

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6513632号
(P6513632)

(45) 発行日 令和1年5月15日 (2019.5.15)

(24) 登録日 平成31年4月19日 (2019.4.19)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	38/17	(2006.01)	A 6 1 K	38/17	Z N A
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	11/08	(2006.01)	A 6 1 P	11/08	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

請求項の数 6 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-503332 (P2016-503332)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月16日 (2014.3.16)
 (65) 公表番号 特表2016-520531 (P2016-520531A)
 (43) 公表日 平成28年7月14日 (2016.7.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/030101
 (87) 国際公開番号 W02014/145357
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014.9.18)
 審査請求日 平成29年3月15日 (2017.3.15)
 (31) 優先権主張番号 13/843, 289
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510300407
 セラブロン セラピューティクス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国, メリーランド州 20850, ロックビル, キー ウェスト アベニュー 9430, スイート 150
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史
 (74) 代理人 100117189
 弁理士 江口 昭彦
 (74) 代理人 100134120
 弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えヒトセクレトグロビンの改善された使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N末端 A T A を有する組換えヒト S C G B 3 A 2 ポリペプチドを含む組成物であって、前記組換えヒト S C G B 3 A 2 ポリペプチドが配列番号：3 に記載の アミノ酸配列からなる、組成物。

【請求項 2】

前記 ポリペプチドが P L A 2 酵素を阻害する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 ポリペプチドが、等電点電気泳動用ゲルにおいて 6 . 3 もしくは 6 . 7 または 6 . 3 から 6 . 7 の間の等電点に対応する 位置に移動する、請求項 1 または 2 に記載の組成物

10

【請求項 4】

前記組成物に含まれている前記 ポリペプチドの中、一部が ホモ二量体の形態である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物に含まれている前記 ポリペプチドの中、一部が 6 . 7 の p I を有する ホモ二量体の形態である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

N末端 A T A を有する組換えヒト S C G B 3 A 2 ポリペプチドを合成する方法であって、

20

__ インタクトな S C G B 3 A 2 ポリペプチドを放出するために、U B L 融合パートナーと、前記融合パートナーを認識して融合パートナーと S C G B 3 A 2 との間で切断する U B L プロテアーゼとを使用する工程を含み、

前記インタクトな S C G B 3 A 2 ポリペプチドが配列番号： 3 に記載のアミノ酸配列からなる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、S C G B 1 A 1 (CC10)、S C G B 3 A 1、および S C G B 3 A 2 を含むセクレトグロビンタンパク質の医薬組成物、製造方法、分析方法、および使用方法に関する。これらのセクレトグロビンの新規な生理学的役割および治療用途が同定された。特に、本発明は、治療過程後 10 カ月まで重度の呼吸増悪 (severe respiratory exacerbation) による入院を防止または遅延させることにおける r h C C 1 0、r h S C G B 3 A 2、および r h S C G B 3 A 1 の新規な使用方法に関する。本発明はまた、安定であり、かつ抗炎症性を有する r h S C G B 3 A 2 の新規な製造方法および医薬組成物にも関する。より具体的には、本発明はさらに、r h C C 1 0 を投与することによって重度の呼吸増悪を防止する方法を提供する。本発明はさらに、r h S C G B 3 A 2 を投与することによって気管支拡張症を治療し、気管支拡張症の増悪を防止する方法を提供する。さらにより具体的には、本発明は r h C C 1 0、r h S C G B 3 A 2、または r h S C G B 3 A 1 を投与することによって慢性肺疾患における気道リモデリングを改善し、急性肺傷害における気道リモデリングを防止する方法を提供する。さらにより具体的には、これらのセクレトグロビンは、正常な数のクララ細胞ならびに気道上皮において抗 C G R P 1 抗体への免疫反応性によって同定される神経上皮小体 (NEBとも呼ばれる) または神経内分泌細胞クラスター (NECとも呼ばれる) と呼ばれるそれらの関連構造を回復させることによって、間接的に気道リモデリングを改善する。クララ細胞および他の C G R P 1 + 細胞はその後、これらのセクレトグロビンおよび通常の粘膜環境の他の成分を分泌し、呼吸器粘膜ならびに、その後に吸入された刺激物に対してより耐性となり、重度の増悪を起こしていない上皮のホメオスタシスと正常な機能に寄与する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

天然のヒトクララ細胞 10 k D a タンパク質 (CC10) は、ウテログロビン、クララ細胞 16 k D a タンパク質 (CC16)、クララ細胞分泌タンパク質 (CCSP)、ブラストキニン、尿タンパク 1、およびセクレトグロビン 1 A 1 (SCGB1A1) としても知られ、あらゆる脊椎動物に存在すると考えられているセクレトグロビンと呼ばれる関連するタンパク質のファミリーの一つである。S C G B 3 A 1 および S C G B 3 A 2 と呼ばれる、気道中においても非常に高いレベルで発現している 2 つの他のセクレトグロビンがある (Porter, 2002)。これら 3 つのタンパク質 S C G B 1 A 1、S C G B 3 A 1、および S C G B 3 A 2 を、ここでは「呼吸器セクレトグロビン」と呼ぶ。表 1 は、各呼吸器セクレトグロビンの G e n e b a n k 座位とアミノ酸配列を示している。

【 0 0 0 3 】

【表 1】

表1: 呼吸器セクレトグロビンタンパク質

タンパク質	Genebank 座位	アミノ酸配列
SCGB1A1 (CC10)	BC004481	EICPSFQRVIETLLMDTPSSYEAAAMELFSPDQDMREAGAQLKKLV DTLPQKPRESIKLMKIAQSSLCN
SCGB3A1	NP_443095	AAFLVGS AKPVAQPVAALLESAAEAGAGTLANPLGTLNPLKLLSSL GIPVNHLEIGSQKCV AELGPQAVGAVKALKALLGALT VFG
SCGB3A2	AAQ89338	ATAFLINKVPLPVDKLA PLPLDNILPFMDPLKLLKTLGISVEHLVEG LRKCVNELGPEASEAVKKLLEALSHLV

10

【0004】

哺乳類における呼吸器セクレトグロビンの主要な供給源は、肺および気管の上皮、特に非纖毛細気管支気道上皮細胞（主にクララ細胞）であり、それらは成人の肺の細胞外液において非常に豊富な、局所的に生成されるタンパク質である。それらはまた、鼻の上皮においても分泌される。このように、呼吸器セクレトグロビンは、気道の上部および下部の両方において高度に発現され、上気道は鼻孔および副鼻腔を含み、下気道は気管、気管支および肺胞を含む。また、相当量の呼吸器セクレトグロビンが血清および尿中にも存在するが、これは主として肺供給源に由来するものである。SCGB3A1はまた、胃、心臓、小腸、子宮および乳腺においても発現され、SCGB3A2は甲状腺において低いレベルで発現される（Porter, 2002）。CC10はまた、生殖組織（子宮、精囊）、外分泌腺（前立腺、乳腺、膵臓）、内分泌腺（甲状腺、下垂体、副腎、および卵巣）によって、ならびに胸腺および脾臓によっても生成される（Mukherjee, 1999; Mukherjee, 2007）。ヒトCC10のin vivoにおける主要な回収可能形態は、2つの同じ70アミノ酸の単量体から構成され、4.8の等電点を有するホモ二量体である。SDS PAGE上では約10kDaの見かけの分子量で移動するが、その分子量は15.8kDaである。単量体は、一方のN末端が他方のC末端の近傍となる、逆平行の構成で配置され、二量体の完全に酸化された形態では、単量体は2つのジスルフィド結合によって連結されている（Mukherjee, 1999）。しかしながら、ヒトの試料におけるSCGB3A2のin vivoの分子形態（単量体、二量体、または他の複合体）はまだ特徴付けられていない。3つ全ての呼吸器セクレトグロビンが、合成法（Nicolas, 2005）または組換え法（Mantile, 1993）によって作製されうるが、今日までヒトSCGB3A1およびSCGB3A2の成功した合成およびこれらのタンパク質のin vitroにおける生化学的特徴付けの報告はなかった。

