

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6793180号
(P6793180)

(45) 発行日 令和2年12月2日(2020.12.2)

(24) 登録日 令和2年11月11日(2020.11.11)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 36/81	(2006.01)	A 61 K	36/81
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P	43/00
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P	35/00
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 P	43/00
A 61 K 31/675	(2006.01)	A 61 K	39/395

請求項の数 18 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-502049 (P2018-502049)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月25日 (2016.3.25)
 (65) 公表番号 特表2018-509478 (P2018-509478A)
 (43) 公表日 平成30年4月5日 (2018.4.5)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2016/024283
 (87) 國際公開番号 WO2016/160590
 (87) 國際公開日 平成28年10月6日 (2016.10.6)
 審査請求日 平成31年3月15日 (2019.3.15)
 (31) 優先権主張番号 62/139, 163
 (32) 優先日 平成27年3月27日 (2015.3.27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 504412015
ザ リサーチ ファウンデーション フォー ザ ステイト ユニバーシティ オブ ニューヨーク
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 122
O 7 アルバニー ステイト ストリート
35
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌を治療するための方法および物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生のポテトから得られたポテト多糖調製物を含む、哺乳動物において癌細胞によるKRAS
ポリペプチド発現を減少させるための組成物であって、該哺乳動物が、KRASポリペプチド
を発現する癌細胞を有すると同定されており、該ポテト多糖調製物が、誘導体化したとき
にガスクロマトグラフィー/質量分析を使用した評価で少なくとも以下のアシル化糖

- (a) 内部標準として役立つよう1倍に設定される、ミオ-イノシトール、
- (b) ミオ-イノシトール含量の約40倍～約60倍のグルコース、
- (c) ミオ-イノシトール含量の約10倍～約20倍のキシロース、
- (d) ミオ-イノシトール含量の約5倍～約15倍のマンノース、および
- (e) ミオ-イノシトール含量の約3倍～約7倍のガラクトース

をもたらす、前記組成物。

【請求項2】

SHOC2ポリペプチド、ILKポリペプチド、またはHSP9Aポリペプチドの発現を減少させる
、請求項1記載の組成物。

【請求項3】

癌細胞が、結腸直腸癌細胞、非小細胞肺癌細胞、胰臓癌細胞、肝臓癌細胞、または神経
芽腫の癌細胞である、請求項1または2記載の組成物。

【請求項4】

哺乳動物がヒトである、請求項1～3のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 5】

化学療法剤と組み合わせて用いられる、請求項1～4のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 6】

化学療法剤が、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、ハーセプチニン、シクロホスフアミド、ゲムシタビン、カペシタビン、アザシタジン(azacytadine)、ポルテゾミブ、カルボプラチニン、シスプラチニン、エトポシド、イマチニブ、5-フルオロウラシル/ロイコボリン、ドセタキセル、パクリタキセル、nab-パクリタキセル、イリノテカン、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびオキサリプラチニン療法を含む群より選択される、請求項5記載の組成物。

【請求項 7】

哺乳動物に投与されるポテト多糖調製物のポテト多糖成分を該哺乳動物の体重1kg当たり0.05mg～50mgでもたらす量の該ポテト多糖調製物を含む、請求項1～6のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 8】

ポテト多糖調製物を1mg～100mg含む、請求項1～7のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 9】

ポテト多糖調製物を6mg～20mg含む、請求項1～7のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 10】

ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を1mg～100mg含む、請求項1～7のいずれか一項記載の組成物。

20

【請求項 11】

ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を6mg～20mg含む、請求項1～7のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 12】

錠剤の形態である、請求項1～11のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 13】

リポ酸を含む、請求項1～12のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 14】

組成物が トコフェロールを含む、請求項1～13のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 15】

ポテト多糖調製物が、哺乳動物に投与される該ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を該哺乳動物の体重1kg当たり0.075mg～0.5mgでもたらす量である、請求項1～14のいずれか一項記載の組成物。

30

【請求項 16】

ポテト多糖調製物の少なくとも約80パーセントがポテト多糖である、請求項1～15のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 17】

ポテト多糖調製物の少なくとも約90パーセントがポテト多糖である、請求項1～15のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 18】

ポテト多糖調製物の少なくとも約95パーセントがポテト多糖である、請求項1～15のいずれか一項記載の組成物。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****1. 技術分野**

本願は、癌を治療するための方法および物質に関する。例えば、本願は、哺乳動物における癌細胞の数を減少させるためにポテト多糖調製物を含有する組成物を使用することに関する。いくつかの場合では、本願は、哺乳動物におけるv-Ki-ras2カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ(KRAS)ポリペプチドを発現する癌細胞の数を減少させるため

50

にポテト多糖調製物を含有する組成物を使用することに関する。

【背景技術】

【0002】

2. 背景情報

ポテトは、ポテト植物から得られるデンプン質の食用塊茎であり、世界の多くの食糧供給の不可欠な部分をなす。実際に、ポテトは世界で4番目に多い食用作物である。世界中で主要なポテトの種は、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) である。

【発明の概要】

【0003】

概要

10

本願は、癌を治療するための方法および物質を提供する。例えば、本願は、哺乳動物における癌細胞の数を減少させるためにポテト多糖調製物を含有する組成物を使用するための方法を提供する。いくつかの場合では、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物は、哺乳動物におけるKRASポリペプチドを発現する癌細胞の数を減少させるために使用され得る。

【0004】

哺乳動物における癌細胞の数を減少させるために本明細書において記載されるポテト多糖調製物を含有する組成物を使用できることは、臨床医および患者に癌への有効な治療レジメンを提供することができる。

【0005】

20

本願は、ポテト多糖調製物を含有する組成物(例を挙げると、栄養補助組成物)も提供する。例えば、本願は、ポテト多糖調製物を含有する栄養補助組成物、ポテト多糖調製物を得るための方法、ポテト多糖調製物を含有する栄養補助組成物を作製するための方法、および癌に関するポリペプチドの発現を増加させるかまたは低下させるための方法を提供する。

【0006】

いくつかの場合では、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物は、KRASポリペプチドの発現および/またはKRASポリペプチドと機能的に相互に関連する癌遺伝子ポリペプチドの発現を低下させるために使用され得る。

【0007】

30

いくつかの場合では、本明細書において提供される組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物またはポテト多糖調製物)は、癌に関するポリペプチドの発現を増加させるかまたは低下させるために使用され得る。例えば、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物または本明細書において提供されるポテト多糖調製物は、KRASポリペプチド、soc-2クリア抑制因子ホモログ(SOC2)ポリペプチド、インテグリン結合プロテインキナーゼ(ILK)ポリペプチド、熱ショック70kDaタンパク質(HSP9A)ポリペプチド、またはこれらの組み合わせの発現を低下させるために使用され得る。

【0008】

概して、本願の1つの局面は、哺乳動物における癌細胞の数を減少させるための方法を特徴とする。方法は、(a)KRASポリペプチドを発現する癌細胞を有する哺乳動物を同定する工程；および(b)生のポテトから得られたポテト多糖調製物を含む組成物を該哺乳動物に投与する工程であって、該哺乳動物における癌細胞の数が減少される、工程を含むか、またはこれらの工程から本質的になる。組成物は、KRASポリペプチドの発現を減少させ得る。組成物は、SHOC2ポリペプチド、ILKポリペプチド、またはHSP9Aポリペプチドの発現を減少させ得る。癌細胞は、結腸直腸癌細胞、非小細胞肺癌細胞、膵臓癌細胞、肝臓癌細胞、または神経芽腫の癌細胞であり得る。哺乳動物は、ヒトであり得る。組成物は、化学療法剤をさらに含み得る。化学療法剤は、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、ハイセプチン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、カペシタビン、アザシタジン(azacytadine)、ボルテゾミブ、カルボプラチニン、シスプラチニン、エトポシド、イマチニブ、5-フル

40

50

オロウラシル/ロイコボリン、ドセタキセル、パクリタキセル、nab-パクリタキセル、イリノテカン、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびオキサリプラチニン療法を含む群より選択され得る。組成物は、哺乳動物に投与されるポテト多糖調製物のポテト多糖成分を哺乳動物の体重1kg当たり0.05mg～50mgでもたらす量のポテト多糖調製物を含み得る。組成物は、ポテト多糖調製物を1mg～100mg含み得る。組成物は、ポテト多糖調製物を6mg～20mg含み得る。組成物は、ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を1mg～100mg含み得る。組成物は、ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を6mg～20mg含み得る。組成物は、錠剤の形態であり得る。組成物は、リポ酸を含み得る。組成物は、トコフェロールを含み得る。ポテト多糖調製物は、哺乳動物に投与されるポテト多糖調製物のポテト多糖成分を哺乳動物の体重1kg当たり0.075mg～0.5mgでもたらす量であり得る。ポテト多糖調製物の少なくとも約80パーセントは、ポテト多糖であり得る。ポテト多糖調製物の少なくとも約90パーセントは、ポテト多糖であり得る。ポテト多糖調製物の少なくとも約95パーセントは、ポテト多糖であり得る。

【0009】

特に定義した場合を除いて、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて本発明が属する技術分野における当業者によって一般的に解釈されるものと同じ意味を有する。本明細書において記載されるものと類似または同等の方法および物質が本発明の実施または試験に使用され得るが、好適な方法および物質は以下に記載されている。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参照文献は、その全体が参照により組み入れられる。矛盾する場合、定義を含めて本明細書が優先される。さらに、物質、方法、および実施例は、例示にすぎず限定を意図するものではない。

【0010】

[本発明1001]

(a) KRASポリペプチドを発現する癌細胞を有する哺乳動物を同定する工程；および
 (b) 生のポテトから得られたポテト多糖調製物を含む組成物を該哺乳動物に投与する工程であって、該哺乳動物における癌細胞の数が減少される、工程を含む、哺乳動物における癌細胞の数を減少させるための方法。

[本発明1002]

組成物が、KRASポリペプチドの発現を減少させる、本発明1001の方法。

[本発明1003]

組成物が、SHOC2ポリペプチド、ILKポリペプチド、またはHSP9Aポリペプチドの発現を減少させる、本発明1001の方法。

[本発明1004]

癌細胞が、結腸直腸癌細胞、非小細胞肺癌細胞、膵臓癌細胞、肝臓癌細胞、または神経芽腫の癌細胞である、本発明1001の方法。

[本発明1005]

哺乳動物がヒトである、本発明1001の方法。

[本発明1006]

組成物が化学療法剤をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1007]

化学療法剤が、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、ハーセプチン、シクロホスフアミド、ゲムシタビン、カペシタビン、アザシタジン(azacytadine)、ボルテゾミブ、カルボプラチニン、シスプラチニン、エトポシド、イマチニブ、5-フルオロウラシル/ロイコボリン、ドセタキセル、パクリタキセル、nab-パクリタキセル、イリノテカン、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびオキサリプラチニン療法を含む群より選択される、本発明1006の方法。

[本発明1008]

組成物が、哺乳動物に投与されるポテト多糖調製物のポテト多糖成分を該哺乳動物の体重1kg当たり0.05mg～50mgでもたらす量の該ポテト多糖調製物を含む、本発明1001の方法

[本発明1009]

組成物が、ポテト多糖調製物を1mg～100mg含む、本発明1001の方法。

[本発明1010]

組成物が、ポテト多糖調製物を6mg～20mg含む、本発明1001の方法。

[本発明1011]

組成物が、ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を1mg～100mg含む、本発明1001の方法。

[本発明1012]

組成物が、ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を6mg～20mg含む、本発明1001の方法。

[本発明1013]

組成物が錠剤の形態である、本発明1001の方法。

10

[本発明1014]

組成物がリポ酸を含む、本発明1001の方法。

[本発明1015]

組成物がトコフェロールを含む、本発明1001の方法。

[本発明1016]

ポテト多糖調製物が、哺乳動物に投与される該ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を該哺乳動物の体重1kg当たり0.075mg～0.5mgでもたらす量である、本発明1001の方法。

[本発明1017]

ポテト多糖調製物の少なくとも約80パーセントがポテト多糖である、本発明1001の方法

。

20

[本発明1018]

