

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5800907号
(P5800907)

(45) 発行日 平成27年10月28日(2015.10.28)

(24) 登録日 平成27年9月4日(2015.9.4)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K	38/46	(2006.01)	A 6 1 K	37/54	Z N A
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/02	
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	

請求項の数 16 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-534173 (P2013-534173)
 (86) (22) 出願日 平成22年10月21日(2010.10.21)
 (65) 公表番号 特表2013-545444 (P2013-545444A)
 (43) 公表日 平成25年12月26日(2013.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/065915
 (87) 国際公開番号 W02012/052059
 (87) 国際公開日 平成24年4月26日(2012.4.26)
 審査請求日 平成25年9月9日(2013.9.9)

特許法第30条第1項適用 平成22年5月6日、http://sobi.test.dropit.se/PageFiles/356/Kiobrina_20100506.pdfおよびhttp://sobi.test.dropit.se/PageFiles/356/Kiobrina_poster_20100506.pdfを通じて発表。

(73) 特許権者 513099072
 スウェディッシュ オーファン バイオビ
 トラム パブリーク アクチエボラグ
 スウェーデン王国 ストックホルム エス
 イー - 1 1 2 7 6
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト乳児による不飽和脂肪酸の吸収を増大させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト早産児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させるための、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ (rhBSSL) を含む薬学的組成物であって、該児に1日あたり1～100mgの該リパーゼ/kg乳児体重の治療的有効量で経腸投与され、該児が該脂肪酸の吸収を増大させるための治療的処置を医学的に必要とする、薬学的組成物。

【請求項2】

不飽和脂肪酸が、

- 必須脂肪酸;
- 多価不飽和脂肪酸;
- 20個以上の炭素原子の脂肪族鎖を有する不飽和脂肪酸;および/または
- 20個以上の炭素原子の脂肪族鎖を有する多価不飽和脂肪酸(長鎖多価不飽和脂肪酸-LCPU FA)

からなる群より選択される、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項3】

前記少なくとも1種類の不飽和脂肪酸が、エイコサジエン酸(C20:2 n-6)、ジホモ-γ-リノレン酸(C20:3 n-6)、エイコサトリエン酸(C20:3 n-3)、アラキドン酸(C20:4 n-6)およびドコサヘキサエン酸(C22:6 n-3)、リノール酸(C18:2 n-6)、およびα-リノレン酸(C18:3 n-3)からなる群より選択される不飽和脂肪酸である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項4】

前記リパーゼ投与後に、該児の視覚発達および/または認知発達が改善される、請求項1～3のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記リパーゼが1日当たり5～50mgの該リパーゼ/Kg乳児体重、15～40mgの該リパーゼ/Kg乳児体重、または22.5～27mgの該リパーゼ/Kg乳児体重の量で投与される、請求項1～4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項6】

前記リパーゼが、脂肪供給源を含有する栄養成分(nutritional base)の投与の前に、投与の後で、または投与と同時に投与される、請求項1～5のいずれか一項記載の薬学的組成物。

10

【請求項7】

前記脂肪供給源が少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を含有するトリグリセリドである、請求項6記載の薬学的組成物。

【請求項8】

前記栄養成分が、乳児用調合乳および/または低温殺菌母乳である、請求項6または7記載の薬学的組成物。

【請求項9】

前記リパーゼが前記乳児用調合乳または低温殺菌母乳に0.03～0.5g/L調合乳または母乳の最終濃度まで添加される、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項10】

20

前記ヒト早産児が、第37週前に生まれたヒト早産児であるか、妊娠37週～32週、妊娠32週～25週、または妊娠25週～22週に生まれたヒト早産児である、請求項1～9のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項11】

前記リパーゼが少なくとも4日にわたって少なくとも1日1回の授乳と共に、少なくとも5日にわたって少なくとも1日1回の授乳と共に、少なくとも7日にわたって少なくとも1日1回の授乳と共に、1日当たりほとんどの授乳と共に、または全ての授乳について投与される、請求項1～10のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項12】

前記リパーゼが、少なくとも2週間、少なくとも3週間、または少なくとも4週間の期間にわたって投与される、請求項11記載の薬学的組成物。

30

【請求項13】

少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大が該児の発育速度の増大と同時に生じる、請求項1～12のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項14】

前記リパーゼが、
a. SEQ ID NO: 1を含むアミノ酸配列もしくはSEQ ID NO: 1によって示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を含む；
b. SEQ ID NO: 2の位置151～2316の配列を含む核酸から発現可能である；および/または
c. 組換えチャイニーズハムスター卵巢細胞株の発現産物から単離される、
請求項1～13のいずれか一項記載の薬学的組成物。

40

【請求項15】

前記リパーゼが、以下より選択される1つまたは複数の特徴によってさらに定義される、請求項1～14のいずれか一項記載の薬学的組成物：

- a. 該リパーゼが、他の乳タンパク質または乳成分を含まないか、または乳に固有の他の汚染物質を含まない；
- b. 該リパーゼが、70%を上回る純度、または80%、90%、もしくは95%を上回る純度を有する；
- c. 該リパーゼが、BSSL-MAMのグリコシル化レベルより小さい、および/またはrhBSSL-OVIのグリコシル化レベルより大きなグリコシル化レベルを有する；

50

d.該リパーゼが、BSSL-MAMのグリコシル化パターンとは異なる、および/またはrhBSSL-OV Iのグリコシル化パターンとは異なるグリコシル化パターンを有する；

e.該リパーゼが、90KDa～75KDa、84～86KDa、または85KDaの分子量を有する；ならびに/あるいは

f.SEQ ID NO: 1に示した配列によって示される完全長型と比較してC末端において1アミノ酸または2アミノ酸短い形態で存在するリパーゼ分子の量が、SEQ IDNO: 1に示した配列によって示される完全長型で存在するリパーゼ分子の量の50%より多い。

【請求項 16】

前記リパーゼが薬学的組成物中に含まれる、請求項 1～15のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる方法であって、前記乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ(rhBSSL)を経腸投与する工程を含む、方法に関する。別の局面において、本発明はまた、ヒト乳児の視覚発達および/または認知発達を改善する方法であって、前記乳児にrhBSSLを経腸投与する工程を含む、方法に関する。このような方法は、ヒト早産児、このような不飽和脂肪酸の吸収またはこのような不飽和脂肪酸に対する利用可能性を増大させることが医学的に必要な特定のヒト早産児に特に有用である。さらなる局面において、本発明は、それぞれの場合において、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させるのに有用な、またはヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達を増大させるのに有用な、キット、包装された薬学的製品、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ、および薬学的組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

出生時に、ヒト胎児はグルコース優位のエネルギー供給から脂質優位のエネルギー供給に切り替わる。なぜなら、脂肪、すなわち具体的にはトリグリセリド(TG)はヒト乳およびほとんどの乳児用調合乳の中の全エネルギーの半分を構成し、新生児の主要なエネルギー基質として役立つからである。従って、食事性TGの効率的な消化および吸収は乳児の发育および発達にとって重要である。

【0003】

成人において、コリパーゼ依存性膵臓リパーゼ(PTL)は食事性TGの消化を担う主な酵素である。新生児、特に、早産児において、外分泌膵機能は十分に発達していない(Manson & Weaver, 1997; Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 76: 206-211)。従って、乳児において、膵臓リパーゼの発現は成人膵臓と比較して低く(Lombardo, 2001; Biochim Biophys Acta, 1533: 1-28; Li et al 1007; Pediatr Res, 62: 537-541)、確立された脂肪消化中の腔内PTL活性は成人と比較してかなり低く(Fredrikzon et al, 1978; Paediatr Res, 12: 138-140)、脂肪吸収不良は珍しいことではない(Carnielli et al, 1998; Am J Clin Nutr 67: 97-103; Chappell et al, 1986; J Pediatr, 108: 439-443)。母乳栄養児において、低いPTL活性は特異性の広いリパーゼである胆汁酸活性化リパーゼ(BSSL)(EC3.1.1.13)によって補われる。胆汁酸活性化リパーゼは乳汁分泌乳腺から乳に分泌されるものと、外分泌膵臓から分泌されるものがある。早産児において、乳は、授乳中の十二指腸内容物にあるBSSLの大部分を提供するように見える(Fredrikzon et al, 1978)。

【0004】

脂肪吸収は健康なヒト成人において効率的なプロセスであり、食事性脂質の5%未満が糞便と一緒に排泄されるが(Carey & Hernell, 1992, Semin Gastrointest Dis, 3: 189-208)、早産児においては未熟以外の理由なく、20～30%と多くの(またはそれ以上の)食事性脂肪が排泄されることがある。しかしながら、脂肪吸収不良の程度は研究間および授乳タイプ間で大きく異なり、脂肪吸収率(CFA)は68%～91%と報告されていることに注目す

10

20

30

40

50

べきである(総説については、Lindquist & Hernell, 2010; Curr Opin Clin Nutr Met Care, 13: 314-320を参照されたい)。いくつかの研究から、熱処理(低温殺菌)されたヒト乳からのCFAは生乳からのCFAより低いことが分かっている(Andersson et al, 2007; Acta Paediatr 96: 1445-1449)。さらに、調合乳および乳の中の脂肪組成物が似ているのであれば、乳児用調合乳からのCFAはヒト生乳からのCFAより低い(Chappell et al, 1986)。しかしながら、CFAは脂肪酸(FA)の鎖の長さがC10:0からC18:0へと伸びるにつれて減少し、FAの二重結合の数、C18:0、C18:1、およびC18:2 n-6が増えるにつれて増加すると報告されているので(Lindquist & Hernell, 2010において報告されたAndersson et al, 2007)、全CFAを増加させるために、一部の調合乳には、多価不飽和FAに富む高濃度の中鎖トリグリセリド(MCT)または長鎖トリグリセリドが用いられる。ヒト乳および調合乳の両方から報告されたCFA範囲は広いことに注目すべきである。これは、一部には、与えられた脂肪の量および組成によって、一部には、早産児における食事性脂肪を利用する能力の大きな個体間差によって説明することができるが、CFAを正確に評価することがかなり難しいことも反映している(Hernell, 1999; J Pediatr, 136: 407-409)。

【0005】

ヒト乳および乳児用調合乳の中の脂質は主にエネルギー基質として用いられるが、不可欠な脂溶性ビタミンの担体でもあり、n-6系列およびn-3系列の必須脂肪酸、すなわち、それぞれ、リノール酸(LA)および α -リノレン酸(LNA)を提供する。ヒト乳および早産児を対象としたほとんどの調合乳はまた、LAおよびLNAに由来する長鎖多価不飽和脂肪酸(LCPUFA)である条件付き必須脂肪酸、例えば、それぞれ、アラキドン酸(AA)およびドコサヘキサエン酸(DHA)も提供する。

【0006】

コレステロール、リン脂質、およびリン脂質の構成要素であるLCPUFAなどの脂質の中には細胞膜の構成成分として役立つものもあり、膜成分としてのこれらの利用可能性および代謝が膜機能に直接影響を及ぼす。網膜および脳灰白質は特にLCPUFAに富み、神経の発達および機能は授乳によるLCPUFAの供給に依存する可能性があるが(Uauy & Dangour, 2009; Ann Nutr Metab 55: 76-96; Innis et al, 2009; J Pediatr Gastroenterol Nutr, 48: S16-S24)、このことは、最近、疑問視されている(Beyerlein et al, 2010; J Pediatr Gastroenterol Nutr, 50: 79-85)。ある特定のLCPUFAは遺伝子発現を調節し(Jump et al, 2008; Chem Phys Lipids, 153: 3-13)、エイコサノイド、例えば、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、およびつい最近発見されたドコサノイド、例えば、レゾルビン、ドコサトリエン、およびニューロプロテクチンの前駆体である(Serhan et al, 2004; Lipids, 39: 1125-1132; Serhan et al, 2008; Nat Rev Immunol, 8: 349-361)。従って、エネルギー基質として用いられる食事性脂質の量と食事性構造脂質供給の質が両方とも新生児の発育、発達、および機能に影響を及ぼすことは明らかである。

【0007】

例えば、2005年にMcCannおよびAmes(Am J Clin Nutr, 82: 281-295)によりまとめられたように、不飽和脂肪、特に、LCPUFAと視覚および/または認知の発達または機能との関係を考察した非常に多くの分析、研究、および総説が発表されている。実際に、全ての入手可能な証拠に基づいて、乳児用調合乳にはLCPUFAであるドコサヘキサエン酸(DHA)およびアラキドン酸(AA)が添加され、妊娠中および授乳中の女性の場合、推定されたLCPUFA要求量の増加および母体DHA状態と胎児/乳児DHA状態との関係を考慮して食事に食物DHA源を含めることが推奨されてきた(Koletzko et al, 2008; J Perinat Med, 36: 5-14)。

【0008】

胎児期の最後の三半期および小児期の最初の2年の間に、脳は「脳成長スパート(brain growth spurt)」と呼ばれる急速に発育する期間を経る。LCPUFA、特に、DHAおよびAAは、網膜および脳の細胞膜に高濃度にあるように脳成長スパート中に急速に蓄積する(Martinez, 1992; J Pediatrics, 120: 129-138)。視力の低下は、妊娠中に、網膜中DHA濃度を大幅に低下させる食事条件に供された霊長類およびげっ歯類の子孫において一貫して観察されてきた。ヒト検死研究から、母乳栄養児と無添加調合乳が与えられた乳児との間で、脳

灰白質中DHA濃度に約11%～40%の有意差があることが報告された(例えば、Byard et al, 1995; J Pediatric Child Health 31: 14-16)。無添加調合乳が与えられたヒト乳児における脳DHA濃度をLCPUFA添加調合乳が与えられたヒト乳児における脳DHA濃度と比較した直接的な検死証拠は得られていない。しかしながら、非ヒト霊長類における検死試験から、無添加調合乳が与えられた早産児の視覚皮質中DHA濃度はLCPUFA添加調合乳が与えられた乳児より約30%低いことが報告された(Sarkadi-Nagy et al, 2003; Pediatric Res 54: 244-252)。ヒトにおいて、無添加調合乳比較群と添加調合乳比較群との間の血漿中DHA濃度および血漿中AA濃度の有意差は詳細に記録に残されている(例えば、Boehm et al, 1996; Eur J Pediatr 155: 410-416)。

【0009】

10

げっ歯類を用いて、精神成績とLCPUFAとの関係を調べた多くの実験研究が行われている。多くの初期研究から、発達中にn-3脂肪酸が厳しく制限された飼料と、認知能力または行動能力を測定するようにデザインされた試験における子孫の低成績との関係が示唆された(例えば、Wainright, 1992; Neurosci Behav Res 16: 193-205において概説される)。さらに、McCannおよびAmesは、n-3制限動物にDHA、DHA+AA、DHAに富む油、またはDHAおよびさらなるn-6脂肪酸を添加し、これらの動物の成績をn-3制限対照の成績と比較した8つの研究を調査した。これらの研究は全て、添加群における成績が有意に向上したと報告した。

【0010】

McCannおよびAmesはまた、20年以上に及ぶ母乳栄養研究の部分的に重複する一部を批判的に評価した、1999年から公表された5つの系統的レビューも検討した。これらのレビューに含まれる研究のほとんどは、母乳栄養を受けた小児の成績と調合乳が与えられた小児の成績を比較した。共変量について調整を行う前に、これらの研究のほとんどは母乳栄養を受けた小児の成績試験において高いスコアを報告した。

20

【0011】

母乳栄養観察研究により得られた因果関係の問題に関する情報は関連性があるが、限定的である。無作為化対照試験によって、LCPUFAサプリメントの分量および組成を含む実験変数をコントロールするために観察研究より非常に多くの機会が得られる。さらに、このデザインによって、母乳栄養観察研究の解釈を複雑にする潜在的な交絡因子の多くを回避する機会が得られる。無作為化臨床試験において、Willattsおよび共同研究者ら(1998; The Lancet, 352: 688-691)は、4ヶ月までLCPUFA添加調合乳が与えられた乳児が10ヶ月で試験された時に、無添加調合乳が与えられた乳児より有意に多くの意図的な解答を出したことが観察された。これらの結果に基づいて、著者らは、乳児がLCPUFA添加から利益を得る可能性があり、これらの効果が添加期間を過ぎても持続すると示唆した。さらに、乳児期における高い問題解決スコアは高IQスコアと関連するので、彼らは、添加が小児知能の発達に重要な可能性があるとして推測した。別の無作為化臨床試験(Birch et al, 2000; Dev Med Child Neurol, 42: 174-181)では、乳児用調合乳へのDHA+AAの添加は、乳児発達用ベリー尺度、第2版試験(BSID-II)の精神発達指数(Mental Development Index)(MDI)において7ポイントの平均増加と関連づけられた。MDIの認知下位尺度および運動下位尺度は両方とも、DHA添加群およびDHA+AA添加群の発達年齢が対照群より有意に優位に立っていることを示した。言語下位尺度について同様の傾向が得られたが、統計的有意性に達しなかった。4ヶ月時の血漿-DHAおよび赤血球-DHAと18ヶ月時のMDIとの有意な相関関係から、食事による早期DHA供給がMDI成績改善の食事に関する主な決定要因だと示唆されたが、12ヶ月時の血漿-DHAおよび赤血球-DHAと18ヶ月時のMDIとの相関関係から、食事による早期DHA供給がMDI成績改善の主な食事決定要因だと示唆されなかった。しかしながら、最近、4つの大規模な臨床試験のメタ解析から、18ヶ月時のベリー試験により評価された時に、DHA添加調合乳は無添加調合乳と比較して乳児発達に対して効果がないことが分かった(Bayerlein et al, 2010)

30

40

【0012】

ヒトの正常妊娠期間は約40週(38～42週)であり、WHOは、未熟児を、最終月経期の初日

50

から数えて第37週前に生まれた赤ん坊と定義している。未熟児は多数の健康問題を受けやすく、多くが新生児集中治療室(NICU)において特殊な治療を必要とする。しかしながら、正常な子宮発育が脳の初期成長の点で極めて重要な場合があり、早産が低いIQおよび発達スキルにつながる可能性があるといった提案は特に意義があった(Cook, 2006; Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 91: 17-20)。妊娠33週前に生まれた個体は、青年期まで顕著な脳容積減少および著しい側方脳室容積増加を示し続ける(Nosarti et al, 2002; Brain, 125: 1616-1623)。このような神経学的変化が原因かどうかは議論の余地が残されている。しかしながら、学生生活における追跡調査中に、5歳時での認知機能低下および神経運動機能低下は在胎齢が低下するにつれて増加することが分かっている。これらの小児の多くは高度の特別支援を必要とする(Larroque et al, 2008; Lancet, 8;371: 813-820)。特に、妊娠24~28週で生まれた乳児の約半分は5歳時にこのような身体障害を有し、その後(妊娠29~32週)に生まれた乳児では、約1/3が5歳時にこのような身体障害を有する(Marlow et al, 2005; N Engl J Med, 352: 9-19)。さらに、他の研究から、在胎齢と行動問題および精神運動問題が関係することが分かっている。例えば、リバプール(UK)からの試験は、第32週前に生まれ、かつ通常の学校に行くのに十分に健康な7歳および8歳の小児に注目し、学校の小児のクラスにいる、ほぼ同じ産後年齢の正期産児と比較した(Foulder-Hughes & Cooke, 2003; Dev Med Child Neurol, 45: 97-103)。この試験から、(i)早産児の運動機能低下の発生率は高く、早産児の知能が正常であっても、このことが学校での成績に影響を及ぼす;(ii)クラスメートの6%と比較して30%以上に協調運動発達障害(DCD)がある;(iii)早産児は過活動になる、容易に注意散漫になる、衝動的になる、混乱する、および辛抱強さに欠ける可能性が有意に高いことが示唆された。彼らはまた能力を過大評価する傾向があった。(iv)注意欠陥多動障害(ADHD)は早産児の8.9%において見られ、対照の2%にしか見られなかった。しかしながら、歴史的な研究と比較して、最も未熟であった小児が必ずしも最低スコアの小児とは限らなかったことに注目した。重大な身体障害が低減したが、新生児の治療の改善にもかかわらず、この試験において試験された身体障害のレベルが10または20年前に生まれた小児において見られた身体障害のレベルより小さいようには見えなかった。

【0013】

前記のように、出生時に脾機能および肝機能は十分に発達しておらず、このことは、未熟児では特に顕著である。最近、LindquistおよびHernell(1990; Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 13: 314-320)は人生の早期における脂質消化および脂質吸収というテーマを詳しく調べた。母乳栄養児は、脂肪(重要なことに、LCPUFA)を、調合乳が与えられた乳児より効率的に消化および吸収する(Bernback et al., 1990; J Clin Invest, 85: 1221-1226; Carnielli et al., 1998)。類似した脂肪組成の乳児用調合乳に加えて、母乳も、ヒト乳からの極めて効率的な脂肪吸収を促進する特異性の広いリパーゼである胆汁酸活性化リパーゼ(BSSL)(EC3.1.1.13)を含有する。

【0014】

BSSLは、ほとんどのリパーゼより広い基質特異性を有すると考えられている。この酵素は、TGの3つ全ての脂肪酸だけでなく、脂溶性ビタミンエステル、例えば、ビタミンAならびにコレステリルエステルも完全に加水分解することができる。従って、BSSLは腔内脂肪分解を完了させ、グリセロールおよび長鎖多価不飽和脂肪酸を含む遊離脂肪酸(FFA)を形成する(Hernell, 1975; Eur J Clin Invest, 5: 267-272; Bernback et al, 1990; Hernell et al, 1993; J Pediatr Gastro Nutr, 16: 426-431; Chen et al, 1994; Biochem Biophys Acta, 1210: 239-243)。BSSLはpH8~8.5で最適活性を示し、酸性環境では脾臓リパーゼより安定している。BSSLは生理学的濃度でペプシンによる分解に耐性がある。BSSLは乳中の総タンパク質の約1%を占め、0.1~0.2g/Lの濃度で存在する(Blackberg et al, 1987; FEBS Lett, 217: 37-41; Wang & Johnson, 1983; Anal Biochem, 133: 457-461; Stromqvist et al, 1997; Arch Biochem Biophys, 347: 30-36)。ヒト乳中のBSSLレベルは一日を通してほぼ同じであり(Freed et al., 1986; J Pediatr Gastroenterol Nutr, 5: 938-942)、ヒト乳中のBSSL産生は少なくとも3ヶ月間、維持されるが(Hernell et al., 1977

; Am J Clin Nutr, 30: 508-511)、BSSL濃度は授乳期間と共に低下することがある(Torres et al., 2001; J Natl Med Assoc, 93: 201-207)。トリグリセリドはヒト乳または調合乳の全脂質の約98%以上を構成し、それによって、エネルギー含有率の約50%を占める。

【0015】

TGおよびBSSLの(現実的には)複合の供給源として新鮮なヒト乳を用いて、HallおよびMuller(1982; Pediatr Res 16: 251-255)は、BSSLにはTGの異なる脂肪酸に対する特異性がほとんどないと結論づけた。対照的に、一酸(monoacid)TGの等モル混合物(の人工系)を用いて、Wangおよび共同研究者ら(1983; J Biol Chem, 259: 9197-9202)は、BSSLが長鎖より容易に短鎖TGを加水分解し、C18:2脂肪酸がC18:1およびC18:0より速く加水分解されたと示唆した。Jensenおよび共同研究者ら(1985; J Pediatr Gastroenterol Nutr, 4: 580-582)は、C18:2脂肪酸の加水分解を優先するように非対称TG加水分解が偏っているという証拠を得た。Hernellおよび共同研究者ら(1993; J Pediatr Gastroenterol Nutr, 16: 426-431)は放射性標識ラット由来カイロミクロンを用いて、BSSLが、LA(C18:2 n-6)もしくはAA(C20:4 n-6)の加水分解、またはAAおよびエイコサペンタエン酸(C20:5 n-3)の加水分解を区別しないと結論づけた。類似のアッセイにおいて、Chenおよび共同研究者ら(1994; Biochim et Biochphys Acta, 1210: 239-243)は、BSSLがDHA脂肪酸(C22:6 n-3)を加水分解したが、C18:1またはAAより非効率的に加水分解したという証拠を入手し、BSSLが、DHAエステルまたはAAエステルを含有する乳TGの、遊離脂肪酸およびグリセロールへの十二指腸における加水分解の完了において生理学的役割を有し得ると推測した。

【0016】

ヒト乳が満期産児ならびに早産児の栄養源として優れていることは多くの研究および多くの専門家グループの勧告において示されている。従って、世界中で推奨される栄養法は母乳栄養である。しかしながら、母乳栄養も母親自身の母乳を与えることも必ずしも可能だとは限らず、医学的な理由で推奨されるとは限らない。母乳栄養は、他の多くの理由により、それぞれの場合において本明細書の他の場所に議論されるように実施されないことがある。乳児が母乳栄養されていない場合、乳児用調合乳、または母乳バンクにある、および母乳バンクにない低温殺菌母乳および/もしくは冷凍母乳が用いられることが多い。しかしながら、全てのものが、いくつかの点で新生児にとって栄養的に最適ではない。

【0017】

ウイルス感染(ヒト免疫不全症ウイルス[HIV]、サイトメガロウイルス[CMV]、肝炎)およびより少ない程度で病原性細菌伝播のリスクのために、いわゆる母乳バンクにおいて用いられるドナー乳は一般的に使用前に低温殺菌される。しかしながら、BSSLはヒト乳の低温殺菌中に不活性化される(Bjorksten et al., 1980; Br Med J, 201: 267-272)。また、BSSLは、早産児または正期産児の栄養摂取のために存在する多くの異なる調合乳のいずれにも存在しない。新鮮な母乳が与えられた乳児における脂肪吸収、体重増加、および直線的成長は低温殺菌母乳と比較して高いことが示されている(Andersson et al. 2007; Williams et al., 1978; Arch Dis Child 43: 555-563)。これは、母乳を与えることができない新生児乳児、特に早産児には他の母親からの非低温殺菌乳を与えるべきだと唱えられてきた理由の1つである(Bjorksten et al., 1980)。

【0018】

Hamosh (1983; J Ped Gastro Nutr, 2: 248-251)は、BSSL酵素活性が、26~30週で分娩した女性の新鮮な母乳に存在すると報告した。この報告では、-20℃または-10℃で保管された乳標本はBSSL活性消失が遅いが、-10℃でたった3週間、保管された後でも活性に対する胆汁酸依存性の消失が顕著であり、このことは-20℃での母乳保管中でも乳脂質が加水分解される一因となり得るとさらに述べられた。

【0019】

乳胆汁酸活性化リパーゼは、ある特定の種、すなわち、ヒト、ゴリラ、ネコ、およびイヌの乳の中にしか発見されていない(Freed, et al., 1986; Biochim Biophys Acta, 878: 209-215)。乳胆汁酸活性化リパーゼは、ウシ、ウマ、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、アカゲザルによって産生されない(Blackberg et al., 1980; Freudenberg, 1966; Experien

tia, 22: 317)。

【0020】

BlackbergおよびHernell (1981; Eur J Biochem, 116: 221-225)ならびにWang およびJohnson (1983)に報告されたように、天然ヒト乳BSSL(hBSSL-MAM)が均一になるまで精製されており、ヒトBSSLのcDNA配列がNilsson (1990; Eur J Biochem, 192: 543-550)によって同定され、W091/15234およびW091/18923に開示された。いくつかの研究室からの特徴付けおよび配列研究によって、タンパク質hBSSL-MAMおよび臍臓カルボキシルエステル加水分解酵素(CEH)(臍臓BSSLとも知られる)はいずれも同じ遺伝子の産物であると結論づけられた(例えば、Baba et al., 1991; Biochem, 30: 500-510 Hui et al., 1990; FEBS Lett, 276: 131-134; Reue et al., 1991; J Lipid Res, 32: 267-276)。

10

【0021】

cDNA配列が単離された後に、US5716817、W094/20610、およびW099/54443に記載のように、トランスジェニックヒツジ(rhBSSL-OVI)を含めて、組換えヒトBSSL(rhBSSL)ならびにその変種が産生されている。トランスジェニック動物を用いた治療用タンパク質の産生は大きな安全上、学術上、規制上、および倫理上の抵抗にあってきた。実際に、現在に至るまで米国市場でもEU市場でもトランスジェニックヒツジから産生された治療製品は認可されておらず、他のトランスジェニック動物から産生された医療製品は、トランスジェニックヤギから産生されたATRYN(組換え抗トロンビン)、およびトランスジェニックウサギから産生されたRUCONEST(組換え成分1エステラーゼ阻害剤)の2つしか今までに認可されていない。このように産生された(乳腺組織において発現され、乳の中に排出された)タンパク質は、乳清タンパク質などの、これらの動物の乳に天然に見られる成分、または非ヒトの乳タンパク質もしくは乳清タンパク質が夾雑することがあり、このようなタンパク質は、ヒト使用のために、ある個体において、例えば、乳をベースとする成分または製品に対して不耐性またはアレルギーの個体において使用される場合に安全上の問題を引き起こすことがある。

20

【0022】

新鮮なヒト母乳がヒト乳児に最も適した食品であると長く奨励されてきた。これは、3週間連続して未処理ヒト乳、低温殺菌ヒト乳、および煮沸ヒト乳をそれぞれ1週間与えた、3~6週齢の7人のVLBW早産児(1.3Kg未満)の実験研究において、ヒト乳の熱処理によって脂肪吸収が(未処理ヒト乳と比較して)約1/3になったことを示したWilliams et al (1978)による初期研究などの研究に基づいている。この研究により、熱処理ヒト乳と比較した未処理ヒト乳における脂肪吸収の改善は乳リパーゼの保存に関連し得ることが示唆された。この研究が、未処理乳が与えられた週の間には全ての乳児の体重が最も急速に増加したと述べたことに注目すべきである。この期間の間に、体重増加の平均(1週間当たりの増加g/週/摂取された乳100mLで報告された)は、低温殺菌乳または煮沸乳が投与されたほぼ同じ期間より約1/3多かった。Alemi(1980; Pediatrics.68:484-489)により報告されたさらに大規模な(しかし、短期間の)試験では、出生時体重660~1,695gおよび在胎齢26~33週で生まれた15人のVLBW児において脂肪排泄が研究された。この試験は生後7~44日で開始した。ヒト乳および調合乳の混合物が72時間、与えられた乳児の脂肪排泄は、調合乳しか与えられなかった乳児と比較して少なかった。つい最近、Anderssonおよび共同研究者ら(2007)は、無作為化試験において、母乳の低温殺菌によって早産児における脂肪吸収および発育が低下したと報告し、これらの作用が、低温殺菌による乳をベースとするBSSLの不活性化によるものだったと提唱した。前記を含む多数の試験から、ヒト乳および調合乳の両方から報告された脂肪吸収率(CFA)の範囲が広いことに注目すべきである。これは、一部には、与えられた脂肪の量および組成によって、一部には、早産児における食事性脂肪を利用する能力の大きな個体間差によって説明することができるが、CFAを正確に評価することがかなり難しいことも反映している(Hernell, 1999; J Pediatr, 136: 407-409)。

