなナイアシンおよびその誘導体、ラウリルニコチン酸エステルは、特に、以下に議論されるような波及効果を伴い、レプチンの産生を刺激する。

## 【背景技術】

## 【0003】

ob遺伝子によってコードされる167アミノ酸のタンパク質、レプチンは、肥満傾向 (obesity prone) 系統 (すなわち、「ob/ob」マウス) における分子の欠損を同定するための研究の過程で、同定された。レプチンは、白色脂肪組織の大部分で産生されることが見出されており、褐色脂肪組織ではごくわずかしき見出されていない。この分子に関する例示的な特許文献としては、米国特許第6,132,724号;同第6,124,448号;同第6,124,439号;同第6,068,976号;同第6,048,837号および同第5,795,909号があり、これらの全ては、本明細書中に参考として援用される。

## 【0004】

レプチンについては最初の報告は、レプチンが脂肪細胞から得られる、シグナル伝達分子であり、食物の取り込みを制限しそしてエネルギー消費量を増加する、すなわち「アジポサット (adiposatt)」であることを示唆した。このことを支持する証拠として、レプチンを注射された、遺伝的な肥満または食餌に誘導される肥満が明らかなげっ歯類において観察される体重の減少、および代謝制御の改善が挙げられる。ob遺伝子に変異を持つ、ob/obマウスにおいては、細胞内で分解される不完全なレプチン分子の合成を導き、レプチンの効果は特に明瞭となる。ob/obマウスは肥満体で、糖尿病でそして生殖不能であり、そして活動性、代謝、および体温の低下を示す。さらに、レプチン欠損型ob/obマウスは、創傷治癒の深刻な遅延を被る。全身的にまたは局所的に投与されたレプチンは、このモデルにおける創傷の再上皮化を改良することが示された。例えば、Frankら、J. Clin. Invest. 106:501-509 (2000) を参照のこと。このようにして、ob/obマウスは、損われた創傷治癒を元に戻すための能力について薬品を試験するためのモデル系として使用されてきた。

## 【0005】

上で議論された、レプチン欠損型マウスでの効果に加えて、レプチンは、野生型マウスにおいて再上皮化を顕著に促進した。さらに、レプチン経路における下流調節因子である、STAT3およびペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター (以後「PPAR」という) は、皮膚のホメオスタシスに関与する。Komuvresら、J. Invest. Dermatol. 115:361-267 (2000) を参照のこと。STAT3は、毛包周期および創傷治癒を含む、皮膚の再形成において必須の役割を果たすことが示されてきた。PPAR 活性化因子が、上皮の分化を含む細胞増殖を、正常化すること、および上皮透過性障壁 (epidermal permeability barrier) の発達を促進することもまた公知である。Hanleyら、J. Clin. Inv. 100:705-712 (1997) を参照のこと。最近、PPAR 活性化因子が、マウスの皮膚腫瘍発癌補助作用を阻害することが実証されてきた。このことは、PPAR が、皮膚において生理的な役割を有することと一致する。Thuillierら、Mol. Carcinogenesis 29:134-142 (2000) を参照のこと。

## 【0006】

レプチンについてのさらなる研究は、レプチン分子が、脂質形成、脂肪分解、およびエネルギー代謝に関係するいくつかの脂肪特異的遺伝子の転写を変化させることを明らかにしてきた。レプチン分子はまた、白色脂肪組織においてアポトーシスを引き起こすようである。大部分の分子の代謝効果は、中枢神経系および末梢組織に位置するレセプターとの特異的相互作用に起因するようである。このレセプターは同定され、そしてこれはクラスIサイトカインレセプターであり、IL-2レセプター、インターフェロンレセプターお

よび成長ホルモンレセプターを含むファミリーに属する。簡単に述べると、レプチンレセプターは、レプチンシグナルを3つのSTAT分子、STAT3、5、および6（まとめて、「脂肪STATS」といわれる）に伝達する。

#### 【0007】

レプチンについて一般に認められた見解は、レプチンの主要な役割は、食物の摂取の制御を介して肥満を防ぐことおよび視床下部（hypothalamic）中枢に対する作用を介して熱発生を防ぐことである。しかし、最近の証拠は、非脂肪組織における脂肪酸の過剰蓄積は、レプチンが仲介する酸化の調節により妨げられ得るという理由により、レプチンがさらなる役割を有し得ること、すなわち抗脂肪症活性を示し得ることを示唆する。レプチンは、脂肪酸の酸化に關与する酵素を増加させ、そしてこれまで知られていない型の脂肪分解を刺激し、ここでグリセロールは、遊離脂肪酸の比例的な放出なしに放出される。

