

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 10 月 3 日(03.10.2013)



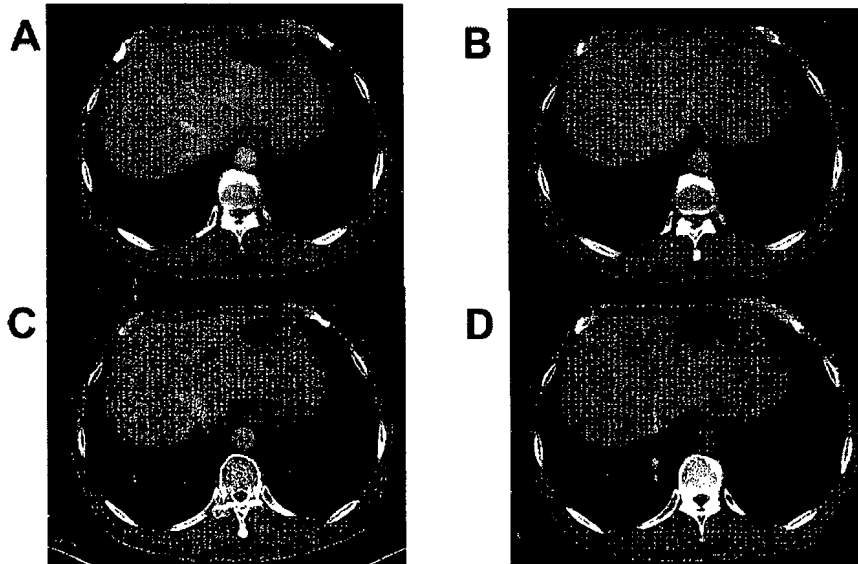
(10) 国際公開番号
WO 2013/146734 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/341 (2006.01) A61K 36/28 (2006.01)
A61K 31/7034 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/058692
- (22) 国際出願日: 2013 年 3 月 26 日(26.03.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-069964 2012 年 3 月 26 日(26.03.2012) JP
- (71) 出願人: クラシエ製薬株式会社 (KRACIE PHARMA, LTD.) [JP/JP]; 〒1088080 東京都港区海岸 3 丁目 20 番 20 号 Tokyo (JP). 独立行政法人 国立がん研究センター (NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地 5 丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP). 国立大学法人富山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF TOYAMA) [JP/JP]; 〒9308555 富山県富山市五福 3 1 9 0 Toyama (JP).
- (72) 発明者: 江角 浩安 (ESUMI Hiroyasu); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉 6-5-1 国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 池田 公史 (IKEDA Masafumi); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉 6-5-1 国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 三好 千香 (MIYOSHI Chika); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉 6-5-1 国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 門田 重利 (KADOTA Shigetoshi); 〒9300882 富山県富山市五艘 1 3 5 7-1 7 Toyama (JP). 大窪 敏樹 (OKUBO Toshiki); 〒9330856 富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内 Toyama (JP). 与茂田 敏 (YOMODA Satoshi); 〒9330856 富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内 Toyama (JP). 布施 貴史 (FUSE Takafumi); 〒9330856 富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内 Toyama (JP). 川島 孝則 (KAWASHIMA Takanori); 〒9330856 富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内 Toyama (JP). 千葉 殖幹 (CHIBA Shigeki); 〒9330856 富山県高岡市鐘紡町 3 番 1 号クラシエ製薬株式会社内 Toyama (JP).

[続葉有]

(54) Title: ANTICANCER AGENT

(54) 発明の名称: 抗癌剤



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a novel anticancer agent effective against cancer. When an agent prepared using an extract of Arctium lappa seeds was injected into a pancreatic cancer patients such that the daily dose of arctigenin was 100mg or greater, a tumor shrinkage effect was observed and a decrease in tumor markers was confirmed. The present invention provides an anticancer agent containing arctigenin such that the daily dose is 100mg or greater. Further, the present invention provides an anticancer agent containing arctigenin and arctiin in a weight ratio arctigenin / arctiin = 0.7-1.3.

(57) 要約: 本発明は、癌に対して効果を有する新規な抗癌剤を提供することを目的とする。ゴボウ抽出物を用いて調製した剤を、アルクチゲニンの 1 日あたりの投与量が 100mg 以上となるように膵臓癌患者に投与したところ、腫瘍縮小効果が見られ、また腫瘍マーカーの低下が確認された。本発明は、アルクチゲニンを 1 日あたりの投与量が 100mg 以上となるように含有する、抗癌剤を提供する。また、本発明は、アルクチゲニンおよびアルクチインを、アルクチゲニン/アルクチイン=0.7~1.3 の重量比にて含有する、抗癌剤を提供する。

WO 2013/146734 A1



(74) 代理人: 相原 礼路(AIHARA, Reiji); 〒1820024 東京都調布市布田四丁目19番地1 ライオンズプラザ調布305 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称 : 抗癌剤

技術分野

[0001] 本発明は、アルクチゲニンを含有する抗癌剤に関する。より詳細には、本発明は、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する抗癌剤に関する。

背景技術

[0002] 膵臓癌は難治性がんの一つであり、患者全体の5年生存率は2-3%と推定されている。膵臓癌で死亡する患者数は最近20年間におよそ2.5倍と急速に増加し、2009年の統計では26,791人が膵臓癌で死亡している。発生数と死亡数とはほぼ同数であり、これは日本におけるがんの死因の6%を占め、部位別がん死亡数では、肺、胃、大腸、肝に次いで第5位である。

[0003] 根治が期待できる治療は、外科的切除のみであるが、膵臓癌は多くの患者が、進行癌 (stage III+IV) の状態で発見されるため、実際に根治的切除が可能であるのは膵臓癌患者全体の約10-20%と言われている。Stage毎の生存期間中央値はStage I、IIで約12-30ヶ月、Stage IIIで9-11ヶ月、Stage IVで5-6ヶ月程度と、非常に予後不良であり、特に切除不能である患者には治癒する可能性は殆どないと考えられている。

[0004] 進行膵臓癌に対する標準治療はゲムシタビンであり、ゲムシタビンが不応となった場合の標準的な治療法は確立されていない。進行膵臓癌患者においてはゲムシタビンに不応になった時点においても、全身状態の良好な症例も認められ、このような患者群 (ゲムシタビン不応膵臓癌) における有効な治療法の開発は、膵臓癌の治療法開発全体において重要な課題であると考えられている。

[0005] 近年、PANC-1、AsPC-1、BxPC-1およびKP-3などの膵臓癌由来の細胞は、極度の栄養飢餓状態においても強い耐性が見られ、その耐性を解除することが癌治療における新しい生化学的アプローチとなる可能性が報告されている (特

許文献1)。

[0006] 膵臓癌細胞株PANC-1を使用して、低栄養状態における腫瘍細胞の生存能力を解除できる物質のスクリーニングを行ったところ、アルクチゲニンが有効であることが報告されている（非特許文献1）。

[0007] ここで、ゴボウシは、日局15でゴボウ *Arctium lappa* Linne (Compositae) の果実であると規定されている。また、ゴボウシは、銀翹散、駆風解毒湯、消風散などに処方される生薬であり、専ら医薬品として使用される成分本質に分類される。

[0008] ゴボウシは、リグナン配糖体に分類されるアルクチインを約7%およびそのアグリコンであるアルクチゲニンを約0.6%含む。これらの知見から、アルクチゲニンを含有するゴボウシ抽出物は、癌を治療するための抗癌剤として使用できると期待される。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：日本国公開特許公報「特開2002-065298号公報」

非特許文献

[0010] 非特許文献1：S. AwaLe, J. Lu, S. K. KaLauni, Y. Kurashima, Y. Tezuka, S. Kadota, H. Esumi, *Cancer Res.*, 2006, 66(3), 1751-1757)。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、癌に対して効果を有する新規な抗癌剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 現在知られているゴボウシは、ゴボウシ中のアルクチゲニン含量が約0.6%と低い。また、水に溶解難い。このため、従来利用されている熱水抽出法では、アルクチゲニンを高含量で含有するゴボウシ抽出物を製造することがきわめて困難であった。

[0013] また、膵臓癌などの治療に使用するにあたり、有効成分であるアルクチゲニンが一定の含有量となるゴボウシ抽出物の提供が望まれているが、上記のとおり、アルクチゲニン高含有ゴボウシ抽出物の製造において、アルクチインをアルクチゲニンに変換し、水に溶解難いアルクチゲニンを一定の含有量となるように制御することは困難であった。

[0014] さらに、膵臓癌などの治療に使用するにあたり、アルクチゲニンが主要な有効成分であるとともに、アルクチゲニンおよびアルクチインを一定含量で含むゴボウシ抽出物は、特に抗癌効果が優れていることが分かってきている。このため、アルクチゲニン高含有ゴボウシ抽出物の製造において、アルクチゲニンおよびアルクチインを一定の含有量となるように制御することができる製造方法が望まれる。特に、アルクチゲニンおよびアルクチインを約1：1の重量比で含有するゴボウシ抽出物を製造することができる方法が望まれる。

[0015] 本発明者らは、これらの課題を解決するために鋭意検討を行った結果、原料とするゴボウシ内在の β -グルコシダーゼ酵素活性、ゴボウシを切裁する粒径、アルクチインをアルクチゲニンに酵素変換する際の温度およびゴボウシからアルクチゲニンおよびアルクチインを抽出する際の温度を調整することにより、アルクチゲニンを一定の含有量とする技術、並びにアルクチゲニンおよびアルクチインの含有比を調節する技術を見出した。

[0016] そして、本発明者らは、これらの技術によって得られたゴボウシ抽出物を用いて、アルクチゲニンの1日あたりの投与量が100mg以上となるように調製した剤を膵臓癌患者に投与したところ、腫瘍縮小効果を観察するとともに、腫瘍マーカーの低下を確認した。本発明は、この驚くべき知見に基づき完成されたものである。

[0017] すなわち、本発明は、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、抗癌剤を提供する。

[0018] また、本発明は、さらにアルクチインを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する上記抗癌剤を提供する。

[0019] また、本発明は、アルクチゲニンおよびアルクチインを、アルクチゲニン／アルクチイン＝0.7～1.3の重量比にて含有する抗癌剤を提供する。

[0020] また、本発明は、上記アルクチゲニンおよび上記アルクチインがゴボウシ由来である上記抗癌剤を提供する。

[0021] また、本発明は、ゲムシタビンによる治療に不応答である膵臓癌を治療するための上記抗癌剤を提供する。

[0022] また、本発明は、アルクチゲニンを含有する、抗癌幹細胞剤を提供する。

[0023] また、本発明は、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、抗癌幹細胞剤を提供する。

発明の効果

[0024] 本発明により、癌に対して効果を有する新規な抗癌剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]本発明の一実施例の顆粒剤投与前 (A)、投与開始1か月後 (B)、2か月後 (C) および3か月後 (D) の胸腹部造影CTの結果を示す図。

[図2]本発明の一実施例の顆粒剤投与前 (A)、投与開始1か月後 (B)、2か月後 (C) および3か月後 (D) の胸腹部造影CTの結果を示す図。

[図3]本発明の一実施例の顆粒剤投与前 (A)、投与開始1か月後 (B)、2か月後 (C) および3か月後 (D) の胸腹部造影CTの結果を示す図。

[図4]腫瘍モデル動物 (CAPAN-1 Xenografts) における抗腫瘍性の評価の結果を示す図。

[図5]腫瘍モデル動物 (PSN-1 Xenografts) における抗腫瘍性の評価の結果を示す図。

[図6]癌幹細胞に対するPI染色および膵臓癌幹細胞マーカー (CD44, CD24, ESA) 染色の結果を示す図。

[図7]癌幹細胞に対するPI染色および膵臓癌幹細胞マーカー (CD44, c-Met) 染色の結果を示す図。

[図8]癌幹細胞に対するPI染色および膵臓癌幹細胞マーカー染色の結果 (シス

プラチン処理との比較)を示す図。

発明を実施するための形態

- [0026] 以下、本発明について詳細に説明する。開示する条件は一例であり、これに限定されるものではない。
- [0027] 本発明の抗癌剤は、有効成分として、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する。アルクチゲニンは、アルクチゲニンを含有する植物由来であってもよく、たとえばゴボウシ由来であってもよい。すなわち、本発明の抗癌剤は、植物からの抽出物、たとえばゴボウシから得たゴボウシ抽出物に含まれるアルクチゲニンを有効成分として含有してもよい。
- [0028] 本発明の抗癌剤はまた、さらに有効成分としてアルクチインを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有してもよい。アルクチインは、アルクチインを含有する植物由来であってもよく、たとえばゴボウシ由来であってもよい。すなわち、本発明の抗癌剤は、植物からの抽出物、たとえばゴボウシから得たゴボウシ抽出物に含まれるアルクチインを有効成分として含有してもよい。
- [0029] 本発明の抗癌剤はまた、有効成分として、アルクチゲニンおよびアルクチインを、 $\text{アルクチゲニン} / \text{アルクチイン} = 0.7 \sim 1.3$ の重量比(1.0~1.9のモル比)にて含有するものであってもよい。アルクチゲニンおよびアルクチインは、アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する植物由来であってもよく、たとえばゴボウシ由来であってもよい。すなわち、本発明の抗癌剤は、アルクチゲニンおよびアルクチインを、 $\text{アルクチゲニン} / \text{アルクチイン} = 0.7 \sim 1.3$ の重量比にて含有する植物の抽出物、たとえばゴボウシ抽出物を含有してもよい。また、この抗癌剤において、アルクチゲニンは、1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有されていてもよく、またアルクチインは、1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有されていてもよい。
- [0030] アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する植物は、特に限定されないが、たとえばゴボウ(スプラウト・葉・根茎)、ベニバナ、ヤグルマギク、

アメリカオニアザミ、サントリソウ（ギバナアザミ）、カルドン、ゴロツキアザミ、アニウロコアザミ、アイノコレンギョウ、チョウセンレンギョウ、レンギョウ、シナレンギョウ、ゴマ、モミジヒルガオ、シンチクヒメハギ、チョウセンテイカカズラ、テイカカズラ、ムニンテイカカズラ、ヒメテイカカズラ、トウキョウチクトウ、ケテイカカズラ、リョウカオウ、オオケタデ、ヤマザクラ、シロイヌナズナ、アマランス、クルミ、エンバク、スペルタコムギ、軟質コムギ、メキシコイトスギおよびカヤなどを含む。なかでも、ゴボウおよびレンギョウは、アルクチゲニン含有量が高いため好ましい。

[0031] 本発明において、アルクチゲニンおよびアルクチインがゴボウシ由来である場合には、後述するゴボウシ抽出物の製造方法を用いて得られるゴボウシ抽出物を用いることができる。そのため、製造時の生産性を向上させることができ、安価にかつ簡便に抗癌剤を調製することができる。また、ゴボウシ以外の植物を用いる場合にも、後述する製造方法を利用することにより、アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する抽出物を容易に得ることが可能である。

[0032] 後述するゴボウシ抽出物の製造方法によって得られる抽出物粉末は、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン／アルクチイン＝0.7～1.3の重量比で含有する。したがって、このゴボウシ抽出物の製造方法によって得られる抽出物粉末は、従来のゴボウシ抽出物と比較して、優れた抗癌効果を有する本発明の抗癌剤として使用することができる。

[0033] 本発明の抗癌剤は、さらに任意の成分を含むことができる。たとえば、本発明の抗癌剤は、薬学的に許容される基剤、担体、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤および着色剤などを含む形態にて提供することができる。

[0034] 抗癌剤に使用する担体および賦形剤の例には、乳糖、ブドウ糖、白糖、マンニトール、デキストリン、馬鈴薯デンプン、トウモロコシデンプン、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウムおよび結晶セルロースなどを含む。

[0035] また、結合剤の例には、デンプン、ゼラチン、シロップ、トラガントゴム

、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースなどを含む。

[0036] また、崩壊剤の例には、デンプン、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびカルボキシメチルセルロースカルシウムなどを含む。

[0037] また、滑沢剤の例には、ステアリン酸マグネシウム、水素添加植物油、タルクおよびマクロゴールなどを含む。また、着色剤は、医薬品に添加することが許容されている任意の着色剤を使用することができる。

[0038] また、抗癌剤は、必要に応じて、白糖、ゼラチン、精製セラック、ゼラチン、グリセリン、ソルビトール、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、フタル酸セルロースアセテート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルメタクリレートおよびメタアクリル酸重合体などで一層以上の層で被膜してもよい。

また、必要に応じて、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤および可溶化剤などを添加してもよい。

[0039] また、抗癌剤は、任意の形態の製剤として提供することができる。たとえば、抗癌剤は、経口投与製剤として、糖衣錠、バッカル錠、コーティング錠およびチュアブル錠等の錠剤、トローチ剤、丸剤、散剤およびソフトカプセルを含むカプセル剤、顆粒剤、懸濁剤、乳剤、ドライシロップを含むシロップ剤、エリキシル剤等の液剤であることができる。

[0040] また、抗癌剤は、非経口投与のために、静脈注射、皮下注射、腹腔内注射、筋肉内注射、経皮投与、経鼻投与、経肺投与、経腸投与、口腔内投与および経粘膜投与などの投与のための製剤であることができる。たとえば、注射剤、経皮吸収テープ、エアゾール剤および坐剤などであることができる。また、抽出物粉末が特有のえぐみを有することから、抽出物粉末をマスキング

する製剤としたり、被覆剤で被覆するフィルムコート剤としたりすることができる。

[0041] 一方、後述するゴボウシ抽出物の製造方法によって得られた抽出物粉末は、そのままの形で抗癌剤として使用することもできる。

[0042] 本発明の抗癌剤は、精製したアルクチゲニンおよび他の成分を混合して製造してもよいし、以下に記述する方法により製造されるゴボウシ抽出物を用いて製造してもよい。

[0043] ゴボウシ抽出物は、生薬切裁工程、抽出工程（酵素変換工程および有機溶媒による抽出工程）、固液分離工程、濃縮工程および乾燥工程を経て製造される。

[0044] （生薬切裁工程）

本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法では、原料とするゴボウシを抽出に適した大きさに切裁する。原料となる生薬は、植物の様々な部位や鉱物、動物など種々の大きさ、形状、固さがあり、その特質に応じた切裁が必要となる。

ゴボウシは、当業者に公知の任意の手段を使用して切裁することができる。たとえば、市販の切裁機を使用することができる。

[0045] 本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法では、ゴボウシに内在する酵素である β -グルコシダーゼの活性を事前に測定し、本発明の製造に適したゴボウシを選択することができる。

[0046] β -グルコシダーゼの活性を測定する方法としては、たとえばp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド ($C_{12}H_{15}NO_8$ ：分子量301.25) (SIGMA-ALDRICH社製) を基質として、ゴボウシ粉碎品を作用させることで生成するp-ニトロフェノールを400nmの吸光度の変化を測定することにより、酵素活性を測定できる。酵素活性を表す単位として1分間に1マイクロモルのp-ニトロフェノールを生成する酵素量を1単位 (U) として表すことができる。

[0047] アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン／アルクチイン=0.7～1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、ゴボウシに内在す

る β -グルコシダーゼの活性が、たとえば0.4U/g以上、好ましくは1U/g以上のゴボウシを用いることができる。

0.4U/g未満の場合は、加水分解が不十分となり、アルクチゲニンの重量比が下がり、所望のゴボウシ抽出物を効率的に得られなくなる。

[0048] また、本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法では、任意の粒径に切裁されたゴボウシを使用することができる。切裁されたゴボウシの粒径が小さいほど酵素変換が促進され、抽出物収率も上昇すると考えられる。その反面、粒径が小さすぎると、酵素変換が速過ぎてプロセス管理が困難になったり、後の工程において正確な固液分離に支障が生じたりすることがある。

[0049] アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン／アルクチイン=0.7～1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、以下の実施例に示したように、ゴボウシは、9.5mm以下の粒径に、たとえば9.5mmの篩を全通するように切裁される。

[0050] また、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン／アルクチイン=0.7～1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、ゴボウシの粒径が、9.5mm篩を全量通過し、たとえば0.85mmの篩に60～100%が分布するように、さらに好ましくは0.85mmの篩に65～80%が分布するように切裁されることが望ましい。

[0051] (抽出工程)

抽出工程は、生薬抽出物粉末製造工程中で、品質上最も重要な工程である。この抽出工程により、生薬抽出物粉末の品質が決まる。本発明のゴボウシ抽出物の製造方法では、ゴボウシ抽出物を抽出するために、酵素変換工程と有機溶媒による抽出工程の2段階に分けて抽出を行う。

[0052] (酵素変換工程)

酵素変換工程は、本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法において重要な工程である。酵素変換工程は、ゴボウシに内在する酵素である β -グルコシダーゼにより、ゴボウシに含まれているアルクチインをアルクチゲ

ニンに酵素変換する工程である。

[0053] 具体的には、上記工程で準備したゴボウシ切裁物を、適切な温度に保持することにより β -グルコシダーゼを作用させて、アルクチインからアルクチゲニンへの反応を進行させる。たとえば、切裁したゴボウシに水などの任意の溶液を加えて、30℃付近の温度にて攪拌することなどにより、ゴボウシを任意の温度に保持することができる。

[0054] アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン／アルクチイン＝0.7～1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、切裁したゴボウシを30℃付近の温度、たとえば20～50℃の間の温度に保持する。

[0055] 20℃未満の場合は、加水分解が不十分となり、アルクチゲニンの重量比が下がり、所望のゴボウシ抽出物を効率的に得られなくなる。一方、50℃より高温の場合は、酵素が失活し、アルクチゲニンの重量比が下がり、所望のゴボウシ抽出物を効率的に得られなくなる。

[0056] また、保持時間は、上記温度において保持する限り特に限定されず、たとえば約30分保持させることができる。20～50℃の間に保持することにより、保持時間にかかわらず、適切な量のアルクチインがアルクチゲニンに酵素変換され、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）が約1：1で含有するゴボウシ抽出物を得ることができる。

[0057] （有機溶媒による抽出工程）

有機溶媒による抽出工程は、任意の適切な有機溶媒を使用して、ゴボウシからアルクチゲニンおよびアルクチインを抽出する工程である。すなわち、上記の酵素変換工程によりアルクチゲニンが高含量となった状態で、適切な溶媒を添加して、ゴボウシ抽出物を抽出する工程である。たとえば、ゴボウシ抽出物に適切な溶媒を添加して、適切な時間加熱攪拌してゴボウシ抽出物を抽出する。また、加熱攪拌以外にも、加熱還流、ドリップ式抽出、浸漬式抽出または加圧式抽出法などの当業者に公知の任意の抽出法を使用して、ゴボウシ抽出物を抽出することができる。