ポテト多糖調製物の少なくとも約90パーセントがポテト多糖である、本発明1001の方法

。

[本発明1019]

ポテト多糖調製物の少なくとも約95パーセントがポテト多糖である、本発明1001の方法

。

本発明の他の特徴および利点は、下記の詳細な説明から、および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0011】

30

【図1】生のポテト(ラセット・バーバンク(Russet Burbank))の10%ACN抽出物のHPLCクロマトグラムである。

【図2】図1に示す生のポテトの10%ACN抽出物から回収し再精製した3.5分ピーク物質のHPLCクロマトグラムである。

【図3】3.5分HPLCピーク物質のLC/MSトレースである。

【図4】3.5分HPLCピーク物質の全NMRスペクトルである。

【図5】3.5分HPLCピーク物質の拡大NMRスペクトルである。

【図6】生のラセット・バーバンクポテトから得た3.5分HPLCピーク物質の誘導体化糖フラグメントのトータルイオンクロマトグラムである。

【図7】ジアセトアミドのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライブラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図8】3-アセトキシピリジンのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライブラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図9】3,4-フランジメタノール、ジアセテートのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライブラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図10】1,2,3-プロパントリオールジアセテートのフラグメンテーションパターンであ

40

50

る。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図11】イミダゾール,2-アセトアミノ-5-メチルのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図12】6,7-ジヒドロ-5H-ピロール[2,1,c][1,2,4]トリアゾール-3-カルボン酸のフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。
10

【図13】酢酸,1-(2-メチルテトラゾール-5-イル)エテニルエステルのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図14】1,2,3,4-ブタントリオール,テトラアセテート(異性体1)のフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図15】1,2,3,4-ブタントリオール,テトラアセテート(異性体2)のフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。
20

【図16】ペンタエリスリトールテトラアセテートのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図17】1,2,3,4,5-ペンタ-o-アセチル-D-キシリトール(異性体1)のフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。
30

【図18】1,2,3,4,5-ペンタ-o-アセチル-D-キシリトール(異性体2)のフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図19】3,5-ジアセトキシベンジルアルコールのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。
。

【図20】-D-ガラクトピラノース,ペンタアセテートのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。
40

【図21】D-マンニトールヘキサアセテートのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図22】ガラクチコール(galacticol),ヘキサアセテートのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。
50

【図23】シクロヘキサンカルボン酸,1,2,4,5-テトラキス(アセトキシ),(1,3,4,5)-(-)のフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図24】ムコ-イノシトール,ヘキサーセートのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図25】D-グルシトール-ヘキサーセートのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。
10

【図26】ミオ-イノシトール,ヘキサーセートのフラグメンテーションパターンである。ピークフラグメンテーションパターンが上のパネルに、化合物ライプラリの対応フラグメンテーションが下のパネルに、両者を重ねあわせたものが中央のパネルに示されている。

【図27】生のオーガニック・イエロー(Organic Yellow)ポテトの10%ACN抽出物のHPLCクロマトグラムである。

【図28】生のパープル(Purple)ポテトの10%ACN抽出物のHPLCクロマトグラムである。

【図29】生のアイダホ・ラセット(Idaho Russet)ポテトの10%ACN抽出物のHPLCクロマトグラムである。
20

【図30】生のユーコン・ゴールド(Yukon Gold)ポテトの10%ACN抽出物のHPLCクロマトグラムである。

【図31】生のカンショの10%ACN抽出物のHPLCクロマトグラムである。

【図32】茹でたパープルポテトの10%ACN抽出物のHPLCクロマトグラムである。

【図33】アイダホ・ラセットポテトからの2つのプールした分画回収物のHPLCクロマトグラムである。

【図34】3gのパープルポテトからの分画回収物のHPLCクロマトグラムである。

【図35】ポテト多糖調製物で処置したZDFラットおよび未処置の対照ZDFラットの肝臓組織試料間の閾値サイクル数の差異を実証する、KRASについてのリアルタイムPCR増幅プロットである。処置ラットの組織についてのより大きいサイクル数は、より低い遺伝子発現と等しい。
30

【図36】ポテト多糖調製物で処置したZDFラットおよび未処置の対照ZDFラットの肝臓組織試料間の閾値サイクル数(曲線が閾値と交差する点)の差異を実証する、ILKについてのリアルタイムPCR増幅プロットである。処置ラットの組織についてのより大きいサイクル数は、より低い遺伝子発現と等しい。

【図37】ポテト多糖調製物で処置したZDFラットおよび未処置の対照ZDFラットの肝臓組織試料間の閾値サイクル数(曲線が閾値と交差する点)の差異を実証する、SHOC2についてのリアルタイムPCR増幅プロットである。処置ラットの組織についてのより大きいサイクル数は、より低い遺伝子発現と等しい。

【発明を実施するための形態】
40

【0012】

詳細な説明

本願は、癌を治療するための方法および物質を提供する。例えば、本願は、哺乳動物における癌細胞の数を減少させるためにポテト多糖調製物を含有する組成物を使用するための方法を提供する。本明細書において記載されるように、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物)は、任意の適切な哺乳動物に、哺乳動物内の癌細胞の数を減少させるため、哺乳動物内の腫瘍成長を減少させるため、哺乳動物の生存期間を増加させるため、および/または哺乳動物内の転移の可能性を減少させるために投与され得る。

【0013】

10

20

30

40

50

いくつかの場合では、本願は、癌を有する哺乳動物(例を挙げると、ヒト)を治療することに関する方法および物質を提供する。本明細書において記載されるように治療され得る哺乳動物の例は、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、アヒル、ウサギ、ヒツジ、ラット、およびマウスを非限定的に含む。本明細書において記載されるように治療され得る癌の例は、結腸直腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝臓癌、または神経芽腫の癌を非限定的に含む。哺乳動物は、任意の適切な癌診断法を使用して癌を有すると同定され得る。

【0014】

いくつかの場合では、本明細書において提供される組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物およびポテト多糖調製物)は、哺乳動物内の癌を治療するためまたは哺乳動物内の癌細胞の数を減少させるために単独でまたは化学療法および/もしくは抗癌免疫療法と組み合わせて使用され得る。本明細書において記載されるように哺乳動物内の癌を治療するためまたは哺乳動物内の癌細胞の数を減少させるために本明細書において提供される組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物またはポテト多糖調製物)と組み合わせて使用され得る化学療法剤の例は、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、ハーセプチニン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、カペシタビン、アザシタジン、ボルテゾミブ、カルボプラチニン、シスプラチニン、エトポシド、イマチニブ、5-フルオロウラシル/ロイコボリン、ドセタキセル、パクリタキセル、nab-パクリタキセル、イリノテカン、ドキソルビシン、メトレキサート、およびオキサリブラチニン療法を非限定的に含む。

【0015】

本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物)を哺乳動物に投与するために、任意の適切な投与経路(例を挙げると、経口または非経口投与)が使用され得る。例えば、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物は、経口投与され得る。いくつかの場合では、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物は、注射によって投与され得る。

【0016】

本明細書において提供される組成物(例を挙げると、栄養補助組成物)は、1つまたは複数のポテト多糖調製物を含み得る。ポテト多糖調製物は、ポテトの水抽出物から得られ、かつC18カートリッジ(例を挙げると、Sep-Pak Plus C-18カートリッジ)から10%アセトニトリルで溶出する能力を有する多糖物質を含有する調製物であり得る。いくつかの場合では、ポテト多糖調製物は、ポテトから得られる、実施例1に記載されるような3.5分で溶出するピークのもののHPLC特性を有する多糖物質を含有する調製物であり得る(図1、2、および27~33も参照されたい)。いくつかの場合では、本明細書において提供されるポテト多糖調製物の多糖は、極性の水溶性多糖であり得る。いくつかの場合には、本明細書において提供されるポテト多糖調製物の多糖は、高度に置換された複合キシログルカン物質であり得る。

【0017】

いくつかの場合では、ポテト多糖調製物は、ポテトから得られる、誘導体化した時にGC/MSを使用した評価で少なくとも次のアシル化糖をもたらす多糖物質を含有する調製物であり得る：(a)ミオ-イノシトール(内部標準として役立つよう1倍に設定)、(b)ミオ-イノシトール含量の約40倍~約60倍のグルコース(例を挙げると、ミオ-イノシトール含量の約50倍のグルコース)、(c)ミオ-イノシトール含量の約10倍~約20倍のキシロース(例を挙げると、ミオ-イノシトール含量の約15倍のキシロース)、(d)ミオ-イノシトール含量の約5倍~約15倍のマンノース(例を挙げると、ミオ-イノシトール含量の約10倍のマンノース)、および(e)ミオ-イノシトール含量の約3倍~約7倍のガラクトース(例を挙げると、ミオ-イノシトール含量の約5倍のガラクトース)。誘導体化手順は、多糖物質の乾燥残渣を形成し、次いでトリフルオロ酢酸を使用して加水分解することを含み得る。次いで、得られた物質を、水素化ホウ素ナトリウムを使用して還元し、ホウ酸塩の除去後、最終生成物を、無水酢酸およびピリジンを使用してアシル化する。次いで、反応の最終生成物を、アシリ

10

20

30

40

50

化糖を同定するためにGC/MSに直接注入する。

【0018】

いくつかの場合では、ポテト多糖調製物は、ポテトから得られる、誘導体化しGC/MSを使用して評価した時に少なくとも4つの主要な成分(3,4-フランジメタノール、ジアセテート；1,2,3,4,5-ペンタ-O-アセチル-D-キシリトール(異性体1)；3,5-ジアセトキシ-ベンジルアルコール；およびD-グルシトール-ヘキサーセート)をもたらす多糖物質を含有する調製物であり得る。例を挙げると、実施例1を参照されたい。いくつかの場合では、ポテト多糖調製物は、ポテトから得られる、誘導体化しGC/MSを使用して評価した時に表1に列挙した化合物をもたらすかまたは図6に示すプロファイルをもたらす多糖物質を含有する調製物であり得る。

10

【0019】

いくつかの場合では、本明細書において提供されるポテト多糖調製物は、実質的に純粋なポテト多糖調製物であり得る。典型的には、実質的に純粋なポテト多糖調製物とは、例えば、HPLCを使用して評価した時に、単一ピークの物質(例を挙げると、単一ピークの多糖物質)を含有する調製物である(例を挙げると、図2および32を参照されたい)。いくつかの場合では、本明細書において提供されるポテト多糖調製物の60、70、75、80、85、90、95、または99パーセント超が、ポテトから得られた多糖物質であり得る。

