(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-550276
(P2023-550276A)
(43)公表日　令和5年12月1日(2023.12.1)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C08B 37/00 (2006.01)		C08B	37/00	Q	4B018
A61K 31/715 (2006.01)		A61K	31/715	ZNA	4B065
A61P 37/04 (2006.01)		A61P	37/04		4C085
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	111	4C086
A61P 29/00 (2006.01)		A61P	29/00	101	4C090

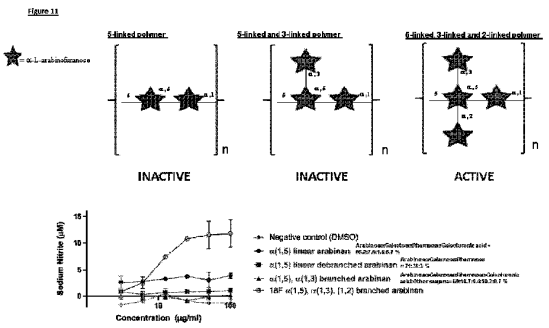
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全73頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-526189(P2023-526189)
(86)(22)出願日　令和3年10月29日(2021.10.29)
(85)翻訳文提出日　令和5年6月27日(2023.6.27)
(86)国際出願番号　PCT/GB2021/052818
(87)国際公開番号　WO2022/090735
(87)国際公開日　令和4年5月5日(2022.5.5)
(31)優先権主張番号　2017255.7
(32)優先日　令和2年10月30日(2020.10.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

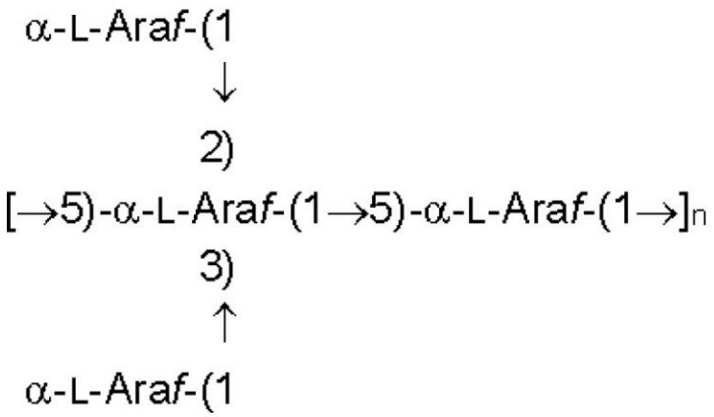
(71)出願人　504389636
ザ クイーンズ ユニヴァーシティ オブ ベルファスト
イギリス， ベルファスト ビーティー７ １エヌエヌ， ユニヴァーシティー ロード（番地無し）
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100156144
弁理士　落合 康
(72)発明者　グリーン，ブライアン デズモンド
英国ビーティ９・５ディエル、ベルファスト、クイーンズ・ユニバーシティ・ベルファスト、バイオロジカル・サイエンシーズ・ビルディング内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　免疫調節物質

(57)【要約】
本発明は、免疫反応を調節するために使用できる多糖に関する。

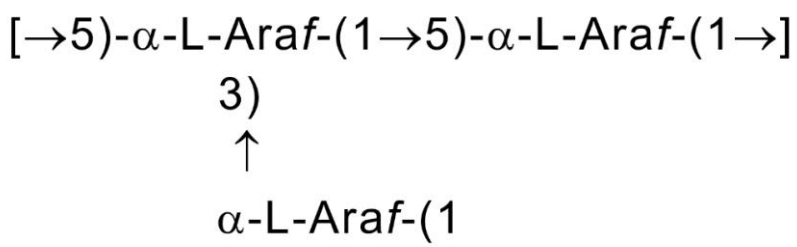


【特許請求の範囲】
【請求項１】
「n」反復単位を含む多糖であって、各「n」反復単位はそれぞれ、骨格としてのアルファ-(1-5)-結合アラビノフラノース残基、前記骨格のアラビノフラノース残基に結合する単一アルファ-アラビノフラノース残基(1-2)である第一の側鎖、および前記骨格の同じアラビノフラノース残基に結合する単一アルファ-アラビノフラノース残基(1-3)である第二の側鎖を含む多糖。
【請求項２】
反復単位が、式(I)：
【化１】



[式(I)]

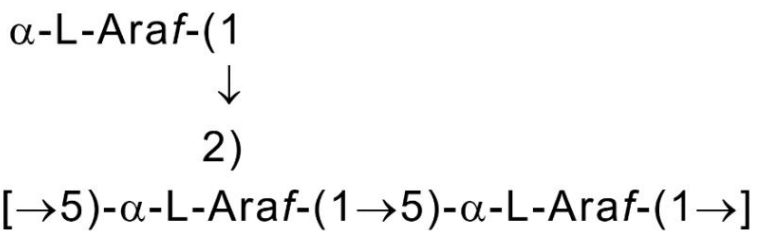
(これは、ブロック「A」と呼称されることもある)
を含むか、またはそれからなる、請求項1に記載の多糖。
【請求項３】
反復単位が、式(II)：
【化２】



[式(II)]

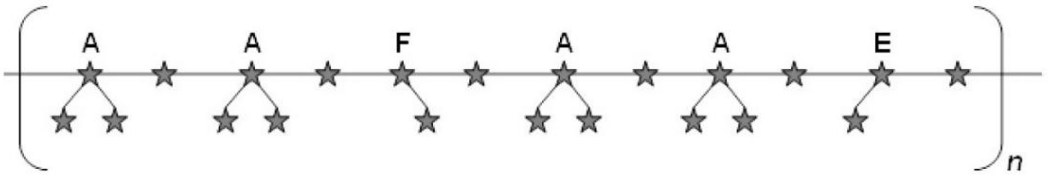
で示されるブロックEをさらに含む、請求項1または2に記載の多糖。
【請求項４】
反復単位が、式(III)：

【化３】



[式(III)]

で示されるブロックFをさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の多糖。
【請求項５】
各ブロックの骨格が、アルファ-(1-5)-グリコシド結合により結合されている、請求項2～4のいずれか一項に記載の多糖。
【請求項６】
反復単位におけるA:E:Fの比が、約4～6:1～2:1である、請求項2～5のいずれか一項に記載の多糖。
【請求項７】
反復単位におけるA:Fの比が、約4～6:1である、請求項2～5のいずれか一項に記載の多糖。
【請求項８】
反復単位におけるA:Eの比が、約2～6:1である、請求項2～5のいずれか一項に記載の多糖。
【請求項９】
反復単位が、式(IV)：
【化４】



[式(IV)の各星印はそれぞれ、アラビノフラノース、好ましくはL-アラビノフラノース、より好ましくはアルファ-アラビノフラノース、最も好ましくはアルファ-L-アラビノフラノースに相当する]
を含む、請求項1に記載の多糖。
【請求項１０】
「n」が、約5～約1000、約10～約500、または約15～約250、または約15～約230、または約15～約220であり、好ましくは、「n」が、約15～約220または約15～約230である、請求項1～9のいずれか一項に記載の多糖。
【請求項１１】
マルバレス植物から本発明の多糖を単離する方法であって、
i. マルバレス植物をホモジナイズして脱水させることで、脱水マルバレス植物粒子および/または粉末を形成すること；および
ii. 該脱水マルバレス植物粒子および/または粉末から多糖を抽出することで、マルバレス植物から多糖を単離すること、
を含む方法。
【請求項１２】

マルバレス植物をホモジナイズすることが、植物を粉砕および/または細切りして、粒子および/または粉末にすることを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項１３】

マルバレス植物を脱水させることが、植物材料を凍結乾燥または加熱することで水分を除去することを含む、請求項11または12に記載の方法。

【請求項１４】

脱水マルバレス植物粒子または粉末から多糖を抽出することが、第一のアルコール抽出工程、その後の1つまたはそれ以上の水性抽出工程、その後の第二のアルコール抽出工程を含む、請求項11～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】

第二のアルコール抽出工程が、単離された多糖および沈殿を含有するアルコール相が形成されるようにプールされている、1つまたはそれ以上の水性抽出工程の水相で行われる、請求項14に記載の方法。

【請求項１６】

アルコール相が、遠心分離により沈殿から分離される、請求項15に記載の方法。

【請求項１７】

精製工程、例えばクロマトグラフィー技術、結晶化技術または蒸留技術をさらに含む、請求項16に記載の方法。

【請求項１８】

請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖。

【請求項１９】

請求項1～10のいずれか一項に記載の単離された多糖、または請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖を含む培養培地。

【請求項２０】

クローニング培地またはハイブリドーマフィーダー補充物である、請求項19に記載の培養培地。

【請求項２１】

細胞、生物学的組織、生物学的臓器または生物をさらに含む、請求項19または20に記載の培養培地。

【請求項２２】

請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖、または請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖を含む組成物であって、任意に、組成物は医薬組成物であり、および薬学的に許容できる担体など、または食用組成物(例えば、プレバイオティクス)である、組成物。

【請求項２３】

請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖、または請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖を含む免疫学的アジュバント。

【請求項２４】

請求項23に記載の免疫学的アジュバントを含むワクチン。

【請求項２５】

医薬に使用するための、請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖、請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖、請求項22に記載の組成物、請求項23に記載の免疫学的アジュバントまたは請求項24に記載のワクチン。

【請求項２６】

対象のワクチン接種に使用するための、請求項23に記載の免疫学的アジュバントまたは請求項24に記載のワクチン。

【請求項２７】

対象の疾患または状態の処置、改善または予防に使用するための、請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖、請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖、請求項22に記載の組成物、請求項23に記載の免疫学的アジュバントま

たは請求項24に記載のワクチン。
【請求項２８】
対象のヘルパーT細胞(T_H)介在疾患または病状の処置、改善または予防に使用するための、請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖、請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖、請求項22に記載の組成物、請求項23に記載の免疫学的アジュバント、請求項24に記載のワクチン、またはマルバレス目の植物もしくはその一部。
【請求項２９】
請求項25に記載の使用のための多糖、組成物、アジュバント、ワクチンまたはマルバレス目の植物であって、経口、エアロゾル吸入(例えば、経鼻吸入または経口吸入)、舌下、局所的、経皮、非経腸的(皮下、筋肉内または静脈内)で投与される多糖、組成物、アジュバント、ワクチンまたはマルバレス目の植物。
【請求項３０】
対象にワクチン接種をする方法であって、請求項23に記載のアジュバントまたは請求項24に記載のワクチンを対象に投与することを含む方法。
【請求項３１】
対象においてヘルパーT細胞(T_H)介在疾患または病状を処置、改善または予防する方法であって、(i)請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖、(ii)請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖、(iii)請求項22に記載の組成物、(iv)請求項23に記載のアジュバント、(v)請求項24に記載のワクチン、または(vi)マルバレス目の植物もしくはその一部、を該対象に投与することを含む方法。
【請求項３２】
ヘルパーT細胞(T_H)介在疾患または病状が、T_H1介在疾患もしくは病状、またはT_H2介在疾患もしくは病状である、請求項31に記載の方法。
【請求項３３】
T_H1介在疾患または病状が、リウマチ性関節炎(RA)；乾癬性関節炎；乾癬；炎症性腸症候群(IBD)；クローン病；潰瘍性大腸炎；多発性硬化症(MS)；インフルエンザ(汎発性インフルエンザを含む)；呼吸器障害、例えば、呼吸器多核体ウイルス(RSV)などのウイルスにより引き起こされるもの；嚢胞性線維症(CF)；ヘルペス(性器ヘルペスを含む)；敗血症および敗血症性ショック；細菌肺炎；細菌髄膜炎；デング出血熱；子宮内膜症；前立腺炎；ブドウ膜炎；子宮成熟症；円形脱毛症；強直性脊椎炎；セリアック病；皮膚筋炎；1型糖尿病；グッドパスチャー症候群；グレーブス病；ギランバレー症候群；若年性特発性関節炎；橋本甲状腺炎；特発性血小板減少性紫斑病；エリテマトーデス；混合性結合組織病；重症筋無力症；ナルコレプシー；骨関節症；尋常性天疱瘡；悪性貧血；多発性筋炎；原発性胆汁性肝硬変；再発性多発軟骨炎；シェーグレン症候群；側頭動脈炎；脈管炎；ウェゲナー肉芽腫症；加齢黄斑変性症、感染性疾患(例えば、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mt)感染、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染またはコロナウイルス感染))；自己免疫性障害(例えば、関節炎、多発性硬化症または1型糖尿病)；癌；癌後手術または癌処置；および免疫後療法を含む/それらからなる群から選択される1つまたはそれ以上であり、好ましくは、T_H1介在疾患または病状が、嚢胞性線維症(CF)、I型糖尿病、加齢黄斑変性症、感染性疾患(例えば、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mt)感染、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染またはコロナウイルス感染)である、請求項32に記載の方法。
【請求項３４】
T_H2介在疾患または病状が、好ましくは、1型過敏性疾患（アレルギー(例えば鼻炎、アレルギー性皮膚炎、蕁麻疹)、喘息、湿疹、枯草熱、蕁麻疹、慢性移植片対宿主病、進行性全身性硬化症、全身性エリテマトーデスを含む）；慢性肺疾患；強皮症；アナフィラキシー；萎縮症(例えば、筋肉)；および移植片拒絶を含む/それらからなる群から選択される1つまたはそれ以上である、請求項32に記載の方法。
【請求項３５】

多糖、組成物、アジュバント、ワクチンまたは植物が、経口、舌下、局所的、経皮または非経腸的(皮下、筋肉内または静脈内)で投与される、請求項31～34のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
細胞、生物学的組織、生物学的臓器または生物学的システムを培養する方法であって
培養培地に、細胞、生物学的組織、生物学的臓器または生物学的システムを配置すること、および
培養培地に、(i)請求項1～10に記載の多糖、(ii)請求項11～17のいずれか一項に記載の方法により製造される単離された多糖、(iii)請求項22に記載の組成物、(iv)請求項23に記載のアジュバント、(v)請求項24に記載のワクチン、または(vi)マルバレス目の植物もしくはその一部を配置すること、
を含む方法。
【請求項３７】
T_H1介在免疫応答を誘導または増強する方法であって、
T_H1介在免疫応答を誘導または増強するように請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖を、生物、生物学的システム、生物学的組織、生物学的臓器または細胞に接触させること；または
T_H1介在免疫応答を誘導または増強するように請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖を、生物、生物学的システム、生物学的組織、生物学的臓器または細胞に投与すること、
を含む方法。
【請求項３８】
T_H2介在免疫応答を予防または減衰させる方法であって、
T_H2介在免疫応答を予防または減衰させるように請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖を、生物、生物学的システム、生物学的組織、生物学的臓器または細胞に投与すること；または
T_H2介在免疫応答を予防または減衰させるように請求項1～10のいずれか一項に記載の多糖を、生物、生物学的システム、生物学的組織、生物学的臓器または細胞に接触させること、を含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、多糖、該多糖の単離方法、該多糖を含む組成物、医薬として使用するための該多糖、該多糖を用いた処置方法、その他該多糖の特定の医学的使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
自然免疫系は、微生物が動物またはヒトの体内に侵入すると、第一の防衛線として機能する。適応免疫系は第二の防衛線であり、自然免疫系が微生物を処理するときに、特に微生物を除去できない場合に発動されるものである。適応免疫系は、自然免疫系とは異なり、侵入した微生物に存在する固有の抗原に対して特異性を示し、その微生物が体から除去された後もその固有の抗原を記憶する。これらの適応免疫系の特性により、固有の抗原(および関連する微生物)が2回目または3回目の体内への侵入時に、それをより迅速に排出することができ、これが、ワクチンが機能する基礎となる。
【０００３】
ワクチンは一般的に、少なくとも、適応免疫系を刺激する抗原を含む。そのため、その後同じ抗原を持つ生きた微生物に遭遇した場合、適応免疫系のメモリーB細胞およびメモリーT細胞(抗原を記憶しており、抗原との最初の遭遇後にナイーブT細胞から形成されている)が、特異的かつより効果的な免疫応答を調節して、抗原/微生物をより早く除去する。
【０００４】

成熟したB細胞(Bリンパ球)は一般に、細胞外の微生物に対する抗体を産生することによって機能し、他方、成熟したTリンパ球は一般に、細胞内微生物を殺すのに役立つ。細胞傷害性T細胞としても知られているCD8+T細胞は、感染細胞に結合して細胞傷害性物質を放出することによって細胞内微生物を殺す。ヘルパーT細胞(T_H)としても知られているCD4+T細胞は、炎症反応の活性化を誘導するサイトカイン(マクロファージの活性化を介して)または体液性反応の活性化を誘導するサイトカイン(B細胞の活性化により)を産生することによって、細胞内微生物に対する保護を提供する。炎症反応の活性化を誘導するヘルパーT細胞はTH1細胞と称され、体液性反応の活性化を誘導するヘルパーT細胞はT_H2細胞と称される。

【０００５】

残念ながら、いくつかのワクチンは、微生物に対して適切な応答を形成するのに十分な適応免疫系を刺激することができない。代替的または追加的に、いくつかのワクチンは、免疫応答を誘導するために、多量の外来微生物材料を必要とする。しかし、ワクチンに含まれる微生物物質が多すぎると、使用者に有害となる可能性がある。このような問題やその他の問題の結果、いくつかのワクチンは、それの効果を増強するために、免疫調節物質(例えば、アジュバント)とともに投与される。アジュバントが効果的であるためには、関連する適応免疫応答(例えば、T_H1介在免疫応答またはT_H2介在免疫応答)を増強できるものでなければならない。

【０００６】

したがって、適応免疫応答を調節するのに使用できる免疫調節物質が必要とされている。

【発明の概要】

【０００７】

本発明の第一の態様によれば、「n」反復単位を含む多糖であって、各「n」反復単位はそれぞれ、骨格としてのアルファ-(1-5)-結合アラビノフラノース残基、前記骨格のアラビノフラノース残基に結合する単一のアルファ-アラビノフラノース残基(1-2)である第一の側鎖、および前記骨格の同じアラビノフラノース残基に結合する単一のアルファ-アラビノフラノース残基(1-3)である第二の側鎖を含む多糖が提供される。

【０００８】

本発明者らは、様々な植物の抽出物が免疫調節性質を示すことを見出した(実施例3を参照のこと)。実施例4において、観察された免疫調節活性に新規の多糖が関与していることが確認された。したがって、有利には、本発明による多糖は、免疫応答の調節(すなわち、刺激および/または減衰)に使用され得る。実施例に示すように、多糖は、T_H1介在免疫応答を誘導するのに特に有効である。しかし、T_H1応答およびT_H2応答が反対の作用をすることを考慮すると、本発明の多糖を使用してT_H2介在免疫応答を減衰または防止できることが理解されるであろう。したがって、本発明による多糖は、免疫応答の刺激および/または増強、ならびに免疫応答の停止および/または減衰に使用することができる。多糖はまた、食用であり、経口摂取後に無毒で効能があり、アナフィラキシーを誘発しないので有利である。したがって、経口投与されてもよい。

【０００９】

本発明による多糖は、以下の一つまたはそれ以上の能力を有し得る：

・ T_H1サイトカイン(例えばIFNγ、TNFαおよび/またはIL-2)の放出を誘導または増強する；

・ リンパ球(T細胞および/またはB細胞など)の増殖を誘導または増強する；

・ IgM、IgAおよび/またはIgG抗体の産生を誘導または増強する；

・ マクロファージを活性化(例えば、iNOSの活性化/NOの放出および/またはO_2^-の放出)またはその活性化を増強する；

・ マクロファージによる貪食作用を誘導または増強する；

・ プレバイオティクス効果を有する(腸内に定着する有利な細菌または真菌の基質として作用することによって、それらの成長および/または活性を刺激する)；

・ 特にマクロファージにおけるIL-6および/またはTNFαの放出を誘導または増強する；
・ 特にミクログリアにおけるIL-6および/またはIL-12の放出を誘導または増強する；
・ 免疫細胞によりIL-9、IL-6および/またはIL-71Aの放出を誘導または増強する；
・ 免疫細胞におけるIL-8の産生を誘導または増強する；
・ 免疫細胞におけるMIG(ガンマによって誘導されるモノカイン)の産生を阻害または抑制する。

【００１０】

したがって、本発明による多糖は、細菌、真菌および/またはウイルスなどの異物または微生物による感染を処置、予防または改善することが可能であり得る。

【００１１】

本発明による多糖は、以下の1つ以上の能力を有し得る。

・ T_H2サイトカイン(例えばIL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13および/またはIL-25)の放出を減衰させるかまたは防止する；
・ IgEへのB細胞クラススイッチを防止するかまたは減衰させる；
・ IgE抗体の放出を防止するかまたは減衰させる；
・ 肥満細胞の脱顆粒を防止するかまたは減衰させる；
・ 好塩基球の脱顆粒を防止または阻害する；
・ 好酸球増加症を防止または阻害する；
・ 樹状細胞の活性化を防止または阻害する。

【００１２】

本発明の多糖は、マルバレス(Malvales)植物から単離され得る。本発明の多糖は、マルバレ(Malvales)目の植物から単離され得る。マルバレス(Malvales)目は、ビキサセアエ(Bixaceae)ファミリー、シスタセアエ(Cistaceae)ファミリー、シチナセアエ(Cytinaceae)ファミリー、ジプテロカルパセアエ(Dipterocarpaceae)ファミリー、ムンチンギアセアエ(Muntingiaceae)ファミリー、ネウラダセアエ(Neuradaceae)ファミリー、サルクロアエナセアエ(Sarcloaenaceae)ファミリー、スファエロセパラセアエ(Sphaerosepalaceae)ファミリー、チメラエセアエ(Thymelaeceae)ファミリーおよびマルバセアエ(Malvaceae)ファミリーを含む。好ましくは、植物は、マルバセアエ(Malvaceae)ファミリーのメンバーである。マルバセアエ(Malvaceae)ファミリーは、ボンバコイデアエ(Bombacoideae)、ブロウンロウィオイデア(Brownlowioideae)、ビトンネリオイデアエ(Bytnnerioideae)、ビットネリオイデアエ(Byttnerioideae)、ドムベヨイデアエ(Dombeyoideae)、グレウィオイデアエ(Grewioideae)、ヘリクテロイデアエ(Helicteroideae)、マルボイデアエ(Malvoideae)、ステルクリオイデアエ(Sterculioideae)およびチリオデアエ(Tiliodeae)のサブファミリーを含む。好ましくは、植物は、マルボイデアエ(Malvoideae)である。マルボイデアエ(Malvoideae)は、マルベアエ(Malveae)族、ゴッシピエアエ(Gossypieae)族、ヒビスセアエ(Hibisceae)族、キジエアエ(Kydieae)族を含む。好ましくは、植物は、マルベアエ(Malveae)族に由来するものである。植物は、シダ属またはマルバ(Malva)属またはマルバストルム(Malvastrum)属またはシダルセアエ(Sidalcea)属またはアブチロン(Abutilon)属またはアルテア(Althea)属またはスファエラルセアエ(Sphaeralcea)属またはラバテラ(Lavatera)属に由来するものであり得る。最も好ましくは、シダ族の植物は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)(イリマ(ilima)、フランネル・ウェエド(flannel weed)、バラ(bala)、コウントリ・マロウ(country mallow)またはヘアルト-レアフ・シダ(heart-leaf sida)とも称される)である。最も好ましくは、マルバ(Malva)属の植物は、マルバ・シルベストリス(Malva sylvestris)である。最も好ましくは、マルバストルム(Malvastrum)属の植物は、マルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum lateritium)である。最も好ましくは、シダルセアエ(Sidalcea)属の植物は、シダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora)である。最も好ましくは、アブチロン(Abutilon)属の植物は、アブチロン・テオフラスチ(Abutilon theophrasti)である。最も好ましくは、アルテア(Althea)属の植物は、アルテア・オフィシナリス(Althea officinalis

)である。最も好ましくは、スファエラルセアエ(Sphaeralcea)属の植物は、スファエラルセアエ・コクシネア(Sphaeralcea coccinea)である。最も好ましくは、ラバテラ(Lavatera)属の植物は、ラバテラ・アルボレア(Lavatera arborea)である。最も好ましくは、植物は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)である。

【００１３】

このように、多糖は、シダ属(例えばシダ・コルジホリア(Sida cordifolia))またはマルバ(Malva)属(例えばマルバ・シルベストリス(Malva sylvestris))またはマルバストルム(Malvastrum)属(例えばマルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum lateritium))またはシダルセアエ(Sidalcea)属(例えばシダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora))またはアルテア(Althea)属(例えばアルテア・オフィシナリス(Althea officinalis))、またはスファエラルセアエ(Sphaeralcea)属(例えばスファエラルセアエ・コクシネア(Sphaeralcea coccinea))、またはラバテラ(Lavatera)属(例えばラバテラ・アルボレア(Lavatera arborea))から単離され得る。

【００１４】

好ましくは、多糖は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)から単離される多糖である。多糖は、植物の一部、例えば、植物の葉、花、茎および/または根から単離され得る。好ましくは、多糖は、マルバレス(Malvales)目の植物の根から単離される。このように、多糖は、シダspp.(例えば、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia))またはマルバ(Malva)spp.(例えばマルバ・シルベストリス(Malva sylvestris))またはマルバストルム(Malvastrum)spp.(例えばマルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum lateritium))またはシダルセアエ(Sidalcea)spp.(例えばシダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora))の根から単離され得る。最も好ましくは、多糖は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)の根から単離される。

【００１５】

本発明による多糖は、ホモ多糖またはヘテロ多糖であり得る。多糖は、アラビナン多糖であり得る。多糖は、アラビナンホモ多糖であり得る。ホモ多糖の残基は、L-アラビノフラノース残基またはD-アラビノフラノース残基であり得る。好ましくは、残基は、L-アラビノフラノース残基である。

【００１６】

第一の態様による多糖の骨格の各反復単位は、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上、7つまたはそれ以上、8つまたはそれ以上、9つまたはそれ以上または10つの追加の残基を骨格の末端残基でさらに含む。好ましくは、骨格の追加の残基は、アルファ-(1-5)-結合アラビノフラノース残基である。最も好ましくは、骨格の追加の残基は、アルファ-L-(1-5)-結合アラビノフラノース残基である。1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上、7つまたはそれ以上、8つまたはそれ以上、あるいは9つまたはそれ以上の追加のアルファ-(1-5)-結合アラビノフラノース残基は、いずれかの側鎖を含んでいてもよく、含んでいなくてもよい。1つまたはそれ以上の追加のアルファ-(1-5)-結合アラビノフラノース残基は、側鎖として単一アルファ-(1-2)-結合アラビノフラノース残基を含み得る。1つまたはそれ以上の追加のアルファ-(1-5)-結合アラビノフラノース残基は、側鎖として単一アルファ-(1-3)-結合アラビノフラノース残基を含み得る。1つ、2つまたは3つの追加のアルファ-(1-5)-結合アラビノフラノース残基は、側鎖としてアラビノフラノース残基に結合する単一アルファ-(1-2)および側鎖として骨格の同じ追加のアラビノフラノース残基に結合する単一アルファ-アラビノフラノース残基(1-3)を含み得る。

【００１７】

各反復単位は、独立して、分枝状であってもよく、非分枝状であってもよい。したがって、少なくとも約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%または約100%の反復単位が、分枝状であってもよい。このように

、約１００％未満、約９０％未満、約９５％未満、約９０％未満、約８５％未満、約８０％未満、約７５％未満、約７０％未満、約６５％未満、約６０％未満、約５５％未満、約５０％未満、約４５％未満、約４０％未満、約３５％未満、約３０％未満、約２５％未満、約２０％未満、約１５％未満、約１０％未満または約５％未満の反復単位が、分枝状であってもよい。

【００１８】

各反復単位は、互いに直接または間接的に結合されていてもよい。好ましくは、各反復単位は、グリコシド結合、例えば、アルファ-(1-5)グリコシド結合またはアルファ-L-(1-5)グリコシド結合を介して互いに直接結合されている。

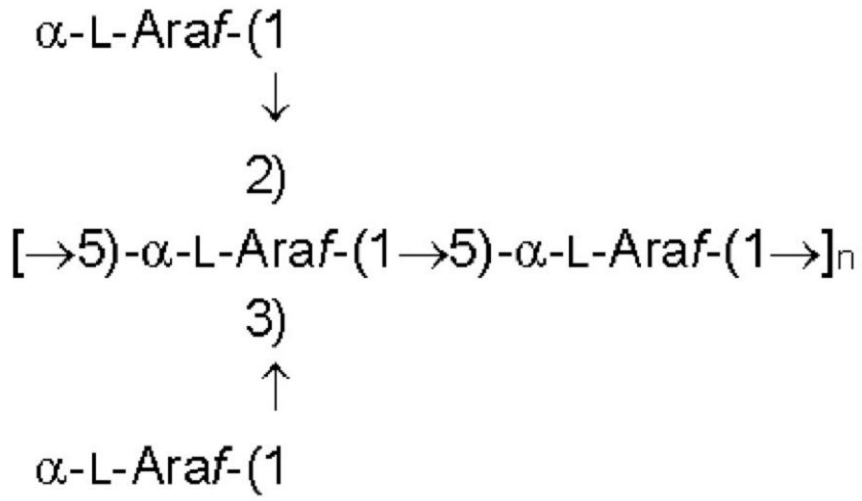
【００１９】

本発明による多糖の第一の側鎖および第二の側鎖は、骨格の同じアラビノフラノース残基に結合し得る。

【００２０】

一実施態様において、反復単位は、本明細書において以下のように定義されている式(I)(本明細書ではブロック「A」とも称されることがある)：

【化１】



[式(I)]

を含むか、またはそれらからなる。

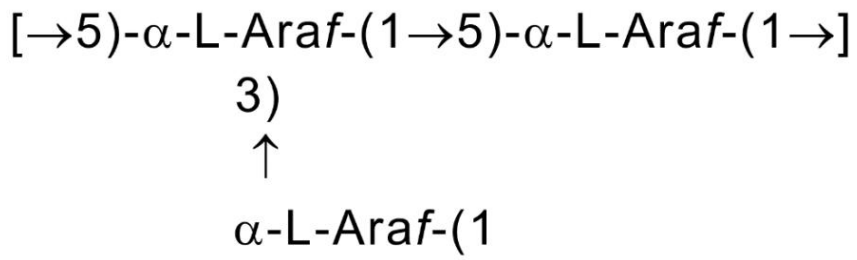
【００２１】

本発明による多糖の反復単位は、本明細書においてブロック「A」、「E」および「F」と称されるブロックを含むか、またはそれらからなり得る。したがって、多糖の反復単位は、ブロックEおよび/またはブロックFをさらに含み得る。

【００２２】

反復単位は、以下の式(II)：

【化２】



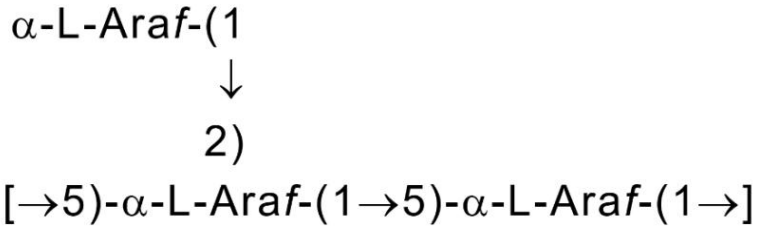
[式(II)]

で示されるブロックEをさらに含み得る。

【００２３】

反復単位は、以下の式(III)：

【化３】



[式(III)]

