

(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2017-532365

(P2017-532365A)

(43) 公表日 平成29年11月2日 (2017.11.2)

| | | |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 38/39 (2006.01) | A 6 1 K 38/39 | 4 B 0 6 4 |
| A 6 1 P 13/02 (2006.01) | A 6 1 P 13/02 | 4 B 0 6 5 |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01) | A 6 1 P 13/12 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 | |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2017-525311 (P2017-525311) | (71) 出願人 | 517024869 |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年7月23日 (2015. 7. 23) | | ゴールドフィンチ バイオファーマ, インク. |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成29年3月22日 (2017. 3. 22) | | アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ファースト・ストリート 2 1 5 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2015/041712 | | |
| (87) 国際公開番号 | W02016/014781 | (74) 代理人 | 100082072 |
| (87) 国際公開日 | 平成28年1月28日 (2016. 1. 28) | | 弁理士 清原 義博 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/029, 135 | (72) 発明者 | ホッジズ, ブラッドリー ローウェル |
| (32) 優先日 | 平成26年7月25日 (2014. 7. 25) | | アメリカ合衆国 0 1 7 5 7 マサチューセッツ州 ミルフォード ハイブン・ストリート 3 0 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 62/072, 490 | | |
| (32) 優先日 | 平成26年10月30日 (2014. 10. 30) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 62/128, 729 | | |
| (32) 優先日 | 平成27年3月5日 (2015. 3. 5) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

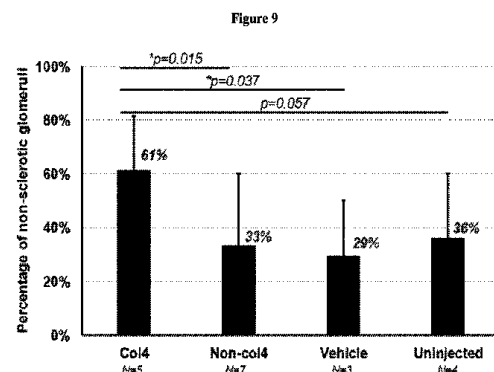
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン I V の置き換え

(57) 【要約】

本発明は、組換えヒトコラーゲン I V タンパク質を必要とする患者にそれを投与することによりアルポート症候群を治療するための薬学的組成物、製剤、及び方法を提供する。

【選択図】 図 9



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

組換えコラーゲン I V タンパク質と、1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 2】

前記組換えコラーゲン I V タンパク質が、コラーゲン I V プロトマー、二量体、四量体、多量体、及び / またはこれらの混合物である、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

前記組換えコラーゲン I V タンパク質が、コラーゲン I V プロトマーである、請求項 2 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 4】

前記コラーゲン I V プロトマーが、3 (I V)、4 (I V)、及び 5 (I V) 鎖ポリペプチドからなる群から選択される 3 つの (I V) ポリペプチドからなるヘテロ三量体である、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

前記コラーゲン I V プロトマーが、配列番号 3 のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む 1 つの 3 (I V) 鎖ポリペプチド、配列番号 4 のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む 1 つの 4 (I V) 鎖ポリペプチド、ならびに配列番号 5 のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む 1 つの 5 (I V) 鎖ポリペプチドからなるヘテロ三量体である、請求項 4 に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 6】

前記コラーゲン I V プロトマーが、1 つ、2 つ、または 3 つのキメラ 3 (I V)、4 (I V)、及び 5 (I V) 鎖ポリペプチドを含むヘテロ三量体であり、前記キメラ 3 (I V) 鎖ポリペプチドは、前記 3 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部が 1 (I V) もしくは 2 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラペプチドであり、前記キメラ 4 (I V) 鎖ポリペプチドは、前記 4 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部が 1 (I V) もしくは 2 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラペプチドであり、前記キメラ 5 (I V) 鎖ポリペプチドは、5 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部が 1 (I V) もしくは 2 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラペプチドである、請求項 4 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 7】

前記コラーゲン I V プロトマーは、前記 3 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部が 1 (I V) もしくは 2 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部に置き換えられる 1 つのキメラ 3 (I V) 鎖ポリペプチド、前記 4 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部が 1 (I V) もしくは 2 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部に置き換えられる 1 つのキメラ 4 (I V) 鎖ポリペプチド、及び前記 5 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部が 1 (I V) もしくは 2 (I V) 鎖の NC 1 ドメインの全てまたは一部に置き換えられる 1 つのキメラ 5 (I V) 鎖ポリペプチドからなるヘテロ三量体である、請求項 6 に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 8】

1 (I V)、2 (I V)、3 (I V)、4 (I V)、5 (I V) の前記 NC 1 ドメインが、それぞれ、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、及び配列番号 11 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

前記組換えコラーゲン I V タンパク質が、コラーゲン I V 二量体であり、前記二量体が、請求項 4 ~ 8 に記載のいずれか 1 つから選択される 2 つのプロトマーを含む、請求項 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

前記組換えコラーゲン I V タンパク質が、3 - ヒドロキシプロリン、4 - ヒドロキシブ

50

ロリン及び／またはヒドロキシリジン残基を含有する、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1】

前記組換えコラーゲン I V タンパク質が、約 0 . 3 % ～ 1 . 6 % の 3 - ヒドロキシプロリン残基、及び約 6 . 5 % ～ 1 4 % の 4 - ヒドロキシプロリン残基を含む、請求項 1 0 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2】

前記組換えコラーゲン I V タンパク質が、非天然アミノ酸及び／または他のアミノ酸置換基を更に含む、請求項 1 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 3】

前記 1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤が、1 つ以上の酸化防止剤、1 つ以上の等張化剤、及び／または 1 つ以上のキレート剤を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 4】

請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の組換えコラーゲン I V タンパク質を含む、アルポート症候群の患者における糸球体構造及び機能を改善するための薬学的組成物。

【請求項 1 5】

コラーゲン I V タンパク質のうちの 1 つ以上の欠乏によって特徴付けられる状態の治療を必要とする対象において治療を行うための方法であって、前記対象に有効量の請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 1 6】

前記状態が、3 (I V) 鎖の 1 つ以上の欠乏、4 (I V) 鎖の 1 つ以上の欠乏、及び 5 (I V) 鎖の 1 つ以上の欠乏からなる群から選択される 1 つ以上の欠乏によって特徴付けられる、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 3 (I V) 鎖の 1 つ以上の欠乏が C O L 4 A 3 遺伝子における突然変異に起因し、前記 4 (I V) 鎖の 1 つ以上の欠乏が C O L 4 A 4 遺伝子における突然変異に起因し、前記 5 (I V) 鎖の 1 つ以上の欠乏が C O L 4 A 5 遺伝子における突然変異に起因する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記状態が、菲薄基底膜腎症 (T B M N) 、アルポート症候群、家族性血尿、末期腎疾患 (E S R D) 、進行性腎不全、糸球体性血尿、蛋白尿、周産期脳出血及び孔脳症、ならびに出血性卒中を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記状態が、アルポート症候群である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

アルポート症候群が、X連鎖性アルポート症候群、常染色体劣性アルポート症候群、及び常染色体優性アルポート症候群からなる群から選択される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記対象が男性であり、前記アルポート症候群が X連鎖性アルポート症候群である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記対象が女性であり、前記アルポート症候群が X連鎖性アルポート症候群である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記対象が、男性または女性であり、前記アルポート症候群が常染色体劣性アルポート症候群である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記対象が、男性または女性であり、前記アルポート症候群が常染色体優性アルポート症候群である、請求項 2 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

アルポート症候群が家族歴により診断される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 26】

前記対象に 1 つ以上の予防薬を共投与する工程を更に含み、前記予防薬が、抗血栓薬及び / または抗炎症薬を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 27】

前記抗血栓薬が、アスピリン、トリフルサル、クロピドグレル、プラスグレル、チカグレロル、チクロピジン、シロスタゾール、アブシキシマブ、エプチフィバチド、チロフィバン、ジピリダモール、トロンボキサンシンターゼ阻害剤、トロンボキサン受容体拮抗薬、テルトロバン、ワルファリン、ヘパリン、アセノクマロール、アトロメンチン、プロデ

10

【請求項 28】

前記抗炎症薬が、NSAIDs、アセトアミノフェン、ヘパリン、クマジン、コルチコステロイド、抗ヒスタミン、及び / または補体カスケードに対する抗体からなる群から選択される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

前記対象への投与が、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、髄腔内注射、脳室内投与、頭蓋内送達、眼内送達、耳内送達により、及び / または短期もしくは長期的に設置されたカテーテルにより送達される、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 30】

前記患者への投与が静脈内注射により送達される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記有効量が、約 100 ng / kg ~ 約 100 mg / kg である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

哺乳動物における 1 つ以上の異常を反転させる、寛解させる、緩徐化させる、停止させる、改善する、または予防するための方法であって、前記哺乳動物に、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

30

【請求項 33】

前記 1 つ以上の異常が、糸球体基底膜 (GBM) の菲薄化及び分裂、重度の蛋白尿、軽度の蛋白尿、血尿、腎不全、末期腎疾患への進行、聴覚機能障害、眼異常、孔脳症、出血を伴う脳小血管疾患、アクセンフェルト・リーガー異常を伴う脳小血管疾患、腎障害、動脈瘤、及び筋肉を伴う遺伝性血管障害、ならびに / または脳内出血を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記哺乳動物が、マウス、ラット、イヌ、またはヒトである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

組換えコラーゲン I V タンパク質を生産するための方法であって、3 - ヒドロキシプロリン及び / または 4 - ヒドロキシプロリンを生成するためにプロリン残基を修飾する工程を含む、方法。

40

【請求項 36】

組換えコラーゲン I V タンパク質を生産するための細胞系であって、遺伝子操作される、細胞系。

【請求項 37】

前記細胞系は、ペルオキシダジン、リジルオキシターゼ、未変性コラーゲン I V タンパク質、及び / もしくは他のコラーゲンが欠乏するように、かつ / またはプロリル 4 - ヒドロキシラーゼ及び / もしくはプロリル 3 - ヒドロキシラーゼ、ならびにリジンヒドロキシ

50

ラーゼを発現するように遺伝子操作される、請求項 36 に記載の細胞系。

【請求項 38】

キメラ (IV) 鎖ポリペプチドを発現させるためのキメラ cDNA 構築物であって、前記キメラ (IV) 鎖ポリペプチドが、キメラ 3 (IV)、4 (IV)、及び 5 (IV) 鎖ポリペプチドからなる群から選択される、キメラ cDNA 構築物。

【請求項 39】

前記キメラ 3 (IV)、4 (IV)、及び 5 (IV) 鎖ポリペプチドは、前記 3 (IV)、4 (IV)、及び 5 (IV) 鎖ポリペプチドのそれぞれの NC1 ドメインの全てまたは一部が 1 (IV) 及び / もしくは 2 (IV) 鎖の NC1 ドメインの全てまたは一部に置き換えられる、キメラペプチドである、請求項 38 に記載のキメラ cDNA 構築物。

10

【請求項 40】

1 (IV)、2 (IV)、3 (IV)、4 (IV)、5 (IV) の NC1 ドメインが、それぞれ、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、及び配列番号 11 のアミノ酸配列を含む、請求項 39 に記載のキメラ cDNA 構築物。

【請求項 41】

キメラ (IV) ポリペプチドを生産するための発現系であって、請求項 38 ~ 40 のいずれか一項に記載のキメラ cDNA を含有する、発現系。

【請求項 42】

基底膜における組換えコラーゲン IV タンパク質を検出するためのアッセイであって、受容体結合アッセイ、細胞遊走、分化及び / もしくは接着アッセイ、ならびに / またはバイオマーカー測定から選択される、アッセイ。

20

【請求項 43】

前記コラーゲン IV プロトマーが、1 (IV) 鎖ポリペプチドの 2 つの複製物及び 2 (IV) 鎖ポリペプチドの 1 つの複製物からなるヘテロ三量体である、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 44】

前記コラーゲン IV プロトマーが、配列番号 1 のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む前記 1 (IV) 鎖ポリペプチドの 2 つの複製物、配列番号 2 のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む前記 2 (IV) 鎖ポリペプチドの 1 つの複製物からなるヘテロ三量体である、請求項 43 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 45】

コラーゲン IV タンパク質のうちの 1 つ以上の欠乏によって特徴付けられる状態の治療を必要とする対象において治療を行うための方法であって、前記対象に有効量の請求項 43 ~ 44 のいずれか一項に記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 46】

前記状態がアルポート症候群である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記有効量が約 1 mg / kg ~ 約 10 mg / kg である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 48】

前記有効量が約 5 mg / kg である、請求項 47 に記載の方法。

40

【請求項 49】

前記コラーゲン IV プロトマーが、1 (IV) 鎖ポリペプチドの 2 つの複製物及び 2 (IV) 鎖ポリペプチドからなるヘテロ三量体である、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 50】

前記コラーゲン IV プロトマーは、それぞれが配列番号 1 のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む 1 (IV) 鎖ポリペプチドの 2 つの複製物、ならびに配列番号 2 のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む 1 つの 2 (IV) 鎖ポリペプチドからなるヘテロ三量体である、請求項 49 に記載の薬学的組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互関連

本出願は、2015年3月5日出願された米国仮出願第62/128,729号、2014年10月30日出願された米国仮出願第62/072,490号、及び2014年7月25日出願された米国仮出願第62/029,135号の優先権を主張し、これらのそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表に対する参照

本出願は、電子形式の配列表と共に出願される。配列表は、20721004 P C T S E Q L S T . t x t という名の、2015年7月23日に作成された、サイズが100,507バイトであるファイルとして提供される。配列表の電子形式の情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、コラーゲン関連疾患、特にコラーゲンI V アルポート症候群を治療するためのコラーゲンの置き換えに関する。アルポート症候群などのコラーゲンI V 関連障害を治療するための組換えコラーゲンI V 分子、薬学的組成物、及び方法が提供される。

【背景技術】

【0004】

アルポート症候群は、主に、血液から老廃物を濾過する腎臓の毛細管の小さい房である糸球体に影響を及ぼす遺伝性疾患である。この疾患の最も初期の症状は尿中の血液（血尿）である。患者は、聴力損失及び／または眼合併症も示す場合が多い。50パーセントのアルポート患者が20歳までに末期腎疾患（E S R D）を発症し、死亡時期の中央値は25歳であり、45歳までには90パーセントとなる。介入なしでは、E S R Dへの進行を免れない。アルポート症候群は、特定の地域に限定されることなく世界的に報告されてきた。有病率は、米国において、5000人の新生児に約1人であると推定される。UKにおいて、100万人に約40人（疾患保有者を含む）の個人がアルポート症候群を患い、アルポート症候群は、腎臓移植療法の患者の約1%を占める。アルポート症候群の発生率は、フィンランドでは1:53,000、及びスウェーデン南部では1:17,000であることが分かった（P a j a r i e t a l . , A c t a P a e d i a t r , 1996, 85, 1300-1306、及びP e r s s o n e t a l . , C l i n N e p h r o l , 2005, 64, 85-90）。

【0005】

糸球体基底膜（G B M）はアルポート病変の部位である。アルポート症候群の患者における特徴的なG B M超微細構造の変化は、G B Mの不規則な肥厚化及び「バスケット織り」パターンを形成する緻密層の多層状構造である。これらの変化は、疾患の初期段階では最小であるが、成人患者においては広範囲に及ぶ。G B Mの広範囲に及ぶ変化は、進行性疾患経過に向かう傾向を示す。G B Mの不規則な肥厚化の重症度と臨床経過との間の有力な相関関係が報告されている（B a s t a - J o v a n o v i c e t a l . , A m J K i d D i s , 1990, 16, 51-56）。若年患者は療法に最も適している可能性が高い。

【0006】

アルポート症候群は、正常な構造及び糸球体基底膜の機能に重要なタンパク質であるI V 型コラーゲンに影響を及ぼす遺伝子における変化（突然変異）によって引き起こされる。この疾患は、主に、コラーゲンI V の 3、4、及び 5 鎖をコードするコラーゲンI V 遺伝子（C O L 4 A 3、C O L 4 A 4、またはC O L 4 A 5）における劣性突然変異に起因する。C O L 4 A 5 はX連鎖性であるため、男性における1つの欠陥遺伝子が疾患をもたらすのに十分である。コラーゲンI V の 3 - 4 - 5 は、腎臓における糸球体基底膜の重要な構成要素である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

アルポート症候群の診断は、患者の家族歴と共に、患者の徴候及び症状の慎重な評価に依存する。時折、聴力及び視力が検査される。評価は、アルポート症候群を判断するために、血液検査、尿検査、及び腎臓の生検も含み得る。遺伝子検査は、アルポート症候群の診断を確認し、その遺伝子型を判断するのに役立ち得る。

【 0 0 0 8 】

現在、腎臓移植を除き、ACE阻害剤が唯一の療法であり、これらはESRDを遅延することができる。アルポート患者は、医療システムに大きな負担を課し、腎臓移植を必要とするヨーロッパの全ESRD患者の1～2%及び米国の全患者の2～3%を構成する。更に、移植は、移植した同種移植片の免疫拒絶反応をもたらすことが多い。したがって、この深刻で命にかかわる稀な障害に対する新規療法を開発する、未だ満たされていない医学的必要性が存在する。

10

【 0 0 0 9 】

医学研究者は、アルポート症候群の個人がなぜ腎不全を発症するかを理解し、腎不全の発症を緩徐または予防できる治療を開発することに非常に関心がある。コラーゲンIV組織化を媒介する酵素の阻害剤及び幹細胞療法を含む、いくつかの治療がアルポート症候群に等しい状態の動物において試験されている。コラーゲンIVタンパク質がGBMの主な構成成分であり、アルポートGBMにおいて欠乏しているという事実を踏まえて、本発明は、機能性組換えヒトコラーゲンIV(rhCol4)タンパク質が罹患したGBMに送達し戻される、アルポート症候群に対する新規治療を開発する。本発明によると、意外にも、組換えヒトコラーゲンが脈管構造を容易に脱出し、罹患したGBMに埋め込まれるだろうことが示される。このようなコラーゲンIVの置き換えは、腎臓における糸球体の濾過機能を回復させ、したがって、アルポート症候群を治療することが可能である。

20

【 発明の概要 】

【 0 0 1 0 】

本発明は、コラーゲン関連疾患、特にコラーゲンIVアルポート症候群を治療するためのコラーゲンの置き換えに関する。アルポート症候群などのコラーゲンIV関連障害を治療するための組換えコラーゲンIVタンパク質、薬学的組成物、及び方法が提供される。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、本発明は、組換えコラーゲンIVタンパク質、ならびにコラーゲンIVの安定性、送達、浸透、及び/または機能性を促進する1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物及び製剤を提供する。組換えコラーゲンIVタンパク質は、コラーゲンIVプロトマー、二量体、四量体、多量体、及び/またはこれらの混合物であり得る。コラーゲンIVプロトマーは、1(I V)、2(I V)、3(I V)、4(I V)、5(I V)、及び6(I V)鎖ポリペプチドからなる群から選択される3つのポリペプチドを含有し得る。

30

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、コラーゲンIVプロトマーは、3(I V)鎖ポリペプチド、4(I V)鎖ポリペプチド、及び5(I V)鎖ポリペプチドを含むヘテロ三量体であり、3(I V)鎖ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含み、4(I V)鎖ポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含み、5(I V)鎖ポリペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む。

40

【 0 0 1 3 】

他の実施形態では、コラーゲンIVプロトマーは、1(I V)鎖ポリペプチドの2つの複製物及び1つの2(I V)鎖ポリペプチドを含むヘテロ三量体であり、1(I V)鎖ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含み、2(I V)鎖ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む。

【 0 0 1 4 】

免疫拒絶反応を駆動できる特定のT細胞エピトープは、(I V)鎖のNC1ドメイン

50

に見出されるため、他の実施形態では、該コラーゲンⅠⅤプロトマーは、キメラ 3 (ⅠⅤ)、 4 (ⅤⅠ)、及び 5 (ⅠⅤ) ポリペプチドから選択される、1つ、2つ、または3つのキメラコラーゲンⅠⅤ ポリペプチドを含むヘテロ三量体である。本発明に開示されるように、キメラ 3 (ⅠⅤ) 鎖ポリペプチドは、 3 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) 及び/もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドである。キメラ 4 (ⅠⅤ) 鎖ポリペプチドは、 4 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) 及び/もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドである。キメラ 5 (ⅠⅤ) 鎖ポリペプチドは、 5 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) 及び/もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドである。

10

【0015】

キメラ (ⅠⅤ) ポリペプチドを含有する組換えコラーゲンⅠⅤプロトマーの例として、コラーゲンⅠⅤヘテロ三量体プロトマーは、 3 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられる1つのキメラ 3 (ⅠⅤ) 鎖ポリペプチド、 4 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられる1つのキメラ 4 (ⅠⅤ) 鎖ポリペプチド、ならびに 5 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられる1つのキメラ 5 (ⅠⅤ) 鎖ポリペプチドからなってもよい。

20

【0016】

いくつかの態様では、 1 (ⅠⅤ)、 2 (ⅠⅤ)、 3 (ⅠⅤ)、 4 (ⅠⅤ)、 5 (ⅠⅤ) のNC1ドメインは、それぞれ、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、及び配列番号11のアミノ酸配列を含む。

【0017】

他の実施形態では、該組換えコラーゲンⅠⅤタンパク質は、非共有結合的にまたは共有結合的に二量体化される2つのプロトマーを含むコラーゲンⅠⅤ二量体の形態であり、このプロトマーは、ヘテロ三量体 3 (ⅠⅤ) - 4 (ⅠⅤ) - 5 (ⅠⅤ)、またはキメラ 3 (ⅠⅤ)、 4 (ⅠⅤ)、及び/もしくは 5 (ⅠⅤ) 鎖を含むヘテロ三量体であり得る。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、該組換えコラーゲンⅠⅤは、組換えヒトコラーゲンⅠⅤ、特にヒトコラーゲンⅠⅤ 3 - 4 - 5である。

【0019】

本発明によると、コラーゲンⅠⅤタンパク質は、コラーゲンⅠⅤ含有組織及び臓器からのヒト天然コラーゲンⅠⅤの抽出及び精製により、または哺乳類細胞系、昆虫、植物細胞、ならびに/または細菌及び酵母における組換えコラーゲンⅠⅤタンパク質の発現を通して生産され得る。いくつかの態様では、コラーゲンⅠⅤタンパク質は、天然に生じるコラーゲンⅠⅤタンパク質と比較したとき、特定の率の3 - ヒドロキシプロリン、4 - ヒドロキシプロリン、及び/またはヒドロキシリジンを達成するように更に修飾される。例えば、本発明のコラーゲンⅠⅤタンパク質は、約6.5%~約14%の4 - ヒドロキシプロリン(すなわち、65~140個の3 - ヒドロキシプロリン残基/1000AA)、及び/または約0.2%~約1.6%の3 - ヒドロキシプロリン(すなわち、6~16個の3 - ヒドロキシプロリン残基/1000AA)を含有する。

40

【0020】

更なる態様では、本発明において試験されたとき、本発明において使用されたコラーゲンⅠⅤタンパク質は、修飾されたアミノ酸及び/または他のアミノ酸置換を含有し得る。このような修飾及び置換は、コラーゲンⅠⅤタンパク質の機能性を変更しないだろうが、安定性の増加及び免疫反応性の減少などのコラーゲンⅠⅤタンパク質のある程度の化学的

50

及び物理的特徴を改善し得る。

【0021】

一実施形態では、組換えヒトコラーゲンⅠⅤタンパク質を含む薬学的組成物は、アルポート症候群の患者における系球体構造及び機能を改善するために使用され得、この組換えヒトコラーゲンⅠⅤタンパク質は、コラーゲンⅠⅤタンパク質プロトマー、二量体、四量体、多量体、及び/またはこれらの混合物、ならびに1つ以上の薬学的に許容される賦形剤を含み、該コラーゲンⅠⅤタンパク質プロトマー、二量体、多量体は、3(ⅠⅤ)、4(ⅠⅤ)、及び5(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドからなる群から選択される3つの鎖ポリペプチドからなる。

【0022】

本発明によると、薬学的に許容される賦形剤は、1つ以上の酸化防止剤、1つ以上の等張化剤、1つ以上のキレート剤、及び臭素などの系球体部位においてコラーゲンⅠⅤの組織化を補助できる薬剤を含む。

【0023】

本発明において提供されるものには、本発明の正常な、キメラコラーゲンⅠⅤポリペプチドを生産するための方法、ベクター、キメラcDNA構築物、細胞系、及び機能アッセイも含まれる。いくつかの態様では、宿主細胞は、プロリル3-ヒドロキシラーゼ及び/またはプロリル4-ヒドロキシラーゼを発現するように遺伝子操作され得る。他の態様では、宿主細胞は、ペルオキシダジン、リジルオキシダーゼ、及び/または未変性コラーゲンⅠⅤタンパク質もしくは未変性コラーゲンⅠⅤ以外のコラーゲンが更に欠乏している場合がある。

【0024】

いくつかの実施形態では、本発明は、組換えコラーゲンⅠⅤタンパク質を含む薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与することにより、コラーゲンⅠⅤタンパク質のうちの1つ以上の欠乏によって特徴付けられる状態の治療を必要とする対象においてそれを行うための方法の特徴とする。該状態は、3(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドの1つ以上欠乏、4(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドの1つ以上の欠乏、及び/または5(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドの1つ以上の欠乏を特徴とし得る。特に、このような欠乏は、COL4A3、COL4A4、及び/またはCOL4A5遺伝子における遺伝子突然変異に起因する。

【0025】

いくつかの態様では、コラーゲンⅠⅤタンパク質の欠乏によって特徴付けられる状態は、アルポート症候群、菲薄基底膜腎症(TBMN)、家族性血尿、末期腎疾患(ESRD)、進行性腎不全、系球体性血尿、蛋白尿、遺伝性腎炎、糖尿病性腎症、周産期脳出血及び孔脳症、出血性卒中、ならびにコラーゲンⅠⅤタンパク質の欠損を伴うあらゆる疾患または障害から選択される。

【0026】

好ましい実施形態では、疾患はアルポート症候群である。アルポート症候群は、X連鎖性アルポート症候群、常染色体劣性アルポート症候群、または常染色体優性アルポート症候群であり得る。X連鎖性アルポート症候群は、5(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドをコードするCOL4A5遺伝子におけるあらゆる突然変異に起因し得る。常染色体劣性アルポート症候群は、それぞれ、4(ⅠⅤ)鎖ポリペプチド及び5(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドをコードするCOL4A3及び/またはCOL4A4遺伝子におけるあらゆる突然変異によって引き起こされ得る。常染色体優性アルポート症候群は、それぞれ、4(ⅠⅤ)鎖ポリペプチド及び5(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドをコードするCOL4A3及び/またはCOL4A4遺伝子におけるあらゆる突然変異によって引き起こされる。

【0027】

他の態様では、アルポート症候群の患者は、家族歴または遺伝子検査により診断される、腎機能障害所見のない患者であり得る。

【0028】

いくつかの実施形態では、本方法において使用される薬学的組成物は、組換えコラーゲ

10

20

30

40

50

ンⅠⅤプロトマー、二量体、四量体、多量体、及びこれらの混合物を含む。いくつかの態様では、組換えコラーゲンⅠⅤはプロトマーからなる。コラーゲンⅠⅤプロトマーは、1本の 3 (ⅠⅤ) 鎖、1本の 4 (ⅠⅤ) 鎖、及び1本の 5 (ⅠⅤ) 鎖からなるヘテロ三量体であり、この3本の鎖は3重らせんを形成し、かつ 3 (ⅠⅤ) 鎖は配列番号3のアミノ酸配列を含み、 4 (ⅠⅤ) 鎖は配列番号4のアミノ酸配列を含み、 5 (ⅠⅤ) 鎖は配列番号5のアミノ酸配列を含む。

【0029】

他の態様では、組換えコラーゲンⅠⅤプロトマーは、キメラ 3 (ⅠⅤ)、 4 (ⅠⅤ)、 5 (ⅠⅤ) 鎖から選択される1本、2本または3本のキメラ (ⅠⅤ) 鎖を含むヘテロ三量体であり、 3 (ⅠⅤ) 鎖は、 3 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドを含み、キメラ 4 (ⅠⅤ) 鎖は、 4 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドを含み、キメラ 5 (ⅠⅤ) 鎖は、 5 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が 1 (ⅠⅤ) もしくは 2 (ⅠⅤ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドを含む。

10

【0030】

他の実施形態では、該組換えコラーゲンⅠⅤはコラーゲンⅠⅤ二量体の形態であり、該二量体は、本明細書に開示される、組換えコラーゲンⅠⅤ 3 - 4 - 5 及び / またはキメラコラーゲンⅠⅤであり得る2つのコラーゲンⅠⅤプロトマーを含む。いくつかの態様では、該コラーゲンⅠⅤ二量体は、必要とする対象に投与する前に、インビトロで酵素的または化学的に二量体化される。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、コラーゲンⅠⅤタンパク質は、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、髄腔内注射、脳室内投与、頭蓋内送達、眼内送達、耳内送達により、及び / または短期もしくは長期的に設置されたカテーテルにより、それを必要とする対象に投与される。好ましい実施形態では、コラーゲンⅠⅤタンパク質は、静脈内注射により、それを必要とする対象に投与される。

【0032】

いくつかの実施形態では、有効量は、約 100 ng / kg ~ 約 100 mg / kg である。いくつかの態様では、有効量は、約 100 ng / kg ~ 約 100 µg / kg である。他の態様では、有効量は、1 µg / kg ~ 約 1 mg / kg である。更に他の態様では、有効量は、約 1 mg / kg ~ 約 100 mg / kg である。一実施形態では、有効量は約 5 mg / kg である。

30

【0033】

1つ以上の予防薬は、必要とする対象にコラーゲンⅠⅤタンパク質組成物と共投与され得、該予防薬は、抗血栓薬及び / または抗炎症薬であり得る。

【0034】

抗血栓薬は、組換えコラーゲンⅠⅤの置き換えにより誘導された即時的血栓形成を一次予防する、または二次予防するために使用され得る。抗血栓薬は、抗血小板薬、抗凝固薬、または血栓溶解薬であり得る。抗血小板薬は、アスピリン及びトリフルサルなどの不可逆的シクロオキシゲナーゼ阻害剤；クロピドグレル、プラスグレル、チカグレロル、及びチクロピジンなどのアデノシン二リン酸 (ADP) 受容体阻害剤；シロスタゾールなどのホスホジエステラーゼ阻害剤；アブシキシマブ、エブチフィバチド、及びチロフィバンなどの糖タンパク質ⅠⅡB / ⅠⅡA阻害剤；ジピリダモールなどのアデノシン再取り込み阻害剤；トロンボキササンシンターゼ阻害剤などのトロンボキサン阻害剤；トロンボキサン受容体拮抗薬、ならびにテルトロバン (terutroban) を含み得るが、これらに限定されない。抗凝固薬は、ワルファリン、ヘパリン、アセノクマロール、アトロメンチン、プロディファコウム、及びフェニンジオンを含み得るが、これらに限定されない。血栓溶解薬は、アルテプラゼ、レテプラゼ、及びテネクテプラゼなどの組織プラス

40

50

ミノーゲン活性化因子 $t-P A$; アニストレプラーゼ ; ストレプトキナーゼ、及びウロキナーゼを含み得るが、これらに限定されない。

【0035】

抗炎症薬は、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセンなどの $N S A I D s$ (非ステロイド系抗炎症薬) ; アセトアミノフェン ; 及び $I m S A I D s$ (免疫選択的抗炎症薬) を含み得るが、これらに限定されない。

【0036】

いくつかの実施形態では、本発明は、コラーゲン $I V$ タンパク質の投与が対象の表現型による帰結を予防、寛解、緩徐、停止、及び/または改善するように、組換えコラーゲン $I V$ タンパク質を含む薬学的組成物を投与することにより、糸球体基底膜 ($G B M$) の菲薄化及び分裂、重度の蛋白尿、軽度の蛋白尿、血尿、腎不全 ($r e n a l d e f i c i e n c y$)、末期腎疾患への進行、聴覚機能障害、眼異常、孔脳症、出血を伴う脳小血管疾患、アクセンフェルト・リーガー異常を伴う脳小血管疾患、腎障害、動脈瘤、及び筋肉を伴う遺伝性血管障害、ならびに/または脳内出血を含む1つ以上の異常の予防、寛解、反転、緩徐、停止、及び/または改善を必要とする対象において、それらを行うための方法の特徴とする。

10

【0037】

コラーゲン $I V$ タンパク質は哺乳動物に投与され得る。哺乳動物は、マウス、ラット、イヌ、またはヒトであり得る。

【0038】

加えて、基底膜における組換えコラーゲン $I V$ を検出するために使用され得るアッセイが本発明において提供される。該アッセイは、受容体結合、細胞遊走、分化及び/または接着、ならびにバイオマーカー測定を含み得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】抗 $C o l 4$ 抗体 : $s c 7 0 2 4 6 (1 : 1 0 0)$ (レーン4~7)、 $a b 6 5 8 6 (1 : 1 0 0 0)$ (レーン8~11)、及び $a b 1 9 8 0 8 (1 : 1 0 0 0)$ (レーン12~15) で免疫プロットされる $C o l 4 (1 (2) 2)$ タンパク質の代表的な変性/非還元 $S D S - P A G E$ ゲル画像である。レーン1及び2は、 $N o v e x$ からの分子量マーカーである。各抗体に関して、異なる量の $C o l 4 (1 (2) 2)$ タンパク質 ($2 5 0 n g$ 、 $1 2 5 n g$ 、 $2 5 n g$ 、 $1 2 . 5 n g$) がロードされた。バンド : 個々の ($I V$) 鎖 (I)、プロトマー (P)、二量体 (D)、及び四量体 (T) は、 $H R P$ 複合抗 $I g G$ 二次抗体 ($1 : 2 0$, $0 0 0$ 希釈) で可視化された。

30

【図2a】ジスルフィド還元して、または還元せずに $S D S - P A G E (4 \sim 1 5 \%$ ゲル) を変性した際の $C o l 4 (1 (2) 2)$ 種を示す。図2aは、ジスルフィド還元しなかった $C o l 4 (1 (2) 2)$ 調製物の代表的な変性 $S D S - P A G E$ ゲル画像である。図2bは、ジスルフィド還元した $C o l 4 (1 (2) 2)$ 調製物の代表的な変性 $S D S - P A G E$ ゲル画像である。図2a及び2bのレーン13、14、及び15は、 $L A M - 1 1 1$ を完全に還元し、 $L A M - 1 1 1$ のガンマ1鎖のみがガンマ1特異的抗体 (カタログ番号 $s c 5 5 8 4$) によりアッセイされる。

40

【図2b】ジスルフィド還元して、または還元せずに $S D S - P A G E (4 \sim 1 5 \%$ ゲル) を変性した際の $C o l 4 (1 (2) 2)$ 種を示す。図2bは、ジスルフィド還元した $C o l 4 (1 (2) 2)$ 調製物の代表的な変性 $S D S - P A G E$ ゲル画像である。図2a及び2bのレーン13、14、及び15は、 $L A M - 1 1 1$ を完全に還元し、 $L A M - 1 1 1$ のガンマ1鎖のみがガンマ1特異的抗体 (カタログ番号 $s c 5 5 8 4$) によりアッセイされる。

【図3】ダイレクトレッド80染料を使用した、電荷シフトを伴う $C o l 4 (1 (2) 2)$ タンパク質の代表的な未変性 $P A G E$ ゲル画像である。 $L A M - 1 1 1$ は、独立した分子量マーカーとして使用された。

