

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6254580号  
(P6254580)

(45) 発行日 平成29年12月27日 (2017.12.27)

(24) 登録日 平成29年12月8日 (2017.12.8)

(51) Int. Cl.	F I
<b>A 6 1 K 31/352 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/352
<b>A 6 1 K 47/10 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/10
<b>A 6 1 P 17/08 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/08
<b>A 6 1 P 17/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/10
<b>A 6 1 P 17/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/00

請求項の数 12 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2015-512185 (P2015-512185)	(73) 特許権者	514288635
(86) (22) 出願日	平成25年5月15日 (2013.5.15)		テサン・ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-523553 (P2015-523553A)		アメリカ国、カリフォルニア州 9200
(43) 公表日	平成27年8月13日 (2015.8.13)		8、カールスバッド、オーウェンズ・アベニュー 5864、スイート 200
(86) 国際出願番号	PCT/IB2013/053979	(74) 代理人	110001737
(87) 国際公開番号	W02013/171696		特許業務法人スズエ国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成25年11月21日 (2013.11.21)	(72) 発明者	ソーラ、ジャン・ヒレール
審査請求日	平成28年5月16日 (2016.5.16)		スイス国、ツェーハー 1206 ジュネーブ、リュ・ドゥ・ラテネ 22
(31) 優先権主張番号	12168121.7		
(32) 優先日	平成24年5月15日 (2012.5.15)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
		審査官	高橋 樹理

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用皮脂抑制活性を有する AhR 受容体のリガンドを同定する方法、および前記リガンド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高脂漏に関連する皮膚疾患を治療するための局所的な組成物を製造するための 5, 6 - ベンゾフラボンの使用であって、前記 5, 6 - ベンゾフラボンは、前記組成物中に前記組成物の 0.005 重量% ~ 1 重量% の量で存在している使用。

【請求項 2】

前記 5, 6 - ベンゾフラボンの濃度は、前記組成物の 0.1% 重量% ~ 1 重量% である請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記組成物は、0.5% の 5, 6 - ベンゾフラボンを含み、エタノールおよび PEG をさらに含む請求項 1 に記載の使用。 10

【請求項 4】

前記皮膚疾患はニキビである請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

前記皮膚疾患は脂漏性皮膚炎である請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

前記皮膚疾患は酒さである請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 7】

前記組成物は薬学的に許容される担体を含み、前記 5, 6 - ベンゾフラボンは約 0.1 重量% ~ 約 1 重量% の濃度で存在し、前記薬学的に許容される担体は、約 400 g / mo 20

1の平均分子量を有するポリエチレングリコールおよびエタノールを含む請求項1～6のいずれか一項に記載の使用。

【請求項8】

前記5, 6 - ベンゾフラボンは、約0.1重量%の濃度で存在する請求項7に記載の使用。

【請求項9】

前記5, 6 - ベンゾフラボンは、約0.5重量%の濃度で存在する請求項7に記載の使用。

【請求項10】

前記5, 6 - ベンゾフラボンは、約1重量%の濃度で存在する請求項7に記載の使用。

10

【請求項11】

ポリエチレングリコールに対して容量で約1:1の割合でエタノールをさらに含む請求項7から10までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項12】

前記医薬組成物は、溶液であり、前記組成物100ml当たり0.5gの5, 6 - ベンゾフラボンの濃度での5, 6 - ベンゾフラボン、エタノール、およびエタノールに対して容量で約1:1の割合で約400g/molの平均分子量を有するポリエチレングリコールを含む請求項7から10までのいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、局所的皮膚治療における皮脂抑制活性能 (sebosuppressive activity) を決定するために物質を分類する方法に関する。また本発明はこのような選別により識別可能な物質に関する。

【0002】

本発明は、特に、高脂漏 (hyperseborrhea) およびそれによって、関連する皮膚疾患、例えば、ニキビ、脂漏性皮膚炎および酒さなどの治療および/または予防を目的とする局所使用のための医薬組成物に関する。

【背景技術】

30

【0003】

多く物質が、リガンドとして、上皮および間葉皮膚細胞によって顕著に発現されるAhR受容体(アール炭化水素受容体)と相互作用することができる。文献WO2004/041758、WO2007/060256およびWO2007/128725は、そのようなリガンドのアンタゴニスト性またはアゴニスト性を決定するためのインビトロ試験を記載し、皮膚科的治療におけるアンタゴニストリガンドの使用を提案する。現在の当該技術分野において最も頻繁に使用されるこの種のインビトロ試験はCALUXまたはEROD試験である。文献WO2009/093207もまたこのようなインビトロ試験を開示する。

【0004】

40

2, 3, 7, 8 - テトラクロロジベンゾ - p - ダイオキシン(TCDD)が原型であるアゴニストリガンドとしてAhR受容体と相互作用する化合物は、ほとんどが様々な種類の組織病変を誘発するゼノトキック(xenotoxic)な化合物である。この理由により、皮膚機能を調節する活性剤としてのそのようなアゴニスト化合物の治療的および/または予防的使用が、現在の当該技術分野では排除されていると思われる。

【0005】

それとは逆に、出願人は、参照によりその内容をここに引用する、文献WO2009/093207では、AhR受容体のあるアゴニストリガンドの皮膚への適用が、いくつかの皮膚機能、例えば、皮脂腺機能、抗感染防御、創傷治癒、皮膚粗鬆症(dermatoporosis)およびエストロゲン枯渇に関わる皮膚萎縮などを有利に調節できることを示している。

