

(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2007-533728****(P2007-533728A)**

(43) 公表日 平成19年11月22日(2007.11.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 35/20 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/20	4 C O 8 7
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12	
<b>A 6 1 P 31/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2007-509007 (P2007-509007)	(71) 出願人	506291863
(86) (22) 出願日	平成17年4月20日 (2005. 4. 20)		ハムレット・ファルマ・アーバー
(85) 翻訳文提出日	平成18年12月11日 (2006. 12. 11)		スウェーデン国S-222 22ルンド.
(86) 国際出願番号	PCT/IB2005/001255		リラフィスカーレガータン10
(87) 国際公開番号	W02005/102382	(74) 代理人	100091731
(87) 国際公開日	平成17年11月3日 (2005. 11. 3)		弁理士 高木 千嘉
(31) 優先権主張番号	0408752.4	(74) 代理人	100127926
(32) 優先日	平成16年4月20日 (2004. 4. 20)		弁理士 結田 純次
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス感染を治療するためのH A M L E T (腫瘍細胞に致死的なヒトアルファ-ラクトアルブミン) の使用

## (57) 【要約】

ウイルス感染の治療に使用するための医薬品の製造における、H A M L E T (腫瘍細胞に致死的なヒト - ラクトアルブミン)、もしくはそれらの生物学的に活性な変異体、またはこれらのうちいずれかの生物学的に活性なフラグメントから選択される、 - ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体の使用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ウイルス感染の治療に使用するための医薬品の製造における、H A M L E T またはそれらの生物学的に活性な改変体、またはこれらのうちいずれかの生物学的に活性なフラグメントから選択される - ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体の使用。

## 【請求項 2】

ウイルス感染は、気道、胃腸のウイルス、免疫不全ウイルス、および脳またはその他の内部器官のウイルスの感染である、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 3】

生物学的に活性な複合体は、アポフォールディング状態である - ラクトアルブミンまたは - ラクトアルブミンの変異体、またはこれらのうちいずれかのフラグメント、および該複合体を生物学的に活性な形態に安定化する補因子を含み、ただし、 - ラクトアルブミンまたはそれらの変異体のいずれのフラグメントも、 - ラクトアルブミンのドメインとドメインとの境界を形成する領域に相当する領域を含む、請求項 1 または 2 に記載の使用。 10

## 【請求項 4】

補因子は、シス C 1 8 : 1 : 9 または C 1 8 : 1 : 1 1 脂肪酸、または類似の立体配置を有する異なる脂肪酸である、請求項 3 に記載の使用。

## 【請求項 5】

生物学的に活性な複合体は、H A M L E T を含み、該 H A M L E T は、p H 4 . 6 で沈殿した乳汁のカゼイン分画から単離すること、陰イオン交換とゲルクロマトグラフィーとの組み合わせ、または - ラクトアルブミンを、C 1 8 : 1 脂肪酸を特徴とするヒトミルクカゼイン由来の補因子の存在下で、イオン交換クロマトグラフィーで処理することのいずれかによって入手可能である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。 20

## 【請求項 6】

- ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体は、

( i ) シス C 1 8 : 1 : 9 または C 1 8 : 1 : 1 1 脂肪酸、または類似の立体配置を有する異なる脂肪酸；および

( ii ) カルシウムイオンが除去されている - ラクトアルブミン、またはカルシウムイオンが除去されているか、もしくは機能的なカルシウム結合部位を有さない - ラクトアルブミンの変異体；またはこれらのうちいずれかのフラグメント（ただし、いずれのフラグメントも、 - ラクトアルブミンのドメインとドメインとの境界を形成する領域に相当する領域を含む）、を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。 30

## 【請求項 7】

生物学的に活性な複合体は、カルシウムへの親和性が減少するか、または機能しなくなるように、カルシウム結合部位が改変されている - ラクトアルブミンの変異体を含む、請求項 6 に記載の使用。

## 【請求項 8】

変異体は、ウシ - ラクトアルブミンの K 7 9、D 8 2、D 8 4、D 8 7 および D 8 8 に相当するアミノ酸のいずれか 1 ヶ所に突然変異を有する、請求項 7 に記載の使用。 40

## 【請求項 9】

改変は D 8 7 にあり、D 8 7 A または D 8 7 N 変異を有する - ラクトアルブミンの変異体を含む、請求項 8 に記載の使用。

## 【請求項 10】

生物学的に活性な複合体は、 - ラクトアルブミンまたはそれらの変異体のフラグメントを含み、ここにおいて、該フラグメントは、天然型タンパク質のアミノ酸 3 4 ~ 8 6 の全領域を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 11】

