

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6718375号
(P6718375)

(45) 発行日 令和2年7月8日(2020.7.8)

(24) 登録日 令和2年6月16日(2020.6.16)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 P 31/04	(2006.01) A 61 P 31/04
A 61 P 31/10	(2006.01) A 61 P 31/10
A 61 P 31/12	(2006.01) A 61 P 31/12
A 61 K 38/48	(2006.01) A 61 K 38/48 100
A 61 K 38/17	(2006.01) A 61 K 38/17

請求項の数 14 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-549436 (P2016-549436)
(86) (22) 出願日	平成27年1月29日 (2015.1.29)
(65) 公表番号	特表2017-505624 (P2017-505624A)
(43) 公表日	平成29年2月23日 (2017.2.23)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2015/050212
(87) 國際公開番号	W02015/114343
(87) 國際公開日	平成27年8月6日 (2015.8.6)
審査請求日	平成30年1月25日 (2018.1.25)
(31) 優先権主張番号	1401480.7
(32) 優先日	平成26年1月29日 (2014.1.29)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國 (GB)
(31) 優先権主張番号	1405784.8
(32) 優先日	平成26年3月31日 (2014.3.31)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國 (GB)

(73) 特許権者	516227593 エンツィマティカ アクティエ ボラ ーグ スウェーデン王国, エス-223 70 ルンド, イデオン サイエンス パーク
(74) 代理人	110001416 特許業務法人 信栄特許事務所
(72) 発明者	クラルスンド, マツィ ピアテル スウェーデン王国, エス-22651 ル ンド, ボンペーゲン 20
(72) 発明者	ブローム, ウルフ トマス スウェーデン王国, エス-24633 レ ッドコッピング, ラントベーゲン 44
審査官	坂井田 京

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規治療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫不全症を罹患している被験者における、微生物感染症の治療又は防止用組成物であつて、

プロテアーゼ活性を有するポリペプチドを含み、

前記ポリペプチドがタイセイヨウダラ (*Gadus morhua*) 由来のトリプシンである、微生物感染症の治療又は防止用組成物。

【請求項 2】

前記免疫不全症が、続発性又は後天性免疫不全症である、請求項 1 に記載の微生物感染症の治療又は防止用組成物。

【請求項 3】

前記被験者が原発性免疫不全症を有する、請求項 1 又は 2 に記載の微生物感染症の治療又は防止用組成物。

【請求項 4】

前記被験者が、T 細胞及び B 細胞の複合免疫不全症、抗体欠損症、ウィスコット・アルドリッヂ症候群、毛細血管拡張性運動失調症、運動失調様症候群、ナイミー・ヘン染色体不安定症候群、ブルーム症候群、ディ・ジョージ症候群（胸腺欠損に随伴する場合）、軟骨・毛髪形成不全症、シムケ症候群、ヘルマンスキー・パドラック症候群 2 型、高 Ig E 症候群、慢性粘膜皮膚カンジダ症、免疫不全を伴う肝静脈閉塞症 (VODI)、XL - 先天性角化異常症 (ホイエラール・レイダーソン症候群)、免疫調節異常の疾患、食細胞の数

10

20

及び / 又は機能の先天性欠損症、先天性免疫における欠損症、自己炎症性疾患、及び補体欠損症からなる群より選択される原発性免疫不全症を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の微生物感染症の治療又は防止用組成物。

【請求項 5】

前記微生物感染症が、
口腔及び / 又は咽頭の二次感染、
鼻漏、口腔の真菌感染症及び / 又は歯茎炎症、
細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、及び酵母感染症、
からなる群より選択される微生物感染症である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の微生物感染症の治療又は防止用組成物。 10

【請求項 6】

前記ポリペプチドが、タイセイヨウダラ由来のトリプシン I である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の微生物感染症の治療又は防止用組成物。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、配列番号 1 によるアミノ酸配列を含んでなるか又はそれから構成される、請求項 6 に記載の微生物感染症の治療又は防止用組成物。

【請求項 8】

前記微生物感染症の治療又は防止用組成物が、口腔及び / 又は咽頭の粘膜への送達に適した形態で提供される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の微生物感染症の治療又は防止用組成物。 20

【請求項 9】

免疫不全症を罹患している被験者における、微生物感染症の治療又は防止のための医薬の調製における、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項において定義された通りの微生物感染症の治療又は防止用組成物の使用。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、タイセイヨウダラ由来のトリプシン I である、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記微生物感染症の治療又は防止用組成物が口腔スプレー、鼻腔スプレー、ロゼンジ、香錠、チューインガム、又は液体で提供される、請求項 9 又は 10 に記載の使用。 30

【請求項 12】

前記被験者が原発性免疫不全症を有する、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 13】

前記被験者が、T 細胞及び B 細胞の複合免疫不全症、抗体欠損症、ウィスコット・アルドリッヂ症候群、毛細血管拡張性運動失調症、運動失調様症候群、ナイミー・ヘン染色体不安定症候群、ブルーム症候群、ディ・ジョージ症候群（胸腺欠損に随伴する場合）、軟骨・毛髪形成不全症、シムケ症候群、ヘルマンスキー・パドラック症候群 2 型、高 Ig E 症候群、慢性粘膜皮膚カンジダ症、免疫不全を伴う肝静脈閉塞症（VODI）、XL - 先天性角化異常症（ホイエラール・レイダーソン症候群）、免疫調節異常の疾患、食細胞の数及び / 又は機能の先天性欠損症、先天性免疫における欠損症、自己炎症性疾患、及び補体欠損症からなる群より選択される原発性免疫不全症を有する、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の使用。 40

【請求項 14】

前記微生物感染症が、
口腔及び / 又は咽頭の二次感染、
鼻漏、口腔の真菌感染症及び / 又は歯茎炎症、
細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、及び酵母感染症、
からなる群より選択される微生物感染症である、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の使用。 50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、免疫不全症を罹患しているか又はその感受性がある被験者における、微生物感染症の治療又は防止における使用のための、ポリペプチドを主成分とする薬剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

原発性免疫不全症（PIDD）は、免疫系の発生及び／又は機能性に本質的に影響を及ぼす、300を超える遺伝的疾患の多様なグループである。それらの大部分は稀な単一遺伝子疾患であるが、PIDDの範囲は、次世代シーケンシング技術と改善された臨床的認識による新たな免疫不全症候群の同定とともに、常に広がりつつある。患者は、古典的には感染症又は異常生物による感染に対し高い感受性を呈し、また自己免疫又は自己炎症性疾患及びリンパ網内系悪性腫瘍も発症し得る。最小の又は支持療法がこれらの症状の多くに有効ではあるが、最も重症なものには慢性の病的状態及び早期死亡を防止するための決定的な初期治療が必要である。

【0003】

殆どの原発性免疫不全症の発病率は、国家登録又は国民健康調査による報告がないという理由から、不確定である。合衆国では、500,000人のヒトが既知の原発性免疫不全症の1つを有し、約50,000の症例が毎年診断されている。原発性免疫不全症は、男性及び女性にほぼ等しく影響を及ぼすように見える。

【0004】

PIDDはまた、欧州では取組まれていない公衆衛生問題であり、同盟国内で推定2百万の小児及び成人が、診断されることなく、かつそれ故に治療を勧められることなく、再発性感染症を罹患している。

【0005】

以下を含む数多くの様々な治療方針が、原発性免疫不全症の管理のために開発されてきた：

(a) 静脈内免疫グロブリン（IVIg）

過去20年にわたり、静脈内投与免疫グロブリン（IVIg）が、無ガンマグロブリン血症の治療に使用してきた。この薬剤は現在、殆どの抗体欠損症のための標準治療である。最も一般的には、IVIGは、X連鎖無ガンマグロブリン血症、分類不能型免疫不全症、X連鎖高IgM、重症複合免疫不全症、ウィスコット・アルドリッヂ症候群、及び選択的IgGクラス欠損症の患者に使用される。

IVIgはまた、広く多様な他の病気において使用されるか、又は使用が考慮されている。結果として、その限られた利用可能性が懸念されている。

(b) 骨髄移植

HLA一致ドナーからの骨髄移植は、重症複合免疫不全症、ウィスコット・アルドリッヂ症候群、及びディ・ジョージ症候群などの、細胞性免疫不全症の患者における治療法となり得、かつ慢性肉芽腫性疾患の患者において有効であり得る。骨髄移植は現在、抗体欠損症の治療には全く役立たない。

HLA一致ドナーは、常に利用可能というわけではない。半合致ドナーからの骨髄移植では、長期生存率が低下し得る。したがって、遺伝子療法などの代替え戦略の研究が、さもなければ骨髄移植を要することになる原発性免疫不全症の患者の管理に有益となることも可能である。

(c) 抗生物質及び他の療法

再発性感染症が問題である場合、原発性免疫不全症の多くの患者は、抗生物質を単独で用いるか、又はIVIGとの併用で管理される。例えば、慢性肉芽腫性疾患の患者では、トリメトプリム・スルファメトキサゾール（Bactrim、Septra）を用いた予防療法が、重症感染症の発生率を50%まで低減する。同様に、補体欠損症のための治療は

10

20

30

40

50

、感染の防止を目指すものであり、被包性細菌のための抗生物質予防投与と免疫化とからなる（例えば、7価肺炎双球菌ワクチン、ヘモフィルスb結合型ワクチン、髄膜炎菌多糖体ワクチン）。

原発性免疫不全症のための他の治療法は、アデノシンデアミナーゼ欠損症（重症複合免疫不全症のサブタイプ）の患者における酵素補充、及び慢性肉芽腫性疾患の患者におけるサイトカイン療法を包含する。

【0006】

より最近では、原発性免疫不全症のための遺伝子療法においても進歩があった（例えば、非特許文献1参照）。

【0007】

10

しかしながら、原発性免疫不全症又は薬物誘発性免疫不全症などの免疫不全症の患者において微生物感染症を管理して、かかる患者の生活の質を改善するための、改良された療法がなお必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Rivatら、「Hum. Gene. Ther.」、2012年、第23巻、第7号、p. 668-675.