[0058] アルクチゲニンは水難溶性であることから、有機溶媒を添加することによ

り、アルクチゲニンの収率を向上させることができる。有機溶媒は、任意の有機溶媒を使用することができる。たとえば、メタノール、エタノールおよびプロパノールなどのアルコール、並びにアセトンを使用することができる。安全性の面を考慮すると、本発明の抗癌剤に用いるゴボウシ抽出物の製造方法では、有機溶媒としてエタノールを使用することが好ましい。

[0059] 加熱攪拌によってゴボウシ抽出物を抽出する場合、加熱攪拌は、任意の温度にて行うことができるが、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン／アルクチイン＝0.7～1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得るためには、80℃以上の温度、たとえば80～90℃の間の温度に保持する。

[0060] また、加熱攪拌する時間は、上記温度において加熱攪拌する限り、特に限定されず、約30分間、たとえば30～60分間加熱攪拌することにより、溶媒中にゴボウシからアルクチゲニンおよびアルクチインを抽出させることができる。

[0061] アルクチゲニンおよびアルクチインの収率は、加熱攪拌の時間が長いほど向上する。しかし、加熱攪拌の時間が長いと、不要な油脂類が多く溶け出し、濃縮工程の負荷が大きくなってしまう。したがって、加熱攪拌の時間は、状況に応じて適宜決定すればよい。

[0062] また、アルクチゲニンおよびアルクチインの収率は、エタノール量が多いほどアルクチゲニンおよびアルクチインの溶解度が高くなるため、収率も向上する。しかし、エタノール量が多いと、不要な油脂類も多く溶け出し、濃縮工程の負荷が大きくなってしまう。したがって、投入量は、状況に応じて適宜決定すればよい。なおこの工程での加熱攪拌により、同時にゴボウシ抽出物を滅菌および殺菌することができる。

[0063] (固液分離工程)

固液分離工程は、抽出の終わったゴボウシを抽出液から分離する工程である。固液分離は、当業者に公知の任意の方法を使用して行うことができる。固液分離法には、たとえば濾過法、沈降法および遠心分離法などがある。工業的には、遠心分離法が望ましい。

[0064] (濃縮工程)

濃縮工程は、乾燥に先立ちゴボウシ抽出液から溶媒を除去する工程である。ゴボウシ抽出液からの溶媒の除去は、当業者に公知の任意の方法を使用して行うことができる。

[0065] しかし、上記工程によって得られたゴボウシからの抽出液が、さらに高温に長時間曝されることがないようにすることが好ましい。

[0066] たとえば、減圧濃縮法を使用することにより、高温に長時間曝されることがなく、ゴボウシ抽出液を濃縮することができる。

[0067] ゴボウシ抽出液の濃縮は、所望の濃度のゴボウシ抽出物が得ることができる濃度まで濃縮することができる。

[0068] たとえば、以下の乾燥工程において乾燥を適正に行うことができる程度まで濃縮することが望ましい。また、以下の工程においてゴボウシ抽出物を乾燥させて粉末製剤にした場合に、適切な製剤特性が得られる濃度まで濃縮を行うことが望ましい。

[0069] アルクチゲニンおよびアルクチインは、水難溶性であるため、アルクチゲニンおよびアルクチインが以下の乾燥工程における製造装置内に付着する量が多く、最終的な収率が大幅に低下する。そこで、製造装置にアルクチゲニンおよびアルクチインが付着するのを防止するために、この濃縮工程で得られたゴボウシ抽出液にデキストリンを添加することができる。デキストリンの添加量は、たとえば濃縮液の固形分に対して15～30%程度が望ましい。

[0070] (乾燥工程)

上記工程によって得られたゴボウシ抽出物を粉末状に仕上げる工程である。乾燥は、当業者に公知の任意の方法を使用して行うことができる。たとえば、乾燥法として、凍結乾燥および噴霧乾燥などが知られているが、実験室レベルであれば前者、量産レベルであれば後者を用いるのが一般的である。

[0071] 以上の製造工程により、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン／アルクチイン＝0.7～1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を得ることができる。このゴボウシ抽出物の製造方法は、20℃～50℃の温度で酵素変

換を行う工程を含まなければならないが、その他の工程の全てを含む必要はない。

[0072] また、以上の製造工程により、アルクチゲニンの濃度が高いゴボウシ抽出物を、安価にかつ簡便に得ることができる。したがって、この方法により得られたゴボウシ抽出物を用いることによって、本発明の抗癌剤を安価にかつ簡便に製造することができる。

[0073] また、以上の製造工程により得られるゴボウシ抽出物のアルクチゲニン濃度が高いため、従来のゴボウシ抽出物を用いた場合と比較して、抗癌剤の1日当たりの全体量を少なくすることができる。したがって、患者の負担を軽減させることができる。

[0074] なお、本発明は、ゴボウシを切裁する工程と、ゴボウシに内在する β -グルコシダーゼによりゴボウシに内在するアルクチインをアルクチゲニンに酵素変換する工程であって、前記酵素変換は、20℃～50℃の温度で反応させる工程とを含む、アルクチゲニンおよびアルクチインをアルクチゲニン／アルクチイン＝0.7～1.3の重量比（1.0～1.9のモル比）で含有するゴボウシ抽出物を製造する方法をも提供する。

[0075] また、本発明は、切裁する工程において、ゴボウシが0.85mm～9.5mmの粒径に切裁される、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

[0076] さらに、本発明は、ゴボウシに内在する β -グルコシダーゼの酵素活性が、ゴボウシ1g中0.4U以上である、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

[0077] また、本発明は、酵素変換する工程の後に、有機溶媒を加えることにより、アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する抽出物を抽出する工程を含む、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

[0078] また、本発明は、有機溶媒がエタノールである、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

[0079] また、本発明は、抽出する工程が約80℃で抽出される、上記のゴボウシ抽出物を製造する方法を提供する。

- [0080] さらに、本発明は、上記方法によって得られる、アルクチゲニン／アルクチインを0.7～1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を提供する。
- [0081] さらに、本発明は、上記方法によって得られる、アルクチゲニン／アルクチインを0.7～1.3の重量比で含有するゴボウシ抽出物を含有する抗癌剤を提供する。
- [0082] 本発明により、アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、抗腫瘍効果のある抗癌剤の提供が可能となった。また本発明により、アルクチゲニンおよびアルクチインを、アルクチゲニン／アルクチイン＝0.7～1.3（重量比）にて含有する抗癌剤の提供が可能となった。本発明の抗癌剤は、癌患者、たとえば膵臓癌患者に投与することで、安定した腫瘍の増殖抑制や抗腫瘍効果を期待できる。また、本発明の抗癌剤は、ゲムシタビンによる治療に不応答である膵臓癌を治療するための膵臓癌治療剤として用いることができる。
- [0083] また、以下の試験例7において、アルクチゲニンおよびアルクチインを含有する顆粒剤の毒性が非常に低いことが示された。したがって、本発明の抗癌剤は、非常に少ない副作用で高い抗癌効果を提供することができる。
- [0084] また、以下の試験例8および9において、アルクチゲニンが膵臓および肝臓の癌幹細胞に対し殺傷効果を有することが示された。このことから、アルクチゲニンは、固形癌に対して腫瘍本体だけでなく癌幹細胞にも作用して殺傷することにより抗癌作用を発揮することが示唆された。また、アルクチゲニンは、膵臓癌だけでなく他の癌の癌幹細胞も殺傷し、抗癌効果を有することが示された。したがって、本発明は、種々の癌を治療するための抗癌剤を提供する。
- [0085] また、本発明は、アルクチゲニンを含有する抗癌幹細胞剤をも提供する。抗癌幹細胞剤は、癌幹細胞を殺傷する効果を有する薬剤をいう。癌幹細胞は、癌細胞のうち幹細胞性を有する細胞をさす。
- [0086] 本発明の抗癌幹細胞剤は、上述した本発明の抗癌剤と同様の構成であることができる。すなわち、抗癌幹細胞剤は、アルクチゲニンを1日あたりの投与

量が100mg以上となるように含有してもよい。また、抗癌幹細胞剤は、アルクチンをさらに含有してもよく、アルクチンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有してもよい。抗癌幹細胞剤は、アルクチゲニンおよびアルクチンを、アルクチゲニン／アルクチン＝0.7～1.3の重量比にて含有してもよい。アルクチゲニンおよびアルクチンは、アルクチゲニンおよびアルクチンを含有する植物由来であってもよく、たとえばゴボウシ由来であってもよい。

- [0087] 以下の試験例8および9において、アルクチゲニンは、特に癌細胞の周囲の環境に近い栄養飢餓条件において癌幹細胞を選択的に殺傷する効果を有することが示された。したがって、本発明の抗癌幹細胞剤は、癌幹細胞を殺傷することにより、癌細胞の増殖を抑制することができるため、抗癌剤として好適に利用することができる。

実施例

- [0088] (試験例)

ゴボウシの酵素活性および酵素変換条件（温度と時間）が、アルクチゲニン／アルクチン（重量比）に及ぼす影響、すなわち両者の因果関係を検証した。

- [0089] (酵素活性の測定)

産地やロットが異なるゴボウシをウイレー氏粉碎機により粉碎し、このゴボウシ粉碎品0.1gを10mLの水で希釈し、試料溶液とした。

- [0090] 基質溶液として、p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド0.15gに水を加えて25mLに定容し、20mmol/L p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド水溶液を調製した。0.1mol/L酢酸緩衝液1mLに20mmol/L p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド水溶液0.5mLを加えて、反応混液を調製し、37℃で約5分予備加熱を行った。

- [0091] 反応混液に試料溶液0.5mL加えて37℃で15分反応させた後、反応停止液である0.2mol/L炭酸ナトリウム水溶液を2mL加えて反応を停止させた。この液の400nmにおける吸光度を測定し、酵素反応を行わないブランク溶液からの変化量

から下式により酵素活性を求めた。

酵素活性 (U/g) = (試料溶液の吸光度-ブランク溶液の吸光度) × 4mL × 1 / 18.1 (p-ニトロフェノールの上記測定条件下でのミリモル分子吸光係数: cm² / μmol) × 1 / 光路長(cm) × 1 / 反応時間 (分) × 1 / 0.5mL × 1 / 試料溶液濃度 (g/mL)

[0092] 表1に示すように各ゴボウシの酵素活性が0.12~8.23U/gであることを確認した。

[0093] (試験例1)

酵素活性が0.12、0.27、0.40U/g (試料1~3) である切裁したゴボウシ1gに水7mLを加えて、酵素反応温度15℃、20℃の温度条件でそれぞれの反応温度での反応時間を30分に設定し、反応後エタノールを加え80℃で抽出を行い、得られた抽出物のアルクチゲニン及びアルクチインを定量し、アルクチゲニン / アルクチイン重量比を求めた。結果を表1の比較例1~2、実施例1に示す。

[0094] 酵素活性が0.40U/gの試料3は、酵素反応温度20℃、反応時間30分で、アルクチゲニン / アルクチイン (重量比) = 0.82のゴボウシ抽出物が得られた。

[0095] 一方、酵素反応温度15℃、反応時間30分では、アルクチゲニン / アルクチイン (重量比) = 0.69であり、酵素反応温度は20℃以上であることが好ましい。

[0096] また、酵素活性が0.40U/g未満の試料1及び2は、酵素反応温度20℃であってもアルクチゲニン / アルクチイン (重量比) = 0.70以上を満たすことができないことから、ゴボウシの酵素活性は0.40U/g以上であることが好ましい。

[0097] (試験例2)

酵素活性が4.03U/g (試料5) である切裁したゴボウシ1gに水7mLを加えて、酵素反応温度30℃、40℃、50℃、60℃の温度条件でそれぞれの反応温度での反応時間を15分、30分 (30℃と60℃のみ) に設定し、反応後エタノールで抽出を行い、得られた抽出物のアルクチゲニン及びアルクチインを定量し、アルクチゲニン / アルクチイン重量比を求めた。

[0098] 結果を表1の実施例3に示す。酵素反応温度30℃、反応時間15分で、アルク

チゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.7、酵素反応温度30℃、反応時間30分で、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝1.0、酵素反応温度40℃、反応時間15分で、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝1.2、酵素反応温度50℃、反応時間15分で、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝1.2のゴボウシ抽出物が得られた。

[0099] 一方、酵素反応温度60℃、反応時間15分では、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.4、酵素反応温度60℃、反応時間30分では、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.5であった。以上のことから、酵素反応温度は60℃未満が好ましい。

[0100] （試験例3）

酵素活性が1.42U/g（試料4）である切裁したゴボウシ1gに水を7mL加えて、酵素反応温度25℃の温度条件で反応時間を10分、30分に設定し、反応後エタノールで抽出を行い、得られた抽出物のアルクチゲニン及びアルクチインを定量し、アルクチゲニン／アルクチイン重量比を求めた。

[0101] 結果を表1の実施例2に示す。酵素反応温度25℃、反応時間10分で、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.74、同じく反応時間30分でアルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.85のゴボウシ抽出物が得られた。

以上のことから酵素活性1.42U/gであっても所望の結果を得ることができた。

。

[0102]

[表1]

			比較例 1	比較例 2	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5
試 料			試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7
酵素活性 (U/g)			0.12	0.27	0.40	1.42	4.03	7.82	8.23
アルクチゲニン/アルクチイン 重量比	15℃	30 分	0.28	0.50	0.69	--	--	--	--
	20℃	30 分	0.23	0.60	0.82	--	--	--	--
	25℃	10 分	--	--	--	0.74	--	--	--
		30 分	--	--	--	0.85	--	--	--
	30℃	15 分	--	--	--	--	0.70	--	--
		30 分	--	--	--	--	1.00	0.93	0.89
	40℃	15 分	--	--	--	--	1.20	--	--
		30 分	--	--	--	--	--	--	--
	50℃	15 分	--	--	--	--	1.20	--	--
		30 分	--	--	--	--	--	--	--
	60℃	15 分	--	--	--	--	0.40	--	--
		30 分	--	--	--	--	0.50	--	--

[0103] (実施例6 ゴボウシ抽出物の製造1)

ゴボウシ（酵素活性8.23U/g）を切裁し、9.5mmの篩を全通するものをさらに0.85mmの篩に通し、75%が残ることを確認した。このゴボウシ細切80kgを29～33℃に保温した水560Lに加えて30分間攪拌した。次いで、エタノール265Lを加えて85℃に昇温し、さらに60分間加熱還流した。この溶液を遠心分離し、ゴボウシ抽出液を得た。この操作を2回繰り返して得られた抽出液を合わせて、減圧濃縮し、抽出物固形分に対してデキストリン20%を加えて、噴霧乾燥した。アルクチゲニンおよびアルクチイン含量は、それぞれ6.2%および7.1%であり、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.89のゴボウシ抽出物粉末（デキストリン20%含有）が得られた。

[0104] (実施例7 ゴボウシ抽出物の製造2)

ゴボウシ（酵素活性8.23U/g）を切裁し、9.5mmの篩を全通するものをさらに0.85mmの篩に通し、75%が残ることを確認した。このゴボウシ細切80kgを30～33℃に保温した水560Lに加えて30分間攪拌した後、エタノール265Lを加えて85℃に昇温し、さらに30分間加熱還流した。この溶液を遠心分離し、ゴボウシ抽出液を得た。この操作を2回繰り返して得られた抽出液を合わせて、減圧濃縮し、抽出物固形分に対してデキストリン20%を加えて、噴霧乾燥した。アルクチゲニンおよびアルクチイン含量は、それぞれ6.0%および6.8%で

あり、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.87のゴボウシ抽出物粉末（デキストリン20%含有）が得られた。

[0105] （実施例8 ゴボウシ抽出物の製造3）

ゴボウシ（酵素活性7.82U/g）を切裁し、9.5mmの篩を全通するものをさらに0.85mmの篩に通し、75%が残ることを確認した。このゴボウシ細切80kgを30～32℃に保温した水560Lに加えて40分間攪拌した後、60分後にエタノール258Lを加えて85℃に昇温し、さらに30分間加熱還流した。この液を遠心分離し、ゴボウシ抽出液を得た。この操作を2回繰り返して得られた抽出液を合わせて、減圧濃縮し、抽出物固形分に対してデキストリン20%を加えて、噴霧乾燥した。アルクチゲニンおよびアルクチイン含量は、それぞれ6.2%および6.7%であり、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.93のゴボウシ抽出物粉末（デキストリン20%含有）が得られた。

[0106] （実施例9 ゴボウシ抽出物の製造4）

ゴボウシ（酵素活性7.82U/g）を切裁し、9.5mmの篩を全通するものをさらに0.85mmの篩に通し、75%が残ることを確認した。このゴボウシ細切80kgを30～32℃に保温した水560Lに加えて30分間攪拌した後、エタノール253Lを加えて85℃に昇温し、さらに40分間加熱還流した。この液を遠心分離し、得られた抽出液を得た。この操作を2回繰り返して得られた抽出液を合わせて、減圧濃縮し、抽出物固形分に対してデキストリン25%を加えて、噴霧乾燥した。アルクチゲニンおよびアルクチイン含量は、それぞれ6.4%および7.2%であり、アルクチゲニン／アルクチイン（重量比）＝0.89のゴボウシ抽出物粉末（デキストリン25%含有）が得られた。

[0107]

[表2]

		実施例6	実施例7	実施例8	実施例9
ゴボウシ	酵素活性	8.23	8.23	7.82	7.82
切裁工程	粒径(mm)	0.85~9.5	0.85~9.5	0.85~9.5	0.85~9.5
酵素変換工程	温度(°C)	29~33°C	30~33°C	30~32°C	30~32°C
	時間(分)	30分	30分	40分	30分
抽出工程	溶媒	エタノール	エタノール	エタノール	エタノール
	温度(°C)	85°C	85°C	85°C	85°C
	時間(分)	60分	30分	30分	40分
固液分離工程		遠心分離法	遠心分離法	遠心分離法	遠心分離法
濃縮工程		減圧濃縮	減圧濃縮	減圧濃縮	減圧濃縮
乾燥工程		噴霧乾燥	噴霧乾燥	噴霧乾燥	噴霧乾燥
アルクチゲニン/アルクチイン(重量比)		0.89	0.87	0.93	0.89

[0108] 上記の実施例6~9の結果から、酵素変換工程において、およそ30°Cにおいて酵素変換することにより、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）＝約1：1の含有量のゴボウシ抽出物が得られることが分かった。通常、酵素による反応は、温度および時間に依存的に反応が進行するが、この温度であれば酵素変換時間にかかわらず、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）＝約1：1の含有量のゴボウシ抽出物が得られることが分かった。

[0109] また、上記の実施例6~9の結果から、加熱還流工程において、およそ85°Cに温度を上昇させて加熱還流することにより、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）＝約1：1の含有量のゴボウシ抽出物が得られることが分かった。通常、加熱還流して抽出物を得る場合、抽出物中の含有物の量は、温度および時間に依存して変化するが、この温度であれば加熱還流時間にかかわらず、アルクチゲニン：アルクチイン（重量比）＝約1：1の含有量のゴボウシ抽出物が得られることが分かった。

[0110] （実施例10 ゴボウシ抽出物粉末配合顆粒剤）

(1) 実施例7のゴボウシ抽出物粉末	33.3%
(2) 乳糖	65.2%
(3) ヒドロキシプロピルセルロース	1.5%
合計	100%

[0111] (製造方法)

「日局」製剤総則、顆粒剤の項に準じて顆粒剤を製造する。すなわち上表に記載の(1)～(3)までの成分をとり、顆粒状に製した。これを1.5gずつアルミラミネートフィルムに充填し、1包あたりゴボウシ抽出物粉末を0.5g含有する顆粒剤を得た。

[0112] (実施例11 ゴボウシ抽出物粉末配合顆粒剤)

(1) 実施例7のゴボウシ抽出物粉末	66.7%
(2) 乳糖	30.3%
(3) ヒドロキシプロピルセルロース	3.0%
合計	100%

[0113] (製造方法)

「日局」製剤総則、顆粒剤の項に準じて顆粒剤を製造する。すなわち上表に記載の(1)～(3)までの成分をとり、顆粒状に製した。これを3.0gずつアルミラミネートフィルムに充填し、1包あたりゴボウシ抽出物粉末を2g含有する顆粒剤を得た。

(実施例12 ゴボウシ抽出物粉末配合錠剤)

(1) 実施例7のゴボウシ抽出物粉末	37.0%
(2) 結晶セルロース	45.1%
(3) カルメロースカルシウム	10.0%
(4) クロスポピドン	3.5%
(5) 含水二酸化ケイ素	3.4%
(6) ステアリン酸マグネシウム	1.0%
合計	100%

[0114] (製造方法)

「日局」製剤総則、錠剤の項に準じて錠剤を製する。すなわち上表に記載の(1)～(6)成分をとり、錠剤を得た。

[0115] (試験例4)

実施例10の顆粒剤を用いて膵臓癌に対する効果を試験した。

[0116] 病理組織学的に腺癌（腺扁平上皮癌を含む）であることが確認され、前治療として1年3か月の間Gemcitabine+S-1療法を行いBestresponseが部分奏効（PR：PartialResponse）であった、最終的にGemcitabine+S-1療法に抵抗性となり、PD（Progressivedisease）となった患者（53歳、男性）を対象とした。この患者に対し、実施例10の顆粒剤7.5g（5包）（ゴボウシ抽出物粉末2.5gを含有する）を、1日1回朝食後、連日経口投与した。

[0117] なお、本試験例で用いた顆粒剤に含まれるゴボウシ抽出物粉末1gには、アルクチゲニン59.4mgおよびアルクチイン68.5mgが含まれる。すなわち、患者に投与した1日当たりのアルクチゲニンは148.5mgであり、アルクチインは171.25mgである。

[0118] 図1～3は、この患者における顆粒剤投与前（A）、投与開始1か月後（B）、2か月後（C）および3か月後（D）の胸腹部造影CTの画像を示す図である。これらの画像により、経時的に「固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン（RECISTguideline（version1.1））による腫瘍縮小効果判定を行った。その結果、図2および図3に矢印で示すように、腫瘍縮小効果が確認された。一方、上記患者において、実施例10の顆粒剤の投与後に重篤な副作用は見られなかった。

