

(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2015-504675

(P2015-504675A)

(43) 公表日 平成27年2月16日 (2015. 2. 16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
C O 7 K 1/22 (2006. 01)	C O 7 K 1/22	4 B O 6 5
C O 7 K 19/00 (2006. 01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 4
C 1 2 N 9/99 (2006. 01)	C 1 2 N 9/99	4 H O 4 5
C O 7 K 16/00 (2006. 01)	C O 7 K 16/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-552305 (P2014-552305)	(71) 出願人	308032460
(86) (22) 出願日	平成25年1月10日 (2013. 1. 10)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月31日 (2014. 7. 31)		ティ オブ コロラド, ア ボディー コ
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/021057		ーポレイト
(87) 国際公開番号	W02013/106589		THE REGENTS OF THE
(87) 国際公開日	平成25年7月18日 (2013. 7. 18)		UNIVERSITY OF COLOR
(31) 優先権主張番号	61/585, 182		ADO, a body corporat
(32) 優先日	平成24年1月10日 (2012. 1. 10)		e
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 コロラド 80203,
(31) 優先権主張番号	61/586, 038		デンバー, グラント ストリート 1
(32) 優先日	平成24年1月12日 (2012. 1. 12)		800, 8ティーエイチ フロアー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/614, 391		
(32) 優先日	平成24年3月22日 (2012. 3. 22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アルファー 1 アンチトリプシン融合分子の組成物、方法、及び使用

(57) 【要約】

アルファ - 1 アンチトリプシン (A A T) 融合分子又はそのペプチド誘導体の組成物並びにそれを製作及び使用するため方法が開示されている。組成物及び方法は、薬学的に許容される組成物に使用される A A T 融合分子を生成して、A A T 療法又は治療を必要とする対象体を治療することに関する。本明細書に開示された組成物及び方法は、A A T 又はその誘導体を免疫断片に結合させることに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アルファ - 1 アンチトリプシン (A A T) 又はその断片若しくはペプチド切断分子をコードする核酸、及び

免疫断片又はそれ自体に結合可能な断片をコードし、前記免疫断片のヒンジ領域を切断又は除去するために更に操作されている核酸を含む構築体。

【請求項 2】

A A T をコードする核酸が、天然 A A T (配列番号 1) をコードする核酸を含む、請求項 1 に記載の構築体。

10

【請求項 3】

A A T ペプチド切断分子をコードする核酸が、天然 A A T の 1 つ又は複数のカルボキシ末端断片をコードする核酸を含む、請求項 1 に記載の構築体。

【請求項 4】

前記カルボキシ末端断片が、配列番号 1 の最後の 80 個のアミノ酸、又はその 10 個以上連続するアミノ酸を含む、請求項 3 に記載の構築体。

【請求項 5】

前記カルボキシ末端断片が、配列番号 1 の最後の 36 個のアミノ酸 (配列番号 34) を含む、請求項 3 に記載の構築体。

【請求項 6】

M 型 A A T を含む、請求項 1 に記載の構築体。

20

【請求項 7】

前記免疫断片が、F c を含む、請求項 1 に記載の構築体。

【請求項 8】

前記免疫断片が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4 に由来する F c 断片をコードする核酸を含む、請求項 1 に記載の構築体。

【請求項 9】

前記 F c 断片のヒンジ領域をコードする核酸が、切断又は欠失されている、請求項 8 に記載の構築体。

【請求項 10】

前記 F c 断片をコードする核酸が、配列番号 49、配列番号 56、配列番号 57、又は配列番号 58 のアミノ酸配列をコードする、請求項 9 に記載の構築体。

30

【請求項 11】

前記構築体が、A A T の N 末端に前記免疫断片を結合させることにより形成される、請求項 1 に記載の構築体。

【請求項 12】

前記構築体が、A A T の C 末端に前記免疫断片を結合させることにより形成される、請求項 1 に記載の構築体。

【請求項 13】

A A T をコードする核酸が、反応中心ループ (R C L) に突然変異を有する突然変異 A A T をコードする核酸を含む、請求項 1 に記載の構築体。

40

【請求項 14】

融合タンパク質であって、前記タンパク質のアミノ末端から始まり、(i) アルファ - 1 アンチトリプシン又はそのカルボキシ末端断片、(i i) ペプチドリンカー、及び (i i i) 欠失又は切断されたヒンジ領域を有する F c 免疫断片に存在する連続したアミノ酸に対応する連続したアミノ酸を含み、(i) の連続したアミノ酸が、精製時に (i i i) と結合したままである融合タンパク質。

【請求項 15】

前記 F c 免疫断片が、I g G 1 断片を含む、請求項 14 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

50

前記 F c 免疫断片が、I g G 2 断片を含む、請求項 1 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 7】

前記 F c 免疫断片が、I g G 3 断片を含む、請求項 1 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 8】

前記 F c 免疫断片が、I g G 4 断片を含む、請求項 1 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 9】

請求項 1 に記載の構築体又は請求項 1 4 に記載の融合分子を、タンパク質又はペプチドの混合物から精製するための方法であって、

a. 前記タンパク質又はペプチドの混合物を、樹脂に結合されているプロテイン A 又はカラムに結合されているプロテイン A と接触させるステップ、

b. 前記構築体又は融合分子の免疫断片を、樹脂に結合されているプロテイン A 又はカラムに結合されているプロテイン A に結合させるステップ、

c. 前記混合物の未結合タンパク質又はペプチドを除去するステップ、及び

d. 前記タンパク質又はペプチドをプロテイン A から溶出させるステップ

を含む方法。

【請求項 2 0】

前記免疫断片が、前記構築体又は融合分子から切断される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

回収された前記構築体又は融合分子が、天然 A A T 調製物と比較して、少なくとも約 9 0 % の抗炎症活性を保持する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記構築体又は融合分子が、医薬組成物に使用される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 4 に記載の融合タンパク質及び薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 2 4】

前記融合タンパク質が、治療上有効量で前記組成物中に存在する、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

請求項 1 に記載の核酸構築体を含むベクター。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載のベクターを含む形質転換細胞。

【請求項 2 7】

請求項 1 4 に記載の融合タンパク質を含む、発現された封入体の単離調製物。

【請求項 2 8】

A A T 療法を必要とする対象体を治療するための方法であって、抗炎症反応を開始させるのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を前記対象体に投与することを含み、前記投与が、前記対象体の前記炎症反応を低減させる方法。

【請求項 2 9】

A A T 療法を必要とする対象体を治療するための方法であって、免疫調節応答を達成するのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を前記対象体に投与することを含む方法。

【請求項 3 0】

対象体の糖尿病を治療するための方法であって、糖尿病を治療するのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を前記対象体に投与することを含み、前記投与が、前記対象体の糖尿病を治療する方法。

【請求項 3 1】

対象体の虚血性再灌流傷害を治療するための方法であって、前記対象体を治療するのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を前記対象体に投与することを含み、前記投与が、前記対象体の前記虚血性再灌流傷害を治療する方法。

【請求項 3 2】

10

20

30

40

50

臓器又は非臓器移植を受けている対象体を治療するための方法であって、前記対象体を治療するのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を前記対象体に投与することを含み、前記投与が、前記対象体の移植拒絶反応を調節する方法。

【請求項 3 3】

感染症を有する対象体を治療するための方法であって、前記対象体を治療するのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を前記対象体に投与することを含み、前記投与が、前記対象体の前記感染症を調節する方法。

【請求項 3 4】

前記感染症が、細菌性、ウイルス性、真菌性、又は寄生虫性感染症を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

A A T 療法を必要とする A A T 欠乏対象体を治療するための方法であって、前記対象体を治療するのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を投与することを含み、前記投与が、前記対象体の A A T 欠乏を低減させる方法。

【請求項 3 6】

痛風を有する対象体を治療するための方法であって、前記対象体を治療するのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を前記対象体に投与することを含み、前記投与が、前記対象体の痛風を調節する方法。

【請求項 3 7】

心臓疾患を有する対象体を治療するための方法であって、前記対象体を治療するのに有効な量の請求項 2 3 を含む治療上有効量の前記組成物を前記対象体に投与することを含み、前記投与が、前記対象体の前記心臓疾患を調節する方法。

20

【請求項 3 8】

対象体に移植するための臓器、組織、又は細胞を保存するための方法であって、前記臓器、組織、又は細胞を、移植又は保管のために前記臓器、組織、又は細胞を保存するのに有効な量の請求項 2 3 を含む前記組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 3 9】

アルファ - 1 アンチトリプシン (A A T) 又はその断片若しくはペプチド切断分子をコードする核酸、及び

ヒンジ領域を持たない F c 断片のアミノ酸配列をコードする核酸を含む構築体。

30

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の構築体によりコードされるアミノ酸配列、及びその薬学的に許容される塩、及びその薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本明細書の実施形態は、組換えアルファ - 1 アンチトリプシン (- 1 アンチトリプシン、A A T) の組成物、方法、及び使用に関する。ある実施形態では、本明細書に開示された組換え A A T は、他の形態の A A T よりも容易に単離することができる。他の実施形態では、組換え A A T は、天然 A A T 又は A A T の他の市販製剤と比較して、抗炎症活性及び抗免疫活性の増強を示す。更に他の実施形態では、1 0 倍、1 0 0 倍、又は 1 0 0 0 倍も少ない組換え A A T (r A A T) 又は A A T 融合分子を、対象体の症状又は疾患を予防又は治療するためのあらゆる現行形態の A A T の代わりに使用することができる。幾つかの実施形態では、A A T 融合分子は、感染症等の疾患又は他の健康状態を有する対象体を治療するために使用することができる。本明細書に報告されている更に他の実施形態は、心筋症状、糖尿病、炎症性腸疾患、移植片拒絶、又は他の公知の A A T 応答性疾患を治療するための組成物及び方法に関する。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

50

A A T

アルファ - 1 アンチトリプシン (A A T) の正常な血漿中濃度は、 1 . 3 以上 3 . 5 m g / m l 以下の範囲である。ある条件下では、 A A T は、組織空間へと容易に拡散し、標的プロテアーゼ、主に好中球エラスターゼと 1 : 1 の複合体を形成する。トリプシン、キモトリプシン、カテプシン G、プラスミン、トロンビン、組織カリクレイン、及び第 X a 因子等の他の酵素も基質となり得る。その後、酵素 / 阻害剤複合体は、セルピン - 酵素複合体 (S E C) 受容体と結合することにより循環から除去され、肝臓及び脾臓により分解される。

【発明の概要】

【 0 0 0 3 】

本明細書の実施形態には、市販の A A T 組成物よりも優れた特性を有するアルファ - 1 アンチトリプシン (A A T) の組換え構築体の生成及び使用が報告されている。他の実施形態には、治療用に組換え A A T 生産を精製及びスケールアップするための方法が報告されている。これらの実施形態によると、組換え A A T は、例えば、抗炎症剤、免疫修飾剤、及び / 又はセリンプロテアーゼ阻害剤として、任意の A A T 関連活性を使用するために単離することができる。

【 0 0 0 4 】

ある実施形態では、本明細書に開示された組換え A A T は、当技術分野で知られている任意の組換え技術により生成された全長分子又はそのカルボキシ末端ペプチド誘導体を含む。幾つかの実施形態は、例えば、 A A T の迅速な精製や活性の保存に使用するための、又は A A T 若しくはそのペプチドの活性を増加させるための、 A A T と結合されている免疫学的要素を有する A A T 又はそのカルボキシ末端誘導体を含む構築体に関する。他の実施形態は、各々が免疫学的要素 (例えば、 F c 断片) と結合され、ユニットとして共精製される、 A A T 分子を有する複数の構築体の同時合成に関する。他の実施形態は、例えば、 1 つ又は複数の免疫分子と結合して、本明細書に開示された組成物、方法、及び使用のための構築体を形成する、この分子の最後の 8 0 A A の断片又はその亜断片 (例えば、約 4 0 、約 3 0 、約 2 0 、若しくは約 1 0 A A 、又は約 5 A A) を含む、 A A T の 1 つ又は複数のカルボキシ末端誘導体又は断片の構築体を生成することに関する。

【 0 0 0 5 】

本明細書で企図されている構築体の A A T 分子は、天然アルファ - 1 アンチトリプシン (例えば、ヒト) 、又は A A T の最も多く見られる形態、又はそれらの他の天然形態、又はそれらの断片若しくは誘導体、又は顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たない突然変異型の A A T 、又はそれらの対立遺伝子 (例えば、およそ 1 0 0 個の天然 A A T 変異体が存在し、これらの変異体はいずれも、本明細書に開示された構築体を使用することができる) 、又はそれらの類似体、又はそれらの融合タンパク質 (例えば、ヒト I g G 又はヒト I g G の断片) に関する。これらの実施形態によると、最終構築体は、各々が免疫学的断片 (例えば、 F c 断片) と結合された 2 つの A A T 構築体を含んでいてもよく、 A A T - 免疫断片構築体は、ジスルフィド結合で共に結合されており、 1 つ又は複数のジスルフィド結合で結合された 2 重 A A T - 免疫断片構築体を形成する (例えば、図 1 及び図 2 を参照) 。本明細書に開示されたある方法では、免疫分子に結合された A A T 又は A A T ペプチドの迅速精製は、 A A T 活性の失活を顕著に低減し、精製時間を短縮した。迅速精製では、複数の精製ステップが省略され、構築体の重要な活性が保存される。例えば、このような迅速に精製された融合分子は、対照血漿由来 A T T と比較して (例えば、天然 A A T の典型的な精製、及び市販製剤の精製) 、サイトカイン阻害機能を保持することができ、免疫分子及び炎症分子の産生を調節する。顕著に低減された濃度の融合分子を使用して、同じか又はより良い調節機能を達成することができる。更に、 F c - A A T の F c 領域が切断型ヒンジ又は欠失ヒンジ領域を有する、本明細書に開示された融合分子は、血漿由来 A A T 、又は完全な F c を有する F c - A A T の融合分子と比較して優れた活性を有する。

【 0 0 0 6 】

これらの実施形態によると、2つ以上のAAT-Fc（ヒンジ欠失／切断）構築体（又はカルボキシ末端AATペプチド断片）を含むユニットは、本明細書に開示された組成物及び方法で精製及び使用することができる。Fc-huAAT（ヒンジ欠失）のこれらの実施形態の幾つかは、本明細書で企図された任意の方法又は組成物に使用することができる。他の実施形態には、AAT分子の活性を保存するために迅速精製法により精製されたAAT分子に結合されたIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4 Fc断片（ヒンジは、切断又は欠失されている）を使用することが含まれていてもよい。

【0007】

本明細書に開示されたある実施形態は、他の方法及び血漿AAT精製に使用される複数ステップの有害効果を回避するために、Fc融合構築体の最小ステップ（例えば、一段階）精製にプロテインAを使用することに関する。本明細書の幾つかの実施形態は、市販の製品（例えば、Aralast（登録商標）、Prolastin（商標））及び／又は血漿中に見出される天然AATに使用される標準的精製と比較して、融合分子中で85%、90%、又は95%以上のAAT抗炎症活性を保存することに関する。幾つかの実施形態では、本出願の融合分子は、市販の製剤と比較して、炎症を低減するか又は疾患を治療する活性が100～1000倍高いことを実証した。他の実施形態では、Fc部分の切断又は欠失ヒンジ領域を有するAAT-Fcは、Fcが完全であるFc-AATよりもin vivoでの活性が優れていることを実証した。

10

【0008】

本明細書に開示されているのは、血漿由来AATと同様の、ある実施形態ではそれより優れた活性を有する構築体を生成及び回収する方法である。AATに関して興味の対象となっていることが知られている活性には、免疫調節活性又は炎症調節活性が含まれる。本明細書では、記載されている構築体を単離し、セリンプロテアーゼ阻害活性以外の活性について評価することが企図されている。幾つかの実施形態では、本明細書に開示された構築体は、市販の組成物と比較して、IL-1受容体アンタゴニスト活性の増加、及びIL-1並びに他の炎症誘発性サイトカインの産生の低減を示す。

20

【0009】

ある実施形態では、組成物（例えば、構築体組成物）及び方法は、対象体に対する放射線の有害効果を調節することに関する。幾つかの実施形態では、組成物及び方法は、例えば、癌を有するか又は悪性腫瘍の発症が疑われるか又は細胞増殖制御不能の対象体に投与される場合、放射線療法又は放射線を受けている対象体を治療することに関する。本明細書に開示された他の実施形態は、例えば、偶発的に又は意図的な行為により、放射線に被曝した対象体を治療することに関する。

30

【0010】

幾つかの実施形態は、AAT療法を必要とする対象体に、組換え法を使用して生成されたAATを投与することに関する。これらの実施形態によると、対象体は、AAT欠乏、炎症若しくは免疫疾患、又は当技術分野で知られている他のAAT関連疾患を有する場合がある。本明細書のある実施形態には、少なくとも1つの構築体を有する組成物及び薬学的に許容される担体を、そのような治療を必要とする対象体に投与することが含まれる。ある実施形態では、対象体に投与される用量には、市販の製剤と比較して10倍、100倍、又は1,000倍低減された対象体に対する用量（例えば、Fc-AAT3構築体の）が含まれていてもよい。ある実施形態では、用量は、10mg/kg～100mg/kg（Aralast（登録商標）又はProlastin C（商標）等の、一般的に使用されている市販AATの濃度）と比較して、対象体に対して約1mg/kgから約10mg/kgである。

40

【0011】

本発明の幾つかの実施形態は、虚血再灌流の有害効果を低減することに関する。これらの実施形態によると、本明細書の組成物は、心筋梗塞又は腎不全又は他の疾患の結果としての虚血再灌流損傷の影響を調節するために使用することができる。他の実施形態では、本明細書で報告されている融合構築体は、心臓組織リモデリング（例えば、心臓組織の拡

50

張及び壊死)、例えば、左心室又は右心室(LV)リモデリングの発症又は進行を調節するために使用することができる。これらの実施形態によると、例えば、本明細書に開示された組成物の投与による介入は、心筋損傷に結び付く場合がある心臓事象の前に又は事象中に又は事象後に、発症、重症度(例えば、損傷)、又は進行を調節することができる。更に他の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、心臓疾患を有する対象体に投与して、急性期又は後期梗塞サイズを縮小することができる。これらの実施形態によると、急性期梗塞は、手術又は他の心臓事象の前(例えばベースライン)、事象中、又は事象の48時間後に測定されたものであってもよい。他の実施形態では、後期梗塞は、手術又は他の心臓事象の48時間後又は最大数日若しくは数週間後、例えば心臓事象の7日後に測定されたものであってもよい。更に他の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、心臓事象(例えば、心筋梗塞)を有する対象体を治療して、心臓事象の結果としての心臓の拡張及び機能不全を、これらの組成物で治療されなかった対象体と比較して、約5%、又は約10%、又は約15%、又は約20%、又は約25%、又は約30%以上調節するために使用することができる。

10

20

30

40

50

【0012】

ある実施形態は、心臓事象を有する対象体を治療するための組成物に関する。これらの実施形態によると、組成物は、AAT-Fc(ヒンジ欠失又は切断)(例えば、ヒトAAT又はその断片)、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たないその突然変異体、又はその対立遺伝子(例えば、およそ100個の天然AAT変異体が存在する)、又はその類似体、又はその融合タンパク質(例えば、ヒトIgG又はヒトIgGの断片(Fc))を含むことができる。幾つかの実施形態は、LVリモデリングを調節するために、心臓事象を有するか有していた対象体に天然AATを投与することに関する。他の実施形態は、1つ又は複数のカルボキシ末端誘導体又は断片、例えば、394AAの天然AATの最後の80AAの断片(配列番号1及び33)の組成物を投与することに関していてもよい。幾つかの実施形態は、心臓疾患を改善するために、本明細書に開示された組換え的に産生されたAAT融合ペプチドを用いて、心臓疾患を有する対象体を治療することに関する。

【0013】

他の実施形態には、本明細書に開示された組成物を使用して、感染症(例えば、細菌性又はウイルス性感染症)を有する対象体を治療すること、又は対象体が感染症に罹患することを予防することが含まれる。ある実施形態では、ウイルス性感染症は、HIVによる感染症又はインフルエンザ(例えば、H1N1、A型又はB型インフルエンザ)であってもよい。他の実施形態では、細菌性感染症は、細菌性肺炎、マイコバクテリア感染、バチルス・アントラシス(bacillus anthracis)との接触、又は他の細菌性感染症を含んでいてもよい。

【0014】

幾つかの実施形態は、移植片拒絶を低減又は予防するための、本明細書に開示された組成物に関する。他の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、移植片対宿主疾患(GVHD)の発生頻度を低減又は予防するために使用することができる。ある実施形態では、本明細書に開示された組成物は、臓器、組織、又は細胞移植の前、移植中、又は移植後に、対象体を治療するために使用することができる。他の実施形態では、臓器、組織、又は細胞培養を、移植前に及び移植中に臓器、組織、又は細胞培養を保存するために、Fc-AAT(ヒンジ欠失型又は切断型)融合分子を有する組成物と接触させることができる。

【0015】

ある実施形態では、投与用の組成物は、1ml又は1mgの製剤当たり約0.1ng~約10mgの範囲であってもよい。AAT又はペプチドと同様の活性を有する治療上有効量のAATペプチド又は構築体は、モル濃度で測定することができ、約1nM~約10mMの範囲であってもよい。また、薬学的又は美容的に許容される担体と組み合わせた製剤が企図される。正確な用量は、周知の日常的な臨床試験により過度の実験作業を行わずに確立することができる。1つの実施形態では、単一用量(対照と比較した構築体組成物の

効力に応じて、例えば、IV注入により0.6mg/kg～0.8mg/kg)の活性薬剤(例えば、AAT構築体又はそのAATペプチド誘導体)を用いて、対象体の疾患を治療することができる。この実施形態によると、対象体は、医療従事者により決定されるように、継続治療で治療することができる(例えば、単一又は複数用量後の5～10日間)。他の実施形態には、プラセボ(例えば、ヒト血清アルブミン投与又は他の同様のプラセボ)での対照集団を使用し、プラセボ効果を、本明細書に開示された組成物を受容した集団と比較することが含まれていてもよい。

【0016】

他の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、対象体が放射線療法及び/又は化学療法を受ける毎に対象体に投与してもよい。本明細書に開示された幾つかの実施形態は、癌治療を受けている対象体の治療に関する。癌治療には、限定するものではないが、以下の治療が含まれる：膀胱癌、乳癌、腎臓癌、白血病、肺癌、骨髄腫、脂肪肉腫、リンパ腫、舌癌、前立腺癌、胃癌、結腸癌、子宮癌、黒色腫、膵臓癌、眼の癌、及び他の公知の癌。

10

【0017】

本明細書に開示された幾つかの実施形態は、前立腺癌を有する対象体を治療することに関する。これらの実施形態によると、性交不能又は勃起不全の発症、前立腺癌治療の一般的な副作用を低減するために、前立腺癌を有する男性対象体を、放射線療法及び/又は化学療法の前、療法中、又は療法後に、本明細書に開示された組成物で治療することができる。

20

【0018】

ある実施形態では、対象体は哺乳動物である。幾つかの実施形態では、上記哺乳動物は、ヒトである。更に他の実施形態では、対象体は、妊婦又は幼児である。他の実施形態では、対象体は、ペット、飼育動物、又は家畜である。

【0019】

他の実施形態では、対象体又は哺乳動物は、捕獲された又は捕獲されていない野生動物等の非飼育哺乳動物であってもよい。

ある実施形態では、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たないヒトAAT突然変異体を含む組成物を、記載されている方法で使用するための本明細書に開示された構築体(例えば、AAT融合ペプチド誘導体又は反応中心ループ関連突然変異融合ポリペプチド)に使用することができる。これらの実施形態によると、本明細書に開示された組換え分子又は融合タンパク質構築体は、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たない。免疫分子(例えば、Fc)と結合するこれら構築体を生成することができる。免疫分子との結合を構築体の迅速精製に使用し、それにより精製ステップを低減してAAT又はそのカルボキシ末端の活性を保存することができる。ある実施形態では、精製ステップは、親和性プロセス(例えば、プロテインA)を使用した一段階である。こうしたプロセスは、他の市販の製剤(例えば、Aralast(登録商標)、Zemaira(商標)、Prolastin C(商標)、及びGlassia(商標))で使用される有害精製ステップを低減することにより、本明細書に開示された構築体の立体構造を保存する。他の実施形態は、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を示さないように構成されたAAT由来断片構築体に関する。本明細書の構築体には、限定するものではないが、以下のものを含む構築体が含まれる：AATに対応するカルボキシ末端ペプチド又はアミノ末端ペプチド、それらの類似体、セルピン-酵素複合体(SEC)受容体と結合するAATカルボキシ末端の任意の誘導体、又は免疫分子(例えば、IgG分子)と結合するそれらの組み合わせ。

30

40

【0020】

本明細書で企図されている医薬組成物には、抗炎症剤、免疫抑制剤、免疫調節剤、抗ウイルス剤、抗病原体剤、抗菌剤、プロテアーゼ阻害剤、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される作用剤が更に含まれていてもよい。これらの作用剤の幾つかには、限定するものではないが、以下のものの1つ又は幾つかが含まれる：インターフェロン、ベータセロン、ベータ-インターフェロンを含むインターフェロン誘導体、イロprost、シ

50

カプロストを含むプロスタン誘導体；コルチゾール、プレドニゾロン、メチル・プレドニゾロン、デキサメタゾンを含むグルココルチコイド；シクロスポリンA、FK-506、メトキサレン、サリドマイド、スルファサラジン、アザチオプリン、メトトレキセートを含む免疫抑制剤；ジロートン、MK-886、WY-50295、SC-45662、SC-41661A、BI-L-357を含むリポキシゲナーゼ阻害剤；ロイコトリエンアンタゴニスト；ACTH及びその類似体を含むペプチド誘導体；可溶性TNF受容体；TNF-抗体；インターロイキン、他のサイトカイン、T細胞タンパク質の可溶性受容体；インターロイキン、他のサイトカイン、T細胞タンパク質の受容体に対する抗体；並びにカルシポトリオール；Celcept（商標）、ミコフェノール酸モフェチル、及び単独で又は組み合わせのいずれかで採用されるそれらの類似体。

10

【0021】

他の実施形態は、癌関連療法を受けている対象体を治療するための併用療法に関する。例えば、本明細書に開示された組成物は、腫瘍を退縮又は除去するか、対象体の腫瘍の転移を低減するか、又は対象体の癌の他の態様を治療することが知られている任意の他の作用剤と組み合わせることができる。

【0022】

ある実施形態では、本明細書に包含されている組成物で対象体を治療して正常細胞損傷を調節することは、組成物で治療しなかった対象体と比較して、少なくとも10%、又は少なくとも20%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%の調節であり得る。

20

【0023】

そのため、当業者であれば、本発明の実施形態の幾つの特徴及び利点を実施するための他の方法を設計する基盤として、本開示が基づく概念を直ちに使用することができることを認識するであろう。

【0024】

以下の図面は、本明細書の一部を形成しており、本明細書に開示された実施形態を更に説明するために含まれている。実施形態は、本明細書に示されている特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせ、これら図面の1つ又は複数を参照することにより更によく理解することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】ある実施形態で組換えAATを生産するための、本明細書に開示された幾つの実施形態に使用することが企図されているAAT構築体の模式図である。また、本発明のある実施形態を使用してAATペプチド断片を生産することができる。

【図2】本明細書に開示された幾つの実施形態に使用することが企図されている免疫分子に結合されたヒトAAT構築体の模式図である。

【図3】本明細書に開示された実施形態により生成される幾つかの融合分子の泳動を例示するSDS-PAGEゲルを示す図である。

【図4A】本明細書に開示されたAAT融合分子と接触させた*in vitro*細胞モデルにおけるサイトカイン産生（例えば、TNF、腫瘍壊死因子-アルファ）をヒストグラムプロットにより示す図である。

40

【図4B】市販のAAT製剤と比較して、本明細書に開示されたAAT融合分子と接触させた*in vitro*細胞モデルにおけるサイトカイン産生（例えば、TNF、腫瘍壊死因子-アルファ）をヒストグラムプロットにより示す図である。

【図5A】AAT融合分子（rAAT即ち組換えAAT）を用いた又は用いないLPSの存在下で又は非存在下での種々の炎症誘発性サイトカインの発現の低減を示す図である。

【図5B】AAT融合分子（recAAT-Fc；組換えFc-AAT）の量を減少させた場合のIL-1Ra発現の低減を示す図である。

【図6A】AAT融合分子、Fc-AAT2と比べた、血漿由来AATの存在下でのCD

50

1 1 b / C D 4 5 陽性細胞の発現パーセントを示す図であり、約 1 0 0 ~ 約 1 0 0 0 倍少ない組換え A A T (F c - A A T 2) が、これらの有害分子に対して同じ阻害効果を示したことが見出された。例えば、T o l l 様受容体 4 は、5 0 0 n g 又は 1 0 0 n g のいずれでも、5 0 0 μ g の血漿由来 A A T と同様に効果的である。

【図 6 B】A A T 融合分子、F c - A A T 2 と比べた、血漿由来 A A T の存在下での T L R 4 発現のパーセントを示す図であり、約 1 0 0 ~ 約 1 0 0 0 倍少ない組換え A A T (F c - A A T 2) が、これらの有害分子に対して同じ阻害効果を示したことが見出された。

