

(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2006-500321

(P2006-500321A)

(43) 公表日 平成18年1月5日(2006.1.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/76 (2006.01)	C 0 7 K 14/76	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-503504 (P2004-503504) (86) (22) 出願日 平成15年5月8日 (2003.5.8) (85) 翻訳文提出日 平成16年12月15日 (2004.12.15) (86) 国際出願番号 PCT/IB2003/002366 (87) 国際公開番号 W02003/095490 (87) 国際公開日 平成15年11月20日 (2003.11.20) (31) 優先権主張番号 0210464.4 (32) 優先日 平成14年5月8日 (2002.5.8) (33) 優先権主張国 英国 (GB)	(71) 出願人 504339446 カタリナ・スヴァンボルイ スウェーデン国 S-222 29 ルンド. セントマンスガータン4 (74) 代理人 100091731 弁理士 高木 千嘉 (74) 代理人 100127926 弁理士 結田 純次 (74) 代理人 100105290 弁理士 三輪 昭次 (72) 発明者 カタリナ・スヴァンボルイ スウェーデン国 S-222 29 ルンド. セントマンスガータン4 Fターム(参考) 4C084 AA02 BA26 BA44 NA14 ZB26 最終頁に続く
---	---

(54) 【発明の名称】 α -ラクトアルブミン (H A M L E T) および補因子の活性複合体

(57) 【要約】

皮膚パピローマのようなパピローマの治療に用いる医薬品の製造における、H A M L E T (腫瘍細胞に致死的なヒト α -ラクトアルブミン) もしくは生物学的に活性なその改変体、または、これらのうちいずれかの生物学的に活性な断片から選択される、 α -ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体の使用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

パピローマの治療で使用するための医薬品の製造における、H A M L E T もしくは生物学的に活性なその改変体、または、これらのうちいずれかの生物学的に活性な断片から選択される、
- ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体の使用。

【請求項 2】

生物学的に活性な複合体は、アポフォールディング状態の
- ラクトアルブミンもしくは
- ラクトアルブミンの変異体、または、これらいずれかの断片、および、複合体を生物学的に活性な型に安定化する補因子を含み、
- ラクトアルブミンまたはその変異体の断片はいずれも、
ドメインと
ドメインとの境界面を形成する
- ラクトアルブミンの領域に対応する領域を含む、請求項 1 に記載の使用。

10

【請求項 3】

補因子は、シス C 1 8 : 1 : 9 もしくは C 1 8 : 1 : 1 1 脂肪酸、または、構造が類似した異なる脂肪酸である、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

生物学的に活性な複合体は、H A M L E T を含み、H A M L E T は、p H 4 . 6 で沈殿させた乳汁のカゼイン分画から単離すること、陰イオン交換およびゲルクロマトグラフィーの組み合わせで、または、C 1 8 : 1 脂肪酸で示されるヒトのミルクカゼイン由来の補因子の存在下で、
- ラクトアルブミンをイオン交換クロマトグラフィーで処理することのいずれかによって得られる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 5】

- ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体は、

(i) シス C 1 8 : 1 : 9 もしくは C 1 8 : 1 : 1 1 脂肪酸、または、構造が類似した異なる脂肪酸；および、

(ii) カルシウムイオンが除去された
- ラクトアルブミン、または、カルシウムイオンが除去された
- ラクトアルブミン変異体もしくは機能的なカルシウム結合部位を有さない
- ラクトアルブミン変異体；または、これらいずれかの断片を含み、断片はいずれも、
ドメインと
ドメインとの境界面を形成する
- ラクトアルブミンの領域に対応する領域を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 6】

生物学的に活性な複合体は、カルシウム結合部位が、カルシウムに対する親和性が減少するように、または、機能しないように改変された
- ラクトアルブミン変異体を含む、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

変異体は、ウシ
- ラクトアルブミンの K 7 9、D 8 2、D 8 4、D 8 7、および、D 8 8 と同等なアミノ酸のいずれか 1 箇所に突然変異を有する、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

改変体は、D 8 7 に、D 8 7 A 変異または D 8 7 N 変異を有する
- ラクトアルブミン変異体を含む、請求項 7 に記載の使用。

40

【請求項 9】

生物学的に活性な複合体は、
- ラクトアルブミンまたはその変異体の断片を含み、断片は、野生型タンパク質のアミノ酸 3 4 ~ 8 6 の全領域を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 10】

- ラクトアルブミンは、ヒトもしくはウシ
- ラクトアルブミン、または、これらいずれかの変異体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 11】

- ラクトアルブミンは、ヒト
- ラクトアルブミンである、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

