

(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2009-504657

(P2009-504657A)

(43) 公表日 平成21年2月5日 (2009. 2. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/02 (2006. 01)	A 6 1 P 37/02	4 C 0 8 8
A 6 1 P 37/08 (2006. 01)	A 6 1 P 37/08	4 C 2 0 6
A 6 1 P 29/00 (2006. 01)	A 6 1 P 29/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く		

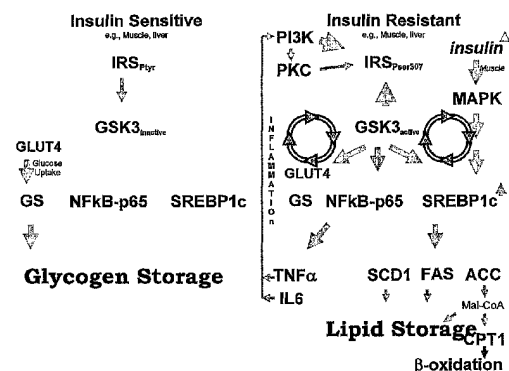
(21) 出願番号	特願2008-526144 (P2008-526144)	(71) 出願人	508042984 メタプロテオミクス、エルエルシー アメリカ合衆国ワシントン州98332, ギグ・ハーバー、フォーティーフォース・ アベニュー 9770, ノースウエスト, スイート 100
(86) (22) 出願日	平成18年8月9日 (2006. 8. 9)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月9日 (2008. 4. 9)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/030920	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02007/021694	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成19年2月22日 (2007. 2. 22)		
(31) 優先権主張番号	60/706, 984		
(32) 優先日	平成17年8月9日 (2005. 8. 9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/748, 931		
(32) 優先日	平成17年12月9日 (2005. 12. 9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホップ及びアカシア産物によるプロテインキナーゼ調節

(57) 【要約】

キナーゼ活性を調節する植物の化合物を開示する。開示する化合物及び方法はまた、COX-2の発現を阻害し、標的細胞におけるプロスタグランジンの合成を選択的に阻害し、そして炎症応答を選択的に阻害する。本組成物は、ホップ又はAcaciaより単離されるか又は由来する少なくとも1つの分画を含有する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の疾患関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする方法であって、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益であり、アルファ酸、ベータ酸、プレニルフラボノイド、カルコン、イソアルファ酸、還元イソアルファ酸、使用済ホップ (spent hops)、及びアカシア由来の化合物又は抽出物からなる群より選択される化合物を含んでなる組成物の治療有効量を必要としている該被検者へ投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 2】

必要としている被検者が、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、眼障害、及び神経系障害からなる群より選択される状態を有する、請求項 1 の方法。

10

【請求項 3】

疾患関連プロテインキナーゼが、ABL、AKT、AURORA、CDK、DBF2/20、EGFR、EPH/ELK/ECK、ERK/MAPKFGFR、GSK3、IKKB、INSR、JAK DOM 1/2、MARK/PRKAA、MEK/STE7、MEKK/STE11、MLK、mTOR、PAK/STE20、PDGFR、PI3K、PKC、OLO、SRC、TEC/ATK、及びZAP/SYKからなる群より選択される、請求項 2 の方法。

20

【請求項 4】

アルファ酸が、フムロン、コフムロン、アドフムロン、プレフムロン、及びポストフムロンからなる群より選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

ベータ酸が、ルプロン、コルプロン、アドルプロン、及びプレルプロンからなる群より選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 6】

イソアルファ酸が、イソフムロン、イソアドフムロン、及びイソコフムロンからなる群より選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 7】

還元イソアルファ酸が、ジヒドロイソフムロン、ジヒドロイソコフムロン、ジヒドロアドフムロン、テトラヒドロイソフムロン、テトラヒドロイソコフムロン、テトラヒドロアドフムロン、ヘキサヒドロイソフムロン、ヘキサヒドロイソコフムロン、ヘキサヒドロアドフムロン、及びrho-イソアルファ酸からなる群より選択される、請求項 1 の方法。

30

【請求項 8】

カルコンが、キサントフモール又はイソキサントフモールである、請求項 1 の方法。

【請求項 9】

プレニルフラボノイドが、6-プレニルナリンゲニン又は8-プレニルナリンゲニンである、請求項 1 の方法。

【請求項 10】

アカシア由来の化合物又は抽出物が、Acacia catechu 又は Acacia nilotica に由来する、請求項 1 の方法。

40

【請求項 11】

Acacia catechu 又は Acacia nilotica の化合物が、ゴム樹脂、樹皮粉末、芯材粉末、及び Acacia catechu 又は Acacia nilotica 抽出物からなる群より選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 12】

Acacia catechu 又は Acacia nilotica 抽出物が、酸性、アルカリ性、極性の溶媒、非極性溶媒、及び胃液抽出物より選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 13】

50

組成物が、コーティング剤、等張剤及び吸収遅延剤、結合剤、接着剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、芳香剤、甘味剤、吸収剤、界面活性剤 (detergents)、及び乳化剤からなる群より選択される医薬的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 14】

組成物が、抗酸化薬、ビタミン、無機物、タンパク質、脂肪、及び炭水化物からなる群より選択される 1 以上の成分 (members) をさらに含む、請求項 13 の方法。

【請求項 15】

組成物が、ロシグリタゾン、トログリタゾン、ピオグリタゾン、及びメトホルミンからなる群より選択される抗糖尿病薬をさらに含む、請求項 1 の方法。

10

【請求項 16】

複数の代謝症候群関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする方法であって、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益であり、5:1 比の r h o - イソアルファ酸と *Acacia nilotica* 芯材粉末抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を必要としている該被検者へ投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 17】

複数の疾患関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物であって、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益であり、アルファ酸、ベータ酸、プレニルフラボノイド、カルコン、イソアルファ酸、還元イソアルファ酸、使用済ホップ、及びアカシア由来の化合物又は抽出物からなる群より選択される化合物を含んでなる組成物の治療有効量を含んでなる、前記組成物。

20

【請求項 18】

必要としている被検者が、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、眼障害、及び神経系障害からなる群より選択される状態を有する、請求項 17 の組成物。

【請求項 19】

疾患関連プロテインキナーゼが、ABL、AKT、AURORA、CDK、DBF2/20、EGFR、EPH/ELK/ECK、ERK/MAPKFGFR、GSK3、IKKB、INSR、JAK DOM 1/2、MARK/PRKAA、MEK/STE7、MEKK/STE11、MLK、mTOR、PAK/STE20、PDGFR、PI3K、PKC、OLO、SRC、TEC/ATK、及びZAP/SYKからなる群より選択される、請求項 17 の組成物。

30

【請求項 20】

アルファ酸が、フムロン、コフムロン、アドフムロン、プレフムロン、及びポストフムロンからなる群より選択される、請求項 17 の組成物。

【請求項 21】

ベータ酸が、ルプロン、コルプロン、アドルプロン、及びブレルプロンからなる群より選択される、請求項 17 の組成物。

【請求項 22】

イソアルファ酸が、イソフムロン、イソアドフムロン、及びイソコフムロンからなる群より選択される、請求項 17 の組成物。

40

【請求項 23】

還元イソアルファ酸が、ジヒドロイソフムロン、ジヒドロイソコフムロン、ジヒドロアドフムロン、テトラヒドロイソフムロン、テトラヒドロイソコフムロン、テトラヒドロアドフムロン、ヘキサヒドロイソフムロン、ヘキサヒドロイソコフムロン、ヘキサヒドロアドフムロン、及び r h o - イソアルファ酸からなる群より選択される、請求項 17 の組成物。

【請求項 24】

カルコンが、キサントフモール又はイソキサントフモールである、請求項 17 の組成物

50

。

【請求項 25】

プレニルフラボノイドが、6-プレニルナリンゲニン又は8-プレニルナリンゲニンである、請求項17の組成物。

【請求項 26】

アカシア由来の化合物又は抽出物が、*Acacia catechu* 又は *Acacia nilotica* に由来する、請求項17の組成物。

【請求項 27】

Acacia catechu 又は *Acacia nilotica* の化合物が、ゴム樹脂、樹皮粉末、芯材粉末、及び *Acacia catechu* 又は *Acacia nilotica* 抽出物からなる群より選択される、請求項17の組成物。

10

【請求項 28】

Acacia catechu 又は *Acacia nilotica* 抽出物が、酸性、アルカリ性、極性の溶媒、非極性溶媒、及び胃液抽出物より選択される、請求項17の組成物。

【請求項 29】

コーティング剤、等張剤及び吸収遅延剤、結合剤、接着剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、芳香剤、甘味剤、吸収剤、界面活性剤、及び乳化剤からなる群より選択される医薬的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項17～28のいずれか1項の組成物。

【請求項 30】

抗酸化薬、ビタミン、無機物、タンパク質、脂肪、及び炭水化物からなる群より選択される1以上の成分をさらに含む、請求項29の組成物。

20

【請求項 31】

ロシグリタゾン、トログリタゾン、ピオグリタゾン、及びメトホルミンからなる群より選択される抗糖尿病薬をさらに含む、請求項17の組成物。

【請求項 32】

複数の代謝症候群関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物であって、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益であり、5:1比の *r h o*-イソアルファ酸と *Acacia nilotica* 芯材粉末抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を含んでなる、前記組成物。

【請求項 33】

複数の眼障害関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物であって、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益であり：

30

- a. 約1mg～約1000mgのビタミンC；
- b. 約1IU～約1000IUのビタミンE；
- c. 約0.1mg～約2.5mgのセレン；
- d. 約1mg～約50mgの亜鉛；
- e. 約0.1mg～約10mgの銅；
- f. 約1mg～約15mgのルテイン；
- g. 約0.05mg～約1mgのゼアキサンチン；及び

40

h. 約1mg～約1000mgの *Acacia nilotica* 芯材粉末抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を含んでなる、前記組成物。

【請求項 34】

複数の癌関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物であって、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益であり：

- a. 約0.01mg～約10,000mgのキサントフモール；
- b. 約0.01mg～約10,000mgのTHIAA；
- c. 約0.01mg～約10,000mgのHHIAA；
- d. 約0.01mg～約10,000mgのRIAA；

50

- e. 約0.01mg～約10,000mgのIAA；
- f. 約0.01mg～約10,000mgのベータ酸；及び
- g. 約0.01mg～約10,000mgのアルファ酸からなる群より選択される少なくとも1つの成分の治療有効量を含んでなる、前記組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、米国仮特許出願60/706,984号(2005年8月9日出願)及び60/748,931号(2005年12月9日出願)に対する優先権を主張する。

10

【0002】

発明の背景

技術分野

本出願は、プロテインキナーゼ活性の組織特異的な活性化及び／又は炎症に関連した病理学的状態を治療又は阻害するために使用し得る方法及び組成物に、プロテインキナーゼ活性を細胞において調節する方法に、そして炎症を調節する方法に概して関する。より具体的には、本発明は、ホップから、又は*Acacia*植物属のメンバーのいずれか又はその組合せより単離する抽出物、誘導体、又は分画を利用する方法及び組成物に関する。

【0003】

関連技術の記載

20

シグナル伝達は、正常なホメオスタシスを維持すること、又は、混乱したならば、数多くの疾患の疾患病理及び状態に関連する起因又は貢献機序として作用することに重要な支配的な調節機序を提供する。細胞レベルでは、シグナル伝達は、細胞の外側から細胞の内側へのシグナル又はシグナリング成分の動きに関連する。シグナルは、その受容体標的に達するとすぐに、多くの細胞イベントに必須のリガンド-受容体相互作用を始動させる場合があり、その中には、後続のシグナルとしてさらに作用し得るものもある。そのような相互作用は、一連のカスケードとしてだけでなく、ホメオスタシスプロセスの微調整制御をもたらすことが可能なシグナルイベントの複雑な相互作用ネットワーク又はウェブとしてもさらに役立つ。しかしながら、このネットワークは、調整不全(dysregulated)になって、それにより細胞活性の改変や応答細胞内で発現される遺伝子のプログラムの変化をもたらす場合がある。例えば、インスリンの感受性及び抵抗性を調節する相互作用キナーゼウェブの簡略化バージョンを表示する図1を参照のこと。

30

【0004】

一般に、シグナル伝達受容体は、3つの群へ分類される。第一群の受容体は、形質膜を貫通して、内因性の酵素活性を有する受容体である。内因性の酵素活性を有する代表的な受容体には、チロシンキナーゼ(例、PDGF、インスリン、EGF、及びFGFの受容体)、チロシンホスファターゼ(例、T細胞及びマクロファージのCD45[クラスター決定因子-45]タンパク質)、グアニル酸シクラーゼ(例、ナトリウム利尿ペプチド受容体)、及びセリン/スレオニンキナーゼ(例、アクチビン及びTGF- β の受容体)であるものが含まれる。内因性チロシンキナーゼ活性のある受容体は、他の基質のリン酸化だけでなく自己リン酸化が可能である。

40

【0005】

第二群の受容体は、細胞の内部にあって、GTPの結合及び加水分解タンパク質(Gタンパク質と呼ばれる)に共役しているものである。Gタンパク質と相互作用するこの群の受容体は、7つの膜貫通ドメインを特徴とする構造を有する。これらの受容体は、セリン[蛇行貫通型]受容体と呼ばれる。この群の例は、アドレナリン受容体、嗅覚受容体、およびある種のホルモン(例、グルカゴン、アンジオテンシン、バソプレッシン、及びブラジキニン)受容体である。

【0006】

第三群の受容体は、細胞内に見出されて、リガンド結合と同時に核へ移行する(そこで

50

リガンド-受容体複合体が遺伝子転写に直接影響を及ぼす) 受容体として記載してよい。

受容体チロシンキナーゼ (R T K) をコードするタンパク質は、4つの主要ドメインを含有して、それらは、a) 膜貫通ドメイン、b) 細胞外リガンド結合ドメイン、c) 細胞内調節ドメイン、及びd) 細胞内チロシンキナーゼドメインである。R T Kのアミノ酸配列は、c A M P依存型プロテインキナーゼの (A T P及び基質結合領域内の) 配列で高度に保存されている。R T Kタンパク質は、システインリッチドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、カドヘリンドメイン、ロイシンリッチドメイン、K r i n g l eドメイン、酸性ドメイン、フィブロネクチン I I I型リピート、ジスコイジン I 様ドメイン、及びE G F様ドメインが含まれる、その細胞外部分の構造特徴に基づいて、種々のファミリーへ分類されている。これらの様々な細胞外ドメインの存在に基づいて、R T Kは、少なくとも14種の異なるファミリーへ細分されてきた。

10

【0007】

リン酸化時に内因性のチロシンキナーゼ活性を有する多くの受容体は、シグナル伝達カスケードの他のタンパク質と相互作用する。これらの他のタンパク質は、c - S r c 癌原遺伝子において最初に同定されたドメインに相同であるアミノ酸配列のドメインを含有する。これらのドメインは、S H 2ドメインと呼ばれる。

【0008】

S H 2ドメイン含有タンパク質のR T K又は受容体関連チロシンキナーゼとの相互作用は、S H 2含有タンパク質のチロシンリン酸化をもたらす。生じるリン酸化は、その活性の改変 (陽性又は陰性のいずれか) をもたらす。内因性の酵素活性を有するいくつかのS H 2含有タンパク質には、ホスホリパーゼC - γ (P L C - γ)、癌原遺伝子c - R a s 関連G T Pアーゼ活性化タンパク質 (r a s G A P)、ホスファチジルイノシトール3 - キナーゼ (P I - 3 K)、タンパク質チロシンホスファターゼ-1 C (P T P 1 C)、並びに、タンパク質チロシンキナーゼ (P T K) のS r cファミリーのメンバーが含まれる。

20

【0009】

非受容体タンパク質チロシンキナーゼ (P T K) は、概ね、酵素活性をそれ自体は欠いている細胞受容体へ結合する。タンパク相互作用を介した受容体-シグナル伝達の例は、インスリン受容体 (I R) に関連する。この受容体は、内因性のチロシンキナーゼ活性を有するが、自己リン酸化に続いて、S H 2ドメインを含有する酵素活性タンパク質 (例、P I - 3 K又はP L C - γ) と直接的には相互作用しない。むしろ、主要なI R基質は、I R S - 1と呼ばれるタンパク質である。

30

【0010】

T G F - β スーパーファミリーの受容体は、原型的な受容体セリン/スレオニンキナーゼ (R S T K) を代表する。T G F - β スーパーファミリーの多機能タンパク質には、アクチビン、インヒビン、及び骨形態形成タンパク質 (B M P) が含まれる。これらのタンパク質は、細胞の増殖又は分化を誘導及び/又は阻害して、様々な細胞種の遊走及び接着を調節することができる。T G F - β の1つの主要効果は、細胞周期の進行の調節である。追加的に、細胞のT G F - β への応答に関連する1つの核タンパク質はc - M y cであり、これは、M y c結合要素を収容する遺伝子の発現に直接影響を及ぼす。P K A、P K C、及びM A Pキナーゼは、非受容体セリン/スレオニンキナーゼの3つの主要クラスを代表する。

40

【0011】

現在、多くの研究室において、キナーゼ活性と疾患状態の間の関連性が検討されている。そのような関連性は、疾患そのものの原因となる場合もあれば、疾患関連の総体症状の発現及び進行に緊密に関連する場合もある。自己免疫疾患の慢性関節リウマチは、キナーゼと疾患の間の関連性が現在検討されている1つの例である。

【0012】

自己免疫疾患は、身体がそれ自身の臓器、組織、及び細胞を攻撃する自己抗体を産生する (タンパクリン酸化により仲介されるプロセス)、免疫系の機能不全より生じる。

50

80種を超える臨床的に識別される自己免疫疾患が確認されて、合わせると、米国ではほぼ2400万人が罹患している。自己免疫疾患は、身体の中の組織又は臓器にも影響を及ぼす可能性がある。この多様性のために、それらは、自己免疫攻撃の部位に依存して、広範囲の症状及び臓器損傷を引き起こす可能性がある。多くの自己免疫疾患に種々の治療法が存在するが、そのどれにも決定的な治療法はない。重篤さを抑える治療法には、しばしば有害な副作用がある。

【0013】

慢性関節リウマチ (RA) は、自己免疫疾患の中で最も罹患率が高く最もよく研究されている。全世界人口の約1%がこれに罹患して、他の自己免疫疾患のように、不明の理由により、増加中である。RAは、関節の進行性の骨及び軟骨破壊を生じる、慢性の滑膜炎を特徴とする。サイトカイン、ケモカイン、及びプロスタグランジンが炎症の主要メディエーターであり、活動性の疾患を抱える患者の関節と血液の両方で多量に見出すことができる。例えば、PGE₂は、RA患者の滑液に豊富に存在する。増加したPGE₂レベルは、シクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) 及び誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の炎症部位での誘導により仲介される [例えば、van der Kraan PM and van den Berg WB. 「骨関節炎における同化性及び破壊性メディエーター (Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis)」 Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 3: 205-211, 2000; Choy EHS and Panayi GS. 「慢性関節リウマチにおけるサイトカイン経路及び関節炎症 (Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis)」 N Eng J Med. 344: 907-916, 2001; 及び、Wong BR, et al. 「アレルギー及び自己免疫障害への治療法として Syk へ標的指向すること (Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders)」 Expert Opin Investig Drugs 13: 743-762, 2004. を参照のこと]。

【0014】

ヒトにおけるRAの病因及び病理発生は、依然としてあまり理解されていないが、3つの相で進行すると見られている。初期相では、樹状細胞が自己抗原を自己反応性T細胞へ提示する。このT細胞がサイトカインを介して自己反応性B細胞を活性化すると、自己抗体の産生を生じ、次いで、これにより関節に免疫複合体が生成される。エフェクター相では、先の免疫複合体がマクロファージ及び肥満細胞上のFcγ受容体と結合して、サイトカイン及びケモカインの放出、炎症、及び疼痛を生じる。最終相では、サイトカインとケモカインにより、プロテアーゼ、酸、及びO²・のようなROSを放出する、滑液の線維芽細胞、破骨細胞、及び多形核好中球が活性化及び動員されて、不可逆性の軟骨及び骨破壊をもたらす。

【0015】

コラーゲン誘発性RA動物モデルでは、この疾患を始動させるのにT細胞及びB細胞の参画が必要とされる。B細胞活性化が脾臓のチロシンキナーゼ (Syk) 及びホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K) を介してシグナル伝達されて、抗原受容体の起動化 (triggering) が続く [Ward SG, Finan P. 「治療薬剤としてのアイソフォーム特異的ホスホイノシチド3-キナーゼ阻害剤 (Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents)」 Curr Opin Pharmacol. Aug; 3(4): 426-34, (2003)]。抗原受容体のB細胞上での結合 (engagement) の後で、Sykは、3つのチロシン上でリン酸化される。Sykは、免疫認識受容体を多数の下流シグナル伝達経路へ共役させることに中心的な役割を担う、72kDaのタンパク質-チロシンキナーゼである。この機能は、その触媒活性と、SH2ドメインを含有するエフェクタータンパク質との相互作用に参画するその能力の両方の特性である。Tyr-317、342、及び346のリン酸化により、多数のSH2ドメイン含有タンパク質のためのドッキング部位が創出される。 [Hutchcroft, J. E., Harrison, M. L. & Geahlen, R. L. (1992). 「72kDaタンパク質-チロシンキナーゼ Ptk72 のB細胞抗原受容体との会合 (Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase Ptk72 with the B-cell antigen receptor)」 J. Biol. Chem. 267: 8613-8619, (1992)、及び Yamada, T., Taniguchi, T., Yang, C., Yasue, S.

, Saito, H. & Yamamura, H. 「B細胞抗原細胞抗原受容体のタンパク質—チロシンキナーゼ—P72 (Syk) との会合と膜IgMの結合による活性化 (Association with B-cell antigen cell antigen receptor with protein-tyrosine kinase-P72 (Syk) and activation by engagement of membrane IgM)」Eur. J. Biochem. 213: 455-459, (1993)]。

【0016】

Sykは、B細胞抗原受容体 (BCR) とマクロファージ又は好中球のFc受容体の結合が含まれる多様なシグナルへ応答するPI3Kの活性化に必要とされることが示されている [Crowley, M. T., et al., J. Exp. Med. 186: 1027-1039, (1997); Raeder, E. M. et al., J. Immunol. 163, 6785-6793, (1999); 及び、Jiang, K., et al., Blood 101, 236-244, (2003) を参照のこと]。B細胞では、PI3KのBCR刺激活性化は、BCA P、CD19、又はGablのようなアダプタータンパク質のリン酸化を介して達成され得て、それによりPI3Kのp85調節サブユニットの結合部位が創出される。多くのIgG受容体により伝達されるシグナルでは、SykとPI3Kの両方の活性と、その密集化 (clustered) 受容体の部位へのそれらの動員が必要とされる。好中球と単球では、FcγRIIA上のリン酸化免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ配列とPI3Kの会合が、PI3Kの該受容体への動員の機序として提唱された。そして最近は、SykとPI3Kの間の直接的な分子相互作用が報告されている [Moon KD, et al., 「Sykタンパク質—チロシンキナーゼとホスホイノシチド3—キナーゼの間の直接相互作用の分子基礎 (Molecular Basis for a Direct Interaction between the Syk Protein-tyrosine Kinase and Phosphoinositide 3-Kinase)」J. Biol. Chem. 280, No. 2, Issue of January 14, pp. 1543-1551, (2005)]。

【0017】

COX-2活性の阻害剤がPGE2の産生減少をもたらして、RAのような慢性関節炎状態の患者への疼痛緩和に有効であることを多くの研究が示してきた。しかしながら、COX-1とCOX-2のいずれも胃腸系及び心臓血管系のような組織における重要な維持機能に関与しているので、COX酵素活性を阻害する薬剤の副作用については懸念が表明されてきた。故に、これらの患者における疼痛緩和への安全で長期の治療アプローチを設計することが必要である。COX-2及びiNOS合成のインデューサーは、Syk、PI3K、p38、ERK1/2、及びNF-κBに依存した経路を介してシグナル伝達するので、これらの経路の阻害剤は、自己免疫状態において、特にRA患者の炎症状態で変性しつつある関節において治療薬になるかもしれない。

【0018】

ホップ誘導体のRho (ロー) イソアルファ酸 (RIAA) は、炎症のRAW264.7マウスマクロファージモデルでのPGE2阻害のスクリーニングにおいて見出された。本研究において、我々は、RIAAが直接的なCOX酵素阻害剤であるかどうか、及び／又は、それがCOX-2及びiNOSの誘導を阻害するかどうかを検討した。RIAAは、COX酵素活性を直接阻害するのではなく、むしろNF-κB推進性の酵素誘導を阻害するという我々の知見により、我々は、RIAAがキナーゼ阻害剤であるかどうかを検討する。RIAAがSykとPI3Kをともに阻害するという我々の知見により、我々は、様々な自己免疫疾患に罹患している患者を対象とするパイロット試験においてその効力を検証する。

【0019】

疾患の総体症状とのその関連が現在検討されている他のキナーゼには、Aurora、FGFB、MSK、RSE、及びSYKが含まれる。

Auroraは、細胞分裂の重要な調節因子であり、セリン／スレオニンキナーゼのAuroraファミリーには、Aurora A、B、及びCが含まれる。Aurora A及びBキナーゼは、有糸分裂において、直接的であるが識別される役割を有することが確認されている。これら3種のアイソフォームの過剰発現は、白血病、結直腸癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、メラノーマ、及び頸部癌が含まれる、多様な範囲のヒト腫瘍型に関連づけられてきた。

10

20

30

40

50

【0020】

線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) は、受容体チロシンキナーゼである。この受容体における突然変異は、受容体の二量体化、キナーゼ活性化、及びFGFへの親和性増加を介した構成的な活性化をもたらす場合がある。FGFRは、軟骨形成不全、血管新生、及び先天性疾患との関連が示唆されている。

【0021】

MSK (マイトジェン及びストレス活性化プロテインキナーゼ) 1 及びMSK 2 は、ERK (細胞外シグナル調節キナーゼ) 1 / 2 又はp38 MAPK (マイトジェン活性化プロテインキナーゼ) 経路のいずれか一方の下流で *in vivo* 活性化されるキナーゼであり、CREB (cAMP応答要素結合タンパク質) 及びヒストンH3のリン酸化に必要とされる。

10

【0022】

Rseは、大抵は、脳において高度に発現されている。Rseは、Brt、BYK、Dtk、Et k 3、Sky、Tif、又はsea関連受容体チロシンキナーゼとしても知られる受容体チロシンキナーゼであり、その主要な役割は、ニューロンをアポトーシスより保護することである。Rse、Ax1、及びMerは、細胞接着分子関連の受容体チロシンキナーゼの新たに同定されたファミリーに属する。GAS6は、このチロシンキナーゼ受容体、Rse、Ax1、及びMerのリガンドである。GAS6は、安定期のECにより産生されて、好炎症刺激がECの好接着機構を始動させるときに枯渇する、生理学的な抗炎症剤として機能する。

20

【0023】

2つのアイソフォームで存在するグリコゲンシンターゼキナーゼ-3 (GSK-3) は、グリコゲン代謝の制御に関与する酵素として同定されて、細胞増殖及び細胞死の調節因子として作用する可能性がある。多くのセリン-スレオニンプロテインキナーゼと違って、GSK-3は、構成的に活性であり、インスリン又は増殖因子に応答して阻害される。筋肉グリコゲン合成のインスリン刺激におけるその役割が、それを糖尿病及び代謝症候群における治療介入の魅力的な標的としている。

【0024】

GSK-3調節不全 (dysregulation) は、インスリン抵抗性の発症における焦点であることが示されてきた。GSK3の阻害は、グルコース処理速度の増加によるだけでなく、ホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ及びグルコース-6-ホスファターゼのような糖新生遺伝子の肝細胞における阻害により、インスリン抵抗性を改善する。さらに、選択的GSK3阻害剤は、グルコース輸送のインスリン依存的な活性化と筋肉における利用を *in vitro* と *in vivo* で増強する。GSK3はまた、インスリン受容体基質-1のセリン/スレオニン残基を直接リン酸化して、それによりインスリンシグナル伝達の障害をもたらす。GSK3は、インスリンシグナル伝達経路において重要な役割を担っていて、それは、インスリンの非存在下で、グリコゲンシンターゼをリン酸化して阻害する [Parker, P. J., Caudwell, F. B., and Cohen, P. (1983) Eur. J. Biochem. 130: 227-234]。増える証拠は、骨格筋のグルコース輸送活性の調節におけるGSK-3の負の役割を裏付ける。例えば、インスリン抵抗性の齧歯動物を選択的GSK-3阻害剤で急性治療すると、全身のインスリン感受性と筋肉グルコース輸送に対するインスリン作用が改善される。インスリン抵抗性のプレ糖尿病肥満Zuckerラットを特異的なGSK-3阻害剤で慢性治療すると、経口グルコース耐性と全身インスリン感受性が高められて、脂質異常症の回復と骨格筋におけるIRS-1依存性インスリンシグナル伝達の改善に関連する。これらの結果は、筋肉におけるGSK-3の選択的標的指向が肥満関連のインスリン抵抗性の治療に有効な介入法になり得るという証拠を提供するものである。

30

40

【0025】

Sykは、B細胞受容体及びIgE受容体からのシグナル伝達に関わるZAP-70に関連した非受容体チロシンキナーゼである。Sykは、これら受容体内のITAMモチーフへ結合して、Ras、PI3-キナーゼ、及びPLC γ シグナル伝達経路を介したシグ

50

ナル伝達を始動させる。S y k は、細胞内シグナル伝達において不可欠の役割を担うので、炎症疾患及び呼吸障害の重要な標的になる。

【0026】

故に、単数又は多数の選択キナーゼの発現又は活性を調節させ得る方法及び組成物を同定することは有用であろう。様々なプロテインキナーゼ及びキナーゼ経路の間の関連性やその間の相互作用の複雑性を理解することは、多数のキナーゼ又は多数のキナーゼ経路に対して有益な活性を有するプロテインキナーゼ調節剤、調整剤、又は阻害剤として作用することが可能な医薬剤を開発することへの緊急ニーズを高めるものである。1つのキナーゼ又は1つのキナーゼ経路に特異的に標的指向する単剤のアプローチは、例えば、糖尿病や代謝症候群のような、非常に複雑な疾患、状態、及び障害を治療するには不十分であろう。追加的に、多数のキナーゼの活性を調節することは、単一のキナーゼ調節では獲得不能な相乗的な治療効果をもたらすかもしれない。

10

【0027】

このような調節及び使用は、慢性状態への連続使用を要求しても、例えば、それ自身の状態として、又は多くの疾患及び状態の必須要素としての炎症において必要とされるように、間欠使用を要求してもよい。追加的に、キナーゼの調節剤として作用する組成物は、哺乳動物の身体における多種多様な障害に影響を及ぼすことができる。本発明は、キナーゼ活性を調整して、それにより数多くの疾患関連症状を治療する手段を提供すると同時に生命の質を増加させるために使用し得る、ホップ又はA c a c i a (アカシア)に由来する化合物及び抽出物について記載する。

20

【0028】

発明の要約

本発明は、疾患関連プロテインキナーゼを必要としている細胞又は哺乳動物において調節する方法及び組成物に概して関する。いくつかの例において、必要としている哺乳動物は、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害(骨が含まれる)、老化が含まれるインスリン抵抗性関連障害、心臓血管系疾患、脂質貯留障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、眼障害、及び神経系障害からなる群より選択される状態を有する。より具体的には、本発明は、ホップから、又はA c a c i a 植物属のメンバーからのいずれか又はその組合せより単離する抽出物、誘導体、又は分画を含んでなる方法及び組成物に関する。さらに本発明は、C O X - 2 又はプロスタグランジンのような炎症メディエーター化合物を選択的に阻害するか又は選択した標的細胞においてプロテインキナーゼ調節を介して炎症応答を阻害するための方法及び組成物に関する。追加的に記載するのは、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害(骨が含まれる)、老化が含まれるインスリン抵抗性関連障害、心臓血管系疾患、脂質貯留障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、眼障害、及び神経系障害からなる群より選択される疾患又は状態に関連した総体症状を治療するための方法及び組成物である。

30

【0029】

本発明の第一の態様は、複数の疾患関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする方法について記載し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この態様において、該方法は、アルファ酸、ベータ酸、プレニルフラボノイド、カルコン、イソアルファ酸、還元イソアルファ酸、使用済ホップ、及びアカシア由来の化合物又は抽出物からなる群より選択される化合物を含んでなる組成物の治療有効量を必要としている該被検者へ投与することを含む。

40

【0030】

本発明の第二の態様は、複数の代謝症候群関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする方法について記載し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この方法は、5 : 1 比の r h o - イソアルファ酸と *Acacia nilotica* 芯材又は樹皮粉末抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を必要としている該被検者へ投与することを含む。

【0031】

50

本発明のさらなる態様は、複数の疾患関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物について記載し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この態様において、該組成物は、アルファ酸、ベータ酸、プレニルフラボノイド、カルコン、イソアルファ酸、還元イソアルファ酸、使用済ホップ、及びアカシア由来の化合物又は抽出物からなる群より選択される化合物を含んでなる組成物の治療有効量を含む。

【0032】

本発明の別の態様は、複数の代謝症候群関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物について記載し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この組成物は、5：1比のr h oーイソアルファ酸と *Acacia nilotica* 芯材又は樹皮粉末抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を含む。

10

【0033】

さらなる態様において、複数の眼障害関連プロテインキナーゼの活性の調節を、被検者においてする組成物について記載し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。ここで、該組成物は、約1mg～約1000mgのビタミンC；約1IU～約1000IUのビタミンE；約0.1mg～約2.5mgのセレン；約1mg～約50mgの亜鉛；約0.1mg～約10mgの銅；約1mg～約15mgのルテイン；約0.05mg～約1mgのゼアキサントシン；及び約1mg～約1000mgの *Acacia nilotica* 芯材粉末又は樹皮抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を含む。

20

【0034】

本発明の別の態様は、複数の癌関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物を開示し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この態様において、該組成物は、

- a. 約0.01mg～約10,000mgのキサントフモール；
- b. 約0.01mg～約10,000mgのテトラヒドロイソアルファ酸（THIAA）；
- c. 約0.01mg～約10,000mgのヘキサヒドロイソアルファ酸（HHIAA）；
- d. 約0.01mg～約10,000mgのRIAA；
- e. 約0.01mg～約10,000mgのイソアルファ酸（IAA）；
- f. 約0.01mg～約10,000mgのベータ酸；及び
- g. 約0.01mg～約10,000mgのアルファ酸からなる群より選択される少なくとも1つの成分の治療有効量を含む。

30

【0035】

発明の詳細な説明

本発明は、必要としている細胞又は哺乳動物においてプロテインキナーゼを調節する方法及び組成物を提供する。いくつかの例において、必要としている哺乳動物は、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、及び神経系障害からなる群より選択される状態を有する。より具体的には、本発明は、ホップから、又は *Acacia* 植物属のメンバーのいずれか又はその組合せより単離する抽出物、誘導体、又は分画を含んでなる組成物、方法、及びキットに関する。さらに本発明は、シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）又はプロスタグランジンのような炎症メディエーター化合物を選択的に阻害するか又は選択した標的細胞におけるプロテインキナーゼ調節を介して炎症応答を阻害するための方法及び組成物に関する。

40

【0036】

本明細書に言及する特許、公開公報出願、及び学術文献は、当業者の知識を確実なものとして、それぞれが具体的かつ個別に参照により組み込まれることが意図されるかのよう、その全体が同じ程度まで参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に引用するあらゆる参考文献と本明細書の具体的な教示との間のあらゆる相違も、後者に有利なように

50

解決されよう。同様に、当該技術分野で理解されている単語又は語句の定義と本明細書で具体的に教示される単語又は語句の定義との間のあらゆる相違は、後者に有利なように解決されよう。

【0037】

本明細書に使用する技術及び科学の用語は、他に定義されなければ、本発明が関連する当該技術分野の当業者により通常理解される意味を有する。本明細書では、当業者に知られている様々な方法論及び材料を参考にする。組換えDNA技術の一般原理を説明する標準の参考書目には、Sambrook et al., 「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、ニューヨーク (1989) ; Kaufman et al. 監修「生物学、医学における分子及び細胞の方法の手引き (Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine)」CRCプレス、ボカラトン (1995) ; McPherson 監修「特異的突然変異誘発：実践アプローチ (Directed Mutagenesis: A Practical Approach)」IRLプレス、オックスフォード (1991) が含まれる。薬理学の一般原理を説明する標準の参考書目には、「グッドマン・アンド・ギルマンの治療薬の薬理学的基礎 (Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics)」第11版、マクグロウヒルカンパニーズ社、ニューヨーク (2006) が含まれる。

10

【0038】

本明細書と付帯の特許請求項において、単数形には、文脈が明らかに他のやり方で指定しなければ、複数の指示物が含まれる。本明細書に使用するように、単数形の冠詞 (「a」、「an」、及び「the」) には、特に、文脈が明らかに他のやり方で指定しなければ、それらが指示する用語の複数形が含まれる。追加的に、本明細書に使用するように、具体的に他のやり方で指定しなければ、単語「又は (or)」は、「及び／又は」の「包含的な」意味で使用されて、「どちらか一方」の「排他的な」意味では使用しない。用語「約」は、本明細書において、「おおよそ」又は「ほぼ」の範囲で「概ね」を意味するために使用する。用語「約」を数的範囲と一緒に使用する場合、それは、示した数値の上下の境界を広げることによって、その範囲を変化させる。一般に、用語「約」は、本明細書において、述べた数値の上下の数値を20%の変動だけ変化させるために使用する。

20

【0039】

本明細書に使用するように、ある変数に対する数的範囲の掲載 (recitation) は、本発明がその範囲内の数値のいずれにも等しい変数で実施し得ることを伝えるためのものである。このように、本来的に不連続である変数では、変数は、その数的範囲のどの整数値にも等しい場合があり、その範囲の末端点も含まれる。同様に、本来的に連続である変数では、変数は、その数的範囲のどの実数値にも等しくてよく、その範囲の末端点も含まれる。例として、0と2の間の数値を有すると記載される変数は、本来的に不連続である変数では、0、1、又は2であり得て、本来的に連続である変数では、0.0、0.1、0.01、0.001、又はあらゆる他の実数値であってよい。

30

【0040】

以下、本発明の特定の態様について詳細に言及する。これら特定の態様に関連して本発明を記載しても、本発明をそのような特定の態様に限定することを企図するものではないと理解されたい。むしろ、付帯の特許請求項により定義されるような、本発明の精神及び範囲内に含まれる場合がある代替物、修飾物、及び同等物が含まれることが企図される。以下の記載では、本発明の徹底的な理解をもたらしするために、数多くの特定の詳細を示す。本発明は、これらの特定の詳細の一部又は全部を伴わずに実施してよい。他の例では、よく知られた方法の操作については詳しく記載しなかったが、本発明を不必要にわかりにくくするためではない。

40

【0041】

本発明を行うときには、当業者に知られたどの好適な材料及び／又は方法も利用してよい。しかしながら、好ましい材料及び方法について記載する。以下の記載及び実施例において言及する材料、試薬、等は、他に注目しなければ、市販の供給元より入手可能である

50

。

【0042】

本発明の第一の態様は、複数の疾患関連プロテインキナーゼの活性を調節を、それを必要としている被検者においてする方法を開示して、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この態様の方法は、アルファ酸、ベータ酸、プレニルフラボノイド、カルコン、イソアルファ酸、還元イソアルファ酸、使用済ホップ、及びアカシア由来の化合物又は抽出物からなる群より選択される化合物を含んでなる組成物の治療有効量を必要としている該被検者へ投与することを含む。

【0043】

この態様のいくつかの側面において、必要としている該被検者は、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、眼障害、及び神経系障害からなる群より選択される状態を有する一方、他の側面において、疾患関連プロテインキナーゼは、ABL、AKT、AURORA、CDK、DBF2/20、EGFR、EPH/ELK/ECK、ERK/MAPKFGFR、GSK3、IKKB、INSR、JAK/DOM1/2、MARK/PRKAA、MEK/STE7、MEKK/STE11、MLK、mTOR、PAK/STE20、PDGFR、PI3K、PKC、POLO、SRC、TEC/ATK、及びZAP/SYKからなる群より選択される。

