

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6156882号
(P6156882)

(45) 発行日 平成29年7月5日(2017.7.5)

(24) 登録日 平成29年6月16日(2017.6.16)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54 ZMD
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06

請求項の数 5 外国語出願 (全 59 頁)

(21) 出願番号	特願2014-245814 (P2014-245814)	(73) 特許権者	503102674
(22) 出願日	平成26年12月4日 (2014.12.4)		アレクシオン ファーマシューティカルズ
(62) 分割の表示	特願2013-528353 (P2013-528353)		, インコーポレイテッド
原出願日	平成23年9月9日 (2011.9.9)		アメリカ合衆国 06510 コネチカッ
(65) 公開番号	特開2015-52014 (P2015-52014A)		ト州, ニュー ヘイブン, カレッジ スト
(43) 公開日	平成27年3月19日 (2015.3.19)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成26年12月4日 (2014.12.4)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	PCT/US2011/033699	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成23年4月23日 (2011.4.23)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アンソニー クイン
(31) 優先権主張番号	61/432, 372		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(32) 優先日	平成23年1月13日 (2011.1.13)		467, チェスナット ヒル, マネ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ロード 107

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者のリソソーム酸性リパーゼ欠乏症を治療するためのリソソーム酸性リパーゼの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リソソーム酸性リパーゼ (L A L) 欠乏症を罹患するヒト患者を治療するための、組み換えリソソーム酸性リパーゼ (r h L A L) を含む組成物であって、該組成物は、体重1キログラム当たり1mgのL A Lの1または複数の初期用量で投与され、その後体重1キログラム当たり3mgのL A Lの1または複数の用量での該組成物の投与が続くことを特徴とし、さらに、該組成物は、週に1回投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 2】

前記ヒト患者の血漿トリグリセリド (T G) または低密度リポタンパク質 (L D L) レベルが、前記1または複数の初期用量の投与後に減少する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記r h L A LのC_{max}は、血清1mL当たり約200ng～血清1mL当たり約800ngである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記r h L A Lの血清半減期は30分未満である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

前記r h L A Lは約55kD±2の分子量を有する、請求項1に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

10

20

リソソーム酸リパーゼ（LAL）欠乏症は、酵素の欠乏によりリソソーム中のコレステリルエステル（CE）およびトリグリセリド（TAG）を分解できないことを特徴とする、珍しいリソソーム蓄積症（LSD）である。LAL欠乏症は、多くの組織および細胞種における基質の蓄積を伴う他のリソソーム蓄積障害に似ている。LAL欠乏症において、基質の蓄積は、肝臓のクッパー細胞、脾臓の組織球、および小腸の固有層を含む網内系の細胞で最も際立つ。網内細胞は、結合、細胞の取り込み、およびGlucNAcもしくはマンノース末端N-グリカンを有するタンパク質のリソソーム内在化を媒介し、これらの重要な細胞種における酵素欠乏を潜在的に補正するための経路を提供する、マクロファージマンノース／N-アセチルグルコサミン受容体（マクロファージマンノース受容体MMR、もしくはCD206として知られる）を発現する。

10

【0002】

LAL欠乏症は、胃腸、肝臓、および心血管の合併症と共に最も一般的に顕在化し、顕著な罹患率および死亡率と関連する多系疾患である。LAL欠乏症の臨床作用は、多くの組織のリソソームにおける脂質物質の大量の蓄積ならびに肝コレステロール合成の実質的な増加を含む、コレステロールおよび脂質における恒常的機序の著しい妨害による。LAL欠乏症は、ウォルマン病（WD）およびコレステリルエステル蓄積症（CESD）の少なくとも2つの表現型として現れる。

【0003】

最初に説明した医師にちなんで名付けられたウォルマン病は、最も攻撃的なLAL欠乏症の表れである。この表現型は、成長障害、吸収不良、脂肪便、著しい体重減少、リンパ節腫大、脾腫大、および肝腫大を含む、胃腸および肝臓の顕在化を特徴とする。ウォルマン病は、急速に進行し、通常生後1年以内に必ず命にかかわる。例症報告調査は、生後1年で重度のLAL欠乏症により成長障害を示す患者において、12ヶ月齢を超えた生存は、非常に珍しい。この最も攻撃的な形態において、成長障害は、主な臨床特徴であり、早期死亡の主な寄与因子である。肝肥大およびトランスアミナーゼの上昇により示されるように、肝臓の関与も、乳児において一般的である。

20

【0004】

ウォルマン病の診断は、身体所見および実験分析の両方により確立される。乳児は、典型的に、下痢、持続的嘔吐、摂食困難、成長阻止、および発育不良により生後2ヶ月内に入院する。身体所見は、肝腫大および脾腫大による腹部膨満を含み、X線検査は、副腎のカルシウム沈着を明らかにすることが多い。実験評価は、典型的に、血清トランスアミナーゼレベルの上昇および内因性LAL酵素活性の不在または極端な低下を明らかにする。コレステロールおよびトリグリセリドの血中濃度の上昇が一部の患者に見られる。

30

【0005】

LAL欠乏症を有する患者は、後年、主な肝臓および心血管の関与を示すこともあり、これは、しばしば、コレステリルエステル蓄積症（CESD）と呼ばれる。CESDにおいて、肝臓は、著しい肝腫大、肝細胞壊死、トランスアミナーゼの上昇、肝硬変、および肝臓線維症の影響を強く受ける。CEおよびTAGのレベルの増加により、心血管の関与は、高脂血症を特徴とすることができる。CESDに罹患する一部の対象において、動脈壁上の脂肪沈着の蓄積（粥状動脈硬化）が報告されてきた。沈着は、動脈管腔を狭め、心筋梗塞および脳卒中を含む顕著な心血管事象のリスクを増加させる血管の閉塞をもたらす可能性がある。しかしながら、LAL欠乏症に罹患する全ての患者が粥状動脈硬化を発症するわけではない。例えば、ウォルマン病の患者は、肝臓および脾臓の肥大、リンパ節腫大、および小腸による吸収不良を含む疾患に関連する他の症状に圧倒されるが、WDは、一般に、粥状動脈硬化を特徴としない（The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle D., eds) 7th ed., Volume 2 p. 2570 McGraw-Hill, 1995)。同様に、全てのCESD患者が粥状動脈硬化を示すわけではない。Di Bisceglie et al., Hepatology 11: 764-772 (1990)

40

50

), Ameis et al., J. Lipid Res. 36:241-250 (1995) を参照のこと。CESDの表れは、合併症が成人期後期に顕在化するまで診断されない一部の患者により非常に変動するが、一方で、他は、幼児期早期に表れる肝不全を有する可能性がある。CESDは、短い寿命および著しい健康障害と関連する。CESDを有する者の平均余命は、関連する合併症の重篤度に依存する。

【0006】

ウォルマン病の現在の治療選択肢は、非常に限られている。発熱および／または感染の兆候がある乳児に抗生物質が投与される。副腎不全のためのステロイド置換療法および専門的な栄養支援が処方され得、これらの介入が死を防止するという証拠はないが、これらが短期間の生存に影響を及ぼすかも、今のところはっきりしない。骨髄移植で治療されたLAL欠乏症を有する一連の4人の患者において、処置の合併症により、患者4人全員が移植の月内に死亡した。一部の成功が後の例症報告で説明されたが、死亡率は高く、多くの患者は、病気が重くて移植前状態調節レジームを耐え抜くことができないため、移植されない。非常に少数の報告された長期生存者は、造血性細胞のみの酵素欠乏の補正が、これらの疾患における臨床状態を実質的に改善するのに十分であることを示す。典型的に、臨床支援は、死をもたらす疾患の急な顕在化と関連する非可搬性脂質および非分解性脂質の蓄積を制限するための試みにおいて、食事制限により提供される。

【0007】

CESD表現型の現在の治療選択肢は、コレステロールおよびトリグリセリドが豊富な食物を除外する食事による脂質蓄積の制御、ならびにコレステロール低下剤（例えば、スタチンおよびコレスチラミン）の投与によるコレステロール合成およびアポリポタンパク質B産生の抑制を介した対症治療に集中する。ある程度の臨床改善が見られるかもしれないが、根底にある疾患の顕在化は持続し、疾患の進行がさらに起こる。

【0008】

組み換えLALを用いた酵素置換療法がリソソーム酸リパーゼ欠乏症および関連する症状に対して現実的な治療選択肢であってもよいことが示されてきた(Meyers et al. (1985) Nutrition Res. 5(4):423-442、特許文献1、およびBesley (1984) Clinical Genetics 26:195-203を参照)。LAL欠乏症のマウスモデルを使用した一部の研究は、3日に1回、高用量（体重1キログラム当たり1ミリグラムを超える）の組み換えヒトLALの点滴により、LAL欠乏(LAL^{-/-})マウスのいくつかの異常の補正を示した（例えば、Grabowskiの特許文献2を参照）。LAL欠乏マウス内の欠損を補正するためのこれらの初期の研究は、根底にある表現型を補正するために、比較的多量および高頻度投与量の組み換えLALタンパク質が必要であったことを示唆した。最初にYoshida and Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol 40, p 486-489によって説明されたLAL^{-/-}ラットモデルと異なり、上記の研究で使用されたLAL^{-/-}マウスモデルは、LAL欠乏マウスがヒト患者で見られる成長異常を示さないという点で、ヒトWDに密接に似ていないことに留意することも重要である。

【0009】

今まで、外因性LALは、ヒトに投与されておらず、WD、CESD、およびその他を含むLAL欠乏症を治療するのに利用可能な有効な療法がない。したがって、患者の生活の質を改善するために、最小頻度の投与による療法の緊急な必要性が存在する。さらに、ヒト患者の成長を回復する、肝機能を正常化する、LAL組織濃度を増加させる、およびLAL活性を増加させる治療有効用量が望ましい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第98/11206号

【特許文献2】米国特許出願公開第2007/0264249号明細書

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、患者が外因性LALで正常に投与された最初のヒト臨床例症に基づく。LAL欠乏症（ウォルマン病または早発性LAL欠乏症）の他の致命的な形態に罹患する乳児が、外因性LALを投与することによって効果的に治療され、LAL酵素置換療法の安全評価が、遅発性LAL欠乏症に罹患するヒト患者群で評価された。早発性LAL欠乏症を有する乳児は、いずれの有害事象または有害反応を引き起こすことなく、毎週低用量を投与された。有効性についての生命徴候および臨床／実験測定値の劇的な改善は、早ければ初期投与後1～2週で観察された。4ヶ月を超える毎週投与後、治療された乳児は、正常な成長を回復し、吸収不良、肝腫大、および肝機能を含むLAL欠乏症に関連する全ての症状において著しい改善を示した。遅発性成人患者も、有害事象の兆しもなく、毎週低量の外因性LALを投与された。したがって、今まで収集された臨床データは、本発明の外因性LALを使用した酵素置換療法がLAL欠乏症に対して安全かつ効果的な治療を提供することを示す。

10

【0012】

したがって、本発明は、有効量の外因性リソソーム酸リパーゼ（LAL）を投与することにより、ヒト患者のLAL欠乏症に関連する疾患または状態を治療する方法を提供する。外因性LALは、少なくとも1つのマンノースおよび／またはマンノースー6ーリン酸塩を含むN結合グリカン構造を有する組み換えヒトLALであり得る。外因性LALは、例えばリンパ球、マクロファージ、および／または線維芽細胞のリソソーム中に効果的に内在化される。

20

【0013】

一部の実施形態では、LAL欠乏症に罹患するヒト患者は、ウォルマン病（WD）と診断される。一実施形態では、投与は、WD患者の成長を増加させるのに十分である。一実施形態では、投与は、WD患者の正常な成長を回復するのに十分である。他の実施形態では、LAL欠乏症に罹患する患者は、コレステリルエステル蓄積症（CESD）と診断される。本発明による治療方法は、あらゆる年齢のヒト患者に提供され得る。

【0014】

肝機能を改善するために有効量で組み換えヒトLALを患者に投与することにより、LAL欠乏症に罹患するヒト患者を治療するための方法も、本明細書において提供する。一部の実施形態では、投与は、肝臓試験を正常化するのに十分である。一実施形態では、投与は、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを減少させるのに十分である。例えば、肝臓トランスアミナーゼは、血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）および／またはアラントランスアミナーゼ（ALT）を含んでもよい。一実施形態では、投与は、肝腫大を最小にするのに十分である。一実施形態では、投与は、患者の肝臓の大きさを減少させるのに十分である。一実施形態では、投与は、血清フェリチンレベルを減少させるのに十分である。

30

【0015】

一実施形態では、投与は、例えば、コレステリルエステル（CE）および／またはトリグリセリド（TG）レベルを含む血清脂質レベルを減少させるのに十分である。

40

【0016】

LAL欠乏症を有するヒト患者のLAL活性を増加させる方法も提供する。そのような方法は、投与が、例えばリンパ球および／または線維芽細胞で測定され得るLAL活性の増加をもたらすように、組み換えヒトLALを患者に投与することを含む。

【0017】

一実施形態では、5日に1回～30日に1回、有効量の外因性LALタンパク質を患者に投与することにより、ヒト患者のLAL欠乏症に関連する状態を治療する方法を説明する。

【0018】

50

一部の実施形態では、L A L 欠乏症に罹患するヒト患者は、体重 1 キログラム当たり約 0 . 1 m g ～約 5 0 m g の外因性 L A L を投与される。一実施形態では、ヒト患者は、体重 1 キログラム当たり約 0 . 1 m g ～約 1 0 m g の外因性 L A L を投与される。一実施形態では、ヒト患者は、体重 1 キログラム当たり約 0 . 1 m g ～約 5 m g の外因性 L A L を投与される。

【0019】

一実施形態では、点滴速度は、約 0 . 1 m g / k g / 時間～約 4 m g / k g / 時間である。

【0020】

一部の実施形態では、ヒト患者は第 2 の治療薬で治療される。第 2 の治療薬は、例えば、コレステロール低下剤（例えばスタチンもしくはエゼチミブ）、抗ヒスタミン剤（例えばジフェンヒドラミン）、または免疫抑制剤を含んでもよい。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目 1）

リソソーム酸性リパーゼ（L A L）欠乏症を有するヒト患者を治療する方法であって、組み換えヒト L A L を前記患者に投与することを含み、前記投与は、肝機能を改善するのに十分である、方法。

（項目 2）

前記投与は、肝臓試験を正常化するのに十分である、項目 1 に記載の方法。

（項目 3）

前記投与は、肝腫大を最小にするのに十分である、項目 1 または 2 に記載の方法。

（項目 4）

前記投与は、肝臓の大きさを減少させるのに十分である、項目 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 5）

前記投与は、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを減少させるのに十分である、項目 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 6）

前記投与は、脂質レベルを減少させるのに十分である、項目 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 7）

前記投与は、トリグリセリドレベルを減少させるのに十分である、項目 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 8）

前記投与は、コレステリルエステルを減少させるのに十分である、項目 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 9）

L A L 欠乏症を有するヒト患者の L A L 活性を増大させる方法であって、組み換えヒト L A L を前記患者に投与することを含み、前記投与は、前記患者における L A L 活性の増大を結果としてもたらす、方法。

（項目 10）

前記投与は、前記患者の L A L 活性を少なくとも約 3 5 p m o l / m g / 分だけ増大させるのに十分である、項目 9 に記載の方法。

（項目 11）

治療を必要とする患者において L A L 欠乏症に関連する状態を治療する方法であって、有効量の外因性 L A L タンパク質を前記患者に 5 日に 1 回～30 日に 1 回投与することを含む、方法。

（項目 12）

治療を必要とする患者において L A L 欠乏症に関連する状態を治療する方法であって、7 日に 1 回～14 日に 1 回投与される、1 キログラム当たり 0 . 1 m g ～5 0 m g の用量の

10

20

30

40

50

外因性 L A L を前記患者に投与することを含む、方法。

(項目 1 3)

治療を必要とする患者において L A L 欠乏症に関連する状態を治療する方法であって、1 キログラム当たり約 0. 1 m g ~ 5. 0 m g の用量の外因性 L A L を前記患者に投与することを含む、方法。

(項目 1 4)

治療を必要とするヒト患者においてウォルマン病または C E S D を治療する方法であって、5 日に 1 回 ~ 3 0 日に 1 回投与される、1 キログラム当たり約 0. 1 m g ~ 5 0 m g の用量の外因性 L A L を前記患者に投与することを含む、方法。

(項目 1 5)

前記外因性 L A L は、組み換えヒト L A L である、項目 1 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記外因性 L A L は、少なくとも 1 つのマンノースまたはマンノース-6-リン酸塩を含む、項目 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 7)

前記 L A L は、約 0. 1 0 m g / k g ~ 約 5. 0 m g / k g の量で投与される、項目 1 ~ 1 2 または項目 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 8)

前記量は約 0. 3 0 m g / k g である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記量は約 0. 3 5 m g / k g である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記量は約 1. 0 m g / k g である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記量は約 3. 0 m g / k g である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記投与は、ほぼ毎週のものである、項目 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記投与は、約 2 週間に一度のものである、項目 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 4)

前記投与は、治療前のレベルから少なくとも 5 0 % だけ血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ (A S T) のレベルを減少させるのに十分である、項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記投与は、治療前のレベルから少なくとも 5 0 % だけ血清アラニントランスアミナーゼ (A L T) のレベルを減少させるのに十分である、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 6)

前記投与は、約 1 7 分未満の L A L 半減期 ($t_{1/2}$) を達成するのに十分である、項目 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7)

前記投与は、約 6 分、約 7 分、約 8 分、約 9 分、約 1 0 分、約 1 1 分、約 1 2 分、約 1 3 分、約 1 4 分、約 1 5 分、約 1 6 分、または約 1 7 分の L A L 半減期 ($t_{1/2}$) を達成するのに十分である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 8)

前記投与は、血清 1 m L 当たり少なくとも約 2 0 0 n g の C_{max} を達成するのに十分である、項目 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 9)

10

20

30

40

50

前記投与は、血清 1 mL 当たり約 200 ng～血清 1 mL 当たり約 800 ng の C_{max} を達成するのに十分である、項目 1～28 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 30)

前記 LAL は、線維芽細胞によって内在化される、項目 1～29 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

前記 LAL は、マクロファージによって内在化される、項目 1～30 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 32)

前記 LAL は、遺伝子導入鳥類によって産生される、項目 1～31 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 33)

前記 LAL は、哺乳類細胞系によって産生される、項目 1～31 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 34)

前記哺乳類細胞系は、ヒト細胞系である、項目 33 に記載の方法。

(項目 35)

前記投与は、静脈内のものである、項目 1～34 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 36)

前記投与は、点滴によるものである、項目 35 に記載の方法。

20

(項目 37)

前記点滴は、約 2 時間～約 4 時間にわたるものである、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

前記点滴は、約 0.1 mg/kg/時間～約 4 mg/kg/時間の速度である、項目 36 または 37 に記載の方法。

(項目 39)

前記投与は、前記組み換えヒト LAL に対する免疫応答を最小にする、項目 1～38 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 40)

前記投与は、リンパ節腫大を減少させる、項目 1～39 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 41)

前記投与は、血清フェリチンレベルを減少させるのに十分である、項目 1～40 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 42)

前記投与は、血清ヘモグロビンレベルを増大させるのに十分である、項目 1～41 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 43)

前記投与は、小児患者の成長を増進させるのに十分である、項目 1～42 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 44)

40

前記投与は、体重増加の速度を上昇させるのに十分である、項目 1～43 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 45)

投与後の前記患者の成長速度は、前記投与前の前記患者の成長速度の少なくとも約 2 倍である、項目 1～44 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 46)

前記投与は、脂肪組織を増大させるのに十分である、項目 1～45 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 47)

前記患者は、1 歳未満である、項目 1～46 のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 4 8)

前記患者は、少なくとも 1 歳である、項目 1 ～ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

前記患者は、ウォルマン病 (WD) と診断された、項目 1 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記患者は、コレステリルエステル蓄積症 (CESD) と診断された、項目 1 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記 CESD は、10 歳より前に診断された、項目 5 0 に記載の方法。

10

(項目 5 2)

第 2 の治療薬を投与することをさらに含む、項目 1 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記第 2 の治療薬は、コレステロール減少剤である、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記第 2 の治療薬は、スタチンである、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記第 2 の治療薬は、エゼチミブである、項目 5 3 に記載の方法

(項目 5 6)

20

前記第 2 の治療薬は、LAL の免疫原性を減少させる、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記第 2 の治療薬は、抗ヒスタミン剤である、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記第 2 の治療薬は、免疫抑制剤である、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記抗ヒスタミン剤は、前記 LAL が投与される前に投与される、薬学的有効用量のジフェンヒドラミンである、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記ジフェンヒドラミンの用量は、1 キログラム当たり約 1 mg ～ 約 5 mg である、項目 5 9 に記載の方法。

30

(項目 6 1)

前記ジフェンヒドラミンは、LAL の投与の約 20 分前～約 90 分前に投与される、項目 5 9 または 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記患者の臨床的な提示および病理学的な提示を監視するための評価を完了することをさらに含む、項目 1 ～ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記評価は、脂質分析、胸部 X 線、肝機能試験、糞便チャート、血漿メバロン酸分析、免疫原性試験、血漿リソソーム酸性リパーゼ分析、キトトリオシダーゼ分析、門脈圧亢進分析、人体測定、肝臓または脾臓の特徴づけ、胃腸管の画像化またはこれらの組み合わせである、項目 6 2 に記載の方法。

40

(項目 6 4)

前記画像化の技術は、超音波、磁気共鳴画像法または核磁気共鳴分光である、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