[0119] さらに、顆粒剤投与前後の腫瘍マーカーCA19-9およびCEAの量を検査した。その結果、表3に示すように、顆粒剤投与後の腫瘍マーカーCA19-9およびCEAの低下が確認された。

[0120] [表3]

	投与前	投与1か月後	投与2か月後	投与3か月後
CA19-9 (U/mL)	69.7	172.5	123	100.6
CEA (ng/mL)	66.4	224.1	114.8	98.3

[0121] したがって、本発明の抗癌剤は、膵臓癌に対して効果的であることが示された。特に、ゲムシタビンによる治療に不応答である膵臓癌に対して効果があることが示された。本発明の構成を投与したときに膵臓癌に対し効果があ

ることは、従来は知られていなかったことであり、また実際に人に対して投与してみなければ容易に想到し得ないことである。

[0122] また、本発明の抗癌剤は、膵臓癌だけでなく大腸癌など、乏血管性であって低酸素・低栄養状態の癌などにも有効性が期待できる。

[0123] (試験例5)

前治療としてゲムシタビン療法を行い不応答であった膵臓癌患者3名を対象として、実施例10の顆粒剤3g(ゴボウシ抽出物粉末1gを含有する)を、1日1回朝食後、連日経口投与した。すなわち、本試験例において患者に投与した1日当たりのアルクチゲニンは59.4mgであり、アルクチインは68.5mgであった。

[0124] その結果、これらの患者では、投与開始1~2か月間は腫瘍の増大が認められなかったものの、最終的にはPDと判定された。すなわち、腫瘍の縮小効果および腫瘍マーカー低下は確認されなかった。また、いずれの患者においても、上記顆粒剤の投与後に重篤な副作用は見られなかった。

[0125] (実施例12 刻み、冷浸抽出、エタノール添加によるゴボウシエキスの製造)

ゴボウシ細切200gを水(22℃)1Lに加えて1時間攪拌した後、エタノール0.45Lを加えて更に1時間加熱還流した。ガーゼ4枚(金網100mesh)でろ過し、30%エタノール0.5Lで洗浄し、合せた抽出液(1.5L)を凍結乾燥した。このようにして得た、生薬の刻みを冷浸抽出したゴボウシエキスは、アルクチイン及びアルクチゲニン含量がそれぞれ、13.3%及び11.4%で、アルクチゲニン/アルクチイン(重量比)=0.86であった。

[0126] (試験例6: 腫瘍モデル動物における抗腫瘍性の評価)

(試験方法)

腫瘍モデル動物は、ドナーとなるヌードマウス(BALB-cAJnu/nu;日本クレア)の背皮下にヒトすい臓がん細胞株CAPAN-1もしくは、PSN-1を播種し、得られたドナーマウスの腫瘍塊をレシピエントマウスの背皮下に移植することによって作製した。アルクチゲニン(AG)、アルクチイン(A)およびゴボウシ

エキス(実施例12)は、DMSOに10mg/mlの濃度で溶解したものを生理食塩水で希釈し、マウス1匹あたり50 μ gを1週間に5回、胃内に経口投与した。抗腫瘍性は、背皮下の腫瘍塊のサイズを経時的に計測することによって評価した。

[0127] 投与開始後1ヶ月で、コントロールに比べて薬剤投与群に顕著な腫瘍の増殖抑制効果が認められた。また、精製アルクチゲニンの投与群においても抗腫瘍効果が得られたが、前駆体であるアルクチインをともに含んだゴボウシエキス(実施例12)の方が、より強い抗腫瘍効果が見られた(図4および5)。この結果から、アルクチゲニン/アルクチイン(重量比)=0.7~1.3のゴボウシエキスは、より高い抗腫瘍活性を示すことが確認できた。

[0128] (試験例7:用量制限毒性(dose limiting toxicity: DLT)の発現頻度)
前治療としてゲムシタビン療法を行い不応答であった膵臓癌患者15名を対象として、用量制限毒性の発現頻度を調査するためアルクチゲニン含有顆粒剤の第I相試験を行った。この15名には、所定の用量のアルクチゲニン含有顆粒剤を1日1回朝食後、連日経口投与した。この15名のうち3名には、1回あたり、実施例10の顆粒剤3g(ゴボウシ抽出物粉末1g、すなわちアルクチゲニン59.4mgおよびアルクチイン68.5mgを含有する)を投与した。15名のうち別の3名には、1回あたり、実施例10の顆粒剤7.5g(ゴボウシ抽出物粉末2.5g、すなわちアルクチゲニン148.5mgおよびアルクチイン171.25mgを含有する)を投与した。さらに別の9名には、1回あたり、実施例10の顆粒剤12g(ゴボウシ抽出物粉末4g、すなわちアルクチゲニン237.6mgおよびアルクチイン274mgを含有する)を投与した。

[0129] その結果、対象患者15名のうち、用量制限毒性の発現頻度は0であった。具体的には、膵癌患者に対するアルクチゲニン含有顆粒剤の第I相試験での主なGrade 3以上の有害事象は、GGTの上昇、高血糖、ALPの上昇、血中ビリルビンの上昇で、重篤な有害事象は認めなかった。

[0130]

[表4]

アルクチゲニン含有顆粒剤の第I相試験での有害事象
(n=15, 全コース期間中)

項目	G1	G2	G3	G4	%G 3-4
自他覚症状					
下痢	3	1	0	0	0
悪心	2	2	0	—	0
胃痛	1	0	0	—	0
嘔吐	3	0	0	0	0
食欲不振	3	4	0	0	0
臨床検査値					
白血球減少	5	0	0	0	0
好中球数減少	1	0	0	0	0
貧血	11	2	0	0	0
血小板数減少	3	0	0	0	0
血中ビリルビン増加	1	1	1	0	6.67
AST 増加	9	2	0	0	0
ALT 増加	6	1	0	0	0
ALP 増加	10	1	1	0	6.67
GGT 増加	4	0	7	0	46.7
Cr 増加	0	1	0	0	0
高血糖	5	5	4	0	26.7

[0131] これらの結果から、本実施例の顆粒剤は毒性が非常に低く、安全性が高いことが分かった。したがって、本発明は、副作用がより少ない抗癌剤を提供することが可能であることが示された。

[0132] (試験例8：脾臓癌幹細胞に対する効果)

次に、癌に対する様々な治療抵抗性や再発・転移巣の出現に深く関与すると考えられる癌幹細胞様集団 (CSCs : Cancer Stem-like cells) に対するアルクチゲニンの効果を調べた。

[0133] (培地および試薬調製)

グルコース含有培地は、4.75gダルベッコ変法イーグル培地2 (日水製薬) を水に溶解し、12.5ml 1M HEPES pH7.4 (DOJINDO、342-01375) を加えて滅菌後、18.5ml 10% NaHCO_3 、10ml L-glutamine (SIGMA)、5ml Anti-Anti (Life technologies)、5ml MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACID SOLUTION (SIGMA)、56°Cで30分温浴にて非動化させた50ml FETAL BOVINE SERUM (biowest) を加え、最終的に500mlにして作製した。

[0134] グルコース阻害培地は、グルコース含有培地に終濃度20mMの2-Deoxy-Glucose

se (2-DG) (東京化成工業) を添加して作製した。

[0135] 3 μ Mアルクチゲニンを含む培地は、グルコース含有培地またはグルコース阻害培地に、終濃度3 μ Mのアルクチゲニン (クラシエ製薬) を添加して作製した。

[0136] FACSバッファーは、10g Bovine serum albumin Protease free (和光純薬工業) を1LのPBS(-)に溶解し、終濃度0.1%のアジ化ナトリウムを加え、濾過滅菌にて作製した。

[0137] FACS分析用の蛍光標識抗体は、CD44(338803または338807, biolegend), CD24(311117, biolegend), ESA(324205, biolegend), c-Met(11-8858, e-bioscience)を使用した。また染色行程は、製品添付のデータシートに従った。

[0138] (試験方法および結果)

膵臓癌細胞PANC-1 (ATCC No. CRL-1469) をグルコース含有培養培地に播種して一晩インキュベートした後、グルコース含有培地、グルコース阻害培地、3 μ Mアルクチゲニンを含むグルコース含有培地および3 μ Mアルクチゲニンを含むグルコース阻害培地のそれぞれにおいて24時間培養した。細胞を回収した後、定法にしたがってPI染色 (死細胞染色) および癌幹細胞マーカー染色を行い、フローサイトメトリー (FACS) にて解析を行った。マーカーとしては、膵臓癌の幹細胞マーカーとして報告のあるCD44、CD24およびESA(CD326)の3重陽性、またはCD44陽性、c-Met強陽性の2重陽性を用いた。

[0139] PI染色および癌幹細胞マーカー (CD44⁺、CD24⁺およびESA⁺(CD326)の3重陽性) の染色結果を図6に示す。PI染色の結果、細胞の生存率は、グルコース含有条件では78.20%、グルコース阻害条件では68.53%、およびグルコース含有条件における3 μ Mアルクチゲニン存在下では69.50%であったのに対し、グルコース阻害条件での3 μ Mアルクチゲニン存在下では生存率が35.71%であった。

[0140] また、癌幹細胞マーカー染色の結果、膵臓癌幹細胞を指し示すCD44⁺ESA⁺CD24⁺細胞の割合 (生存数) は、全分析細胞中の、グルコース含有条件では4.41%

(441個)、グルコース阻害条件では6.51% (651個)、およびグルコース含有条件における3 μ Mアルクチゲニン存在下では5.01% (501個)であったのに対し、グルコース阻害条件での3 μ Mアルクチゲニン存在下では0.98% (98個)であった。したがって、アルクチゲニンは、グルコース飢餓条件において膵臓癌幹細胞を殺傷する効果を有することが示された。

[0141] PI染色および癌幹細胞マーカー (CD44⁺、c-Met^{High} の2重陽性) の染色結果を図7に示す。PI染色の結果、細胞の生存率は、グルコース含有条件では84.70%、グルコース阻害条件では88.80%、およびグルコース含有条件における3 μ Mアルクチゲニン存在下では83.30%であったのに対し、グルコース阻害条件での3 μ Mアルクチゲニン存在下では生存率が27.50%であった。

[0142] 強力な造腫瘍能を指標とした膵臓癌幹細胞の新たなマーカーとして報告が相次いでいるCD44陽性c-Met強陽性(CD44⁺、c-Met^{High})細胞の膵臓がん細胞株における陽性割合(生存数)は、グルコース含有条件では0.63% (38個)、グルコース阻害条件では0.78% (47個)、およびグルコース含有条件における3 μ Mアルクチゲニン存在下では0.52% (31個)であったのに対し、グルコース飢餓条件での3 μ Mアルクチゲニン存在下では0.22% (13個)であった。したがって、アルクチゲニンは、グルコース飢餓条件において、これらの幹細胞マーカーを発現する膵臓癌幹細胞に対しても、これを殺傷する効果を有することが示された。

[0143] (試験例9：膵臓癌幹細胞に対する既存化学療法剤との比較試験)

アルクチゲニンと膵臓癌に対する既存の化学療法剤の一つであるシスプラチンの膵臓がん幹細胞に対する殺傷効果の比較を行った。

[0144] (培地および試薬調製)

グルコース含有培地は、4.75gダルベッコ変法イーグル培地2(日水製薬)を水に溶解し、12.5ml 1M HEPES pH7.4 (DOJINDO、342-01375)を加えて滅菌後、18.5ml 10% NAHCO₃、10ml L-glutamine (SIGMA)、5ml Anti-Anti (Life technologies)、5ml MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACID SOLUTION (SIGMA)、56°Cで30分温浴にて非動化させた50ml FETAL BOVINE SERUM (biowest)を加え

、最終的に500mlにして作製した。

[0145] グルコース阻害培地は、グルコース含有培地に終濃度15mMの2-Deoxy-Glucose (2-DG) (東京化成工業) を添加して作製した。

[0146] 4 μ Mアルクチゲニンを含む培地は、グルコース含有培地またはグルコース阻害培地に、終濃度4 μ Mのアルクチゲニン (クラシエ製薬) を添加して作製した。

[0147] (試験方法および結果)

膵臓癌細胞Capan-1 (ATCC No. HTB-79) をグルコース含有培養培地に播種して一晩インキュベートした後、グルコース含有培地、グルコース阻害培地、4 μ Mアルクチゲニンを含むグルコース含有培地および4 μ Mアルクチゲニンを含むグルコース阻害培地、または7 μ Mシスプラチン (CDDP: 和光純薬工業) のそれぞれにおいて24時間培養した。細胞を回収した後、定法にしたがってPI染色 (死細胞染色) および癌幹細胞マーカー染色を行い、フローサイトメトリ (FACS) にて解析を行ったマーカーとしては、膵臓癌の幹細胞マーカーとして報告のあるCD44、CD24およびESA (CD326) の3重陽性を用いた。

[0148] PI染色および癌幹細胞マーカーの染色結果を図8に示す。PI染色の結果、細胞の生存率は、グルコース含有条件では67.57%、グルコース阻害条件では79.10%、およびグルコース含有条件における4 μ Mアルクチゲニン存在下では72.80%であったのに対し、グルコース阻害条件での4 μ Mアルクチゲニン存在下では生存率が48.73%であり、シスプラチン処理では58.08%であった。

[0149] また、癌幹細胞マーカー染色の結果、膵臓癌幹細胞を指し示すCD44⁺ESA⁺CD24⁺細胞の割合 (生存数) は、全細胞中で分析すると、グルコース含有条件では0.87% (65個)、グルコース阻害条件では1.40% (105個)、およびグルコース含有条件における4 μ Mアルクチゲニン存在下では1.04% (78個) であったのに対し、グルコース阻害条件での4 μ Mアルクチゲニン存在下では0.24% (18個) であり、シスプラチン処理では1.17% (88個) であった。一方で、生存細胞中で分析すると、グルコース含有条件では1.28%、グルコース阻害条件では1.77%、およびグルコース含有条件における4 μ Mアルクチゲニン存在下

では1.43%であったのに対し、グルコース阻害条件での4 μ Mアルクチゲニン存在下では0.50%であり、シスプラチン処理では2.02%に上昇していた。したがって、アルクチゲニンは、グルコース飢餓条件において、シスプラチンで殺傷することが困難なCD44⁺ESA⁺CD24⁺陽性膵臓癌幹細胞を殺傷する効果を有することが示された。

[0150] 試験例8および9の結果から、アルクチゲニンは、体内において癌細胞が置かれている環境に近い栄養飢餓条件において、癌幹細胞様集団に対し殺傷効果を有することが強く示唆された。また、アルクチゲニンは、また、アルクチゲニンは、腫瘍本体に作用して癌細胞の増殖を抑制する効果だけでなく、癌細胞を供給し腫瘍組織を再構築する能力を有する癌幹細胞に作用してこれを殺傷する効果をも有することが強く示唆された。

[0151] また、試験例7におけるアルクチゲニンを含む顆粒剤は、非常に低い毒性を示した。アルクチゲニンは、栄養飢餓条件において殺傷効果を有すること、および癌本体の細胞だけでなく癌幹細胞にも作用することによって、正常な細胞に対する影響を低下させることができるため、低い毒性を獲得している可能性が示唆される。したがって、本発明は、少ない副作用で高い抗癌作用を有する抗癌剤を提供することが可能である。

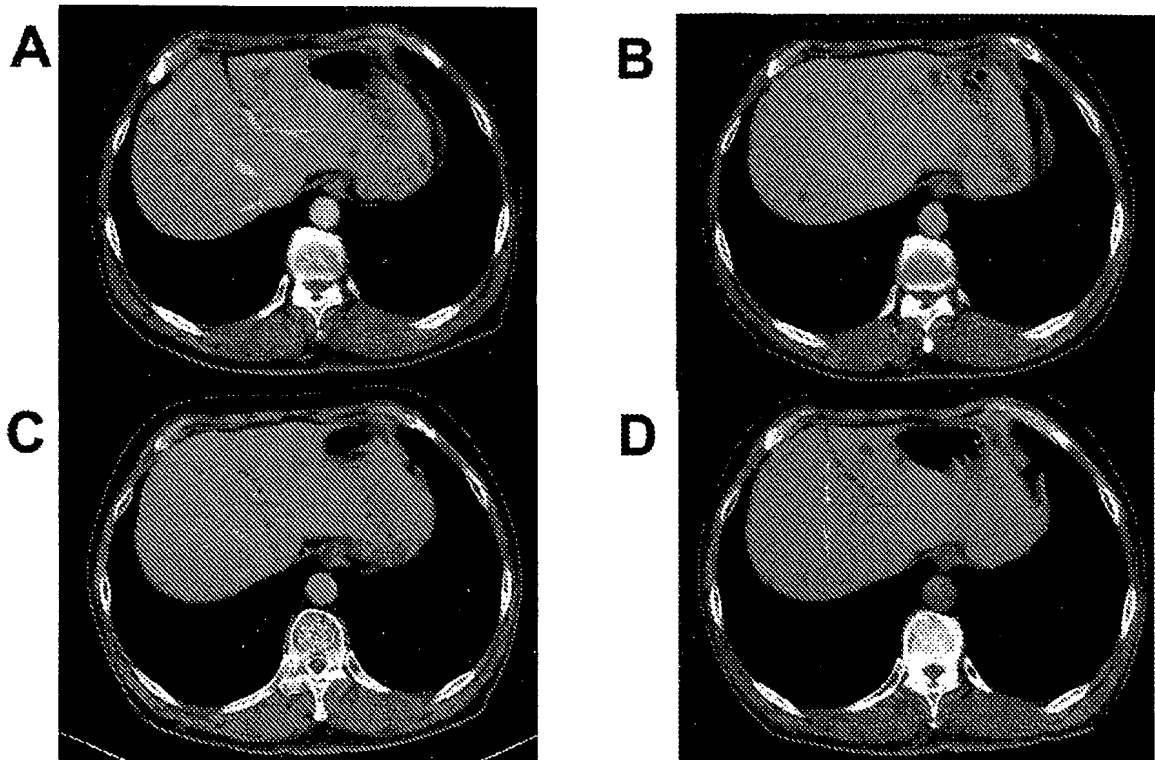
産業上の利用可能性

[0152] 本発明は、抗癌剤、特に膵臓癌治療剤に好適に利用することができる。

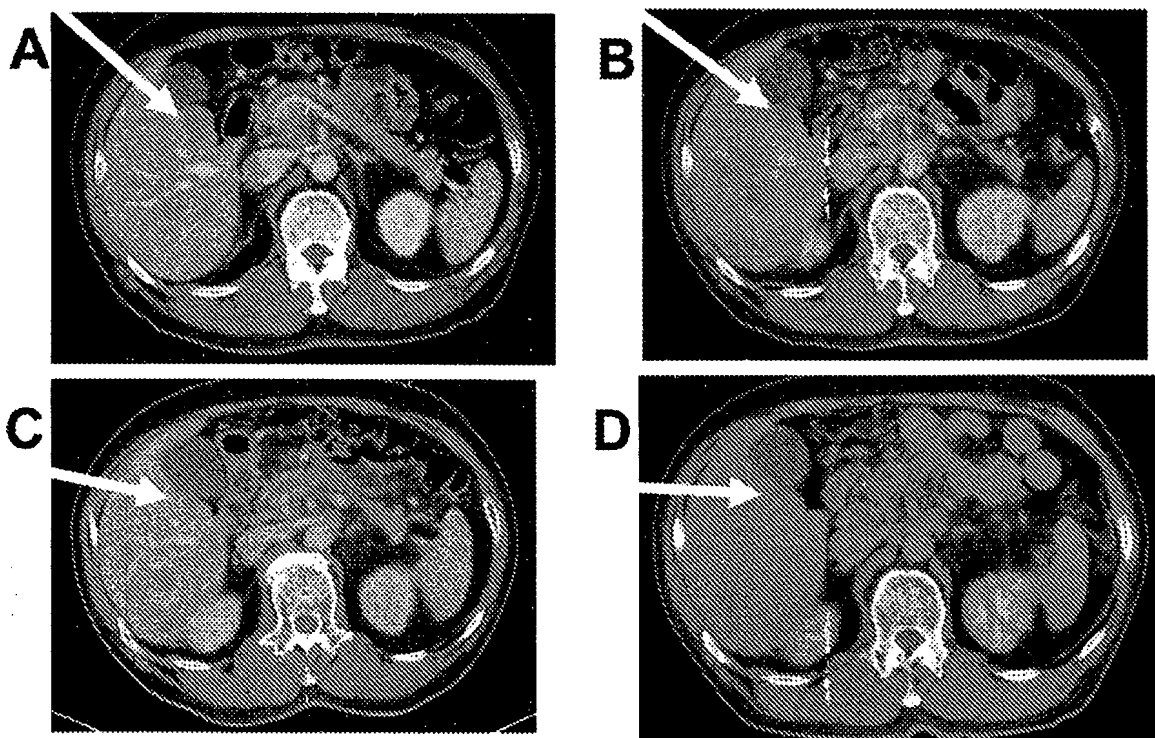
請求の範囲

- [請求項1] アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、抗癌剤。
- [請求項2] さらにアルクチインを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、請求項1に記載の抗癌剤。
- [請求項3] アルクチゲニンおよびアルクチインを、アルクチゲニン／アルクチイン＝0.7～1.3の重量比にて含有する、請求項2に記載の抗癌剤。
- [請求項4] 前記アルクチゲニンおよび前記アルクチインがゴボウシ由来である、請求項2または3に記載の抗癌剤。
- [請求項5] ゲムシタピンによる治療に不応答である膵臓癌を治療するための請求項1～4のいずれか1項に記載の抗癌剤。
- [請求項6] アルクチゲニンを含有する、抗癌幹細胞剤。
- [請求項7] アルクチゲニンを1日あたりの投与量が100mg以上となるように含有する、請求項6に記載の抗癌幹細胞剤。