20

30

【0005】

CC10は、他のタンパク質との様々な相互作用、受容体および細胞型に関して特徴付けられている抗炎症性および免疫調節性のタンパク質である（Mukherjee, 2007; Mukherjee, 1999、およびPilon, 2000において概説されている）。喘息（Lensmar, 2000; Shijubo, 1999; Van Vyve, 1995）、肺炎（Nomori, 1995）、細気管支炎（Nord, 2002）、サルコイドーシス（Shijubo, 2000）を含む、ある程度の炎症によって特徴付けられる多数の臨床状態について、ならびに再発性副鼻腔炎および鼻ポリープ症を伴う慢性鼻炎を患う患者（Liu, 2004）において、低レベルのCC10タンパク質またはmRNAが様々な組織および体液試料中に見出されている。内因性CC10の体内の主要な供給源である肺上皮細胞は、しばしばこれらの状況において有害な影響を受け、枯渇し、またはさらには失われている（Shijubo, 1999）。

40

【0006】

CC10ノックアウト（KO）マウスは、肺のホメオスタシス、生殖、および特定の型の腎疾患におけるCC10の役割を特徴付ける際に重要であった。各々異なる遺伝子ノックアウトコンストラクトおよび異なる親マウス系統を有する、2つの系統のCC10 KOマウスが存在する。一方のノックアウト系統は、全身性の炎症、乏しい生殖能力（少ない

50

一腹仔数)、およびヒト IgA 腎症に似た致死的な腎表現型を含む、いくつかの極端な表現型を示す (Zhang, 1997; Zheng, 1999)。もう一方のノックアウト系統は、これらの極端な表現型を有さず、より生存可能で、より多くの数の実験を行うことを可能とする (Stripp, 1997)。両系統の CC10 KO マウスは、喘息、肺線維症、ならびに発癌、細菌およびウイルス感染、ならびに酸素およびオゾン曝露に対する、より高い感度と著しく上昇した炎症反応を共有している (Plopper, 2006; Lee, 2006; Yang, 2004; Wang, 2003; Harrod, 2002; Chen, 2001; Wang, 2001; Hayashida, 2000; Harrod, 1998)。組換えヒト CC10 (rhCC10) を用いた、これらのノックアウトマウスにおける CC10 機能の回復は、最長 7 日のエンドポイントの短期間誘発モデルにおいて、悪化した肺炎症反応を軽減することが示されている (Chen, 2001; Wang, 2003)。本発明に最も関連することとして、両系統は、カルシトニン遺伝子関連タンパク質 1 (CGRP1) の陽性染色によって同定される、クララ細胞ならびに神経上皮小体 (NEB; Castro, 2000) もしくは神経内分泌細胞クラスター (NEC; Hong, 2001; Reynolds, 2000) と呼ばれる関連する構造の著しく減少した数によって特徴付けられる気道上皮表現型を共有している。これらの KO マウスにおいては、気道におけるクララ細胞および関連構造のこれらの 2 ~ 10 倍の欠損は、あらゆる種類の傷害の非存在下で生じる。

【0007】

呼吸促進症候群 (RDS) を起こした早産児は、天然の CC10 を欠損している。臨床試験において、単回投与の rhCC10 が、出生の日に投与され、肺における 3 ~ 7 日の強力な短期的抗炎症作用を媒介した。薬物動態学的な分析は、過剰な CC10 は、投与された単回投与の 48 時間以内に排除されることを示した。抗炎症作用にも関わらず、rhCC10 は、1) 出生後 28 日における胸部 X 線の不透明性、または 2) 月経後年齢 (PMA) 36 週における補充酸素の使用を含む臨床パラメーターによって定義される、新生児気管支肺異形成症 (BPD) の発症を防止しなかった (Levine, 2005)。気管吸引液 (TAF) において観察された肺炎症の指標が著しく低下したにもかかわらず、rhCC10 は、入院中の時間も人工呼吸器上の日数も減らさなかった。Levine ら (2005) が述べているように、12 カ月のエンドポイントでプラセボ、低用量および高用量の治療群の間に差異はなかった。

【0008】

BPD を有する早産児は、頻繁かつ重度の呼吸増悪を起こしやすく、生後 1 ~ 2 年間に おける再入院率は高い。重度の呼吸増悪は、息切れ、呼吸困難、鼻および胸の鬱血、粘液の過剰産生、および時として呼吸困難によって特徴付けられる。重度の呼吸増悪は、患者が、ほこり、煙、アレルゲン、汚染物質、化学物質、細菌、真菌、およびウイルスの吸入を通じて、環境曝露および感染に遭遇した際に生じる。

【0009】

気道、胃腸管、尿生殖路の慢性疾患を有する多くのタイプの患者は、環境誘因に曝された場合、重度の増悪を生じやすい。同様に、自己免疫疾患およびアレルギー性疾患を含む免疫疾患を有する患者もまた、環境誘因に曝された場合、重度の増悪を生じやすい。重度または急性の増悪は、ある患者において一年間に 3 回より多く生じる場合、頻繁であるとみなされる。慢性疾患を有さないが急性肺傷害 (ALI) を起こしている患者であっても、傷害後に、重度の呼吸増悪に似た頻繁かつ重度の急性呼吸器エピソードを生じやすい。増悪を誘発させる環境刺激物質は、ほこり、微粒子、煙、アレルゲン、汚染物質、化学物質、夾雑物、細菌、真菌、およびウイルスを含むが、これらに限定されず、それらは、吸入、摂取、嚥下されるか、皮膚から吸収されることができ、または他の方法で患者の体の湿った粘膜表面に局所的に接触されうる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

上述の事項は、本発明によって達成される目的の非限定的なリストを提供する：

本発明の第 1 の目的は、セクレトグロビンを投与して、セクレトグロビンが投与された

10

20

30

40

50

後10カ月までの間、基礎または慢性疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、セクレトグロビンが投与された後10カ月までの間、基礎または慢性呼吸器疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

本発明のさらなる目的は、rhCC10を投与して、セクレトグロビンが投与された後10カ月までの間、基礎または慢性呼吸器疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

本発明のさらなる目的は、rhSCGB3A2を投与して、セクレトグロビンが投与された後10カ月までの間、基礎または慢性呼吸器疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

10

本発明のさらなる目的は、rhSCGB3A1を投与して、セクレトグロビンが投与された後10カ月までの間、基礎または慢性呼吸器疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

本発明のさらなる目的は、セクレトグロビンを投与して、セクレトグロビンが投与された後少なくとも1カ月間、基礎または慢性疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、セクレトグロビンが投与された後少なくとも1カ月間、基礎または慢性呼吸器疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

20

本発明のさらなる目的は、rhCC10を投与して、セクレトグロビンが投与された後少なくとも1カ月間、基礎または慢性呼吸器疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

