

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-519763

(P2017-519763A)

(43) 公表日 平成29年7月20日 (2017.7.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/48 (2006.01)	A 6 1 K 38/48	4 B 0 5 0
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 7 6
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	4 C 0 8 8
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-573565 (P2016-573565)	(71) 出願人	515135804
(86) (22) 出願日	平成27年6月16日 (2015.6.16)		ネプエトックス, エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月14日 (2017.2.14)		アメリカ合衆国, フロリダ州 3 2 5 4 1
(86) 国際出願番号	PCT/CA2015/000389		, デスティン, スイート 1 0 5, 1 2 3
(87) 国際公開番号	W02015/192211		4 エアポート ロード
(87) 国際公開日	平成27年12月23日 (2015.12.23)	(74) 代理人	100114775
(31) 優先権主張番号	62/012, 865		弁理士 高岡 亮一
(32) 優先日	平成26年6月16日 (2014.6.16)	(74) 代理人	100121511
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小田 直
(31) 優先権主張番号	62/118, 396	(74) 代理人	100202751
(32) 優先日	平成27年2月19日 (2015.2.19)		弁理士 岩堀 明代
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 グルテン不耐症及びそれから生じる障害を治療するための組成物及び方法

(57) 【要約】

本明細書に記載の本発明は、1種または複数の N e p e n t h e s 酵素を含む医薬組成物を投与することによって、グルテン不耐症及び関連する状態（例えば、セリアック病及びグルテン過敏症）を治療するための、または抗原性食品ペプチドが原因の、腸における炎症及び／若しくは免疫応答を阻害するための方法及び組成物に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする患者における、ペプチド性食品抗原の存在から生じる腸の炎症の減弱または予防方法であって、前記抗原を非抗原ペプチドに切断し、それによって、前記腸の炎症を減弱または予防するために、ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシン、それらの変異体及びそれらの混合物からなる群から選択される酵素を含む有効量の医薬組成物を前記患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記腸の炎症が前記患者の腸における上皮内リンパ球（IEL）の浸潤及び／または増殖を特徴とし、さらに、前記腸における IEL の前記浸潤及び／または増殖が減弱または

10

【請求項 3】

絨毛萎縮が前記患者の腸に存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

絨毛萎縮が減弱または予防される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ペプチド性食品抗原が部分的に加水分解されたグルテンタンパク質を含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記医薬組成物が、グルテン含有食品の摂取より前に、摂取の間に、または摂取の直後に、経口的に投与される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記グルテン含有食品が固体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記グルテン含有食品が液体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記患者が、グルテン過敏症、セリアック病、注意欠陥多動性障害、自閉症、関節リウマチ、線維筋痛症、栄養素の吸収不良及びヘルペス状皮膚炎からなる群から選択される疾患を罹患している、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記炎症が、グルテンの存在によって悪化したセリアック病が原因である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 11】

部分的に加水分解された抗原性コムギタンパク質がセリアック病を有する患者の腸に存在することから生じるセリアック病の発現の減弱または予防方法であって、前記部分的に加水分解されたコムギタンパク質を非抗原ペプチドに切断し、それによって、セリアック病の発現を減弱または予防するために、ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシン、それらの変異体及びそれらの混合物からなる群から選択される酵素を含む有効量の酵素組成物を前記患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 12】

前記部分的に加水分解されたコムギタンパク質が部分的に加水分解されたグルテンタンパク質である、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記医薬組成物が持続性放出製剤である、請求項 1～4、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記医薬組成物が Nepenthes の嚢状葉液の抽出物を含む、請求項 1～4、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシンまたはそれらの変異体の少なくとも 1

50

つが組換えタンパク質である、請求項 1～4、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記変異体が、配列番号 1、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 20 及び配列番号 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である、請求項 1～4、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記医薬組成物が約 pH 5～約 pH 8 の間である、請求項 1～4、11 または 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 18】

それを必要とする患者の腸におけるペプチド性食品抗原の存在が原因の上皮内のリンパ球増加の減弱または予防方法であって、前記腸における上皮内のリンパ球増加を減弱または予防するために、前記抗原が分解される条件下で、ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシン及びそれらの混合物からなる群から選択される酵素を含む有効量の酵素医薬組成物を前記患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 19】

前記酵素がグルテン含有食品の摂取より前に、摂取の間に、または摂取の直後に、経口的に投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

20

前記グルテン含有食品が固体である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記グルテン含有食品が液体である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記医薬組成物が、Nepenthes の嚢状葉液の抽出物を含む、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記ネペンテシン I、ネペンテシン II 及び／またはネプロシンが組換えタンパク質である、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

30

前記患者が、グルテン過敏症、セリアック病、注意欠陥多動性障害、自閉症、関節リウマチ、線維筋痛症及びヘルペス状皮膚炎からなる群から選択される疾患を罹患している、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記医薬組成物の有効量が約 1 mg～約 1 g の間である、請求項 1～4、11、12 または 18～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

患者の腸におけるペプチド性食品抗原の存在が原因の腸の炎症を減弱または予防するための、ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシン、それらの変異体及びそれらの混合物からなる群から選択される酵素を含む医薬組成物の使用。

40

【請求項 27】

前記患者がグルテン過敏症、セリアック病、注意欠陥多動性障害、自閉症、関節リウマチ、線維筋痛症及びヘルペス状皮膚炎からなる群から選択される疾患を罹患している、請求項 26 に記載の使用。

【請求項 28】

前記医薬組成物が Nepenthes の嚢状葉液の抽出物を含む、請求項 26 に記載の使用。

【請求項 29】

前記ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物が組換えタンパク質である、請求項 26 に記載の使用。

50

【請求項 30】

前記医薬組成物の単位用量が、約 1 mg ～ 約 25 g の間の前記酵素を含む、請求項 26 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 31】

前記医薬組成物が約 pH 5 ～ 約 pH 8 の間である、請求項 26 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 32】

前記変異体が、配列番号 1、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 20 及び配列番号 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 85 % の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である、請求項 26 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の使用。

10

【請求項 33】

ネプロシンが、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質である、ネプロシン及び医薬的に許容可能な適切な賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 34】

前記ネプロシンの前記アミノ酸配列が、シグナル配列を有さない配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 33 に記載の医薬組成物。

【請求項 35】

少なくとも 1 種のさらなる *Nepenthes* 酵素またはその変異体をさらに含む、請求項 34 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 36】

前記少なくとも 1 種のさらなる *Nepenthes* 酵素またはその変異体がネペンテシン I、ネペンテシン II 及び／またはそれらの変異体である、請求項 33 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 37】

持続性放出製剤である、請求項 33 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

前記ネプロシンが約 pH 2 の水性系で維持される、その結果、前記ネプロシンの遊離アミノ基が荷電される、請求項 33 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 39】

少なくとも 1 つのさらなるプロテアーゼをさらに含む、請求項 33 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 40】

前記少なくとも 1 つのさらなるプロテアーゼがアスパラギン酸プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼまたはメタロプロテアーゼである、請求項 39 に記載の医薬組成物。

【請求項 41】

前記ネプロシン及び／または *Nepenthes* 酵素（複数可）がプロペプチドを含む、請求項 35 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 42】

前記組成物が中性 pH で維持される、請求項 33 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 43】

前記ネプロシンが多層中に存在し、その結果、前記製剤が胃の中に存在する間、前記ネプロシンが継続的に放出される、請求項 33 ～ 42 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 44】

さらに医薬的に許容可能な緩衝液を含み、その結果、胃の中で酸に接触した際にネプロ

50

シンの pH が pH 5 または 6 にとどまる、請求項 33～42 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 45】

グルテンを消化するために内部賦形剤及び請求項 33～42 のいずれか 1 項に記載の有効量の医薬組成物を含む、ディスペンサー。

【請求項 46】

前記内部賦形剤が、塩化ナトリウムまたはヨウ化ナトリウムまたはそれらの混合物を含む、請求項 45 に記載のディスペンサー。

【請求項 47】

前記医薬組成物が、前記ディスペンサーから効率的に分配するようにサイズを合わせられた顆粒形態である、請求項 45 または 46 に記載のディスペンサー。

10

【請求項 48】

それを必要とする患者におけるセリアック病の調節方法であって、請求項 33～35 のいずれか 1 項に記載の有効量の組成物を前記患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 49】

前記組成物が、グルテンを含むか、グルテンを含む疑いがある食品の摂取より前に前記患者に投与される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記組成物が、グルテンを含むか、グルテンを含む疑いがある食品の摂取とともに前記患者に投与される、請求項 48 に記載の方法。

20

【請求項 51】

前記組成物が、グルテンを含むか、グルテンを含む疑いがある食品の摂取後に前記患者に投与される、請求項 48 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014 年 6 月 16 日に提出された米国特許仮出願第 62/012865 号、及び 2015 年 2 月 19 日に提出された第 62/118396 号に対して優先権を主張するものである。各先行出願の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0002】

グルテン不耐症及び関連する状態、例えば、セリアック病またはグルテン過敏症を治療するための組成物及び方法が、本明細書で提供される。さらに、腸に食品タンパク質抗原が存在することによって誘導される上皮内リンパ球 (IEL) 浸潤を減弱または予防するための組成物及び方法が本明細書で提供される。そのような食品タンパク質抗原は、グルテンを含むコムギ、オオムギ、ライムギなどに見出されるタンパク質などのプロリンリッチな食品を消化するのが困難であることを含む。特にグルテンは、消化管で部分的に加水分解され、IEL 浸潤ならびに筋内膜 IgA 及び抗組織トランスグルタミナーゼを含めた抗体の産生を導く可能性がある。本発明の組成物及び方法は、腸内のそのような食品タンパク質抗原の量の低減、次に、腸の IEL 浸潤量の低減を提供する。

40

【背景技術】

【0003】

いくつかの疾患は、高感受性個体において、抗原性食品タンパク質への反応によって媒介される。例えば、抗原性食品タンパク質 (例えば、グルテン) を含むコムギ、オオムギ及びライムギの摂取は、グルテン不耐症個体において、異常な自己免疫応答、例えば、セリアック病、コムギアレルギー及びヘルペス状皮膚炎を引き起こし得る。グルテンは、グルタミン-及びプロリン-リッチなグルテニン及びプロラミンタンパク質分子の混合物である。

【0004】

セリアック病は、小腸に影響を及ぼす自己免疫障害である。セリアック病に特有な異常

50

な自己免疫応答を有する個体の大部分は、ヒト白血球抗原（H L A）D Q 2 または D Q 8 分子を発現する。この疾患の症状は、グルテンタンパク質への反応によって引き起こされ、摂取される穀物製品中の他の貯蔵タンパク質（例えば、セルピン、プリン（p u r i n i n s））も含み得る。臨床的に、この疾患は、グルテン及び組織トランスグルタミナーゼ（t T G）に対して特異的な抗体の定量化を通じてある程度検出可能である。自己免疫応答は、陰窩過形成及び粘膜炎症をともなう小腸粘膜絨毛萎縮を発生させる。セリアック病の症状は、個体によって異なる可能性があり、疲労、慢性的な下痢、便秘、栄養素の吸収不良、体重減少、腹部膨満、貧血、及び骨粗鬆症及び腸の悪性腫瘍（リンパ腫及び癌腫）の発生の危険性増大の 1 つまたは複数を含み得る。

【0005】

10

I 型糖尿病は、セリアック病の危険因子である。自閉症もセリアック病と関係があり、グルテンフリーの食事は、自閉症のいくつかの症状の軽減に役立ち得る。同様に、注意欠陥多動性障害の人の中には、グルテンが食事から除去される場合に、より少ない症状しか示さない人もいると考えられている。食事のグルテン排除から恩恵を受け得る他の状態としては、関節リウマチ及び線維筋痛症が挙げられる。

【0006】

グルテン不耐症、特にセリアック病の治療は、一般に、一生続く嚴重なグルテンフリーの食事を必要とする。しかし、グルテンフリーの食事は不便で、制限が多く、グルテンを避けるのは困難である。したがって、グルテン不耐症及びセリアック病の有効な代替治療が必要とされる。

20

【発明の概要】

【0007】

本発明は、本明細書に記載の 1 種または複数の N e p e n t h e s 酵素を含む医薬組成物を、抗原性の可能性がある食品タンパク質と組み合わせて投与することが、腸内の上皮内リンパ球の浸潤及び／または生成の低下を含めた、摂取後の抗原性食品タンパク質への免疫応答を低下させるという発見に関する。上皮内リンパ球は、大腸及び小腸の上皮細胞の間に散在している T 細胞である。T 細胞数の増加は炎症の初期の指標であり、セリアック病を含めたグルテン不耐症と関係がある可能性がある。

【0008】

グルテンタンパク質（例えば、グリアジン及びグルテニン）の毒性は、（ペプシンを含めた）ヒト消化酵素によるタンパク質の不完全な分解の間に生成される、プロリンー及びグルタミンーリッチペプチドが原因であると考えられている。胃及び膵臓のエンドプロテアーゼは、不完全分解の、これらの有毒なまたは免疫原性のペプチド副生成物を切断することができず、これは、少なくとも部分的には、そのような酵素がプロリン及び／またはグルタミンに対する特異性を欠くという事実が原因である。このペプチドは、感受性個体において、上皮内のリンパ球増加、絨毛萎縮及び／または炎症を含めた、腸の多数の症状を引き起こすと考えられている。セルピン、プリン、アルファーアミラーゼ／プロテアーゼ阻害因子、グロブリン及びファリニンを含めた、コムギ中に存在する他のタンパク質も自己免疫応答に関与し得る。

30

【0009】

T 細胞は、感受性個体における抗原性発作（すなわち、有毒な食品ペプチドの存在）に対する最初のレスポnderである。T 細胞は抗原発作にすばやく反応し、炎症、時として腸の劣化を引き起こす。したがって、腸における T 細胞の低減は、免疫応答の低下を示し、感受性個体における、免疫原性食品（例えば、グルテン）の摂取に関係がある症状の低減または排除の潜在的な指標である。

40

【0010】

理論に拘束されないが、グルテン（または他の抗原性タンパク質）を本明細書に記載の医薬組成物に接触させることによって、免疫応答を低減または排除する（すなわち、有毒でないまたは毒性が低い）小さなポリペプチドフラグメントにタンパク質が破壊されると考えられる。

50

【0011】

本明細書に記載の医薬組成物を、消化管酵素によって効果的に分解されない食物タンパク質、特にプロリンー及び／またはグルタミナーリッチタンパク質を分解するのに使用できることが予期される。そのような分解がタンパク質の吸収を増大させる及び／または免疫原性を低下させるであろうことがさらに予期される。そのような結果は、腸の疾患及び障害（例えば、セリアック病、グルテン不耐症、過敏性腸症候群、結腸炎、クローン病、食品アレルギーなど）の症状に対して有益効果を有し得る。一実施形態では、医薬組成物の投与は、栄養素の吸収を向上させる。

【0012】

熱帯地方において、モンキーカップ (monkey cups) として一般に知られている食虫性囊状葉植物である *Nepenthes* の囊状葉分泌物は、いくつかのプロテアーゼを含む。*Nepenthes* の濃縮された囊状葉液は、プロリンー及びグルタミナーリッチグルテンペプチドに対して高い特異性を有する。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第 2014/0186330 号及び第 2014/0140980 号は、*Nepenthes* の濃縮された囊状葉液及び組換え *Nepenthes* 酵素の活性及び特異性を記載している。囊状葉液は酸性であり、その中の酵素は、一般に、酸性 pH で最も活性である。

【0013】

ネペンテシン (EC 3.4.23.12) は、*Nepenthes* の囊状葉分泌物及び様々な他の植物源から単離または濃縮され得るアスパラギン酸プロテアーゼである。Tookes ら, *Digestive Enzymes Secreted by the Carnivorous Plant Nepenthes macfarlanei* L., *Planta* (Berl.) 119, 39-46 (1974)。ネペンテシンの活性は、食品タンパク質のペプチドへの分解に部分的に関与する、ヒトの胃に存在する酵素であるペプシン (EC 3.4.23.1) より高いことが見出された。ネペンテシンは、既知の 2 つのアイソタイプ：ネペンテシン I (2 つの変異体：ネペンテシン Ia 及びネペンテシン Ib を有することが知られている) ならびにネペンテシン II を有する。

【0014】

一態様では、本発明は、新規なプロリルエンドペプチダーゼ、ネプロシン (neprosin) の発見に関し、これは、プロリンリッチなタンパク質及びオリゴペプチド（例えば、グルテンタンパク質）の切断について、高いタンパク質分解活性を持つ。ネプロシンは、*Nepenthes* の囊状葉分泌物から単離または濃縮され得、広い pH 範囲で活性であり、特に低 pH（例えば、約 3~5）で活性である。ネプロシンタンパク質の配列は、ゲノムデータベース中のいかなるの他の既知のタンパク質にも相同でない。ネプロシンは、プロリンのカルボキシ (C) 末端側でペプチドを効率的に切断することができる。この切断は、非常に特異的であるように思われる。

