

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6859567号
(P6859567)

(45) 発行日 令和3年4月14日(2021.4.14)

(24) 登録日 令和3年3月30日(2021.3.30)

(51) Int. Cl.		F I
A 2 3 L 35/00	(2016.01)	A 2 3 L 35/00
A 6 1 K 31/436	(2006.01)	A 6 1 K 31/436
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 1 2 N 9/12	(2006.01)	C 1 2 N 9/12

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2016-555357 (P2016-555357)	(73) 特許権者	515333798
(86) (22) 出願日	平成27年3月6日(2015.3.6)		ユニヴァーシティ オブ サザン カリフォルニア
(65) 公表番号	特表2017-513460 (P2017-513460A)		University of Southern California
(43) 公表日	平成29年6月1日(2017.6.1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90015, ロサンゼルス, サウスオーヴストリート 1150, 스위트 2300
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/019102	(74) 代理人	110001302
(87) 国際公開番号	W02015/134837		特許業務法人北青山インターナショナル
(87) 国際公開日	平成27年9月11日(2015.9.11)	(72) 発明者	ロンゴ, ヴァルター ディー.
審査請求日	平成30年2月23日(2018.2.23)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90293, プラヤ デル レイ, ジトラテラス 8240
(31) 優先権主張番号	61/948, 792		
(32) 優先日	平成26年3月6日(2014.3.6)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 従来の化学療法剤の効力および実行可能性を増強し、かつ正常な細胞および組織におけるキナーゼの副作用を逆転させるための、キナーゼ阻害剤と併用した短期間絶食レジメンの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌を処置するための制限食パッケージであって、当該制限食パッケージは、被験者に第1の期間に提供されるカロリー制限食を含み、前記カロリー制限食は1日当たり最大で1000 kcalであり、前記カロリー制限食が前記被験者に提供される前、その期間、またはその後にキナーゼ阻害剤が前記被験体に投与され、前記カロリー制限食が短期間絶食(STS)であり、前記キナーゼ阻害剤がラパマイシンであることを特徴とする制限食パッケージ。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の制限食パッケージにおいて、前記第1の期間が3～10日であることを特徴とする制限食パッケージ。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の制限食パッケージにおいて、前記キナーゼ阻害剤が、前記第1の期間中に投与されることを特徴とする制限食パッケージ。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の制限食パッケージにおいて、前記キナーゼ阻害剤が、前記第1の期間の後であるがその1週間以内に投与されることを特徴とする制限食パッケージ。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の制限食パッケージにおいて、前記第1の期間後に前記被験体に化学療法剤が投与されることを特徴とする制限食パッケージ。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の制限食パッケージにおいて、前記化学療法剤による処置が開始した後の第 2 の期間、カロリー制限食が前記被験体に与えられることを特徴とする制限食パッケージ。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の制限食パッケージにおいて、前記被験体が黒色腫または神経芽細胞腫または乳癌を有することを特徴とする制限食パッケージ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年3月6日に出願された米国仮特許出願第 61 / 948 , 792 号明細書の利益を主張するものであり、この仮特許出願の開示は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【0002】

連邦支援の研究または開発に関する記載

本発明は、国立衛生研究所 (National Institute of Health) からの助成金第 1 P O 1 A G 0 3 4 9 0 6 号の下で、政府の支援によりなされた。政府は本発明に対して一定の権利を有する。

【0003】

少なくとも一態様では、本発明は、癌細胞を特異的に標的化し、死滅させ、かつ化学療法の毒性作用を緩和する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

癌は、哺乳動物、特にヒトが罹患する遍在性の疾患である。ほとんどの癌において非外科的に治癒させることは実現されていないが、癌の処置は着実に進歩している。癌は、現在完全には理解されていない多面的な病気であることが、研究から明らかになっている。したがって、将来の処置プロトコールが、現在認識されていない経路を含むことは疑いない。

【0005】

癌を処置するための比較的新しい経路には、短期間絶食 (STS) および絶食模倣食が含まれる。短期間絶食および絶食模倣食は、差動ストレス感作 (DSS) による、化学療法に対する種々の癌細胞型の感作に効果的である一方、差動ストレス抵抗性 (DSR) による、正常な細胞および組織の保護にも効果的である。

【0006】

したがって、癌に罹患した被験体を処置するための改善された方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、少なくとも一実施形態では、癌の症状および/または化学療法もしくはキナーゼ阻害剤の効果を緩和または処置する方法を提供することによって、従来技術の 1 つまたは複数の問題を解決する。この方法は、癌を有する被験体を特定するステップを含む。カロリー制限食が、被験体に第 1 の期間与えられる。特徴として、カロリー制限食は、1 日当たり最大で 1000 kcal を提供する。キナーゼ阻害剤が被験体に投与される。

【0008】

別の実施形態では、癌を処置し、かつ/または化学療法の症状を緩和する方法が提供される。この方法は、癌を有する被験体を特定するステップを含む。カロリー制限食が、被験体に第 1 の期間与えられる。特徴として、カロリー制限食は、1 日当たり最大で 1000 kcal を提供する。第 1 の期間の後に、化学療法剤が被験体に投与される。

【0009】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、キナーゼ阻害剤処置の副作用を緩和するための方法が提供される。この方法は、キナーゼ阻害剤で処置されている被験体を特定するステップを含む。カロリー制限食が、被験体に第1の期間与えられる。特徴として、カロリー制限食は、1日当たり最大で1000kcalを提供する。キナーゼ阻害剤が被験体に投与される。