【図4】様々な抗 $F I T C$ 抗体を使用した、 $F I T C - C o l 4 (1 (2) 2)$ 複合

50

体検出のためのE L I S Aアッセイのヒストグラムである。

【図5 a】F I T C標識された、及び未標識のC o l 4 (1 (2) 2)の検出を示す代表的なゲル画像である。C o l 4 (1 (2) 2)は、レーンA ~ Cでは還元され、レーンD ~ Fでは還元されない。同量のタンパク質が各レーンにロードされた。レーンA及びDは未標識のC o l 4 (1 (2) 2)でロードされ、レーンB及びEはF I T C標識されたC o l 4 (1 (2) 2)でロードされたが、サイズ排除カラムで精製されず、レーンC及びFはF I T C標識されたC o l 4 (1 (2) 2)でロードされ、サイズ排除カラムで精製された。

【図5 b】F I T C - C o l 4 (1 (2) 2)の検出のための、抗F I T C抗体 (a b 1 9 4 9 2、1 : 2 0、0 0 0希釈)を使用した免疫プロットの代表的なゲル画像である。

【図6 a】様々な抗F I T C抗体を使用したF I T C - L A M - 1 1 1複合体検出のためのE L I S Aアッセイのヒストグラムである。

【図6 b】F I T C標識された、及び未標識のL A M - 1 1 1の検出を示す代表的なゲル画像である。L A M - 1 1 1は、レーンA ~ Bでは還元され、レーンD ~ Fでは還元されない。同量のタンパク質が各レーンにロードされた。レーンA及びDは未標識のL A M - 1 1 1でロードされ、レーンB及びEはF I T C標識されたL A M - 1 1 1でロードされたが、サイズ排除カラムで精製されず、レーンC及びFはF I T C標識されたL A M - 1 1 1でロードされ、サイズ排除カラムで精製された。

【図6 c】F I T C - L A M - 1 1 1の検出のための、抗F I T C抗体 (a b 1 9 4 9 2、1 : 2 0、0 0 0希釈)を使用した免疫プロットの代表的なゲル画像である。

【図7】静脈内注射を6回投与した後の糸球体基底膜 (G B M)におけるF I T C - C o l 4 (1 (2) 2)及びF I T C - L A M - 1 1 1の局在化を示す。図7 a及び7 bは、未注射のヘテロ接合 (C o l 4 + / - (ハイブリッド))マウス (図7 a)、及びF I T C - C o l 4 (1 (2) 2)を6回注射されるアルポート (C o l 4 - / - (ハイブリッド))マウス (図7 b)の腎臓の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像である。上部パネルは抗F I T C抗体染色の画像であり、中央のパネルは抗アグリン染色の画像であり、底部パネルはD N AマーカーD A P I染色を使用した抗F I T Cと抗アグリン染色のオーバーラップ画像である。図7 c及び7 dは、未注射のヘテロ接合 (C o l 4 + / - (B 6))マウス (図7 c)、及びF I T C - L A M - 1 1 1を6回注射されるアルポート (C o l 4 - / - (B 6))マウス (図7 d)の腎臓の代表的な共焦点蛍光顕微鏡画像である。上部パネルは抗F I T C抗体染色の画像であり、中央のパネルは抗アグリン染色の画像であり、底部パネルはD N AマーカーD A P I染色を使用した抗F I T Cと抗アグリン染色のオーバーラップ画像である。

【図8】図8のaは、未注射のアルポートマウス (C o l 4 - / - 7 5日齢)における糸球体形態の代表的な画像を示す。図8のbは、C o l 4 - (1 (2) 2)投与されたアルポートマウス (C o l 4 - / -、8 8日齢)における糸球体形態の代表的な画像を示す。

【図9】C o l 4 - (1 (2) 2) (N = 5)で処置されたか、もしくは未処置 (N = 4)のいずれか、または対照ビヒクルのみ (N = 3)で処置されたアルポートマウス (C o l 4 - / -)における糸球体硬化のヒストグラムである。生後7 0日の各マウスから少なくとも1 0 0の糸球体が数えられ、その率は、各コホートにおける非硬化糸球体の平均数を示す。バーは各コホートにおける値の範囲を表す。未C o l 4 (N = 7)は、未注射、及びビヒクル注射されたアルポートマウスからの複合データを表す。

【図1 0】糸球体毛細管の代表的な電子顕微鏡画像を示す。図1 0 aは、ビヒクルのみを注射されたヘテロ接合マウス (C o l 4 + / -)の代表的な画像である (7 0日目)。図1 0 bは、ビヒクルを注射されたアルポートマウス (C o l 4 - / -)の代表的な画像である (7 0日目)。図1 0 cは、C o l 4 - (1 (2) 2)タンパク質を注射されたアルポートマウス (C o l 4 - / -)の代表的な画像である (7 0日目)。

【図1 1】C o l 4 - (1 (2) 2)を投与されたアルポートマウス (上)及び未処

10

20

30

40

50

置 / ビヒクル処置されたアルポートマウス (下) における血中尿素窒素 (B U N) 測定値である。

【図 1 2】 C o l 4 - (1 (2) 2) 投与されたアルポートマウス (上) 及び未処置 / ビヒクル処置されたアルポートマウス (下) の尿中アルブミン / クレアチニン比である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 0 】

本発明の 1 つ以上の実施形態の詳細は、以下の添付の説明に記載される。本明細書に記載されるものに類似するまたは同等のあらゆる材料及び方法が本発明の実践及び試験に使用され得るが、好ましい材料及び方法がここに記載される。本発明の他の特徴、目的、及び利点は説明から明らかであろう。この説明において、文脈が明確に別様を示さない限り、単数形は複数形も含む。別様に定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は、この発明が属する当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。矛盾する場合、本説明に従う。

【 0 0 4 1 】

本発明は、コラーゲン関連疾患、特にコラーゲン I V 3、4、及び 5 鎖ポリペプチドをコードする C O L 4 A 3、C O L 4 A 4、及び C O L 4 A 5 遺伝子における遺伝子突然変異に起因するアルポート症候群などの、コラーゲン I V タンパク質のうちの 1 つ以上の欠乏によって特徴付けられる疾患を治療するための薬学的組成物、薬剤、及び方法に関する。本発明は、コラーゲン I V に基づく構造的支持及び他の生理学的機能を回復させるために患部に機能性コラーゲン I V タンパク質を輸送し戻すことを目的とする。

【 0 0 4 2 】

コラーゲンは哺乳動物の主な構造構成成分である。多くの疾患及び状態は、組織におけるコラーゲンの過剰な蓄積、コラーゲン 鎖の突然変異、異常な組織化、翻訳後修飾の増加 / 減少、及び / または他の構造タンパク質とのコラーゲン相互作用の中断と関連する。コラーゲン 鎖ポリペプチドのいずれかにおける突然変異は、組織及び臓器に支持を提供する、発達のためにシグナルを提示する、ならびに / または生理学的機能を支持する正しいコラーゲン構造の不在に起因する、様々な稀な疾患をもたらす。例えば、C O L 4 A 3、C O L 4 A 4、及び C O L 4 A 5 遺伝子における突然変異に起因するコラーゲン I V の不在は、後に腎不全をもたらす場合がある糸球体基底膜を損なう。

【 0 0 4 3 】

コラーゲン媒介障害の治療のために、不在または異常なコラーゲンをどのように回復させるかの問題は未だ対処されていない。本発明は、コラーゲン媒介障害、特にコラーゲン I V 媒介障害であるアルポート症候群を治療するための新規薬学的組成物、薬剤、及び方法を提供する。アルポート症候群を治療する、及び / または腎不全の過程を予防、緩徐するための方法も本明細書において提供される。

【 0 0 4 4 】

コラーゲン I V 3、4、及び 5 鎖 (C O L 4 A 3、C O L 4 A 4、及び C O L 4 A 5) をコードする遺伝子における突然変異は、糸球体腎炎、末期腎疾患、聴力損失、及び眼合併症によって特徴付けられるアルポート症候群をもたらす。現在、アルポート症候群に対する特定の治療はない。高血圧及び腎疾患の他の症状を有する個人に使用される同じ治療がアルポート症候群の個人に使用される。腎臓移植は通常、アルポート症候群の個人において非常に成功しており、末期腎不全が近づいているときの最良の治療と考えられる。しかしながら、多くの患者は、抗糸球体基底膜疾患の侵襲性形態であるアルポート移植後腎炎 (A P T N) を発症する。

【 0 0 4 5 】

本発明の原理は、糸球体基底膜などの患部に組換えヒトコラーゲン I V タンパク質を輸送し戻して、その正常な構造、したがってその濾過機能を回復させることである。以前に、いくつかの研究が、大きいタンパク質が糸球体基底膜内に浸透できることを示してきた。内皮窓は約 1 0 0 ~ 1 5 0 n m であり、フェリチンなどの大きいタンパク質の通過を可

10

20

30

40

50

能にするのに十分に大きい、コラーゲンⅠⅤプロトマーなどの細長い分子、または更に細長いコラーゲンⅠⅤ二量体がGBM内に浸透可能であるかは知られていない。ネフローゼ系球体基底膜は、通常の系球体基底膜よりもフェリチンに透過性である。したがって、本発明は、静脈内注射により、罹患した患者に組換えコラーゲンⅠⅤタンパク質、特にコラーゲンⅠⅤプロトマー、二量体、四量体、または多量体を投与することにより、アルポート症候群を治療するための薬学的組成物及び方法を開発する。我々は、コラーゲンⅠⅤプロトマー、二量体、四量体、または多量体が腎臓の系球体基底膜内に浸透し、他の構成成分と共に細胞外マトリックスネットワーク内に埋め込まれる新規発見を開示する。

【0046】

加えて、組換えコラーゲンⅠⅤを含む薬学的組成物は、再生薬剤の一部としても使用され得る。非限定的な例として、本発明からの組換えコラーゲンⅠⅤは、人工足場及び/もしくは天然の脱細胞化足場に組み込むことができる、他の細胞外マトリックスタンパク質と混合され得る、幹細胞のインビボ、エクスピボ、及び/もしくはインビトロ成長、分化、及び選択のための基材として採用され得る、または短期創傷対の血栓症強化パッチとして採用され得る。

定義

【0047】

別様に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、この発明が属する当業者によって通常理解される意味を有する。以下の用語は、別様に指定されない限り、付与された意味を有する。また、定義は、本明細書に記述される本発明を理解するのに役立つ。

【0048】

本明細書で使用されるとき、用語「プロトマー」は、大きい巨大分子（すなわち、オリゴマータンパク質）の分子構造のサブユニットを指す。コラーゲンの文脈において、コラーゲンプロトマー自体は、3つの鎖ポリペプチドからなる三量体である。例えば、コラーゲンⅠⅤプロトマーは、3つの鎖ポリペプチドのヘテロ三量体である。コラーゲンプロトマーは、二量体、四量体、オリゴマー、及び多量体を形成する。

【0049】

本明細書で使用されるとき、用語「基底膜」は、「基底層」とも称され、原線維の薄い広がりを意味する。基底膜は、いくつかの特定の種類のコラーゲン（例えば、ⅠⅤ型及びⅠ～Ⅴ型）、ラミニン、及び様々な種類の細胞接着分子（CAM）、プロテオグリカン、及びフィブロネクチンを含む、少なくともいくつかの確認されたタンパク質及びペプチド誘導体から構成される。基底膜は、様々な組織（例えば皮膚）の細胞の根底にある線維の薄いシートを形成する。基底膜は主に、細胞を下に結合組織に結合する細胞の係留系として機能するか、または異物もしくは悪性細胞に対する保護バリアを提供するか、または腎臓の系球体を通して血液を濾過する。

【0050】

本明細書で使用されるとき、用語「系球体基底膜（GBM）」は、系球体濾過バリアの細胞外マトリックス構成成分として機能する、腎臓における系球体の基底膜を指す。これは有足細胞及び系球体内皮細胞層と隣接している。主なGBMの構成成分は、ラミニン-521、コラーゲン3-4-5（ⅠⅤ）、ナイドジェン、及びヘパラン硫酸プロテオグリカンアグリンである。

【0051】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書において、アミノ酸残基のポリマーを指すように互換的に使用され、特定の長さのポリマーを指さない。よって、ペプチド、オリゴペプチド、及びタンパク質断片は、ポリペプチドの定義内に含まれる。本用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に生じるアミノ酸の類似体もしくは模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に生じるアミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは、例えば、糖タンパク質を形成するために炭水化物残基を付加することにより修飾され得る。翻訳後修飾の別の例は、多くのコラーゲンポリペプチドにお

10

20

30

40

50

けるプロリン及びリジンのヒドロキシル化である。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、糖タンパク質ならびに非糖タンパク質を含む。

【0052】

本明細書で使用されるとき、用語「治療する」または「治療」は、予防及び／または治療目的のための、薬学的組成物、例えば、コラーゲンⅠⅤタンパク質を含む本発明の組成物を投与することを指す。「疾患を予防する」ことは、まだ病気ではないが、特定の疾患に感受性を示す、またはさもないければそれを発症する危険性がある患者の予防的治療を指す。例えば、患者は、遺伝子検査により、COL4A3、COL4A4、及び／またはCOL4A5遺伝子に突然変異を有する。「疾患を治療する」ことは、既に疾患に罹患している患者に、疾患を寛解させ、患者の状態、例えば腎機能を改善するために投与することを指す。

10

【0053】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲において論じられる。

コラーゲン

【0054】

コラーゲンは哺乳動物において最も豊富なタンパク質であり、総タンパク質の約25%を構成する。コラーゲンは、皮膚、骨、腱、軟骨、及び歯周組織の主な線維構成成分である。典型的なコラーゲン分子は、3本鎖らせんの、長く、棒状の剛構造である。コラーゲンは、更に架橋されて、原線維、シート、及びフィラメントなどの高分子コラーゲン構造／ネットワークを形成する。タンパク質のコラーゲンスーパーファミリーは、様々な組織の一体性を維持する際に主要な役割を担い、またいくつかの他の重要な機能も有する。

20

【0055】

コラーゲン分子は身体全体にわたって見られるが、それらの種類及び編成は、コラーゲンが特定の臓器／組織において担う構造的役割により決定される。一部の臓器では、コラーゲンは、細胞外マトリックスまたは眼の様々な体液にあるような、構造を支持するゲルとして分散され得る。他の臓器では、コラーゲンは、腱にあるような、多大な強度を提供する密接した平行線維に束ねられ得る。骨のコラーゲン線維は、特に機械的攻撃に抵抗するように配置され得る。

コラーゲンの型

30

【0056】

コラーゲンは、高度に編成された超分子組織化を形成する25超のコラーゲン型（表1を参照）、ならびにコラーゲン様ドメインを有する追加のタンパク質を含む、大きなファミリーの高度に発達した繊維性タンパク質である。多くの遺伝学的、化学的、及び免疫学的に異なる型のコラーゲンも特定されている。コラーゲンの変種は、塩基性ポリペプチド鎖の組織化における相違、異なる長さのらせん、らせんにおける様々な中断、らせンドメインの終結における相違、及び／または非コラーゲンドメインの切断に起因し得る。

【0057】

コラーゲンは、身体におけるそれらの位置及び機能に基づいて、いくつかのグループに分類される。コラーゲンⅠ型、ⅠⅠ型、ⅠⅠⅠ型、Ⅴ型、及びⅩⅠ型は、原線維形成コラーゲンであり、これらは、原線維における個々のコラーゲン分子の規則的なジグザグ状の詰め込みを示す特徴的な縞模様を有する原線維の線状ポリマーを形成する。コラーゲンⅠⅩ型、ⅩⅠⅠ型、ⅩⅠⅤ型、及びⅩⅤⅠ型は、これらの原線維を互いに、及び／または細胞外マトリックスの他の構成成分に連結する、コラーゲン原線維の表面に結合する原線維会合コラーゲンである。コラーゲンⅠⅤ型、ⅤⅠⅠⅠ型、及びⅩ型は、ネットワーク形成コラーゲンであり、これらは原線維ではない3次元の網目を形成する。コラーゲンⅠⅤ型分子は、基底膜の主な部分を構成するシートに組織化される。第4グループのコラーゲンには、コラーゲンⅤⅠ型（数珠状原線維形成コラーゲン）及びⅤⅠⅠ型（係留線維）などの全ての他のコラーゲンが含まれる。

40

コラーゲンの構造的特徴

50

【 0 0 5 8 】

全てのコラーゲン分子は、鎖と称される3つのポリペプチドからなり、この鎖は、それらの長さの少なくとも一部に対して互いに巻きついて3重らせんを形成する。3重らせんを形成しないコラーゲンの部分は、非コラーゲンまたは「NC」ドメインと呼ばれ、例えば、NC1、NC2など、各コラーゲン内で番号付けされる。個々の鎖ポリペプチドは、小さいN及びC末端グロブドメイン（すなわち、非コラーゲンドメイン）に隣接している、多くのGly-X-Y反復を有するドメイン（すなわち、コラーゲンドメイン）を形成する大きな中央3重らせんを含有する、類似したドメイン構成を有する。3重らせんコラーゲンプロトマーのいくつかの型は、ホモ三量体を形成する3本の遺伝学的に同一の鎖を含有し、一方で、他は、ヘテロ三量体を形成する2本または3本の異なる鎖を含有する。

10

【 0 0 5 9 】

H結合：3つの鎖ポリペプチドは、一緒に保持され、それらの間の水素結合により安定化される。より一般的ならせんとは異なり、コラーゲンらせんは鎖内水素結合を有しない。

【 0 0 6 0 】

アミノ酸配列：コラーゲンらせンドメインは、3重らせんの形成に重要である特定のアミノ酸（グリシン、プロリン、及びヒドロキシプロリン）を含有する。これらのアミノ酸は、各鎖ポリペプチドにおいて規則的な配置を有する。配列は、Gly-X-Y（式中、Xは頻繁にプロリンであり、Yはヒドロキシプロリンであることが多い（ヒドロキシリジンでもあり得る））のパターンに従うことが多い。よって、鎖のらせん部分の大半は、その配列が（-Gly-Pro-Hyp-）_nとして表され得るポリトリペプチドと見なされ得る。プロリンまたはヒドロキシプロリンは、全配列の約1/6を構成し、グリシンは配列の1/3を占める。プロリンは、その環構造がペプチド鎖において「ねじれ」をもたらすため、各鎖のらせん配向の形成を促進する。グリシンは3重反復の3番目の位置毎に見られる。グリシンは一番小さく、側鎖を有しない非極性アミノ酸であるため、線維構造タンパク質において独特の役割を担う。グリシンの側鎖は水素原子であり、このような小さい側鎖は、他のアミノ酸が収まらない場所に容易に収まることができる。例えば、グリシンのみがコラーゲンらせんの内部アミノ酸内にあることができる。

20

【 0 0 6 1 】

コラーゲンは、酵素及び輸送タンパク質のような化学的に反応性の側基を含有しない。

30

【 0 0 6 2 】

3重らせん構造：コンパクトな構造に折り畳まれる大半の球状タンパク質とは異なり、繊維性タンパク質であるコラーゲンは、そのアミノ酸側鎖の多くを3重らせん分子上に置く、細長い3重らせん構造を有する。各鎖は左巻きらせんを形成し、一緒に整合されて3重右巻きらせんプロトマーを形成する。鎖のそれぞれは、豊富なグリシンと共にそれらの幾何学的に制約されたカルボキシル及び（二級）アミノ基を伴って、高いプロリン及びヒドロキシプロリン環含有量のため、左巻き対称に成形される。左巻きらせんはいずれの鎖内水素結合なしに形成される。3重らせんは連続ストレッチであり得るか、または非コラーゲン要素により中断され得る。

40

【 0 0 6 3 】

ヒドロキシプロリン及びヒドロキシリジン：コラーゲンは、ヒドロキシプロリン（Hyp）及びヒドロキシリジン（Hyl）を含有し、これらは大半の他のタンパク質には存在しない。これらの残基は、プロリン及びリジン残基の一部の翻訳後ヒドロキシル化から生じる。ヒドロキシル化反応は酵素（ヒドロキシラーゼ）により触媒され、アスコルビン酸（ビタミンC）を必要とする。ヒドロキシプロリンは、鎖間水素結合の形成を最大にするため、コラーゲンの3重らせん構造を安定化させる際に重要である。

【 0 0 6 4 】

グリコシル化：いくつかの場合では、コラーゲンのヒドロキシリジン残基のヒドロキシル基は、酵素学的にグリコシル化され得、コラーゲンを糖タンパク質にする。最も一般的

50

には、グルコース及びガラクトースは、3重らせん形成前にポリペプチドに順に結合される。

【0065】

架橋：コラーゲンの引っ張り強度は、個々のタンパク質サブユニット間の共有結合分子間架橋の形成に依存する。高等脊椎動物における原線維含有コラーゲン（例えば、I型、II型、III型、V型、及びXI型）は、リジロキシダーゼにより、リジン（またはヒドロキシリジン）側鎖から酵素学的に生成されたアルデヒドの反応に基づいた機序を通して架橋される。ある特定の他のコラーゲン型（例えば、軟骨のコラーゲンIX）もリジンオキシダーゼ機序により架橋される。

コラーゲンの生合成

【0066】

コラーゲン分子のポリペプチド前駆体の合成の主な部位は、線維芽細胞、軟骨細胞（軟骨の）、骨芽細胞（骨の）、象牙芽細胞、及びセメント芽細胞を含む、間葉系細胞、ならびにそれらの類似体である。他の細胞は、上皮細胞、内皮細胞、筋細胞、及びシュワン細胞を含み得るが、これらに限定されない。

【0067】

前駆体ポリペプチドは、特定のmRNAからのプレプロ-鎖の翻訳、シグナルペプチド（プロ-鎖）の切断、プロリンのヒドロキシル化、リジンのヒドロキシル化、ヒドロキシリジンのグリコシル化、及びC末端ペプチドの会合/ジスルフィド結合形成/C末端プロペプチド（プロコラーゲン分子）の組み込みを含む、順に起こる事象を通して細胞の内部で形成される。コラーゲン分子は、次に、細胞外マトリックス中に分泌される。酵素修飾後、成熟したコラーゲン単量体が凝集し、架橋となりコラーゲン線維を形成する。

【0068】

プロ鎖の形成：排出/分泌のために生産された大半のタンパク質と同様に、鎖（プレプロ-鎖）の新しく合成されたポリペプチド前駆体は、それらのN末端側に特別なシグナル配列を含有する。シグナル配列は、リボソームの粗面小胞体（RER）への結合を促進し、プレプロ-鎖の、RERの管腔内への通路を指向する。シグナル配列はRERにおいて迅速に切断されて、プロ-鎖と呼ばれるコラーゲンの前駆体をもたらす。

【0069】

翻訳後修飾：プロ-鎖は、RERの管腔内のいくつかの酵素によって処理されるが、ポリペプチドは尚も合成される。-Gly-X-Y-配列のY位置に見られるプロリン及びリジン残基は、ヒドロキシル化されてヒドロキシプロリン及びヒドロキシリジン残基を形成する。これらのヒドロキシル化反応は、分子の酸素 Fe^{2+} 、及び還元剤のアスコルビン酸（ビタミンC）を必要とする。プロリンヒドロキシラーゼ及びリジンヒドロキシラーゼの2つのヒドロキシル化酵素が通常関与する。プロリン及びリジンヒドロキシル化の欠落は、安定した3重らせんの形成のような鎖間のH結合の形成を損なう。加えて、コラーゲン原線維は架橋されることができず（以下を参照）、組織化された線維の引っ張り強度を大幅に減少させる。ヒドロキシプロリンは、温度変化においてコラーゲン原線維の変性も妨げる場合がある。非ヒドロキシル化3重らせんは37より低い温度で変性を受けることが示されている。いくつかのヒドロキシリジン残基は、グルコースまたはグルコシル-ガラクトースとのグリコシル化により修飾される。

【0070】

3重らせん組織化：ヒドロキシル化及びグリコシル化の後、3本のプロ-鎖は、プロペプチドと呼ばれる非らせんN及びC末端ドメインに隣接する3重らせんの中央コラーゲン領域を有するプロコラーゲン分子（プロトマー）を形成する。

【0071】

プロコラーゲン分子の形成は、中間のコラーゲンドメインを通して3重らせん形成の核生成のための正しい整合をもたらす、3本のプロ鎖のC末端非コラーゲンドメイン間の一連の非共有結合相互作用で始まる。C末端ポリペプチドのこの最初の認識は、プロコラーゲン組織化のための特定の鎖を選択する。例えば、プロコラーゲンI型及びIII型は

10

20

30

40

50

、両方とも皮膚の線維芽細胞において合成され、またそれらのプロコラーゲン鎖配列において高レベルの同一性を有するにもかかわらず、型特異的様式で組織化される。コラーゲン I は 2 本のプロ 1 (I) 鎖及び 1 本のプロ 2 (I) 鎖のヘテロ三量体として存在するが、コラーゲン I I I は 3 本のプロ 1 (I I I) 鎖を含む絶対ホモ三量体である。

【 0 0 7 2 】

分泌：プロコラーゲン分子は、分泌小胞にパッケージされるゴルジ装置を通過して移動する。小胞は細胞膜と融合し、プロコラーゲン分子の細胞外空間への放出をもたらす。

【 0 0 7 3 】

順に起こる生合成事象は、プロコラーゲンが成熟コラーゲンに処理される細胞外空間において生じる。このような事象は、N 末端及び C 末端ドメイン (プロペプチド) 切断 (N - 及び C - プロテイナーゼ)、微小線維 (リジン / ヒドロキシリジン末端 N H 2 酸化 (C u 2 + 含有リジロキシダーゼ)) を形成するコラーゲン分子の整合、及び最終原線維形成 (還元性架橋形成及び架橋の成熟) を含む。原線維は未成熟であり、強度を欠く。これらの未成熟原線維は架橋され、徐々に成熟コラーゲン原線維を形成する。架橋は緩慢なプロセスであり、コラーゲンの引っ張り強度は線維の成長及び再編成を介して長期間にわたって着実に増加する。

【 0 0 7 4 】

プロペプチドの細胞外切断：大半のプロコラーゲン分子に関して、末端非コラーゲンドメイン (プロペプチド) は、細胞外空間へのそれらの放出後、N - 及び C - プロコラーゲンペプチダーゼにより切断される。切断されたトロポコラーゲンは互いに架橋してコラーゲン線維または他の構造を形成する。

【 0 0 7 5 】

これらのプロペプチドの多くは、コラーゲンドメインとは異なる重要な機能を有する。例えば、コラーゲン X V I I I 型から放出された断片であるエンドスタチンは、血管新生及び腫瘍成長を強く阻害する。

【 0 0 7 6 】

コラーゲン線維の形成：個々のトロポコラーゲン分子は、自然発生的に会合してコラーゲン原線維を形成する。これらはジグザグ状のパターンに配置された隣接したコラーゲン分子と規則的でオーバーラップする平行なアレイを形成し、それぞれが分子のおよそ 4 分の 3 の長さその隣にオーバーラップする。本明細書で使用されるとき、用語「トロポコラーゲン」は、N 末端及び C 末端プロペプチドが切断されるコラーゲンサブユニットを指す。

【 0 0 7 7 】

架橋：架橋は細胞外酵素のリジロキシダーゼにより触媒される。この C u 2 + 含有細胞外酵素は、コラーゲンにおけるリジン及びヒドロキシリジン残基のいくつかを酸化脱アミノ化する。生じる (アリシン及びヒドロキシアリシン) 反応性アルデヒドは、隣のコラーゲン分子のリジンまたはヒドロキシリジン残基と縮合して共有結合性架橋を形成し、よってコラーゲン線維を成熟させ、次に、反応性アルデヒドはコラーゲン残基と組み合わせさせて架橋を形成する。

コラーゲンの分解

【 0 0 7 8 】

正常なコラーゲンは、高度に安定しており、数年もの半減期を有する。しかしながら、コラーゲンの分解は、形態形成及び成長を受けるあらゆる正常な組織の主要な構成要素である。結合組織は動的であり、例えば組織の損傷に回答して常に再構築される。このプロセスが厳密な制御下に置かれることが重要となる。コラーゲンの破壊は、マトリックスメタロプロテイナーゼ (M M P) という大きいファミリーの一部であるコラゲナーゼにより主に媒介される。コラゲナーゼは、3 重らせん構造が一般的なプロテイナーゼの大半に耐性であるため、コラーゲンを特異的に加水分解するように進化した特殊な酵素である。例えば、コラーゲン I の切断部位は限定されており、4 分の 3 及び 4 分の 1 の長さの断片を生成する。これらの断片は、他のマトリックスメタロプロテイナーゼにより、それらの成分のア

10

20

30

40

50

ミノ酸に分解される。

【 0 0 7 9 】

コラーゲンの生合成は、細胞及び組織特異的様式で、正常な発達及び恒常性の間に厳密に調節される。様々な成長因子及びサイトカインが、発達、炎症、創傷治癒、及び他の生理学的状態中のコラーゲン生産を調節することが示された（例えば、PDGF、TGF-β、FGF、及びIGF、IL-1、IFN-γ、THF-α、ならびにグルココルチコイド）。これらの翻訳後修飾酵素のいくつかは、多くの線維性疾患におけるコラーゲン蓄積を治療するための薬物の開発に魅力的な標的であり得る。

コラーゲン病

【 0 0 8 0 】

結合組織の主な構成成分として、コラーゲンタンパク質の欠損が中枢神経系から筋骨格及び心血管系まで、ヒトの身体の多くの系に影響を及ぼし得ることは回避できない。広範な疾患は、約22のコラーゲン遺伝子において特定された1000超の突然変異に起因する。これらの突然変異は、欠失、小さい挿入、RNAスプライシング突然変異、ナンセンス突然変異、及び/またはミスセンス突然変異を含む。コラーゲン疾患のいくつかの例としては、骨形成不全症、多くの軟骨異形成、エーラース・ダンロス症候群のいくつかの亜型、アルポート症候群、ベスレムミオパチー、表皮水疱症のある特定の亜型、ノブロック症候群、及び同様にいくつかの場合の骨粗鬆症、動脈瘤、変形性関節症、及び椎間板疾患が挙げられる（表1を参照）。更なるコラーゲン遺伝子における突然変異の特徴はおそらく更なる疾患をこのリストに追加する。

【 0 0 8 1 】

表1．コラーゲン及び疾患

【 0 0 8 2 】

【表1 - 1】

| 型 | 遺伝子 (複数可) | 特徴 | 提案された機能 | 起源の細胞 | 障害 |
|----|------------------|---|-------------------|----------------------|--|
| I | COL1A1 COL1A2 | ヒトの身体の最も豊富なコラーゲン；大半は瘢痕組織に存在し、修復により組織が治癒したときの最終産物；一般に、腱、皮膚、動脈壁、筋原線維の筋内膜、線維軟骨、ならびに骨及び歯の有機部分に見られる。 | 原線維形成；引っ張り強度を提供する | 線維芽細胞； 細網細胞；平滑筋細胞 | 骨形成不全症；エーラース・ダンロス症候群1型、2型、7型；乳児皮質過骨症（キャフエイ病） |
| II | COL2A1 | 硝子軟骨；全軟骨タンパク質の50%を構成する；眼の硝子体 | 原線維形成；引っ張り強度を提供する | | コラゲノパチー（Collagenopathy）；軟骨低発生症；軟骨無発生 |

【 0 0 8 3 】

【表 1 - 2】

| | | | | | |
|----------|--|---|---|-------------------------|--|
| | | 液；椎間板 | る | | 症 2 型；スティック ラー症候群；先天性 脊椎骨端異形成症候 群；脊椎骨端骨幹端 異形成ストラドワイ ック型 |
| I I I | COL 3 A 1 | これは肉芽組織 のコラーゲンで あり、より強い I 型コラーゲン が合成される前 に若い線維芽細胞 により迅速に 生産される細網 線維。同じく、 動脈壁、皮膚、 腸、及び子宮に 見られる。 | 原線維形 成； 胎児皮 膚、血 管；引っ 張り強度 を提供す る | 線維芽細胞； 内皮細胞；細 網細胞 | エーラース・ダンロ ス症候群（I V 型） |
| I V | COL 4 A 1 COL 4 A 2 COL 4 A 3 COL 4 A 4 COL 4 A 5 COL 4 A 6 | 基底膜；眼水晶 体毛細管におけ る濾過系及び腎 臓におけるネフ ロンの糸球体の 一部としても機 能する。 | ネットワ ーク形 成；ラミ ニン及び ヘパラン 硫酸と相 互作用す る；基底 膜の主な 構成成分 | 有足細胞；上 皮及び内皮細胞 | アルポート症候群； グッドパスチャー症 候群 |
| V | COL 5 A 1 COL 5 A 2 COL 5 A 3 | 大半の間質組 織、コラーゲン I と関連する、 胎盤と関連す る。 | 基底膜と 間質との 間の結合 体、細胞 の結合及 び遊走を 促進する | 線維芽細胞； 平滑筋細胞 | エーラース・ダンロ ス症候群（1 型及び 2 型、古典的） |
| V I | COL 6 A 1 COL 6 A 2 COL 6 A 3 | 大半の間質組 織、I 型コラー ゲンと関連す る。コラーゲン V I 微小線維 は、筋肉、皮 膚、腱、軟骨、 椎間板、水晶 体、内臓、及び 血管を含む多種 多様な細胞外マ | マトリッ クス組織 化；結合 組織に細胞 を結合 する | 線維芽細胞 | ウルリッヒ型先天性 筋ジストロフィー； ベスレムミオパチー |

10

20

30

40

【表 1 - 3】

| | | | | | |
|------------|--|--|---|---------|---|
| | | トリックスにおいて見られる。 | | | |
| V I I | COL 7 A 1 | 真皮表皮接合部における係留線維を形成する | ネットワーク形成；大半は重層扁平上皮の下。上皮細胞の基底面と下層の結合組織を連結する、係留線維 | 線維芽細胞 | 栄養障害型表皮水疱症；劣性栄養障害性表皮水泡症；パート症候群；新生児の一過性の水泡性皮膚炎 (Transient bullous dermolysis of the newborn) |
| V I I I | COL 8 A 1 COL 8 A 2 | 一部の内皮細胞；デスメ膜；角膜 | 細胞の表現型の安定化及び細胞一体性の維持 | 角膜線維芽細胞 | 後部多形性角膜ジストロフィー 2；フックスジストロフィー 1 |
| I X | COL 9 A 1 COL 9 A 2 COL 9 A 3 | F A C I T コラーゲン、軟骨、I I 型及び X I 型原線維と関連する | 原線維関連。I I 型コラーゲンに結合し、他の結合組織要素の結合を媒介する。 | | 骨端異形成症、重複、2 (EDM 2)；EDM 3 及び EDM 6 |
| X | COL 1 0 A 1 | 肥大及び鉱化軟骨 | 肥大軟骨の除去を促進する；軟骨の骨への転換を促進する | | シュミット型骨幹端軟骨異形成症 |
| X I | COL 1 1 A 1 COL 1 1 A 2 | 軟骨 | I I 型コラーゲンの直径を調節し、コラーゲンプロテオグリカン相互作用を媒介する | | ワイセンバッハー・ツウェイミュラー症候群；耳脊椎巨大骨端異形成症 |
| X I I | COL 1 2 A 1 | F A C I T コラーゲン；原線維、デコリン、 | 原線維に関連する；腱、 | 線維芽細胞 | エーラース・ダンロスミオパチー；ベスレムミオパチーに類 |