- ラクトアルブミンは、ヒトまたはウシ - ラクトアルブミン、またはこれらのうち 50

いずれかの変異体である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 12】

- ラクトアルブミンは、ヒト - ラクトアルブミンである、請求項 11 に記載の使用

。

【請求項 13】

- ラクトアルブミンは、S70R 突然変異を含む突然変異ウシ - ラクトアルブミンである、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 14】

HAMLET またはそれらの生物学的に活性な改変体、またはこれらのうちいずれかの生物学的に活性なフラグメントから選択される - ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体を、それを必要とする患者に投与することを含む、ウイルス感染を治療する方法。 10

【請求項 15】

粘膜表面におけるウイルス感染を治療するためであり、それを必要とする患者の該表面に、HAMLET またはそれらの生物学的に活性な改変体、またはこれらのうちいずれかの生物学的に活性なフラグメントから選択される - ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体を投与することを含む、請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルス感染の治療方法、およびウイルス感染を治療するための医薬品の製造における生物学的に活性な複合体の使用に関する。 20

【背景技術】

【0002】

HAMLET (腫瘍細胞に致死的なヒト - ラクトアルブミン) (以前はMALとして知られていた) は、アルファ - ラクトアルブミン (また、 - ラクトアルブミンとも記載される) の活性なフォールディング変異体であり、これは、形質転換細胞においてアポトーシスを誘導するが健康な分化細胞には影響を与えない (M. Svensson 等 (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 4221 ~ 6)。HAMLET は、腫瘍細胞の表面に結合して、細胞質に転移して細胞核中に蓄積し、そこでDNA断片化を引き起こすことが示されている (M. Svensson 等 (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 4221 ~ 6)。例えばEP - 0776214では、乳汁 (特にヒトの乳汁) から得られたこのタイプの生物学的に活性な複合体が、それらの抗菌剤としての使用と共に説明されている。 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

これまで、HAMLETを用いて報告されている研究で、形質転換細胞はインビトロでHAMLETの作用を受けやすいことが示されており、これは、HAMLETがガン治療への適用を有することを示唆する (例えば、C. Svanborg 等, Advances in Cancer Research, United States, 2003, 88, 1 ~ 29を参照)。また、抗菌作用を有し、特に、インビトロで試験した場合、ヒト気道上皮細胞への肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) やインフルエンザ菌 (H. influenzae) の付着を阻害することも見出されている (WO96/04929)。それとは逆に、ある種のウイルス、例えばアデノウイルスのいくつかのタイプは、インビトロで特定の細菌の付着を強化するようである (A. Hakansson 等, Infection and Immunity, (1994) 第62巻, 7: 2707 ~ 2714)。 40

【課題を解決するための手段】

【0004】

本出願人は、HAMLETおよびこのタイプの複合体をウイルス感染の治療で用いると 50

、意外なことに優れた結果が得られることを見出した。

【0005】

本発明によれば、ウイルス感染の治療に使用するための医薬品の製造における、H A M L E Tまたはそれらの生物学的に活性な改変体、またはこれらのうちいずれかの生物学的に活性なフラグメントから選択される - ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体の使用が提供される。

【0006】

H A M L E Tまたはそれらの生物学的に活性な改変体の作用は、特定の細胞型を標的とし、このような細胞型には、これまで報告されている腫瘍細胞に加えて、ウイルスに感染した細胞も含まれるようである。

10

【0007】

それゆえに、これらの複合体は、ウイルス感染の治療への適用を有すると予想される。所定時間で処理すると、H A M L E Tは、レトロウイルスのようなウイルスを含む細胞を、ウイルスが複製する機会を持つ前に死に至らしめる。結果として、ウイルスの蔓延が抑制される。

【0008】

この方法で、ヒトおよび獣医学系ウイルスの両方を含む多様なウイルスを処理することが可能である。このようなウイルスの一覧を以下に示す。

【0009】

1. マストアデノウイルス属、基準種 (Type species) : ヒトアデノウイルス 2、およびアピアデノウイルス属、基準種 : トリアデノウイルス 1 およびアフリカ豚コレラ様ウイルスを含むアデノウイルス科。

20

2. アレナウイルス属、基準種 : リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、およびアルテリウイルス属、基準種 : ウマ動脈炎ウイルスを含むアレナウイルス科。