50

その文献において、出願人は、この特性をこれらの皮膚機能の機能不良を治療するために使用でき、またそれらが、ダイオキシンなどのゼノトキシクナリガンドによる過剰な AhR 活性化の 1 つの主要な合併症、すなわち増殖性嚢胞性病変 (proliferative cystic lesions) を引き起こさないようにこれらの物質がどのように選択されるべきかを示した。これらの嚢胞性病変は、正式には「塩素挫瘡」と呼ばれ、これ以後 M A D I S H と呼ぶ (J.H.Saurat et al The cutaneous lesions of dioxin exposure: Lessons from 15 the poisoning of V. Yushchenko, Toxicological Sciences 2012; 125; 310-SI 7)。治療用 AhR リガンドの適用が M A D I S H の原因となることを防ぐために、アゴニストは、それらが迅速に代謝されるように、体内で複数時間 / 複数日の半減期を有するように選択しなければならず、これは、ヒトの皮膚におけるその半減期が複数年において測定され得る原型アゴニスト、ダイオキシンとは異なる。

10

## 【 0 0 0 6 】

文献 W O 2 0 0 9 / 0 9 3 2 0 7 によると、リガンドは好ましくは 4 つの基準を満たすように選択される：

1 . A h R 受容体を活性化する能力。

## 【 0 0 0 7 】

2 . A h R によって制御される特異的遺伝子を調節する能力。

## 【 0 0 0 8 】

3 . 人体において、好ましくは 2 時間 ~ 9 6 時間、より具体的には 6 ~ 2 4 時間の短い半減期。

20

## 【 0 0 0 9 】

4 . 認められたこれらの皮膚機能の機能不良の基準において測定可能な陽性作用。

## 【 0 0 1 0 】

アゴニストの特徴を有するリガンドは数多く存在する。文献 W O 2 0 0 9 / 0 9 3 2 0 7 はそのようなアゴニストリガンドを数種列挙している。それらのいくつかは、N A h R A s ( ナチュラル A h R アゴニスト ) と呼ばれる、所謂 ナチュラルリガンド A h R クラスに属する。

## 【 0 0 1 1 】

ヒトにおいて治療に有効な皮脂抑制作用を有すると思われるこれらのリガンドから最善の候補を実際にどのように同定するのもまた知られていない。現在のアプローチは、適切な動物種における皮脂腺の分化領域の萎縮誘導試験を伴う。これらの試験は、複雑な解釈を必要とし、慎重に取り扱われるべきであり、それらは複数週に亘る検討の下で長期に亘るリガンドの適用を必要とするかもしれない。

30

## 【 0 0 1 2 】

そのため、本発明の目的は、高精度、迅速であり、且つ分類結果と選択された物質のヒト皮膚における皮脂抑制特性との間で高相関性を示す、上述において明示されたような分類方法を提供することである。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 1 3 】

## 発明の主題

40

この目的のために、本発明はインビボ試験を含む、局所的皮膚治療における皮脂抑制活性性能を決定するために物質を分類する方法であって、前記インビボ試験が以下のステップを含む方法を提供する：

- A h R 受容体のリガンドの中から物質を選択すること；
- 皮膚内で C Y P 1 A 1 遺伝子が誘導される哺乳動物を選択すること；
- 皮脂腺に関して選択された前記哺乳動物の皮膚の一部分を、局所的経路を介して、用量 / 反応 / 反応時間プロトコルに従って前記物質を含む組成物で処理すること；
- 前記哺乳動物の皮膚の前記一部分の皮脂腺における C Y P 1 A 1 の発現を免疫組織染色により試験すること；
- 前記皮脂腺のいくつかの異なる種類 ( 区画 ) の細胞における免疫組織化学的標識の発現

50

のシーケンス ( s e q u e n c e ) に関して前記物質を選択すること。

【 0 0 1 4 】

分析に適している皮脂腺を含んでいることが知られており、また C Y P 1 A 1 遺伝子が最も誘導されやすい耳の皮膚を特に選択することが可能である。

【 0 0 1 5 】

前記物質は、前記インビボ試験が所定の時間内に複数の細胞種が染色を示すときに選択される。

【 0 0 1 6 】

試験されるべき前記物質は、好ましくは少なくとも1つのインビトロ試験に基づいてアゴニスト性を有する A h R 受容体のリガンドの中から選択される。

10

【 0 0 1 7 】

N A h R A の中からの最も好ましい性質の候補の選択は、それゆえインビトロ試験に基づいて、例えば C A L U X および E R O D 試験を使用して、十分な A h R アゴニスト作用の証明およびでの短いインビボ半減期の証明を初めに必要とする。

【 0 0 1 8 】

本発明の方法の1つの実施形態によれば、前記哺乳動物はマウスである。C 5 7 / B 6 マウス系統を選択することが可能である。

【 0 0 1 9 】

この実施形態によれば、さらに詳細には前記マウスの耳が局所的経路を介して処理され、次にサンプリングされ、C Y P 1 A 1 の発現が、抗体を使用する免疫化学的分析により試験される；特に、それらに限定されるものではないが、使用される抗体は、ウサギ抗ラット C Y P 1 A 1 ポリクローナル抗体 ( M i l l i p o r e A B 1 2 4 7 ) であってもよい。

20

【 0 0 2 0 】

この実施形態において、皮脂腺における C Y P 1 A 1 の発現の試験は：

- 峡部 ( i s t h m u s r e g i o n ) の試験、特に前駆細胞の試験；
- 当該腺の周辺領域の試験、特に未分化細胞の試験；
- 前記腺の中間領域の試験、特に分化細胞の試験；
- 前記腺の中心領域の試験、特に成熟細胞の試験；

を含み得る。

30

【 0 0 2 1 】

これらの4つの細胞種を試験した後に、1週間の処理の後に少なくとも2つの細胞種において C Y P 1 A 1 の発現が標識されたときに、前記物質は選択されることができる。