【0020】

本明細書において提供されるポテト多糖調製物を得るために、任意の適切なポテト種または変種が使用され得る。例えば、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を得るために、ジャガイモ、サツマイモ(*Ipomoea batatas*)、アカウレ(*S. acaule*)、*S. ブカソビイ*(*S. bukasovii*)、*S. レプトフィエス*(*S. leptophyes*)、*S. メギスタクロロバム*(*S. megalostachyos*)、*S. コマーソニイ*(*S. commersonii*)、または*S. インフンジブリフォーム*(*S. infundibuliforme*)が使用され得る。いくつかの場合では、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を得るために、ジャガイモのポテト変種、例えば、オーガニック・イエロー、パープルもしくはブルー(blue)変種、クリーム・オブ・ザ・クロップ(Cream of the Crop)、アディロンダック・ブルー(Adirondack Blue)、アディロンダック・レッド(Adirondack Red)、アガタ(Agata)、アーモンド(Almond)、アンデス・ゴールド(Andes Gold)、アンデス・サン(Andes Sun)、アプライン(Apline)、アルトゥラス(Alturas)、アマンディーヌ(Amandine)、アナベル(Annabelle)、アニヤ(Anya)、アラン・ビクトリー(Aran Victory)、アトランティック(Atlantic)、アバランチ(Avalanche)、バンベルク(Bamberg)、バノック・ラセット(Bannock Russet)、ベル・ド・フォントネ(Belle de Fontenay)、BF-15、ビルトスター(Biltstar)、ピンチエ(Bintje)、ブレイザー・ラセット(Blazer Russet)、ブルー・コンゴ(Blue Congo)、ボノット(Bonnotte)、ブリティッシュ・クイーンズ(British Queens)、カブリタス(Cabritas)、カモタ(Camota)、カネラ・ラセット(Canela Russet)、カーラ(Cara)、カローラ(Carola)、シェリナ(Chelina)、チロエ(Chiloe)、シエロ(Cielo)、クラベラ・ブランカ(Clavela Blanca)、デジレ(Desiree)、エスティマ(Estima)、フィアナ(Fianna)、フィンガーリング(Fingerling)、フラバ(Flava)、ジャーマン・バターボール(German Butterball)、ゴールデン・ワンダー(Golden Wonder)、ゴールドラッシュ(Goldrush)、ホーム・ガード(Home Guard)、イノベーター(Innovator)、アイリッシュ・コブラー(Irish Cobbler)、ジャージー・ロイヤル(Jersey Royal)、ケネベック(Kennebec)、ケールズ・ピンク(Kerr's Pink)、ケストレル(Kestrel)、ケウカ・ゴールド(Keuka Gold)、キング・エドワード(King Edward)、キップラー(Kipfler)、レディ・バルフォア(Lady Balfour)、ラングレード(Langlade)、リンダ(Linda)、マーシー(Marcy)、マルフォナ(Marfona)、マリス・パイパー(Maris Piper)、マークイーズ(Marquis)、メガチップ(Megachip)、モナリザ(Monalisa)、ニコラ(Nicola)、パチャコナ(Pachacona)、パイク(Pike)、ピンク・アイ(Pink Eye)、ピンク・ファー・アップル(Pink Fir Apple)、ブリムラ(Primula)、ランガー・ラセット(Ranger Russet)、ラーテ(Ratte)、レコード(Record)、レッド・ラソーダ(Red LaSoda)、レッド・ノーランド(Red Norland)、レッド・ポンティアック(Red Pontiac)、ルースター(Rooster)、ラセット・バーバンク、ラセット・ノ

20

30

40

50

ーコター(Russet Norkotah)、セルマ(Selma)、シェポーディー(Shepody)、ジーグリンデ(Sieglinde)、シルバートン・ラセット(Silverton Russet)、シリコ(Sirco)、スノーデン(Snowden)、スプンタ(Spunta)、アップ・トゥ・デート(Up to date)、ストブラバ(Stobrawa)、スペリア(Superior)、ビバルディ(Vivaldi)、ビテロッテ(Vitelotte)、イエロー・フィン(Yellow Finn)、またはユーコン・ゴールドが使用され得る。

【0021】

本明細書において提供されるポテト多糖調製物を得るために、任意の適切な方法が使用され得る。例えば、生のポテト物質は、水中で均質化(例を挙げると、ポリトロンホモジナイザーを用いて均質化)し、時折振盪しながら室温で一定期間(例を挙げると、約1時間)維持することができる。このホモジネートを、遠心分離(例を挙げると、4000gで10分間遠心分離)して、あらゆる大きな固体物を除去することができる。得られた上清を固相抽出カートリッジ(例を挙げると、Sep-Pak Plus C-18カートリッジなどのC18カートリッジ)に充填し、10パーセントアセトニトリルで多糖物質を溶出することができる。溶出後、多糖物質を乾燥させ保管(例を挙げると、約4℃で保管)することができる。

10

【0022】

本願は、本明細書において提供される1つまたは複数のポテト多糖調製物を含有する栄養補助組成物も提供する。例えば、アイダホ・ラセットポテトから得られた本明細書において提供されるポテト多糖調製物は、栄養補助組成物に製剤化され得る。

【0023】

本明細書において提供される組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物またはポテト多糖調製物)を製剤化するために、任意の適切な量の本明細書において提供されるポテト多糖調製物が使用され得る。例えば、KRASポリペプチドを発現する癌細胞を有する哺乳動物内の癌細胞の数を減少させるための組成物を製剤化するために、本明細書において提供されるポテト多糖調製物が使用され得る。組成物は、ポテト多糖調製物のポテト多糖成分を約1mg～約750mg(例を挙げると、約1mg～約500mg、約1mg～約250mg、約5mg～約40mg、約5mg～約30mg、約5mg～約20mg、約6mg～約50mg、約6mg～約20mg、約10mg～約25mg、または約15mg～約20mg)含有し得る。いくつかの場合では、組成物(例えば、栄養補助組成物)は、哺乳動物(例を挙げると、ヒト)に対して1日当たり体重1kg当たり約0.05mgのポテト多糖成分～体重1kg当たり約0.5mgのポテト多糖成分を送達するよう製剤化され得る。例えば、栄養補助組成物は、ヒトが1日に1回飲み込むことで体重1kg当たり約0.05mgのポテト多糖成分～体重1kg当たり約0.5mgのポテト多糖成分を提供することができる、単一の経口用組成物に製剤化され得る。

20

【0024】

本明細書において提供される組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物またはポテト多糖調製物)を製剤化するために、任意の適切な方法が使用され得る。例えば、本明細書において記載される成分を有する組成物(例を挙げると、栄養補助組成物)を作製するために、一般的な製剤混合法および調製法が使用され得る。さらに、本明細書において提供される組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物またはポテト多糖調製物)は、任意の形態であり得る。例えば、本明細書において提供される組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物またはポテト多糖調製物)は、丸剤、カプセル剤、錠剤、ジェルキャップ、栄養シェイク飲料、栄養バー、直腸坐剤、舌下坐剤、鼻腔スプレー、吸入剤、または注射用アンプルに製剤化され得る。いくつかの場合では、本明細書において提供される組成物(例を挙げると、栄養補助組成物)は、本明細書において提供される1つまたは複数のポテト多糖調製物を単独で、またはゼラチン、セルロース、デンプン、糖、ベントナイト、乳酸、マンニトール、リポ酸、トコフェロール、L-アスコルビン酸塩、もしくはこれらの組み合わせを非限定的に含む他の成分と組み合わせて含み得る。

30

40

【0025】

本明細書において記載されるように、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物(例を挙げると、本明細書において提供される栄養補助組成物またはポテ

50

ト多糖調製物)は、KRASポリペプチドおよび/または癌に関するポリペプチドの発現を増加させるかまたは低下させるために使用され得る。例えば、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物または本明細書において提供されるポテト多糖調製物は、KRASポリペプチド、SOC2ポリペプチド、ILKポリペプチド、HSP9Aポリペプチド、またはこれらの組み合わせの発現を低下させるために使用され得る。

【0026】

いくつかの場合では、本明細書において提供される組成物は、KRASポリペプチドの発現を約5%～約70%(例を挙げると、約10%～約70%、約15%～約70%、約20%～約70%、約5%～約45%、約5%～約60%、約5～約50%、約15%～約40%、または約20%～約30%)低下させるために使用され得る。いくつかの場合では、本明細書において提供される組成物は、SOC2ポリペプチドの発現を約5%～約50%(例を挙げると、約10%～約50%、約15%～約50%、約20%～約50%、約5%～約45%、約5%～約40%、約5～約35%、約15%～約30%、または約20%～約40%)低下させるために使用され得る。いくつかの場合では、本明細書において提供される組成物は、ILKポリペプチドの発現を約5%～約50%(例を挙げると、約10%～約50%、約15%～約50%、約20%～約50%、約5%～約45%、約5%～約40%、約5～約35%、約15%～約30%、または約20%～約40%)低下させるために使用され得る。いくつかの場合では、本明細書において提供される組成物は、HSPA9ポリペプチドの発現を約5%～約50%(例を挙げると、約10%～約50%、約15%～約50%、約20%～約50%、約5%～約45%、約5%～約40%、約5～約35%、約15%～約30%、または約20%～約40%)低下させるために使用され得る。

【0027】

ヒトでは、本明細書において提供されるポテト多糖調製物を含有する組成物または本明細書において提供されるポテト多糖調製物は、ヒトKRASポリペプチド、ヒトSOC2ポリペプチド、ヒトILKポリペプチド、ヒトHSP9Aポリペプチド、またはこれらの組み合わせの発現を低下させるために使用され得る。

【0028】

ヒトKRASポリペプチドは、GenBank(登録商標)アクセション番号NP_203524.1(GI番号15718763)に記されたアミノ酸配列を有し得、GenBank(登録商標)アクセション番号NP_033360.2(GI番号34485724)に記された核酸配列によってコードされ得る。いくつかの場合では、ヒトKRASポリペプチドは、GenBank(登録商標)アクセション番号NM_004976.2(GI番号15718761)に記されたアミノ酸配列を有し得、GenBank(登録商標)アクセション番号NM_004985.3(GI番号34485723)に記された核酸配列によってコードされ得る。いくつかの場合では、ヒトKRASポリペプチドは、GenBank(登録商標)アクセション番号XP_005253422.1(GI番号530399133)に記されたアミノ酸配列を有し得、GenBank(登録商標)アクセション番号XM_005253365.1(GI番号530399132)に記された核酸配列によってコードされ得る。ヒトSOC2ポリペプチドは、GenBank(登録商標)アクセション番号NP_031399.2(GI番号41281398)に記されたアミノ酸配列を有し得、GenBank(登録商標)アクセション番号NM_001269039.1(GI番号392841223)に記された核酸配列によってコードされ得る。ヒトILKポリペプチドは、GenBank(登録商標)アクセション番号CAG28601.1(GI番号47115283)に記されたアミノ酸配列を有し得、GenBank(登録商標)アクセション番号NM_001014794.2(GI番号510785737)に記された核酸配列によってコードされ得る。ヒトHSP9Aポリペプチドは、GenBank(登録商標)アクセション番号NP_004125.3(GI番号24234688)に記されたアミノ酸配列を有し得、GenBank(登録商標)アクセション番号NG_029469(GI番号340523104)に記された核酸配列によってコードされ得る。

【0029】

本願は、特許請求の範囲に記載された発明の範囲を限定するものではない次の実施例においてさらなる説明を提供する。

【実施例】

【0030】

実施例1-ポテト多糖調製物の同定および特徴付け

ジャガイモ種のラセットポテト変種6gを、ポリトロンホモジナイザーを用いて50mLの遠

10

20

30

40

50

心分離管において20mLの水中で均質化し、室温で1時間放置した。ホモジネートを4000rpmで10分間遠心分離した。Sep-Pak Plus C-18カートリッジを10mLの100%アセトニトリル(ACN)で活性化し、10mLの0.05%トリフルオロ酢酸水溶液(TFA水)で洗浄した。カートリッジに上清を10mL充填し、カートリッジを通過するH₂Oをすべて1.5mLのエッペンドルフチューブに回収した。次に、10mLの2%ACN(0.05%TFA水中)をカラムに通過させ、溶出液を1.5mLのエッペンドルフチューブに回収した。次に、10mLの5%ACN(0.05%TFA水中)を使用してカラムを洗浄し、溶出液を1.5mLのエッペンドルフチューブに回収した。最後に、10mLの10%ACN(0.05%TFA水中)を、カラムを通過した後に1.5mLのエッペンドルフチューブに回収した。全ての画分を乾燥させ、同じACN濃度の乾燥画分を、HPLCを介したさらなる精製のために1本のチューブに1mLの0.05%TFA水で再構成するか、または細胞処理に使用するために1mLのリン酸緩衝食塩水で再構成した。

【0031】

フォトダイオードアレイ検出器を備えたWaters 2695分離モジュールを使用して10%ACN抽出物を精製した。移動相として0.05%TFA水を用いた分離のためにXterraRP C18カラム(4.6 X 150mm)を使用した。各HPLCランは、0~2.5%ACNの範囲の20分間の勾配とした。注入容量は100 μLであり、流速は0.5mL/分であった。10%ACN抽出物のHPLC分画により、3.5、3.9、および12.1分で溶出した3つの主要なUV吸収ピークを得た(図1)。3.5分画分の回収およびHPLC再精製により、198.3nmで最大吸光度を示す対称ピークを得た(図2)。