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

20

【0009】

本発明の第1の態様は、免疫不全症を罹患しているか又はその感受性がある被験者における、微生物感染症の治療又は防止における使用のための、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドを提供する。

【0010】

「プロテアーゼ」により本発明者らは、哺乳類（例えば、ヒト）の身体において、インビオでタンパク質分解を触媒することができる任意の酵素を包含する。したがって本発明においては、制限するものではないが、セリンプロテアーゼ（例えば、トリプシン／キモトリプシン）、スレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパルテートプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、及びメタロプロテアーゼを包含する、任意のタイプのプロテアーゼが利用され得る。

30

【0011】

「免疫不全症」により本発明者らは、それにおいて被験者の免疫疾患が全体的又は部分的に損なわれる状態を意味する。免疫不全症は、後天性又は続発性なもの、例えば、免疫抑制療法による処置に続くものであり得、或いは、原発性、例えば、それにおいて身体の免疫系の一部が欠如するか又は正常に機能しない自然発生的障害であり得る。したがって、1つの実施形態では、免疫不全症は続発性又は後天性免疫不全症である。

【0012】

40

例えば、被験者における免疫不全症は、免疫抑制療法（例えば、グルココルチコイド、細胞分裂抑制剤、抗体、イムノフィリンに作用する薬剤、インターフェロン、オピオイド、TNF結合タンパク質、ミコフェノレート、及び放射線療法）を用いた処置を受けたことから生じ得る。

【0013】

免疫抑制療法は、例えば：

(a) 移植された臓器及び組織（例えば、骨髄、心臓、腎臓、肝臓）の拒絶を防止するため；

(b) 自己免疫疾患又は自己免疫起源である疾患（例えば、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシス、巣状分節性糸球体硬化症、クローン病、ベーチェット病、天疱瘡、及び潰瘍性大腸炎）を治療するため；及び

(c) 他の非自己免疫炎症性疾患を治療するため（例えば、長期間アレルギー性喘息制御

50

)、

医学において一般的に使用される。

【0014】

さらなる実施形態においては、免疫不全症は自然発生的免疫不全症である。例えば、免疫不全症は、原発性免疫不全症（以下参照）、癌（例えば、白血病、リンパ腫、多発性骨髓腫）、慢性感染症（例えば、後天性免疫不全症候群、又はAIDS）、栄養不良、及び／又は加齢に起因し得る。

【0015】

原発性免疫不全症は、患者を感染に対しより感受性にする多様な疾患を包含する。未処置のまま放置された場合、これらの感染症は致死的となり得る。一般的な原発性免疫不全症は、液性免疫の疾患（B細胞分化又は抗体産生に影響を及ぼす）、T細胞欠損症並びに複合B及びT細胞欠損症、食細胞障害、及び補体欠損症を包含する。これらの障害の主要な徴候は、積極的治療の甲斐もない多重感染、異常又は日和見生物による感染、生育不全又は成長不良、及び家族歴陽性を包含する。初期の認識及び診断は、原発性免疫不全症の経過を有意に変更でき、かつ患者のアウトカムに対しポジティブな効果をもつ。

10

【0016】

1つの実施形態では、患者は、表I～VIIIに列記された徴候からなる群より選択される原発性免疫不全症を有する。

【0017】

表I

20

複合T及びB細胞免疫不全症

これらの障害では、Tリンパ球及びBリンパ球の双方が機能不全か、又は数が減少する。主に構成するのは、様々なタイプの重症複合免疫不全症（SCID）である。

1. T - / B + SCID（主にT細胞がない）：c欠損症、JAK3欠損症、インターロイキン7受容体鎖欠損症、CD45欠損症、CD3 / CD3欠損症。

2. T - / B - SCID（T及びB細胞の双方がない）：RAG1/2欠損症、DCLR E1C欠損症、アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症、細網異形成

3. オーメン症候群症

4. DNAリガーゼIV型欠損症

5. セルヌノス（Cernunnos）欠損症

30

6. CD40リガンド欠損症

7. CD40欠損症

8. プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）欠損症

9. CD3欠損症

10. CD8欠損症

11. ZAP-70欠損症

12. Ca++チャネル欠損症

13. MHCクラスI欠損症

14. MHCクラスII欠損症

15. ウィングドヘリックス欠損症

40

16. CD25欠損症

17. STAT5b欠損症

18.ltk欠損症

19. DCK8欠損症

【0018】

表II

主として抗体欠損症

原発性抗体欠損症では、1つ以上のアイソタイプの免疫グロブリンが減少するか、又は適切に機能しない。

1. B細胞がなく、結果として全てのタイプの抗体の深刻な減少を生じる：X連鎖無ガン

50

マグロプリン血症 (b t k 欠損症、又はブルトン型無ガンマグロプリン血症)、 μ 重鎖欠損症、IgM欠損症、IgG欠損症、B L N K 欠損症、免疫不全を伴う胸腺腫

2. B細胞は不足するも存在するか、又は2つ以上のアイソタイプ（通常はIgG及びIgA、時にIgM）における減少を除けば正常：分類不能型免疫不全症（CVID）、ICOS欠損症、CD19欠損症、TACI（TNFRSF13B）欠損症、BAFF受容体欠損症。

3. B細胞は正常数で、IgG及びIgAの減少とIgMの増加とを伴う：高IgM症候群

4. B細胞数は正常で、アイソタイプ又は軽鎖の欠損を伴う：重鎖欠損、カッパ鎖欠損、選択的IgGサブクラス欠損症、IgGサブクラスの欠損を伴うIgA欠損症、選択的免疫グロブリンA欠損症

5. 正常B細胞および正常Ig濃度を伴う、特異抗原に対する特異抗体の欠損症

6. 乳児一過性低ガンマグロブリン血症（THI）

【0019】

表III

他の充分に定義された免疫不全症候群

正式な分類からは漏れるが、特定の臨床又は免疫学的特徴から別 の方法で識別可能である多数の症候群。

1. ウィスコット・アルドリッチ症候群

2. 選択的SCIDを発生しないDNA修復欠損症：毛細血管拡張性運動失調症、運動失調様症候群、ナイミー・ヘン染色体不安定症候群、ブルーム症候群

3. ディ・ジョージ症候群（胸腺欠損に随伴する場合）

4. 種々の免疫性骨形成不全症（免疫上の問題による骨格の異常形成）：軟骨・毛髪形成不全症、シムケ症候群

5. ヘルマンスキー・パドラック症候群2型

6. 高IgE症候群

7. 慢性粘膜皮膚カンジダ症

8. 免疫不全を伴う肝静脈閉塞症（VODI）

9. XL-先天性角化異常症（ホイエラール・レイダーソン症候群）

【0020】

表IV

免疫調節異常の疾患

いくつかの症状においては、免疫系の部分の固有活性よりもむしろ調節が最も重要な問題である。

1. 色素沈着低下又は白化を伴う免疫不全症：チェディアック・東症候群、グリセリ症候群2型

2. 家族性血球貪食症候群：パーフォリン欠損症、MUNC13D欠損症、シンタキシン11欠損症

3. X連鎖リンパ球増殖症候群

4. 自己免疫を伴う症候群：

(a) 自己免疫性リンパ球増殖症候群：1a型（CD95欠損症）、1b型（Fasリガンド欠損症）、2a型（CASPR10欠損症）、2b型（CASPR8欠損症）

(b) APECED（カンジダ症及び外肺葉ジストロフィーを伴う自己免疫性多腺性内分泌不全症）

(c) IPEX（免疫調節異常 多腺性内分泌不全症 腸疾患 X連鎖症候群）

(d) CD25欠損症

【0021】

表V

食細胞の数、機能、又は双方の先天性欠損症

いくつかの症状においては、食細胞の数が低減されるか、又はその機能的能力が損なわ

10

30

40

50

れるかのいずれかである。

1 . 重症先天性好中球減少症 : E L A 2 欠損症に起因 (骨髓異形成を伴う)	
2 . 重症先天性好中球減少症 : G F I 1 欠損症に起因 (T / B リンパ球減少症を伴う)	
3 . コストマン症候群	
4 . 心臓及び泌尿生殖器奇形	
5 . 糖原病 1 b 型	
6 . 周期性好中球減少症	
7 . X 連鎖好中球減少症 / 骨髓異形成	
8 . P 1 4 欠損症	
9 . 白血球接着不全症 1 型	10
10 . 白血球接着不全症 2 型	
11 . 白血球接着不全症 3 型	
12 . R A C 2 欠損症 (好中球性免疫不全症候群)	
13 . ベータアクチン欠損症	
14 . 限局性若年性歯周炎	
15 . パピヨン・ルフェーブル症候群	
16 . 特異顆粒欠損症	
17 . シュワッハマン・ダイアモンド症候群	
18 . 慢性肉芽腫性疾患 : X 連鎖	
19 . 慢性肉芽腫性疾患 : 常染色体性 (C Y B A)	20
20 . 慢性肉芽腫性疾患 : 常染色体性 (N C F 1)	
21 . 慢性肉芽腫性疾患 : 常染色体性 (N C F 2)	
22 . I L - 1 2 及び I L - 2 3 1 鎮欠損症	
23 . I L - 1 2 p 4 0 欠損症	
24 . インターフェロン 受容体 1 欠損症	
25 . インターフェロン 受容体 2 欠損症	
26 . S T A T 1 欠損症 (2 形)	
27 . A D 高 I g E	
28 . A R 高 I g E	
29 . 肺胞タンパク症	30

【 0 0 2 2 】

表 V I

先天性免疫における欠損症

いくつかの稀な症状は、先天性免疫系における欠損症に起因する。これらの症状の多くは、皮膚の問題と関連している。

1 . 発汗減少性外肺葉性異形成	
(a) N E M O 欠損症	
(b) I K B A 欠損症	
2 . E D A - I D	
3 . I R A K - 4 欠損症	40
4 . M y D 8 8 欠損症	
5 . W H I M 症候群 (疣贅、低ガンマグロブリン血症、感染症、骨髓中好中球貯留)	
6 . 疣贅状表皮異形成	
7 . 単純ヘルペス脳炎	
8 . 慢性粘膜皮膚カンジダ症	
9 . トリパノソーマ症	

【 0 0 2 3 】

表 V I I

自己炎症性疾患

殆どの自己炎症性疾患は、感染症の素因となるよりもむしろ過度の炎症につながる。多 50

くが、周期性発熱症候群として発症する。

1. 家族性地中海熱
2. TNF受容体関連周期性症候群 (TRAPS)
3. 高IgD症候群 (HIDS)
4. C1AS1関連疾患：
 - (a) マックル・ウェルズ症候群
 - (b) 家族性低温自己炎症性症候群
 - (c) 新生児期発症多臓器炎症性疾患
5. PAPA症候群 (化膿性無菌性関節炎、壞疽性膿皮症、アクネ)
6. プラウ症候群 10
7. 慢性再発性多発性骨髄炎及び先天性赤血球形成異常性貧血 (マジード症候群)
8. DIRA (IL-1受容体アンタゴニストの欠損症)

【0024】

表VIII

補体欠損症

補体欠損症は感染症の素因となるが、また自己免疫状態の素因ともなる。

1. C1q欠損症 (全身性エリテマトーデス様証拠群、リウマチ性疾患、感染症)
2. C1r欠損症 (同上)
3. C1s欠損症
4. C4欠損症 (同上) 20
5. C2欠損症 (全身性エリテマトーデス様証拠群、血管炎、多発性筋炎、化膿性感染症)
6. C3欠損症 (再発性化膿性感染症)
7. C5欠損症 (ナイセリア感染症、SLE)
8. C6欠損症 (同上)
9. C7欠損症 (同上、血管炎)
10. C8a欠損症
11. C8b欠損症
12. C9欠損症 (ナイセリア感染症)
13. C1インヒビター欠損症 (遺伝性血管性浮腫) 30
14. I因子欠損症 (化膿性感染症)
15. H因子欠損症 (溶血性尿毒症症候群、膜増殖性糸球体腎炎)
16. D因子欠損症 (ナイセリア感染症)
17. プロペルジン欠損症 (ナイセリア感染症)
18. MBP欠損症 (化膿性感染症)
19. MASp2欠損症
20. 補体受容体3 (CR3) 欠損症
21. 膜補助因子タンパク質 (CD46) 欠損症
22. 膜攻撃複合体インヒビター (CD59) 欠損症
23. 発作性夜間欠色素尿症 40
24. フィコリン3欠損症を伴う免疫不全症

【0025】

当業者には、本発明のポリペプチドそれ自体が、原発性免疫不全症のための治療薬を提供するものではないことが理解されるであろう。むしろポリペプチドは、かかる疾患に関連した微生物感染症の1つ以上の症状を緩和するか又は防止しようとするものである。