【 0 0 2 2 】

これらの4つの細胞種を試験した後に、好ましくは、1週間の処理の後に4つの細胞種において C Y P 1 A 1 の発現が標識されたときに、前記物質が選択される。

【 0 0 2 3 】

そのため、本発明の更なる側面によると、本発明の目的は、ヒトの皮膚疾患、特にニキビ、脂漏性皮膚炎および酒さの治療および/または予防のための組成物であって、前記組成物は、皮膚への前記組成物の局所的な適用によって高脂漏を治療および/または予防するように構成されており、前記物質は

40

- A h R 受容体を活性化する能力；
- A h R により制御されている遺伝子を調節する能力；
- 人体における2時間～96時間の短い半減期；
- 認められた高脂漏の基準において測定可能な陽性作用；

を有する A h R アゴニストリガンドからなる群から選択される活性物質を含み、および

前記活性物質は、先に定義されたインビボ試験によって肯定的に選択される。

【 0 0 2 4 】

本発明は、局所的使用のための皮脂抑制組成物の中の好ましい活性物質として、特に、

50

ベータ - ナフトフラボンとも呼ばれる 5 , 6 ベンゾフラボン ( 5 , 6 B Z F ) を提案する。

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、局所的使用のための皮脂抑制組成物の中の活性物質として、ルテカルピンも提案する。

【 0 0 2 6 】

またさらなる側面よると、本発明の目的は、ヒトの皮膚疾患、例えば、ニキビ、脂漏性皮膚炎および酒さなどを治療および / または予防するための処理方法であって、皮膚への局所的適用により高脂漏を治療および / または予防するように構成されている組成物を提供することと、

前記組成物は：

- A h R 受容体を活性化する能力；
- A h R により制御された遺伝子を調節する能力；
- 人体における 2 時間 ~ 9 6 時間の短い半減期；
- 認められた高脂漏の基準において測定可能な陽性作用；

を有する A h R アゴニストリガンドからなる群から選択された活性物質を含み、  
 ここにおいて、前記活性物質は先に定義されたインビボ試験によって肯定的に選択され、  
 当該ヒトに前記組成物を局所的に投与することを含む、方法である。

【 0 0 2 7 】

本発明の特定の目的は、従って、ヒトにおいて高脂漏に誘導された皮膚状態を治療および / または予防するための方法であって、皮膚への局所的適用のために構成された組成物を提供することと、

前記組成物は活性物質として 5 , 6 ベンゾフラボン ( 5 , 6 B Z F ) を含み、

前記ヒトに前記組成物を局所的に投与することを含む、方法である。

【 0 0 2 8 】

添付の図面についての言及とともに述べられた本発明の特定の実施形態の以下の詳細な説明を通して、当業者であれば治療用の局所的な皮脂抑制活性を有する A h R 受容体のリガンドを同定するための新規な方法をどのように決定することができるかを理解するであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 9 】

【 図 1 】 図 1 は、 1 A、 2 A、 3 A、 4 A 部分を含み、これらは、 C Y P 1 A 1 遺伝子を発現することができる 4 種類の細胞、すなわち： - 前駆細胞 ( 1 )； - 未分化細胞 ( 2 )； - 分化細胞 ( 3 )； - 成熟細胞 ( 4 )；の皮脂腺内部での位置の概略図である。

【 図 2 】 図 2 は、 1 B、 2 B、 3 B、 4 B 部分を含み、これらは、図 1 A、 2 A、 3 A、 4 A に対応する顕微鏡写真観察である； 1 C は 1 B、すなわち前駆細胞の異なる視野角および拡大図を示す。

【 図 3 】 図 3 は、 A h R 受容体のいくつかのリガンドの局所的な適用後の図 1 および図 2 の脂腺細胞のすべての分集団 ( sub-population ) における時間の関数として C Y P 1 A 1 活性の発現を示す。

【 図 4 】 図 4 は、インビトロ試験、本発明に従うインビボ試験および図 3 のリガンドのヒトにおける皮脂抑制活性の臨床試験の相関関係を示す表である。

【 図 5 】 図 5 は、インビトロ試験、本発明によるインビボ試験および 3 つのフラボンのヒトにおける皮脂抑制活性の臨床試験の相関関係を示す表である。

【 図 6 】 図 6 は、 3 つのフラボンによる皮脂産生酵素 ( sebogenic enzymes ) の遺伝子の転写の阻害の比較表である。

【 図 7 】 図 7 は、 3 つの異なる濃度で 5 , 6 B Z F で処理した後に真皮において皮脂腺が占める相対的な表面の比較表である。

【 図 8 】 図 8 は、図 7 と同じ濃度で 5 , 6 B Z F で処理した後の皮脂腺における分化指数の比較表である。

10

20

30

40

50

【図9】図9は、図7と同じ濃度で5, 6 B Z Fで処理した後の分化および成熟脂腺細胞の数の比較表である。

【図10】図10は、図7と同じ濃度で5, 6 B Z Fで処理した後の活性化脂腺の数の比較表である。

【発明を実施するための形態】

【0030】

分類方法の実施形態の説明

本発明に従うヒトにおける脂抑制治療を目的とするAhRのリガンド分子を分類するための方法は、WO 2009/093207に列挙されたいくつかのAhRリガンドの局所的および全身的な投与の際の偶然の予想外の観察結果に基づく。

10

【0031】

当業者が、本発明の最も驚くべき性質をよく理解できるように、技術水準の以下の要素が、核受容体、例えばAhR、またはさらなる例として、レチノイン酸受容体(RAR)、ビタミンD受容体(VDR)などのリガンドの適用により誘発される皮膚における生物学的現象の分布に関して想起されるに違いない。

【0032】

技術水準によれば、リガンドの局所的または全身的な投与により誘発される生物学的活性は：

- 受容体を発現する全ての体の部位において；および
  - 当該リガンドは量的に十分な態様で、また非代謝活性型で、これらの部位において拡散され；
- 均一であるべきである。