3. アストロウイルス属、基準種 : ヒトアストロウイルス 1 を含むアストロウイルス科。

4. クアビルナウイルス属、基準種 : 伝染性脾臓壊死ウイルス、およびトリビルナウイルス属、基準種 : 伝染性ファブリキウス囊病ウイルスを含むビルナウイルス科。

5. ブニヤウイルス属、基準種 : ブニヤンペラウイルス、ハンタウイルス属、基準種 : ハンターウイルス、ナイロウイルス属、基準種 : ナイロビヒツジ病ウイルス、およびフレボウイルス属、基準種 : サシチョウバエ熱シシリアンウイルスを含むブニヤウイルス科。

30

6. カリシウイルス属、基準種 : ブタ水疱疹ウイルスを含むカリシウイルス科。

7. サーコウイルス属、基準種 : ニワトリ貧血ウイルスを含むサーコウイルス科。

8. コロナウイルス属、基準種 : 鶏伝染性気管支炎ウイルス、トロウイルス属、基準種 : ベルンウイルス ( B e r n e v i r u s )、およびデルタウイルス属、基準種 : 肝炎デルタウイルスを含むコロナウイルス科。

9. フィロウイルス科、例えば、フィロウイルス属、基準種 : マールブルグウイルスを含むモノネガウイルス目。

10. フラビウイルス属、基準種 : 黄熱病ウイルス、ペスチウイルス属、基準種 : ウシ下痢ウイルス、および「C型肝炎様ウイルス」属、基準種 : C型肝炎ウイルスを含むフラビウイルス科。

40

【0010】

11. オルソヘパドナウイルス属、基準種 : B型肝炎ウイルス、およびトリヘパドナウイルス属、基準種 : アヒルB型肝炎ウイルスを含むヘパドナウイルス科。

12. アルファヘルペスウイルス、例えば、シンプレックスウイルス属、基準種 : ヒトヘルペスウイルス 1、ワリセロウイルス属、基準種 : ヒトヘルペスウイルス 3 ; およびそのベータヘルペスウイルス亜科、例えば、サイトメガロウイルス属、基準種 : ヒトヘルペスウイルス 5、ムロメガロウイルス ( M u r o m e g a l o v i r u s ) 属、基準種 : マウスサイトメガロウイルス 1、ロゼオロウイルス属、基準種 : ヒトヘルペスウイルス 6、

50

さらに、ガンマヘルペスウイルス亜科、例えば、リンホクリプトウイルス属、基準種：ヒトヘルペスウイルス4、およびラジノウイルス (*Rhadinovirus*) 属、基準種：アテライン (*ateline*) ヘルペスウイルス2を含むヘルペスウイルス科とその亜科。

13. ラナウイルス属、基準種：カエルウイルス3、リンホシスティウイルス属、基準種：フラウンダーウイルス (*flounder virus*)、および、「キンギョウイルス (*Goldfish virus*) 様のウイルス」属、基準種：キンギョウイルス1を含むイリドウイルス科。

14. フィロウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科を含むモノネガウイルス目。

15. インフルエンザウイルスA、B属、基準種：インフルエンザAウイルス、インフルエンザウイルスC属、基準種：インフルエンザCウイルス、および「トゴト様ウイルス」属、基準種：トゴトウイルスを含むオルソミクソウイルス科。

#### 【0011】

16. ポリオーマウイルス属、基準種：マウスポリオーマウイルス、およびパピローマウイルス属、基準種：ワタオノウサギ乳頭腫ウイルス (*cottontail rabbit papillomavirus*) (ショープ) を含むパポバウイルス科。

17. パラミクソウイルス科、およびそのパラミクソウイルス亜科、例えば、パラミクソウイルス属、基準種：ヒトパラインフルエンザウイルス1、麻疹ウイルス属、基準種：麻疹ウイルス、ルブラウイルス属、基準種：流行性耳下腺炎ウイルス；およびニューモウイルス亜科、例えば、ニューモウイルス属、基準種：ヒト呼吸器合胞体ウイルスを含むモノネガウイルス目。

18. パルボウイルス亜科、例えば、パルボウイルス属、基準種：マウス微小ウイルス、エリスロウイルス属、基準種：B19ウイルス、およびディペンドウイルス属、基準種：アデノ随伴ウイルス2を含むパルボウイルス科。

19. エンテロウイルス属、基準種：ポリオウイルス1、ライノウイルス属、基準種：ヒトライノウイルス1A、ヘパトウイルス属、基準種：A型肝炎ウイルス、カルジオウイルス属、基準種：脳心筋炎ウイルス、およびアフタウイルス属、基準種：口蹄疫ウイルスOを含むピコルナウイルス科。