【0015】

ネプロシン、ネペンテシン I 及びネペンテシン II は、単独でまたは一緒に、有毒な食品ペプチドを、より小さな無毒のペプチドに切断することができる。これらの酵素は広い酸性 pH 範囲で活性であるので、これらの酵素による消化は、胃の酸性環境で惹起することができる。

【0016】

本発明はさらに、そのような酵素組成物は、食品と組み合わせて使用される場合に、IEL 浸潤によって測定した場合の腸における免疫応答が減弱または排除されるレベルまで食品タンパク質抗原を分解することができるという発見に基づく。ペプチド性食品抗原（複数可）の存在が原因の IEL 浸潤は、食品抗原（例えば、グルテン）に対する感受性の初期の生物学的指標である。したがって、一態様では、本発明は、哺乳動物の腸における食品タンパク質抗原に対する免疫応答を減弱または予防する方法に関し、この方法は、少なくとも 1 種の *Nepenthes* 酵素を含む有効量の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも 1 種の *Nepenthes* 酵素は、ネペンテシ

10

20

30

40

50

ン I、ネペンテシン I I、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物である。一実施形態では、医薬組成物の量は、ペプチド性食品抗原（複数可）の存在が原因の腸の I E L 浸潤を減弱または予防するのに有効である。一実施形態では、I E L 浸潤は、胃及び／または腸の内在性酵素による抗原性の可能性がある食品タンパク質の不完全な消化が原因である。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取より前に、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取とともに、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取の後に、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取に関係なく、哺乳動物に投与される。一実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質はグルテンである。一実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質は、1 種または複数のコムギタンパク質である。

10

【0017】

一実施形態では、腸の炎症は、腸における I E L の浸潤及び／または増殖を特徴とする。したがって、一態様では、本発明は、哺乳動物の腸におけるペプチド性食品抗原（複数可）の存在が原因の腸の炎症を減弱または予防する方法に関し、この方法は、少なくとも 1 種の N e p e n t h e s 酵素を含む有効量の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも 1 種の N e p e n t h e s 酵素は、ネペンテシン I、ネペンテシン I I、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物である。一実施形態では、医薬組成物の量は、ペプチド性食品抗原（複数可）の存在が原因の腸の炎症を減弱または予防するのに有効である。一実施形態では、腸の炎症は、胃及び／または腸の内在性酵素による抗原性の可能性がある食品タンパク質の不完全な消化が原因である。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取より前に、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取とともに、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取の後に、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取に関係なく、哺乳動物に投与される。一実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質はグルテンである。一実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質は、1 種または複数のコムギタンパク質である。

20

30

【0018】

一態様では、本発明は、哺乳動物の腸におけるペプチド性食品抗原（複数可）の存在が原因の上皮内のリンパ球増加を減弱または予防する方法に関し、この方法は、少なくとも 1 種の N e p e n t h e s 酵素を含む有効量の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも 1 種の N e p e n t h e s 酵素は、ネペンテシン I、ネペンテシン I I、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物である。一実施形態では、医薬組成物の量は、腸における上皮内のリンパ球増加を阻害するのに有効である。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取より前に、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取とともに、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品の摂取後に、哺乳動物に投与される。一実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品またはタンパク質の摂取に関係なく、哺乳動物に投与される。一実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質はグルテンである。一実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質は、1 種または複数のコムギタンパク質である。

40

【0019】

一実施形態では、医薬組成物の有効量は約 1 m g ～約 1 g の間である。一実施形態では、医薬組成物の有効量は、抗原性の可能性がある摂取されるタンパク質の量に依存する。

【0020】

一実施形態では、本発明は、患者の腸におけるグルテンまたは他の抗原性タンパク質の存在に対する免疫応答と関係がある少なくとも 1 つの症状を治療及び／または改善するこ

50

とに関する。症状としては、限定はされないが、「ぼんやりとした精神状態 (foggy mind)」、抑うつ、不安、ADHD様行動、腹痛、腹部膨満、下痢、便秘、頭痛、片頭痛、骨または関節の痛み、慢性疲労、小腸の損傷、組織トランスグルタミナーゼ (tTG) 抗体の発生、重度の座瘡、嘔吐、体重減少、被刺激性、鉄欠乏性貧血、関節炎、四肢の刺痛・しびれ、不妊及び口の潰瘍性口内炎が挙げられる。

【0021】

一態様では、本発明は、哺乳動物の腸におけるペプチド性食品抗原（複数可）の存在が原因の絨毛萎縮を減弱または予防する方法に関し、この方法は、少なくとも1種のNepenthes酵素を含む有効量の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも1種のNepenthes酵素は、ネペンテシンI、ネペンテシンII、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物である。一実施形態では、腸における絨毛萎縮を阻害するために、抗原性の可能性があるタンパク質が医薬組成物によって分解される。一実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質はグルテンである。一実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質は、1種または複数のコムギタンパク質である。

10

【0022】

一態様では、本発明は、ペプチド性食品抗原に対するT細胞応答を低減させる方法に関し、この方法は、少なくとも1種のNepenthes酵素を含む有効量の医薬組成物とペプチド性食品抗原を接触させることを含む。一実施形態では、抗原に対するT細胞応答を低減するために前記抗原が分解される条件下で、少なくとも1種のNepenthes酵素は、ネペンテシンI、ネペンテシンII、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物である。一実施形態では、哺乳動物の腸におけるT細胞応答が低減される。一実施形態では、抗原は、哺乳動物の胃において医薬組成物と接触する。一実施形態では、抗原はエクスピボで医薬組成物と接触する。一実施形態では、抗原はグルテンである。一実施形態では、抗原は免疫毒性グルテンタンパク質である。

20

【0023】

一態様では、本発明は、セリアック病を有する患者の腸における部分的に加水分解されたコムギタンパク質の存在から生じるセリアック病の発現を減弱または予防する方法に関し、この方法は、少なくとも1種のNepenthes酵素を含む有効量の医薬組成物を患者に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも1種のNepenthes酵素は、セリアック病の発現を減弱または予防するための、ネペンテシンI、ネペンテシンII、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物である。

30

【0024】

一態様では、本発明は、腸の障害を有する哺乳動物において食品由来タンパク質の消化性を向上させる方法に関し、この方法は、少なくとも1種のNepenthes酵素を含む有効量の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも1種のNepenthes酵素は、食品中のタンパク質が医薬組成物によって分解される条件下で、ネペンテシンI、ネペンテシンII、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物である。一実施形態では、タンパク質の分解は腸におけるタンパク質の吸収を向上させる。一実施形態では、障害の少なくとも1つの症状が減弱または予防される。一実施形態では、腸の障害はクローン病、過敏性腸症候群または結腸炎である。一実施形態では、食品からのタンパク質吸収が増大する。

40

【0025】

一態様では、本発明は、それを必要とする患者において膵臓の酵素の不全を治療する方法に関し、この方法は、少なくとも1種のNepenthes酵素を含む有効量の医薬組成物を患者に投与することを含む。一実施形態では、少なくとも1種のNepenthes酵素は、ネペンテシンI、ネペンテシンII、ネプロシン、それらの変異体及びそれらの混合物である。一実施形態では、1種または複数の膵臓の酵素が投与される。1種または複数の膵臓の酵素は、医薬組成物と同時に、または異なる時に投与することができる。一実施形態では、膵臓の酵素は、リパーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼまたはそれらの混

50

合物である。一実施形態では、膵臓の酵素の不全は、膵炎、嚢胞性線維症、シュワックマン・ボディアン・ダイヤモンド症候群、胆石、ループス、セリアックスブルー、膵臓がんまたは膵臓の手術が原因である。一実施形態では、膵炎は慢性膵炎である。

【0026】

一実施形態では、Nepenthes 酵素は、Nepenthes 植物の嚢状葉液から濃縮、単離または抽出される。一実施形態では、Nepenthes 酵素は、組換えネペンテシン I、組換えネペンテシン II、組換えネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物を含む。

【0027】

一実施形態では、それらの変異体は、アミノ酸配列が、配列番号 1、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 20 及び配列番号 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有する、タンパク質を含む。一実施形態では、それらの変異体は、アミノ酸配列が、配列番号 2、配列番号 4 及び配列番号 14 からなる群から選択される cDNA にコードされるアミノ酸に対して少なくとも 85% の配列相同性を有する、タンパク質を含む。

【0028】

一実施形態では、食品は液体である。一態様では、食品は固体である。好ましい実施形態では、医薬組成物は、経口的に投与される。

【0029】

患者が嚴重なグルテンフリーの食事に忠実である場合でさえも、グルテンを回避するのは難しい。多数の食品、特に加工食品は、少量のグルテンが混入している。微量のグルテンの摂取でさえも、セリアック病を有する患者において症状の再発を引き起こす可能性がある。そのようなことは、他の免疫原性の可能性がある食品についても当てはまる。

【0030】

一実施形態では、医薬組成物は、患者が免疫原性の可能性があるタンパク質を含む食品を摂取した（例えば、承知の上で摂取した）かどうかに関係なく、投与される。一実施形態では、医薬組成物は、必要に応じて、例えば、免疫原性の可能性があるタンパク質が混入している可能性があるまたは免疫原性の可能性があるタンパク質の含量が不明な食事の前、間及び／または後に、投与される。一実施形態では、医薬組成物は定期的に投与される。一実施形態では、医薬組成物は、少なくとも 1 日あたり 1 回投与される。一実施形態では、医薬組成物は、1 日あたり 2 回、3 回、4 回またはそれ以上投与される。一実施形態では、医薬組成物は、各食事及び／または軽食と併せて（例えば前、間または後に）投与される。一実施形態では、医薬組成物は持続性放出製剤の一部として含まれ、ここでは、酵素（複数可）の継続的な放出があり、これによって、食品の抗原性タンパク質含量を問わず、断続的に軽食をとることなどが可能になる。

【0031】

一実施形態では、医薬組成物は約 pH 2 の水性系で維持され、ここでは、前記酵素の遊離アミノ基が荷電される。一実施形態では、組成物は、胃の中で酸と接触するより前に、中性 pH で維持される。一実施形態では、医薬組成物は医薬的に許容可能な緩衝液を含み、その結果、胃の中で酸に接触した際に、組成物の pH が pH 5 または 6 にとどまる。

【0032】

一実施形態では、医薬組成物の有効量は約 1 mg ～ 約 1 g の間である。一実施形態では、医薬組成物の有効量は、1 g の基質（例えば、グルテンまたは他の免疫原性の可能性があるタンパク質）あたり約 1 mg ～ 約 1 g の間である。一実施形態では、医薬組成物は、ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシンまたはそれらの変異体の 1 種より多くを含む。

【0033】

一実施形態では、哺乳動物はヒトである。一態様では、ヒトは、グルテン過敏症またはセリアック病を罹患している。一態様では、腸の抗原タンパク質への感受性は、注意欠陥多動性障害、自閉症、関節リウマチ、線維筋痛症及び／またはヘルペス状皮膚炎と直接的

10

20

30

40

50

または間接的に相関することが予期される。本発明の組成物を使用してそのような抗原性の腸のタンパク質を腸から除去することは、注意欠陥多動性障害、自閉症、関節リウマチ、線維筋痛症及び／またはヘルペス状皮膚炎について陽性結果を有することが、さらに予期される。好ましい実施形態では、ヒトはセリアック病を罹患している。

【0034】

一態様では、本発明は、ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物を含む医薬組成物に関する。好ましい実施形態では、医薬組成物は、ネプロシンまたはその変異体及び／または塩を含む。さらなる好ましい実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1種のさらなる *Nepenthes* 酵素をさらに含む。一実施形態では、さらなる *Nepenthes* 酵素は、ネペンテシン I、ネペンテシン II、それらの変異体及び／またはそれらの塩を含む。

10

【0035】

理論に拘束されないが、ネペンテシン I、ネペンテシン II 及びネプロシンは中性から塩基性 pH では活性が低いまたは実質的に不活性であると考えられる。これは、酵素（複数可）による望ましくない消化の可能性がある場合、重要であり得る。例えば、医薬組成物が経口的に投与される場合、pH 6.5 以上へ組成物を緩衝することによって、より低い活性型の酵素（複数可）がもたらされる可能性があり、その結果、組成物と接触し得る口腔粘膜、食道粘膜及び他の細胞が、その中の酵素（複数可）によって消化されない。同様に、組成物が食品に加えられる場合、緩衝された酵素（複数可）は、摂取される前に食品を消化することができない（またはしにくい）。そのような状況では、胃の酸性環境への組成物の導入は、pH の低下及び酵素（複数可）の活性化をもたらす。

20

【0036】

一実施形態では、医薬組成物は、約 pH 6.5 以上に緩衝される。好ましい実施形態では、組成物は、約 pH 6.5 ～ 約 pH 8.5 に緩衝される。一実施形態では、組成物は液体形態である。一実施形態では、組成物は固体形態である。一実施形態では、組成物の pH を液体形態において調整し、組成物を乾燥して固体を形成する。

【0037】

一実施形態では、医薬組成物は、1種または複数のさらなるプロテアーゼを含む。一実施形態では、1種または複数のさらなるプロテアーゼは、アスパラギン酸プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼまたはメタロプロテアーゼである。一実施形態では、医薬組成物は、1種または複数のさらなるエキソプロテアーゼ、例えば、ロイシンアミノペプチダーゼ及びカルボキシペプチダーゼを含む。一実施形態では、1種または複数のさらなるプロテアーゼはトリプシンである。好ましい実施形態では、1種または複数のさらなるプロテアーゼは酸性 pH（例えば、pH 2 ～ 6）で活性である。

30

【0038】

一態様では、本発明は、本発明の医薬組成物を含む製剤に関し、ここでは、酵素（複数可）が遅延放出ビヒクル中に存在し、その結果、製剤が胃の中に存在する間、酵素（複数可）が継続的に放出される。一実施形態では、製剤は、胃の中で酸と接触するより前に、約 5 を越える pH を有する。一実施形態では、製剤は生物学的に許容可能な緩衝液を含み、その結果、胃の中で酸に接触した際に、組成物の pH は少なくとも一定期間約 pH 5 または 6 にとどまる。

40

【0039】

一実施形態では、本発明は、医薬組成物の単位用量製剤に関する。例えば及び限定はされないが、単位用量は、錠剤、カプセル剤中に存在してもよい。単位用量は、固体、液体、粉末または任意の他の形態でもよい。理論に拘束されないが、医薬組成物の単位用量製剤は、（例えば、免疫原性の摂取タンパク質の量に基づいて）適切な投薬を可能にし、一方で、過剰な量の組成物の投与の潜在的な負の副作用を回避することを可能にすることが想像される。

【0040】

50

一実施形態では、本発明は、ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシン及び／またはそれらの変異体のプロ酵素形態に関する。一実施形態では、プロペプチドが酵素に存在する。好ましい実施形態では、酸性 pH によってプロペプチドを除去し、それによって、酵素を活性化する。一実施形態では、プロペプチドは、酵素についての天然に存在するプロペプチドアミノ酸配列を含む。一実施形態では、プロペプチドは人工プロペプチドまたは異種性のプロペプチド（すなわち、異なるタンパク質及び／または種由来の酸不安定性プロペプチド）である。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】 *Nepenthes mirabilis*（配列番号5）、*Nepenthes alata*（配列番号6）、*Nepenthes gracilis*（配列番号7）、*Zea mays*（配列番号10）及び *Oryza sativa*（配列番号11）由来のネペンテシン I、ならびに *Nepenthes mirabilis*（配列番号8）、*Nepenthes gracilis*（配列番号9）、*Oryza sativa*（配列番号12）及び *Zea mays*（配列番号13）由来のネペンテシン II についてのタンパク質配列のアライメントを示す図である。

【図2】組換えネペンテシンタンパク質のサイズを示す図である。A：ネペンテシン I のクーマシー染色ゲル。B：酸活性化ネペンテシン I の MALDI-TOF MS 分析。C：ネペンテシン II のクーマシー染色ゲル。D：酸活性化ネペンテシン II の MALDI-TOF MS 分析。

【図3】MALDI-TOF MS による、（2～3種からプールした）天然のネペンテシン I 及びネペンテシン II のサイズ。

【図4】組換えネペンテシン II、*Nepenthes* 抽出物またはペプシンで消化後のグルテンフラグメントの分子量を示す、クーマシー染色ゲルの SDS-PAGE ゲルの写真である。

【図5A】ペプシン（40 µg）または指示された量の組換えネペンテシン I または組換えネペンテシン II で消化したグルテンタンパク質のスラリーを含む、バイアルの写真である。

【図5B】図5Bは、ペプシン（40 µg）または指示された量の *Nepenthes* 抽出物で消化したグルテンタンパク質のスラリーを含むバイアルの写真である。ネペンテシンまたは *Nepenthes* 抽出物とともにインキュベートしたバイアルはペプシンのバイアルよりも濁りが少なく、これにより、より活発なグルテン消化が示される。