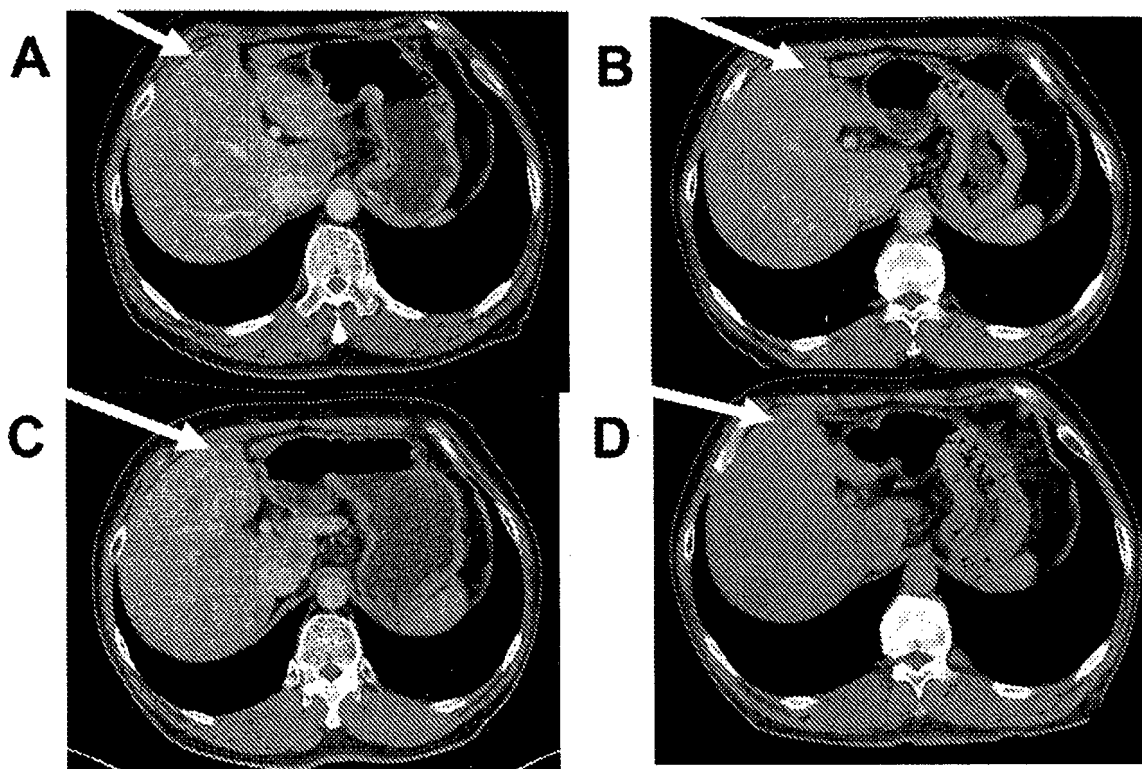
[図1]



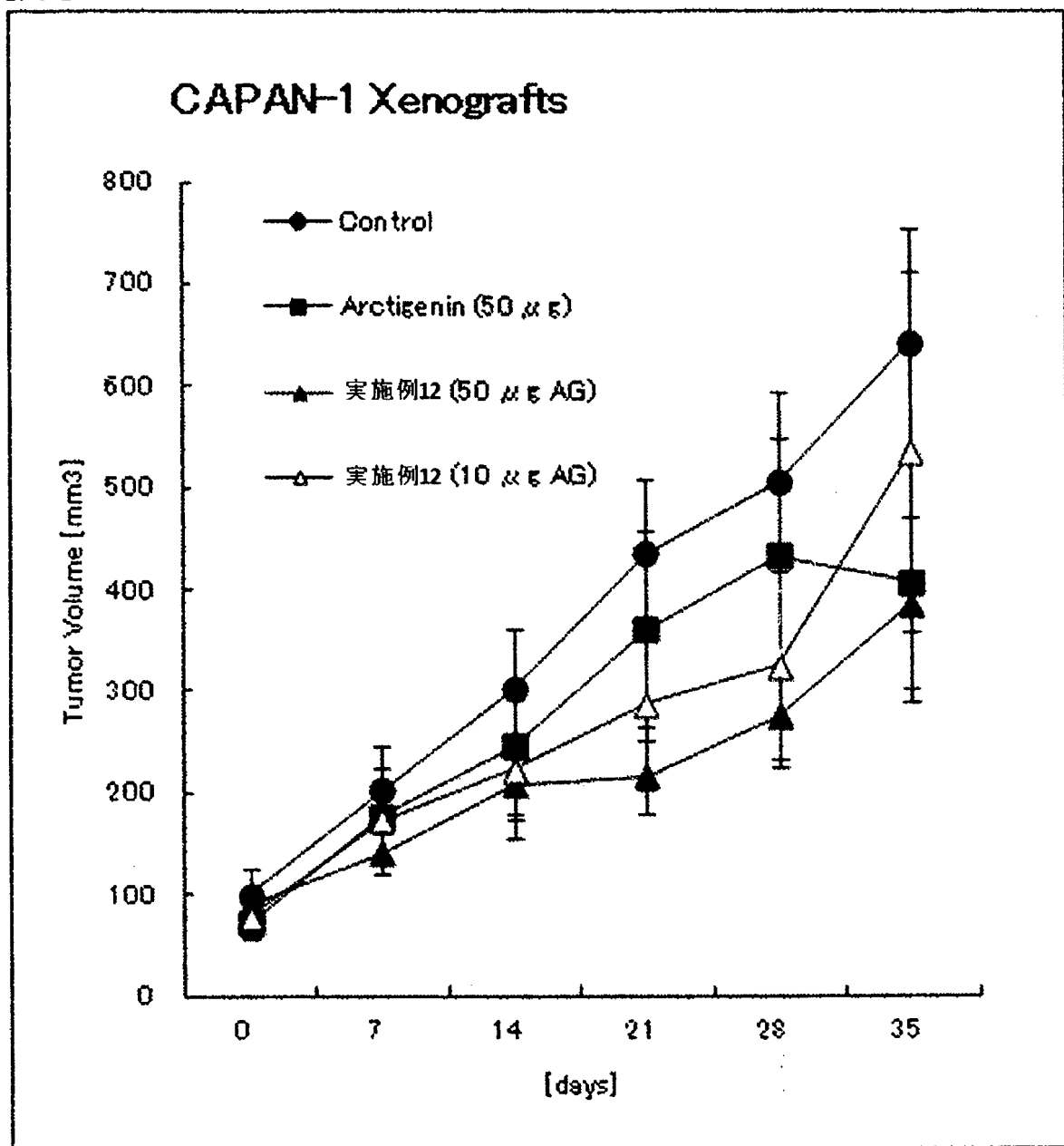
[図2]



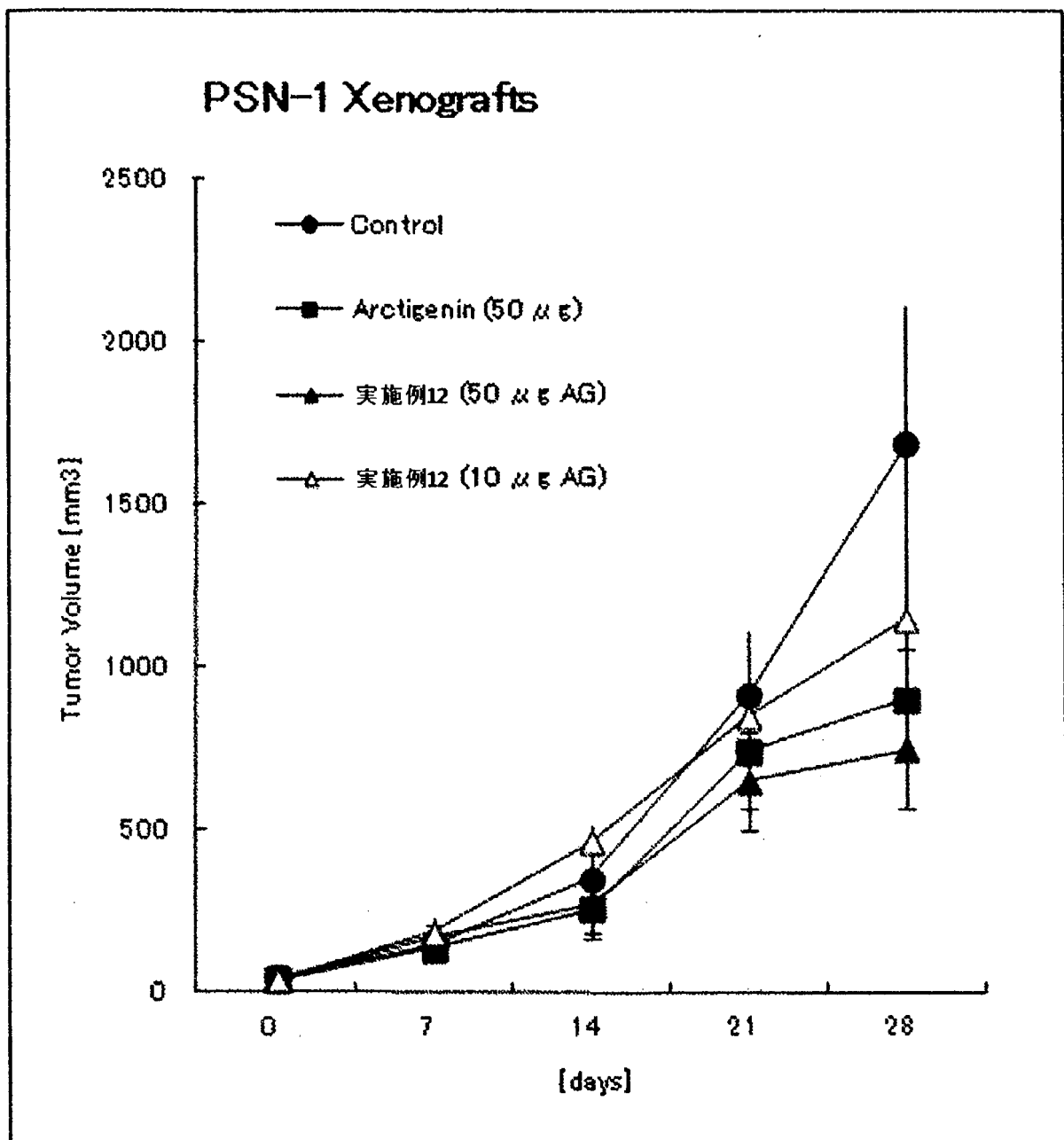
[図3]



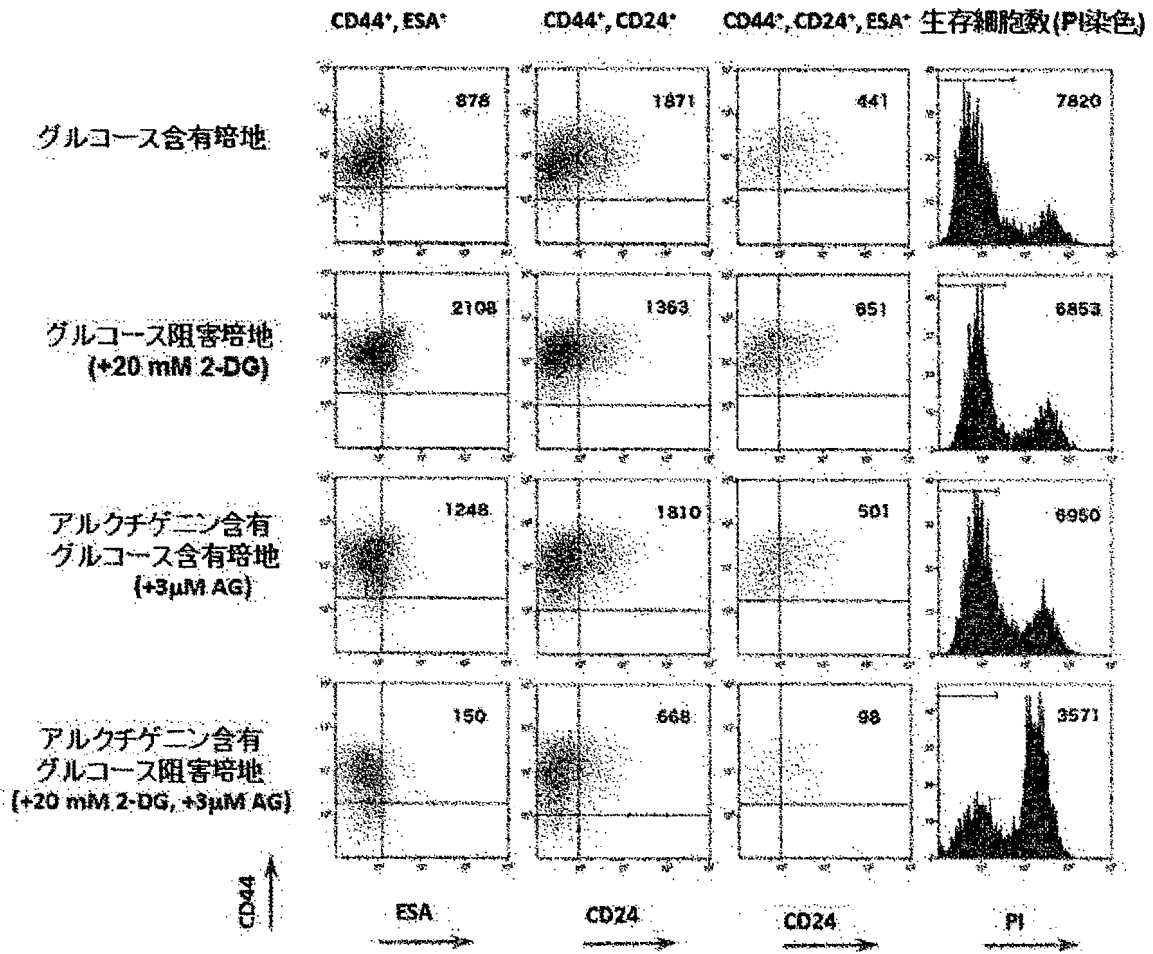
[図4]



[図5]

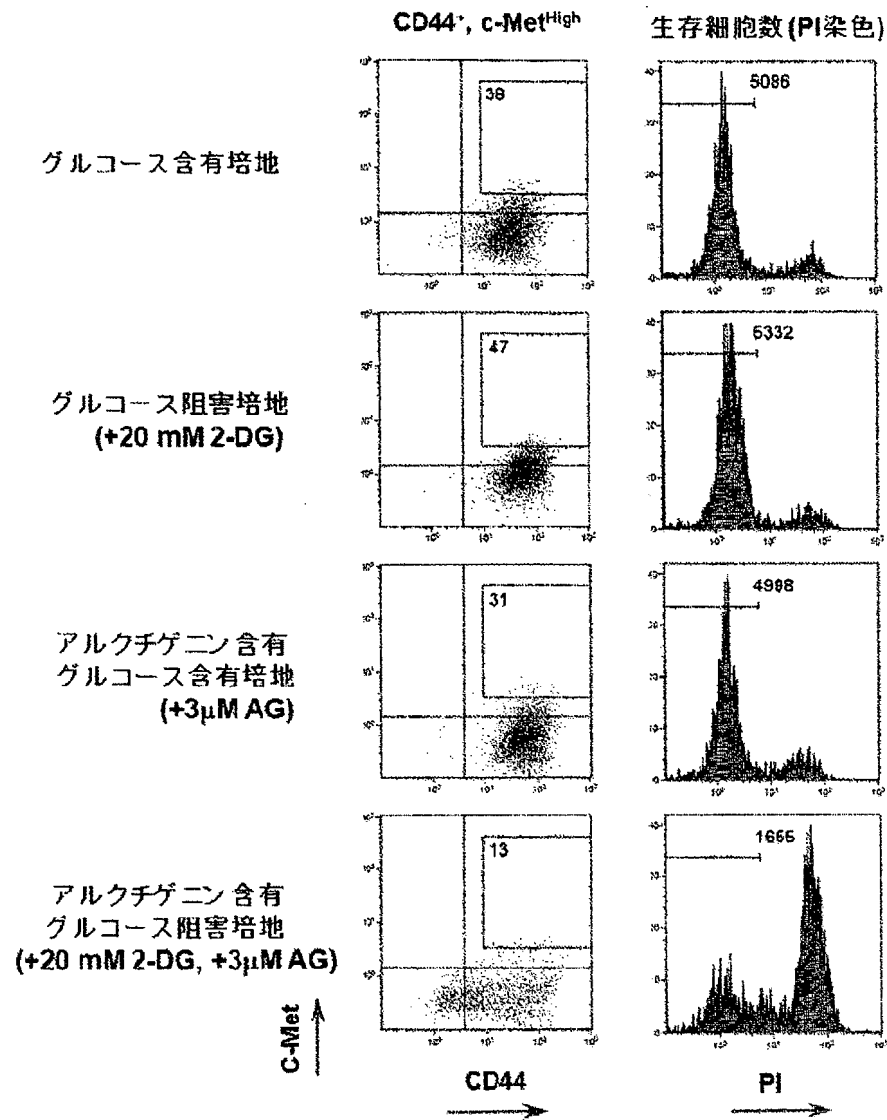


[図6]



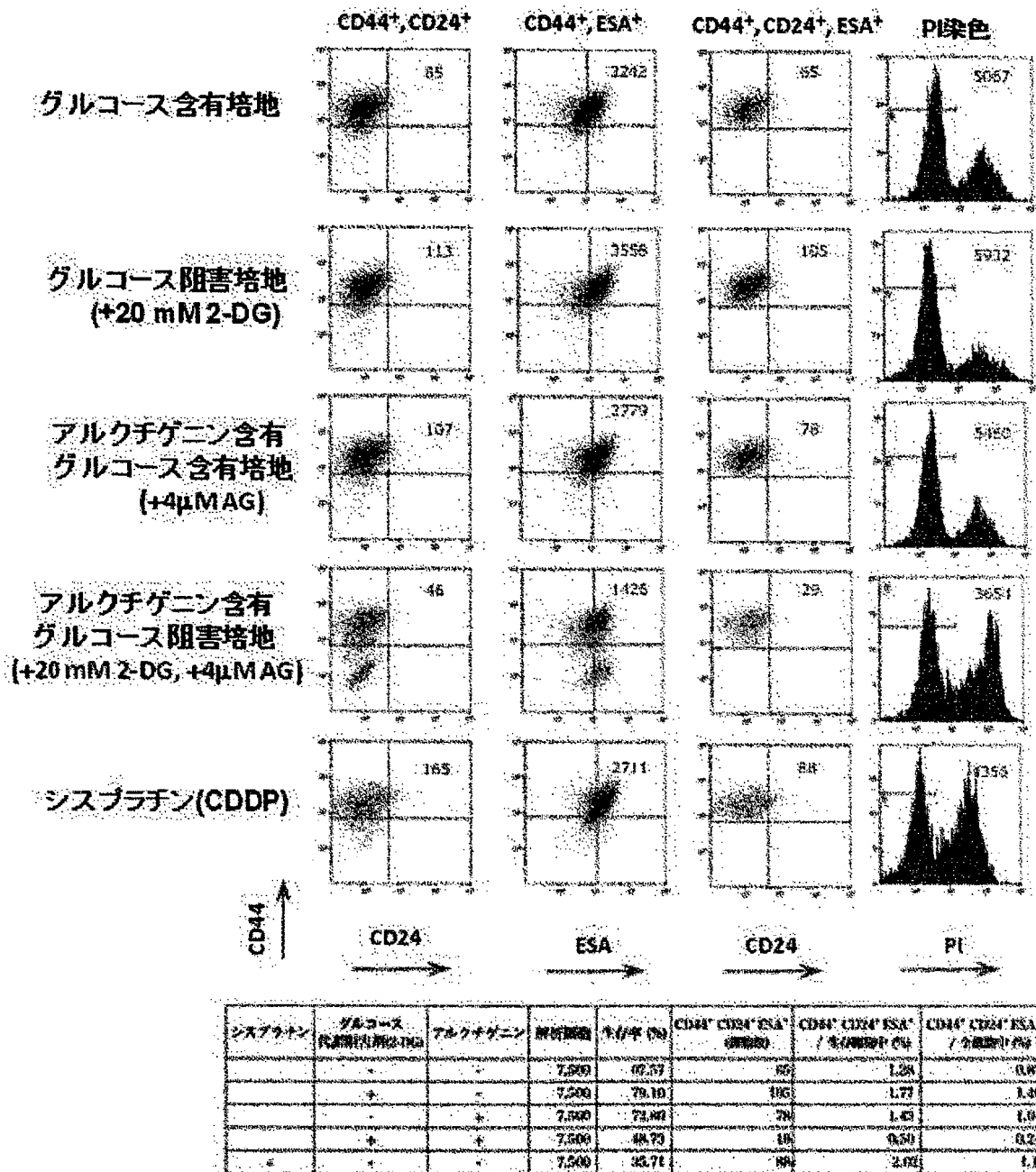
グルコース 代謝阻害剤(2- DG)	アルクチゲニン	解析細胞数	生存率 (%)	CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺ (細胞数)	CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺ (生存細胞中%)	CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺ (全細胞中%)
-	-	10,000	78.20	441	5.64	4.41
+	-	10,000	68.53	651	9.50	6.51
-	+	10,000	69.50	501	7.21	5.01
+	+	10,000	35.71	98	2.74	0.98

[図7]



グルコース 代謝阻害剤(2-DG)	アルクチゲニン	解析細胞数	生存率 (%)	CD44 ⁺ c-Met ^{High} (細胞数)	CD44 ⁺ c-Met ^{High} (生存細胞中 %)	CD44 ⁺ c-Met ^{High} (全細胞中 %)
-	-	6,000	84.70	38	0.75	0.63
+	-	6,000	88.80	47	0.88	0.78
-	+	6,000	83.30	31	0.62	0.52
+	+	6,000	27.50	13	0.78	0.22

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/341(2006.01)i, A61K31/7034(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i,
A61K36/28(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

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)

A61K31/341, A61K31/7034, A61K36/00, A61K36/28, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2010/109961 A1 (Kracie Pharma, Ltd.), 30 September 2010 (30.09.2010), claims; examples 2 to 4, 9 to 10; test examples 2 to 3 & JP 2012-144558 A & US 2012/0029070 A1 & EP 2412377 A1 & WO 2010/109961 A1 & CN 102365092 A & KR 10-2012-0022748 A	1-7 1-7
X Y	AWALE, S. et al, Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation, Cancer Res., 2006, Vol.66, No.3, p.1751-1757, Abstract, Figure 3.,4.	1,5-7 1,5-7

☒ 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
18 June, 2013 (18.06.13)

Date of mailing of the international search report
02 July, 2013 (02.07.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058692

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BOECK, S. et al, Second-line chemotherapy with pemetrexed after gemcitabine failure in patients with advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial, Ann. Oncol., 2007, Vol.18, No.4, p.745-751, Abstract, Table 1.	1-5
Y	MUELLER, M.T. et al, Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer, Gastroenterology, 2009, Vol.137, No.3, p.1102-1113, Abstract, Figure 1.A	1-7
Y	LI, Y. et al, Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds, J. Nutr. Biochem., 2011, Vol.22, No.9, p.799-806, Abstract, Table 1, paragraph of "4.1 Curcumin", "4.7 Piperine"	1-7
Y	YOO, J.H. et al, Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/beta-catenin signaling, Food Chem. Toxicol., 2010, Vol.48, No.8-9, p.2247-2252, Abstract, Fig. 4.	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. A61K31/341(2006.01)i, A61K31/7034(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i, A61K36/28(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. A61K31/341, A61K31/7034, A61K36/00, A61K36/28, A61P35/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	WO 2010/109961 A1 (クラシエ製薬株式会社) 2010.09.30,	1-7	
Y	請求項、実施例 2-4、9-10、試験例 2-3 & JP 2012-144558 A & US 2012/0029070 A1 & EP 2412377 A1 & WO 2010/109961 A1 & CN 102365092 A & KR 10-2012-0022748 A	1-7	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの; 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 18.06.2013		国際調査報告の発送日 02.07.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伊藤 清子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 3779

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	AWALE, S. et al, Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation, Cancer Res., 2006, Vol.66, No.3, p.1751-1757	1,5-7
Y	Abstract, Figure 3.、4.	1,5-7
Y	BOECK, S. et al, Second-line chemotherapy with pemetrexed after gemcitabine failure in patients with advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial, Ann. Oncol., 2007, Vol.18, No.4, p.745-751	1-5
Y	Abstract, Table 1.	
Y	MUELLER, M. T. et al, Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer, Gastroenterology, 2009, Vol.137, No.3, p.1102-1113	1-7
Y	Abstract, Figure 1.A	
Y	LI, Y. et al, Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds, J. Nutr. Biochem., 2011, Vol.22, No.9, p.799-806	1-7
Y	Abstract, Table 1, “4.1 Curcumin”、“4.7 Piperine” の項	
Y	YOO, J. H. et al, Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/beta-catenin signaling, Food Chem. Toxicol., 2010, Vol.48, No.8-9, p.2247-2252	1-7
	Abstract, Fig.4.	



