

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-523245

(P2016-523245A)

(43) 公表日 平成28年8月8日 (2016. 8. 8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/593 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 31/593	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 9/127 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 9/12 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 9/12	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 9/02 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 9/02	
<b>A 6 1 K 47/12 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 47/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-520738 (P2016-520738)	(71) 出願人	515353109
(86) (22) 出願日	平成26年6月13日 (2014. 6. 13)		ノークス、デイビッド
(85) 翻訳文提出日	平成28年2月17日 (2016. 2. 17)		英国領チャンネル諸島 ガーンジー ジーワ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/051824		イ 1 2 エスタブリュー、セント ピーター
(87) 国際公開番号	W02014/202956		ー ポート、フォート ジョージ、ラベリ
(87) 国際公開日	平成26年12月24日 (2014. 12. 24)		ン ロード、ペンドラゴン
(31) 優先権主張番号	1311134. 9	(74) 代理人	110000855
(32) 優先日	平成25年6月21日 (2013. 6. 21)		特許業務法人浅村特許事務所
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ルッキエロ、マルコ
(31) 優先権主張番号	1403508. 3		イタリア国、フィレンツェ、ヴィア プッ
(32) 優先日	平成26年2月27日 (2014. 2. 27)		チノッティ 3 1
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	F ターム (参考)	4C076 AA01 AA19 AA24 AA95 BB01
			BB11 BB29 CC27 CC41 DD41
			EE41 EE59 FF34 FF70
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DE-VDBP 及び不飽和脂肪酸とのビタミンD複合体、並びに治療法におけるその使用

## (57) 【要約】

がん、神経変性疾患、慢性腎疾患及びH I V感染などの慢性疾患における治療的使用のための強力で安定なビタミンDベースの複合体のファミリーが開示される。それらは、脱グリコシル化されたビタミンD結合タンパク質との相互作用により作製されて、二量体複合体を形成することが可能であり、それらは更に、不飽和脂肪酸により安定化されて、原形質膜にあるビタミンD受容体との細胞レベルでの相互作用の改善を提供する三量体複合体を形成することができる。有効性は、適切な溶媒中にサプリメントを溶解又は可溶化させることにより更に改善することができる。複合体に関する送達メカニズムの1つは、リポソーム中にそれらを封入することであり、経口投与を可能にする。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

骨格として、脱グリコシル化されたビタミン D 結合タンパク質、ビタミン D<sub>3</sub> 又はその類似体、及び少なくとも 1 つの不飽和脂肪酸の三量体複合体であるビタミン D ベースの製剤。

## 【請求項 2】

水性アルコール系生理食塩水溶媒を更に含む、請求項 1 に記載の製剤。

## 【請求項 3】

前記不飽和脂肪酸が、オレイン酸又はエイコサペンタエン酸である、請求項 1 又は 2 に記載の製剤。

10

## 【請求項 4】

リボソーム中に封入される、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の製剤を含む経口投与可能な組成物。

## 【請求項 5】

噴霧による投与用に製剤化されて、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の製剤を含む組成物。

## 【請求項 6】

坐薬としての投与用に製剤化されて、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の製剤を含む組成物。

20

## 【請求項 7】

浣腸剤としての投与用に製剤化されて、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の製剤を含む組成物。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の製剤の生産方法であって、ビタミン D 結合タンパク質を脱グリコシル化するステップと、脱グリコシル化されたタンパク質を、ビタミン D<sub>3</sub> 又はその類似体と複合体形成させるステップと、そのようにして得られる二量体複合体を、少なくとも 1 つの不飽和脂肪酸と更に複合体形成させるステップとを順次含む上記方法。

## 【請求項 9】

請求項 4 に記載の経口投与可能な組成物の生産方法であって、リボソーム中に請求項 8 に記載の方法により得られる複合体を封入するステップを含む上記方法。

30

## 【請求項 10】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の治療有効量の製剤の投与により、がんを患う患者を治療する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

2. 専門用語：

下記説明において、読みやすさを支援するために、下記用語が使用され；それぞれ、その意味を伴う：

## 【0002】

40

VDBP：ビタミン D 結合タンパク質。

de-VDBP：シアル酸及びガラクトースの逐次除去により Thr（スレオニン）420 位で脱グリコシル化されたビタミン D 結合タンパク質。

Vit Ds：ビタミン D 及びその類似体。

VDR：ビタミン D 受容体。

UFA：不飽和脂肪酸。

二量体 / 三量体 / 四量体複合体：特異的な認識部位間での化学的相互作用により結び付いている 2 個、3 個又は 4 個の分子の安定な会合。複合体を形成する分子は、[ 角括弧 ] 内に示される。

混合物：幾つかの分子種が存在するが、互いに結合しない混合物。例えば、「遊離」の d

50

e - V D B P + [ V i t D s / d e - V D B P ] + [ V i t D s / d e - V D B P / U F A ]。

【図面の簡単な説明】

【0003】

また、下記説明において、本発明の説明の一部を成す添付の図1から図11に関して言及される。図12及び図13は、本発明が臨床治療において実施される際の治療効果を示す。

【0004】

3. 発明の分野：

本発明は、特にサプリメントとしての使用のためのビタミンDベースの複合体に関するが、これらに限定されない。特に、本発明は、がん、神経変性疾患、慢性腎疾患及びHIV感染などの慢性疾患における補完療法的使用法のための強力で安定なビタミンDベースのサプリメントのファミリーを提供する。

10

【0005】

下記説明は、脱グリコシル化されたビタミンD結合タンパク質、(de - V D B P)の骨格に基づく分子のファミリーの製剤を開示し、ビタミンD<sub>3</sub>及び他のビタミンD受容体アゴニストは、疎水性相互作用によってこのような骨格に結合されている。不飽和脂肪酸もまた、細胞膜との相互作用を支持するようにde - V D B P骨格に結合されている。これらの安定な複合体は、経口バイオアベイラビリティのためにリボソーム中に封入されてもよい。このファミリーの新規の安定化された複合体は、ビタミンDの補給が有効であると証明されている状態全てにおいて使用され得る。

20

【背景技術】

【0006】

4. 発明に対する背景

4.1. ビタミンD及びビタミンD系 (axis)

近年、多種多様な慢性疾患において、ビタミンD系の役割に非常に興味を持たれている。ビタミンD系は、ビタミンD<sub>3</sub>であるビタミンDの活性形態、ビタミンD受容体(VDR)及びビタミンD結合タンパク質(VDBP)を包含する。VDBPは、種々のアイソフォームで存在し、GalNAc - Gal - Siaタイプの直鎖状O連結三糖は、Gc1s及びGc1fと称される3つの最も一般的なアイソフォームのうちの2つにおいて420位にあるスレオニン残基(Thr 420)に結合される(Biochim Biophys Acta, 2010 Apr; 1804(4): 909 - 17)。VDBPは、シアリダーゼ及びベータ - ガラクトシダーゼによる処置により脱グリコシル化することができ、脱グリコシル化後、GalNAc糖部分のみが、Thr 420に結合されたままであり、それは、一連の相補的酸性アミノ酸を有する標的タンパク質と相互作用し得る。

30

【0007】

ビタミンD生理学は、ビタミンD系の、並びに組み合わせられる水溶性及び脂溶性ビタミン群におけるその対応物の任意の他の構成成分よりも重要性を増し、且つ注目されている。この理由は、部分的には、ビタミンD欠乏症が工業国及び先進国の両方で依然として広く蔓延しているためであり、またビタミンDの有益な効果がカルシウム及びリン恒常性単独の調節を超えて広がることが実証されたためである(Endocrinol Metab Clin North Am, 2010; 39: 355 - 63)。何世紀にもわたって、ミネラル恒常性に影響を及ぼすことで知られているビタミンD<sub>3</sub>は、がん細胞の成長に対する影響及びある特定の免疫障害に対する保護を含む幾つかの他の多様な生理学的機能を有する(Endocrinol Metab Clin North Am, 2010; 39: 243 - 53)。多数の研究により、がん、心血管リスクの中間マーカー、流行性インフルエンザ、アルブミン尿、転倒のリスク及びHIV感染に対するビタミンDの保護効果が明らかとなった(Rev Med Liege, 2013 Jan; 68(1): 25 - 31)。ビタミンDの更なる活性は、微生物感染、例えば結核の防御、骨格筋の収縮力及びうつ血性心不全の反作用に関する。横断的研究により、ヒトにおけるビタ

40

50

ミンD欠乏症は、血圧の上昇及びアテローム発生の進行に関連付けられ、成体におけるビタミンD補給は、アテローム発生を防ぐか、又はその進行を停止させて、動脈性高血圧症に抵抗するためのほとんど潜在的な副作用を伴わない単純な手段と見なされ得ることが実証された (Int Urol Nephrol, 2010; 42: 165 - 71)。

#### 【0008】

ビタミンDのこれらの特色が、最も一般的なものを挙げると人口の高齢化、心血管疾患及びがんに関連付けられる疾患に特に関連して、多数の慢性疾患の進行にどのように関連するかが即座に明らかとなる。ビタミンD補給がいかにか、ほとんど全ての慢性疾患にとってほぼ必須要件であるかもまた明らかとなる。実際に、新たな証拠により、慢性疾患及びそれらに関連付けられる心血管系合併症の多くの進行が、ビタミンD欠乏症に関連していることが示唆される。新たな証拠により、ビタミンDに関する古典的な(ゲノム)機能並びに非古典的な(迅速な非ゲノム)機能の理解が改善されてきたため、セコステロイドホルモンとして作用するビタミンDが、免疫系、腎臓系、神経系及び心血管系を含む幾つかの系の重要なモジュレーターであることが明白となってきた (Ethn Dis, 2009; 19: S5 - 8 - 11)。特に、腎臓で生産されるビタミンDは、古典的な内分泌リン酸カルシウム (phosphocalcic) 特性並びに細胞増殖及び分化、アポトーシス、レニン分泌、インターロイキン及び殺菌性タンパク質生産に対するオートクリン及びパラクリン作用を有すると知られている (Med Sci (Paris), 2010; 26: 417 - 21)。細胞増殖、分化及びアポトーシスに対する効果は、ビタミンDの抗がん特性と厳密に関係があることが明らかである。更に、現代社会で増加発生している慢性腎疾患における疫学的研究により、ビタミンD欠乏症及びビタミンDによる処置の欠如は、心血管死亡率の増加に関連付けられることが実証された (Ugeskr Laeger, 2009; 171: 3684 - 9)。したがって、ビタミンDの欠乏症を伴う患者におけるビタミンD補給が、骨障害、心血管系の偶発的出来事 (incidents) の頻度の減少、幾つかの悪性腫瘍のより低いリスク、及び腎機能にかかわらず、免疫系応答の改善に寄与することが一貫して示されていることは驚くべきことではない (Pol Merkur Lekarski, 2009; 27: 437 - 41)。ビタミンDが「万能薬」を表し得るという概念は、「ビタミンDは世界を動かせるのか？」という冗談交じりの表題の論文審査のある刊行物において、近年重視された (Breastfeed. Med. 2008, 3(4), 239 - 250)。

#### 【0009】

幾つかの可能性あるメカニズムにより、ビタミンDがなぜ健康維持に非常に重要であるかを説明し得る。多数の研究により、ビタミンDは、抗炎症及び免疫調節効果を発揮し、したがってそれらの病因論とは関係なく、全ての慢性状態の根底にある基礎的な病理学的変化に対抗することが示されている (Nat Rev Nephrol, 2009; 5: 691 - 700)。

#### 【0010】

「免疫調節」という概念は、ビタミンDと、がんからHIV感染までの全ての慢性状態において頻繁に損なわれ、及び/又は混乱される系である免疫系との間の複雑な関係をもたらす。実際に、ビタミンDは、自然免疫系を刺激して、結核及びHIVなどの感染のクリアランスを容易にしている。この概念と一致して、ビタミンD欠乏症は、多数の近年の疫学的報告において、幾つかの自己免疫障害、各種悪性腫瘍及び心血管リスク因子に関連付けられている。これらの観察的な報告に基づいて、ビタミンD及びその類似体は、様々な状態の防止及び治療に関して評価されている (Curr Opin Nephrol Hypertens, 2008; 17: 408 - 15)。しかしながら、免疫系に対するビタミンDの正味の効果は、免疫賦活薬として簡単に定義することはできない。実際に、場合によって、ビタミンDは免疫抑制薬として作用し、このことは自己免疫障害において観察された有益な効果を説明し得る (Expert Rev Respir Med. 2012 Dec; 6(6): 683 - 704)。