で示されるブロックFをさらに含み得る。

【００２４】

各ブロック(すなわち、ブロックA、ブロックEおよびブロックF)はそれぞれ、骨格を含む。各ブロックは、アルファ-(1-5)-グリコシド結合、具体的には各ブロックの骨格よって結合され得る。このように、反復単位は、アルファ-(1-5)-グリコシド結合によって式(II)が結合している式(I)を含み得る。反復単位は、アルファ-(1-5)-グリコシド結合によって式(III)が結合している式(I)を含み得る。反復単位は、アルファ-(1-5)-グリコシド結合によって式(III)が結合している式(II)を含み得る。

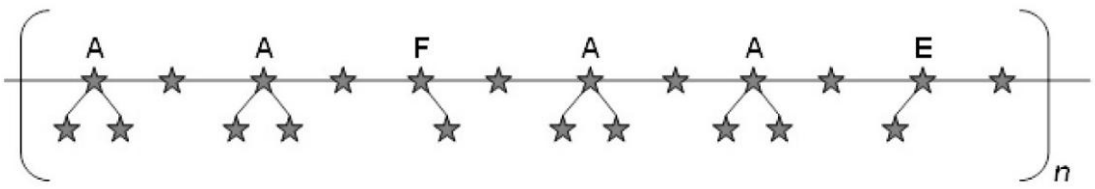
【００２５】

好ましくは、ブロックF(反復単位中に存在する場合)は、A、EおよびFのうち最も少なく存在するブロックである。好ましくは、ブロックAはA、EおよびFのうち最も豊富に存在するブロックである。ブロックF(反復単位中に存在する場合)は、ブロックAより約2、約3、約4、約5、約6、約7またはそれ以下の存在量であり得る。ブロックF(存在する場合)は、ブロックAよりも約1倍～約2倍少ない存在量であり得る。好ましくは、Fのすべての出現に対して、Aの約4～約6の出現があり、Fのすべての出現に対して、Eの約1～約2の出現がある。したがって、反復単位におけるA：E：Fの比率は、約2～8：1～3：1または約3～7：1～2：1または約4～6：1～2：1であり得る。最も好ましくは、A：E：Fの比は、約4～6：1～2：1である。反復単位におけるA：Fの比は、約2～8：1または約3～7：1または約4～6：1であり得る。最も好ましくは、A:Fの比は、約4～6：1である。反復単位におけるA：Eの比は、約2～8：1または約2～7：1または約2～6：1であり得る。最も好ましくは、A：Fの比は約2～6：1である。

【００２６】

反復単位は、本明細書で以下のように定義されている式(IV)：

【化４】



[式 IV]

[式中、各式(IV)の星印はそれぞれ、アラビノフラノース、好ましくはL-アラビノフラノース、より好ましくはアルファ-アラビノフラノース、最も好ましくはアルファ-L-ア

ラビノフラノースに相当する］
を含み得る。
【００２７】
本発明による多糖の反復単位は、以下の表1に示される組み合わせのいずれか1つで示される：
【表１】

AAAAE		AAAAF		AAFAAE		AAEAAF
AAAEA		AAAFA		AFAAAE		AEAAAF
AAEAA		AAFAA		FAAAAE		EAAAAF
AEAAA		AFAAA		AAAFEA		AAAEFA
EAAAA		FAAAA		AAFAEA		AAEAFA
AAAAEF		AAAAFE		AFAAEA		AEAAFA
AAAEFA		AAAFEA		FAAAEA		EAAAFA
AAAEFA		AAAFEA		AAFEAA		AAEFAA
AAEFAA		AAFEAA		AFAEAA		AEAFAA
AEFAAA		AFEAAA		FAAEAA		EAAFAA
EFAAAA		FEAAAA		AFEAAA		AEFAAA
AAAFAE		AAAEAF		FAEAAA		EAFAAA

【００２８】
上記表1の各セルは、本発明による多糖の反復単位の実施態様を示す。したがって、本発明の多糖の反復単位は、表1に示される48例のうちのいずれか1つによって示され得る。本発明の多糖は、「n」個の反復単位、例えば、式(I)または式(IV)または、表1に示される48例のいずれかの反復単位の「n」個を含み得る。「n」は、2またはそれ以上、3またはそれ以上、4またはそれ以上、5またはそれ以上、6またはそれ以上、7またはそれ以上、8またはそれ以上、9またはそれ以上、10またはそれ以上、15またはそれ以上、20またはそれ以上、25またはそれ以上、30またはそれ以上、35またはそれ以上、あるいは40またはそれ以上、50またはそれ以上、100またはそれ以上、200またはそれ以上、300またはそれ以上、500またはそれ以上、あるいは1000またはそれ以上であり得る。「n」は、約5～約1000、約10～約500、または約15～約250、または約15～約230、または約15～約220であり得る。好ましくは、「n」は、約15～約220または約15～約230である。
【００２９】
本発明による多糖は、対象の免疫応答の調節、好ましくは、免疫応答の刺激に使用することができる。本発明者らは、分子量が大きくなるにつれて、多糖の重量あたりの免疫応答の調節効果も高くなることを見いだした。本発明による多糖の平均分子量または本発明

による多糖の反復単位は、少なくとも約3kDa、少なくとも約5kDa、少なくとも約10kDa、少なくとも約15kDa、少なくとも約20kDa、少なくとも約25kDa、少なくとも約30kDa、少なくとも約35kDa、少なくとも約40kDa、少なくとも約50kDa、少なくとも約60kDa、少なくとも約65kDa、少なくとも約70kDa、少なくとも約75kDa、少なくとも約80kDa、少なくとも約85kDa、少なくとも約90kDa、少なくとも約95kDa、少なくとも約100kDa、少なくとも約105kDa、少なくとも約110kDa、または少なくとも約115kDaであり得る。

【００３０】

本発明による多糖は、約3kDa～約200kDa、4kDa～約180kDa、5kDa～約160kDa、6kDa～約140kDa、約7kDa～約120kDa、約8kDa～約120kDa、約9kDa～約120kDa、約10kDa～約120kDa、約20kDa～約120kDa、約30kDa～約120kDa、約40kDa～約120kDa、約50kDa～約120kDa、約60kDa～約120kDa、約70kDa～約120kDa、約80kDa～約120kDa、約90kDa～約120kDa、約100kDa～約120kDaまたは約110kDa～約120kDaの平均分子量を有し得る。好ましくは、多糖は、0kD～120kDaの分子量を有する。

【００３１】

本発明の多糖は、例えば、経口、直腸、経鼻、肺、局所(頬側および舌下を含む)、経皮、大槽内、腹腔内、膣および非経腸(皮下、筋肉内、髄腔内、静脈内および皮内)経路を含むいくつかの異なる経路で投与される。好ましくは、多糖は、経口投与される。

【００３２】

本発明による多糖は、特にヒトにおいて非毒性である。本発明による多糖は、100μg/mlまでの用量で非毒性である。本発明による多糖は、特にヒトにおいて、100μg/mlまでの用量で非毒性である。

【００３３】

本発明による多糖は、ラムノガラクツロナン、例えばラムノガラクツロナン-IIのラムノガラクツロナン-Iであってもよく、それでなくてもよい。

【００３４】

別の態様によれば、マルバレス(Malvales)植物から本発明による多糖を単離する方法であって、

i. マルバレス(Malvales)植物をホモジナイズして脱水させることで、脱水マルバレス(Malvales)植物粒子または粉末を形成すること；および

ii. 脱水マルバレス(Malvales)植物粒子および/または粉末から多糖を抽出することで、マルバレス(Malvales)植物から多糖を単離すること、

を含む方法が提供される。

【００３５】

本発明による方法は、マルバレス(Malvales)目のメンバーまたはその植物の一部(根など)から多糖を単離することを含み得る。したがって、マルバレス(Malvales)植物またはその一部は、ビキサセアエ(Bixaceae)ファミリー、シスタセアエ(Cistaceae)ファミリー、シチナセアエ(Cytinaceae)ファミリー、ジプテロカルパセアエ(Dipterocarpaceae)ファミリー、ムンチンギアセアエ(Muntingiaceae)ファミリー、ネウラダセアエ(Neuradaceae)ファミリー、サルクロアエナセアエ(Sarcloaenaceae)ファミリー、スファエロセパラセアエ(Sphaerosepalaceae)ファミリー、チメラエセアエ(Thymelaeceae)ファミリーまたはマルバセアエ(Malvaceae)ファミリーの植物を含み得る。好ましくは、植物は、マルバセアエ(Malvaceae)ファミリーのメンバーである。したがって、マルバレス(Malvales)植物のメンバーまたはその一部は、マルバセアエ(Malvaceae)ファミリーのサブファミリーであり得る。マルバセアエ(Malvaceae)サブファミリーは、ボンバコイデアエ(Bombacoideae)、ブロウンロウィオイデア(Brownlowioideae)、ビトンネリオイデアエ(Bytnnerioideae)、ビットネリオイデアエ(Byttnerioideae)、ドムベヨイデアエ(Dombeyoideae)、グレウィオイデアエ(Grewioideae)、ヘリクテロイデアエ(Helicteroideae)、マルボイデアエ(Malvoideae)、ステルクリオイ

デアエ(Sterculioideae)およびチリオデアエ(Tiliodeae)を含む。好ましくは、植物は、マルボイデアエ(Malvoideae)である。マルボイデアエ(Malvoideae)植物は、マルベアエ(Malveae)族(tribe)、ゴッシピエアエ(Gossypieae)族、ヒビスセアエ(Hibisceae)族またはキジエアエ(Kydieae)族のものであり得る。好ましくは、植物は、マルベアエ(Malveae)族のものである。植物は、シダ属またはマルバ(Malva)属またはマルバストルム(Malvastrum)属またはシダルセアエ(Sidalcea)属またはアブチロン(Abutilon)属またはアルテア(Althea)属またはスファエラルセアエ(Sphaeralcea)属またはラバテラ(Lavatera)属のものであり得る。最も好ましくは、シダ属の植物は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)(イリマ(ilima)、フランネル・ウェエド(flannel weed)、バラ(bala)、コウントリ・マロウ(country mallow)またはヘアルト-レアフ・シダ(heart-leaf sida)とも称される)である。最も好ましくはは、マルバ(Malva)属の植物は、マルバ・シルベストリス(Malva sylvestris)である。最も好ましくは、マルバストルム(Malvastrum)属の植物は、マルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum lateritium)である。最も好ましくは、シダルセアエ(Sidalcea)属の植物は、シダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora)である。最も好ましくは、アブチロン(Abutilon)属の植物は、アブチロン・テオフラスチ(Abutilon theophrasti)である。最も好ましくは、アルテア(Althea)属の植物は、アルテア・オフィシナリス(Althea officinalis)である。最も好ましくは、スファエラルセアエ(Sphaeralcea)属の植物は、スファエラルセアエ・コクシネア(Sphaeralcea coccinea)である。最も好ましくは、ラバテラ(Lavatera)属の植物は、ラバテラ・アルボレア(Lavatera arborea)である。最も好ましくは、植物は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)である。

【００３６】

多糖は、シダ属(例えばシダ・コルジホリア(Sida cordifolia))またはマルバ(Malva)属(例えば、マルバ・シルベストリス(Malva sylvestris))またはマルバストルム(Malvastrum)属(例えばマルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum lateritium))またはシダルセアエ(Sidalcea)属(例えばシダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora))またはアルテア(Althea)属(例えばアルテア・オフィシナリス(Althea officinalis))、またはスファエラルセアエ(Sphaeralcea)属(例えばスファエラルセアエ・コクシネア(Sphaeralcea coccinea))、またはラバテラ(Lavatera)属(例えばラバテラ・アルボレア(Lavatera arborea))の植物から単離され得る。好ましくは、多糖は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)多糖である。多糖は、マルバレス(Malvales)植物の一部、例えば、植物の葉、花、茎および/または根から単離され得る。好ましくは、多糖は、マルバレス(Malvales)植物の根から単離される。多糖は、シダspp.(例えばシダ・コルジホリア(Sida cordifolia))またはマルバ(Malva)spp.(例えばマルバ・シルベストリス(Malva sylvestris))またはマルバストルム(Malvastrum)spp.(例えばマルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum lateritium)))またはシダルセアエ(Sidalcea)spp.(例えばシダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora))の根から単離され得る。最も好ましくは、多糖は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)の根から単離される。

【００３７】

マルバレス(Malvales)植物をホモジナイズして脱水させる工程は、植物材料をホモジナイズする前に植物を脱水されること、または植物をホモジナイズした後に植物を脱水させることを含み得る。マルバレス(Malvales)植物をホモジナイズすることは、マルバレス(Malvales)植物が粒子または粉末を形成するように、植物の表面積を増加させ、および/またはサイズを減少させることである。脱水させることは、マルバレス(Malvales)植物から水分を除去することである。

【００３８】

マルバレス(Malvales)植物をホモジナイズすることは、植物を粉砕および/または細切りして、粒子および/または粉末にするを含み得る。植物をホモジナイズすることは、分析用ミルを使用することを含み得る。粒子または粉末は、約0.8ｍｍに等しいかまたはそれ未満の篩サイズを通過するのに十分な大きさであり得る。

【００３９】
マルバレス(Malvales)植物を脱水させる工程は、植物材料を凍結乾燥または加熱することで水分を除去することを含み得る。好ましくは、脱水させることは、凍結乾燥することを含む。
【００４０】
マルバレス(Malvales)植物から多糖を抽出する工程は、水-アルコール沈殿、希薄アルカリ浸出、酵素処理、マイクロ波抽出、超音波抽出、超音波介在酵素抽出、真空抽出およびパルス電界抽出からなる群から選択される1つまたはそれ以上を含み得る。好ましくは、多糖を抽出する工程は、水-アルコール沈殿を含む。
【００４１】
脱水マルバレス(Malvales)植物粒子から多糖を抽出する工程は、脱水マルバレス(Malvales)植物粒子または粉末をアルコール相と粒子相に分離する、または水相をアルコール相と沈殿に分離する、1つまたはそれ以上のアルコール抽出工程(例えば、エタノール抽出工程)を含み得る。
脱水マルバレス(Malvales)植物粒子から多糖を抽出する工程は、脱水マルバレス(Malvales)植物粒子を水相と沈殿に分離する、またはアルコール相を水相と沈殿に分離する、1つまたはそれ以上の水性抽出工程を含み得る。
【００４２】
脱水マルバレス(Malvales)植物粒子から多糖を抽出する工程は、1つまたはそれ以上のアルコール抽出工程および/または1つまたはそれ以上の水性抽出工程を含み得る。
【００４３】
水性抽出工程は、水、食塩水、または塩を含む他の溶液(例えば、リン酸緩衝化食塩水)などの水溶液を用いて行われ得る。アルコール抽出工程は、エタノールを用いて行われ得る。好ましくは、2つのアルコール抽出工程があり、最も好ましくは、第一のアルコール抽出工程(例えばエタノール抽出工程)、その後の1つまたはそれ以上の水性抽出工程、その後の第二(最終)のアルコール抽出工程(例えばエタノール抽出工程)がある。
【００４４】
(第一の)アルコール抽出工程は、脱水マルバレス(Malvales)植物粒子または粉末をアルコール相と粒子相に分離することを含み得る。好ましくは、アルコール抽出工程は、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間または少なくとも約12時間、任意にアルコール抽出工程全体の間に同時に攪拌しながら行われる。アルコール相および沈殿は、遠心分離により分離され得る。遠心分離は、約6000rpm～約7000rpm、好ましくは約6500rpmで行われ得る。遠心分離は、約0.1～約10℃未満、約1℃～9℃、約2℃～8℃、約2℃～7℃、約3℃～6℃または約3℃～6℃で行われてもよい。好ましくは、遠心分離は約4℃で行われる。遠心分離は、約10分またはそれ以上、約20分またはそれ以上、約30分またはそれ以上、1時間またはそれ以上行われ得る。好ましくは、遠心分離は、約30分またはそれ以上行われる。遠心分離は、約6000rpm～約7000rpmまたは約6500rpmで、約4℃で、約10分またはそれ以上、約20分またはそれ以上または約30分またはそれ以上行われ得る。アルコール相は廃棄してもよい。本発明による多糖を含む粒子相は、保持されてもよい。(第一の)アルコール抽出工程は、室温で95％アルコール(例えば、エタノール)を用いて行われてもよい。
【００４５】
1つまたはそれ以上の水性抽出工程は、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上の水性抽出工程であってもよい。1つまたはそれ以上の水性抽出工程は、第一のアルコール抽出工程または水性抽出工程の沈殿を水性相と沈殿に分離することを含み得る。1つまたはそれ以上の水性抽出工程は、沸騰水溶液、好ましくは約100℃の温度に維持された水溶液(抽出工程全体の間)を用いて行われ得る。水性抽出工程は、水などの沸騰水溶液を用いて約30分またはそれ以上、約1時間またはそれ以上、または約2時間またはそれ以上行われ得る。水性抽出工程は、水性抽出工程全体の間撹拌を含み得る。水性相および沈殿は遠心

分離により分離され得る。遠心分離は、約6000rpm～約7000rpm、好ましくは約6500rpmで行われ得る。遠心分離は、約0.1～約10℃未満、約1℃～9℃、約2℃～8℃、約2℃～7℃、約3℃～6℃または約3℃～6℃で行われ得る。好ましくは、遠心分離は、約4℃で行われる。遠心分離は、約10分またはそれ以上、約20分またはそれ以上、約30分またはそれ以上、1時間またはそれ以上行われ得る。好ましくは、遠心分離は、約30分またはそれ以上行われる。遠心分離は、約6000rpm～約7000rpmまたは約6500rpmで、約4℃で、約10分またはそれ以上、約20分またはそれ以上、30分またはそれ以上行われ得る。本発明による多糖を含有する、1つまたはそれ以上の水性抽出工程の分離された水相は、一緒に保管してプールされてもよい。水性抽出工程の沈殿は、本発明によるさらなる多糖を単離するための、さらなる水性抽出工程に使用され得る。

【００４６】

一緒にプールされた1つまたはそれ以上の水性抽出工程の水相は、室温(または約37℃)で1つまたはそれ以上の酵素で処理され、不要な炭水化物およびタンパク質が消化され、任意にその後透析が行われ得る。酵素は、アルファ-アミラーゼ、プルラナーゼおよびプロテアーゼKからなる群から選択されてもよい。透析は、水を用いておこなわれてもよい。透析は、約12～14kDaのポケットカットオフを有し得る。

【００４７】

第二/最終のアルコール抽出工程は、アルコール相および沈殿が形成されるように、一緒にプールされた、1つまたはそれ以上の水性抽出工程の水性相に対して行われ得る。好ましくは、第二/最終のアルコール抽出工程は、一緒にプールされ、酵素処理され、透析された、1つまたはそれ以上の水性抽出工程の水相に対して行われる。(第二/最終の)アルコール抽出工程は、室温(例えば、約18～22℃)で80%アルコール(例えば、80%エタノール)を用いて行われ得る。好ましくは、アルコール抽出工程は、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間または少なくとも約12時間、任意にアルコール抽出工程全体の間に攪拌しながら行われる。アルコール相と沈殿は、遠心分離により分離され得る。遠心分離は、約6000rpm～約7000rpm、好ましくは約6500rpmで行われ得る。遠心分離は、約0.1～約10℃未満、約1℃～9℃、約2℃～8℃、約2℃～7℃、約3℃～6℃または約3℃～6℃で行われ得る。好ましくは、遠心分離は、約4℃で行われる。遠心分離は、約10分またはそれ以上、約20分またはそれ以上、約30分またはそれ以上、1時間またはそれ以上行われ得る。好ましくは、遠心分離は、約30分またはそれ以上行われる。遠心分離は、約6000rpm～約7000rpmまたは約6500rpmで、約4℃で、約10分またはそれ以上、約20分またはそれ以上、約30分またはそれ以上行われる。アルコール相は廃棄してもよい。本発明による多糖を含有する粒子相は、当該技術分野で知られているクロマトグラフィー技術を用いて使用されるか、またはさらに濃縮され得る。当該技術分野で知られているクロマトグラフィー技術には、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーおよびフラッシュクロマトグラフィーが含まれる。

【００４８】

本発明による方法は、最終(iii)精製工程を含み得る。精製工程は、クロマトグラフィー技術、結晶化技術または蒸留技術を用いて、マルバレス(Malvales)植物から単離された多糖を精製することを含み得る。

【００４９】

別の態様によれば、本発明による方法により製造される単離された多糖が提供される。

【００５０】

本発明による多糖は、細胞培養添加剤として使用され得る。したがって、別の態様によれば、本発明による単離された多糖または本発明による方法により製造される単離された多糖を含む培養培地が提供される。

【００５１】

培養培地は、細胞、生物学的組織、生物学的臓器、生物学的システムまたは生物をさらに含み得る。

【００５２】
培養培地は、クローニング培地(cloning medium)またはハイブリドーマフィーダー補充物(hybridoma feeder supplement)(細胞クローニング効率またはハイブリドーマ成長および生存率の向上を目的とする)であってもよい。
【００５３】
本発明による多糖は、ワクチン、医薬組成物または食用組成物(例えばプレバイオティクス)などの、ヘルパーT細胞介在疾患を処置、改善、または予防するための既知の療法の補助として、またはそれと組み合わせて使用され得る。例えば、本発明の多糖は、様々なアレルギー性障害(例えば、枯草熱)、炎症性障害(例えば、喘息)、および/または自己免疫性障害(例えば、リウマチ性関節炎)を処置するための剤、例えばグルココルチコイド、コルチコステロイド、メトトレキサート、疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARDs)、ヤヌスキナーゼ(JAK)阻害剤またはサイトカインと相互作用する生物製剤(例えばエタネルセプト)などの既知の剤と組み合わせて使用され得る。
【００５４】
したがって、本発明の別の態様によれば、本発明による多糖または本発明による方法により製造される単離された多糖を含む組成物が提供され、任意に、該組成物は、医薬組成物および薬学的に許容できる担体など、または食用組成物(例えばプレバイオティクス)である。
【００５５】
本発明の別の態様によれば、本発明による多糖を含む免疫学的アジュバントが提供される。
【００５６】
本発明の別の態様によれば、本発明による免疫学的アジュバントを含むワクチンが提供される。
【００５７】
別の態様によれば、医薬に使用するための、本発明による多糖、本発明による組成物、本発明による方法により製造される単離された多糖、本発明による免疫学的アジュバントまたは本発明によるワクチンが提供される。
【００５８】
別の態様によれば、対象のワクチン接種に使用するための、本発明による免疫学的アジュバントまたはワクチンが提供される。
【００５９】
免疫学的アジュバントまたはワクチンは、ヘルパーT細胞(T_H)介在疾患または病状を有する対象のワクチン接種に使用するためのものであってもよい。ヘルパーT細胞(T_H)介在疾患または病状は、T_H1介在疾患もしくは病状、またはT_H2介在疾患もしくは病状であり得る。
【００６０】
別の態様によれば、対象の疾患または状態の処置、改善または予防に使用するための、本発明による多糖、本発明による方法により製造される単離された多糖、本発明による組成物、本発明による免疫学的アジュバント、または本発明によるワクチンが提供される。
【００６１】
別の態様によれば、対象のヘルパーT細胞(T_H)介在疾患または病状の処置、改善または予防に使用するための、多糖、本発明による方法により製造される単離された多糖、本発明による免疫アジュバントまたは本発明によるワクチン、またはマルバレス(Malvales)目の植物もしくはその一部が提供される。
【００６２】
別の態様によれば、対象にワクチン接種する方法であって、本発明によるアジュバントまたは本発明によるワクチンを該対象に投与することを含む方法が提供される。
【００６３】
別の態様によれば、対象においてヘルパーT細胞(T_H)介在疾患または病状を処置、改善

または予防する方法であって、(i)本発明による多糖、(ii)本発明による方法により製造される単離された多糖、(iii)本発明による組成物、(iv)本発明によるアジュバント、(v)本発明によるワクチン、または(vi)マルバレス(Malvales)目の植物もしくはその一部を該対象に投与することを含む方法が提供される。

【００６４】

有利には、本発明によるアジュバントまたはワクチンは、アジュバントを受けた対象の免疫調節活性を増強することで、T_H1介在免疫応答が不活性であるか、またはT_H2介在応答が過剰活性である状態の処置のための免疫系の刺激をもたらすことができる。

【００６５】

植物は、本明細書で称されるマルバレス(Malvales)目の植物またはその植物の一部であり得る。

【００６６】

したがって、ヘルパーT細胞(T_H)介在疾患または病状は、T_H1介在疾患もしくは病状、またはT_H2介在疾患もしくは病状であり得る。

【００６７】

T_H1介在応答が効果的でないまたは不活性であるT_H1介在疾患または病状は、リウマチ性関節炎(RA)；乾癬性関節炎；乾癬；炎症性腸症候群(IBD)；クローン病；潰瘍性大腸炎；多発性硬化症(MS)；インフルエンザ(汎発性インフルエンザを含む)；呼吸器障害、例えば、呼吸器多核体ウイルス(RSV)などのウイルスによって引き起こされるもの；嚢胞性線維症(CF)；ヘルペス(性器ヘルペスを含む)；敗血症および敗血症性ショック；細菌肺炎；細菌髄膜炎；デング出血熱；子宮内膜症；前立腺炎；ブドウ膜炎；子宮成熟症(uterine ripening)；円形脱毛症；強直性脊椎炎；セリアック病；皮膚筋炎；1型糖尿病；グッドパスチャー症候群；グレーブス病；ギランバレー症候群；若年性特発性関節炎；橋本甲状腺炎；特発性血小板減少性紫斑病；エリテマトーデス；混合性結合組織病；重症筋無力症；ナルコレプシー；骨関節症；尋常性天疱瘡；悪性貧血；多発性筋炎；原発性胆汁性肝硬変；再発性多発軟骨炎；シェーグレン症候群；側頭動脈炎；脈管炎；ウェゲナー肉芽腫症(Wegener's granulumatosis)；加齢黄斑変性症、感染性疾患(例えば、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mt)感染、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染またはコロナウイルス感染))；自己免疫性障害(例えば関節炎、多発性硬化症または1型糖尿病)；癌；癌後手術(post-cancer surgery)または癌処置；および免疫後療法(post-immunisation)を含む/それらからなる群から選択される1つまたはそれ以上であり得る。好ましくは、T_H1介在疾患または病状は、嚢胞性線維症(CF)、I型糖尿病、加齢黄斑変性症、感染性疾患(例えばマイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mt)感染、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染またはコロナウイルス感染)の1つまたはそれ以上である。T_H1介在疾患または病状は、嚢胞性線維症(CF)であり得る。T_H1介在疾患または病状は、I型糖尿病であり得る。T_H1介在疾患または病状は、加齢黄斑変性症であり得る。T_H1介在疾患または病状は、感染性疾患であり得る。T_H1介在疾患または病状は、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mt)感染であり得る。T_H1介在疾患または病状は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染であり得る。T_H1介在疾患または病状は、コロナウイルス感染であり得る。

【００６８】

T_H2介在応答が過剰活性であるT_H2介在疾患または病状は、1型過敏性疾患(アレルギー(例えば鼻炎、アレルギー性皮膚炎、蕁麻疹)、喘息、湿疹、枯草熱、蕁麻疹(urticarial)、慢性移植片対宿主病、進行性全身性硬化症、全身性エリテマトーデスを含む)；慢性肺疾患；強皮症；アナフィラキシー；萎縮症(例えば、筋肉)；および移植片拒絶を含む/それらからなる群から選択される1つまたはそれ以上であり得る。好ましくは、T_H2介在疾患または病状は、アレルギー(例えば、鼻炎、アレルギー性 皮膚炎、蕁麻疹)、喘息、湿疹および枯草熱の1つまたはそれ以上である。T_H2介在疾患または病状は、アレルギーであり得る。T_H2介在疾患または病状は、鼻炎であり得る。T_H2介在疾患または病状は、アレルギー性皮膚炎であり得る。T_H2介在疾患または病状は、蕁麻疹であり得る。T

T_H2介在疾患または病状は、喘息であり得る。T_H2介在疾患または病状は、湿疹であり得る。T_H2介在疾患または病状は、(季節性および/または通年性アレルギー性鼻炎)枯草熱であり得る。

【００６９】

したがって、一実施態様において、対象において嚢胞性線維症(CF)、I型糖尿病、加齢黄斑変性症および感染性疾患(例えばマイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mt)感染、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染またはコロナウイルス感染)を含む/それらからなる群から選択されるT_H1介在疾患/状態の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖、または本発明による方法により製造される単離された多糖がある。

【００７０】

別の一実施態様において、嚢胞性線維症(CF)の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明による方法により製造される単離された多糖がある。

【００７１】

別の一実施態様において、I型糖尿病の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００７２】

別の一実施態様において、加齢黄斑変性症の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００７３】

別の一実施態様において、感染性疾患(例えばマイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mt)感染、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染またはコロナウイルス感染)の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００７４】

別の一実施態様において、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mt)感染の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００７５】

別の一実施態様において、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００７６】

別の一実施態様において、コロナウイルス感染の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００７７】

別の実施態様において、アレルギー(例えば鼻炎、アレルギー性皮膚炎、蕁麻疹)、喘息、湿疹および枯草熱を含む/それらからなる群から選択されるT_H2介在疾患/状態の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００７８】

別の一実施態様において、アレルギーの処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００７９】

別の一実施態様において、鼻炎の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００８０】

別の一実施態様において、アレルギー性皮膚炎の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。

【００８１】

別の一実施態様において、蕁麻疹の処置、予防または改善に使用するための、本発明に

よる多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。
【００８２】
別の一実施態様において、喘息の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。
【００８３】
別の一実施態様において、湿疹の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。
【００８４】
別の一実施態様において、枯草熱の処置、予防または改善に使用するための、本発明による多糖または本発明の方法により製造される単離された多糖がある。
【００８５】
本発明による多糖、本発明による組成物、本発明によるアジュバント、本発明によるワクチン、本発明による植物は、経口、エアロゾル吸入(例えば、経鼻吸入または経口吸入)、舌下、局所的に、経皮、非経腸的(皮下、筋肉内または静脈内)で投与され得る。
【００８６】
本発明による多糖または組成物は、経口投与され得る。本発明による多糖または組成物は、エアロゾル吸入(例えば鼻腔吸入または経口吸入)で投与され得る。本発明による多糖または組成物は、舌下投与され得る。本発明による多糖または組成物は、局所的に投与され得る。本発明による多糖または組成物は、経皮投与され得る。本発明による多糖または組成物は、非経腸的に(皮下、筋肉内または静脈内)投与され得る。好ましくは、本発明による多糖または組成物は、経口投与される。
【００８７】
本発明による処置方法は、本発明による多糖、本発明による組成物、本発明によるアジュバントまたは本発明によるワクチンの治療有効量を投与することを含み得る。
【００８８】
別の態様によれば、細胞、生物学的組織、生物学的臓器、生物学的システムまたは生物を培養する方法であって、
培養培地に、細胞、生物学的組織、生物学的臓器、生物学的システムまたは生物を配置することと、
培養培地に、(i)本発明による多糖、(ii)本発明による方法により製造される単離された多糖、(iii)本発明による組成物、(iv)本発明によるアジュバント、(v)本発明によるワクチン、または(vi)マルバレス(Malvales)目の植物もしくはその一部を配置すること、を含む方法が提供される。
【００８９】
別の態様によれば、T_H1介在免疫応答を誘導または増強する方法であって、T_H1介在免疫応答を誘導または増強するように、本発明による多糖を、生物、生物学的システム、生物学的組織、生物学的臓器または細胞に投与または接触させることを含む方法が提供される。
【００９０】
T_H1介在免疫応答は、T_H1サイトカイン(例えば、IFNγ、TNFαおよび/またはIL-2)の産生；リンパ球増殖(T細胞および/またはB細胞増殖など)の誘導；IgM、IgAおよび/またはIgG抗体の産生；マクロファージの活性化(例えば、iNOSの活性化/NOの放出、O_2^-の放出)；およびマクロファージによる貪食作用の誘導(induction of phagocytosis)を含む/それらからなる群からの1つまたはそれ以上を含み得る。
【００９１】
別の態様によれば、T_H2介在免疫応答を予防するかまたは減衰させる方法であって、T_H2介在免疫応答を予防するかまたは減衰させるように、生物、生物学的システム、生物学的組織、生物学的臓器または細胞に本発明による多糖を投与または接触させることを含む方法が提供される。
【００９２】

