

(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2015-523963

(P2015-523963A)

(43) 公表日 平成27年8月20日 (2015. 8. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/09 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 31/09	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 P 43/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 2 0 6
<b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
<b>A 6 1 P 17/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 35/04 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 17/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-511433 (P2015-511433)  
 (86) (22) 出願日 平成24年11月14日 (2012. 11. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年12月8日 (2014. 12. 8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/064993  
 (87) 国際公開番号 W02013/169291  
 (87) 国際公開日 平成25年11月14日 (2013. 11. 14)  
 (31) 優先権主張番号 13/466, 827  
 (32) 優先日 平成24年5月8日 (2012. 5. 8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

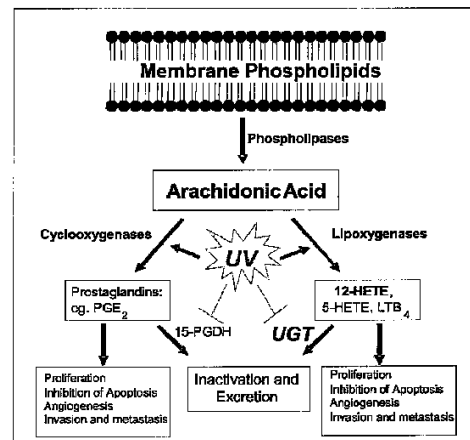
(71) 出願人 514064763  
 クロマデックス, インコーポレイテッド  
 ChromaDex, Inc.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 618, アーヴァイン, ミューアランズ  
 10005, スイート ジー  
 (71) 出願人 506115514  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 607 オークランド フランクリン ス  
 トリート 1111 トウエルフス フロ  
 ア  
 (74) 代理人 110001302  
 特許業務法人北青山インターナショナル  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プテロスチルベンを使用して UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ活性を誘導する方法

## (57) 【要約】

細胞増殖性障害の個体を処置する方法において、かかる処置を必要とする個体に治療有効量の化合物プテロスチルベンを投与するステップを含み、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性を高める方法を提供する。ある実施形態では、12-HETEのレベルをプテロスチルベンの投与によって低下させることができる。

【選択図】図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞増殖性障害の個体を処置する方法において、かかる処置を必要とする個体に治療有効量の化合物プテロスチルベンを投与するステップを含み、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性を高めることを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記 UGT 活性を UGT 発現の誘導によって高めることを特徴とする方法。

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法において、前記個体がヒトであることを特徴とする方法。

10

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法において、前記プテロスチルベン化合物が、薬学的に許容される担体又は栄養補給食品として許容される担体を含む組成物で用意されることを特徴とする方法。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法において、総用量に対する前記治療有効量のプテロスチルベンが、前記組成物の総重量を基準にして、約 0.1 重量% ~ 約 10 重量% の範囲であることを特徴とする方法。

## 【請求項 6】

請求項 4 に記載の方法において、総用量に対する前記治療有効量のプテロスチルベンが、前記組成物の総重量を基準にして、約 0.1 重量% ~ 約 0.5 重量% の範囲であることを特徴とする方法。

20

## 【請求項 7】

請求項 4 に記載の方法において、1 日総用量に対する前記治療有効量のプテロスチルベンが、約 5 mg ~ 約 1000 mg の範囲であることを特徴とする方法。

## 【請求項 8】

請求項 4 に記載の方法において、1 日総用量に対する前記治療有効量のプテロスチルベンが、約 50 mg ~ 約 250 mg の範囲であることを特徴とする方法。

## 【請求項 9】

請求項 7 に記載の方法において、前記化合物の投与経路が、経口、局所、皮内、経皮及び皮下からなる群から選択されることを特徴とする方法。

30

## 【請求項 10】

請求項 7 に記載の方法において、前記細胞増殖性障害が皮膚がんであることを特徴する方法。

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法において、前記皮膚がんが、基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫、カポジ肉腫、メルケル細胞癌及び皮膚のリンパ腫からなる群から選択されることを特徴とする方法。

## 【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法において、前記悪性黒色腫が転移性であることを特徴する方法。

40

## 【請求項 13】

請求項 7 に記載の方法において、前記細胞増殖性障害が日光角化症及び異形成母斑からなる群から選択されることを特徴とする方法。

## 【請求項 14】

請求項 1 に記載の方法において、12 - HETE のレベルが低下することをさらに特徴とする方法。

## 【請求項 15】

個体における UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性の、UV により誘発される消失を防止又は抑制する方法において、かかる処置を必要とする個体に治療

50

有効量の化合物プテロスチルベンを投与するステップを含み、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性を高めることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法において、前記 UGT 活性を UGT 発現の誘導によって高めることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法において、前記個体が細胞増殖性障害に罹患していることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法において、前記個体がヒトであることを特徴とする方法。

10

【請求項 19】

請求項 18 に記載の方法において、前記プテロスチルベン化合物が、薬学的に許容される担体又は栄養補給食品として許容される担体を含む組成物で用意されることを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法において、総用量に対する前記治療有効量のプテロスチルベンが、前記組成物の総重量を基準にして、約 0.1 重量% ~ 約 10 重量% の範囲であることを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の方法において、総用量に対する前記治療有効量のプテロスチルベンが、前記組成物の総重量を基準にして、約 0.1 重量% ~ 約 0.5 重量% の範囲であることを特徴とする方法。

20

【請求項 22】

請求項 19 に記載の方法において、1 日総用量に対する前記治療有効量のプテロスチルベンが、約 5 mg ~ 約 1000 mg の範囲であることを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 19 に記載の方法において、1 日総用量に対する前記治療有効量のプテロスチルベンが、約 50 mg ~ 約 250 mg の範囲であることを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 22 に記載の方法において、前記化合物の投与経路が、経口、局所、皮内、経皮及び皮下からなる群から選択されることを特徴とする方法。

30

【請求項 25】

請求項 22 に記載の方法において、前記細胞増殖性障害が皮膚がんであることを特徴とする方法。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の方法において、前記皮膚がんが、基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫、カポジ肉腫、メルケル細胞癌及び皮膚のリンパ腫からなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の方法において、前記悪性黒色腫が転移性であることを特徴とする方法。

40

【請求項 28】

請求項 22 に記載の方法において、前記細胞増殖性障害が日光角化症及び異形成母斑からなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 29】

請求項 22 に記載の方法において、前記細胞増殖性障害が、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、前立腺がん、精巣がん、結腸直腸がん、肺がん、腎がん、肝がん、脳がん、胃がん、気管支がん、膵がん、膀胱がん及び骨がんからなる群から選択されるがんであることを特徴とする方法。

【請求項 30】

50

請求項 15 に記載の方法において、12 - H E T E のレベルが低下することをさらに特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

細胞増殖性障害の処置方法に関連して、有効量のプテロスチルベンを使用してUDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性を増加又は誘導する方法について記載する。UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性を誘導するために個体に投与するのに好適な、プテロスチルベンを含有する医薬配合剤及び栄養補給配合剤について記載する。

10

【背景技術】

【0002】

第II相代謝の間に、内因性又は外因性の基質は、内因性分子の共有結合によってより親水性になる。第II相は抱合代謝とも呼ばれる。なぜなら、抱合する部分、例えば、スルホナート、グルクロナート、グルタチオン、グリシナート、アセタート、及びメチラートを形成することができるからである。通例、第II相代謝を身体が使用して、基質分子の親水性を高め、抱合した生成物の輸送及び排出を容易にする。

【0003】

第II相グルクロン酸抱合反応は、酵素のUDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) ファミリーによって触媒される。グルクロン酸抱合反応は、グルクロノシル基を、ウリジン5' - ジホスホ - グルクロン酸 (UDP - GA) から、酸素、窒素、硫黄又はカルボキシル官能基を含有する基質分子に転移することからなる。UGT 酵素は、発癌物質の変異原性、及び生体異物と内因性代謝中間体との双方の毒性に対する反応性の高い防衛システムを示す。さらに、代謝的に活性な組織において、一定の転写因子、例えばペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) は、UGT 遺伝子の発現及び活性の制御に能動的な役目をする。Runge - Morris, et al., PPAR Res. (2009), Article ID 728941, 14頁、"Regulation of Sulfotransferase and UDP - Glucuronosyltransferase Gene Expression by the PPARs" (Hindawi Publ. Co., New York) を参照されたい。

