

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6549554号
(P6549554)

(45) 発行日 令和1年7月24日(2019.7.24)

(24) 登録日 令和1年7月5日(2019.7.5)

(51) Int.Cl.	F I	
C O 7 K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435	Z N A
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 O 1
請求項の数 24 (全 89 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-503021 (P2016-503021)	(73) 特許権者	506115514
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(65) 公表番号	特表2016-516054 (P2016-516054A)		ティ オブ カリフォルニア
(43) 公表日	平成28年6月2日 (2016.6.2)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/029232		607-5200, オークランド, フラン
(87) 国際公開番号	W02014/144708		クリン ストリート 1111, 12番
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)		フロア
審査請求日	平成29年3月14日 (2017.3.14)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	61/798, 191		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)	(74) 代理人	100123582
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 三橋 真二
前置審査		(74) 代理人	100092624
			弁理士 鶴田 準一
		(74) 代理人	100114018
			弁理士 南山 知広
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コレステロール流出を刺激する、減少した毒性を有するペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コレステロール流出活性を有する単離ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、非極性表面及び極性表面を有する両親媒性 α ヘリックスである、長さが24アミノ酸であるアミノ酸配列を含み、前記極性表面が、脂質／水界面に荷電及び非荷電アミノ酸残基を含み、前記アミノ酸配列が、

配列番号1を参照して決定される、1位、7位、8位、15位、18位、及び19位に、酸性アミノ酸残基を含み、

配列番号1を参照して決定される、2位、6位、9位、10位、13位、16位、17位、20位、21位、及び24位に、疎水性アミノ酸を含み、

配列番号1を参照して決定される、3位、14位、及び23位のうち少なくとも2つに、非荷電アミノ酸残基を有し、ここで、3位、14位、及び23位の第3の位置がRまたはKであり；及び非荷電アミノ酸残基の少なくとも1つがシトルリンであり、及び

配置番号1と少なくとも90%の同一性を有し、または配置番号2と少なくとも90%の同一性を有する、前記単離ポリペプチド。

【請求項2】

前記3位、14位、及び23位のうちの2番目にある前記非荷電アミノ酸残基が、極性非荷電アミノ酸残基である、請求項1に記載の単離ポリペプチド。

【請求項3】

前記アミノ酸配列が、25位がKまたはNであり、26位がSまたはYである、25位

及び 26 位を更に含む、請求項 1 または 2 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 4】

前記アミノ酸配列が、3 位、14 位、及び 23 位のうち 2 つにシトルリンを有する、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 5】

シトルリンを有する前記 2 つの位置が、3 位及び 14 位である、請求項 4 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 6】

前記アミノ酸配列が、3 位、14 位、または 23 位に、Q、N、L、V、I、もしくは A を有し、または 3 位、14 位、または 23 位に、Q もしくは N を有する、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

10

【請求項 7】

2 位、6 位、10 位、13 位、16 位、17 位、20 位、及び 24 位にある残基のうち 4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、または 8 つ全てが、脂肪族アミノ酸である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 8】

前記脂肪族アミノ酸が、L、V、A、及び I からなる群から選択される、請求項 7 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 9】

10 位、13 位、16 位、及び 20 位にある前記残基が、L、I、及び V からなる群から選択される、請求項 7 に記載の単離ポリペプチド。

20

【請求項 10】

10 位、13 位、16 位、及び 20 位にある前記残基が I であるか、または 10 位、13 位、16 位、及び 20 位にある前記残基が L である、請求項 7 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 11】

前記アミノ酸配列が、配列番号 1 と少なくとも 90 % の同一性を有する、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 12】

前記アミノ酸配列が、配列番号 2 と少なくとも 90 % の同一性を有する、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。

30

【請求項 13】

前記ポリペプチドが配列番号 1 または配列番号 2 を含む、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 14】

前記ポリペプチドが、保護基を更に含む、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 15】

前記保護基が、アセチル (Ac)、アミド、3～20 個の炭素のアルキル基、Fmoc、t-ブトキシカルボニル (Tboc)、9-フルオレンアセチル基、1-フルオレンカルボキシ基、9-フルオレンカルボキシ基、9-フルオレノン-1-カルボキシ基、ベンジルオキシカルボニル、キサントール (Xan)、トリチル (Trit)、4-メチルトリチル (Mtt)、4-メトキシトリチル (Mmt)、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチル-ベンゼンスルホニル (Mtr)、メシチレン-2-スルホニル (Mts)、4, 4-ジメトキシベンズヒドリル (Mbh)、トシル (Tos)、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル (Pmc)、4-メチルベンジル (MeBzl)、4-メトキシベンジル (MeOBzl)、ベンジルオキシ (BzlO)、ベンジル (Bzl)、ベンゾイル (Bz)、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys)、1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソシクロヘキシルイデン) エチル (Dde)、2, 6-ジクロロベンジル (2, 6-DiCl-Bzl)、2-クロロベンジルオキシカルボ