20. コードボックスウイルス亜科、例えば、オルソボックスウイルス属、基準種：ワクシニアウイルス、パラボックスウイルス属、基準種：オルフウイルス、アピボックスウイルス属、基準種：鶏痘ウイルス、カプリボックスウイルス属、基準種：ヒツジ痘ウイルス、レボリボックスウイルス属、基準種：粘液腫ウイルス、スイボックスウイルス属、基準種：豚痘ウイルス、モラシボックスウイルス属、基準種：伝染性軟属腫ウイルス (*Molluscum contagiosum virus*)、およびヤタボックスウイルス属、基準種：ヤバサル腫瘍ウイルスを含むボックスウイルス科。

#### 【0012】

21. オルトレオウイルス属、基準種：レオウイルス3、オルピウイルス属、基準種：ブルータングウイルス1、ロタウイルス属、基準種：サルロタウイルスSA11、コルティウイルス属、基準種：コロラドダニ熱ウイルス、およびアクアレオウイルス属、基準種：ゴールデン・シャイナー・ウイルス (*golden shiner virus*) を含むレオウイルス科。

22. 「哺乳動物タイプBレトロウイルス」属、基準種：マウス乳癌ウイルス、「哺乳動物タイプCレトロウイルス」属、基準種：ネズミ白血病ウイルス、「鳥類のタイプCレトロウイルス」属、基準種：トリ白血病ウイルス、「タイプDレトロウイルス」属、基準種：メーソン・ファイザーサルウイルス (*Mason-Pfizer monkey virus*)、「blv-htlvレトロウイルス」属、基準種：ウシ白血病ウイルス、レンチウイルス属、基準種：ヒト免疫不全ウイルス1、およびスプーマウイルス属、基準種：ヒトスプーマウイルスを含むレトロウイルス科。

23. ラブドウイルス科、例えば、ベシクロウイルス属、基準種：水疱性口内炎インデ

10

20

30

40

50

イアナウイルス、リッサウイルス属、基準種：狂犬病ウイルス、およびエファメロウイルス属、基準種：ウシ流行熱を含むモノネガウイルス。

24. dsDNAサテライト、および、ssRNAサテライトを含むサテライト。

25. アルファウイルス属、基準種：シンドビスウイルス、およびルビウイルス属、基準種：風疹ウイルスを含むトガウイルス科。

#### 【0013】

上述の生物学的な複合体を用いて処理することが可能である具体的なウイルスとしては、気道のウイルス、胃腸のウイルス、免疫不全ウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)、および脳のウイルス、例えばウイルス性髄膜炎、またはその他の内部器官のウイルスが挙げられる。

10

#### 【0014】

粘膜表面で見出される状態は、特性(例えばpHなど)に関して極めて独特なことがある。しかしながら、本発明の複合体は、これらの状態においても活性なままである。粘膜表面は、特に、鼻腔、口、喉、食道、肺、胃、結腸、膈および膀胱において見出される。本発明に従って処理が可能な具体的な粘膜表面としては、喉、肺、結腸、および膀胱表面が挙げられる。本発明は、特に、これらの領域に影響を与えるウイルス(例えばHSV)の治療に適用可能である。

#### 【0015】

本発明に従って処理することが可能な、気道の具体的なウイルスとしては、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、パラインフルエンザ

20

#### 【0016】

本明細書で用いられる用語「H A M L E T」は、  
- ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体を意味し、これは、pH4.6で沈殿した乳汁のカゼイン分画から単離すること、例えばEP-A-0776214で説明されているように陰イオン交換とゲルクロマトグラフィーとの組み合わせ、またはWO99/26979で説明されているように、  
- ラクトアルブミンを、C18:1脂肪酸を特徴とするヒトミルクカゼイン由来の補因子の存在下で、イオン交換クロマトグラフィーで処理することのいずれかによって入手できる。

#### 【0017】

- ラクトアルブミンは、様々な哺乳動物源由来のものが可能であり、このような哺乳動物源としては、ヒト、ウシ、ヒツジおよびヤギの乳汁が挙げられるが、好ましくはヒトまたはウシであり、および最も好ましくはヒトである。また、タンパク質の組換え型も使用可能である。