項目 1 ～ 6 4 のいずれか一項に記載の方法にしたがって LAL を投与するための組成物。

【図面の簡単な説明】

【0021】

50

【図1】図1Aは、外因性LAL（SBC-102）の投与を毎週受けたウォルマン病の小児男子（即ち、早発性LAL欠乏症）患者の血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）のレベルを示す（用量：0.2 mg/kg（初期点滴；0週目）；0.3 mg/kg（1週目）；0.5 mg/kg（2週目）；および1.0 mg/kg（3～8週目））。図1Bは、同じ患者の血清アラニントランスアミナーゼ（ALT）のレベルを示す。患者の年齢は、初期点滴時、4ヶ月と1週であった。

【図2】外因性LAL（SBC-102）の投与を毎週受けたウォルマン病患者の血清フェリチンのレベルを示す（用量：0.2 mg/kg（初期点滴；0週目）；0.3 mg/kg（1週目）；0.5 mg/kg（2週目）；および1.0 mg/kg（3～8週目））。患者の年齢は、初期点滴時、4ヶ月と1週であった。0週目の初期投与後1週目からの血清フェリチンレベルが示される。

10

【図3】外因性LAL（SBC-102）の投与を毎週受けたウォルマン病患者の成長速度を示す（用量：0.2 mg/kg（初期点滴；0週目）；0.3 mg/kg（1週目）；0.5 mg/kg（2週目）；および1.0 mg/kg（3～8週目））。

【図4】ウォルマン病患者（kg、男子の年齢別体重パーセンタイル）の成長曲線を示す。

【図5】0.35 mg/kgの用量の外因性LALを毎週受けた41歳のCESD白人男性患者の血清ASTレベルを示す。

【図6】0.35 mg/kgの用量の外因性LALを毎週受けた41歳のCESD白人男性患者の血清ALTレベルを示す。

20

【図7】0.35 mg/kgの用量の外因性LALを毎週受けた41歳のCESD白人男性患者の血清アルブミンレベルを示す。

【図8】0.35 mg/kgの用量の外因性LALを毎週受けた41歳のCESD白人男性患者の血清フェリチンレベルを示す。

【図9】それぞれが次の4つの外因性LAL投与量レジームのうちの1つに割り当てられた4匹の同年齢雄ラットにおける体重増加の速度を図示する：週に1回、1キログラム当たり1 mg、週に1回、1キログラム当たり5 mg、2週間に1回、1キログラム当たり5 mg、またはプラセボ。欄内の数字は、生後の日数を表す。

【図10】野生型対照、外因性LALで治療されたLAL欠乏ラット、およびLAL欠乏プラセボ治療されたラットの病理学および組織病理学的検査の結果を示す。肉眼による病理像は、外因性LALで治療されたラットの肝臓の色および大きさの正常化を示す。外因性LALで治療されたラットからの肝組織の組織病理像は、プラセボ治療された動物の泡沫状のマクロファージの実質的な蓄積とは好対照に、基本的に正常な肝臓組織像を示す。

30

【図11】定順位走査モードを使用した共焦点蛍光顕微鏡法により検査された細胞のリソソームにおける組み換えヒトLAL（SBC-102）とリソソームマーカーの共局在化を示す。

【図12】マクロファージ細胞系NR8383を使用した競合結合アッセイにより評価された組み換えヒトLAL（SBC-102）のGlcnAc/マンノース受容体への結合特異性を示す。

40

【図13】生体外での正常細胞およびLAL欠乏細胞の細胞における組み換えヒトLALの活性を示す。

【図14】LAL欠乏ラットの内部臓器塊に対する組み換えヒトLAL（SBC-102）の作用を図示する。臓器の大きさは、4週間、5 mg/kgのビヒクルまたはSBC-102を毎週投与された後のLAL^{-/-}ラットおよびLAL^{+/+}ラットにおける、8週齢で決定された体重率として表される。

【図15】4週間、5 mg/kg⁻¹のビヒクルまたはSBC-102を毎週投与された後の野生型およびLAL欠乏ラットの体重を図示する。4週目で開始される用量投与は、X軸上でひし形で強調される。

【図16】4週間、5 mg/kg⁻¹のビヒクルまたはSBC-102を毎週投与された

50

後のWTおよびLAL欠乏ラットにおける、8週齢で決定された肝臓コレステロール、コレステリルエステル、およびトリグリセリドのレベルを示す。

【図17】LAL欠乏ラットの体重増加率を示す。

【図18】4週間SBC-102を投与した後のLAL欠乏ラットにおける体重率として肝臓の重量を示す。

【図19】4週間SBC-102を投与した後のLAL欠乏ラットにおける組織コレステリルエステルのレベルを図示する。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明は、外因性リソソーム酸リパーゼの投与に応答する疾患または状態に罹患するヒトを治療するための方法を提供する。

【0023】

定義

便宜上、本明細書、実施例、および付属の特許請求の範囲に利用される特定の用語は、本発明を説明するために使用される様々な用語の意味および範囲を図示ならびに定義するために、本明細書に明記される。

【0024】

本明細書で使用される「LAL」とは、「リソソーム酸リパーゼ」を指し、この2つの用語は、本明細書全体を通して互換的に使用される。LALは、ヒトタンパク質、即ち、ヒトリソソーム酸リパーゼであり得る。本明細書で使用される「SBC-102」という用語は、組み換えヒトリソソーム酸リパーゼを指す。LALは、文献において、酸コレステリルエステル加水分解酵素、コレステリルエステラーゼ、リパーゼA、LIPA、およびステロールエステラーゼとも称される。

【0025】

LALは、コレステロール、グリセロール、および遊離脂肪酸を取り除くために、コレステロールエステルおよびトリグリセリドの加水分解を触媒する。よって、「LAL活性」は、例えば、蛍光基質であるオレイン酸4-メチルウンベリフェリル(4MUO)の切断により測定され得る。4MUOの切断は、例えば、放出されたフルオロフォアである4-メチルウンベリフェロン(4MU)の約360nmでの励起、および460nmでの発光により検出され得る。結果は、相対的な蛍光単位(RFU)で報告され得る。例えば、30分のエンドポイントアッセイで切断された基質の量は、4MU標準曲線に対して定量化され得、活性の1単位(U)は、37℃で1分当たり1マイクロモルの4MUOを切断するために必要とされる酵素の量として定義され得る。したがって、LALの機能断片または変異体は、LAL活性、例えばコレステロールエステルおよび/もしくはトリグリセリドを加水分解する能力を有する断片または変異体を含む。

【0026】

本明細書で使用される「外因性LAL」とは、患者によって自然に産生されないLALを指す。例えば、外因性LALは、患者に投与される組み換えLALタンパク質、個人または動物から単離され、患者に投与されるLALタンパク質、ならびにLALをコードするRNAおよび/もしくはDNAの投与または外因性LALタンパク質の発現を増加させる別の治療の結果として患者に産生される(即ち、発現する)LALタンパク質を含む。

【0027】

多くの場合医学的にIVプッシュ(IV push)またはボラス注入とも称される「静脈内注入」は、シリンジがIVアクセスデバイスに接続され、薬物が直接、典型的には迅速に、そして静脈の過敏または非常に迅速な作用をもたらすかもしれない場合、最大15分の期間、時折注入される投与経路を指す。薬品がIV管類の液体流の中に注入されると、管類から患者に達することを確実にする何らかの手段がなければならない。通常、これは、液体流を正常に流動させ、それによって、薬品を血流の中に送ることにより達成

10

20

30

40

50

される。しかしながら、いくつかの場合において、薬品が血流の中に入るのを容易にするために、第1の注入後、時折「フラッシュ」と呼ばれる第2の流体注入が使用される。

【0028】

「静脈内点滴」とは、薬物が長期間にわたって送達される投与経路を指す。例えば、薬物は、1～8時間の時間期間にわたって患者に送達され得る。薬物はまた、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、または約8時間にわたって患者に送達され得る。静脈内点滴を達成するために、IV重力滴下またはIVポンプが使用され得る。IV点滴は、典型的に、患者が特定の時間にのみ薬物を必要とし、用量が電解質、血糖、および水の損失回復するもの等の、追加の静脈内流体（例えば、ナトリウム、塩化物、グルコース、またはそのいずれかの組み合わせ）を必要としないときに使用

10

【0029】

本明細書に使用される「鳥」という用語は、これらに限定されないが、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、キジ、オウム、フィンチ、タカ、カラス、およびダチョウ、エミュー、およびヒクイドリを含む走鳥類等の、分類学鳥類の生物のいずれの種、亜種、または種族を指す。本用語は、様々な既知のガルスガルス、またはニワトリ（例えば、ホワイトレグホーン（White Leghorn）、ブラウンレグホーン（Brown Leghorn）、バードロック（Barred-Rock）、サセックス（Sussex）、ニューハンプシャー（New Hampshire）、ロードアイランド（Rhode Island）、オーストラロップ（Australorp）、ミノルカ（Minorca）、アムロックス（Amrox）、カルフォルニアグレイ（California Gray））の系統、ならびにシチメンチョウ、キジ、ウズラ、アヒル、ダチョウ、および商業的規模で一般的に飼育される他の家禽の系統を含む。それはまた、胚形成期および胎仔期を含む、全ての発育段階の個々の鳥生物も含む。

20

【0030】

「家禽由来」または「鳥由来」という用語は、家禽から産生された、またはそれから得られた組成物または物質を指す。「家禽」とは、これらに限定されないが、ニワトリ、アヒル、シチメンチョウ、ウズラ、および走鳥類を含む、家畜として飼育され得る鳥類を指す。例えば、「家禽由来」とは、ニワトリ由来、シチメンチョウ由来、および／またはウズラ由来を指してもよい。

30

【0031】

本明細書で使用される「患者」とは、例えば、医療提供者により医療もしくは治療を受ける、または受けた、または受ける予定のいずれの個人を指す。

【0032】

本明細書で使用される「治療有効用量」とは、意図される治療応答を産生するのに必要とされる薬物の用量（例えば、量および／または間隔）を指す。治療有効用量とは、そのような用量を受けなかった対応する対象と比較して、疾患、障害、もしくは副作用の治療、治癒、防止、または軽減の改善、あるいは疾患もしくは障害の発生または進行の速度の減少をもたらす用量を指す。本用語はまた、その範囲内で、生理学的機能を強化するために有効な用量も含む。

40

【0033】

「治療する」「治療（treating）すること」および「治療（treatment）」という用語は、予防的に、および／または症状が生じた後のいずれかに、疾患もしくは症状を緩和する、寛解する、または軽減する、さらなる症状を防止する、根底にある症状の原因を軽減する、または防止する、疾患もしくは状態を阻害する、疾患もしくは状態の進行を阻止する、疾患もしくは状態を和らげる、疾患もしくは状態の後退をもたらす、疾患もしくは状態によってもたらされた状態を和らげる、または疾患もしくは状態の症状を停止させる方法を指す。

【0034】

特定の用量に関して本明細書で使用される「 kg^{-1} 」、「1kg当り」「/kg」、

50

および「1キログラム当り」とは、哺乳類の「体重1キログラム当り」を表し、よって、本用語は、互換的に使用され得る。

【0035】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、単数の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）により直鎖状に結合されたモノマー（アミノ酸）から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸のいずれの鎖または複数の鎖を指し、産物の特定の長さを指すものではない。よって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2つ以上のアミノ酸の鎖もしくは複数の鎖を指すために使用される他のいずれかの用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりに、またはそれと互換的に使用され得る。「ポリペプチド」という用語は、非限定的に、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解の切断、または自然に生じないアミノ酸による修飾を含む、ポリペプチドの発現後の修飾の産物を指すことも意図される。ポリペプチドは、自然の生物学的起源に由来するか、または組み換え技術によって産生され得るが、指定された核酸配列から必ずしも翻訳されない。それは、化学合成を含む、いずれの手段で生成され得る。

10

【0036】

本明細書で使用される2つのアミノ酸配列または2つのヌクレオチド配列間の相同性パーセントは、2つの配列間の同一性パーセントと等しい。2つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一位置の数の関数（即ち、相同性%＝同一位置の#／位置の総#×100）であり、2つの配列の最適な整合のために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮する。2つの配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、非限定的な以下の実施例に記載されるように、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

20

【0037】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティ、および4のギャップペナルティを使用してALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれた、E. MeyersおよびW. Miller（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17（1988））のアルゴリズムを使用して決定され得る。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossom62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、および16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重量および1、2、3、4、5、または6の荷重（length weight）を使用して、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で入手可能）のGAPプログラムに組み込まれた、NeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol. 48:444-453（1970））アルゴリズムを使用して決定され得る。

30

【0038】

「単離された」ポリペプチド、またはその断片、変異体、もしくは誘導体により、その自然環境にはないポリペプチドが意図される。特定のレベルの精製は必要ない。例えば、単離されたポリペプチドは、その天然または自然環境から除去される。宿主細胞で発現する、組み換えにより産生されたポリペプチドおよびタンパク質は、いずれの適切な技法により分離、画分、または部分的もしくは実質的に精製された天然または組み換えポリペプチドであるため、本明細書に開示されるように単離されたと考えられる。

40

【0039】

本明細書で開示される他のポリペプチドは、前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、または変異体、およびそれらのいずれかの組み合わせである。本明細書に開示されるポリペプチドのいずれかを指すとき、「断片」、「変異体」、「誘導体」、および「類似体」という用語は、対応する天然のポリペプチド（例えば、コレステロールエステルおよび／またはトリグリセリドを加水分解する能力を保持するLALポリペプチド断片、変異

50

体、誘導体、および類似体)の活性の少なくとも一部を保持するいずれかのポリペプチドを含む。ポリペプチドの断片は、例えば、タンパク質分解の断片ならびに欠失断片を含む。ポリペプチドの変異体は、上述の断片、およびアミノ酸置換、欠失、または挿入により、変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも含む。変異体は、自然に生じるか、または自然に生じなくてもよい。自然に生じない変異体は、当該技術分野に公知の変異誘発法を使用して産生され得る。変異体ポリペプチドは、保存もしくは非保存アミノ酸置換、欠失、または付加を含んでもよい。誘導体は、自然ポリペプチドで見られない追加特徴を示すように変更されたポリペプチドである。例としては融合タンパク質が挙げられる。変異体ポリペプチドは、本明細書において、「ポリペプチド類似体」とも称され得る。本明細書で使用される対象ポリペプチドの「誘導体」は、官能側基の反応により化学的に誘導された1つ以上の残基を含有してもよい。20の標準アミノ酸のうちの1つ以上の自然に生じるアミノ酸を含有するそれらのペプチドも、「誘導体」として含まれる。例えば、4-ヒドロキシプロリンはプロリンに代えて置換され得る、5-ヒドロキシリジンはリジンに代えて置換され得る、3-メチルヒスチジンはヒスチジンに代えて置換され得る、ホモセリンはセリンに代えて置換され得る、および/またはオルニチンはリジンに代えて置換され得る。

10

【0040】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単一核酸ならびに複数の核酸を包含するように意図され、単離された核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) もしくはプラスミドDNA (pDNA) を指す。ポリヌクレオチドは、従来のリン酸ジエステル結合または特殊結合(例えば、ペプチド核酸(PNA)等)に見られるアミド結合)を含んでもよい。「核酸」という用語は、ポリヌクレオチドに存在するいずれかの1つ以上の核酸セグメント、例えば、DNAもしくはRNA断片を指す。「単離された」核酸またはポリヌクレオチドにより、その天然環境から除去された核酸分子、DNA、またはRNAが意図される。例えば、ベクターに含有されるLALをコードする組み換えポリヌクレオチドは、本発明の目的において単離されたと考えられる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例としては、異種宿主細胞または溶液中の(部分的に、または実質的に)精製されたポリヌクレオチドに維持される組み換えポリヌクレオチドが挙げられる。単離されたRNA分子は、本発明のポリヌクレオチドの生体内または生体外RNA転写物を含む。本発明による単離されたポリヌクレオチドまたは核酸は、合成的に産生されたそのような分子をさらに含む。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーター等の制御エレメントであり得る、またはそれを含んでもよい。

20

30

【0041】

本明細書で使用される「コード領域」とは、アミノ酸に翻訳されたコドンからなる核酸の一部分である。「停止コドン」(TAG、TGA、またはTAA)は、アミノ酸に翻訳されないが、コード領域の一部と考えられてもよい、しかし、いずれの隣接配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン等は、コード領域の一部ではない。本発明の2つ以上のコード領域は、例えば単一ベクター上の単一ポリヌクレオチド構築物、または例えば別個の(異なる)ベクター上の別個のポリヌクレオチド構築物に存在してもよい。さらに、いずれのベクターも、単一コード領域を含有するか、または2つ以上のコード領域を含んでもよい。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、LALポリペプチドまたはその断片、変異体、もしくは誘導体をコードする核酸に融合するまたは融合しない、いずれかの異種コード領域をコードすることができる。異種コード領域は、非限定的に、分泌シグナルペプチドまたは異種機能ドメイン等の、特殊エレメントもしくはモチーフを含む。

40

【0042】

様々な転写調節領域は、当業者に公知である。これらは、これらに限定されないが、サイトメガロウイルスからのプロモーターおよびエンハンサーセグメント(イントロンAと共に、即時初期プロモーター)、シミアンウイルス40(初期プロモーター)、およびレ

50

トロウイルス（ラウス肉腫等）の、脊椎動物細胞で機能する転写調節領域を非限定的に含む。他の転写調節領域は、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、およびウサギβ-グロビン等の脊椎動物遺伝子に由来するもの、ならびに真核生物細胞での遺伝子発現を調節することができる他の配列を含む。さらなる適切な転写調節領域は、組織特異的プロモーターおよびエンハンサーならびにリンホカイン誘発性プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンにより誘発されるプロモーター）を含む。

【0043】

同様に、様々な転写調節エレメントが当業者に公知である。これらは、リボソーム結合部位、翻訳開始および終結コドン、ならびにピコルナウイルスに由来するエレメント（特に内部リボソーム侵入部位またはIRES、またCITE配列とも称される）を含むが、これらに限定されない。

【0044】

他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、例えばメッセンジャーRNA（mRNA）の形態のRNAである。

【0045】

本発明のポリヌクレオチドおよび核酸コード領域は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの分泌を指令する、分泌またはシグナルペプチドをコードするさらなるコード領域と関連してもよい。シグナル仮説によると、粗面小胞体にわたって成長タンパク質鎖の輸出が開始されると、哺乳類細胞によって分泌されたタンパク質は、成熟タンパク質から切断されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。脊椎細胞によって分泌されたポリペプチドは、一般に、分泌された、または「成熟」形態のポリペプチドを産生するために、完全または「完全長」のポリペプチドから切断される、ポリペプチドのN末端に融合したシグナルペプチドを有することを、当業者は認識する。特定の実施形態では、天然のシグナルペプチド、例えばヒトLALのMKMRFLGLVVC LVLWTLHSEG（配列番号2）シグナルペプチド、またはそれと操作可能に関連するポリペプチドの分泌を指令する能力を保持するその配列の機能性誘導体を使用される。代替的に、異種のシグナルペプチド（例えば、異種の哺乳類または鳥のシグナルペプチド）またはその機能性誘導体を使用され得る。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）またはマウスβグルクロニダーゼのリーダー配列で置換され得る。

【0046】

「ベクター」とは、一本鎖、二本鎖、環状、または超螺旋DNAもしくはRNAからなるポリヌクレオチドを意味する。典型的なベクターは、機能遺伝子発現を可能にするために適切な距離で操作可能に結合された以下のエレメントから成り得る：複製起源、プロモーター、エンハンサー、5' mRNAリーダー配列、リボソーム結合部位、核酸カセット、終結およびポリアデニル化部位、および選択マーカー配列。これらのエレメントの1つ以上は、特定の用途において省くことができる。核酸カセットは、発現する核酸配列の挿入において制限部位を含んでもよい。機能ベクターにおいて、核酸カセットは、転写開始および終結部位を含む、発現する核酸配列を含有する。任意に、イントロンが構築物に、例えば5'がコード配列に含まれ得る。ベクターは、特定のコード配列が適切な制御配列を有するベクターに位置するように構築され、調節配列に対して、コード配列が調節または制御配列の「調節」下で転写されるようなコード配列の位置付けおよび配向である。この目的を達成するために、特定の関心のタンパク質をコードする配列の修飾が望ましい。例えば、一部の場において、適切な配向を有する調節配列に結合され得るように、配列を修飾する、またはリーディングフレームを維持することが必要であり得る。調節配列および他の制御配列は、ベクターの中に挿入される前にコード配列に結合され得る。代替的に、コード配列は、調節配列を有するリーディングフレームにあり、かつその制御調節下にある調節配列および適切な制御部位を既に含有する発現ベクターの中に直接クローン化され得る。

【0047】

本明細書で使用される「発現」という用語は、遺伝子が生化学物質、例えばポリペプチドを産生するプロセスを指す。本プロセスは、非制限的に、遺伝子ノックダウンならびに一過性の発現および安定した発現の両方を含む細胞内の機能的な遺伝子の存在のいずれの顕在化を含む。それは、非限定的に、遺伝子のメッセンジャーRNA（mRNA）への転写、およびそのようなmRNAのポリペプチド（複数可）への翻訳を含む。遺伝子の発現は、「遺伝子産物」を産生する。本明細書で使用される遺伝子産物は、核酸、例えば遺伝子の転写により産生されるメッセンジャーRNA、または転写物から翻訳されるポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載される遺伝子産物は、転写後修飾、例えばポリアデニル化を伴う核酸、または転写後修飾、例えばメチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットの会合、タンパク質分解切断等を伴うポリペプチドをさらに含む。

10

【0048】

本明細書で使用される「宿主細胞」とは、組み換えDNA技法を使用して構築され、少なくとも1つの異種遺伝子をコードするベクターを持つ細胞を指す。

【0049】

本明細書で使用される「N-グリカン」、「オリゴ糖」、「オリゴ糖構造」、「グリコシル化パターン」、「グリコシル化プロファイル」、および「グリコシル化構造」という用語は、基本的に同じ意味を有し、それぞれ、糖残基から形成され、グリコシル化タンパク質に結合される1つ以上の構造を指す。

