

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6412876号

(P6412876)

(45) 発行日 平成30年10月24日(2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日(2018.10.5)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/48 (2006.01) A 6 1 K 38/48
A 6 1 K 45/00 (2006.01) A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 1/14 (2006.01) A 6 1 P 1/14
A 6 1 P 37/00 (2006.01) A 6 1 P 37/00
A 2 3 L 33/185 (2016.01) A 2 3 L 33/185

請求項の数 18 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2015-543220 (P2015-543220)	(73) 特許権者	515135804
(86) (22) 出願日	平成25年11月20日(2013.11.20)		ネブエトックス, エルエルシー
(65) 公表番号	特表2016-501853 (P2016-501853A)		アメリカ合衆国, フロリダ州 3 2 5 4 1
(43) 公表日	平成28年1月21日(2016.1.21)		, デスティン, スイート 1 0 5, 1 2 3
(86) 国際出願番号	PCT/CA2013/000970		4 エアポート ロード
(87) 国際公開番号	W02014/078935	(74) 代理人	100114775
(87) 国際公開日	平成26年5月30日(2014.5.30)		弁理士 高岡 亮一
審査請求日	平成28年11月21日(2016.11.21)	(74) 代理人	100121511
(31) 優先権主張番号	61/729, 210		弁理士 小田 直
(32) 優先日	平成24年11月21日(2012.11.21)	(74) 代理人	100191086
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 高橋 香元
(31) 優先権主張番号	61/797, 040	(72) 発明者	スチリーマー, デイビッド
(32) 優先日	平成24年11月27日(2012.11.27)		カナダ国, アルバータ州 ティー1エック
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ス 1 ビー6, チェスターミア, 9 0 1
			ウェスト チェスターミア ドライブ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルテン不耐症および関連する状態の治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする患者においてグルテン不耐症、セリアック病、小麦アレルギー、または疱疹状皮膚炎の治療において使用するためのネペンテシン I、ネペンテシン II、またはそれらの塩を含む医薬組成物。

【請求項 2】

前記組成物がグルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物の摂取前に前記患者に投与される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記組成物がグルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物の摂取と共に前記患者に投与される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記組成物がグルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物の摂取後に前記患者に投与される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

ネペンテシン I が投与される、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

ネペンテシン II が投与される、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

。

【請求項 7】

ネペンテシン I、ネペンテシン I I、および／またはそれらの塩を含む、患者においてグルテン不耐症または関連する状態の治療において使用するための組成物であって、グルテン源をさらに含み、前記グルテン源は、小麦、ライ麦、および大麦の製品からなる群より選択される、組成物。

【請求項 8】

栄養補助食品である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

医薬組成物である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

食物である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記組成物は、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物の摂取前の患者への投与用である、請求項 7 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

ネペンテシン I またはその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 13】

ネペンテシン I I またはその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 14】

ネペンテシン I およびネペンテシン I I またはこれら各々の薬学的に許容可能な塩を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 15】

ネペンテシン I、ネペンテシン I I、および／またはそれらの薬学的に許容可能な塩は、約 pH 5 以上である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 16】

胃のプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、およびプロピルエンドペプチダーゼからなる群より選択される少なくとも 1 つの付加酵素をさらに含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 17】

トランスグルタミナーゼの阻害剤、抗炎症剤、COX-2 阻害剤、p38MAPキナーゼ阻害剤、肥満細胞安定化剤、抗潰瘍剤、抗アレルギー剤、および抗TNF α 剤からなる群より選択される少なくとも 1 つの付加剤をさらに含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記組成物が経口投与される、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、セリアック病等のグルテン不耐症およびセリアック病等の関連する状態を治療する組成物、食物および方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

グルテンを含有する小麦、大麦、ライ麦、および場合によってはオート麦の摂取は、グルテン不耐症な個人に、セリアック病、小麦アレルギー、疱疹状皮膚炎等の自己免疫反応異常を生じさせ得る。グルテンは、グルタミンとプロリンとを多く含む、グルテニンおよびプロラミンタンパク質分子の混合物である。自己免疫反応異常のある個人の多くは、ヒト白血球型抗原 (HLA) DQ2 または DQ8 分子を発現する。自己免疫反応は、陰窩過形成および粘膜炎を伴う、小腸粘膜の絨毛萎縮を発生させる。セリアック病の症状は、個人差が発生することがあり、疲労、慢性的な下痢、便秘、栄養素の吸収不良、体重減少、腹部膨満、貧血症のうち 1 つ以上を含み得るほか、骨粗鬆症および腸の悪性腫瘍 (リンパ腫および癌腫) の発生のリスクを大きく増大させる。

10

20

30

40

50

【0003】

一般に、グルテン不耐症の治療では、生涯続く厳格なグルテン抜き食事療法が行なわれる。しかし、グルテン抜き食事療法は、不便で、制限が多く、またグルテンを控えるのは困難である。そのため、グルテン不耐症の効果的な代替治療が必要とされている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、酵素ネペンテシンが、特に、低pH（例えば、約2～3）において、タンパク質およびオリゴペプチド（グルテンを含有する）を切断する高いタンパク質分解活性を有するという発見に関する。ネペンテシン（EC 3. 4. 23. 12）は、熱帯地方において、一般的にモンキーカップ（monkey cups）の名で知られる、ウツボカズラ属（食虫性の囊状葉植物）の囊状葉の分泌液等、様々な植物源から単離または濃縮され得る植物由来のアスパラギン酸プロテアーゼである。Tokesらの「食虫植物 *Nepenthes macfarlanei* L., *Planta* から分泌される消化酵素（Digestive Enzymes Secreted by the Carnivorous Plant *Nepenthes macfarlanei* L., *Planta*）」（Berl.）119, 39-46（1974）。ネペンテシンの活性が、食品タンパク質のペプチドへの分解を部分的に担う胃に存在する酵素である、ペプシン（EC 3. 4. 23. 1）よりも約1000倍高いことが分かっている。また、ネペンテシンが、G、S、T、V、IおよびWを除く多くのアミノ酸残基の後ろを効果的に切断する、ペプシンに比べはるかに緩い特異性を有することも分かっている。特に、K、RおよびPの後ろを切断する。比較すると、ペプシンは、疎水性残基F、LおよびMを効率良く切断するが、P、H、KおよびRの後ろを切断することは、基本的に絶対でない。

【0005】

セリアック病および／または疱疹状皮膚炎等のグルテン不耐症および関連する状態ならびに症状は、小腸粘膜における患者の自己免疫反応異常により生じる。特定のグルテン成分は、ペプシン、トリプシン、およびキモトリプシン等の胃および膵臓のペプチダーゼにより切断されにくい。特定の理論に縛られることを望むものではないが、患者の腸管に到達する前に、ネペンテシンによりグルテンが非毒性ペプチドに分解されることにより、小腸に入る毒性グルテンタンパク質またはペプチドの濃度が減少すると考えられる。ネペンテシンが酸安定性であるため、ネペンテシンは、胃のpHに適合し、グルテンを消化し、患者のグルテン不耐症または関連する状態もしくは症状を調節する。