20

30

【0004】

グルクロン酸抱合は、生物学的に活性な内因性ホルモン及び代謝中間体の調節に生理学的な役目をする。UGT の重要な1つの内因性基質はビリルビンであり、その代謝はUGT 1A1 によって厳しく管理され、これにより排出生成物ビリルビンジグルクロニドを形成する。別のアイソフォーム、UGT 2B4 は、ヒト肝臓中で胆汁酸を抱合する主要なUGT 酵素として知られており、ヒオデオキシコール酸のグルクロン酸抱合を触媒する。さらに、UGT の種々のアイソフォームが誘導可能であることが観察されており、それらの活性の制御は薬物の解毒及び排出の重要な決定因子となり得る。例えば、PPAR はUGT の制御において重要な役目をする (Barbier, et al., J. Biol. Chem. (2003) 278: 32852 - 32860)。

40

【0005】

PPAR 核内受容体網は、細胞エネルギーバランスの中心的な決定因子である。レチノイドX受容体 (RXR) とのヘテロ二量体の共同関係において、PPAR は、リガンドにより活性化された核内受容体転写因子を形成し、これは細胞の脂質代謝、エネルギー恒常性及び炎症に関与する広範な標的遺伝子 (UGT を含む) の発現を統合することが可能である。PPAR - アイソフォームの発現は、肝臓、腎臓及び心臓において顕著であり、これらの器官で当該アイソフォームが脂肪酸の酸化の制御に従事している。PPAR - は生体内変換酵素の誘導を媒介することもできる。酵素受容体活性化結合に鍵と鍵穴の一致を使用して、脂肪酸は細胞エネルギーの主要な供給源となり、PPAR - の重要な生理学的活性化因子となる。上記のPPAR - RXRヘテロ二量体は、他の活性化補助因子

50

とともに、標的遺伝子の調節領域内のペルオキシソーム増殖因子応答配列 ( P P R E ) と呼ばれる DNA 配列に結合し、U G T などの酵素の転写及び翻訳を開始する。

【 0 0 0 6 】

したがって、U G T の発現及び活性化を制御するために、適切且つ選択的な酵素誘導物質を提供しなければならない。ヒトにおいては、P P A R - アゴニストであるクロフィブラートなど、一定の U G T 誘導物質が知られている ( B a r b i e r , 上記引用文中 ) 。ラットにおいては、U G T 1 A 1 は P P A R - の標的遺伝子であり、P P A R - アゴニストなどの一定の誘導物質に曝露すると、肝臓中でこの U G T の mRNA 発現を増加させることができる ( S h e l b y , e t a l . , D r u g M e t a b . a n d D i s p o s i t i o n ( 2 0 0 6 ) 3 4 : 1 7 7 2 - 1 7 7 8 ) 。

10

【 0 0 0 7 】

さらに、U G T は、1 2 - ヒドロキシエイコサテトラエン酸、即ち 1 2 ( S ) - H E T E ( 「 1 2 - H E T E 」 ) をグルクロン酸抱合し、不活性化する事が示されている。T u r g e o n , e t a l . J . L i p i d R e s . ( 2 0 0 3 ) 4 4 : 1 1 8 2 - 1 1 9 1 を参照されたい。一定の炎症過程、さらには U V により誘発される損傷及び / 又は皮膚発癌に対する反応として、アラキドン酸 ( 「 A A 」 ) 、即ち膜リン脂質中に天然に存在する脂肪酸は、リボキシゲナーゼ ( L O X ) によって複数の活性なエイコサノイドに代謝される。A A の L O X 代謝によって、ロイコトリエン及びヒドロキシエイコサテトラエン酸 ( H E T E ) が生成する。5 - L O X はロイコトリエン及び 5 - H E T E の生成を担い、1 2 - L O X は 1 2 - H E T E を生成する。詳細には、リボキシゲナーゼは A A を不安定なヒドロペルオキシ - エイコサテトラエン酸 ( H P E T E ) に変換し、次にこれがペルオキシダーゼによって加水分解されて H E T E になる。5 - L O X 及び 1 2 - L O X の両代謝物は、アポトーシスに対する抵抗性並びに増殖、血管新生及び細胞遊走の増加によって発癌を促進することを多くの証拠が示している。5 - L O X 及び 1 2 - L O X の双方とも、正常な上皮にはほとんど存在しないが、種々の上皮がん恒常的に発現することが多い。

20

【 0 0 0 8 】

1 2 - L O X mRNA のレベルが高いと、後期のがん及び予後不良と結びつくこともある。さらに、1 2 - L O X は、マウスモデルでの皮膚発癌において直接的な役目をする事が実証されており、1 2 - H E T E は、マウスにおいて、正常な皮膚と比較して皮膚腫瘍では高レベルで検出されている。具体的には、1 2 - H E T E のレベルは、乳頭腫及び有棘細胞癌において、同じマウスの正常な皮膚より 5 0 倍の高さであった ( V i r m a n i , J . , e t a l . , C a n c e r L e t t . ( 2 0 0 1 ) 1 6 2 ( 2 ) : 1 6 1 - 1 6 5 ; K r i e g , P . , e t a l . , M o l . C a r c i n o g . ( 1 9 9 5 ) 1 4 ( 2 ) : 1 1 8 - 1 2 9 ) 。別のマウスモデルでは、特定の 1 2 - L O X 阻害剤 ( バイカリン ) を使用すると、U V B により誘発される皮膚の DNA 損傷に対して保護性があることが実証された ( B i n g - R o n g , Z . , e t a l . , P h o t o d e r m a t o l . P h o t o i m m u n o l . P h o t o m e d . ( 2 0 0 8 ) 2 4 ( 4 ) : 1 7 5 - 1 8 2 ) 。この結果は皮膚がんの進行における 1 2 - H E T E の重要性をさらに強調するものである。このため、理論に縛られるものではないが、ヒト皮膚がんは、1 2 - L O X の直接的な抑制によって、又は 1 2 - L O X シグナル伝達の抑制、即ち 1 2 - H E T E レベルの低下によって、処置又は防止することができると仮定される。上記のとおり、U G T は、1 2 - H E T E をグルクロン酸抱合することができ、したがって不活性化することができ、身体による 1 2 - H E T E の排出を導く。しかし、皮膚で発現した U G T は、皮膚がん及び他の増殖性障害の一番疑わしい原因因子である U V 照射によって下方制御される場合がある。

30

40

【 0 0 0 9 】

上記を考慮すると、個体、動物又はヒトに投与することによって U G T 発現を活性化又は誘導することができる酵素誘導物質又はアゴニストを提供することが望ましいであろう。さらに、U G T 発現を活性化又は誘導することができる酵素誘導物質又はアゴニストは

50

、 12 - H E T E のレベルも低下させるであろうと期待され、このことは、当技術分野に有用な貢献として役目を果たすであろう。

【 0 0 1 0 】

さらに、皮膚がんを含む細胞増殖性障害の個体を処置するための酵素誘導物質又はアゴニストの使用において、かかる処置を必要とする個体に治療有効量の化合物プテロスチルベンを投与するステップを含み、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ ( U G T ) 活性を高める使用は、当技術分野に有用な貢献となるであろう。

【発明の概要】

【 0 0 1 1 】

細胞増殖性障害の個体を処置する方法において、かかる処置を必要とする個体に治療有効量の化合物プテロスチルベンを投与するステップを含み、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ ( U G T ) 活性を高める方法を提供する。

10

【 0 0 1 2 】

別の実施形態では、個体 (例えば細胞増殖性障害に罹患している個体) におけるUDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ ( U G T ) 活性の、UVにより誘発される消失を防止又は抑制する方法において、かかる処置を必要とする個体に治療有効量の化合物プテロスチルベンを投与するステップを含み、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ ( U G T ) 活性を高める方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