【0044】

なお他の側面において、アルファ酸は、フムロン、コフムロン、アドフムロン、プレフムロン、及びポストフムロンからなる群より選択されるか、又はベータ酸は、ルブロン、コルブロン、アドルブロン、及びプレルブロンからなる群より選択される。

【0045】

なお他の側面において、使用する組成物のイソアルファ酸は、イソフムロン、イソアドフムロン、及びイソコフムロンからなる群より選択される。該組成物がRIAAを利用する場合、RIAAは、ジヒドロイソフムロン、ジヒドロイソコフムロン、ジヒドロアドフムロン、テトラヒドロイソフムロン、テトラヒドロイソコフムロン、テトラヒドロアドフムロン、ヘキサヒドロイソフムロン、ヘキサヒドロイソコフムロン、及びヘキサヒドロアドフムロンからなる群より選択される。この態様のなお他の側面では、rho-イソアルファ酸の配置を利用する。

【0046】

この態様のいくつかの側面において、カルコンは、キサントフモール又はイソキサントフモールであるか、又はプレニルフラボノイドは、6-プレニルナリンゲニン又は8-プレニルナリンゲニンである。

【0047】

なお他の側面において、アカシア由来の化合物又は抽出物は、Acacia catechu 又は Acacia nilotica に由来する。アカシア由来の化合物又は抽出物が、Acacia catechu 又は Acacia nilotica に由来する側面において、Acacia catechu 又は Acacia nilotica の化合物は、ゴム樹脂、樹皮粉末、芯材粉末、及び Acacia catechu 又は Acacia nilotica 抽出物からなる群より選択される。アカシア由来の化合物が、Acacia catechu 又は Acacia nilotica 抽出物である側面において、該抽出物は、酸性、アルカリ性、極性の溶媒、非極性溶媒、及び胃液抽出物より選択される。

【0048】

この態様の方法に使用する組成物は、抗酸化薬、ビタミン、無機物、タンパク質、脂肪、及び炭水化物からなる群より選択される1以上の成分、又はコーティング剤、等張剤及び吸収遅延剤、結合剤、接着剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、芳香剤、甘味剤、吸収剤、界面活性剤、及び乳化剤からなる群より選択される医薬的に許容される賦形剤をさらに含む。

【0049】

この態様のいくつかの方法において、使用する組成物は、ロシグリタゾン、トログリタゾン、ピオグリタゾン、及びメトホルミンからなる群より選択される抗糖尿病薬をさらに

10

20

30

40

50

含む。

【0050】

本明細書に使用するように、「疾患関連キナーゼ」は、疾患の直接の原因であるか、又はその活性化が問題の疾患の症状を増悪させることに役立つ経路に関連している個別のプロテインキナーゼ又はキナーゼの群若しくはファミリーを意味する。さらに、本明細書に使用するように、「疾患」、「状態」、又は「障害」は、交換可能的に使用してよい。

【0051】

句「プロテインキナーゼ調節は、被検者の健康に有益である」は、キナーゼ調節（アップ又はダウンいずれかのレギュレーション）が疾患の症状を抑制する、予防する、及び／又は逆転させることを生じるか、又は二次治療モダリティの活性を増強する事例を意味する。

10

【0052】

本明細書に使用するように、接続句においても、又は特許請求項の本体においても、用語「～を含む」及び「～を含んでなる」は、制限なしの意味を有するものと解釈されるべきである。即ち、この用語は、「～を少なくとも有する」又は「～が少なくとも含まれる」と同義に解釈されたい。ある方法の文脈において使用する場合、用語「～を含んでなる」は、この方法に引用の工程が少なくとも含まれるが、追加の工程が含まれてもよいことを意味する。化合物又は組成物の文脈において使用するとき、用語「～を含んでなる」は、化合物又は組成物に引用の特徴又は化合物が少なくとも含まれるが、追加の特徴又は化合物も含まれてもよいことを意味する。

20

【0053】

本明細書に使用するように、用語「誘導体」又は「～由来の」物質は、別の物質に構造的に関連して、理論的にはそれより入手可能な化学物質、即ち、別の物質より作製することができる物質を意味する。誘導体には、化学反応を介して入手される化合物を含めることができる。

【0054】

本明細書に使用するように、用語「ホップ抽出物」は、（１）ホップ植物産物を溶媒へ曝露すること、（２）この溶媒をホップ植物産物より分離すること、及び（３）該溶媒を消失させることより生じる固体材料を意味する。「使用済ホップ」は、ホップ抽出手順の後で残るホップ植物産物を意味する。ホップ化学の詳細な考察については、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Verzele, M. and De Keukeleire, D. 「食品科学の開発 27: ホップ及びビール苦味酸の化学及び分析 (Developments in Food Science 27: Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids)」Elsevier Science Pub. Co., 1991（ニューヨーク、アメリカ）を参照のこと。本明細書において R I A A に関連するときに使用されるように、「R h o」は、その還元イソアルファ酸を意味し、ここで還元は、４－メチルー３－ペンテノイル側鎖中のカルボニル基の還元である。

30

【0055】

本明細書に使用するように、用語「溶媒」は、ホップ植物産物より固体材料を抽出するのに必要な特徴を保有する水系又は有機系の液体を意味する。溶媒の例には、限定されないが、水、蒸気、超加熱水、メタノール、エタノール、ヘキサン、クロロホルム、液体 C O₂、液体 N₂、又はそのような材料のあらゆる組合せが含まれる。

40

【0056】

本明細書に使用するように、用語「C O₂ 抽出物」は、ホップ植物産物を液体若しくは超臨界 C O₂ 調製物へ曝露することに続く、後続の C O₂ の除去より生じる固体材料を意味する。

【0057】

用語「医薬的に許容される」は、組成物の他の成分と適合していて、そのレシピエントへ有害でないという意味で使用する。

本明細書に使用するように、「化合物」は、その化学構造、化学名、又は一般名のいずれでも同定してよい。化学構造と化学若しくは一般名が矛盾するとき、化学構造が化合物

50

の同一性 (identity) を決定する。本明細書に記載する化合物は、1 以上のキラル中心、及び／又は二重結合を含有してよく、それ故に、二重結合異性体 (即ち、幾何異性体)、エナンチオマー、又はジアステレオマーのような立体異性体として存在してよい。従って、本明細書に図示する化学構造には、例示又は同定される化合物のすべての可能なエナンチオマー及び立体異性体が含まれ、それには、立体異性体として純粋な形態 (例、幾何学的に純粋、エナンチオマーとして純粋、又はジアステレオマーとして純粋な) とエナンチオマー及び立体異性体の混合物が含まれる。エナンチオマー及び立体異性体の混合物は、当業者によく知られた分離技術又はキラル合成技術を使用して、それらの成分のエナンチオマー又は立体異性体へ分解することができる。本化合物は、エノール型、ケト型、及びこれらの混合物が含まれるいくつかの互変異性型で存在してもよい。従って、本明細書に図示する化学構造には、例示又は同定される化合物のすべての可能な互変異性型が含まれる。記載される化合物には、1 以上の原子が天然で慣用的に見出される原子量とは異なる原子量を有する同位体標識化合物も含まれる。本発明の化合物へ取り込んでよい同位体の例には、限定されないが、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、等が含まれる。化合物は、非溶媒和型だけでなく、水和型が含まれる溶媒和型において、そして N-オキシドとして存在してよい。一般に、化合物は、水和、溶媒和、又は N-オキシドであってよい。ある種の化合物は、多数の結晶型又は非結晶型で存在してよい。また、本発明の範囲内に考慮されるのは、化合物の同属体 (congeners)、類似体、加水分解産物、代謝産物、及び前駆体若しくはプロドラッグである。一般に、他に示さなければ、すべての物理形態は、本明細書において考慮する使用について同等であり、本発明の範囲内にあると企図される。

10

20

【0058】

本発明による化合物は、塩として存在してよい。特に、化合物の医薬的に許容される塩が考慮される。本発明の「医薬的に許容される塩」は、本発明の化合物と、塩 (例えば、本明細書において「Mg」又は「Mg」) として示されるマグネシウム塩のような) を形成して、治療条件下の被検者により忍容される酸又は塩基のいずれかの組合せである。一般に、本発明の化合物の医薬的に許容される塩は、1 以上の治療指数 (最低有毒量の最低治療有効量に対する比) を有するものである。当業者は、最低治療有効量が被検者ごとに、そして適応症ごとに変動するので、それに従って調整するものであることを理解されよう。

30

【0059】

本明細書に使用するように、「ホップ (複数)」は、細菌作用を妨げて、特徴的な苦味をビールへ加えるために醸造業界で使用される苦い芳香族オイルを含有する、*Humulus* 属の植物の実 (cones) を意味する。より好ましくは、使用するホップは、*Humulus lupulus* に由来する。

【0060】

本明細書に使用する用語「アカシア (acacia)」は、*Acacia* 属のマメ科の高木及び低木のあらゆるメンバーを意味する。好ましくは、アカシア由来の植物化合物は、*Acacia catechu* 又は *Acacia nilotica* に由来する。

【0061】

本発明による化合物は、希釈剤及び賦形剤が含まれる、よく知られた医薬的に許容される担体のいずれとも一緒に、医薬的に許容される運搬体において任意選択的に製剤化される (「レミントン製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」第18版、Gennaro, Mack Publishing Co., ペンシルヴェニア州イーストン、1990 及び「レミントン：調剤の科学及び実践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy)」Lippincott, Williams & Wilkins, 1995 を参照のこと)。本発明の組成物を作製するのに利用する医薬的に許容される担体／運搬体の種類は、該組成物の哺乳動物への投与の形式に依って変化するものであるが、一般には、医薬的に許容される担体は、生理学的に不活性であり、無毒である。本発明による組成物の製剤は、本発明の化合物の 1 より多い種類を含有してよく、同様に、治療される症状／状態の治療に有用な他のあらゆる薬理学的に有効な成分も

40

50

含有してよい。

【0062】

この態様のいくつかの側面において、調節されるキナーゼは、Abl、Abl (T315I)、ALK、ALK4、AMPK、Arg、Arg、ARK5、ASK1、Aurora-A、Ax1、Blk、Bmx、BRK、BrSK1、BrSK2、BTk、CaMKI、CaMKII、CaMKIV、CDK1/サイクリンB、CDK2/サイクリンA、CDK2/サイクリンE、CDK3/サイクリンE、CDK5/p25、CDK5/p35、CDK6/サイクリンD3、CDK7/サイクリンH/MAT1、CDK9/サイクリンT1、CHK1、CHK2、CK1(y)、CK1δ、CK2、CK2α2、cKit (D816V)、cKit、c-RAF、CSK、cSRC、DAPK1、DAPK2、DDR2、DMPK、DRAK1、DYRK2、EGFR、EGFR (L858R)、EGFR (L861Q)、EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA7、EphA8、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、Erbb4、Fer、Fes、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、Fgr、Flt1、Flt3 (D835Y)、Flt3、Flt4、Fms、Fyn、GSK3β、GSK3α、Hck、HIPK1、HIPK2、HIPK3、IGF-1R、IKKβ、IKKα、IR、IRAK1、IRAK4、IRR、ITK、JAK2、JAK3、JNK1α1、JNK2α2、JNK3、KDR、Lck、LIMK1、LKB1、LOK、Lyn、Lyn、MAPK1、MAPK2、MAPK2、MAPKAP-K2、MAPKAP-K3、MARK1、MEK1、MEK2、Met、MINK、MKK4、MKK6、MKK7β、MLCK、MLK1、Mnk2、MRCKβ、MRCKα、MSK1、MSK2、MSSK1、MST1、MST2、MST3、MusK、NEK2、NEK3、NEK6、NEK7、NLK、p70S6K、PAK2、PAK3、PAK4、PAK6、PAR-1Bα、PDGFRβ、PDGFRα、PDK1、PI3Kbeta、PI3Kdelta、PI3Kgamma、Pim-1、Pim-2、PKA(b)、PKA、PKBβ、PKBα、PKBγ、PKCμ、PKCβI、PKCβII、PKCα、PKCγ、PKCδ、PKCε、PKCζ、PKCη、PKCθ、PKCι、PKD2、PKG1β、PKG1α、Plk3、PRAK、PRK2、PrKX、PTK5、Pyk2、Ret、RIPK2、ROCK-I、ROCK-II、ROCK-III、Ron、Ror、Rse、Rsk1、Rsk1、Rsk2、Rsk3、SAPK2a、SAPK2a (T106M)、SAPK2b、SAPK3、SAPK4、SGK、SGK2、SGK3、SIK、Snk、SRPK1、SRPK2、STK33、Syk、TAK1、TBK1、Tie2、TrkA、TrkB、TSSK1、TSSK2、WNK2、WNK3、Yes、ZAP-70、及びZIPKからなる群より選択される。

【0063】

好ましい側面において、調節されるキナーゼは、Aurora-A、CDK2/サイクリンA、DAPK1、DAPK2、EphA3、FGFR4、GSK3β、GSK3α、Hck、MAPK1、MAPKAP-K2、MSK2、MSSK1、PI3Kbeta、PI3Kdelta、PI3Kgamma、Rse、Rsk2、Syk、及びTie2からなる群より選択される。より好ましい側面において、調節されるキナーゼは、ABL、AKT、AURORA、CDK、DBF2/20、EGFR、EPH/ELK/ECK、ERK/MAPKFGFR、GSK3、IKKB、INSR、JAK DOM 1/2、MARK/PRKAA、MEK/STE7、MEKK/STE11、MLK、mTOR、PAK/STE20、PDGFR、PI3K、PKC、POLO、SRC、TEC/ATK、及びZAP/SYKからなる群より選択される。

【0064】

いくつかの側面において、必要としている哺乳動物は、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、眼障害、及び神経系障害からなる群より選択される状態を有する。必要としている哺乳動物が自己免疫障害を有する側面において、その障害は、自己免疫溶血性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋

無力症、慢性関節リウマチ、及び全身性紅斑性狼瘡からなる群より選択される。

【0065】

この態様の他の側面において、アレルギー又は炎症障害は、喘息、鼻炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、膵炎、胃炎、良性腫瘍、ポリープ、遺伝性ポリポーシス症候群、結腸癌、直腸癌、乳癌、前立腺癌、胃癌、消化器官の潰瘍性疾患、狭心症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、狭心症又は心筋梗塞の後遺症、老年性痴呆、微生物感染（例、真菌、細菌、又はウイルス）に関連した炎症、及び脳血管系疾患からなる群より選択される。なお他の側面において、代謝症候群又は糖尿病関連障害は、代謝症候群、1型糖尿病、2型糖尿病、インスリン非感受性、及び肥満からなる群より選択される。

【0066】

いくつかの側面において、癌は、脳、乳房、結腸、腎臓、白血病、肝臓、肺、及び前立腺の癌からなる群より選択される。この態様のなお他の側面において、眼障害は、網膜症、糖尿病性網膜症、及び黄斑変性からなる群より選択される。この態様のなお他の側面において、神経系障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ALS又はルー・ゲーリック病）、ハンチントン病、神経認知機能不全、老人性痴呆、及び情緒異常疾患からなる群より選択される。

【0067】

用語「調節する」又は「調節」は、本明細書において、酵素の発現又は活性をそれに関連する化合物、成分、等により上方又は下方に調整することを意味するために使用する。

本明細書に使用するように、用語「プロテインキナーゼ」は、ドナー分子由来のリン酸基をタンパク質のアミノ酸残基へ移すことができるトランスフェラーゼ群の酵素を表す。プロテインキナーゼとファミリー／群の命名法の詳細な考察については、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Kostich, M., et al. 「真核プロテインキナーゼファミリーのヒトメンバー (Human Members of the Eukaryotic Protein Kinase Family)」 *Genome Biology* 3(9): research0043.1-0043.12, 2002 を参照のこと。

【0068】

プロテインキナーゼの代表的で非限定的な例には、Ab1、Ab1 (T315I)、ALK、ALK4、AMPK、Arg、Arg、ARK5、ASK1、Aurora-A、Ax1、Blk、Bmx、BRK、BrSK1、BrSK2、BTK、CaMKI、CaMKII、CaMKIV、CDK1／サイクリンB、CDK2／サイクリンA、CDK2／サイクリンE、CDK3／サイクリンE、CDK5／p25、CDK5／p35、CDK6／サイクリンD3、CDK7／サイクリンH／MAT1、CDK9／サイクリンT1、CHK1、CHK2、CK1 (y)、CK1δ、CK2、CK2α2、cKit (D816V)、cKit、c-RAF、CSK、cSRC、DAPK1、DAPK2、DDR2、DMPK、DRAK1、DYRK2、EGFR、EGFR (L858R)、EGFR (L861Q)、EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA7、EphA8、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、Erbb4、Fer、Fes、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、Fgr、Flt1、Flt3 (D835Y)、Flt3、Flt4、Fms、Fyn、GSK3β、GSK3α、Hck、HIPK1、HIPK2、HIPK3、IGF-1R、IKKβ、IKKα、IR、IRAK1、IRAK4、IRR、ITK、JAK2、JAK3、JNK1α1、JNK2α2、JNK3、KDR、Lck、LIMK1、LKB1、LOK、Lyn、Lyn、MAPK1、MAPK2、MAPK2、MAPKAP-K2、MAPKAP-K3、MARK1、MEK1、MELK、Met、MINK、MKK4、MKK6、MKK7β、MLCK、MLK1、Mnk2、MRCKβ、MRCKα、MSK1、MSK2、MSSK1、MST1、MST2、MST3、MusK、NEK2、NEK3、NEK6、NEK7、NLK、p70S6K、PAK2、PAK3、PAK4、PAK6、PAR-1Bα、PDGFRβ、PDGFRα、PDK1、PI3Kbeta、PI3Kdelta、PI3Kgamma、Pim-1、Pim-2、PKA (b)、PKA、PKBβ、PKBα、PKBγ、PKCμ、PKCβI、PKCβII、PKCα、PKCγ、

10

20

30

40

50

PKC δ 、PKC ϵ 、PKC ζ 、PKC η 、PKC θ 、PKC ι 、PKD2、PKG1 β 、PKG1 α 、Plk3、PRAK、PRK2、PrKX、PTK5、Pyk2、Ret、RIPK2、ROCK-I、ROCK-II、ROCK-III、Ron、Ros、Rse、Rsk1、Rsk1、Rsk2、Rsk3、SAPK2a、SAPK2a(T106M)、SAPK2b、SAPK3、SAPK4、SGK、SGK2、SGK3、SIK、Snk、SRPK1、SRPK2、STK33、Syk、TAK1、TBK1、Tie2、TrkA、TrkB、TSSK1、TSSK2、WNK2、WNK3、Yes、ZAP-70、及びZIPKが含まれる。いくつかの態様において、キナーゼは、ALK、Aurora-A、Ax1、CDK9/サイクリンT1、DAPK1、DAPK2、Fer、FGFR4、GSK3 β 、GSK3 α 、Hck、JNK2 α 2、MSK2、p70S6K、PAK3、PI3Kdelta、PI3Kgamma、PKA、PKB β 、PKB α 、Rse、Rsk2、Syk、Trk1、及びTSSK1であってよい。なお他の態様において、キナーゼは、ABL、AKT、AURORA、CDK、DBF2/20、EGFR、EPH/ELK/ECK、ERK/MAPKFGFR、GSK3、IKKB、INSR、JAK DOM 1/2、MARK/PRKAA、MEK/STE7、MEKK/STE11、MLK、mTOR、PAK/STE20、PDGFR、PI3K、PKC、POLO、SRC、TEC/ATK、及びZAP/SYKからなる群より選択される。

【0069】

本発明の方法及び組成物は、本発明の方法の利益を体験する可能性があるどの哺乳動物での使用にも企図される。そのような哺乳動物の中で一番はヒトであるが、本発明は、そのように限定されることを企図せず、獣医学の使用に適用可能である。このように、本発明によれば、「哺乳動物」又は「必要としている哺乳動物」には、ヒトだけでなく非ヒト哺乳動物、特に、限定なしに、ネコ、イヌ、及びウマが含まれる家畜動物が含まれる。

【0070】

本明細書に使用するように、「自己免疫障害」は、宿主系が宿主自身の免疫系により攻撃されるときに生じる疾患、病気、又は状態を意味する。自己免疫疾患の代表的で非限定的な例には、円形脱毛症、強直性脊椎炎、関節炎、抗リン脂質症候群、自己免疫アジソン病、自己免疫溶血性貧血、自己免疫内耳疾患（メニエール病としても知られる）、自己免疫リンパ増殖症候群（ALPS）、自己免疫血小板減少性紫斑病、自己免疫溶血性貧血、自己免疫肝炎、ベーチェット病、クローン病、1型真性糖尿病、糸球体腎炎、グレイブス病、ギラン・バレー症候群、炎症性腸疾患、ループス腎炎、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性筋炎、原発性胆管性肝硬変症、乾癬、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、強皮症、シェーグレン症候群、全身性紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、眩暈、及びウェジナー肉芽腫症が含まれる。自己免疫障害に関連するキナーゼの代表的で非限定的な例には、BTK、ERK、FGFR、FMS、GSK、IGFR、IKK、JAK、PDGFR、PI3K、PKC、PLK、ROCK、及びVEGFRが含まれる。

【0071】

本明細書に使用する「アレルギー障害」は、平均的な個体に対しては匹敵する効果のない物質、状況、又は身体状態に対する過激又は病理学的な反応（くしゃみ、呼吸困難、痛痒、又は皮膚発疹によるような）を意味する。本明細書に使用するように、「炎症障害」は、毛細血管拡張、白血球浸潤、発赤、発熱、疼痛、腫脹、及びしばしば機能喪失を特徴として、有害な作用体や傷害された組織の消失を始動させる機序として役立つ、細胞損傷への（通常は局所的な）応答を意味する。アレルギー又は炎症障害の例には、限定なしに、喘息、鼻炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、膵炎、胃炎、良性腫瘍、ポリープ、遺伝性ポリポーシス症候群、結腸癌、直腸癌、乳癌、前立腺癌、胃癌、消化器官の潰瘍性疾患、狭心症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、狭心症又は心筋梗塞の後遺症、老年性痴呆、及び脳血管系疾患が含まれる。アレルギー障害に関連するキナーゼの代表的で非限定的な例には、AKT、BTK、EGFR、FYN、IKKB、ITK、JAK、KIT、LCK、LYN、MAPK、MEK、mTOR、PDGFR、PI3K、PKC、PPAR、

ROCK、SRC、SYK、及びZAPが含まれる。

【0072】

本明細書に使用するように、「代謝症候群」及び「糖尿病関連障害」は、インスリン関連障害、即ち、インスリンへの応答がその疾患の原因であるか、又はその疾患若しくは状態の進行若しくは抑制に関与する可能性がある疾患又は状態を意味する。インスリン関連障害の代表的な例には、限定なしに、糖尿病合併症、インスリン感受性、多嚢胞性卵巣疾患、高血糖症、脂質異常症、インスリン抵抗性、代謝症候群、肥満、体重増加、炎症疾患、消化器官の疾患、狭心症、心筋梗塞、狭心症又は心筋梗塞の後遺症、老人性痴呆、及び脳血管系痴呆が含まれる。「ハリソン内科学原理(Harrison's Principles of Internal Medicine)」16版、マクグロー・ヒル・カンパニー社、ニューヨーク(2005)を参照のこと。炎症状態の例には、限定なしに、消化器官の疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病、膵炎、胃炎、消化器官の良性腫瘍、消化性ポリープ、遺伝性ポリポーシス症候群、結腸癌、直腸癌、胃癌、及び消化器官の潰瘍性疾患のような)、狭心症、心筋梗塞、狭心症又は心筋梗塞の後遺症、老人性痴呆、脳血管系痴呆、免疫系疾患、及び癌全般が含まれる。代謝症候群に関連するキナーゼの非限定的な例には、AKT、AMPK、CDK、ERK、GSK、IGFR、JNK、MAPK、MEK、PI3K、及びPKCが含まれる。

10

【0073】

「インスリン抵抗性」は、身体のインスリン依存性プロセスによるインスリンへの感受性の低下を意味し、これらのプロセスの活動低下、又はインスリン産生の増加、又はその両方をもたらす。インスリン抵抗性は、2型糖尿病に典型的であるが、糖尿病の非存在時に起こる場合もある。

20

【0074】

本明細書に使用するように、「糖尿病合併症」には、限定なしに、網膜症、筋梗塞、特発性骨格骨化過剰症及び骨損失、足の潰瘍、ニューロパシー、動脈硬化症、呼吸性自律神経異常症と胸郭及び肺実質の構造障害、左心室肥大、心臓血管系の罹患状態、腎機能の進行性損失、及び貧血が含まれる。

【0075】

本明細書に使用するように、「癌」は、悪性になると、周囲の組織に浸潤して、新たな身体部位へ転移する傾向がある未分化細胞の増殖を特徴とする、様々な良性又は悪性の新生物のいずれをも意味する。本発明の範囲内で考慮される癌の代表的で非限定的な例には、脳、乳房、結腸、腎臓、白血病、肝臓、肺、及び前立腺の癌が含まれる。本発明の範囲内で考慮される癌関連プロテインキナーゼの非限定的な例には、ABL、AKT、Aurora、BRK、CDK、EGFR、ERB、FGFR、IGFR、KIT、MAPK、mTOR、PDGFR、PI3K、PKC、及びSRCが含まれる。

30

【0076】

「眼障害」は、発達性の異常、疾患、損傷、加齢、又は毒素より生じる、眼の構造又は機能における障害を意味する。本発明の範囲内で考慮される眼障害の非限定的な例には、網膜症、黄斑変性、又は糖尿病性網膜症が含まれる。眼障害関連キナーゼには、限定なしに、Aurora、EPH、ERB、ERK、FMS、IGFR、MEK、PDGFR、PI3K、PKC、SRC、及びVEGFRが含まれる。

40

【0077】

本明細書に使用する「神経系障害」は、発達性の異常、疾患、損傷、又は毒素より生じる、中枢神経系の構造又は機能におけるあらゆる障害を意味する。神経系障害の代表的で非限定的な例には、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症(ALS又はルー・ゲーリック病)、ハンチントン病、神経認知機能不全、老人性痴呆、及び情緒異常疾患が含まれる。神経系障害に関連するプロテインキナーゼには、限定なしに、CDK、FYN、JNK、MAPK、PKC、ROCK、RTK、SRC、及びVEGFRを含めてよい。

【0078】

本明細書に使用するように、「心臓血管系疾患」又は「CVD」は、心臓組織又は血管

50

の機能を妨げるか又はそれを破壊する病理又は状態を意味する。心臓血管系疾患関連キナーゼには、限定なしに、AKT、GRK、GSK、IKKB、JAK、JUN、MAPK、PKC、RHO、ROCK、及びTORが含まれる。

【0079】

本明細書に使用する「骨粗鬆症」は、骨がきわめて多孔性になることにより、骨が骨折をより受けやすくなって、治癒がより遅れる疾患を意味する。骨粗鬆症に関連するプロテインキナーゼには、限定なしに、AKT、CAMK、IRAK-M、MAPK、mTOR、PPAR、RHO、ROS、SRC、SYR、及びVEGFRが含まれる。

【0080】

本発明の態様は、複数の代謝症候群関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする方法を記載し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この方法は、5:1 (w/w) 比のrho-イソアルファ酸と *Acacia nilotica* 芯材粉末抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を必要としている該被検者へ投与することを含む。

【0081】

本発明のさらなる態様は、複数の疾患関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物を開示し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この態様の組成物は、アルファ酸、ベータ酸、プレニルフラボノイド、カルコン、イソアルファ酸、還元イソアルファ酸、使用済ホップ、及びアカシア由来の化合物又は抽出物からなる群より選択される化合物の治療有効量を含む。

【0082】

この態様のいくつかの側面において、必要としている被検者は、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、眼障害、及び神経系障害からなる群より選択される状態を有し、一方、他の側面において、疾患関連プロテインキナーゼは、ABL、AKT、AURORA、CDK、DBF2/20、EGFR、EPH/ELK/ECK、ERK/MAPKFGFR、GSK3、IKKB、INSR、JAK DOM 1/2、MARK/PRKAA、MEK/STE7、MEKK/STE11、MLK、mTOR、PAK/STE20、PDGFR、PI3K、PKC、POLO、SRC、TEC/ATK、及びZAP/SYKからなる群より選択される。

【0083】

なお他の側面において、アルファ酸は、フムロン、コフムロン、アドフムロン、プレフムロン、及びポストフムロンからなる群より選択されるか、又はベータ酸は、ルブロン、コルブロン、アドルブロン、及びプレルブロンからなる群より選択される。

【0084】

なお他の側面において、使用する組成物のイソアルファ酸は、イソフムロン、イソアドフムロン、及びイソコフムロンからなる群より選択される。該組成物がRIAAを利用する場合、RIAAは、ジヒドロイソフムロン、ジヒドロイソコフムロン、ジヒドロアドフムロン、テトラヒドロイソフムロン、テトラヒドロイソコフムロン、テトラヒドロアドフムロン、ヘキサヒドロイソフムロン、ヘキサヒドロイソコフムロン、ヘキサヒドロアドフムロンからなる群より選択される。この態様のなお他の側面では、rho-イソアルファ酸の配置を利用する。

【0085】

この態様のいくつかの側面において、カルコンは、キサントフモール又はイソキサントフモールであるか、又はプレニルフラボノイドは、6-プレニルナリンゲニン又は8-プレニルナリンゲニンである。

【0086】

なお他の側面において、アカシア由来の化合物又は抽出物は、*Acacia catechu* 又は *Acacia nilotica* に由来する。アカシア由来の化合物又は抽出物が、*Acacia catechu* 又は *Acacia nilotica* に由来する側面において、*Acacia catechu* 又は *Acacia nilotica* の化

10

20

30

40

50

合物は、ゴム樹脂、樹皮粉末、芯材粉末、及び *Acacia catechu* 又は *Acacia nilotica* 抽出物からなる群より選択される。アカシア由来の化合物が、*Acacia catechu* 又は *Acacia nilotica* 抽出物である側面において、該抽出物は、酸性、アルカリ性、極性の溶媒、非極性溶媒、及び胃液抽出物より選択される。

【0087】

この態様の組成物は、抗酸化薬、ビタミン、無機物、タンパク質、脂肪、及び炭水化物からなる群より選択される1以上の成分、又はコーティング剤、等張剤及び吸収遅延剤、結合剤、接着剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、芳香剤、甘味剤、吸収剤、界面活性剤、及び乳化剤からなる群より選択される医薬的に許容される賦形剤をさらに含んでよい。

【0088】

この態様のいくつかの方法において、使用する組成物は、ロシグリタゾン、トログリタゾン、ピオグリタゾン、及びメトホルミンからなる群より選択される抗糖尿病薬をさらに含む。

【0089】

この態様のいくつかの側面において、調節されるキナーゼは、Ab1、Ab1 (T315I)、ALK、ALK4、AMPK、Arg、Arg、ARK5、ASK1、Aurora-A、Ax1、B1k、Bmx、BRK、BrSK1、BrSK2、BTK、CaMKI、CaMKII、CaMKIV、CDK1/サイクリンB、CDK2/サイクリンA、CDK2/サイクリンE、CDK3/サイクリンE、CDK5/p25、CDK5/p35、CDK6/サイクリンD3、CDK7/サイクリンH/MAT1、CDK9/サイクリンT1、CHK1、CHK2、CK1(y)、CK1δ、CK2、CK2α2、cKit (D816V)、cKit、c-RAF、CSK、cSRC、DAPK1、DAPK2、DDR2、DMPK、DRAK1、DYRK2、EGFR、EGFR (L858R)、EGFR (L861Q)、EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA7、EphA8、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、Erbb4、Fer、Fes、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、Fgr、Flt1、Flt3 (D835Y)、Flt3、Flt4、Fms、Fyn、GSK3β、GSK3α、Hck、HIPK1、HIPK2、HIPK3、IGF-1R、IKKβ、IKKα、IR、IRAK1、IRAK4、IRR、ITK、JAK2、JAK3、JNK1α1、JNK2α2、JNK3、KDR、Lck、LIMK1、LKB1、LOK、Lyn、Lyn、MAPK1、MAPK2、MAPK2、MAPKAP-K2、MAPKAP-K3、MARK1、MEK1、MEK2、Met、MINK、MKK4、MKK6、MKK7β、MLCK、MLK1、Mnk2、MRCKβ、MRCKα、MSK1、MSK2、MSSK1、MST1、MST2、MST3、MusK、NEK2、NEK3、NEK6、NEK7、NLK、p70S6K、PAK2、PAK3、PAK4、PAK6、PAR-1Bα、PDGFRβ、PDGFRα、PDK1、PI3Kbeta、PI3Kdelta、PI3Kgamma、Pim-1、Pim-2、PKA(b)、PKA、PKBβ、PKBα、PKBγ、PKCμ、PKCβI、PKCβII、PKCα、PKCγ、PKCδ、PKCε、PKCζ、PKCη、PKCθ、PKCι、PKD2、PKG1β、PKG1α、Plk3、PRAK、PRK2、PrKX、PTK5、Pyk2、Ret、RIPK2、ROCK-I、ROCK-II、ROCK-III、Ron、Ros、Rse、Rsk1、Rsk1、Rsk2、Rsk3、SAPK2a、SAPK2a (T106M)、SAPK2b、SAPK3、SAPK4、SGK、SGK2、SGK3、SIK、Snk、SRPK1、SRPK2、STK33、Syk、TAK1、TBK1、Tie2、TrkA、TrkB、TSSK1、TSSK2、WNK2、WNK3、Yes、ZAP-70、及びZIPKからなる群より選択される。

【0090】

好ましい側面において、調節されるキナーゼは、Aurora-A、CDK2/サイクリンA、DAPK1、DAPK2、EphA3、FGFR4、GSK3β、GSK3α、Hck、MAPK1、MAPKAP-K2、MSK2、MSSK1、PI3Kbeta、

PI3Kdelta、PI3Kgamma、Rse、Rsk2、Syk、及びTie2からなる群より選択される。より好ましい側面において、調節されるキナーゼは、ABL、AKT、AURORA、CDK、DBF2/20、EGFR、EPH/ELK/ECK、ERK/MAPKFGFR、GSK3、IKKB、INSR、JAKDOM1/2、MARK/PRKAA、MEK/STE7、MEKK/STE11、MLK、mTOR、PAK/STE20、PDGFR、PI3K、PKC、POLO、SRC、TEC/ATK、及びZAP/SYKからなる群より選択される。

【0091】

いくつかの側面において、必要としている哺乳動物は、自己免疫障害、アレルギー又は炎症障害、代謝症候群又は糖尿病関連障害、癌、眼障害、及び神経系障害からなる群より選択される状態を有する。必要としている哺乳動物が自己免疫障害を有する側面において、その障害は、自己免疫溶血性貧血、クローン病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、慢性関節リウマチ、及び全身性紅斑性狼瘡からなる群より選択される。

10

【0092】

この態様の他の側面において、アレルギー又は炎症障害は、喘息、鼻炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、膵炎、胃炎、良性腫瘍、ポリプ、遺伝性ポリポーシス症候群、結腸癌、直腸癌、乳癌、前立腺癌、胃癌、消化器官の潰瘍性疾患、狭心症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、狭心症又は心筋梗塞の後遺症、老年性痴呆、及び脳血管系疾患からなる群より選択される。なお他の側面において、代謝症候群又は糖尿病関連障害は、代謝症候群、1型糖尿病、2型糖尿病、インスリン非感受性、及び肥満からなる群より選択される。

20

【0093】

いくつかの側面において、癌は、脳、乳房、結腸、腎臓、白血病、肝臓、肺、及び前立腺の癌からなる群より選択される。この態様のなお他の側面において、眼障害は、網膜症、糖尿病性網膜症、及び黄斑変性からなる群より選択される。この態様のなお他の側面において、神経系障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ALS又はルー・ゲーリック病）、ハンチントン病、神経認知機能不全、老人性痴呆、及び情緒異常疾患からなる群より選択される。

【0094】

本発明の別の態様は、複数の代謝症候群関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物を記載し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。これらの組成物は、5:1(w/w)比のrho-イソアルファ酸とAcacia nilotica 芯材粉末抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を含む。

30

【0095】

本発明の別の態様は、複数の疾患関連プロテインキナーゼの活性の調節を、それを必要としている被検者においてする組成物を開示し、ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である。この態様において、組成物は：

- a. 約0.01mg～約10,000mgのキサントフモール；
- b. 約0.01mg～約10,000mgのTHIAA；
- c. 約0.01mg～約10,000mgのHHIAA；
- d. 約0.01mg～約10,000mgのRIAA；
- e. 約0.01mg～約10,000mgのIAA；
- f. 約0.01mg～約10,000mgのベータ酸；及び
- g. 約0.01mg～約10,000mgのアルファ酸からなる群より選択される少なくとも1つの成分の治療有効量を含む。

40

【0096】

本明細書に使用するように、「治療すること」は、本発明の化合物が投与された個体における症状を、本発明により治療されていない個体の症状と比較して、抑制する、予防する、及び／又は逆転させることを意味する。実施者は、本明細書に記載の化合物、組成物、及び方法を熟練実施者（医師又は獣医師）による連続した臨床評価と随伴して使用して

50

、後続の療法を決定することができることを理解されよう。従って、治療に続いて、実施者は、標準の方法論による肺の炎症の治療における改善を評価することができる。そのような評価は、特別な治療の用量、投与の形式、等を増加、減少、又は継続させるべきかどうかを評価するのに役立ち、その情報を与えるものである。

【0097】

本発明の化合物が投与される被検者は、特定の外傷状態に罹患している必要はないと理解されよう。実際、本発明の化合物は、症状の発現に先立って、予防的に投与してよい。用語「療法の」、「療法的に」、及びこれらの用語の置き換えは、療法的、緩和的、並びに予防的な使用を包含するために使用する。従って、本明細書に使用するように、「症状を治療するか又は緩和すること」は、本発明の化合物が投与された個体の症状を、そのよう

10

【0098】

用語「治療有効量」は、求める治療結果を達成するのに有効な投与量での治療を示すために使用する。さらに、当業者は、本発明の化合物の治療有効量は、微調整によって、及び／又は本発明の化合物の1より多くを投与することによって、又は本発明の化合物を別の化合物とともに投与することによって低下又は増加させてよいことを理解されよう。例えば、Meiner, C. L. 「臨床治験：設計、実施、及び解析 (Clinical Trials: Design, Conduct, and Analysis)」疫学及び生物統計学の研究論文 (Monographs in Epidemiology and Biostatistics) 第8巻、オックスフォード大学出版局、アメリカ (1986) を参照の

20

【0099】

当業者には、本発明による化合物の投与の回数は、年齢、体重、及び該哺乳動物の状態、及び選択する投与の経路といった他の臨床要因が含まれる、ある所与の時期でのその患者の特別な医学的状态に基づいて、患者ごとに変動するものであることが理解されよう。

【0100】

本明細書に使用するように、「症状」は、患者により体験されて、特別な疾患に関連している、身体機能のあらゆる感覚又は変化、即ち、「X」に付随して、「X」の存在の印とみなされるものを意味する。症状は、疾患ごとに、又は状態ごとに変化するのであることが認められて、理解される。非限定的な例を挙げれば、自己免疫障害に関連した症状には、疲労、眠気、不定愁訴、臓器若しくは組織の大きさの増加 (例えば、グレイブス病における甲状腺肥大)、又は臓器若しくは組織の機能低下をもたらす臓器若しくは組織の破壊 (例えば、糖尿病では、膵臓の島細胞が破壊される) が含まれる。

30

【0101】

アレルギーに関連した疾患又は状態の代表的な総体症状には、放心状態、アナフィラキシー、喘息、眼の充血 (burning eyes)、便秘、空咳、眼の下又は周囲の黒ずみ、皮膚炎、うつ、下痢、嚥下困難、散漫又は集中困難、眠気、湿疹、当惑、疲労、紅潮、頭痛、心悸亢進、蕁麻疹、嗅覚低下、過敏性／行動上の問題、鼻、皮膚、又は喉の痒み、関節痛、筋肉痛、鼻鬱血、鼻ポリープ、悪心、鼻後方排膿 (鼻後方滴下)、速脈、鼻漏 (粘液分泌の鼻)、耳鳴り (耳のポン鳴り、又は充満感)、息切れ、皮膚発疹、睡眠障害、くしゃみ、腫脹 (血管浮腫)、喉の哽声、鼻の刺痛、疲労感、眩暈、嘔吐、涙目、目の痒み、痂皮のような目、又は血走った目、及び喘鳴が含まれる。