T_H2介在免疫応答は、T_H2サイトカイン(例えばIL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13およびIL-25)の産生；IgEへのB細胞クラススイッチの誘導、IgE抗体の産生；肥満細胞脱顆粒；好塩基球脱顆粒；好酸球の動員；および樹状細胞の活性化を含む/それらからなる群からの1つまたはそれ以上を含み得る。

【００９３】

本発明による方法は、インビボ方法、エクスビボ方法またはインビトロ方法であり得る。

【００９４】

略語：kDa-キロダルトン；Gal-D-ガラクトース；GalA-D-ガラクツロン酸；Rha-L-ラムノース；Ara-L-アラビノース；Fuc-L-フコース；Glc-D-グルコース；GracA-D-グルクロン酸。本明細書で示さるこれらのモノマーおよび対応するポリマー(例えば多糖)のL-およびD-形態は、本明細書の残りの部分に示されるモノマーおよびポリマー(例えば、多糖)にも当てはまる(省略されずに完全に書かれることがある)。

【００９５】

用語「平均」とは、算術平均、最頻値または中央値であってもよい。好ましくは、平均は、算術平均を意味する。

【００９６】

本発明による多糖は、単離された多糖であってもよい。

用語「単離された」とは、もはやその自然環境にない多糖を意味することができる。したがって、用語「単離された」は、マルバセアエ(Malvaceae)/マルボイデアエ(Malvoideae)/マルベアエ(Malveae)植物組織および細胞(例えば、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)組織およびシダ・コルジホリア(Sida cordifolia)細胞)から分離された多糖を意味することができる。

【００９７】

「対象」は、脊椎動物、哺乳動物、非ヒト動物または飼育動物であり得る。したがって、本発明による多糖、アジュバント、ワクチン、組成物および医薬は、いずれかの哺乳動物、例えば家畜(例えば馬)、ペットを処置するために使用されてもよく、または他の獣医学的用途で使用されてもよい。家畜は、ウシ(bovine)、雌ウシ(cow)、畜牛(cattle)、ヒツジ、ウマ、トリ、ヤギ、ブタ、子ウシ、シカ、ガチョウ、シチメンチョウまたはウサギであり得る。飼育動物は、イヌまたはネコであってもよい。好ましくは、対象は哺乳動物である。最も好ましくは、哺乳動物はヒトである。生物は、対象を意味することができる。

【００９８】

免疫応答の調節とは、身体を守るための免疫系の活動または能力を調節することである。これは、免疫刺激または免疫抑制に関連するかもしれない。免疫系の主な仕事は、真菌、細菌、ウイルス、原虫および寄生虫などの病原体から保護することである。この文脈では、免疫応答の調節とは、好ましくは、免疫応答がこの機能を達成できるように、免疫応答を刺激することを意味する。これは、T_H1介在応答を活性化または増強することによって達成され得る。好適には、免疫応答の刺激は、人体の自然な防御を増強することに寄与する。一方、免疫系は、イエダニ、埃、花粉などの無害な物質に対して免疫反応を起こすことがあり、その結果、アレルギー(過剰活性T_H2介在応答)をもたらす。また、高コレステロール血症や肥満など、多くの生理的障害は、低グレードの炎症状態をもたらす。アレルギーまたは炎症のような異常な免疫反応の脈絡における免疫調節とは、過敏性免疫応答を弱めるか妨害することを意味する。本発明は、免疫応答を刺激/増強する主要なタスク、および/または「異常な」免疫応答を阻害するタスクに関連し得る。

【００９９】

本発明による医薬組成物は、薬学的に許容できる塩またはその他の形態をさらに含み得る。本発明による医薬組成物は、担体、希釈剤、充填剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、着色剤、顔料、安定化剤、防腐剤、抗酸化剤、および/または溶解度増強剤などの1つまたはそれ以上薬学的に許容できる賦形剤を含み得る。本発明による医薬組成物は、薬学的に許

容できる塩および任意に1つまたはそれ以上の薬学的に許容できる賦形剤を含み得る。

【０１００】

医薬組成物は、当該技術分野で知られている技術によって製剤化することができる。医薬組成物は、経口、非経腸、例えば局所、経皮、筋肉内、静脈内、皮下、皮内、動脈内、心臓内、経鼻、吸入またはエアゾール投与(例えば鼻腔または経口吸入)のための剤形として製剤化することができる。医薬組成物は、経口投与のための剤形として製剤化され得る。

【０１０１】

本明細書において、用語「薬学的に許容できる塩」とは、患者にとって有害でない塩を示すことを意図するものである。このような塩としては、薬学的に許容できる酸付加塩、薬学的に許容できる金属塩、アンモニウム塩およびアルキル化アンモニウム塩が挙げられる。酸付加塩は、有機酸の塩および無機酸の塩を含む。好適な無機酸の代表例としては、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン酸、硫酸、硝酸等が挙げられる。好適な有機酸の代表例としては、ギ酸、酢酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、安息香酸、桂皮酸、クエン酸、フマル酸、グリコール酸、乳酸、マレイン酸、マロン酸、マンデル酸、シュウ酸、ピクリン酸、ピルビン酸、サリチル酸、コハク酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、酒石酸、アスコルビン酸、パモ酸、ビスメチレンサリチル酸、エタンジスルホン酸、グルコン酸、シトラコン酸、アスパラギン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、EDTA、グリコール酸、p-アミノ安息香酸、グルタミン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。薬学的に許容できる無機酸付加炎または有機酸付加塩のさらなる例としては、J. Pharm. Sci. 1977, volume 66, issue 2に記載されている薬学的に許容できる塩が挙げられる。金属塩の例としては、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩等が挙げられる。アンモニウム塩およびアルキル化アンモニウム塩の例としては、アンモニウム塩、メチルアンモニウム塩、ジメチルアンモニウム塩、トリメチルアンモニウム塩、エチルアンモニウム塩、ヒドロキシエチルアンモニウム塩、ジエチルアンモニウム塩、ブチルアンモニウム塩、テトラメチルアンモニウム塩等が挙げられる。

【０１０２】

本発明による医薬組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示されているような従来の技術に従って、薬学的に許容できる担体または希釈剤、ならびに他のいずれかの既知のアジュバントおよび賦形剤とともに製剤化され得る。

【０１０３】

適当な医薬担体には、不活性な固体希釈剤または充填剤、無菌水溶液および様々な有機溶媒が含まれる。固体担体の例としては、ラクトース、白土、スクロース、シクロデキストリン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸およびセルロースの低級アルキルエーテルが挙げられる。液体担体の例としては、シロップ、ピーナッツ油、オリーブ油、リン脂質、脂肪酸、脂肪酸アミン、ポリオキシエチレンおよび水が挙げられる。さらに、本発明の化合物は、水または一般的な有機溶媒と溶媒和物を形成し得る。そのような溶媒和物もまた、本発明の範囲に包含される。

【０１０４】

組成物は、緩衝系、防腐剤(複数可)、等張化剤(複数可)、キレート剤(複数可)、安定化剤および界面活性剤をさらに含み得て、これは当業者によく知られている。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000を参照する。組成物はまた、同じ疾患状態に対して活性な1つまたはそれ以上の治療薬をさらに含み得る。

【０１０５】

本発明の組成物に有用な放出制御系を製造する方法としては、結晶化、濃縮、共結晶化、沈殿、共沈殿、乳化、分散、高圧ホモジナイズ、カプセル化、噴霧乾燥、マイクロカプセル化、コアセルベーション、相分離、マイクロスフェアを産生する溶媒蒸発、押出およ

び超臨界流体プロセスがあるが、これらに限定はしない。一般に、医薬品放出制御ハンドブック(Wise, D. L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000)および医薬品と製薬科学(Drug and the Pharmaceutical Sciences) vol. 99: Protein Composition and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000)を参照すること。

【０１０６】

本発明による医薬組成物の投与は、いくつかの投与経路、例えば、経口、経鼻、直腸、吸入(例えば経鼻吸入または経口吸入)、肺、局所(頬側および舌下を含む)、経皮、大槽内、胸腔内、膣および非経腸(皮下、筋肉内、髄腔内、静脈内および皮内を含む)経路を介してもよい。好ましい経路は、処置される対象の一般的な状態および年齢、処置される状態の性質、および選択される活性成分に依存することが理解されるであろう。

【０１０７】

局所使用については、本発明の化合物を含有するスプレー、クリーム、軟膏、ゼリー、ゲル、吸入剤、皮膚パッチ、植込剤、懸濁液などが考えられる。この適用の目的では、局所適用には洗口剤および含嗽剤が含まれる。本発明の化合物はウェーハ技術に使用することができ、生分解性グリアデルポリマーウェーハなどのウェーハ技術は脳腫瘍の化学療法に有用である。

【０１０８】

経口投与のための医薬組成物は、固体剤形、例えば硬質または軟質のカプセル、錠剤、トローチ、糖衣錠、丸薬、ロゼンジ、粉末および顆粒、ならびに溶液、エマルジョン、水性または油性懸濁液、シロップおよびエリキシルを含む経口投与用の液体剤形であって、それぞれが所定量の活性成分を含み、適切な賦形剤を含み得るものを含む。

【０１０９】

経口使用を意図する組成物は、いずれかの既知の方法に従って調製することができ、このような組成物は、薬学的に上品なのみやすい製剤を提供するために、甘味剤、香料、着色剤および防腐剤からなる群から選択される1つまたはそれ以上の薬剤を含み得る。

【０１１０】

錠剤は、活性成分を錠剤の製造に適した非毒性の薬学的に許容できる賦形剤と混和してを含み得る。これらの賦形剤は、不活性希釈剤、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム；造粒・崩壊剤、例えばトウモロコシデンプンまたはアルギン酸；結合剤、例えばデンプン、ゼラチンまたはアカシア；および滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクであり得る。

【０１１１】

錠剤はコーティングされていなくてもよく、公知の技術によりコーティングされることで、消化管での崩壊および吸収を遅延させ、それによってより長期間にわたって持続的な作用を提供してもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの時間遅延材料を採用することができる。また、米国特許4,356,108；4,166,452；および4,265,874に記載の技術によってコーティングすることで、制御放出のための浸透圧治療錠を形成することもできる。

【０１１２】

経口用製剤は、活性成分を不活性な固体希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリンと混合した硬質ゼラチンカプセルとして、または活性成分を水または油媒体、例えばピーナッツ油、液体パラフィンまたはオリーブ油と混合した軟質ゼラチンカプセルとして提示することもできる。

【０１１３】

水性懸濁液は、活性化合物を水性懸濁液の製造に適した賦形剤と混和して含むことができる。そのような賦形剤は、懸濁化剤、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガムおよびアカシアガム；分散剤または湿潤剤(レシチ

ンなどの天然に存在するリン脂質、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合物、例えばポリオキシエチレンステアレート、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合物、例えばヘプタデカエチル-エネオキシセタノール(eneoxycetanol)、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導される部分エステルとの縮合物、例えばポリチレンソルビトールモノオレート、またはエチレンオキシドと脂肪酸および無水物から誘導される部分エステルとの縮合物、例えばポリエチレンソルビタンモノオレート)である。水性懸濁液は、1つまたはそれ以上の着色剤、1つまたはそれ以上の香味料、および1つまたはそれ以上の甘味剤、例えばスクロースまたはサッカリンも含み得る。

【０１１４】

油性懸濁液は、活性成分を植物油、例えば落花生油、オリーブ油、ゴマ油またはヤシ油に、または液体パラフィンのような鉱物油に懸濁することによって製剤化され得る。油性懸濁液は、例えば蜜蝋、硬質パラフィンまたはセチルアルコールなどの増ちょう剤を含んでもよい。上記のような甘味剤、および香味料を添加して、のみやすい経口調剤を提供することができる。これらの組成物は、アスコルビン酸などの抗酸化剤の添加によって保存することができる。

【０１１５】

水を添加することによって水性懸濁液を調製するのに適した分散性粉末および顆粒は、活性化合物を分散剤または湿潤剤、懸濁化剤および1つまたはそれ以上の防腐剤との混和物で提供される。適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤は、既に上述したものによって例示されている。追加の賦形剤、例えば、甘味料、香料および着色剤も存在することがある。

【０１１６】

本発明の医薬組成物は、水中油型エマルジョンの形態であってもよい。油相は、植物油、例えばオリーブ油または落花生油、または鉱油、例えば液体パラフィン、またはそれらの混合物であってもよい。適当な乳化剤は、天然に存在するガム、例えばアカシアガムまたはトラガカントガム、天然に存在するフォスファチド、例えば大豆、レシチン、およびエステルまたは脂肪酸およびヘキシトール無水物から得られる部分エステル、例えばソルビタンモノオレート、および前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであり得る。エマルションは、甘味料および香料を含むこともある。

【０１１７】

シロップおよびエリキシルには、甘味料、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトールまたはスクロースを配合してもよい。このような製剤はまた、粘滑剤、防腐剤、香味料および着色剤も含み得る。医薬組成物は、無菌注射用水性または油性の懸濁液の形態であってもよい。この懸濁液は、上記の適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いて、既知の方法に従って配合され得る。無菌注射用調剤はまた、例えば1,3-ブタンジオール中の溶液として、非毒性の非経腸的に許容できる希釈剤または溶媒中の無菌注射用溶液または懸濁液であってもよい。採用され得る許容できるビヒクルおよび溶媒は、水、リンゲル液、および等張塩化ナトリウム溶液であり得る。さらに、無菌の不揮発油は、溶媒または懸濁媒体として好都合に採用される。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドを用いて、いずれかのブランドの不揮発油を採用し得る。さらに、オレイン酸などの脂肪酸は、注射剤の調製に使用される。

【０１１８】

非経腸投与は、注射器、任意にペン様注射器を用いて、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射により行ってもよい。あるいは、非経腸投与は、輸液ポンプの手段によって行うことができる。さらなる選択肢として、プロラクチン受容体アンタゴニストを経鼻または肺スプレー(pulmonal spray)の形態で投与するための溶液または懸濁液であり得る組成物がある。さらに別の選択肢として、本発明の化合物を含有する医薬組成物は、経皮投与、例えば針を使わない注射による投与、またはパッチ、任意にイオン泳動的(iontophoretic)パッチによる投与、または経粘膜的投与、例えば頬側投与に適合させることもで

きる。

【０１１９】

非経腸投与のための医薬組成物には、無菌の水性および非水性の注射液、分散液、懸濁液またはエマルジョン、ならびに使用前に無菌の注射液または分散液に再構成される無菌の粉末が含まれる。

【０１２０】

医薬は、組成物(例えば、医薬組成物または食用組成物)、処方薬、非処方薬、市販薬、栄養補助食品、食物性食品(dietary food)、臨床食品、食用製品、錠剤、カプセル、丸薬および飲料などの食品製品またはいずれかの他の適当な食品製品、および当業者に一般的に知られているいずれかの他の組成物を含むがこれらに限定されない。あるいは、医薬は、注射可能な物質または経鼻スプレーなどの吸入可能な物質であってもよい。

【０１２１】

本発明による多糖は、特定の塩の形態で食用組成物または医薬組成物に添加されてもよい。本発明による食用組成物は、いずれかの物理的形態であり得る。特に、食品製品、飲料、食物性食品(dietary food)、または臨床食品であってもよい。また、飲料、錠剤、カプセル、液体(例えば、スープまたは飲料、スプレッド、ドレッシングまたはデザート)の形態、または栄養補助食品に適した他の形態の栄養補助食品であってもよい。食用組成物は、液体またはスプレッド状の形態であってもよく、スプーン状の固体または軟固体の製品であってもよく、または栄養補助食品であってもよい。好ましくは、食用組成物は液体製品である。食用製品は、好適には、例えば、スープ、飲料、スプレッド、ドレッシング、デザート、パンの形態をとってもよい。本明細書で使用される用語「スプレッド」は、マーガリン、ライトマーガリン、スプレッド状チーズベース製品、プロセスチーズ、ディリースプレッド(dairy spread)およびディリー代替スプレッド(dairy- alternative spread)などのスプレッド状製品を包含する。本明細書で使用するスプレッド(水中油型または油中水型エマルション)は、約5重量％～85重量％、好ましくは約10重量％～80重量％、より好ましくは約20重量％～70重量％の油および/または脂肪の濃度を有し得る。好ましくは、油および/または脂肪は植物由来の油および/または脂肪(ヒマワリ油、パーム油、ナタネ油などであるが、これらに限定されない);非植物由来の油および/または脂肪(食物性脂肪(dairy fat)、魚油などであるが、これらに限定されない)も組成物に含まれ得る。本発明による多糖、したがって食用組成物は、プレバイオティックであってもよい。プレバイオティックは、腸に定着する真菌および/または細菌などの有益な微生物の成長および/または活性を誘導する組成物として定義され得る。有益な微生物の成長および/または活性は、多糖が有益な微生物の基質として作用することによって増加し得る。

【０１２２】

用語「水性組成物」は、少なくとも50％w/wの水を含む組成物として定義される。同様に、用語「水溶液」は、少なくとも50％w/wの水を含む溶液として定義され、用語「水性懸濁液」は、少なくとも50％w/wの水を含む懸濁液として定義される。このような水溶液は、必要に応じて適切に緩衝化され、液体希釈剤は、まず十分な食塩水またはグルコースで等張にされるべきである。水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適している。採用される無菌水性媒体は、いずれも当業者に知られている標準的な技術により容易に入手可能である。デポ注射用製剤もまた、本発明の範囲内にあるものとして企図される。

【０１２３】

「免疫学的アジュバント」とは、抗原またはワクチンに対する免疫応答を増強する剤を意味し得る。

【０１２４】

本明細書で使用される用語「処置」および「処置する」とは、疾患または障害などの状態に対抗することを目的とする対象の管理およびケアを意味することが理解されるであろう。この用語は、症状または合併症の軽減、疾患、障害または状態の進行の遅延、症状お

よび合併症の軽減または緩和、および/または疾患、障害または状態の治癒または除去、ならびに状態の予防を含む、対象が苦しんでいる所定の状態に対する処置の全範囲を含むことを意図し、ここで予防は、疾患、状態または障害と対抗するための対象の管理およびケアと理解され、症状または合併症の発症を予防するリガンドの投与を含む。

【０１２５】

用語「含む」とは、「からなる」または「から本質的になる」を意味し得る。

【０１２６】

本明細書に記載のすべての実施態様および特徴(添付の特許請求の範囲、要約および図面を含む)、および/またはそのように開示されたいずれかの方法またはプロセスのすべての工程は、特定の組み合わせ、例えば、そのような特徴および/または工程の少なくともいくつかが相互に排他的である組み合わせに言及して別様に述べない限り、いずれかの組み合わせで上記の態様または実施態様のいずれかと組み合わせることができる。

【０１２７】

本発明をより良く理解するために、また、本発明の実施態様が実施され得ることを示すために、次に、例として、添付の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】

【０１２８】

【図１】図1は、植物材料から活性なアラビナン多糖を得るための最適化抽出プロトコルの模式図である。流れ図は、方法論の詳細を含む、多糖の単離に必要な3つの主要工程を示している。簡単に説明すると、この方法は、多糖を最初に抽出するためにエタノールを使用する第一の工程と、最大6サイクルの水(水性)抽出を含む第二の工程、その後の最後の酵素的消化、透析、沈殿の工程を含む。

【０１２９】

【図２】図2は、既知のM.W.のデキストラン(青)およびアルビナンBr/17/D(赤)のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)-HPLCでの溶出プロファイルである。既知の分子量のデキストランと比較した結果、Br/17/Dの分子量は49KDaであることが明らかになった。以下は、既知のM.W.のデキストランに基づく検量線の例と、直線式の不定型例である。

【０１３０】

【図３】図3は、Br/14/E(純度の低い画分)の連鎖分析である。画分Br/14/Eの部分メチル化アルジトールアセテート(PMAA)のGC-MS分析である。上部のトレースは、全イオンの存在量を示すクロマトグラムを示す。下部のトレース(赤色)は、118イオン(抽出クロマトグラムイオン118)の存在量を示すクロマトグラム（このイオンを有するピークのみが表示されている）を示す宇。I＝不純物。

【０１３１】

【図４】図4は、(A)Br/14/E(純度の低い画分)およびBr/18/F(純粋なアラビナン)の^{1}H NMRスペクトル(600MHz, 298K, D2O)；および(B)Br/14/EおよびBr/18/Fの^{1}H NMRスペクトルの拡大である。アラビナンの構造を図57に示す。

【０１３２】

【図５】図5：A)異なるシグナル間の比を評価するために使用した積分値とともにアノマー領域を詳述したアラビナン(Br/18/F)の^{1}H NMR(600MHz, 298K, D2O)の拡大。各シグナルは大文字で標識し、アラビノフラノース単位の診断に使用する。B)SNFCの規則に従って描いたアラビナン多糖の構造。この構造には、NMR分析によって見出されたアラビノフラノース単位が含まれており、積分によって検出された比率が良好な近似値で維持されている。

【０１３３】

【図６】図6：Br/18/F(強い活性を有する純粋なアラビナン)のフルスケールで描いた^{1}H-^{13}C HSQCスペクトル(600MHz, 298K, D2O)。早く識別できるように密度をラベル付き、プロトンスペクトルを赤色で報告；アラビナンの構造および使用した標識については、図57Bを参照。「i」不純物、* HSQCシーケンスのアーティファクト。

【０１３４】
【図７】図7：Br 18/F(強い活性を有する純粋なアラビナン)の^{1}H-^{13}C HSQCスペクトル(600MHz, 298K, D2O)の拡大。詳細には、(上部)アノマー領域(anomeric region)、(下部)カルビノール領域(carbinolic region)とプロトントレース。CH_2(黒)は、DEPT最頻値で取得されたスペクトルであるため、他の密度とは区別されている。アラビナンの構造および使用したラベルについては、図57Bを参照すること。
【０１３５】
【図８】図8：Br 18/F(強い活性を有する純粋なアラビナン)のHSQC(濃いグレー)およびHMBC(薄いグレー)スペクトルの重複を報告するNMRスペクトル(600MHz, 298K, D2O)の選択領域：アノマー領域(左パネル)およびカルビノール領域(右パネル)。アラビナンの構造および使用したラベルについては、図57Bを参照すること。
【０１３６】
【図９】図9：アラビナン(Br/18/F、強い活性を有する純粋なアラビナン)のアノマー領域を詳述し、TOCSY(黒)およびCOSY(濃いグレーおよび薄いグレー)スペクトルの重複を報告する(600MHz, 298K, D2O)拡大。アラビナンの構造および使用したラベルについては、図57Bを参照すること。
【０１３７】
【図１０】図10：アラビナン(Br/18/F、強い活性を有する純粋なアラビナン)のアノマー領域を詳述し、NOESY(黒)およびCOSY(濃いグレーおよび薄いグレー)スペクトルの重複を報告する(600MHz, 298K, D_2O)拡大。アラビナンの構造および使用したラベルについては、図57Bを参照すること。
【０１３８】
【図１１】図11は、免疫調節活性に重要な結合を示す字。1-5骨格のみを有する直鎖状アラビナン多糖は免疫調節活性がない。1-5骨格および1-3分岐を有するアラビナン多糖も活性がない。免疫調節活性を有する唯一の試験済みアラビナン多糖は、1-5、1-3、さらに1,2結合を含む(18F)。本明細書での測定は、マクロファージ細胞株内でのNOの産生に基づくものである。
【０１３９】
【図１２】図12は、1-5、1-3、1,2結合アラビナン多糖(18F)の免疫調節活性は濃度依存的であり、添加濃度の増加に伴いマクロファージ細胞株でのNO産生が有意に増加することを示している。
【０１４０】
【図１３】図13は、1-5、1-3、1,2結合アラビナン多糖の精製量の分子量が活性に影響し得ることを示す。1-5、1-3、1-2構造が同じで、調製された分子量が異なる多糖の異なる調製物は、その活性の程度に差がある。66KDaおよび10KDaの分子量を有する多糖を含有する調製物は強い活性を有していた(Br/36/A)。49KDaの分子量を有する多糖を含有する調製物は、中程度の活性を有していた(Br/17/D)。12KDaの分子量を有する多糖を含有する調製物も中程度の活性を有していた(18F)。最後に、3Daの分子量を有する多糖を含有する調製物は、貧弱で無視できる活性を有していた(Br34F)。
【０１４１】
【図１４】図14は、脾細胞増殖EXHヘキサン抽出物；EXCクロロホルム抽出物；EXMメタノール抽出物；EXA水性抽出物を示すヒートマップである。赤＞黄＞青
【０１４２】
【図１５】図15は、抗体分泌(IgG)EXHヘキサン抽出物；EXCクロロホルム抽出物；EXMメタノール抽出物；EXA水性抽出物を示すヒートマップである。。赤＞黄＞青
【０１４３】
【図１６】図16は、抗体分泌(IgA)EXHヘキサン抽出物；EXCクロロホルム抽出物；EXMメタノール抽出物EXA水性抽出物を示すヒートマップである。赤＞黄＞青
【０１４４】
【図１７】図17は、抗体分泌(IgM)EXHヘキサン抽出物；EXCクロロホルム抽出物；E

XMメタノール抽出物；EXA水性抽出物を示すヒートマップである。赤＞黄＞青

【０１４５】

【図１８】図18は、RAW 264.7マクロファージを示す。(A)は、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)の水性(粗)抽出物に曝露し、その後ニューラルレッドを含有する培地で培養したマクロファージを示す。マルベアエ(malveae)の水性抽出物に曝露すると、細胞のサイズがはるかに大きく見え、エンドサイトーシスの能力が増加するため、細胞の細胞質ではより強い赤色となる。(B)は、同じ条件で処理したが多糖に曝露しなかったマクロファージを示し、それらはニュートラルレッド摂取量が明らかに少ない状態で小さく見えた。

【０１４６】

【図１９】図19は、呼吸バーストに対する抽出物(EXHヘキサン抽出物；EXCクロロホルム抽出物；EXMメタノール抽出物；EXA水性抽出物)の効果を示すヒートマップである。赤＞黄＞青

【０１４７】

【図２０】図20は、ファゴカゴサイトーシス率(phagochagocytosis rate)EXHヘキサン抽出物；EXCクロロホルム抽出物；EXMメタノール抽出物；EXA水性抽出物を示すヒートマップである。赤＞黄＞青

【０１４８】

【図２１】図21は、(A)シダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora)の抽出物を例とした脾細胞増殖アッセイ(B)S.マルビフロラ(S.malviflora)によるIgA分泌(C)S.マルビフロラ(S.malviflora)によるIgG産生(D)S.マルビフロラ(S.malviflora)によるIgM産生の結果を示す。

【０１４９】

【図２２】図22は、S.マルビフロラ(S.malviflora)抽出物を用いた脾細胞増殖アッセイとELISA rdUアッセイの結果を示す。

【０１５０】

【図２３】図23は、マルベアエ(malveae)の水性抽出物中の粘液の％wt.を示す棒グラフである。

【０１５１】

【図２４】図24は、多糖沈殿M.シルベストリス(M. sylvestris)によるIRスペクトルを示す。

【０１５２】

【図２５】図25は、マルベアエの(A)シダルセアエ・マルビフロラ(Sidalceae malviflora)(マルベアエ・サブ・マルボイデアエ(malveae sub malvoideae))；(B)マルバ・シルベステリス(Malva sylvesteris)(マルベアエ・サブ・ マルボイデアエ(malveae sub malvoideae))の多糖を構成する単糖の割合を示すグラフを示す。

【０１５３】

【図２６】図26は、マルベアエの(A)マルバ・シルベストリス(Malva sylvestris)(マルベアエ・サブ・マルボイデアエ(malveae sub malvoideae))；(B)スファエラルセアエ・コクシネア(Sphaeralcea coccinea)(マルベアエ・サブ・マルボイデアエ(malveae sub malvoideae))の多糖を構成する単糖の割合を示すグラフを示す。

【０１５４】

【図２７】図27は、免疫調節作用が観察されなかったマルバセアエ(malvacea)のサブファミリー(A)ラグナリア・パテルソニイ(Lagunaria patersonii)(サブファミリー；ボンバコイデアエ(Bombacoideae)) (B)ヒビスクス・ロサ-シネンシス(Hibiscus rosa-sinensis)(サブファミリー；マルボイデアエ族；ヒビスセアエ(Hibisceae))の多糖を構成する単糖の割合を示すグラフを示す。

【０１５５】

【図２８】図28は、水性抽出物(EXA)と、水性抽出物からエタノール沈殿によって生成した水性抽出物沈殿(EXAP)の両方で観察される脾細胞増殖を比較するヒートマップです

。

【０１５６】

【図２９】図29は、水性抽出物(EXA)と、水性抽出物からエタノール沈殿によって生成した水性抽出物沈殿(EXAP)の両方におけるリンパ球IgG産生を比較したヒートマップである。

【０１５７】

【図３０】図30は、水性抽出物(EXA)と、水性抽出物からエタノール沈殿によって生成した水性抽出物沈殿(EXAP)の両方におけるリンパ球IgA産生を比較したヒートマップである。

【０１５８】

【図３１】図31は、水性抽出物(EXA)と、水性抽出物からエタノール沈殿によって生成した水性抽出物沈殿(EXAP)の両方におけるリンパ球IgM産生を比較したヒートマップである。

【０１５９】

【図３２】図32は、水性抽出物(EXA)と、水性抽出物からエタノール沈殿によって生成した水性抽出物沈殿(EXAP)の両方のマクロファージ貪食活性を比較したヒートマップである。

【０１６０】

【図３３】図33は、水性抽出物(EXA)と、水性抽出物からエタノール沈殿によって生成した水性抽出物沈殿(EXAP)のマクロファージ呼吸バーストを比較したヒートマップである。

【０１６１】

【図３４】図34は、ガレリアの幼虫(Galleria larvae)の血リンパ1mlあたりの血球数を示す。(A)S.コルジフリア(S. cordiflia) (B)M.シルベステリス(M. sylvesteris) (C)M.ラテリチウム(M. lateritium) (D)S.マルビフロラ(S. malviflora)

【０１６２】

【図３５】図35は、多糖濃縮水性抽出物(A)S.コルジフリア(S. cordiflia) (B)M.シルベステリス(M. sylvesteris) (C)M.ラテリチウム(M. lateritium) (D)S.マルビフロラ(S. malviflora)で前処理した幼虫のCFU/mlを示す。

