

(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2005-529898  
(P2005-529898A)

(43) 公表日 平成17年10月6日(2005.10.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/353	A 6 1 K 31/353	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/352	A 6 1 K 31/352	4 C 0 8 8
A 6 1 K 35/78	A 6 1 K 35/78 C	
A 6 1 P 3/04	A 6 1 K 35/78 L	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 K 35/78 X	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-500784 (P2004-500784)  
 (86) (22) 出願日 平成15年4月30日 (2003. 4. 30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年12月27日 (2004. 12. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/013463  
 (87) 国際公開番号 W02003/092599  
 (87) 国際公開日 平成15年11月13日 (2003. 11. 13)  
 (31) 優先権主張番号 60/377, 168  
 (32) 優先日 平成14年4月30日 (2002. 4. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

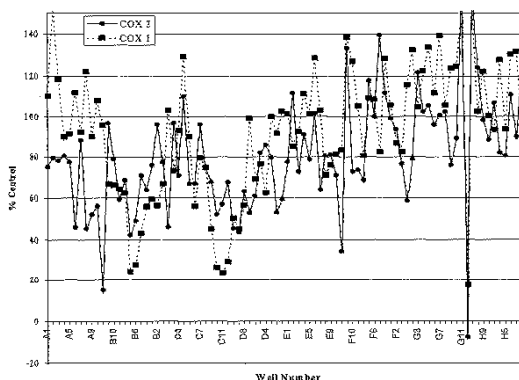
(71) 出願人 504000568  
 ユニゲン・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国ワシントン州98516,  
 ラセイ, ノース・イースト, ウィラメッテ・ドライブ 2660  
 (74) 代理人 100089705  
 弁理士 社本 一夫  
 (74) 代理人 100076691  
 弁理士 増井 忠式  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100080137  
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療剤としての遊離-B-環フラボノイド類とフラバン類との混合物の製剤

(57) 【要約】

本発明は、COX-2及び5-LO経路によって仲介される疾患及び状態の予防及び治療において使用するための2つの特定のクラスの化合物(遊離-B-環フラボノイド類及びフラバン類)の混合物で構成される新規な組成物を提供する。本発明はさらに、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)及び5-リポキシゲナーゼ(5-LO)酵素を同時に阻害し、cox-2 mRNA生成を低減する新規な方法を提供する。最後に、本発明は、体重減少及び血中グルコース制御の方法を含む。本発明の方法は、これを必要とする受容者に、有効な量の本発明の組成物を薬学的に許容可能なキャリアと一緒に投与することで構成される。本発明は一般に、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)及び5-リポキシゲナーゼ(5-LO)経路によって仲介される疾患及び状態の予防及び治療に関し、こうしたものとしては、変形性関節症、慢性関節リウマチ、及び過剰使用から生じる他の損傷のような状態に関連する関節の不快感及び疼痛の緩和が挙げられるがこれらに限定されるものではない。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 1 つの遊離 - B - 環フラボノイドと少なくとも 1 つのフラバンの混合物で構成される組成物。

## 【請求項 2】

前記組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド対フラバンの比は、99 : 1 の遊離 - B - 環フラボノイド : フラバン ~ 1 : 99 の遊離 - B - 環フラボノイド : フラバンの範囲から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

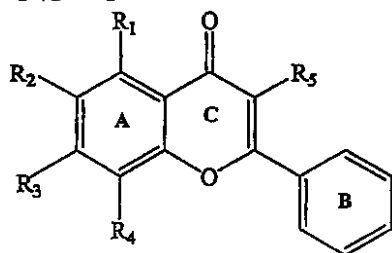
## 【請求項 3】

前記組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド : フラバンの比は約 85 : 15 である、請求項 2 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記遊離 - B - 環フラボノイドは、以下の構造 :

## 【化 1】



[ 式中、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、及び  $R_5$  は独立して、-H、-OH、-SH、-OR、-SR、-NH<sub>2</sub>、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、炭素、酸素、窒素または硫黄、アルドペントース、メチル-アルドペントース、アルドヘキソース、ケトヘキソース及びその化学的誘導体を含む単一のまたは多数の糖の組合せのグリコシドからなる群から選択され；

ここで、

R は、1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルキル基であり；

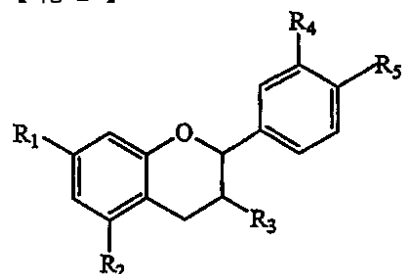
X は、ヒドロキシル、塩化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フッ化物及び炭酸塩を含む薬学的に許容可能な対陰イオンの群から選択される。 ]

を有する化合物の群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記フラバンは、以下の構造 :

## 【化 2】



[ 式中、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  及び  $R_5$  は独立して、-H、-OH、-SH、-OCH<sub>3</sub>、-SCH<sub>3</sub>、-OR、-SR、-NH<sub>2</sub>、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、独立して、没食子酸エステル、酢酸エステル、シンナモイル及びヒドロキシル-シンナモイルエステル、トリヒドロキシベンゾイルエステル及びカフェオイルエステルからなる群から選択される置換基のエステル；アルドペントース、メチルアルドペントース、アルドヘキソース、ケトヘキソース及びその化学的誘導体を含む単一のまたは多数の糖の組合せの炭素、

10

20

30

40

50

酸素、窒素または硫黄グリコシド；ダイマー、トリマー及び他の重合フラバン類；からなる群から選択され；

ここで、

R は、1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルキル基であり；

X は、ヒドロキシル、塩化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フッ化物、炭酸塩が挙げられるがこれらに限定されるものではない薬学的に許容可能な対陰イオンの群から選択される。]

を有する化合物の群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記遊離 - B - 環フラボノイド及び前記フラバンは、有機合成によって得られるかまたは植物から単離される、請求項 1 に記載の組成物。 10

【請求項 7】

前記遊離 - B - 環フラボノイド及び前記フラバンは、茎、茎樹皮、樹幹、樹幹樹皮、小枝、塊茎、根、根樹皮、新鞘、種子、根茎、花及び他の生殖器官、葉並びに他の気生部分からなる群から選択される植物部分から単離される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記遊離 - B - 環フラボノイドは、アンノナセアエ、アステラセアエ、ビグノニアセアエ、コムブレタセアエ、コンポシタエ、エウフォルビアセアセ、ラビアタエ、ラウランセアセ、レグミノサエ、モラセアエ、ピナセアエ、プテリダセアエ、シノプテリダセアエ、ウルマセアセ及びジンギベラセアからなる群から選択される植物科から単離される、請求項 6 に記載の組成物。 20

【請求項 9】

前記遊離 - B - 環フラボノイドは、デスモス、アキロクリン、オロキシウム、プチェナピア、アナファリス、コツラ、グナファリウム、ヘリクリスム、セントウレア、エウパトリウム、バッカリス、サピウム、スキューテラリア、モルサ、コレブローケア、スタキス、オリガナム、ジジフォラ、リンデラ、アクチノダフネ、アカシア、デリス、グリシルヒザ、ミレッチア、ポンガミア、テフロシア、アルトカルプス、フィクス、ピティログラマ、ノトラエナ、ピヌス、ウルムス及びアルピニアからなる群から選択される植物属から単離される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記フラバンは、アカシア・カテキュー、アカシア・コンシナ、アカシア・ファルネシアナ、アカシア・セネガル、アカシア・スペシオサ、アカシア・アラビカ、A . カエシア、A . ペンナタ、A . シヌアタ、A . メアルンシイ、A . ピクナンタ、A . デアルバタ、A . アウリクリフォルミス、A . ホロセレシア及び A . マンギウムからなる群から選択される植物種から単離される、請求項 6 に記載の組成物。 30

【請求項 11】

前記遊離 - B - 環フラボノイドは、スキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、前記フラバンは、アカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 12】

関節の疼痛及びこわばりを軽減し、可動性及び身体的機能を改良する方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物で構成される有効な量の組成物を投与することを含む方法。 40

【請求項 13】

前記組成物は、0 . 01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

変形性関節症及び慢性関節リウマチに関連する病理学的状態を予防し、治療する方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を薬学的に許容可能なキャリアと一緒に投与することを含む方法。

【請求項 16】

前記組成物は、0.01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 18】

シクロオキシゲナーゼ COX - 2 酵素の酵素活性を阻害する方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物で構成される有効な量の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 19】

前記組成物は、0.01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 20】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 21】

5 - リポキシゲナーゼ (5 - LO) 酵素の酵素活性を阻害する方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物で構成される有効な量の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 22】

前記組成物は、0.01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 24】

COX - 2 酵素及び 5 - LO 酵素の酵素活性を同時に阻害する方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物で構成される有効な量の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 25】

前記組成物は、0.01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 27】

c o x - 2 m R N A 生成の阻害の方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 28】

前記組成物は、0.01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 27 に記載の方法。

50

## 【請求項 30】

C O X - 2 及び 5 - L O 経路によって仲介される疾患及び状態を予防し、治療する方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を投与することを含む方法。

## 【請求項 31】

前記組成物は、0.01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

10

## 【請求項 33】

C O X - 2 及び 5 - L O 経路仲介の生理学的及び病理学的状態は、生理痛、動脈硬化症、心臓発作、肥満症、糖尿病、症候群 X、アルツハイマー病、呼吸器アレルギー反応、慢性静脈不全、痔核、全身性エリテマトーデス、乾癬、慢性緊張性頭痛、片頭痛、炎症性腸疾患；ウイルス、細菌、真菌によって引き起こされる局所感染、日やけ、熱傷、接触性皮膚炎、メラノーマ及び癌からなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 34】

血中グルコース濃度を低減する方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を投与することを含む方法。

20

## 【請求項 35】

前記組成物は、0.01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 37】

ボディマス指数を減少させ、体重減少を引き起こす方法であって、これを必要とする受容者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を投与することによる方法。

30

## 【請求項 38】

前記組成物は、0.01 ~ 200 mg/kgの体重から選択される用量で投与される、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 39】

投与経路は、経口、局所、坐剤、静脈内、及び皮内、胃内、筋肉内、腹腔内及び静脈内投与からなる群から選択される、請求項 37 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は一般に、シクロオキシゲナーゼ - 2 (C O X - 2) 及び 5 - リポキシゲナーゼ (5 - L O) 経路によって仲介される疾患及び状態の予防及び治療に関する。特に、本発明は、C O X - 2 及び 5 - L O 経路によって仲介される疾患及び状態の予防及び治療において使用するための 2 つの特定のクラスの化合物 (遊離 - B - 環フラボノイド類及びフラバン類) のブレンドの混合物で構成される新規な組成物に関する。本発明に含まれるのは、C O X - 2 及び 5 - L O 酵素のタンパク質機能の同時阻害の方法、及び本発明の新規な組成物の投与によって m R N A の生成を調節する方法である。また本発明に含まれるのは、例えば変形性関節症、慢性関節リウマチ、及び過剰使用から生じる他の損傷のような状態に関連する関節の不快感及び疼痛が挙げられるがこれらに限定されるものではない C O X - 2 及び 5 - L O 仲介疾患及び状態の予防及び治療の方法である。さらに本発明に含まれるのは、血中グルコースレベルを低減し、体重減少を促進する方法である。

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞膜からのアラキドン酸(AA)の遊離及び代謝は、幾つかの異なる経路による親炎症性代謝物の生成をもたらす。ほぼ間違いなく、炎症に至る最も重要な経路のうちの2つは、酵素5-リポキシゲナーゼ(5-LO)及びシクロオキシゲナーゼ(COX)によって仲介される。こうした平行経路はそれぞれロイコトリエン及びプロスタグランジンの生成をもたらす、これらは炎症反応の開始及び進行において重要な役割を果たす。こうした血管作動性化合物は、組織中への炎症細胞の浸潤を促進し、炎症反応を引き延ばすケモタキシンである。従って、炎症のこうしたメディエーターを生成させる原因である酵素は、慢性関節リウマチ、変形性関節症、アルツハイマー病及び特定のタイプの癌のような疾患の病因論に寄与する炎症の治療を目的とする多くの新たな薬物の標的になった。

10

## 【0003】

シクロオキシゲナーゼ(COX)酵素の阻害は、大部分の非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)に帰する作用の機構である。COX酵素の2つの別個のアイソフォーム(COX-1及びCOX-2)が存在し、これらは約60%の配列相同性を共有するが、発現プロフィル及び機能が異なる。COX-1は、血小板凝集能、胃の細胞機能の保護及び正常な腎臓機能の維持のような正常な生理学的機能の調節に關与する生理学的に重要なプロスタグランジンの生成と関連づけられた酵素の構成形態である(Dannhardt and Kiefer (2001) Eur. J. Med. Chem. 36:109-26)。第2のアイソフォーム(COX-2)は、親炎症性サイトカインの例えばインターロイキン-1(IL-1)及び他の成長因子によって誘発可能な酵素の形態である(Herschmann (1994) Cancer Metastasis Rev. 134:241-56; Xie et al. (1992) Drugs Dev. Res. 25:249-65)。このアイソフォームは、AAからのプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)の生成を触媒する。COX-2の阻害が、従来のNSAIDsの抗炎症活性の原因である。

20

## 【0004】

COX-2及び5-LOに対する二重特異性を証明し、同時に、COX-1と比較してCOX-2選択性を維持する阻害剤は、AA代謝の多数の経路を阻害するという明白な恩典を有すると思われる。このような阻害剤は、生成を制限することによって、PGE<sub>2</sub>の炎症性効果並びに多数のロイコトリエン(LT)のものを遮断すると思われる。これは、LTB<sub>4</sub>及びLTD<sub>4</sub>の血管拡張、血管透過性及び走化性効果並びにLTE<sub>4</sub>の影響(またアナフィラキシーの遅反応性物質として周知である)を含む。こうしたもののうち、LTB<sub>4</sub>は最も効力のある走化性及びケモカイン効果を有し(Moore (1985) in Prostanoid s: Pharmacological, Physiological and Clinical Relevance, Cambridge University Press, N.Y., pp. 229-30)並びに炎症性腸疾患を有する患者の消化管粘膜中で(Sharon and Stenson (1983) Gastroenterology 84:1306-13)及び慢性関節リウマチを有する患者の滑液内部で(Klicksein et al. (1980) J. Clin. Invest. 66:1166-70; Rae et al. (1982) Lancet ii :1122-4)高まることが示された。

30

## 【0005】

二重COX-2/5-LO阻害剤の上述の恩典に加えて、多くの二重阻害剤は、従来のNSAIDsによって引き起こされる消化管損傷及び不快感を含むNSAIDsまたはCOX-2阻害剤に特徴的な副作用の幾つかを引き起こさない。NSAID誘発胃炎症は主として5-LOの代謝物、特にLTB<sub>4</sub>(細胞を胃の病巣の部位に引きつけ、従ってさらなる損傷を引き起こす)が原因であると示唆されてきた(Kircher et al. (1997) Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 56:417-23)。ロイコトリエンは、プロスタノイド阻害後の胃粘膜内部の一次AA代謝物を表す。こうした化合物は、NSAIDsの使用から生じる胃上皮損傷のかなりの量の一因となるようである。(Celotti and Laufer (2001) Pharmacol. Res. 43:429-36)。COX-2及び5-LOの二重阻害剤はまた、ラットモデルにおける関節炎の心臓における冠状血管収縮を阻害することが証明された(Gok et al. (2000) Pharmacology 60:41-46)。総合すれば、こうした特性は、増大した効力及び低減した副作用の両方に関して、COX-2及び5-LOの二重阻害剤には、特異的

40

50

COX-2 阻害剤及び非特異的 NSAIDs にまさる別個の利点存在するかもしれないことを示唆する。

【0006】

COX 阻害剤の作用の機構は大部分の従来の NSAIDs のものと重なり合うので、COX 阻害剤を使用して、炎症が決定的な役割を果たす一時的状態及び慢性疾患における炎症に関連する疼痛及び腫脹のような同じ症状の多くが治療される。一時的状態は、少量の表皮剥脱、日やけまたは接触性皮膚炎に関連する炎症の治療、並びに、緊張性頭痛及び片頭痛及び生理痛に関連する疼痛の緩和を含む。慢性状態は、関節炎の疾患の例えば慢性関節リウマチ及び変形性関節症を含む。慢性関節リウマチは主として自己免疫疾患であり、変形性関節症は関節の軟骨の劣化によって引き起こされるが、各々に関連する炎症を低減することは、こうした疾患に苦しむ人々にクオリティ・オブ・ライフのかなりの増大を提供する (Weinberg (2001) *Immunol. Res.* 22:319-41; Wollhiem (2000) *Curr. Opin. Rheum.* 13:193-201)。炎症は一般にリウマチ性疾患の構成要素なので、COX 阻害剤の使用は、疾患の例えば全身性エリテマトーデス (SLE) (Goebel et al. (1999) *Chem. Res. Tox.* 12:488-500; Patrono et al. (1985) *J. Clin. Invest.* 76:1011-1018) 及びリウマチ性皮膚状態の例えば強皮症を含むように拡大された。COX 阻害剤はまた、乾癬炎のようなリウマチ由来ではない炎症性皮膚状態の緩和のために使用され、ここではプロスタグランジンの過剰生成から生じる炎症を低減することは、直接の恩典を提供する可能性がある (Fogh et al. (1993) *Acta Derm. Venereol (Oslo)* 73:191-3)。

10

20

【0007】

抗炎症剤としてのそれらの使用に加えて、COX 阻害剤の別の潜在的な役割は癌の治療である。COX-2 の過剰発現は、様々なヒト悪性腫瘍において証明され、COX-2 の阻害剤は、皮膚、乳房及び膀胱腫瘍を有する動物の治療において有効であることが示された。作用の機構は完全に理解されているわけではないが、COX-2 の過剰発現はアポトーシスを阻害し、腫瘍発生細胞タイプの侵襲性を増大させることが示された (Dempke et al. (2001) *J. Can. Res. Clin. Oncol.* 127:411-17; Moore and Simmons (2000) *Current Med. Chem.* 7:1131-44)。COX-2 の過剰発現から生じるプロスタグランジンの向上した生成は、細胞増殖を促進し、従って脈管形成を増大させることが可能である。 (Moore (1985) in *Prostanoids: Pharmacological, Physiological and Clinical Relevance*, Cambridge University Press, N.Y., pp. 229-30; Fenton et al. (2001) *Am. J. Clin. Oncol.* 24:453-57)。

30

40

【0008】

様々なタイプの癌の予防及び治療における潜在的な使用のために、COX-2 阻害剤を評価する多数の臨床研究がなされた。1999年に、結腸直腸癌の130,000人の新たな患者が米国において診断された。非特異的 NSAID であるアスピリンは、結腸直腸癌の発生を40~50% (Giovannucci et al. (1995) *N. Engl. J. Med.* 333:609-614) 及び死亡率を50% (Smalley et al. (1999) *Arch. Intern. Med.* 159:161-166) 低減することが見い出された。1999年に、FDA は、結腸直腸癌による死亡率を低減するために、COX-2 阻害剤セレコキシブをFAP (家族性大腸ポリポーシス) において使用するために承認した。COX-2 が関与する証拠を有する他の癌をCOX-2 阻害剤を用いて成功裏に予防及び/または治療できるかもしれないと考えられており、こうしたものとしては、食道癌、頭部癌及び頸の癌、乳癌、膀胱癌、頸部癌、前立腺癌、肝細胞癌及び非小細胞性肺癌が挙げられるがこれらに限定されるものではない (Jaeckel et al. (2001) *Arch. Otolaryngol.* 127:1253-59; Kirschenbaum et al. (2001) *Urology* 58:127-31; Dannhardt and Kiefer (2001) *Eur. J. Med. Chem.* 36:109-26)。COX-2 阻害剤はまた、ハイリスク患者における結腸癌を成功裏に予防すると判明するかもしれない。また、COX-2 阻害剤は、幾つかのタイプの致命的な癌を予防できるかまたは逆転さえもできるという証拠が存在する。現在まで、50もの研究は、動物における前癌性及び悪性腫瘍を予防することができ、多分、膀胱、食道及び皮膚癌を同様に予防することを示している。COX-2 阻害は、今世紀の最も重要な予防医学的成果のうちの1つであると判明する

50

可能性がある。

【0009】

最近の科学の進歩は、COX-2発現、一般的な炎症及びアルツハイマー病(AD)の病因論の間の相関を特定した(Ho et al. (2001) Arch. Neurol. 58:487-92)。動物モデルにおいては、COX-2酵素を過剰発現するトランスジェニックマウスは、より損傷を受けやすいニューロンを有する。国立老化現象研究所(NIA)は、NSAIDsがアルツハイマー病の進行を遅らせることができるかどうかを決定するための臨床試験に着手している。ナプロキセン(非選択的NSAID)及びロフェコキシブ(ビオックス(Vioxx)、COX-2特異的選択的NSAID)が評価されよう。先の証拠は、炎症はアルツハイマー病の一因となることを示した。アルツハイマー協会(Alzheimer's Association)及びNIAによれば、米国において約四百万の人々がADに苦しみ、これは今世紀の中ごろまでに千四百万人に増大すると予想される。

10

【0010】

COX酵素(またプロスタグランジンH<sub>2</sub>シンターゼとして周知である)は2つの別個の反応を触媒する。第1の反応においては、AAを代謝して、不安定なプロスタグランジンG<sub>2</sub>(PGG<sub>2</sub>)を形成し、これはシクロオキシゲナーゼ反応である。第2の反応においては、PGG<sub>2</sub>をエンドペルオキシドPGH<sub>2</sub>に転換し、これはペルオキシダーゼ反応である。短命のPGH<sub>2</sub>は非酵素的にPGE<sub>2</sub>に分解する。本明細書において説明する化合物は、COX酵素の新規な阻害剤を特定するために、COX-1及びCOX-2ペルオキシダーゼ活性の阻害に焦点を合わせたアッセイと化学的脱複製プロセスを合わせた発見戦略の結果である。

20

【0011】

遺伝子発現という用語をしばしば使用して、mRNA生成及びタンパク質合成の広い結果を説明する。実際に、実際の遺伝子発現の変化はタンパク質レベルの観察可能な変化を決してもたらさないかもしれない。タンパク質レベルの変化は必ずしも遺伝子発現の変化から生じるとは限らないという命題もまた真であり得る。ゲノムDNAから機能性タンパク質に至る経路中に6つの可能な調節箇所が存在する:(1)前mRNAの生成に至る、核因子及び他の信号による転写調節;(2)エクソンスプライシング、5'キャップ構造及び3'ポリ-アデニル化配列の付加並びに核から細胞質中への熟成mRNAの輸送を含む前mRNAプロセッシング調節;(3)タンパク質への翻訳のための、特定の細胞質部位へのmRNAの局在化を制御するmRNA輸送調節;(4)特定のmRNAからの任意のタンパク質翻訳の前にまたは翻訳の終了の手段としてmRNAプールのサイズを制御するmRNA分解調節;(5)タンパク質翻訳開始の特定の速度の翻訳調節;(6)グリコシル化及びタンパク質開裂のような修飾を含む翻訳後プロセッシング調節。ゲノム研究に関連して、この経路中の後の段階(例えばタンパク質レベル)ではなく初期の段階(例えばmRNAレベル)により近い遺伝子発現レベルを測定する技術を使用することが重要である。

30

【0012】

最近の報告は、cox-2遺伝子発現における変更において、薬草であるスキューテラリア・バイカレンシス(Scutellaria baicalensis)から単離されたフラボノイド類を関与させる可能性に取り組んでいる(Wakabayashi and Yasui (2000) Eur. J. Pharmacol. 406:477-481; Chen et al. (2001) Biochem. Pharmacol. 61:1417-1427; Chi et al. (2001) 61:1195-1203 and Raso et al. (2001) Life Sci. 68:921-931)。cox-2遺伝子発現に関して上記に引用された研究の各々は、ウェスタンブロット技術を使用して、分子レベルの実証無しで遺伝子発現における推定上の変更を評価した。この方法は、タンパク質レベルを測定するのみであり、特異的転写生成物であるmRNAを測定しないので、タンパク質発現の観察される増大に至る他の機構を含むことが可能である。例えば、LPSは、mRNAsの3'未翻訳領域(3'UTR)中に見い出される不安定性配列によってmRNA半減期を調節すると報告され(Watkins et al. (1999) Life Sci. 65:449-481)、これは遺伝子転写の速度の交互変化の無い増大したタンパク質発現を説明できた。従