本発明のさらなる目的は、rhSCGB3A2を投与して、セクレトグロビンが投与された後少なくとも1カ月間、基礎または慢性呼吸器疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

本発明のさらなる目的は、rhSCGB3A1を投与して、セクレトグロビンが投与された後少なくとも1カ月間、基礎または慢性呼吸器疾患の重度の増悪による入院を防止することである。

本発明のさらなる目的は、セクレトグロビンを投与して、慢性疾患の再発性増悪を典型的に起こしている患者において、ある重度の増悪から次の増悪までの時間間隔を広げることである。

30

本発明のさらなる目的は、慢性疾患の再発性増悪を起こしている患者において、呼吸器セクレトグロビン治療の投与後または経過後10カ月までの間、ある重度の増悪から次の増悪までの時間間隔を広げることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、慢性呼吸器疾患の再発性増悪を起こしている患者において、ある重度の呼吸増悪から次の増悪までの時間間隔を広げることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、急性肺傷害を起こしたが傷害前に慢性呼吸器疾患の診断を受けていない患者において増悪に似た重度の急性呼吸器エピソードを防止することである。

40

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、慢性呼吸器疾患を有する感受性の高い患者において、増悪を誘発することができる吸入された刺激物質に曝露した後の重度の増悪を防止することである。

本発明のさらなる目的は、セクレトグロビンを投与して、慢性自己免疫疾患の再発性増悪を起こしている患者において、ある重度の自己免疫増悪から次の増悪までの時間間隔を広げることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、慢性呼吸器疾患の頻繁な増悪を起こしている患者において、ある重度の呼吸増悪から次の増悪までの時間間隔を広げることである。

50

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、慢性自己免疫疾患の頻繁な増悪を起こしている患者において、ある重度の自己免疫増悪から次の増悪までの時間間隔を広げることである。

本発明のさらなる目的は、前の増悪中または増悪後にセクレトグロビンを投与して、次の増悪を防止することである。

本発明のさらなる目的は、静脈内注射、気管内点滴注入、吸入、鼻腔内点滴注入、経口投与、舌下投与によって、または肛門もしくは膣クリーム、ゲル、もしくは坐薬によって、セクレトグロビンを投与することである。

本発明の第2の目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、非纖毛性分泌性上皮細胞の数を増加させ、それにより粘膜組織を復旧させることである。

10

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、上気道および下気道を含む気道における非纖毛性分泌性上皮細胞 (non-ciliated secretory epithelial cells) の数を増加させ、それにより呼吸器粘膜組織および気道を復旧させることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、気道におけるクララ細胞の数を増加させ、それにより呼吸器粘膜組織および気道を復旧させることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、気道におけるNEBおよびNECの数を増加させ、それにより呼吸器粘膜組織および気道を復旧させることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、血液中を循環する1つまたは複数の天然の呼吸器セクレトグロビンの量を増加させることである。

20

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、鼻孔、気管、もしくは肺の気道被覆液 (ALF) および / または痰もしくは誘発喀痰中に見出される1つまたは複数の天然の呼吸器セクレトグロビンの量を増加させることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、気道におけるセクレトグロビン分泌細胞の数を増加させ、それにより呼吸器粘膜組織および気道を復旧させることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、気道におけるCC10分泌細胞の数を増加させ、それにより呼吸器粘膜組織および気道を復旧させることである。

。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、気道におけるSCGB3A2分泌細胞の数を増加させ、それにより呼吸器粘膜組織および気道を復旧させることである。

30

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、気道におけるSCGB3A1分泌細胞の数を増加させ、それにより呼吸器粘膜組織および気道を復旧させることである。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、女性の尿生殖路におけるCC10分泌上皮細胞の数を増加させ、それにより膣粘膜組織を復旧させることである。

。

本発明のさらなる目的は、呼吸器セクレトグロビンを投与して、口、喉、食道、胃、膵臓、胆管、上部および下部腸、ならびに結腸を含む、胃腸管におけるCC10分泌上皮細胞の数を増加させ、それにより胃腸管粘膜組織を復旧させることである。

40

本発明のさらなる目的は、ATAの非天然N末端を有するヒトSCGB3A2の医薬組成物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、6.7の等電点を有するヒトSCGB3A2の医薬組成物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、6.3の等電点を有するヒトSCGB3A2の医薬組成物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、6.3および6.7の等電点を有するアイソフォームの組み合わせを有するヒトSCGB3A2の医薬組成物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、別のタンパク質との融合物として合成される組換えヒトSC

50

G B 3 A 2 の医薬組成物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、ユビキチン様タンパク質との融合物として合成される組換えヒト S C G B 3 A 2 の医薬組成物を提供することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、気管支拡張症と診断された患者において気管支拡張症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、ある種の肺線維症と診断された患者において肺線維症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、ある種の嚢胞性線維症と診断された患者において嚢胞性線維症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、C O P D と診断された患者において C O P D の増悪を遅延または防止することである。

10

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、慢性気管支炎と診断された患者において慢性気管支炎の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、肺気腫と診断された患者において肺気腫の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、喘息と診断された患者において喘息の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、B P D と診断された患者において B P D の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト呼吸器セクレトグロビンを投与して、胎便吸引症候群 (MAS) と診断された患者において M A S の増悪を遅延または防止することである。

20

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、気管支拡張症と診断された患者において気管支拡張の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、ある種の肺線維症と診断された患者において肺線維症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、ある種の嚢胞性線維症と診断された患者において嚢胞性線維症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、C O P D と診断された患者において C O P D の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、慢性気管支炎と診断された患者において慢性気管支炎の増悪を遅延または防止することである。

30

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、肺気腫と診断された患者において肺気腫の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、喘息と診断された患者において喘息の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、B P D と診断された患者において B P D の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト C C 1 0 を投与して、胎便吸引症候群 (MAS) と診断された患者において M A S の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、気管支拡張症と診断された患者において気管支拡張の増悪を遅延または防止することである。

40

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、ある種の肺線維症と診断された患者において肺線維症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、ある種の嚢胞性線維症と診断された患者において嚢胞性線維症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、C O P D と診断された患者において C O P D の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、慢性気管支炎と診断された患者において慢性気管支炎の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、肺気腫と診断された患者に

50

において肺気腫の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、喘息と診断された患者において喘息の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、B P D と診断された患者において B P D の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 2 を投与して、胎便吸引症候群 (MAS) と診断された患者において M A S の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、気管支拡張症と診断された患者において気管支拡張の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、ある種の肺線維症と診断された患者において肺線維症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、ある種の嚢胞性線維症と診断された患者において嚢胞性線維症の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、C O P D と診断された患者において C O P D の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、慢性気管支炎と診断された患者において慢性気管支炎の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、肺気腫と診断された患者において肺気腫の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、喘息と診断された患者において喘息の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、B P D と診断された患者において B P D の増悪を遅延または防止することである。

本発明のさらなる目的は、ヒト S C G B 3 A 1 を投与して、胎便吸引症候群 (MAS) と診断された患者において M A S の増悪を遅延または防止することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

気道において発現されるセクレトグロビンタンパク質は、クララ細胞および他の気道上皮細胞ならびに機能的な気道上皮に存在する免疫構造の発生を促進する。S C G B 1 A 1 (CC10、ウテログロビン、CCSP、CC16等とも呼ばれる)、S C G B 3 A 2 (UGRP1、HIN-2とも呼ばれる)およびS C G B 3 A 1 (UGRP2、HIN-1とも呼ばれる)を含む、ヒトの気道において高度に発現される3種類のセクレトグロビンが存在する。

