

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4737931号
(P4737931)

(45) 発行日 平成23年8月3日 (2011.8.3)

(24) 登録日 平成23年5月13日 (2011.5.13)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/201 (2006.01)	A 6 1 K 31/201
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04

請求項の数 3 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2003-533923 (P2003-533923)	(73) 特許権者	504142949
(86) (22) 出願日	平成14年10月9日 (2002.10.9)		ユニベルシタト デ レス イルレス バ
(65) 公表番号	特表2005-527479 (P2005-527479A)		レアルス
(43) 公表日	平成17年9月15日 (2005.9.15)		スペイン国、パルマ デ マロルカ、エデ
(86) 国際出願番号	PCT/ES2002/000475		ィフィシオ ソン ルレド、5、 ケイエ
(87) 国際公開番号	W02003/030891		ム、 7、 クル、 バルデモッサ、 キャンパス
(87) 国際公開日	平成15年4月17日 (2003.4.17)		ユニベルシタリオ
審査請求日	平成17年7月1日 (2005.7.1)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	P200102269		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成13年10月11日 (2001.10.11)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)		弁理士 浅村 肇
前置審査		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬品の製造におけるヒドロキシオレイン酸及び類似化合物の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 - ヒドロキシオレイン酸、2 - メチル - オレイン酸又は2 - アミノオレイン酸を含む、癌の治療のための、薬学的組成物。

【請求項 2】

2 - ヒドロキシオレイン酸又は2 - メチル - オレイン酸を含む、高血圧の治療のための、薬学的組成物。

【請求項 3】

2 - ヒドロキシオレイン酸を含む、肥満の治療のための、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗腫瘍剤としての、血圧低下活性のある薬剤としての、及び体重の減少を引き起こすための薬剤としての、ヒドロキシオレイン酸 (2 - ヒドロキシオレイン酸) 及び類似構造の分子の使用に関する。

【0002】

また、本発明は、膜構造を制御し、Gタンパク質の活性及び/又は局在化を制御し、膜構造の調節を介してGタンパク質に結合している受容体の活性を制御するための、2 - ヒドロキシオレイン酸及び類似化合物の使用に関する。

【0003】

また、本発明は、癌治療を対象とした薬物、心血管疾患を治療するための薬物並びに体重及び肥満の問題を治療するための薬物を製造するための、2-ヒドロキシオレイン酸及び類似化合物の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

脂肪酸は、食品と工業の双方において応用範囲の広い分子である。2-ヒドロキシオレイン酸は、すでにその合成が報告されており (Adam 他、Eur. J. Org. Chem.、9 巻、2013~2018 ページ、1998 年)、化粧品を調製するための乳化剤として工業的に用いられている。

【0005】

例えば、一方では、特許 JP 10182338 は、低い被刺激性及び塩との高い相容性を示し、[A] ポリオキシエチレンソルビトールモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレート及びポリオキシエチレンソルビトールモノステアレートなどの非イオン性界面活性剤、[B] 2-ヒドロキシステアリン酸などの 2-ヒドロキシ C10~C22 脂肪酸、[C] 油及び [D] 水を含む、比 A/B が 1:0.01~1:2 である水中油乳化組成物に関する。

【0006】

また、特許 JP 09110635 は、薬剤製品、化粧品及び食品として使用することが可能であり、[A] ポリグリセリル脂肪酸のエステル、[B] 2-ヒドロキシ C10~C22 脂肪酸、[C] 油及び [D] 水を含む、重量比 A/C 及び B/C がそれぞれ 2.0 及び 0.5 であり、10~300 nm の平均粒径を有する組成物に関する。これらの組成物は、たとえ酸性条件もしくは低粘度であっても、又は多量の塩が存在しても良好な安定性を示すため、皮膚に適合する。

【0007】

一方、この脂肪酸は、オレアミド加水分解酵素の阻害剤としても用いられ、その作用は、この物質の睡眠誘導効果に伴うものである (特許 US 6096784 及び WO 9749667)。

【0008】

例えば、特許 US 6096784 は、睡眠誘導脂質 (cis-9-オクタデセナミド) の加水分解を担うオレアミド加水分解酵素阻害剤の設計及び合成に関する。最も強力な阻害剤は、(チオ)ヘミアセタール又はシステイン型もしくはセリン型のプロテアーゼによって触媒される反応の遷移状態を模倣するための (チオ)ヘミアセタールを可逆的に形成することができる求電子性カルボニル基を有する。阻害活性に加え、一部の阻害剤は、実験動物で睡眠を誘導するアゴニスト活性を示した。

【0009】

六方晶膜構造

膜脂質は、タンパク質及び核酸に比べてより多くの二次構造をとることができる。生体膜の典型的な脂質二重層は、これらの二次的立体配置の一つに過ぎない。生細胞におけるその他の二次構造の存在度及び役割についてはほとんど知られていない。これらの構造の一機能、すなわち膜に対する G タンパク質の結合親和性を増加させる機能は、発明者他による以前の研究に記載されている (Escriva PV、Ozaita A、Ribas C、Miralles A、Fodor E、Farkas 及び Garcia-Sevilla JA、Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA、94 巻、11375~11380 ページ、1997 年)。

【0010】

膜構造という概念は、膜の流動性のみが記述されている現況技術についての一部の特許 (WO 87/04926 及び WO 80/11286) に記載されている概念をはるかに超え、その概念は、もっと広い分野、すなわち膜構造に広がっている。我々の特許に包含される分子は、層状構造から六方晶構造への遷移又は経過に対して作用する (図 1)。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

引用した従来技術を調べてみても、現況技術には、癌治療、心血管疾患及び／又は体重の管理の領域に特に関心を向けていると思われる 2 - ヒドロキシオレイン酸又は類似の化合物と結びつく他の応用例は存在しない。