【図 6 C】A A T 融合分子、F c - A A T 2 と比べた、血漿由来 A A T の存在下での T L R 2 発現のパーセントを示す図であり、約 1 0 0 ~ 約 1 0 0 0 倍少ない組換え A A T (F c - A A T 2) が、これらの有害分子に対して同じ阻害効果を示したことが見出された。

【図 7 A】本明細書に開示された幾つかの実施形態の融合分子の関節腫脹に対する効果に関する、マウスでの i n v i v o 痛風性関節炎アッセイ (2 つの F c A A T 融合分子の比較) を表すヒストグラムデータプロットを示す図である。

【図 7 B】本明細書に開示された幾つかの実施形態の融合分子の関節腫脹に対する効果に関する、マウスでの i n v i v o 痛風性関節炎アッセイ (7 A) と同じモデルにおける I L - 6 産生を表すヒストグラムデータプロットを示す図である。

【図 7 C】本明細書に開示された幾つかの実施形態の融合分子の関節腫脹に対する効果に関する、マウスでの i n v i v o 痛風性関節炎アッセイ (F c A A T 融合分子対対照) を表すヒストグラムデータプロットを示す図である。

【図 7 D】本明細書に開示された幾つかの実施形態の融合分子の関節腫脹に対する効果に関する、マウスでの i n v i v o 痛風性関節炎アッセイ (7 A) と同じモデルにおける F c A A T 融合分子との接触の効果及び I L - 1 の経時的な阻害 (2 4 ~ 7 2 時間) を表すヒストグラムデータプロットを示す図である。

【図 8】マウスが虚血再灌流を起こす心筋梗塞誘導マウスモデルを使用した、心臓事象後の F c - A A T 2 (2 つの濃度の組換え A A T) の存在下又は非存在下での梗塞サイズを表すヒストグラムプロットを示す図である。

【図 9】マウスが虚血再灌流を起こす心筋梗塞誘導マウスモデルを使用した、心臓事象後の、各々が完全 F c に結合された完全 A T T 分子を有する 2 つの F c - A A T (同じ濃度) の存在下又は非存在下での梗塞サイズを表すヒストグラムプロットを示す図である。

【図 1 0】本発明のある実施形態の F c - A A T 融合分子の模式図を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 6 】

定義：

本明細書で使用される場合、「1 つ」は、項目の 1 つ又は複数を意味する場合がある。

本明細書で使用される場合、「約」は、プラス又はマイナス 1 0 % を意味することができる。例えば、約 1 0 分は、9 分以上 1 1 分以下を意味することができる。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される場合、「F c - A A T」又は「A A T - F c」は、A A T 又は A A T カルボキシ末端断片に結合された F c 断片であって、A A T ポリペプチドのカルボキシ末端又はアミノ末端のいずれかに結合された F c 断片を意味する場合がある。

【 0 0 2 8 】

詳細な説明

以下のセクションでは、本発明の種々の実施形態を詳述するために、種々の例示的な組成物及び方法が説明されている。当業者であれば、種々の実施形態の実施は、本明細書で概説されている特定の詳細の全て又は幾つかの使用をさえ必要とせず、むしろ、濃度、時間、及び他の特定の詳細は、日常的な実験作業により改変することができることは明白であろう。ある場合には、周知の方法又は成分は、説明に含まれていない。

【 0 0 2 9 】

A A T (アルファ - 1 アンチトリプシン) 抗炎症活性は、従来より、セリンプロテアーゼ、及び特に好中球エラスターゼを阻害するその能力に起因すると考えられてきた。これ

10

20

30

40

50

が、A A T 欠乏を有するヒトの補充療法に A A T を使用する根拠である。現在、ヒト用に市販されている A A T は、他の A A T 関連活性ではなく、その抗エラスターゼユニットにより標準化されている。こうした市販製剤は、プールされたヒト血漿から精製されるが、他のヒト血清タンパク質を含有しているため（程度の差はあるが）純粋ではない。in vitroでの並びにin vivoモデルでのヒト A A T に関する研究の多くは、各々がヒト用に認可されている、セリンプロテアーゼ阻害活性に対するこれらの市販調製物の使用に依存している。種々の A A T 欠乏疾患を有するヒトへの A A T 注入は、安全であると考えられているが、混入タンパク質の役割は不明である。本明細書の実施形態には、共精製された夾雑物血漿タンパク質の問題を克服するための、高純度及び高活性の組換え形態の A A T の迅速な生産が報告されている。

10

【0030】

本明細書に開示された実施形態では、好中球エラスターゼの阻害が、A A T による増強治療の治療的利益の唯一の機序であるという長年の概念に関する検証が示されている。本明細書で明らかにされた1つの寄与は、A A T の精製を支援するだけでなく、天然の市販組成物よりも活性が高い、F c 融合体等の新規形態の A A T 融合分子の創出である。数十年間にわたり、科学者らは、同様の又は同じ有益な効果を保持する組換え形態の A A T の生成を試みてきたが、そのほとんどは成功していない。F c 融合タンパク質は、安全性について長い歴史があり、多くは、何十万人の治療に使用されている（例えば、関節リウマチ治療に使用される、例えば、Enbrel（登録商標）及びAlabaccept（商標））。本明細書に示されている F c - A A T 融合分子は、容易に大量に生産及び精製することができ、他の構築体の副作用を低減した。加えて、本明細書に示されている融合構築体は、抗炎症活性及び抗免疫活性等の A A T 活性に関して、市販の製剤（例えば、Zemaira（商標）、Aralast（登録商標）、Prolastin（商標）等）と比較して、最大10倍、最大20倍、最大30倍、最大40倍、最大50倍、... 最大100倍、及びある場合には最大1,000倍高い効力を有する。市販の精製血漿由来 A A T 製剤の場合、精製中に抗炎症ドメインを破壊する可能性が高いため、ある態様では、本明細書に示されている融合構築体は、部分的には市販の製剤より優れていると考えられる。ある方法では、血漿由来 A A T の精製における初期ステップの1つは、高度に酸化性の低温アルコール析出である。したがって、本明細書で提供される融合分子は、A A T 欠乏患者のCOPDを治療するための、移植片拒絶の影響を低減するための、炎症性疾患を治療するための優れた治療等の臨床適用のいずれかのための、A A T の優れた代替物を提供する。それは、他の製剤では A A T 活性が全体として保存されているが、本明細書に開示された製剤は、部分的には、エラスターゼ阻害ではなく A A T の抗炎症ドメインの維持に着目しているからである。

20

30

【0031】

本明細書に開示された他の実施形態は、種々の形態の A A T に結合された修飾 F c 分子に関する。これらの実施形態によると、A A T 又は A A T のペプチド断片に融合された免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4であってもよい。ある実施形態では、A A T の融合分子は、A A T との融合前に12アミノ酸のヒンジ領域が、突然変異、切断、又は除去されているIgG2を含んでいてもよい。例えば、本明細書に開示された1つの融合分子は、A A T に融合されたヒンジ欠失を有するIgG2（クローン3又はFc3とも呼ばれる）に関する。IgG2のヒンジ領域の切断、突然変異、又は除去は、融合分子のin vivo副作用を低減する。幾つかの実施形態には、補体及び他の活性を活性化する能力の低減が含まれる。本明細書に開示された融合分子は、天然 A A T、血漿由来組成物（例えば、Aralast（登録商標）等の市販の組成物）よりも優れた活性を保持する。

40

【0032】

過剰な炎症又は炎症活性化は、幾つかの慢性疾患、例えば、慢性の破壊性又は消耗性疾患の発症、進行、及び破壊的性質をもたらす場合がある。これらには、以下のものに限定されないが、関節リウマチ等の自己免疫疾患、狼瘡（全身性エリトマトーデス）、インス

50

リン産生ベータ細胞が免疫攻撃により破壊される場合がある1型等の糖尿病が含まれる。本明細書に開示された組成物及び方法により治療することができる他の疾患には、2型糖尿病が含まれる。自己免疫疾患に加えて、冠動脈の慢性炎症は、心臓発作又は脳卒中のリスクを増加させる場合がある。また、慢性炎症は、腸の炎症に寄与する（例えば、クローン病、炎症性腸疾患（IBD）、又は潰瘍性大腸炎）。対象体の炎症を制御する幾つかの天然タンパク質は、対象体内で日々産生されている。AATは、こうしたタンパク質の1つである。AATを用いた療法の1つの欠点は、市販されているAATが、ヒト供血者の血漿から単離されており、したがって、供給は、入手可能な血漿に制限されるということである。治療用AATの用途は、その応用が慢性閉塞性肺疾患（COPD）及びAAT補充療法等の現行用途に限定されないため、増加している。

10

【0033】

本明細書のある実施形態では、血漿由来AATと同様に及びある態様ではそれよりも効率的にAAT欠乏疾患又はAAT応答性疾患の治療に機能的である有効な組換え形態のヒトアルファ1アンチトリプシンが報告されている。ある実施形態では、本明細書に開示された組成物及び方法は、免疫分子又はその断片（例えば、IgG1、IgG2）に融合されたAAT（例えば、ヒト又は他の哺乳動物）に関する。他の実施形態では、融合タンパク質には、切断型のAATが含まれていてもよい。これらの実施形態によると、ある融合ポリペプチドは、AAT又はその断片のアミノ末端により結合されていてもよい。幾つかの実施形態は、Fc等の免疫グロブリン分子に融合されたAATの構築体に関する。ある実施形態では、AAT又はそのカルボキシ末端ペプチド断片は、IgG1又はIgG2に由来するFcに結合されていてもよい。例えば、ヒトIgG1のFcは、骨髄性細胞の補体受容体に結合し、IgG2は、ある組成物及び方法において優れていることが見出されたため、IgG2に由来するFcを使用してもよい。

20

【0034】

FcRI、FcRII、及びFcRIIIと呼ばれる3つの異なるタイプのFc-ガンマ（ ）受容体が生じ、それらは、ヒト白血球に見出される。FcRI（CD64）は、単球、マクロファージ、好中球、骨髄性前駆体、及び樹状細胞上に発現される高親和性受容体である。FcRIは、単量体ヒトIgG1及びIgG3に対して高い親和性を有するが、IgG2には結合しない。IgGのFc部分に対するFcRの結合は、炎症性メディエーターの放出を含む細胞のエフェクター機能の誘導を支援することが示されている。

30

【0035】

例えば、4つのIgGサブクラスは、それらのエフェクター機能が互いに異なり、例えば、ヒンジ領域の長さ及び柔軟性が異なることが明らかになっている。ヒンジ領域の柔軟性は、IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2の順で低下する。FcIgG2は、ヒンジ領域に12個のアミノ酸を有しており、FcIgG1ほど柔軟ではない。補体活性化を含むがそれに限定されない、融合分子の更なるin vivo副作用を低減するために、Fc断片の任意のヒンジ領域を操作して、ヒンジ領域を欠失又は修飾することが企図される。1つ又は複数のアミノ酸を修飾又はこの領域から取り除いて、未修飾対照と比較して、AAT活性が増加した融合分子を生成することができる。ある実施形態では、構築体の柔軟性を調節するために、Fcに対するin vivo副作用を低減するために、又は本明細書で企図されているFc-AAT構築体のAAT活性を増強するように三次構造を変更するために、ヒンジ領域を短縮してもよい。幾つかの実施形態では、本明細書に開示されたFc-AAT構築体は、血漿由来AAT製剤と比較して、半減期の増加を示す。

40

【0036】

加えて、FcIgG2は、プロテアーゼに耐性であり、以前に記載されているように、高親和性FcRIと結合せず、並びに補体を活性化する能力が弱い。ある実施形態では、本明細書で企図されている融合タンパク質に使用されるFcは、IgG1、又はIgG2、又はIgG3、又はIgG4に由来してもよい。他の実施形態では、Fcは、受容体と結合しない突然変異分子であってもよい。更に他の実施形態では、Fcは、AAT又

50

はそのカルボキシ末端ペプチドに結合された IgG2 に由来する野生型又は突然変異形態であってもよい。ある実施形態では、Fc 分子を、AA T 分子と結合させて、例えば、ジスルフィド結合により結合された Fc - AA T の 2 量体を製作してもよい。他の実施形態では、Fc - AA T の単量体分子を生成し、本明細書に開示された方法に使用してもよい。開示されたある構築体は、例えば、この領域のアミノ酸を更に取り除くことによりヒンジ領域の柔軟性を更に低減するように、構築体の Fc が修飾されている Fc - AA T に関する。本明細書に記載の分子はいずれも、例えば、プロテイン A カラム若しくはマトリックス、又は迅速分離用の他の迅速な精製法若しくは濃縮法を使用して迅速に精製し、活性を保存することができる。

【0037】

本明細書の実施形態では、現行の市販 AA T 組成物よりも優れた特性を有するアルファ - 1 アンチトリプシン (AA T) 又はそのカルボキシ末端断片の構築体の生成が報告されている。他の実施形態では、融合タンパク質又はペプチドを精製するための方法、及び本明細書に開示された精製 AA T 融合分子のその後の使用が報告されている。血漿に由来する市販の AA T は、供給が不足しており、現在、AA T の重要な特性を破壊する方法により精製されており、合成的に生産された AA T が、天然型の AA T 又は AA T 由来ペプチドと同様に、そうでなければ天然型の AA T 又は AA T 由来ペプチドよりも良好に作用することが可能であるこの分子の合成型又は最新の精製方法に対する必要性が存在する。

【0038】

セリンプロテアーゼ阻害以外の AA T 活性に関して、AA T は、幾つかの機序により抗炎症性特性を発揮する。抗プロテアーゼ部位の突然変異 (例えば、抗プロテアーゼ活性を無視できるレベルに低減するための) を使用した予備的データは、AA T の活性は、AA T の抗プロテアーゼ特性を必要としないという概念を支持する。ある実施形態では、分子の抗炎症特性を評価するために、天然ヒト AA T (例えば、394 AA、M_r が約 51,000) の様々な組換え切断型及び突然変異型が生成される。この手法により、種々の組成の AA T 分子を産生することが可能になり、それは、血漿由来 AA T の標準的方法を使用することでは非常に困難であり、不可能に近い。AA T の抗炎症特性は、現在用いられている市販組成物の精製手順により酸化される場合があることが示された。本明細書に開示された方法は、記載されている融合分子及び構築体のこの活性を保存するための優れた精製法を提供する。

【0039】

以前に開示されているある方法では、AA T が、マウスモデル及びヒト臍島細胞で IL - 1 の毒性活性を阻止することが示されている。本明細書の幾つかの実施形態は、この活性を模倣することが可能な AA T 融合分子の組換え体産生に関する。ある実施形態では、IL - 1 の毒性活性又は産生を阻止するための、及びカスパーゼ - 1 活性を低減するための、組換え的に産生されるヒト AA T のカルボキシル末端領域の融合ペプチドが生成される (実施例セクションを参照)。これら融合ペプチドは、炎症誘発性分子の産生又は活性を阻止又は低減するのに有用であり、したがって、多くの健康状態の治療及び予防に有用である。

【0040】

アルファ 1 - アンチトリプシン又は 1 - アンチトリプシン (AA T) は、セルピンスーパーファミリーに属するプロテアーゼ阻害剤として最初に分類された。AA T は、一般的に、血清トリプシン阻害剤として知られている。また、AA T は、多種多様なプロテアーゼを阻害するため、アルファ - 1 プロテイナーゼインヒビター (A1PI) と呼ばれる場合がある。AA T は、炎症細胞の酵素、特に好中球のエラスターゼから組織を保護し、典型的には、約 1.5 ~ 3.5 グラム / リットルの血中範囲を有するが、濃度は、急性炎症時に何倍にも上昇する場合がある。1 - アンチトリプシンの 100 個を超える様々な変異体、種々の集団で記録されている。最も一般的な種類の AA T は、IEF ゲルでの泳動に基づき、M と命名されている。他の変異体は、M バンドに対して近位に泳動するか又は遠位に泳動するかに応じて、A ~ L 及び N ~ Z と命名されている。IEF に異常なバ

10

20

30

40

50

ンドが存在することは、A A T 欠乏の存在を示す場合がある。上記に示されているように、M 型 A A T には幾つかのサブタイプがあり、それらサブタイプは全て、本明細書での使用が企図されている。

【0041】

A A T の治療用濃縮物を得るための現在の傾向は、供血者の血漿から A A T を調製することである。供血者の血漿は、供給が限られており、商品にするのに多大な精製ステップが必要である。これまでのところ、米国食品医薬品局は、ヒト血漿に由来する幾つかの市販製品の使用を認可している。例えば、これらの製品の幾つかには、P r o l a s t i n (商標)、P r o l a s t i n C (商標) (T a l e c r i s 社(現在はG r i f o l s 社、ローリー市、ノースカロライナ州)、Z e m a i r a (商標)、及びA r a l a s t (登録商標) (B a x t e r 社)が含まれる。K a m a d a 社は、エアゾル用製品及び静脈内注射用製品を両方とも有する (K a m a d a 社、イスラエル)。これらの製剤のほとんどは、A A T 欠乏患者の A A T 療法のために静脈内投与され、1 患者当たり年間 1 0 0 , 0 0 0 ドルもの費用がかかる場合がある。血漿から単離された A A T は、血液由来の A A T と比較して活性の低減を示す。本明細書に開示された組成物は、血漿由来 A A T ではなく血液の A T T に類似した抗炎症活性の増加を示し、抗プロテアーゼ活性に基づく活性を有する市販の製剤よりも高い活性を示した。

10

【0042】

1 つの研究では、F D A 認可製品のうち 3 つが、その一次構造及びグリコシル化の点で分析及び比較された。製品の幾つかは、正常ヒト血漿 A A T と比較して、精製手順中に導入された可能性が高い相違を示した。加えて、ある研究では、セリンプロテアーゼ阻害活性及び A A T 純度に関して大きなばらつきがあることが、市販の製剤を比較することにより以前に示された。最近、標準的な市販製剤の 1 つである P r o l a s t i n (商標) が評価されたが、新しい製剤である P r o l a s t i n C (商標) は、最終製品の抗プロテアーゼ活性 (例えば、セリンプロテアーゼ阻害活性) を増加させるために、P r o l a s t i n (商標) とは精製が異なっていた。これら製品の報告された活性は全て、抗炎症性でないセリンプロテアーゼ阻害活性、又は免疫調節活性、又は別の A A T 関連活性に向けられている。

20

【0043】

ある実施形態では、本明細書で生成された組成物は、エアゾル製剤とした時、部分的には静脈内注射法よりも下気道に到達するため、他の形態よりも有用である場合がある。本明細書では、構築体制剤はいずれも、当技術分野で知られている任意の方法により、薬学的に許容される製剤として、対象体に導入することができることが企図されている。

30

【0044】

血漿由来 A A T 製剤を向上させる試みにも関わらず、A A T を調製するために利用可能な血漿の供給には限りがあり、生産が高価である。したがって、組換え A A T 分子が求められている。組換え A A T 分子を開発する研究者が直面した問題の 1 つは、血漿由来製剤と比較して、これらの分子は活性が低いということである。以前に生成された組換え分子は、セリンプロテアーゼ阻害剤アッセイにより分析すると、以前に適用されている市販製剤と比較して活性が低いことが多かった。したがって、血漿の供給に限りがあり、過去の組換え A A T 分子が劣っているため、過去に又は最近発見された方法のために適切な供給量の A A T を生成する余地が残されている。

40

【0045】

本明細書の幾つかの実施形態は、当技術分野で知られている任意の A A T 法又は治療に使用される市販の製剤と比べて、高度に活性で、高度に機能的な組換え A A T 構築体を生成することに関する。ある実施形態では、本明細書に開示された組換え A A T は、全長分子又はそのカルボキシ末端ペプチド誘導体を含む。幾つかの実施形態は、各々が免疫学的要素 (例えば、F c 断片又は他の断片) と結合されており、共精製される、A A T 分子を有する複数の構築体の同時合成に関する。他の実施形態は、例えば、1 つ又は複数の免疫分子と結合して、本明細書に開示された方法及び使用のための構築体を形成する分子の最

50

後の 80、70、60、40、30 個のアミノ酸の断片又はカルボキシ末端の他の断片を含む、AAT の 1 つ又は複数のカルボキシ末端誘導体又は断片の構築体を生成することに関する。

【0046】

本明細書中で企図されている構築体の AAT 分子は、天然アルファ - 1 アンチトリプシン（例えば、ヒト又は他の哺乳動物）又はその断片若しくは誘導体、又は AAT の突然変異型、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たない任意の AAT、又はそれらの対立遺伝子（例えば、およそ 100 個の天然 AAT 変異体が存在する）、又はそれらの類似体、又はそれらの融合タンパク質（例えば、ヒト IgG 又はヒト IgG の断片）に関する。これらの実施形態によると、構築体は、各々が免疫学的断片（例えば、2 分子の AAT に結合された Fc 断片）に結合されている 2 量体 AAT 構築体を含むことができ、この Fc - AAT 構築体は、1 つ又は複数のジスルフィド結合により共に結合されている。例えば、本明細書に開示されている図 1 及び図 2 を参照されたい。ある方法では、組換え AAT 又は AAT ペプチドと免疫分子との複合体の精製は、精製ステップを顕著に減らして、AAT 又は AAT ペプチドの効力を顕著に増加させることにより、AAT 又は AAT ペプチドの活性を増加させる。これらの実施形態によると、本明細書で企図された組換え AAT 分子は、融合ポリペプチド（2 量体又は単量体形態）として使用してもよく、又は精製後にその免疫分子から切り離してもよく、市販の製剤よりも低い濃度で 사용할ことができる。幾つかの実施形態は、市販の製剤と比較して、1 / 100 ~ 1 / 1000 の濃度を使用することに関する。ある例では、これらの分子は、対照と比較して（例えば、天然 AAT の典型的な精製及び市販製剤の精製）、サイトカインを阻害するか又は分子の免疫及び炎症機能を調節するための組成物に使用することができる。1 つの実施形態では、本出願の組換え分子は、市販の製剤よりも 100 ~ 1000 倍高い活性を示した。本発明の AAT 構築体に関して興味の対象となっていることが知られている活性には、免疫調節活性又は炎症調節活性が含まれる。幾つかの実施形態では、本明細書に開示された構築体は、市販の組成物と比較して、IL - 1 受容体アンタゴニスト活性の増加を示した。

【0047】

健康状態の治療における組換え AAT の使用

本明細書で報告されている幾つかの実施形態は、組換え AAT 又は融合タンパク質、又はそのカルボキシ末端断片融合分子を使用して、AAT 療法、AAT 置換、又は AAT 補充を必要とする対象体を治療することに関する。AAT 治療は、限定するものではないが、以下のものを含む種々の疾患での使用が報告されている：アポトーシス関連疾患、酸化窒素関連疾患、虚血再灌流機能不全誘導性疾患、移植片拒絶及び細胞拒絶、糖尿病、気腫、他の肺疾患、細菌性感染症の治療及び予防、ウイルス性感染症の治療及び予防、及び放射線誘導性傷害等。

【0048】

本明細書の幾つかの実施形態は、炎症性障害（例えば、IBD、クローン病、関節炎）を治療するために使用される、本明細書に開示された融合分子の組成物に関する。幾つかの実施形態では、本明細書に開示された融合分子は、市販の AAT 組成物と比較して、増強した抗炎症活性を有する。幾つかの実施形態は、合成的に生成された AAT 又はそのカルボキシ末端切断型（例えば、AAT の最後の 36 ~ 80 個のアミノ酸）に融合されたヒンジ欠失型、切断型、又は突然変異型 IgG2 Fc に関する。1 つの実施形態では、Fc - AAT は、合成的に生成された完全な AAT 分子に結合されて、ある場合にはクローン 3 として参照されるものを形成する、アミノ酸 2 個のリンカーを有する IgG2 ヒンジ欠失を含む。

【0049】

ある実施形態では、本明細書中に開示された組成物及び方法は、対象体の炎症性腸障害の発症を低減又は予防するために使用することができる。これらの実施形態によると、対象体の IBS 関連疾患の低減は、約 10 ~ 20 %、又は約 30 ~ 40 %、又は約 50 ~ 60 %、又は約 75 ~ 100 % 程度の低減又は阻害であってもよい。これらの実施形態によ

ると、IBS又はIBDを有する対象体は、AAT又はAAT-カルボキシ末端ペプチドの組換え又は融合タンパク質（ヒンジ欠失又はヒンジ切断を有するFc-AAT）の薬学的に許容される組成物を用いて治療して、そのような組成物を受容しない対照対象体と比較して、消耗を低減するか、又は喪失を低減するか、又はバリア機能を回復させることができる。他の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、炎症性腸障害の発症を低減するために使用することができる。

【0050】

本明細書の幾つかの実施形態は、急性又は慢性疾患を有する対象体の腸又は腸管過透過性を回復させることに関する。これらの実施形態によると、腸又は腸管過透過性又はバリア機能の喪失は、全身性炎症反応症候群（SIRS）、炎症性腸疾患、1型糖尿病、アレルギー、及び喘息等の慢性疾患による場合がある。ある実施形態では、医療従事者は、腸又は腸管過透過性を有する対象体を、1日1回、週2回、週1回等の所定の投薬計画、又は他の所定の投薬計画で治療することができる。

10

【0051】

ある実施形態では、本明細書に開示された組成物は、限定するものではないが、糖尿病（例えば、1型及び2型）、自己免疫疾患等の免疫疾患、炎症性疾患、心障害、及び感染症等を含むある徴候を治療するために使用することができる。本明細書に開示された幾つかの疾患は、炎症性疾患、自己免疫疾患、又は肺疾患等とみなすことができる喘息のように、複数の範疇に入る場合がある。ある実施形態では、本明細書に開示された組成物には、限定するものではないが、以下のものを含む自己免疫疾患を治療するために使用することができる：関節リウマチ等のリウマチ性疾患、全身性エリトマトーデス（SLE）、I型糖尿病、並びに甲状腺、腸、及び中枢神経系の自己免疫疾患（例えば、関節リウマチ、エリトマトーデス、シェーグレン症候群、強皮症、混合性結合組織疾患、皮膚筋炎、多発性筋炎、ライター症候群、及びベーチェット病）；中枢神経系の自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、重症筋無力症、又は脳脊髄炎）；消化器系の自己免疫疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、セリアック病、スプルー）；甲状腺の自己免疫疾患（例えば、橋本甲状腺炎、又はグレーブス病）及び眼の自己免疫疾患（例えば、ブドウ膜炎）。本明細書で企図されている自己免疫障害は、以下のものに関していてもよい：円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎及び精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、チャージ-ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、クレスト症候群、クローン病、円盤状狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症-線維筋炎、糸球体腎炎、ギラン-バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少症紫斑（ITP）、過敏性大腸疾患（IBD）、IgA神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリトマトーデス、メニエール病、混合性結合組織疾患、多発性硬化症、1型又は免疫媒介性真性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎及び皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリトマトーデス、エリトマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、疱疹状皮膚炎血管炎等の血管炎、尋常性白斑、ヴェーゲナー肉芽腫症、T細胞媒介性自己免疫疾患、リウマチ性疾患、リウマチ性関節炎、及びエリトマトーデス。

20

30

40

【0052】

他の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、限定するものではないが、アレルギー性障害、又は例えば、関節炎、炎症性骨溶解症、喘息、慢性炎症（例えば、慢性ウイルス性又は細菌性感染症に由来する）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、脳炎、炎症性腸疾患（IBD）、乾癬（例えば、プラーク乾癬、膿胞性乾癬、乾癬性紅皮症、滴状乾癬、又は逆乾癬）、肺線維症、未分化関節症、未分化脊椎関節障害を含む炎症性疾患等の疾患

50

を治療することが含まれ得る。他の疾患には、限定するものではないが、呼吸異常、例えば、喘息、COPD、気腫が含まれ得る。ある実施形態は、融合分子がFc-AAT（ヒンジ欠失型又はヒンジ切断型）を含む、組換え的に産生された融合分子の形態のAATを10倍～100倍少ない量で使用し、月1回、週1回、2週に1回、1日1回、1日2回、又は他の投与計画で対象体を治療して、炎症の有害効果を低減することに関する。ある例では、Fc-AAT3又はFc-AAT4を組成物に使用して、これらの障害の有害効果を阻害し、それらの関連疾患を改善することができる。

【0053】

放射線防護及び癌

ある実施形態では、組成物（例えば、構築体組成物）及び方法は、対象に対する放射線の有害効果を調節することに関する。幾つかの実施形態では、組成物及び方法は、例えば癌を有するか又は悪性腫瘍の発生が疑われるか又は細胞増殖制御不能の対象体に投与される場合、放射線療法又は放射線を受けている対象体を治療することに関する。本明細書に開示された他の実施形態は、部分的には放射線治療の有害作用を低減するために、例えば偶発的に又は意図的な行為により放射線に被曝した対象を治療することに関する。

10

【0054】

本明細書に開示された幾つかの実施形態は、癌治療を受けている対象体の治療に関する。これらの実施形態によると、癌治療を受けている対象体は、本明細書に開示された組成物で治療して、治療の有害効果（例えば、放射線及び/又は化学療法による治療に由来する）を低減又は予防することができる。癌治療には、限定するものではないが、膀胱癌、乳癌、腎臓癌、白血病、肺癌、骨髄腫、脂肪肉腫、リンパ腫、舌癌、前立腺癌、胃癌、結腸癌、子宮癌、黒色腫、膵臓癌、脳腫瘍、眼癌、皮膚癌、及び他の公知の癌の治療が含まれる。