【0050】

本明細書で使用される「薬学的組成物」という用語は、本明細書に記載される化合物の、担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、および／または賦形剤等の他の化学成分との混合物を指す。

20

【0051】

不十分なLAL活性を有する患者

本発明をいずれかの特定の状態または状態の群の治療に制限するものではないが、本発明は、患者のリソソーム酸リパーゼ（LAL）欠乏症の治療を含む。本明細書で使用されるLAL欠乏症を有する患者は、不十分なLAL活性を有するあらゆる患者である。患者の不十分なLAL活性は、例えば、低RNAレベル、低タンパク質レベル、または低タンパク質活性の結果であり得る。不十分なLAL活性は、LALコード配列、LAL制御配列、または別の遺伝子（例えばLALを制御する遺伝子）の変異に起因してもよい。不十分なLAL活性はまた、環境要因の結果であってもよい。

30

【0052】

本発明は、対象または患者において多様な状態を治療するために使用され得る。したがって、本発明による外因性LALによって有益に治療され得るあらゆる状態が、本発明の範囲内に含まれる。

【0053】

本発明の一実施形態は、リソソーム酸リパーゼの欠乏、特にウォルマン病（WD）およびコレステリルエステル蓄積症（CESD）に起因するリソソーム蓄積症（LSD）の治療に焦点をあてる。本発明をいずれかの特定の理論または操作機構に制限するものではないが、WDおよびCESDの両方は、LAL遺伝子座の変異によるものであり得、本発明の方法による外因性LALの投与により治療され得る多くの組織のリソソームにおける脂質性物質の大量の蓄積、およびコレステロールおよび脂質の恒常的機序の著しい妨害をもたらす。よって、一実施形態では、本発明により治療されるLAL欠乏症は、WDである。別の実施形態では、本発明により治療されるLAL欠乏症は、CESDである。一部の実施形態では、WDまたはCESDの診断は、遺伝子分析（例えば、LALコード配列の機能的変異の識別）に基づく。他の実施形態では、WDまたはCESDの診断は、臨床知見（例えば、身体検査および／または実験試験）に基づく。

40

【0054】

50

一部の実施形態では、外因性LALは、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）および非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）等の、様々な状態の合併症を治療するために使用され得る。NAFLDは、過剰なアルコール摂取による肝疾患に類似する組織病理像を有する肝臓の疾患を指す。それは、肝臓の肥大をもたらす大滴性脂肪症を特徴とする。NAFLDは、線維症および肝硬変をもたらす可能性がある炎症ならびに肝臓への損傷に加え、NAFLDに類似する肝疾患を指すNASHに進行する可能性がある。

【0055】

一部の実施形態では、外因性LALは、膵炎、例えば慢性膵炎および／または急性膵炎ならびにアルコール誘発性膵炎等の、アルコール誘発性膵傷害を含む状態を治療するために使用され得る。

【0056】

いずれかの有用な方法によって産生された外因性LALは、これらに限定されないが、肝臓、脾臓、消化管、および心血管組織等の身体組織に脂質エステルの蓄積をもたらす、これらのアルコール誘発性細胞傷害を含むがこれらに限定されないアルコール誘発性細胞傷害による疾患を治療するために使用され得る。本発明によると、吸収不良も外因性LALを投与することにより治療され得る。外因性LALは、タンジール病および家族性低 α リポタンパク血症を有する患者の治療にも有用である。タンジール病／家族性低 α リポタンパク血症は、外因性LALの投与により治療され得る低HDLレベルと共に、肝脾腫大および／またはリンパ節腫大を伴うマクロファージにおけるコレステロールエステルの蓄積に関連する。例えば、本発明をいずれかの特定の理論または操作機構に制限するものではないが、傷害性LAL活性は、ABCA1発現を減少させてもよく、逆に、タンジール病／家族性低 α リポタンパク血症を有する患者に外因性LALを投与することにより得られるLAL活性の増加は、多型の結果として機能的活性の減少を伴うABCA1遺伝子の作用を排除するためにABCA1発現を増加させる。

【0057】

一部の実施形態では、治療前の患者のLAL活性レベルは、LAL活性の正常レベルの約1%、約2%、約3%、約5%、約10%、約15%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、または約80%である。一実施形態では、治療前の患者のLAL活性レベルは、LAL活性の正常レベルの約50%以下である。一実施形態では、治療前の患者のLAL活性レベルは、LAL活性の正常レベルの約40%以下である。一部の実施形態では、治療前の患者のLAL活性レベルは、LAL活性の正常レベルの約30%以下である。一部の実施形態では、治療前の患者のLAL活性レベルは、LAL活性の正常レベルの約20%以下である。一部の実施形態では、治療前の患者のLAL活性レベルは、LAL活性の正常レベルの約10%以下である。一部の実施形態では、治療前の患者のLAL活性レベルは、LAL活性の正常レベルの約5%以下である。一部の実施形態では、患者は、治療前に測定可能なLAL活性を示さない。

【0058】

一部の実施形態では、LAL活性レベルは、LAL欠乏症に罹患するヒト患者より得た培養線維芽細胞中で測定される。一部の実施形態では、LAL活性レベルは、LAL欠乏症に罹患するヒト患者のリンパ球（例えば白血球）中で測定される。リンパ球は、末梢血単核細胞（PMBC）を含むが、これに限定されない。測定方法は、例えば、Burton et al., (1980) Clinica Chimica Acta 101: 25-32およびAnderson et al., (1999) Mol. Genet. & Metab., 66: 333-345に記載されており、その両方はそれらの全体が本明細書に組み込まれる。外因性LALで治療される予定のLAL欠乏患者は、基質としてトリオレインを使用して測定されるように、約30、約20、約10、約5、約4、約3、約2、または約1 pmol/mg/分未満である線維芽細胞LAL酵素活性を示してもよい。外因性LALで治療される予定のLAL欠乏患者は、基質としてトリオレインにより測定されるように、約30、約20、約10、約5、約4、約3、約2、または約1 p

mol/mg/分未満である白血球LAL酵素活性を示してもよい。外因性LALで治療される予定のLAL欠乏患者は、基質としてオレイン酸コレステリルを使用して測定されるように、約30、約20、約10、約5、約4、約3、約2、または約1pmol/mg/分未満である線維芽細胞LAL酵素活性を示してもよい。外因性LALで治療される予定のLAL欠乏患者は、基質としてオレイン酸コレステリルを使用して測定されるように、約30、約20、約10、約5、約4、約3、約2、または約1pmol/mg/分未満である白血球LAL酵素活性を示してもよい。

【0059】

外因性LALの投与

10

本発明は、患者に外因性LALを投与することを含む、外因性LALでヒト患者を治療する方法を提供し、投与は、成長を回復させる、肝機能を改善する、肝臓損傷を減少させる、LALの組織レベルを増加させる、および/または患者のLAL活性を増加させるのに十分である。本発明は、WDおよびCESDを含むLAL欠乏症により生じる状態を治療するのに有用かつ今までに特定されていない外因性LALの投与頻度（即ち投与スケジュール）、ならびにこれらの状態を治療するための今までに特定されていない投与量を提供する。

【0060】

本発明は、医学分野の専門家により決定された期間の間、5日に1回～30日に1回患者に投与される治療有効用量の外因性LALを提供する。一実施形態では、期間は、患者の余生である。一実施形態では、投与頻度は、5日に1回～25日に1回である。一実施形態では、投与頻度は、5日に1回～21日に1回である。別の実施形態では、投与頻度は、7日に1回～14日に1回である。外因性LALは、5日に1回、6日に1回、7日に1回、8日に1回、9日に1回、10日に1回、11日に1回、12日に1回、13日に1回、または14日に1回投与され得る。一部の実施形態では、外因性LALは、ほぼ毎週投与される。他の実施形態では、外因性LALは、約2週に1回投与される。一実施形態では、投与頻度は、約30日に1回である。

20

【0061】

状態の治療のために、一般に、投与される外因性LALの量は、受給者の年齢、健康状態、および体重、並行治療の種類、治療の頻度等の既知の要因により変動してもよい。通常活性成分の投与量は、体重1キログラム当たり約0.01～約50mgであり得る。一実施形態では、本発明による外因性LALの投与量は、体重1キログラム当たり約0.1～約0.5mgである。一実施形態では、用量は、1キログラム当たり約0.1mg～約5.0mgである。一実施形態では、用量は、1キログラム当たり約0.1mg～約5.0mgである。一実施形態では、用量は、1キログラム当たり約0.1、約0.2、約0.25、約0.30、約0.35、約0.40、約0.45、約0.50mgである。一実施形態では、用量は、1キログラム当たり約1mg～約5mgである。一実施形態では、用量は、1キログラム当たり約1mgである。一実施形態では、用量は、1キログラム当たり約3mgである。例えば、体重1キログラム当たり0.1mg、体重1キログラム当たり0.2mg、体重1キログラム当たり0.3mg、体重1キログラム当たり0.4mg、体重1キログラム当たり0.5mg、体重1キログラム当たり1mg、体重1キログラム当たり2mg、体重1キログラム当たり3mg、体重1キログラム当たり4mg、または体重1キログラム当たり5mgが投与され得る。一実施形態では、用量は、体重1キログラム当たり約1mg～約20mgである。

30

40

【0062】

本発明は、本発明の投与スケジュールを利用するとき、他の投与量も含む。例えば、本発明の投与スケジュールによると、体重1キログラム当たり約0.1mg～約50mgが患者に投与される。

【0063】

一部の実施形態では、約0.5～約50mgの外因性LALが、例えば1ヶ月～24ヶ月

50

月の年齢のウォルマン病を有する患者に投与される。一実施形態では、患者は1歳未満である。別の実施形態では、患者は2歳未満である。一部の実施形態では、約0.1mg、約0.2mg、約0.3mg、約0.4mg、約0.5mg、約1mg、約2mg、約3mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、約25mg、約30mg、約35mg、約40mg、約45mgの外因性LALが、ウォルマン病を有する患者に投与される。一部の実施形態では、約0.5～約30mg、約0.5～約20mg、約0.5～約10mg、または約0.5～約5mgが、ウォルマン病を有する患者に投与される。一部の実施形態では、約1～約30mg、約1～約20mg、約1～約10mg、または約1～約5mgが投与される。

【0064】

一部の実施形態では、約1mg～約350mgの外因性LALが、例えばCESDと診断された患者に投与される。よって、一部の実施形態では、約1、5、10、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、または350mgの外因性LALが、CESDを有する患者に投与される。一部の実施形態では、約5～約350mg、約5～約300mg、約5～約250mg、または約5～約200mgが、CESDを有する患者に投与される。一部の実施形態では、約10～約350mg、約10～約300、約10～約250、または約10～約200mgが、CESDを有する患者に投与される。

【0065】

併用治療

本明細書に開示される治療用タンパク質は、他の治療剤と組み合わせて使用され得る。本発明は、本発明による外因性LALの投与によって生じ得るいかなるアナフィラキシー反応の可能性を最小にする、または予防するための前治療処置を提供する。一実施形態では、アナフィラキシー反応の可能性を前治療するために、抗ヒスタミン剤（例えばジフェンヒドラミン）としても知られるH-1受容体拮抗薬が患者に投与される。一実施形態では、H-1受容体拮抗薬は、体重1キログラム当たり約1mg～約10mgの用量で投与される。例えば、抗ヒスタミン剤は、1キログラム当たり約5mgの用量で投与され得る。抗ヒスタミン剤の投与は、本発明による外因性LALの投与前であり得る。一実施形態では、H-1受容体拮抗薬は、外因性LALの約10～約90分前、例えば約30～約60分前に投与される。H-1受容体拮抗薬は、血管アクセスポートに接続された携帯型システムを使用して投与され得る。一実施形態では、抗ヒスタミン剤は、外因性LALの投与約90分前に投与される。一実施形態では、抗ヒスタミン剤は、外因性LALの投与約10～約60分前に投与される。別の実施形態では、抗ヒスタミン剤は、外因性LALを投与する約20～約40分前に投与される。例えば、抗ヒスタミン剤は、外因性LALの投与20、25、30、35、または40分前に投与され得る。一実施形態では、投与される抗ヒスタミン剤は、ジフェンヒドラミンである。あらゆる有用な抗ヒスタミン剤が使用され得る。そのような抗ヒスタミン剤は、非限定的に、クレマスチン、ドキシルアミン、ロラタジン、デスロラタジン、フェキソフェナジン、フェニラミン、セチリジン、エバスチン、プロメタジン、クロルフェニラミン、レボセチリジン、オロパタジン、クエチアピン、メクリジン、ジメンヒドリナート、エンブラミン、ジメチンデン、およびデキスクロルフェニルアミンを含む。

【0066】

一実施形態では、抗ヒスタミン剤は、体重1キログラム当たり約0.1mg～約10mgの用量で投与される。一実施形態では、抗ヒスタミン剤は、体重1キログラム当たり約1mg～約5mgの用量で投与される。例えば、用量は、体重1キログラム当たり1mg、2mg、3mg、4mg、または5mgであり得る。抗ヒスタミン剤は、いずれかの有用な方法により投与され得る。一実施形態では、抗ヒスタミン剤は、静脈内投与される。別の実施形態では、抗ヒスタミン剤は、薬学的に許容されるカプセルにおいて投与される。

【0067】

別の実施形態では、静脈内点滴に関して、ランプアッププロトコルを使用して点滴を投与することにより、アナフィラキシー反応の可能性を減少させることができる。これに関して、ランプアッププロトコルは、薬物の点滴に対して患者を脱感作するために、点滴の過程にわたって点滴の速度をゆっくり増加させることを指す。

【0068】

これらに限定されないが、抗ヒスタミン剤、コルチコステロイド、シロリムス、ボクロスポリン (voclosporin)、シクロスポリン、メトトレキサート、IL-2 受容体指向性抗体、T-細胞受容体指向性抗体、TNF- α 指向性抗体、または融合タンパク質 (例えばインフリキシマブ、エタネルセプト、またはアダリムマブ)、CTLA-4-Ig (例えばアバタセプト)、抗OX-40 抗体等の免疫抑制剤は、例えばアナフィラキシー反応または有害免疫応答が予想される、または患者に認められる場合、外因性LAL投与前、投与中、または投与後にも投与され得る。

10

【0069】

本発明は、1つ以上のコレステロール低下剤 (例えばHMG-CoAレダクターゼ阻害剤) と組み合わせた外因性LAL含有組成物の投与を伴う療法も包含する。そのような薬剤の非限定的な例としては、アトルバスタチン (Lipitor (登録商標) およびTorvast (登録商標))、フルバスタチン (Lescol (登録商標))、ロバスタチン (Mevacor、(登録商標) Altocor (登録商標)、Altoprev (登録商標))、ピタバスタチン (Livalo (登録商標)、Pitava (登録商標))、プラバスタチン (Pravachol (登録商標)、Selektine (登録商標))、Lipostat (登録商標))、ロスバスタチン (Crestor (登録商標))、およびシンバスタチン (Zocor (登録商標)、Lipex (登録商標)) が挙げられる。

20

【0070】

外因性LALの作用

本発明は、外因性LALでの治療後、疾患関連症状の補正または正常化のために提供される。外因性LALに応答する臨床的進行 (即ち、状態の改善) は、いずれの有用な方法または手順により監視され得る。

【0071】

一部の実施形態では、外因性LALの投与は、約200 ng/mL ~ 約1,500 ng/mLのCmaxを達成するのに十分である。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、約200 ng/mL ~ 約1,000 ng/mLのCmaxを達成するのに十分である。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、約200 ng/mL ~ 約800 ng/mLのCmaxを達成するのに十分である。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、約200 ng/mL、約300 ng/mL、約400 ng/mL、約500 ng/mL、約600 ng/mL、約700 ng/mL、約800 ng/mL、約900 ng/mL、約1,000 ng/mL、約1,250 ng/mL、または約1,500 ng/mLのCmaxを達成するのに十分である。一部の実施形態では、Cmaxは、点滴中に達する。

30

【0072】

一部の実施形態では、外因性LALの投与は、40分未満のLAL半減期 ($t_{1/2}$) を達成するのに十分である。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、30分未満のLAL半減期 ($t_{1/2}$) を達成するのに十分である。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、20分未満のLAL半減期 ($t_{1/2}$) を達成するのに十分である。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、15分未満のLAL半減期 ($t_{1/2}$) を達成するのに十分である。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、10分未満のLAL半減期 ($t_{1/2}$) を達成するのに十分である。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、または40分のLAL半減期 ($t_{1/2}$) を達成するのに十分である。

40

【0073】

50

一部の実施形態では、外因性LALは、患者のLAL活性を増加させる。LAL活性は、例えば、肝臓、脾臓、リンパ腺、大動脈、末梢血白血球、および／または皮膚線維芽細胞で増加することができる。一部の実施形態では、LAL活性は、血液試料から単離されたリンパ球の抽出物において測定される。

【0074】

外因性LALは、LAL活性を、LALの投与前の活性の少なくとも約1.5、約2、約2.5、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、または約20倍に増加させることができる。外因性LALは、LAL活性を、LALの投与前の活性の少なくとも約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20倍に増加させることができる。LAL活性は、例えば、コレステリル1-¹⁴C]オレエート、トリオレイン（グリセロールトリ[1-¹⁴C]オレエート）、p-ニトロフェニルミリステートまたは4-MUO（オレイン酸4-メチルウンベリフェリル）基質を使用するアッセイを含む、当該技術分野に公知の方法を使用して評価され得る。

10

【0075】

一実施形態では、内臓および組織容量ならびに特徴付けは、本発明による外因性LALの投与後の状態の改善を決定するために利用される。

【0076】

一実施形態では、外因性LALの投与後の肝機能／傷害の臨床的進行は、経時的に、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）および／もしくはアラニントランスアミナーゼ（ALT）等の血液トランスアミナーゼの定量化、ならびに／またはアルブミン、アルカリホスファターゼ、およびビリルビン等の他のバイオマーカー（直接および総量）により監視される。

20

【0077】

一実施形態では、臨床的進行は、撮像技術を使用して監視される。例えばおよび非限定的に、使用される撮像技術は、超音波、CTスキャン、磁気共鳴映像法、および核磁気共鳴分光法であり得る。

【0078】

一部の実施形態では、本明細書に記載される用量での外因性LALの投与は、ヒト患者の成長を回復させ、かつ／または体重を増加させるのに十分である。外因性LALの投与は、早発性LAL欠乏症に罹患する乳児または小児患者の成長速度（即ち、体重増加）も増加させることができる。例えば、外因性LALの投与は、投与前に見られる成長速度／速度の少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約200%、約300%、約400%、または約500%体重増加の速度を増加させることができる。一部の実施形態では、外因性LALの投与は、約1ヶ月～約24ヶ月の年齢の早発性LAL欠乏症（例えばウォルマン病）に罹患する小児患者の正常な成長速度を回復させる。この内容において「正常」とは、医学分野の実施者によって決定される、治療される患者の正常な成長速度を指す。

30

【0079】

一実施形態では、例えばWDおよびCESDまたは他のLAL欠乏症に関して、肝腫大は顕著に好転し、肝臓の大きさが正常より約1%～約60%以内の大きさに戻った。この内容において「正常」とは、医学分野の実施者によって決定される、治療される患者の正常な大きさの肝臓を指す。一実施形態では、肝臓の大きさは、正常より約1%～約50%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、肝臓の大きさは、正常より約1%～約40%大きい大きさに減少する。一実施形態では、肝臓の大きさは、正常より約1%～約30%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、肝臓の大きさは、正常より約1%～約20%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、肝臓の大きさは、正常より約10%～約20%大きい大きさに減少する。例えば、肝臓は、正常の大きさより10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%大きくてもよい。また別の実施形態では、肝臓の大きさは、正常より約0%～約10%大きい

40

50

大きさに減少する。例えば、肝臓は、肝臓の正常な大きさより 0 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、または 10 % 大きくてもよい。

【0080】

外因性 L A L を用いた治療は、肝機能も改善することができる。よって、一部の実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、正常な肝機能を回復し、かつ／または肝臓試験を正常化するのに十分である。一部の実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを、例えば、少なくとも約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、および／または少なくとも約 90 % 減少させるのに十分である。一部の実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを少なくとも約 40 % 減少させるのに十分である。一部の実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを少なくとも約 50 % 減少させるのに十分である。一部の実施形態では、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを少なくとも約 60 % 減少させるのに十分である。一部の実施形態では、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを少なくとも約 70 % 減少させるのに十分である。一実施形態では、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを少なくとも約 80 % 減少させるのに十分である。一実施形態では、肝臓トランスアミナーゼの血清レベルを少なくとも約 90 % 減少させるのに十分である。

10

【0081】

一部の実施形態では、肝臓トランスアミナーゼは、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) である。一実施形態では、外因性 L A L の投与は、血清 A L T を減少させるのに十分である。例えば、外因性 L A L の投与は、血清 A L T を、例えば、少なくとも約 50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 減少させることができる。血清 A L T レベルは、肝傷害の兆候に役立つ。よって、本発明は、血清 A L T を減少させるために有効量の外因性 L A L を投与することにより、L A L 欠乏症に罹患するヒト患者の肝傷害を減少させる方法も包含する。

20

【0082】

一部の実施形態では、肝臓トランスアミナーゼは、血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ (A S T) である。一実施形態では、外因性 L A L の投与は、血清 A S T を減少させるのに十分である。例えば、外因性 L A L の投与は、血清 A S T を、例えば、少なくとも約 50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % 減少させることができる。血清 A S T レベルは、肝傷害の兆候に役立つ。よって、本発明は、血清 A S T を減少させるために有効量の外因性 L A L を投与することにより、L A L 欠乏症に罹患する患者の肝傷害を減少させる方法も包含する。