10

20

30

40

【表 1 - 4】

| | | | | | |
|-----------------|----------------|--|----------------------------------|---------|------------------------|
| | | 及びグリコサミノグリカを含有する I 型と相互作用する | 靱帯。I 型コラーゲンに結合し、他の結合組織要素の結合を媒介する | | 似する |
| X I I I | COL 1 3 A 1 | 膜貫通コラーゲン、インテグリン $\alpha 1 \beta 1$ 、フィブロネクチン、ならびにナイドジェン及びパールカンのような基底膜の構成成分と相互作用する。 | 細胞膜 | | 既知の疾患なし |
| X I V | COL 1 4 A 1 | F A C I T コラーゲン； 全組織 | | 線維芽細胞 | 掌蹠角化症 |
| X V | COL 1 5 A 1 | | | | 既知の疾患なし |
| X V I | COL 1 6 A 1 | | | | クローン炎症性腸疾患 |
| X V I I | COL 1 7 A 1 | 膜貫通コラーゲン、BP 180 としても知られる、180 kDa タンパク質 | 半接着斑 | ケラチノサイト | 水疱性類天疱瘡及びある特定の形態の表皮水疱症 |
| X V I I I | COL 1 8 A 1 | エンドスタチン源； 網膜構造及び神経管閉鎖において役割を担う。 | | | ノブロック症候群 |
| X I X | COL 1 9 A 1 | F A C I T コラーゲン | | | 既知の疾患なし |
| XX | COL 2 0 A 1 | | | | 既知の疾患なし |
| XX I | COL 2 1 A 1 | F A C I T コラーゲン | | | 既知の疾患なし |
| XX I I | COL 2 2 A 1 | | | | 既知の疾患なし |
| XX I I I | COL 2 3 A 1 | M A C I T コラーゲン | | | 先天性多毛症 |
| XX | COL 2 | | | | 既知の疾患なし |

【表 1 - 5】

| | | | | | |
|----------------|-------------|---------|--|--|-------------------|
| IV | 4A1 | | | | |
| XX V | COL2 5A1 | | | | 反社会性パーソナリ ティ障害 |
| XX VI | EMID 2 | | | | 既知の疾患なし |
| XX VI I | COL2 7A1 | | | | 盗血症候群 |
| XX VI II | COL2 8A1 | | | | 既知の疾患なし |
| XX IX | COL2 9A1 | 表皮コラーゲン | | | アトピー性皮膚炎 |

10

【0087】

コラーゲンポリペプチドをコードする遺伝子における遺伝子突然変異に起因するコラーゲン欠乏の疾患に加えて、多くの自己免疫障害は、血管疾患など、免疫系がコラーゲンに影響を及ぼすときに生じる。コラーゲン血管疾患は、強直性脊椎炎、皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、乾癬性関節炎、関節リウマチ、強皮症、及び全身性エリテマトーデスを含むが、これらに限定されない。

20

【0088】

更に、コラーゲン線維合成における多くの工程のうちのいずれか1つにおける欠損（例えば、コラーゲン修飾酵素欠損）は、コラーゲンが線維を適切に形成し、よって、コラーゲンにより通常提供される必要とされる引っ張り強度を有する組織を提供する能力がない遺伝性疾患をもたらす場合がある。

コラーゲンの医療用途

【0089】

コラーゲンは医療分野において広く使用されている。コラーゲンの最も一般的な使用は、美容外科において、及び火傷患者における創傷治癒の補助としての使用である。コラーゲンは、重度の火傷の対応に使用される人工皮膚代替物の構築に使用され得る。コラーゲンは、骨の再構築として、ならびに多種多様な歯科、整形外科及び外科目的のために広く使用される。他の用途は、創傷包帯及び組織成長のためのマトリックスとしての使用を含む。

30

【0090】

コラーゲンの生化学的な特徴のため、コラーゲンは、細胞培養（細胞付着のため、細胞の挙動及び細胞外環境との細胞相互作用の研究など）における用途、バリアフィルム/シートとして、コラーゲンヒドロゲル、コラーゲン-リボソーム、コラーゲンナノ粒子/ナノ球体などの薬物送達のため、及びコラーゲン錠剤/ペレット、生分解性材料、及び代替物など、多くの他の分野において使用されている。

40

【0091】

コラーゲンの医療用途は、薬物送達のためのコラーゲンスポンジ（例えば、米国特許第3,157,524号、同第4,412,947号、及び同第5,512,301号を参照）；コラーゲンフィルム（例えば、米国特許第3,014,024号を参照）；コラーゲンヒドロゲル（例えば、米国特許第5,108,424号、同第5,213,701号を参照）；創傷治癒剤としてのコラーゲン（例えば、米国特許第3,810,473号、同第4,841,962号、同第4,837,285号、同第4,925,924号、同第5,081,106号、及び同第5,766,631号を参照）；コンタクトレンズの作製（例えば、米国特許第4,268,131号を参照）；コラーゲンナノ粒子（例えば、米国特許第5,932,245号及び第8,668,926号ならびに米国特許公開第

50

20130323311号を参照)；神経修復(例えば、米国特許公開第20110276066号を参照)；軟骨修復、補綴、整形外科用グラフト、腱置き換え用インプラント、軟組織及び骨インプラントのためのインプラントなどの様々な目的のためのコラーゲンインプラント(例えば、米国特許第3,272,204号、同第4,424,208号、同第5,171,273号、同第5,523,291号、同第6,080,194号、同第7,544,212号、及び同第7,595,062号、ならびに米国特許公開第20080305517号、同第2010108945号、及び同第20110264237号を参照)、治療及び診断用途のための修飾されたコラーゲン(例えば、米国特許第7,183,383号及び第8,283,414号ならびに米国特許公開第20130116405号を参照)など、当該技術分野において広く論じられている。

10

コラーゲン生産

【0092】

医療目的に使用されるコラーゲンの大半は、認証されたBSE(牛海綿状脳症)を有しないウシからのウシコラーゲンである。他に一般に使用されるものはブタ組織及びウマ組織を含む。いくつかの場合では、ヒト患者自身の脂肪、ヒアルロン酸、またはポリアクリルアミドゲルも使用される。ヒトコラーゲンは、ドナー屍体、胎盤、及び免疫反応の可能性が低い中絶胎児から抽出され得る。

【0093】

多くの組換え技術は、組換えコラーゲンタンパク質を生産するために開発されてきた。生物工学により組換えコラーゲンタンパク質を生産するためのこれらの方法は当業者に周知である。いくつかの例示的な方法は、遺伝子導入動物の乳におけるヒト組換えコラーゲンの生産(例えば、米国特許第5,667,839号、同第5,895,833号、同第5,962,648号、及び同第6,111,165号を参照)、植物細胞における哺乳動物組換えコラーゲンの生産(例えば、米国特許第6,617,431号、同第7,232,886号を参照)、哺乳類細胞、昆虫、ならびに細菌及び酵母などの微生物における哺乳動物組換えコラーゲンの生産(例えば、米国特許第6,150,081号、同第7,932,353号、同第8,084,579号、同第8,188,230号、及び米国特許公開第20020142391号、同第20140107036号を参照)、組換えキメラ3重らせんコラーゲンの生産(例えば、PCT特許公開第WO2010071938号を参照)、3つの鎖ポリペプチドとの融合タンパク質(例えば、米国特許公開第20130237486号を参照)、ならびに未変性コラーゲンタンパク質を発現させるための線維芽細胞の刺激(例えば、米国特許公開第20100239556号を参照)を含む。

20

30

コラーゲン関連疾患の動物モデル

【0094】

遺伝子操作されたコラーゲン突然変異を有するマウスは、様々なコラーゲンの機能を定義するため、ならびにコラーゲンの関連疾患及び生理学的機能の多くの態様を研究するために有用であることを証明してきた。例えば、COL4A3ノックアウトマウスは、アルポート症候群のモデルとして使用される(Cosgrove et al., Genes Dev., 1996, 10, 1403-1413)。

40

【0095】

本発明によると、研究は、コラーゲンIV含有組織から抽出されるか、または組換え方法により生産されるかのいずれかのコラーゲンIVを、静脈内または他の適切な送達経路により、アルポート症候群のマウスモデルに注射するように設計される。系球体基底膜(GBM)内へのコラーゲンIV組み込み、GBMの組織学的な特徴、コラーゲンIV受容体結合、他のGBM構成成分との相互作用、細胞遊走及び分化、ならびに/またはバイオマーカー測定などの他のコラーゲンIV機能アッセイの網羅的分析は、アルポート様症候群を有するマウスにコラーゲンIVを投与した後に行われる。投与後、コラーゲンIVの置き換えで処置されたマウスは、血尿、蛋白尿、アルブミン対クレアチニン比、または推定系球体濾過量の尿分析など、腎機能に関して分析される。

50

コラーゲンⅣ

【0096】

コラーゲンⅣは、細胞外基底膜に見られる最も豊富なタンパク質である。COL4A1からCOL4A6までの6つの遺伝子によりコードされる1～6の6つの遺伝学的に異なるコラーゲンⅣ鎖が存在し、これらは組織化されて3つの異なるヘテロ三量体（プロトマーと称される）：1-1-2、3-4-5、及び5-5-6を形成する。各鎖ポリペプチドのアミノ酸配列は、それらのUniProt受入番号を含む表2に列記される（2つ以上のイソ型が既知である場合、イソ型1が示される）。代表的な配列が実質的に各ポリペプチドを変更しない任意のバリエーション及び誘導体も含むことを当業者は理解する。各コラーゲンⅣアルファ鎖は、3つのドメイン：7Sドメイン（小さい非コラーゲンN末端ドメイン）、中間領域における主なコラーゲンドメイン（約1400個のアミノ酸残基）、及びNC1ドメイン（C末端ドメインを構成する非コラーゲン球状ドメイン（約230個の残基））に分類され得る。

10

【0097】

全てのコラーゲン鎖のように、コラーゲンⅣ鎖のコラーゲンドメインは、多くのGly-X-Yアミノ酸三塩基反復を含有し、プロリン及びヒドロキシプロリンは頻りに、位置X及びYに位置する。3番目毎のアミノ酸としてのグリシンの存在も、コラーゲンタンパク質の3重らせんの中央に収まるのに十分に小さい唯一のアミノ酸であるため、必須である。しかしながら、骨及び軟骨の原線維形成コラーゲンとは異なり、コラーゲンⅣのGly-X-Y反復領域は、複数の中断を示し（すなわち、約20の短い非コラーゲン配列）、コラーゲンⅣプロトマー及びそれが基底膜に形成されるネットワークに柔軟性を付与する。

20

【0098】

コラーゲンⅣプロトマーの3本の鎖は、7S及び主なコラーゲンドメインにおいて3重らせん体に編成されるが、NC1ドメインにおいて、各鎖は球状構造に折り畳まれ、鎖内ジスルフィド結合により安定化される。ヘテロ三量体の組織化中に、NC1ドメインは3本の鎖間の分子相互作用を開始し、そしてプロトマーの三量体化、次いでC末端側からジッパー様形式に進み、完全に組織化されたプロトマーをもたらす。2つのコラーゲンⅣプロトマーは、NC1六量体を形成するそれらのC末端NC1ドメインを通して端-端二量体を形成し、次に、4つのプロトマーがN末端7Sドメインの十二量体相互作用を通して四量体を形成し、複雑なコラーゲンⅣネットワークに重合される。これらは、隣接する3重らせんプロトマーの界面でメチオニン及びヒドロキシリジン残基を架橋する通常とは異なる共有結合スルフィリミン（S=N）化学結合であるジスルフィド結合、及びリジロキシダーゼ媒介架橋を介して過度に連結される（Borza et al., PNAS, 2014, 111(1), 331-336）。

30

【0099】

コラーゲン型の中でも、コラーゲンⅣは、独自にスルフィリミン結合（S=N）を含有し（Fidler et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(1), 331-336）、このスルフィリミン結合は細胞外マトリックス関連ペルオキシダーゼであるペルオキシダジンにより触媒される。スルフィリミン結合は、三量体NC1ドメインの対の間に位置し、コラーゲンⅣネットワークの形成を促進する（Vanacore et al., Science, 2009, 325, 1230-1234）。ヒトにおいて、ペルオキシダジンは、内皮において最も高度に発現される。

40

【0100】

表2. コラーゲンⅣ鎖及び配列

【0101】

【表 2 - 1】

| α鎖 | 遺伝子 | UniProt受入番号 | 配列番号 | 配列 |
|-----|--------|-------------|------|--|
| α 1 | COL4A1 | P02462 | 1 | MGPRLSVWLLLLPAALLLHEEHSR AAAKGGCAGSGCGKCDCHGVKGQK GERGLPGLQGVIGFPGMQGPEGPPQ GPPGQKGDTPGEPGLPGTKGTRGPP GASGYPGNPGLPGIPGQDGPFGPP GIPGCNGTKGERGPLGPPGLPGFA GNPGPPGLPGMKGDPGEILGHVPG MLLKGERGFPGIPGTPGPPGLPGL QGPVGPFGFTGPPGPPGPPGPPGE KGQMGLSFQGPKGDKGDQGVSGPP GVPGQAQVQEKGDFA TKGEKGQKG EPGFQGMPPGVGEKGEPPGKPPRGK PGKDGDKGEKGSPPGFPEPGYPGL IGRQGPQGEKGEAGPPGPPGIVIG TGPLGEKGERGYPGTPGPRGEPGP KGFPGLPGQPPGPPGLPVPGQAGAP GFPGERGEKGDGRGFPGTSLPGPSG RDGLPGPPGSPGPPGQPGYTNGIV ECQPGPPGDQGPPIPGQPGFIGE IGEKGGKGESCLICDIDGYRGPPG PQGPPGEIGFPGQPGA KGDRLPG RDGVAGVPGPQGTPGLIGQPGA KG EPGEFYFDLRLKGDKGDPGFPGQP GMPGRAGSPGRDGHPLPGPKGSP GSVGLKGERGPPGGVGFPGSRGDT GPPGPPGYGPAGPIGDKGQAGFP GPGSPGLPGPKGEPPGKIVPLPGPP GAEGLPGSPGFPGPQGDRGFPGTP GRPGLPGEKGA VGQPGIGFPGPPG PKGVDGLPGDMGPPGTPGRPGFNG LPGNPGVQGGQKGEPPGVGLPGLKGL PGLPGIPGTPGEKGSIGVPGVPGE HGAIGPPGLQGIRGEPGPPGLPGS VGSPGVPGIGPPGARGPPGGQGP GLSGPPGIKGEKGFPGFPGLDMPG PKGDKGAQGLPGITGQSGLPGLPG QQGAPGIPGFPGSKGEMGMGT PGQPGSPGPVGAPGLPGEKGDHGFPG SSGPRGDPGLKGDGVDVGLPGKPG |

10

20

30

40

【表 2 - 2】

| | | | | | |
|------------|----------------|----------------|---|---|----|
| | | | | <p> SMDKVDMGSMKGQKGDQGEKGQIG PIGEKGSRGDPGTPGVPGKDQGAG QPGQPGPKGDPGISGTPGAPGLPG PKGSVGGMGLPGTPGEKGVPGIPG PQGS PGLPGDKGAKGEKGQAGPPG IGIPGLRGEKGDQGIAGFPGPSPE KGEKGSIGIPGMPPGSPGLKGSPPG VGYPGSPGLPGGEKGDGKGLPGLDGI PGVKGEAGLPGTPGPTGPAGQKGE PGSDGIPGSAGEKGE PGLPGRGF GFPGA KGDGSKGEVGF PGLAGSP GIPGSKGEQGFMPGPPGPQGQPGLP GSPGHATEGPKGDRGPQGQPGLPG LPGPMGPGLPGIDGVKGDGKNPG WPGAPGVPGPKGDPGFQGMPIGG SPGITGSKGDMGPPGVPGFQGPKG LPGLQG IKGDQGDQGVPGA KGLPG PPGPPGPYDI IKGE PGLPGPEGPP GLKGLQGLPGPKGQQGV TGLVGIP GPPGIPGFDGAPGQKGE MGPAGPT GPRGFPGPPGPDGLPGSMGPPGTP SVDHGFLVTRHSQTIDDPQCPSGT KILYHGYSLLYVQGNERAHGQDLG TAGSCLRKFSTMPFLFCNINNVCN FASRNDYSYWLSTPEPMPMSMAPI TGENIRPFI SRCACEAPAMVMAV HSQTIQIPPCPSGWSSLWIGYSFV MHTSAGAE GSGQALASPGSCLEEF RSAPFIECHGRGTCNYYANAYSFW LATIERSEMFKKPTPSTLKAGELR THVSRCQVCMRRT </p> | 10 |
| $\alpha 2$ | CO L4 A2 | P0 85 72 | 2 | <p> MGRDQRAVAGPALRRWLLLGTVTV GFLAQSVLAGVKKFDVPCGGRDCS GGCQCYPEKGGRGQP GPVGPQGYN GPPGLQGF PGLQGRKGDGGERGAP GVTGPKGDVGARGVSGFP GADGIP GHPGQGGPRGRPGYDGCNGTQGDS GPQGPPGSEGFTGPPGPQGPKGQK GEPYALPKEERDRYRGEPGE PGLV GFQGP PGRPGHVGQMGPVGAPGRP GPPGPPGPKGQQGNRGLGFYGVKG EKGDVGQPGPNGIPSDTLHP I IAP TGVTFHPDQYKGEKGSEGE PGIRG ISLKGE EGIMGF PGLRGYPGLSGE KGSPPGQKGSRGLDGYQGPDGPRGP KGEAGDPGPPGLPAYSPHPSLAKG ARGDPGFPGAQGE PGSGQGE PGDPG LPGPPGLSIGDGDQRRGLPGEMGP </p> | 40 |

【表 2 - 3】

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | KGF I G D P G I P A L Y G G P P G P D G K R G P P G P P G L P G P P G P D G F L F G L K G A K G R A G F P G L P G S P G A R G P K G W K G D A G E C R C T E G D E A I K G L P G L P G P K G F A G I N G E P G R K G D R G D P G Q H G L P G F P G L K G V P G N I G A P G P K G A K G D S R T I T T K G E R G Q P G V P G V P G M K G D D G S P G R D G L D G F P G L P G P P G D G I K G P P G D P G Y P G I P G T K G T P G E M G P P G L G L P G L K G Q R G F P G D A G L P G P P G F L G P P G P A G T P G Q I D C D T D V K R A V G G D R Q E A I Q P G C I G G P K G L P G L P G P P G P T G A K G L R G I P G F A G A D G G P G P R G L P G D A G R E G F P G P P G F I G P R G S K G A V G L P G P D G S P G P I G L P G P D G P P G E R G L P G E V L G A Q P G P R G D A G V P G Q P G L K G L P G D R G P P G F R G S Q G M P G M P G L K G Q P G L P G P S G Q P G L Y G P P G L H G F P G A P G Q E G P L G L P G I P G R E G L P G D R G D P G D T G A P G P V G M K G L S G D R G D A G F T G E Q G H P G S P G F K G I D G M P G T P G L K G D R G S P G M D G F Q G M P G L K G R P G F P G S K G E A G F F G I P G L K G L A G E P G F K G S R G D P G P P G P P V I L P G M K D I K G E K G D E G P M G L K G Y L G A K G I Q G M P G I P G L S G I P G L P G R P G H I K G V K G D I G V P G I P G L P G F P G V A G P P G I T G F P G F I G S R G D K G A P G R A G L Y G E I G A T G D F G D I G D T I N L P G R P G L K G E R G T T G I P G L K G F F G E K G T E G D I G F P G I T G V T G V Q G P P G L K G Q T G F P G L T G P P G S Q G E L G R I G L P G G K G D D G W P G A P G L P G F P G L R G I R G L H G L P G T K G F P G S P G S D I H G D P G F P G P P G E R G D P G E A N T L P G P V G V P G Q K G D Q G A P G E R G P P G S P G L Q G F P G I T P P S N I S G A P G D K G A P G I F G L K G Y R G P P G P P G S A A L P G S K G D T G N P G A P G T P G T K G W A G D S G P Q G R P G V F G L P G E K G P R G E Q G F M G N T G P T G A V G D R G P K G P K G D P G F P G A P G T V G A P G I A G I P Q K I A V Q P G T V G P Q G R R G P P G A P G E M G P Q G P P G E P G F R G A P G K A G P Q G R G G V S A V P G F R G D E G P I G H Q G P I G Q E G A P G R P G S P G L P G M P G R S V S I G Y L L V K H S Q T D Q E P M C P V G M N K L W S G Y S L L Y F E G Q E K A H N Q D L G L A G S C L A R F S T M P F L Y C N P G D V C Y Y A S R |
|--|--|--|--|

10

20

30

40

【表 2 - 4】

| | | | | |
|------------|------------------|-------------------|---|---|
| | | | | NDKSYWLSTTAPLPMPVAEDEIK PYISRCVCEAPAIAIAVHSQDVS IPHCPAGWRSWLWIGYSFLMHTAAG DEGGGQSLVSPGSCLEDFRATPFI ECNGGRGTCHYYANKYSFWLTTIP EQSFQGGSPSADTLKAGLIRTHISR CQVCMKNL |
| α 3 | CO L 4 A 3 | Q 0 1 9 5 5 | 3 | MSARTAPRPQVLLLPLLLVLLAAA PAASKGCVCKDKGQCFCDAKGEK GEKGFPGPPGSPGQKGFTGPEGLP GPQGPKGFPGLPGLTGSKGVRGIS GLPGFSGSPGLPGTPGNTGPYGLV GVPGCSSGSKGEQGFPLPGTPGYP GIPGAAGLKGGKGAAPAKGEDIELD AKGDPGLPGAPGPQGLPGPPGFPG PVGPPGPPGFFGFPGAMGPRGPKG HMGERVIGHKGERGVKGLTGPPGP PGTVIVTLTGPDNRTDLKGEKGDK GAMGEPGPPGPSGLPGESYGSEKG APGDPGLQGKPGKDGVPGFPGSEG VKGNRGFPGLMGEDGKGGKGDIG PPGFRGPTTEYYDTYQEKDEGTPG PPGPRGARGPQGPPSGPPGVPGPS SSRPGLRGAPGWPGGLKGSKGERGR PGKDAMGTPGSPGCAGSPGLPGSP GPPGPPGDIVFRKGPPGDHGLPGY LGSPGIPGVDGPKGEPGLLCTQCP YIPGPPGLPGLPGLHGVKGIPGRQ GAAGLKGSPPGSPGNTGLPGFPGF GAQGDPLKGEKGETLQPEGQVGV PGDPGLRGQPGRKGLDGIPGTLGV KGLPGPKGELALSGEKGDQGPPGD PGSPGSPGPAGPAGPPGYGPQGEP GLQGTQGVPGAPGPPGEAGPRGEL SVSTPVPGPPGPPGPPGHPGPQGP PGIPGSLGKCGDPGLPGPDGEPGI PGIGFPGPPGPKGDQGFPGTKGSL GCPGKMGEPLPGKPGLPGAKEGP AVAMPGGPGTPGFPGERGNSEHG EIGLPGLPGLPGTPGNEGLDGPRG DPGQPGPPGEQGPPGRCIEGPRGA QGLPGLNGLKGQQGRRGKTGPKGD PGIPGLDRSGFPGETGSPGIPGHQ GEMGPLGQRGYPGNPGILGPPGED GVIGMMGFPGAIGPPGPPGNPGTP GQRGSPGIPGVKGQRGTPGAKEGQ GDKGNPGPSEISHVIGDKGEPGLK GFAGNPGEKGNRGVPGMPGLKGLK |

10

20

30

40

【表 2 - 5】

| | | | | |
|------------|----------------|----------------|---|---|
| | | | | GLPGPAGPPGPRGDLGSTGNPGE GLRGIPGSMGNMGMPGSKGKRGT GFPGRAGRPGLPGLHGLQGDKGE GYSEGTRPGPPGPTGDPGLPGDMG KKGEMGQPGPPGHLGPAGPEGAPG SPGSPGLPGKPGPHGDLGFKGIGK LLGPPGIRGPPGLPGFPGSPGPMG IRGDQGRDGI PGPAGEKGETGLLR APPGPRGNPGAQGAKGDRGAPGFP GLPGRKGAMGDAGPRGPTGIEGFP GPPGLPGAII PGQTGNRGPPGSRG SPGAPGPPGPPGSHVIGIKGDKGS MGHPGPKGPPGTAGDMGPPGRLGA PGTPGLPGPRGDPGFQGFPGVKGE KGNPGFLGSI GPPGPI GPKGPPGV RGDPGTLKII SLPGSPGPPGTPGE PGMQGEPPGPPGPNLGPCGPRGK PGKDGPGTTPGPAGEKGNKGSKE PGPAUSDGLPGLKGKRGDSGSPAT WTTRGFVFTRHSQTTAIPSCPEGT VPLYSGFSFLFVQGNQRAHGQDLG TLGSCLQRFTTMPFLFCNVNDVCN FASRNDYSYWLSTPALMPMNMAPI TGRALEPYISRCTVCEGPAIAIAV HSQTTDIPPCPHGWISLWKGFSEFI MFTSAGSEGTGQALASPGSCLEEF RASPFLECHGRGTCNYYSNSYSFW LASLNPERMFRKPI PSTVKAGELE KII SRCQVCMKKRH |
| α 4 | CO L4 A4 | P5 34 20 | 4 | MWSLHIVLMRCSFRLTKSLATGPW SLILILFSVQYVYGSGKKYIGPCG GRDCSVCHCVPEKGSRGPPGPPGP QGP IGPLGAPGPI GLSGEKGMRGD RGPPGAAGDKGDKGPTGVPGFPGL DGIPGHPGPPGPRGKPGMSGHNGS RGDPGFPGGRGALGPGGPLGHPGE KGEKGNVSF I LGAVKGI QGDRGDP GLPGLPGSWGAGGPAGPTGYPPGE GLVGPPGQPGRPGLKGNPGVGVKG QMGDPGEVGQQGSPGPTLLVEPPD FCLYKGEKGIKGI PGMVGLPGPPG RKGESGIGAKGEKGI PGFPGRGD PGSYGSPGFPLKGELGLVGDPGL FGLIGPKGDPGNRGHPGPPGVLT PPLPLKGPPGDPGFPGRYGETGDV GPPGPPGLLGRPGEACAGMIGPPG PQGFPLPGLPGEAGIPGRPDSAP GKPGKPGSPGLPGAPGLQGLPGSS |

10

20

30

40

【表 2 - 6】

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| | | | | V I Y C S V G N P G P Q G I K G K V G P P G G R G P K G E K G N E G L C A C E P G P M G P P G P P G L P G R Q G S K G D L G L P G W L G T K G D P G P P G A E G P P G L P G K H G A S G P P G N K G A K G D M V V S R V K G H K G E R G P D G P P G F P G Q P G S H G R D G H A G E K G D P G P P G D H E D A T P G G K G F P G P L G P P G K A G P V G P P G L G F P G P P G E R G H P G V P G H P G V R G P D G L K G Q K G D T I S C N V T Y P G R H G P P G F D G P P G P K G F P G P Q G A P G L S G S D G H K G R P G T P G T A E I P G P P G F R G D M G D P G F G G E K G S S P V G P P G P P G S P G V N G Q K G I P G D P A F G H L G P P G K R G L S G V P G I K G P R G D P G C P G A E G P A G I P G F L G L K G P K G R E G H A G F P G V P G P P G H S C E R G A P G I P G Q P G L P G Y P G S P G A P G G K G Q P G D V G P P G P A G M K G L P G L P G R P G A H G P P G L P G I P G P F G D D G L P G P P G P K G P R G L P G F P G F P G E R G K P G A E G C P G A K G E P G E K G M S G L P G D R G L R G A K G A I G P P G D E G E M A I I S Q K G T P G E P G P P G D D G F P G E R G D K G T P G M Q G R R G E L G R Y G P P G F H R G E P G E K G Q P G P P G P P G P P G S T G L R G F I G F P G L P G D Q G E P G S P G P P G F S G I D G A R G P K G N K G D P A S H F G P P G P K G E P G S P G C P G H F G A S G E Q G L P G I Q G P R G S P G R P G P P G S S G P P G C P G D H G M P G L R G Q P G E M G D P G P R G L Q G D P G I P G P P G I K G P S G S P G L N G L H G L K G Q K G T K G A S G L H D V G P P G P V G I P G L K G E R G D P G S P G I S P P G P R G K K G P P G P P G S S G P P G P A G A T G R A P K D I P D P G P P G D Q G P P G P D G P R G A P G P P G L P G S V D L L R G E P G D C G L P G P P G P P G P P G P P G Y K G F P G C D G K D G Q K G P M G F P G P Q G P H G F P G P P G E K G L P G P P G R K G P T G L P G P R G E P G P P A D V D D C P R I P G L P G A P G M R G P E G A M G L P G M R G P P G P G C K G E P G L D G R R G V D G V P G S P G P P G R K G D T G E D G Y P G G P G P P G P I G D P G P K G F G P G Y L G G F L L V L H S Q T D Q E P T C P L G M P R L W T G Y S L L Y L E G Q E K A H N Q D L G L A G S C L P V F S T L P F A Y C N I H Q V C H Y A Q R N D R S Y W L A S A A P L P M M P L S E E A I R P Y V S R C A V C E A P A Q A V A V H S Q D Q S I P P C P Q T W R S L W I G Y S F L M H T G A G |
|--|--|--|--|--|

10

20

30

40

【表 2 - 7】

| | | | | |
|------------|------------------|-------------------|---|---|
| | | | | DQGGGQALMSPGSCLEDFRAAPFL ECQGRQGTCHFFANKYSFWLTTVK ADLQFSSAPAPDTLKESQAQRQKI SRCQVCVKYS |
| α 5 | CO L 4 A 5 | P 2 9 4 0 0 | 5 | MKLRGVSLAAGLFLALSLWGQPA EAAACYGCSPGSKCDCSGIKGEKG ERGFPGLEGHFGLPGFPGPPEPPG PRGQKGGDGI PGPPGPKGIRGPPG LPGFPGLTPGLPGMPGHDGAPGPQG IPGCNGTKGERGFPGSPGFPLQG PPGPPGIPGMKGEPGSIIMSSLPG PKGNPGYPGPPGIQGLPGPTGIPG PIGPPGPPGLMGPPGPPGLPGPKG NMGLNFQGPKEKGEQGLQGPPGP PGQISEQKRPIDVEFQKGDQGLPG DRGPPGPPGIRGPPGPPGGEKGEK GEQGEFGKRGKPGKDGENGQPGIP GLPGDPCYPGEPGRDGEKKGKGD GPPGPPGLVIPRPGTGITIGEKN IGLPGLPGEKGERGFPGIQGPPL PGPPGAAMGPPGPPGFPGERGQK GDEGPPGISIPGPPGLDGQPGAPG LPGPPGPAGPHIPPSDEICEP GPPGSPGDKGLQGEQGVKGDKGD CFNCIGTGISGPPGQPGLPGLPG PGSLGFPGQKEKKGAGATGPKGL PGIPGAPGAPGFPGSKGEPGDILT FPGMKGDKGELGSPGAPGLPGLPG TPGQDGLPGLPGPKGEPGGITFKG ERGPPGNPGLPGLPGNIGPMGPPG FGPPGPVGEKGIQGVAGNPGQPGI PGPKGDPGQTTITQPGKPLPGNPG RDGDVGLPGDPGLPGQPGLPGIPG SKGEPGIPGIGLPGPPGPKGFPGI PGPPGAPGTPGRIGLEGPPGPPGF PGPKGEPGFALPGPPGPPGLPGFK GALGPKGDRGFPGPPGPPGRTGLD GLPGPKGDVGPNGQPGPMGPPGLP GIGVQGPPGPPGIPGPIGQPGLHG IPGEKGDGPPGLDVPGPGERGS PGIPGAPGPIGPPGSPGLPGKAGA SGFPGTKGEMGMMGPPGPPGPLGI PGRSGVPGLKGDDGLQGQPGLPGP TGEKGSKEPGLPGPPGPMDPNLL GSKGEKGEPLPGIPGVSGPKGYQ GLPGDPGQPGLSGQPGLPGPPGPK GNPGLPGQPGLIGPPGLKGTIGDM GFPGPQGVGPPGPGSGVPGQPGSP |

10

20

30

40

【表 2 - 8】

| | | | | | |
|------------|----------------|----------------|---|---|----------|
| | | | | GLPGQKGDKGDPGISSIGLPGLP PKGEPGLPGYPGNPGIKGSVGD LPGLPGTPGAKGQPGLPGFPGTP PPGPKGISGPPGNPGLPGEPPV GGGHPGQPGPPGEGKGKPGQDGI PAGQKGEPPGQPGFGNPGPPLGL SGQKGDGGLPGIPGNPGLPGPKGE PGFHGFPGVQGP PGPPGSPGPALE GPKGNPGPQGP PGRPLPGPEGPP GLPGNGGIKGEKGNPGQPGLPLP GLKGDQGPGLQGNPGRPLNGMK GDPGLPGVPGFPGMKGPSGVPGSA GPEGEPLIGPPGPPGLPGPSGQS I I I KGDAGPPGIPGQPGLKGLPG QGPQGLPGPTGPPGDPGRNGLPGF DGAGGRKGDPLPGQPGRGLDGP PGPDGLQGPPGP PGTSVAHGFLI TRHSQTTDAPQCPQGT LQVYEGFS LLYVQGNKRAHGQDLGTAGSCLRR FSTMPFMFCNINNV CNFASRNDYS YWLSTPEPMPMSMQPLKGQSIQPF I SRCAVCEAPAVVIAVHSQTIQIP HCPQGWD SLWIGYSFMMHTSAGAE GSGQALASPGSCLEEF RSAPFIEC HGRGTCNYYANSYSFWLATVDVSD MFSKPQSETLKAGDLRTRISRCQV CMKRT | 10 |
| $\alpha 6$ | CO L4 A6 | Q1 40 31 | 6 | MLINKLWLLLVTLCLTEELAAAGE KSYGKPCGGQDCSGSCQCFPEKGA RGRPGPIG IQGPTGPQGFTGSTGL SGLKGERGFPGLLGPYGPKGDKGP MGVPGLG I NGIPGHPGQPGPRGP PGLDGCNGTQGAVGFPGPDGYPL LGPPGLPGQKGSKGDPVLAPGSFK GMKGDPLPGLDGITGPQGAPGFP GAVGPAGPPGLQGPPGPPGPLGPD GNMGLGFQGEKGVKGDVGLPGPAG PPPSTGELEFMGFPGKKGSKGEP GPKGFPGLRGPPGFPLGTTGEKG EKGEKGIPLPGPRGPMGSEGVQG PPGQQGKKGTLGFPLNGFQGIEG QKGDIGLPGPDVFIDIDGAVISGN PGDPGDPLPGLKGDEGIQGLRGP SGVPGLPALSGVPGALGPQGFPGL KGDQGNPGRTTIGAAGLPGRDGLP GPPGPPGPPSPEFETETLHNKEAG FPGLRGEQGPKNLGLKG I KGDSG FCACDGGVPNTGPPGEPGPPGPWG | 30 40 |

【表 2 - 9】

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| | | | | L I G L P G L K G A R G D Q G S G G A Q G P A G A P G L V G P L G P S G P K G K K G E P I L S T I Q G M P G D R G D S G S Q G F R G V I G E P G K D G V P G L P G L P G L P G D G G Q G F P G E K G L P G L P G E K G H P G P P G L P G N G L P G L P G P R G L P G D K G K D G L P G Q Q G L P G S K G I T L P C I I P G S Y G P S G F P G T P G F P G P K G S R G L P G T P G Q P G S S G S K G E P G S P G L V H L P E L P G F P G P R G E K G L P G F P G L P G K D G L P G M I G S P G L P G S K G A T G D I F G A E N G A P G E Q G L Q G L T G H K G F L G D S G L P G L K G V H G K P G L L G P K G E R G S P G T P G Q V G Q P G T P G S S G P Y G I K G K S G L P G A P G F P G I S G H P G K K G T R G K K G P P G S I V K K G L P G L K G L P G N P G L V G L K G S P G S P G V A G L P A L S G P K G E K G S V G F V G F P G I P G L P G I S G T R G L K G I P G S T G K M G P S G R A G T P G E K G D R G N P G P V G I P S P R R P M S N L W L K G D K G S Q G S A G S N G F P G P R G D K G E A G R P G P P G L P G A P G L P G I I K G V S G K P G P P G F M G I R G L P G L K G S S G I T G F P G M P G E S G S Q G I R G S P G L P G A S G L P G L K G D N G Q T V E I S G S P G P K G Q P G E S G F K G T K G R D G L I G N I G F P G K K G E D G K V G V S G D V G L P G A P G F P G V A G M R G E P G L P G S S G H Q G A I G P L G S P G L I G P K G F P G F P G L H G L N G L P G T K G T H G T P G P S I T G V P G P A G L P G P K G E K G Y P G I G I G A P G K P G L R G Q K G D R G F P G L Q G P A G L P G A P G I S L P S L I A G Q P G D P G R P G L D G E R G R P G P A G P P G P P G P S S N Q G D T G D P G F P G I P G P K G P K G D Q G I P G F S G L P G E L G L K G M R G E P G F M G T P G K V G P P G D P G F P G M K G K A G P R G S S G L Q G H P G Q T P T A E A V Q V P P G P L G L P G I D G I P G L T G D P G A Q G P V G L Q G S K G L P G I P G K D G P S G L P G P P G A L G D P G L P G L Q G P P G F E G A P G Q Q G P F G M P G M P G Q S M R V G Y T L V K H S Q S E Q V P P C P I G M S Q L W V G Y S L L F V E G Q E K A H N Q D L G F A G S C L P R F S T M P F I Y C N I N E V C H Y A R R N D K S Y W L S T T A P I P M M P V S Q T Q I P Q Y I S R C S V C E A P S Q A I A V H S Q D I T I P Q C P L G W R S L W I G Y S F L M H T A A G A E G G G Q S L V S P G S C L E D F R A T P F I E C S G A R G T C H Y F A N K Y S F W L T T |
|--|--|--|--|--|