【0010】

有利には、本発明の実施形態では、キナーゼ阻害剤と併用したSTSまたはFMDは、a)化学療法を用いない癌の処置において、安全で強力なツールを提供するために、b)癌処置において、化学療法剤と併用した短期間絶食の既知の有益な効果を増強するために(図3および4)、またc)従来の化学療法剤とのみ併用したキナーゼ阻害剤の投与期間中に観察される毒性作用を逆転させるために使用される。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】図1Aは、STS、ラパマイシン、ならびにSTSとラパマイシンで処置したマウスの血糖レベルを示す図である。

【図1B】図1Bは、STS、ラパマイシン、ならびにSTSとラパマイシンで処置したマウスのケトン体レベルを示す図である

【図2A】図2Aは、12週齢雌性C57BL/6マウスに施される、ストレス抵抗性実験のためのスケジュールを示す概略的なタイムラインである。

【図2B】図2Bは、図3Aの実験について、20日目(終了時点)における生存率の結果を示す図である。

20

【図2C】図2Cは、図3Aについて、STSの有効性を確認するための血糖レベルを示す図である。

【図3A】図3Aは、自由給餌またはSTSの条件下で、ラパマイシンおよび化学療法剤カクテルTVD(トポテカン+ピンクリスチン+ドキシソルビシン)で処理したヒト神経芽細胞腫細胞株の細胞生存率を示す図である。

【図3B】図3Bは、自由給餌またはSTSの条件下で、ラパマイシンおよび化学療法剤ドキシソルビシン(DXR)で処理したマウス乳癌(4T1)細胞株の細胞生存率を示す図である。

【図3C】図3Cは、自由給餌またはSTSの条件下で、ラパマイシンおよび化学療法剤ドキシソルビシン(DXR)で処理したマウス黒色腫(B16)細胞株の細胞生存率を示す図である。

30

【図4A】図4Aは、カロリー制限食およびラパマイシンを含む腫瘍進行試験のスケジュールを示すタイムラインである。

【図4B】図4Bは、DXR投与と併用してラパマイシンおよび複数回のSTSで処置したBALB/cマウスの4T1マウス乳癌モデルについての腫瘍体積対時間のプロットである。

【図4C】図4Cは、図4Bの実験終了時点での腫瘍体積を示す棒グラフである。

【図4D】図4Dは、DXR投与と併用してラパマイシンおよび複数回のSTSで処置したC57BL/6マウスのマウス黒色腫モデルについての腫瘍体積対時間のプロットである。

40

【図4E】図4Eは、図4Dの実験終了時点での腫瘍体積を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の現在における好ましい組成物、実施形態、および方法に対する詳細について言及がなされる。図は必ずしも一定の縮尺ではない。開示された実施形態は、種々のおよび代替の形態で具体化され得る、本発明の単なる例示である。したがって、本明細書に開示された具体的な詳細は、限定するものとして解釈されるべきではなく、本発明のあらゆる態様の代表的な基礎として、かつ/または本発明を様々に使用するように当業者に教示するための代表的な基礎として解釈されるべきである。

【0013】

50

実施例または他で明確に指示されている場合を除いて、物質または反応および/もしくはは使用の条件を示す本明細書のすべての数量は、本発明の最も広範囲の記載において、単語「約」によって修飾されるものと理解されるべきである。記述された数値範囲内での実施が概ね好ましい。さらに、反することが明確に記述されていない限り、パーセント、「部」、および比の値は重量基準であり；本発明に関連して所与の目的に適したまたは好ましいとして、ある群またはクラスの物質を記載すると、その群またはクラスのメンバーの任意の2つまたは複数の混合物も同等に適しているかまたは好ましく；化学用語での成分の記載は、本明細書で指定された任意の組合せに対する添加時点での成分を指し、いったん混合された混合物の成分間の化学的相互作用を必ずしも排除するものではなく；頭字語または他の略語の最初の定義は、本明細書におけるそれ以降の同じ略語のすべての使用に適用され、最初に定義された略語の正規の文法的变化が必要な変更を加えて適用され；かつ反することが明確に記述されていない限り、特性の測定は、同じ特性について以前にまたはそれ以降に言及されるものと同じ手法により行われることを意味する。

10

【0014】

特定の成分および/または条件は当然変動し得るので、本発明は、以下に記載の特定の実施形態および方法に限定されるものではない。さらに、本明細書に使用される専門用語は、本発明の特定の実施形態を記載する目的のためにのみ使用され、何ら限定することを意図するものではない。

【0015】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに他を指示しない限り、複数対象も含む。例えば、単数形での成分の言及は、複数の成分を含むことを意図する。

20

【0016】

「必須アミノ酸」という用語は、生物が合成することができないアミノ酸を指す。ヒトでは、必須アミノ酸として、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、バリンが挙げられる。さらに、次のアミノ酸も、特定の条件下ではヒトに不可欠である - ヒスチジン、チロシン、およびセレノシステイン。

【0017】

「キロカロリー」(kcal)および「カロリー」という用語は、食物カロリーを指す。「カロリー」という用語は、いわゆる小カロリーを指す。

30

【0018】

「被験体」という用語は、ヒトまたは動物、例えば、霊長類（特に高等霊長類）、ヒツジ、イヌ、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、モルモット、ヤギ、ブタ、ネコ、ウサギ、およびウシなどのすべての哺乳動物を指す。

【0019】

略語：

「AL」は、自由に(ad lib)を意味する。

「DSS」は、差動ストレス感作を意味する。

「DXR」は、ドキシソルピシンを意味する。

40

「FMD」は、絶食模倣食を意味する。

「KB」は、ケトン体を意味する。

「mTOR」は、哺乳動物のラパマイシン標的を意味する。

「PKA」は、プロテインキナーゼAを意味する。

「Rapa」は、ラパマイシンを意味する。

「STS」は、短期間絶食を意味する。

「TVD」は、トポテカン+ピンクリスチン+ドキシソルピシンを意味する。

【0020】

一実施形態では、癌の症状および/または化学療法の副作用もしくはキナーゼ阻害剤の副作用を緩和または処置する方法は、それを必要とする被験体を特定するステップを含む

50

。カロリー制限食が、被験体に第1の期間与えられる。特徴として、カロリー制限食は、1日当たり最大で1000kcalを提供する。キナーゼ阻害剤は、第1の期間の前、後、またはその最中に投与される。