40

50



って、これは、こうした治療条件は遺伝子発現の意味のある変化をもたらしたかどうかという疑問を残したままである。

【0013】

RT-qPCR及びDNAマイクロアレイ分析のような技術は、分析のためのmRNAレベルに依拠し、様々な条件下で、すなわち医薬品の存在下でまたは無い状態で遺伝子発現のレベルを評価するために使用することができる。文献には、遊離-B-環フラボノイド類またはフラバン類を治療剤として使用する場合に直接にまたは間接にmRNAの量を特異的に測定する技術を使用する既知の報告が存在しない。

【0014】

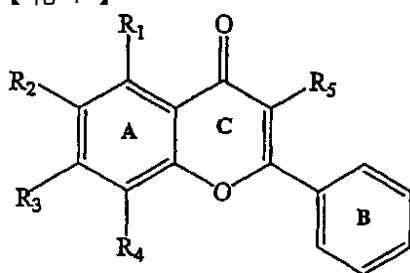
フラボノイド類は、天然物の広く分布する群である。フラボノイド類の摂取は、痴呆の発生の危険と逆に関連することが証明された。作用の機構は既知ではないが、フラボノイド類の抗酸化効果が原因であると推測されてきた(Commenges et al. (2000) Eur. J. Epidemiol. 16:357-363)。ポリフェノールフラボン類は、cox-2、核因子カッパB(NF- $\kappa$ B)及びbcl-X(L)を含む遺伝子上のmRNAレベルで作用することで形質転換結腸細胞におけるプログラム細胞死、分化及び成長阻害を誘発する(Wenzel et al. (2000) Cancer Res. 60:3823-3831)。B環上のヒドロキシル基の数は、cox-2転写活性の抑制において重要であると報告された(Mutoh et al. (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91:686-691)。

【0015】

遊離-B-環フラボン類及びフラボノールは特定のクラスのフラボノイド類であり、芳香族B環上に置換基を有せず(本明細書において遊離-B-環フラボノイド類と呼ぶ)、これは以下の一般的な構造によって示される：

【0016】

【化1】



【0017】

[式中、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、及び $R_5$ は独立して、-H、-OH、-SH、OR、-SR、-NH<sub>2</sub>、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、炭素、酸素、窒素または硫黄、アルドペントース、メチル-アルドペントース、アルドヘキソース、ケトヘキソース及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない単一のまたは多数の糖の組合せのグリコシドからなる群から選択され；

ここで、

Rは、1~10個の炭素原子を有するアルキル基であり；

Xは、ヒドロキシル、塩化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フッ化物、炭酸塩等が挙げられるがこれらに限定されるものではない薬学的に許容可能な対陰イオンの群から選択される。]

遊離-B-環フラボノイド類は比較的まれである。合成するかまたは天然源から単離された9,396種のフラボノイド類中、231種の遊離-B-環フラボノイド類のみが周知である(The Combined Chemical Dictionary, Chapman & Hall/CRC, Version 5:1 June 2001)。遊離-B-環フラボノイド類は多様な生理活性を有すると報告された。例えば、ガランギン(galangin)(3,5,7-トリヒドロキシフラボン)は抗酸化剤及びフリーラジカル捕捉剤として働き、抗遺伝子毒性及び癌の化学的予防の有望な候補であると

10

20

30

40

50

考えられている (Heo et al. (2001) *Mutat. Res.* 488:135-150)。抗菌剤活性 (Afolayan and Meyer (1997) *Ethnopharmacol.* 57:177-181) 及び抗ウイルス活性 (Meyer et al. (1997) *J. Ethnopharmacol.* 56:165-169) を有するのは、チロシナーゼモノフェノラーゼの阻害剤 (Kubo et al. (2000) *Bioorg. Med. Chem.* 8:1749-1755)、ウサギ心臓カルボニルレダクターゼの阻害剤 (Imamura et al. (2000) *J. Biochem.* 127:653-658) である。バイカレイン (Baicalein) 及び2つの他の遊離 - B - 環フラボノイド類は、ヒト乳癌細胞に対する抗増殖性活性を有する。(So et al. (1997) *Cancer Lett.* 112:127-133)。

#### 【0018】

典型的に、フラボノイド類は、その利用可能性に基づいて、活性に関して無作為に試験された。時々、B - 環上の置換の要件が、特定の生理活性、例えば p - 糖タンパク質に対する高親和性結合にとって必要な B - 環置換 (Boumendjel et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:75-77) ; 強心効果 (Itoigawa et al. (1999) *J. Ethnopharmacol.* 65:267-272)、リノール酸ヒドロペルオキシド誘発毒性に対し内皮細胞に及ぼす保護効果 (Kaneko and Baba (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:323-328)、COX - 1 阻害活性 (Wang (2000) *Phytomedicine* 7:15-19) 及びプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ活性 (Kalkbrenner et al. (1992) *Pharmacology* 44:1-12) のために重要視された。幾つかの発表のみが、遊離 - B - 環フラボノイド類の未置換 B - 環の重要性について言及した。1例は、NADPHキノンアクセプターオキシドレダクターを阻害する2 - フェニルフラボン類の潜在的な抗凝血薬としての使用である (Chen et al. (2001) *Biochem. Pharmacol.* 61:1417-1427)。

#### 【0019】

様々な遊離 - B - 環フラボノイド類の抗炎症活性に関して報告された作用の機構は議論的となった。遊離 - B - 環フラボノイド類であるクリシン (Liang et al. (2001) *FEBS Lett.* 496:12-18)、ウォゴニン (wogonin) (Chi et al. (2001) *Biochem. Pharmacol.* 61:1195-1203) 及びハランギン (halangin) (Raso et al. (2001) *Life Sci.* 68:921-931) の抗炎症活性は、ペルオキシソーム - 増殖剤活性化受容体ガンマ (PPAR $\gamma$ ) の活性化による誘発可能なシクロオキシゲナーゼ及び一酸化窒素合成酵素の抑制並びに脱顆粒及びAA放出に及ぼす影響に関連づけられた (Tordera et al. (1994) *Z. Naturforsch [C]* 49:235-240)。オロキシリン (oroxylin)、バイカレイン及びウォゴニンは、シクロオキシゲナーゼに影響することなしに12 - リポキシゲナーゼ活性を阻害すると報告された (You et al. (1999) *Arch. Pharm. Res.* 22:18-24)。より最近、ウォゴニン、バイカリン (baicalin) 及びバイカレインの抗炎症活性は、一酸化窒素阻害剤及びリポ多糖によって誘発される誘発可能な一酸化窒素合成酵素及びcox - 2 酵素生成の阻害によって起きるとして報告された (Chen et al. (2001) *Biochem. Pharmacol.* 61:1417-1427)。またオロキシリンはNF $\kappa$ B 活性化の抑制によって作用すると報告された (Chen et al. (2001) *Biochem. Pharmacol.* 61:1417-1427)。最後に、ウォゴニンは、報告によると、マクロファージ中の誘発可能なPGE $_2$  生成を阻害する (Wakabayashi and Yasui (2000) *Eur. J. Pharmacol.* 406:477-481)。

#### 【0020】

バイカレインによるマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) のリン酸化の阻害及びCa $^{2+}$ イオノホアA23187誘発PGE $_2$ 放出の阻害は、スキューテラリアエ・ラディックス (*Scutellaria eradix*) の抗炎症活性の機構として報告された (Nakahata et al. (1999) *Nippon Yakurigaku Zasshi* 114, Supp. 11:215P-219P, Nakahata et al. (1998) *Am. J. Chin. Med.* 26:311-323)。スキューテラリア・バイカレンシスから得られるバイカリンは、報告によると、超抗原ブドウ球菌エキソトキシン刺激T - 細胞増殖並びにIL - 1、IL - 6、腫瘍壊死因子 - (TNF - )、及びインターフェロン - (IFN - ) の生成を阻害する (Krakauer et al. (2001) *FEBS Lett.* 500:52-55)。従って、バイカリンの抗炎症活性は、超抗原によって活性化された親炎症性サイトカイン仲介シグナリング経路を阻害することに関連づけられた。しかしながら、バイカリン

10

20

30

40

50

の抗炎症活性は、その生理活性を制限する様々なケモカイン類の結合が原因であると提案された (Li et al. (2000) Immunopharmacol. 49:295-306)。最近、トロンピン及びトロンピン受容体アゴニストペプチドによって誘発される接着分子発現にバイカリンが及ぼす影響 (Kimura et al. (2001) Planta Med. 67:331-334)、並びに、M A P Kカスケードの阻害 (Nakahata et al. (1999) Nippon Yakurigaku Zasshi 114, Supp 11:215P-219P; Nakahata et al. (1998) Am. J. Chin Med.26:311-323) が報告された。

#### 【 0 0 2 1 】

中国産の薬用植物であるスキューテラリア・バイカレンシスは、バイカレイン、バイカリン、ウォゴニン及びバイカレノシド (baicalenoside) を含むかなりの量の遊離 - B - 環フラボノイド類を含む。従来、この植物を使用して、熱の除去、発熱の除去、湿気 - 温暖及び夏季熱症候群；高熱から生じる煩渴多飲症；カルブンケル、痛み及び他の化膿性皮膚感染；上気道感染の例えば急性扁桃炎、咽頭炎及び猩紅熱；ウイルス性肝炎；腎炎；ペルピティス；赤痢；吐血及び鼻出血を含む多数の状態を治療した。またこの植物を従来を使用して、流産を予防した (Encyclopedia of Chinese Traditional Medicine, ShangHai Science and Technology Press, ShangHai, China, 1998を参照されたい)。臨床的には、現在スキューテラリアを使用して、小児肺炎、小児細菌性下痢、ウイルス性肝炎、急性胆嚢炎症、高血圧、切り傷及び手術から生じる局所急性炎、気管支喘息及び上気道感染のような状態を治療している (Encyclopedia of Chinese Traditional Medicine, ShangHai Science and Technology Press, ShangHai, China, 1998)。気管支喘息を治療するためのスキューテラリアの根の薬理的効力は、報告によると、遊離 - B - 環フラボノイド類の存在及び好酸球の補充に関連するエオタキシンの抑制に関連する (Nakajima et al. (2001) Planta Med.67(2):132-135)。

#### 【 0 0 2 2 】

現在まで、多数の天然に存在する遊離 - B - 環フラボノイド類が様々な使用のために商品化された。例えば、スキューテラリア抽出物のリポソーム製剤は皮膚ケアのために利用された (米国特許第5,643,598号；同第5,443,983号)。バイカリンは、癌遺伝子に及ぼすその阻害効果が理由となって癌を予防するために使用された (米国特許第6,290,995号)。バイカリン及び他の化合物は、抗ウイルス、抗菌性及び免疫調節剤として (米国特許第6,083,921号) 並びに天然の抗酸化剤として (ポーランド国特許第9,849,256号) 使用された。クリシンはその不安低減特性のために使用された (米国特許第5,756,538号)。抗炎症フラボノイド類は、直腸及び結腸疾患の制御及び治療 (米国特許第5,858,371号) 並びにリポキシゲナーゼの阻害 (米国特許第6,217,875号) のために使用される。またこうした化合物を、結合組織の修復及び維持のためにグルコサミンコラーゲン及び他の成分と共に製剤化する (米国特許第6,333,304号)。フラボノイドエステルは、化粧品組成物のための活性成分を構成する (米国特許第6,235,294号)。2002年3月1日に出願された "Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2 inhibitors" と称する米国特許出願第10/091,362号は、遊離 - B - 環フラボノイドを含む組成物または遊離 - B - 環フラボノイド類の混合物を含む組成物をこれを必要とする受容者に投与することによってシクロオキシゲナーゼ酵素 COX - 2 を阻害する方法を開示している。これは、遊離 - B - 環フラボノイド類と COX - 2 阻害活性との間の関連に関する最初の報告である。この出願を、特に本明細書において、参考のためにその全体を引用する。

#### 【 0 0 2 3 】

日本国特許第63027435号はバイカレインの抽出及び富化を説明しており、日本国特許第61050921号はバイカリンの精製を説明している。

フラバン類は、以下の一般的な構造によって示される化合物を含む：

#### 【 0 0 2 4 】

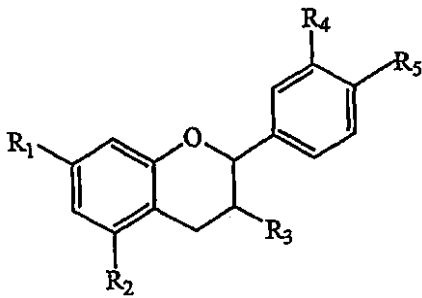
10

20

30

40

## 【化2】



## 【0025】

[ 式中、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> 及び R<sub>5</sub> は独立して、-H、-OH、-SH、-OCH<sub>3</sub>、-SCH<sub>3</sub>、-OR、-SR、-NH<sub>2</sub>、-NRH、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、没食子酸エステル、酢酸エステル、シナモイル及びヒドロキシル-シナモイルエステル、トリヒドロキシベンゾイルエステル及びカフェオイルエステル、及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない言及された置換基のエステル；アルドペントース、メチルアルドペントース、アルドヘキソース、ケトヘキソース及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない単一のまたは多数の糖の組合せの炭素、酸素、窒素または硫黄グリコシド；ダイマー、トリマー及び他の重合フラバン類；からなる群から選択され；

ここで、

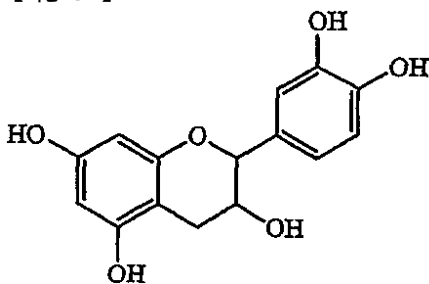
R は、1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルキル基であり；

X は、ヒドロキシル、塩化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フッ化物、及び炭酸塩等が挙げられるがこれらに限定されるものではない薬学的に許容可能な対陰イオンの群から選択される。]

カテキンは、主にアカシア中に見い出され、以下の構造を有するフラバンである。

## 【0026】

## 【化3】



カテキン

## 【0027】

カテキンは、単独で及び茶に見い出される他のフラボノイド類と共にの両方で作用し、抗ウイルス活性及び抗酸化剤活性の両方を有する。カテキンは、ウイルス性肝炎の治療の際に有効であることが示された。これはまた、心臓、腎臓、肺及び脾臓に対する酸化的損傷を予防するようであり、胃癌細胞の増殖を阻害することが示された。

## 【0028】

カテキン及びその異性体であるエピカテキンは、プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼを IC<sub>50</sub> 値 40 μM で阻害する。(Kalkbrenner et al. (1992) Pharmacol. 44:1-12)。(+) - カテキン及びガロカテキンを含む 5 つのフラバン - 3 - オール誘導体は、4 つの植物種、アツナ・ラセモサ (Atuna racemosa)、シジギウム・カリノカルプム (Syzygium carynocarpum)、シジギウム・マラッセンス (Syzygium malaccense) 及びバンタネア・ペルビアナ (Vantanea perviana) から単離され、COX - 1 と比較して、COX - 2 に対して IC<sub>50</sub> 値 3.3 μM ~ 138 μM の範囲にわたる等しいかまたはよ

10

20

30

40

50

り弱い阻害活性を示す (Noreen et al. (1998) *Planta Med.* 64:520-524)。 (+) - カテキンは、セイバ・ペンタンドラ (*Ceiba pentandra*) の樹皮から単離され、COX - 1 を  $IC_{50}$  値  $80 \mu M$  で阻害する (Noreen et al. (1998) *J. Nat. Prod.* 61:8-12)。市販の純粋な (+) - カテキンは、COX - 1 を実験条件に依存して  $IC_{50}$  値約  $183 \sim 279 \mu M$  で阻害し、COX - 2 に対する選択性はない (Noreen et al. (1998) *J. Nat. Prod.* 61:1-7)。

#### 【0029】

緑茶カテキンをスプレグ・ドーリー雄性ラットの食餌中に補った場合に、血小板  $PLA_2$  の活性レベルを低下させ、血小板シクロオキシゲナーゼレベルを有意に低減した (Yang et al. (1999) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 45:337-346)。カテキン及びエピカテキンは、報告によると、ヒト結腸癌 DLD - 1 細胞において  $cox - 2$  遺伝子転写を弱く抑制する ( $IC_{50} = 415.3 \mu M$ ) (Mutoh et al. (2000) *Jpn. J. Cancer Res.* 91:686-691)。赤葡萄酒から得られる (+) - カテキンの神経保護能力は、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼまたは一酸化窒素合成酵素のような細胞内酵素に及ぼす阻害効果ではなく、カテキンの抗酸化剤特性から生じる (Bastinanetto et al. (2000) *Br. J. Pharmacol.* 131:711-720)。緑茶及び紅茶から精製されたカテキン誘導体の例えばエピガロカテキン - 3 - ガラート (EGCG)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキン - 3 - ガラート (ECG) 及びテアフラビンは、ヒト結腸粘膜及び結腸腫瘍組織における AA のシクロオキシゲナーゼ - 及びリポキシゲナーゼ - 依存性代謝の阻害 (Hong et al. (2001) *Biochem. Pharmacol.* 62:1175-1183) 並びに誘発  $cox - 2$  遺伝子発現及び  $PG E_2$  生成 (Park et al. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286:721-725) を示した。セラツルス・オルビクラツス (*Celastrus orbiculatus*) の気生部分 (aerial part) から単離されるエピアフゼレチン (Epiaphzelechin) は、 $IC_{50}$  値  $15 \mu M$  で COX - 1 活性の用量依存性阻害を示し、また用量  $100 mg/kg$  での経口投与後のカラゲーニン誘発マウス脚浮腫に対する抗炎症活性を証明した (Min et al. (1999) *Planta Med.* 65:460-462)。

#### 【0030】

様々な植物源から、特に緑茶茶葉から得られるカテキン及びその誘導体は、HPV 感染尖形コンジローマの治療において (Cheng、米国特許第 5,795,911 号) 及び乳頭腫ウイルスによって引き起こされる過形成の治療において (Cheng、米国特許第 5,968,973 号及び同第 6,197,808 号) 使用された。またカテキン及びその誘導体は、哺乳類組織において脈管形成を阻害するために、皮膚癌、乾癬、クモ状静脈または目の下のくまのような状態において (Anderson、米国特許第 6,248,341 号)、マウスにおける UVB 誘発腫瘍発生に対して (Agarwal et al. (1993) *Photochem. Photobiol.* 58:695-700)、遺伝子発現のレベルで一酸化窒素合成酵素及び酵素活性を阻害するために (Chan、米国特許第 5,922,756 号)、毛髪成長剤として (Takahashi、米国特許第 6,126,940 号) 局所使用された。カテキンに基づく組成物はまた、ざ瘡の治療のために (Murad、米国特許第 5,962,517 号)、消化器の組織を硬化し (Shi、米国特許第 5,470,589 号)、アンドロゲン障害関連疾患及び癌を治療する際に 5 アルファ - レダクターゼ活性を阻害するために (Liao、米国特許第 5,605,929 号) 他の抽出物及びビタミンと共に製剤化された。緑茶抽出物は、COX - 2 酵素を阻害することで炎症を低減するために、特定の活性成分のいずれも特定せずに 7 つの他の植物抽出物と共に製剤化された (Mewmark、米国特許第 6,264,995 号)。

#### 【0031】

アカシアはマメ科の高木及び低木の属である。アカシア属は、レグミノサエ (*Legumino sae*) の科及びミノソイデアエ (*Mimosoideae*) の亜科に属する 1,000 種を超えるものを含む。アカシアは、中央及び南アメリカ、アフリカ、アジアの一部、並びに、最大数の固有種を有するオーストラリアの熱帯及び亜熱帯区域のような場所で世界中に分布する。アカシアは主に乾燥した領域に存在し、ここでは森林はしばしばまばらなとげの多い低木の性質である。アカシア属は、主に葉の形態に基づいて 3 つの亜属に分類され、これはすなわちアカシア、アクリフェルム (*Aculiferum*) 及びヘテロフィルム (*Heterophyllu*

10

20

30

40

50

m)である。しかしながら、成木の葉の性質に基づいて、アカシア属は2つの“普及した”群に分類でき、これはすなわち典型的な二回羽状種及び偽葉種である。偽葉は、拡張して、小葉のない葉様構造になる変性した葉柄であり、乾生条件に適応している。典型的な二回羽状種は主に熱帯全体にわたって見い出されるが、偽葉種は主にオーストラリアに見られる。40種を超えるアカシアがインドにおいて報告された。ギャンブル(Gamble)はFlora of Madras Presidencyと称する自書においてインド南部に関して23の自生種を列記しており、この15はタミール・ナドゥにおいて見い出される。しかしながら、この時以来、多くの新たなアカシア種がインドに導入され、現在約40種がタミール・ナドゥ自体において見い出される。固有種は主に、とげの多い高木または低木であり、幾つかはとげの多い迷い出た枝があり、例えばA.カエシア(A. caesia)、A.ペンナタ(A. pinnata)及びA.シヌアタ(A. sinuata)である。多くの種がアフリカ及びオーストラリアから導入され、こうしたものとしてはA.メアルンシイ(A. mearnsii)、A.ピクナンタ(A. picnantha)及びA.デアアルバタ(A. dealbata)(二回羽状葉を有する)、並びにA.アウリクリフォルミス(A. auriculiformis)、A.ホロセレシア(A. holosericea)及びA.マンギウム(A. mangium)(偽葉種である)が挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0032】

アカシアは経済的に非常に重要であり、タンニン、ガム、木材、燃料及び飼料の源を提供する。タンニンは、主に樹皮から単離され、原皮のなめしのために広範囲にわたって使用されている。また幾つかのアカシア樹皮は地酒を着香するために使用される。またA.シヌアタのような幾つかの固有種はサポニン類を与え、これは水と混合し、攪拌した場合にせっけんの泡を形成する任意の様々な植物グルコシドである。サポニン類は、洗剤、泡立て剤及び乳化剤において使用される。幾つかのアカシア種の花は芳香があり、香料を製造するために使用される。例えば、カッシエ香料は、A.フェルゲネア(A. ferruginea)から得られる。多くのアカシアの心材は農業器具を製造するために使用され、また薪の源を提供する。アカシアガムは、薬剤及び菓子製造において並びにサイズ材料及び仕上げ材料として繊維工業において広範囲にわたって使用されている。ラックカイガラムシは、A.ニロティカ(A. nilotica)及びA.カテキュー(A. catechu)を含む幾つかの種上で成長できる。A.ニロティカを含む幾つかの種は荒地の造林のために使用され、これは若干の湛水に耐えることができ、幾つかのこのような区域は鳥類保護区域になった。

#### 【0033】

現在まで、約330の化合物が様々なアカシア種から単離された。フラボノイド類は、あるタイプの水溶性植物顔料であり、アカシアから単離された主要なクラスの化合物である。約180の異なるフラボノイド類が特定され、この111はフラバン類である。テルペノイド類は、アカシア属の種から単離された2番目に大きなクラスの化合物であり、48の化合物が特定された。アカシアから単離された他のクラスの化合物は、アルカロイド(28)、アミノ酸/ペプチド(20)、タンニン(16)、炭水化物(15)、酸素複素環(15)及び脂肪族化合物(10)を含む。(Buckingham, in The Combined Chemical Dictionary, Chapman & Hall CRC, version 5:2, Dec. 2001)。

#### 【0034】

フェノール化合物、特にフラバン類は中～高濃度で全てのアカシア種中に見い出される(Abdulrazak et al. (2000) J. Anim. Sci. 13:935-940)。歴史的に、アカシア属の植物及び抽出物の大部分は、収斂薬として、消化管障害、下痢、消化不良を治療するために及び出血を止めるために利用された(Vautrin (1996) Universite Bourgogne (France) European abstract 58-01C:177; Saleem et al. (1998) Hamdard Midicus. 41:63-67)。A.アラビカ・ワイルド.(A. arabica Willd.)の樹皮及びさやは多量のタンニンを含み、収斂薬及び去痰薬として利用された(Nadkarni (1996) India Materia Medica, Bombay Popular Prakashan, pp.9-17)。ジアリールプロパノール誘導体は、ソマリア産のA.トーティリス(A. tortilis)の茎樹皮から単離され、平滑筋弛緩効果を有すると報告された(Hagos et al. (1987) Planta Med. 53:27-31,1987)。またテルペノイドサポニン類は、A.ビクトリアエ(A. victoriae)から単離され、ジメチルベンズ(a)アント