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

| | | | | |
|------------|---------------------|---|----|---|
| | | | | VEERQQFGELPVSETLKAGQLHTR VSRQVCMKSL |
| $\alpha 1$ | NC 1ド メイ ン | P0 24 62 [1 44 5- 16 6 9] | 7 | GFLVTRHSQTIDDPQCPSGTKILY HGYSLLYVQGNERAHGQDLGTAGS CLRKFTSTMPFLFCNINNVCNFASR NDYSYWLSTPEPMPMSMAPITGEN IRPFI SRC AVCEAPAMVMAVHSQT IQIPPCPSGWSSLWIGYSFVMHTS AGAEGSGQALASPGSCLEEFRSAP FIECHGRGTCNYYANAYSFWLATI ERSEMFKKPTPSTLKAGELRTHVS RCQVCMRRT |
| $\alpha 2$ | NC ドメ イン | P0 85 72 [1 48 9- 17 1 2] | 8 | GYSLLVKHSQTDQEP MCPVGMNKLW SGYSLLYFEGQEKAHNQDLGLAGS CLARFSTMPFLYCNPGDVCYYASR NDKSYWLSTTAPLPMPVAEDEIK PYISRC SVCEAPAI AIAVHSQDVS IPHCPAGWRSLWIGYSFLMHTAAG DEGGGQSLVSPGSCLEDFRATPFI ECNGGRGTCHYYANKYSFWLTTIP EQSFQGS PSADTLKAGLIRTHISR CQVCMKNL |
| $\alpha 3$ | NC 1ド メイ ン | Q0 19 55 [1 45 5- 16 6 9] | 9 | GFVFTRHSQTTAIPSCPEGTVPLY SGFSFLFVQGNQRAHGQDLGTLGS CLQRFTTSTMPFLFCNVNDVCNFASR NDYSYWLSTPALMPMNMAPITGRA LEPYISRCTVCEGPAIAIAVHSQT TDIPPCPHGWISLWKGF SFIMFTS AGSEGTGQALASPGSCLEEFRAS P FLECHGRGTCNYYSNSYSFWLASL NPERMFRKPI PSTVKAGELEKII S RCQVCMKKR |
| $\alpha 4$ | NC 1ド メイ ン | P5 34 20 [1 46 5- 16 9 0] | 10 | GFLVLHSQTDQEPTCPLGMPRLW TGYSLLYLEGQEKAHNQDLGLAGS CLPVFSTLPFAYCNIHQVCHYAQR NDRSYWLASAAPLPMMPLSEEAIR PYVSRCAVCEAPAQAVAVHSQDQS IPPCPQ TWRSLWIGYSFLMHTGAG DQGGGQALMSPGSCLEDFRAAPFL ECQGRQGTCHFFANKYSFWLTTVK ADLQFSSAPAPDTLKESQAQRQKI SRCQVCVKYS |
| $\alpha 5$ | NC 1ド メイ ン | P2 94 00 [1 46 1-] | 11 | GFLITRHSQTTDAPQCPQGTLQVY EGFSLLYVQGNKRAHGQDLGTAGS CLRRFSTMPFMFCNINNVCNFASR NDYSYWLSTPEPMPMSMQPLKGQS IQPFISRC AVCEAPAVVIAVHSQT IQIPHCPQGWDSLWIGYSFMMHTS |

【表 2 - 1 1】

| | | | | |
|-----|---------------------|---|----|--|
| | | 16 8 5] | | AGAEGSGQALASPGSCLEEFRSAP FIECHGRGTCNYYANSYSFWLATV DVSDMFSKPPQSETLKAGDLRTRIS RCQVCMKRT |
| α 6 | NC 1ド メイ ン | Q1 40 31 [1 46 7ー 16 9 1] | 12 | GYTLVKHSQSEQVPPCPIGMSQLW VGYSLLFVEGQEKAHNQDLGFAGS CLPRFSTMPFIYCNINEVCHYARR NDKSYWLSTTAPIPMMPVSQTQIP QYISRCSVCEAPSQAI AVHSQDIT IPQCPLGWRSLWIGYSFLMHTAAG AEGGGQSLVSPGSCLEDFRATPFI ECSGARGTCHYFANKYSFWLTTVE ERQQFGELPVSETLKAGQLHTRVS RCQVCMKSL |

【0112】

翻訳後修飾

他のコラーゲン型に類似して、コラーゲンⅣ分子は、分泌前に広範な翻訳後修飾を受け、この修飾は、適切なプロリン及びリジン残基のヒドロキシ化、及びある特定のヒドロキシリジン残基の、ガラクトシルヒドロキシリジン及びグルコシルガラクトシルヒドロキシリジンへのグリコシル化からなる (Bornstein and Sage, *Annu. Rev. Biochem.*, 1980, 49, 957-1004) において概説される)。コラーゲンⅣ分子は、アスパラギン連結オリゴ糖側鎖の付加によっても修飾される (Cooper et al., 1981 及び Kurkinen et al., 1982)。コラーゲンⅣにおける細胞内修飾の程度は、全てのコラーゲン型の中で最も高い。コラーゲンⅣの異常な修飾は、コラーゲンⅣの分泌に影響を及ぼす場合がある (Wang et al., *J. Bio. Chem.*, 1989, 264, 15556-15564)。

【0113】

コラーゲンⅣ修飾に必要な酵素は、プロリル-4ヒドロキシラーゼ、プロリル-3-ヒドロキシラーゼ、リジルヒドロキシラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、グルコシルガラクトシルトランスフェラーゼ、及びアスパラギン連結グルコシル化機構を含む。修飾の程度におけるバリエーションは、コラーゲンⅣ分子の同じ型内で、異なる組織から、または更には多くの生理学的及び病理学的状態における同じ組織からも見出すことができる (Kivirikko and Myllylä, *Methods Enzymol.*, 1982, 82, 245-304)。

【0114】

適切に修飾されたコラーゲンⅣは、細胞分化 (F9 幹細胞など) に重要である (Wang et al., *J. Bio. Chem.*, 1989, 264, 15556-15564)。

【0115】

コラーゲンⅣにおける3-ヒドロキシプロリンの範囲は、1000個のアミノ酸当たり6~16個の3-ヒドロキシプロリン残基 (すなわち、約0.3%~1.6%) であると推定される。コラーゲンⅣにおける4-ヒドロキシプロリンの範囲は、1000個のアミノ酸当たり65~140個の4-ヒドロキシプロリン残基 (すなわち、約6.5~14%) であると推定される (例えば、Pokidysheva et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(1), 161-166、Tiainen et al., *J Biol Chem*, 2008, 283(28), 19432-19439、Price and Spiro, *J Biol Chem*, 1971, 246, 1111-1116)。

10

20

30

40

50

1977, 252(23), 8697-9602、及びSchuppen et al., Biochem J. 1984, 220(1), 227-233を参照)。4-ヒドロキシプロリン(4Hyp)、3-ヒドロキシプロリン(3Hyp)、及びヒドロキシリジン残基の含有量はコラーゲンIVの特徴に影響を及ぼす可能性がある。4-ヒドロキシプロリン残基が水架橋分子内水素結合を通してコラーゲン3重らせんを安定させることは十分に確立されている(Berg et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 52, 115-120)。しかしながら、3-ヒドロキシプロリン残基は4-ヒドロキシプロリン残基と比較したとき、大幅に少ない。コラーゲンI型及びII型において、3Hypの1~2個の残基のみが1鎖当たり生じ、コラーゲンV型及びXI型において、3~6個の残基が1鎖当たり生じる。含有量は全ヒドロキシプロリンの10%が3Hypであり得る基底膜のIV型コラーゲンにおいて最も高い(Gryder et al., J. Biol. Chem., 1975, 250, 2470-2474)。3Hyp残基が3重らせん間水素結合を通してコラーゲン3重らせん体の微調整に関与している可能性があることも推測される。コラーゲンIVにおける十分な3-ヒドロキシプロリン化は血小板の凝集を減少させ得る。

基底膜(BM)

【0116】

コラーゲンIVの非線維状組織化は、ラミニン、ナイドジェン、及びパルカンのサブタイプ、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(Breitkreutz Det al., Biomed. Res Int, 2013, e179784)を含む他のマトリックス分子と共に薄いシートのような基底膜を形成するための、ならびに細胞付着のための足場として機能する。コラーゲンIV 3-4-5は、主に、腎臓、内耳、及び眼の基底膜に見られる。コラーゲンIV 1-1-2は、ある特定の組織の基底膜の主な巨大分子である。

【0117】

基底膜の主な構造要素として、ラミニン及びコラーゲンIVは、モノーまたはオリゴマーナイドジェン及びパルカンにより非共有結合的に相互接続となる異なるネットワークを形成する。コラーゲンIV分子は、それらの非コラーゲンC及び球状N末端を介してジスルフィド架橋により共有結合的に連結され、BMの機械的強度を主に決定する高化学耐性の非常に安定した「金網」のような網目構造をもたらす。構造的な特徴に加えて、基底膜は、細胞挙動、組織の区分化、組織のリモデリング、及び形態形成の重要な調節因子でもある。基底膜は、皮膚、筋肉、眼、血管、神経組織、及び腎臓内の細胞外マトリックスに広く分布される。

【0118】

コラーゲンIVは、主に、環境影響に対するバリアを形成する皮膚の基底膜(BM)において見られる。皮膚において、コラーゲンIVは、表皮ケラチノサイト及び真皮線維芽細胞の両方により合成される。表皮基底膜において、コラーゲンIV 1-2-2及びコラーゲンIV 5-5-6ヘテロ三量体のみが見られる(Hasegawa et al., Arch. Histol. Cytol. 2007, 70, 255-265)。COL4A1及びCOL4A2の不活性化も生命を脅かすが、妊娠の後期段階でのみである。

【0119】

コラーゲンIVは、神経血管束及び他の歯周組織細胞の基底膜においても見られる。歯肉の脈管構造の弾性系を維持する役割も担う。例えば、内皮細胞は血管新生のためにコラーゲンIVを発現する。

【0120】

糸球体基底膜(GBM): 腎臓において、GBMは、内皮細胞及び有足細胞(独特な上皮細胞)の2つの細胞構成成分間に位置する糸球体濾過関門(GFB)の中心の非細胞層である。GBMは、主に、内皮細胞及び有足細胞により分泌される、ラミニン-521、コラーゲンIV 3-4-5、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(主にアグリン)、

及びナイドジェンの4つの細胞外マトリックス巨大分子から構成される。GBMにおけるこれらの細胞外マトリックスタンパク質は、サイズ及び電荷の両方の選択特性を付与すると考えられる織り合わされた網目構造を生産する。

【0121】

哺乳類の腎臓発達中、発達しているGBMに存在するコラーゲンIVの胚形態であるコラーゲンIV 1-1-2は一般に、コラーゲンIV 3-4-5により成人の成熟GBMにおいて置き換えられる。このイソ型置換は、GBMにおけるラミニンの遷移と同時に生じる。3-4-5 IV型コラーゲンは、1-1-2 IV型コラーゲンネットワークと比較して、より過度に架橋された、及びよりプロテアーゼ耐性のネットワークをもたらすため、コラーゲンIV遷移は、成人における血圧の増加に対処するために必要とされる可能性があるかと仮定される。

10

【0122】

顕微鏡技術(例えばSTORM)の向上による最近の研究は、GBMの微細構造及び腎臓GBMにおけるコラーゲンIVのタンパク質の分布を解明した。GBMのコラーゲンIV(3-4-5)は有足細胞によりのみ分泌され(Abrahamson et al., J Am Soc Nephrol, 2009, 20, 1471-1479及びAbrahamson DR, Semin Nephrol, 2012, 32(4), 342-349)、このコラーゲンIVは最終的には、有足細胞から離れてGBMの中央に位置し(Suleiman et al., eLife, 2013, e01149)、GBMが有足細胞からGBMの中央へのコラーゲンIVプロトマーの遊走に透過性であることを示唆する。内皮窓は約100~150nmであり、約12nmの直径を有する棒のようなヘテロ三量体であるコラーゲンIVプロトマーなどの大きいタンパク質の輸送を促進するのに十分に大きい。他の研究は、GBMがフェリチン及び大きい抗原-抗体複合体などの400kDaよりも大きい他の大きい分子に透過性であることを更に示した(Farquhar et al., J Exp Med., 1961, 113, 47-66、Vogt et al., Kidney Int. 1982, 22(1): 27-35、及びFujigaki et al., Am J Pathol., 1993, 142(3), 831-842)。しかしながら、外因性コラーゲンタンパク質(組換えコラーゲンIV分子など)がインビボ送達を介して腎臓のGBMに良好に輸送され得るという証拠は報告されていない。更に、このような外因性コラーゲンIV分子がGBMに組み込まれ、GBMの他の構成成分と正しい基底ネットワークを形成できることは予想外である。したがって、本発明は、組換えコラーゲンIVタンパク質、特にコラーゲンIVプロトマー、二量体、四量体、または多量体を、コラーゲンIVの欠乏により損なわれるGBMに全身または局所送達を介して投与する。次いで、コラーゲンIVプロトマー、二量体、四量体、または多量体は、欠損GBM内に埋め込まれ、腎臓のGBMにおける正常なマトリックスタンパク質を回復する。

20

30

【0123】

COL4A3、COL4A4、及び/またはCOL4A5遺伝子における突然変異に起因する、3-4-5 IV型コラーゲンネットワークの不在などのコラーゲンIVの欠乏は基底膜(例えばGBM)を損なうことが多く、アルポート症候群、ならびに後天性表皮水疱症などのいくつかのリウマチ性疾患及び皮膚病、ならびに糖尿病における腎症及び網膜症の血管合併症を含む多くの疾患をもたらす。同様に、GBMの他の構成成分(例えば、ラミニン及びアグリリン)の欠乏は、基底膜を損なう場合があり、ネフローゼ疾患をもたらす。例えば、ラミニンベータ2遺伝子(LAMB2)における突然変異は、ネフローゼ症候群及びびまん性メサンギウム硬化症からの腎不全によって特徴付けられる稀な常染色体劣性疾患であるピアソン症候群をもたらす(Bull et al., J Pathol., 2014, 233(1), 18-26)。ラミニン2は、成熟GBMにおいて主要なラミニンヘテロ三量体である、ヘテロ三量体LAM-521(521)の3本の鎖のうちの1本である。

40

アルポート症候群(AS)

50

【0124】

アルポート症候群は、糸球体腎炎に起因する進行性腎不全をもたらす糸球体基底膜の遺伝性障害である。アルポート症候群は典型的には、聴力損失及び眼機能不全と関連し得る血尿または蛋白尿として幼少期に生じ、この疾患は成人期に腎不全（腎疾患の末期（ESRD）など）に徐々に進行する。患者の腎臓の腎生検検査は、コラーゲンIVアルファ鎖の不在、ならびにGBMの病理学的変化を確認する。聴力損失及びESRDはほぼ一致して進行し、各症状の段階の時期は遺伝子型 - 表現型相関関係ごとにわずかに変動する（例えば、Kashtan et al., J of Clinical Invest., 1999, 78, 1035 - 1044を参照）。一部の患者において、聴力損失は腎病理と関連する。Burkeら（Burke et al., Acta Ophthalmol., 1991, 69: 555 - 557）は、アルポート症候群における両側性角膜上皮びらんを説明した。患者は感音性聴力損失を発症する場合がある。

10

【0125】

眼異常は一部のアルポート症候群患者において観察された。典型的な眼関連は、およそ85%の罹患成人男性に生じる点及び斑点網膜症（dot - and - fleck retinopathy）、およそ25%に生じる前部円錐水晶体、及び後部多形性角膜ジストロフィーである。Govanらは、アルポート症候群における特徴的な眼部所見としてその前部円錐水晶体（水晶体の異常な形状）ならびに筋肉及び中周辺網膜における網膜の斑点を説明した（Govan et al., Brit. J. Ophthalmol., 1983, 67: 493 - 503）。眼の症状はアルポート症候群のX連鎖性及び常染色体形態において同じである。これらの異常はコラーゲンIV分子における欠損と相関する。

20

【0126】

アルポート症候群の診断である腎臓生検の微細構造の特徴は、（i）糸球体基底膜（GBM）の不規則な肥厚化及び菲薄化、（ii）GBMの分裂または薄層形成、（iii）GBMの「バスケット織り」、ならびに（iv）異常なGBMの領域における足突起融合からなる。更に、アルポート症候群における早期微細構造の所見は、時折、女兒または女性が菲薄基底膜腎症（TBMN）と誤診されるGBMのびまん性菲薄化である。コラーゲンIV 3、4、及び5鎖は、アルポート症候群の患者のGBMから生化学的に不在である。

30

【0127】

アルポート症候群において、GBM胚性コラーゲンIV 1 - 1 - 2は存在し続け、疾患の進行を遅延すると考えられるが、GBMにおけるこれらの胎児イソ型の異常な持続は、コラゲナーゼ及びカテプシンによるタンパク質分解攻撃に対する感受性の増加を生じさせると仮定される。コラーゲンIV 3 - 4 - 5は、六量体のより硬いジスルフィドネットワークを形成し、糸球体濾過の部位でタンパク質分解性の分解に対してより耐性である。アルポート症候群患者からのGBMにおけるこれらの潜在的に保護的なコラーゲンIVイソ型の不在は、進行する基底膜の分裂、及びこれらの患者における腎臓悪化としての損傷の増加を説明し得る。

【0128】

アルポート症候群は、遺伝学的に異質性であり、コラーゲンIVの3、4、または5鎖をコードする遺伝子（COL4A3、COL4A4、及び/またはCOL4A5）における突然変異に起因する。COL4A3及びCOL4A4における突然変異は、~15%のアルポート症候群を占める常染色体劣性アルポート症候群の原因となり、一方、COL4A5突然変異は残りの85%を占めるX連鎖性アルポート症候群の原因となる。常染色体優性遺伝は稀である。アルポート症候群の原因となるCOL4A3、COL4A4、及びCOL4A5における突然変異のいくつかの例は表3に列記される。COL4A5における更なる突然変異はCOL4A5データベース（http://www.arup.utah.edu/database/ALPORT/ALPORT_display.php）に見出すことができる。

40

【0129】

50

他の家族成員における腎不全のリスクを適切に評価するために、X連鎖性と常染色体劣性遺伝とを区別することが重要である。常染色体劣性遺伝は、疾患が単一世代で生じ、女性及び男性の個人が等しい頻度かつ重度で罹患する。分子検査は臨床診断を確認するために採用されることが多い。

【0130】

アルポート症候群は、COL4A5遺伝子を伴う遺伝子欠失に起因する2つの他の障害：アルポート症候群及び平滑筋腫症、ならびにアルポート症候群、精神遅滞、顔面中部低形成、及び楕円赤血球症の特徴でもある。

【0131】

X連鎖性アルポート症候群(XLAS)：85パーセントのアルポート症候群は、コラーゲンIVの5鎖をコードするX連結性のCOL4A5遺伝子における突然変異から生じ、血尿、眼異常、及び高調感音性聴力損失と関連する。ほぼ全ての罹患している男性が早ければ10代に末期腎疾患(ESRD)をもたらす腎機能の減少を有する。罹患している女性もネフローゼ症候群、腎機能の減少、及びESRDを発症する危険性がある。一時的な黄斑菲薄化(macular thinning)もXLASと関連する(Ahmed et al., JAMA Ophthalmol. 2013, 131(6), 777-782)。

10

【0132】

GBMの層状構造は通常、XLASの男性に起こる。GBMは、最初は、男児において菲薄化するが、経時的に更に広範囲に及び限局性層状構造がある。

20

【0133】

コラーゲンIVの3、4、及び5鎖の免疫染色は、本質的にXLASの全ての男性において、GBM、遠位尿細管基底膜(dTBM)、及びボーマン嚢におけるこれらのコラーゲン鎖の完全な不在を示し、一方で、XLASのヘテロ接合保有者である女性は、可変なX染色体不活性化による部分的または「モザイク状の」不在を示す。これらの免疫組織学的な特徴は、XLASを常染色体劣性AS(ARAS)と区別するのに役立ち、免疫染色によるコラーゲンIVの5鎖の発現は、GBMにおいて陰性であるが、dTBM及びボーマン嚢において陽性である。皮膚の上皮膜も5(IV)鎖を有しない。

【0134】

突然変異は、X連鎖性アルポート症候群の各ファミリーにおいて異なり、700を超えるバリエーションが記載されている(https://grenada.lumc.nl/LOVD2/COL4A/home.php?select_db=COL4A5)。約50%は直接または下流のいずれかで終止コドンをもたらす、40%の突然変異がミスセンスである。大きい欠失/挿入、再配置、ナンセンス突然変異、及び他の遺伝子変化も報告されている。特定された突然変異のいくつかの例は、ミスセンス突然変異(G123E, Guo et al., Mol Biol Rep. 2014, 4196, 3631-3635); G1205V)、ナンセンス突然変異(Q379X)、COL4A5のコラーゲンドメインにおけるミスセンス突然変異、ハイボモルフ突然変異(G624D、P628L; Pierides A et al., Hippokratia, 2013, 17(3), 207-213)、COL4A5遺伝子における複合体欠失/挿入突然変異(c.359_363delGTATTinsATAC)(Wang et al., Gene, 2013, 512(2), 482-485)、スプライス部位での突然変異、及びCOL4A5遺伝子における深部イントロン(deep intronic)突然変異(King K et al., Human Genet. 2002, 111, 548-554)を含む。

30

40

【0135】

常染色体劣性アルポート症候群(ARAS)：約15パーセントのアルポート症候群は、COL4A3またはCOL4A4遺伝子の両複製物(トランスで)における常染色体劣性ホモ接合または化合物ヘテロ接合突然変異から生じる(Mochizuki T et al., Nat. Genet., 1994, 8, 77-81)。COL4A3またはC

50

OL4A4 遺伝子における突然変異は、ミスセンス変化、フレームシフト変化、小さい欠失 / 挿入、重複、イントロンバリエーション、スプライシング突然変異、及びナンセンス突然変異を含む。

【 0 1 3 6 】

表 3 . コラーゲン I V 突然変異及びアルポート症候群の例

【 0 1 3 7 】

【表 3】

| 表現型 | 突然変異 |
|-----------------|-------------------------------|
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A3、5-BP DEL、NT 4414 |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A3、ARG1481TER |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A3、SER1524TER |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A3、5-BP DEL |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A3、EX5、C-T、ARG-TER |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A3、ALU INS、EX6 |
| 血尿、良性家族性 | COL4A3、GLY1015GLU |
| 血尿、良性家族性 | COL4A3、GLY985VAL |
| アルポート症候群、常染色体優性 | COL4A3、IVS21DS、G-A、-1 |
| アルポート症候群、常染色体優性 | COL4A3、GLY1167ARG |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、EX5-10DEL |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、CYS108SER |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、10-15-KB INS、40-KB DEL |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、450-KB DEL |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、38-KB DEL |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、GLY1143ASP |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、GLY325ARG |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、3-PRIME及び部分的5-PRIME欠失 |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、TRP1538SER |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、GLY521CYS |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、GLY325GLU |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、GLY289VAL、及びARG1421CYS |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、GLY54ASP |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、CYS1638TYR |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、LEU1649ARG |
| アルポート症候群、X連鎖性 | COL4A5、ARG1677GLN |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A4、GLY1201SER |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A4、SER1238TER |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A4、ARG1377TER |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A4、CYS1641TER |
| アルポート症候群、常染色体劣性 | COL4A4、PRO1572LEU |
| 血尿、良性家族性 | COL4A4、GLY897GLU |
| 血尿、良性家族性 | COL4A4、1-BP INS、3222A |
| 血尿、良性家族性 | COL4A4、GLY960ARG |

常染色体優性アルポート症候群：ヘテロ接合COL4A3またはCOL4A4バリエーションから生じる常染色体優性遺伝は非常に稀である(van der Loop et al., Kidney Int., 2000, 58, 1870-1875.)。

アルポート症候群の現在の治療

【0139】

アルポート症候群に利用可能な満足いく治療的な治療はない。末期腎不全(ESRD)を発症する患者は、血液透析により、及び腎臓移植によっても治療される。しかしながら、約5%の移植を受けた男性がアルポート移植後抗GBM腎炎を発症し、移植した腎臓を失う。多くの研究は、腎不全の発症を緩徐化または予防できる新規治療の開発に焦点を当ててきた。

10

【0140】

現時点のアルポート症候群患者の治療は、主に、シクロスポリンによるカルシニューリン阻害を含む蛋白尿(例えば、Sigmundsson et al., Scand J Urol Nephrol, 2006, 40, 522-525を参照)、ならびにアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、アンギオテンシン受容体遮断薬(ARB)、及びアルドステロン阻害剤によるレニン-アンギオテンシンアルドステロン系(RAAS)の遮断を含む蛋白尿に対処する。最近の証拠は、腎置き換え療法及びESRDの開始時期を大幅に遅らせることができることを示した(例えば、Noone and Licht, Pediatr Nephrol, 2013, 28, 1025-1036を参照)。

20

【0141】

アルポート症候群患者を治療するために使用されてきたACE阻害剤は、エナラプリル、ホシノプリル、リシノプリル、キナプリルを含むが、これらに限定されない。ACE阻害剤は、大半の個人に比較的によく忍容される。それでも、これらは副作用がないわけではなく、一部の患者はACE阻害剤を使用すべきではない。最も一般的な副作用は、咳、血中カリウムレベルの上昇、低血圧、めまい、頭痛、眠気、脱力感、味覚異常(金属味または塩味)、及び発疹である。稀だが、ACE阻害剤の最も重篤な副作用は、腎不全、アレルギー反応、白血球の減少、及び組織の腫脹(血管浮腫)である。

【0142】

アルポート症候群患者を治療するために使用されてきたARBは、ロサルタン及びカンデサルタンを含むが、これらに限定されない。

30

【0143】

アルポートマウスモデルにおけるいくつかの研究は、バソペプチダーゼ阻害剤(例えばAVE688)及び3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-補酵素(HMG-CoA)レダクターゼ阻害剤がCOL4A3-/-マウスにおいて大幅な改善を示したことを示唆する(Katayama et al., Searching for a treatment for Alport Syndrome using mouse models, World J Nephrol, 2014, 3(4):230-236により概説される)。

【0144】

病的蛋白尿の下流作用は、近位尿細管上皮細胞(PTEC)の完全な活性化と共に、炎症及び線維症を介して尿細管間質伝播をもたらすことが多いため、これらのプロセスを阻害しようとする治療戦略は、上述の抗蛋白尿療法と組み合わせて、アルポート症候群における疾患の進行を制限するためにも採用される。これらの治療は、CCR1(ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体1)拮抗薬(例えばBX471)などのケモカイン受容体拮抗薬を含み得る。

40

【0145】

研究者は、アルポート症候群の新規治療の開発に焦点を当ててきた。このような新しい治療は、遺伝子療法(例えばTryggvason et al., Kidney International, 1997, 51, 1493-1499による概説を参照)、マクロRNA調節(例えば、米国特許公開第20140100263号、Gomez e

50

t al., Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways, J Clin Invest. 2015, 125(1):141-156を参照)、幹細胞(例えば、米国特許公開第20090214488号を参照)、コラーゲンメタロプロテアーゼ阻害剤(例えば、米国特許公開第20080187508号、同第20090318511号、同第20110112076号、及び同第20110014186号を参照)、RAC1/CDC42阻害剤などの標的療法(例えば、PCT特許公開第2014028059号を参照)、及びコラーゲンIV受容体インテグリン阻害剤(例えば、米国特許第6,492,325号を参照)を含み、これらのそれぞれの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0146】

最も最近では、細胞または遺伝子のいずれかに基づく療法により、GBMにおいて正常なコラーゲン3-4-5(IV)ネットワークを回復するための戦略が提案されている(Linet al., J Am Soc Nephrol., 2014, 25(4), 687-692)。

コラーゲンIV及び他の疾患

【0147】

最近の研究は、コラーゲンIVタンパク質の欠乏が多くの他の疾患と関連することを示した。COL4A1における突然変異は、周産期脳出血及び孔脳症(Gould DB et al. Science, 2005, 308(5725), 1167-1171)ならびに筋眼脳症(MEB)及びウォーカー・ワールブルク症候群(WWS)(Labelle-Dumais C et al. Plos Genet. 2011, 7(5), e1002062)を引き起こす。MEB/WWSは、眼異形成、神経細胞移動欠損、及び先天性筋ジストロフィーによって特徴付けられる常染色体劣性疾患のスペクトルに属する。

20

【0148】

COL4A2における突然変異は、脳内出血及び白質脳症(出血性卒中)(Gunda B et al., J Neurol., 2014, 261(3), 500-503)ならびに家族性孔脳症及び小血管疾患(Verbeek E et al., Eur. J. Hum. Genet., 2012, 20(8), 844-851)を引き起こす。COL4A5及びCOL4A6における突然変異は、食道平滑筋腫症を伴うアルポート症候群を引き起こす。

30

【0149】

機能性コラーゲンIVタンパク質、特に3、4、及び5鎖におけるいくつかの欠損は、限定されないが、菲薄基底膜を伴う家族性顕微鏡的血尿、顕微鏡的血尿、菲薄基底膜腎症(TBMN)、ネフロゼ域の蛋白尿、進行性腎不全、糸球体性血尿、重度または軽度の蛋白尿、及び糖尿病性腎症(DN)とも関連し得る。

【0150】

グッドパスチャー症候群と呼ばれる稀な自己免疫腎疾患(抗糸球体基底抗体疾患としても知られる)は、3(IV)鎖のNC1ドメインに対する自己抗体により媒介される。自己抗体の結合は通常、迅速な進行性糸球体腎炎を引き起こす(Olaru et al., J Immunology, 2013, 190, 1424-1432)。

40

【0151】

GBMにおけるコラーゲンIVの重要な役割及び様々な疾患とのその密接な関連は、疾患を治療するためのコラーゲンIVを使用する可能性を提起する。例えば、米国特許第7,183,383号は、腎上皮細胞傷害(例えば、毒素誘導傷害、及び薬物誘導傷害)後の細胞機能(例えば、Na⁺/K⁺ ATPase活性、酸素消費、及び基底膜へのインテグリン局在化)を回復させるためのコラーゲンIVタンパク質の使用を開示している。この方法は、傷害細胞を有効量のコラーゲンIVタンパク質と直接接触させる工程を含む

50

。

ネフローゼ G B M の透過性

【 0 1 5 2 】

更なる研究は、ネフローゼ G B M が正常な G B M よりも大きい分子により透過性であることを示す (Farquhar and Palade, J Exp Med., 1961, 114, 699-716)。例えば、ある研究 (Schneeberger et al., J Exp Med., 1974, 139(5), 1283-1302) は、血液中のガンマグロブリン、注射された西洋ワサビペルオキシダーゼ及びカタラーゼ (約 240 kDa)、ならびにフェリチン (480 kDa) が自己免疫複合体 (AIC) 腎炎のラットモデルにおいて腎系球体内に浸透できることを示した。フジガキは、フェリチン抗フェリチン免疫複合体が腎炎ラットの G B M を移動できることも示した (Fujigaki et al., Am J Pathol., 1993, 142(3), 831-842)。浸透したフェリチンが G B M に約 3 日間保持され得ることも更に示される。G B M の透過性の増加は、G B M を通した大きい分子の浸透を強化し得る。コラーゲン I V (3-4-5) プロトマーは約 480 kDa であり、このサイズくらいの分子はアルポート症候群における障害性 G B M などのネフローゼ G B M に容易に侵入することができると考えられる。本発明によると、組換えコラーゲン I V 分子は、アルポート症候群と等しい欠損 G B M を有する患者に全身または局所送達される。組換えコラーゲン I V は、それらが正しいネットワークを形成し、G B M の他の構成成分と相互作用する G B M に輸送され、腎臓における G B M の構造及び実質的に G B M の濾過機能を回復させることができる。

10

20

【 0 1 5 3 】

本明細書に論じられるように、本発明は、組換えコラーゲン I V タンパク質を身体、特に腎臓の系球体基底膜に再び戻すことにより、1つ以上のコラーゲン I V 欠乏によって特徴付けられる疾患を治療するための方法を提供する。コラーゲン I V の置き換えは、罹患した G B M に埋め込まれ、それらの機能を回復させる。特に、本発明は、3 (I V)、4 (I V)、及び 5 (I V) 鎖ポリペプチドをコードする COL4A3、COL4A4、及び COL4A5 遺伝子における突然変異によって引き起こされるアルポート症候群に関する。本発明の文脈において、組換えコラーゲン I V タンパク質は、プロトマー、二量体、四量体、及び多量体、ならびにこれらの混合物であり得る。本発明によるコラーゲン I V プロトマーは、主に系球体基底膜に見られるヘテロ三量体である、コラーゲン I V 3-4-5 のヘテロ三量体である。加えて、コラーゲン I V プロトマーは、キメラ 3 (I V)、4 (I V)、及び 5 (I V) 鎖のヘテロ三量体であり得、これらの鎖のそれぞれにおける NC1 ドメインの全てまたは一部が、1 (I V) 及び 2 (I V) 鎖の NC1 ドメインの全てまたは一部に置き換えられる。

30

【 0 1 5 4 】

いくつかの態様では、本発明の組換えコラーゲン I V タンパク質は、他の好適な賦形剤と共に薬学的組成物として製剤化され得る。このような薬学的組成物は以下に論じられる。特に、組換えコラーゲン I V は組換えヒトコラーゲン I V である。

40

薬学的組成物

【 0 1 5 5 】

組換えコラーゲン I V プロトマー、二量体、四量体、多量体、及び / またはこれらの混合物、ならびに薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物が本明細書において提供される。このような薬学的組成物は、それを必要とするヒト患者に投与及び / または注射するのに好適である。このような組成物は、活性成分 (すなわち、組換えコラーゲン I V) を有効にさせるように製剤化されることが多く、この組成物は、製剤が投与されるであろう対象に毒性である追加の構成成分を含有しない。

コラーゲン I V タンパク質

【 0 1 5 6 】

いくつかの実施形態では、活性成分は、コラーゲン I V プロトマー、二量体、四量体、

50

多量体、及び／またはこれらの混合物である。いくつかの態様では、コラーゲンⅣは、
1 (Ⅳ)、2 (Ⅳ)、3 (Ⅳ)、4 (Ⅳ)、5 (Ⅳ)、及び6 (Ⅳ) からなる群から選択される3つの鎖ポリペプチドを含むプロコラーゲンであり、
各鎖は遺伝子COL4A1、COL4A2、COL4A3、COL4A4、COL4A5、及びCOL4A6によりコードされる。