【0006】

低pHにおいて活性が高く、広範囲で活性を示す場合、特に、ネペンテシンは、胃でのグルテンタンパク質の消化に有用である。また、非毒性ペプチドへのグルテンの分解は、グルテンの解毒とも呼ぶ。

【課題を解決するための手段】

【0007】

一態様において、グルテン不耐症の患者においてグルテン不耐症を調節する方法であって、有効量のネペンテシンまたはその誘導体をその患者に投与することを含む方法が提供される。

【0008】

一実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、グルテン含有食物とネペンテシンまたはその誘導体を混合し、グルテン不耐症に関連する状態を調節または抑制する食品添加物として投与する。ネペンテシンまたはその誘導体は、単独でまたはそのような食物と組み合わせて使用することができる。

【0009】

他の態様において、患者のグルテン不耐症により引き起こされる状態を調節する方法であって、有効量のネペンテシンまたはその誘導体をその患者に投与することを含む方法が提供される。当該状態は例示に過ぎないが、セリアック病、小麦アレルギー、グルテン過

敏症、および／または疱疹状皮膚炎を含む。

【0010】

いずれの場合も、ネペンテシンまたはその誘導体は、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物を摂取する前、摂取と同時に、またはその直後に投与され得る。

【0011】

他の態様として、それを必要とする患者においてセリアック病、小麦アレルギー、グルテン過敏症、または疱疹状皮膚炎等のグルテン不耐症または関連する状態を調節する方法であって、患者が摂取する前に、有効量のネペンテシンで、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物を処理することを含む方法が提供される。

10

【0012】

他の態様として、ネペンテシンを含む食物または組成物が提供される。

【0013】

本発明の上記または他の態様を、以下の説明において詳説する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】 (A) P1またはN末端側の切断部位および (B) P1'またはC末端側の切断部位におけるネペンテシン切断選好性部位を示す図である。データを、アミノ型に応じて分類し、Hamuroらの「H/D交換適合条件における豚由来の固定化ペプシンの特異性 (Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions)」Rapid Communications in Mass Spectrometry 22 (7): 1041-1046 (2008) によるペプシンのデータを同様に表記したものと比較する。黒色の棒は、ネペンテシン消化を示し、灰色の棒は、ペプシン消化を示す。切断割合 (%) は、集合におけるある残基の総数に対する、ある残基で観察される切断数を表す。実施例に記載するように、6つの変性タンパク質の消化物からネペンテシンデータを得た。

20

【図2】 ドメイン型の種類に応じて配置された、XRCC4複合ペプチドの配列表を示す図である。4つの異なる酵素：基質比 (65:1~520:1、青色の棒) におけるペプシンの消化および4つの異なる酵素：基質比 (0.0075:1~0.38:1、赤色の棒) におけるネペンテシンの消化により、ペプチドを得た。

30

【図3】 C末端アミノ酸により分類された、ネペンテシン消化後に得られたペプチドの平均MASSCOITスコアを示す図である。各計算に使用したペプチド数は、棒の上部にあり、末端アミノ酸に関する。実施例に記載するように、6つの変性タンパク質よりペプチドを得た。

【図4】 酵素：基質比の範囲 (説明文に示す) に関する (A) ネペンテシンおよび (B) ペプシンにより消化されたXRCC4のペプチドイオンクロマトグラム (PIC) を示す図である。カラムに対して同一の質量の基質の添加をして酵素消化のPICを作製した。

【図5】 LC-MS/MSを用いて、小麦由来のグリアジンから、37℃で1分、5分、10分、15分、30分、60分、130分、360分または810分後に同定された全てのペプチドの平均長を示す図である。偽陽性同定を排除するため、スコアにおける信頼水準95%のカットオフ値 ($p < 0.05$) を使用した。ペプチド長の相対標準偏差を入れ子の図に示す。

40

【図6】 37℃で1分、5分、10分、15分、30分、60分、130分、360分または810分間の消化後にLC-MS/MSにより同定されたペプチド数を長さで分類し表示する図である。データは、図5に示すものと同様である。

【図7】 37℃で、10分、60分、120分、360分または810分間の消化後の特定の長さを得る確率として、図5に示すもの同一のデータを表示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

50

I. 定義

別段の規定のない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語および科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者が一般的に理解するものと同一の意味を有する。本発明の実施または検査のため、本明細書に記載されるものと同様または均等な方法および物質を使用可能であるが、好ましい方法、装置、および物質を以下に記載する。本明細書は、本明細書において引用される全ての技術刊行物および特許公報の全体を、参考として組み込む。本明細書のいかなる内容も、先行発明によって、本発明がそのような開示に先行することが認められていないことを承認したと解釈されるものではない。

【0016】

明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上、別段の指定のない限り、複数形を含む。

10

【0017】

本明細書において使用される場合、用語「含む (comprising)」は、他を除外することなく、組成物および方法が列挙された要素を含む意味を有することを意図している。組成物および方法を定義するため使用される場合の「本質的に〜からなる (Consisting essentially of)」は、本質的に組み合わせる意味のあるもの以外の他の要素を除外する意味を有するものとする。例えば、本明細書に定義される要素から本質的になる組成物は、特許請求の範囲に係る発明の基本的で新規な特徴に重大な影響を及ぼさない他の要素を除外しない。「からなる (Consisting of)」は、微量とは言えない他の配合成分および列挙された実質的な方法工程を除外する意味を有するものとする。これらの他動的用語 (transition term) により定義される実施形態は、本発明の範囲内にある。

20

【0018】

本明細書において使用される場合、用語「グルテン」は、通常、特定の個人に潜在的に悪影響をもたらす、小麦または大麦およびライ麦を含む近縁穀物にあるタンパク質を指す。グルテンタンパク質は、単量体タンパク質、およびジスルフィド結合により結合した高分子量および低分子量のサブユニットの集合体の非常に不均一な混合物である、 α -グリアジン類、 β -グリアジン類、 γ -グリアジン類および ω -グリアジン類等のグリアジン類を含む。多くの小麦グルテンタンパク質は、特徴が明らかにされている (例えば、Wo y c h i k らの「小麦グルテンのタンパク質のアミノ酸成分 (Amino Acid C o m p o s i t i o n o f P r o t e i n s i n W h e a t G l u t e n) 、 J . A g r i c . F o o d C h e m . , 9 (4) , 3 0 7 - 3 1 0 (1 9 6 1) 参照)。本明細書で使用される用語「グルテン」は、食物に含まれるグルテンからのグルテンタンパク質に由来し、免疫反応異常を生じさせる可能性があるオリゴペプチドをも含む。それらオリゴペプチドのうちいくつかは、通常の消化酵素に耐性がある。上述のタンパク質およびオリゴペプチドを含むグルテンは、グルテン不耐症患者のセリアック病のT細胞の抗原となると考えられている。