【図6】37℃で1、5、10、15、30、60、130、360または810分後に、LC-MS/MSを使用して、濃縮された *Nepenthes* 流体によるコムギ由来グリアジンの消化から同定されたすべてのペプチドの平均長を示す図である。偽陽性の同定を減らすために、スコアに対する95%信頼度カットオフ（ $p < 0.05$ ）を使用した。ペプチド長の相対標準偏差を挿入図に示す。

【図7】37℃で1、5、10、15、60、130、360または810分の消化後に、LC-MS/MSによって同定された、長さでグループ化されたペプチド数を示す図である。データは図6と同様である。

【図8】37℃で10、60、120、360または810分の消化後に特定の長さを得る累積確率として、図6と同じデータを示す図である。

【図9】示される酵素に関して、（A）切断部位の P1 または N 末端側での、及（B）切断部位の P1' または C 末端側での切断優先性を示す図である。各残基についての左側のバーは *Nepenthes* 抽出物での消化を示し、中央のバーは精製された *Nepenthes* 抽出物での消化を示し、右側のバーは組換えネペンテシン I での消化を示す。％切断は、存在するペプチドの総数に対する、所与の残基で観察された切断の数を表す。データは、グリアジンの消化物から得た。

【図10】*Nepenthes* 流体についてのイオン交換精製のプロファイルを示す図である。ネプロシン及びネペンテシンに対応するピークを矢印で示す。囲まれた領域は、収

10

20

30

40

50

集画分を示す。

【図 1 1】処理過程におけるマウスの体重を示す図である。陰性対照（●）の動物はグリアジンで負荷しなかった。陽性対照（■）の動物はペプシンで消化したグリアジンで負荷した。処理 1（▲）の動物は N e p e n t h e s 抽出物で消化したグリアジンで負荷した。処理 2（▼）の動物は組換えネペンテシン I I で消化したグリアジンで負荷した。

【図 1 2】処理したマウスの腸における C D 3 陽性 I E L に関する免疫組織化学的検査の写真である。

【図 1 3】各処理群に関して、腸中の腸細胞 1 0 0 個あたりの C D 3 陽性上皮内リンパ球（I E L）の平均数を示す図である。* $p < 0.05$; * * * $p < 0.001$

【図 1 4】各処理集団に関して、絨毛と陰窩の平均比を示す図である。

【図 1 5 A】データ依存型 L C - M S / M S で検出した場合の、ネプロシンによって消化されるグリアジン部分のサンプリングを示す図である。

【図 1 5 B】ネプロシンで消化後のグリアジンの消化プロファイルを示す図である。ピリオドは切断部位を示す。

【図 1 6】様々な種由来のネプロシンのアミノ酸配列における多型の位置を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0042】

本発明は記載される特定の実施形態に限定されず、したがって、当然ながら変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される術語は特定の実施形態のみを説明することを目的とし、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、制限を意図したものではないことも理解されたい。

【0043】

本発明の詳細な説明は、読者の利便性のためだけに様々なセクションに分けられ、いかなるセクションで見出される開示も別のセクションのものと組み合わせることができる。

【0044】

I. 定義

別段規定されない限りは、本明細書で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様または均等ないかなる方法及び材料も本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法、装置及び材料を次に記載する。本明細書で引用されるすべての技術刊行物及び特許公報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書のいずれの記述も、先行発明によって、本発明がそのような開示に先行する権利が与えられないことを認めると解釈されるものではない。

【0045】

本明細書及び特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈において別段明記しない限り、複数形を含む。

【0046】

本明細書で使用する場合、用語「comprising」は、組成物及び方法が、列挙される要素を含むが、他を除外しないことを意味することを意図する。組成物及び方法を定義するために使用される場合、「Consisting essentially of」は、組み合わせにとって本質的に重要な任意の他の要素を除外することを意味するものとする。例えば、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、特許請求される発明の基本的及び新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない他の要素を除外しないはずである。「Consisting of」は、微量より多い他の成分及び列挙される実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これらの移行用語のそれぞれによって定義される実施形態は本発明の範囲内である。

【0047】

本明細書で使用する場合、「抗原性の可能性がある食品またはタンパク質」は、感受性個体の腸において免疫及び／または炎症応答を引き起こし得る任意の食品またはタンパク

10

20

30

40

50

質である。好ましい実施形態では、個体はヒトであり、食品はヒトによる摂取を目的とする食品である。抗原性の可能性がある食品としては、限定はされないが、コムギ、ライムギ、オオムギ、ピーナッツ、ナッツ及び種子が挙げられる。一実施形態では、これらの食品由来の抗原性の可能性があるタンパク質としては、プロラミンタンパク質、2Sアルブミン、非特異的脂質輸送タンパク質、二機能性アルファアミラーゼ/プロテアーゼ阻害剤、ダイズ疎水性タンパク質、インドリン、グルテン、セルピン、プリニン、アルファアミラーゼ/プロテアーゼ阻害因子、グロブリン及びファリニンが挙げられる。好ましい実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質（またはペプチド）は、プロリン及び/またはグルタミン残基に富む。特に好ましい実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質はグルテンである。別の好ましい実施形態では、抗原性の可能性があるタンパク質はコムギタンパク質である。

10

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「グルテン」は、一般に、特定の個体に潜在的な有害作用を有する、コムギまたはオオムギ及びライムギを含めた近縁穀物種中に存在するタンパク質を指す。グルテンタンパク質は、単量体タンパク質である、 α -グリアジン、 β -グリアジン、 γ -グリアジン及び ω -グリアジンなどのグリアジン、ならびにジスルフィド結合によって結合した高分子量及び低分子重サブユニット凝集体の非常に不均一な混合物である、グルテニンを含む。多くの小麦グルテンタンパク質が特徴付けされている。例えば、Woychikら, Amino Acid Composition of Proteins in Wheat Gluten, J. Agric. Food Chem 9 (4), 307-310 (1961)を参照されたい。本明細書で使用する場合、用語グルテンは、グルテン含有食品由来グルテンタンパク質の通常のヒト消化から生じ得、異常な免疫応答を引き起こし得るオリゴペプチドも含む。これらのオリゴペプチドの中には、通常の消化酵素に抵抗性であるものもある。上記のタンパク質及びオリゴペプチドを含めたグルテンは、グルテン不耐症（例えば、セリアックスブルー）の患者において、T細胞（例えば、IEL）に対する抗原として作用すると考えられている。用語グルテンは、例えばベイクド製品で見られるであろう変性したグルテンも指す。

20

【0049】

本明細書で使用する場合、用語「グルテン過敏症及び関連する状態」は、グルテンタンパク質またはペプチドに対する不耐性または感受性に起因する任意の状態を指す。これらとしては、限定はされないが、セリアックスブルー（セリアック病）、コムギアレルギー、グルテン過敏症、グルテン過敏性腸症、特発性グルテン過敏症及びヘルペス状皮膚炎が挙げられる。関連する状態としては、限定はされないが、自閉症、注意欠陥多動性障害（ADHD）、関節リウマチ、線維筋痛症、クローン病、栄養素の吸収不良（malabsorption）及び過敏性腸症候群（IBS）も挙げられる。

30

【0050】

用語「ネプロシン」は、およそ29キロダルトン（kDa）の分子量を有するプロリルエンドプロテアーゼを指す。ネプロシンは、Nepenthes種の囊状葉分泌物から単離することができる。ネプロシンは、高い特異性で、タンパク質のカルボキシ末端をプロリンに切断する。この酵素は、約pH2～約pH6で活性である。一実施形態では、ネプロシンは、配列番号1のアミノ酸配列を有する。ネプロシンのアミノ酸配列は、いかなる他の既知タンパク質にも相同でない。一実施形態では、ネプロシンは、配列番号2のcDNA配列にコードされる。一実施形態では、ネプロシンはシグナル配列を含む。一実施形態では、シグナル配列は、配列番号3のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、ネプロシンはシグナル配列を含まない。

40

【0051】

ネプロシンは、すべてのアイソフォーム、アイソタイプ及びネプロシンの変異体、組換えネプロシンならびにそれらの塩を含む。塩は、遊離ネプロシンの生物学的効果及び特性を保持し、生物学的にまたはその他の点で望ましくないものではない、1種または複数の塩基または1種または複数の酸とともにネプロシンによって形成される塩を指す。無機塩

50

基に由来する塩としては、限定されないが、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウムの塩などが挙げられる。有機塩基に由来する塩としては、限定されないが、第1級、第2級及び第3級アミン、天然に存在する置換アミンを含めた置換アミン、環状アミン及び塩基性イオン交換樹脂、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオプロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジン、ポリアミン樹脂などの塩が挙げられる。塩を形成することができる酸としては、限定されないが、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など、及び有機酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸 (salicylic acid) などが挙げられる。

10

【0052】

プロテアーゼの例としては、限定はされないが、アスパラキシン酸プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、グルタミシン酸プロテアーゼ及びメタロプロテアーゼが挙げられる。本発明で有用であり得るプロテアーゼとしては、限定はされないが、BACE、カテプシンD、カテプシンE、キモシン（または「レンニン」）、ナプシン、ペプシン、プラスメプシン、プレセニリン、レニン、トリプシン、ケモトリプシン (chemotrypsin)、エラスターゼ及びシステインエンドプロテアーゼ (EP) B2 (EPB2としても知られる) が挙げられる。プロテアーゼは、例えば、米国特許第7,320,788号；第7,303,871号；第7,320,788号；第7,628,985号；第7,910,541号；及び第7,943,312号；PCT特許公開第2005/107786号；第2008/115428号；第2008/115411号；第2010/021752号；第2010/042203号；第2011/097266号（これらのそれぞれは、参照により本明細書に明確に組み込まれる記載される）に記載されるものを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つのさらなるプロテアーゼは、酸性pH、例えば胃で見られるもの（例えば、pH1.5～3.5）で活性である。

20

30

【0053】

用語「ネペンテシン」は、酵素番号EC3.4.23.12を有するアスパラキシン酸プロテアーゼを指し、ネペンテシンのすべてのアイソフォーム、アイソタイプ及び変異体、例えば、ネペンテシンI及びネペンテシンII、ネペンテシンアイソフォーム及び組換えネペンテシン、ならびにそれらの塩を含む。ネペンテシン (EC3.4.23.12) は、様々な植物源、例えば、熱帯地方においてモンキーカップとして一般に知られている食虫性囊状葉植物である *Nepenthes* の囊状葉分泌物から単離または濃縮され得る、植物起源のアスパラキシン酸プロテアーゼである。ネペンテシンは、2013年3月15日に出願された米国特許出願第13/843,369号に詳細に記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。既知のネペンテシンタンパク質配列（及び推定上のネペンテシンタンパク質配列）の配列アラインメントを図1に示す。

40

【0054】

一実施形態では、「有効量」は、対象における症状の阻害若しくは改善または所望の生物学的な転帰、例えば、臨床徴候の向上、疾患の発症の遅延などをもたらす組成物量を指す。有効量は、当業者が決定することができる。選択される投薬量レベルは、治療を受ける状態の重症度ならびに治療を受ける哺乳動物の状態及び以前の病歴に依存し得る。しかし、所望の治療効果を達成するのに必要とされるより低いレベルで組成物の用量を開始すること、及び投所望の効果が達成されるまで薬量を次第に増大させることは、当技術分野の範囲内である。

50

【0055】

用語「セリアック病の発現」は、セリアック病の症状または臨床像のうちのいずれかを指す。そのような発現としては、限定はされないが、腸の炎症、「ぼんやりとした精神状態」、抑うつ、不安、ADHD様行動、腹痛、腹部膨満、下痢、便秘、頭痛、片頭痛、骨または関節の痛み、慢性疲労、小腸の損傷、組織トランスグルタミナーゼ（tTG）抗体の発生、重度の座瘡、嘔吐、体重減少、被刺激性、鉄欠乏性貧血、関節炎、四肢の刺痛・しびれ、不妊及び口の潰瘍性口内炎が挙げられる。発現は、陰窩過形成をともなう小腸粘膜絨毛萎縮、腸の粘膜炎症、栄養素の吸収不良、腹部膨満、ならびに骨粗鬆症及び腸の悪性腫瘍（リンパ腫及び癌腫）の発生に対する危険性の実質的な高まりをさらに含む。

【0056】

本明細書で使用する場合、「同時投与」または「共治療」は、一緒にまたは互いに前後する薬剤の投与を含む。

【0057】

用語「調節する」、「減弱する」または「改善する」は、哺乳動物などの対象における疾患または障害の任意の治療を意味し、

- ・疾患若しくは障害を予防する若しくは疾患若しくは障害から保護すること、すなわち、異常な生物学的反応若しくは症状を発生させないようにすること；

- ・疾患若しくは障害を阻害すること、すなわち、異常な生物学的反応及び／若しくは臨床症状の発生を抑止または抑制すること；ならびに／または

- ・疾患または障害を軽減すること、すなわち、異常な生物学的反応及び／若しくは症状を後退させることを含む。

【0058】

本明細書で使用する場合、用語「予防する」または「阻害する」は、それらを必要とする対象の予防的治療を指す。予防的治療は、病気を罹患する危険性がある対象に適切な用量の治療剤を与え、それによって、病気の発症を実質的に防ぐことによって達成することができる。

【0059】

本明細書で使用する場合、用語「状態」は、本明細書に提供される化合物、組成物及び方法が使用されている病態を指す。

【0060】

本明細書で使用する場合、用語「患者」または「対象」は哺乳動物を指し、ヒト及びヒト以外の哺乳動物を含む。本明細書の特定の実施形態では、患者または対象はヒトである。

【0061】

数値の前で使用される場合、用語「約」は、値が合理的な範囲、すなわち±5%、±1%または±0.2%内で変化し得ることを示す。

【0062】

別の配列に対して特定のパーセンテージ（例えば、80%、85%、90%または95%）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチド若しくはポリペプチド領域）とは、整列させた場合に、塩基（またはアミノ酸）のパーセンテージが、その2つの配列の比較において同一であることを意味する。アライメント及びパーセント相同性または配列同一性は、当技術分野で既知のソフトウェアプログラム、例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Ausubelら編1987）補遺30、セクション7.7.18、表7.7.1に記載されているものを使用して決定することができる。好ましくは、アライメントについてデフォルトパラメーターを使用する。アライメントプログラムの1つは、デフォルトパラメーターを使用するBLASTである。プログラムの例としては、BLASTN及びBLASTPが挙げられ、これは、以下のデフォルトパラメーターを使用する：遺伝暗号＝標準；フィルター＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝60；期待値＝10；マ

10

20

30

40

50

トリックス=B L O S U M 6 2 ; 説明 (d e s c r i p t i o n s) = 5 0 配列 ; ソート
バイ (s o r t b y) = H I G H S C O R E ; データベース = n o n - r e d u n d
a n t , G e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B + G e n B a n k C D S t r a
n s l a t i o n s + S w i s s P r o t e i n + S P u p d a t e + P I R 。これらの
プログラムの詳細は、以下のインターネットアドレス : n c b i . n l m . n i h . g o
v / c g i - b i n / B L A S T で見出すことができる。

【0063】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸
分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較目的で整列され得る各配列における位置を比
較することによって決定することができる。比較される配列における位置が同じ塩基また
はアミノ酸で占められている場合は、これらの分子はその位置で相同である。配列間の相
同性の程度は、これらの配列に共通の一致する位置または相同な位置の数の関数である。

「無関係の」または「非相同な」配列は、本開示の配列のうちの1つと40%未満の同一
性、あるいは25%未満の同一性を有する。

【0064】

II. 方法

一態様では、本発明は、患者においてグルテン不耐症によってもたらされる状態を調節
する方法であって、有効量の N e p e n t h e s 酵素含有医薬組成物を患者に投与するこ
とを含む方法に関する。好ましい実施形態では、状態はセリアック病またはコムギアレルギーである。

【0065】

別の態様では、本発明は、哺乳動物の腸におけるペプチド性食品抗原の存在が原因の、
腸における I E L の生成及び／または漸増を、減弱または予防する方法に関する。一実施
形態では、方法は、有効量の N e p e n t h e s 酵素含有医薬組成物を哺乳動物に投与す
ることを含む。一実施形態では、腸における I E L の生成及び／または漸増を減弱または
予防するために、グルテンタンパク質が医薬組成物によって分解される。

【0066】

一態様では、本発明は、哺乳動物の腸におけるペプチド性食品抗原の存在が原因の腸の
炎症を減弱または予防する方法に関する。一実施形態では、方法は、有効量の N e p e n
t h e s 酵素含有医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態では、腸の炎
症を減弱または予防するために、酵素（複数可）によってペプチド性食品抗原が分解され
る。

【0067】

一態様では、本発明は、哺乳動物の腸におけるペプチド性食品抗原の存在が原因の上皮
内のリンパ球増加を減弱または予防する方法に関する。一実施形態では、方法は、有効量
の N e p e n t h e s 酵素含有医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態
では、腸における上皮内のリンパ球増加を減弱または予防するために、ペプチド性食品抗
原が医薬組成物によって分解される。