50

- ラクトアルブミンは、S70R突然変異を含むウシ - ラクトアルブミン突然変異体である、請求項10に記載の使用。

【請求項13】

HAMLETもしくは生物学的に活性なその改変体、または、これらのうちいずれかの生物学的に活性な断片から選択される、 - ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体を、パピローマの治療を必要とする患者に投与することを含む、パピローマの治療方法。

【請求項14】

実質的に実施例に関連して以後記載される、請求項1に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、パピローマの治療方法、および、皮膚パピローマまたは疣贅のようなパピローマの治療のための医薬品の製造における生物学的に活性な複合体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

パピローマは、皮膚および粘膜表面の腫瘍であり、ヒトパピローマウイルス（HPV）で形質転換されたケラチノサイトによって形成される。ほとんどの皮膚病変は良性のままであるが、粘膜病変は、前ガン性であり、子宮頸癌が重要なHPV感染の続発症であり、毎年750,000を超える症例が報告されている。ほとんどの子宮頸癌が、限定された数のHPV型（HPV16および18）を含むが、皮膚パピローマは、このウイルス特異性を欠く。これらは、約130種の異なるHPV型のうち1またはそれ以上によって発症し、例えば足底疣贅、尋常性疣贅および扁平疣贅がある。免疫抑制された患者は、パピローマを発症させるリスクが高く、複数のHPV型を高い頻度で有する可能性がある。現在の治療としては、寒冷療法、搔爬、焼灼、局所的な殺ウイルス剤、レーザー、細胞分裂抑制薬、および、免疫活性化剤が挙げられる。子宮頸部のパピローマのためのHPVワクチンが開発されているが、未だに使用されていない。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

HAMLET（腫瘍細胞に致死的なヒト - ラクトアルブミン）（以前はMALとして知られる）は、アルファ - ラクトアルブミン（また、 - ラクトアルブミンと示される）の活性フォールディング変異体であり、健康な分化細胞ではなく形質転換細胞でアポトーシスを誘導する（M. Svensson等、（2000年）Proc Natl Acad Sci USA, 97, 4221~6）。HAMLETは、腫瘍細胞の表面に結合し、細胞質に転移し、細胞核中に蓄積され、そこでDNA断片化を引き起こすことがわかっている（M. Svensson等、（2000年）Proc Natl Acad Sci USA, 97, 4221~6）。乳汁、特にヒトの乳汁から得られたこのタイプの生物学的に活性な複合体、および、抗菌剤としてのそれらの使用は、例えばEP-0776214に説明されている。

30

【0004】

本願において、HAMLETおよびこのタイプの複合体が、パピローマ、特に皮膚パピローマの治療に有用であることが見出された。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明に従って、パピローマの治療で使用するための医薬品の製造における - ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体の使用が提供され、この - ラクトアルブミンは、HAMLETもしくは生物学的に活性なその改変体、もしくは、これらのうちいずれかの生物学的に活性な断片から選択される。

【0006】

本医薬品を用いて治療可能なパピローマとしては、上に列挙した血清型のいずれかのパ

50

ピローマが挙げられる。これらは、皮膚パピローマ、および、生殖器のパピローマを含む。

【0007】

本発明で用いられる用語「HAMLET」は、 α -ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体を意味し、これは、pH 4.6で沈殿させた乳汁のカゼイン分画から単離すること、EP-A-0776214の実施例で説明されたように、陰イオン交換とゲルクロマトグラフィーとの組み合わせ、または、WO99/26979に記載されたようなC18:1脂肪酸であることを特徴とするヒトのミルクカゼイン由来の補因子の存在下で α -ラクトアルブミンをイオン交換クロマトグラフィーで処理すること、のいずれかにより得ることができる。

10

【0008】

α -ラクトアルブミンは、様々な哺乳動物源、例えばヒト、ウシ、ヒツジおよびヤギの乳汁から得ることができるが、好ましくはヒトまたはウシの乳汁であり、最も好ましくはヒトの乳汁である。このタンパク質の組換え型もまた用いることができる。

【0009】

また、ヒト α -ラクトアルブミンのHAMLETへの変換において、その他の試薬、特にオレイン酸のような脂質が有用であることがわかっている。特に、これまでに、オレイン酸(C18:1:9シス)が、HAMLET生成に必要であることが報告されている(M. Svensson等, (2000年) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 4221~6)。さらに最近になって、その他の脂肪酸が、同様に補因子として作用する可能性があることがわかっている。 α -ラクトアルブミンのHAMLETへの変換に最適な補因子は、シスコンフォメーションで、9位または11位に二重結合を有するC18:1脂肪酸である。