30

【0019】

用語「ネペンテシン」は、酵素番号 E C 3 . 4 . 2 3 . 1 2 のアスパラギン酸プロテアーゼを指し、全てのアイソフォームおよびネペンテシン I やネペンテシン II 等の様々なネペンテシンならびにこれらの塩を含む。塩としては、限定するものではないが、遊離ネペンテシンの生物学的効果および性質を維持し、かつ生物学的にまたはその他の意味において有害ではない、1つ以上の塩基または1つ以上の酸を有するネペンテシンにより形成されるそれらの塩を指す。無機塩基由来の塩は、ナトリウム塩類、カリウム塩類、リチウム塩類、カルシウム塩類、マグネシウム塩類、鉄塩類、亜鉛塩類、銅塩類、マンガン塩類、およびアルミニウム塩類等が挙げられる。有機塩基由来の塩としては、限定するものではないが、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサ

40

50

ミン、メチルグルカミン、テオブロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジン、およびポリアミン樹脂等の、第1級、第2級、および第3級アミンと、天然置換アミン、環状アミン、および塩基性イオン交換樹脂とを含む置換アミンが挙げられる。塩類を形成可能な酸としては、限定するものではないが、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、およびリン酸等の無機酸、および酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、P-トルエンスルホン酸、およびサリチル酸等の有機酸が挙げられる。

【0020】

ネペンテシン誘導体は、グルテン解毒能を保持する、生物学的等価物、断片、および伸長ネペンテシンならびにそれらの塩を含む。一部の実施形態において、ネペンテシン誘導体は、ネペンテシンの生物学的等価物を含む。「生物学的等価物」は、ネペンテシンと、少なくとも約80%の相同性および同一性、あるいは少なくとも約85%、あるいは少なくとも約90%、あるいは少なくとも約95%、あるいは少なくとも約98%の相同性を有するもの、またあるいは、所望の構造を維持し、タンパク質分解活性の少なくとも一部を呈しつつ、ストリンジェントな条件下でネペンテシンをコードするヌクレオチド配列またはその相補体をハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドまたはタンパク質を含む。

10

【0021】

一部の実施形態において、ネペンテシン誘導体は全ネペンテシンタンパク質のうち少なくとも約20個の連続するアミノ酸、または少なくとも約50個の連続するアミノ酸を有する、もしくは、100個以上の連続するアミノ酸を含むネペンテシン断片であり、それらは、最大値がネペンテシンの完全なタンパク質である。また、ネペンテシン誘導体は、付加配列を有するネペンテシンをも含む。

20

【0022】

一部の実施形態において、ネペンテシン誘導体は、少なくとも約10%のネペンテシンのタンパク質分解活性、または少なくとも約50%、少なくとも約70%、または少なくとも約90%のネペンテシンのタンパク質分解活性、もしくは、少なくとも100%以上のネペンテシンのタンパク質分解活性を有する。

【0023】

「ハイブリダイゼーション」は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行われてよいハイブリダイゼーション反応を指す。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーを高める条件は、周知であり、当該技術分野において（例えば、SambrookおよびRussell編（2001）「モレキュラークローニング：研究室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」第3版、参照）に公開されている。（ストリンジェンシーを高めるための）適切な条件の例としては、培養温度：25℃、37℃、50℃、および68℃、緩衝液濃度：10倍のSSC、6倍のSSC、1倍のSSC、0.1倍のSSC（SSCとは、0.15M NaClおよび15mM クエン酸緩衝液）、ならびに他の緩衝液系によるそれらの等価物、ホルムアミド濃度：0%、25%、50%、および75%、培養時間：5分～24時間および持続時間を増加させる、頻度を増加させる、または緩衝液濃度を減少させる洗浄などの条件が挙げられる。

30

【0024】

用語「調節する」または「調節」は、哺乳類等の対象における疾患または障害を治療することを意味し、

- ・疾患または障害を予防するまたは疾患または障害から保護すること、すなわち、異常な生物学的反応または症状を進行させないこと
- ・疾患または障害を抑制すること、すなわち、異常な生物学的反応および／または臨床状態の進行を阻止するまたは抑えること、および／または
- ・疾患または障害を軽減させること、すなわち、異常な生物学的反応および／または臨床

40

50

状態を元に戻すこと
を含む。

【0025】

本明細書において使用される場合、用語「予防」は、必要に応じた患者の予防的治療を指す。予防的治療は、疾病を患う危険のある対象に適切な用量の治療薬を与え、実質的に疾病の発症を免れることにより成すことができる。

【0026】

本明細書において使用される場合、用語「状態」は、本明細書に記載の化合物、組成物、および方法を使用している病態を指す。

【0027】

本明細書において使用される場合、用語「患者」または「対象」は、哺乳類を指し、ヒトおよびヒト以外の哺乳類を含む。本明細書の特定の実施形態において、患者または対象は、ヒトである。

【0028】

数値の前で使用される用語「約」は、値が、±5%、±1%、および±0.2%等の妥当な範囲内で変化してもよいことを示す。

【0029】

II. 方法および組成物

一態様において、グルテン不耐症の患者のグルテン不耐症を調節する方法であって、その患者に有効量のネペンテシンまたはその誘導体を投与することを含む方法を提供する。

【0030】

一実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、グルテン含有食物とネペンテシンまたはその誘導体を混合し、グルテン不耐症に関連する状態を調節または抑制する食品添加物として投与する。ネペンテシンまたはその誘導体は、単独でまたはそのような食物と組み合わせて使用することができる。

【0031】

他の態様において、患者のグルテン不耐症により引き起こされる状態を調節する方法であって、有効量のネペンテシンまたはその誘導体をその患者に投与することを含む方法が提供される。当該状態としては、例示に過ぎないが、セリアック病、小麦アレルギー、グルテン過敏症、および／または疱疹状皮膚炎が挙げられる。ネペンテシンまたはその誘導体は、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物を摂取する前、摂取と同時に、またはその直後に投与され得る。

【0032】

ネペンテシンには、ネペンテシン I（2つの変異ネペンテシン Ia およびネペンテシン Ib があることが既知である）および II という既知な 2つのアイソフォームがある。ネペンテシンの配列およびネペンテシンをコードする cDNA のヌクレオチド配列は、当該技術分野において既知であり、例えば Athauda SB による「ネペンテシンの酵素的および構造的解析、アスパラギン酸プロテイナーゼの新規なサブファミリーの特異な種 (Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases)」, Biochem. J. 381:295-306 (2004) に記載される。

【0033】

ネペンテシンは、ウツボカズラ属等の植物の囊状葉の分泌液等の天然源から、濾過または固定化ペプスタチンに基いたアフィニティー精製等の既知の方法により濃縮または精製することができる。植物源から単離される他、ネペンテシンまたはその誘導体は、当該技術分野において既知な従来の方法を用いて、化学合成または生合成により調製され得る。化学合成は、ネペンテシンの配列に応じたアミノ酸のカップリングにより成され得る。様々なペプチドカップリング法、および例えばアプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems, Inc. カリフォルニア州フォスターシティ)、ベックマ

