

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-534620

(P2017-534620A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	4 C 0 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
A 6 1 K 9/20 (2006.01)	A 6 1 K 9/20	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-522017 (P2017-522017)	(71) 出願人	515292543
(86) (22) 出願日	平成27年10月23日 (2015.10.23)		アフィロジック
(85) 翻訳文提出日	平成29年5月22日 (2017.5.22)		フランス国 44 200 ナント リュ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/074644		ラ ノウェ プラス ドゥ フェール
(87) 国際公開番号	W02016/062874		21 バイオ ウエスト
(87) 国際公開日	平成28年4月28日 (2016.4.28)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	1460226		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成26年10月24日 (2014.10.24)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		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】 OBフォールドタンパク質バリエントを含む経口投与組成物

(57) 【要約】

本発明は、OBフォールドタンパク質バリエントを含有している経口投与組成物およびそれを調製する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型OBフォールドタンパク質の天然リガンドとの結合の界面に5～32個の変異型残基を有する、野生型OBフォールドタンパク質のバリエーションを含む、経口投与組成物。

【請求項 2】

野生型OBフォールドタンパク質が、スルホロブス・アシドカルダリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*) 由来のSac7dまたはSac7e、スルホロブス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) 由来のSso7d、スルホロブス・トコダイー (*Sulfolobus tokodaii*) 由来のDBP7、スルホロブス・シバテ (*Sulfolobus shibatae*) 由来のSsh7b、スルホロブス・シバテ由来のSsh7a、およびスルホロブス・ソルファタリカス由来のp7ssより選択されることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

バリエーションが、抗原、抗体、細胞タンパク質、循環血中タンパク質、ペプチド、医薬の活性成分、核酸、具体的には、インターロイキン、サイトカイン、サイトカインまたはインターロイキンの受容体、癌遺伝子によってコードされたタンパク質、微生物の表面タンパク質、および微生物リポ多糖より選択される関心対象の標的に結合することを特徴とする、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

ゲルカプセル剤、錠剤、ロゼンジ剤、または丸剤の形態をとっていることを特徴とする、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

液体組成物の形態をとっていることを特徴とする、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

抗菌剤、抗寄生虫剤、抗真菌剤、抗炎症剤、鎮痒剤、麻酔剤、抗ウイルス剤、角質溶解剤、およびフリーラジカル消去剤より選択される少なくとも1種の剤も含有していることを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

胃腸系の障害または疾患の処置において使用するための、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

野生型OBフォールドタンパク質の天然リガンドとの結合の界面に5～32個の変異型残基を有する、野生型OBフォールドタンパク質のバリエーションを、薬学的に許容される経口投与担体と混合する工程を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の経口投与組成物を調製する方法。

【請求項 9】

トレーサーと結合した所望の抗原に結合するOBフォールドタンパク質のバリエーションを含む請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物を患者へ投与する工程を含む、臓器、具体的には、胃腸系における特定の抗原の存在を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、関心対象の標的に結合する活性成分を含有している、治療的に使用するための経口組成物の調製の領域に関する。

【背景技術】

【0002】

相当数の胃腸系疾患が存在する。これらの疾患を処置するためには、疾患の部位において直接作用する利用可能な組成物を有し得ることが望ましい。

【0003】

10

20

30

40

50

そのためには、直腸組成物を開発することが可能であるが、経口組成物の方が、患者に好まれ、処置に対するよりよい遵守を可能にする。さらに、（胃腸系に限局していない）全身性疾患を処置するためにも、医療従事者の関与を必要とし得る他の投与モード（具体的には、注射）より、可能な限り、経口投与が好ましい。

【0004】

疾患が何であれ、一般に、医薬が活性を及ぼす治療的に関心対象の標的が存在する。これは、細胞受容体または微生物の表面タンパク質であり得る。一般に、作用の部位において直接、治療的に関心対象の標的に対して作用する活性成分の適用を可能にする組成物を有することが望ましいと考えられる。しかしながら、抗体のようないくつかのタンパク質は、胃を通過する時に分解される。

【0005】

出願WO 2007/139397（特許文献1）は、タンパク質の天然リガンドとの結合のためのOBドメインへ変異を導入することによってOBドメインが修飾されているOBフォールドタンパク質のライブラリーの使用を記載している。

