

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6867378号  
(P6867378)

(45) 発行日 令和3年4月28日(2021.4.28)

(24) 登録日 令和3年4月12日(2021.4.12)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 35/747	(2015.01)
A 6 1 K 35/74	(2015.01)
A 6 1 P 9/12	(2006.01)
A 6 1 K 31/07	(2006.01)
A 6 1 K 31/375	(2006.01)
	A 6 1 K 35/747
	A 6 1 K 35/74
	A 6 1 P 9/12
	A 6 1 K 31/07
	A 6 1 K 31/375

請求項の数 20 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-517278 (P2018-517278)	(73) 特許権者 516128485 オプティバイオティクス リミテッド イギリス国 ウィオー10 5ディージー ヨーク, ヘスリントン, イノベーション センター イノベーション ウェイ
(86) (22) 出願日	平成28年11月2日 (2016.11.2)	(74) 代理人 100120891 弁理士 林 一好
(65) 公表番号	特表2018-535940 (P2018-535940A)	(74) 代理人 100165157 弁理士 芝 哲央
(43) 公表日	平成30年12月6日 (2018.12.6)	(74) 代理人 100205659 弁理士 斎藤 拓也
(86) 國際出願番号	PCT/GB2016/053390	(74) 代理人 100126000 弁理士 岩池 满
(87) 國際公開番号	W02017/077286	(74) 代理人 100185269 弁理士 小菅 一弘
(87) 國際公開日	平成29年5月11日 (2017.5.11)	
審査請求日	令和1年11月5日 (2019.11.5)	
(31) 優先権主張番号	1519327.9	
(32) 優先日	平成27年11月2日 (2015.11.2)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)	
微生物の受託番号	NCTC ECGC13110402	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラクトバチルス・プランタルム2830 (ECGC13110402) を含む組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

高血圧の処置または予防において使用するための、ラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) 2830 (ECGC13110402) を含む組成物。

## 【請求項2】

少なくとも軽度高コレステロール血症を有する個体における高血圧の処置または予防において使用するための、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項3】

食品材料、栄養補助食品または飲料に組み込まれる請求項1に記載の組成物。

10

## 【請求項4】

ラクトバチルス・プランタルムが  $10^5$  cfu/g ~  $10^{12}$  cfu/g の範囲内の用量で投与される、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項5】

1日1回または2回投与される、請求項1~4のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項6】

食事後または食事中に投与または服用される、請求項1~5のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項7】

カプセル化されている、請求項1~6のいずれか一項に記載の組成物。

20

## 【請求項 8】

ラクトバチルス・プランタルムが濃縮および／または凍結乾燥されている、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

ビタミン、ミネラル、植物性化学物質、酸化防止剤およびそれらの組合せから選択される 1 つ以上の活性成分をさらに含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 10】

1 つ以上の追加高血圧低減剤をさらに含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 11】

以下の物質、スタチン、ステロールおよび／またはスタノールのうちの 1 つ以上と組み合わせて投与または服用される、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の組成物。 10

## 【請求項 12】

4 以下で保存される、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 13】

前記ラクトバチルス・プランタルムの株の成長に特異的なプレバイオティック成長培地をさらに含む、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 14】

前記プレバイオティック成長培地が、逆酵素反応により、前記ラクトバチルス・プランタルムの株によって生産されうる、請求項 13 に記載の組成物。 20

## 【請求項 15】

前記プレバイオティック成長培地がオリゴ糖を含む、請求項 13 または 14 に記載の組成物。

## 【請求項 16】

前記オリゴ糖がガラクト-オリゴ糖 (GOS) を含む、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

1 日 1 回または 2 回、 $1 \times 10^5 \sim 10^{12}$  細胞の範囲内の量で投与される、高血圧を予防し、処置し、または調整する方法において使用するための、ラクトバチルス・プランタルム 2830 (ECGC13110402)。 30

## 【請求項 18】

活性株約 120 mg の量で投与される、請求項 17 に記載のラクトバチルス・プランタルム。

## 【請求項 19】

朝食および夕食の直前、食中、または食後に投与される、請求項 17 または 18 に記載のラクトバチルス・プランタルム。

## 【請求項 20】

1 つ以上のプロバイオティクスおよび／またはプレバイオティクスと共に投与される、請求項 17～19 のいずれか一項に記載のラクトバチルス・プランタルム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、高血圧 (hypertension) の処置、予防および／または管理に有用であることが示された、ラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) 2830 (ECGC13110402) を含む組成物に関する。 40