10

20

30

40

50

ン (Beckman) や他のメーカー製の自動合成装置などの市販のペプチド合成装置を利用可能である。ネペンテシンの生合成は、既知の生物工学技術を用いて、ネペンテシンのDNAおよび／またはメッセンジャーRNAを用いて細胞を転写し、細胞のネペンテシン生成を可能にすることにより、組み換え合成システムを利用し、成され得る。例えば、ネペンテシンは、大腸菌 (*Escherichia coli*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア酵母 (*Pichia pastoris*)、ラクトバチルス、バチルス (*Bacilli*)、アスペルギルス (*Aspergilli*)、およびタバコ細胞等の植物細胞の培養などの生命体の宿主—ベクター系を確立することにより生成することができる。

【0034】

合成ネペンテシンまたはその誘導体は、植物の囊状葉液から、ネペンテシンまたはその誘導体を単離するためのもの等、既知の方法に従い、濃縮または生成することができる。

【0035】

一部の実施形態において、天然源または合成源から単離されたタンパク質産物は、少なくとも20重量%のネペンテシンまたはその誘導体を含む。一部の実施形態において、単離されたタンパク質産物は、少なくとも約50重量%、約75重量%、約90重量%、約95重量%のネペンテシンまたはその誘導体を含む。一部の実施形態において、単離されたタンパク質産物は、少なくとも99重量%のネペンテシンまたはその誘導体を含む。

【0036】

一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物を患者が摂取する前に、患者に投与される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、ネペンテシンまたはその誘導体に、少なくとも部分的に患者が摂取する食物中のグルテンを分解する効果がある（例えば、本来の活性のうち少なくとも約10%、20%、50%、70%、90%）期間内に投与される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、患者が食物を摂取する前の約4時間、3時間、2時間、1時間または30分以内に投与される。

【0037】

一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物を摂取すると同時に患者に投与される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、成分または食物への添加剤等、食物と共に投与される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、食物とは別に投与される。

【0038】

一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物を患者が摂取した直後に患者に投与される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、食物中のグルテンの少なくとも一部（例えば、少なくとも約10%、20%、50%、70%、90%）が、患者の胃にまだ残っている期間内に投与される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、患者が食物を摂取した後の4時間、3時間、2時間、1時間または30分以内に投与される。

【0039】

ネペンテシンまたはその誘導体は、様々な組成物のみで、または適切な、薬学的に許容可能な担体または希釈剤または食品成分とともに投与することができる。

【0040】

従って、別の態様において、ネペンテシンまたはその誘導体を含む食用の組成物が本明細書にて提供される。一部の実施形態において、組成物は、栄養補助食品である。一部の実施形態において、組成物は、医薬組成物である。一部の実施形態において、組成物は、食品または食品添加物である。組成物は、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、液剤、注射剤、ゲル剤、およびミクロスフェア等の固体、半固体、または液体状に製剤され得る。ネペンテシンまたはその誘導体の投与は、例えば、経口投与など様々な方法で成される。

10

20

30

40

50

【0041】

経口投与では、ネペンテシンまたはその誘導体は、単独で、または錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、液剤、懸濁剤などを形成する適切な添加剤と組み合わせて使用することができる。例えば、ネペンテシンまたはその誘導体の固体経口剤形は、従来の添加剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤および香味剤を用いて調製され得る。賦形剤の非限定例としては、ラクトース、マンニトール、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、結晶セルロース、セルロース誘導体、アカシア、コーンスターチ、カルボキシメチルセルロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、香料および色素が挙げられる。一部の実施形態において、製剤は、患者の胃で、ネペンテシンまたはその誘導体を放出し、ネペンテシンまたはその誘導体により、グルテンを分解することができる。

10

【0042】

ネペンテシンまたはその誘導体は、任意に、適切な緩衝液（例えばリン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン、イミダゾール緩衝液）および賦形剤（例えば、スクロース、ラクトース、トレハロースなどの凍結保護剤）の存在下で、水溶液から凍結乾燥することができる。凍結乾燥された塊は、任意に、賦形剤と混合され、異なる形状を形成することができる。

【0043】

一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、小麦、ライ麦、および大麦等から作られたパン、パスタ、およびシリアル等のグルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物と共に、食品添加物として投与される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、そのような食物の成分として添加される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、任意に、約pH 5以上等の不活性なpHで、摂取前の食物に分散される。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、患者による食物の摂取中にグルテンを含有する食物に適用可能な粉末、スプレッド、スプレー、ソース、ディップ、ホイップクリーム等として作製またはそれらに取り込まれ得る。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、キャンディー、チューインガム、咀嚼する栄養補助食品、シロップ等の容易に投与するため、個人の食欲に訴える形状にすることができる。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、砂糖、塩、サラダドレッシング、スパイス、チーズ、バター、マーガリン、揚げ用ショートニング、マヨネーズ、乳製品、ナッツバター、シードバター、カーネルバター、ピーナッツバター等の一般的な食料品に混ぜることができる。好ましくは、ネペンテシンを含む食料品または添加剤は、温度上昇によりネペンテシンまたはその誘導体の活性の損失の可能性を最小限に止めるため、患者に摂取される前の熱処理を不要とする。

20

30

【0044】

通常、ネペンテシンまたはその誘導体は、所望なグルテン分解効果を生じるために安全かつ十分な量投与される。正確な量は、投与されるネペンテシンまたはその誘導体の特徴、および食物の種類や量、患者のグルテンに対する感受性等、多くの要因に依存する。一般的に、ネペンテシンまたはその誘導体は、患者がグルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物を摂取する予定がある、摂取している、または摂取した時など、必要な時に投与される。平均的な人で、1日につき、約0.01mg～約1000mg/kg（体重）、または、1回につき、約1mg～約100gの投与量で投与することができる。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、1日に、0.01、0.1、1、5、10、50、100、500、または1000mg/kg（体重）およびそれらの値のうち任意の2つ間の範囲（終点を含む）で投与することができる。一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、1回につき、1mg、10mg、100mg、200mg、500mg、700mg、1g、10g、20g、50g、70g、100g、およびそれらの値のうち任意の2つの間の範囲（終点を含む）で投与することができる。一部の実施形態において、患者がグルテンを含有する食物を摂取する回数に応じて、日に、1回、2回、3回等投与され得る。

40

50

【0045】

一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、胃のプロテアーゼ（例えば、ペプシンおよびペプシノゲン）など別の酵素、Chenらの「米のアスパラギン酸プロテアーゼの遺伝子ファミリー：遺伝子構造および発現、予想されるタンパク質の機能と系統発生の関係（Aspartic proteases gene family in rice: Gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation）」Gene 442:108-118（2009）に記載されるもの等、別のアスパラギン酸プロテアーゼ、およびプロピルエンドペプチダーゼ（PEP）、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP IV）、およびジペプチジルカルボキシペプチダーゼ（DCP）または米国特許第7,910,541号に記載のシステインプロテイナーゼB等の酵素と共に投与される。