【0006】

出願WO 2008/068637（特許文献2）は、関心対象の標的に対する親和性を有するリガンドを入手するための、Sac7dタンパク質に基づくライブラリーの使用を記載している。WO 2008/068637（特許文献2）に記載された方法は、この野生型OBフォールドタンパク質の結合部位のある種のアミノ酸における変異を示す野生型タンパク質のバリエーションの作製をもたらすある種のランダム変異の存在を除き、全てが同一の配列を有する複数のDNA分子を含有しているコンビナトリアルライブラリーの生成を含む。具体的には、WO 2008/068637（特許文献2）に関して、野生型OBフォールドタンパク質は、具体的には、K7、Y8、K9、K21、K22、W24、V26、M29、S31、T33、T40、R42、A44、S46より選択されるアミノ酸、またはV26、G27、K28、M29、S31、R42、A44、S46、E47、およびK48のようなその他のアミノ酸において、可変性を生成するための変異が導入される、Sac7dタンパク質である。これらのアミノ酸は、SEQ ID No.1によって表されるSac7d配列に基づく。

【0007】

特許出願WO 2012/150314（特許文献3）は、Sac7dファミリーのあるタンパク質から同一ファミリーのもう一つのタンパク質への変異のポータビリティを提示している。このポータビリティによって、具体的には、WO 2008/068637（特許文献2）の方法を実施することによって、入手することが可能である、Sac7dファミリーのあるタンパク質の変異体から、そのファミリーのもう一つのタンパク質の変異体が作出されることになる。

【0008】

Sac7dファミリーは、Sac7dファミリーに関係するものとして定義され、極限環境細菌から単離された7kDaのDNA結合タンパク質のファミリーに相当する。これらのタンパク質およびこのファミリーは、具体的には、WO 2008/068637（特許文献2）に記載されている。従って、本発明に関して、配列SEQ ID No.8に相当する配列を有する時、そのタンパク質はSac7dファミリーに属する。このファミリーには、具体的には、スルホロブス・アシドカルダリウス（*Sulfolobus acidocaldarius*）由来のSac7dタンパク質またはSac7eタンパク質、スルホロブス・ソルファタリカス（*Sulfolobus solfataricus*）由来のSso7dタンパク質、スルホロブス・トコダイー（*Sulfolobus tokodaii*）由来のDBP7タンパク質、スルホロブス・シバテ（*Sulfolobus shibatae*）由来のSsh7bタンパク質、スルホロブス・シバテ由来のSsh7aタンパク質、およびスルホロブス・ソルファタリカス由来のp7ssタンパク質が含まれる。

【0009】

OBフォールドタンパク質は、当技術分野において公知である。それらは、具体的には、前記引用の文献に記載され、Arcus（Curr Opin Struct Biol.2002 Dec;12(6):794-801）（非特許文献1）にも記載されている。OBフォールドは、5つのベータ（ β ）シートを有する円柱の形態をとっている。大部分のOBフォールドタンパク質が、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、タンパク質、金属イオン、または触媒基質であり得る天然リガンドの同一の結

10

20

30

40

50

合界面を使用する。この結合界面は、ベータシート内に位置する残基を主に含む。ループ内に位置するある種の残基も、OBフォールドタンパク質の天然リガンドとの結合に関与し得る。従って、出願WO 2007/139397（特許文献1）およびWO 2008/068637（特許文献2）、ならびにArcusの文献（2002、前記）は、天然リガンドとの結合のためのOBフォールドタンパク質ドメインを記載している。従って、文献WO 2008/068637（特許文献2）は、OBフォールドタンパク質の結合ドメインを同定する方法を正確に記載している。

【0010】

ウェブサイトWU-Blast2 (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html>) (Lopez et al., 2003, Nucleic Acids Res 31, 3795-3798 (非特許文献2))、T-COFFEE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) (Notredame et al., 2000, J Mol Biol 302, 205-217 (非特許文献3))、およびDALI lite (<http://www.ebi.ac.uk/DaliLite/>) (Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16, 566-567 (非特許文献4))を使用して、OBフォールドドメインを有するタンパク質のいくつかの配列および3D構造を重ね合わせることによって、修飾することができる結合ドメイン、具体的には、アミノ酸の位置を同定することが可能である。Sac7d (SEQ ID No.1) の配列を参照とすると、これらは、残基V2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E11、K13、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、Y34、D36、N37、G38、K39、T40、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50、およびP51である。さらに、このSac7d配列を参照として、欠失させることができる残基は、A59、R60、A61、E64、および/またはK66である。

【0011】

WO 2008/068637（特許文献2）に記載されるように、他のOBフォールドタンパク質の結合ドメインを同定することができる。この出願は、DALIウェブサイト (<http://www.ebi.ac.uk/dali/interactive.html>) (Holm and Sander, 1998, Nucleic Acids Res 26, 316-319 (非特許文献5))を使用して、OBフォールドタンパク質またはOBフォールドドメインの3D構造の重ね合わせを達成することが可能であることを示している（この出願においては、Sac7dを含む10個のドメインが使用された）。従って、任意のOBフォールドタンパク質（または任意のOBフォールドドメイン）について、結合部位に含まれておりかつ前記のSac7dアミノ酸に相当するアミノ酸を同定することは容易である。