さらなる実施形態では、前癌性日光角化症 ( A K ) 病変における12 - H E T E のレベルを、プテロスチルベンの投与によって低下させることができる。

20

【 0 0 1 4 】

他のさらなる実施形態では、前癌性の増殖細胞又は悪性細胞における12 - L O X の発現レベルを、プテロスチルベンの投与によって低下させることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図1】図1は、本発明の実施形態において提案されている、UGTが12 - H E T E を不活性化することができる代謝経路を表す。

【図2】図2は、 $25 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ の単一線量のUV - Bに曝露した正常なヒトメラノサイト中のUGTのUV - Bによる下方制御を表す。塗りつぶしの棒：未処置の細胞、斜線の棒：左から右へ、それぞれ4時間及び24時間UV - B処置した細胞。

30

【図3】図3は、一実施形態での、正常なヒトメラノサイト中のUGT 2アイソフォームの、UV - Bにより誘発される消失、及びプテロスチルベン ( P t e r o ) での前記消失の防止を表す。UV - B線量： $25 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 。塗りつぶしの棒：未処置の細胞、斜線の棒：UV - B処置した細胞、縦線の棒：UV - B処置及びプテロスチルベン処置 (  $100 \text{ nM}$  )。

【図4】図4は、別の実施形態での、UGTアイソフォームファミリーメンバーの全mRNAのRT - PCR分析 ( ポジティブコントロールとしてGAPDH ) による、初代培養の正常なヒトケラチノサイト中のUGT mRNA発現を表す。

【図5】図5は、別の実施形態での、正常なヒトケラチノサイト中のUGT 2 B 1 7 アイソフォームの、UV - Bにより誘発される消失、及びプテロスチルベンでの前記消失の防止を表す。UV - B線量： $25 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 。塗りつぶしの棒：未処置の細胞、斜線の棒：UV - B処置した細胞、縦線の棒：UV - B処置及びプテロスチルベン処置 (  $100 \text{ nM}$  )。

40

【図6】図6は、別の実施形態での、プテロスチルベン ( P t e r o ) 又はレスベラトロール ( R e s )  $50 \mu \text{M}$ でSKmel28ヒト黒色腫細胞を処置した後のウェスタンプロット ( ローディングコントロールとしてB - アクチン ) による、12 - L O X 発現を表す。

【図7】図7は、同じヒト患者 (  $n = 6$  ) の正常な皮膚及びAKにおいて測定した12 - H E T E のレベルを表す。

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0016】

細胞増殖性障害の処置のために個体に治療有効量で投与することができる、プテロスチルベンを含有する安全で有効な健康補助食品を用意した。一実施形態では、細胞増殖性障害の個体を処置する方法は、かかる処置を必要とする個体に治療有効量の化合物プテロスチルベンを投与するステップを含み、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性を高める。

## 【0017】

ある実施形態では、前記プテロスチルベンを含有する安全で有効な健康補助食品は、日光角化症 (AK) 及びUVにより誘発される皮膚の光損傷に関連する他の前癌病変の後退をもたらすことになる。さらに、前記プテロスチルベンを含有する健康補助食品は、非黒色腫皮膚がん (NMSC) の処置、抑制及び/又は防止に使用されることになる。

10

## 【0018】

さらなる実施形態では、細胞増殖性障害に罹患している個体において、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性の消失を抑制する方法は、かかる処置を必要とする個体に治療有効量の化合物プテロスチルベンを投与するステップを含み、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) 活性を高める。

## 【0019】

UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) は、グルクロン酸が、高エネルギー補助因子である、UDP - グルクロン酸から、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基又はチオール基などの利用可能な反応中心又は求核中心を含有する生体異物、薬物又は内因性基質に転移するのを触媒する。UGTは、主として肝臓及び腸内に発現する第II相生体内変換酵素であり、小胞体の管腔側に位置する膜結合酵素である。親基質と比較して、グルクロン酸抱合の最終生成物は、通例、極性がより高く、尿又は胆汁を通して排泄及び排出するのにより好適である。

20

## 【0020】

UGTの内因性基質は、ビリルビン、中性ステロイド、胆汁酸、脂肪酸及びレチノイドを含む。UGTの生体異物の基質は、ベンゾ [a] ピレンなどの環境毒物からアセトアミノフェン及び他のNSAIDなどの一般的な医薬までの範囲である。個別のUGTアイソフォームは、基質特異性及び誘導制御について特有のパターンを呈する。種々のUGTが種特異的且つ組織特異的に発現する。2つの主要なUGT遺伝子ファミリーはUGT1及びUGT2である。

30

## 【0021】

PPARはUGTの制御に関与することが知られている。特に、UGTは、PPAR - ではなくPPAR - の標的である。レスベラトロールは既知のPPAR - 活性化物質で、UGTの誘導を幾分示しているが、PPAR - の活性化物質ではない。類似のステロイドの群についての一研究において、プテロスチルベンのみがシプロフィブラートと同様にPPAR - を活性化した (Rimando, et al., J. Agric. Food Chem. (2005) 53: 3403 - 3407)。プテロスチルベンがPPAR - の活性化物質とは考えられていない。このサブタイプの選択性は、プテロスチルベンを使用してUGT発現を活性化又は誘導する本手法において有利であると考えられる。

40

## 【0022】

UGTは、例えばUVにより誘発される皮膚発癌の過程の中で酵素12 - LOXによって生成される12 - ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (12 - HETE) を、グルクロン酸抱合し、不活性化することがわかっている。プテロスチルベン及びその栄養補給配合剤は、UGT活性を誘導することができ、このため皮膚における12 - HETEのレベルを低下させることが発見された。

## 【0023】

図1は、アラキドン酸 (AA) 代謝及びUGT抱合代謝のモデルを示す。シクロオキシ

50

ゲンセス (Cyclooxygenases) も炎症過程において役目を果たすことができるが、本明細書では論考しない。全体として、図 1 は、12-HETE の生成及び代謝を含む、UV により誘発される皮膚がんの進行 (又は UV により誘発される他の種類の皮膚損傷、例えば日焼け) において提案される AA 代謝の役目を示す。

#### 【0024】

非黒色腫皮膚がん (NMSC) は、圧倒的に多いがんであり、ヒトを苦しめる。NMSC の発生率は、他のがんの形態のすべてを合わせた発生率とほぼ同じである。アメリカがん協会 (American Cancer Society) の推定によると、2007 年には、米国内で 100 万件を超える新たな非黒色腫皮膚がんの症例が診断され、非黒色腫皮膚がんに関連する死亡は約 2,700 件であった。しかし、この推定値は、皮膚の有棘細胞癌及び基底細胞癌については報告の必要がないことを考慮すると低く、このため、実際の年間症例件数はおそらく 300 万を超えている。NMSC には 2 つの主な型があり、基底細胞癌は症例の約 80% を占め、有棘細胞癌は約 20% を占める。NMSC による大多数の死亡の原因は有棘細胞癌である。有棘細胞癌を含むほとんどの NMSC の原因は、日光曝露及びその結果として生じる光発癌である。NMSC の処置は外科手術であり、瘢痕及び他の病的状態が残ることが多い。

10

#### 【0025】

日光角化症 (AK) は前癌性の皮膚新生物であり、有棘細胞癌を引き起こす恐れがある。AK は長時間の日光曝露の結果として生じる。AK 及び NMSC の他の原因は、日焼けブース又はアーク溶接の UV 光、X 線照射、又は一定の化学物質への曝露である。AK はきわめて多い病変であり、一千万人を超える米国人が罹患している。オーストラリアでは、平均的リスクの人における AK の年間進行速度は、10,000 人当たり 8~24 人の間である。高リスクの人 (AK に複数箇所罹患している人) の進行速度は 3 年間で 12~30 パーセントも高い。AK から生じる有棘細胞がんのうち 2 パーセントは転移する恐れがあり、7 パーセントは局所的に再発する。日光角化症は、液体窒素又は例えば 5-フルオロウラシルなどの局所的化学治療で処置されることがきわめて多い。日光角化症が、他の局所用剤 (ジクロフェナク及びイミキモド)、光線力学治療、ケミカルピーリング又は非分割照射若しくは分割照射のレーザー切除表面再生 (ablative laser resurfacing) で処置されることはより少ない。