【0157】

いくつかの態様では、該コラーゲンⅣプロトマーは、1つの3 (Ⅳ) 鎖ポリペプチド、1つの4 (Ⅳ) 鎖ポリペプチド、及び1つの5 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドのヘテロ三量体であり、
3 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列及び／またはそのバリエーションを含み、
4 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列及び／またはそのバリエーションを含み、
5 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列及び／またはそのバリエーションを含む。

10

【0158】

本発明のいくつかの実施形態では、組換えコラーゲンⅣは、キメラ (Ⅳ) ポリペプチド、特にキメラ3 (Ⅳ)、4 (Ⅳ)、及び5 (Ⅳ) ポリペプチドを含み得る。
アルポート症候群を伴う移植を受けた患者の同種移植片を標的とする抗糸球体基底膜疾患の活動的な形態であるアルポート移植後腎炎 (APT N) において、患者の同種抗体は、
3 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメイン内の同種エпитープ、及び／またはコラーゲンⅣ

3 - 4 - プロトマーのNC1六量体の4次構造に依存する同種エпитープを標的とすることが示されている (Olaru et al., J Am Soc Nephrol. 2013, 24 (6), 889 - 895)。更に、コラーゲンⅣ 3 - 4 -

20

5のNC1ドメインは、肺出血を伴う迅速に進行する腎疾患である、グッドパスチャー症候群において主要な同種抗原である。3 (Ⅳ)、4 (Ⅳ)、及び／または5 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの置換は組換えコラーゲンⅣの投与により誘導される自己免疫反応を減少させると予想される。

【0159】

他の実施形態では、該コラーゲンⅣプロトマーは、キメラ3 (Ⅳ)、4 (Ⅳ)、及び5 (Ⅳ) ポリペプチドから選択される1つ、2つ、または3つのキメラコラーゲンⅣポリペプチドを含むヘテロ三量体である。本発明に開示されるように、キメラ3 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドは、3 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1 (Ⅳ) 及び／もしくは2 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドである。キメラ4 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドは、4 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1 (Ⅳ) 及び／もしくは2 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドである。キメラ5 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドは、5 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1 (Ⅳ) 及び／もしくは2 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドである。

30

【0160】

非限定的な例として、組換えヒトコラーゲンⅣプロトマーは、3 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドのNC1ドメインの全てまたは一部で置き換えられる1つのキメラ3 (Ⅳ) 鎖ポリペプチド、1つの4 (Ⅳ) 鎖ポリペプチド、及び1つの5 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドを含み、この3つのポリペプチドが3重らせんを形成する。別の非限定的な例として、組換えコラーゲンⅣプロトマーは、3 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドのNC1ドメインの全てまたは一部で置き換えられる1つのキメラ3 (Ⅳ) 鎖ポリペプチド、4 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が2 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドのNC1ドメインの全てまたは一部で置き換えられる1つのキメラ4 (Ⅳ) 鎖ポリペプチド、ならびに5 (Ⅳ) 鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドのNC1ドメインの全てまたは一部で置き換えられる1つのキメラ5 (Ⅳ) 鎖ポリペプチドを含み得、この3つのポリペプチドが3重らせんを形成する。

40

50

【0161】

いくつかの実施形態では、本発明の該コラーゲンⅠⅤタンパク質は、上記に開示される2つのコラーゲンⅠⅤプロトマーを含む二量体であり得る。いくつかの態様では、本発明に開示される2つのコラーゲンⅠⅤプロトマーは、酵素及び／もしくは化学二量体化を介して、または非共有結合会合を通して二量体化され得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、本発明に使用されるコラーゲンⅠⅤタンパク質は、ある特定の率の3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、及び／またはリジルヒドロキシリジン残基を含有し得る。いくつかの態様では、コラーゲンⅠⅤタンパク質は、約6.5%～約14%の4-ヒドロキシプロリン（すなわち、65～140個の4-ヒドロキシプロリン残基／1000AA）、及び／または約0.3%～約1.6%の3-ヒドロキシプロリン（すなわち、6～16個の3-ヒドロキシプロリン残基／1000AA）を含有し得る。

10

【0163】

他の態様では、該コラーゲンⅠⅤタンパク質はヒトコラーゲンⅠⅤタンパク質である。治療／置き換えに使用されるコラーゲンⅠⅤは、コラーゲンⅠⅤを含有する組織（例えば、ヒト及び他の哺乳動物）からの抽出及び精製を含む、様々な供給源から得ることができる。コラーゲンⅠⅤは、組換えコラーゲンⅠⅤ、特にヒト組換えコラーゲンⅠⅤなど、遺伝子操作を介しても生産され得る。

【0164】

いくつかの実施形態では、コラーゲンⅠⅤ 3- 4- 5ならびに／またはキメラコラーゲンⅠⅤプロトマー、二量体、四量体、多量体、及び／もしくはこれらの混合物を含むコラーゲンⅠⅤタンパク質は、薬学的組成物として製剤化される。組換えコラーゲンⅠⅤを含む該薬学的組成物は、アルポート症候群患者など、それを必要とする対象に投与するのに好適である。

20

コラーゲンⅠⅤの精製

【0165】

コラーゲンⅠⅤプロトマー、二量体、多量体、及び／またはこれらの混合物は、基底膜、胎盤、眼水晶体など、コラーゲンⅠⅤ含有組織から抽出され得る。基本的に、コラーゲンの調製方法は、希釈した有機酸による抽出、塩による沈殿、任意のゲル化及び／または凍結乾燥、タンジェント濾過、ならびに精製などを伴う（例えば、米国特許第4,148,664号、同第5,028,695号、同第5,670,369号、同第5,814,328号、同第7,964,704号を参照、これらのそれぞれの内容は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。異なるコラーゲン型は、異なるイオン強度及びpHの溶液におけるそれらの可溶性に対して抽出及び分離され得ることは当該技術分野において既知である。コラーゲンⅠⅤを抽出するための多くの方法は、ペプシン加水分解によるコラーゲンの可溶化を伴うSage et al. (J. Biol. Chem., 1979, 254(19), 9893-9900)の方法に従う。日本特許公開第11-171898(1999)（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）は、コラーゲンⅠⅤのポリマー画分を単離する技術を開示している。

30

40

【0166】

本明細書で使用されるとき、「コラーゲンⅠⅤ含有組織」は、腱、皮膚、角膜、骨、軟骨、歯、椎間板、胎児皮膚、心血管系、基底膜、胎盤、眼水晶体、及びいずれの上皮下の係留線維を含むが、これらに限定されない、コラーゲンⅠⅤを含有するあらゆる組織を指す。コラーゲンⅠⅤは、上皮及び内皮基底層、糸球体基底膜、胎膜、血管、胎盤基底膜において最も豊富である。他の組織においても少量含まれている。

【0167】

米国特許第5,436,135号は、ヒト及び／または動物の胎盤からのコラーゲンⅠⅤの抽出プロセスを説明している。該方法は、酵素消化（例えばペプシン）と酸pH処理を組み合わせ、非常に効率よく汚染されていないコラーゲンⅠⅤ型を抽出することができ

50

る。この特許の内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0168】

米国特許第7,396,912号は、発酵を使用して組織からコラーゲンを抽出するための方法を説明している。組織を発酵させるために、細菌、酵母などの微生物がコラーゲン含有組織に提供される。発酵を介して抽出されたコラーゲンは、純度が増し、大半が良く保存された、本来の立体構造を有するコラーゲン単量体を含む。この特許の内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0169】

米国特許第7,741,441号は、他のタンパク質による汚染なく、また分解もしくは変性なく、水晶体包からコラーゲンIVを抽出するための方法を説明している。このよ

10

【0170】

いくつかの実施形態では、線維芽細胞などのコラーゲン生産細胞はコラーゲンIVを発現させるために使用され得る。コラーゲン生産細胞（例えば線維芽細胞）は、コラーゲンIVを含むコラーゲンの発現/合成を増加させるために、異なる薬剤で刺激され得ることが当該技術分野において論じられている。例えば、PCT特許公開第WO1995031473号、同第WO2008070893号、及び同第WO2008070892号を参照（これらのそれぞれの内容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

【0171】

当該技術分野における多くの参考文献は、あるものはコラーゲンIVを含む、様々な供給源から他の型のコラーゲンを抽出及び精製するための他の方法を開示している。このような方法は、必要に応じて採用され得る（例えば、米国特許第2,979,438号、同第5,064,941号、同第5,436,135号、同第5,814,328号、同第7,964,704号、ならびに米国特許公開第20140147400号及び第20130123468号を参照）。線維芽細胞からのコラーゲン（コラーゲンIVを含む）の生産を刺激する他の方法も必要に応じて使用され得る（例えば、米国特許公開第20100239556号及び第20080306001号を参照）。

組換えコラーゲンIVの生産

30

【0172】

組換え技術は組換えヒトコラーゲンIVを生産するためにも使用され得る。組換えコラーゲンIVは、これをコードする組換えDNAを発現させるために好適な宿主細胞を培養することにより生産され得、この組換えコラーゲンIVは、コラーゲンIVが細胞の外に分泌されるため、培養培地から精製され得る。哺乳類の分泌経路は生物学的に活性なタンパク質の組織化及び折り畳みを促進することが知られているため、組換えコラーゲンIVを発現させるために様々な哺乳類の細胞系が採用され得る。酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、及び/または細菌などの他の宿主も本発明の組換えコラーゲンIVタンパク質を生産するために使用され得る。

【0173】

40

培養上清内に放出される分泌されたコラーゲンIVを生産するために、コラーゲンIVの天然のシグナルペプチドが使用されるか、または例えば、特定の発現系において効率的である別の分泌されたタンパク質に由来するシグナルペプチドが使用されるかのいずれかである。このような組換えコラーゲンタンパク質の例は、米国特許第8,470,555号（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において論じられており、ヒトコレクチンのシグナルペプチドを含むコラーゲン3重らせん構造を有する組換えコラーゲンタンパク質を教示している。

【0174】

本発明の内容において、従来の分子生物学、組換えDNA技術、及びタンパク質生化学は当該技術分野内である。このような技術は、文献、例えば、Sambrook et

50

al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, Ausubel et al. eds. (2005) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ, Bonifacino et al. eds. (2005) Current Protocols in Cell Biology, Hoboken, NJ, 及び Coligan et al. eds. (2005) Current Protocols in Protein Science, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ に十分に説明されている。

10

【0175】

コラーゲンⅠⅤ 鎖ポリペプチドをコードする核酸は、タンパク質の発現に好適ないずれの発現ベクター内にクローン化され得る。ベクターの一般的な性質は、本発明によると、コラーゲンⅠⅤの生産に重要ではない。一般に、好適な発現ベクター及び発現構築物は当業者には明らかである。好適な発現ベクターは、宿主特異的であるか、または関心の他の宿主用に操作されるかのいずれかであり得るプラスミド及びファージに基づき得る。他の好適なベクターは、コスミド、レトロウイルス、及び多くの他のビヒクルを含み得る。プロモーター、オペレーター、誘導因子、ターミネーター、及び他の配列などの他の制御及び調節配列は当業者には明らかである。組換えコラーゲンⅠⅤを生産するためのベクター及び構築物は、いずれの好適な方法で修飾及び/または操作され得る。好適なベクターは、当然のことながら、所望の発現系に従い、当業者により選択され得る。

20

【0176】

当該技術分野において周知の多くの方法が本発明のコラーゲンⅠⅤ 鎖ポリペプチドを生産するために使用され得る。非限定的な例として、簡単な方法の1つは、コラーゲンⅠⅤ 鎖ポリペプチドをコードする核酸を得、それらを好適な発現ベクター（例えばプラスミド）内に挿入し、好適な宿主（例えば哺乳類の細胞系）を形質転換し、形質転換した宿主を培養し、断片化及び遠心分離などのいずれの好適な手段により本発明のポリペプチドを得る工程を含み得る。

【0177】

いくつかの態様では、該3つのコラーゲンⅠⅤ 鎖ポリペプチドは共通のベクター内に挿入され得る。他の態様では、該3つのコラーゲンⅠⅤ 鎖ポリペプチドは、ベクターを分離するために挿入され、次に同時に発現させるために宿主に同時形質転換され得る。

30

【0178】

他の好適なクローン化方法は当業者には明らかである。

【0179】

本発明によると、組換えコラーゲンⅠⅤは、哺乳類細胞及び糖鎖操作された酵母細胞を含む真核発現系において生産され得る。非限定的な例として、CHO細胞系は、それらが高レベルのタンパク質発現を促進する十分に特徴付けされ、選択可能であり、かつ増幅可能な遺伝子発現系を提供するため、最適である。加えて、これらの細胞は、接着または懸濁培養物として操作することが容易であり、比較的良好な遺伝的安定性を呈する。CHO細胞及びそれらにおいて発現された組換えタンパク質は広範に特徴付けされ、規制当局により臨床製造における使用が承認されている。

40

【0180】

他の細胞系は、ヒト胚性腎臓細胞系293（HEK293細胞）、ヒト線維芽細胞を含み得る。例えば、HEK293細胞は、3（ⅠⅤ）、4（ⅠⅤ）、及び5（ⅠⅤ）鎖ポリペプチドを発現するベクターで安定してトランスフェクトされ得る。これらのトランスフェクトされた細胞の細胞抽出物及び培養培地は、例えば、3（ⅠⅤ）、4（ⅠⅤ）、及び5（ⅠⅤ）鎖ポリペプチドの免疫共沈降を介して、コラーゲンヘテロ三量体の組織化を検出するために使用され得る（例えば、Kobayashi et al.,

50

Kidney International. , 2003, 64 (6), 1986 - 1996、及び Kobayashi and Uchiyama, Biomed Res. , 2010, 31 (6), 371 - 377)。

【0181】

ビタミンCを含まない培地において培養された細胞がI V型コラーゲンタンパク質よりも非常に多い量で単鎖コラーゲンI Vポリペプチドを生産することが示された(Yoshikawa, K. et al. , J. Biochem. , 2001, 129, 929 - 936を参照)。本発明のいくつかの態様では、細胞は、3鎖などの単一鎖ポリペプチドを含む単一構築物でトランスフェクトされ、3鎖ポリペプチドのみを生産するためにビタミンCを含まない培地で培養され得る。このような3鎖は、同じ方法で生産された他の2つの鎖ポリペプチドまたはキメラポリペプチド(すなわち、4及び5)と混合されて、コラーゲンI Vヘテロ三量体を形成し得る。

10

【0182】

いずれの生細胞に好適な培養は本発明の培養に有用であり得る。培養系は、原核発現系(例えば大腸菌細胞)から真核発現系(例えばCHO細胞及びHEK293細胞)まで様々であり得る。

【0183】

大腸菌はヒドロキシル化ヒトコラーゲンI Vの組換え発現を発現させるために使用され得る。巨大ウイルスであるミミウイルスによりコードされる新しいプロリル及びリジルヒドロキシラーゼ遺伝子の特徴付けは、ヒドロキシル化コラーゲンの生産のための方法を明らかにする。大腸菌におけるミミウイルスのプロリル及びリジルヒドロキシラーゼとのヒトコラーゲンI V型構築物の同時発現は、ヒドロキシル化コラーゲンI Vを生産し得る。プロリル及びリジルヒドロキシル化のそれぞれのレベルは、未変性ヒトコラーゲンI V型のヒドロキシル化レベルに類似し得る。組換えコラーゲンI Vに沿ったヒドロキシプロリン及びヒドロキシリジンの分布も、質量分光分析により決定されるとき、未変性コラーゲンのものと類似し得る。

20

【0184】

いくつかの実施形態では、人工的にまたは天然のいずれかで、未変性コラーゲンI V発現または他のコラーゲンの発現が欠損している宿主細胞は、本発明の組換えコラーゲンI Vを生産するために使用され得る。

30

【0185】

コラーゲンI Vの合成は、それぞれ、-X-Pro-Gly-、-Pro-4Hyp-Gly-、及び-X-Lys-Gly-配列における4-ヒドロキシプロリン、3-ヒドロキシプロリン、及びヒドロキシリジンの形成を含む、上述の多くの異常な同時翻訳及び翻訳後修飾を伴う。いくつかの実施形態では、組換えコラーゲンI Vタンパク質を生産するために使用される細胞は、コラーゲンプロリル4-ヒドロキシラーゼ(P4Hs)、プロリル3-ヒドロキシラーゼ(P3Hs)、及び/またはリジルヒドロキシラーゼ(LHs)を発現するように操作され得る。

【0186】

いくつかの態様では、組換えコラーゲンI Vを生産するために使用される細胞は、それぞれ、プロリル1-3ヒドロキシラーゼ(P3H)及び組換えコラーゲンI V鎖をコードする核酸配列を含有する構築物と同時にトランスフェクトされ得る。P3Hは、組換えコラーゲンI Vの3-ヒドロキシプロリンの含有量を増加させ、この組換えコラーゲンI Vの高い数の3-ヒドロキシプロリン残基は、血小板誘導凝集を減少させることができる。他の態様では、組換えコラーゲンI Vを生産するために使用される細胞は、それぞれ、プロリル-4ヒドロキシラーゼ(P4H)及び組換えコラーゲンI V鎖をコードする核酸配列を含有する構築物と同時にトランスフェクトされ得る。P4Hは、組換えコラーゲンI Vの4-ヒドロキシプロリンの含有量を増加させ、この組換えコラーゲンI Vの4-ヒドロキシプロリン残基の高い含有量は、コラーゲンの熱安定性を増加させ、かつ/またはタンパク質分解による消化に対する感受性を減少させる。

40

50

【0187】

また他の態様では、組換えコラーゲンⅤを生産するために使用される細胞は、それぞれ、リジルヒドロキシラーゼ（LH）及び組換えコラーゲンⅤ鎖をコードする核酸配列を含有する構築物と同時にトランスフェクトされ得る。LHは、組換えコラーゲンⅤのリジルヒドロキシリジンの含有量を増加させ、この組換えコラーゲンⅤのリジルヒドロキシリジン残基の高い含有量は、安定性を更に増加させ、グリコシル化修飾のための部位を提供する。

【0188】

コラーゲンⅤは、コラーゲンⅤのネットワークを強化し得る、メチオニン硫黄とヒドロキシリジン窒素との間に独特なスルフィリミン（ $S=N$ ）結合を含有する。基底膜に見られる酵素であるペルオキシダジンは、スルフィリミン結合の形成を触媒する（Bhave et al., Nature Chem. Biol., 2012, 8, 784-790）。本発明によると、コラーゲンⅤプロトマーは、その比較的小さいサイズを考えると、薬学的組成物の活性成分として使用され得る。この文脈において、組換えコラーゲンⅤを生産するために使用される細胞は、ペルオキシダジンを枯渇させるように操作され、したがって、コラーゲンⅤプロトマーの二量体化を妨げることができる。他の態様では、ペルオキシダジン阻害剤は、組換えコラーゲンⅤプロトマー合成中のスルフィリミン結合の形成を妨げるために宿主細胞に適用され得る。ペルオキシダジン阻害剤は、ペルオキシダジンの合成を阻害する siRNA またはアンチセンス核酸などの核酸、ペルオキシダジンに特異的に結合する抗体、ペルオキシダジンまたはペルオキシダジン基質の断片であるペプチド、小分子、及び/またはヨウ化物もしくはチオシアネートなどのアニオンであり得る。ペルオキシダジンの阻害は、培養した細胞における臭化物の除去により、またはタウリンなどの次亜塩素酸及び/または次亜臭素酸の中和剤の適用によっても生じ得る。

【0189】

いくつかの実施形態では、このような細胞系は、キメラ 3（Ⅴ）、4（Ⅴ）、及び 5（Ⅴ）ポリペプチドから選択されるキメラ（Ⅴ）鎖ポリペプチドを生産するために使用され得る。キメラ 3（Ⅴ）鎖ポリペプチドは、3（Ⅴ）鎖の NC1 ドメインの全てまたは一部のアミノ酸配列をコードする核酸配列が 1（Ⅴ）及び/もしくは 2（Ⅴ）鎖の NC1 ドメインの全てまたは一部のアミノ酸配列をコードする核酸配列に置き換えられる、キメラ cDNA によりコードされ得る。キメラ 4（Ⅴ）鎖ポリペプチドは、4（Ⅴ）鎖の NC1 ドメインの全てまたは一部のアミノ酸配列をコードする核酸配列が 1（Ⅴ）及び/もしくは 2（Ⅴ）鎖の NC1 ドメインの全てまたは一部のアミノ酸配列をコードする核酸配列に置き換えられる、キメラ cDNA によりコードされ得る。キメラ 5（Ⅴ）鎖ポリペプチドは、5（Ⅴ）鎖の NC1 ドメインの全てまたは一部のアミノ酸配列をコードする核酸配列が 1（Ⅴ）及び/もしくは 2（Ⅴ）鎖の NC1 ドメインの全てまたは一部のアミノ酸配列をコードする核酸配列に置き換えられる、キメラ cDNA によりコードされ得る。

【0190】

他の態様では、キメラ（Ⅴ）ポリペプチドをコードする該キメラ cDNA s は、哺乳類細胞、細菌、昆虫、植物細胞、及び/または酵母における発現のためにコドン最適化され得る。組換えポリペプチドの発現を最適化するためのコドン最適化は当該技術分野において周知である。

【0191】

該キメラ cDNA s は、キメラ（Ⅴ）ポリペプチドを生産するために、哺乳類細胞、細菌、昆虫細胞、植物細胞、及び/または酵母内にトランスフェクトされ得る。キメラ（Ⅴ）ポリペプチドをコードするキメラ cDNA を含有する、形質転換された宿主細胞、細菌、昆虫、植物細胞、及び/または酵母も本発明において提供される。

【0192】

いくつかの実施形態では、本発明の組換えコラーゲンⅤタンパク質は、ポリペプチド

の安定性を強化し得るものなど、非天然アミノ酸及び／または他のアミノ酸置換を更に含有し得る。

薬学的に許容される賦形剤

【0193】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、他の薬学的に許容される賦形剤を更に含み得る。

【0194】

用語「薬学的に許容される賦形剤」は、薬学的製品の製剤化に使用される緩衝液、溶媒、等張化剤、安定剤、酸化防止剤、界面活性剤、またはポリマーなど、治療活性を有さず、また許容される毒性を有するあらゆる成分を指す。これらは一般的に、米国食品医薬品局により公布されるものを含む、確立された政府標準規格に従う、ヒトへの投与に安全である。

10

【0195】

緩衝液：本明細書で使用されるとき、用語「緩衝液」は、溶液のpHを許容可能な範囲に維持するそれらの薬剤を包含する。緩衝液は、弱酸及びその共役塩基または弱塩基及びその共役酸の混合物からなる水溶液である。そのpHは、少量の強酸または塩基が添加されたときにほとんど変化せず、よって、溶液のpHにおけるあらゆる変化を防止するために使用される。緩衝溶液は、狭いpH範囲内にタンパク質を安定して維持する手段としてコラーゲンI Vタンパク質製剤に使用される。

20

【0196】

緩衝液は、薬学的組成物のpHを安定させることができる。好適な緩衝液は当該技術分野において周知であり、文献に見出すことができる。好ましい薬学的に許容される緩衝液は、ヒスチジン緩衝液、アルギニン緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、酢酸緩衝液、及びリン酸緩衝液、またはこれらの混合物を含むが、これらに限定されない。最も好ましい緩衝液は、クエン酸、L-アルギニン、L-ヒスチジン、またはL-ヒスチジンとL-ヒスチジン塩酸塩の混合物を含む。他の好ましい緩衝液は酢酸緩衝液である。使用される緩衝液とは関係なく、pHは、当該技術分野において既知の酸または塩基、例えば、塩酸、酢酸、リン酸、硫酸、及びクエン酸、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムで調節され得る。pHは、許容可能な安定性を提供するため、コラーゲンI Vプロトマー、二量体、四量体、及び／または多量体の可溶性及びインスリン分泌活性を維持するため、なら

30

びに非経口投与に容認される範囲に調節される。pHは、約pH5、約pH5.5、約pH6、約pH6.5、または約pH7.0など、約pH4～約pH7.0、または約pH5～約pH6であり得る。

【0197】

等張化剤：本明細書で使用されるとき、用語「等張化剤」は、薬学的組成物及び製剤の張度を調節するために使用される薬学的に許容される賦形剤を列挙する。張度は一般に、通常ヒトの血清に対する溶液の浸透圧を指す。浸透圧は、半透膜にわたって水の内方向の流れを防止するために、溶液に提供されなければならない圧力である。溶質のみが浸透圧をもたらすため、浸透圧及び張度は膜を横断できない溶質によってのみ影響を受ける。製剤は、低張性、等張性、または高張性であり得るが、典型的に、好ましくは等張性である。等張性製剤は、液体または固体形態から、例えば凍結乾燥形態から再構築された液体であり、生理学的塩溶液及び血清など、比較されるある他の溶液と同じ等張性を有する溶液を示す。

40

【0198】

等張化剤賦形剤は、適用部位での浸透圧ショックを防止することによって局所刺激を減少させるために、注射可能な眼または鼻腔内調製物に添加される。投与中の快適性のために、多くの注射可能剤形は、身体の正常な細胞及び血液と同じ塩（等張性）濃度を有さなければならない。

【0199】

好適な等張化剤は、糖類、塩類、及びアミノ酸を含む。等張化剤のいくつかの例として

50

は、コーンシロップ、含水デキストロース、無水デキストロース、トレハロース、スクロース、グリセリン、アルギニン、マンニトール、塩化カリウム、及び塩化ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。

【0200】

本明細書で使用されるとき、用語「糖」は、水溶性である単糖またはオリゴ糖を示す。単糖は、単純糖及びそれらの誘導体を含む、酸によって加水分解可能ではない単量体炭水化物である。単糖の例としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、ソルボース、リボース、デオキシリボース、ノイラミン酸が挙げられる。オリゴ糖は、分枝状または鎖のいずれかのグリコシド結合（複数可）を介して結合される2つ以上の単量体糖単位からなる炭水化物である。オリゴ糖内の単量体糖単位は、同一または異なり得る。オリゴ糖の例としては、スクロース、トレハロース、ラクトース、マルトース、及びラフィノースが挙げられる。

10

【0201】

等張化剤または安定剤の文脈において、用語「アミノ酸」は、カルボキシル基に対して位置に位置するアミノ部分を有する薬学的に許容される有機分子を指す。アミノ酸の例としては、アルギニン、グリシン、オルニチン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、イソロイシン、ロイシン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、プロリンが挙げられる。等張化剤または安定剤の文脈において、好ましいアミノ酸は、アルギニン、トリプトファン、メチオニン、ヒスチジン、またはグリシンである。例えば、アルギニンはタンパク質可溶化剤であり、コラーゲンI Vの凝集を減少させる安定剤でもある。

20

【0202】

無機塩は、有効な等張化剤であり、一般に、タンパク質安定剤としても使用される。無機塩は、塩化ナトリウム（ NaCl ）、硫酸ナトリウム（ Na_2SO_4 ）、チオシアン酸ナトリウム（ NaSCN ）、塩化マグネシウム（ MgCl_2 ）、硫酸マグネシウム（ MgSO_4 ）、チオシアン酸アンモニウム（ NH_4SCN ）、硫酸アンモニウム（ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）、塩化アンモニウム（ NH_4Cl ）、塩化カルシウム（ CaCl_2 ）、硫酸カルシウム（ CaSO_4 ）、塩化亜鉛（ ZnCl_2 ）など、及びこれらの組み合わせを含み得るが、これらに限定されない。

30

【0203】

製剤がタンパク質を安定させるために高濃度の1つ以上の糖類を必要とする場合、無機塩濃度は、注射通が投与時に低減されるように製剤の浸透圧を維持するために、ゼロであるか、または非常に低く保たれるべきであることは周知である。いくつかの実施形態では、コラーゲンI V製剤は、無機塩が本明細書に記載される製剤への添加から実質的に除外される無塩製剤である。これらの無塩製剤は、沈殿または凝集など、安定性が増加し、相変化が減少して、コラーゲンI V製剤の浸透圧を維持することができる。pH調節により導入される本開示の製剤内の無機塩の存在は、無機塩の添加とは見なされないことを当業者は理解するだろう。

40

【0204】

他の実施形態では、高濃度のコラーゲンI Vタンパク質が所望されない場合、コラーゲンI Vタンパク質を含む薬学的組成物は、様々な生理学的に許容される塩の形態のいずれかであり、かつ/または許容される薬学的担体及び/もしくはは添加剤を伴い得る。薬学的に許容される塩は、例えば、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、重酒石酸塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カンシラート、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、二塩酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グルセプテート、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート（*glycollylarsanilate*）、ヘキシルレソルシネート（*hexylresorcinate*）、ヒドラバミン、ヒドロ臭化物、塩酸塩、ヒドロキシナフトエート、ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩ト、臭化メチル、硝酸メチル、硫酸メチル、ムケート（*mucate*）、ナブ

50

シレート (n a p s y l a t e)、硝酸塩、パモ酸塩 (エンボネート)、パントテン酸塩、リン酸塩 / ジスリン酸塩 (d i s p h o s p h a t e)、ポリガラクトツロ酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、次酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、及びテオクレート (t e o c l a t e) / トリエチオジド (t r i e t h i o d i d e) アニオン ; ベンザチン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン、及びプロカイン (有機) カチオン ; ならびにアルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、及び亜鉛 (金属) カチオンを含む。薬学的に許容される塩は、例えば、B e r g e e t a l . , J . P h a r m . S c i . 1 9 7 7 , 6 6 , 1 - 1 9 に記載されるそれらの塩も含む。

【 0 2 0 5 】

本発明のいくつかの実施形態では、コラーゲン I V 組成物は、等張化剤としてマンニトールを更に含み得る。マンニトール濃度は、約 3 . 0 ~ 約 6 . 3 % w / v の範囲である。

【 0 2 0 6 】

界面活性剤 : 界面活性剤は、コラーゲン I V タンパク質の変性をもたらすことなく、攪拌及び剪断のような機械的応力に対してタンパク質製剤を保護するため、ならびに処理及び保管中の表面への吸着を減少させるために使用され得る。界面活性剤は、ポロキサマー、ポリソルベート、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (B r i j)、アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル (トリトン - X) またはドデシル硫酸ナトリウム (S D S) を含み得るが、これらに限定されない。好ましい界面活性剤はポリソルベート及びポロキサマーである。

【 0 2 0 7 】

ポリソルベートは、ソルビトールのオレイン酸エステル及びその無水物であり、典型的にはエチレンオキシドと共重合される。ポリソルベート 2 0 (ポリ (エチレンオキシド) (2 0) モノラウリン酸ソルビタン、T w e e n 2 0) またはポリソルベート 8 0 (ポリ (エチレンオキシド) (8 0) モノラウリン酸ソルビタン、T w e e n 8 0) を含む一般的に使用されるポリソルベート及び P l u r o n i c (登録商標) ポリオールは、界面相互作用を減少させることにより処理及び保管中のタンパク質を安定させ、タンパク質の吸着を防止することができる。

【 0 2 0 8 】

本発明のいくつかの実施形態では、コラーゲン I V 組成物は、可溶化剤及び / または安定剤としてポリソルベート - 8 0 を更に含み得る。ポリソルベート - 8 0 の濃度は、約 0 . 0 1 ~ 0 . 0 5 % (w / v) (または m g / m l を単位として表される、約 0 . 1 ~ 0 . 5 m g / m l) の範囲である。ポリソルベート - 8 0 のこの濃度は、可溶性凝集体及び不溶性粒子の形成を最小にするために、コラーゲン I V タンパク質及びマンニトールの組み合わせで決定される。

【 0 2 0 9 】

ポロキサマーは、ポリ (エチレンオキシド) (P E O) の 2 本の親水性鎖に隣接するポリプロピレンオキシド (P P O) の中央疎水性鎖から構成される非イオン性トリブロックコポリマーを意味し、各 P P O または P E O 鎖は異なる分子量のものであってもよい。

【 0 2 1 0 】

安定した高濃度のコラーゲン I V 製剤を提供するのに有効な界面活性剤の量は通常、約 5 0 p p m ~ 約 2 0 0 p p m の範囲である。本発明のコラーゲン I V 製剤は、例えば、ポリソルベート 2 0 もしくは 8 0 などの 1 つ以上のポリソルベート (複数可)、ポロキサマー 1 8 4 もしくは 1 8 8 などの 1 つ以上のポロキサマー、1 つ以上の P l u r o n i c (登録商標) ポリオール (複数可)、及び / または 1 つ以上エチレン / ポリプロピレンブロックポリマー (複数可) を含む、1 つ以上の非イオン性界面活性剤 (複数可) を有する製剤を含むが、これに限定されない。ポリソルベート 2 0 (T w e e n 2 0) またはポリソルベート 8 0 (T w e e n 8 0) などのポリソルベートを有する製剤が本明細書において例示される。

【 0 2 1 1 】

酸化防止剤：酸化防止剤は、活性薬学的成分、特に組換えコラーゲンⅠⅤタンパク質の酸化を防止するために使用され得る。これは、キレート剤、反応性脱酸素剤、及び鎖ターミネーターを含む。酸化防止剤は、EDTA、クエン酸、アスコルビン酸、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、亜硫酸ナトリウム、p-アミノ安息香酸、グルタチオン、没食子酸プロピル、システイン、メチオニン、エタノール、及びN-アセチルシステインを含むが、これらに限定されない。特に、EDTA、ALA、BAPTA、EGTA、DTPA、及びDMSAなどの金属キレート剤は、コラーゲンⅠⅤプロトマー、二量体、及び/または多量体の間のリジロオキシダーゼ媒介コラーゲンⅠⅤ架橋を阻害するために使用され得る。

【0212】

コラーゲンⅠⅤタンパク質は、溶液及び注入に好適な粉末として生産されるか、またはこのようなコラーゲンⅠⅤタンパク質の注射及び他の投与経路に好適な溶液として製剤化され得る。

【0213】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、組換えタンパク質の安定性を損失することなく、高濃度のコラーゲンⅠⅤタンパク質を含有し得る。

【0214】

標準的な薬学的製剤技術は当業者に周知である（例えば、2005, Physicians' Desk Reference（登録商標）, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Genado et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000を参照）。好適な薬学的添加剤は、上記に論じられるもの、例えば、マンニトール、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。組成物は、pH緩衝試薬及び湿潤剤または乳化剤も含有し得る。組成物は、保存剤を含んでも含まなくてもよい。

【0215】

薬学的組成物の製剤は、意図される投与形態及び他のパラメータにより変動し得る（例えば、Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th ed., APhA Publications, 2003を参照）。いくつかの実施形態では、組成物は、注射用に滅菌水で再構築したときに静脈内注射により投与されるように、滅菌非発熱性の白からオフホワイトの凍結乾燥ケーキまたは粉末であり得る。他の実施形態では、製剤自体が滅菌非発熱性溶液であり得る。

【0216】

凍結乾燥製剤：いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、凍結乾燥防止剤の存在下で凍結乾燥された混合物として製剤化され得る。

【0217】

他の実施形態では、本発明の薬学的組成物は、生分解性ポリマーに封入され得る。

【0218】

水性製剤：本明細書で使用されるとき、「水性製剤」は、好適な溶媒に溶解された1つ以上の賦形剤（例えば、化学添加剤）と組み合わせて、コラーゲンⅠⅤタンパク質を含有する溶液または液体調製物を指す。いくつかの実施形態では、コラーゲンⅠⅤ組成物は、有効量の可溶性コラーゲンⅠⅤタンパク質、所望のpHを有するクエン酸-リン酸緩衝液もしくはクエン酸緩衝液、スクロースもしくはトレハロース、塩化ナトリウム、及びL-ヒスチジンもしくはL-アスパラギン酸のいずれかを含む、安定した水性製剤として製剤化され得る。