20

【0033】

この場合、皮膚へのAhRリガンドの適用は、はじめに表皮の表層で均一にこの受容体の経路を活性化し、その後、リガンドの侵入勾配により、表皮のより深い層、次に恐らく真皮および付属物、毛髪および脂腺へと徐々に拡散する。そのことは事実上公知であり、これは、出願人によって、AhR受容体が皮膚のこれらの区画(compartments)の全てにおいて均一に発現されていることが証明されている。

【0034】

さらに、最も驚くべきことに、出願人は、AhRリガンドの皮膚への適用が、前駆細胞から始まる脂腺における限局的な態様で、すなわち毛包脂腺の峽部領域内に位置する脂腺幹細胞、続いて未分化脂腺細胞、分化脂腺細胞、そして最後に成熟細胞のシーケンスに、この受容体の経路を活性化することを発見した。これらの結果を図1および2に示す。

30

【0035】

さらに驚くべきことに、強い脂抑制活性を持つリガンドは、AhR受容体のインビトロ活性化試験時に最も強い活性を示す必要はなく、図4の表および図3に示されるように初期段階で迅速且つ完全に自然の位置でのこのシーケンスの活性化に従うものである。

【0036】

これらの観察結果は、Rowe MJら(J. Invest. Derm. 2008:128; 1866-68)のものとは異なるために実に驚くべきものである。これらの著者らは、(CYP1A1-GFPプロモーター)トランスジェニックマウスにおいて、全身的経路を介して投与されたAhRリガンドによって誘導された生物学的活性は脂腺に局在することができたが、次の場合には均一になる：

40

- 第1に、出願人の観察では、投与経路が経皮であり、上記で説明された経皮拡散のために優先的な分布が完全に予測できない。Rowe MJらにより行われた研究においては、3-
- メチルコラントレンであるリガンドは血液経路を介した皮膚へ接近を必要とする全身的な経路を介して投与され、このことは脂腺における脂溶性リガンドの分布は驚くべきものではないことを意味する。

【0037】

- 第2に、また特に、本発明の基礎にある活性化シーケンス：前駆 > 未分化 > 分化 > 成

50

熟細胞：は、皮脂腺の領域における生物学的活性の拡散を明示しているRowe MJら(J. Invest. Derm. 2008:128;1866-68)によっては観察されていなかった。Roweらによって示されたこの側面は、本発明の皮脂抑制リガンドを分類するための方法という課題を決定することも、または示唆することもいずれもできるものではないであろう。

【0038】

皮脂腺におけるAhR受容体活性の連続する限局的な領域の証明

ここで説明される実施形態は、この分野で広く使用される例えばCALUXやERODなどの方法を使用して受容体のインビトロでのそれらの活性化特性について既に特徴づけられたAhR受容体のリガンドを用いた、用量/反応/反応時間プロトコルに従う局所的経路を介した、C57/B6マウスの耳の処理を伴う(表1を参照されたい)。

10

【0039】

前記耳はサンプリングされ、CYP1A1発現は、特異的な抗体を使用する免疫組織化学的分析により試験される。図1は、観察された異なる種類の標識を示す。免疫組織化学の陽性、すなわち図2において茶色に染色されている細胞は、その領域がCYP1A1タンパク質を発現していることを示す。

【0040】

1. 基礎的狀態では、前記タンパク質は検出できない。

【0041】

2. AhRリガンドが使用された全ての場合において、CYP1A1免疫組織化学の陽性をもたらす、染色されるのと同時にAhR受容体の活性化により誘導されたCYP1A1タンパク質の増加を示す最初の領域は、皮脂腺の《前駆》細胞が位置する峽部の領域である(図1Aおよび2B)：第1段階。これは多能性増殖性細胞に相当し、それゆえ一般的に《脂腺幹細胞》に相当する。峽部領域の特有のトポロジーに加えて、これらの細胞は峽部多能性増殖細胞のマーカーであるケラチン15およびL-RIG1の発現により特徴づけられる。CYP1A1およびL-RIG1ダブル染色の使用により、局所由来のAhRリガンドによって活性化された細胞が、事実上この峽部領域でのこの個体群に対応すると断定できると考えられた。

20

【0042】

3. 次の段階は、未分化細胞への染色の拡大であり、これは脂質を含有せず、また一般的に皮脂腺の周辺に位置する(図2Aおよび2B)：第2段階。

30

【0043】

4. 次の段階は、分化細胞への染色の拡大であり、これは脂質を含有し、また一般的に皮脂腺の中間部に位置する(図3Aおよび3B)：第3段階。

【0044】

5. 次の段階は、成熟細胞への染色の拡大であり、これは脂質を含有し、また一般的に皮脂腺の中央部に位置する(図4Aおよび4B)：第4段階。

【0045】

連続的な活性化段階とリガンドの皮脂抑制特性との間の対応

図4の表は、局所的な活性化発現の段階および皮脂障害指数、並びにヒト皮膚における作用の間の対応を示す。皮脂障害指数は、皮脂腺の全細胞数に対する成熟および分化細胞の数を数えることにより計算される。成熟および分化細胞の減少は、皮脂産生の障害を表す。ヒト皮膚への作用は、《カジュアルレベル(casual level)》として知られているもの(J. Cosmet Dermatol. 2007 June;6(2):113-8)を使用する皮脂計量試験(sebumetric examination)により決定される。