【0012】

本発明は概して、環境曝露によって引き起こされる慢性疾患、特に呼吸器疾患の重度の増悪を遅延および防止するための呼吸器セクレトグロビンの使用に関する。組織レベルにおいて、呼吸器セクレトグロビンは、セクレトグロビン分泌細胞および呼吸器組織における関連する構造の数の増加を媒介し、これは、体液中のセクレトグロビン分泌産物の量の増加を通して間接的に測定することができる。例えば、r h C C 1 0 の投与は、クララ細胞、N E B、およびN E Cの数の増加を媒介し、気道上皮を回復させる。現在、これは、C C 1 0 K Oマウスの気道上皮表現型に整合し、重度の呼吸増悪からの非常に強力な長期的保護に係するが肺線維症の一種である新生児 B P D の防止には関係しない早産児におけるデータを説明する唯一の仮説である。

【0013】

r h C C 1 0 は新生児 B P D の発症を防がなかったものの、それは再入院を必要とする重度の呼吸増悪からの長期的保護を与え、これは乳児が40週間の在胎期間後の6カ月齢の時点であった6カ月 P M A において観察された。この試験は24~28週 P M A の乳児を登録していたため、このエンドポイントはr h C C 1 0 の単回投与後最長10カ月である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

10

20

30

40

50

【図1】図1：ヒトSCGB3A2のアミノ酸配列、予測されるN末端と実際のN末端との比較を伴うヒトSCGB3A2アミノ酸配列のアライメントの図である。

【図2】図2：精製したrhSCGB3A2のSDS-PAGE、精製したrhSCGB3A2のSDS-PAGEの図である。各々1mM DTTを添加および非添加で5マイクログラムを含む試料がSDS試料バッファーと混合され、5分間煮沸され、10~20%トリシゲル上に負荷された。ゲル泳動が行われ、クーマシーR250により染色された。ゲルは脱染色され、デジタルカメラで画像化された。

【図3】図3：精製rhSCGB3A2の等電点分離、rhCC10およびUBLおよびDen-1と比較した、精製rhSCGB3A2の等電点分離の図である。各々5マイクログラムを含む試料がNovex IEFゲル上に負荷された。ゲル泳動が行われ、クーマシーR250により染色された。ゲルは脱染色され、デジタルカメラで画像化された。矢印はATA N末端を有するrhSCGB3A2の主要なアイソフォームとマイナーなアイソフォームをあらわす。

10

【図4】図4：rhSCGB3A2によるsPLA₂-1Bのin vitro阻害の図である。パネルA：UNIBIPY基質；PLA₂なし；rhSCGB3A2なし。パネルB：UNIBIPY基質+PLA₂；rhSCGB3A2なし。パネルC：UNIBIPY基質+PLA₂+rhSCGB3A2。ピーク#1はUNIBIPYリン脂質基質であり、ピーク#2はsPLA₂による切断後の産物である。

【図5】図5：ヒトTAF中のSCGB3A2のウエスタンブロットの図である。抗rhSCGB3A2ウサギポリクローナル抗体を用いた、精製rhSCGB3A2と比較したヒト乳児からの気管吸引液のウエスタンブロット。各々20マイクロリットルのTAFを含む試料がNovex 10~20%トリシゲル上に負荷された；rhSCGB3A2はレーン1（5ナノグラム）とレーン8（1ナノグラム）である。ゲルは脱染色され、デジタルカメラで画像化された。

20

【図6】図6：ヒトSCGB3A2の競合的ELISAの検量線の図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

1) 早産児において観察されたrhCC10の単回投与による重度の呼吸増悪と再入院からの長期的な保護、2) CC10 KOマウスの気道上皮の表現型、および3) SCGB3A2の「増殖因子」性を含む、3つの断片の証拠が組み合わされて、本発明が考案された（Guha, 2012; Kurotani, 2008; Kurotani, 2008a; Inoue, 2008; Niimi, 2001）。長年の研究にもかかわらず、気道上皮におけるCC10の役割に関しては、それが抗炎症作用を媒介すること以外は、周知のコンセンサスはない。アレルギー性鼻炎の鼻アレルギー誘発モデルにおける最近の臨床試験の失敗は、そのin vivoの抗炎症作用でさえも、あらゆる型の炎症性疾患に対して一貫したものではないことを示した（Widgren, 2009）。そして、完全なCC10の欠損にもかかわらず、クララ細胞はなおも、CC10 KOマウスの両系統の気道において見出される。CC10およびSCGB3A2は構造的に類似しているものの、またそれゆえ、いくつかの機能を共有すると考えられるものの、CC10による気道上皮細胞の増殖または発生の刺激に関する報告はなく、また、rhCC10は実際のところ、気道上皮細胞株A549（Szabo, 1998）を含む上皮起源の腫瘍細胞の増殖を抑制することがよく知られている（Kundu, 1996; Leyton, 1994）。

30

40

【0016】

我々はそれにもかかわらず、出生の日には早産児に投与されたrhCC10が、CC10分泌細胞の発生を刺激し、これは次いで、天然のCC10を生成し、これが、より多くのCC10分泌細胞の発生などを刺激したと考えている。結末は、あらゆる環境攻撃（ほこり、煙、アレルギー、RSV感染、インフルエンザ感染など）に対して、プラセボ処置乳児よりも耐性のrhCC10処置乳児における、より正常かつ弾力的な気道上皮であった。出生の日におけるrhCC10の単回投与は、重度の呼吸増悪による再入院からの100%の保護を与えたが、これは、プラセボ処置乳児において観察された50%の再入院率とは対照をなしている。

50

【 0 0 1 7 】

我々はさらに、気道上皮における C C 1 0 分泌細胞の発生を刺激するための C C 1 0 の使用が、気道リモデリングがクララ細胞の喪失をもたらしている慢性呼吸器疾患を有する成人においても奏功すると考えている。r h C C 1 0 による治療過程は疾患を治癒させないかもしれないが、しかし、クララ細胞と関連する構造をある程度回復させ、以降の環境攻撃に対して、その後、より耐性を示す、より正常な上皮をもたらすであろうと我々は考えている。すると、r h C C 1 0 処置過程の臨床転帰は、次の重度増悪までの時間間隔の増大となるであろう。

【 0 0 1 8 】

我々はさらに、C C 1 0 K O マウスにおけるクララ細胞欠損の気道上皮表現型は、C C 1 0 がクララ細胞、関連する構造、および気道上皮の他の正常細胞集団の発生に必要とされるオートクリンおよびパラクリン因子であることを示唆していると考えている。我々は、C C 1 0 が胃腸管および尿生殖路を含む、気道の外側の C C 1 0 分泌細胞の発生および維持に必要とされるオートクリンおよびパラクリン因子であると考えている。セクレトグロビンは構造的な類似性を共有しているため、それらは同様な機能も共有しているとの多くの推論がなされているが、しかしながら、これまで *in vitro* または *in vivo* のいずれにおいても、2つの何らかのセクレトグロビンの間で何らかの生物学的活性が共有されていることは全く示されていない。ここにおいて、我々は、r h S C G B 3 A 2 がブタの膵臓ホスホリパーゼ A₂ を *in vitro* で阻害する能力を C C 1 0 と共有することを報告する。これは、C C 1 0 以外の何らかの他のセクレトグロビンが、ホスホリパーゼ A₂ 酵素を実際に阻害する、つまり、何らかの型の抗炎症活性を有することの最初の報告である。これらの結果に基づき、我々は、呼吸器セクレトグロビンを含む、r h C C 1 0 と構造的な類似性を共有する他のセクレトグロビンが、それらを分泌する細胞の発生および維持を刺激して、次の増悪までの時間の増大、次の増悪の重度の減少、および急性傷害後の重度増悪の防止などの、長期的臨床利益をもたらすことができると推論している。