20

【0055】

他の実施形態では、本明細書に開示された組成物は、癌を有する対象体を治療するために使用することができる。これらの実施形態のために企図されている癌には、限定するものではないが、以下のものが含まれる：線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、カポジ肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、横紋肉腫、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、黒色腫、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管がん、絨毛膜癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、希突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽腫、網膜芽細胞腫、骨髄腫、リンパ腫、白血病、又は他の公知の癌。

30

【0056】

本明細書に開示された放射線防護及び組成物に関する他の実施形態は、三叉神経痛の治療、重篤な甲状腺眼疾患の治療、翼状片の治療、色素性絨毛結節性滑膜炎の治療、ケロイド瘢痕増殖の予防、異所性骨化の予防、美容手術又は再建手術の応用手術（例えば、瘢痕形成の縮小）、化学療法中、ホルモン療法との併用、及び/又は免疫療法の組み合わせに関してもよい。

40

【0057】

ある副作用は、放射線被曝中に、及び放射線療法又は化学療法の副作用としてでさえ発生する場合がある。本明細書の幾つかの実施形態は、本明細書に開示された組成物で対象体を治療することにより、対象体におけるこれらの副作用を低減又は予防することに関する。組成物には、AAT、AATカルボキシ末端ペプチド（例えば、80マー、36マー等）、組換え/融合形態のAAT、及び/又は組換え/融合形態のAATカルボキシ末端ペプチドが含まれ得る。放射線療法の副作用には、限定するものではないが、細胞損傷、痛み、膨潤、局所刺激、線維症、瘢痕、組織完全性の喪失、組織脆弱性の増加、嚥下困難、及び放射線治療又は被曝に伴う他の症状が含まれ得る。低減又は予防することができる

50

他の副作用は、例えば、骨髄移植中の全身照射（ＴＢＩ）に由来する副作用に関する。これらの副作用には、上記のものに加えて、急性及び慢性免疫不全症及び日和見感染が含まれ得る。

【００５８】

本明細書に開示された幾つかの実施形態は、前立腺癌を有するか又は発症が疑われる対象体を治療することに関する。これらの実施形態によると、これらの療法に起因する副作用を低減するために、前立腺癌を有するか又は発症が疑われる男性対象体を、放射線療法及び／又は化学療法の前、療法中、又は療法後に、本明細書に開示された組成物で治療することができる。例えば、副作用は、限定するものではないが、性交不能又は勃起不全の発症であってもよい。

10

【００５９】

本明細書で企図されている他の疾患には、以下のものが含まれる：全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ又は狼瘡）、慢性関節リウマチ、敗血症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ又は狼瘡）、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、自己免疫疾患、粥状動脈硬化症、アルツハイマー病、関節炎、筋ジストロフィー、ダウン症候群、多発性硬化症、脳卒中、神経変性障害、他の炎症性疾患又は症状、及び血清反応陰性脊椎関節症。

【００６０】

ある実施形態では、本明細書に開示された組成物は、敗血症ショックの対象体を治療するために使用することができる（これらの確認研究の動物モデルを参照：Doiら、The Journal of Clinical Investigation 第119巻、10月10日号、2009年；for an animal model of sepsis and sepsis-induced kidney injury）。血漿由来AATは、マウスモデル及びヒトコホート研究にて、ウイルス性感染症及び細菌性感染症の両方を治療するために全身性に使用することができることが示されており、したがって、血漿由来AATと比較して向上したことが示されたFc-AAT（Fcのヒンジ欠失又はヒンジ切断型、例えば、FcAAT3）を、敗血症の治療に使用することができる。例えば、1つ又は複数の感染症又は他の原因による敗血症を有する対象体は、本明細書に開示された組成物で治療して、対象体の疾患を改善し、潜在的に死亡を防止することができる。

20

【００６１】

ある実施形態では、対象体は、哺乳動物である。幾つかの実施形態では、上記哺乳動物は、ヒトである。更に他の実施形態では、対象体は、男性、女性、妊娠している女性、幼児、又は年少者である。

30

【００６２】

移植片拒絶及び移植片生着

他の実施形態では、本明細書で企図されている組換え又は融合ポリペプチド（例えば、Fc-AAT又はFc-AAT断片）は、臓器又は非臓器（例えば、細胞）移植等の移植を受けている対象体を治療するために使用することができる。ある実施形態では、細胞移植には、骨髄、臍島細胞（例えば、臍島移植）、角膜細胞、幹細胞、皮膚（例えば、細胞性又はより大型の）、死体からの一時的な皮膚移植（例えば、軟組織、顔面組織又はその他）、又は、移植片対宿主疾患（GVHD）等の細胞移植拒絶反応に関連する症状が含まれ得る。本発明の実施形態は、移植を受けたか又は移植を必要とする対象体が経験する症状又は徴候を改善するための方法を提供する。これらの実施形態によると、症状又は徴候には、移植片対宿主疾患（GVHD）又は移植片拒絶に伴う疾患が含まれていてもよい。

40

1つの例では、本明細書に開示された方法は、骨髄移植を受けた対象体を治療するために使用することができる。他の実施形態では、本明細書に開示された方法は、幹細胞又は他の細胞移植を受けた対象体を治療するために使用することができる。これらの実施形態によると、対象体を治療して、移植拒絶を低減し、移植片の細胞を保存し、及び／又は移植した細胞（移植片）の生着を延長することができる。他の実施形態には、心臓、肺、腸、肝臓、脾臓、腎臓、又は他の臓器移植等の臓器移植を受けている対象体を治療することが

50

含まれ得る。

【 0 0 6 3 】

1つの例では、本明細書に開示された方法は、骨髄移植を受けている対象体を治療するために使用することができる。これらの実施形態によると、骨髄移植の前、移植中、又は移植後に対象体を治療して、対象体の移植片拒絶及び／又はG V H Dを低減又は予防することができる。

【 0 0 6 4 】

他の実施形態では、本明細書に開示された組成物及び方法は、移植臓器拒絶の発生を予防又は低減することに関する。他の実施形態では、本明細書に開示された組成物及び方法は、臓器移植の延長に関する。本明細書で企図されている移植は、腎移植、心移植、肝移植、軟組織移植、顔面成分移植、腸管移植、及び脾移植に關していてもよい。加えて、本明細書に開示された組成物は、臓器又は非臓器の移植に伴う症状の軽減又は予防に関する場合がある。移植を受けている対象体を本明細書に開示された組成物を用いて治療することにより、低減又は予防することができる症状には、移植片拒絶、腎不全、肺不全、心不全、粘膜潰瘍、脾臓機能低下（グルコース増加、真性糖尿病）、移植片対宿主疾患（G V H D）、胃腸（G I）潰瘍、肺不全、皮膚潰瘍、凝血異常、C N S機能不全、及び昏睡が含まれ得る。

【 0 0 6 5 】

本発明の更に他の態様は、移植前の臓器又は細胞の保存に関する。例えば、凍結保護又は輸送中の保護又は他の保存方法は、臓器、組織、又は細胞を、本明細書に開示された組成物と接触させることにより向上させることができる。本明細書のある実施形態は、移植又は凍結保護に備えて、臓器、組織、又は細胞を保存するために、本明細書に開示された組成物を使用することに関する。これらの実施形態によると、臓器、組織、又は細胞には、明細書に開示されたもの、例えば、脾臓細胞、幹細胞、骨髄細胞、腎臓、肝臓、肺、及び他の臓器又は細胞移植片のいずれが含まれていてもよい。

【 0 0 6 6 】

本発明の実施形態は、それを必要とする対象体に、組換えA A T又はその融合タンパク質及び薬学的に許容される賦形剤を含む治療上有効量の組成物を投与することを含む、対象体の移植片生着及び機能の延長を促進するための方法を提供する。

【 0 0 6 7 】

本発明のある実施形態では、本明細書に開示された組成物には、併用療法が更に含まれていてもよい。例えば、併用療法には、以下のものの1つ又は複数が含まれていてもよい：インターフェロン、ベータセロンを含むインターフェロン誘導体、 - インターフェロン、イロprost、シカprostを含むprost誘導体；コルチゾール、プレドニゾン、メチル - プレドニゾン、デキサメタゾンを含むグルココルチコイド；シクロスポリンA、FK - 506、メトキサレン、サリドマイド、スルファサラジン、アザチオプリン、メトトレキサートを含む免疫抑制剤；ジロートン、MK - 886、WY - 50295、SC - 45662、SC - 41661A、BI - L - 357を含むリポキシゲナーゼ阻害剤；ロイコトリエンアンタゴニスト；ACTH及びその類似体を含むペプチド誘導体；可溶性TNF受容体；TNF - 抗体；インターロイキン、他のサイトカイン、T細胞タンパク質の可溶性受容体；インターロイキン、他のサイトカイン、T細胞タンパク質の受容体に対する抗体；及びカルシトトリオール；Celcept（商標）、ミコフェノール酸モフェチル、及び単独で又は組み合わせのいずれかで採用されるそれらの類似体。

【 0 0 6 8 】

形成外科手術及び瘢痕の低減／予防

本明細書に開示された他の態様は、副作用の低減、及び再建外科手術からの回復向上、又は美容外科手術の向上に関する（例えば、選択的、美容的、熱傷被害者、又は放射線等の治療を原因とするもの）。再建形成外科手術は、例えば、熱傷；顔面骨折及び破断等の外傷；口蓋裂又は口唇裂等の先天性異常；発育異常；ウイルス性又は細菌性感染症及び疾患；及び癌又は腫瘍により引き起こされる機能障害を矯正するために実施される場合があ

10

20

30

40

50

る。再建形成外科手術は、機能を向上させるために実施される場合があるが、対象体を正常な外観に再形成するために実施してもよい。

【0069】

最も一般的な再建手術の1つは、腫瘍摘出、裂傷修復、瘢痕修復、手の手術、及び乳房縮小術である。幾つかの他の一般的な再建外科手術には、乳房切除術後の乳房再建術、口唇口蓋裂術、熱傷生存者の拘縮手術、及び先天的に欠損している場合に新しい外耳を形成することが含まれる。医療従事者は、局所組織が利用可能でない場合、顕微手術を使用して組織を移植し、欠損を被覆することが多い。皮膚の皮弁、筋肉、硬骨、脂肪、又は組み合わせを、対象体自身の体内から切除して、体内の別の部位に移動させ、血液供給等に再結合することができる。したがって、本明細書に開示された組成物は、該当する場合、再建外科手術又は美容外科手術の前に、手術中に、又は手術後に、瘢痕を低減し、組織移植及び保持（例えば、移植片拒絶及び瘢痕の低減）を向上させるために使用することができる。ある実施形態では、Fc - AAT（ヒンジ欠失又は完全なヒンジ領域）等のAAT融合分子を含む治療用組成物を使用して、炎症の予防又は低減等の美容手術及び再建手術の副作用、膨潤及び組織損傷に結び付く場合があるこれらの外科手術の一般的な副作用を低減することができる。他の実施形態には、本明細書に開示された組成物を使用して、再建手術を受けたか又は受けている対象体を治療して、回復時間を短縮し、再建プロセスを向上させ、そのようなプロセスを受けている対象体の炎症反応及び免疫反応を増強又は改善することが含まれていてもよい。本明細書に開示された組成物を使用して、医療従事者により決定される必要性に応じて全身的に又は患部に直接塗布（例えば、軟膏剤又はローション剤又は他の様式として塗布される）することにより対象体を治療することができる。

10

20

【0070】

糖尿病

幾つかの実施形態は、本明細書に開示された組成物を使用して、糖尿病を有するか又は発症の疑いがある対象体を治療することに関する。これらの実施形態によると、糖尿病を有する任意の対象体に、本明細書に開示された組成物を投与して、対象体の疾患を治療することができる。1型又は2型糖尿病を有する対象体を、本明細書に開示された組成物で治療することができる。これらの治療は、当技術分野で知られている糖尿病のあらゆる治療と併用することができる。ある実施形態では、本明細書に開示された組成物は、糖尿病を有する対象体を治療するために現在入手可能な市販製剤と比較して、低いレベル（例えば、濃度）で対象体に投与することができる。これらの実施形態によると、糖尿病を有する対象体は、5年以内に診断された早期発症1型糖尿病を有する対象体であって、例えば、検出可能なc - ペプチドレベル、及び/又は検出可能なインスリン産生、及び/又は残存膵島細胞機能を有する対象体であってもよい。

30

【0071】

他の実施形態は、*in vivo*で（例えば、膵島細胞機能を保存又は回復させるために）又は*in vitro*で（例えば、移植の輸送中に）膵島細胞を保護するために、本明細書に開示された組成物を使用することに関していてもよい。本明細書に開示された組成物を使用して、ある程度の残存膵島細胞機能を有する糖尿病対象体を治療することができ、及び/又は膵島細胞の完全性及び機能を保存するために膵島細胞を対象体に移植する前に膵島細胞を処理することができることが企図される。したがって、対象体は、膵島細胞移植の前に、又は移植中に、又は移植後に治療されることが企図される。他の実施形態では、糖尿病治療には、インスリン抵抗性糖尿病、I型、及びII型を有する対象体を治療することが含まれていてもよい。本明細書に開示されたFc - AAT融合分子は、顕著に低い濃度においてでさえ、血漿由来AATで観察されるように炎症誘発性サイトカインの産生を調節可能であることが示された。Fc - AAT融合分子（ヒンジ欠失型又はヒンジ切断型）を含む組成物を使用して、それを必要とする対象体の膵島細胞集団を保存することができる。

40

【0072】

心臓疾患

50

本発明の幾つかの実施形態は、心臓疾患を有するか又は心臓の介入措置（例えば、外科手術、予防的治療）を受けている対象体を治療することを含む。これらの実施形態によると、心臓疾患を有する対象体は、限定するものではないが、以下の症状の1つ又は複数を有していてもよい：梗塞、心筋虚血、慢性全身性の動脈性及び静脈性高血圧、肺性の動脈性及び静脈性高血圧、先天性心疾患（心臓内シャントを伴うもの及び伴わないもの）、弁膜性心疾患、特発性拡張型心筋症、感染性及び非感染性心筋炎、ストレス心筋症（重症管理疾病、身体的及び感情的ストレス、及び頭蓋内出血及び脳卒中に伴って観察されるような）、敗血性心筋症、心房性及び心室性不整脈、心内膜炎、心膜炎、心筋への損傷、心筋麻痺、心拍停止、急性心筋梗塞（AMI）、心筋虚血再灌流傷害、心室リモデリング、求心性肥大、遠心性肥大、及び他の公知の心臓疾患。

10

【0073】

ある実施形態では、心筋梗塞を有するか又は有する疑いのある対象体に、本明細書に開示された組成物を投与して、心臓疾患の症状又は副作用等の症状を改善することができる。ある実施形態では、Fc-AAT融合分子及び薬学的に許容される担体を含む、本明細書に開示された組成物を使用して、心臓の心室リモデリングを低減又は予防するか、又は虚血再灌流の影響を低減することができる。本明細書に開示された任意の心臓疾患を治療するための方法には、心臓事象の前に、事象中に、又は事象後に組成物を投与することが含まれていてもよい。ある実施形態では、組成物は、心臓事象が対象体に生じた後、医療従事者が最も有益であると決定した期間にわたって対象体に投与することができる。例えば、対象体は、事象後、最大1週間、最大2週間、又はそれを超える期間、組成物で治療することができる。ある実施形態では、本明細書に記載の対象体に投与される組成物は、例えば組換え又はFc-AAT融合分子で1用量当たり0.001mg/kg~10mg/kg等、市販のAAT製剤（例えば、Aralast（登録商標）、Zemaira（商標）、Prolastin C（商標））の使用量と比べて、5倍、10倍、100倍、又は1,000倍少ない場合がある。

20

【0074】

胃腸障害

本発明の幾つかの実施形態には、胃腸のある症状又は疾患（例えば、間欠性疾患、単発性疾患、又は慢性疾患）、又は炎症性腸障害を有する対象体を治療することが含まれる。これらの実施形態によると、胃腸の疾患を有する対象体は、限定するものではないが、以下の疾患の1つ又は複数を有していてもよい：炎症性腸疾患（例えば、IBS又はIBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、全身性炎症反応症候群（SIRS）、アレルギー関連腸疾患、1型糖尿病関連腸疾患、他の大腸炎タイプ（例えば、コラーゲン大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、不確定大腸炎）、腸の炎症に伴うベーチェット症候群及び他の腸障害。ある実施形態では、腸障害の症状又は副作用は、本明細書に開示された組成物により治療することができる。例えば、腸障害の副作用には、限定するものではないが、皮膚症状、体重減少、結腸短縮、腸粘膜、腸又は腸管過透過性が含まれ、それらは、Fc-AAT融合構築体（例えば、ヒンジ欠失又はヒンジ切断型）及び薬学的に許容される担体を有する組成物で改善することができる。ある実施形態には、本明細書に開示された組成物を用いて腸障害を有する対象体を治療して、障害を有する対象体の体重減少を低減又は予防することが含まれていてもよい。本明細書に開示された組成物は、Fc-AAT（IgG1）が、胃腸マウスモデルで示された血漿由来AATよりも優れた抗炎症活性を有しており、Fc-AAT3（IgG1に由来するFcのヒンジ欠失型）が、Fc-AAT（IgG1）と同様の抗炎症活性を有するという以前の観察により支援される。

30

40

【0075】

細菌性疾患

本発明の幾つかの実施形態には、細菌性感染症を有する対象体を治療することが含まれる。他の実施形態には、対象体の細菌性感染症を予防するために、本明細書に開示された組成物を投与することが含まれていてもよい。本明細書で企図されている細菌性感染症には、限定するものではないが、グラム陰性又はグラム陽性細菌又はミコバクテリウム生物

50

が含まれていてもよい。グラム陰性細菌には、限定するものではないが、以下のもの
 が含まれていてもよい：N.ゴノレア(N. gonorrhoeae)、髄膜炎菌(N. meningitidis)、M.カタラーリス(M. catarrhalis)、H.イン
 フルエンザ(H. influenzae)、大腸菌(E. coli)、全てのクレブシエ
 ラ種(Klebsiella spp.)、全てのエンテロバクター種(Enterobacter spp.)、全てのセラチア種(Serratia spp.)、全てのサルモネ
 ラ種(Salmonella spp.)、プロテウス・ミラビリス(Proteus mirabilis)、プロテウス・ブルガリス(Proteus vulgaris)、
 全てのプロビデンシア種(Providencia spp.)、全てのモルガネラ種(Morganella spp.)、シュードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)、
 全てのシトロバクター種(Citrobacter spp.)、全てのパスツレラ属種(Pasteurella spp.)、全てのエ
 ロモナス種(Aeromonas spp.)、シュードモナス・セパシア(Pseudomonas cepacia)、全てのシゲラ種(Shigella spp.)、ステ
 ノトロホモナス・マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia)、全てのアシネトバクター種(Acinetobacter spp.)、全
 てのレジオネラ種(Legionella spp.)、Y.エンテロコリチカ(Y. enterocolitica)、他のエルギニア症(Yersiniaiosis)、H.
 デュクレー(H. ducreyei)、全てのクラミジア種(Chlamydia spp.)、マイコプラズマ肺炎、ミコプラズマ・ホミニス(Mycoplasma
 hominis)、バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)、P.メラニノゲニカ(P. melaninogenica)、全てのモラクセ
 ラ属種(Moraxella spp.)、全てのボルテデラ種(Bordetella spp.)、及びP.マルトシダ(P. multocida)。

10

20

30

40

50

【0076】

本明細書で企図されているミコバクテリアには、限定するものではないが、以下のもの
 が含まれる：M.ボビス(M. bovis)、結核菌(M. tuberculosis)、マイコバクテリウム・アビウム複合体(MAC、Mycobacterium avi
 um complex)生物、及びM.イントラセルラーレ(M. intracellulare)、M.アビウム(M. avium)、パラ結核菌(M. paratuber
 culosis)、ハンセン病を引き起こす(癩菌(M. leprae)、M.フラベセ
 ンス(M. flavescens)、M.レブラムリウム(M. lepraemurium)、M.ミクロチ(M. microti)、M.ケロネイ(M. chelonae)、
 M.アフリカヌム(M. africanum)、M.マリヌム(M. marinum)、
 M.ブルーリ(M. buruli)、M.フォーツイタム(M. fortuitum)、
 M.ヘモフィルム(M. haemophilum)、M.カンサシ(M. kansas
 ii)、M.リットラレ(M. littorale)、M.マルモエンセ(M. malm
 oense)、M.マリアヌム(M. marianum)、M.シミアエ(M. simi
 ae)、M.ツルガイ(M. szulgai)、M.ウルセランス(M. ulceran
 s)、M.ゴルドナエ(M. gordonae)、M.ガストリ(M. gastri)、
 M.フレイ(M. phlei)、M.ノンクロモゲニクム(M. nonchromoge
 nicum)、M.スメグマチス(M. smegmatis)、M.テラエ(M. ter
 rae)、M.トリビアル(M. trivial)、M.スクロフラセウム(M. scr
 ofulaceum)、M.ゼノピ(M. xenopi)、M.ゴルドナエ(M. gor
 donae)、M.ヘモフィルム(M. haemophilum)、M.ゲナベンセ(M.
 genavense)、M.シミアエ、M.バッカエ(M. vaccae)。

【0077】

本明細書で企図されているグラム陽性細菌には、限定するものではないが、以下のもの
 が含まれる：C.テタニ(C. tetani)、C.ボツリヌム(C. botulinu
 m)、C.ディフィシレ(C. difficile)、A、B、C及びGストレプトコッ

カス (*Streptococcus*)、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス・ミレリ (*Streptococcus milleri*) 群、緑色連鎖球菌 (*Viridans streptococcus*)、全てのリステリア種 (*Listeria spp.*)、全てのスタフィロコッカス種 (*Staphylococcus spp.*)、*S. アウレウス* (*S. aureus*) (MSSA)、*S. アウレウス* (MRSA)、*S. エピデルミデス* (*S. epidermidis*)、*エンテロコッカス・フェカリス* (*Enterococcus faecalis*)、*エンテロコッカス・フェシウム* (*Enterococcus faecium*)、全てのクロストリジウム種 (*Clostridium spp.*)、*C. ジフテリア* (*C. diphtheriae*)、*C. ジェイケイウム* (*C. jeikeium*)、全てのロドコッカス種 (*Rhodococcus spp.*)、全てのリユーコノストック種 (*Leukonostoc spp.*)、及びパチルス・アントラシス (*Bacillus anthracis*) (例えば、炭疽病を引き起こす)。

10

20

30

40

50

【0078】

ある実施形態では、本明細書に開示された組成物を使用して、細菌性疾患を有する対象体を治療し、細菌関連疾患の発症を低減又は予防することができる。

更に他の実施形態は、対象体の敗血症ショックを治療又は低減することに関する。敗血症ショックは、対象体の全身性細菌性感染症、例えば、グラム陰性リボポリサッカリド等の菌体内毒素により引き起こされる場合がある。ある実施形態では、酸化窒素産生過剰が、敗血症ショックに寄与すると考えられている。NO産生の低減は、敗血症ショックの症状を低減することが示されている。これらの実施形態によると、本明細書に開示された方法は、Fc- AAT等のAAT融合分子を投与することにより、敗血症を治療することに関する。幾つかの実施形態には、他の療法、例えば炎症誘発性サイトカイン等に対する抗体と共にAAT融合分子を投与することが含まれる。又は、リボポリサッカリドを低減する作用剤は、腫瘍壊死因子又はインターロイキン-1発現、又はインターロイキン-1受容体アンタゴニスト発現、又は可溶性TNF若しくはIL-1受容体を低減する。ある実施形態では、マクロファージ及び内皮が、酸化窒素活性阻害の細胞標的であり得る。現在まで、敗血症ショックの治療に成功した療法はない。

【0079】

ウイルス性疾患

本発明の幾つかの実施形態には、ウイルス性感染症を有する対象体を治療することが含まれる。本明細書の他の実施形態には、ウイルスと接触した対象体でのウイルス性感染症の発症を予防するために、本明細書に開示された組成物を投与することが含まれていてもよい。本明細書で企図されているウイルス性感染症には、限定するものではないが、以下のものが含まれていてもよい：ヒト免疫不全ウイルス (HIV) AIDS、インフルエンザウイルス (例えば、A、B、C型、インフルエンザA型H1N1、H1N2、H3N2、H9N2、H7N2、H10N7)、帯状疱疹、単純ヘルペス、ヒトパピローマウイルス、大痘瘡ウイルス (天然痘)、ラッサ熱ウイルス、鳥インフルエンザ、AIDS関連症候群、水痘瘡 (水痘)、サイトメガロウイルス (CMV)、コロラドダニ熱、デング熱、エボラ出血熱、手足口病、肝炎、HPV、伝染性単核症、ムンプス、灰白髄炎、進行性多巣性白質脳症、狂犬病、風疹、SARS、ウイルス性脳炎、ウイルス性胃腸炎、ウイルス性髄膜炎、西ナイル病、黄熱病、マールブルグ出血熱、麻疹、及び他のウイルス関連障害。

【0080】

本明細書に開示された他の実施形態は、本明細書に開示された組成物を使用して、対象体のウイルス複製及び/又は感染を阻害することにより、ウイルス感染に起因する癌の発症を低減又は予防することに関する。ウイルスにより誘発される癌には、限定するものではないが、以下のものが含まれ得る：ラウス肉腫誘導性癌、ヒトパピローマウイルス (HPV) 誘導性癌 (例えば、子宮頸癌)、ポリオーマウイルス誘導性癌、B型肝炎ウイルス誘導性癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、脊索腫、

内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑液膜腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、横紋肉腫、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌、黒色腫、前立腺癌、卵巣癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、脂腺癌、腺癌、汗腺癌、乳頭状癌、肝癌、嚢胞腺癌、乳頭腺癌、気管支癌、髄様癌、腎細胞癌、セミノーマ、胆管がん、子宮頸癌、ウイルス腫瘍、胚性癌、肺癌、絨毛膜癌、精巣腫瘍、膀胱癌、上皮癌、小細胞肺癌、頭蓋咽頭腫、髄芽細胞腫、星細胞腫、神経膠腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、希突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽腫、網膜芽細胞腫、骨髄腫、リンパ腫、及び白血病。更に他の実施形態は、ウイルス性肺炎及び気管支肺炎に関する。

【0081】

ある実施形態では、本明細書に開示された組成物を使用して、ウイルス感染症を有する対象体を治療し、ウイルス関連疾患の発症を低減又は予防することができる。例えば、本明細書に開示された組成物を使用して、ウイルス感染症を有する対象体を治療し、ウイルスの伝染を低減し、対象体でのウイルス複製（例えば、インフルエンザ又は対象体間で伝染する他の疾患）を低減し、それにより対象体間での伝染を低減することができる。

【0082】

種々のペプチドの構築体

本明細書の実施形態は、AAT融合分子、全長AAT又はAATに由来するカルボキシ末端ペプチド（例えば、AATの最後の80個のアミノ酸に見出されるAATのカルボキシ末端ペプチド、又はAATの最後の36個のアミノ酸に見出されるAATのカルボキシ末端ペプチド等）のいずれかの迅速な生成及び使用を提供する。

【0083】

本発明の1つの実施形態では、組成物は、AAT療法（例えば、哺乳動物由来のAAT）、例えば、AAT及びその誘導体に対応するカルボキシ末端アミノ酸ペプチドを含む一連のペプチドを必要とする対象体を治療するための構築体を含んでもよい。これらのペプチドには、以下のものを含むペンタペプチドが含まれていてもよい：FVFLM（配列番号2）、FVFAM（配列番号3）、FVALM（配列番号4）、FVFLA（配列番号5）、FLVFI（配列番号6）、FLMII（配列番号7）、FLFVL（配列番号8）、FLFVV（配列番号9）、FLFLI（配列番号10）、FLFFI（配列番号11）、FLMFI（配列番号12）、FMLLI（配列番号13）、FIIMI（配列番号14）、FLFCI（配列番号15）、FLFAV（配列番号16）、FVYLI（配列番号17）、FAFLM（18）、AVFLM（配列番号19）、及びそれらの任意の組み合わせ。

【0084】

他の実施形態では、また、本明細書の構築体、医薬組成物、及び方法に使用されることが企図されているAATペプチドは、カルボキシ末端アミノ酸に関連する、配列番号1又は配列番号33（394アミノ酸の天然AAT、最も一般的な形態は、サブタイプM1、M2、M3等を有するM型であり、これらも本明細書で企図されている）のこうした特定のAATペプチドのいずれか又は全てを含むことが意図されている。抗炎症性活性及び/又は免疫調節活性を有するAATポリペプチドは全て、本明細書に開示された方法での使用が企図されている。315～394の範囲のアミノ酸、325～384、358～394、340～380等の範囲のアミノ酸等の、AAT又はAAT様活性を模倣する連続アミノ酸のあらゆる組み合わせを使用することができる。加えて、カルボキシ末端の5マー、10マー、15マー、20マー、25マー、30マー、35マー等の連続アミノ酸配列の組み合わせも使用することができる。例えば、配列番号1 AAT 314～394に由来する5マー、10マー、15マー、20マーの連続アミノ酸の任意の組み合わせを、本明細書で企図された構築体の開発又は精製に使用することができる。

【0085】

ある実施形態は、AAT分子全体（例えば、配列番号1又は33）を、又はAATのカルボキシ末端アミノ酸領域に由来するペプチド分子を、IgG（例えば、Fc、又は例えばヒンジ領域を低減させた突然変異Fc）又はその断片に結合させることを含む、組換え