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104379143 A

(43) 申请公布日 2015.02.25

(21) 申请号 201380016479.1

代理人 郑青松

(22) 申请日 2013.03.26

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

2012-069964 2012.03.26 JP

A61K 31/341(2006.01)

A61K 31/7034(2006.01)

A61K 36/00(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.25

A61K 36/28(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/058692 2013.03.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/146734 JA 2013.10.03

(71) 申请人 客乐谐制药株式会社

地址 日本东京都

申请人 独立行政法人国立癌症研究中心

国立大学法人富山大学

(72) 发明人 江角浩安 池田公史 三好千香

门田重利 大洼敏树 与茂田敏

布施贵史 川岛孝则 千叶殖干

(74) 专利代理机构 北京青松知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 11384

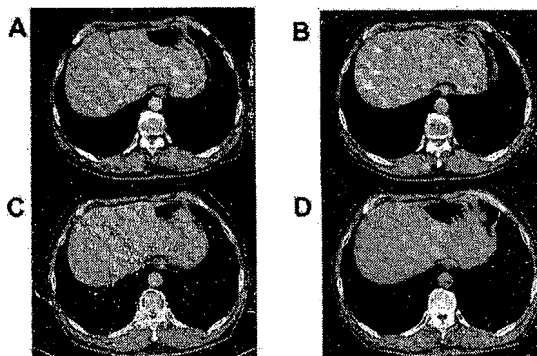
权利要求书1页 说明书17页 附图7页

(54) 发明名称

抗癌剂

(57) 摘要

本发明的目的是提供对癌症具有效果的新颖抗癌剂。将使用牛蒡子萃取物而调制的药剂,以牛蒡苷元(arctigenin)的每1日投与量成为100mg以上的方式投与胰脏癌患者后,可见肿瘤缩小效果,又肿瘤位置标记的降低被确认。本发明是提供牛蒡苷元以每1日的投与量成为100mg以上的方式含有的抗癌剂。又,本发明是提供牛蒡苷元及牛蒡苷以牛蒡苷元/牛蒡苷=0.7~1.3的重量比含有的抗癌剂。



1. 一种抗癌剂,其是以每1日的投与量为100mg以上的方式含有牛蒡苷元(arctigenin)。
2. 根据权利要求1所述的抗癌剂,其进一步以每1日的投与量为100mg以上的方式含有牛蒡苷(arctiin)。
3. 根据权利要求2所述的抗癌剂,其是以牛蒡苷元/牛蒡苷=0.7~1.3的重量比含有牛蒡苷元及牛蒡苷。
4. 根据权利要求2或3所述的抗癌剂,其中所述牛蒡苷元及所述牛蒡苷是来自牛蒡子。
5. 根据权利要求1至4任一项所述的抗癌剂,其是用于治疗对吉西他滨(gemcitabine)的治疗效果不佳的胰腺癌。
6. 一种抗癌干细胞剂,其含有牛蒡苷元。
7. 根据权利要求6所述的抗癌干细胞剂,其是以每1日的投与量为100mg以上的方式含有牛蒡苷元。

抗癌剂

技术领域

[0001] 本发明是关于含有牛蒡苷元 (arctigenin) 的抗癌剂。更详细言之,本发明是关于将牛蒡苷元以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有的抗癌剂。

背景技术

[0002] 胰脏癌是难治性癌的一种,所有患者的 5 年存活率一般被推定为 2-3%。死于胰脏癌的患者数量于最近 20 年间迅速地增加约 2.5 倍,于 2009 年的统计,有 26791 人死于胰脏癌。发生数与死亡数几乎为相同数量,此癌症占日本的癌症死因的 6%,以癌症发生部位的死亡数可知,依序为肺、胃、大肠、肝,胰脏是接着为第 5 位。

[0003] 可期待根治的治疗仅为外科的切除,但胰脏癌于大多数的患者中,因在癌症晚期(第 III+IV 期)的状态下表现,实际上可根治的切除可谓为所有胰脏癌患者的约 10-20%。每一期的生存期间中间值在第 I、II 期为约 12-30 个月,第 III 期为 9-11 个月,第 IV 期为 5-6 个月左右,且预测后期极为不良,尤其对于不能切除的患者而言,一般认为几乎无治愈的可能性。

[0004] 对进行性胰脏癌的标准治疗是吉西他滨 (gemcitabine),对吉西他滨无反应的情形标准治疗法并未确立。对于进行性胰脏癌患者,即使对吉西他滨无反应的时候,同样承认有全身状态良好的病例,此态样的患者群(对吉西他滨不反应的胰脏癌)的有效治疗法的开发被认为是于所有胰脏癌的治疗法开发的重要课题。

[0005] 近年来,已报告 PANC-1、AsPC-1、BxPC-1 及 KP-3 等来自胰脏癌的细胞在极度营养饥饿状态时亦可见有很强的耐性,解除其耐性有成为癌治疗中新生化学的途径的可能性(专利文献 1)。

[0006] 使用胰脏癌细胞株 PANC-1,进行可解除在低营养状态中的肿瘤细胞的生存能力的物质的筛选后,已报告牛蒡苷元是有效的(非专利文献 1)。

[0007] 本文中,牛蒡子(日文:ゴウブシ)于第十五改正日本药典(日局 15)中被规定为牛蒡(*Arctium lappa* Linne(Compositae))的果实。又,牛蒡子是于银翘散、驱风解毒汤、消风散等作为处方的草药,被分类为专门医药品所使用的成分本质。

[0008] 牛蒡子含有约 7% 被分类为木聚糖(lignan)配糖体的牛蒡苷(arctiin)及约 0.6% 的为其苷元(aglucon)的牛蒡苷元。由此等知识可知,含有牛蒡苷元的牛蒡子萃取物是被期待可使用作为用于治疗癌症的抗癌剂。

[0009] (以往技术文献)

[0010] 【专利文献】

[0011] 【专利文献 1】日本公开专利公报「特开 2002-065298 号公报」

[0012] 【非专利文献】

[0013] 【非专利文献 1】S. AwaLe, J. Lu, S. K. KaLauni, Y. Kurashima, Y. Tezuka, S. Kadota, H. Esumi, Cancer Res., 2006, 66(3), 1751-1757)

发明内容

[0014] (本发明要解决的问题)

[0015] 本发明是以提供对癌症具有效果的新颖抗癌剂为目的。

[0016] (本发明解决问题的技术手段)

[0017] 现在已知的牛蒡子,牛蒡子中的牛蒡苷元含量为约 0.6% 的低值。又难溶于水。因此,以熟知利用的热水萃取法,要制造高含量含有牛蒡苷元的牛蒡子萃取物是非常困难的。

[0018] 同时,使用于胰脏癌等的治疗时,期待提供有效成分的牛蒡苷元成为一定含量的牛蒡子萃取物,但如上述,于含有高量牛蒡苷元的牛蒡子萃取物的制造,将牛蒡苷变换为牛蒡苷元,并控制使难溶于水的牛蒡苷元含有一定量是困难的。

[0019] 此外,使用于胰脏癌等的治疗时,牛蒡苷元为主要有效成分的同时,含有一定含量的牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物,已知抗癌效果特别优异。因此,对于含有高含量牛蒡苷元的牛蒡子萃取物的制造,期望可控制牛蒡苷元及牛蒡苷成为一定含量的制造方法。尤其,期望可制造以约 1:1 的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物的方法。

[0020] 本发明为为了解决此等课题而专心进行检讨的结果,利用调整作为原料的牛蒡子内存在的 β -葡萄糖苷酶 (glucosidase) 酶活性、裁切牛蒡子的粒径、将牛蒡苷酶变换为牛蒡苷元时的温度及由牛蒡子萃取牛蒡苷元及牛蒡苷时的温度,而发现将牛蒡苷元作成一定含量的技术、以及调节牛蒡苷元及牛蒡苷的含有比的技术。

[0021] 而且,本发明使用利用此等技术所获得的牛蒡子萃取物,将牛蒡苷元以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式调制的制剂投与胰脏癌患者后,观察肿瘤缩小效果的同时,确认肿瘤位置标记的降低。本发明是基于如此惊人的发现而完成的。

[0022] 即,本发明是提供牛蒡苷元以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有的抗癌剂。

[0023] 又,本发明是提供牛蒡苷以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有的上述抗癌剂。

[0024] 又,本发明是提供牛蒡苷元及牛蒡苷以牛蒡苷元/牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式含有的抗癌剂。

[0025] 又,本发明是提供上述牛蒡苷元及上述牛蒡苷是来自牛蒡子的上述抗癌剂。

[0026] 又,本发明是提供用以治疗对吉西他滨的治疗无反应的胰脏癌的上述抗癌剂。

[0027] 又,本发明是提供含有牛蒡苷元的抗癌干细胞剂。

[0028] 又,本发明是提供牛蒡苷元以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有的抗癌干细胞剂。

[0029] (发明效果)

[0030] 依据本发明,可提供对癌症具有效果的新颖抗癌剂。

附图说明

[0031] 图 1 显示本发明的一实施例的颗粒剂投与前 (A)、投与开始 1 个月后 (B)、2 个月后 (C) 及 3 个月后 (D) 的胸腹部电脑断层成像的结果图。

[0032] 图 2 显示本发明的一实施例的颗粒剂投与前 (A)、投与开始 1 个月后 (B)、2 个月后 (C) 及 3 个月后 (D) 的胸腹部电脑断层成像的结果图。

[0033] 图 3 显示本发明的一实施例的颗粒剂投与前 (A)、投与开始 1 个月后 (B)、2 个月后

(C) 及 3 个月后 (D) 的胸腹部电脑断层成像的结果图。

[0034] 图 4 显示肿瘤模型动物 (CAPAN-1 异种移植 (Xenografts)) 中的抗肿瘤性评价的结果图。

[0035] 图 5 显示肿瘤模型动物 (PSN-1 异种移植) 中的抗肿瘤性评价的结果图。

[0036] 图 6 显示对癌干细胞的 PI 染色 (死细胞染色) 及胰脏癌干细胞位置标记 (CD44, CD24, ESA) 染色的结果图。

[0037] 图 7 显示对癌干细胞的 PI 染色及胰脏癌干细胞位置标记 (CD44, c-Met) 染色的结果图。

[0038] 图 8 显示对癌干细胞的 PI 染色及胰脏癌干细胞位置标记染色的结果 (与顺铂 (cisplatin) 处理的比较) 图。

具体实施方式

[0039] 以下, 详细说明本发明。揭示的条件为一例, 并未限定于此例。

[0040] 本发明的抗癌剂以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有作为有效成分的牛蒡苷元。牛蒡苷元可为来自含有牛蒡苷元的植物, 例如可来自牛蒡子。即, 本发明的抗癌剂可以来自植物的萃取物, 例如来自牛蒡子而得的牛蒡子萃取物中所含的牛蒡苷元作为有效成分来含有。

[0041] 本发明的抗癌剂进一步以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有作为有效成分的牛蒡苷。牛蒡苷可来自含有牛蒡苷的植物, 例如可来自牛蒡子。即, 本发明的抗癌剂是可以来自植物的萃取物, 例如来自牛蒡子而得的牛蒡子萃取物中所含的牛蒡苷作为有效成分来含有。

[0042] 本发明的抗癌剂又可以牛蒡苷元 / 牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比 (1.0 ~ 1.9 的摩尔比) 的方式含有作为有效成分的牛蒡苷元及牛蒡苷。牛蒡苷元及牛蒡苷可来自含有牛蒡苷元及牛蒡苷的植物, 例如可来自牛蒡子。即, 本发明的抗癌剂是以牛蒡苷元 / 牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的植物萃取物, 例如可含有牛蒡子萃取物。又, 于此抗癌剂, 牛蒡苷元可以以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有, 又牛蒡苷可以以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有。

[0043] 含有牛蒡苷元及牛蒡苷的植物并未特别限定, 但例如包含牛蒡 (burdock) (芽 (sprout) · 叶 · 根茎)、红花 (safflower)、矢车菊 (cornflower)、翼蓟 (Cirsium vulgare)、圣蓟 (blessed thistle) (蓟属 (Cnicus))、大蓟 (cardon)、苏格兰大翅蓟 (Onopordum acanthium)、伊利里亚大翅蓟 (Onopordum illyricum)、边境连翘 (Forsythia x intermedia)、朝鲜连翘 (Forsythia ovata)、连翘 (Forsythia suspensa Vahl)、支那连翘 (Forsythia viridissima Lindl)、胡麻 (sesame)、槭叶牵牛 (Ipomoea cairica)、金不换 (Polygala chinensis)、亚洲络石 (T. asiaticum var. intermedium)、日本络石 (Trachelospermum asiaticum)、络石 (Trachelospermum foetidum Nakai)、细梗络石 (Trachelospermum gracilipes)、夹竹桃 (Nerium indicum Nerium)、络石 (Trachelospermum jasminoides var. pubescens)、南岭尧花 (Wikstroemia indica)、葎草 (Polygonum orientale L.)、山樱 (Cerasus jamasakura)、阿拉伯芥 (Arabidopsis thaliana)、千穗谷 (Amaranthus hypochondriacus)、胡桃木 (walnut)、燕麦 (Avena

sativa)、思佩耳特小麦 (*Triticum spelta* L.)、软质小麦、白粉柏 (*Cupressus lusitanica*) 及日本榧树 (*Torreya nucifera*) 等。其中,牛蒡及连翘因牛蒡苷元含量高而较为佳。

[0044] 于本发明,牛蒡苷元及牛蒡苷是来自牛蒡子的情形,可为使用后述的牛蒡子萃取物的制造方法而获得的牛蒡子萃取物。因此,可使制造时的生产性提升、便宜且简便地调制抗癌剂。又,使用牛蒡子以外的植物的情形,亦可利用利用后述的制造方法,容易地获得含有牛蒡苷元及牛蒡苷的萃取物。

[0045] 利用后述的牛蒡子萃取物的制造方法所获得的萃取物粉末是以牛蒡苷元 / 牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷。从而利用此牛蒡子萃取物的制造方法所获得的萃取物粉末,与熟知的牛蒡子萃取物相比,可使用作为具有优异抗癌效果的本发明的抗癌剂。

[0046] 本发明的抗癌剂可进一步含有任意成分。例如,本发明的抗癌剂可为提供含有药学上可容许的基剂、载体、赋形剂、崩解剂、润滑剂及着色剂等形态者。

[0047] 于抗癌剂使用的载体及赋形剂为例,包含乳糖、葡萄糖、白糖、甘露糖醇 (mannitol)、糊精 (dextrin)、马铃薯淀粉、玉米淀粉、碳酸钙、磷酸钙、硫酸钙及结晶纤维素等。

[0048] 又,结合剂之例包含淀粉、明胶 (gelatin)、糖浆、黄蓍胶 (tragacanth)、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol)、聚乙烯醚 (polyvinyl ether)、聚乙烯吡咯啉酮 (polyvinyl pyrrolidone)、羟基丙基纤维素 (hydroxypropyl cellulose)、甲基纤维素 (methyl cellulose)、乙基纤维素 (ethyl cellulose) 及羧基甲基纤维素 (carboxymethyl cellulose) 等。

[0049] 又,崩解剂之例包含淀粉、琼脂、明胶末、结晶纤维素、碳酸钙、碳酸氢钠、褐藻酸钠 (sodium alginate)、羧基甲基纤维素钠及羧基甲基纤维素钙等。

[0050] 又,润滑剂之例包含硬脂酸镁 (magnesium stearate)、氢化植物油、滑石 (talc) 及聚乙二醇 (macrogol) 等。又,着色剂可使用可容许添加于医药品的任意着色剂。

[0051] 又,因应必要,抗癌剂可以白糖、明胶、精制虫胶 (shellac)、明胶、甘油 (glycerin)、山梨糖醇 (sorbitol)、乙基纤维素、羟基丙基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯啉酮、酞酸乙酸纤维素 (phthalic acid cellulose acetate)、羟基丙基甲基纤维素酞酸酯 (hydroxypropyl methylcellulose phthalate)、甲基丙烯酸甲酯 (methyl methacrylate) 及甲基丙烯酸 (methacrylic acid) 聚合物等,以一层以上的层加以被膜。

[0052] 又,因应必要,可添加 pH 调节剂、缓冲剂、安定化剂及可溶化剂等。

[0053] 又,抗癌剂可以任意形态的制剂来提供。例如,抗癌剂作为经口投与制剂,可为糖衣錠、口腔錠 (backal)、包衣錠及可嚼錠等的錠剂、片剂 (troche)、丸剂、散剂及包含软胶囊的胶囊剂、颗粒剂、悬浮剂、乳剂、包含干糖浆的糖浆剂、酏剂 (elixir) 等的液剂。

[0054] 又,抗癌剂可为用以非经口投与的静脉注射、皮下注射、腹腔内注射、肌肉内注射、经皮投与、经鼻投与、经肺投与、经肠投与、口腔内投与及经黏膜投与等的投与用的制剂。例如,可为注射剂、经皮吸收带、气溶胶剂及栓剂等。又,因萃取物粉末具有特殊的味道,可作成将萃取物粉末包覆的制剂、以被覆剂被覆的膜衣剂。

[0055] 另一方面,利用后述的牛蒡子萃取物的制造方法所获得的萃取物粉末亦可以此形

态下作为抗癌剂来使用。

[0056] 本发明的抗癌剂可混合经纯化的牛蒡苷元及其他成分来制造,亦可使用利用以下记载的方法制造的牛蒡子萃取物来制造。

[0057] 牛蒡子萃取物是经由草药裁切步骤、萃取步骤(酶变换步骤及利用有机溶剂的萃取步骤)、固液分离步骤、浓缩步骤及干燥步骤而被制造。

[0058] (草药裁切步骤)

[0059] 本发明的抗癌剂所使用的牛蒡子萃取物的制造方法中,将作为原料的牛蒡子裁切成适合萃取的大小。作为原料的草药是有因应植物的不同部位或矿物、动物等各种的大小、形状、坚固度、特质的裁切的必要。

[0060] 牛蒡子可使用本项技术领域者众所皆知的任意手段来裁切。例如,可使用市售的裁切机。

[0061] 以本发明的抗癌剂所使用的牛蒡子萃取物的制造方法,可事先测定牛蒡子内存在的酶的 β -葡萄糖苷酶的活性,而可选择适合本发明的制造的牛蒡子。

[0062] 就测定 β -葡萄糖苷酶的活性的方法而言,例如将p-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside)($C_{12}H_{15}NO_8$:分子量 301.25)(SIGMA-ALDRICH 公司制)作为基质,使其与牛蒡子粉碎品作用,经测定生成的p-硝基苯酚(p-nitrophenol)的400nm吸光度的变化,可测定酶活性。就表示酶活性的单位而言,可将于1分钟生成1微摩尔的p-硝基苯酚的酶量作为1单位(U)来表示。

[0063] 为了获得以牛蒡苷元/牛蒡苷=0.7~1.3的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物,可使用牛蒡子内存在的 β -葡萄糖苷酶的活性为0.4U/g以上、较佳为1U/g以上的牛蒡子。

[0064] 低于0.4U/g的情形,水解变的不充分,牛蒡苷元的重量会下降,变的无法有效率地获得所期望的牛蒡子萃取物。

[0065] 又,本发明的抗癌剂所使用的牛蒡子萃取物的制造方法是可使用裁切成任意粒径的牛蒡子。一般认为经裁切的牛蒡子的粒径越小则酶变换会被促进,萃取物生产率亦提升。与此相反,粒径过小时,酶变换过快而制程管理变困难,于的后的步骤的正确的固液分离上有发生障碍的情形。

[0066] 为了获得以牛蒡苷元/牛蒡苷=0.7~1.3的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物,如以下的实施例所示,牛蒡子被裁切为9.5mm以下的粒径,例如以皆可通过9.5mm筛的方式被裁切。

[0067] 又,为了获得以牛蒡苷元/牛蒡苷=0.7~1.3的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物,将牛蒡子的粒径裁切成全部通过9.5mm筛,并期望例如60~100%分布于0.85mm的筛,更佳为65~80%分布于0.85mm的筛。

[0068] (萃取步骤)

[0069] 萃取步骤是草药萃取物粉末制造步骤中对于品质上最重要的步骤。利用此萃取步骤,决定草药萃取物粉末的品质。本发明的牛蒡子萃取物的制造方法,为了萃取牛蒡子萃取物,分成酶变换步骤及利用有机溶剂的萃取步骤的两阶段来进行萃取。