ラセン誘発ネズミ皮膚発癌に及ぼす阻害効果を有し (Hanausek et al. (2000) Proc. Am. Assoc. Can. Res. Annu. Mtg. 41:663)、アポトーシスを誘発する (Haridas et al. (2000) Proc. Am. Assoc. for Can. Res. Annu. Mtg. 41:600) と報告された。A . ニロティカから得られる植物抽出物は、痙攣発生、血管収縮薬及び抗高血圧活性 (Amos et al. (1999) Phytotherapy Research 13:683-685; Gilani et al. (1999) Phytotherapy Research 13:665-669)、並びに抗血小板凝集活性 (Shah et al. (1997) Gen. Pharmacol. 29: 251-255) を有すると報告された。抗炎症活性が A . ニロティカに関して報告された。フラボノイド類、多糖類及び有機酸は潜在的な活性成分であると推測された (Dafallah and Al-Mustafa (1996) Am. J. Chin. Med. 24:263-269)。現在まで、アカシアから単離された唯一の報告された 5 - リポキシゲナーゼ阻害剤は、モノテルペノイダルカルボキサミドである (Seikine et al. (1997) Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 45:148-11)。

10

#### 【 0 0 3 5 】

アカシアガムは、活性成分のいずれも特定せずに他の植物成分と共に製剤化され、潰瘍を予防するために使用された (Fuisz、米国特許第5,651,987号)。またアカシアガムは、他の植物成分と共に製剤化され、栄養組成物の粘度を低下させることで (Chancellor、米国特許第5,545,411号)、薬物溶解を改良するために使用された (Blank、米国特許第4,946,684号)。

#### 【 0 0 3 6 】

アカシアの樹皮から得られる抽出物は日本において外用に増白剤として (Abe、JP10025238)、歯科用途にグルコシルトランスフェラーゼ阻害剤として (Abe、JP07242555)、タンパク質合成阻害剤として (Fukai、JP07165598)、外用皮膚製剤のための活性酸素捕捉剤として (Honda、JP07017847、Bindra、米国特許第6,1266,950号)、炎症、花粉症及び咳を予防するための経口消費のためのヒアルロニダーゼ阻害剤として (Ogura、JP07010768) 特許化された。

20

#### 【 0 0 3 7 】

文献を検討して、疼痛の緩和のために遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を使用するかまたは変形性関節症治療のために生化学的臨床結果を測定するヒトへの臨床適用がないことが明らかになった。この報告は、ヒトにおけるこうした化合物の安全及び効力に関する最初の無作為化二重盲検プラセボ対照研究であると思われる。

#### 【 発明の開示 】

30

#### 【 0 0 3 8 】

本発明は、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物で構成される新規な組成物を含む。この新規な組成物を本明細書においてユニベスチン<sup>T M</sup> (UNIVESTIN<sup>T M</sup>) と呼ぶ。本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、特定の疾患または状態の予防及び治療に関する徴候及び特定の要件に基づいて調節できる。一般に、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類 ~ 1 : 99の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80及び10 : 90からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の比は約85 : 15である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

40

#### 【 0 0 3 9 】

本発明はさらに、COX - 2及び5 - LO酵素の両方を同時に阻害する際に有効な方法を含む。COX - 2及び5 - LO経路の同時二重阻害の方法は、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む組成物を、これを必要とする受容者に投与することで構成される。この方法の効力を、精製された酵素を用いて、様々な細胞系において、多数の動物モデル及び最

50

最終的にヒトへの臨床研究において証明した。本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類 ~ 1 : 99の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80及び10 : 90からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の比は約85 : 15である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

10

## 【0040】

本発明はさらに、生理痛、動脈硬化症、心臓発作、肥満症、糖尿病、症候群X、アルツハイマー病、呼吸器アレルギー反応、慢性静脈不全、痔核、全身性エリテマトーデス、乾癬、慢性緊張性頭痛、片頭痛、炎症性腸疾患；ウイルス、細菌及び真菌によって引き起こされる局所感染、日やけ、熱傷、接触性皮膚炎、メラノーマ並びに癌が挙げられるがこれらに限定されるものではないCOX - 2及び5 - LO仲介疾患及び状態の予防及び治療の方法を含む。COX - 2及び5 - LO仲介疾患及び状態を予防し、治療する方法は、これを必要とする受容者に、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を薬学的に許容可能なキャリアと一緒に投与することで構成される。遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類 ~ 1 : 99の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80及び10 : 90からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の比は約85 : 15である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

20

## 【0041】

別の具体例においては、本発明は、一般的な関節の疼痛及びこわばりを治療し、可動性及び身体的機能を改良し、変形性関節症及び慢性関節リウマチの病理学的状態を予防し、治療する方法を含む。関節の疼痛及びこわばりを予防し、治療し、可動性及び身体的機能を改良し、変形性関節症、及び慢性関節リウマチの病理学的状態を予防し、治療する方法は、これを必要とする受容者に、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を薬学的に許容可能なキャリアと一緒に投与することを含む。遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1 ~ 1 : 99の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80及び10 : 90からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の比は約85 : 15である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

30

40

## 【0042】

本発明は、可動性、可撓性及び身体的機能を改良することから生じる増大した活動性による体重減少及び血糖制御の方法を含み、該方法は、これを必要とする受容者に、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物及び薬学的に許容可能なキャリアを投

50



与することを含む。遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1 の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類 ~ 1 : 99 の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 及び 10 : 90 からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の比は約 85 : 15 である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

【0043】

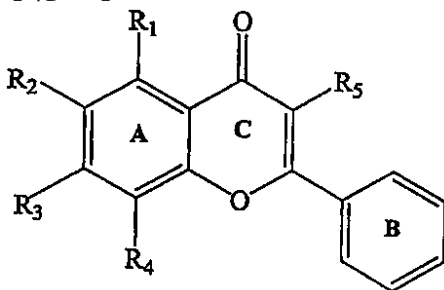
本発明はまた、疼痛経路に關与する mRNA の生成を調節する方法を含み、該方法は、これを必要とする受容者に、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物及び薬学的に許容可能なキャリアを投与することを含む。理論によって限定されるものではないが、出願人は、mRNA の生成を調節する能力は、cox - 2 遺伝子によるが cox - 1 遺伝子によらない mRNA の生成において遊離 - B - 環 / フラバン組成物中の活性成分による減少によって成し遂げられると考えている。本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1 ~ 1 : 99 の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 及び 10 : 90 からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の比は約 85 : 15 である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

【0044】

以下の発明に従って使用できる遊離 - B - 環フラボノイド類（また本明細書において遊離 - B - 環フラボン類及びフラボノールと呼ぶ）は、以下の一般的な構造によって示される化合物を含む：

【0045】

【化4】



【0046】

[式中、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、及びR<sub>5</sub>は独立して、-H、-OH、-SH、OR、-SR、-NH<sub>2</sub>、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、炭素、酸素、窒素または硫黄、アルドペントース、メチル - アルドペントース、アルドヘキソース、ケトヘキソース及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない単一のまたは多数の糖の組合せのグリコシドからなる群から選択され；

ここで、

Rは、1 ~ 10 個の炭素原子を有するアルキル基であり；

Xは、ヒドロキシル、塩化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フッ化物、炭酸塩等が挙げられるがこれらに限定されるものではない薬学的に許容可能な対陰イオンの群

10

20

30

40

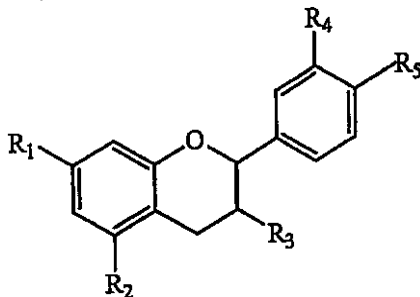
50

から選択される。]

以下の発明に従って使用できるフラバン類は、以下の一般的な構造によって示される化合物を含む：

【0047】

【化5】



10

【0048】

[式中、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>は独立して、-H、-OH、-SH、-OCH<sub>3</sub>、-SCH<sub>3</sub>、-OR、-SR、-NH<sub>2</sub>、-NRH、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、没食子酸エステル、酢酸エステル、シンナモイル及びヒドロキシル-シンナモイルエステル、トリヒドロキシベンゾイルエステル及びカフェオイルエステル、及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない言及された置換基のエステル；アルドペントース、メチルアルドペントース、アルドヘキソース、ケトヘキソース及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない単一のまたは多数の糖の組合せの炭素、酸素、窒素または硫黄グリコシド；ダイマー、トリマー及び他の重合フラバン類；からなる群から選択され；

20

ここで、

Rは、1～10個の炭素原子を有するアルキル基であり；

Xは、ヒドロキシル、塩化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フッ化物、及び炭酸塩等が挙げられるがこれらに限定されるものではない薬学的に許容可能な対陰イオンの群から選択される。]

30

本発明の遊離-B-環フラボノイド類は、合成法によって得るかまたはアンノナセアエ(Annonaceae)、アステラセアエ(Asteraceae)、ビグノニアセアエ(Bignoniaceae)、コムブレタセアエ(Combretaceae)、コンポシタエ(Compositae)、エウフォルビアセアエ(Euphorbiaceae)、ラビアタエ(Labiatae)、ラウランセアエ(Lauranceae)、レグミノサエ、モラセアエ(Moraceae)、ピナセアエ(Pinaceae)、プテリダセアエ(Pteridaceae)、シノプテリダセアエ(Sinopteridaceae)、ウルマセアエ(Ulmaceae)及びジンギベラセアエ(Zingiberaceae)が挙げられるがこれらに限定されるものではない植物の科から抽出してよい。遊離-B-環フラボノイド類は、デスモス(Desmos)、アキロクリン(Achyrocline)、オロキシルム(Oroxylum)、ブチェナビア(Buchenavia)、アナファリス(Anaphalis)、コツラ(Cotula)、グナファリウム(Gnaphalium)、ヘリクリスム(Helichrysum)、セントウレア(Centaurea)、エウパトリウム(Eupatorium)、バックカリス(Baccharis)、サピウム(Sapium)、スキューテラリア、モルサ(Molsa)、コレブローケア(Colebrookea)、スタキス(Stachys)、オリガヌム(Origanum)、ジジフォラ(Ziziphora)、リンデラ(Lindera)、アクチノダフネ(Actinodaphne)、アカシア、デリス(Derris)、グリシルヒザ(Glycyrrhiza)、ミレッチア(Millettia)、ポンガミア(Pongamia)、テフロシア(Tephrosia)、アルトカルプス(Artocarpus)、フィクス(Ficus)、ピティログラマ(Pityrogramma)、ノトラエナ(Notholaena)、ピヌス(Pinus)、ウルムス(Ulmus)及びアルピニア(Alpinia)が挙げられるがこれらに限定されるものではない高等植物の属から抽出し、濃縮し、精製することができる。

40

【0049】

上記に言及したように、本発明のフラバン類は、アカシアの属から選択される単数また

50

は複数の植物から得てよい。好適な具体例においては、植物は、アカシア・カテキュー、  
A．コンシナ (A. concinna)、A．ファルネシアナ (A. farnesiana)、A．セネガル (A. Senegal)、  
A．スペシオサ (A. speciosa)、A．アラビカ、A．カエシア、A．ペンナタ、A．シヌアタ、  
A．メアルンシイ、A．ピクナンタ、A．デアルパタ、A．アウリクリフォルミス、  
A．ホロセレシア及びA．マンギウムからなる群から選択される。

【0050】

本発明は、製剤を最適化し、最良の効力を得るために酵素及びインビボモデルを使用した、遊離 - B - 環フラボノイド類及びフラバン類の様々な組成物の評価を含む。またこの製剤の効力及び安全は、ヒトへの臨床研究において証明される。本発明は、望ましい生理学的活性を有する組成物を与えるために、アカシアフラバン類及び遊離 - B - 環フラボノイド類を単離、精製し、組み合わせる工業的に実行可能な方法を提供する。本発明の組成物は、当業者には周知の任意の方法によって投与できる。投与のモードとしては、経腸 (経口) 投与、非経口 (静脈内、皮下、及び筋肉内) 投与及び局所適用が挙げられるがこれらに限定されるものではない。本発明に従って治療する方法は、これを必要とする患者に、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との治療上有効な量の混合物を内服または局所で投与することを含む。

10

【0051】

前述の一般的な説明及び以下の詳細な説明の両方は模範例であって、説明とするのみであり、請求される本発明を制限するものではないことは理解できるはずである。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0052】

本明細書において様々な用語を使用して本発明の態様に言及する。本発明の構成要素の説明の解明を助けるために以下の定義を提供する。

“ある”物質という用語は、この物質のうちの1つ以上を指し、例えば、フラボノイドは1つ以上のフラボノイド類を指すことに注意されたい。従って、“ある”、“1つ以上の”及び“少なくとも1つの”という用語は、本明細書において互換性がある。

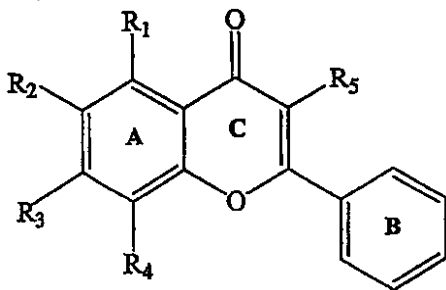
【0053】

本明細書において使用する“遊離 - B - 環フラボノイド類”は特定のクラスのフラボノイド類であり、芳香族B環上に置換基を有せず、これは以下の一般的な構造によって示される：

30

【0054】

【化6】



40

【0055】

[式中、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、及びR<sub>5</sub>は独立して、-H、-OH、-SH、OR、-SR、-NH<sub>2</sub>、-NHR、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、炭素、酸素、窒素または硫黄、アルドペントース、メチル-アルドペントース、アルドヘキソース、ケトヘキソース及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない単一のまたは多数の糖の組合せのグリコシドからなる群から選択され；

ここで、

Rは、1～10個の炭素原子を有するアルキル基であり；

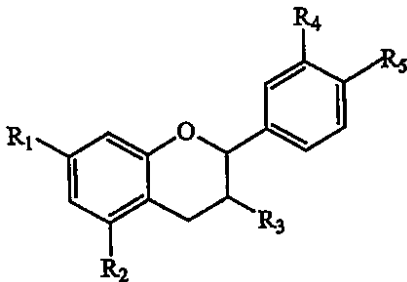
50

Xは、ヒドロキシル、塩化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フッ化物、炭酸塩等が挙げられるがこれらに限定されるものではない薬学的に許容可能な対陰イオンの群から選択される。]

“フラバン類”は、以下の一般的な構造で一般に表すことができる特定のクラスのフラボノイド類である：

【0056】

【化7】



10

【0057】

[式中、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>は独立して、-H、-OH、-SH、-OCH<sub>3</sub>、-SCH<sub>3</sub>、-OR、-SR、-NH<sub>2</sub>、-NRH、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、没食子酸エステル、酢酸エステル、シンナモイル及びヒドロキシル-シンナモイルエステル、トリ  
20  
ヒドロキシベンゾイルエステル及びカフェオイルエステル、及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない置換基のエステル；アルドペントース、メチルアルドペントース、アルドヘキソース、ケトヘキソース及びその化学的誘導体が挙げられるがこれらに限定されるものではない単一のまたは多数の糖の組合せの炭素、酸素、窒素または硫黄グリコシド；ダイマー、トリマー及び他の重合フラバン類；からなる群から選択され；

ここで、

Rは、1～10個の炭素原子を有するアルキル基であり；

Xは、ヒドロキシル、塩化物、ヨウ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フッ化物、及び炭酸塩等が挙げられるがこれらに限定されるものではない薬学的に許容可能な対陰イオ  
30  
ンの群から選択される。]

“遺伝子発現”は、遺伝子からmRNAへの転写を指す。

【0058】

“タンパク質発現”は、mRNAからタンパク質への翻訳を指す。

“RT-qPCR”は、mRNA分子をcDNA分子に逆転写(RT)し、次に遺伝子発現のレベルを、蛍光レポーターと組み合わせたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)使用して定量的に評価する方法である。

【0059】

本明細書において使用する“治療上の”は、治療及び/または予防を含む。使用する場合に、治療上のは、ヒト並びに他の動物に当てはまる。

40

“薬学的にまたは治療上有効な用量または量”は、所望の生物学的結果を誘発するのに十分な用量レベルを指す。この結果は、疾患若しくは望ましい生体系の任意の他の変更の徴候、症状または原因の軽減としてよい。

【0060】

“プラセボ”は、疾患の徴候、症状または原因の軽減するかもしれない所望の生物学的製剤を誘導するのに十分な薬学的にまたは治療上有効な用量または量を非活性物質で置き換えることを指す。

【0061】

“受容者”または“患者”は、本明細書において説明する組成物が投与される生体、ヒトまたは動物である。

50

本出願全体にわたって様々な引用が提供されることに注意されたい。各引用を特に本明細書において参考のためにその全体を引用する。

【0062】

本発明は、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物で構成される新規な組成物を含む。この新規な組成物を本明細書においてユニベスチン<sup>T M</sup>と呼ぶ。本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、特定の疾患または状態の予防及び治療に関する徴候及び特定の要件に基づいて調節できる。一般に、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類 ~ 1 : 99の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80及び10 : 90からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の比は約85 : 15である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

10

【0063】

本発明の1具体例においては、実施例5、7及び13 ; 表5、7、8及び9並びに図3において定義するように、標準化遊離 - B - 環フラボノイド抽出物は、純度1 ~ 99% (重量で)の総遊離 - B - 環フラボノイド類を有する活性化合物で構成される。バイカリンは、総遊離 - B - 環フラボノイド類の約50 ~ 90% (重量で)を占める、抽出物中の主要な活性成分である。好適な具体例においては、標準化抽出物は > 70%の総遊離 - B - 環フラボノイド類を含み、遊離 - B - 環フラボノイド類の > 75%はバイカリンである。

20

【0064】

1具体例においては、実施例8、9及び12 ; 表4、6及び9並びに図9において定義するように、標準化フラバン抽出物は、純度1 ~ 99% (重量で)の総フラバン類を有する活性化合物で構成される。カテキンは、抽出物中の主要な活性成分であり、総フラバン類の約50 ~ 90% (重量で)を占める。好適な具体例においては、標準化フラバン抽出物は > 50%の総フラバン類を含み、フラバン類の > 70%はカテキンである。

【0065】

1具体例においては、ユニベスチン<sup>T M</sup>は、上記の2つの抽出物または合成化合物を99 : 1 ~ 1 : 99の比で混合することで製造される。実施例14において定義するように、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の好ましい比は85 : 15の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類である。

30

【0066】

ユニベスチン<sup>T M</sup>中の遊離 - B - 環フラボノイド類の濃度は約1% ~ 99%とすることができ、ユニベスチン<sup>T M</sup>中のフラバン類の濃度は99% ~ 1%とすることができる。本発明の好適な具体例においては、ユニベスチン<sup>T M</sup>中の総遊離 - B - 環フラボノイド類の濃度は約75%であり、バイカリン含量はユニベスチン<sup>T M</sup>の総重量の約60%であり ; ユニベスチン<sup>T M</sup>中の総フラバン類の濃度は約10%であり、カテキン含量約9%である。この具体例においては、ユニベスチン<sup>T M</sup>中の総活性成分 (遊離 - B - 環フラボノイド類プラスフラバン類)は総重量の > 80%である。

40

【0067】

本発明はまた、COX - 2及び5 - LO酵素の両方を同時に阻害する際に有効な方法を含む。COX - 2及び5 - LO経路の同時二重阻害の方法は、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む組成物を、これを必要とする受容者に投与することで構成される。本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類 ~ 1 : 99の遊離 - B - 環フラボノイド類 : フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラ

50

バン類の比は約 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 及び 10 : 90 からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類：フラバン類の比は約 85 : 15 である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

**【0068】**

本明細書はさらに、COX - 2 及び 5 - LO 仲介疾患及び状態の予防及び治療の方法を含む。COX - 2 及び 5 - LO 仲介疾患及び状態を予防し、治療する方法は、これを必要とする受容者に、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を薬学的に許容可能なキャリアと一緒に投与することで構成される。遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1 の遊離 - B - 環フラボノイド類：フラバン類 ~ 1 : 99 の遊離 - B - 環フラボノイド類：フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 及び 10 : 90 からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類：フラバン類の比は約 85 : 15 である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

10

20

**【0069】**

なおさらなる具体例においては、本明細書は、一般的な関節の疼痛及びこわばりを治療し、可動性及び身体的機能を改良し、変形性関節症及び慢性関節リウマチの病理学的状態を予防し、治療する方法を含む。関節の疼痛及びこわばりを予防し、治療し、可動性及び身体的機能を改良し、変形性関節症、及び慢性関節リウマチの病理学的状態を予防し、治療する方法は、これを必要とする受容者に、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物を薬学的に許容可能なキャリアと一緒に投与することで構成される。遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1 ~ 1 : 99 の遊離 - B - 環フラボノイド類：フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 及び 10 : 90 からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類：フラバン類の比は約 85 : 15 である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

30

**【0070】**

本発明はまた、疼痛経路に關与する mRNA の生成を調節する方法を含み、該方法は、これを必要とする受容者に、合成された及び/または単一の植物または多数の植物から単離された遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物を含む有効な量の組成物及び所望により薬学的に許容可能なキャリアを投与することを含む。遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は、99 : 1 ~ 1 : 99 の遊離 - B - 環フラボノイド類：フラバン類の範囲内とすることができる。本発明の特定の具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類対フラバン類の比は約 90 : 10、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80 及び 10 : 90 からなる群から選択される。本発明の好適な具体例においては、本組成物中の遊離 - B - 環フラボノイド類：フラバン類の比は約 85 : 15 である。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類はスキューテラリア属の植物中の単数または複数の植物から単離され、フラバン類はアカシア属の植物中の単数または複数の植物から単離される。

40

50

## 【0071】

本発明の方法に従って使用できる遊離 - B - 環フラボノイド類は、上記に説明した一般的な構造によって示される化合物を含む。本発明の遊離 - B - 環フラボノイド類は、合成法によって得るかまたはアンノナセアエ、アステラセアエ、ピグノニアセアエ、コムプレタセアエ、コンボシタエ、エウフォルビアセアエ、ラビアタエ、ラウランセアエ、レグミノサエ、モラセアエ、ピナセアエ、プテリダセアエ、シノプテリダセアエ、ウルマセアエ、及びジンギベラセアエが挙げられるがこれらに限定されるものではない植物の科から単離してよい。また遊離 - B - 環フラボノイド類は、デスモス、アキロクリン、オロキシルム、ブチエナピア、アナファリス、コツラ、グナファリウム、ヘリクリスム、セントウレア、エウパトリウム、パッカリス、サピウム、スキューテラリア、モルサ、コレブローケア、スタキス、オリガナム、ジジフォラ、リンデラ、アクチノダフネ、アカシア、デリス、グリシルヒザ、ミレッチア、ポンガミア、テフロシア、アルトカルプス、フィクス、ピティログラマ、ノトラエナ、ピナス、ウルムス、及びアルピニアが挙げられるがこれらに限定されるものではない高等植物の属から抽出し、濃縮し、精製することができる。

10

## 【0072】

遊離 - B - 環フラボノイド類は、茎、茎樹皮、小枝、塊茎、根、根樹皮、新鞘、種子、根茎、花及び他の生殖器官、葉並びに他の気生部分が挙げられるがこれらに限定されるものではない植物の様々な部分中に見い出される。遊離 - B - 環フラボノイド類の単離及び精製の方法は、2002年3月1日出願された"Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2 inhibitors"と称する米国特許出願第10/091,362号において説明されており、本明細書において、参考のためにその全体を引用する。

20

## 【0073】

本発明の方法に従って使用できるフラバン類は、上記に説明した一般的な構造によって示される化合物を含む。本発明のフラバン類は、合成法によって得るかまたはアカシア属の植物から選択される単数または複数の植物から単離してよい。好適な具体例においては、植物は、アカシア・カテキュー、A. コンシナ、A. ファルネシアナ、A. セネガル、A. スペシオサ、A. アラビカ、A. カエシア、A. ペンナタ、A. シヌアタ、A. メアルンシイ、A. ピクナンタ、A. デアルパタ、A. アウリクリフォルミス、A. ホロセレシア及びA. マングウムからなる群から選択される。