20

#### 【0026】

本明細書では、当然のことながら、「日光角化症」は AK を生じさせる増殖性障害である。

30

#### 【0027】

処置は幾つか知られているが、処置費用、罹患率及び死亡率を低下させるために、日光角化症及び皮膚がんの形成を未然に防止又は抑制するのが望ましいであろう。生涯にわたって日光から保護することが、日光角化症及び非黒色腫皮膚がんの発症のリスクを最小限にするための優れた方法である。しかし、患者の大多数は既に広範な光損傷を有し、日光から保護する行動を変えるのは困難であることがわかっている。

#### 【0028】

理想的な化学的予防薬があれば、副作用を最小にするか又はなくして、前癌病変の後退を実現し、NMSC の発症を防止し、紫外光が関与する損傷を最小限にすることができる。上記のとおり、日光角化症を除去することができる局所用剤はあるが、一般に、処置部位にかなりの炎症が生じる。新規な手法が必要である。

40

#### 【0029】

ヒト皮膚は、下方の真皮層 (真皮) に載っている上表皮層 (表皮) を含む。表皮は主としてケラチノサイトできており、ケラチノサイトは基部で発生し、上へと移動し、常に置換されている。古い死細胞が落ちると置換されるため、この層はそれ自体を常に再生している。表皮はメラノサイトも含有する。メラノサイトは一般にこの層の基部近くに位置し、色素メラニンを生成し、皮膚の色に貢献し、UV からの保護も付与する。表皮は、免疫系に関与する樹状 (ランゲルハンス) 細胞、及びこの層の基部に見られる基底細胞も含

50



有する。表皮は扁平細胞も含む。表皮層及び真皮層は幹細胞及び毛包も含有する。哺乳動物では、メラノサイトは、他の組織の中では脳、眼、耳及び心臓にも分布している。

【0030】

説明した皮膚細胞は、UV光により誘発される損傷、DNA損傷及び発癌に感受性が高い。

【0031】

プテロスチルベン(3,5-ジメトキシ-4'-ヒドロキシ-トランス-スチルベン)は経口で生体利用が可能な化合物であり、血液中半減期 $t_{1/2}$ が約105分である。対照的に、レスベラトロールは生体利用性が劣り、UGTによって容易に代謝され、半減期がきわめて短く(血液中で $t_{1/2}$ が約14分)、このため、その化学的予防薬としての効力が阻害される。

10

【0032】

レスベラトロールは、経口投与又は局所適用すると、マウス皮膚においてUV-Bが媒介する細胞損傷を防止することを示した研究が幾つかある(Afaq, F., et al., "Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice," *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2003) 186(1): 28-37; Reagan-Shaw, S., et al., "Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin," *Oncogene* (2004) 23(30): 5151-60; 及びAziz, M.H., et al., "Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin," *Photochem. Photobiol.* (2005) 81(1): 25-31)。レスベラトロールはUGT活性を誘導することも示されている(Chow, H.H., et al., "Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzyme s in a healthy volunteer study," *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*, (2010) 3(9): 1168-75)。しかし、化学的予防薬としてそれをヒトに使用するのは、生体利用性に劣るため、見込みがないと思われる(少なくとも単剤としては)。レスベラトロールはヒトにおいて忍容性が高いが、容易に代謝され(皮肉にもUGTによって)、半減期が短く、このため、その化学的予防薬としての効力が阻害される。

20

30

【0033】

プテロスチルベンはブドウ及び漿果に見られる。これはレスベラトロールの天然のジメチル化類似体であるが、半減期がより長く、その理由は、UGTによるその代謝を劇的に低下させることができるメチル基による可能性が最も高い(Hougee, S., et al., "Selective COX-2 inhibition by a Pterocarpus marsupium extract characterized by pterostilbene, and its activity in healthy human volunteers," *Planta Med.* (2005) 71(5): 387-92)。プテロスチルベンは、マウス皮膚におけるNF-KB、AP-1及びiNOSの活性化の抑制を含む、マウスにおける幾つかの生物学的アッセイにおいて、レスベラトロールと同等に、又はこれより大いに強力であることが示されている(Cichocki, M., et al., "Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

40

50

activated NF $\kappa$ B, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis," Mol. Nutr. Food Res. (2008) 52 Suppl 1: S62-70)。

【0034】

プテロスチルベン又はその誘導体を含む栄養補給配合剤を使用して、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT)活性を有利に増加させる、又はその*in vivo*発現を誘導することができると考えられる。このUGTの上方制御により、例えば、ヒトケラチノサイト又はメラノサイトに見られるUV照射に対応した下方制御を含む一定の要因によって引き起こされるUGTの消失を抑制又は防止することができる。図1を参照されたい。

10

【0035】

プテロスチルベンの有用な治療投与量は、限定はしないが、ヒト個体において約5mg~約1000mgの範囲とすることができる。別の好適な用量範囲は、約20mg~約250mgである。プテロスチルベンは、薬学的に許容される担体又は栄養補給食品として許容される担体をそれぞれ含む、医薬組成物又は栄養補給組成物として配合することができる。プテロスチルベンを含有する医薬組成物の一実施形態では、プテロスチルベンの好適な濃度は、組成物の総重量を基準にして、約0.1重量%~約10重量%の範囲とすることができる。

【0036】

本発明の栄養補給組成物は、栄養補給食品として許容される担体と組み合わせて投与することができる。かかる配合剤中の活性成分は、1重量%~99重量%、又は0.1重量%~99.9重量%を占めることができる。「栄養補給食品として許容される担体」とは、配合剤の他の成分と適合性があり、ユーザーに対して有害でない任意の担体、希釈剤又は添加剤を意味する。有用な添加剤には、微結晶セルロース、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、任意の許容される糖(例えばマンニトール、キシリトール)が含まれ、美容的使用には油系が好ましい。

20

【0037】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体と組み合わせて投与することができる。かかる配合剤中の活性成分は、1重量%~99重量%、又は0.1重量%~99.9重量%を占めることができる。「薬学的に許容される担体」とは、配合剤の他の成分と適合性があり、ユーザーに対して有害でない任意の担体、希釈剤又は添加剤を意味する。

30

【0038】

プテロスチルベンは、例えばヒト患者には、1日投与量約50mg~約250mgで供与することができる。別の好適な投与量範囲は1日につき約50mg~約150mgである。別の好適な投与量範囲は1日につき約50mg~約100mgである。特に好適な投与量は、1日につき投与される約100mgである。

【0039】

皮膚が標的器官として使用される場合、AK病変における12-HETEのレベルを、プテロスチルベン補給を受ける前と後の両方で測定して、個体におけるUGT発現の誘導を評価することができる。以下は、他の測定可能な評価項目の中でも、プテロスチルベンが、UGT発現の誘導及び/又はUGT活性の増加、12-HETEレベルの低下及び/又は12-LOX発現の抑制をする有効性を評価するための、第II相臨床試験の一般的な試験デザインである。

40

【0040】

試験母集団

有棘細胞癌の病歴があり、現在日光角化症に罹患している34名~40名の被験者が最後まで試験をすることになる。NMSCのリスクの高い人を試験対象とし、18歳を超えていることとする。詳細には、ここ5年以内に有棘細胞癌に少なくとも1箇所罹患したことがあり、現在前腕に少なくとも10箇所日光角化症(AK)のある被験者とするようになる。

50

## 【0041】

## 試験デザイン

試験は、NMSCを抑制又は防止する新規な方法を評価する機会を提供する。これは、分子マーカーの分析から標準的な臨床的評価まで、最新の組成イメージングまでの種々の評価項目を利用している。このデザインにより、関連の重要な評価項目用バイオマーカー（このため種々の確認データを得ることができる）を用いて、想定薬を初めて臨床的に試験して、労力の節約を可能にする。

## 【0042】

適格な被験者には、プテロスチルベンを経口で約50mg～約250mgの範囲の用量で投与することができる。一実施形態では、患者に100mgのプテロスチルベンを経口で毎日投与することになる。プテロスチルベンは、栄養補給食品として許容される担体と組み合わせた適切な栄養補給配合剤で供与する、又は当該担体と同時投与することができる。或いは、プテロスチルベンは、薬学的に許容される担体と組み合わせた適切な医薬配合剤で供与する、又は当該担体と同時投与することができる。