40

【0046】

図3および図4の表1において、使用される略語は以下の意味を持つ：

NSA1：ルテカルピン

NSA2：ベータナフトフラボン

NSA3：TCDD

NSA4：FICZ

50

N S A 5 : ヒスピジン

N S A 6 : ベータカルボリン

N S A 7 : エソメプラゾール。

【 0 0 4 7 】

図 3 および図 4 ( 表 1 ) 間の比較は、1 週間未満の期間内で 4 つの細胞分集団において A h R 経路を活性化する 2 つのリガンド、すなわち 5 , 6 ベンゾフラボンまたは 5 , 6 B Z F と呼ばれるベータタフトフラボン、および T C D D が、ヒトにおいて最も強い皮脂抑制活性を示すものであることを示す。2 つの細胞分集団内の A h R 経路を活性化するルテカルピンは、5 , 6 B Z F の活性よりも弱いが有用な皮脂抑制活性を潜在的に持っている。一方、他のリガンドは、1 つの細胞分集団の A h R 経路を活性化するのみであり、仮にこの活性が高いレベルに達したとしてもヒトでは弱い皮脂抑制活性を発揮するだけである。

10

【 0 0 4 8 】

5 , 6 B Z F および構造類似体の皮脂抑制特性の説明

5 , 6 B Z F の皮脂抑制活性を、同じ条件の下で、すなわち上述した通りのインビトロ試験、本発明に従うインビボ試験およびヒトにおける臨床試験において 7 , 8 B Z F ( 7 , 8 ベンゾフラボン ) およびフラボンと比較した。結果を図 5 に示す。7 , 8 B Z F またはフラボンではなく、5 , 6 ベンゾフラボンは、最も活性な A h R アゴニスト ( T C D D ) と同じように皮脂腺におけるそのアゴニスト活性を分布するが、一方、フラボンおよび 7 , 8 ベンゾフラボンはこのような作用を有さないことがわかる。いかなる理論によって拘束されることを望むものではないが、組織分布のこの能力は、A h R 受容体への当該分子の親和性に完全には関連していないようであり、これは F I C Z などのより強い親和性を持つ分子は、5 , 6 B Z F ように皮脂腺には分布しないからである。以下に説明するその他の特性と組み合わせると、皮脂腺を標的にするこの特性は、望まれる治療効果を説明することができる。

20

【 0 0 4 9 】

図 6 は、C 5 7 B L / 6 マウスの耳が、5 週間に亘り 0 . 5 % で 3 種類の上記の異なるフラボンで処理された時の実験結果を示す。参考の活性物質は 1 0 0 0 倍低い濃度の T C D D であった。

【 0 0 5 0 】

R N A の抽出の後、R T q P C R 反応を皮脂性脂質の産生における 3 つの主要な酵素について行った。その結果を賦形剤で処理されたコントロールマウスと比較した：図 6 は、3 種のフラボンの中でもつばら 5 , 6 ベンゾフラボンが 3 つの酵素をコードする m R N A の発現を大きく阻害を誘導するのに対して、7 , 8 ベンゾフラボンはむしろ僅かな刺激作用しか持たず、フラボンは顕著な作用を有してはいないことを示す。7 , 8 ベンゾフラボンではなく、5 , 6 ベンゾフラボンは、マウスにおける A W A T 1、E L O V L 3 および F A D S 2 などの皮脂を特徴づける脂質の産生において重要な酵素の遺伝子の発現を強く阻害し、このことはその皮脂抑制作用の部分的に説明する。これらの標的は、先行技術において開示されてはいない。

30

【 0 0 5 1 】

分子構造におけるこれらの差異は、第 1 に受容体活性化特性に関する、第 2 に可溶性に関する変化を引き起こす。これらの後者の特性は前述のように皮脂腺を標的とするための決定因子となり得る。

40

【 0 0 5 2 】

5 , 6 B Z F の用量と皮脂抑制作用との間の関係

皮脂産生の顕著な抑制を得るための 5 , 6 ベンゾフラボンの用量は、特に良好な耐性を確保し、また上述のような M A D I S H 型の囊胞の発現を阻止するために定められるべきであり、それは用量依存性であってもよく、それら自身部分的にこの状況の範囲内で用量に依存する薬物動態に関連していてもよい。

【 0 0 5 3 】

50

この必須段階は、いくつかの局面において達成された。

【0054】

1. マウスにおける用量効果

予備研究は、0.05%よりも高い濃度の良好な耐性と、上述の連続的なインビボ活性化試験における活性とを示した。これらの用量効果試験のために、C57BL/6マウスは、耳に3~5週間に亘り、週に5日、3つの濃度、すなわち0.1、0.5および1%のBZFで処理された。

【0055】

a. 皮脂抑制効果は3週間目に分析されたが、その発現は、1週間後に始まる。図7~10は、非常に顕著な効果を示しており、そこにおいてTCDDなどの有害物質以外の物質では、皮脂腺が占める相対表面およびそれらの活性に関して、並びに未分化、分化および成熟脂腺細胞の割合に関して双方ともにこのモデルにおいて誘発できるものは少ない。特に、腺の分化した区分における減少が観察されたが、これは、脂腺細胞の分化が細胞質の脂質過負荷によって規定されることから、皮脂性脂質生成酵素の遺伝子の抑制効果によく一致している。

10

【0056】

b. MADISH型嚢胞の産生がないときには、耐性は、5週間の処理の後に評価された。これらの高濃度では嚢胞性病変は観察されなかった。これらのマウスにおけるHPLCによる5,6BZFの血液分析は、いずれも観測可能な濃度(検出感度5nM)を検出せず、これは、体内で短命のアゴニストの使用に関するWO2009/093207の教示を裏付ける。

20

【0057】

2. ヒトにおける耐性および効果

a. 5,6BZFの安定的な0.5%処方を明示した。

【0058】

i. 処方: 100mLのエタノール/PEG400(1:1)中で0.5gの5,6BZF。

【0059】

溶媒: エタノール EMSURE(登録商標)メルク社カタログ1.00983番、バッチK42754183。

30

【0060】

ポリエチレン400、フルカ社カタログ81170番、バッチ260154 286またはPEG400、アルドリッチ社カタログ202398番。

【0061】

ii. 安定性: 調製後の6か月で観察された分解産物なし。

【0062】

b. ヒトにおける使用: 当該処方は、強度の脂漏を患い、且つイソトレチノインでの経口治療には適さない11人の患者、6人がニキビ、4人が酒さ、1人が脂漏性皮膚炎を伴う患者の顔面に対して1日1回適用された。