【実施例】

【 0 0 1 9 】

実施例 1 : R D S を有する早産児における r h C C 1 0 による長期的保護

界面活性剤処置後 (Levine, 2005) に r h C C 1 0 の安全性、薬物動態、抗炎症性が、プラセボ (n = 7)、1.5 mg / kg (n = 8) または 5.0 mg / kg (n = 7) の r h C C 1 0 の気管内 (IT) 投与を受けた平均出生体重 932 g および平均在胎期間 26.9 週間の呼吸促進症候群 (RDS) を有する早産児 22 例の無作為化、プラセボ対照、二重盲検、多施設試験において評価された。r h C C 1 0 処置乳児は、生後 3 日間にわたって T A F 総細胞数 (P < 0.001)、好中球数 (P < 0.001) および総タンパク質濃度 (P < 0.01) における有意な減少、ならびに減少した I L - 6 (P < 0.07) を示した。r h C C 1 0 は安全で、許容性がよかった。

【 0 0 2 0 】

著しいことに、そして少数にもかかわらず、修正在胎月齢 (CGA) 6 カ月における乳児 17 例のフォローアップは、表 2 に示されるように、プラセボを受けた 3 / 6 に比べて、r h C C 1 0 を受けた 0 / 11 が呼吸器の原因で病院に再入院したことを明らかにした (P < 0.05、フィッシャーの正確確率検定、両側)。

【 0 0 2 1 】

【表 2】

表1: 重度の呼吸増悪のための再入院

	6カ月 CGA
プラセボ (7例登録)	3/6
1.5 mg/kg (8例登録)	0/6
5 mg/kg (7例登録)	0/5

10

【0022】

6カ月CGAは、この文脈において、乳児の40週間の妊娠期間後6カ月に対応する時間期間を意味すること、また、この試験の数例の乳児は、出生時に24週の月経後年齢(PMA)であり、6カ月CGAのフォローアップ時点は、出生の日に投与されたrhCC10の単回投与後10カ月も後に生じていることを考慮すると、この結果はさらに注目すべきものである。統計学的な観点からは、結果は、プラセボ群における再入院の少なくとも57%の発生率に対して、rhCC10群における少なくとも27%の発生率を示している。これは非常に強力な長期的効果であり、これらのデータは、rhCC10の投与の有意かつ前例のない長期的利益を例証している。

20

【0023】

過剰なCC10が投与の48時間以内に排除され、9~11時間の血清半減期を有することを薬物動態分析が示しているときに、このような甚大な長期利益が見られることは、さらに注目すべきことである(Levine, 2005)。有意な量のrhCC10がほぼ2日間、気管吸引液において観察され、6時間までに血清に達していたが、その後、腎臓によって濾過され、12時間までに尿中に排出されていた。rhCC10は、肺から血液へ、尿へと自然な生理学的分布経路をたどり、迅速な排除にもかかわらず、長期的利益を示した。

【0024】

30

実施例2: rhSCGB3A2のクローニングと発現

図2は、これらの試験のために作製されたrhSCGB3A2のアミノ酸配列を示している。この配列はGeneBank座位AAQ89338から取得された。ユビキチン様(UBL)融合系を利用し、UBLプロテアーゼを用いてUBLからrhSCGB3A2産物を放出させた組換え産物法の結果として、N末端は、哺乳類分泌タンパク質のコンセンサス単一ペプチド切断部位を用いて天然タンパク質から予測されるN末端とは異なっている。またそれは、ヒト体液試料から単離される実際のペプチドのN末端とも異なっている。これはヒスチジン精製タグを持たないヒトSCGB3A2の合成の最初の記述であり、タンパク質の安定性と活性に対するN末端の影響は予測できなかった。rhSCGB3A2のアミノ酸配列は表1に示されており、8147.82ダルトンの予測される分子量と6.1の予測される等電点を有する。

40

【0025】

rhSCGB3A2の合成DNAコード配列は、E.coli細菌K12株における発現に最適化されたコドン使用頻度を用いて、jcatを用いて設計された(www.jcat.de)。DNA配列が生成された後、UBLを既に含む細菌発現ベクターpTXB1への遺伝子の方向性クローニングを容易にするために、末端に制限部位が付加された。SCGB3A2は、UBLのC末端延長部分としてクローニングされた。方向性クローニングのためにAflII部位が5'端に配置され、BamHI部位が3'端に配置された。

【0026】

rhSCGB3A2の新たな遺伝子が、PCRを用いて重複するオリゴヌクレオチドが

50

ら合成された。r h S C G B 3 A 2 遺伝子の D N A 配列は：

CTTAAGAGGTGGTGCTACCGCTTCTCTGATCAACAAAGTTCCGCTGCCGGTTGACAACTGGCTCCGCTGCCGCTGGACA
ACATCCTGCCGTTTCATGGACCCGCTGAACTGCTGCTGAAAACCTGGGTATCTCTGTTGAACACCTGGTTGAAGGTCTG
CGTAAATGCGTTAACGAAGCTGGTCCGGAAGCTTCTGAAGCTGTAAAAAACTGCTGGAAGCTCTGTCTCACCTGGTTTA
GTAAGGATCC

である。

【 0 0 2 7 】

U B L - r h S C G B 3 A 2 融合物を含む p T X B 1 プラスミドが、融合タンパク質の誘導性発現を可能とする T 7 R N A ポリメラーゼをコードする D E 3 プロファージを含む E . c o l i 株 H M S 1 7 4 / D E 3 中に形質転換された。融合タンパク質の発現についてコロニーがスクリーニングされ、高発現のものにおいて r h S C G B 3 A 2 遺伝子が D N A 配列決定により再確認された。アンピシリンと共に S u p e r B r o t h 培地を含む 4 リットル発酵培養に、最高発現クローンの終夜培養 1 2 0 m l が播種され、3 7 で増殖させられた。培養は 8 . 7 5 の O D ₆₀₀ において U B L - r h S C G B 3 A 2 融合タンパク質を過剰発現させるために 0 . 3 m M の I P T G を用いて誘導され、さらに 2 時間増殖させられた。細胞ペーストが遠心により回収され、ウェットな細胞ペースト収量は 6 7 グラムであった。細胞ペーストはその後、r h S C G B 3 A 2 の精製のために使用された。