【0026】

それ故、「治療」により本発明者らは、原発性免疫不全症の患者における、制限するものではないが細菌、ウイルス、及び真菌感染症を含む微生物感染症の症状の、部分的又は全体的な緩和を包含する。

【0027】

「防止」により本発明者らは、原発性免疫不全症の患者において微生物感染症の発症のリスクを低減することを包含する。しかしながら、かかる防止は絶対的なものではなく、即ち、微生物感染症を発生しているかかる患者の全てを防止し得るものではないことが理解されよう。したがって、用語「防止」及び「予防」は、区別なく使用される。

【0028】

1つの実施形態では、微生物感染症は、細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、及び酵母感染症からなる群より選択される。

【0029】

とりわけ、本発明のポリペプチドは、口腔及び／又は咽頭（例えば、中咽頭）の二次感染の治療又は防止において使用される。例えばポリペプチドは、鼻漏及び／又は口腔の真菌感染症及び／又は歯茎炎症の治療又は防止において使用され得る。10

【0030】

本発明のポリペプチドは、感染の定期的なエピソード（例えば、1年間に少なくとも5回の微生物感染症、例えば、1年間に少なくとも10回、15回、20回、30回以上の微生物感染症）に苦しむP.I.患者における、微生物感染症の治療又は防止において特に有用である。

【0031】

本発明のポリペプチドは、トリプシン活性を示し得る。「トリプシン活性」により本発明者らは、ポリペプチドが、トリプシン酵素（EC 3, 4, 21, 4）又は関連するペプチダーゼ（例えば、キモトリプシン酵素、EC 3, 4, 21, 1）の、ペプチダーゼ活性を示すことを意味する。20

【0032】

本発明のポリペプチドは、天然産か、又は非天然産であり得る。

【0033】

1つの実施形態では、ポリペプチドは直接又は間接的に、タイセイヨウダラ（*Gadus morhua*）、タイセイヨウ及びタイヘイヨウサケ（例えば、*Salmo salar* 及び *Oncorhynchus* 属の種）及びスケトウダラ（*Theragra chalcogramma*）などの魚から由来する。

【0034】

トリプシンの3つの主要なアイソザイムが、タイセイヨウタラから特性決定されており、トリプシンI、II、及びIIIと称される（*Asgeirsson et al.*, 「Eur. J. Biochem.」、1989年、第180巻、p. 85-94（その開示は参考として本明細書に援用される）を参照）。例えば、GenBank アクセション番号ACO90397参照。30

【0035】

加えて、タイセイヨウタラは、キモトリプシンA及びBと称される、キモトリプシンの2つの主要なアイソザイムを発現する（*Asgeirsson & Bjarnason*、「Comp. Biochem. Physiol. B」、1991年、第998巻、p. 327-335（その開示は参考として本明細書に援用される）を参照。例えば、GenBank アクセション番号CAA55242.1参照。40

【0036】

1つの実施形態では、ポリペプチドは、タイセイヨウタラ（*Gadus morhua*）からのトリプシンIのアミノ酸配列、即ち配列番号1：

IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWVVSAAHCYKSVLRVRLGEHHIRVNEGTEQYISSSSVIRHPNYSSYN
INNDIMLIKLTKPATLNQYVHAVALPTECAADATMCTVSGWNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMF
CAGYLEGGKDSCQGDGGPVVCNGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY

[配列番号1]

か、或いは、前記アミノ酸配列のトリプシン活性を保持する、そのフラグメント、変異体、誘導体、又は融合体（或いは、前記フラグメント、変異体、又は誘導体の融合体）を含んでなるか又はそれから構成される。50

【0037】

好ましい実施形態においては、ポリペプチドは配列番号1によるアミノ酸配列を含んでなるか又はそれから構成される。かかるポリペプチドは、タイセイヨウタラから、例えば、Asgaeirsson et al., 「Eur J. Biochem.」、1989年、第180巻、p. 85-94（その開示は参考として本明細書に援用される）に記載されたように精製され得る。

【0038】

本発明のポリペプチドの適当な例、及びそれらの製造のための方法はまた、欧州特許第1 202 743 B号（その開示は参考として本明細書に援用される）に記載されている。

10

【0039】

用語「アミノ酸」は、本明細書で用いる場合、標準的な20の遺伝的にコードされたアミノ酸及びそれらの対応する「D」型の立体異性体（天然の「L」型に比較して）、オメガアミノ酸及び他の天然産アミノ酸、非通常のアミノ酸（例えば、-, -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸など）、及び化学的に誘導体化されたアミノ酸（以下参照）を包含する。

【0040】

「アラニン」又は「Ala」又は「A」のように、アミノ酸が具体的に列挙されている場合、そうではないと明白に述べられない限り、この用語はL-アラニン及びD-アラニンの双方を指す。他の非通常のアミノ酸もまた、所望の機能特性がポリペプチドによって保持される限り、本発明のポリペプチドに適した成分であり得る。示したペプチドについては、それぞれのコードされたアミノ酸残基は、適宜に、通常のアミノ酸の慣用名に対応する一文字の名称によって表される。

20

【0041】

本発明によれば、本明細書に開示されたアミノ酸配列は、N末端からC末端の方向へ示される。

【0042】

1つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、L-アミノ酸を含んでなるか又はそれから構成される。

【0043】

ポリペプチドが配列番号1によるアミノ酸配列を含んでなる場合、それはさらなるアミノ酸を、そのN及び/又はC末端に配列番号1のものを超えて含んでなっていてもよく、例えば、ポリペプチドは、さらなるアミノ酸をそのC末端に含んでなっていてもよい。同様に、ポリペプチドが配列番号1によるアミノ酸配列の、フラグメント、変異体、又は誘導体を含んでなる場合、それは更なるアミノ酸をそのN及び/又はC末端に含んでなっていてもよい。

30

【0044】

当業者は、本発明のポリペプチドが完全長の天然産トリプシンタンパク質に一致する必要がないことを理解するであろう。代わりにポリペプチドは、野生型トリプシンなどのフラグメントに、前記フラグメントがその由来する天然産トリプシンタンパク質のトリプシン活性を（少なくとも一部）保持するという条件付きで一致していてもよい。

40

【0045】

トリプシン活性は、当該技術分野において周知の方法を用いて測定され得る。例えば、トリプシンアッセイキットが、Abcam、ケンブリッジ、英国（カタログ番号ab102531参照）及び他の供給業者から市販されている。1つの実施形態では、トリプシン活性はCbz-Gly-Pro-Arg-p-ニトロアニリド(Cbz-GPR-pNA)を基質として用いて測定され、少なくとも10U/mgの比活性、例えば少なくとも50U/mg、又は少なくとも100U/mgの非活性を生じる(EP 1 202 743 B参照)。

【0046】

50

したがって1つの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1によるアミノ酸配列のフラグメントを含んでなるか又はそれから構成される。

【0047】

したがってポリペプチドは、配列番号1の、少なくとも15個の連続したアミノ酸、例えば、少なくとも16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、又は240個の、配列番号1の連続したアミノ酸を含んでなるか又はそれから構成されていてもよい。

【0048】

例えればフラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基61～77を含んでなるか又はそれから構成されていてもよい。 10

【0049】

代わりに、又は加えて、フラグメントは配列番号1のアミノ酸残基225～241を含んでなるか又はそれから構成されていてもよい。

【0050】

当業者には、本発明のポリペプチドが、配列番号1（又はそのフラグメント）によるアミノ酸配列の変異体を代わりに含んでなるか又はそれから構成され得ることが理解されるであろう。かかる変異体は、非天然産の変異体であってもよい。

【0051】

ポリペプチドの「変異体」により本発明者らは、保存的であれ非保存的であれ、挿入、欠失、及び置換を包含する。とりわけ、本発明者らは、かかる変化が前記ポリペプチドのトリプシン活性を、少なくとも一部は保持する場合に、ポリペプチドの変異体を包含する。 20

【0052】

かかる変異体は、組換えポリヌクレオチドを用いて、当該技術分野において既知のタンパク質工学及び部位特異的突然変異誘発の方法を用いて作製され得る（例えば、Sambrook & Russell著、「Molecular Cloning: a Laboratory Manual」、第3版、2000年、Cold Spring Harbor Laboratory Press（これは、参考として本明細書に援用される）を参照のこと）。 30

【0053】

1つの実施形態では、変異体は、配列番号1又はそのフラグメントによるアミノ酸配列と、少なくとも50%、例えば少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、又は少なくとも99%の同一性をもつアミノ酸配列を有する。

【0054】

2つのポリペプチド間のパーセント配列同一性は、適当なコンピュータプログラム、例えば、ウィスコンシン大学遺伝学コンピュータグループのGAPプログラムを用いて決定され得、またパーセント同一性は、その配列が最適に整列されたポリペプチドについて計算されることが理解されよう。 40

【0055】

或いはまた整列は、Clustal Wプログラムを用いて（Thompson et al., 「Nuc. Acid Res.」、1994年、第22巻、p. 4673-4680（これは、参考として本明細書に援用される）に記載されたように）実行され得る。

【0056】

用いられるパラメータは、以下の通りであり得る：

F A S Tペアワイスアラインメントパラメータ：K - タブル（ワード）サイズ：1、ウインドウサイズ；5、ギャップペナルティ；3、トップダイアゴナルの数；5、スコアリング法；xパーセント。 50

マルチプルアラインメントパラメータ：ギャップオープンペナルティ；10、ギャップ伸長ペナルティ；0.05。

スコアリングマトリックス；BLOSUM。

【0057】

これに代えて、BESTFITプログラムを用いて、局所的配列アラインメントが決定され得る。

【0058】

1つの実施形態では、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、以下のアミノ酸位置：

E21, H25, H29, V47, K49, D50, L63, H71, H72, R74, N76, T79, Y82, S85, S87, S89, 10
N98, I99, V121, M135, V138, M145, V148, D150, K154, L160, M175, S179, A183, L185,
, V212, Y217, P225, A229, V233, L234, V238, N240, Y241及び/又はM242.

(これにおいて、アミノ酸配列及び番号付けは、Protein Data Bank [PDB] エントリー「2EEK！」に従い、配列番号1の最初のイソロイシンが位置I-16として番号付けられている)からなる群より選択される1つ以上の突然変異アミノ酸を含んでなる、配列番号1の変異体である。

【0059】

したがって、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは：

E21T, H25Y, H29(Y/N), V47I, K49E, D50Q, L63I, H71D, H72N, R74(K/E), N76(T/L), T7 20
9(S/N), Y82F, S85A, S87(K/R), S89R, N98T, I99L, V121I, M135Q, V138I, M145(T/L/V/
E/K), V148G, D150S, K154(T/V), L160(I/A), M175(K/Q), S179N, A183V, L185G, V212I,
Y217(D/H/S), P225Y, A229V, V233N, L234Y, V238I, N240S, Y241N及び/又はM242I.