【0021】

別の実施形態では、キナーゼ阻害剤処置の副作用を緩和するための方法が提供される。この方法は、キナーゼ阻害剤で処置されている被験体を特定するステップを含む。一洗練形態では、キナーゼ阻害剤は、mTORプロテインキナーゼである。カロリー制限食が、被験体に第1の期間与えられる。特徴として、カロリー制限食は、1日当たり最大で1000kcalを提供する。キナーゼ阻害剤が被験体に投与される。一部の洗練形態では、カロリー制限食を与えるステップと、キナーゼ阻害剤を投与するステップは、下記に示すように、複数回反復することができる処置サイクルを構成する。

10

【0022】

本発明のさらに別の実施形態では、癌を有し、かつ/または化学療法を受ける被験体が特定される。キナーゼ阻害剤(例えば、ラパマイシン)は、カロリー制限食と共に被験体に投与される。カロリー制限食は、短期間絶食(STS)であるか、または第1の期間与えられる絶食模倣食(FMD)のいずれかである。一洗練形態では、キナーゼ阻害剤は、mTORプロテインキナーゼである。短期間絶食では、被験体は、1日当たり実質的に0キロカロリーを提供される。一般に、FMD制限食は、与えられる場合、1日当たり約1000キロカロリー未満を提供する。FMD制限食の詳細は、以下により詳しく示される。別の変形形態では、キナーゼ阻害剤と異なる化学療法剤も処置期間中に被験体に投与される。適切な化学療法剤の例としては、以下に限定されるものではないが、トポテカン、ビンクリスチン、ドキシソルピシン、およびそれらの組合せが挙げられる。化学療法剤の投薬量は、そのような薬剤による種々の癌の処置に対して当技術分野で公知のものである。本実施形態は、黒色腫、神経芽細胞腫、もしくは乳癌を有する被験体か、またはこれらの症状に対する化学療法により処置されている被験体を処置するために特に有用であることが見出されている。さらに、本実施形態の処置プロトコールにより、本明細書に示すカロリー制限食とキナーゼ阻害剤を併用しない化学療法剤による処置よりも腫瘍体積が小さくなる。他の洗練形態では、カロリー制限食を与えるステップと、化学療法剤を投与するステップと、キナーゼ阻害剤を投与するステップは、複数回反復することができる処置サイクルを構成する。有利には、STSまたはFMDを含む本発明の方法は、ドキシソルピシンにより誘導され、ドキシソルピシンとラパマイシンの併用により悪化する死亡率を低下または完全に逆転させる。

20

30

【0023】

本実施形態の文脈では、IGF-Iを含む因子ならびにmTORおよびPKAなどのシグナル伝達タンパク質のダウンレギュレーションを含む(ただし、排他的ではなく)、STSおよびFMDの期間中に分子レベルおよび生理学的レベルでの複数の変化が生じることを認識するべきである。有利には、本発明の方法は、種々のアミノ酸、インスリン、およびグルコースの減少をもたらす一方、ケトン体(KB)の増加をもたらす(下記に詳細に記載される図1を参照のこと)。特に、本方法は、典型的には解糖系促進状態(ワールブルク効果)にある癌細胞を、エネルギー産生および生存のために呼吸に切り換えてそれに依存するように誘導する。これらの分子、アクター、およびタンパク質はすべて、セリン/トレオニンプロテインキナーゼを調節することにより正常細胞の増殖を部分的に調整する。事実上、癌細胞はすべて、癌遺伝子中に突然変異を有し、これらの突然変異は癌細胞を外部変化に無反応にする。しかしながら、内部的には、癌細胞は、一部の場合に、別経路に切り換えをすることができる。有利には、この現象は、STS/FMDと共にキナーゼ阻害剤を投与するという発明概念を支持し、ここでは、STS/FMDが、別経路の活性化を防止または阻害する。

40

【0024】

特定のキナーゼおよび他の増殖阻害剤は、特に、阻害剤が発癌性突然変異の下流に作用する場合、癌進行を低減することができる。STSおよびFMDにより誘導される複数の

50

変化は、キナーゼ阻害剤により標的化されない経路に影響を及ぼすことができる追加の増殖阻害効果を促進する。特に、FMDは、ケトン体および脂肪酸などの他のものを顕著に増加させると共に、多種多様の栄養素の顕著な減少をもたらす。したがって、キナーゼ阻害剤とSTSおよびFMDとの併用は、キナーゼおよび細胞増殖に影響を及ぼす他のタンパク質の阻害剤との相乗的な細胞死促進作用を提供する。これらの効果は、STS/FMDレジメンの最中に生じ得るが、化学療法によりさらに増強することができる（下記に記載の図3および4を参照のこと）。さらに、キナーゼおよび他のシグナル伝達の阻害剤は、癌増殖を遅延させることができるが、同時に正常細胞に深刻な副作用および死さえも引き起こすことがある（図2D）。STSまたはFMDは、部分的に、正常細胞におけるキナーゼ阻害剤により影響を受ける経路の活性を低減することにより、化学療法とキナーゼ阻害剤の同時投与により誘導される死亡率の増加を逆転させる（下記に記載の図2を参照のこと）。