【 0 0 1 2 】

脂肪酸、特にオレイン酸及びパルミオレイン (p a l m i o l e i c) 酸などの本発明に記載の一部の脂肪酸が含まれる様々な化合物の複雑な混合物からなる食品 (G B 2 1 4 0 6 6 8、E P 0 6 1 1 5 6 8 及び W O 0 2 / 0 0 4 2) 又は M . c r y o p h i l u s の培養液からの抽出物 (W O 8 9 / 1 1 2 8 6)、及び動脈性高血圧の治療における、肥満を管理するための、又は抗腫瘍剤としてのこれらの混合物の使用についての記載があるに過ぎず、前記治療効果における具体的役割を、本発明で考慮に入れられた混合物の成分のいずれかによるものとは見ていない。W O 0 2 / 0 5 1 4 0 6 及び W O 9 4 / 0 1 1 0 のみが、現況技術に記載の前記脂肪酸を用いる場合に限り、本発明の目的ではない前立腺癌の治療における特定の脂肪酸 (C₁₄ ~ C₂₀) の使用について記載している。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 3 】

本発明は、現況技術に記載の化合物とは無関係の 2 - ヒドロキシオレイン酸及び類似化合物の新たな用途を見いだすという目的を有する。

【 0 0 1 4 】

本発明の第一の目的は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、抗腫瘍剤としての活性を有することを示すことである。

20

【 0 0 1 5 】

本発明の第二の目的は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、血圧低下剤としての活性を有することを示すことである。

【 0 0 1 6 】

本発明の第三の目的は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、体重の減少を引き起こす薬剤としての活性を有することを示すことである。

【 0 0 1 7 】

本発明の第四の目的は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、細胞膜の層状構造から六方晶構造への遷移を制御するための薬剤としての用途を有することを示すことである。この膜構造の調節は、G タンパク質、並びにそれらの伝達経路、すなわちシグナル伝搬経路の分子成分の活性に影響する。多数の薬物が、このタイプの分子、又はそれらの活性に由来する細胞シグナルに結びつく機構との直接相互作用により、G タンパク質に結合している受容体に作用する。しかしながら、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体は、膜構造に作用する。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 8 】

2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体について後述する用途は、これまで誰によっても言及されたことはなく、それらの使用は、特定の病状の治療に有効であると立証される可能性がある。特に、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体は、抗腫瘍活性、血圧低下 (すなわち抗高血圧) 活性を示し、体重の減少を引き起こすことが見いだされた。

40

【 0 0 1 9 】

本発明では、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の新たな用途を、実験モデル、特に i n v i t r o 分析の系、細胞培養系及び生体を用いて実証する。これらの分析モデルはすべて、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、G タンパク質に関係するシグナルの制御に基づき、癌治療のため、心血管疾患の治療のため、及び体重と肥満の問題、並びに膜構造の層状から六方晶への遷移によって媒介される他の疾患又は欠乏状態にある対象を治療するための薬物を製造するために使用することができる分子であることを示すことは間違いない。

50

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明では、「2-ヒドロキシオレイン酸」とは、cis-2-ヒドロキシオレイン酸、オクタデセン酸C18:1cisすなわちcis-2-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸を意味する。「類似体」とは、中心帯から1又は2位シフトした二重結合を有し、かつ/又は中心帯から1～5位シフトした二重結合を有し、かつ/又は二重結合の両側に1から約6個までの炭素原子(CH₂基)を有し、かつ/又はOHと異なる小さな原子質量(200Da以下のMw)の残基(R)を2位に有する脂肪酸を意味する。R基の投影に対応する立体異性体は、RとSのどちらであってもよい。様々な被験分子に関して、以下に示す一般式を有する分子が、ヒドロキシオレイン酸に類似するいくつかの効果を示し、したがってその類似体として分類できることが観察された。

10

【0021】

一般式I: COOH-CHR-(CH₂)_m-CH=CH-(CH₂)_n-CH₃(式中、m及びnは独立して0～15の値を有し、Rは、H、OH、NH₂、CH₃又は分子量が200Da以下である他の残基であってもよい)。

【0022】

本発明では、「Gタンパク質」とは、3個のサブユニット(1個のアルファ、1個のベータ及び1個のガンマ)から形成されるグアニンヌクレオチド結合タンパク質であり、Gタンパク質に結合している受容体からのシグナルをエフェクター(アデニリルシクラーゼ、グアニリルシクラーゼ、ホスホリパーゼC、イオンチャネルなど)に送るタンパク質を意味する。

20

【0023】

本発明では、「膜構造」とは、天然膜又は合成膜(リポソーム)における脂質の二次構造又は配置を意味する。

【0024】

本発明では、「急性効果」とは、薬物の単回投与後数分から数時間の間にもたらされる効果を意味する。

【0025】

本発明では、「慢性効果」とは、薬物を数日から数週間連続投与する間にもたらされる効果を意味する。

30

【0026】

本発明では、「薬剤として許容可能な形態」とは、本分野で日常的に使用される任意の形態を意味し、エステル、特に脂肪酸の可溶化剤としての特性からエチルエステル、エーテル、アミド、塩などが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0027】

本発明の一目的は、細胞膜の層状構造から六方晶構造への遷移を制御する際の2-ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の用途である。この現象の分子的機序は、2-ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の膜との相互作用並びに膜組成及び/又は膜構造の変調にある(表1及び2)。

【0028】

40

【表 1】

表 1

層状構造から六方晶構造 (H_{II}) への遷移温度に対する
2-ヒドロキシオレイン酸の結合の効果。

DEPE:2OHOA (mol:mol)	T_H^a ($^{\circ}C$)
1:0 (純粋な DEPE)	63
40:1	54
20:1	48
10:1	41