## 【背景技術】

## 【0002】

高血圧は、血圧上昇 (high blood pressure) とも別称され、重大な健康問題であり、心血管疾患 (CVD: cardiovascular disease) にとって危険因子である。世界保健機関 (WHO: World Health Organisation) は、2020 年までに、すべてのヒトの死の最大 40 % が CVD 50

に関係することになると予測している。高コレステロールは、血管におけるコレステロールplaquesの蓄積により、高血圧と関連することが多い。

#### 【0003】

高血圧の処置には、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、カルシウムチャネル遮断薬、利尿薬およびベータ-遮断薬がある。しかし、これらの処置はいずれもそれらの副作用を伴わないわけではなく、それゆえに、代替的処置またはより自然な処置が好ましいであろう。

#### 【0004】

胆汁酸調節因子を調節することによるコレステロールレベルの低減、そしてそれゆえに可能性として高血圧の低減における、微生物株の使用は公知である。胆汁酸塩ヒドロラーゼ(BSH: Bile Salt Hydrolase)活性プロバイオティクスは管腔内胆汁酸脱抱合を増加させて、増加した循環脱抱合型胆汁酸塩レベルをもたらすことが、ヒトおよび動物研究において示されている。胆汁酸は腸内で脱抱合されるので、食事性および胆汁性コレステロールの吸収が低減し、胆汁の再循環が改変されて、血中の低密度リポタンパク質コレステロール(LDL-C: low density lipoprotein cholesterol)レベルの、より良好な制御をもたらす。

#### 【0005】

血圧の低減におけるプロバイオティクスの役割は、研究によって示唆されている。9つの治験のメタ分析(非特許文献1)は、プロバイオティクス消費が、対照群と比較して、収縮期BPを-3.56mmHg(95%信頼区間、-6.46~-0.66)、拡張期BPを-2.38mmHg(95%信頼区間、-2.38~-0.93)変化させることを示した。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0006】

【非特許文献1】Khalesi et al., (2014), Hypertension, 64, (4), 897-903

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

それゆえに、高血圧のための改良された処置または代替的処置を提供することが、本発明の目的である。個体における、特に軽度高コレステロール血症を有する個体における、血圧を制御または低減する方法を提供することも、本発明の目的である。高血圧を低減するために使用することができるプロバイオティック組成物を提供することは、本発明のさらなる目的である。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明の一態様では、高血圧の処置、制御または予防において使用するための、ラクトバチルス・プランタルム2830(ECGC13110402)またはその1つもしくは複数の変異株を含む組成物が提供される。

#### 【0009】

本発明の別の一態様では、高血圧の処置、制御または予防において使用するための、ラクトバチルス・プランタルム2830(ECGC13110402)またはその1つもしくは複数の変異株を含む組成物が提供される。

#### 【0010】

本発明のさらなる一態様では、高血圧の処置、制御または予防のための医薬品の製造において使用するための、ラクトバチルス・プランタルム2830(ECGC13110402)またはその1つもしくは複数の変異株を含む組成物が提供される。

#### 【0011】

高血圧の処置または予防における本組成物の使用は、少なくとも軽度高コレステロール

10

20

30

40

50

血症を有する個体における使用であることが好ましい。

【0012】

本発明のさらにもう一つの態様では、高血圧の低減、予防および／または制御において使用するための、ラクトバチルス・プランタルム 2830 (E C G C 13110402) またはその1つもしくは複数の変異株を含む食品材料組成物または栄養補助食品 (food supplement) 組成物が提供される。

【0013】

本発明のさらにもう一つの態様では、高血圧の処置、制御または予防のための栄養補助食品または食品材料の製造において使用するための、ラクトバチルス・プランタルム 2830 (E C G C 13110402) またはその1つもしくは複数の変異株を含む組成物が提供される。