【0032】

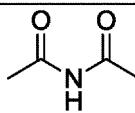
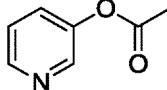
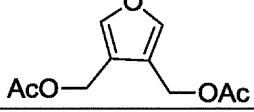
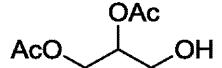
対称性の3.5分HPLCピーク物質のさらなる化学的特徴付けを実施した。プールした3.5分HPLC画分を乾燥させ、1mLのTFA水で再構成し、タンデムLC/MS/MS(図3)およびNMR化学分析(図4および5)に供した。NMR分析では、試料をさらに分析するために、溶媒として酸化ジユウテリウム(D₂O)を使用して試料の¹H-NMRを行った。4.65PPMでの水のピークは溶媒で抑制され、スペクトルは数時間取得した。1.9PPMでのアセトニトリルと共に、アセトアミドが3.2PPMで検出された。1.05PPM、1.17PPM(ブロードピーク)、1.189PPM、および1.864PPMで小さなピークが検出された。プロトンNMRにおける高分子物質の1つの特徴は、1.17PPMでのシフトなどのピークのブロード化であった。NMRにおけるこれらのシフトは4.8PPMのピークを表し得、多糖などの極性の水溶性高分子を示唆した。まとめると、これらの結果から、3.5分で溶出するHPLC精製画分に含有される高分子量多糖物質の存在が確認された。

【0033】

さらなる分析により、3.5分で溶出するHPLC精製画分は多糖物質(例を挙げると、高度に置換された複合キシログルカン物質)を含有することが確認された。多糖物質をガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)によって分析可能にするために、その誘導体化糖フラグメントへと変換した。簡潔に記載すると、試料を濃縮して乾燥残渣にし、これをトリフルオロ酢酸を使用して加水分解した。次いでこれを水素化ホウ素ナトリウムを使用して還元し、ホウ酸塩の除去後、最終生成物を無水酢酸およびピリジンを使用してアシル化した。反応の最終生成物を、あらゆるアシル化糖を同定するためにGC/MSに直接注入した。最終分析に基づくと、より大きな糖が試料中に存在していた。トータルイオンクロマトグラム(TIC)を添付の図6に示し、適切なピーク標識を以下の表1に示す。同定した主要な成分は、太字で表示する(ピーク3、12、14、および21)。各化合物について対応するフラグメントーションパターンは、図7~26に提供する。各フラグメントーションについて、ピークフラグメントーションパターンが上部にあり、化合物ライプラリの対応フラグメントーションが下部にあり、両者を重ねあわせたものが中央にある。最後に、標識していないピークは、カラムブリードであるか、または化合物ライプラリとは十分な一致がなかった。

【0034】

(表1) GC/MS結果の概要

ピーク	保持時間 (min)	化合物名	構造
1	10.731	ジアセトアミド	
2	13.669	3-アセトキシピリジン	
3	19.568	3, 4-フランジメタノール, ジアセテート	
4	19.950	1,2,3-プロパントリオール ジアセテート	

5	23.387	イミダゾール, 2-アセトアミノ-5-メチル	
6	23.499	6, 7-ジヒドロ-5H-ピロール[2, 1, c][1, 2, 4]トリアゾール-3-カルボン酸	
7	24.304	酢酸, 1-(2-メチルテトラゾール-5-イル)エテニルエステル	
8	25.538	1, 2, 3, 4-ブタントリオール, テトラアセテート	
9	27.412	(1, 5) β (1, 3)トリアセチルD-ガラクトサン(立体異性体1)	
10	28.188	(1, 5) β (1, 3)トリアセチルD-ガラクトサン(立体異性体2)	
11	29.210	ペンタエリスリトールテトラアセテート	
12	29.727	1,2,3,4,5-ペンタ-o-アセチル-D-キシリトール(異性体1)	
13	30.697	1,2,345-ペンタ-o-アセチル-D-キシリトール(異性体2)	
14	32.477	3, 5-ジアセトキシ-ベンジルアルコール	
15	32.677	β -D-グルコピラノース, ペンタアセテート	
16	33.012	D-マンニトールヘキサアセテート	

10

20

30

40

17	33.106	β -D-ガラクトピラノース、 ペンタアセテート	
18	33.206	ガラクチコール、 ヘキサアセテート	
19	33.364	シクロヘキサン カルボン酸、 1, 2, 45-テトラキス (アセトキシ), (1 α , 3 α , 4 α , 5 β)--(-)	
20	33.582	ムコ-イノシトール、 ヘキサアセテート	
21	33.006	D-グルシトールー ヘキサアセテート	
22	34.463	ミオ-イノシトール、 ヘキサアセテート	

【0035】

これらの結果は、より大きな糖の構成単位として働く糖モノマーの存在を実証している。これら様々な分析から、ポテト多糖調製物は高度に置換された複合キシログルカンであることが明らかになった。

【0036】

実施例2-カンショおよび複数のポテト変種がポテト多糖物質の存在を示す

ジャガイモの複数の変種(オーガニック・イエロー、パープル、アイダホ・ラセット、およびユーコン・ゴールド)からのポテト物質6グラムおよびカンショ(サツマイモ)からの物質6グラムを、20mLの水中に抽出した。次いでその水10mLをsep-pakカートリッジに充填し、次いでカートリッジを10mLの10%ACNで溶出した。次いでACNを乾燥させ、残渣を1mLの水に溶解した。HPLCを使用して、この水100 μ Lを注入して評価した。

【0037】

HPLCクロマトグラムは、試験した全5種類のポテトについては最初のピーク(210nmで3.5分)の量が同じであることを実証した(図27~31)。

【0038】

別の実験では、茹でたパープルポテトから物質を抽出し分析した。3.5分のピークは、茹でたポテトでは減少しなかった(図32)。

【0039】

アイダホ・ラセットポテトからの2つのブールした分画回収物から3.5分ピークを回収し、乾燥させ、100 μ Lの水で再構成した。次いで物質をHPLCに注入して、3.5分で単一のピークを得た(図33)。まとめると、これらの結果は、ジャガイモ種およびサツマイモ種内のポテトがポテト多糖物質を含有することを実証している。

【0040】

実施例3-ポテト多糖調製物の分析

ポテト多糖調製物を、パープルポテト3gからHPLCを使用して精製した。ポテト多糖ピークは、約5分で溶出した(図34)。このピークは、3.5分ピークを得るために使用したカラムと比較して異なるクロマトグラフィーカラム(10mm x150mm)を使用して得られた。このカラムはより大きな分取カラムであり、流量は1.5mL/分であったので、ポテト多糖の溶出時間は5分であった。

【0041】

実施例4-KRAS発現ヒト神経芽腫細胞株へのポテト多糖調製物のインビトロ投与

神経芽腫の樹立細胞株における発癌性KRASおよび相互作用する可能性のある癌遺伝子の発現に対するポテト多糖調製物の投与の効果を判定するために、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(ATCC)から入手したHTB-11神経芽腫細胞を、標準培地を使用した6ウェル培養プレートの各ウェルに 5×10^5 細胞/2mLの濃度で播種した。別個のインキュベーションで、HTB-11神経芽腫細胞に、精製ポテト多糖調製物を60 μg/mLの最終濃度で、またはポテト多糖調製物ベヒクルを、4時間投与した。インビトロポテト多糖調製物試験は三つ組で実施した。

10

【0042】

ポテト多糖調製物の抽出および精製

典型的には、ポテト6gをポリトリロンホモジナイザーを用いて50mLの遠心分離管において20mLの水中で均質化し、室温で1時間放置した。ホモジネートを4000rpmで10分間遠心分離し、上清画分を確保した。10mLの100%アセトニトリル(ACN)に続いて10mLの0.05%トリフルオロ酢酸水溶液(TFA水)で予め活性化したSep-Pak Plus C-18カートリッジに10mLの上清画分を通して浸透させた。連続的な低ACN洗浄の後、半精製ポテト多糖調製物を10mLの0.05%TFA水中10%ACNで溶出した。溶出液画分を乾燥させ、HPLCを介したさらなる精製のために1mLの0.05%TFA水で再構成した。

20

【0043】

再構成した10%ACN溶出液画分を、Waters Xterra RP C18カラム(4.6X150mm)と、フォトダイオードアレイ検出器を備えたWaters 2695分離モジュールとを利用したHPLC精製に供した。HPLC精製には、0.5mL/分の流速で0.05%TFA水において0~2.5%のながらかな20分間の勾配を採用した。3.5分での主要な198nm UV吸収ピークの回収およびHPLC再精製により、高精製ポテト多糖調製物を含有する対称HPLCピークを得た。精製されたHPLC画分を乾燥させ、生物学的実験で使用するためにリン酸緩衝食塩水(PBS)で再構成した。

30

【0044】

RNA単離

HTB-11神経芽腫細胞を精製ポテト多糖調製物とインキュベーションした後、RNeasyミニキット(Qiagen、Valencia、CA)を使用して全RNAを単離し精製した。簡潔に記載すると、ペレット状にした細胞を600 μLのRLT溶解緩衝液(Qiagen)に再懸濁し、溶解液を1mLピペットチップに20回通過させることによって均質化した。次いで試料をメーカーの指示書(Qiagen、Valencia、CA)に従って処理した。最終工程で、50 μLのRNase不含水を用いて1分間13,000gでの遠心分離によってRNAを溶出した。メーカーのプロトコルに従って全RNAナノチップを使用してモデル2100バイオアナライザー(Agilent、Santa Clara、CA)でRNAを分析した。

40

【0045】

DNAマイクロアレイ分析

DNAマイクロアレイ分析は、Agilentによって提供されたシステムを用いて実施した。アレイは、1チップ当たりアレイを4つ含んでいた(Agilent 4X44Kチップ)。全RNAは、T7プライマーを使用して逆転写(400ng)し、シアニン-3色素を使用して標識および転写した。各アレイは、少なくとも1.65 μgの標識cRNAと65 °Cで18時間ハイブリダイズさせた。アレイは、Agilentアレイスキャナーを使用して走査した。アレイ画像は、Agilent特徴抽出ソフトウェアを用いて抽出し、遺伝子発現の変化は、Genespringバージョン12.6を使用して算出した。

50

【 0 0 4 6 】

結果

HTB-11神経芽腫細胞への精製ポテト多糖調製物のインビトロでの4時間の投与は、DNAマイクロアレイ分析によって観察されるように、発癌性KRAS遺伝子の発現の $21.4 \pm 8.0\%$ の統計的に有意な減少を引き起こした。さらに、表2に示されるように、相互作用性SHOC2およびILK癌遺伝子の発現の、それぞれ $16.7 \pm 3.1\%$ および $23.9 \pm 2.5\%$ の同調的減少が見られた。SHOC2遺伝子産物は、KRAS/ERK/MAPキナーゼシグナル伝達カスケードを連結すると推定される反復ロイシンリッチリピートを有する細胞骨格タンパク質である。発癌性KRASおよびSHOC2の発現の同調的な調節不全は、主要なクラスのヒト癌において表皮EGFR媒介性シグナル伝達によるERK1/2活性化の通常の調節を無効にすることがある。さらに、KRASおよびSHOC2変異は、血液悪性腫瘍ならびに特定の神経芽腫および胎児性横紋筋肉腫の固形腫瘍につながる常染色体優性疾患であるヌーナン症候群の発症と関連付けられている。発癌性ILKは、原発性腫瘍細胞の増殖および転移成長と機能的に関連付けられる細胞内インテグン：アクチン架橋タンパク質である。したがって、腫瘍の成長、生存、および転移において発癌性KRAS、SHOC2、およびILKが同調的に機能的に動員される場合があり、これは、ポテト多糖調製物が、癌(例えば、ヒト癌)を治療するために単独でまたは1つもしくは複数の化学療法剤と組み合わせて使用され得ることを実証している。10

【 0 0 4 7 】

(表2) ポテト多糖調製物のインビトロ投与による発癌性KRAS、SHOC2、およびILK癌遺伝子の低減した発現。P値は <0.05 である。上に記載されるように、データセットはDNAマイクロアレイ分析によって導き出された。20