$^a T_H$ は、層状構造から六方晶構造への遷移温度を示す。

【0029】

表 1 は、ジエライドイル (d i e l a i d o y l) ホスファチジルエタノールアミン (DEPE) の膜における層状構造から六方晶構造への遷移温度を示している。対照値 (2-ヒドロキシオレイン酸がない場合) は 63 である。2-ヒドロキシオレイン酸 (2OHOA) によって引き起こされる低下 (濃度依存的) は、この分子が非層状構造の存在を安定化することを示している。この細胞膜の重要な改変は、分子及び細胞機能にとって重要な結果を有している。治療活性を有する 2-ヒドロキシオレイン酸の被験類似体もすべて、膜構造に対する効果を引き起こす (表 2)。

【0030】

【表 2】

表 2

リン脂質ジエライドイルホスファチジルエタノールアミン (DEPE) の層状-六方晶遷移に対する 2-ヒドロキシオレイン酸の様々な類似体 (リン脂質:類似体 20:1 mol:mol) の効果。

	T_H ($^{\circ}C$)
対照 (DEPE のみ)	61
オレイン酸	45
アミノオレイン酸	49
メチルオレイン酸	50
cis-バクセン酸	53
ネルボン酸	55

【0031】

層状非層状遷移の変調は、G タンパク質の活性を調節する。

ヒドロキシオレイン酸及び関連化合物は、 $[^3S]GTP$ の結合によって測定される G タンパク質の活性を変調することができる (図 5)。

【0032】

これは、共焦点顕微鏡の写真に示されるように、これらの分子が、G タンパク質の膜との相互作用及び G タンパク質の細胞局在化に影響するためである (図 2)。G タンパク質の局在化及び活性に対する 2-ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の効果は、G タンパ

ク質に対する直接相互作用のためではない。図 6 は、膜の非存在下、精製された G タンパク質の活性に対するこれらの分子が効果を示している。G タンパク質が膜と結合している場合に起きることとは対照的に、ダウノマイシン (DNM) 及びヒドロキシオレイン酸 (2-OHA)、並びにヒドロキシオレイン酸の類似体は、これらのタンパク質 (G タンパク質に結合している受容体と膜内で接触した場合にのみ活性化される) の活性に影響しない。

【0033】

G タンパク質に結合している受容体は、至る所に存在し、膜受容体の 80% を占め、神経伝達物質、ホルモン、神経調節物質、サイトカイン、増殖因子などによって惹起されるシグナルを伝達する。他の生理学的プロセスの中でも、G タンパク質は、血圧、細胞の成長及び増殖、並びに体重を調節する。したがって、本発明に記載の分子は、前述の生理学的プロセスを調節することができる。

10

【0034】

- 膜構造に対する試験 -

膜構造を研究するのに最も効果的かつ強力な技法は、X 線回折 / 散乱である。この技法を用い、我々は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体により膜の構造が変化することを立証した。層状構造から六方晶構造への遷移温度の低下は、膜における脂質分子の配置に対する重要な効果を示している。この配置の調節は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体によって発揮される効果の根幹を成している。一般式を満たす被験類似体はすべて、細胞増殖 (癌における有効性)、血圧 (心血管プロセスにおける有効性) 及び体重 (肥満における有効性) の膜変調及び制御の活性を有している。

20

【0035】

本発明の目的は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が抗腫瘍剤としての活性を有することを立証することである。

【0036】

初めに、細胞周期は、細胞表面上の特異的受容体に結合する増殖因子によって制御される。前記増殖因子の受容体との結合は、サイクリンと呼ばれ、細胞周期に関係するタンパク質と二量体複合体を形成する有糸分裂キナーゼ (cdk) を活性化することを目的とする反応のカスケードを引き起こす。cdk / サイクリン複合体は、細胞周期及びその進行の段階を調節し、有糸分裂及び細胞分裂を引き起こす。

30

【0037】

細胞表面上の多くの特異的受容体が G タンパク質と結合しているため、増殖因子が受容体と相互作用した場合、G タンパク質が活性化され、前述の反応カスケードの引き金となる。

【0038】

したがって、G タンパク質の局在化及び活性の変調は、細胞増殖及び細胞分裂を制御することを可能にするはずである。

【0039】

2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の抗腫瘍効果に関する機序は、それらの化合物が、G タンパク質及びプロテインキナーゼ C 又は小さな G タンパク質 (Ras 型、Raf 型などの) などの他の末梢性タンパク質の局在化及び活性の変調を引き起こすという事実に基づいている。この変調は、膜脂質の構造の調節に関係がある。

40

【0040】

2 - ヒドロキシオレイン酸が、G タンパク質の核への転位の阻害剤として作用することを見いだした (図 2)。このように、タンパク質 p21 のレベルの明らかでかつ顕著な増加並びに細胞周期タンパク質 cdk2 及びサイクリン B 及び D3 の減少によって裏付けられたように、細胞増殖の阻害が行われる (図 3A 及び B)。さらに、培養中の細胞において、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、プロテインキナーゼ C の顕著な増加 (40% から 120% の増加) を引き起こすことが観察された。

【0041】

50

Gタンパク質の細胞内局在化のこの変化は、癌の治療に広く使用されている薬物ダウノマイシンによってもたらされる変調よりも大きな変調をGタンパク質の機能にもたらす。これらの変化は、腫瘍細胞の増殖及び生存に対する重要な阻害効果を有している（図4）。