40

【0063】

i. 副作用は認められず、特に小嚢胞の発現を示唆する臨床的兆候は認められなかった。これは、動物で得られた所見の確認をヒトに与えるものである。AhR受容体の活性化のこの分野において種の感応性は非常に重要な意味をもつ; 仮に試験のために選択されたマウス系統がTCDDおよび5,6BZFの局所的作用に対して最も感受性があったとしても。そのためヒトにおけるこの耐性は最も重要なオリジナルデータに値する。それは体内で寿命が短いアゴニストの使用に関するWO2009/093207における教示の正確さを裏付け、且つその明確な適用の例証を与える。

【0064】

ii. 脂漏は、適用の2~3か月後の効果の明確な出現を伴って、著しく減少した。ニキビ、酒さおよび脂漏性皮膚炎の症状は、有意に改善または取り除かれた。予め0.4~0

50

． 5 m g / b w / d a y の中間用量のイソトレチノインを経口投与を受けた患者は、彼らがそれゆえに刺激や不快症状を抑えて処方された局所的な 5 , 6 B Z F で同様の効果を得たと判断された。

【 0 0 6 5 】

iii . 処置後の 6 人において産生された皮脂の総量を測定するための S e b u t a p e (登録商標) ( C U D e r m ) パッチテストの使用は、正常な脂漏の範囲に相当するカジュアルレベルを示した。

【 0 0 6 6 】

本発明の局所的医薬組成物は、前記組成物の 0 . 0 0 5 重量% ~ 1 重量%、特に 0 . 1 重量% ~ 1 重量% の濃度の 5 , 6 ベンゾフラボン ( 5 , 6 B Z F ) を有し得る。

10

【 0 0 6 7 】

結論：関連する皮脂腺の生理病理学的における新規な情報に加えて、本発明は、治療上の使用のための候補皮脂抑制分子の迅速な分類を可能にする。

【 0 0 6 8 】

当業者であれば、本発明の範囲を逸脱することなく、C 5 7 B L / 6 マウス系統以外の他の実験用哺乳動物において、記載されている活性化シーケンスの再現を提供するという条件において、本発明の方法を実施することができることを容易に理解するだろう。

【 0 0 6 9 】

受容体の活性化力を示すインビトロデータとインビボ効果との間の相違は、恐らく各分子に特有の組織内の動態要素を反映している。そのため本発明の方法主題は、皮膚組織内の脂腺細胞を特異的に標的とする調査を可能にすることを初めて記述する。

20

【 0 0 7 0 】

臨床レベルで顕著な皮脂抑制効果の誘導が可能なりガンドは、処理の第 1 週目ほどの初期に第 2 段階を超える。最大の活性は処理の第 1 週目ほどの初期に第 4 段階に達する。

【 0 0 7 1 】

上述の試験の間、本発明によるインビボ試験の後に選択された 5 , 6 ベンゾフラボンはヒトにおける局所的適用として皮脂抑制治療での使用可能性を確認する。

以下に、本願出願の当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[ 1 ]

インビボ試験を含むことを特徴とする、局所的な皮膚治療における皮脂抑制活性能を決定するために物質を分類する方法であって、前記インビボ試験は以下の工程を含む：

30

- A h R 受容体のリガンドの中から物質を選択すること；
- C Y P 1 A 1 遺伝子を発現している哺乳動物を選択すること；
- 皮脂腺を含む前記哺乳動物の皮膚の一部を、局所経路を介して、用量 / 反応 / 反応時間プロトコルに従って前記物質を含む組成物で処理すること；
- 前記哺乳動物の皮膚の前記一部分の皮脂腺における C Y P 1 A 1 の発現を免疫組織化学的染色により試験すること；
- 前記皮脂腺のいくつかの異なる種類の細胞における免疫組織化学的染色の発現のシーケンスの関数に従って前記物質を選択すること。

[ 2 ]

前記インビボ試験が、所定の時間内に複数の細胞種において染色を示すときに前記物質が選択されることを特徴とする上記 [ 1 ] に記載の方法。

40

[ 3 ]

前記物質が少なくとも 1 つのインビトロ試験に基づいてアゴニスト性を有する A h R 受容体のリガンドの中から選択されることを特徴とする上記 [ 1 ] または [ 2 ] に記載の方法。

[ 4 ]

前記インビトロ試験が、C A L U X、E R O D 試験およびそれらの組み合わせの中から選択されることを特徴する [ 3 ] に記載の方法。

[ 5 ]

前記哺乳動物は、当該皮脂腺が：

50

- 前駆細胞
- 未分化細胞
- 分化細胞
- 成熟細胞

の活性化のシーケンスを再現することを可能にするように選択されたマウス系統であることを特徴とする上記[1]~[4]のうちの1つに記載の方法。

[6]

前記哺乳動物が、C57/B6マウス系統であることを特徴とする上記[1]~[5]の1つに記載の方法。

[7]

前記マウスの耳が、局所的経路により処理され、次にサンプリングされ、およびCYP1A1発現が抗体を使用する免疫組織化学的試験によって試験されることを特徴とする[5]または[6]に記載の方法。

10

[8]

皮脂腺におけるCYP1A1の発現の当該試験が：

- 峽部領域の試験、特に前駆細胞の試験；
- 当該腺の周辺領域の試験、特に未分化細胞の試験；
- 当該腺の中間領域の試験、特に分化細胞の試験；
- 当該腺の中心領域の試験、特に成熟細胞の試験；

を含むことを特徴とする、上記[1]~[7]のうちの1つに記載の方法。

20

[9]