30

40

【0023】

ある動物モデル試験は、新生児用食品に外因性BSSLを添加することによって乳児発育に対する効果を調べようと試みた(Wang et al., 1989; Am J Clin Nutr, 49: 457-463)。こ

50

の試験は、仔ネコ用調合乳(牛乳と3:1で混合した)に精製ヒトBSSL(0.1mg/mL)を添加し、6匹の仔ネコに5日間哺乳瓶で与えることを伴った。この試験では、hBSSLが添加された仔ネコ用調合乳が与えられた仔ネコの発育速度は調合乳のみが与えられた仔ネコの発育速度の2倍であると報告された。調合乳に牛乳が添加され、仔ネコは早産仔でも低出生体重仔でもなく、生まれて最初の48時間は母乳栄養され、この試験は精製された天然hBSSLを用いて行われたことに注目すべきである。著者らは、仔ネコを、BSSLの機能的役割の調査における動物モデルとして利用することができたと示唆した。この試験に基づいて、(他の局面の中で)以下:胆汁酸活性化リパーゼが乏しい脂肪含有乳児用調合乳を強化するための方法であって、調合乳からの脂肪吸収および乳児発育を増大させるために、乳胆汁酸活性化リパーゼ[BSSL]および胆汁酸活性化膵臓カルボキシエステラーゼ[現在ではBSSLとも知られる]からなる群より選択される、有効量の単離された胆汁酸活性化リパーゼを調合乳に添加する工程を含む、方法;ならびに脂肪を含む第1の供給源からの食事成分を乳児に与えるための方法であって、成分中にある脂肪の乳児による消化および吸収を改善し、乳児の発育を高めるのに十分な量の、乳胆汁酸活性化リパーゼ[BSSL]および胆汁酸活性化膵臓カルボキシエステラーゼ[BSSLとも知られる]からなる群より選択される単離された胆汁酸活性化リパーゼを乳児に投与する工程からなり、リパーゼは第2の供給源に由来する、方法を開示する関連特許出願(US4944944、EP0317355、およびEP0605913を含む)が出願された。脂肪吸収の改善を裏付けるデータも、ヒト乳児が関与した試験から得られたデータも開示されなかった。Lindquist および Hernell (2010)によって別の試験(Lindquist et al., 2007; J Pediatr Gastroenterol Nutr 44: E335)が報告されており、BSSLノックアウト雌親によって育てられているBSSLノックアウトマウス仔に精製ヒトBSSLを人工的に与えると正常な脂肪吸収が回復し、腸障害の形成が阻止された。

【0024】

hBSSL cDNAのクローニングおよび多量の組換えヒトBSSL(rhBSSL)を産生する様々なアプローチの開示の後に、rhBSSLを含む様々な乳児用調合乳(例えば、US5200183、W091/15234、W091/18923、およびUS5716817)、ならびに乳児用サプリメントとしての、食事性脂質の改善、脂肪吸収不良、ある特定の膵臓異常、および嚢胞性線維症の治療(例えば、W091/18923、W094/20610、およびW099/54443)のための、このような調合乳またはrhBSSLの様々な方法または使用に対して、非常に多くの開示およびクレームがなされた。しかしながら、示唆に富む先行研究と同様に、ヒト乳児に組換え胆汁酸活性化リパーゼを与えた実験から得られた、裏付けとなるデータは開示されていない。実際に、1996年になっても、これらの示唆、共同研究および開示、この分野における主要研究者は、依然として、「調合乳を与えている乳児にヒト乳の生理活性成分[例えば、BSSL]を与えるべきなのか?」と疑問を唱え、さらには、「消化酵素[例えば、BSSL]を与えた試みに関するデータがない」と述べている(Hamosh, at Symposium: Bioactive Components in Milk and Development of the Neonate: Does Their Absence Make a Difference? Nutr, 12: 971-974; 1997において報告された)。つい最近、Anderssonおよび共同研究者ら(2007)は、低温殺菌乳に組換えヒト乳BSSLを添加すると乳の内因性脂肪分解活性が回復する可能性があるかと推測した。

【0025】

722アミノ酸の天然BSSLは高度にグリコシル化され(30~40%炭水化物)(Abouakil et al., 1989; Biochem Biophys Acta, 1002: 225-230)、この分子のC末端部分には広範囲のOグリコシル化部位があり、BSSLの最も豊富な形態ではO結合型炭水化物を有する11残基からなる16プロリンリッチリピートを含有する(Hansson et al., 1993; J Biol Chem, 268: 26692-26698)。広範囲のO-グリコシル化の役割は証明されていないが、その配列組成に基づいて、大きなC末端テールは親水性が非常に高く、到達可能であると予測されている(Wang et al, 1995; Biochemistry, 34: 10639-10644)。

【0026】

グリコシル化パターンの差は、多くのタンパク質、特に、医学において用いられるタンパク質の活性または他の特性において著しい差を有することがある。例えば、ARANESP(ダルベポエチン α)は、この分子に3つではなく5つのN結合型オリゴ糖鎖を提供し、薬物動態

学的特性を大幅に変える2アミノ酸だけPROCRT(エポエチン α)と異なる、特異的に操作されたエリスロポエチン変種である。ダルベポエチンはエポエチンと比較して血清半減期が3倍延長し、インビボ活性が増加している(Sinclair and Elliot, 2005; J Pharm Sci 94: 1626-1635)。

【0027】

異なる組換え産生系(例えば、哺乳動物細胞、酵母、トランスジェニック動物)、および同じ発現系からの産生プロセスの一見小さな変化でさえも同じタンパク質/ポリペプチド配列のグリコシル化の変化につながることもある。例えば、組換えヒト α -ガラクトシダーゼAはファブリー病の酵素補充療法において用いられる。市販製剤は2つの手法で製造され、同じアミノ酸配列を有するが、それぞれが異なるグリコシル化パターンを有する:REPLAGAL(アガルシダーゼアルファ)およびFABRAZYME(アガルシダーゼベータ)。REPLAGALは連続したヒト線維芽細胞株において産生されるのに対して、FABRAZYMEはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において産生され、それぞれの製品のグリコシル化は異なる。CHO細胞から産生された他のタンパク質と同様に、FABRAZYMEはシアリル化(sialyated)糖タンパク質であり、REPLAGALと比較してシアリル化(sialylation)およびリン酸化の程度が異なる(Lee et al, 2003; Glycobiology, 13: 305-313)。天然ヒト糖タンパク質と比較して、CHO細胞において産生された糖タンパク質のシアリル化の定性的および定量的な差は、生体内分布レベルおよび免疫原性の強さが原因で生じた結果である。実際に、アガルシダーゼベータで治療されたほぼ全ての患者においてIgGの存在が報告されたのに対して、アガルシダーゼアルファで治療された患者の55%しかIgGの存在が報告されていない(Linthorst et al, 2004; Kidney Int, 66: 1589-1595)。さらに、場合によっては、アガルシダーゼベータを用いた治療に対するアレルギー型反応と、循環中のIgEの存在および/または陽性皮内反応が報告されている(Wilcox et al, 2004; Am J Hum Genet, 75: 65-74)。

【0028】

実際に、これらのペプチドマップは非常に似ているが、天然BSSLのグリコシル化パターンは、マウスC127およびハムスターCHO細胞株において産生されたrhBSSLのグリコシル化パターンとはかなり異なり、コンカナバリン、トウゴマ(Ricinus communis)アグルチニン、およびアレウリア・アウランチア(Aleuria aurantia)アグルチニンを含む、ある特定のレクチンに結合する能力の点でも異なる。このことは、天然BSSLが、組換え型よりかなり多くのフコースおよび末端 β -ガラクトース残基を含有することを示唆している(Stromqvist et al., 1995; J Chromatogr, 718: 53-58)。Landberg et al(1997; Arch Biochem Biophys 344:94-102)はこれらの2つの組換え型をさらに特徴付け、両組換え型とも総単糖のモルパーセントが低く(C127によって産生されたrhBSSLについては20%、CHOによって産生されたrhBSSLについては15%であるのに対して、天然hBSSLについては23%)、天然hBSSLが、ある特定のルイス抗原検出抗体と反応したが、C127-rhBSSLが反応しなかったと報告した。

【0029】

前記で報告された、C127によって産生されたrhBSSLおよびCHOによって産生されたrhBSSLは、分子量、グリコシル化、およびレクチン結合の点で互いにおおむね似ていた。対照的に、トランスジェニックマウスの乳から単離されたrhBSSLはサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)において少ない見かけの分子量を示し、レクチンパネルと検出可能な相互作用を示さなかった。このことから、トランスジェニックマウスからの乳中のrhBSSLの0-グリコシル化の程度は他の組換え型で見られたものよりかなり低いことが分かる(Stromqvist et al., 1996; Transgen Res 5: 475-485)。

【0030】

ある特定の形態のrhBSSLを用いて行われた特定の適応症における臨床研究、すなわち、慢性膵炎または嚢胞性線維症(CF)による外分泌膵機能不全(PI)の初期探索的研究が報告されている。2004年に、通常用量または25%投与量で与えられたCreonのみと比較して、補助物質として0.2gまたは1gの単回投与量のrhBSSLがCreon通常用量の25%に添加された時に、PIのあるCF患者(12~39歳)の脂質取り込みが迅速かつ効率的になることを示した第II

相試験が報告された(Strandvik et al, 2004; 18th North American Cystic Fibrosis Conference, St Louis MI; Pediatr Pulmonolに掲載されたアブストラクト, S27: 333)。2005年に、別の第II相試験の結果が報告され、rhBSSLは、PIに罹患しているスウェーデン人CF患者群の脂肪消化能力を大幅に改善した(Biovitrumからのプレスリリース、Strandvik et al, 2005; 28th European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Conference, Creteにおいて報告)。両臨床試験において、これらの臨床結果はrhBSSL-OVIを用いて得られた。つい最近、CFおよびPIの成人患者における脂肪吸収に対する効果を評価するためにrhBSSL(この中では「ブセリパーゼ(bucelipase)アルファ」と述べられている)経口懸濁液が5～6日間にわたって1日3回、170mgで投与された、さらなる第II相試験が完了したと発表されたが、これから効力結果は現在に至るまで公表されていない(clinicaltrials.gov識別子NCT00743483)。

10

【0031】

rhBSSLを用いた2つの第II相試験が計画され、かつ進行中であることが少なくとも2008年から開示されており、それぞれ、32週在胎齢の前に生まれ、乳児用調合乳(clinicaltrials.gov識別子NCT00658905)または低温殺菌母乳(clinicaltrials.gov識別子NCT00659243)に添加された0.15g/L rhBSSLまたはプラセボで1週間、治療された早産児における脂肪吸収率ならびに身長および体重の変化の調査を目的としている。

【0032】

従って、先行技術、および長年にわたる切実な解決の必要性を考慮して、本発明の目的は、ヒト早産児などのヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸、例えば、必須脂肪酸またはLCPUFAの吸収を増大させる方法を提供することである。前記方法は、以下を含む先行技術の欠点の1つまたは複数の克服をするはずである：活性成分を確実にかつ/もしくは再現可能に大量に産生することができる；活性成分が学術的、規制の、および/もしくは倫理的に許容される方法によって製造されている；ならびに/または前記方法もしくは前記方法において用いられた活性成分が、ヒト乳児が参加した無作為化臨床試験において有効かつ安全であると証明される。

20

【0033】

前記技術的問題に対する解決は、本明細書および/または特許請求の範囲において定義された、または他のやり方で開示された本発明の様々な局面および態様によって提供される。

30

【発明の概要】

【0034】

概要

1つの局面において、本発明は、ヒト乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる方法に関する。

【0035】

別の局面において、本発明は、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするヒト乳児を治療するための治療方法であって、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を医学的に必要とする乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、方法に関する。

40

【0036】

さらに別の局面において、本発明はまた、ヒト乳児の視覚発達および/または認知発達を改善する方法であって、前記乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、方法に関する。

【0037】

本発明の別の局面は、(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための、および/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/または認知発達の改善において使用するための、改良された乳児用調合乳または改良された母乳を調製するためのキットに関する。前記キットは、以下の成分：

a. 第1の量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ、例えば、凍結乾燥製剤の形をした第1の量

50

の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む、少なくとも1つの第1の容器;および
b. 第2の量の改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳を含む、第1の容器とは異なる少なくとも1つの第2の容器
を含み、

前記リパーゼおよび前記改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳はそれぞれ、前記改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳が前記乳児に与えられた時に、例えば、少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために、または少なくとも約7日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために前記乳児に与えられた時に、(a)前記乳児による前記不飽和脂肪酸の吸収を増大させる;ならびに/または(b)前記乳児の視覚発達および/もしくは認知発達を改善するのに有効な量の前記リパーゼを含む、改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳をそれぞれ調製するのに十分な量である、キットに関する。前記キットは、

c. (A)前記乳児が(a)少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とする、または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするものとする;ならびに/あるいは(b)視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とする、または視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とするものとする;ならびに/あるいは(B)組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが臨床試験において有効かつ安全だと示され、かつヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる(または他のやり方でヒト乳児に対する利用可能性を増大させる)と示されていると説明している、説明書をさらに含む。

【0038】

さらに別の局面において、本発明は、(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる;および/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達を改善する方法であって、

i. 組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む、改良された乳児用調合乳もしくは改良された低温殺菌母乳を調製する工程もしくは他のやり方で提供する工程、または本発明のキットを使用することによって、改良された乳児用調合乳もしくは改良された低温殺菌母乳を調製する工程;

ii. このように調製された、または他のやり方で提供された改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を前記乳児に与える工程;ならびに

iii. 少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために、または少なくとも約7日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために前記工程を繰り返す工程
を含む、方法に関する。

【0039】

なおさらなる局面において、本発明は、ある量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む薬学的組成物を含む、包装された薬学的製品であって、

i. ある量の前記リパーゼを含有する改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を調製する工程;および

ii. 前記改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳をヒト乳児に与えることによって、例えば、少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために、または少なくとも約7日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために前記改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳をヒト乳児に与えることによって、前記量のリパーゼを経腸投与する工程
について説明し、

(A)前記乳児が(a)少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とする、または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするものとする;ならびに/あるいは(b)視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とする、または視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とするものとする;ならびに/あるいは(B)組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが臨床試験において有効かつ安全だと示され、かつヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸

収を増大させる(または他のやり方でヒト乳児に対する利用可能性を増大させる)と示されていると説明している、説明書をさらに含む、包装された薬学的製品に関する。

【0040】

特定の局面において、本発明はまた、(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための;ならびに/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善において使用するための組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼに関する。

【0041】

別の特定の局面において、本発明はまた、(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための;ならびに/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善において使用するための、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む薬学的組成物に関する。

10

[本発明1001]

ヒト乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、該乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる方法。

[本発明1002]

不飽和脂肪酸が、

a. 必須脂肪酸;

b. 多価不飽和脂肪酸;

c. 20個以上の炭素原子の脂肪族鎖を有する不飽和脂肪酸;および/または

d. 20個以上の炭素原子の脂肪族鎖を有する多価不飽和脂肪酸(長鎖多価不飽和脂肪酸-LC PUFA)

20

からなる群より選択される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記少なくとも1種類の不飽和脂肪酸が、エイコサジエン酸(C20:2 n-6)、ジホモ- γ -リノレン酸(C20:3 n-6)、エイコサトリエン酸(C20:3 n-3)、アラキドン酸(C20:4 n-6)およびドコサヘキサエン酸(C22:6 n-3)、リノール酸(C18:2 n-6)、および α -リノレン酸(C18:3 n-3)からなる群より選択される不飽和脂肪酸であり、好ましくは、該不飽和脂肪酸がアラキドン酸(C20:4 n-6)および/またはドコサヘキサエン酸(C22:6 n-3)である、本発明1001の方法。

30

[本発明1004]

前記リパーゼ投与後に、乳児の視覚発達および/または認知発達が改善される、本発明1001~1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記リパーゼが1日当たり1~100mgの該リパーゼ/Kg乳児体重、5~50mgの該リパーゼ/Kg乳児体重、15~40mgの該リパーゼ/Kg乳児体重、または約22.5~27mgの該リパーゼ/Kg乳児体重の量で投与される、本発明1001~1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

乳児に新鮮な母乳が与えられない、本発明1001~1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

最初に前記リパーゼが乳児用調合乳または低温殺菌母乳に添加され、次いでこれが乳児に与えられ、それによって該リパーゼが経腸投与される、本発明1001~1006のいずれかの方法。

40

[本発明1008]

前記リパーゼが乳児用調合乳または低温殺菌母乳に0.03~0.5g/L調合乳または母乳の最終濃度まで添加され、好ましくは、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に0.05~0.3g/L調合乳もしくは母乳、0.1~0.2g/L調合乳もしくは母乳、または約0.15g/L調合乳もしくは母乳の最終濃度まで添加される、本発明1007の方法。

[本発明1009]

ヒト乳児がヒト早産児であり、好ましくは、該ヒト早産児が、約第37週前に生まれたヒ

50

ト早産児であるか、妊娠約37週～約32週、妊娠約32週～約25週、または妊娠約25週～約22週に生まれたヒト早産児である、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

前記リパーゼが少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳と共に、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳と共に、または少なくとも約7日にわたって少なくとも1日1回の授乳と共に投与され、好ましくは、1日当たりほとんどの授乳と共に、または全ての授乳について投与される、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記リパーゼが、少なくとも約2週間、少なくとも約3週間、または少なくとも約4週間の期間にわたって投与される、本発明1010の方法。

10

[本発明1012]

少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大が乳児の発育速度の増大と同時に生じ、好ましくは、該発育速度の増大が該乳児の体重増加速度の増大であり、最も好ましくは、該ヒト乳児の体重増加速度が約10～30gの体重増加/該乳児体重Kg/日(g/Kg/日)、約15～25g/Kg/日、または約20g/Kg/日、または約18g/Kg/日である、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記リパーゼが、
a. SEQ ID.NO.1を含むアミノ酸配列もしくはSEQ ID.NO.1によって示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を含む；
b. SEQ ID.NO.2の位置151～2316の配列を含む核酸から発現可能である；および/または
c. 組換えチャイニーズハムスター卵巢細胞株の発現産物から単離される、
本発明1001～1012のいずれかの方法。

20

[本発明1014]

前記リパーゼが、以下より選択される1つまたは複数の特徴によってさらに定義される、本発明1001～1013のいずれかの方法：
a. 該リパーゼが、他の乳タンパク質または乳成分、例えば乳カシンおよび乳清タンパク質、例えばラクトフェリンを含まないか、または乳に固有の他の汚染物質を含まない、特に、このような乳由来タンパク質もしくは他の汚染物質がヒト、ヒツジ、もしくはマウスの乳に由来する；
b. 該リパーゼが、約70%を上回る純度、約80%、90%、または95%を上回る純度を有する；
c. 該リパーゼが、BSSL-MAMのグリコシル化レベルより小さい、および/またはrhBSSL-OVIのグリコシル化レベルより大きなグリコシル化レベルを有する；
d. 該リパーゼが、BSSL-MAMのグリコシル化パターンとは異なる、および/またはrhBSSL-OVIのグリコシル化パターンとは異なるグリコシル化パターンを有する；
e. 該リパーゼが、90KDa～75KDa、約84～86KDa、または約85KDaの分子量を有する；ならびに/あるいは
f. SEQ ID.NO.1に示した配列によって示される完全長型と比較してC末端において1アミノ酸または2アミノ酸短い形態で存在するリパーゼ分子の量が、SEQ ID.NO.1に示した配列によって示される完全長型で存在するリパーゼ分子の量の50%より多い、例えば、約100%～500%、約200%～400%、または約300%である。

30

40

[本発明1015]

脂肪酸吸収を増大させるための治療的処置を前記乳児が医学的に必要とし、投与される前記リパーゼの量が治療的有效量である、本発明1001～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするヒト乳児を治療するための治療方法であって、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を医学的に必要とする乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、治療方法。

[本発明1017]

50

ヒト乳児の視覚発達および/または認知発達を改善する方法であって、該乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、方法。

[本発明1018]

(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための;ならびに/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善において使用するための改良された乳児用調合乳または改良された母乳を調製するためのキットであって、以下の成分:

a. 第1の量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを、好ましくは凍結乾燥製剤中に含む、少なくとも1つの第1の容器;および

b. 第2の量の改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳を含む、第1の容器とは異なる少なくとも1つの第2の容器

を含み、
該リパーゼおよび該改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳はそれぞれ、該改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳が該乳児に与えられた時に、例えば、少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、または少なくとも約7日にわたって少なくとも1日1回の授乳について該乳児に与えられた時に、(a)該乳児による該不飽和脂肪酸の吸収を増大させる;ならびに/または(b)該乳児の視覚発達および/もしくは認知発達を改善するのに有効な量の該リパーゼを含む、改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳をそれぞれ調製するのに十分な量であり、

該キットはさらに、

c. (A) 該乳児が(a)少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とする、または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするものとする;ならびに/あるいは(b)視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とする、または視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とするものとする;ならびに/あるいは(B)組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが臨床試験において有効かつ安全だと示され、かつヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる(または他のやり方でヒト乳児に対する利用可能性を増大させる)と示されていると説明している説明書を含み、

好ましくは、該説明書が、

i. 改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳をそれぞれ形成するために、例えばある量の該リパーゼを改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳に添加することによって、ある量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を調製する工程;および

ii. 該改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を、少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、または少なくとも約7日にわたって少なくとも1日1回の授乳についてヒト乳児に与える工程

について説明している、前記キット。

[本発明1019]

(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる;ならびに/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達を改善する方法であって、以下の工程を含む、方法:

i. 組換え胆汁酸活性化リパーゼを含む改良された乳児用調合乳もしくは改良された低温殺菌母乳を調製もしくは他のやり方で提供する工程、または本発明1018のキットを使用することによって、改良された乳児用調合乳もしくは改良された低温殺菌母乳を調製する工程;

ii. このように調製または他のやり方で提供された改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を該乳児に与える工程;および

iii. 少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、または少なくとも約7日にわたって少なくと

10

20

30

40

50

も1日1回の授乳について前記工程を繰り返す工程。

[本発明1020]

ある量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む薬学的組成物を含む、包装された薬学的製品であって、

i. ある量の該リパーゼを含有する改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を調製する工程;および

ii. 前記改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を、例えば、少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、または少なくとも約7日にわたって少なくとも1日1回の授乳について、ヒト乳児に与えることによって、該量のリパーゼを経腸投与する工程について説明している説明書をさらに含み、該説明書が、

(A) 該乳児が(a) 少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とする、または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするものとする; ならびに/あるいは(b) 視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とする、または視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とするものとする; ならびに/あるいは(B) 組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが臨床試験において有効かつ安全だと示され、かつヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる(または他のやり方でヒト乳児に対する利用可能性を増大させる)と示されていると説明し、

好ましくは、該包装が乳児用調合乳または低温殺菌母乳をさらに含む、包装された薬学的製品。

[本発明1021]

前記リパーゼが、1.5~75mg、5~45mg、または約10mg、15mg、20mg、もしくは25mgの量のリパーゼを含む単位用量の中にある、本発明1020の包装された薬学的製品。

[本発明1022]

(a) ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための; ならびに/または(b) ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善において使用するための、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ。

[本発明1023]

(a) ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための、ならびに/または(b) ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善において使用するための、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む薬学的組成物。

[本発明1024]

0.1~100mgの組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ、例えば、1.5~75mgの該リパーゼ、5~45mgの該リパーゼ、または約10mg、15mg、20mg、もしくは25mgの該リパーゼを含む単位用量形態の、本発明1022の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼまたは本発明1023の薬学的組成物。

[本発明1025]

経腸投与および/またはヒト乳児への投与に適合された、本発明1022もしくは1024の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼまたは本発明1023もしくは1024の薬学的組成物。

[本発明1026]

乳児用調合乳または低温殺菌母乳の中に含まれる、本発明1025の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼまたは本発明1025の薬学的組成物。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】 rhBSSL構造の模式図を示す。潜在的なグリコシル化の部位も示す。

【図2-1】 乳児用調合乳または低温殺菌母乳に添加されるrhBSSLの臨床試験の模式化された計画を示す。

【図2-2】 PP集団の発育速度(g/kg/日)の差とCFA(%)の差との相関関係、複合データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0043】

詳細な説明

1つの局面において、本発明は、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる方法であって、前記乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、方法に関する。本発明の代わりの局面において、前記リパーゼの経腸投与は、ヒト乳児に対する少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の利用可能性を増大させる方法において用いられる。ある特定の態様において、この局面は非医学的方法である。

【0044】

本発明の関連する局面において、前述の方法(およびこれらの方法のそれぞれの任意の態様)は、代わりに、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための、またはヒト乳児に対する少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の利用可能性の増大において使用するための組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼとして表される。それぞれの場合において、前記リパーゼは経腸投与される。本発明の他の関連する局面において、前述の方法(およびこれらの方法のそれぞれの任意の態様)はまた、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための、またはヒト乳児に対する少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の利用可能性の増大において使用するための薬学的組成物の製造における組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの使用として表されてもよい。それぞれの場合において、前記リパーゼは経腸投与される。

【0045】

「不飽和脂肪酸」という用語は当業者により容易に特定されるであろう。「不飽和脂肪酸」という用語は、例えば、鎖内の2つの隣接する炭素原子の間に少なくとも1つの二重結合がある枝分かれしていない脂肪族テール(鎖)を有する任意のカルボン酸を含む。二重結合の両側に隣接して結合している鎖内の2つの炭素原子はシス配置またはトランス配置にあってもよい。本発明のある特定の態様において、前記不飽和脂肪酸の中にある少なくとも1つの二重結合はシス配置である。本発明のさらなる態様において、不飽和脂肪酸は、本明細書の他の場所に記載のようにさらに特徴付けることができる。

【0046】

本発明において有用な組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ(rhBSSL)が本明細書において説明、定義、または言及される。例えば、rhBSSLは、ヒト胆汁酸活性化リパーゼだと当業者が認識可能なポリペプチドを含む。前記ヒトリパーゼは、このようなポリペプチドを産生するように(例えば、組換え遺伝子技術によって)適合もしくは改良された非ヒト供給源、例えば、非ヒト生物によって産生または単離されたものである。

【0047】

ヒト胆汁酸活性化リパーゼ(BSSL)は、様々な識別子または別名;例えば、「カルボキシルエステルリパーゼ(CEL)」、「胆汁酸活性化リパーゼ(BAL)」、「胆汁酸依存性リパーゼ(BSDL)」、「カルボキシエステラーゼ」、「カルボキシルエステル加水分解酵素」(CEH)、および「GeneCards」(www.genecards.org)などの情報源から当業者に容易に入手可能な多数の他の別名および記述によって知られる酵素である。ヒトBSSLの多数の天然アミノ酸配列およびアイソフォームがヒト乳(および臍臓)から同定されており、多数の異なるアミノ酸配列(典型的には、cDNA配列またはゲノム配列から予測された)が記載されている。本明細書において、これらの全てが「ヒト胆汁酸活性化リパーゼ」という用語の中に含まれる。例えば、ヒト胆汁酸活性化リパーゼは、最初に、20~26アミノ酸シグナル配列を含む前駆配列として天然に産生され、成熟完全長型タンパク質は722~733アミノ酸を有すると記載されている(例えば、Nilsson et al., 1990; W091/15234; W091/18923; cDNA配列 GenBank 提出ID: X54457から予測されたポリペプチド; GenBank ID: CAA38325.1; 「CEL/BSSL」のGeneCards エントリー; GenBank ID: AAH42510.1; RefSeq ID: NP_001798.2; Swiss-Prot ID: P19835を参照されたい)。さらなる例では、ヒト胆汁酸活性化リパーゼのさらに短い他のアイソフォームがVenter et al (2001; Science, 291: 1304-1351); GenBank ID: AAC71012.1; Pasqualini et al (1998; J Biol Chem, 273: 28208-28218); GenBank ID: EAW88031.1; W094/20610および Blackberg et al (1995; Eur J Biochem, 228: 817-821)

に記載されている。

【0048】

特定の態様において、ヒト胆汁酸活性化リパーゼは、SEQ ID.NO.1を含むアミノ酸配列またはSEQ ID.NO.1によって示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。他の特定の態様において、(組換え)ヒト胆汁酸活性化リパーゼは、Nilsson et al., 1990; W091/15234、W091/18923; RefSeq ID: NP_001798.2; GenBank ID: AAH42510.1; GenBank ID: CA A38325.1; 「CEL/BSSL」のGeneCardsエントリー; Swiss-Prot ID:P19835に開示されるアミノ酸配列より選択される、成熟型BSSLまたは前駆型BSSLのアミノ酸配列を有する。さらなるこのような態様において、(組換え)ヒト胆汁酸活性化リパーゼは、前述の参考文献に開示される任意の配列の少なくとも720の連続したアミノ酸であるアミノ酸配列、またはSEQ ID.NO.1のアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。他の態様において、(組換え)ヒト胆汁酸活性化リパーゼは、少なくとも、SEQ ID.NO.1もしくはW091/15234に開示されるアミノ配列の位置1~101のアミノ配列、または少なくとも、SEQ ID.NO.1に開示されるアミノ配列の位置1~535のアミノ酸配列、例えば、Hansson et al., 1993; J Biol Chem, 35: 26692-26698に開示される「変種A」を有するタンパク質を含む。ここで、このようなタンパク質は、例えば、Blackberg et al(1995; Eur J Biochem 228: 817-821)に開示される方法によって決定され得るように胆汁酸結合および/または胆汁酸依存性リパーゼ活性を有する。