【0068】

一態様では、本発明は、哺乳動物の腸におけるペプチド性食品抗原の存在が原因の絨毛
萎縮を減弱または予防する方法に関する。一実施形態では、方法は、有効量の N e p e n
t h e s 酵素含有医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。一実施形態では、腸にお
ける絨毛萎縮を減弱または予防するために、ペプチド性食品抗原が医薬組成物によって分
解される。一実施形態では、絨毛萎縮は腸の炎症の結果である。

【0069】

一実施形態では、N e p e n t h e s 酵素は、ネペンテシン I 、ネペンテシン I I 、ネ
プロシン、それらの変異体またはそれらの混合物である。好ましい実施形態では、医薬製
剤は持続性放出製剤である。

【0070】

一実施形態では、変異体は、配列番号 1 、配列番号 5 、配列番号 6 、配列番号 7 、配列

10

20

30

40

50

番号 8、配列番号 9、配列番号 20 または配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。一実施形態では、変異体は、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。一実施形態では、変異体は、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。一実施形態では、変異体は、配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。一実施形態では、変異体は、配列番号 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。一実施形態では、変異体は、配列番号 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。一実施形態では、変異体は、配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。一実施形態では、変異体は、配列番号 20 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。一実施形態では、変異体は、配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 85% の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。

【0071】

一実施形態では、医薬組成物は Nepenthes の嚢状葉液の抽出物を含む。一実施形態では、医薬組成物は、Nepenthes の嚢状葉液の抽出物から精製されたネペンテシン I、ネペンテシン II 及び／またはネプロシンを含む。一実施形態では、ネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシンまたはそれらの変異体の少なくとも 1 つは、組換えタンパク質である。一実施形態では、医薬組成物は、投与より前に約 pH 5 ～ 約 pH 8 の間である。本明細書に記載の方法で使用するための医薬組成物をより詳細に以下で述べる。

【0072】

好ましい実施形態では、哺乳動物はヒトである。一実施形態では、ヒトは、グルテン不耐症、セリアック病、注意欠陥多動性障害、自閉症、関節リウマチ、線維筋痛症及びヘルペス状皮膚炎からなる群から選択される疾患に罹患している。一実施形態では、ヒトは、食品アレルギーに罹患している。

【0073】

一実施形態では、医薬組成物は、グルテン含有食品の摂取より前に、摂取の間に、または摂取の直後に、経口的に投与される。

【0074】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、グルテンを含むか、グルテンを含む疑いがある食品を対象が摂取するより前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象が摂取する食品中のグルテンの分解に酵素が少なくとも部分的に有効（例えば、本来の活性の少なくとも約 10%、20%、50%、70%、90%）である期間内に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象が食品を摂取するより前の約 4 時間、3 時間、2 時間、1 時間または 30 分以内に投与される。

【0075】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、免疫原性の可能性がある食品を対象が摂取すると同時に対象に投与される。いくつかの実施形態では、酵素組成物は、食品とともに投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、食品とは別に投与される。

【0076】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、免疫原性の可能性がある食品を対象が摂取した直後に対象に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、食品中の抗原（複数可）の少なくとも一部（例えば、少なくとも約 10%、20%、50%、70%、90%）がまだ対象の胃の中にある期間内に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象が食品を摂取した後の 4 時間、3 時間、2 時間、1 時間または 30 分以内に投与される。

【0077】

一般的には、医薬組成物は、安全であり、ペプチド性食品抗原（複数可）の解毒という所望の効果をもたらすのに十分である量で投与される。医薬組成物の投薬量は、多くの因子、例えば、投与される特定の酵素、食品に対する対象の感受性、摂取される抗原含有食品の量及び種類、酵素の薬力学的特性、投与様式、受容者の年齢、健康及び体重、症状の性質及び程度、治療の頻度及びもしあれば併用療法の種類ならびに酵素のクリアランス速度によって変動し得る。当業者は、上記の因子に基づいて、適切な投薬量を決定することができる。組成物は、臨床応答に応じて、必要に応じて調整することができる適切な投薬量で、最初に投与することができる。至適な投薬量範囲を特定するのを支援するために、インビトロアッセイを場合により用いることができる。製剤に用いられることになる正確な用量は、投与経路及び／または疾患若しくは障害の重症度にも依存し、医師の判断及び各対象の状況に従って決定されるべきである。

10

【0078】

成人対象の投薬または投与のレジメンを、小児及び幼児用に比例的に調整することができる、また、例えば分子量または免疫応答に応じて、他の投与または他の型式用に調整することができる。医師の裁量で、投与または治療を適切な間隔で反復することができる。

【0079】

一般に、医薬組成物は、必要な場合に、例えば、抗原性タンパク質を含むか、抗原性タンパク質を含む疑いがある食品を対象が摂取するであろう、または摂取している、または摂取した場合に、投与される。いずれにせよ、これは、1日につきkg体重あたり約0.001mg～約1000mgの酵素の投薬量で、または平均的な人に対して、投与あたり約1mg～約100gの投薬量で投与することができる。いくつかの実施形態では、酵素は、1日あたり0.001、0.01、0.1、1、5、10、50、100、500または1000mg/kg体重で、及びこれらの値のうちの任意の2つの間の範囲（端点を含む）で投与することができる。いくつかの実施形態では、酵素は、投与あたり1mg、10mg、100mg、200mg、500mg、700mg、1g、10g、20g、50g、70g、100gで、及びこれらの値のうちの任意の2つの間の範囲（端点を含む）で、投与することができる。いくつかの実施形態では、これは、対象が抗原性タンパク質を含む食品を摂取する回数及び／またはそのような食品のどのくらいが摂取されるかに応じて、1日にあたり1回、2回、3回など投与することができる。本明細書に記載される酵素の量は、組成物中の全酵素または各酵素に関し得る。

20

30

【0080】

いくつかの実施形態では、投与される医薬組成物の量は、摂取された／摂取されることになる基質（例えば、グルテン及び／若しくは他のタンパク質または抗原性の可能性があるタンパク質）の量（またはおおよその量）に依存する。一実施形態では、1gの基質あたり約1mg～約1gの酵素が投与される。一実施形態では、1gの基質あたり約5mg～約1gの酵素が投与される。一実施形態では、1gの基質あたり約10mg～約1gの酵素が投与される。一実施形態では、1gの基質あたり約100mg～約1gの酵素が投与される。一実施形態では、1gの基質あたり約1mg～約500mgの酵素が投与される。一実施形態では、1gの基質あたり約1mg～約250mgの酵素が投与される。一実施形態では、1gの基質あたり約1mg～約100mgの酵素が投与される。これは、これらの範囲（端点を含む）及びこれらの値のうちの任意の2つの間の部分範囲の任意の値を含む。

40

【0081】

一実施形態では、基質と投与される酵素の比は、約1：1～約10000：1の間である。好ましい実施形態では、基質と酵素の比は、約10：1～約1000：1の間である。一実施形態では、基質と酵素の比は、約10：1～約100：1の間である。

【0082】

本発明の医薬組成物は、単独の活性薬剤として投与することができ、または他の薬剤と

50

組み合わせ（同時に、連続的に若しくは別々に、または共製剤によって）投与することができ、他の薬剤には、同じ若しくは同様の治療活性を示し、そのような併用投与に安全且つ効果的であると判定された他の化合物が含まれる。

【0083】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、さらなる酵素、例えば、胃のプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ（ペプシン、ペプシノーゲンまたはChenら, Aspartic proteases gene family in rice: Gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation, Gene 442:108-118 (2009)によって記載されるものなど）ならびに別のプロリルエンドペプチダーゼ（PEP）、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP IV）及びジペプチジルカルボキシペプチダーゼ（DCP）またはシステインプロテイナーゼB（米国特許第7,910,541号に記載されている）などの酵素とともに投与される。一実施形態では、他の酵素は、さらなる酵素を生成及び／または分泌する細菌の形態で投与される。一実施形態では、細菌は、ネペンテシンI、ネペンテシンII、ネプロシン及び／またはそれらの変異体を生成及び／または分泌するように遺伝子操作される。

10

【0084】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は別の薬剤とともに対象に投与される。医薬組成物とともに投与することができる薬剤の非限定例としては、組織トランスグルタミナーゼの阻害剤、抗炎症剤、例えば、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、エンドペプチダーゼ、HMG-CoA還元酵素阻害剤（例えば、コンパクチン、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン及びアトルバスタチン）、ロイコトリエン受容体アンタゴニスト（例えば、モンテルカスト及びザフィルルカスト）、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ及びロフェコキシブ）、p38MAPキナーゼ阻害剤（例えば、BIRB-796）；肥満細胞安定化剤、例えば、クロモグリク酸ナトリウム（クロモリン）、ペミロラスト、プロキシクロミル、レピリナスト、ドキサントラゾール、アンレキサノクス、ネドクロミル及びプロビクロミル、抗潰瘍剤、抗アレルギー剤、例えば、抗ヒスタミン剤（例えば、アクリバスチン、セチリジン、デスロラタジン、エバスチン、フェキソフェナジン、レボセチリジン、ロラタジン及びミゾラスチン）、トランスグルタミナーゼ2（TG2）の阻害剤、抗TNF α 剤ならびに抗生物質が挙げられる。一実施形態では、さらなる薬剤はプロバイオティクである。プロバイオティクとしては、限定はされないが、lactobacillus、酵母、bacillusまたはbifidobacteriumの種及び系統が挙げられる。一実施形態では、他の薬剤はエラフィンである。一実施形態では、他の薬剤は、さらなる薬剤を生成及び／または分泌する細菌の形態で投与される。

20

30

【0085】

いくつかの実施形態では、他の薬剤は、腸で活性である酵素（例えば、プロテアーゼ）を含む。理論によって制限されるものでないが、そのような酵素は、医薬組成物の酵素（複数可）と相乗的に作用して、さらに免疫原性タンパク質を分解することができると考えられる。

【0086】

前述の状態及び疾患のうちの1つを治療または予防するための医薬の製造における、ネペンテシンI、ネペンテシンII、ネプロシン、それらの変異体及び／またはそれらの塩を含む酵素組成物の使用も本明細書で提供される。

40

【0087】

III. 医薬組成物

医薬組成物は、様々な組成物で、単独で、または適切な医薬的に許容可能な担体、賦形剤若しくは希釈剤とともに、投与することができる。

【0088】

したがって、別の態様では、ネペンテシンI、ネペンテシンII、ネプロシン、それらの変異体及び／またはそれらの塩を含む組成物が本明細書で提供される。いくつかの実施

50

形態では、組成物は医薬組成物である。組成物は、固体、半固体または液体形態、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、溶液剤、注射剤、ゲル剤及びマイクロスフェアに製剤化することができる。組成物の投与は、様々な方法で、例えば経口投与によって達成することができる。

【0089】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、治療有効量のネペンテシン I、ネペンテシン II、ネプロシン、それらの変異体またはそれらの混合物及び医薬的に許容可能な担体を含む。特定の実施形態では、用語「医薬的に許容可能な」は、動物及びより詳細にはヒトで使用するために、連邦または州政府の規制当局によって承認されているか、米国薬局方または他の一般に認められた薬局方に収載されていることを意味する。用語「担体」は、希釈剤、補助剤、賦形剤またはビヒクル（治療剤がこれらとともに投与される）を指す。そのような医薬担体は、滅菌した液体、例えば、水ならびに石油、動物、植物または合成起源のものを含めた油、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱物油、ゴマ油などでもよい。生理食塩水ならびにデキストロース水溶液及びグリセロール水溶液も液状担体として用いることができる。

10

【0090】

適切な医薬品賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は、必要に応じて、少量の加湿若しくは乳化剤または pH 緩衝剤も含むことができる。これらの組成物は、溶液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続性放出製剤などの形態をとることができる。適切な医薬担体の例は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる、E. W. Martin による “Remington's Pharmaceutical Sciences” に記載されている。そのような組成物は、対象に適切に投与するための形態を提供するために、好ましくは精製された形態の治療有効量の酵素（複数可）を適切な量の担体とともに含む。製剤は、投与様式に適していなければならない。

20

【0091】

経口投与については、医薬組成物を、単独で、または適切な添加剤と組み合わせて使用して、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、液剤、懸濁剤などを作製することができる。例えば、組成物の固体経口形態は、従来の添加剤、崩壊剤、潤滑剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤及び着香剤を用いて調製することができる。賦形剤の非限定例としては、ラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、結晶セルロース、セルロース誘導体、アラビアゴム、トウモロコシデンプン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、香料及び着色剤が挙げられる。いくつかの実施形態では、製剤は、対象の胃の中に酵素（複数可）を放出し、その結果、酵素（複数可）によってペプチド性食品抗原（複数可）が分解され得る。

30

【0092】

組成物を、場合により適切な緩衝液（例えば、リン酸、クエン酸、ヒスチジン、イミダゾール緩衝液）及び賦形剤（例えば、ショ糖、ラクトース、トレハロースなどの抗凍結剤）の存在下で、水溶液から凍結乾燥することができる。凍結乾燥ケーキを、場合により賦形剤と混ぜることができ、様々な形態にすることができる。

40

【0093】

別の態様では、それを必要とする患者において、グルテン不耐症または関連する状態、例えば、セリアック病、コムギアレルギー、グルテン過敏症及びヘルペス状皮膚炎を治療する方法であって、グルテンを含むか、グルテンを含む疑いがある食品を、患者が摂取するより前に有効量の組成物で処理することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、食品は、その調製の間有効量の組成物と混ぜ合わされる。一実施形態では、組成物は、食品調製の任意の加熱ステップの後に加えられる。一実施形態では、組成物は、食品調製の 1 つまたは複数の加熱ステップの前に加えられる。

50

【0094】

ネペンテシン I、ネペンテシン I I 及びネプロシンは、活性化前に、Nepenthes 中にプロ酵素として存在する。すなわち、これらのタンパク質は、囊状葉液中で酵素を活性化するために切断されるプロペプチドを含む。一実施形態では、組成物は、プロペプチドを含む、ネペンテシン I、ネペンテシン I I、ネプロシン、それらの変異体及び／またはそれらの塩を含む。一実施形態では、プロペプチドは酵素の N 末端に隣接する。一実施形態では、プロペプチドは、天然に存在する、酵素のプロペプチドである。一実施形態では、プロペプチドは、（例えば、異なるタンパク質若しくは種に由来する、または合成的な）異種のプロペプチドである。一実施形態では、プロペプチドは酸性条件によって切断される。一実施形態では、プロペプチドは酵素によって切断される。一実施形態では、プロペプチドの存在は、（例えば、プロペプチドを除去し、成熟酵素を生成するのに必要とされる時間が原因で）、胃において酵素の活性を遅らせる。一実施形態では、プロペプチドは、胃において酵素の活性を遅らせるために、よりゆっくりと除去されるように遺伝子操作される。一実施形態では、プロペプチドは、胃において酵素の活性を迅速化するために、よりすばやく除去されるように遺伝子操作される。

10

【0095】

好ましい実施形態では、製剤は制御放出製剤である。用語「制御放出製剤」は、持続性放出製剤及び徐放性製剤を含む。制御放出製剤は当技術分野で周知である。これらは、薬物の持続性放出、周期的放出、パルス放出または遅延放出を可能にする賦形剤を含む。制御放出製剤は、限定はされないが、マトリックス中に薬物を包埋すること、腸溶性コーティング、マイクロカプセル化、ゲル及びヒドロゲル、ならびに薬物の制御放出を可能にする任意の他の製剤を含む。

20

【0096】

いくつかの実施形態では、組成物は、抗原性の可能性がある食品タンパク質を含むか、含む疑いがある食品とともに、食品添加剤として投与される。一実施形態では、食品はグルテンを含むか、含む疑いがあり、例えば、コムギ、ライムギ及びオオムギなどから作られたパン、パスタ、シリアルなどである。いくつかの実施形態では、組成物は、そのような食品に成分として加えられる。いくつかの実施形態では、組成物は、場合により組成物が不活性な pH で、例えば約 5 以上の pH で、摂取前に食品中に分散される。いくつかの実施形態では、組成物を、患者が食品を摂取する場合にその食品に加えることができる、粉末、スプレッド、スプレー、ソース、ディップ、ホイップクリームなどにする、またはこれらに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、容易な投与のために、組成物をヒトの食欲に訴える形態、例えば、キャンディー、チューインガム、栄養補助食品咀嚼物、シロップなどにすることができる。いくつかの実施形態では、組成物を一般的な食料品、例えば、砂糖、塩、サラダドレッシング、香辛料、チーズ、バター、マーガリン、スプレッド、バター、揚げ用ショートニング、マヨネーズ、乳製品、ナッツバター、種子バター、カーネルバター、ピーナッツバターなどと混合することができる。好ましくは、組成物を含む食料品または添加剤は、患者が摂取する前に加熱を必要とせず、その結果、高温による酵素（複数可）活性喪失の可能性を最小限にすることができる。