30

#### 【0018】

また、ヒト - ラクトアルブミンのH A M L E Tへの変換において、その他の試薬、具体的には脂質(例えばオレイン酸)が有用であることも見出されている。特に、これまで、H A M L E T生産には、オレイン酸(C18:1:9シス)が必要であることが報告されている(M. Svensson等(2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 4221~6)。さらに近年、その他の脂肪酸も同様の方法で補因子として作用する可能性があることが発見された。 - ラクトアルブミンのH A M L E Tへの変換に最適な補因子は、9または11位でシスコンフォメーションで二重結合を有するC18:1脂肪酸である。

40

#### 【0019】

- ラクトアルブミン残基は、4個のジスルフィド結合(61~77; 73~91; 28~111、および6~120)によって連結された4個のヘリックス(残基1~34、86~123)と逆平行シート(残基38~82)で構成される14.2kDaの球状タンパク質である(K. R. Acharya等(1991) J Mol Biol, 221, 571~81)。 - ラクトアルブミンの天然型のコンフォメーションは、Asp82、Asp87およびAsp88の側鎖のカルボキシレート、Lys79およびAsp

50

84のカルボニルの酸素、ならびに、2個の水分子が配位した高い親和性の $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位によって定義される(K. R. Acharya等(1991) J Mol Biol, 221, 571~81)。上記タンパク質は、低いpH、または強く結合した $\text{Ca}^{2+}$ イオンを放出するキレート化剤の存在下に晒されると、H A M L E Tに見出されるいわゆるアポコンフォメーションをとる(D. A. Dolgikh等(1981) FEBS Lett, 136, 311~5; K. Kuwajima, (1996) Faseb J, 10, 102~09)。

#### 【0020】

生物学的に活性な複合体を形成するために、 $\alpha$ -ラクトアルブミンは、一般的に、立体配座の変化またはフォールディング変化、同様に、脂質補因子の存在の両方を必要とする。コンフォメーション変化は、適切には、 $\alpha$ -ラクトアルブミンからカルシウムイオンを除去することによって実行される。好ましい実施形態において、これは、適切には、機能的なカルシウム結合部位を有さない $\alpha$ -ラクトアルブミンの変異体を用いて促進される。

10

#### 【0021】

このような変異体を含む生物学的に活性な複合体は、本明細書で用いられるようなH A M L E Tの「改変体」という用語に包含される。しかしながら、本出願人は、機能的なカルシウム結合部位の存在および/またはカルシウムの存在は、一度形成されたら、複合体の安定性または生物活性に影響を与えないことを見出した。生物学的に活性な複合体は、活性を失うことなくカルシウムへの親和性を保持することを見出した。それゆえに、本発明の複合体は、カルシウムイオンをさらに含んでいてもよい。

20

#### 【0022】

従って、特に、本発明は、アポフォールディング状態である $\alpha$ -ラクトアルブミンまたは $\alpha$ -ラクトアルブミンの変異体、またはこれらのうちいずれかのフラグメント、および前記複合体を生物学的に活性な形態に安定化する補因子を含み、ただし、 $\alpha$ -ラクトアルブミンまたはそれらの変異体のいずれのフラグメントも、 $\alpha$ -ラクトアルブミンのドメインとドメインとの境界を形成する領域に相当する領域を含む、生物学的に活性な複合体を用いる。

#### 【0023】

適切には、上記補因子は、シスC18:1:9またはC18:1:11脂肪酸、または類似の立体配置を有する異なる脂肪酸である。

30

#### 【0024】

具体的な便利な実施形態において、本発明で用いられる生物学的に活性な複合体は、

(i)シスC18:1:9またはC18:1:11脂肪酸、または類似の立体配置を有する異なる脂肪酸；および

(ii)カルシウムイオンが除去されている $\alpha$ -ラクトアルブミン、またはカルシウムイオンが放出されているか、もしくは機能的なカルシウム結合部位を有さない $\alpha$ -ラクトアルブミンの変異体；またはこれらのうちいずれかのフラグメント(ただし、いずれのフラグメントも、 $\alpha$ -ラクトアルブミンのドメインとドメインとの境界を形成する領域に相当する領域を含む)、

を含む。

40

#### 【0025】

本明細書で用いられるように、表現「変異体」は、基礎タンパク質、適切にはヒトまたはウシ $\alpha$ -ラクトアルブミン(ただし、それらが誘導された塩基配列とは、配列中の1またはそれ以上のアミノ酸がその他のアミノ酸で置換されているという点で異なる)に相同なポリペプチドまたはタンパク質を意味する。アミノ酸置換は、アミノ酸が、概して類似の特性を有するが異なるアミノ酸で置換される場合、「保存的」とであるとされる場合もある。非保存的置換は、アミノ酸が、異なるタイプのアミノ酸で置換される場合をいう。大まかに言えば、非保存的置換が少なければ少ないほど、ポリペプチドの生物活性を変化させる可能性が少ないと予想される。適切には、変異体は、少なくとも60%同一であると予想され、好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは80%または85%、特