40

50

ニル（2-C1-Z）、2-ブロモベンジルオキシカルボニル（2-Br-Z）、ベンジルオキシメチル（Bom）、シクロヘキシルオキシ（cHxO）、t-ブトキシメチル（Bum）、t-ブトキシ（tBuO）、t-ブチル（tBu）、及びトリフルオロアセチル（TFA）からなる群から選択される保護基である、請求項14に記載の単離ポリペプチド。

【請求項16】

前記保護基が、アミノまたはカルボキシ末端に連結される、請求項14または15に記載の単離ポリペプチド。

【請求項17】

前記ポリペプチドが、前記アミノ末端に連結された第1の保護基、及び前記カルボキシ末端に連結された第2の保護基を含む、請求項14または15に記載の単離ポリペプチド。

10

【請求項18】

前記第1の保護基がアセチルであり、及び前記第2の保護基がアミドである、請求項17に記載の単離ポリペプチド。

【請求項19】

前記ペプチドが、鏡像異性D型アミノ酸を含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項20】

請求項1～19のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

20

【請求項21】

脂質と複合体化している、請求項1～19のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、組成物。

【請求項22】

哺乳動物における、コレステロール流出を媒介し、アテローム性動脈硬化症の症状を治療し、内腔壁における不安定プラークを安定させ、グルコースレベルを低下させ、またはアルツハイマー病の症状を治療または予防するための医薬組成物であって、前記医薬組成物が、請求項1～19のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、前記医薬組成物。

【請求項23】

前記哺乳動物がヒトである、請求項22に記載の医薬組成物。

30

【請求項24】

前記ヒトがAPOE4対立遺伝子を有する、請求項23に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年3月15日出願の米国仮出願第61/798,191号の優先利益を主張し、その出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

40

連邦支援の研究及び開発の下で成された発明への権利に関する声明

本発明は、米国エネルギー省によって授与された契約番号DE-AC02-05CH11231、及び国立衛生研究所によって授与された助成金番号HL085791の下で、政府支援によって成された。米国政府は、この発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

上昇したレベルの血漿HDLコレステロールは、アテローム性動脈硬化症の危険性の減少と関連付けられる（Gordon et al., "High Density Lipoprotein As A Protective Factor Against Coronary Heart Disease," Am. J. Med., 62:70

50

7-14 (1977))。HDLの有益な影響は、一部には、抗動脈硬化性コレステロール逆輸送(RCT)経路の媒介における活性に関係する。RCTは、便におけるステロールの排泄のための末梢マクロファージから肝臓までのコレステロールの輸送を伴う(Lewis et al., "New Insights Into The Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport," Circ. Res., 96:1221-32 (2005))。RCTの律速段階は、Apo A-I及びApo Eなどの天然アポリタンパク質によって媒介される、マクロファージからのコレステロール流出の刺激を伴う。コレステロール流出のこのプロセスは、新生HDLを生成し、ATP結合カセットトランスポーターA1(ABCA1)を必要とし、さもないとアテローム性動脈硬化症が発症される(Calpe-Berdiel et al., "Direct Evidence In Vivo of Impaired Macrophage-Specific Reverse Cholesterol Transport in ATP-Binding Cassette Transporter A1-Deficient Mice," Biochim. Biophys. Acta., 1738(1-3):6-9 (2005))。ABCA1は、血漿HDLの重度の欠乏を特徴とするタンジール病、及び早期アテローム性動脈硬化症における欠陥分子である(Attie et al., "Pivotal Role of ABCA1 in Reverse Cholesterol Transport Influencing HDL Levels and Susceptibility to Atherosclerosis," J Lipid Res., 42(11):1717-26 (2001))。アポリタンパク質A及びEはまた、細胞ABCA1タンパク質を、その分解を防止することにより安定させて、高レベルの細胞コレステロール搬出及びHDL集合を確実にする。