【0012】

WO 2008/068637（特許文献2）の教示は、任意で、OBフォールドタンパク質、具体的には、Sac7dファミリーのタンパク質のループへアミノ酸を挿入することができること；具体的には、（WO 2008/068637（特許文献2）の図1bおよび2に定義される）ループ3、例えば、Sac7dの残基25～30の領域、好ましくは、残基27と28との間に1～15個のアミノ酸残基を挿入することができ、（WO 2008/068637（特許文献2）の図1bおよび2に定義される）ループ4、例えば、Sac7dの残基35～40の領域、好ましくは、残基37と38との間に1～15個のアミノ酸残基を挿入することができ、（WO 2008/068637（特許文献2）の図1bおよび2に定義される）ループ1、例えば、Sac7dの残基7～12の領域、好ましくは、残基9と10との間に1～20個の残基を挿入することができることも示している。

【0013】

拡張的に、本願に関して、「OBフォールドタンパク質」という用語には、天然OBフォールドタンパク質が含まれ、より複雑なタンパク質から単離され得るOBフォールドを有するドメインも含まれる。これらのOBフォールドドメインは、具体的には、出願WO 2007/139397（特許文献1）およびWO 2008/068637（特許文献2）に、より詳細に記載されている。この用語には、遺伝子工学によって、OBフォールドタンパク質またはOBフォールドを有するドメインを、関心対象のタンパク質またはドメイン、例えば、よりよい精製を可能にするタグと、N末端またはC末端の位置において融合させることによって入手され得るポリペプチドも含まれる。

【0014】

WO 2008/068637（特許文献2）に記載された方法の利点は、相当数のアミノ酸が「ランダム化されている」、即ち、ランダムなアミノ酸に交換されている複数のバリエーションを含

有しているかまたは発現しているコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって、OBフォールドタンパク質のバリエーションを入手することを可能にする点である。これらのライブラリーのスクリーニングは、コンビナトリアルライブラリーの生成元の野生型タンパク質の天然リガンド以外の関心対象の標的と、特異的に、一般に、強力な親和性で（出願WO 2008/068637（特許文献2）は、実際、1ナノモル程度の親和性を記載している）結合するこれらのタンパク質のバリエーションを同定することを可能にする。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】WO 2007/139397

10

【特許文献2】WO 2008/068637

【特許文献3】WO 2012/150314

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Arcus (Curr Opin Struct Biol.2002 Dec;12(6):794-801)

【非特許文献2】Lopez et al.,2003,Nucleic Acids Res 31,3795-3798

【非特許文献3】Notredame et al.,2000,J Mol Biol 302,205-217

【非特許文献4】Holm and Park,2000,Bioinformatics 16,566-567

【非特許文献5】Holm and Sander,1998,Nucleic Acids Res 26,316-319

20

【発明の概要】

【0017】

本発明者らは、OBフォールドタンパク質が、胃分解に対して十分に抵抗性であって、腸に残留するかまたは腸の関門を横断することができ、従って、様々な疾患、具体的には、腸に限局した疾患、または体循環の通過の後に身体の他の臓器の疾患の処置のために経口的に使用され得る組成物において使用され得ることを示した。好ましくは、病理学的状態、具体的には、胃腸系のもの、または全身性の病理学的状態（即ち、胃腸系以外の臓器に位置する病理学的状態）に関与している関心対象の標的に結合するOBフォールドタンパク質のバリエーションが使用される。

【0018】

従って、本発明は、OBフォールドタンパク質、または野生型OBフォールドタンパク質の天然リガンドとの結合の界面に5～32個の変異型残基を有する野生型OBフォールドタンパク質のバリエーションを含む、経口投与のための組成物に関する。

30

【発明を実施するための形態】

【0019】

一つの具体的な態様において、バリエーションは治療活性を示す。具体的には、バリエーションは、天然リガンドの標的以外の関心対象の標的に特異的に結合する。次いで、このバリエーションは、WO 2008/068637またはWO 2007/139397に記載されるような方法を実行することによって同定することができた。実際、これらの2件の特許出願に記載された方法の実行は、一般に、任意の関心対象の標的に結合する任意のOBフォールドタンパク質のバリエーションを同定することを可能にする。この組成物は、一般に、そのような経口投与のために使用され得る薬学的に許容される賦形剤も含有している。

40

【0020】

上記のように、野生型OBフォールドタンパク質には、OBフォールドドメインも包含される。好ましくは、本発明に関して使用されるバリエーションは、最大で300個のアミノ酸、好ましくは、最大で200個のアミノ酸、好ましくは、最大で175個のアミノ酸、より好ましくは、最大で150個のアミノ酸、より好ましくは、最大で100個のアミノ酸を含有している。一つの具体的な態様において、それは最大で80個または最大で70個のアミノ酸を含有している。