## 【0074】

フラバン類は、茎、茎樹皮、樹幹、樹幹樹皮、小枝、塊茎、根、根樹皮、新鞘、種子、根茎、花及び他の生殖器官、葉並びに他の気生部分が挙げられるがこれらに限定されるものではない植物の様々な部分中に見い出される。フラバン類の単離及び精製の方法は、2002年3月22日出願された"Isolation of a Dual COX-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor from Acacia"と称する米国特許出願第10/104,477号において説明されており、本明細書において、参考のためにその全体を引用する。

30

## 【0075】

本発明は、一連のインビボ研究並びにインビトロ生化学、細胞、及び遺伝子発現ふるい分けを組み合わせて、COX-2及び5-Lipoxygenase酵素活性を特異的に阻害し、cox-1ではなくcox-2 mRNA生成に影響する活性植物抽出物及び成分を特定する戦略を実現する。COX-2及び5-Lipoxygenase経路を特異的に阻害する活性植物抽出物及び成分を特定するために本明細書において使用する方法を実施例1~13に説明する(図1~10)。こうした方法は、2002年3月1日出願された"Identification of Free-B-ring Flavonoids as Potent COX-2 inhibitors"と称する米国特許出願第10/091,362号及び2002年3月22日出願された"Isolation of a Dual COX-2 and 5-Lipoxygenase Inhibitor from Acacia"と称する米国特許出願第10/104,477号においてさらに詳細に説明されており、この各々を特に本明細書において、参考のためにその全体を引用する。

40

## 【0076】

こうした研究は、それぞれ遊離 - B - 環フラボノイド類及びフラバン類を含む2つの標準化抽出物の特許ブレンドで構成され、本明細書においてユニベスチン<sup>T M</sup>と呼ぶ

50

新規な組成物の発見をもたらした。このような組成物を製造するための一般的な実施例を、それぞれアカシア及びスキューテラリアから単離された2つの標準化抽出物を1つ以上の賦形剤と一緒に使用して実施例14に提供する。実施例14において使用されるアカシア抽出物は、カテキン及びエピカテキンとして>60%の総フラバン類を含み、スキューテラリア抽出物は>70%の遊離-B-環フラボノイド類を含み、これは主にバイカリンだった。表11に説明するように、スキューテラリア抽出物は他の少量の遊離-B-環フラボノイド類を含んだ。1つ以上の賦形剤を所望により組成物に加える。加える賦形剤の量は、所望の各成分の実際の活性含量に基づいて調節できる。生成物の各個々のバッチのブレンドング表は、成分の個々のバッチの製品仕様及びQC結果に基づいて作成しなければならない。2~5%の範囲内の追加の量の活性成分が、製品仕様に適合するために推奨される。実施例14は、ユニベスチン<sup>T M</sup>の1バッチ(ロット#G1702-COX-2)のために作成したブレンドング表を示す。実施例15~17に説明するように、様々なブレンドング比の製剤化されたユニベスチン<sup>T M</sup>製品を、COX-2及び5-L O酵素活性を阻害し、cox mRNA生成を低減する能力に関して試験した。

#### 【0077】

COX-2阻害アッセイは、ヘム及びアラキドン酸の存在下で酵素ペルオキシダーゼの活性に依拠した。COX-1及びCOX-2活性を阻害した化合物に関してふるい分けするために、実施例2及び6に示すように両方の酵素のペルオキシダーゼ活性の阻害を利用した高スループットインビトロアッセイを開発した。一定量のCOX-1及びCOX-2酵素に対して滴定することで、ふるい分けプロセスにおいてCOX-2活性を阻害した植物フラクションを単離した後に、2つの個々の標準化抽出物(1つは主に遊離-B-環フラボノイド類(スキューテラリアから単離された)及び他はフラバン類(アカシアから単離された)で構成された)、並びに、各抽出物から精製された成分及び様々な比の合わせた抽出物を比較した。この研究は、スキューテラリア・バイカレンシスから単離された精製された遊離-B-環フラボノイド類であるバイカリン及びバイカレン並びにアカシア・カテキユールから単離された精製されたフラバンであるカテキンは、COX-2及び5-L O活性を阻害することを明らかにした。加えて、個々の標準化抽出物の各々は、10~90%の範囲内(HPLCに基づいて)の濃度の遊離-B-環フラボノイド類、及び10~90%の範囲内(HPLCに基づいて)のフラバン類を含み、またCOX-2及び5-L O活性を阻害した。最後に、研究は、遊離-B-環フラボノイド類対フラバン類の比約80:20、50:50、及び20:80を有する個々の標準化抽出物の各々の混合物を含む組成物はまた全てCOX-2酵素活性をインビトロで阻害する際に非常に有効であることを明らかにした。結果を図11~13に説明する。

#### 【0078】

実施例16は、5-L O経路中のアラキドン酸の分解における化合物、すなわちLTB<sub>4</sub>の標的阻害を実行した細胞アッセイを説明する。結果を図14及び15に説明する。

実施例17は、ユニベスチン<sup>T M</sup>によるcox-2遺伝子の示差的阻害を決定するために実行した実験を説明する。遺伝子発現データを、半定量RT-qPCRアッセイにおいてcox-1及びcox-2 mRNA生成の阻害に関して得た。結果を図16及び17に説明する。図16に関してユニベスチン<sup>T M</sup>は、cox-1遺伝子発現に影響せずにcox-2 mRNA生成を阻害したことが分かる。加えて、他のCOX-2阻害剤と比較した場合に、ユニベスチン<sup>T M</sup>は、cox-1及びcox-2遺伝子発現のLPS-刺激増大を減少させることができた。さらに重要なことには、セレコキシブ及びイブプロフェンは両方ともcox-2遺伝子発現を増大した(図17)。

#### 【0079】

インビボ効力は、実施例18に説明するように、AAのような皮膚刺激物質のマウスの耳への適用及びユニベスチン<sup>T M</sup>を用いて治療したマウスにおける腫脹の低減を測定することによって証明された。結果を図18に説明する。加えて、実施例19に説明するように、炎症及び疼痛の部位での効力は、刺激原をマウスの足首関節に注射し、ユニベスチン<sup>T M</sup>を用いて治療したマウスにおける腫脹の低減を測定することによって証明された。結



果を図19に説明する。

【0080】

10～99%の範囲内（HPLCに基づいて）の濃度の遊離-B-環フラボノイド類及び10～99%の範囲内（HPLCに基づいて）のフラバン類を含む個々の標準化抽出物並びに製品ユニベスチン<sup>T M</sup>を、慢性及び急性投与の場合のマウスにおける毒性に関して試験した（データは示さない）。慢性投与プロトコルにおいては、1日用量90mg/kg（ヒト1日用量500mgと同等）、450mg/kg（1日用量同等物の5倍）及び900mg/kg（1日用量同等物の10倍）でマウスに試験物品を経口栄養補給によって供給した。マウスは、体重増加、物理的外観または挙動の点で悪影響を示さなかった。総体的な死体解剖の結果は器官の異常を示さず、胃、腎臓、及び肝臓の組織学は、未処理の対照マウスと比較して差を示さなかった。電解質、血液タンパク質、血中酵素、及び肝臓酵素を測定する完全な血液研究は、未処理の対照マウスと比較して異常を示さなかった。急性プロトコルにおいては、10～99%の範囲内（HPLCに基づいて）の濃度の遊離-B-環フラボノイド類及び10～99%の範囲内（HPLCに基づいて）のフラバン類を含む個々の標準化抽出物並びに製品ユニベスチン<sup>T M</sup>（2グラム/kg（1日用量同等物の200倍）で与えた）は、体重増加、外観、挙動、器官の総体的な死体解剖の外観、胃、腎臓、及び肝臓の組織学または血液研究において異常を示さなかった。

10

【0081】

実施例20は、膝及び/または腰部の慢性関節リウマチまたは変形性関節症によって引き起こされる疼痛の緩和に及ぼすユニベスチン<sup>T M</sup>の効力を評価するために実行した臨床研究を説明する。研究は、単一中心無作為化二重盲検プラセボ対照研究だった。膝及び/または腰部の慢性関節リウマチまたは変形性関節症を有する60人の被験者（n=60）を無作為に4つの群に入れ、90日間プラセボ、ユニベスチン<sup>T M</sup>（250mg/日または500mg/日）またはセレブレックス<sup>T M</sup>（Celebrex<sup>T M</sup>）（またセレコキシブとして周知である）（200mg/日）を用いて治療した。実施例14、表11に示すように、ユニベスチン<sup>T M</sup>は、バイカリン含量82.2%（w/w）及び総遊離-B-環フラボノイド類>90%（w/w）を有するスキューテラリア・バイカレンシス・ゲオルギ（*Scutellaria baicalensis* Georgi）の標準化抽出物と総フラバン含量77.2%（w/w）を有するアカシア・カテキューの標準化抽出物との85：15の比の特許ブレンドからなった。セレブレックス<sup>T M</sup>は、COX-2選択的阻害剤である処方薬の商品名である。表12は、治療前（ベースラインスコア）及び30、60及び90日での疼痛、こわばり及び機能に関するWOMAC指数スコアを説明する。表13は、治療後30、60及び90日間の疼痛、こわばり及び機能に関するWOMAC指数スコアの絶対変化を説明する。図20～31は、全てのデータに関する95%信頼区間を作図してこの研究の結果を示す。

20

30

【0082】

図20～31に示すように、疼痛、こわばり及び身体的機能に関連するWOMAC複合スコア及び個々のサブスコアは、ユニベスチン<sup>T M</sup>の投与の最中にプラセボ群と比較して有意な改良を示した。

【0083】

さらに、ユニベスチン<sup>T M</sup>は、処方薬セレブレックス<sup>T M</sup>と比較して、疼痛緩和に対する同様の有効性、こわばりを減少させる際のより良好な有効性、及び身体的機能の際立った改良を示した。最大の有意性は、変形性関節症または慢性関節リウマチに関連する疼痛、こわばり及び機能障害を緩和する際に各用量のユニベスチン<sup>T M</sup>とプラセボ及びセレコキシブとを比較する際に見られる。

40

【0084】

分散分析モデル内の各治療群対についての多数の事後比較は、30日（p=0.020）の治療の最中に、500mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>は、変形性関節症を引き起こす疼痛の低減に関して200mg/日のセレコキシブよりも有意に有効であることを示した。加えて、30日（p=0.044）、60日（p=0.032）及び90日（P=0.001）の治療の範囲内で、用量500mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>の投与はまた疼痛の低

50

減に関してプラセボよりも有意に有効だった。200 mg/日のセレコキシブは、60日 ( $p = 0.009$ ) の治療で疼痛の低減に関してプラセボに対して有意性を示した。90日で、500 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>用量は、90日 ( $p = 0.038$ ) の治療の範囲内の250 mg/日の用量と比較して有意により高い有効性を示した。

【0085】

30日 ( $p = 0.00$ )、60日 ( $p = 0.027$ ) 及び90日 ( $p = 0.015$ ) の治療の範囲内で、250 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>は、変形性関節症によって引き起こされるこわばりの低減に関してプラセボよりも有意に有効だった。加えて、30日 ( $p = 0.001$ ) 及び90日 ( $p = 0.005$ ) の治療の範囲内で、500 mg/日の用量のユニベスチン<sup>T M</sup>は、変形性関節症によって引き起こされるこわばりの低減に関してプラセボよりも有意に有効だった。30日 ( $p = 0.023$ ) の治療のみ、200 mg/日のセレコキシブは、変形性関節症によって引き起こされるこわばりの低減に関してプラセボよりも有効性を示した。

【0086】

30日 ( $p = 0.010$ ) の治療の範囲内で、変形性関節症によって引き起こされる機能障害の低減に関して、ユニベスチン<sup>T M</sup>は200 mg/日のセレコキシブよりも有意に有効だった。加えて、30日 ( $p = 0.010$ )、60日 ( $p = 0.043$ ) 及び90日 ( $p = 0.039$ ) の治療の範囲内で、250 mg/日用量のユニベスチン<sup>T M</sup>はまた変形性関節症によって引き起こされる機能障害の低減に関してプラセボよりも有意に有効だった。30日 ( $p = 0.015$ )、60日 ( $p = 0.043$ ) 及び90日 ( $p = 0.039$ ) の治療の範囲内で、500 mg/日用量のユニベスチン<sup>T M</sup>は200 mg/日のセレコキシブよりも有効だった。最後に、30日 ( $p = 0.015$ )、60日 ( $p = 0.016$ ) 及び90日 ( $p = 0.003$ ) の治療の範囲内で、500 mg/日用量のユニベスチン<sup>T M</sup>はまた変形性関節症によって引き起こされる機能障害の低減に関してプラセボよりも有意に有効だった。

【0087】

こうした結果は、ユニベスチン<sup>T M</sup>は、特に500 mg/日の用量で、変形性関節症によって引き起こされる疼痛、こわばりを緩和し、機能障害を改良する際にプラセボ及びセレコキシブよりもはるかに有効であることを示唆する。加えて、プラセボ及びセレコキシブと比較して、250 mg/日の用量で投与されたユニベスチン<sup>T M</sup>はまた、変形性関節症によって引き起こされるこわばりを緩和し、機能障害を改良する際に非常に有効である。セレコキシブはまた全体的に、変形性関節症によって引き起こされる疼痛、こわばり及び機能障害を緩和する際にわずかな改良のみを示した。

【0088】

変形性関節症によって引き起こされる疼痛、こわばり及び機能障害にユニベスチン<sup>T M</sup>が及ぼす影響に加えて、実施例21は、ボディマス指数 (BMI) 及び体重減少にユニベスチン<sup>T M</sup>が及ぼす測定可能な影響を示す。理論によって限定されるものではないが、この影響は、抗炎症剤の投与の結果としての可動性の増大が原因かもしれずまたは体内の代謝を増大させるか若しくは脂肪及び炭水化物の利用を低減する特定の機構も原因かもしれない。表14は、30及び90日の治療後に、250及び500 mg/日の用量で投与したユニベスチン<sup>T M</sup>並びにセレコキシブ及びプラセボが体重及びBMIに及ぼす影響を示す。結果を図32及び33にグラフで示す。図32及び33に関して、250及び500 mg/日の両方の用量で投与したユニベスチン<sup>T M</sup>は、30日後に体重及びBMIの有意な低下もたらし、体重減少は90日後にほぼ2倍になったことが分かる。セレコキシブは、ユニベスチン<sup>T M</sup>と比較して体重及びBMIに及ぼす影響がより小さい。

【0089】

実施例21に説明するように、また分散分析モデルを用いた各治療群対についての多数の事後比較を、体重減少及びBMIに関して実行した。こうした分析は、30日の治療後に、250 mg/日及び500 mg/日用量のユニベスチン<sup>T M</sup>はプラセボに対して統計的に有意な体重減少を引き起こした ( $p = 0.011$  対  $P = 0.118$ ) ことを示した。30

10

20

30

40

50

日で、セレコキシブは、プラセボに対して有意な体重減少を引き起こさなかった。体重減少は、250及び500 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>を用いた90日の治療の間中続き、プラセボに対して統計的有意性があった(それぞれ  $p = 0.001$  及び  $0.01$ )。セレコキシブは、プラセボと比較して依然として有意性を示さなかった。BMIの減少は、250 mg/日用量のユニベスチン<sup>T M</sup>の場合に同様の傾向をたどり、30日 ( $p = 0.008$ ) 並びに90日 ( $p = 0.001$ ) 後にプラセボと比較して有意だった。500 mg/日用量のユニベスチン<sup>T M</sup>はBMIの減少を示し、30日の治療で統計的有意性が無かった。しかしながら、BMIの減少は、90日の治療 ( $p = 0.011$ ) で統計的有意性に達した。再度、90日の治療後に、セレコキシブ治療群は、プラセボに対するBMIの統計的に有意な変化を示した。

10

## 【0090】

実施例22は、ユニベスチン<sup>T M</sup>の投与は、血中グルコースレベルに影響するかもしれないこと並びに体重減少及びBMIに及ぼす影響を示唆する。ユニベスチン<sup>T M</sup>を用いた治療の開始から30日で、血中グルコースレベルの測定可能な差を検出した。90日で、250及び500 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>治療群の両方は血中グルコースレベルの有意な低下を示した。セレコキシブが血中グルコースに及ぼす影響はより劇的でなかった。結果を表15に説明し、図34にグラフで示す。

## 【0091】

実施例22に説明するように、再度、分散分析モデルを用いた各治療群対についての多数の事後比較を、血中グルコースに関しても実行した。500 mg/日用量のユニベスチン<sup>T M</sup>のみが、プラセボ群に対して統計的に関連のある有意性(30日後に  $p = 0.028$ ; 90日後に  $p = 0.022$ )を示した。しかしながら、250 mg/日用量のユニベスチン<sup>T M</sup>は、プラセボに対して血中グルコースレベルの臨床上有意な変化を示した。

20

## 【0092】

本願出願人は、2002年3月22日に出願された"Isolation of a Dual COX-2 and 5-Lipoxygenase inhibitor from Acacia"と称する米国特許出願第10/104,477号は、COX-2及び5-LOに対する二重特異性を証明するアカシア属の植物から単離された組成物の最初の報告であり、2002年3月1日に出願された"Identification of Free-Binding Flavonoids as Potent COX-2 inhibitors"と称する米国特許出願第10/091,362号は、遊離-B-環フラボノイド構造とCOX-2阻害活性との間の相関の最初の報告であると考えている。こうした発見は、関節の疼痛及びこわばりを軽減し、可動性及び身体的機能を改良し、変形性関節症、及び慢性関節リウマチの病理学的状態を予防し、治療するために使用され、本明細書においてユニベスチン<sup>T M</sup>と呼ぶ組成物を製造するための2つのクラスの特定の化合物(遊離-B-環フラボノイド類及びフラバン類)の新規なブレンディングをもたらした。

30

## 【0093】

理論によって限定されるものではないが、この製剤の確認された作用の機構は、COX-2酵素及び5-LO酵素活性の各々のmRNAの生成の減少に加えて、こうした酵素の両方のペルオキシダーゼ活性の直接阻害であると考えられている。またユニベスチン<sup>T M</sup>を利用して、変形性関節症、慢性関節リウマチ、生理痛、動脈硬化症、心臓発作、肥満症、糖尿病、症候群X、アルツハイマー病、呼吸器アレルギー反応、慢性静脈不全、痔核、全身性エリテマトーデス、乾癬、慢性緊張性頭痛、片頭痛、炎症性腸疾患; ウイルス、細菌、真菌によって引き起こされる局所感染、日やけ、熱傷、接触性皮膚炎、メラノーマ及び癌が挙げられるがこれらに限定されるものではないCOX-2及び5-LO仲介疾患及び状態を予防し、治療することができる。最後に、ユニベスチン<sup>T M</sup>は、ヒトへの臨床研究において、可撓性、可動性の改良及び活動性を増大させることが原因で体重減少を引き起こし、血中グルコースレベルを低減できることが見いだされた。

40

## 【0094】

本発明はまた、本発明の治療剤を含む治療組成物に関する。本発明の治療剤は、例えば、皮内で、注射によるか、またはエアロゾルによって、例えば非経口、局所、経口または

50

局所性投与を含む任意の適切な手段によって投与できる。個々の投与のモードは治療される状態に依存しよう。本発明の試剤は、任意の体液、または体液によって接近可能な任意の標的若しくは任意の組織によるとしてよいと予測される。本発明の好適な具体例においては、試剤を注射によって投与する。このような注射は、任意の影響された領域に局所的に投与することができる。治療組成物は、投与する方法に依存して様々な単位剤形で投与できる。例えば、動物の経口投与に適した単位剤形としては、散剤、錠剤、丸剤及びカプセルが挙げられる。本発明の治療組成物の好ましい送達方法としては、例えば、注射または局所投与による静脈内投与及び局所性投与が挙げられる。本発明の治療試薬を、任意の動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトに投与することができる。

#### 【0095】

個々の送達のモードの場合、本発明の治療組成物は、他の成分の例えば薬学的に許容可能な賦形剤、アジュバント、及び/またはキャリアを含むように製剤化できる。例えば、本発明の組成物を、治療される動物が耐えることができる賦形剤中に製剤化できる。このような賦形剤の例としては、セルロース、二酸化ケイ素、デキストレート、スクロース、ナトリウムデンプングリコレート、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、水、生理的食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、マンニトール、ハックス液、及び他の水性生理学的平衡塩類溶液が挙げられるがこれらに限定されるものではない。非水性ビヒクルの例えば揮発性油、ゴマ油、オレイン酸エチル、またはトリグリセリドもまた使用してよい。他の有用な製剤は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランのような粘度向上剤を含む懸濁液を含む。賦形剤はまた少量の添加剤、例えば等張性及び化学的安定性を向上させる物質を含むことができる。緩衝液の例としては、リン酸緩衝液、重炭酸塩緩衝液、Tris緩衝液、ヒスチジン、シトレート、及びグリシン、またこれらの混合物が挙げられ、保存剤の例としては、チメロサル、m-またはo-クレゾール、ホルマリン及びベンジルアルコールが挙げられる。標準的な製剤は、液体注射可能医薬品または固形物とすることができ、これは、注射用の懸濁液剤または液剤として、適切な液体中に吸収させることができる。従って、非液体製剤においては、賦形剤はデキストロース、ヒト血清アルブミン、保存剤等を含むことができ、投与の前に、これに無菌の水または生理的食塩水を加えることができる。

#### 【0096】

本発明の1具体例においては、組成物はまた、アジュバントまたはキャリアを含むことができる。アジュバントは典型的に、一般にCOX & LO経路に関連する徴候を予防し、治療する際に配合の機能を向上する物質である。適切なアジュバントとしては、フロイントアジュバント；他の細菌細胞壁成分；アルミニウムに基づく塩；カルシウムに基づく塩；シリカ；ホウ素、ヒスチジン、グルコサミンサルフェート、コンドロイチン硫酸、グルコン酸銅、ポリヌクレオチド；ビタミンD、ビタミンK、トキソイド；鮫及びウシ軟骨；血清タンパク質；ウイルスコートタンパク質；他の細菌由来製剤；ガンマイインターフェロン；ブロックコポリマーアジュバントの例えばハンターズ・タイターマックス・アジュバント（バクセル・TM、Inc. ノークロス、Ga.）（Hunter's Titermax adjuvant (Vaxcel.TM., Inc. Norcross, Ga.))；リビアジュバント（Ribi adjuvants）（リビ・イムノケム・リサーチ、Inc.、ハミルトン、Mont.）（Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.）から入手可能）；並びにサポニン類及びそれらの誘導体の例えばクイルA（Quil A）（スーパーフォス・バイオセクターA/S、デンマーク（Superfos Biosector A/S, Denmark）から入手可能）が挙げられるがこれらに限定されるものではない。キャリアは典型的に、治療される動物中の治療組成物の半減期を増大させる化合物である。適切なキャリアとしては、ポリマー制御放出製剤、生分解性植込み剤、リボソーム、細菌、ウイルス、油、エステル、及びグリコールが挙げられるがこれらに限定されるものではない。

#### 【0097】

本発明の1具体例は、本発明の組成物を動物中に徐々に放出できる制御放出製剤である。本明細書において使用する制御放出製剤は、制御放出ビヒクル中の本発明の組成物を含

10

20

30

40

50

む。適切な制御放出ビヒクルとしては、生体親和性ポリマー、他のポリマーマトリックス、カプセル、マイクロカプセル、微粒子、ポーラス製剤、浸透圧ポンプ、拡散装置、リポソーム、リボスフェア、及び経皮送達システムが挙げられるがこれらに限定されるものではない。本発明の他の制御放出製剤は、動物に投与すると固体またはゲルをインシトゥで形成する液体を含む。好ましい制御放出製剤は生物分解性（すなわち、生体侵食性）である。