10

【0046】

一部の実施形態において、ネペンテシンは、別の薬剤と共に患者に投与される。ネペンテシンと共に投与することができる薬剤の非限定の例としては、組織トランスグルタミナーゼの阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤（例えば、コンパクチン、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチンおよびアトルバスタチン）、ロイコトリエン受容体アンタゴニスト（例えば、モンテルカストおよびザフィルルカスト）、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブおよびロフェコキシブ）、p38MAPキナーゼ阻害剤（例えば、BIRB-796）等の抗炎症剤、クロモグリケート酸ナトリウム（クロモリン）、ペミロラスト、プロキシクロミル、レピリナスト、ドキサントラゾール、アンレキサノクス、ネドクロミルおよびプロビクロミル等の肥満細胞安定化剤、抗潰瘍剤、抗ヒスタミン剤（例えば、アクリバスタチン、セチリジン、デスロラタジン、エバスタチン、フェキソフェナジン、レボセチリジン、ロラタジンおよびミゾラスチン）等の抗アレルギー剤、トランスグルタミナーゼ2（TG2）の阻害剤、および抗TNF α 剤が挙げられる。

20

【0047】

別の態様において、それを必要とする患者において、セリアック病、小麦アレルギー、グルテン過敏症、および疱疹状皮膚炎等のグルテン不耐症または関連する状態を治療する方法であって、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある食物を、患者が摂取する前に有効量のネペンテシンまたはその誘導体で処理することを含む方法が提供される。一部の実施形態において、食物を、有効量のネペンテシンまたはその誘導体と、その調製中、好ましくは、加熱工程の後に、混合する。

30

【0048】

別の態様において、ネペンテシンまたはその誘導体を含む食料製品が提供される。一部の実施形態において、食料製品は、小麦、ライ麦、および大麦から作られたベーカリー製品（例えば、ケーキ、マフィン、ドーナツ、ペストリー、ロールパン、およびパン）、パスタ、クラッカー、トルティーヤチップス、シリアル等、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のあるものである。一部の実施形態において、食料製品は、グルテンを含有するかまたはグルテンを含有する可能性のある別の食物と共に摂取することができる。そのような食物の非限定の例としては、粉末、スプレッド、スプレー、ソース、ディップ、ホイップクリーム、キャンディー、チューインガム、シロップ、砂糖、塩、サラダドレッシング、スパイス、チーズ、バター、マーガリン、スプレッド、バター、揚げ用ショートニング、マヨネーズ、乳製品、ナッツバター、シードバター、カーネルバター、ピーナッツバターなどが挙げられる。

40

【0049】

一部の実施形態において、ネペンテシンまたはその誘導体は、食物と混合されるか、またはグルテンを含有する食材を前処理するために使用される。食物中のネペンテシンは、摂取前または摂取中に、食物中のグルテンの濃度を減少させる酵素的活性があり得る。

【0050】

I I I . 実施例

50

別段の記述がない限り、明細書全体を通して使用される略語は、以下の意味を有する。

【表 1】

g	=	グラム	
kDa	=	キロダルトン	
kg	=	キログラム	
L	=	リットル	
LC	=	液体クロマトグラフィー	
mg	=	ミリグラム	
min	=	分	10
mL	=	ミリリットル	
mM	=	ミリモル	
MS	=	質量分析	
nM	=	ナノモル	
pM	=	ピコモル	
s.d.	=	標準偏差	
μCi	=	マイクロキュリー	
μL	=	マイクロリットル	
μM	=	マイクロモル	
μm	=	マイクロメートル	20
°C	=	セルシウス度	

【0051】

これら 1 文字の記号は、アミノ酸を表す場合、以下の意味を有する。

【表 2】

A	=	アラニン	
R	=	アルギニン	
N	=	アスパラギン	
D	=	アスパラギン酸	30
C	=	システイン	
E	=	グルタミン酸	
Q	=	グルタミン	
G	=	グリシン	
H	=	ヒスチジン	
I	=	イソロイシン	
L	=	ロイシン	
K	=	リシン	
M	=	メチオニン	
F	=	フェニルアラニン	40
P	=	プロリン	
S	=	セリン	
T	=	トレオニン	
W	=	トリプトファン	
Y	=	チロシン	
V	=	バリン	

【0052】

材料および方法

化学品

水およびアセトニトリル、HPLCグレード形態のBurdick & JacksonをVWR社から購入した。ギ酸、トリス、グリシンは、Sigma Aldrich社から購入した。

【0053】

植物培養

Nepenthes rafflesiana、*Nepenthes ampullaria*、*Nepenthes mirabilis*、および*Nepenthes globosa*の移植体をKeehns Carnivores社 (<http://www.keehnscarnivores.ca>) から購入した。これらを、木の樹皮、パーライト、ピートモス及び腐植（それぞれ40、35、10、5%）で鉢植した。成長条件としては、1日につき14時間光を当て、湿度80%、23～28℃の温度で、週に2～3回水やりをした。嚢状葉の成熟に際し、植物に、嚢状葉毎に1匹または2匹のショウジョウバエを与え、1週間後に嚢状葉の液体を採取した。嚢状葉とその分泌液を、第2段階の給餌および抽出前の一週間、回復させた。

10

【0054】

液体調製

嚢状葉液を全4種の植物から回収し、混合した。まず、粗嚢状葉液を0.22 μmフィルターを通して、精製し、その後、アミコンウルトラ遠心10 kDa分子量カットオフフィルターを使用して80～100倍に濃縮した（共に、Millipore社製）。消化で使用する前に、濃縮物を100 mMグリシンHCl (pH 2.5) を用いて酸で3時間活性化し、その後、洗浄ごとに10倍の液体を使用して、濾過装置において、100 mMグリシン-HCl (pH 2.5) で3回洗浄した。その後、最終単離物を嚢状葉液の元のサンプルに基づき、11倍の濃縮物に再び希釈した。

20

【0055】

質量分析によるネペンテシン消化のマッピング

水素／重水素交換 (HDX) 用途用に設計されたLEAP HTX-PALオートサンプラーおよびディスペンスシステムを使用し、タンパク質の消化を行い、データをAB Sciex Triple-TOF 5600 Qq TOF質量分析計で収集した。MS/MSデータからMascot (v2.3) を用いて、ペプチドを同定した。つまり、8 μLの8 μM タンパク質 (XRCC4、XLF、リガーゼ IV-タンデムBRC Tドメイン、PNK、ミオグロビン、またはシトクロムC) を10 μLの11倍濃縮液体と、10℃で2分間混合した。ミオグロビンおよびシトクロムCは、Sigma社から購入した。1 μMの基質濃度に希釈後、15 μLを質量分析計に接続された冷却逆相LCシステム (4℃) に注入した。ペプチドを5 cmの200 μm i.d. Onyx C18 モノリス型カラム (Phenomenex社) で捕捉し、3%～40%のアセトニトリル勾配で10分間溶出させた。これら分析で検出されたペプチドを、気相分取法 (gas-phase fractionation strategy) に似た、MS/MSスペクトルの複数の情報依存性取得におけるCID断片化のため選択した。Blonder Jら、「質量分析法による、気相分取を用いたナチュラルキラー細胞ミクロソームのプロテオミクス研究 (Proteomic investigation of natural killer cell microsomes using gas-phase fractionation by mass spectrometry) Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1698 (1): 87-95 (2004)」。スペクトルを全6つのタンパク質の配列を保存している小規模データベースで探索した。配列結果を手動で確認した。