【0219】

いくつかの実施形態では、コラーゲンⅠⅤタンパク質の製剤は、特に、吸着を阻害し、酸化を防止し、pHを維持し、コラーゲンⅠⅤタンパク質を安定させ、かつ薬学的組成物の浸透圧を制御する賦形剤を含有し得る。一般に、コラーゲンⅠⅤを安定させる賦形剤は、それらが製造プロセス中、特定の保存条件下、または特定の投与モードと関連して生じ得る様々な化学的及び物理的応力に対してタンパク質を安定させる機序に基づき選択され得る。

【0220】

製剤に使用される賦形剤の濃度または量は、例えば、製剤に含まれるコラーゲンⅠⅤタンパク質の量、所望の製剤に含まれる他の賦形剤の量、製剤中の他の構成成分の量または容量、及び達成されることが望まれる所望の張度または浸透圧により変動する。様々な実施形態では、異なる種類の賦形剤が単一製剤において混合され得る。したがって、単一製剤は、1つの賦形剤、2つ、3つ以上の異なる種類の賦形剤を含有し得る。液体製剤における賦形剤の使用は、例えば、製造中、輸送中、保管中、使用前調製中、または投与中に生じ得る応力に起因する分解または凝集プロセスに対してタンパク質を安定させるための確立された慣習である。実際に、製剤における特定の賦形剤の存在は、2つ以上の効果または目的を有し得る。

10

【0221】

様々な刊行物及び概説、例えば、Arakawa, et al, Pharm. Res., 1991, 8(3), 285-91(1991)、Kendrick, et al, Pharmaceutical Biotechnology, 2002, 13, 61-84、及びRandolph, et al., Pharmaceutical Biotechnology, 2002, 13, 159-175(これらのそれぞれの内容は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)がタンパク質の安定化について利用可能である。

20

【0222】

したがって、当該技術分野における様々な参考文献が薬学的な目的のためのタンパク質製剤について論じており、例えば、米国特許第6,821,515号、同第6,685,940号、同第8,420,081号、及び同第8,613,919号、ならびに米国特許公開第20120294866号及び第20130156760号、ならびPCT特許公開第WO2013096791号(これらのそれぞれの内容は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)を参照。

30

【0223】

一実施形態では、本発明のコラーゲンⅠⅤタンパク質製剤は、コラーゲンⅠⅤプロトマー、二量体、四量体、多量体、及び/またはこれらの混合物を含み、コラーゲンⅠⅤプロトマーは、コラーゲンⅠⅤ 1、2、3、4、5、及び6鎖から選択される3つの鎖ポリペプチドを含むヘテロ三量体である。好ましい実施形態では、該コラーゲンⅠⅤプロトマーは、1つの3鎖、1つの4鎖、及び1つの5鎖ポリペプチドからなるヘテロ三量体である。

【0224】

いくつかの態様では、コラーゲンⅠⅤ製剤は、配列番号3のアミノ酸配列及び/またはそのバリエーションを含む3(ⅠⅤ)鎖ポリペプチド、配列番号4のアミノ酸配列及び/またはそのバリエーションを含む4(ⅠⅤ)鎖ポリペプチド、配列番号5のアミノ酸配列及び/またはそのバリエーションを含む5(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドを含む、組換えコラーゲンⅠⅤタンパク質を含有する。他の態様では、コラーゲンⅠⅤ製剤は、キメラ3(ⅠⅤ)鎖ポリペプチド、キメラ4(ⅠⅤ)鎖ポリペプチド、及びキメラ5(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドから選択されるキメラ(ⅠⅤ)鎖ポリペプチドを含むコラーゲンⅠⅤタンパク質を含有する。

40

【0225】

非限定的な例として、本発明によるコラーゲンⅠⅤタンパク質製剤は、薬学的有効量のコラーゲンⅠⅤタンパク質(例えば、組換えヒトコラーゲンⅠⅤタンパク質)、好適な濃

50

度の非イオン性界面活性剤、ヒスチジン、アルギニン、リジン、グリシン、及びアラニンから選択される1つ以上のアミノ酸、ポリソルベート-80、ならびに/またはマンニトール、デキストロース、グルコース、トレハロース、及びスクロースから選択される1つ以上の糖類を含有し得、コラーゲンI Vタンパク質の濃度は約10 ng/ml ~ 約10 mg/mlであり、該コラーゲンI Vタンパク質製剤はpH 4.5 ~ pH 6.5のpHを有し、該コラーゲンI Vタンパク質製剤は実質的に無機塩を含有しない。

【0226】

更なる実施形態では、コラーゲンI V製剤は、コラーゲンI Vプロトマー、二量体、単量体、及びこれらの混合物の架橋を阻害するために、EDTAなどの金属キレート剤を更に含み得る。

投与及び投薬量

【0227】

本発明によると、組換えヒトコラーゲンI Vタンパク質、コラーゲンI Vタンパク質を含む薬学的組成物、またはコラーゲンI Vタンパク質製剤は、静脈内注射、ならびに/または筋肉内、皮下、脳内、脳室内、頭蓋内、眼内、耳内送達、及び短期もしくは長期的に設置されたカテーテルによる送達などの他の全身もしくは局所投与により、それを必要とする患者に投与され得る。

【0228】

本発明の薬学的組成物の投与経路は、好ましくは、静脈内、皮下、腹腔内、及び筋肉内経路を含む非経口経路である。静脈内投与が好ましい。注射に加えて、移植片及び経皮パッチが使用され得るか、または活性化合物が、マイクロカプセル送達系を含む放出制御調製物を使用して調製され得る(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照)。エチレン酢酸ビニル、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、またはポリ乳酸などの生分解性または生適合性ポリマーが使用され得る。

【0229】

薬学的組成物の剤形には特に制限はない。薬学的薬剤は、例えば、液体、半固体、及び固体のいずれかの剤形である。この具体的な例としては、溶液(例えば、注射可能な溶液及び不溶性溶液)、分散液、懸濁液、錠剤、ビル、粉末、リボソーム、及びナノ粒子が挙げられる。

【0230】

剤形は、投与経路または効能により適切に選択される。注射可能な剤形が好ましい。注射可能な剤形の好ましい組成物の例としては、注射可能な溶液または不溶性溶液の剤形が挙げられ、具体的には、静脈内、皮下、及び筋肉内注射、好ましくは静脈内注射に好適なものを含む。

【0231】

加えて、本発明の薬学的組成物は、薬学的薬剤が滅菌であり、生産及び保管条件下で安定している限り、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リボソーム形態、及びナノ粒子のいずれか、ならびに投与に好適な他の形態であり得るが、これらに限定されない。コラーゲンI Vプロトマー、二量体、四量体、多量体、及び/またはこれらの混合物は、必要な場合、上に列記される成分のうちの1つ以上の組み合わせと共に、必要な量の適切な溶媒に組み込まれる。その後、混合物は注射可能な滅菌溶液を調製するために濾過により滅菌され得る。

【0232】

一般に、薬学的組成物は、分散液を調製するために、基本の分散培地及び上に列記される必要な追加成分(複数可)を含有する滅菌培地に組み込まれる。注射可能な滅菌溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥及び凍結乾燥により、濾過により既に滅菌された溶液からの適宜所望の追加成分を有する活性成分の粉末を得るこ

10

20

30

40

50

とを伴う。例えば、分散に必要な粒子サイズは、レシチンなどのコーティング剤の使用により維持することができ、一方で、溶液の適切な流動性は、界面活性剤の使用により維持することができる。モノステアレート及びゼラチンなどの吸収遅延剤は組成物中に含有され得、それにより注射可能な組成物の持続的吸収が達成される。

【0233】

投与の単回用量は、特に限定されず、目的により適切に選択され得る。単回用量は、通常、約10 ng/kg ~ 約250 mg/kg、より好ましくは約10 ng/kg ~ 約1 µg/kg、または約100 ng/kg ~ 約100 µg/kg、または約1 µg/kg ~ 約1 mg/kg、または約10 ng/kg ~ 約50 mg/kg、または約1 mg/kg ~ 約100 mg/kg、または約10 mg/kg ~ 約50 mg/kg、特に好ましくはおよそ約5 mg/kg ~ 約10 mg/kgである。いくつかの実施形態では、単回用量は、約0.1 mg/kg、約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg、約10 mg/kg、または約20 mg/kgである。本明細書で使用されるとき、用語「約」は、薬剤の用量などの測定可能な値を指すとき、変動が開示される組成物に適切であるように、指定された量から±20%または±10%、より好ましくは±5%、更により好ましくは±1%、及び尚より好ましくは±0.1%の変動を包含することを意味する。用量は、治療される症状により各投与に関して調節され得る。あるいは、この範囲外となる用量は、患者の症状、一般的な状態、投与経路などを考慮して適用することができる。

10

20

【0234】

薬学的組成物の投与スケジュールは、単回用量投与及び継続投与のいずれかであり得る。

【0235】

本発明の薬学的組成物は、1つ以上の追加の薬学的薬物と組み合わせて使用され得る。薬学的組成物と組み合わされる薬学的薬物は、症状または有害反応を考慮して適切に選択される。本発明において、このような組み合わせ使用は、本発明の薬学的薬物を同時に投与する、または追加の薬学的薬物、ならびに追加の薬学的薬物と共に本発明の薬学的薬物の製剤をほぼ同時に投与することを含む。

30

【0236】

本発明の薬学的組成物と組み合わせることができる薬学的薬物は、症状により適切に選択される。薬物の例としては、抗血栓薬、抗炎症薬、及び/またはヒスタミン拮抗薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【0237】

予防のための薬学的薬剤または薬学的組成物として使用される薬学定薬物の剤形、投与経路、用量、及び投与スケジュールは、治療に使用される場合と同じである。

【0238】

例えば、インビトロアッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトに使用するための投薬量の範囲を製剤化する際に使用され得る。このような組成物の投薬量は、好ましくは毒性が低い、ほとんどない、または全くない、ED50を含む循環濃度の範囲内である。投薬量は、採用される剤形及び利用される投与経路によりこの範囲内で変動し得る。薬学的組成物の治療有効量は、最初に、インビトロアッセイから推定され得る。用量は、症状の最大障害の半分を達成するために必要とされる範囲を含む循環血漿濃度範囲を達成するように、マウスモデルにおいて製剤化され得る。血漿中のタンパク質レベルは、例えば、ELISA、免疫ブロット、質量分光法などにより測定され得る。任意の特定の投薬量の効果は、エンドポイントの好適なバイオアッセイにより監視され得る。

40

【0239】

別途記載のない限り、本発明の薬学的組成物は、症状の重症度、及び腎病理の進行により、およそ約1.0 ng/kg ~ 約500 mg/kgの用量で投与され得る。非限定的な

50

例として、薬学的組成物は、外来状況で、例えば、1、2、3、4、5日以上ごとに、緩徐な静脈内注入により、または例えば毎週、隔週、毎月、または隔月の投与により投与され得る。化合物の適切な治療有効量は、およそ約1 ng/kg ~ 約100 mg/kg、約1 ng/kg ~ 約50 mg/kg、約1 ng/kg ~ 約10 mg/kg、約1 µg/kg ~ 約1 mg/kg、約10 µg/kg ~ 約1 mg/kg、約10 µg/kg ~ 約100 µg/kg、約100 µg/kg ~ 約1 mg/kg、及び約500 µg/kg ~ 約5 mg/kgの範囲であり得る。いくつかの実施形態では、適切な治療用量は、例えば、約0.1 mg/kg、約0.25 mg/kg、約0.5 mg/kg、約0.75 mg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg、約10 mg/kg、約15 mg/kg、約20 mg/kg、約30 mg/kg、約40 mg/kg、約50 mg/kg、約60 mg/kg、約70 mg/kg、及び約100 mg/kgから選択される。

10

【0240】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、例えば、10、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、または33 mg/時間以下の注入速度で、2週間毎または4週間毎に、例えば、1.0 mg/kg体重の用量で静脈内注射により投与され得る。別の例では、コラーゲンIVタンパク質を含む薬学的組成物は、およそ約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10時間にわたって、2または4週間毎に、例えば、20 mg/kg ~ 40 mg/kgの用量で静脈内注射により投与され得る。

20

アルポート症候群を治療するための方法

【0241】

いくつかの実施形態では、本発明は、薬学的有効量の組換えコラーゲンIVタンパク質を含有する薬学的組成物を対象に投与することにより、コラーゲンIVタンパク質の1つ以上の欠乏によって特徴付けられる疾患状態の治療を必要とする対象においてそれを行うための方法を提供する。この状態は、1、2、3、4、5、及び6鎖から選択されるコラーゲンIV鎖ポリペプチドのうちのいずれか1つにおけるいずれかの欠乏に関連し得る。好ましくは、この欠乏は、コラーゲンIV 3、4、及び5鎖に関連する。

30

【0242】

いくつかの態様では、コラーゲンIVタンパク質の欠乏によって特徴付けられる状態は、アルポート症候群、菲薄基底膜腎症(TBMN)、家族性血尿、末期腎疾患(ESRD)、進行性腎不全、糸球体性血尿、蛋白尿、遺伝性腎炎、糖尿病性腎症、周産期脳出血及び孔脳症、出血性卒中、ならびにコラーゲンIVタンパク質の欠損を伴うあらゆる疾患もしくは障害、ならびに/またはコラーゲンIVタンパク質の欠損を伴うあらゆる疾患もしくは障害から選択される。

【0243】

好ましい実施形態では、疾患はアルポート症候群である。アルポート症候群は、X連鎖性アルポート症候群、常染色体劣性アルポート症候群、または常染色体優性アルポート症候群であり得る。X連鎖性アルポート症候群は、5(I V)鎖ポリペプチドをコードするCOL4A5遺伝子におけるあらゆる突然変異によって引き起こされ得る。常染色体劣性アルポート症候群は、4(I V)鎖ポリペプチド及び5(I V)鎖ポリペプチドをコードするCOL4A3及び/またはCOL4A4遺伝子におけるあらゆる突然変異によって引き起こされ得る。常染色体優性アルポート症候群は、4(I V)鎖ポリペプチド及び5(I V)鎖ポリペプチドをコードするCOL4A3及び/またはCOL4A4遺伝子におけるあらゆる突然変異によって引き起こされ得る。

40

【0244】

一実施形態では、アルポート症候群の対象は、重度の蛋白尿を伴うアルポート症候群、軽度の蛋白尿を伴うアルポート症候群、血尿のみを伴うアルポート症候群、家族歴及び遺伝子スクリーニングにより診断される腎不全所見がないアルポート症候群、X連鎖性アル

50

ポート症候群、常染色体劣性アルポート症候群、または常染色体優性アルポート症候群と診断される。

【0245】

別の実施形態では、COL4A3、COL4A4、及びCOL4A5遺伝子における1つ以上の欠乏によって特徴付けられる状態は、聴覚機能障害、眼機能障害、出血を伴う脳小血管疾患、アクセンフェルト・リーガー異常を伴う脳小血管疾患、または脳内出血を更に含む。

【0246】

いくつかの実施形態では、本方法に使用される薬学的組成物は、組換えコラーゲンIVプロトマー、二量体、四量体、多量体、及び/またはこれらの混合物を含む。いくつかの態様では、組成物は、組換えコラーゲンIVプロトマーを含み、プロトマーは、3(IV)、4(IV)、及び5(IV)鎖からなる群から選択される3本の(IV)鎖を含むヘテロ三量体であり、この3本の鎖は3重らせんを形成する。好ましい実施形態では、組成物は、1本の3(IV)鎖、1本の4(IV)鎖、及び1本の5(IV)鎖を有する組換えコラーゲンIVヘテロ三量体を含み、3(IV)鎖は、配列番号3のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含み、4(IV)鎖は、配列番号4のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含み、5(IV)鎖は、配列番号5のアミノ酸配列及びそのバリエーションを含む。

10

【0247】

他の実施形態では、コラーゲンIVプロトマーは、キメラ3(IV)、4(IV)、及び5(IV)鎖から選択される1本、2本、または3本のキメラ鎖を含むヘテロ三量体であってもよく、キメラ3(IV)鎖は、3(IV)鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1(IV)もしくは2(IV)鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドを含み、キメラ4(IV)鎖は、4(IV)鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1(IV)もしくは2(IV)鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドを含み、キメラ5(IV)鎖は、5(IV)鎖のNC1ドメインの全てまたは一部が1(IV)もしくは2(IV)鎖のNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラポリペプチドを含む。

20

【0248】

いくつかの場合では、組成物は組換えコラーゲンIV二量体を含み、該二量体は、本明細書に開示される、組換えコラーゲンIV3-4-5及び/またはキメラコラーゲンIVであり得る2つのコラーゲンIVプロトマーを含む。いくつかの態様では、コラーゲンIV二量体は、それを必要とする対象に投与される前に、インビトロで酵素的または化学的に二量体化される。

30

【0249】

いくつかの実施形態では、コラーゲンIVタンパク質を含む薬学的組成物は、それを必要とする対象に、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、髄腔内注射、脳室内投与、頭蓋内送達、眼内送達、耳内送達により、及び/または短期もしくは長期的に設置されたカテーテルにより投与される。好ましい実施形態では、組換えコラーゲンIVタンパク質は、それを必要とする対象に、静脈内注射により投与される。

40

【0250】

いくつかの実施形態では、コラーゲンIVタンパク質を含む薬学的組成物は、血栓症及び炎症、ならびに/または組換えコラーゲンIVタンパク質を対象に投与することにより誘導される他のアナフィラキシー反応を回避するために、1つ以上の予防薬と共に、それを必要とする対象に共投与され得る。このような予防薬は抗血栓薬及び/または抗炎症薬を含み得る。抗血栓薬は、血栓形成を減少させる薬剤である。本明細書に記載されるように、抗血栓薬は、コラーゲンIVの置き換えにより誘導された短期血栓形成を一次予防する、または二次予防するために使用され得る。抗血栓薬は、血小板の凝集を制限する抗血小板薬、血液が凝固する能力を制限する抗凝固薬、または血餅が形成された後に血餅を溶

50

解するように作用する血栓溶解薬であり得る。抗血小板薬は、アスピリン及びトリフルサルなどの不可逆的シクロオキシゲナーゼ阻害剤；クロピドグレル、プラスグレル、チカグレロル、及びチクロピジンなどのアデノシン二リン酸（ADP）受容体阻害剤；シロスタゾールなどのホスホジエステラーゼ阻害剤；アブシキシマブ、エプチフィバチド、及びチロフィバンなどの糖タンパク質IIb/IIIa阻害剤；ジピリダモールなどのアデノシン再取り込み阻害剤；トロンボキサンシンターゼ阻害剤などのトロンボキサン阻害剤；トロンボキサン受容体拮抗薬、ならびにテルトロバン（terutroban）を含み得るが、これらに限定されない。抗凝固薬は、ワルファリン、ヘパリン、アセノクマロール、アトロメンチン、プロディファコウム、及びフェニンジオンを含み得るが、これらに限定されない。血栓溶解薬は、アルテプララーゼ、レテプララーゼ、及びテネクテプララーゼなどの組織プラスミノゲン活性化因子t-PA；アニストレプララーゼ；ストレプトキナーゼ、及びウロキナーゼを含み得るが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0251】

いくつかの実施形態では、コラーゲンIVタンパク質を含む薬学的組成物は、それを必要とする対象に、1つ以上の抗炎症薬と共投与され得る。抗炎症薬は、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセンなどのNSAIDs（非ステロイド系抗炎症薬）；アセトアミノフェン；ImSAIDs（免疫選択的抗炎症薬）；リン酸化デンドリマー（例えば、米国特許出願公開第20100173871号を参照）を含み得るが、これらに限定されない。多くの他のNSAIDsは、米国特許第5,385,941号、同第5,373,022号、同第6,730,696号、同第7,173,018号、同第7,417,035号、同第7,741,359号、同第8,314,140号、及び同第8,541,398号に開示されており、これらのそれぞれの内容は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0252】

医薬品に加えて、抗炎症であるいくつかの健康/食物サプリメント、例えば、抗炎症プロスタグランジン（PGE1及びPGE3）を作り出す食物も、本発明の薬学的組成物と共に使用され得る。抗炎症質を有するハーブ及び健康サプリメントは、ショウガ、ウコン、アルニカ・モンタナ、柳樹皮、緑茶、パイナップルブロメライン、及びインドオリパナムを含み得る。

【0253】

いくつかの実施形態では、抗血栓薬及び/または抗炎症薬は、それを必要とする対象に、本発明の組換えヒトコラーゲンIVタンパク質と同時に、実質的に同時に、または順次に、実質的に順次に投与され得る。

【0254】

タンパク質系薬品は、対象に投与されるとき、先天性免疫応答を誘導することが多いことは当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、免疫応答を減少させることができる他の薬剤がコラーゲンIVタンパク質を含む本薬学的組成物と共に使用され得る。非限定的な例として、このような薬剤は、ステロイド（例えば、コルチコステロイド）、抗ヒスタミン、補体カスケードに対する抗体、及び/または米国特許第3,167,475号、同第4,829,077号、及び同第4,902,688号に論じられるものであり得る。

【0255】

いくつかの実施形態では、コラーゲンIV欠乏を治療するための方法は、静脈内血管外漏出を促進する1つ以上の薬剤を必要とする対象にそれを投与する工程を更に含み、該薬剤はヒアルロニダーゼ及びヒスタミン作動薬を含む。

【0256】

最近の研究では、臭化物はイオン臭化物（Br⁻）として動物において遍在的に存在し、スルフィリミン架橋のペルオキシダジン触媒形成、組織発達に必須の翻訳後修飾、及び基底膜（BM）のコラーゲンIV足場内に見られる構造のための必要な補因子であることが示された。次亜臭素酸に変換される臭化物は、BM組織化及び組織発達に重要な事象

であるコラーゲンⅠⅤ内でのスルフィリミン形成のためにエネルギー的に選択するプロモスルホニウム-イオン中間体を形成する(McCall et al., Cell, 2014, 157(6), 1380-1392)。臭素は、動物にとって必須の微量元素であり、臭素食品サプリメントはGBMにおけるコラーゲンⅠⅤネットワークの形成を促進することができる。

【0257】

本発明のいくつかの実施形態によると、ペルオキシダジンのうちの1つ以上の補因子は、組換えヒトコラーゲンⅠⅤプロトマーの投与後、または実質的に投与後に対象に投与され得る。例えば、患者は臭素を含有する特殊な食事を取ることができる。

【0258】

いくつかの実施形態では、本発明は、コラーゲンⅠⅤタンパク質の投与が対象の表現型による帰結を予防及び/または寛解させるように、コラーゲンⅠⅤタンパク質を含む薬学的組成物の投与を必要とする対象においてそれらを行うことにより、系球体基底膜(GBM)の菲薄化及び分裂、重度の蛋白尿、軽度の蛋白尿、血尿、腎不全、末期腎疾患への進行、聴覚機能障害、眼異常、孔脳症、出血を伴う脳小血管疾患、アクセンフェルト・リーガー異常を伴う脳小血管疾患、腎障害、動脈瘤、及び筋肉を伴う遺伝性血管障害、ならびに/または脳内出血を含む1つ以上の異常を予防、寛解させるための方法の特徴とする。

【0259】

コラーゲンⅠⅤタンパク質は哺乳動物に投与され得る。哺乳動物は、マウス、ラット、イヌ、またはヒトであり得る。

【0260】

いくつかの更なる実施形態では、キメラ(ⅠⅤ)ポリペプチド及び/またはキメラ(ⅠⅤ)ポリペプチドをコードするキメラcDNA構築物を発現する宿主細胞が本方法において使用され得る。該キメラ(ⅠⅤ)ポリペプチドは、3(ⅠⅤ)、4(ⅠⅤ)、及び5(ⅠⅤ)ポリペプチドのそれぞれのNC1ドメインの全てまたは一部が1(ⅠⅤ)及び/または2(ⅠⅤ)ポリペプチドのNC1ドメインの全てまたは一部に置き換えられるキメラ3(ⅠⅤ)、4(ⅠⅤ)、及び5(ⅠⅤ)ポリペプチドから選択され得る。

ELISAアッセイ

【0261】

ELISAは、血清または組織における組換えコラーゲンⅠⅤの濃度を検査するために使用される。血清または組織におけるコラーゲンⅠⅤレベルは、多くの条件において変化する。血清コラーゲンⅠⅤは、組織におけるコラーゲンⅠⅤの分解を示す場合があり、GBMを含む基底膜におけるコラーゲンⅠⅤと関連し得る。コラーゲンⅠⅤの定量測定は、組換えコラーゲンⅠⅤ治療の効果を監視するのに役立ち得る。エシュロンのコラーゲンⅠⅤELISAキットなどのELISA分析がこの目的のために使用され得る。製造者の提案に従い、ユーザは、単純に、提供された標準曲線及びそれらの試料をコラーゲンⅠⅤ捕捉プレートに添加し、インキュベーション及びプレートの洗浄後、HRP標識された検出試薬を添加する。更なるインキュベーション及びプレート洗浄後、TMB基質をプレートに添加し、1N硫酸の添加により比色反応を停止させる。450nmでの吸光度を測定し、標準曲線との比較により試料の濃度を決定する。

バイオマーカーアッセイ

【0262】

本発明によると、血液、組織、及び尿内に存在する内因性分子は、コラーゲンⅠⅤの置き換え効果を測定するために使用され得る。特に、組換えヒトコラーゲンⅠⅤで治療された患者から得た血液及び尿試料が、アルブミン、免疫グロブリンA、E、G、及びM、DBP、RBP、1ミクログロブリン、2ミクログロブリン、キューブリン(cubulin)、アポリポタンパク質A-1、及びメガリンなどのバイオマーカーの存在ならびに/または濃度を検査するために使用される。

コラーゲンⅠⅤ受容体結合アッセイ

【0263】

インテグリンは、コラーゲンを含む細胞外マトリックスタンパク質の主要な受容体である。インテグリン受容体は、非共有結合される 及び 膜貫通サブユニットから構成されるヘテロ二量体である。コラーゲン結合は、主に、インテグリン 1 1、 2 1、 10 1、及び 1 1 1により提供される。インテグリン 10 1は優先的にコラーゲンⅠⅤに結合するが、コラーゲンⅤⅠ及びⅠⅠにも結合する。細胞は、ジスコイジンドメイン受容体1型(DDR1)、ジスコイジンドメイン受容体2型(DDR2)、糖タンパク質ⅤⅠ(GPⅤⅠ)、及び/またはマンノース受容体などの他のコラーゲン受容体も発現し得る。細胞は、当該技術分野において周知のあらゆる技術を用いて、コラーゲンⅠⅤ受容体インテグリン(例えば、インテグリン 10 1)を提示するように操作される。異なる濃度のコラーゲンⅠⅤタンパク質をインテグリン陽性細胞の培養培地に添加し、インテグリン-コラーゲンⅠⅤ結合動態、細胞遊走、処置した細胞の接着形態、及び分化を分析する。

血液細胞アッセイ

【0264】

いくつかの実施形態では、組換えコラーゲンⅠⅤで治療された対象から得た血液細胞は、焦点接着キナーゼ(FAK)細胞アッセイなどの細胞接着アッセイにも使用され得る。いくつかの実施形態では、ヒト肺線維芽細胞を含む他の細胞が細胞接着アッセイに使用され得る。例えば、ヒト肺線維芽細胞を、コラーゲンⅠⅤインテグリン受容体を発現するベクターでトランスフェクトし、コラーゲンⅠⅤ事前コーティングされた48ウェルプレートにおいて培養する。細胞を、所望の時間期間の間、事前コーティングされたウェルにおいて培養し、次に未結合細胞を洗い流し、接着した細胞を固定して染色し、その後染色した細胞から上清への色素溶出をもたらず抽出工程が続く。よって、細胞接着は595nmで比色ELISAプレートリーダーを用いて定量することができる。

【0265】

コラーゲンⅠⅤタンパク質を検出するために、コラーゲンⅠⅤに対してモノクローナル抗体(mAbs)が使用され得る。mAbsなどは米国特許第5,741,652号に開示されるものを含み得る。米国特許第8,420,331号に開示されるコラーゲンⅠⅤ免疫反応性ペプチドもコラーゲンⅠⅤを検出するために使用され得る。

シグナル伝達経路アッセイ

【0266】

血液細胞は、組換えコラーゲンⅠⅤタンパク質で治療された対象から得ることができる。コラーゲンⅠⅤ相互作用に関する細胞内シグナル伝達カスケード、及びコラーゲンⅠⅤタンパク質により誘導される遺伝子発現は、基底膜におけるコラーゲンⅠⅤの組み込みを試験するために使用され得る。

無細胞系におけるタンパク質相互作用

【0267】

コラーゲンⅠⅤがラミニン-111、コラーゲンⅤⅠ、及びバイグリカンなどの他の基底膜構成成分に結合する能力は、インビトロ結合アッセイにおいて試験される。

【0268】

このようなアッセイは、ラミニン-111、コラーゲンⅤⅠ、及びバイグリカンをプレート上にコーティングし、その後組換えコラーゲンⅠⅤのインキュベーションが続く、その後HRPまたは他のレポーター分子に化学的に接合される抗コラーゲンⅠⅤ抗体を用いてコラーゲンⅠⅤの検出が続く、ELISAに基づいた方法を含み得る。BiaCoreなどの他のアッセイは、組換えコラーゲンⅠⅤに対するラミニン-111、コラーゲンⅤⅠ、及びバイグリカンの親和性を測定することができる。

【実施例】

【0269】

実施例1:コラーゲンⅠⅤ欠乏動物モデルへのコラーゲンⅠⅤタンパク質の投与
動物モデル(COL4A3/COL4A4ノックアウトモデル)

10

20

30

40

50

【0270】

Cosgroveらは、COL4A3ノックアウトによりアルポート症候群の常染色体形態のマウスモデルを生産した(Cosgrove et al., Genes Dev., 1996, 10, 2981-2992)。マウスは微小血尿及び蛋白尿を伴う進行性糸球体腎炎を発症した。末期腎疾患は約14週齢で発症した。腎病理発達中の糸球体基底膜(GBM)の透過電子顕微鏡(TEM)は、4週で外部毛細管ループにおいて始まり、8週までにGBM全体に広がった巣状の多重積層化された肥厚化及び菲薄化を明らかにした。14週までに、糸球体の半分は線維化し、崩壊した毛細管を伴う。GBMの免疫蛍光分析は、通常メサンギウムマトリックスに局在化される、IV型コラーゲン3、4、及び5鎖の不在、ならびに1及び2鎖の存続を示した。コラーゲン鎖に特異的なプローブを用いたノーザンブロット分析は、ノックアウトにおけるCOL4A3の不在を示し、一方で、残りの鎖のmRNAは未変化であった。アルポート腎疾患の進行は、罹患した動物のGBMにおけるフィブロネクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニン-1、及びエンタクチンの蓄積と時間及び空間において相関した。

10

【0271】

COL4A3欠乏マウスは、糸球体基底膜における顕著な構造欠損にもかかわらず、生後4週までに有足細胞及び細胞膜関連タンパク質の正常な発現を有した。5週目で、細胞膜内での変化、有足細胞の消失、及び細胞膜関連タンパク質であるネフリンの発現の変化があった。これらの所見は、糸球体基底膜タンパク質における欠損が潜行性の血漿タンパク質の漏出をもたらし、一方で、細胞膜の破壊は急激な血漿タンパク質の漏出をもたらすことを示唆する(Hamano et al., J. Biol. Chem., 2002, 277, 31154-31162)。

20

【0272】

最近、別のマウスアルポート症候群モデルがCOL4A4における突然変異により特定され、これらのマウスは、糸球体硬化、間質性腎炎、及び尿細管萎縮と関連する低年齢での尿中アルブミンの急速な増加を呈する(Korstanje et al., Kidney International, 2014, 85, 1461-1468)。

【0273】

一実験では、野生型のコラーゲンIV3鎖ノックアウトマウス(COL4A3-/-)及び/またはコラーゲンIV4鎖ノックアウトマウス(COL4A4-/-)を得、標準的な条件下で維持し、自由に標準的なマウス固形飼料及び水を摂取させた。COL4A3遺伝子のホモ接合欠失は、前述のようにPCR反応により確認される(Cosgrove et al., Genes Dev., 1996, 10, 2981-2992)。尿検査が蛋白尿の進行減少、安定した蛋白尿、もしくは蛋白尿の減少を示すまで、または動物の寿命が維持される限り、マウス(野生型、COL4A3+/+、COL4A3-/-)に、1ng/kg~100mg/kgの様々な濃度で、毎日、1日おき、毎週、または隔週、コラーゲンIVを静脈内注射した。

30

動物モデル(COL4A5モデル)

【0274】

イヌのX連鎖性遺伝性腎炎は、5(IV)鎖ポリペプチドにおける未成熟の終止コードの存在によって特徴付けられるヒトX連鎖性アルポート症候群の動物モデルである(Zheng et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1994, 91, 3989-3993)。腎臓におけるイヌのコラーゲンIV型遺伝子の発現は、大幅に減少したレベルのCOL4A5遺伝子発現(通常のおよそ10%)に加えて、COL4A3及びCOL4A4遺伝子の発現も、それぞれ、14~23%及び11~17%に減少したことを示す。これらの所見は、これら3つの基底膜タンパク質の発現を調整する機序を提案した(Thorner et al., J. Biol. Chem., 1996, 271, 13821-13828)。同様に、イヌのX連鎖性アルポート症候群及び対照動物を購入し、尿検査が蛋白尿の進行減少、安定した蛋白尿、もしくは蛋白尿の減少を示すまで、または動物の寿命が維持される限り、1ng/kg~100mg/kgの様々な濃度で、

40

50

毎日、1日おき、毎週、または隔週、コラーゲンI Vを静脈内注射した。

コラーゲンI Vタンパク質の静脈内投与後のマウス表現型測定

【0275】

尿中アルブミン及びクレアチニン濃度は、市販されているアッセイキット（例えば、Sigma, St. Louis, MO）を使用して、比色アッセイを用いて推定される。尿中アルブミン排出は、前述のように、尿中アルブミン及び尿中クレアチニンの指数として推定される（Sugimoto et al., J Clin Lab Anal., 2003, 17(2), 37-43）。

腎組織の組織学的評価

【0276】

腎臓の組織を固定し、ヘマトキシリン-エオジン（H&E）で染色する。腎病理の程度は、前述のように、糸球体疾患、尿細管萎縮、及び間質線維化の形態計測により評価される。糸球体基底膜の構造を検査するために、透過電子顕微鏡（TEM）及び走査電子顕微鏡（SEM）を使用する。蛋白尿における改善は、GBMの分裂の減少もしくは肥厚化の減少、または有足細胞の足突起の再構築など、GBMの構造及び形態の正常化と一致しないが、アルポート症候群におけるこのような形態学的表現型の寛解は有効性の測定を提供すると想定される。組換えコラーゲンI Vを用いたアルポート症候群の早期治療はGBM構造の正常化をもたらすと想定される。

免疫組織化学（コラーゲンI V発現）

【0277】

免疫蛍光染色は前述のように行われる（Cosgrove et al., Genes Dev., 1996, 10, 2981-2992）。3（IV）、4（IV）、または5（IV）鎖のいずれかに特異的な抗体が、コラーゲンI Vを投与されたマウスにおけるコラーゲンI Vタンパク質を染色するために使用される。臓器を採取する前に、2% PBS緩衝ホルマリンでマウスを灌流する。凍結切片した組織試験片を、3（IV）、4（IV）、または5（IV）鎖のいずれかに対して一次抗体で、室温で1時間染色し、切片を蛍光（例えば、FITC、GFP）複合二次抗体と反応させる。GBMに存在する組換えコラーゲンI Vタンパク質が蛍光標識され、分析される。