50

に好ましくは、90%、95%もしくは98%、またはそれを超える同一性を有する。

#### 【0026】

同一性の程度を決定する目的でアミノ酸配列を比較する場合、BESTFITやGAP（いずれも、ウィスコンシン・ジェネティクス・コンピューター・グループ（Wisconsin Genetics computer Group；GCG）製のソフトウェアパッケージ）のようなプログラムがある。例えば、BESTFITは、2つの配列を比較して、最も類似したセグメントの最適なアライメントを作製する。GAPは、配列をそれらの全長に沿って並べさせることが可能であり、必要に応じていずれかの配列にスペースを挿入することによって、最適なアライメントを発見する。適切には、本発明に関して、配列の同一性を考察する場合、比較は、それらの全長にそった配列のアライメントによ

10

#### 【0027】

用語「それらのフラグメント」は、例えば完全な $\alpha$ -ラクトアルブミンのアミノ酸配列を含む複合体に類似した活性を有する複合体を形成すると予想される、所与のアミノ酸配列を有するあらゆる部分を意味する。フラグメントは、全長タンパク質由来の2以上の部分を一緒に含んでいてもよい。適切には、このような部分は、基礎配列からの、少なくとも5個、好ましくは少なくとも10個の連続したアミノ酸を含むと予想される。適切なフラグメントは、欠失突然変異体と予想され、適切には、長さが少なくとも20個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも100個のアミノ酸を含む。これらは、上記タンパク質由来の小さい領域を含むか、または、これらの組み合わせを含む。

20

#### 【0028】

ドメインとドメインとの境界を形成する領域は、ヒト $\alpha$ -ラクトアルブミンにおいては、構造中のアミノ酸34～38、および、82～86で定義される。従って、適切なフラグメントは、これらの領域を含むと予想され、好ましくは天然型タンパク質のアミノ酸34～86の全領域を含む。

#### 【0029】

特に好ましい実施形態において、生物学的に活性な複合体は、カルシウムへの親和性が減少するか、または機能しなくなるように、カルシウム結合部位が改変されている $\alpha$ -ラクトアルブミンの変異体を含む。

#### 【0030】

ウシ $\alpha$ -ラクトアルブミンにおいて、カルシウム結合部位には、残基K79、D82、D84、D87およびD88が配位されていることが発見された。従って、非ウシ $\alpha$ -ラクトアルブミンにおける、この部位またはそれと同等の部分の、例えば、1個またはそれ以上の酸性残基を除去することによる改変によって、その部位のカルシウム親和性を減少させることができ、または機能を完全に除去することもでき、さらに、このタイプの突然変異体は、本発明の好ましい側面である。

30

#### 【0031】

ウシ $\alpha$ -ラクトアルブミンの $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位は、 $3_{10}$ ヘリックス、および2つのヘリックスを分離するショートターン領域を有するヘリックスからなる（Acharya K. R. 等（1991）J Mol Biol 221, 571～581）。2個のジスルフィド架橋が側面にあり、このかなり硬い分子の一部を構成している。 $\text{Ca}^{2+}$ に配位している7個の酸素基のうち5個は、Asp82、87および88の側鎖のカルボキシレート、またはLys79およびAsp84のカルボニル酸素が寄与している。2個の水分子は、残りの2個の酸素を供給する（Acharya K. R. 等（1991）J Mol Biol 221, 571～581）。

40

#### 【0032】

これまで、87位におけるアスパラギン酸のアラニンへの部位特異的変異誘発（D87A）が、強いカルシウム結合部位を不活性化し（Anderson P. J. 等（1997）Biochemistry 36, 11648～11654）、その突然変異タンパク質はアポコンフォメーションをとることが示されてきた。

50



## 【0033】

それゆえに、特定の実施形態において、ウシ - ラクトアルブミンのタンパク質配列中のアミノ酸87位におけるアスパラギン酸残基を、非酸性残基、そして特に非極性または非荷電性極性側鎖へ突然変異させる。

## 【0034】

非極性側鎖としては、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、またはシステインが挙げられる。特に好ましい例は、アラニンである。非荷電性極性側鎖としては、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、またはチロシンが挙げられる。