【０１６３】

【図３６】図36は、脾細胞増殖アッセイの結果を示す。群は、SCAF0(S.コルジホリア(S.コルジホリア(S. cordifolia))の粗多糖画分)；SCAF1：低イオン強度＜100kDa；SCAF2：中イオン強度、10～100kDa；SCAF3：中イオン強度、＞100kDa；SCAF4:高イオン強度、10kDa～100kDa；SCAF5：高イオン強度、＜100kDa；およびCON A(陽性対照)。

【０１６４】

【図３７】図37は、シダ・コルドフィリア(Sida cordofilia)の抽出物とインキュベートした脾臓細胞によるIgG分泌物示す。群は、SCAF0(シダ・コルドフィリア(Sida cordofilia)の粗多糖画分)；SCAF1：低イオン強度＜100kDa；SCAF2：中イオン強度、10～100kDa；SCAF3：中イオン強度、＞100kDa；SCAF4：高イオン強度、10kDa～100kDa；SCAF5：高イオン強度、＜100kDa；およびCON A(陽性対照)。

【０１６５】

【図３８】図38は、シダ・コルドフィリア(Sida cordofilia)の抽出物とインキュベートした脾細胞によるIgM分泌を示す。群は、SCAF0(S.コルジホリア(S.コルジホリア(S. cordifolia))の粗多糖画分)；SCAF 1：低イオン強度＜100kDa；SCAF 2：中イオン強度、10～100kDaの間；SCAF 3：中イオン強度、＞100kDa；SCAF4：高イオン強度、10kDa～100kDa；SCAF 5：高イオン強度、＜100kDa；および CON A(陽性対照)。

【０１６６】

【図３９】図39は、シダ・コルドフィリア(Sida cordofilia)の抽出物とインキュベー

トした脾細胞によるIgA分泌を示す。群は、SCAF 0(S.コルジホリア(S. cordifolia))の粗多糖画分)；SCAF1：低イオン強度＜100kDa；SCAF2：中イオン強度、10～100kDa；SCAF3：中イオン強度、＞100kDa；SCAF4：高イオン強度、10kDa～100kDa；SCAF5：高イオン強度、＜100kDa；およびCON A(陽性対照)。

【０１６７】

【図４０】図40は、ニュートラルレッドの貪食作用アッセイの結果である。群は、SCAF0(S.コルジホリア(S. cordifolia))の粗多糖画分)；SCAF1：低イオン強度＜100kDa；SCAF2：中イオン強度、10～100kDa；SCAF3：中イオン強度、＞100kDa；SCAF4：高イオン強度、10kDa～100kDa；SCAF5：高イオン強度、＜100kDa；およびLPS(陽性対照)。

【０１６８】

【図４１】図41は、シダ・コルドフィリア(Sida cordofilia)の抽出物とインキュベートした成長培地(RAW264細胞)において検出された亜硝酸塩の濃度を示す。

【０１６９】

【図４２】図42は、カブトガニ血球抽出成分(LAL)アッセイを行うのに使用するチューブを示す。LALは、エンドトキシンを検出すると凝固するカブトガニの血球の水性抽出物である。下側のチューブには2SCAF 5が、上側のチューブにはLPSエンドトキシンが入っている。上部の凝固でエンドトキシンの存在が確認される。しかし、SCAF1～5を添加しても血液が凝固しないことから、エンドトキシンが存在しないことが確認された。

【０１７０】

【図４３】図43は、TAK-242を用いたTLR4阻害アッセイの結果を示す。マクロファージによる亜硝酸塩産生に対する抽出物およびTAK-242の作用をモニターした。細胞をTAK-242とインキュベートしたときにマクロファージの活性化を阻害できなかったことは、活性化経路がTL4受容体に関与していないことを示唆している。

【０１７１】

【図４４】図44は、SCAF5に曝露した後のRAW 264.7によるサイトカイン発現を示す。

【０１７２】

【図４５】図45は、SCAF5に曝露した後の脾細胞によるサイトカイン発現を示す。

【０１７３】

【図４６】図46は、SCAF5に曝露した後のiNOSの増幅曲線である(RAW 264.7)。線は、未処理の対照およびSCAF5による処理を示す。

【０１７４】

【図４７】図47は、SCAF5に曝露した後のIL-6の増幅曲線である(脾細胞)。線は、未処理の対照およびSCAF 5による処理を示す。

【０１７５】

【図４８】図48は、S.コルドフィリア(S. cordofilia)に曝露したガレリア・メロネラの幼虫(Galleria mellonella larvae)の血球数を示す。投与後(24h；SCAF1-SCAF5；100μg/ml)の血リンパ1mlあたりの血球一覧である。LPS(1μg/ml)。

【０１７６】

【図４９】図49は、SCAF0およびSCAF5(20μl、100μg/ml)に曝露したガレリアの幼虫における感染後24時間の細菌量(ACTCC 43300)を示す。対照幼虫(20μlのPBS)。

【０１７７】

【図５０】図50は、(1)PBSで処理して24時間後のガレリア幼虫の血リンパ中の細菌量(MRSA 43300)(コロニーはMTTで染色)；(2)SCAF5(20μl；100μg/ml)で処理して24時間後のガレリア幼虫の血リンパ中の細菌量(MRSA 43300)を示す。コロニーはMTTで可視化。

【０１７８】

【図５１】図51は、本発明による多糖で処理したRAW 264.7マクロファージにおける濃度-作用曲線である。測定された作用は、NO産生である。

【０１７９】
【図５２】図52は、本発明による多糖またはLPSで処理したRAW 264.7マクロファージにおける濃度-作用曲線である。測定された作用は、NO産生である。
【０１８０】
【図５３】図53は、マクロファージによるサイトカイン産生に対する本発明による多糖の作用を示す。
【０１８１】
【図５４】図54は、ヒト臍帯静脈内皮細胞によるサイトカイン産生に対する本発明による多糖の作用を示す。
【０１８２】
【図５５】図55は、C57Bl/6Jマウスの糞便の細菌組成に対する本発明による単離された多糖の作用を、系統レベル(phyla level)で示す。
【０１８３】
【図５６】図56は、C57Bl/6Jマウスの糞便の細菌多様性に対する本発明による単離された多糖の作用を、系統レベルおよび種レベルで示す。
【実施例】
【０１８４】
実施例1-植物多糖の単離
本発明の活性アラビナン多糖は、多くの方法で植物材料から単離することができる。最適化3-工程抽出プロセス(図1に概略を示す)は、Br/29/16に存在する活性アラビナンをもたらす(Br/29/17は不活性である)。活性アラビナンはBr/29/16に存在し、高度に濃縮されており、比較的純粋であるが、クロマトグラフィー法によってさらに精製することがある。
【０１８５】
工程I-最初の抽出は、室温で95%エタノール中で粉末の植物材料を一晩インキュベートすることによって行う。抽出は遠心分離によって完了することで、チューブの底で沈殿ペレットを得る。残ったエタノール相(Br/29/2)は廃棄する。
【０１８６】
工程II-さらなる抽出は、ペレットに水を加え、油浴および熱電対を用いてこれを沸騰させ(1時間；100℃)、その後遠心分離する(詳細は図1を参照)といったサイクルを6回繰り返すことによって行う。毎回、水相(例えば、Br/29/3、5、7、9、11、および14)を一緒に混合し、チューブの底にあるペレット(例えば、Br/29/4、6、8、10、および12)はさらに抽出サイクルを受ける。
【０１８７】
工程III-プールした抽出物をロータリーエバポレーターで減量する。これを酵素消化(37℃)して、不要な多糖やタンパク質を除去する(図1)。添加した酵素は、プルラナーゼ(EC 3.2.1.41； Sigma Aldrich)；α-アミラーゼ(EC 3.2.1.1； Sigma Aldrich)およびプロテアーゼk(EC 3.4.21.14； Sigma Aldrich)を含む。次に、この消化物を透析し(Spectra/Por(登録商標)4 Dialysis Membrane Standard RC Tubing； MWCO: 12-14 KDa； Thermo Fisher)、エタノールによる沈殿と最後の遠心分離工程により、最終多糖調製物(BR/29/16)を得る。このペレットは強力な免疫調節活性を有する。
【０１８８】
実施例2-シダ・コルドホリア(Sida Cordofolia)の活性画分中の植物多糖の化学構造の決定と、抽出/精製方法の最適化
シダ・コルドホリア(Sida Cordofolia)の根からの抽出物を、ゲル-濾過、HPLCおよび他の所定のクロマトグラフィー法で精製した。生物活性誘導分画のプロセスを行うことで、活性を有する高度精製の多糖画分を同定した。いくつかの異なる抽出/精製戦略を行い、得られた多糖について、(i)活性、(ii)収量、(iii)純度および(iv)分子量の方面で評価した。活性は、前述のように、マクロファージ細胞株におけるNO応答を測定すること

によって確定した。収量は、画分の乾燥重量を初期乾燥重量と比較することによって確定した。純度は、NMRまたはクロマトグラフィーにより適宜評価した。分子量は、SEC-HPLC(TSK gel G5000 PWXL, 30cm x 7.8mm ID)により確定した。精製したアラビナン多糖(30μl；1mg/ml溶液)をTSKカラムに注入し、100%50mM重炭酸アンモニウムで溶出した(フロー0.8ml/min)。溶出液は屈折率でモニターした。カラムは既知の分子量(5KDa、50KDa、150KDa、410KDa、610KDa)のデキストランで較正し、データを線形回帰でフィッティングし、それに応じて分子量を評価した(図2)。精製した免疫調節活性の強いアラビナン多糖は、次のような経過をたどった：

・CG-MSによる単糖成分の定性定量分析；
・単糖成分の結合部位分析(図3参照)、および
・純粋なポリマーの1Dおよび2D NMRの実行および分析(図4-10参照)。

【０１８９】

【表２】

表2:標識残基の構造

標識	残基
A	α-L-Ara*f*-(1 ↓ 2) [→5)-α-L-**Ara*f***-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→]$_n$ 3) ↑ α-L-Ara*f*-(1
B	α-L-**Ara*f***-(1 ↓ 2) [→5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→]$_n$ 3) ↑ α-L-Ara*f*-(1
C	α-L-Ara*f*-(1 ↓ 2) [→5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→]$_n$ 3) ↑ α-L-**Ara*f***-(1
D	α-L-Ara*f*-(1 ↓ 2) [→5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-**Ara*f***-(1→]$_n$ 3) ↑ α-L-Ara*f*-(1
E	[→5)-α-L-**Ara*f***-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→]$_n$ 3) ↑ α-L-Ara*f*-(1
F	α-L-Ara*f*-(1 ↓ 2) [→5)-α-L-**Ara*f***-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→]$_n$

【０１９０】

免疫調節活性(マクロファージ細胞株内でのＮＯの産生に基づく)に必要なアラビナン内の結合を確定した(図１１)。1-5骨格のみを有する2種類の市販の直鎖状アラビナン多糖は、免疫調節活性を有していなかった。また、1-5骨格および1-3分岐を有する市販のアラビナン多糖も活性がない。本発明者らは、1-5、1-3およびさらに1,2結合を含むアラビナン多糖(18F)のみが免疫調節活性を有することを見いだした。1-5、1-3および1,2結合アラビナン多糖(18F)の免疫調節活性を探索したところ、濃度依存性があり、添加濃度が高くなるにつれてマクロファージ細胞株におけるＮＯ産生が有意に増加することを見出した(図１２)。(全て上記式IおよびIIに記載の同じ1-5、1-3および1-2のグリコシド結合

および構造を有する)であるが、調製された分子量が異なるアラビナン多糖の異なる調製物は、その活性の程度に差が生じ得る。66KDaおよび10KDaの分子量の多糖を含有する調製物は、強い活性を有していた(Br/36/A；図13)。49KDaの分子量を有する多糖を含有する調製物は、中程度の活性を有していた(Br/17/D)。12KDaの分子量を有する多糖を含有する調製物も、中程度の活性を有していた(18F)。最後に、3Dの分子量を有する多糖を含有する調製物は、貧弱で無視できる活性を有していた(Br34F)。

アラビナン(Br/14/E、純度の低い画分)の結合パターンは、De Castro et al (2010)に従って決定した。簡単に説明すると、試料(0.5mg)をDMSO(1mL)に溶解し、粉末NaOHで処理し、ヨードメタン(300μL)でメチル化し、加水分解(2M TFA, 200μL, 120℃, 2h)し、$NaBD_4$(5mg)でカルボニル還元し、最後にピリジン(100μL)中で無水酢酸(50μL)でアセチル化した。

【0191】

PMAA誘導体は、SPB-5キャピラリーカラム(Supelco、30m x 0.25 i.d.、流速、0.8mL min^{-1})と担体ガスとしてHeを備えたAgilent装置(Agilent 6850とMS Agilent 5973とを一組にしたGC装置)でGC-MSにより分析した。電子衝撃質量スペクトルは、イオン化エネルギー70eV、イオン化電流0.2mAで記録した。すべての分析に使用した温度プログラムは以下の通りである：150℃で5分間、150→280℃で3℃/分、300℃で5分間。

【0192】

NMR取得パラメーター

NMR分析は、低温プローブを備えたBruker 600MHzで行い、スペクトルは298Kで記録した。アセトンは内部標準として使用し(^1H 2.225ppm, ^{13}C 31.45ppm)および2Dスペクトル(^1H-^1H DQF-COSY, ^1H-^1H NOESY, ^1H-^1H TOCSY, ^1H-^{13}C HSQC and ^1H-^{13}C HMBC)はBrukerソフトウェア(TopSpin 2.0)で獲得した。等核実験では、FIDあたり32スキャンで2048複合体の512FIDを使用して記録し、TOCSYおよびNOESYスペクトル取得にはそれぞれ100msと200msの混合時間を使用した。HSQCおよびHMBCスペクトルは、それぞれ90スキャンを蓄積して、2048複合点の512FIDで取得した。Bruker TopSpin 3プログラムを用いてスペクトルを処理し、分析した。

【0193】

純粋なアラビナンBr/17/Dの分子量測定

純粋なアラビナンBr/17/D(Br/18/Fに相当、図2参照)の分子量は、SEC-HPLC(TSK gel G5000 PWXL, 30 cm x 7.8 mm ID)により測定した。アラビナンのPMを開示するために、30μl(1mg/ml溶液)をTSKカラムに注入し、100%50mM重炭酸アンモニウムで溶出した(フロー0.8ml/min)。溶出液は屈折率でモニターした。カラムは既知の分子量(5KDa、50KDa、150KDa、410KDa、610KDa)のデキストランで較正し、データを線形回帰で適合させ、それに応じてBr/17/Dの分子量を評価した(図2、表3)。

【0194】

表3：poly_1およびpoly_2の分子量の計算に使用したデキストランの分子量。5000Da～670000Daの分子量を有するデキストランをTSKカラム(1mg/mlの溶液30μl)に注入し、次の直線方程式：y=-1,3958x+15.176で検量線を作成した。Br/17/DをTSKカラム(1mg/mlの溶液30μl)に注入し、直線方程式を解くことで分子量を求めた。

【0195】

【表３】

	MW(Da)	log MW	時間(min)	溶出体積
デキストラン (Dexstran)	5000	3,70	12,54	10,03
デキストラン	50000	4,70	10,76	8,60
デキストラン (Dexstran)	150000	5,18	9,90	7,92
デキストラン (Dexstran)	410000	5,61	9,16	7,33
デキストラン (Dexstran)	670000	5,8	8,85	7,08
Br/17/D	48977,88	4,69	10,79	8,63

【０１９６】

参考文献

De Castro C, Parrilli M, Holst O, Molinaro A. Microbe-Associated Molecular Patterns in 自然免疫: 抽出物ion and Chemical Analysis of Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides. Methods Enzymol. 2010, 480, 89-115. Doi: 10.1016/S0076-6879(10)80005-9.

【０１９７】

実施例3-マルバセアエ(Malvaceae)の免疫調節免疫調節活性

本発明者らは、マルバセアエ(Malvaceae)ファミリーの植物の免疫調節作用について研究することにした。マルバセアエ(Malvaceae)からの抽出物がT_H1介在免疫応答を誘導することを見出した。

【０１９８】

方法

植物材料および抽出

チリア・コルダタ(Tilia cordata)、スパルマンニア・アフリカナ(Sparrmannia africana)、ドンベヤ・ワリキイ(Dombeya wallichii)、ラグナリア・パテルソニイ(Lagunaria patersonii)、パキラ・アクアティカ(Pachira aquatic)、ヒビスクス・シリアクス(Hibiscus syriacus)、ヒビスクス・ワイメアエ(Hibiscus waimeae)、ヒビスクス・ロサ-シネンシス(Hibiscus rosa-sinensis)、パボニア・スピニフェキス(Pavonia spinifex)、アブチロン・テオフラスチ(Abutilon theophrasti)およびシダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora)の根は、ベルファスト・ボタニック・ガーデン(Belfast Botanic Garden)の厚意により採収し寄贈してもらったものとした。テブロマ・カコア(Thebroma cacoa)およびラバテラ・アルボレア(Lavatera arborea)の標本は、エジンバラのロイヤル・ボタニック・ガーデン(Royal Botanic Garden)厚意により寄贈してもらったものとした。シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)の根は、ブリストルのPukka herbsにより寄贈してもらったものとした。マルバ・シルベストリス(Malva sylvestris)、スファエラルセアエ・コクシネア(Sphaeralcea coccinea)、ゴシピウム・ヒルスツム(Gossypium hirsutum)、ゴシピウム・ヘルバケウム(Gossypium herbaceum)、マルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum. lateritium))種子から育てのものとし、アルテア・オフィシナリス(Althea officinalis)の根は、ロンドンのNeal Yard Remediesから得たものとした。

【０１９９】

新鮮な植物の根をイソプロパノールおよび水で洗浄し、その後、根を凍結乾燥し、-20℃で保存した。凍結乾燥した根を分析用ミルを用いて微粉末にホモジナイズし、100gの各根をn-ヘキサン、クロロホルム、メタノールおよびddH2Oに室温で24時間、順次浸

漬した。n-ヘキサン、クロロホルムおよびメタノール抽出物を、45℃に設定したロータリー蒸発装置を用いて、減圧下で濃縮し、水性抽出物を2000gで15分間遠心分離し、続いて凍結乾燥した。水性抽出物1gを10～20mlのddH20に溶解し、次いでエタノール沈殿(abs)を行うことにより、凍結乾燥した水性抽出物から沈殿を分離し、沈殿を遠心分離によりペレット化し、後に凍結乾燥し-20℃で保存し、分離した沈殿の画分をEXAPで標識した。

【０２００】

リンパ球アッセイ

リンパ球の調製

すべての動物処置は、動物科学的処置法(1986)およびQueen’s University, Belfastの研究倫理方針に従って行った。成体雌のbalb/マウスは、Queen's University BelfastのBiological Response Unitから供給され、頚椎脱臼により犠牲させた。脾臓を無菌的に取り出し、1%ペニシリン・ストロプトマイシンを有する5mlのRPMI-1640培地(Life technologies^{TM}, Paisley)(不完全培地)中で保存した。脾臓を、5mlの不完全培地中で無菌鉗子を用い、余分な脂肪組織と脾臓の被膜を除去ながら、静かに引き離した。脾臓を、プラスチック製2ml注射器から、無菌40μmナイロン製セルストレーナー(BD Falcon, Oxford)を介して、ゴム製プランジャーを用いて不完全培地に静かに通過させた。セルストレーナーを15mlの不完全培地で洗浄し、総体積を20mlとした。

【０２０１】

培地を10分間沈降させた後、大きな細胞の塊と破片を除去し、上清を新しい無菌50ml遠心分離チューブに移した。次に、細胞懸濁液を300gで10分間遠心分離し、上清を廃棄した。赤血球を、赤血球溶解バッファー(1ml容量　脾臓-1)(Sigma-Aldrich - Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max)を用いて1分間枯渇させた。次に、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(100μg/ml)および10%熱不活性化ウシ胎児血清(FBS)を含む50mlのRPMI 1640 Glutamax培地(完全培地)に再懸濁させた。自動血球計数器(Countess(登録商標)自動血球計数器、Invitrogen)を用いて、0.4%トリパンブルー色素で生細胞を列挙した。細胞密度を$2x10^6$細胞/mlに調整し、細胞懸濁液100μlを用いて96ウェル(BD Falcon)マイクロタイタープレートに播種し、$2x10^5$細胞/ウェルとした。上記の工程はすべて、汚染を防ぐために生物学的安全キャビネット内で無菌条件下で行った。細胞は、5%CO_2加湿インキュベーター内で、37℃で72時間培養した。

【０２０２】

リンパ球増殖アッセイ

脾細胞とは、脾臓組織を構成する様々な白血球種類のいずれかを意味する。それらは、自然免疫系と、TおよびBリンパ球の大規模な集団を含む適応免疫系の両方の一部であるさまざまな細胞集団からなる。抽出物の対数的希釈は、抽出物の2mg/ml原液を用い、1.5mlのエッペンドルフチューブ中の完全RPMI培地で2mg/ml～20ng/mlの範囲で行い、各希釈液100μlを播種した96ウェルプレートに三回添加することで、1mg/ml～10ng/mlの範囲の最終濃度を得た。リンパ球のマイトジェンとして知られているカナバリア・エンシホルミス(Canavalia ensiformis)(Sigma-Aldrich)から単離されたコンカナバリンA(Concanavalin A)(5μg/ml)を陽性対照として使用した(Beckert & Sharkey 1970)。

【０２０３】

脾細胞の増殖も、生細胞の還元機能を利用してレザズリンをレゾルフィンに変換させるAlamarBlue(登録商標)細胞生存率インジケーターを用いて測定した。レサズリンは無毒の細胞透過性化合物で、細胞に入ると青色になる。レサズリンは生細胞中でレゾルフィン(ピンク/赤)に還元される(Page et al. 1993)。生細胞は継続的にレサズリンをレゾルフィンに変換させ、それによって生存率と細胞毒性の定量的尺度を生み出す。メーカーの指示に従って、10%(20μl)AlamarBlue溶液(Invitrogen^{TM}, Life Technologies, Paisley, UK)を各ウェルの細胞培地に添加し、さらに24時間インキュベートした。

【０２０４】
Tecan Safire2マイクロプレートリーダー(Tecan, Switzerland)を用いて、各ウェルの光学密度をλ570nmで測定した。結果は、式：PI＝OD(λ570)刺激された細胞/OD(λ570)刺激されていない細胞を用いて、増殖指数(PI)を用いて表した。
【０２０５】
脾細胞の増殖は、さらにBromodeoxyuridine(BrDU)アッセイキット(Roche Diagnostics Ltd, Sussex)を用いて確認した。簡単に説明すると、BrDUは、複製している細胞のDNAに取り込ませることができるチミジンの合成アナログである。その後、BrDUに特異的な抗体を用いて、取り込まれたBrDUを検出することができる。アッセイは、製造元のプロトコルに従って行った。
【０２０６】
体液性免疫： ELISAによる免疫グロブリン分泌の定量化。
免疫グロブリン産生を調節する脾細胞(Bリンパ球)の能力に対する抽出物の作用を、サンドイッチ酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を用いて評価した。簡単に言うと、脾細胞を抽出物とインキュベートした。48時間後、96ウェルプレートを300gで10分間遠心分離し、各ウェルから150μlの上清を注意深く吸引し、別の96ウェルプレートに移し、-20℃で保存した。
【０２０７】
ELISAプレートを、0.1M炭酸ナトリウム/重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.4)中で1：1000に希釈したヤギ抗マウスIgA、IgG、IgM抗体(Sigma Alrich)75μlで4℃で一晩コーティングした。翌日、プレートを1%脱脂乾燥乳(marvel)150μlで、37℃で2時間ブロックした。
【０２０８】
マイクロタイタープレート(Greiner Bio-One)にアイソタイプ特異的ヤギ抗マウス抗体(IgA、IgMおよびIgA)(Sigma-Aldrich)を10μg/mlの炭酸緩衝液(0.1M炭酸ナトリウム/炭酸水素緩衝液、pH9.4)の濃度でコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。その後、プレートを洗浄緩衝液(50mM Tris、pH 8.0、0.1M NaCl、0.05% Tween)で2回洗浄し、ウェルを150μlのブロッキング溶液(1%脱脂乾燥乳、50mM Tris、pH 8.0、0.15M NaCl)でコーティングし、37℃で2時間インキュベートした。その後、プレートを洗浄液で2回洗浄した。その後、希釈した細胞上清75μlを96マイクロタイタープレートのウェルに加え、37℃で2時間インキュベートした。上清を廃棄し、プレートをELISA洗浄溶液で広範に洗浄した。75μlのヤギで産生された抗マウスIgG、IgA、IgM抗体(HRP結合)(Sigma-Aldrich)を、1%の脱脂乾燥乳を含むリン酸緩衝液で1：2000の濃度で希釈し、各ウェルに添加した。プレートを37℃でプレート振盪機で1時間インキュベートした。インキュベーション完了後、プレートをELISA洗浄液で3回洗浄し、さらに1ウェルあたり100μlの西洋ワサビペルオキシダーゼ-結合ヤギ抗マウスで60分間インキュベートし、再びプレートを3回洗浄した後、3，3，5，5’テトラメチルベンジジン(TMB)(Sigma-Aldrich)を含む基質溶液をそれぞれのウェルに添加することによりプレートを展開した。次に、プレートは室温で10分間インキュベートした。インキュベーション後、各ウェルに2M硫酸100μlを添加することによって反応を停止させ、Tecan Safire2マイクロプレートリーダーを用いて、吸光度λ450nmで測定した。
【０２０９】
マクロファージ(RAW 264.7)アッセイ
マクロファージは、自然免疫系の必須の細胞構成要素であり、宿主にとって潜在的に病原性であると考えられる物質を巡回する本質的にすべての組織に見られる。潜在的な病原体が検出されると、それらは活性化され、細胞に劇的な変化が起こる。ある研究では、観察されたマクロファージ遺伝子の25%に変化があったと報告された(Ehrta et al. 2001)。活性化後、細胞は形態学的に大きくなり、エンドサイトーシス(飲作用および貪食作用)の増加を示し、リソソーム内の加水分解タンパク質が増加する。マクロファージが潜在的脅威を保持し排除する一方で、適応免疫反応を組織化することを可能にする産物の転

写、産生および分泌が著しく増加する。活性化マクロファージによって誘導される酵素には、スーパーオキシドジスムターゼ(これによりH_2O_2が形成される)、NADPHオキシダーゼ(O2-)、および微生物を殺すためにアルギニンをNOに代謝する酵素である誘導性一酸化窒素シンターゼ(iNOS)が含まれる(Mosser et al. 2008)。

【０２１０】

マクロファージの調製

RAW264.7細胞株由来のマウスマクロファージを、European Collection of Cell Cultures(ECACC)から購入した。この細胞を、75cmの培養フラスコ中で、10％熱不活性化FBS、100u/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを含むダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)中で培養した。細胞を5％CO_2存在下、37℃でインキュベートした。すべての細胞培養作業は、汚染を防ぐために生物学的安全キャビネットの中で無菌条件で行った。

【０２１１】

マクロファージ増殖アッセイ

細胞を96ウェルプレートに$1x10^5$細胞 ml($1x10^4$細胞/ウェル)の播種密度で播種した。陽性対照として、マクロファージのアクティベーターとして知られているリポ多糖(LPS)(Sigma-Aldrich)を1μg/mlの濃度で使用した。インキュベーション時間は24時間とした。細胞を5％CO2存在下、37℃で培養し、マクロファージ増殖はAlamarBlueを用いて測定した。

【０２１２】

亜硝酸塩濃度の測定

iNOSの誘導は、L-アルギニンのシトルリンへの変換により一酸化窒素(NO)の内因性産生をもたらす(Murad 1998)。NOは炎症反応の重要な促進因子であり、標準的な経路(TLRのライゲーション)を介してマクロファージ活性化によってのみ産生される(Mosser 2003)。NOは非常に反応性が高いため、その形成は一般的に間接的に測定される(すなわち、NOの2つの主要な安定した非揮発性分解生成物の1つである亜硝酸(NO2-)の測定によって)。

【０２１３】

培地中の亜硝酸塩(NO2-)濃度は、メーカー(Life Technologies, Paisley)から提供されたプロトコルに従って、Griess反応法を用いて測定した。簡単に説明すると、NO2-の生成量を測定するために、各ウェルから50μlの培地を吸引し、5％リン酸中の50μlスルファニル酸1％(10mg/ml)と共に滅菌96ウェルプレートに移した。次に、このプレートを室温で10分間インキュベートした。その後、0.1％N-(1-ナフチル)エチレンジアミンジヒドロクロライドを含有する溶液50μlを添加し、室温でさらに20分間インキュベートした。NO2-の濃度は、Tecan Safire2マイクロプレートリーダーを用いて、λ550nmで比色分析で測定した。

【０２１４】

0.1M亜硝酸ナトリウム($NaNO_2$)の標準液を用いて、100～1μMの範囲で連続希釈し、標準曲線によりNO2-濃度を定量化した。

【０２１５】

ニュートラルレッド貪食作用アッセイ

ニュートラルレッド取り込みアッセイを介してマクロファージの細胞内活性を測定する能力は、Antal et al. (1995)によって記載されている。0.1％ニュートラルレッド(NR)(3-アミノ-7ジメチルアミノ-2-メチルフェナジンヒドロクロライド)溶液は、ニュートラルレッド結晶0.1gを無菌リン酸緩衝液(pH7.2)100mlに溶解することによって調製し、その溶液を注射器フィルターで濾過することで、不溶な結晶を除去し、溶液の均質性を確保した。簡単に言うと、96ウェルプレートにRAW 264.7細胞を培養して播種し、24時間インキュベートした後、無菌NR溶液20μlを各ウェルに添加した(Repetto et al.2008)。

【０２１６】

次に、プレートをさらに6時間インキュベートした。その後、上清を注意深く吸引して廃棄し、ウェルを200μlのPBS(PBS：1M KH_2PO_4, 1M K_2HPO_4, 5M NaCl pH7.2)で2回洗浄した。100μlの細胞溶解液(50% abs.エタノール、49%脱イオン水、1%氷酢酸)を添加することによって細胞を溶解し、細胞を室温で2時間インキュベートし、Tecan Safire2マイクロプレートリーダーを用いて540nmでの光学密度を測定した。

【０２１７】

エンドトキシンの検出。

タンパク質に比べ、エンドトキシン(リポ多糖)は非常に安定で、極端な温度やpHに耐性がある。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞膜に由来し、細菌の細胞壁のマトリックス内で結合している。しかし、細菌が成長して分裂するにつれ、エンドトキシン単位を環境中に継続的に放出する。これらのエンドトキシン単位は、IFN-γのプライミングシグナルとは無関係に、TH1介在免疫応答を活性化することができる。したがって、LPSはマクロファージを直接活性化し(Andrade et al. 2003)、TNFα、IL-6およびIL-1などの炎症性メディエーターの放出をもたらすため、抽出物中のリポ多糖の存在を排除する必要がある。

【０２１８】

Limulus sppの血液をエンドトキシンに暴露すると凝固が起こり(Bang & Frost 1953)、このメカニズムは細菌を捕捉して固定化し、細菌の全身への伝播を防ぐ作用がある。この発見は、カブトガニ血球抽出成分(Limulus Amebocyte Lysate, LAL)アッセイ(Young et al. 1972)の基礎となっており、アメーバ様細胞の溶解液にエンドトキシンを暴露すると、凝固酵素の活性化を頂点とする酵素のカスケードが開始され、コアグロゲン（凝固タンパク質）が切断され、その結果、不溶性（コアグリン）が形成され、これが凝集して血栓を形成する(Levin & Bang 1964)。