10

## 【0043】

治療期間は約12週間までとすることができる。被験者は、試験治療の4週、8週及び12週に、次いで処置後には、試験の16週及び20週に評価されることになる。

## 【0044】

プテロスチルベン補給の前と後で、広視野機能イメージング(wide-field functional Imaging)(WiFI)技術を用いてAK病変のイメージングを実施して、例えば血流、脂肪含量及び含水量における変化を測定することができる。広視野機能イメージング(WiFI)とは、2種の広視野イメージング装置、即ち空間的に調整された反射/蛍光イメージング(spatially modulated reflectance/fluorescence imaging)(MI)及びレーザースペckルイメージング(LSI)を統合したものである。WiFIは、混濁した組織中の組織血流及び生化学的組成（即ちオキシヘモグロビン及びデオキシヘモグロビン、含水量及び脂質含量）を同時に測定することができる。これは、厚い組織中の数ミリメートルの深さでの迅速（即ちミリ秒の時間尺度）且つ局在的（即ち数十 $\mu\text{m}$ ～mm）なイベントを試験するために十分な時空間の解像度を有する。被験者は、来院毎に、この安全で（標準的なデジタル写真撮影と類似しているが、皮膚に当てられる赤色光及び近赤外光を使用して行われる）、迅速で（10分以下）非侵襲的な測定を実施されることになる。これらの試験は、カリフォルニア大学(University of California, Irvine)のBeckman Laser Centerにて実施可能である。少なくとも3箇所のAKを含有する日光で損傷した皮膚の $8\text{cm}^2$ 切片のWiFIが、来院毎に実施されることになる。12週には処置前と比較して、AKにおける血流の低下が観察されると予想している。

20

30

## 【0045】

このように、血流を非侵襲的WiFIイメージングによって、マッピングしたAKの脂肪含量及び含水量と同様に検査することになる。12-HETEは血管内皮細胞成長因子(VEGF)の活性化を通して血管新生を刺激することが可能であるため、プテロスチルベン補給後にAK病変への血流の低下が観察されると予想している。

40

## 【0046】

## 試験スケジュール

各患者に、皮膚科の審査、即ちAK及び/又は日光による損傷についての両腕、両脚及び他の皮膚領域の全皮膚検査を含むがこれに限定しない一次スクリーニングのための来院が実施されることになる。以下の試験、即ち、血液試験（鑑別を伴うCBC）、包括的代謝パネル、脂質パネル及び尿検査を実施することもできる。

## 【0047】

スクリーニング来院から4週間以内に、実験室試験及び血液試験をレビューする。左右の前腕のAKの写真撮影及び計数を行う。次いで、患者の皮膚上に試験の領域を選び（8

50

c m × 8 c m )、指定してスライドにマッピングする。選んでマッピングした領域は、少なくとも3箇所(AK)を有するものとするが、右腕でも左腕でもよい。生検前及び生検後の領域の指定を、イメージング部位に加えて行う。NMSCと疑われる生検試料を採取する。この段階で、非侵襲的イメージング(即ちWIFI)を実施することができる。

#### 【0048】

一実施形態では、皮膚の生検部位は、処置前AK(pre-AK)として指定することができる。生検の結果、AKではなく異型の細胞構造であると判明した場合、その被験者の処置を継続し、モニターしてもよい。

#### 【0049】

臨床試験の後期を通して、例えば4週、8週及び12週に、皮膚の試験領域をモニターし、検査し、写真撮影及び/又はイメージングする。有害事象について患者をモニターすることになる。

#### 【0050】

12週間の最後に、皮膚の試験領域を検査し、写真撮影し、イメージングすることになる。具体的には、各患者の左右の前腕のAKを写真撮影し、計数する。次いで、上記の血液試験及び尿試験に加えて、NMSCと疑われる処置後の生検試料及び処置後のAK部位(post-AK)を採取し、分析する。

#### 【0051】

ある実施形態では、処置後の、16週及び20週に(又はその前後の別の計画した時点で)、皮膚の試験領域を、上記のとおり、マッピング、検査、写真撮影及びイメージングすることになる。

#### 【0052】

組織サンプル及びバイオマーカー評価

開始時(処置前)及び処置後(12週)の4mmのAK生検組織を各患者から得る。生検組織を半分にカットすることになる。臨床的生検法の直後に、サンプルを薄く切り、片方の半分を病理組織学的分析に送り、残ったサンプルをバイオマーカー分析のため、実験室に送ることになる。すべてのバイオマーカー分析は、処置終了後に4名の患者の一群で実施されることになり、これにより、一対のサンプルを一緒に分析することができる。

#### 【0053】

アラキドン酸代謝物(12-HETE及びPGE<sub>2</sub>)のレベル(pg/mgタンパク質)を日光ケロトーセス(actinic keratoses)の処置前に定量し、次いで、確立したプロトコルに従い三連四重極型質量分析計に連結した液体クロマトグラフィー(LC/MS/MS)を使用して処置後のレベルと比較することになる。アッセイには、サンプルを調製するために、組織抽出、超音波処理、遠心分離及びタンパク質含有量の定量が必要で、その後LC/MS/MSを行う。AKにおける12-HETE及びPGE<sub>2</sub>のレベルは、プテロスチルベン処置又はプテロスチルベン補給後に顕著に低下しているであろうと期待される。

#### 【0054】

COX-2、12-LOX、UGT及び15-PGDHのタンパク質レベルは、確立したプロトコルに従いアクチンを基準にしたウェスタンブロットによって、半定量的に測定することになる。プテロスチルベン処置後のAKからの発現レベルにおける変化は、濃度測定の後で処置前のレベルと比較し、倍率変化として報告することになる。COX-2及び12-LOXの発現は、プテロスチルベン処置後に顕著に低下しているであろうと期待される。逆に、UGT及び15-PGDHのタンパク質レベルはプテロスチルベン補給後にAKにおいて顕著に増加しているであろうと期待される。

#### 【0055】

臨床試験評価項目

上記の試験は、ランダム化も対照群もない単一の治療群試験を説明するものである。試験の第一の目的は、プテロスチルベン補給を受ける前と後で、被験者の前癌性日光角化症(AK)病変における生理活性脂質12-ヒドロキシエイコステトラエン酸(12-hy

10

20

30

40

50

droxyeicosatetraenoic acid) (12- HETE) のレベルを評価することである。理論に縛られるものではないが、仮説は、試験治療が、前癌性日光角化症の後退をもたらし、皮膚の光による損傷に関連する他の前癌病変を退行させる、安全で有効な栄養補給であると判明するであろうというものである。割り付けられた試験薬のすべての用量に 80% のコンプライアンスを示す被験者を、主要評価項目である 12- HETE (pg / mg タンパク質) について評価可能であるとみなすことにする。副次的評価項目には、PGE<sub>2</sub> (pg / mg タンパク質) 及び UGT、COX - 2、15 - PDGH 及び 12 - LOX の酵素タンパク質レベルが含まれる。追加の副次的評価項目には、AK 病変において測定した血流、脂肪含量及び含水量、元からの AK 病変の数、新たな AK 病変の数及び非黒色腫皮膚がん (NMSC) の数が含まれる。

10

#### 【0056】

##### 送達システム

好適な剤形には、錠剤、カプセル剤、溶液剤、懸濁剤、粉末剤、ガム及び糖菓剤が含まれる。舌下送達システムには、以下に限定はしないが、舌下及び舌上用の可溶性錠剤、液滴及び飲料が含まれる。可食性フィルム、親水性ポリマー、経口可溶性フィルム又は経口可溶性小片を使用することができる。他の有用な送達システムは、口内若しくは鼻内用の噴霧剤又は吸入剤などを含む。

#### 【0057】

経口投与用として、錠剤、カプセル剤、丸剤、粉末剤、顆粒剤又は他の好適な剤形を調製するために、プテロスチルベンは 1 種又は複数種の固形不活性成分と組み合わせることができる。例えば、活性薬は、少なくとも 1 種の添加剤、例えば、充填剤、結合剤、軟釈剤、崩壊剤、溶解遅延剤、吸収加速剤、湿潤剤、吸収剤又は滑沢剤と組み合わせることができる。他の有用な添加剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、マンニトール、キシリトール、甘味剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、微結晶セルロース、シリカ、ゼラチン、二酸化ケイ素などが含まれる。