#### 【0011】

例えば、ビタミンDはカテリシジン及びデフェンシンなどの「内因性抗生物質」の転写を誘導し、それがTh1及びTh2細胞媒介性疾患の両方の発生を阻止する。ビタミンDは、喘息の有病率を低減させる。Th1依存性自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、1型糖尿病、クローン病、関節リウマチ等）はまた、抗原提示の阻害、Th0細胞のTh1細胞への極性化の低減及び後者の細胞からのサイトカイン生産の低減に起因して、ビタミンDにより阻害される。更に、ビタミンDの補給は、慢性閉塞性肺疾患の防止又は補助療法に有用であることが証明されている。免疫系に対するビタミンDの作用の複雑さのため、ビタミンDについて言及される「免疫調節」という用語は、十分に正当化されているようである（Curr Opin Pharmacol, 2010; 10: 482 - 96）。

10

#### 【0012】

上記で引用した考察は全て、現代社会において、人々が十分に日光に当たらず、十分な内因性ビタミンD<sub>3</sub>を生産しない場合に、ビタミンD補給が、ほとんどの場合に健康の維持に必要とされるという自明の結論に至る。論理的に結果として生じる疑問：「ビタミンDはどれくらい補給されなくてはならないのか？」に対する答えは、さほど自明ではない。腎臓研究向けの主な定期刊行物（Kidney Int, 2009; 76: 931 - 3）で近年論述されているように、その疑問に対する答えは、単にビタミンDの血清状態（serostatus）に依存するわけではなく、古典的なVDRに関する遺伝子コードの個々の多型により順に影響される受容体の機能性も考慮に入れなくてはならない。ビタミンD系の他の構成成分もまた、ビタミンD補給の妥当性を決定するのに役割を担っており、その疑問に対する答えをより一層複雑にすることが知られている。ビタミンDの効果を媒介する際のVDBP及びVDRの役割に焦点を当てることにより、新規ファミリーのビタミンDベースのサプリメントが開発され得ることを本発明者は見出した。

20

#### 【0013】

VDBPに関する更なるデータは、公開された科学文献から入手可能である。上述する様々な引用に加えて、VDBPに関する更なる参考資料に関して、下記論文が言及されるべきである：

#### 【0014】

Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 163, No. 1, 1989, Calvo M, et al., 「ビタミンD結合タンパク質のビタミンD結合特性と脂肪酸結合特性との間の関係（Relations between vitamin D and fatty acid binding properties of vitamin D-binding protein）」, pages 14 - 17。

30

#### 【0015】

The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 42, No 8, Sep 1992, Bouillon, R, et al., 「多価不飽和脂肪酸は、ヒトビタミンD結合タンパク質に関するビタミンD代謝産物の見かけの親和性を減少する（Polyunsaturated fatty acids decrease the apparent affinity of vitamin D metabolites for human vitamin D-binding protein）」, pages 855 - 861。

40

#### 【0016】

Trends in Biotechnology, Vol. 2, No 7, No 7, Jul 2004, Gomme, P, et al., 「ビタミンD結合タンパク質の治療可能性（Therapeutic potential of vitamin D-binding protein）」, pages 340 - 345。

#### 【0017】

Nutrients, Vol. 5, No 7, Jul 2013, Thyer, L, et

50

a l . , 「ビタミンD系の主な構成成分に関する新規役割：ビタミンD結合タンパク質由来マクロファージ活性化因子は、マクロファージの刺激を通じてヒト乳がん細胞のアポトーシスを誘導する (A novel role for a major component of the vitamin D axis: vitamin D binding protein-derived macrophage activating factor induces human breast cancer cell apoptosis through stimulation of macrophages)」, pages 2577 - 2589。

【0018】

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. 212, No 4, Sept 1996, Ray, R, 「ビタミンD結合タンパク質における分子認識 (Molecular recognition in vitamin D-binding protein)」, pages 305 - 312。

10

【0019】

#### 4.2. VDBP及びビタミンD機能の調節

ビタミンD<sub>3</sub>は、疎水性分子であり、それ自体は、生物学的親水性液体中に可溶性ではない。したがって、ビタミンD<sub>3</sub>は、疎水性構造である細胞原形質膜の付近で、ビタミンD<sub>3</sub>を血液から標的細胞へ運搬する特異的な結合タンパク質に生理学的に結合されている。ビタミンD<sub>3</sub>に特異的に結合して、それを標的細胞の原形質膜へ運搬するタンパク質は、VDBPである。ひとたび原形質膜にあると、ビタミンD<sub>3</sub>は、VDRと相互作用して、VDRを活性化する。活性化されたVDRは、多数の細胞内シグナル伝達タンパク質と相互作用して、最終的には、先のパラグラフに記載するビタミンDの全ての効果をもたらす (Steroids. 2001 Mar - May; 66 (3 - 5): 213 - 21)。ビタミンD<sub>3</sub>の生物学的効果は全て、VDBP及びVDRとのその相互作用により媒介されると記述することができる。

20

【0020】

VDBPは、分子量51～58kDaを有する単一ポリペプチド鎖で構成される血清アルファ2糖タンパク質であり、構造上血清アルブミンと関連する。VDBPはまた、Gc-グロブリン (群特異的構成成分グロブリン) としても知られ、肝臓で合成されて、20～55mg/100mlのレベルで血漿中に存在する。VDBPは、幾つかの細胞型、即ち卵黄嚢内胚葉細胞及び幾つかのTリンパ球の表面上で検出されている。B細胞では、VDBPは、表面免疫グロブリンの連結に関与する。このタンパク質は長さが458残基であり (J Biol Chem, 1986; 261: 3441 - 50)、3つのドメインを形成し、そのうちの最初のドメインがビタミンD結合部位を含有する。3つのドメインは、互いに、及びヒト血清アルブミンにおける類似した反復と限られた配列相同性を共有する。

30

【0021】

しかしながら、これらの周知の相同性の他に、本発明者らは、ビタミンD系の他の構成成分、即ちVDRと配列相同性が存在することを観察した。図1は、VDBPの3つのアイソフォームのアミノ酸配列、及びVDRアミノ酸配列とのアラインメントを示す。アミノ酸1とアミノ酸197との間のトラクト (エクソン1、2、3、4、5) は、VDBPとVDRとの間で20%同一性を示し、アミノ酸217とアミノ酸330との間のトラクト (エクソン6、7、8) は、40%同一性を示す。これらの特徴は、VDBP及びVDRが互いに相互作用する場合があります、したがって下記パラグラフで詳細に説明するように、ビタミンD<sub>3</sub>の効果を媒介するという仮説へと導いた。

40

【0022】

VDBPの疎水性プロファイルのより詳細な解析を図2に示し、ここでは、Kyte及びDoolittleの方法を使用して、アミノ酸配列の相対的疎水性を算出する。VDBP配列の最初の部分 (アミノ末端) は、ビタミンD<sub>3</sub>及び/又はその類似体が疎水性相

50

相互作用を通じて結合する領域に相当する高価の疎水性を示すことが観察され得る。

【0023】

これまでに行われてきたことと、本発明による新規ファミリーの分子の設計との間の重要な差は、古典的にアミノ末端から開始して行われるように、また図1に示すようにVDBP及びVDRのアミノ酸配列を整列させる代わりに、アラインメントを逆向きにして、ビタミンDが結合するVDBPのアミノ末端のアミノ酸配列を、ビタミンDがVDRに結合する疎水性領域であるVDRのカルボキシル末端と比較することである。換言すると、ビタミンDが両方の分子に結合する領域であるVDBP及びVDRの2つの疎水性配列が整列される。これを実施するために、VDBPの最初の部分をVDRの最後の部分と整列させるアラインメントのセンスは、2つの配列が逆並行であるように逆向きにされなくてはならない。この新規タイプの論拠は、2つの鎖のセンスが逆並行であるDNAにおけるヌクレオチド配列のアラインメントによって着想された。

10

【0024】

図3は、VDBPの最初の23個のアミノ酸と、VDRの最後の23個のアミノ酸とのアラインメントを示す。これらは、ビタミンD及び/又は類似体が結合する領域である。

【0025】

VDBPのアミノ末端付近に23個の疎水性アミノ酸(-----MKRVLVLLLA VAFGHALERGRDY)、及びVDRのカルボキシル末端付近に23個のアミノ酸(SFQPEC SMKLTPLVLEVF GNEIS-----)が存在することが観察され得る。これらの2つの配列が図3で示されるように整列される場合、両方のタンパク質において、長い一続き(13~14個)の疎水性アミノ酸(緑色で強調される)が存在することだけでなく、4個の疎水性アミノ酸が同一であり(L L FG; アラインメントの上下で、黄色及び緑色で示される。VDBPの配列は上である)、11個のアミノ酸が類似した機能的原子価を有する(定式記号[\*]、[.]及び[:]により示されるように)ことも観察することが可能である。したがって、VDBP及びVDRのビタミンD結合ドメインでは、機能的同一性又は類似性を示す23個のアミノ酸のうちの総計11個、及び疎水性である13~14個が存在する。

20

【0026】

したがって、本発明による新規ファミリーの化合物は、VDBP及びVDRが、それらの保存されたビタミンD結合疎水性ドメインを通じて相互作用するという発見及びビタミンDが2つのタンパク質間に挟まれ得るという発見に基づく。

30

【0027】

このタイプの疎水性相互作用の他に、VDBPが、VDRとの分子相互作用の別の部位であるThr420で選択的に脱グリコシル化されると、この際には親水性タイプのものが露出され得ることを本発明者らは見出した。

【0028】

実際に、先のパラグラフで記述するように、Gc1s及びGc1fと称される自然に存在するVDBPアイソフォームは、Thr420に結合されるタイプGalNAc-Gal-Siaの直鎖状O連結三糖を保有する(Biochim Biophys Acta . 2010 Apr; 1804(4): 909-17)。シアリダーゼ及びベータ-ガラクトシダーゼなどの酵素の使用は、親水性、塩基性、化学物理特性を有するアルファ-N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分の露出をもたらす。したがって、Thr420位にあるGalNAcは、VDRの207~215位に位置する一続きの酸性アミノ酸と相互作用し得る。この位置では、GalNAcを結合する酸性ポーチを同定する近接近している6個のアミノ酸が存在する(図4)。

40

【0029】

したがって、これまで、VDBPとVDRとの間の相互作用の2つの部位が同定されている: 1. ビタミンD<sub>3</sub>が両方の分子に結合する疎水性の一続きの23個のアミノ酸; 2. de-VDBPのGalNAc部分が結合するVDRにおける親水性の一続きの酸性アミノ酸。

50

## 【0030】

上述の2つの結合部位の他に、本発明者らは、今回、ビタミンD<sub>3</sub>結合に関与しないVDBPの領域中に、VDBPとVDRとの間の相互作用の別の部位を発見した。

## 【0031】

実際に、ドメインIIとドメインIIIの間、即ち304位と387位との間に位置する領域において、VDBPは、脂肪酸を結合する浅い間隙(shallow cleft)を示し(Biochem Biophys Res Commun, 1988 Jun 30; 153(3): 1019-24)、この浅い間隙に位置する脂肪酸は、細胞原形質膜と相互作用することができ、したがって、膜の外側上のVDBPと、細胞内部に位置するVDRとの間の相互作用を支持する。上記で引用したVDRの23個の疎水性アミノ酸(即ち、ビタミンD<sub>3</sub>を結合するもの)を、VDBPの不飽和脂肪酸結合部位の相当する疎水性アミノ酸(特に、356~386位におけるもの)と整列させる場合に、かなりの度合いの機能的相同性が観察され得る: 実際に、長い一続きの疎水性アミノ酸において類似した機能的原子価を有する8個のアミノ酸が存在する。

10

## 【0032】

VDBPが多重結合/認識部位を有するという観察は驚くべきことではない。したがって、VDBPが、ビタミンDの他に、免疫グロブリン及びアクチンを結合して、更にはアクチンスカベンジャーとして作用する多機能タンパク質であることは周知である。アクチン単量体に対する親和性は高く、アクチン結合部位は、残基350~430間のドメインIII内に存在すると報告されている(図1を参照)。VDBP及びアクチンの複合体の構造(Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99: 8003-8)により、ドメインIIIが、アクチンのサブドメイン1と3との間にアクチン結合接触を形成することが確認される。VDBPのこれらの特徴は、ビタミンD代謝に直接的に関連されないにもかかわらず、アクチンが真核細胞において最も豊富なタンパク質であり、VDBPのアクチン除去能力を上回る場合に循環中のアクチン含有血栓の致命的な形成を引き起こし得る細胞壊死中に放出される主な細胞タンパク質であるため、がん及び心血管疾患などの細胞壊死を含む慢性状態において極めて重要である(Dan Med Bull, 2008; 55: 131-46)。したがって、近年の研究により、血清レベルのVDBPの決定が、急性肝不全、アセトアミノフェン過剰用量、多発外傷又は多臓器不全症候群又は敗血症を伴う患者における予後指標として有用であることが実証された。他の研究により、VDBPレベルと、慢性閉塞性肺疾患、甲状腺疾患、糖尿病、多発性硬化症及びサルコイドーシスに対する耐性又は感受性との間の関連性が示唆される(Postepy Hig Med Dosw, 2008; 62: 625-31)。