[0070] (酶变换步骤)

[0071] 酶变换步骤是本发明的抗癌剂所使用的牛蒡子萃取物的制造方法中的重要步骤。

酶变换步骤是利用牛蒡子内存在的酶 β -葡萄糖苷酶,将牛蒡子所含的牛蒡苷酶变换为牛蒡苷元的步骤。

[0072] 具体而言,将上述步骤准备的牛蒡子裁切物,经由保持于适当的温度使 β -葡萄糖苷酶作用,使进行由牛蒡苷至牛蒡苷元的反应。例如,于裁切的牛蒡子中添加水等的任意溶液,利用于 30℃左右的温度加以搅拌,可将牛蒡子保持于任意温度。

[0073] 为了获得以牛蒡苷元/牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物,将经裁切的牛蒡子保持于 30℃左右的温度,例如 20 ~ 50℃之间的温度。

[0074] 低于 20℃的情形,水解变的不充分,牛蒡苷元的重量比会下降,变的无法有效率地获得所期望的牛蒡子萃取物。另一方面,较 50℃更高温的情形,酶会失活,牛蒡苷元的重量比会降下,变的无法有效率地获得所期望的牛蒡子萃取物。

[0075] 又,保持时间只要保持于上述温度即可,并未特别限制,例如可保持约 30 分钟。利用保持于 20 ~ 50℃之间,可不需保持时间,将适当量的牛蒡苷酶变换为牛蒡苷元,而获得以牛蒡苷元:牛蒡苷(重量比)为约 1:1 的方式含有的牛蒡子萃取物。

[0076] (利用有机溶剂的萃取步骤)

[0077] 利用有机溶剂的萃取步骤是使用任意的适当有机溶剂,而自牛蒡子萃取牛蒡苷元及牛蒡苷的步骤。即,利用上述的酶变换步骤,牛蒡苷元成为高含量的状态下,添加适当溶剂,来萃取牛蒡子萃取物的步骤。例如,于牛蒡子萃取物中添加适当溶剂,以适当时间加热搅拌而萃取牛蒡子萃取物。又,除加热搅拌以外,亦可使用加热回流、滴下式萃取、浸渍式萃取或加压式萃取法等之本项技术领域者众所皆知的任意萃取法,可萃取牛蒡子萃取物。

[0078] 因牛蒡苷元为水难溶性,利用添加有机溶剂,可使牛蒡苷元的生产率提升。有机溶剂可使用任意的有机溶剂。例如,可使用甲醇(methanol)、乙醇(ethanol)及丙醇(propanol)等的醇,以及丙酮(acetone)。考虑安全性的方面时,用于本发明的抗癌剂的牛蒡子萃取物的制造方法是使用乙醇作为有机溶剂为较佳。

[0079] 经加热搅拌来萃取牛蒡子萃取物的情形,加热搅拌可于任意温度下进行,但为了获得以牛蒡苷元/牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物,保持于 80℃以上的温度,例如 80 ~ 90℃之间的温度。

[0080] 又,加热搅拌的时间只要于上述温度下加热搅拌即可,并未特别限定,经由约 30 分钟,例如 30 ~ 60 分钟加热搅拌,可于溶剂中自牛蒡子萃取牛蒡苷元及牛蒡苷。

[0081] 牛蒡苷元及牛蒡苷的生产率是加热搅拌的时间越长而越提升。然而,加热搅拌的时间长时,不必要的油脂类会溶出过多,而对浓缩步骤的负荷变大。因而,加热搅拌的时间是因应状况加以适宜决定为宜。

[0082] 又,牛蒡苷元及牛蒡苷的生产率是因乙醇量越多而牛蒡苷元及牛蒡苷的溶解度变高,故生产率亦提升。然而,乙醇量多时,不必要的油脂类亦会溶出过多,对浓缩步骤的负荷变大。因而,投入量是因应状况加以适宜决定为宜。此外利用这个步骤的加热搅拌,可同时 will 牛蒡子萃取物灭菌及杀菌。

[0083] (固液分离步骤)

[0084] 固液分离步骤是将萃取结束的牛蒡子由萃取液加以分离的步骤。固液分离可使用本项技术领域者众所皆知的任意方法来进行。固液分离法例如有过滤法、沉降法及离心法

等。工业上以离心法为较佳。

[0085] (浓缩步骤)

[0086] 浓缩步骤是在干燥之前自牛蒡子萃取液去除溶剂的步骤。由牛蒡子萃取液的溶剂的去除可使用本项技术领域者众所皆知的任意方法来进行。

[0087] 然而,自利用上述步骤所获得的牛蒡子的萃取液是不进一步长时间暴露于高温中为较佳。

[0088] 例如,利用使用减压浓缩法,不长时间暴露于高温,可浓缩牛蒡子萃取液。

[0089] 牛蒡子萃取液的浓缩是可浓缩至可获得所期望浓度的牛蒡子萃取物的浓度。

[0090] 例如,于以下的干燥步骤,浓缩至可适当进行干燥的程度为较佳。又,于以下的步骤,使牛蒡子萃取物干燥而作成粉末制剂的情形,浓缩进行至获得适当制剂特性的浓度为较佳。

[0091] 因牛蒡苷元及牛蒡苷是水难溶性,牛蒡苷元及牛蒡苷附着于以下的干燥步骤的制造装置内的量很多,最终的生产率会大幅降低。因此,为了防止牛蒡苷元及牛蒡苷附着于制造装置,可于此浓缩步骤所获得的牛蒡子萃取液中添加糊精。糊精的添加量是例如相对于浓缩液的固体成分为 15 ~ 30% 左右为较佳。

[0092] (干燥步骤)

[0093] 将利用上述步骤所获得的牛蒡子萃取物完成为粉末状的步骤。干燥是可使用本项技术领域者众所皆知的任意方法来进行。例如,就干燥法而言,已知冻结干燥及喷雾干燥等,但若为实验室程度者,通常使用前者,若为量产程度,则通常使用后者。

[0094] 经由以上制造步骤,可获得以牛蒡苷元 / 牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物。此牛蒡子萃取物的制造方法必须包含于 20℃ ~ 50℃ 的温度下进行酶变换的步骤,而不需要包含全部的其他步骤。

[0095] 又,经由以上的制造步骤,可便宜且简便地获得牛蒡苷元的浓度为高的牛蒡子萃取物。从而利用使用由此方法所获得的牛蒡子萃取物,可便宜且简便地制造本发明的抗癌剂。

[0096] 又,因由以上的制造步骤所获得的牛蒡子萃取物的牛蒡苷元浓度为高,与使用熟知的牛蒡子萃取物的情形作比较,可将抗癌剂的每 1 日的全部量作成少量。因而可减轻患者的负担。

[0097] 又,本发明亦提供制造以牛蒡苷元 / 牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比 (1.0 ~ 1.9 的摩尔比) 的方式含有牛蒡苷元及牛蒡苷的牛蒡子萃取物的方法,其包含裁切牛蒡子的步骤、利用牛蒡子内存在的 β -葡萄糖苷酶将牛蒡子内存在的牛蒡苷酶变换为牛蒡苷元的步骤,其中所述酶变换是于 20℃ ~ 50℃ 的温度下使反应的步骤。

[0098] 又,本发明是提供制造上述的牛蒡子萃取物的方法,其是于裁切的步骤中,将牛蒡子裁切为 0.85mm ~ 9.5mm 的粒径。

[0099] 此外,本发明是提供制造牛蒡子内存在的 β -葡萄糖苷酶的酶活性为牛蒡子 1g 中为 0.4U 以上的上述牛蒡子萃取物的方法。

[0100] 又,本发明是提供包含于酶变换步骤的后,经由添加有机溶剂,萃取含有牛蒡苷元及牛蒡苷的萃取物的步骤的制造上述牛蒡子萃取物的方法。

[0101] 又,本发明是提供有机溶剂为乙醇的制造上述牛蒡子萃取物的方法。

[0102] 又,本发明是提供制造上述牛蒡子萃取物的方法,其中萃取的步骤为于约为 80℃ 下萃取。

[0103] 此外,本发明提供由上述方法所获得的牛蒡苷元 / 牛蒡苷以 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式含有的牛蒡子萃取物。

[0104] 此外,本发明提供含有由上述方法所获得的牛蒡苷元 / 牛蒡苷以 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式含有的牛蒡子萃取物的抗癌剂。

[0105] 依据本发明,可提供牛蒡苷元以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有的具有抗肿瘤效果的抗癌剂。又依据本发明,可提供牛蒡苷元及牛蒡苷以牛蒡苷元 / 牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 (重量比) 的方式含有的抗癌剂。本发明的抗癌剂投与癌症患者,例如胰脏癌患者时,可期待安定的肿瘤增殖抑制或抗肿瘤效果。又,本发明的抗癌剂可使用作为用以治疗对吉西他滨的治疗为无反应的胰脏癌的胰脏癌治疗剂。

[0106] 又,于以下的试验例 7,显示含有牛蒡苷元及牛蒡苷的颗粒剂的毒性是非常地低。因而,本发明的抗癌剂可于非常少的副作用下提供高抗癌效果。

[0107] 又,于以下的试验例 8 及试验例 9,显示牛蒡苷元对胰脏及肝脏的癌干细胞具有杀伤效果。由此可知,显示牛蒡苷元不仅对固形癌的肿瘤本体,亦对癌干细胞有作用而利用杀伤发挥抗癌作用。又,显示牛蒡苷元不仅对胰脏癌,亦会杀伤其他癌症的癌干细胞,具有抗癌效果。因而,本发明提供用于治疗各种癌症的抗癌剂。

[0108] 又,本发明亦提供含有牛蒡苷元的抗癌干细胞剂。抗癌干细胞剂是指具有杀伤癌干细胞效果的药剂。癌干细胞是指于癌细胞中具有干细胞性的细胞。

[0109] 本发明的抗癌干细胞剂可为与上述本发明的抗癌剂相同构成的。即,抗癌干细胞剂的牛蒡苷元可以每 1 日的投与量为 100mg 以上的方式含有。又,抗癌干细胞剂可进一步含有牛蒡苷,牛蒡苷以每 1 日的投与量可为 100mg 以上的方式含有。抗癌干细胞剂的牛蒡苷元及牛蒡苷可以牛蒡苷元 / 牛蒡苷 = 0.7 ~ 1.3 的重量比的方式来含有。牛蒡苷元及牛蒡苷可为来自含有牛蒡苷元及牛蒡苷的植物,例如可为来自牛蒡子。

[0110] 于以下的试验例 8 及试验例 9,显示牛蒡苷元具有选择性杀伤癌干细胞的效果,尤其于癌细胞的周围环境附近且于营养饥饿条件,具有选择性杀伤癌干细胞的效果。因而,因本发明的抗癌干细胞剂经由杀伤癌干细胞,可抑制癌细胞的增殖,故可适合利用作为抗癌剂。

[0111] [实施例]

[0112] (试验例)

[0113] 验证牛蒡子的酶活性及酶变换条件 (温度与时间) 对牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) 的影响,即验证两者的因果关系。

[0114] (酶活性的测定)

[0115] 将产地或批次相异的牛蒡子利用 Willey 氏粉碎机加以粉碎,将此牛蒡子粉碎品 0.1g 以 10mL 的水稀释,作成试料溶液。

[0116] 作为基质溶液,于 p- 硝基苯基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷 0.15g 中添加水而作成固定容量 25mL,调制 20mmol/L p- 硝基苯基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷水溶液。于 0.1mol/L 乙酸缓冲液 1mL 中添加 20mmol/L p- 硝基苯基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷水溶液 0.5mL,调制反应混合液,并于 37℃ 进行预备加热约 5 分钟。

[0117] 于反应混合液中添加试料溶液 0.5mL 并于 37℃ 使反应 15 分钟后, 添加作为反应停止液的 0.2mol/L 碳酸钠水溶液 2mL 而使反应停止。测定此液的 400nm 中的吸光度, 由未进行酶反应的空白组溶液的变化量利用下式求得酶活性。

[0118] 酶活性 (U/g) = (试料溶液的吸光度 - 空白组溶液的吸光度) $\times$ 4mL $\times$ 1/18.1 (p-硝基苯酚的上述测定条件下的毫摩尔分子吸光系数: cm²/μmol) $\times$ 1/光路长 (cm) $\times$ 1/反应时间 (分钟) $\times$ 1/0.5mL $\times$ 1/试料溶液浓度 (g/mL)

[0119] 如表 1 所示, 确认各牛蒡子的酶活性为 0.12 ~ 8.23U/g。

[0120] (试验例 1)

[0121] 于酶活性为 0.12、0.27、0.40U/g (试料 1-3) 的经裁切牛蒡子 1g 中添加水 7mL, 于酶反应温度 15℃、20℃ 的温度条件下, 将各自反应温度的反应时间设定为 30 分钟, 反应后添加乙醇并于 80℃ 进行萃取, 定量获得的萃取物的牛蒡苷元及牛蒡苷, 求得牛蒡苷元 / 牛蒡苷重量比。结果示于表 1 的比较例 1、2、实施例 1。

[0122] 酶活性为 0.40U/g 的试料 3 是于酶反应温度 20℃、反应时间 30 分钟下获得牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 0.82 的牛蒡子萃取物。

[0123] 另一方面, 于酶反应温度 15℃、反应时间 30 分钟, 牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 0.69、酶反应温度为 20℃ 以上者为较佳。

[0124] 又, 酶活性为低于 0.40U/g 的试料 1 及试料 2, 由于即使酶反应温度为 20℃, 亦无法满足牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 0.70 以上, 故牛蒡子的酶活性是 0.40U/g 以上为较佳。

[0125] (试验例 2)

[0126] 于酶活性为 4.03U/g (试料 5) 的经裁切牛蒡子 1g 中添加水 7mL, 于酶反应温度 30℃、40℃、50℃、60℃ 的温度条件下, 于各自反应温度的反应时间设定为 15 分钟、30 分钟 (仅 30℃ 及 60℃), 反应后以乙醇进行萃取, 将获得的萃取物的牛蒡苷元及牛蒡苷定量, 求得牛蒡苷元 / 牛蒡苷重量比。

[0127] 结果示于表 1 的实施例 3。于酶反应温度 30℃、反应时间 15 分钟, 获得牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 0.7, 于酶反应温度 30℃、反应时间 30 分钟, 获得牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 1.0, 于酶反应温度 40℃、反应时间 15 分钟, 获得牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 1.2, 于酶反应温度 50℃、反应时间 15 分钟, 获得牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 1.2 的牛蒡子萃取物。

[0128] 另一方面, 于酶反应温度 60℃、反应时间 15 分钟, 牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 0.4, 于酶反应温度 60℃、反应时间 30 分钟, 牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 0.5。由以上可知, 酶反应温度是低于 60℃ 为较佳。

[0129] (试验例 3)

[0130] 于酶活性为 1.42U/g (试料 4) 的经裁切牛蒡子 1g 中添加水 7mL, 并于酶反应温度 25℃ 的温度条件下设定反应时间为 10 分钟、30 分钟, 反应后以乙醇进行萃取, 将获得的萃取物的牛蒡苷元及牛蒡苷定量, 求得牛蒡苷元 / 牛蒡苷重量比。

[0131] 结果示于表 1 的实施例 2。酶反应温度 25℃、反应时间 10 分钟下, 牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 0.74, 于相同反应时间 30 分钟, 获得牛蒡苷元 / 牛蒡苷 (重量比) = 0.85 的牛蒡子萃取物。

[0132] 由以上可知,即使酶活性 1.42U/g,可获得所欲结果。

[0133] [表 1]

[0134]

			比较例 1	比较例 2	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5
试料			试料 1	试料 2	试料 3	试料 4	试料 5	试料 6	试料 7
酶活性(U/g)			0.12	0.27	0.40	1.42	4.03	7.82	8.23
牛蒡苷元/牛蒡苷重量比	15℃	30 分	0.26	0.50	0.69	—	—	—	—
	20℃	30 分	0.23	0.60	0.82	—	—	—	—
	25℃	10 分	—	—	—	0.74	—	—	—
		30 分	—	—	—	0.85	—	—	—
	30℃	15 分	—	—	—	—	0.70	—	—
		30 分	—	—	—	—	1.00	0.93	0.89
	40℃	15 分	—	—	—	—	1.20	—	—
		30 分	—	—	—	—	—	—	—
	50℃	15 分	—	—	—	—	1.20	—	—
		30 分	—	—	—	—	—	—	—
	60℃	15 分	—	—	—	—	0.40	—	—
		30 分	—	—	—	—	0.50	—	—

[0135] (实施例 6 牛蒡子萃取物的制造 1)

[0136] 裁切牛蒡子(酶活性 8.23U/g),将其全部通过 9.5mm 的筛后进一步通过 0.85mm 的筛,确认 75%残留。将此牛蒡子细切 80kg 加到保温于 29 ~ 33℃的水 560L 中并搅拌 30 分钟。其次,添加乙醇 265L 而升温至 85℃,再加热回流 60 分钟。离心此溶液,而获得牛蒡子萃取液。合并重复此操作两次所获得的萃取液,减压浓缩,对萃取物固体成分添加糊精 20%,并喷雾干燥。牛蒡苷元及牛蒡苷含量是各自为 6.2%及 7.1%,获得牛蒡苷元/牛蒡苷(重量比) = 0.89 的牛蒡子萃取物粉末(含有糊精 20%)。

[0137] (实施例 7 牛蒡子萃取物的制造 2)

[0138] 裁切牛蒡子(酶活性 8.23U/g),将其全部通过 9.5mm 的筛者进一步通过 0.85mm 的筛,确认 75%残留。将此牛蒡子细切 80kg 加到保温于 30 ~ 33℃的水 560L 中并搅拌 30 分钟后,添加乙醇 265L 而升温至 85℃,再加热回流 30 分钟。离心此溶液,而获得牛蒡子萃取

液。合并重复此操作两次所获得的萃取液,减压浓缩,对萃取物固体成分添加糊精 20%,并喷雾干燥。牛蒡苷元及牛蒡苷含量是各自为 6.0%及 6.8%,获得牛蒡苷元/牛蒡苷(重量比) = 0.87 的牛蒡子萃取物粉末(含有糊精 20%)。

[0139] (实施例 8 牛蒡子萃取物的制造 3)

[0140] 裁切牛蒡子(酶活性 7.82U/g),将其全部通过 9.5mm 的筛后进一步通过 0.85mm 的筛,确认 75%残留。将此牛蒡子细切 80kg 加到保温于 30 ~ 32℃的水 560L 中,并搅拌 40 分钟后,60 分钟后添加乙醇 258L 并升温至 85℃,再加热回流 30 分钟。离心此溶液,而获得牛蒡子萃取液。合并重复此操作两次所获得的萃取液,减压浓缩,对萃取物固体成分添加糊精 20%,并喷雾干燥。牛蒡苷元及牛蒡苷含量是各自为 6.2%及 6.7%,获得牛蒡苷元/牛蒡苷(重量比) = 0.93 的牛蒡子萃取物粉末(含有糊精 20%)。

[0141] (实施例 9 牛蒡子萃取物的制造 4)

[0142] 裁切牛蒡子(酶活性 7.82U/g),将其全部通过 9.5mm 的筛后进一步通过 0.85mm 的筛,确认 75%残留。将此牛蒡子细切 80kg 加到保温于 30 ~ 32℃的水 560L 中,并搅拌 30 分钟后,添加乙醇 253L 并升温至 85℃,再加热回流 40 分钟。离心此溶液,而获得的萃取液。合并重复此操作两次所获得的萃取液,减压浓缩,对萃取物固体成分添加糊精 25%,喷雾干燥。牛蒡苷元及牛蒡苷含量是各自为 6.4%及 7.2%,获得牛蒡苷元/牛蒡苷(重量比) = 0.89 的牛蒡子萃取物粉末(含有糊精 25%)。

[0143] [表 2]

[0144]

		实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9
牛蒡子	酶活性	8.23	8.23	7.82	7.82
裁切步骤	粒径(mm)	0.85-9.5	0.85-9.5	0.85-9.5	0.85-9.5
酶变换步骤	温度(℃)	29~33℃	30~33℃	30~32℃	30~32℃
	时间(分)	30 分	30 分	40 分	30 分

[0145]

萃取步骤	溶剂	乙醇	乙醇	乙醇	乙醇
	温度(℃)	85℃	85℃	85℃	85℃
	时间(分)	60 分	30 分	30 分	40 分
固液分离步骤		离心法	离心法	离心法	离心法
浓缩步骤		减压浓缩	减压浓缩	减压浓缩	减压浓缩
干燥步骤		喷雾干燥	喷雾干燥	喷雾干燥	喷雾干燥
牛蒡苷元/牛蒡苷(重量比)		0.89	0.87	0.93	0.89

[0146] 由上述的实施例 6-9 的结果可知,于酶变换步骤,于约 30℃利用酶变换,可获得牛蒡苷元:牛蒡苷(重量比)=约 1:1 的含量的牛蒡子萃取物。通常,利用酶的反应是进行依存于温度及时间的反应,但若为此温度,未经历酶变换时间,即可获得牛蒡苷元:牛蒡苷(重量比)=约 1:1 的含量的牛蒡子萃取物。

[0147] 又,由上述的实施例 6-9 的结果可知,于加热回流步骤,利用使温度上升至约 85℃来加热回流,可获得牛蒡苷元:牛蒡苷(重量比)=约 1:1 的含量的牛蒡子萃取物。通常,加热回流而获得萃取物的情形,萃取物中的含有物的量会依存于温度及时间而变化,但若为此温度,未经历加热回流时间,可获得牛蒡苷元:牛蒡苷(重量比)=约 1:1 的含量的牛蒡子萃取物。

[0148] (实施例 10 牛蒡子萃取物粉末配合颗粒剂)

[0149]

(1)实施例 7 的牛蒡子萃取物粉末	33.3%
(2)乳糖	65.2%
(3)羟基丙基纤维素	1.5%
合计	100%

[0150] (制造方法)

[0151] 依据「日本药典(日局)」制剂总则,颗粒剂的项目,而制造颗粒剂。即,取上表记载的(1)-(3)的成分,作成颗粒状。将其各 1.5g 填充于铝层合薄膜,获得每 1 包含有牛蒡子萃取物粉末 0.5g 的颗粒剂。

[0152] (实施例 11 牛蒡子萃取物粉末配合颗粒剂)