40

【0102】

本明細書に使用する「炎症」又は「炎症状態」は、毛細血管拡張、白血球浸潤、発赤、発熱、疼痛、腫脹、及びしばしば機能喪失を特徴として、有害な作用体や傷害された組織の消失を始動させる機序として役立つ、細胞損傷への局所応答を意味する。炎症又は炎症状態の代表的な症状には、関節に限定すれば、発赤、触ると温かい腫脹関節、関節の疼痛

50

及び硬直、及び関節機能の損失が含まれる。全身性の炎症応答は、例えば、発熱、悪寒、疲労／体力喪失、頭痛、食欲喪失、及び筋肉硬直のような、「風邪様の」症状をもたらす場合がある。

【0103】

糖尿病及び代謝症候群は、その症状の多くが無害のように見えるので、しばしば、診断未確定である。例えば、いくつかの糖尿病症状には、限定なしに、頻尿、過剰な渇き、過度の空腹、異常な体重減少、疲労の増加、過敏性、及び視界のぼやけが含まれる。

【0104】

神経系障害の総体症状は多様であり得て、限定なしに、痺れ、刺痛、知覚過敏（感受性の増加）、麻痺、局在性の虚弱、構語障害（言語障害）、失語症（話し得ないこと）、嚥下障害（呑み込み困難）、複視（二重視）、認知障害（例えば、集中し得ないこと）、記憶喪失、一過性黒内障（片目の一時的な視覚喪失）、歩行困難、協調運動障害、振戦、発作、混乱、嗜眠、痴呆、譫妄、及び昏睡が含まれる場合がある。

【0105】

さらなる態様において、複数の眼障害関連プロテインキナーゼの活性の調節を被検者においてする組成物（ここで前記プロテインキナーゼ調節は、該被検者の健康にとって有益である）について記載する。ここで該組成物は、約1mg～約1000mgのビタミンC；約1IU～約1000IUのビタミンE；約0.1mg～約2.5mgのセレン；約1mg～約50mgの亜鉛；約0.1mg～約10mgの銅；約1mg～約15mgのルテイン；約0.05mg～約1mgのゼアキサントシン；及び約1mg～約1000mgの *A cacia nilotica* 芯材粉末又は樹皮抽出物を含んでなる組成物の治療有効量を含む。

【0106】

以下の実施例は、本発明のいくつかの好ましい態様をさらに例示することを企図して、本発明を決して限定するものではない。当業者は、定型的な実験だけを使用して、本明細書に記載の特定の物質及び手順に対する数多くの同等物を認めるか、又はそれを確かめることができよう。

【0107】

実施例

実施例1

プロテインキナーゼに対する修飾ホップ成分の効果

上記に述べたように、キナーゼは、ドナー分子（通常、ATP）由来のリン酸基をタンパク質のアミノ酸残基（通常、スレオニン、セリン、又はチロシン）へ移すことが可能であるトランスフェラーゼ群の酵素を表す。キナーゼは、酵素の調節のためのシグナル伝達において使用される。即ち、それらは、コレステロール生合成、アミノ酸変換、又はグリコゲン代謝回転におけるように、酵素の活性を阻害するか又は活性化することができる。ほとんどのキナーゼは単一種のアミノ酸残基へ特化しているが、2つの異なる種類のアミノ酸をリン酸化することができるという点で、二元的な活性を明示するキナーゼもある。図1に示すように、キナーゼは、シグナルの伝達及び翻訳において機能する。

【0108】

方法—本発明の10µg RIAA/mlの、ヒトキナーゼ活性に及ぼす阻害効果について、Kinase ProfilerTM Assay (Upstate Cell Signaling Solutions, Upstate USA社、バージニア州シャーロットビル、アメリカ)において、200を超えるキナーゼのパネルで検査した。特定のキナーゼのアッセイプロトコールについては、http://www.upstate.com/img/pdf/kp-protocols_full.pdf（最終更新日：2006年6月12日）に要約されている。

【0109】

結果—205種よりやや多いヒトキナーゼについて無細胞系でアッセイした。驚くべきことに、我々は、試験したホップ化合物が205種のキナーゼのうち25種を10%以上阻害することを発見した。205種のうち8種は、20%より高く阻害され；205種のうち5種は、30%より高く阻害され；そして2種は、約50%より高く阻害された。

【0110】

具体的には、PI3キナーゼ経路において、ホップは、PI3K γ 、PI3K δ 、PI3K β 、Akt1、Akt2、GSK3 α 、GSK3 β 、P70S6Kを阻害する。mTORは、試験に利用できなかったことに留意されたい。

【0111】

試験したキナーゼに対するホップ化合物、RIAAの阻害効果を以下の表1に示す。

表1

Kinase ProfilerTM Assayにおいて10 μ g/mlで試験したRIAAによるキナーゼ阻害

【0112】

【表1】

キナーゼ	対照の%	キナーゼ	対照の%
Abl	93	MAPKAP-K2	98
Abl	102	MAPKAP-K3	97
Abl (T315I)	121	MARK1	101
ALK	84	MEK1	113
ALK4	109	MELK	98
AMPK	103	Met	109
Arg	96	MINK	109
Arg	95	MKK4	94
ARK5	103	MKK6	114
ASK1	116	MKK7s	113
Aurora-A	77	MLCK	114
Axl	89	MLK1	109
Blk	115	Mnk2	116
Bmx	108	MRCKs	114
BRK	112	MRCK α	119
BrSK1	108	MSK1	97
BrSK2	100	MSK2	89
BTK	97	MSSK1	92
CaMKI	96	MST1	105
CaMKII	119	MST2	103
CaMKIV	115	MST3	104
CDK1/サイクリンB	109	MuSK	100
CDK2/サイクリンA	94	NEK2	99
CDK2/サイクリンE	122	NEK3	109
CDK3/サイクリンE	104	NEK6	98
CDK5/p25	100	NEK7	98
CDK5/p35	103	NLK	109
CDK6/サイクリンD3	110	p70S6K	87
CDK7/サイクリンH/MAT1	108	PAK2	92
CDK9/サイクリンT1	84	PAK3	54

【0113】

【表 2】

CHK1	102	PAK4	99
CHK2	98	PAK6	109
CK1 (y)	109	PAR-1B α	109
CK1 δ	104	PDGFRs	109
CK2	122	PDGFR α	101
CK2 α 2	126	PDK1	118
cKit (D816V)	135	PI3K beta	95
cKit	103	PI3K delta	88
c-RAF	101	PI3K gamma	80
CSK	108	Pim-1	133
cSRC	103	Pim-2	112
DAPK1	78	PKA (b)	99
DAPK2	67	PKA	66
DDR2	108	PKBs	87
DMPK	121	PKB α	49
DRAK1	111	PKB γ	100
DYRK2	112	PKC μ	100
EGFR	120	PKCs I	112
EGFR (L858R)	113	PKCs II	99
EGFR (L861Q)	122	PKC α	109
EphA1	105	PKC γ	109
EphA2	115	PKC δ	101
EphA3	93	PKC ϵ	99
EphA4	108	PKC ζ	107
EphA5	120	PKC η	119
EphA7	127	PKC θ	117
EphA8	112	PKC ι	96
EphB1	134	PKD2	115
EphB2	110	PKG1s	99
EphB3	101	PKG1 α	110
EphB4	113	Plk3	98
ErbB4	123	PRAK	100
Fer	80	PRK2	102
Fes	121	PrKX	94
FGFR1	96	PTK5	104
FGFR2	103	Pyk2	112
FGFR3	109	Ret	96
FGFR4	83	RIPK2	98
Fgr	102	ROCK-I	105
Flt1	102	ROCK-II	90
Flt3 (D835Y)	103	ROCK-II	105
Flt3	108	Ron	102
Flt4	110	Ros	94

【 0 1 1 4 】

【表 3】

Fms	105	Rse	84
Fyn	100	Rsk1	93
GSK3s	82	Rsk1	95
GSK3 α	89	Rsk2	89
Hck	83	Rsk3	95
HIPK1	98	SAPK2a	111
HIPK2	113	SAPK2a(T106M)	108
HIPK3	119	SAPK2b	100
IGF-1R	97	SAPK3	98
IKKs	117	SAPK4	98
IKK α	117	SGK	94
IR	95	SGK2	96
IRAK1	109	SGK3	107
IRAK4	110	SIK	90
IRR	102	Snk	98
ITK	117	SRPK1	117
JAK2	112	SRPK2	110
JAK3	111	STK33	94
JNK1 α 1	104	Syk	82
JNK2 α 2	84	TAK1	109
JNK3	98	TBK1	121
KDR	101	Tie2	95
Lck	94	TrkA	85
LIMK1	102	TrkB	91
LKB1	106	TSSK1	51
LOK	127	TSSK2	97
Lyn	100	WNK2	102
Lyn	109	WNK3	104
MAPK1	95	Yes	92
MAPK2	101	ZAP-70	113
MAPK2	113	ZIPK	91

【0115】

P I 3 K経路のいくつかのキナーゼがR I A Aにより選好的に阻害される（例えば、A k t 1は、51%阻害）ことに注目されたい。3種のA k tアイソフォームが存在することに注目することは興味深い。A k t 1ヌル（null）マウスは生存可能であるが、成長が遅れる [Cho et al., Science 292: 1728-1731 (2001)]。A k t 1を欠損するキロシヨウジョウバエの眼細胞は、サイズが抑制される [Verdu et al., Nat cell Biol 1: 500-505 (1999)]；過剰発現は、正常からのサイズ増加をもたらす。A k t 2ヌルマウスは生存可能であるが、グルコース制御に障害がある [Cho et al., J Biol Chem 276: 38345-38352 (2001)]。従って、A k t 1は、サイズ決定に役割を担い、A k t 2は、インスリンシグナル伝達に関与しているようである。

【0116】

P I 3 K経路は、m R N A安定性とm R N A翻訳選択において主要な役割を担い、様々な腫瘍遺伝子タンパク質及び炎症経路タンパク質の差別的な（differential）タンパク発現をもたらすことが知られている。5'-TOPと示される特別な5'm R N A構造は、m R N A翻訳選択の調節において主要な構造であることが示されている。

【0117】

c P L Aの文献及びD N A配列に関する概説は、ヒトc P L A 2の5'm R N Aがコンセンサス（同様に調節される既知の腫瘍因子に対して82%相同である）配列を含有して

、それも 5' TOP 構造を有することを示す。炎症に関連している可能性があることも知られている sPLA も、この同じ 5' -TOP を有する。さらに、このことは、cPLA 2 とおそらくは他の PLA が cPLA 2 mRNA の翻訳選択を高めることを介して PI 3 K 経路によりアップレギュレートされて、cPLA 2 タンパク質の増加をもたらすことを示す。逆に言えば、PI 3 K の阻害剤は、cPLA 2 の量を低下させて、COX 2 経路を介して作られる PGE 2 形成を抑えるはずである。

【0118】

先のキナーゼデータと、ホップ化合物が cPLA 2 の mRNA ではなくタンパク発現（ウェスタンブロット、データ示さず）を阻害することを発見した我々自身のデータをともに考慮すると、ホップ化合物の作用の抗炎症様式は、cPLA タンパク質レベルを低下させることによって、そしておそらくはより具体的には、PI 3 K 経路を阻害することによって、COX 2 に対する基質の利用可能性を抑えることを介して、TOP mRNA 翻訳の活性化の阻害をもたらすと示唆される。

【0119】

活性の正確な経路は、依然として不明である。リボソームタンパク質 S6 (RPS6) の 6 つのアイソフォームの 1 以上のリン酸化を介して活性化が起こるというモデルに一致する報告もある。RPS6 は、5' TOP mRNA を分解して、タンパク質への効率的な翻訳を可能にすると報告されている。しかしながら、Stolovich et al. Mol Cell Biol Dec, 8101-8113 (2002) は、このモデルを否定して、Akt が未知の翻訳因子、X をリン酸化して、これが TOP mRNA 翻訳を可能にすると提唱している。

【0120】

実施例 2

選択プロテインキナーゼに対するホップ又はアカシア成分の用量応答効果

実施例 1 のプロトコールに従って、60 種を超える選択プロテインキナーゼに対する mg Rh o の用量応答性についてほぼ 10、50、及び 100 μ g/ml で試験して、以下の表 2 に提示する。最も多く阻害された 5 種のキナーゼを図 2 としてグラフで図示する。

【0121】

以下の表 3 に提示するように、86 種の選択キナーゼに対する THIAA 調製物のキナーゼ阻害の用量応答性についてほぼ 1、10、25、及び 50 μ g/ml で試験した。同様に、実施例 1 のプロトコールに従って、230 種を超える選択プロテインキナーゼに対してアカシア調製物をほぼ 1、5、及び 25 μ g/ml で試験して、以下の表 4 に提示する。イソアルファ酸 (IAA)、ヘキサヒドロイソアルファ酸 (HHIAA)、ベータ酸、及びキサントフモールの調製物についても、86 種の選択キナーゼに対してほぼ 1、10、25、及び 50 μ g/ml で試験して、用量応答性の結果をそれぞれ以下の表 5～8 に提示する。

【0122】

表 2

選択プロテインキナーゼに対する mg Rh o の用量応答効果（対照の % として）

【0123】

10

20

30

【表 4】

キナーゼ	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml		キナーゼ	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
Abl	103	82	65		MSSK1	120	31	26
ALK	79	93	109		p70S6K	105	86	69
AMPK	107	105	110		PAK2	99	84	89
Arg	94	76	64		PAK5	99	94	78
Aurora-A	96	59	33		PASK	105	111	102
Axl	101	87	85		PDK1	98	90	78
CaMKI	95	85	77		PI3K beta (est)	74	49	39
CDK2/サイクリンA	106	81	59		PI3K delta (est)	64	22	13
CDK9/ サイクリンT1	100	88	101		PI3K gamma (est)	85	69	55
c-RAF	105	109	103		PKA	103	95	92
DAPK1	82	56	51		PKC ϵ	96	93	91
DAPK2	64	51	45		PKC ι	100	94	96
EphA3	103	64	55		PrKX	100	105	90
Fer	87	74	83		ROCK-II	102	101	99
FGFR1	98	99	93		Ros	105	86	90
FGFR4	111	68	35		Rse	71	39	22
GSK3s	65	17	26		Rsk2	108	79	56
GSK3 α	65	64	13		Rsk3	108	102	86
Hck	86	72	59		SAPK2a	96	105	109
IKKs	104	91	92		SAPK2a (T106M)	100	107	107
IKK α	104	101	96		SAPK2b	101	102	106
IR	87	85	78		SAPK3	110	109	110
JNK1 α 1	105	115	106		SAPK4	97	107	109
JNK2 α 2	119	136	124		SGK	111	105	94
JNK3	98	98	86		SIK	130	125	117
Lck	105	83	81		STK33	99	96	103
MAPK1	77	53	44		Syk	79	46	28
MAPK2	101	104	106		Tie2	113	74	56
MAPKAP-K2	111	99	49		TrkA	127	115	93
MAPKAP-K3	109	106	73		TrkB	106	105	81
MEK1	106	104	91		TSSK1	105	100	95
MKK4	110	110	98		Yes	100	105	100
MSK2	92	54	43		ZIPK	92	62	83

【0124】

表 3

選択プロテインキナーゼに対する TH I A A の用量応答効果（対照の%として）

【0125】

【表 5】

キナーゼ	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml
Abl (T315I)	104	95	68	10
ALK4	127	112	108	
AMPK	135	136	139	62
Aurora-A	102	86	50	5
Bmx	110	105	57	30
BTk	104	86	58	48
CaMKI	163	132	65	16
CaMKIIs	106	102	90	71
CaMKII γ	99	101	87	81
CaMKII δ	99	103	80	76
CaMKIV	99	117	120	126
CaMKI δ	91	95	61	43
CDK1/サイクリンB	82	101	77	66
CDK2/サイクリンA	118	113	87	50
CDK2/サイクリンE	87	79	73	57
CDK3/サイクリンE	113	111	105	32
CDK5/p25	102	100	85	54
CDK5/p35	109	106	89	80
CDK6/サイクリンD3	114	113	112	70
CDK9/サイクリンT1	106	93	66	36
CHK1	116	118	149	148
CHK2	111	116	98	68
CK1 (γ)	101	101	55	
CK1 γ 1	101	100	42	43
CK1 γ 2	94	85	33	48
CK1 γ 3	99	91	23	18
CK1 δ	109	97	65	42
cKit (D816H)	113	113	69	75
CSK	110	113	92	137
cSRC	105	103	91	17
DAPK1	62	34	21	14
DAPK2	60	54	41	17
DRAK1	113	116	75	18
EphA2	110	112	85	31
EphA8	110	110	83	43
EphB1	153	177	196	53
ErbB4	124	125	75	56

【 0 1 2 6 】

【表 6】

Fer	85	41	24	12
Fes	112	134	116	57
FGFR1	109	110	110	111
FGFR1 (V561M)	97	106	91	92
FGFR2	126	115	58	7
FGFR3	112	94	39	16
FGFR4	122	93	83	58
Fgr	121	120	110	47
Flt4	126	119	85	31
IKK α	139	140	140	102
JNK1 α 1	71	118	118	107
JNK2 α 2	94	97	98	101
JNK3	121	78	58	44
KDR	106	107	104	126
Lck	97	105	125	88
LKB1	145	144	140	140
MAPK2	99	109	112	102
Pim-1	103	100	44	44
Pim-2	103	109	83	22
PKA (b)	104	77	32	0
PKA	104	101	90	25
PKBs	117	102	27	33
PKB α	103	101	49	50
PKB γ	107	109	99	33
PKC μ	90	90	93	87
PKCs II	99	107	103	64
PKC α	110	111	112	102
PKC γ	86	95	77	62
PKC δ	97	93	84	87
PKC ε	76	88	88	90
PKC ζ	93	100	107	103
PKC η	82	99	103	90
PKC θ	93	95	86	90
PKC ι	77	90	93	134
PRAK	99	81	21	33
PrKX	92	76	32	38

【 0 1 2 7 】

10

20

30

【表 7】

Ron	120	110	97	42
Ros	105	105	94	93
Rsk1	101	87	48	31
Rsk2	100	85	40	14
SGK	98	103	79	77
SGK2	117	110	45	18
Syk	99	93	55	17
TBK1	101	100	82	56
Tie2	109	115	100	32
TrkA	107	65	30	15
TrkB	97	96	72	21
TSSK2	112	111	87	66
ZIPK	106	101	74	59

10

【0128】

表 4

選択プロテインキナーゼに対するアカシアの用量応答効果（対照の%として）

【0129】

【表 8】

キナーゼ	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml		キナーゼ	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml
Abl	53	27	2		LOK	103	72	27
Abl (T315I)	57	26	11		Lyn	4	1	2
ALK	102	52	10		MAPK1	115	38	15
ALK4	84	96	98		MAPK2	108	90	48
AMPK	108	101	77		MAPK2	99	78	45
Arg	86	53	23		MAPKAP-K2	67	12	1
Arg	106	55	18		MAPKAP-K3	82	28	1
ARK5	36	13	6		MARK1	52	20	4
ASK1	100	70	23		MEK1	117	94	41
Aurora-A	8	-1	3		MELK	61	27	2
Axl	64	17	4		Mer	95	74	5
Blk	31	-2	-3		Met	168	21	7
Bmx	101	51	0		MINK	79	57	18
BRK	47	19	7		MKK4	103	135	13
BrSK1	58	6	2		MKK6	113	105	50
BrSK2	82	16	4		MKK7s	91	44	9
BTK	15	-1	-3		MLCK	83	38	52
CaMKI	97	90	49		MLK1	92	75	42
CaMKII	83	50	6		Mnk2	103	71	29
CaMKIIs	87	45	10		MRCKs	95	52	18
CaMKII γ	90	51	12		MRCK α	96	76	32
CaMKII δ	25	13	6		MSK1	105	97	33
CaMKIV	89	44	44		MSK2	56	22	12
CaMKI δ	69	19	10		MSSK1	12	4	4
CDK1/ サイクリンB	62	48	9		MST1	58	36	17
CDK2/ サイクリンA	69	15	5		MST2	106	104	38
CDK2/ サイクリンE	51	14	8		MST3	50	10	2
CDK3/ サイクリンE	41	13	4		MuSK	97	83	63
CDK5/p25	82	41	7		NEK11	89	58	19
CDK5/p35	77	46	13		NEK2	99	100	37
CDK6/ サイクリンD3	100	54	5		NEK3	79	41	18
CDK7/サイク リンH/MAT1	124	90	42		NEK6	78	43	4
CDK9/ サイクリンT1	79	21	4		NEK7	110	94	27

【 0 1 3 0 】

【表 9】

CHK1	87	52	17		NLK	103	90	44
CHK2	52	16	5		p70S6K	43	17	10
CK1 (γ)	77	32	3		PAK2	103	79	16
CK1 γ 1	51	7	-4		PAK3	43	5	3
CK1 γ 2	31	5	1		PAK4	99	91	58
CK1 γ 3	49	16	0		PAK5	69	6	2
CK1 δ	60	15	6		PAK6	77	22	1
CK2	157	162	128		PAR-1B α	70	20	8
CK2 α 2	95	83	51		PASK	136	114	26
cKit (D816H)	27	7	2		PDGFRs	59	19	9
cKit (D816V)	111	91	41		PDGFR α (D842V)	60	11	5
cKit	94	68	24		PDGFR α	100	106	51
cKit (V560G)	49	5	0		PDGFR α (V561D)	59	11	7
cKit (V654A)	30	8	3		PDK1	97	57	16
CLK3	33	16	6		PhK γ 2	67	62	16
c-RAF	105	100	87		Pim-1	44	9	2
CSK	74	19	1		Pim-2	82	17	10
cSRC	99	12	0		PKA (b)	104	52	7
DAPK1	90	72	12		PKA	99	85	16
DAPK2	75	31	4		PKBs	61	9	-1
DCAMKL2	107	106	77		PKB α	98	67	8
DDR2	84	91	45		PKB γ	86	50	5
DMPK	105	106	116		PKC μ	90	81	44
DRAK1	92	40	11		PKCs I	108	112	100
DYRK2	83	55	25		PKCs II	71	47	30
eEF-2K	103	97	59		PKC α	75	34	32
EGFR	76	26	6		PKC γ	72	47	27
EGFR (L858R)	99	40	1		PKC δ	105	94	63
EGFR (L861Q)	90	49	1		PKC ε	108	90	59
EGFR (T790M)	93	29	7		PKC ζ	34	10	2
EGFR (T790M, L858R)	74	30	4		PKC η	107	99	84
EphA1	106	43	9		PKC θ	88	31	21
EphA2	94	82	6		PKC ι	66	69	63
EphA3	94	83	50		PKD2	106	108	81
EphA4	55	12	6		PKG1s	31	16	5
EphA5	100	28	10		PKG1 α	41	18	7
EphA7	103	80	6		Plk3	114	106	115
EphA8	113	84	19		PRAK	18	18	35
EphB1	116	63	8		PRK2	92	35	8
EphB2	30	5	2		PrKX	49	14	16
EphB3	109	35	1		PTK5	99	95	88

【 0 1 3 1 】

【表 10】

EphB4	30	11	3		Pyk2	90	45	9
ErbB4	61	8	0		Ret	23	-1	-2
FAK	106	78	2		RIPK2	103	95	64
Fer	106	134	28		ROCK-I	95	90	54
Fes	143	74	43		ROCK-II	100	66	39
FGFR1	125	26	3		ROCK-II	91	59	39
FGFR1 (V561M)	92	50	2		Ron	32	2	4
FGFR2	73	-2	-5		Ros	95	40	35
FGFR3	21	3	1		Rse	35	14	0
FGFR4	30	7	5		Rsk1	45	9	4
Fgr	78	18	7		Rsk1	75	8	5
Flt1	41	12	1		Rsk2	60	4	3
Flt3 (D835Y)	65	15	-1		Rsk3	78	31	7
Flt3	76	16	3		Rsk4	71	25	12
Flt4	12	3	2		SAPK2a	99	106	106
Fms	94	73	19		SAPK2a (T106M)	110	106	80
Fyn	23	5	1		SAPK2b	99	100	77
GRK5	96	91	81		SAPK3	108	79	40
GRK6	117	117	94		SAPK4	103	86	57
GSK3s	13	5	4		SGK	89	34	2
GSK3 α	5	2	1		SGK2	102	36	5
Hck	87	29	-2		SGK3	103	96	34
HIPK1	110	112	62		SIK	115	28	5
HIPK2	92	71	24		Snk	93	96	61
HIPK3	106	92	56		SRPK1	56	14	6
IGF-1R	148	122	41		SRPK2	37	15	4
IKKs	30	6	3		STK33	100	94	64
IKK α	120	86	11		Syk	2	2	3
IR	121	123	129		TAK1	105	101	86
IRAK1	98	85	49		TA02	97	64	25
IRAK4	117	95	47		TBK1	37	5	12
IRR	91	70	28		Tie2	97	67	7
Itk	121	114	48		TrkA	20	4	2
JAK2	83	69	23		TrkB	22	0	0
JAK3	24	7	1		TSSK1	89	10	5
JNK1 α 1	118	110	75		TSSK2	97	29	2
JNK2 α 2	99	106	102		VRK2	98	88	67
JNK3	52	23	3		WNK2	96	75	21
KDR	90	60	18		WNK3	110	98	38
Lck	92	93	25		Yes	63	33	3
LIMK1	108	104	53		ZAP-70	57	19	10
LKB1	126	122	98		ZIPK	104	81	28

【0132】

表 5

選択プロテインキナーゼに対する I A A の用量応答効果（対照の%として）

【0133】

【表 1 1】

キナーゼ	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml
Abl (T3151)	104	119	84	56
ALK4	92	110	113	
AMPK	122	121	86	49
Aurora-A	103	106	61	20
Bmx	90	125	108	43
BTK	96	102	62	48
CaMKI	126	139	146	54
CDK1/サイクリンB	96	102	86	69
CDK2/サイクリンA	102	111	98	59
CDK2/サイクリンE	81	89	72	55
CDK3/サイクリンE	99	121	107	62
CDK5/p25	88	108	95	69
CDK5/p35	92	117	100	73
CDK6/サイクリンD3	111	119	108	64
CDK9/サイクリンT1	87	109	77	51
CHK1	105	117	140	159
CHK2	102	106	75	46
CK1 (y)	94	105	103	
CK1 γ 1	98	102	69	21
CK1 γ 2	89	88	39	42
CK1 γ 3	91	87	26	17
CK1 δ	95	111	90	56
cKit (D816H)	98	117	100	59
CSK	95	111	72	86
cSRC	99	111	100	53
DAPK1	73	52	36	21
DAPK2	59	54	50	47
DRAK1	102	123	129	75
EphA2	104	118	108	88
EphA8	113	120	117	98
EphB1	112	151	220	208
ErbB4	93	107	110	20
Fer	95	76	49	38
Fes	101	110	120	59
FGFR2	85	122	97	5
Fgr	99	120	119	70
Flt4	85	37	74	33
Fyn	90	88	92	90
GSK3s	86	77	47	14
GSK3 α	85	83	56	17

10

20

30

40

【 0 1 3 4 】

【表 1 2】

Hck	88	81	76	4
HIPK2	101	107	107	84
HIPK3	97	101	127	84
IGF-1R	132	229	278	301
IKKs	103	116	93	56
IR	110	107	121	131
IRAK1	115	143	156	122
JAK3	88	98	83	74
Lyn	82	114	41	73
MAPK1	81	87	55	55
MAPKAP-K2	100	98	82	36
MAPKAP-K3	108	113	106	80
MINK	102	122	118	127
MSK1	99	103	66	61
MSK2	95	90	44	45
MSSK1	90	78	52	52
p70S6K	94	98	84	58
PAK3	91	66	21	11
PAK5	101	108	106	59
PAK6	98	109	106	102
PhK γ 2	103	109	102	66
Pim-1	104	106	77	46
Pim-2	101	108	88	60
PKA(b)	104	115	86	12
PKA	110	102	99	106
PKBs	104	110	57	76
PKB α	98	103	91	72
PKB γ	103	108	104	76
PKCsII	103	103	102	59
PKC α	106	104	89	46
PRAK	99	91	38	18
PrKX	94	92	91	58
Ron	117	113	113	40
Ros	101	108	84	75
Rsk1	96	101	72	48
Rsk2	95	101	76	36
SGK	102	110	100	96
SGK2	99	128	105	60
Syk	85	92	53	7
TBK1	100	105	82	86
Tie2	101	124	113	40
TrkA	112	139	24	20
TrkB	97	111	90	59
TSSK2	99	112	109	75
ZIPK	102	102	95	73

10

20

30

40

【0 1 3 5】

表 6

選択プロテインキナーゼに対するHH I A Aの用量応答効果（対照の%として）

【0 1 3 6】

50

【表 1 3】

キナーゼ	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml
Abl (T315I)	113	109	84	38
ALK4	123	121	108	
AMPK	133	130	137	87
Aurora-A	111	107	64	27
Bmx	103	102	106	44
BTk	110	105	67	61
CaMKI	148	151	140	56
CDK1/サイクリンB	118	115	98	85
CDK2/サイクリンA	109	112	82	60
CDK2/サイクリンE	83	84	70	88
CDK3/サイクリンE	115	119	108	85
CDK5/p25	101	94	69	51
CDK5/p35	110	103	73	68
CDK6/サイクリンD3	119	124	117	83
CDK9/サイクリンT1	106	96	66	40
CHK1	127	124	140	144
CHK2	119	117	110	82
CK1 (γ)	102	102	100	
CK1 γ 1	105	103	68	30
CK1 γ 2	99	99	45	49
CK1 γ 3	104	98	28	22
CK1 δ	110	115	89	56
cKit (D816H)	116	109	91	68
CSK	100	108	109	112
cSRC	105	114	103	37
DAPK1	94	67	37	27
DAPK2	72	58	46	47
DRAK1	110	119	103	69
EphA2	106	127	115	68
EphA8	133	109	89	74
EphB1	154	162	200	164
ErbB4	141	122	85	14
Fer	90	62	13	20
Fes	137	126	111	81
FGFR2	116	120	71	7
Fgr	122	127	118	91
Flt4	135	116	88	58
Fyn	104	119	82	81
GSK3s	138	84	51	10
GSK3 α	89	82	58	18
Hck	93	99	73	77

【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

【表 1 4】

HIPK2	103	105	100	98
HIPK3	117	121	118	29
IGF-1R	138	173	207	159
IKKs	123	116	98	79
IR	129	95	105	81
IRAK1	142	140	152	120
JAK3	104	103	61	90
Lyn	115	113	56	80
MAPK1	100	88	55	67
MAPKAP-K2	104	99	71	29
MAPKAP-K3	111	109	99	77
MINK	107	102	114	123
MSK1	105	101	58	69
MSK2	101	86	39	48
MSSK1	98	78	41	60
p70S6K	108	99	78	56
PAK3	113	24	14	10
PAK5	109	105	89	36
PAK6	106	106	88	71
PhK γ 2	105	109	85	54
Pim-1	107	110	81	50
Pim-2	111	106	98	58
PKA (b)	105	119	67	12
PKA	98	107	102	91
PKBs	121	142	50	42
PKB α	105	108	81	57
PKB γ	115	116	107	42
PKCsII	113	115	109	95
PKC α	110	90	105	103
PRAK	109	89	41	33
PrKX	86	88	77	59
Ron	114	106	129	74
Ros	113	107	109	98
Rsk1	101	102	53	60
Rsk2	105	103	58	25
SGK	108	114	112	64
SGK2	120	121	96	63
Syk	100	95	68	17
TBK1	115	103	99	114
Tie2	109	120	95	43
TrkA	87	73	41	24
TrkB	100	107	97	13
TSSK2	115	112	109	71
ZIPK	109	109	96	8

10

20

30

40

【0 1 3 8】

表 7

選択プロテインキナーゼに対するベータ酸の用量応答効果（対照の%として）

【0 1 3 9】

【表 1 5】

キナーゼ	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml
Abl (T315I)	101	101	70	29
ALK4	108	114	90	
AMPK	136	131	135	77
Aurora-A	110	85	43	2
Bmx	111	100	93	54
BTK	96	90	14	37
CaMKI	142	142	131	57
CDK1/サイクリンB	116	120	95	65
CDK2/サイクリンA	106	104	94	64
CDK2/サイクリンE	93	86	81	65
CDK3/サイクリンE	119	115	96	53
CDK5/p25	97	97	95	96
CDK5/p35	109	106	90	50
CDK6/サイクリンD3	107	117	101	76
CDK9/サイクリンT1	101	104	88	35
CHK1	111	125	144	164
CHK2	103	100	94	69
CK1 (y)	102	104	83	
CK1 γ 1	100	95	82	33
CK1 γ 2	97	83	55	44
CK1 γ 3	99	75	40	21
CK1 δ	103	98	81	54
cKit (D816H)	103	112	100	18
CSK	107	111	108	145
cSRC	104	99	90	19
DAPK1	109	106	88	59
DAPK2	97	76	57	45
DRAK1	124	134	107	51
EphA2	116	122	115	80
EphA8	107	105	86	36
EphB1	130	164	204	207
ErbB4	111	118	116	28
Fer	78	69	30	18
Fes	120	106	114	79
FGFR2	130	118	99	7
Fgr	119	119	127	62
Fl14	104	96	65	22
Fyn	99	94	86	78
GSK3s	83	67	27	4
GSK3 α	70	71	31	1
Hck	102	88	61	22

10

20

30

40

【 0 1 4 0 】

【表 16】

HIPK2	101	104	99	94
HIPK3	109	119	118	83
IGF-1R	101	163	262	260
IKKs	110	113	85	59
IR	106	106	108	95
IRAK1	143	155	165	158
JAK3	100	98	64	38
Lyn	114	120	68	59
MAPK1	88	75	51	37
MAPKAP-K2	111	104	65	22
MAPKAP-K3	108	106	102	69
MINK	102	103	123	140
MSK1	106	97	54	36
MSK2	96	86	28	25
MSSK1	95	82	61	67
p70S6K	89	95	69	44
PAK3	103	40	16	11
PAK5	103	99	81	44
PAK6	103	98	82	83
PhK γ 2	108	103	79	40
Pim-1	104	97	57	21
Pim-2	103	101	68	73
PKA (b)	120	104	51	3
PKA	103	105	102	28
PKBs	114	108	56	52
PKB α	98	95	80	58
PKB γ	105	104	101	52
PKCsII	107	105	100	49
PKC α	108	104	98	54
PRAK	105	81	24	11
PrKX	93	86	68	29
Ron	108	119	98	44
Ros	107	103	80	98
Rsk1	103	99	69	17
Rsk2	98	96	56	8
SGK	109	111	98	100
SGK2	123	113	84	0
Syk	92	81	62	16
TBK1	110	103	80	78
Tie2	110	100	106	79
TrkA	97	66	53	18
TrkB	105	100	86	11
TSSK2	112	109	103	62
ZIPK	105	110	85	37

10

20

30

40

【0141】

表 8

選択プロテインキナーゼに対するキサントフォームの用量応答効果（対照の%として）

【0142】

【表 17】

キナーゼ	1 ug/ml	5 ug/ml	25 ug/ml	50 ug/ml
Abl (T315I)	126	115	16	4
ALK4	116	100	71	49
AMPK	122	113	90	81
Aurora-A	83	27	3	8
Bmx	108	97	22	0
BTk	109	57	2	20
CaMKI	142	83	3	4
CDK1/サイクリンB	118	103	46	18
CDK2/サイクリンA	107	96	57	6
CDK2/サイクリンE	82	86	18	9
CDK3/サイクリンE	101	100	37	8
CDK5/p25	97	97	24	87
CDK5/p35	103	102	41	44
CDK6/サイクリンD3	110	79	23	7
CDK9/サイクリンT1	110	107	45	31
CHK1	121	126	142	149
CHK2	25	5	3	2
CK1 (y)	91	63	37	9
CK1 γ 1	101	79	50	26
CK1 γ 2	92	48	30	12
CK1 γ 3	98	51	22	15
CK1 δ	75	32	16	12
cKit (D816H)	94	45	14	
CSK	113	113	93	100
cSRC	92	50	27	21
DAPK1	113	85	49	20
DAPK2	105	88	45	26
DRAK1	133	40	19	-5
EphA2	124	113	121	52
EphA8	103	92	29	19
EphB1	92	122	175	161
ErbB4	132	85	52	27
Fer	55	20	10	1
Fes	131	106	102	26
FGFR2	116	89	36	4
Fgr	101	36	10	0
Flt4	74	10	11	4
Fyn	104	66	42	18
GSK3s	120	99	25	3
GSK3 α	102	81	11	-4
Hck	85	35	17	0

【0143】

【表 18】

HIPK2	110	98	75	37
HIPK3	106	102	90	59
IGF-1R	107	113	129	139
IKKs	145	118	61	44
IR	120	108	97	103
IRAK1	129	104	81	36
JAK3	104	84	17	5
Lyn	97	40	4	2
MAPK1	91	64	19	17
MAPKAP-K2	99	95	6	8
MAPKAP-K3	100	99	17	7
MINK	42	10	5	7
MSK1	114	92	31	9
MSK2	126	61	8	19
MSSK1	47	11	7	5
p70S6K	94	48	19	7
PAK3	21	18	8	4
PAK5	106	99	42	5
PAK6	105	94	14	2
PhK γ 2	106	60	11	5
Pim-1	88	35	4	3
Pim-2	104	48	14	6
PKA(b)	137	113	33	2
PKA	105	109	98	21
PKBs	146	102	1	8
PKB α	102	81	18	5
PKB γ	104	104	12	4
PKCsII	108	108	71	79
PKC α	100	100	75	83
PRAK	101	53	2	2
PrKX	92	75	2	3
Ron	135	127	60	69
Ros	101	99	85	94
Rsk1	34	49	4	0
Rsk2	96	43	3	4
SGK	111	84	0	3
SGK2	130	110	2	-4
Syk	95	60	32	17
TBK1	104	71	45	42
Tie2	94	96	100	35
TrkA	36	19	8	3
TrkB	95	89	58	3
TSSK2	102	95	61	48
ZIPK	115	74	20	70

【0144】

結果－試験した様々な化合物によるキナーゼ活性調節に対する効果は、試験した特定のキナーゼ及び化合物に依って広範囲の調節効果を表示し（表2～8）、その代表例を以下に列挙する。

【0145】

10

20

30

40

50

P I 3 K δ は、例えば、慢性関節リウマチ及び紅斑性狼瘡のような自己免疫疾患との関連が強く示唆されているキナーゼであり、M g R h o の 1 0、5 0、及び 1 0 0 μ g / m l でそれぞれキナーゼ活性の 3 6 %、7 8 %、及び 8 7 % を阻害する応答を明示した。M g R h o は、1 0、5 0、及び 1 0 0 μ g / m l で、それぞれ 2 1 %、5 4 %、及び 7 2 % の阻害という用量依存的なやり方で S y k を阻害した。追加的に言うと、G S K 又はグリコゲンシンターゼキナーゼ (G S K α 及び β の両方) は、m g R h o 曝露に続いて阻害を表示した (1 0、5 0、1 0 0 μ g / m l で、それぞれ α : 3 5、3 6、8 7 % の阻害 ; β : 3 5、8 3、7 4 % の阻害) 。表 2 を参照のこと。

【 0 1 4 6 】

T H I A A は、試験したキナーゼの多くで用量依存性のキナーゼ活性阻害を表示して、F G F R 2 の阻害は、1、5、2 5、及び 5 0 μ g / m l で、それぞれ 7 %、1 6 %、7 7 %、及び 9 1 % であった。1、5、2 5、及び 5 0 μ g / m l では、F G F R 3 (それぞれ、0 %、6 %、6 1 %、及び 8 4 %) と T r k A (それぞれ、2 4 %、4 5 %、9 3 %、及び 9 4 %) について、同様の結果が観察された。表 3 を参照のこと。