30

40

【0056】

DNA損傷修復に関連する複合体のHD交換

BRC Tを含むXRCC4 (1-200) およびBRC Tを含むXRCC4 (完全長)

50

の保存溶液を緩衝液（10 mN トリス-HCl、pH 7.5）で等モル濃度（10 mM）まで希釈し、4℃で少なくとも30分間培養し、錯体形成を促進させた。試料をHDX分析まで4℃に維持した。D₂O（25% v/v）を添加しつつ、アリコートで20℃で2分間、重水素化した。その後、アリコートを2の方法で消化した。第1の消化法において、タンパク質の重水素化物を試料に100 mMの冷グリシン-HCl（pH 2.5）を添加することにより急冷し、急冷タンパク質溶液をペプシンマイクロリアクターに注入した。このマイクロリアクターを注入バルブとC18カラムの間のHTX-PALシステムに搭載した。タンパク質消化物を、モノリス型C18キャピラリーカラムで捉え、質量分析計に溶出させた。マイクロリアクターを含む全液体要素を4℃で冷やし、分析時間（< 15分）重水素化の逆交換を最小限とした。第2の消化法において、等量の重水素化タンパク質を急冷し、同時に、3 μLまたは5 μLの11倍ネペンテス液で、それぞれ3または5分間、10℃で消化させた。試料を質量分析計に接続された冷却LCシステムに注入した。

10

【0057】

反復質量シフト計測をし（4回以上）、タンパク質の状態（遊離XRCC4（1-200）、遊離XRCC4（完全長）および遊離LigIV-BRCT）を制御するために参照した。各ペプチドの平均重水素化レベルを、Hydra v1.5. Slys G Wらの、「Hydra: MSまたはタンデムMS分析からのH/D交換データの目的に合わせた処理を行うソフトウェア（Hydra: software for tailored processing of H/D exchange data from MS or tandem MS analyses）」Bmc Bioinformatics 10（2009）の改訂版である、Mass Spec Studio（投稿準備中）を用いて決定した。（a）各状態の分析から保存された標準偏差を使用し、両側t検定（p<0.05）を通過した場合、（b）スペクトルの重複を防ぐ分布分析を通過した場合、および（c）シフトノイズの計測に基づき、シフト閾値（±2標準偏差）を超える場合、かつその正規分布は、Bennett MJら「質量シフトの摂動マッピングによるラウリマライドー微小管の結合方式の発見と特性（Discovery and Characterization of the Laulimalide-Microtubule Binding Mode by Mass Shift Perturbation Mapping）」Chemistry & Biology 17（7）：725-734（2010）とした場合、質量シフトの摂動は有意であると
考えられる。

20

30

【0058】

結果

囊状葉液の抽出

囊状葉植物の分泌液を濃縮し、消化酵素をpHを低下（pH 2.5）させることにより、活性化させた。濃縮工程およびプロテオーム液による活性化による影響をプロテオミクス法を用いて決定した。まず、ネペンテシン酵素の存在を確認するため、非活性な濃縮物をSDS-PAGEにより分離した。ごくわずかにクマシー染色された7つの連続したゲル領域をトリプシンで消化し、標準的な方法を用いてナノLC-MS/MSで分析した。活性化したプロテアーゼ液の完全なカタログとなることを期待してはいないが、分析により、植物由来のアスパラギン酸プロテアーゼ ネペンテシンI/IIの存在に加え、グルカナーゼ、キチナーゼ、カルボキシペプチダーゼおよびペルオキシダーゼ、さらにはわずかなレベルのショウジョウバエおよび細菌汚染を確認した。プロテオーム液の複雑性の低さは、細菌の分析、Hatano N、Hamada T（2012）の「食虫植物Nepenthes alataの囊状葉液の餌動物の成分により導かれる分泌タンパク質のプロテオーム解析（Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant Nepenthes alata）」Journal of Proteomics

40

50

3 ; 7 5 (1 5) : 4 8 4 4 - 5 2 (E p u b J u n . 1 5 , 2 0 1 2) と一致したが、この分析において、ネペンテシン-I が、幅広い質量範囲 (4 0 ~ 7 0 k D a) に分布していることが分かった。その後、酸化活性化液体を同様の様式で処理し、分析した。活性化工程により、全タンパク質収量が減少し、組成物の簡略化が見られた。ネペンテシン-I とは別に、ケラチンとアクチンからのみわずかな汚染が見られた。これら分析は、ネペンテシンが主成分である濃液体の複雑さの低さを示す。活性化および 8 0 倍に濃縮した液体の総タンパク質濃度は、BCA アッセイにより計測により、 $22 \text{ ng} / \mu \text{L}$ であった。この値は、液体の濃縮について記述する以前の研究 (Tokes Z A ら「食虫植物 *Nepenthes-Macfarlanei-L* により分泌される消化酵素 (Digestive Enzymes Secreted by Carnivorous Plant *Nepenthes-Macfarlanei-L*) 」 *Planta* 1 1 9 (1) : 3 9 - 4 6 (1 9 7 4)) と一致した。

10

【0059】

一連のタンパク質を HDX-MS 実験に適した条件下で、濃縮した液体で消化した。濃縮物の消化特異性の特徴を、ペプシンでの同様の研究 (Hamuro Y ら「H/D 交換に互換性のある条件における固定化ブタペプシンの特異性 (Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions) 」 *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2 2 (7) : 1 0 4 1 - 1 0 4 6 (2 0 0 8) 」との比較をサポートするために、位置 P 1 および P 1 ' (図 1) において示す。いくつかの混入したタンパク質が明らかに存在していたとしても、濃縮液体中の計測されたタンパク質の全てがネペンテシンであると仮定して、本実施例において、酵素-基質比は、1 : 8 5 である。

20

【0060】

ネペンテシンデータは、1 6 1 2 残基の評価を表し、対応するペプシンデータ (1 3 , 7 6 6 残基) のように広範囲ではないが、配列の多様性は、位置 P 1 および P 1 ' のレベルでの比較を保証するために設定されたタンパク質において著しく高い。ペプシンの秀でた特異性が位置 P 1 に現れている。これは、P、H、K および R の後ろで切断することが基本的にありえないが、疎水性残基 F、L、および M の高効率な切断を表している。ネペンテシンは、G、S、T、V、I および W を除いて、多くの残基の後ろを切断する。それは、予想されるペプシン P 1 残基の後ろだけでなく、ペプシン消化においてありえない残基、特に K、R、および P における高確率な切断をサポートする。位置 P 1 ' において、ペプシンは、一般的に芳香族の任意の残基を含む疎水性残基を選好することを示す。逆に、ネペンテシンは、恐らく G、P および H に対してを除き、位置 P 1 ' における選択性について、より低いことを示す。全体として、ネペンテシンは、ペプシンに対し、位置 P 1 における、著しく緩い特異性を示し、非常に高効率な指標を提供する。