30

【0083】

一部の実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、血清フェリチンレベルを低下させることができる。よって、一部の実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、前治療レベルと比較して、血清フェリチンを、例えば、少なくとも約 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、または 95 % 減少させるのに十分である。一実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、フェリチンの血清レベルを、少なくとも 50 % 低下させるのに十分である。さらに別の実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、フェリチンの血清レベルを少なくとも約 60 % 低下させるのに十分である。一実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、フェリチンの血清レベルを少なくとも約 70 % 低下させるのに十分である。一実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、フェリチンの血清レベルを少なくとも約 80 % 低下させるのに十分である。一実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、フェリチンの血清レベルを少なくとも約 90 % 低下させるのに十分である。一実施形態では、外因性 L A L を用いた治療は、フェリチンの血清レベルを少なくとも約 95 % 低下させるのに十分である。

40

【0084】

一実施形態では、例えばウォルマン病および C E S D または他の L A L 欠乏症に関して、脾腫大は顕著に好転し、脾臓の大きさが正常より約 1 % ~ 約 60 % 以内の大きさに戻っ

50

た。この内容において「正常」とは、医学分野の実施者によって決定される、研究される患者の正常な大きさの脾臓を指す。一実施形態では、脾臓の大きさは、正常より約1%～約50%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、脾臓の大きさは、正常より約1%～約40%大きい大きさに減少する。一実施形態では、脾臓の大きさは、正常より約1%～約30%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、脾臓の大きさは、正常より約1%～約20%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、脾臓の大きさは、正常より約10%～約20%大きい大きさに減少する。例えば、脾臓は、正常の大きさより10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%大きくてもよい。また別の実施形態では、脾臓の大きさは、正常より約0%～約10%大きい大きさに減少する。例えば、脾臓は、脾臓の正常の大きさより0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%大きくてもよい。

10

【0085】

一実施形態では、外因性LALの投与は、リンパ節腫大（即ち、リンパ節の肥大）を減少させるのに十分である。よって、一部の実施形態では、リンパ節は、正常より約1%～約60%の大きさに減少する。この内容において「正常」とは、医学分野の実施者によって決定される、研究される患者の正常な大きさのリンパ節を指す。一実施形態では、リンパ節の大きさは、正常より約1%～約50%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、リンパ節の大きさは、正常より約1%～約40%大きい大きさに減少する。一実施形態では、リンパ節の大きさは、正常より約1%～約30%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、リンパ節の大きさは、正常より約1%～約20%大きい大きさに減少する。別の実施形態では、リンパ節の大きさは、約10%～約20%大きい大きさに減少する。例えば、リンパ節は、正常の大きさより10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%大きくてもよい。また別の実施形態では、リンパ節の大きさは、正常より約0%～約10%大きい大きさに減少する。例えば、リンパ節は、リンパ節の正常な大きさより0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%大きくてもよい。

20

【0086】

別の実施形態では、状態の改善を監視するために、脂質分析が実施される。例えば、脂質分析は、外因性LALの治療効果を評価するために行われ得る。脂質分析は、これらに限定されないが、高性能液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、質量分光法、もしくは薄層クロマトグラフィー、またはそのいずれかの組み合わせ等の、当業者により適切と判断される有用な方法により、患者の組織試料（例えば、血液試料、肝臓生検試料）に対して実施され得る。一実施形態では、本発明により実施される脂質分析は、総コレステロール、トリグリセリド、低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質、および／またはコレステリルエステルのレベルを示す。

30

【0087】

一実施形態では、例えばウォルマン病およびCESDまたは他のLAL欠乏症に関して、本発明により治療される患者の脂質分析は、医学分野の実施者により決定され得る肝臓、脾臓、腸、リンパ節、および／または大動脈の脂質濃度の正常化を示す。

【0088】

40

脂質レベルは、血漿脂質分析または組織脂質分析を使用して評価され得る。血漿脂質分析において、血漿が採取され得、例えばCOD-PAPキット（Wako Chemicals）を用いた比色アッセイを使用して総血漿遊離コレステロールレベルが測定され得る、例えばトリグリセリド/GBキット（Boehringer Mannheim）を使用して、総血漿トリグリセリドが測定され得る、および／またはコレステロール/HPキット（Boehringer Mannheim）を使用して、総血漿コレステロールが決定され得る。組織脂質分析において、脂質は、肝臓、脾臓、および／または小腸試料から抽出され得る（例えばFolch et al., J. Biol. Chem 226: 497-505 (1957) に提供されるFolch法を使用する）。例えばオーフタルアルデヒドを使用して、総組織コレステロール濃度が測定され得る。

50

【0089】

一部の実施形態では、外因性LALの投与は、栄養素吸収を増加させるのに十分である。一実施形態では、外因性LALの投与は、血清αトコフェロール、25OHビタミンD、血清レチノール、ジデヒドロレチノイン酸またはトランスサイレチンのレベルによって測定される栄養素吸収を増加させる。

【0090】

一部の実施形態では、例えばWDおよびCESDまたは他のLAL欠乏症に関して、外因性LALの投与は、血清ヘモグロビンレベル(Hb)を増加させるのに十分である。一実施形態では、ヘモグロビンレベルは、外因性LALを用いて投与される前に観察されたものと比較して、少なくとも約10%または約20%増加する。

10

【0091】

一部の実施形態では、外因性LALは、副作用を最小にするための方法を使用して投与され得る。例えば、外因性LALの投与は、外因性LALに対する免疫応答を最小にすることができる。

【0092】

外因性LALを含むLALおよび薬学的組成物

本発明は、本明細書に記載されるLAL欠乏症関連状態のいずれか、および治療から利益を受けるであろう前述されない他の状態を治療することを包含する。本発明に従い利用される外因性LALは、非限定的に、細胞培養物（例えばCHO細胞、COS細胞）、大腸菌等の細菌、哺乳類および鳥類（例えば、ニワトリ、アヒル、およびシチメンチョウ）等の遺伝子導入動物を含むいずれの有用なタンパク質発現系、および植物系（例えば、アオウキクサおよびタバコ植物）で産生され得る組み換えLALを含む。本発明の一態様は、2006年10月3日に発行された米国特許第7,524,626号、2007年10月10日に出願された米国仮特許第11/973,853号、2007年10月29日に出願された第11/978,360号、および2009年1月7日に出願された第12/319,396号に従い産生された組み換えLALに関し、その開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。本発明の一態様は、Duet al., (2005) Am. J. Hum. Genet. 77:1061-1074およびDuet al., (2008) J. Lipid Res., 49:1646-1657に記載されるように産生された組み換えLALに関し、その開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。有用な実施形態の1つにおいて、外因性LALは、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる2011年4月23日に出願された第PCT/US2011/033699号に記載される方法により、遺伝子導入鳥（例えば遺伝子導入ニワトリ）の卵管で産生される。一部の実施形態では、組み換えLALは、鳥細胞系で産生される。一部の実施形態では、組み換えLALは、哺乳類（例えばヒト）細胞系で産生される。

20

30

【0093】

一実施形態では、本発明により使用される外因性リソソーム酸リパーゼは、実質的にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)およびマンノース終結N結合構造を有するグリカンを含む。外因性LAL上のGlcNAcおよびマンノース終結グリカンは、マクロファージおよび線維芽細胞により特異的に認識および内在化され得る。タンパク質を、外因性LALの投与によって治療可能な状態に関与する細胞上で発現するGlcNAc/マンノース受容体の標的とすることができるマンノース-6-リン酸塩(M6P)も、典型的に、本発明により使用される外因性LAL上に存在する。

40

【0094】

典型的に、本明細書に説明され、開示される本発明の外因性LALは、ヒトLALである。一実施形態では、外因性LALは、Genbank(RefSeq NM_000235.2)に提供されるアミノ酸配列を有する。一実施形態では、成熟外因性LALは、以下のアミノ酸配列を有する。

50

【0095】

【化1】

SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPSSEYLVETEDGYILCLNRIPHGRKN
 HSDKGPKPVVFLQHGLLADSSNWVTNLANSSLGFLADAGFDVWMGNSR
 GNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNKTGQEQVYY
 VGHSQGTITIGFIAFSQIPELAKRIKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPD
 HLIKDLFGDKFLPQSAFLKWLGHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERN
 LNMSRVDVYTTTHSPAGTSVQNMLHWSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYF
 HYNQSYPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILLTQITNLVFH
 ESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ (配列番号1)

10

【0096】

一部の実施形態では、外因性LALは、配列番号1のアミノ酸1-378、配列番号1のアミノ酸3-378、配列番号1のアミノ酸6-378、または配列番号1のアミノ酸7-378を含む。一部の実施形態では、外因性LALは、配列番号1のアミノ酸1-378、配列番号1のアミノ酸3-378、配列番号1のアミノ酸6-378、および配列番号1のアミノ酸7-378からなる群から選択される少なくとも2つのポリペプチドの混合物を含む。一部の実施形態では、外因性LALは、配列番号1のアミノ酸1-378を含むポリペプチド、配列番号1のアミノ酸3-378を含むポリペプチド、および配列番号1のアミノ酸6-378を含むポリペプチドの混合物を含む。

20

【0097】

一部の実施形態では外因性LALは、配列番号1のアミノ酸1-378、配列番号1のアミノ酸3-378、配列番号1のアミノ酸6-378、または配列番号1のアミノ酸7-378と同一であるポリペプチドを含む。他の実施形態では、外因性LALは、配列番号1のアミノ酸1-378、配列番号1のアミノ酸3-378、配列番号1のアミノ酸6-378、または配列番号1のアミノ酸7-378に少なくとも約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一であるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、外因性LALは、配列番号1の機能断片、または配列番号1の機能断片に少なくとも約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一であるポリペプチドを含む。

30

【0098】

一部の実施形態では、外因性LALは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2011年4月23日に出版されたPCT/US2011/033699号に記載される組み換えLALタンパク質である。

【0099】

同一ではないアミノ酸位置は、しばしば、アミノ酸残基が類似する化学特性（例えば電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基に代えて置換され、したがって、分子の機能特性を変更しない保存アミノ酸置換基により異なることが認識される。配列が保存的置換において異なる場合、配列同一性パーセントは、置換の保存的性質を補正するために上方に調節され得る。この調節を行うための方法は、当業者に周知である。保存的置換の得点は、例えばMeyers & Millers, Computer Applic. Biol. Sci. 4:11-17 (1988) のアルゴリズムにより計算され得る。

40

【0100】

「比較ウィンドウ」とは、2つの配列が最適に整合された後に配列を同一数の隣接位置の参照配列と比較してもよい、約25～約400位置、または約50～200位置、または約100～150位置等の連続位置のセグメントを指す。比較用の配列のアライメント方法は、当該技術分野において周知である。比較用の配列の最適なアライメントは、例え

50

ば、小域相同性アルゴリズム (Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)) により、大域アライメントアルゴリズム (Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)) により、類似性法の検索 (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:2444 (1988); Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-402 (1997)) により、典型的にはデフォルト設定を使用した、これらのアルゴリズム (例えば、GAP、BESTFIT、FASTA、および BLAST in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) のコンピュータ化された実装により、または手動アライメントおよび目視 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (eds.), 1994 を参照) により実施され得る。例えば、BLAST タンパク質検索は、配列番号 1 のアミノ酸配列またはその断片に 80% 超相同であるアミノ酸配列を得るために、XBLAST プログラム、スコア = 50、ワード長 = 3 を使用して実施され得る。

【0101】

有用なアルゴリズム実装の一例は PILEUP である。PILEUP は、プログレッシブペアワイズアライメント (progressive pairwise alignment) を使用して、関連する配列の群から複数の配列アライメントを作製する。それは、アルゴリズムを作製するために使用されるクラスタリング関係を示す系統樹もプロットすることができる。PILEUP は、Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987) のプログレッシブアライメント法の単純化を使用する。使用される方法は、Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3 (1989) により説明される方法に類似する。複数のアライメント手順は、最も類似する 2 つの配列のペアワイズアライメントから始まり、整合させた 2 つの配列のクラスターを産生する。このクラスターは、次いで、次の最も関連する配列または整合された配列のクラスターに整合され得る。配列の 2 つのクラスターは、2 つの個々の配列のペアワイズアライメントの単純な伸長により整合され得る。繰り返す毎に次第に類似性を失う配列および配列のクラスターを含む一連のそのようなペアワイズアライメントは、最終アライメントを産生する。

【0102】

一部の実施形態では、本発明の外因性 LAL ポリペプチドは、野生型配列の変異体を含む。これらの変異体は、置換、挿入、または欠失変異体の 3 つのクラスのうちの一つ以上に該当する。これらの変異体は、自然に生じる対立遺伝子または種間変異体であり得るか、またはそれらは、DNA コードタンパク質のヌクレオチドの部位特異的変異誘発により調製され得る。部位特異的変異誘発は、カセット、または PCR 変異誘発、または変異体をコードする DNA を産生するための、当該技術分野において周知の他の技法を使用して実施され、その後、組み換え細胞培養物中で DNA を発現させる。最大約 100~150 のアミノ酸残基を有する変異体標的タンパク質断片は、確立された技法を使用して、生体外合成により調製され得る。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該技術分野において周知である (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:10915-10919 (1992))。

【0103】

アミノ酸置換は、典型的に単一残基のものである。かなり長い挿入を許容することができるが、挿入は、通常、およそ約 1~約 20 のアミノ酸である。いくつかの場合では、欠失は非常に長い場合もあるが、欠失は、約 1~約 20 の残基の範囲である。最終誘導体に到達するために、置換、欠失、および挿入、またはそれらのいずれかの組み合わせが使用され得る。

【0104】

一部の実施形態では、外因性LALは、少なくとも約100U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、少なくとも約200U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、少なくとも約250U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、約100～約1,000U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、約100～約500U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、約100～約350U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、約200～約350U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、約250～約350U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、約250U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、約275U/mgの特異的活性を有する。一部の実施形態では、外因性LALは、約300U/mgの特異的活性を有する。ヒトLALは、N結合グリコシル化のためにそのアミノ酸配列に、配列番号1に明記されるAsn36、Asn72、Asn101、Asn161、Asn273、およびAsn321の6つの可能性のある部位を有する。一部の実施形態では、少なくとも1、2、3、4、または5のN結合グリコシル化部位がグリコシル化される。一部の実施形態では、6つのグリコシル化部位全てがグリコシル化される。一部の実施形態では、Asn36、Asn101、Asn161、Asn273、およびAsn321がグリコシル化される。一部の実施形態では、Asn36、Asn101、Asn161、Asn273、およびAsn321がグリコシル化され、Asn72はグリコシル化されない。一部の実施形態では、N-グリジン構造は、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、マンノース、および/またはマンノース-6-リン酸塩（M6P）を有する2分枝型、3分枝型、および4分枝型構造を含む。一部の実施形態では、外因性LALは、Asn101、Asn161、およびAsn273にM6P修飾されたN-グリカンを含む。一部の実施形態では、外因性LALは、O結合グリカンを含まない。一部の実施形態では、外因性LALは、シアル酸を含まない。一部の実施形態では、外因性LALは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2011年4月23日に出願された第PCT/US2011/033699号に記載されるグリコシル化パターンを有する。

【0105】

一部の実施形態では、外因性LALの分子量は、約55kDである。

【0106】

特定の実施形態では、対象は、例えばベクターに外因性LALをコードする核酸分子を用いて治療され得る。ポリペプチドをコードする核酸の用量は、患者当たり約10ng～1g、100ng～100mg、1μg～10mg、または30～300μg DNAの範囲である。感染ウイルスベクターの用量は、用量当たり10～100ビリオン以上まで変動する。

【0107】

本発明の一部の実施形態では、外因性LALは、(1) LAL、またはその活性断片、変異体、もしくは誘導体を発現する核酸、例えばベクターで移植可能な宿主細胞を形質転換または形質移入する、および(2) 形質転換した宿主細胞を哺乳類に移植することを含む治療法で投与される。本発明の一部の実施形態では、移植可能な宿主細胞を、外因性LALをコードする単離された核酸で一時的に培養された、形質転換された、または形質移入された哺乳類から除去し、それが除去された同じ哺乳類に移植し戻す。必要はないが、細胞は、移植される同じ部位から除去され得る。時折エクスピボ遺伝子療法としても知られるそのような実施形態は、制限された期間の間、連続した外因性LALポリペプチドの供給を提供することができる。

【0108】

本発明で提供される治療用タンパク質である組み換えLALは、未精製の形態で投与することが可能であるが、治療用タンパク質を薬学的製剤の一部として投与することが好ましい。

【0109】

よって、本発明は、鳥由来のグリコシル化された治療用タンパク質またはその薬学的に許容される誘導体、ならびに1つ以上のその薬学的に許容される担体、および任意に、他の治療および／または予防的成分を含む薬学的製剤、ならびにそのような薬学的製剤を投与する方法をさらに提供する。本発明は、哺乳類由来のグリコシル化された治療用タンパク質またはその薬学的に許容される誘導体、ならびに1つ以上のその薬学的に許容される担体、および任意に、他の治療および／または予防的成分を含む薬学的製剤、ならびにそのような薬学的製剤を投与する方法も提供する。

【0110】

担体（複数可）は、製剤の他の成分と適合可能であり、その受給者に有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。本発明の薬学的組成物を使用して患者を治療する方法（例えば、投与される薬学的タンパク質の量、投与の頻度、および治療期間の継続期間）は、当該技術分野の医師に既知の標準的な方法論を使用して決定され得る。

10

【0111】

薬学的製剤は、経口、直腸、鼻腔、局所（頬および舌下を含む）、膣、または非経口に適切なものを含む。薬学的製剤は、筋肉内、皮下、および静脈内投与を含む注入による投与に適切なものを含む。薬学的製剤は、吸入または吹送により投与されるものも含む。適切な場合、製剤は、便宜上、別個の投与量単位で提示され得、薬学の分野において周知の方法のいずれかにより調製され得る。薬学的製剤を産生する方法は、典型的に、治療用タンパク質を、液体担体もしくは微粉碎した固体担体または両方と混合し、必要であれば産物を所望の製剤に成形するステップを含む。

20

【0112】

経口投与に適切な薬学的製剤は、便宜上、それぞれが所定量の活性成分を含有するカプセル、カシェ剤もしくは錠剤等の別個の単位として、粉末もしくは顆粒として、溶液として、懸濁液として、またはエマルジョンとして提示され得る。活性成分も、ボーラス、舐剤、またはペーストとして提示され得る。経口投与用の錠剤およびカプセルは、結合剤、充填剤、潤滑剤、崩壊剤、または湿潤剤等の従来の賦形剤を含有することができる。錠剤は、当該技術分野に周知の方法によりコーティングされ得る。経口液体調製物は、例えば、水性もしくは油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ、またはエリキシル剤の形態であるか、または使用前に水もしくは他の適切なビヒクルで構成するために乾燥産物として提示され得る。そのような液体調製物は、懸濁剤、乳化剤非水性ビヒクル（食用油を含む）、または防腐剤等の従来の添加剤を含有することができる。

30

【0113】

本発明の治療用タンパク質は、非経口投与（例えば注入、例えば、ボーラス注入または連続点滴）用にも製剤化され得、アンプル、前充填シリンジ、少量点滴、または防腐剤添加された多回用量容器の単位用量形態で提示され得る。治療用タンパク質は、例えば皮下注入、筋肉内注入、および静脈内（IV）点滴もしくは注入により注入され得る。一実施形態では、外因性LALは、いずれの有用な方法により、IV点滴により静脈内投与され得る。一例では、外因性LALは、末梢路を通した静脈内点滴により投与され得る。別の例では、外因性LALは、末梢的に挿入された中央カテーテルを通して静脈内点滴により投与され得る。別の例では、外因性LALは、静脈血管アクセスポートに取り付けられた携帯型点滴機によって促進される静脈内点滴により投与され得る。静脈内点滴の一実施形態では、薬物は、当該技術分野の医師によって決定される、点滴される薬物の量および患者の以前の点滴に関する反応歴により、1～8時間の期間にわたって投与される。別の実施形態では、外因性LALは、IV注入により静脈内投与される。別の実施形態では、外因性LALは、腹腔内注入を介して投与され得る。また別の実施形態では、外因性LALは、治療用タンパク質の薬学的に許容されるカプセルを介して投与される。例えば、カプセルは、腸溶性コーティングされたゼラチンカプセルであり得る。

40

【0114】

一部の実施形態では、治療用タンパク質は点滴により投与され、点滴は、例えば、30分～10時間の長期間にわたって行われてもよい。よって、点滴は、例えば、約1時間、

50

約2時間、約3時間、約4時間、または約5時間の期間にわたって行われてもよい。点滴はまた、様々な速度で行われてもよい。よって、例えば、点滴速度は、1時間当たり1mL～1時間当たり約20mLであり得る。一部の実施形態では、点滴速度は、1時間当たり5mL～10mLである。一実施形態では、点滴速度は、1時間当たり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20mLである。一実施形態では、点滴速度は、0.1～5mg/kg/時間である。一実施形態では、点滴速度は、約0.1、約0.2、約0.3、約0.5、約1.0、約1.5、約2.0、または約3mg/kg/時間である。

【0115】

治療用タンパク質は、油性もしくは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、またはエマルジョンのような形態を取ることができ、懸濁剤、安定剤、および／または分散剤等の製剤作用物質を含有することができる。治療用タンパク質は、使用前に適切なビヒクル、例えば滅菌発熱性物質除去蒸留水を用いて構成するために、滅菌固体を無菌単離することにより、または溶液から凍結乾燥することにより得られた粉末形態であり得る。