10

【0014】

すべての態様において、ラクトバチルス・プランタルム 2830 (E C G C 13110402) またはその1つもしくは複数の変異株は、好ましくは、高血圧を低減、予防または制御するように有効量で、組成物中に存在するであろう。好ましくは、ラクトバチルス・プランタルムは  $10^5$  c f u / g ~  $10^{12}$  c f u / g の範囲内の量で個体に投与されるであろう。より好ましくは、ラクトバチルス・プランタルムは  $10^8$  c f u / g ~  $10^{10}$  c f u / g の範囲内の量で投与されるであろう。ラクトバチルス・プランタルムは  $1 \times 10^5$  c f u ~  $1 \times 10^{12}$  c f u の範囲内の量で個体に投与されうる。より好ましくは、ラクトバチルス・プランタルムは  $1 \times 10^8$  c f u ~  $1 \times 10^{10}$  c f u の範囲内の量で投与されるであろう。最も好ましくは、ラクトバチルス・プランタルムは、約  $1.8 \times 10^9$  c f u を与える活性株約 120 mg の量である。ただし、個体の状態および高血圧の程度ならびに他の医学的考慮事項に応じて、異なる投与量が投与されうることは理解されるであろう。

20

【0015】

投与頻度も個体の状態に依存するであろうが、好ましくは、本組成物は1日2回投与されるであろう。

【0016】

本組成物は1日のうちのいつ投与されてもよいが、好ましくは、本組成物は食後に投与される。食後の投与はBSH活性ラクトバチルス・プランタルムの脱抱合効果を有利に高めうる。ほとんどの胆汁酸分泌は食事の消費後に起こり、分泌される胆汁酸の量は消費された食品の量およびタイプと比例関係にある。

30

【0017】

本組成物が、例えば粉末、錠剤、またはカプセル剤の形態など、容易に投与される任意の形態をとりうることは、当業者には理解されるであろう。あるいは、本組成物は食品材料または食品添加物の形態をとりうる。本組成物は、固形または液状の食品材料と混合することができる飲用可能な流動体、スプレッドおよび／または粉末の形態をとりうる。本組成物は、例えば食品／飲料に配合されるまたは食品／飲料と並行して消費される、健康補助食品 (dietary supplement) として使用することができるであろう。

40

【0018】

本組成物は、腸環境での、成分のうちの1つ以上の放出プロファイルを修飾するための賦形剤または担体化合物を、さらに含みうる。放出は、コレステロール吸収を低減するのに最も適当な時間に起こり、よって高血圧を制御すべきである。典型的には、培養物は、それが小腸の腸細胞に到達するまでは、比較的完全な形で生き残らなければならない。

【0019】

本組成物はカプセル化することができる。数多くのカプセル化技法が当業者には明らかであるだろう。そして使用されるカプセル化技法は、消化管通過時に要求されるラクトバチルス・プランタルムの安定性に適合しているであろう。カプセル化物は、ラクトバチルス・プランタルムに特異的に適合しているプレバイオティクスを含みうる。

50

## 【0020】

ラクトバチルス・プランタルムは濃縮および/または凍結乾燥されうる。好都合なことに、ラクトバチルス・プランタルム 2830 (E C G C 13110402) は、パイロット規模の試験製造において優れた凍結乾燥生残性を示している。

## 【0021】

本組成物は、ビタミン、ミネラル、植物性化学物質、酸化防止剤、およびそれらの組合せから選択される1つ以上の活性成分を、さらに含みうる。

## 【0022】

ビタミンは、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、およびビタミンなどの脂溶性ビタミン、ならびにそれらの組合せを包含しうる。いくつかの実施形態において、ビタミンは、ビタミンC(アスコルビン酸)、ビタミンB群(チアミン、すなわちB1、リボフラビン(*r i b o f l a v o i n*)、すなわちB25、ナイアシン、すなわちB3、ピリドキシン、すなわちB6、葉酸、すなわちB9、シアノコバラミン(*c y a n o c o b a l i m i n*)、すなわちB12、パントテン酸、ビオチン)などの水溶性ビタミン、ならびにそれらの組合せを包含しうる。

10

## 【0023】

ミネラルは、ナトリウム、マグネシウム、クロム、ヨウ素、鉄、マンガン、カルシウム、銅、フッ化物、カリウム、リン(*p h o s p h o r o u s*)、モリブデン、セレン、亜鉛、およびそれらの組合せを包含しうるが、これらに限定されるわけではない。