【0049】

従って、今や、本発明のある特定の態様において、説明されたこれらの形態の(組換え)ヒト胆汁酸活性化リパーゼの1つまたは複数が本発明の様々な局面において有用であり得ることは当業者に明らかであろう。さらに、(例えば、Blackberg et al., 1995に開示される方法によって決定され得るように)胆汁酸依存性脂肪分解活性を有し、本明細書において説明、定義、または言及されるポリペプチド配列とアミノ酸配列が類似する他の(組換え)タンパク質も本発明において有用性を有する可能性があり、従って、これもまた「ヒト胆汁酸活性化リパーゼ」という用語に含まれることが当業者に明らかであろう。ある特定のこのような態様において、本明細書において説明、定義、または言及される配列と少なくとも約30、50、100、250、500、600、700、711、720、722、733、または750アミノ酸にわたって90%超、95%、98%、99%、99.5%の配列同一性を示すタンパク質。他の態様において、本明細書において開示、定義、または言及されるBSSLポリペプチド配列の1つに1つまたは複数のアミノ酸置換がなされてもよい。例えば、SEQ ID.NO.1に開示される配列に、1アミノ酸、2アミノ酸、3アミノ酸、4アミノ酸、5アミノ酸、または10アミノ酸までの置換、欠失、または付加がなされてもよい。このようなアミノ酸変化は中立の変化(例えば、中立のアミノ酸置換)でもよく、および/または何らかの(望ましい)やり方でタンパク質のグリコシル化、結合、触媒活性、もしくは他の特性に影響を及ぼしてもよい。このような置換を有するタンパク質が胆汁酸依存性脂肪分解活性を有するのであれば、これもまた本発明の意味で「ヒト胆汁酸活性化リパーゼ」であると当業者が認識するであろう。

【0050】

他の態様において、ヒト胆汁酸活性化リパーゼは、適切な核酸配列を有する核酸から発現可能であるか、または適切な核酸配列を有する核酸によって他のやり方でコードされる。限定されない例として、前記リパーゼは、SEQ ID.NO.2の位置151~2316の配列を含む核酸またはW094/20610もしくはNilsson et al(1990)に開示される配列を含む核酸から発現可能であるか、あるいはSEQ ID.NO.2の位置151~2316の配列を含む核酸またはW094/20610もしくはNilsson et al(1990)に開示される配列を含む核酸によって他のやり方でコードされる。当業者にも理解されるように、「適切な核酸配列」は前述の核酸配列の変種も含む。例えば、トリプレットコドンによってコードされるアミノ酸を変えない1つまたは複数のヌクレオチド塩基(例えば、3番目のコドン位置にあるヌクレオチド塩基)の変化も「適切」であろう。このような核酸配列の部分断片もまた、本明細書に記載のヒト胆汁酸活性化リパーゼの(短い)アイソフォームをコードするのであれば「適切」であろう。さらに

、SEQ ID.NO.1によって示されるアミノ酸配列の変種を有するタンパク質をコードする核酸配列、例えば、前記の核酸配列も「適切」であろう。従って、本発明は、(組換え)ヒト胆汁酸活性化リパーゼが、SEQ ID.NO.2の位置151～2316の配列を含む核酸もしくは位置151～755の配列を含む核酸とハイブリダイズする核酸から発現可能である、またはSEQ ID.NO.2の位置151～2316の配列を含む核酸もしくは位置151～755の配列を含む核酸を含む核酸とハイブリダイズする核酸によって他のやり方でコードされ、胆汁酸依存性脂肪分解活性を有するタンパク質である態様を想定する。ある特定のこのような態様において、ハイブリダイゼーションは、ストリンジェントな条件、例えば、当業者に公知のストリンジェントな条件で行われ、一般的な教科書、例えば、Joe Sambrook and David Russellによる「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(CSHL Press)に記載されている。

10

【0051】

特定の態様において、(組換え)ヒト胆汁酸活性化リパーゼは、本明細書において説明、定義、または言及される核酸からの発現によって産生される。

【0052】

本発明の文脈において、本明細書において説明、定義、または言及されるヒト胆汁酸活性化リパーゼは組換え胆汁酸活性化リパーゼ(rhBSSL)である。すなわち、前記ヒトリパーゼは、このようなりパーゼを産生するように(例えば、組換え遺伝子技術によって)適合もしくは改良された非ヒト供給源、例えば、非ヒト生物によって産生されている、またはこのようなりパーゼを産生するように(例えば、組換え遺伝子技術によって)適合もしくは改良された非ヒト供給源、例えば、非ヒト生物から単離される。特定の態様において、rhBSSLは、本明細書において説明、定義、または言及される単離され得た核酸分子から、無細胞転写翻訳法および/またはインビトロ転写翻訳法を用いて産生される。または、組換え非ヒト生物が用いられる。この場合、前記非ヒト生物は少なくとも1コピーのこのような核酸を含み、前記核酸は、望ましいタンパク質:rhBSSLを産生する前記非ヒト生物によって発現可能である。例えば、組換え細菌細胞、藻類細胞、酵母細胞、または他の真核細胞が用いられてもよく、rhBSSLは、ある特定の態様では、このような組換え細胞の培養物から産生される。他の態様において、rhBSSLは、改良されたまたは特異的に選択されたヒト細胞の体外培養によって、例えば、改良されたまたは特異的に選択されたヒト細胞のインビトロ培養によって産生されてもよい。さらに他の態様では、rhBSSLは、トランスジェニック動物、例えば、トランスジェニックウシ、ヒツジ、ヤギ、またはウサギの乳からrhBSSLを単離することによって産生されてもよい。当業者であれば、組換え技術を用いてヒト胆汁酸活性化リパーゼを産生するのに利用可能な非常に多くの技術を知っているだろう。

20

30

【0053】

組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、大腸菌(*E.coli*)、マウス、およびハムスター(Hansson et al., 1993)、ならびに*P.パストリス*(*P.pastoris*)(Trimple et al., 2004; Glycobiol, 14: 265-274)細胞の培養物を含む組換え細胞培養物から産生可能であることが示されている。組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼはまた、トランスジェニックマウスの乳(Strömqvist et al., 1996; Transgen Res, 5: 475-485)およびトランスジェニックヒツジの乳(W099/54443)から産生および単離できることも示されている。本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、このような組換え細胞の培養物またはこのようないトランスジェニック動物の乳から単離される。代わりの態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、トランスジェニックヒツジまたはトランスジェニックマウスの乳から単離されたものではない。

40

【0054】

本発明の特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、組換えチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株の発現産物から単離される、組換えCHO細胞株によって産生される、または組換えCHO細胞株によって発現可能である、もしくは組換えCHO細胞株から単離される。このようなりパーゼを産生する組換えCHO細胞株発現系を使用すると、特定の構造特徴、活性特徴、または他の特徴、例えば、本明細書に記載の特徴の1つまたは複数を示すrhBSSLを産生することができる。非限定的な例として、本発明において有用なrh

50

BSSLは、本明細書の例示に類似する、もしくは本明細書の例示において実質的に説明されるプロセスを用いて単離されてもよく、および/または本明細書の例示に類似する、もしくは本明細書の例示において実質的に説明される特徴を示してもよい。

【0055】

本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、例えば、国際一般名(INN)体系(stem)「ブセリパーゼ」(WHO Drug Information, 21: 62, 2007を参照されたい)によって特定される。なぜなら、ヒト胆汁酸活性化リパーゼのアミノ酸配列がこの中に示されているからである。組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは本発明において使用される時、SEQ ID.NO.1を参照して、位置Cys64-Cys80およびCys246-Cys257において1つまたは複数のジスルフィド架橋を有してもよい、および/またはAsn-187、Thr-538、Thr-549、Thr-559、Thr-576、Thr-587、Thr-598、Thr-609、Thr-620、Thr-631、およびThr-642における可能性のあるグリコシル化部位の1つまたは複数においてグリコシル化される(1つのこのような態様では、図1.1に模式的に示した)。ある特定のこのような態様において、rhBSSLはグリコフォームであり、例えば、「ブセリパーゼアルファ」のINNを有してもよい。

10

【0056】

本発明の他の特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、天然のヒト胆汁酸活性化リパーゼ(BSSL-MAM)の構造特性、組成特性、および/もしくは他の特性とは異なる、ならびに/または、例えば、W099/54443に記載のようなトランスジェニックヒツジの乳からの単離によって産生された形態の組換え胆汁酸活性化リパーゼ(rhBSSL-OVI)とは異なる構造特性、組成物特性、および/もしくは他の特性を有する。

20

【0057】

従って、ある特定のこのような態様において、本発明に有用な組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは他の乳タンパク質も乳成分も(実質的に)含まない。本発明の開示の際に明らかのように、ある特定の態様において、rhBSSLはヒト乳児に投与される前に、乳をベースとする乳児用食品に添加される。従って、このような態様において、「他の乳タンパク質も乳成分も含まない」は、前記乳をベースとする乳児食品に前記リパーゼを添加するすぐ前(例えば、直前)に存在する組換え胆汁酸活性化リパーゼの形態、組成物、または製剤に適用される。例えば、このような態様において、rhBSSLを含有する本発明の薬学的組成物もしくはキット成分、または任意の乳児用調合乳および/もしくは低温殺菌母乳への添加の準備ができて提供される前記の量のrhBSSLは、このような乳をベースとする夾雑物を含まない。ある特定のこのような態様において、rhBSSLは、乳カゼインおよび乳清タンパク質、例えば、ラクトフェリンを含まない、または乳に固有の他の夾雑物を含まず、特に、このような乳由来タンパク質もしくは他の夾雑物がヒト、ヒツジ、もしくはマウスの乳に由来する場合に、乳カゼインおよび乳清タンパク質、例えば、ラクトフェリンを含まない、または乳に固有の他の夾雑物を含まない。これらの態様において、特定のこのようなタンパク質または夾雑物を「含まない」とは、日常的な検出法によって、物質的な量のこのようなタンパク質または他の夾雑物を検出できないことを意味する。または、このような特定の不純物は約5%未満、例えば、約2%、1%、0.5%、もしくは0.1%未満のレベルで存在してもよい、または本質的にもしくは有効に存在しない。または、全種類のこのような乳由来タンパク質または他の夾雑物の全てが、約5%未満、例えば、約2%、1%、0.5%、もしくは0.1%未満のレベルで存在する、または本質的にもしくは有効に存在しない。当業者により理解されるように、細胞培養物、例えば、組換えCHO細胞から産生および単離された組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、このような乳をベースとする夾雑物を「含まない」とみなされるだろう。

30

40

【0058】

本発明の他のある特定のこのような態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、約70%を上回る純度、約80%、90%、または95%を上回る純度を有する。特定のこのような態様において、このようなパーセント純度は総タンパク質に対するパーセント純度である。前記のように、適用可能な態様において、このような純度の尺度は、乳児用食品ま

50

たは他の投与媒体に添加する前の前記リパーゼを含む組成物の純度である。このような純度値は、RP-HPLC、SE-HPLC、またはSDS-PAGE(とSyproRubyまたは銀染色)法を用いて決定することができる。

【0059】

本発明の他の態様において、特に、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが組換えCHO細胞を用いて産生されるのであれば(組換えCHO細胞から発現されるのであれば)、rhBSSLは本発明において使用される時に、1つまたは複数の構造特性、活性特性、または他の特性、例えば、以下に記載の特性によって特徴付けることができる。

【0060】

本発明のさらなるある特定のこのような態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、天然のヒト胆汁酸活性化リパーゼ(BSSL-MAM)のグリコシル化レベルより低いグリコシル化レベル(全体/総)を有する、および/またはトランスジェニックヒツジの乳から単離された組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ(rhBSSL-OVI)のグリコシル化レベルより高いグリコシル化レベル(全体/総)を有する。BSSL(またはその試料)のグリコシル化レベル、例えば、単糖含有率レベルおよび/またはシアル酸含有率レベルは、高pH陰イオン交換クロマトグラフィーとパルスアンペロメトリック検出(HPAEC-PAD)を用いて測定することができる。本発明の特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの総単糖含有率(モル単糖/モルrhBSSL)は、約20~100、約25~65、または約25~55、例えば、約40~45モル/(モルrhBSSL)である。本発明のある特定の態様において、rhBSSLの総シアル酸含有率(シアル酸モル/rhBSSLモル)は、約20~35、例えば、約25~30モル/(rhBSSLモル)である。

【0061】

本発明のさらに他のある特定のこのような態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、BSSL-MAMとは異なる、および/またはrhBSSL-OVIとは異なるグリコシル化パターン、例えば、0-グリカンのグリコシル化パターンを有する。このような差違は、キャピラリー電気泳動とレーザー誘起蛍光検出(CE-LIF)および/またはHPAEC-PADを用いて検出することができる。本発明の特定の態様において、rhBSSLは、約20~50モルのN-アセチルノイラミン酸(NANA=Neu5Ac)/モルrhBSSL[モル/(モルrhBSSL)]、例えば、約25~40モル/(モルrhBSSL)を有してもよい。本発明において用いられるrhBSSLは、約5モル未満のN-グリコシルノイラミン酸(NGNA=Neu5Gc)/モルrhBSSL、例えば、約2モル未満/(モルrhBSSL)を有してもよい、またはNGNAは本質的に検出不可能である。本発明において用いられるrhBSSLは、約20モル未満のフコース/モルrhBSSL、例えば、約10未満、約5未満、または約2モル未満/(モルrhBSSL)を有してもよく、ある特定の態様において、フコースは本質的に検出不可能である。本発明において用いられるrhBSSLは、約5~25モルのガラクトサミン/モルrhBSSL、例えば、約10~20または約15~18モル/(モルrhBSSL)を有してもよい。本発明において用いられるrhBSSLは、約10モル未満のグルコサミン/モルrhBSSL、例えば、約5未満、約3未満、または約2モル未満/(モルrhBSSL)を有してもよい。本発明において用いられるrhBSSLは、約5~25モルのガラクトース/モルrhBSSL、例えば、約10~20または約15~18モル/(モルrhBSSL)を有してもよい。本発明において用いられるrhBSSLは、約5モル未満のグルコース/モルrhBSSL、例えば、約2モル未満/(モルrhBSSL)を有してもよい、またはグルコースは本質的に検出不可能である。本発明において用いられるrhBSSLは、約2~8モルのマンノース/モルrhBSSL、例えば、約4~6モル/(モルrhBSSL)を有してもよい。本発明の特定の態様において、rhBSSLは、表1.1に示されるような、または表1.1に実質的に示されるような単糖(monosaccharide)含有率および/またはシアル酸含有率のプロファイルを有してもよい。

【0062】

本発明の他の態様において、本発明に有用な組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、レクチン結合試験またはルイス抗原結合試験のプロファイルまたは量、例えば、それぞれ、Blackberg et al (1995)に記載のアッセイおよびプロファイルならびにLandberg et al(1997)に記載のアッセイおよびプロファイルの点でBSSL-MAMおよびrhBSSL-OVIと異なる。このようなレクチン結合試験またはルイス抗原結合試験は、これらの異なる形態のBSSL間のグ

リコシル化パターンの差を示すことができる。本発明に有用な組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを同定および/または特徴付けるために、他の技法を使用することができる。例えば、rhBSSLは、エンドプロテアーゼLys-C消化の後に、逆相HPLCと定量UV検出(214nm)による、結果として生じたペプチドの解析、および結果として生じたクロマトグラムの記録/検査によって特徴付けることができる(ならびに/またはBSSL-MAMもしくはrhBSSL-OVIと区別することができる)。結果として生じたクロマトグラムの差は、保持時間に特定の差がある、rhBSSLを含む特定のペプチドのグリコシル化の独特の特徴によるものでもよく、従って、rhBSSLを含む特定のペプチドのグリコシル化の独特の特徴をさらに反映してもよい。

【0063】

10

本発明のなおさらなる態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは90KDa~75KDaの分子量を有する。特定のこのような態様において、前記リパーゼの分子量は約84~86KDa、例えば、約85KDaである。分子量は、MALDI-MSを含む日常的な技法によって決定することができる。比較として、同じ検出法を用いて、BSSL-MAMの分子量はかなり大きい分子量(例えば、約100KDa)として測定され、rhBSSL-OVIの分子量はかなり小さい分子量(例えば、約78KDa)として測定される。

【0064】

本発明の他のさらなるこのような態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、異なるアミノ酸長の配列を有する組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ分子の集団を含んでもよい。このような態様のいくつかでは、最も長い(または予測された)完全長型(例えば、SEQ ID.NO.1によって示された分子)と比較してC末端において1アミノ酸短い、2アミノ酸短い、3アミノ酸短い、4アミノ酸短い、5アミノ酸短い、または10アミノ酸まで短い形態で存在するリパーゼ分子の量は、このような最も長いまたは(予測された)完全長型で存在するリパーゼ分子の量の50%より多い。ある特定のこのような態様において、短いリパーゼ分子、例えば、C末端から1アミノ酸または2アミノ酸短いリパーゼ分子として存在する量は、最も長い(または予測された完全長)リパーゼ分子の量の約100%~500%である。特定のこのような態様において、短いリパーゼ分子、例えば、C末端から1アミノ酸または2アミノ酸短いリパーゼ分子として存在する量は、最も長い(または予測された完全長)分子(例えば、SEQ ID.NO.1によって示された分子)の量の約200%~400%、例えば、約300%である。特定の態様において、または前述において、2アミノ酸短いリパーゼ分子として、最も長い(または予測された完全長)前記リパーゼ分子の量の1%未満が存在する。他の態様において、このような最も長い(または予測された)分子よりC末端から1アミノ酸短い、2アミノ酸短い、3アミノ酸短い、4アミノ酸短い、5アミノ酸短い、または10アミノ酸まで短い形で、最も長い(または予測された)前記リパーゼ分子の数の2~5倍、約3倍が存在する。

20

30

【0065】

本発明のさらに他のさらなるこのような態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、ヒト乳から単離されるBSSLおよび/またはrhBSSL-OVIより大きな比活性を有してもよい。例えば、rhBSSLの比活性は、(質量に基づいて)BSSL-MAMおよび/またはrhBSSL-OVIの比活性より約15%~35%高い比活性でもよく、例えば、約20%または25%高い比活性でもよい。ヒトBSSLの比活性を測定する技法は当業者に公知であり、本明細書の例示に概説されたように4-ニトロフェニルエステル酪酸(PNPB)アッセイの使用を含む。BSSLの他のインビトロアッセイは、例えば、BSSL基質としてアラビアゴムで乳化したトリオレオイルグリセロールおよび活性化胆汁酸塩としてコール酸ナトリウム(10mM)の使用によって知られている(例えば、Blackberg and Hernell, 1981; Eur J Biochem, 116: 221-225に記載)。特定の態様において、比活性を測定する前に、BSSLは、例えば、ヘパリンアフィニティクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーの技法を用いて高純度まで精製されてもよい。

40

【0066】

当業者に理解されるように、本発明において使用される組換えヒト胆汁酸活性化リパー

50

ぜは、本明細書において説明または定義される複数の特徴、例えば、前記の特徴によって特徴付けることができる。例えば、このような特徴の2つ以上(例えば、3、4、5以上)の組み合わせが一緒になって、本発明において使用するための組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの特定の態様を特徴付けることができる。

【0067】

ヒト乳児(またはヒト乳児の集団/試料)による特定の不飽和脂肪酸の吸収または特定の不飽和脂肪酸に対する利用可能性の増大または他のやり方での改善もしくは増強は、当技術分野において公知の様々な手段によって、例えば、脂肪酸の重量分析、例えば、Anderssonおよび共同研究者ら(2007)により用いられた脂肪酸の重量分析を用いて定量された脂肪酸の脂肪投入量と脂肪排泄量との脂肪平衡を調べることによって検出、調査、モニタリング、または観察することができる。または、個々の脂肪酸の定量は、ガスクロマトグラフィー法、例えば、本明細書の例示に記載のガスクロマトグラフィー法を用いて行うことができる。Sidiskyおよび共同研究者ら(1996; The Reporter[Supelco/Sigma-Aldrich], 15(1): 1-4)は、重要な脂肪酸メチルエステルを分離する、従って、検出する適切なカラムの選択を助けるために様々なキャピラリーカラムの特性について説明している。脂肪吸収の程度は、以下の例示に詳述されるように、類似するもしくは関連する脂肪酸の任意の特定のサブグループもしくはグループの脂肪吸収率(CFA)として、または個々の脂肪酸の値を適切に合計することにより全ての/全体の脂肪酸(すなわち、最も豊富な脂肪酸)の脂肪吸収率(CFA)として量的に表すことができる。方法のさらなる例として、ヒト乳児一人一人(またはそのグループ)の場合、不飽和脂肪酸吸収、例えば、DHAまたはAAの吸収の改善は、例えば、個々の脂肪酸のクロマトグラフィー(GC)分離の使用の後に同定/定量、例えば、質量分析を用いた同定/定量を行うことを含む、経時的にまたは治療中に血漿または赤血球の膜リン脂質の絶対的脂肪酸含有率または相対的脂肪酸含有率を分析すること(Carlson et al, 1996; Pediatr Res, 39: 882-888; Boehm et al, 1996)によって調査、モニタリング、追跡、および/またはチェックすることができる。

【0068】

本発明者らは、本明細書において、ヒト乳児に組換え胆汁酸活性化リパーゼを投与した臨床試験の中で、前記乳児による不飽和脂肪酸の吸収率が増加し、ある特定の不飽和脂肪酸グループ、より具体的には特定の不飽和脂肪酸の吸収率も増加したという本発明の基盤について説明する。

【0069】

この効果とは対照的に、および以下の例示に詳述されるように、本発明者らは、全CFA(すなわち、全ての脂肪酸または最も豊富な脂肪酸の吸収率)の限定されたかつ有意でない増加と一致して、臨床試験のパー・プロトコルセット(PP)の乳児における治療群間の飽和脂肪酸CFAの差は非常に限定的であり、かつ有意でなかったことも示す。ヒト乳児にrhBBSLが投与された時、プラセボが投与された時と比較して飽和脂肪酸CFAのLS平均は2.25%しか増加しなかった($p=0.236$)。実際に、乳児用調合乳が与えられた乳児において、乳児にrhBBSLが投与された時とプラセボが投与された時を比較して、飽和脂肪酸CFAの差は有効でなく(LS平均差0.08%; $p=0.975$)。母乳が与えられた時にも乳児治療間の有意差はなかった。この解析用の飽和脂肪酸は、二重結合を有さない(脂肪族鎖の長さに関係しない)脂肪酸である。

【0070】

以下の効果は、本発明の基盤をさらに裏付ける。

【0071】

第1に、全ての不飽和脂肪酸の一般的なグループにおいて、組換え胆汁酸活性化リパーゼが投与された時にプラセボが投与された時と比較して、臨床試験のパー・プロトコルセット(PP)の乳児による不飽和脂肪酸のCFAが有意に増加する。rhBBSLが投与された時に、ヒト乳児の不飽和脂肪酸CFAのLS平均は、これらの乳児にプラセボが投与された時と比較して4.22%増加した($p=0.034$)。このような効果は、それぞれの個々の臨床試験(乳児用調合乳で治療された乳児または母乳で治療された乳児)においても見られ、母乳が与えられ

た乳児は、rhBSSL投与の際に大きくかつ有意な効果を有した(LS平均差5.10%、 $p=0.044$)。乳児用調合乳が与えられた乳児において観察された効果は有意でなかったが($p=0.286$)、不飽和脂肪酸CFAの増加(LS平均差3.25%)を示した。この増加は、複合解析における全効果および統計的有意性に寄与した。この解析用の不飽和脂肪酸は、少なくとも1つの二重結合を有する脂肪酸(脂肪族鎖の長さに関係しない)である。

【0072】

第2に、全ての多価不飽和脂肪酸の一般的なグループにおいて、臨床試験のパー・プロトコルセット(PP)の乳児に組換え胆汁酸活性化リパーゼが投与された時に、多価不飽和脂肪酸CFAはプラセボが投与された時と比較して有意かつ大幅に増加した。ヒト乳児にrhBSSLが投与された時、多価不飽和脂肪酸のCFAのLS平均は、これらの乳児にプラセボが投与された時と比較して5.82%増加した($p=0.005$)。このよう効果はまた、それぞれの個々の臨床試験(乳児用調合乳で治療された乳児または母乳で治療された乳児)においても見られた。母乳が与えられた乳児は、rhBSSL投与に対して大きくかつ有意な効果を有した(LS平均差6.92%、 $p=0.020$)。乳児用調合乳が与えられた乳児において観察された効果は0.05水準で統計的に有意でなかったが($p=0.093$)、不飽和脂肪酸CFAの大幅な増加(LS平均差5.05%)を示した。この増加は、複合解析における全効果および統計的有意性に寄与した。この解析用の多価不飽和脂肪酸は、少なくとも2つの二重結合を有する脂肪酸(脂肪族鎖の長さに関係しない)である。

【0073】

第3に、本明細書の他の場所に記載のように、発達中の乳児に特に重要な脂肪酸であるLCPUFAの特定のサブグループでは、組換え胆汁酸活性化リパーゼが投与された時に、臨床試験のパー・プロトコルセット(PP)の乳児によるLCPUFA CFAは、プラセボが投与された時と比較してさらに増加した。rhBSSLが投与された時、ヒト乳児のLCPUFA CFAのLS平均は、これらの乳児にプラセボが投与された時と比較して7.33%増加した($p=0.002$)。このような効果は、それぞれの個々の臨床試験(乳児用調合乳で治療された乳児または母乳で治療された乳児)においても見られ、母乳が与えられた乳児は、rhBSSL投与の際に大きくかつ有意な効果を有した(LS平均差8.02%、 $p=0.012$)。乳児用調合乳が与えられた乳児において観察された効果は0.05水準で全く統計的に有意でなかったが($p=0.054$)、不飽和脂肪酸CFAの大幅な増加(LS平均差7.01%)も示した。この増加は、複合解析における大きな全効果および高い統計的有意性に寄与した。この解析用のLCPUFAは、脂肪族鎖に少なくとも20個の炭素原子を有し、少なくとも2つの二重結合を有する脂肪酸である。

【0074】

ヒト乳児に組換え胆汁酸活性化リパーゼを投与することによって、条件付き必須脂肪酸であるアラキドン酸(AA;C20:4 n-6)およびドコサヘキサエン酸(DHA;C22:6 n-3)の吸収が大きくかつ統計的に有意に増大することが本発明にとって特に有用である。rhBSSLが投与された時、ヒト乳児のAA CFAのLS平均は、これらの乳児にプラセボが投与された時と比較して8.63%増加し(95%信頼区間[CI]=3.60~13.67)、DHA CFAのLS平均は5.80%増加した(95%CI=1.30~10.29)。このような効果は、それぞれの個々の臨床試験(乳児用調合乳で治療された乳児または母乳で治療された乳児)においても見られ、母乳が与えられた乳児は、rhBSSL投与の際に大きくかつ有意な効果を有した。乳児用調合乳が与えられた乳児において観察された効果は統計的に有意でなかったが、これらの脂肪酸のCFAの大幅な増加も示した。この増加は、複合解析における大きな全効果および高い統計的有意性に寄与した。

【0075】

ヒト乳児に組換え胆汁酸活性化リパーゼを投与すると、必須脂肪酸であるリノール酸(LA;C18:2 n-6)およびα-リノレン酸(LNA;C18:3 n-3)の吸収が大幅に増大することも本発明にとって特に有用である。rhBSSLが投与された時のヒト乳児のLA CFAのLS平均は、これらの乳児にプラセボが投与された時と比較して5.79%増加し(95%CI=1.82~9.76)、LNA CFAのLS平均は3.66%増加した(95%CI=-1.24~8.55)。このような効果は、それぞれの個々の臨床試験(乳児用調合乳で治療された乳児または母乳で治療された乳児)においても見られ

、母乳が与えられた乳児は、rhBSSL投与の際にLA吸収に対して大きく、統計的に有意な効果を有した。

【0076】

以下の例示にさらに詳述されるように、ヒト乳児に組換え胆汁酸活性化リパーゼが投与されると、不飽和脂肪酸であるエイコサジエン酸(C20:2 n-6)およびジホモ- γ -リノレン酸(C20:3 n-6)/エイコサトリエン酸(C20:3 n-3)の吸収が増大する。この効果は、このような脂肪酸を含有するように乳児用調合乳が処方されなかったので、乳児に与えられた母乳にしか観察されなかった。表2.14(母乳研究)からも明らかなように、ヒト乳児に組換え胆汁酸活性化リパーゼが投与されると、脂肪族鎖内に少なくとも20個の炭素原子を有する全ての不飽和脂肪酸の吸収の数値も大幅に増加する。

10

【0077】

ヒト乳児への組換え胆汁酸活性化リパーゼの投与が特定の飽和脂肪酸であるミリスチン酸(MA;C14:0)の吸収の増大を示すことも本発明者らによって証明された。ヒト乳児にrhBSSLが投与された時のMA CFAのLS平均は、これらの乳児にプラセボが投与された時と比較して4.81%増加した(95%CI=0.24~9.38)。

【0078】

乳児における乳-BSSLの意義は単に脂肪酸吸収を助けることができるだけではないという実験上の示唆がある。例えば、Miller & Lowe(2008; J Nutr 138: 927-930)は、CEL-(BSSL)欠乏マウスにおいて、母乳および臍臓CEL(BSSL)が両方とも存在しないだけで脂肪吸収不良が起こり、母乳CEL(BSSL)だけが存在しなくても食事性脂肪吸収の効力は影響を受けず、糞便中脂肪が増加してもCEL-(BSSL)欠乏マウスの仔が正常に体重増加したことを観察した。また、および特に、Howlesおよび共同研究者ら(1999; Am J Physiol, 277: G653-G661)は、CEL-(BSSL)欠乏マウスを用いた実験後に、CEL(BSSL)が新生仔マウスにおいて脂肪由来腸損傷、特に、遠位小腸の上皮における過剰な脂質の蓄積による損傷を阻止し得ると推測した(Lindquist & Hernell, 2010により報告された、Lindquist et al., 2007; J Pediatr Gastroenterol Nutr 44: E335も参照されたい)。実際に、本明細書において開示された臨床試験では、(PPデータセットにおける)乳児用調合乳が与えられた乳児は、それぞれの治療期間の食品追跡マーカー間に、母乳が与えられた乳児(rhBSSLについては19.00gの脂肪およびプラセボについては20.51gの脂肪)と比較して多量の総脂肪に曝露された(糞便中に多量の脂肪を排泄した)ことが観察された(総脂肪曝露:rhBSSLについては29.12gの脂肪およびプラセボについては28.50gの脂肪)[数字は、体重の違いに対する補正がなされていない]。前記のBSSLの推測された保護的な役割を考慮すれば、乳児に与えられた調合乳と母乳との間の総脂肪曝露のこの観察された差は、調合乳が与えられた乳児と母乳が与えられた乳児との間で見られた特定の脂肪酸のCFAの差を説明する要因になるかもしれない。試験および/または治療期間の間の、摂取された乳の平均体積または調合乳の平均体積の差はほとんどなかった。