【 0 0 2 8 】

実施例 3：r h S C G B 3 A 2 の精製

細胞ペーストは 2 0 m M N a H ₂ P O ₄、0 . 5 M N a C l、p H 7 . 2 に再懸濁され、細胞はその後、粗ライセートを生成するために凍結融解によって破壊された。粗ライセートは 4 、 1 9 , 8 0 0 × g で 2 0 分間の遠心により清澄化された。D N A、エンドトキシン、および他の細菌夾雑物は、0 . 0 2 5 % の濃度のポリエチルイミン (P E I) と 4 、 1 9 , 8 0 0 × g で 1 0 分間の第二の遠心を用いて、清澄化したライセートの上清から沈殿して除かれた。P E I 上清はその後、0 . 2 2 ミクロンのフィルターを通して濾過され、1 0 m M イミダゾールが濾液に加えられた。U B L と U B L プロテアーゼはどちらもヒスチジンタグを含んでおり、そのため、それらは固定化金属アフィニティークロマトグラフィーカラムに結合する。U B L - r h S C G B 3 A 2 融合タンパク質を含む濾液はその後、あらかじめ 2 0 m M N a H ₂ P O ₄、0 . 5 M N a C l、1 0 m M イミダゾール、p H 7 . 2 で平衡化した I M A C カラム (ニッケルキレート化セファロースファーストフロー) を通され、カラムは同じバッファーで洗浄され、その後、U B L - r h S C G B 3 A 2 融合タンパク質は 2 0 m M N a H ₂ P O ₄、1 0 0 m M N a C l、3 0 0 m M イミダゾール、p H 7 . 2 によって溶出された。I M A C 溶出液はその後、濃縮され、1 5 m M トリス、1 5 m M ビストリス、4 0 m M N a C l、p H 7 . 0 の 5 k D a N M W C O フィルターによるタンジェント流濾過を用いてバッファー交換された。夾雑物は結合し、U B L - r h S C G B 3 A 2 は通過する M a c r o P r e p H i g h Q カラム (B i o R a d) 上で U B L - r h S C G B 3 A 2 はさらに精製された。r h S C G B 3 A 2 はその後、H C l で 6 . 5 に p H を調整した 5 m M D T T 中の U B L プロテアーゼ D e n - 1 による 3 7 で 2 時間の消化 (1 : 1 0 0 モル比) によって U B L から分離された。r h S C G B 3 A 2 はその後、陽イオン交換クロマトグラフィー (G E S e p h a r o s e S P H i g h P e r f o r m a n c e) を用いて消化混合物から精製された。S P カラムは 1 5 m M トリス、1 5 m M ビストリス、4 0 m M N a C l、p H 6 . 5 で平衡化され、消化混合物が負荷され、夾雑物はカラムに結合する一方、r h S C G B 3 A 2 は通過した。S P 通過画分はその後、3 . 5 k D a M W C O 再生セルロース膜を用いて 0 . 9 % N a C l に対して徹底的に透析された。試料は遠心濃縮機を用いて濃縮され (3 . 5 k D a M W C O)、その後、0 . 2 2 ミクロンフィルターを通して濾過された。濾液が精製 r h S C G B 3 A 2 となった。図 2 は最終的な精製タンパク質の S D S - P A G E 分析を示している。それは S D S - P A G E の濃度測定によると > 9 7 % の純度であり、ほぼ 9 5 % が二量体、5 % が単量体である。r h C C 1 0 と同じく、還元剤によって二量体を単量体に完全

に還元するのは難しい。

【0029】

実施例4：r h S C G B 3 A 2 の等電点

タンパク質の等電点 (pI) は、そのタンパク質の総表面電荷の測定値であり、pI は標準的な等電点分離 (IEF) 法を用いて測定される。図3に示されているように、r h S C G B 3 A 2 の pI を決定するために、約5マイクログラムの r h S C G B 3 A 2、r h C C 1 0、U B L、および D e n - 1 が I E F ゲル (Novex) 上に負荷された。タンパク質が S D S - P A G E 上の単一のバンドとして泳動し、I E F ゲルにおいて複数のバンドが観察される場合、おそらくタンパク質の代替的なアイソフォームが存在する。pI 4.8 に単一のバンドを示す r h C C 1 0 とは対照的に、r h S C G B 3 A 2 は pI 6.7 と 6.3 に2つのバンドを示す。我々の r h S C G B 3 A 2 配列の予測される pI は 6.1 であるが (www.expasy.edu; Protein tool "Compute MW/pI")、タンパク質の大部分は 6.7 の pI に対応する位置に泳動する。6.3 のマイナーなバンドでさえ、予測される 6.1 の pI には対応していない。2つの r h S C G B 3 A 2 I E F バンドが存在するということは、代替的な折りたたみのアイソフォームが存在するか、非還元 S D S - P A G E において可視化されるように、それらが単量体と二量体に相当することのいずれかを意味する。

【0030】

これらの pI はさらに、この調製物が、未知の予測されていない独特な r h S C G B 3 A 2 のアイソフォームであることを示している。組換えタンパク質の独特な折りたたみパターンはしばしば、合成プロセス、今回の場合、N末端の選択、ユビキチン様タンパク質とのC末端融合物としてのタンパク質の発現、融合タンパク質の I M A C 精製、U B L からの S C G B 3 A 2 の切断、ならびに U B L および U B L - プロテアーゼからの S C G B 3 A 2 の分離によって決定される。よって、この調製物の特有性は、合成プロセス、非天然のN末端、またはこれらの組み合わせ、あるいは他の未知の因子によるものであり得る。

【0031】

実施例5：r h S C G B 3 A 2 による P L A₂ の阻害

r h S C G B 3 A 2 の生物学的活性は、異なるバッチの r h C C 1 0 の力価を評価するために開発された、ブタ膵臓分泌性 P L A₂ 酵素 (s P L A₂) の阻害を評価する蛍光および定量的 H P L C アッセイにおいて評価された。P L A₂ 酵素の阻害は、C C 1 0 の主要な抗炎症作用機序であると考えられている。多くの者が、他のセクレトグロビンもまた、C C 1 0 とのそれらの構造的な類似性のために、P L A₂ 酵素を阻害すると推測していた。r h S C G B 3 A 2 (5.5マイクログラム) が、100ナノグラムのブタ s P L A₂ 1 B (0.1マイクログラム) と混合され、37 °C でインキュベートされた。反応は、蛍光リン脂質アナログである 2 - デカノイル - 1 - (O - (11 - (4, 4 - ジフルオロ - 5, 7 - ジメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン - 3 - プロピオニル) アミノ) ウンデシル) - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (UNIBIPY と呼ばれる; 47.6ナノグラム) の添加を通して開始された。15分後、反応は 2 - プロパノール / n - ヘキサンの添加により終結させられた。切断産物は W a t e r s S p h e r i s o r b シリカ H P L C カラム上で基質から分離された。分離の後に続けて、G 1 3 2 1 A 蛍光検出器が用いられた。

【0032】

アッセイの結果は図4に示されている。パネルAは、s P L A₂ または r h S C G B 3 A 2 を伴わない U N I B I P Y 基質を示している; パネルBは U N I B I P Y 基質 + s P L A₂ を示しており、パネルCは U N I B I P Y 基質 + s P L A₂ + r h S C G B 3 A 2 を示している。s P L A₂ は基質 (ピーク # 1) を切断し、産物 (ピーク # 2) を生じる。r h S C G B 3 A 2 の存在下では、産物のピークは有意に減少する。各反応セットは2回繰り返して実行された。アッセイにおいて r h S C G B 3 A 2 は、r h C C 1 0 タンパク質に匹敵する、s P L A₂ - 1 B 活性の 83% の阻害を示した (データは示さず)。

【 0 0 3 3 】

パーセント阻害は以下のようにして計算している：

% 阻害 = { 1 - (r h S C G B 3 A 2 による切断領域の平均 / (r h S C G B 3 A 2 によらない切断領域の平均) } × 1 0 0