10

#### 【0008】

種々のレプチンレセプターのアイソフォームは、全身にわたって発現される。このことは、レプチンが、神経外組織に対して、さらなる生理学的な機能を有することを示唆する。レプチンに対する組織の応答性を評価する研究は、もしあれば、レプチンが、糖質の（glucidic）および脂質の代謝、ならびにいくつかの酵素の発現に対してどのような効果を有するのかを決定することにより行われた。所定の組織に対するレプチンの直接的な効果が、観察される場合、これは、ホルモン/レセプター結合から続く、シグナル伝達機構の迅速な誘導を暗示する。特に、作用の機構は、以下のように要約し得る：レプチンは、脂肪組織においてSTAT3を活性化し、レプチンのそのレセプターへの結合は、レセプターのオリゴマー化を導き、そしてJAKを活性化し、次々にSTATリン酸化を導く；リン酸化されたSTATSは、2量体化し、そして核の中に移動し、核の中で、標的遺伝子を活性化する。簡単に言うと：

20

(i) レプチンは、STAT3を活性化し、そしてPPARの活性を増加する；

(ii) PPAR / PPREは、肝臓細胞において、アポA-Iの発現を誘導する；

(iii) STAT3 / PPAR は、皮膚のホメオスタシスに必須である；

(iv) PPAR 活性化因子は、マウスの皮膚腫瘍発癌補助作用を阻害する。

#### 【0009】

例えば、Bendinelliら、Mol. Cell Endocrin 168:11-20 (2000)；Ungerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2327-2332 (1992)；Petersら、J. Biol. Chem. 272:27307-27312 (1997)；Hanleyら、J. Clin. Invest. 100:705-712 (1997)；Sanoら、EMBO J 18:4657-4666 (1999)；Thuillierら、Mol. Carcin 29:134-142 (2000)。

30

#### 【0010】

エネルギー調節の役割に加えて、レプチンはまた、内分泌および免疫機能を調節する。感染および炎症の間、レプチンのレベルは、急激に増加し、そして炎症に対する宿主の応答における保護因子となり得る。レプチンの欠乏は、感染性および炎症性の刺激に対する感受性を増強し、そしてサイトカイン産生の調節不全と関連する。Faggioniら、FASEB J. 15:2565-2571 (2001)を参照のこと。

40

#### 【0011】

加えて、前述の経路はまた、皮膚のホメオスタシスおよび再構築も導き得ることが、仮定され得、この経路は次々に、上皮の障壁の発達、創傷治癒および毛髪成長、ならびに増強した免疫機能により引き起こされる皮膚腫瘍発癌補助作用の阻害を導く。この経路を、図1に要約する。

#### 【0012】

ナイアシンは、補酵素ニコチンアミドジヌクレオチド（NAD）およびNADリン酸（NADP）の形成のために必須であり、ここで、ニコチンアミド部分は、多くの生物学的

50

な酸化還元反応において、電子受容体または水素の供与体として作用する。詳細に述べると、NADは、細胞内呼吸のための電子担体として、および燃料分子の酸化における補酵素として機能する。NADPは、脂肪酸合成およびステロイド合成を含む還元性の生合成において、水素の供与体として作用する。NADの場合と同様に、NADPもまた、補酵素として作用する。

#### 【0013】

NADは、3つのクラスの酵素についての基質であり、これらの酵素は、ADP-リボース単位を、DNA修復、細胞分化および細胞のカルシウム移動に關与するタンパク質に転移する。ニコチン酸は、ニコチンアミドとは逆に、1.5~4g/日の用量を与えられた場合、血中のコレステロールプロファイルを改善する。

10

#### 【0014】

市販されている、ニコチン酸アナログでありかつ脂質低下(hypolipodemic)因子である、アシピモックス(acipimox)は、トランスジェニックマウスにおける血漿レプチンレベルの増加を示した。例えば、Wormら、Eur. J. Endocrinol. 143:389-395(2000)を参照のこと。