20

【0010】

α -ラクトアルブミンは、4個の α -ヘリックス(残基1~34、86~123)と、4個のジスルフィド結合(61~77; 73~91; 28~111、および、6~120)で連結された逆平行シート(残基38~82)とを有する14.2 kDaの球状タンパク質である(K. R. Acharya等, (1991年) J Mol Biol, 221, 571~81)。 α -ラクトアルブミンの野生型コンフォメーションは、Asp82、Asp87およびAsp88のカルボキシレート側鎖、Lys79およびAsp84のカルボニルの酸素、および、2個の水分子が配位した、高い親和性のCa²⁺結合部位によって定義される(K. R. Acharya等, (1991年) J Mol Biol, 221, 571~81)。このタンパク質は、HAMLETにおいて、低いpHに晒されたりキレート化剤の存在によって強く結合したCa²⁺イオンが解離される際に観察されるいわゆるアポコンフォメーションをとる(D. A. Dolgikh等, (1981年) FEBS Lett, 136, 311~5; K. Kuwajima, (1996年) Faseb J, 10, 102~09)。

30

【0011】

生物学的に活性な複合体を形成するために、 α -ラクトアルブミンは、一般的に、コンフォメーション変化またはフォールディング変化と、脂質補因子の存在の両方を必要とする。コンフォメーション変化は、 α -ラクトアルブミンからカルシウムイオンを除去することによって適切に影響を受ける。好ましい実施形態において、これは、機能的なカルシウム結合部位を有さない α -ラクトアルブミン変異体を用いることによって適切に促進できる。

40

【0012】

このような変異体を含む生物学的に活性な複合体は、本発明で用いられるHAMLETの用語「改変体」に含まれる。しかしながら、本出願人等は、複合体が一度形成されれば、機能的なカルシウム結合部位の存在、および/または、カルシウムの存在は、複合体の安定性または生物学的活性に影響を与えないことを見出した。生物学的に活性な複合体は、活性を失うことなくカルシウムに対する親和性を保持しつづけることがわかった。それ

50

ゆえに、本発明の複合体は、カルシウムイオンをさらに含んでもよい。

【0013】

従って、特に、本発明は、生物学的に活性な複合体を用い、この複合体は、アポフォルディング状態の - ラクトアルブミンもしくは - ラクトアルブミンの変異体、または、これらいずれかの断片、および、複合体を生物学的に活性な型に安定化する補因子を含み、 - ラクトアルブミンまたはそれらの変異体のあらゆる断片が、ドメインとドメインとの境界面を形成する - ラクトアルブミンの領域に対応する領域を含む。

【0014】

適切には、補因子は、シスC18:1:9もしくはC18:1:11脂肪酸、または、構造が類似した異なる脂肪酸である。

【0015】

特定の有用な実施形態において、本発明で用いられる生物学的に活性な複合体は、

(i) シスC18:1:9もしくはC18:1:11脂肪酸、または、構造が類似した異なる脂肪酸；および、

(ii) カルシウムイオンが除去された - ラクトアルブミン、または、カルシウムイオンが除去された - ラクトアルブミン変異体もしくは機能的なカルシウム結合部位を有さない - ラクトアルブミン変異体；または、これらいずれかの断片を含み、あらゆる断片が、ドメインとドメインとの境界面を形成する - ラクトアルブミンの領域に対応する領域を含む。

【0016】

本発明で用いられる表現「変異体」は、基礎となるタンパク質に相同な、適切なヒトまたはウシ - ラクトアルブミンであるが、基礎となるタンパク質が生成される塩基配列とは異なり、その配列中の1またはそれ以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたポリペプチドまたはタンパク質を意味する。アミノ酸置換は、アミノ酸が、概して類似した特性を有する異なるアミノ酸で置換されている「保存的」な置換とみなしてよい。非保存的な置換とは、アミノ酸が、異なるタイプのアミノ酸で置換されていることである。大まかに言えば、多くの非保存的な置換が、ポリペプチドの生物学的活性を変化させる可能性があると考えられる。適切な変異体は、少なくとも60%同一、好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは80%、または、85%同一であり、特に好ましくは90%、95%、または、98%同一であり、または、それ以上の同一性を有し得る。