【 0 0 3 4 】

r h S C G B 3 A 2 はブタ膵臓 s P L A ₂ を阻害し、活性のレベルは r h C C 1 0 に匹敵すると結論された。

【 0 0 3 5 】

実施例 6：ヒト体液中の天然 S C G B 3 A 2 に対する r h S C G B 3 A 2 の比較

精製 r h S C G B 3 A 2 は、標準的な免疫プロトコルを用いて 2 羽のニュージーランド白ウサギを免疫するために使用された。タンパク質は K L H にコンジュゲートされ、フロイントのアジュバントと混合され、動物に注射された。両方の動物が、非常に高い力価を有する優れた抗体反応を生じた。I g G は P i e r c e プロテイン A I g G 精製キットを用いて動物の血清の各セットから精製され、精製した I g G は P B S、p H 7 . 2 中に透析され、分注され、- 8 0 で保存された。

【 0 0 3 6 】

抗体は、ヒト早産児から得られた気管吸引液 (T A F) を用いて、ウエスタンブロットによって認定された。6 例の乳児からの 2 0 マイクロリットルの T A F を含む試料が、非還元 S D S - P A G E 上で泳動され、r h S C G B 3 A 2 (5 ナノグラム) と比較された。ゲルは、P V D F 膜に電気ブロットされ、4 % 脱脂乳でブロッキングされ、その後、最も高い力価のウサギ抗 r h S C G B 3 A 2 I g G (1 : 5 0 0 0 希釈) がブロットと共にインキュベートされ、それにヤギ抗ウサギ - H R P コンジュゲート (1 : 2 0 , 0 0 0 希釈) が続いた。ブロットは、強化化学ルミネッセンスを用いて現像された (4 I P B A - E C L - 100mM Tris/HCl pH8.8、1.25mM ルミノール、5.3mM 過酸化水素および 2mM 4 I P B A) 。 5 / 6 の T A F 試料において免疫反応性のバンドが出現した。試料のうちの 2 つ (レーン 3 および レーン 6) は、r h S C G B 3 A 2 ホモ二量体と同じ大きさに泳動するバンドを含み、これは、一部の患者では r h S C G B 3 A 2 調製物が天然のヒト S C G B 3 A 2 と似ていることを指し示している。動物またはヒトの試験における使用のための組換えタンパク質、特に疎水性タンパク質の異種性発現はしばしば、ミスフォールドしていたり、不活性であったり、免疫原性であったり、または他の理由で使用できない調製物を生じる。天然の S C G B 3 A 2 の実際の N 末端が知られておらず、r h S C G B 3 A 2 の p I が予測と一致しなかったことを考慮すると、少なくとも一部のヒト試料が同様なタンパク質を含んでいたという観察は、我々の合成アプローチと r h S C G B 3 A 2 調製物を確認していた。5 つ全ての反応性試料が 2 0 0 k D a の水準の高分子量種を含んでおり、また、全てが 8 ~ 1 3 k D a サイズ範囲の複数の分離したバンドを含んでいたが、その一部は、単量体、二量体、および代替的なアイソフォームに対応しうる。また、2 つの試料 (レーン 3 および レーン 7) は、3 . 5 k D a より低い免疫反応性のスミアも含んでいたが、これはおそらく、S C G B 3 A 2 分解産物をあらわしている。これは、天然の S C G B 3 A 2 がウエスタンブロットによって可視化された最初の例である。ウエスタンブロットに使用された抗 r h S C G B 3 A 2 抗体は、次いでヒト S C G B 3 A 2 の E L I S A を開発するために使用された。

【 0 0 3 7 】

実施例 7：r h S C G B 3 A 2 のための E L I S A の開発

標準的な方法を用いて、競合的 E L I S A が開発された。競合的なアッセイ形式においては、標的を捕捉する抗体がマイクロタイタープレートのウェル上にコーティングされ、次いで酵素をコンジュゲートさせた標的分子 (標識された標的) を用いて、ウェル中の利用可能な部位への結合について、試料中のコンジュゲートされていない標的と競合させる。試料中の標的の濃度が増加するにつれて、ウェルに結合する標識された標的の量が減少する。ウサギ抗 r h S C G B 3 A 2 抗体は、9 6 ウェル M a x i s o r b プレート上にコーティングされ (2 0 0 n g / w e l l) 、その後、ウェルは 5 % ショ糖、P B S 中 2 .

10

20

30

40

50

5 % B S A でブロッキングされ、その後、プレートは乾燥され、4 で保存された。セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) と r h S C G B 3 A 2 のコンジュゲートが作製され (Pierce kit- EZ-Link Maleimide Activated HRP kit, Cat# 31494)、1 : 1 3 0 , 0 0 0 希釈でアッセイに使用された。r h S C G B 3 A 2 を用いてキャリブレーター (1 ~ 5 0 0 n g) が作製され、図 6 に示されているように、検量線が生成された。天然の S C G B 3 A 2 はその後、表 3 に示されているようにヒト T A F 試料において定量された。

【 0 0 3 8 】

【表 3】

表3: ヒトTAF中の天然SCGB3A2

10

レーン	試料	[SCGB3A2] (ng/ml)*
1	Rh-SCGB3A2 (5 ng)	
2	乳児TAF; 患者6	774
3	乳児TAF; 患者7	804
4	乳児TAF; 患者12	ND
5	乳児TAF; 患者15	540
6	乳児TAF; 患者17	462
7	乳児TAF; 患者19	395
8	Rh-SCGB3A2 (1 ng)	

20

30

【 0 0 3 9 】

また、S C G B 3 A 2 は、3 例のヒト成人血清試料においても測定され、0、2 9、および 3 2 n g / m l の値が返された。S C G B 3 A 2 は、濃縮していないヒトの尿、または 1 0 × 濃縮の尿においては検出できなかった。アッセイの検出限界は 5 n g / m l であった。

【 0 0 4 0 】

実施例 8 :

a) 急性肺傷害を有する患者において、投与後 1 0 カ月までの期間、重度の呼吸増悪による入院を防止するための r h C C 1 0 の使用方法。

40

b) 頻繁な増悪を起こしている患者において、投与後少なくとも 1 カ月間、重度の呼吸増悪を防止するための r h C C 1 0 の使用方法。

c) 慢性呼吸器状態 (chronic respiratory condition) を有する患者において、投与後少なくとも 1 カ月の期間、重度の呼吸増悪による入院を防止するための r h C C 1 0 の使用方法。

d) 慢性呼吸器状態が C O P D である、例 a ~ c の方法。

e) 慢性呼吸器状態が喘息である、例 a ~ c の方法。

f) 急性肺傷害を有する患者において、投与後 1 0 カ月までの期間、重度の呼吸増悪による入院を防止するための r h S C G B 3 A 2 の使用方法。

g) 頻繁な増悪を起こしている患者において、投与後少なくとも 2 カ月間、重度の呼吸増

50

悪を防止するための r h S C G B 3 A 2 の使用方法。

h) 慢性呼吸器状態を有する患者において、投与後少なくとも 1 カ月の期間、重度の呼吸増悪による入院を防止するための r h S C G B 3 A 2 の使用方法。

i) 慢性呼吸器状態を有する患者において、投与後少なくとも 2 カ月の期間、重度の呼吸増悪による入院を防止するための r h S C G B 3 A 2 の使用方法。

j) 慢性呼吸器状態が肺線維症である、例 g ~ i の方法。

k) 慢性呼吸器状態が気管支拡張症である、例 g ~ i の方法。

S C G B 3 A 2 :