CYP1A1の当該発現が、1週間の処理の後に2種類以上の細胞において標識されるときに、前記物質が選択されることを特徴とする[7]に記載の方法。

[10]

CYP1A1の当該発現が、1週間の処理の後に4種類以上の細胞において標識されるときに、前記物質が選択されることを特徴とする[7]に記載の方法。

[11]

ヒトの皮膚疾患、特にニキビ、脂漏性皮膚炎および酒さを治療および/または予防するための組成物であって、前記組成物は、前記組成物の皮膚への局所適用によって高脂漏を治療および/または予防するように構成され、前記組成物は：

30

- AhR受容体を活性化する能力；
- AhRによって制御される遺伝子を調節する能力；
- 人体における2時間~96時間の間の短い半減期；
- 認められた高脂漏の基準において測定可能な陽性作用；

を有するAhRアゴニストリガンドからなる群より選択された活性化物質を含み、および

前記活性化物質は上記[1]~[10]のいずれか1項において記載されるインビボ試験によって肯定的に選択される組成物。

[12]

活性物質として5,6ベンゾフラボン(5,6BZF)を含むことを特徴とする、皮脂産生を減少させることを目的として局所的に使用するための医薬組成物。

40

[13]

ヒトの皮膚疾患、特にニキビ、脂漏性皮膚炎および酒さを治療および/または予防するための医薬組成物であって、前記組成物は、前記組成物の皮膚への局所適用によって高脂漏を治療および/または予防するように構成され、前記組成物は、活性物質として5,6ベンゾフラボン(5,6BZF)を含む医薬組成物。

[14]

5,6ベンゾフラボン(5,6BZF)の濃度が、前記組成物の0.005重量%~1重量%、特に0.1重量%~1重量%であることを特徴とする[12]または[13]に記載の医薬組成物。

50

[ 1 5 ]

局所的に使用するための皮脂抑制組成物における活性物質としての5,6ベンゾフラボン(5,6BZF)。

[ 1 6 ]

局所的に使用するための皮脂抑制組成物における活性物質としてのルテカルピン。

[ 1 7 ]

ヒトの皮膚疾患、例えば、ニキビ、脂漏性皮膚炎および酒さなどを治療および/または予防するための処理方法であって、組成物の皮膚への局所適用によって高脂漏を治療および/または予防するように構成された組成物を提供することと、

前記組成物は：

- AhR受容体を活性化する能力；
- AhRによって制御される遺伝子を調節する能力；
- 人体における2時間～96時間の間の短い半減期；
- 認められた高脂漏の基準において測定可能な陽性作用；

を有するAhRアゴニストリガンドからなる群より選択された活性化物質を含み、前記活性物質は上記[1]～[10]の何れかに記載において記載されたいずれか1つのインビボ試験によって肯定的に選択された物質であり、当該ヒトに対して前記組成物を局所的に投与することを含む、方法。

[ 1 8 ]

皮膚に局所適用するように構成された組成物を提供することと、ここで、前記組成物は活性物質として5,6ベンゾフラボン(5,6BZF)を含み、前記組成物をヒトに局所的に投与することを含む、ヒトにおける高脂漏を治療および/または予防する方法。

[ 1 9 ]

5,6ベンゾフラボン(5,6BZF)の当該濃度が、前記組成物の0.005重量%～1重量%、特に0.1重量%～1重量%である[18]に記載の方法。

【図1】

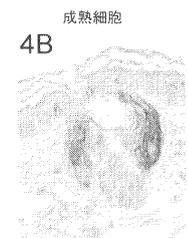
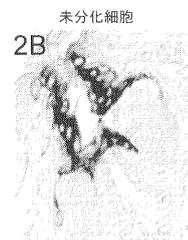
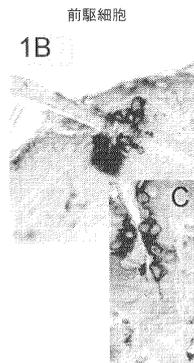
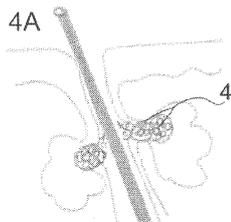
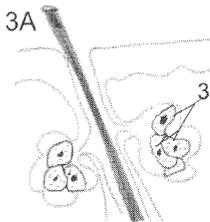
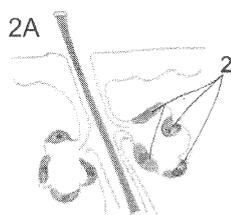
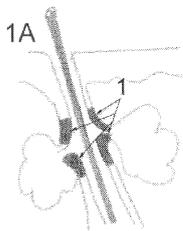
【図2】