20

#### 【0058】

##### 投与経路

化合物は、経口、舌下、頬側、経眼、経肺、経直腸及び非経腸投与、又は口内若しくは鼻内用噴霧 (例えば、噴霧蒸気、液滴又は固形粒子の吸入) としての経路を含むがこれらに限定されないいずれの経路でも投与することができる。非経腸投与には、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、腔内、嚢内 (例えば膀胱に)、皮内、経皮、局所又は皮下投与が含まれる。やはり本発明の範囲内で企図するのは、患者の身体に、薬物の全身又は局所放出が時間をおいて起こる徐放性配合剤で、プテロスチルベンを点滴注入することである。例えば、薬物は、循環への徐放、又は腫瘍成長の局所部位への放出のために、デポーで局在化させてもよい。

30

#### 【0059】

処置は、単回の連続セッションでも、不連続のセッションでも、必要なだけの期間実施することができる。処置担当医は、患者の反応に基づいて、処置の増加、低減又は中断の仕方がわかるであろう。一実施形態によれば、処置は約 4 ~ 約 12 週間実施する。処置のスケジュールは、必要に応じて反復してもよい。

40

#### 【0060】

プテロスチルベン及びその栄養補給配合剤は、基底細胞癌、有棘細胞癌、悪性黒色腫、カポジ肉腫、メルケル細胞癌、皮膚のリンパ腫、母斑、異形成母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、ケロイド及び乾癬を含むがこれらに限定されない皮膚がんなどの、様々な種類のがん及び腫瘍に対して有効であると考えられる。

#### 【0061】

皮膚がんは、転移性又は非転移性の固形腫瘍であり得る。したがって、本明細書で使用する「腫瘍細胞」という用語は、上記の同定された障害のうち任意の 1 つに罹患した細胞を含む。

#### 【0062】

50

乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、前立腺がん、精巣がん、結腸直腸がん、肺がん、腎がん、肝がん、脳がん、胃がん、気管支がん、膵がん、膀胱がん及び骨がんからなる群から選択されるがんに限らないがこれらを含む他の細胞増殖性障害は、本明細書に記載するブテロスチルベン配合剤による処置に対して感受性がある。

#### 【0063】

ブテロスチルベン及びその栄養補給配合剤は、良性の徴候を特徴とする細胞増殖性障害である非がん性細胞増殖性障害の処置にも有用であると考えられる。かかる障害は、細胞が身体によって異常に高速で作られるという点で、細胞増殖性又は過剰増殖性としても知られていることがある。ブテロスチルベン配合剤による処置が可能と考えられる非がん性細胞増殖性障害には、日光角化症（AK）及び他の前癌性病変が含まれる。

10

#### 【0064】

UV - B照射処置用の材料及び方法の項  
試薬及び細胞培養

正常なヒトメラノサイトを、UC IrvineのInternal Review Boardが承認したプロトコルに従って、身元を特定しない新生児の環状切除手術による包皮から単離した。メラノサイトを上記のとおり単離し（Eisinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79(6): 2018 - 22; 及びLiu, et al., J. Invest. Dermatol. (2009) 129(2): 422 - 31）、2%ウシ胎仔血清、10 ng/mlの12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセート及び0.15%ウシ下垂体抽出物を添加したMCDB 153培地で培養した。ブテロスチルベンをChromaDex, Inc. (Irvine, California) から得た。

20

#### 【0065】

メラノサイトのUV - B照射処置

UV - B照射を上記のとおり実施した（Liu, F., et al., "MitF links Erk1/2 kinase and p21 CIP1/WAF1 activation after UVC radiation in normal human melanocytes and melanoma cells," Mol. Cancer (2010) 9: 214）。細胞を約70%コンフルエンスまで成長させ、UV - B照射処置のため、培地を完全に除去した。UVB照射をStratalinker UV架橋装置（Stratagene, La Jolla, California）の中でピーク波長312 nmにて実施した。UV照度を適切なプローブを備えた線量計で測定した。培養培地を照射処置直後に置換し、細胞を37 インキュベーターに戻して回収した。慢性曝露にするため、このプロセスを1時間毎に反復して合計5回の曝露とした。本明細書で示す時間は、常に最初の曝露後の時間を表す。

30

#### 【0066】

全RNA単離、逆転写及びリアルタイムPCR

Arum total RNA mini Kit (BioRad, Hercules, California) を使用し、標準的な製造元のプロトコルに従って、全RNAを細胞から単離した。NanoDrop 1000 (Thermo/Fisher, Wilmington, Delaware) を使用してRNAを定量した。次いで、iScript Reverse Transcriptase Kit (BioRad) を使用し、標準的なプロトコルに従って、cDNAを1.0 µgのRNAから作製した。メラノサイト中のUGTmRNAの発現レベルを分析するために、リアルタイムPCRを上記のとおり実施した（Chen, G., et al., "Identification of a prevalent functional missense polymorphism in the UGT2B10 gene and its association with UGT2B10 inactivation against tobacco-specific nitrosamines," Pharmacogenet. Genomics (2008) 18(3): 181 - 91; 及びDellin

40

50

ger, R. W., et al., "Glucuronidation of PhIP and N-OH-PhIP by UDP-glucuronosyltransferase 1A10," *Carcinogenesis* (2007) 28(11): 2412-8)。それに応じて、以前デザインされた TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Carlsbad, California) (IDは、UGT2B7については Hs00426592\_\_m1、UGT2B10については Hs02556282\_\_s1、UGT2B15については Hs03008769\_\_g1、NQO1については Hs0016857\_\_m1、及び GAPDHについては Hs99999905\_\_m1) を、製造元のプロトコルに従って使用した。50 ng の cDNA を含有する全体積 20  $\mu$ l を使用し、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を基準の「ハウスキーピング」遺伝子及びポジティブコントロールとして使用して、リアルタイム PCR を実施した。リアルタイム PCR は CFX96 Real-Time PCR machine (BioRad) で実施した。報告された mRNA の発現値は、少なくとも 3 つの別個の実験の標準偏差を伴う平均値とする。

10

#### 【0067】

上記の方法は、以下の実施例との関連でさらに理解されるであろう。

#### 【実施例】

#### 【0068】

##### 実施例 A

20

急性 UV - B 曝露後の正常なヒトメラノサイト中の UGT 発現の下方制御

UGT2B7、UGT2B10 及び UGT2B15 が、身元を特定しない新生児の包皮から単離したヒトメラノサイト中で発現しているのが発見された。さらに、UGT 発現は、試験した黒色腫の細胞株 5 つのうち 4 つで観察されなかった。このことは、UGT 発現の消失が黒色腫の病因の一部であるという興味深い可能性を提起する。UV - B がメラノサイト中の UGT 発現を制御し得るのかどうかを判断するために、再度メラノサイトを、身元を特定しない新生児の包皮から単離して培養した。次いで、これらの細胞を、日焼け線量とほぼ同等である 25 mJ / cm<sup>2</sup> の単一線量の UV - B に曝露した。次いで、細胞を、照射 0 時間後、4 時間後及び 24 時間後に回収し、上記の材料及び方法に記載したとおり、GAPDH 発現を基準にしたリアルタイム PCR を使用して、UGT 発現をアッセイした。図 2 に示すように、UGT2B7、UGT2B10 及び UGT2B15 の発現レベルは、急性 UV - B 線量に応じてすべて低下した。特に、UGT2B7 発現は照射 4 時間後に検出不能であるが、その発現は、曝露 24 時間後までに高いレベルに戻っている。UGT2B10 発現は処置 4 時間後までに消失し、処置 24 時間後に依然として検出不能であり、一方、UGT2B15 の発現レベルは照射 4 時間後には変化していないが、照射 24 時間後までに検出不能になる。NADPH デヒドロゲナーゼキノン 1 (NQO1) は、その発現が UV - B 曝露後に変化しなかったため、対照として使用する。これは UGT 発現が UV - B 曝露によって制御され得ることの初めての実証であったが、急性 UV 曝露に関連して黒色腫のリスクが高まることと一致している。