からなる群より選択される、1つ以上のアミノ酸突然変異を含んでなる、配列番号1の変異体であり得る。

【0060】

例えば、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、以下の定義された突然変異(又はそれらの組合せ)の1つをもつ、配列番号1のアミノ酸配列を含んでなるか又はそれから構成され得る：

(a) N240S, Y241N, S87K (“EZA-002”);

30

(b) K154T (“EZA-003”);

(c) K154L (“EZA-004”);

(d) K154V (“EZA-005”);

(e) K154E (“EZA-006”);

(f) N98T (“EZA-007”);

(g) I99L (“EZA-008”);

(h) L185G, P225Y (“EZA-009”);

(i) V212I (“EZA-0010”);

(j) Y217D, M175K (“EZA-011”);

(k) Y217H (“EZA-012”);

40

(l) Y217S (“EZA-013”);

(m) A229V (“EZA-014”);

(n) H25Y (“EZA-015”);

(o) H25N (“EZA-016”);

(p) H29Y (“EZA-017”);

(q) H71D (“EZA-018”);

(r) H72N (“EZA-019”);

(s) R74K (“EZA-020”);

(t) R74E (“EZA-021”);

(u) N76T (“EZA-022”);

(v) N76L, Y82F (“EZA-023”);

50

- (w) T79S ("EZA-0024");
- (x) T79N ("EZA-025");
- (y) K49E, D50Q ("EZA-026");
- (z) S87R ("EZA-027");
- (aa) E21T, H71D, D150S, K154V ("EZA-028");
- (bb) S179N, V233N ("EZA-029");
- (cc) M135Q ("EZA-030");
- (dd) M145K, V148G ("EZA-031");
- (ee) M175Q ("EZA-032");
- (ff) L63I, S85A ("EZA-033");
- (gg) L160I ("EZA-034");
- (hh) V138I, L160A, A183V ("EZA-035");
- (ii) V121I ("EZA-036");
- (jj) V47I, V238I, M242I ("EZA-037");
- (kk) V238I ("EZA-038"); and
- (ll) L234Y ("EZA-039")

【 0 0 6 1 】

同様に、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、以下の定義された突然変異（又はそれらの組合せ）の1つをもつ、配列番号1のアミノ酸配列を含んでなるか又はそれから構成され得る：

- (a) H25N, N76T
- (b) H25N, H29Y
- (c) H25N, M135Q
- (d) H29Y, T79N, M135Q
- (e) I99L, V121I, L160I, Y217H
- (f) V121I, L160I
- (g) H72N, R74E, S87K
- (h) H25N, M135Q, Y217H
- (i) T79N, V121I, V212I
- (j) H29Y, N76T, I99L, M135Q
- (k) K49E, D50Q, N76L, Y82F, S179N, V233N
- (l) M145K, V148G, N76L, Y82F, S179N, V233N
- (m) H25N, N76T, S87K, K154T
- (n) H25Q
- (o) H25D
- (p) H25S
- (q) K24E, H25N
- (r) Y97N
- (s) N100D
- (t) A120S, A122S
- (u) M135E
- (v) V204Q, A122S
- (w) T79D
- (x) R74D
- (y) K49E
- (z) K49S, D50Q
- (aa) D50Q
- (bb) Q178D
- (cc) S87R

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

1つの好ましい実施形態においては、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、位置
25においてヒスチジンを含まない、配列番号1のアミノ酸配列の変異体である。

【0063】

例えば、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号2（H25N突然変異を含んでなる；以下の配列中のボックスを参照）：

【0064】

【化1】

16

I

IVGGYECTK[N]SQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWVVSAAHCYKSVLVRLGEHHIRV
NEG

79

I

TEQYISSLSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLTKPATLNQYVHAVALPTECAADAMCTVSG
141

I

WGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQGDSG
GPV

200

I

VCNGVLQGVVSWGYGCAERDHGPVYAKVCVLSGWVRDTMANY

10

[配列番号2]

【0065】

のアミノ酸配列を含んでなるか又はそれから構成され得る。

【0066】

別の好ましい実施形態においては、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列の変異体であり、これは位置160においてリジンを含まない。

【0067】

例えば、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号3（L160I突然変異を含んでなる；以下の配列中のボックスを参照）：

30

【0068】

【化2】

16

I

IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLVSKDWVVSAAHCYKSVLVRLGEHHIRV
NEG

79

I

TEQYISSLSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLTKPATLNQYVHAVALPTECAADAMCTVSG
141

40

I

WGNTMSSVADGDKLQCLS[PILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQGDSG
GPV

200

I

VCNGVLQGVVSWGYGCAERDHGPVYAKVCVLSGWVRDTMANY

[配列番号3]

【0069】

のアミノ酸配列を含んでなるか又はそれから構成され得る。

【0070】

50

当業者には、上記に定義された突然変異（タイセイヨウタラのトリプシンⅠのアミノ酸配列、配列番号1、を参照して定義）がまた、他の種からのトリプシンにおいて作製されることも可能であることが理解されよう。例えば、配列番号2及び3において強調表示された特定の突然変異（それぞれ、H25N及びL160I）は、スケトウダラからのトリプシンにおいて作製可能であった（例えば、GenBank：BAH70476.3、これにおいて、活性トリプシンのアミノ酸配列は位置120において始まり、H25がBAH70476.3などにおけるH29に対応するようにする）。

【0071】

別の実施形態では、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、天然産セリンプロテアーゼのアミノ酸配列を含んでなるか又はそれから構成される。したがって、セリンプロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、真核生物又は原核生物のいずれかに起源する、天然産トリプシンのアミノ酸配列から構成され得る。特に、低温適応型トリプシン、例えばタイセイヨウダラ（*Gadus morhua*）、タイセイヨウ及びタイヘイヨウサケ（例えば、*Salmo salar* 及び *Oncorhynchus* 属の種）、及びスケトウダラ（*Theragra chalcogramma*）からのトリプシンが包含される。10

【0072】

本発明の第1の態様のさらなる実施形態においては、ポリペプチドは、融合タンパク質を含んでなるか又はそれから構成される。

【0073】

ポリペプチドの「融合体」により本発明者らは、任意の他のポリペプチドへ融合された、配列番号1（又はそのフラグメント若しくは変異体）に対応するアミノ酸配列を包含する。例えば、前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドの精製を促進する目的で、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）又はプロテインAなどのポリペプチドへ融合され得る。かかる融合体の例は、当業者には周知である。同様に、前記ポリペプチドは、His6などのオリゴヒスチジンタグに対し、又は周知のMyctagエピトープなどの、抗体により認識されるエピトープに対し融合され得る。前記ポリペプチドの任意の変異体又は誘導体への融合体もまた、本発明の範囲内に包含される。20

【0074】

融合体は、所望の特徴を本発明の前記ポリペプチドに付与するさらなる部分を含んでなついててもよく；例えば、部分は、治療効果の増大又は延長において有用であり得る。例えば、1つの実施形態では、融合体は、ヒト血清アルブミン又は類似のタンパク質を含んでなる。30

【0075】

別法として、融合タンパク質は、例えば、ビオチン成分、放射性成分、蛍光性成分、例えば、当業者に周知の低分子蛍光体又は緑色蛍光タンパク質（GFP）蛍光体であり得る。成分は、免疫原性タグ、例えば、当業者に周知のような、Myctagタグであり得、或いは、当業者に周知のような、ポリペプチドの細胞取込みを促進できる親油性分子又はポリペプチドドメインであり得る。

【0076】

本発明の第1の態様のさらなる実施形態においては、ポリペプチドは、修飾又は誘導体化される1つ以上のアミノ酸を含んでなるか又はそれから構成される。40

【0077】

1つ以上のアミノ酸の化学的誘導体は、官能性側鎖基を用いた反応により得られ得る。かかる誘導体分子は、例えば、それにおいて遊離アミノ基が、アミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボキシベンズオキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基、又はホルミル基を形成するべく誘導体化されている分子を包含する。遊離カルボキシル基は、塩、メチル及びエチルエステル、又は他のタイプのエステル及びヒドロジドを形成するべく誘導体化され得る。遊離ヒドロキシル基は、O-アシル又はO-アルキル誘導体を形成するべく誘導体化され得る。また、20の標準的なアミノ酸の天然産アミノ酸誘導体を含有するペプチドも、化学的誘導体として包含される。例として：4-ヒド50

ロキシプロリンはプロリンの代わりに置換され得；5-ヒドロキシリジンはリジンの代わりに置換され得；3-メチルヒスチジンはヒスチジンの代わりに置換され得；ホモセリンはセリンの代わりに、またオルニチンはリジンの代わりに置換され得る。誘導体はまた、必要な活性が維持される限り、1つ以上の付加又は欠失を含有するポリペプチドも包含する。他に含まれる修飾は、アミド化、アミノ末端アシル化（例えば、アセチル化、又はチオグリコール酸のアミド化）、末端カルボキシルアミド化（例えば、アンモニア又はメチルアミンによる）、及び同様の修飾である。

【0078】

当業者にはさらに、ペプチドミメティック化合物もまた有用であり得ることが理解されよう。それ故「ポリペプチド」により本発明者らは、配列番号1の抗炎症活性を有するペプチドミメティック化合物を包含する。用語「ペプチドミメティック」は、治療薬としての、特定のペプチドのコンフォメーション及び所望の特徴を摸倣する化合物を指す。10

【0079】

例えば、本発明のポリペプチドは、アミノ酸残基がペプチド（-CO-NH-）結合によって結合されている分子だけでなく、ペプチド結合が逆である分子も包含する。かかるレトロインベルソ型ペプチドミメティックスは、当該技術分野において既知の方法、例えば、Meziere et al.、「J. Immunol.」、1997年、第159巻、p. 3230-3237（これは、参考として本明細書に援用される）に記載されたものなどを用いて作製され得る。このアプローチは、主鎖を含みかつ側鎖の配向は含まない変更を含有する、疑似ペプチドを作製することを含む。レトロインベルソ型ペプチドは、CO-NHペプチド結合の代わりにNH-CO結合を含有し、タンパク質分解に対しづつと高い抵抗性がある。別法として、本発明のポリペプチドは、ペプチドミメティック化合物であり得、これにおいて1つ以上のアミノ酸残基は、通常のアミド結合のかわりに、-y(CH₂NH)-結合によって結合される。20

【0080】

さらなる別法では、ペプチド結合は、アミノ酸残基の炭素原子間の間隔を保持する適当なリンカー成分が使用されるという条件で、全て一緒に省かれてもよく；リンカー成分には、ペプチド結合と実質的に同じ電荷分布と、実質的に同じ平面性とをもつことが有利であり得る。30

【0081】

エキソ型タンパク質分解消化に対する感受性の減少を助けるようにするため、ポリペプチドがそのN-又はC-末端において便利にブロックされ得ることが理解されよう。

【0082】

D-アミノ酸及びN-メチルアミノ酸などの、コードされていないか又は修飾された種々のアミノ酸もまた、ポリペプチドを修飾するために使用されてきた。加えて、推定される生物活性コンフォメーションは、環化などの共有結合的修飾によるか、又はラクタムの取込み若しくは他のタイプの架橋によって安定化され得る。例えば、Weber et al.、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、1978年、第75巻、p. 2636、及びThursell et al.、「Biochem. Biophys. Res. Comm.」、1983年、第111巻、p. 166（これらは、参考として本明細書に援用される）を参照。40

【0083】

1つの好ましい実施形態においては、しかしながら、本発明のポリペプチドは、PEG化、アミド化、エステル化、アシル化、アセチル化、及び/又はアルキル化により修飾又は誘導体化された、1つ以上のアミノ酸を含んでなる。

【0084】

当業者には、本発明のポリペプチドが、任意の適当な長さであり得ることが理解されよう。好ましくは、ポリペプチドは、10と30の間のアミノ酸長、例えば10と20、12と18、12と16、又は15と20の間のアミノ酸長である。これに代えてポリペプチドは、150と250の間のアミノ酸長、例えば、200と250、210と240、50