20

30

## 【0033】

更に、VDBPが、23個の疎水性アミノ酸結合ドメインでビタミンD<sub>3</sub>を一意的に結合しないことに留意すべきである。ビタミンD類似体と称され、且つVDRを結合して、活性化することが可能な他の化合物は、VDBPに対して親和性を示すが、ビタミンD<sub>3</sub>の親和性よりも一般的に低い。例えば、2つの非高カルシウム血性ビタミンD類似体であるカルシポトリエン及び22-オキサカルシトリオールは、カルシウム血性作用の低減を担っている低VDBP親和性を示す(Am J Kidney Dis, 1998; 32: S25-39)。

40

## 【0034】

## 4.3. VDBP及びVDRシグナル伝達

最近まで、ビタミンD<sub>3</sub>のシグナル伝達メカニズムは下記の通りに記載されていた: 非常に疎水性の分子であるビタミンD<sub>3</sub>は、VDBPにより血液及び生物学的液体中で運搬される。ひとたび細胞原形質膜(高度に疎水性の構造)のレベルにあると、ビタミンD<sub>3</sub>は放出されて、それは原形質膜を自由に通過して、ひとたび細胞内部にあると、VDRであるそのタンパク質様受容体と相互作用する。二量体複合体ビタミンD<sub>3</sub>/VDRは、核へ移行して、そこで二量体複合体ビタミンD<sub>3</sub>/VDRは、多数のシグナル伝達タンパク質と相互作用して、最終的にビタミンD<sub>3</sub>の生物学的効果を担う多数の種々の遺伝子の発

50



現を制御する。VDRは、膨大な数の正常組織及び病理組織で発現されるため、このことは、生理学及び病理学におけるビタミンD<sub>3</sub>の多数の効果及び多面的な効果を説明する(概説に関しては、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101(16): 6062-7を参照)。この筋書きでは、VDBPの役割は、血液中、及び生物学的液体中でビタミンD<sub>3</sub>を単に運搬することであり、シグナル伝達メカニズムに関与することではなかった。

#### 【0035】

しかしながら、より最近の研究により、この筋書きが不完全であることが実証された。実際に、ビタミンD<sub>3</sub>は、原形質膜を自由に通過しないが、複合体VDBP/ビタミンD<sub>3</sub>が細胞に内部移行され、ひとたび細胞内部にあると、それはVDRに結合することが実証された。内部移行は、メガリン、キュピリン及びアダプタータンパク質disable d-2と呼ばれる原形質膜関連タンパク質により実施される(J. Nutr. 2008 Jul; 138(7): 1323-8)。この筋書きによれば、VDBPは、ビタミンD<sub>3</sub>とVDRとの間の相互作用に必須である。

#### 【0036】

しかしながら、先述のセクションに記載するように、VDBPは、2つの形態、即ち完全にグリコシル化された形態及び脱グリコシル化された形態で存在し得る。先述のセクションで提唱されるモデルによれば、VDBPの脱グリコシル化された形態は、Thr420にあるGalNAcと、上述のVDRの一連の酸性アミノ酸との親水性相互作用の結果、VDRとより安定な相互作用を樹立することができる。

#### 【0037】

長年にわたって、VDRは細胞質及び核中に局在化されるのに対して、VDBPは原形質膜を通過することができず、したがって表面受容体、場合によってはレクチン型受容体により認識されなくてはならないと考えられてきたため、この筋書きは、当初は異様に見えたかもしれない(J. Biol. Chem., 1999; 274: 10697-705)。しかしながら、VDRに関する遺伝子コードの多型と、ヒト単球におけるde-VDBPに対する差次的な応答との(J. Nephrol. 2012 Jul-Aug; 25(4): 577-81)、並びに転移性乳がんとの(Oncol. Res., 1998; 10(1): 43-6)間の関連性の観察は、de-VDBPとVDRとの間の直接的な分子相互作用の明らかに異様な事柄を支持する。この仮説を支持して、VDRが原形質膜に移行し(J. Cell Biochem. 2002; 86(1): 128-35)、原形質膜関連VDRが、ビタミンDの迅速な非ゲノム効果を担う(Calcif. Tissue Int (2013) 92: 151-162)ことが観察される。

#### 【0038】

この新規シグナル伝達の筋書きによれば、ビタミンD<sub>3</sub>のシグナル伝達メカニズムは下記である: VDBPは、上述するようにビタミンD<sub>3</sub>及び脂肪酸を運搬し、したがって、三量体複合体を形成する。この複合体は、ビタミンD<sub>3</sub>及び脂肪酸が結合されているVDBPの疎水性部分を通じて、原形質膜と相互作用する。複合体は、細胞タンパク質により内部移行される。ひとたび細胞内部にあると、複合体は、膜関連VDRと相互作用する。VDBPが完全にグリコシル化されている場合、相互作用は、疎水性相互作用を通じてのみ媒介されるが、VDBPが脱グリコシル化され、GalNAcが露出されている場合、VDRとの相互作用は、それが親水性の塩基-酸相互作用を含むため、より安定である。この後者の場合、四量体複合体、即ち[ビタミンD<sub>3</sub>/de-VDBP/脂肪酸/VDR]は核に移行し、そこで、それは、他のシグナル伝達タンパク質及びDNAと相互作用して、したがって活性化されたVDRにより修飾されることが知られている多数の遺伝子を調節する。

#### 【0039】

要約すると、複合体[ビタミンD<sub>3</sub>/VDBP/脂肪酸]はVDRを活性化し、これまでのところビタミンD<sub>3</sub>に起因する効果を担う。VDBPの脱グリコシル化された形態は、それがより安定な相互作用を樹立することができるので、VDRを活性化するのにより

10

20

30

40

50

効率的である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0040】

したがって、本発明の目的は、骨格として、 $d e - V D B P$ を使用して、より効率的な方法で $V D R$ を活性化することが可能な新規分子／複合体の全体的なファミリーを提供することである。

【0041】

上述した事項に基づいて、このファミリーの分子／複合体は、望ましくは、上記のセクション4.1に記載する様々な条件で使用されているビタミンDから作られる現行のサプリメントと比較して、下記利点を有するべきである。

10

【0042】

1.それらは、自然界に存在する実際の分子配列を模倣しているため、効力がはるかに大きいこと。

【0043】

2.それらは、骨格として $d e - V D B P$ を使用するため、安定性がはるかに大きく、したがって効率がより大きいこと。

【0044】

3.このアプローチは、 $d e - V D B P$ 骨格上のビタミン $D_3$ 及び脂肪酸を、特定健康状態に有益であることが知られている特性が付与された他の $V D R$ アゴニスト及び／又は脂肪酸で置換することにより、多種多様な新たな分子を設計することを可能にすべきことである。続いて、新たな分子／複合体の各タイプは、特定の疾患又は状態を標的とすることができる。

20

【0045】

4.各々の対象の $V D R$ の遺伝子多型を考慮するテーラーメイドの分子／複合体を設計することができる。

【0046】

5.これらの新規分子／複合体は、リボソームに封入することができ、これは、正規のビタミン $D_3$ では行うことはできない。リボソームは、経口的に消費されて、静脈内注射を使用して得ることが可能である効率に引けを取らない効率で、それらの内容物を血漿中に送達することができる。

30

【0047】

5.本発明の一般的な説明

本発明は、ビタミンD（又はその類似体）及び脂肪酸が、疎水性相互作用によって結合されている $d e - V D B P$ の骨格に基づく分子又は多分子複合体を提供する。この新規ファミリーの分子／複合体は、これらの新たな分子及び分子の新たな複合体が、より安定且つより活性であり、特定疾患を標的とするように特異的に設計することができ、及び／又は個々の遺伝的可変性（*genetic variables*）を満たすことができ、効率的な送達のためにリボソーム中に封入することができるという利点を有するビタミン $D_3$ 補給の全ての公知の有益な効果を提供する。

40

【0048】

実際に、今まで、ビタミン $D_3$ は、経口又は非経口投与用のサプリメントとして供給され、現在商業目的での製剤では、ビタミン $D_3$ は、いかなる他の分子とも複合体形成されず、特に、製剤では、それは、 $d e - V D B P$ とはもちろん、 $V D B P$ であるその自然に存在する結合タンパク質と複合体形成されない。したがって、ビタミン $D_3$ が経口摂取される（又は投与される）と、ビタミン $D_3$ は、血漿 $V D B P$ に結合し、それは細胞へ運搬されて、そこでビタミン $D_3$ は、上記セクション4.1に記載するようにその作用を発揮する。しかしながら、ビタミン $D_3$ は、 $d e - V D B P$ と複合体形成されないため、その受容体である $V D R$ との相互作用は、本発明で提唱されるようにそれが $d e - V D B P$ と複合体形成された場合で見られ得るほど安定でも効率的でもない。

50

## 【0049】

概して、本発明によれば、下記工程を含む修飾ビタミンD含有複合体の生産に関するプロセスが提供される：

## 【0050】

1. VDBPは、例えば(Biochim Biophys Acta, 2010 Apr; 1804(4): 909-17)に記載される方法に従って、順次脱グリコシル化される。

## 【0051】

2. ビタミンD<sub>3</sub>又はその類似体は、疎水性相互作用を通じて、de-VDBPに結合される。

## 【0052】

3. 不飽和脂肪酸(UFA)は、複合体[ビタミンD<sub>3</sub>/de-VDBP]に結合されている。

## 【0053】

これらの三量体複合体[ビタミンD<sub>3</sub>/de-VDBP/UFA]は、経口投与又は例えば軟膏における局所投与を可能にするようにリボソーム中に封入されてもよい。或いは、複合体は、それ自体が舌下投与用の適切な担体中で使用されてもよい。更なる代替法では、それらは、腫瘍内又は腫瘍周囲の注射に適した混合物中で使用されてもよい。

## 【0054】

このプロセスを実施することにより、ビタミンD(又はその類似体)及び脂肪酸がde-VDBPに結合されている新たな分子及び多分子複合体のファミリーが生産され得る。ビタミンD<sub>3</sub>が、様々なビタミンD類似体で置換することでき、幾つかのUFAは、de-VDBP分子において特異的な結合部位と相互作用するようにされ得るため、このアプローチを用いて生産することができる新たな分子の数は非常に多い。

## 【0055】

本発明における新規性の要素は、ビタミンD<sub>3</sub>が生理学的なシグナル伝達で見られるため、ビタミンD<sub>3</sub>の自然分子配列を模倣する多分子複合体の当初の設計に存する。この設計は、VDBP及びVDRの分子構造に関する本発明者らの観察に基づく。既存の製剤を上回るこれらの分子の利点は、先のセクションに列挙される。これらの分子の有用性は、それらが、既存のビタミンDサプリメントよりも活性であり、より安定であり、且つより特異的であり、全てのそれらの数多くの用途において既存のビタミンDサプリメントを置換することができるという事実に存する。

## 【0056】

6. 好ましい実施形態の具体的な記述

6.1. 本発明による新たな分子又は分子の混合物の調製に関する一般的方法を以下のセクション6.1.1~6.1.5に提示する：

## 【0057】

6.1.1. VDBPの脱グリコシル化。

VDBPの脱グリコシル化は、Bradstreetら(Autism Insights 2012: 4 31-38)において修飾された場合のRavnsborgら(Biochim Biophys Acta, 2010 Apr; 1804(4): 909-17)の方法に従って達成された。簡潔に述べると、VDBPは、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-セファロース高アフィニティクロマトグラフィー又はアクチン-アガロースアフィニティクロマトグラフィーを使用して、米国赤十字社(American Red Cross)から得られる精製ヒト血清から単離された。結合している材料を溶出させて、続いて3つの固定化酵素とのインキュベーションにより更に加工処理した。タンパク質含有量及び濃度は、標準的なBradfordタンパク質アッセイ法を使用してアッセイした(Anal. Biochem. 1976; 7: 248-254)。