10

【0025】

本実施形態で使用することができるSTSおよびFMDのプロトコルの例は、開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第12/430,058号明細書および同第13/488,590号明細書に見出される。一変形形態では、カロリー制限食は、低カロリー食またはノンカロリー食を提供する。制限食は、ヒト被検体に栄養を提供することができる食材を含有する一方、1日当たり1000kcal以下、特に、1日当たり813~957kcalを提供する。一変形形態では、カロリー制限食は、1日当たり約100~1000kcalを被験体に提供する。一洗練形態では、カロリー制限食は、優先の順番で1日当たり最大で1000、957、700、500、300、または100kcalを提供する。さらに別の洗練形態では、制限食は、1日当たり0kcalを提供する。

20

【0026】

本明細書に示す実施形態の変形形態では、カロリー制限食は、1日当たり30~36g以下の量で被験体にタンパク質を提供する。一洗練形態では、カロリー制限食は、優先の順番で1日当たり40、35、20、10、もしくは5g以下、または0gの量で被験体にタンパク質を提供する。炭水化物が食材にある場合、カロリー制限食のエネルギーの半分以下は炭水化物にある。一洗練形態では、STS/FMD制限食は、被験体が化学療法に曝露される前連続して3~10日間被験体に与えることができる。制限食はまた、曝露後24時間被験体に与えることもできる。好ましくは、制限食は、被験体が化学療法に曝露される前連続して3~10日間、および曝露後24時間の両方の期間、被験体に与えることができる。

30

【0027】

本明細書に示す実施形態のそれぞれの変形形態では、キナーゼ阻害剤は、カロリー制限食のサイクルの開始の1週間以内（すなわち、第1の期間）に投与することができる。さらに別の洗練形態では、キナーゼ阻害剤は、カロリー制限食のサイクルの開始の1、2、3、4、または5日以内に投与することができる。別の変形形態では、キナーゼ阻害剤は、カロリー制限食のサイクルの終了後であるがその1週間以内に投与される。さらに別の洗練形態では、キナーゼ阻害剤は、カロリー制限食のサイクルの終了後であるがその1、2、3、4、または5日以内に投与することができる。別の変形形態では、カロリー制限食は、処置サイクル当たり3日~14日の全期間与えられる。さらに別の洗練形態では、カロリー制限食は、処置サイクル当たり3日~10日の全期間与えられる。上記に示すように、カロリー制限食を与えるステップと、化学療法剤（使用する場合）を投与するステップと、キナーゼ阻害剤を投与するステップは、所定間隔で複数回反復することができる処置サイクルを構成する。例えば、この処置サイクルは、2週から2か月の間隔で反復することができる。一洗練形態では、この処置サイクルは、2週から1か月の間隔で反復することができる。

40

【0028】

本明細書で示す実施形態の他の変形形態では、カロリー制限食は栄養を提供する一方、

50

1日当たり被験体のkg体重当たり11kcal以下(例えば、8、5、もしくは2kcal以下、または0kcal)のエネルギー、および1日当たり動物またはヒトのkg体重当たり0.4g以下(例えば、0.3、0.2、もしくは0.1g、または0g)のタンパク質を提供する。炭水化物が制限食中にある場合、エネルギーの半分以下は炭水化物にある。一部の実施形態では、制限食は、1日当たり700kcal以下(例えば、600、400、もしくは200kcal、または0kcal)の総エネルギーを提供することができる。被験体が化学療法に曝露される場合、癌細胞などの異常細胞はそうではないが、動物またはヒトの正常細胞は保護される。例えば、制限食は、被験体の化学療法への曝露前連続して3~10日間動物またはヒトに与えることができる。制限食はまた、曝露後24時間被験体に与えることもできる。好ましくは、制限食は、被験体の化学療法への曝露前連続して3~10日間、および曝露後24時間の両方の期間、被験体に与えることができる。

10

【0029】

別の変形形態では、カロリー制限食に使用されるSTS/FMDプロトコールには、絶食模倣食が含まれる。例えば、癌に罹患する被験体は、1回の化学療法前48~140時間または化学療法後4~56時間絶食することができる。好ましくは、癌に罹患する被験体に、1回の化学療法前48~140時間および化学療法後4~56時間、FMDを与える。

【0030】

FMD制限食の例は、米国特許出願第14060494号明細書および同第14178953号明細書に見出される；これらの開示全体は参照により本明細書に組み込まれる。典型的には、FMDプロトコールでは、被験体の制限食に所定の日数(すなわち、5日)置き換えられる。この期間中、被験体は多量の水を摂取する。標準体重(肥満度指数すなわちBMIが18.5~25の間)の健常被験体の場合、制限食は、最初の3か月(制限食を5日、普通食を25~26日)およびその後3か月ごとに(3か月ごとに5日)、月1回摂取される。被験体の体重が測定され、被験体は、次のサイクルが開始する前に、制限食期間中に失われた体重の少なくとも95%を回復しなければならない。医師により推奨および指導されない限り、BMIが18.5未満の被験体はFMDを試みるべきでない。同じレジメン(3か月間月1回、その後3か月ごとに1回)は、特許出願に提示される症状すべての処置のために、またはその処置の支援に採用することができる。米国特許出願第14178953号明細書は、FMD制限食の低タンパク質バージョンを提供する。