【０２１９】

LALアッセイ

Pyrosate(登録商標)(CapeCod)迅速エンドトキシン検出キット(0.03エンドトキシン単位(EU)/ml)は、高感度な検出法である。本キットは、最大100ng/mlのグルカン濃度に特異的なエンドトキシンである。アッセイはメーカーのプロトコルに従って行った。簡単に説明すると、1mg/mlの凍結乾燥水性抽出物を、エンドトキシンを含まない無菌水(Sigma)に溶解し、原液をさらに希釈して100ng/mlの溶液を生成し、次に100ng/mlの溶液0.5mlを、L.ポリフェムス(L. Polyphemus)アメーバ様細胞の水性抽出物、塩、グルカンブロッカーおよび緩衝液のみを含有する0.5mlの凍結乾燥LAL試薬を含むチューブに分注した。次に、試験チューブを水平面内で20～30秒間穏やかに混合し、次に2.5mlを対照標準エンドトキシン(大腸菌O113:H10)を含むチューブに移した。次に、チューブを水平面で20～30秒間穏やかに再度混合し、次いで37℃で1時間インキュベートした。

【０２２０】

インビトロ免疫モデル(ガレリア・メロネラの幼虫(Galleria mellonella larvae))

微生物に対する自然免疫反応の多くの重要な態様は、節足動物と齧歯類との間で非常に保存されている。この免疫応答における顕著な相同性により、宿主と微生物との相互作用を研究するための原型モデルとして昆虫を用いることに多くの関心が集まっている(Hultmark 1993)。節足動物は顎口虫類に代わる非常に経済的な代替品であり、より倫理的に許容可能なモデルである。オオハチミツガ・ガレリア・メロネラ(鱗翅類)の幼虫は37℃が生育至適温度であり、ニワトビウンカに感染することが知られている様々な病原性微生物の培養にも最適であるという利点もある(Ramarao et al. 2012)。

【０２２１】

節足動物では、PAMPsを検出すると、血リンパ系を介して自然免疫応答が促進される。ガレリア属(Galleria spp)では、他の節足動物と同様に、免疫応答には体液性応答と細胞性応答がある(Vilmos & Kurucz 1998)。体液性反応には、小さな抗菌ペプチドの産生と酵素を介した凝固カスケードがあり、これは、以前にLimulus属(Limulus sp

p.)について述べたものと同じである(Muta & Iwanaga 1996)。鱗翅目幼虫の血リンパには主に顆粒細胞と形質細胞が含まれ(Lavine & Strand 2002)、これらはPAMPsを検出すると、潜在的脅威を緩和されるか、貪食作用を介して根絶することによって反応し(Schmit & Ratcliffe 1977)、興味深いことに、これらの細胞は顎口虫類の食細胞で見られるものと類似した受容体も示す(Vilmos & Kurucz 1998)。

【０２２２】

ガレリア・メロネラ

ガレリア・メロネラの幼虫(Livefoods Direct)は、25℃(暗黒)で人工飼料で飼育し、実験中は37℃のインキュベーターで無菌ペトリ皿(5cm)に保持した。実験群は、体重250～300mgの幼虫(最終齢)10匹で構成されていた。

【０２２３】

マルベエ(Malveae)の水性抽出物に予め曝露した幼虫における細菌量

シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)、マルバ・シルベストリス(Malva sylvestris)、マルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum lateritium)およびシダアルセアエ・マルビフロラ(Sidaalcea malviflora)の水性抽出物の溶液を1mg/mlおよび0.1mg/mlの濃度で、無菌状態でPBS中で調製した。Terumo Myjector 1ml 29G 0.33x12mmを用いて、抽出物の10μlアリコートを各群の幼虫の背外側部位の腹脚(左)を介して血体腔に注射し、陰性対照群にはPBS(0.1M Tris-HCl中の150mM NaCl；5mM KCl、pH 6.9)を注射し、幼虫を37℃に設定したインキュベーターに24時間入れておいた。次に、各群にMRSA(ATCC43300)または大腸菌(ACTCC11303)を感染させた。接種実験は、Ramaraoらによって記載されたプロトコルに従って行った。接種材料の密度は、0.5マクファーランド汚濁標準(McFarland turbidity standard)の光学的等価物に標準化し、これはλ600nmでの吸光度が0.06～0.10nmであり、107cfu/mlに相当し(Andrews 2001)、PBSでさらに希釈(1:10)し、水性抽出物の場合と同様の方法で、背外側部位の腹脚(右)を介して接種材料を投与した。接種した幼虫は、37℃に設定したインキュベーターで24時間維持させた。

【０２２４】

細菌接種材料を段階的に希釈して、各希釈液20μlをミューラー・ヒントン寒天プレート上にプレーティングし、37℃で24時間インキュベートすることが含まれるミスラ法(Miles and Misra Method, Miles et al. 1938)を用いて接種材料のサイズを確かめた。したがって、接種材料濃度は$1.2x10^6$ CFU/mlとして計算した。接種後24時間、48時間および72時間で、各群から3匹の幼虫を取り出し、ミスラ法を用いて血リンパ中の細菌量を測定し、CFUを計算した。

【０２２５】

免疫応答

血球に対するマルベアエ(malveae)抽出物の作用は、1mg/mlおよび0.1mg/mlの濃度のシダ・コルジホリア(Sida cordifolia)、マルバ・シルベストリス(Malva sylvestris)、マルバストルム・ラテリチウム(Malvastrum lateritium)およびシダアルセアエ・マルビフロラ(Sidaalcea malviflora)の水性抽出物を注射することによって評価した。その後、幼虫を37℃に設定したインキュベーターで24時間維持させた。インキュベーション後、血リンパを取り出し、血球計数器を用いて血球を数え上げた。

【０２２６】

多糖の分析

アルコール沈殿中の多糖の存在は、Molisch試薬(アルコール(abs.)に溶解した5％チモール)により確認した。簡単に説明すると、10mgの試料をガラス試験管中の750μlのddH_2Oに溶解し、ガラス試験管に500μlのMolisch試薬を添加し、次いで3gttの濃硫酸を添加した。

【０２２７】

多糖濃縮画分中のタンパク質含有量の測定

多糖を沈殿させる方法は、タンパク質も沈殿させることができる。そのため、沈殿中の

タンパク質含有量を測定する必要があった。動物源から得られた生理液中のタンパク質含有量を測定する方法は数多く開発されているが、残念ながらこれらのアッセイはタンパク質-銅キレート化に基づいて開発されており、これは、銅がCu(II)からCu(I)に還元される結果をもたらし、植物抽出物に存在する還元剤の存在によって影響を受けることがある(Compton & Jones 1985)。一方、Bradfordアッセイは、Brilliant Blue G250(Coomassie Brilliant Blue)色素および塩基性アミノ酸残基(アルギニン、リシンおよびヒスチジン)間の複合体の形成に基づく。結果として得られた複合体は、Brillant Blue G250の吸収最大をλ465nm～595nmにシフトさせる(Bradford 1976)。

【０２２８】

簡単に説明すると、多糖濃縮画分をPBS(0.5mg/ml)に溶解し、0.5mg/mlの画分10μlを96ウェルプレートのウェルに3回分注し、そこに250μlのBradford試薬(Bio-Rad)を室温で添加した。PBS中の1mg/mlのウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma Aldrich)のタンパク質標準を、その後連続希釈(1：10)して、0～100μg/mlの範囲の標準を形成した。10μlを試料とともに96ウェルプレートのウェルに3回添加し、次いで150μlのBradford試薬を添加した。プレートを室温で20分間インキュベートし、Tecan Safire 2マイクロプレートリーダー(Tecan,Switzerland)を用いて、λ595nmでの吸光度を測定した。

【０２２９】

赤外スペクトロスコピー

ラマン-IRスペクトロスコピー(Thermo Scientific Nicolet iS5 FT-IR Spectrometer with Omnic Software^{TM}, Madison, Wisconsin, USA)を行い、次いで400MHz Bruker NMR(Billerica, MA, USA)を用いてMeOH中で^{13}C NMRおよび^{1}H NMRを行って構造を確かめた。

【０２３０】

多糖のGC-MS分析

多糖濃縮画分(100mg)を、25mlの密閉フラスコ中で、105℃で1Mトリフルオロ酢酸(TFA)(Sigma-Aldrich)10mlで7時間加水分解し(Uzaki & Ishiwatari 1983)、次に凍結乾燥した。その後、試料(2mg)を、1mlの無水ピリジン中、N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(BSTFA)500μlと1%トリメチルクロシラン(Sigam-Aldrich)でシリル化反応により誘導体化した。反応は、室温で12時間行った。

【０２３１】

GC-MS分析は、ZB半揮発性カラム(30m x 0.25mm x 0.25μm Zebron^{TM}、Phenomenex Inc)を備えた、質量選択検出器(Agilents 5975C)と接続させたガスクロマトグラフィー(Agilent 7890A)を用いて、ヘリウムを担体ガスとして1ml/分の一定速度で行った。注射器およびMS源の温度はそれぞれ260℃と230℃に維持させた。カラム温度プログラムは、80℃で注射して1分間保持し、15℃min^{-1}で300℃まで温度を上昇させ、次いで300℃で15分間等温保持することからなる。MSは、イオン化エネルギー70eVの電子衝撃モードで動作させた。スキャン範囲は、50～550Daの質量スキャン範囲から設定した。注射容量は1μlとし、入口の分流は20ml^{-1}(分割比20:1)とした。

【０２３２】

データの取得と処理は、Chemstationソフトウェア(Hewlett Packard)で行った。化合物の同定は、クロマトグラフィーの保持特性や標準物質のマススペクトル、NISTマススペクトルライブラリー(米国国立標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology, USA))との比較によって行った(Magalhaes et al. 2007)。

【０２３３】

結果

脾細胞の増殖

脾細胞を用いて行った増殖アッセイの結果をヒートマップにまとめた(図14)。その結果、マルボイデアエ(malvoideae)のマルベアエ(malveae)族の粗水抽出物は、0.01～1mg/mlで濃度依存的に脾細胞の増殖を有意に刺激した(P〈0.05)。この活性は、マル

ベアエ(malveae)族(サブファミリー マルボイデアエ(malvoideae))の異なる属を代表する8種すべてで観察された。脾細胞増殖は、ゴッシピエアエ(Gossypieae)族の水性抽出物およびヒビスセアエ(Hibisceae)族の1種(アベルモスクス・モスカツス(Abelmoschus moschatus))でも観察された。n-ヘキサン、クロロホルムまたはメタノールのいずれの抽出物にも活性は認められず、この活性は極性の高い成分によるものであることを示唆している。このアッセイで観察された脾細胞刺激活性は、その後、BrdUアッセイ(図14)により確認され、マルベアエ(malveae)の水性抽出物でも同様の濃度依存的な作用が観察された。

【０２３４】

抗体分泌

脾細胞をマルバセアエ(malvaceae)の抽出物でインキュベートした、ウェルから採取した上清は、1mg/mlの濃度のマルベアエ(malveae)族のすべての種の水性抽出物でインキュベート後、全てのIgGレベルが2～3倍上昇を示し(図15)、0.1mg/mlの濃度でマルベアエ(malveae)族のすべての種の水性抽出物でインキュベート後、全てのIgGレベルが1～2倍上昇を示した。また、0.01mg/mlの濃度のシダ・コルジホリア(Sida cordifolia)、シダルセアエ・マルビフロラ(Sidalcea malviflora)およびアルタエアエ・オフィシナリス(Althaea officinalis)とインキュベートした上清では、総IgGレベルの1.2～1.5倍の上昇が検出された(図21)。インキュベーション後の総IgMレベルについても同様の傾向が観察され、同様に1mg/mlの濃度でIgMレベルが2～3倍、0.1mg ml-1の濃度でIgMレベルが1.3～2.5倍上昇した(図21)。図17のヒートマップにまとめられているIgMの総レベル。細胞をマルベアエ(malveae)の水性抽出物に曝露したウェルから吸引した上清中の総IgAは、1mg/mlの濃度で1.2～1.7倍の上昇があった。IgAの総レベルは、図16 のヒートマップにまとめた。

【０２３５】

マクロファージの活性化

RAW 264.7マクロファージで増殖アッセイを行うことで増殖を観察した。増殖は観察されなかったが、マクロファージの活性化に典型的な形態的変化が観察された(図18)。マルベアエ(malveae)の水性抽出物とインキュベートした細胞は、抽出物を添加していない細胞(陰性対照)と比較して、はるかに大きく、均一でないように見えた。これは、活性化マクロファージと一致する。なぜなら、細胞膜の突起が増加し、内在化した病原体を貪食するための液胞の数が増加し、それが集合的に細胞サイズを大きくしているからである。

【０２３６】

呼吸バースト

活性化マクロファージは、活性酸素種と活性窒素種を放出する。亜硝酸イオン(NO2-)を急速に形成する硝酸は、マクロファージ内に取り込まれた寄生虫の分解に不可欠な反応種の産生の増加を示す窒素種の1つである。図19のヒートマップは、脾細胞を抽出物とインキュベートしたときのNO_2^-の生成における応答を要約している。亜硝酸塩レベルは、以前に報告された脾細胞の増殖およびIgG、IgM、およびIgAレベルと同様の傾向をたどった。要約すると、1mg/mlの濃度のマルベアエ(malveae)種の水性抽出物とマクロファージをインキュベートしたときのNO2-レベルは60～80μmol/mlの範囲であり、これは1ng/mlの濃度のLPSの場合と同じであった。この活性は、検出可能な硝酸塩レベルが10～20μmol/mlの範囲であることが見出された0.001mg/mlの濃度でも統計的に有意であった(P 〈 0.05)。

【０２３７】

貪食作用

活性化マクロファージのさらなる特徴は、貪食する能力である。マクロファージをシダ・コルジホリア(Sida cordifolia)(マルベアエ(malveae))の水性抽出物に曝露した。インキュベーション後、ニュートラルレッド溶液を添加し、6時間インキュベートした。NO_2^-レベルが上昇しているように見える細胞は、その貪食能力を反映して、より濃い赤

色の細胞質を有するようにも見えた。上清を吸引し、溶解液で細胞を溶解したところ、マルベアエ(malveae)の水性抽出物と細胞をインキュベートした場合、貪食活性が2倍増加したことが観察され、これはヒートマップ図20にまとめている。

【０２３８】

マルベアエ(Malveae)の水性抽出物中の粘着性物質(Mucialgenous Matter)の分析

水性抽出物を凍結乾燥し、エタノールで粘着性物質を抽出した。沈殿を集めて、凍結乾燥し、定量化した。試験したマルベアエ(malveae)の水性抽出物中の粘液の含有量が12～24％の範囲であることを見出した(図23)。

【０２３９】

多糖濃縮画分の分析(EXAP)

エタノール沈殿中の粘着性多糖の存在は、Molisch試験によって最初に確認された。多糖の存在は、濃H_2SO_4の添加後、チモール溶液と水溶液の界面にピンク/紫色のメニスが直ちに形成されることを観察することで確認された。Lugol液では色の変化は観察されず、これはデンプンが存在しないことを示唆している。また、Benedict試薬による還元糖では陰性の結果が観察された。凍結乾燥した沈殿中に多糖が存在することは、その後、赤外スペクトロスコピーで確認された。図24は、不定型多糖沈殿のスペクトルを示しており、マルバセアエ(malvaceae)の水性抽出物のエタノール沈殿によって産生されたIRスペクトルを表す。要約すると、3380cm-1領域で観察された最大値はOH基を表し、2930cm-1の範囲で観察された最大値は-CH2または-CH2、H-C=Oの存在を示し、1650-1700cm-1領域で観察された最大値は、C=Cを表す最大値と重なるC=O基の存在を示す。すべてのIRスペクトルにおいて、通常糖サイクルに関連する930および615cm-1の最大値も観察された。典型的には、すべてのスペクトルで1200～1000cm-1の間に、C-OH側基の存在による伸縮振動とC-O-Cグリコシド結合振動が重なる糖環振動が支配する領域があった。

【０２４０】

多糖濃縮画分(EXAP)中のタンパク質含有量

多糖のエタノール沈殿は、タンパク質の沈殿を引き起こすことができるため、Bradfordアッセイを用いてタンパク質濃度を測定した。タンパク質含有量は、沈殿した多糖1mg ml-1の溶液中で、0～0.1μg/mlの領域であると測定された(すなわち、〈0.0001％w/v)。

【０２４１】

多糖沈殿(EXAP)のGC-MS分析

加水分解した多糖を凍結乾燥し、誘導体化した後にGC-MS分析を行い、標準物質とNISTライブラリーを用いて多糖を構成する単糖を同定した。マルベアエ(malveae)族と免疫調節活性を示さないサブファミリーのメンバーとの間には、単糖のプロファイルに明確な違いがあった。まとめると、マルベアエ(malveae)族の多糖はより多様な単糖を含み、すべてのケースで合計9種類の単糖を含んでいた。一般に、マルベアエ(malveae)の多糖は、ラムノース(8～18％)、グルコース(16～28％)、マンノース(5～12％)、アラビノース(2～9％)、ガラクトース(28～1％)およびウロン酸(1～14％)でできた(図25、26)が、他のサブファミリーの種の水性抽出物で単離された多糖は異なる組成を有していた(図27)ことを見出した。

【０２４２】

LAL試験によるエンドトキシンの検出

グラム陰性菌のリポ多糖(エンドトキシン)の汚染をLAL試験で判定した。マルベアエ(malveae)の水抽出物およびアルコール沈殿中のエンドトキシンレベルは、0.03EU/mlと無視してよいレベルであった。

【０２４３】

多糖濃縮画分(EXAP)の免疫調節作用

微量のタンパク質を示し、エンドトキシンの存在が陰性であると示したたマルベアエ(malveae)の凍結乾燥沈殿を、その元となった粗水性抽出物と一緒に試験した。

【０２４４】
脾細胞増殖、免疫グロブリン分泌およびマクロファージ活性化に対するEXAPの作用
マルベアエ(malveae)の水抽出物(EXA)は、脾細胞増殖、免疫グロブリン分泌およびマクロファージ活性化について、前述と同様の応答を示した。しかし、多糖沈殿(EXAP)では、EXAと比較して有意な活性の向上が観察された。EXAPではEXAと比較してより大きな脾細胞増殖が観察された(図２８)。EXAPではIgG、IgMおよびIgAの分泌も、EXAと比較してより多く観察された(図２９、３０および３１)。マクロファージ活性化についても、EXAPの方がEXAと比較して貪食活性とNO2-産生の両面で大きかった。これは、多糖を濃縮した場合に、この生理活性の強化があったことを示している(図３２および３３)。
【０２４５】
考察
本研究において、本発明者らは、マルバセアエ(malvaceae)ファミリーの植物からの抽出物がインビトロおよびインビボで免疫調節活性を誘導することを確認した。また、抽出物の主成分も同定した。自然免疫系および適応免疫系の要素を活性化する能力について、より広いマルバセアエ(malvaceae)を代表する様々な植物をスクリーニングした。マルバセアエ(malvaceae)ファミリーのマルベアエ(malveae)族に属する水性抽出物は、増殖および抗体分泌の誘導によって証明されるように、マウスリンパ球の機能を強化した。また、マルベアエ(malveae)種の水性抽出物は、マクロファージの貪食活性と呼吸性バースト活性を増強した。免疫調節活性はマルベアエ(malveae)の多糖の構成要素によって引き起こされるようであり、これらは単純なインビボのモデルで免疫調節を引き起こす。最も有望なのは、幼虫の宿主をマルベアエ(malveae)抽出物で前処理することで、致命的となり得る微生物のチャレンジに対して、実質的に感染に抵抗できるようになったことである。抗生物質耐性が広まって以来、予防的抗生物質に代わる最も有望な代替手段の1つは、植物由来の外因性生物学的応答調節物質(EDBRM)を含む免疫モジュレーターの使用である。EDBRMは化学的に多様で、ステロイド性ラクトン、フェニルクロモン、トリテルペノイド、ビス-ベンジルイソキノリンなどが含まれるが、EDBRMとして化学的に出現した最も著名な群は多糖である。植物由来の多糖が免疫調節応答を引き起こすと考えられる提案されたメカニズムは、免疫系によって発現される多様なパターン認識受容体の1つまたはそれ以上を誘発することによるものである。
【０２４６】
免疫調節活性は水性抽出物にのみ存在し、ヘキサン、クロロホルムおよびメタノール抽出物には全く存在しないことを見出した。このことは、これは、活性成分が本質的に極性であることを示している。本発明者らは、その活性が、一般に生物学的試料を汚染することができるグラム陰性細菌からのエンドトキシン汚染物質の結果である可能性を考えた。エンドトキシン汚染物質の存在は、LALアッセイによって直ちに除外した。エタノール沈殿により、水性抽出物から淡褐色の沈殿が単離され、これがこの免疫調節活性の源であることが確認された。Molisch試験では多糖の存在が示され、これはIRスペクトロスコピーによって確認された。EXAP画分のタンパク質含有量は無視してよく、免疫調節活性に関与しているとは考えにくいことを見出した。水性抽出物の総多糖含有量(% wt.)は、マルバセアエ(Malvaceae)ファミリー全体として観察された免疫調節活性と相関していた。マルベアエ(Malveae)族の多糖のプロファイルは、それらが同じ9つの単糖を含んでおり、それらの比率には多少の違いはあるものの、これは免疫調節活性に実質的な影響を与えないことを証明している。しかし、同じマルボイデアエ(malvoideae)のサブファミリー内の族に由来する免疫調節活性を有しない種は、全く異なる単糖プロファイルを有していた。例えば、ヒビスクス・ロサ-シネンシス(Hibiscus rosa-sinensis)には単糖が6個しか存在せず、そのうちの単糖含有量の９６％は、グルコース(６７％)、ガラクトース(２１％)およびアラビノース(８％)の3つの糖だけで構成されていた。これは、例えばグルコース(２２％)、アラビノース(８％)、ラムノース(１８％)、リボース(２％)、キシロース(１％)、ガラクツロン酸(１％)、ガラクトース(２８％)、マンノース(６％)、ウロン酸(１４％)を含むシダルセアエ・ マルビフロラ(Sidalcea malviflora)よりも多様性がはる

かに低い。同様に、活性を有していなかったボンバコイデアエ(Bombacoideae)のサブファミリーのラグナリア・パテルソンニイ(Lagunaria patersonnii)も、単糖プロファイルの多様性がはるかに低かった。単糖は6種類しか存在せず、単糖の総含有量の94%はグルコース(33%)、ガラクトース(50%)およびガラクツロン酸(9%)の3糖だけである。多糖の単糖組成は、免疫調節活性に極めて重要である。植物由来の多糖の大部分は、マクロファージの活性化を介して免疫系を調節すると考えられる(Schepetkin & Quinn 2006)。この実施例の結果では、マルベアエ(Malveae)から単離された多糖がインビトロでいくつかのマクロファージ機能を活性化する能力を実証している。活性化マクロファージによるNOの濃度依存的な放出は、代替的に活性化されたマクロファージがiNOSの誘導をもたらさないことから、マクロファージが標準的に活性化されることを示唆している。さらに、マクロファージの標準的な活性化は、免疫系をT_H1介在応答に向かわせるエフェクター細胞であることを強く示唆している。この結果、一般に、細菌、真菌、原虫およびウイルスに対する殺菌作用が活性化される。これらの応答は、マクロファージの活性化をもたらし、これは、iNOSの誘導による活性酸素種と活性窒素種の産生、および本実施例で観察された飲作用率(pinocytic rate)の上昇につながる。マクロファージは一旦活性化されると、T_H1介在免疫応答を誘導するサイトカインを分泌し始め、ここで、ナイーブCD4+T細胞がT_H1エフェクター細胞に分化し、その結果、炎症促進性サイトカインが分泌される。これらの炎症促進性サイトカインは、その後、顎口虫類においてより特異的な適応免疫応答の活性化を開始し、例えば、マクロファージの活性化は、適応免疫反応の必須成分であるTリンパ球(CD8+)の活性化に不可欠なコスト刺激シグナルとして機能するB7-1(CD80)およびB7-2(CD86)タンパク質の発現をもたらす。ガレリア・メロネラの幼虫(Galleria mellonella larvae)は、高度に保存されたPAMPsを検出する能力も有していることから、節足動物の自然免疫の刺激を研究するための原始的な節足動物モデルとして使用した。この幼虫モデルを用いて、自然免疫反応に対するマルベアエ(Malveae)ファミリーの多糖濃縮画分の刺激作用を実証した。このことは、多糖濃縮画分が直接的な抗菌活性を有しない(≦16mg/ml)ことが示されたことを考慮すると、血球の増加(図34)、およびガレリアの幼虫の感染抵抗能力と細菌量の減少(図35)によって明らかであった。したがって、観察された細菌量の減少の唯一のもっともらしい説明は、自然免疫系の直接的な活性化である。T_H1エフェクター細胞の特徴は、サイトカインであるTNF-αおよびIFN-γである。TNF-αは、創傷治癒に不可欠な因子として関与している。これは、線維芽細胞の増殖と血管形成を誘導する。このことは、マルベアエ(malveae)属が創傷治癒の促進剤として伝統的に応用されてきたことを説明し得る。一方、IFN-γは、オプシン化および補体結合反応のための抗体のB細胞産生を誘導する。本実施例における免疫グロブリン(IgG、IgMおよびIgA)の増加は、IFN-γのレベルの向上の結果であるかもしれない。抗体の総レベルの向上および自然免疫応答の刺激は、マルベアエ(Malvea)族に関連する抗毒作用としてマルベアエ(Malvea)属の属を伝統的に使用する原因となっている可能性がある。

【0247】

最後に、B細胞(50～60%)、T細胞(30%)およびマクロファージ(5%)からなるマウス脾細胞の増殖に対して、マルベアエ(Malveae)の水抽出物から分離したマルベアエ(Malveae)多糖が非常に強力な効果を示したことは特筆すべきことである。マクロファージ細胞株(RAW 264.7)を用いた増殖アッセイでは増殖を示さなかったため、集団サイズの変化はB細胞とT細胞で大きく生じたと考えられる。

【0248】

結論

植物由来の多糖は比較的に無毒であり、微生物源由来の多糖に関連するアナフィラキシーを誘発しない傾向がある。この実施例では、マルベアエ(Malveae)の種から単離された多糖が顕著な免疫調節活性を有し、それが抗原提示細胞の刺激とそれに伴うT_H1経路の促進をもたらす可能性があることが証明された。T_H1経路の活性化は、感染を迅速に排除するのに役立つ殺生物活性の増加を促進する。この能力は、自然免疫系の節足動物モ

デルのインビボ細菌チャレンジによって検証された。このことから、マルベアエ(Malvae)のサブファミリーの植物は、細菌感染の予防または抵抗に利用できることが明らかとなり、それ自体がかなりの治療的潜在性をもたらす可能性がある。

【０２４９】

実施例4-シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)の免疫調節活性

本発明者らは、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)の水性抽出物から多糖濃縮画分を分画し、特徴づけた。。彼らは、多糖の生物活性誘導分画を行い、多糖の単糖の一部を同定し、トール様-4受容体(TLR4)に対する精製抽出物の影響を探索した。精製抽出物はTLR4経路を活性化しないことを見出した。

【０２５０】

方法

植物材料の抽出

シダ・コルジホリア(Sida cordifolia) L radixは、インドのKarnatakaで採集され(2012年)、Pukka Herbs、Bristolから寄贈され、証拠標本はDBN Economic Collections, Glasnevin Herbarium Dublin (DBN 06:201261)に預けた。植物の根をイソプロパノールと水で洗浄した。凍結乾燥した根をIKA(登録商標)A11分析ミル(IKA(登録商標) Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)を用いてホモジナイズして細粉にした。粉末(200g)をn-ヘキサン、クロロホルム、メタノールおよびddH2Oに室温で24時間、順次浸漬した。n-ヘキサン、クロロホルムおよびメタノール抽出物を45℃に設定したロータリー蒸発装置を用いて減圧下で濃縮し、水性抽出物を4500rpmで15分間遠心分離した後、凍結乾燥し、抽出物をそれぞれ0.092g、54.32g、16.4gおよび62.2gと秤量した。凍結乾燥水性抽出物(62.2g)中の多糖は、20mlのddH20 10gに溶解し、次いでエタノール沈殿(abs.) (1:4 v/v)を一晩行うことによって凍結乾燥水性抽出物から抽出した。得られた沈殿を遠心分離によりペレット化し、上清を廃棄した。凍結乾燥ペレットの収量は2.356g(凍結乾燥水性抽出物の23.56%)であった。

【０２５１】

多糖の分画

上記で得られた粗多糖画分(2.00g)を、ddH20で予め平衡化したDEAE™ Sephadex A-50 (弱陰イオン交換体)(GE Healthcare)カラム(30x2.5)でさらに分画した。溶出は、イオン強度が増加する低(0mol/l)、中(0.75mol/l)および高(2mol/l)NaOHのNaCl溶液を用いて段階的に行った。得られた画分を凍結乾燥し、秤量したところ、それぞれ0.089g、0.251gおよび1.412gを得た。画分をVivaspin™分子量カットオフ(MWCO)フィルター(Sartorius, Goettingen Germany)を用いて分子サイズに応じてさらに分画した。簡単に説明すると、凍結乾燥した抽出物を50mg/mlの濃度でddH20に溶解し、100kDaのMWCOフィルターにロードして遠心分離した(2000g；1時間)。100kDaのMWCOフィルターに残った残渣を、水に溶解(200μl)およびすすぐ(100μl)ことによって1.5mlのエッペンドルフチューブに回収した。この操作を、すべてのイオン交換クロマトグラフィー画分(低、中および高)に対して繰り返した。10kDaのMWCOフィルターからの溶出液は集めたが、その後、すべてが不活性であると確定された時点で廃棄した。

【０２５２】

上記の工程で得られた画分は、SCAF0(S.コルジホリア(S. cordifolia)の多糖粗製画分)；SCAF1：低イオン強度、＜100kDa(56.1mg)；SCAF2：中イオン強度、10～100kDa(142.6mg)；SCAF3：中イオン強度、＜100kDa(72.5mg)；SCAF4：高イオン強度(2mol/l)、10kDa～100kDa(532.6mg)およびSCAF5：高イオン強度、＜100kDa(786.7mg)。

【０２５３】

リンパ球細胞の調製

すべての動物処置は、動物科学処置法(1986年)およびQueen’s University Belfastの研究ガバナンスポリシーに従って行った。成体雌のbalb/マウスは、Queen's Univ

ersity BelfastのBiological Response Unitから供給され、頚椎脱臼により犠牲にした。脾臓を無菌的に取り出し、1%ペニシリン・ストレプトマイシンを含むかウシ胎児血清は含まない5mlのRPMI-1640培地に保存した。脾臓を5mlの培地中で穏やかに引き裂き、無菌鉗子を用いて余分な脂肪組織と脾臓の被膜を除去した。脾臓を無菌40μmナイロン製セルストレーナーでRPMI1640培地に押し込み、リンパ球細胞懸濁液を調製した。自動血球計数器(Countess(登録商標)自動血球計数器、Invitrogen)を用いて、0.4%トリパンブルーで生細胞を計数した。細胞密度は$2x10^6$細胞/mlに調整した。100μlの細胞懸濁液を96ウェル(BD Falcon)マイクロタイタープレートの播種に使用し、$2x10^5$/ウェルとした。上記はすべて、汚染を防ぐために生物学的安全キャビネット内で、37℃、5%CO_2加湿インキュベーター内で72時間、無菌条件下で行った。