【0098】

一旦治療組成物が製剤化されたら、これを、無菌バイアル中に液剤、懸濁液剤、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水若しくは凍結乾燥散剤として貯蔵してよく；或いは経口投与のために他の不活性キャリアと共に直接にカプセル化及び/または錠剤化してよい。このような製剤を、即使用可能形態または投与の直前に再構成を必要とする形態で貯蔵してよい。全身送達のための組成物を含む製剤の投与方法は、経口、皮下、筋肉内、静脈内、鼻腔内または腔若しくは直腸坐剤によってよい。

10

【0099】

個々の障害または状態の治療の際に有効であろう組成物の量は、状態の障害の性質に依存しようし、標準的な臨床技術によって決定できる。加えて、インビトロまたはインビボアッセイを所望により用いて、最適用量範囲を特定するのを助けてよい。製剤に用いられる正確な用量も、投与経路、及び疾患または状態の深刻さまたは進行に依存しようし、開業医及び各患者の状況によって決定すべきである。有効な用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られる用量反応曲線から外挿してよい。例えば、組成物の有効な量は、段階的用量の組成物を投与し、所望の効果を観察することで容易に決定できる。

20

【0100】

本発明に従って治療する方法は、これを必要とする患者に、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物で構成される治療上有効な量の組成物を内服または局所で投与することを含む。混合物の純度としては、単数または複数の化合物を得るために使用する手法に依存して0.01%~100%が挙げられるがこれに限定されるものではない。好適な具体例においては、遊離 - B - 環フラボノイド類とフラバン類との混合物及びこれを含む医薬組成物の用量は、一般に0.01~200 mg/kgの体重の範囲から選択される有効で無毒の量である。常用の臨床試験を使用する当業者であれば、治療される個々の疾患のための最適用量を決定できる。

30

【0101】

以下の実施例は例示のためにのみ提供するものであり、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

【実施例】

【0102】

実施例1. アカシア及びスキューテラリア植物から得られる有機及び水性抽出物の製造  
アカシア・カテキュー(L)・ワイルド.(*Acacia catechu* (L) Willd.)の樹皮、スキューテラリア・オルソカリクス(*Scutellaria orthocalyx*)の根、スキューテラリア・バイカレンシスの根またはスキューテラリア・ラテリフロラ(*Scutellaria lateriflora*)の植物全体から得られる植物材料を粉碎して粒度2 mm以下にした。乾燥した粉碎植物材料(60 g)を次にエルレンマイヤーフラスコに移し、メタノール：ジクロロメタン(1 : 1)(600 mL)を加えた。混合物を1時間振とうし、ろ過し、バイオマスを再度メタノール：ジクロロメタン(1 : 1)(600 mL)を用いて抽出した。有機抽出物を合わせ、真空下で蒸発させて、有機抽出物を提供した(下記の表1を参照されたい)。有機抽出後に、バイオマスを空気乾燥し、超純水(600 mL)を用いて1回抽出した。水溶液をろ過し、凍結乾燥して、水性抽出物を提供した(下記の表1を参照されたい)。

40

【0103】

## 【表 1】

表 1. アカシア及びスキューテラリア種の有機及び水性抽出物の収率

植物源	量	有機抽出物	水性抽出物
アカシア・カテキューの樹皮	60g	27.2g	10.8g
スキューテラリア・オルソカリクスの根	60g	4.04g	8.95g
スキューテラリア・バイカレンシスの根	60g	9.18g	7.18g
スキューテラリア・ラテリフロラ (植物全体)	60g	6.54g	4.08g

10

## 【0104】

実施例 2 . アカシア・カテキュー、様々なスキューテラリア種及び他の植物から得られる植物抽出物による COX - 2 及び COX - 1 ペルオキシダーゼ活性の阻害

特異的 COX - 2 阻害剤の特定のためのバイオアッセイ志向型ふるい分けプロセスを設計して、下記に説明するように酵素のペルオキシダーゼ活性をアッセイした。

## 【0105】

ペルオキシダーゼアッセイ . COX - 2 の阻害剤を検出するためのアッセイを、高スループットプラットホーム (ラズ (Raz)) のために修正した。簡潔に述べると、ペルオキシダーゼ緩衝液 (100mMTBS、5mMEDTA、1µMHeme、1mgエピネフリン、0.094%フェノール) 中の組み換え羊 COX - 2 (ケイマン (Cayman)) を、抽出物 (1:500 希釈) を用いて 15 分間インキュベートした。クワンタブルー (Quantablu) (ピアース (Pierce)) 基質を加え、45 分間 25℃ で展開させた。次にルミネセンスを、ワラック・ビクター 2 プレートリーダー (Wallac Victor 2 plate reader) を使用して読み取った。結果を表 2 に提出する。

20

## 【0106】

表 2 は、アカシア・カテキューの樹皮、2 つのスキューテラリア種の根を含む 5 つの植物種から得た有機及び水性抽出物及び 3 つの他の植物種から得られる抽出物 (構造的に同様の遊離 - B - 環フラボノイド類で構成される) による酵素の阻害を説明する。データを、組み換え羊 COX - 2 酵素及び基質単独と比較して、ペルオキシダーゼ活性のパーセントとして提出する。有機抽出物によるパーセント阻害は 30% ~ 90% の範囲にわたる。

30

## 【0107】

【表 2】

表 2. 様々な種による COX-2 ペルオキシダーゼ活性の阻害

植物源	有機抽出物による COX-2 の阻害	水性抽出物による COX-2 の阻害
アカシア・カテキュー(樹皮)	75%	30%
スキューテラリア・オルソカリクス(根)	55%	77%
スキューテラリア・バイカレンシス(根)	75%	0%
デスモジウム・サムブエンセ(植物全体) ( <i>Desmodium sambuense</i> )	55%	39%
ユーカルプツス・グロブルス(葉) ( <i>Eucalyptus globulus</i> )	30%	10%
ムリカ・ナナ(葉) ( <i>Murica nana</i> )	90%	0%

10

20

## 【0108】

COX-1 及び COX-2 アイソフォームの相対的阻害の比較は、こうした酵素の各々につき IC<sub>50</sub> 値の生成を必要とする。IC<sub>50</sub> を、対照に関する酵素活性の 50% 阻害が特定の阻害剤によって実現される濃度と定義する。こうした実験において、表 3 に説明するように、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ COX-2 及び COX-1 酵素に関して 6 ~ 50 µg/mL 及び 7 ~ 80 µg/mL の範囲にわたることが見いだされた。COX-2 及び COX-1 の IC<sub>50</sub> 値の比較は、こうした酵素の各々に対する様々な植物から得られる有機抽出物の特異性を証明する。スキューテラリア・ラテリフロラの有機抽出物は、例えば、COX-1 よりも COX-2 の選択的阻害を示し、それぞれ IC<sub>50</sub> 値 80 及び 30 µg/mL である。一方、ある抽出物は、他のものではなく COX-2 の選択的阻害を証明する。HTP フラクション及びこうしたフラクションから得られる精製された化合物を調べることは、こうした抽出物及び化合物に対する阻害の真の特異性を決定するために必要である。

30

## 【0109】

【表 3】

表 3. ヒト及び羊 COX-2 及び COX-1 の場合の  
有機抽出物の IC<sub>50</sub> 値

植物源	IC <sub>50</sub> ヒト COX-2 ( $\mu$ g/mL)	IC <sub>50</sub> 羊 COX-2 ( $\mu$ g/mL)	IC <sub>50</sub> 羊 COX-1 ( $\mu$ g/mL)
アカシア・カテキュー(樹皮)	3	6.25	2.5
スキューテラリア・ オルソカリクス(根)	行わない	10	10
スキューテラリア・ バイカレンシス(根)	30	20	20
スキューテラリア・ ラテリフロラ(植物全体)	20	30	80
ユーカルプツス・ グロブルス(葉)	行わない	50	50
ムリカ・ナナ(葉)	5	6	7

10

20

## 【0110】

## 実施例 3. 活性抽出物の HTP 分画

活性植物から得られる有機抽出物(400 mg)を予備充填フラッシュカラム(2 cm ID × 8.2 cm、10 g のシリカゲル)上に負荷した。カラムを、日立高スループット精製(HTP)システム(Hitachi high throughput purification (HTP) system)を使用し、勾配移動相(A) 50:50 EtOAc:ヘキサン及び(B)メタノールで100%A~100%Bを用いて30分、流量5 mL/分で溶出した。分離を、広帯域波長UV検出器を使用して監視し、フラクションを、ジルソンフラクションコレクター(Gilson fraction collector)を使用して1.9 mL/穴で96深穴プレート中に集めた。試料プレートを低真空及び遠心分離下で乾燥した。DMSO(1.5 mL)を使用して、各細胞中の試料を溶解させ、一部分(100  $\mu$ L)をCOX阻害アッセイ用に採取した。

30

## 【0111】

活性植物から得られる水性抽出物(750 mg)を水(5 mL)中に溶解させ、1  $\mu$ M シリンジフィルターを通してろ過し、4 mL 高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)バイアルに移した。次に溶液をオートサンプラーによって予備充填逆相カラム(C-18、粒度15  $\mu$ m、2.5 cm ID × 10 cm、プレカラム挿入)上に注入した。カラムを、日立高スループット精製(HTP)システムを使用し、勾配移動相(A)水及び(B)メタノールで100%A~100%Bを用いて20分、続いて100%メタノールを用いて5分間、流量10 mL/分で溶出した。分離を、広帯域波長UV検出器を使用して監視し、フラクションを、ジルソンフラクションコレクターを使用して1.9 mL/穴で96深穴プレート中に集めた。試料プレートを凍結乾燥した。超純水(1.5 mL)を使用して、各細胞中の試料を溶解させ、一部分(100  $\mu$ L)をCOX阻害アッセイ用に採取した。

40

## 【0112】

## 実施例 4. アカシア及びスキューテラリア種から得られる HTP フラクションによる COX ペルオキシダーゼ活性の阻害

COX-1 及び COX-2 組み換え酵素の両方のペルオキシダーゼ活性を阻害する能力に関して HTP フラクションの各々を調べることで、個々の生理活性有機抽出物をさらにキャラクター化して示した。結果を図 1 及び 2 に提出し、実施例 1 及び 3 に説明するよ

50



うに単離し、実施例 2 に説明するようにアッセイしたアカシア・カテキューの樹皮及びスキューテラリア・バイカレンシスの根の有機抽出物から得られる H T P フラクションによる C O X - 2 及び C O X - 1 活性の阻害を示す。図 1 及び 2 に示すプロフィールは、各抽出物中の多数の活性成分を示す阻害の多数のピークを示す。幾つかの活性ピークは C O X - 2 に対して非常に選択的である。スキューテラリア・オルソカリクス及びスキューテラリア・ラテリフロラを含む他のスキューテラリア s p . は、阻害の同様のピークを証明する（データは示さない）。しかしながら、C O X - 1 及び C O X - 2 酵素の両方は阻害の多数のピークを証明し、初期の阻害プロフィールの一因となる 1 を超える分子が存在することを示唆する

【 0 1 1 3 】

実施例 5 . スキューテラリアの有機抽出物から得られる活性遊離 - B - 環フラボノイド類の単離及び精製

スキューテラリア・オルソカリクスの根から得られる有機抽出物 ( 5 g ) ( 実施例 1 に説明するように単離した ) を予備充填フラッシュカラム ( 1 2 0 g のシリカ、4 0 μ m 粒度 3 2 ~ 6 0 μ m、2 5 c m × 4 c m ) 上に負荷し、勾配移動相 ( A ) 5 0 : 5 0 E t O A c : ヘキサン及び ( B ) メタノールで 1 0 0 % A ~ 1 0 0 % B を用いて 6 0 分、流量 1 5 m L / 分で溶出した。フラクションを 1 0 m L / フラクションで試験管中に集めた。溶媒を真空下で蒸発させ、各フラクション中の試料を 1 m L の D M S O 中に溶解させ、2 0 μ L のアリコート を 9 6 穴の浅いディッシュプレートに移し、C O X 阻害活性に関して試験した。C O X アッセイ結果に基づいて、活性フラクション # 3 1 ~ # 3 9 を合わせ、蒸発させた。H P L C / P D A 及び L C / M S による分析は、保持時間 8 . 9 分及び 2 7 2 m / e での M S ピークを有する主要な化合物を示した。生成物をさらに、C 1 8 半作製カラム ( 2 5 c m × 1 c m ) 上で、勾配移動相 ( A ) 水及び ( B ) メタノールを用いて 4 5 分間、流量 5 m L / 分で精製した。8 8 のフラクションを集めて、5 . 6 m g の淡黄色の固体を与えた。純度を、H P L C / P D A 及び L C / M S、及び標準との比較及び N M R データによって決定した。

【 0 1 1 4 】

【 化 8 】

$^1\text{H NMR}$ :  $\delta$  ppm. (DMSO-d<sub>6</sub>) 8.088 (2H, m, H-3',5'), 7.577 (3H, m, H-2',4',6'), 6.932 (1H, s, H-8), 6.613 (1H, s, H-3). MS: [M+]<sup>+</sup> = 271m/e.

【 0 1 1 5 】

化合物をバイカレインであると特定した。C O X - 2 酵素に対するバイカレインの I C <sub>50</sub> は 1 0 μ g / m L であると決定された。

分取 C - 1 8 カラムのカラムクロマトグラフィーを使用して、他の遊離 - B - 環フラボノイド類を単離し、スキューテラリア・バイカレンシスの根から単離され遊離 - B - 環フラボノイド含量 8 2 . 2 % を有する標準化抽出物 ( ロット # R M 0 5 2 3 0 2 - 0 1 ) を使用して特定した。図 3 に示すように、1 1 の構造が H P L C / P D A / M S を使用して明らかになった。図 3 に関して、特定した 1 1 の化合物は、バイカリン、ウォゴニン - 7 - グルクロニド、オロキシリン A 7 - グルクロニド、バイカレイン、ウォゴニン、クリシン - 7 - グルクロニド、5 - メチル - ウォゴニン - 7 - グルクロニド、スキューテラリン ( scutellarin )、ノルウォゴニン、クリシン及びオロキシリン A だった。

【 0 1 1 6 】

実施例 6 . 精製された遊離 - B - 環フラボノイド類の C O X 阻害

幾つかの遊離 - B - 環フラボノイド類を得、実施例 2 に説明する方法を使用して 2 0 μ g / m L の濃度で C O X - 2 阻害活性に関して試験した。結果を下記の表 4 に要約する。

【 0 1 1 7 】

スキューテラリア・バイカレンシスの根から単離されたバイカレイン、バイカリン及び標準化遊離 - B - 環フラボノイド抽出物の I C <sub>50</sub> の測定を、以下の方法を使用して実行した。開裂可能な過酸化発色団をアッセイに含めて、補因子としてのアラキドン酸の存

10

20

30

40

50

在下で各酵素のペルオキシダーゼ活性を視覚化した。典型的に、アッセイを96穴フォーマット中で実行した。各阻害剤を、100% DMSO中の10 mg/mLストックから取り、室温で以下の範囲の濃度を使用して3回重複して試験した：0、0.1、1、5、10、20、50、100、及び500 µg/mL。各穴に、150 µLの100 mM Tris-HCl (pH 7.5)を、tris緩衝液中で希釈した10 µLの22 µMヘマチン、DMSO中で希釈した10 µLの阻害剤、及び25単位のCOX-1またはCOX-2酵素と一緒に加えた。成分を、回転するプラットホーム上で10秒間混合し、その後、20 µLの2 mM N,N,N',N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミンジヒドロクロリド (TMPD) 及び20 µLの1.1 mM AAを加えて反応を開始した。プレートを10秒間振とうし、次に5分間インキュベートし、その後吸光度を570 nmで読み取った。阻害剤濃度対パーセント阻害を作図し、等温線に沿って半最高点を取り、x軸の濃度と交差させることによって、IC<sub>50</sub>を決定した。次にIC<sub>50</sub>をアッセイ中の酵素単位数に基準化した。スキューテラリア・バイカレンシスの根から単離されたバイカレイン、バイカリン及び標準化遊離-B-環フラボノイド抽出物に関する用量反応及びIC<sub>50</sub>の結果をそれぞれ図4、5及び6に提供する。

10

【0118】

【表4】

表4. 精製された遊離-B-環フラボノイドによるCOX酵素活性の阻害

遊離-B-環フラボノイド	COX-1の阻害	COX-2の阻害
バイカレイン	107%	109%
5,6-ジヒドロキシ-7-メトキシフラボン	75%	59%
7,8-ジヒドロキシフラボン	74%	63%
バイカリン	95%	97%
ウォゴニン	16%	12%

20

30

【0119】

実施例7. スキューテラリア・オルソカリクス(根)、スキューテラリア・バイカレンシス(根)及びオロキシラム・インディカム (Oroxylum indicum) (種子)から単離された活性抽出物中の遊離-B-環フラボノイド類のHPLC定量化

3つの異なる植物種から単離された5つの活性抽出物中の遊離-B-環フラボノイド類の存在及び量を確定し、表5に説明する。遊離-B-環フラボノイド類を、ルナC-18 (Luna C-18)カラム (250 × 4.5 mm, 5 µm)を使用し、1%リン酸及びアセトニトリル勾配80%~20%を使用したHPLCによって22分で定量的に分析した。遊離-B-環フラボノイド類を、UV検出器を使用して254 nmで検出し、遊離-B-環フラボノイド標準との比較によって保持時間に基づいて特定した。

40

【0120】

## 【表 5】

表 5. 活性植物抽出物中の遊離-B-環フラボノイド含量

活性抽出物	抽出物の重量	バイオマスからの%抽出可能	遊離-B-環フラボノイドの全量	抽出物中の%遊離-B-環フラボノイド
S. オルソカリクス (水性抽出物)	8.95g	14.9%	0.2mg	0.6%
S. オルソカリクス (有機抽出物)	3.43g	5.7%	1.95mg	6.4%
S. バイカレンシス (水性抽出物)	7.18g	12.0%	0.03mg	0.07%
S. バイカレンシス (有機抽出物)	9.18g	15.3%	20.3mg	35.5%
オロキシラム・インディウム (有機抽出物)	6.58g	11.0%	0.4mg	2.2%

10

## 【0121】

実施例 8. アカシア・カテキューの有機抽出物から得られる活性化合物の単離及び精製

A. カテキューの根から得られる有機抽出物 (5g) (実施例 1 に説明するように単離した) を予備充填フラッシュカラム (120g のシリカ、40 μm 粒度 32 ~ 60 μm、25 cm × 4 cm) 上に負荷し、勾配移動相 (A) 50 : 50 EtOAc : ヘキサン及び (B) メタノールで 100% A ~ 100% B を用いて 60 分、流量 15 mL / 分で溶出した。フラクションを 10 mL / フラクションで試験管中に集めた。溶媒を真空下で蒸発させ、各フラクション中の試料を DMSO (1 mL) 中に溶解させ、20 μL のアリコートをして 96 穴の浅いディッシュプレートに移し、COX 阻害活性に関して試験した。COX アッセイ結果に基づいて、活性フラクション # 32 ~ # 41 を合わせ、蒸発させて、2.6 g の固体を与えた。HPLC / PDA 及び LC / MS による分析は、それぞれ保持時間 15.8 及び 16.1 分を有する主要な化合物を示した。生成物をさらに、C18 半作製カラム (25 cm × 1 cm) 上で精製し、12.4 mg の生成物を負荷し、勾配移動相 (A) 水及び (B) アセトニトリル (ACN) を用いて 60 分間、流量 5 mL / 分で溶出した。88 のフラクションを集めて、2 つの活性化合物を単離した。化合物 1 (11.5 mg) 及び化合物 2 (16.6 mg) である。純度を、標準 (カテキン及びエピカテキン) との比較による HPLC / PDA 及び LC / MS データによって並びに NMR データによって決定した。

20

30

## 【0122】

化合物 1.

## 【0123】

## 【化9】

$^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  ppm (DMSO-d6) 27.84 (C4), 66.27 (C3), 80.96 (C2), 93.78 (C9), 95.05 (C7), 99.00 (C5), 114.48 (C12), 115.01 (C15), 118.36 (C16), 130.55 (C11), 144.79 (C14), 155.31 (C6), 156.12 (C10), 156.41 (C8).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  ppm. (DMSO-d6) 9.150 (1H, s, OH), 8.911 (1H, s, OH), 8.835 (1H, s, OH), 8.788 (1H, s, OH), 6.706 (1H, d,  $J=2$  Hz, H2'), 6.670 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-6'), 6.578 (1H, dd,  $J=2, 8$  Hz, H-5'), 5.873 (1H, d,  $J=2$  Hz, H8), 5.670 (1H, d,  $J=2$  Hz, H6), 4.839 (1H, d,  $J=4$  Hz, OH), 4.461 (1H, d,  $J=7.3$  Hz, H2), 3.798 (1H, m, H3), 2.625 (1H, m, H4b), 2.490 (1H, m, H4a). MS:  $[\text{M}+1]^+$  = 291 m/e.

10

## 【0124】

この化合物をカテキンであると特定した。

化合物2.

## 【0125】

## 【化10】

$^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  ppm. (DMSO-d6) 28.17 (C4), 64.87 (C3), 78.02 (C2), 94.03 (C9), 95.02 (C7), 98.44 (C5), 114.70 (C12), 114.85 (C15), 117.90 (C16), 130.56 (C11), 144.39 (C14), 155.72 (C6), 156.19 (C10), 156.48 (C8).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  ppm. (DMSO-d6) 9.083 (1H, s, OH), 8.873 (1H, s, OH), 8.777 (1H, s, OH), 8.694 (1H, s, OH), 6.876 (1H, d,  $J=2$  Hz, H2'), 6.646 (2H, s, H-5', 6'), 5.876 (1H, d,  $J=2$  Hz, H8), 5.700 (1H, d,  $J=2$  Hz, H6), 4.718 (1H, s, OH), 4.640 (1H, d,  $J=4.5$  Hz, H2), 3.987 (1H, d,  $J=4.5$  Hz, H3), 2.663 (1H, dd,  $J=4.6, 6.3$  Hz, H4b), 2.463 (1H, dd,  $J=4.6, 6.3$  Hz, H4a). MS:  $[\text{M}+1]^+$  = 291 m/e.