## 【0024】

20

酸化防止剤は、アスコルビン酸、クエン酸、ローズマリー油、ビタミンA、ビタミンE、リン酸ビタミンE、トコフェロール、リン酸ジ-アルファ-トコフェリル、トコトリエノール、アルファリポ酸、ジヒドロリポ酸、キサントフィル、ベータクリプトキサンチン、リコ펜、ルテイン、ゼアキサンチン、アスタキサンチン、ベータ-カロテン、カロテン、混合カロテノイド、ポリフェノール、フラボノイド(*f i a v o n o i d*)、およびそれらの混合物を包含しうるが、これらに限定されるわけではない。

## 【0025】

植物性化学物質は、カロテノイド(*c a r t o t e n o i d*)、クロロフィル、クロロフィリン、纖維、フラバノイド、アントシアニン(*a n t h o c y a m n*)、シアノ化物(*c y a n i d i n g*)、デルフィニジン、マルビジン、ペラルゴニジン、ペオニジン、ペツニジン、フラバノール、カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、没食子酸エピガロカテキン(*e p i g a i l o c a t e c h i n g a l l a t e*)、テアフラビン、テアルビジン、プロアントシアニン、フラボノール、ケルセチン、ケンペロール、ミリセチン、イソラムネチン、フラボノンヘスペレチン(*f l a v o n o n e s h e s p e r e t i n*)、ナリングニン、エリオジクチオール、タンゲレチン、フラボン、アピゲニン、ルテオリン、リグナン、フィトエストロゲン、レスベラトロール、イソフラボン、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、大豆イソフラボン、およびそれらの混合物を包含しうるが、これらに限定されるわけではない。

30

## 【0026】

本組成物は1つ以上のコレステロール低減剤をさらに含みうる。例えば本組成物はベータグルカンを含みうる。

40

## 【0027】

本組成物は、1つ以上のスタチン、ステロールおよび/またはスタノールと共に投与されうる。本組成物を、他の高血圧活性成分(*a c t i v e i n g r e m e n t*)と共に投与するか、またはそのような活性成分との併用治療の一部として使用することで、投与される成分の量を低減し、それゆえに副作用を制限しうる。

## 【0028】

好ましくは、本組成物は4以下で保存される。この温度範囲では細菌の成長が安定化するので、組成物の安定性が保証される。

## 【0029】

50

本組成物は、ラクトバチルス・プランタルムの株の成長に特異的なプレバイオティック成長培地を、さらに含みうる。プレバイオティック成長培地は、好ましくは、逆酵素反応により、ラクトバチルス・プランタルムの株によって生産されうるであろう。この酵素は、糖分解酵素またはグリコシダーゼ酵素を含みうる。これらの糖分解酵素またはグリコシダーゼ酵素は細菌または真菌に由来しうる。

【0030】

プレバイオティック成長培地は、ガラクト-オリゴ糖 (galacto-oligosaccharide) (GOS)、グルコ-オリゴ糖 (gluco-oligosaccharide)、またはフルクト-オリゴ糖 (FOS)などのオリゴ糖を、さまざまな濃度で含みうる。オリゴ糖の形態は、本株の - ガラクトシダーゼ、- ガラクトシダーゼ、- および - グルコシダーゼ、- マンノシダーゼ、ならびに - キシロシダーゼの逆反応によって生産される形態と実質的に同じであることが好ましい。

10

【0031】

プレバイオティック成長培地は、安全性、耐性、および貯蔵寿命に悪影響を及ぼすことなく腸内で本株の最適な成長および生残をもたらす量で存在しうる。

【0032】

本発明のさらなる一態様によれば、有効量のラクトバチルス・プランタルムを有する組成物を投与することによって、上昇した高血圧を持つ個体または上昇した高血圧の危険がある個体を処置する方法が提供される。

20

本発明のさらなる一態様によれば、1日2回、 $1 \times 10^5 \sim 10^{12}$  細胞の範囲内の量で投与される、高血圧を予防し、処置し、または調整する方法において使用するための、ラクトバチルス・プランタルム 2830 (ECGC13110402)、またはその1つもしくは複数の変異株が提供される。

【0033】

より好ましくは、ラクトバチルス・プランタルムは、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$  細胞の範囲内の量で投与されうる。最も好ましくは、ラクトバチルス・プランタルムは約  $1.8 \times 10^9$  細胞の量で投与される。ラクトバチルス・プランタルムが活性株約 120 mg の量で投与されることも好ましい。