【 0 1 4 7 】

検査したアカシア (A. nilotica) 抽出物は、試験した中でキナーゼ活性の最も強い阻害剤であるらしく (表 4)、いずれも 1 μ g / m l の曝露で、S y k (9 8 %)、L y n (9 6 %)、G S K 3 α (9 5 %)、A u r o r a - A (9 2 %)、F l t 4 (8 8 %)、M S S K 1 (8 8 %)、G S K 3 β (8 7 %)、B T K (8 5 %)、P R A K (8 2 %)、及び T r k A (8 0 %) のようなキナーゼについて 8 0 % 以上の活性阻害を明示した。

【 0 1 4 8 】

実施例 3

P I 3 K 活性に対するホップ成分の効果

実施例 1 の手順及びプロトコールに従って、ヒト P I 3 K - β 、P I 3 K - γ 、及び P I 3 K - δ に対するホップ成分のキサントフモールとベータ酸のマグネシウム塩、イソアルファ酸のマグネシウム塩 (M g - I A A)、テトラヒドロイソアルファ酸のマグネシウム塩 (M g - T H I A A)、及びヘキサヒドロイソアルファ酸のマグネシウム塩 (M g - H H I A A) の阻害効果を試験した。Acacia nilotica 芯材抽出物を追加的に試験した。すべての化合物を 5 0 μ g / m l で試験した。この結果を図 3 としてグラフで図示する。

【 0 1 4 9 】

試験したホップ化合物のすべてが P I 3 K 活性の > 5 0 % 阻害を示して、M g - T H I A A は、最大の全体阻害 (試験したすべての P I 3 K アイソフォームで > 8 0 % 阻害) をもたらしたことに注目すべきである。さらに、キサントフモールと M g - ベータ酸がともに、P I 3 K - β 又は P I 3 K - δ に対するよりも P I 3 K - γ に対してより阻害的であったことに注目されたい。M g - I A A は、P I 3 K - γ 又は P I 3 K - δ に対するより P I 3 K - β に対して 3 倍阻害的であった。Acacia nilotica 芯材抽出物は、P I 3 K - β 又は P I 3 K - δ の活性を刺激するように見えた。S y k 及び G S K キナーゼでは、同等の結果を得た (データ示さず) 。

【 0 1 5 0 】

実施例 4

ホップ化合物及び誘導体による、刺激及び非刺激マウスマクロファージにおける P G E₂ 合成の阻害

本実施例の目的は、マウス R A W 2 6 4 . 7 マクロファージモデルにおいて、ホップ誘導体が、P G E₂ の C O X - 1 合成より選好的に P G E₂ の C O X - 2 合成を阻害する程度を評価することであった。R A W 2 6 4 . 7 細胞系は、試験薬剤の抗炎症活性を評価するための十分に確立されたモデルである。R A W 2 6 4 . 7 細胞を細菌リポ多糖で刺激すると、C O X - 2 の発現と P G E₂ の産生を引き起こす。P G E₂ 合成の阻害は、試験薬剤の抗炎症活性の測定基準として使用する。機器、化学品及び試薬、P G E₂ アッセイ、

10

20

30

40

50

及び計算について以下に記載する。

【0151】

機器—本実施例に使用する機器には、O H A S Model # E 0 1 1 4 0 分析天秤、F o r m a Model # F 1 2 1 4 生物学的安全キャビネット（オハイオ州マリエッタ）、0.1～100 μ l を配分する様々なピペット（VWR, ニューヨーク州ロチェスター）、細胞手動カウンター（VWR カタログ# 2 3 6 0 9 - 1 0 2, ニューヨーク州ロチェスター）、F o r m a Model # F 3 2 1 0 CO₂ インキュベーター（オハイオ州マリエッタ）、血球計（H a u s s e r Model # 1 4 9 2, ペンシルヴェニア州ホーシャム）、L e i c a Model # D M I L 倒立顕微鏡（W e t z l a r, ドイツ）、P U R E L A B Plus Water Polishing System（U. S. Filter, マサチューセッツ州ローウェル）、4℃冷蔵庫（F o r m a Model # F 3 7 7 5, オハイオ州マリエッタ）、ボルテックス・ミキサー（VWR カタログ# 3 3 9 9 4 - 3 0 6, ニューヨーク州ロチェスター）、及び37℃水浴（S h e l Lab Model # 1 2 0 3, オレゴン州コルネリウス）。

10

【0152】

化学品及び試薬—細菌リポ多糖（L P S ; B E coli 055: B5）は、シグマ（ミズーリ州セントルイス）からのものであった。加熱不活性化胎仔ウシ血清（F B S - H I Cat # 3 5 - 0 1 1 C V）、及びダルベッコ改良イーグル培地（D M E M Cat # 1 0 - 0 1 3 C V）は、M e d i a t e c h（バージニア州ヘンンドン）より購入した。ホップ分画（1）アルファホップ（1%アルファ酸；A A）、（2）アロマホップ O E（10%ベータ酸及び2%異性化アルファ酸）、（3）イソホップ（異性化アルファ酸；I A A）、（4）ベータ酸溶液（ベータ酸；B A）、（5）ヘキサホップゴールド（ヘキサヒドロ異性化アルファ酸；H H I A A）、（6）レジホップ（還元異性化アルファ酸；R I A A）、（7）テトラホップ（テトラヒドロイソアルファ酸；T H I A A）、及び（8）使用済ホップは、B e t a t e c h H o p s P r o d u c t s（ワシントンD. C., アメリカ）より入手した。使用済ホップは、当量の無水エタノールで2回抽出した。40℃で加熱することによってエタノールを除去すると、濃厚な茶褐色の残渣だけが残った。この残渣を、R A W 2 6 4. 7 細胞での試験用に、D M S O に溶かした。

20

【0153】

試験材料—表12に記載のようなホップ誘導体を使用した。COX-1 選択阻害剤のアスピリンとCOX-2 選択阻害剤のセレコキシブを陽性対照として使用した。アスピリンは、シグマ（ミズーリ州セントルイス）より入手して、セレコキシブの市販製剤（C e l e r b r e x TM, サール社、イリノイ州シカゴ）を使用した。

30

【0154】

細胞培養と試験材料での処理—A m e r i c a n Type Culture C o l l e c t i o n より入手したR A W 2 6 4. 7 細胞（C a t a l o g # T I B - 7 1, バージニア州マナッサス）をダルベッコ改良イーグル培地（D M E M, M e d i a t e c h, バージニア州ヘンンドン）で増殖させて、対数期に維持した。D M E M 増殖培地は、500ml ボトル量のD M E M へ50ml の加熱不活性化F B S と5ml のペニシリン／ストレプトマイシンを加えて、4℃で保存することによって作製した。この増殖培地は、使用前に、水浴において37℃へ温めた。

40

【0155】

COX-2 関連のP G E₂ 合成では、1日目に調製した細胞プレートの各ウェルより100 μ l の培地を取り出して、平衡化2X最終濃度の100 μ l の試験化合物と交換した。次いで、細胞を90分間インキュベートした。刺激する細胞の各ウェルへ20 μ l のL P S を加えて1 μ g L P S / m l の最終濃度を達成して、この細胞を4時間インキュベートした。細胞を5 μ M アラキドン酸とともに15分間さらにインキュベートした。培地へ放出されたP G E₂ の定量のために、各ウェルより25 μ l の上清培地を清浄なマイクロ分離管へ移した。

【0156】

50

COX-1 関連の PGE₂ 合成では、1 日目に調製した細胞プレートの各ウェルより 100 μl の培地を取り出して、平衡化 2X 最終濃度の 100 μl の試験化合物と交換した。次いで、細胞を 90 分間インキュベートした。次に、LPS 刺激をせずに、細胞を 100 μM アラキドン酸とともに 15 分間インキュベートした。培地へ放出された PGE₂ の定量のために、各ウェルより 25 μl の上清培地を清浄なマイクロ分離管へ移した。

【0157】

細胞の外観を観察して、生存能力を視覚的に評価した。どの化合物でも、試験した最高濃度で、明らかな毒性を観察しなかった。培地へ放出された PGE₂ の定量のために、各ウェルより 25 μl の上清培地を清浄なマイクロ分離管へ移した。既報のように PGE₂ を定量して、下記に報告する。

【0158】

PGE₂ アッセイ—PGE₂ 定量用の市販の非放射活性手順 (Cayman Chemical, ミシガン州アンアバー) を利用して、製造業者の推奨手順を変更なしに使用した。簡潔に言えば、25 μl の培地を、PGE₂ 標準試料の系列希釈液とともに、適正量のアセチルコリンエステラーゼ標識トレーサー及び PGE₂ 抗血清と混合して、室温で 18 時間インキュベートした。ウェルを空にして洗浄緩衝液で濯ぎ、アセチルコリンエステラーゼの基質を含有する Ellman 試薬の 200 μl を加えた。この反応物をローシェーカー上に室温で 1 時間維持して、415 nm での吸光度を Bio-Tek Instruments (Model #Elx800, バーモント州ウィノオスキ) ELISA プレートリーダーで定量した。PGE₂ 濃度は、ピコグラム/ml として表した。このアッセイへの製造業者の仕様書には、10% 未満のアッセイ内変動係数、1% 未満の PGD₂ 及び PGF₂ との交差反応性、及び 10~1000 pg/ml の範囲での直線性が含まれる。COX-2 と COX-1 の両方からの PGE₂ 合成についてのメジアン阻害濃度 (IC₅₀) について以下に記載のように計算した。

【0159】

計算—CalcuSyn (BIOSOFT, ミズーリ州ファーガソン) を使用して、PGE₂ 合成についてのメジアン阻害濃度 (IC₅₀) を計算した。計算には、それぞれの試験材料又は陽性対照の少なくとも 4 点の濃度を使用した。この統計学パッケージは、T. C. Chou と P. Talalay [Chou, T. C. and P. Talalay 「用量—効果関係の定量解析；多数の薬物又は酵素阻害剤の組合せ効果 (Quantitative analysis of dose-effect relationships; the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors)」Adv Enzyme Regul 22: 27-55, (1984)] により記載されるメジアン効果法を使用する多数の薬物用量—効果の計算を実施して、参照により本明細書に組み込まれる。実験は、3 つの異なる日付で 3 回繰り返した。各用量での阻害パーセントを 3 回の独立実験で平均して、これを使用して、報告するメジアン阻害濃度を計算した。

【0160】

メジアン阻害濃度を 4 種の任意カテゴリーへ順位付けた：(1) 0.1 という 0.3 μg/ml 以内の IC₅₀ 値の薬剤は、最高の抗炎症応答；(2) 0.7~1.0 μg/ml の IC₅₀ 値の薬剤は、高い抗炎症応答；(3) 2~7 μg/ml の IC₅₀ 値の薬剤は、中間の抗炎症応答；(4) 12 μg/ml (試験した最高濃度) より大きい IC₅₀ 値の薬剤は、低い抗炎症応答。

【0161】

結果—アスピリンとセレコキシブの陽性対照は、このモデル系において、そのそれぞれのシクロオキシゲナーゼ選択性を明示した (表 9)。アスピリンが COX-1 に対してはば 1000 倍より選択的であるのに対して、セレコキシブは、COX-2 に対して 114 倍より選択的であった。すべてのホップ材料は COX-2 選択的であり、Rhoinsoalfacetic acid と Isoalfacetic acid が最高の COX-2 選択性 (それぞれ、363 倍と 138 倍) を明示した。低いメジアン阻害濃度と組み合わせられたそのような高い COX-2 選択性は、他の供給源からの天然産物ではこれまで報告されていない。残るホップ誘導体の中では、アロマホップオイルだけがかろうじて 3 倍の COX-2 選択性を明示した。in vitro デ

10

20

30

40

50

ータを臨床効果へ外挿するには、一般に、5倍以上のCOX-2選択性が臨床的に重要な胃粘膜保護の潜在能力を示すと仮定されている。この判定基準では、ベータ酸、CO₂ホップ抽出物、使用済ホップCO₂/エタノール、テトラヒドロイソアルファ酸、及びヘキサヒドロイソアルファ酸が潜在的に臨床意義のあるCOX-2選択性を表示した。

【0162】

表9

ホップ分画及び誘導体による、RAW264.7細胞におけるCOX-2及びCOX-

1阻害

【0163】

【表19】

10

試験材料	IC ₅₀ COX-2 [μg/ml]	IC ₅₀ COX-1 [μg/ml]	COX-1/COX-2
Rho イソアルファ酸	0.08	29	363
イソアルファ酸	0.13	18	138
ベータ酸	0.54	29	54
CO ₂ ホップ抽出物	0.22	6.3	29
アルファ酸	0.26	6.2	24
使用済ホップ CO ₂ /エタノール	0.88	21	24
テトラヒドロイソアルファ酸	0.20	4.0	20
ヘキサヒドロイソアルファ酸	0.29	3.0	10
アロマホップオイル	1.6	4.1	3.0
陽性対照			
アスピリン	1.16	0.0009	0.0008
セレコキシブ	0.005	0.57	114

20

【0164】

実施例5

還元異性化アルファ酸又は異性化アルファ酸による、LPS刺激Raw264.7細胞における直接的なPGE₂阻害の不足

30

本試験の目的は、RAW264.7細胞の炎症モデルにおいて、COX-2仲介性PGE₂生合成の直接的な阻害剤として独立的に機能する、ホップ誘導体の還元イソアルファ酸及び異性化アルファ酸の能力を評価することであった。この実施例では、実施例4に記載のようなRAW264.7細胞系を使用した。機器、化学品及び試薬、PGE₂アッセイ、及び計算は、実施例4に記載の通りであった。

【0165】

試験材料—表12に記載のようなホップ誘導体の還元イソアルファ酸及び異性化アルファ酸を使用した。COX-1選択陽性対照のアスピリンは、シグマ（ミズーリ州セントルイス）より入手した。

【0166】

40

細胞培養と試験材料での処理—RAW264.7細胞（TIB-71）をAmerican Type Culture Collection（バージニア州マナッサス）より入手して、実施例4に記載のように継代培養した。5% CO₂とともに37℃で一晩のインキュベーションに続いて、増殖培地を吸引して、FBSもペニシリン/ストレプトマイシンも含まない200μl DMEMに置き換えた。RAW264.7細胞をLPSで刺激して一晩インキュベートして、COX-2発現を誘導した。LPS刺激から18時間後、試験材料を加えて、60分後に、カルシウムイオノフォアのA23187の添加を続けた。試験材料をDMSOに溶かして、250倍のストック溶液とした。この250倍ストック試験材料調製物の4μlを1mlのDMEMへ加えて、引き続き、この溶液の200μlを試験材料の各用量につき8つのウェルへ加えた。30分後に、PGE₂定量の

50

ために上清培地をサンプリングした。実施例 4 に記載のように、2 つの独立した実験での少なくとも 4 点の濃度よりメジアン阻害濃度を計算した。

【0167】

PGE₂ の定量－実施例 4 に記載のように、PGE₂ 定量には、PGE₂ 定量用の市販の非放射活性手順 (Caymen Chemical, ミシガン州アンアーバー) を利用して、製造業者の推奨手順を変更なしに使用した。

【0168】

細胞生存度－PGE₂ アッセイ用の培地をサンプリングすることに先立つか又はその直後に細胞を顕微鏡で視察することによって、細胞生存度を評価した。試験した濃度のいずれでも、明らかな細胞死は認められなかった。

10

【0169】

計算－4 点の濃度 (0.10、1.0、10、及び 100 µg/ml) を使用して用量－応答曲線を導いて、CalcuSyn (BIOSOFT, ミズーリ州ファーガソン) を使用して 95% 信頼区間でメジアン阻害濃度 (IC₅₀) を計算した。

【0170】

結果－RAW264.7 細胞における PGE₂ 産生の LPS 刺激は、非刺激細胞に比べて、1.4 倍～2.1 倍に及んだ。アスピリン陽性対照について計算した 8.7 µg/ml (95% CL = 3.9～19) の IC₅₀ 値は、1.4～50 µg/ml に及ぶ直接的な COX-2 阻害の公表値 [Warner, T. D. et al. 「非ステロイド薬の (シクロオキシゲナーゼ-2 ではなく) シクロオキシゲナーゼ-1 への選択性は、ヒトの胃腸毒性に関連する：完全な in vitro 分析 (Nonsteroidal drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis)」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7563-7568, (1999)] と、A549 細胞系での 3.2 µg/ml (95% CL = 0.55～19) という本研究所のこれまでのデータに一致した。

20

【0171】

RAW264.7 細胞での LPS による COX-2 誘導に続いて加えるとき、RIAA と IAA は、ともに、ごくわずかな、用量関連性の PGE₂ 阻害をもたらした。試験材料の濃度を 1000 倍増加しても、RIAA 及び IAA で、それぞれ 14 及び 10% の阻害の増加しか認められなかった。用量応答の傾きが浅いために、RIAA (36 mg/ml) と IAA (>1000 mg/ml) では、mg/ml 範囲の IC₅₀ 値 (表 10) をもたらした。わずかな変化が 3 つの対数単位の用量に及ぶ応答で観察されたことは、この細胞ベースのアッセイにおいて観察されたホップ誘導体の PGE₂ 阻害効果がこの細胞に対する二次的な効果であって、COX-2 酵素活性の直接的な阻害ではない可能性があることを示唆する。

30

【0172】

図 4A 及び 4B は、それぞれ RIAA 及び IAA の用量応答データを白い棒として、そしてこの実施例からの用量応答データを灰色の棒として図示する。添加の順番の効果が明らかに見られて、RIAA と IAA が直接の COX-2 酵素阻害剤ではないという推論を裏付ける。

40

【0173】

(1) ホップ材料は、PGE₂ 生合成を in vitro で阻害するその能力により評価されるように、試験した中で最も活性のある、抗炎症性の天然産物であった：(2) RIAA と IAA は、COX-2 誘導に関するその阻害の様式に基づけば、直接的な COX-2 酵素阻害剤ではないらしい；そして (3) RIAA と IAA は、COX-2 酵素阻害ではなく、COX-2 発現の阻害に基づくように見える COX-2 選択性を有すると考えられる。この選択性は、その選択性が差別的な酵素阻害に基づくセレコキシブとは異なるものである。

【0174】

表 10

50

RAW264.7細胞において一晚のLPS刺激後に試験材料を加えるときのRIAA、IAAのメジアン阻害濃度

【0175】

【表20】

試験材料	IC ₅₀ [μg/ml]	95% 信頼区間 [μg/ml]
RIAA	36,000	17,000-79,000
IAA	>1,000,000	-
陽性対照	IC ₅₀ [μg/ml]	95% 信頼区間 [μg/ml]
アスピリン	8.7 μg/ml	3.9-19

RAW264.7細胞をLPSで刺激し、一晚インキュベートしてCOX-2発現を誘導した。LPS刺激して18時間後、試験材料を添加し、次いで60分後にA23187を添加した。30分後にPGE₂測定のために、上清培地のサンプルを採取した。2つの独立した実験について、4点の濃度において最低8つの複製物からメジアン阻害濃度を算出した。

【0176】

実施例6

ホップの化合物及び誘導体は、A549肺上皮細胞において直接的なシクロオキシゲナーゼ酵素阻害剤ではない

化学品一本実施例において使用するホップとホップ誘導体は、実施例4ですでに記載した。他の化学品は、いずれも実施例4に記載のような供給業者より入手した。

【0177】

機器、PGE₂アッセイ、及び計算は、実施例4に記載の通りであった。

細胞-A549(ヒト肺上皮)細胞をAmerican Type Culture Collection(バージニア州マナッサス)より入手して、供給業者の指示書に従って継代培養した。この細胞を、50ユニットペニシリン/ml、50μgストレプトマイシン/ml、5mMピルビン酸ナトリウム、及び5mM L-グルタメートとともに10% FBSを含有するRPMI 1640において、5% CO₂とともに37℃で定期的に培養した。実験の当日、指数的に増殖する細胞を採取して、無血清RPMI 1640で洗浄した。

【0178】

対数期のA549細胞を96ウェル組織培養プレートの各ウェルにつき0.2ml増殖培地に8x10⁴細胞/ウェルでプレート培養した。試験化合物によるPGE₂阻害の定量については、WHMA-COX-2プロトコールとしても知られる、Warner et al. [「非ステロイド薬の(シクロオキシゲナーゼ-2ではなく)シクロオキシゲナーゼ-1への選択性は、ヒトの胃腸毒性に関連する：完全なin vitro分析(Nonsteroidal drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis)」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7563-7568, (1999)]の手順に変更なしで従った。簡潔に言えば、A549細胞のプレート培養から24時間後、インターロイキン-1β(10ng/ml)を加えて、COX-2の発現を誘導した。24時間後、この細胞を無血清RPMI 1640で洗浄した。引き続き、DMSOと無血清RPMIに溶かした試験材料をウェルへ加えて、25、5.0、0.5、及び0.05μg/mlの最終濃度とした。各濃度につき、同一2検体で実施した。対照ウェルへは、試験ウェルに含まれるものと等しい量でDMSOを加えた。60分後、A23187(50μM)をウェルへ加えて、アラキドン酸を放出させた。30分後に、PGE₂定量用に25μlの培地をウェルよりサンプリングした。

。

10

20

30

40

50

【0179】

細胞生存度を視覚的に評価すると、どの化合物でも、試験した最高濃度で明らかな毒性を観察しなかった。すでに実施例4で記載したようにして、上清培地中のPGE₂を定量して報告した。すでに実施例4で記載したようにして、PGE₂合成についてのメジアン阻害濃度(IC₅₀)を計算した。

【0180】

結果—この実験プロトコールは、試験した用量で、ホップの抽出物又は誘導体のいずれでも、メジアン有効濃度をとらえることができなかった。このプロトコールは試験化合物の添加に先立つCOX-2発現の刺激を必要とするので、試験材料がPGE₂合成を阻害することができなかったのは、その作用機序がCOX-2アイソザイムの発現を阻害することによって、活性を直接阻害するわけではないことにあると考えられる。このWHMA-COX-2プロトコールを使用していくらかの直接的な阻害が観察されたが、この手順では、ホップ化合物又はホップ化合物の誘導体の抗炎症特性を評価するのに不適切であるらしい。

【0181】

実施例7

ホップ誘導体は、A549肺上皮細胞において、PGE₂生合成のダニ埃アレルゲン活性化を阻害する

化学品—本実施例において使用するホップとホップ誘導体、(1)アルファホップ(1%アルファ酸;AA)、(2)アロマホップOE(10%ベータ酸及び2%異性化アルファ酸)、(3)イソホップ(異性化アルファ酸;IAA)、(4)ベータ酸溶液(ベータ酸;BA)、(5)ヘキサホップゴールド(ヘキサヒドロ異性化アルファ酸;HHIAA)、(6)レジホップ(還元異性化アルファ酸;RIAA)、及び(7)テトラホップ(テトラヒドロイソアルファ酸;THIAA)については、実施例1ですでに記載した。他の化学品は、いずれも実施例4に記載のような供給業者より入手した。試験材料は、10µg/mlの最終濃度で、ダニ埃アレルゲンの添加60分前に加えた。

【0182】

機器、PGE₂アッセイ、及び計算は、実施例4に記載の通りであった。

ダニ埃アレルゲンの単離—*Dermatophagoides farinae* は、アメリカのハウスダスト・ダニである。*D. farinae* を1:1比のPurina Laboratory Chow (Ralston Purina社、ミズーリ州セントルイス)とFleischmannの造粒ドライイースト(Standard Brands社、ニューヨーク州ニューヨーク)に室温、湿度75%で育てた。生きているダニを培地から移動中に培養器より吸引し、凍結によって殺し、乾燥させて、0℃の湿度で保存した。埃ダニのアレルゲン成分を周囲温度に水で抽出した。500mgのダニ粉末を15mlコニカル遠心分離管(VWR, ニューヨーク州ロチェスター)中5mlの水へ加え(1:10 w/v)、1分間振り混ぜて、そのまま周囲温度で一晩静置させた。翌日、0.2µmの使い捨てシリンジフィルター(Nalgene, ニューヨーク州ロチェスター)を使用して、水相を濾過した。この濾液をダニ埃アレルゲンと呼び、A549肺上皮細胞におけるPGE₂生合成の誘導を試験するために使用した。

【0183】

細胞の培養及び処理—実施例6ですでに記載のように、ヒト気道上皮細胞系、A549(American Type Culture Collection, メリーランド州ベセスダ)を培養して処理した。ダニ埃アレルゲンを培養基へ加えて、1000ng/mlの最終濃度とした。18時間後、PGE₂定量用に培地をサンプリングした。

【0184】

結果—表11は、ダニ埃アレルゲンにより刺激したA549肺細胞におけるPGE₂生合成のホップ誘導体による阻害の程度を図示する。試験したすべてのホップ誘導体は、ダニ埃アレルゲンの刺激効果を有意に阻害することが可能であった。

【0185】

10

20

30

40

50

表 1 1

ダニ埃アレルゲンにより刺激された A 5 4 9 肺上皮細胞における、ホップ誘導体による P G E₂ 阻害

【 0 1 8 6 】

【表 2 1】

試験材料	PGE ₂ 阻害パーセント
アルファホップ(AA)	81
アロマホップ OE	84
イソホップ(IAA)	78
ベータ酸 (BA)	83
ヘキサホップ(HHIAA)	82
レジホップ(RIAA)	81
テトラホップ(THIAA)	76

10

【 0 1 8 7 】

この実施例は、ホップ誘導体が、A 5 4 9 肺細胞におけるダニ埃アレルゲンの P G E₂ 刺激効果を阻害することが可能であることを明示する。

【 0 1 8 8 】

実施例 8

還元イソアルファ酸による直接的な C O X - 2 阻害の不足

20

本実施例の目的は、マグネシウム-還元イソアルファ酸が C O X - 2 酵素活性の直接的な阻害剤として作用することができるかどうかを判定することであった。

【 0 1 8 9 】

材料-試験化合物は、ジメチルスルホキシド (D M S O) において調製して、- 2 0 ° C で保存した。L P S は、シグマーアルドリッチ (ミズーリ州セントルイス) より購入した。M g R I A A は、M e t a g e n i c s (カリフォルニア州サンクレメンテ) より供給され、セレコキシブの市販製剤 (C e l e r b r e x^{T M}, サール社、イリノイ州シカゴ) を使用した。

【 0 1 9 0 】

細胞培養-マウスマクロファージ R A W 2 6 4 . 7 細胞系を A T C C (バージニア州マナッサス) より購入して、その指示書に従って維持した。細胞を 8×10^4 細胞/ウェルの密度で 9 6 ウェルプレートにおいて継代培養して、ほぼ 2 日間、そのまま 9 0 % の集密に達せしめた。L P S ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 又は P B S 単独を細胞培地へ加えて、1 2 時間インキュベートした。培地をウェルより除去して、D M S O と無血清 R P M I に溶かした試験化合物をウェルへ加えて、M g R I A A の最終濃度を 2 0、5、1、及び 0 . $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ とセレコキシブの最終濃度を 1 0 0、1 0、1、及び 0 . $1 \text{ng}/\text{ml}$ とした。各濃度を 8 つの同一 2 検体で実施した。試験化合物との 1 時間のインキュベーションに続いて、細胞培地を取り出して、試験化合物と L P S ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 入りの新鮮培地に置き換えて、1 時間インキュベートした。培地をウェルより取り出して、P G E₂ 合成を分析した。

30

40

【 0 1 9 1 】

P G E₂ アッセイ-P G E₂ 定量用の市販の非放射活性手順 (C a y m e n C h e m i c a l, ミシガン州アンアーバー) を利用した。試料を E I A 緩衝液で 1 0 倍希釈して、製造業者の推奨手順を変更なしに使用した。P G E₂ 濃度は、ピコグラム/ ml として表した。このアッセイへの製造業者の仕様書には、1 0 % 未満のアッセイ内変動係数、1 % 未満の P G D₂ 及び P G F₂ との交差反応性、及び 1 0 ~ 1 0 0 0 p g / ml の範囲での直線性が含まれる。

【 0 1 9 2 】

C O X - 2 特異的な阻害剤のセレコキシブ (1 0 0、1 0、1、及び 0 . $1 \text{ng}/\text{ml}$) が C O X - 2 仲介性 P G E₂ 合成を用量依存的に阻害したのに対し、M g R I A A では

50

、有意な PGE₂ 阻害を観察しなかった。このデータは、MgR I A A が、セレコキシブと違って、直接的な COX-2 酵素阻害剤ではないことを示唆する。

【0193】

実施例 9

i N O S 及び C O X - 2 タンパク発現の M g R I A A による阻害

M g R I A A で処理して L P S で刺激した R A W 2 6 4 . 7 細胞由来の細胞抽出物について、ウェスタンブロットにより i N O S 及び C O X - 2 タンパク質をアッセイした。

【0194】

材料-試験化合物は、ジメチルスルホキシド (DMSO) において調製して、-20℃で保存した。M g R I A A は、M e t a g e n i c s (カリフォルニア州サンクレメンテ) より供給された。パーセノライドは、シグマ-アルドリッチ (ミズーリ州セントルイス) より購入した。P I 3 K 阻害剤のウォルトマンニン及び L Y 2 9 4 0 0 2 は、E M D B i o s c i e n c e s (カリフォルニア州サンディエゴ) より購入した。COX-2 及び i N O S に対して産生した抗体は、C a y m e n C h e m i c a l (ミシガン州アンアーバー) より購入した。G A P P H に対して産生した抗体は、N o v u s B i o l o g i c a l (コロラド州リットルトン) より購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼへ共役する二次抗体は、アマーシャム・バイオサイエンス (ニュージャージー州ピスカタウェイ) より購入した。

【0195】

細胞培養-マウスマクロファージ R A W 2 6 4 . 7 細胞系を A T C C (バージニア州マナッサス) より購入して、その指示書に従って維持した。細胞を増殖させて、3 x 10⁵ 細胞/ウェルの密度で 24 ウェルプレートにおいて継代培養して、ほぼ 2 日間、そのまま 90% の集密に達せしめた。無血清培地中のこの細胞へ 0.4% DMSO の最終濃度で試験化合物を加えた。試験化合物との 1 時間のインキュベーションに続いて、細胞ウェルへ L P S (1 µg/ml) 又はリン酸緩衝化生理食塩水単独を加えて、インキュベーションを指定時間の間続けた。

【0196】

ウェスタンブロット-細胞抽出物を緩衝液 E (50 mM HEPES, pH 7.0; 150 mM NaCl; 1% t r i t o n X-100; 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム; アプロチニン 5 µg/ml; ペプスタチン A 1 µg/ml; ロイペプチン 5 µg/ml; フッ化フェニルメタンスルホニル 1 mM) において調製した。簡潔に言えば、細胞を冷 P B S で 2 回洗浄して緩衝液 E を加えた。細胞を清浄な試験管へ掻き入れて、14,000 rpm で、4℃で 10 分間の遠心分離を続けて、上清を全細胞抽出物として取った。細胞抽出物 (50 µg) を、予め固化させた 4%~20% T r i s - H C l C r i t e r i o n ゲル (B i o - R a d, カリフォルニア州ヘルクレス) を通して、先端の移動色素がゲルの底から 5 mm に達するまで電気泳動させた。B i o - R a d (カリフォルニア州ヘルクレス) からの半乾燥システムを使用して、タンパク質をニトロセルロース膜へ移した。この膜を洗浄して、5% 乾燥ミルク粉末を用いて、室温で 1 時間固定した。一次抗体に続く二次抗体とのインキュベーションは、室温でそれぞれ 1 時間であった。ピアス・バイオテクノロジー (イリノイ州ロックフォード) からの S u p e r S i g n a l W e s t F e m t o M a x i m u m S e n s i t i v i t y S u b s t r a t e を使用して、等量のルミノール/エンハンサー溶液と安定ペルオキシド溶液の室温で 5 分間のインキュベーションによって、化学発光を実施した。冷却 C C D K o d a k (登録商標) (ニューヨーク州ロチェスター) I S I 1000 イメージングシステムを使用して、ウェスタンブロットイメージを捕捉した。K o d a k (登録商標) ソフトウェアを使用して、デンシトメトリーを実施した。

【0197】

ウェスタンブロット検出を使用して、COX-2 及び i N O S タンパク発現のパーセントを評価した。COX-2 の発現は、L P S での刺激後 20 時間で観察された。DMSO の溶媒対照と比較すると、M g R I A A によって、COX-2 タンパク発現の 55% 低下

が見られた（図6）。特異的なNF-κB阻害剤であるパーセノライドがタンパク発現を22.5%阻害したのに対して、PI3-キナーゼ阻害剤は、COX-2発現を約47%減少させた（図6）。追加的に言えば、MgRIAAによって、LPSでの刺激後20時間でiNOSタンパク発現の73%の低下が観察された（図7）。

【0198】

実施例10

NF-κBの核移行及びDNA結合

MgRIAAで処理してLPSで4時間刺激したRAW264.7細胞からの核抽出物について、NF-κBのDNAへの結合をアッセイした。

【0199】

材料-試験化合物は、ジメチルスルホキシド（DMSO）において調製して、-20℃で保存した。MgRIAAは、Metagenics（カリフォルニア州サンクレメンテ）より供給された。パーセノライド（NF-κB活性化の特異的な阻害剤）は、シグマアルドリッチ（ミズーリ州セントルイス）より購入した。PI3K阻害剤のLY294002は、EMD Biosciences（カリフォルニア州サンディエゴ）より購入した。

【0200】

細胞培養-マウスマクロファージRAW264.7細胞系をATCC（バージニア州マナッサス）より購入して、その指示書に従って維持した。細胞を 1.5×10^6 細胞/ウェルの密度で6ウェルプレートにおいて継代培養して、ほぼ2日間、そのまま90%の集密に達せしめた。無血清培地中のこの細胞へ0.4% DMSOの最終濃度で、試験化合物、MgRIAA（55及び14 μg/ml）、パーセノライド（80 μM）、及びLY294002（25 μM）を加えた。試験化合物との1時間のインキュベーションに続いて、細胞培地へLPS（1 μg/ml）又はPBS単独を加えて、インキュベーションをさらに4時間続けた。

【0201】

NF-κB-DNA結合-核抽出物は、本質的に Dignam, et al [Nucl Acids Res 11: 1475-1489, (1983)] に記載のように調製した。簡潔に言えば、細胞を冷PBSで2回洗浄してから、緩衝液A（10 mM HEPES, pH 7.0; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0.1% NP-40; アプロチニン5 μg/ml; ペプスタチンA 1 μg/ml; ロイペプチン 5 μg/ml; フッ化フェニルメタンスルホニル 1 mM）を加えて、そのまま氷上に15分間静置させた。次いで、細胞を清浄な試験管へ掻き入れて、凍結/融解の3サイクルで処理した。10,000 x g、4℃で5分間の遠心分離後の上清層を細胞質分画とした。残存するペレットを緩衝液C（20 mM HEPES, pH 7.0; 1.5 mM KCl; 420 mM KCl; 25%グリセロール; 0.2 mM EDTA; アプロチニン5 μg/ml; ペプスタチンA 1 μg/ml; ロイペプチン 5 μg/ml; フッ化フェニルメタンスルホニル 1 mM）に再懸濁して、そのまま氷上に15分間静置させた。10,000 x g、4℃で5分間の遠心分離後の上清層として核抽出分画を採取した。Active Motif（カリフォルニア州カールスバッド）からのTransAM NF-κBキットを製造業者の説明書のように使用して、核抽出物のNF-κB DNA結合を評価した。図8に見られるように、TransAMキットは、96ウェルフォーマットにおいて、NF-κBのp50サブユニットのコンセンサス配列への結合を検出した。タンパク濃度を測定して（Bio-Radアッセイ）、10 μgの核タンパク抽出物を同一2検体でアッセイした。

【0202】

核抽出物（10 μg タンパク質）の分析を同一2検体で実施して、その結果を図9にグラフで示す。LPS（1 μg/ml）での刺激は、NF-κB DNA結合の2倍増加をもたらした。LY294002（PI3キナーゼ阻害剤）での処理は、これまでの文献報告から予測されるように、NF-κB結合のわずかな減少をもたらした。パーセノライドも、予測されるように、NF-κB結合の有意な低下をもたらした。MgRIAAでは

10

20

30

40

50

、NF- κ B結合の大きな低下が観察された。この効果は、用量-応答のやり方で観察された。NF- κ B結合の低下は、COX-2、iNOS、及びTNF α が含まれる標的遺伝子の転写活性化の低下をもたらす可能性がある。

【0203】

上記の結果は、MgDHAで観察されるNF- κ B結合の減少がCOX-2タンパク発現の減少をもたらし、最終的にはPGE₂産生の減少をもたらす可能性があることを示唆する。

【0204】

実施例11

Acacia樹皮の水系抽出物のジメチルスルホキシド可溶性分画により誘発される、3T3-L1脂肪細胞における脂肪生成の増加

モデル-3T3-L1マウス線維芽細胞モデルを使用して、脂肪細胞の分化及び脂肪生成に対する化合物の潜在効果を試験する。この細胞系により、前脂肪細胞の複製を調整する刺激及び機序について、脂肪細胞への分化を調整するそれとは別に検討することが可能になる [Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. 「3T3-L1脂肪細胞におけるアジポネクチン遺伝子発現のホルモン調節 (Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes)」 *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1084-1089, (2002); Li, Y. and Lazar, M. A. 「PPAR γ アゴニストと構成的に活性なPPAR γ 2による差別的な遺伝子調節 (Differential gene regulation by PPARgamma agonist and constitutively active PPARgamma2)」 *Mol Endocrinol*, 16: 1040-1048, (2002)] だけでなく、試験薬剤のインスリン増感能力及びトリグリセリド低下能力の検討が可能になる [Raz, I., Eldor, R., Cernea, S., and Shafrir, E. 「糖尿病：インスリン抵抗性と脂質代謝における障害。脂肪の輸送及び保存への介入による治療 (Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage)」 *Diabetes Metab Res Rev*, 21: 3-14]。

【0205】

3T3-L1細胞は、前脂肪細胞として、線維芽細胞の外観を有する。それらは、培養において、集密した単層を形成するまで増殖して、その後で、細胞-細胞接触により、G₀/G₁増殖停止が引き起こされる。3T3-L1細胞の脂肪細胞への最終分化は、集密の前と後の前脂肪細胞の増殖に依存する。3-イソブチル-1-メチルキサンタン、デキサメタゾン、及び高用量のインスリン(MDI)で2日間の後続の刺激は、これらの細胞が集密後の有糸分裂クローン膨張を起こし、細胞周期を出て、脂肪細胞特異的な遺伝子を発現し始めることを促進する。分化の誘導からほぼ5日後、この細胞の90%より多くが特徴的な脂質充満の脂肪細胞の表現型を表示する。3T3-L1細胞のトリグリセリド合成を評価することは、試験薬剤のインスリン増感能力の検証されたモデルを提供する。

【0206】

脂肪細胞における脂質取込みを促進する薬剤がインスリン感受性を改善することは、逆説的に見える。この矛盾を説明しようとして、いくつかの仮説が提唱されてきた。研究の裏付けを獲得し続けている1つの仮説は、「脂肪酸盗流 (fatty acid steal)」、または脂肪酸が血漿より脂肪細胞へ取り込まれることによって、筋肉中の脂肪酸の相対的な枯渇を引き起こして、グルコース取込みを同時に改善するという概念である [Martin, G., K. Schoonjans, et al. 「PPAR γ アクチベータは、脂肪細胞における脂肪酸取込みを刺激することによってグルコースのホメオスタシスを改善する (PPARgamma activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes)」 *Atherosclerosis* 137 Suppl: S75-80, (1998)]。トログリタゾン及びピオグリタゾンのようなチアゾリジンジオンは、脂肪細胞における脂肪生成活性を選択的に刺激して、脂肪分解又は脂肪酸の血漿への放出のインスリン抑制を高めることが示されている [Yamauchi, T., J. Kamon, et al. 「異種接合ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ)の欠乏とPPAR γ アゴニストの両方がインスリン耐性を改善する機序 (The mechanisms

by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGgamma) deficiency and PPARGgamma agonist improve insulin resistance) 」 J Biol Chem 276(44): 41245-54, (2001); Oakes, N. D., P. G. Thalen, et al. 「チアゾリジンジオンは、血漿-脂肪組織 FFA の交換能力を増やして、全身 FFA 利用度のインスリン仲介性の制御を高める (Thiazolidinediones increase plasma- adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability) 」 Diabetes 50(5): 1158-65, (2001)」。この作用は、他の組織に利用可能な遊離脂肪酸を少なくするはずである [Yang, W. S., W. J. Lee, et al. 「減量は、脂肪由来の抗炎症性タンパク質、アジポネクチンの血漿レベルを高める (Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin) 」 J Clin Endocrinol Metab 86(8): 3815-9, (2001)」。従って、筋肉及び肝臓における遊離脂肪酸のインスリン脱感作効果は、チアゾリジンジオン処理の結果として抑制されるのであろう。これら in vitro の結果は、臨床的に確かめられている [Boden, G. 「インスリン抵抗性及び NIDDM の病理発生における脂肪酸の役割 (Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM) 」 Diabetes 46(1): 3-10, (1997); Stumvoll, M. and H. U. Haring 「グリタゾン：臨床効果と分子機序 (Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms) 」 Ann Med 34(3): 217-24, (2002)」。