[0153]

(1)实施例 7 的牛蒡子萃取物粉末	66.7%
(2)乳糖	30.3%
(3)羟基丙基纤维素	3.0%
合计	100%

[0154] (制造方法)

[0155] 依据「日局」制剂总则,颗粒剂的项目,而制造颗粒剂。即,取上表记载的(1)-(3)的成分,作成颗粒状。将其各 3.0g 填充于铝层合薄膜,获得每 1 包含有牛蒡子萃取物粉末 2g 的颗粒剂。

[0156] (实施例 12 牛蒡子萃取物粉末配合锭剂)

[0157]

(1)实施例 7 的牛蒡子萃取物粉末	37.0%
(2)结晶纤维素	45.1%
(3)羧甲基纤维素(carmellose)钙	10.0%
(4)交联聚维酮(crospovidone)	3.5%
(5)含水二氧化矽	3.4%
(6)硬脂酸镁	1.0%
合计	100%

[0158] (制造方法)

[0159] 依据「日局」制剂总则,锭剂的项目,而制造锭剂。即,取上表记载的(1)-(6)成分,获得锭剂。

[0160] (试验例 4)

[0161] 使用实施例 10 的颗粒剂而试验对胰脏癌的效果。

[0162] 病理组织学上的腺癌(包含腺扁平上皮癌)被确认,作为前治疗的 1 年 3 个月之间进行吉西他滨(Gemcitabine)+S-1 疗法,最佳反应(Bestresponse)为部分奏效(PR:PartialResponse),将最终以吉西他滨+S-1 疗法变得有抵抗性而成为渐行性疾病(PD(Progressivedisease))的患者(53 岁、男性)作为对象。对此患者,每 1 日 1 次于早餐后连续数日经口投与实施例 10 的颗粒剂 7.5g(5 包)(含有牛蒡子萃取物粉末 2.5g)。

[0163] 又,于本试验例所使用的颗粒剂所含的牛蒡子萃取物粉末 1g 中,含有牛蒡苷元 59.4mg 及牛蒡苷 68.5mg。即,每 1 日投与患者的牛蒡苷元为 148.5mg,牛蒡苷为 171.25mg。

[0164] 图 1 至图 3 是显示此患者的颗粒剂投与前(A)、投与开始 1 个月后(B)、2 个月后(C)及 3 个月后(D)的胸腹部电脑断层成像的影像图。利用此等影像,连续地依据「固形癌的治疗效果判定用的新准则(RECIST guideline(version1.1))」进行肿瘤缩小效果判定。其结果,于图 2 及图 3 如箭号所示,肿瘤缩小效果被确认。另一方面,于上述患者,实施例 10 的颗粒剂的投与后未见严重的副作用。

[0165] 再者,检查颗粒剂投与前后的肿瘤位置标记 CA19-9 及 CEA 的量。其结果,如表 3 所示,颗粒剂投与后的肿瘤位置标记 CA19-9 及 CEA 的降低被确认。

[0166] [表 3]

[0167]

	投与 前	投与 1 个月 后	投与 2 个月 后	投与 3 个月 后
CA19-9(U/mL)	69.7	172.5	123	100.6
CEA(ng/mL)	66.4	224.1	114.8	98.3

[0168] 因而,本发明的抗癌剂显示对胰脏癌有效果。尤其,显示对吉西他滨的治疗无反应的胰脏癌有效果。投与本发明的构成时,对胰脏癌有效果是并非过去已知的,又未实际上对人投与的话,并无法容易地推想得知。

[0169] 又,本发明的抗癌剂不仅对胰脏癌,对大肠癌等的缺血性且低氧、低营养状态的癌症等亦可期待有效性。

[0170] (试验例 5)

[0171] 以进行作为前治疗的吉西他滨疗法效果不佳的胰脏癌患者 3 名作为对象,将实施例 10 的颗粒剂 3g(含有牛蒡子萃取物粉末 1g)以每 1 日 1 次于早餐后连续数日经口投与。即,于本试验例,投与患者的每 1 日的牛蒡苷元为 59.4mg,牛蒡苷为 68.5mg。

[0172] 此结果,于此等患者,投与开始 1-2 个月间虽然并未认为有肿瘤增大,但最终被判定为 PD。即,肿瘤的缩小效果及肿瘤位置标记降低并未被确认。又,于任一患者,上述颗粒剂的投与后并未见到严重的副作用。

[0173] (实施例 12 切割、冷浸萃取、添加乙醇的牛蒡子萃取物的制造)

[0174] 将牛蒡子细切 200g 添加至水 (22℃) 1L 并搅拌 1 小时后,添加乙醇 0.45L 再加热回流 1 小时。以纱网 4 片(金属网 100 个网孔)过滤,以 30%乙醇 0.5L 洗净,冻结干燥合并的萃取液 (1.5L)。如此获得的冷浸萃取草药切割物的牛蒡子萃取物,其牛蒡苷及牛蒡苷元含量各自为 13.3%及 11.4%,牛蒡苷元/牛蒡苷(重量比)=0.86。

[0175] (试验例 6:肿瘤模型动物中的抗肿瘤性的评价)

[0176] (试验方法)

[0177] 与成为供给者的裸鼠 (BALB-cAJnu/nu;日本 CLEA) 的背皮下接种人类胰脏癌细胞株 CAPAN-1 或 PSN-1,利用将获得的供给者小鼠的肿瘤块移植至接受者小鼠的背皮下而制作肿瘤模型动物。牛蒡苷元 (AG)、牛蒡苷 (A) 及牛蒡子萃取物 (实施例 12) 是将于 DMSO 中以 10mg/ml 的浓度溶解者以生理食盐水稀释,每 1 双小鼠经口投与至胃内 50 μ g,每 1 周 5 次。抗肿瘤性是利用连续地测量背皮下的肿瘤块的大小来评价。

[0178] 投与开始后 1 个月,与对照组相比,药剂投与组被认为有显著的肿瘤的增殖抑制效果。又,于纯化牛蒡苷元的投与组,亦可获得抗肿瘤效果,但同时含有前驱物的牛蒡苷的牛蒡子萃取物 (实施例 12),可见更强的抗肿瘤效果 (图 4 及图 5)。由此结果,可确认牛蒡苷元/牛蒡苷(重量比)=0.7~1.3 的牛蒡子萃取物显示更高的抗肿瘤活性。

[0179] (试验例 7:剂量限制性毒性 (dose limiting Toxicity DLT) 的表现频率)

[0180] 将对进行前治疗的吉西他滨疗法效果不佳的胰脏癌患者 15 名作为对象,进行用以调查剂量限制性毒性的表现频率的含有牛蒡苷元的颗粒剂的第 I 期试验。于此 15 名,每 1 日 1 次早餐后连续数日经口投与指定用量的牛蒡苷元含有颗粒剂。此 15 名中的 3 名,每 1 次投与实施例 10 的颗粒剂 3g(牛蒡子萃取物粉末 1g,即含有牛蒡苷元 59.4mg 及牛蒡苷 68.5mg)。于 15 名中的另外 3 名,每 1 次投与实施例 10 的颗粒剂 7.5g(牛蒡子萃取物粉末 2.5g,即含有牛蒡苷元 148.5mg 及牛蒡苷 171.25mg)。又于另外 9 名,每 1 次投与实施例 10 的颗粒剂 12g(牛蒡子萃取物粉末 4g,即含有牛蒡苷元 237.6mg 及牛蒡苷 274mg)。

[0181] 其结果,对象患者 15 名中,剂量限制性毒性的表现频率为 0。具体而言,对抗胰脏癌患者的含有牛蒡苷元的颗粒剂的第 I 期试验中主要的 Grade 3 以上的有害事项的 GGT 上升、高血糖、ALP 上升、血中胆红素 (bilirubin) 上升上不认为有严重的有害事项。

[0182] [表 4]

[0183] 含有牛蒡苷元的颗粒剂的第 I 期试验中的有害事项 (n=15,全部历经期间中)

[0184]

项目	G1	G2	G3	G4	%G 3-4
自己与他人感觉的症状					
腹泻	3	1	0	0	0
恶心	2	2	0	—	0
胃痛	1	0	0	—	0
呕吐	3	0	0	0	0
食欲不振	3	4	0	0	0
临床检查值					
白血球减少	5	0	0	0	0
嗜中性球减少	1	0	0	0	0
贫血	11	2	0	0	0
血小板数减少	3	0	0	0	0
血中胆红素增加	1	1	1	0	6.67
AST 增加	9	2	0	0	0
ALT 增加	6	1	0	0	0
ALP 增加	10	1	1	0	6.67
GGT 增加	4	0	7	0	46.7
Cr 增加	0	1	0	0	0
高血糖	5	6	4	0	26.7

[0185] 由此等的结果,可知本实施例的颗粒剂是毒性非常低、安全性高。据此,本发明显示可提供副作用较少的抗癌剂。

[0186] (试验例 8:对胰腺癌干细胞的效果)

[0187] 其次,调查牛蒡苷元对被认为与癌症的各式各样的治疗抵抗性或再发、转移巢的出现有深切关联的癌干细胞样族群(CSCs:Cancer Stem-like cells)的效果。

[0188] (培养基及试药调制)

[0189] 含葡萄糖培养基是将 4.75g Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)培养基 2(日水制药)溶解于水中,添加 12.5ml 1M HEPES pH7.4(DOJINDO、342-01375)而灭菌后,添加 18.5ml 10% NAHCO₃、10ml L- 麸胺酸(glutamine)(SIGMA)、5ml Anti-Anti(Life technologies)、5ml MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACID SOLUTION(SIGMA),添加于 56℃下以 30 分钟温浴而失活的 50ml 胎牛血清(FETAL BOVINE SERUM(biowest)),最终作成 500ml。

[0190] 葡萄糖阻害培养基是于含葡萄糖培养基中添加最终浓度 20mM 的 2- 去氧 - 葡萄糖 (2-Deoxy-Glucose (2-DG)) (东京化成工业) 而制作。

[0191] FACS 缓冲液是将 10g 无蛋白酶的牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin Protease free) (和光纯药工业) 溶解于 1L 的 PBS(-), 添加最终浓度 0.1% 的叠氮化钠 (sodium azide), 过滤灭菌来制作。

[0192] FACS 分析用的荧光标识抗体是使用 CD44(338803 或 338807, Biolegend), CD24(311117, Biolegend), ESA(324205, Biolegend), c-Met(11-8858, e-bioscience)。又染色过程是依据附于制品的资料表单来进行。

[0193] (试验方法及结果)

[0194] 将胰脏癌细胞 PANC-1(ATCC No. CRL-1469) 接种于含葡萄糖培养基培育一晚后, 分别于含葡萄糖培养基、葡萄糖阻碍培养基、含有 3 μ M 牛蒡苷元的含葡萄糖培养基及含有 3 μ M 牛蒡苷元的葡萄糖阻害培养基培养 24 小时。回收细胞后, 依照一定方法进行 PI 染色(死细胞染色)及癌干细胞位置标记染色, 以流式细胞分析(FACS, flow cytometry)进行解析。就位置标记而言, 使用作为胰脏癌的干细胞位置标记有报告的 CD44、CD24 及 ESA(CD326) 的 3 重阳性、或 CD44 阳性、c-Met 强阳性的 2 重阳性。

[0195] PI 染色及癌干细胞位置标记(CD44+、CD24+ 及 ESA+(CD326) 的 3 重阳性) 的染色结果示于图 6。PI 染色的结果, 相对于细胞的存活率是于含有葡萄糖的条件下为 78.20%, 于葡萄糖阻碍条件下为 68.53%, 及含有葡萄糖的条件中的 3 μ M 牛蒡苷元存在下为 69.50%, 于葡萄糖阻害条件下的 3 μ M 牛蒡苷元存在下, 存活率为 35.71%。

[0196] 又, 癌干细胞位置标记染色的结果, 指示胰脏癌干细胞的 CD44+ESA+CD24+ 细胞的比率(生存数)是相对于全分析细胞中的含有葡萄糖的条件下为 4.41%(441 个)、葡萄糖阻碍条件下为 6.51%(651 个)、及含有葡萄糖的条件中的 3 μ M 牛蒡苷元存在下为 5.01%(501 个), 葡萄糖阻碍条件下的 3 μ M 牛蒡苷元存在下为 0.98%(98 个)。据此, 牛蒡苷元显示于葡萄糖饥饿条件具有杀伤胰脏癌干细胞的效果。

[0197] PI 染色及癌干细胞位置标记(CD44+、c-MetHigh 的 2 重阳性) 的染色结果示于图 7。PI 染色的结果, 相对于细胞的存活率于含有葡萄糖的条件下为 84.70%、于葡萄糖阻碍条件下为 88.80%、及于含有葡萄糖的条件中的 3 μ M 牛蒡苷元存在下为 83.30%, 于葡萄糖阻碍条件下的 3 μ M 牛蒡苷元存在下的存活率为 27.50%。

[0198] 将强力肿瘤生成能力作为指标的胰脏癌干细胞的新位置标记的接续报告的 CD44 阳性 c-Met 强阳性(CD44+, c-MetHigh) 细胞的胰脏癌细胞株的阳性比率(生存数), 相对于含有葡萄糖的条件下为 0.63%(38 个)、葡萄糖阻碍条件下为 0.73%(47 个)、及含有葡萄糖的条件中的 3 μ M 牛蒡苷元存在下是为 0.52%(31 个), 于葡萄糖饥饿条件的 3 μ M 牛蒡苷元存在下为 0.22%(13 个)。据此, 牛蒡苷元显示于葡萄糖饥饿条件, 对表现此等的干细胞位置标记的胰脏癌干细胞, 显示亦具有杀伤其的效果。

[0199] (试验例 9:与现有化学疗法药剂抗胰脏癌干细胞的比较试验)

[0200] 进行牛蒡苷元与抗胰脏癌的现有化学疗法药剂之一的顺铂的胰脏癌干细胞的杀伤效果的比较。

[0201] (培养基及试药调制)

[0202] 含葡萄糖培养基是将 4.75g Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 培养基

2(日水制药) 溶解于水中,添加 12.5ml 1M HEPES pH7.4(DOJINDO、342-01375) 而灭菌后,添加 18.5ml 10% NaHCO_3 、10ml L- 麸胺酸 (SIGMA)、5ml Anti-Anti(Life technologies)、5ml MEM NON-ESSENTIAL AMINO ACID SOLUTION(SIGMA),添加于 56°C 以 30 分钟温浴而失活的 50ml 胎牛血清 (FETAL BOVINE SERUM(biowest)),最终作成 500ml。

[0203] 葡萄糖阻碍培养基是于含葡萄糖培养基中添加最终浓度 15mM 的 2- 去氧基 - 葡萄糖 (2-DG) (东京化成工业) 而制作。

[0204] 含有 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元的培养基是于含葡萄糖培养基或葡萄糖阻碍培养基中添加最终浓度 $4\mu\text{M}$ 的牛蒡苷元 (Kracie 制药) 而制作。

[0205] (试验方法及结果)

[0206] 将胰臟癌细胞 Capan-1(ATCC No. HTB-79) 接种于含葡萄糖培养基中培育一晚后,各自于含葡萄糖培养基、葡萄糖阻碍培养基、含有 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元的含葡萄糖的培养基及含有 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元的葡萄糖阻碍培养基、或 $7\mu\text{M}$ 顺铂 (CDDP:和光纯药工业) 中培养 24 小时。回收细胞后,依据一定方法进行 PI 染色 (死细胞染色) 及癌干细胞位置标记染色,作为以流式细胞分析 (FACS) 进行解析的位置标记而言,使用作为胰臟癌的干细胞位置标记的报告的 CD44、CD24 及 ESA(CD326) 的 3 重阳性。

[0207] PI 染色及癌干细胞位置标记的染色结果示于图 8。PI 染色的结果,相对于细胞的存活率于含有葡萄糖的条件下为 67.57%、于葡萄糖阻碍条件下为 79.10%、及含有葡萄糖的条件中的 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元存在下为 72.80%,葡萄糖阻碍条件下的 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元存在下的存活率为 48.73%,顺铂处理为 58.08%。

[0208] 又,癌干细胞位置标记染色的结果,指示胰臟癌干细胞的 CD44+ESA+CD24+ 细胞的比率 (生存数) 是以全细胞中分析时,相对于含有葡萄糖的条件下为 0.87% (65 个)、葡萄糖阻碍条件下为 1.40% (105 个)、及含有葡萄糖的条件中的 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元存在下为 1.04% (78 个),葡萄糖阻碍条件下的 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元存在下为 0.24% (18 个),顺铂处理为 1.17% (88 个)。另一方面,于生存细胞中分析时,相对于含有葡萄糖的条件为 1.28%、于葡萄糖阻碍条件为 1.77%、及于含有葡萄糖的条件中的 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元存在下为 1.43%,于葡萄糖阻碍条件的 $4\mu\text{M}$ 牛蒡苷元存在下为 0.50%,以顺铂处理则上升为 2.02%。据此,牛蒡苷元显示,于葡萄糖饥饿条件,具有杀伤以顺铂杀伤较为困难的 CD44+ESA+CD24+ 阳性胰臟癌干细胞的效果。

[0209] 由试验例 8 及 9 的结果可知,牛蒡苷元强烈地暗示,于体内置有癌细胞的环境附近的营养饥饿条件,对癌干细胞样族群具有杀伤效果。又,牛蒡苷元不仅具有抑制对肿瘤本体作用的癌细胞增殖的效果,亦强烈暗示对供给癌细胞而再构筑肿瘤组织的能力的癌干细胞作用而具有杀伤的效果。

[0210] 又,含试验例 7 的牛蒡苷元的颗粒剂显示非常低的毒性。牛蒡苷元因于营养饥饿条件具有杀伤效果、及不仅作用于癌本体的细胞亦对癌干细胞作用而可使对正常的细胞的影响降低,故暗示获得低毒性的可能性。据此,本发明可提供于少的副作用下具有高抗癌作用的抗癌剂。