【0021】

（野生型タンパク質と比べた）バリエーション内の変異型残基の数は、5～32個である。他

50

の態様において、これらのバリエーションは、野生型OBフォールドタンパク質（またはドメイン）と比較して、好ましくは、少なくとも5個、より好ましくは、少なくとも8個、さらに好ましくは、少なくとも10個の置換されたアミノ酸未満を有するが、一般には、32個未満、より好ましくは、24個未満、さらに好ましくは、20個未満または15個未満の置換されたアミノ酸未満を有する。野生型タンパク質と比べて、8個、9個、10個、11個、12個、13個、または14個のアミノ酸が変異している時が好ましい。これらの変異型アミノ酸は、OBフォールドタンパク質の天然リガンドとの結合の部位に位置している。それらは、一般に、この結合ドメインの全体に分布している。この結合ドメインの構造のため、ある種の変異型残基は、（一般に、いくつかの、具体的には、2つまたは3つの）ベータシートに見出される。

10

【0022】

一つの具体的な態様において、これらのバリエーションは、OBフォールドのベータシートを連結するループにアミノ酸挿入を含んでいてもよい。従って、1～15個のアミノ酸が、ループ1および/またはループ4および/またはループ3へ導入されていてもよい（ループは、WO 2008/068637と同様に番号付けられる）。

【0023】

一つの具体的な態様において、野生型OBフォールドタンパク質は、スルホロブス・アシドカルダリウス由来のSac7dまたはSac7e、スルホロブス・ソルファタリカス由来のSso7d、スルホロブス・トコダイー由来のDBP7、スルホロブス・シバテ由来のSsh7b、スルホロブス・シバテ由来のSsh7a、およびスルホロブス・ソルファタリカス由来のp7ssより選択される。

20

【0024】

従って、それは、本発明の経口投与組成物において使用されるバリエーションが比較されるタンパク質である。

【0025】

Sac7dタンパク質、Sso7dタンパク質、Sac7eタンパク質、Ssh7bタンパク質、Ssh7aタンパク質、DBP7タンパク質、およびSis7タンパク質の様々な配列は、それぞれ、SEQ ID No. 1～SEQ ID No.7によって表される。

【0026】

このSac7dファミリーのタンパク質のバリエーションは、ナノフィチン（nanofitin）と呼ばれる。従って、本発明は、優先的には、SEQ ID No.1～SEQ ID No.7によって表されるタンパク質のバリエーション、具体的には、Sac7dのバリエーションに対して実行される。

30

【0027】

液体組成物の場合、本発明による組成物におけるバリエーションの濃度は、一般に、10ng/mlより高く、600mg/ml未満である。従って、それは、一般に、500mg/ml未満、好ましくは、250mg/ml未満、好ましくは、100mg/ml未満または50mg/ml未満またはさらには10mg/ml未満である。それは、一般に、10ng/mlより高く、好ましくは、50ng/mlより高く、好ましくは、100ng/mlより高い。

【0028】

濃度は、5～20mlの摂取のため、患者に投与されることが望まれる用量に調整される。

40

【0029】

固体組成物の場合、用量は、患者が治療的観点から有効である用量を入手するため、摂取するであろう錠剤（またはロゼンジ剤等）の数によって調整される。

【0030】

一般に、（具体的には、疾患の性質、標的とされる抗原、任意で、この抗原に対するOBフォールドタンパク質のバリエーションの親和性、患者の体重、病理学的状態のための他の医薬と組み合わせて使用されるか否かに依るであろう）極めて可変性の量が、患者へ投与される。従って、範囲は、一般に、10mg/kg～200mg/kgまたはさらには400mg/kgのOBフォールドタンパク質バリエーションの1回または複数回の摂取になるであろう。しかしながら、前述のように、これらの限度値は指標に過ぎず、より多いかまたはより少ない生成物を投与

50

するための組成物を調製することも可能である。

【0031】

本発明による組成物に存在するバリエーションは、関心対象の標的に特異的に結合する。実際、それは、この関心対象の標的との特異的な結合のため、WO 2008/068637またはWO 2007/139397に記載されたような方法によって選択されたものであり得る。さらに、これらの特許出願に記載された方法は、1マイクロモル（WO 2007/139397）または1ナノモル（WO 2008/068637）程度の親和性を入手することを可能にする。