#### 【0015】

ニコチン酸誘導体は、とりわけ、皮膚細胞の保護、DNAの修復などにおいて、効力を有することが示されてきた。例えば、1999年12月1日に出願された、米国特許第6,337,065号(Jacobsenら)を参照のこと(これは、その全体が、参考として本明細書中に援用される)。この出願は、ドデシルニコチン酸エステルまたはラウリルニコチン酸エステルを含む種々のニコチン酸誘導体を記載する。現在このようなニコチン酸エステル(例えば、ラウリルニコチン酸エステル)は、ナイアシンにおいては見られない程度に、レプチン産生を刺激することが知られている。例えば、局所的な適用のために適する物質として、ニコチン酸エステルが処方され得る場合、レプチン刺激およびレプチン産生のための新しいアプローチが、提供される。

20

#### 【実施例】

#### 【0016】

##### (実施例1)

脂肪組織は、動物におけるレプチン産生の主要な供給源として認められる。このため、脂肪細胞におけるレプチン産生に対するナイアシンの効果を決定するために実験を、設計した。

30

#### 【0017】

ヒト脂肪細胞を、標準的な方法に従って得た。簡単に言うと、コラゲナーゼ処理のあとで、前脂肪細胞を、皮下の脂肪細胞から集めた。前脂肪細胞をプレートし、脂肪細胞を形成するために、3週間分化させた。

#### 【0018】

次いで、脂肪細胞を、2%のウシ血清アルブミンを加えた0.6mlのDMEM/F-10培地中でインキュベートした。加えて、培養物に、0.1mMのナイアシンを与えたか、または与えなかった。

#### 【0019】

24時間後、培養培地を、市販のELISAキットを使用して、レプチンについて分析した。

40

#### 【0020】

図2に示される結果は、ナイアシンを加えた培養物において、レプチン産生が62%増加したことを示す。

#### 【0021】

##### (実施例2)

業者から得た雌性のapoB/CETP二重トランスジェニックマウスを、3つの群に分け、そして1つのケージ当たり6匹を収容した。1つの群は、コントロールとして用い、ナイアシンの添加なしに、標準的な食餌を与えた。背部を刈り、そして、下記の第3の

50

群に与えたのと同じだがラウリルニコチン酸エステルを含まない、ローション剤を与えた。第2の群には、ナトリウム塩の形態で、ナイアシンを与え、飲料水中に0.75%の濃度で(0.63%有離酸)溶解した。動物のナイアシンの摂取を、水の消費に基づいて見積もると、約1400mg/kg体重であった(ここで、体重100gあたり水の消費量23mlと見積もり、そして平均体重25gに基づく)。この値は、70kgのヒトだと、約8.4g/日に相当する。本明細書中に参考として援用される、Freireichら、Cancer Chemother. Rep. 50: 219-244 (1966)を参照のこと。第3の群に対して、背部を刈り、そして10%(wt/wt)のラウリルニコチン酸エステルを含む、200mgのローション剤によって、ラウリルニコチン酸エステルを、刈った領域に適用した。適用したエステルの量は、再び平均体重25gと仮定すると、約80~800mg/kgである。前述のFreireichを用いると、約0.48~約4.8g/日/70kgヒトの用量に相当する。ローション剤を、毎日、13週間にわたり適用した。

10

#### 【0022】

血漿中のレプチンレベルを、市販のマウスレプチンラジオイムノアッセイを使用して決定した。RIAを、眼窩後部叢(retroorbital plexus)から得た絶食(16時間)血液サンプルについて実施した。血液サンプルを、回収し、そして2000×gで、15分間遠心分離して、血漿を得た。図3に要約される結果は、経口ナイアシンが、循環するレプチンの量を増加させたが、しかしラウリルニコチン酸エステルは、循環するレプチンの量に関して、ナイアシンより勝った。

20

#### 【0023】

##### (実施例3)

実施例2に記載される実験を、続けて、この実施例に記載する実験で行った。具体的には、雄性のBALB/Cマウスを、肩甲骨から尾の基部まで刈った。次いで、被験動物に、前述の、実施例2に記載された、ラウリルニコチン酸エステルローションまたはミリスチルニコチン酸エステルローションの局所的な適用を種々の濃度で与えた。コントロールには、ビヒクルのみを与えた。ローション剤を、4ml/kgマウスの用量で適用した。