【0042】

細胞周期の重要な制御因子は、タンパク質p53であり、G1（有糸分裂前の段階）のレベルで細胞分裂を減速することにより負の制御を行っている。このタンパク質は、DNAの変化が現れるのに反応して細胞自身により合成される。複製されたDNAが娘細胞に対して負に影響する可能性がある場合、p53は活性化され、アポトーシス（プログラム細胞死）を引き起こす。前記タンパク質p53の活性化は、p21、p27、p16などの、サイクリン及びcdk（細胞周期のプロセスに関与している）の活性/発現を阻害する調節タンパク質をコードする他の遺伝子が発現されることを意味する。

【0043】

多くのタイプの腫瘍細胞において、p53タンパク質は、変異を受けかつ/又は不活性であるように見え、形質転換（癌性）細胞の増殖が起きる。細胞における2-ヒドロキシオレイン酸及び/又はその類似体の存在は、p53に係するシグナル経路の活性化を引き起こし、様々なタイプの腫瘍細胞においてアポトーシスの開始又は細胞周期の停止を引き起こす。本発明の第一の目的を行うため、*in vitro*及び*in vivo*のモデルを用いた。この点について、2-ヒドロキシオレイン酸及び前述の式Iを満たす構造類似体はすべて、かなりの抗腫瘍能力を有することが判明した。2-ヒドロキシオレイン（2-ヒドロキシ-cis-9-オクタデセン）酸の類似体である被験分子は、2-メチル-オレイン（2-メチル-cis-9-オクタデセン）酸、2-アミノ-オレイン（2-アミノ-cis-9-オクタデセン）酸、オレイン（cis-9-オクタデセン）酸、パルミトレイン（cis-9-ヘキサデセン）酸、cis-バクセン（cis-11-オクタデセン）酸及びネルボン（cis-15-テトラコセン）酸とした。これらの分子は、細胞増殖を停止させ、又は様々なタイプの腫瘍細胞（例えば、ヒト肺癌細胞A549、ジャーカットTリンパ球など）の死を引き起こすことが分かった（図4）。これらの結果は、記載した脂肪酸の抗腫瘍活性を立証し、2-ヒドロキシオレイン酸の基本構造に小さな変形があっても、その抗腫瘍活性は変化しないことを示している。

【0044】

他の分子モデルにより、我々は、2-ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、他の抗腫瘍薬、例えばアントラサイクリンが示す活性よりも高い抗腫瘍活性を有し、したがって治療上極めて興味のある化合物であることを裏付けることができた。3T3線維芽細胞の膜において、我々は、2-ヒドロキシオレイン酸及び/又はオレイン酸（2-ヒドロキシオレイン酸の類似体の一つ）200 µMの存在が、NIH 3T3細胞におけるGタンパク質の活性に75～84%の阻害をもたらすのに対して、ダウノマイシン200 µMは、前記活性に46%の阻害を引き起こすことを証明することに成功した（図5）。

【0045】

2-ヒドロキシオレイン酸及びその類似体オレイン酸の抗腫瘍効果を図8に示すが、この図において、我々は、2-ヒドロキシオレイン酸による処理後に、肺腺癌から形成される一部の脳腫瘍転移の消失を認めることができる。この2-ヒドロキシオレイン酸及びオレイン酸による処理は、癌の完全な消失を引き起こした。これらの結果は、（a）2-ヒドロキシオレイン酸及びその類似体は、癌を治療することを目的とする薬物を製造するために用いることができる分子であること；（b）それらは広範囲な作用を有していること（それらは、培養及び生体において様々なタイプの腫瘍細胞に対して有効であった）及び（c）それらは、抗腫瘍効力の点、副作用が存在しない点、及び経口投与されるが、静脈内又は皮下投与も可能である点において、癌を治療するために用いられる他の分子より優れていることを証明している。

【0046】

- 抗腫瘍試験 -

ヒドロキシオレイン酸の抗増殖効果をヒト肺癌細胞 A 5 4 9 及びヒト白血病細胞（ジャーカット）において証明した。図 3 は、腫瘍細胞が分裂するために必要なタンパク質 c d k 2、サイクリン B 及びサイクリン D 3 の減少に伴う抗増殖性タンパク質 p 2 1 の誘導を示している。同様の効果が、前述の一般構造式を満たす被験類似体すべてによって生じた。2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体のこの抗増殖効果は、培養液における腫瘍細胞の細胞密度の低下によって立証された（図 4）。また、この抗増殖効果は、他の技法及び他の細胞タイプを用いても観察され、ラット一次星状細胞において、これらの脂肪酸は抗増殖効果を有し、トリチウム化チミジンの取り込みによって試験した。さらに、ヒドロキシオレイン酸及びその類似体は、ヒト癌細胞においてアポトーシスすなわちプログラム細胞死を引き起こすことができる。一方では P A R P の分解が（図 3 C）、他方では細胞形態の変化及び細胞残渣の存在が（図 4）、細胞死の誘導物質としての 2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の効果を証明している。フローサイトメトリー実験を用いることにより、2 - ヒドロキシオレイン酸の存在下で生きているヒト白血病細胞（ジャーカット）の数は、知られている抗腫瘍剤エトポシドにより生存し続ける細胞の 1 0 % に過ぎないことが立証された。

10

【 0 0 4 7 】

最後に、ヒトにおける効果の検討により、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、極めて重要な抗腫瘍剤のファミリーを構成する可能性が明らかにされた。図 8 は、ヒトにおける腫瘍に対する 2 - ヒドロキシオレイン酸及びオレイン酸による治療の効果を示している。示した症例は、これまでに行われた化学療法及び放射線療法が脳腫瘍の減少を生じなかった女性患者に該当する。

20

【 0 0 4 8 】

本発明の目的は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、血圧低下活性を持つ薬剤であることを証明することである。