## 【0058】

6.1.2. de-VDBPへのビタミンD<sub>3</sub>の結合及び多分子複合体の新たなファミリ

10

20

30

40

50

ーの第1のメンバーの調製。

ビタミンD<sub>3</sub> [1, 25 - ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> (6, 19, 19 - d3)] は、Sigma - Aldrich から得られた。その分子量は、原子% 計算により 419.61 Da である。de - VDBP とのインキュベーションは、試験管中で、25 で 30 分間穏やかに振とうして実施した。ビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP の比は、de - VDBP の分子量を 58 kDa とみなして算出した。下記比を使用した：1 / 10 ; 2 / 10 ; 5 / 0 ; 1 / 1 (ここで、1 番目の数は、ビタミンD<sub>3</sub> 分子の算出数を指し、2 番目の数は、de - VDBP 分子の算出数を指す。したがって、1 / 1 の比は、de - VDBP の各 1 分子当たりビタミンD<sub>3</sub> 1 分子が存在したことを示す)。ビタミンD<sub>3</sub> と de - VDBP との間の疎水性相互作用を支持するために、Cecchi らに概括される原理に従って、種々のイオン強度を有するインキュベーション緩衝液を使用した (Clin Chim Acta . 2007 Feb ; 376 (1 - 2) : 142 - 9)。本質的には、ビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP の比が増加した場合に、イオン強度が増加された。このようにして、より多数の分子間での疎水性相互作用が支持及び安定化された。インキュベーション緩衝液中の NaCl の濃度は、0.2 ~ 2.0 M の範囲であった。他の実験では、Ital J Anat Embryol . 2001 Jan - Mar ; 106 (1) : 35 - 46 に記載される方法に従って、NaCl の代わりに塩酸グアニジンを使用した。インキュベーション後、過剰の塩を除去するために、60 kDa で設定されたカットオフを有する透析膜に対して、試料を徹底的に (24 時間) 透析した。24 時間の透析後、NaCl 濃度を、いわゆる生理食塩水溶液の濃度に対して調節した。最終濃度は、de - VDBP を考慮して調節した。例を挙げると、100 ng / ml の濃度を有するバイアル中では、これは、de - VDBP に結合されている他の分子 (ビタミンD<sub>3</sub> 又は UFA) が存在したかどうかとは無関係に、de - VDBP の濃度を指す。以下を参照されたい。

【0059】

手順の終わりに、一連の新たな分子及び新たな分子の混合物が、使用したビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP の比に依存して得られた。簡略化するために、比が 1 / 10 で設定された場合、混合物中には de - VDBP 10 分子及びビタミンD<sub>3</sub> 1 分子のみが存在していた。したがって、de - VDBP 1 分子のみが、ビタミンD<sub>3</sub> 1 分子と複合体形成された (即ち、結合された)。de - VDBP の残りの 9 分子は、インキュベーション媒質中のイオン強度のため、それら各々の疎水性ドメインを通じて互いに相互作用した。しかしながら、de - VDBP の数が奇数であった (即ち、それが 9 であった) ため、de - VDBP 1 分子が「遊離」のままであった。したがって、極めて単純に言うと、1 / 10 の比では、3 つのタイプの分子：ビタミンD<sub>3</sub> と複合体形成された de - VDBP (即ち、二量体複合体 [ビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP]) 1 分子；その受容体又は他の分子と自由に相互作用できる de - VDBP 1 分子；各対で、1 個の de - VDBP 分子が別の de - VDBP 分子と複合体形成される 4 対の de - VDBP が存在したと記述することができる。次に、これら 3 つのタイプの分子それぞれ 1 つが、細胞レベルで、及びその結果として生物全体で、別個の作用を実施することができた。二量体複合体 [ビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP] は、細胞原形質膜に結合して、VDR を相互作用して、VDR を活性化して、「背景」セクション (4.3) に記載するシグナル伝達カスケードを誘発させる。「遊離」の de - VDBP は、原形質膜の細胞外部分上のそのコンドロイチン硫酸プロテオグリカン受容体に結合して、そのシグナル伝達カスケードを誘発する (J Immunol . 1999 Aug 15 ; 163 (4) : 2135 - 42)。de - VDBP の 4 つの対のそれぞれ 1 つが、(Mol Immunol . 2007 Mar ; 44 (9) : 2370 - 7) に記載されるように、細胞輸送タンパク質を通じて標的細胞へ内部移行される。

【0060】

この方法を用いて生産される分子の活性は、水性アルコール系生理食塩水溶媒中にそれらを溶解させることにより更に調節することができる。この特定のタイプの賦形剤は、静脈内製剤において日常的に使用される。改善された結果は、等量の生理食塩水及び水性混

合アルコール溶媒（20% v/v エタノール、30% v/v プロピレングリコール）、平衡水の混合物を使用すると確実に得ることを本発明者らは見出した。この賦形剤は部分的に疎水性であるため、上述の対における de - VDBP 間の相互作用を崩壊させることができる。したがって、その存在下では、1 個の二量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP ] 及び 9 個の「遊離」の de - VDBP 分子が存在する。非常に明確に、この後者の組合せは、細胞及び生物レベルで、異なる作用を実施する。例えば、この組合せは、広範な壊死及び壊死細胞からのアクチンの放出が見られる進行がんで使用することができる。この場合、de - VDBP の 9 個の「遊離」の分子は、アクチンスカベンジャーとして作用して、毒性アクチンを除去することができるのに対して、二量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP ] は、上記「背景」セクションで言及するように、細胞応答を刺激し得る。

10

#### 【0061】

また、このような溶媒を使用して、6.1.1 に記載するように調製される de - VDBP を可溶化することができる。実際に、de - VDBP 分子のみが存在する生理食塩水溶液中では、イオン強度がそれらの大部分を、それら各々の疎水性ドメインを通じて互いと相互作用させて、それらのうちのほんの少数が、その受容体又は他の分子と相互作用するのに「遊離」のままである。これらの相互作用のため、生理食塩水中の de - VDBP の生物活性は非常に低いと記述され得る。それは水性アルコール系生理食塩水溶媒中でそれを可溶化することにより桁違いに増加することができる。

20

#### 【0062】

6.1.3. 不飽和脂肪酸の、二量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP ] への結合。

不飽和脂肪酸は、Sigma - Aldrich から得られた。不飽和脂肪酸は、下記であった：

#### 【0063】

i. 式  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  を有する 18 : 1 シス - 9 の脂質数で略記される一不飽和オメガ - 9 脂肪酸であるオレイン酸。

#### 【0064】

ii. オメガ - 3 脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA、又は同様にイコサペンタエン酸)。化学的文献では、それには名称 20 : 5 (n - 3) が付与される。EPA は、20 炭素鎖及び 5 個のシス二重結合を有するカルボン酸であり、第 1 の二重結合は、オメガ末端から 3 番目の炭素に位置する。

30

#### 【0065】

両方の UFA は、4 つの特徴のため選択された：高い疎水性；de - VDBP における疎水性アミノ酸の浅い間隙に結合する能力；シス立体配置における二重結合の存在に起因したそれらの分子構造に固有の可撓性；それらの文書で十分裏付けされた健康促進特性。

#### 【0066】

他のポリ UFA もまた、以下に記載するように考慮された。

#### 【0067】

UFA は、先述のパラグラフに記載する手順に倣って二量体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP ] 複合体とともにインキュベートされた。[ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP / UFA ] の比は、各 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP ] 複合体における de - VDBP 分子の数を考慮して算出した。例えば、1 / 10 の比のビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP から生じる組成物中には、[ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP ] 1 分子及び de - VDBP ( 対で結合されているか、又は遊離している ) 9 分子が存在した。UFA ( 例えば、オレイン酸 ) が比 1 / 1 で添加されると、これは、オレイン酸と同程度多い de - VDBP の分子が存在し、したがって、最終混合物中には、三量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP / オレイン酸 ] 1 分子；二量体複合体 [ de - VDBP / オレイン酸 ] 9 分子が存在したことを意味する。代わって、オレイン酸が比 1 / 10 で添加された場合、これは、最終混合物中に、たった 1 個の三量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP / オレイン酸 ]、及

40

50

び対で結合されているか、又は遊離している 9 個の  $d e - V D B P$  分子が存在したことを意味する。三量体複合体 [ ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  / オレイン酸 ] のモデルレンダリングを図 5 に表す。ビタミン  $D_3$  及びオレイン酸はともに、タンパク質の浅い間隙に位置するそれらの各々の疎水性結合部位に結合されるのが明確に視認でき ( 矢印 )、 $V D B P$  の行われた脱グリコシル化が、楕円中に示されるような  $T h r 4 2 0$  にある  $G a l N A c$  の存在により明らかとなる。

#### 【 0 0 6 8 】

この手順を使用して、多数の可能性ある組合せが、4 個の変数 :  $i$  : ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  の比、 $i i$  . [ ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  ] /  $U F A$  の比、 $i i i$  .  $U F A$  のタイプ ;  $i v$  . 水性アルコール系生理食塩水溶媒の存在を考慮して、迅速且つ単純な方法で得られ得る。

10

#### 【 0 0 6 9 】

このようにして得られる組合せは、ビタミン  $D_3$  の使用が有益であるとすでに実証されている特定条件を標的とし得る。例えば、分子の大部分が三量体タイプ [ ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  / オレイン酸 ] に属する組合せは、原形質膜の脂質組成が一般的である条件における  $V D R$  シグナル伝達の最大の刺激に使用され得る。実際に、図 6 に示される分子レンダリングで実証されるように、どちらかという「直鎖状」分子であるオレイン酸の存在は、 $i$  . ビタミン  $D_3$  結合ドメイン、 $i i$  .  $G a l N A c$  / 酸性アミノ酸認識ドメインである  $d e - V D B P$  /  $V D R$  相互作用を媒介する 2 つの認識ドメイン間の幾らか線状の相互作用を付与する。しかしながら、図 7 に報告されるように、三量体複合体が [ ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  /  $E P A$  ] である場合、 $E P A$  はより多くの「曲線」立体配置を有するポリ不飽和脂肪酸であるため、 $E P A$  と原形質膜との相互作用が、複合体 [ ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  /  $E P A$  ] と  $V D R$  との間の異なる空間的相互作用を決定する。図の左上角の四角内に、 $d e - V D B P$  及び  $V D R$  の相補的な疎水性アミノ酸配列が報告される。上のラインは、 $E P A$  が結合されている  $d e - V D B P$  配列を指し、下のラインは、 $V D R$  の疎水性の 2 3 個のアミノ酸配列を指す。 $E P A$  が結合されているかなりの度合いの機能的相同体が存在し、実際に、長い一続きの疎水性アミノ酸 ( 図 7 中では青色で強調されている ) において類似した機能的原子価を有する 8 個のアミノ酸が存在することを言及することが可能である。図 7 に記載される四量体複合体 [ ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  /  $E P A$  /  $V D R$  ] の全体的な立体配置は、図 6 で表される比較的線状の四量体複合体 [ ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  / オレイン酸 /  $V D R$  ] よりも球形である。したがって、下記セクションで記載するように、四量体複合体 [ ビタミン  $D_3$  /  $d e - V D B P$  /  $E P A$  ] は、慢性炎症からがん及び神経疾患までの  $E P A$  が有益であると実証されている疾患全てにおいてより効率的であり得る。実際に、 $U S \ National \ Institute \ of \ Health's \ MedlinePlus$  は、 $E P A$  ( 単独で、又は他の - 3 供給源と連携して ) が、有効な治療であると知られているか、又は考えられている病状を列挙しており、これらの大部分が炎症を低減させるその能力を含む。上述するものなどの三量体複合体は、単一の安定なシグナル伝達効率的な分子において、ビタミン  $D_3$  及び  $E P A$  の十分に実証された有益な特性を組み合わせる。

20

30

#### 【 0 0 7 0 】

40

6 . 1 . 4 . 類似体によるビタミン  $D_3$  の置換。

上述の二量体又は三量体複合体では、ビタミン  $D_3$  は、 $V D R$  を刺激して、上述のシグナル伝達カスケードを誘発することが可能であるが、 $d e - V D B P$  又は  $V D R$  に対して異なる親和性を有する種々の類似体で置換することができる。ビタミン  $D$  類似体は、ビタミン  $D_3$  の基本的な化学構造から開始して合成されるが、 $V D B P$  及び / 又は  $V D R$  に対して異なる親和性を有する分子である (  $J \ Med \ Chem . 2 0 1 2 \ Oct \ 2 5 ; 5 5 ( 2 0 ) : 8 6 4 2 - 5 6$  ) 。それらの大部分は、自然のビタミン  $D_3$  の活性と類似した抗増殖活性、分化促進 (  $pro - differentiating$  ) 活性及び転写活性を有するが、あまり顕著ではない高カルシウム血性効果を有する化合物を得るために合成される。現在、それらの主な適用分野は、慢性腎疾患 (  $Curr \ Vasc \ Pha$