30

【0097】

一実施形態では、組成物中の酵素（複数可）は、酸に接触する際に（すなわち、胃の中で）活性化される。

40

【0098】

別の態様では、ネプロシン、ネペンテシン I、ネペンテシン I I、それらの変異体またはそれらの組み合わせを含む食品製品が提供される。いくつかの実施形態では、食品製品は、グルテンを含むか、グルテンを含む疑いがあり、例えば、コムギ、ライムギ及びオオムギから作られたベーカリ製品（例えば、ケーキ、マフィン、ドーナツ、ペーストリー、ロールパン及びパン）、パスタ、クラッカー、トルティーヤチップス、シリアルなどである。いくつかの実施形態では、食品製品は、グルテンを含むか、グルテンを含む疑いがある別の食品製品とともに摂取され得る。そのような食品の非限定例としては、粉末、スプ

50

レッド、スプレー、ソース、ディップ、ホイップクリーム、キャンディー、チューインガム、シロップ、砂糖、塩、サラダドレッシング、香辛料、チーズ、バター、マーガリン、スプレッド、バター、揚げ用ショートニング、マヨネーズ、乳製品、ナッツバター、種子バター、カーネルバター、ピーナッツバターなどが挙げられる。

【0099】

いくつかの実施形態では、ネプロシン、ネペンテシン I、ネペンテシン II、それらの変異体またはそれらの組み合わせを含む組成物は、食品と混合されるか、グルテンを含む食材を前処理するのに使用される。食品中に存在する組成物は、摂取より前にまたは摂取の間に食品中のグルテンレベルを低減するように、酵素的に活性であり得る。

【0100】

本発明の一態様では、ネプロシン、ネペンテシン I、ネペンテシン II、それらの変異体またはそれらの組み合わせを含む組成物は、食品が摂取される前に食品に加えられる。一実施形態では、本発明は、グルテンを消化するために内部賦形剤及び有効量の医薬組成物を含むディスペンサーに関する。一実施形態では、医薬組成物及び／または内部賦形剤は、食品が摂取される前に食品に加えられる。一実施形態では、食品はグルテンを含むか、グルテンを含むことが疑われる。一実施形態では、内部賦形剤は、塩化ナトリウムまたはヨウ化ナトリウムまたはそれらの混合物を含む。一実施形態では、医薬組成物及び／または内部賦形剤は、前記ディスペンサーから効率的に分配するようにサイズを合わせられた、顆粒形態である。

【0101】

いくつかの実施形態では、組成物（医薬組成物または食用に適する組成物など）または食品製品は、約 0.1%～約 99%、約 0.5%～約 95%、約 1%～約 95%、約 5%～約 95%、約 10%～約 90%、約 20%～約 80%、約 25%～約 75%の酵素（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、組成物（医薬組成物または食用に適する組成物など）または食品製品中の酵素の量は、組成物または食品製品の全体の約 0.01%、約 0.1%、約 0.5%、約 1%、約 5%、約 10%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%または約 95%、またはこれらの値のうちの任意の 2つの間の範囲（端点を含む）である。

【0102】

いくつかの実施形態では、組成物は、ネプロシン及びネペンテシンまたはそれらの変異体を含む。いくつかの実施形態では、ネペンテシンは、ネペンテシン I 及び／またはネペンテシン II またはそれらの変異体である。いくつかの実施形態では、ネペンテシンは、組換えネペンテシン I 及び／または組換えネペンテシン II またはそれらの変異体である。いくつかの実施形態では、ネペンテシンは、組換えネペンテシン I 及び組換えネペンテシン II またはそれらのそれぞれの変異体である。いくつかの実施形態では、ネプロシンは、組換えネプロシンまたはその変異体である。好ましい実施形態では、組成物は、*Nepenthes* 種由来のネペンテシン I、ネペンテシン II 及び／若しくはネプロシンのアミノ酸配列（複数可）を含む、ネペンテシン I、ネペンテシン II 及び／若しくはネプロシンまたはそれらの変異体（複数可）を含む。

【0103】

ネペンテシン I の mRNA / cDNA 配列は、いくつかの *Nepenthes* 種、例えば、*Nepenthes mirabilis* (GenBank 受託番号 JX494401)、*Nepenthes gracilis* (GenBank 受託番号 AB114914) 及び *Nepenthes alata* (GenBank 受託番号 AB266803) から記載されている。ネペンテシン II の mRNA / cDNA 配列は、いくつかの *Nepenthes* 種、例えば、*Nepenthes mirabilis* (GenBank 受託番号 JX494402) 及び *Nepenthes gracilis* (GenBank 受託番号 AB114915) から記載されている。

【0104】

ネペンテシン I のタンパク質配列は、いくつかの *Nepenthes* 種、例えば、*Nepenthes mirabilis* (GenBank 受託番号 AFV26024; 配列番号 5)、*Nepenthes gracilis* (GenBank 受託番号 BAD07474; 配列番号 7) 及び *Nepenthes alata* (GenBank 受託番号 BAF98915; 配列番号 6) から記載されている。ネペンテシン II のタンパク質配列は、いくつかの *Nepenthes* 種、例えば、*Nepenthes mirabilis* (GenBank 受託番号 AFV26025; 配列番号 8) 及び *Nepenthes gracilis* (GenBank 受託番号 BAD07475; 配列番号 9) から記載されている。これらの配列は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2014/0186330 号にも見出される。

10

【0105】

本明細書で提供される GenBank 受託番号によって表される配列のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0106】

いくつかの実施形態では、ネペンテシンは、ネペンテシン I のアミノ酸配列（例えば、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 または配列番号 21）に対して少なくとも約 85% の配列相同性を有する、ネペンテシンの変異体である。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン I のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン I のアミノ酸配列に対して少なくとも約 95% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン I のアミノ酸配列に対して少なくとも約 96% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン I のアミノ酸配列に対して少なくとも約 97% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン I のアミノ酸配列に対して少なくとも約 98% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン I のアミノ酸配列に対して少なくとも約 99% の配列相同性を有する。一実施形態では、ネペンテシンは、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 または配列番号 21 のアミノ酸配列を含む。

20

【0107】

いくつかの実施形態では、ネペンテシンは、ネペンテシン II のアミノ酸配列（例えば、配列番号 8、配列番号 9 または配列番号 22）に対して少なくとも約 85% の配列相同性を有する、ネペンテシンの変異体である。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン II のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン II のアミノ酸配列に対して少なくとも約 95% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン II のアミノ酸配列に対して少なくとも約 96% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン II のアミノ酸配列に対して少なくとも約 97% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン II のアミノ酸配列に対して少なくとも約 98% の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、変異体は、ネペンテシン II のアミノ酸配列に対して少なくとも約 99% の配列相同性を有する。一実施形態では、ネペンテシンは、配列番号 8、配列番号 9 または配列番号 22 のアミノ酸配列を含む。

30

40

【0108】

本発明の一態様では、組成物中のネプロシンとネペンテシン I 及び／または II の比は、グルテン不耐症、セリアック病、コムギアレルギー、若しくはヘルペス状皮膚炎、対象の腸における炎症、IEL の増殖若しくは漸増、上皮内のリンパ球増加、及び／若しくは絨毛萎縮、またはそれらの任意の症状を予防するために、ペプチド性食品抗原が十分に小さな及び／または無害のフラグメントに切断されるような比である。いくつかの実施形態では、ネプロシン：ネペンテシンの比は、約 1：100～約 100：1 の間である。

【0109】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 100：1 のネプロシンとネペンテ

50

シン（ネペンテシン I 及び／または I I）の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 90 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 70 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 60 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 50 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 40 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 30 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 20 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 10 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 5 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 4 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 3 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 2 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 1 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 2 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 3 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 4 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 5 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 10 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 20 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 30 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 40 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 50 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 60 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 70 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 80 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 90 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 100 のネプロシンとネペンテシンの比を含む。

10

20

30

【0110】

本発明の一態様では、組成物中のネペンテシン I とネペンテシン I I の比は、対象の腸における、炎症、I E L の増殖若しくは漸増、上皮内のリンパ球増加、及び／または絨毛萎縮を予防するために、ペプチド性食品抗原が十分に小さな及び／または無害のフラグメントに切断されるような比である。いくつかの実施形態では、ネペンテシン I : ネペンテシン I I の比は、約 1 : 100 ~ 約 100 : 1 の間である。

【0111】

いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 100 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 90 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 70 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 60 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 50 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 40 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 30 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 20 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 10 : 1 のネペンテシン I とネペ

40

50

ンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 5 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 4 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 3 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 2 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 2 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 3 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 4 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 5 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 10 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 20 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 30 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 40 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 50 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 60 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 70 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 80 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 90 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも約 1 : 100 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。

10

20

【0112】

I V. 調製方法

ネペンテシン及び／またはネプロシンを、当技術分野で既知の方法、例えば（限定されないが）、濾過または固定化されたペプスタチンに基づく親和性精製によって、Nepenthesなどの植物の嚢状葉分泌物を含めた天然源から、濃縮（若しくは抽出）または精製できることが予期される。伝統的なタンパク質クロマトグラフィー、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー（ゲル浸透クロマトグラフィーとしても知られる）及び／またはクロマトフォーカシングクロマトグラフィーを使用して、ネペンテシン及び／またはネプロシンを濃縮（若しくは抽出）または精製することもできる。クロマトフォーカシングは、サイズ排除より前に使用してもよいし、後に使用してもよい。ネペンテシン I、ネペンテシン I I 及びネプロシンは、天然の植物分泌物中に比較的小量で見出される。ネペンテシン I、ネペンテシン I I 及び／またはネプロシンの生成は、例えば、増大した量の所望の酵素（複数可）またはその変異体を発現及び／または分泌するトランスジェニック植物を作出するための生物工学技術を使用して、増大させることができる。

30

【0113】

植物源から単離されることに加えて、Nepenthes 酵素またはその変異体は、化学合成によって調製され得る。化学合成は、所望の酵素または変異体の配列に従ってアミノ酸をカップリングすることによって達成することができる。ペプチドまたはタンパク質を合成するのに、様々なペプチドカップリング方法及び市販のペプチド合成機器が利用可能であり、例えば、Applied Biosystems, Inc.、Foster City, Calif.、Beckman 及び他の製造者による自動合成機である。

40

【0114】

別の態様では、細胞が酵素（複数可）を生成することができるように、酵素（複数可）の DNA（例えば、cDNA）及び／または伝令 RNA で細胞を形質転換すること、またはこれらを細胞にトランスフェクトすることによる、組換え生成系を使用して、Nepenthes 酵素またはその変異体を調製する方法が提供される。例えば、ネペンテシンは

50

、生物体、例えば、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Lactobacillus*、*Bacilli*、*Aspergilli* 及び植物細胞培養、例えばタバコ細胞などにおいて、宿主－ベクター系を確立することによって生成することができる。

【0115】

ポリヌクレオチドを含むベクター及び *E. coli* などの宿主細胞、及び本明細書に記載の及びポリヌクレオチドまたはポリペプチドのうちのいずれかを含む組成物も提供される。

【0116】

別の態様では、組換え *Nepenthes* 酵素（ネペンテシン I、ネペンテシン II 及び／若しくはネプロシンまたはそれらの変異体）を生成する方法であって、前記酵素をコードする核酸配列を選択された宿主生物中で発現すること、及び適切に設計されたベクターに核酸配列を挿入することを含む方法が提供される。一態様では、組換え酵素はネペンテシン I またはその変異体である。一態様では、組換え酵素はネペンテシン II またはその変異体である。一態様では、組換え酵素はネプロシンまたはその変異体である。一態様では、組換え酵素は、ネペンテシン I、ネペンテシン II 及び／若しくはネプロシンまたはそれらの変異体の混合物である。

【0117】

別の態様では、ネペンテシン I 及び／若しくはネペンテシン II またはその変異体などの組換えネペンテシンを含む組成物が提供される。一態様では、組換えネペンテシンはネペンテシン I またはその変異体である。一態様では、組換えネペンテシンはネペンテシン II またはその変異体である。一態様では、組換えネペンテシンは、ネペンテシン I 及びネペンテシン II またはその変異体の混合物である。

【0118】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の cDNA に関する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の cDNA を含むベクターに関する。好ましい実施形態では、ベクターは発現ベクターである。一実施形態では、本発明は、組換えネペンテシン I、組換えネペンテシン II、組換えネプロシン、それらの変異体または混合物を発現する細胞に関する。

【0119】

いくつかの実施形態では、*Nepenthes* 酵素（複数可）の生合成は、ネペンテシン I をコードする cDNA、例えば、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6（GenBank 受託番号 JX494401、GenBank 受託番号 AB114914 または GenBank 受託番号 AB266803）のヌクレオチド配列を含むベクターで細胞を形質転換することによって達成することができる。いくつかの実施形態では、ネペンテシンの生合成は、ネペンテシン I をコードする cDNA に相同な配列（この配列は、プロテアーゼ活性を有するタンパク質をコードする）を含むベクターで細胞を形質転換することによって達成することができる。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 60% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 70% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 80% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 85% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 90% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 95% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 96% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 97% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 98% の相同性を有し得る。配列は、ネペンテシン I をコードする cDNA に対して少なくとも約 99% の相同性を有し得る。好ましい実施形態では、配列は、グルテナーゼ活性を保持する、ネペンテシン I の変異体をコードする。特に好ましい実施形態では、配列は、少なくと

10

20

30

40

50

も1種の有毒なグルテンペプチドを分解する、ネペンテシンIの変異体をコードする。

【0120】

いくつかの実施形態では、Nepenthes酵素（複数可）の生合成は、ネペンテシンIIをコードするcDNA、例えば配列番号8、配列番号9（GenBank受託番号JX494402またはGenBank受託番号AB114915）のヌクレオチド配列を含むベクターで細胞を形質転換することによって達成することができる。いくつかの実施形態では、ネペンテシンの生合成は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに相同な配列（この配列は、プロテアーゼ活性を有するタンパク質をコードする）を含むベクターで細胞を形質転換することによって達成することができる。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約60%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約70%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約80%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約85%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約90%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約95%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約96%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約97%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約98%の同一性を有し得る。配列は、ネペンテシンIIをコードするcDNAに対して少なくとも約99%の同一性を有し得る。好ましい実施形態では、配列は、グルテナーゼ活性を保持する、ネペンテシンIIの変異体をコードする。特に好ましい実施形態では、配列は、少なくとも1種の有毒なグルテンペプチドを分解する、ネペンテシンIIの変異体をコードする。

【0121】

いくつかの実施形態では、Nepenthes酵素（複数可）の生合成は、ネプロシンをコードするcDNA、例えば、配列番号2のヌクレオチド配列を含むベクターで細胞を形質転換することによって達成することができる。いくつかの実施形態では、ネプロシンの生合成は、ネプロシンをコードするcDNAに相同な配列（この配列は、プロテアーゼ活性を有するタンパク質をコードする）を含むベクターで細胞を形質転換することによって達成することができる。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約60%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約70%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約80%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約85%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約90%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約95%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約96%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約97%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約98%の同一性を有し得る。配列は、ネプロシンをコードするcDNAに対して少なくとも約99%の同一性を有し得る。好ましい実施形態では、配列は、プロリルエンドプロテアーゼ活性を保持する、ネプロシンの変異体をコードする。特に好ましい実施形態では、配列は、グルテナーゼ活性を保持する、ネプロシンの変異体をコードする。特に好ましい実施形態では、配列は、少なくとも1種の有毒なグルテンペプチドを分解する、ネプロシンの変異体をコードする。

【0122】

理論に拘束されないが、罹患者の腸におけるグルテンに対する炎症応答は、有毒な（免疫毒性の）グルテンペプチドの形成をもたらす、グルテンタンパク質の不完全な加水分解が原因であると考えられる。いくつかの免疫毒性の及び／または免疫毒性の可能性のあるグルテンペプチドが既知である。これらとしては、限定されないが、 α -グリアジン由来の33-mer（配列番号15、LQLQPF（PQPQLPY）₃PQPQPF）及び

10

20

30

40

50

p 3 1 - 4 9 (配列番号 1 6、L G Q Q Q P F P P Q Q P Y P Q P Q P F) ; 低分子量グルテニン由来の G l y - 1 5 6 (配列番号 1 7、Q Q Q Q P P F S Q Q Q Q S P F S Q Q Q Q) ; ならびに高分子量グルテニン由来のノナペプチドリピート (配列番号 1 8、G Y Y P T S P Q Q) 及びヘキサペプチドリピート (配列番号 1 9、P G Q G Q Q) が挙げられる。