30

【0034】

ラクトバチルス・プランタルムは、朝食および夕食の直前、食中、または食後に投与されうる。好ましくは、ラクトバチルス・プランタルムは、朝食および夕食の直前に投与される。

【0035】

ラクトバチルス・プランタルムは、薬として、または健康補助食品として、投与されうる。

【0036】

ラクトバチルス・プランタルムは、凍結乾燥された形態をとりうる。

【0037】

ラクトバチルス・プランタルムは凍結乾燥された形態をとりうる。

【0038】

ラクトバチルス・プランタルムは1つ以上の追加高血圧活性成分要素と共に投与されうる。そのような要素は、アンジオテンシン-変換酵素 (ACE) 阻害剤、カルシウムチャネル遮断薬、利尿薬またはベータ-遮断薬を含みうる。さらにまた、ラクトバチルス・プランタルムは、1つ以上のプロバイオティクスおよび / またはプレバイオティクスと共に投与されうる。ラクトバチルス・プランタルムは、ラクトバチルス・プランタルムの株の成長に特異的なプレバイオティック成長培地と組み合わせて投与されうる。プレバイオティック成長培地は、好ましくは、逆酵素反応により、ラクトバチルス・プランタルムの株によって生産されうるであろう。プレバイオティック成長培地はオリゴ糖を含むことができ、そのオリゴ糖は好ましくはガラクト-オリゴ糖 (GOS) を含むであろう。

40

【0039】

好ましくは、ラクトバチルス・プランタルムは、投与前は 4 以下で保存される。

50

## 【0040】

本発明のさらなる一態様によれば、医薬品または栄養補助食品の調製において使用するためのラクトバチルス・プランタルム 2830 (E C G C 1 3 1 1 0 4 0 2) またはその1つもしくは複数の変異株を生産する方法であって、

a) 培養プロセスを生産するのに十分な条件下でラクトバチルス・プランタルムを発酵させる工程、

b) ラクトバチルス・プランタルム細胞の濃縮物が形成されるように培養プロセスからラクトバチルス・プランタルムを濃縮する工程、

c) 混合物が形成されるように濃縮物を凍結保護物質にさらす工程、および

d) 混合物を凍結乾燥する工程

を含む方法が提供される。

10

## 【0041】

上述の方法によるラクトバチルス・プランタルム細胞の凍結乾燥に関する生残率は70%超である。さらにまた、好都合なことに、本方法はラクトバチルス・プランタルム細胞を最大  $8 \times 10^{11}$  c f u / g の量で生産することが見いだされている。

## 【0042】

本方法は、当然、上述の組成物のためのラクトバチルス・プランタルム 2830 (E C G C 1 3 1 1 0 4 0 2) またはその1つもしくは複数の変異株を、さらに言えば上述のラクトバチルス・プランタルム 2830 (E C G C 1 3 1 1 0 4 0 2) を、生産するのに適しているであろう。

20

## 【0043】

本発明の第1態様に関して列挙した本組成物の特徴のうちのいくつかが、本方法において投与される組成物と交換可能であるだろうことは、当業者には明らかであるだろう。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0044】

本発明の実施形態を、単なる例として、以下に説明する。

## 【0045】

ラクトバチルス・プランタルム E C G C 1 3 1 1 0 4 0 2 を含む組成物を49人の軽度高コレステロール血症成人に投与することにより、安全性、コンプライアンスおよび高血圧制御の程度を確立するために、ヒトボランティア試験を行った。この試験は、英国レディング大学 (University of Reading) の食品栄養科学部 (Department of Food and Nutritional Sciences) により、独立して実行された。この試験はヘルシンキ宣言に従って実行され、すべてのボランティアから文書によるインフォームドコンセントを得た。試験プロトコールはレディング大学の研究倫理委員会によって承認された。

30

## 【0046】

被験者は30~65歳の男女であった。被験者が直近6ヶ月以内の心血管イベントの既往を有している場合、甲状腺機能障害に関する続発性異常脂質血症が存在する場合、被験者が過去3ヶ月間に脂質代謝に影響を及ぼす何らかの薬物を使用していた場合、被験者にアルコール乱用の経歴がある場合、被験者が過去6ヶ月間に抗生物質の投薬を受けていた場合、または被験者が直近の1ヶ月間にプレバイオティクス/プロバイオティック調製物を摂取していた場合、その被験者は除外した。