30

【0061】

緩い特異性が HDX-MS 用途用の配列マッピングの改善につながるかどうかを決定するため、完全長 XRCC 4 (球状ドメインおよび拡張ヘリカルストークおよび長く不規則な C 末端を含むタンパク質) を精製した。Hammel M ら「XRCC 4 リガーゼ IV 複合体の XLF 調節フィラメントアーキテクチャ (Regulates Filament Architecture of the XRCC 4 . Ligase IV Complex) 」 *Structure* 1 8 (1 1) : 1 4 3 1 - 1 4 4 2 (2 0 1 0) 、および Junop MS ら「Xrcc 4 DNA 修復タンパク質の結晶構造および末端結合の影響 (Crystal structure of the Xrcc 4 DNA repair protein and implications for end joining) 」 *Embo J* 1 9 (2 2) : 5 9 6 2 - 5 9 7 0 (2 0 0 0) 。そのようなマルチドメインタンパク質を、単一の消化プロトコルに含ませることは困難であり、特に天然変性領域は、ペプシンでの消化が乏しい傾向があり、それらは、比較的、疎水性残基が枯渇し、プロリンに濃縮され、残基が荷電されるためである。Dunker

40

50

AKら「天然変性タンパク質 (Intrinsically disordered protein)」Journal of Molecular Graphics & Modelling 19 (1) : 26-59 (2001)。このタンパク質のペプシンおよびネペンテシンマップを図2に示す。この比較において、異なるプロテアーゼ量および再帰MS/MS実験を用いた、両酵素の徹底的なマッピングを進めた。ネペンテシンは、完全長のタンパク質のカバレッジに優れ、ペプシンが187に対し、ネペンテシンは、357個のペプチドである(11個の残基の平均ペプチド長は、両酵素において同一である)。両酵素は、多くの数の重複ペプチドがある球状およびストーク領域を表すが、ネペンテシンにより提供される相補性は明らかである。例えば、ネペンテシンは、球状ドメイン(残基1~30)のβシート領域の非常に大幅なカバレッジを提供する。変性C末端領域は、はるかに大きい範囲および非常に高い冗長性に及ぶ。この変性テール領域の各残基は、ネペンテシンを用いて、16倍のカバレッジおよびペプシンで4.7倍のカバレッジを受ける。

【0062】

ペプチド検出のバイアスの存在は、メトリックで平均検索スコアを選択することにより探索される(図3)。このアプローチは、配列マップが定義される原理手段として配列同定の信頼性を強調する。本発明者らがトリプシン系ボトムアッププロテオミクスからわかるものと同一の、1つの異常値はRである。Rで終結するペプチドの高いスコアは、高い平均ペプチド強度と優れた断片化の組み合わせを表していると考えられる。Warwood Sら「定性的および定量的プロテオミクスのグアニジン化学 (Guanidination chemistry for qualitative and quantitative proteomics)」Rapid Communications in Mass Spectrometry 20 (21) : 3245-3256 (2006)。

【0063】

酵素効率をより詳細に試験した。単に、酸素・基質比を変えることによりペプチド質量マップを変化させ得るまたは調節し得る度合を図4に示す。溶液中の消化のため、ネペンテシン添加を50倍の範囲にわたって変化させた。ペプシンの実験では、過度のペプシン自己分解を避けるため、遊離ペプシンではなく、スラリー形式の固定化ペプシンを使用した。酵素添加を8倍の範囲にわたって変化させた。量が少なければ、ペプチド強度に乏しく、量を多くすると、マップの自己分解への影響はなかった。ネペンテシンは、より多い添加においてでさえ非常に低い自己消化を生じることを見出した。効果的な消化を計測するため、集合ペプチドのイオンクロマトグラム(PIC)を使用した。520:1(ペプシン:基質)で見られた分布との比較的類似した分布と0.38:1(ネペンテシン:基質)との比較は、HDXのような用途において、ネペンテシンの効果がペプシンを超えて、顕著な1400倍の改善を表すことが分かった。

【0064】

ネペンテシン消化は、酵素添加を変化させ、XRC4の可変的な提示を作成することにより、大きな断片を小さくより容易に変化させることができた。これは、PICが、高添加での短い保持時間から低添加での長い保持期間に変化したことから、図4Aにおいて証明された。この変化は、低酵素添加時の>12から、高酵素添加時の10に変わる、最も多いときのペプチドの平均ペプチド長に関する。逆に、可変のペプシン添加は、PICまたは平均ペプチド長を著しく変化させることはなかった(図4B)。強制流ペプシンマイクロリアクターは、進歩しているが、より小さな断片を生じさせないようであった。

【0065】

ネペンテシンによるグリアジンの消化

ネペンテシンによりグリアジンの消化を水素/重水素交換(HDX)用途用に設計されたLEAP HTX-PALオートサンプラーおよびディスペンスシステムを用いて、溶液中で実行した。データをAB Sciex Triple-TOF 5600 QqTOF 質量分析計を用いて収集した。ペプチドをMS/MSデータからMascot (

10

20

30

40

50

v 2. 3) を用いて同定した。簡潔に説明すると、12 pmol の粗グリアジン (Sigma Aldrich 社から購入) を、2 μ L の100倍濃縮液体と混合した。消化後、全容量を質量分析計に接続された逆相 LC システムに注入した。ペプチドを7 cm の150 μ m i. d. Magic C18 カラムで捕捉し、10分または30分、10%~40% のアセトニトリル勾配で溶出した。これら分析で検出されたペプチドを、MS/MS スペクトルの複数の情報依存性取得方式におけるCID断片化のため選択した。スペクトルを、全ての同定された小麦グリアジン (α 、 β 、 γ 、 ω) タンパク質、さらに低高分子量のグルテニンの配列を含有する小型のデータベースで探索した。図5は、37℃で1分、5分、10分、15分、30分、60分、130分、360分または810分後、LC-MS/MSを用いて、小麦からのグリアジンのネペンテシン消化物から同定された全てのペプチドの平均長を示す。偽陽性同定を排除するため、スコアにおける信頼水準95%のカットオフ値を使用した。ペプチド長の相対標準偏差を入れ子の図に示す。

【0066】

図6は、37℃で1分、5分、10分、15分、30分、60分、130分、360分または810分間の消化後のLC-MS/MSにより同定されたペプチド数を示す。データは、図5と同じである。