【0032】

関心対象の標的は、処置することが望まれる疾患によって選択される。従って、任意の抗原、抗体、細胞タンパク質、循環血中タンパク質、またはペプチドを挙げることができる。医薬の活性成分または特定の核酸を標的とすることも可能である。具体的には、関心対象の標的は、インターロイキン、サイトカイン、サイトカインもしくはインターロイキンの受容体、癌遺伝子によってコードされたタンパク質、微生物の表面タンパク質、または微生物リポ多糖であることが企図される。

【0033】

本発明による組成物は、当技術分野において公知の任意の形態をとってよい。具体的には、それは、ゲルカプセル剤、錠剤（フィルムコーティングされているかまたはされていない）、丸剤、またはロゼンジ剤の形態をとっている。もう一つの態様において、それは、シロップ剤のような液体組成物の形態をとっている。それは、固体の形態をとっていてもよい。

【0034】

組成物が固体の形態をとっている場合、タルク（E553b）、結晶セルロース、乳糖、デンプン（具体的には、コーンスターチ）、ステアリン酸マグネシウム（E572）、ステアリン酸（E570）、または結晶セルロースのような、当技術分野において公知の任意の賦形剤を使用することができる。組成物がフィルムコーティング錠の形態をとっている時、フィルムコーティングは、ヒプロメロース（E464）、エチルセルロース、マクロゴール、タルク（E553b）、二酸化チタン（E171）、または酸化鉄（E172）のような、当技術分野において公知の任意の物質から形成されていてよい。

【0035】

組成物は徐放型であってもよい。そのような放出制御型または徐放型の製剤は、具体的には、WO 2011/077239に記載されている。従って、これらの組成物は、OBフォールドタンパク質（天然またはバリエーション）が存在するマトリックスを、任意で、他の成分と共に、含んでいてよい。これらのマトリックスは、OBフォールドタンパク質の一部の即時放出を可能にした後、これらのタンパク質の別の部分の徐放を可能にするようなものであり得る。

【0036】

固体の形態をとっている経口組成物において、タンパク質は、凍結乾燥されていてよいし、またはWO 98/043615に記載されるようなマトリックスへ組み込まれていてよい。

【0037】

しかしながら、OBフォールドタンパク質バリエーションは、具体的には、OBフォールドタンパク質がSac7dファミリーのもの（SEQ ID No.1～SEQ ID No.7）である時、胃分解に対して抵抗性であって、従って、腸において、またはさらには体循環において、効果を発揮することができることを、実施例が明白に示していることに、注目すべきである。従って、経口投与組成物の要素が、これらのタンパク質の防御を改善することを可能にし得たとしても、これは、付加的なものに過ぎず、技術的效果を生じるために不可欠な要素ではないことが明らかである。

【0038】

組成物が液体の形態をとっている時、タンパク質は一般に溶液中に直接存在する。

【0039】

一般に、PBS（リン酸緩衝生理食塩水、塩化ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸

10

20

30

40

50

一カリウム、および少量の塩化カリウムを含有している生理学的溶質)、TBS(トリス緩衝生理食塩水)、(具体的には、100mMクエン酸一ナトリウムによって作製される)クエン酸緩衝液、またはHEPES(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸、生理学的pHにおいて優れた安定性を有する緩衝液である双性イオン性有機化合物)が使用される。

【0040】

pHが4~6に調整されるクエン酸緩衝液を除き、緩衝液は、優先的にはpH7.4である。

【0041】

しかしながら、他の型の緩衝液を、経口液体組成物の調製のために使用することも可能である。

【0042】

当然、これらの緩衝液は、患者への投与を可能にする条件(追跡可能性、優良製造規範等)の下で調製されることが好ましい。

【0043】

本発明による組成物において使用されるOBフォールドタンパク質のバリエーションは、固相化学合成または遺伝子組換えによって作製され得る。化学合成は、例えば、Applied Biosystemsの自動ペプチド合成機(モデル433A)を用いて、またはアミノ酸のαアミノ官能の一時的保護のためにフルオレニルメチルオキシカルボニル基を使用するFmoc化学によって実施され得る。

【0044】

しかしながら、遺伝子工学によって、具体的には、ポリペプチドをコードする核酸配列を発現ベクターへ組み込むことによって、本発明に関して使用され得るバリエーションを作製することが好ましい。次いで、この発現ベクターが、宿主細胞(大腸菌(*Escherichia coli*))のような細菌が具体的には適当である)へ導入され、それが、ポリペプチドの合成を可能にする培養条件の下で培養される(具体的には、発現ベクターにおいてポリペプチドの上流に誘導可能プロモーターが使用され得る)。次いで、合成されたポリペプチドが回収される。次いで、任意の型の分子が、ポリペプチドのN末端またはC末端の位置において移植され得る。

【0045】

当業者は、具体的には、Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd editionによって書籍に記載されている、ポリペプチドを作製する方法を承知している。