## 【0035】

突然変異タンパク質における構造的なひずみを最小化するために、D87はまた、アスパラギン(N)で置換させており(Permyakov S. E. 等(2001) Proteins Eng 14, 785~789)、これは、カルボキシラート基の非補償性の負電荷が欠失しているが、同じ側鎖体積と幾何学的配置を有する。この突然変異タンパク質(D87N)は、低い親和性( $K_{Ca} 2 \times 10^5 M^{-1}$ )でカルシウムと結合することが示されている(Permyakov S. E. 等(2001) Proteins Eng 14, 785~789)。本発明のさらなる好ましい実施形態において、このような突然変異体は、生物学的に活性な複合体の構成要素を形成する。

## 【0036】

従って、本発明の複合体に使用するための特に好ましい変異体は、 - ラクトアルブミンのD87AとD87N変異体、またはこの突然変異を含むフラグメントである。

## 【0037】

分子のこの領域は、ウシ - ラクトアルブミンにおいて3個の塩基性アミノ酸のうち1個(R70)が、S70に変化しているため、1個の配位している側鎖が除外されているという点で、ウシタンパク質とヒトタンパク質とで異なる。それゆえに、本発明の複合体にウシ - ラクトアルブミンが用いられる場合、S70R突然変異体を用いることが好ましい場合がある。

## 【0038】

$Ca^{2+}$ 結合部位は、異なる種由来の - ラクトアルブミンにおいて100%保存されており(Acharya K. R. 等(1991) J Mol Biol 221, 571~581)、そのタンパク質に関するこの機能の重要性が説明されている。そこには、5個の異なるアミノ酸と2個の水分子が配位されている。D87の側鎖カルボキシラートは、D88と共に、最初に、カルシウムイオンをカチオン結合領域にドッキングし、構造を安定化する内部水素結合を形成する(Anderson P. J. 等(1997) Biochemistry 36, 11648~11654)。D87またはD88のいずれかの喪失は、 $Ca^{2+}$ 結合を阻害し、部分的にフォールディングしていない状態で分子を安定にすることが示されている(Anderson P. J. 等(1997) Biochemistry 36, 11648~11654)。

## 【0039】

さらに、ウシ - ラクトアルブミンのカルシウム結合部位に2個の異なる点突然変異を有する突然変異タンパク質を用いてもよい。例えば、87位におけるアスパラギン酸のアラニンでの置換(D87A)は、カルシウム結合を完全に阻害し、タンパク質の三次構造を崩壊させることが発見されている。アスパラギン酸のアスパラギンの置換、すなわちタンパク質(D87N)は、それでもなおカルシウムと結合するが、D87A突然変異体に関して述べられたほどではないが、親和性はより低く、三次構造の喪失を示す(Permyakov S. E. 等(2001) Proteins Eng 14, 785~789)。これらの突然変異タンパク質は、両方のアミノ酸が同じ平均体積 $125 \text{ \AA}^3$ を有するために充填体積において最小の変化しか示さず、さらに、アスパラギンのカルボキシラート側鎖は、タンパク質にカルシウムを配位させるが、非効率的であった(Permyakov S. E. 等(2001) Proteins Eng 14, 785~789)。両方

10

20

30

40

50

の突然変異タンパク質は、生理的温度でアポコンフォメーションで安定であったが、このコンフォメーション変化にもかかわらず、それらは生物学的に不活性であった。この結果から、アポコンフォメーションへのコンフォメーション変化単独では、生物活性を誘導するには不十分であることが実証される。

【0040】

- ラクトアルブミンの構造は、この技術分野で既知であり、本明細書で述べられた残基の正確なアミノ酸の番号付けは、例えば上記の Anderson 等、および上記の Permyakov 等で示された構造を参照することによって同定することができる。

【0041】

本発明に従って製造された医薬品は、適切には、ウイルスに感染した特定の領域への局所投与に適した形態の医薬組成物である。 10

【0042】

例えば、気道の感染のためには、本組成物は、吸入法または吹入法による投与に適したものが可能である。消化管の感染、特に胃の感染のウイルス感染を治療するためには、経口用組成物を用いてもよい。膣または結腸のようなその他の粘膜表面のウイルス感染の治療には、坐剤のような局所用製剤で治療してもよい。

【0043】

希釈剤またはクリーム基剤と共に、タンパク質複合体のための乳化剤を適切に含む局所用液剤またはクリーム剤は、粘膜表面でのその他のウイルス感染への適用により適している場合がある。このような製剤は、その表面に直接塗布することができる。 20