融合タンパク質の生成に関する。A A Tの1つの一般的な形態は、配列番号33に示されている。本明細書で企図されている1つの構築体は、配列番号32として参照されている（例えば、全長A A T、リーダー配列、及び免疫グロブリン分子のF c部分/断片）。これらの構築体は、本明細書に開示された組成物中に2量体形態として使用されてもよく又は単量体形態として使用されてもよい。これらの実施形態によると、薬学的に許容される組成物は、F c - A A Tの2量体、又はF c - A A Tの単量体、又はF cから切断されたA A T、又はそれらの組み合わせ、及び薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。加えて、F c領域に点突然変異を導入して、ヒンジ領域の柔軟性を低減させ、新規のF c - A A T分子を生成することができる。他の実施形態では、F cをA A T又はA A Tペプチドに結合する前に、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又はI g G 4に由来するF cのヒンジ領域を、欠失又は切断することができる。F cを更に操作して上記領域を修飾し、受容体相互作用を低減させ、F c - A A T構築体活性を増強することができる。例えば、F c領域に点突然変異を導入して、ヒンジ領域の柔軟性を低減させてもよく、又はこの領域に欠失又は付加を導入し、この領域に関する二次的相互作用に影響を及ぼすか又は融合分子の三次構造を変更して、新規のF c - A A T分子を生成してもよい。

10

【0086】

【化1】

配列番号33: EDPQGDAQAQKTDTSHTDQDHPTFNKITPNLAFAFS

LYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTPEAQIHEGF
QELLRTLNQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFQDTEEA
KKQINDYVEKGTQGGKIVDLVKELDRDTVFAVNYIFFKKGKWERPFVKDTEEDFH
VDQATTVKVPMKRLGFMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNAIAIFLPDEGKLQHLE
NELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTVDLKSVDLGLGITKVFSSNGADLSGVTE
EAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKS
PLFMG KVVNPTQK

20

他の実施形態では、A A Tプロテアーゼ結合ドメインは、この分子のプロテアーゼ機能を低減又は除去し、エラスターゼ活性を阻害しないように突然変異させることができる。これらの分子は、F c - A A T突然変異体等の、本明細書で企図された任意の構築体を使用することができる。ある実施形態では、突然変異A A Tを使用して、本明細書に開示された方法によりA A T構築体を生成することができる。他の実施形態では、突然変異分子（例えば、プロテアーゼ活性が低減されているか又は本質的に活性がない）は、その抗炎症効果及び/又は免疫調節効果を保持しており、抗炎症性分子として、A A T療法を必要とする対象体に使用することができる。当業者であれば、A A Tの非プロテアーゼ結合ドメイン、並びに天然A A Tのカルボキシ末端の最後の80個のアミノ酸と呼ばれるものを理解するであろう。

30

【0087】

上述の方法の各々では、1 - アンチトリプシン又はそのカルボキシ末端ペプチド誘導体は、本明細書の組成物に使用することが企図されている。これらのペプチド誘導体には、限定するものではないが、A A Tの最後の80個のカルボキシ末端由来アミノ酸を含有するアミノ酸ペプチドが含まれていてもよい：G I T K V F S N G A（配列番号20）、D L S G V T E E A P（配列番号21）、L K L S K A V H K A（配列番号22）、V L T I D E K G T E（配列番号23）、A A G A M F L E A I（配列番号24）、P M S I P P E V K F（配列番号25）、N K P F V F L M I E（配列番号26）、Q N T K S P L F M G（配列番号27）、K V V N P T Q K（配列番号28）、L E A I P M S I P P E V K F N K P F V F L M（配列番号29）；及びL E A I P M S I P P E V K F N K P F V F（配列番号30）、G A D L S G V T E E A P L K L S K A V H K A V L T I D E

40

50

K G T E A A G A M F L E A I P M S I P P E V K F N K P F V F L M I E Q N T K S P
L F M G K V V N P T Q K (配列番号 3 1)、配列番号 3 4 又はそれらの任意の組み合わせ。ある実施形態では、A A T のカルボキシ末端ペプチドは、配列番号 3 3 により特定される天然 M 型アミノ酸配列と、8 0 %、又は 8 5 %、又は 9 0 %、又は 9 5 %、又は 9 9 % 同一である。ある実施形態では、約 3 個、約 4 個、又は約 5 個のアミノ酸が、M 型配列のカルボキシ末端側に由来する 8 0 マーとは異なってもよい (例えば、点突然変異)。

【 0 0 8 8 】

ある実施形態には、融合分子配列番号 3 2、又は F c 領域が I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4、又は更に I g D に由来する F c ヒンジ領域を有する又は有していない他の F c - A A T 融合分子の組成物が含まれる。これらの実施形態によると、組成物は、医薬組成物であってもよい。

10

【 0 0 8 9 】

ある実施形態では、S E C 受容体に結合可能な組換え A A T 又は A A T 由来カルボキシ末端ペプチドの組成物、又は A A T 様活性を有する組成物を、それを必要とする対象体に投与することができる。本明細書に開示されているように、A A T のカルボキシ末端領域は、他のヒト A A T 分子又は他の天然 A A T 分子の最後の 8 0 個のアミノ酸 (配列番号 3 1) を含む。他の実施形態では、A A T に由来するペプチドには、5 マー、1 0 マー、2 0 マー、2 5 マー、3 0 マー、3 5 マー、4 0 マー、5 0 マー、及び最大 8 0 マーの A A T 分子が含まれていてもよく、企図されたペプチドはいずれも、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たず、A A T のカルボキシ末端に由来しており、放射線を受けている対象体、又は偶然に若しくは他の原因で大量の放射線に被曝した対象体を治療するために使用することが可能である。

20

【 0 0 9 0 】

本発明の 1 つの実施形態では、構築体は、S E C 受容体と係合又は結合する化合物を含んでいてもよい。記載されている方法の幾つかでは、本発明の方法で使用するために企図された、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たない A A T 突然変異体又は A A T 由来ペプチド (例えば、哺乳動物に由来する) は、A A T に対応するカルボキシ末端アミノ酸ペプチドを含む一連のペプチドを含むことができる。加えて、アミノ酸 5 マー又は 1 0 マー又は 2 0 マー又は 3 0 マー以上の組み合わせも使用することができる。例えば、1 つ又は複数の 5 マー又は 1 0 マー又は 2 0 マー等は、配列番号 1 として表されている天然 A A T の A A 3 1 5 から開始し、A A 3 9 4 で終了する連続アミノ酸を含むことができる。本明細書で企図されているように、カルボキシ端部に向かう配列の後半部分は、カルボキシ末端と呼ばれる。ある実施形態では、カルボキシル末端から逆方向に進行する A A T のカルボキシルドメインは、異種間で大部分が保存されているアミノ酸として規定され、A A T のプロテアーゼ結合ドメインには寄与しない。加えて、他の実施形態では、A A T プロテアーゼ結合ドメインは、この分子のプロテアーゼ機能を低減又は除去するために突然変異させることができる。この分子は、本明細書で企図された任意の構築体を使用することができる。他の実施形態では、突然変異分子は、その抗炎症効果及び / 又は免疫調節効果を保持することができる。また、本明細書では、カルボキシルドメインは、非プロテアーゼ結合ドメインであることが企図されている。当業者であれば、A A T の非プロテアーゼ結合ドメインを理解するであろう。

30

40

【 0 0 9 1 】

上述の方法の各々では、本明細書の組成物には、A A T のカルボキシ末端に由来するペプチドが含まれていてもよい。ある実施形態では、本明細書の方法及び組成物で使用される A A T 結合分子には、限定するものではないが、配列番号 1、天然 A A T (血清から単離される A A T のおよそ 9 0 % を占める 3 9 4 A A 長の分子)、他の A A T M 型、又は他の A A T 分子の組成物が含まれていてもよい。

【 0 0 9 2 】

【化 2】

グリッド：

下線＝制限部位

無印＝ヒトAAT分子

Fc＝ 網掛け

ヒンジ領域＝イタリック及び太字 (Lucida console)

配列番号47

AAT-Fc2 (pCAG.neo-hAAT-hIgG1 Fc) (配列番号32に対する核酸配列)

人工：ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG1のFc断片に由来

< DNA 配列 > dsDNA 1977 bp

GAATTCGCCA CCATGCCGTC TTCTGTCTCG TGGGGCATCC TCCTGCTGGC AGGCCTGTGC 60
 TGCTTGGTCC CTGTCTCCCT GGCTGAGGAT CCCCAGGGAG ATGCTGCCCA GAAGACAGAT 120
 ACATCCCACC ACGATCAGGA TCACCCAACC TTCAACAAGA TACCCCCAA CCTGGCTGAG 180
 TTCGCCTTCA GCCTATACCG CCAGCTGGCA CACCAGTCCA ACAGCACCAA TATCTTCTTC 240
 TCCCCAGTGA GCATCGCTAC AGCCTTTGCA ATGCTCTCCC TGGGGACCAA GGCTGACACT 300
 CACGATGAAA TCCTGGAGGG CCTGAATTTC AACCTCACGG AGATTCCGGA GGCTCAGATC 360
 CATGAAGGCT TCCAGGAAC TCTCCGTACC CTCAACCAGC CAGACAGCCA GCTCCAGCTG 420
 ACCACCGGCA ATGGCCTGTT CCTCAGCGAG GGCCTGAAGC TAGTGGATAA GTTTTTGGAG 480
 GATGTTAAAA AGTTGTACCA CTCAGAAGCC TTCACTGTCA ACTTCGGGGA CACCGAAGAG 540
 GCCAAGAAAC AGATCAACGA TTACGTGGAG AAGGGTACTC AAGGGAAAAT TGTGGATTG 600
 GTCAAGGAGC TTGACAGAGA CACAGTTTTT GCTCTGGTGA ATTACATCTT CTTTAAAGGC 660
 AAATGGGAGA GACCCCTTGA AGTCAAGGAC ACCGAGGAAG AGGACTTCCA CGTGGACCAG 720
 GCGACCACCG TGAAGGTGCC TATGATGAAG CGTTTAGGCA TGTTTAACAT CCAGCACTGT 780
 AAGAAGCTGT CCAGCTGGGT GCTGCTGATG AAATACCTGG GCAATGCCAC CGCCATCTTC 840
 TTCTGCCTG ATGAGGGGAA ACTACAGCAC CTGGAAAATG AACTACCCA CGATATCATC 900
 ACCAAGTTCC TGAAAATGA AGACAGAAGG TCTGCCAGCT TACATTTACC CAAACTGTCC 960
 ATTACTGGAA CCTATGATCT GAAGAGCGTC CTGGGTCAAC TGGGCATCAC TAAGTCTTTC 1020
 AGCAATGGGG CTGACCTCTC CGGGGTCACA GAGGAGGCAC CCCTGAAGCT CTCCAAGGCC 1080
 GTGCATAAGG CTGTGCTGAC CATCGACGAG AAAGGGACTG AAGCTGCTGG GGCCATGTTT 1140
 TTAGAGGCCA TACCCATGTC TATCCCCCCC GAGGTCAAGT TCAACAAACC CTTTGTCTTC 1200
 TTAATGATTG AACAAAATAC CAAGTCTCCC CTCTTCATGG GAAAAGTGGT GAATCCCACC 1260
 CAAAAA**ACGC** **GT**GAGCCCCA ATCTTGTGAC AAAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCA 1320
 CCTGA**ACTCC** TGGGGGGACC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC 1380
 ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT 1440
 GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG 1500
 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG 1560
 GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC 1620
 ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG 1680
 CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTACGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC 1740
 TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC 1800
 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC 1860

10

20

30

40

GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT 1920
 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG AGGATCT 1977

配列番号32

AAT-Fc2 < アミノ酸配列 >

652 a.a.

MPSSVSWGIL LLAGLCCLVP VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEFASF 60
 LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF 120
 QELLRTLNPQ DSQQLQTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAFVTN FGDTEEAKKQ 180
 INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTV FALVN YIFFFKGWER PFEVKDTEEE DFHVDQATTV 240
 KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL 300
 ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA 360
 VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQKTR 420
EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF 480
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT 540
 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP 600
 PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALH NH YTQKSLSLSP GK 652

10

20

配列番号48

AAT-Fc3 (pCAG.neo-hAAT-hIgG1 Fc; ヒンジ欠失)

(人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG1のFc断片ヒンジ欠失型に由来)

< DNA 配列 > dsDNA 1950 bp

GAATTCGCCA CCATGCCGTC TTCTGTCTCG TGGGGCATCC TCCTGCTGGC AGGCCTGTGC 60
 TGCCTGGTCC CTGTCTCCCT GGCTGAGGAT CCCCAGGGAG ATGCTGCCCA GAAGACAGAT 120
 ACATCCCACC ACGATCAGGA TCACCCAACC TTCAACAAGA TCACCCCCAA CCTGGCTGAG 180
 TTCGCCTTCA GCCTATACCG CCAGCTGGCA CACCAGTCCA ACAGACCAA TATCTTCTTC 240
 TCCCCAGTGA GCATCGCTAC AGCCTTTGCA ATGCTCTCCC TGGGGACCAA GGCTGACACT 300
 CACGATGAAA TCCTGGAGGG CCTGAATTTT AACCTCACGG AGATTCCGGA GGCTCAGATC 360
 CATGAAGGCT TCCAGGAACCT CCTCCGTACC CTCAACCAGC CAGACAGCCA GCTCCAGCTG 420
 ACCACCGGCA ATGGCTGTT CCTCAGCGAG GGCTGAAGC TAGTGGATAA GTTTTGGAG 480
 GATGTTAAAA AGTTGTACCA CTCAGAAGCC TTCACTGTCA ACTTCGGGGA CACCGAAGAG 540
 GCCAAGAAAC AGATCAACGA TTACGTGGAG AAGGGTACTC AAGGGAAAAT TGTGGATTTG 600
 GTCAAGGAGC TTGACAGAGA CACAGTTTTT GCTCTGGTGA ATTACATCTT CTTTAAAGGC 660
 AAATGGGAGA GACCCTTTGA AGTCAAGGAC ACCGAGGAAG AGGACTTCCA CGTGGACCAG 720
 GCGACCACCG TGAAGGTGCC TATGATGAAG CGTTTAGGCA TGTTTAACAT CCAGCACTGT 780
 AAGAAGCTGT CCAGCTGGGT GCTGCTGATG AAATACCTGG GCAATGCCAC CGCCATCTTC 840
 TTCTGCCTG ATGAGGGGAA ACTACAGCAC CTGGAAAATG AACTCACCCA CGATATCATC 900
 ACCAAGTTCC TGGAAAATGA AGACAGAAGG TCTGCCAGCT TACATTTACC CAAACTGTCC 960
 ATTACTGGAA CCTATGATCT GAAGAGCGTC CTGGGTCAAC TGGGCATCAC TAAGGTCTTC 1020

30

40

AGCAATGGGG CTGACCTCTC CGGGGTCACA GAGGAGGCAC CCCTGAAGCT CTCCAAGGCC 1080
 GTGCATAAGG CTGTGCTGAC CATCGACGAG AAAGGGACTG AAGCTGCTGG GGCCATGTTT 1140
 TTAGAGGCCA TACCCATGTC TATCCCCCCC GAGGTCAAGT TCAACAAACC CTTTGCTCTC 1200
 TTAATGATTG AACAAAATAC CAAGTCTCCC CTCTTCATGG GAAAAGTGGT GAATCCCACC 1260
 CAAAAAACGC GTACATGCCC ACCGTGCCCC GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC 1320
 TTCCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA 1380
 TGCCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 1440
 GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 1500
 CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG 1560
 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 1620
 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG 1680
 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG 1740
 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC 1800
 GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 1860
 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 1920
 CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGGGATCT 1950

10

配列番号49

AAT-Fc3 < アミノ酸配列 > 新配列49 (人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG1のFc断片に由来)

20

643 a.a.

MPSSVSWGIL LLAGLCCLVP VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEFASF 60
 LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF 120
 QELLRTLNPQ DSQQLQTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAFVTN FGDTEEAKKQ 180
 INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTV FALVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQATTV 240
 KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYL G NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL 300
 ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA 360
 VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQKTR 420
TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV 480
 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKQPR 540
 EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCIVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGSE 600
 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSL S PGK 643

30

配列番号50

AAT-Fc4 (pCAG.neo-hAAT-hIgG2 Fc, 完全) >

(人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG2のFc断片に由来)

< DNA 配列 > dsDNA 1962 bp

40

GAATTCGCCA CCATGCCGTC TTCTGTCTCG TGGGGCATCC TCCTGCTGGC AGGCCTGTGC 60
 TGCCTGGTCC CTGTCTCCCT GGCTGAGGAT CCCCAGGGAG ATGCTGCCCA GAAGACAGAT 120
 ACATCCCACC ACGATCAGGA TCACCCAACC TTCAACAAGA TCACCCCA CCGTGGCTGAG 180

TTCGCCTTCA GCCTATACCG CCAGCTGGCA CACCAGTCCA ACAGCACCAA TATCTTCTTC	240	
TCCCCAGTGA GCATCGCTAC AGCCTTTGCA ATGCTCTCCC TGGGGACCAA GGCTGACACT	300	
CACGATGAAA TCCTGGAGGG CCTGAATTTT AACCTCACGG AGATTCCGGA GGCTCAGATC	360	
CATGAAGGCT TCCAGGAACT CCTCCGTACC CTCAACCAGC CAGACAGCCA GCTCCAGCTG	420	
ACCACCGGCA ATGGCCTGTT CCTCAGCGAG GGCCTGAAGC TAGTGGATAA GTTTTTGGAG	480	
GATGTAAAA AGTTGTACCA CTCAGAAGCC TTCACTGTCA ACTTCGGGGA CACCGAAGAG	540	
GCCAAGAAAC AGATCAACGA TTACGTGGAG AAGGGTACTC AAGGGAAAAT TGTGGATTTG	600	
GTCAAGGAGC TTGACAGAGA CACAGTTTTT GCTCTGGTGA ATTACATCTT CTTTAAAGGC	660	
AAATGGGAGA GACCCTTTGA AGTCAAGGAC ACCGAGGAAG AGGACTTCCA CGTGGACCAG	720	10
GCGACCACCG TGAAGGTGCC TATGATGAAG CGTTTAGGCA TGTTTAACAT CCAGCACTGT	780	
AAGAAGCTGT CCAGCTGGGT GCTGCTGATG AAATACCTGG GCAATGCCAC CGCCATCTTC	840	
TTCTGCTCTG ATGAGGGGAA ACTACAGCAC CTGGAAAATG AACTCACCCA CGATATCATC	900	
ACCAAGTTCC TGGAAAATGA AGACAGAAGG TCTGCCAGCT TACATTTACC CAAACTGTCC	960	
ATTACTGGAA CCTATGATCT GAAGAGCGTC CTGGGTCAAC TGGGCATCAC TAAGGTCTTC	1020	
AGCAATGGGG CTGACCTCTC CGGGGTCACA GAGGAGGCAC CCCTGAAGCT CTCCAAGGCC	1080	
GTGCATAAGG CTGTGCTGAC CATCGACGAG AAAGGGACTG AAGCTGCTGG GGCCATGTTT	1140	
TTAGAGGCCA TACCATGTC TATCCCCCCC GAGGTCAAGT TCAACAAACC CTTTGTCTTC	1200	
TTAATGATTG AACAAAATAC CAAGTCTCCC CTCTTCATGG GAAAAGTGGT GAATCCCACC	1260	20
CAAAAA ACGC <u>GT</u> CGCAAATG TTGTGTCGAG TGCCACCGT GCCCAGCACC ACCTGTGGCA	1320	
GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC	1380	
CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC	1440	
TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC	1500	
AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC	1560	
AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC	1620	
TCCAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT	1680	
GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC	1740	
ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC	1800	
GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG	1860	30
TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC	1920	
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGAGGAT <u>CT</u>	1962	

配列番号51

AAT-Fc4 < アミノ酸配列 > (人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG2のFc断片に由来)

647 a.a.

MPSSVSWGIL LLAGLCCLVP VSLAEDPQGD AAQKTDTSBH DQDHPTFNKI TPNLAEFASF	60	
LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF	120	40
QELLRLNQF DSQQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAFTVN FGDTEEAKKQ	180	
INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDVFALVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQATTV	240	
KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL	300	

ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA 360
 VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQKTR 420
RKCCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD 480
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK 540
 GQPREPOVYT LPPSRDELTK NOVSLTCIVK GFYPSDIAVE WESNGQPENNI YKTTTPVLDS 600
 DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK 647

配列番号52

AAT-Fc5 (pCAG.neo-hAAT-hIgG3 Fc, 完全)

10

(人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG3のFc断片に由来)

< DNA 配列 > dsDNA 1995 bp

GAATTCGCCA CCATGCCGTC TTCTGTCTCG TGGGGCATCC TCCTGCTGGC AGGCCTGTGC 60
 TGCCTGGTCC CTGTCTCCCT GGCTGAGGAT CCCCAGGGAG ATGCTGCCCA GAAGACAGAT 120
 ACATCCCACC ACGATCAGGA TCACCCAACC TTCAACAAGA TCACCCCAAA CCTGGCTGAG 180
 TTCGCCTTCA GCCTATACCG CCAGCTGGCA CACCAGTCCA ACAGCACCAA TATCTTCTTC 240
 TCCCCAGTGA GCATCGCTAC AGCCTTTGCA ATGCTCTCCC TGGGGACCAA GGCTGACACT 300
 CACGATGAAA TCCTGGAGGG CCTGAATTTC AACCTCACGG AGATTCCGGA GGCTCAGATC 360
 CATGAAGGCT TCCAGGAACCT CCTCCGTACC CTCAACCAGC CAGACAGCCA GCTCCAGCTG 420
 ACCACCGGCA ATGGCCTGTT CCTCAGCGAG GGCCTGAAGC TAGTGGATAA GTTTTTGGAG 480
 GATGTTAAAA AGTTGTACCA CTCAGAAGCC TTCACTGTCA ACTTCGGGGA CACCGAAGAG 540
 GCCAAGAAAC AGATCAACGA TTACGTGGAG AAGGGTACTC AAGGGAAAAT TGTGGATTG 600
 GTCAAGGAGC TTGACAGAGA CACAGTTTTT GCTCTGGTGA ATTACATCTT CTTTAAAGGC 660
 AAATGGGAGA GACCCTTTGA AGTCAAGGAC ACCGAGGAAG AGGACTTCCA CGTGGACCAG 720
 GCGACCACCG TGAAGGTGCC TATGATGAAG CGTTTAGGCA TGTTTAAACAT CCAGCACTGT 780
 AAGAAGCTGT CCAGCTGGGT GCTGCTGATG AAATACCTGG GCAATGCCAC CGCCATCTTC 840
 TTCTGCCTG ATGAGGGGAA ACTACAGCAC CTGGAAAATG AACTCACCCA CGATATCATC 900
 ACCAAGTTCC TGGAAAATGA AGACAGAAGG TCTGCCAGCT TACATTTACC CAAACTGTCC 960
 ATTACTGGAA CCTATGATCT GAAGAGCGTC CTGGGTCAAC TGGGCATCAC TAAGTCTTC 1020
 AGCAATGGGG CTGACCTCTC CGGGGTCAAC GAGGAGGCAC CCCTGAAGCT CTCCAAGGCC 1080
 GTGCATAAGG CTGTGCTGAC CATCGACGAG AAAGGGACTG AAGCTGCTGG GGCCATGTTT 1140
 TTAGAGGCCA TACCATGTG TATCCCCCCC GAGGTCAAGT TCAACAAACC CTTTGTCTTC 1200
 TTAATGATTG AACAAAATAC CAAGTCTCCC CTCTTCATGG GAAAAGTGGT GAATCCCACC 1260
CAAAAAACGC GTCCATGCCC ACGGTGCCCA GAGCCCAAAT CTTGTGACAC ACCTCCCCCG 1320
TGCCCCAAGGT GCCCAGCACC TGAAGTCCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTCCCCCA 1380
AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC 1440
GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT 1500
AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC 1560
CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCCTCAAC 1620
AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA 1680
CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG 1740

20

30

40

ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CIATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG	1800
CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC	1860
CTCTACAGCA AGCTCACCCT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC	1920
TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG	1980
GGTAAATGAG <u>GATCT</u>	1995

配列番号53

AAT-Fc5 < アミノ酸配列 > (人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG3のFc断片に由来)

658 a.a.

MPSSVSWGIL LLAGLCLVP VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEFASF	60
LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF	120
QELLRTLNPQ DSQQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAF TVN FGDTEEAKKQ	180
INDYVEKGQT GKIVDLVKEL DRD TVFALVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQATTV	240
KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL	300
ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVF SNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA	360
VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK TR	420
PCPRCPEPKS CDTPPPCPRC PAPELL GGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE	480
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP	540
APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	600
NYKTTTPFVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	658

配列番号54

AAT-Fc6 (pCAG.neo-hAAT-hIgG4 Fc, 完全)

人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG4のFcフラグメントに由来)

< DNA 配列 > dsDNA 1965 bp

GAATTC GCCA CCATGCCGTC TTCTGTCTCG TGGGGCATCC TCCTGCTGGC AGGCCTGTGC	60
TGCCTGGTCC CTGTCTCCCT GGCTGAGGAT CCCAGGGAG ATGCTGCCCA GAAGACAGAT	120
ACATCCCACC ACGATCAGGA TCACCAACC TTCAACAAGA TCACCCCAA CCTGGCTGAG	180
TTGCCTTCA GCCTATACCG CCAGCTGGCA CACCAGTCCA ACAGACCAA TATCTTCTTC	240
TCCCCAGTGA GCATCGCTAC AGCCTTTGCA ATGCTCTCCC TGGGGACCAA GGCTGACACT	300
CACGATGAAA TCCTGGAGGG CCTGAATTTC AACCTCACGG AGATTCCGGA GGCTCAGATC	360
CATGAAGGCT TCCAGAACT CCTCCGTACC CTCAACCAGC CAGACAGCCA GCTCCAGCTG	420
ACCACCGGCA ATGGCCTGTT CCTCAGCGAG GGCCTGAAGC TAGTGGATAA GTTTTTGGAG	480
GATGTTAAAA AGTTGTACCA CTCAGAAGCC TTCACTGTCA ACTTCGGGGA CACCGAAGAG	540
GCCAAGAAAC AGATCAACGA TTACGTGGAG AAGGGTACTC AAGGGAAAAT TGTGGATTTG	600
GTCAAGGAGC TTGACAGAGA CACAGTTTTT GCTCTGGTGA ATTACATCTT CTTTAAAGGC	660
AAATGGGAGA GACCCTTTGA AGTCAAGGAC ACCGAGGAAG AGGACTTCCA CGTGGACCAG	720
GCGACCACCG TGAAGGTGCC TATGATGAAG CGTTTAGGCA TGTTTAACAT CCAGCACTGT	780
AAGAAGCTGT CCAGCTGGGT GCTGCTGATG AAATACCTGG GCAATGCCAC CGCCATCTTC	840
TTCTGCCTG ATGAGGGGAA ACTACAGCAC CTGGAAAATG AACTCACCCA CGATATCATC	900

ACCAAGTTCC TGGAAATGA AGACAGAAGG TCTGCCAGCT TACATTTACC CAAACTGTCC 960
 ATTACTGGAA CCTATGATCT GAAGAGCGTC CTGGGTCAAC TGGGCATCAC TAAGGTCTTC 1020
 AGCAATGGGG CTGACCTCTC CGGGGTCACA GAGGAGGCAC CCCTGAAGCT CTCCAAGGCC 1080
 GTGCATAAGG CTGTGCTGAC CATCGACGAG AAAGGGACTG AAGCTGCTGG GGCCATGTTT 1140
 TTAGAGGCCA TACCCATGTC TATCCCCCCC GAGGTCAAGT TCAACAAACC CTTTGTCTTC 1200
 TTAATGATTG AACAAAATAC CAAGTCTCCC CTCTTCATGG GAAAAGTGGT GAATCCCACC 1260
 CAAAAAACGC GTTCCAAATA TGGTCCCCCA TGCCCATCAT GCCCAGCACC TGAGTTCCTG 1320
 GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA AAACCCAAGG ACACCTCAT GATCTCCCGG 1380
 ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCTGA GTCAAGTTC 1440
 AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG 1500
 TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT 1560
 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC
 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC 1620
 ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCTGCC CCCATCCCGG 1680
 GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC 1740
 GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT 1800
 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC 1860
 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC 1920
 TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTAAATGAG GATCT 1965

10

20

配列番号55

AAT-Fc6 < アミノ酸配列 > (人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒトIgG4のFc断片に由来)

648 a.a.

MPSSVSWGIL LLAGLCLLPV VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEF AFS 60
 LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF 120
 QELLRTLNPQ DSQLQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAF TVN FGDTEEAKKQ 180
 INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTV FALVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQATT V 240
 KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKLQHL ENE LTHDIITKFL 300
 ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA 360
 VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQKTR 420
SKYGPPCPSC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV 480
 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA 540
 KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYP SDIAV EWESNGQ PEN NYKTTTPVLD 600
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 648

30

配列番号56

AAT-Fc7 < アミノ酸配列 > (人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒンジ欠失を有するヒトIgG2のFc断片に由来)

634 a.a.