20

30

【0031】

上記に示すように、本発明の実施形態は、キナーゼ阻害剤、特にmTORキナーゼ阻害剤の投与を必要とする。ラパマイシンは、特に有用なmTORキナーゼ阻害剤の1つである。典型的には、ラパマイシンは、1日当たり5~20mgの投薬量で投与される。他のキナーゼ阻害剤の例としては、アフアチニブ(ジロトリフ(Gilotrif))(標的は、非小細胞肺癌(NSCLC)を処置するためのEGFR/Erbb2である-40mg、経口的に1日1回)；アキシチニブ(標的は、腎細胞癌を処置するためのVEGFR1/VEGFR2/VEGFR3/PDGFRβ/c-KITである-5mg、1日2回)；ルキシロチニブ(標的は、骨髄線維症を処置するためのJAKである-WBC数に応じて5~25mgの間、経口的に1日2回)；イマチニブ(グリベック)(標的は、慢性骨髄性白血病(CML)を処置するためのBcr-Ablである-400mg~600mg、1日1回)；ベムラフェニブ(ゼルボラフ)(標的は、後期黒色腫を処置するためのBRAFである-960mg、12時間ごと)；ボスチニブ(ボシュリフ)(標的は、慢性骨髄性白血病を処置するためのBcrAbl/SRCである-500mg、食物と一緒に1日1回)；およびそれらの組合せが挙げられる。

40

【0032】

哺乳動物の被験体、特にヒト用のFMDは、癌患者の普通食の代わりに5~21日間使用されるが、ほとんどの患者の場合最大17日間であり(以下を参照のこと)、その頻度は他の処置の頻度および効力に基づいて決定され、他の処置が癌処置に効果的でない場合

50

には使用頻度は高くなる。次のサイクルが開始する前に体重を回復する患者の能力も考慮されなければならない。体重を回復することができる、より重篤な症状を有する患者は他の処置と同じ頻度で制限食を給餌され、体重を回復しないか、または完全な制限食期間を受けることができない患者は、標準体重（処置開始前の体重であって、BMIが18を超える体重）に戻った後にのみFMDが与えられる。FMDは、概ね安全と見なされる（RGA S）成分からなる。カロリーは被験体の体重に応じて摂取される。1日目については、総カロリー摂取量は、1ポンド当たり4.5～7カロリー（または1キログラム当たり10～16カロリー）である。制限食は、少なくとも90%を植物ベースとするべきである。1日目制限食は、30g未満の糖、28g未満の植物ベースのタンパク質、20～30グラムの植物ベースの一価不飽和脂肪、6～10gの植物ベースの多価不飽和脂肪、および2～12gの植物ベースの飽和脂肪を含有するべきである。2～21日目については、総カロリー摂取量は、1ポンド当たり3～5カロリー（または1キログラム当たり7～11カロリー）である。2～21日目制限食は、20g未満の糖、18g未満の植物ベースのタンパク質、10～15gの植物ベースの一価不飽和脂肪、3～5gの植物ベースの多価不飽和脂肪および1～6グラムの植物ベースの飽和脂肪、体重に基づいて1リットルの水で希釈した10～30グラムのグリセロール/日（100ポンドの人に対して10グラム、200ポンドの人に対して20グラム、300ポンドの人に対して30グラム）を含有するべきである。制限食はまた、ビタミン、ミネラル+必須脂肪酸のためのRDA（毎日）の約50%を含有する高い栄養にするべきである。最小期間は5日または6日であり、また最大期間は21日である（絶食クリニックでの安全性データおよび標準治療の実施に基づいて）。

10

20

【0033】

以下の実施例は、本発明の範囲を説明することを意図するものであるが、それを限定することを意図するものではない。このような実施例は、使用される可能性のあるものの典型であるが、当業者に公知の他の手順も代替的に利用することができる。実際、当業者は、本明細書の教示に基づいて、過度に実験することなく、さらなる実施形態を容易に想定し、作製することができる。

【実施例】

【0034】

DSSおよびDSRの実験

30

本発明の方法は、主として、*in vitro*および*in vivo*のマウスモデルで試験した。STSおよびFMDはまた、種々の臨床試験で試験されており、2つの食餌介入の安全性および実現可能性が示されている。FMD制限食は、DSSとDSRの両方を誘発する際にSTSと同様に効果的であることが示されている。

【0035】

方法：短期間絶食（STS）または絶食模倣食（FMD）をそれぞれ、48時間または4日間、隔週で与えた。食餌介入の終了は、静脈内注射によるドキシソルピシンの投与と同時であった。食餌介入の一サイクルと次のサイクルの間に体重を回復させるために、10～12日を動物に与えた。ラパマイシンを、実験の全期間において、食餌介入期間中ではない自由給餌期間中に毎日腹腔内投与した。循環するグルコース、ケトン体、およびS6Kレベルなどの生理学的マーカーおよび分子マーカーを、処置の効力を検証するために観察した。図1Aに、ラパマイシン処置がインスリン抵抗性様の状態を誘導し、血糖の増大をもたらすことを示す。Rapa+STS/FMDマウスにおける血糖低下は、RapaおよびSTS/FMDで処置したマウスがラパマイシン単剤で処置したマウスよりも抵抗性であるという仮説を支持する。図1Bに、ケトン体（KB）レベルが、予想されるように、ラパマイシン投与と併用しても併用しなくても、STS/FMD期間中有意に増大したことを示す。一元配置分散分析検定を行ない、 p 値 <0.05 の差を有意と見なした（ p 値 <0.05 、 0.01 、および 0.001 をそれぞれ、*、*、および***として示した）。