実施例2：アルポートマウスモデルへの（1）2 / 2（IV）コラーゲンの投与

【0278】

本明細書に記載されるように、GBMにおける主要なコラーゲンイソ型3 / 4 / 5（IV）に加えて、コラーゲンイソ型（1）2 / 2（IV）ネットワークは、GBMの内皮下領域に存在し、GBMの発達及び機能に重要な役割を担う。アルポートGBMにおける欠損はコラーゲンネットワークの必要な安定性をもたらすのに十分なイソ型（1）2 / 2（IV）が存在しないためであると仮定される。イソ型（1）2 / 2（IV）の静脈内注入がGBMにおけるコラーゲン（1）2 / 2（IV）レベルを増加させ、病変の更なる発達及び進行を阻止し、腎不全に進行する腎疾患を大幅に緩徐化することができるという仮説を試験するために、実験が設計される。

【0279】

野生型のコラーゲンI V 3鎖ノックアウトマウス（COL4A3 - / -）及び／またはコラーゲンI V 4鎖ノックアウトマウス（COL4A4 - / -）を得、標準的な条件下で維持し、自由に標準的なマウス固形飼料及び水を摂取させた。加えて、マウスは129S1 / SvImJ株背景、またはB6背景、または129S1 / B6ハイブリッド背景のいずれかであり得る。腎機能不全は129S1背景では迅速に進行し（約10週）、B6背景ではゆっくりであり（約8ヶ月）、129S1 / B6ハイブリッド背景では中程度であった（約4ヶ月）。

【0280】

一実験では、129S1 / SvImJ株背景のCol4a3 - / -アルポートマウスを、各群7～10匹のマウスの3つの処置群に分ける。各群を、それぞれ、ビヒクルのみ、低用量のコラーゲンイソ型（1）2 / 2（IV）、及び高用量のコラーゲンイソ型（

10

20

30

40

50

1) 2 / 2 (I V) で、静脈内注射により処置した。処置を 3 ~ 4 週齢で開始し、少なくとも 10 週齢まで毎週続けるか、または処置が腎疾患の進行を緩徐化させるのに有効であると証明された場合、それ以上続けられる。

【 0 2 8 1 】

実施例 1 と同様に、コラーゲンイソ型 (1) 2 / 2 (I V) の投与後に、G B M の形態、コラーゲン組み込み、及び腎機能が分析される。低用量または高用量のいずれかで標識されたコラーゲンイソ型 (1) 2 / 2 (I V) を注射された数匹のマウスを様々な週齢で屠殺して、標識が G B M に集中したかを決定する。

【 0 2 8 2 】

尿は、タンパク質及びクレアチニンに関して 1 ~ 2 週毎に分析される (4 週齢で開始する) 。体重損失が腎不全の前に生じるため、総合的な健康の一般的な測定として、動物の体重を 7 ~ 10 日毎に決定する (6 週齢で開始する) 。処置したマウスを、様々な週齢で (尿及び体重分析の結果により) 、または腎臓の組織像及び糸球体微細構造を検証することができ、また線維形成及び糸球体基底膜構造に対する処置の効果を決定することができるように、腎不全の時に屠殺する。

10

【 0 2 8 3 】

分析の結果は、静脈内コラーゲンイソ型 (1) 2 / 2 (I V) 処置が腎疾患の進行の緩徐化に有益であるかの決定を可能にする。更に、最も有効な用量が実験により決定される。

実施例 3 : マウス C o l 4 (1 (2) 2) 調製物の特徴

20

【 0 2 8 4 】

マウス組織からコラーゲン I V 型タンパク質 (C o l 4 (1 (2) 2)) を精製し、調製した。C o l 4 (1 (2) 2) 調製物内の種、ならびにプロトマー、二量体、四量体、及び凝集物の相対比を試験するために、変性及び未変性ゲル電気泳動を使用し、各バンドのサイズを分析した。

【 0 2 8 5 】

C o l 4 (1 (2) 2) タンパク質に結合するそれらの能力に関して、いくつかの市販の抗体を評価し、抗体は、ヒトコラーゲン I V 型 2 鎖の内部エピトープを認識するウサギポリクローナル抗体を含む抗体 (カタログ番号 s c 7 0 2 4 6 , S a n t a C r u z , D a l l a s , T X , U S A) 、ヒト胎盤からのヒトコラーゲン I V a a 1 - 1 6 6 9 に対応する完全長の未変性の精製されたタンパク質の免疫原を使用して産生されるウサギポリクローナル抗体 (カタログ番号 a b 6 5 8 6 , A b c a m , C a m b r i d g e , M A , U S A) 、及びマウス E H S の腫瘍組織から抽出及び精製された、完全長の未変性コラーゲン I V の免疫原を使用して産生されるウサギポリクローナル抗体 (カタログ番号 a b 1 9 8 0 8 , A b c a m , C a m b r i d g e , M A , U S A) を含む。

30

【 0 2 8 6 】

マウスからの精製した C o l 4 (1 (2) 2) タンパク質 (カタログ番号 s c - 2 9 0 1 0 , S a n t a C r u z , D a l l a s , T X , U S A) は、変性 / 非還元 S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E) を使用して分離され、それぞれ、s c - 7 0 2 4 6 (1 : 1 0 0 希釈) 、a b 6 5 8 6 (1 : 1 0 0 0 希釈) 、及び a b 1 9 8 0 8 (1 : 1 0 0 0 希釈) で免疫プロットされた。H R P 複合抗ウサギ I g G 二次抗体 (1 : 2 0 , 0 0 0 希釈) は、バンドを可視化するために使用された。図 1 に示されるように、マウス C o l 4 (1 (2) 2) タンパク質は、天然に、個々の 1 及び 2 鎖 (I) (約 1 8 0 K D a) 、プロトマー (P) (約 4 8 0 K D a) 、二量体 (D) (約 9 0 0 K D a) 、及び四量体 (T) (9 0 0 K D a より大きい) を含む C o l 4 (1 (2) 2) の 4 つの主要な種を含有する。精製及び調製により完全長のポリヌクレオチド及びタンパク質を確保し、非常に少ない分解産物を有するタンパク質が C o l 4 (1 (2) 2) 調製物において観察された。試験された 3 つ全ての抗 C o l 4 抗体の中で、A b c a m からの抗体 a b 6 5 8 6 が C o l 4 (1 (2) 2) タンパク質の検出において最も感受性である。

40

50

【0287】

上述のように、コラーゲンI Vタンパク質はジスルフィド結合を介して連結され、安定される。ジスルフィド還元がC o l 4 (1 (2) 2) 種を個々のアルファ鎖、プロトマー、二量体、及び四量体に分解するかを試験するために、サイズの特徴付けが更に分析された。ジスルフィド還元して、または還元せずにS D S - P A G Eの変性を行い、比較した。ジスルフィドを選択的に還元するために、T C E P (トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン) を使用した。図2 A 及び2 B の代表的なゲル画像に示されるように、ジスルフィド還元しないP A G E の変性は、C o l 4 (1 (2) 2) 種を個々のアルファ鎖 (I) 、プロトマー (P) 、二量体 (D) 、及び四量体 (T) (図2 A) に分解する (図2 A) 。ジスルフィド還元によるP A G E の変性は、C o l 4 (1 (2) 2) 種を、ほぼある程度プロトマー (P) 、二量体 (D) 、及び四量体 (T) を有して個々のアルファ鎖 (I) に分解する (図2 B) 。この結果は、未変性C o l 4 (1 (2) 2) タンパク質がジスルフィド結合及び非ジスルフィド結合種の混合物を含有し、この大多数が個々のアルファ鎖に還元され得ることを示唆する。G B M の別の構造タンパク質であるL A M - 1 1 1 (カタログ番号2 3 0 1 7 - 0 1 5 , L i f e T e c h n o l o g i e s , C a r l s b a d , C A , U S A) は、C o l 4 (1 (2) 2) の個々のアルファ鎖と比較するために正確な分子量標準として平行して試験された。

10

【0288】

p H 条件は、C o l 4 (1 (2) 2) プロトマー、二量体、及び四量体の形成に対するその作用のために試験された。S a n t a C r u z (カタログ番号s c - 2 9 0 1 0) からのC o l 4 (1 (2) 2) タンパク質を、それぞれ、酸性溶液 (5 0 m M H C l , p H ~ 2 . 0) 、中性T B S (2 0 m M トリス - H C l 及び5 0 0 m M N a C l , p H ~ 7 . 5) 、及び塩基性トリス - H C l (1 0 0 m M T r i s - H C l , p H ~ 9 . 0) に希釈し、ジスルフィド還元して、または還元せずにS D S - P A G E を変性することにより分析した。全ての調製物は、ローディング試料緩衝液を添加する前に、室温で1 7 分間組織化された。別々のバンドは、銀染色または抗体s c 6 5 8 6 を使用した免疫プロットにより可視化された。ジスルフィド還元して、または還元しない3 つ全て (酸性、中性、塩基性) の条件において、全くまたは非常に少ししか凝集は観察されなかった。3 つ全てのp H 条件において、ジスルフィド還元処理は、高分子量の二量体 (D) 及び四量体 (T) からプロトマー (P) 及び個々のアルファ鎖 (I) にほぼ完全に還元される (データ示さず) 。この結果は、個々のアルファ鎖、プロトマー、二量体、及び四量体の間での自己触媒ジスルフィド形成がp H 依存プロセスであり、可逆的であることを示唆する。

20

30

【0289】

アルファポリヌクレオチド鎖上の異なる電荷はコラーゲンI V 組織化に影響を及ぼす可能性がある。我々は、ダイレクトレッド8 0 電荷がC o l 4 (1 (2) 2) 種の比率をシフトさせることができるかを試験した。C o l 4 (1 (2) 2) 調製物及びL A M - 1 1 1 を酸性緩衝液 (5 0 m M H C l) に希釈し、0 . 0 1 % ダイレクトレッド8 0 染料 (カタログ番号3 6 5 5 4 8 , S i g m a - A l d r i c h) を含有するゲル試料緩衝液にロードし、ジスルフィド還元して、または還元せずに、0 . 0 1 % ダイレクトレッド8 0 染色を含有する酸性化泳動用緩衝液を使用して、未変性P A G E により分析した。未変性P A G E 分離は、変性S D S P A G E に類似するC o l 4 バンドを生成する。ダイレクトレッド8 0 がC o l 4 を電荷シフトさせ、未変性P A G E によりC o l 4 (1 (2) 2) 調製物を分離できることが示された。7 0 でのC o l 4 (1 (2) 2) 調製物のジスルフィド還元は、プロトマー (P) 、二量体 (D) 、及び四量体 (T) を分離することができる。非還元C o l 4 (1 (2) 2) 未変性調製物において、プロトマー (P) 、二量体 (D) 、及び四量体 (T) は明らかであるが、2 M D より大きい凝集はない (図3) 。

40

【0290】

まとめると、これらの結果は、C o l 4 - 1 (2) 2 がインビトロにおいて二量体

50

化及び四量体化することができることを示す。

実施例 4：インビトロにおける血小板凝集

休止血小板の調製

【0291】

マウスの血小板豊富血漿 (PRP) を、前述のように調製した (Hoffmeister et al., the clearance mechanism of chilled blood platelets. Cell 2003; 10(1): 87-97)。血小板の活性化を防止するために、全ての遠心分離工程はプロスタグランジン E₁ を含んだ。マウス染色 CD-1 が休止血小板の調製に使用された。

【0292】

0.1 容量の Aster-Jandl 抗凝固薬に採取した、健康なボランティアからのヒト血液を、100 g で 10 分間遠心分離した。いずれのボランティアも、血液採取の少なくとも 10 日前に、アスピリンまたは他の非ステロイド系抗炎症薬を摂取しなかった。単離した血小板豊富血漿懸濁液を 37℃ で最大 1 時間インキュベートした。

休止血小板の活性化

【0293】

ヒト血液から調製した休止血小板を、異なる濃度の Col 4 (1(2) 2) タンパク質と共に 5 ~ 10 分間インキュベートし (表 4)、8 uM トロンビン受容体活性化ペプチド (TRAP) (カタログ番号 T1573, Sigma-Aldrich, USA) を使用して活性化させた。

【0294】

マウスから調製した休止血小板を、最初に 4 μl の Col 4 (1(2) 2) タンパク質、次に更に 40 μl の Col 4 (1(2) 2) タンパク質と共に 5 ~ 10 分間インキュベートし、25 uM ADP (カタログ番号 101312, BIO/DATA Corp., USA) を使用して活性化させた。

【0295】

血小板の凝集は、活性化数分後に始まり、GPIIa/b 受容体の作動の結果として生じ、これはこれらの受容体がフォン・ヴィレブランド因子 (vWF) またはフィブリノーゲンに結合することを可能にする。血小板の活性化は、湾曲した形状から直線にそれらの形状を変化させ、このような活性化は、血小板凝集計 (BIO/DATA Corp. H 30

【0296】

表 4. 血小板凝集アッセイ

【0297】

【表 4】

| C o l 4 - α 1 (2) α 2 | PRP (ヒト) | C o l 4 - α 1 (2) α 2 の総量 | C o l 4 - α 1 (2) α 2 誘導血小 板凝集 | TRAP誘導血小板 凝集 |
|----------------------------------|------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| 4 μ l | 400 μ l | 5. 6 μ g / m l | なし | あり |
| 40 μ l | 360 μ l | 56 μ g / m l | なし | あり |
| 80 μ l | 320 μ l | 112 μ g / m l | なし | あり |
| C o l 4 - α 1 (2) α 2 | PRP (マウ ス) | C o l 4 - α 1 (2) α 2 の総量 | C o l 4 - α 1 (2) α 2 誘導血小 板凝集 | ADP誘導血小板凝 集 |
| 4 μ l、 次いで1 分後更に 40 μ l | 400 μ l | 61. 6 μ g / m l | なし | あり |

10

20

【0298】

結果は、C o l 4 (1 (2) 2) が血小板を活性化しなかったか、または凝集を誘導しなかったことを示す。更に、C o l 4 (1 (2) 2) 調製物は、作動薬 T R A P または A D P により誘導された血小板凝集を阻害しなかった。

実施例 5 : C o l 4 (1 (2) 2) 及び L A M - 1 1 1 のインビトロ標識

【0299】

2

注射した C o l 4 (1 (2) 2)、特にインビボの G B M における高分子量種の C o l 4 (1 (2) 2) (約 900 K D a) の堆積を可視化するために、C o l 4 (1 (2) 2) 及び L A M - 1 1 1 タンパク質を最初にフルオロセイン (F I T C) で標識した。この実験では、ヘキサ酸スパーサーを含有する混合イソ型 (カタログ番号 F 2 1 8 1 , M o l e c u l a r P r o b e s) の 5 (6) - S F X (6 - (フルオロセイン - 5 - (及び - 6) - カルボキサミド) ヘキサ酸、スクシンイミジルエステル) を、C o l 4 (1 (2) 2) 及び L A M - 1 1 1 を標識するために使用した。10 m g / m l の 5 (6) - S F X を 1 m l の無水ジメチルホルムアミド (10 m g / m l) に溶解した。2.5 m g の C o l 4 (1 (2) 2) 及び 1.2 m g の L A M - 1 1 1 は、Z e b a S p i n 脱塩 2 m l カラム (カタログ番号 89890 , T h e r m o , U S A) を使用して、最初に 0.2 M カーボネート (p H 8.3) に緩衝液交換された。次いで、5 (6) - S F X 溶液を 10 % (容量 / 容量) に添加し、反応のために混合物を室温で 1 時間攪拌した。次いで、混合物は、Z e b a S p i n 脱塩 2 m l カラムを使用して 1 × P B S に緩衝液交換された。

30

40

【0300】

F I T C 標識された C o l 4 (1 (2) 2) 及び F I T C - L A M - 1 1 1 複合体は、E L I S A アッセイを使用して、安定性に関して試験された。F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) 及び F I T C - L A M - 1 1 1 複合体を検出するために、ウサギまたはヤギのポリクローナル抗 F I T C - H R P 抗体を使用し、一方、F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) 複合体及び未標識 C o l 4 (1 (2) 2) の両方を検出するために、抗ウサギ H R P 二次抗体と共にウサギ抗 C o l 4 (1 (2) 2) 抗体を使用した。図 4 は、A b c a m からの試験した抗 F I T C 抗体 a b 19492 (ウサギ) 及び a b 66

50

56 (ヤギ) が F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) 複合体のみを検出することを図示する。抗 F I T C 及び抗 C o l 4 (1 (2) 2) 抗体の染色の比較は、F I T C 標識された C o l 4 (1 (2) 2) が減少したことを示し、広範な F I T C 標識が C o l 4 (1 (2) 2) エピトープを覆ったか、または C o l 4 (1 (2) 2) の安定性を減少させたかのいずれかの可能性があることを示唆する。

【0301】

F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) 複合体の質は S D S - P A G E により分析された。代表的なゲル画像を図 5 a に示す。E L I S A アッセイの結果と一致して、バンドサイズ分析は、F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) の検出が大幅に減少することを示し、広範な F I T C 標識が C o l 4 エピトープを覆ったか、またはその安定性を減少させたかのいずれかの可能性があることを示唆する。しかしながら、a b 1 9 4 9 2 (1 : 2 0 , 0 0 0 希釈) での抗 F I T C 免疫プロットは、圧倒的に二量体及び個々の鎖である F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) の高感度の検出を明らかにした (図 5 b に示される)。これらの結果は、タンパク質濃度の定量及び注射される量が推定及び調節される場合、F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) 複合体が注射に好適であることを示唆する。

10

【0302】

F I T C - L A M - 1 1 1 複合体は、E L I S A アッセイ及び免疫プロットにより試験したとき、F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) 複合体に類似する (図 6 a ~ 6 c) 。
実施例 6 : C o l 4 - 1 (2) 2 のインビボ投与及び G B M における検出

20

【0303】

前の実施例において記載されるように調製された F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) 及び F I T C - L A M - 1 1 1 複合体を、野生型、ヘテロ接合、及びアルポートマウスに全身投与し、腎臓の G B M における F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) 及び F I T C - L A M - 1 1 1 複合体の局在化を検査した。

【0304】

B 6 もしくは 1 2 9 S のいずれか、またはハイブリッド背景の C o l 4 + / - 及び C o l 4 - / - マウスに、それぞれ、F I T C - C o l 4 (1 (2) 2) または F I T C - L A M - 1 1 1 複合体を 1 回または 6 回静脈内注射した。マウスを観察し、あらゆる異常を記録し、研究の終わりに、または投薬の合間中のいずれかに、組織試料を採取した。投薬スケジュール及び時間間隔は表 5 に列記される。

30

【0305】

免疫蛍光 (I F) 染色の技術分野において記載される標準的な手順に従い、採取した組織サンプルを処理した。抗アグリン抗体 L G 1 1 2 3 (S c h l o t z e r - S c h r e h a r d t e t a l . , E x p E y e R e s . , 2 0 0 7 , 8 5 (6) : 8 4 5 - 8 6 0) 及び抗 F I T C - H R P 抗体 a b 6 6 5 6 (A b c a m) を 2 重染色のために使用した。染色した試料を検査し、共焦点顕微鏡を使用して染色画像を撮り、分析した。各染色に関して、腎臓の切片を、対照として抗アグリン抗体 L G 1 1 2 3 のみで染色し、F I T C シグナルを検査した。F I T C シグナルは系球体において全く観察されないか、または非常に弱く、F I T C - C o l 4 - 1 (2) 2 及び F I T C - L A M - 1 1 1 複合体を注射した組織試料に見られた F I T C シグナルがこれらの F I T C 複合体に特異的であることを示す。各マウスからの系球体における F I T C - C o l 4 - 1 (2) 2 タンパク質の染色パターンも表 5 に要約された。

40

【0306】

これらの結果は、全身投与された F I T C - C o l 4 - 1 (2) 2 及び F I T C - L A M - 1 1 1 複合体 (例えば、静脈内注射) が腎臓に送達され、マウス腎臓の G B M 内に浸透できることを示す。G B M 内への F I T C - C o l 4 - 1 (2) 2 の堆積が強く現れることも示唆する。

【0307】

興味深いことに、共焦点画像 (図 7 a ~ 7 d) は、検出された F I T C - C o l 4 シグナルは主にアグリンシグナルとオーバーラップするが、F I T C - L A M - 1 1 1 シグナ

50

ルの一部分のみがアグリンシグナルとオーバーラップすることを示す。つまり、F I T C - C o l 4 - 1 (2) 2 注射された腎臓は、F I T C - L A M - 1 1 1 注射された腎臓よりも G B M への F I T C シグナルの局在化が多いことを示す。

【 0 3 0 8 】

3 日間にわたって投与された最大 6 回の注射後、毒性は観察されなかった。データは、全身送達後、C o l 4 産物ならびに L A M - 1 1 1 対照薬（それぞれが高分子量タンパク質である）がマウス G B M 内に堆積可能であることを示す。

【 0 3 0 9 】

G B M における F I T C - C o l 4 - 1 (2) 2 及び F I T C - L A M - 1 1 1 のこのような堆積は、堆積した C o l 4 - 1 (2) 2 タンパク質が G B M におけるコラーゲンネットワーク内に組み込まれ、アルポート G B M の機能性を復旧させることができるかを試験するために更に検証され得る。実施例 1 及び 2 に記載されるものなど、C o l 4 - 1 (2) 2 の長期反復投薬がアルポートマウスモデルにおいて治療的であるかの評価が研究される。

10

【 0 3 1 0 】

加えて、F I T C - L A M - 1 1 1 の G B M への堆積は、L A M - 5 2 1 などの他のラミニンイソ型がピアソン症候群などの他の腎疾患に治療的であり得ることを示す。

【 0 3 1 1 】

表 5 . F I T C 標識された C o l 4 - 1 (2) 2 及び L A M - 1 1 1 の系統的投与

20

【 0 3 1 2 】

【 表 5 - 1 】

| 遺伝子型及び株背景 | 性別 | 齢 | 注射 | 試料採取 | 腎臓における 2重F I T C 及びアグリン I F 染色結果 |
|--------------------------------|----|-------------|------|--|---|
| C o l 4 + ／－ (1 2 9 S) | 雄 | 4 . 4 ヵ月 | 注射なし | ・ 0 時間で尿を採取 ・ 4 時間で、尿、 腎臓、肺、肝臓、 大腿四頭筋を採取 | 糸球体においてF I T C シ グナルなし |
| C o l 4 + ／－ (B 6) | 雄 | 3 . 2 ヵ月 | 注射なし | ・ 0 時間で尿を採取 ・ 研究の終わりに (7 1 時間で) 腎 臓、肺、肝臓、大 腿四頭筋を採取 | 糸球体においてF I T C シ グナルなし |

30

【 0 3 1 3 】

40

【表 5 - 2】

| | | | | | | |
|---------------------------|---|------------|--|---|--|----------|
| C o l 4 + ／－ (ハイブリッド) | 雌 | 2. 4 カ月 | 注射なし | <ul style="list-style-type: none"> ・ 4 時間、2 8 時間で尿を採取 ・ 研究の終わりに (7 1 時間で) 腎臓、肺、肝臓、大腿四頭筋を採取 | 糸球体において F I T C シグナルなし | |
| C o l 4 － ／－ (B 6) | 雄 | 5. 4 カ月 | 0 時間での、F I T C－L A M－1 1 1 複合体の 1 回の投薬 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 0 時間で尿を採取 ・ 4 時間で、尿、腎臓、肺、肝臓、大腿四頭筋を採取 | いくつかのシグナルと共に糸球体において適度なまたは明確な F I T C シグナルがアグリン陽性 G B M に見られ、残りはメサングウムに見られる | 10 |
| C o l 4 － ／－ (B 6) | 雌 | 2. 9 カ月 | 0 時間、7 時間、2 2 時間、3 1 時間、4 6 時間、及び 5 5 時間での、F I T C－L A M－1 1 1 複合体の 6 回の投薬 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 各投薬前及び投薬の合間の尿 (0 時間、7 時間、2 2 時間、及び 4 6 時間) ; ・ 最後の投薬後 (7 1 時間で) 腎臓、肺、肝臓、大腿四頭筋を採取 | いくつかのシグナルと共に糸球体において明確な F I T C シグナルがアグリン陽性 G B M に見られ、残りはメサングウムに見られる | 20 |
| C o l 4 － ／－ (ハイブリッド) | 雌 | 2. 4 カ月 | 0 時間、7 時間、2 2 時間、3 1 時間、4 6 時間、及び 5 5 時間での、F I T C－C o l 4－α 1 (2) α 2 複合体の 6 回の投薬 | <ul style="list-style-type: none"> ・ 投薬の合間に尿を採取 (4 時間、2 8 時間で ; ・ 最後の投薬後 (7 1 時間で) 腎臓、肺、肝臓、大腿四頭筋を採取 | 大半のシグナルと共に糸球体において適度な F I T C シグナルがアグリン陽性 G B M に見られ、明るい F I T C シグナルを伴ういくつかの塊が細管の管腔に見られる | 30 40 |
| C o l 4 (－／－) (B 6) | 雌 | 3 カ月 | 0 時間での、F I T C－F I T C－C o l 4 複合体の 1 回の投薬 | <ul style="list-style-type: none"> ・ C o l 4 投薬後 0 時間及び 4 時間で尿を採取 ・ 4 時間で、腎臓、肺、肝臓、大腿四頭筋を採取 | 糸球体、一部のアグリン陽性 G B M、及びメサングウムの全てにおいて適度な F I T C シグナル | |

【表 5 - 3】

| | | | | | |
|---------------------------|---|-----------------|--|--|--|
| C o l 4 (-/-) (B 6) | 雌 | 2 カ 月 | 0 時間での、 F I T C - F I T C - C o l 4 複合体の 1 回の投薬 | ・ C o l 4 投薬 0 時間及び 4 時間後 で尿を採取 ・ 4 時間で、腎 臓、肺、肝臓、大 腿四頭筋を採取 | 糸球体、一部 のアグリン陽 性 G B M、及 びメサングウ ムの全てにお いて明確な F I T C シグナ ル |
| C o l 4 - /- (B 6) | 雌 | 4 . 5 カ 月 | 0 時間、7 時 間、2 4 時 間、3 1 時 間、4 8 時 間、及び 5 5 時間での、F I T C - C o l 4 - α 1 (2) α 2 複 合体の 6 回の 投薬 | ・ 投薬前及び最後 の投薬の 8 時間後 に尿を採取 ・ 最後の投薬の 8 時間後に腎臓、 肺、肝臓、大腿四 頭筋を採取 | 糸球体、アグ リン陽性 G B M、及びメサ ングウムの全 てにおいて明 確な F I T C シグナル |
| C o l 4 - /- (B 6) | 雌 | 3 カ 月 | 0 時間、7 時 間、2 4 時 間、3 1 時 間、4 8 時 間、及び 5 5 時間での、F I T C - C o l 4 - α 1 (2) α 2 複 合体の 6 回の 投薬 | ・ 投薬前及び最後 の投薬の 8 時間後 に尿を採取 ・ 最後の投薬の 8 時間後に腎臓、 肺、肝臓、大腿四 頭筋を採取 | 糸球体、アグ リン陽性 G B M、及びメサ ングウムの全 てにおいて明 確な F I T C シグナル |
| C o l 4 - /- (B 6) | 雌 | 2 カ 月 | 0 時間、7 時 間、2 4 時 間、3 1 時 間、4 8 時 間、及び 5 5 時間での、F I T C - C o l 4 - α 1 (2) α 2 複 合体の 6 回の 投薬 | ・ 投薬前及び最後 の投薬の 8 時間後 に尿を採取 ・ 最後の投薬の 8 時間後に腎臓、 肺、肝臓、大腿四 頭筋を採取 | 糸球体、アグ リン陽性 G B M、及びメサ ングウムの全 てにおいて明 確な F I T C シグナル |

10

20

30

40

【 0 3 1 5 】

【表 5 - 4】

| | | | | | |
|---------------------------|---|----------|--|---|--------------------------------|
| C o l 4 - / - (B 6) | 雄 | 3 か 月 | 0 時間、7 時 間、2 4 時 間、3 1 時 間、4 8 時 間、及び 5 5 時間での、ビ ヒクルの 6 回 の注射 | ・注射前及び最後 の注射 8 時間後に 尿を採取 ・最後の注射の 8 時間後に腎臓、 肺、肝臓、大腿四 頭筋を採取 | 糸球体におい て F I T C シ グナルなし |
|---------------------------|---|----------|--|---|--------------------------------|

【0 3 1 6】

10

実施例 7 : C o l 4 - 1 (2) 2 の長期反復投薬及びアルポートマウスにおける治療効果

コラーゲン I V の置き換えの治療有効性がアルポートマウスを使用して試験された。アルポート及び対照マウスは、ある時間期間にわたって 5 m g / k g の用量で、C o l 4 - 1 (2) 2 タンパク質を反復投薬された。注射溶液は、1 3 0 μ l の F I T C - C o l 4 - 1 (2) 2 (0 . 5 m g / m l) 及び 1 4 . 5 μ l の 1 0 X トリス緩衝生理食塩水を混合することにより調製された。表 6 に図示されるように、6 匹のマウスに、生後 2 8 日 (p 2 8) で開始して少なくとも 6 週間の間、週に 2 回投薬し、試験動物の寿命が維持される場合、投薬を継続した。各動物の一般的な健康を監視し、毎日寿命を記録した。各処置された動物からの尿試料を定期的に採取し、更に分析した。

20

【0 3 1 7】

表 6 : 長期反復投薬の有効性研究

【0 3 1 8】

【表 6】

| 群 | 動物の数 (N =) | 遺伝子型 | 用量 | 投薬週数 | 投与経路 |
|---|---------------|----------------|--------------------|------|-------|
| 1 | 9 | アルポー ト | 5 . 0 m g / k g | 6 + | 眼窩後注射 |
| 2 | 6 | アルポー ト | ビヒクル | 6 + | 眼窩後注射 |
| 3 | 5 | H e t / W T | ビヒクル | 6 + | 眼窩後注射 |

30

【0 3 1 9】

結果

C o l 4 - 1 (2) 2 タンパク質堆積

少なくとも 6 週間の C o l 4 - 1 (2) 2 または対照ビヒクルの反復投薬後、マウスの腎臓における既知の G B M タンパク質である C o l 4 - 1 (2) 2 及びアグリン 2 重免疫蛍光免疫染色により、類似する染色を行った。前の観察 (実施例 6 に論じられ、図 7 a ~ 7 d に示されるように) と一致して、C o l 4 - 1 (2) 2 タンパク質は腎臓における糸球体内に堆積し、G B M の他のタンパク質 (例えばアグリン) と共局在化する。

40

糸球体の形態

【0 3 2 0】

実験マウスの糸球体の形態も検査された。対照 (すなわち、注射なしまたはビヒクル注射された) アルポートマウス (C o l 4 - / -) と比較して、C o l 4 - 1 (2) 2 注射されたアルポートマウス (C o l 4 - / -) は G B M の毛細管ループの開口及び鮮明な線状染色を維持し (図 8 の a 及び b) 、硬化糸球体が少なく、炎症が減少していることを示す。図 8 に示されるように、C o l 4 - 1 (2) 2 投薬の 6 週間後 (生後 7 0 日

50

）の各マウスから少なくとも100の糸球体を数え、統計的に分析した。統計的データは、C o l 4 - 1 (2) 2 処置されたアルポートマウス (C o l 4 - / -) が61%の非硬化糸球体を有し、一方、未処置のアルポートマウス (c o l 4 - / -) 及びビヒクル処置されたアルポートマウス (C o l 4 - / -) が、それぞれ、36%及び29%の非硬化糸球体を有することを示す。

寿命

【0321】

生存データは、C o l 4 - 1 (2) 2 で処置されたアルポートマウス (C o l 4 - / -) がビヒクル処置されたアルポートマウス (C o l 4 - / -) よりも長く生存したことを示す。アルポートマウスの寿命は、マウスの体重がそのピーク体重の15%降下したために人道的に殺処分されなければならない日である。C o l 4 - 1 (2) 2 で処置された7匹のアルポートマウスのうち、2匹が97日及び105日生存し、ビヒクル処置されたアルポートマウスの～90日の寿命をだいた超える (表9) 。C O L 4 の胚性イソ型であるC o l 4 - 1 (2) 2 は成体アルポート腎臓内にすでに発現されているが、C o l 4 - 3 / 2 / 5 よりもタンパク質分解による消化により感受性であることが知られる ((K a l l u r i e t a l , J . C l i n . I n v e s t . 9 9 (1 0) , 1 9 9 7 , 2 4 7 0 - 2 4 7 8 、及びG u n w a r , e t a l , J . B i o l . C h e m . , 2 7 3 (1 5) , 1 9 9 8 , 8 7 6 7 - 8 7 7 5) 。したがって、外因性C o l 4 - 1 (2) 2 の糸球体内への投与及び堆積は、既存のC o l 4 - 1 (2) 2 と共に、糸球体基底膜を維持し、糸球体の硬化を遅延するように思えた。C o l 4 - 3 / 2 / 5 のタンパク質分解による消化に対する耐性を考えると、C O L 4 - 3 4 5 によるアルポートマウスの処置は、処置が早期に開始される場合、C o l 4 - 1 (2) 2 よりも大きな有効性及び長い寿命をもたらすことが期待される。加えて、処置されたアルポートマウスにおいて毒性の徴候は観察されず、高用量のC o l 4 - 1 (2) 2 の長期的な反復投薬が安全であることを示唆する。

糸球体毛細管

【0322】

アルポートマウスにおける糸球体毛細管の詳細が電子顕微鏡により更に分析された。ビヒクル処置及びC o l 4 - 1 (2) 2 処置されたアルポートマウス (C o l 4 - / -) における毛細管のネットワークは類似したパターンを共有する。糸球体基底膜における教訓は、ビヒクル注射されたアルポートマウス (図9b) と比較したとき、C o l 4 - 1 (2) 2 注射されたアルポートマウスにおいて顕著な相違を示さず (図9c) 、両方とも対照マウス (ヘテロ接合C o l 4 + / - マウス) (図9a) とは顕著に異なる。

血中尿素窒素 (B U N) 分析

【0323】

アルポートマウス (C o l 4 - (1 (2) 2 を注射されたC o l 4 - / -) において、顕著な相違は糸球体毛細管において観察されなかったが、血中尿素窒素 (B U N) 検査は、図11に示されるように、一部の処置されたアルポートマウスにおいて外因性コラーゲンI V タンパク質の利益を示す。表7は、反復投薬中の異なる時間点でのそれぞれの処置されたアルポートマウスにおけるB U N 測定値を列記する。

【0324】

表7：それぞれの処置されたアルポートマウスにおけるB U N 測定値

【0325】

【表 7 - 1】

| 遺伝子型／性別 | 処置 | ～7週 | | ～9週 | | ～10週 | | ～11週 | | ～12週 | | ～13週 | | ～14週 | |
|------------------------|----------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|---------------------|-------------|-------------------------|-------------|--|-------------|-------------------------|-------------|---------------------|
| | | 齡 ／ 日 | BU N (mg/ d l) | 齡 ／ 日 | BU N (mg/ d l) | 齡 ／ 日 | BUN (mg/ d l) | 齡 ／ 日 | BU N (mg/ d l) | 齡 ／ 日 | B U N (mg / d l) | 齡 ／ 日 | BU N (mg/ d l) | 齡 ／ 日 | BUN (mg/ d l) |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | | | 6 1 | 3 5. 2 | | | 7 4 | 4 8. 1 | 8 4 | 6 4 0 . 9 | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | | | 6 1 | 2 9. 3 | | | 7 4 | 4 5. 3 | 8 4 | 5 8 . 9 | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | | | 6 1 | 3 8. 3 | | | 7 4 | 3 2. 8 | 8 4 | 5 5 . 0 | 9 2 | 5 2. 1 | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | | | 6 1 | 3 0. 6 | | | 7 4 | 3 7. 1 | 8 4 | 5 7 . 7 | 8 8 | 4 2. 0 | | |