50

rmacol. 2013 May 16)、がん (Anticancer Agents Med Chem. 2013 Jan 1; 13 (1): 118 - 25)、糖尿病性腎症 (Scientific World Journal. 2013 Apr 24; 2013: 928197)、乾癬 (J Drugs Dermatol. 2013 May 1; 12 (5): 546 - 50) 及び線維症の防止 (Lab Invest. 2012 Dec; 92 (12): 1666 - 9) に存する。試験されてきた類似体の幾つかは、ドキセルカルシフェロール、アルファカルシドール、パリカルシトール (19 - ノル - 1, 25 - ジヒドロキシビタミンD2)、マキサカルシトール (1, 25 - ジヒドロキシ - 22 - オキサ - ビタミンD3)、カルシポトリオール (カルシポトリエン) 及び22 - オキサカルシトリオール (OCT) である。これらの化合物の大部分が、VDBPに対してより低い親和性を有する (Am J Kidney Dis, 1998; 32: S25 - 39)。二量体及び三量体複合体を調製する手順は、6.1.2 及び 6.1.3 に記載する手順と同一であった。また、これらの複合体の場合、水性アルコール系溶媒を含むことができる。ビタミンD<sub>3</sub> がその類似体の1つで置換され、それらそれぞれが特有の特性を有するこれらの二量体及び三量体複合体は、それらが単独で投与される場合の類似体に関して示される全ての条件に関して示され得る。同様にこの場合では、本発明の新規性は、類似体の安定化、UFAとの相互作用、最終的には活性化されたVDRを介したより効率的なシグナル伝達を支持するための骨格としての de - VDBP の使用にある。

#### 【0071】

6.1.5. 上述の複合体を含有するリボソームの調製。

リボソームは、脂質二重層で構成される人工的に調製される小胞である。リボソームは、栄養分及び調合薬の投与用の小胞として使用され得る。リボソームは、経口投与されて、ひとたび吸収されると、それらは、静脈内注射の効率よりもほんのわずかに低い効率で、血中にそれらの内容物を送達する。これらの特徴のため、リボソーム内の疎水性及び親水性の栄養分及び調合薬の封入は、胃系の破壊要素を迂回して、細胞及び/組織への封入された栄養分/薬の送達を助長する非常に有効な方法である。2008年の時点で、リボソーム送達系を用いた11個の薬物が認可されており、6個の更なるリボソーム薬が臨床試験中であった (Clin Pharmacol Ther. 2008 May; 83 (5): 761 - 9. Epub 2007 Oct 24)。これらは下記を含む：

真菌感染用のリボソームアンホテリシンB

真菌及び原虫感染用のリボソームアンホテリシンB

悪性リンパ性髄膜炎用のリボソームシタラビンDepocyt

HIV関連カポジ肉腫用のリボソームダウノルビシンDaunoXome

転移性乳がんにおけるシクロホスファミドとの併用療法用のリボソームドキソルビシン

A型肝炎用のリボソームIRIVワクチン

インフルエンザ用のリボソームIRIVワクチン

体内術後鎮痛用のリボソームモルヒネ

加齢性黄斑変性症、病的近視、眼ヒストプラズマ症用のリボソームベルテボルフィン

HIV関連カポジ肉腫、転移性乳がん、転移性卵巣がん用のリボソーム - PEGドキソルビシン

ミセルエストラジオール。

#### 【0072】

6.1.1.、6.1.2.、6.1.3. 及び 6.1.4. に記載する de - VDBP 及び多分子複合体を封入するように設計されるリボソームを調製する際、本発明者らは、de - VDBP の GalNAc 部分間の分子相互作用を考慮した。実際に、分子及び/又は複合体の他の領域全てが、特定リボソームを設計する際に考慮される必要がある表面電荷の特有の配置を提示しない。

#### 【0073】

下記脂質組成 (Sigma - Aldrich) (それら全てが、負の表面電荷を生じる) が考慮された：

30 : 40 : 30 の比の 1 - パルミトイル - 2 - オレイル - ホスファチジルコリン ( P O P C ) : コレステロール : 1 - パルミトイル - 2 - オレイル - ホスファチジルグリセロール ( P O P G ) 。

L - - ホスファチジルコリン , - オレイル - - パルミトイル、8 . 7  $\mu\text{mol}$  。 L - - ホスファチジル - D L - グリセロール , ジオレオイル、1 . 0  $\mu\text{mol}$  。 コレステロール、6 . 9  $\mu\text{mol}$  。

L - - ホスファチジルコリン , ジステアロイル、8 . 4  $\mu\text{mol}$  。 L - - ホスファチジル - D L - グリセロール , ジステアロイル、0 . 9  $\mu\text{mol}$  。 コレステロール、6 . 9  $\mu\text{mol}$  。

#### 【 0 0 7 4 】

リポソームは、LiposoFast Liposome Factory (Sigma - Aldrich) を使用して調製した。この方法は、一様なサイズの単層リポソームの迅速で効率的な形成を可能にする。原理は下記である：脂質エマルジョンを、多孔質ポリカーボネート膜に通して繰り返し押し出して、膜支持カプセルに取り付けた特殊修飾した機密性シリンジにより前後に力かける。キットに備えられたシリンジを用いて、ユニットは、0 . 5 mL 容量、事実上デッドボリュームゼロを有する。200 ~ 400 nm の孔サイズの膜を使用して、所望のサイズのリポソームを生産した。非常に明確に、より小さなサイズのリポソームは、de - VDBP などの単一分子に使用され、より大きなサイズのリポソームは、上記セクション 6 . 1 . 2、6 . 1 . 3 及び 6 . 1 . 4 に記載する二量体及び三量体複合体に使用された。

#### 【 0 0 7 5 】

リポソームを通じて上述の新規化合物全てを送達するという新規性及び利点は明らかである。ビタミン D 系に関連する強力且つ安定な分子は、経口投与することができ、静脈内注射を通じて達成可能な濃度と似た血漿濃度に達し得る。リポソームは、抗がん、抗 HIV 及び抗微生物医薬品を効率的に送達するのに現在使用されているため、ひとたび上述の新規多分子複合体を封入するのに使用されると、それらは、ビタミン D 及びその類似体が有効であると証明されている条件全てで使用することができる。

#### 【 0 0 7 6 】

6 . 2 . 6 . 1 に記載する方法に従う特定疾患又は状態を対象とした特定分子及び分子の混合物の調製

6 . 2 . 1 . 一般の原理。

以下に記載する分子及び分子の混合物は、種々の疾患及び状態における細胞の特有の生体分子の特徴を考慮して、セクション 6 . 1 に記載する方法に従って設計される。これらの製剤の一般的な命名法は下記である：「I」は、注射用を表す。「L」は、経口で、又は経皮的に使用され得るリポソーム形態を示す。「S」は、生理食塩水を表し、化合物が生理食塩水溶液中に溶解されることを示す。「X」は、上記セクション 6 . 1 . 3 で指定される水性アルコール系生理食塩水溶媒を表す。ギリシャ文字を使用して、混合物の名称を示す。最終的な de - VDBP 濃度は、100 ng / mL である。他の濃度は、特定ニーズに従って容易に達成することができる。

#### 【 0 0 7 7 】

6 . 2 . 2 . 下記は、本発明による、種々のタイプのがんを標的とするサプリメント又は注射用製剤として意図される分子及び分子の混合物の例の説明である。

#### 【 0 0 7 8 】

6 . 2 . 2 . 1 . I X - アルファ / I S - アルファ。進行がん、即ちステージ 4 及び転移したがん用の分子の混合物。この製剤は、壊死がん細胞から放出される高レベルの毒性アクチンを考慮する。したがって、それは、1 / 10 の比のビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP で開始して調製される。オレイン酸が 1 / 10 の比で添加される。この製剤では、アクチンを除去して、de - VDBP 受容体と相互作用するのに利用可能な最多数の「遊離」の de - VDBP が存在する。三量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP / オレイン酸 ] は、原形質膜で VDR と相互作用して、VDR シグナル伝達を誘発する。



## 【0079】

6.2.2.2. IS - ベータ。白血病、リンパ腫及びアポトーシスが調節解除される他のがん用の分子の混合物。この製剤は、これらのタイプのがんにおいて最も頻繁に活性化される遺伝子の1つである遺伝子 Bcl - 2 の疎水性プロファイルを考慮する。de - VDBP 及び Bcl - 2 の疎水性プロファイルの比較を図 8 に報告する。この製剤は、生理食塩水中の 2 / 10 の比のビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP で開始して、オレイン酸が 1 / 1 の比で添加される。この製剤では、Bcl - 2 との疎水性相互作用を通じて相互作用して、したがってその作用を阻害する多数の疎水性二量体複合体 [ de - VDBP / オレイン酸 ] が存在する。この相互作用を支持するために、生理食塩水のイオン強度が使用される。比較的数量少ない三量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP / オレイン酸 ] は、原形質膜で VDR と相互作用して、VDR シグナル伝達を誘発する。

10

## 【0080】

6.2.2.3. IX - ガンマ / IS - ガンマ。結腸及び乳がん用の分子の混合物。分子のこの混合物は、ヒト癌腫の約 50 % に関与する腫瘍抑制因子の遺伝子産物 p53 を標的とする (BMC Cancer, 2013 Jun 5; 13 (1): 277)。図 9 で観察され得るように、p53 は、Bcl - 2 よりもはるかに低い疎水性プロファイルを示す。したがって、このタンパク質を標的とする分子の設計は、de - VDBP の GalNAc 部分を含む親水性相互作用を考慮しなくてはならない。この製剤は、1 / 10 の比のビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP で開始する。オレイン酸が 1 / 10 の比で添加される。この製剤では、ひとたび内部移行されると、p53 との親水性相互作用を通じて相互作用して、その作用を阻害する多数の親水性二量体複合体である「遊離」の de - VDBP 分子が存在する。親水性 (hydrophilia) を損なうことなく、内部移行を支持するために、オレイン酸が低い比で、即ち 1 / 10 で添加される。三量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP / オレイン酸 ] は、原形質膜で VDR と相互作用して、VDR シグナル伝達を誘発する。

20

## 【0081】

6.2.2.4. IX - デルタ ; LS - デルタ。黒色腫及び乾癬用の分子の混合物。分子のこの混合物は、ヒト黒色腫 (Eur J Surg Oncol, 1996 Aug; 22 (4): 342 - 6)、及び乾癬が発がん性疾患ではなくても乾癬 (J Invest Dermatol, 1990 Nov; 95 (5 Suppl): 7S - 9S) に関与するがん遺伝子産物 MYC を標的とする。図 10 で観察され得るように、MYC は、Bcl - 2 よりもはるかに低い疎水性プロファイルを示す。したがって、このタンパク質を標的とする分子の設計は、de - VDBP の GalNAc 部分を含む親水性相互作用を考慮しなくてはならない。この製剤は、1 / 10 の比のビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP で開始する。EPA が 1 / 10 の比で添加される。この製剤では、ひとたび内部移行されると、MYC との親水性相互作用を通じて相互作用して、したがってその作用を阻害する多数の親水性二量体複合体である「遊離」の de - VDBP 分子が存在する。親水性を損なうことなく、内部移行を支持するために、EPA が低い比で、即ち 1 / 10 で添加される。三量体複合体 [ ビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP / EPA ] は、原形質膜で VDR と相互作用して、VDR シグナル伝達を誘発する。アルファ、ベータ及びガンマとは異なり、デルタでは、MYC がタンパク質との相互作用を支持するように分子のより高い可撓性を提供するために、オレイン酸の代わりに EPA が存在する。デルタは、注射用製品として、又は局所用途用のリボソーム製剤として調製され得る。

30

40

## 【0082】

6.2.2.5. IX - イプシロン / IS - イプシロン。前立腺がん用の多分子複合体の混合物。p53、MYC 及び Bcl - 2 は全て、ヒト前立腺がんの進行に関与するため (Arch Biochem Biophys, 2009 Jun 15; 486 (2): 95 - 102)、中間の疎水性 / 親水性の特徴を有する多分子複合体の混合物が設計されなくてはならない。この製剤は、5 / 10 の比のビタミン D<sub>3</sub> / de - VDBP で開始する。EPA が 1 / 1 の比で添加される。最良の結果に関して、最終的な割当 50 % v / v