40

【0036】

50

食餌（マウス）：マウスは、照射されたTD . 7912げっ歯類固形飼料（Harlan Teklad）で維持した。手短に言えば、この食餌は、25：58：17のパーセント比のタンパク質、炭水化物、および脂肪により供給されるカロリーで、3.75 kcal/gの可消化エネルギーを含有する。食物は自由給餌とした。平均して、対照群のマウスは、14.9 kcal/日（または3.9 g/日）を摂取した。本発明者らの実験的なFMD制限食は、低カロリー摂取の期間中に高い栄養を可能にする成分を同定した栄養スクリーニングに基づいている（Brandhorst, Wei et al., 2013. Exp Gerontol. 2013 Oct; 48(10):1120-8. doi:10.1016/j.exger.2013.02.016. Epub 2013 Feb 21）。残りの固形飼料の給餌および食糞を回避するために、FMD制限食を給餌する前に、動物を新鮮ケージに移した。FMD制限食は、1日目制限食および2～4日目制限食と命名された2つの異なる成分からなり、これらはこの順序でそれぞれ給餌される。1日目制限食は、1.88 kcal/gを含有し、その後の給餌日中の低カロリー摂取期間にマウスを適応させるように設計した。2～4日目制限食はすべての給餌日で同一であり、0.36 kcal/gを含有する。1日目制限食および2～4日目制限食は、自由給餌対照群の平均摂取量（約4 g）として、2週間ごとに給餌した。給餌したFMD制限食のカロリー密度が異なるため、このコホートのマウスは、1日目に摂取カロリーが約50%減少し、2～4日目では対照コホートの9.7%を摂取した。マウスは、FMDレジメンの毎日において給餌した食物をすべて摂取し、食物嫌悪の徴候を示さなかった。2～4日目制限食の終了後、別のFMDサイクルを開始する前に、TD . 7912固形飼料を10日間自由給餌した。

【0037】

図2A～Cに、マウスにおける誘発ストレス抵抗性を示す実験結果を示す。これらの実験では、12週齢雌性C57BL/6マウスを以下の実験群に分けた；ad lib（自由給餌）、STS/FMD、DXR、STS/FMD+DXR（図2）。ラパマイシンを含むまたは含まないあらゆる処置に対する応答を観察するために、各群を二つ組としたが、一方のみにラパマイシン処置を行った。ラパマイシン投与は、14日間行い、その最終日に高用量のドキソルピシン（24 mg/kg）をiv投与した。STS+DXR群に属する動物に、ドキソルピシンの注射前48時間、超低カロリーでタンパク質不含のFMDを給餌した。ドキソルピシン注射後、動物を毎日モニターし、生存を記録した（図2）。図2Aに、ストレス抵抗性実験のための処置スケジュールを示す。図2Bに、20日目の生存率データを示す。図2Cに、各実験群の血糖レベルのプロットを示す。さらに、化学療法期間中にラパマイシンを投与すると、薬物に対してマウスが感作され、死亡率の増大をもたらされることが観察された。しかしながら、図2Bの実験から、STSは、ラパマイシンにより誘導される、正常組織の化学療法に対する感作を逆転させることができる。

【0038】

癌関連実験

STSおよび化学療法剤と併用したmTORキナーゼ阻害剤ラパマイシンを、癌増殖を遅延させ、生存率を改善するように、動物、ヒト被験体、または癌細胞に投与した。試験した化学療法剤は、アントラサイクリン系ドキソルピシン単剤、または2つの他の化学療法剤、トポテカンおよびピンクリスチンとの併用（TV D）としたが、これらは、癌を有する成人および小児を処置するために通常使用されるものである。

【0039】

図3A～Bに、腫瘍増殖の低減における、ラパマイシンと併用したSTSの効力を、ヒト神経芽細胞腫（SH-SY5Y）、マウス乳癌（4T1）、およびマウス黒色腫（B16）の細胞株について、in vitroで試験した実験の結果を示す。図3Aに、自由給餌またはSTSの条件下で、ラパマイシンおよび化学療法剤カクテルTV D（トポテカン+ピンクリスチン+ドキソルピシン）で処理したヒト神経芽細胞腫細胞株の細胞生存率のプロットを示す。図3Bに、自由給餌またはSTSの条件下で、ラパマイシンおよび化

学療法剤ドキソルビシン (DXR) で処理した乳癌 (4T1) 細胞株の細胞生存率のプロットを示す。図3Bに、自由給餌またはSTSの条件下で、ラパマイシンおよび化学療法剤ドキソルビシン (DXR) で処理した黒色腫 (B16) 細胞株の細胞生存率のプロットを示す。これらの実験のそれぞれにおいて、細胞生存率は、試験したすべての細胞株についてトリパンブルー染色により決定し、生存率に対する各処理の有効性は、スチューデントt検定を行うことにより判定した (p値 < 0.05、0.01、および0.001をそれぞれ、*、*、および***として示す)。これらの結果から、短期間絶食 (STS) は、複数の癌細胞株の細胞生存率の低減におけるラパマイシンおよび化学療法の効力を増強することが示される。