【0207】

試験材料ートログリタゾンは、Cayman Chemicals (ミシガン州アンダーバー) より入手して、メチルイソブチルキサンチン、デキサメタゾン、インドメタシン、オイルレッドO、及びインスリンは、シグマ (ミズーリ州セントルイス) より入手した。試験材料は、Acacia (AcE) 試料 # 4909 のゴム樹脂の 50:50 (v/v) 水/アルコール抽出物より生成した濃褐色の粉末であり、Bayir Chemicals (No. 68, South Cross Road, Basavanagudi, インド) より入手した。この抽出物を、20% 以上のアペカテキンを含有するように標準化した。本実施例で使用するバッチ番号 A Cat / 2304 は、UV 分析により定量されるように、20.8% のアペカテキンを含有した。ペニシリン、ストレプトマイシン、ダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) は、Mediatech (バージニア州ヘンンドン) から、そして 10% FBS-HI (胎仔ウシ血清-熱不活性化) は、Mediatech 及び Hyclone (ユタ州ローガン) からのものであった。他に述べなければ、他の標準試薬はいずれもシグマより購入した。

【0208】

細胞培養と処理—マウス線維芽細胞系、3T3-L1 は、American Type Culture Collection (バージニア州マナッサス) より購入して、供給業者の説明書に従って継代培養した。実験に先立って、50 ユニット/ml のペニシリンと 50 µg/ml のストレプトマイシンを加えた 10% FBS-HI を含有する DMEM において細胞を培養して、実験設定に先立って、対数期に維持した。細胞を 5% CO₂ 加湿インキュベーターにおいて、37℃ で増殖させた。プレ集密培地の成分には、(1) 4.5 g/L のグルコースを含有する 10% FBS/DMEM; (2) 50 U/ml のペニシリン; 及び (3) 50 µg/ml のストレプトマイシンが含まれた。500 ml DMEM へ 50 ml の熱不活性化 FBS と 5 ml のペニシリン/ストレプトマイシンを加えることによって、増殖培地を作製した。この培地を 4℃ で保存した。使用前に、培地を水浴において 37℃ へ温めた。

【0209】

3T3-L1 細胞を 24 ウェルプレートにおいて 6×10^4 細胞/cm² の初期密度で播いた。2 日間、この細胞をそのまま増殖させて、集密に達せしめた。集密に続いて、分化培地の添加によって、この細胞を強制的に脂肪細胞へ分化させた; この培地は、(1) 10% FBS/DMEM (高グルコース); (2) 0.5 mM メチルイソブチルキサンチン; (3) 0.5 µM デキサメタゾン、及び (4) 10 µg/ml インスリン (MDI 培地) より構成された。3 日後、この培地を、10% FBS/DMEM 中の 10 µg/

ml インスリンからなる分化後培地へ交換した。

【0210】

A c E をジメチルスルホキシド (DMSO) に一部溶かして、培養基へ加えて、分化の 0 日目と成熟期 (6 ~ 7 日目 (D 6 / 7)) を通して $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度を達成した。新鮮な培地を加えるときはいつでも、新鮮な試験材料も加えた。DMSO を選択したのは、その極性と、それが水系の細胞培養基と混和するという事実のためである。陽性対照として、インドメタシンとトログリタゾンを加えて、それぞれ 5.0 及び $4.4 \mu\text{g} / \text{ml}$ の最終濃度とした。分化した D 6 / D 7 3 T 3 - L 1 細胞を 0.36% オイルレッド O 又は 0.001% BODIPY で染色した。細胞の分化と試験材料での処理についての完全な手順を図 10 に図式的に概説する。

10

【0211】

オイルレッド O 染色 - Kasturi and Joshi [Kasturi, R. and Joshi, V. C. 「ステアロイル補酵素 A デサチュラーゼ活性のホルモン調節と 3 T 3 - L 1 細胞の脂肪変換の間の脂肪生成 (Hormonal regulation of stearyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells)」 J Biol Chem, 257: 12224-12230, 1982] の方法に従って、D 6 / D 7 分化 3 T 3 - L 1 細胞のトリグリセリド含量をオイルレッド O で推定した。単層細胞を PBS (リン酸緩衝化生理食塩水、Mediatech) で洗浄して、 10% ホルムアミドで 10 分間固定した。固定した細胞を、3 分量の 0.6% オイルレッド O / イソプロパノールストック溶液と 2 分量の水からなるオイルレッド O 作業溶液で 1 時間染色して、過剰の染色を水で 1 回洗浄した。生じる染色した油滴をこの細胞よりイソプロパノールで抽出して、 540 nm での分光学的分析 (MEL 312e BIO-KINETICS READER, Bio-Tek Instruments, バーモント州ウィノオスキ) により定量した。試験材料と陽性対照のインドメタシン及びトログリタゾンの結果を溶媒対照の 540 nm 吸光度に対して表した。

20

【0212】

BODIPY 染色 - $4,4$ -ジフルオロ- $1,3,5,7,8$ -ペンタメチル- 4 -ボラー- $3a,4a$ -ジアザ- s -インダセン (BODIPY 493 / 503; Molecular Probes, オレゴン州ユージーン) を、細胞の中性及び非極性の脂質の定量に使用した。簡潔に言えば、培地を除去して、細胞を非滅菌 PBS で 1 回洗浄した。 1 mg の BODIPY を 1 ml DMSO に溶かすことによって、 $1000 \times$ BODIPY / DMSO ストック溶液 ($1,000 \mu\text{g}$ BODIPY / ml) を作製した。次いで、 $10 \mu\text{l}$ のストック溶液を $990 \mu\text{l}$ PBS へ加えることによって BODIPY 作業溶液を作製して、作業溶液中の最終 BODIPY 濃度を $0.01 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ とした。この作業溶液の $100 \mu\text{l}$ ($1 \mu\text{g}$ BODIPY) を 96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルへ加えた。オービタルシェーカー (DS-500, VWR Scientific Products, ニュージャージー州サウスプレインフィールド) 上に周囲温度で 15 分後、細胞を $100 \mu\text{l}$ PBS で洗浄し、続いて、BODIPY の細胞中への取込みを分光蛍光測定で定量する読取りのために $100 \mu\text{l}$ PBS を添加した。BODIPY 蛍光の定量のために、 485 nm 励起と 530 nm 放射で設定した Packard Fluorocount 分光蛍光計 (Model # BF10000, コネチカット州メリダ) を使用した。試験材料、インドメタシン、及びトログリタゾンの結果を溶媒対照の蛍光に対して報告した。

30

40

【0213】

すべての中性及び非極性脂質の BODIPY 定量と D 7 の 3 T 3 - L 1 細胞中のトリグリセリド含量のオイルレッド O 定量との間の関係についてのカイ二乗分析は、2 つの方法の間の有意な相関性を $p < 0.001$ と 4.64 のオッズ比で示した。

【0214】

統計計算と解釈 - A c E とインドメタシンについては、同一 2 検体で少なくとも 3 回アッセイした。溶媒とトログリタゾン対照についても、同一 2 検体で 8 回繰り返した。非極性脂質の取込みは、完全に分化した細胞の溶媒対照における非極性脂質蓄積に対して表し

50

た。陽性応答は、オイルレッドO又はBODIPY染色により評価される脂質蓄積が溶媒対照の95%信頼区間の各上限より大きく増加することと定義した(片側、Excel; マイクロソフト、ワシントン州レッドモンド)。AcEは、溶媒応答に対するトログリタゾンの陽性対照と同等以上に脂肪生成を高めるものとしてさらに特徴づけた。この評価には、Excelの学生t検定関数を使用した。

【0215】

結果—陽性対照のインドメタシン及びトログリタゾンは、3T3-L1細胞において同程度に脂肪生成を誘導した(図11)。意外にも、AcEは、陽性対照のインドメタシン及びトログリタゾンのいずれよりも大きい脂肪生成応答を引き起こした。

【0216】

3T3-L1細胞、水系Acacia試料#4909抽出物のジメチルスルホキシド可溶性成分において実証された脂肪生成の可能性は、インスリンへの非感受性の徴候又は症状を明示するヒトや他の動物においてインスリン感受性を高める潜在能力を示すものである。

【0217】

実施例12

Acaciaの水系抽出物のジメチルスルホキシド可溶性分画により誘発される、インスリン抵抗性3T3-L1脂肪細胞からのアジポネクチン分泌の増加

モデル—これらの実験では、実施例11に記載のような3T3-L1マウス線維芽細胞モデルを使用した。

【0218】

試験材料—トログリタゾンは、Cayman Chemicals (ミシガン州アンアバー)より入手して、メチルイソブチルキサンチン、デキサメタゾン、及びインスリンは、シグマ(ミズーリ州セントルイス)より入手した。試験材料は、Acacia試料#4909のゴム樹脂の50:50(v/v)水/アルコール抽出物より生成した濃褐色の粉末であり、Bayir Chemicals (No. 68, South Cross Road, Basavanagudi, インド)より入手した。この抽出物を、20%以上のアベカテキンを含有するように標準化した。本実施例で使用するバッチ番号A Cat/2304は、UV分析により定量されるように、20.8%のアベカテキンを含有した。ペニシリン、ストレプトマイシン、ダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)は、Mediatech (バージニア州ヘンドン)から、そして10% FBS-HI (胎仔ウシ血清—熱不活性化)は、Mediatech及びHyclone (ユタ州ローガン)からのものであった。他に述べなければ、他の標準試薬はいずれもシグマより購入した。

【0219】

細胞培養と処理—マウス線維芽細胞系3T3-L1を培養して6日目に分化した脂肪細胞を産生することを実施例10に記載のように実施した。3T3-L1細胞を96ウェルプレートにおいて 1×10^4 細胞/cm²の初期密度で播いた。2日間、この細胞をそのまま増殖させて、集密に達せしめた。集密に続いて、分化培地の添加によって、この細胞を強制的に脂肪細胞へ分化させた; この培地は、(1) 10% FBS/DMEM (高グルコース); (2) 0.5 mMメチルイソブチルキサンチン; (3) 0.5 μ Mデキサメタゾン、及び(4) 10 μ g/ml インスリン(MDI培地)より構成された。3日目~5日目に、この培地を、10% FBS/DMEM中の10 μ g/ml インスリンからなる分化後培地へ交換した。

【0220】

インスリン抵抗性の成熟3T3-L1細胞に対するAcaciaの効果を評価することは、Fasshauer et al. [Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. 「3T3-L1脂肪細胞におけるアジポネクチン遺伝子発現のホルモン調節 (Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes)」BBRC, 290: 1084-1089, (2002)]に記載の手順の改良法を使用して実施した。簡潔に言えば、6日目に、0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有する無血清培地に細胞を3時

10

20

30

40

50

間維持してから、 $1 \mu\text{g}$ インスリン/ ml + 溶媒、又はインスリン + 試験材料で処理した。トログリタゾンをジメチルスルホキシドに溶かして、5、2.5、1.25、及び0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度を達成するように加えた。Acacia 抽出物は、50、25、12.5、及び6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で試験した。24時間後、上清の培地をアジポネクチン定量のためにサンプリングした。細胞の分化と試験材料での処理の全手順を図12に図式的に概説する。

【0221】

アジポネクチンアッセイ-培地へ分泌されるアジポネクチンは、Mouse Adiponectin Quantikine (登録商標) Immunoassay キット (R & D Systems, ミネソタ州ミネアポリス) を変更なしに使用して定量した。製造業者により提供される情報は、マウス細胞培養基においてスパイクされるアジポネクチンの回収が平均103%であり、最低の検出可能なアジポネクチン濃度が0.001~0.007 ng/ ml の範囲であることを示した。

【0222】

統計計算と解釈—すべてのアッセイを同一2検体で実施した。統計解析のために、Acacia のアジポネクチン分泌に対する効果を溶媒対照に比較して計算した。スチューデントのt検定を多変量比較の補正なしに使用して用量間の違いを決定して、第I種誤差の名義5%確率を選択した。

【0223】

見かけのミカエリス定数と最大速度を決定するためのHofsteeの方法 [Hofstee, B. H. 「酵素反応速度論における非逆数対逆数のプロット (Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics)」Nature 184:1296-1298, (1959)] の変法を使用して、試験材料の効力を評価した。独立変数 $v/[S]$ に {相対アジポネクチン分泌/[濃度]} を、そして従属変数 $\{v\}$ に {相対アジポネクチン分泌} を代入して、式: $y = mx + b$ の関係を得た。溶媒対照に対する最大アジポネクチン分泌をy切片より推定する一方で、半最大アジポネクチン分泌に必要な試験材料の濃度を傾きの負値より計算した。

【0224】

結果—陽性対照のトログリタゾンについて試験したすべての濃度で、インスリン抵抗性3T3-L1細胞においてアジポネクチン分泌が亢進されて、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、溶媒対照に比較して2.44倍の最大刺激があった(図13)。50及び25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のAcaciaは、いずれも溶媒対照に比較してアジポネクチン分泌を高めた(それぞれ、1.76及び1.70倍)。これらの濃度のAcaciaは、トログリタゾンで観測された最大アジポネクチン分泌にはいずれも同等でなかったが、それらは、1.25及び0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のトログリタゾンに匹敵するものであった。

【0225】

改良Hofsteeプロットより導かれる最大アジポネクチン分泌の推定は、半最大刺激に必要とされる濃度に大きな違いがある、アジポネクチン分泌の比較可能な相対増加を示した。トログリタゾン及びAcacia catechuのy切片より推定される最大アジポネクチン分泌は、溶媒対照に対して、それぞれ2.29及び1.88倍であった。しかしながら、インスリン抵抗性3T3-L1細胞における半最大アジポネクチン分泌の刺激に必要とされる濃度は、トログリタゾンで0.085 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、Acaciaで5.38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。20%の最少アベカテキン含量に基づいて計算すると、後者のAcaciaの数字は、ほぼ1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になる。

【0226】

インスリン抵抗性3T3-L1細胞におけるアジポネクチン分泌を高めるその能力に基づけば、Acacia及び/又はアベカテキンは、血漿アジポネクチン濃度が低下している臨床病理に対して陽性の効果を及ぼすことが期待されよう。

【0227】

実施例13

Acaciaの水系抽出物のジメチルスルホキシド可溶性分画により誘発される、TN

10

20

30

40

50

F α 処理 3 T 3-L 1 脂肪細胞からのアジポネクチン分泌の増加

モデル—これらの実験では、実施例 1 1 に記載のような 3 T 3-L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。

【0228】

試験材料—インドメタシン、メチルイソブチルキサンチン、デキサメタゾン、及びインスリンは、シグマ（ミズーリ州セントルイス）より入手した。試験材料は、Acacia 試料 # 4909 のゴム樹脂の 50 : 50 (v/v) 水/アルコール抽出物より生成した濃褐色の粉末であり、Bayir Chemicals (No. 68, South Cross Road, Basavanagudi, インド) より入手した。この抽出物を、20 % 以上のアペカテキンを含むように標準化した。本実施例で使用するバッチ番号 A Cat/2304 は、UV 分析により定量されるように、20.8 % のアペカテキンを含むした。ペニシリン、ストレプトマイシン、ダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) は、Mediatech (バージニア州ヘンドン) から、そして 10 % FBS-HI (胎仔ウシ血清—熱不活性化) は、Mediatech 及び Hyclone (ユタ州ローガン) からのものであった。他に述べなければ、他の標準試薬はいずれもシグマより購入した。

【0229】

細胞培養と処理—マウス線維芽細胞系 3 T 3-L 1 を培養して 3 日目に分化した脂肪細胞を産生することを実施例 1 0 に記載のように実施した。3 T 3-L 1 細胞を 96 ウェルプレートにおいて 1×10^4 細胞/cm² の初期密度で播いた。2 日間、この細胞をそのまま増殖させて、集密に達せしめた。集密に続いて、分化培地の添加によって、この細胞を強制的に脂肪細胞へ分化させた；この培地は、(1) 10 % FBS/DMEM (高グルコース)；(2) 0.5 mM メチルイソブチルキサンチン；(3) 0.5 μ M デキサメタゾン、及び (4) 10 μ g/ml インスリン (MDI 培地) より構成された。3 日目～5 日目に、この培地を DMEM 中 10 % FBS からなる分化後培地へ交換した。5 日目に、培地を、インドメタシン又は Acacia 抽出物を含むか又は含めない 10 % FBS/DMEM 中に 10、2 又は 0.5 ng TNF α /ml を含有する試験培地へ交換した。インドメタシンをジメチルスルホキシドに溶かして、5、2.5、1.25、及び 0.625 μ g/ml の濃度を達成するように加えた。Acacia 抽出物は、50、25、12.5、及び 6.25 μ g/ml で試験した。6 日目に、上清の培地をアジポネクチン定量のためにサンプリングした。細胞の分化と試験材料での処理の全手順を図 1 4 に図式的に概説する。

【0230】

アジポネクチンアッセイ—培地へ分泌されるアジポネクチンは、Mouse Adiponectin Quantikine (登録商標) Immunoassay キット (R & D Systems, ミネソタ州ミネアポリス) を変更なしに使用して定量した。製造業者により提供される情報は、マウス細胞培養基においてスパイクされるアジポネクチンの回収が平均 103 % であり、最低の検出可能なアジポネクチン濃度が 0.001 ~ 0.007 ng/ml の範囲であることを示した。

【0231】

統計計算と解釈—すべてのアッセイを同一 2 検体で実施した。統計解析のために、インドメタシン又は Acacia catechu のアジポネクチン分泌に対する効果を溶媒対照に比較して計算した。スチューデントの t 検定を多変量比較の補正なしに使用して用量及び試験薬剤間の違いを決定して、第 I 種誤差の名義 5 % 確率を選択した。

【0232】

結果—TNF α は、10 及び 2 ng/ml 濃度で、成熟 3 T 3-L 1 細胞におけるアジポネクチン分泌を溶媒対照に対して有意に ($p < 0.05$) それぞれ 65 及び 29 % 低下させて、0.5 ng/ml では、アジポネクチン分泌に対して明らかな効果がなかった (図 1 5)。10 及び 2 ng/ml の TNF α で、インドメタシンは、試験したすべての用量で TNF α 単独に対してアジポネクチン分泌を高めた ($p < 0.05$) が、アジポネク

チン分泌を溶媒対照のレベルまで回復させることはできなかった。10 ng TNF α /ml の存在下での Acacia 処理は、インドメタシンよりは弱い、同様のアジポネクチン増加をもたらした。アジポネクチン刺激における Acacia catechu とインドメタシンの間の差は、4つの増加濃度にわたり、それぞれ14、20、32、及び41%であった。用量間の倍数はインドメタシンと Acacia で同一であったので、これらの結果は、インドメタシンの効力が超生理学的な濃度の TNF α の存在下の 3T3-L1 細胞に対してアジポネクチン分泌を回復させることで Acacia 中の活性材料より大きかったことを示唆する。

【0233】

3T3-L1 細胞の 2 ng TNF α と Acacia での処理は、6.25、25、及び 50 μ g/ml で、TNF α 単独に対して有意である ($p < 0.05$) アジポネクチン分泌の増加をもたらした。しかしながら、10 ng TNF α /ml 処理とは異なり、Acacia とインドメタシンの間の差は、より小さくて、用量に明らかに関連するわけではなく、試験した全部で4つの濃度で平均して5.5%であった。インドメタシンで観察されたように、Acacia は、アジポネクチン分泌を、溶媒対照において観察されるレベルまでは回復させなかった。

【0234】

0.5 ng TNF α /ml では、インドメタシンは、2.5及び5.0 μ g/ml の濃度で、有意である ($p < 0.05$) アジポネクチン分泌の用量依存的な減少をもたらした。興味深いことに、インドメタシンとは異なり、Acacia catechu は、50 μ g/ml で、TNF α 及び溶媒処理の両方の 3T3-L1 脂肪細胞に対してアジポネクチン分泌を高めた。従って、生理学的なレベルへ近づく TNF α の濃度では、Acacia catechu は、TNF α と溶媒対照の両方に対してアジポネクチン分泌を高めて、驚くべきことに、インドメタシンより優れていた。

【0235】

TNF α 処理 3T3-L1 細胞においてアジポネクチン分泌を高めるその能力に基づけば、Acacia catechu 及び／又はアペカテキンは、TNF α レベルが上昇していて、血漿アジポネクチン濃度が低下しているすべての臨床病理に対して陽性の効果を及ぼすことが期待されよう。

【0236】

実施例 14

多様な市販の Acacia 試料は、3T3-L1 脂肪細胞モデルにおいて脂肪生成を高める

モデル—これらの実験では、実施例 11 に記載のような 3T3-L1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。使用するすべての化学品及び手順は、オイルレッド O アッセイを実施して、Acacia catechu 誘導性の細胞トリグリセリド含量を評価すること以外は、実施例 11 に記載の通りであった。Acacia catechu 試料 #5669 は、Natural Remedies (364, 2nd Floor, 16th Main, 4th T Block Bangalore, Karnataka 560041 インド) より入手して；試料 #4909、#5667、及び #5668 は、Bayir Chemicals (No. 10, Doddanna Industrial Estate, Penya I I Stage, Bangalore, 560091 Karnataka, インド) より入手した。Acacia nilotica 試料 #5639、#5640、及び #5659 は、KDN-Vita International 社 (121 Stryker Lane, Units 4 & 6 ニュージャージー州ヒルズバラ、08844) より購入した。試料 #5640 は、樹皮として、試料 #5667 は、ゴム樹脂として、試料 #5669 は、芯材粉末として記載した。他のすべての試料は、他に示さなければ、Acacia catechu 樹皮専用メタノール抽出物として記載した。

【0237】

結果—試験したすべての Acacia 試料は、陽性の脂肪生成応答をもたらした (図 1

10

20

30

40

50

6)。最高の脂肪生成応答が達成されたのは、試料#5669の芯材粉末(1.27)、#5659のメタノール抽出物(1.31)、#5640のDMSO抽出物(1.29)、及び、#4909のメタノール抽出物(1.31)であった。

【0238】

本実施例は、インスリン作用の増加を支援する、脂肪細胞生理の陽性修飾を可能にする、多数の化合物が *Acacia catechu* に存在することをさらに証明する。

【0239】

実施例15

多様な市販の *Acacia* 試料は、TNF α -3T3-L1 脂肪細胞モデルにおいてアジポネクチン分泌を高める

モデル—これらの実験では、実施例11に記載のような3T3-L1マウス線維芽細胞モデルを使用した。標準の化学品を使用して、細胞の処理は、実施例11及び13に記載のように実施した。しかしながら、3T3-L1脂肪細胞のTNF α での処理は、細胞を2又は10ng/mlのTNF α だけに曝露した点で、実施例12とは異なっていた。培養6日目に、実施例12に詳述したように、上清培地についてアジポネクチンをアッセイした。*Acacia* 試料#4909、#5639、#5659、#5667、#5668、#5640、及び#5669の製剤は、実施例13に記載の通りであった。

【0240】

結果—2ng/mlのTNF α は、3T3-L1脂肪細胞のアジポネクチン分泌を、溶媒対照より27%抑制したが、アジポネクチン分泌は、1.25 μ g/mlのインドメタシンによって、TNF α 溶媒対照より最大11%上昇した(表12)。*Acacia* 製剤#5559だけが試験した4つの用量のいずれでもアジポネクチン分泌を高めることができなかった。他のすべての*Acacia* 製剤は、10~15%に及ぶアジポネクチン分泌の同等の最大増加をもたらした。しかしながら、様々な*Acacia* 製剤により最大アジポネクチン分泌が誘発される濃度に関しては、差が観察された。最も強力な製剤は、12.5 μ g/mlでアジポネクチン刺激の最大刺激を達成した#5640であり、#4909及び#5668(25 μ g/ml)と、最後に#5639、#5667、及び#5669(50 μ g/ml)が続いた。

【0241】

表12

2ng/mlのTNF α の存在下で様々な*Acacia* 製剤により誘発される、3T3-L1脂肪細胞からの相対最大アジポネクチン分泌

【0242】

10

20

30

【表 2 2】

試験材料	濃度 [$\mu\text{g/ml}$]	アジポネクチン 指数†
2ng TNF α /ml $\pm$ 95% CI	—	1.00 $\pm$ 0.05
溶媒対照	—	1.27*
インドメタシン	1.25	1.11*
Acacia catechu #4909 樹皮 (メタノール抽出物)	25.0	1.15*
Acacia nilotica #5639 芯材(DMSO抽出物)	50.0	1.14*
Acacia nilotica #5659 樹皮 (メタノール抽出物)	25	1.02
Acacia catechu #5667 樹皮 (メタノール抽出物)	50.0	1.10*
Acacia catechu #5668(ゴム樹脂)	25.0	1.15*
Acacia nilotica #5640 樹皮(DMSO抽出物)	12.5	1.14*
Acacia catechu #5669 芯材粉末 (DMSO抽出物)	50.0	1.14*

†アジポネクチン指数 = [アジポネクチン]_{試験} / [アジポネクチン]_{TNF α 対照}*TNF α 溶媒応答から有意に増加(p<0.05)。

【0 2 4 3】

10 ng/ml の TNF α は、3 T 3-L 1 脂肪細胞のアジポネクチン分泌を溶媒対照より 54% 低下させ、一方、アジポネクチン分泌は、5.0 μg インドメタシン/ml によって、TNF α 溶媒対照より最大 67% 上昇した (表 1 3)。トログリタゾンは、試験した最低濃度の 0.625 μg /ml でアジポネクチン分泌を最大 51% 増加させた。Acacia 製剤 #5559 は、25 μg /ml で 12% の最低の有意 (p<0.05) 増加をもたらした。他のすべての Acacia 製剤は、50 μg /ml で、17~41% に及ぶアジポネクチン分泌の最大増加をもたらした。最も強力な製剤は、#4909 と #5669 であり、TNF α 溶媒対照に対して、アジポネクチン分泌をそれぞれ 41 及び 40% 増加させた。

【0 2 4 4】

表 1 3

10 ng TNF α /ml の存在下で様々な Acacia 製剤により誘発される、3 T 3-L 1 脂肪細胞からの相対最大アジポネクチン分泌

【0 2 4 5】

【表 2 3】

試験材料	濃度 [$\mu\text{g/ml}$]	アジポネクチン 指数†
10ng TNF α /ml $\pm$ 95% CI	—	1.00 $\pm$ 0.10
溶媒対照	—	1.54*
インドメタシン	5.0	1.67*
トログリタゾン	0.625	1.51*
Acacia catechu #4909 樹皮 (メタノール抽出物)	50	1.41*
Acacia nilotica #5639 芯材(DMSO抽出物)	50	1.26*
Acacia nilotica #5659 樹皮 (メタノール抽出物)	25	1.12*
Acacia catechu #5667 樹皮 (メタノール抽出物)	50	1.26*
Acacia catechu #5668(ゴム樹脂)	50	1.30*
Acacia nilotica #5640 樹皮(DMSO抽出物)	50	1.17*
Acacia catechu #5669 芯材粉末 (DMSO抽出物)	50	1.40*

†アジポネクチン指数=[アジポネクチン]_{試験}/[アジポネクチン]_{TNF α 対照}

*TNF α 溶媒応答から有意に増加(p<0.05)。

【0 2 4 6】

Acaciaの異なる試料又は製剤がこの代謝症候群の第二のモデルにおいて類似の応答を誘発するという観察事実は、インスリン作用の増加を支援する、脂肪細胞生理の陽性修飾を可能にする、多数の化合物がAcaciaに存在することをさらに証明する。

【0 2 4 7】

実施例 1 6

TNF α / 3 T 3 - L 1 脂肪細胞モデルにおいてアジポネクチン分泌を高めることが可能な Acacia catechu 由来の極性及び非極性溶媒抽出化合物

モデル—これらの実験では、実施例 1 1 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。使用する標準の化学品は、実施例 1 1 及び 1 3 に記載の通りである。実施例 1 3 に記載のように、3 T 3 - L 1 脂肪細胞を 10 ng TNF α / ml で処理した。実施例 1 3 に詳述したように、6 日目に培養基の上清についてアジポネクチンをアッセイした。

【0 2 4 8】

試験材料—Acacia catechu 試料 # 5 6 6 9 芯材の大きなチップ（各チップは、5～10 グラムの重さ）を、標準のパワードリルを低速で使用する 5 / 8 ” 金属ドリルビットでの粉碎へ処した。この木の削り屑モーターへ採取して、液体 N₂ 下に凍結させながら、微細粉末へ粉碎した。次いで、この粉末を 250 ミクロン篩いで篩いにかけて、ほぼ 10 g の浮遊性の微細粉末とした。

【0 2 4 9】

表 1 4

3 T 3 - L 1 アジポネクチンアッセイ用の Acacia catechu 抽出試料の記載

【0 2 5 0】

【表 2 4】

抽出溶媒	抽出物の重量[mg]	抽出パーセント
胃液 ¹	16	11
ジメチルスルホキシド	40	27
クロロホルム	0.2	0.13
メタノール/水 pH=2 (95:5)	20	13
水	10	6.7
酢酸エチル	4	2.7

¹ 胃液は、2.90g NaCl、7.0ml 濃塩酸HCl、3.2g ペプシン(800-2500活性単位/mg)を水で希釈して1000mlとした。最終pHは、1.2であった。この抽出では、胃液-芯材懸濁液を40℃に1時間保った後で、胃液を真空で除去した。次いで、残る残渣をMeOHに溶かし、0.45ミクロンPTFEシリンジフィルターに通して濾過して、真空で濃縮した。

【0 2 5 1】

この粉末を6つの琥珀色のガラス瓶へ分配して(150mg/バイアル)、表14に列挙した溶媒の2mlを用いて、40℃でほぼ10時間抽出した。この抽出に続いて、芯材/溶媒の懸濁液を遠心分離(5800xg, 10分)へ処した。遠心分離からの上清分画を0.45ミクロンPTFEシリンジフィルターに通して、別々の琥珀色のガラス瓶へ濾過した。これら試料のそれぞれを真空で濃縮した。表7に見られるように、DMSOは、Acacia catechu 芯材よりほとんどの材料を抽出して、クロロホルムは、最も少なく抽出した。すべての抽出試料を50、25、12.5、及び6.25µg/mlで試験した。

【0 2 5 2】

ピオグリタゾンは、45mgピオグリタゾン錠剤として、Actos(登録商標)(Takeda Pharmaceuticals, イリノイ州リンカーンシア)の市販品より入手した。この錠剤を微細粉末へ粉碎して、5.0、2.5、1.25、及び0.625µgピオグリタゾン/mlで試験した。インドメタシンも、追加の陽性対照として含めた。

【0 2 5 3】

結果—陽性対照のピオグリタゾンとインドメタシンは、いずれも、TNFαの存在下での脂肪細胞によるアジポネクチン分泌を高めた(それぞれ、115及び94%) (図17)。最適のピオグリタゾン及びインドメタシン濃度は、それぞれ1.25及び2.5µg/mlであった。Acacia catechu 試料#5669のすべての抽出物は、TNFα処理に対してアジポネクチン分泌を増加させた。種々の抽出物の中では、DMSO抽出物が最も強力なアジポネクチン分泌の誘導剤であり、6.25µg抽出物/mlで最大活性を観察した。この結果は、様々な極性の広範囲の材料を抽出するDMSOの能力によるのかもしれない。図17の検討は、水抽出物(極性化合物)とクロロホルム抽出物(非極性化合物)が、TNFα/3T3-L1脂肪細胞モデルにおいてアジポネクチン分泌を高めるその能力において同等であったことを示す。これらの抽出物が類似の化合物を含有していた可能性は低い。本実施例は、好炎症刺激の存在下に脂肪細胞からのアジポネクチン分泌を高めることが可能である、Acacia catechu 芯材由来の化合物を抽出する、異なる極性の溶媒の能力を例示するものである。

【0 2 5 4】

実施例 17

TNFα/3T3-L1脂肪細胞モデルにおいてアジポネクチン分泌を高めることが可能な Acacia catechu の酸性及び塩基性分画

モデル—これらの実験では、実施例11に記載のような3T3-L1マウス線維芽細胞モデルを使用した。使用する標準の化学品は、実施例11及び13に記載の通りであった。実施例13に記載のように、3T3-L1脂肪細胞を10ng TNFα/mlで処理

した。実施例 13 に詳述したように、6 日目に培養基の上清についてアジポネクチンをアッセイした。

【0255】

試験材料—Acacia catechu 試料 # 5669 を以下の手順に従って抽出した：50 ml 試験管中ほぼ 50 mg の乾燥 Acacia catechu 芯材粉末 # 5669 へアルカリ性イソプロピルアルコール溶液（イソプロパノール中 1 %（v/v）1.5 N NaOH）を加えた。次いで、この試料を軽く混合し、30 分間音波処理し、1 時間遠心分離させて、残る固体材料をペレットにした。次いで、上清の液体を 0.45 ミクロン濾紙に通して濾過した。使用する塩基性イソプロパノールの pH は pH 8.0 であり、採取した液体の pH は pH 7.0 であった。澄明な、濾過した液体の一部を真空で乾燥させると、白い固形物のよう

10

【0256】

残るペレット状の材料を酸性イソプロピルアルコール溶液（イソプロパノール中 1 %（v/v）10 % HCl）へ赤い溶液として入れた。この試料を、ペレット材料が液体中に十分に分散するまで混合してから、30 分間遠心分離させて、残る固形物を再びペレットにした。この薄黄色い上清の溶液を 0.45 ミクロン濾紙に通した。採取した液体の pH は pH 3.0 であり、この試料の pH を pH 8~9 へ高めるときに、赤茶色~茶褐色の沈殿（乾燥沈殿）が生成されることがわかった。この沈殿を採取して乾燥させて、赤茶色~茶褐色の固形物を得た。この上清液を再び 0.45 ミクロンフィルターに通過させて、あらゆる残存沈殿を除去した。この液体は、深黄色であった。この残る液体を乾燥させると茶褐色の固体試料を生じ、乾燥酸性抽出物と名づけた。3 つの分画の回収量を表 15 に列挙する。試験材料はいずれも 50、25、12.5、及び 6.25 µg/ml でアッセイして、ピオグリタゾン陽性対照は、5.0、2.5、1.25、及び 0.625 µg/ml で検査した。

20

【0257】

表 15

Acacia catechu 芯材粉末からの試験材料の回収

【0258】

【表 25】

試験材料	mg 採取量(% Acacia catechu 試料 #5669)
乾燥アルカリ性抽出物	0.9 (1.8)
乾燥沈殿	1.2 (2.4)
乾燥酸性抽出物	1.5 (3.0)

30

【0259】

結果：TNFα は、溶媒対照に比較してアジポネクチン分泌を 46 % 抑制した。アジポネクチン分泌のピオグリタゾンによる最大回復は、1.25 µg/ml で観察された、TNFα 処理の 1.47 倍であった（表 16）。試験材料の中では、TNFα のみの対照より有意に高くアジポネクチン分泌を増加させることができなかったのは、乾燥沈殿物だけである。酸性抽出物と芯材粉末（出発材料）は、TNFα の存在下でのアジポネクチン分泌を高める能力において類似していたが、アルカリ抽出物がアジポネクチン分泌を高めたのは、最高用量の 50 µg/ml でだけである。

40

【0260】

表 16

TNFα / 3T3-L1 モデルにおいて 4 つの用量で誘発される最大アジポネクチン分泌

【0261】

【表 2 6】

試験材料	濃度 [$\mu\text{g/ml}$]	アジポネクチン指数†
DMSO 対照	—	1.86
TNF α $\pm$ 95% CI	—	1.00 $\pm$ 0.11††
Acacia catechu 試料 #5669 芯材粉末	6.25	1.14
乾燥アルカリ性抽出物	50	1.19
乾燥沈殿	6.25	1.09
乾燥酸性抽出物	6.25	1.16
ピオグリタゾン	1.25	1.47

† アジポネクチン指数 = [アジポネクチン]_{試験} / [アジポネクチン]_{TNF α 対照}

†† 1.11より大きい数値は、TNF α 対照より有意差あり (p<0.05)。

【0 2 6 2】

実施例 1 8

Acacia の水系抽出物のジメチルスルホキシド可溶性分画による、TNF α 処理 3 T 3-L 1 脂肪細胞からのインターロイキン-6 分泌の減少

インターロイキン-6 (IL-6) は、宿主防御、急性期の反応、免疫応答、神経細胞機能、造血、及び代謝症候群において重要な役割を担う多機能性サイトカインである。これは、脂肪細胞のような、多様な正常及び形質転換のリンパ様及び非リンパ様細胞により発現される。IL-6 の産生は、マイトジェン又は抗原刺激、リポ多糖、カルシウムイオノフォア、サイトカイン、及びウイルスのような数多くのシグナルによりアップレギュレートされる [Hibi, M., Nakajima, K., Hirano T. 「IL-6 サイトカインファミリーとシグナル伝達：サイトカイン系のモデル (IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system)」 J MoI Med. 74(1): 1-12, (Jan 1996)]。細菌及びウイルスの感染症、外傷、自己免疫疾患、悪性腫瘍、及び代謝症候群が含まれる数多くの病理学的状態では、上昇した血清レベルが観察されている [Arner, P. 「2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性—アジポカインの役割 (Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines)」 Curr MoI Med.;5(3):333-9, (May 2005)]。

【0 2 6 3】

モデル—これらの実験では、実施例 1 1 に記載のような 3 T 3-L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。使用する標準の化学品は、実施例 1 1 及び 1 3 に記載の通りであった。実施例 1 3 に記載のように、3 T 3-L 1 脂肪細胞を 10 ng TNF α / ml で処理した。実施例 1 3 に詳述したように、6 日目に培養基の上清についてアジポネクチンをアッセイした。

【0 2 6 4】

試験材料—インドメタシン、メチルイソブチルキサンチン、デキサメタゾン、及びインスリンは、シグマ (ミズーリ州セントルイス) より入手した。試験材料は、Acacia catechu 試料 # 4 9 0 9 のゴム樹脂の 50 : 50 (v/v) 水/アルコール抽出物より生成した濃褐色の粉末であり、Bayir Chemicals (No. 68, South Cross Road, Basavanagudi, インド) より入手した。この抽出物を、20% 以上のアベカテキンを含有するように標準化した。本実施例で使用するバッチ番号 A Cat / 2 3 0 4 は、UV 分析により定量されるように、20.8% のアベカテキンを含有した。ペニシリン、ストレプトマイシン、ダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) は、Mediatech (バージニア州ヘンドン) から、そして 10% FBS-HI (胎仔ウシ血清—熱不活性化) は、Mediatech 及び Hyclone (ユタ州ローガン) からのものであった。他に述べなければ、他の標準試薬はいずれもシグマより購入した。

【0 2 6 5】

インターロイキン-6 アッセイ—培地へ分泌される IL-6 を、Quantikine (登録商標) Mouse IL-6 Immunoassay キット (R&D Syst

10

20

30

40

50

ems, ミネソタ州ミネアポリス) を変更なしに使用して定量した。製造業者により提供される情報は、マウス細胞培養基においてスパイクされる IL-6 の回収が 1 : 2 希釈液で平均 99% であり、最低の検出可能な IL-6 濃度が 1.3 ~ 1.8 pg/ml の範囲であることを示した。上清の培地試料は、いずれも希釈せずにアッセイした。

【0266】

統計計算と解釈—すべてのアッセイを同一 2 検体で実施した。統計解析のために、Acacia のアジボネクチン又は IL-6 分泌に対する効果を溶媒対照に比較して計算した。スチューデントの t 検定を多変量比較の補正なしに使用して用量間の違いを決定して、第 I 種誤差 (片側) の名義 5% 確率を選択した。