20

30

【0079】

本発明の第1の特定の態様において、不飽和脂肪酸は、必須脂肪酸、例えば、身体が必要とするが、他の食物成分から作ることができないために、ヒトが良好な健康のために摂取しなければならない脂肪酸である。必須脂肪酸には α -リノレン酸(LNA)およびリノール酸(LA)が含まれる。 γ -リノレン酸(GLA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、アラキドン酸(AA)、およびドコサヘキサエン酸(DHA)などの一部の脂肪酸は、ヒトの体内で必須脂肪酸であるLAおよびLNAから製造される。LAおよびLNAの代謝が限られているために、GLA、AA、EPA、およびDHAは条件付きで必須になることがある。胎児期の最後の三半期の間および小児期の最初の2年以内にヒト脳が急速に発達している間、脂肪酸GLA、EPA、AA、およびDHAは限定的になり、特に、早産児には限定的になる場合がある。従って、本発明のある特定のこのような態様において、不飽和脂肪酸は、GLA、EPA、AA、および/またはDHAなどの条件付き必須脂肪酸である。

40

【0080】

本発明の第2の特定の態様において、不飽和脂肪酸は、多価不飽和脂肪酸、すなわち、

50

少なくとも2つの二重結合を有する脂肪酸であって、それぞれの二重結合は脂肪酸の脂肪族テール(鎖)内の隣接する炭素対の間にある脂肪酸である。二重結合の両側に隣接して結合している鎖内の2つの炭素原子はシス配置でもよく、トランス配置でもよい。本発明のある特定の態様において、前記多価不飽和脂肪酸の中にある二重結合の少なくとも1つはシス配置にある。特定のこのような態様において、多価不飽和脂肪酸の全ての二重結合はシス配置にある。

【0081】

本発明の第3の特定の態様において、不飽和脂肪酸は、少なくとも20(20)個の炭素原子の長さを有する脂肪族テール(鎖)を有する。

【0082】

本発明の第4の特定の態様において、不飽和脂肪酸は、少なくとも20(20)個の炭素原子の長さを有する脂肪族テール(鎖)を有する多価不飽和脂肪酸(すなわち、少なくとも2つの二重結合を有する脂肪酸)である。少なくとも20(20)個の炭素原子の長さを有する脂肪族テール(鎖)および少なくとも2つの二重結合を有する脂肪酸は、本発明の様々な局面および態様において「長鎖多価不飽和脂肪酸」(LCPUFA)として知られ、それぞれの二重結合は脂肪酸の脂肪族テール(鎖)を有する隣接する炭素対の間にある。

【0083】

本発明の全ての局面のある特定の態様において、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸は、エイコサジエン酸(C20:2 n-6)、ジホモ- γ -リノレン酸(C20:3 n-6)、エイコサトリエン酸(C20:3 n-3)、アラキドン酸(C20:4 n-6)およびドコサヘキサエン酸(C22:6 n-3)、リノール酸(C18:2 n-6)および α -リノレン酸(C18:3 n-3)からなる群より選択される不飽和脂肪酸である。当業者であれば、慣用名および/または「C:D」脂質番号から、必要であれば「n-x」命名法と組み合わせて、このような脂肪酸を容易に認識できるであろう。

【0084】

特定のこのような態様において、不飽和脂肪酸はアラキドン酸(C20:4 n-6)および/またはドコサヘキサエン酸(C22:6 n-3)である。

【0085】

代替りの特定のこのような態様において、不飽和脂肪酸はリノール酸(C18:2 n-6)および/または α -リノレン酸(C18:3 n-3)である。

【0086】

本発明の特定の態様において、不飽和脂肪酸はアラキドン酸(AA;C20:4 n-6)でない、および/またはドコサヘキサエン酸(DHA;C22:6 n-3)でない。

【0087】

本発明の全ての局面の特定の態様において、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収(またはヒト乳児に対する利用可能性)の増大は、前記乳児による飽和脂肪酸ミリスチン酸の吸収(またはヒト乳児に対する飽和脂肪酸ミリスチン酸の利用可能性)の増大と同時に生じる。

【0088】

異なる局面において、本発明はまた、ヒト乳児による少なくとも飽和脂肪酸ミリスチン酸の吸収を増大させる方法であって、前記乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、方法に関する。本発明の代替りの局面において、前記リパーゼの経腸投与は、ヒト乳児に対する少なくとも飽和脂肪酸ミリスチン酸の利用可能性を増大させる方法において用いられる。

【0089】

本明細書の他の場所に記載のように、本発明者らは、2つの対照臨床試験およびこれらの2つの試験からの複合データの解析により例示されるように、本発明が、ヒト乳児に組換え胆汁酸活性化リパーゼが投与された時には、不飽和脂肪酸の吸収、特に、LCPUFAの吸収を増大させ、発育速度も増大させたことを観察したのに対して、全CFA(脂肪吸収率)により測定されるような脂肪酸の全吸収率(すなわち、全ての脂肪酸または最も豊富な脂肪酸の吸収率)の限られた増加しか観察しなかった。以下の例示に詳述するように、パー・

10

20

30

40

50

プロトコルデータセット(PP)の乳児は、rhBSSLの投与の際にプラセボと比較して統計的に有意な発育速度の増大を示したが(2.08g/Kg/日のLS平均差;p=0.019)、顕著かつ有意な全CFA増加を示さなかった(3.56%のLS平均差;p=0.069)。(PPセットにおける)プラセボのLS平均効果と比較した効果の相対(%)増加に関して、rhBSSL投与は発育速度を13.8%増大させたが(15.06g/Kg/日と比較して17.15g/Kg/日)、全CFAを5.4%しか増加させなかった(65.50% CFAと比較して69.06% CFA)。このような観察は、乳児用調合乳が与えられた乳児のサブセット(PP)において顕著であり、プラセボと比較してrhBSSL投与の際に高く、かつ統計的に有意な発育速度の増大を示したが(2.30g/Kg/日のLS平均差;p=0.038)、全CFA増加は同時に生じなかった(有意でなかった)(2.08%のLS平均差;p=0.462)。プラセボのLS平均効果と比較した、調合乳が与えられた乳児へのrhBSSL投与の際の相対(%)増加は発育速度を14.9%増大させたが(15.45g/Kg/日と比較して17.75g/Kg/日)、全CFAを3.1%しか増加させなかった(67.38% CFAと比較して69.46% CFA)。さらに、および本明細書の例示の中でも詳述するように、乳児一人一人の発育速度の個体内差(rhBSSL-プラセボ)と対応する全CFA差との間には相関関係はほとんどなかった(有意でなかった)(R^2 線形=0.041;p=0.177)。発育速度の個体内差において観察された分散が小さいことは、対応する個体の全CFA値増加の分散によって説明される(線形回帰後のANOVA)。

【0090】

(i)特定の脂肪酸(もしくはそのサブグループ)による相対吸光度および/または特定の脂肪酸(もしくはそのサブグループ)に対する利用可能性;ならびに/あるいは(ii)発育速度の増大および全CFAの増大との限られた同時発生に関連した結果を調査および/または提示する解析アプローチまたは方法を含めて、他の解析アプローチまたは方法を用いて、本明細書において開示された2つの臨床試験からの結果をさらに調査および/または提示することができる。

【0091】

本明細書において開示された臨床試験から、他の乳児発育研究(例えば、Andersson et al., 2007を参照されたい)に匹敵する発育速度の増大の平均にもかかわらず、観察された全CFA値の平均は、他の乳児CFA研究において一般的に観察されてきた全CFA値の平均より少ないこと(PPデータセットにおける全CFA平均:rhBSSLについては69.08%およびプラセボについては65.66%)にも注目すべきである(総説については、Lindquist and Hernell, 2010を参照されたい)。しかしながら、乳児一人一人の全CFA値のばらつき(PPにおいてrhBSSLについては14.68%、プラセボについては16.13%、個体内差については13.19%の標準偏差)は、他の乳児CFA研究において一般的に観察された値(Williamson et al., 1978; Morgan et al., 1998; Acta Paediatr 87: 318-324; Andersson et al., 2007)におおむね一致した。BSSLは、多くの種類の脂質および脂質様分子を加水分解することができる広域リパーゼとして知られる(総説については、Lindquist and Hernell, 2010を参照されたい)。乳児に利用可能なエネルギーの半分以上が、乳に含まれる加水分解された脂質に由来するので、最も興味を引く結果が全CFAの増加であり、発育速度の増大が(全CFAの増加に強く依存すると予想されていたので)全CFAの増加ほど興味を引くものではなかったと当業者は予想したかもしれない。

【0092】

従って、本発明のある特定の態様において、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸に対する利用可能性の増大は、前記乳児において、同時に生じる全脂肪吸収率(すなわち、全ての脂肪酸または最も豊富な脂肪酸の吸収率)の増加が観察および/または達成されることなく達成される、観察される、または望まれる。本発明の特定のこのような態様において、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸に対する利用可能性の増大は、全脂肪吸収率(すなわち、全ての脂肪酸もしくは最も豊富な脂肪酸の吸収率)の増加と同時に生じない、全脂肪吸収率の増加によって示されない、および/または全脂肪吸収率の増加と相関しない。他の特定のこのような態様において、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸に対する利用可能性の増大は

全CFAの増加によって完全に説明できない(または全CFAの増加によって引き起こされない)。

【0093】

不飽和脂肪酸(特に、LCPUFA;特に、アラキドン酸およびドコサヘキサエン酸)とヒト乳児、特に、未熟児の視覚発達および/または認知発達との原因となる関係の重要な証拠を提供する、先行技術からの他の多くの研究が本明細書の他の場所において説明される。

【0094】

従って、本発明のある特定の態様において、乳児への組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの投与後に、ヒト乳児による前記不飽和脂肪酸の少なくとも1つの吸収または前記不飽和脂肪酸の少なくとも1つに対する利用可能性は、前記乳児の視覚発達および/または認知発達10の改善、増大、または他のやり方での増強をもたらし得る。乳児の視覚発達または認知発達のこのような増強は、視覚成熟および/もしくは神経成熟、脳発達および/もしくは網膜発達、神経系および/もしくは視覚系の発達、ならびに/またはCNSもしくは精神発達を含む多数の機構を介して起こり得る。本発明のある特定のこのような態様において、視覚発達および/または認知発達の増強は、人生の早期またはその後で乳児から測定可能なアウトカムをもたらす。例えば、本発明のある特定のこのような態様では、ヒト乳児による前記不飽和脂肪酸の少なくとも1つの吸収(または前記不飽和脂肪酸の少なくとも1つに対する利用可能性)は、視力(立体視力を含む)、認知行動、情報処理、目と手の協応、知能指数(IQ)、精神運動発達、問題解決、言語IQ、語彙発達、言語発達、産出および/もしくは20は理解、視覚認識における目新しさの優先(novelty preference on visual recognition)、脳波記録(EEG)パターンの成熟、記憶、情報処理、および/または行動成績;ならびに/あるいは異常全身運動スコア(abnormal general movement score)の低下および/もしくは自発性運動行動を含む、前記乳児から測定可能なアウトカムの増加をもたらし得る。このような測定可能なアウトカムの1つまたは複数を改善または増強を試験するために当業者が使用することができる多数の試験および/または他の研究方法がある。これらの試験の非限定的な例には、ブルネット・レジン(Brunet-Lezine)試験、ベアリー精神運動発達指数、乳児発達用ベアリー尺度、カウフマン小児アセスメントバッテリー(Kaufmann Assessment Battery for Children)(K-ABC)試験が含まれる。前述の先行技術の総説および試験は、このような機構、測定可能なアウトカム、および試験方法について詳述する。

【0095】

本発明において、ヒト乳児に経腸投与される組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの量は異なってもよい。ある特定の態様において、前記リパーゼの量は、有効量、例えば、前記リパーゼが本発明に従って乳児に投与された時に乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させるのに効果的な量である。所定の日数で乳児に投与され得る組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの適切な量は、1日当たり1~100mgの前記リパーゼ/Kg乳児体重の量でもよい。特定の態様において、1日に5~50mgの前記リパーゼ/Kg乳児体重または15~40mgの前記リパーゼ/Kg乳児体重が投与されてもよく、例えば、1日当たり約22.5~27mgの前記リパーゼ/Kg乳児体重が投与されてもよい。非限定的な例として、25mg/Kg/日で投与される1.5Kgの乳児には、1日当たり合計約37.5mgの組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが投与されてもよい。本発明のある特定の態様において、本明細書において使用または言及されるrhBSSLの質量は絶対質量として与えられるのではなく、活性rhBSSL分子の質量として与えられる。rhBSSLの異なる生産バッチまたは保管バッチは酵素活性が異なる場合があるので、このような活性変化を補うために、従って、より均一な量の活性rhBSSLを提供するために、投与されるrhBSSLの絶対質量を変えてもよい。標準的な活性BSSL分子に関して、本明細書に記載のようにPNPBアッセイを用いて、rhBSSLの活性を容易に求めることができる。活性rhBSSLの適切な質量は、前記で示された質量の範囲内である。rhBSSLなどの複合タンパク質の分子量は、例えば、グリコシル化の差のために異なる場合があるので、前記リパーゼの量は、質量以外のやり方で、例えば、(活性)モル量で定義されることがある。当業者であれば、特定のmg量から対応するマイクロモル量への他の変換を容易に行うことができるだろう。または、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの量は、例えば、BSSL活性の4050

インビトロアッセイ、例えば、本明細書に記載のインビトロアッセイにおいて求められるように、リパーゼ活性、酵素単位(U)で表され、例えば、アッセイの条件下で1分につき1マイクロモルの生成物の形成を触媒する前記リパーゼの量として定義されてもよい。

【0096】

当業者に理解されるように、典型的に(例えば、グルコース点滴の場合を除き)、ヒト乳児には、脂肪供給源、例えば、トリグリセリドを含有する栄養成分(nutritional base)が定期的に与えられる。乳児には、経口により、または経管栄養を介して栄養成分が与えられてもよい。栄養成分(食品または食物)は、一般的に、乳児用調合乳またはヒト母乳である。従って、本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、脂肪供給源、例えば、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を含有するトリグリセリドを含有する栄養成分が与えられているヒト乳児に投与される。特定のこのような態様において、前記栄養成分は乳児用調合乳および/または低温殺菌母乳であり、両方とも、かなりの割合の脂肪をトリグリセリドの形で含有することが当業者に知られている。本発明の様々なこのような態様において、rhBSSLの経腸投与は、前記乳児に栄養成分が与えられる前、前記乳児に栄養成分が与えられた後、または前記乳児に栄養成分が与えられるのと同時にでもよい。栄養成分が与えられる前または栄養成分が与えられた後に投与されるのであれば、rhBSSLは、前記乳児に栄養成分が与えられて約1時間以内、例えば、前記乳児に栄養成分が与えられて約30分以内、15分以内、もしくは5分以内、または約2分より短い期間内で投与されてもよい。栄養成分を与える間の期間がrhBSSL投与の約1分以内であれば、これは、事実上、脂肪を含有する栄養成分(例えば、乳児用調合乳および/または低温殺菌母乳)が前記乳児に与えられるのと同時にrhBSSLが投与されるとみなすことができる。このような同時発生(または同時)投与は、rhBSSLが最初に乳児用調合乳または母乳に添加され、次いで、乳児用調合乳または母乳がヒト乳児に与えられた場合に起こるだろう。

【0097】

一般に知られているように、乳児の母親からの新鮮な母乳で完全母乳栄養することが好ましい。しかしながら、様々な理由で、他の母親からの低温殺菌母乳、例えば、母乳バンクからの低温殺菌母乳が乳児に与えられることがある。または、よくあるように、乳児には、(新鮮でない)母乳の代わりに、または(新鮮でない)母乳に加えて乳児用調合乳が与えられることがある。ヒト乳児に新鮮な母乳が与えられないことは、これらの代替の1つを除いて、1つまたは複数の原因による場合がある。例えば、(i)既往乳房手術またはプロラクチンの欠乏などの健康上の理由のために母親から十分な母乳が出ない場合がある;(ii)母親が乳腺炎、湿疹、または乳管の詰まり(plugged milk duct)に罹患しているために、授乳に痛みが伴うことがある;(iii)口唇裂または口蓋裂など乳児の口に障害がある場合がある;(iv)例えば、文化または利便性の理由で母親に母乳栄養の十分な知識がなく、母乳が新鮮な母乳を与えないことにする場合がある;あるいは(v)感染性因子、例えば、HIVウイルス、CMVウイルス、Tリンパ球向性ウイルス、または結核菌の伝播を含む母乳の潜在的に有害な成分から乳児を守るために、危険な薬物療法または薬物(もしくはその代謝産物)、例えば、違法薬物の使用、レトロウイルス薬物療法もしくは化学療法薬物療法から乳児を守るために、あるいは母親が放射線療法を受けている場合に乳児を守るために、新鮮な母乳を与えないように母親が勧められる場合がある。最後に、乳児が虚弱すぎて乳房から母乳を飲めないことがある。このことは早産児または低体重乳児に特有の問題になり得る。

【0098】

従って、本発明のある特定の態様において、ヒト乳児は新鮮な母乳で完全母乳栄養されない。例えば、乳児は、例えば、完全母乳栄養によって、または新鮮な搾母乳を与えることによって母親からの新鮮な乳で完全母乳栄養されない。完全母乳栄養されていない乳児、または母親からの(新鮮な)搾母乳で完全母乳栄養されていない乳児には、他の供給源からの乳、例えば、乳児用調合乳または母乳バンクからの低温殺菌母乳および/もしくは(前もって)冷凍された母乳が与えられるだろう。本発明の特定の態様において、乳児には新鮮な母乳が与えられず、例えば、乳児は、乳児用調合乳、低温殺菌母乳および/または冷

凍母乳、例えば、母乳バンクの低温殺菌母乳および/または冷凍母乳で完全母乳栄養される。これは、出生してすぐに行われてもよく、すなわち、ヒト乳児には母親の新鮮な母乳が全く与えられない。または、これは、出生後、早い時期に、例えば、生後1日目以内、2日目以内、3日目以内、4日目以内、5日目以内、または6日目以内に行われてもよい。他の態様において、生後約1週間以内、2週間以内、もしくは3週間以内に、または生後約1ヶ月以内、2ヶ月以内、3ヶ月以内、もしくは6ヶ月以内までにヒト乳児に新鮮な母乳を与えるのをやめてもよい。

【0099】

組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、経口投与を含む様々な手段によって本発明に従って経腸投与されてもよい。例えば、投与は、リパーゼのパスタ剤、シロップ剤、舐剤、ポーラス、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、懸濁液、溶液または他の液体形態を用いて行われてもよい。経口投与はリパーゼの頬投与および舌下投与を含んでもよい。他の形態の経腸投与は、リパーゼを胃腸管に直接投与する方法、例えば、胃栄養管もしくは胃瘻管を用いて胃に直接投与する方法、または十二指腸栄養管を用いて小腸に配置される方法を含んでもよい。特に小さな乳児、早産児、または虚弱乳児の場合、本発明に従って組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを投与するために、このような管をベースとする投与形態は現実的であり得る、または必要であり得る。

10

【0100】

特定の経腸投与法に応じて、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの投与に用いられる製剤は異なってもよい。rhBSSLを経腸投与するための液体剤形には、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ剤、およびエリキシル剤が含まれる。rhBSSLに加えて、液体剤形は、当技術分野において一般的に用いられる不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、ならびにその混合物を含有してもよい。不活性希釈剤に加えて、経腸投与するための組成物は、添加物、例えば、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、増量剤および安定剤を含んでもよい。本発明の活性阻害剤に加えて、懸濁液は懸濁剤を含有してもよい。

20

【0101】

特定の状況のためにヒト乳児に経腸投与するための最も適切な手段および製剤は異なってもよいが、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを投与する特に適切な手段は、前記ヒト乳児への定期的な授乳の一部として経口によりまたは経管栄養によって前記リパーゼを投与することである。従って、本発明の特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、最初に、乳児用調合乳または新鮮でない(例えば、[前もって]低温殺菌された)母乳に添加され、次いで、これらが前記乳児に与えられる。この改良された乳児用調合乳または改良された新鮮でない母乳を乳児に与えることによって、前記リパーゼが経腸投与される。この投与手段は、乳をベースとする食品に含まれる脂質が(同時)投与されたrhBSSLと同じ時間および胃腸管内の位置に存在することを提供するので特に関連している。本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、例えば、前記乳児に与えられる前に最初に調合乳に添加されることによって乳児用調合乳と(同時)投与される。乳児用調合乳は、本明細書の他の場所に開示された組成物に類似した、または実質的に似ている組成物を有してもよい。

30

40

【0102】

当業者に理解されるように、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの添加によって改良された乳児用調合乳または(前もって)低温殺菌された母乳は、一般的に、自然の乳頭をまねた、従って、より効果的な授乳を提供する適切な乳首または乳頭が備わっている哺乳瓶を用いて前記乳児に与えられる。または、改良された乳児用調合乳または改良された新鮮でない母乳は他の手段を用いて与えられてもよく、例えば、乳児の口に奇形がある場合に必要とされ得るように、点滴注入器、注射器、スプーン、または浸漬された布を用いて与えられてもよい。超低出生体重児、早産児、または虚弱乳児などの、ある特定の態様において、授乳は、胃管、胃瘻管、または十二指腸管を介して胃腸管に直接なされてもよい。

【0103】

50

本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが添加された新鮮でない母乳は、低温殺菌母乳である。他の態様において、母乳は、例えば低温殺菌後に、冷凍されている。特定の態様において、本発明において使用される母乳は母乳バンクに由来する。母乳バンクは、寄付されたヒト乳を収集し、乳の安全性および品質の徹底を図り、必要としている乳児に利用可能にする全国組織であるナショナルミルクバンク(National Milk Bank)(NMB)、または北米における母乳バンクの設立および運営のための標準を設けるために、ならびにその設立および運営を容易にするために1985年に設立されたドナーヒト母乳バンクの非営利団体であるヒューマンミルクアソシエーションオブノースアメリカ(Human Milk Banking Association of North America)(HMBANA)を含んでもよい。

【0104】

当業者により理解されるように、本発明において使用される母乳はヒト母乳であることが特に適している。しかしながら、代わりの態様において、特に後期乳児の場合、母乳は、大型家畜、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、またはウマから得られる。このような態様は、ヒト乳または乳児用調合乳が常に与えられるとは限らないが、このような動物から得られた乳をヒト乳児に(少なくとも部分的に)与えることがある、ある特定の文化または国で実施することができる。このような乳は低温殺菌されているかどうかに関係なく、ヒト乳児におけるリパーゼ消化を助ける十分な動物BSSLを含んでいない場合があり、間違いなくヒトBSSLを含有しないだろう。従って、母乳が本発明のこのような態様において用いられる時、新鮮な動物母乳、すなわち、加熱処理および/または冷凍されていない乳を含んでもよい。

【0105】

さらに別の代わりの態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは乳児用調合乳に添加される。当業者であれば、多くの市販の乳児用調合乳を知っているだろう。市販の乳児用調合乳には、Enfamil(商標)、Pregestimil(商標)、Nutramigen(商標)、およびNutramigen AA(商標)(全てMead Johnsonにより販売または製造されている);Similac(商標)、Isomil(商標)、Alimentum(商標)、およびEleCare(商標)(全てAbbott Laboratories, Ross部門により販売または製造されている);Nestle:12%、世界で最大の調合乳製造業者はGoodStart(商標)を製造している(Nestle/Gerber Products Companyにより販売または製造されている);Farex1(商標)およびFarex2(商標)(Wockhardt Nutritionにより販売または製造されている)が含まれる。早産児の場合、Similac Neosure、Entamil Premature、Similac Special Care、Cow & Gate Nutriprem 2、およびEntamil Enfacareなどの他の乳児用調合乳も入手可能である。rhBSSLなどのリパーゼの基質である脂質源を含有することが全ての乳児用調合乳に共通する。特定の態様において、乳児用調合乳は、証拠物件Aに示した仕様書、もしくはESPGHANがコーディネートした国際専門家グループ(ESPGHAN Coordinated International Expert Group)により推奨される仕様書(Koletzko et al., 2005; J Ped Gastro Nutr 41: 584-599)におおむね準拠する、または実質的に、証拠物件Aに示した仕様書、もしくはESPGHANがコーディネートした国際専門家グループ(ESPGHAN Coordinated International Expert Group)により推奨される仕様書(Koletzko et al., 2005; J Ped Gastro Nutr 41: 584-599)として組成(rhBSSL添加前)を有する。ある特定の態様において、乳児用調合乳は、証拠物件Bに示した成分の1つまたは複数を、ほぼ、証拠物件Bに示したレベルで含有する。特に有利な態様では、乳児用調合乳は、(総脂肪に対して)少なくとも0.5%のDHAおよび/またはAAを含有し、さらなるこのような態様では、AAの濃度は、少なくともDHAの濃度に達しなければならない、および/またはエイコサペンタエノン酸(eicosapentaenoic acid)(C20:5 n-3)が添加されるのであれば、その濃度はDHAの含有率を超えない。

【0106】

利便性、安全性、および効率的な配布などの特定の理由のために、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、ある特定の場所(例えば、母乳バンク)において多量の(新鮮でない)母乳に添加され、次いで、保管および/または乳児に配布されてもよい。同様に、rhBSSLは、例えば、乳児用調合乳の製造業者によって、ある特定の場所において多量の乳児用調合乳

10

20

30

40

50

に添加され、次いで、包装され、ヒト乳児の親または介護者に(例えば、販売することによって)配布されてもよい。この特定の態様は、改良された調合乳(rhBSSLを含む)を乾燥粉末として保管および配送できる時に特に有用である。または、および特に、乳児に特有の用量が望ましいのであれば、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、授乳の直前に、かつこのような授乳に十分な量で、またはこの特定の乳児に特有の比および量で乳児用調合乳または母乳に添加されてもよい。例えば、適量のrhBSSLが、授乳サイズの分量の新鮮でない母乳または乳児用調合乳に添加されてもよい。

【0107】

本発明のための乳児食品中の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの量と他の成分の量の適切な比があり、前記リパーゼは、乳児用調合乳または(前もって)低温殺菌および/もしくはは冷凍された母乳に約0.03~0.5g/L調合乳または母乳の最終濃度まで添加される。例えば、前記リパーゼは、乳児用調合乳または新鮮でない母乳に約0.05~0.3g/L調合乳または母乳の最終濃度まで添加されてもよい。特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、約0.1~0.2g/L調合乳または母乳、例えば、約0.15g/L調合乳または母乳の最終濃度まで添加される。ある特定の態様の説明から理解されるように、所定の濃度の活性rhBSSLを提供するように適切な(絶対)濃度が合わせられてもよく(適切な量は、前記で示された範囲内にある)、および/またはこのような濃度は、(活性)モル(またはマイクロモル)量のrhBSSL/乳の単位体積、例えば、前記乳中にある結果として生じたモル濃度(M)のrhBSSL、または酵素活性(U)/乳の単位体積(例えば、U/mL)で表されてもよい。本発明の特定の態様において、rhBSSLは、約15~300単位、約50~150単位rhBSSL/mL乳児用調合乳または乳(U/mL)、約80~90U/mLまたは約87U/mLの乳児用調合乳または乳として投与される。

【0108】

本発明の特定の態様において、ヒト乳児はヒト低体重児である。ヒト乳児は出生時に低体重でもよく、例えば、体重が2,500g未満で生まれた低出生体重(LBW)児、体重が1,500g未満で生まれた極低出生体重(VLBW)児、または1000g未満で生まれた超低出生体重(ELBW)児でもよい。または、低体重乳児は、少ない出生質量(birth mass)(所定の在胎齢の平均出生時体重より少ない質量)を有することがある、または胎内発育遅延(SGA)である(質量が、所定の在胎齢の出生時体重の第10百分位数より少ない)。または、乳児は、成長障害(FTT)の乳児など、典型的な速度で成長していない時に低体重になることがある。

【0109】

乳児が低体重になる(生まれる)と考えられる様々な原因が存在する。特に、乳児は、早産で生まれたために低体重になることが多い。全ての早産児が低体重になるとは限らないが、早産児は脾機能および肝機能が完全に発達しておらず、多くの場合、正常産児と同じくらいよく育たないことがある。従って、本発明の別の特定の態様において、前記ヒト乳児はヒト早産児、すなわち、約40週間の正常妊娠期間の前に生まれた乳児であるか、または、特に、妊娠約第37週前に生まれた乳児である。ある特定のこのような態様において、前記ヒト早産児は、妊娠約37週~約32週に生まれた乳児である。特定のこのような態様において、前記ヒト早産児は、妊娠約32~25週に生まれた乳児または妊娠約25~22週に生まれた乳児である。他の特定のこのような態様において、前記早産児は、約第37週前に生まれたが、妊娠約21週後、妊娠22週後、または妊娠23週後に生まれた乳児である。

【0110】

当業者により理解されるように、在胎齢は、一般的に、母親の最終月経期(LMP)の初日から数え始めることによって計算されるが、インビトロ受精などのある特定の状況では、在胎齢は、受精齢(fertilization age)、胚齢(embryonic age)、受胎齢(conceptional age)、または子宮内発育(intrauterine developmental)(IUD)齢として知られる方法を用いて受胎日から計算することができる。この方法により、乳児は、妊娠が一般的なLMP法によって計算された場合より約2週間若いように見える。

【0111】

本発明の特定の態様において、前記ヒト乳児は産後0~200日である。例えば、最初の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの投与は、出生日に、または生後1日以内、2日以内、3日

10

20

30

40

50

以内、4日以内、5日以内、もしくは6日以内に、または生後約6ヶ月まで行われてもよい。ある特定のこのような態様において、本発明による最初の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ投与の際に、前記ヒト乳児は、産後4週未満、例えば、約3週未満、2週未満、または1週未満である。他のこのような態様において、本発明による最初の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ投与の際に、前記ヒト乳児は約1~2ヶ月であるか、または約2~4ヶ月、例えば、約5ヶ月である。

【0112】

本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは最初に投与されたら、複数日にわたって少なくとも1日1回(例えば、少なくとも1回の授乳と共に)投与される。例えば、rhBSSLは、少なくとも約4日続く期間にわたって、本発明に従って少なくとも1日1回投与されてもよい。ある特定のこのような態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、少なくとも約5日間、例えば、少なくとも約7日続く期間にわたって少なくとも1日1回(例えば、少なくとも1回の授乳と共に)投与される。特定のこのような態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、所定の日において前記乳児に与えられるほとんどの授乳と共に(またはその一部として)、例えば、1日約4回または12回の授乳、例えば、1日約4~10回の授乳、例えば、1日約6回、7回、または8回の授乳において投与される。別の非限定的な態様では、時として、乳児は、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの(同時)投与なく、(例えば、1日1回、2回、または3回)授乳されることがある。このような代わりの態様において、授乳が前記乳児に与えられるごとに、乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが(同時)投与される。すなわち、1日全ての授乳のために乳児にrhBSSLが投与される。