30

#### 【0069】

40

##### 実施例 B

ヒトメラノサイト中の UGT 発現の、UV - B により誘発される消失後のプテロスチルベン処置。

ここで、プテロスチルベンが、日焼け線量 (25 mJ / cm<sup>2</sup>) での急性 UV - B 曝露に応じた UGT の消失を防止することができるかどうかを試験した。コーカサス系 / ラテンアメリカ系の上記のメラノサイト細胞株を、未処置で放置、又はプテロスチルベン 100 nM で 1 時間処置した。次いで、細胞を上記のとおり照射し、照射後に、プテロスチルベン 100 nM を細胞培地と一緒に置換した。図 3 に示すように、プテロスチルベンは、照射 4 時間後と 24 時間後の両方で、UGT2B7、UGT2B10 及び UGT2B15 の消失を防止したが、唯一の例外は 4 時間後の UGT2B15 発現であった。3 種の UG

50

Tのすべてが、プテロスチルベンでの処置の24時間後に高いレベル(8倍まで)で観察された。

#### 【0070】

したがって、天然生成物プテロスチルベンは、ヒトメラノサイト中のUGT発現の、UV-Bにより誘発される消失、又は消失のリスクの低下を防止することができることが実証された。なお、ヒトケラチノサイトを使用して同じ手順を実施することができる。

#### 【0071】

##### 実施例C

正常なヒトケラチノサイト中のUGT発現。

ケラチノサイトは、表皮中の最も多いタイプの細胞である(表皮中の細胞の約95%)。NMSCはこの細胞から生じる可能性がある。この重要な皮膚細胞がUGTを発現するかどうかを確認するために、RT-PCRを実施した。図4に示すように、UGT1A4、UGT1A6及びUGT2B17は、新生児の包皮から単離された初代培養ヒトケラチノサイト(正常な)の中で発現しているのが示された。期待される大きさの帯域を切除し、標準法を用いて配列決定して、これらが指定のUGTであることを確認した。これは、ヒトケラチノサイト中のUGT発現の初めてのキャラクタリゼーションであった。

10

#### 【0072】

図4は、初代培養ヒトケラチノサイト中のUGT mRNA発現を示している。ヒトケラチノサイトの全mRNAのRT-PCR分析を実施して、指定のUGTファミリーメンバーを検出した。GAPDHプライマーをポジティブコントロール(+)として使用した。他のUGTファミリーメンバーは検出されなかった。

20

#### 【0073】

##### 実施例D

ヒトケラチノサイト中のUGT2B17発現の、UV-Bにより誘発される消失後のプテロスチルベン処置。

ここで、UGT2B17発現がUV-B照射によって制御され得るのかどうか、及びプテロスチルベンがその消失を防止し得るのかどうかを試験した。ヒトケラチノサイトを、プテロスチルベン(100nM)有り又は無しで、25mJ/cm<sup>2</sup>のUV-B照射に曝露し、照射0時間後、2時間後、4時間後、8時間後及び24時間後に回収した。次いで、リアルタイムPCRを、UGT2B17について特定のTaqManアッセイを使用して実施した。図5に示すように、UGT2B17 mRNA発現は、UV-B曝露後4時間という短さで大幅に下方制御され、少なくとも24時間低いままである。重要なことであるが、上記のプテロスチルベン処置(100nM)は、UV-Bが媒介するUGT2B17の消失を阻止する。

30

#### 【0074】

図5に示すように、プテロスチルベンは、UGT2B17の消失を、照射4時間後、8時間後及び24時間後に防止した。UGT2B17の相対mRNA発現が、GAPDHを基準とし、0時間を任意に1.0に設定して示されている。

#### 【0075】

したがって、天然生成物プテロスチルベンは、ヒトケラチノサイト中のUGT発現の、UV-Bにより誘発される消失、又は消失のリスクの低下を防止することができることが実証された。

40

#### 【0076】

##### 実施例E

ヒト黒色腫細胞における12-LOX発現の、プテロスチルベン(Ptero)による抑制。

図6に示すように、既知の方法で試験すると、プテロスチルベン(50μM)はin vitroで12-LOX活性を実質的に阻止した。指示したとおりの、未処置のまま(UN)、若しくは50μMのプテロスチルベン(Ptero)で処置、若しくはレスベラトロール(Res)で処置したSKmel28ヒト黒色腫細胞の12-LOXのウェスタ

50



ンプロット。B - アクチンをローディングコントロールとして使用した。プテロスチルベンの方がレスベラトロールよりも、*in vitro*で12-L O X発現を抑制したことが観察された。

#### 【0077】

##### 実施例 F

正常な皮膚及びヒトAKにおける12 - H E T E 活性

標準法を使用して、同じ患者の正常な皮膚又はAKの3mmの皮膚のパンチ生検組織から脂質画分を抽出し、LC / MS / MS 標準法で分析して12 - H E T E 濃度を測定した (n = 6 患者、各患者から採取した正常なサンプル及びAKサンプル)。図7に示すように、12 - H E T E のレベルは、同じ個体の正常な皮膚と比較して、日光角化症 (AK) では3倍の高さであった。

10

#### 【0078】

AKにおける12 - H E T E のレベルはこれまでに報告されていないため、これは新奇的なデータであった。さらに、このデータは、上記の臨床試験において12 - H E T E を臨床的評価項目として使用するために必要である。このデータは、12 - H E T E の制御解除を示すマウス研究 (K r i e g , P . , e t a l . , " 12 - L i p o x y g e n a s e i s o e n z y m e s i n m o u s e s k i n t u m o r d e v e l o p m e n t , " M o l . C a r c i n o g . ( 1995 ) 14 ( 2 ) : 118 - 129 ) と相関性が高い。

20

#### 【0079】

12 - L O X は12 - H E T E を生成するため、プテロスチルベンによって、増殖性又は前癌性の細胞中の12 - L O X 発現が低下すると、12 - H E T E の形成が防止又は低減されるであろうし、且つ/又は、プテロスチルベンが、損傷した皮膚において12 - H E T E を正常なレベルに回復させるのに有効であるだろう (12 - L O X の抑制とUGT の上方制御との両方によって) と期待される。増殖性又は前癌性の細胞の処置により、AK ( 及び場合によりNMSC ) が後退又は退行するであろうと、さらに期待される。

#### 【0080】

##### 実施例 1

一実施形態によれば、患者 ( 又は患者コホートの各構成員 ) を、許容される栄養補給用担体中に配合した1日投与量100mgのプテロスチルベンを次のように経口投与して処置する。100mgのプテロスチルベン及び150mgの微結晶セルロースを組み合わせ、植物性カプセルに入れる。患者の前腕の皮膚試験領域 ( 8 cm<sup>2</sup> ) からAK ( 及び場合によりNMSC ) を特定し、マッピング、写真撮影、イメージングを行い、病変の生検組織を採取してから、上記で詳しく述べたとおり、臨床試験を実施する。12週間の試験のモニタリングの後に、各ヒト被験者が、皮膚試験領域に特定されたAKの後退を示しているであろうと期待される。

30

#### 【0081】

##### 実施例 1 A

ある実施形態によれば、患者 ( 又は患者コホートの各構成員 ) を、許容される栄養補給用担体中に配合した1日投与量100mgのプテロスチルベンを経口投与して処置する。患者の前腕の皮膚試験領域 ( 8 cm<sup>2</sup> ) からAK ( 及び場合によりNMSC ) を特定し、マッピング、写真撮影、イメージングを行い、病変の生検組織を採取してから、上記で詳しく述べたとおり、臨床試験を実施する。12週間にわたる試験の間に、mRNA又はタンパク質に応じた前癌性組織サンプル中のUGT発現は、大幅に増加するであろうと期待される。

40

#### 【0082】

##### 実施例 1 B

一実施形態によれば、患者 ( 又は患者コホートの各構成員 ) を、許容される栄養補給用担体中に配合した1日投与量100mgのプテロスチルベンを経口投与して処置する。患者の前腕の皮膚試験領域 ( 8 cm<sup>2</sup> ) からAK ( 及び場合によりNMSC ) を特定し、マ