【0267】

結果—これまでの実施例で見られたように、TNF α がアジボネクチン分泌を劇的に低下させた一方で、インドメタシンと Acacia catechu 抽出物は、TNF α の存在下でともにアジボネクチン分泌を高めた。インドメタシン陽性対照と Acacia catechu 抽出物は、いずれもアジボネクチン分泌の用量に関連した増加を明示したが、いずれの材料も、TNF α のないジメチルスルホキシド対照で見られる濃度までアジボネクチン濃度を回復させなかった (表 17)。Acacia catechu 抽出物は、TNF α の存在下に、強力で用量に関連した IL-6 分泌阻害を明示したが、インドメタシンは、抗炎症効果を明示しなかった。

【0268】

抗炎症性アジボネクチンの好炎症性 IL-6 の比の検討は、インドメタシンと Acacia catechu 抽出物の両方について、相対的な抗炎症活性の優れた用量関連の増加をもたらした。

【0269】

表 17

TNF α / 3T3-L1 モデルにおいて Acacia catechu 試料 # 4909 により誘発される IL-6 分泌の減少とアジボネクチン分泌の増加

【0270】

【表 27】

試験材料	濃度 [μ g/ml]	アジボネクチン 指数†	IL-6 指数††	アジボネクチン/ IL-6
DMSO対照	—	2.87*	0.46*	6.24*
TNF α 対照 ±95 % CI	—	1.00±0.079	1.00±0.08	1.00±0.08
インドメタシン	5.00	2.69*	1.10*	2.45*
	2.50	2.08*	1.04	2.00*
	1.25	1.71*	1.01	1.69*
	0.625	1.54*	1.37*	1.12*
Acacia catechu 試料 #4909	50.0	1.51*	0.27*	5.55*
	25.0	1.19*	0.71*	1.68*
	12.5	1.13*	0.78*	1.45*
	6.25	1.15*	0.93	1.23*

Acacia catechu 試験材料又はインドメタシンを 10ng TNF α /ml とともに D5 3T3-L1 脂肪細胞へ加えた。翌日、上清培地をアジボネクチン及び IL-6 の定量用にサンプリングした。数値は、いずれも TNF α 対照を基準とした。

† アジボネクチン指数 = [アジボネクチン]_{試験} / [アジボネクチン]_{TNF α 対照}

†† IL-6 指数 = [IL-6]_{試験} - [IL-6]_{対照} / [IL-6]_{TNF α} - [IL-6]_{対照}

* TNF α 対照より有意差あり (p < 0.05)。

【0271】

Acacia catechu 試料 # 4 9 0 9 は、T N F α / 3 T 3 - L 1 脂肪細胞モデルにおいて二元的な抗炎症作用を明示した。Acacia catechu 抽出物の成分は、アジポネクチン分泌を高める一方で、I L - 6 分泌を低下させた。Acacia catechu の全体的な効果は、T N F α 対照に比べて強く抗炎症性であった。これらの結果は、インスリン抵抗性の体重増加、肥満、心臓血管系疾患、及び癌を減少させるための脂肪細胞生理の改善への Acacia catechu の使用を支持するものである。

【0272】

実施例 19

インスリン抵抗性 3 T 3 - L 1 脂肪細胞からのアジポネクチン、I L - 6、及びレジスチンの分泌に及ぼす、Acacia 水系抽出物のジメチルスルホキシド可溶性分画の効果
モデル—これらの実験では、実施例 11 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。使用する標準化学品及び統計処理は、実施例 11 及び 12 に記載の通りであった。I L - 6 は、実施例 18 に記載のようにアッセイした。

10

【0273】

レジスチンアッセイ—培地へ分泌されるレジスチンの量を、Quantikine (登録商標) Mouse Resistin Immunoassay キット (R&D Systems, ミネソタ州ミネアポリス) を変更なしに使用して定量した。製造業者により提供される情報は、マウス細胞培養基においてスパイクされるレジスチンの回収が 1 : 2 希釈液で平均 99% であり、最低の検出可能なレジスチン濃度が 1.3 ~ 1.8 pg/ml の範囲であることを示した。上清の培地試料は、いずれも、製造業者により供給される希釈培地でアッセイ前に 20 倍希釈した。

20

【0274】

統計計算と解釈—すべてのアッセイを同一 2 検体で実施した。統計解析のために、Acacia catechu のアジポネクチン又は I L - 6 分泌に対する効果を溶媒対照に比較して計算した。スチューデントの t 検定を多変量比較の補正なしに使用して用量間の違いを決定して、第 I 種誤差 (片側) の名義 5% 確率を選択した。

【0275】

結果—トログリタゾンと Acacia 試料 # 4 9 0 9 は、高濃度のインスリンの存在下で用量に関連したやり方でアジポネクチン分泌をともに高めた (表 18)。Acacia catechu が I L - 6 の低下による抗炎症効果を 6.25 μ g/ml の濃度だけで明示したのに対し、トログリタゾンは、5.00 及び 1.25 μ g/ml の濃度で好炎症性であり、他の 2 つの濃度では、効果が観察されなかった。レジスチン分泌は、トログリタゾンにより用量依存的なやり方で増加したが、Acacia catechu は、レジスチン発現を同じように用量依存的なやり方で減少させた。

30

【0276】

実施例 18 で見られたように、Acacia catechu 試料 # 4 9 0 9 は、高インスリン血症 / 3 T 3 - L 1 脂肪細胞モデルにおいて再び二元的な抗炎症作用を明示した。Acacia catechu 抽出物の成分は、アジポネクチン分泌を増加させる一方で、I L - 6 分泌を減少させた。従って、Acacia catechu の全体効果は、高インスリン対照に比べて抗炎症性であった。高インスリン濃度の存在下でのレジスチン分泌に対する Acacia catechu の効果は、トログリタゾンのそれと反対であった。トログリタゾンがレジスチン発現を増加させたのに対し、Acacia catechu は、レジスチン発現をさらに減少させたのである。これらのデータは、複雑な Acacia catechu 抽出物が P P A R γ 受容体を介して機能しているのではないことを示唆する。これらの結果は、インスリン抵抗性の体重増加、肥満、心臓血管系疾患、及び癌を減少させるための脂肪細胞生理の改善への Acacia catechu の使用をさらに支持するものである。

40

【0277】

表 18

インスリン抵抗性 3 T 3 - L 1 モデルにおけるアジポネクチン、I L - 6、及びレジスチン分泌に対する Acacia catechu 抽出物の効果

50

【 0 2 7 8 】

【 表 2 8 】

試験材料	濃度 [$\mu\text{g/ml}$]	アジポネクチン 指数†	IL-6 指数††	レジスチン 指数†††
インスリン対照	-	1.00±0.30*	1.00±0.23	1.00±0.13
トログリタゾン	5.00	1.47	1.31	1.43
	2.50	2.44	1.06	1.22
	1.25	1.87	1.46	1.28
	0.625	2.07	1.00	0.89
Acacia catechu 試料 #4909	50.0	1.76	1.23	0.50
	25.0	1.70	0.96	0.61
	12.5	1.08	0.92	0.86
	6.25	1.05	0.64	0.93

Acacia catechu 試験材料又はインドメタシンを166nMインスリンとともにD5 3T3-L1脂肪細胞へ加えた。翌日、上清培地をアジポネクチン、IL-6、及びレジスチンの定量用にサンプリングした。数値は、いずれもインスリンのみの対照を基準とした。

†アジポネクチン指数 = [アジポネクチン]_{試験}/[アジポネクチン]_{インスリン対照}

††IL-6指数 = [IL-6]_{試験}/[IL-6]_{インスリン対照}

†††レジスチン指数 = [レジスチン]_{試験}/[レジスチン]_{インスリン対照}

*指数の数値は、分散分析の残差平方平均より計算した平均±95%信頼区間を表す。インスリン対照±95% C Iより大きい又は小さい数値は、 $p<0.05$ で有意差がある。

【 0 2 7 9 】

実施例 2 0

ホップに由来する植物化学品による、脂肪細胞における脂肪生成の増加

モデルーこれらの実験では、実施例 1 1 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。使用する標準化学品及び統計処理は、実施例 1 1 に記載の通りであった。

【 0 2 8 0 】

試験材料ーこの試験に使用したホップの植物化学品は、表 1 9 に記載されて、B e t a t e c h H o p s P r o d u c t s (ワシントン、D. C. アメリカ) より購入した。

【 0 2 8 1 】

表 1 9

ホップ試験材料の記載

【 0 2 8 2 】

10

20

30

【表 29】

ホップ試験材料	記載
アルファ酸溶液	82%アルファ酸/2.7%ベータ酸/2.95%イソアルファ酸(体積比)。アルファ酸には、フムロン、アドフムロン、及びコフムロンが含まれる。
Rhoイソアルファ酸(RIAA)	Rho-イソフムロン、rho-イソアドフムロン、及びrho-イソコフムロン。
イソアルファ酸(IAA)	25.3%イソアルファ酸(体積比)。cis及びtransイソフムロン、cis及びtransイソアドフムロン、並びに、cis及びtransイソコフムロンが含まれる。
テトラヒドロイソアルファ酸(THIAA)	複合ホップ-8.9% THIAA(体積比)。cis及びtransテトラヒドロ-イソフムロン、cis及びtransテトラヒドロ-イソアドフムロン、並びにcis及びtransテトラヒドロ-イソコフムロンが含まれる。
ヘキサヒドロイソアルファ酸(HHIAA)	3.9% THIAA; 4.4% HHIAA(体積比)。HHIAA異性体には、ヘキサヒドロ-イソフムロン、ヘキサヒドロ-イソアドフムロン、及びヘキサヒドロ-イソコフムロンが含まれる。
ベータ酸溶液	10%ベータ酸(体積比); <2%アルファ酸。ベータ酸には、ルブロン、コルブロン、アドルブロン、及びブレルブロンが含まれる。
キサントフモール(XN)	>80%キサントフモール(重量比)。キサントフモール、キサントフモールA、キサントフモールB、キサントフモールC、キサントフモールD、キサントフモールE、キサントフモールG、キサントフモールH、デスメチルキサントフモール、キサントガレノール、4'-O-メチルキサントフモール、3'-ゲラニルカルコナリンゲニン、3', 5' ジプレニルカルコナリンゲニン、5'-プレニルキサントフモール、フラボカウイン、ab-ジヒドロキサントフモール、及びイソ-デヒドロシクロキサントフモール水和物が含まれる。
使用済ホップ	キサントフモール、キサントフモールA、キサントフモールB、キサントフモールC、キサントフモールD、キサントフモールE、キサントフモールG、キサントフモールH、trans-ヒドロキシキサントフモール、1'', 2''-ジヒドロキシキサントフモールC、デスメチルキサントフモールB、デスメチルキサントフモールJ、キサントフモールI、デスメチルキサントフモール、イソキサントフモール、ab-ジヒドロキサントフモール、ジプレニルキサントフモール、5''-ヒドロキシキサントフモール、5'-プレニルキサントフモール、6, 8-ジプレニルナリンゲニン、8-プレニルナリンゲニン、6-プレニルナリンゲン、イソキサントフモール、フムリノン、コフムリノン、4-ヒドロキシベンズアルデヒド、及びシトステロール-3-O-b-グルコピラノシド。
ヘキサヒドロコルブロン	KOH中1体積%ヘキサヒドロコルブロン

【0283】

細胞培養と処理—ホップ化合物をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶かして、分化の0日目に10、5、4又は2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように加えて、成熟期(6又は7日目)を通して維持した。使用済ホップは、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で試験した。新鮮な培地を加えるときはいつでも、新鮮な試験材料も加えた。DMSOを選択したのは、その極性と、それが水系の細胞培養基と混和するという事実のためである。陽性対照として、インドメタシンとトログリタゾンを加えて、それぞれ5.0及び4.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度とした。分化したD6/D7 3T3-L1細胞を0.36%オイルレッドO又は0.001% BODIPYで染色した。

【0284】

結果—陽性対照のインドメタシン及びトログリタゾンは、3T3-L1細胞において脂

肪生成を同程度に誘導した（図18）。意外にも、4つのホップ成分（genera）は、3T3-L1脂肪細胞において、陽性対照のインドメタシン及びトログリタゾンより大きく脂肪生成応答をもたらした。これら4つの成分には、イソアルファ酸、Rhο-イソアルファ酸、テトラヒドロイソアルファ酸、及びヘキサヒドロイソアルファ酸が含まれた。この知見は、個々のイソフムロンのPPAR γ との結合は、強力なPPAR γ アゴニスト、ピオグリタゾンのほぼ1/3～1/4であったという公知の報告[Yajima, H., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Fujiwara, D., Odai, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Oikawa, S., and Kondo, K.「ホップ由来苦味酸のイソフムロンは、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 α 及び γ をとともに活性化して、インスリン抵抗性を低下させる（Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance）」J Biol Chem, 279: 33456-33462, (2004)]に照らせば、驚きである。 10

【0285】

キサントフモール、アルファ酸、及びベータ酸の脂肪生成応答は、インドメタシンやトログリタゾンに匹敵したが、使用済ホップとヘキサヒドロコルブロンは、溶媒対照より大きな脂肪生成応答を誘発することができなかった。

【0286】

3T3-L1細胞におけるその脂肪生成の潜在能力に基づけば、異性化アルファ酸、アルファ酸、ベータ酸、並びにキサントフモールが含まれる、この試験での陽性ホップの植物化学成分には、インスリンへの非感受性の徴候又は症状を明示するヒトや他の動物において、インスリン感受性を増加させて血清トリグリセリドを減少させることが期待されよう。 20

【0287】

実施例21

ホップ植物化学品は、インスリン抵抗性3T3-L1脂肪細胞においてアジポネクチン分泌を増加させる。

【0288】

モデル－本実施例では、実施例11及び12に記載のような3T3-L1マウス線維芽細胞モデルを使用した。標準化学品、ホップ化合物のRIAA、IAA、THIAA、HHIAA、キサントフモール、ヘキサヒドロコルブロン、使用済ホップについては、実施例12及び20にそれぞれ記載した通りである。 30

【0289】

細胞培養と処理－細胞を実施例12に記載のように培養して、先に記載のようなホップ植物化学品で処理した。アジポネクチンアッセイと統計解析は、実施例12に記載する通りであった。見かけのミカエリス定数と最大速度を決定するためのHofsteeの方法の変法を使用して、試験材料の効力を評価した。独立変数 $v/[S]$ に{相対アジポネクチン分泌/[濃度]}を、そして従属変数{ v }に{相対アジポネクチン分泌}を代入して、式： $y = mx + b$ の関係を得た。溶媒対照に対する最大アジポネクチン分泌を y 切片より推定する一方で、半最大アジポネクチン分泌に必要な試験材料の濃度を傾きの負値より計算した。 40

【0290】

結果－陽性対照のトログリタゾンは、インスリン抵抗性3T3-L1細胞において、アジポネクチン分泌を $2.5 \mu\text{g/ml}$ で溶媒対照に対して2.44倍の最大亢進させた（図19）。試験したすべてのホップ植物化学品は、溶媒対照に対して亢進されたアジポネクチン分泌を明示して、イソアルファ酸は、トログリタゾンより有意に大きい（対照に対して2.97倍）アジポネクチン分泌をもたらした。試験した4つの用量の中で、最大のアジポネクチン分泌が観測されたのは、イソアルファ酸、Rhοイソアルファ酸、ヘキサヒドロイソアルファ酸、及びテトラヒドロイソアルファ酸では、最高用量の $5 \mu\text{g/ml}$ である。キサントフモール、使用済ホップ、及びヘキサヒドロコルブロンでは、アジポネクチン分泌の最大増加が観測されたのは、それぞれ1.25、25、及び12.5 $\mu\text{g/ml}$ 50

mlである。キサントフモール、Rhoイソアルファ酸、及び使用済ホップでは、観測される最大相対アジポネクチン発現がトログリタゾンに匹敵していたが、ヘキサヒドロイソアルファ酸、ヘキサヒドロコルブロン、及びテトラヒドロイソアルファ酸では、対照より大きいものの、トログリタゾンよりは小さかった。

【0291】

表20

Hofsteeプロットのy切片と傾きよりそれぞれ推定される、最大アジポネクチン分泌と半最大アジポネクチン分泌に必要な試験材料の濃度

【0292】

【表30】

試験材料	最大アジポネクチン分泌 ^[1] [対照に対する倍数]	半最大分泌での試験材料 [μg/ml]
イソアルファ酸	3.17	0.49
キサントフモール	2.47	0.037
Rhoイソアルファ酸	2.38	0.10
トログリタゾン ^[2]	2.29	0.085
使用済ホップ	2.21	2.8
ヘキサヒドロイソアルファ酸 ^[2]	1.89	0.092
ヘキサヒドロコルブロン ^[2]	1.83	3.2
テトラヒドロイソアルファ酸	1.60	0.11

[1]試験した4つの濃度をすべて使用するHofsteeプロットの線形回帰分析より推定した。

[2]用量-応答の推定には、1つのアウトライアーを除いて、3つの濃度を使用した。

【0293】

表20に見られるように、改良Hofsteeプロットより導かれる最大アジポネクチン分泌の推定値は、上記の観察事実を裏付けた(図20)。最大アジポネクチン分泌のy切片推定値は、ほぼ3つの群へ分類された：(1)イソアルファ酸、(2)キサントフモール、Rhoイソアルファ酸、トログリタゾン、及び使用済ホップ、並びに(3)ヘキサヒドロイソアルファ酸、ヘキサヒドロコルブロン、及びテトラヒドロイソアルファ酸。インスリン抵抗性3T3-L1細胞における半最大アジポネクチン分泌の刺激に必要なとされる試験材料の濃度はほぼ0.1μg/mlであり、トログリタゾン、Rhoイソアルファ酸、テトラヒドロイソアルファ酸、及びヘキサヒドロイソアルファ酸で同等であった。イソアルファ酸の半最大アジポネクチン分泌での濃度は0.49μg/mlであり、ほぼ5倍大きかった。キサントフモールは0.037μg/mlと推定される、半最大アジポネクチン分泌の最低用量を明示した。使用済ホップとヘキサヒドロコルブロンでは、推定される半最大アジポネクチン分泌変数の最高濃度が見られ、それぞれ2.8及び3.2μg/mlであった。

【0294】

インスリン抵抗性3T3-L1細胞においてアジポネクチン分泌を高めるその能力に基づけば、本試験で見られた陽性のホップ植物化学成分であるイソアルファ酸、Rhoイソアルファ酸、テトラヒドロイソアルファ酸、ヘキサヒドロイソアルファ酸、キサントフモール、使用済ホップ、及びヘキサヒドロコルブロンは、血漿アジポネクチン濃度が低下しているすべての臨床病理に対して陽性の効果を及ぼすことが期待されよう。

【0295】

実施例22

ホップ植物化学品は、インスリン抵抗性3T3-L1脂肪細胞において、アジポネクチン分泌の亢進とインターロイキン-6分泌の阻害を介して抗炎症活性を明示する。

【0296】

モデル-本実験では、実施例11に記載のような3T3-L1マウス線維芽細胞モデルを使用した。アジポネクチンとIL-6は、それぞれ実施例12及び18に記載のようにアッセイした。標準化学品、ホップ化合物のRIAA、IAA、THIAA、HHIAA、キサントフモール、ヘキサヒドロコルブロン、使用済ホップについては、実施例12及

び 20 に記載の通りであった。

【0297】

統計計算と解釈—すべてのアッセイを同一 2 検体で実施した。統計解析のために、アジポネクチン又は IL-6 分泌に対するホップ誘導体の効果を溶媒対照に比較して計算した。分散分析を多変量比較の補正なしに使用して用量間の違いを決定して、第 I 種誤差の意義 5 % 確率を選択した。

【0298】

結果—トログリタゾンと試験したすべてのホップ誘導体は、高濃度のインスリンの存在下でアジポネクチン分泌を高めた (表 21)。トログリタゾンは、このモデルにおいて、IL-6 分泌を減少させなかった。事実、トログリタゾンと HHC L が IL-6 分泌を高める 2 つの濃度を明示したのに対して、THIAA と使用済ホップは、最高濃度で IL-6 を増加させたが、他の濃度では、効果がなかった。他のホップ誘導体の IL-6 分泌に対する効果は、概ね二相性であった。試験した最高濃度で、RIAA、HHIAA、及び XN は、IL-6 分泌を増加させたが、IAA だけがそれを増加させなかった。RIAA、IAA、THIAA、及び XN では、IL-6 分泌の有意な減少が認められた。

10

【0299】

表 21

インスリン抵抗性 3T3-L1 脂肪細胞におけるアジポネクチン及びインターロイキン-6 の分泌に対するホップ化合物の効果

【0300】

20

【表 3 1】

試験材料	濃度 [μg/ML]	アジボネクチン 指数†	IL-6 指数††	アジボネクチン /IL-6
インスリン対照 ±95% CI	-	1.00±0.30*	1.00±0.23	1.00±0.30
トログリタゾン	5.00	1.47#	1.31#	1.12
	2.50	2.44#	1.06	2.30#
	1.25	1.87#	1.46#	1.28
	0.625	2.07#	1.00	2.07#
RHO イソアルファ酸 (RIAA)	5.0	2.42#	1.28#	1.89#
	2.5	2.27#	0.83	2.73#
	1.25	2.07#	0.67#	3.09#
	0.625	2.09#	0.49#	4.27#
イソアルファ酸 (IAA)	5.0	2.97#	0.78	3.81#
	2.5	2.49#	0.63#	3.95#
	1.25	2.44#	0.60#	4.07#
	0.625	1.73#	0.46#	3.76#
テトラヒドロ イソアルファ酸 (THIAA)	5.0	1.64#	1.58#	1.04
	2.5	1.42#	0.89	1.60#
	1.25	1.55#	0.94	1.65#
	0.625	1.35#	0.80	1.69#
ヘキサヒドロ イソアルファ酸 (HHIAA)	5.0	1.94#	1.49#	1.30#
	2.5	1.53#	0.74#	2.07#
	1.25	1.64#	0.67#	2.45#
	0.625	1.69#	0.73#	2.32#
キサントフモール (XN)	5.0	2.41#	1.23#	1.96#
	2.5	2.11#	0.96	2.20#
	1.25	2.50#	0.92	2.72#
	0.625	2.29#	0.64#	3.58#
ヘキサヒドロコルブ ロン (HHCL)	50.0	1.65#	2.77#	0.60#
	25.0	1.62#	1.19	1.36#
	12.5	1.71#	0.94	1.82#
	6.25	1.05	1.00	1.05
使用済ホップ	50.0	1.92#	1.58#	1.22#
	25.0	2.17#	0.86	2.52#
	12.5	1.84#	1.03	1.79#
	6.25	1.46#	1.03	1.42#

Acacia catechu 試験材料又はインドメタジンを166nMインスリンとともにD5 3T3-L1脂肪細胞へ加えた。翌日、上清培地をアジボネクチン、IL-6、及びレジスチンの定量用にサンプリングした。数値は、いずれもインスリンのみの対照を基準とした。

†アジボネクチン指数＝[アジボネクチン]_{試験}/[アジボネクチン]_{インスリン対照}

††IL-6指数＝[IL-6]_{試験}/[IL-6]_{インスリン対照}

†††レジスチン指数＝[レジスチン]_{試験}/[レジスチン]_{インスリン対照}

*指数の数値は、分散分析の残差平方平均より計算した平均±95%信頼区間である。アジボネクチン又はアジボネクチン/IL-6では、<0.7又は>1.3がインスリン対照より有意差があり、IL-6では、<0.77又は>1.23がインスリン対照より有意差がある。

#インスリン対照より有意差がある(p<0.05)。

【0301】

アジボネクチン／IL-6比（全体的な抗炎症効果の測定基準）は、RIAA、IAA

10

20

30

40

50

、HH I A、及びX Nできわめて陽性 (> 2.00) であった。TH I A A、HH C L、及び使用済ホップは、より低いが、陽性のアジポネクチン / I L - 6 比を明示した。トログリタゾンでは、アジポネクチン / I L - 6 比は、2.5 及び 0.625 $\mu\text{g} / \text{ml}$ での強い陽性の応答と 5.0 又は 1.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ での無効が混在していた。

【0302】

このデータは、脂肪細胞における高インスリン血症の好炎症効果をホップ誘導体の R I A A、I A A、HH I A、TH I A A、X N、HH C L、及び使用済ホップで弱めることができることを示唆する。概して言えば、高インスリン血症状態 (TNF α による併発症を伴わない高インスリン血症) におけるホップ誘導体の抗炎症効果は、トログリタゾンのそれより首尾一貫していた。

10

【0303】

実施例 23

ホップ植物化学品は、TNF α 処理 3 T 3 - L 1 脂肪細胞においてアジポネクチン分泌を増加させる。

【0304】

モデルー本実験では、実施例 11 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。標準化学品とホップ化合物の I A A、R I A A、HH I A A、及び TH I A A は、それぞれ実施例 13 及び 20 に記載の通りであった。ホップ誘導体は、0.625、1.25、2.5、及び 5.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度で試験した。アジポネクチンは、実施例 12 に記載のようにアッセイした。

20

【0305】

結果 - 5 日目 (D 5) の 3 T 3 - L 1 脂肪細胞を 10 ng TNF α / ml で一晩処理すると、アジポネクチン分泌を顕著に抑制した (図 21)。ホップ誘導体の I A A、R I A A、HH I A A、及び TH I A A は、いずれも TNF α / 溶媒対照に比べてアジポネクチン分泌を増加させた。R I A A と HH I A A では線形の用量 - 応答曲線が観察されて、試験した最高濃度の 5.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ で最大の障害を生じた。I A A がアジポネクチンの最大分泌を 1.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ で誘発したのに対し、TH I A A は、曲線の応答を明示して、最大のアジポネクチン分泌は 5.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であった。

【0306】

超生理学的な濃度の TNF α の存在下に脂肪細胞アジポネクチン分泌を増加させる、ホップ誘導体の I A A、R I A A、HH I A A、及び TH I A A の能力は、次善の脂肪細胞機能が関与する炎症状態の予防又は治療におけるこれらの化合物の有用性を支持するものである。

30

【0307】

実施例 24

3 T 3 - L 1 脂肪細胞における脂肪生成及びアジポネクチン分泌を改変させる、Acacia catechu 製剤のホップ誘導体との相乗的な相互作用

モデルー本実験では、実施例 11 及び 13 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。

【0308】

試験化学品と処理 - 使用する標準化学品は、実施例 11 及び 13 に記載の通りであった。3 T 3 - L 1 脂肪細胞を、脂肪生成指数を計算するために、実施例 11 のように分化に先立って処理するか、又はアジポネクチン指数を評価するために、実施例 12 に記載のように TNF α で処理した。実施例 14 に記載のような Acacia catechu 試料 # 5669 を先に記載のようなホップ誘導体の R h o - イソアルファ酸及びイソアルファ酸とともに使用した。Acacia catechu と、A c a c i a : R I A A 及び A c a c i a : I A A の 5 : 1 及び 10 : 1 の組合せを、50、10、5.0、及び 1.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ で試験した。R I A A と I A A は、5.0、2.5、1.25、及び 0.625 $\mu\text{g} / \text{ml}$ で独立して試験した。

40

【0309】

50

計算-A c a c i a /ホップ組合せの予測される脂肪生成応答及びアジポネクチン分泌の評価は、先に記載のように行なった。

結果-試験したすべての組合せが、試験した1以上の濃度で、脂肪生成シナジーを明示した(表22)。A c a c i a : R I A Aの組合せは、A c a c i a : I A Aの組合せより全般により活性であり、A c a c i a : R I A A [5:1]は、すべての用量でシナジーを明示して、A c a c i a : R I A A [10:1]は、10及び5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で相乗的であって、試験したどの濃度でも拮抗的ではなかった。A c a c i a : I A A [10:1]の組合せも、2つの中間用量で相乗的で、拮抗作用を示さなかった。A c a c i a : I A A [5:1]は、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では相乗的であったが、5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 用量では、拮抗的であった。

10

【0310】

同様に、すべての組合せが、試験した1以上の濃度で、アジポネクチン分泌を増加させることに関してシナジーを明示した(表23)。A c a c i a : I A A [10:1]はすべての用量でシナジーを明示したが、A c a c i a : R I A A [5:1]とA c a c i a : R I A A [10:1]は、3つの用量で相乗的で、1つの濃度で拮抗的であった。A c a c i a : I A A [5:1]の組合せは、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で相乗的で、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より高い濃度では、拮抗的であった。

【0311】

表22

インスリン抵抗性3T3-1モデルにおいて Acacia catechu とホップ誘導体により誘発される脂肪生成応答の観測値と予測値

20

【0312】

【表32】

試験材料	濃度 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	脂肪生成指数†		結果
		観測値	予測値	
Acacia/RIAA [5:1] ¹	50	1.05	0.98	シナジー
	10	0.96	0.89	シナジー
	5.0	0.93	0.90	シナジー
	1.0	0.92	0.89	シナジー
Acacia/IAA [5:1] ²	50	1.06	0.98	シナジー
	10	0.93	0.95	無効
	5.0	0.90	0.98	拮抗
	1.0	0.96	0.98	無効
Acacia/RIAA [10:1] ³	50	0.99	1.03	無効
	10	1.00	0.90	シナジー
	5.0	1.00	0.90	シナジー
	1.0	0.94	0.89	無効
Acacia/IAA [10:1] ⁴	50	1.37	1.29	シナジー
	10	1.16	1.15	無効
	5.0	1.08	1.09	無効
	1.0	1.00	0.99	無効

30

† 脂肪生成指数 = $[\text{OD}]_{\text{試験}} / [\text{OD}]_{\text{DMSO 対照}}$

1) 95%信頼限界上限は1.03であり、最小有意差=0.03。

2) 95%信頼限界上限は1.03であり、最小有意差=0.03。

3) 95%信頼限界上限は1.07であり、最小有意差=0.07。

4) 95%信頼限界上限は1.02であり、最小有意差=0.02。

40

【0313】

表23

50

TNF α /3T3-1モデルにおいて *Acacia catechu* とホップ誘導体により誘発されるアジポネクチン分泌の観測値と予測値

【0314】

【表33】

		アジポネクチン指数†		
試験材料	濃度 [$\mu\text{g/ml}$]	観測値	予測値	結果
<i>Acacia</i> /RIAA [5:1] ¹	50	1.27	1.08	シナジー
	10	0.99	1.25	拮抗
	5.0	1.02	0.92	シナジー
	1.0	1.19	1.07	シナジー
<i>Acacia</i> /IAA [5:1] ¹	50	1.13	1.16	無効
	10	0.92	1.13	拮抗
	5.0	1.04	1.09	無効
	1.0	1.25	1.13	シナジー
<i>Acacia</i> /RIAA [10:1] ²	50	1.29	1.11	シナジー
	10	1.07	0.95	シナジー
	5.0	0.94	1.06	拮抗
	1.0	1.03	0.94	シナジー
<i>Acacia</i> /IAA [10:1] ²	50	1.28	0.82	シナジー
	10	1.12	1.07	シナジー
	5.0	1.11	0.99	シナジー
	1.0	1.30	1.05	シナジー

† アジポネクチン指数=[アジポネクチン]_{試験}/[アジポネクチン]_{TNF α 対照}

1) 95%信頼限界上限は1.07であり、最小有意差=0.07。

2) 95%信頼限界上限は1.03であり、最小有意差=0.03。

【0315】

Acacia catechu とホップ誘導体の R h o イソアルファ酸又はイソアルファ酸の組合せは、脂肪細胞における脂質取込みを増加させることと脂肪細胞からのアジポネクチン分泌を増加させることに関して、相乗的な組合せとごくわずかな拮抗の組合せを明示する。

【0316】

実施例25

リポ多糖/3T3-L1脂肪細胞モデルにおけるホップ誘導体の抗炎症活性

モデル—本実験では、実施例11及び13に記載のような3T3-L1マウス脂肪細胞モデルを使用した。

【0317】

試験化学品と処理—標準化学品は、実施例11及び13に記載の通りであったが、D5には、TNF α の代わりに100ng/mlの細菌リポ多糖(LPS, シグマ、ミズーリ州セントルイス)を使用した。使用するホップ誘導体の R h o イソアルファ酸及びイソアルファ酸は、実施例20に記載の通りであった。非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)のアスピリン、サリチル酸、及びイブプロフェンをシグマより入手した。セレコキシブの市販カプセル製剤(CelebrexTM, G. D. サール社、イリノイ州シカゴ)を使用して、有効成分の含量に基づいて、細胞に投薬した。ホップ誘導体、イブプロフェン、及びセレコキシブは、5.00、2.50、1.25、及び0.625 $\mu\text{g/ml}$ で投薬した。インドメタシン、トログリタゾン、及びピオグリタゾンは、10、5.0、1.0、及び0.50 $\mu\text{g/ml}$ で試験した。アスピリンの濃度は、100、50.0、25.0、及び12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、一方、サリチル酸のそれは、200、100、50.0、及び25.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。IL-6とアジポネクチンについてアッセイ

して、データを解析して、I L-6 については実施例 18 に、そしてアジポネクチンについては実施例 13 にすでに記載のように作表した。

【0318】

結果-LPS は、D5 脂肪細胞において、I L-6 の 12 倍の刺激をもたらした。すべての試験薬剤が、LPS 刺激脂肪細胞による I L-6 分泌を様々な度合いで抑制した。I L-6 の最大阻害と、この最大阻害を観測した濃度を表 24 に提示する。処理内の比較的大きな変動のために、I L-6 の最大阻害の程度は、試験材料間で差がなかった。しかしながら、最大阻害が起こる用量は、著しく異なっていた。I L-6 阻害の効力の順位は、イブプロフェン>R I A A = I A A >セレコキシブ>ピオグリタゾン=インドメタシン>トログリタゾン>アスピリン>サリチル酸であった。定性的なベースで言えば、インドメ
10
タシン、トログリタゾン、ピオグリタゾン、イブプロフェン、及びセレコキシブは、試験したすべての濃度で I L-6 分泌を阻害したが、R I A A、I A A、及びアスピリンは、最低濃度では、I L-6 を有意には阻害しなかった（データ示さず）。

【0319】

D5 3T3-L1 脂肪細胞の LPS 処理は、DMSO 対照に対してアジポネクチン分泌を減少させた（表 25）。すべての化合物が分泌をある程度阻害した I L-6 阻害とは違って、アスピリン、サリチル酸、及びセレコキシブは、試験したいずれの用量でも、LPS 処理 3T3-L1 脂肪細胞においてアジポネクチン分泌を誘導することができなかった。トログリタゾン、R I A A、I A A、及びイブプロフェンでは、0.625 µg/ml で、それぞれ 15、17、20、及び 22% の最大アジポネクチン刺激を観測した。ピ
20
オグリタゾンは、アジポネクチン刺激の効力の順位で二番手にあり、1.25 µg/ml で 12% の刺激であった。インドメタシンは、2.50 µg/ml でアジポネクチン分泌を 9% 刺激して、活性のある試験材料の中では、最も弱い効力であった。

【0320】

LPS / 3T3-L1 モデルにおいて、ホップ誘導体の R I A A 及び I A A、並びにイブプロフェンは、in vivo で得られる可能性がある濃度で、I L-6 分泌を減少させて、アジポネクチン分泌を増加させた。チアゾリジンジオンのトログリタゾン及びピオグリタゾンは、I L-6 分泌の阻害剤としてさほど強力ではなく、ホップ誘導体より高用量を必要としたが、アジポネクチン刺激に関しては、ホップ誘導体と同等であった。NSAID のインドメタシン、アスピリン、イブプロフェン、及びセレコキシブでは、マクロファ
30
ージモデルと脂肪細胞モデルの抗炎症活性の間に、首尾一貫した関係が観察されなかった。

【0321】

表 24

ホップ誘導体と選択された NSAID による、LPS / 3T3-L1 脂肪細胞における I L-6 分泌の最大阻害

【0322】

【表 3 4】

試験材料	濃度 [$\mu\text{g/ml}$]	IL-6 指数 †	阻害 (%)
DMSO 対照	—	0.09*	91*
LPS 対照 ± 95% CI	—	1.00 ± 0.30	0
インドメタシン	5.00	0.47*	53*
トログリタゾン	10.0	0.31*	69*
ピオグリタゾン	5.00	0.37*	63*
Rho-イソアルファ酸	1.25	0.63*	37*
イソアルファ酸	1.25	0.61*	39*
アスピリン	25.0	0.61*	39*
サリチル酸	50.0	0.52*	48*
イブプロフェン	0.625	0.46*	54*
セレコキシブ	2.50	0.39*	61*

試験材料は、100ng LPS/ml とともに D5 3T3-L1 脂肪細胞へ加えた。翌日、上清培地を IL-6 の定量用にサンプリングした。すべての数値は、下記のように、LPS 対照を基準とした。提示する濃度は、IL-6 分泌の最大阻害をもたらす用量を表し、0.70 未満の数値は、LPS 対照より有意に小さい ($p < 0.05$)。

† IL-6 指数 = $[\text{IL-6}_{\text{試験}} - \text{IL-6}_{\text{対照}}] / [\text{IL-6}_{\text{LPS}} - \text{IL-6}_{\text{対照}}]$

* LPS 対照より有意差あり ($p < 0.05$)。

【0 3 2 3】

表 2 5

ホップ誘導体と選択された NSAID による、LPS / 3 T 3 - L 1 脂肪細胞におけるアジポネクチン分泌の最大刺激

【0 3 2 4】

【表 3 5】

試験材料	濃度 [$\mu\text{g/ml}$]	アジポネクチン指数 †	刺激 (%)
DMSO 対照	—	1.24	
LPS 対照 ± 95% CI	—	1.00	
インドメタシン	2.50	1.09*	9
トログリタゾン	0.625	1.15*	15
ピオグリタゾン	1.25	1.12*	12
Rho-イソアルファ酸	0.625	1.17*	17
イソアルファ酸	0.625	1.20*	20
アスピリン	113	1.02	NS
サリチル酸	173	0.96	NS
イブプロフェン	0.625	1.22*	22
セレコキシブ	5.00	1.05	NS

† アジポネクチン指数 = $[\text{アジポネクチン}]_{\text{試験}} / [\text{アジポネクチン}]_{\text{LPS 対照}}$

* 1.07 より大きい数値は、LPS 対照より有意差がある ($p < 0.05$)。

NS = LPS 対照より有意差がない。

【0 3 2 5】

実施例 2 6

TNF α / 3 T 3 - 1 モデルにおける、クルクミン又はキサントフモールと組み合わせた Acacia catechu 又はホップ誘導体のシナジー

モデル—本実験では、実施例 1 1 及び 1 3 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。

【0 3 2 6】

試験化学品と処理—使用する標準化学品は、実施例 1 1 及び 1 3 に記載の通りであった

。3 T 3 - L 1 脂肪細胞を、アジポネクチン指数を評価するために実施例 1 3 に記載のように T N F α で処理した。本実験では、実施例 1 4 に記載のような *Acacia catechu* 試料 # 5 6 6 9、実施例 2 0 に記載のようなホップ誘導体 R h o - イソアルファ酸及びキサントフモール、そして *Metagenics* (ワシントン州ギグ・ハーバー) により提供されるクルクミンを使用した。*Acacia catechu* と、*A c a c i a* : クルクミン及び *A c a c i a* : キサントフモールの 5 : 1 の組合せを 5 0、1 0、5 . 0、及び 1 . 0 μ g / m l で試験した。R I A A と、クルクミン及び X N の 1 : 1 の組合せを 1 0、5、1 . 0、及び 0 . 5 0 μ g / m l で試験した。

【0327】

計算—この組合せの予測アジポネクチン指数の評価とシナジーの決定を先に記載のよう
に行なった。 10

結果—T N F α は、アジポネクチン分泌を溶媒だけの対照の約 5 0 パーセントまで低下させた。陽性対照のピオグリタゾン、アジポネクチン分泌を 8 0 パーセント増加させた (表 2 6)。*A c a c i a* のクルクミン又は X N との組合せは、より高い濃度で拮抗的であり、より低い濃度で相乗的であることがわかった。同様に、R I A A とクルクミンは、3 つの高用量で拮抗的であるが、最低用量の 1 . 0 μ g / m l では、きわめて相乗的であった。2 つのホップ誘導体、R I A A と X N は、T N F α 刺激 3 T 3 - L 1 細胞からのアジポネクチン分泌においてシナジーを明示しなかった。