【0046】

本発明による組成物は、OBフォールドタンパク質のバリエーションを、単独で含有していてもよいし、または他の活性成分と共に含有していてもよい。従って、組成物は、抗菌剤、抗寄生虫剤、抗真菌剤、抗炎症剤、鎮痒剤、麻酔剤、抗ウイルス剤、角質溶解剤、およびフリーラジカル消去剤より選択される少なくとも1種の剤を含有していてもよい。

【0047】

この組成物は、具体的には、pHがpH=7付近に制御されることを可能にするため、pH制御剤を有していてもよい。

【0048】

OBフォールドタンパク質のバリエーションを、具体的には、半減期を増加させるため、活性タンパク質またはその他の化合物と融合させることもできる。

【0049】

本発明による組成物は、診断法において使用されてもよい。従って、一つの具体的な態様において、OBフォールドタンパク質のバリエーションは、検出剤またはコントラスト剤、トレーサーまたは金属と結合される。これは、具体的には、この検出剤(コントラスト剤、トレーサー、金属)を追跡し、OBフォールドタンパク質のバリエーションが結合する臓器を決定する(それによって、関心対象の標的の存在を示す)ことを可能にする。従って、本発明は、検出可能トレーサーと結合した、抗原に結合するOBフォールドタンパク質バリエーション

10

20

30

40

50

トを含む前記の経口組成物を投与する工程を含む、臓器、具体的には、胃腸系における特定の抗原の存在を検出する方法に関する（具体的には、トレーサーによって放射された放射線放射、または金属、またはコントラスト剤の検出）。この方法は、ヒト体内のトレーサーの存在を検出する工程、およびこのトレーサーが検出される臓器を突き止める工程も含んでいてよく、このトレーサーが検出される臓器に抗原が存在すると結論付けることを可能にする。臓器における抗原の存在に関するこの結論は、具体的には、抗原がこの病理学的状態のマーカーである場合、特定の病理学的状態の存在に関する結論に到達することを可能にするため、この診断法における結論に到達するために重要である。最も一般的なトレーサーは、フッ素18 (^{18}F) のような（2時間未満の半減期を有する）同位体、または ^{15}O 、 ^{13}N 、および ^{11}C のようなその他の放射性元素である。

10

【0050】

本発明は、野生型OBフォールドタンパク質のバリエントを薬学的に許容される経口投与賦形剤と混合する工程を含む、経口投与組成物を調製する方法にも関する。

【0051】

本発明は、医薬としての、野生型OBフォールドタンパク質の天然リガンドとの結合の界面に5~32個の変異型残基を有する野生型OBフォールドタンパク質のバリエントを含有している本発明による経口投与組成物にも関する。この具体的なケースにおいて、バリエントは、治療標的である関心対象の標的に特異的に結合する。

【0052】

本発明は、全身性の疾患もしくは障害、または、より具体的に、胃腸系の疾患もしくは障害を処置するための、本発明による経口投与組成物にも関する。この態様において、使用されるOBフォールドタンパク質バリエントは、企図された疾患の病因またはこの疾患に関連した治療標的を標的とする（に結合する）。

20

【0053】

胃腸系疾患は、具体的には、アメーバ症、結腸直腸癌、胃十二指腸癌、食道癌、炎症性腸疾患（IBD）、膵臓癌、コレラ、肝炎、および肝硬変（具体的には、B型ウイルスまたはC型ウイルスによって引き起こされる肝硬変）、大腸炎（具体的には、クロストリジウム（*Clostridium*）によるもの）、下痢（具体的には、細菌性下痢（具体的には、シゲラ（*Shigella*）、カンピロバクター（*Campylobacter*）、サルモネラ（*Salmonella*）、仮性結核菌（*Yersinia pseudotuberculosis*）、およびエンテロコリチカ菌（*Yersinia enterocolitica*））またはウイルス性下痢（具体的には、パルボウイルスおよびレオウイルス、ロタウイルス（レオ様ウイルス）、エンテロウイルス、アストロウイルス、コロナ様ウイルスによって引き起こされるもの）、成人におけるセリアック病、ウィップル病、膵炎、過敏性腸症候群、腹部腫瘍、肝臓腫瘍、十二指腸または胃の潰瘍、腸内寄生虫、ゾリンジャー・エリソン症候群より選択される疾患である。

30

【0054】

全身性疾患とは、胃腸系以外の臓器に位置する疾患である。

【0055】

従って、この態様において、処置することが望まれる疾患または障害に関与している治療標的（病因またはエフェクター）に結合するOBフォールドタンパク質のバリエントが、具体的には、WO 2008/068637に記載されたスクリーニング法によって選択され、このバリエントが、経口投与組成物に製剤化される。