MPSSVSWGIL LLAGLCLLPV VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEF AFS 60

40

```

LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF      120
QELLRTLNPQ DSQQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEFTVN FGDTEEAKKQ      180
INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTVFAVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQATTV      240
KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYL NATAIFFLPD EGKLQHLNE LTHDIITKFL      300
ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFNSGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA      360
VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQKTR      420
PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SPTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNKTKPRE      480
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALFAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP      540
SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD      600
KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK      634

```

10

配列番号57

AAT-Fc7 < アミノ酸配列 > (人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒンジ欠失を有するヒトIgG2のFc断片に由来)

634 a.a.

```

MPSSVSWGIL LLAGLCCLPV VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAFAFS      60
LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF      120
QELLRTLNPQ DSQQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEFTVN FGDTEEAKKQ      180
INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTVFAVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQATTV      240
KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYL NATAIFFLPD EGKLQHLNE LTHDIITKFL      300
ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFNSGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA      360
VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQKTR      420
GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ      480
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR      540
DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS      600
RWQQGNVFS SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK      632

```

20

配列番号58

AAT-Fc9 < アミノ酸配列 > (人工:ヒトアルファ-1アンチトリプシン及びヒンジ欠失を有するヒトIgG4のFc断片に由来)

632 a.a.

```

MPSSVSWGIL LLAGLCCLPV VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAFAFS      60
LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF      120
QELLRTLNPQ DSQQLTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEFTVN FGDTEEAKKQ      180
INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTVFAVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQATTV      240
KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYL NATAIFFLPD EGKLQHLNE LTHDIITKFL      300
ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFNSGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA      360
VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQKTR      420
GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ      480
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR      540
DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS      600
RWQQGNVFS SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK      632

```

40

本明細書に開示された組換え又は融合分子との比較用及び/又は対照用の市販製剤には、以下の市販製剤中の血漿由来AATが含まれていてもよい: Aralast (登録商標) (Baxter社)、Zemaira (商標) (Aventis Behring社)、Prolastin (商標)、又はProlastin C (商標) (Talecris社)、Aprotonin (商標)、又はTrasylol (登録商標) (Bayer Pharmaceutical Corporation社)、Ulinistatin

50

(商標)(小野薬品工業株式会社)、及び吸入及び/又は注射可能なAAT、Glassia(商標)(Kamada, Ltd.社、イスラエル)、又は任意の他の市販AAT組成物、又はそれらの任意の組み合わせ。

【0093】

他の実施形態は、ヒトAATの突然変異体に関し、上記突然変異体は、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たないように生成される。突然変異体を生成するための当技術分野で知られている任意の方法が企図される。幾つかの実施形態には、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たないhAATを生成するために、部位特異的突然変異誘発を使用することが含まれる(実施例セクション及びpEF-hAATを参照)。幾つかの実施形態では、組成物は、突然変異ヒトアルファ-1アンチトリプシン(hAAT)を有する医薬組成物であってもよく、上記AATは、AATの反応中心ループ(RCL)内のAATのプロテアーゼ結合部位に1つ又は複数の点突然変異を有するAATを含む。これら1つ又は複数の点突然変異は、対照ヒトAATと比較して、AATのセリンプロテアーゼ阻害活性を顕著に低減又は除去する場合がある。他の方法には、hAATを加熱するなどの他の破壊方法によりhAATのセリンプロテアーゼ阻害領域を破壊すること、又はRCL内の357位でプロリン残基がシステイン残基に修飾されたRCL突然変異体等の突然変異体を生成して、セリンプロテアーゼ阻害活性を除去又は劇的に低減すること、又は化学的にAAT(例えば、ヒトAAT)を修飾することが含まれる。ある実施形態では、融合分子は、RCL(例えば、天然AATのアミノ酸355~363)内のアミノ酸の1つ又は複数に1つ又は複数の点突然変異を有するAAT突然変異体に、操作されたFc(例えば、IgG1、2、3、又は4)又はFABを結合させることを含むことができ、このAAT突然変異体は、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たず、RCLは完全性を維持している。

10

20

【0094】

医薬組成物

本明細書の実施形態では、*in vivo*での医薬品投与に好適な生物学的適合形態で、対象体に組成物を投与することが提供される。「*in vivo*での投与に好適な生物学的適合形態」とは、活性作用剤の治療効果が任意の毒性効果を上回るように投与される活性作用剤の形態(例えば、実施形態の医薬用化学薬品、タンパク質、遺伝子、抗体等)を意味する。治療上活性量の治療用組成物の投与は、所望の結果を達成するのに必要な用量及び期間で有効な量と定義される。例えば、治療上活性量の化合物は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重等の要因、及び抗体が所望の応答を個体に誘発する能力により様々であってもよい。投与計画は、最適な治療効果を提供するために調整することができる。

30

【0095】

AAT又はそのペプチド断片又はその類似体又はその突然変異体又はその機能的誘導体(例えば、幾つかの実施形態の医薬用化学薬品、タンパク質、ペプチド)を含有する医薬組成物は、例えば、皮下、静脈内、心臓内、冠内、筋肉内、経口投与、吸入、経皮塗布、腔内塗布、局所塗布、鼻腔内、又は直腸内投与により、対象体に投与することができる。投与経路に応じて、活性化合物は、酵素、酸、及び化合物を不活化する他の自然条件による分解から化合物を保護する物質でコーティングされていてもよい。好ましい実施形態では、化合物は、経口投与することができる。別の好ましい実施形態では、化合物は、静脈内投与することができる。1つの特定の実施形態では、組成物は、吸入等、鼻腔内投与することができる。

40

【0096】

本明細書に開示された幾つかの実施形態は、ステント又はカテーテルを使用して、癌を有するか又はその疑いのある治療中の対象体に1つ又は複数の化学治療剤(例えば、本明細書に開示された組成物と共に)を送達することに関する。1つ又は複数の作用剤を腫瘍部位に直接送達することができるあらゆるステント又は当技術分野で知られている他の送達方法が企図される。これらの送達技術は、単独で又は他の送達方法と組み合わせて使用

50

することができる。

【0097】

化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、又はそれらの混合物）は、適切な担体又は希釈剤を用いて対象体に投与してもよく、酵素阻害剤と同時投与してもよく、又はリポソーム等の適切な担体を用いて投与してもよい。用語「薬学的に許容される担体」は、本明細書で使用される場合、生理食塩水又は緩衝水溶液等の希釈剤を含むことが意図される。化合物は、その不活化を防止する物質でコーティングするか、又はそのような物質と同時投与することが必要な場合がある。また、活性作用剤は、非経口投与又は腹腔内投与してもよい。また、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物で、及び油中で分散物を調製してもよい。保管及び使用の通常条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含有していてもよい。

10

【0098】

注射可能な使用に好適な医薬組成物は、当技術分野で知られている手段により投与することができる。例えば、無菌水溶液（水溶性の場合）又は分散物、及び無菌注射溶液又は分散物の即時調製のための無菌粉末を使用することができる。

【0099】

無菌注射溶液は、必要量の活性化合物（例えば、セリンプロテアーゼ活性を低減する化合物）を、上記の成分の1つ又は組み合わせと共に適切な溶媒中に組み込み、その後必要に応じて過滅菌をすることにより調製することができる。

【0100】

水性組成物には、薬学的に許容される担体又は水性媒体に溶解又は分散された、有効量の治療用化合物、ペプチド、エトープコア領域、刺激因子、及び阻害剤等が含まれていてもよい。本明細書に開示された化合物及び生体材料は、当技術分野で知られている方法により精製することができる。遊離塩基又は薬理学的に許容される塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤と適切に混合された水で調製することができる。

20

【0101】

製剤化に際して、溶液は、投与製剤と適合する様式で、治療上有効量のような量で投与されることになる。製剤は、上述したタイプの注射用溶液等の様々な剤形で容易に投与される。徐放カプセル、持続放出微粒子等も使用することができることが企図される。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、及び腹腔内投与に特に好適である。

30

【0102】

活性治療剤は、1用量当たり約0.0001～1.0ミリグラム、又は約0.001～0.1ミリグラム、又は約0.1～1.0又は更には約1～10グラムを含むように、混合物内に製剤化されてもよい。また、単一用量又は複数用量は、毎日、隔週、毎週、隔月等の所定の条件の適切なスケジュールで投与することができる。医薬組成物は、副作用を調節するのに有効な量及び頻度で投与される。正確な用量及び治療の継続期間は、公知の試験プロトコルを経験的に使用して、又は当技術分野で知られているモデル系で組成物を試験し、そこから推定することにより決定することができる。また、用量は、疾患の重症度に応じて様々であってもよい。ある実施形態では、組成物範囲は、対象体に1日1回又は週1回で導入される1.0～75 mg/kgであってもよい。また、1-アンチトリプシン、ペプチド、又は1-アンチトリプシン若しくはペプチドと同様の活性を有する薬剤の治療上有効量は、モル濃度で測定することができ、約1 nM～約2 mMの範囲であってもよい。

40

【0103】

別の実施形態では、点鼻液又はスプレー、エアゾル又は吸入剤を、目的化合物の送達に使用することができる。他の投与方法に好適な更なる製剤には、坐剤及びペッサリーが含まれていてもよい。また、直腸ペッサリー又は坐剤を使用してもよい。一般的に、坐剤の場合、従来の結合剤及び担体には、例えば、ポリアルキレングリコール又はトリグリセリドが含まれていてもよく、そのような坐剤は、0.5%～10%、好ましくは1%～2%

50

の範囲の活性成分を含有する混合物で形成されていてもよい。

【0104】

リポソーム又は微粒子を、医薬品送達系として使用することができ、公知の実験室技術により調製することができる。加えて、以前の記載のように調製された乾燥脂質又は凍結乾燥リポソームは、活性作用剤（例えば、核酸、ペプチド、タンパク質、又は化学薬品）の溶液で再構成し、その溶液を、当業者に知られている好適な溶媒で適切な濃度に希釈してもよい。カプセルに封入される活性作用剤の量は、標準的な方法により決定することができる。

【0105】

幾つかの実施形態では、医薬構築体組成物は、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たないが、他の 1 - アンチトリプシン活性を有する AAT 分子又はその類似体由来する構築体に、対象体を治療するために、単一治療用量で、急性様式で、又は慢性様式で使用する事ができる。例えば、本明細書で企図されている融合ポリペプチドは、顕著なプロテアーゼ阻害活性を持たない融合ポリペプチドであってもよい。

【0106】

ある実施形態では、本明細書の組成物は、経口で、全身的に、移植片により、持続放出又は徐放組成物（例えば、ゲル、微粒子等）により、静脈内に、局所的に、髄腔内に、皮下に、吸入により、経鼻的に、又は当技術分野で知られている他の方法、又はそれらの組み合わせで投与することができる。

【0107】

発現タンパク質及び構築体

標的遺伝子又は遺伝子の一部が決定されれば、遺伝子を適切な発現系に挿入することができる。任意の数の様々な組換え DNA 発現系で遺伝子を発現させて、大量のポリペプチド産物を生成することができ、その後それらを精製し、本明細書に開示された組成物及び方法に使用することができる。

【0108】

当業者に知られている発現系の例には、大腸菌等の細菌、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 等の酵母、バキュロウイルス、及び Cos 又は CHO 細胞等の哺乳動物発現系が含まれる。遺伝子全体を発現させてもよく、或いは、ポリペプチドの一部をコードする遺伝子の断片を産生してもよい。

【0109】

AAT 遺伝子又はポリペプチドをコードする遺伝子断片は、標準的サブクローニング技術により発現ベクターに挿入することができる。組換えポリペプチドを融合タンパク質として産生する大腸菌発現ベクターを使用し、タンパク質の迅速な親和性精製を可能にすることができる。そのような融合タンパク質発現系の例は、グルタチオン S - トランスフェラーゼ系 (Pharmacia 社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州)、マルトース結合タンパク質系 (NEB 社、ベバリー、マサチューセッツ州)、FLAG 系 (IBI 社、ニューヘブーン、コネティカット州)、及び 6 x His 系 (Qiagen 社、チャッツワース、カリフォルニア州) である。

【0110】

また、ポリペプチドのアミノ酸配列変異体を調製してもよい。これらは、例えば、天然変異により集団内に生じるポリペプチドの軽微な配列変異体であってもよく、他の種に見出される相同体であってもよい。また、それらは、天然ではないが、同様に機能するのに及び/又は天然形態のポリペプチドと交差反応する免疫応答を誘発するのに十分な程度に類似している配列であってもよい。配列変異体は、膜貫通配列を除去するために本明細書に記載されているもの等の、指定部位突然変異誘発の標準的な方法により調製してもよい。

【0111】

ポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、置換、挿入、又は欠失変異体であってもよい。欠失変異体は、機能又は免疫原性活性に不可欠ではない、天然タンパク質の 1 つ又は複数の残基を欠如しており、膜貫通配列を欠如する変異体とその代表例である。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 2 】

原核生物系又は真核生物系で発現させるためのDNAセグメントの遺伝子操作は、組換え発現における当業者に一般的に知られている技術により実施することができる。事実上、あらゆる発現系を、特許請求されている核酸配列の発現に使用することができると考えられる。

【 0 1 1 3 】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝子操作された」及び「組換え」細胞は、AAT全長cDNA又は遺伝子等の外来性DNAセグメント又は遺伝子が、人工的に導入されている細胞を指すことが意図されている。したがって、遺伝子操作された細胞は、組換え的に導入された外来性DNAセグメント又は遺伝子を含っていない天然細胞と識別可能である。組換え細胞には、導入cDNA又はゲノム遺伝子を有するものが含まれ、特定の導入遺伝子に天然では関連しない異種性プロモーターに隣接して配置されている遺伝子も含まれる。

10

【 0 1 1 4 】

本明細書の実施形態によると、全長AAT突然変異体であるか、その野生型であるか、若しくはカルボキシ末端ペプチドであるかに関わらず、組換えコード化タンパク質又はペプチドを発現するために、当技術分野で知られている1つ又は複数のプロモーターの制御下にあるか又はプロモーターに作用可能に結合されている単離された核酸を含む発現ベクターを調製することができる。タンパク質又はペプチド発現を様々な宿主発現系で達成するための、適切な核酸及び転写/翻訳調節配列を含有する発現ベクターの構築には、多くの標準的技術が使用可能である。発現に使用可能な細胞タイプには、限定するものではないが、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換された、大腸菌及び枯草菌(*B. subtilis*)等の細菌が含まれる。

20

【 0 1 1 5 】

原核生物宿主の例は、大腸菌株RR1、大腸菌LE392、大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC番号31537)並びに大腸菌W3110(F-、ラムダ-、原栄養株、ATCC番号273325);枯草菌(*Bacillus subtilis*)等の桿菌;及びサルモネラ・チフィリウム(*Salmonella typhimurium*)、セラチア・マルセスセンス(*Serratia marcescens*)、及び種々のシュードモナス種等の他の腸内細菌である。

30

【 0 1 1 6 】

一般的に、レプリコン、及び宿主細胞と適合する種に由来する配列である制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主と共に使用される。ベクターは、通常、複製部位、並びに形質転換細胞の表現型選択を提供することが可能なマーカー配列を保持する。

【 0 1 1 7 】

加えて、レプリコン及び宿主微生物と適合する制御配列を含有するファージベクターを、これらの宿主の形質転換ベクターとして使用することができる。例えば、ファージラムダGEM(商標)-11を、大腸菌LE392等の宿主細胞の形質転換に使用可能な組換えファージベクターの製作に使用することができる。

40

【 0 1 1 8 】

後で精製及び分離又は切断するためのグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)可溶性融合タンパク質の生成に使用される更なる有用なベクターには、pINベクター(Inouyeら、1985年)及びpGEXベクターが含まれる。他の好適な融合タンパク質は、-ガラクトシダーゼ又はユビキチン等を有するものである。

【 0 1 1 9 】

組換えDNA構築に最も一般的に使用されるプロモーターには、-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)、ラクトース、及びトリプトファン(trp)プロモーター系が含まれる。これらが最も一般的に使用されるものであるが、他の微生物プロモーターが発見及び使

50

用されており、それらのヌクレオチド配列に関する詳細は公開されており、当業者であれば、それらをプラスミドベクターに機能的にライゲーションすることが可能である。

【0120】

サッカロマイセスでの発現には、例えば、プラスミド Y R p 7 が一般的に使用される。このプラスミドは、トリプトファン中で増殖する能力を欠如する酵母の突然変異株、例えば、A T C C 番号 4 4 0 7 6 又は P E P 4 - 1 (J o n e s 、 1 9 7 7 年) に選択マーカーを提供する t r p 1 遺伝子を既に含有している。したがって、酵母宿主細胞ゲノムの特徴として t r p 1 の機能障害が存在することにより、トリプトファンの非存在下で増殖させることにより、形質転換を検出するための効果的な環境が提供される。酵母ベクターの好適なプロモーター配列は、当技術分野で公知である。好適な発現プラスミドを構築する場合、これらの遺伝子に関連する終止配列も、m R N A のポリアデニル化及び終止を提供するために発現されることが望ましい配列の 3 ' 側で発現ベクターにライゲーションされる。また、増殖条件により転写が制御されるという更なる利点を有する他の好適なプロモーターが、本明細書で企図される。

10

【0121】

微生物に加えて、多細胞生物に由来する細胞の培養物も、宿主として使用することができる。原理的には、脊椎動物か又は無脊椎動物かに関わらず、任意のそのような細胞培養物が使用可能である。哺乳動物細胞に加えて、これらには、組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、及び組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス (C a M V) 、タバコモザイクウイルス、T M V 、又は他の植物）に感染したか、又は 1 つ若しくは複数のコード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、T i プラスミド）で形質転換された植物細胞系が含まれる。昆虫系も企図される。

20

【0122】

有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、V E R O 及び H e L a 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞系、W 1 3 8 、B H K 、C O S - 7 、2 9 3 、H e p G 2 、3 T 3 、R I N 、及び M D C K 細胞系である。加えて、挿入配列の発現を調節するか、又は所望の特定の様式で遺伝子産物を修飾及びプロセッシングする宿主細胞株を選択してもよい。タンパク質産物のそのような修飾（例えば、グリコシル化）及びプロセッシング（例えば、切断）は、コードされたタンパク質の機能に重要な場合がある。

30

【0123】

様々な宿主細胞が、タンパク質の翻訳後プロセッシング及び修飾の特徴的及び特異的な機序を有する。発現された外来タンパク質の修飾及びプロセッシングが正確に行われるように、適切な細胞系又は宿主系を選択することができる。哺乳動物細胞で使用される発現ベクターは、通常、任意の必要なりボソーム結合部位、R N A スプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列に加えて、複製開始点（必要に応じて）、発現させようとする遺伝子の前に配置されたプロモーターを含む。複製開始点は、例えば S V 4 0 又は他のウイルス（例えば、ポリオーマ、アデノ、V S V 、B P V ）供給源等に由来するような外来性起点を含むようにベクターを構築することにより提供してもよく、又は宿主細胞染色体複製機序により提供されてもよい。ベクターが宿主細胞染色体に組み込まれる場合、後者で十分なことが多い。プロモーターは、哺乳動物細胞のゲノム由来であってもよい。また、更に、所望の遺伝子配列に通常関連するプロモーター又は制御配列を使用することが可能であり、それが望ましい場合がある。ただし、そのような制御配列が宿主細胞系と適合性であることを条件とする。

40

【0124】

アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、コード配列を、アデノウイルス転写 / 翻訳調節複合体（例えば、後期プロモーター及び 3 連リーダー配列）にライゲーションすることができる。その後、このキメラ遺伝子を、i n v i t r o 又は i n v i v o 組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域 E 1 又は E 3 ）への挿入は、感染宿主中でタンパク質を発現可能な

50

生存能力のある組換えウイルスをもたらすであろう。

【0125】

また、特定の開始シグナルが、特許請求されている単離された核酸コード配列の効率的な翻訳に必要とされる場合がある。これらのシグナルには、A T G 開始コドン及び隣接配列が含まれる。A T G 開始コドンを含む外来性翻訳調節シグナルを、更に提供する必要がある場合がある。当業者であれば、これを容易に決定し、必要なシグナルを提供することができるであろう。開始コドンは、インサート全体の翻訳を保証するために、所望のコード配列のリーディングフレームとインフレーム（又はインフェーズ）でなければならないことは周知である。これらの外来性翻訳調節シグナル及び開始コドンは、由来が様々であってもよく、天然でも合成でもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント又は転写ターミネーターの包含により増強することができる（B i t t n e r ら、1987年）。

10

【0126】

また、真核生物発現では、典型的には、元のクローニングセグメント内に含まれていない場合は、適切なポリアデニル化部位（例えば、5' - A A T A A A - 3'）を転写ユニットに組み込むことが望ましいであろう。典型的には、ポリA付加部位は、転写終結の前に位置するタンパク質の終止部位の約30～2000ヌクレオチド「下流に」配置される。

【0127】

組換えタンパク質の長期高収率産生には、安定した発現が好ましい。例えば、タンパク質をコードする構築体を安定的に発現する細胞系を遺伝子操作してもよい。ウイルス複製開始点を含む発現ベクターを使用するのではなく、宿主細胞を、適切な発現調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等）及び選択可能なマーカーにより制御されるベクターで形質転換してもよい。外来性DNAを導入した後、遺伝子操作した細胞を、栄養豊富な培地で1～2日間増殖させ、その後選択培地に切り換えてもよい。組換えプラスミドにある選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞が自身の染色体にプラスミドを安定的に組み込み、増殖してコロニーの形成を可能にし、次いでそれをクローニングして、細胞系へと拡張することができる。

20

【0128】

多くの選択系を使用することができ、それらには、以下のものに限定されないが、それぞれ、t k -、h g p r t -、又はa p r t - 細胞中の単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれる。また、メトトレキセートに対する耐性を付与するd h f r、コフェノール酸に対する耐性を付与するg p t、アミノグリコシドG - 418に対する耐性を付与するn e o、及びヒグロマイシンに対する耐性を付与するh y g r o、又は当技術分野で知られている他の方法の代謝拮抗剤耐性を、選択基準として使用してもよい。

30

【0129】

本発明の単離された核酸は、「過剰発現」させることができ、つまり、ヒト前立腺、膀胱、又は乳房細胞におけるその天然発現と比べて、又は組換え宿主細胞での他のタンパク質の発現と比べた場合でさえ、増加したレベルで発現させることができることが企図される。そのような過剰発現は、放射性物質標識及び/又はタンパク質精製を含む、様々な方法により評価することができる。しかしながら、単純で直接的な方法、例えば、S D S / P A G E 及びタンパク質染色又はウエスタンブロッティングの後、その結果生じたゲル又はプロットを濃度測定走査すること等、定量分析することを含むものが好ましい。宿主細胞により産生される他のタンパク質に対する特定のタンパク質の相対的存在量と同様に、天然ヒト前立腺、膀胱、又は乳房細胞中のレベルと比較して、組換えタンパク質又はペプチドのレベルが特異的に増加することが、過剰発現の特徴であり、例えば、ゲルで可視化される。

40

50

【0130】

本明細書では、免疫分子（例えば、Fc部分）を使用して生成された構築体は、種々の親和性カラムを使用して単離することができることが企図されている。加えて、Fc断片は、ヒンジ領域の除去等、更に操作することもできる。これらのFc断片には、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、又はIgDのいずれが含まれていてもよい。ヒンジ領域は、免疫断片をAAT標的分子に結合させる前に、除去又は切断又は突然変異させることができる。

【0131】

単離されたタンパク質

1つの実施形態は、単離されたタンパク質及びその生物学的に活性なペプチドに関する。1つの実施形態では、天然ポリペプチドは、標準的なタンパク質精製技術を使用して、適切な精製スキームにより、細胞又は組織供給源から単離することができる。ある実施形態では、天然ポリペプチドを、加熱又はそうでなければ処理して、セリンプロテアーゼ阻害活性を低減又は除去することができる。ある特定の実施形態では、セリンプロテアーゼ阻害活性は、低減され、顕著な活性は残存しない。別の実施形態では、本明細書で企図されたポリペプチドは、組換えDNA技術により産生される。組換え発現の代わりに、標準的なペプチド合成技術を使用して、ポリペプチドを化学的に合成してもよい。本明細書に開示された組成物での使用が企図されているペプチド又はタンパク質分子はいずれも、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たない組成物であってもよい。例えば、AAT組成物は、セリンプロテアーゼ阻害活性を低減又は除去するために突然変異又は切断されていてもよく、又はAATポリペプチドは単離されていてもよく、その場合、ポリペプチドは、セリンプロテアーゼ阻害活性が低減されているか又は顕著な活性を持たない。

【0132】

「単離された」又は「精製された」タンパク質又はその生物学的活性部分は、タンパク質が由来する細胞又は組織供給源に由来する細胞性物質又は他の夾雑タンパク質を実質的に含んでいないか、又は化学的に合成された場合は、化学的前駆物質又は他の化学薬品を実質的に含んでいない。したがって、細胞性物質が実質的に含まれていないタンパク質は、約30%、20%、10%、又は5%（乾燥重量による）未満の異種性タンパク質（本明細書では「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を有するタンパク質調製物を含む。また、タンパク質又はその生物学的活性部分は、組換え的に産生される場合、培養培地を実質的に含んでいないことが好ましい。タンパク質は、化学合成により生成される場合、化学的前駆物質又は他の化学薬品が実質的に含まれていないことが好ましい。例えば、タンパク質のそのような調製物は、目的のポリペプチド以外の化学的な前駆物質又は化合物が、約30%、20%、10%、5%（乾燥重量による）未満である。

【0133】

ある実施形態では、ポリペプチドをコードするヌクレオチドを、当技術分野で知られている任意の構築体に挿入して、ペプチド又はタンパク質を生成することができる。それらのペプチドには、AAT又はAAT対立遺伝子のカルボキシ末端の最後の80個のアミノ酸の一部又は全てに対応する連続アミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれていてもよい。他の有用なタンパク質は、カルボキシ末端の任意の部分と実質的に同一であり、セリンプロテアーゼ阻害活性以外の、対応する天然タンパク質のペプチドの機能的活性を保持しているが、天然対立遺伝子変異又は突然変異誘発のためアミノ酸配列が異なる。

【0134】

ある実施形態では、本明細書に開示されたFc-AAT構築体の精製は、プロテインAカラム又はプロテインAマトリックス等（Pierce社又は他のIgG精製キット）を使用することを含んでいてもよい。ある実施形態では、本明細書に開示された構築体の精製は、標的AATタンパク質又はペプチドの抗炎症活性又は免疫調節活性を保存するために、最低限のステップを使用することによるものであってもよい。これらの実施形態によると、本明細書で企図されている構築体の精製は、一段階（例えば、Fc-AAT分子のプロテインAカラム精製）によるものであってもよい（例えば、Kin-Mingら、P

rotein Engineering 11巻6号、495～500頁、1998年；
expression/Fc/Fc-X/fusion protein；and di
abody technologiesを参照）。

【0135】

本明細書では、それ自体に可逆的に結合することができる（例えば、ジスルフィド又は他の結合により）任意のタンパク質又はペプチドをコードする核酸を、本明細書に開示されたAAT構築体の生成に使用することができることが企図されている。これらの構築体は、機能喪失を低減する精製を向上させるためにAATの2量体として使用することができる、また、2量体分子として治療応用又は研究目的に使用することができる。これらの実施形態によると、AAT又はカルボキシ末端断片に結合された部分は、免疫原性の増加が所望でない限り、不活性であるか又は本質的に非免疫原性であってもよい。更に、本明細書に開示された構築体中のFcは、補体相互作用又は活性化を低減又は除去するために操作されている（例えば、ヒンジが欠失されている）。AATのカルボキシ末端領域にFcを配置しても、抗炎症及びエラスターゼ阻害等のあるAAT活性が妨害されないことが示されている。

10

【0136】

他の使用

本明細書に開示された幾つかの組成物は、より全体的に又は部分的に、過剰なセリンプロテアーゼ活性により引き起こされる生理学的な疾患を治療するための治療剤として使用することができる。加えて、生理学的な疾患を、全体的に又は部分的に阻害することができる。本明細書で企図されているペプチドは、遊離ペプチド又はその薬学的に許容される塩としての組成物で投与することができる。ペプチドは、ほとんどの場合、融合分子及び薬学的に許容される賦形剤又は薬学的に許容される担体又はその薬学的に許容される塩製剤を含む医薬組成物として対象体に投与することができる。

20

【0137】

AAT又はそのペプチド誘導体の生物学的活性部分は、タンパク質のアミノ酸配列と十分に同一であるか又はそれに由来するアミノ酸配列を含んでいてもよい（例えば、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を示す配列番号2～32、34、49、又は51のいずれかにより捕捉されるアミノ酸配列）。本発明のタンパク質の生物学的活性部分は、例えば、5、10、20、30、又は40アミノ酸以上の長さのポリペプチドであってもよい。更に、タンパク質の他の領域が欠失されている、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たない他の生物学的活性部分は、組換え技術により調製することができ、本明細書に開示されたポリペプチドの天然形態の機能的活性の1つ又は複数で評価することができる。

30

【0138】

ある実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2～32、34、49、又は51のアミノ酸配列を有していてもよい。他の有用タンパク質は、配列番号1～34、49、及び51、及び配列番号49、56、57、58により表されるFcに結合されたAAT、又はFcヒンジ領域が操作されている又は操作されていない他の構築体のいずれかと実質的に（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、又は99%）同一である。

40

【0139】

顕著なセリンプロテアーゼ活性を持たないAAT分子の変異体は、突然変異誘発、例えば別々の点突然変異、又は切断により生成することができる。例えば、反応中心ループ（RCL）の完全性を依然として維持し、AAT又はペプチドとのセリンプロテアーゼ結合能力を妨害又は防止するものの、放射線有害効果を調節するその能力が保持される点突然変異を、AAT又はそのペプチド誘導体に導入してもよい。アゴニストは、顕著なセリンプロテアーゼ活性が残存しないことを除いて、天然形態のタンパク質と実質的に同じ生物学的活性又はそのサブセットを保持することができる。タンパク質のアンタゴニストは、例えば、目的タンパク質を含む細胞のシグナル伝達カスケードの下流又は上流メンバーと競合的に結合することにより、天然形態のタンパク質の活性の1つ又は複数に阻害するこ