【0123】

いくつかの実施形態では、ネペンテシン I、ネペンテシン I I、ネプロシン及び／またはそれらの変異体は、所望の各酵素の c D N A 配列を含む 1 種または複数のベクターを細胞にトランスフェクトする、これらを細胞に感染させる、またはこれらで細胞を形質転換することによって合成される。すなわち、2 種以上の酵素を生成するように、単一細胞、細胞系統また生物体を遺伝子操作することができる。いくつかの実施形態では、所望の酵素は、別々の細胞によって合成され、医薬組成物中で組み合わせられる。好ましい実施形態では、組換えネペンテシン I、ネペンテシン I I、ネプロシン及び／またはそれらの変異体は、グリコシル化されない。一実施形態では、組換えネペンテシン I、ネペンテシン I I、ネプロシン及び／またはそれらの変異体は、天然の酵素 (すなわち、N e p e n t h e s 植物から単離したネペンテシン I、ネペンテシン I I またはネプロシン) とは異なるグリコシル化パターンを有する。

【0124】

合成 (例えば、組換え) N e p e n t h e s 酵素 (複数可) は、既知の方法、例えば、植物の嚢状葉液体から N e p e n t h e s 酵素 (複数可) を単離する方法に従って、濃縮または精製することができる。

【0125】

いくつかの実施形態では、天然源または合成 (例えば、組換え) 源から単離したタンパク質生成物は、少なくとも 2 0 重量%の少なくとも 1 種の N e p e n t h e s 酵素またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、単離したタンパク質生成物は、少なくとも約 5 0 %、約 7 5 %、約 9 0 %、約 9 5 重量%の N e p e n t h e s 酵素またはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、単離したタンパク質生成物は、少なくとも 9 9 重量%の N e p e n t h e s 酵素またはその変異体を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、組換え N e p e n t h e s 酵素またはその変異体は、組換えネペンテシンまたはその変異体のみを実質的に含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンまたはその変異体は、組換えネペンテシン I またはそれらの変異体のみを実質的に含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンまたはその変異体は、ネペンテシン I I またはその変異体のみを実質的に含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンまたはその変異体は、ネペンテシン I 及びネペンテシン I I またはそれらの変異体を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンまたはその変異体は、少なくとも約 1 0 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I (またはそれらのそれぞれの変異体) の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 9 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 7 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 6 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 5 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 4 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 3 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 2 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 1 0 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では、組換えネペンテシンは、少なくとも約 5 : 1 のネペンテシン I とネペンテシン I I の比を含む。いくつかの実施形態では

20

30

50

のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約3：1のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約2：1のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：1のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：2のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：3のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：4のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：5のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：10のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：20のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：30のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：40のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：50のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：60のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：70のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：80のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：90のネプロシンとネペンテシンの比を含む。いくつかの実施形態では、組換えNepenthes酵素は、少なくとも約1：100のネプロシンとネペンテシンの比を含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、天然源または合成源から単離したタンパク質生成物は、NepenthesのネペンテシンIのアミノ酸配列（例えば、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号21）に対して少なくとも約70%相同なアミノ酸を含む。一実施形態では、タンパク質生成物はプロテアーゼ活性を保持する。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIに対して少なくとも約80%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIに対して少なくとも約85%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIに対して少なくとも約90%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIに対して少なくとも約95%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIに対して少なくとも約96%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIに対して少なくとも約97%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIに対して少なくとも約98%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIに対して少なくとも約99%相同であり得る。

【0129】

いくつかの実施形態では、天然源または合成源から単離したタンパク質生成物は、NepenthesのネペンテシンII（例えば、配列番号8、配列番号9、配列番号20）に対して少なくとも約70%相同なタンパク質を含む。一実施形態では、タンパク質生成物はプロテアーゼ活性を保持する。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIIに対して少なくとも約80%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIIに対して少なくとも約85%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIIに対して少なくとも約90%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIIに対して少なくとも約95%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIIに対して少なくとも約96%相同であり得る。タンパク質は、NepenthesのネペンテシンIIに対して少なくとも

約 97% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネペンテシン I I に対して少なくとも約 98% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネペンテシン I I に対して少なくとも約 99% 相同であり得る。

【0130】

いくつかの実施形態では、天然源または合成源から単離したタンパク質生成物は、Nepenthes のネプロシン（例えば、配列番号 1）に対して少なくとも約 70% 相同なタンパク質を含む。一実施形態では、タンパク質生成物はプロテアーゼ活性を保持する。タンパク質は、Nepenthes のネプロシンに対して少なくとも約 80% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネプロシンに対して少なくとも約 85% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネプロシンに対して少なくとも約 90% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネプロシンに対して少なくとも約 95% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネプロシンに対して少なくとも約 96% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネプロシンに対して少なくとも約 97% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネプロシンに対して少なくとも約 98% 相同であり得る。タンパク質は、Nepenthes のネプロシンに対して少なくとも約 99% 相同であり得る。

10

【0131】

いくつかの実施形態では、天然源または合成源から単離したタンパク質生成物は、Nepenthes のネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 10% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 20% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 30% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 40% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 50% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 60% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 70% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 80% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 90% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I の本来のプロテアーゼ活性の約 100% 越を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。

20

30

【0132】

いくつかの実施形態では、天然源または合成源から単離したタンパク質生成物は、Nepenthes のネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 10% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 20% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 30% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 40% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 50% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 60% を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 7

40

50

0 %を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 8 0 %を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 9 0 %を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネペンテシン I I の本来のプロテアーゼ活性の約 1 0 0 %越を有するネペンテシンまたはその変異体を含む。

【0133】

いくつかの実施形態では、天然源または合成源から単離したタンパク質生成物は、N e p e n t h e s のネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 1 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 2 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 3 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 4 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 5 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 6 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 7 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 8 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の少なくとも約 9 0 %を有するネプロシンまたはその変異体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質生成物は、ネプロシンの本来のプロテアーゼ活性の約 1 0 0 %越を有するネプロシンまたはその変異体を含む。

【0134】

別段の記載がない限り、本明細書全体にわたって使用される省略形は、以下の意味を有する：

g = グラム

k D a = キロダルトン

k g = キログラム

L = リットル

L C = 液体クロマトグラフィー

m g = ミリグラム

m i n = 分

m L = ミリリットル

m M = ミリモル

M S = 質量分析

n M = ナノモル

p M = ピコモル

s . d . = 標準偏差

μ C i = マイクロキュリー

μ g = マイクログラム

μ L = マイクロリットル

μ M = マイクロモル

μ m = マイクロメートル

$^{\circ}$ C = セルシウス度

【0135】

これらの1文字記号は、アミノ酸を表す場合、以下の意味を有する：

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

10

20

【実施例】

【0136】

実施例1．ネペンテシン抽出物の調製

化学物質

Burdick and JacksonのHPLCグレードの水及びアセトニトリルをVWRから購入した。ギ酸、トリス及びグリシンをSigma Aldrichから購入した。

【0137】

植物培養

Nepenthes rafflesiana、*Nepenthes ampullaria*、*Nepenthes mirabilis*及び*Nepenthes globosa*の移植体をKeehns Carnivores (www.keehnscarnivores.ca) から購入した。これらを、木材の樹皮、パーライト、ピートモス及び腐植土（それぞれ、40、35、10、5%）を用いて鉢植した。生育条件は、1日あたり14時間の光、湿度80%及び23℃～28℃の範囲の温度を要し、週に2～3回灌水した。囊状葉が成熟すると、囊状葉あたり1または2匹の*Drosophila*を植物に与え、1週間後に囊状葉液を採取した。囊状葉及びその分泌物をそのままにして1週間回復させてから、2回目の給餌及び抽出を行った。

30

【0138】

抽出物の調製

4種の植物すべてから囊状葉液を収集し、混ぜ合わせた。この粗囊状葉液を、最初に、0.22 μmフィルターを通して清澄化し、次いで、Amicon Ultra遠心10kDa分子量カットオフフィルターを使用して、80～100倍に濃縮した（両方ともMillipore製）。消化に使用する前に、この濃縮物を、100mMグリシンHCl（pH2.5）で3時間酸活性化し、次いで、洗浄ごとに10倍の流体量を使用して、濾過装置中で、100mMグリシン-HCl（pH2.5）で3回洗浄した。次いで、囊状葉液の元のサンプリングに基づいて、最終的な単離物を11倍の濃度に再び希釈した。

40

【0139】

囊状葉液抽出物の特徴づけ

50

嚢状葉植物の分泌液を濃縮し、pHを低下（pH 2.5）させることにより、消化酵素を活性化した。プロテオミクス法を使用して、流体プロテオームに対する濃縮プロセス及び活性化の影響を決定した。最初に、ネペンテシン酵素の存在を確認するために、SDS-PAGEによって不活性濃縮物を分離した。非常に弱くクーマシー染色された7つの連続的なゲル領域をトリプシンで消化し、標準的な方法を使用して、ナノLC-MS/MSによって分析した。これは、活性化された流体プロテオームの完全なカタログであることは期待されないが、この分析によって、アスパラギン酸プロテアーゼのネペンテシンI/I Iの存在、ならびに植物起源のグルカナーゼ、キチナーゼ、カルボキシペプチダーゼ及びペルオキシダーゼ、これらに加えてショウジョウバエ及び細菌の中程度のレベルの混入物が確認された。流体プロテオーム複雑性の低さは、最近の分析、Hatano N, Hamada T (2012) Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. Journal of Proteomics 3; 75 (15): 4844-52 (Epub Jun. 15, 2012)と矛盾がないが、本分析において、ネペンテシン-Iがより広い質量範囲（40～70 kDa）にわたって分布していることが分かった。

【0140】

次いで、酸活性化した流体を同様の方式で処理し、分析した。活性化プロセスは、全タンパク質の収量を低減し、また、組成物を単純化するように思われた。ネペンテシン-Iの他には、ケラチン及びアクチン由来の微量な混入物のみが見られた。これらの分析は、濃縮された流体の複雑性が低く、ここでは、ネペンテシンが主要な成分であることを指摘する。活性化及び80倍に濃縮された流体の全タンパク質の濃度は、BCAアッセイによって22 ng/μLと測定された。この値は、流体の濃縮を記載する以前の研究と矛盾がない。Tokes Z.A., Digestive Enzymes Secreted by Carnivorous Plant *Nepenthes-Macfarlanei*-L. Planta 119 (1): 39-46 (1974)。

【0141】

実施例2：ネペンテシン抽出物の精製
抽出物の精製

50×2 cmのIDカラム中のセファロース固定化ペプスタチンを、20 mMグリシン-HCl、pH 2.5～3中で平衡化した。濾過した嚢状葉液（実施例1に記載されているように調製）を、カラムを通して2回循環させ、このカラムを100 mLの平衡化緩衝液（20 mMグリシンHCl、pH 2.5）で洗浄した。このカラムを100 mM炭酸水素アンモニウムpH 8.7で溶出し、画分を収集した。最大酵素活性を保つために、画分を収集した直後に、2 MグリシンHCl、pH 2.5でpHを4に低下させた。消化アッセイを使用して活性を確認し、最も活性な画分を混ぜ合わせ、元の流体量に基づいて、およそ80倍に濃縮した。

【0142】

*Nepenthes*の流体及び／または抽出物において検出可能レベルで発見された唯一のエンドプロテアーゼは、アスパラギン酸プロテアーゼ及びプロリルエンドプロテアーゼである。

【0143】

実施例3：組換えネペンテシンI

ネペンテシンI（配列番号4；植物のシグナル配列を有さない、*N. gracilis*由来のアミノ酸残基20～413をコードする）の遺伝子をネペンテシンIのcDNAから調製し、NdeIとHindIIIの制限部位の間に配置した。この配列を、T4 DNAリガーゼ（1U）（New England Bio、NEB）、T4 DNAリガーゼ緩衝液（NEB）、ATP（0.5 mM）（NEB）、0.5 μgのpET21aベクター及び2 μgのネペンテシンIのcDNAを使用して、pET21aにクローニングし

た。これを18℃で4時間インキュベートした。このライゲーション混合物(5μL)を200μLのNovaBlueコンピテントセルに加え、氷上で15分間インキュベートした。細胞をヒートショック(42℃で45秒、次いで、1mlのLB培地とともに直ちに氷上)によって形質転換し、37℃で1時間インキュベートし、抗生物質(テトラサイクリン及びアンピシリン)とともにプレーティングした。いくつかの白コロニーにおいて遺伝子の存在を確認した後に、代表的なコロニーを選択して、マキシプレップを行った。得られた組換えプラスミドpET21a/R.NepIを上記のようにヒートショックによってE.coli C41に形質転換し、IPTGによる誘導下で発現させた。ここでは、0.6のOD₆₆₀まで細胞を増殖させ、0.1mMのIPTGで、37℃で4時間誘導した。発現したタンパク質は封入体となった。

10

【0144】

封入体を以下のように単離した。細胞を遠心分離し、ショ糖溶解バッファー(25%サッカロース、50mMトリスCl pH7.4、1mMEDTA、1mMNaN₃及びプロテアーゼ阻害剤)を加え、細胞を4ラウンドの凍結/融解及び超音波処理にかけた。これに続いて、DNAse及びRNAseを加えて、室温で30分間インキュベートした。この調製物を遠心分離(5000×gで約15分)して、封入体及び膜フラグメントをペレットにした。このペレットをトリトン緩衝液(50mMトリスCl pH7.4、10mMNaCl、1mMβ-メルカプトエタノール、1mMNaN₃、0.5%トリトンX100+プロテアーゼ阻害剤)に再懸濁し、氷上で超音波処理を行った。これを再度遠心分離して、封入体をペレットにし、このペレットを、トリトンを含んでいない緩衝液(50mMトリスCl pH7.4、10mMNaCl、1mMβ-メルカプトエタノール、1mMNaN₃、プロテアーゼ阻害剤)中で、(混合及び超音波処理を行いながら)氷上で2回洗浄した。

20

【0145】

次いで、タンパク質ペレットをリフォールディングにかけた。1gの封入体を、1Lの50mMCAPS pH10.5、8M尿素、1mMEDTA、1mMグリシン、500mMNaCl、300mMβ-メルカプトエタノールに懸濁し、1時間振盪した。この懸濁液を、50mMトリス、pH11に対して、1回に1時間で2回透析し、続いて、50mMトリス、pH7.5に対して1日透析し、最後に、300mMNaClを含むリン酸緩衝液、pH7.0に対して透析した。

30

【0146】

溶液を高速(10000×g、15分間)で遠心分離して、いかなるリフォールディングされていないタンパク質も除去し、上清を、0.22μmの膜を通して濾過した。ネペンテシンIを、pH2.5(グリシン-HCl)で、4℃で一晩活性化した。収量は、1Lの細胞培養から出発して、10~100mgのフォールディングされた活性化タンパク質の範囲にわたる。

【0147】

実施例4：組換えネペンテシンII

植物のシグナル配列を有さない、N.gracilis由来のネペンテシンIIのcDNA(配列番号14を参照されたい)を使用して、ネペンテシンIIのcDNAを調製した。この配列を、T4DNAリガーゼ(1U)(New England Bio、NEB)、T4DNAリガーゼ緩衝液(NEB)、ATP(0.5mM)(NEB)、0.5μgのpET21aベクター及び2μgのネペンテシンIIのcDNAを使用して、NdeIとHindIIIの制限部位の間でpET21aにクローニングした。これを18℃で4時間インキュベートした。このライゲーション混合物(5μL)を200μLのNovaBlueコンピテントセルに加え、氷上で15分間インキュベートした。細胞をヒートショック(42℃で45秒、次いで、1mlのLB培地とともに直ちに氷上)によって形質転換し、37℃で1時間インキュベートし、抗生物質(テトラサイクリン及びアンピシリン)とともにプレーティングした。いくつかの白コロニーにおいて遺伝子の存在を確認した後に、代表的なコロニーを選択して、マキシプレップを行った。得られた組換えプ

40

50

ラスミド pET21a/R. Nep I を上記のようにヒートショックによって E. coli C41 に形質転換し、IPTG による誘導下で発現させた。ここでは、0.6 の OD₆₆₀ まで細胞を増殖させ、0.1 mM の IPTG で、37℃ で 4 時間誘導した。発現したタンパク質は封入体となった。

【0148】

封入体を以下のように単離した。細胞を遠心分離し、ショ糖溶解バッファー（25% サッカロース、50 mM トリス Cl pH 7.4、1 mM EDTA、1 mM NaN₃ 及びプロテアーゼ阻害剤）を加え、細胞を 4 ラウンドの凍結／融解及び超音波処理にかけた。これに続いて、DNAse 及び RNAse を加えて、室温で 30 分間インキュベートした。この調製物を遠心分離（5000×g で約 15 分）して、封入体及び膜フラグメントをペレットにした。このペレットをトリトン緩衝液（50 mM トリス Cl pH 7.4、10 mM NaCl、1 mM β-メルカプトエタノール、1 mM NaN₃、0.5% トリトン X100 + プロテアーゼ阻害剤）に再懸濁し、氷上で超音波処理を行った。これを再度遠心分離して、封入体をペレットにし、このペレットを、トリトンを含んでいない緩衝液（50 mM トリス Cl pH 7.4、10 mM NaCl、1 mM β-メルカプトエタノール、1 mM NaN₃、プロテアーゼ阻害剤）中で、（混合及び超音波処理を行いながら）氷上で 2 回洗浄した。