【0113】

ある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの投与レジメンは少なくとも約1週間または2週間の期間にわたって続く。特定のこのような態様において、この期間は、少なくとも約3週間、例えば、少なくとも約4週間である。本発明の代わりの態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、例えば、医学療法の過程の一部として、ヒト乳児が集中治療室から移されるまで、病院から退院するまで、医療の下もしくは監督下ではなくなるまで、または前記乳児が医学的に許容される量の不飽和脂肪酸、例えばAAおよび/またはDHAを吸収するまで投与される。

【0114】

本発明の特定の態様において、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収における増加は、前記乳児の発育速度における増加と同時に起こる。当業者により理解されるように、発育速度の増大または他の点では発育速度の改善もしくは強化を調査、モニタリング、追跡、および/またはチェックするために、任意の一般的な方法または許容される方法によってヒト乳児の発育をモニタリングすることができる。例えば、ヒト乳児の発育速度は、本発明の目的では、頭囲、身体質量(体重)、身長または脚長(例えば、膝から踵までの長さ)を定期的に(例えば、毎日)測定および記録することによってモニタリングされるか、またはモニタリングされてもよい。ヒト乳児の大きさおよび/または発育を測定する他の方法は一般に知られている。このような定期的な測定は発育速度、すなわち、単位期間での(例えば、1日当たりの)発育量に容易に変換することができる。本発明のある特定の態様において、ヒト乳児の発育速度の前記増大は、グラム/日として表される発育速度、グラム/Kg体重/日として表される発育速度(g/Kg/日)、グラム/日/100Kcalの消費エネルギー(g/日/100kcal)として表される発育速度、またはグラム/日/100mLの摂取される乳/調合乳(g/日/100mL)として表される発育速度などの前記乳児の体重増加速度の増大であるか、または前記乳児の体重増加速度の増大として測定される(もしくは他のやり方でモニタリングされる)。身体質量(体重)の測定は、乳児の発育をモニタリングする特に便利な方法である。発育速度を表すこのような2番目の方法(g/Kg/日)は、典型的には、大きな乳児の体重が同じ期間に小さな乳児より大きな絶対量分だけ増加するので、異なる大きさの乳児の絶対発育速度を標準化しようとする時に特に有用である。従って、ある特定のこのような態様において、本発明の実施に当たり、rhBSSLが投与された時、前記ヒト乳児によって達成さ

れる、前記ヒト乳児において観察される、または前記ヒト乳児から望まれる体重増加速度は、約10～30gの体重増加/Kg前記乳児の体重/日(g/Kg/日)である。特定のこのような態様において、このような体重増加速度は、約15～25g/Kg/日、例えば、約20g/Kg/日、または約18g/Kg/日である。

【0115】

本発明の他の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが投与されたヒト乳児における発育速度の増大は、rhBSSLが投与されていないヒト乳児より1g/Kg/日～8g/Kg/日多い、例えば、約2g/Kg/日、3g/Kg/日、4g/Kg/日、または5g/Kg/日多い体重増加である。本発明の代わりの態様において、発育速度の増大は、rhBSSLが投与されていないヒト乳児の発育速度の値より約5%～40%大きな体重増加、例えば、約20%大きな体重増加を含めて、約10%～30%大きな体重増加または15%～25%大きな体重増加である。

10

【0116】

理解されるように、ヒト乳児の体重は、rhBSSL投与に関連しない理由を含めて様々な理由で日々変化することがある。従って、1日当たりの量(または相対またはパーセント)として本明細書において述べられた発育速度は、日々または毎日、前記ヒト乳児によって達成されなくてもよく、前記ヒト乳児において観察されなくてもよく、または前記ヒト乳児から望まれなくてもよく、複数日にわたって、例えば、3日、5日、もしくは7日にわたって、またはさらに長期間、例えば、2週間、3週間、もしくは4週間、または、例えば、乳児にrhBSSLが投与されている期間にわたって、もしくは乳児が医療、例えば、NICU内で医療を受けている期間にわたって測定および評価される場合にしか、このように達成されない、観察されない、または望まれないことがある。

20

【0117】

本発明の他の態様において、発育増大は、脚の長さの増加として測定される(または他のやり方でモニタリングされる)。例えば、膝から踵までの長さの増加は、単位期間、例えば、1週間での発育mmとして表すことができる。さらに別の態様において、発育速度は、自身の大きさを基準にして、例えば、WHOの子供の発育および栄養不良に関する世界データベース(Global Database on Child Growth and Malnutrition of the WHO)を参照して子供の発育をモニタリングすることができる、子供の体重身長パーセント(W/H%)または標準偏差(SD)スコア(Zスコアとも知られる)を用いてモニタリングされる。

【0118】

本明細書の他の場所に記載のように、本発明者らは、2つの対照臨床試験およびこれらの2つの試験からの複合データの解析により例示されるように、本発明が、不飽和脂肪酸の群、部分群、および/または特定の不飽和脂肪酸の、組換え胆汁酸活性化リパーゼが投与されたヒト乳児による吸収を、そのような群、部分群、および/または特定の脂肪酸に関するCFA(脂肪吸収率)で測定して、増大させたことを観察した。CFAは例示において述べるようにモニタリングすることができる。

30

【0119】

本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、少なくとも1種類の(他の)栄養補助食品および/もしくは乳強化剤(milk fortifier)の前、後、または同時に投与される。いくつかのこのような栄養補助食品または乳強化剤は、ヒト乳児の発育の向上を助ける、または他のやり方でヒト乳児に利益を与えるために認可され、販売され、または他のやり方で使用され、当業者に周知であろう。非限定的な例として、このような栄養補助食品および/または乳強化剤には、Nutriprem、Milupa、Eoprotin、Enfami 1 Human Milk Fortifier、およびSimilac Human Milk Fortifierが含まれる。本発明のある特定の他の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、少なくとも1種類の他のリパーゼ、例えば、別の組換えヒトリパーゼの前、後、または同時に投与される。

40

【0120】

代わりの態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、追加の栄養補助食品および/もしくは乳強化剤(例えば、本明細書において説明および定義された栄養補助食品および/もしくは乳強化剤)が投与されることなく、または他のリパーゼが投与されることなく

50

投与される。

【0121】

理解されるように、本発明を実施することができる相対的な容易さのために、1つの態様では、ヒト乳児に経口授乳するために組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを乳児用調合乳に単に添加することによって投与できるために、医学的介入、監督、支援、または助言なく乳児の家で本発明が実施される。例えば、一般的に、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸(例えば、AAおよび/もしくはDHA)の吸収を助ける、ならびに/または赤ん坊の視覚発達/認知発達を助ける栄養補助食品としてとして販売されることがある。さらなる非限定的な例として、乳児用調合乳は、適量のrhBSSLを既に含む国内での使用のために製造および配布されてもよい。従って、ある特定の局面において、本発明は、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させるための非医学的方法に関する。

10

【0122】

または、本発明は、資格のある医療スタッフによって、または他のやり方で、例えば、病院または診療所において、例えば、ヒト早産児を看護している集中治療室において、医学的介入、監督、もしくは助言の下で、または医学的介入、監督、もしくは助言と共に実施することができる、または実施するように指導することができる。従って、本発明のこのような代替りの局面において、前記方法は、ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収および/またはヒト乳児に対する利用可能性を増大させる医学的方法に関する。このような局面において、乳児は、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を医学的に必要としてもよく、前記量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが治療的有效量でもよい。

20

【0123】

従って、前記に関連するさらなる局面において、本発明はまた、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするヒト乳児を治療するための治療方法であって、少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を医学的に必要とする乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、方法に関する。このような医学的介入を特に必要とする乳児は、それぞれの場合において、本明細書の他の場所において説明または定義され得るように、未熟児、例えば、妊娠約37週前に生まれた乳児、胎内発育遅延(SGA)児、低出生体重(LBW)児、および/または成長障害(FTT)児でもよい。

【0124】

別の局面において、本発明はまた、ヒト乳児の視覚発達および/または認知発達を改善する方法であって、前記乳児に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを経腸投与する工程を含む、方法に関する。ある特定の態様において、この局面は非医学的方法である。

30

【0125】

今や当業者に容易に明らかなように、前記の任意の態様、例えば、様々な組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ、投与量、投与方法および/またはレジメン、乳児の部分母集団について述べている態様、ならびにrhBSSL投与によって少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大をもたらすことができると述べている態様の1つまたは複数はまた、ヒト乳児の視覚発達および/または認知発達を改善する方法をさらに特徴付けることができる。例えば、ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達を改善する方法は、組換えハムスター卵巣細胞の発現産物から単離されたrhBSSLを使用してもよく、および/または1日当たり1~100mgの前記リパーゼ/Kg乳児体重の量で投与されてもよく、例えば、乳児用調合乳に入れて妊娠約37週前に生まれた早産児に投与されてもよい。

40

【0126】

本発明の関連する局面において、前述の方法(およびその方法のそれぞれの任意の態様)は、代わりに、ヒト乳児の視覚発達および/または認知発達の改善において使用するための組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼとして表され、前記リパーゼは経腸投与される。本発明の別の関連する局面において、前述の方法(およびその方法のそれぞれの任意の態様)はまた、ヒト乳児の視覚発達および/または認知発達の改善において使用するための薬学的組成物の製造における組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの使用として表されてもよく、前

50

記リパーゼは経腸投与される。

【0127】

本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、保管、配布、および/または本発明の改良された乳児用調合乳もしくは改良された乳への組み込みに適した形態で提供される。例えば、ある特定の態様において、前記リパーゼは凍結乾燥製剤として提供される。典型的に、前記リパーゼの凍結乾燥製剤は、都合よいサイズの容器、例えば、バイアルに入れて提供され、適切な量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含んでもよい。ある特定のこのような態様において、容器は、滅菌バイアルを含む滅菌容器である。凍結乾燥製剤として提供される時、rhBSSLは乳児用調合乳または乳に添加される前に可溶化されてもよく、例えば、滅菌水で可溶化されてもよい。または、rhBSSLの凍結乾燥製剤は前記乳児用調合乳または乳で直接可溶化されてもよい。

10

【0128】

利便性または無菌性もしくは安全性などの他の理由のために、本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは単位用量として提供される。単位用量は、別々のユニットまたは容器に入れられて単回投与するのに必要とされる十分な(またはわずかに多い)rhBSSLを提供してもよい。または、少数のこのような別々のユニットまたは容器、例えば、2〜5個のこのような別々のユニットまたは容器が一緒になって、単回投与するのに必要とされる十分な(またはわずかに多い)rhBSSLを提供する。ある特定のこのような態様において、単位剤形は、1.5〜75mgリパーゼの量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む。特定のこのような態様において、rhBSSLの量は5〜45mgまたは約20mgの前記リパーゼである。

20

【0129】

別の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは溶液として提供される。このような溶液中のrhBSSL濃度は1.5〜150mg/mLでもよく、ある特定のこのような態様において、7.5〜30mg/mLの濃度、例えば、約15mg/mLの濃度でもよい。

【0130】

本発明の特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、1つまたは複数の薬学的に許容される担体ならびにrhBSSLを含む、組成物として、または薬学的製剤、例えば、凍結乾燥組成物もしくは溶液組成物として提供される。適切な薬学的に許容される担体は必要とされるのであれば当業者に公知であり、本明細書の他の場所に記載の薬学的に許容される担体を含む。

30

【0131】

本発明のある特定の態様において、(rhBSSLを含む)改良された乳児用調合乳は、授乳のために既に調製されている。他の態様において、前記改良された乳児用調合乳は、前記乳児に与えられる前に処理に供される。例えば、調合乳は水に溶解されてもよく、および/または授乳に適した温度、例えば、37℃まで温められてもよい。特定のこのような態様において、改良された乳児用調合乳は粉末もしくは顆粒として、または使いやすい液体として、または濃縮懸濁液もしくは濃縮溶液として提供される。

【0132】

本発明のある特定の態様において、(rhBSSLを含む)改良された母乳は、授乳のために既に調製されている。他の態様において、改良された母乳は、前記乳児に与えられる前に処理に供される。例えば、改良された母乳は冷凍状態から解凍されてもよく、および/または授乳に適した温度、例えば、37℃まで温められてもよい。

40

【0133】

本発明の特に現実的な局面は、(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための;ならびに/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善において使用するための改良された乳児用調合乳または改良された母乳を調製するためのキットであって、以下の成分:

a. 第1の量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ、例えば、凍結乾燥製剤または溶液製剤の形をした第1の量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む、少なくとも1つの第1の容器;

50

ならびに

b. 第2の量の改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳および/もしくは冷凍母乳を含む、第1の容器とは異なる少なくとも1つの第2の容器を含む、

前記リパーゼおよび前記改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳はそれぞれ、前記改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳が前記乳児に与えられた時に、例えば、少なくとも約4日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために、少なくとも約5日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために、または少なくとも約7日にわたって少なくとも1日1回の授乳のために前記乳児に与えられた時に、(a)前記乳児による前記不飽和脂肪酸の吸収を増大させる;ならびに/または(b)前記乳児の視覚発達および/もしくは認知発達を改善するのに有効な量の前記リパーゼを含む、改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳をそれぞれ調製するのに十分な量である、キットに関する。

10

【0134】

ある特定の態様において、キットは説明書をさらに含む。このような説明書は、(A)前記乳児が(a)少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とする、または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするものとする;ならびに/あるいは(b)視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とする、または視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とするものとすると説明してもよい。代替りのこのような態様において、説明書は、(B)組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが臨床試験において有効かつ安全だと示され、かつヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸、例えば、脂肪酸AAおよび/またはDHAの吸収を増大させる(または他のやり方でヒト乳児に対する利用可能性を増大させる)と示されていると説明してもよい。

20

【0135】

本発明のさらなるある特定の態様において、キットの中の説明書は、

i. ある量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を調製して、例えば、ある量の前記リパーゼを改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳に添加することによって、ある量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を調製して、それぞれ、改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を形成する工程;および

30

ii. 前記改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を、本明細書において説明または定義された投与レジメンにわたって少なくとも1日1回の授乳のためにヒト乳児に与える工程

について説明してもよい。

【0136】

別の局面において、本発明は、

(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させる;ならびに/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達を改善する方法であって、

i. 改良された乳児用調合乳もしくは改良された低温殺菌母乳を調製する工程または他のやり方で提供する工程であって、それぞれの場合において、改良された乳児用調合乳もしくは改良された低温殺菌母乳がrhBSSLを含むか、または前記方法によって、もしくは前記キットを使用することによって調製される、工程;

40

ii. このように調製された、または他のやり方で提供された改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を前記乳児に与える工程;ならびに

iii. 本明細書において説明または定義された投与レジメンにわたって前記工程を繰り返す工程

を含む、方法に関する。

【0137】

ある量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む薬学的組成物を含む包装された薬学的

50

製品に関するなおさらなる局面は、本発明によって本明細書において提供される医学的用途または治療用途のために特に有用である。前記包装された薬学的製品は、

i. ある量の前記リパーゼを含有する改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を調製する工程;および

ii. 前記改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳を、例えば、本明細書において説明または定義された投与レジメンにわたって少なくとも1日1回の授乳のためにヒト乳児に与えることによって前記量のリパーゼを経腸投与する工程

について説明している説明書をさらに含む。前記説明書は、(A)前記乳児が(a)少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とする、または少なくとも1種類の不飽和脂肪酸を必要とするものとする;ならびに/あるいは(b)視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とする、または視覚発達および/もしくは認知発達の改善を必要とするものとする;ならびに/あるいは(B)組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが臨床試験において有効かつ安全だと示され、かつヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸、例えば、脂肪酸AAおよび/またはDHAの吸収を増大させる(または他のやり方でヒト乳児に対する利用可能性を増大させる)と示されていると説明している。

【0138】

本発明の他の態様において、包装された薬学的製品は乳児用調合乳または低温殺菌母乳をさらに含む。前記乳児用調合乳または低温殺菌母乳は、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼに対して別個の成分として包装された薬学的製品の中に含まれてもよい。すなわち、前記乳児用調合乳または低温殺菌母乳は、改良されていない乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳でもよい。代わりのこのような態様において、包装された薬学的製品は、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを既に含んでいる乳児用調合乳または低温殺菌母乳を含んでもよい。すなわち、前記乳児用調合乳または低温殺菌母乳は、改良された乳児用調合乳または改良されていない低温殺菌母乳でもよい。このような態様のいずれにおいても、乳児用調合乳は、可溶化するために乾燥した顆粒または粉末として提供されてもよく、適切な容器に入れた液体として(適切な濃度の液体として、もしくは濃縮物として)提供されてもよく、または冷凍試料として提供されてもよい。

【0139】

この包装された薬学的製品のある特定の態様において、薬学的組成物は、本明細書の他の場所において説明または定義された薬学的組成物である。

【0140】

本発明のなおさらなる局面において、包装された薬学的製品の中にある薬学的組成物は、0.1~100mgの組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む単位用量を含む。単位用量は当業者に容易に理解され、例えば、本明細書の他の場所において説明または定義された単位用量を含む。このような局面のある特定の態様において、単位用量は1.5~75mgのrhBSSLを含む。特定のこのような態様において、単位用量は、5~45mgの前記rhBSSL、例えば、約10mg、15mg、20mg、または25mgの前記リパーゼを含む。

【0141】

前記の酵素量に関する議論から理解されるように、本発明のある特定の態様において、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼの単位用量は、rhBSSLの絶対質量または活性rhBSSLの質量を含む様々なやり方で表すことができる。または(もしくはさらに)、rhBSSL量は酵素の単位(U)で表すことができる。従って、特定の態様において、単位用量は、約2,000~20,000単位のrhBSSL(U)、約5,000~約15,000単位、例えば、約7,000~10,000単位の量のrhBSSLを含む。

【0142】

さらなる局面において、本発明はまた、(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための;ならびに/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善において使用するための組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼに関する。治療目的の関連する局面において、本発明はまた、(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大において使用するための;ならびに/または(b)ヒト乳

児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善において使用するための、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼを含む薬学的組成物に関する。

【0143】

今や当業者に容易に明らかなように、前記の任意の態様、例えば、様々な組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ、投与量、投与方法および/またはレジメン、乳児の部分母集団について述べている態様、ならびにrhBSSL投与によって少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収の増大をもたらすことができると述べている態様の1つまたは複数または、これらの局面をさらに特徴付けることができる。例えば、(a)ヒト乳児による少なくとも1種類の不飽和脂肪酸の吸収を増大させるための;ならびに/または(b)ヒト乳児の視覚発達および/もしくは認知発達の改善するための、このような局面は、組換えハムスター卵巣細胞の発現産物から単離されたrhBSSLを使用してもよく、および/または1日当たり1~100mgの前記リパーゼ/Kg乳児体重の量で投与されてもよく、例えば、乳児用調合乳に入れて妊娠約37週前に生まれた早産児に投与されてもよい。

10

【0144】

このような局面のある特定の態様において、本発明の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼまたは薬学的組成物は、単位用量、例えば、前記の単位用量の中にある。

【0145】

ある特定の態様において、本発明の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼまたは薬学的組成物は経腸投与および/またはヒト乳児への投与に適合されており、例えば、前記単位用量はヒト乳児への経腸投与に特に適合されている。例えば、前記単位用量は、乳児用調合乳もしくは母乳食品に添加するのに適した、または乳児用調合乳もしくは母乳食品として調製するのに適した量のおよび/または製剤の中にある、凍結乾燥された、可溶化された、または冷凍された量の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼである。他の態様において、単位用量は、本明細書の他の場所において説明または定義された形態、容器、または量のrhBSSLで提供されてもよい。

20

【0146】

これらの局面の特定の態様において、本発明の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼまたは薬学的組成物は乳児用調合乳の中に含まれる、または低温殺菌母乳の中に含まれる。

【0147】

今や当業者に理解されるように、任意のキットもしくは薬学的組成物を構成する、または任意の方法において用いられる組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼは、本明細書の他の場所において説明または定義された任意の組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼでよい。

30

【0148】

本発明に関して、改良された乳児用調合乳もしくは改良された低温殺菌母乳の調製もしくは提供を必要とする任意の前記方法、またはこのような調製もしくは提供について説明している説明書を含むそのキットもしくは包装された薬学的製品において、このような局面のある特定の態様において、改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳が調製される前に、組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼおよび/または改良されていない乳児用調合乳もしくは改良されていない低温殺菌母乳が解凍および/または可溶化されることが必要な場合がある。このような調製または提供は、改良されていない乳児用調合乳(例えば、乾燥プレミックスとして提供される)または改良されていない冷凍した低温殺菌母乳に組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼが添加されることを含んでもよい。他の態様において、このような調製または提供は、最初に、改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳が解凍される、および/またはヒト乳児への授乳に適した温度、例えば、37℃まで温められることを含んでもよい。他の態様において、最初に、改良されていない冷凍母乳は解凍され、次いで、rhBSSLが添加され、次いで、例えば、前記リパーゼが凍結乾燥粉末または顆粒の形として提供されるのであれば可溶化される。

40

【0149】

本明細書における本発明の開示の際に当業者により理解されるように、本発明の改良された乳児用調合乳もしくは改良された低温殺菌母乳、またはキット、包装された薬学的製

50

品、rhBSSL、または薬学的組成物は、治療レジメン全体の必要を満たす分量、サイズ、または量である必要はない。例えば、新鮮な分量の改良された乳児用調合乳または改良された低温殺菌母乳は、例えば、複数のキットまたは薬学的組成物が治療レジメンの間に用いられるように、ヒト乳児に投与されるたびに本発明のキットまたは薬学的組成物から調製されてもよい。

【0150】

本明細書に含まれる開示を考慮すれば、特定の問題または環境への本発明の開示の適用は当業者の能力の範囲内であることが理解されるはずである。本発明の生成物、組成物、包装容器、またはキット、およびこれらを調製または使用するための代表的な方法またはプロセスの例を以下に示す。

10

【0151】

本明細書において引用された全ての参考文献、特許、および刊行物はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0152】

例示

実施された実験および達成された結果を含む以下の例示は本発明における特定の様々な本発明の態様も例示し、例示のためだけに提供され、本発明を限定すると解釈してはならない。

【0153】

20

セクション1: 原薬、その特徴付け、および治験薬製品の調製

標準的な手順に従って、SEQ ID.NO.1に示した予測アミノ酸配列を有する原薬であるヒト胆汁酸活性化リパーゼを、ヒトBSSLをコードするヌクレオチド配列を含む核酸発現系を含有する組換えチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞から発現させることによって産生した。簡単に述べると、(Nilsson et al., 1990; Eur J Biochem, 192: 543-550に記載のように)リーダー配列を含む完全長hBSSLをコードする2.3Kb cDNA配列を、pS146(Hansson et al., 1993; J Biol Chem, 268: 26692-26698)から入手し、遺伝子発現用のCMVプロモーター/SV40ポリAシグナルおよび選択/増幅用のdhfr遺伝子を含むpBRベースのプラスミドである発現ベクターpAD-CMV1(Boehringer Ingelheim)にクローニングして、pAD-CMV-BSSLを形成した。次いで、DHFR陰性CHOss細胞(Boehringer Ingelheim)のトランスフェクションと、ジェネティシン(G418)耐性を選択するネオマイシン耐性をコードするプラスミドpBR3127SV/Neo pAのコトランスフェクションのためにpAD-CMV-BSSLを用いて、DHFR陽性BSSL産生CHO細胞を作製した。結果として生じたCHO細胞を、多量のrhBSSLを発現する条件およびスケールで培養した。例えば、マスター細胞バンク(MCB)からの細胞を解凍し、グルタミンおよびグルコースを含まないEx-Cell 302培地(SAFC)を使用し、後でグルタミンおよびグルコースを添加したEx-Cell 302培地を使用して振盪フラスコの中で増やし、15Lおよび100Lバイオリアクターに入れて増殖させた後に、BSSLが流加培養プロセスで構成的に発現および産生される700L製造用バイオリアクターに接種した。培養物をシングルバッチとして収集し、陰イオン交換クロマトグラフィー工程を含む多数の下流工程を介して、成熟rhBSSLポリペプチド(すなわち、リーダー配列を含まない)を細胞、細胞破片、および他の夾雑物から精製した。夾雑ウイルスを低pH処理および乾熱処理工程によって不活化してもよい。rhBSSL原薬(DS)バルクを適切な製剤になるまでダイアフィルター(diafilter)に供し、濃縮した。処方後、凍結乾燥および熱処理のために材料を1~3つのバッチに分けて、1~3つのDSバッチを作製した。

30

40

【0154】

この哺乳動物細胞発現系においてrhBSSLを産生すると、SEQ ID.NO.1に示した予測アミノ酸配列および図1.1に模式的に示した構造を有するrhBSSLが産生される。図1.1には潜在的なグリコシル化の部位も示す。

【0155】

この形態のrhBSSLは、ヒト乳において見られる天然hBSSL(BSSL-MAM)とは異なり、rhBSS

50

L-OVI(トランスジェニックヒツジから産生される)とも異なるグリコシル化を示すように見える。例えば、高pH陰イオン交換クロマトグラフィーとパルスアンペロメトリック検出(HPAEC-PAD)を使用して、本明細書に記載の臨床試験のために産生および使用されたCHO由来rhBSSL(rhBSSL-CHO)の単糖およびシアル酸グリコシル化レベルが求められ、BSSL-MAMより低い、rhBSSL-OVIより高い総グリコシル化レベルを有することが見出された(表1.1を参照されたい)。これらの全グリコシル化レベルは、それぞれの形態のBSSLの全分子量と相関関係にあった。それぞれの形態のBSSLの全分子量はMALDI-MSによって求められ、rhBSSL-CHOについては約85KDaであったのに対して、BSSL-MAMについては100KDa、rhBSSL-OVIについては78KDaであることが見出された。表1.1に示したように、rhBSSL-CHOの可能性があるグリコシル化部位におけるグリコシル化(単糖およびシアル酸)のパターンまたはプロファイル、特に、O-グリカンのグリコシル化(単糖およびシアル酸)のパターンまたはプロファイルはrhBSSL-MAMおよびrhBSSL-OVIと比較して異なる(キャピラリー電気泳動とレーザー誘起蛍光検出[CE-LIF]および/またはHPAEC-PADを用いた検出)。

【0156】

(表1.1)rhBSSL-CHO、rhBSSL-OVI、およびhBSSL-MAMの単糖含有量およびシアル酸含有量[モル/(モルBSSL)]

	rhBSSL-CHO	hBSSL-MAM	rhBSSL-OVI
単糖含有量			
フコース	2.0	30.6	1.3
ガラクトサミン	16.6	15.8	3.0
グルコサミン	2.1	37.6	0.0*
ガラクトース	17.5	51.8	3.4
グルコース	0.0	0.0	0.0
マンノース	5.0	9.8	2.5
合計	43.2	145.6	10.2**
シアル酸含有量			
N-アセチルノイラミン酸	27.9	16.4	0.5
N-グリコシルノイラミン酸	0.0	0.0	5.0
合計	27.9	16.4	5.5

*rhBSSL-OVI材料中のグルコサミンを分析した時に、クロマトグラムに小さなピークが見られた。しかしながら、較正曲線の交点の方が大きく、交点が差し引かれたために、このような少ない量はマイナス値として計算されたので、値を報告しなかった。絶対/未修正の推定値は1.8モルのグルコセアミン(glucoseamine)/モルBSSLであった。

** (絶対/未修正)グルコサミンを含む合計は12モル/モルBSSLであった。

【0157】

rhBSSL-CHOのグリコシル化の程度および分布がBSSL-MAMのグリコシル化の程度および分布ならびにrhBSSL-OVIのグリコシル化の程度および分布と異なるだけでなく、C末端アミノ酸配列(例えば、エンドプロテインGlu-Cペプチドマッピング、および液体クロマトグラフィーとエレクトロスプレーイオン化質量分析[LC-ESI-MS-MS]を用いた配列特定によって決定された)によって、リパーゼ分子の大部分は、(予測)完全長ポリペプチド分子と比較して1アミノ酸(時として、2アミノ酸)短いことが見出された。完全長C末端が配列決定された分子1つにつき、C末端の最後のアミノ酸が切断された分子が約3つ検出された。最後の2アミノ酸が切断された小さな割合のC末端配列が検出された。例えば、(完全に近い長さの)リパーゼ分子のこの集団のうち、約25%が完全長であり、約75%が1アミノ酸短く、1%未満が2アミノ酸短い。

【0158】

rhBSSL-CHOとBSSL-MAMとrhBSSL-OVIとの間で機能特性の違いが観察された。rhBSSL-CHO

の比活性は他の形態のBSSLの比活性より高いことが観察された。BSSL-MAMおよびrhBSSL-0 VIの比活性は質量ベースでrhBSSL-CHOの比活性の80%しかない。それぞれの試料をHA-HPLCおよびSE-HPLCによって特異的に精製した後に、比活性を求める。比活性は、BSSL基質として4-ニトロフェニルエステル酪酸(PNPB)および4-ニトロフェノール放出の検出を用いて求められる。簡単に述べると、rhBSSLの希釈系列(例えば、20~160ng活性/mL)を、0.1%BSAを含むPBSで調製する。これらのrhBSSL溶液200 μ lを、0.1%BSAを含むPBSで溶解した20 mMコール酸ナトリウム(胆汁酸活性化剤)を含有する活性化溶液25 μ lに添加する。これらの溶液を分光光度計に入れて27°Cで5分間プレインキュベートする。測定直前に、PBS-Tween中に5mM PNPBを含有する、よく混ぜた基質溶液25 μ lを添加する。4-ニトロフェノール形成を、400nmでの4-ニトロフェノール吸光度によって検出することができ、90秒間の吸光度増加を測定する。rhBSSL標準品の検量線を用いてBSSL活性量を求める。

10

【0159】

注射用水に溶解した凍結乾燥原薬から治験薬製品を調製した。溶液を予め濾過し(10 μ l)、注射用水で最終(活性)濃度まで調節した。生成物を0.22 μ mフィルターで濾過し、予め滅菌した10mLガラスバイアルに詰めた。バイアルに、滅菌した栓を付け、アルミニウムキャップで密封した。