10

【0116】

表皮への局所投与において、治療用タンパク質は、軟膏、クリーム、もしくはローションとして、または経皮パッチとして製剤化され得る。軟膏およびクリームは、例えば、適切な増粘剤および／またはゲル化剤を添加することにより、水性または油性基材を用いて製剤化され得る。ローションは、水性または油性基材を用いて製剤化され得、一般に、1つ以上の乳化剤、安定剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、または着色剤も含有する。

20

【0117】

口内の局所投与に適切な製剤は、風味基材、通常スクロースおよびアカシアまたはトラガントに活性成分を含むロゼンジ剤、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシア等の不活性基材に活性成分を含む芳香錠、および適切な液体担体に活性成分を含む口内洗浄液を含む。担体が固体である直腸投与に適した薬学的製剤は、最も好ましくは、単位用量の坐剤として提示される。適切な担体は、ココアバターおよび当該技術分野で通常使用される他の材料を含み、坐剤は、便宜上、活性化合物の、軟化させたまたは融解させた担体（複数可）との混合物により形成され、その後冷却され、鋳型で成形される。

【0118】

膣投与に適した製剤は、活性成分に加え、適切であることが当該技術分野において公知であるそのような担体を含有する膣坐剤、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、泡状物、またはスプレーとして提示され得る。

30

【0119】

鼻腔内投与において、本発明の治療用タンパク質は、液体スプレーまたは分散性粉末として、または滴剤の形態で使用され得る。

【0120】

滴剤は、1つ以上の分散剤、可溶化剤、または懸濁剤も含む水性もしくは非水性基材を用いて製剤化される。液体スプレーは、便宜上、加圧パックから送達される。

【0121】

吸入による投与において、本発明による治療タンパク質は、便宜上、吸入器、ネブライザ、もしくは加圧パック、またはエアロゾルスプレーを送達する他の簡便な手段から送達され得る。加圧パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切なガス等の適切な推進剤を含んでもよい。加圧エアロゾルの場合において、投与量単位は、計量した量を送達するための弁を提供することにより決定され得る。

40

【0122】

吸入または吹送による投与において、本発明による治療用タンパク質は、乾燥粉末組成物、例えば、化合物とラクトースもしくはデンプン等の適切な粉末基材の粉末ミックスの形態を取ることができる。粉末組成物は、例えば、カプセルもしくはカートリッジの単位投与量形態で、または粉末が吸入器もしくは吹送器の補助により投与され得るゼラチンも

50

しくはブリスターパックで提示され得る。所望する場合、活性成分を持続放出するように適合された上記の製剤が利用され得る。

【0123】

本発明による薬学的組成物は、抗菌剤または防腐剤等の他の活性成分も含有してもよい。

【0124】

一部の実施形態では、薬学的組成物中の外因性LALの濃度は、約0.5～約10mg/mLである。一部の実施形態では、LALの濃度は、約1～約5mg/mLである。一部の実施形態では、LALの濃度は、約1、約1.5、約2、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、約6.5、または約7.5mg/mLである。

10

【0125】

一部の実施形態では、外因性LALを含む薬学的組成物は、緩衝液をさらに含む。代表的な緩衝液としては、酢酸、リン酸、クエン酸、およびグルタミン酸緩衝液が挙げられる。代表的な緩衝液としては、クエン酸リチウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸カルシウム、乳酸リチウム、乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、乳酸カルシウム、リン酸リチウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸カルシウム、マレイン酸リチウム、マレイン酸ナトリウム、マレイン酸カリウム、マレイン酸カルシウム、酒石酸リチウム、酒石酸ナトリウム、酒石酸カリウム、酒石酸カルシウム、コハク酸リチウム、コハク酸ナトリウム、コハク酸カリウム、コハク酸カルシウム、酢酸リチウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウム、およびそれらの混合物も挙げられる。一部の実施形態では、緩衝液は、クエン酸三ナトリウム二水和物である。一部の実施形態では、緩衝液は、クエン酸一水和物である。一部の実施形態では、薬学的組成物は、クエン酸三ナトリウム二水和物およびクエン酸一水和物を含む。

20

【0126】

一部の実施形態では、外因性LALを含む薬学的組成物は、安定剤をさらに含む。代表的な安定剤としては、アルブミン、トレハロース、糖類、アミノ酸、ポリオール、シクロデキストリン、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、および塩化カルシウム等の塩類、凍結乾燥保護剤(lyoprotectant)、ならびにそれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態では、薬学的組成物は、ヒト血清アルブミンを含む。

30

【0127】

特定の例において、本明細書に開示されるように産生された組み換えヒトLALは、1ミリリットル当りに外因性LAL(例えば2mgのLAL)、クエン酸三ナトリウム二水和物(例えば13.7mg)、クエン酸一水和物(例えば1.57mg)、およびヒト血清アルブミン(例えば10mg)を含有する薬学的製剤に利用され、5.9±0.1等の酸性pHに製剤化される。本発明は、外因性LALの関連内臓および組織のリソソームへの取り込みを促進するいずれの投与形態経路を包含する。

【実施例】

【0128】

以下の特定の実施例は、本発明を図示することが意図され、特許請求項の範囲を制限するものと解釈されるべきではない。

40

【0129】

実施例1

組み換えLALの投与による早発性LAL欠乏症(ウォルマン病)の治療

生まれたとき(出生時体重、3.88kg)から体重増加不良のため、15週齢の男児が入院した。乳児は、嘔吐、摂食問題、栄養状態の不良、下痢、腹部膨満の増加、および貧血を示した。患者はウォルマン病と診断された。

【0130】

最初の身体検査で、患者の体重は5.62kgであり、年齢別体重の第5パーセンタ

50

ルより下であった。15週齢での最初の検査から4週間の間、および19週齢での最初の点滴前には、患者の体重は増加しなかった。推定された成長速度は、年齢別体重の第1パーセンタイル未満であると計算された。腹部は極端に膨満し、顕著な肝腫大および脾腫大を伴った。腹部の超音波およびCTスキャンは、カルシウム沈着を伴う肝脾腫大および両側性の対照的に肥大した副腎を認めた。216 U/L（正常10～45 U/L）のアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）と同様に、血清アラニントランスアミナーゼ（ALT）のレベルは、119 U/L（正常10～50 U/L）に上昇した。治療開始前の炎症のマーカーである血清フェリチンは、約1,500 $\mu\text{g/L}$ （正常7～144 $\mu\text{g/L}$ ）であった。患者は、治療前は一貫して貧血であり、ヘモグロビン値は7.2～8.3 g/dLの範囲であった。

10

【0131】

19週齢で、0.2 mg/kgの初期用量で、週に1回のrhLAL（SBC-102）のIV点滴を開始した。点滴反応の可能性を相殺するために、患者は、SBC-102点滴の約90分前に1 mg/kgのジフェンヒドラミンで前治療された。点滴時間は、約4時間であった。点滴は良好に耐受され、患者は、いずれの有害事象または点滴関連反応を起こさなかった。

【0132】

初期点滴の7日後、2回目の点滴が患者に投与された。患者は、約4時間、0.3 mg/kgのSBC-102を投与され、いずれの有害事象の兆しを示すことなく耐受性を示した。

20

【0133】

治療を開始してから2週間以内に、患者は、鋭敏さおよび反応性を含む一般的な健康において顕著な改善を示した。下痢および嘔吐は安定した。患者の体重は増加し始め、血清トランスアミナーゼ（例えばASTおよびALT）において、基本的に正常レベルへの著しい減少を示した（図1Aおよび1B）。患者の成長速度は、急速に正常化した（図3および4）。腹部膨満は、腹囲の減少と対応して減少した。肝機能試験は、継続的に改善を示した（図1Aおよび1B）。

【0134】

3回目の来院で、患者は0.5 mg/kgのSBC-102を受けた。点滴は、継続的に良好に耐受された。臨床状態は継続的に改善し、治療開始から体重は7日で150 g増加し、腕囲は1.5 cm増加した（図3および4）。肝臓試験は安定しており、ヘモグロビンレベルは増加し（10～11 g/dL）、フェリチンレベルは減少し続けた（図2）。アルカリホスファターゼは、治療前、正常の低範囲の137 U/L（正常110～300 U/L）であったが、治療により増加した（204 U/L）。SBC-102投与によるこの効果は、前臨床疾患モデルで認められた知見と一致した。

30

【0135】

4回目の点滴を発端に、患者は毎週1.0 mg/kgの用量を受け始めた。治療開始2ヶ月後、患者の成長は、実質的に改善し、推定成長速度は、第95パーセンタイルに近かった。この成長増加は、63日で1.25 kgまたは2.79ポンドの増加をもたらし、体重が7.21 kgとなり、年齢別体重の第30パーセンタイルとなった（図3および4）。ASTおよびALTの両方のレベルは、最初の点滴後、急速に低下した。

40

【0136】

治療を経て3ヶ月、ASTおよびALTは正常であった。肝機能の改善に加え、フェリチンの著しい減少も見られた（図2）。

【0137】

4ヶ月の治療にわたって、患者のGI症状は回復し、患者の栄養状態は良好であった。患者の体重は増加し続け（図3および4）、正常で健康な乳児の身体徴候を示した。患者は、いずれの点滴反応または他の副作用を示すことなく点滴の耐受性を示し続けた。患者は、外来患者として21回目の1.0 mg/kgの用量を受けた。

【0138】

50

実施例 2

早発性 L A L 欠乏症に対する研究設計

遺伝子導入ガルス属で産生された r h L A L である S B C - 1 0 2 が、I V 点滴により毎週投与された。研究は、I V 点滴により毎週投与される S B C - 1 0 2 の 2 用量レジメンの安全性、耐容性、および有効性を評価するために考案される。そのため、この研究における主な結果変数は、L A L 欠乏症による成長阻害を有する小児における S B C - 1 0 2 の安全性および耐容性を決定し、生命徴候および身体検査所見、臨床実験試験、抗薬物抗体試験、ならびに併用薬物の使用を含む。成長阻害が L A L 欠乏症／ウォルマン表現型の共通する臨床特徴であることを考えると、この疾患の良好な療法は、L A L 欠乏症により影響を受けた小児に見られる成長阻害に対処することができるはずである。小児の成長および栄養状態に直接関連するパラメータは、二次または探索目的、例えば、漸進的な体重の成長速度、体重増加、および線形の成長速度として評価される。この研究は、薬物動態生物マーカーに対する S B C - 1 0 2 の作用、肝臓および脾臓の大きさ、リンパ節腫大、ヘモグロビンおよび血小板、肝機能および栄養の実験評価、腹囲、中上腕囲、および頭囲も調査する。この研究は、血漿 C m a x および推定クリアランスを含む L A L 欠乏症による成長阻害を有する小児の S B C - 1 0 2 の予備薬物動態も説明する。

【0139】

【表 1】

【表 1】評価スケジュール：24 週目までのスクリーニング

評価	最初の診断	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目	6 週目	8 週目	10 週目	12 週目	14 週目	16 週目	18 週目	20 週目	22 週目	24 週目
	前点滴	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日	±2 日
説明による同意	X														
採択/除外基準	X														
病歴	X														
分子遺伝分析用試料															
乾燥血斑試料															
健康に関連する生活の質 ¹	X								X						X
12 誘導 ECG	X								X _P						
身体検査 ²	X				X _P				X _P						
妊娠試験 ³	X				X _P				X _P		X _P		X _P		X ^P
臨床実験試験 ⁴	X				X _P				X _P						X ^P
肝臓、脂質、および凝固 ⁴ 試験	X	X _P			X _P				X _P						X ^P
急性期反応物	X	X _P			X _P				X _P						X ^P
抗 SBC-102 抗体	X				X _P		X _P		X _P		X _P		X _P		X ^P
血清および尿探索性生物マーカー収集	X				X _P		X _P		X _P		X _P		X _P		X ^P
腹部 MRI/MRS ⁶	X								X						
生命徴候 ⁷		X	X	X	X	X	X	X	X	X ₉	X	X	X	X	X
SBC-102 点滴		X	X	X	X	X	X	X	X	X ₁₀	X	X	X	X	X
有害事象	継続														
併用薬物/療法	継続														

^P前点滴¹年齢に応じた HRQOL。²身体検査は、体重の測定（身長はスクリーニング時のみ）、肝臓および脾臓の大きさ、リンパ節腫大、および動脈疾患の評価を含む。

【0140】

対象は、等しい大きさの 2 つの逐次コホート（各 4 人の対象）に参加する。投与は、各コホート内、コホート間、低用量コホート（コホート 1；開始用量 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）の最初の対象で開始する投与により調整される。コホート 1 の追加対象の投与および高用量コホート（コホート 2；開始投与量 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）の投与の開始は、前の対象の許容可能な安全性および耐受性に基づく。

【0141】

10

20

30

40

50

コホート 1

最初の 4 人の対象は、コホート 1 を構成する研究に参加した。このコホートの最初の対象は、 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の単一用量の SBC-102 を受け、少なくとも投与後 24 時間の間の安全性の検討に基づき投与の継続が許可されれば、対象は、次いで、 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の 2 回目の用量の SBC-102 を 1 週間後に受ける。対象が 2 回目の用量の SBC-102 を受けた後、全ての利用可能な安全データが検討され、その時点で、最初の対象の用量を $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ に上げ、コホート 1 の他の対象の投与を開始するかどうかに関しての容認性が決定される。コホート 1 の他の対象 3 人の投与は、同様の様式で進める。安全性の検討は、 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ から $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ への対象の用量の増大を保障しないが、対象が開始用量での治療を継続することが安全であると考えられる場合、対象は、 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の用量を受けるのを継続してもよい。コホート 1 のいずれかの対象が、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の少なくとも 4 用量の SBC-102 を受けた後に、治療に対して最適以下の応答を示す場合、 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ へのさらなる用量増大は考慮される。

10

【0142】

コホート 2

コホート 2 の投与開始は、コホート 1 が完全に参加し、安全性がコホート 1 で $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の 2 用量以上の SBC-102 を受けた少なくとも 2 人の対象について検討された後である。研究に登録された最後の 4 人の対象が参加し、コホート 2 で投与された。このコホートの最初の対象は、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の単一用量の SBC-102 を受け、少なくとも投与後 24 時間の間の安全性の検討に基づき投与の継続が許可されれば、対象は、次いで、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の 2 回目の用量の SBC-102 を 1 週間後に受ける。対象が 2 回目の用量の SBC-102 を受けた後、全ての利用可能な安全データが以下の容認性に対して検討される：最初の対象の用量を $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ に上げ、コホート 2 の他の対象の投与を開始する。コホート 2 の他の対象 3 人の投与は、安全性の検討を用いて同様の様式で実施される。安全性の検討は、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ から $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ への対象の用量の増大を容認しないが、対象が開始用量での治療を継続することが安全であると考えられる場合、対象は、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の用量を受けるのを継続してもよい。対象が $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の開始用量に耐容性を示さない場合、 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の低用量が考慮され得る。

20

30

【0143】

研究は、約 22 回の来院予定からなる：来院 1 回目（スクリーニング）、来院 2 回目（ベースライン評価、研究薬物の開始）～21 回目（研究薬物の毎週投与）、来院 22 回目（研究調査の終了）。LAL 欠乏症による早発性成長阻害の重篤度および生命を脅かす性質を考慮すると、これらの対象は入院する可能性がある。

【0144】

研究の標的集団は、LAL 欠乏症による成長阻害を有する男子および女子である。対象は、以下の基準を満たす場合、この研究に参加する条件を満たす：（1）対象の親または法廷後見人が、リスクおよび副作用の可能性を含む、完全な研究の性質および目的を理解し、実施されるいずれの研究手順前に書面による同意／許可を提供する、（2）アッセイを実施するラボの正常範囲に対して文書化された LAL 活性の低下、または LAL 欠乏症の診断を確認する分子遺伝子試験の文書化された結果を持つ男子または女子、および（3）生後 6 ヶ月前に発症した成長阻害。

40

【0145】

安全性

主要安全評価項目は、有害事象（AE）および点滴関連反応（IRR）の発生、生命徴候（血圧、心拍数、呼吸数、および体温）のベースラインからの変化、身体検査所見および臨床実験試験（CBC／血液学検査、血清化学、および尿検査）、併用薬物／療法の使

50

用、ならびに血清転換率、血清転換まで時間、中央およびピーク免疫グロブリンG（IgG）ADA力価を含む抗SBC-102抗体（ADA）の特徴付け、およびピークIgG ADA力価までの時間を含む。

【0146】

有効性

有効性評価項目は、（１）肝臓および脾臓の大きさ（超音波による）ならびに肝臓および脾臓の容量ならびに脂肪含量（磁気共鳴映像法〔MRI〕による）のベースラインからの変化および／またはパーセント変化、ならびに（２）血清トランスアミラーゼ、血清脂質（総コレステロール、トリグリセリド、高密度リポタンパク質〔HDL〕、および低密度リポタンパク質〔LDL〕）、ヘモグロビン、および血小板数のベースラインからの変化を含む。パーセンタイルおよびzスコアのベースラインからの変化を含む成長パラメータも≤18歳の対象について評価される。これらの成長パラメータは、Centers for Disease Control（CDC）成長チャートに基づき、対象の年齢が<30ヶ月の年齢別体重（WFA）、身長別体重（WFL）、年齢別身長（LFA）、および年齢別頭囲（HCFA）、ならびに対象が≥36ヶ月～18歳のWFA、年齢別背丈（stature-for-age）（SFA；注記：背丈とは対象の身長を指す）、および背丈別体重（WFS）、ならびに全対象の体重不足、衰弱（wasting）、および成長阻害の成長状態の指標を含む。

【0147】

実施例3

早発性LAL欠乏症患者の身体評価

全身麻酔に耐えるのに十分な臨床的に安定である患者に対して、長期血管アクセスのための中心静脈カテーテル留置が考慮されるべきである。他の手順で全身麻酔および／または鎮静を受ける患者において、ベースライン腹部磁気共鳴映像法（MRI）スキャンが考慮される。全身麻酔および／または鎮静を必要とする新しい手順の事象において、それが1回目の点滴後3ヶ月以降である場合、調査MRIが考慮される。身体計測（体重、身長、腹囲、中上腕囲、および頭囲）が測定される。一般的な身体検査が実施される。詳細な身体検査が行われる。検査は、対象の一般的な外見、皮膚、頭、眼、耳、鼻、および喉の評価、心臓、肺、腹部、脚／関節、および精神状態を含む。全ての身体検査は以下も含む。肝臓の大きさ：肝臓の大きさ（触診／非触診および肋骨縁からのセンチメートル）、規則性（平滑／結節性）、および感応性（敏感／非敏感）の臨床評価が行われる。

脾臓の大きさ：脾臓の大きさ（触診／非触診および肋骨縁からのセンチメートル）、規則性（平滑／結節性）、および感応性（敏感／非敏感）の臨床評価が行われる。

リンパ節腫大：大きさ、位置、およびあらゆる触診可能なリンパ節の特徴の評価が行われる。検査される領域は、頭部（後頭部、耳介前、耳後部、頤下、顎下）、頸部、鎖骨、腋窩、および鼠径部を含む。いずれの拡大した節は、敏感または非敏感として特徴付けされる。

撮影：仰臥位での対象のデジタル画像（全長および腹部拡大）が撮影される。

【0148】

肝臓／脾臓超音波およびMRI

肝臓および脾臓の大きさを測定するために、腹部超音波検査が実施され得る。腹部MRIは、肝臓および脾臓の容量の良好な定量化を提供することができ、ベースラインおよび1回目の点滴の少なくとも3ヶ月後の来院で考慮される。

【0149】

生命徴候

生命徴候は、脈拍数、呼吸数、収縮期および拡張期の血圧、ならびに深部体温（肛門お

よび口腔)を含む。脈拍数および血圧の評価は、対象が仰臥位であった後に行われる。生命徴候は、全ての研究来院で測定される。投与日、生命徴候は、点滴前、点滴中および点滴後2時間の間15分(±10)毎、次いで、点滴が完了した後2～4時間の間30分(±15)毎に記録される。

【0150】

実施例4

実験評価

以下の実験評価は、診断試験および有効性として実施される。

1) CBC/血圧学検査：白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、細胞形態の検査のための末梢血塗抹標本

10

2) 化学的パネル：グルコース、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、塩化物、カルシウム(総量およびイオン化)、マグネシウム、無機リン、総タンパク質、乳酸デヒドロゲナーゼ

3) 肝機能試験：AST/血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(SGOT)、ALT/血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(SGPT)、アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGTP)、アルブミン、ビリルビン(直接、総量)

20

4) 抗薬物抗体：抗SBC-102抗体

5) 尿検査：pH、グルコース、ケトン、血液、タンパク質、亜硝酸塩

6) 凝集研究：白血球(顕微鏡検査は、血液、亜硝酸塩、および/または白血球が異常である場合行われ得る)

7) 実験栄養評価：血清αトコフェロール：コレステロール比、25OHビタミンD、血清レチノール、ジデヒドロレチノール、トランスサイレチン、血清フェリチン

8) 脂質パネル：総コレステロール、トリグリセリド、HDL、LDL

9) 遺伝子プロファイル

タンパク質コード配列ならびに遺伝子転写、メッセンジャーリボ核酸(mRNA)、安定性および認識され得るタンパク質の有効性を制御する配列の両方を含むDNA配列は、以下を含む：

30

1. リソソーム酸リパーゼ(LIPA遺伝子)