【 0 0 4 9 】

G タンパク質の活性の調節は、血圧を制御する

本発明の薬物と G タンパク質の活性と血圧の間には関連性がある。以前に記載したことを裏付ける結果は、ヒトで行われた研究であるが、高血圧患者に膜脂質のレベルに変化があることが認められた（表 3）。膜脂質は層状 - 六方晶遷移に影響し、さらに G タンパク質の局在化及び機能を決定する。実際、高血圧患者において、我々は、膜に結合している G タンパク質のレベルに、前述した膜脂質の変化及び六方晶相形成のしやすさに起因する変化を観察している。非層状膜構造の変調及び結果として生じる G タンパク質の再局在化が高血圧を引き起こすのであれば、膜脂質の層状 - 六方晶遷移を調節することにより、膜タンパク質の局在化及び、最終的には血圧の調節を行うことが可能である（図 7）。

30

【 0 0 5 0 】

【表 3】

表 3

正常血圧（対照）及び高血圧被験者の赤血球膜におけるリン脂質及び
コレステロールエステルの脂肪酸の組成（mg/100mg）。

リン脂質			エステル	コレステロール 1
脂肪酸	高血圧患者	対照	高血圧患者	対照
C14:0	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.2
C14:1n-5	1.7 ± 0.2	2.2 ± 0.3 **	0.7 ± 0.2	n.d.***
C16:0	23.7 ± 0.6		5.1 ± 0.6	14.3 ± 0.5
C16:1n-9	0.4 ± 0.0	23.1 ± 0.5	3.1 ± 0.6	*
C16:1n-7	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	2.4 ± 0.4	2.5 ± 0.3
C16:4n-3	2.6 ± 0.3	0.5 ± 0.1 2.5 ± 0.5	n.d.	** 1.7 ± 0.1 ***
C18:0	16.6 ± 0.3		3.2 ± 0.5	n.d.
C18:1n-9t	0.9 ± 0.1	17.1 ± 0.6 0.6 ± 0.0 ***	n.d.	n.d.
C18:1n-9	16.3 ± 0.6		18.4 ± 1.2	2.9 ± 0.5
C18:1n-7	1.8 ± 0.1		1.5 ± 0.1	n.d.
C18:2n-6	12.5 ± 0.7	16.0 ± 0.8	45.8 ± 2.8	
C18:3n-6	0.4 ± 0.0	2.0 ± 0.2 **	0.9 ± 0.2	16.7 ± 0.6 **
C18:3n-3	0.3 ± 0.0	13.4 ± 0.7* n.d.***	n.d.	1.7 ± 0.2**
C20:2n-6	2.1 ± 0.1		0.9 ± 0.1	51.1 ± 1.6
C20:4n-6	17.0 ± 0.4		7.0 ± 0.6	***
C22:4n-6	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.1	n.d.	0.8 ± 0.1 **
C22:6n-3	0.7 ± 0.1	2.1 ± 0.2 16.5 ± 0.4 0.6 ± 0.1	n.d.	n.d.
C24:1n-9	1.5 ± 0.1		n.d.	
全SFA	41.2 ± 1.1		19.3 ± 1.2	0.9 ± 0.1
全MUFA	22.6 ± 0.6	0.8 ± 0.2	25.9 ± 1.6	6.4 ± 0.9
全PUFA	36.2 ± 1.2		54.8 ± 2.4	*
PUFA:SFA	0.8 ± 0.04	1.6 ± 0.1	2.7 ± 0.3	n.d.
PUFA:MUFA	1.6 ± 0.1	41.1 ± 0.7 21.7 ± 0.7 * 38.2 ± 0.9 ** 0.9 ± 0.03 1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	n.d. n.d. 18.2 ± 1.1 * 22.7 ± 0.8 *** 59.1 ± 1.6 *** 3.4 ± 0.3 *** 2.6 ± 0.2 ***

数値は、平均値±平均値の標準誤差である（n=28）。

SFA、飽和脂肪酸；MUFA、一不飽和脂肪酸；PUFA、多価不飽和脂肪酸。

*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。n.d.: 検出されず。

10

20

30

40

【0051】

2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、心拍数を変化させることなく収縮期及び拡張期血圧の低下を引き起こすことから、それらが顕著な血圧低下作用も有していることが立証された(図9a、9b及び10)。2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体によって生じる血圧低下作用は、急性型(治療の2時間から明瞭に認められる)及び慢性(治療を持続する間、数日間及び数週間維持される)の血圧低下を引き起こすことである。例えば、アミノオレイン酸は、1週間続く慢性治療において血圧を15 mmHg低下させる。

【0052】

血圧は、バソプレッシン受容体、アドレナリン受容体などの、Gタンパク質と結合している受容体の様々な系によって制御されている。

10

【0053】

血圧の制御に関与しているホルモンと刺激性のGタンパク質に結合している受容体との相互作用は、2 - ヒドロキシオレイン酸及び類似の分子によって変調される。

【0054】

これらの脂肪酸は、受容体、Gタンパク質とエフェクター間の連絡を調節する。その結果は、サイクリックAMP、ホスホリパーゼC及び一酸化窒素のシグナルの変調であり、血圧の低下を引き起こす。また、この効果は、膜構造の調節とつながりがある。2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の主な薬理学的利点は、他の血圧降下薬とは対照的に、心拍に影響を持たない(すなわち、心拍数を著しく減少又は増加させない)ことである。これらの化合物のさらなる利点は、他の心血管系危険因子、すなわち血清脂質/リポタンパク質プロファイル及び体重(下記参照)を制御することである。血圧の管理は、それだけで患者の寿命を延ばすには不十分であり、他の心血管系危険因子を制御することが必要であることから、これらの脂肪酸は、心血管疾患のある患者で用いられる他の分子よりも優れている。