50

でのIS - イブシロンとの組合せが想定される。

【0083】

6.2.3. 種々のタイプの疾患又は状態を標的とするサプリメントとして、又は注射による投与用に意図される多分子複合体及び複合体の混合物の例の説明。

【0084】

6.2.3.1. LS - ゼータ。自閉症用の複合体の混合物。脳の炎症は、自閉症の特質の1つであるため、この現象を対象とする多分子複合体を設計した。この製剤は、1 / 1の比のビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBPで開始する。EPAが1 / 1の比で添加される。これらの比により、血液脳関門を通過することが可能な最多数の疎水性分子が提供される。経口バイオアベイラビリティは、子供達への投与を支持する。EPAは、ヒトの脳の主な構造構成成分であり、多数の神経疾患において有効であると証明されているオメガ - 3 - 脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) で置換され得る。最終的な混合物は、[ビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP / EPA] + [ビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP / DHA]、50 % v / vである。

10

【0085】

6.2.3.2. IX - イータ / IS - イータ ; LS - イータ。筋痛性脳脊髄炎 / 慢性疲労症候群、神経変性傷害、重金属関連神経状態用の複合体の混合物。この製剤は、5 / 10の比のビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBPで開始する。EPAが2 / 10の比で添加される。この製剤は、注射用形態 (IX - イータ) で、又は経口投与用のリボソーム製剤 (LS - イータ) として使用され得る。また、この場合、EPAは、ヒトの脳の主な構造構成成分であり、多数の神経疾患において有効であると証明されているオメガ - 3 - 脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) で置換され得る。最終的な混合物は、6.2.3.1.の最終的な混合物と一致するが、UFAの比は、成体における血液脳関門の異なる透過性のため異なる。

20

【0086】

6.2.3.3. IX - シータ / IS - シータ、慢性腎疾患用の分子の混合物。この製剤は、1 / 1の比のビタミンD類似体 / de - VDBPで開始する。EPAが5 / 10の比で添加される。

【0087】

6.2.3.4. IX - イオタ ; IS - イオタ ; L [ X - イオタ / S - イオタ ]。心血管疾患用の分子の混合物。IX - イオタの製剤は、1 / 1の比のビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBPで開始する。EPAが1 / 1の比で添加される。続いて、IS - イオタの混合物が、1 / 1 v / vの比で添加される。得られた混合物は、経口投与用のリボソーム製剤としても調製することができる。

30

【0088】

6.2.3.5. カッパシリーズ。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を標的とする分子の混合物。HIVのアミノ酸配列を図11に表す。この場合、2つの配列間に相同性が存在しないので、de - VDBPの配列とのアラインメントは存在しない。HIVの配列に目を向けると、6.1に記載する方法に従って調製される幾つかの分子が相互作用し得る長い一続きの疎水性アミノ酸が存在することが明確である。したがって、カッパシリーズの分子は、多分子複合体と、異なる度合いの疎水性及びビリオンの丸みを帯びた構造に適合させるための可撓性を示す各複合体との混合物を生産するという概念に従って設計された。カッパシリーズを構成する各複合体は、連続した数を用いて称される。

40

【0089】

カッパ1。1 / 10の比のビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP。EPAが1 / 1の比で添加される。

【0090】

カッパ2。1 / 1の比のビタミンD<sub>3</sub> / de - VDBP。EPAが1 / 10の比で添加される。

【0091】

50

カップ 3。1 / 10 の比のビタミン D<sub>3</sub> / d e - V D B P。オレイン酸が 1 / 1 の比で添加される。

【 0 0 9 2 】

カップ 4。1 / 1 の比のビタミン D<sub>3</sub> / d e - V D B P。オレイン酸が 1 / 10 の比で添加される。

【 0 0 9 3 】

最終的なカップ剤は、25 % v / v である等量でカップシリーズの各複合体を含有する。カップシリーズ剤は、経口投与用のリポソーム剤としても製剤化することができる。

【 0 0 9 4 】

6 . 2 . 3 . 6 . 個々の V D R 遺伝子型に対して特異的に調整した分子及び混合物。V D R 遺伝子多型が、ビタミン D<sub>3</sub> に対する差次的応答に関連付けられることが十分に評価される。このため、ビタミン D<sub>3</sub> 補給が必要とされる場合、ビタミン D<sub>3</sub> の投与の最も効率的な用量及び頻度を提供するために、V D R 遺伝子型の決定が推奨される ( K i d n e y I n t . 2 0 0 9 N o v ; 7 6 ( 9 ) : 9 3 1 - 3 )。例えば、B B 及び f f ホモ接合性遺伝子型がビタミン D<sub>3</sub> に対して乏しいレスポナーであることは周知である。個々の V D R 遺伝子型に対して調整された特異的な分子は、V D R の配列を考慮して、多型受容体との最良の相互作用を提供するように設計される。例えば、F o k - I 多型は、3 個アミノ酸長い V D R タンパク質を含む。これは、V D R 分子を「より強く」させて、それ自体、他のタンパク質及び D N A と相互作用する能力が低い。V D R 分子のこのような特徴は、上述の分子において高い可撓性を有するポリ不飽和脂肪酸を使用することにより標的とされ得る。例えば、 $\alpha$ -リノレン酸又はドコサヘキサエン酸 ( D H A ) は、オレイン酸又は E P A に代わって使用することができる。公知の V D R 遺伝子型を有する個体では、U F A のタイプは、セクション 6 . 2 . 2 . 及び 6 . 2 . 3 . に記載する分子のいずれかに関して調節することができる。

【 0 0 9 5 】

6 . 2 . 3 . 7 . 本発明の複合体は、がんを治療するための腫瘍内 / 腫瘍周囲注射用に製剤化され得る。例えば、下記スキームに従う種々のエタノール ( 2 0 % v / v ) 及びプロピレングリコール ( 3 0 % v / v ) 中に溶解した 1 / 1、1 / 0 . 5、1 / 0 . 2、1 / 0 . 1 の比の d e - V D B P / オレイン酸の多分子 ( 五量体 ) 混合物：

【 0 0 9 6 】

1 . 比 1 / 1 容量 2 . 4 2 m L 収量 4 0 0 n g / m L の d e V D B P 及び 1 . 9 7 n g / m L のオレイン酸 9 . 1 % エタノール ( 2 0 % v / v ) 及びプロピレングリコール ( 3 0 % v / v )。

【 0 0 9 7 】

2 . 比 1 / 0 . 5 容量 2 . 4 2 m L 収量 4 0 0 n g / m L の d e V D B P 及び 1 . 0 8 n g / m L のオレイン酸 9 . 1 % エタノール ( 2 0 % v / v ) 及びプロピレングリコール ( 3 0 % v / v )。

【 0 0 9 8 】

3 . 比 1 / 0 . 2 容量 2 . 4 2 m L 収量 4 0 0 n g / m L の d e V D B P 及び 0 . 4 4 n g / m L のオレイン酸 6 . 4 % エタノール ( 2 0 % v / v ) 及びプロピレングリコール ( 3 0 % v / v )。

【 0 0 9 9 】

4 . 比 1 / 0 . 1 容量 2 . 4 2 m L 収量 4 0 0 n g / m L の d e V D B P 及び 0 . 1 9 n g / m L のオレイン酸 生理食塩水中。

【 0 1 0 0 】

5 . 比 1 / 0 容量 2 . 4 2 m L 収量 4 0 0 n g / m L の d e V D B P 生理食塩水中。

【 0 1 0 1 】

この混合物は、超音波ガイドされた腫瘍周囲 / 腫瘍内注射を使用して投与され得る。こ

10

20

30

40

50

れに関連して、それは、そのフォールディングが脂肪酸との結合により影響されるタンパク質に結合されたオレイン酸の周知の抗がん特性を利用する (F E B S J . 2 0 1 3 Apr ; 2 8 0 ( 8 ) : 1 7 3 3 - 4 9 )。したがって、H A M L E T (腫瘍細胞に対して致死的にさせたヒト - ラクトアルブミン) 又は V D B P などのタンパク質に結合されているオレイン酸は、がん遺伝子依存又はワールブルグ効果などのがん細胞の統一的な特色を利用することにより、がん細胞のアポトーシスを誘導する (O n c o g e n e . 2 0 1 1 Dec 1 ; 3 0 ( 4 8 ) : 4 7 6 5 - 7 9 )。

#### 【0102】

この混合物は、(C a n c e r R e s . 2 0 1 1 Jul 1 ; 7 1 ( 1 3 ) : 4 4 8 4 - 9 3) で実証されるように、炭水化物 1 0 % 又はそれ未満、脂肪 (特に、オレイン酸及び他の U F A ) 2 5 %、及びタンパク質 5 0 ~ 6 0 % を含有する等カロリー食事に存する栄養プランを行っているがん患者において特に有効であることがわかっている。その有効性は、それが腫瘍性形質転換の基礎的な分子メカニズムを標的とするため、様々ながんに対して作動する (O n c o g e n e . 2 0 1 1 Dec 1 ; 3 0 ( 4 8 ) : 4 7 6 5 - 7 9 )。更に、その物理化学的特色、即ち同じ範囲の診断用超音波における分子複合体共鳴の形成 (B r a i n S t i m u l . 2 0 1 3 May ; 6 ( 3 ) : 4 0 9 - 1 5) に起因して、混合物は、集束超音波により発揮される機械力を通じて病変を標的とし得る。換言すると、混合物の注射直後に腫瘍を標的とする超音波ビームは、分子が力学的エネルギーの放出により解離される病変に対して分子に力をかけて、したがってそれらの治療的有效性を劇的に増加させる。

#### 【0103】

本発明者らはまた、混合物が、一般的なネブライザーを用いてエアロゾルとして投与される場合に特に有効であることを見出した。その特有の多分子立体配置により、病原性ウイルス、細菌、微生物及びがん細胞に対する自然免疫応答の重要な要素である肺胞マクロファージを刺激する際にそれが非常に有効となる (G e r o n t o l o g y . 2 0 1 3 ; 5 9 ( 6 ) : 4 8 1 - 9 )。実際に、オレイン酸を含有するエマルジョンが、鼻内経路を通じて迅速に吸収されるという特徴を有し、優れた薬物動態特性を示すことが実証されている (X e n o b i o t i c a . 2 0 1 1 Jul ; 4 1 ( 7 ) : 5 6 7 - 7 7 )。このようなエアロゾル投与は、原発性及び転移性肺がんの他に、慢性閉塞性肺疾患並びにウイルス性又は細菌性肺炎などの様々な肺関連病的状態で有用であり得る。

#### 【0104】

##### 7. 補足的観察

##### 7. 1 I n v i t r o 活性:

先述のセクションに記載する分子及び多分子複合体の生物活性は、ビタミン D<sub>3</sub> 及びビタミン D 系の他の構成成分の生物活性を評価するのに日常的に使用される i n v i t r o 系 (M C F - 7 ヒト乳がん細胞培養物) 中で試験した (E v i d B a s e d C o m p l e m e n t A l t e r n a t M e d . 2 0 1 2 ; 2 0 1 2 : 3 1 0 8 7 2 . O n c o l R e p . 2 0 1 2 Dec ; 2 8 ( 6 ) : 2 1 3 1 - 7 . A n t i c a n c e r R e s . 2 0 1 2 Mar ; 3 2 ( 3 ) : 7 3 9 - 4 6 )。ヒト乳癌細胞 M C F - 7 に、種々の濃度のビタミン D<sub>3</sub>、d e - V D B P 及び [ ビタミン D<sub>3</sub> / d e - V D B P / オレイン酸 ] を負荷した。表 1 に報告される結果により、先述のセクションに記載する新規複合体が、ビタミン D<sub>3</sub> 又は d e - V D B P と比較してはるかに高い生物活性を有することがはっきりと示される。M C F - 7 増殖の最大障害は、非常に高い非生理学的濃度である 1 μ M のビタミン D<sub>3</sub> で達成された。しかしながら、同じレベルの障害が、ビタミン D<sub>3</sub> を d e - V D B P 及びオレイン酸と複合体形成した際に、1 0 0 0 倍低いビタミン D<sub>3</sub> で達成することができた。

#### 【0105】

## 【表 1】

表1. MCF-7ヒト乳がん細胞増殖に対するビタミンD<sub>3</sub>及び他の化合物の効果

処置	吸光度単位 (X 10 <sup>3</sup> )
対照 (添加せず)	450±21
ビタミン D <sub>3</sub> 1 nM	425±10
ビタミン D <sub>3</sub> 1 μM	55±10
de-VDBP 1 ng/ml	395±37
[ビタミン D <sub>3</sub> 1 nM /de-VDBP 1 ng/ml/オレイン酸 1/1]	55±9

## 【0106】

細胞系。MCF-7細胞は、ATCCから入手した。細胞は、1 mMピルビン酸ナトリウム、10 %ウシ胎児血清 (FBS)、100 U/mlのペニシリン及び100 μg/mlのストレプトマイシンを補充したアールの平衡塩類溶液中のイーグルの最小必須培地中で、37 °Cで、5 % CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下で日常的に維持された (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。