20

## 【0126】

この化合物をエピカテキンであると特定した。

30

実施例6に説明する方法を使用して、A. カテキューの樹皮から単離されたカテキン及び標準化フラバン抽出物に関する用量反応及びIC<sub>50</sub>の結果を図7及び8に示す。COX-1及びCOX-2酵素に対するエピカテキンのIC<sub>50</sub>値はそれぞれ7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

## 【0127】

実施例9. アカシア・カテキューから得られる活性抽出物のHPLC定量化

アカシア・カテキューから単離された有機及び水性抽出物中のフラバン含量を、ホットダイオードレイ検出器(HPLC/PDA)及びルナC18カラム(250 mm  $\times$  4.6 mm)を使用してHPLCによって定量化した。フラバン類を、アセトニトリル勾配10%~30% ACNを使用して20分間、続いて60% ACNを使用して5分間カラムから溶出した。結果を表6に説明する。HPLC精製のプロフィールを図9に示す。カテキン及びエピカテキンを標準として使用し、保持時間及びPDAデータに基づいて、フラバン類を定量化した。2つの主要なフラバン類の保持時間はそれぞれ12.73分及び15.76分だった。

40

## 【0128】

【表 6】

表 6. 活性植物抽出物中の遊離-B-環フラボノイド含量

A. カテキューの樹皮からの活性抽出物	抽出物の重量	バイオマスからの%抽出可能	抽出物中の%フラバン
水性抽出物	10.8g	18.0%	0.998%
有機抽出物	27.2g	45.3%	30.37%

10

## 【0129】

実施例 10. アカシア・カテキュー及びスキューテラリア種から得られる有機抽出物の COX 阻害活性のインビトロ研究

アカシア・カテキュー及び様々なスキューテラリア種から単離された有機抽出物のインビトロ効力及び COX - 2 特異性を、細胞に基づく系において AA 代謝物の生成を阻害する能力に関して試験した。COX - 2 を構成的に発現する細胞系 HOSC 及び COX - 1 を発現する THP - 1 を、AA の存在下で PGE<sub>2</sub> を生成する能力に関して試験した。

## 【0130】

COX - 2 細胞に基づくアッセイ. HOSC (ATCC # 8304 - CRL) 細胞を培養して 80 ~ 90 % 集密的にした。細胞をトリプシン処理し、洗浄し、10 mL 中に  $1 \times 10^6$  細胞/mL で組織培地 (MEM) 中に再懸濁させた。細胞懸濁液 (200  $\mu$ L) で 96 穴組織培養プレートを覆い、2 時間、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> でインキュベートした。次に、培地を、1 ng/mL IL - 1 B を含む新たな HOSC 培地で取り替え、一晩インキュベートした。培地を再度除去し、190 mL HOSC 培地で取り替えた。次に試験化合物を 10  $\mu$ L の HOSC 培地中に加え、15 分間、37 °C でインキュベートした。HOSC 培地 (20 mL、100  $\mu$ M) 中のアラキドン酸を加え、混合物を、10 分間、振とう機上、室温でインキュベートした。ELISA 緩衝液中の 190  $\mu$ L/穴の 100  $\mu$ M インドメタシンを含む新たなプレートに、上澄み (20  $\mu$ L) を移した。上澄みを ELISA によって下記に説明するように分析した。

20

## 【0131】

COX - 1 細胞に基づくアッセイ. THP - 1 細胞を懸濁して体積 30 mL ( $5 \times 10^5$  細胞/mL) にした。TPA を加えて終濃度 10 nM TPA にし、48 時間培養して細胞を分化させて、マクロファージにした (付着)。細胞を HBS (25 mL) 中に再懸濁させ、200 mL の体積、 $5 \times 10^5$  細胞/穴で 96 穴プレートに加えた。次に RPMI 1640 (10  $\mu$ L) 中の試験化合物を加え、5 分間、37 °C でインキュベートした。次いで RPMI (20  $\mu$ L) 中のアラキドン酸を加え、混合物を 10 分間、振とう機上、室温でインキュベートした。上澄み (20  $\mu$ L) をインドメタシン (100  $\mu$ M) を含む ELISA 緩衝液 (190  $\mu$ L) に加えた。次に上澄みを ELISA によって下記に説明するように分析した。

30

## 【0132】

COX - 2 全血アッセイ. 正常で健康な提供者の末梢血を、静脈穿刺によって集めた。全血 (500  $\mu$ L) を、試験化合物及び抽出物と共に 15 分間、37 °C でインキュベートした。リポ多糖 (LPS、大腸菌血清型 0111 : B4 から得た) を加えて終濃度 100  $\mu$ g/mL にし、一晩、37 °C で培養した。血液を遠心分離し (12,000  $\times$  g)、血漿を集めた。血漿 (100  $\mu$ L) をメタノール (400  $\mu$ L) に加えて、タンパク質を沈澱させた。上澄みを PGE<sub>2</sub> 生成に関して ELISA によって測定した。この手順は、Brideau et al. (1996) Inflamm. Res. 45:68-74 によって説明される方法の修正である。

40

## 【0133】

COX - 1 全血アッセイ. 新鮮血液を、抗凝血薬を含まない管中に集め、直ちに分取して 500  $\mu$ L アリコートにして、シリコーン処理済み微小遠心分離管中に入れた。試験試

50

料を加え、攪拌し、1時間、37 で凝固させた。次に試料を遠心分離し(12,000 × g)、血漿を集めた。血漿(100 μL)をメタノール(400 μL)に加えて、タンパク質を沈澱させた。上澄みをTXB<sub>2</sub>生成に関してELISAによって測定した。この手順は、Brideau et al. (1996) *Inflamm. Res.* 45:68-74によって説明される方法の修正である。

【0134】

ELISAアッセイ。イムノロン-4 ELISAプレート(Immunolon-4 ELISA plate)を、炭酸塩緩衝液(pH9.2)中、一晚、4 で、0.5~4 μg/mLの捕捉抗体でコーティングした。プレートを洗浄し、2時間、遮断緩衝液(PBS+1%BSA)と共に室温でインキュベートした。プレートを再度洗浄し、試験試料(100 μL)を加え、振とうしながら1時間、室温でインキュベートした。ペルオキシダーゼ複合第二抗体を、0.5~4 mg/mLを含む50 μLの体積で加え、振とうしながら1時間、室温でインキュベートした。次にプレートを3回洗浄し、TMB基質(100 μL)を加えた。プレートを30分間展開させ、その後1Mリン酸(100 μL)を加えることで反応を止めた。次にプレートを450 nmでワラック・ピクター2プレートリーダーを使用して読み取った。

10

【0135】

細胞毒性。損傷した細胞中への乳酸デヒドロゲナーゼの放出を測定する比色キット(オックスフォード・バイオケミカル・リサーチ(Oxford Biochemical Research))を使用して、細胞の細胞毒性を評価した。アッセイを製造業者の指示に従って完了した。アカシア・カテキューから得られる精製されたフラバン類及び標準化抽出物の両方を試験した。試験した化合物のいずれでも細胞毒性は観察されなかった。

20

【0136】

アッセイの結果を表7に説明する。データを、直接比較のためのIC<sub>50</sub>値として提出する。表5に関して、IC<sub>50</sub>値は一般にCOX-2よりもCOX-1よりもCOX-1の場合に低い。加えて、また全血をPGE<sub>2</sub>生成(この系におけるCOX-2の尺度)またはトロンボキサンB<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)(COX-1活性化の尺度)の示差的阻害に関して測定した。表7を参照すると、こうした研究は、全血細胞に基づくアッセイの範囲内でCOX-2阻害に対する特異性を明らかに証明する。しかしながら、THP-1及びHOSCに基づくモデル系を使用した研究は実際に、COX-1に対するより大きな選択性を示した。この矛盾の可能な理由は、酵素の各々を構成的に発現する不死化細胞系と誘発されてCOX酵素を発現する全血に由来する一次細胞との間の基本的な相違である。一次細胞は、炎症をインビボで研究するためのより適切なモデルである。加えて、COX-1対COX-2活性を特定するために使用される化合物はこうした系の各々において変化し、従って直接に比較できない。

30

【0137】

【表7】

表7. 有機抽出物による細胞システム中のCOX活性の阻害

有機抽出物の植物源	細胞系に基づくアッセイ		全血アッセイ	
	IC <sub>50</sub> COX-2	IC <sub>50</sub> COX-1	IC <sub>50</sub> COX-2	IC <sub>50</sub> COX-1
A. カテキュー(樹皮)	78 μg/mL	22 μg/mL	40 μg/mL	>50 μg/mL
S. オルソカリクス(根)	50 μg/mL	18 μg/mL	10 μg/mL	>50 μg/mL
S. バイカレンシス(根)	82 μg/mL	40 μg/mL	20 μg/mL	8 μg/mL
S. ラテリフロラ(植物全体)	60 μg/mL	30 μg/mL	8 μg/mL	20 μg/mL

40

【0138】

50

### 実施例 11 . アカシア・カテキューから得られるカテキンによる 5 - リポキシゲナーゼの阻害

上記に言及したように、炎症反応に關与する最も重要な経路のうちの 1 つは非ヘム鉄含有リポキシゲナーゼ ( 5 - L O、1 2 - L O、及び 1 5 - L O ) によって生じ、こうしたものは、A A ( A A ) のような脂肪酸の上への分子状酸素の付加を触媒してヒドロペルオキシド 5 -、1 2 - 及び 1 5 - H P E T E を生成し、次にロイコトリエンに轉換する。A . カテキューから得られるフラバン抽出物は、ある程度の 5 - L O 阻害を提供するかもしれない、それによって 5 - H P E T E の形成を予防するという初期の徴候があった。リポキシゲナーゼ阻害剤ふるい分けアッセイキット ( ケイマン・ケミカル、I n c . ( Cayman C hemical, Inc. )、カタログ # 7 6 0 7 0 0 ) を使用して、アカシア・カテキューから得られる精製されたフラバンカテキンが 5 - L O をインビトロで直接に阻害するかどうか評価した。マイクロろ過を使用して、リン酸塩から t r i s に基づく緩衝液への緩衝液の変更を実行した後に、通常キットにおいて使用される大豆から得られる 1 5 - L O をジャガイモ 5 - L O で取り替えた。このアッセイは、酸素検知クロマジェンによってヒドロペルオキシドの形成を検出する。簡潔に述べると、9 0  $\mu$ L の 0 . 1 7 単位 /  $\mu$ L ジャガイモ 5 - L O、2 0  $\mu$ L の 1 . 1 m M A A、1 0 0  $\mu$ L の酸素検知クロマジェン、及び 1 0  $\mu$ L の精製されたフラバン阻害剤を 0 ~ 5 0 0  $\mu$ g/mL の範囲にわたる終濃度で加えることで、アッセイを 3 回重複して実行した。カテキンから得られる 5 - L O 阻害の I C<sub>50</sub> は 1 . 3 8  $\mu$ g/mL/酵素の単位であると決定された。

10

20

【 0 1 3 9 】

### 実施例 12 . アカシア・カテキューから得られる標準化抽出物の製造

アカシア・カテキュー ( 5 0 0 mg の粉碎樹皮 ) を、以下の溶媒系を用いて抽出した。 ( 1 ) 1 0 0 % 水、 ( 2 ) 8 0 : 2 0 水 : メタノール、 ( 3 ) 6 0 : 4 0 水 : メタノール、 ( 4 ) 4 0 : 6 0 水 : メタノール、 ( 5 ) 2 0 : 8 0 水 : メタノール、 ( 6 ) 1 0 0 % メタノール、 ( 7 ) 8 0 : 2 0 メタノール : T H F、 ( 8 ) 6 0 : 4 0 メタノール : T H F 。抽出物を濃縮し、低真空下で乾燥した。各抽出物中の化学的成分の特定を、ホットダイオードアレイ検出器 ( H P L C / P D A ) 及び 2 5 0 mm  $\times$  4 . 6 mm C 1 8 カラムを使用して H P L C によって実現した。カテキン及びエピカテキンを標準として使用し、保持時間及び P D A データに基づいて、化学的成分を定量化した。結果を表 8 及び図 9 に説明する。表 6 に示すように、8 0 % メタノール / 水を用いた溶媒抽出から生成したフラバン抽出物は、フラバン成分の最良の濃度を提供した。

30

【 0 1 4 0 】

## 【表 8】

表 8. アカシア・カテキューから標準化フラバン抽出物を生成するための溶媒

抽出溶媒	抽出物の重量	バイオマスからの%抽出可能	カテキンの全量	抽出物中の%カテキン
100%水	292.8mg	58.56%	13mg	12.02%
水:メタノール(80:20)	282.9mg	56.58%	13mg	11.19%
水:メタノール(60:40)	287.6mg	57.52%	15mg	13.54%
水:メタノール(40:60)	264.8mg	52.96%	19mg	13.70%
水:メタノール(20:80)	222.8mg	44.56%	15mg	14.83%
100%メタノール	215.0mg	43.00%	15mg	12.73%
メタノール:THF(80:20)	264.4mg	52.88%	11mg	8.81%
メタノール:THF(60:40)	259.9mg	51.98%	15mg	9.05%

10

20

## 【0141】

実施例 13 . 様々なスキューテラリア種から得られるs標準化遊離 - B - 環フラボノイド抽出物の製造

スキューテラリア・オルソカリクス(500mgの粉碎根)を、25mLの以下の溶媒系を用いて2回抽出した。(1)100%水、(2)80:20水:メタノール、(3)60:40水:メタノール、(4)40:60水:メタノール、(5)20:80水:メタノール、(6)100%メタノール、(7)80:20メタノール:THF、(8)60:40メタノール:THF。抽出物を合わせ、濃縮し、低真空下で乾燥した。各抽出物中の化学的成分の特定を、ホットダイオードアレイ検出器(HPLC/PDA)及び250mm×4.6mmC18カラムを使用してHPLCによって実行した。バイカレイン、バイカリン、スキューテラレイン(scutellarein)、及びウオゴニンを標準として使用し、保持時間及びPDAデータに基づいて、化学的成分を定量化した。結果を表9に説明する。

30

## 【0142】



## 【表 9】

表 9. スキューテラリア・オルソカリクスから抽出した遊離-B-環フラボノイドの定量化

抽出溶媒	抽出物の重量	バイオマスからの%抽出可能	フラボノイドの全量	抽出物中の%フラボノイド
100%水	96mg	19.2%	0.02mg	0.20%
水:メタノール(80:20)	138.3mg	27.7%	0.38mg	0.38%
水:メタノール(60:40)	169.5mg	33.9%	0.78mg	8.39%
水:メタノール(40:60)	142.2mg	28.4%	1.14mg	11.26%
水:メタノール(20:80)	104.5mg	20.9%	0.94mg	7.99%
100%メタノール	57.5mg	11.5%	0.99mg	10.42%
メタノール:THF(80:20)	59.6mg	11.9%	0.89mg	8.76%
メタノール:THF(60:40)	58.8mg	11.8%	1.10mg	10.71%

10

20

## 【0143】

スクューテラリア・バイカレンシス(1000mgの粉碎根)を、メタノールと水との50mLの混合物を次の通り使用して2回抽出した:(1)100%水、(2)70:30水:メタノール、(3)50:50水:メタノール、(4)30:70水:メタノール、(5)100%メタノール。抽出物を合わせ、濃縮し、低真空下で乾燥した。化学的成分の

特定を、ホットダイオードアレイ検出器(HPLC/PDA)、及び250mm×4.6mmC18カラムを使用してHPLCによって実行した。バイカレイン、バイカリン、スクューテラレイン、及びウォゴニンを標準として使用し、保持時間及びPDAデータに基づいて、各抽出物中の化学的成分を定量化した。結果を表10に説明する。

30

## 【0144】

## 【表 10】

表 10. スキューテラリア・バイカレンシスから抽出した遊離-B-環フラボノイドの定量化

抽出溶媒	抽出物の重量	バイオマスからの%抽出可能	フラボノイドの全量	抽出物中の%フラボノイド
100%水	277.5mg	27.8%	1mg	0.09%
水:メタノール(70:30)	338.6mg	33.9%	1.19mg	11.48%
水:メタノール(50:50)	304.3mg	30.4%	1.99mg	18.93%
水:メタノール(30:70)	293.9mg	29.4%	2.29mg	19.61%
100%メタノール	204.2mg	20.4%	2.73mg	24.51%

10

## 【0145】

実施例 14. スキューテラリア・バイカレンシスの根から得られる標準化遊離-B-環フラボノイド抽出物及びアカシア・カテキューの樹皮から得られる標準化フラバン抽出物を用いた製剤の製造

20

本明細書においてユニベスチン<sup>T M</sup>と呼ぶ新規な組成物を、それぞれアカシア及びスキューテラリアから単離された2つの標準化抽出物を1つ以上の賦形剤と一緒に使用して製剤化した。このような組成物を製造するための一般的な実施例を下記に説明する。この実施例において使用されるアカシア抽出物は、カテキン及びエピカテキンとして>60%の総フラバン類を含み、スキューテラリア抽出物は>70%の遊離-B-環フラボノイド類を含み、これは主にバイカリンだった。表11に説明するように、スキューテラリア抽出物は他の少量の遊離-B-環フラボノイド類を含んだ。1つ以上の賦形剤を組成物に加える。フラバン及び遊離-B-環フラボノイド類の比は、COX-2対5-L0の阻害に関する徴候及び特定の要件並びに製品の効力要件に基づいて調節できる。賦形剤の量は、各成分の実際の活性含量に基づいて調節できる。生成物の各個々のバッチのブレンディング表は、成分の個々のバッチの製品仕様及びQC結果に基づいて作成しなければならない。2~5%の範囲内の追加の量の活性成分が、製品仕様に適合するために推奨される。表11は、ユニベスチン<sup>T M</sup>の1バッチ(ロット#G1702-COX-2)のために作成したブレンディング表を示す。

30

## 【0146】

遊離-B-環フラボノイド含量82.2%(バイカリン)を有するスキューテラリア・バイカレンシスの根の抽出物(38.5kg)(ロット#RM052302-01);総フラバン含量80.4%を有するアカシア・カテキュー樹皮抽出物(6.9kg)(ロット#RM052902-01);及び賦形剤(5.0kgのキャンデックス(Candex))を合わせて、ブレンディング比85:15を有するユニベスチン<sup>T M</sup>製剤(50.4kg)を提供した。表9は、この特定のバッチのユニベスチン<sup>T M</sup>(ロット#G1702-COX-2)の活性遊離-B-環フラボノイド類及びフラバン類の定量化を提供し、これは実施例7及び9に提供する方法を使用して決定された。

40

## 【0147】

## 【表 1 1】

表 1 1. ユニベスチン™製剤の遊離-B-環フラボノイド及びフラバン含量

活性成分	%含量
1. フラボノイド	
a. パイカリン	62.5%
b. 少量のフラボノイド	
i. ウォゴニン-7-グルクロニド	6.7%
ii. オロキシリンA7-グルクロニド	2.0%
iii. バイカレイン	1.5%
iv. ウォゴニン	1.1%
v. クリシン-7-グルクロニド	0.8%
vi. 5-メチル-ウォゴニン-7-グルクロニド	0.5%
vii. スキューテラリン	0.3%
viii. ノルウォゴニン	0.3%
ix. クリシン	<0.2%
x. オロキシリンA	0.2%
c. 合計遊離-B-環フラボノイド	75.7%
2. フラバン	
a. カテキン	9.9%
b. エピカテキン	0.4%
c. 小計フラバン	10.3%
3. 合計活性成分	86%

10

20

30

## 【0148】

表 9 に関して、この特定のバッチのユニベスチン™は、86%総活性成分を含み、これは75.7%遊離-B-環フラボノイド類及び10.3%フラバン類を含む。カプセル形態の2つの異なる用量レベルの最終生成物をこのバッチのユニベスチン™(50.0 kg)から製造し、これらは125 mg/用量(60カプセル)及び250 mg/用量(60カプセル)だった。実施例 15 に説明するように、最終生成物をヒトへの臨床試験において評価した。

40

## 【0149】

同じ手法を使用して、2つの他のバッチのユニベスチン™を、スクューテラリア・バイカレンシスの根から得られる標準化遊離-B-環フラボノイド抽出物及びアカシア・カテキュー樹皮から得られる標準化フラバン抽出物の組合せを使用して製造し、これらはブレンド比それぞれ50:50及び20:80を有した。

## 【0150】

実施例 15. ユニベスチン™の3つの製剤から得られるCOX酵素阻害の用量反応及び

50

I C<sub>50</sub> 値の測定

ユニベスチン<sup>T M</sup> の3つの異なる製剤を実施例14に提供するように製造し、COX-1及びCOX-2阻害活性に関して実施例6に説明するように試験した。図11、12及び13に示すように、3つの製剤は全て、COX酵素活性の有意な用量反応阻害を示す。

## 【0151】

実施例16．ユニベスチン<sup>T M</sup> の製剤から得られるLO酵素阻害の用量反応及びI C<sub>50</sub> 値

ユニベスチン<sup>T M</sup> 試料を、スキューテラリア・バイカレンシスの根から得られる標準化遊離-B-環フラボノイド抽出物及びアカシア・カテキュー樹皮から得られる標準化フラバン抽出物の組合せを使用して、実施例14に略述するように製造し、これらはブレンド 10  
 イング比80：20を有した。試料を、THP-1またはHT-29細胞(COX-1、COX-2及び5-LOを発現する単核細胞系)を含む組織培地中で滴定した。LTB<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>;ネオジェン、Inc.(Neogen, Inc.)、カタログ#406110)のための競合ELISAを使用して、各細胞系中に存在するLTB<sub>4</sub>の新規合成レベルにユニベスチン<sup>T M</sup> が及ぼす影響をユニベスチン<sup>T M</sup> が5-LO経路に及ぼす阻害効果の尺度として評価した。160,000~180,000細胞/穴を6穴プレート中に加えて、アッセイを二回重複して実行した。ユニベスチン<sup>T M</sup> を3、10、30及び100 µg/mLでTHP-1培養に加え、一晚(~12-15時間)、37 °Cで、5%CO<sub>2</sub>と共に、加湿した環境中でインキュベートした。結果を図14に説明し、ユニベスチン<sup>T M</sup> をTHP-1 20  
 培養に3~10 µg/mL加えることで、新規LPS誘発LTB<sub>4</sub>の生成をほぼ完全に阻害したことを示す。

## 【0152】

ユニベスチン<sup>T M</sup> 及び別の周知の5-LO阻害剤であるイブプロフェンを3 µg/mLでHT-29細胞に加え、48時間、37 °Cで、5%CO<sub>2</sub>と共に、加湿した環境中でインキュベートした。各治療済み細胞系を次に遠心分離によって集め、生理学的緩衝液中のジェントル・ダウンス均質化溶解によって破壊した。図15に示すように、ユニベスチン<sup>T M</sup> は、HT-29細胞中の80%の新規合成LTB<sub>4</sub>生成を阻害した。イブプロフェンのみは、同じ時間にわたってLTB<sub>4</sub>の量の20%低減を示した。

## 【0153】

実施例17．ユニベスチン<sup>T M</sup> 対他のNSAIDsによるcox-1ではなくcox-2 30  
 遺伝子発現の示差的阻害

ユニベスチン<sup>T M</sup> がゲノムレベルで機能するかどうかを評価するために、単離したヒト末梢血単球(PBMCs)をリポ多糖(LPS)を用いて刺激し、実施例14に示すようなユニベスチン<sup>T M</sup>、セレコキシブ、イブプロフェンまたはアセトアミノフェンを用いて処理し、生成した総RNAを次に集め、半定量RT-qPCRによって評価した。特に、130,000細胞/穴を6穴プレート中に加えることでアッセイを構成した。次に、細胞を10 ng/mL LPSを用いて刺激し、1、3、10、30及び100 µg/mLのユニベスチン<sup>T M</sup> 並びに3 µg/mLのセレコキシブ、イブプロフェン及びアセトアミノフェンと共に18時間、37 °Cで、5%CO<sub>2</sub>と共に、加湿した環境中で同時インキュベートした。次に各細胞処理状態を遠心分離によって集め、生成した総RNAをトリゾル(登録商標)( 40  
 TRIzol(登録商標))試薬(インビトロジェン<sup>T M</sup>・ライフ・テクノロジーズ(Invitrogen<sup>T M</sup> Life Technologies)、カタログ#15596-026)及び推奨されるトリゾル(登録商標)試薬プロトコルを使用して単離した。総RNAを、モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素(M-MLV RT;プロメガCorp.(Promega Corp.)、カタログ#M1701)を使用し、ランダムヘキサマー(プロメガCorp.、カタログ#C1181)を使用して逆転写した。qPCR実験を、18S rRNA内部標準及び遺伝子特異的アッセイに関して既に開発済みで実証済みのアッセイ・オン・デマンド製品(Assays-on-Demand products)(アプライド・バイオシステムズ、Inc.(Applied Biosystems, Inc.)製のAOD、カタログ#4331182)を使用して、ABIプリズム(登録商標) 7700シーケンス・デテクション・システム(ABI Prism(登録商標) 7700 S 50

equence Detection System) 上で実行した。遺伝子特異的発現値をそのそれぞれの 18 S rRNA 遺伝子発現値 (内部対照) に標準化し、次に非-LPS 非-薬物処理条件を 100 に標準化した。処理条件をこのゼロ状態と比較した。

#### 【0154】

ユニベスチン<sup>T M</sup> は、cox-2 の標準化遺伝子発現を 100 倍を超えて減少させ、一方、cox-1 標準化遺伝子発現はほとんど変化を示さなかった。PBMCS を、3 µg/mL のユニベスチン<sup>T M</sup>、セレコキシブ、イブプロフェンまたはアセトアミノフェンを用いて処理した場合に、ユニベスチン<sup>T M</sup> のみが cox-2 の遺伝子発現を増大させなかった。これは、半定量 RT-qPCR 技術を使用し、遊離-B-環フラボノイド類とフラバン類との混合物を用いて治療した後の疼痛及び炎症経路に關与するエイコシノイド、サイトカイン、ケモカイン及び他の遺伝子の遺伝子発現レベルの変化の最初の報告と考えられている。この研究を、タンパク質レベルの変化を評価するための ELISA に基づくアッセイ並びにタンパク質機能における変更を評価するための酵素機能アッセイを用いる研究と結び合わせた。こうした研究の結果として、ユニベスチン<sup>T M</sup> を用いて治療した後のゲノム及びプロテオームの両方を結び合わせた効果が証明された。文献中に引用する他の研究は、タンパク質特異的方法を使用して遺伝子発現を推測しており、直接に示したものではない。結果を図 16 及び 17 に説明する。

10

#### 【0155】

実施例 18 . インビボマウス耳腫脹モデルを用いたユニベスチン<sup>T M</sup> の効力の評価

ユニベスチン<sup>T M</sup> を使用してインビボで炎症を治療できる可能性があるかどうか試験するために、実施例 14 に説明するように製造した組成物を、経口栄養補給によって、AA を用いて耳を処置する 1 日前に、4 ~ 5 週齢 ICR マウス (ハーラン・ラプス (Harlan Labs)) に投与した。試験マウスに、オリーブ油中に懸濁した 50、100 及び 200 mg/kg のユニベスチン<sup>T M</sup> の用量同等物を供給し、一方対照マウスにオリーブ油のみを供給した。翌日、各マウスの一方の耳に 95% アルコール中の 20 µL の 330 mM AA を適用し、一方、他の耳にアルコールを対照として適用した。図 18 に証明するように、ユニベスチン<sup>T M</sup> を用いて治療したマウスは、次第に増大する用量のユニベスチン<sup>T M</sup> を用いてたどる測定可能な用量反応を示した。図 18 に関して、200 mg/kg 用量は、ユニベスチン<sup>T M</sup> の無い対照と比較して腫脹を 50% を超えて低減した。50 mg/kg 用量のユニベスチン<sup>T M</sup> は、50 mg/kg 用量の別の強力な抗炎症剤であるインドメタシンと同程度に有効だった。

20

30

#### 【0156】

実施例 19 . インビボマウス足首関節腫脹モデルを用いたユニベスチン<sup>T M</sup> の効力の評価

ユニベスチン<sup>T M</sup> は関節の疼痛を標的にするように設計されているので、95% エタノール中の 20 µL の 100 mM AA の溶液を 4 ~ 5 週齢 ICR マウス (ハーラン・ラプス) の後ろ足首関節に注射して腫脹を発生させた。試験群に、オリーブ油中に懸濁した 100 mg/kg のユニベスチン<sup>T M</sup> を ~ 12 時間前に供給し、一方、別の群はユニベスチン<sup>T M</sup> を与えられなかった。対照群は、アラキドン酸注射を受けなかったマウス (負の対照) 及び AA 注入無しで 95% エタノールを有した群 (ビヒクル対照) を含んだ。こうした群はまたユニベスチン<sup>T M</sup> を与えられなかった。結果を図 19 に説明する。図 19 に関して、AA を注射されユニベスチン<sup>T M</sup> を与えられたマウスは、対照及び未処理のアラキドン酸注入群と比較して、バックグラウンドレベルの腫脹を示した。こうした結果は、関節中の腫脹 (作用点) を低減するためのユニベスチン<sup>T M</sup> の有効性を証明する。

40

#### 【0157】

実施例 20 . 膝及び/または腰部の慢性関節リウマチまたは変形性関節症によって引き起こされる疼痛の緩和に及ぼす遊離-B-環フラボノイド類及びフラバン類の効力の臨床評価

この臨床研究は、単一中心無作為化二重盲検プラセボ対照研究だった。膝及び/または腰部の慢性関節リウマチまたは変形性関節症を有する 60 人の被験者 (n = 60) を無作為に以下の 4 つの群のうちの一つの中に入れた。

50

## 【 0 1 5 8 】

## 【 表 1 2 】

A <sub>0</sub>	プラセボ	n=15	プラセボ	
A <sub>1</sub>	用量1	n=15	ユニベスチン <sup>TM</sup>	250mg/日 (125mgb. i. d.)
A <sub>2</sub>	用量2	n=15	ユニベスチン <sup>TM</sup>	500mg/日 (250mgb. i. d.)
A <sub>3</sub>	活性対照	n=15	セレコキシブ	200mg/日 (100mgb. i. d.)