【0254】

リンパ球増殖アッセイ

S.コルジホリア(S. cordifolia)画分SCAF0～SCAF5の対数的希釈を、抽出物の2mg/mlの原液を用いて、10%ウシ胎仔血清を含むRPMI培地中で0ng/ml～2mg/mlの濃度範囲で行った。各希釈液(100μl)を、播種した96ウェルプレートに3回添加することで、最終濃度を1mg/ml～10ng/mlトした。リンパ球のマイトジェンとして知られているカナバリア・エンシホルミス(Canavalia ensiformis)(Sigma-Aldrich)から単離したコンカナバリンA(Concanavalin A)(5μg/ml)を陽性対照として使用した(Beckert & Sharkey 1970)。脾細胞の増殖は、AlamarBlueを用いて測定した。製造説明書に従って、10%(20μl)AlamarBlue溶液(Invitrogen™, Life Technologies, UK)を各ウェルの細胞培地に添加し、さらに24時間インキュベートした。ウェルの光学密度は、Tecan Safire2マイクロプレートリーダー(Tecan, Switzerland)を用いて、λ570nmで測定した。結果は、式：PI＝OD(λ570)刺激されている細胞/OD(λ570)刺激されていない細胞を用いて増殖指数(PI)を用いて示した。

【0255】

体液性免疫、ELISAによる免疫グロブリン分泌の定量化

免疫グロブリン産生を調節する脾細胞(Bリンパ球)の能力に対する多糖画分SCAF0～SCAF5の作用を、サンドイッチ酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を用いて評価した。簡単に説明すると、脾細胞を抽出物とインキュベートした。48時間後、96ウェルプレートを300gで10分間遠心分離し、次に、各ウェルから150μlの上清を注意深く吸引し、別の96ウェルプレートに移し、-20℃で保存した。IgA、IgGおよびIgM抗体についてELISAアッセイを行った。インキュベーションが完了した後、プレートをELISA洗浄溶液で3回洗浄し、プレートを1ウェルあたり100μlの西洋ワサビペルオキシダーゼ-結合ヤギ抗マウスとさらに60分間インキュベートした。さらに洗浄した後、ウェルごとに3,3,5,5'テトラメチルベンジジン(TMB)(Sigma-Aldrich)を含む基質溶液を添加することによってプレートを展開した。ウェル当たり2M硫酸100μlを添加することによって反応を停止させ、Tecan Safire2マイクロプレートリーダーを用いて吸光度(λ450nm)を測定した。

【0256】

細胞培養(RAW264.7)

細胞株RAW264.7由来のマウスマクロファージを、European Collection of Cell Cultures(ECACC)から購入した。この細胞は、75cm^2の培養フラスコ中で、10%熱不活性化FBS、100u/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを含むダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)中で培養した。細胞を5%CO_2存在下、37℃でインキュベートした。すべての細胞培養作業は、汚染を防ぐために生物学的安全性キャビネットの中で無菌状態で行った。

【0257】

マクロファージ増殖アッセイ

細胞を、1mg/ml～10ng/mlの範囲の濃度のS.コルジホリア(S. cordifolia)画分SCAF0～SCAF5の画分とともに、$1x10^5$細胞 ml($1x10^4$細胞/ウェル)の播種密度で96-

ウェルマイクロタイタープレートに播種した。既知のマクロファージのアクティベーターであるリポ多糖(LPS)(Sigma-Aldrich)(1μg/ml)を陽性対照として使用した。プレートをインキュベートし(5% CO_2；37℃；24時間)、マクロファージ増殖をAlamarBlue(Invitrogen™, Life Technologies, Paisley, UK)を用いて測定した。

【０２５８】

亜硝酸塩濃度の測定

生成されたNO_2の量を測定するために、インキュベーション後に、96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルから50μlの培地を吸引し、新しい96ウェルマイクロタイタープレートに移し、そこに5%リン酸中の1%スルファニル酸50μlの溶液を添加し、室温で10分間インキュベートした。その後、0.1%N-(1-ナフチル)エチレンジアミンジヒドロクロライドからなる溶液50μlを添加し、室温でさらに20分間インキュベートした。NO_2-の濃度は、Tecan Safire2マイクロプレートリーダーを用いて比色分析(λ550nm)で測定した。標準0.1M亜硝酸ナトリウム($NaNO_2$)を用いて段階希釈液(1～100μM)を作成し、標準曲線によってNO2-を定量した。

【０２５９】

ニュートラルレッド貪食作用アッセイ

NR結晶0.1gを100mlの無菌リン酸緩衝液(pH7.2)に溶解することによって0.1%ニュートラルレッド(NR)溶液を調製した。次に、溶液を注射器フィルターを用いて濾過することで、不溶性結晶を除去し、均質性を確保した。アッセイは、実施例3に記載のように行った。画分SCAF0～SCAF5(1mg/ml～0.1ng/ml)でのインキュベーション後(24時間)、0.1%NR溶液20μlをウェルに添加し、インキュベーションした(6時間)。上清を注意深く吸引して廃棄し、ウェルをPBS200μlで2回洗浄した。細胞溶解液(50% abs.エタノール、49%脱イオン水および1%氷酢酸)100μlを添加することによって細胞を溶解し、室温でインキュベートし(2時間)、Tecan Safire2マイクロプレートリーダーを用いて光学密度(540nm)を測定した。

【０２６０】

LALアッセイ(エンドトキシン検出)

アッセイは、メーカーPyrosate(登録商標)(CapeCod)が提供したプロトコルに従い、実施例3に記載のように行った。

【０２６１】

TLR4阻害アッセイTAK-242(Resatorvid)

TAK-242は、トール様受容体(TLR)4の特異的阻害剤である小分子であり、TLR4の細胞内ドメインのCys747に結合することによって炎症促進性メディエーターの産生を阻害する。これにより、TLR4とそのアダプター分子であるToll/IL-1受容体ドメイン含有アダプタータンパク質(TIRAP)およびインターフェロン-β関連アダプター分子を誘導するToll/IL-1受容体ドメイン含有アダプタータンパク質(TRAM)との相互作用を阻害する。その結果、炎症促進性サイトカインの産生をもたらす下流シグナル伝達を含めてLPS誘導シグナル伝達が阻害される(Matsunaga et al. 2011)。TAK-242は、1.1～11nMの範囲のIC_{50}を有すると報告されている(Ii et al. 2006)。RAW 264.7を実施例3に記載のように調製し、続いて2枚の96ウェルマイクロタイターのプレートに1×10^5細胞/ウェルの密度で播種した。S.コルジホリア(S. cordifolia)画分(100μl)SCAF0およびSCAF5(1～0.001mg/ml)を1つのプレートに3回添加した。陽性対照は1ng/mlのLPSとし、陰性対照は100μlのDMEM培地とした。残りのプレートも同様に配置した。しかしながら、画分SCAF0およびSCAF5、ならびに陽性(LPS 1ng/ml)および陰性(中程度)画分はすべて、10nMの濃度のTAK-242を含んでいた。プレートを、5%CO_2、37℃のインキュベーター内で18時間インキュベートした。インキュベーション後、Griess試薬を用いて亜硝酸塩濃度を測定した。

【０２６２】

ガレリア・メロネラ

ガレリア・メロネラの幼虫(Livefoods Direct)を、25℃(暗黒)の人工飼料で飼育し

、実験中は37℃のインキュベーターで無菌ペトリ皿(5cm)に維持させた。実験群は、250～300mgの体重の幼虫(最終齢)10匹で構成されていた。

【０２６３】

ガレリア・メロネラの免疫応答

1mg/ml、0.1mg/mlおよび0.001mg/mlの濃度の画分SCAF0およびSCAF5を、無菌条件下でPBS中で調製した。Terumo Myjector 1ml 29G 0.33x12mmを用いて、各群の幼虫の背外側部位の腹脚(左)を介して抽出物の20μlアリコートを血体腔に注射し、その後幼虫を24時間インキュベートした。インキュベーション後に血リンパを取り出し、血球計算器を用いて血球を数え上げた。

【０２６４】

SCAF0～SCAF5に予め暴露した幼虫の細菌量

SCAF0およびSCAF5(0.001mg/ml、0.1mg/mlおよび1mg/ml)を、無菌条件下でPBS中で調製した。Terumo Myjector(1ml 29G 0.33 x 12 mm)を用いて、各群の幼虫の背外側部位の腹脚(左)を介して抽出物の10μlアリコートを血体腔に注射し、陰性対照群にはPBSを注射した。幼虫は37℃に設定したインキュベーターに24時間配置した。水性抽出物の投与から24時間後に、各群にMRSA(ATCC 43300)を感染させ、Ramarao et al.(2012)に記載のプロトコルに従って接種実験を行った。接種材料の密度は、0.5マクファーランド濁度標準(McFarland turbidity standard)の光学的等価値に標準化し、λ600nmでの吸光度が0.06～0.10nmで、107cfu/mlに対応し(Andrews 2001)、その後PBSで希釈し、1×105CFU/mlの濃度の接種材料を作成した。感染した幼虫に、背外側部位の腹脚(右)を介して投与した(注射容量20μl(2x103CFU))。接種した幼虫を37℃のインキュベーターで24時間維持させた。幼虫の感染に使用した細菌接種材料を段階的に希釈して、各希釈液20μlをミューラー・ヒントン寒天プレートにプレーティングし、37℃で24分間インキュベートするミスラ法(Miles and Misra Method)(Miles et al. 1938)を用いて接種材料のサイズを確認した。接種材料の濃度は、1.1x10^{5}CFU/mlとして計算された。感染後24時間、48時間および７２時間で、各群から3匹の幼虫を取り出し、血リンパ中の細菌量を、血リンパを排出し、希釈することによって測定した。血リンパのCFU/mlは、ミスラ法法を用いてCFUを計算することによって測定した。

【０２６５】

SC1およびSC2の投与による幼虫の細菌量への作用

幼虫(群あたり10匹の幼虫、体重250～300mg)を、1mlのTerumo Myjector注射器(29G 0.33×12mm)を用いて、左腹脚を介して背外側部位を介してMRSA(ACTCC 4330)(10μl、1.1×105CFU/ml)に感染させ、その後、幼虫を6時間インキュベートした。インキュベーション後の幼虫に化合物SC1およびSC2を投与し、その後幼虫を37℃のインキュベーター内で48時間維持させた。次に、血リンパを取り出し、前述のようにミスラ法を用いてCFUを計算することによって血リンパのCFU/mlを測定した。

【０２６６】

GC-MS分析

SCAF0およびSCAF5(100mg)を、密閉した25mlフラスコ中で1Mトリフルオロ酢酸(TFA)(Sigma-Aldrich)10mlを用いて105℃で7時間加水分解し(Uzaki & Ishiwatari 1983)、次に凍結乾燥した。試料(2mg)を、無水ピリジン1ml中の1%トリメチルクロシラン(Sigam-Aldrich)を含むN,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (BSTFA)500μlとのシリル化反応によって誘導体化した。反応は室温で12時間行った。GC-MS分析は、ZB半揮発性カラム(30m x 0.25mm x 0.25μm Zebron^{TM} Phenomenex Inc)を備えた、質量選択検出器(Agilents 5975C)と接続させたガスクロマトグラフィー(Agilent 7890A)を用いてヘリウムを担体ガスとして1ml/分の一定速度で行った。注射器とMS源の温度はそれぞれ260℃と230℃に維持させた。カラム温度プログラムは、80℃での注射と1分間の保持、300℃までの毎分15℃の昇温、その後300℃での15分間の等温保持からなるものとした。MSは、イオン化エネルギー70eVの電子

衝撃モードで動作した。スキャン範囲は、質量スキャンレンジ50～550Daに設定した。注射容量は1μl、注射口は20ml-1の分流(分割比20：1)とした。データの取得と処理は、Chemstationソフトウェア(Hewlett Packard)を用いて行った。モノマーの同定は、クロマトグラフィーの保持特性および標準物質に対する質量スペクトル、およびNISTマススペクトルライブラリー(National Institute of Standards and Technology、米国)で比較することによって行った。

【０２６７】

リアルタイム定量PCR(RT-qPCR)

RNA試料の調製

マウス脾細胞懸濁液を上記のように調製した。細胞を6ウェルCorning(登録商標)細胞培養プレートに2×10^6細胞/mlの密度で播種した。マウスマクロファージ(RAW 264.7)を、実施例3に記載のように培養した。細胞を5×10^5細胞/mlの密度で播種した。その後、1.5mlのS.コルジホリア(S. cordifolia)画分SCAF0およびSCAF5を、1mg/mlおよび0.1mg/mlの濃度で、播種プレートのウェルに3回添加した。陽性対照は1ng/mlのLPS、陰性対照は1.5DMEMまたはRPMI培地とした。プレートを37℃で24時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をセルスクレーパ用いてウェルから穏やかに除去し、上清をプレートから吸引して無菌ユニバーサルチューブに移した。各試料の3つを同じユニバーサルチューブにプールした。各チューブで細胞の総数を測定し、その後の調整を行った結果、最終的な細胞密度は脾細胞およびRAW264.7細胞でそれぞれ、1.5 $x10^6$細胞/mlおよび$3x10^5$細胞/mlとなった。次に、ユニバーサルチューブを300gで15分間遠心分離し、上清を吸引した。RNAを、Qiagen RNeasy Mini kit(Qiagen LTD, Manchester, UK)を用いて単離した。簡単に言うと、1%v/vのβ-メルカプトエタノールを含む600μlのRLT溶解バッファー(グアニジニウムチオシアネート含有溶解バッファー)(Qiagen)を、細胞ペレットの入ったユニバーサルチューブに添加し、細胞をホモジナイズした。次に、溶解液をRNAaseフリーのエッペンドルフチューブに移し、次にチューブをベンチトップのMiniSpin Eppendorf centrifuge(Eppendorf UK LTD, Stevenage, UK)のminispinで10,000gで、3分間遠心分離した。その後、上清を1.5mlのエッペンドルフチューブに移し、そこに70%エタノール600μlを添加した。その後、試料700μlを2mlのコレクションチューブに入れたスピンカラムに移し、10000gで1分間遠心分離した後、残りの試料をスピンカラムに通過させた。

【０２６８】

次に、スピンカラムを清潔なコレクションカラムに移し、濾液を廃棄した。次に、700μlのRW1緩衝液を、10000gで1分間遠心分離し、次いで500μlのRPE緩衝液を、10000gでカラムで遠心分離し、次いでさらなる500μlのRPE緩衝液を10000gで2分間遠心分離し、次いで11000gでさらに1分間遠心分離することによってスピンカラムを通過させた。50μlのRNaseフリー水を添加し、10000gで遠心分離することにより、カラム膜からRNAを溶出させた。

【０２６９】

試料をTURBO™ DNase(Life Technologies)で簡単に処理することにより、RNA試料からゲノムDNAを除去した。10X TURBO DNase緩衝液(DNase酵素の最大活性に必須の二価陽イオンCa2+およびMg2+を含む)を1X濃度で添加し、次いで1μlのTURBO DNase(2U)を添加し、チューブを37℃で30分間インキュベートした。単離されたRNAの純度は、260nmと280nmでの吸光度の比を用いて評価し、NanoDrop 2000c分光光度計(Thermo Scientific, Loughborough, UK)を用いて定量し、試料の比率は、すべての試料で2.0～2.1として計算された。RNA試料は、cDNA合成前に-80℃で保存した。

【０２７０】

逆転写、cDNA合成

RNA濃度は、NanoDrop 2000cを用いて260nmでの吸光度により定量した。その範囲は167.1ng/μl～08.8ng/μlと確定した。RNAの濃度は、cDNA合成の前にRNase

フリー水を用いて150ng/μlに調整した。Transcriptor First-Strand cDNA合成キット(Roche Diagnostics Ltd, Sussex, UK)を用いて、ランダムヘキサマープライマーを用いて逆転写を行い、逆転写はメーカーのプロトコルに従って3回行った。すべての反応に使用したRNA濃度は1μgとした。転写反応は、Eppendorf Mastercyclerで行った。反応設定は、25℃で10分間、55℃で30分間、最後に85℃で5分間加熱することによって逆転写酵素を不活性化した。

【0271】

RT-qPCR

RT-qPCRは、定量的リアルタイムPCR実験の公開に関する最小情報(Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, MIQE)ガイドライン(Bustin et al. 2009)に従って行った。正規化のための参照遺伝子を決定するには、遺伝子の発現の安定性が実験要因下で変化していなければならない(Kozera & Marcin 2013)。その結果、β-アクチン、β-2-ミクログロブリン(B2M)、グリセルアルデヒド3-ホスフェート(GADPH)、ヒドロキシメチルビランシンターゼ(HMBS)およびヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPRT1)の安定性を試験した。HPRT1は最も安定した遺伝子であることが同定され、その発現は変化しないため、参照遺伝子として使用し、アッセイの正規化に使用した。2-工程Sybr Greenアッセイで90～110%の効率が公表されているライマー配列が同定され、プライマーの設計に使用した。増幅後、プライマーダイマーアーチファクトについて融解曲線を検査し、反応特異性を確保し、1.0%アガロースゲルでのRT-PCR産物の電気泳動により、予測されたサイズのアンプリコンの存在と非特異的増幅産物の非存在が明らかになった。

【0272】

【表4】

表4:アッセイに使用されるプライマー(順方向および逆方向)

遺伝子	順方向	逆方向
IL-1a	GGAAGATTCTGAAGAAGAGACGG	TGAGATTTTTAGAGTAACAGG
IL-1b	TGTCTGAAGCAGCTATGGCAAC	CTGCCTGAAGCTCTTGTTGATG
IL-6	TCTTGGGACTGATGCTGGTG	CAGAATTGCCATTGCACAACTC
IL-10	AATTCCCTGGGTGAGAAGCTG	CATGGCCTTGTAGACACCTTG
1L-12 p35	TGG ACC TGC CAG GTG TCT TAG	CAATGTGCTGGTTTGGTCCC
IL-12 p40	AAGAAGGAAAATGGAATTTGGTCC	ATGTCACTGCCCGAGAGTCAG
TNF -	CTCAGCCTCTTCTCATTCCTGC	CCATAGAACTG ATGAGAGGG
IFN-γ	AGCAACAGC AAG GCG AAA A	CTGGACCTGTGGGTTGTTGA
IFN-β	CGTGGGAGATGTCCTCAACT	AAGATCTCTGCTCGGACCAC
iNOS	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG
(HPRT1)	GAGGAGTCCTGTTGATGTTGCCAG	GGCTGGCCTATAGGCTCATAGTGC

【0273】

PCR反応は、100ngのcDNAテンプレート、各0.25μMの順方向プライマーおよび逆方向プライマー(表4を参照)、12.5μlのQuantiTect SYBR Greenマスターミックス(Qiagen LTD, Manchester, UK)、9.25μlのH20(RNaseフリー)を含む23μlの反応物として行った。反応は、サーマルを用いてLightCycle(登録商標)480システム(Roche Diagnostics Ltd, Sussex, UK)システムで次の条件下で行った:94℃で15秒間の変性、58℃で1分間のアニーリングおよび72℃での伸長の45サイクル。1.0%アガロースゲルでのRT-PCR産物の電気泳動により、予測されるサイズのアンプリコンの存在が明らかになった。

【0274】

結果の定量化は、対象遺伝子を参照遺伝子(HPRT1)に対して正規化した、次いで処理

した試料(TRT)のCt値をキャリブレーターとして機能する試料(CTL)(未処理細胞)と比較する比較Ct法を用いて、以下の方式(Pfaffl 2001)で行った。

【数１】

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\,(TNF\alpha TRT - HPRT1TRT) - \Delta Ct\,(TNF\alpha CTL - HPRT1CTL)$$

$$倍率変化 = 2(-\Delta\Delta Ct)$$

【０２７５】

結果

リンパ球アッセイ

リンパ球増殖アッセイ

リンパ球を用いて行った増殖アッセイの結果を図36に要約する。SCAF3およびSCAF5では、刺激活性の濃度依存的な増加が明らかであった。

【０２７６】

抗体分泌

脾細胞を含むウェルから上清を収集し、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)水性抽出物の画分とともにインキュベートし、抗体分泌を測定した。IgG、IgMおよびIgAの抗体分泌アッセイの結果をそれぞれ図37、図38および図39に示す。SCAF3およびSCAF5では、刺激活性の濃度依存的な上昇が観察された。

【０２７７】

マクロファージアッセイ(RAW 264.7)。

貪食作用アッセイ。

ニュートラルレッド貪食作用アッセイの結果を図40に示す。SCAF5では活性の濃度依存的な上昇が観察された。

【０２７８】

一酸化窒素(NO)の生成

一酸化窒素(NO)の生成は、比色分析法(Griess反応)を用いて、培養上清中の安定な生成物である亜硝酸塩の蓄積として測光的に検出し、測定し、定量化した。NOの上昇は、RAW264マクロファージ細胞の活性化の明確なインジケーターである。SCAF5では活性の濃度依存的な上昇が観察されました(図41、図51および図52)。RAW264.7細胞における一酸化窒素生成を刺激するための多糖の半数効果濃度は約8μg/mlである。これらの細胞では、多糖は約25μg/mlで最大応答に達する。

【０２７９】

サイトカイン産生

多糖は、マクロファージとミクログリアに免疫応答に関連するサイトカインを放出させた。マクロファージは、本発明による多糖との接触に応答して、濃度依存的にIL-6およびTNFαを産生する(図53を参照)。

【０２８０】

多糖はまた、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に免疫応答に関連するサイトカインを産生させるか、または抑制させた。HUVECは多糖との接触に応答してIL-8を放出し、本発明による多糖との接触に応答してMIGの放出を抑制した(図54参照)。

【０２８１】

考察

本実施例は、S.コルジホリア(S. cordifolia)からの精製抽出物が免疫調節活性を有することを示す。この二重の活性により、S.コルジホリア(S. cordifolia)は非常にユニークであり、感染の処置および/または予防に非常に有用となる。この研究では、免疫調節活性の源を単離して研究した。免疫調節活性は多糖の構成成分に由来することが同定され

た。

【０２８２】

免疫調節

実施例3における最初のスクリーニングにより、免疫調節活性は水性抽出物に由来することが同定され、さらに分画を行ったところ、この活性は水性抽出物(SCAF0)に含まれる多糖に由来することが同定された。SCAF0の活性を粗水抽出物の活性と比較すると、SCAF0の方が高い活性を示した。本実施例では、SCAF0をイオン交換クロマトグラフィーによりさらに分画した。イオン交換クロマトグラフィーで得られた画分を、分子サイズによってさらに分画した。SCAF5と称される画分が最も大きな免疫調節活性を有することが見出された。SCAF5のこの刺激活性は、100μg/mlの陽性対照レクチンであるコンカナバリンAよりも強いことが観察された。この観察は、観察されたIgG、IgMおよびIgAレベルの上昇や、マクロファージの活性化および貪食作用の刺激を示す研究によって完全に裏付けられている。SCAF5は高いイオン強度を有し、分子サイズは100kDa以上である。行った電気泳動研究では、多糖のサイズの範囲が100kDa～150kDaであることを示している。10～100kDaの分子量範囲のSCAF2およびSCAF4はより中等度の活性プロフィールを示したことから、多糖のサイズが免疫調節活性の重要な決定因子であることを示唆している。SCAF4はニュートラルレッド貪食作用アッセイで応答を引き起こしたが、SCAF2もSCAF4もマクロファージでの亜硝酸塩産生に有意な影響を与えず、したがってこれらの画分の活性が弱いことが一致した。SCAF5の強力な活性は、Galleriaモデルでインビボで試験した。SCAF5では、血リンパ中の血球の著しい増加が観察された。

【０２８３】

さらに、GalleriaモデルにSCAF5を投与することにより、幼虫はMRSA感染の成立を予防することができた。この効果は用量依存的であった。

【０２８４】

SCAF5刺激によるマクロファージでのNO産生は、RT-qPCR分析により確認され、iNOS発現が2.1倍増加した。iNOSの発現とNO産生の増加は、T_H1介在応答を示している(Lawrence & Hagemann 2012, Stuehr & Marletta 1985)。T_H1介在応答は、殺菌性(すなわち、活性酸素種の産生による呼吸バースト)に寄与する。T_H1応答の活性化は、マクロファージの貪食活性の増加が観察されたことからも裏付けられた。T_H1介在応答のためのより決定的な証拠は、RAW264.7細胞およびマウス脾細胞の両方でサイトカインの発現が増加したことである。通常T細胞と活性化マクロファージから分泌される炎症促進性イトカインであるIL-6の発現により、脾細胞およびマクロファージにおいて、SCAF5によってそれぞれ4.2倍および3.3倍増加した。

【０２８５】

T_H1介在免疫応答の特徴であるIL-6は、PAMPに応答してマクロファージによって分泌される。感染におけるIL-6の重要性は、IL-6遺伝子を欠くC57B1/6マウスが肺炎球菌性肺炎(連鎖球菌性肺炎)に対する防御力を低下させるというインビボモデルを用いて以前に実証されている(Poll et al. 1997)。SCAF5がT_H1介在免疫応答を引き起こすことを強く示唆するさらなる証拠は、T_H0(ナイーブT細胞)のT_H1細胞への分化に関与するIL-12の発現が増加した結果、活性化T細胞およびNK細胞からのIFN-γおよびIFN-γの産生がもたらされたことである(Jacobson et al. 1995)。SCAF5は、脾細胞およびRAW264.7細胞においてそれぞれTNF-αを1.2倍および2倍増加させた。TNF-αは、単球、マクロファージ、Tリンパ球、Bリンパ球およびNK細胞などの多くの種類の細胞によって産生される。活性化マクロファージの特徴であるTNF-αは、創傷治癒、組織のリモデリングにも関与し、血管形成を示す(Leibovich et al. 1987)と同時に線維芽細胞の増殖を促進する(Battegay et al. 1995)。TNF-αは、IL-1およびIL-6とともに、微生物上で発現するホスホコリンに結合するC反応性タンパク質を含む、肝臓からのタンパク質の放出の促進にも関与していると考えられており、その結合により補体が活性化され(Black et al. 2004)、結果的に病原体の除去をもたらす。SCAF5に応答した脾細胞でも、それぞれIFN-γとIFN-βの2.5倍と2.4倍の増加が観察された。IFN-γは活性化T

リンパ球とナチュラルキラー細胞に特徴的であることから、これは脾細胞集団の中に活性化T細胞とNKが存在することを示しており、IFN-γは抗増殖および抗ウイルス性質を有し、単核食細胞の強力なアクティベーターであるため、細胞内微生物を破壊する能力を向上させる(Huang et al. 1993)。IFN-γを欠くマウスは、亜致死量でもマウスにおいて致死することが示された細胞内病原体であるウシ結核菌を含む病原体の亜致死量によって犠牲にした(Dalton et al. 1993)。IFN-γと同様に、IFN-βもまた抗ウイルス活性を示す(Damme et al. 1987)。IL-1βの発現における2.5倍および2.4倍の増加もまた、RAW 264.7細胞および脾細胞の両方においてSCAF5で観察された。食細胞から分泌されるIL-1はリンパ球活性化因子として、リンパ球のマイトジェンとして働き、また病原体に対する非特異的抵抗性にも関与している。IL-1はIL-12、IL-6、IFN-γ、IFN-βおよびTNF-αと同様にコルチコステロイドによって抑制されることが示されている(Miyaura & Iwata 2002, Lew et al. 1988)。これらの炎症促進性サイトカインを増加させるSCAF5の能力は、T_H1介在応答の刺激剤として使用する正当な理由であるかもしれない。RAW264.7および脾細胞培養の両方でIL-10の発現に変化がなかったことから、T_H1介在免疫応答が提唱されていることのさらなる証拠が得られた。SCAF0～5にエンドトキシン(LPS)が含まれていないことは、LALアッセイによって確認された。さらに、TAK-242がマクロファージの活性化を阻害できないことは、TAK-242およびLPSの存在下でインキュベートした細胞が不活性化されたことから確認された。このことから、マクロファージの活性化をもたらすパターン認識受容体(PRR)はTLR-4ではなく、この活性はエンドトキシン汚染物質の存在によるものではないことを示唆している。SCAF0およびSCAF5の多糖のGC-MS分析では、モノマー成分は同様であったが、糖の比率が異なっていたことを見出した。SCAF5にはウロン酸およびグルクロン酸レベルの両方が高く、このことはSCAF5を溶出するために高いイオン強度の溶液が必要であったことを説明し得る。SCAF5におけるマンノースの割合の増加は、マンノース受容体が免疫調節活性のメディエーターであることを示唆しているかもしれない。

【０２８６】

結論

本実施例では、シダ・コルジホリア(Sida cordifolia)のPPが免疫調節活性を示すことを示している。免疫調節活性は、〉100kDaの分子量で単離した多糖分子によって引き起こされる。LALアッセイによって確認されたように、エンドトキシンは検出されなかった。TAK 242で免疫応答を阻止できないことから、免疫調節活性はTLR4受容体の直接活性化の結果ではないと考えられる。SCAF5は活性の弱い画分(SCAF1-4)と比較してマンノース単糖の割合が高いことから、マンノース受容体の活性化によって免疫活性化が引き起こされる可能性がある。SCAF5によって惹起されるサイトカインプロファイルは、免疫系が微生物攻撃に対して最も重要なものである、T_H1細胞介在炎症促進性免疫応答を強く示唆している。マクロファージにおけるiNOSの増加もまた、炎症促進性免疫応答を示唆している。

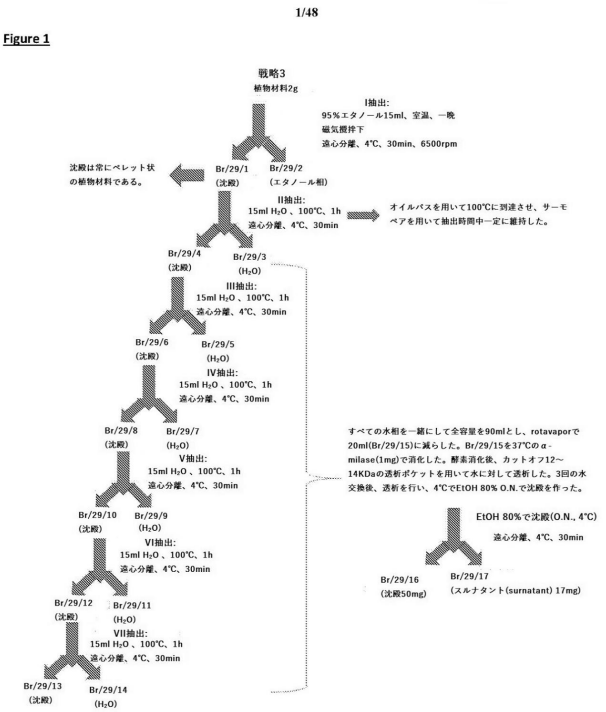
【０２８７】

実施例5-糞便細菌の多様性に対する多糖の作用

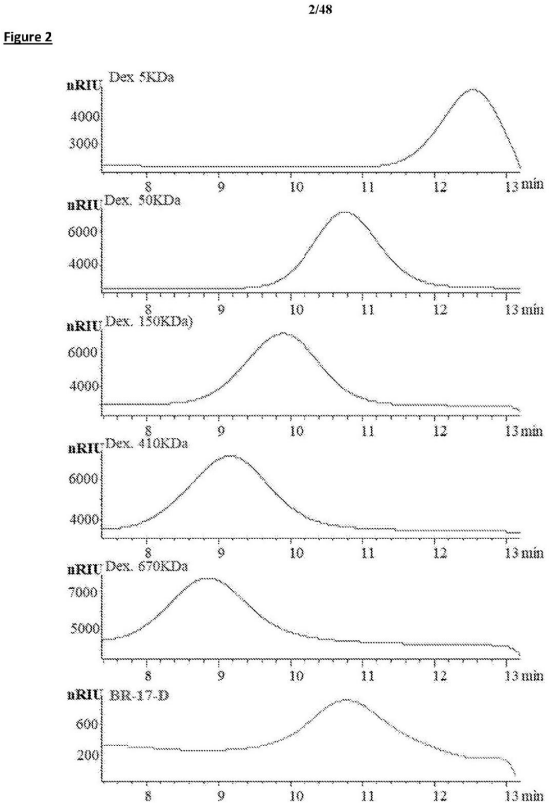
C57Bl/6Jマウスからの糞便試料を評価して、その細菌組成を決定した。マウスには、食塩水(0.9％)または精製多糖を含む食塩水(300mg/kg)を毎日強制経口投与した。多糖は、本明細書に記載の「戦略3」方法論(図1に示されている)に従って調製した。図55は、多糖または食塩水による７日間の処理後のマウスにおける糞便微生物叢の％組成(門レベル)を示す。図56は、門レベルおよび種レベルで分析したときの(図55の)細菌多様性の要約である(アルファ多様性はシャノン指数を用いて計算した)。図55および56は、本発明による多糖が、C57Bl/6Jマウスにおいて門レベルおよび種レベルで糞便の細菌多様性を増加させることを明らかに示している。したがって、本発明による多糖はプレバイオティクスとして使用することができる。