図1

Fig.1

図2

Fig.2



10

20

【 図 3 】

図 3

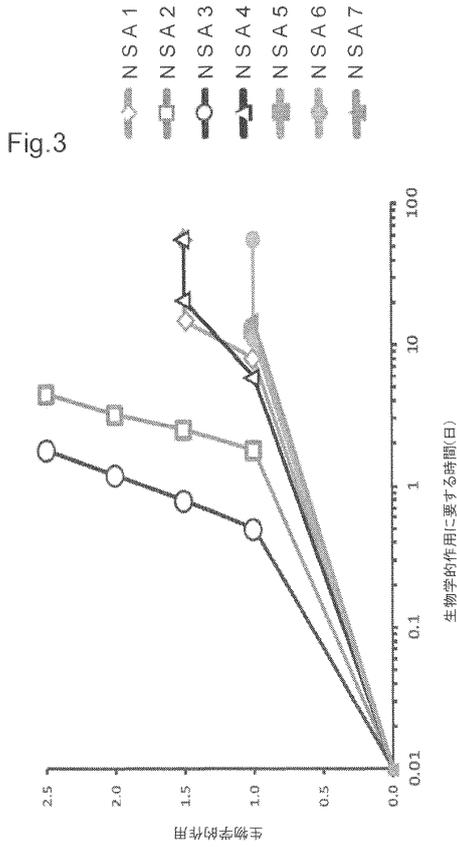


Fig.3

【 図 4 】

図 4

	CALLUXの有効性		ERODの有効性		AHR活性化(Cyp1A1)の局所的な発現				ヒトにおけるおける活性
	濃度	%値 TCDD	濃度	値 TCDD $10^{-11}$	前駆	未分化	分化	成熟	
NSA 1	10	1.0E-05	78	25	第1段階	第2段階	第3段階	第4段階	○
NSA 2	5	1.0E-05	13	20	第1段階	第2段階	第3段階	第4段階	○
NSA 3	0.01	1.0E-11	100	100	第1段階	第2段階	第3段階	第4段階	○
NSA 4	0.1	1.0E-11	76	60	第1段階	第2段階	第3段階	第4段階	○
NSA 5	100	1.0E-04	32	30	第1段階	第2段階	第3段階	第4段階	○
NSA 6	100	1.0E-04	58	10	第1段階	第2段階	第3段階	第4段階	○
NSA 7	100	1.0E-04	17	17	第1段階	第2段階	第3段階	第4段階	○

表1

活性 ○○○ 低い活性 ○○○○ \*皮脂産生抑制(皮脂分化指数)  
効果なし ○○○○

Fig.4

【 図 5 】

図 5

	CALLUXの有効性		ERODの有効性		AHR活性化(Cyp1A1)の局所的な発現			
	濃度M	%値 TCDD	濃度M	値 TCDD $10^{-11}$	前駆	未分化	分化	成熟
TCDD	1.0E-11	100	1.0E-12	100	XXX	XXX	XXX	XXX
5,6ベンゾフラボン (ベータタナフト フラボン)	1.0E-05	13	1.0E-06	20	XXX	XXX	XXX	XXX
7,8ベンゾフラボン (アルファタナフト フラボン)	1.0E-04	18	1.0E-04	4	000	000	000	000
フラボン	1.0E-05	20	1.0E-05	6	XXX	000	000	000

Fig.5

【 図 6 】

図 6

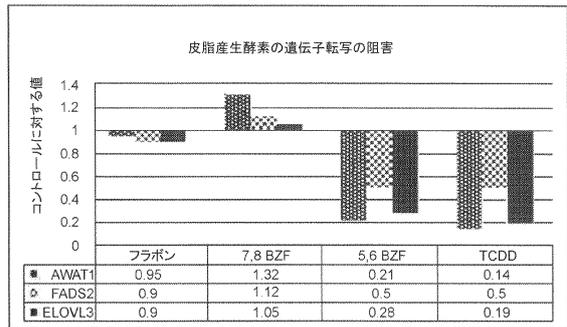


Fig.6

【 図 7 】

図 7

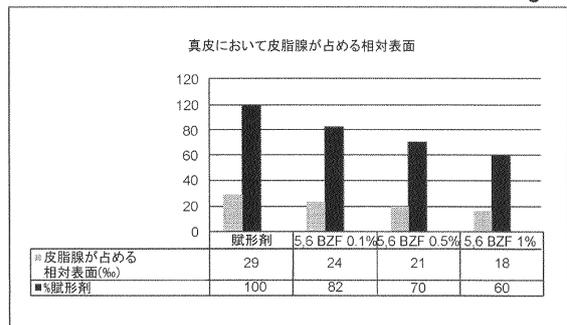
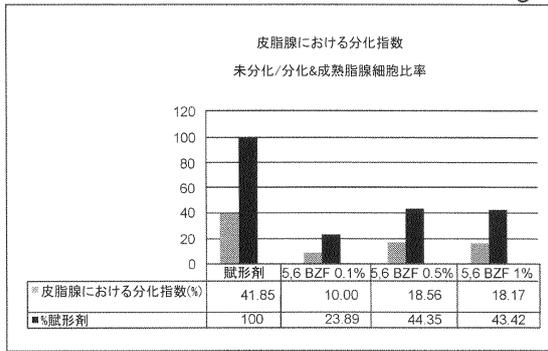


Fig.7

【 図 8 】

図 8

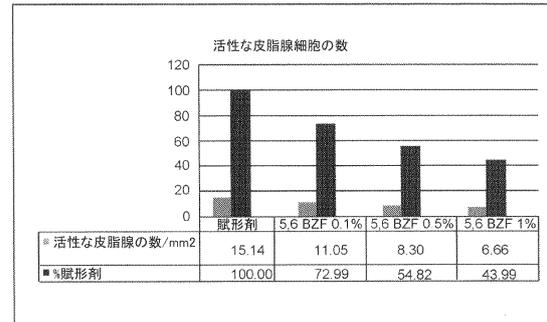
Fig.8



【 図 10 】

図 10

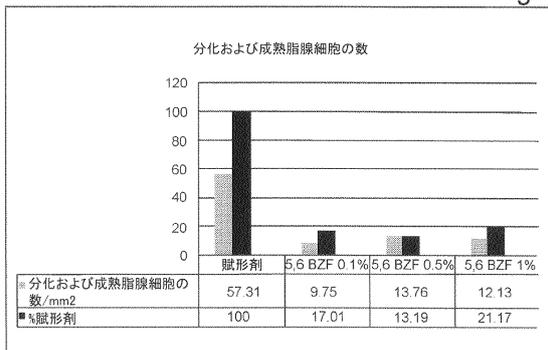
Fig.10



【 図 9 】

図 9

Fig.9



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2004-515453(JP,A)  
米国特許出願公開第2010/0324109(US,A1)  
医薬品添加物事典 2007, 2007, p.279-280  
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2006, Vol.319(3), p.1162-1171

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/352

CAPLUS/REGISTRY(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)