40

## 【0047】

本試験の開始に先だって、組み入れ基準を満たす被験者をスクリーニングした。ベースライン血液サンプルを採取し、被験者のBMIおよび血圧を測定した。

## 【0048】

この試験は単一施設前向き無作為化二重盲プラセボ対照並行群間治験であった。被験者を、プラセボまたはラクトバチルス・プランタルム E C G C 1 3 1 1 0 4 0 2 による処置の2群に、ランダムに分配した。プラセボ群および処置群に、プリスター包装されたDR 1カプセル剤を与えた。処置群には、1カプセルあたり  $1.8 \times 10^9$  細胞の用量をもた

50

らす 120 mg の活性ラクトバチルス・プランタルム E C G C 1 3 1 1 0 4 0 2 を与え、これを、1日2回、朝食時に1回および夜に1回、投与した。参加者には、治験期間を通して日常の食事または身体活動を変えないように勧告した。習慣的食事を事前検証済みの5日間食事日記（週末2日および平日3日）によって評価した。

【0049】

活性製剤およびプラセボ製剤に関する製剤の詳細をそれぞれ下記表1および表2に示す。

【0050】

【表1】

成分	mg/カプセル	カプセルあたり 10億	生産のための g
プロバイオティクス粉末	120	8.4x10 <sup>9</sup>	567.00
トウモロコシデンプン	118.6		560.39
ステアリン酸マグネシウム	3.2		15.12
二酸化ケイ素	3.2		15.12
カプセル DR サイズ1 ホワイト	75		354.38
合計	320		1512

表1

10

【0051】

【表2】

20

成分	mg/カプセル	カプセルあたり 10億	生産のための g
トウモロコシデンプン	238.6		1127.39
ステアリン酸マグネシウム	3.2		15.12
二酸化ケイ素	3.2		15.12
カプセル DR サイズ1 ホワイト	75		354.38
合計	320		1512

表2

【0052】

ボランティアを試験開始の2週間前に事前スクリーニングし、あらゆるプレ／プロバイオティクス摂取を差し控えるように勧告した。試験は処置期間（12週）およびウォッシュアウト期間（4週）の二相からなった。この試験は、選抜時のベースライン来院、中間時点での来院、および処置期間の終了時点での来院（それぞれ0週目、6週目および12週目）、ならびにウォッシュアウト期間後の4回目の来院（16週目）を含んだ。

30

【0053】

初期分析セットでは、2つの群が十分に対応していることを保証するために、ベースラインでの人口統計的変数およびアウトカム変数を調べた。連続変数は対応のないt検定を使って分析し、一方、カテゴリー変数にはカイ二乗検定を使用した。

【0054】

2つの試験群間の試験アウトカムを、時点間の変化に関して分析した。ベースライン～中間点（0～6週）、中間点～終了点（6～12週）、ベースライン～終了点（0～12週）、および終了点～ウォッシュアウト（12～16週）の4つの試験期間を、アウトカムの変化について調べた。各分析のためのデータはその分析における2つの特定時点に限定した。分析は共分散分析（ANCOVA）を使って行った。後者の時点をアウトカム変数として使用し、先の時点を共変量とみなした。このアプローチは、テスト群および対照群の可変的出発値を考慮するので、群間で経時的变化を単純に比較するより、数学的に好みしい。

40

【0055】

この試験を通してボランティアによって報告された安全性、コンプライアンス、または耐性の問題はなかった。3人のボランティアは、無関係な病気のために抗生物質処置を受

50

け、そのため以後の試験への参加から除外されることになったため、試験から離脱した。

【0056】

ベースライン特徴（身体測定値、収縮期圧および拡張期圧）をプラセボ群（n = 23）と活性剤群（n = 23）との間で比較した。それらを下記表3に示す。これらの結果は、それらの人口統計（年齢、性別）に関して、またはベースラインでの身体測定値のいずれについても、2つの試験群間に有意差がないことを示唆した。

【0057】

【表3】

変数	プラセボ (n=23) 平均 (SD)	活性剤 (n=23) 平均 (SD)	P値
年齢	52.0 (8.4)	52.3 (10.7)	0.89
性別：女性	14 (61%)	18 (78%)	0.20
性別：男性	9 (39%)	5 (22%)	
体重	79.2 (16.5)	72.1 (12.0)	0.10
BMI	26.8 (5.0)	26.7 (3.7)	0.96
胴囲	92.3 (13.5)	89.6 (12.0)	0.49
収縮期 BP	118.7 (16.0)	119.2 (13.2)	0.73
拡張期 BP	71.0 (12.2)	73.0 (8.0)	0.52