20

【0055】

- 血圧降下試験 -

2 - ヒドロキシオレイン酸は、ラットにおいて血圧の有意な低下を引き起こした(図9)。これらの低下は、急性型(治療2時間で 19 ± 6 mmHg、 $P < 0.01$ 、 $n = 6$)及び慢性型(1週間、 26 ± 7 mmHg、 $P < 0.001$ 、 $n = 6$)であった。さらに、1 mg/kgから10 mg/kgまでの急性及び慢性治療も、濃度依存性である血圧の有意な低下を引き起こした。

30

【0056】

ヒトにおいても、2 - ヒドロキシオレイン酸は、血圧の有意かつ大きな低下を引き起こした。図9を参照。

【0057】

さらに、前述の一般式を満たす2 - ヒドロキシオレイン酸の類似体は、血圧低下作用を有していた(図10)。すべての場合において、血圧の低下は対照に比較して有意であった(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

【0058】

これらの結果は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が高血圧の臨床/薬理学的治療に有効な薬剤であることを明確に示している。

40

【0059】

本発明の目的は、2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体が、体重の減少を引き起こす薬剤としての活性を有することを立証することである(図11)。

【0060】

2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の抗腫瘍及び血圧低下活性の他に、それらは、体重の減少を引き起こす。

【0061】

体重は、とりわけ個々の代謝能及び食物摂取量の制御などの因子によって調節される。

50

【 0 0 6 2 】

食物摂取量の制御は、ホルモンレベルで調節される満腹感によって決定される。例えば、栄養素の欠乏は、ホルモンの分泌を刺激し、食欲感を引き起こす。摂食後に栄養素が回復すると、満腹感を引き起こすホルモンの分泌が刺激される。

【 0 0 6 3 】

2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体は、満腹の効果を生じ、食物摂取量の減少を引き起こすことが見いだされた。また、この制御は、サイトカイン、レプチン、アドレナリン受容体、及びこれらの脂肪酸によって活性が変調される G タンパク質と結合している他の受容体によって媒介される。

【 0 0 6 4 】

処置動物では、満腹に対するこの効果は、対照動物に比べて 1 5 % から 3 0 % 飼料の消費が少ないことを意味した。

【 0 0 6 5 】

- 体重制御の試験 -

これらの分子で処置したラットは、慢性治療中 (5 ~ 1 7 日) に体重が減った。これらの実験では、2 - ヒドロキシオレイン酸又はその類似体、特にアミノオレイン酸で処置したラットには、処置ラットの対照群と同様、飼料と水を自由に与えた (図 1 1)。これらの条件で、処置の初日から始まり、処置の 7 日目には 1 7 グラム (2 ~ 3 月齢 S p r a g u e - D o w l e y ラットの正常体重の 5 %) までラットの体重に漸進的減少が認められた。これらの動物に供給した飼料の重さを量ると、処置期間中は消費が低いことが判明し、本発明に関連する分子による処置は、動物に満腹の効果を生じることを裏付けた。2 - ヒドロキシオレイン酸を用い、成体マウスに対して 2 8 日までの期間行った同様の実験は、対照マウス (溶媒で処置) に比べ、1 5 % から 2 5 % の体重の減少を示す。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 6 】

【 図 1 】層状の他に、膜がとり得る多くの構造の一部を示す図である。

【 図 2 】ラット脳の一次星状細胞におけるフルオレセインで標識した G i ₂ タンパク質の細胞局在化を示す図である。対照細胞では、標識化が、このタンパク質が細胞全体、特に核 (矢印) 内に存在していることを示す。2 - ヒドロキシオレイン酸 (2 O H O A) で処理した細胞では、標識化が、膜及びサイトゾル中に見られるが、核 (矢印) 内には見られない。

【 図 3 】細胞増殖及び細胞死の分子マーカーにおける 2 - ヒドロキシオレイン酸の効果を示す図である。パート A は、ヒト肺癌細胞 A 5 4 9 における細胞周期タンパク質 c d k 2、サイクリン B 及びサイクリン D 3 に対する 2 - ヒドロキシオレイン酸 (2 O H O A) の効果を示している。これらのタンパク質の減少は、この脂肪酸が細胞周期の停止、すなわち細胞分裂の停止を引き起こすことを示している。パート B は、2 4 及び 4 8 時間インキュベートした後の A 5 4 9 細胞における p 2 1 タンパク質に対する 2 - ヒドロキシオレイン酸 (2 O H O A) の効果を示している。タンパク質 p 2 1 は細胞周期を阻害するため、抗増殖性タンパク質である。このタンパク質に対して 2 - ヒドロキシオレイン酸が引き起こす大きな増加は、周期及び腫瘍細胞の増殖の停止を説明している。パート C は、ヒト白血病細胞 (ジャーカット) におけるポリ A D P リボースポリメラーゼ (P A R P) の分解を示している (エトポシド : 2 5 [E 1] 及び 2 5 0 μ M [E 2] ; 2 - ヒドロキシオレイン酸 : 1 0 [O 1]、1 0 0 [O 2] 及び 1 0 0 0 μ M [O 3])。この酵素のレベルの低下、すなわちその分解の跡は、アポトーシスすなわちプログラム細胞死の開始を示している。これらの実験で陽性対照としてエトポシドを使用したのは、この分子がアポトーシスの誘導物質及び抗腫瘍剤として知られているためである。