【0017】

同一性の度合いを測定するためにアミノ酸配列を比較するには、BESTFITやGAP（いずれもウィスコンシン・ジェネティクス・コンピューター・グループ（GCG）のソフトウェアパッケージより）のようなプログラムがある。例えばBESTFITは、2つの配列を比較し、最も類似したセグメントの最適なアライメントを作製する。GAPは、配列をそれらの全長にそって並べることができ、いずれかの配列に必要な応じてスペースを挿入することにより最適なアライメントを見出す。配列の同一性を考察する際、本発明に関して適切には、全長にそった配列アライメントにより比較を行う。

【0018】

用語「それらの断片」は、完全な - ラクトアルブミンアミノ酸配列を含む複合体と類似の活性を有する複合体を形成し得る所定のアミノ酸配列のあらゆる部分を意味する。断片は、完全長タンパク質からの2以上の部分を一緒に結合したものを含んでもよい。このような部分は、適切には、基礎となる配列からの、少なくとも5個、好ましくは少なくとも10個の連続したアミノ酸を含み得る。適切な断片は、適切には、長さが少なくとも20個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも100個のアミノ酸を含む欠失突然変異体であり得る。欠失突然変異体は、上記タンパク質からの小さい領域、または、それらの組み合わせを含む。

【0019】

ドメインとドメインとの境界面を形成する領域は、ヒト - ラクトアルブミンにおいて、構造中、アミノ酸34~38および82~86に定められる。従って、適切な断片

10

20

30

40

50

は、これら領域を含む可能性があり、好ましくは天然型タンパク質のアミノ酸34～86の全領域を含む。

【0020】

特に好ましい実施形態において、生物学的に活性な複合体は、カルシウム結合部位が、カルシウムに対する親和性が減少するように、または、機能しないように改変された - ラクトアルブミンの変異体を含む。

【0021】

ウシ - ラクトアルブミンにおいて、カルシウム結合部位は、残基K79、D82、D84、D87、および、D88が配位していることがわかっている。従って、例えば1またはそれ以上の酸性残基を除去することにより、非ウシ - ラクトアルブミンにおけるこの部位またはそれと同等の部位を改変すれば、この部位のカルシウムに対する親和性を減少させることができ、または、機能を完全に失わせることができ、このタイプの突然変異体は、本発明の好ましい形態である。

10

【0022】

ウシ - ラクトアルブミンの Ca^{2+} 結合部位は、 3_{10} ヘリックスとヘリックスとからなり、2つのヘリックスを分ける短いターン領域を有する(Acharya K. R. 等, (1991年) J Mol Biol 221, 571~581)。この結合部位には、2個のジスルフィド架橋が両側にあり、それにより分子のこの部分がほとんど動かないようにしている。 Ca^{2+} を配位させる7個の酸素のうち5個の基は、Asp82、87および88のカルボキシレート側鎖、または、Lys79およびAsp84のカルボニルの酸素に起因する。2個の水分子は、残りの2個の酸素を供給する(Acharya K. R. 等, (1991年) J Mol Biol 221, 571~581)。

20

【0023】

これまでに、87位のアスパラギン酸のアラニンへの部位特異的変異誘発(D87A)が、強固なカルシウム結合部位を不活性化することが示されており(Anderson P. J. 等, (1997年) Biochemistry 36, 11648~11654)、突然変異タンパク質はアポコンフォメーションをとる。

【0024】

それゆえに、特定の実施形態において、ウシ - ラクトアルブミンタンパク質配列中のアミノ酸第87位のアスパラギン酸残基が、非酸性残基、特に非極性または極性非電荷側鎖に変異する。

30

【0025】

非極性側鎖としては、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、または、システインが挙げられる。特に好ましい例はアラニンである。

【0026】

極性非電荷側鎖としては、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、または、チロシンが挙げられる。

【0027】

突然変異タンパク質の構造的な歪みを最小限にするために、D87はまた、アスパラギン(N)で置換されており(Permyakov S. E. 等, (2001年) Proteins Eng 14, 785~789)、これは、カルボキシレート基の補われていない負電荷を欠くが、同じ側鎖の容積と配置を有する。この突然変異タンパク質(D87N)は、低い親和性($K_{\text{Ca}}^{2+} \times 10^5 \text{M}^{-1}$)でカルシウムと結合することが示された(Permyakov S. E. 等, (2001年) Proteins Eng 14, 785~789)。このような突然変異体は、本発明のさらに好ましい実施形態において、生物学的に活性な複合体の要素を形成する。