## 【0107】

細胞増殖。細胞増殖の評価は、Calbiochem迅速細胞増殖キットにより測定した。各条件は、四重反復試料で繰り返され、各実験は三度繰り返された。

## 【0108】

7.2 in vivo 活性：患者 A

6.2.2.3に記載する分子 (IX - ガンマ / IS - ガンマ) を、いかなる他の従来の療法にも不適格であった不治の乳がん患者において、いわゆる「思いやりのあるアプローチ」の一部として使用した。IS - ガンマ、880 ng を、左腋窩に近接して位置する固形腫瘍に注射した。免疫系の活性化、及び続く抗がん効果を、腫瘍における血流を評価することによりモニタリングした。したがって、活性マクロファージが、血管拡張を引き起こして、且つ強力な抗がん特性を示す化合物である一酸化窒素 (NO) を放出することは周知である (J Exp Med. 1989 May 1; 169 (5): 1543 - 55. Curr Opin Immunol. 1991 Feb; 3 (1): 65 - 70.)。腫瘍内血流を、エコーカラー Doppler 技法を使用して超音波系でモニタリングした。図 12 は、IS - ガンマ (880 ng) の注射前 (左パネル) 及び注射の 2 分後の固形腫瘍内部の血流を示す。中心にある壊死の円形領域により同定される腫瘍の同じ面積における血流の増加が劇的である。

## 【0109】

7.3 in vivo 活性：患者 B

転移性前立腺がんを伴う患者において、IS - ガンマ、880 ng を、これまでの MRI が転移性であることを示している腹腔内の大動脈周囲結節を標的とすることを目的として、鼠径部結節の領域に注射した (各側において 440 ng)。図 13 は、毎日の注射の 3 日後に、参照とされる結節が、25 % の体積減少を示したことを示す。処置前の結節は、左パネルに示され、右パネルは、処置の 3 日後の結節 3 を示す。測定が精密であり且つ信頼できることを確実にするために、血管を参照とした。

## 【0110】

## 7.4 in vivo 活性：臨床結果

本発明による複合体の有効性は、Emma Ward et al, American Journal of Immunology 10(1); 23-32 2014で議論される。それらの開示は、参照により本明細書に援用される。

## 【0111】

要約すると、本発明は、ビタミンD<sub>3</sub>及びビタミンD類似体（ともに、Vit Dsと称される）に基づく改善されたサプリメントを生産する方法を提供する。これらは、脱グリコシル化されたビタミンD結合タンパク質（de-VDBP）との相互作用により安定化される。VDBPは、シアリダーゼ及びベータ-ガラクトシダーゼによる処置によりThr 420位で脱グリコシル化され得る。de-VDBPは、Vit Dsを安定化するために骨格として使用され、細胞原形質膜との、及びビタミンD受容体（VDR）とのより効率的な相互作用を可能にする。安定化は、Vit Dsとde-VDBPの23個の疎水性アミノ酸との間の特定疎水性相互作用により達成される。骨格としての二量体複合体[Vit Ds/de-VDBP]は、de-VDBPのドメインIIIにおける一続きの疎水性アミノ酸と不飽和脂肪酸（UFA）との間の疎水性相互作用により更に安定化され得る。生じた三量体[Vit Ds/de-VDBP/UFA]は、原形質膜のレベルでVDRと相互作用することが実証され得る。生じた四量体複合体[Vit Ds/de-VDBP/UFA/VDR]は、細胞輸送タンパク質により標的細胞へ自発的に内部移行されて、ひとたび細胞の内部にあると、タンパク質/タンパク質相互作用が、de-VDBP骨格のThr 420位にあるアルファ-N-ガラクトサミンと、VDRの207~215位における一続きの酸性アミノ酸との間の塩基-酸相互作用により更に強化される。安定化された三量体複合体[Vit Ds/de-VDBP/UFA]の、正常細胞培養物及び病的細胞培養物への投与が、ビタミンD<sub>3</sub>単独又はde-VDBP単独を用いた場合に観察される応答よりも10~100倍高い細胞応答を誘起する。de-VDBP及び複合体の効力及びバイオアベイラビリティは、水性アルコール系生理食塩水溶媒中に複合体を溶解させることにより、更に増加させることができる。三量体複合体[Vit Ds/de-VDBP/UFA]は、経口経路を通じて容易に吸収可能な、及び/又は例えば軟膏における局所使用のための化合物を生産するために、種々のリン脂質組成を有するリポソーム中に封入され得る。同様に、安定化された複合体は全て、舌下投与されてもよい。この戦略は、ビタミンD<sub>3</sub>が例えば非高カルシウム血性VDRアゴニスト（エルデカルシトールなどの）で置換され得るde-VDBPの骨格に関連付けられる化合物のファミリーの生産を可能にする。Vit Ds/de-VDBP/UFAのこのファミリーの新規の安定化された複合体は、総死亡率の防止；免疫系の刺激；骨の健康；心血管疾患；がん；慢性腎疾患；HIV感染；神経変性疾患（パーキンソン、アルツハイマー、自閉症、筋痛性脳脊髄炎、多発性硬化症）；重金属関連神経状態の防止を含むが、これらに限定されないビタミンDの補給が有効であると証明されている条件全てにおいて使用され得る。

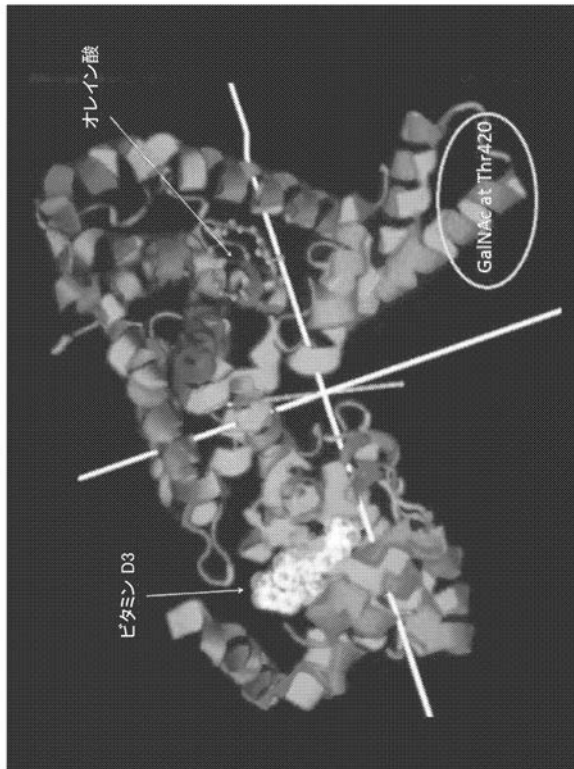
10

20

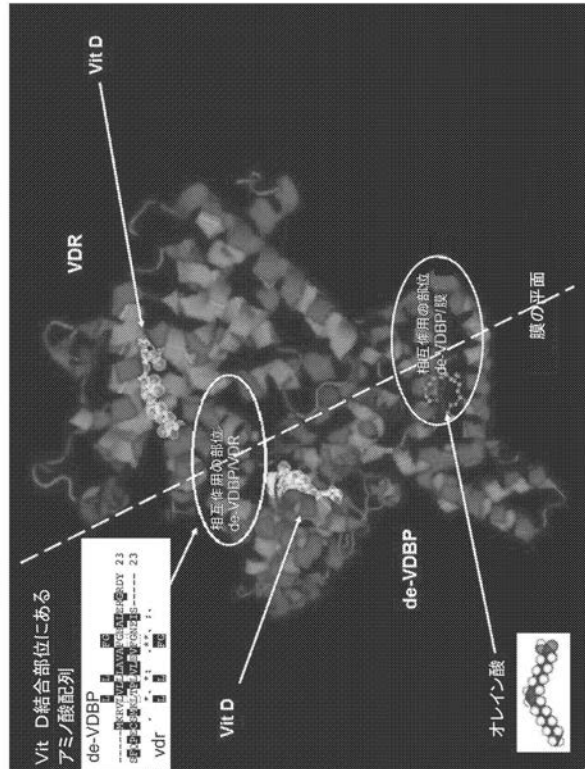
30



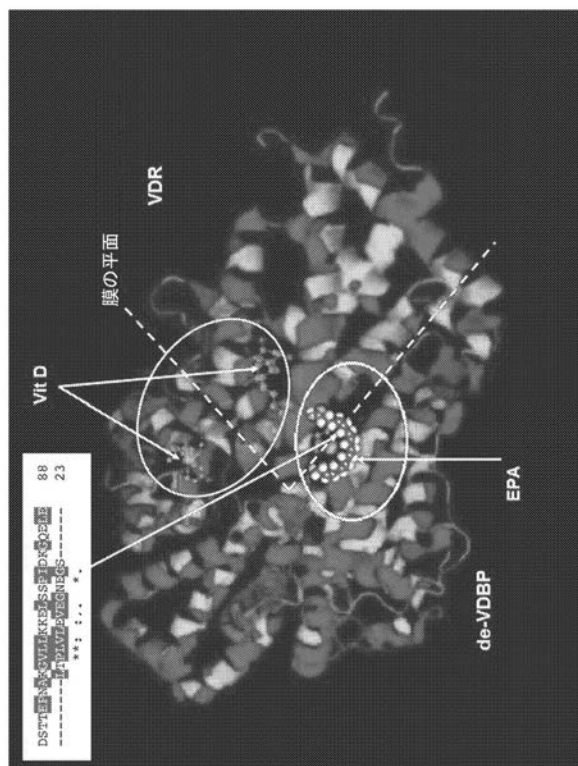
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

配列解析及びアラインメント

1. de-VDBP

vs

2. B細胞CLL/リンパ腫3 [ホモサピエンス]

疎水性アミノ酸は緑色で強調

```

gii32483410irelNP_000574.2iMKPVLVLLAVAFGLALERGRDYENKVKCKEESHLGKEDTSTSLVLYSRKFSSQTE58
gii20072668igbiAAH27258.1i-----VAAGRTGYDNREIVLVKYHYKISORQYE29

gii32483410irelNP_000574.2iQVSLVKEVSLTEACCAAGA-DPDCYDRTSA-----SAKSCSNSETPVAPGIA109
gii20072668igbiAAH27258.1iWAGGVYGAAPPGAAPPGIASSOPCHTTPAASRDPAVATSLDTAAPGAA81

gii32483410irelNP_000574.2iESQTKESGLERKCMALIKHQQEPIYVETINDECAFRKQKVEYNDWVEYSTNYQ169
gii20072668igbiAAH27258.1iAGPALSPPVPAVITLQASDSSRRYRRDZATSSQALITETARER129

gii32483410irelNP_000574.2iAPLSLT-----V-SYTKSYLSMVGSCGISASTVCHKERLOKHISITITISNRVC220
gii20072668igbiAAH27258.1iPAIVPFEIRADGVWGRVAFTEGGVMCTESNREMSPLVAMALWITETYNRH185

gii32483410irelNP_000574.2iSQVAVGEKKSRSMILKAKQVRIADLEDVLPLAEDITNLSKCCESASSEDMAKELPE280
gii20072668igbiAAH27258.1i-----

gii32483410irelNP_000574.2iHTVKICDNSTKNKEDCCQEKIAMDFVCITYFMPAAOLPELPDVELTNKDVDPGNT340
gii20072668igbiAAH27258.1i-----HTWQDNGGWPAFVELYGRSWFPLFD-----211

gii32483410irelNP_000574.2iKVMDKYTFSSRRTHLFAVLEKVEITIKSLGSCCAVEDSTICFAGPLLKKESS400
gii20072668igbiAAH27258.1i-----SWLSKTLISALVGACITLGAY-----LGHK-----239

gii32483410irelNP_000574.2iDKSGECADYSENTITEYKKKLAERLAKLEDAITPEAKLVNKHSDFASSCSNPP460
gii20072668igbiAAH27258.1i-----

gii32483410irelNP_000574.2iYQSEDAEIKK474
gii20072668igbiAAH27258.1i-----