2. LAL欠乏症の疾患表現型の一因となる、および/またはそれを修飾してもよい脂質生物学に關与する他のタンパク質をコードする遺伝子、例えば、ABCA1

3. いずれかのSBC-102に対する脆弱性を修飾してもよい遺伝子

10) 薬物動態評価

医源性貧血のリスクを低減するために、PK試料採取は制限され得る。重要度によって、試料は、以下のパラメータを導き出すために収集される：1) Cmaxおよび2) CLの推定。0日目(用量1)および105日目(用量16)のSBC-102の血清レベルの測定のために試料採取が収集される。全ての対象において、試料は、前用量(投与の30分以内)、点滴開始90(±5)分後、および点滴開始110(±5)分後に収集される。BP評価のために点滴をしない腕の加圧帯を膨らませる前に、生命徴候の評価と同じ時点で、全てのPK試料が採取される。他の時間点でのPK試料は、加圧帯の収縮の少なくとも5分後に採取される。

40

【0151】

実施例5

用量調製および点滴

SBC-102は、透明な液体として単一用量の10mLのガラスバイアルで提供される。溶液(総量10.5mL、5%の過剰を含む)は、2mg・mL⁻¹の濃度である。

50

全ての SBC-102 バイアルは、2～8℃の調節温度で保管された。バイアルは凍結され、保管中、光から保護される。0.9%の生理食塩水に希釈された SBC-102 を含有するシリンジは、点滴直前に調製された。SBC-102 のシリンジが、前もって調製されたときは、希釈された溶液にはラベルが貼られ、調製の4時間以内に使用された。

【0152】

点滴の朝の投与前に記録され、最も近い0.1kgに四捨五入された患者の体重は、各点滴の SBC-102 量を計算するために使用された。研究に使用された総点滴量は、表2に示される投与レジメンに基づく。

【0153】

【表2】

10

【表2】

用量	点滴量
0.35 mg/kg	10 mL
1 mg/kg	10 mL
3 mg/kg	20 mL

【0154】

用量調製および投与は、シリンジ、針、移送管、および二方コックを含むがこれらに限定されない、滅菌の非発熱性の使い捨て材料を使用して実施されるべきである。

【0155】

流量制御デバイス上の点滴速度は、表3に示されるように、約120分にわたって総量を投与するように設定されるべきである。

20

【0156】

【表3】

【表3】

用量	1時間当りの点滴速度	1分当りの点滴速度	1時間当り1キログラム当りの点滴速度
0.35 mg/kg	5 mL	0.083 mL	0.175 mg/kg/時間
1 mg/kg	5 mL	0.083 mL	0.5 mg/kg/時間
3 mg/kg	10 mL	0.167 mL	1.5 mg/kg/時間

【0157】

30

実施例6

有害事象 (AE)

臨床的に顕著な心血管、呼吸器、または他の作用を伴うAEまたは点滴関連反応 (IRR) が認められる患者においては点滴を中断するべきであり、2歳未満の小児における重度の点滴反応管理のための協会のガイドラインにより、対象はアナフィラキシー反応について治療されなければならない。これは、必要な場合、静脈内抗ヒスタミン剤、コルチコステロイド、およびエピネフリンを含んでもよい。関連する生物学的産物において、大半の遅延性IRRは、点滴後24時間超で生じる。症状は、関節痛、筋肉痛、インフルエンザ様症状、頭痛、疲労、および発疹または蕁麻疹を含む。臨床的に示されるように、遅延性反応は、鎮痛剤または抗ヒスタミン剤で治療され得る。IRRは、急性 (点滴開始24時間以内に生じる) または遅延性 (点滴の1～6日後に生じる) のいずれかに分類される。過敏反応の治療のための薬物および機器は、予想外の重度の過敏反応の場合の即時使用のために利用可能でなければならない。これらの供給品は、酸素、アセトアミノフェン、抗ヒスタミン剤 (例えば、ジフェンヒドラミン、非経口、およびPO)、コルチコステロイド、エピネフリン、および心肺機能救急蘇生デバイスを含むが、これらに限定されない。類似する生物学的産物において、最も急性のIRRは、点滴の24時間以内に生じる (Cerezyme (登録商標)、VPRIV (登録商標)、Fabrazyme (登録商標) 処方情報)。急性IRRの可能性の兆しは、軽度から中程度のIRRに分類され得る：充血、紅潮、発熱および／または悪寒、吐気、そう痒、蕁麻疹、胃腸症状 (嘔吐、下痢、腹部痙攣)。軽度の反応は、一時的な中止または点滴速度の減少後の自己限定性の自然

40

50

回復反応として定義される。中程度の反応は、単純な措置で回復しない、観察の延長を必要とする、および療法を中断する反応として定義される。重度のIRRは、胸痛、呼吸困難、喘鳴、喘音、低血圧もしくは高血圧、呼吸停止、無呼吸、呼吸困難、徐脈、または頻拍を伴う。上記の兆しおよび症状のいずれか点滴中に観察され、対象が血行動態的に安定している場合、点滴速度を遅くすることができ（事象の開始時に行われた速度の半分、例えば $10 \text{ mL} \cdot \text{時間}^{-1}$ から $5 \text{ mL} \cdot \text{時間}^{-1}$ に減少させる）、点滴時間を延長する。事象が解決されたら、点滴スケジュールの元の速度の75%に速度を増加させる前に、点滴は、最低30分間減速で継続するべきである。対象が過敏症の兆しを示し続ける場合、2歳未満の小児の点滴反応管理のための協会ガイドラインにより、IMまたは低IV用量の抗ヒスタミン剤が投与され得る。

10

【0158】

実施例7

遅発性LAL欠乏症を有するヒト患者へのrhLALの投与

研究の主な目的は、遅発性LAL欠乏症による肝不全を有する患者におけるSBC-102の安全性および耐容性（生命徴候、身体検査、臨床実験試験、免疫原性試験、有害事象評価、併用療法）を評価することである。第2の目的は、単一用量および複数用量（点滴前および点滴後、0日目および21日目）後にIV点滴により送達されたSBC-102の薬物動態を特徴付けするためである。遅発性LAL欠乏症の対象の採択基準は、以下を含む：

20

1. 患者がリスクおよび副作用を含む研究の完全な性質および目的を理解し、全ての研究手順に従う意思があり、かつそれに従うことができ、同意を提出する；
2. ≥ 18 歳から ≤ 65 歳の男性または女性；
3. アッセイを実施するラボの正常範囲に対して文書化されたLAL活性の低下、またはLAL欠乏症の診断を確認する分子遺伝子試験の文書化された結果、
4. 臨床像（肝腫大）および／または実験試験結果（ALTまたはAST $\geq 1.5 \times \text{ULN}$ ）に基づく肝臓関与の証明、
5. スタチンまたはエゼチミブを受けている場合、患者は、スクリーニング前の少なくとも4週間の間、安定した用量を受けていなければならない、
6. 女性全員、スクリーニング時、血清妊娠試験が陰性でなければならない、また授乳を
7. 妊娠の可能性がある女性患者は、研究期間中、高度に有効で承認された避妊法（複数可）を使用することに同意し、最終用量後30日間使用を継続しなければならない。

30

【0159】

臨床評価は、身体検査、尿検査、臨床化学分析、CBC／血液検査、急性期反応物、凝集研究、12誘導ECG、抗SBC-102抗体、およびCmaxを導き出すためのPK、AUC_{inf}、T_{1/2}、Cl、およびV_{ss}を含む。

【0160】

患者は、毎週1回、2時間にわたり静脈内（IV）点滴を介して $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、または $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ のLALを与えられる。最初の対象が投与され、コホートの他の対象への投与を進める前に少なくとも24時間、耐容性について監視される。各対象は、最初のSBC-102の点滴後、24時間入院する。対象は、SBC-102用量のさらなる3用量の毎週1回のIV点滴を継続するが、但し、耐容性および安全性が許容可能であることを条件とする。

40

【0161】

薬物動態

PKデータは、少なくとも1用量の研究薬物を受けた、研究に参加した全ての対象を使用して分析されるが、主なプロトコルの逸脱により影響を受けた可能性がある、あらゆる

50

データ点を除外する。PK分析は、1つのコンパートメント点滴モデルを使用して実施される。以下のPKパラメータが導き出され、コホートにより提示される (C_{max} 、 AUC_{inf} 、 $T_{1/2}$ 、 Cl 、および V_{ss})。単一用量および複数用量のPKパラメータは、来院2回目および来院6回目のデータを使用して比較される。

【0162】

この研究の用量間での提案された増分は、3、4、5、または6倍であり得、これは、 $mg \cdot kg^{-1}$ での6倍の用量範囲にわたって、ヒトにおける最初の安定性、耐容性、および薬物動態の評価を可能にしてもよい。関連のある前臨床ラットモデルにおいて、毎週1回 $1 mg \cdot kg^{-1}$ 、2週に1回 $3 mg \cdot kg^{-1}$ 、および毎週1回 $5 mg \cdot kg^{-1}$ の薬物動態作用が比較可能である。よって、毎週1回 $3 mg \cdot kg^{-1}$ より多い用量を必要とすることは予想されないが、疾患の重症度により、4、5、6、7、8、9、または $10 mg \cdot kg^{-1}$ 等の、 $3 mg \cdot kg^{-1}$ を超える用量が考慮され得る。

10

【0163】

研究設計

この状態の患者の希少性を考えると、この研究の標的数は、9人の評価可能な対象である。対象は、コホート当り対象3人の3つの逐次コホートに参加する。コホート1に割り当てられた対象は、最初に投与を開始し、続いて、コホート2に割り当てられたもの、次いでコホート3のものが続く。

【0164】

20

【表 4 - 1】

【表 4】遅発性 LAL 欠乏症研究スケジュール：来院、評価、および間隔

評価	前治療	活性段階								活性後段階		
	来院 1 回目	来院 2 回目	来院 3 回目	来院 4 回目	TC	来院 5 回目	TC	来院 6 回目	TC	来院 7 回目	来院 7.1 回目	来院 8 回目
	(28~7 日目)	(0 日目)	(1 日目)	(7±1 日目)	8 日目	(14±1 日目)	15 日目	(21±1 日目)	22 日目	(28±1 日目)	(35±1 日目)	(52±1 日目)
説明による同意	X											
採扱/除外基準	X	X										
人口学的情報	X											
患者健康上の転帰	X											
病歴 ¹	X											
12 誘導 ECG	X											X
身体検査	X ²	X						X		X ²		X
生命徴候 ³	X	X ³	X	X ³		X ³		X ³		X		X
尿検査	X	X ^p	X ^p	X		X		X		X		X
妊娠試験 ⁴	X	X ^p						X ^p				X
CBC/血液学検査	X	X ^p	X ^p	X ^p		X ^p		X ^p		X		X
化学パネル	X	X ^p	X ^p	X ^p		X ^p		X ^p		X		X
肝臓パネル	X	X ^p	X ^p	X ^p		X ^p		X ^p		X	X	X
脂質パネル	X	X ^p								X		
急性期反応物	X	X ^p								X		X
凝集試験	X											X
ウイルス性肝炎スクリーニング	X											
ウイルス性肝炎スクリーニング	X											
DNA 試料	X											
血液 PBMC LAL 活性	X							X ^p				X
Anti SBC-102 Ab (ADA)	X	X ^p								X		X
探索性生物マーカー試料	X	X ^p								X	X	X
PK 試料 ⁵		X						X				
SBC-102 投与		X		X		X		X				
有害事象	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
併用療法	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

TC = 電話呼び出し

^p 前用量¹ 飲酒歴を含む (AUDIT 質問事項)² 身長および体重を含む³ 前用量、点滴中 15 分毎、点滴後 2 時間の間 15 分毎、および点滴後 2 ~ 4 時間の間 30 分毎。⁴ 来院 1 日目および来院 8 日目に血清、来院 2 回目および来院 6 日目に尿⁵ 前用量、点滴中 10、15、20、40、60、90 分、点滴の終わり (約 120 分)

ならびに点滴後 5、10、20、30、40、60、および 120 分

【0165】

コホート 1

3 人の対象が $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の SBC-102 の IV 点滴を受ける。最初の対象が投与され、コホートの他の 2 人の対象への投与を進める前に少なくとも 24 時間、耐容性について監視される。各対象は、最初の SBC-102 の点滴後、24 時間入院する。対象は、 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の 3 回のさらなる IV 点滴を継続するが、但し、耐容性および安全性が許容可能であることを条件とする。

【0166】

10

20

30

40

50

コホート 2

3 人の対象が $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の SBC-102 の IV 点滴を受ける。コホート 2 の最初の対象が投与され、コホートの他の 2 人の対象への投与を進める前に少なくとも 24 時間、耐容性について監視される。各対象は、最初の SBC-102 の点滴後、24 時間入院する。対象は、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の 3 回のさらなる IV 点滴を継続するが、但し、耐容性および安全性が許容可能であることを条件とする。

【0167】

コホート 3

3 人の対象が $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ の SBC-102 の IV 点滴を受ける。コホート 3 の最初の対象が投与され、コホートの他の対象への投与を進める前に少なくとも 24 時間、耐容性について監視される。各対象は、最初の SBC-102 の点滴後、24 時間入院する。対象は、 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ のさらなる 3 用量の毎週 1 回の IV 点滴を継続するが、但し、耐容性および安全性が許容可能であることを条件とする。

【0168】

安全委員会 (SC) は、耐容性の不良または安全上のリスクの可能性により、いずれかの時点で、コホート全て、または個々の対象への投与を一時停止してもよい。

【0169】

対象が、来院 8 回目 (研究の終了) 以外の来院予定で、または来院予定外で研究治療を中断する場合、対象は、来院 8 回目で行われる研究評価の終了のために、最後の SBC-102 の用量後 7 日以降に再来院するべきである。

【0170】

SBC-102 は、来院 2、4、5、および 6 日目に IV 点滴により投与される。併用療法は、研究中記録される。有害事象は、同意の署名時から記録される。

【0171】

各対象は、合計 4 用量の SBC-102 を毎週受けるが、但し、耐容性および安全性が許容可能であることを条件とする。

【0172】

研究期間

研究は、安全性の評価、および後続の臨床試験のための投与スケジュールを支持するために、4 週間の SBC-102 での投与、および休薬期を伴う。この研究の完了後、対象は、LAL 欠乏症 / CED 表現型を有する患者の SBC-102 の長期安全性および有効性を評価するための別個のプロトコルのもと、SBC-102 を再開する対象であってもよい。

【0173】

身体検査

一般的な身体検査は医学資格保有者によって実施される。系 (心血管、呼吸器、胃腸、および神経系を含むがこれらに限定されない) が特定され、記録される。検査が行われる各時点で、いかなる異常も記述されるべきである。新しい異常の診断は、適切な場合、有害事象として記録されるべきである。

【0174】

スクリーニング来院で実施される追加の身体検査評価:

a) 肝臓の大きさ: 肝臓の大きさ (触診 / 非触診および肋骨縁からのセンチメートル)、規則性 (平滑 / 結節性)、および感応性 (敏感 / 非敏感) の臨床評価が行われる。

b) リンパ節腫大: 大きさ、位置、およびいずれの触診可能なリンパ節の特徴の評価が行われる。検査される領域は、頭部 (後頭部、耳介前、耳後部、頤下、顎下)、頸部、鎖骨、腋窩、および鼠径部を含む。いずれの肥大した節は、敏感または非敏感として特徴付けられる。

10

20

30

40

50

c) 動脈疾患：右側および左側の後脛骨筋および足背動脈の脈拍が臨床的に評価され、右側および左側の足関節上腕血圧比 (ABI) が記録される。ABI は、右側または左側の腕の上腕収縮期圧 (どちらか高い方) で割った足背動脈または後部脛骨動脈の収縮期圧の比として定義される。

【0175】

生命徴候

脈拍数、呼吸数、収縮期および拡張期の血圧、および体温を含む生命徴候が測定される。脈拍数および血圧の評価は、対象が少なくとも5分間半仰臥位であった後に取られた。投与日、生命徴候は、点滴前、点滴中および点滴後2時間の間15分 (±5) 毎、ならびに点滴が完了した後2～4時間の間30分 (±10) 毎に記録される。点滴関連反応 (IRR) の場合には、治験担当医師の判断でさらなる数値が取られてもよい。対象が少なくとも5分間、仰臥であった後、正式記録値を含む12誘導心電図 (ECG) が取られる。

【0176】

実験評価

実験試験の試料は、評価スケジュールに示される時間点で収集される。以下の分析 (ESR、凝集研究、および抗SBC-102抗体を除く) が実施される。

【0177】

CBC/血液学検査：白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、血小板数、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球

化学的パネル：グルコース、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、塩化物、カルシウム、マグネシウム、無機リン、総タンパク質、乳酸デヒドロゲナーゼ、尿酸

肝機能試験：AST/SGOT、ALT/SGPT、アルカリホスファターゼ、GGTP、アルブミン、ビリルビン (直接、総量)

脂質パネル：総コレステロール、トリグリセリド、HDL、LDL

凝集研究：プロトロンビン時間 (PT) 国際標準率 (INR)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT)

尿検査：グルコース、ケトン、血液、pH、タンパク質、亜硝酸塩、および白血球 (顕微鏡検査は、血液、タンパク質、亜硝酸塩、および/または白血球が異常である場合にのみ行われる)

ウイルス性肝炎スクリーニング：HBsAgおよびHCV血清学検査 (スクリーニング時、または試験中に臨床的に示される場合)

自己免疫肝炎スクリーニング：抗平滑筋抗体 (ASMA)、抗核抗体 (ANA)、抗LKM1抗体、抗SLA抗体

抗薬物抗体：抗SBC-102抗体

急性期反応物：高感受性C反応性タンパク質 (CRP)、赤血球沈降速度 (ESR)、および血清フェリチン

妊娠試験：女性は全員、最低でも月に1回妊娠試験を行う。これらは、来院1日目および来院8日目に血清、ならびに来院2日目および来院6日目に尿を使用して実施される。

薬物動態 (PK) 評価：PK試料は点滴カニューレとは反対の腕から採取される。0日目 (用量1、来院2回目) および21日目 (用量4、来院6日目) のSBC-102血清レベルを測定するための詳細な試料採取が収集される：前投与直前 (投与の30分以内)、点滴中10 (±1)、15 (±1)、20 (±1)、40 (±2)、60 (±2)、および90 (±2) 分、ならびに点滴の終わり (約120分)、ならびに点滴の完了5 (±1)、10 (±1)、20 (±1)、30 (±1)、40 (±2)、60 (±2)、および120 (±2) 分後。

【0178】

S B C - 1 0 2 の調製

来院 1 日目に記録された対象の体重は、各点滴の S B C - 1 0 2 量を計算するために使用される。I V 点滴用の S B C - 1 0 2 医薬品は、以下のステップを使用して、希釈により調製される。

1. バイアルが冷蔵庫から取り出される。
2. バイアルの使用期限が過ぎていないことを確認する。
3. 投与に必要な計算された S B C - 1 0 2 の総量が決定される。

例：

対象の体重 (k g) : 7 0 k g

対象の用量レベル : 3 m g · k g ⁻¹

薬物の濃度 : 2 . 0 m g · m L ⁻¹

【 0 1 7 9 】

【表 4 - 2 】

1. 対象の用量の計算：

体重(kg)	×	用量レベル	=	総用量
70kg	×	3 mg·kg ⁻¹	=	210 mg

2. 注入量の計算：

1 日の総用量	÷	バイアル中の薬物の 濃度	=	総注入量
210 mg	÷	2.0 mgmL ⁻¹	=	105 mL

【 0 1 8 0 】

4. 以下の 0 . 9 % の生理食塩水の点滴袋は、投与群の割り当てに基づき使用される。

【 0 1 8 1 】

【表 4 - 3 】

コホート	用量(mg·kg ⁻¹)	点滴袋の容量(mL)
1	0.35	100
2	1	
3	3	250

【 0 1 8 2 】

5. 投与に必要な S B C - 1 0 2 の容量に等しい容量（上記ステップ 3 で計算される）は、1 0 0 m L または 2 5 0 m L のいずれかの 0 . 9 % の生理食塩水の点滴袋から取り出される（即ち、上記の例を使用すると、1 0 5 m L の生理食塩水が 2 5 0 m L の点滴袋から取り出される）。

【 0 1 8 3 】

6. 0 . 9 % の生理食塩水に対する計算された S B C - 1 0 2 の総量が作製され、移される（即ち、上記の例を使用すると、1 0 5 m L の S B C - 1 0 2 溶液が作製され、点滴袋に移される）。

【 0 1 8 4 】

7. 袋を混合するために、ゆっくりした反転を使用する。

【 0 1 8 5 】

r h L A L の投与

1. I V 点滴管類が希釈された S B C - 1 0 2 の袋に取り付けられる。

2. 管類を準備し、全ての空気を排出する。
3. 約100分にわたり以下の速度で総量を投与するために、流動制御デバイス上の点滴速度を設定する。

【0186】

【表4-4】

コホート	用量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	点滴速度(1時間当り)	点滴速度(1分当り)
1	0.35	60 mL	1 mL
2	1		
3	3	150 mL	2.5 mL

10

【0187】

4. 対象によって変動し、かつ前肘静脈または手首の静脈（または中心静脈カテーテル）を含んでもよいIV点滴部位が選択される。
5. IV管類が血管カテーテルに取り付けられる。開通性を評価し、生理食塩水が容易に流れるかを検証するために、生理食塩水がIV路に注入される。
6. IV路は、テープで固定される。
7. 流動制御でデバイスを使用して、SBC-102点滴が開始される。
8. 点滴は、定期的に監視される。
9. 袋が空になったら、注入ポートを使用して、25mLの0.9%生理食塩水を直ぐに点滴袋に注入する。
10. 点滴が完了するまで、ラインを同じ点滴速度で流す（ $0.35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ および $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 用量において、1時間当り60mL〔1分当り1mL〕、そして $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 用量において、1時間当り150mL〔1分当り2.5mL〕）。点滴の終了は、点滴および流しが完了し、文書化されたときと定義される。

20

【0188】

点滴反応

点滴関連反応（IRR）は、少なくとも点滴におそらく関連する免疫学的に媒介される有害事象として定義される。IRRは、急性（点滴の開始の24時間以内に生じる）または遅延性（点滴後1～14日の間に生じる）のいずれかとして分類される。