10

20

【0326】

【表 7 - 2】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|----------|--------|--------------|--------|--------------|--------|----------|--------|--------------|--------|------------------|--------|--------------|--------|-------|
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | | | 6 1 | 2 9. 5 | | | 7 4 | 3 7. 8 | 8 4 | 6 2 . 1 | 8 8 | 6 1. 9 | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | 4 8 | 2 0. 3 | 6 2 | 2 7. 7 | 7 0 | 25. 6 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | 4 8 | 1 5. 1 | 6 2 | 2 0. 7 | 7 0 | 21. 8 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | 4 8 | 1 6. 2 | 6 2 | 1 6. 9 | | | 7 6 | 1 8. 3 | 8 3 | 1 9 . 7 | 9 0 | 3 8. 3 | 9 7 | 50. 7 |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | 4 8 | 1 3. 6 | 6 2 | 2 2. 2 | | | 7 6 | 2 4. 3 | 8 3 | 3 7 . 0 | 9 0 | 6 0. 8 | 9 7 | 65. 1 |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | 4 8 | 2 2. 3 | 6 2 | 2 6. 5 | 6 9 | 40. 8 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | 4 9 | 1 6. 1 | 6 3 | 2 6. 0 | 7 0 | 35. 1 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | 4 9 | 2 0. 5 | 6 3 | 3 1. 4 | 7 0 | 51. 2 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | Col4-112 | 4 9 | 2 5. 6 | 6 0 | 4 6. 7 | | | | | | | | | | |

30

40

【0327】

【表 7 - 3】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|------|--------|--------------|--------|--------------|--------|----------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--|--|
| COL-/- (1 29) / (雄) | ビヒクル | 4 9 | 1 5. 8 | 6 3 | 1 8. 2 | | | 7 7 | 3 4. 1 | 8 4 | 5 4 .1 | 9 1 | 6 4. 3 | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | ビヒクル | 4 9 | 1 7. 0 | 6 3 | 2 1. 8 | | | 7 7 | 4 1. 3 | 8 4 | 5 6 .7 | 8 8 | 6 8. 0 | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | ビヒクル | 4 7 | 1 8. 2 | 6 1 | 2 4. 9 | 7 0 | 50. 5 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雌) | ビヒクル | 4 9 | 1 9. 3 | 6 3 | 4 8. 7 | 7 | 63. 2 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雌) | ビヒクル | 4 9 | 2 6. 5 | 6 0 | 6 6. 8 | | | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雌) | ビヒクル | 4 9 | 2 3. 5 | 6 3 | 2 7. 9 | 7 0 | 42. 7 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) / (雄) | 注射なし | 4 8 | 1 9. 2 | 6 2 | 2 7. 7 | 6 9 | 42. 3 | | | | | | | | |
| COL-/- (1 29) (雄) | 注射なし | 4 8 | 1 9. 9 | 6 2 | 2 8. 4 | 6 9 | 34. 8 | | | | | | | | |
| COL+/- (1 29) / (雌) | ビヒクル | | | 6 1 | 1 7. 2 | | | 7 4 | 1 5. 8 | 8 4 | 1 3 .2 | 9 2 | 3 0. 4 | | |

10

20

【0328】

【表 7 - 4】

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|----------|--------|--------------|--------|--------------|--------|----------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| COL+/- (12 9) / (雄) | ビヒクル | 4 8 | 1 7. 8 | 6 2 | 1 5. 1 | 7 0 | 20. 9 | | | | | | | | |
| COL+/- (12 9) / (雄) | Col4-112 | 4 8 | 1 6. 3 | 6 2 | 2 0. 2 | 7 0 | 23. 0 | | | | | | | | |
| COL+/- (12 9) / (雄) | ビヒクル | 4 7 | 1 6. 1 | 6 1 | 1 6. 8 | 7 0 | 19. 5 | | | | | | | | |
| COL+/- (12 9) / (雌) | ビヒクル | 4 9 | 1 7. 1 | 6 3 | 1 9. 1 | 7 0 | 21. 9 | | | | | | | | |
| COL+/- (12 9) / (雄) | 注射なし | 4 8 | 2 1. 3 | 6 2 | 2 3. 0 | 6 9 | 24. 9 | | | | | | | | |
| COL+/- (12 9) / (雄) | Col4-112 | 4 9 | 1 7. 4 | 6 3 | 4 0. 8 | 7 0 | 34. 4 | | | | | | | | |

30

【0329】

尿中アルブミン対クレアチニン比 (UACR) 分析

40

同様に、ビヒクルを注射されたアルポートマウス (Col4-/-) と比較したとき、Col4- (1 (2) 2) を注射されたアルポートマウス (Col4-/-) の尿中アルブミン及びクレアチニン比は、外因性コラーゲン I V 処置の利益を示唆する (図 12)。表 8 は、反復投薬中の異なる時間点でのそれぞれの処置されたアルポートマウスにおける尿中アルブミン / クレアチニン比を列記する。

【0330】

表 8 : それぞれの処置されたアルポートマウスの尿中アルブミン / クレアチニン比

【0331】

【表 8 - 1】

| 遺伝子型/性別 | 処置 | ～7週 | | ～9週 | | ～10週 | | ～12週 | | ～14週 | |
|-------------------------|--------------|-----|------------------|-----|------------------|------|------------------|------|------------------|------|------------------|
| | | 齢 | アルブミン/CRE (g/mg) | 齢 | アルブミン/CRE (g/mg) | 齢 | アルブミン/CRE (g/mg) | 齢 | アルブミン/CRE (g/mg) | 齢 | アルブミン/CRE (g/mg) |
| COL-/- (129)/ (雄) | Col4 -112 | 49日 | 0.017 | 62日 | 0.036 | 69日 | 0.054 | 83日 | 0.054 | | |
| COL-/- (129) (雄) | Col4 -112 | 49日 | 0.021 | 62日 | 0.027 | 69日 | 0.037 | 83日 | 0.048 | | |
| COL-/- (129)/ (雄) | Col4 -112 | 49日 | 0.014 | 62日 | 0.027 | 69日 | 0.041 | 83日 | 0.039 | | |
| COL-/- (129)/ (雄) | Col4 -112 | 49日 | 0.017 | 62日 | 0.038 | 69日 | 0.042 | 83日 | 0.056 | | |
| COL-/- (129)/ (雌) | Col4 -112 | 49日 | 0.013 | 62日 | 0.040 | 69日 | 0.064 | 83日 | 0.064 | | |
| COL-/- (129)/ (雄) | Col4 -112 | 46日 | 0.007 | 60日 | 0.018 | 67日 | 0.029 | | | | |
| COL-/- (129)/ (雌) | Col4 -112 | 46日 | 0.007 | 60日 | 0.015 | 67日 | 0.025 | | | | |

10

20

【0332】

【表 8 - 2】

| | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| COL-/- (129)/ (雌) | Col4 -112 | 46日 | 0.001 | 60日 | 0.009 | 67日 | 0.025 | 81日 | 0.027 | 96日 | 0.033 |
| COL-/- (129)/ (雌) | Col4 -112 | 46日 | 0.008 | 60日 | 0.020 | 67日 | 0.037 | 81日 | 0.035 | 96日 | 0.091 |
| COL-/- (129)/ (雌) | Col4 -112 | 47日 | 0.010 | 61日 | 0.033 | 68日 | 0.035 | | | | |
| COL-/- (129)/ (雄) | Col4 -112 | 48日 | 0.014 | 62日 | 0.023 | 69日 | 0.035 | | | | |
| COL-/- (129)/ (雌) | Col4 -112 | 48日 | 0.018 | 62日 | 0.038 | 69日 | 0.046 | | | | |
| COL-/- (129)/ (雌) | Col4 -112 | 48日 | 0.022 | 60日 | 0.029 | | | | | | |
| COL-/- (129)/ (雄) | ビヒクル | 47日 | 0.010 | 61日 | 0.021 | 68日 | 0.028 | 82日 | 0.042 | | |
| COL-/- (129)/ (雄) | ビヒクル | 47日 | 0.011 | 61日 | 0.018 | 68日 | 0.039 | 82日 | 0.038 | | |
| COL-/- (129)/ (雄) | ビヒクル | 46日 | 0.023 | 60日 | | 67日 | 0.044 | | | | |
| COL-/- (129)/ (雌) | ビヒクル | 48日 | 0.015 | 62日 | 0.019 | 69日 | 0.046 | | | | |

30

40

【0333】

【表 8 - 3】

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------|-----|-----------|-----|-----------|---------|-------|--|--|--|
| COL-/- (129) / (雌) | ビヒクル | 48日 | 0.03 6 | 60日 | 0.0 31 | | | | | |
| COL-/- (129) / (雌) | ビヒクル | 48日 | 0.01 6 | 62日 | 0.0 25 | 69 日 | 0.028 | | | |
| COL-/- (129) / (雄) | 未注射 | 47日 | 0.00 6 | 61日 | 0.0 15 | 68 日 | 0.023 | | | |
| COL-/- (129) / (雄) | 注射なし | 47日 | 0.01 2 | 61日 | 0.0 24 | 68 日 | 0.031 | | | |

10

【0334】

表9に要約されるように、アルポート (Col4 - / -) マウスにおける外因性コラーゲンIVタンパク質の置き換えは、この症候群に対する顕著な利益を示唆する。

【0335】

表9：アルポート (Col4 - / -) マウスにおけるCol4 - (1(2) 2置き換えの効果

【0336】

【表 9】

| | アルポート (Col4 - / -) 注射なし | アルポート (Col4 - / -) ビヒクル注射された | アルポート (Col4 - / -) Col4 α 112注射された |
|--------------------|----------------------------|---------------------------------|--|
| FITC-Col4 IF染色 | 陰性 | 陰性 | 陽性 |
| 糸球体形態/病理 (70日目) | 36%の非硬化 糸球体 | 29%の非硬化糸 球体 | 61%の非硬化糸球体 |
| 寿命 (日数; 個々のマウス) | 決定されず | 88、91 | 83、84、88、90、92、92 97、105 |
| BUN | 利益なし (表7の詳細な測定値を参照) | 利益なし (表7の詳細な測定値を参照) | 改善 (表7の詳細な測定値を参照) |
| 尿中アルブミン/クレアチニン比 | 利益なし (表8の詳細な測定値を参照) | 利益なし (表8の詳細な測定値を参照) | 改善 (表8の詳細な測定値を参照) |

20

30

40

【0337】

均等物及び範囲

当業者は、日常的以上の実験をすることなく、本明細書に記載される発明による特定の実施形態に対する多くの均等物を認識するか、または把握することができるだろう。本発明の範囲は、上記の説明を限定することを意図するのではなく、むしろ添付の特許請求の範囲に記載される通りである。

【0338】

特許請求の範囲において、「a」、「an」、及び「the」などの冠詞は、反対が示されない限り、または別様に文脈から明らかでない限り、1つまたは2つ以上を意味し得る。群の1つ以上の成員の間で「or」を含む特許請求の範囲または説明は、反対が示さ

50

れない限り、または別様に文脈から明らかでない限り、群の成員のうちの１つ、２つ以上、または全てが所与の製品またはプロセスに存在する、採用される、または別様に適切である場合に満たされると考えられる。本発明は、群のうちの正確に１つの成員が所与の製品またはプロセスに存在する、採用される、または別様に適切である実施形態を含む。本発明は、２つ以上または全ての群の成員が所与の製品またはプロセスに存在する、採用される、または別様に適切である実施形態を含む。

【０３３９】

用語「含む (c o m p r i s i n g) 」は、非限定的かつ許可であることが意図されるが、追加的な要素または工程の包含を必要としないことにも留意する。用語「含む」が本明細書で使用されるとき、用語「からなる」もしたがって包含され、開示される。

10

【０３４０】

範囲が与えられる場合、端点が含まれる。更に、別途記載のない限り、または別様に文脈から明らかでない限り、及び当業者が理解するように、範囲として表される値は、文脈が明確に別様を示さない限り、その範囲の下限の単位の１０分の１まで、本発明の異なる実施形態における規定範囲内の任意の特定の値または小範囲を取ることができることを理解されたい。

【０３４１】

加えて、先行技術内に入る本発明の任意の特定の実施形態は特許請求の範囲の任意の１つ以上から明示的に除外されることを理解されたい。このような実施形態は当業者に既知であると認められるため、それらは、除外されることが本明細書に明示的に記載されなくても除外され得る。本発明の組成物の任意の特定の実施形態（例えば、任意の抗生物質、治療薬、または活性成分、任意の生産方法、任意の使用方法など）は、先行技術の存在に関連するか否かにかかわらず、いかなる理由であれ、任意の１つ以上の特許請求の範囲から除外され得る。

20

【０３４２】

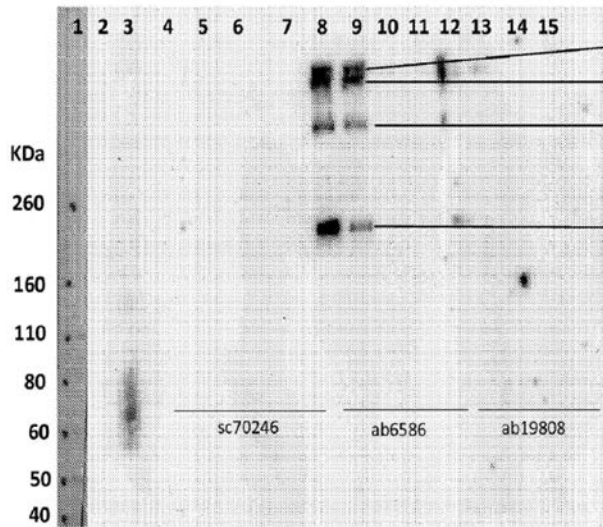
使用されてきた用語は限定ではなく説明の用語であり、その広義の態様において本発明の真の範囲及び趣旨から逸脱することなく、添付の特許請求の範囲の範囲内で変更がなされ得ることを理解されたい。

【０３４３】

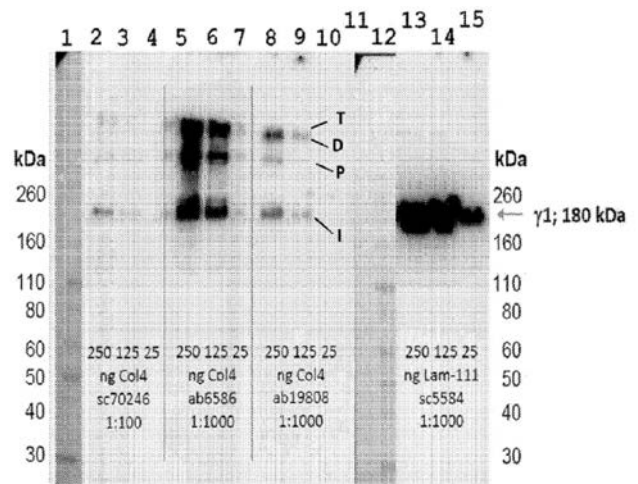
本発明はいくつかの記載される実施形態に関してある程度十分かつある程度詳細に説明されてきたが、任意のこのような詳細または実施形態もしくはは任意の特定の実施形態に限定されるべきであることを意図しないが、先行技術を考慮してこのような特許請求の範囲の広い可能な解釈を提供し、したがって、本発明の意図される範囲を効果的に包含するように、添付の特許請求の範囲を参照にして解釈される。

30

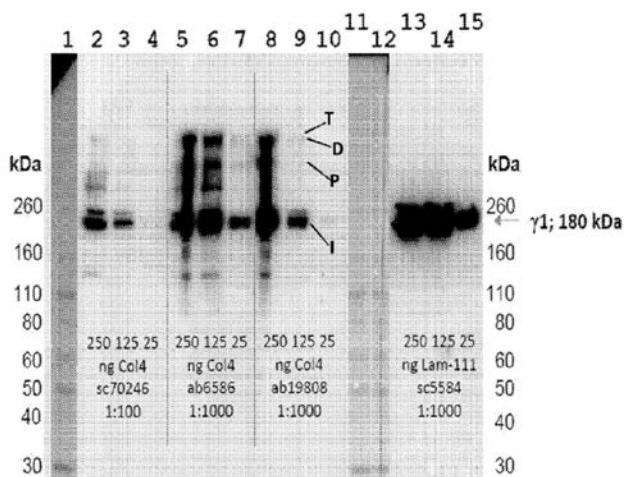
【図 1】



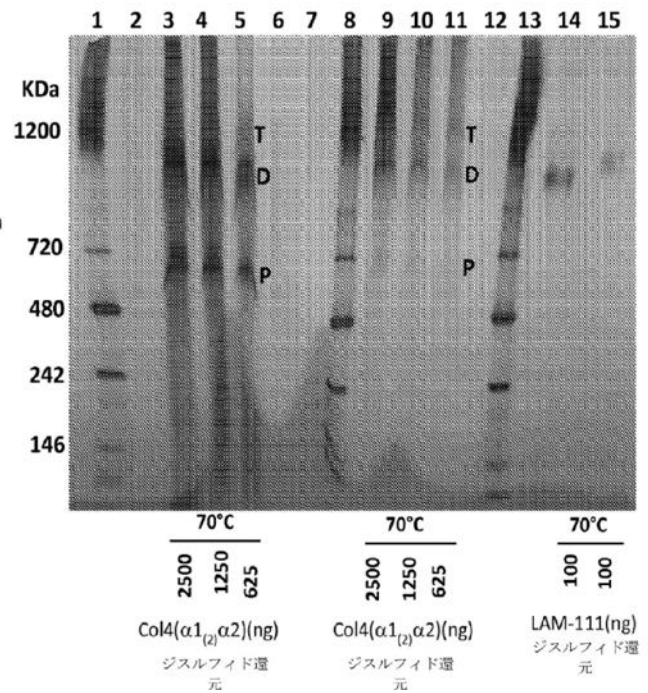
【図 2 a】



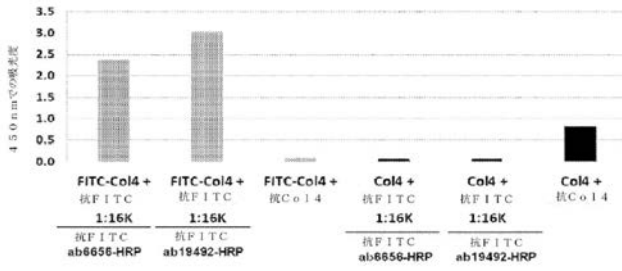
【図 2 b】



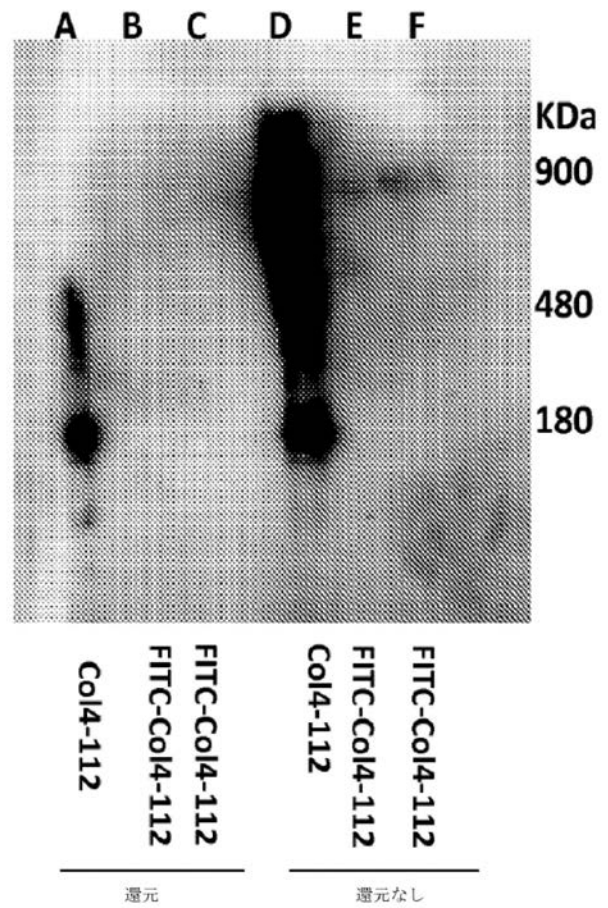
【図 3】



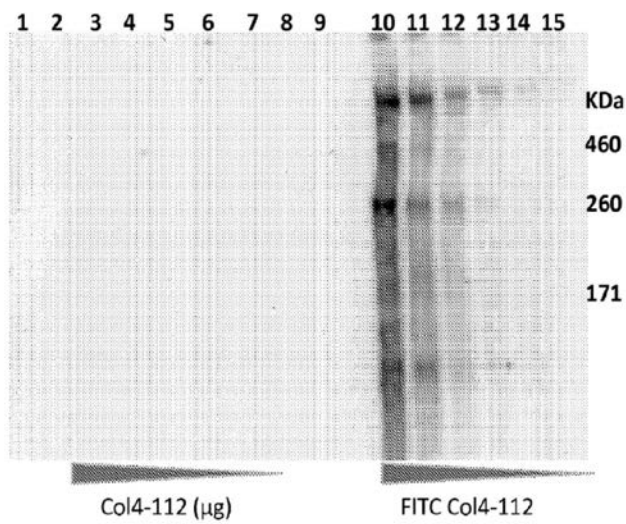
【図 4】



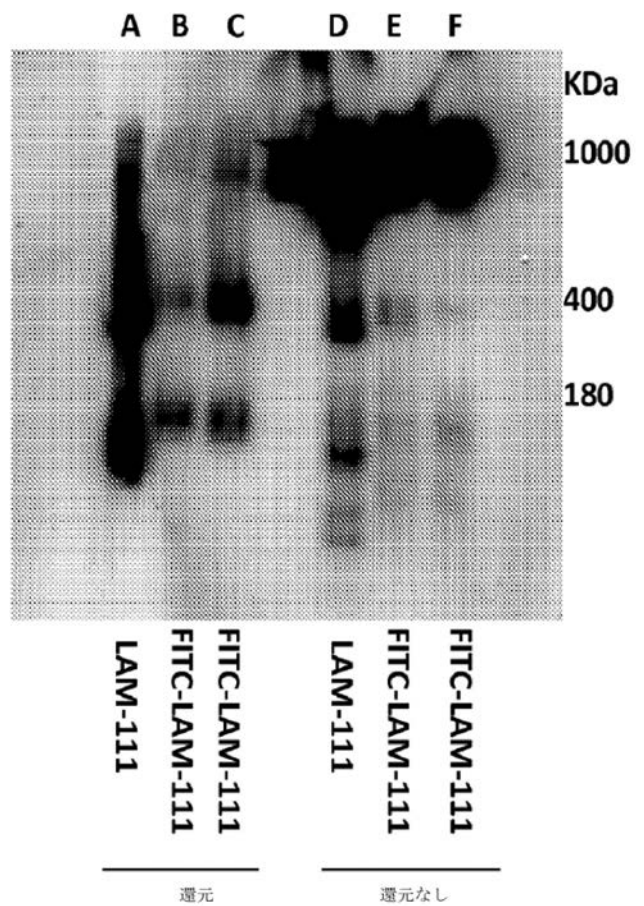
【図 5 a】



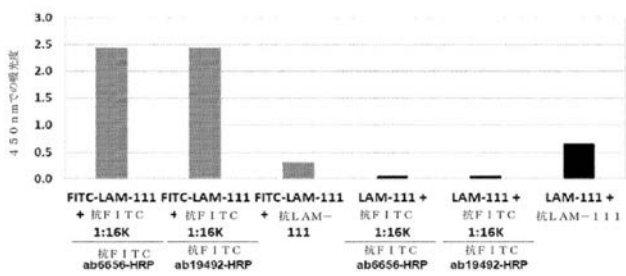
【図 5 b】



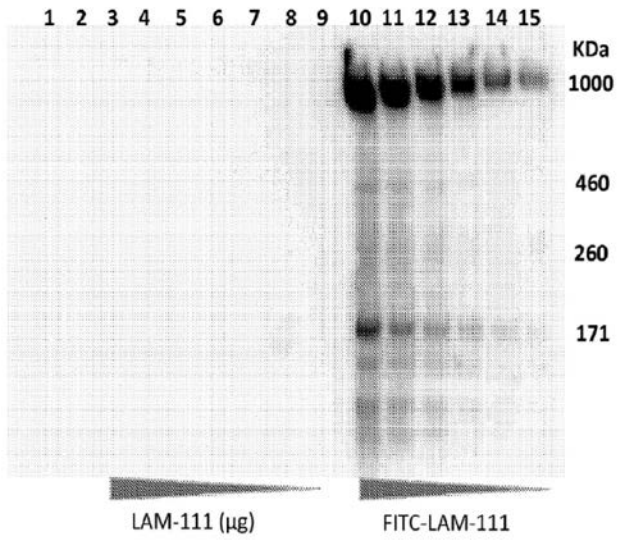
【図 6 b】



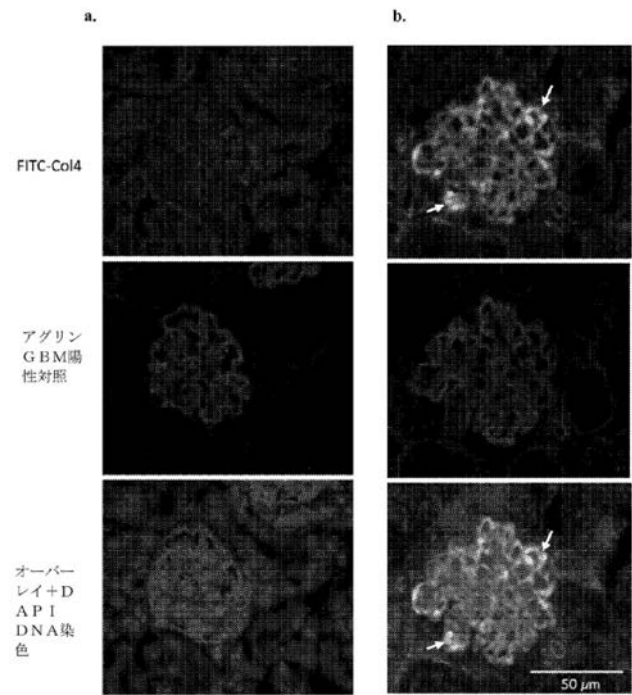
【図 6 a】



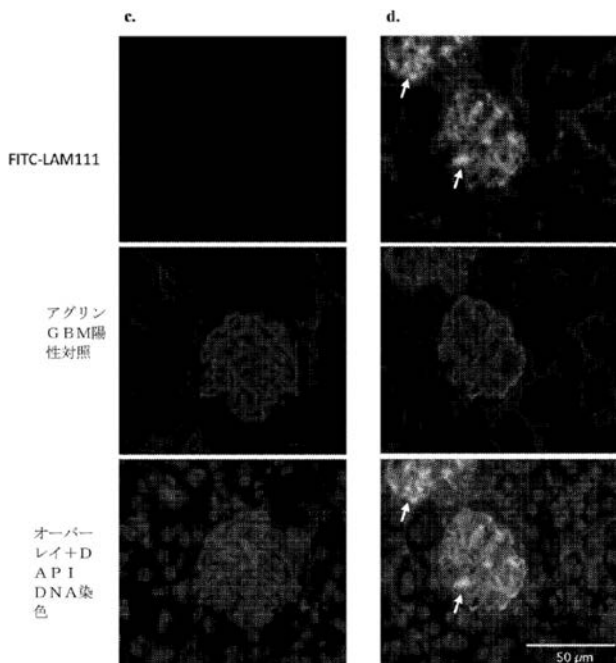
【図 6 c】



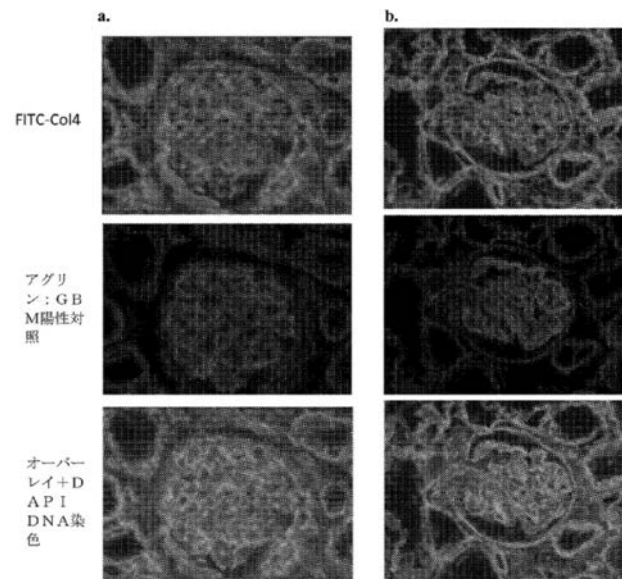
【図 7 - 1】



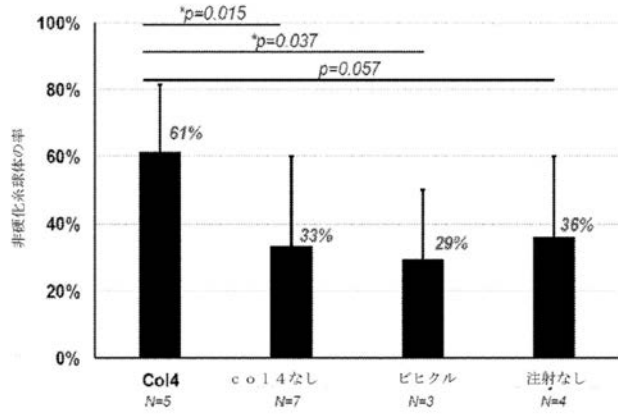
【図 7 - 2】



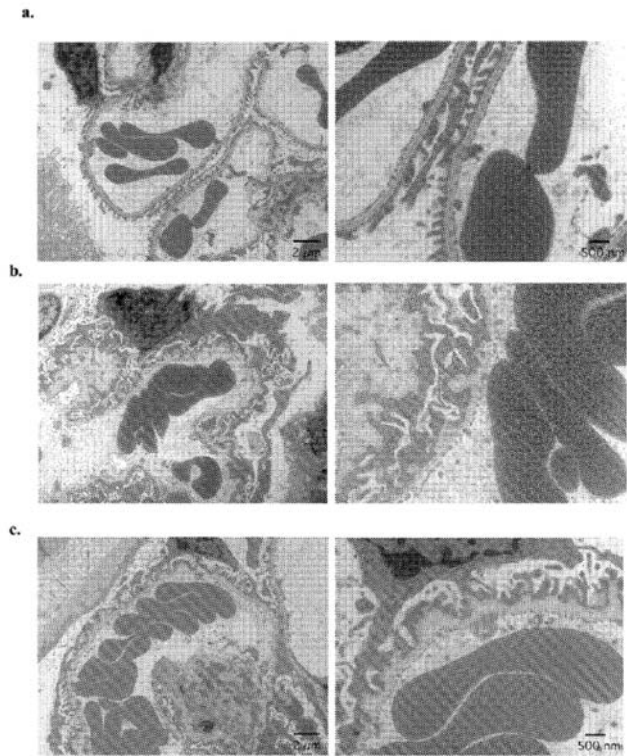
【図 8】



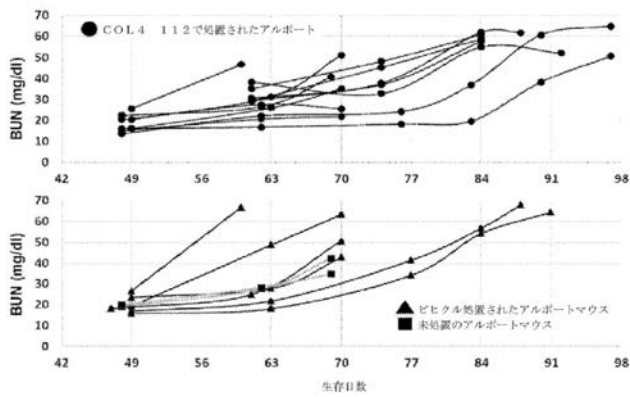
【図 9】



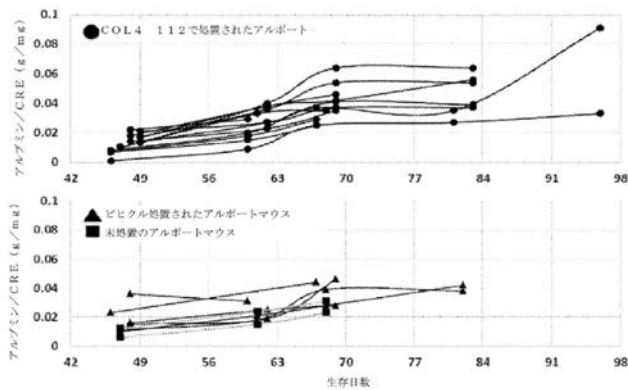
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/41712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/39 (2015.01)

CPC - A61K 38/39

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)

IPC(8): A61K 38/39; A61P 19/02, 17/02, 31/10, 3/10; C07K 5/097 (2015.01)

CPC: C12N 2501/998; A61K 38/39, 2039/505; C07K 16/18, 2299/00, 14/78

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)

PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google/Google Scholar; NCBI/PubMed/BLAST;

ProQuest;

Search terms used: collagen IV, pharmaceutical, recombinant, protomer, heterotrimer, dimer, chimera, NC1, chain, polypeptide, peptide, hydroxyproline, alport syndrome

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-------------|--|---|
| X — Y | US 2004/0132662 A1 (HUDSON, B et al.); July 8, 2004; paragraphs [0008], [0030], [0031], [0038]-[0041] | 1-4, 43, 49 5-8, 9/4-9/8, 10/1-10/4, 10/6-10/7, 10/9/5-10/9/8, 44, 45/43-45/44, 46/45/43-46/45/44, 50 |
| X — Y | US 2013/0116412 A1 (PINKAS, DM et al.); May 9, 2013; paragraphs [0007], [0012], [0023], [0027], [0139] | 35-37 10/1-10/4, 10/6-10/7, 10/9/5-10/9/8 |
| X — Y | US 2007/0042965 A1 (HUDSON, B et al.); February 22, 2007; paragraphs [0050], [0059], [0098], [0101] | 38, 39, 41/38-41/39, 42 6-8, 9/4-9/8, 10/6-10/7, 10/9/5-10/9/8, 40, 41/40 |
| Y | US 7608413 B1 (JOSELOFF, E et al.); October 27, 2009; SEQ ID NOs: 93, 603, 2730 | 5, 8, 9/5, 9/8, 10/9/5, 10/9/8, 40, 41/40, 44, 45/44, 46/45/44, 50 |
| Y | US 2014/0100263 A1 (REGULUS THERAPEUTICS INC.); April 10, 2014; paragraphs [0004], [0005] | 45/43-45/44, 46/45/43-46/45/44 |
| Y | US 6812339 B1 (VENTER, JC et al.); November 2, 2004; SEQ ID NOs: 5883-5884 | 5, 8, 9/5, 9/8, 10/9/5, 10/9/8, 40, 41/40 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 October 2015 (09.10.2015)

Date of mailing of the international search report

04 NOV 2015

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/41712

Box No. 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:
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.: 13-34, 47, 48
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | | | テーマコード (参考) | | |
|--------------------------------|----------------|--------------|--------------|-------------|--|--|
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N | 1/15 | Z N A | | | |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N | 1/19 | | | | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N | 1/21 | | | | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | | | | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N | 15/00 | A | | | |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | C 1 2 P | 21/02 | C | | | |

(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

(72)発明者 バーンズ , トーマス マイケル
アメリカ合衆国 0 2 4 4 6 マサチューセッツ州 ブルックライン メイソン・テラス 1 2

(72)発明者 ライリー , フィリップ レイモンド
アメリカ合衆国 0 1 7 4 2 マサチューセッツ州 コンコード モニュメント・ストリート 1 4 5

(72)発明者 コウトニウク , ウォルター ユージーン
アメリカ合衆国 0 2 1 2 7 マサチューセッツ州 サウス・ボストン ウエスト・セカンド・ストリート 3 6 0 ユニット 1 5

F ターム (参考) 4B064 AG01 CA19 CA21 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA19 BA01 BA08 BA22 CA53 DA40 MA02 MA66 NA14
ZA36 ZA81 ZC54