【0328】

T N F α 処理 3 T 3 - L 1 脂肪細胞において、*A c a c i a* と R I A A は、アジポネクチン分泌を相乗的に増加させたが、X N とのシナジーを明示したのは、*A c a c i a* だけである。 20

【0329】

表 2 6

T N F α / 3 T 3 - 1 モデルにおける、クルクミン又はキサントフモールと組み合わせた *Acacia catechu* 及びホップ誘導体のシナジー

【0330】

【表 3 6】

試験材料	濃度[$\mu\text{g/ml}$]	アジボネクチン指数†		解釈
		観測値	予測値	
DMSO 対照	—	2.07	—	—
TNF α $\pm$ 95% CI	—	1.0 $\pm$ 0.049	—	—
ピオグリタゾン	1.0	1.80	—	—
Acacia/クルクミン [5:1] ¹	50	0.56	0.94	拮抗
	10	1.01	1.07	拮抗
	5.0	1.19	1.02	シナジー
	1.0	1.22	1.16	シナジー
Acacia/XN[5:1] ¹	50	0.54	0.85	拮抗
	10	0.95	1.06	拮抗
	5.0	0.97	1.01	拮抗
	1.0	1.26	1.15	シナジー
RIAA/クルクミン[1:1] ¹	5	0.46	0.79	拮抗
	1	1.03	1.11	拮抗
	5.0	1.12	1.28	拮抗
	1.0	1.30	1.08	シナジー
RIAA/XN[1:1] ¹	50	0.31	0.63	拮抗
	10	0.81	1.06	拮抗
	5.0	1.09	1.25	拮抗
	1.0	1.09	1.06	無効

† アジボネクチン指数 = [アジボネクチン]_{試験} / [アジボネクチン]_{TNF α 対照}

1) 95%信頼区間は、0.961~1.049 であり、最小有意差=0.049。

【0331】

実施例 27

インスリン抵抗性 3T3-L1 脂肪細胞モデルにおける、ホップ誘導体の Rho-イソ
アルファ酸と組み合わせた共役リノール酸による脂肪生成の in vitro シナジー

モデル—本実験では、実施例 11 及び 13 に記載のような 3T3-L1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。

【0332】

試験化学品と処理—使用する標準化学品は、実施例 11 に記載の通りであった。3T3-L1 脂肪細胞を、脂肪生成指数を計算するために実施例 11 のように分化に先立って処理した。粉末化 CLA を Lipid Nutrition (イリノイ州シャンナホン) より入手して、c9t11 及び t10c12 の異性体の 1:1 混合物として記載した。CLA と、CLA:RIAA の 5:1 の組合せを 50、10、5.0、及び 1.0 $\mu\text{g/ml}$ で試験した。RIAA については、先に記載のような予測脂肪生成指数の計算のために 10、1.0、及び 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で試験した。

【0333】

結果—RIAA は、CLA との組合せにおいてトリグリセリド含量を相乗的に増加させた。すべての用量でシナジーを認めた (表 27)。

CLA と RIAA の間のシナジーは、広範囲の用量で観察されて、CLA のインスリン増感効力を高めるために潜在的に使用することができる。

【0334】

表 27

10

20

30

40

50

インスリン抵抗性 3 T 3 - L 1 脂肪細胞モデルにおける、R h o - イソアルファ酸と組み合わせた共役リノール酸による脂肪生成のシナジー

【0335】

【表37】

脂肪生成指数†				
試験材料	濃度[μg/ml]	観測値	予測値	解釈
CLA:RIAA[5:1] ¹	50	1.26	1.15	シナジー
	10	1.16	1.06	シナジー
	5.0	1.16	1.10	シナジー
	1.0	1.17	1.06	シナジー

† 脂肪生成指数 = $[\text{OD}]_{\text{試験}} / [\text{OD}]_{\text{DMSO 対照}}$

1) 95%信頼限界上限は1.05 であり、最小有意差=0.05。

10

【0336】

実施例28

ホップ植物化学品は、TNFα 処理 3 T 3 - L 1 脂肪細胞においてNF-κB 活性化を阻害する

モデルー本実験では、実施例11に記載のような3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。

【0337】

細胞培養と処理ー分化に続いて、3 T 3 - L 1 脂肪細胞を分化後培地にさらに40日間維持した。標準化学品、培地、及びホップ化合物のRIAA及びキサントフモールは、実施例13及び20に記載の通りであった。ホップ誘導体と陽性対照のピオグリタゾンについて、2.5及び5.0 μg/mlの濃度で試験した。TNFαでの処理に先立つ1時間前に試験材料を加えて、その処理の3及び24時間後に核抽出物を調製した。

20

【0338】

ELISAー3 T 3 - L 1 脂肪細胞を増殖培地に分化後40日間維持した。Active Motif (カリフォルニア州カールスバッド)からのTransAMTM NF-κBキットを変更なしに使用して、核のNF-κB p65を定量した。このキットに提供されるJurkat核抽出物は、50 ng/ml TPA (ホルボール、12-ミリスレート、13-アセテート)及び0.5 μMカルシウムイオノフォアA23187を補充した培地に37℃で2時間培養した直後に採取する細胞に由来した。

30

【0339】

タンパク質アッセイーActive Motif Fluorescent Protein Quantification Kit (活性モチーフ蛍光タンパク定量キット)を使用して、核タンパク質を定量した。

【0340】

統計解析ースチューデントの片側t検定を使用して、比較を実施した。第I種誤差の確率を名義5%水準に設定した。

結果ーTPA処理Jurkat核抽出物は、NF-κB p65の予測された増加を明示して、キット試薬の十分な性能を示した(図22)。D40 3 T 3 - L 1 脂肪細胞を10 ng TNFα/mlで3時間(図22A)又は24時間(図22B)処理すると、核NF-κB p65をそれぞれ2.1及び2.2倍増加させた。予測されるように、PPARγアゴニストのピオグリタゾンは、TNFα処理後3時間でも24時間でも核NF-κB p65の量を阻害しなかった。5.0及び2.5 μg RIAA/mlでは、TNFαの3時間後に、NF-κB p65の核移行がそれぞれ9.4及び25%阻害された。24時間では、5.0 RIAA/mlの処理だけがNF-κB p65の核移行の有意な(p<0.05)阻害を明示した。キサントフモールは、NF-κB p65の核移行を、5.0及び2.5 μg/mlで、TNFα処理後3時間ではそれぞれ15.6及び6.9%、そして24時間では13.4及び8.0%阻害した。

40

50

【0341】

R I A Aとキサントフモールはともに、T N F α で処理したインスリン抵抗性の成熟脂肪細胞において、N F - k B p 6 5の核移行の、わずかであるが首尾一貫した阻害を明示した。この結果は、3 T 3 - L 1 脂肪細胞におけるN F - k B p 6 5の核移行を阻害することが示されたことはないとする、P P A R γ アゴニストについて記載されている結果とは異なるものである。

【0342】

実施例 29

Acacia catechu 抽出物とメトホルミンは、インスリン抵抗性 3 T 3 - L 1 脂肪細胞におけるトリグリセリド取込みを相乗的に増加させる。

10

【0343】

モデルー本実験では、実施例 1 1 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。使用するすべての化学品及び手順は、実施例 1 1 に記載の通りであった。

試験化学品と処理ーメトホルミンは、シグマ（ミズーリ州セントルイス）より入手した。試験材料は、ジメチルスルホキシドにおいて、分化の 0 日目と成熟期（6 / 7 日目）を通して 2 日毎に加えた。陽性対照として、トログリタゾンを加えて、4 . 4 μ g / m l の最終濃度とした。メトホルミン、Acacia catechu 試料 # 5 6 6 9、及びメトホルミン / A c a c i a の 1 : 1（w / w）の組合せについて、5 0 μ g / m l の試験材料で試験した。分化した 3 T 3 - L 1 細胞を 0 . 2 % オイルレッド O で染色した。生じる染色した油滴をイソプロパノールで溶かして、5 3 0 n m での分光光度分析により定量した。完全に分化した細胞の溶媒対照中での相対トリグリセリド含量として結果を表した。

20

【0344】

計算ー関係式： $1 / L I = X / L I_x + Y / L I_y$ （ここで L I = 脂肪生成指数、X と Y は、試験混合物中の各成分の相対分数であり、 $X + Y = 1$ ）を使用して、メトホルミン / Acacia catechu 抽出物の予測脂肪生成効果の推定を行なった。推定 L I の平均が対応する観測分数の推定値の 9 5 % 信頼区間の外側にあれば、シナジーが推量された。シナジーの定義は、成分の各効果と組合せの効果の比較に関わるものであり、Berenbaum [Berenbaum, M. C. 「シナジーとは何か？（What is synergy ?）」Pharmacol Rev 41 (2), 93-141, (1989)] により記載された。

【0345】

30

結果ーAcacia catechu 抽出物は、きわめて脂肪生成であり、3 T 3 - L 1 細胞のトリグリセリド含量を 3 2 パーセント高めて（図 2 3）、1 . 3 2 の脂肪生成指数を生じた。メトホルミン単独では、0 . 7 9 の脂肪生成指数であり、脂肪生成でなかった。メトホルミン / Acacia catechu 抽出物の組合せは、1 . 3 5 の観測脂肪生成指数を明示した。メトホルミン / Acacia catechu 抽出物は、9 8 の予測脂肪生成指数であり、観測脂肪生成指数が予測値の 2 つの 9 5 % 信頼限界の外側にあったので、シナジーを明示した。

【0346】

3 T 3 - L 1 細胞において明示された脂肪生成の潜在能力に基づけば、メトホルミン及び Acacia catechu 抽出物の 1 : 1 の組合せは、臨床使用において相乗的に挙動することが期待されよう。そのような組合せは、血漿トリグリセリドを減少させること、又はメトホルミン効果の期間を延長させることといった、メトホルミン療法のポジティブな利益の範囲を増加させることに有用であろう。

40

【0347】

実施例 30

インスリン抵抗性 3 T 3 - L 1 脂肪細胞モデルにおける、ホップ誘導体とチアゾリジンジオンによる脂肪生成の in vitro シナジー

モデルー本実験では、実施例 1 1 及び 1 3 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。

【0348】

試験化学品と処理ー使用する標準化学品は、実施例 1 1 に記載の通りであった。3 T 3

50

ーL 1 脂肪細胞を、脂肪生成指数を計算するために実施例 1 1 に記載のように分化に先立って処理した。トログリタゾンは、Cayman Chemicals (イリノイ州シカゴ) より入手した。ピオグリタゾンは、市販の錠剤製剤 (ACTOSE (登録商標) (Takeda Pharmaceuticals, イリノイ州リンカーンシア) として入手した。この錠剤を粉砕して、全粉末をアッセイに使用した。すべての結果は、有効成分含量に基づいて計算した。使用するホップ誘導体の R h o - イソアルファ酸及びイソアルファ酸は、実施例 2 0 に記載の通りであった。トログリタゾンは、R I A A 及び I A A と組み合わせて $4.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ で試験し、一方、より強力なピオグリタゾンは、R I A A 及び I A A との 1 : 1 の組合せにおいて $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で試験した。また、実施例 3 4 に記載のような予測脂肪生成指数の計算のために、すべての材料を 4.0 及び $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で独立して試験した。

10

【0349】

結果ートログリタゾン又はピオグリタゾンとともにそれぞれ 4.0 及び $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で試験するとき、R h o - イソアルファ酸とイソアルファ酸は、インスリン抵抗性 3 T 3 - L 1 脂肪細胞モデルにおいて、このチアゾリジンジオンと相乗的にトリグリセリド合成を高めた (表 2 8)。

【0350】

ホップ誘導体の R h o - イソアルファ酸及びイソアルファ酸は、チアゾリジンジオンのインスリン増感効果を相乗的に高めて、用量低下又は好ましく応答する患者数の増加という潜在的な臨床上の利益をもたらす可能性がある。

20

【0351】

表 2 8

インスリン抵抗性 3 T 3 - L 1 脂肪細胞モデルにおけるホップ誘導体及びチアゾリジンジオンの *in vitro* 合成

【0352】

【表 3 8】

試験材料	濃度 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	脂肪生成指数 †		解釈
		観測値	予測値	
トログリタゾン/RIAA [1:1] ¹	4.0	1.23	1.06	シナジー
トログリタゾン/IAA [1:1] ¹	4.0	1.14	1.02	シナジー
ピオグリタゾン/RIAA [1:1] ²	2.5	1.19	1.00	シナジー
ピオグリタゾン/IAA [1:1] ²	2.5	1.16	0.95	シナジー

30

† 脂肪生成指数 = $[\text{OD}]_{\text{試験}} / [\text{OD}]_{\text{DMSO 対照}}$

1) 95%信頼限界上限は1.02であり、最小有意差=0.02。

2) 95%信頼限界上限は1.05であり、最小有意差=0.05。

【0353】

実施例 3 1

T N F α / 3 T 3 - L 1 脂肪細胞モデルにおける R h o - イソアルファ酸及びメトホルミンの *in vitro* シナジー

40

モデルー本実験では、実施例 1 1 に記載のような 3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用した。使用する標準化学品と脂肪細胞の $10 \text{ ng T N F } \alpha / \text{ml}$ での処理は、それぞれ実施例 1 1 及び 1 3 に記載する通りであった。

【0354】

試験材料と細胞処理ーメトホルミンは、シグマ (ミズーリ州セントルイス) より入手して、R h o - イソアルファ酸は、実施例 2 0 に記載の通りであった。 $1 \mu\text{g R I A A} / \text{ml}$ を伴うか又は伴わずにメトホルミンを 50、10、5.0、又は $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、 $10 \text{ ng T N F } \alpha / \text{ml}$ と同時に D 5 3 T 3 - L 1 脂肪細胞へ加えた。実施例 1 1 に詳述したように、6 日目に培養基上清について I L - 6 をアッセイした。メトホルミン : R I A A 混合物の I L - 6 阻害に対する予測効果の推定を先に記載のように行なった。

50

【0355】

結果—TNF α は、D5脂肪細胞中でのIL-6分泌において6倍の増加をもたらした。トログリタゾンが1 μ g/mlでIL-6分泌を対照に対して34パーセント阻害する一方で、1 μ gのRIAAは、IL-6分泌を対照に対して24パーセント阻害した(表29)。メトホルミンは、1 μ g RIAA/mlとの組合せにおいて、50 μ g/mlの濃度でシナジーを、1 μ g/mlの濃度で強いシナジーを明示した。メトホルミン50 μ g/mlでは、1 μ gのRIAAがこの混合物においてさらに10パーセント阻害をもたらしたのに対し、1 μ gのメトホルミンでは、1 μ gのRIAAがIL-6阻害を35パーセント増加させた。メトホルミン：RIAAの組合せでは、2つの中間用量で拮抗作用と無効がそれぞれ見られた。

10

【0356】

メトホルミンとRh α -イソアルファ酸の組合せは、高い濃度と低い濃度の両方で相乗的に機能して、TNF α 処理3T3-L1脂肪細胞からのIL-6分泌を低下させる。

【0357】

表29

TNF α /3T3-L1脂肪細胞におけるIL-6分泌の、ホップRh α -イソアルファ酸及びメトホルミンによる相乗阻害

【0358】

【表39】

試験材料	濃度 [μ g/ml]	IL-6指数†	阻害(%)	解釈
DMSO対照	—	0.16	—	—
TNF α 対照 $\pm$ 95% CI	—	1.00 $\pm$ 0.07*	0	—
トログリタゾン	1.0	0.66	34	—
RIAA	1.0	0.76	24	—
メトホルミン	50	0.78	22	—
メトホルミン/1 μ g RIAA	50	0.68	32	シナジー
メトホルミン	10	0.78	22	—
メトホルミン/1 μ g RIAA	10	0.86	14	拮抗
メトホルミン	5.0	0.96	4	—
メトホルミン/1 μ g RIAA	5.0	0.91	9	無効
メトホルミン	1.0	0.91	9	—
メトホルミン/1 μ g RIAA	1.0	0.56	44	シナジー

20

30

試験材料は、10ng TNF α /mlとともに開始濃度でD5 3T3-L1脂肪細胞へ加えた。翌日、上清培地をIL-6定量用にサンプリングした。すべての数値は、TNF α 対照を基準にした。

† IL-6指数 = [IL-6_{試験} - IL-6_{対照}] / [IL-6_{TNF α} - IL-6_{対照}]

* 0.93未満の数値は、TNF α 対照より有意に(p<0.05)小さい。

【0359】

実施例32

癌細胞増殖に対する試験化合物の in vitro 効果

本実験は、本発明のいくつかの試験化合物について、癌細胞増殖に対する in vitro の直接的な阻害効果を実証する。

40

【0360】

方法—本発明の試験化合物の癌細胞増殖に及ぼす阻害効果をRL95-2子宮内膜癌細胞モデル(AKTキナーゼの過剰発現体)とHT-29(COX-2を構成的に発現する)及びSW480(活性化AKTキナーゼを構成的に発現する)結腸癌細胞モデルにおいて検証した。簡潔に言えば、標的細胞を96ウェル組織培養プレートへプレート培養して、そのまま亜周密まで増殖させた。次いで、この細胞を実施例4に記載のような様々な量の試験化合物で72時間処理して、CyQuant(Invitrogen, カリフォルニア州カールスバッド)の市販蛍光アッセイによって相対的な細胞増殖を定量した。

50

【0361】

結果－RL95-2細胞を10 μ g/mlのMgDHIAA (mgRho)、IAA、THIAA、TH-HHIAA (THIAA及びHHIAAの1:1混合物)、Xn (キサントフモール)、LY (LY249002, PDK阻害剤)、EtOH (エタノール)、アルファ (アルファ酸混合物)、及びベータ (ベータ酸混合物) で72時間処理した。細胞増殖に対する相対阻害を図24として提示して、キサントフモールでは、DMSO溶媒対照に比べて50%より大きい阻害を示す。図25及び26は、様々な濃度のRIA又はTHIAAの、それぞれHT-29及びSW480癌細胞に対する用量応答の結果を表示する。RIA及びTHIAAのメジアン阻害濃度は、HT-29細胞系で31及び10 μ Mであり、SW480細胞系で38及び3.2 μ Mであった。

10

【0362】

実施例33

KK-A^yマウス糖尿病モデルにおける *Acacia nilotica* 及びホップ誘導体の in vivo 血糖降下作用

モデル－雄性、9週齢、平均40 $\pm$ 5グラムのKK-A^y/Taマウスを使用して、絶食時血清グルコース又はインスリンの濃度を低下させる試験材料の潜在能力を評価した。このマウスの系統は、1940年代に糖尿病のモデルとして開発されたKK系統とモデルA^y/遺伝子型の系統の間の交雑の結果である。観察される表現型は、まだ完全には特徴づけられていないが、少なくとも4つの定量的な形質の遺伝子座が同定された多遺伝子突然変異の結果である。このうちの1つは、レプチン受容体中のミスセンス突然変異に関連している。この突然変異があるにもかかわらず、この受容体は、十分に効率的ではないかもしれないが、依然として機能的である。KK系統は、インスリン非感受性とグルコース不耐性に関連するが、明白な高血糖症とは関連しない糖尿病を発症する。A^y突然変異の導入は、肥満と高血糖症を引き起こす。A^y突然変異は、アグーチ遺伝子座に対して5'にあって、アグーチをRalyプロモーターの制御下に置くRaly遺伝子の170kbの欠失である。ホモ接合体の動物は、着床前に死亡する。

20

【0363】

試験材料－実施例14に記載のような *Acacia nilotica* 試料#5659と実施例20に記載のようなホップ誘導体のRho-イソアルファ酸、イソアルファ酸、及びキサントフモールを使用した。*Acacia nilotica*、RIA、及びIAAを100mg/kg/日で投与する一方で、XNは20mg/kgで投与した。追加的に、*Acacia nilotica* のRIA、IAA、及びXNとの5:1及び10:1の組合せを製剤化して、100mg/kg/日で投与した。

30

【0364】

試験手順－試験物質は、各群5匹の動物へ0.2% Tween-80中のガバージュにより毎日投与した。初回投与の前と第三回及び最終投与の90分後に血清を後眼窩より採取した。ムタローゼ/グルコースオキシダーゼ法により非絶食時血清グルコースを酵素的に定量して、マウ斯特異的ELISA (酵素結合免疫吸着検定) により血清インスリンを定量した。

【0365】

データ解析－試験物質が対照に対して血清グルコース又はインスリンを減少させるかどうかを評価するために、各マウスについて、はじめに、投与後グルコース及びインスリンの数値を処理前パーセントとして投与前濃度に対して正規化した。処理前パーセントの限界値 (片側、対照マウスの95%信頼区間より低い) をグルコース及びインスリンの変数の両方に対して計算した。試験材料のそれぞれの処理前パーセント値を対照の限界値と比較した。対照の限界値より低い試験材料の処理前パーセント値を対照より有意に異なる ($p < 0.05$) とみなした。

40

【0366】

結果－3日の処理期の間、非絶食の血清グルコースが2.6%増加する一方、血清インスリンは、対照マウスにおいて6.7%減少した。ロシグリタゾン、*Acacia nilotica*、

50

XN:Acacia [1:5]、XN:Acacia [1:10]、Acacia:RIAA [5:1]、キサントフモール、Acacia:IAA [5:1]、異性化アルファ酸、及びRho-イソアルファ酸は、いずれも対照に比べて、非絶食時血清グルコースを減少させたが、血清インスリンに対しては無効であった。Acacia:RIAA [10:1]とAcacia:IAA [10:1]は、血清グルコースにもインスリンにも効果がなかった(表30)。

【0367】

2型糖尿病のKK-AyマウスモデルにおけるAcacia nilotica 試料#5659、キサントフモール、異性化アルファ酸、Rho-イソアルファ酸、及びそれらの様々な組合せの速やかな血糖降下効果は、高血糖症と関連したヒト疾患の治療における臨床効果への潜在能力を裏付ける。

【0368】

表30

KK-Ay糖尿病マウスの非絶食時血清グルコース及びインスリンに対するAcacia nilotica 及びホップ誘導体の効果

【0369】

【表40】

試験材料	投薬† [mg/kg-日]	血糖 [% 処理前]	インスリン [% 処理前]
対照 (限界値)	-	102.6(98.7)	93.3(85.4)
ロシグリタゾン	1.0	80.3#	88.7
Acacia nilotica 試料 #5659	100	89.1#	95.3
XN:Acacia [1:5]	100	91.5#	106.5
XN:Acacia [1:10]	100	91.7#	104.4
Acacia:RIAA [5:1]	100	92.6#	104.8
キサントフモール	20	93.8#	106.4
Acacia:IAA [5:1]	100	98.0#	93.2
異性化アルファ酸	100	98.1#	99.1
Rho-イソアルファ酸	100	98.3#	100
Acacia:RIAA [10:1]	100	101.6	109.3
Acacia:IAA [10:1]	100	104.3	106.4

†投薬は、各群5匹の動物に対して3連続日の間1日1回行った。

#対照より有意に低い(p<0.05)。

【0370】

実施例34

糖尿病db/dbマウスモデルにおけるAcacia nilotica 及びホップ誘導体のin vivo シナジー

モデル-雄性的C57BLKS/J m⁺/m⁺ Lep^{db} (db/db)マウスを使用して、絶食時血清グルコース又インスリンの濃度を低下させる試験材料の潜在能力について評価した。この系統のマウスは、機能性レプチン受容体の非存在のためにレプチンに対して抵抗性である。血漿インスリンの上昇は、10~14日目に、そして血糖の上昇は、4~8週目に始まる。試験時(9週目)には、動物が顕著に肥満(50±5g)になり、島肥大の証拠を明示した。

【0371】

試験材料-陽性対照のメトホルミンとロシグリタゾンをそれぞれ300mg/kg/日と1.0mg/kg/日で3連続日の毎日投薬した。Acacia nilotica 試料#5659、ホップ誘導体、及びそれらの組合せを先に記載のように投薬した。

【0372】

試験手順-試験物質は、0.2% Tween-80中のガバージュにより毎日投与し

た。初回投薬の前と第三回及び最終投薬の90分後に血清を後眼窩より採取した。ムタロターゼ／グルコースオキシダーゼ法により非絶食時血清グルコースを酵素的に定量して、マウス特異的ELISAにより血清インスリンを定量した。

【0373】

結果－陽性対照のメトホルミン及びロシグリタゾンは、血清グルコース及びインスリンの濃度を対照に対してともに減少させた（表31）。単一の試験材料として許容される結果を示したのは、RIAとXNだけである。RIAが血清インスリンを低下させる一方で、XNは、血清グルコースの低下をもたらして、インスリンに対しては無効であった。Acacia:RIA[5:1]は、血清インスリン濃度を低下させることについて試験した中で最も有効な薬剤であり、ビグアニドのメトホルミンによる血清インスリンレベルの17パーセント低下とチアゾリジンジオンのロシグリタゾンによる15%減少に対して、血清インスリンレベルの21パーセント低下をもたらした。このAcacia:RIA[5:1]組合せの応答は、個々の成分のいずれの応答よりも大きかったので、シナジーの潜在能力を明示した。Acacia nilotica だけでは、血清グルコースもインスリンも低下させることができなかったが、RIAは、血清インスリンをメトホルミンと同様の程度まで抑制した。残る試験材料の中では、Acacia:IAA[10:1]の組合せも、血清インスリン濃度を低下させるのに有効であった。

10

【0374】

2型糖尿病のdb/dbマウスモデルにおける、Rho-イソアルファ酸により影響される血清インスリンの速やかな低下と、キサントフモールによる血清グルコースの低下は、インスリン非感受性及び高血糖症に関連したヒト疾患の治療における臨床効果へのその潜在能力を裏付けるものである。さらに、Rho-イソアルファ酸及びAcacia catechuの5:1組合せは、db/dbマウス糖尿病モデルにおいて相乗的に見えた。2つの独立した糖尿病の動物モデルと3つのin vitro モデルにおいてRho-イソアルファ酸、キサントフモール、及びAcacia:RIA[5:1]製剤により明示された陽性の応答は、血清グルコースの低下又はインスリン感受性の亢進が求められる臨床状況におけるそれらの潜在的な有用性を裏付ける。

20

【0375】

表31

db/db糖尿病マウスの非絶食時血清グルコース及びインスリンに対する Acacia nilotica 及びホップ誘導体の効果

30

【0376】

【表 4 1】

試験材料	投薬† [mg/kg-日]	血糖 [% 処理前]	インスリン [% 処理前]
対照(限界値)	-	103.6(98.4)	94.3(84.9)
Acacia:RIAA [5:1]	100	99.6	79.3#
メトホルミン	300	67.6#	83.3#
Rho-イソアルファ酸	100	102.3	83.8#
Acacia:IAA [10:1]	100	104.3	84.4#
ロシグリタゾン	1.0	83.0#	84.7#
XN:Acacia [1:10]	100	101.5	91.1
Acacia nilotica 試料 #5659	100	100.4	91.9
Acacia:RIAA [10:1]	100	101.6	93.5
異性化アルファ酸	100	100.8	95.8
キサントフモール	20	97.8#	101.6
XN:Acacia [1:5]	100	104.1	105.6
Acacia:IAA [5:1]	100	102.7	109.1

† 投薬は、各群5匹の動物に対して3連続日の間1日1回行った。

#対照より有意に低い(p<0.05)。

【0377】

実施例 3 5

糖尿病 db/db マウスモデルにおける Acacia nilotica 及びホップ誘導体の比の in vivo 最適化

モデル-雄性の C57BLKS/J m+/m+ Leprdb (db/db) マウスを使用して、絶食時血清グルコース又インスリンの濃度を低下させる試験材料の潜在能力について評価した。この系統のマウスは、機能性レプチン受容体の非存在のためにレプチンに対して抵抗性である。血漿インスリンの上昇は、10～14日目に、そして血糖の上昇は、4～8週目に始まる。試験時(9週目)には、動物が顕著に肥満(50±5g)になり、島肥大の証拠を明示した。

【0378】

試験材料-陽性対照のメトホルミンとロシグリタゾンそれぞれ300mg/kg/日と1.0mg/kg/日で5連続日の毎日投薬した。1:99、1:5、1:2、1:1、2:1、及び5:1の比のホップ誘導体 RIAA 及び Acacia nilotica 試料#5659を100mg/kgで投薬した。

【0379】

試験手順-試験物質は、0.2% Tween-80中のガバージュにより毎日投与した。初回投薬の前と第五回及び最終投薬の90分後に血清を後眼窩より採取した。ムタロターゼ/グルコースオキシダーゼ法により非絶食時血清グルコースを酵素的に定量して、マウス特異的 ELISA により血清インスリンを定量した。

【0380】

結果-陽性対照のメトホルミン及びロシグリタゾンは、血清グルコース及びインスリンの濃度を対照に対してともに減少させた(p<0.05、結果を示さず)。個別には、RIAAとAcaciaは、100mg/kg、5日間で血清グルコースを対照に対してそれぞれ7.4及び7.6パーセント低下させた(p<0.05)。RIAA及びAcaciaの1:99、1:5、又は1:1での組合せは拮抗的に見えたが、2:1及び5:1の比のRIAA:Acaciaは、血清グルコースを対照に対してそれぞれ11及び22パーセント減少させた。この応答は、RIAA又はAcacia単独のいずれよりも大きくて、2つの成分間での相乗効果を示唆する。血清インスリン濃度の低下でも同様の効果が見られた(図27)。

【0381】

このモデルにおいて、糖尿病の治療に現在使用されている2つの医薬品、メトホルミン及びロシグリタゾンに対して、R h o - イソアルファ酸及びA c a c i a の5 : 1 の組合せについてさらに試験した。この結果 (図28) は、R h o - イソアルファ酸及びA c a c i a の5 : 1 の組合せが、血清グルコース (パネルA) 及び血清インスリン (パネルB) を低下させることにおいてこれらの医薬品に匹敵する結果をもたらしたことを示す。

【0382】

d h / d b マウス糖尿病モデルにおいて、R h o - イソアルファ酸及びA c a c i a の2 : 1 及び5 : 1 の組合せは、相乗的に見え、血清グルコースの低下又はインスリン感受性の亢進が求められる臨床状況における潜在的な有用性を裏付ける。

【0383】

実施例36

コラーゲン誘発性慢性関節リウマチマウスモデルにおけるホップ試験化合物の効果

本実施例は、2つのホップ化合物、M g R h o 及びT H I A A の、慢性関節リウマチモデルにおいて炎症と関節炎の総体症状を抑制する効果を実証する。そのような炎症及び症状には、いくつかのプロテインキナーゼが一部仲介することが知られている。

【0384】

モデル—雌性D B A / J マウス (10匹/群) を明暗の標準条件下に収容して、食餌を自由に摂らせた。このマウスに、0日目に、スクワレン中に100 μ g のI I 型コラーゲンと100 μ g の結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) を含有する混合物を皮内注射した。21日目に追加注射を繰り返した。22~27日目に、マウスについて関節炎の徴候を検査して、非応答性のマウスをこの試験から除外した。28日目に始めて42日目に終わる14日間、マウスを試験化合物のガバージュにより毎日処理した。本実施例に使用する試験化合物は、10mg / kg (低)、50mg / kg (中間) 又は250mg / kg (高) のR I A A (M g R h o) ; 10mg / kg (低)、50mg / kg (中間)、又は250mg / kg (高) のT H I A A ; 20mg / kg のセレコキシブ; 及び10mg / kg のプレドニゾロンであった。

【0385】

以下に記載の関節炎指標を使用して、関節炎の総体症状についてそれぞれの爪を評価した (0~4でスコア付け)。この関節炎指標では、0 = 目につく徴候なし; 1 = 浮腫及び/又は紅斑: 1つの指; 2 = 浮腫及び/又は紅斑: 2つの関節; 3 = 浮腫及び/又は紅斑: 2より多い関節; 及び4 = 爪全体の重度関節炎と指の硬直症及び変形

結果—関節炎指標に対するR I A A の効果を図29のようにグラフで提示する。10mg / kg のプレドニゾロン (30~42日目)、20mg / kg のセレコキシブ (32~42日目)、250mg / kg のR I A A (34~42日目)、及び50mg / kg のR I A A (38~40日目) で有意な低下 ($p < 0.05$, 両側検定) が観察され、R I A A では、50又は250mg / kg で抗関節炎効果が実証された。図30は、関節炎指標に対するT H I A A の効果を表示する。ここでも、セレコキシブ (32~42日目)、250mg / kg のT H I A A (34~42日目)、及び50mg / kg のT H I A A (34~40日目) で有意な低下が観察されて、抗関節炎剤としてのT H I A A の有効性が実証された。

【0386】

実施例37

ヒトの代謝症候群に対するR I A A : A c a c i a (1 : 5) の効果

本実験では、代謝症候群のあるボランティア患者におけるいくつかの臨床意義マーカーに対する、R I A A : A c a c i a (1 : 5) 製剤での治療の効果を検証した。

【0387】

方法と治験デザイン—本治験は、単一の試験施設 (Functional Medicine Research Center, ワシントン州ギグハーバー) で実施した無作為化、プラセボ対照の二重盲検試験であった。本試験への適格規準は、被検者 (18~70歳) が以下を満たすことを求めた: (i) B M I が25と42.5kg / m²の間であ

10

20

30

40

50

ること；(i i) $TG/HDL-C$ 比 ≥ 3.5 ；(i i i) 絶食時インスリン $> 10 \text{ mcIU/mL}$ 。さらに、被検者は、以下の5つの判定基準のうち3つを満たさなければならない：(i) 腰回り > 35 ” (女性) 及び > 40 ” (男性)；(i i) $TG \geq 150 \text{ mg/dL}$ ；(i i i) $HDL < 50 \text{ mg/dL}$ (女性)、及び $< 40 \text{ mg/dL}$ (男性)；(i v) 血圧 $\geq 130/85$ 、又は投薬時に高血圧と診断されること；及び(v) 絶食時グルコース $\geq 100 \text{ mg/dL}$ 。

【0388】

上記の適格規準を満たす被検者を4つのアーム：(i) $RIAA/Acacia$ の組合せ (1錠につき 100 mg $RIAA$ と 500 mg $Acacia nilotica$ 芯材抽出物を含有する) を1錠、1日3回服用する被検者；(i i) $RIAA/Acacia$ 組合せを2錠、1日3回服用する被検者；(i i i) プラセボ、1錠、1日3回；及び(i v) プラセボ、2錠、1日3回の1つへ無作為化した。治験の全期間は、12週であった。被検者より血液を1日目、8週目、及び12週目で採取して、代謝症候群の様々な変数に対する(薬剤)補給の効果を評価した。

【0389】

結果—本治験に登録された被検者(プラセボ群と $RIAA/Acacia$ を1日3錠服用する被検者をプールした)の最初の人口学的及び生化学的特徴を表32に示す。最初の絶食時血糖と食後2時間(2h pp)血糖値は、 $RIAA/Acacia$ 群とプラセボ群で同様であった(それぞれ、 99.0 対 96.5 mg/dL と 128.4 対 109.2 mg/dL)。さらに、いずれの血糖値も、概ね研究基準範囲(絶食時血糖は $40 \sim 110 \text{ mg/dL}$ 、2h pp血糖値は $70 \sim 150 \text{ mg/dL}$)内にあった。2h ppインスリン応答の変化は、後期の代謝症候群や明らかな糖尿病において見られる血糖及び絶食時インスリンの上昇に先行するので、このことは予測されていた。

【0390】

表 3 2

人口学的特徴とベースラインでの生化学的特徴

【0391】

【表 4 2】

	プラセボ		$RIAA/Acacia$ (3錠/日)	
N	35		35	
性別				
男性	11 (31%)		12 (34%)	
女性	24 (69%)		23 (66%)	
	平均	SD	平均	SD
年齢(歳)	46.0	13.2	47.9	13.4
体重(lbs)	220.6	35.2	219.5	31.6
BMI (kg/m^2)	35.0	4.0	35.4	4.0
収縮期BP (mm)	131.0	15.1	129.7	13.9
拡張期BP (mm)	83.7	8.5	82.6	7.8
ウエスト(インチ)	42.9	4.9	42.9	4.5
ヒップ(インチ)	47.1	4.0	47.6	3.2
絶食時インスリン (mcIU/mL)	13.2	5.2	17.5	12.1
2h pp インスリン (mcIU/mL)	80.2	52.1	99.3*	59.2*
絶食時血糖 (mg/dL)	96.5	9.0	99.0	10.3
2h pp 血糖 (mg/dL)	109.2	30.5	128.4	36.9
絶食時TG (mg/dL)	231.2	132.2	255.5	122.5

* 2h pp インスリン値の異常により1名の被検者を解析から除外した；BMI，基礎代謝指数；BP，血圧；TG，トリグリセリド；HDL，高密度リポタンパク質

【0392】

絶食時の血中インスリン測定値は同様で、やはり基準範囲内にあり、初期値は、R I A A / A c a c i a 群で 17.5 mcIU/mL であり、プラセボ群で 13.2 mcIU/mL であった（基準範囲 $3 \sim 30 \text{ mcIU/mL}$ ）。2 h p p インスリン値は、基準範囲を超えて上昇して（ 99.3 対 80.2 mcIU/mL ）、絶食時インスリン又は血糖測定値より大きな変動を示した。初期値は同様であったが、R I A A / A c a c i a 群は、絶食時インスリンと 2 h p p インスリンにおいて、並びにプロトコールで 8 週後の 2 h p p 血糖において大きな減少を示した（図 3 1 及び 3 2）。

【0393】

ホメオスタシスモデル評価（H O M A）スコアは、公知のインスリン抵抗性の尺度である。全被検者の H O M A スコアの変化を図 3 3 に示す。代謝症候群被検者のインスリン及び血糖値に見られる変動性により、絶食時インスリン $> 15 \text{ mcIU/mL}$ の被検者だけの亜群についても評価した。この亜群の H O M A スコアを表 3 3 に示すと、プラセボ群に比較して、R I A A / A c a c i a 群では、有意な減少が観察されることが示される。

【0394】

表 3 3

初期の絶食時インスリンが 15 mcIU/mL 以上である被検者の H O M A スコアに対する R I A A / A c a c i a 補給（3 錠／日）の効果

【0395】

【表 4 3】

HOMAスコア			
処理	N	初期値	8週後
プラセボ	9	4.39	4.67
RIAA/Acacia	13	5.84	4.04

【0396】

両群間の差は、8 週目で有意であった（ $p < 0.05$ ）。絶食時インスリン及び血糖より公知の方法〔（インスリン（ mcIU/mL ）×血糖（ mg/dL ））／405〕によって H O M A スコアを計算した。

【0397】

トリグリセリド（T G）の上昇も、代謝症候群の重要な裏付け指標である。表 3 4 と図 3 4 は、R I A A / A c a c i a 補給が 8 週後にプラセボに比較して有意な（ $p < 0.05$ ）T G 減少をもたらしたことを示す。R I A A / A c a c i a 群では、T G / H D L - C 比も実質的に減少する（ 6.40 から 5.28 へ）ことが示されたが、プラセボ群では、減少を認めなかった（ 5.81 から 5.92 へ）。

【0398】

表 3 4

T G レベル及び T G / H D L - コレステロール比に対する R I A A / A c a c i a 補給（3 錠／日）の効果

【0399】

【表 4 4】

補給	絶食時TG (mg/dL)			TG/HDL		
	初期値	8週後	変化	初期値	8週後	変化
プラセボ	231.2	229.8	-1.4	5.81	5.92	+0.11
RIAA/Acacia(3錠/日)	258.6	209.6	-49.0	6.40	5.28	-1.12

【0400】

代謝症候群の患者に 100 mg の r h o - イソアルファ酸と 500 mg Acacia nilotica 芯材抽出物からなる組合せ錠剤を 1 日 3 錠、8 週の間補給すると、プラセボに比較して、2 h p p インスリンレベルのより大きな低下をもたらした。さらに、R I A A / A c