【図面】

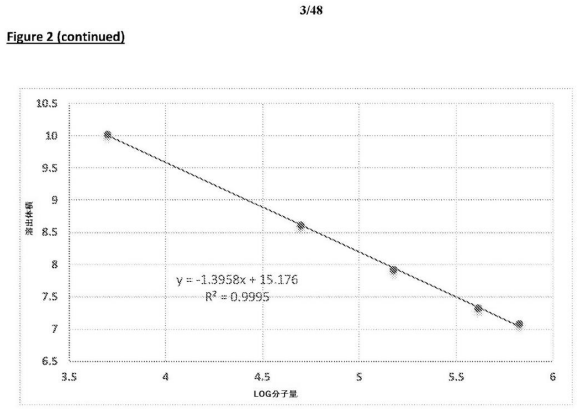
【図１】



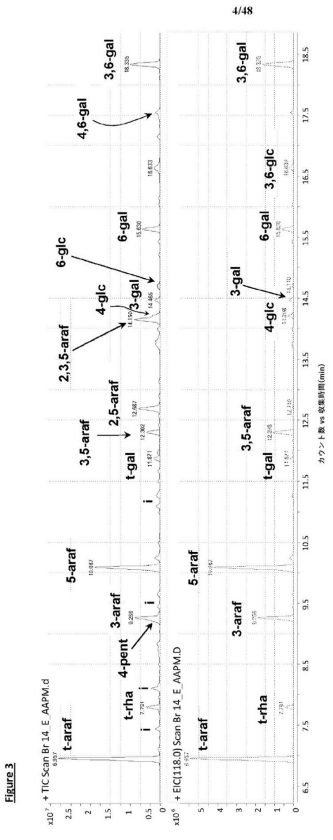
【図２－１】



【図２－２】



【図３】



【図４】

5/48

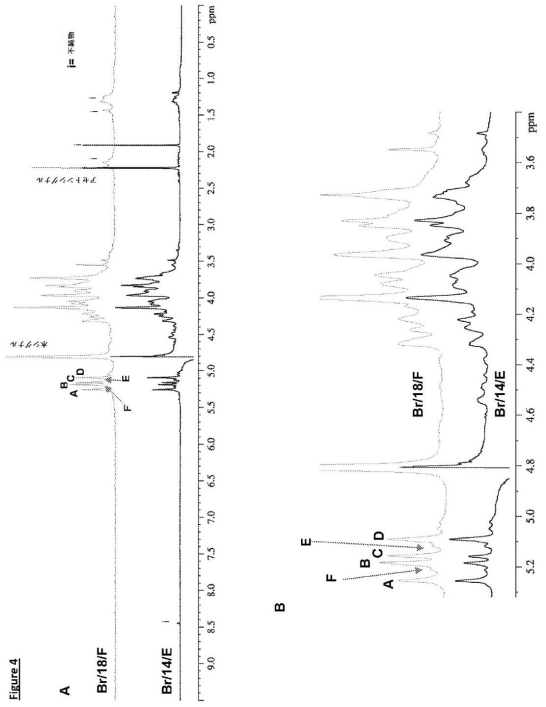


Figure 4

【図５】

6/48

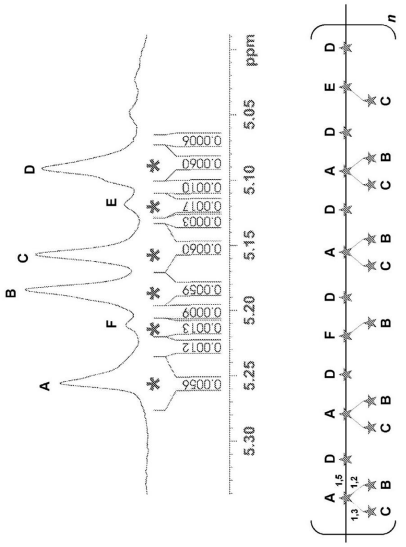


Figure 5

【図６】

7/48

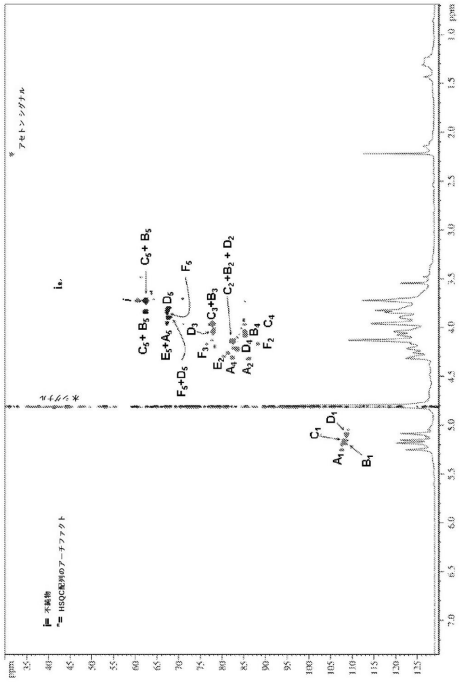


Figure 6

【図７】

8/48

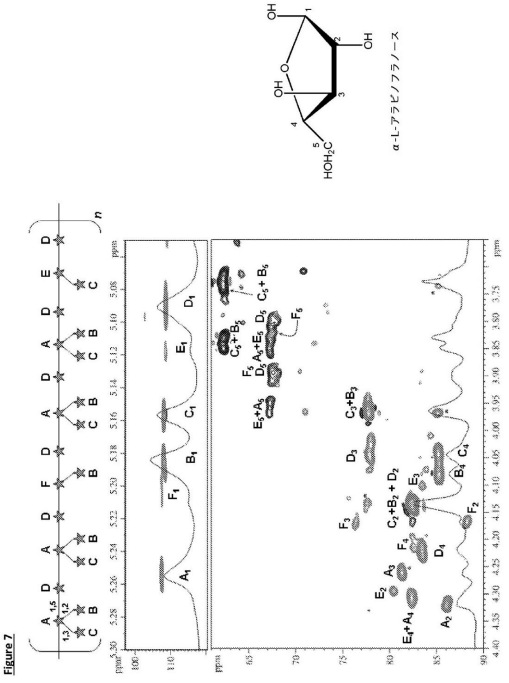
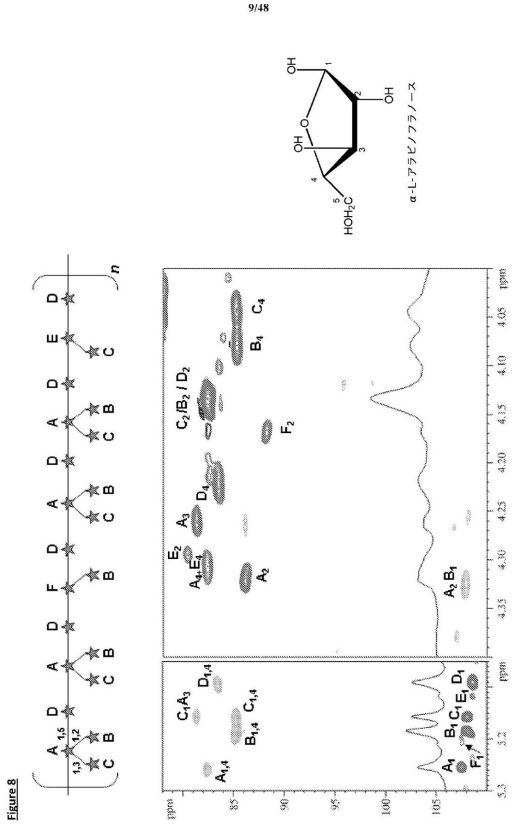
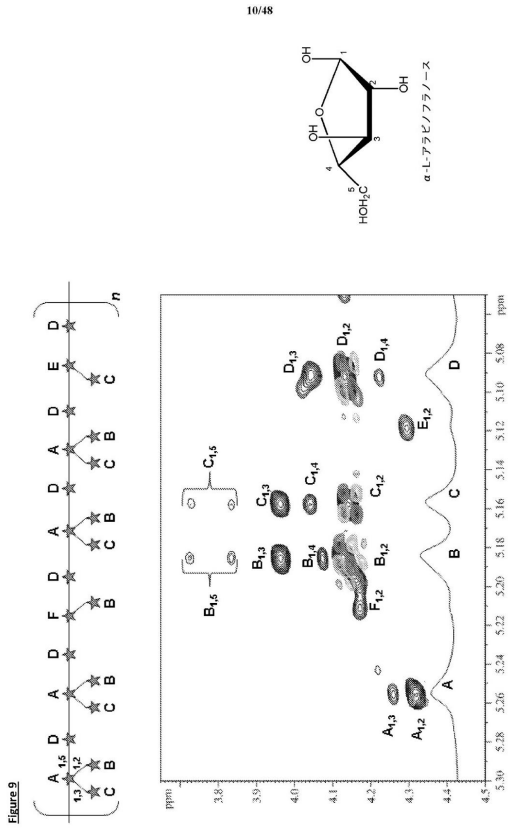


Figure 7

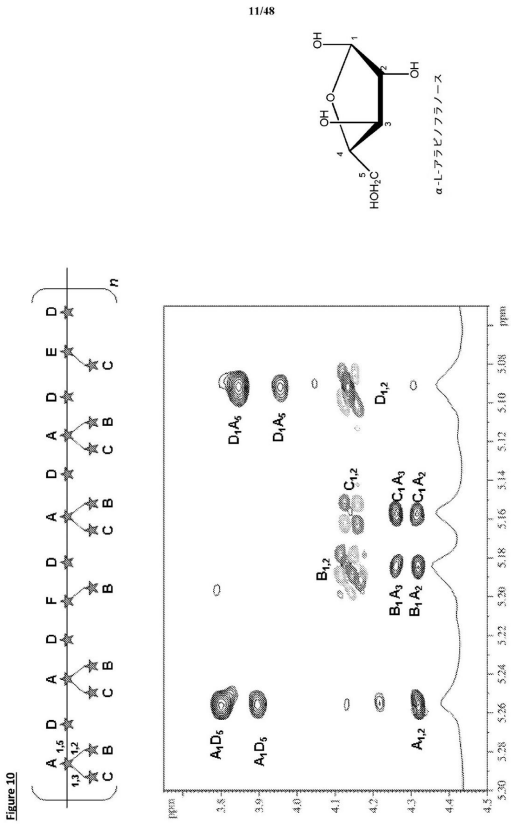
【図８】


9/48
α-L-アラビノフラノース
Figure 8

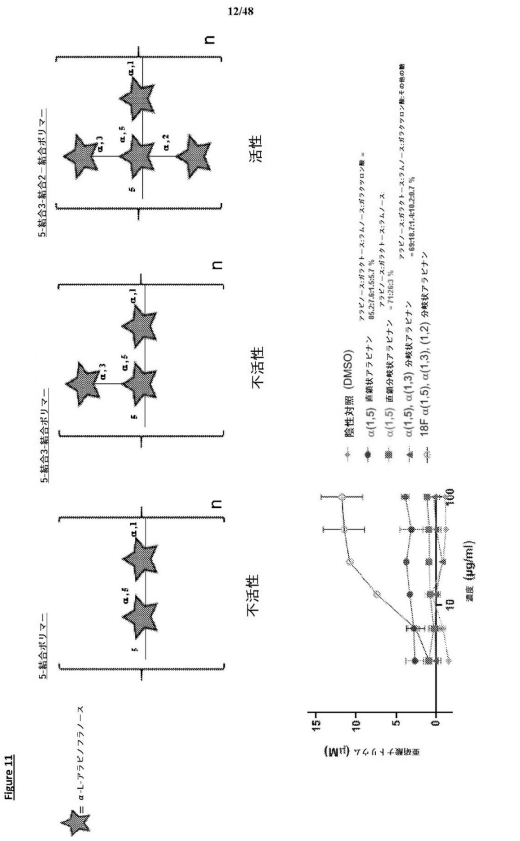
【図９】


10/48
α-L-アラビノフラノース
Figure 9

【図１０】


11/48
α-L-アラビノフラノース
Figure 10

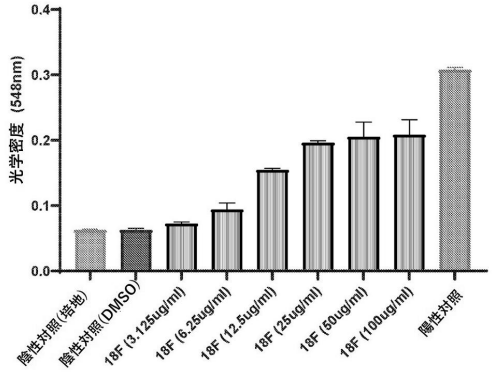
【図１１】


12/48
5-結合ポリマー
5-結合3-結合ポリマー
5-結合3-結合2-結合ポリマー
不活性
不活性
活性
酸性対照 (DMSO)
α(1,5) 直鎖状アラビナン
α(1,5) 直鎖分岐状アラビナン
α(1,5), α(1,3) 分岐状アラビナン
18F α(1,5), α(1,3), (1,2) 分岐状アラビナン
濃度 (μg/ml)
Figure 11

【図１２】

13/48

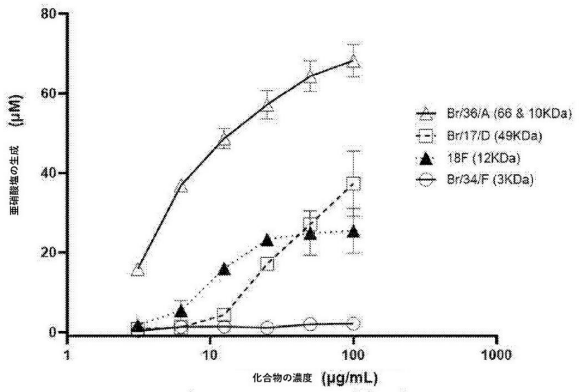
Figure 12



【図１３】

14/48

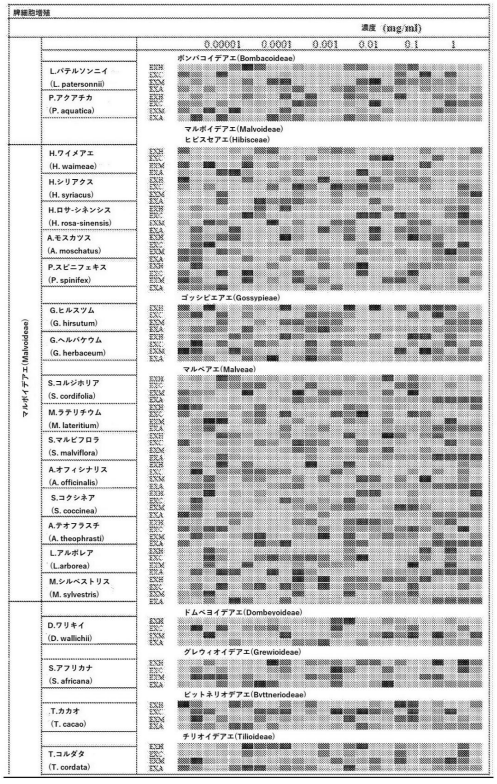
Figure 13



【図１４】

15/48

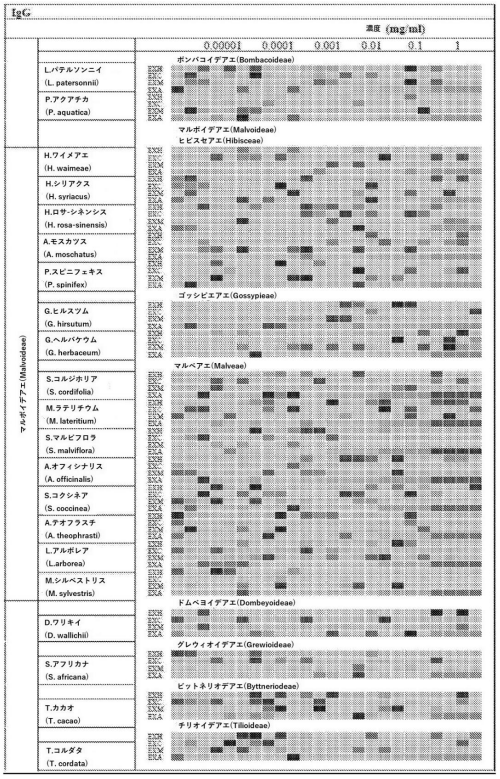
Figure 14



【図１５】

16/48

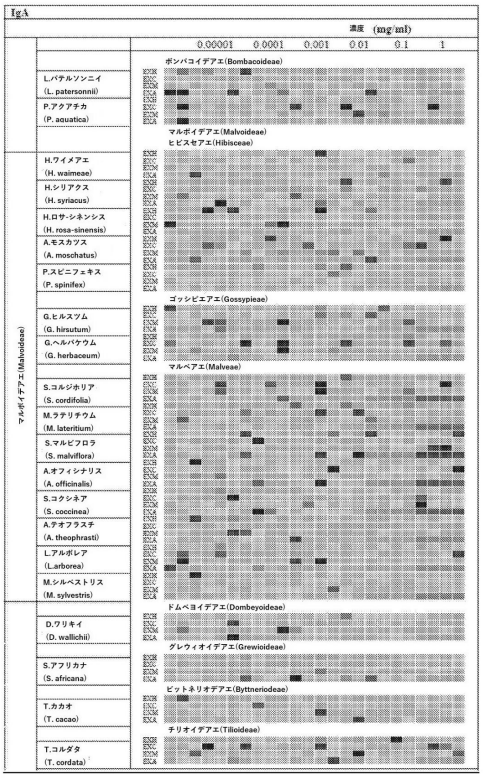
Figure 15



【図１６】

17/48

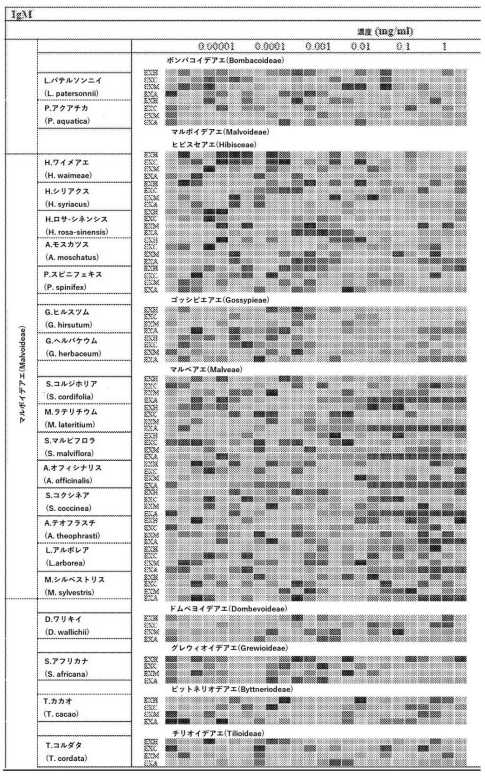
Figure 16



【図１７】

18/48

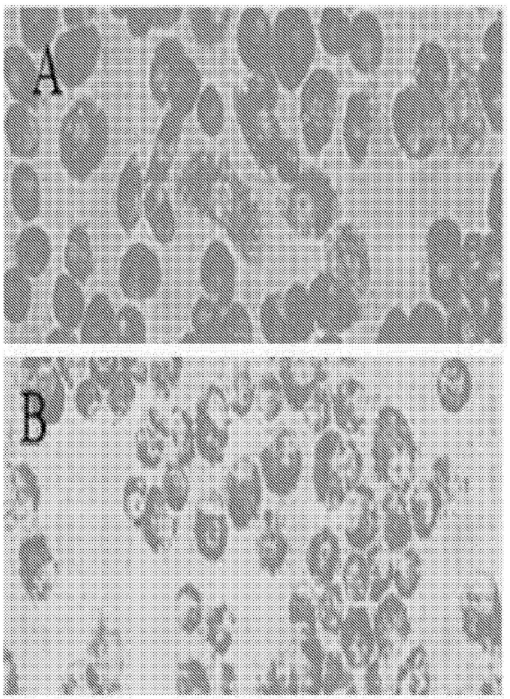
Figure 17



【図１８】

19/48

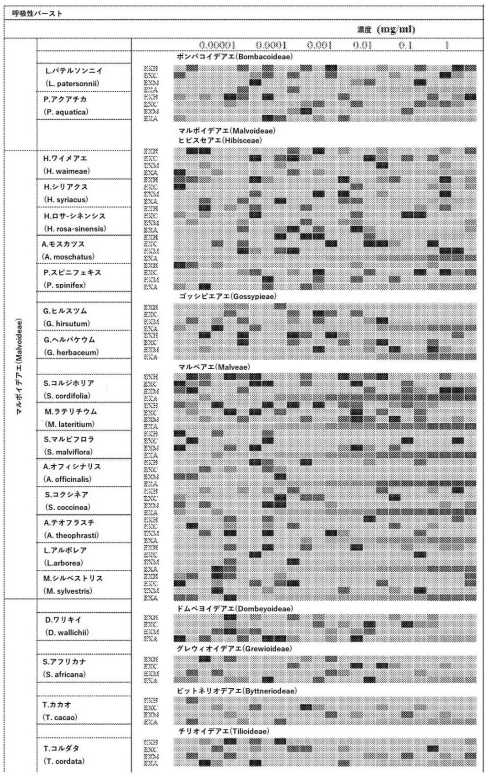
Figure 18



【図１９】

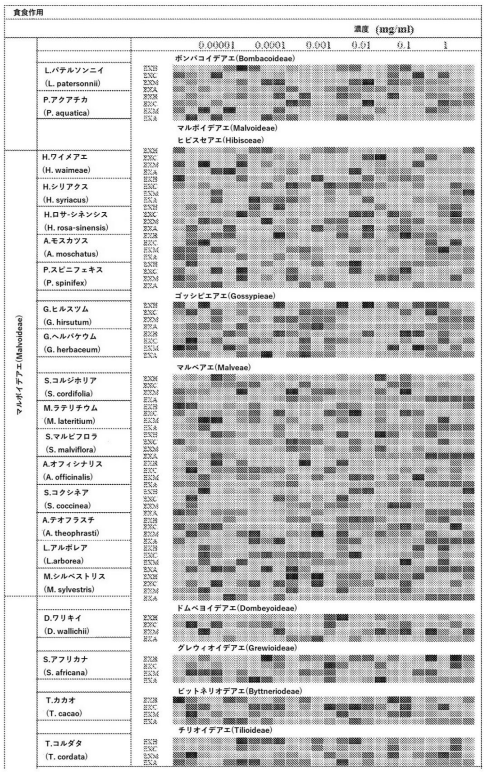
20/48

Figure 19



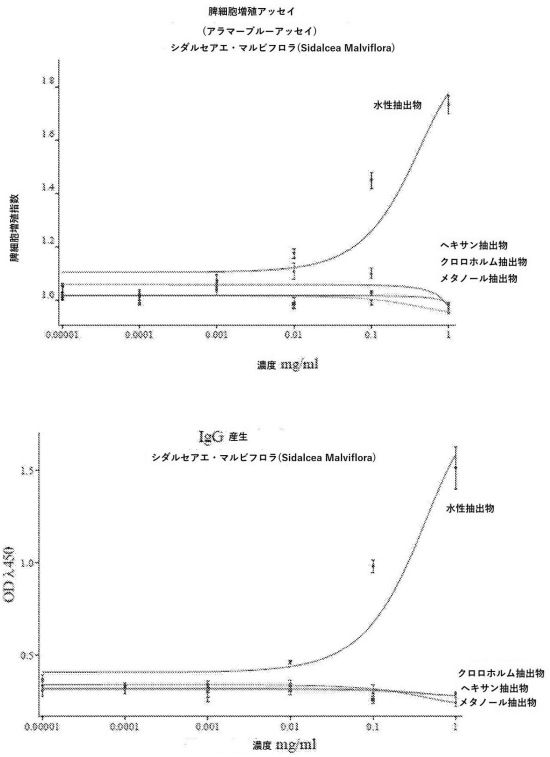
【図２０】

Figure 20



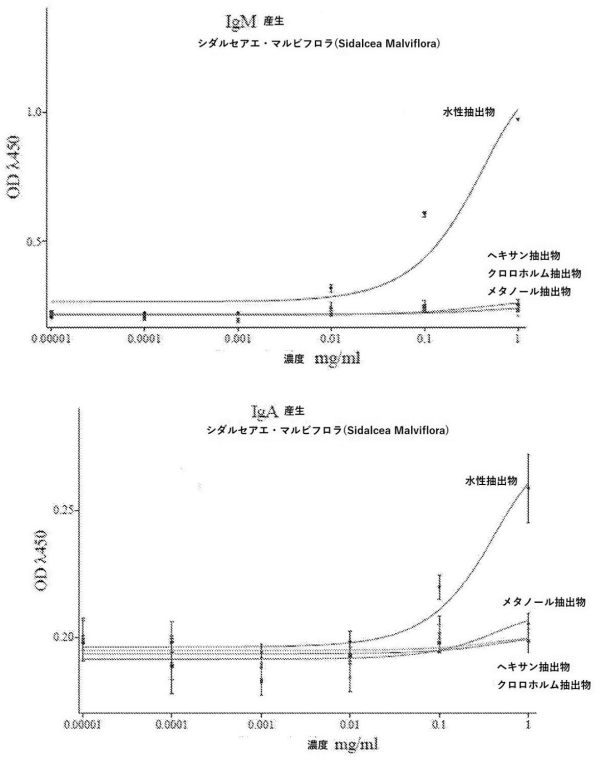
【図２１－１】

Figure 21



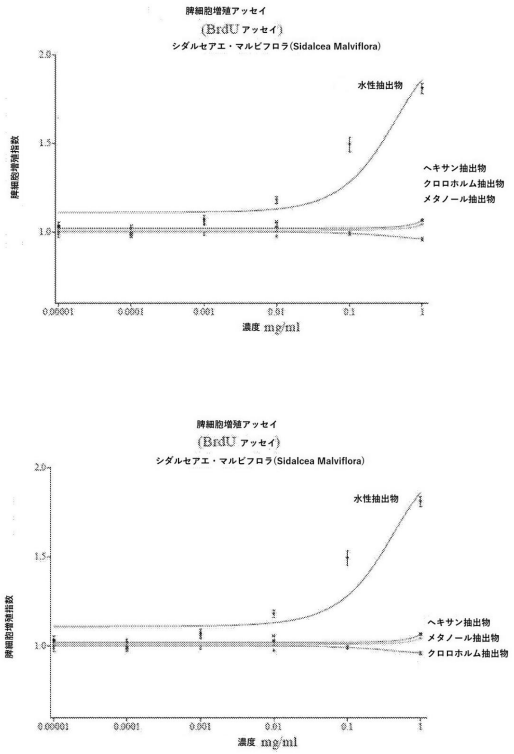
【図２１－２】

Figure 21 (continued)