l) 配列番号 1 を含む、N 末端 A T A を有する組換えヒト S C G B 3 A 2 タンパク質の組成物。

10

m) 配列番号 1 に従うインタクトな S C G B 3 A 2 タンパク質を放出するために、U B L 融合タンパク質と、融合パートナーを認識し、融合パートナーと S C G B 3 A 2 の間で切断する U B L プロテアーゼとを使用して、組換えヒト S C G B 3 A 2 を合成する方法。

n) P L A₂ 酵素を阻害する、r h S C G B 3 A 2 の医薬組成物。

o) 6 . 3 もしくは 6 . 7 またはその間の等電点に対応する等電点電気泳動用ゲルにおいて泳動する、r h S C G B 3 A 2 の医薬組成物。

p) ホモ二量体を含む、r h S C G B 3 A 2 の医薬組成物。

q) P L A₂ 酵素を阻害する 6 . 7 の p I を有するホモ二量体を含む、r h S C G B 3 A 2 の医薬組成物。

【 0 0 4 1 】

20

本発明は、最も実際的かつ好ましい態様であると現在考えられるものに関して記述されているが、本発明は開示された態様に限定されるべきものではなく、逆に、添付の特許請求の範囲の精神および範囲内に含まれる様々な修正形態および均等な構成をカバーすることが意図されていると理解されよう。

【 0 0 4 2 】

略語および定義

C C 1 0 : クララ細胞 1 0 k D a タンパク質

C C S P : クララ細胞分泌タンパク質

C C 1 6 : クララ細胞 1 6 k D a タンパク質

S C G B 1 A 1 : S C G B 1 A 1 遺伝子によってコードされるタンパク質、C C 1 0、C C S P、C C 1 6、ウテログロビンと同じ

30

S C G B 3 A 1 : S C G B 3 A 1 遺伝子によってコードされるタンパク質、H I N - 1 および U G R P 2 と同じ

S C G B 3 A 2 : S C G B 3 A 2 遺伝子によってコードされるタンパク質、H I N - 2 および U G R P 1 と同じ

H I N - 1 : h i g h - i n - n o r m a l タンパク質 1

H I N - 2 : h i g h - i n - n o r m a l タンパク質 2

U G R P 1 : ウテログロビン遺伝子関連タンパク質 1

U G R P 2 : ウテログロビン遺伝子関連タンパク質 2

セクレトグロビン : ジスルフィド結合によって連結された 4 つのヘリックス束の単量体によって特徴付けられる、構造的に関連したタンパク質のファミリーからのタンパク質

40

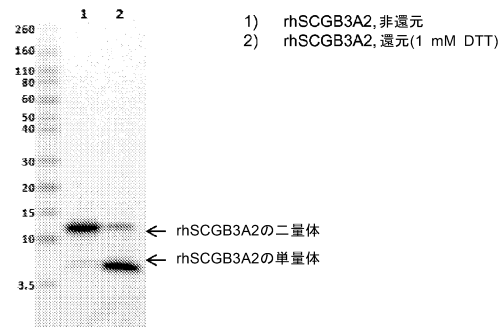
呼吸器セクレトグロビン : S C G B 1 A 1、S C G B 3 A 1、および S C G B 3 A 2 を含む、気道において高度に発現され、豊富なセクレトグロビン

【図 1】

図 1: ヒト SCGB3A2 アミノ酸配列
(Hm-2, UGRP1 と呼ばれる)

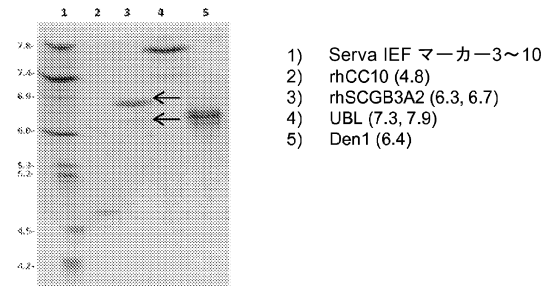
【図 2】

図 2: 精製 rhSCGB3A2 の SDS-PAGE

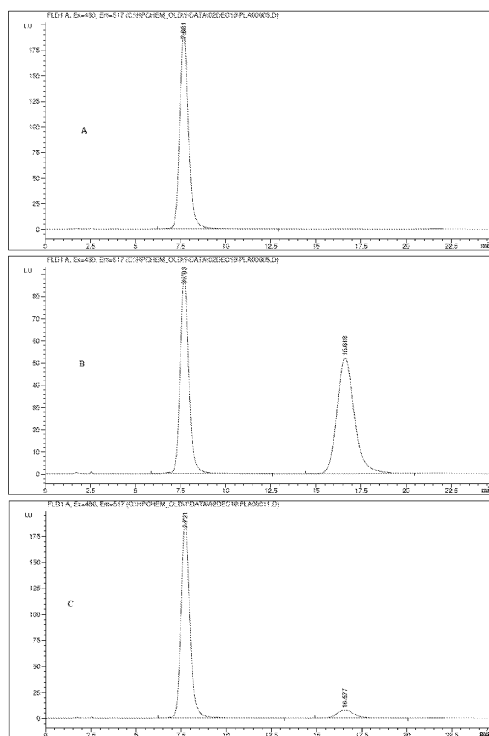


【図 3】

図 3: 精製 rhSCGB3A2 の等電点分離

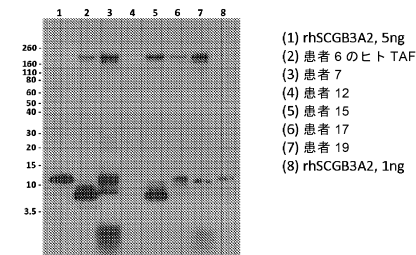


【図 4】

図 4: rhSCGB3A2 による PLA₂ の阻害

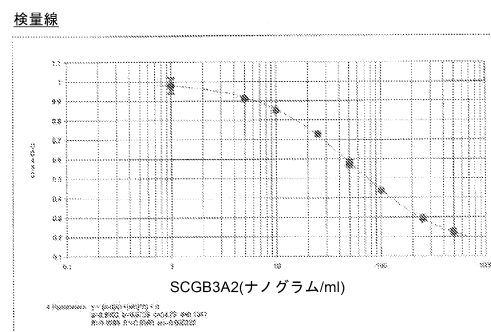
【図 5】

図 5: ヒト TAF 中の SCGB3A2 のウェスタンブロット



【図 6】

図 6: ヒト SCGB3A2 の競合的 ELISA の検量線



【配列表】

0006513632000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 A
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N 15/12

(72)発明者 ピロン, アブリーレ, エル.
 アメリカ合衆国, メリーランド州 2 0 8 5 0, ロックビル, グレート セネカ ハイウェイ 9
 7 0 0, スイート 3 1 4

(72)発明者 ウィン, メリッサ, イー.
 アメリカ合衆国, メリーランド州 2 0 8 5 0, ロックビル, グレート セネカ ハイウェイ 9
 7 0 0, スイート 3 1 4

(72)発明者 ゼマー, ジョン, ケー.
 アメリカ合衆国, メリーランド州 2 0 8 5 0, ロックビル, グレート セネカ ハイウェイ 9
 7 0 0, スイート 3 1 4

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 4 / 1 0 1 8 2 4 (WO, A 1)
 特表2 0 0 7 - 5 2 9 1 9 1 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 P 2 1 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q