【0004】

HDLの臨床的意義は、療法目的でRCTを操作する戦略の開発における関心をかき立てた。ペプチドは、インビボにおいてコレステロール流出を刺激し得ることが特定された(例えば、WO2008/115303及びWO2009/155366を参照されたい)。これらのペプチドは、極性及び非極性表面ならびに酸性アミノ酸残基の整列を有するアルファヘリックスを特徴とする。しかしながら、一部の背景においては、これらのペプチドは、非常に高い薬理的用量で投与する場合、毒性を呈した。したがって、減少した毒性を有する向上したペプチドを提供する必要がある。本発明はこの必要を満たす。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、コレステロール流出活性を有し、細胞傷害性プロファイルの観点から優れた特性を有する、ペプチドに関係する。

【0006】

一態様では、本発明は、完全長アポリタンパク質(例えば、Apo A I及びApo E)のものに匹敵するコレステロール流出活性を有し、完全長アポリタンパク質のものに匹敵するABCA1に対する高選択性を有する、ポリペプチドのファミリーを提供する。その上、該ペプチドのファミリーは、高い薬理的用量で投与する場合に毒性をほとんどまたは全く示さないという点で、望ましい細胞傷害性プロファイルを有する。本発明のポリペプチドも、疾患のアポリタンパク質E欠乏マウスモデルにおける高コレステロール血症及び高脂肪食傷害の存在下で、インビボにおけるマクロファージ泡沫細胞からのコレステロール流出を刺激し、便中ステロール分泌の持続的増加を促進し、定着したアテローム性動脈硬化症の重症度を軽減する。

【0007】

本発明のペプチドは、ABCA1安定化、及びABCA1脂質流出活性を促進するために治療的に使用することができ、心血管疾患の治療のために、単独、または代替的に他の既知である薬剤との組み合わせで使用して、アテローム性動脈硬化症を軽減することができる。加えて、本発明のポリペプチドは、急性冠症候群の治療のために、単独、または代

替的に他の既知である薬剤との組み合わせで使用して、プラーク脂質含量を減少させる、及び不安定プラークを安定させることができる。更に、本発明のペプチドは、脂質異常症、高コレステロール血症、及び炎症の治療のために、単独、または代替的に他の既知である薬剤との組み合わせで使用して、血漿HDL濃度を上昇させる、及び／またはコレステロール逆輸送を促進することができる。更に、本発明のペプチドは、単独、または他の薬剤との組み合わせで使用して、グルコース代謝異常疾患を有する患者においてグルコースを低下させることができる。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、治療的に使用して、アルツハイマー病または前頭側頭型認知症の1つ以上の症状を治療または予防することができる。種々態様では、本発明は以下の実施形態を含むが、これらに限定されない。

【0008】

本発明のペプチドは、ペプチドの薬物動態的及び薬力学的特性を共に規定する、ある特定の特徴を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、血漿中のHDLに選択的に結合し、細胞中のABCA1トランスポーターを標的にする、24アミノ酸残基のコア配列を含む。ペプチドの特徴としては、極性表面の中心に下がったところで酸性残基の整列を持ち、脂質／水界面に正荷電アミノ酸を持つ、両親媒性 α ヘリックス構造が挙げられる。更に、本発明のペプチドは、脂質／水界面の極性表面に、例えば、配列番号1を参照して付番される、24アミノ酸配列の3位、14位、及び／または23位に、1つ以上の非荷電残基を有する。一部の実施形態では、1つ以上の非荷電残基は、極性非荷電残基である。一部の実施形態では、ペプチドは、極性表面に、例えば、3位、14位、及び23位のうち1つまたは2つに、1つ以上の非荷電疎水性アミノ酸を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、極性表面に、例えば、3位、14位、及び23位のうち1つまたは2つに、1つ以上の非荷電脂肪族アミノ酸を含む。典型的な実施形態では、本発明のペプチドは、正味の負荷電を有する。一部の実施形態では、脂肪族アミノ酸が非極性表面では好ましい。一部の実施形態では、アラニンを使用して、疎水性を減少させることができる。