30

【0189】

過敏反応の治療のための薬物および機器は、予想外の重度の過敏反応の場合の即時使用のために利用可能でなければならない。これらは、酸素、アセトアミノフェン、抗ヒスタミン剤（例えば、ジフェンヒドラミン、非経口、およびPO）、コルチコステロイド、エピネフリン、および心肺機能救急蘇生デバイスを含むが、これらに限定されない。

【0190】

急性IRRの可能性の兆しは、充血、紅潮、発熱および／または悪寒、吐気、そう痒、蕁麻疹、胃腸症状（嘔吐、下痢、腹部痙攣）、胸痛、呼吸困難、喘鳴、喘音、低血圧もしくは高血圧を含む心肺反応であり得る。上記の兆しおよび症状のいずれか点滴中に観察され、対象が血行動態的に安定している場合、点滴速度を遅くするか、または停止しなければならない。対象が過敏症の兆しを示し続ける場合、IMまたは低IV用量の抗ヒスタミン剤を投与すべきである。臨床的に顕著な心血管または呼吸器作用を伴う重度の点滴反応が認められる患者においては、点滴を中断すべきである。そのようなアナフィラキシー反応において、対象は、静脈内抗ヒスタミン剤、コルチコステロイド、およびエピネフリンを用いて治療され得る。

40

【0191】

ラットモデルにおける組み換えLALの投与

組み換えヒトLALの反復投与の体重、組織トリグリセリドおよびコレステロール、肝腫大、脾腫大、リンパ節腫大、腸管重量、および他のパラメータに対する作用が、Yoshida and Kuriyama (1990) *Laboratory Animal Science*, vol 40, p486-489に記載されるLAL欠乏ドンリュウラットにおいて評価され (Kuriyama et al (1990) *Journal of Lipid Research*, vol 31, p1605-1611、Nakagawa et al, (1995) *Journal of Lipid Research*, vol 36, p2212-2218も参照)、その開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

LAL欠失 (LAL-/-) にホモ接合性である4週齢のドンリュウラットは、遺伝子導入ニワトリの卵管系で産生された組み換えヒトLALまたは生理食塩水プラセボのいずれかを用いて投与される群に割り当てられた。野生型の同年齢の同腹仔のラットを対照として使用した。LAL-/-ラットは、単一用量として、または30分の間隔をあけて与えられる2等用量で、尾血管注入により、4週間の間、週に1回 (合計4用量) または4週間の間、2週に1回 (合計2用量) を投与された。組み換えLALの用量は、1mg/kgまたは5mg/kgであった。投与スケジュールを表5に示す。アナフィラキシー反応の可能性を相殺するために、ラットをジフェンヒドラミン (5mg/kg) を用いて前治療されたが、これは、リソソーム蓄積症の治療のための酵素置換療法の動物モデルにおける以前の経験に基づく手順であり (Shull et al. (1994) *Proceedings of the National Academy of Science*, vol 91, p. 12937、Bieliński et al. (1999) *The Journal of Biological Chemistry*, 274, p. 36335、Vogler et al. (1999) *Pediatric Research*, 45, p. 838.)、それらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0192】

図9は、1週当たり1mg/kgの組み換えLAL、もしくは1週当たり5mg/kgの組み換えLAL、または2週当たり5mg/kgの組み換えLALのいずれかで投与されたラットの体重増加の毎日の進展を示す。2つの用量数と頻度との間の治療的作用には、ほとんど、または全く差がないことが図から分かる。

30

【0193】

【表 5】

【表 5】 L A L 欠乏ドブリュウラットの体重および投与スケジュール

出生後日数	実施された評価／注入
13 日目	
14 日目	
20 日目	
21 日目	幼若ラット離乳
24 日目	
25 日目	
27 日目	
28 日目	毎週 1 回および 2 週に 1 回投与の最初の注入
31 日目	
32 日目	
34 日目	
35 日目	毎週 1 回投与の 2 回目の注入
38 日目	
39 日目	
41 日目	
42 日目	毎週 1 回投与の 3 回目の注入；2 週に 1 回の 2 回目の投与
45 日目	
48 日目	
49 日目	毎週 1 回投与の 4 回目の注入
55 日目	
56 日目	剖検

10

20

【0194】

実施例 9

組み換え L A L を用いて治療された L A L - / - ラットの病理検査

実施例 8 に記載される研究の終了時、研究動物は、人道的に安楽死され、肉眼による病理像、組織病理像、および臨床化学を検査するために剖検された。肉眼による剖検は、身体の外表面、全ての開口部、ならびに頭部、胸部、および腹部空洞、ならびにそれらの内容物の検査を含んだ。内部臓器および組織の塊は、ラットに対して決定され、臓器および組織は、採取され、10%の中性-緩衝ホルマリンで固定された。固定後、組織を処理し、ヘマトキシリンおよびエオシン染色切片の組織学的スライドを準備し、評価した。

30

【0195】

分析された治療された動物の肉眼による病理学的検査は、図 10 に示される解剖に見られるように、肝臓の大きさおよび色の実質的な正常化を示した。臓器対体重比が決定され、プラセボ治療されたラットと比較して、解剖された良好に治療された動物の肝臓、脾臓、腸間膜組織、十二指腸、空腸、および回腸の相対的な臓器の大きさにおいて減少を示した。分析された組み換え L A L 治療されたラットからの肝組織の組織病理像は、プラセボ治療された動物の泡沫状のマクロファージの実質的な蓄積とは好対照に、基本的に正常な肝臓組織像を示す（図 10）。

40

【0196】

実施例 10

マクロファージおよび線維芽細胞リソソームにおける組み換えヒト L A L の内在化

遺伝子導入鳥由来の組み換えヒト L A L （「SBC-102」）が細胞に結合する、およびリソソームコンパートメントに内在化される能力は、マクロファージおよび線維芽細胞の細胞を使用して、生体外で検証された。マクロファージ細胞と共にインキュベートされるとき、蛍光的に標識された SBC-102 は、リソソームに局在化することが分かった。この作用は、マンノース多糖競合物を使用する、N-アセチルグルコサミン／マンノ

50

ース (GlcNAc/マンノース) 受容体を認識の機構として関係付ける、およびこれらの細胞による取り込みにより弱毒化され得る。SBC-102は、生体外でインキュベートした後、LAL欠乏ヒト線維芽細胞および正常なマウス線維芽細胞の両方において、細胞関連LAL活性を増加させ、SBC-102への露出が欠乏した酵素活性の実質的な置換をもたらすことができることを示す。

【0197】

マンノース-6-リン酸塩 (M6P) は、遍在するM6P受容体を介して、リソソーム酵素の広範な細胞の種類への送達に関与することが示されているSBC-102のオリゴ糖構造に存在する。

【0198】

組み換えLALは、遺伝子導入メンドリの卵白から精製された。Oregon Green NHSは、Invitrogen (登録商標) (#0-10241) から得た。ラット肺胞マクロファージ系のNR8383、およびマウス線維芽細胞系のNIH-3T3は、ATCCから得た。LAL欠乏ウォルマン線維芽細胞は、Coriell Institute for Medical Researchから得、LysoTracker (登録商標) Redは、Invitrogen (登録商標) から得た。

【0199】

酵素標識：PBS中の4mgの遺伝子導入鳥由来のLALを、製造者の推奨に従いOregon Greenで標識し、続いて反応をPBSに対して透析し、次いで濃縮した。

【0200】

マクロファージの取り込み：蛍光的に標識された遺伝子導入鳥由来のLAL (5 µg/mL) およびLysoTracker (登録商標) Redを、2時間、NR8383細胞と共にインキュベートした。488nm、次いで514nmの定順位走査モードを使用して、共焦点蛍光顕微鏡法により細胞を検査した。

【0201】

マンナンを用いた拮抗阻害：蛍光的に標識されたSBC-102 (5 µg/mL) およびマンナンを、2時間、NR8383細胞と共にインキュベートした。細胞をトリプシン処理し、エンドポイントとして中央蛍光強度を使用して、蛍光活性化された細胞選別により組み換えLAL取り込みを測定した。

【0202】

遺伝子導入鳥由来LALが取り込まれ、続いて標的細胞のリソソームの中へ組み込まれる能力は、マクロファージ細胞系のNR8383を使用して検査された。蛍光的に標識された遺伝子導入鳥由来LALおよびリソソームマーカーの「LysoTracker (登録商標) Red」(Invitrogen登録商標) を、2時間、細胞と共にインキュベートした。遺伝子導入鳥由来LALおよびリソソームマーカーの、これらの細胞のリソソームへの共局在化は、続いて、定順位走査モードを使用して、共焦点蛍光顕微鏡法により検査された (図11)。組み換えLALは、リソソームへの局在化を示し、これは、様々な供給源からの組み換えヒト (rhLAL) を使用した類似する生体外研究と一致する。

【0203】

遺伝子導入鳥由来LALのGlcNAc/マンノース受容体への結合特異性は、マクロファージ細胞系のNR8383を使用して、競合結合アッセイにより評価された (図12)。5 µg/mLの蛍光標識された (Oregon Green) 遺伝子導入鳥由来LAL、および様々な濃度のマンノース含有オリゴ糖、マンナンを、2時間、細胞と共に同時にインキュベートした。エンドポイントとして中央蛍光強度を使用して、マンナンを含まない対照と比較した、マンナンにより取り込まれた遺伝子導入鳥由来LALの相対阻害が、蛍光活性化された細胞選別分析により定量化された。遺伝子導入鳥由来LAL結合/取り込みにおいて、マンノース用量依存阻害が観察され、これは、遺伝子導入鳥由来LAL : GlcNAc R相互作用と一致する。

【0204】

加えて、線維芽細胞の細胞におけるマンノース-6-リン酸塩媒介取り込みが、マンノ

10

20

30

40

50

ースー6ーリン酸塩との競合実験により示された。

【0205】

実施例11

治療された細胞におけるLAL活性の増加

LALは、コレステロール、グリセロール、および遊離脂肪酸を取り除くために、コレステロールエステルおよびトリグリセリドの加水分解を触媒する。よって、LAL活性は、例えば、蛍光基質であるオレイン酸4-メチルウンベリフェリル(4MUO)の切断により測定され得る。

【0206】

10

線維芽細胞

遺伝子導入鳥由来LALの曝露が細胞のLAL活性を増加させる能力が、生体外で正常細胞およびLAL欠乏細胞の両方を使用して検査された。線維芽細胞をウォルマン患者から単離し、0、0.16、または0.5マイクログラム/mLのいずれかの濃度の遺伝子導入鳥由来LALの存在下で、正常なマウス線維芽細胞(NIH-3T3)を5時間インキュベートした。次いで、非特異的シグナルを取り除くために細胞を洗浄し、オレイン酸4-メチルウンベリフェリル(4-MUO)基質を使用して、LAL活性について細胞溶解物をアッセイした。図13は、内因性細胞関連LAL活性が、NIH-3T3と比較して、ウォルマン線維芽細胞で低く、遺伝子導入鳥由来LALと共にインキュベートした後のLAL活性の用量依存増加が両方の細胞種において観察されたことを示す(図13)。

【0207】

20

白血球

血清单核白血球は、投与前および投与後のLAL欠乏症患者から得た。血液試料は、酵素活性を損失することなく冷蔵庫で保管された。単核白血球(リンパ球)は、フィコールおよびジアトリゾ酸ナトリウムの調製物を使用して、血液から単離された。ハンクス平衡塩溶液で1:1に事前に希釈した4~8mLの血液を、3mLのフィコールバック上に静かに重ね、遠心分離した。単核細胞環を吸引し、ハンクス溶液で1回、次いで、1~2mLの水にペレットを再懸濁することにより少なくとも2回洗浄した。使用前に-20℃でペレットを凍結させた。アッセイ前に、ペレットを解凍し、蒸留水に再懸濁し、氷上で超音波処理した。次いで、調製物を20,000×gで15分間、4℃で遠心分離した。アッセイ前に、上清(0.5~1.5mgのタンパク質/mLを含有する)を氷上に維持した。

【0208】

酸リパーゼアッセイ用の基質は、ヘキサン中の1mLの10mM 4MUO(オレイン酸4-メチルウンベリフェリル)を、CHCl₃中の1mLの16mM L-α-ホスファチジルコリンに添加することにより調製された。N₂下で溶媒を蒸発させ、水中の25mLの2.4mMタウロデオキシコール酸(ナトリウム塩)を添加した。混合物を30~40Wで1~2分間、氷上で超音波処理した。アッセイ前に、1容量の基質ストックを7容量の200mM酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液(pH4.0)で希釈した。各2mLの反応キュベットは、100nmolのオレイン酸4-メチルウンベリフェリル、160nmolのL-α-ホスファチジルコリン、および600nmolのタウロデオキシコール酸ナトリウムを含有した。

【0209】

5~100μLの酵素を添加することによって反応を開始させ、分光蛍光光度計を使用して37℃で監視した。4MUOの切断は、例えば、放出されたフルオロフォアである4-メチルウンベリフェロン(4MU)の約360nmでの励起、および約460nmでの発光により検出された。経時的な蛍光の変化が記録された。

【0210】

30

40

50

実施例 1 2

組み換えヒト LAL (SBC-102) の生体内分析

LAL 欠乏ヨシダラット (即ち、ホモ接合) (Kuriyama et al. (1990), Journal of Lipid Research, vol. 31, p1605-1611、Nakagawa et al., (1995) Journal of Lipid Research, vol. 36, p2212-2218、および Yoshida and Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol. 40, p486-489 を参照) は、4 週齢から 4 週間の間、1 回/週で SBC-102 (5 mg/kg、IV) またはプラセボのいずれかで治療された。各投与において、SBC-102 は、30 分の間隔をあけて 2 等用量 (2.5 mg/kg) でラットの尾血管に注入された。ラットおよび同年齢野生型対照は、最終用量の 1 週間後に検査された。分析は三つ組で行われた。

10

【0211】

SBC-102 治療された動物の肉眼による病理検査は、臓器の大きさの減少に加え、肝臓の色の正常化を示した。SBC-102 治療されたラットは、ビヒクル治療された動物の泡沫状のマクロファージの実質的な蓄積とは好対照に、基本的に正常な肝臓組織像を示した。LAL^{-/-}ラットでは上昇した血清アラニンおよびアスパラギントランスフェラーゼのレベルも、SBC-102 治療されたラットでは低下した。

【0212】

内部臓器および組織の塊は、各ラットに対して決定され、そのデータを図 14 に示す。臓器の大きさは、4 週間、5 mg/kg のビヒクルまたは SBC-102 を毎週投与された後の LAL^{-/-}ラットおよび LAL^{+/+}ラットにおける、8 週齢で決定された体重率として表される。

20

【0213】

SBC-102 またはビヒクル治療されたヨシダラットの体重は、図 15 に示されるように、野生型ラットと比較された。SBC-102 (5 mg/kg) またはビヒクルは、単一用量として、または分割用量 (4 時間以内の間に与えられる) としてのいずれかで、IV 注入により LAL^{-/-}ラットに投与された。LAL^{+/+}ラットは、同年齢の同腹仔対照であった。

【0214】

30

実施例 1 3

トリグリセリド分析

トリグリセリド分析は、野生型のホモ接合プラセボおよびホモ接合 SBC-102 治療された動物からの肝臓および脾臓組織に対して実施された。トリグリセリド分析は、標準的な方法論 (即ち、MBL International のトリグリセリド定量化キット、カタログ # JM-K622-100) を使用して実施され、三つ組で行われた。

【0215】

【表 6】

【表 6】野生型および LAL 欠乏ラットの肝臓および脾臓のトリグリセリドレベル

40

トリグリセリド(ug/mg 含水組織)			
	野生型 (n=3)	プラセボ (n=3)	SBC-102 (n=3)
肝臓	48	84	57
脾臓	3	22	4

【0216】

肝臓基質レベル

図 16 は、4 週間、5 mg · kg⁻¹ のビヒクルまたは SBC-102 を毎週投与され

50

た後のWTおよびLAL欠乏ラットにおける、8週齢で決定された肝臓コレステロール、コレステリルエステル、およびトリグリセリドのレベルを示す。

【0217】

実施例14

ラット用量反応研究

上記で実施された研究に基づき、LAL^{-/-}ラットにおいて、用量の範囲および投与スケジュール（qwおよびqow）の薬物動態（PD）作用を検査した。これらの研究において、4週齢から1ヶ月間、SBC-102が、0.2、1、3、および5mg/kg（qow）、または0.35、1.0、および5.0mg/kg（qw）の投与量で、IV注入により投与された。結果は、体重（BW）増加（図17）、臓器巨大症（図18）、および組織基質レベル（図19）の改善を示す。SBC-102の用量が増加すると、血清トランスアミナーゼレベルも低下し、より高い用量で、レベルは、実質的に野生型レベルに達した。

【0218】

実施例15

SBC-102の薬物動態

a. 試料採取

PK試料は、遅発性LAL欠乏症に罹患する成人患者から得た。患者は、2時間、0.35mg/kgを投与された。0日目（用量1、来院2回目）および21日目（用量4、来院6日目）の血清試料が、用量直前（投与の30分以内）、点滴中（DI）10（±1）、15（±1）、20（±1）、40（±2）、60（±2）、および90（±2）分、ならびに点滴の終わり（EOI）（点滴の開始から約120分）、ならびに点滴の完了（AI）5（±1）、10（±1）、20（±1）、30（±1）、40（±2）、60（±2）、および120（±2）分後に収集される。

【0219】

b. 血清酵素アッセイ

-20℃の冷凍庫に保持された4-MUO（4mM）を、使用前に、暗所で、4℃の冷蔵庫で解凍し、暗所で1.5時間、25℃のインキュベータに設置した。SBC-102医薬品を1.56ng/mLに希釈することにより標準物を調製した。ブランクアッセイ緩衝液を含んだ。第1希釈用に、全ての試料を50ng/mLに希釈した。希釈物を作製した直後に標準物および試料を平板培養した。標準物および試料を調製した後、62.5uLのアッセイ緩衝液（0.2mol/L酢酸ナトリウム三水和物、pH5.5）を各ウェルに添加した。二つ組で、12.5uLの標準物および試料を各ウェルに添加した。4%のトリトンX-100を用いて4-MUO（4mM）を1.6×に希釈し、ウェル当たり25uLを添加した。多穴プレートを軽く数回たたいて混合し、きつく密封し、30分間、37℃のインキュベータに設置した。インキュベート後、50uLの停止溶液（0.77Mトリス、pH8.0）を各ウェルに添加し、150uL/ウェルの最終容量を作製した。プレートをマイクロプレートリーダーに設置し、360nmの励起および460nmの発光で、プレートの底部から蛍光のレベルを測定した。

【0220】

表7～11に示されるように、遅発性LAL欠乏症に罹患する成人患者に投与された組み換えLALの血清C_{max}は、約270ng/mL～720ng/mLの範囲であった。半減期（t_{1/2}）は、7.6分～16.7分の範囲であり、平均t_{1/2}は、約13分（標準偏差3.812）であった。

【0221】

【表 7】

【表 7】

患者 ID (用量 :0.35mg/kg)	来院#	濃度(ng/mL)	公称時間
02-001	2	5.63	前点滴
02-001	2	241.88	10 分 DI
02-001	2	369.44	15 分 DI
02-001	2	369.93	20 分 DI
02-001	2	359.64	40 分 DI
02-001	2	294.64	60 分 DI
02-001	2	71.85	90 分 DI
02-001	2	71.20	EOI
02-001	2	37.95	5 分 AI
02-001	2	24.91	10 分 AI
02-001	2	14.16	20 分 AI
02-001	2	9.76	30 分 AI
02-001	2	9.02	40 分 AI
02-001	2	7.20	60 分 AI
02-001	2	7.51	120 分 AI

$C_{max} = 369.93 \text{ ng/mL}$; $t_{1/2} = 16.8 \text{ 分}$; $LLQ = 4.68 \text{ ng/mL}$

【0 2 2 2】

【表 8】

【表 8】

患者 ID (用量 :0.35mg/kg)	来院#	濃度(ng/mL)	公称時間
03-001	2	8.23	前
03-001	2	199.80	10 分 DI
03-001	2	215.10	15 分 DI
03-001	2	228.12	20 分 DI
03-001	2	237.25	40 分 DI
03-001	2	210.73	60 分 DI
03-001	2	262.41	90 分 DI
03-001	2	102.39	EOI
03-001	2	52.20	5 分 AI
03-001	2	33.75	10 分 AI
03-001	2	17.60	20 分 AI
03-001	2	12.17	30 分 AI
03-001	2	10.82	40 分 AI
03-001	2	9.39	60 分 AI
03-001	2	8.72	120 分 AI

$C_{max} = 262 \text{ ng/mL}$; $t_{1/2} = 15.3 \text{ 分}$; $LLQ = 4.68 \text{ ng/mL}$

【0 2 2 3】

【表 9】

【表 9】

患者 ID (用量 :0.35mg/kg)	来院#	濃度(ng/mL)	公称時間
03-002	2	< 4.68	前点滴
03-002	2	480.55	10 分 DI
03-002	2	531.16	15 分 DI
03-002	2	613.85	20 分 DI
03-002	2	717.75	40 分 DI
03-002	2	84.46	60 分 DI
03-002	2	54.34	90 分 DI
03-002	2	171.41	EOI
03-002	2	87.95	5 分 AI
03-002	2	49.70	10 分 AI
03-002	2	16.47	20 分 AI
03-002	2	11.01	30 分 AI
03-002	2	9.76	40 分 AI
03-002	2	6.28	60 分 AI
03-002	2	5.19	120 分 AI

$C_{max} = 718 \text{ ng/mL}$; $t_{1/2} = 10.8 \text{ 分}$; $LLQ = 4.68 \text{ ng/mL}$