表3

【0058】

ベースラインから12週後の処置終了時までの身体測定値の変化を、プラセボ処置群および活性剤処置群の全被験者（n = 46）について、以下の表4に示す。表4には、ベースラインおよび12週後に測定された各アウトカムについて、平均値および標準偏差が示されている。ANCOVA分析による群差も平均差および対応する信頼区間で示す。これらは、ベースライン値について調整して、活性剤群のアウトカムからプラセボ群のアウトカムを差し引いた値として報告されている。結果の有意性を示すP値を報告する。体重はkg、BMIはkg/m<sup>2</sup>、胴囲はcm、収縮期／拡張期圧はmmHgの単位で表されている。

【0059】

10

20

【表4】

アウトカム	群	ベースライン平均(SD)	12週平均(SD)	変化平均(SD)[区間]	変化平均%(SD)[区間]	群差平均(95%CI)	P値
体重	プラセボ	79.2 (16.5)	79.3 (16.8)	0.2 (1.7) [-2.6, 3.5]	0.1 (2.1) [-3.3, 4.7]	0	0.18
	活性剤	72.1 (12.0)	72.8 (12.6)	0.7 (1.7) [-2.6, 3.8]	0.9 (2.2) [-2.8, 4.9]	0.7 (-0.3, 1.7)	
BMI	プラセボ	26.8 (5.0)	27.0 (5.2)	0.3 (1.3) [-3.1, 4.2]	0.9 (4.7) [-9.3, 15.5]	0	0.41
	活性剤	26.7 (3.7)	27.2 (4.0)	0.5 (0.9) [-1.1, 3.3]	2.0 (3.3) [-3.9, 11.8]	0.3 (-0.4, 1.0)	
胴囲	プラセボ	92.3 (13.5)	90.5 (13.8)	-1.8 (6.4) [-14, 12]	-1.8 (6.8) [-17.3, 12.9]	0	0.61
	活性剤	89.6 (12.0)	89.1 (11.0)	-0.5 (5.7) [-13, 13]	-0.2 (6.7) [-13.0, 16.3]	0.9 (-2.6, 4.4)	
収縮期圧	プラセボ	117.7 (16.0)	122.3 (11.4)	4.7 (11.0) [-13, 28]	4.9 (10.3) [-11.4, 31.1]	0	0.15
	活性剤	119.2 (13.2)	119.7 (13.0)	0.5 (8.9) [-19, 21]	0.7 (7.2) [-13.4, 15.8]	-3.6 (-8.6, 1.4) -3%	
拡張期圧	プラセボ	71.0 (12.2)	73.5 (8.2)	2.4 (9.0) [-15, 18]	5.0 (13.6) [-14.4, 30.5]	0	0.39
	活性剤	73.0 (8.0)	73.0 (8.2)	0.0 (5.9) [-9, 13]	0.3 (8.4) [-10.5, 20.3]	-1.6 (-5.2, 2.1) -2.2%	

表4

## 【0060】

ベースラインと12週における処置終了時点との間で、体重、BMIおよび胴囲に関連する身体測定パラメータに、有意な変化は認められなかった。

## 【0061】

ベースラインと12週との間での収縮期血圧および拡張期血圧の相違の群証拠(group evidence)があった。収縮期血圧の相違は統計的にも臨床的にも有意であった。全被験者活性剤処置群では、収縮期血圧が3.6 mmHg低く(-3%)、一方、拡張期圧は1.6 mmHg(2.2%)低減した。収縮期血圧の低減の大半は6~12週期間に起こった。これは、プラセボ群と比較した場合に、活性剤群における、6 mmHg(5.1%)の収縮期血圧の統計的に有意な低減(P=0.003)を示した(表4ではデータ省略)。これは、ACE阻害剤、ARBおよびレニン阻害剤によって達成される平均3 mmHgの脈圧低減ならびに非選択的ベータ遮断薬による2 mmHgの脈圧低減より高い。またこの低減は、プロバイオティクスによる血圧低減を分析する試験(Keale et al., 2014)において示された対照群との比較で-3.56 mmHg(95%信頼区間、-6.46~-0.66)の収縮期BP低減よりも、大きい。