50

ッピング、写真撮影、イメージングを行い、病変の生検組織を採取してから、上記で詳しく述べたとおり、臨床試験を実施する。12週間にわたる試験の間に、前癌性組織サンプル中の12-HETEのレベルは大幅に低下するであろうと期待される。

【0083】

#### 実施例2

一実施形態によれば、患者（又は患者コホートの各構成員）を、許容される栄養補給用担体中に配合した1日投与量100mgのプテロスチルベンを次のように経口投与して処置する。100mgのプテロスチルベン及び150mgの微結晶セルロースを組み合わせ、植物性カプセルに入れる。患者の前腕の皮膚試験領域（ $8\text{ cm}^2$ ）からAK（及び場合によりNMSC）を特定し、マッピング、写真撮影、イメージングを行い、病変の生検組織を採取してから、上記で詳しく述べたとおり、臨床試験を実施する。12週間の試験のモニタリングの後に、処置によって、皮膚試験領域に特定された前癌性AKのNMSCへの進行が防止され、且つ/又は各ヒト被験者における新たなNMSCの形成が抑制されるであろうと期待される。

【0084】

上記の明細書において、本発明を、その一定の実施形態に関して記載し、多くの詳細を説明のために述べてきたが、本発明は追加の実施形態が可能であり、本明細書に記載した詳細の中には、本発明の基本原則から逸脱することなく相当に変更することが可能なものがあるということが当業者には明らかであろう。

【0085】

本明細書に引用したすべての参考文献は、その内容全体を参照により本明細書に組み込んだものとする。本発明は、その趣旨又は本質的な特質から逸脱することなく、他の具体的な形態に具現化することができ、したがって、本発明の範囲を指定するものとして、上記の明細書よりもむしろ添付の特許請求の範囲について参照がなされるべきである。

【図1】

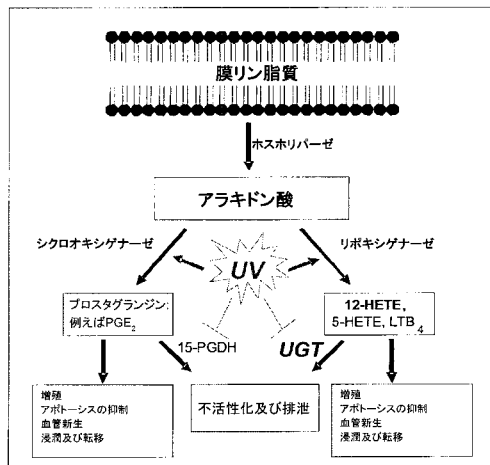


図1

【図2】

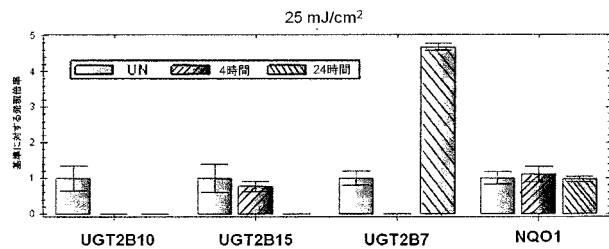


図2

【図3】

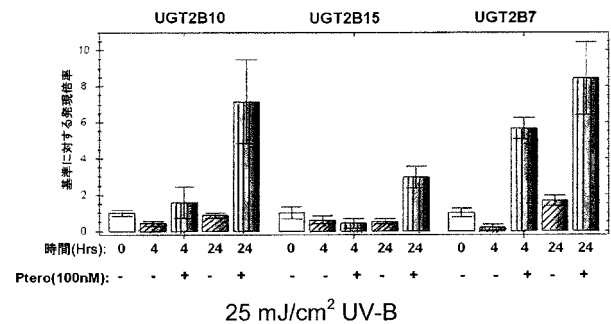


図3

【 図 4 】

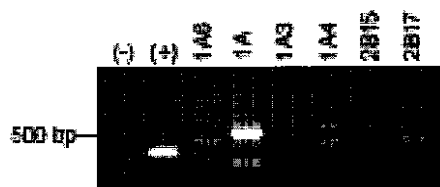


FIG. 4

【 図 6 】

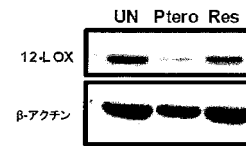


図6

【 図 5 】

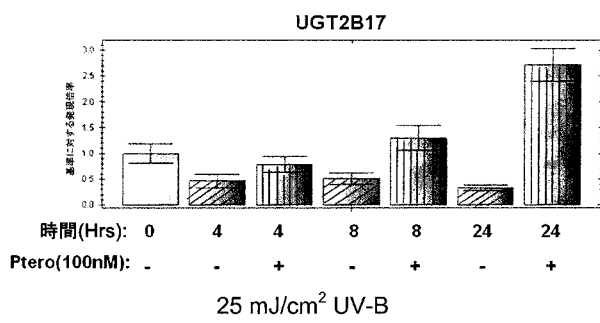


図5

【 図 7 】

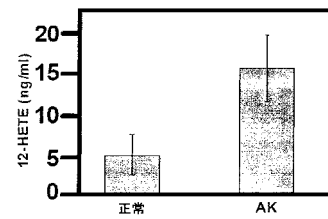


図7

## 【国際調査報告】

Date of receipt: 28 April 2015 (28.04.2015) PCT/US2012/064993

PCT/US2012/064993 24.01.2013

61500290015



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CHROM-104PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 12/64993	International filing date (day/month/year) 14 November 2012 (14.11.2012)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 08 May 2012 (08.05.2012)
Applicant CHROMADEX INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

## 1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

12. 5. 2015

Date of receipt: 28 April 2015 (28.04.2015) PCT/US2012/064993

PCT/US2012/064993 24.01.2013

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/64993

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 31/05, 31/08 (2012.01)

USPC - 514/733, 720

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) - A61K 31/05, 31/08 (2012.01)

USPC - 514/733, 720

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC - 514/733, 720, 514/724, 730

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatBase, Google Patents, Google Scholar, WIPO (UDP, UGT, skin, cancer, pterostilbene, stilbene, stilbenol, resveratrol, HETE, mg, dose, proliferative, keratosis, nevi, glucuronosyltransferase, UDTG, uridine, melanoma, diphosphate-glucuronosyltransferase)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0136751 A1 (ESTRELA, et al.) 09 June 2011 (09.06.2011) entire document, especially para [0014]-[0015], [0020], [0035], [0038]-[0039], [0053], [0067]-[0068], [0085], [0117], [0135]-[0136]	1-14, 20-21, 23
Y	US 2008/0213198 A1 (LINTNER, et al.) 04 September 2008 (04.09.2008) entire document, especially para [0003], [0042], [0068], [0152], [0258]	1-30
Y	WO 2011/051483 A1 (ESTRELA ARIQUEL, et al.) 05 May 2011 (05.05.2011) entire document, especially pg 1, ln 24- pg 2, ln 12; pg 3, ln 29-pg 4, ln 21, 29-pg 5, ln 5; pg 6, ln 29-pg 7, ln 1; pg 10, ln 11-14, 21; pg 13, ln 8-14, 16-20; pg 36, ln 16-21	13, 15-30
Y	US 2009/0324740 A1 (ALBRITTON, IV) 31 December 2009 (31.12.2009) entire document, especially para [0036], [0048], [0072]-[0081]	14, 30

☐ 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 December 2012 (28.12.2012)

Date of mailing of the international search report

24 JAN 2013

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

## 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 15/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)		A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)		A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)		A 6 1 P 13/10	
A 2 3 L 1/30 (2006.01)		A 6 1 P 19/08	
		A 2 3 L 1/30	B

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

(72)発明者 バルトス, ジェレミー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 8 6 8, オレンジ, ノースシトラス 4 9 4

(72)発明者 デリンジャー, ライアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 0 3, アーヴァイン, サマーセット 5

F ターム(参考) 4B018 MD08 MD52 ME08 ME14 MF01

4C206 AA01 AA02 CA34 MA01 MA02 MA04 MA05 MA72 MA83 MA86

NA14 ZA02 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA96 ZB21 ZB26 ZC19