#### 【0024】

血清レプチンレベルを、前述のように測定した。この結果は、血清レプチンレベルが、10%のラウリルニコチン酸エステルローションを与えられた被験動物において、45%まで増加したが、ミリスチルニコチン酸エステルを与えられた被験動物は、57%(2%処方物)および77%(5%処方物)血清レプチンレベルが増加したことを示す。図4はこれらの結果を示す。

30

#### 【0025】

##### (実施例4)

レプチンと創傷治癒との関連は、上で議論された。このことについての相関を、これらの実験において調査した。

#### 【0026】

マウスに、麻酔下(フェノバルビタールナトリウム)で、直径約6mmの全層の創傷(full thickness wound)を与えた。次いで、マウスに、毎日、14日間、20%ニコチン酸エステルローションの局所的な適用を与えた。投薬は、各適用において100μlであり、毎日2回塗布した。コントロールとして、エステルなしのローション剤を使用した。創傷の直径を、毎日測定した。

40

#### 【0027】

この結果を、図5に示す。結果は、コントロールと比較して、ニコチン酸エステルを含む処方物を受けたマウスが、創傷の厚さの減少を示したことを示す。ラウリルエステルは、43%の減少を示し、最も効果的であった。

#### 【0028】

血清レプチンレベルを測定した場合、ニコチン酸エステルの適用を受けたマウスは、コ

50

ントロールと比較して、44%の増加を有することが見出された。これらの結果を、図6に示す。

【0029】

前述の実施例は、本発明の種々の特徴を示し、とりわけ、ニコチン酸またはニコチン酸エステルのようなニコチン酸誘導体のレプチン刺激量を上記の被験体に投与することによって、レプチンの産生が必要な被験体でのレプチンの産生を刺激するための方法を包含する。上で引用された親出願に記載されたような、他の化合物もまた使用され得るが、最も好ましくは、このニコチン酸またはニコチン酸誘導体は、ラウリルニコチン酸エステルである。特に好ましくは、ニコチン酸それ自体、またはニコチン酸アルキルエステルであり、ここでこのエステル部分は、必要に応じて置換される1~30炭素原子を含む。より好ましくは、このアルキル部分は、1~22の炭素原子を含み、最も好ましくは、1~18の炭素原子を含む。好ましくは被験体は、レプチンレベルの増加によって緩和され得る状態を患う被験体であり、この状態には、図1に示される状態、改善された免疫機能、皮膚の上皮化、毛包周期、皮膚腫瘍の形成のような腫瘍形成の阻害、などが挙げられる。

【0030】

ニコチン酸またはニコチン酸エステルが、被験体に投与される様式は、変わり得る。経口、徐放、静脈内皮内、および他の形態の投与法が、局所的な投与と同様に、意図される。このような局所的な投与は、クリーム、ローション剤、液体、エアロゾル、体洗浄剤、うがい薬、歯磨き粉、胃管栄養(gavage)または他の局所的投与形態によってなされ得る。例えば、徐放適用の場合においてニコチンの徐放において使用されるような、「パッチ」、帯具、ラップなどが、使用され得る。

【0031】

ニコチン酸エステルは、レプチン産生を刺激するために十分な量として投与される。使用される用量は、変わり得るが；しかし、処方物は、例えば、約0.1~約10g/日/70kg体重にわたる用量で送達されるべきであり、より好ましくは、約0.1~約7g/日/70kg体重、最も好ましくは約0.4~約5g/日/70kg体重である。

【0032】

上で示したように、レプチン産生の刺激は、以前から知られてきたレプチンに関連する効果に加えて、皮膚腫瘍の退化、皮膚のホメオスタシスおよび再構築、上皮障壁の発達、創傷治癒および毛髪の成長をもたらす。

【0033】

他の適用は、当業者にとって明らかであり、本明細書中に詳述する必要は無い。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、本発明において生じると考えられる、提唱される機構および作用経路である。先が平たい線は、標的の状態を阻害することを意味することに注意のこと。従って、皮膚腫瘍発癌補助作用に対するレプチンの効果は、腫瘍の阻害である。

【図2】図2は、インビトロでの脂肪細胞におけるレプチン産生に関連するデータの概要を示す。

【図3】図3は、ナイアシンが、ラウリルニコチン酸エステルの形態で投与されたあとの、試験動物における血漿のレプチンレベルを決定するために設計された実験の結果を比較する。