【0160】

セクション2:rhBSSLを用いた2つの第II相試験からの複合データに関する簡略データ

プロトコル番号:BVT.BSSL-020

EUDRACT番号:2007-002423-33

20

Clinicaltrials.gov識別子:NCT00658905

在胎齢32週前に生まれた早産児における1週間の治療中に、乳児用調合乳に添加された0.15g/L rhBSSLとプラセボを比較する、前向き無作為化二重盲式クロスオーバー試験および

プロトコル番号:BVT.BSSL-021

EUDRACT番号:2007-002434-10

Clinicaltrials.gov識別子:NCT00659243

在胎齢32週前に生まれた早産児における1週間の治療中に、低温殺菌母乳に添加された0.15g/L rhBSSLとプラセボを比較する、前向き無作為化二重盲式クロスオーバー試験

【0161】

30

略語表

AA	アラキドン酸	
AE	有害事象	
ANCOVA	共分散分析	
ANOVA	分散分析	
BSSL	胆汁酸活性化リパーゼ	
CFA	脂肪吸収率	
CRF	症例報告書	
DHA	ドコサヘキサエン酸	10
FA	脂肪酸	
FAS	最大解析対象集団	
g	グラム	
ICH	医薬品規制調和国際会議	
kg	キログラム	
MedDRA	医薬品規制用語集	
mm	ミリメートル	20
N/A	該当なし	
PP	パー・プロトコル	
PT	優先使用語	
rhBSSL	組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ	
SAE	重大な有害事象	
SAP	統計解析計画書	
SAS [®]	統計解析ソフトウェア	30
SD	標準偏差	
SOC	器官別大分類	
TEAE	治療下で発現した有害事象	
TLFs	表、データリスト、および図	

【0162】

1序論

早産児においてrhBSSLを用いた2つの第II相試験、試験BVT.BSSL-020および-021が実施された。両試験の主要目的は、調合乳(試験-020)または低温殺菌母乳(試験-021)に入れて投与された時の、rhBSSLを用いた治療後の早産児における脂肪吸収(脂肪吸収率、CFA)を、プラセボを用いた治療後の早産児における脂肪吸収(脂肪吸収率、CFA)と比較することであった。副次的目的は、乳児用調合乳/低温殺菌母乳に入れて投与された時の、rhBSSLを用いた治療後の早産児における身長および体重を、プラセボを用いた治療後の早産児における身長および体重と比較すること、ならびに乳児用調合乳/低温殺菌母乳に入れて投与された時のrhBSSLの安全性を試験することであった。

40

【0163】

それぞれの試験における標本サイズの評価は、90%の検出力および5%の有意水準での治療期間の間の推定された10% CFA単位差および15%標準偏差に基づいた。10%のCFA差は発育速度において2g/kg/日の差をもたらすと予測された。しかしながら、どの試験も、それぞれの試験において患者数(32人)が少なく、治療期間(1週間)が短いために、発育の改

50

善を証明するのに十分な検出力を有すると予測されなかった。従って、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、プラセボと比較したrhBSSLを用いた治療後の発育の改善を証明するという主要目的をもつ、2つの試験の予め定義された複合解析を、別の統計解析計画(SAP)に記載した。複合データのSAPを開発および完成した後に、2つの試験のいずれかにおいてデータベースのロックおよび臨床データベースの盲検解除を行った。

【0164】

さらに、SAPに記載されていない、いくつかの事後解析も実施されており、ここに報告する。

【0165】

本報告は、2つの試験からのデザインおよび結果をまとめたものであり、複合解析に焦点を当てているが、多くの場合において試験による結果を示している。本報告は、個々の試験報告に示された情報、複合解析の統計報告、および事後解析の統計報告に基づく。

【0166】

両試験ともICH GCPガイドラインおよびヘルシンキ宣言に則って実施された。両試験とも適切な独立倫理委員会(Independent Ethics Committees)によって認可され、組み入れられた全ての患者の保護者からインフォームドコンセントが得られた。

【0167】

2複合解析の解析目的

2.1主要目的

複合解析の主要目的は、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、プラセボと比較した組換えヒト胆汁酸活性化リパーゼ(rhBSSL)を用いた治療後の発育の改善を証明することであった。

【0168】

2.2副次的目的

副次的目的は以下の通りであった。

- ・乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、プラセボと比較したrhBSSLを用いた治療後の早産児における脂肪吸収の改善を証明する。
- ・乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、rhBSSLを用いた治療後の早産児における膝から踵までの長さを、プラセボを用いた治療後の早産児における膝から踵までの長さと比較する。
- ・乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、早産児におけるrhBSSLの安全性および忍容性を評価する。

【0169】

2.3探索的効力目的

探索的効力目的は、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、プラセボ治療に対するrhBSSL治療後の早産児における、調合乳および母乳の両方に存在する長鎖多価不飽和脂肪酸(LCPUFA)-ドコサヘキサエン酸(DHA)およびアラキドン酸(AA)の吸収を探索することであった。

【0170】

3試験デザイン

2つの試験の試験デザインおよび手順は授乳法以外は同一であった(試験BVT.BSSL-020では調合乳を使用し、試験BVT.BSSL-021では低温殺菌乳を使用した)。従って、2つの試験からのデータの複合は適切である。それぞれの試験は、評価可能な26人の患者を得るために32人の患者を登録する計画を立てた。

【0171】

最初の7日間、患者を、最終濃度0.15g/LのrhBSSLが添加された乳児用調合乳/低温殺菌母乳または滅菌注射用水が「添加された」乳児用調合乳/低温殺菌母乳(プラセボ)に無作為化した。2日間のウォッシュアウト期間後、次の7日間の治療期間、患者を他の治療レジメンに「クロスオーバー」した。CFA評価のために、それぞれの治療期間の最後の3日間(7

10

20

30

40

50

2時間)、糞便試料を収集した。

【0172】

全ての組み入れ基準が満たされ、除外基準がどれも満たされなかった後、患者を登録し、新生児集中治療室においてこれらの試験に無作為化した。020試験に登録する前に他の乳児用調合乳が与えられた乳児は、登録日に、その時に使用していた調合乳から試験調合乳に切り替えられた。Eoprotin以外の乳強化剤が与えられていた021試験の患者については、乳強化剤を中断する。および/または初回投与の少なくとも2日前にEoprotinに切り替えることが必要であった。

【0173】

試験デザインを図2.1に示した。

10

【0174】

試験評価計画を以下の表2.1に示した。

【0175】

(表2.1.) 試験評価計画

来診	1*	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	スクリーニング	ベースライン							WO	WO								追跡調査
日	-7~-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	16 ^{##}
インフォームドコンセント	X																	
病歴	X																	
組入/除外	X																	
人口統計データ	X																	
定型検査、利用可能な場合#	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X
身体検査	X							X			X						X	X
無作為化																		
体重(グラム)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
膝から踵までの発育(ミリメートル)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
体温	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ^{###}	X
血圧/心拍数	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ^{###}	X
ECG、利用可能な場合#	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X	# X
おもつかぶれのチェック		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
併用薬	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
試験薬物の投与		X	X	X	X	X	X	X										
食物摂取の記録		X	X	X	X	X	X	X										
吐瀉物の秤量																		
追跡色素					X	X	X	X									X	
糞便の収集**					X	X	X	X									X	
忍容性の評価 (糞便の粘度/色、吐き戻し)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
有害事象		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

* 来診1および来診2は同時に行うことができた。全てのベースライン評価は試験薬物投与前に実施され、CRFに記録された。

** 糞便の収集は第1の色素が現れてから、第2の色素が現れるまで続けた。第2のマーカ含有する糞便は収集しなかった。

10

20

30

40

50

*** 試験用調合乳または乳の摂取は、第2の色素が糞便中に現れるまで続けた。

#通常の看護の中で入手可能な時だけ記録した。試験のために、余分な血液試料もECGも採取しなかった。

##来診17は、第2の追跡色素が現れるまで、必要であれば16日目を過ぎて延長した。

###生命徴候は、第2の追跡色素が現れるまで毎日収集した。

【0176】

4患者の選択

これらの試験のために選択された患者は、在胎齢32週前に生まれ、かつ登録時に妊娠32週間6日(推定年齢)以下であった乳児であった。これらの試験に登録した乳児には、非経口栄養(グルコースを除く)を与えなかった。

【0177】

4.1組み入れ規準

試験に組み入れるために、患者は以下の基準を満たさなければならない。

1. 妊娠32週前に生まれ、かつ登録時に妊娠32週6日(推定年齢)以下であった早産児
2. 在胎齢に適した早産児(それぞれの実施施設は、その実施施設の発育曲線または手順を使用し、使用された発育曲線または手順のコピーを試験責任者のファイルに保管しなければならない。1箇所の実施施設にいる全ての患者に同じ発育曲線を使用しなければならない)
3. 母乳を与えようと考えていない母親をもつ、乳児用調合乳が与えられている早産児
4. 経口栄養または経腸栄養(哺乳瓶または経鼻チューブ)が与えられている早産児

【0178】

4.2除外基準

以下が存在すれば、試験への組み入れから患者が排除される:

1. 非経口栄養(グルコースを除く)が与えられている乳児
2. BVT.BSSL-020の場合:乳強化剤(例えば、Enfamil、Nutripren、Milupa Eoprotin(商標登録))が与えられている乳児

・初回投与の2日前に強化剤の使用が中断されるのであれば、乳強化剤が与えられている他の点で資格のある乳児が登録されることがある。

BVT.BSSL-021の場合:Eoprotin(登録商標)(例えば、Enfamil、Nutripren)以外の乳強化剤が与えられている乳児

・初回投与の2日前に強化剤の使用が中断されるのであれば、Eoprotin(登録商標)以外の乳強化剤が与えられた他の点で資格のある乳児が登録されることがある。

3. 機械的換気を必要とする乳児
4. 胎内発育遅延(SGA)児
5. $>30\%O_2$ を必要とする乳児
6. 光線療法を受けている乳児(光線療法を完了し、他の点で試験資格のある赤ん坊が登録されることがある)
7. グレードIIIもしくはIVの脳室周囲出血もしくは脳室内出血、髄膜炎または水頭症、グレードIIIもしくはIVの頭蓋内出血、脳室周囲白質軟化症を含む重篤な脳疾患をもつ乳児
8. 発育および発達に影響を及ぼす可能性のある重大な異形症または先天性異常
9. 血行力学的に重大な動脈管遺残(PDA)をもつ乳児
10. 敗血症の臨床エビデンス(少量もしくは多量の白血球数および/または少量の血小板数、ならびに細菌学的に証明された全身感染エビデンスを含む)
11. 先天性感染症(例えば、CMV)の記録
12. 壊死性腸炎の存在
13. 出血性肺事象

14. ヒドロコルチゾン以外のコルチコステロイドを用いた前治療または併用治療

15. 試験責任者の意見によって患者が組み入れに不適切になる任意の状態

16. スクリーニング来診の2日以内から追跡調査来診が完了するまで、同時に行われている別の臨床研究に登録していること

10

20

30

40

50

【0179】

4.3療法または評価からの対象の除去

試験責任者の意見で医学的に必要であれば、または患者の親もしくは法的な保護者の希望があれば、患者は試験薬物から脱落した。

治療からの脱落の他の理由は以下を含んでもよい。

- ・試験への不正確な組み入れ
- ・重大なプロトコル違反
- ・有害事象

【0180】

5治療

10

5.1投与された治療

投与された調合乳または乳の量は、毎朝、CRFに記録された時の患者の体重に基づいた。調合乳または低温殺菌母乳の中のrhBSSL濃度は0.15g/Lで一定していた。無作為化計画に応じて、rhBSSLを含む、rhBSSLを含まない調合乳(試験020)または低温殺菌母乳(試験021)を7日間、患者に与えた。患者がプラセボに割り当てられた時に、対応する量の滅菌注射用水(WFI)を、rhBSSLを含まない低温殺菌母乳に添加した。毎朝、投与された調合乳/乳の量をCRFに記録した。

治療		薬物	剤形	経路	調合乳/乳中のrhBSSL用量	授乳法
A	BSSL	rhBSSL	液体溶液	経口	0.15 g/L*	体重による*
B	プラセボ	注射用滅菌水	液体溶液	経口	rhBSSLと一致する体積	体重による*

20

*乳児には約150～180mLの乳/kg体重/日を与えた。特定の乳児に対するmL/kg単位での授乳量は両期間とも一定であった。

【0181】

5.2治験薬の情報

例示のセクション1(前記)に記載のように、組換えヒトBSSL原薬および治験薬製品(IMP)を調製した。

30

【0182】

組換えヒトBSSLを、10mLガラスバイアルに入っている冷凍経口溶液として与えた。濃度は15mg/mLであり、充填体積は1.3mLであった。試験薬物は、部外者が近づけない試験センターの場所に冷凍保管(-25℃～-15℃)しなければならなかった。

【0183】

投与前に、冷凍溶液を解凍し、食品中に最終濃度0.15g/Lとなるように、0.9mLアリコートのrhBSSL溶液を90mLの調合乳(試験020)または低温殺菌母乳(試験021)に移した。プラセボ調合乳/乳を、rhBSSL溶液の代わりに0.9mLの滅菌水を使用して同じように調製した。

【0184】

これらの両試験において2つのIMPロットを使用した。

40

【0185】

サプリメントとしての強化剤Eoprotin(登録商標)の添加は試験021(母乳)全体を通じてしか許可されなかった。しかしながら、Eoprotin(登録商標)の量は治療期間中に一定でなければならなかった。

【0186】

5.3濃度の選択

低温殺菌乳および調合乳に添加されるrhBSSLの濃度は、母乳に通常存在する0.1～0.2g/Lのレベルに基づいて選択された。

【0187】

5.4盲検化

50

無作為化計画は、Biovitrumの委任された者によって安全で施錠された場所において維持され、データベースのロックがなされるまで病院職員にも、試験責任者にも、Biovitrum従業員にも、親にも明らかにされなかった。調合乳または低温殺菌母乳へのrhBSSL/プラセボの添加は、治療の割り付けを知っており、患者の評価に関与しない薬剤師または委任された者によって行われた。

【0188】

5.5前療法および併用療法

試験責任者の自由裁量で、患者の幸福に必要とみなされた他の療法を与えることができた。このような全ての療法をCRFに記録した。非経口栄養(グルコースを除く)、最初の試験薬投与の2日以内から最後の投与の2日後までの乳強化剤(前記の試験021におけるEoprotinを除く)、およびヒドロコルチゾンを除くコルチコステロイドの併用投与が試験中に禁止された。試験中の他の薬物は試験薬物と併用されなかった。患者は、別の臨床研究に同時参加することが許されなかった。

10

【0189】

早産児は、治療介入を必要とする合併症を経験することが多い。これは、薬物療法が授乳を妨げない限り許容することができた。併用薬物療法によって非経口栄養が必要とされた場合、患者は試験から脱落した。同様に、壊死性腸炎または腹部閉塞などの経腸栄養の吸収に影響を及ぼす合併症が発症した場合は、患者は試験への参加を中断する必要があった。

20

【0190】

72時間の糞便収集中に、皮膚刺激治療のための軟膏を使用することは禁止された。皮膚を乾燥した状態に保つために、72時間の収集期間中に、おむつを頻繁に交換した。糞便収集の中断につながる、発疹が重篤な患者は試験から脱落した。

【0191】

6複合データに関する解析のための試験評価

6.1それぞれの試験における効力評価

6.1.1体重

患者の体重を、秤を用いてグラム単位で少なくとも ± 5 グラムの正確度で毎日記録し、CRFに入力した。可能な限り、毎日、ほぼ同じ時間に体重を測定した。

【0192】

30

6.1.2試料の収集

試験BVT.BSSL-021では4~7日目および13~16日目に、母乳のアリコートを採取した後にrhBSSLまたはプラセボを添加した。

【0193】

CFAを求めるために、脂肪、すなわち、調合乳または乳の摂取に対応する期間にわたり、それぞれの治療期間が終わるまで72時間、糞便の収集を行った。それぞれの実施施設に支給されたおむつを糞便収集に使用した。2つの治療期間中に、カルミン赤色追跡色素をマーカーとして食事(正午ごろ)と一緒に4日目および13日目にそれぞれ与えた。糞便収集は、糞便中に第1のカルミン赤色マーカーが現れるのと同時に開始した。第1のマーカーを含有する糞便を収集し、収集された第1の糞便の日時をCRFに記録した。第1の赤色マーカーを投与して72時間後に、第2のカルミンマーカーを与え、第2のカルミンマーカーが現れるまで糞便収集を続けた。第2のマーカーを含有する糞便を収集しなかったが、第2のマーカーが現れた日時をCRFに記録した。おむつをあてる前、取り外した後に秤量し、重量の差をCRFに記録した。それぞれの収集の時間および収集期間全体の経過期間もCRFに記録した。糞便収集期間中に皮膚刺激治療のための軟膏を使用することは禁止された。皮膚を乾燥した状態に保つために、収集期間中に、おむつを頻繁に交換した。糞便収集の中断につながる、発疹が重篤な患者は試験から脱落した。具体的な収集方法を別の実験マニュアルに示した。該当する場合には、両治療期間の糞便収集期間からの吐瀉物を秤量した。小さな布/リネンを秤量し、各乳児の頭の下に置いた。布/リネンが吐瀉物で汚れた時、布/リネンを取り外し、再秤量した。乳児から吐瀉物を取り除くために追加の布が用いられた場

40

50

合には、その布も使用前後に秤量した。吐瀉物の重量(総重量-布/リネンの重量)をCRFに記録した。他の全ての食品の損失、例えば、哺乳瓶に残っている調合乳または乳を測定し、授乳ごとに摂取された調合乳の体積の計算において、その量を考慮に入れた。

【0194】

それぞれの収集期間中に使用した全てのおむつおよび紙ナプキンを収集した。これらを密封式バックに入れ、患者IDおよび日時を付け、分析検査室に発送するまで-20℃で保管した。

【0195】

6.1.3試料分析

糞便試料、調合乳(試験020)および乳アリコート(試験021)は中央研究所によって分析された。糞便および食品中にある長鎖多価不飽和脂肪酸DHAおよびAAを含む個々の脂肪酸を、Folch法による抽出後にガスクロマトグラフィー法によって定量した。両試験とも、脂肪酸分離のためにOmegawax 250カラム(Supelco)を使用した。しかしながら、DHAと、母乳にしか存在しないネルボン酸(C24:1)が共溶出するので、試験021からの試料のDHAを定量するために、試験021からのパー・プロトコル解析対象集団の患者からの試料をSP-2380カラム(Supelco)を用いて分析もした。このカラムを用いるとDHAおよびC24:1は良好に分離されるが、調合乳および乳の中にある他の脂肪酸を全て分離するには適していない。従って、試験021(母乳)からのこれらの試料からの個々の脂肪酸を、SP-2380カラム(DHA用)およびOmegawax 250カラム(他の全ての脂肪酸用)を(別々に)使用して分離および分析した。総脂質は個々の脂肪酸の合計として計算した(セクション7.5.1を参照されたい)。同じ分析原理を用いて、試験に使用した調合乳バッチおよび母乳アリコートのそれぞれにある脂質を測定した。

【0196】

6.1.4膝から踵までの長さ

患者の脚の長さを膝から踵まで、これらの部位に提供された膝高計(knemometer)を用いて測定した。膝から踵までの長さをミリメートル単位でCRFに記録した。可能な限り、毎日、ほぼ同じ時間に、同じ人間によって長さを測定した。測定を3回行い、平均値をCRFに入力した。

【0197】

6.2安全性評価:有害事象

それぞれの試験における有害事象(AE)報告期間は治験薬の初回投与時(1日目)から開始し、追跡調査来診(試験薬物摂取量を最後に投与して1週間±3日後)に終了した。有害事象報告期間中に患者において生じた全てのAEは、事象が薬物療法/製品に関連するとみなされたかどうかに関係なく報告された。さらに、AE報告期間後に発生し、治験製品に関連する可能性が低い、治験製品に関連する可能性が高い、または治験製品に確実に関連すると試験責任者が評価した既知の不都合な事象もAEとして報告された。

【0198】

7統計法

7.1解析集団

- ・安全性解析対象集団:無作為化治験薬(rhBSSLまたはプラセボ)が少なくとも1回投与された全ての無作為化患者。安全性変数の解析は、安全性解析対象集団を用いて実施された。
- ・最大の解析対象集団(FAS):無作為化治験薬が少なくとも1回投与され、両治療期間においてベースラインおよび少なくとも1回のベースライン後の体重評価を受けた、全ての無作為化患者。
- ・パー・プロトコル解析対象集団(PP):妥当なコンプライアンスを有し、他の重大なプロトコル違反のない、FASに組み入れられた全ての患者。

【0199】

それぞれの試験の中でPP解析対象集団の資格のある患者の評価を、それぞれの試験のデータベースのロックおよび盲検解除の前に実施した。FASおよびPPの両方について、複合データセットは個々の試験と正確に同じ患者を組み入れた。

【0200】

7.2複合解析の統計目的

7.2.1主要効力目的および仮説

2つの試験からの複合データに対する解析の主要目的は、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、プラセボと比較したrhBSSLを用いた治療後の発育の改善を証明することであった。

【0201】

発育速度に関して治療間に差はないという帰無仮説を立てた。対立仮説は、以下:rhBSSLは、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時にプラセボと比較して発育速度を改善する、であった。

10

【0202】

7.2.2副次的効力目的

2つの試験からの複合データに対する解析の副次的効力目的は以下の通りであった。

- ・乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、プラセボと比較したrhBSSLを用いた治療後の早産児における脂肪吸収の改善を証明する。
- ・乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、rhBSSLを用いた治療後の早産児における膝から踵までの長さを、プラセボを用いた治療後の早産児における膝から踵までの長さと比較する。

【0203】

CFAに関して治療間に差はないという帰無仮説を立てた。対立仮説は、以下:rhBSSLは、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時にプラセボと比較して脂肪吸収を改善する、であった。

20

【0204】

膝から踵までの長さに関して統計仮説検定は実施されなかった。

【0205】

7.2.3探索的効力目的

2つの研究からの複合データに関する解析の探索的効力目的は、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の、プラセボ治療に対するrhBSSL治療後の早産児における、DHAおよびAAの吸収を探索することであった。

【0206】

30

7.2.4安全性目的

2つの試験からの複合データに対する解析の安全性目的は、乳児用調合乳または低温殺菌母乳に入れて投与された時の早産児におけるrhBSSLの安全性および忍容性を評価することであった。

【0207】

7.3患者の内訳

患者の内訳は治療シーケンス(treatment sequence)によってまとめられ、両試験において無作為化された全ての患者に基づいた。要約表には、無作為化された患者の数、それぞれの試験を完了した患者の数(%)、それぞれの試験から中断した患者の数(%)、および中断のそれぞれの理由の患者の数(%)が含まれた。要約表はまた、安全性、FAS、およびPP解析対象集団に組み入れられた患者の数(%)、ならびにそれぞれの治療期間を完了した患者の数(%)も報告した。

40

【0208】

7.4患者の人口統計学的特性およびベースライン特性

人口統計学的特性には、治験薬の初回投与時の実際の年齢および推定在胎齢、出生時の在胎齢、性別、人種、ならびに民族が含まれた。ベースライン特性には膝から踵までの長さおよび体重が含まれた。人口統計学的特性およびベースライン特性について2つの概要表を示した。最初の表は治療シーケンスによる複合データの要約を示し、第2の表は、試験による人口統計学的特性およびベースライン特性の要約を示す。連続変数を、患者の数、平均、標準偏差(SD)、中央値、最小値、および最大値によってまとめた。カテゴリカ

50

ル変数を、それぞれのカテゴリーにおける患者の数およびパーセントによってまとめた。

【0209】

7.5効力解析

これらの2つの試験において収集された全ての効力データを、それぞれの試験および複合解析について記述統計学を用いてまとめた。序論で述べたように効力目的に従って個々の試験の効力解析を行った(これらの解析の結果は本報告に示さない)。

【0210】

2つの試験からの複合データに対する解析の主要解析は、0.05の α 有意水準を用いた両側検定に基づいた。ステップワイズ逐次検定法(stepwise sequential testing procedure)を用いて、0.05の多重有意水準(multiple level of significance)を確実にした。

・第1段階:0.05の α 有意水準を用いて、発育速度に関して治療間に差はないという帰無仮説を検定した。帰無仮説が棄却されたら、逐次検定法の第2段階を行った。

・第2段階:0.05の α 有意水準を用いて、CFAに関して治療間に差はないという帰無仮説を検定した。帰無仮説が棄却されたら、CFAに関して確認主張(confirmatory claim)も行った。

【0211】

この多重比較法は多重有意水準が5%以下になることを確認する。

【0212】

主要効力解析および副次的効力解析および探索的解析は、それぞれの治療の点推定値および推定値の周囲にある95%信頼区間ならびに対応する95%信頼区間に付随する治療間の差の推定値を報告する。前述の発育速度およびCFA以外の変数について仮説検定は実施されなかった。

【0213】

連続変数を、n、平均、SD、中央値、最小値、および最大値を用いてまとめた。カテゴリカル変数を、それぞれのカテゴリーにおける患者の数およびパーセントを用いてまとめた。

【0214】

期間中の発育速度の計算時に最終評価が得られなければ、発育速度は最後の入手可能な評価において計算され、最終日に繰り越された。他のやり方で、欠測データの補定(imputation)は実施されなかった。

【0215】

7.5.1解析のための効力変数

主要効力変数は以下であった。

・発育速度(g/kg/日): 発育速度を、第1の期間については、(第1の期間における最終評価時の体重-1日目の体重)/[1日目および(第1の期間における最終評価の日-1)の体重]で割ったものと定義し、第2の期間については、(第2の期間における最終評価時の体重-10日目の体重)/[10日目および(第2の期間における最終評価の日-10)の体重]で割ったものと定義した。

【0216】

副次的効力変数は、以下:

・それぞれの治療期間の最後の3日(72時間)の間、追跡マーカー間に収集された食物試料および糞便試料において測定されたCFAであった。

【0217】

CFAを、[食物中の脂肪(g/期間)の-糞便中の脂肪(g/期間)]/[食物中の脂肪(g/期間)] * 100として計算した。

【0218】

食物中の脂肪を、([食物(mL)-吐瀉物(mL)] * [食物中の脂肪含有率(g/100mL)]/100として計算した。この式は、以下:(a)吐瀉物中の脂肪含有率は食物中の脂肪含有率と同じである;(b)吐瀉物の密度は食物の密度と同じである、という仮定に基づいた。

【0219】

食物(調合乳または低温殺菌母乳)の脂肪含有率を、糞便解析と同じ方法を用いて決定し、同じ検査室によって実施した。食物(mL)および吐瀉物(mL)を、第1の追跡摂取時または第1の追跡摂取後および第2の追跡摂取前に記録された食物または吐瀉物の総量として計算した。吐瀉物をCRFにグラム単位で記録した。従って、吐瀉物(mL)を吐瀉物(g)/密度として記録した。

【0220】

2つの試験間の糞便中の脂肪(g/期間)および食物中の脂肪含有率(g/100mL)の計算には違いが1つあった。この違いは、以下に記載のように、乳および調合乳の中の異なる脂肪酸含有率に関する。

10

【0221】

BVT.BSSL-020:

それぞれの脂肪酸が検査室によってmg単位で示されたので、糞便中の脂肪(g/期間)を、以下の脂肪酸:C12:0、C14:0、C16:0、C18:0、C18:1、C18:2n-6、C18:3n-3、C20:4n-6、およびC22:6n-3の合計を1000で割ったものとして計算した。

【0222】

食物中のそれぞれの脂肪酸をg/100mLの単位で示した。食物中の脂肪含有率(g/100mL)を糞便と同じ脂肪酸の合計として計算した。

【0223】

BVT.BSSL-021:

20

それぞれの脂肪酸が検査室によってmg単位で示されたので、糞便中の脂肪(g/期間)を、以下の脂肪酸:C12:0、C14:0、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、C18:2n-6、C18:3n-3、C18:3n-6、C20:1、C20:2n-3、C20:3n-6、C20:4n-6、C22:6n-3、およびC24:1の合計を1000で割ったものとして計算した。

【0224】

食物中のそれぞれの脂肪酸をg/100mLの単位で示した。食物中の脂肪含有率(g/100mL)を糞便と同じ脂肪酸の合計として計算した。

【0225】

複合解析:

CFAデータの複合統計解析には、2つの個々の試験のそれぞれからの、それぞれの乳児/治療期間について計算された全CFA値が用いられた。

30

・長さの変化(mm):長さの変化を、第1の期間における1日目~7日目および第2の期間における10日目~16日目の膝から踵までの長さの変化と定義した。

【0226】

探索的効力変数は、以下:

・DHAおよびAAの吸収:

それぞれの治療期間の最後の3日間(72時間)に収集された糞便試料において測定されたDHA(C22:6 n-3)およびAA(C20:4 n-6)の吸収率

【0227】

DHA吸収率およびAA吸収率は、CFA計算に使用したのと同じアプローチを用いたが、それぞれ、DHAおよびAAの試料中の個々の(C22:6 n-3)の量および(C20:4 n-6)の量だけを用いて計算した。

40

【0228】

7.5.2効力解析法

主要効力解析および副次的効力解析は、2つの試験からの複合データのFASに基づいた。補助的な効力解析は、2つの試験からの複合データのPP解析対象集団に基づいた。さらに、それぞれの効力変数を、FAS解析対象集団およびPP解析対象集団に対する試験によって解析した。

【0229】

主要効力アウトカムである発育速度を、分散分析(ANOVA)によって、因子として治療、

50

レジメン(低温殺菌母乳または乳児用調合乳)、期間、シーケンス、ならびにレジメンおよびシーケンスの中で入れ子にされた患者を用いて解析した。全ての主効果を、ANOVAモデルからの残差平均平方に対して検定した。

【0230】

シャピロ-ウィルク検定を用いて、複合データに基づく発育速度分布の正規性仮定(normality assumption)を検定した。正規性仮定に従わなければ、順位値(ranked value)をANOVAに使用した。

【0231】

副次的効力アウトカムである、それぞれの治療期間の最後の3日間からのCFAを、発育速度と同じように分散分析(ANOVA)によって、因子として治療、レジメン(低温殺菌母乳または乳児用調合乳)、期間、シーケンス、ならびにレジメンおよびシーケンスの中で入れ子にされた患者を用いて解析した。

【0232】

治療による食物中の総脂肪量および糞便中の総脂肪量の記述統計学を示した。

【0233】

別の副次的効力アウトカムである膝から踵までの長さの変化を、共分散分析(ANCOVA)によって、因子として治療、レジメン、期間、シーケンス、ならびにレジメンおよびシーケンスの中で入れ子にされた患者を用いて、共変量(covariate)としてベースライン値を用いて解析した。