40

【0028】

従って、本発明の複合体において使用するのに特に好ましい変異体は、 - ラクトアルブミンのD87AおよびD87N変異体、または、この突然変異を含む断片である。

50

【0029】

本分子のこの領域は、ウシタンパク質とヒトタンパク質とでは異なり、すなわち、ウシ - ラクトアルブミンにおいては、3つの塩基性アミノ酸のうち1つが(R70)がS70に変わっており、従って1つの配位側鎖が除去されている。それゆえに、本発明の複合体にウシ - ラクトアルブミンを使用する場合、S70R突然変異体を使用することが好ましいといえる。

【0030】

Ca²⁺結合部位は、様々な種からの - ラクトアルブミンにおいて100%保存されており(Acharya K. R. 等, (1991年) J Mol Biol 221, 571~581)、このタンパク質に関するこの機能の重要性を物語っている。Ca²⁺結合部位は、5個の異なるアミノ酸と、2個の水分子が配位している。最初に、D87のカルボキシレート側鎖が、D88と共に、カルシウムイオンをカチオン結合領域にドッキングさせ、内部の水素結合が形成され、構造を安定化する(Anderson P. J. 等, (1997年) Biochemistry 36, 11648~11654)。D87またはD88のいずれかがないと、Ca²⁺結合が損なわれ、分子が部分的にアンフォールドした状態で安定化されることが示された(Anderson P. J. 等, (1997年) Biochemistry 36, 11648~11654)。

【0031】

さらに、ウシ - ラクトアルブミンのカルシウム結合部位に2つの異なる点突然変異を有する突然変異タンパク質を使用してもよい。例えば、87位のアスパラギン酸のアラニンへの置換(D87A)は、総じてカルシウム結合を行わず、タンパク質の三次構造を崩壊させることがわかった。アスパラギン酸をアスパラギンで置換した場合、そのタンパク質(D87N)は、カルシウムを結合させたままであり(ただしより低い親和性で)、三次構造の崩壊を示したが、D87A突然変異体でみられるほど著しくはなかった(Permyakov S. E. 等, (2001年) Proteins Eng 14, 785~789)。これら突然変異タンパク質は、充填容積において最小限の変化しか示さなかったが、これは、いずれのアミノ酸も同じ平均容積125³を有し、アスパラギンのカルボキシレート側鎖がタンパク質にカルシウムを配位させる(ただし非効率的に)ためである(Permyakov S. E. 等, (2001年) Proteins Eng 14, 785~789)。いずれの突然変異タンパク質も、生理学的な温度でアポコンフォメーションで安定であったが、このコンフォメーション変化にも関わらず、これらは生物学的に不活性であった。従って、アポコンフォメーションへのコンフォメーション変化だけでは、生物学的活性を誘導するには不十分であることがわかる。

【0032】

- ラクトアルブミンの構造は、当業界で既知であり、本発明において述べられた残基の正確なアミノ酸のナンバリングは、例えば上述のAnderson等や上述のPermyakov等で示された構造を参照することにより確認することができる。

【0033】

本発明に従って製造される医薬品は、適切には、局所的な使用に適した形態の、例えばクリーム、軟膏、ゲル、または、水性または油性の溶液もしくは懸濁液としての医薬組成物である。これらは、製薬上許容できる一般的に知られたキャリアー、充填剤、および/または添加剤を含んでもよい。

【0034】

局所用溶液またはクリームは、適切には、タンパク質複合体のための乳化剤を、希釈剤またはクリーム基材と共にを含む。このような製剤は、パピローマに直接的に塗布することができる。

【0035】

活性化化合物の一日量は、標準的な臨床の実践に従って、患者や治療しようとするパピローマの性質などによって様々である。一般的な規則として、生物学的に活性な複合体は、局所投与で2~200mg/用量で用いられる。

10

20

30

40

50

【0036】

本出願人等は、免疫応答可能な患者と免疫抑制患者の皮膚パピローマで、パピローマへの局所的H A M L E T処置の効果に関する3種の試験を行った。第一の試験は、二重盲検でプラセボ対照試験であり、プラセボ溶液(0.15 M NaCl)、または、H A M L E T(10 mg/ml, 0.7 mM, NaCl溶液中)のいずれかを42人の患者に投与することによって行われた。1日1回、3週間、1滴の物質をパピローマに局所的に塗布し、治療期間中、週1回、パピローマを測定し、撮影した。観察は、治療が終了した後1~2ヶ月の間、継続した。全ての患者は、第二のオープンH A M L E T試験を同じ期間継続し、観察は、治療が終了した後1ヶ月継続した。第三のオープン試験は、1.8 mM(25 mg/ml) H A M L E Tを用いて行われた。パピローマ容量が75%以上減少すると、有効な治療と定義した。