10

【0149】

次いで、タンパク質ペレットをリフォールディングにかけた。1 g の封入体を、1 L の 50 mM CAPS pH 10.5、8 M 尿素、1 mM EDTA、1 mM グリシン、500 mM NaCl、300 mM β-メルカプトエタノール中に懸濁し、1 時間振盪した。この懸濁液を、50 mM トリス pH 11 に対して、1 回に 1 時間で 2 回透析し、続いて、50 mM トリス pH 7.5 に対して 1 日透析し、最後に、300 mM NaCl、pH 7.0 を含むリン酸緩衝液に対して透析した。

20

【0150】

溶液を高速（10000×g、15 分間）で遠心分離して、いかなるリフォールディングされていないタンパク質も除去し、上清を、0.22 μm の膜を通して濾過した。ネペンテシン II を、pH 2.5（グリシン-HCl）で、4℃で一晩活性化した。収量は、1 L の細胞培養から出発して、10～100 mg のフォールディングされた活性化タンパク質の範囲にわたる。

30

【0151】

実施例 5. Nepenthes 酵素のグリコシル化

精製された E. coli 封入体のリフォールディングからのネペンテシン I (A) 及び II (C) の組換え体の生成を図 2 に示す。リフォールディング手順の各ステップをモニターし、精製された E. coli 封入体由来の全可溶化タンパク質（レーン 1）、最終的な透析後にリフォールディングされたネペンテシン（レーン 2）、リフォールディング生成物の 24 時間酸活性化（100 mM グリシン-HCl、pH 2.5）（レーン 3）として示す。24 時間酸活性化したネペンテシン I (B) 及び II (D) 酵素に対して MALDI-TOF MS 分析を行った。酸活性化したバンド（A 及び C、レーン 3）のゲル内消化物の LC-MS/MS 分析によって、それぞれ、純粋なネペンテシン I 及び II の存在が確認された。

40

【0152】

（2～3 種からプールした）天然のネペンテシンの MALDI-TOF 分析を行った。図 3 に結果を示す。37,200 の質量はネペンテシン II であると考えられ、38,951 の質量はネペンテシン I であると考えられる。どちらにしても、これらは、表 1 で示すように、組換え酵素の質量と異なる。

【表 1】

表 1：組換え体対天然のネペンテシンの質量

ネペンテシン I	質量(ダルトン)*	ネペンテシン II	質量(ダルトン)*
組換え体	37,460	組換え体	37,506
天然	38,949	天然	37,199
差	1,489		-307

* 1 ダルトンは、MALDIによって加えられたプロトンについて、減算された。

【0153】

10

理論に拘束されないが、本発明者らは、これは、ネペンテシン I が天然にグリコシル化されていることを確認するものであると考える。組換えネペンテシン I I の活性な、成熟酵素は、天然に存在するものより大きい。天然のネペンテシン I I はタンパク質配列がさらにより小さいが、ある種の微量なグリコシル化を有するという可能性が残る。本明細書で報告する天然の酵素の質量は A t h a u d a らとは異なり、これは、分子の質量の決定に対して、質量分析計が SDS PAGE よりも正確な技法であることが理由であると思われる。

【0154】

実施例 6. Nepenthes 酵素とペプシンの比較

指示された酵素によって消化したグリアジンについて SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE は、分子量に従ってタンパク質を大まかにプロファイリングする。ペプシン、精製された Nepenthes 抽出物または組換えネペンテシン I I でのグリアジンの消化は、およそ 100 : 1 の基質と酵素の比で行った。グリアジン (5 mg) を、指示された調製物とともに 37℃ で 2 時間インキュベートした。図 4 は、組換えネペンテシン I I、Nepenthes 抽出物またはペプシンによるグリアジンの消化の SDS-PAGE ゲルを示す。このゲルは、組換えネペンテシン I I によるグリアジンの消化が、ペプシンが行うのとは異なる消化パターン及びペプシンが行うより小さなペプチドへの消化をもたらすことを示す。これは、ゲルの囲まれた部分で特に顕著である。Nepenthes 抽出物はグリアジンの分解において非常に効率的なので、この領域に残留グリアジンタンパク質は観察されない。

20

30

【0155】

表 2 は、ペプシン、組換えネペンテシン I 及び I I 及び Nepenthes 抽出物による C 末端切断に対して、好ましい、低確率及び禁制 (forbidden) の残基を示す酵素を分類する古典的な方法である C 末端切断の特異性は、タンパク質基質の大規模収集に基づいてまとめられる。ネペンテシンは切断特異性がペプシンと全く異なり、これによって、ネペンテシンとペプシンは非常に異なる酵素であることが示される。表 2 に示されるペプシンのデータは、文献 (例えば、books.google.ca/books?id=7O1nU4-6T-wC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false で入手可能な、Melissa Palashoff による論文である、“Determining the Specificity of Pepsin for Proteolytic Digestion”) から要約される。Nepenthes 酵素のデータは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2014/0186330 号に記載されているものなどの消化研究から要約される。

40

【表 2】

表 2 : C 末端切断

	ペプシン	ネペンテシン I 及び I I	Nepenthes 抽出物
好ましい	F, L, M	F, L, M, K, R, D, E, C, Y, A	F, L, M, K, R, D, E, C, Y
低	W, C, Y, D, E, G, Q, N, S, T	W, G, N, Q, V, T	H, I, A, P, N, Q
確率			
「禁制」	I, V, K, R, P, H, G	G, I, S, P	G, S, T, W, V

10

【0156】

LC-MS アッセイを行って、各酵素が 33-mer の有毒なグルテンペプチドを切断する能力を決定した。33-mer を指示された酵素とともに 100 : 1 比（基質：酵素）で 0.5 時間インキュベートし、一般的な方法に従って、標準に対する未消化の 33-mer の量を決定した。データは、対照（酵素添加なしの 33-mer）に対するパーセントとして示す。

【0157】

表 3 は、「33-mer」（LQLQPFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPFP）配列番号 15 と呼ばれる、グルテンタンパク質由来のペプシン抵抗性フラグメントの消化を示す。この配列は、セリアック病に強く関連しており、有毒なグルテンペプチドと呼ばれることが多い。グルテンタンパク質全体自体と同様に、33-mer は、Q、P 及び L アミノ酸に富む。単にペプシンだけを使用して消化時間を延ばすことは、このペプチドに大した影響を与えなかった。このペプチドは、ペプシン消化に非常に抵抗性であった。これに対して、ネペンテシン I、ネペンテシン I I 及び Nepenthes 抽出物（流体）の高分子量画分（> およそ 10 kDa）は、このペプチドを消化する能力を示した。データは、対照（酵素なしの 33-mer）の % として示す。

20

【表 3】

表 3 : 33-mer の消化

消化用酵素	相対ピーク面積 (%)
対照	100.0
Nepenthes の流体	0.0
ネペンテシン I	78.7
ネペンテシン II	34.0
ペプシン	93.2

30

【0158】

グリアジンタンパク質のスラリー（5 mg グルテン）を 40 若しくは 200 μ g の組換えネペンテシン I 若しくは組換えネペンテシン I I または 40 μ g のペプシンとともにインキュベートし、（関連する溶液の混濁度によって決定した場合の）消化度を調べた。ペプシン量の増大は、スラリーの混濁に影響を与えない（データ非表示）。図 5 A は、グリアジンのスラリー及び指示される量の組換えネペンテシン I、組換えネペンテシン I I またはペプシンを含むバイアルの画像である。図 5 B も同様であるが、5、20 または 100 μ g の Nepenthes 抽出物を使用した。ネペンテシンまたは Nepenthes 抽出物とともにインキュベートしたバイアルは、ペプシンのバイアルよりも混濁が少なく、これは、より活発なグリアジンの消化を示すものである。

40

【0159】

これらのデータは、グリアジンタンパク質の消化物は、ゲルレベル（「より大きな」消

50

化産物を示す)、ペプチドレベル(33-merのプロセッシング)及びスラリーレベル(溶液の清澄化)で、Nepenthes酵素とペプシンの間で異なることを示す。ペプシン、ネプロシン及びネペンテシンは、特にグルテンタンパク質に関して異なる切断特異性を有する、非常に異なるタンパク質である。簡単に言えば、ペプシンは、グルテン毒性を回避する方法でグルテンを十分に消化しないが、Nepenthes酵素は消化する。

【0160】

実施例7. Nepenthes抽出物によるグリアジンの消化

水素/重水素交換(HDX)用途のために設計されたLEAP HTX-PALオートサンプラー及び分注システムを使用して、ネペンテシンによるグリアジンの消化を溶液で行った。AB SciexのTriple-TOF 5600 QqTOF質量分析計を使用してデータを収集した。Mascot(v2.3)を使用して、MS/MSデータからペプチドを同定した。手短に言えば、12 pmolの粗グリアジン(Sigma Aldrichから購入)を、実施例1に記載されているように生成した2 µLの100倍濃縮抽出物と混合した。消化後、質量分析計に連結した逆相LCシステムに全量を注入した。ペプチドを7 cmの150 µm i.d. Magic C18カラムでトラップし、10分または30分以内に、10%~40%のアセトニトリル勾配で溶出した。これらの分析で検出されたペプチドを選択して、MS/MSスペクトルの複数情報依存的獲得におけるCIDフラグメンテーションを行った。スペクトルを、すべての同定されたコムギグリアジン(α、β、γ、ω)タンパク質に加えて低分子量及び高分子量のグルテニンに関する配列を含む小型のデータベースに対して検索した。

【0161】

図6は、37℃で1、5、10、15、30、60、130、360または810分後に、LC-MS/MSを使用して、コムギ由来グリアジンのNepenthes抽出物による消化から同定されたすべてのペプチドの平均長を示す。偽陽性の同定を減らすために、スコアに対する95%信頼度のカットオフ($p < 0.05$)を使用した。ペプチド長の相対標準偏差を挿入図に示す。

【0162】

図7は、37℃で1、5、10、15、30、60、130、360または810分の消化後に、LC-MS/MSによって同定された、長さでグループ化されたペプチド数を示す。データは図6と同様である。

【0163】

図8は、37℃で10、60、120、360または810分の消化後に特定の長さを得る確率として、図6と同じデータを示す。

【0164】

消化物のマッピングのために、基質と酵素の比がおおよそ1000:1であったことを除いては、上記のようにグリアジンの消化を行った。ネペンテシン抽出物、精製されたネペンテシン抽出物または組換えネペンテシンIで、グリアジンを37℃で2時間消化した。

【0165】

組換えネペンテシンIのP1切断優先性は、濃縮された流体抽出物及び抽出物の精製画分のもものと非常に類似している(図9A)。驚いたことに、抽出物は、精製抽出物または組換えネペンテシンIのいずれかよりも高いグルタミン優先性を示した。

【0166】

組換えネペンテシンIのP1'の切断優先性は、濃縮された流体抽出物及び抽出物の精製画分のもものと非常に類似している(図9B)。驚いたことに、抽出物は、精製抽出物または組換えネペンテシンIのいずれかよりも高いプロリン優先性を示した。

【0167】

抽出物はネペンテシンI、ネペンテシンII及びネプロシンを含むが、精製戦略は、他の2つの酵素より多くのネペンテシンIを回収する。理論に拘束されることを望むものではないが、P1グルタミン位置及びP1'プロリン位置での抽出物による切断の高まりは、ネプロシン、ネペンテシンII及び/または2つ以上の酵素の間の相乗作用に

よるものであると考えられる。

【0168】

実施例 8. ネプロシン抽出物の調製

ネプロシンを *Nepenthes* sp 消化流体から抽出した。凍結したショウジョウバエを与えてから 5 日後の植物の嚢状葉から流体を収集した。収集した液体を濾過して、死んだ昆虫を除去し、10 kD の分子量カットオフ膜を通す複数の濃縮／濾過サイクルによって、20 mM 酢酸アンモニウム pH 5.0 で繰り返し洗浄した。

【0169】

ネプロシンを、mono P5 / 50 GL カラムでネペンテシンから部分的に精製した。5 mL の 1.5 倍濃縮流体を、低イオン強度 (20 mM 酢酸アンモニウム pH 6) で平衡化した mono P カラムに注入した。タンパク質を、0.5 mL / 分で 40 分の NaCl 勾配 (0 ~ 1 M) で溶出した。0.5 mL ごとに画分を収集した。天然変性プロリンリッチタンパク質、APLF を消化することによって、各画分においてネプロシン活性を試験した。生成されたペプチドを C8 カラムで分離し、triple ToF 5600 (AB Sciex) で LC-MS / MS によって分析した。画分 19 ~ 22 はネプロシンに関して濃縮されており (図 10)、粗ネプロシン抽出物と呼ぶ。ネプロシンはネペンテシンとは別個のものであり、ネペンテシンは後の画分で濃縮された。

【0170】

実施例 9. グルテン不耐性マウスの腸の炎症阻害における *Nepenthes* 酵素の有効性

目的；グリアジン感作化 NOD-DQ8 マウスを使用して、インビボでのグリアジン誘導性損傷の予防における、*Nepenthes* 抽出物または組換えネペンテシン II を使用するグリアジンのインビトロ消化の有効性を試験すること

【0171】

実験計画：NOD-DQ8 マウスをコレラ毒素 (CT) 及びグリアジンで感作して、グリアジンに対する経口免疫寛容を破壊した。陰性対照は、CT 及びグリアジンで処理したが、その後の経口グリアジン負荷はないままにした。様々な有毒な及び免疫原由来のペプチドを含む、ブタプロテアーゼ (ペプシン) によるグリアジンの消化物で、グリアジン負荷を行った。*Nepenthes* 抽出物または組換えネペンテシン II で (37 セルシウス度で 90 分間) 前もって消化したグリアジンで、処理群を負荷した。*Nepenthes* 抽出物または組換えネペンテシン II によるグリアジンの消化物は、ペプシンによるグリアジンの消化物よりもインビボで免疫原性が低いことが仮定される。

【0172】

群；

陽性対照 (n = 8)：感作及びグリアジン負荷。マウスをコレラ毒素 (CT) 及びペプシングリアジン (P-G) で感作した (1 週間につき 1 回で 3 週間)。実験期間中、マウスを P-グリアジンで強制栄養した (1 週間につき 3 回で 3 週間)。

【0173】

陰性対照 (n = 8)：感作 (次いで、グリアジンなし)。マウスをコレラ毒素 (CT) 及びペプシングリアジン (P-G) で感作した (1 週間につき 1 回で 3 週間)。実験期間中、マウスをビヒクルで強制栄養した (1 週間につき 3 回で 3 週間)。

【0174】

処理 1 (n = 8)：*Nepenthes* 抽出物。マウスをコレラ毒素 (CT) 及びペプシングリアジン (P-G) で感作した (1 週間につき 1 回で 3 週間)。実験期間中、マウスを *Nepenthes* 抽出物で消化したグリアジンで強制栄養した (1 週間につき 3 回で 3 週間)。

【0175】

処理 2 (n = 8)：マウスをコレラ毒素 (CT) 及びペプシングリアジン (P-G) で感作した (1 週間につき 1 回で 3 週間)。実験期間中、マウスをネペンテシン II で消化したグリアジンで強制栄養した (1 週間につき 3 回で 3 週間)。

【0176】

結果；

4群すべてのマウスを、ペプシン－グリアジンの消化物に加えてコレラ毒素で感作した。陰性対照は、感作後にグリアジン負荷がないままにした。陽性対照及び処理群は、感作後にグリアジンで経口的に負荷した。処理群の違いは、グリアジン負荷物がNepenthes抽出物で前もって消化されるか、またはネペンテシンIIで前もって消化されるかである。この方法では、「陰性対照」は、（感作フェーズ間に曝露されたため）全くグリアジンの処理を受けておらず、それにより、グルテンフリーの食事に忠実である間、寛解の状態になるセリアック病患者の臨床状況を模倣した。

【0177】

臨床的／毒性作用：マウスの全体的な様子（動作、開眼、毛づくろい）を評価した。処理または対照群のいずれにおいても悪影響は観察されなかった。実験全体を通して体重を記録し、いずれの群においても体重減少は観察されなかった（図11）。

【0178】

グリアジン負荷に対する自然免疫の変化：各処理群のマウスの腸に対して、CD3＋上皮内リンパ球について免疫組織化学検査を行った（図12）。これは、このモデルにおける腸のグリアジン曝露の迅速且つ初期の自然免疫マーカーである。グリアジン曝露は、陰性対照マウス及びNepenthes抽出物またはネペンテシンIIで前もって消化したグリアジンを曝露したマウスと比較して、IEL数を増加させた（図13）。Nepenthes抽出物処理群とネペンテシンII処理群の間でIEL数の違いは観察されなかった。