```



## 【図 9】

配列解析及びアラインメント

1. de-VDBP

vs

2. B細胞 CLL /リンパ腫3 [ホモサピエンス]

疎水性アミノ酸は緑色で強調

```

gi|32483410ref|NP_000574.2| MKRVLVLLAVAFG-ALERGRDYENKKNVCKE-SHLOKEDTSSVLYSRKF-SSQTE 58
gi|20072668|gb|AAH27258.1| -----VAAGRTSGYDNREYVKNYTKISQRCYE 29

gi|32483410ref|NP_000574.2| QYSGVKEVSSITEACCAAGA-DPQDYDRTSA--SAKSCESNS-SPVPGTA 109
gi|20072668|gb|AAH27258.1| WAGGV-----GAAPGAAPAGGIFSSQDHTFPAASRDPAHTSLDTAAPGA 81

gi|32483410ref|NP_000574.2| ECTKEGLERKLCMAALNHOQETIYVERINDECFARKDKKEYINQFMWEYSTNYEQ 169
gi|20072668|gb|AAH27258.1| AGR-----ALSPVPPVV-LTRQAGDDSRRYRRDFAEWSQD-LTETAFGR 129

gi|32483410ref|NP_000574.2| APSL-----V-SYTKSYLSMVGSCOTSASPIVCRKERLOKHISITLISNRC 220
gi|20072668|gb|AAH27258.1| FATIVVEEPRDGVNWRVAFEFEGGVMGVSWREWSLVLNALW--WTEYNRI 185

gi|32483410ref|NP_000574.2| SQYAAVEKKSRISNLCADKVFADL-VLPLAEDTINISKCCESASEDCMAKELPE 280
gi|20072668|gb|AAH27258.1| -----

gi|32483410ref|NP_000574.2| TIVKCDNISTKNSKEDCCQEKIAMVFCIYMPAAOLP-EDVEITNKDVGQDNT 340
gi|20072668|gb|AAH27258.1| -----HIWQDNGWDFAVEYQISMPLEQ 211

gi|32483410ref|NP_000574.2| KVMQKYTFSSRRTHPEVLSKVLFTKSGDCCVEDSTTCEVAQRLKKESS 400
gi|20072668|gb|AAH27258.1| KVMQKYTFSSRRTHPEVLSKVLFTKSGDCCVEDSTTCEVAQRLKKESS 400

gi|32483410ref|NP_000574.2| DKQELCADYSENTIEYKKKAEERLAKNPDLITETANVKNHSDFASSNCCS 460
gi|20072668|gb|AAH27258.1| -----

gi|32483410ref|NP_000574.2| YDSEDAEKN 474
gi|20072668|gb|AAH27258.1| -----

```

## 【図 11】

HIV 領域 Env 前駆物質

Env [ヒト免疫不全ウイルス] (856 aa)

疎水性アミノ酸は黄色で強調

1 - 856 aa Env 前駆物質

34 - 511 aa gp120

512 - 856 aa gp41

```

1
MRVKEKYQHLEWFGWGRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYGVPPWKEATTTLFCASDAKA 60
gp120

481
SELYKYYKVVKEPLGVAPTAKARRVVQREKRAVGIGALFLGLGAAGSTMGAASMTLTQ 540

661
LELDKQWASLWVNFNTNLWYIKFIMIVGGLVGLRIVFAVLSVNRVQGYSPLSFQTH 72
0 gp41

```

## 【図 10】

配列解析及びアラインメント

1. de-VDBP

vs

2. 原がん遺伝子タンパク質 [ホモサピエンス] (454 aa)

3. がん遺伝子 [ホモサピエンス] (439 aa)

疎水性アミノ酸は緑色で強調

```

gi|32483410ref|NP_000574.2| MKRVLVLLAVAFG-ALERGRDYENKKNVCKE-SHLOKEDTSSVLYSRKF-SSQTE 58
gi|71774083|ref|NP_002458.2| MKRVLVLLAVAFG-ALERGRDYENKKNVCKE-SHLOKEDTSSVLYSRKF-SSQTE 55
gi|29839758|emb|CAA25015.2| MKRVLVLLAVAFG-ALERGRDYENKKNVCKE-SHLOKEDTSSVLYSRKF-SSQTE 40

gi|32483410ref|NP_000574.2| ECTKEGLERKLCMAALNHOQETIYVERINDECFARKDKKEYINQFMWEYSTNYEQ 169
gi|71774083|ref|NP_002458.2| ECTKEGLERKLCMAALNHOQETIYVERINDECFARKDKKEYINQFMWEYSTNYEQ 160
gi|29839758|emb|CAA25015.2| ECTKEGLERKLCMAALNHOQETIYVERINDECFARKDKKEYINQFMWEYSTNYEQ 149

gi|32483410ref|NP_000574.2| APSL-----V-SYTKSYLSMVGSCOTSASPIVCRKERLOKHISITLISNRC 220
gi|71774083|ref|NP_002458.2| APSL-----V-SYTKSYLSMVGSCOTSASPIVCRKERLOKHISITLISNRC 210
gi|29839758|emb|CAA25015.2| APSL-----V-SYTKSYLSMVGSCOTSASPIVCRKERLOKHISITLISNRC 207

gi|32483410ref|NP_000574.2| SQYAAVEKKSRISNLCADKVFADL-VLPLAEDTINISKCCESASEDCMAKELPE 280
gi|71774083|ref|NP_002458.2| SQYAAVEKKSRISNLCADKVFADL-VLPLAEDTINISKCCESASEDCMAKELPE 261
gi|29839758|emb|CAA25015.2| SQYAAVEKKSRISNLCADKVFADL-VLPLAEDTINISKCCESASEDCMAKELPE 248

gi|32483410ref|NP_000574.2| TIVKCDNISTKNSKEDCCQEKIAMVFCIYMPAAOLP-EDVEITNKDVGQDNT 340
gi|71774083|ref|NP_002458.2| TIVKCDNISTKNSKEDCCQEKIAMVFCIYMPAAOLP-EDVEITNKDVGQDNT 340
gi|29839758|emb|CAA25015.2| TIVKCDNISTKNSKEDCCQEKIAMVFCIYMPAAOLP-EDVEITNKDVGQDNT 333

gi|32483410ref|NP_000574.2| KVMQKYTFSSRRTHPEVLSKVLFTKSGDCCVEDSTTCEVAQRLKKESS 400
gi|71774083|ref|NP_002458.2| KVMQKYTFSSRRTHPEVLSKVLFTKSGDCCVEDSTTCEVAQRLKKESS 398
gi|29839758|emb|CAA25015.2| KVMQKYTFSSRRTHPEVLSKVLFTKSGDCCVEDSTTCEVAQRLKKESS 401

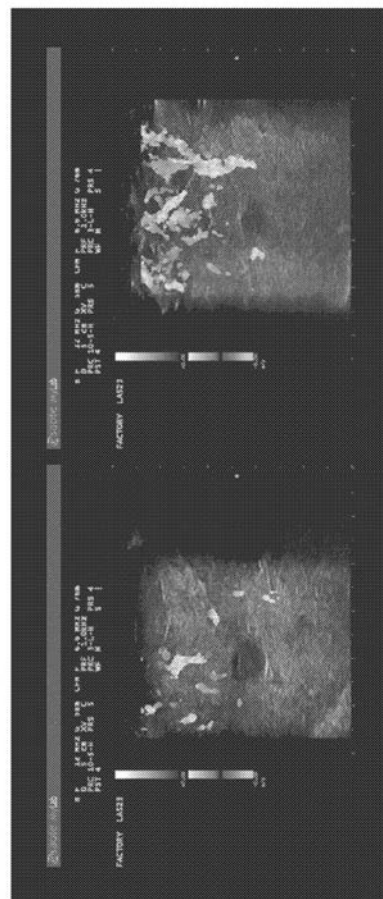
gi|32483410ref|NP_000574.2| DKQELCADYSENTIEYKKKAEERLAKNPDLITETANVKNHSDFASSNCCS 460
gi|71774083|ref|NP_002458.2| DKQELCADYSENTIEYKKKAEERLAKNPDLITETANVKNHSDFASSNCCS 454
gi|29839758|emb|CAA25015.2| DKQELCADYSENTIEYKKKAEERLAKNPDLITETANVKNHSDFASSNCCS 439

gi|32483410ref|NP_000574.2| YDSEDAEKN 474
gi|71774083|ref|NP_002458.2| YDSEDAEKN 474
gi|29839758|emb|CAA25015.2| YDSEDAEKN 474

```

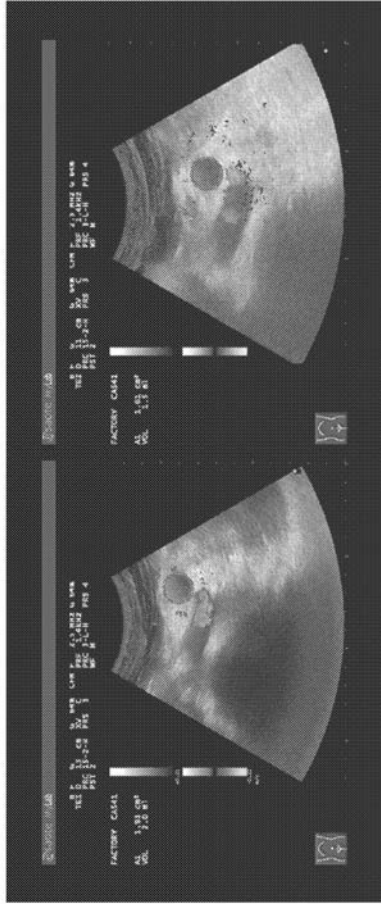
## 【図 12】

不活の乳がんにおけるIS-ガンマ(850ng)の腫瘍内注射に対する効果。左ハネル:注射前の腫瘍内血流。  
右ハネル:注射の2分後の腫瘍内血流。



## 【図 13】

転移性肺がんを伴う患者における腫瘍節結節に近接する1日当たりのIS-ガンマ(880mg)の皮下注射に対する効果。  
左パネル:処置前の転移性大動脈周囲結節。右パネル:処置の3日後の同じ結節。



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2014/051824

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/593 A61K38/17 A61K31/201 A61K31/202  
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)

A61K

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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/85194 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER [US]; UNIV BOSTON [US]; PIRIE SHEPHERD STEVEN) 15 November 2001 (2001-11-15) paragraph [0014] - paragraph [0016]; claims 19-21	1-10
Y	----- PACINI S ET AL: "Effects of vitamin D-binding protein-derived macrophage-activating factor on human breast cancer cells", ANTICANCER RESEARCH 2012 INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH GRC, vol. 32, no. 1, January 2012 (2012-01), pages 45-52, XP002731713, ISSN: 0250-7005 abstract; figure 1 page 46, column 2, paragraph 5 ----- -/-	1-10

☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 2014

Date of mailing of the international search report

10/11/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tardi, Christine

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/051824

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANGELO FONTANA ET AL: "The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS AND PROTEOMICS, vol. 1834, no. 6, 14 March 2013 (2013-03-14), pages 1125-1143, XP055149214, ISSN: 1570-9639, DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.02.041 abstract page 1132, column 2, paragraph 2 - page 1133, column 1, paragraph 1 page 1137, column 2, paragraph 2 - page 1138, column 1, paragraph 1 -----	1-10
A	WO 2009/012784 A2 (NYA HAMLET PHARMA AB [DK]; AGGER TEIT [DK]; BRO CHRISTOFFER [DK]) 29 January 2009 (2009-01-29) the whole document -----	1-10
X,P	WARD: "CLINICAL EXPERIENCE OF CANCER IMMUNOTHERAPY INTEGRATED WITH OLEIC ACID COMPLEXED WITH DE-GLYCOSYLATED VITAMIN D BINDING PROTEIN", AMERICAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 10, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 23-32, XP055147028, ISSN: 1553-619X, DOI: 10.3844/ajisp.2014.23.32 the whole document -----	1-10
X,P	THYER LYNDIA ET AL: "A novel role for a major component of the vitamin D axis: vitamin D binding protein-derived macrophage activating factor induces human breast cancer cell apoptosis through stimulation of macrophages.", NUTRIENTS JUL 2013, vol. 5, no. 7, July 2013 (2013-07), pages 2577-2589, XP002731714, ISSN: 2072-6643 the whole document -----	1-10
T	RUGGIERO MARCO ET AL: "Oleic Acid, Deglycosylated Vitamin D-Binding Protein, Nitric Oxide: A Molecular Triad Made Lethal to Cancer", ANTICANCER RESEARCH, vol. 34, no. 7, July 2014 (2014-07), pages 3569-3578, XP002731715, the whole document -----	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2014/051824

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0185194	A1	15-11-2001	AU 6137801 A 20-11-2001
			AU 2001261378 B2 17-03-2005
			CA 2409759 A1 15-11-2001
			EP 1280546 A1 05-02-2003
			JP 4907032 B2 28-03-2012
			JP 2003532682 A 05-11-2003
			US 2004224877 A1 11-11-2004
			WO 0185194 A1 15-11-2001
-----			
WO 2009012784	A2	29-01-2009	NONE
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I	テーマコード ( 参考 )	
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/42</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	47/42	
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/48</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	47/48	
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	35/00	
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/47</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	14/47	Z N A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 AA10 DA14 NA13 ZB26  
4H045 AA30 BA10 CA40 EA20