50

とができる。したがって、機能が限定された変異体を用いて治療することにより、特定の生物学的効果を誘発することができる。天然形態のタンパク質の生物学的活性のサブセットを有する変異体を用いて対象体を治療することにより、天然形態のタンパク質を用いた治療と比べて、対象体の副作用をより少なくすることができる。

【0140】

融合ポリペプチド

他の実施形態では、AAT及び/又はその類似体又はそのペプチド誘導体若しくは断片等の作用剤は、融合ポリペプチドの一部であってもよい。1つの例では、融合ポリペプチドは、AAT（例えば、ヒト等の天然哺乳動物 1 - アンチトリプシン）又はその類似体又はその断片、及びIgG断片等の免疫断片（例えば、Fcヒンジ欠失若しくはヒンジ切断型又はその突然変異体）であってもよい様々なアミノ酸配列を含んでいてもよい。加えて、本明細書に開示された融合ポリペプチドは、薬学的に許容される担体、賦形剤、又は希釈剤を含んでいてもよい。融合タンパク質又は融合ペプチドを生成するためのあらゆる公知の方法が、本明細書で企図される。

10

【0141】

更に別の実施形態では、AATポリペプチド又はペプチド融合タンパク質は、GST配列のC末端に融合されているGST融合タンパク質であってもよい。融合発現ベクター及び精製及び検出手段は、当技術分野で公知である。発現ベクターは、当技術分野で知られている手段により、原核生物（例えば、大腸菌）、又は真核細胞（例えば、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、酵母細胞、又は哺乳動物細胞）中で本発明の融合ポリペプチドを発現するように、日常的に設計することができる。更に別の実施形態では、本発明の核酸は、当技術分野に記載されている哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。

20

【0142】

本明細書に開示されたFc - AATは、それらが切断又は還元されて2つのFc - AAT単一分子を生成しない限り、2つのAAT分子の2量体として生じるため、本明細書に開示された融合分子と比較して、ある系に対する血漿由来AAT製剤の効果を検討する場合、タンパク質濃度を考慮に入れる。本明細書に開示された組成物に使用されるFc - AAT融合分子には、本明細書で提供されている又は当技術分野で知られている血漿由来AAT治療に应答する炎症性疾患又は他の疾患を有する対象体を治療するための、配列番号32、49、51、53、又は55～58の1つ又は複数の薬学的に許容される組成物が含まれていてもよい。ある実施形態では、AAT、突然変異AAT形態、又はAATペプチド断片に結合されたFcは、in vivoでAATの半減期を増加させるか、又はin vivoでの構築体の細胞取り込み及び輸送を促進する場合がある。したがって、組換え形態のAATの生成に関して、血漿由来AAT及び他の組換え体と比較して複数の向上が観察され、並びにFc - AAT（IgG1、Fc - AAT2）と比較してin vivoでの向上が観察された新規の分子が製作された。

30

【0143】

併用療法

本明細書で詳述されている実施形態はいずれも、本明細書に開示された組成物と組み合わせ、1つ又は複数の他の治療上有効な作用剤を更に含んでいてもよい。ある実施形態では、これらの代替的作用剤は、癌治療における癌関連薬物を含むことができる。例えば、これらの療法には、限定するものではないが、以下のものが含まれる：アスピリン、及び例えば、クロピドグレル、プラスグレル、チカグレロル、アブシキシマブ、エプチフィバチド、チロフィバンを含む他の抗血小板療法；ヘパリン及び誘導体；直接的トロンビン阻害剤又はXa阻害剤；ワルファリン；アンギオテンシン変換酵素阻害剤又はアンギオテンシン受容体遮断剤；ベータ - 及びアルファ - アドレナリン受容体遮断剤；カルシウムチャンネル遮断剤；HMGCoA還元酵素阻害剤（例えば、スタチン）；ナイアシン及び誘導体；フェノフィブラート；魚油；アルドステロン遮断剤；ヒドララジン及びニトロ誘導体；ホスホジエステラーゼ阻害剤；直接的グアニリルシクラーゼ活性化因子、抗微生物薬、

40

50

抗炎症剤、免疫調節剤、又は免疫抑制剤、又はそれらの組み合わせ。

【0144】

抗細菌性作用剤の例には、限定するものではないが、以下のものが含まれる：ペニシリン、キノロン、アミノグリコシド、バンコマイシン、モノバクタム、セファロsporin、カルバセフェム、セファマイシン、カルバペネム、及びモノバクタム、並びにそれらの種々の塩、酸、塩基、及び他の誘導体。

【0145】

本明細書で使用が企図されている抗真菌作用剤には、限定するものではないが、以下のものが含まれる：カスポファンギン、テルビナフィン塩酸塩、ナイスタチン、アムホテリシンB、グリセオフルビン、ケトコナゾール、硝酸ミコナゾール、フルシトシン、フルコ

10

【0146】

本明細書で使用が企図されている抗ウイルス剤には、限定するものではないが、以下のものが含まれる：バルガンシクロビル、アマンタジン塩酸塩、リマントジン、アシクロビル、ファムシクロビル、ホスカルネット、ガンシクロビルナトリウム、イドクスウリジン、リバビリン、ソリブジン、トリフルリジン、バラシクロビル、ビダラビン、ジダノシン、スタブジン、ザルシタピン、ジドブジン、インターフェロンアルファ、及びエドクスジン。

【0147】

本明細書で使用が企図されている抗寄生虫剤には、限定するものではないが、以下のものが含まれる：ピレトリン/ピペロニルブトキシド、ペルメトリン、ヨードキノール、メトロニダゾール、ジエチルカルバマジンクエン酸塩、ピペラジン、ピランテルパモ酸塩、メベンダゾール、チアベンダゾール、ブラジカンテル、アルベンダゾール、プログアニル、キニジングルコナート注射剤、キニーネ硫酸塩、リン酸クロロキン、メフロキン塩酸塩、リン酸プリマキン、アトバクオン、コトリモキサゾール、(スルファメトキサゾール/トリメトプリム、及びペンタミジンイセチオネート。

20

【0148】

免疫調節剤には、以下のものが含まれていてもよい：例えば、免疫系の細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、又は抗原提示細胞（APC））の細胞活性を刺激又は抑制することにより、又は免疫系以外の成分に作用し、次いで免疫系を刺激、抑制、又は調節することにより、免疫系に直接的又は間接的に作用する作用剤（例えば、ホルモン、受容体アゴニスト又はアンタゴニスト、及び神経伝達物質）。他の免疫調節剤には、免疫抑制剤又は免疫賦活剤が含まれていてもよい。抗炎症剤には、例えば、炎症応答、傷害に対する組織反応を治療する作用剤、免疫系、脈管系、又はリンパ系を治療する作用剤、又はそれらの任意の組み合わせが含まれていてもよい。

30

【0149】

本明細書での使用が企図されている抗炎症又は免疫調節薬又は作用剤には、限定するものではないが、以下のものが含まれる：インターフェロン誘導体、例えばベータセロン、
- インターフェロン；プロスタン誘導体、イロプロスト、シカプロスト；コルチゾール、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン等のグルココルチコイド；シクロスポリンA、FK-506、メトキサレン、サリドマイド、スルファサラジン、アザチオプリン、メトトレキセート等の免疫抑制剤；リボキシゲナーゼ阻害剤、例えば、ジロートン、MK-886、WY-50295、SC-45662、SC-41661A、BI-L-357；ロイコトリエンアンタゴニスト；ペプチド誘導体、例えば、ACTH及び類似体；可溶性TNF（腫瘍壊死因子）-受容体；TNF-抗体；インターロイキン、他のサイトカイン、T細胞タンパク質の可溶性受容体；インターロイキン、他のサイトカイン、及びT-細胞タンパク質の受容体に対する抗体。

40

【0150】

本明細書の組成物と組み合わせて使用される他の作用剤は、セリンプロテアーゼ阻害活

50

性を有する分子であってもよい。例えば、本明細書での使用が企図されている他のセリンプロテアーゼ阻害剤には、限定するものではないが、白血球エラスターゼ、トロンピン、カテプシンG、キモトリプシン、プラスミノゲン活性化因子、及びプラスミンが含まれていてもよい。

【0151】

加えて、本明細書に開示された方法の他の併用組成物には、ある抗体に基づく療法が含まれていてもよい。非限定的な例には、ポリクローナル抗リンパ球抗体、T細胞抗原レセプター複合体（OKT3、TIOB9）に対するモノクローナル抗体、インターロイキン-2受容体アルファを含む追加の細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体が含まれる。ある実施形態では、抗体に基づく療法は、本明細書に開示された組成物及び方法と組み合わせた誘導療法として使用することができる。

10

【0152】

本明細書で企図されている対象体には、ヒト対象体、男性又は女性、成人又は幼児、又は胎児、又は限定するものではないが、霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、モルモット、鳥類、及びげっ歯動物を含む非ヒト対象体等の他の対象体が含まれていてもよい。

【0153】

AAT

ヒトAATは、内部ジスルフィド結合を有しておらず、通常はシステイン又はグルタチオンのいずれかに分子間ジスルフィド結合された単一のシステイン残基のみを有する単一のポリペプチド鎖である。AATの1つの反応部位は、メチオニン残基を含有しており、それは、タバコ煙又は他の酸化汚染物質と接触すると酸化されやすい。そのような酸化は、AATのエラスターゼ-阻害活性を低減させ、したがって、その位置を別のアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、グリシン、フェニルアラニン、アルギニン、又はリジン）で置換すると、より安定した形態のAATが産生される。天然AATは、配列番号1若しくは33又は他の公知の天然AAT分子の配列により表すことができる。

20

【0154】

本明細書に開示された融合分子を産生及び精製することが知られているあらゆる手段が企図されている（例えば、哺乳動物細胞中で、細菌により、真菌又は他の生物により、又は植物中で生成される）。

【0155】

キット

また更なる実施形態では、上述の組成物、構築体（例えば、組換え及び/又は融合分子）、及び方法で使用するためのキットが企図される。キットは、以下のものを含んでいてもよい：AAT融合又は組換え構築体（例えば、Fc-AAT、Fc-突然変異体AAT、AAT又はAATのカルボキシ末端誘導体に結合されたIgG2突然変異体、又はFcヒンジ欠失構築体、配列番号32及び49～58等）、AATに由来する1つ又は複数のペプチドの構築体、突然変異AAT構築体組成物、遺伝子治療送達系に関連する突然変異AAT分子、又は他の組み合わせ。低分子、タンパク質、又はペプチドは、開示された方法のいずれに使用されてもよい。加えて、抗細菌剤等の他の作用剤、免疫抑制剤、抗炎症剤が、キットに提供されていてもよい。キットは、好適な容器手段、タンパク質、又はペプチド、又は類似体作用剤、及び任意に1つ又は複数の追加作用剤を含んでいてもよい。

40

【0156】

キットは、記載されている治療応用のための標準曲線又は検出アッセイを準備するために使用することができる、標識又は非標識のいずれでもよい、コードされたタンパク質又はポリペプチド抗原の適切に等分された（aliquoted）構築体組成物を更に含んでいてもよい。

【0157】

キットの容器は、一般的に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、注射器、又は他の容器、又は他の送達デバイス（例えば、ステント又はカテーテル）を含む。また、キットは、一般的に、他の併用作用剤を入れることができる第2の、第3の、

50

又は他の追加容器を含む。そのような容器には、そこに所望のバイアルが保持される射出又はブロー成形プラスチック容器が含まれていてもよい。

【0158】

ある実施形態では、キットは、限定するものではないが、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たないAAT、AAT断片、又はAAT類似体若しくはポリペプチドの構築体を含む組成物を含んでいてもよい。これらの実施形態によると、キットは、顕著なセリンプロテアーゼ阻害活性を持たないAAT又はその類似体を含んでいてもよい。

【0159】

実施例

以下の例は、種々の実施形態を例示するために含まれている。当業者であれば、以下の例において開示された技術は、特許請求されている方法、組成物、及び装置の実施において十分に機能することが発見された技術であることが理解されるべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らして、本発明の趣旨及び範囲から逸脱せずに、開示されている幾つかの実施形態に変更を行い、それでも同様の又は類似の結果を得ることができることを理解すべきである。

【0160】

実施例1

組換えヒトAAT産生用の発現プラスミドの生成

1つの例示的な方法では、Fc-AAT構築体を生成することができる。図1に示されているように、融合分子用の組換えAATを生成することができる。ヒトAAT（又はカルボキシ末端ペプチド等のAATペプチド）配列の、発現ベクターpCAGGSへの挿入。1260塩基対のヒト全長AAT cDNAを、ヒト肝臓ライブラリーから単離し、図1に示されているように、pCAGGSに挿入した。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を、発現用のプラスミドで形質移入した。限界希釈法を使用して、AAT陽性クローンを選択し、無血清培地で増殖させた。上清を収集してプールした。ヒトAATに対する抗体を使用して、約55kDaのバンドをウエスタンブロット（データ非表示）で観察し、AATであることを確認した。ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4（様々なヒンジ領域欠失、突然変異、及び最大でヒンジ領域全体の欠失を有するか又は有していない）Fc受容体との融合タンパク質を使用して、組換えAAT又はその融合分子を生成した。これらの構築体を精製した。ある例示的な方法では、これらの構築体を、Fcと結合するプロテインA（カラム又はマトリックス等として）を使用して精製し、標的融合分子を溶液から迅速に単離した。本明細書で産生された融合分子（例えば、Fc-AAT2/AAT-Fc2及びFc-AAT-6/AAT-Fc6）の代表的なSDS-PAGEゲル分離は、図3を参照されたい。

【0161】

実施例2

別の例示的な方法では、本明細書に開示された融合構築体を精製し、市販のAAT組成物により治療されることが知られている任意の疾患又は他の炎症性疾患のための方法又は治療的処置に使用することができる。

【0162】

ヒトFc IgGプラスミドは、Qiagen社から購入することができる（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4等）。ヒトcDNAを切り出し、PCRクローニングによりヒトFcベクターに挿入した。確認のためインフレーム配列解析を実施した。プラスミドをCHO細胞に形質移入し、限界希釈して単一クローンを取得した後、幾つかの安定クローンを単離した。安定クローンを増殖させ（expanded）、無血清培地を使用して更に選択した。大規模細胞培養を実施し、上清を収集及びプールした。

【0163】

Fc-AAT融合分子を含有する上清は、ゲル又はカラム中でプロテインAをマトリックスとして使用して精製することができる。ある方法では、本明細書で生成されたヒトFc-AATを、グリシン（約pH2.4）を使用してプロテインAから溶出させ、その後

迅速に生理学的 pH、約 pH 7.4 に中和した。これらの方法は、還元条件下の SDS-PAGE ゲルに単一のバンドをもたらした。その後、精製された Fc-AAT 融合構築体を、エラスターゼ阻害アッセイ、抗炎症アッセイ（例えば、サイトカインレベル等に影響する）等の AAT 関連活性について、Aralast（登録商標）、Glassia（商標）、Prolastin C（商標）等の市販製剤とすぐに比較することができた。

【0164】

ヒト AAT-Fc の精製：ウエスタンブロットでは、IgG1 由来の Fc に操作を加えていない 2 つの Fc-AAT 全長分子の完全な 2 量体を表すバンド（約 170 kDa）が示された。ウエスタンブロットの他のレーンには、ジスルフィド結合が全て破壊され、Fc-AAT の 2 つの単一分子が形成された場合が示されていた。非還元ゲル並びに還元ゲルは両方とも、AAT 構築体の純度レベルを示した。Fc-AAT を、プロテイン A クロマトグラフィーを使用して、哺乳動物細胞培養液上清から一段階で精製し、したがって AAT 活性に有害な精製の副作用を劇的に低減させることができる。以下のクローンを生成した：クローン 2：IgG1 及び AAT のカルボキシ末端へのリンカーを使用した Fc-AAT；クローン 3：Fc のヒンジ領域が除去された IgG1、及び AAT のカルボキシ末端に再び結合されているリンカーを使用した Fc-AAT。ヒンジ領域欠失を有する及び有していない IgG2、IgG3、及び IgG4 に由来する Fc を含む他のクローンを生成した。留意すべきことに、Fc-AAT2 及び Fc-AAT3 は、エラスターゼ阻害活性を保持するが、*in vivo* 及び *in vitro* の両方で比較すると、ある条件下では挙動が異なる。このことは、セリンプロテアーゼ阻害活性領域以外の別の AAT 活性領域が関与することを示唆しており、それは、抗炎症及び抗免疫活性領域 AAT であると考えられる。

【0165】

実施例 3

サイトカイン誘導性のマウス RAW マクロファージ由来 TNF に対する Fc-AAT（又はマウス AAT-Fc）の効果は、部分的には、クローンが迅速精製され、AAT 活性が保存されているため、天然 AAT（例えば、市販製剤）の活性よりも強力に TNF を低減するであろうと考えられた。また、完全なヒンジ欠失を有するクローン 3 は、試験する活性によっては、*in vitro* でより強力である場合があるが、二次的活性の問題（例えば、補体活性等）が低減されるために、*in vivo* 用としても改善された製剤であると考えられる。1 つの例示的な方法では、望ましくない免疫活性を試験するために、ATT-Fc2 / Fc-AAT2（クローン 2 完全な IgG1 ヒンジ）及び AAT-Fc3 / Fc-AAT（クローン 3、欠失 IgG1 ヒンジ）を、免疫刺激活性の自然発生、マウス TNF 産生に対する効果について試験した。

【0166】

AAT 融合分子のサイトカインアッセイ：*in vitro* でのサイトカイン産生についての細胞培養のアッセイ。RAW マクロファージを、以下の実験に使用した。Raw 264.7 細胞を 96 ウエルプレートで使用した（1 ウエル当たり 3×10^5 細胞）。図に示されるように、漸増濃度の AAT-Fc2 及び AAT-Fc3 を適用して、マウス RAW 細胞を刺激した。AAT-Fc によるマウス TNF 産生の平均 \pm SEM を、標準的 ELISA キットにより、製造業者の説明書（R&D Systems 社、ミネアポリス、ミネソタ州）に従って測定した。ここでは、2 つの異なる AAT-Fc 分子によるマウス TNF の自然誘導の差を試験した。これらの結果は、AAT-Fc3（ヒンジ欠失）が、この *in vitro* モデルにおいてでさえ、TNF 産生、炎症誘発性サイトカインマーカーの低減に、より効果的であることを支持している。図 4A には、2 つの融合分子、Fc-AAT2 及び Fc-AAT3 の比較、及び *in vitro* 系での TNF 産生の効果が示されている。図 4B には、2 つの融合分子、Fc-AAT2 及び Fc-AAT3 の、市販の血漿由来 AAT 製剤（Aralast（登録商標））との比較が示されている。Fc-AAT3 は、血漿由来 AAT（Aralast（登録商標））と同等の優れた結果を示した。留意すべきことに、腫瘍壊死因子（TNF）、カケキシン、又はカケクチン

は、以前は腫瘍壊死因子 - アルファ又は T N F - として知られており、全身性炎症に關与するサイトカインであり、急性期反応を刺激する一群のサイトカインのメンバーである。それは、C D 4 + リンパ球、N K 細胞、及びニューロン等の多くの他の細胞タイプにより産生されるが、主に活性化マクロファージ (M 1) により産生される。この *i n v i t r o* 研究は、ヒンジ領域が欠失又は修飾されている F c - A A T が、完全な F c ヒンジ領域を有する F c - A A T よりも優れた性質を有し、血漿由来製剤と同様に T N F 産生の阻害に活性であることを支持する。

【 0 1 6 7 】

これらの実験は、3 回実施して、A A T - F c 2 (I g G 1、クローン 2) 及び A A T - F c 3 (ヒンジ欠失、I g G 2、クローン 3) の観察結果が、同等であり、市販の製剤と比較したそれらの効力を正確に反映することを保証した (例えば、図 4 A 及び 4 B を参照)。その際、A A T - F c 2 (I g G 1) 及び A A T - F c 3 (ヒンジ欠失) によるマウス T N F の自然産生に顕著な違いがあったことが観察され (図 4 A)、A A T - F c 2 と比較して、A A T - F c 3 の T N F 誘導が劇的に低減されている。更に、市販の製剤 (例えば、A r a l a s t (登録商標)) を、A A T - F c 2 (クローン 2) 及び A A T - F c 3 (クローン 3) と比較すると、劇的な違いがあった。

10

【 0 1 6 8 】

同様のデータが、刺激因子としてヒト I L - 3 3 を使用して観察された。また、組換えマウス I L - 3 3 を試験した。1 0 0 及び 5 0 0 n g / m L レベルの F c - A A T (全長 A A T を有する完全 I g G 1 F c (データ非表示)) による T N F の一貫した抑制が示された。

20

【 0 1 6 9 】

実施例 4

I L - 1 受容体アンタゴニスト誘導及び I L - 8 誘導

この例示的な方法では、I L - 8 の産生を評価する。I L - 8 は、炎症性分子であり、その産生は、炎症応答誘導の指標である。この例では、ヒト血中好中球 (3×10^6 細胞 / m l) を、単独で又は L P S (1 0 n g / m l)、組換え A A T (クローン 2) (1 0 μ g / m l)、又はこの 2 つの組み合わせの存在下で 6 時間インキュベートした。細胞培養上清中での I L - 8 の産生を測定した (N = 3)。組換え A A T は、刺激因子 L P S の存在下で I L - 8 発現を劇的に低減したことが示された。クローン 3 (I g G 1 のヒンジ欠失) は、F c が操作されているものの、このクローンの A A T 部分は完全であるため、この実験 (図 5 A を参照) で反映されているのと同様の活性を有すると考えられる。このデータは、血漿由来 A A T を使用した以前のデータにより支援される (データ非表示)。したがって、これらの分子は、炎症を阻害することが可能である。

30

【 0 1 7 0 】

別の例示的な方法では、別の炎症マーカーに対する組換え分子製剤の効果を評価するために、I L - 1 受容体アンタゴニスト (I L - 1 R a) を分析した。この例では、ヒト好中球細胞に由来する I L - 1 受容体アンタゴニストの産生を、種々の濃度の組換え A A T で測定した (F c - A A T 2、クローン 2 : 図 Y 2 を参照、c o n は、分子を誘導しない陰性対照である)。これらの実験により、非常に低レベルの組換え A A T が、I L - 1 R a 産生を劇的に抑制することができたことが明らかにされた。このクローンに見出される A A T の領域は、F c - A A T 3 (ヒンジ無し) と同一であるため、このデータは、本明細書で示されている F c - A A T 2 と比較して、同様の活性が F c - A A T 3 でも得られるであろうということを支持する (図 5 B を参照)。

40

【 0 1 7 1 】

実施例 5

他のサイトカイン発現を試験し、F c A A T (クローン 2) の効果を分析した (例えば、I L - 1 ベータ、I F N ガンマ、I L - 1 7 等)。これらの結果の一部は、下記の表 1 に示されている。F c 融合を有する組換え A A T が、有害なサイトカイン産生を阻止可能であることが示された。

50

【 0 1 7 2 】

【 表 1 】

表 1

阻害パーセント				
TNF-a				
	ドナー1	ドナー2	ドナー3	
10 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	54%	54%	47%	10
1 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	17%	50%	29%	
0.1 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	28%	56%	100%	
0.01 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	-15%	63%	100%	
0.001 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD29		0%		
IL-6				
	ドナー1	ドナー2	ドナー3	
10 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	-35%	-250%	100%	20
1 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	52%	-344%	47%	
0.1 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	30%	77%	100%	
0.01 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	-35%	69%	100%	
0.001 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD29		15%		
IL-1 ベータ				
	ドナー1	ドナー2	ドナー3	
10 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	-55%	-305%	100%	20
1 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	30%	-532%	72%	
0.1 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	7%	8%	100%	
0.01 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	-45%	17%	97%	
0.001 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD29		-100%		
IFN-g				
	ドナー1	ドナー2	ドナー3	
10 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	-262%	30%		30
1 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	-9%	20%		
0.1 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	17%	100%		
0.01 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD28	65%	100%		
0.001 ug/mL FcAAT + 抗 CD3/CD29		14%		
IL-17				
Suzhao 試験 1	ドナー1	ドナー2	ドナー3	
26%			100%	40
19%			100%	
51%			100%	
			92%	

【 0 1 7 3 】

【表 2】

IL-1b pg/ml	ドナー1	単独	対照	0	0	0	0	単独	対照	0	0
			30 ug/ml	12	25	6	7		E. LPS 100 ng/ml	6	6
			15 ug/ml	5	13	2	2		E. LPS 10 ng/ml	4	3
	バルトネラ追加	対照	0	2		2	バルトネラ追加	対照	0	0	
		30 ug/ml	11	42	5	5		E. LPS 100 ng/ml	3	3	
		15 ug/ml	7	13	2	3		E. LPS 10 ng/ml	2	2	
	ドナー2	単独	対照	3	1	0	2	単独	対照	0	0
			30 ug/ml	373	119	2	2		E. LPS 100 ng/ml	73	
			15 ug/ml	138	30	0	0		E. LPS 10 ng/ml	34	66
	バルトネラ追加	対照	3	1	0	2	バルトネラ追加	対照	0	0	
		30 ug/ml	227	76	2	1		E. LPS 100 ng/ml	14	13	
		15 ug/ml	53	36	2	1		E. LPS 10 ng/ml	1	1	
IL-6 pg/ml	ドナー1	単独	対照	0	0	0	0	単独	対照	0	0
			30 ug/ml	855	923	0	0		E. LPS 100 ng/ml	2438	2141
			15 ug/ml	777	797	0	0		E. LPS 10 ng/ml	1718	1444
	バルトネラ追加	対照	0	0	0	0	バルトネラ追加	対照	0	0	
		30 ug/ml	873	939	0	0		E. LPS 100 ng/ml	2358	2132	
		15 ug/ml	838	806	0	0		E. LPS 10 ng/ml	1506	1523	
	ドナー2	単独	対照	35	0	0	0	単独	対照	0	0
			30 ug/ml	1939	1828	0	0		E. LPS 100 ng/ml	5255	
			15 ug/ml	1928	1319	0	0		E. LPS 10 ng/ml	4447	4828
	バルトネラ追加	対照	35	0	0	0	バルトネラ追加	対照	0	0	
		30 ug/ml	1129	1054	0	0		E. LPS 100 ng/ml	2812	2568	
		15 ug/ml	183	112	0	0		E. LPS 10 ng/ml	772	558	
TNF-a pg/ml	ドナー1	単独	対照	7	0	7	0	単独	対照	7	0
			30 ug/ml	595	629	174	16		E. LPS 100 ng/ml	901	
			15 ug/ml	520	386	98	101		E. LPS 10 ng/ml	736	724
	バルトネラ追加	対照	0	0	0	0	バルトネラ追加	対照	0	0	
		30 ug/ml	545	533	123	92		E. LPS 100 ng/ml	442	516	
		15 ug/ml	537	493	20	90		E. LPS 10 ng/ml	274	256	

図 6 A ~ 6 C には、Fc - AAT 2 と比較した、血漿由来 AAT の存在下での CD 1 1 b / CD 4 5 陽性細胞の発現パーセント並びに TLR 4 及び TLR 2 発現のパーセントが示されており、約 1 0 0 ~ 約 1 0 0 0 倍少ない組換え AAT (Fc - AAT 2) が、これらの有害分子に対して同じ阻害効果を示すことが見出された。例えば、To11 様受容体 4 は、5 0 0 n g 又は 1 0 0 n g のいずれでも、5 0 0 μ g の血漿由来 AAT と同様に効果的である (図 6 A を参照)。

【0174】

実施例 6

痛風モデル

痛風関節炎のモデルである、尿酸ナトリウム結晶で刺激した PBMC における IL - 1 産生に対する組換え Fc - AAT の効果。C - 1 8 (C 1 8) 脂肪酸と共に尿酸ナトリウム結晶 (MSU) で刺激した PBMC における Fc - AAT 誘導性 IL - 1 産生の効果を、以前に記述されている痛風モデルを使用して分析した。

【0175】

in vivo 炎症研究での IL - 1 産生

マウス痛風 (痛風関節炎) モデルを使用して実験を実施し、Fc - AAT 2 (Ig G 1) 対 Fc - AAT 3 (ヒンジ欠失) の効果を in vivo で比較した (図 7 A を参照)。Fc - AAT 3 (及び欠失ヒンジを有する他の Fc) は、in vivo で、Fc - AAT 2 (完全ヒンジの Ig G 1) よりも優れた結果を示すと考えられた。最初に、AAT - Fc - 2 及び AAT - Fc - 3 のタンパク質濃度を決定した。マウスを計量し、用量を