【0179】

絨毛と陰窩の比；陽性対照群において、低い絨毛／陰窩（V／C）比について有意な傾向は観察されなかった（図14）。Nepenthes抽出物処理群及びネペンテシンII処理群は、陽性対照及び陰性対照と比較して高い比の傾向があった。

【0180】

解釈／考察：

マウスにおいて、Nepenthes抽出物またはネペンテシンIIで前もって消化したグリアジンでの3週間の負荷は安全であり、体重の短期低下を、またはいかなる臨床的有害事象も誘導しなかった。

【0181】

マウスにおいて、経口グリアジン負荷は、前もって感作された状態で、小腸のIEL数の有意な増加をもたらした。IELの増加は、Nepenthes抽出物またはネペンテシンIIで前もって消化したグリアジンを負荷したマウスでは観察されなかった。これは、Nepenthes抽出物またはネペンテシンIIで処理したグリアジンの低い管腔抗原性を示唆するものである。

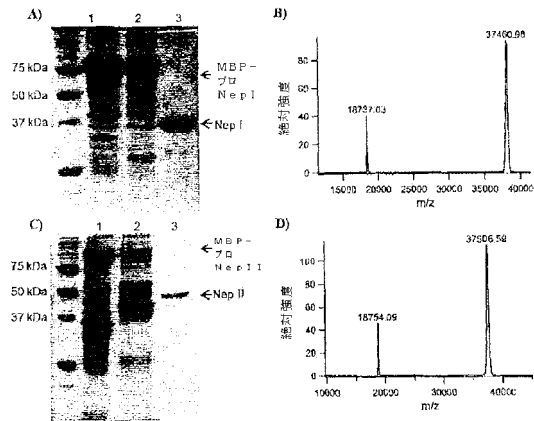
【0182】

V／C比の低下は、陽性対照群で非常に緩やかであった。しかし、Nepenthes抽出物またはネペンテシンIIで前もって消化したグリアジンを負荷したマウスにおいて、より高いV／C比について有意な傾向がなかった。この動物モデルにおけるV／C比の低下は中程度であり、グリアジン負荷の継続期間及び用量とともに変動する。陰性対照がグリアジン／グルテンの処理を完全に受けていない（感作されていない）場合、違いは陽性対照と陰性対照の間でより著明である。より長期にわたる設定において、前もって消化したNepenthes抽出物若しくはネペンテシンIIを使用した場合のV／C比の違い、及び／またはグリアジンの処理を完全に受けていない（感作されていない）マウスと比較した場合のV／C比の違いは、より明白であろうと考えられる。

【0183】

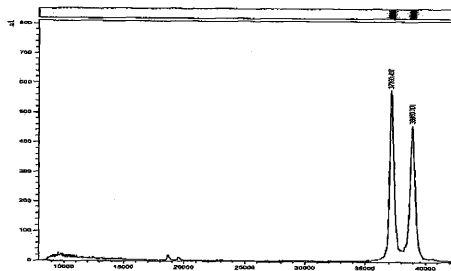
全体的結論：結果は、感作されたNOD／DQ8マウスの小腸管においてグリアジンペプチドの抗原性を低減することに対する、Nepenthes抽出物またはネペンテシンIIでのグリアジンの前消化の効果を示す。

【図 2】

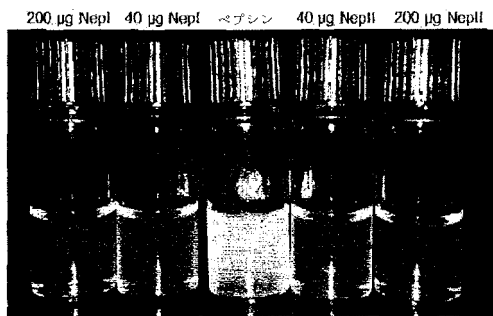


【図 3】

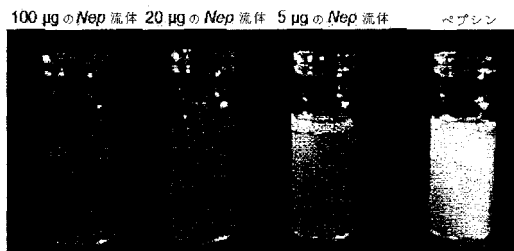
FIGURE 3



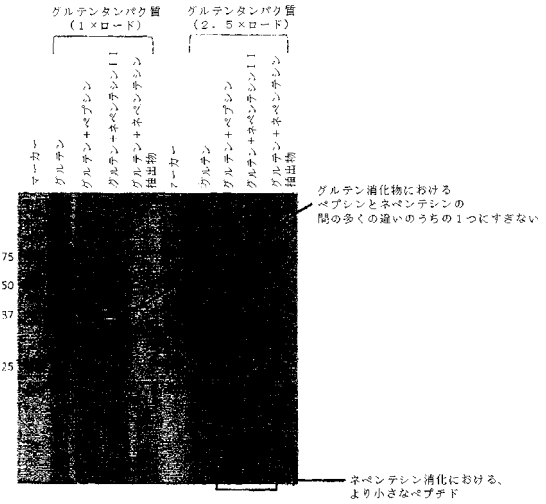
【図 5 A】



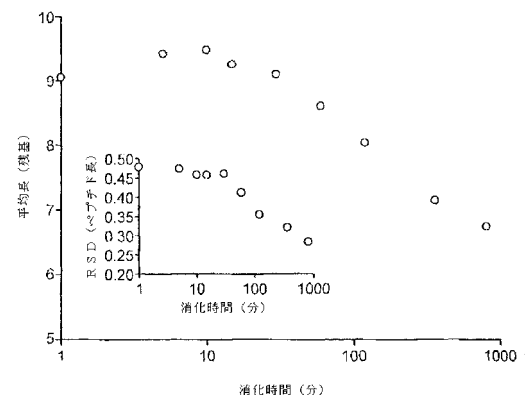
【図 5 B】



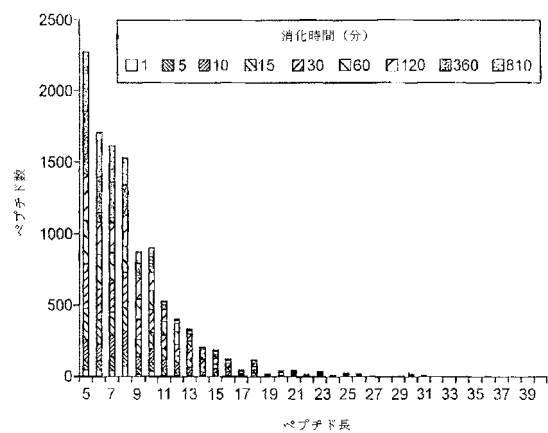
【図 4】



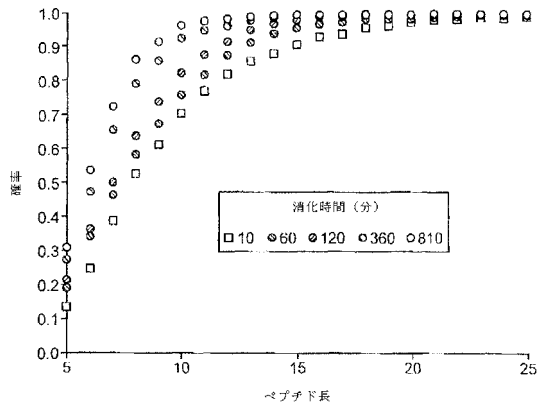
【図 6】



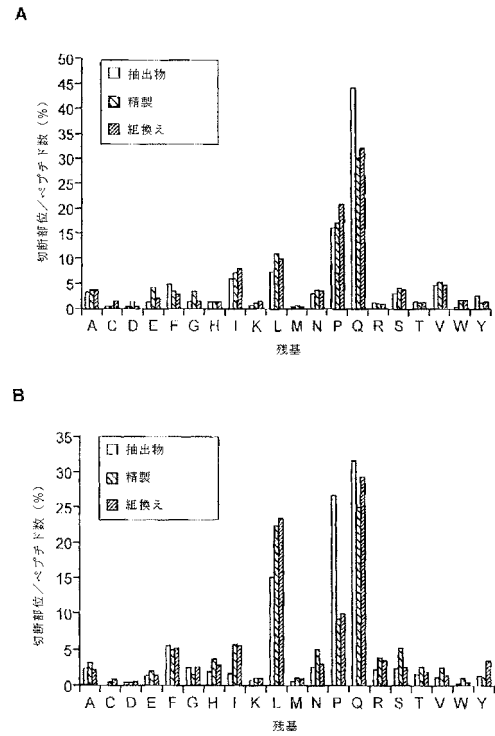
【図 7】



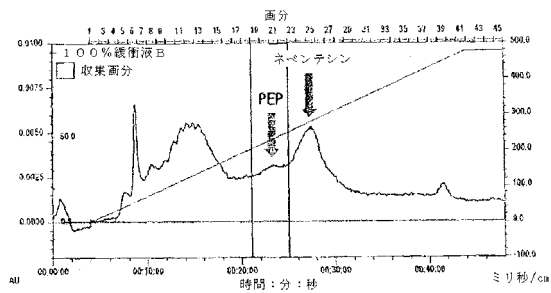
【図 8】



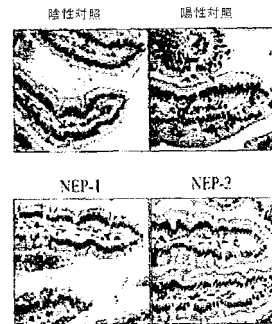
【図 9】



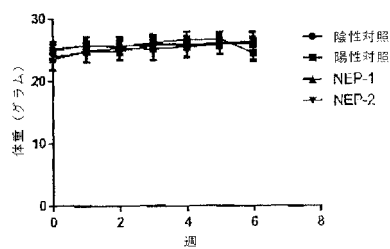
【図 10】



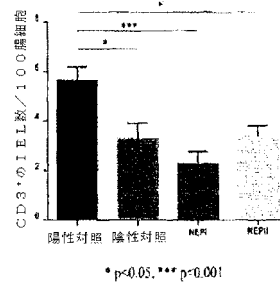
【図 12】



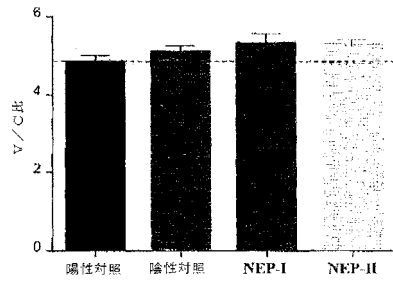
【図 11】



【図 13】



【図 1 5 B - 1】



【図 15 A】

タンパク質配列カバー率：61%

一致したペプチドを赤のボールド体で示す

1	MKPTPLIAL	AIWATATTA	VYVPPVQLP	QNTSPQQQLQ	QVTVLQGGGQ
51	PGQPPVPPQ	QYVPPQPPF	AGQVLAQLQ	FPQVPPPPQ	LYVPPQSPF
101	PGQPPVPPQ	QYVPPQPPF	QCSAQQPPF	PPGQGGGQQL	LQQLQQLQL
151	PCSLVPLVQ	NTALASQVL	QYVTVLQGL	LQQGQLQLP	PSGQQLQLP
201	VAHATLPPQ	QYVPPQPPQ	LQQGQPPQF	LQQGQPPQF	QSSQVSPQF
251	PGQPPVPPQ	QYVPPQPPF	PGQPPVPPQ	PGQPPVPPQ	LQTLPPPPV
301	YVPPVPPQ	QYVPPQPPF	QYVPPQPPF	QYVPPQPPF	QYVPPQPPF

【図 1 5 B - 1】

[illegible]

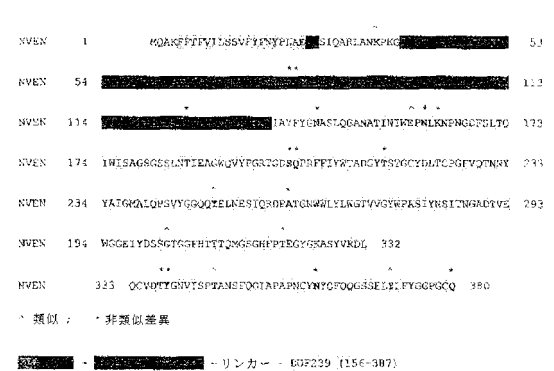
【図 1 5 B - 2】

[illegible]

【図 1 5 B - 3】

ケイロ - 開始 - 終結		分子量		分子量		p.p.m		スモカ	期待値	ウケル	ベブテド
		観測値	(実験値)	(理論値)							
α -D-1	218 - 227	407.7072	815.3996	815.3981	2.54	26	6.506	3	F. GAGGFFP2. C		
α -D-2	219 - 227	405.7379	813.2598	813.3049	2.16	37	6.00497	2	F. GAGGFFP2. C		
α -D-3	220 - 227	405.7379	813.2598	813.3049	2.16	38	6.45238	3	F. GAGGFFP2. C		
α -D-4	218 - 282	397.1495	812.3114	812.3523	0.85	15	0.4419	1	F. GAGGFFP2. C		
α -D-5	218 - 283	360.7051	759.3516	759.3291	2.44	24	6.0431	1	F. GAGGFFP2. C		
α -D-6	218 - 282	362.2074	767.4043	765.3291	2.40	37	6.0431	2	F. GAGGFFP2. C		
α -D-7	280 - 288	439.2462	878.4542	876.4453	-0.11	32	0.56812	1	F. GAGGFFP2. C		
α -D-8	280 - 289	480.1755	960.3506	959.6284	-0.36	57	0.56812	1	F. GAGGFFP2. C		
α -D-9	280 - 288	495.7916	991.5834	993.3288	0.514	24	0.50171	2	F. GAGGFFP2. C		
α -D-10	280 - 334	523.3239	1046.6577	1040.4532	-0.92	36	0.50724	2	F. GAGGFFP2. C		
α -D-11	280 - 285	435.8678	869.8678	868.5018	0.74	21	0.50724	1	F. GAGGFFP2. C		
α -D-12	280 - 290	478.5078	956.9578	956.9578	0.0000	23	0.50724	1	F. GAGGFFP2. C		
α -D-13	280 - 285	321.6545	643.3740	641.3748	-1.40	21	0.50512	1	F. GAGGFFP2. C		

【图 16】



多型の証拠：
 $21/380 = 5.5\%$ 合計
 $14/380 = 3.7\%$ 非類似差異

【手続補正書】

【提出日】平成29年2月23日(2017.2.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017519763000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2015/000389
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>A61K 38/48</i> (2006.01), <i>A61J 1/03</i> (2006.01), <i>A61K 36/36</i> (2006.01), <i>A61P 29/00</i> (2006.01), <i>A61P 37/06</i> (2006.01)		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>A61K 38/48</i> (2006.01), <i>A61J 1/03</i> (2006.01), <i>A61K 36/36</i> (2006.01), <i>A61P 29/00</i> (2006.01), <i>A61P 37/06</i> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Pubmed (NCBI), Google Patents, Canadian Patents Database Search terms: David SCHRIEMER, Martial RAY, Nepenthesin, neprosin, celiac, intraepithelial lymphocytosis, intestinal inflammation, gluten, gliadin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0140980 A1 (SCHRIEMER) 22 May 2014 See: Abstract; paragraphs [0005], [0008], [0010], [0011], [0026], [0043], [0049], [0051], and [0055]; and claims.	1-31b
A	FREEMAN, Pearls and pitfalls in the diagnosis of adult celiac disease. Canadian Journal of Gastroenterology. March 2008, Volume 22, Number 3, pages 273-280, see especially Abstract.	1-50
* Note: Two different claims are labelled as "claim 31", therefore, the second "claim 31" will be referred to as "claim 31b" for the purposes of this search report.		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 31 August 2015 (31-08-2015)		Date of mailing of the international search report 15 September 2015 (15-09-2015)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Joel Karwatsky (819) 994-8928

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P 25/22 (2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P	25/22		
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/24		
A 6 1 K 47/04 (2006.01)	A 6 1 K	36/18		
A 6 1 K 9/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/04		
C 1 2 N 9/48 (2006.01)	A 6 1 K	9/22		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	9/48	Z N A	
	C 1 2 N	15/00		A

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

(72)発明者 シュリーマー, デービッド
カナダ国, アルバータ州 ティー1 エックス 1 ビー6, チェスターミア, 901 ウェスト チェスターミア ドライブ

(72)発明者 レイ, マーシャル
アメリカ合衆国, フロリダ州 32541, デスティン, スイート 105, 1234 エアポート ロード, ネプエトックス, エルエルシー内

Fターム(参考) 4B050 CC07 DD13 EE10 LL01 LL02
4C076 AA38 BB01 CC01 CC07 CC16 CC18 DD23 FF04 FF31
4C084 AA01 AA02 BA01 BA22 CA13 DC02 DC03 MA52 NA14 ZA121
ZA661 ZA891 ZA941 ZB071 ZB151
4C088 AB11 AC05 BA08 CA03 MA52 NA14 ZA12 ZA66 ZA89 ZA94
ZB07 ZB15