遺伝子記号	遺伝子名	%減少
KRAS	カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ 転写物 b mRNA NM_004985.3 GI:34485723 タンパク質 NP_004976.2 GI:15718761 転写物 X1 mRNA XM_005253365.1 GI:530399132 タンパク質 XP_005253422.1 GI:530399133 転写物 a mRNA NM_033360.2 GI:34485724 タンパク質 NP_203524.1 GI:15718763	21.4±8.0
SHOC2	soc-2クリア抑制因子ホモログ mRNA NM_001269039.1 GI:392841223 タンパク質 NP_031399.2 GI:41281398	16.7±3.1
ILK	インテグリン結合キナーゼ mRNA NM_001014794.2 GI:510785737 タンパク質 CAG28601.1 GI:47115283	23.9±2.5

【 0 0 4 8 】

これらの結果は、ポテト多糖調製物がKRASポリペプチドを発現する癌細胞に対する抗増殖剤として使用され得ることも実証している。

【 0 0 4 9 】

実施例5- 遺伝性肥満zucker zdfラットモデルへのポテト多糖調製物のインビボ投与

遺伝性肥満Zucker ZDFラットの機能低下した肝臓における発癌性KRASおよび相互作用する可能性のある癌遺伝子の発現に対するポテト多糖調製物の投与の効果を判定する。

【 0 0 5 0 】

実験動物

22匹の7週齢雄Zucker糖尿病肥満ラット(ZDF、コード：370)および22匹の7～8週齢雄ZDF痩せ型ラット(コード：371)をCharles Rivers Laboratories(Wilmington、MA)から購入した。試験動物はベースライン採血前に4日間の順化期間をとり、その時点でベースライン体重に基づいて各系統から2匹の余分な動物を試験から除外した。ラットは、PhysioGenix社に到着後、1ケージ当たり2匹収容し、Innoviveケージングシステム(San Diego、CA)中で維持した。Innoviveシステムが1時間当たり80回の換気および正圧を確実に維持するようケージを毎日モニターした。Guide for Care and Use of Laboratory Animals(第8版)に従って、ラット部屋を華氏66～75度の温度および30%～70%の相対湿度に維持した。部屋は毎日12時間(午前7:00～午後7:00)人工光によって照らした。動物は、絶食実験中を除き、試験期間中は水およびPurina 5008げっ歯類飼料(Waldschmidt's, Madison, WI)を自

由に摂取させた。

【0051】

ポテト多糖調製物の製剤化

精製ポテト多糖調製物(5mg/mL濃度の貯蔵液10mL)を4℃で保管した。試験用ベヒクルは、滅菌水(カタログ番号002488、Butler Schein)であった。毎週、貯蔵液を滅菌水で1:100希釈し(0.05mg/mL)、1日分のアリコートに分注した。すべてのベヒクルおよび薬剤溶液を4℃で保管し、1mL/動物(推定体重350gに基づいて0.15mg/kg用量)の量で経口胃管栄養法(P0)によって室温で毎日投与した。

【0052】

投薬およびグループ分け

試験には2種類のラットを使用した：ホモ接合型肥満ZDF/ZDFおよびヘテロ接合型痩せ型同腹仔。次いでグループ内のラットをランダムに選び10匹のグループに分けた。グループ1はホモ接合型ZDF/ZDFのベヒクル給餌ラット、グループ2はホモ接合型ZDF/ZDFのポテト多糖調製物給餌、グループ3は痩せ型のベヒクル給餌ラット、およびグループ4は痩せ型のポテト多糖調製物給餌ラットであった。ベヒクルは蒸留水であり、ポテト多糖調製物は、動物1匹当たり0.05mgの投薬量で経口胃管栄養法を介して毎日毎朝与えた。用量は、通常1mlの水で与えた。ラットは、グループごとにケージに入れ、12時間明/12時間暗(午前7時～午後7時)で維持した。試験は28日間に及び、試験の28日目に絶食時血糖データを収集した後、イソフルラン過剰投与および開胸によってすべての動物を安楽死させた。下行大静脈を介して採血した。肝臓および腹部脂肪を採取して秤量し、左外側肝葉の一部および腹部脂肪を個別の組織学的検査カセットに入れ、液体窒素中で急速冷凍した。全般的な病理学的所見を記録した。

【0053】

リアルタイムPCR分析

先に記載したように、Qiagenミニキットを使用して凍結肝臓組織からRNAを単離した。組織(組織100mgおよび溶解緩衝液1.8mL)をポリトロンホモジナイザーを使用して均質化した。RNAを精製した後、Superscript III逆転写酵素およびランダムプライマー(Invitrogen)を使用して1μgの全RNAを逆転写した。リアルタイムPCRを、KRAS、SHOC2、ILK、およびHSP9a検出セット(Applied Biosystem)を用いて実施した。SRSF4を参照遺伝子として使用した。1反応当たり1μLのcDNAを使用して、すべての試料を三つ組で分析した。リアルタイムPCRマスターMixは、25μLの2xユニバーサルマスターMixと、2.5μLの20x検出セット(プライマーおよびプローブを含む)と、21.5μLの水とを含んでいた。PCRは、Applied Biosystems 7500配列検出システムで実施した。サーモサイクラーの条件は、95

℃で15秒間の変性および60℃で60秒間のアニーリング/伸長を含んでいた。40サイクルのPCRの前に10分間95℃にした。Applied Biosystems 7500ソフトウェアを使用して式 $2^{-\Delta C_t}$ を使用して遺伝子の相対量を求めた。

【0054】

結果

ベヒクル対照ZDFラットと比べて、ZDFラット(n=5)への精製ポテト多糖調製物のインビオ投与は、リアルタイムPCR分析(図35)によって観察され表3に示されるように、機能低下した肝臓組織における発癌性KRAS遺伝子の発現の $63.0 \pm 4.0\%$ (p=0.01)の統計的に有意な減少を引き起こした。さらに、相互作用性SHOC2(n=6)およびILK(n=6)癌遺伝子の発現の、それぞれ $27.9 \pm 1.6\%$ (p=0.02)および $41.2 \pm 5.1\%$ (p=0.01)の統計的に有意な同調的減少が見られた(図36および図37)。よって、ポテト多糖調製物の投与によって促進されるKRAS遺伝子発現の阻害ならびにSHOC2およびILK遺伝子発現の同等の減少は、本明細書において提供されるポテト多糖調製物が癌に対する抗新生物薬として使用され得ることを実証している。

【0055】

さらに、ベヒクル対照ラットと比べて、ヘテロ接合型痩せ型ZDFラット同腹仔への精製ポテト多糖調製物のインビオ投与は、肝臓組織ではSHOC2(n=6)およびHSPA9(n=6)癌遺伝子

10

20

30

40

50

の発現においてそれぞれ $11.2 \pm 2.8\%$ および $26.2 \pm 2.5\%$ ($p=0.04$)の統計的に有意な低下を生じた。これらの結果は、本明細書において提供されるポテト多糖調製物が癌を発症する危険性を低減するために使用され得ることを実証している。

【 0 0 5 6 】

(表3) ポテト多糖調製物のインビボ投与の後のZucker糖尿病肥満ラットの肝臓における発癌性KRAS、SHOC2、およびILK癌遺伝子の低減した発現。上に記載されるように、データセットはリアルタイムPCR分析によって導き出された。

遺伝子記号	遺伝子名	%減少
KRAS	カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ	$63.0 \pm 4.0\%$ ($p=0.01$)
SHOC2	soc-2クリア抑制因子ホモログ	$27.9 \pm 1.6\%$ ($p=0.02$)
ILK	インテグリン結合キナーゼ	$41.2 \pm 5.1\%$ ($p=0.01$)

10

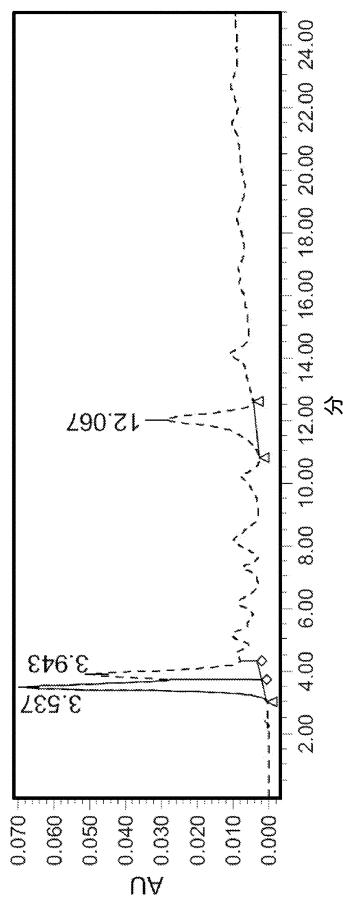
【 0 0 5 7 】

他の態様

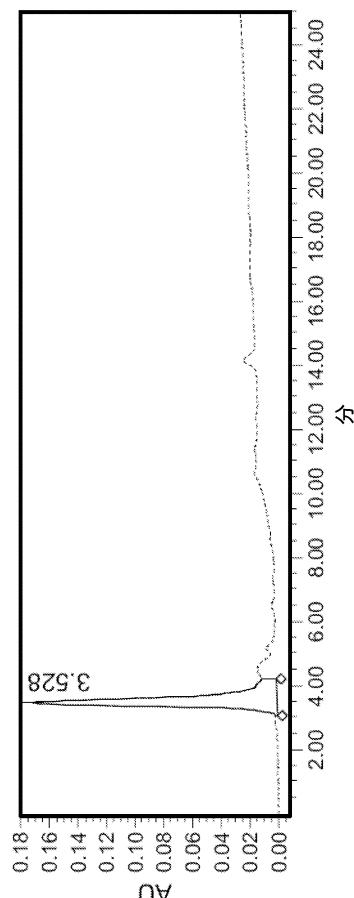
本発明をその詳細な説明と共に記載したが、先の記載は例示を意図したものであり、添付の特許請求の範囲によって規定される発明の範囲を限定するものではないことが理解されるべきである。他の局面、利点、および変更は、添付の特許請求の範囲に含まれる。