2.0 mg/kg に調節した。2 時間後、MSU C 16.0 を、関節内に注射した。4 時間後、マウスを安楽死させ、関節をスコアリングした。滑膜組織をサイトカインレベルについて均一化した（例えば、144,000 g/L = 1 モル；144,000 mg/mL = 1 M；144 mg/mL = 1 mM；144 μg/mL = 1 μM；14 μg/mL = 100 nM）。血漿由来 AAT の分子量 = 42,000（低グリコシル化）42 マイクログラム/mL の血漿由来 AAT は、240 nM であり、AAT-Fc の分子量 = 144,000（低グリコシル化）14 マイクログラム/mL の AAT-Fc は、7 nM である。更なる研究は、AAT の存在下又は非存在下で IL-6 を評価することに関し、市販の製剤（Zemaira（商標））を Fc-AAT2 及び Fc-AAT3 と比較した（図 7B）。カンジダ・アルピカンスにより誘導されたヒト血液単球細胞の *in vitro* モデルを使用して、IL-6 発現の劇的な低減が認められた。組換え製剤は両方とも、天然 AAT 製剤（Zemaira（商標））よりも優れていた（図 7B を参照）。市販の製剤は、Fc-AAT2 及び Fc-AAT3 と比較して、IL-6 発現を顕著には阻害しなかった。

10

20

30

40

50

【0176】

痛風マウスモデルを使用して別の実験を行い、完全な IL-1 レセプター阻害を観察した（図 7C を参照）。更に別の例示的な方法では、IL-1 のレベルに対する Fc-AAT2（クローン 2）の経時的分析を評価した。経過時間は、種々の量の組換え AAT と接触させた後の 0 ~ 72 時間とした。実施した Fc-AAT2 の経時的研究では、腹腔内前処理として融合分子を導入した後に、尿酸ナトリウム（NSU）結晶を膝関節に滴注した。滴注の約 4 時間後に、マウスを犠牲にし、膝関節を摘出して培養した。培養の約 2 時間後、培養上清中の IL-1 を測定した（1 群当たり N = 10）。データは図 7D に示されている。IL-1 は、Fc-AAT2 で前処理すると 48 時間を超えて阻害された。したがって、新規の組換え体が、IL-1 有害効果の阻害に役割を果たし、痛風患者の有望な治療であることが支持された。例えば、Joostenら、Arthritis Rheum. 2010 年 11 月；62 巻（11 号）：3237 ~ 3248 頁の実験手順を参照されたい。

【0177】

方法の要約：10 μl PBS 中の用量範囲の高度に純粋な MSU（30 ~ 300 μg）、200 μM の C 18.0、MSU / C 18.0（300 μg / 200 μM）又は 25 μg の SCW（ラムノース含有量）を、未感作マウスの右膝関節に関節内注射（i.a.）することにより、関節の炎症を誘導することができる。i.a. 注射の 4 時間後に、関節腫脹を測定し、滑膜組織を単離し、膝関節を組織学的検査のために摘出した。関節腫脹測定は、巨視的スコアリング又は 99 mTc 取込み法のいずれかにより測定することができる。巨視的関節腫脹を、0 ~ 3 の範囲の尺度でスコアリングする。皮膚を除去した後、膝関節をスコアリングした：0 = 腫脹無し及び 3 = 重症腫脹。99 mTc 取込み法は、以前に記述されている通り実施した（21、22）。関節腫脹は、対照関節（左膝関節）に対する、炎症部位での 99 mTc 取込みの比率として表される。1.10 を超える値は全て、関節腫脹とする。

【0178】

実施例 7

心筋梗塞モデル

別の例示的な方法では、心筋梗塞マウスモデルを使用して、以前に血漿由来 AAT モデルで示されているように（データ非表示）、Fc-AAT 融合分子が、心臓リモデリングを阻害し、梗塞サイズを低減する能力を評価した。一過性の心筋虚血（30 分間）による AMI（急性心筋梗塞）の実験モデルは、再灌流 AMI を有する患者の臨床背景を模倣する。マウスは、虚血性損傷を経験し、その後再灌流傷害を経験する。平均梗塞サイズは、左心室の 15 ~ 20 % である。マウスは、左心室の拡張及び機能不全を有する穏やかな形態の拡張型心筋症を発症する。このモデルの AMI では、7 日目に、LVEDD 及び LVE SD の増加、及び LVFS の低下（全ての比較で、対照に対して $p < 0.05$ ）が観察

された。Fc - AAT融合分子の濃度を10又は50マイクログラムに増加させると、梗塞により影響を受けた左心室のパーセントとしての梗塞サイズ測定値が、両方の濃度で顕著に低減されたことが示されている（図8）。この濃度は、血漿由来AAT製剤と比較して（比較試験では、およそ100倍を使用した。腹腔内に2ミリグラム）（データ非表示）、劇的に低減されている。

【0179】

恒久的な冠動脈閉塞によるAMIの別の実験モデルは、非再灌流広範囲AMIを有する患者の臨床背景を模倣する。マウスは、重症の虚血性損傷を経験する。平均梗塞サイズは、左心室の25～35%である。マウスは、左心室の拡張及び機能不全を有する重症形態の拡張型心筋症を発症し、致死率が高い。また、このモデルでは、血漿由来AATが、急性心筋梗塞の影響を低減するのに有効であることが示された。

10

【0180】

更に、図9に示されているように、心臓発作を模倣する別のマウスモデルを使用して、エラスターゼ活性を持たないことが示されたFc - AAT1（クローン1）、及びエラスターゼを阻害することが示されたFc - AAT2（クローン2）は、梗塞サイズとして測定された心臓リモデリングの低減に等しく効果的であった。両組換え分子は、5日間の2mg / マウスの他の作用剤（IVIg）と比較して、単一用量（50マイクログラム / マウス）で有効であった。Fc - AAT3（クローン3、IgG1のヒンジ無し）が、このin vivoモデルでは、心臓リモデリング及び虚血再灌流の他の影響を低減するのに、更により効果的であると考えられる。したがって、これらの実験は、本明細書に開示された融合分子が、虚血再灌流傷害の有害な影響及び有害な心臓疾患の低減に効果的であることを支持する。

20

【0181】

Fc - AAT融合分子は、虚血再灌流損傷を制限し、梗塞サイズを低減する。

Fc - AAT融合分子は、虚血再灌流後のサイトカイン放出を制限する。

血漿由来AATは、非再灌流AMIでの梗塞サイズを縮小せず、AATが、再灌流傷害に関連する炎症成分に影響を及ぼし（データ非表示）、したがって有害な心臓疾患を治療するためのFc - AAT融合分子の役割を支持することが示唆される。

【0182】

4) Fc - AAT融合分子は、AMIの両モデルで有害心臓モデリングを制限する。

30

実施例 8

図10には、ヒンジ領域が欠失、切断、又は突然変異されている、本明細書で企図された幾つかのFc - AAT融合分子が示されている。

【0183】

実施例 9

大腸炎 / IBDモデル

上記に示されているように、Fc - AAT3は、in vivo及びin vitroの両方で、サイトカインの産生を阻害し、したがって、炎症誘発性サイトカインの有害効果を調節する。このデータ及び大腸炎 / IBDモデルにおける血漿由来AATの従来の研究は両方とも、炎症性腸疾患の治療又は予防におけるFc - AAT（ヒンジ欠失）の役割を支持する。

40

【0184】

血漿由来AAT治療は、マウスのDSS大腸炎モデルでは、このモデルにおける炎症性腸疾患活性の最も信頼できる指標の1つである体重減少を軽減することが示されている。加えて、結腸外植片の上清に分泌されるサイトカインが顕著に減少する。

【0185】

DSSモデルでは、Fc - AAT（2マイクログラム～2mg / 日i.p.）を用いて、マウスを、媒体で治療されたマウス及び対照血漿由来AAT製剤（2mg / 日）と比較することができる。マウスを、種々の時間で計量し、その後犠牲にして体重を評価し、天然AATで観察されるような結腸短縮の減少を評価する。本明細書で示された裏付けとして

50

の証拠は、融合分子で治療した D S S 大腸炎マウスにて体重減少及び結腸短縮が観察されることにより、更に裏付けられると考える。更に、血漿由来 A A T（陽性対照）と同じか又は同様の結果が観察される融合分子の濃度は、約 10 倍及び最大 1000 倍少ないはずであると予想される。加えて、結腸外植片によるサイトカイン産生（例えば、I L - 1、I L - 6、M C P - 1、及び K C）を評価し、対照マウスと比較する。

【0186】

実施例 10

膵島細胞毒性誘導シナリオにおけるグルコース調節を評価するためのマウスモデルを使用して、F c - A A T 融合分子が、細胞移植拒絶反応を低減し、例えば、血漿由来 A A T が膵島細胞を分解から保護することができるという以前の観察により更に支持されるように、膵島細胞分解を低減する能力を評価する。ある方法では、標準的な毒素を、マウスモデル膵島ベータ細胞毒性アッセイ 毒素ストレプトゾトシン（S T Z）で使用する事ができる。以前に示されているように、市販の A A T（A r a l a s t（登録商標））は、S T Z 誘導性糖尿病で膵島細胞を保護することが示されている。以前の研究では、単一用量の S T Z を使用して、ベータ細胞死を誘導した。S T Z を 2 回注射した後、マウスは糖尿病になる（血糖が 400 m g / d L 超に上昇する）。この 2 倍の用量を、ベータ細胞の免疫破壊の許容されるモデルとして使用する。膵島の保護効果を評価するために、F c - A A T 融合分子を、血漿由来 A A T と比較する。対照（P B S）、血漿由来 A A T（市販）、又は F c - A A T（完全ヒンジ及びヒンジ欠失、1 マウス当たり約 1 マイクログラム又は 10 分の 1 未満）のいずれかを、毎日注射する。A A T の市販製剤は、有害効果を回復させ、膵島細胞機能を保存することが以前に観察された。F c - A A T（ヒンジ欠失）は、血漿由来 A A T と比較して優れた効果を有し、ヒンジ欠失のない F c - A A T よりも少ない副作用を示し、したがって、細胞及び臓器移植を支援して臓器拒絶を低減し移植片を保存するための本明細書に開示された組成物の使用を支持すると予測される。

10

20

【0187】

本明細書に開示された融合分子を、移植前、移植中、及び / 又は移植後に使用することが支持される。ある実施形態では、本明細書に開示された F c - A A T 融合分子を使用して、移植片を維持し、及び / 又は G V H D 等の移植片拒絶の有害効果を低減することができる。

30

【0188】

また、予備的データは、F c - A A T（ヒンジ欠失）の融合分子を使用して、例えば、炎症及び免疫応答の有害効果から対象体の膵島細胞を保護することにより、糖尿病の発症を低減又は予防することができることを支持する。

【0189】

実施例 11

F c - A A T の切断変異体の構築。ある例示的な実施形態では、A A T プロテアーゼ切断は、プロテアーゼ部位、例えばタバコモザイクウイルスプロテアーゼの、A A T 配列内への単なる挿入であり得る。プロテアーゼ認識部位の挿入は、A A T の切断型カルボキシル末端を生成する。この部位は、天然 A A T のカルボキシ - 36 - 末端ペプチド：S I P P E V K F N K P F V F L M I E Q N T K S P L F M G K V V N P T Q K（配列番号 34）の上流にある。

40

【0190】

これらの切断型 A A T 分子は、L P S 誘導性 I L - 1、I L - 6、及び T N F を阻害することが可能である。二価切断型融合分子は、血漿半減期の増加の点でペプチド自体よりも優れているであろう。天然 A A T は、細胞膜の脂質ラフトに見出される可能性が高いことを考慮すれば、挿入が、C 末端ではなく、N - 末端である可能性は低いであろう。したがって、C 末端の 36 個のアミノ酸を F c に結合させて二価構造にすることは、脂質ラフトにてより効果的である可能性が高い。

【0191】

F c ドメインの切断。F c 断片を除去するための別の切断部位は、F c それ自体の切断

50

部位である。この部位は、単量体 A A T 又は切断型 A A T を生成する。しかしながら、F c - I g G 1 の酵素は、F c - I g G 2 の酵素とは異なる。

【0192】

N 末端の融合タンパク質。N 末端 A A T の構築体は、A A T の抗炎症特性がエラスターゼ阻害特性に依存しないことを示すデータに基づく新規の概念である。したがって、N 末端をインフレーション構築に使用することにより、二価 C 末端を有する分子の形成が容易になる。各構築体では、グリコシル化が分子の重要な要素であるため、C H O での発現が不可欠である。したがって、C H O 細胞を、野生型並びに切断型 A A T - F c の発現に使用することになるであろう。他の例には、カルボキシ末端で結合された構築体（例えば、F c - A A T 2 及び F c - A A T 3 ）が含まれる。

10

【0193】

切断型 A A T - F c の精製及びアッセイ。プロテアーゼ挿入部位の場合、分子を切断するプロテアーゼを、最初に導入し、その後プロテイン A を使用して断片のみを単離することができる。それにより、ほぼ純粋な形態の産物が得られるであろう。ある方法では、F c 切断部位の場合等、分子をプロテイン A で精製し、F c 切断プロテアーゼを添加し、その後プロテイン A で F c 断片を除去して、残りのタンパク質をほぼ純粋にすることが最善であろう。

【0194】

実施例 1 2

2 型糖尿病 (T 2 D) における、I L - 1 誘導性 I L - 1 7 に対する F c - A A T の効果。

20

2 型糖尿病 (T 2 D) では、免疫系細胞、特に P B M C 画分の単球が、炎症を促進する役割を果たすという証拠が示されている。T 2 D 患者に由来する単球は、I L - 1 を含む重要な炎症誘発性サイトカインを過剰産生する。I L - 1 は、T 2 D 患者に由来する T 細胞による炎症誘発性 I L - 1 7 産生へとヒト T 細胞を歪めること (s k e w i n g) に関与し (非糖尿病の供与体と比較して) 、構成的に及び刺激に応答して上昇する。I L - 1 誘導性 I L - 1 7 の産生に対する、F c - A A T (r e c - A A T 、 r A A T) の効果を、モデルとしての P B M C で試験する。

【0195】

A A T T g ^{w t} マウスの生成。A A T T g 系統とは異なるこれらのマウスの特徴は、プロモーターである。この新しい系統は、ニワトリベータアクチングローバルプロモーターを有し、血中レベルは、2 型肺上皮で A A T を発現する A A T T g マウスの血中レベルよりも高いであろう。生成したら、ヘテロ接合体マウス (1 コピーの野生型 A A T を発現する) を、i n v i v o 負荷アッセイにかける。a . A A T T g ^{w t} マウスの特徴付け。D N A 分析によりヘテロ接合体マウスを確認したら、種々の組織を使用してウエスタンブロット評価を実施し、定常状態での発現を試験する。それらには、組織の組織学的検査が含まれる。b . i n v i t r o でのサイトカイン産生に関する初代細胞のアッセイ。ヒトと同様に、マウスの P B M C に由来するサイトカインを研究することが可能である。刺激因子には、全ての T o l l 様受容体 (T L R) アゴニスト、並びに I L - 1 8 及び I L - 1 2 の組み合わせが含まれる。c . 種々の負荷後の i n v i v o でのサイトカイン応答。L P S 又は加熱死スタフィロコッカス・エピデルミデス (S t a p h y l o c o c c u s e p i d e r m i d i s) を、腹腔内に注射し、血中サイトカインを特定の時間間隔で測定する。また、I L - 1 8 及び I L - 2 のモデルも試験する。このモデルでは、マウスは、低体温、大腸炎、及び低血糖を示す消耗症候群を発症する。予備的データでは、A A T T g マウスは、このモデルに耐性である。d . 脾臓同種移植片拒絶反応に対する効果。A A T T g ^{w t} マウスが T L R 負荷に耐性であることが示されたら、マウスを、脾臓同種移植片拒絶反応及びマウス脾臓に関する関連研究について評価する。

30

40

【0196】

セリンプロテアーゼ阻害活性を示さない A A T (A A T T g ^{m u}) の突然変異及びクローニング。以前に示されているように、ヒト A A T のシステインの突然変異は、プロテ

50

アーゼを阻害する能力を持たない分子をもたらす（下記の表では、非機能性と表記されている）。上記で示されている A A T プラスミドを、標準的 P C R 法により突然変異させ、C y s を A l a に置換する。配列を確認する。これは、既に突然変異されており、ヒト A A T の C y s は、E B V 遺伝子発現ベクターに挿入されていた。野生型 A A T E B V 遺伝子発現ベクターを、高圧ボラスを使用して野生型マウスの尾静脈に注射すると、D N A は肝細胞に進入し、A A T が肝臓で発現され、A A T の血清レベルが上昇する。

【 0 1 9 7 】

【 表 3 】

表 3. 反応中心：遺伝子操作された及び天然の変異体

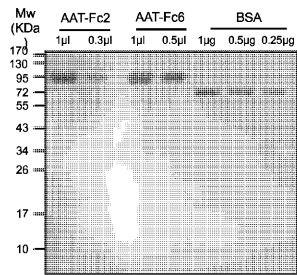
セルピン	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '	P ₅ '	阻害対象	酸化
α ₁ -アンチトリプシン	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	エラスターゼ	+
ビッツバーグ変異体	Ala	Ile	Pro	Arg	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	トロンビン	-
Val-組換え型	Ala	Ile	Pro	Val	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	エラスターゼ	-
Leu-組換え型	Ala	Ile	Pro	Leu	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	Cat G. エラスターゼ	-
P ₂ Cys-組換え型	Ala	Ile	Cys	Met	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	非機能性	-
Ala-組換え型	Ala	Ile	Pro	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	エラスターゼ	-
クライストチャーチ変異体	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro	Lys	エラスターゼ	+
P ₃ -P ₄ '-組換え型	Ala	Ala	Gly	Arg	Ser	Leu	Asn	Pro	Glu	非機能性	-
アンチトロンビン	Ile	Ala	Gly	Arg	Ser	Leu	Asn	Pro	Asn	トロンビン	-
デンバー変異体*	Ile	Ala	Gly	Arg	Leu	Leu	Asn	Pro	Asn	非機能性	-

Stephens, Thalley and Hirs (1985).

本明細書に開示及び特許請求された組成物及び方法は全て、本開示に照らして過度の実験作業を行わずに作製及び実施することができる。組成物及び方法は、好ましい実施形態の点で説明されているが、当業者であれば、本発明の概念、趣旨、及び範囲から逸脱せずに、組成物及び方法に、及び本明細書に記載の方法のステップに若しくはステップの順序に変更を適用することができることは明白であろう。より詳しくは、化学的にも生理学的にも関連するある作用剤を、本明細書に記載の作用剤の代わりに使用し、同じか又は同様の結果を達成することができることは明白であろう。当業者にとって明白なそのような類似代替物及び修飾は全て、添付の特許請求の範囲により規定されている本発明の趣旨、範囲、及び概念に含まれるものとみなされる。

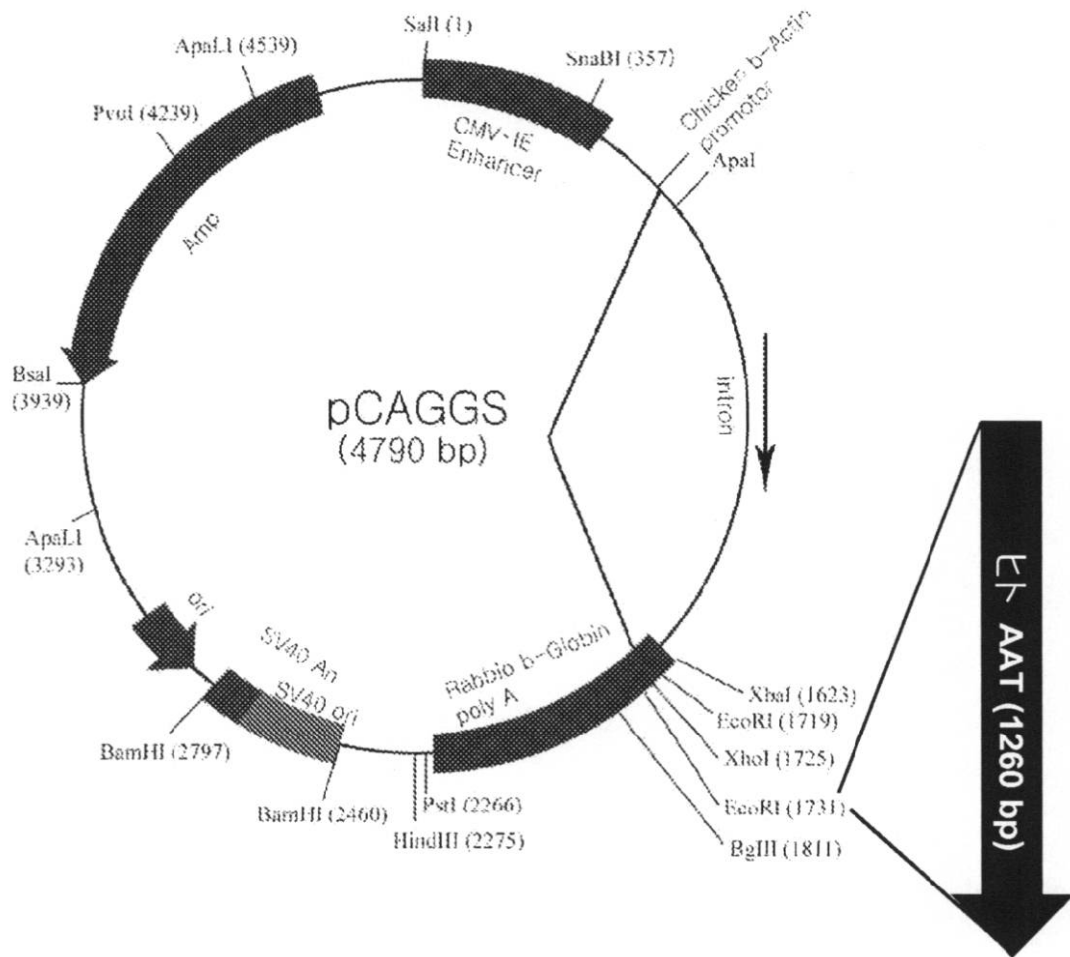
【 図 3 】

Fig. 3



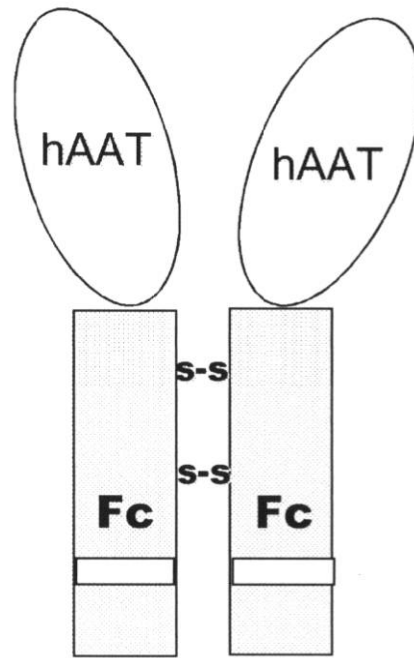
【図1】


pCAGGS- ヒト AAT



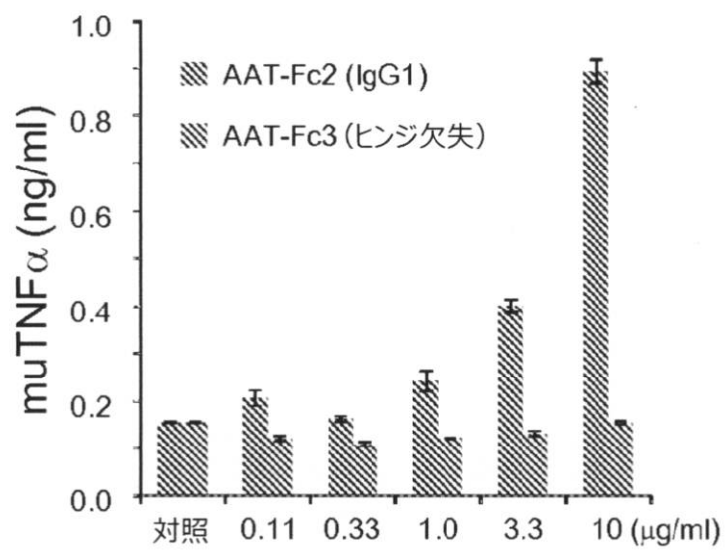
ヒトAAT(挿入物)は、AATの最後の80個以下のアミノ酸のカルボキシ末端断片とすることもできる