【図4】図4は、血清レプチンレベルを測定した実施例2の研究に従って得られた、データの要約を示す。「NIA112」は、ラウリルエステルであるが、「NIA114」は、ミリスチルエステルである。

【図5】図5は、ニコチン酸エステルの投与のあとの創傷のサイズの変化を示すために設計された実験の結果を要約する。

【図6】図6は、マウスの血清レプチンレベルを測定し得られた、類似する結果を示す。

【図 1】

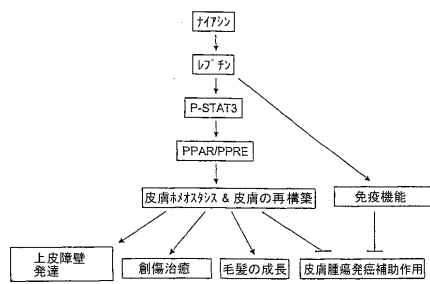


Figure 1

【図 2】

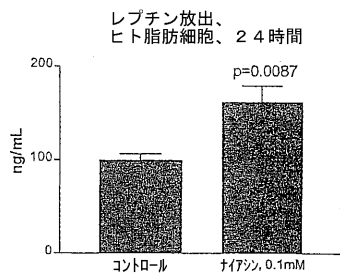


Figure 2

【図 4】

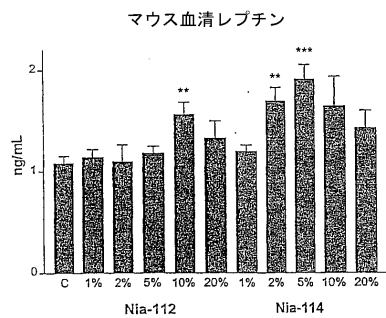


Figure 4

【図 6】

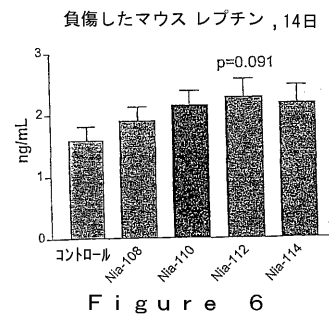


Figure 6

【図 5】

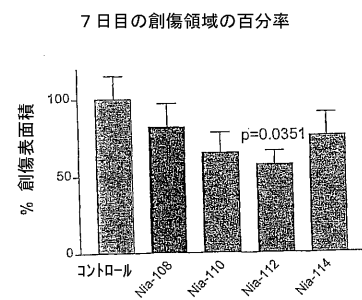


Figure 5

## フロントページの続き

(73)特許権者 503293547

ザ・アリゾナ・ボード・オブ・リージェンツ・オン・ビハーフ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・アリゾナ

THE ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA

アメリカ合衆国 アリゾナ 85721 0158 トゥーソン ノース・ユークリッド・アベニュー 888 스위트 204

888 N. EUCLID AVENUE, SUITE 204, TUCSON, ARIZONA 85721 0158, UNITED STATES OF AMERICA

(74)代理人 100107308

弁理士 北村 修一郎

(72)発明者 ジャコブソン, エレイン

アメリカ合衆国 アリゾナ 85719, タクソン, エヌ. キャンベル アベニュー 2509, ユニバーシティ オブ アリゾナ

(72)発明者 ジャコブソン, マイロン ケイ.

アメリカ合衆国 アリゾナ 85719, タクソン, エヌ. キャンベル アベニュー 2509, ユニバーシティ オブ アリゾナ

(72)発明者 キム, ヒュンテ

アメリカ合衆国 アリゾナ 85719, タクソン, エヌ. キャンベル アベニュー 2509, ユニバーシティ オブ アリゾナ

## 合議体

審判長 今村 玲英子

審判官 平井 裕彰

審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 米国特許第5612382(US,A)

特表平11-504340(JP,A)

国際公開第00/32179(WO,A1)

DERMATOLOGICA、1987、Vol.174、239-243

JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE、2001年1月29日、Vol.70、203-211

European Journal of Endocrinology、2000、Vol.143、389-95

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K31/00-31/80

CAPLUS(STN)

REGISTRY(STN)