【 図 4 】ヒト肺癌細胞 A 5 4 9 (A) 及びヒト白血病のジャーカット細胞 (B) の増殖に対する 2 - ヒドロキシオレイン酸及びその類似体の効果を示す図である。2 - ヒドロキシオレイン酸 (2 O H O A) と、すべてが前述の式を満たしているその類似体は共に、腫瘍細胞の分裂停止及び死を引き起こす (O A : オレイン酸 ; V A : c i s - バクセン酸 ; P

10

20

30

40

50

OA：パルミトレイン酸；NA：ネルボン酸；2MOA：2-メチルオレイン酸；2NOA：2-アミノオレイン酸）。

【図5】ラットアドレナリン受容体 $2A/D$ が形質移入されたNIH 3T3細胞の膜に対する $[^3H]GTP$ の結合を示す図である。このパラメータは、Gタンパク質の活性を測定している。2-ヒドロキシオレイン酸の存在は、アントラサイクリンであるダウノマイシン（DNM）に比べ、より大きなGタンパク質の機能の低下を引き起こす。アントラサイクリン類は、強力な抗腫瘍薬であることから、2-ヒドロキシオレイン酸は、腫瘍に対しより有効な可能性がある。2-ヒドロキシオレイン酸の類似体は、2-ヒドロキシオレイン酸の効果と類似の効果を生じる。

【図6】ヒドロキシオレイン酸及びその類似体は、純粋なGタンパク質（膜の非存在下）に対して影響しないことを示す図である。このことは、Gタンパク質の活性に対する効果が非層状膜構造の調節によって媒介されていることを示している。ダウノマイシン（DNM）は、対照に類似した挙動をした。

【図7】正常血圧の被験者（空棒（empty bar））及び高血圧被験者（充满棒（filled bar））の赤血球の膜におけるGタンパク質のレベルを示す図である。タンパク質 $G_{i1/2}$ （Gi）、 G_o （Go）、 G_s （Gs）及び G_q （Gb）のレベルは、高血圧被験者において有意に低かった。棒の数値は、平均値 \pm 平均値の標準誤差である * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

【図8】肺腺腫から形成される脳転移（腫瘍）を示す図である。左の画像（8a）は治療前の腫瘍に相当し、右の画像（8b、8c及び8d）は、2-ヒドロキシオレイン酸による治療後の様々な日付における腫瘍に相当する。図に示すように、腫瘍のうち一つはより速やかに消失し、他の一つはゆっくりと消失した。

【図9a】Sprague-Dowleyラットにおける収縮期動脈圧に対するヒドロキシオレイン酸（30mg/kg）の急性効果（2時間、黒棒）及び慢性効果（1日3回7日間の注入、白棒）を示す図である。より低用量のこの分子（1~10mg/kg）は、同様の効果を生じたが、顕著ではなかった。* $P < 0.01$ 。

【図9b】ヒトにおける血圧に対する2-ヒドロキシオレイン酸（30mg/kg）の効果を示す図である。この図は、収縮期動脈圧を治療日数の関数として示している。治療前の日数は負の数値で示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

【図10】2-ヒドロキシオレイン酸（2HOA）及びその類似体2-メチルオレイン酸（2MOA）、オレイン酸（OA）、パルミトレイン酸（POA）、cis-バクセン酸（VA）及びネルボン酸（NA）による急性治療の効果を示す図である。2-ヒドロキシオレイン酸及び前述の一般式を満たす類似体を用いて行われた治療はすべて、Sprague-Dowleyラットにおける収縮期動脈圧に有意な低下（* $P < 0.05$ 、** $P < 0.001$ ）を引き起こした。

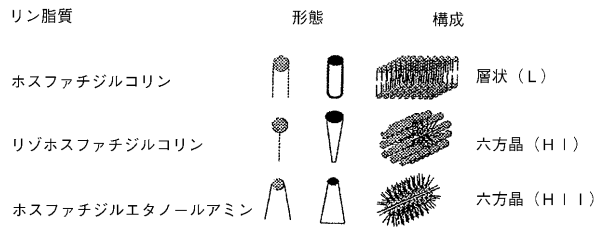
【図11】体重に対する2-ヒドロキシオレイン酸（2HOA）並びにその類似体、オレイン酸（OA）及びパルミトレイン酸（POA）（30mg/kgを1日3回注入）の効果を示す図である。動物（Sprague-Dowleyラット）にはいつでも食餌と水を自由に与えた。

10

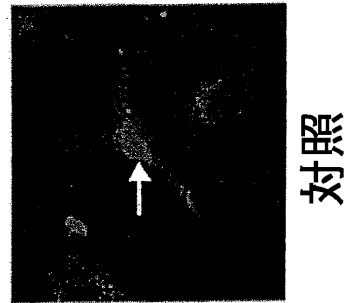
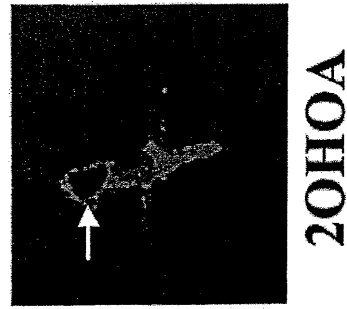
20