10

【0037】

以下で詳述するが、プラセボ対照試験において、H A M L E T 0.7 mM(10 mg/ml)は、H A M L E T摂取患者(88/92パピローマ)の100%(20/20)において有効を示し($p < 0.001$)、一方で、プラセボ摂取患者(15/79パピローマ)の15%(3/20)において有効を示した。H A M L E T摂取患者(19/92パピローマ)の45%(9/20)、および、プラセボ摂取患者(11/74パピローマ)の15%(3/20)において、治療期間中または治療の1ヶ月後にパピローマが完全に消失した。第二のオープンH A M L E T試験では、患者の68%(23/34)において有効が観察された($p < 0.001$)。患者の29%(10/34)のパピローマが、治療期間中または治療の1ヵ月後に完全に消失した(18/139)。1.8 mM(25 mg/ml) H A M L E Tを用いた第三のオープン試験において、患者の70%(7/10)、および、それらのパピローマの66%(21/32)において有効が示された($p < 0.001$)。患者の10%(1/10)のパピローマが、治療期間中または治療の1ヵ月後に完全に消失した(1/32)。逆の反応はみられなかった。

20

【0038】

免疫系の状態がH A M L E T治療に影響があるかどうかを試験するために、免疫応答可能な患者および免疫抑制(免疫非応答)患者を試験に用いた。これらのグループ間での応答における有意差はみられなかった($p < 0.001$)。同様に、H A M L E Tの効果は、患者の性には依存しなかった。

30

【0039】

従って、H A M L E Tは、極めて有益なパピローマ治療であることが明白に示された。

【0040】

本発明のさらなる形態において、パピローマの治療方法が提供され、本方法は、H A M L E Tもしくは生物学的に活性なその改変体、もしくは、これらのうちいずれかの生物学的に活性な断片から選択される、 α -ラクトアルブミンの生物学的に活性な複合体を、それを必要とする患者に投与することを含む。

【0041】

生物学的に活性な複合体の好ましい例は上で説明した通りである。好ましくは生物学的に活性な複合体は、局所用組成物の形態(上で説明した通り)で投与される。

40

【実施例】

【0042】

材料および方法物質の製造と患者のランダム化

母乳のドナーは非喫煙者であり、H A M L E T製造の前にH I Vに関してスクリーニングされた。硫酸アンモニウム沈殿、続いてフェニル-セファロースクロマトグラフィー、および、サイズ排除クロマトグラフィーによって、 α -ラクトアルブミンをヒトの乳汁から精製した。未熟児への投与に関する規則に従って、病院の乳汁バンクからの過剰の乳汁を用いた。文献で説明されたようにオレイン酸で調製したイオン交換クロマトグラフィーカラムで、野生型 α -ラクトアルブミンからH A M L E Tを得た。溶出分画を蒸留水に対

50

して透析し、凍結乾燥し、-20℃で保存した。

さらに、H A M L E Tを細菌のコンタミネーションに関してスクリーニングし、乾燥物質として-20℃で保存した。

【0043】

患者

難治性のパピローマの病歴を有する患者を、局所的H A M L E T治療のプラセボ対照試験に用いた。大多数が免疫応答性であり($n = 31$)、その他の病気には罹っていなかった。11人の患者は、臓器移植($n = 7$)、全身性エリテマトーデス($n = 1$)、または、シェーグレン症候群($n = 1$)後の免疫抑制であり、および、2人は、低-グロブリン血症を有していた。

10

【0044】

平均年齢22.5歳(6~60の範囲)の27人の女性(64%)、および、15人の男性(36%)が参加した。ほとんどの病変は、サリチル酸または寒冷療法に対して反応を示さなかった。診断は、経験を積んだ皮膚科医による目視検査に基づく。対象となるパピローマ($n = 173$)は、結節性または扁平であり、手、前腕または足に局在していた。ほとんどの患者は、複数の病変を有していた(平均 $n = 4$, 1~9の範囲)。

【0045】

患者をH A M L E Tグループまたはプラセボグループにランダム化した。登録時、(治療期間の)3週間の間毎週、および治療が完了した1ヶ月後、パピローマは、検査、測定、撮影された。1滴のH A M L E Tまたはプラセボ(0.15M NaCl)を、1日1回、局所的に障害に塗布し、障害をコムフィール(Comfeel^(R)) (コロプラスト(Coloplast) AB, スウェーデン)とマイクロポアテープ(Micropore tape) (3Mヘルスケア, ミネソタ州, 米国)で覆った。治療期間中に病変を切り取ったりひっかいたりした患者は分析からはずした。全ての患者において試験が完了した際に、コードは破棄した。