【0040】

マウス乳癌 (4T1) およびマウス黒色腫 (B16) のマウス同種移植モデルでは、STSおよびラパマイシンが腫瘍進行の低減に相加効果を示すことが実証され、これにより、STSが癌細胞に対するmTORキナーゼ阻害剤ラパマイシンの効果を増強することが確認される。図4A~Eに、腫瘍進行試験の結果を示す。図4Aに、カロリー制限食およびラパマイシンを含む、腫瘍進行試験のスケジュールを示すタイムラインを示す。全体として、Balb/cマウスおよびC57BL/6マウスにそれぞれ、 2×10^5 個の4T1細胞またはB16細胞を皮下注射した。いったん腫瘍が触知可能になったならば、マウスを群に分けて、DXR投与と併用して複数サイクルのSTSを実施した。図4Bに、DXR投与と併用してラパマイシンおよび複数回のSTS (Aの陰影バー) で処置したBalb/cマウスの4T1マウス乳癌モデルについての腫瘍体積対時間のプロットを示す。図4Cは、図4Bの実験終了時点での腫瘍体積を示す棒グラフである。図4Dに、DXR投与と併用してラパマイシンおよび複数回のSTSで処置したC57BL/6マウスのマウス黒色腫モデルについての腫瘍体積対時間のプロットを示す。図4Eは、図4Dの実験終了時点での腫瘍体積を示す棒グラフである。一元配置分散分析を行って腫瘍サイズの差および試験した処置の有効性の有意性を判定した (p値 < 0.05、0.01、および0.001をそれぞれ、*、*、および***として示す)。4T1マウス乳癌モデルの場合には、雌性Balb/cマウスに、 2×10^5 個の4T1癌細胞を右側腹部に皮下s.c.注射し、腫瘍が触知可能になるまで標準食を自由給餌した。B16マウス黒色腫モデルの場合には、雌性C57BL/6マウスに、 2×10^5 個のB16癌細胞を右側腹部に皮下s.c.注射し、腫瘍が触知可能になるまで標準食を自由給餌した。この時点で、腫瘍体積を測定し、マウスを以下の実験群に配置した; ad lib (自由給餌)、STS/FMD、DXR、STS/FMD + DXR。ラパマイシンを含むまたは含まないあらゆる処置に対する応答を観察するために、各群を二つ組としたが、一方のみにラパマイシン処置を行った。毎日注射のラパマイシンおよび各サイクルを以下のように構成した複数サイクルの処置 (合計3サイクル) にマウスを供した: STS/FMDおよびSTS/FMD + DXRの群に属するマウスに、自由摂水させながら48~72時間完全な摂食制限を行い、次いで、失われた体重を回復させるために、サイクル間の約10日間、標準固形飼料食を再給餌した。STS/FMD + DXR群の動物にはさらに、第1、第2、および第3のサイクルの終了時点でそれぞれドキソルビシンを静脈内注射した。DXR群の動物には自由給餌を行い、ドキソルビシンを同様に注射した。これらの実験から、絶食が腫瘍進行の低減におけるラパマイシンの効果を増強することが示される。

【0041】

要約すると、mTOR阻害剤ラパマイシンとSTS/FMDの併用は、多種多様な癌細胞および腫瘍の増殖および生存の阻害に相加効果を示す。この併用処置はまた、ラパマイシン単剤の投与によりもたらされる正常細胞の化学療法依存的な感作を防止する。これらの結果から、STS/FMDは、AKT-TOR-S6KおよびRas-cAMP-PKAおよびMAPKを含む栄養シグナル伝達経路の他の阻害剤の効果を増強することができることが示唆される。細胞内外の種々の分子、増殖因子、および栄養素に対するSTSまたはそれに等価なFMDの広範な/幅広い作用効果のため、ラパマイシンで観察された増強効果は、癌処置に使用される多くの異なるキナーゼ/増殖阻害剤に対して当てはまるこ

10

20

30

40

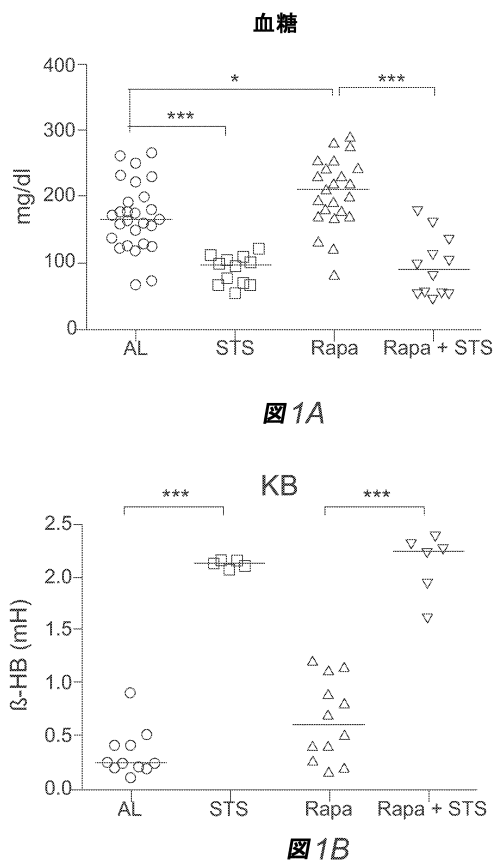
50

とが予想される。ラパマイシンおよび他の多くのキナーゼおよび/または増殖阻害剤がヒトにおける特定の腫瘍の処置に広く使用されているので、これらの結果は、それらの療法の安全性および効力について重要な意義を有する。

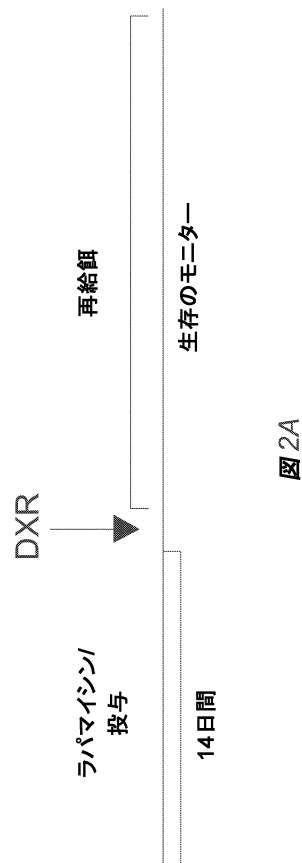
【0042】

例示的な実施形態が上記に記載されるが、これらの実施形態は、本発明のあらゆる可能な形態を記載することを意図するものではない。むしろ、本明細書で使用される言葉は、限定ではなく説明の言葉であり、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、種々の変更がなされ得ることが理解されよう。さらに、種々の実行実施形態の特徴を組み合わせ、本発明のさらなる実施形態を形成することができる。