30

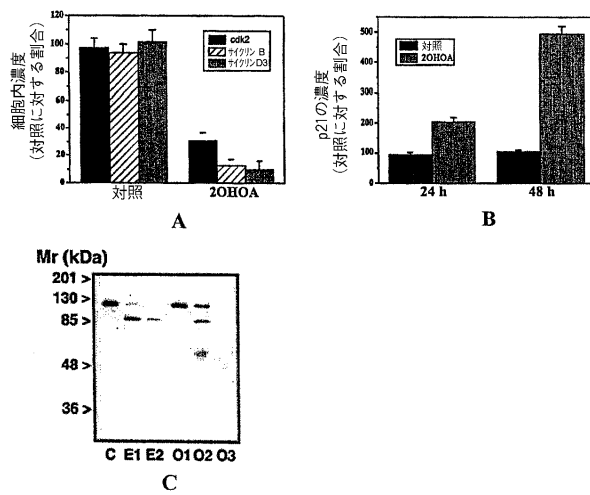
【図 1】



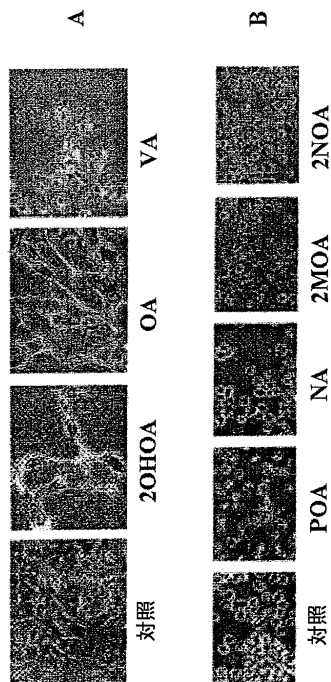
【図 2】



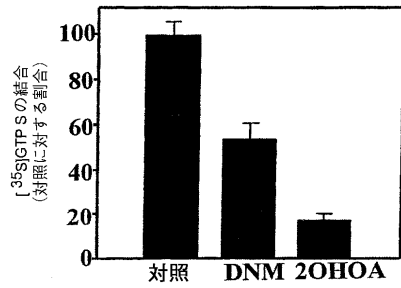
【図 3】



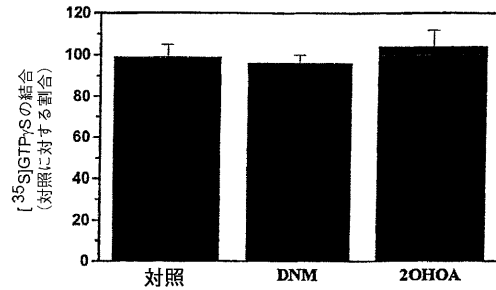
【図 4】



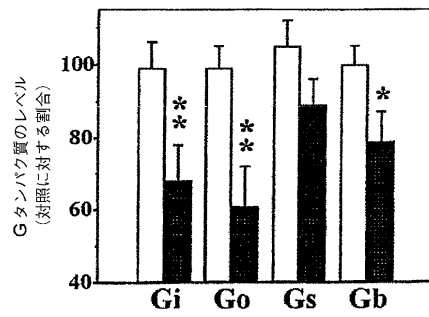
【図 5】



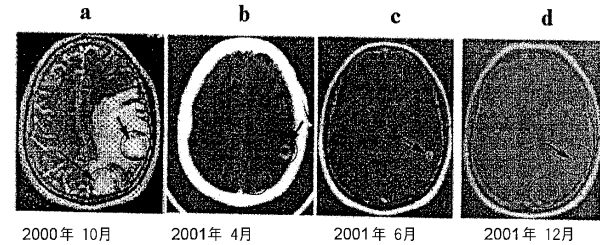
【図 6】



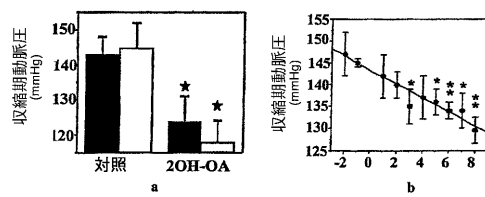
【図 7】



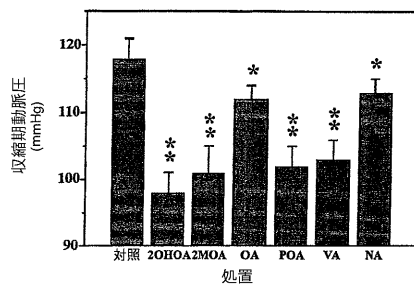
【図 8】



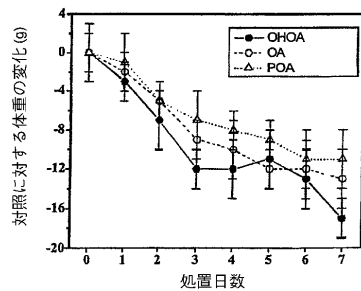
【図 9】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

(72)発明者 エスクリバ ルイス、パブロ、ヴィチェンテ
スペイン国、パルマ デ マロルカ、エディフィシオ ソン ルレド、 5、 ケイエム . 7、ク
ル . パルデモッサ、キャンパス ユニベルシタリオ、 ユニベルシタト デ レス イルレス バ
レアルス内

審査官 小松 邦光

(56)参考文献 特表 2 0 0 0 - 5 1 3 3 6 1 (J P , A)
特開平 0 2 - 2 6 2 5 1 4 (J P , A)
特開昭 6 3 - 0 4 4 8 4 3 (J P , A)
独国特許発明第 1 9 7 2 7 6 3 6 (D E , C 2)
Goodfriend TL, Ball DL. , Fatty acid effects on angiotensin receptors , Journal of cardi
ovascular pharmacology , 1 9 8 6 年 , Vol. 8, No. 6 , p. 1276-1283
Kotchen, Theodore A., et al. , In vitro and in vivo inhibition of renin by fatty acids
 , American Journal of Physiology , 1 9 7 8 年 , Vol. 234, No. 6 , p. E593-E599
Chen W, et al. , Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcific
ation of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthesis heart valves , Circulation , 1
9 9 4 年 , Vol. 90, No. 1 , p. 323-329

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 31/201
A61P 3/04
A61P 9/12
A61P 35/00
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)