【0044】

加えて、このような局所用組成物は、皮膚のウイルス感染を治療するために塗布してもよい。

【0045】

その他の例において、本組成物は、膀胱のウイルスを治療しようとする場合、膀胱への点滴注入に適した形態も可能である。

【0046】

内部器官に影響を与えるその他のウイルス感染を、感染した領域への注入によって治療することが可能である。このような領域としては、脳、肝臓、腎臓、前立腺および卵巣が挙げられる。同様に、免疫不全ウイルスは、リンパ腺および骨髓のような免疫系に關与する器官に、本複合体を注入することによって治療が可能である。 30

【0047】

本複合体は、適切には、還流強化送達 (convection enhanced delivery; CED) を用いて注入される。

【0048】

本組成物は、一般的に既知の、製薬上許容できるキャリアー、充填剤および/または補助剤 (expedient) を含んでいてもよい。

【0049】

例えば、膀胱またはその他の内部器官に点滴または注入される組成物は、活性物質の滅菌水または滅菌食塩水を含むことになる。 40

【0050】

本発明に係る活性剤は、ウイルスに感染した細胞を攻撃し、恐らくアポトーシスによってそれらを死滅させるが、健康な細胞には害を及ぼさないであろう。結果として、ウイルスの蔓延を抑制することになる。

【0051】

活性な化合物の1日用量は様々であり、通常の臨床実践に従って、治療しようとする患者、ウイルスの性質などに依存する。一般的な規則としては、少なくとも3日、好ましくは少なくとも5日の期間中、1日あたりの投与に200mg ~ 1g / 用量の生物学的に活性な複合体が用いられる。

【0052】

本発明のさらなる形態において、H A M L E Tまたはそれらの生物学的に活性な改変体、またはこれらのうちいずれかの生物学的に活性なフラグメントから選択される - ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体を、それを必要とする患者に投与することを含む、ウイルス感染を治療する方法が提供される。

【 0 0 5 3 】

特に、本複合体は、ウイルスに感染した細胞に直接投与されることになる。例えば、粘膜表面のウイルス感染を治療するためには、本複合体は、前記表面に治療上有効な量で投与されることになる。

【 0 0 5 4 】

生物学的に活性な複合体の好ましい例は、上で説明した通りである。好ましくは、生物学的に活性な複合体は、局所用組成物（これも上述の通り）の形態で投与される。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/IB2005/001255

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K38/38 A61P31/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K 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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/095490 A (SVANBORG, CATHERINE) 20 November 2003 (2003-11-20) page 1, line 3 - page 6, line 26	1-15
X	SVANBORG C ET AL: "HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism--cellular, molecular, and therapeutic aspects" ADVANCES IN CANCER RESEARCH, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 88, 2003, pages 1-29, XP002254552 ISSN: 0065-230X page 6, paragraph 6 - page 8, paragraph 3; figure 4 ----- -/-	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  20 September 2005		Date of mailing of the international search report  29/09/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Schönwasser, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/IB2005/001255

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	GUSTAFSSON LOTTA ET AL: "Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 24 JUN 2004, vol. 350, no. 26, 24 June 2004 (2004-06-24), pages 2663-2672, XP008052523 ISSN: 1533-4406 the whole document	1-15
A	HÅKANSSON A ET AL: "A folding variant of ALPHA-LACTalbumin with bactericidal activity against STREPTOCOCCUS pneumoniae" MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 35, no. 3, 2000, pages 589-600, XP002250706 ISSN: 0950-382X the whole document	1-15
P,A	FAST JONAS ET AL: "Stability of HAMLET - A kinetically trapped alpha-lactalbumin oleic acid complex" February 2005 (2005-02), PROTEIN SCIENCE, VOL. 14, NR. 2, PAGE(S) 329-340 , XP008052485 ISSN: 0961-8368 the whole document	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB2005/001255

**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although claims 14 and 15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB2005/001255

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03095490 A	20-11-2003	AU 2003233116 A1	11-11-2003
		CA 2485223 A1	20-11-2003
		EP 1506233 A1	16-02-2005

## フロントページの続き

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

(72)発明者 カタリーナ・スヴァンボルイ

スウェーデン国S - 2 2 3 6 2 ルンド・セルヴェガータン2 3・ルンド・ユニヴァーシティ・デ  
パートメント・オブ・メディカル・マイクロバイオロジー・セクション・オブ・クリニカル・イミ  
ュノロジー

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA44 CA38 NA14 ZB332 ZC552

4C087 AA01 BB39 CA16 NA14 ZB33 ZC55