【0009】

ペプチド、例えば、L及びDアミノ酸を含み、逆位形態も同等によく機能するペプチドはまた、相当な立体特異的効果を欠く。

【0010】

一態様では、本発明は、ペプチドが、非極性表面及び極性表面を有する両親媒性 α ヘリックスであるアミノ酸配列を含み、極性表面が、脂質／水界面に荷電及び非荷電アミノ酸残基を含む場合に、コレステロール流出活性を有し、高い薬理用量で毒性をほとんどまたは全く有しない単離ペプチドを提供する。一部の実施形態では、ペプチドは、アミノ酸配列EVc i t S K L E E W L A A L c i t E L A E E L L A R L (配列番号1)を含み、式中、「c i t」はシトルリンを表す。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号1と、少なくとも50%の同一性、または少なくとも60%の同一性、または少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%の同一性、または少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98、または99%の同一性を有する、配列番号1の変種を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、アミノ酸配列EVc i t S K L E E W I A A I c i t E I A E E I L A R L (配列番号2)を含み、式中、「c i t」はシトルリンを表す。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号2と、少なくとも50%の同一性、または少なくとも60%の同一性、または少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%の同一性、または少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98、または99%の同一性を有する、配列番号2の変種を含む。本明細書に記載のアミノ酸位置は、配列番号1または配列番号2を参照して決定される。配列番号1または配列番号2のペプチド変種は、典型的に、配列番号1を参照して付番される、1位、7位、8位、15位、18位、及び19位に、酸性アミノ酸残基を有する。一部の実施形態では、変種は、極性表面に、例えば、配列番号1を参照して付番される、3位、14位、または23位のうち少なくとも1つに、非荷電残基を有する。一部の実施形態では、変種は、配列番号1を参照して付番される、3位、14位、または23位のうち2つに、シトルリンを有する。一部の実施形

10

20

30

40

50

態では、変種は、3位及び14位、3位及び23位、または14位及び23位に、シトルリンを有する。一部の実施形態では、変種は、3位及び14位にシトルリンを有し、23位にRもしくはKを有するか、3位及び23位にシトルリンを有し、14位にRもしくはKを有するか、または14位及び23位にシトルリンを有し、3位にRもしくはKを有する。一部の実施形態では、変種は、2つ以下のR残基しか有しない。例えば、一部の実施形態では、変種は、5位にR、及び23位にRを有してもよい。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、残基が、Q、N、Y、W、A、I、L、Vなどの疎水性アミノ酸である場合、3位、14位、及び23位のうち1つまたは2つに、非荷電残基を有する。一部の実施形態では、3位、14位、及び23位のうち1つまたは2つにある非荷電残基は、A、I、L、またはVなどの脂肪族アミノ酸である。3位、14位、及び23位のうち1つまたは2つに疎水性または脂肪族アミノ酸がある実施形態では、第3の位置は、R、K、またはシトルリンである。一部の実施形態では、変種は、配列番号1を参照して決定される、2位、6位、9位、10位、13位、16位、17位、20位、21位、22位、及び24位に、疎水性アミノ酸を含む。一部の実施形態では、変種は、2位、6位、10位、13位、16位、17位、20位、21位、22位、及び24位のうち、少なくとも1個、または少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、または9個に、脂肪族アミノ酸を含む。一部の実施形態では、変種は、2位、6位、10位、13位、16位、20位、21位、及び24位の各々に、脂肪族残基を含む。一部の実施形態では、脂肪族アミノ酸は、L、V、またはIである。一部の実施形態では、2位、6位、10位、13位、16位、20位、及び21位にある脂肪族アミノ酸残基は、Lである。一部の実施形態では、2位、6位、10位、13位、16位、20位、及び21位にある脂肪族アミノ酸残基は、Iである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸残基は、Vである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸残基は、Vであり、6位、10位、13位、16位、20位、及び21位にある脂肪族アミノ酸残基は、Lである。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位の各々にある脂肪族アミノ酸は、同一のアミノ酸である。一部の実施形態では、脂肪族アミノ酸は、分枝鎖アミノ酸である。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位の各々にある脂肪族アミノ酸は、L、I、またはVからなる群から選択される同一のアミノ酸である。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位の各々にある脂肪族アミノ酸は、Iである。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位の各々にある脂肪族アミノ酸は、Lである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸は、Vであり、6位、21位、及び24位にある脂肪族アミノ酸はLであり、10位、13位、16位、及び20位にある脂肪族アミノ酸残基は、IまたはLである。一部の実施形態では、変種は、11位及び12位にAを含む。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、グルコース低下活性を有し、及び／または、アルツハイマー病もしくは前頭側頭型認知症の1つ以上の症状を治療もしくは予防する。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、対象をインスリンに感作させることができる。例えば、一部の実施形態では、ペプチドは、X₁₀、X₁₃、X₁₆、及びX₂₁で同一の脂肪族残基を有し、その残基は、分枝鎖脂肪族アミノ酸残基である。一部の実施形態では、X₁₀、X₁₃、X₁₆、及びX₂₁が、Lであるか、またはX₁₀、X₁₃、X₁₆、及びX₂₁が、Iである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1または配列番号2を含む。