## 【 0 1 5 9 】

ユニベスチン<sup>TM</sup>を、実施例14に説明するように製造した。この特定のバッチのユニベスチン<sup>TM</sup> (ロット# G 1 7 0 2 - C O X - 2) は、86%総活性成分を含み、これは75.7%遊離-B-環フラボノイド類及び10.3%フラバン類を含む。セレコキシブ (またセレブレックス<sup>TM</sup>として周知である) は、COX-2選択的阻害剤である処方薬の商品名である。

10

## 【 0 1 6 0 】

被験者は、性別を釣り合わせて年齢40~75才の人から募集した。治療は、上記の投与計画に従って90日間のプラセボまたは活性化合物 (ユニベスチン<sup>TM</sup> またはセレコキシブ) の経口投与からなつた。NSAIDsを投与されている被験者は、研究を開始する前に2週間の洗浄期間を受けた。活動性を制限せず、被験者に食事に関して助言を与えなかつた。被験者は、任意の時期に任意の理由で試行を自由に止めることができた。30、60及び90日の経口投与で、治療の効力を、ウエスタン・オンタリオ及びマクマスター大学 (WOMAC) 変形性関節症指数 (Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC) Osteo-Arthritis index) (Lingard et al. (2001) J. Bone & Joint Surg. 83:1856-1864; Soderman and Malchau (2000) Acta Orthop. Scand. 71(1):39-46を参照されたい) を使用して医師が評価した。このプロトコルは、モントリオール大学IRB委員会 (IRB board from University of Montreal) が検討し、承認した。

20

## 【 0 1 6 1 】

好ましくは被験者に診察室でWOMACを行った。被験者は診察室の待合室で自分でか若しくは代理人がアンケートを読んで答えるように要請されるか、またはプロジェクトのスタッフによって電話で面接を受け、データはコンピュータデータベースに転記された。これは、患者に安定な環境を提供し、患者間の異なる家庭環境による偏りの可能性を低減した。群間での全ての測定に関する差を、多数の比較に関する一方向分散分析及びツケイ (TUkey) の最小有意差を用いて評価した。全ての質問に、疼痛、こわばりまたは機能傷害の重症度に依存して0~4の重みを割り当てた。次に、こうした値を、100に基準化したパーセントに転換し、WOMACスコアとして報告した。より高い値は、より大きな障害を示す。表12は、治療前 (ベースライン) 並びに30、60及び90日の治療後の、200mg/日のセレコキシブ及びプラセボと比較した250mg及び500mg/日ユニベスチン<sup>TM</sup>の疼痛、こわばり及び機能の平均WOMAC指数スコアを説明する。スコアが低い程、患者は疼痛及びこわばりがより少なく、より良好な機能を有する。

30

40

## 【 0 1 6 2 】

## 【表 1 3】

表 1 2. ベースライン及び30、60及び90日でのWOMAC  
指数スコア

WOMAC指数	ユニベスチン <sup>TM</sup> 250		ユニベスチン <sup>TM</sup> 500		セレコキシブ 200		プラセボ	
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差
疼痛- ベースライン	54.33	19.9	60.33	23.34	55	22.28	49.33	15.1
疼痛-30日	41.33	19.22	36	22.93	50	23.09	41.67	15.55
疼痛-60日	40.71	16.62	40.77	19.77	30	16.46	57.31	16.66
疼痛-90日	41.79	16.36	27.69	21.57	31.67	16.42	50	14.43
こわばり- ベースライン	63.33	26.92	61.67	23.84	47.5	21.75	46.67	21.37
こわばり-30日	41.67	16.14	44.17	21.06	39.42	18.29	59.17	20.85
こわばり-60日	37.5	18.99	39.42	19.66	37.5	29.76	46.15	24.68
こわばり-90日	39.29	20.72	28.85	21.28	29.17	25.19	49.04	18.01
機能- ベースライン	58.41	22.74	62.92	17.68	49.38	10.33	52.82	8.29
機能-30日	42.09	14.51	47.59	17.18	48.43	9.29	51.88	14.8
機能-60日	41.47	7.75	41.59	7.34	41.23	9.12	49.64	7.16
機能-90日	42.44	17.08	38.12	13.21	44.41	11.06	50.95	12.73

10

20

30

## 【0163】

表 1 3 は、疼痛、こわばり及び機能に関するWOMACスコアの平均絶対変化を説明する。これは、ベースラインと30、60及び90日に与えられるスコアとの間の差として表される。スコアがより負である程、改良は大きい。

## 【0164】

【表 1 4】

表 1 3. 30、60及び90日でのWOMACスコアの  
平均絶対変化\*

絶対変化	ユニベスチン <sup>TM</sup> 250		ユニベスチン <sup>TM</sup> 500		セレコキシブ 200		プラセボ	
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差
疼痛-30日	-13	24.41	-24.33	18.7	-4.23	15.92	-7.67	26.98
疼痛-60日	-14.64	26.85	-17.31	35.27	-22.31	22.51	5	13.54
疼痛-90日	-13.57	22.91	-30.38	21.06	-16.67	21.36	-2.31	15.89
こわばり-30日	-21.67	24.31	-17.5	18.18	-8.65	20.66	12.5	29.88
こわばり-60日	-28.57	27.05	-21.15	33.61	-9.62	29.82	-1.92	30.55
こわばり-90日	-26.79	27.67	-31.73	20.17	-13.54	37.48	-0.96	26.74
機能-30日	-16.32	19.58	-15.33	18.28	-0.37	6.86	-0.94	14.05
機能-60日	-18.11	24.36	-21.4	19.79	-6.97	13.66	-3.49	11.81
機能-90日	-17.13	23.69	-24.87	23.25	-2.78	8.34	-2.18	11.27

10

20

## 【0165】

\* こうしたデータは、研究を完了した被験者のみを含む。

データに現れる大きな差が原因で、臨床試験において標準偏差を群平均に帰するのは非常に困難である。むしろ平均の信頼限界が好ましく、というのは、これは平均の下限及び上限を与え、区間が狭い程、平均の正確な推定ができるからである。信頼限界は、信頼係数に関して表される。95%信頼区間は、このタイプの統計分析において平均を説明するために最も一般に使用される区間である。これは、区間が真の平均を含む95%の確率が存在することを意味しない。その代わりに、信頼性の水準のレベルは区間を計算する方法に関連する。信頼係数は単に、真の平均を含むと期待されるかもしれない与えられたサイズの試料の割合である。すなわち、95%信頼区間の場合、多くの試料を集めて信頼区間を計算すれば、結局は、こうした区間の約95%は真の平均を含むと思われる。これを考慮して、30、60及び90日で、疼痛、こわばり及び機能に関するWOMACスコアに関して95%信頼区間を計算した。

30

## 【0166】

1～5の範囲を有する5点リカート(Likert)スケールに基づいてWOMACスコアに関する生/非標準化スコアを選択して、最終疼痛、こわばり及び機能障害指数を表した(図20～31)。0～100のスケールへの標準化を、均一を得るために(表12及び13を参照されたい)及び変化の規模の評価を向上されるために他の部分において使用した。しかしながら、全ての図が同じ1～5点のスケールに基づいているので、生データを作図し、というのは、これはこうしたスコアを患者のアンケートから得る方法をより正確に反映するからである。すなわち、患者は1～5の間の選択を与えられたので、こうした表現は、可能な範囲の回答に対する患者の理解を反映しない0～100の標準化または変換されたスコアとは対照的に患者の反応をより良好に反映する。

40

## 【0167】

患者の応答に基づいて250及び500mg/日のユニベスチン<sup>TM</sup>は90日の治療期間にわたって疼痛を低減したことを示す明らかな傾向が、疼痛指数に存在する。この同じ期間にわたって、疼痛を低減しないプラセボと比較して、セレコキシブもまた疼痛を低減す

50



る。しかしながら、セレコキシブは、こわばりを低減する際に両方の用量のユニベスチン<sup>TM</sup>と同程度に有効であるとは思われず、というのは、信頼区間はプラセボのものと強く重なり合うからである。最後に、プラセボと比較して、両方の用量のユニベスチン<sup>TM</sup>は機能障害を明らかに改良したが、セレコキシブはそうではなかった。グラフ図は、たとえ被験者が研究を完了しなかったとしても、全ての被験者を含む。しかしながら、各信頼区間は、WOMAC試験を行った時点で存在した被験者の数に基づいて有効であり、従って傾向は依然として保持される。こうしたデータを図20～31に作図する。

## 【0168】

実施例21．機能の増大によるBMI及び体重減少に及ぼす遊離-B-環フラボノイド類及びフラバン類の効力の臨床評価。

10

## 【0169】

臨床試験の最中に行った追加の測定は、身長及び体重だった。全ての群における全ての被験者(実施例20を参照されたい)につき、30及び90日の治療で身長及び体重を測定した。BMIの低減及び体重減少に対する結果を偏らせないために、被験者には食餌または運動に関して助言を与えなかった。表14は、30及び90日間の治療後に起きた体重及びBMIの変化を示す。

## 【0170】

## 【表15】

表14．30及び90日での平均体重(kg)及びBMI(kg/m<sup>2</sup>)の変化

20

	群							
	ユニベスチン <sup>TM</sup> 250		ユニベスチン <sup>TM</sup> 500		セレコキシブ 200		プラセボ	
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差
体重-30日	-3.60	3.76	-2.40	3.31	-2.00	3.08	-.60	1.99
体重-90日	-5.36	3.43	-4.15	4.81	-3.17	4.88	-.08	1.50
BMI-30日	-1.28	1.33	-.80	1.13	-.68	1.06	-.20	.64
BMI-90日	-1.84	1.14	-1.39	1.64	-1.07	1.67	-.02	.54

30

## 【0171】

こうしたデータに基づいて、250mg/日用量のユニベスチン<sup>TM</sup>は最大量の体重減少及びBMIの変化を与え、続いて500mg/日用量のユニベスチン<sup>TM</sup>、次にセレコキシブだった。プラセボは、体重にもBMIにも影響を及ぼさなかった。

## 【0172】

使用されて体重減少またはBMIの変化をもたらす抗炎症化合物に関する何らかの他の報告が文献中に存在するとは考えられていない。被験者には運動に関して助言を与えなかったが、治療後、特にユニベスチン<sup>TM</sup>を用いて得られたより大きな機能的能力は、自発的により運動することを可能にしたかもしれない。他に、ユニベスチン<sup>TM</sup>は、熱発生、脂肪分解を増大させるか、または食事の炭水化物若しくは脂肪の不十分な利用を引き起こすかもしれない。図32及び33は、30及び90日の治療後にユニベスチン<sup>TM</sup>に関して見られるBMI及び体重減少を示す。

40

## 【0173】

実施例22．機能の増大による血中グルコースの低下に及ぼす遊離-B-環フラボノイド類及びフラバン類の効力の臨床評価。

## 【0174】

50

また血中グルコースを0（ベースライン）、治療後30日及び90日に採取した（実施例20を参照されたい）。こうした測定をミリモル/リットル単位で報告した。またデータをmg/dL単位で示す。表15は、250及び500mg/日のユニベスチン<sup>TM</sup>を用いた30及び90日の治療後の血中グルコースレベルを説明する。

【0175】

【表16】

表15. 30及び90日の治療後の血中グルコースの変化

群									
	ニベスチン <sup>TM</sup> 250			ユニベスチン <sup>TM</sup> 500			プラセボ		
	mmol/L	mg/dL	標準偏差	mmol/L	mg/dL	標準偏差	mmol/L	mg/dL	標準偏差
グルコース-ベースライン	5.24	94.32	.74	5.09	91.62	.67	4.82	86.76	.80
グルコース-30日	5.10	91.80	.71	4.75	85.50	.55	5.08	91.44	.54
グルコース-90日	4.88	87.84	.72	4.034	78.12	.36	4.71	84.78	.56
90日までの%変化	-7.52			-12.79			.94		

10

20

【0176】

こうしたデータは、250及び500mg/日用量のユニベスチン<sup>TM</sup>は両方とも、時間が経つにつれて血中グルコースレベルを有意に低下させることを示唆する。この影響は、上記に観察された体重の減少失または機能障害が改良された時に推測される活性の増大に関連するかもしれないし、しないかもしれない。またグルコース負荷を減少させるかまたは炭水化物をより有効に利用することによって、ユニベスチン<sup>TM</sup>が直接に作用してグルコース代謝を改良することが可能かもしれない。

30

【図面の簡単な説明】

【0177】

【図1】アカシア・カテキューから得られるHTPフラクションによるCOX-1及びCOX-2の阻害をグラフで示す。抽出物を、実施例1及び3に説明するように作製し、分画した。実施例2に説明するように、抽出物を、組み換え羊COX-1（黒四角）または羊COX-2（ ）のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを未処理の対照のパーセントとして提出する。

【図2】スキューテラリア・バイカレンシスから得られるHTPフラクションによるCOX-1及びCOX-2の阻害をグラフで示す。抽出物を、実施例1及び3に説明するように作製し、分画した。実施例2に説明するように、抽出物を、組み換え羊COX-1（黒四角）または羊COX-2（ ）のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを未処理の対照のパーセントとして提出する。

40

【図3】遊離-B-環フラボノイド含量82.2%を有しスキューテラリア・バイカレンシスの根から単離された標準化抽出物（ロット#RM052302-01）のHPLCクロマトグラムを示す。HPLC/PDA/MSを使用して、10の構造が、バイカリン、ウォゴニン-7-グルクロニド、オロキシリンA7-グルクロニド、バイカレイン、ウォゴニン、クリシン-7-グルクロニド、ノルウォゴニン-7-グルクロニド、スキューテラリン、クリシン及びオロキシリンAとして明らかになった。

【図4】スキューテラリア・バイカレンシスから単離し、精製されたバイカレインによるCOX-1及びCOX-2の阻害のプロファイルをグラフで示す。化合物を、組み換え羊C

50

OX - 1 (黒四角) または羊COX - 2 ( ) のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを、阻害剤無しのアッセイのパーセント阻害対阻害剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) として提出する。COX - 1の $IC_{50}$ を計算して $0.18 \mu\text{g/mL}$ /酵素の単位であり、COX - 2の $IC_{50}$ を計算して $0.28 \mu\text{g/mL}$ /単位だった。

【図5】スキューテラリア・バイカレンシスから単離し、精製されたバイカレインによるCOX - 1及びCOX - 2の阻害のプロファイルをグラフで示す。化合物を、組み換え羊COX - 1 (黒四角) または羊COX - 2 ( ) のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを、阻害剤無しのアッセイのパーセント阻害対阻害剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) として提出する。COX - 1の $IC_{50}$ は $0.44 \mu\text{g/mL}$ /酵素の単位であると決定され、COX - 2のものは $0.28 \mu\text{g/mL}$ /単位であると決定された。

10

【図6】スキューテラリア・バイカレンシスから単離された標準化遊離 - B - 環フラボノイド抽出物 (HPLCに基づいて83%バイカリン) によるCOX - 1及びCOX - 2の阻害のプロファイルをグラフで示す。抽出物を、組み換え羊COX - 1 (黒四角) または羊COX - 2 ( ) のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを、阻害剤無しのアッセイのパーセント阻害対阻害剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) として提出する。COX - 1の $IC_{50}$ を計算して $0.24 \mu\text{g/mL}$ /酵素の単位であり、COX - 2の $IC_{50}$ を計算して $0.48 \mu\text{g/mL}$ /単位だった。

【図7】アカシア・カテキューから単離し、精製されたカテキンによるCOX - 1及びCOX - 2の阻害のプロファイルをグラフで示す。化合物を、組み換え羊COX - 1 (黒四角) または羊COX - 2 ( ) のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを、阻害剤無しのアッセイのパーセント阻害対阻害剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) として提出する。COX - 1の $IC_{50}$ は $0.11 \mu\text{g/mL}$ /酵素の単位であると決定され、COX - 2の $IC_{50}$ は $0.42 \mu\text{g/mL}$ /単位であると決定された。

20

【図8】アカシア・カテキューから単離された50%の総カテキンを含む標準化フラバン抽出物によるCOX - 1及びCOX - 2の阻害のプロファイルをグラフで示す。抽出物を、組み換え羊COX - 1 (黒四角) または羊COX - 2 ( ) のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを、阻害剤無しのアッセイのパーセント阻害対阻害剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) として提出する。COX - 1の $IC_{50}$ を計算して $0.17 \mu\text{g/mL}$ /酵素の単位であり、COX - 2の $IC_{50}$ を計算して $0.41 \mu\text{g/mL}$ /単位だった。

【図9】水中の80% MeOHを用いてアカシア・カテキューから抽出されたフラバン類のHPLCクロマトグラムを示す。

30

【図10】アカシア・カテキューから得られる精製されたフラバンカテキンによるCOX - 1及びCOX - 2の阻害のプロファイルをグラフで示す。化合物を、組み換えジャガイモ5 - リポキシゲナーゼ活性 ( ) の阻害に関して調べた。データを、阻害剤無しのアッセイのパーセント阻害対阻害剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) として提出する。5 - LOの $IC_{50}$ は $1.38 \mu\text{g/mL}$ /酵素の単位だった。

【図11】実施例14に説明するように、85 : 15の比の遊離 - B - 環フラボノイド類及びフラバン類の抽出物の組合せによって製造したユニベスチン<sup>T M</sup>組成物によるCOX - 1及びCOX - 2の阻害のプロファイルをグラフで示す。ユニベスチン<sup>T M</sup>を、組み換え羊COX - 1 (黒四角) または羊COX - 2 ( ) のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを、阻害剤無しのアッセイのパーセント阻害対阻害剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) として提出する。COX - 1の $IC_{50}$ は $0.76 \mu\text{g/mL}$ /酵素の単位であり、COX - 2の $IC_{50}$ は $0.80 \mu\text{g/mL}$ /単位だった。

40

【図12】実施例14に説明するように、50 : 50の比の遊離 - B - 環フラボノイド類及びフラバン類の抽出物の組合せによって製造したユニベスチン<sup>T M</sup>組成物によるCOX - 1及びCOX - 2の阻害のプロファイルをグラフで示す。ユニベスチン<sup>T M</sup>を、組み換え羊COX - 1 (黒四角) または羊COX - 2 ( ) のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを、パーセント阻害対阻害剤濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) として提出する。COX - 1の $IC_{50}$ は $0.38 \mu\text{g/mL}$ /酵素の単位であり、COX - 2の $IC_{50}$ は $0.84 \mu\text{g/mL}$ /単位だった。

50

【図13】実施例14に説明するように、20:80の比の遊離-B-環フラボノイド類及びフラバン類の組合せ抽出物によって製造したユニベスチン<sup>T M</sup>組成物によるCOX-1及びCOX-2の阻害のプロファイルをグラフで示す。ユニベスチン<sup>T M</sup>を、組み換え羊COX-1(黒四角)または羊COX-2( )のペルオキシダーゼ活性の阻害に関して調べた。データを、阻害剤無しのアッセイのパーセント阻害対阻害剤濃度(μg/mL)として提出する。COX-1のIC<sub>50</sub>は0.18 μg/mL/酵素の単位であり、COX-2のIC<sub>50</sub>は0.41 μg/mL/単位だった。

【図14】ELISAによって決定される、THP-1またはHT-29細胞(ATCC)中でユニベスチン<sup>T M</sup>の次第に増大する濃度が誘発新規合成LTB<sub>4</sub>の量( )に及ぼす影響を示す。組合せ抽出物の活性は、誘発LTB<sub>4</sub>合成の%阻害として表される。

10

【図15】実施例16に説明するように、非誘発細胞中に3 μg/mLユニベスチン<sup>T M</sup>を用いた治療と3 μg/mLイブプロフェンを用いた治療との後にHT-29細胞中に残るLTB<sub>4</sub>レベルをELISAによって決定して比較する。

【図16】ユニベスチン<sup>T M</sup>の様々な濃度がcox-1及びcox-2遺伝子発現に及ぼす影響を比較する。発現レベルを18S rRNA発現レベルに標準化(内部対照)し、次に非治療非LPS状態に基準化する。この図は、LPS-刺激及びユニベスチン<sup>T M</sup>への露出後のcox-1遺伝子発現ではなくcox-2遺伝子発現の減少を証明する。

【図17】3 μg/mLユニベスチン<sup>T M</sup>がcox-1及びcox-2遺伝子発現に及ぼす影響を同等の濃度の他のNSAIDsと比較する。発現レベルを18S rRNA発現レベルに標準化(内部対照)し、次に非治療非LPS状態に基準化する。

20

【図18】炎症の阻害の尺度としての耳腫脹データをグラフで示す。80:20の比の遊離-B-環フラボノイド類及びフラバン類の標準化抽出物の組合せによって製造したユニベスチン<sup>T M</sup>を、未処理のマウス及び経口栄養補給によってインドメタシン(50 mg/kg)を与えられたマウスと比較した。データを、各マウスにつき未治療対治療済み耳たぶのミクロン測定の違いとして提出する。