20

【0046】

分析

スチューデントのt検定とChi²検定でグループを比較した。

【0047】

結果:

30

H A M L E Tはパピローマに対して治療効果を有する

プラセボ対照試験において、H A M L E Tは、パピローマに顕著な効果を示した。H A M L E Tの局所塗布は、プラセボ対照グループと比べて、皮膚パピローマ容量の顕著な減少を示した。その効果は、治療完了後の1ヶ月以内に記録された最も低い病変容量として評価された。全てのH A M L E T処置患者は、病変容量の減少を示し、結果的な平均残存容量は14%(0~33%の範囲)であった。全てのH A M L E T処置患者(20/20患者)で、および、それらの病変の96%(88/92)で、75%以上の減少が記録された。1以上の病変の完全な消失が患者の15%(3/20)において、および、彼等の病変の21%において、記録された。

【0048】

40

それに対して、プラセボ対照グループにおいては、病変容量の顕著な減少は記録されなかった。平均残存病変容量は、81%(0~74%の範囲)であり、病変の20%(15/74)において75%以上の減少が記録された。1以上の病変の完全な消失が患者の15%(3/20)において、および病変の15%(11/74)において、観察された。

【0049】

H A M L E Tの効果は、患者の性および免疫状態に非依存적であった。H A M L E Tを摂取した4人の免疫抑制患者は、病変の大きさの顕著な減少を示し(75%以上)、そのうち3人において、少なくとも1の病変が消失した。それに対して、プラセボグループの5人の免疫抑制患者は、病変の大きさの減少は示さなかった。H A M L E Tは、全ての女性および男性において顕著な減少を引き起こし、一方、14人の女性のうち8人、および

50

、6人の男性のうち1人において完全な消失が観察された。

【0050】

H A M L E Tの効果はまた、位置および病変の特徴に非依存적であった。H A M L E T治療は、96% (76 / 79) において結節性病変の病変容量を75%以上減少させ、24% (19 / 79) において消失させた。同様に、H A M L E T治療は、92% (12 / 13) において扁平パピローマの容量を減少させたが、消失させなかった。手の病変容量は、97% (66 / 68) において顕著に減少し、24% (16 / 68) において病変が消失した。同様に、足の病変は、92% (22 / 24) において減少し、13% (3 / 24) において病変が消失した。

【0051】

10

さらなるオープン試験

上記と同じプロトコルを用いたオープン試験に、10人の新しい患者を補充した。5人の患者は免疫応答性であり、残りの5人は免疫抑制であった。8人が女性 (80%) であり、2人が男性 (20%) であり、平均年齢は47歳 (11 ~ 57の範囲) であった。含まれるパピローマ (n = 32) は、結節性 (n = 27) または扁平であり、手 (n = 27) または足に存在していた。ほとんどの患者は、複数の病変を有していた (平均 n = 3, 1 ~ 7の範囲)。

【0052】

この試験においてH A M L E Tの効果を記録した。患者は、1.8 mM H A M L E Tを投与された。これにより、患者の7 / 10、および、それらの病変の66% (21 / 32) において、病変容量の顕著な減少が引き起こされた。患者の10% (1 / 10)、全ての病変の3% (1 / 32) において、少なくとも1の病変が完全に消失した。