【0011】

一部の実施形態では、本発明のペプチド、例えば、配列番号1または本明細書に記載の変種は、配列番号1を参照して付番される25位及び26位に、アミノ酸を更に含む。一部の実施形態では、25位にあるアミノ酸残基は、KまたはNであり、26位にあるアミノ酸残基は、SまたはYである。一部の実施形態では、25位にあるアミノ酸はKであり、26位にあるアミノ酸はSである。一部の実施形態では、ペプチドは、アミノ酸配列EVc i t S K L E E W L A A L c i t E L A E E L L A R L K S（配列番号3）を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、EVc i t S K L E E W I A A I c i t E I A E E I L A R L K S（配列番号4）を含む。

10

20

30

40

50

【0012】

一部の実施形態では、本発明は、ポリペプチドが、極性表面の中心に下がったところで酸性残基の整列を持ち、脂質／水界面に正荷電アミノ酸を持つ、両親媒性 α ヘリックス構造という特徴を有するアミノ酸配列を含む場合に、コレステロール流出活性を有し、毒性をほとんどまたは全く有しない、単離ポリペプチドを提供する。更に、本発明のペプチドは、脂質／水界面の極性表面に、例えば、3位、14位、または23位に、1つ以上の非荷電残基を有する。故に、一部の実施形態では、本発明は、以下の24アミノ酸配列：

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$ (配列1)

を含むペプチドを提供する。

10

【0013】

式中、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は独立して、E及びDからなる群から選択され、 X_2 、 X_6 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、 X_{21} 、及び X_{24} は、疎水性アミノ酸残基であり、 X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} は、非荷電アミノ酸であり、 X_4 、 X_{11} 、及び X_{22} は、S、T、G、A、及びYからなる群から独立して選択されるアミノ酸であり、 X_5 は、RまたはKである。 X_5 がRである実施形態では、ペプチドは、典型的に、2つ以下のR残基しか有しない。一部の実施形態では、 X_2 、 X_6 、 X_{10} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、 X_{21} 、及び X_{24} は、脂肪族アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} のうち2つは、シトルリンであり、第3の位置は、RまたはKである。一部の実施形態では、24アミノ酸配列は、2つ以下の芳香族アミノ酸しか有しない。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、グルコース低下活性を有し、及び／または、アルツハイマー病もしくは前頭側頭型認知症の1つ以上の症状を治療もしくは予防する。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、対象をインスリンに感作させることができる。例えば、一部の実施形態では、ペプチドは、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{21} で同一の脂肪族残基を有し、その残基は、分枝鎖脂肪族アミノ酸残基である。一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{21} が、Lであるか、または X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{21} が、Iである。

20

【0014】

本発明は、以下の24アミノ酸配列：

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$ (配列2)

を含む、細胞障害性をほとんどまたは全く有しないコレステロール流出活性を有する単離ペプチドを、加えて提供する。

30

【0015】

式中、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は、酸アミノ酸であり、 X_2 、 X_6 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、及び X_{24} は、疎水性アミノ酸、例えば、脂肪族アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} は、非荷電アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} のうち2つは、シトルリンであり、第3の位置は、RまたはKである。一部の実施形態では、 X_{11} 及び X_{22} は、Aである。一部の実施形態では、 X_4 は、極性アミノ酸、好ましくは極性非荷電アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_4 は、S、T、G、またはYである。一部の実施形態では、 X_4 はSである。一部の実施形態では、 X_5 は正荷電アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_5 は、RまたはKである。一部の実施形態では、 X_5 はRである。一部の実施形態では、 X_3 及び X_{14} はシトルリンである。一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、Iである。一部の実施形態では、24アミノ酸配列は、2つ以下の芳香族アミノ酸しか含まない。一部の実施形態では、 X_5 がRである場合に、ペプチドは、2つ以下のR残基しか有しない。一部の実施形態では、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は独立して、D及びEから選択され、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、Iであり、 X_2 、 X_6 、 X_9 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 、及び X_{24} は、疎水性アミノ酸であり、 X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} のうち2つは、シトルリンであり、第3の位置は、RまたはKである。一部の実施形態では、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は独立して、D及びEから選択され、