【0224】

【表 10】

【表 10】

患者 ID (用量 :0.35mg/kg)	来院#	濃度(ng/mL)	公称時間
02-001	6	5.12	前点滴
02-001	6	249.91	10 分 DI
02-001	6	294.37	15 分 DI
02-001	6	313.75	20 分 DI
02-001	6	330.04	40 分 DI
02-001	6	245.48	60 分 DI
02-001	6	262.78	90 分 DI
02-001	6	81.09	EOI
02-001	6	32.10	5 分 AI
02-001	6	20.39	10 分 AI
02-001	6	10.74	20 分 AI
02-001	6	8.08	30 分 AI
02-001	6	6.38	40 分 AI
02-001	6	5.82	60 分 AI
02-001	6	< 4.68	120 分 AI

$C_{max} = 330 \text{ ng/mL}$; $t_{1/2} = 15.3 \text{ 分}$; $LLQ = 4.68 \text{ ng/mL}$

【0225】

【表 1 1】

【表 1 1】

患者 ID (用量 :0.35mg/kg)	来院#	濃度(ng/mL)	公称時間
03-001	6	6.63	前点滴
03-001	6	317.45	10 分 DI
03-001	6	333.46	15 分 DI
03-001	6	310.83	20 分 DI
03-001	6	378.68	40 分 DI
03-001	6	234.49	60 分 DI
03-001	6	246.07	90 分 DI
03-001	6	206.06	EOI
03-001	6	253.80	5 分 AI
03-001	6	70.81	10 分 AI
03-001	6	24.61	20 分 AI
03-001	6	12.32	30 分 AI
03-001	6	9.03	40 分 AI
03-001	6	7.18	60 分 AI
03-001	6	5.56	120 分 AI

$C_{max} = 379 \text{ ng/mL}$; $t_{1/2} = 7.7 \text{ 分}$; $LLQ = 4.68 \text{ ng/mL}$

【0226】

実施例 16

免疫原性分析：抗 SBC-102 の測定

各不明の陽性および陰性試料を、 $1 \times \text{PBS}$ 中の 5% の粉ミルクに 1:20 に希釈し、回転器 (500 rpm) 上で 12~18 時間、4℃ でインキュベートした。アッセイ前に、試料を $2000 \times g$ で 20 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml 管に移した。

【0227】

SBC-102 を、 $1 \times \text{PBS}$ 緩衝液中で 0.5 ug/mL の濃度に希釈し、100 uL を 96 ウェル ELISA プレートの各ウェルに設置した。プレートを接着カバーで覆い、室温で 8 時間または一晩、4℃ でインキュベートした。インキュベート後、ウェルを $1 \times$ 洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。200 uL の 5% BSA-無 IgG を各ウェルに添加し、プレートを密封し、4℃ で 12~18 時間または室温で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、ウェルを $1 \times$ 洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。100 uL の各対照試料、不明試料、および陰性試料を三つ組でウェルに添加した。プレートをマイクロプレート振とう器 (500 rpm) 上で室温で 1.5 時間インキュベートした。インキュベート後、ウェルを $1 \times$ 洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。希釈緩衝液で 100 ng/mL の濃度に希釈された 100 uL のビオチン化した SBC-102 を各ウェルに添加し、プレートをマイクロプレート振とう器 (500 rpm) 上で、室温で 1.5 時間インキュベートした。インキュベート後、ウェルを $1 \times$ 洗浄緩衝液で洗浄した。希釈緩衝液で 1:4000 に希釈された 100 uL のストレプトアビジン-HRP 抱合体を各ウェルに添加した。プレートをマイクロプレート振とう器 (500 rpm) 上で、室温で 1.5 時間インキュベートした。インキュベート後、ウェルを $1 \times$ 洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。100 uL の TMB 基質を各ウェルに添加し、プレートを暗所で 15 分間インキュベートした。50 uL の停止溶液 ($0.5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$) を各ウェルに添加し、反応を停止させた。450 nm での OD を測定した。

【0228】

表 12 に一覧にされるように、4 週間、 0.35 mg/kg の用量の SBC-102 を毎週受けた患者は、抗 SBC-102 抗体のレベルの上昇を示さず、SBC-102 点滴

による酵素置換療法がヒト患者においていずれの顕著な免疫原性を引き起こさないことを示唆する。これらの患者は、いずれの有害事象または点滴関連反応（IRR）を示さなかった。

【0229】

【表12】

【表12】

試料	平均 OD	標準偏差	SBC-102 濃度 (ng/ml)
陰性対照	0.056	N/A	0
陽性対照 1	0.076	0.005	15.6
陽性対照 2	0.090	0.003	31.2
陽性対照 3	0.132	0.008	62.5
陽性対照 4	0.201	0.009	125
陽性対照 5	0.349	0.019	250
陽性対照 6	0.635	0.012	500
陽性対照 7	0.958	0.101	1000
患者 ID	平均 OD	標準偏差	
01-001 来院 1 回目	0.053	0.000	
02-001 来院 1 回目	0.051	0.000	
02-001 来院 7 回目	0.053	0.002	
02-001 来院 8 回目	0.050	0.001	
03-001 来院 1 回目	0.051	0.001	
03-001 来院 2 回目	0.051	0.001	
03-001 来院 7 回目	0.050	0.000	
03-002 来院 1 回目	0.052	0.004	
03-002 来院 2 回目	0.056	0.006	

【0230】

実施例 17

組み換え LAL の投与によるウォルマン病（WD）の治療

生後以来体重増加困難および発育不良のため、7 週齢の女子の患者が入院した。最初の身体検査で、患者の体重は、3.6 kg（出生時体重 3.7 kg）であり、痩せており、皮下脂肪は緩い。腹部は膨満し、6 cm の堅い肝腫大および 4 cm の脾腫大を伴う。肥大したリンパ節が鼠径部で認められ、筋活動は弱い。

【0231】

最初のヘモグロビンレベルは 9.2 gm、血小板は 506,000、白血球は 11,550 である。尿検査は正常であり、骨髓塗抹標本から、空胞のあるリンパ球および多数の泡沫状細胞が明らかである。血清化学測定値：総脂質 834 mg/100 ml、リン脂質 176 mg/100 ml、トリグリセリド 141 mg/100 ml、コレステロール 129 mg/100 ml、ビリルビン 0.3 mg/100 ml、アルカリホスファターゼ 9.0 BU%、SGOT 90 単位、SGPT 50 単位、コリンエステラーゼ 20 単位、尿素窒

10

20

30

40

50

素 8. 3 mg、空腹時の糖 45 mg / 100 ml。腹部の CT スキャンは、カルシウム沈着を伴う肝脾腫大および両側性の対照的に肥大した副腎を示す。

【0232】

患者は、投与のための静脈血管アクセスポートを外科的に移植される。ポートを携帯型点滴機に接続した後、アナフィラキシー点滴反応の可能性を相殺するために、患者は、組み換え LAL 点滴の前に 20 分間、1 mg / kg のジフェンヒドラミンで前治療される。次いで、患者は、静脈内点滴により 5 時間にわたり 1 mg / kg の組み換え LAL を投与される。この療法は、無期限で、7 日毎に 1 回繰り返される。

【0233】

最初の用量の組み換え LAL を投与してから 2 週間以内に、患者は、超音波により決定される、体重増加および主要な腹部臓器の大きさについて評価される。患者のリソソーム酸リパーゼ活性を試験する実験結果も実施される。

10

【0234】

実施例 18

組み換え LAL の投与によるコレステリルエステル蓄積症 (CESD) の治療

そう痒性腹部皮疹を伴う 3 歳の男子が、彼の小児科医によって検査される。腹部検査時、肝腫大が医師によって認められ、超音波によって確認される。この時点では、診断は行われず、患者は定期的に監視される。

【0235】

20

8 歳で、彼は胃腸炎で病院に入院する。肝臓生検の光学顕微鏡法は、肝細胞に細胞質内グリコーゲンおよび小さい脂質滴の増加を示す。電子顕微鏡法は、小さい高電子密度顆粒を伴う膜結合脂質滴を示す。グリコーゲン蓄積症 III 型 (脱分枝酵素欠損症) の仮診断がなされたが、皮膚線維芽細胞脱分枝活性は正常である。

【0236】

10 歳で、肝腫大が持続し、2 回目の肝臓生検が行われる。光学顕微鏡法は、軽度の門脈周囲線維症を伴う、細胞質顆粒および空胞を含有する膨満した肝細胞を伴った肝臓軟組織の小葉構造の変化を示す。線維芽細胞酸リパーゼ活性は、正常の 7 % であることが判明し、CESD の診断を確認する。総コレステロール (TC)、トリグリセリド (TG)、低密度リポタンパク質コレステロール (LDL-C) の血漿濃度は、それぞれ、7.51、3.24、および 5.58 mmol / L で、年齢および性別の第 95 パーセンタイルよりそれぞれ上であるが、一方で、血漿高密度リポタンパク質コレステロール (HDL-C) は、0.47 mmol / L で、第 5 パーセンタイルより下であり、彼は、複合型高脂血症 (高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、低 α リポタンパク血症、および高 β リポタンパク血症) である。

30

【0237】

患者は、投与のための静脈血管アクセスポートを外科的に移植される。ポートを携帯型点滴機に接続した後、アナフィラキシー点滴反応の可能性を相殺するために、患者は、組み換え LAL 点滴の前に 20 分間、5 mg / kg のジフェンヒドラミンで前治療される。次いで、患者は、静脈内点滴により 5 時間にわたり 5 mg / kg の組み換え LAL を投与される。この療法は、無期限で、14 日毎に 1 回繰り返される。

40

【0238】

最初の用量の組み換え LAL を投与してから 2 週間以内に、患者は体重増加および主要な腹部臓器の大きさについて、超音波検査によって決定されたとおりに評価される。患者のリソソーム酸リパーゼ活性を試験する実験結果も実施される。

【0239】

上記明細書の各実施例は、本発明の説明のために提供され、本発明を制限するものではない。実際、様々な修正、組み合わせ、追加、除去、および変形が本発明の範囲または趣旨

50

から逸脱することなく本発明になされてもよいことは、当業者には明らかであろう。例えば、一実施形態の一部として図示または説明される特色は、またさらなる実施形態を得るために、別の実施形態に使用されてもよい。本発明は、そのような修正、組み合わせ、追加、除去、および変形を網羅することが意図される。

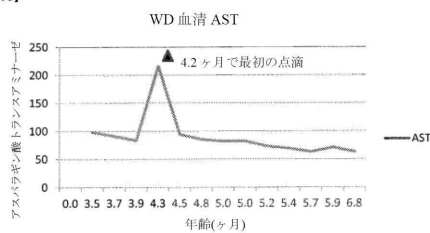
【0240】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、および受入番号／データベース配列（ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の両方を含む）は、各個別の刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、および受入番号／データベース配列が参照によりそのように組み込まれるように具体的かつ個別に示されるのと同じ程度に、全ての目的において、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

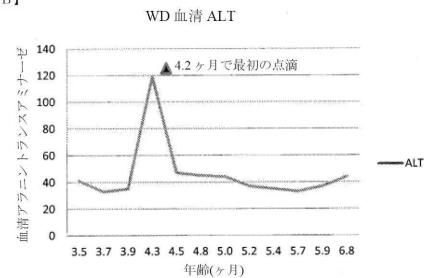
10

【図1】

【図1A】

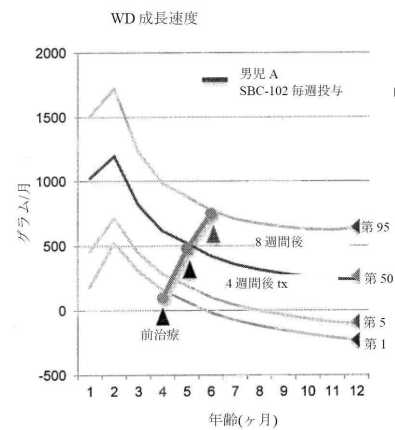


【図1B】



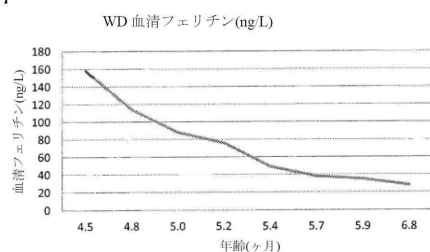
【図3】

【図3】



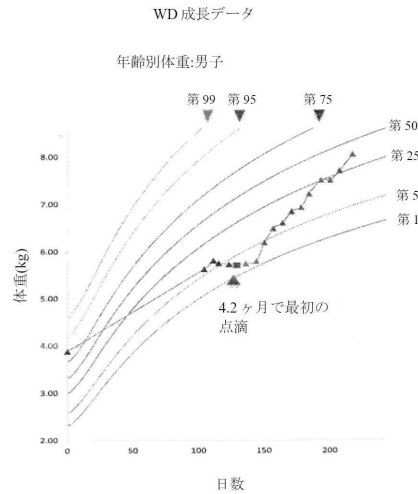
【図2】

【図2】



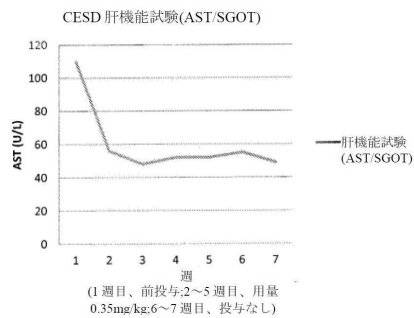
【図 4】

【図 4】



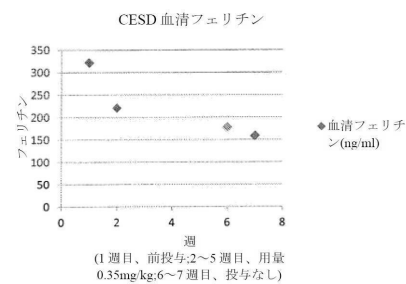
【図 5】

【図 5】



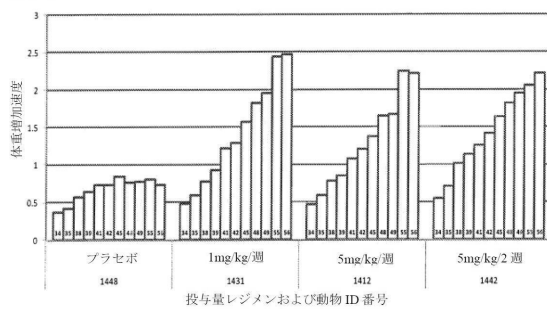
【図 8】

【図 8】



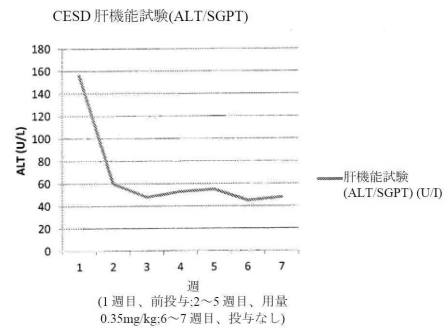
【図 9】

【図 9】



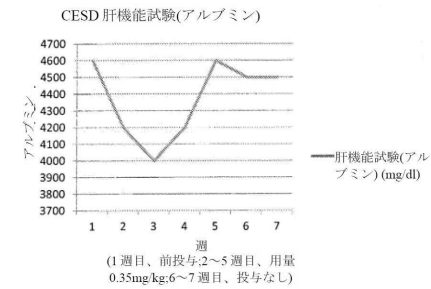
【図 6】

【図 6】



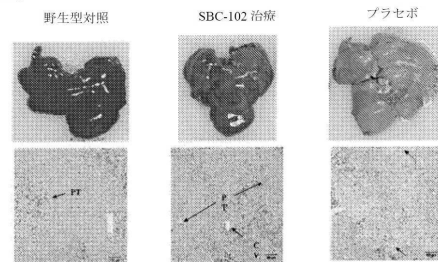
【図 7】

【図 7】



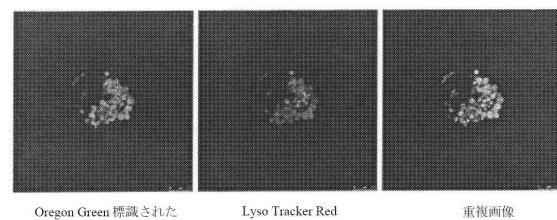
【図 10】

【図 10】



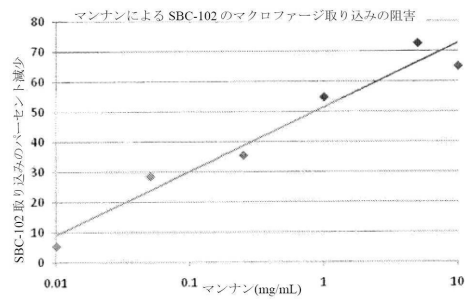
【図 11】

【図 11】



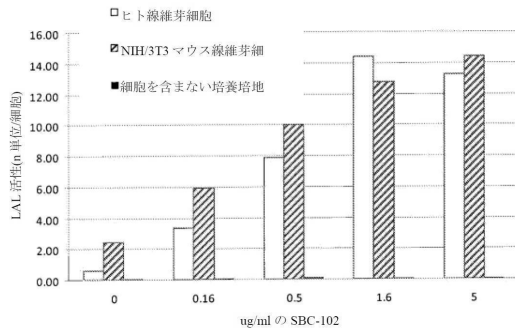
【図 1 2】

【図 1 2】



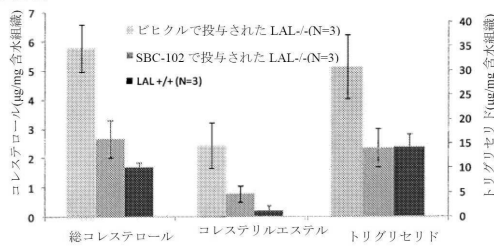
【図 1 3】

【図 1 3】



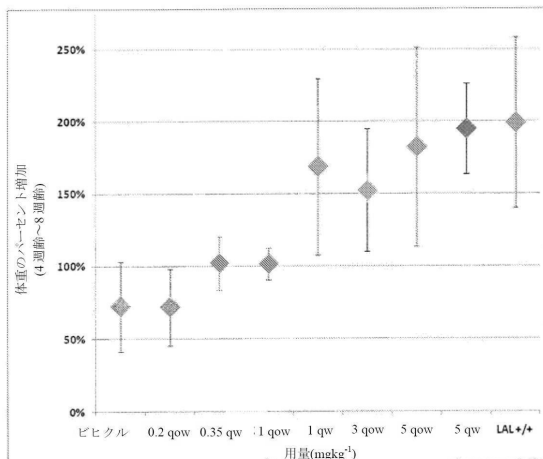
【図 1 6】

【図 1 6】



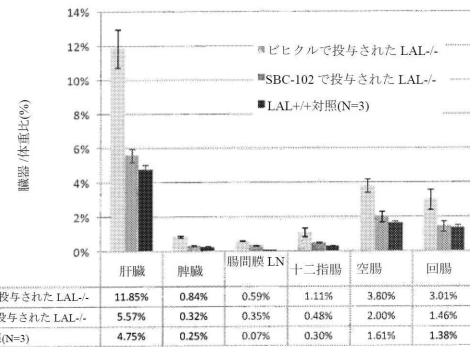
【図 1 7】

【図 1 7】



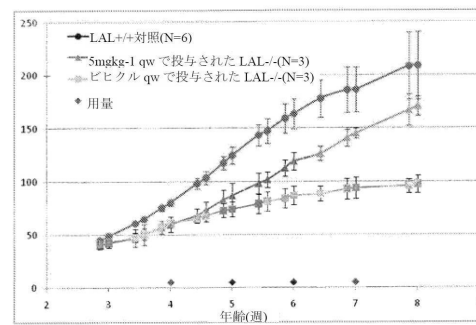
【図 1 4】

【図 1 4】



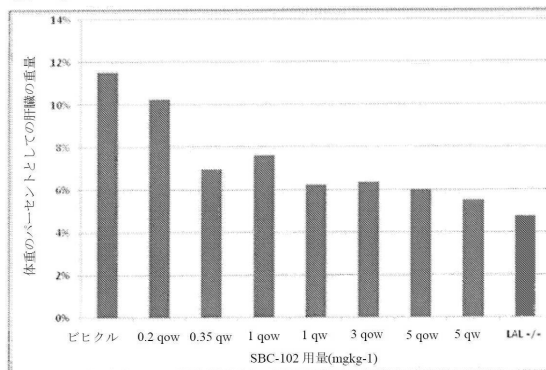
【図 1 5】

【図 1 5】



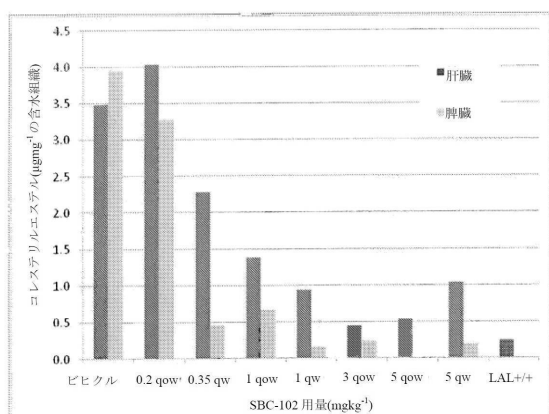
【図 1 8】

【図 1 8】



【図 1 9】

【図 1 9】



【配列表】

0006156882000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/456,014
(32)優先日 平成22年10月29日(2010.10.29)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/403,011
(32)優先日 平成22年9月9日(2010.9.9)
(33)優先権主張国 米国(US)

審査官 吉田 佳代子

- (56)参考文献 特表2013-540733(JP, A)
特許第5693728(JP, B1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 38/00-38/58
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)