【図２２】

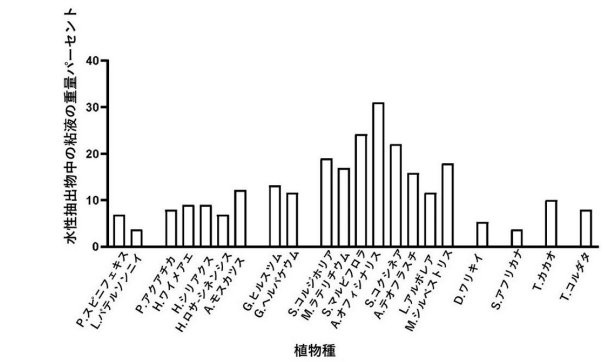
Figure 22



【図２３】

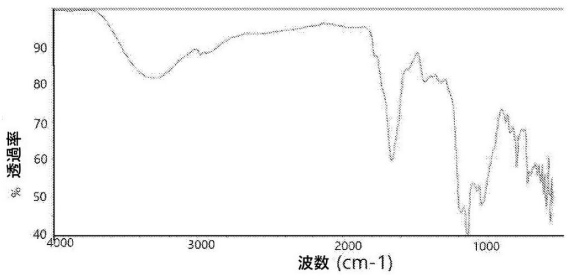
25/48

Figure 23



【図２４】

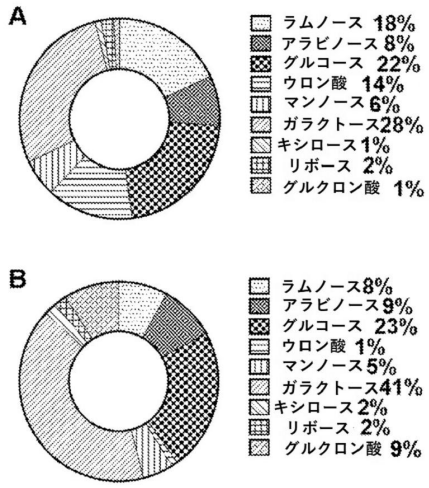
Figure 24



【図２５】

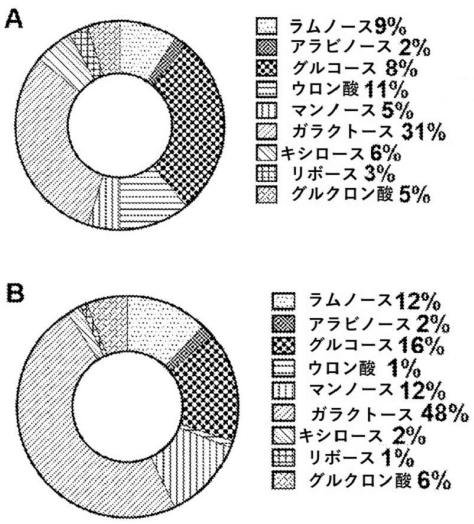
26/48

Figure 25



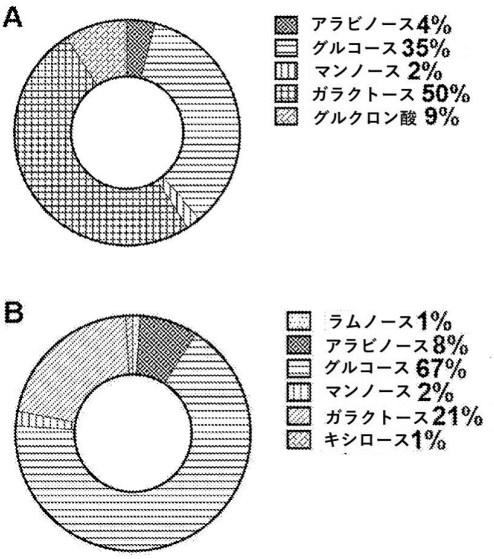
【図２６】

Figure 26



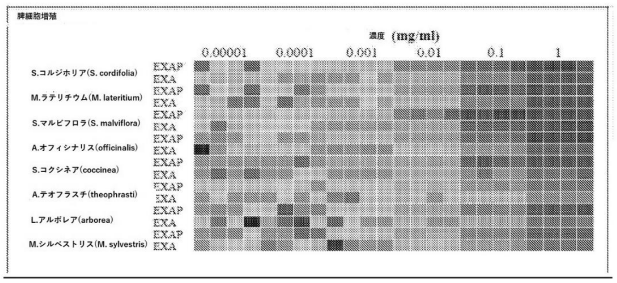
【図２７】

Figure 27



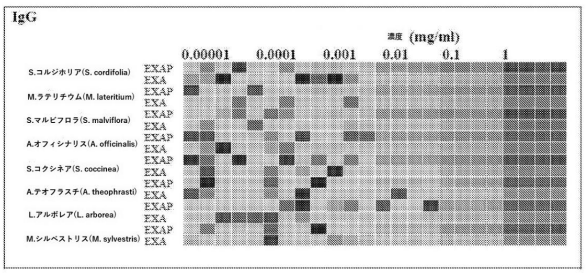
【図２８】

Figure 28



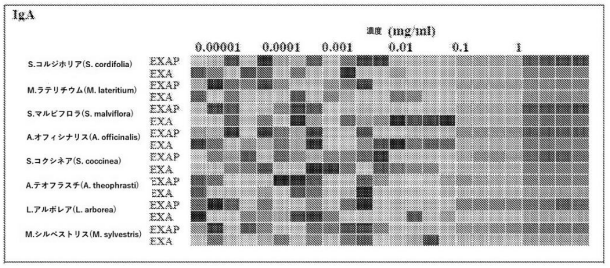
【図２９】

Figure 29



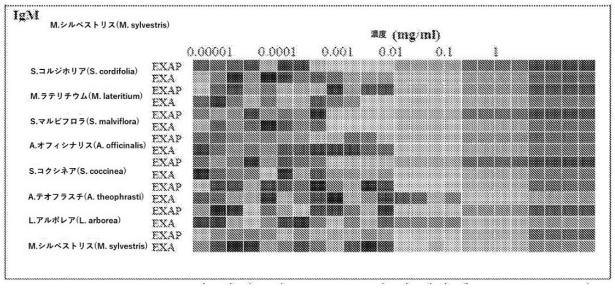
【図３０】

Figure 30



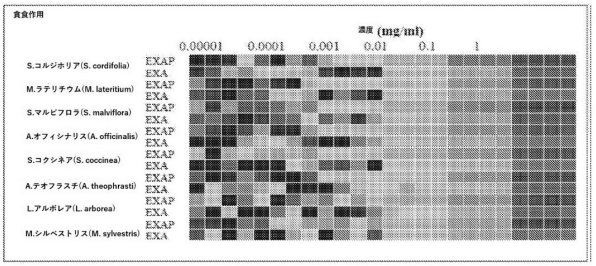
【図３１】

Figure 31



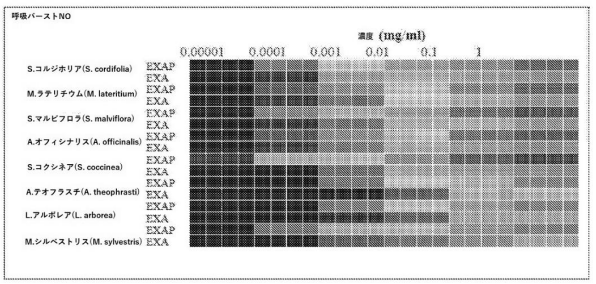
【図３２】

Figure 32



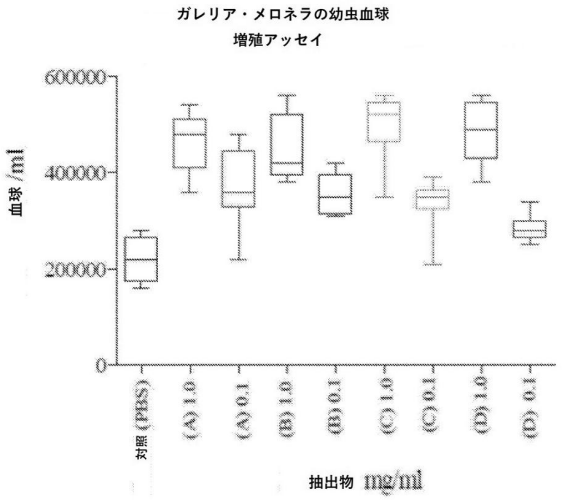
【図３３】

Figure 33



【図３４】

Figure 34



【図３５】

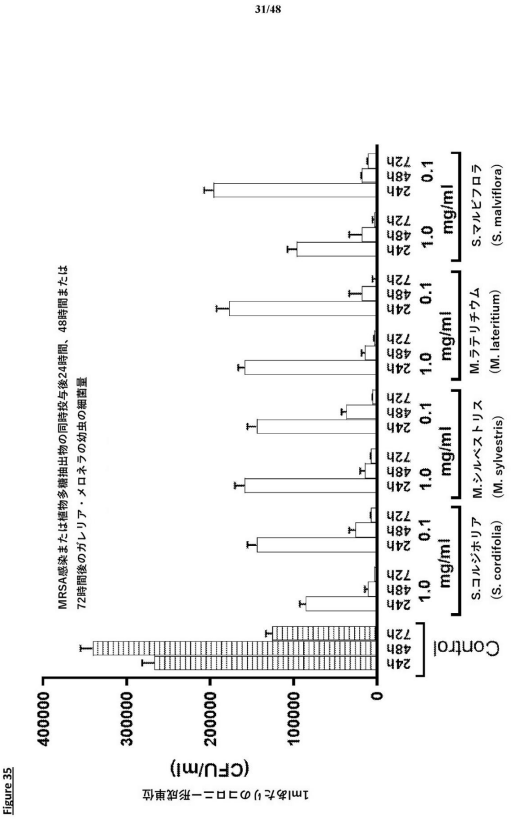


Figure 35

【図３６】

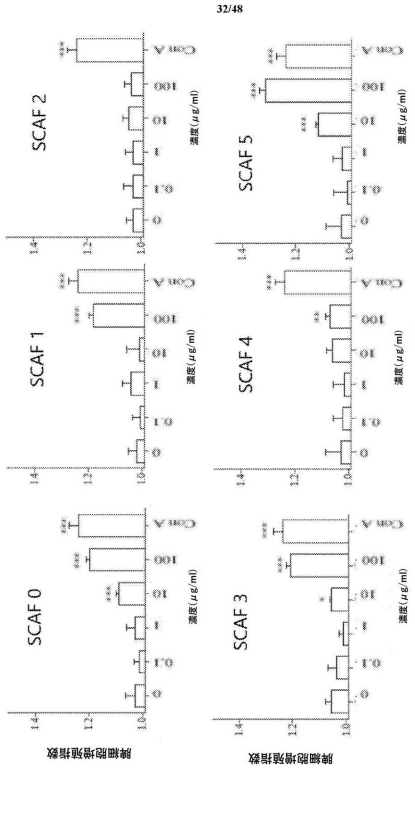


Figure 36

【図３７】

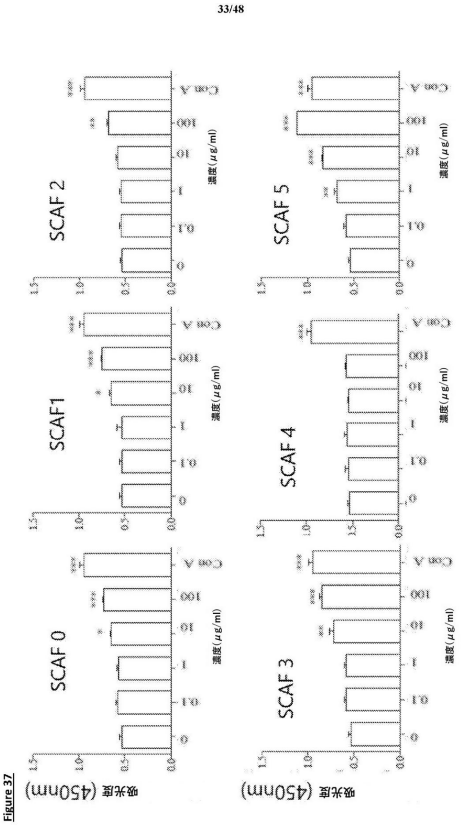


Figure 37

【図３８】

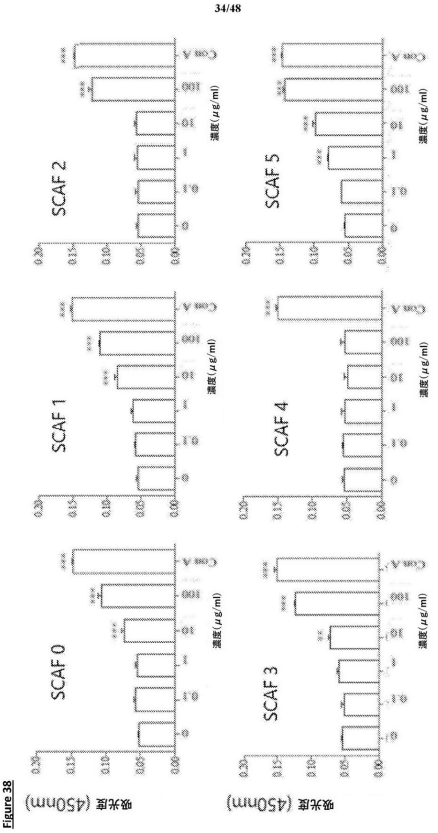


Figure 38

【図３９】

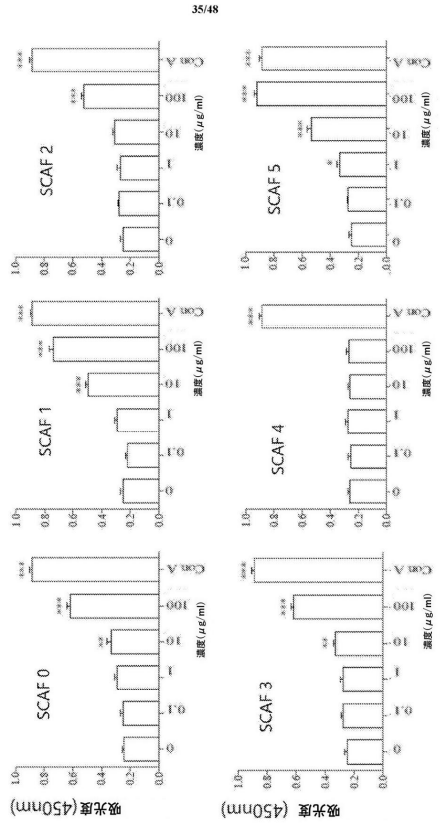


Figure 39

【図４０】

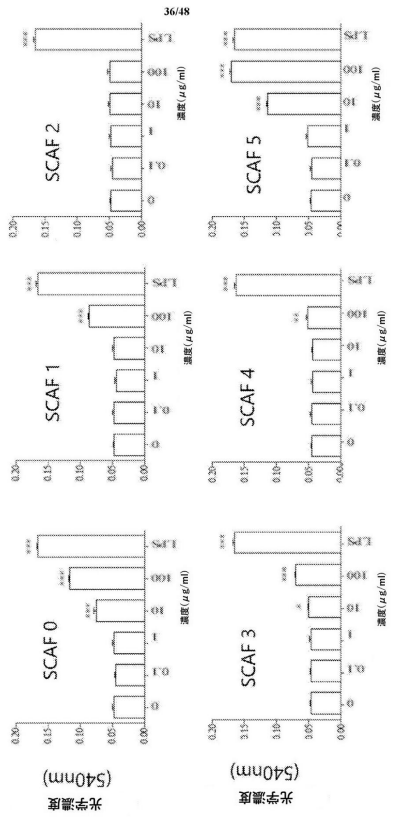


Figure 40

【図４１】

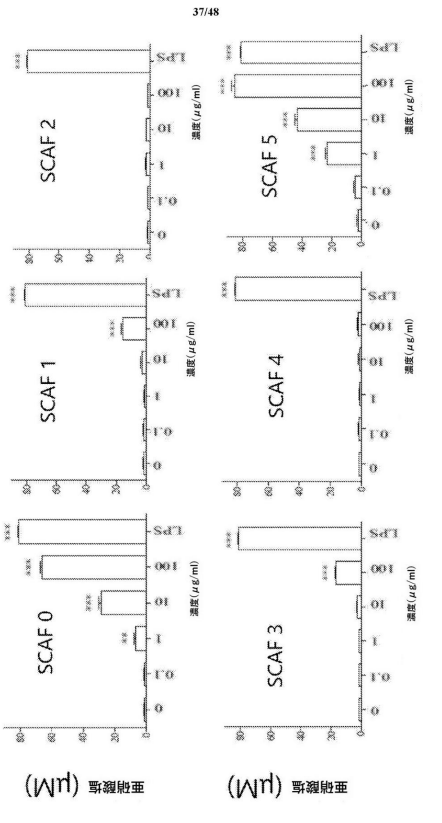
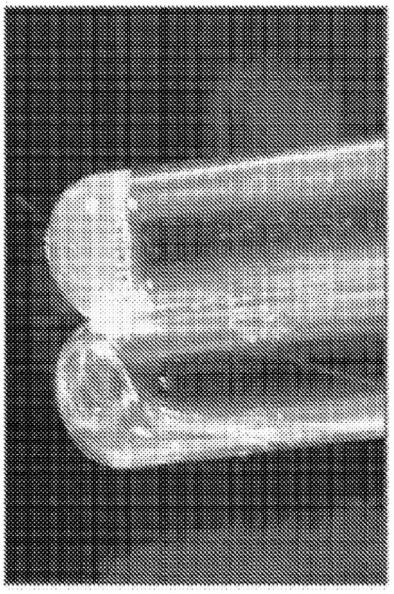


Figure 41

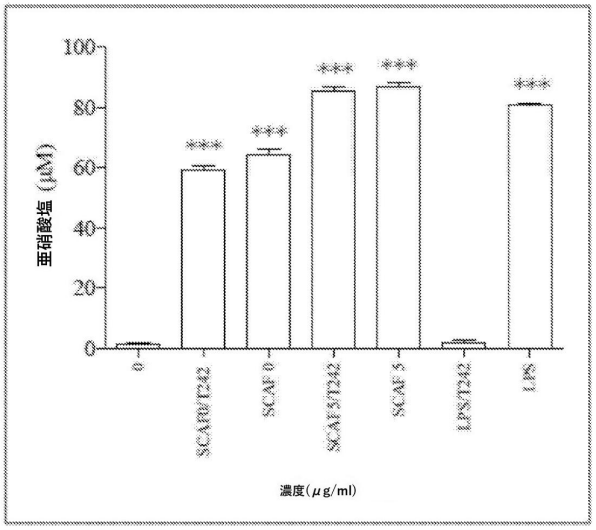
【図４２】

Figure 42



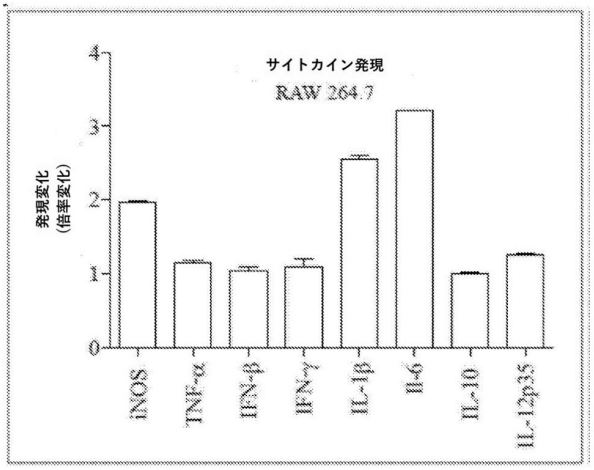
【図４３】

Figure 43



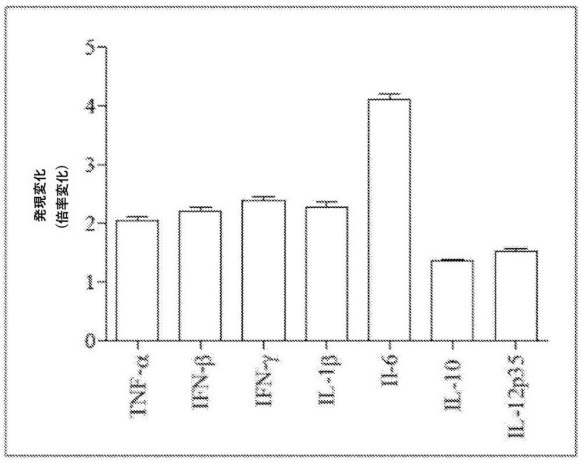
【図４４】

Figure 44



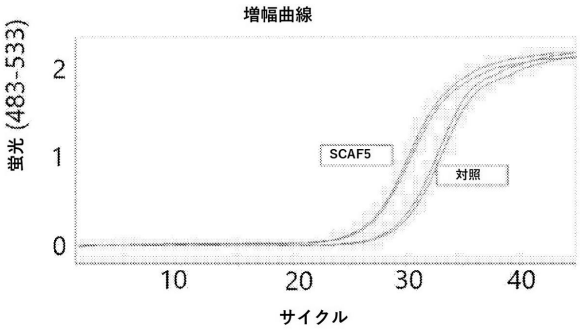
【図４５】

Figure 45



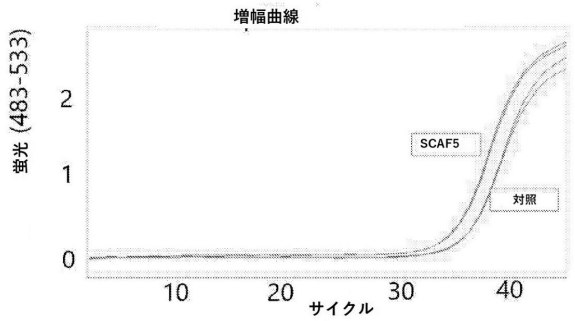
【図４６】

Figure 46



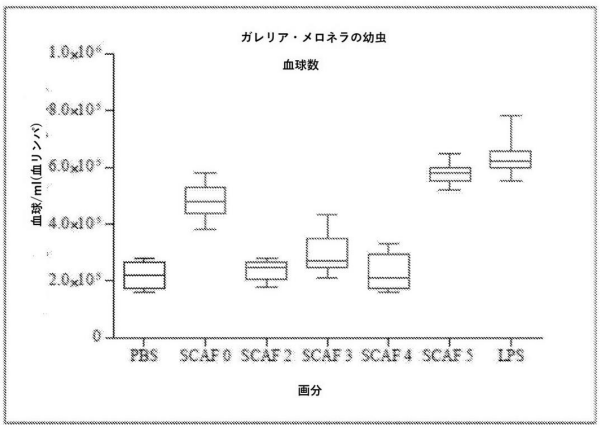
【図４７】

Figure 47



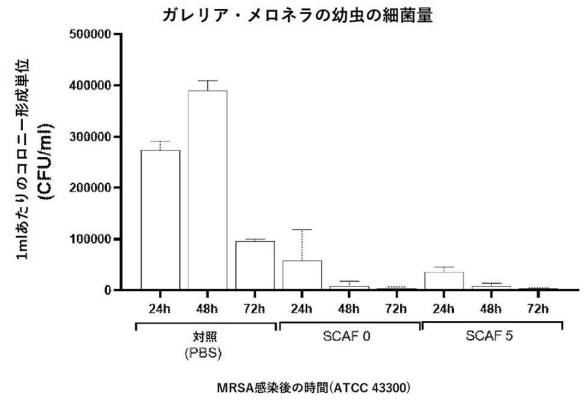
【図４８】

Figure 48



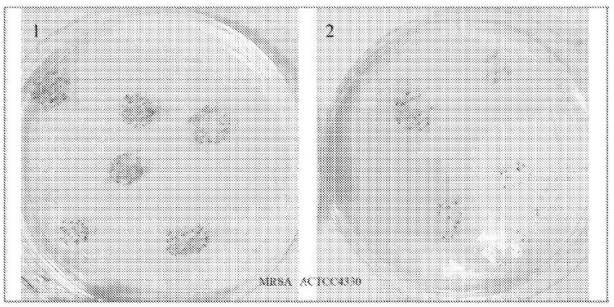
【図４９】

Figure 49



【図５０】

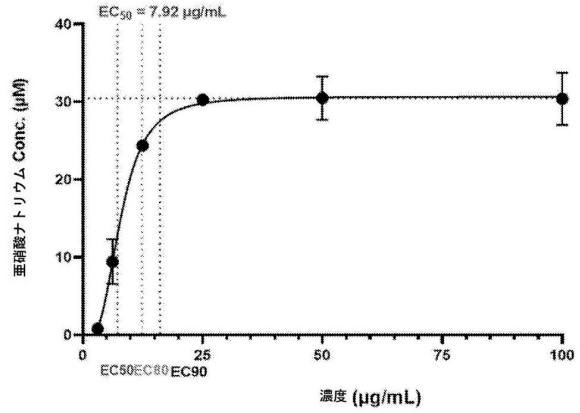
Figure 50



【図５１】

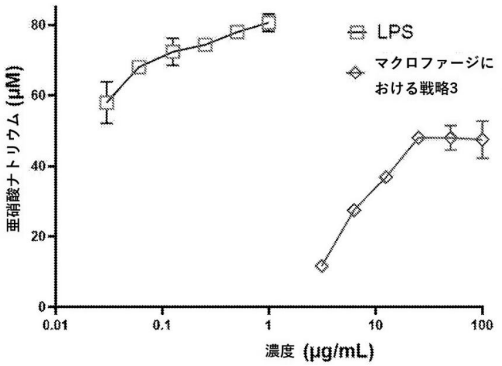
43/48

Figure 51



【図５２】

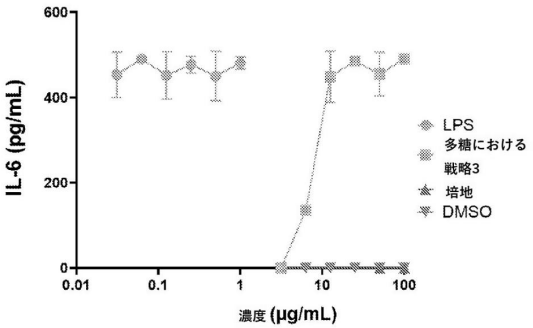
Figure 52

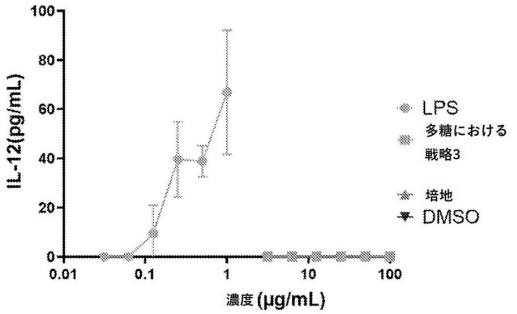


【図５３－１】

44/48

Figure 53

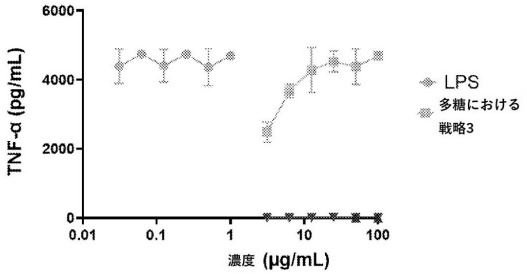




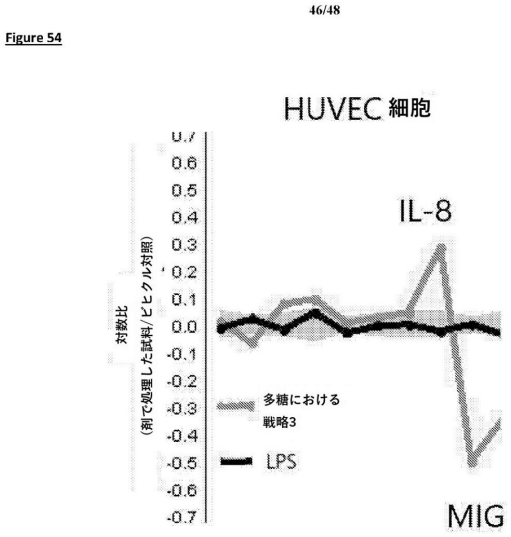
【図５３－２】

45/48

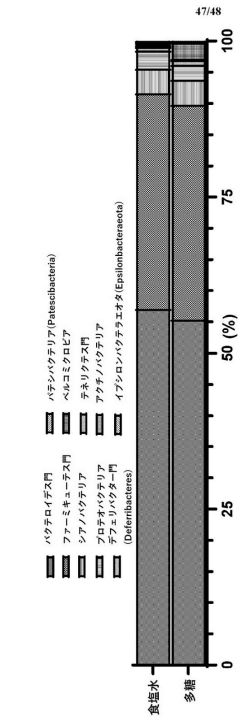
Figure 53 (conintued)



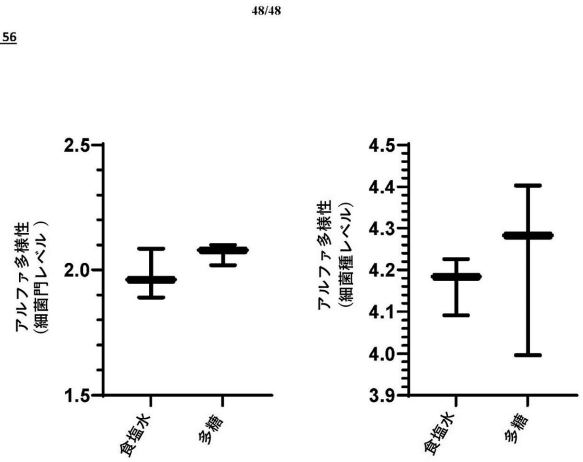
【図５４】



【図５５】



【図５６】



【配列表】

<u>2023550276000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/052818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C08H8/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C08H

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)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAMAVATI VAHID ET AL: "Polysaccharide extraction fromMalva sylvestrisand its anti-oxidant activity", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 60, 20 April 2013 (2013-04-20), pages 427-436, XP028683301, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2013.04.050 page 427 - page 430 ----- -/--	1-20, 22-24

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] 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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 February 2022	16/02/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Friedrich, Christof

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/052818

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEFERS DANIEL ET AL: "Detailed Structural Characterization of Arabinans and Galactans of 14 Apple Cultivars Before and After Cold Storage", FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, vol. 9, 2 October 2018 (2018-10-02), XP55881593, DOI: 10.3389/fpls.2018.01451 page 2, column 1 -----	1
X	GHAOUI WALID BOU JABER EL ET AL: "The effects of Alcea rosea L., Malva sylvestris L. and Salvia libanotica L. water extracts on the production of Anti-egg albumin antibodies, interleukin-4, gamma interferon and interleukin-12 in BALB/c mice", PHYSIOTHERAPY RESEARCH, vol. 22, no. 12, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 1599-1604, XP55881870, GB ISSN: 0951-418X, DOI: 10.1002/ptr.2530 the whole document -----	21,25-38
X,P	Iqbal Haroon ET AL: "Extracts of Sida Cordifolia Contain Polysaccharides Possessing Immunomodulatory Activity and Rosmarinic Acid Compounds With Antibacterial Activity", Research Square, 25 May 2021 (2021-05-25), pages 1-27, XP55881288, DOI: 10.21203/rs.3.rs-558659/v1 Retrieved from the Internet: URL:https://assets.researchsquare.com/files/rs-558659/v1/29e61fca-4174-4b4a-9866-24559100270b.pdf?c=1637244881 [retrieved on 2022-01-19] the whole document -----	1-38

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2021/052818

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [ ] forming part of the international application as filed:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [X] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
A61P	*19/02*	*(2006.01)*	A61P	19/02		4J002
A61P	*17/06*	*(2006.01)*	A61P	17/06		
A61P	*1/04*	*(2006.01)*	A61P	1/04		
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	25/00		
A61P	*31/16*	*(2006.01)*	A61P	31/16		
A61P	*11/00*	*(2006.01)*	A61P	11/00		
A61P	*31/12*	*(2006.01)*	A61P	31/12		
A61P	*31/22*	*(2006.01)*	A61P	31/22		
A61P	*31/04*	*(2006.01)*	A61P	31/04		
A61P	*15/00*	*(2006.01)*	A61P	15/00		
A61P	*3/10*	*(2006.01)*	A61P	3/10		
A61P	*7/04*	*(2006.01)*	A61P	7/04		
A61P	*21/04*	*(2006.01)*	A61P	21/04		
A61P	*7/06*	*(2006.01)*	A61P	7/06		
A61P	*31/18*	*(2006.01)*	A61P	31/18		
A61P	*37/08*	*(2006.01)*	A61P	37/08		
A61P	*11/06*	*(2006.01)*	A61P	11/06		
A61K	*39/00*	*(2006.01)*	A61K	39/00	H	
A23L	*33/125*	*(2016.01)*	A23L	33/125		
A23L	*33/105*	*(2016.01)*	A23L	33/105		
A23L	*33/135*	*(2016.01)*	A23L	33/135		
C12N	*1/00*	*(2006.01)*	C12N	1/00	F	
C12N	*5/12*	*(2006.01)*	C12N	5/12		
C08L	*5/00*	*(2006.01)*	C08L	5/00		
C08K	*5/00*	*(2006.01)*	C08K	5/00		
C08K	*3/01*	*(2018.01)*	C08K	3/01		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

Ｆターム（参考）

4B018 LB01 LB07 LB08 LB09 LB10 LE01 LE02 MD08 MD33 MD61 MD90 ME14 MF01 MF06 MF12

4B065 AA90X AB02 AC20 BA08 BB18 CA60

4C085 AA03 BA99 CC33 DD31 DD32 EE01 FF24 GG01 GG08

4C086 AA01 AA02 EA20 MA52 MA57 MA59 MA63 MA66 NA14 ZA01 ZA53 ZA55 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96 ZB08 ZB09 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35 ZC35 ZC41

4C090 AA01 AA04 BA02 BB08 BB32 BB34 BB35 BB37 BB52 BC01 CA13 CA22 DA23

4J002 AB00X AB04X AB05W AD01X DE226 DE236 DH046 DJ046 EC057 EC068 EF056 EG036 FD030 FD070 FD077 FD090 FD180 FD206 FD208 FD20X FD310 GB00 GC00 GE00 HA06 HA09