220と230、又は220と225の間のアミノ酸長であり得る。

【0085】

1つの実施形態では、ポリペプチドは直鎖である。

【0086】

さらなる実施形態においては、ポリペプチドは組換えポリペプチドである。

【0087】

有利には、ポリペプチドは、口腔及び／又は咽頭（例えば、中咽頭）の粘膜への送達に適した形態で提供される。例えば、ポリペプチドは口腔スプレー、鼻腔スプレー、ロゼンジ、香錠、チューインガム、又は液体で提供され得る。

【0088】

本発明の関連する第2の態様は、免疫不全症を罹患しているか又はその感受性がある被験者における、微生物感染症の治療又は防止のための医薬の調製における、上記に定義されたようなポリペプチドを提供する。

【0089】

本発明の第2の態様の代表的な実施形態は、本発明の第1の態様に関連して上記に記載されている。

【0090】

本発明のポリペプチド、並びにそれを製造するための核酸分子、ベクター、及び宿主細胞は、当該技術分野において周知の方法を用いて作製され得る（例えば、Sam brook & Russell著、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」、第3版、2000年、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、関連する開示（その文書が参考として本明細書に援用される）を参照のこと）。

【0091】

別法として、本発明のポリペプチドは、液相及び固相合成（例えば、t - Boc 固相ペプチド合成及び BOP - SPPS）などの、既知の手段により合成され得る。

【0092】

当業者には、本発明がまた上記記載のポリペプチドの薬学的に許容される酸又は塩基付加塩も包含することが理解されよう。本発明において有用な上述の塩基性化合物の薬学的に許容される酸付加塩を調製するために使用される酸は、非毒性の酸付加塩、即ち、中でも、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、重酒石酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、サッカリン酸塩、安息香酸塩、メタシスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、及びパモエート [即ち、1,1' - メチレン - ピス - (2 - ヒドロキシ - 3 ナフトエート)] 塩などの、薬学的に許容されるアニオンを含有する塩を形成するものである。

【0093】

薬学的に許容される塩基付加塩はまた、ポリペプチドの薬学的に許容される塩型を製造するべく使用され得る。酸性の性質である本化合物の、薬学的に許容される塩基性塩を調製するための試薬として使用され得る化学塩基は、かかる化合物と非毒性の塩基性塩を形成するものである。かかる非毒性の塩基性塩は、制限するものではないが、中でも、アルカリ金属カチオン（例えば、カリウム及びナトリウム）及びアルカリ土類金属カチオン（例えば、カルシウム及びマグネシウム）などの薬学的に許容されるカチオン、アンモニウム又は水溶性アミン付加塩、例えば、N - メチルグルカミン - (メグルミン)、及び低級アルカノールアンモニウムに由来するもの、及び薬学的に許容される有機アミンの他の塩基性塩を包含する。

【0094】

本発明のポリペプチドが、貯蔵のために凍結乾燥され、かつ使用に先立ち適当な担体中で再構成され得ることがさらに理解されよう。任意の適当な凍結乾燥法（例えば、噴霧乾燥、ケーク乾燥）及び／又は再構成技術が使用され得る。当業者には、凍結乾燥及び再構

成が様々な程度の活性損失をもたらし得ること、及び補正のため使用レベルが上方修正されるべきであり得ることが理解されよう。好ましくは、凍結乾燥（フリーズドライ処理）されたポリペプチドは、再水和された場合、その活性（凍結乾燥に先立つ）の約20%以下、又は約25%以下、又は約30%以下、又は約35%以下、又は約40%以下、又は約45%以下、又は約50%以下を損失する。

【0095】

本発明のポリペプチドは、典型的には治療組成物の形態で提供され、これにおいて、ポリペプチドは薬学的に許容される緩衝液、希釈剤、担体、アジュバント、又は賦形剤と一緒に製剤される。EDTA、クエン酸塩、EGTA、又はグルタチオンなどのキレート剤を含む付加的な化合物が、組成物中に含まれ得る。抗菌剤／治療組成物は、当該技術分野において既知の、即ち充分に貯蔵安定性があり、かつヒト及び動物への投与に適した方法で調製され得る。治療組成物は、例えば、フリーズドライニング、噴霧乾燥、噴霧冷却により、又は超臨界粒子形成からの粒子形成の使用により、凍結乾燥され得る。10

【0096】

「薬学的に許容される」により本発明者らは、本発明のポリペプチドのトリプシン活性の有効性を低減しない非毒性物質を意味する。かかる薬学的に許容される緩衝液、担体、又は賦形剤は、当該技術分野において周知である（A.R.Gennaro編、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第18版、Mack Publishing Company、1990年、及びA.Kibbe編、「Handbook of Pharmaceutical Excipients」、第3版、Pharmaceutical Press、2000年（開示は参考として本明細書に援用される）参照）。20

【0097】

用語「緩衝液」は、pHを安定化する目的をもつ、酸・塩基混合物を含有する水溶液を意味することが意図される。緩衝液の例は、Trizma、Bicine、Tricine、MOPS、MOPSO、MOBS、Tris、Hepes、HEPBS、MES、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、グリコール酸塩、乳酸塩、ホウ酸塩、ACES、ADA、酒石酸塩、AMP、AMPD、AMPSO、BES、CABS、カコジル酸塩、CHES、DIPSO、EPPS、エタノールアミン、グリシン、HEPPSO、イミダゾール、イミダゾール乳酸、PIPES、SSC、SSPE、POPSO、TAPS、TABS、TAPSO、及びTESである。30

【0098】

用語「希釈剤」は、治療用製剤中のペプチドを希釈する目的をもつ、水性又は非水性の溶液を意味することが意図される。希釈剤は、1つ以上の、生理食塩水、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノール、又は油（例えば、ベニバナ油、コーン油、落花生油、綿実油、又はゴマ油）であり得る。

【0099】

用語「アジュバント」は、本発明のポリペプチドの生物学的効果を増大するために、製剤に添加される任意の化合物を意味することが意図される。アジュバントは、種々のアミオノンをもつ1つ以上の、亜鉛、銅、又は銀塩、例えば、制限するものではないが、種々のアシル組成物のフッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、チオシン酸塩、亜硫酸塩、水酸化物、リン酸塩、炭酸塩、乳酸塩、グリコール酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩、酒石酸塩、及び酢酸塩であり得る。アジュバントはまた、カチオン性ポリマー、例えば、カチオン性セルロースエーテル、カチオン性セルロースエステル、脱アセチル化ヒアルロン酸、キトサン、カチオン性デンドリマー、カチオン性合成ポリマー、例えばポリ（ビニルイミダゾール）、及びカチオン性ポリペプチド、例えば、ポリヒスチジン、ポリリジン、ポリアルギニン、及びこれらのアミノ酸を含有するペプチドであり得る。40

【0100】

賦形剤はまた、1つ以上の、炭水化物、ポリマー、脂質、及び無機質であり得る。炭水化物の例は、ラクトース、グルコース、スクロース、マンニトール、及びシクロデキスト50

リンを包含し、これらは、例えば凍結乾燥を促進するために組成物へ添加される。ポリマーの例は、デンプン、セルロースエーテル、セルロースカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸塩、カラギーナン、ヒアルロン酸及びその誘導体、ポリアクリル酸、ポリスルホン酸塩、ポリエチレングリコール／ポリエチレンオキシド、ポリエチレンオキシド／ポリプロピレンオキシド共重合体、種々の加水分解度のポリビニルアルコール／ポリビニルアセテート、及びポリビニルピロリドン（全ての異なる分子量の）であり、これらは、例えば、粘度調節のため、生物接着のため、又は化学的若しくは蛋白質分解的分解から脂質を保護するために、組成物へ添加される。脂質の例は、脂肪酸、リン脂質、モノ-、ジ-、及びトリグリセリド、セラミド、スフィンゴ脂質及び糖脂質（全ての異なるアシル鎖長及び飽和の）、卵レシチン、大豆レシチン、水素化卵及び大豆レシチンであり、これらは、ポリマーと同様の理由で組成物に添加される。無機質の例は、タルク、酸化マグネシウム、酸化亜鉛、及び酸化チタンであり、これらは、脂質蓄積の低減又は有利な色素特性などの利益を得るために組成物へ添加される。

【0101】

1つの実施形態では、ポリペプチドは、塩化カルシウムなどの安定剤と一緒に提供され得る。

【0102】

本発明のポリペプチドは、ポリペプチド剤の送達に適するよう、当該技術分野において既知の任意のタイプの治療組成物に製剤され得る。

【0103】

1つの実施形態では、ポリペプチドは、水、生理食塩水、ポリエチレングリコール、ブロピレングリコール、エタノール、又は油（例えば、ベニバナ油、コーン油、落花生油、綿実油、又はゴマ油）、トラガカントガム、及び／又は種々の緩衝液中に簡単に溶解され得る。例えば、ポリペプチドが経口投与用に製剤される場合（例えば、口腔スプレー）、治療組成物は水、グリセロール、及びメタノール中に溶解されたポリペプチドを含んでなり得る。代表的な口腔スプレー製剤は、スカンジナビア内でColdzyme（登録商標）（Enzymatica AB、ルンド、スウェーデン）として市販されている。

【0104】

好ましい実施形態においては、本発明は、上記記載のプロテアーゼポリペプチドを浸透圧的に活性な溶液として提供する。例えば、ポリペプチドは、グリセロール又はグリセリン中に製剤され得る。理論に縛られることを望むものではないが、かかる浸透圧的に活性な溶液は、微生物細胞内から細胞外環境への液体の移動を促進すると考えられる。このことは次に、例えば、咽頭の宿主上皮細胞による、細菌及びウイルスなどの微生物細胞の取込みを阻害する（少なくとも一部を）、薄く活性のあるバリアを生じることにより、本発明のポリペプチドの治療効果を促進すると考えられる。

【0105】

さらなる実施形態においては、本発明の治療組成物は、リポソームの形態であり得、これにおいてポリペプチドは、他の薬学的に許容される担体に加えて、脂質などの両親媒性薬剤と組合されて、ミセル、不溶性の単分子膜、及び液晶として凝集した形態で存在する。リポソーム製剤に適した脂質は、制限するものではないが、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リソレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などを包含する。適当な脂質はまた、血流循環時間を延ばすため極性頭部においてポリ（エチレングリコール）により修飾された、上記の脂質も包含する。かかるリポソーム製剤の調製は、例えば、U.S. 4,235,871（その開示は、参考として本明細書に援用される）に見ることができる。

【0106】

本発明の治療組成物はまた、生分解性マイクロスフェアの形態であり得る。ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、PLAとPGA（PLGA）又はポリ（カプロラクトン）（PCL）の共重合体、及びポリ無水物などの、脂肪族ポリエステル

10

20

30

40

50

が、ミクロスフェアの製造における生分解性ポリマーとして、広く使用されてきた。かかるミクロスフェアの調製は、U.S. 5,851,451 及び E.P. 0 213 303 (その開示は、参考として本明細書に援用される) に見ることができる。