40

【0056】

本発明は、好ましくは、疾患または障害に特徴的な病因または治療標的を標的とする（に結合する）治療的に有効な量のOBフォールドタンパク質を含有している本発明による組成物が経口投与されることを特徴とする、全身性の疾患もしくは障害、または、より具体的に、胃腸系の疾患もしくは障害を処置する方法にも関する。

【実施例】

【0057】

全ての実施例において、前記定義のようなナノフィチン、即ち、WO 2008/068637に記載

50

された方法に類似した方法に従って、コンビナトリアルライブラリーを関心対象の標的に対してスクリーニングすることによって入手されるSac7dバリエーションが、使用される。これらの実施例の目的は、OBフォールドタンパク質、具体的には、ナノフィチンが、胃における分解に対して抵抗することができ、作用が必要とされる胃腸系の部位（例えば、腸）において直接効果を及ぼすことができることを証明することである。

【0058】

実施例1：経口投与されたナノフィチンの効力試験

胃腸系疾患（腸の炎症）に関与している関心対象の標的に対する親和性についてのSac7dバリエーションのライブラリーのスクリーニングから得られた3種のナノフィチンA1、A2、A3を試験した。これらのナノフィチンを、ポリヒスチジンタグとの融合物の形態で、または融合なし（タグなし）で、細菌系において作製した。

10

【0059】

ナノフィチンをPBS（リン酸緩衝生理食塩水）に懸濁させた。

【0060】

ScheiffeleおよびFuss（Curr Protoc Immunol.2002 Aug;Chapter 15:Unit 15.19）に記載されたような、TNBS（2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸）によって誘導される腸炎症（大腸炎）のマウスモデルにおいて、TNBSによる誘導の5日前からの1日1回のナノフィチンの適用および2日後のマウスの屠殺による予防モード、またはTNBSによる誘導の日からの1日1回のナノフィチンの適用および4日後のマウスの屠殺による治療モードのいずれかで、これらのナノフィチンを試験した。

20

【0061】

ナノフィチンの効果を、巨視的および組織学的に評価した。巨視的評価については、Wallace基準に従って病変を評価するため、解剖顕微鏡（5倍）下で、結腸を調査した。Wallaceスコアは、充血ならびに潰瘍形成の数および程度のような炎症を反映する基準に基づく0~10のスケール（0は炎症なしに相当し、10は悪化した炎症に相当する）で、巨視的病変を評価する（Pierre Desreumaux,2001,J Exp Med.,193,827-838）。組織学的評価については、肛門管の2cm上に位置する結腸の切片を切り出し、次いで、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、パラフィンで包埋した。ヘマトキシロンおよびエオシンによって染色された切片を、盲検的に調査し、Ameho基準に従って評価した。Amehoスコアは、細胞浸潤ならびに病変の深さおよび表面上の拡張のような炎症を反映する基準に基づく0~6のスケール（0は炎症なしに相当し、6は悪化した炎症に相当する）で、病変を評価する（Pierre Desreumaux,2001,J Exp Med.,193,827-838）。2つのケースにおいて、結果を、未処置の誘導マウスの全体スコアと比べたスコアの減少（%）を反映する効力（%）に変換した。

30

【0062】

最適用量で使用された、腸抗炎症剤として市販されている参照分子、Pentasa（登録商標）（5-アミノサリチル酸）を、対照として使用した。投薬量および投与ルートは、ナノフィチンに適用されたものと厳密に同一ではなく、結果は、比較より、参照によって示される。

【0063】

直腸投与（30mM）によって予防的に適用された時、Pentasa（登録商標）は、37%（巨視的レベル）および29%（組織学的レベル）の効力を与える。

40

【0064】

治療モデル（飼料中の自由摂取）で適用された時、Pentasa（登録商標）は、59%（巨視的レベル）および39%（組織学的レベル）の効力を与える。

【0065】

（表1）腸炎症モデルにおいて得られた結果（効力（%））

			A1		A2		A3		A3 タグなし	
予防 / 治療		用量 (mg/kg)	M	H	M	H	M	H	M	H
A3	予防	10					27,8	33,6		
		100					18,2	28,1		
		400					48,6	45,1		

10

A3 タグなし	予防	10							32	26
		100							65	75
		400					54	61	56	70

治療モデル における 効力	治療	100	32	43	26	30	37	43		

20

M：巨視的レベルにおける効力

H：組織学的レベルにおける効力

【0066】

これらの結果は、ナノフィチンが、経口投与後に腸に位置する標的に対して直接作用し得ること、分解されることなく胃を有効に通過すること、参照生成物と比較可能な効力のレベルを示すことを示している。