【図1】



【図2-1】



【 図 2 - 2 】

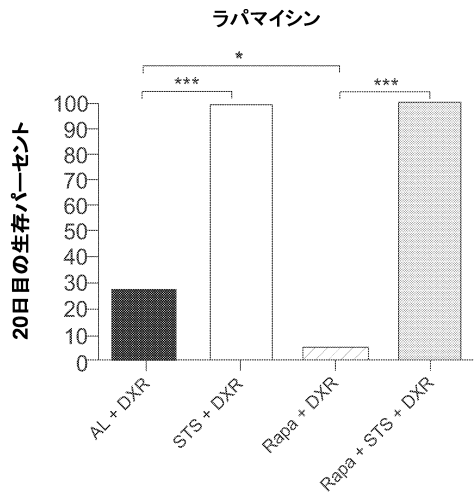


図 2B

【 図 2 - 3 】

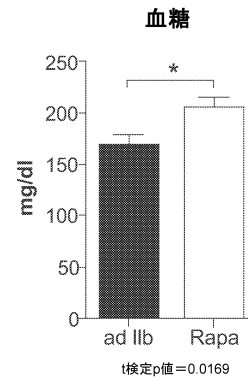


図 2C

【 図 3 - 1 】

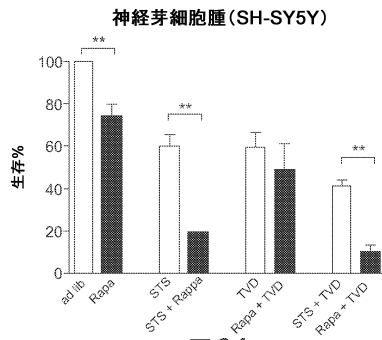


図 3A

【 図 3 - 2 】

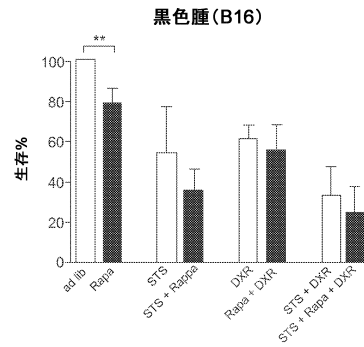


図 3C

乳癌(4T1)

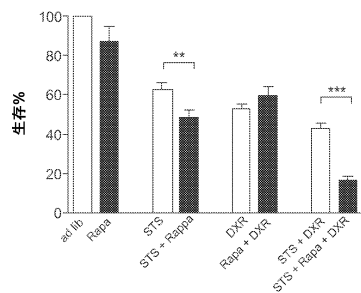


図 3B

【 図 4 - 1 】

【 図 4 - 2 】

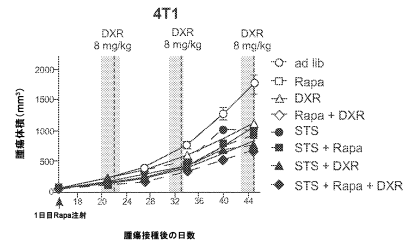
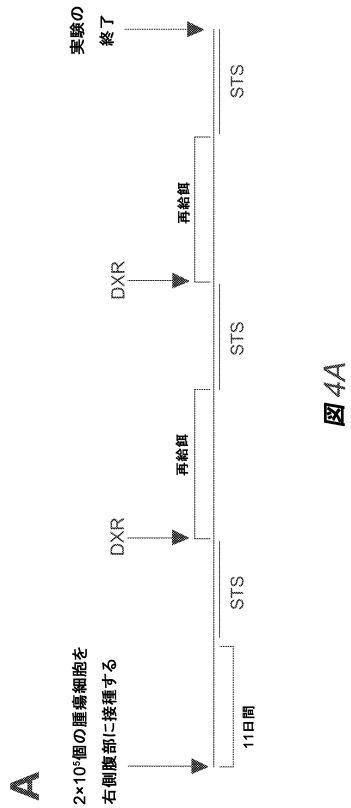


図 4B

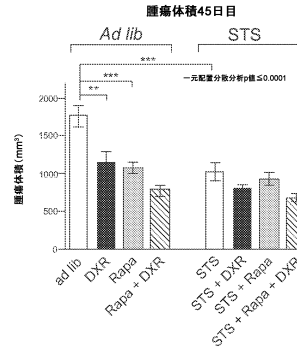


図 4C

【 図 4 - 3 】

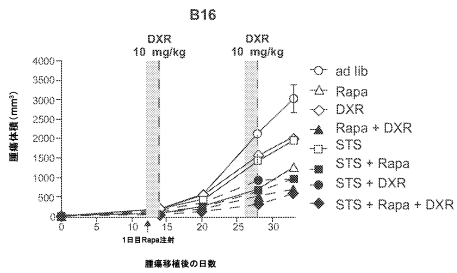


図 4D

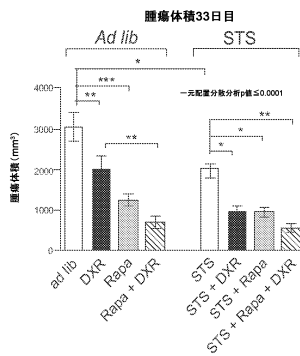


図 4E

フロントページの続き

(72)発明者 デ ビアス, ステファノ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90278, レドンドビーチ, マシューズアヴェニュー 2
221, ユニット エー

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 国際公開第2013/166555(WO, A1)

米国特許出願公開第2013/0171292(US, A1)

特表2013-508411(JP, A)

特表2009-511935(JP, A)

特表2010-521446(JP, A)

特表2010-536738(JP, A)

特表2011-523626(JP, A)

CHOO, A. Y. et al., Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2008年, Vol. 105, pp. 17414-17419

SAFDIE, F. M. et al., Fasting and cancer treatment in humans: A case series report, Aging, 2009年, Vol. 1, pp. 1-20

坂井隆之, 化学療法薬からの癌細胞のサバイバルメカニズム, 日薬理誌, 2006年, Vol. 127, pp. 342-347

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23L 5/40 - 5/49

A23L 31/00 - 35/00

PubMed