【0107】

さらなる実施形態においては、本発明の治療組成物は、ポリマーゲルの形態で提供され、これにおいて、デンプン、セルロースエーテル、セルロースカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸塩、カラギーナン、ヒアルロン酸及びその誘導体、ポリアクリル酸、ポリビニルイミダゾール、ポリスルホン酸塩、ポリエチレングリコール／ポリエチレンオキシド、ポリエチレンオキシド／ポリプロピレンオキシド共重合体、種々の加水分解度のポリビニルアルコール／ポリビニルアセテート、及びポリビニルピロリドンが、ペプチドを含有する溶液を増稠するために使用される。ポリマーはまた、ゼラチン又はコラーゲンを含んでなり得る。10

【0108】

本発明の治療組成物が、ポリペプチドの活性の強化のために、イオン及び規定された pH を含み得ることが理解されよう。加えて、組成物は、滅菌などの通常の治療的操作に供され得、及び／又は保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝液、充填剤などのアジュvant を含有し得る。

【0109】

1つの好ましい実施形態において、治療組成物は、Tris 又はリン酸塩緩衝液中のポリペプチドを、1つ以上の、EDTA、キシリトール、ソルビトール、プロピレングリコール、及びグリセロールと一緒に含んでなる。20

【0110】

本発明の特に好ましい治療組成物は、以下の実施例 A に記載されている。

【0111】

本発明による治療組成物は、当業者には既知の、任意の適当な経路により投与され得る。したがって、可能な投与経路は、経口、経頸、非経口(静脈内、皮下、及び筋肉内)、局所、点眼、点鼻、経肺、非経口、経膣、及び直腸投与を包含する。また、移植片からの投与も可能である。

【0112】

1つの好ましい実施形態では、治療組成物は経口投与される。例えば、ポリペプチドは、口腔スプレー、鼻腔スプレー、ロゼンジ、香錠、チューインガム、又は経口投与用の通常の液体として製剤され得る。30

【0113】

別の実施形態では、治療組成物は非経口的に、例えば、静脈内、脳室内、関節内、動脈内、腹腔内、髄腔内、脳室内、槽内、頭蓋内、筋肉内、又は皮下に投与されるか、又は注入法により投与され得る。それらは、無菌の水溶液の形態で便利に使用され、それらは他の物質、例えば、溶液を血液と等張にするのに充分な塩又はグルコースを含有し得る。水溶液は、必要に応じて、適宜に緩衝されるべきである(好ましくは、3から9のpHに)。無菌条件下での適当な経口用製剤の調製は、当業者に周知の標準的な製薬技術により、容易に遂行される。40

【0114】

非経口投与に適した製剤は、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、及び、意図されたレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含有し得る、水性及び非水性の無菌の注射液；及び、懸濁剤及び増粘剤を含み得る、水性及び非水性の無菌の懸濁液を包含する。製剤は、単回投与又は多数回投与用の容器、例えば、密封アンプル及びバイアル中に提供され得、また使用直前に、無菌の液体担体、例えば注射用水の添加のみを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)された状態で貯蔵され得る。即時調合注射用溶液及び懸濁液は、無菌の粉末、顆粒、及び既に記載された種類の錠剤から調製され得る。

【0115】

50

別法として、治療組成物は、鼻腔内に、又は吸入により投与され得る（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、1，1，1，2-テトラフルオロエタン（HFA-134A又は1，1，1，2，3，3，3-ヘプタフルオロプロパン（HFA-227EA））、二酸化炭素又は他の適当なガスなどの、適当な噴射剤の使用による、加圧容器、ポンプ、スプレー、又はネブライザからの、エアロゾル噴霧プレゼンテーション（aerosol spray presentation）の形態で）。加圧エアロゾルの場合、単位用量は、計量された量を送達するためのバルブを備えることにより決定され得る。加圧容器、ポンプ、スプレー、又はネブライザは、活性ポリペプチドの溶液又は懸濁液を、例えば、エタノールと噴射剤との混合物を溶媒として用いて含有し得、それはまた潤滑剤、例えば、ソルビタントリオレートを付加的に含有し得る。吸入器又は注入器として使用するためのカプセル及びカートリッジ（例えば、ゼラチン製）は、本発明の化合物とラクトース又はデンプンなどの適当な粉末基剤との粉末混合物を含有するべく製剤され得る。

【0116】

治療組成物は、薬学的に有効な用量で患者に投与される。「治療有効量」又は「有効量」又は「治療上有効」とは、本明細書で用いる場合、所与の症状及び投与レジメンに治療的効果を与える量を指す。これは、必要な添加物及び希釈剤、即ち、担体又は投与ビヒクルと共に、所望の治療効果をもたらすべく計算された、予め決められた活性物質量である。さらにそれは、ホストの活性、機能、及び応答における臨床上有意な欠損を、低減しきつ最も好ましくは防止するのに充分な量を意味することが意図されている。或いはまた、治療有効量は、ホストにおける臨床上有意な症状に改善をもたらすのに充分である。当業者に理解されるように、化合物の量は、その比活性に依存して変化し得る。適切な投薬量は、必要な希釈剤と共に所望の治療効果をもたらすべく計算された、予め決められた活性組成物量を含有し得る。本発明の組成物の製造のための方法及び用途においては、活性成分の治療有効量が提供されている。治療有効量は、医学又は獣医学の普通の技術の従事者により、年齢、体重、性別、症状、合併症、他の疾患などといった患者の特徴に基づき、当該技術分野において周知のように決定され得る。薬学的に有効な用量の投与は、個別の用量単位又はさもなければ数回のより少量の用量単位の形態での単回投与、及びまた特定の間隔での細分化された用量の多数回投与の双方により実施され得る。別法として、用量は長期間にわたる連続的な注入として提供され得る。

【0117】

ポリペプチドは、使用される化合物の有効性／毒性に依存して、種々の濃度で製剤され得る。好ましくは、製剤は活性薬剤を、0.1 μMと1 mMの間、より好ましくは1 μMと500 μMの間、500 μMと1 mMの間、300 μMと700 μMの間、1 μMと100 μMの間、100 μMと200 μMの間、200 μMと300 μMの間、300 μMと400 μMの間、400 μMと500 μMの間、及び最も好ましくは約500 μMの濃度で含んでなる。

【0118】

したがって、治療用製剤は、口腔及び／又は咽頭（例えば、中咽頭）内の、ウイルス、細菌、及び酵母などの微生物を殺すか又は増殖を減速させるのに充分な量のポリペプチド、或いはそのフラグメント、変異体、融合体、又は誘導体を含んでなり得る。

【0119】

本発明の第3の態様は、免疫不全症を罹患しているか又はその感受性がある被験者における、微生物感染症の治療又は防止のための方法であって、本発明の第1の態様に関連して上記に定義されたようなポリペプチドの治療有効量を被験者に投与することを含んでなる、該方法を提供する。

【0120】

本発明の第3の態様の代表的な実施形態は、本発明の第1の態様に関連して上記に記載されている。

【0121】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、微生物感染症は、細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、及び酵母感染症からなる群より選択される。

【0122】

1つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、口腔及び／又は咽頭（例えば、中咽頭）の二次感染の治療又は防止に使用される。

【0123】

例えば、ポリペプチドは、鼻漏及び／又は口腔の真菌感染症及び／又は歯茎炎症の治療又は防止において使用され得る。

【0124】

かかる微生物感染症は、口腔スプレー、鼻腔スプレー、ロゼンジなどの形態で本発明のポリペプチドを投与することにより、便利に治療／防止され得る。かかる製剤は、本発明のポリペプチドが口腔及び／又は咽頭（例えば、中咽頭）の粘膜に長期間暴露されて、そこで、ポリペプチドのトリプシン活性が浸潤中の微生物に暴露されるようにする。

10

【0125】

典型的には、本発明のポリペプチドは、数日、数週間又はそれ以上の期間にわたり、反復して投与される。

【0126】

当業者には、本発明のポリペプチドが1つ以上の他の付加的な治療剤と併用され得ることが理解されよう。

【0127】

20

例えば、本発明のポリペプチドは：

(a) 通常の抗生剤（例えば、セファロスボリン、テトラサイクリン、アミノグリコシド、及びペニシリン）；

(b) 抗ウイルス剤（例えば、オセルタミビル及びザナミビル）；及び／又は

(c) 抗真菌剤（ナイスタチン、クロルトリマゾール（chlorotrimazole）、及びフルカノゾール）

と併用され得る。

【0128】

加えて、本発明のポリペプチドは、「市販の」風邪薬及び「流行性」感冒薬、例えば、パラセタモール及びイブプロフェンなどの鎮痛剤、及びフェニレフリンなどの充血除去剤と併用され得る。

30

【0129】

当業者は、本発明の用途及び方法が、医学及び獣医学の双方の分野において実用性があることをさらに理解するであろう。したがって、ポリペプチド薬は、ヒト及び非ヒト動物（例えば、ウマ、イヌ、及びネコ）の双方の治療において使用され得る。

【0130】

しかしながら、好ましくは患者はヒトである。

【0131】

好ましい、本発明のいくつかの態様を具現化する非限定的な例が、ここで記載される。

40

【図面の簡単な説明】

【0132】

【図1】CVIDと診断されかつHizentra（登録商標）（ヒトIgG）の皮下注射で毎週治療された12歳の男性患者についての、週毎の種々の感染症症状のパーセントを示す図である。ベースラインデータは、2012年および2013年の1月から9月までの間に集められた。ColdZyme（登録商標）治療は、2013年10月から11月までの9週間にわたり継続された。

【図2】CVIDと診断されかつHizentra（登録商標）（IgG）の皮下注射で毎週治療された12歳の男性患者についての、学校から家で過ごした週当たりの平均日数を示す図である。ベースラインデータは、2012年および2013年の1月から9月までの間に集められた。ColdZyme（登録商標）治療は、2013年10月から11月までの9週間にわたり継続された。

50

月までの9週間にわたり継続された。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0133】

実施例A：代表的な治療用製剤

本発明のポリペプチド、タイセイヨウタラからのトリプシンI（配列番号1）の代表的なストック溶液は、表1に示されたように処方され得る：

【0134】

【表1】

項目記載	量
純水	50 L
グリセロール	50 L
トリス緩衝液ストック溶液	1 L
タイセイヨウダラ由来のトリプシンI	300 000 U

10

【0135】

pHは、7.5に調整される。

【0136】

タイセイヨウダラからのトリプシンI（配列番号1）の適切な治療組成物はまた、Cold Zyme（登録商標）（Enzymatic AB, ルンド、スウェーデン）として市販されている。

【0137】

実施例B：症例研究

患者：12歳男性

診断：CVID（分類不能型免疫不全症）

30

治療歴：Hizentra（登録商標）、免疫グロブリン（ヒト）皮下注射

Amoxicillin、経口

治療：Cold Zyme（登録商標）、投薬当たり1U、1日2回投与

【0138】

2003年以来、被験者はヒト免疫グロブリン（Hizentra（登録商標）、週当たり4g）の皮下注射を毎週受けてきた。しかしながら、2013年後期の本発明のポリペプチドを用いた治療以前には、被験者は、耳、副鼻腔、鼻、気管支、及び肺の再発性微生物感染症を罹患した。被験者はしばしば継続的な鼻漏、口腔内の真菌増殖、及び歯茎の損傷を伴う歯肉炎を呈した。結果として、被験者の生活の質はひどく損なわれ、彼は通常、少なくとも毎週1日は学校から家にとどまる必要があった。11月という月は、再発性感染症からたびたび肺炎になったため、しばしば特にチャレンジングな月であった。