【 図 2 】

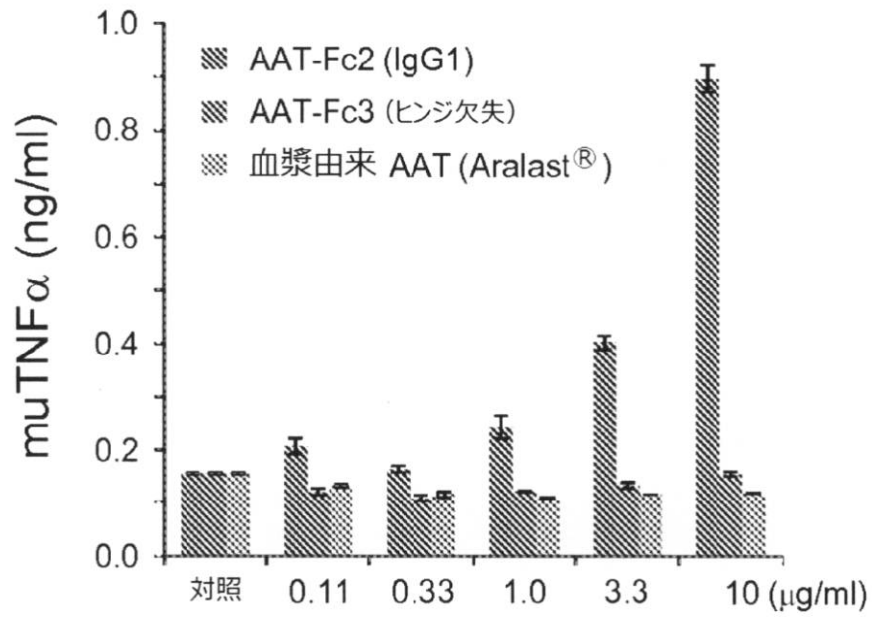


注：ヒンジ欠失または突然変異： 

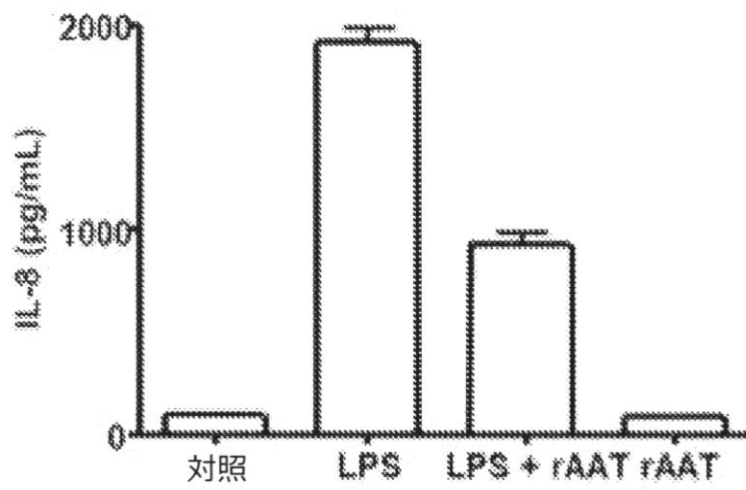
【 図 4 A 】



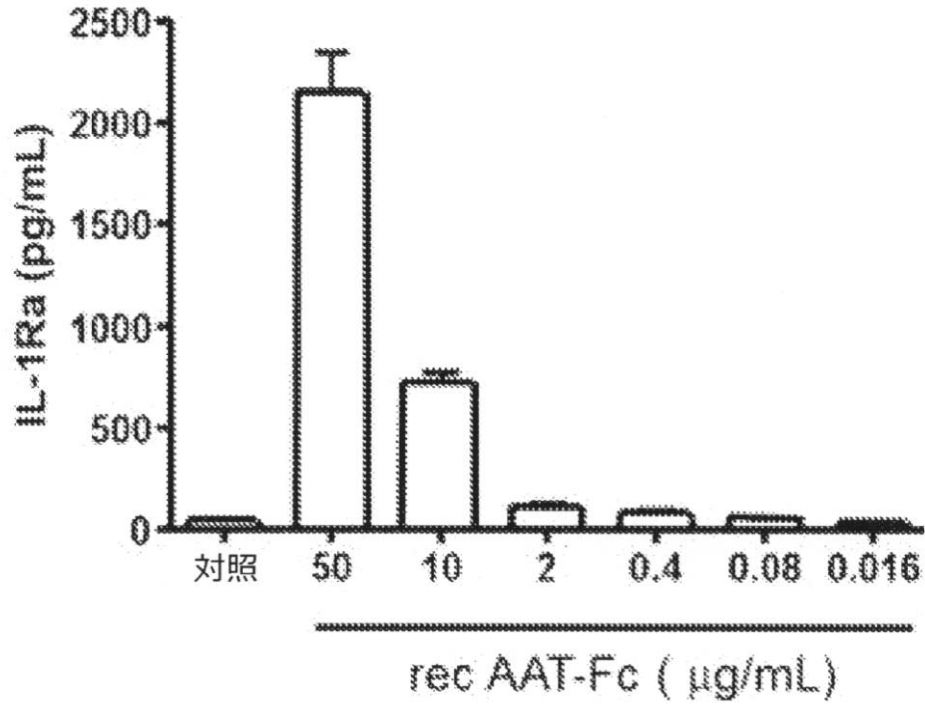
【図 4 B】



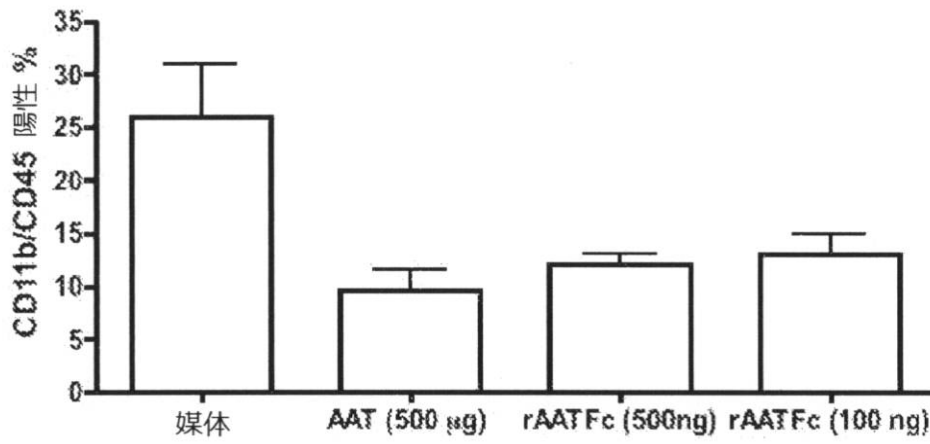
【図 5 A】



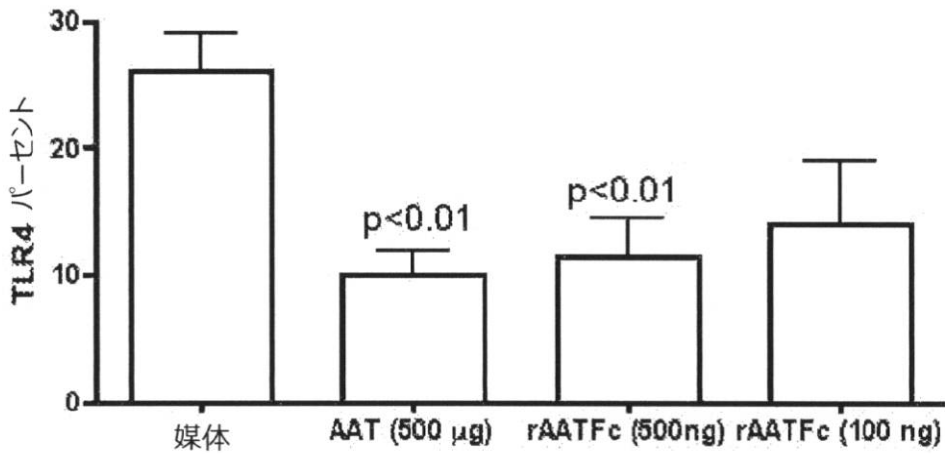
【図 5 B】



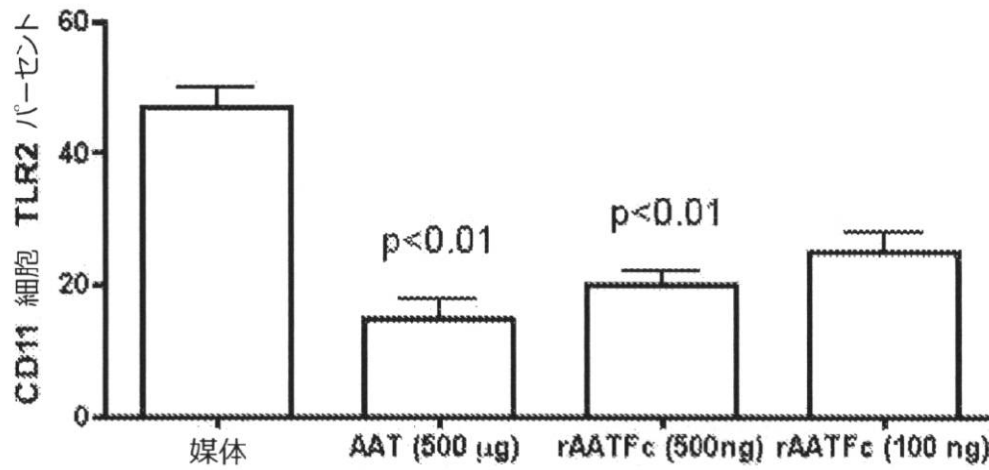
【図 6 A】



【図 6 B】

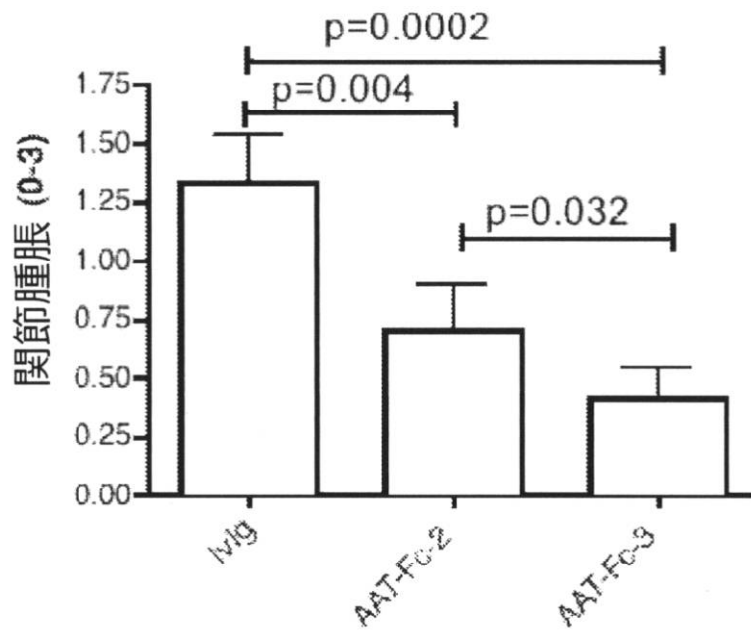


【図 6 C】

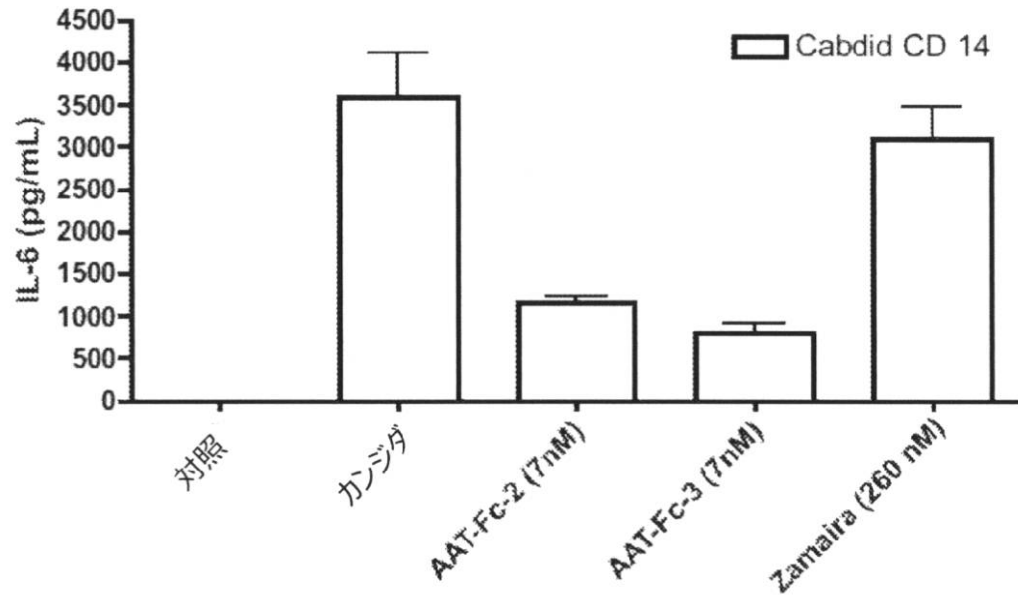


【図 7 A】

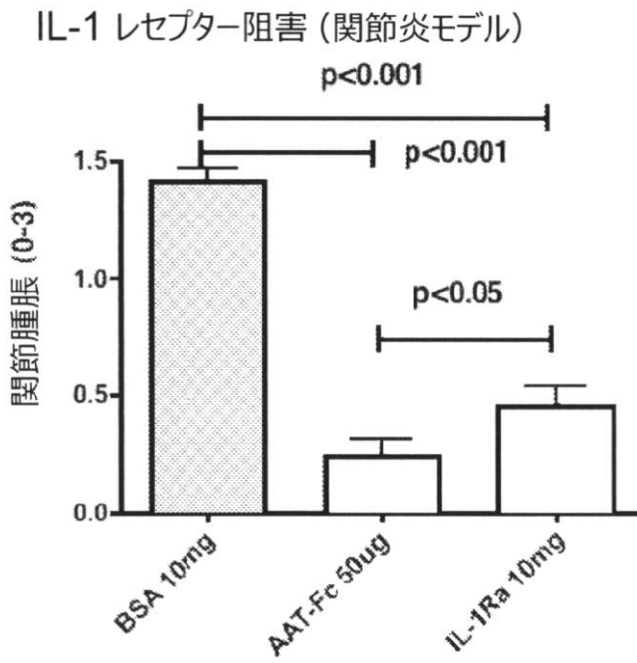
MSU-C16痛風関節炎後の
関節スコア



【図 7 B】

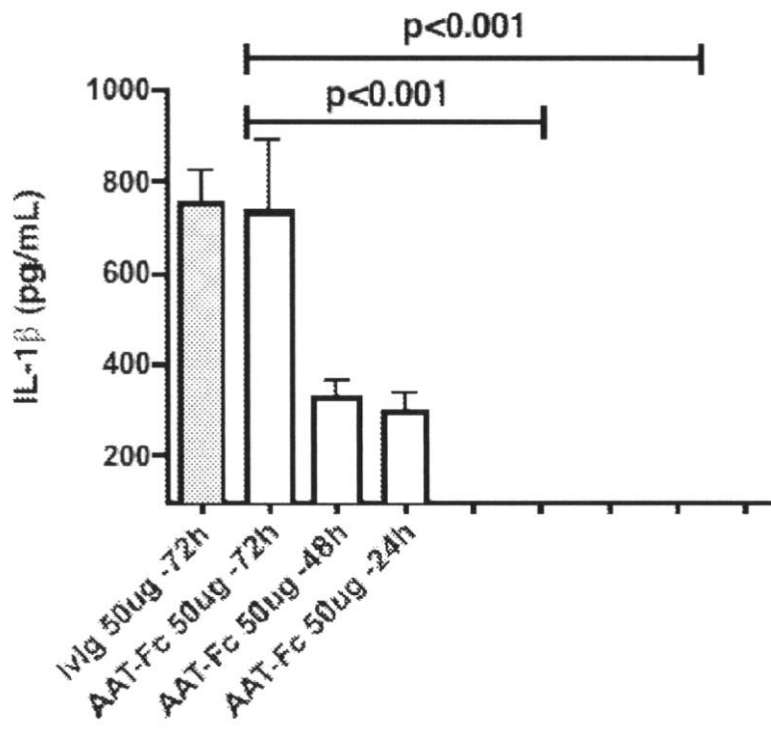


【図 7 C】



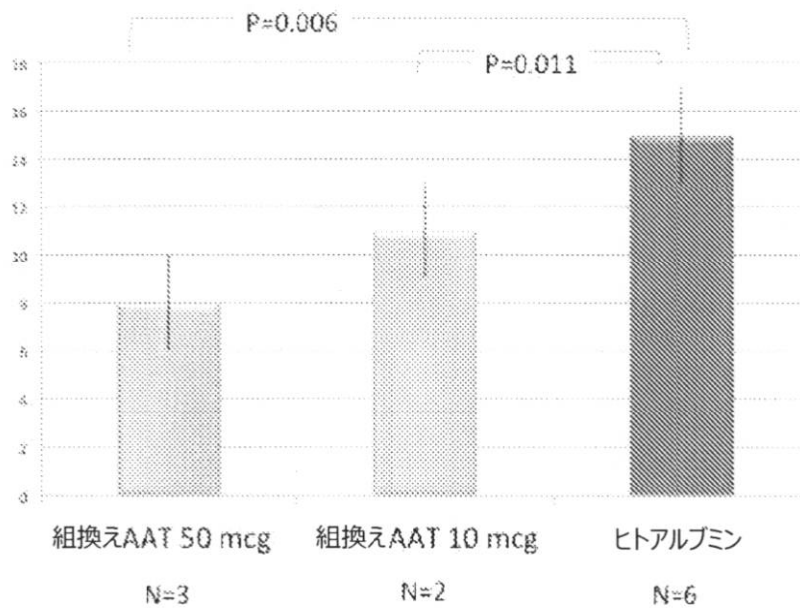
【図7D】

経時変化：Fc-AAT2腹腔内前処理後の
マウス膝関節への尿酸ナトリウム（MSU）結晶の滴注。

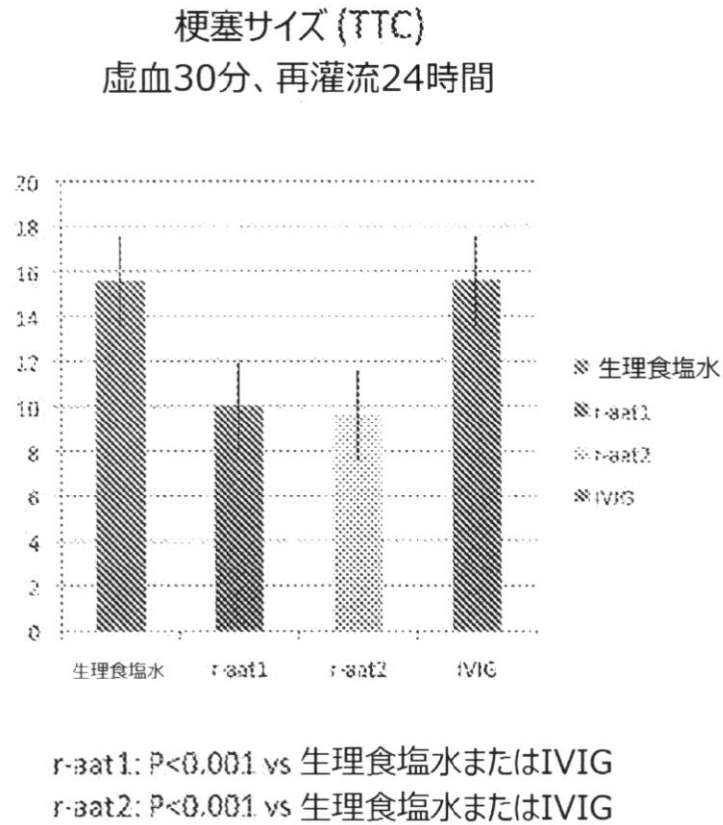


【図8】

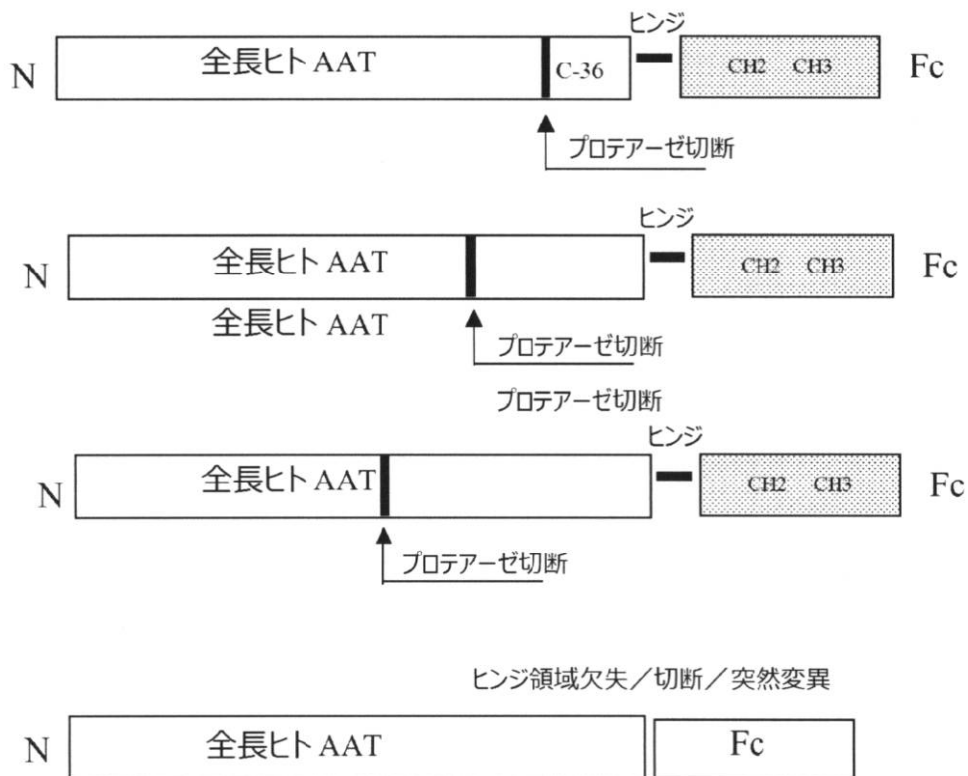
梗塞サイズ (% LV)



【図 9】



【図 10】



【配列表】

2015504675000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/21057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/00; C07H 21/04 (2013.01) USPC - 435/320.1; 536/23.4 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) USPC- 435/320.1; 536/23.4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 424/134.1; 514/20.3, 514/44R, 536/23.1 530/402, 530/387.3, 530/350, 530/363 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) US PTO website, Google, Google Patent, Google Scholar: AAT-Fc, hinge deletion, truncation, M type, RCL GenCore 6.4.1: SEQ ID NO: 1, 39		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0203580 A1 (Dinarello, et al.) 13 August 2009 (13.08.2009) Abstract, para [0171], [0173], claims 5, 7	1-4, 6-13
Y	US 2003/0120059 A1 (Tao, et al.) 26 June 2003 (26.06.2003) Abstract, para [0136]-[0138]	1-4, 8-13
Y	US 7,138,370 B2 (Oliner, et al.) 21 November 2006 (21.11.2006) col 32, ln 10-50; claims 16, 24; SEQ ID NO: 60	10
Y	Blanco, et al. Efficacy of alpha1-antitrypsin augmentation therapy in conditions other than pulmonary emphysema. Orphanet Journal of Rare Diseases 2011, 6:14; Abstract	6
A	Tawara, et al. Alpha-1-antitrypsin monotherapy reduces graft-versus-host disease after experimental allogeneic bone marrow transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A. Epub 27 December 2011, 109(2):564-569	1-4, 6-13
A	US 2011/0077383 A1 (Dall'acqua, et al.) 31 March 2011 (31.03.2011)	1-4, 6-13
A	WO 2009/015345 A1 (Treuhelt, et al.) 29 January 2009 (29.01.2009) claims 1, 15	1-4, 8-13
A	US 2011/0053787 A1 (Brulliard, et al.) 03 March 2011 (03.03.2011) SEQ ID NO 1564, amino acids 1-426	1-4, 6-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 02 June 2013 (02.06.2013)		Date of mailing of the international search report 19 JUN 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/21057

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.: 19/1
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:
Claim 19/1 is not searchable under Article 34(4)(a)(ii) as being unclear, because a nucleic acid construct of claim 1 is not amenable to purification via protein A affinity chromatography.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I+: claims 1-13, 25, 26, 39, drawn to a construct comprising: a nucleic acid encoding alpha-1 antitrypsin (AAT) or fragment or peptide cleavage molecule thereof; and a nucleic acid encoding an immune fragment or a fragment capable of being joined to itself, the nucleic acid further manipulated to truncate or eliminate the immune fragment hinge region. The first invention (claims 1-4, 6-13) is restricted to SEQ ID NO:1 and 49. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional SEQ ID NO(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

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.:
1-4, 6-13, restricted to SEQ ID NO:1 and 49

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/21057

***** Supplemental Sheet *****

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group II: claims 14-18, 19/14 (In part), 20-24, 27-38, 40, drawn to a fusion protein comprising consecutive amino acids which, beginning at the amino terminus of the protein, correspond to consecutive amino acids present in (i) alpha-1 antitrypsin or carboxyterminal fragment thereof, (ii) a peptide linker, and (iii) an Fc immune fragment having a deleted or truncated hinge region, wherein the consecutive amino acids (i) remain bound to (iii) when purified.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group I+ include the special technical feature of a construct comprising: a nucleic acid encoding alpha-1 antitrypsin (AAT) or fragment or peptide cleavage molecule thereof; and a nucleic acid encoding an immune fragment or a fragment capable of being joined to itself, the nucleic acid further manipulated to truncate or eliminate the immune fragment hinge region, not required by Group II.

The invention of Group II includes the special technical feature of a fusion protein comprising consecutive amino acids which, beginning at the amino terminus of the protein, correspond to consecutive amino acids present in (i) alpha-1 antitrypsin or carboxyterminal fragment thereof, (ii) a peptide linker, and (iii) an Fc immune fragment having a deleted or truncated hinge region, wherein the consecutive amino acids (i) remain bound to (iii) when purified, not required by Group I+.

The inventions of Group I+ share the technical feature of a construct of claim 1.

The inventions of Group I+ and Group II share the technical feature of a fusion protein comprising alpha-1 antitrypsin (AAT) or fragment thereof, and an immune fragment having a deleted or truncated hinge region.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being obvious over US 2009/0203580 A1 to Dinarello, et al. (hereinafter "Dinarello") in view of US 2003/0120059 A1 to Tao, et al. (hereinafter "Tao") as follows:

Dinarello teaches a construct comprising a nucleic acid encoding alpha-1 antitrypsin (AAT) (para [0172], [0174]-[0177], claims 5-7) or fragments thereof (para [0019]), and a nucleic acid encoding an immune fragment (para [0170]-[0172]; [0170]-"a fusion polypeptide may include AAT (e.g. mammalian alpha-1-antitrypsin) or an analog thereof and a different amino acid sequence that may be heterologous to AAT or analog substance" which are [0172]-"produced by recombinant DNA techniques"), wherein the AAT is human AAT fusion polypeptides (para [0170]-[0176]) comprising IgG (para [0171], [0173]-"...a fusion protein can include a heterologous sequence derived from... a human immunoglobulin constant region such as a human IgG1 constant region...the FcR region of the immunoglobulin...the immunoglobulin heterologous sequence of the fusion protein can be mutated...") and the nucleic acid is further manipulated to truncate (para [0164]-[0165], [0168]-[0169]), but does not teach specific elimination of the immune fragment hinge region. However, it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to manipulate nucleic acid constructs to truncate or eliminate the immune fragment hinge region, because immunoglobulin heterologous sequence of the fusion protein can be mutated (Dinarello, para [0173]) or truncated (para [0164]-[0165]) that can be produced by recombinant DNA techniques (para [0172]), through recombinant DNA techniques to truncate or eliminate, to produce the desired immune fragment and the AAT- human IgG1 constant region (Fc) fusion protein.

Dinarello teaches AAT fragments can have intramolecular disulfide bonds (Dinarello, para [0191]), but does not specifically disclose an immune fragment capable of being joined to itself. Tao teaches that hinge region of IgG provides intramolecular disulfide bonds between heavy and light chains using critical cysteine residues (para [0046]). Accordingly, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that Fc region of IgG forms multimeric association (Tao, para [0046]) and accordingly, the immune fragments capable of being joined to itself can be used to produce fusion proteins using recombinant DNA technology (Dinarello, para [0172], Tao [0050]-[0062]).

Further, Tao discloses a nucleic acid encoding an IgG1 heavy chain manipulated to truncate or eliminate the immune fragment hinge region, specifically having a CHI-hinge deletion (para [0137], "CHI-hinge deletion (SEQ ID NO:4) capable of activating macrophages as revealed by an ADCC assay (para [0136], [0137], "CHI-hinge deletion (SEQ ID NO:4) gave similar levels of macrophage activation"), but lacked the complement activation capability (para [0136], "In summary, a novel human IgG1 Fc chimera has been constructed... The Fc receptor binding property was retained in the molecule, IgG1 Fc chimera the complement activation capability was absent").

Regarding the limitation that human IgG1 constant region (Fc) is capable of being joined to itself, Tao discloses that said CHI-hinge deletion Fc is capable of being joined to itself (para [0137], "The extracellular region of the transferrin receptor used to anchor Fc (residues 89-97) is able to substitute for native hinge. The hTR fragment used in this study is approximately equal in length, if not amino acid identity, to native IgG1 hinge, and may effectively provide functions similar to that of the hinge region. Another critical function of hinge is to provide intramolecular disulfide bonds between heavy and light chains using critical cysteine residues. The hTR (1-97), which contains at least one cysteine (C89) necessary for TR dimerization, is able to mimic hinge by allowing multimer association of the hTR-FcH monomers").

It would have been obvious to one of ordinary skill to combine Dinarello and Tao by introducing, in the course of routine experimentation and with a reasonable expectation of success, the CHI-hinge deletion of Tao in the AAT- Fc fusion protein of Dinarello, because Dinarello specifically discloses that "the FcR region of the immunoglobulin may be ... mutated. In certain embodiments, it may be desirable to utilize an immunoglobulin fusion protein that does not interact with an Fc receptor and does not initiate ADCC reactions. In such instances, the immunoglobulin heterologous sequence of the fusion protein can be mutated to inhibit such reactions" (para [0171]), while Tao explains that "antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) has an important role in the destruction of many target cells... by macrophages" (para [0005]) and that "the lytic attack on the target cells is triggered by Fc receptor-mediated ADCC" (para [0005]), and that ADCC reactions are avoided by using the Fc having CHI-hinge deletion (para [0138]). As said construct would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

***** See the following Supplemental Sheet to continue *****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/21057

In Continuation of the Preceding Supplemental Sheet:

Another common technical feature of the inventions listed as Group I+ is a nucleic acid encoding specific amino acid sequence of AAT or fragments thereof and a fragment capable of being joined to itself. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2003/0073217 A1 to Barr, et al. (hereinafter "Barr"). Barr discloses a nucleic acid (para [0030], [0086], FIGs. 1-4, Tables 7, 8, 11) encoding the claimed amino acid SEQ ID NO: 1 (para [0017], [0174], [0181]- SEQ ID NO 2, 100% identity) or fragments thereof (para [0074]) and a fragment capable of being joined to itself (para [0174]-methods of formation of intra- and intermolecular disulfide bonds). Therefore, no significant structural similarities can readily be ascertained among the claimed nucleic acids encoding specific amino acid sequences, either known or unknown in the prior art. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Further to the discussion above, the shared the technical feature of a fusion protein comprising alpha-I antitrypsin (AAT) or fragment thereof; and an immune fragment having a deleted or truncated hinge region of Group I+ and Group II, does not represent a contribution over prior art as being obvious over Dinarello.

Dinarello teaches a construct comprising a fusion protein: alpha-I antitrypsin (AAT) (para [0172], [0174]-[0177]) or fragments thereof (para [0019]), and an immune fragment (para [0170]-[0172]; [0170]-"a fusion polypeptide may include AAT (e.g. mammalian .alpha.1-antitrypsin) or an analog thereof and a different amino acid sequence that may be heterologous to AAT or analog substance" which are [0172]- "produced by recombinant DNA techniques"), wherein the AAT is human AAT fusion polypeptides (para [0170]-[0176]) comprising IgG (para [0171], [0173]- "...a fusion protein can include a heterologous sequence derived from... a human immunoglobulin constant region such as a human IgG1 constant region...the FcR region of the immunoglobulin...the immunoglobulin heterologous sequence of the fusion protein can be mutated....) and further manipulated to truncate (para [0164]-[0165], [0168]-[0169]), but does not teach specific elimination of the immune fragment hinge region. However, it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to manipulate nucleic acid constructs to truncate or eliminate the immune fragment hinge region; because immunoglobulin heterologous sequence of the fusion protein can be mutated (Dinarello, para [0173]) or truncated (para [0164]-[0165]) that can be produced by recombinant DNA techniques (para [0172]), through recombinant DNA techniques to truncate or eliminate, to produce the desired immune fragment and the AAT- human IgG1 constant region (Fc) fusion protein.

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I+ and II lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

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	
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	5/00	1 0 1
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/10	
A 6 1 P	33/00 (2006.01)	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 P	19/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,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,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

- (71)出願人 513321401
 コングク ユニバーシティ
 大韓民国 3 8 0 - 7 0 1 チュング - シティ, チョンチョンブク - ド, ダンウォル - ドン
 3 2 2
- (71)出願人 513321412
 オムニ バイオ ファーマシューティカル, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 コロラド 8 0 1 1 1, グリーンウッド ビレッジ, エス. ロズリン ス
 トリート 5 3 5 0, スイート 4 3 0
- (74)代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
- (74)代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
- (74)代理人 100142907
 弁理士 本田 淳
- (72)発明者 ディナレッロ、チャールズ エイ.
 アメリカ合衆国 8 0 3 0 2 コロラド州 ボルダール フィフティーン ストリート 3 3 3
- (72)発明者 キム、スヒョン
 アメリカ合衆国 8 0 1 1 1 コロラド州 グリーンウッド ビレッジ エス.エンポリア ウェ
 イ 5 1 0 6
- (72)発明者 クラボ、ジェームズ デイ.
 アメリカ合衆国 8 0 1 1 3 コロラド州 エングルウッド エス.フォレスト ストリート 4

6 5 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA19 BA61 CA01 CA07 CA11 DA01 DA02 DA05 DA11
EA04 GA11 HA03
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA13 BA41 NA14 ZA362 ZA392 ZB072 ZB082 ZB112 ZB332
ZB352 ZB372 ZC312 ZC352
4H045 AA10 AA11 BA09 BA41 CA40 DA56 DA75 EA20 FA74 GA26