20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PC 'B 03/02366												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/76 A23L1/305 A23J1/20 A23J3/08 A61K38/38 A61K47/12 //A61K35/20														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A23L A23J A61K														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, EPO-Internal, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SVANBORG CATHARINA ET AL: "HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism--cellular, molecular, and therapeutic aspects." ADVANCES IN CANCER RESEARCH. UNITED STATES 2003, vol. 88, 2003, pages 1-29, XP002254552 ISSN: 0065-230X page 18 -page 20</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>M. SVENSSON ET AL: "Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis" PNAS, vol. 97, no. 8, 11 April 2000 (2000-04-11), pages 4221-4226, XP002254553 figures 1-4</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td></td> <td>--- -/--</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	SVANBORG CATHARINA ET AL: "HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism--cellular, molecular, and therapeutic aspects." ADVANCES IN CANCER RESEARCH. UNITED STATES 2003, vol. 88, 2003, pages 1-29, XP002254552 ISSN: 0065-230X page 18 -page 20	1-14	X	M. SVENSSON ET AL: "Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis" PNAS, vol. 97, no. 8, 11 April 2000 (2000-04-11), pages 4221-4226, XP002254553 figures 1-4	1-14		--- -/--	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	SVANBORG CATHARINA ET AL: "HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism--cellular, molecular, and therapeutic aspects." ADVANCES IN CANCER RESEARCH. UNITED STATES 2003, vol. 88, 2003, pages 1-29, XP002254552 ISSN: 0065-230X page 18 -page 20	1-14												
X	M. SVENSSON ET AL: "Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis" PNAS, vol. 97, no. 8, 11 April 2000 (2000-04-11), pages 4221-4226, XP002254553 figures 1-4	1-14												
	--- -/--													
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 17 September 2003		Date of mailing of the international search report 15. 10. 2003												
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer FERNANDO FARIETA /EÖ												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC B 03/02366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KÖHLER C ET AL: "A folding variant of human alpha-lactalbumin induces mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS. GERMANY JAN 2001, vol. 268, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 186-191, XP002254554 ISSN: 0014-2956 page 188 last paragraph ---	1-14
X	WO 99 26979 A (HAAKANSSON PER ANDERS ;SVENSSON MALIN WILHELMINA (SE); SVANBORG CA) 3 June 1999 (1999-06-03) claim 44 ---	1-14
Y	WO 99 27967 A (HAKANSSON PER ANDERS ;SVANBORG CATHARINA (SE)) 10 June 1999 (1999-06-10) claims 1-19 ---	1-14
Y	POLVERINO DE LAURETO PATRIZIA ET AL: "Molten globule of bovine alpha-lactalbumin at neutral pH induced by heat, trifluoroethanol, and oleic acid: a comparative analysis by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis." PROTEINS. UNITED STATES 15 NOV 2002, vol. 49, no. 3, 15 November 2002 (2002-11-15), pages 385-397, XP002254555 ISSN: 1097-0134 figure 8 ---	1-14
A	WO 01 77137 A (HASELTINE WILLIAM A ;HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); ROSEN CRAIG A) 18 October 2001 (2001-10-18) claims 1-36 ---	1-14
A	SVENSSON MALIN ET AL: "Hamlet--a complex from human milk that induces apoptosis in tumor cells but spares healthy cells." ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY. UNITED STATES 2002, vol. 503, 2002, pages 125-132, XP002254556 ISSN: 0065-2598 page 127 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational application No.
PCT/18 03/02366

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 14
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB 03/02366

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 13

Claim 13 relates to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy or diagnostic methods practised on the human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)). Nevertheless, a search has been executed for this claim. The search has been based on the alleged effects of the compounds or compositions.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 14

According to Article 6 PCT the claim or claims shall define the matter for which protection is sought and the claims shall be clear and concise. Simply referring to "hereinbefore" of previous claims or "with reference to the example" described in the application is not considered clear and concise. Claim 14 have only been searched for subject matter covering by claim 1.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC B 03/02366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9926979	A	03-06-1999	AU 1254199 A 15-06-1999
		EP 1032596 A1 06-09-2000	
		WO 9926979 A1 03-06-1999	
		JP 2001524491 T 04-12-2001	
WO 9927967	A	10-06-1999	AU 1171099 A 16-06-1999
		EP 1032426 A1 06-09-2000	
		WO 9927967 A1 10-06-1999	
		JP 2001524535 T 04-12-2001	
WO 0177137	A	18-10-2001	AU 5906301 A 30-10-2001
		AU 5906601 A 30-10-2001	
		AU 6102401 A 30-10-2001	
		AU 6294201 A 30-10-2001	
		AU 6456301 A 30-10-2001	
		AU 6655701 A 23-10-2001	
		AU 7480901 A 30-10-2001	
		CA 2405525 A1 25-10-2001	
		CA 2405550 A1 25-10-2001	
		CA 2405557 A1 25-10-2001	
		CA 2405563 A1 25-10-2001	
		CA 2405701 A1 25-10-2001	
		CA 2405709 A1 25-10-2001	
		CA 2405912 A1 18-10-2001	
		EP 1274719 A2 15-01-2003	
		EP 1274720 A1 15-01-2003	
		EP 1278767 A1 29-01-2003	
		EP 1276856 A1 22-01-2003	
		EP 1276849 A2 22-01-2003	
		EP 1278544 A2 29-01-2003	
		EP 1276756 A1 22-01-2003	
		WO 0179442 A2 25-10-2001	
		WO 0179443 A2 25-10-2001	
		WO 0177137 A1 18-10-2001	
		WO 0179480 A1 25-10-2001	
		WO 0179258 A1 25-10-2001	
		WO 0179271 A1 25-10-2001	
		WO 0179444 A2 25-10-2001	
		US 2003125247 A1 03-07-2003	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA40 BA55 CA40 DA70 EA20 FA50 GA23