40

【0139】

2012年8月から2013年5月までのアモキシリンによる予防的治療の期間は、被験者の再発性の症状に殆ど効果がなかった。

【0140】

被験者は、2013年10月に、Cold Zyme（登録商標）口腔スプレーによる毎日2回の治療（朝夕）を開始し；Hizentra（登録商標）の毎週投与はこの期間を通して継続された。

【0141】

Cold Zyme（登録商標）治療開始のほんの3日以内に、被験者は症状及び生活の

50

質に著しい改善を経験した（表2参照）：

【0142】

【表2】

表2

症状	ColdZyme®以前	ColdZyme®による治療の3日後
鼻漏	継続	鼻漏なし
鼻詰まり	鼻呼吸不可能	鼻で呼吸
口腔真菌感染症	高い	非常に低い
歯茎組織の損傷	高い	非常に低い（数年間で初めて治癒）

10

【0143】

ColdZyme（登録商標）による治療の効果は、図1及び2から明らかに見て取れる。

【0144】

図1（A）は、3つの期間の間に被験者によって経験された、週毎の種々の感染症症状のパーセントを示す：

(a) 2012年全体を通じて（治療 = Hizentra（登録商標）及びアモキシリン）；

(b) 2013年1月から9月まで（治療 = Hizentra（登録商標）及びアモキシリン）；及び

(c) 2013年10月から2013年11月まで（治療 = Hizentra（登録商標）及びColdZyme（登録商標））。

20

【0145】

ColdZyme（登録商標）を用いた治療期間の間、観察された感染症症状の全てにおける劇的な減少が、直ちに明らかとなる。

【0146】

図1（B）は、58週間の延長された試験期間の間に同じ被験者によって経験された、週毎の種々の感染症症状のパーセントを示す。

【0147】

30

図2（A）は、図1と同じ3つの期間の間に、感染症症状の重症度のために被験者が学校を欠席した週当たりの平均日数を示す。ColdZyme（登録商標）による治療の開始に続く劇的な改善が、再び直ちに明らかである。

【0148】

特に、最初の治療期間（10月～11月）が、被験者が最も重症な感染症を経験した時期に一致したことからすれば、被験者における本発明のポリペプチドを用いた治療によるかかる迅速な作用開始及び感染症症状のほぼ完全な除去は、全く予想外であった。当然のことながら、被験者及び彼の母親の双方が、10年を超える消耗性の反復性感染症の後の生活の質の改善に大喜びであった。

【0149】

40

図2（B）は、図1（B）と同じ延長された試験期間の間に、感染症症状の重症度のために被験者が学校を欠席した週当たりの平均日数を示す。

【0150】

実施例C - 組換体セリンプロテアーゼポリペプチドの製造
クローニング

目的のセリンプロテアーゼポリペプチドをコードする合成遺伝子を、何らタグを用いず大腸菌発現E3ベクター（GenScript）へクローニングした。

【0151】

タイセイヨウダラからの野生型トリプシンIをコードしている核酸は、以下の配列番号4（pUC57中）に示される。

50

1 GAAGAAGATA AAATCGTTGG CGGCTATGAA TGCACGAAAC ACTCGCAGGC ACACCAGGTC
 61 TCACTGAACA GCGGTTACCA CTTTTGCGGC GGTAGTCTGG TTAGCAAAGA TTGGGTTGTT
 121 AGTGCAGGCC ATTGCTATAA AAGCGTGCTG CGTGTTCGCC TGCGAACA TCACATTGCT
 181 GTGAATGAAG GCACCGAACAA GTACATTAGC TCTAGTAGCG TTATCCGCCA TCCGAACTAC
 241 TCTAGTTACA ACATCAACAA CGATATCATG CTGATCAAAC TGACCAAACC GGCGACGCTG
 301 AACCGATATG TGCACTGCCGT TGCACTGCCG ACCGAATGCG CAGCGGATGC AACCATGTGT
 361 ACCGTGAGCG GCTGGGGTAA TACGATGAGC TCTGTTGCCG ATGGCGATAA ACTGCAGTGC
 421 CTGTCTCTGC CGATTCTGAG TCATGCCGAT TGTGCCAACT CTTATCCGGG CATGATCACG
 481 CAGAGCATGT TTTGCGCCGG TTACCTGGAA GGCGGTAAAG ATAGCTGCCA GGGTGATTCT
 541 GGCGGTCCGG TGTTTGTAA CGGCGTTCTG CAGGGTGTGG TTAGCTGGG CTACGGTTGT
 601 GCAGAACGTG ATCACCCGGG TGTCTATGCT AAAGTCTGTG TGCTGTCGGG CTGGGTCCGT
 661 GATACGATGG CGAACTAT

[配列番号4]

【0152】

タイセイヨウダラからのトリプシンIの突然変異型をコードしている多数の核酸を、通常の技術、即ちPCRによる特定突然変異誘発により合成した。

【0153】

トリプシンのリフォールディング及び精製

大腸菌BL21(DE3)ケミカルコンピテントセルを、目的のセリンプロテアーゼポリペプチド(トリプシン)をコードしている核酸配列を含有するE3ベクターにより、標準的な方法、即ちヒートショック形質転換法を用いて形質転換した。 10

【0154】

チモーゲンポリペプチド(トリプシノーゲン)が過剰発現され、宿主細胞の細胞質において封入体を形成した。

【0155】

誘導後の細胞を集菌し、超音波処理により溶菌した。遠心分離後、封入体を緩衝液(50 mM Tris、10 mM EDTA、2% Triton X-100、300 mM NaCl、2 mM DTT、pH 8.0)中で洗浄し、50 mM Tris、8 M 尿素、pH 8.0中に溶解し、次いで1×PBS、10%グリセロール、pH 7.4中に、4度一晩透析した。 20

【0156】

リフォールディングからの発現されたチモーゲンポリペプチドの純度は、>90%純度を示し、それ以外の精製は必要ないと考えられた。

【0157】

組換えチモーゲンポリペプチドは、次に、タイセイヨウダラから精製された野生型トリプシンI(0.2 U/ml)を添加すること、及び室温で24時間インキュベートすることにより活性化された(実施例D参照)。

【0158】

代表定なポリペプチド

以下のポリペプチドが得られたか、又は精製された:

- (a) タイセイヨウダラから精製された野生型トリプシンI(「WT-Tryp」又は「野生型」);
- (b) 組換えにより発現されたタイセイヨウダラの野生型トリプシンI(配列番号1、「R-Tryp」); 及び
- (c) タイセイヨウダラのトリプシンIの38の異なる突然変異型(即ち、配列番号1の突然変異された配列)。

【0159】

タラトリプシンIの38の異なる突然変異型の配列突然変異は、以下の表3に示される。

【0160】

10

20

30

40

50

【表3】

表3

代表的なトリプシンポリペプチドの配列

ポリペプチド名	配列番号1に関連した 突然変異*
EZA-001	(なし)
EZA-002	N240S, Y241N, S87K
EZA-003	K154T
EZA-004	K154L
EZA-005	K154V
EZA-006	K154E
EZA-007	N98T
EZA-008	I99L
EZA-009	L185G, P225Y
EZA-010	V212I
EZA-011	Y217D, M175K
EZA-012	Y217H
EZA-013	Y217S
EZA-014	A229V
EZA-015	H25Y
EZA-016	H25N
EZA-017	H29Y
EZA-018	H71D
EZA-019	H72N
EZA-020	R74K
EZA-021	R74E
EZA-022	N76T
EZA-023	N76L, Y82F
EZA-024	T79S
EZA-025	T79N
EZA-026	K49E, D50Q
EZA-027	S87R
EZA-028	E21T, H71D, D150S, K154V
EZA-029	S179N, V233N
EZA-030	M135Q
EZA-031	M145K, V148G
EZA-032	M175Q
EZA-033	L63I, S85A
EZA-034	L160I
EZA-035	V138I, L160A, A183V
EZA-036	V121I
EZA-037	V47I, V238I, M242I
EZA-038	V238I
EZA-039	L234Y

*アミノ酸の番号付けは、Protein Data Bank (PDB)エントリー「2EEK!」に従う。

【0161】

代表的なトリプシンポリペプチドは、N末端に融合された活性化ペプチドM E E D K (配列番号5)をもつチモーゲンポリペプチドとして最初に発現された。

【0162】

実施例D：組換えにより発現された、タイセイヨウダラの野生型及び突然変異型のトリプシンIの安定性

10

20

30

40

50

この実施例は、大腸菌で発現された39の組換えトリプシン突然変異体の活性化からの結果を要約する。組換えトリプシンポリペプチド(R-Tryp)の活性は、タイセイヨウダラから精製された野生型トリプシンI(WT-Tryp)により、24時間のインキュベーション後に活性された。

【0163】

材料及び方法

組換えトリプシンの発現

実施例C参照。

【0164】

安定性の評価

組換え試料の活性化及び安定性分析のためにデザインされた実験は、以下のように実施された：

1日目：組換えトリプシンの活性化

組換え酵素(0.2U/ml)を、マイクロタイタープレート中で、室温で24時間の間、野生型トリプシン(0.2U/ml)により活性化した。試料を、20mM Tris-HCl、1mM CaCl₂、50%グリセロール、pH 7.6と混合して、最終体積を200μlとした。

2日目：活性及び安定性測定

活性化された組換え酵素を新たなマイクロタイタープレート(II)に移し、氷上に維持して酵素の安定性を維持しつつ活性化プロセスを停止した。

(a) 初期活性A₀の測定

活性化された酵素の活性(A₀)は、新たなマイクロタイタープレート(III)において、アッセイ緩衝液中の245μlのGly-Pro-Argを、マイクロタイタープレート(II)からの組換え酵素5μlと混合することにより測定した。410nmの吸収を追跡し、以下の式に従って活性を計算した：

【0165】

【数1】

$$U/m\text{l} = \mu\text{mol/L} \cdot s = \frac{\text{傾き } 410\text{ nm}^* d_f * 60 * 10^3}{\epsilon * 1^*} \quad (1)$$

【0166】

[式中、傾きは、30で200秒間のトリプシン活性の反応速度測定からの線形回帰の傾きであり；d_fは、希釈係数であり、60は、秒から分への変換であり、1は、8800M⁻¹cm⁻¹に等しい吸光係数であり、1は、0.7109cmに等しい光路の長さであり、10³は、mol/lからμmol/lへの変換である]。

(b) 温度による不活性化

活性化された酵素100μlを、マイクロタイタープレート(II)から新たなマイクロタイタープレート(IV)へ移し、200μlに希釈して、50%グリセロール、pH 7.6の最終濃度とした。プレート(IV)を60で3.5時間インキュベートした(WT-Trypは初期活性の90%を失う)。残存活性を(a)のもとに測定した。

3日目：自触媒作用

活性化された酵素100μlを、マイクロタイタープレート(II)から、pH 7.6、25%グリセロール及びアッセイ緩衝液中の0.1U/mlのトリプシン100μlを含有する新たなマイクロタイタープレート(V)へ移した。プレートを25で8時間インキュベートした(WT-Trypは初期活性の90%を失う)。活性(A_AX)を、(a)に記載されたように測定した。

【0167】

結果

39の代表的なセリンプロテアーゼポリペプチドの活性、熱安定性及び自触媒作用は、表4に報告される(組換え野生型タラトリプシン、EZA-001、及びその38の突然

変異体）。突然変異間には、活性にかなりの差異がある。いくつかの突然変異体は、5%の残留活性しかもたなかつた野生型トリプシンに比較して、改善された温度安定性を示し、またいくつかの変異体は、野生型トリプシンに比較して、実質的に改善された自己触媒的安定性を示した。