【0234】

7.6安全性解析:有害事象

全ての有害事象(AE)解析は、両試験からの複合データの安全性解析対象集団に基づく。記述統計学を用いて結果を示した。仮説検定は実施しなかった。

【0235】

いずれかの試験の間に報告された全てのAEを器官別大分類(SOC)および優先使用語(PT)によって分類するために、MedDRA用語集バージョン10.0が用いられた。全ての要約表には、治療下で発現した有害事象(TEAE)のある患者の数が含まれた。それぞれの個々の試験においてTEAEの評価がなされた。TEAEは、試験薬物の開始時または開始後に発症し、かつ試験薬物の最後の投与後14日以内(重大なAEの場合は30日以内)に発症したAE、または試験薬物開始時に進行中であり、重篤度が増大したか、もしくは治療期間中に試験薬物との関連が密接になったAEと定義された。全てのTEAE、治療に関連するTEAE(確実、可能性が高い、および可能性が低い)、SAE、ならびに試験薬物の脱落につながるTEAEを、MedDRA SOC、PT、および治療によってまとめた。発生率(患者の割合)およびそれぞれのTEAEの数をまとめた。さらに、TEAEを、最大重篤度(軽度、中程度、または重度)によってまとめた。TEAEを全てまとめたものを治療シーケンスによって示し、(1)BSSLのみ;(2)プラセボのみ;(3)BSSLおよびプラセボ;ならびに(4)治療なしに割り振られた、それぞれの治療シーケンスのTEAE患者の合計および数(%)によって示した。

【0236】

7.7統計解析計画における解析に対する変更

2種類のLCPUFA、DHAおよびAAの吸収に対するrhBSSLの予想外の統計的に有意な効果のために(セクション8.4.3を参照されたい)、測定された全ての脂肪酸の合計のCFAに対する統計的に有意な効果がないのにもかかわらず(セクション8.4.2を参照されたい)、それぞれの個々の脂肪酸(FA)の吸収率の事後解析、ならびに全ての飽和FA(鎖の長さに関係せず、二重結合を有さない全てのFA)の合計、全ての不飽和FA(鎖の長さに関係せず、少なくとも1つの二重結合を有する全てのFA)、全ての多価不飽和FA(PUFA、鎖の長さに関係せず、少なくとも2つの二重結合を有する全てのFA)の合計、および全てのLCPUFA(少なくとも20個の炭素原子の鎖の長さを有する全てのPUFA)の合計の吸収率の解析を行った。計算は全脂肪のCFAと同じであった。これらの解析をSAPに定義しなかった。多重比較の補正はなされておらず、p値は記述的としきみなされない。

【0237】

8結果

8.1患者の内訳

治療シークエンスによる2つの試験における患者の内訳をまとめたものを表2.2に示した。試験による患者の内訳も収集し、まとめた(本報告には示していない)。

【0238】

(表2.2)患者の内訳

	rhBSSL/プラセボ	プラセボ/rhBSSL	合計
無作為化された患者数	32	33	65
安全性解析対象集団 ^a	31 (100.0%)	32 (100.0%)	63 (100.0%)
最大解析対象集団 (FAS) ^b	30 (96.8%)	30 (93.8%)	60 (95.2%)
パー・プロトコル解析対象集団 (PP) ^c	24 (77.4%)	22 (68.8%)	46 (73.0%)
期間1完了 ^d	30 (96.8%)	31 (96.9%)	61 (96.8%)
期間2完了 ^d	29 (93.5%)	30 (93.8%)	59 (93.7%)
試験完了	29 (93.5%)	30 (93.8%)	59 (93.7%)
試験中断	2 (6.5%)	2 (6.3%)	4 (6.3%)
有害事象	2 (6.5%)	2 (6.5%)	4 (6.3%)
プロトコル違反	0	0	0
同意取り消し	0	0	0
追跡調査の失敗	0	0	0
スポンサーの要請	0	0	0
試験責任者の判断	0	0	0
その他	0	0	0

^a安全性解析対象集団は、無作為化治療薬が少なくとも1回投与された全ての患者を含む。

^b最大の解析対象集団は、無作為化治療薬が少なくとも1回投与され、両治療期間においてベースラインおよび少なくとも1回のベースライン後の体重評価を受けた全ての無作為化患者を含む。

^cパー・プロトコル解析対象集団は、妥当なコンプライアンスを有し、他の重大なプロトコル違反のない、FASの中の患者を含む。

^d期間完了とは、治療期間において治療薬が7日間投与された患者と定義した。

【0239】

両試験全体にわたって合計65人の患者を無作為化した:BVT.BSSL-020では33人の患者、BVT.BSSL-021では32人の患者。合計63人の患者は、無作為化治療薬が少なくとも1回投与され、安全性解析対象集団に組み入れられた:BVT.BSSL-020では33人の患者、BVT.BSSL-021では30人の患者。FASは、安全性解析対象集団内にあり、かつ両治療期間中にベースラインおよび少なくとも1回のベースライン後の体重評価を受けた合計60人の患者を組み入れた:BVT.BSSL-020では33人の患者、BVT.BSSL-021では27人の患者。合計46人の患者をPP解析対象集団に組み入れた:BVT.BSSL-020では26人の患者、BVT.BSSL-021では20人の患者。不完全または不正確な糞便収集のためにPP解析対象集団に組み入れられなかった14人の患者がいた。

【0240】

安全性解析対象集団の63人の患者のうち、31人の患者をrhBSSL/プラセボ治療シークエ

10

20

30

40

50

ンスに無作為化し、32人の患者をプラセボ/rhBSSLに無作為化した。合計61人の患者が期間1を完了し、合計59人の患者が期間2を完了した。4人の患者を除く全員が試験を完了した。これらの4人の患者はAEにより中断した。

【0241】

8.2人口統計学的特性およびベースライン特性

治療シーケンスによる2つの試験における複合データの人口統計学的特性およびベースライン特性を以下の表2.3に示した。試験による人口統計学的特性およびベースライン特性も収集し、まとめた(本報告には示していない)。

【0242】

(表2.3) 人口統計学的特性およびベースライン特性

特性	rhBSSL/プラセボ (N=31)	プラセボ/rhBSSL (N=32)	合計 (N=63)	
年齢(週) ^a				
N	31	32	63	
平均 (SD)	4.14 (1.553)	3.60 (1.393)	3.87 (1.487)	
出生時在胎年齢(週)				
N	31	32	63	10
平均 (SD)	28.39 (1.575)	28.96 (1.542)	28.68 (1.572)	
推定在胎年齢(週) ^a				
N	31	32	63	
平均 (SD)	32.53 (.447)	32.58 (.541)	32.56 (.494)	
性別				
男性	15 (48.4%)	18 (56.3%)	33 (52.4%)	
女性	16 (51.6%)	14 (43.8%)	30 (47.6%)	20
民族				
ヒスパニックまたはラティノー	13 (41.9%)	13 (40.6%)	26 (41.3%)	
ヒスパニックまたはラティノーでない	18 (58.1%)	19 (59.4%)	37 (58.7%)	
人種				
白人	25 (80.6%)	27 (84.4%)	52 (82.5%)	
黒人	1 (3.2%)	2 (6.3%)	3 (4.8%)	30
アジア人	1 (3.2%)	1 (3.1%)	2 (3.2%)	
ハワイ先住民または他の 太平洋諸島住民	1 (3.2%)	0	1 (1.6%)	
その他	3 (9.7%)	2 (6.3%)	5 (7.9%)	
膝から踵までの長さ(mm) ^b				
N	31	32	63	
平均 (SD)	100.09 (5.490)	99.78 (6.573)	99.93 (6.017)	40
体重 (g)				
N	31	32	63	
平均 (SD)	1463.4 (169.28)	1469.6 (216.25)	1466.6 (193.02)	

^a 初回投与日の年齢^b 膝高計を用いて測定した

【 0 2 4 3 】

複合解析において、rhBSSL/プラセボに無作為化された患者の初回投与日の平均年齢(4.14週間)は、プラセボ/rhBSSLに無作為化された患者の平均年齢(3.60週間)と比較して高か

った。他の人口統計学的特性およびベースライン特性は治療シーケンス間で同等であった。

【0244】

2つの試験間の初回投与日の平均年齢の差も注目に値した。BVT.BSSL-020における患者の平均年齢(3.39週)はBVT.BSSL-021における平均年齢(4.39週)と比較して低かった。BVT.BSSL-020における出生時の平均在胎齢(29.18週)はBVT.BSSL-021(28.13週)より約1週間長かった。しかしながら、初回投与日の在胎齢は2つの試験において類似していた。民族の違いも2つの試験間で観察された。BVT.BSSL-020におけるヒスパニック患者またはラティノ患者のパーセント(63.6%)はBVT.BSSL-021(16.7%)と比較して高かった。他の人口統計学的特性およびベースライン特性は試験間で同等であった。

10

【0245】

8.3治療コンプライアンス

試験BVT.BSSL-020における治療コンプライアンスを以下の表2.4にまとめ、試験BVT.BSSL-021については表2.5にまとめた。

【0246】

(表2.4)治療試験BVT.BSSL.020による治療コンプライアンス

変数 統計	rhBSSL (N=33)	プラセボ (N=33)
n	33	33
治療コンプライアンス (%)		
< 60	0	0
≥ 60, < 70	0	0
≥ 70, < 80	0	1 (3.0%)
≥ 80, < 90	0	1 (3.0%)
≥ 90, < 100	28 (84.8%)	25 (75.8%)
≥ 100	5 (15.2%)	6 (18.2%)
平均	98.79	97.24
標準偏差	1.639	4.967
中央値	99.34	98.56
最小値	92.6	73.0
最大値	100.7	101.8

20

30

【0247】

(表2.5)治療試験BVT.BSSL.021による治療コンプライアンス

変数 統計	rhBSSL (N=28)	プラセボ (N=29)
n	28	29
治療コンプライアンス (%)		
< 60	0	0
≥ 60, < 70	1 (3.6%)	0
≥ 70, < 80	0	0
≥ 80, < 90	2 (7.1%)	1 (3.4%)
≥ 90, < 100	16 (57.1%)	19 (65.5%)
≥ 100	9 (32.1%)	9 (31.0%)
平均	95.97	97.52
標準偏差	7.033	3.820
中央値	98.17	97.75
最小値	66.7	87.2
最大値	101.8	103.7

10

【 0 2 4 8 】

8.4効力解析

8.4.1主要効力変数

20

複合解析における主要効力変数は発育速度であった。FAS解析対象集団およびPP解析対象集団における2つの臨床研究の複合解析に基づく発育速度の複合結果を表2.6に示した。FAS解析対象集団およびPP解析対象集団に基づく試験による発育速度解析結果を、それぞれ、表2.7aおよび表2.7bに示した。

【 0 2 4 9 】

(表2.6)FAS解析対象集団およびPP解析対象集団における発育速度(g/kg/日)の解析

試験解析対象集団および 統計	FAS 解析対象集団		PP 解析対象集団	
	rhBSSL (N=60)	プラセボ (N=60)	rhBSSL (N=46)	プラセボ (N=46)
n	60	60	46	46
平均 (SD)	16.92 (4.540)	14.00 (5.942)	17.08 (4.424)	15.04 (5.048)
中央値	16.84	14.95	16.84	15.09
最小値	7.5	-4.5	8.3	0.0
最大値	26.5	26.4	26.5	26.4
LS 平均	16.86	13.93	17.15	15.06
95% CI	(15.73, 17.98)	(12.80, 15.05)	(15.92, 18.38)	(13.83, 16.29)
LS 平均差 (rhBSSL-プラセボ)	2.93		2.08	
LS 平均差の95% CI	(1.35, 4.51)		(0.36, 3.81)	
LS 平均差のp値	<0.001		0.019	

30

40

【 0 2 5 0 】

FAS解析対象集団およびPP解析対象集団において、2つの臨床研究の複合結果は、プラセ

50

ボ治療と比較してrhBSSL治療中に有意な発育速度の増大を示した。FASでは、発育速度LS平均は、rhBSSLでは16.86g/kg/日、プラセボでは13.93g/kg/日であった。rhBSSLとプラセボとの発育速度の差は統計的に有意であった。LS平均差(rhBSSL-プラセボ)は2.93g/kg/日($p<0.001$)であった。PP解析対象集団において、2.08g/kg/日のLS平均差(rhBSSL-プラセボ)も統計的に有意であった($p=0.019$)。

【0251】

以下の表2.7aは、FAS解析対象集団における2つの臨床研究それぞれの発育速度結果を示す。表2.7bはPP解析対象集団の発育速度結果を示す。

【0252】

(表2.7a)FAS解析対象集団における試験による発育速度(g/kg/日)の解析

統計	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021	
	rhBSSL (N=33)	プラセボ (N=33)	rhBSSL (N=27)	プラセボ (N=27)
n	33	33	27	27
平均(SD)	18.06 (3.964)	14.29 (6.493)	15.54 (4.880)	13.63 (5.292)
中央値	18.39	15.51	15.95	13.98
最小値	9.2	-4.5	7.5	-3.1
最大値	25.5	23.3	26.5	26.4
LS 平均	18.05	14.31	15.58	13.63
95% CI	(16.52, 19.58)	(12.78, 15.84)	(13.82, 17.33)	(11.87, 15.39)
LS 平均差(rhBSSL-プラセボ)	3.74		1.95	
LS 平均差の95% CI	(1.58, 5.90)		(-0.54, 4.43)	
LS 平均差のp値	0.001		0.119	

【0253】

プラセボと比較したrhBSSL治療中の発育速度の改善は、試験BVT.BSSL-021より試験BVT.BSSL-020において顕著であった。FASに基づいて、BVT.BSSL-020試験では、LS平均差(rhBSSL-プラセボ)は3.74g/kg/日($p=0.001$)であったのに対して、BVT.BSSL-021試験では1.95g/kg/日($p=0.119$)であった。試験による類似結果がPP解析対象集団において観察された(表2.7bを参照されたい)。

【0254】

表2.7aからの別の観察は、調合乳が与えられた患者の体重が、低温殺菌母乳が与えられた患者より急速に増加したことであった。FASにおいて、rhBSSL治療中の平均発育速度はBVT.BSSL-020では18.06g/kg/日、BVT.BSSL-021では15.54g/kg/日であり、プラセボ治療中では、それぞれの試験において14.29g/kg/日および13.63g/kg/日であった。類似結果がPP解析対象集団において観察された(表2.7bを参照されたい)。

【0255】

シャピロ-ウィルク検定を用いて、複合データに基づく発育速度分布の正規性仮定を検定した。正規性の検定はFASにおいて有意であった(p 値 <0.001)。このことから、正規性仮定に従わなかったことが分かる(PP解析対象集団について類似結果が見られた)。従って、順位値を用いた発育速度の解析も行った。この感度分析の結果は、結果として生じた <0.001 の p 値を用いた主要解析と一致した。このことは、プラセボと比較してrhBSSL治療中に

10

20

30

40

50

発育が有意に改善したことを証明している。

【0256】

(表2.7b)PP解析対象集団における試験による発育速度(g/kg/日)の解析

統計	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021	
	rhBSSL (N=26)	プラセボ (N=26)	rhBSSL (N=20)	プラセボ (N=20)
n	26	26	20	20
平均(SD)	17.79 (4.013)	15.39 (5.412)	16.16 (4.856)	14.59 (4.630)
中央値	17.98	16.08	16.80	14.95
最小値	9.2	0.0	8.3	3.4
最大値	24.0	23.3	26.5	24.6
LS 平均	17.75	15.45	16.47	14.76
95% CI	(16.22,19.28)	(13.92,16.98)	(14.23,18.71)	(12.51,17.00)
LS 平均差(rhBSSL-プラセボ)	2.30		1.71	
LS 平均差の95% CI	(0.14,4.47)		(-1.46,4.88)	
LS 平均差のp値	0.038		0.271	

【0257】

8.4.2副次的効力変数

副次的効力変数は、それぞれの治療期間の開始から終了までのCFAおよび膝から踵までの長さの変化であった。

【0258】

CFA

PP解析対象集団の患者しか、CFAの決定に必須の完全/正確な糞便収集が行われなかった。従って、本報告における提示は、FAS解析対象集団およびPP解析対象集団を対象とした2つの臨床研究の複合解析のCFA結果を示した以下の表2.8aを除いて、PP解析対象集団のデータに限定される。PP解析対象集団に基づく試験によるCFA解析結果を表2.8bに示した。

【0259】

(表2.8a)FAS解析対象集団およびPP解析対象集団におけるCFA(%)の解析

10

20

30

試験解析対象集団および統計	FAS 解析対象集団		PP 解析対象集団		
	rhBSSL (N=60)	プラセボ (N=60)	rhBSSL (N=46)	プラセボ (N=46)	
n	59*	59*	46	46	
平均 (SD)	67.80 (16.663)	64.06 (16.319)	69.08 (14.683)	65.66 (16.126)	
中央値	71.09	66.50	71.83	67.15	
最小値	11.7	25.7	31.2	25.7	
最大値	93.2	93.0	93.2	93.0	10
LS 平均	67.78	64.08	69.06	65.50	
95% CI	(64.73,70.83)	(61.03,67.13)	(66.31,71.80)	(62.75,68.25)	
LS 平均差 (rhBSSL-プラセボ)	3.70		3.56		
LS 平均差の 95% CI	(-0.60, 8.00)		(-0.29, 7.40)		
LS 平均差の p 値	0.090		0.069		20

* 試験020において1人の患者が糞便収集期間前に脱落した。

【0260】

FAS解析対象集団およびPP解析対象集団において、2つの臨床研究の複合結果は、プラセボと比較してrhBSSLにおけるCFAの数値増加を示した。PP解析対象集団において、LS平均CFAはrhBSSL治療中は69.1%、プラセボについては65.5%であった。LS平均差 (rhBSSL-プラセボ) は3.56% (p=0.069) であった。

【0261】

BVT.BSSL-021におけるプラセボと比較したrhBSSL治療中のCFAの改善はBVT.BSSL-020と比較して大きかった。PPにおいて、LS平均差 (rhBSSL-プラセボ) はBVT.BSSL-021では4.86% (p=0.073)、BVT.BSSL-020では2.08% (p=0.462) であった。試験による類似結果がFAS解析対象集団において観察された (表2.8bを参照されたい)。

【0262】

(表2.8b) PP解析対象集団における試験によるCFA (%) の解析

統計	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021		
	rhBSSL (N=26)	プラセボ (N=26)	rhBSSL (N=20)	プラセボ (N=20)	
n	26	26	20	20	
平均 (SD)	69.55 (14.452)	67.07 (14.849)	68.46 (15.333)	63.82 (17.875)	
中央値	70.99	67.15	75.41	67.09	
最小値	36.8	25.7	31.2	35.9	
最大値	89.0	93.0	93.2	91.3	10
LS 平均	69.46	67.38	68.56	63.70	
95% CI	(65.40,73.53)	(63.31,71.45)	(64.78,72.35)	(59.92,67.49)	
LS 平均差 (rhBSSL-プラセボ)	2.08		4.86		
LS 平均差の95% CI	(-3.67,7.84)		(-0.50,10.22)		20
LS 平均差のp値	0.462		0.073		

【 0 2 6 3 】

表2.9aは、複合解析 (PP解析対象集団) における試験による、食物追跡マーカー間に摂取された食物中の総脂肪量、および糞便中の追跡マーカー間に収集された糞便試料からの糞便中の総脂肪量を示す。複合解析のための治療によるデータを表2.9bに示した。

【 0 2 6 4 】

(表2.9a) PP解析対象集団における試験による食物中の総脂肪量および糞便中の総脂肪量

統計	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021	
	rhBSSL (N=26)	プラセボ (N=26)	rhBSSL (N=20)	プラセボ (N=20)
食物中の総脂肪量 (g)				
n	26	26	20	20
平均 (SD)	29.12 (5.037)	28.50 (5.047)	19.00 (5.110)	20.51 (6.718)
中央値	29.11	27.98	18.27	18.70
最小値	21.1	17.7	12.1	13.3
最大値	44.0	39.3	29.1	43.7
糞便中の総脂肪量 (g)				
n	26	26	20	20
平均 (SD)	8.53 (3.416)	8.97 (3.278)	6.16 (3.550)	7.56 (4.785)
中央値	8.63	9.06	4.99	6.09
最小値	3.2	2.0	0.9	2.0
最大値	15.0	14.7	13.3	18.0

【0265】

調合乳が与えられた患者は、低温殺菌母乳が与えられた患者より多くの脂肪を食物から摂取した。PPにおいて、rhBSSL治療(72時間収集期間)中に摂取された食物中の総脂肪量の平均はBVT.BSSL-020において29.12g、BVT.BSSL-021において19.00gであり、プラセボ治療中では、それぞれの試験において28.50gおよび20.51gであった。調合乳が与えられた患者はまた、低温殺菌母乳が与えられた患者より多くの脂肪を糞便中に排泄した。rhBSSL治療中に糞便中に排泄された総脂肪量の平均はBVT.BSSL-020では8.53g、BVT.BSSL-021では6.16gであり、プラセボ中にはそれぞれの試験において8.97gおよび7.56gであった。

【0266】

表2.9bは、PP解析対象集団における複合結果について、72時間収集間隔中の食物中の総脂肪量および糞便中の総脂肪量をまとめたものである。脂肪の摂取および脂肪の排泄は2つの治療について同等であった。PPにおける2つの試験からの複合データにおいて、rhBSSL治療中に摂取された食物中の脂肪量の平均は24.72gであり、プラセボ中に摂取された平均量は25.03gであった。糞便中に排泄された脂肪の量は、それぞれ、7.50gおよび8.36gであった。

【0267】

(表2.9b)PP解析対象集団における食物中の総脂肪量および糞便中の総脂肪量、複合データ

統計	PP 解析対象集団	
	rhBSSL (N=46)	rhBSSL (N=46)
食物中の総脂肪量 (g)		
n	46	46
平均 (SD)	24.72 (7.133)	25.03 (7.018)
中央値	25.28	24.35
最小値	12.1	13.3
最大値	44.0	43.7
糞便中の総脂肪量 (g)		
n	46	46
平均 (SD)	7.50 (3.635)	8.36 (4.018)
中央値	7.05	8.34
最小値	0.9	2.0
最大値	15.0	18.0

10

20

【0268】

異なる試験間での摂取された乳児用調合乳または母乳の平均体積間の差、またはrhBSSLを用いた治療期間の間もしくはプラセボを用いた治療期間の間での摂取された体積間の差はほとんどなかった。

【0269】

発育速度と脂肪吸収との相関関係

図2.2は、2つの試験からのPP解析対象集団からのデータの複合解析における発育速度の差(rhBSSL-プラセボ)対CFAの差(rhBSSL-プラセボ)を示す。

30

【0270】

このグラフにおいて見られるように、発育速度に対するrhBSSLの効果と脂肪吸収(CFA)に対するrhBSSLの効果との間には統計的に有意な相関関係はなかった(p値0.177)。

【0271】

膝から踵までの長さの変化の変化

FAS解析およびPP解析における2つの試験からの複合解析のために膝から踵までの長さの変化の結果を収集し、まとめた(本報告には示していない)。

【0272】

FAS解析対象集団またはPP解析対象集団において、両試験からの複合データにおける、または試験による、膝から踵までの長さの変化の測定値の平均に関して治療間で注目する差は観察されなかった。

40

【0273】

8.4.3探索的効力変数

全脂肪のCFAの提示と全く同じように、本報告における探索的効力変数の提示は、FAS解析対象集団およびPP解析対象集団の両方の結果を示した以下の表2.10.および表2.11を除きPP解析対象集団のデータに限定される。

【0274】

探索的効力変数は、調合乳および母乳の両方に存在する2種類の長鎖多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA、C22:6 n-3)およびアラキドン酸(AA、C20:4、n-6)の吸収

50

率であった。

【0275】

DHA:

FAS解析対象集団およびPP解析対象集団における2つの試験からの複合解析のためのDHA結果を表2.10に示した。PP解析対象集団における試験によるDHAの結果を収集し、表2.13および表2.14の該当するセルの中にまとめた。

【0276】

(表2.10)FAS解析対象集団およびPP解析対象集団におけるDHA吸収率(%)の解析

試験解析対象集団および統計	FAS 解析対象集団		PP 解析対象集団	
	rhBSSL (N=60)	プラセボ (N=60)	rhBSSL (N=46)	プラセボ (N=46)
N	59	59	46	46
平均 (SD)	77.97 (16.251)	71.70 (17.668)	79.76 (14.075)	74.00 (16.197)
中央値	81.22	71.69	82.90	73.35
最小値	26.8	24.7	42.2	24.7
最大値	100.0	98.3	100.0	98.3
LS 平均	77.91	71.67	79.83	74.03
95% CI	(74.55,81.26)	(68.32,75.03)	(76.62,83.04)	(70.82,77.24)
LS 平均差 (rhBSSL-プラセボ)	6.24		5.80	
LS 平均差の 95% CI	(1.50,10.97)		(1.30,10.29)	
LS 平均差のp値	0.011		0.013	

【0277】

AA:

FAS解析対象集団およびPP解析対象集団における2つの研究からの複合解析のためのAAの結果を表2.11に示した。PP解析対象集団における試験によるAAの結果を収集し、表2.13および表2.14の該当するセルの中にまとめた。

【0278】

(表2.11)FAS解析対象集団およびPP解析対象集団におけるAA吸収率(%)の解析

試験解析対象集団および統計	FAS 解析対象集団		PP 解析対象集団		
	rhBSSL (N=60)	プラセボ (N=60)	rhBSSL (N=46)	プラセボ (N=46)	
N	59	59	46	46	
平均 (SD)	77.88 (17.628)	69.16 (22.015)	78.01 (16.881)	69.42 (22.389)	
中央値	81.28	71.29	81.01	70.92	
最小値	26.6	-3.0	26.6	-3.0	
最大値	100.0	97.8	100.0	97.8	10
LS 平均	77.60	68.90	77.36	68.73	
95% CI	(73.98,81.23)	(65.27,72.52)	(73.76,80.96)	(65.13,72.32)	
LS 平均差 (rhBSSL-プラセボ)	8.70		8.63		
LS 平均差の 95% CI	(3.59,13.82)		(3.60,13.67)		
LS 平均差の p 値	0.001		0.001		20

【0279】

2つの研究からの複合結果におけるDHA吸収率およびAA吸収率は、プラセボよりrhBSSLの方が極めて高かった。PPにおいて、DHA吸収率のLS平均はrhBSSL治療中に79.83%であったのに対して、プラセボについては74.03%であった。LS平均差 (rhBSSL- プラセボ) は5.80% (p=0.013) であった。AA吸収率のLS平均はrhBSSLでは77.36%であったのに対して、プラセボでは68.73%であった。LS平均差 (rhBSSL- プラセボ) は8.63% (p=0.001) であった。類似結果がFAS解析対象集団における2つの試験の複合解析から観察された。それぞれの試験においても、rhBSSLの場合、プラセボと比較して極めて高いDHA吸収率およびAA吸収率が観察された (表2.13および表2.14の該当するセルを参照されたい)。

30

【0280】

8.4.4事後解析

個々のFA:

調合乳および低温殺菌乳の両方に存在するそれぞれのFAの吸収率の結果を収集し、まとめた (C20:4[AA] および C22:6[DHA] についてのデータを前記のセクション8.4.3に提示した)。結果を以下の表2.12にまとめた。対応する結果を試験によって提示し、以下の表2.13 (試験020) および表2.14 (試験021) にまとめた。表2.14は、乳にしか存在しないFAに関するデータも含み、従って、複合解析に入れられなかった。

【0281】

40

(表2.12) 調合乳および低温殺菌母乳の両方に存在する個々の脂肪酸のCFA、複合解析。パー・プロトコル解析対象集団

二重結合の数		炭素原子の数					
		12	14	16	18	20	22
0	rhBSSL	88.86	76.15	55.49	44.28		
	プラセボ	86.44	71.34	52.88	42.76		
	差	2.42	4.81*	2.61	1.51		
	95% CI	-0.21, 5.05	0.24, 9.38	-2.15, 7.38	-3.87, 6.90		
1	rhBSSL				73.66		
	プラセボ				70.02		
	差				3.65		
	95% CI				-0.47, 7.76		
2 n-6	rhBSSL				77.49		
	プラセボ				71.70		
	差				5.79*		
	95% CI				1.82, 9.76		
3 n-3	rhBSSL				76.31		
	プラセボ				72.65		
	差				3.66		
	95% CI				-1.24, 8.55		
4 n-6	rhBSSL					77.36	
	プラセボ					68.73	
	差					8.63*	
	95% CI					3.60, 13.67	
6 n-3	rhBSSL						79.83
	プラセボ						74.03
	差						5.80*
	95% CI						1.30, 10.29

*P<0.05

【 0 2 8 2 】

(表2.13)個々の脂肪酸のCFA、試験BVT.BSSL-020(乳児用調合乳)。パー・プロトコル解析対象集団

二重結合の数		炭素原子の数					
		12	14	16	18	20	22
0	rhBSSL	89.70	76.56	46.95	42.20		
	プラセボ	88.52	73.37	46.50	43.30		
	差	1.18	3.19	0.45	-1.10		
	95% CI	-2.34,4.70	-3.91,10.30	-6.62,7.51	-8.64,6.45		
1	rhBSSL				76.24		
	プラセボ				73.88		
	差				2.37		
	95% CI				-4.22,8.95		
2 n-6	rhBSSL				83.91		
	プラセボ				78.93		
	差				4.99		
	95% CI				-0.98,10.95		
3 n-3	rhBSSL				87.79		
	プラセボ				83.37		
	差				4.42		
	95% CI				-1.09,9.93		
4 n-6	rhBSSL					82.96	
	プラセボ					75.83	
	差					7.14	
	95% CI					-0.03,14.30	
6 n-3	rhBSSL						81.15
	プラセボ						74.31
	差						6.85
	95% CI						-0.84,14.54