【配列表】

2017534620000001.app

30

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/074644

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/16 A61K9/00 A61K49/00 C07K14/195 A61P1/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2014/173899 A1 (AFFILOGIC [FR]) 30 October 2014 (2014-10-30) voir revendications et exemples -----	1-3,5,6, 8
Y	WO 2008/068637 A2 (PASTEUR INSTITUT [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; PECORARI FREDERIC) 12 June 2008 (2008-06-12) cited in the application voir revendications et exemples -----	9
Y	WO 2012/150314 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV NANTES [FR]; PECORARI FREDERIC [FR];) 8 November 2012 (2012-11-08) cited in the application voir revendications et exemples ----- -/--	9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2015

Date of mailing of the international search report

07/01/2016

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Merckling-Ruiz, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/074644

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NIMISH GERA ET AL: "Highly Stable Binding Proteins Derived from the Hyperthermophilic Sso7d Scaffold", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 409, no. 4, 8 April 2011 (2011-04-08), pages 601-616, XP028221838, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2011.04.020 [retrieved on 2011-04-16] voir abrégé et page 611 col.1 dernier paragraphe-col.2 premier paragraphe -----	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/074644

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014173899 A1	30-10-2014	FR 3004650 A1 WO 2014173899 A1	24-10-2014 30-10-2014
WO 2008068637 A2	12-06-2008	AT 542830 T AU 2007330409 A1 CA 2671553 A1 CN 101652386 A CN 103145812 A DK 2099817 T3 EP 1930342 A1 EP 2099817 A2 EP 2570424 A1 ES 2536509 T3 HK 1117548 A1 HK 1141304 A1 JP 2010511691 A JP 2014169304 A US 2010145008 A1 WO 2008068637 A2	15-02-2012 12-06-2008 12-06-2008 17-02-2010 12-06-2013 18-05-2015 11-06-2008 16-09-2009 20-03-2013 26-05-2015 06-07-2012 20-12-2013 15-04-2010 18-09-2014 10-06-2010 12-06-2008
WO 2012150314 A1	08-11-2012	FR 2974816 A1 WO 2012150314 A1	09-11-2012 08-11-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2015/074644

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K38/16 A61K9/00 A61K49/00 C07K14/195 A61P1/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K C07K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	WO 2014/173899 A1 (AFFILOGIC [FR]) 30 octobre 2014 (2014-10-30) voir revendications et exemples -----	1-3,5,6, 8
Y	WO 2008/068637 A2 (PASTEUR INSTITUT [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; PECORARI FREDERIC) 12 juin 2008 (2008-06-12) cité dans la demande voir revendications et exemples -----	9
Y	WO 2012/150314 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV NANTES [FR]; PECORARI FREDERIC [FR];) 8 novembre 2012 (2012-11-08) cité dans la demande voir revendications et exemples ----- -/-	9
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
21 décembre 2015		07/01/2016
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Merckling-Ruiz, V

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2015/074644

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NIMISH GERA ET AL: "Highly Stable Binding Proteins Derived from the Hyperthermophilic Sso7d Scaffold", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 409, no. 4, 8 avril 2011 (2011-04-08), pages 601-616, XP028221838, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2011.04.020 [extrait le 2011-04-16] voir abrégé et page 611 col.1 dernier paragraphe-col.2 premier paragraphe -----	9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2015/074644

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2014173899 A1	30-10-2014	FR 3004650 A1 WO 2014173899 A1	24-10-2014 30-10-2014
WO 2008068637 A2	12-06-2008	AT 542830 T AU 2007330409 A1 CA 2671553 A1 CN 101652386 A CN 103145812 A DK 2099817 T3 EP 1930342 A1 EP 2099817 A2 EP 2570424 A1 ES 2536509 T3 HK 1117548 A1 HK 1141304 A1 JP 2010511691 A JP 2014169304 A US 2010145008 A1 WO 2008068637 A2	15-02-2012 12-06-2008 12-06-2008 17-02-2010 12-06-2013 18-05-2015 11-06-2008 16-09-2009 20-03-2013 26-05-2015 06-07-2012 20-12-2013 15-04-2010 18-09-2014 10-06-2010 12-06-2008
WO 2012150314 A1	08-11-2012	FR 2974816 A1 WO 2012150314 A1	09-11-2012 08-11-2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/566
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A
C 0 7 K	14/175	(2006.01)	C 0 7 K	14/175

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(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 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(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 キッテン オリビエ
フランス共和国 44 200 ナント リュ ラ ノウェ ブラス ドゥ フェール 21 バ
イオ ウエスト アフィロジック内

Fターム(参考) 4C076 AA36 AA53 AA95 BB01 CC16 EE41 EE59
4C084 AA02 BA44 DA01 DA12 MA35 MA37 MA52 NA13 ZA661
4H045 AA10 AA30 BA20 CA11 EA20 EA25 FA74