20

【図1】

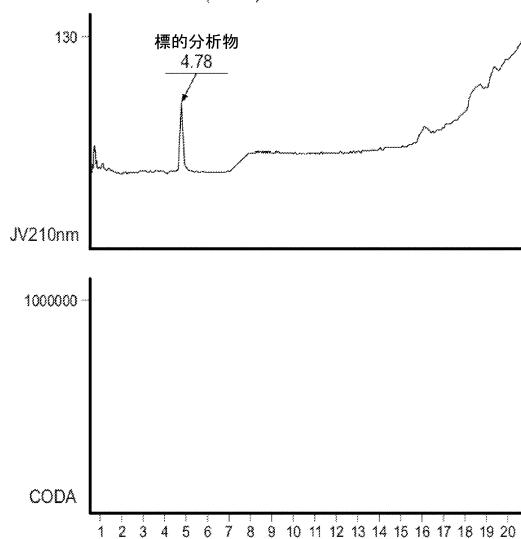


【図2】

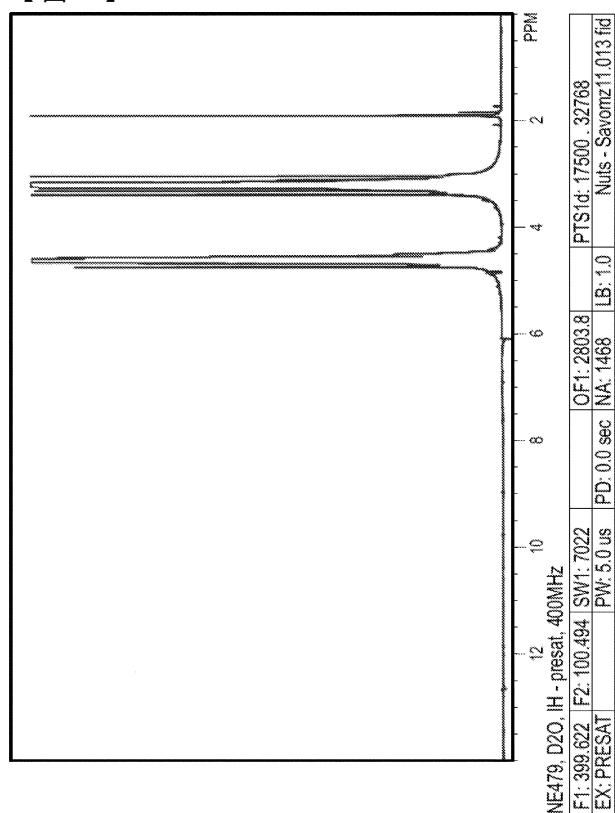


〔 図 3 〕

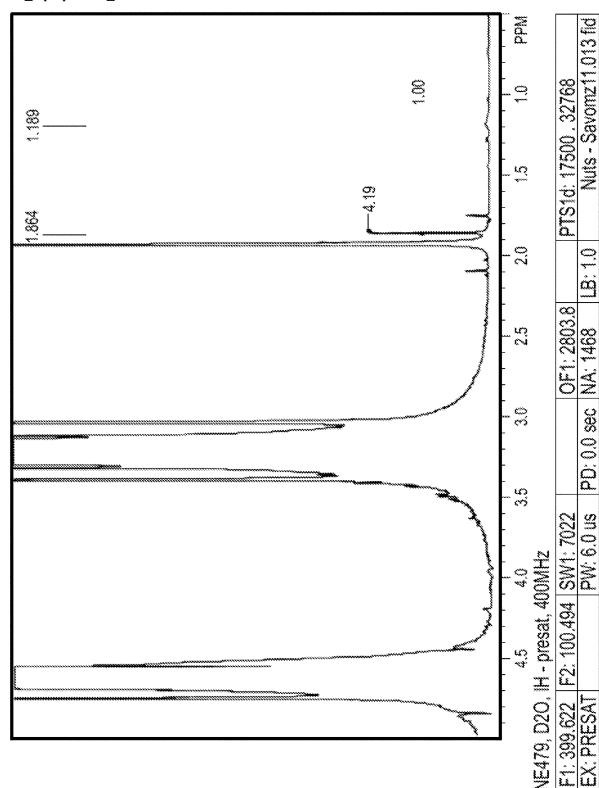
121611-NE479 液体
装置=LComade 1 オペレーター=stim Intel=LC イオン化=ESI+
コメント=90/10 H₂O(HOAc)/MeOH - 100% MeOH



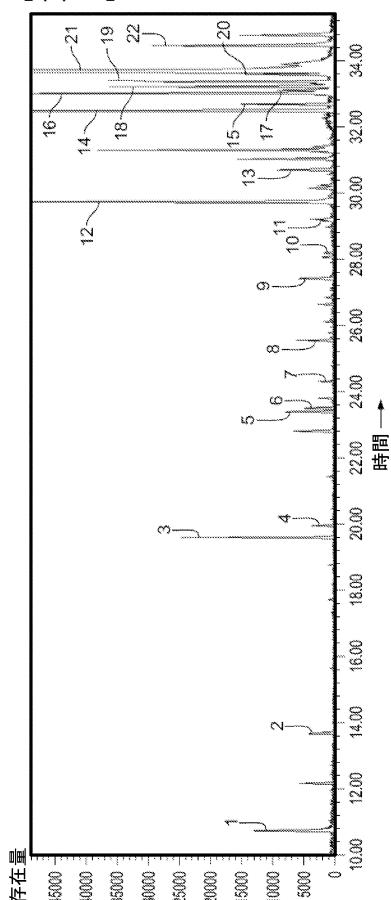
〔 図 4 〕



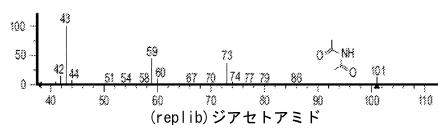
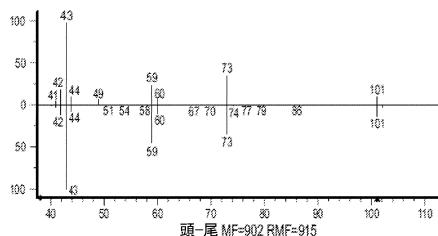
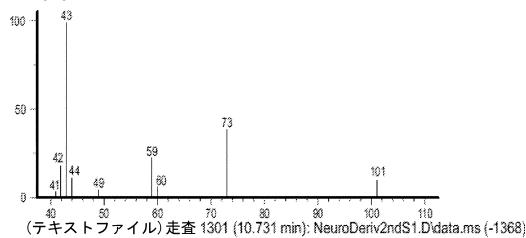
【 図 5 】



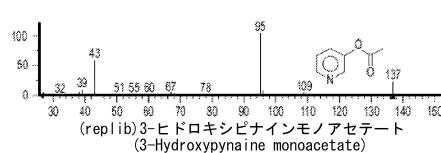
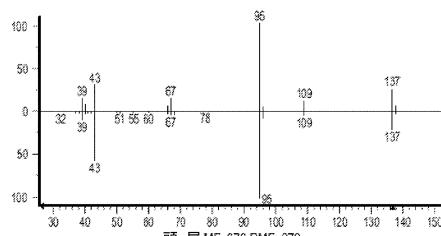
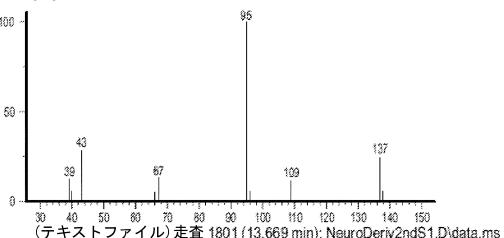
【図6】



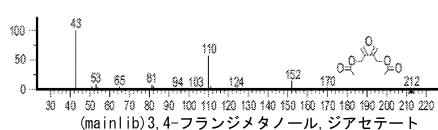
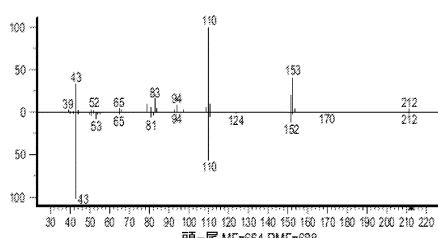
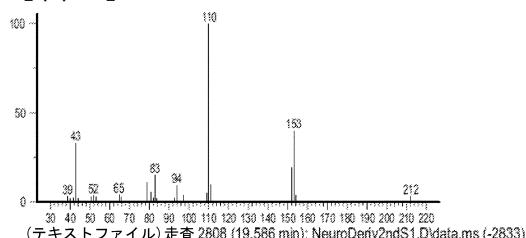
【図7】



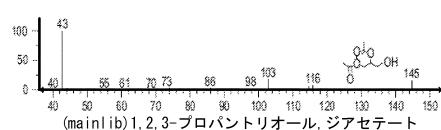
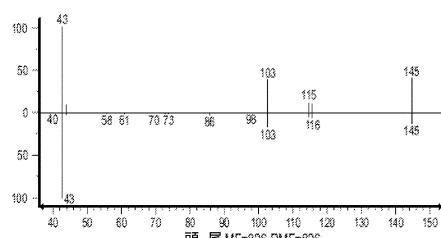
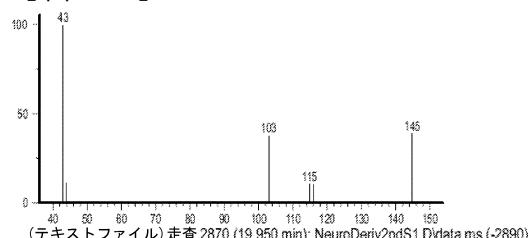
【図8】



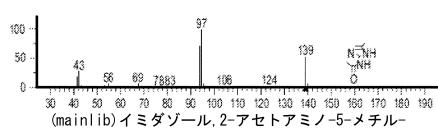
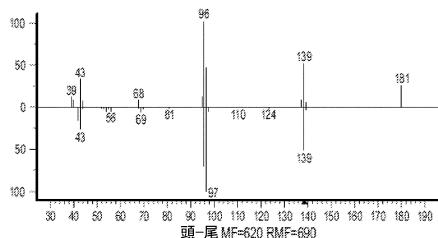
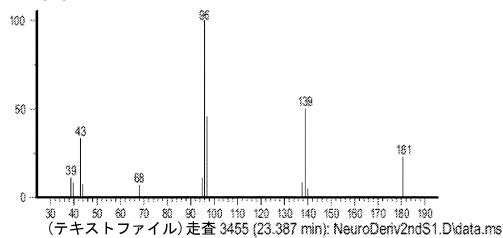
【図9】



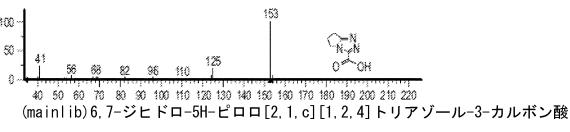
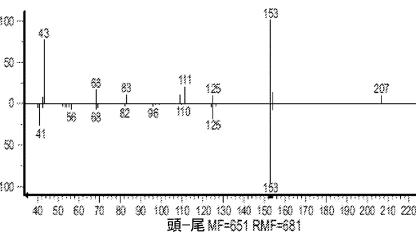
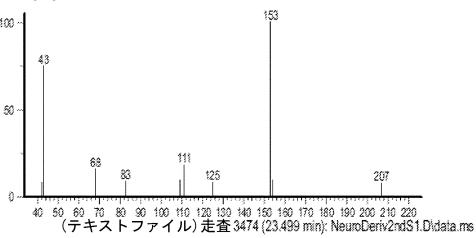
【図10】



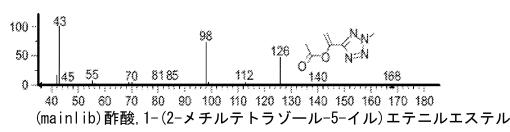
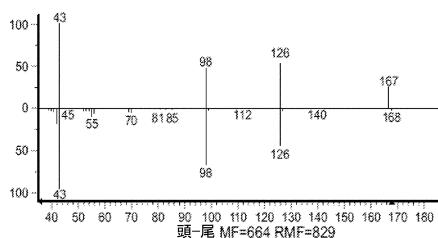
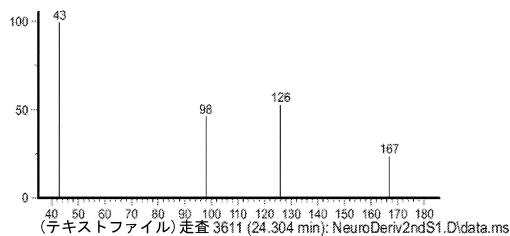
【図 1 1】



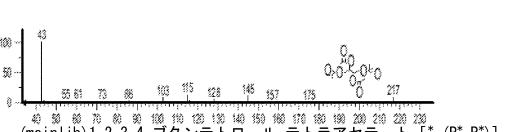
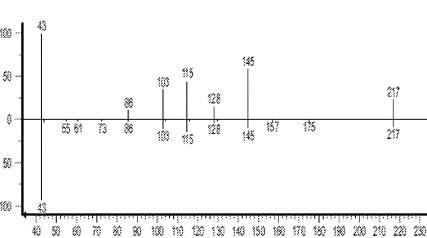
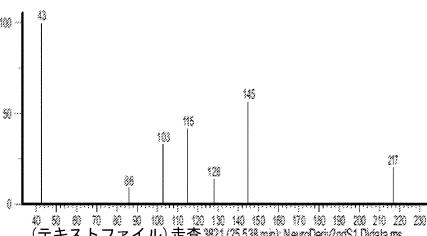
【図 1 2】



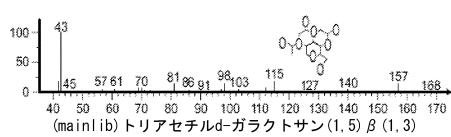
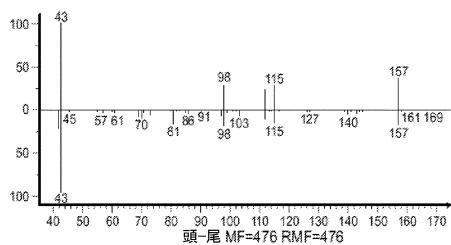
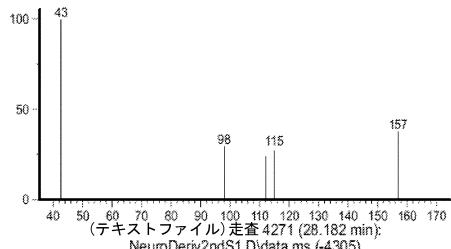
【図 1 3】