10

20

30

40

【0283】

(表2.14) 個々の脂肪酸のCFA、試験BVT.BSSL-021(低温殺菌母乳)。パー・プロトコル解析対象集団

二重結合の数		炭素原子の数						
		12	14	16	18	20	22	24
0	rhBSSL	87.94	75.49	63.88	46.11			
	プラセボ	84.44	69.55	59.42	42.47			
	差	3.50	5.94*	4.46	3.63			
	95% CI	-0.78, 7.78	0.31, 11.57	-2.07, 11.00	-4.39, 11.65			
1	rhBSSL			96.24	71.01	52.09		36.85
	プラセボ			95.80	66.24	43.57		29.17
	差			0.45	4.77	8.53		7.68
	95% CI			-0.06, 0.95	-0.15, 9.68	-2.73, 19.78		-4.95, 20.31
2 n-6	rhBSSL				71.26	53.09		
	プラセボ				64.28	44.72		
	差				6.98*	8.37*		
	95% CI				1.21, 12.75	0.69, 16.06		
3 n-3	rhBSSL				64.39	§		
	プラセボ				62.35			
	差				2.04			
	95% CI				-7.60, 11.67			
3 n-6	rhBSSL				63.94	67.39§		
	プラセボ				58.12	58.48		
	差				5.82	8.91*		
	95% CI				-3.34, 14.99	1.40, 16.42		
4 n-6	rhBSSL					72.10		
	プラセボ					61.28		
	差					10.82*		
	95% CI					2.85, 18.79		
6 n-3	rhBSSL						78.49	
	プラセボ						73.77	
	差						4.72*	
	95% CI						0.59, 8.85	

*P<0.05

§ 試験中にモニタリングされたC20:3種は、C20:3 n-6およびC20:3 n-3、一般名ジホモ-γ-リノレン酸(DGLA;C20:3 n-6)およびエイコサトリエン酸(ETA;C20:3 n-3)であった。これらの2種類の脂肪酸を別々に十分に定量できなかったのも、セル「C20:3 n-6」の中のこれらの結果は両種の合計である。これらの2つの間でC20:3 n-6(DGLA)が最も豊富である。

【0 2 8 4】

FAのグループ:

表2.12~2.14を検証することによって、脂肪吸収に対するrhBSSLの効果は2種類の飽和FAであるC16:0およびC18:0の場合は特に低く、全体的に見て、この効果は鎖の長さおよび不飽和の程度と共に増加するように見えることが分かる。従って、全ての飽和FAの合計お

10

20

30

40

50

よび全ての不飽和FAの合計の脂肪吸収率の解析をそれぞれ行い、全ての多価不飽和FAの合計の解析ならびに全てのLCPUFA(DHAおよびAAだけでない)の合計の解析も行った。複合解析の結果および試験による結果を収集し、以下の表2.15～2.18にまとめた。

【0285】

(表2.15) 全ての飽和*脂肪酸の合計の吸収率(%）、パー・プロトコル解析対象集団

	BVT.BSSL-020 調合乳 N=26		BVT.BSSL-021 低温殺菌乳 N=20		BVT.BSSL-020 および 021 複合 N=46	
	rhBSSL	プラセボ	rhBSSL	プラセボ	rhBSSL	プラセボ
LS平均	61.4	61.4	66.1	61.7	63.8	61.5
95% CI	57.9, 65.0	57.8, 64.9	61.8, 70.4	57.4, 66.05	61.2, 66.5	58.8, 64.2
LS平均差 (rhBSSL-プラセボ)	0.08		4.36		2.25	
LS平均差の95%CI	-4.95, 5.10		-1.74, 10.46		-1.52, 6.02	
LS平均差のp値	0.975		0.150		0.236	

*FA、鎖の長さに関係せず、二重結合を有さない

【0286】

(表2.16) 全ての不飽和*脂肪酸の合計の吸収率(%）、パー・プロトコル解析対象集団

	BVT.BSSL-020 調合乳 N=26		BVT.BSSL-021 低温殺菌乳 N=20		BVT.BSSL-020 および 021 複合 N=46	
	rhBSSL	プラセボ	rhBSSL	プラセボ	rhBSSL	プラセボ
LS平均	78.8	75.5	70.6	65.5	74.7	70.5
95% CI	74.4, 83.1	71.2, 79.9	67.08, 74.09	61.98, 68.99	71.9, 77.5	67.7, 73.3
LS平均差 (rhBSSL-プラセボ)	3.25		5.10		4.22	
LS平均差の95%CI	-2.90, 9.41		0.14, 10.05		0.32, 8.12	
LS平均差のp値	0.286		0.044		0.034	

*FA、鎖の長さ依存せず、少なくとも1つの二重結合を有する

【0287】

(表2.17) 全ての多価不飽和*脂肪酸の合計の吸収率(%）、パー・プロトコル解析対象集団

	BVT.BSSL-020 調合乳 N=26		BVT.BSSL-021 低温殺菌乳 N=20		BVT.BSSL-020 および 021 複合 N=46	
	rhBSSL	プラセボ	rhBSSL	プラセボ	rhBSSL	プラセボ
LS平均	84.0	79.0	70.7	63.7	77.3	71.5
95% CI	79.8, 88.3	74.8, 83.2	66.6, 74.7	59.7, 67.8	74.5, 80.1	68.6, 74.3
LS平均差 (rhBSSL-プラセボ)	5.05		6.92		5.82	
LS平均差の95%CI	-0.92, 11.02		1.21, 12.62		1.86, 9.77	
LS平均差のp値	0.093		0.020		0.005	

*FA、鎖の長さに関係せず、少なくとも2つの二重結合を有する

【0288】

(表2.18)全てのLCPUFA*の合計の吸収率(%）、パー・プロトコル解析対象集団

	BVT.BSSL-020 調合乳 N=26		BVT.BSSL-021 低温殺菌乳 N=20		BVT.BSSL-020 および 021 複合 N=46	
	rhBSSL	プラセボ	rhBSSL	プラセボ	rhBSSL	プラセボ
LS平均	82.2	75.2	70.2	62.2	76.1	68.8
95% CI	77.1, 87.25	70.1, 80.2	65.9, 74.5	57.9, 66.4	72.8, 79.4	65.5, 72.0
LS平均差 (rhBSSL-プラセボ)	7.01		8.02		7.33	
LS平均差の95%CI	-0.15, 14.16		2.00, 14.05		2.77, 11.89	
LS平均差のp値	0.054		0.012		0.002	

*少なくとも20個の炭素原子および少なくとも2つの二重結合を有するFA

【0289】

表2.15～2.18に示した解析は、p値が、複合解析における飽和FAのLS平均差2.25%(p=0.236)から、不飽和FAのグループ全体の4.22%(p=0.034)、さらには多価不飽和FAの5.82%(p=0.005)およびLCPUFAの7.33%(p=0.002)まで減少するので、脂肪吸収に対するrhBSSLの効果が不飽和の程度と共に同時に増加するという本発明のこれらの局面を裏付ける。

【0290】

8.5安全性解析:有害事象

8.5.1曝露の程度

治療曝露を治療時の日数としてまとめたものを以下の表2.19に示した。

【0291】

(表2.19)治療曝露の程度-安全性解析対象集団

10

20

30

40

変数 統計	rhBSSL (N=61)	プラセボ (N=62)	
治療時の日数 [1]			
1	0	0	
2	0	0	
3	1 (1.6%)	1 (1.6%)	
4	0	0	10
5	0	0	
6	0	1 (1.6%)	
7	60 (98.4%)	60 (96.8%)	
n	61	62	
平均	6.9	6.9	20
標準偏差	0.51	0.52	
中央値	7.0	7.0	
最小値	3	3	
最大値	7	7	

[1] 治療時の日数=治療期間の最後の日-治療期間の最初の日+1

【0 2 9 2】

30

治療曝露の程度は治療間で同等であった。患者の98.4%は7日間のrhBSSL治療を受け、患者の96.8%は7日間のプラセボ治療を受けた。1人の患者が、第2の期間中の3日間のプラセボ治療後にBVT.BSSL-020から中断した。BVT.BSSL-021における3(3)人の患者が第1の治療期間中に中断した:2人の患者が、それぞれ、6日間および7日間のプラセボ治療後に中断し、1人の患者が3日間のrhBSSL治療後に中断した。

【0 2 9 3】

rhBSSLへの曝露をまとめたものを以下の表2.20に示した。

【0 2 9 4】

(表2.20) rhBSSLへの曝露の程度-安全性解析対象集団

40

変数 統計	合計 (N=63)
rhBSSLの総量 (g) [1]	
n	61
平均	0.2717
標準偏差	0.05172
中央値	0.2682
最小値	0.063
最大値	0.397

10

[1]rhBSSLの総量(g)=0.15g/L* (rhBSSL治療期間中に摂取された食物の総量(L)-rhBSSL治療期間中の吐瀉物の総量(L))。吐瀉物を1日目、2日目、3日目、10日目、11日目、および12日目に収集しなかった。

注:食物中のrhBSSL濃度はプロトコルに従って0.15g/Lである。

【0295】

複合解析結果において、摂取されたrhBSSLの平均(SD)量は0.27g(0.052g)であった。

20

【0296】

8.5.2有害事象の概要

TEAEの全発生率を以下の表2.21に示した。

【0297】

(表2.21)治療下で発現した有害事象の全体的な概要-安全性解析対象集団

	rhBSSL (N=61)		プラセボ (N=62)		合計 (N=63)	
	患者の n (%)	合計 AE (n)	患者の n (%)	合計 AE (n)	患者の n (%)	合計 AE (n)
任意のTEAEを有する患者	29 (47.5%)	56	32 (51.6%)	78	45 (71.4%)	134
任意の重大なTEAEを有する患者	0	0	2 (3.2%)	2	2 (3.2%)	2
試験からの中断につながる任意のTEAEを有する患者	1 (1.6%)	1	3 (4.8%)	3	4 (6.3%)	4
任意の関連するTEAEを有する患者	5 (8.2%)	6	4 (6.5%)	6	8 (12.7%)	12
任意の重篤なTEAEを有する患者	1 (1.6%)	1	6 (9.7%)	16	6 (9.5%)	17
死亡した患者	0	0	1 (1.6%)	1	1 (1.6%)	1

30

関連するとは、確実に試験薬に関連する、試験薬に関連する可能性が高い、または試験薬に関連する可能性があることを含む。

40

【0298】

これらの2つの試験において、63人の患者のうち45人(71.4%)が、合計134件の治療下で発現した有害事象(TEAE)を経験した。治療間で、TEAE患者の割合において観察された注目値に値する差はなかった。TEAE患者の割合は試験管で同等であった。BVT.BSSL-020において23人(69.7%)の患者がAEを経験し、BVT.BSSL-021において22人(73.3%)がAEを経験した。しかしながら、BVT.BSSL.021におけるTEAEの総数(81事象)は、BVT.BSSL.020(53事象)と比較して多かった(試験による表形式データは本報告には示していない)。

【0299】

2つの試験全体にわたって、2人(3.2%)の患者がプラセボ治療中に1つの重大なTEAEを報告した。4人(6.3%)の患者が、試験からの中断につながる1つのTEAEを報告し(rhBSSL治療

50

中に1人の患者およびプラセボ治療中に3人の患者)、8人(12.7%)の患者が、治療に関連するとみなされた少なくとも1つのTEAEを報告し(rhBSSL治療中に5人の患者、プラセボ治療中に4人の患者。これらの患者のうち1人に、両期間中に関連するTEAEがあった)、1人の患者がプラセボ治療中に死亡した。

【0300】

8.5.3有害事象の表示

最も一般的に報告されたTEAE(患者の $\geq 4\%$ において報告された)をまとめたものを以下の表2.22に示した。報告された全てのTEAEをまとめたものを収集し、まとめた(本報告には示していない)。

【0301】

(表2.22)最も一般的に報告された治療下で発現した有害事象-安全性解析対象集団

優先使用語	rhBSSL (N=61)		プラセボ (N=62)		合計 (N=63)	
	患者の n (%)	合計 AE (n)	患者の n (%)	合計 AE (n)	患者の n (%)	合計 AE (n)
おむつかぶれ	13 (21.3%)	20	13 (21.0%)	15	21 (33.3%)	35
貧血	3 (4.9%)	3	6 (9.7%)	6	8 (12.7%)	9
心雑音	4 (6.6%)	4	2 (3.2%)	2	6 (9.5%)	6
徐脈	1 (1.6%)	2	5 (8.1%)	15	5 (7.9%)	17
低カリウム血症	3 (4.9%)	3	2 (3.2%)	2	5 (7.9%)	5
新生児貧血	2 (3.3%)	2	1 (1.6%)	1	3 (4.8%)	3
血小板血症	0	0	3 (4.8%)	3	3 (4.8%)	3
尿路感染	1 (1.6%)	1	2 (3.2%)	2	3 (4.8%)	3

注: この表は、患者の $\geq 4\%$ において報告されたAEを含む。患者が特定の優先使用語について2回以上カウントされた場合、その優先使用語について1回カウントされる。

【0302】

2つの試験の複合結果における最も一般的なTEAEは、21人(33.3%)の患者によって報告された、おむつかぶれであった。この事象の発生率は治療間で同等であった。最も一般的に報告された他のTEAEは、8人(12.7%)の患者における貧血、6人(9.5%)の患者における心雑音、それぞれ5人(7.9%)の患者によって報告された徐脈および低カリウム血症、ならびにそれぞれ3人(4.8%)の患者によって報告された新生児貧血、血小板血症、および尿路感染であった。プラセボのみで報告された血小板血症を除いて、最も一般的なTEAEが全て両治療において報告された。さらに、BVT.BSSL-020のみで報告された尿路感染およびBVS.BSSL-021のみで報告された低カリウム血症を除いて、最も一般的なTEAEが全て両試験において報告された。

【0303】

9結論

複合解析の結果は、以下の結論を裏付ける個々の試験の結果と一致する。

- ・ rhBSSLは、プラセボと比較して、低温殺菌母乳または乳児用調合乳が与えられた早産児において発育を有意に改善する。
- ・ プラセボと比較して、rhBSSL治療後、脂肪吸収の数値改善はあるが、有意な改善はない。
- ・ プラセボと比較して、1週間のrhBSSL治療後、膝から踵までの長さの変化に関して差は観察されなかった。
- ・ 乳児用調合乳または低温殺菌母乳に添加されたrhBSSLの忍容性は高かった。
- ・ プラセボと比較して、rhBSSL治療中に安全性プロファイルの明らかな差は観察されなかった。
- ・ 調合乳が与えられた患者は、低温殺菌母乳が与えられた患者より多くの脂肪を摂取し、体重が増加した。
- ・ rhBSSLはDHAおよびAAの吸収を有意に改善する。

- ・ rhBSSLは不飽和脂肪酸、特に、LCPUFAの吸収を有意に改善する。
- ・ 脂肪吸収に対するrhBSSLの効果は、脂肪酸の鎖の長さおよび不飽和の程度と共に増加する。

【0304】

証拠物件A

乳児用調合乳の提案された組成要件-ESPGHANにより推奨された標準(Koletzko et al 2005から改訂した):

成分	単位	最小値	最大値	
エネルギー	kcal/100 ml	60	70	
タンパク質				
牛乳タンパク質	g/100 kcal	1.8*	3	10
分離大豆タンパク質	g/100 kcal	2.25	3	
加水分解牛乳タンパク質	g/100 kcal	1.8†	3	
脂質	g/100 kcal			
総脂肪	g/100 kcal	4.4	6	
リノール酸	g/100 kcal	0.3	1.2	
α-リノレン酸	mg/100 kcal	50	NS	
リノール酸/α-リノレン酸比率		5:1	15:1	
ラウリン酸+ミリスチン酸	脂肪の%	NS	20	
トランス脂肪酸	脂肪の%	NS	3	
エルカ酸	脂肪の%	NS	1	
炭水化物				
総炭水化物†	g/100 kcal	9	14	
ビタミン				20
ビタミン A	ug RE/100kcal§	60	180	
ビタミン D3	ug/100 kcal	1	2.5	
ビタミン E	mg α-TE/100 kcal&	0.5{	5	
ビタミン K	ug/100 kcal	4	25	
チアミン	ug/100 kcal	60	300	
リボフラビン	ug/100 kcal	80	400	
ナイアシン #	ug/100 kcal	300	1500	
ビタミン B6	ug/100 kcal	35	175	
ビタミン B12	ug/100 kcal	0.1	0.5	
パントテン酸	ug/100 kcal	400	2000	
葉酸	ug/100 kcal	10	50	
ビタミン C	mg/100 kcal	8	30	
ビオチン	ug/100 kcal	1.5	7.5	
ミネラル類と微量元素				30
鉄(牛乳タンパク質とタンパク質加水分解物を基本とする調合乳)	mg/100 kcal	0.3**	1.3	
鉄(分離大豆タンパク質を基本とする調合乳)	mg/100 kcal	0.45	2	
カルシウム	mg/100 kcal	50	140	
リン(牛乳タンパク質とタンパク質加水分解物を基本とする調合乳)	mg/100 kcal	25	90	
リン(分離大豆タンパク質を基本とする調合乳)	mg/100 kcal	30	100	
カルシウム/リン比率	mg/mg	1:1	2:1	
マグネシウム	mg/100 kcal	5	15	
ナトリウム	mg/100 kcal	20	60	
塩化物	mg/100 kcal	50	160	
カリウム	mg/100 kcal	60	160	
マンガン	ug/100 kcal	1	50	
フッ化物	ug/100 kcal	NS	60	40
ヨウ素	ug/100 kcal	10	50	
セレン	ug/100 kcal	1	9	
銅	ug/100 kcal	35	80	
亜鉛	mg/100 kcal	0.5	1.5	
他の物質				
コリン	mg/100 kcal	7	50	
ミオイノシトール	mg/100 kcal	4	40	
L-カルニチン	mg/100 kcal	1.2	NS	

* 非加水分解牛乳タンパク質とタンパク質を基本とする調合乳のタンパク質含有率の決定は、1.8~2.0g/100kcalの真のタンパク質含有率の測定に基づかなければならない([総N-N PN]x6.25)

† タンパク質含有率が2.25g/100kcal未満の加水分解乳タンパク質を基本とする調合乳を

臨床試験しなければならない。

※スクロース(サッカロース)およびフルクトースは乳児用調合乳に添加してはならない。
§ 1mg RE(レチノール当量)=1mgオールトランスレチノール=3.33IUビタミンA。レチノール含有率はプリフォームドレチノールとして示されるものとする。これに対して、カロテノイド含有率はビタミンA活性の計算および表示に含めない。

&1mg a-TE(a-トコフェロール当量)=1mg d-a-トコフェロール。

{ビタミンE含有率を少なくともPUFA 1g当たり0.5mg a-TEとする。調合乳中の脂肪酸二重結合数に最小ビタミンE含有率を合わせるために以下の当量係数を使用する:0.5mg a-TE/g リノール酸(18:2n-6);0.75mg a-TE/g a-リノレン酸(18:3n-3);1.0 mg a-TE/gアラキドン酸(20:4n-6);1.25mg a-TE/gエイコサペンタエン酸(20:5n-3);1.5mg a-TE/gドコサヘキサエン酸(22:6n-3)。

#ナイアシンはプリフォームドナイアシンを指す。

**乳児に鉄欠乏リスクがある集団では、最小レベル0.3mg/100kcalを超える鉄含有率が適切な場合があり、これは国の水準で推奨される。

NS、特定せず。

【0305】

証拠物件B

任意成分の提案されたレベル-ESPGHANにより推奨された標準(Koletzko et al 2005から改訂した):

任意成分	単位	最小値	最大値
タウリン	mg/100 kcal	0	12
総添加ヌクレオチド	mg/100 kcal	0	5
シチジン5#-リン酸塩 (CTP)	mg/100 kcal	0	1.75
ウリジン5#-リン酸塩 (UMO)	mg/100 kcal	0	1.5
アデノシン5#-リン酸塩 (AMP)	mg/100 kcal	0	1.5
グアノシン5#-リン酸塩 (GMP)	mg/100 kcal	0	0.5
イノシン5#-リン酸塩 (IMP)	mg/100 kcal	0	1
リン脂質	mg/100 kcal	0	300
ドコサヘキサエン酸 *	脂肪の%	0	0.5

*ドコサヘキサエン酸(22:6n-3)を乳児用調合乳に添加する場合は、アラキドン酸(20:4n-6)含有率がDHAと少なくとも同濃度に達していなければならない。エイコサペンタエン酸(20:5n-3)含有率はドコサヘキサエン酸含有率を超えてはならない。

【0306】

配列表

SEQ ID. NO. 1:

```
AKLGAVYTEG GFVEGVNKKL GLLGDSVDIF KGIPFAAPTK ALNPQPHPG 50
WQGTCLKAKNF KKRCLQATIT QDSTYGEDDC LYLNIWVPQG RKQVSRDLPV 100
MIWIYGGAFI MGSFGHANFL NNYLYDGEEI ATRGNVIVVT FNYRVGPLGF 150
LSTGDANLPG NYGLRDQHMA IAWVKRNIAA FGGDPNNITL FGESAGGASV 200
SLQTLSPYK GLIRRAISQS GVALSPWVIQ KNPLFWAKKV AEKVGCPVGD 250
AARMAQCLKV TDPRALTLY KVPLAGLEY P MLHYVGFVPV IDGDFIPADP 300
INLYANAADI DYIAGTNNMD GHIFASIDMP AINKGNKKVT EEDFYKLVSE 350
FTITKGLRGA KTTFDVYTES WAQDPSQENK KKTVDVDFETD VLFLVPTEIA 400
LAQHRANAKS AKTYAYLF SH PSRMPVYPKW VGADHADDIQ YVFGKPFATP 450
TGYRPQDRTV SKAMIAWYTN FAKTGDPNMG DSAVPTHWEP YTTENSGYLE 500
ITKKMGSSSM KRSLRTNFLR YWTLTYLALP TVTDQEATPV PPTGDSEATP 550
VPPTGDSETA PVPPTGDSGA PPVPPTGDSG APPVPPTGDS GAPPVPPTGD 600
SGAPPVPPTG DSGAPPVPPT GD SGAPPVPP TGDSGAPPVP PTGDAGPPP 650
PPTGD SGAPP VPPTGD SGAP PVTPTGDSET APVPPTGDSG APPVPPTGDS 700
EAPVPPTDD SKEAQMPAVI RF 722
```

SEQ ID. NO. 2:

```

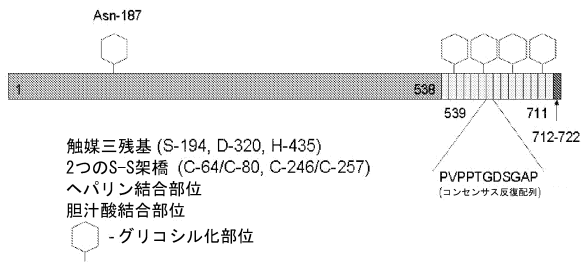
1  accttctgta tcagttaagt gtcaagatgg aaggaacagc agtctcaaga taatgcaaag
61  agttttattca tccagaggct gatgctcacc atggggcgcc tgcaactggg tgtgttgggc
    ***
121  ctcacctgct gctgggcagt ggcgagtgcc gcgaagctgg gcgccgtgta cacagaaggt
181  gggttcgtgg aaggcgtaaa taagaagctc ggccctcctg gtgactctgt ggacatcttc
241  aagggcattc ccttcgcagc tcccaccaag gccctggaaa atcctcagcc acatcctggc
301  tggcaaggga ccctgaaggc caagaacttc aagaagagat gcctgcaggc caccatcacc
361  caggacagca cctacgggga tgaagactgc ctgtacctca acatttgggt gcccaggggc
421  aggaagcaag tctcccggga cctgcccgtt atgatctgga tctatggagg cgcttccttc
481  atgggggtcc gccatggggc caacttcctc aacaactacc tgtatgacgg cgaggagatc
541  gccacacggc gaaacgtcat cgtggtcacc ttcaactacc gtgtcggccc ccttgggttc
601  ctcagcactg gggacgcca tctgcagggt aactatggcc ttcgggatca gcacatggcc
661  attgcttggt tgaagaggaa tatcgcggcc ttcggggggg accccaacaa catcacgctc
721  ttcggggagt ctgctggagg tgccagcgct tctctgcaga ccctctcccc ctacaacaag
781  ggccctcatc ggcgagccat cagccagagc ggcgtggccc tgagtccctg ggtcatccag
841  aaaaacccac tcttctgggc caaaaagggt gctgagaagg tgggttgccc tgtgggtgat
901  gccgccagga tggcccagtg tctgaagggt actgatcccc gagccctgac gctggcctat
961  aaggtgccgc tggcaggcct ggagtacccc atgctgcact atgtgggctt cgctccctgtc
1021 attgatggag acttcatccc cgctgaccgg atcaacctgt acgccaacgc cgccgacatc
1081 gactatatag caggcaccaa caacatggac ggccacatct tcgccagcat cgacatgcct
1141 gccatcaaca agggcaacaa gaaagtcacg gaggaggact tctacaagct ggtcagtggg
1201 ttcacaatca ccaaggggct cagaggcgcc aagacgacct ttgatgtcta caccgagtcc
1261 tggggcccagg acccatccca ggagaataag aagaagactg tgggtggactt tgagaccgat
1321 gtccctcttc tgggtgcccac cgagattgcc ctagcccagc acagagccaa tgccaagagt
1381 gccaaagacc acgcctacct gttttcccat ccctctcgga tgcccgtcta ccccaaattg
1441 gtggggggcg accatgcaga tgacattcag tacgttttcg ggaagccctt cgccaccccc
1501 acgggctacc ggcccacaag caggacagtc tctaaggcca tgatcgccca ctggaccaac
1561 tttgcaaaaa caggggaccc caactgggga gactcggctg tgcccacaca ctgggaaccc
1621 taactacggg aaaacagcgg ctacctggag ataccaaga agatgggcag cagctccatg
1681 aagcggagcc tgagaaccaa cttcctgcgc tactggaccc tcacctatct ggcgctgccc
1741 acagtgaccg accaggaggc caccctgtgt ccccccacag gggactccga ggccactccc
1801 gtgcccccca cgggtgactc cgagaccgcc cccgtgccgc ccacgggtga ctccggggcc
1861 ccccccgtgc cgccacggg tgactcgggg gcccccccg tgccgcccac ggggtgactc
1921 ggggcccccc cgtgcccgc caggggtgac tccggggccc ccccgctgcc gccacgggt
1981 gactccgggg cccccccgt gccgcccac ggtgactccg gggccccccc cgtgcccgc
2041 acgggtgact ccggcgcccc ccccgctgcc ccacgggtg acgcggggcc ccccccggt
2101 ccgcccacgg gtgactccgg cgcccccccc gtgcccgcga cgggtgactc cggggcccc
2161 cccgtgaccc ccacgggtga ctccgagacc gcccccgctc cgcccacggg tgactccggg
2221 gccccccctg tgccccccac ggggtgactc gaggtgccc ctgtgcccc cacagatgac
2281 tccaaggaag ctcagatgcc tgcagtcatt aggttttagc gtcccatgag ccttgggtatc
    $$$
2341 aagaggccac aagagtggga cccaggggc tccctccca tcttgagctc ttctgaata
2401 aagcctcata cccctaaaaa aaaaaaaa

```

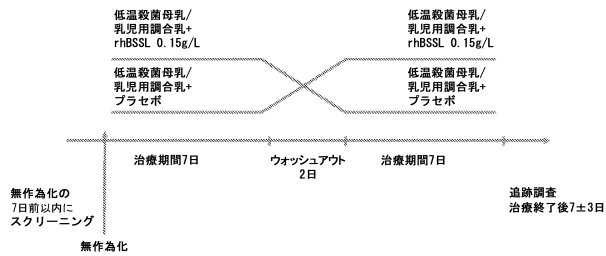
【0307】

開始コドンおよび停止コドン(の下)にそれぞれ「***」および「\$\$\$」の印を付けた。
。リーダー配列に下線を引いた。

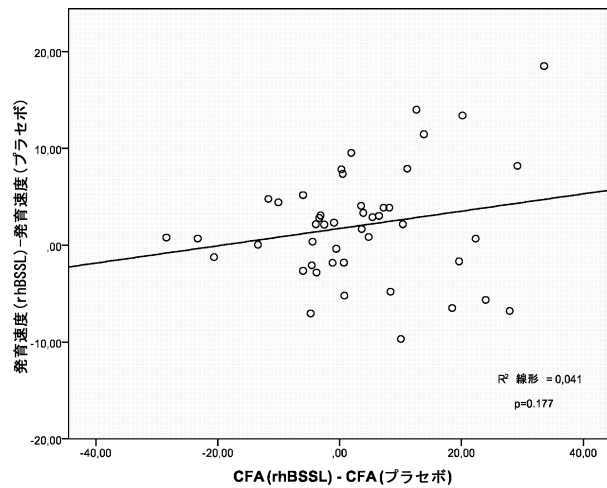
【図 1】



【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



【配列表】

[0005800907000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 9/20 (2006.01) C 1 2 N 9/20
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72)発明者 ハーネル オル
 スウェーデン王国 ウメオ スコルガタン 28
 (72)発明者 オルソン バージッタ
 スウェーデン王国 ステンハンラ エクベーガ
 (72)発明者 ストロネルク パトリック
 スウェーデン王国 ソレンチュナ カナルベージェン 28ビー
 (72)発明者 スベンソン ルナート
 スウェーデン王国 ソルナ グスタブ 3:エス ブールバード 99
 (72)発明者 ティムダール クリスティーナ
 スウェーデン王国 トゥリンゲ ボクベージェン 59エー
 (72)発明者 バゲロ マーテン
 スウェーデン王国 サルヒョーボー ブランダムスベージェン 3ビー
 (72)発明者 オーマン マリア
 スウェーデン王国 ピーテオー スンズガタン 36

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特表2002-512021 (JP, A)
 特表平08-507439 (JP, A)
 特表平07-507687 (JP, A)
 特開2001-112468 (JP, A)
 特開2009-149550 (JP, A)
 特開2010-220627 (JP, A)
 U.S. National Institutes of Health, "Efficacy and Safety of Bile Salt Stimulated Lipase (BSSL) as Replacement Therapy in Pasteurized Breast Milk for Preterm Infants", last update:2010.03.03, [retrieved on 2014.04.18], retrieved from the internet: <URL: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00659243>>, URL, <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00659243>
 U.S. National Institutes of Health, " Efficacy and Safety of Bile Salt Stimulated Lipase (BSSL) as Replacement Therapy in Infant Formula for Preterm Infants", last update:2009.08.04, [retrieved on 2014.04.18], retrieved from the internet: <URL: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00658905>>, URL, <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00658905>

Biovitrum, "Kiobrina shows positive phase II results in preterm infants", 2009.11.25,
[retrieved on 2014.09.12], retrieved from the internet: <<http://hugin.info/134557/R/1357039/329994.pdf>>, URL, <http://hugin.info/134557/R/1357039/329994.pdf>
Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2010.05, Vol.13, No. 3, pp.314-320

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 38/00-38/58

A 61 K 41/00-45/08

C 12 N 9/00-9/99

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq