

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和3年10月7日(2021.10.7)

【公開番号】特開2020-37538(P2020-37538A)

【公開日】令和2年3月12日(2020.3.12)

【年通号数】公開・登録公報2020-010

【出願番号】特願2018-165890(P2018-165890)

【国際特許分類】

A 6 1 K	38/16	(2006.01)
C 1 2 N	9/56	(2006.01)
C 1 2 N	15/57	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 1 2 Q	1/37	(2006.01)
A 6 1 P	9/12	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	11/16	(2006.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)

【F I】

A 6 1 K	38/16	Z N A
C 1 2 N	9/56	
C 1 2 N	15/57	
C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 Q	1/37	
A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	11/16	
A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 P	11/00	

【手続補正書】

【提出日】令和3年8月24日(2021.8.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドであって、下記のアミノ酸配列をその活性部位に含むポリペプチド：

1) His-Glu-Xaa-Xaa-His（配列番号 26）のアミノ酸配列（ここに、Xaaは任意のアミノ酸残基である）、および

2) His-Glu-(Ser/Gly)のアミノ酸配列（ここに、Ser/GlyはSerまたはGlyを意味する）、またはその誘導体を有効成分として含有する、医薬組成物。

#### 【請求項 2】

アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドが、配列番号 6 から 8 および 10 から 17 記載のアミノ酸配列を有するペプチドおよびその変異体、ならびに、  
 • Nam-Xaa-Pro-Lys(Dnp)-OH（ここに、Namは 2 - メチルアミノベンゾイル、Xaaは Leu、Met、Ile、Phe、Val、Trp、Arg、Tyr、Thr、Lys、His、Ala、Asn、Gln、Ser、Pro のうち任意のアミノ酸残基、Dnpは 2 , 4 - ジニトロフェニルを示す）、  
 • Nma-Phe-His-Lys(Dnp)-OH（ここに、NamおよびDnpは前記と同様）、  
 • Cbz（カルボベンゾキシ）-Phe-Tyr、Z（ベンジルオキシカルボニル）-Ala-Xaa（ここに、Xaaは Arg、His、Trp、Tyr、Phe、Ile、Ala、Val、Ser、Met、Asn、Glu、Gly のうち任意のアミノ酸残基）、  
 • Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa (N3-(2,4-ジニトロフェニル)-L-2,3-ジアミノプロピオニル)-Ala-Ala-Trp、  
 • Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa-Ala-Ala-Trp、および  
 • Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa-Ala-Ala-Trp、  
 のうち、少なくとも 1 つのペプチドの C 末端アミノ酸残基を 1 残基切断する活性を有している、請求項 1 記載の医薬組成物。

#### 【請求項 3】

アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドが、配列番号 7 記載のアミノ酸配列を有するペプチドの C 末端アミノ酸残基を 1 残基切断する活性を有している、請求項 1 または 2 記載の医薬組成物。

#### 【請求項 4】

ポリペプチドが、糖鎖を有していない、請求項 1 から 3 のいずれか記載の医薬組成物。

#### 【請求項 5】

ポリペプチドが、以下のの中から選ばれる少なくとも 1 つである、請求項 1 から 4 のいずれか記載の医薬組成物：

1) 配列番号 20 記載のアミノ酸配列を有する B S - C A P、

2) 配列番号 20 記載のアミノ酸配列を有する B S - C A P において、1 または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および / または逆位を有するアミノ酸配列であって、アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有する B S - C A P 变異体、

3) 配列番号 24 記載のアミノ酸配列を有する B A - C A P、

4) 配列番号 24 記載のアミノ酸配列を有する B A - C A P において、1 または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および / または逆位を有するアミノ酸配列であって、アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有する B A - C A P 变異体

5) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する B 3 8 - C A P、および

6) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する B 3 8 - C A P において、1 または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および / または逆位を有するアミノ酸配列であって、アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有する B 3 8 - C A P 变異体。

#### 【請求項 6】

高血圧、心不全、心組織線維化症、急性呼吸窮迫症候群または急性肺傷害、例えば酸吸引もしくは敗血症により誘発される重症急性肺損傷、肺水腫、または重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルス感染もしくはインフルエンザウイルス感染関連肺損傷および障害が原因となるものを処置または予防するための、請求項 1 から 5 のいずれか記載の医薬組成物。

#### 【請求項 7】

アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドであって、下記のアミノ酸配列をその活性部位に含むポリペプチド：

1) His-Glu-Xaa-Xaa-His（配列番号 2 6）のアミノ酸配列（ここに、Xaaは任意のアミノ酸残基である）、および

2) His-Glu-(Ser/Gly)のアミノ酸配列（ここに、Ser/GlyはSerまたはGlyを意味する）、またはその誘導体。

ただし、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する B 3 8 - C A P および、配列番号 1 記載のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位を有するアミノ酸配列であって、アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有する B 3 8 - C A P 变異体を除く。

#### 【請求項 8】

配列番号 6 から 8 および 10 から 17 記載のアミノ酸配列を有するペプチドおよびその变異体、ならびに

- ・Nam-Xaa-Pro-Lys(Dnp)-OH（ここに、Namは 2 - メチルアミノベンゾイル、Xaaは Leu、Met、Ile、Phe、Val、Trp、Arg、Tyr、Thr、Lys、His、Ala、Asn、Gln、Ser、Pro のうち任意のアミノ酸残基、Dnpは 2 , 4 - ジニトロフェニルを示す）、

- ・Nma-Phe-His-Lys(Dnp)-OH（ここに、NamおよびDnpは前記と同様）、

- ・Cbz (カルボベンゾキシ) -Phe-Tyr、Z (ベンジルオキシカルボニル) -Ala-Xaa（ここに、Xaaは Arg、His、Trp、Tyr、Phe、Ile、Ala、Val、Ser、Met、Asn、Glu、Gly のうち任意のアミノ酸残基）、

- ・Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa (N3-(2,4-ジニトロフェニル)-L-2,3-ジアミノプロピオニル) -Ala-Ala-Trp、

- ・Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa-Ala-Ala-Trp、および

- ・Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa-Ala-Ala-Trp、

のうち、少なくとも 1 つのペプチドの C 末端アミノ酸残基を 1 残基切断する活性を有している、請求項 7 記載のポリペプチド。

#### 【請求項 9】

アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドが、配列番号 7 記載のアミノ酸配列を有するペプチドの C 末端アミノ酸残基を 1 残基切断する活性を有している、請求項 7 または 8 記載のポリペプチド。

#### 【請求項 10】

糖鎖を有していない、請求項 7 から 9 のいずれか記載のポリペプチド。

#### 【請求項 11】

可溶性である、請求項 7 から 10 のいずれか記載のポリペプチド。

#### 【請求項 12】

以下のの中から選ばれる少なくとも 1 つである、請求項 7 から 11 のいずれか記載のポリペプチド：

- 1) 配列番号 2 0 記載のアミノ酸配列を有する B S - C A P、

- 2) 配列番号 2 0 記載のアミノ酸配列を有する B S - C A P において、1 または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位を有するアミノ酸配列であって、アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有する B S - C A P 变異体、

- 3) 配列番号 2 4 記載のアミノ酸配列を有する B A - C A P、

- 4) 配列番号 2 4 記載のアミノ酸配列を有する B A - C A P において、1 または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位を有するアミノ酸配列であって、アンジオテンシン変換酵素 2 活性を有する B A - C A P 变異体。

#### 【請求項 13】

請求項 7 から 12 のいずれか記載のポリペプチドをコードする核酸。

#### 【請求項 14】

以下の (a) ~ (f) のいずれかに記載の核酸：

(a) 配列番号 2 、 21 および 25 のいずれか記載の塩基配列からなる核酸、

( b ) 配列番号 2、21 および 25 のいずれか記載の塩基配列と同一性が 80 % 以上である塩基配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するタンパク質をコードする核酸、

( c ) 配列番号 2、21 および 25 のいずれか記載の塩基配列からなる核酸と相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するタンパク質をコードする核酸

( d ) 配列番号 1、20 および 24 のいずれか記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸、

( e ) 配列番号 1、20 および 24 のいずれか記載のアミノ酸配列と同一性が 80 % 以上であるアミノ酸配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するタンパク質をコードする核酸、および

( f ) 配列番号 1、20 および 24 のいずれか記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加および / または逆位されたアミノ酸配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するタンパク質をコードする核酸。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 記載の核酸を含有する組換えベクター。

【請求項 16】

請求項 15 記載の組換えベクターを含有する形質転換体。

【請求項 17】

原核微生物である、請求項 16 記載の形質転換体。

【請求項 18】

大腸菌である、請求項 17 記載の形質転換体。

【請求項 19】

請求項 16 から 18 のいずれか記載の形質転換体を培地に培養し、培養物からアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、請求項 7 から 12 のいずれか記載のポリペプチドを製造する方法。

【請求項 20】

請求項 13 または 14 記載の核酸を含有する、医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 20 記載の組換えベクターを含有する、医薬組成物。

【請求項 22】

高血圧、心不全、心組織線維化症、急性呼吸窮迫症候群または急性肺傷害、例えば酸吸引もしくは敗血症により誘発される重症急性肺損傷、肺水腫、または重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルス感染もしくはインフルエンザウイルス感染関連肺損傷および障害が原因となるものを処置または予防するための、請求項 20 または 21 記載の医薬組成物。

【請求項 23】

アンジオテンシン変換酵素 2 活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、

a ) 請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 変異体を請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 変異体の基質と接触させ、および基質の分解を検出し、それにより請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 変異体の活性を評価する段階、

b ) 請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 変異体を、ACE2 活性を調節し得る候補物質の存在下、請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 変異体の基質と接触させ、および基質の分解を検出し、それによ

り請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の活性を評価する段階、ならびに

c) 段階 a) および b) で評価された請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の活性を比較し、その結果、段階 a) で測定された活性が段階 b) で測定された活性と異なることにより、候補物質が請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の活性を調節することが示唆される段階、を含む方法。

#### 【請求項 24】

アンジオテンシン変換酵素 2 活性を向上させる物質をスクリーニングする方法であって、

a) 請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体を請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の基質と接触させ、および基質の分解を検出し、それにより請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の活性を評価する段階、

b) 請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体を、ACE2 活性を向上させ得る候補物質の存在下、請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の基質と接触させ、および基質の分解を検出し、それにより請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の活性を評価する段階、ならびに

c) 段階 a) および b) で評価された請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の活性を比較し、その結果、段階 b) で測定された活性が段階 a) で測定された活性よりも亢進している場合に、候補物質が請求項 7 から 12 のいずれか記載のアンジオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、または請求項 5 における B38-CAP もしくは B38-CAP 变異体の活性を向上させることが示唆される段階、

を含む方法。

#### 【請求項 25】

基質が、配列番号 6 から 8 および 10 から 17 記載のアミノ酸配列を有するペプチドおよびその变異体、ならびに

- Nam-Xaa-Pro-Lys(Dnp)-OH (ここに、Namは2-メチルアミノベンゾイル、XaaはLeu、Met、Ile、Phe、Val、Trp、Arg、Tyr、Thr、Lys、His、Ala、Asn、Gln、Ser、Proのうち任意のアミノ酸残基、Dnpは2,4-ジニトロフェニルを示す)、

- Nma-Phe-His-Lys(Dnp)-OH (ここに、NamおよびDnpは前記と同様)、

- Cbz (カルボベンゾキシ)-Phe-Tyr、Z(ベンジルオキシカルボニル)-Ala-Xaa (ここに、XaaはArg、His、Trp、Tyr、Phe、Ile、Ala、Val、Ser、Met、Asn、Glu、Glyのうち任意のアミノ酸残基)、

- Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa (N3-(2,4-ジニトロフェニル)-L-2,3-ジアミノプロピオニル)-Ala-Ala-Trp、

- Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa-Ala-Ala-Trp、および

- Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Ala-Ser-Gly-Lys-Dpa-Ala-Ala-Trp、

のうちの少なくとも 1 つである、請求項2\_3または2\_4記載の方法。

【請求項 2\_6】

アンジオテンシン変換酵素 2 活性を向上させ得る候補物質が、各種微生物、動物組織、動物細胞、植物組織、植物細胞、およびそれらの培養物および培養液、ならびに発酵食品、加工食品から得られる、請求項2\_3から2\_5のいずれか記載の方法。