40

50

X₁₀、X₁₃、X₁₆、及びX₂₀は、Lであり、X₂、X₆、X₁₁、X₁₂、X₁₇、X₂₁、X₂₂、及びX₂₄は、脂肪族アミノ酸であり、X₃、X₁₄、及びX₂₃のうち2つは、シトルリンであり、第3の位置は、RまたはKである。一部の実施形態では、X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈、及びX₁₉は独立して、D及びEから選択され、X₁₀、X₁₃、X₁₆、及びX₂₀は、Iであり、X₂、X₆、X₉、X₁₁、X₁₂、X₁₇、X₂₁、X₂₂、及びX₂₄は、疎水性アミノ酸、例えば、脂肪族アミノ酸であり、X₃及びX₁₄は、シトルリンであり、X₂₃は、RまたはKである。一部の実施形態では、X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈、及びX₁₉は独立して、D及びEから選択され、X₁₀、X₁₃、X₁₆、及びX₂₀は、Lであり、X₂、X₆、X₁₁、X₁₂、X₁₇、X₂₁、X₂₂、及びX₂₄は、脂肪族アミノ酸であり、X₃及びX₁₄は、シトルリンであり、X₂₃は、RまたはKである。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、グルコース低下活性を有し、及び／または、アルツハイマー病もしくは前頭側頭型認知症の1つ以上の症状を治療もしくは予防する。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、対象をインスリンに感作させることができる。

10

【0016】

一部の実施形態では、本発明は、細胞傷害性をほとんどまたは全く有さず、かつ以下の24アミノ酸配列：

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄（配列3）

を含むコレステロール流出活性を有する単離ペプチドを提供する。

【0017】

20

式中、X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈、及びX₁₉は、E及びDからなる群から独立して選択されるアミノ酸であり、X₂、X₆、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁、及びX₂₄は、A、V、L、またはIからなる群から独立して選択されるアミノ酸であり、X₉は、A、V、L、I、及びWからなる群から選択され、X₃、X₁₄、及びX₂₃のうち少なくとも2つは、シトルリンであり、X₅は、KまたはRであり、X₄、X₁₁、及びX₂₂は、S、T、G、A、及びYからなる群から独立して選択されるアミノ酸である。一部の実施形態では、X₃及びX₁₄はシトルリンである。一部の実施形態では、X₃及びX₁₄はシトルリンであり、X₂₃はRまたはKである。一部の実施形態では、X₃及びX₂₃はシトルリンであり、X₁₄はRまたはKである。一部の実施形態では、X₁₄及びX₂₃はシトルリンであり、X₃はRまたはKである。例えばX₅がRである一部の実施形態では、ペプチドは、2つ以下のR残基しか含まない。一部の実施形態では、24アミノ酸配列は、2つ以下の芳香族アミノ酸しか含まない。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、グルコース低下活性を有し、及び／または、アルツハイマー病もしくは前頭側頭型認知症の1つ以上の症状を治療もしくは予防する。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、対象をインスリンに感作させることができる。例えば、一部の実施形態では、X₁₀、X₁₃、X₁₆、及びX₂₀は、同一の脂肪族アミノ酸残基、例えば、IまたはLである。

30

【0018】

一部の実施形態では、本発明は、細胞傷害性をほとんどまたは全く有さず、かつ以下の24アミノ酸配列：

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄（配列4）

を含むコレステロール流出活性を有する単離ペプチドを提供する。

40

【0019】

式中、X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈、及びX₁₉は、DまたはEであり、X₂、X₆、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁、及びX₂₄は、A、V、L、またはIからなる群から独立して選択されるアミノ酸であり、X₃、X₁₄、及びX₂₃のうち少なくとも2つは、シトルリンであり、X₉はWであり、X₅はKであり、X₄、X₁₁、及びX₂₂は独立して、S及びAからなる群から選択される。一部の実施形態では、X₃及びX₁₄はシトルリンである。一部の実施形態では、X₃及びX₁₄はシトルリンであり、X₂₃はRまたはKである。一部の実施形態では、24アミノ酸配列は、2つ以下の芳香族アミノ酸しか含まない。

50

一部の実施形態では、本発明のペプチドは、グルコース低下活性を有し、及び／または、アルツハイマー病もしくは前頭側頭型認知症の1つ以上の症状を治療もしくは予防する。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、対象をインスリンに感作させることができる。例えば、一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、同一の脂肪族アミノ酸残基、例えば、IまたはLである。

【0020】

一部の実施形態では、本発明は、細胞傷害性をほとんどまたは全く有さず、かつ以下の24アミノ酸配列：

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19} X_{20} X_{21} X_{22} X_{23} X_{24}$ (配列5)

を含むコレステロール流出活性を有する単離ペプチドを提供する。

【0021】

式中、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は、Eであり、 X_2 、 X_6 、 X_{10} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、 X_{21} 、及び X_{24} は、L及びIからなる群から独立して選択されるアミノ酸であり、 X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} のうち少なくとも2つは、シトルリンであり、 X_9 はWであり、 X_5 はK、 X_4 はSであり、 X_{11} 及び X_{22} はAである。一部の実施形態では、 X_3 及び X_{14} はシトルリンである。一部の実施形態では、 X_3 及び X_{14} はシトルリンであり、 X_{23} はRまたはKである。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、グルコース低下活性を有し、及び／または、アルツハイマー病もしくは前頭側頭型認知症の1つ以上の症状を治療もしくは予防する。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、対象をインスリンに感作させることができる。例えば、一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、同一の脂肪族アミノ酸残基、例えば、IまたはLである。