[0211] 【产业利用性】

[0212] 本发明是可较佳利用于抗癌剂,尤其是胰臟癌治疗剂。

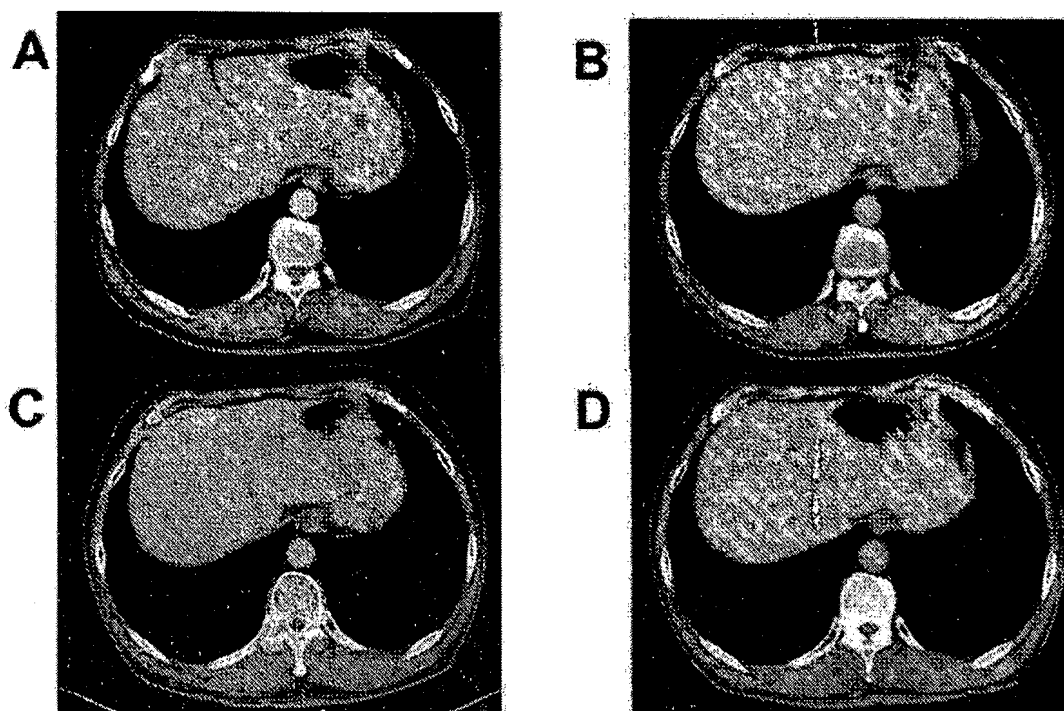


图 1

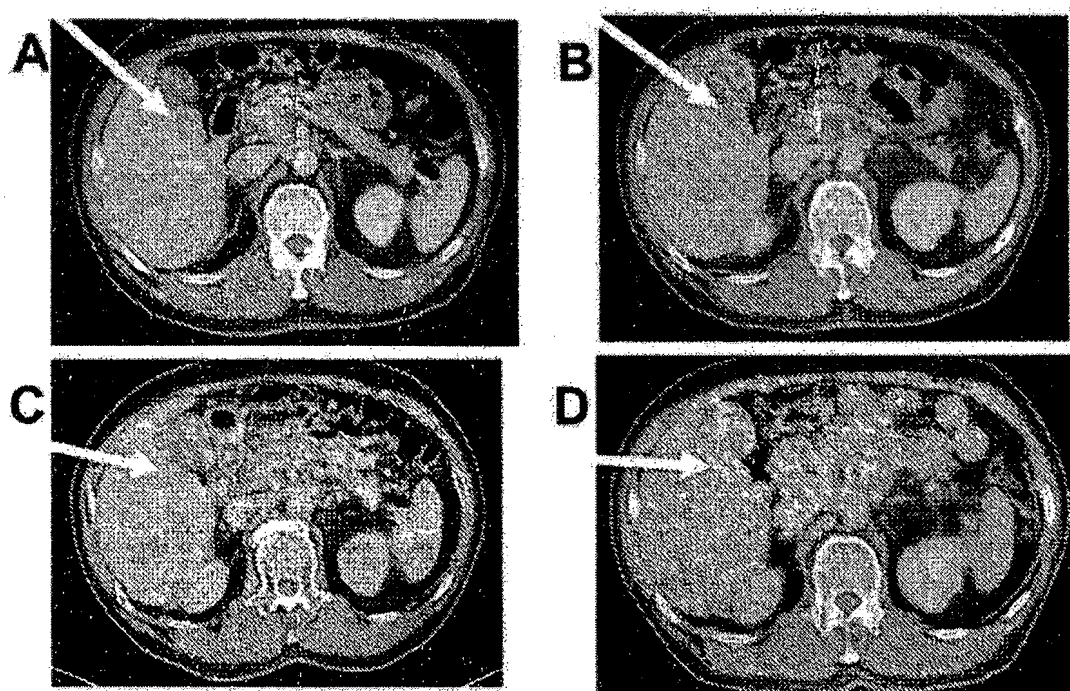


图 2

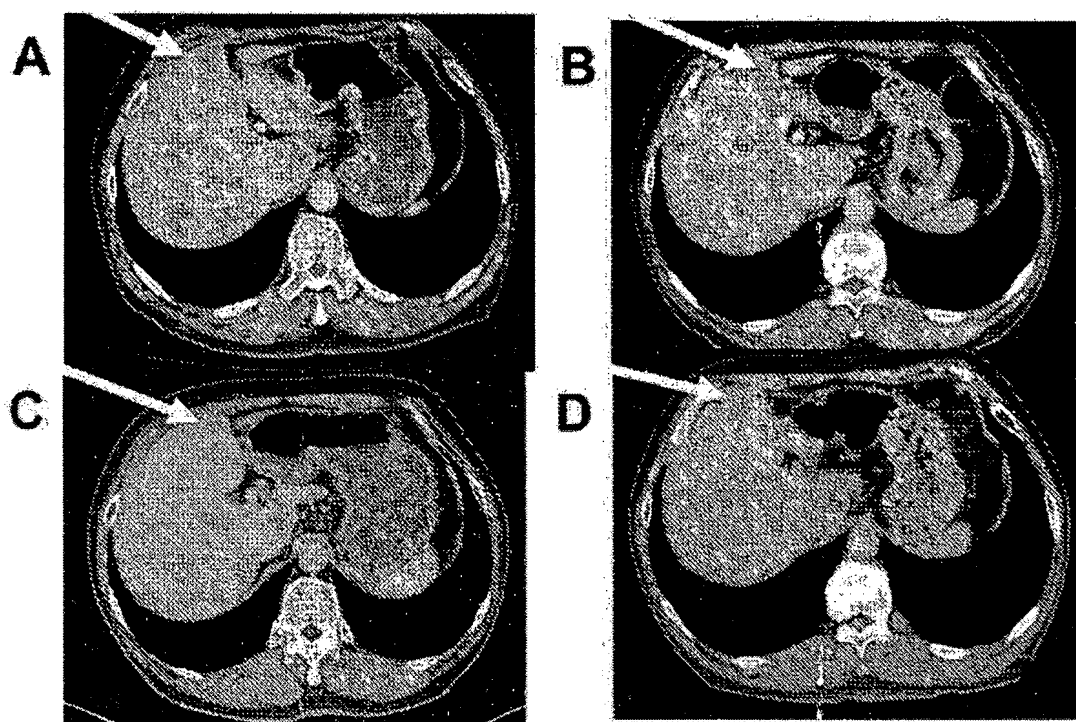


图 3

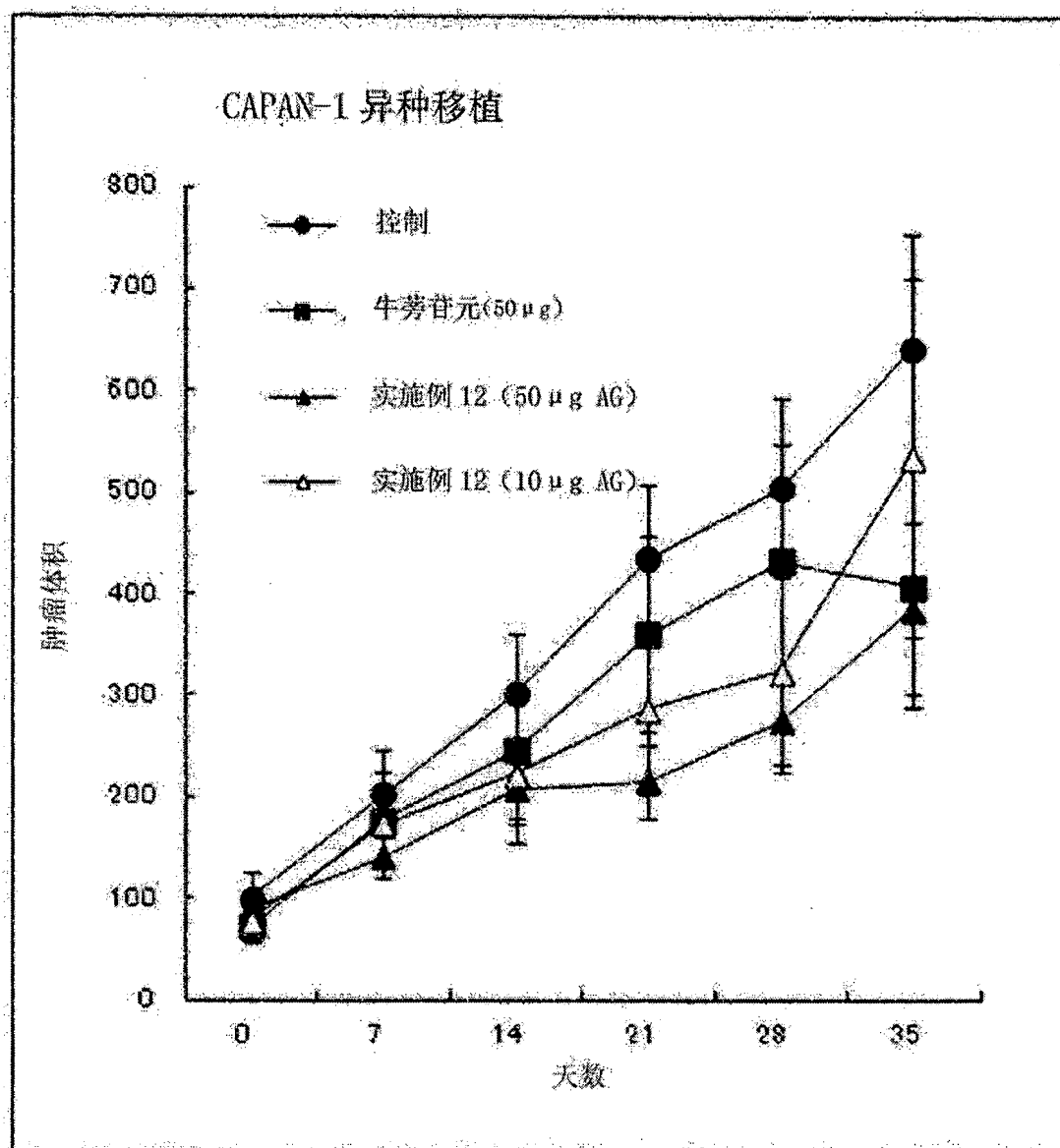


图 4

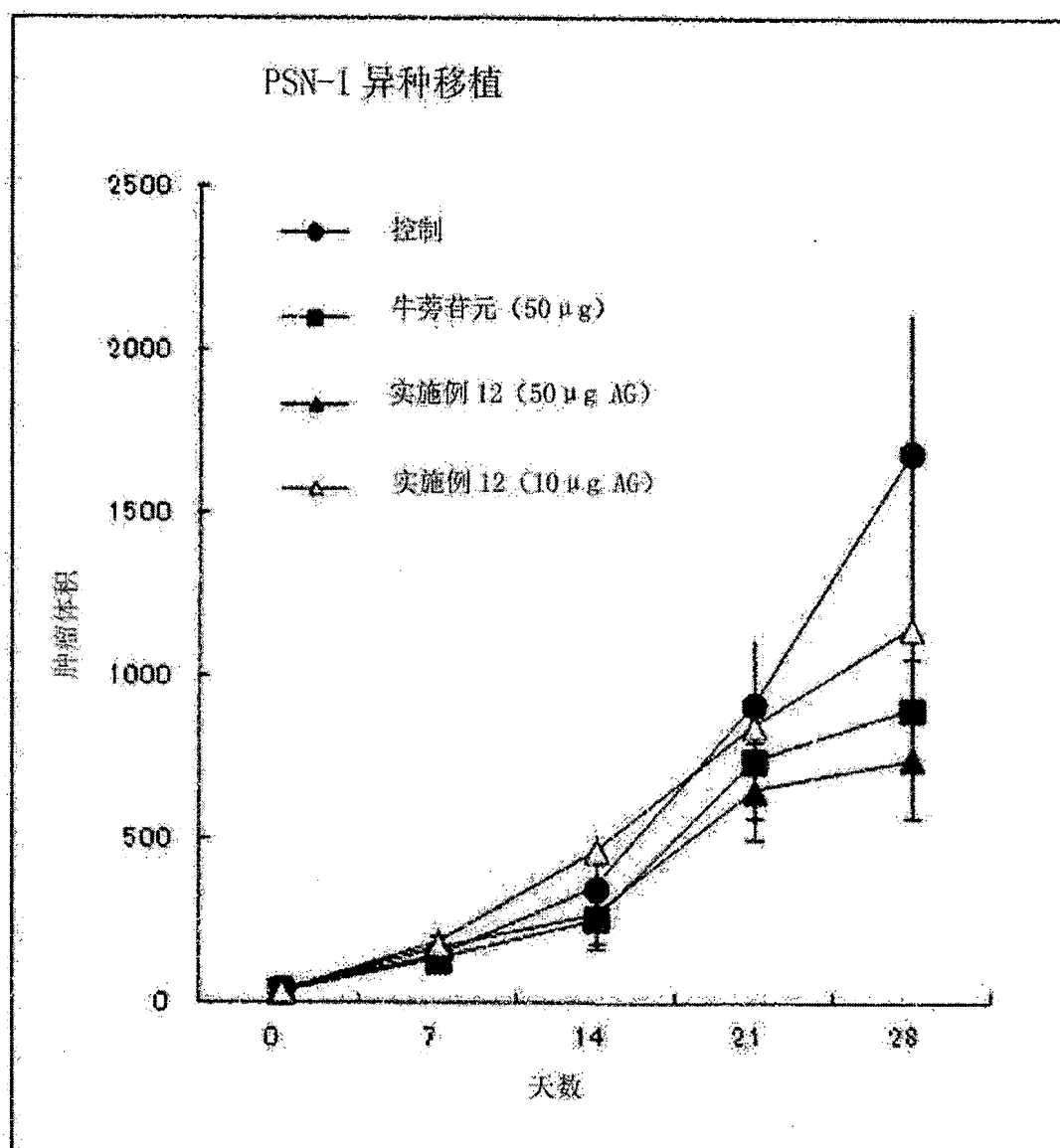
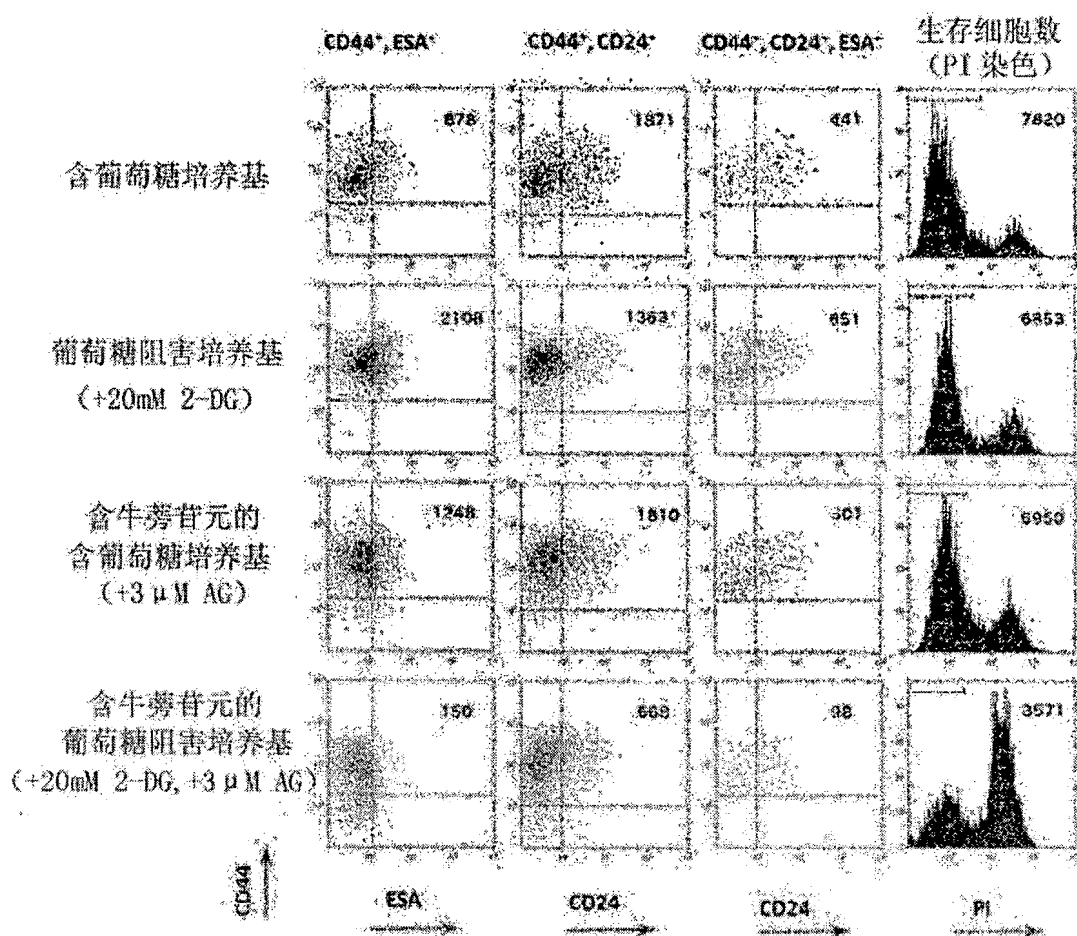
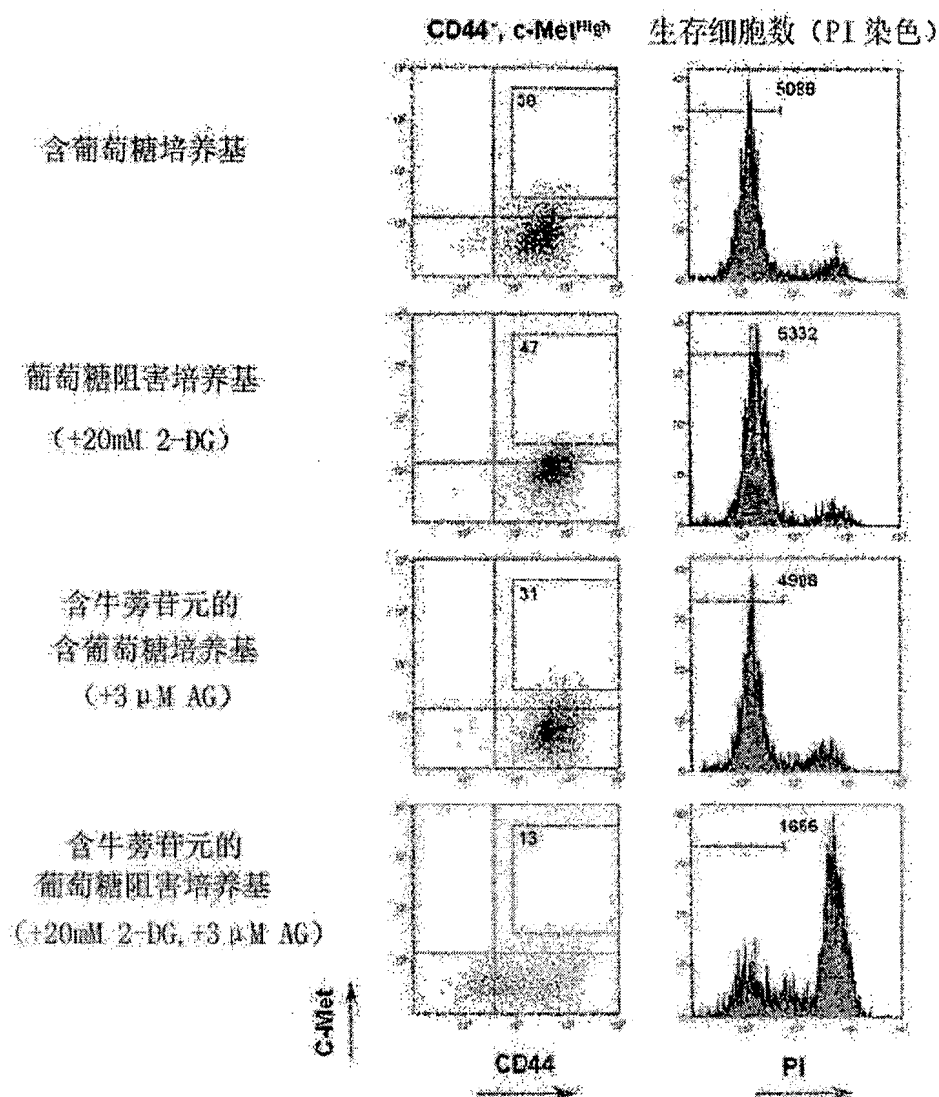


图 5



葡萄糖代谢 阻害剂 (2-DG)	牛蒡苷元	解析细胞数	生存数 (%)	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ ESA ⁺ (细胞数)	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ESA ⁺ (生存细胞中%)	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ ESA ⁺ (全细胞中%)
-	-	10,000	78.20	441	5.64	4.41
+	-	10,000	68.53	651	9.50	6.51
-	+	10,000	69.50	501	7.21	5.01
+	+	10,000	35.71	98	2.74	0.98

图 6



葡萄糖代谢 阻害剂 (2-DG)	牛蒡苷元	解析细胞数	生存率 (%)	CD44 ⁺ c-Met ^{High} (细胞数)	CD44 ⁺ c-Met ^{High} (生存细胞中%)	CD44 ⁺ c-Met ^{High} (全细胞中%)
-	-	6,000	84.70	38	0.75	0.63
+	-	6,000	88.80	47	0.98	0.78
-	+	6,000	83.30	31	0.52	0.52
+	+	6,000	27.50	13	0.78	0.22

图 7

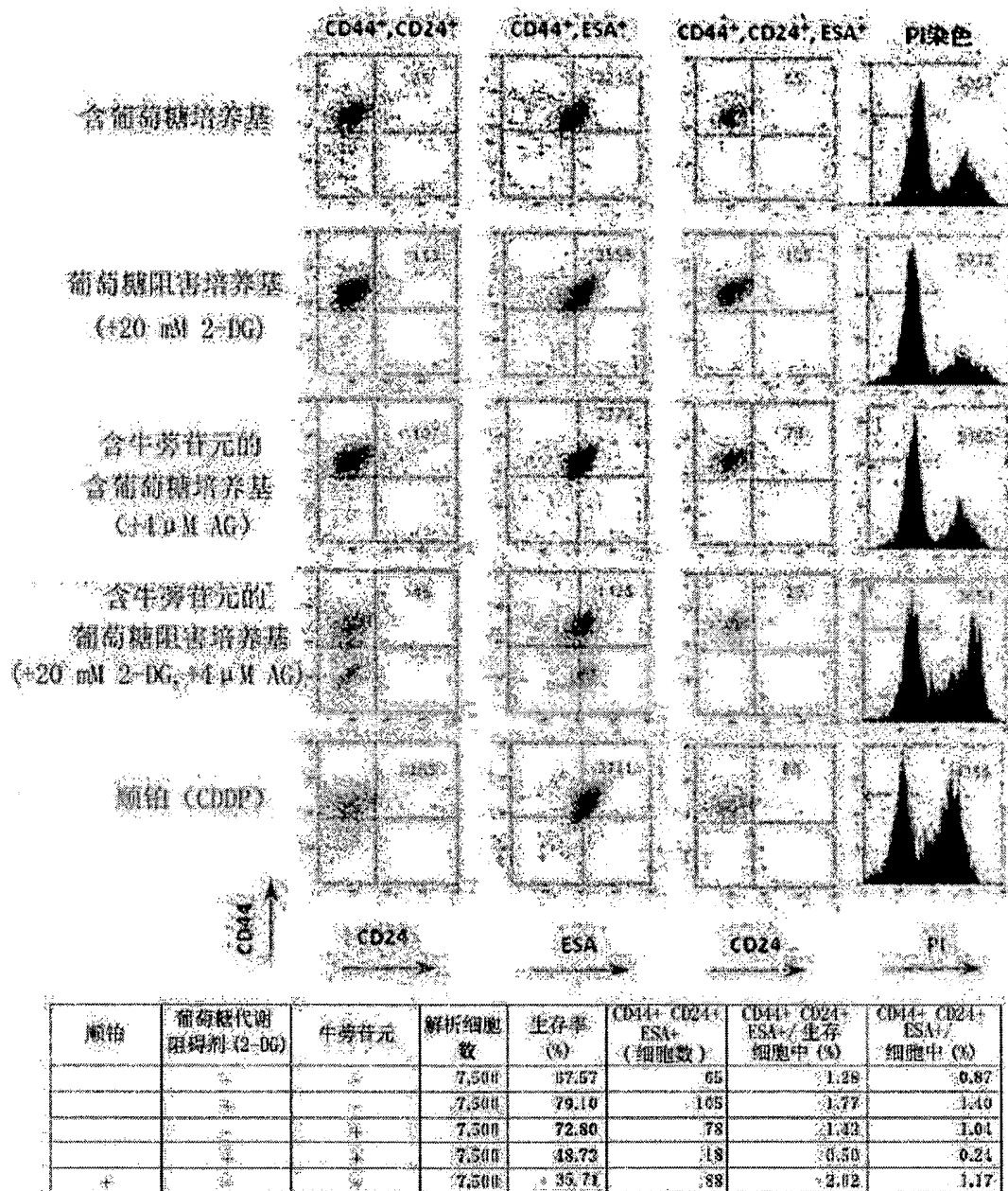


图 8

ABSTRACT

The present invention is intended to provide a novel anticancer agent which is effective to a cancer. After administering an agent prepared using burdock fruit extract to a pancreas cancer patient so that a dose of arctigenin was 100 mg or more per day, the tumor reducing effect was observed, and, in addition, lowering of tumor markers was confirmed. The present invention provides an anticancer agent containing arctigenin, wherein a dose of the arctigenin is 100 mg or more per day. In addition, the present invention provides the anticancer agent containing arctigenin and arctiin at a weight ratio of arctigenin/arctiin = 0.7 to 1.3.