10

20

30

40

50

a c i a 補給（3錠／日）を服用している被検者では、プラセボを服用している被検者に対して、絶食時インスリン、絶食時及び2 h p p 血糖、絶食時トリグリセリド、及びH O M A スコアのより大きな減少が観察された。これらの結果は、R I A A / A c a c i a 補給が代謝症候群の被検者においてインスリンのホメオスタシスを維持するのに有用である可能性があることを示す。

【0401】

本発明を十分記載してきたが、当業者には、付帯の特許請求項の精神又は範囲より逸脱することなくそれに対して多くの変更及び修飾を行うことが可能であることが明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

10

【0402】

【図1】図1は、インスリン感受性及び抵抗性を調節するキナーゼネットワークの一部を図解的に図示する。

【図2】図2は、5種の選択キナーゼのM g R I A A (m g R h o) による阻害をグラフで図示する。

【図3】図3は、5種のホップ成分と Acacia nilotica 抽出物によるP I 3 Kアイソフォームの阻害をグラフで図示する。

【図4】図4は、C O X - 2 発現のL P S 刺激前の前に加えるとき（白い棒）、又は試験材料の添加に先立つ一晚のL P S 刺激に続いて加えるとき（灰色の棒）のR I A A [パネルA] 及びI A A [パネルB] のP G E ₂ 生合成の用量関連阻害を図示する。

20

【図5】図5は、R A W 2 6 4 . 7 細胞において分析した、L P S 誘導C O X - 2 仲介性P G E ₂ 産生に対するセレコキシブ [パネルA] 及びM g R I A A [パネルB] の直接的な酵素阻害のグラフ表現を提供する。P E G ₂ を測定してp g / m l で表した。誤差の棒は標準偏差を示す (n = 8) 。

【図6】図6は、C O X - 2 タンパク発現のウェスタンブロット検出を提供する。R A W 2 6 4 . 7 細胞をL P S で指定時間の間刺激して、その後で全細胞抽出物を、C O X - 2 及びG A P D H の発現についてのウェスタンブロットにより可視化した [パネルA] 。C O X - 2 及びG A P D H のバンドのデンストメトリーを実施した。グラフ [パネルB] は、C O X - 2 のG A P D H に対する比を表す。

【図7】図7は、i N O S タンパク発現のウェスタンブロット検出を提供する。R A W 2 6 4 . 7 細胞をL P S で指定時間の間刺激して、その後で全細胞抽出物を、i N O S 及びG A P D H の発現についてのウェスタンブロットにより可視化した [パネルA] 。i N O S 及びG A P D H のバンドのデンストメトリーを実施した。グラフ [パネルB] は、i N O S のG A P D H に対する比を表す。

30

【図8】図8は、96ウェルフォーマットを利用するT r a n s A M N F - κ B キットの代表的な概略図を提供する。プレートへ結合したオリゴヌクレオチドは、N F - κ B のコンセンサス結合部位を含有する。一次抗体は、N F - κ B のp 5 0 サブユニットを検出した。

【図9】図9は、T r a n s A M N F - κ B キットにより定量した、N F - κ B の代表的な結合活性を提供する。D N A 結合のパーセントは、L P S 対照 (100%) に対して計算した。誤差の棒は、標準偏差 (n = 2) を表す。実施例のセクションに記載のように、R A W 2 6 4 . 7 細胞を試験化合物とL P S で4時間処理した。

40

【図10】図10は、発達中の脂肪細胞と成熟脂肪細胞に対する、A c a c i a 試料 # 4 9 0 9 抽出物の脂肪生成効果を評価するための代表的な試験手順の概略図である。この3 T 3 - L 1 マウス線維芽細胞モデルを使用して、脂肪細胞の脂肪生成に対する試験化合物の潜在効果を試験した。

【図11】図11は、A c a c i a 試料 # 4 9 0 9 抽出物又は陽性対照のインドメタシン及びトログリタゾンで処理した3 T 3 - L 1 脂肪細胞の非極性脂質含量を溶媒対照に比較して図示するグラフ図である。誤差の棒は、95%信頼区間 (片側) を表す。

【図12】図12は、A c a c i a 試料 # 4 9 0 9 の水系抽出物のジメチルスルホキシド

50

可溶性分画の、インスリン抵抗性 3T3-L1 脂肪細胞からのアジポネクチンの分泌に対する効果を評価するための代表的な試験手順の概略図である。

【図 13】図 13 は、トログリタゾンの 3 用量と、Acacia 試料 # 4909 の水系抽出物のジメチルスルホキシド可溶性分画の 4 用量により 24 時間誘発されたインスリン抵抗性 3T3-L1 細胞による最大アジポネクチン分泌を図示する代表的な棒グラフである。提示する数値は溶媒対照に対するパーセントであり；誤差の棒は、95%信頼区間を表す。

【図 14】図 14 は、Acacia 試料 # 4909 の水系抽出物のジメチルスルホキシド可溶性分画の、試験材料 + 10、2、又は 0.5 ng TNF α /ml で処理した 3T3-L1 脂肪細胞からのアジポネクチンの分泌に対する効果を評価するための代表的な試験プロトコルの概略図である。

【図 15】図 15 は、インドメタシン又は Acacia 試料 # 4909 抽出物により誘発した、TNF α 処理した成熟 3T3-L1 細胞によるアジポネクチン分泌を表す代表的な棒グラフを図示する。提示する数値は溶媒対照に対するパーセントであり；誤差の棒は、95%信頼区間を表す。*TNF α 単独処理より有意差あり ($p < 0.05$)。

【図 16】図 16 は、異なる市販源からの Acacia catechu 及び A. nilotica の様々な組成物による、インスリン抵抗性 3T3-L1 脂肪細胞におけるトリグリセリド含量の相対的な増加をグラフにより明示する。提示する数値は、溶媒対照に対するパーセントであり；誤差の棒は、95%信頼区間を表す。

【図 17】図 17 は、Acacia catechu の様々な抽出物により誘発される最大の相対アジポネクチン分泌の表示をグラフにより図示する。提示する数値は、溶媒対照に対するパーセントであり；誤差の棒は、95%信頼区間を表す。

【図 18】図 18 は、ホップ化合物又は陽性対照のインドメタシン及びトログリタゾンで処理した 3T3-L1 脂肪細胞の脂質含量（溶媒対照に対する）をグラフにより図示する。この 3T3-L1 マウス線維芽細胞モデルを使用して、脂肪細胞の脂肪生成に対する試験化合物の潜在効果を試験した。結果は、対照細胞の相対的な非極性脂質含量として表示；誤差の棒は、95%信頼区間を表す。

【図 19】図 19 は、試験化合物により 4 用量で 24 時間誘発されたインスリン抵抗性 3T3-L1 細胞による最大アジポネクチン分泌の代表的な棒グラフである。提示する数値は、溶媒対照に対するパーセントであり；誤差の棒は、95%信頼区間を表す。IAA = イソアルファ酸、RIAA = Rh o イソアルファ酸、HHIA = ヘキサヒドロイソアルファ酸、及び THIAA = テトラヒドロイソアルファ酸。

【図 20】図 20 は、Rh o イソアルファ酸、イソアルファ酸、テトラヒドロイソアルファ酸、ヘキサヒドロイソアルファ酸、キサントフモール、使用済ホップ、ヘキサヒドロコルブロン、及び陽性対照トログリタゾンについてのホフステイ（Hofstee）プロットを図示する。溶媒対照に対する最大アジポネクチン分泌を y 切片より推定する一方で、半最大アジポネクチン分泌に必要な試験材料の濃度を傾きの負値より計算した。

【図 21】図 21 は、イソアルファ酸と Rh o イソアルファ酸 [パネル A]、そしてヘキサヒドロイソアルファ酸とテトラヒドロイソアルファ酸 [パネル B] により誘発した、TNF α 処理した成熟 3T3-L1 細胞による相対的なアジポネクチン分泌を表す 2 つの棒グラフを表示する。提示する数値は、溶媒対照に対するパーセントであり；誤差の棒は、95%信頼区間を表す。*TNF α のみの処理より有意差あり ($p < 0.05$)。

【図 22】図 22 は、10 ng TNF α /ml の添加後 3 時間 [パネル A] 及び 24 時間 [パネル B] のインスリン抵抗性 3T3-L1 脂肪細胞における NF- κ B 核移行 (translocation) を図示する。ピオグリタゾン、RIAA、及びキサントフモールを 5.0 (黒い棒) 及び 2.5 (縞の棒) μ g/ml で加えた。Jurkat 核抽出物は、50 ng/ml TPA (ホルボール、12-ミリステート、13-アセテート) 及び 0.5 μ M カルシウムイオノフォア、A23187 (CI) を補充した培地において 37°C で 2 時間培養した直後に採取する細胞に由来する。

【図 23】図 23 は、溶媒、メトホルミン、Acacia 試料 # 5659 水系抽出物、又

10

20

30

40

50

はメトホルミン／Acacia catechu 抽出物の 1 : 1 組合せで処理したインスリン抵抗性 3 T 3 - L 1 細胞の相対的なトリグリセリド含量についてグラフにより記載する。結果は、溶媒対照において完全に分化した細胞の相対トリグリセリド含量として表す。

【図 2 4】図 2 4 は、R L 9 5 - 2 子宮内膜細胞系における細胞増殖に対する、1 0 μ g / m l の溶媒対照 (DMSO)、R I A A、イソアルファ酸 (I A A)、テトラヒドロイソアルファ酸 (T H I A A)、T H I A A 及びヘキサヒドロイソアルファ酸 (H H I A A) の 1 : 1 混合物、キサントフモール (X N)、L Y 2 4 9 0 0 2 (L Y)、エタノール (E T O H)、アルファ酸 (A L P H A)、及びベータ酸 (B E T A) の効果をグラフにより図示する。

【図 2 5】図 2 5 は、H T - 2 9 細胞系における細胞増殖に対する、様々な濃度の T H I A A 又は還元イソアルファ酸 (R I A A) の効果をグラフにより図示する。

【図 2 6】図 2 6 は、S W 4 8 0 細胞系における細胞増殖に対する、様々な濃度の T H I A A 又は還元イソアルファ酸 (R I A A) の効果をグラフにより図示する

【図 2 7】図 2 7 は、d b / d b マウスモデルにおいて血清グルコース [パネル A] 及び血清インスリン [パネル B] を低下させることについての、還元イソアルファ酸 (R I A A) 及び A c a c i a の様々な組合せの用量応答をグラフにより図示する。

【図 2 8】図 2 8 は、d b / d b マウスモデルにおいて、R I A A : A c a c i a の 5 : 1 の組合せがもたらした、血清グルコース [パネル A] 及び血清インスリン [パネル B] の低下を医薬品の抗糖尿病化合物、ロジグリタゾン及びメトホルミンに比較してグラフにより図示する。

【図 2 9】図 2 9 は、マウスの慢性関節リウマチモデルにおける還元イソアルファ酸 (R I A A) の関節炎指標に対する効果をグラフにより図示する。

【図 3 0】図 3 0 は、マウスの慢性関節リウマチモデルにおける T H I A A の関節炎指標に対する効果をグラフにより図示する。

【図 3 1】図 3 1 は、絶食時及び食後 (p p) 2 時間のインスリンレベルに対する R I A A / A c a c i a (1 : 5) 補給 (3 錠 / 日) の効果をグラフにより図示する。p p 2 時間インスリンレベルの評価では、被検者を 1 0 ~ 1 2 時間絶食にした後で、7 5 g グルコース (T r u t o l 1 0 0, C A S C O N E R L (登録商標) D i a g n o s t i c s) を含有する溶液を消費させた。このグルコースチャレンジから 2 時間後、血液を採取して、インスリンレベルをアッセイした (L a n o r a t o r i e s N o r t h w e s t, ワシントン州タコマ)。

【図 3 2】図 3 2 は、絶食時及び食後 (p p) 2 時間の血糖値に対する R I A A / A c a c i a (1 : 5) 補給 (3 錠 / 日) の効果をグラフにより図示する。食後 2 時間血糖値の評価では、被検者を 1 0 ~ 1 2 時間絶食にした後で、7 5 g グルコース (T r u t o l 1 0 0, C A S C O N E R L (登録商標) D i a g n o s t i c s) を含有する溶液を消費させた。このグルコースチャレンジから 2 時間後、血液を採取して、血糖値をアッセイした (L a n o r a t o r i e s N o r t h w e s t, ワシントン州タコマ)。

【図 3 3】図 3 3 は、H O M A スコアに対する R I A A / A c a c i a (1 : 5) 補給 (3 錠 / 日) の効果をグラフにより図示する。H O M A スコアは、公知の方法により、絶食時インスリン及びグルコースより計算した [(インスリン (m c I U / m L) * グルコース (m g / d L)) / 4 0 5] 。

【図 3 4】図 3 4 は、血清 T G レベルに対する R I A A / A c a c i a (1 : 5) 補給 (3 錠 / 日) の効果をグラフにより図示する。

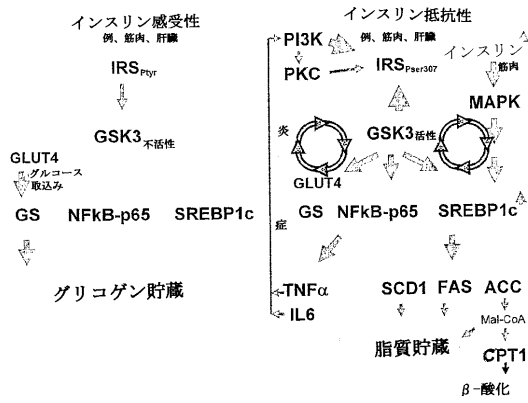
10

20

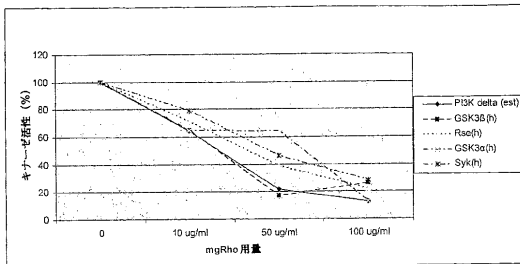
30

40

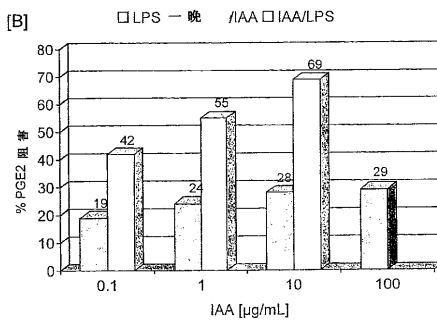
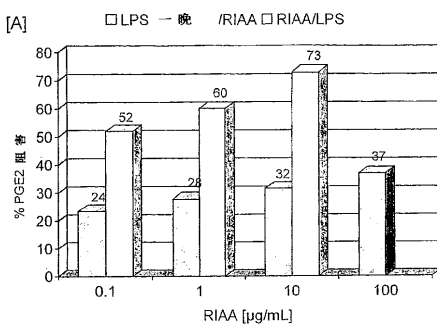
【図 1】



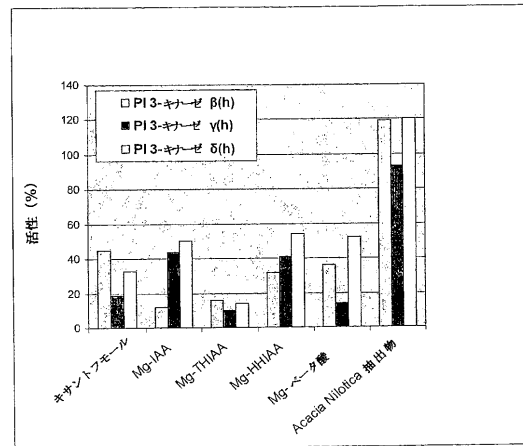
【図 2】



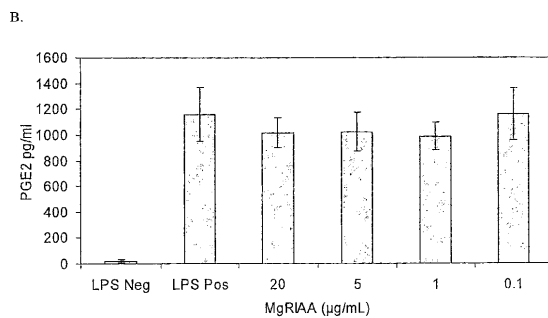
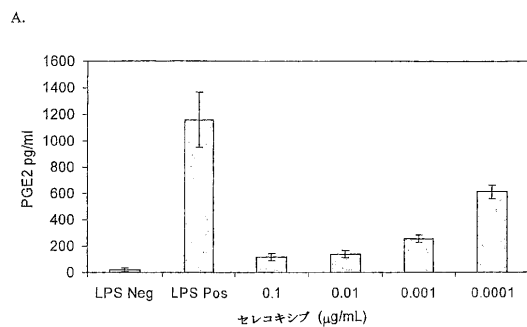
【図 4】



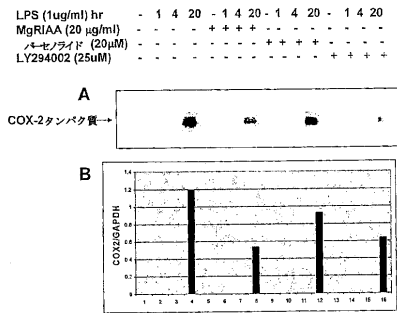
【図 3】



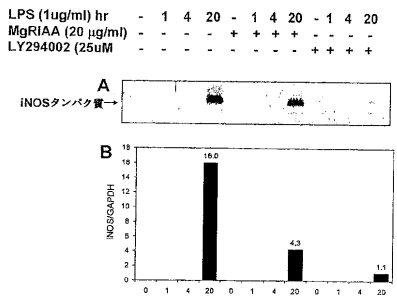
【図 5】



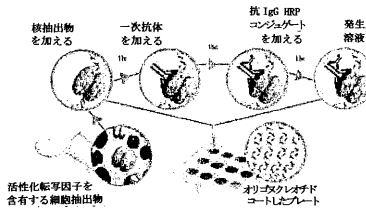
【図 6】



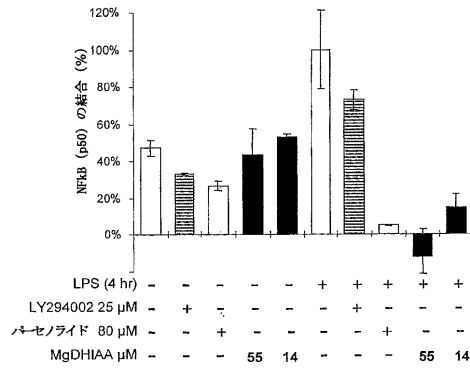
【図 7】



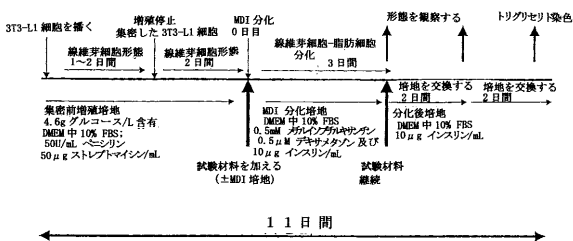
【図 8】



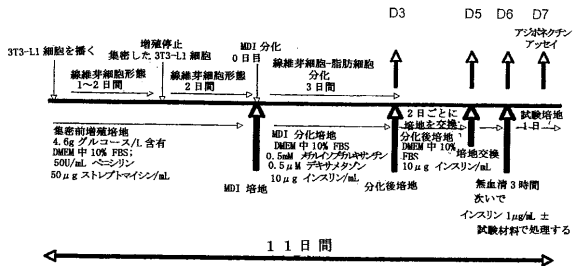
【図 9】



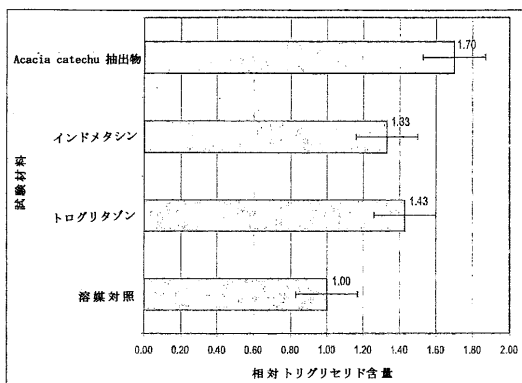
【図 10】



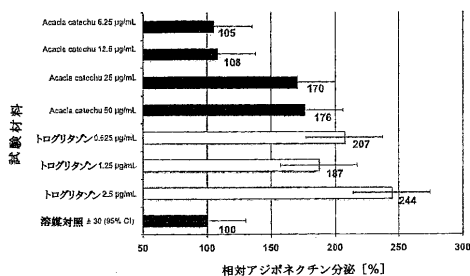
【図 12】



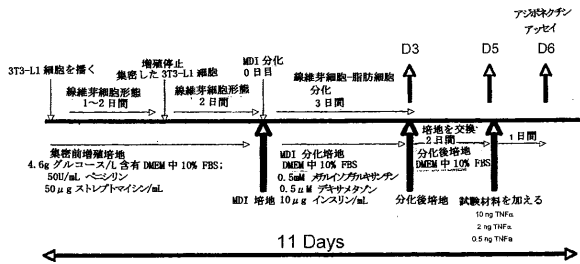
【図 11】



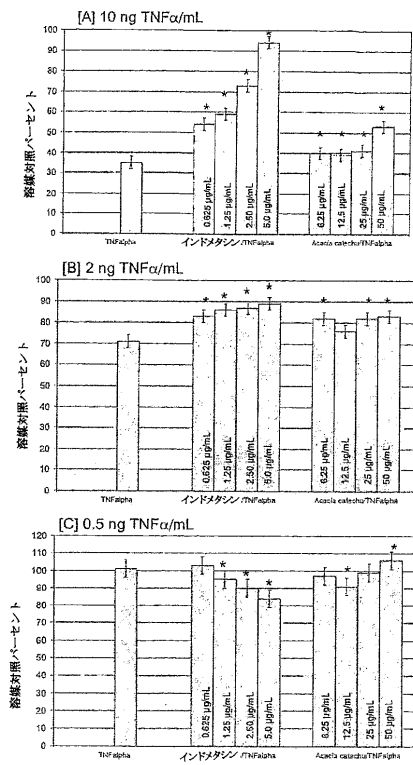
【図 13】



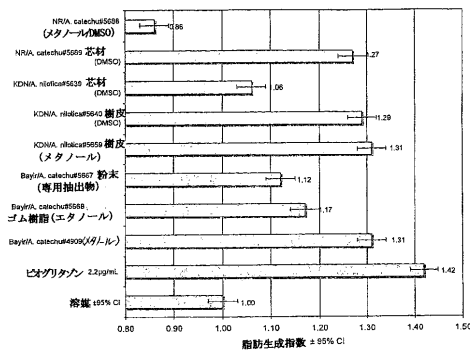
【図 14】



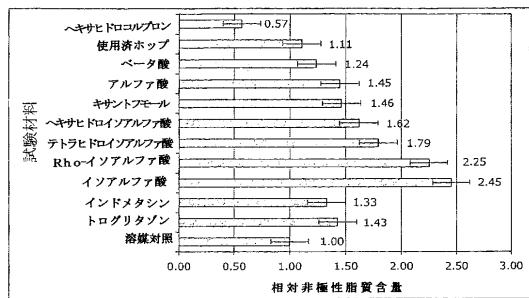
【図 15】



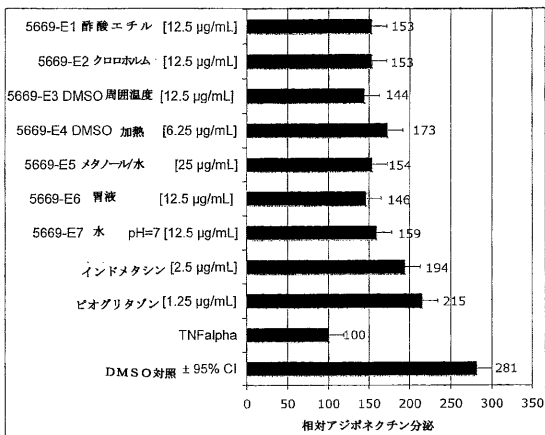
【図 16】



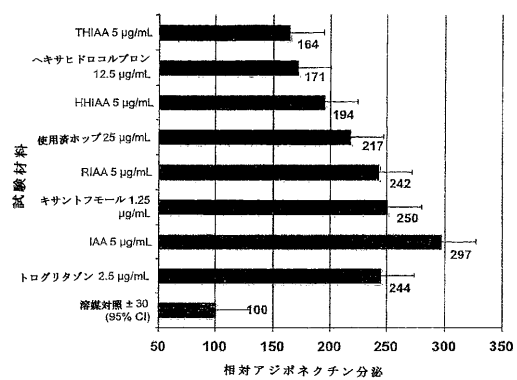
【図 18】



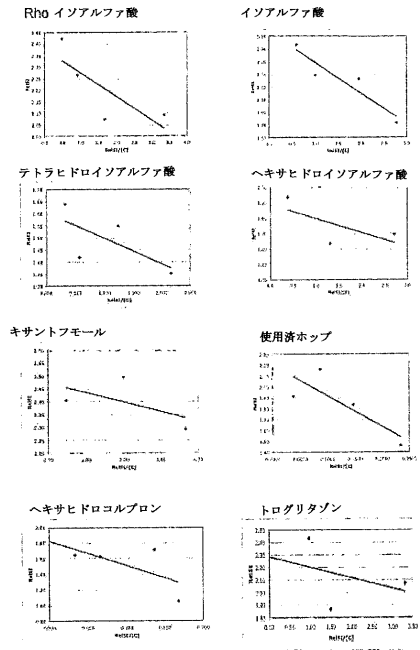
【図 17】



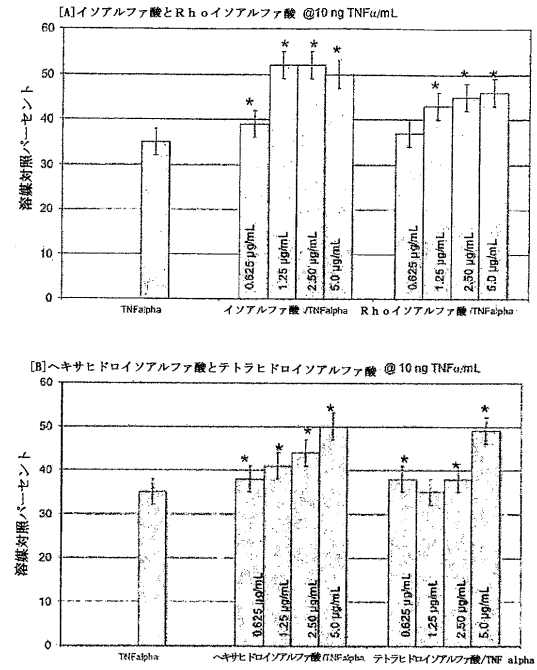
【図 19】



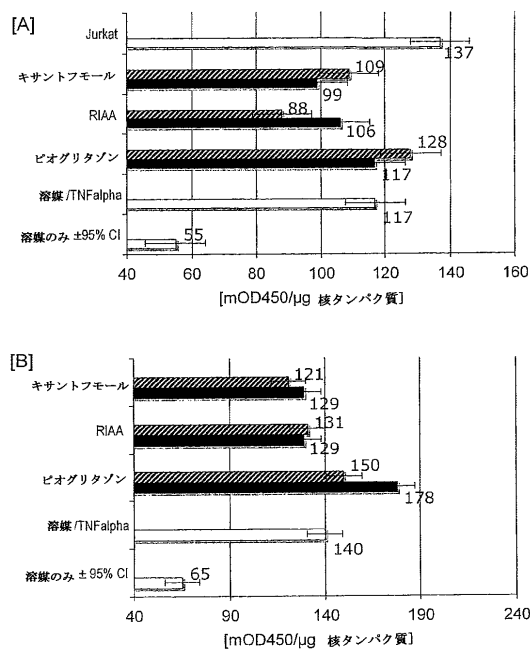
【図 20】



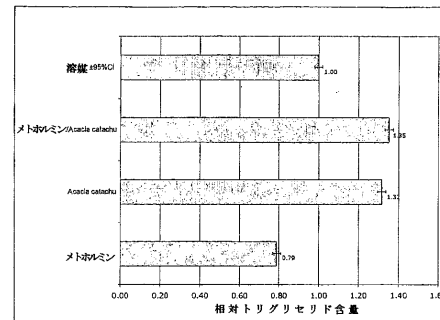
【図 21】



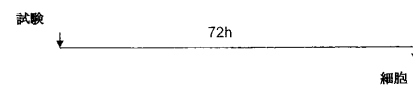
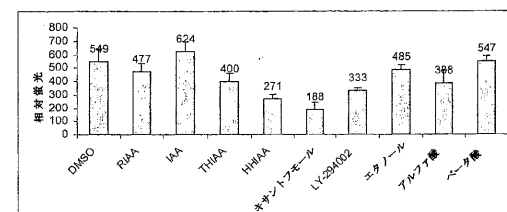
【図 22】



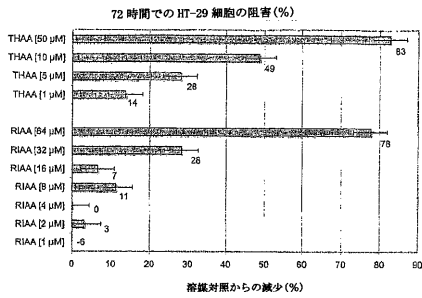
【図 23】



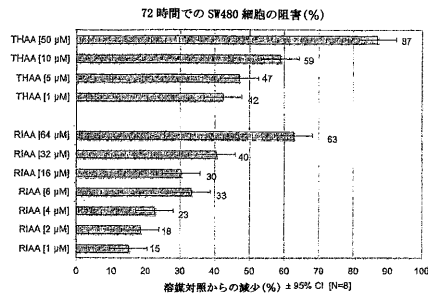
【図 24】



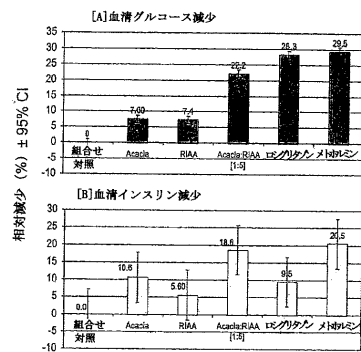
【図 25】



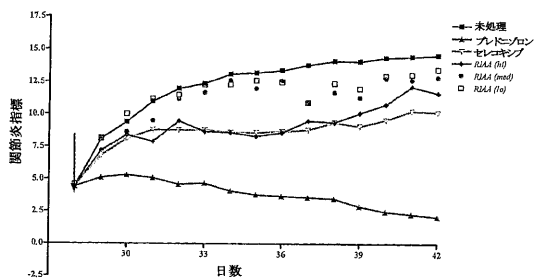
【図 26】



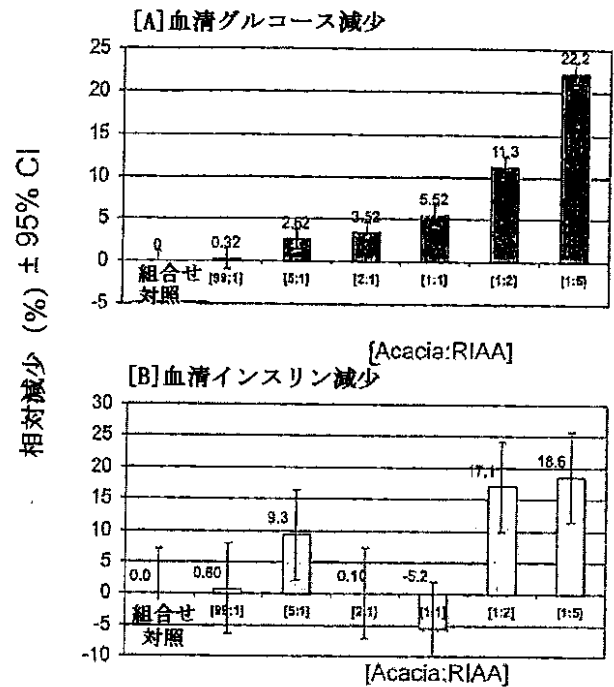
【図 28】



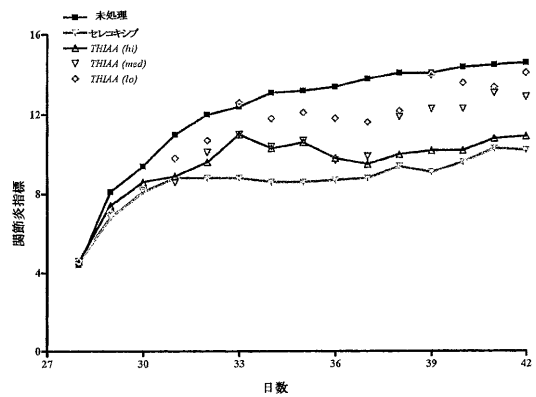
【図 29】



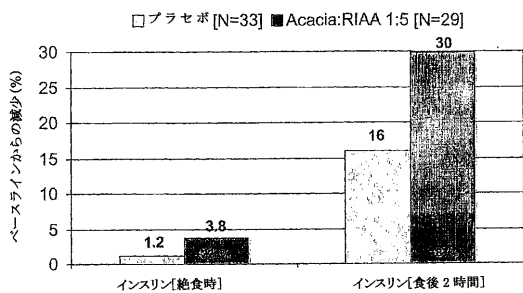
【図 27】



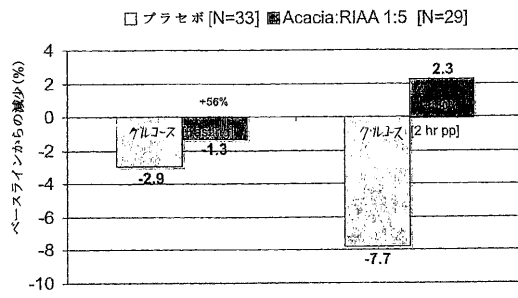
【図 30】



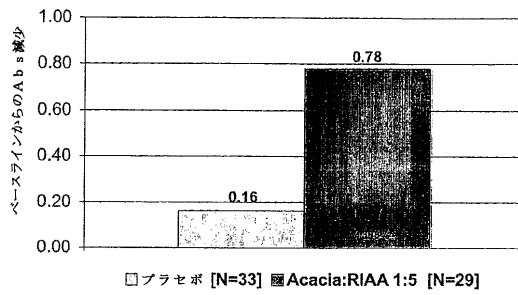
【図 31】



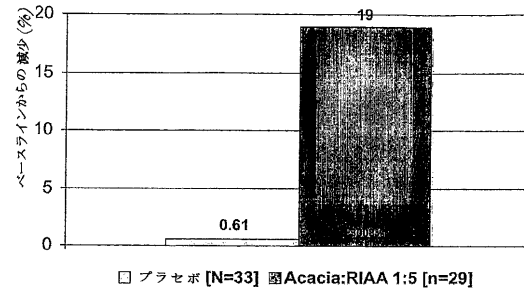
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/30920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 65/00; A61K 31/12 (2007.01) USPC - 424/775, 424/778; 514/690 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A01N 65/00; A61K 31/12 (2007.01) USPC - 424/775, 424/778; 514/690 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/757; 424/780 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPTO, PGPB, EPAB, JPAB); Google Patents; Google Scholar Search Terms: hops, humulone, lupulone, prenylflavonoid, chalcone, xanthohumol, isoalpha acid, protein kinase, inflammation, cancer, diabetes, retinopathy, ocular, acacia catechu, acacia nilotica, vitamin, selenium, zinc, copper, lutein, zeaxanthin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GERHAUSER, C. "Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents." European Journal of Cancer, 13 June 2005, Vol. 41, pages 1941-1954 [online]. [Retrieved on 2007.06.11]. [Retrieved from the internet: http://www.dkfz.de/en/tox/download/gerh/pdf-files/Europ.J._Cancer_41_1941-1954_2005.pdf]	1-2, 4-6, 8-9, 17-18, 20-22, 24-25, and 34
Y	US 2003/0180402 A1 (JIA et al.) 25 September 2003 (25.09.2003), para [0014], [0015], [0024], [0032], [0057]-[0060], and [0078].	3, 7, 10-16, 19, 23, and 28-32
Y	US 2003/0180402 A1 (JIA et al.) 25 September 2003 (25.09.2003), para [0014], [0015], [0024], [0032], [0057]-[0060], and [0078].	10-12 and 26-28
Y	VANHOENACKER, G. et al. "Analysis of iso-acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry." Journal of Chromatography A, 30 April 2004, Vol. 1035, No. 1, pages 53-61 [online]. [Retrieved on 2007.06.13]. [Retrieved from the internet: http://www.sciencedirect.com/science/journal/00219673].	7, 16, 23, and 32
Y	COHEN, P. "Protein kinases: The major drug targets of the twenty-first century?" Nature Reviews: Drug Discovery, April 2002, Vol. 1, pages 309-315 [online]. [Retrieved on 2007.06.13]. [Retrieved from the internet: http://www.nature.com/reviews/drugdisc].	3 and 19
Y	US 6,689,388 B2 (KUHRTS) 10 February 2004 (10.02.2004), col. 6, ln 19-25, and col. 8, ln 27-67.	13-15 and 29-31
Y	GILANI, et al. "Studies on antihypertensive and antispasmodic activities of methanol extract of Acacia nilotica pods." Phytotherapy Research, 30 November 1999, Vol. 13, No. 8, pages 665-669 [online]. [Retrieved on 2007.06.12]. [Retrieved from the internet: http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/67501841/ABSTRACT].	16 and 32
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 June 2007 (15.06.2007)		Date of mailing of the international search report 03 AUG 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/30920

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/082249 A1 (LANG) 9 October 2003 (09.10.2003), pg 14.	33
Y	US 5,919,813 A (DE JUAN) 6 July 1999 (06.07.1999), col. 6, ln 64 and col. 7, ln 1-8.	33

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 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 31/122 (2006.01)	A 6 1 K 31/122	
A 6 1 K 31/353 (2006.01)	A 6 1 K 31/353	
A 6 1 K 36/60 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	D
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	C
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 31/375 (2006.01)	A 6 1 K 31/375	
A 6 1 K 31/355 (2006.01)	A 6 1 K 31/355	
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 33/30 (2006.01)	A 6 1 K 33/30	
A 6 1 K 33/34 (2006.01)	A 6 1 K 33/34	
A 6 1 K 31/047 (2006.01)	A 6 1 K 31/047	
A 6 1 K 31/121 (2006.01)	A 6 1 K 31/121	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 トリップ, マシュー・エル

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 3 3 5, ギグ・ハーバー, セブンティファースト・アベニュー・コート・ノースウエスト 4 2 0 2

(72)発明者 バビシュ, ジョン・ジー

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 4 8 1 7, ブルックトンデイル, ホワイト・チャーチ・ロード 5 0 8

(72)発明者 ブランド, ジェフ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 3 3 3, フォックス・アイランド, ピー・オー・ボックス 4 7 7

(72)発明者 ホール, エイミー・ジェナエ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 3 3 2, ギグ・ハーバー, ノースウエスト, セブンティーンズ・アベニュー・コート 1 1 3 2 5

(72)発明者 コンダ, ヴェーラ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 3 3 5, ギグ・ハーバー, シックスティフォース・アベニュー・ノースウエスト 5 3 2 5

(72)発明者 デサイ, アヌ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 3 3 5, ギグ・ハーバー, シックスティフォース・アベニュー・ノースウエスト 5 3 2 5

Fターム(参考) 4C084 AA17 AA20 MA02 NA05 NA14 ZA021 ZA331 ZB071 ZB111 ZB131
ZB261 ZC211 ZC351 ZC352 ZC411 ZC751
4C086 AA01 AA02 BA08 BA09 BA18 HA01 HA03 HA08 MA01 MA02
MA03 MA04 MA05 NA05 NA14 ZA02 ZA33 ZB07 ZB11 ZB13
ZB26 ZC35 ZC75
4C088 AB12 AB34 AB99 BA08 BA32 MA02 MA06 NA05 NA14 ZA02
ZA33 ZB07 ZB11 ZB13 ZB26 ZC20 ZC21 ZC35 ZC75
4C206 AA01 AA02 CA13 CB19 CB27 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05
NA05 NA14 ZA02 ZA33 ZB07 ZB11 ZB13 ZB26 ZC20 ZC35
ZC75