【0168】

【表4】

表4
39の代表的なセリンプロテアーゼポリペプチドの活性

試料ID	初期活性 A0 (U/mg)	熱安定性: 60°Cでの不活性化後の残留活性, Ax (U/ml)	自己触媒的安定性: 25°Cでの不活性化後の残留活性, Ac (U/ml)	相対的熱安定性 (Ax/A0)	相対的自己触媒的安定性 (Ac/A0)
EZA001	0,52	0,10	0,07	0,20	0,13
EZA002	0,48	0,05	0,01	0,11	0,02
EZA003	0,52	0,09	0,05	0,18	0,09
EZA004	0,48	0,09	0,04	0,19	0,07
EZA005	0,36	0,07	0,02	0,19	0,06
EZA006	0,39	0,10	0,03	0,26	0,07
EZA007	0,30	0,10	0,01	0,33	0,04
EZA008	0,36	0,11	0,09	0,31	0,26
EZA009	0,35	0,06	0,03	0,16	0,09
EZA010	0,44	0,12	0,12	0,28	0,28
EZA011	0,36	0,10	0,11	0,28	0,31
EZA012	0,35	0,13	0,11	0,37	0,31
EZA013	0,36	0,07	0,05	0,20	0,13
EZA014	0,41	0,10	0,07	0,25	0,17
EZA015	0,39	0,09	0,11	0,24	0,27
EZA016	0,36	0,22	0,21	0,60	0,56
EZA017	0,35	0,14	0,15	0,41	0,42
EZA018	0,39	0,05	0,02	0,13	0,04
EZA019	0,37	0,10	0,10	0,27	0,27
EZA020	0,39	0,07	0,03	0,19	0,08
EZA021	0,38	0,11	0,09	0,30	0,23
EZA022	0,49	0,09	0,17	0,18	0,34
EZA023	0,39	0,18	0,16	0,47	0,41
EZA024	0,43	0,09	0,07	0,21	0,17
EZA025	0,39	0,17	0,14	0,43	0,37
EZA026	0,33	0,15	0,15	0,44	0,46

【0169】

10

20

30

40

【表5】

表4 (続き)
3.9の代表的なセリンプロテアーゼポリペプチドの活性

試料ID	初期活性 A ₀ (U/mg)	熱安定性: 60°Cでの不活性化後の残留活性, A _x (U/ml)	自己触媒的安定性: 25°Cでの不活性化後の残留活性, A _c (U/ml)	相対的熱安定性 (A _x /A ₀)	相対的自己触媒的安定性 (A _c /A ₀)
EZA027	0,34	0,10	0,06	0,30	0,17
EZA028	0,35	0,16	0,18	0,45	0,51
EZA029	0,35	0,16	0,16	0,46	0,45
EZA030	0,33	0,16	0,11	0,50	0,33
EZA031	0,40	0,14	0,15	0,35	0,36
EZA032	0,44	0,07	0,02	0,16	0,03
EZA033	0,42	0,12	0,10	0,27	0,24
EZA034	0,41	0,13	0,11	0,31	0,27
EZA035	0,42	0,12	0,16	0,29	0,38
EZA036	0,38	0,11	0,13	0,30	0,34
EZA037	0,36	0,10	0,16	0,27	0,44
EZA038	0,41	0,08	0,05	0,20	0,12
EZA039	0,38	0,10	0,04	0,26	0,11
野生型	0,16	0,01	0,01	0,05	0,08

【0170】

実施例E：組換え突然変異型のタラトリプシンIの活性測定

材料及び方法

組換えポリペプチドの発現

タイセイヨウタラからのトリプシンIの野生型アミノ酸配列、及びその38の突然変異型に対応するポリペプチドを、実施例Cに記載された方法を用いて製造した。

【0171】

活性化

組換え酵素（約0.01mg/ml）の活性化は、野生型トリプシン（0.2U/ml）を室温で添加して、24時間インキュベートすることにより達成した。混合物を、20mM Tris-HCl、1mM CaCl₂、50%グリセロール、pH 8.0中に作製して、最終体積を200μlとした。

【0172】

反応速度定数を測定するための活性アッセイ

基質（Gly-Pro-Arg）を、1%DMSOを含有するアッセイ緩衝液中で0.005~0.15mMの濃度において使用した。245μLの基質溶液を、96ウェルプレートにピペットティングした。反応は、5μLの試料混合物（上記）を添加することにより開始し、SpectraMaxプレートリーダーで410nmにおいてモニターした。反応速度測定は、連続した15分間のランの分毎に実施した。

【0173】

結果

結果は、以下の表5に示される。

【0174】

10

20

30

40

50

【表6】

表5

試料	パラメータ	値	WT-Trp に対する比
WT-Trp (purified)	Vmax (Kcat)	0,05372	100
	Km	0,00125	100
	Vmax /Km	43,07	100
EZA-001	Vmax	0,05309	99
	Km	0,00087	70
	Vmax /Km	61,10	142
EZA-002	Vmax	0,05292	99
	Km	0,00110	88
	Vmax /Km	48,09	112
EZA-003	Vmax	0,05162	96
	Km	0,00050	40
	Vmax /Km	104,07	242
EZA-004	Vmax	0,04380	82
	Km	0,00123	99
	Vmax /Km	35,47	82
EZA-005	Vmax	0,05162	96
	Km	0,00094	75
	Vmax /Km	54,95	128
EZA-006	Vmax	0,05289	98
	Km	0,00095	76
	Vmax /Km	55,81	130
EZA-007	Vmax	0,05313	99
	Km	0,00114	91
	Vmax /Km	46,72	108
EZA-008	Vmax	0,05084	95
	Km	0,00083	67
	Vmax /Km	60,90	141
EZA-009	Vmax	0,05287	98
	Km	0,00087	70
	Vmax /Km	60,98	142
EZA-010	Vmax	0,05046	94
	Km	0,00085	68
	Vmax /Km	59,44	138

【0175】

10

20

30

40

【表7】

表5 (続き1)

試料	パラメータ	値	WT-Trp に対する比
EZA-011	Vmax	0,05045	94
	Km	0,00077	62
	Vmax /Km	65,55	152
EZA-012	Vmax	0,04208	78
	Km	0,00101	81
	Vmax /Km	41,74302	97
EZA-013	Vmax	0,05006	93
	Km	0,00068	55
	Vmax /Km	73,65	171
EZA-014	Vmax	0,05177	96
	Km	0,00083	66
	Vmax /Km	62,64	145
EZA-015	Vmax	0,05060	94
	Km	0,00085	68
	Vmax /Km	59,36	138
EZA-016	Vmax	0,05378	100
	Km	0,00103	83
	Vmax /Km	51,99	121
EZA-017	Vmax	0,05457	102
	Km	0,00104	83
	Vmax /Km	52,53124	122
EZA-018	Vmax	0,05962	111
	Km	0,00198	159
	Vmax /Km	30,04	70
EZA-019	Vmax	0,05408	101
	Km	0,00115	92
	Vmax /Km	47,21	110
EZA-020	Vmax	0,04421	82
	Km	0,00095	76
	Vmax /Km	46,77	109

【0176】

【表8】

表5 (続き2)

試料	パラメータ	値	WT-Trpに対する比
EZA-021	Vmax	0,05309	99
	Km	0,00128	103
	Vmax /Km	41,41	96
EZA-022	Vmax	0,05436	101
	Km	0,00119	95
	Vmax /Km	45,85	106
EZA-023	Vmax	0,05470	102
	Km	0,00137	110
	Vmax /Km	40,06	93
EZA-024	Vmax	0,05120	95
	Km	0,00098	78
	Vmax /Km	52,36	122
EZA-025	Vmax	0,05145	96
	Km	0,00090	72
	Vmax /Km	57,43	133
EZA-026	Vmax	0,05042	94
	Km	0,00084	68
	Vmax /Km	59,70	139
EZA-027	Vmax	0,05195	97
	Km	0,00094	76
	Vmax /Km	55,01	128
EZA-028	Vmax	0,04167	78
	Km	0,00076	61
	Vmax /Km	54,60	127
EZA-029	Vmax	0,05058	94
	Km	0,00091	73
	Vmax /Km	55,40	129
EZA-030	Vmax	0,05109	95
	Km	0,00080	65
	Vmax /Km	63,47	147

【0177】

【表9】

表5 (続き3)

試料	パラメータ	値	WT-Trp に対する比
EZA-031	Vmax	0,05174	96
	Km	0,00103	83
	Vmax /Km	50,07	116
EZA-032	Vmax	0,06226	116
	Km	0,00246	197
	Vmax /Km	25,31	59
EZA-033	Vmax	0,05942	111
	Km	0,00166	133
	Vmax /Km	35,80	83
EZA-034	Vmax	0,05672	106
	Km	0,00144	116
	Vmax /Km	39,29	91
EZA-035	Vmax	0,05807	108
	Km	0,00162	130
	Vmax /Km	35,79	83
EZA-036	Vmax	0,04887	91
	Km	0,00210	168
	Vmax /Km	23,28	54
EZA-037	Vmax	0,05754	107
	Km	0,00172	138
	Vmax /Km	33,54	78
EZA-038	Vmax	0,05786	108
	Km	0,00157	126
	Vmax /Km	36,74	85

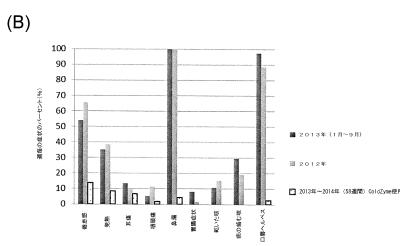
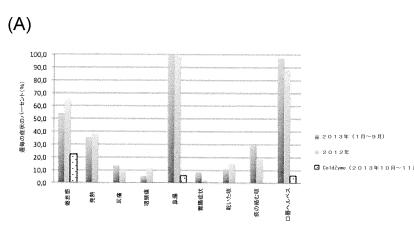
10

20

30

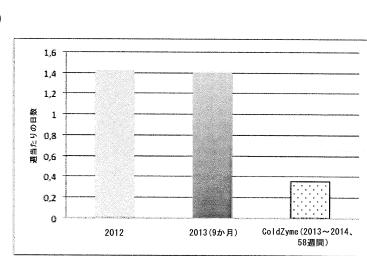
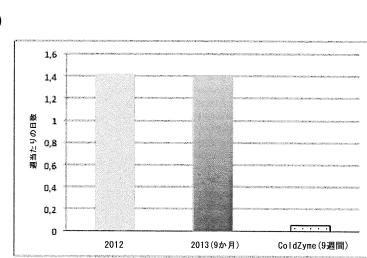
【図1】

FIGURE 1



【図2】

FIGURE 2



【配列表】

0006718375000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 07K 14/46 (2006.01) C 07K 14/46 Z N A
C 12N 9/50 (2006.01) C 12N 9/50

(56)参考文献 特表2003-502071(JP,A)

米国特許出願公開第2012/0258149(US,A1)

Agusta Gudmundsdottir et al., Potential Use of Atlantic Cod Trypsin in Biomedicine, BioMed Research International, 2013, Vol.2013, Article ID 749078, p.1-11

GenPept, 2013年10月16日, Accession No.P16049, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2507250?sat=1&satkey=5917662>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12N 9 / 00 - 9 / 99
A 61 P 31 / 00
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 / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)