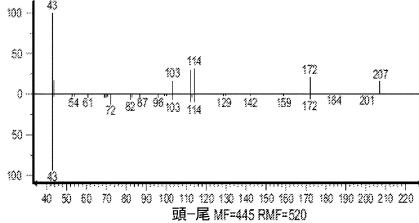
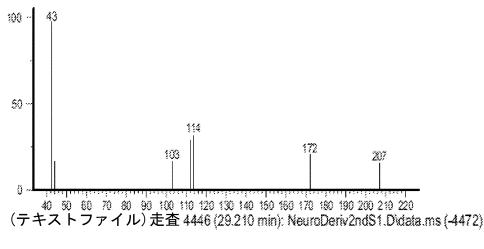
【図 1 4】



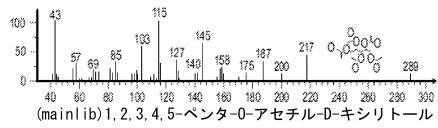
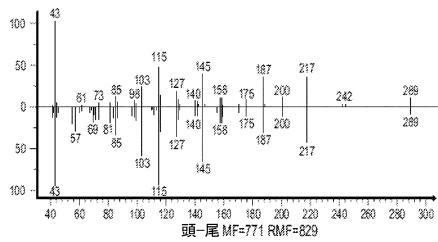
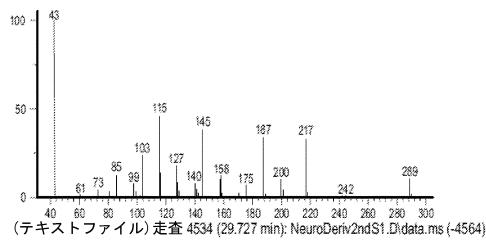
【図15】



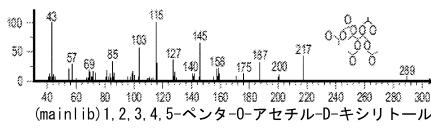
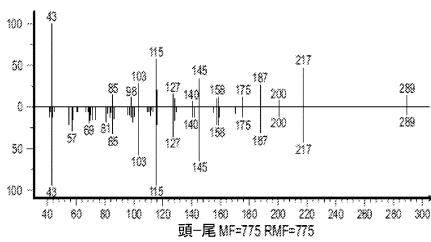
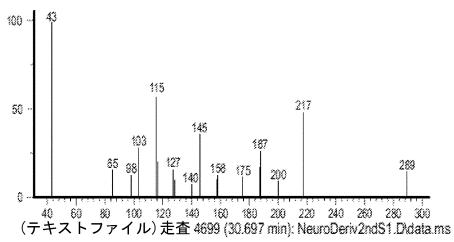
【図16】



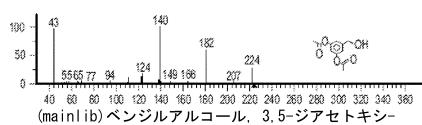
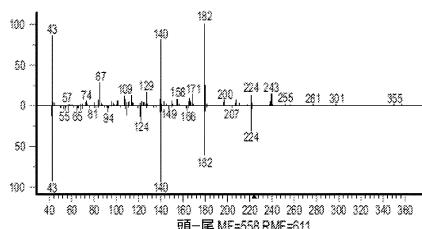
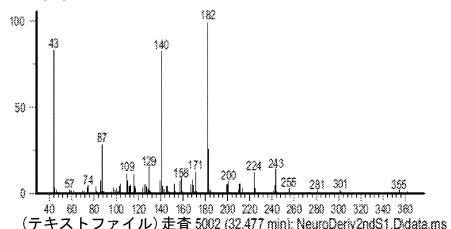
【図17】



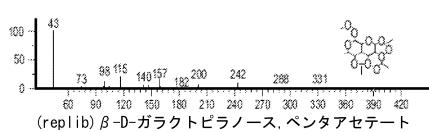
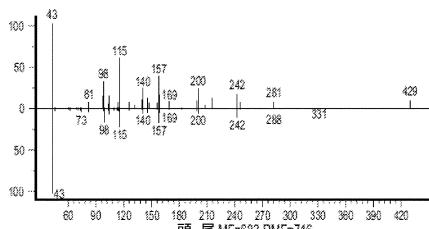
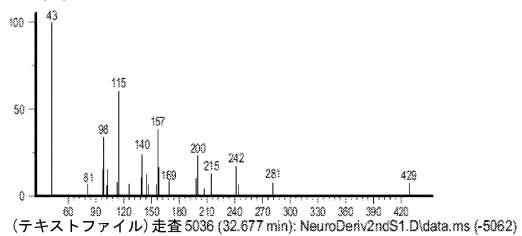
【図18】



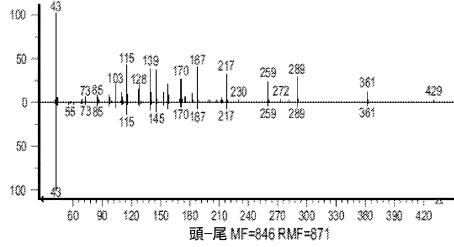
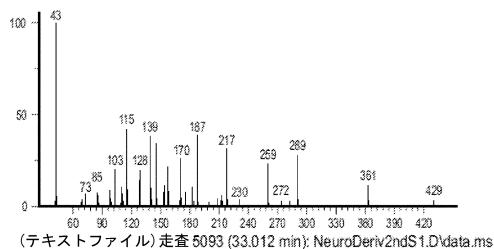
【図19】



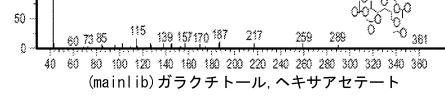
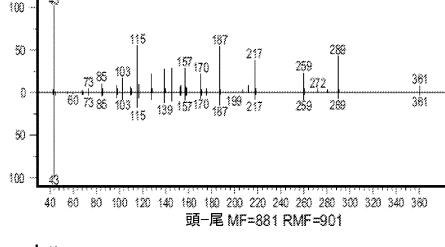
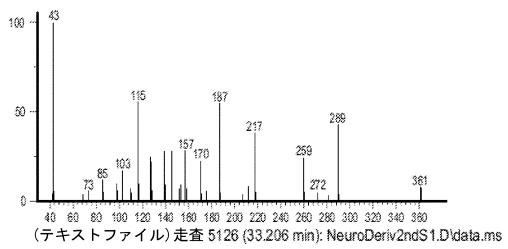
【図20】



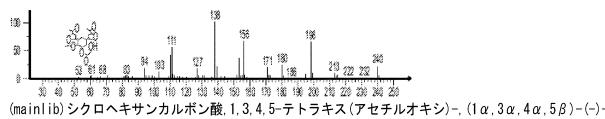
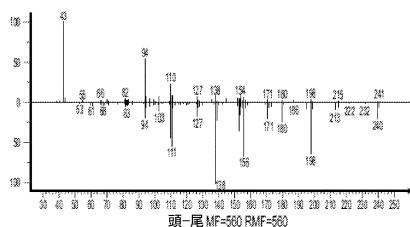
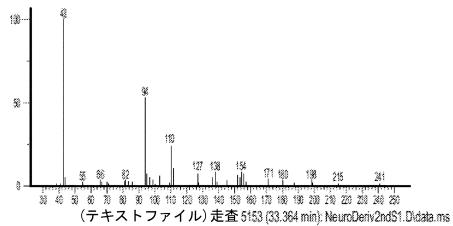
【図21】



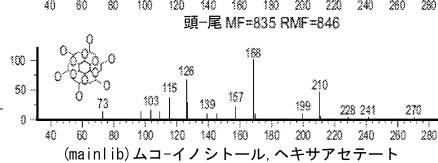
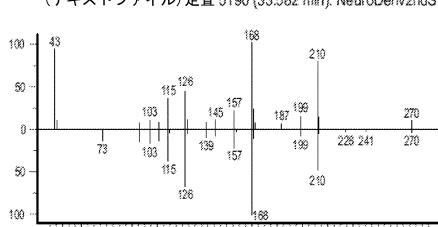
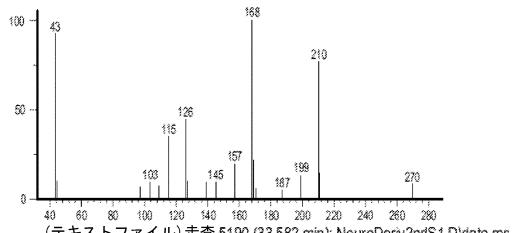
【図22】



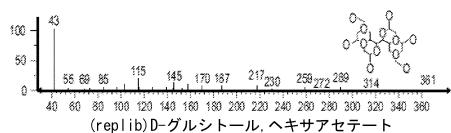
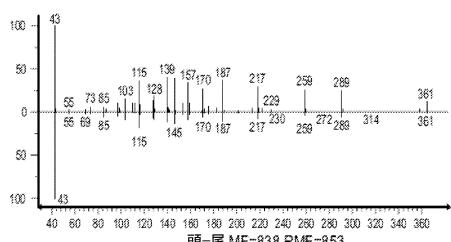
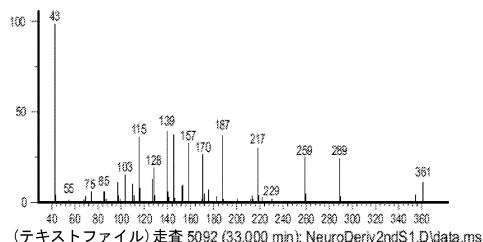
【図23】



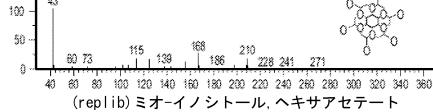
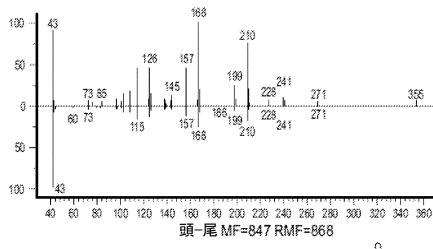
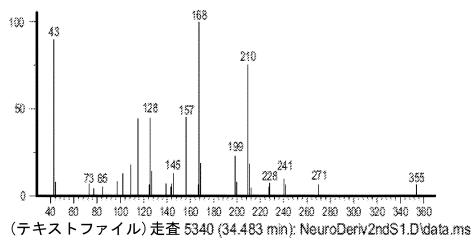
【図24】



【図25】



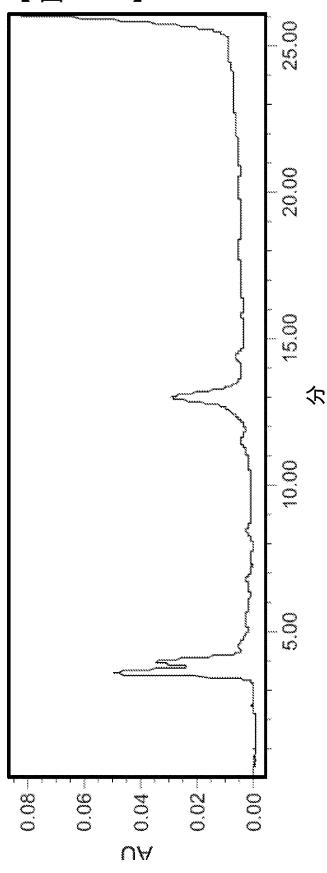
【図26】



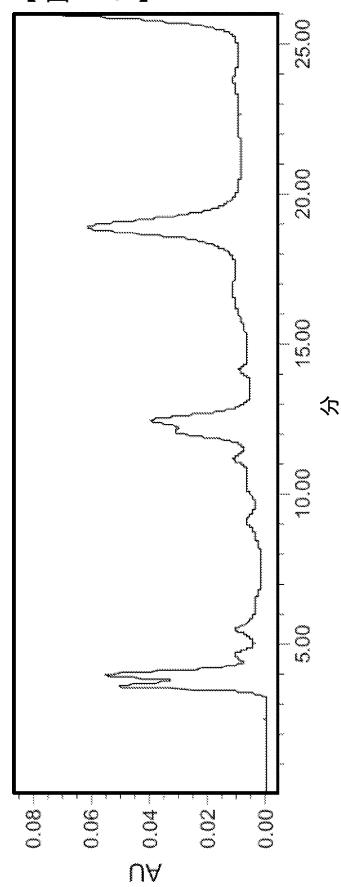
(27)