【図19】非治療マウス(非治療+アラキドン酸)、AA注射無しのマウス(負の対照)または液体キャリアを注射したマウス(ビヒクル対照)と比較して、100 mg/kgのユニベスチン<sup>T M</sup>(80:20)(遊離-B-環フラボノイド類対フラバン類の標準化抽出物の比)がマウスのAA注射した足首(ユニベスチン<sup>T M</sup>+アラキドン酸)に及ぼす影響を示す。

30

【図20】用量250 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>を用いたベースライン、30、60及び90日の治療における疼痛指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図21】用量500 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>を用いたベースライン、30、60及び90日の治療における疼痛指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図22】用量200 mg/日のセレコキシブを用いたベースライン、30、60及び90日の治療における疼痛指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図23】プラセボを用いたベースライン、30、60及び90日の治療における疼痛指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図24】用量250 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>を用いたベースライン、30、60及び90日の治療におけるこわばり指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

40

【図25】用量500 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>を用いたベースライン、30、60及び90日の治療におけるこわばり指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図26】用量200 mg/日のセレコキシブを用いたベースライン、30、60及び90日の治療におけるこわばり指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図27】プラセボを用いたベースライン、30、60及び90日の治療におけるこわばり指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図28】用量250 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>を用いたベースライン、30、60及び90日の治療における機能障害指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図29】用量500 mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>を用いたベースライン、30、60及び90日の治療における機能障害指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

50

【図30】用量200mg/日のセレコキシブを用いたベースライン、30、60及び90日の治療における機能障害指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

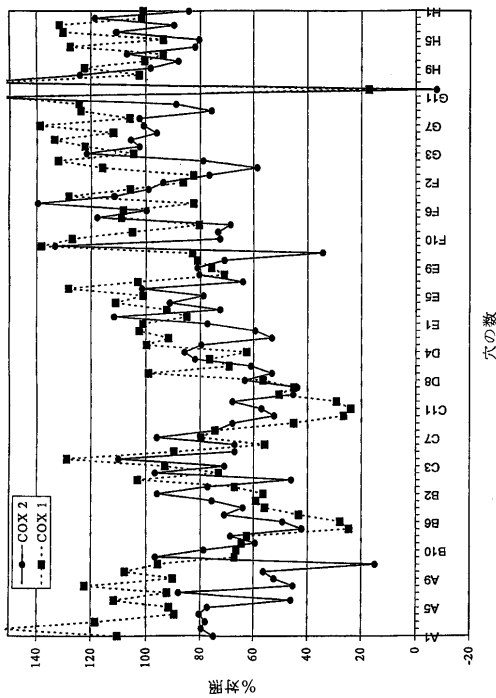
【図31】プラセボを用いたベースライン、30、60及び90日の治療における機能障害指数WOMACスコアの95%信頼区間をグラフで示す。

【図32】200mg/日のセレコキシブ及びプラセボと比較して、用量250及び500mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>がBMIの減少に及ぼす影響を示す。

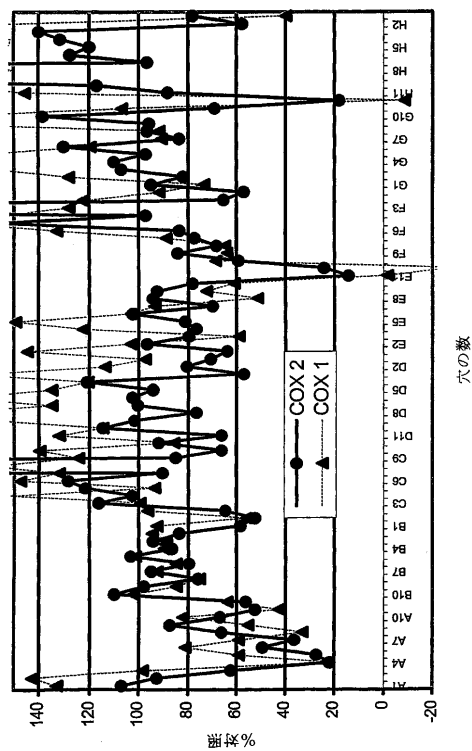
【図33】200mg/日のセレコキシブ及びプラセボと比較して、用量250及び500mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>が体重の減少に及ぼす影響を示す。

【図34】プラセボと比較して、用量250及び500mg/日のユニベスチン<sup>T M</sup>が血中グルコースの低下に及ぼす影響を示す。

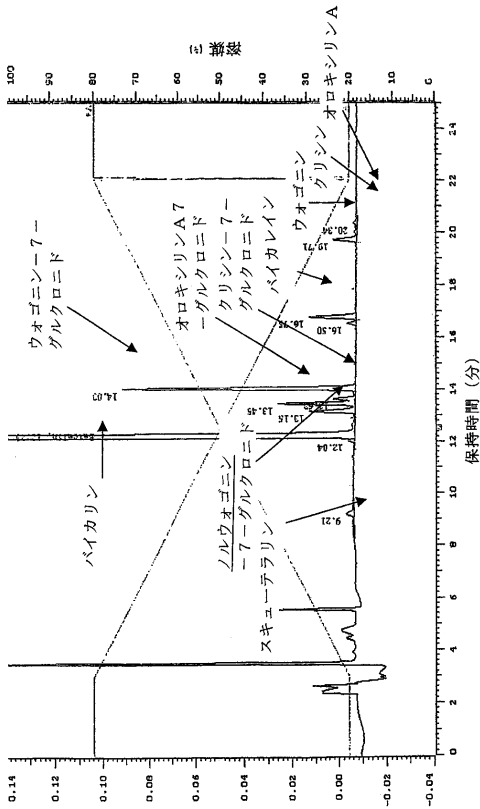
【図1】



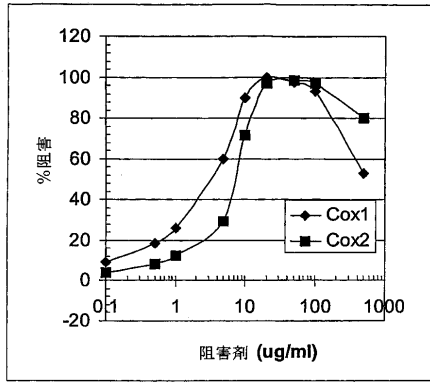
【図2】



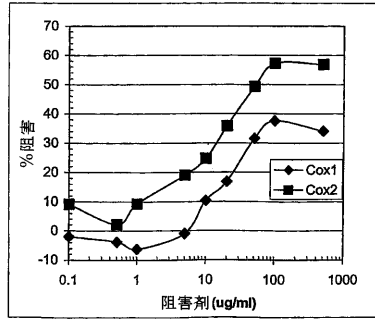
【 図 3 】



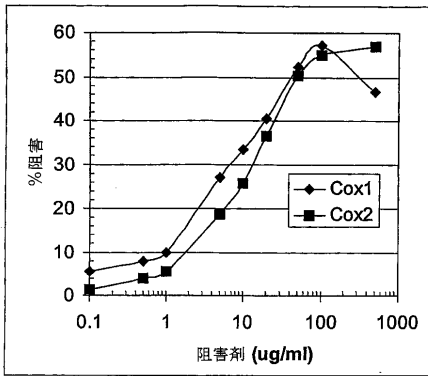
【 図 4 】



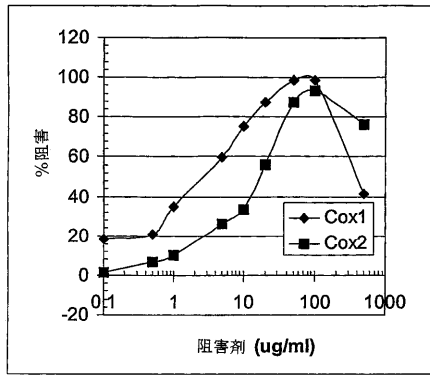
【 図 5 】



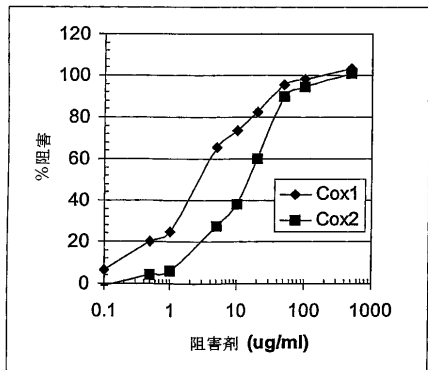
【 図 6 】



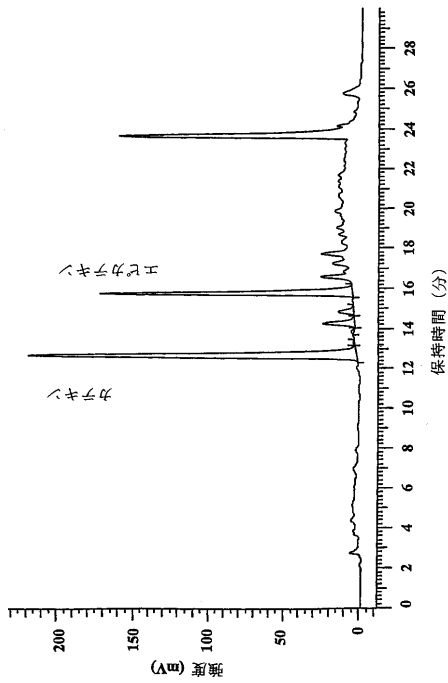
【 図 8 】



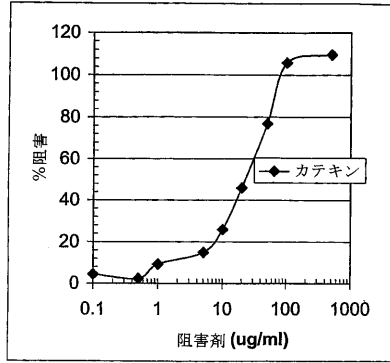
【 図 7 】



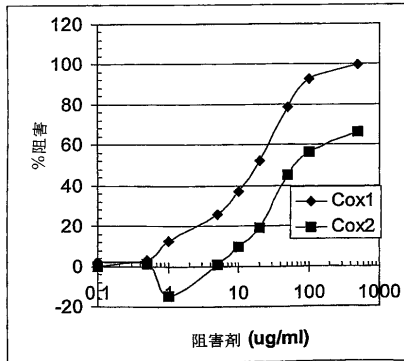
【 図 9 】



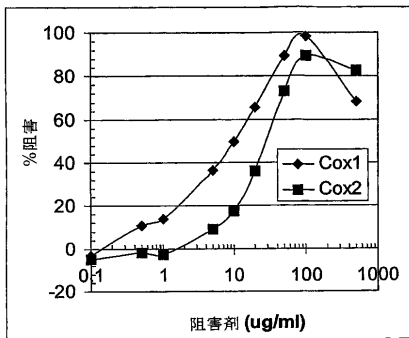
【 図 1 0 】



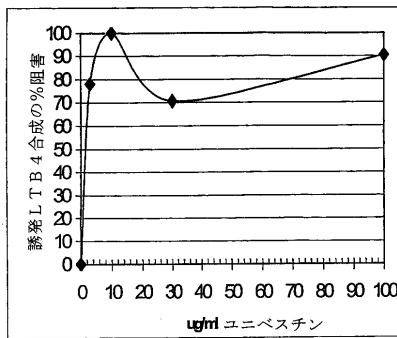
【 図 1 1 】



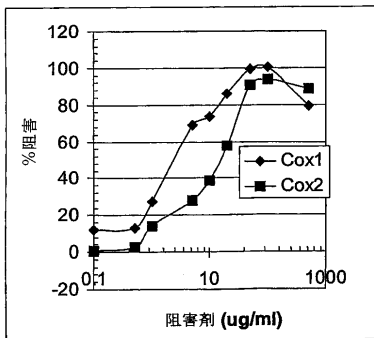
【 図 1 2 】



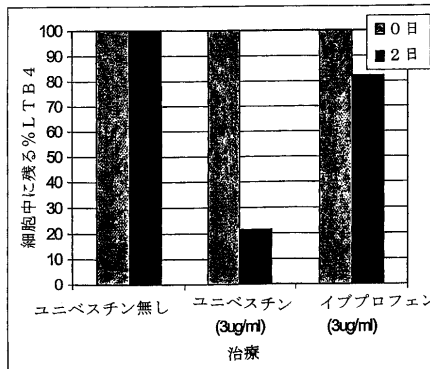
【 図 1 4 】



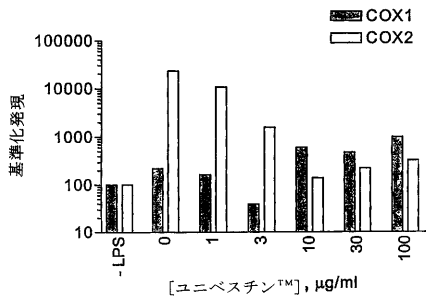
【 図 1 3 】



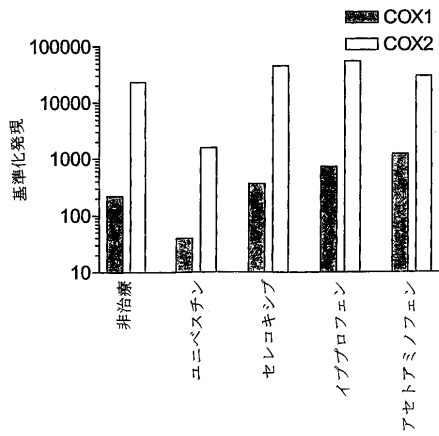
【 図 1 5 】



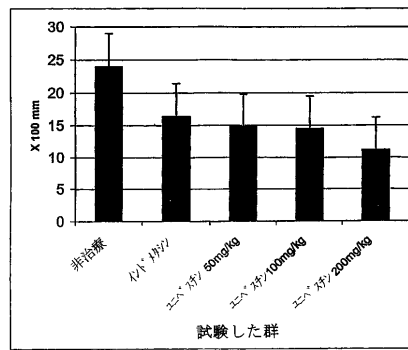
【 図 1 6 】



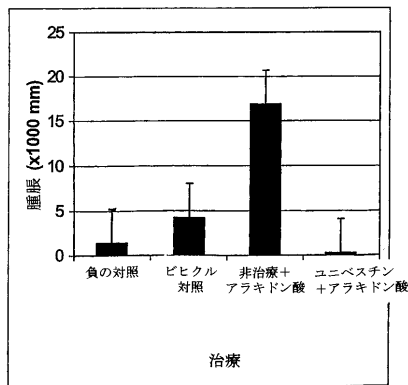
【 図 1 7 】



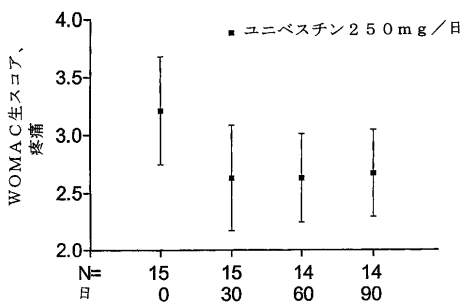
【 図 1 8 】



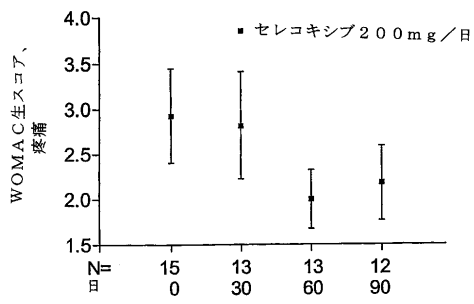
【 図 1 9 】



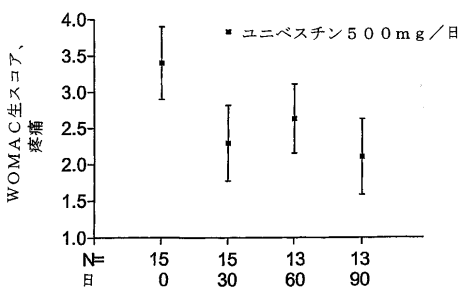
【 図 2 0 】



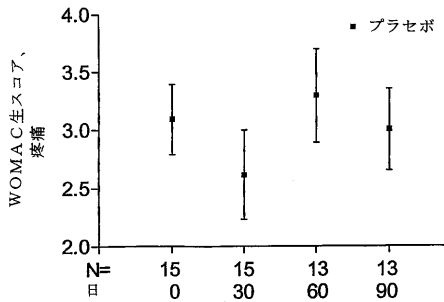
【 図 2 2 】



【 図 2 1 】

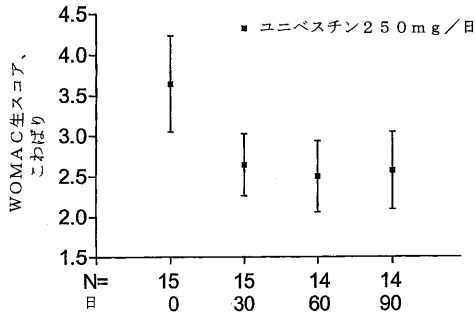


【 図 2 3 】

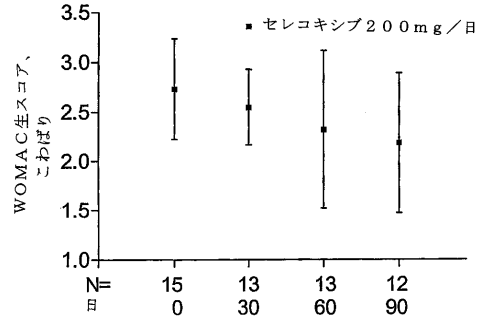




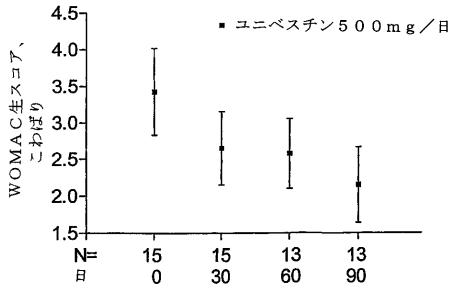
【図 2 4】



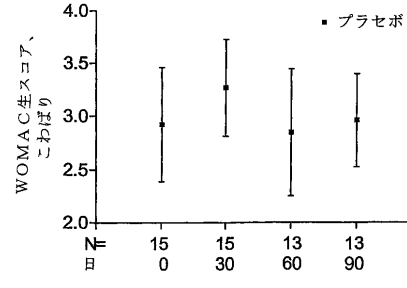
【図 2 6】



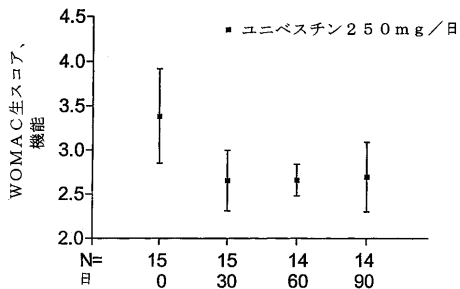
【図 2 5】



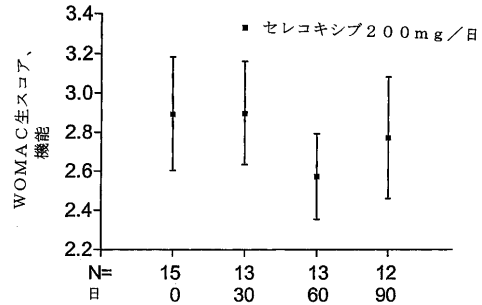
【図 2 7】



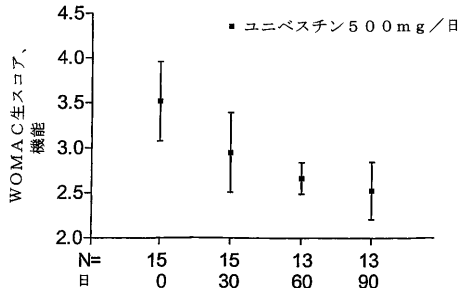
【図 2 8】



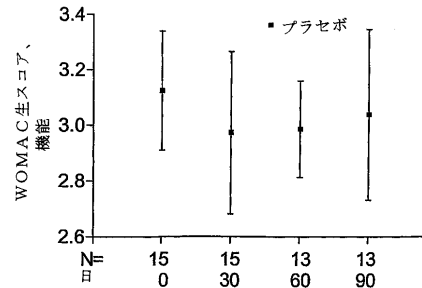
【図 3 0】

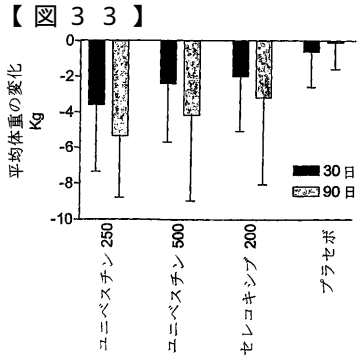
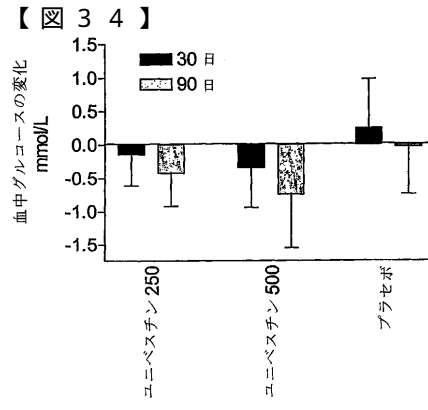
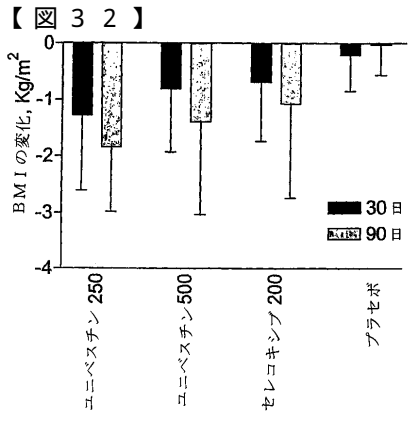


【図 2 9】



【図 3 1】





## 【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/13463
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : A61K 35/84; A61K 31/35 US CL : 424/195.15; 514/456 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/195.15; 514/456		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,093,403A (HUO et al) 25 JULY 2000 (25.07.2000), The abstract, and the claims	1-39
Y	EP 0956867A1 (JIEBEL) 17 NOVEMBER 1999 (17.11.1999), The abstract, and the claims	1-39
Y	JP403240725 (SENU PHARM) 28 OCTOBER 1991 (28.10.1991), see the examples and the claims	1-39
Y	JP 2002053484 (ASASHI BREWERISE) 19 FEBRUARY 2002 (12.02.2002), see the abstract, and the examples.	1-39
Y	US 5,886,029 A (DHALIWAL) 23 MARCH 1999 (23.03.1999), The abstract, and the claims.	1-39
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 06 October 2003 (06.10.2003)	Date of mailing of the international search report 23 DEC 2003	
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. (703)305-3230	Authorized officer Shengjun Wang Telephone No. (703) 305-1235	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US03/13463

**Continuation of Item 4 of the first sheet:**

Title is too long.

New Title: Therapeutic composition comprising free-B-ring flavonoids and flavans.

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

CAS ONLINE, MEDLINE, search terms: flavonoid, flavan, obesity, diabetes, Alzheimer, scutellaria, acacia, acacia catechu, baicalin, baicalein, chrysin, wogonin, catechin, epicatechin, COX I, II, inflammation.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/06	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 31/12	
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100075236  
弁理士 栗田 忠彦

(72)発明者 ジア,キ  
アメリカ合衆国コロラド州80027,スピアリア,ジャスパー・ウェイ 477

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BA08 GA13 GA17 MA02 MA04 MA52 MA56 MA60  
MA63 MA66 NA05 NA14 ZA08 ZA16 ZA36 ZA45 ZA59 ZA70  
ZA89 ZA96 ZB07 ZB13 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35 ZC20 ZC35  
4C088 AB12 AB37 AB46 AC03 AC04 AC05 AC06 AC10 AC11 BA08  
CA03 MA07 MA52 MA56 MA60 MA63 MA66 NA05 NA14 ZA08  
ZA16 ZA36 ZA45 ZA59 ZA70 ZA89 ZA96 ZB07 ZB13 ZB15  
ZB26 ZB33 ZB35 ZC20 ZC35