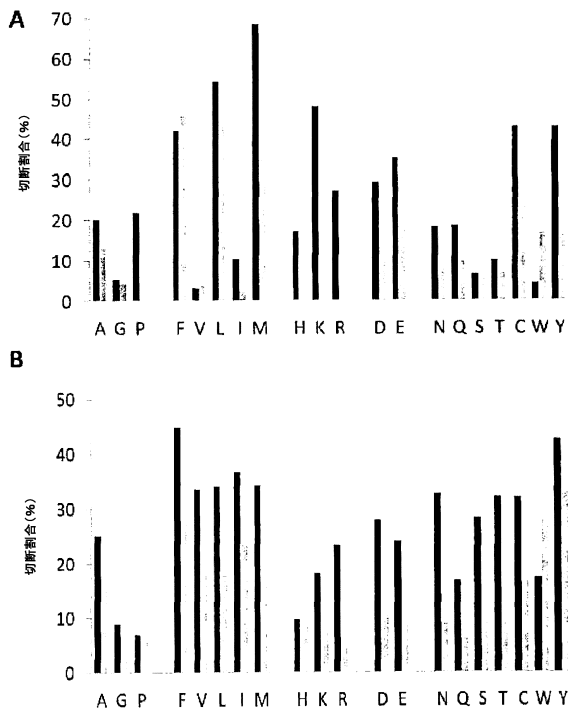
【0067】

図7は、37℃で10分、60分、120分、360分または810分間の消化後の特定の長さを得る確率として、図5と同一のデータを示す。

【0068】

明確な理解のため、説明および実施例によって、上記をいくらか詳細に記載したが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲内で特定の変更および改変を実施してもよいことを理解するであろう。また、本明細書に記載の引用文献は、各引用文献が参照により個別に援用される場合と同程度に、その全体が参照により援用される。

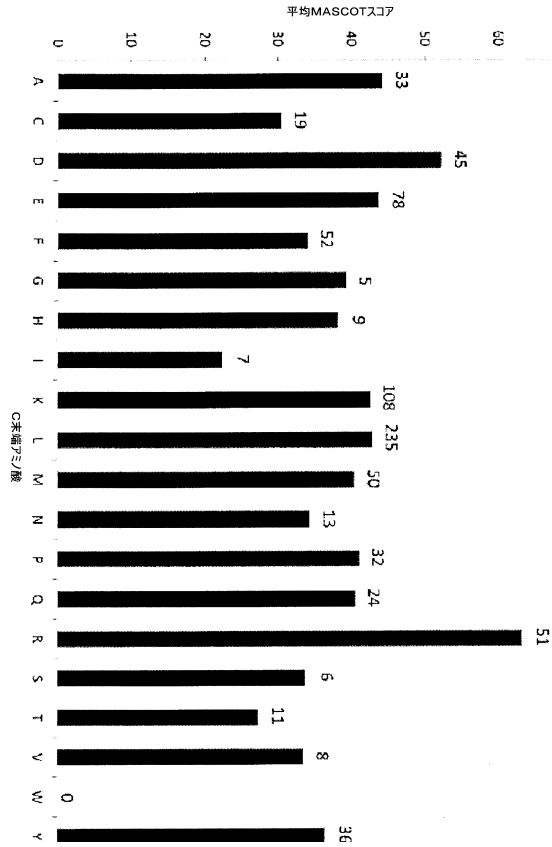
【図1】



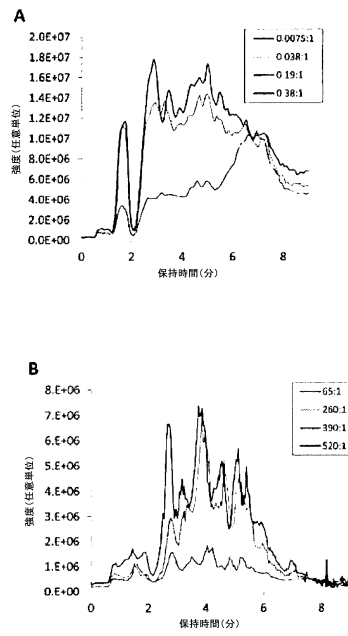
【図2】



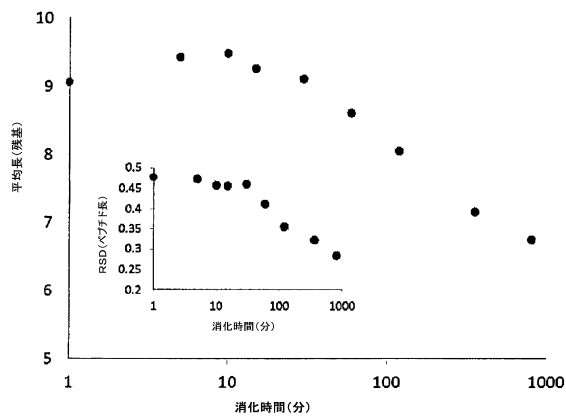
【図 3】



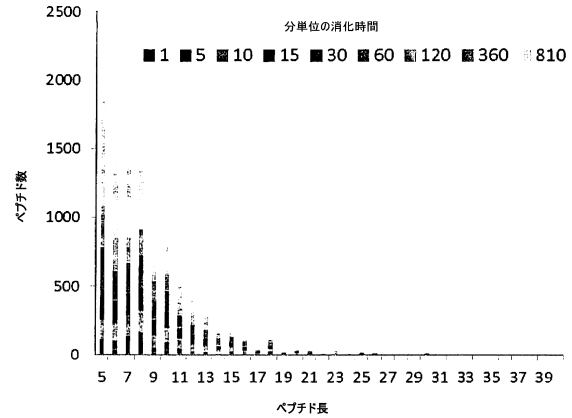
【図 4】



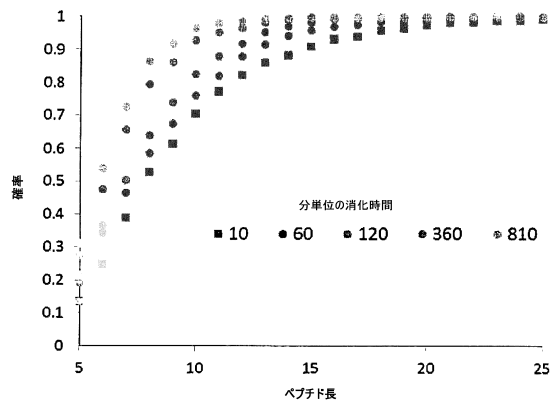
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(72)発明者 レイ, マーシャル

カナダ国, アルバータ州 ティー２ケー ４ジェー１, カルガリー, ５１５ ハンツ クレセント
エヌダブリュー

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 特開２００４－２４８６５４（ＪＰ，Ａ）

特表平０８－５１２２０１（ＪＰ，Ａ）

特開平１１－０４９６９７（ＪＰ，Ａ）

ATHAUDA, S.B.P. et al., "Enzymatic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases", Biochem. J., 2004年 7月 1日, Vol.381, No.1, p.295-306, ISSN 0264-6021

KUBOTA, K. et al., "Stability Profiles of Nepenthesin in Urea and Guanidine Hydrochloride: Comparison with Porcine Pepsin A", Biosci. Biotechnol. Biochem., 2010年, Vol. 74, No.11, p.2323-2326, ISSN 0916-8451

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00-38/58

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)