JP 6793180 B2 2020.12.2

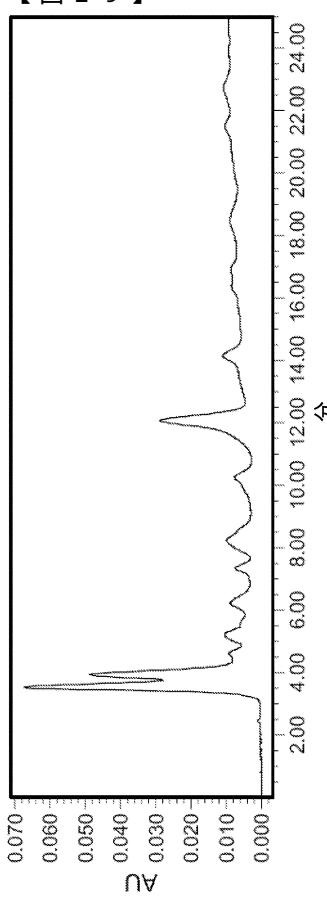
【図 27】



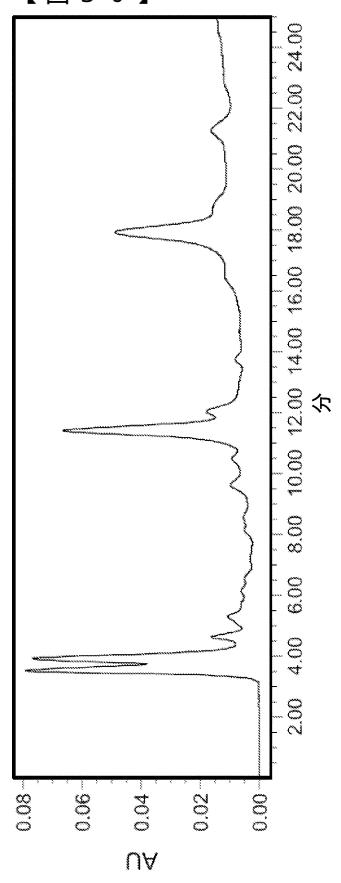
【図 28】



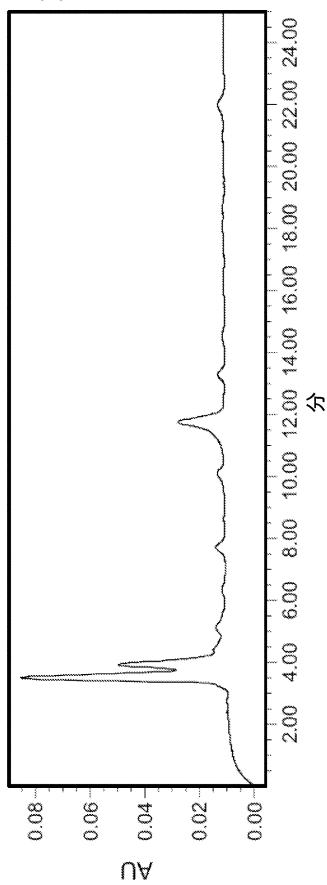
【図 29】



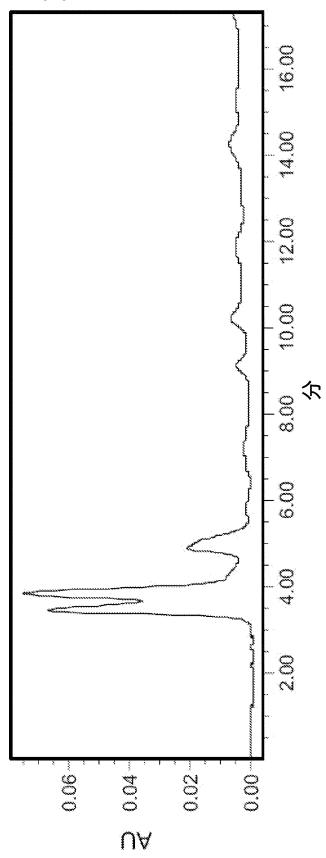
【図 30】



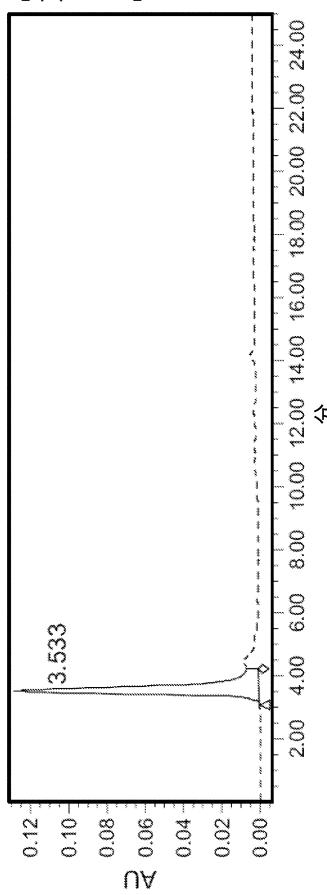
【図 3 1】



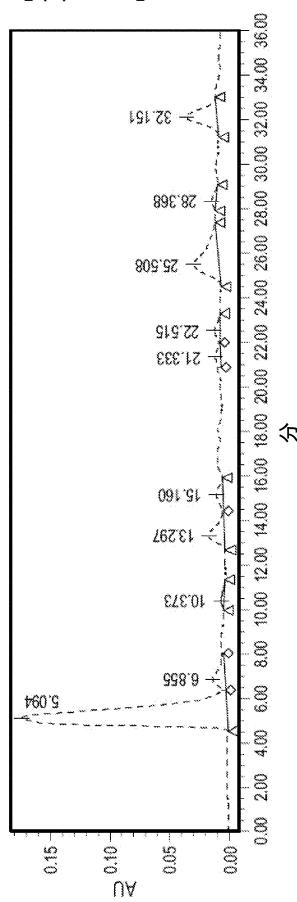
【図 3 2】



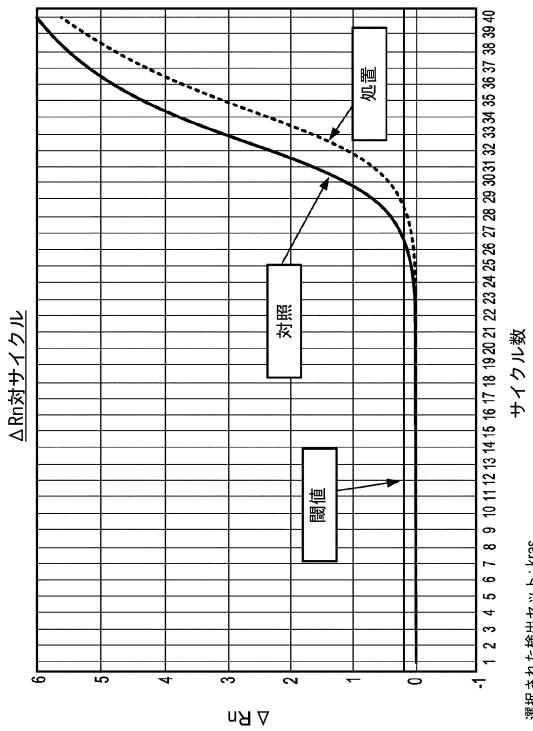
【図 3 3】



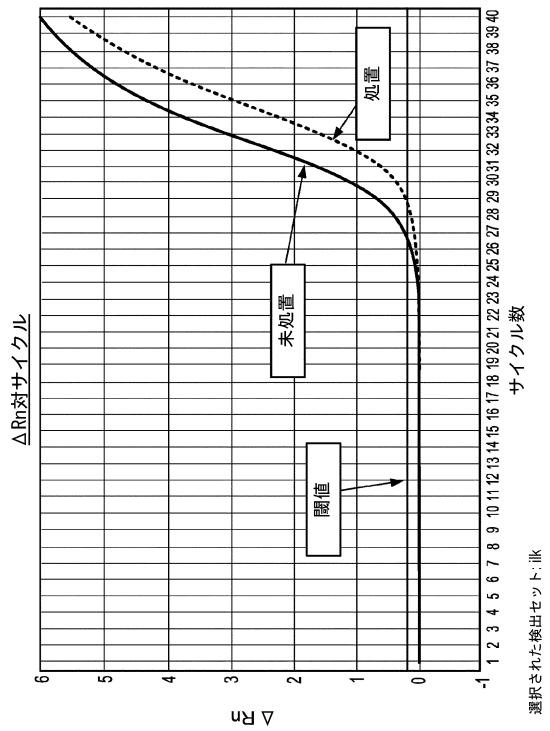
【図 3 4】



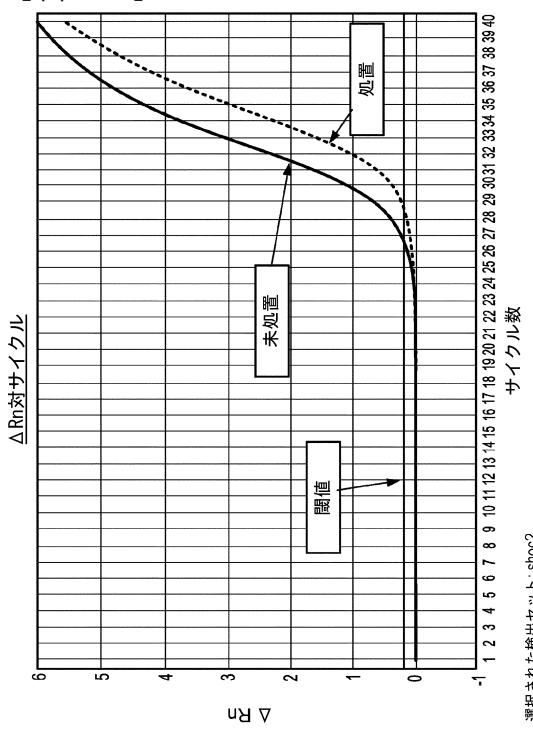
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	
A 61K 31/69 (2006.01)	A 61K 39/395	T
A 61K 31/7068 (2006.01)	A 61K 31/675	
A 61K 31/506 (2006.01)	A 61K 31/69	
A 61K 33/243 (2019.01)	A 61K 31/7068	
A 61K 31/282 (2006.01)	A 61K 31/506	
A 61K 31/704 (2006.01)	A 61K 33/243	
A 61K 31/7048 (2006.01)	A 61K 31/282	
A 61K 31/4745 (2006.01)	A 61K 31/704	
A 61K 31/337 (2006.01)	A 61K 31/7048	
A 61K 31/519 (2006.01)	A 61K 31/4745	
A 61K 31/24 (2006.01)	A 61K 31/337	
A 61K 31/715 (2006.01)	A 61K 31/519	
A 61K 9/20 (2006.01)	A 61K 31/24	
A 61K 47/22 (2006.01)	A 61K 31/715	
	A 61K 9/20	
	A 61K 47/22	

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ステファノ ジョージ ビー .

アメリカ合衆国 111747 ニューヨーク州 メルビル スリーピー レーン 1

(72)発明者 クリム リチャード エム .

アメリカ合衆国 111743 ニューヨーク州 ハンチントン パーク ビュー テラス 22

(72)発明者 マンティオーネ カーク ジェイ .

アメリカ合衆国 111772 ニューヨーク州 パッショウ フランクリン ストリート 206

審査官 渡部 正博

(56)参考文献 国際公開第2014/051076 (WO , A1)

特表2014-532712 (JP , A)

国際公開第2014/200969 (WO , A1)

国際公開第2013/148282 (WO , A1)

国際公開第2015/041837 (WO , A1)

Journal of Zhejiang University , 2 0 1 1 年 , Vol.40, No.4 , pp.365-373

Journal of Southwest China Normal University , 2 0 0 5 年 , Vol.30, No.2 , pp.333-336

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 6 / 0 0 - 3 6 / 9 0 6 8

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)