## 【0062】

これらの結果は、ラクトバチルス・プランタルムECGC13110402が少なくとも軽度高コレステロール血症被験者における収縮期血圧を低下させる可能性を有することを示している。

## 【0063】

活性ラクトバチルス・プランタルムECGC13110402カプセル剤およびプラセボカプセル剤は、試験の継続期間を通して、4で保存した。試験のベースライン時、6週時および12週時(処置の終了時)に製品安定性をチェックしたが、細菌数に有意な変化は観察されなかった。プラセボカプセル剤において細菌成長は検出されなかった。

## 【0064】

安全性パラメータの分析は、ラクトバチルス・プランタルム(ECGC13110402)

10

20

30

40

50

2) 消費の有害な作用を示さなかった。ラクトバチルス・プランタルムは、米国食品医薬品局(FDA: Food and Drug Administration)によってGRAS(Generally Regarded as Safe: 一般に安全と認められる)とみなされている広く使用されるプロバイオティクスであり、欧州食品基準庁(European Food Standard Agency)による特定微生物の安全性推定(QPS: Qualified Presumption of Safety)指定を有する。これは、ラクトバチルス・プランタルム ECGC13110402 が高血圧を処置するための安全で有効な処置である可能性を有することを示唆するものであろう。

【0065】

ラクトバチルス・プランタルム ECGC13110402 に関する工業的スケールアップ実験も行った。以下の作業を行った: a) さまざまな低アレルギー性培地に関するフラスコのテスト、b) 試験を行うための、1~5 L の発酵、少量の濃縮および凍結乾燥、c) さまざまな凍結保護物質のテスト、d) さまざまな凍結乾燥曲線のテスト、e) 80 L での発酵、濃縮および凍結乾燥。最終工程は 80 L 発酵槽での生産であり、これは、(i) 細胞数  $> 8 \times 10^{11}$  cfu/g、(ii) Aw: 0.11、(iii) いかなる賦形剤でも希釈/規格化されていない、凍結乾燥された、濃縮バイオマス量 700 g をもたらした。それゆえにこの特定株は、製造上の観点から、極めて有望であると思われる。細胞の生残率は 70 % 超であることが見いだされ、収率は極めて高い 1.25 % であった。

【0066】

上記の実施形態は、特許請求の範囲によって与えられる保護の範囲を限定しようとするものではなく、むしろ本発明をどのように実施しうるかの例を記載するためのものである。

【0067】

生物の寄託

本願は、寄託された生物学的材料の以下の表示に関係する。

名称: 欧州細胞カルチャーコレクション(European Collection of Cell Cultures)

所在地: 英国 SP4 0JG ソールズベリー、ポートンダウン、イングランド公衆衛生局ポートンダウン(Public Health England Porton Down)、ナショナル・コレクション・オブ・タイプ・カルチャーズ(National Collection of Type Cultures)、PHE カルチャー・コレクションズ(PHE Culture Collections)、微生物部門(Microbial Biological Services)

日付: 2013年11月4日

受託番号: 13110402

10

20

30

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/22	(2006.01)	A 6 1 K 31/22
A 6 1 K	33/14	(2006.01)	A 6 1 K 33/14
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K	45/06	(2006.01)	A 6 1 K 45/06
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K 9/48
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K 9/19
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 2 3 L	33/135	(2016.01)	A 2 3 L 33/135
A 2 3 L	33/125	(2016.01)	A 2 3 L 33/125
A 2 3 L	33/15	(2016.01)	A 2 3 L 33/15
A 2 3 L	33/16	(2016.01)	A 2 3 L 33/16
A 2 3 L	33/10	(2016.01)	A 2 3 L 33/10
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
			C 1 2 N 1/20 E

(74)代理人 100202577

弁理士 林 浩

(72)発明者 オハラ ステファン

イギリス国 ワイオー 10 5ディージー ヨーク ヨークシャー, ヘスリントン, イノベーション センター イノベーション ウェイ

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 韓国公開特許第10-2009-0113477 (KR, A)

中国特許出願公開第1844363 (CN, A)

国際公開第2009/138091 (WO, A1)

中国特許出願公開第102994420 (CN, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 35 / 747

C 1 2 N 1 / 2 0

A 6 1 P 9 / 1 2

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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

W P I D S / W P I X (S T N)