【0022】

本発明は、ペプチドが、非極性表面及び極性表面を有する両親媒性 α ヘリックスであるアミノ酸配列を含み、ペプチドが、配列番号1と、少なくとも60%の同一性、または少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%の同一性を有するか、あるいは、配列番号2と、少なくとも60%の同一性、または少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%の同一性を有し、ペプチドが、3位、14位、または23位に、少なくとも1つの化学的ステープルを含む場合に、毒性をほとんどまたは全く有しないコレステロール流出活性を有する単離ポリペプチドを更に提供する。本明細書に記載の位置は、配列番号1または配列番号2を参照して決定される。故に、例えば、ペプチドは、21位の残基とステープルを形成する、14位の残基を含んでもよい。ペプチドは、1位、7位、8位、15位、18位、及び19位に酸性アミノ酸残基を有することが好ましい。一部の実施形態では、変種は、配列番号1を参照して決定される、2位、6位、9位、10位、13位、16位、17位、20位、21位、22位、及び24位に、疎水性残基を含む。一部の実施形態では、変種は、配列番号1を参照して決定される、2位、6位、10位、13位、16位、17位、20位、21位、22位、及び24位のうち、少なくとも1個、または少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、または9個に、脂肪族アミノ酸を含む。一部の実施形態では、変種は、2位、6位、10位、13位、16位、20位、21位、及び24位の各々に、脂肪族残基を含む。一部の実施形態では、脂肪族アミノ酸は、L、V、またはIである。一部の実施形態では、2位、6位、10位、13位、16位、20位、及び21位にある脂肪族アミノ酸残基は、Lである。一部の実施形態では、2位、6位、10位、13位、16位、20位、及び21位にある脂肪族アミノ酸残基は、Iである。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位の各々にある脂肪族残基は、Iである。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位の各々にある脂肪族残基は、Lである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸残基は、Vである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸残基はVであり、10位、13位、16位、及び20位にある脂肪族アミノ酸残基はLである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸Vであり、6位、21位、及び24位にある脂肪族アミノ酸はLであり、10位、13位、16位、及び20位にある脂肪

10

20

30

40

50

族アミノ酸残基はIである。一部の実施形態では、変種は、11位及び12位にAを含む。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、グルコース低下活性を有し、及び／または、アルツハイマー病もしくは前頭側頭型認知症の1つ以上の症状を治療もしくは予防する。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、対象をインスリンに感作させることができる。例えば、一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、同一の脂肪族アミノ酸残基、例えば、IまたはLである。

【0023】

当技術分野で理解されるように、前述の実施形態のうちのいずれの変異ペプチドも、1つ以上の非自然発生アミノ酸残基を含むことができる。一部の実施形態では、前述の実施形態のうちのいずれにおいても少なくとも1つのシトルリンは、シトルリンアミノ酸類似体で置き換えられる。故に、一部の実施形態では、 X_3 位、 X_{14} 位、及び X_{23} 位のうち1つ以上は、シトルリンの類似体であってもよい。一部の実施形態では、1つ以上の疎水性アミノ酸は、長い脂肪族炭素変動、例えば、長い炭素($C_{5\sim 8}$)アルケニルまたはアルカニル側鎖を有する非自然発生の類似体アミノ酸で置き換えられる。

【0024】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、保護基を更に含む。例えば、ポリペプチドは、構成アミノ酸及び／または末端アミノ酸上のR基が保護基によって遮断される、すなわち、保護されるように、修飾することができる。特にアミノ酸及び／またはカルボキシ末端の遮断は、経口送達を大いに向上させ、血清半減期を有意に増大させ得ることが分かっている。故に、一実施形態では、本発明のポリペプチドは、アミノまたはカルボキシ末端に連結される保護基を更に含む。一実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端に連結される第1の保護基と、カルボキシ末端に連結される第2の保護基を更に含む。

【0025】

好適な保護基としては、アセチル(Ac)、アミド、3～20個の炭素のアルキル基、Fmoc、t-ブトキシカルボニル(Tboc)、9-フルオレンアセチル基、1-フルオレンカルボキシ基、9-フルオレンカルボキシ基、9-フルオレノン-1-カルボキシ基、ベンジルオキシカルボニル、キサントニル(Xan)、トリチル(Trt)、4-メチルトリチル(Mtt)、4-メトキシトリチル(Mmt)、4-メトキシ-2,3,6-トリメチル-ベンゼンスルホン(Trt)、メシチレン-2-スルホン(Mts)、4,4-ジメトキシベンズヒドリル(Mbh)、トシル(Tos)、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホン(Pmc)、4-メチルベンジル(MeBzl)、4-メトキシベンジル(MeOBzl)、ベンジルオキシ(BzlO)、ベンジル(Bzl)、ベンゾイル(Bz)、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシリデン)エチル(Dde)、2,6-ジクロロベンジル(2,6-Diclbzl)、2-クロロベンジルオキシカルボニル(2-Cl-Z)、2-ブロモベンジルオキシカルボニル(2-Br-Z)、ベンジルオキシメチル(Bom)、シクロヘキシルオキシ(cHxO)、t-ブトキシメチル(Bum)、t-ブトキシ(tBuO)、t-ブチル(tBu)、及びトリフルオロアセチル(TFA)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0026】

好ましい実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端に連結される第1の保護基を含み、該第1の保護基としては、アセチル、プロピオニル、及び3～20個の炭素のアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、第1の保護基はアセチルである。別の好ましい実施形態では、ポリペプチドは、カルボキシ末端に連結される第2の保護基を含み、該第2の保護はアミドである。

【0027】

本発明のポリペプチドは、全ての「L」アミノ酸、全ての「D」アミノ酸、または「L」アミノ酸と「D」アミノ酸との混合物を含むことができる。

【0028】

本発明のポリペプチドは、コレステロール流出活性を有する、及び／または、ABCA

10

20

30

40

50

1 安定化活性を有する。また別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、酸化剤による酸化からリン脂質を保護する（すなわち、ポリペプチドが抗酸化活性を有する）。更に別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、接着分子の阻害を含む抗炎症活性を有する。別の実施形態では、本発明のポリペプチドの投与は、LDLを低下させる、及び／または、グルコース制御への好ましい効果、すなわち、グルコース低下効果を有する。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、アルツハイマー病または前頭側頭型認知症の症状を治療または予防する。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、これらの活性の各々を含む。

【0029】

本発明の更なる態様は、本明細書に記載の少なくとも1つの本発明のペプチド、及び薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、薬学的組成物を提供する。一部の実施形態では、薬学的組成物は、追加の薬剤（例えば、コレステロール流出と関連付けられる疾患または障害（例えば、心血管疾患）を治療するための、アトルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フラバスタチン、もしくはロスバスタチンなどのスタチン；コレステラミンもしくはコレステポールなどの胆汁酸結合剤；エゼチミブなどのNiemann-Pick C1-like 1ステロールトランスポーターチャネル阻害剤；アスピリン、チクロピジン、もしくはクロピドグレルなどの血小板凝集阻害剤、ナイアシン／ニコチンアミド、PPAR活性化剤、ビタミンE、またはこれらの組み合わせ）を含む。

【0030】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示のポリペプチドのペプチド模倣体を提供し、該ペプチド模倣体は、類似体ペプチド、例えば、レトロインベルソ類似体もしくはレトロエナンチオ類似体、または非アミド骨格を有する代理ペプチドである。また別の実施形態では、類似体は、トランスオレフィン代理ペプチドまたは誘導体である。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、他の骨格修飾を含み得る。そのようなペプチド類似体または代理物は、本明細書に記載の保護基、及び好ましくはアミノ末端とカルボキシ末端との両方で保護基を更に含む。

【0031】

更なる態様では、本発明は、本明細書に記載の本発明のポリペプチド、例えば、脂質と複合体化する、配列番号1もしくは配列番号2を含むポリペプチド、またはその変種もしくはそのペプチド模倣体を含む、組成物を提供する。一実施形態では、脂質はリン脂質である。別の実施形態では、リン脂質は、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン（「POPC」）である。また別の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体を更に含む。

【0032】

本発明のまた別の態様は、少なくとも1つの本明細書に記載のポリペプチドまたはペプチド模倣体を対象に投与することによる、哺乳動物（例えば、ヒトもしくはチンパンジーなどの霊長類、またはラットもしくはマウスなどのげっ歯類）におけるコレステロール流出の媒介方法を提供する。当業者であれば、ポリペプチド（またはペプチド模倣体）の投与の代わりに、そのようなペプチド（またはペプチド模倣体）をコードする核酸が対象に投与され得ることを、理解するであろう。本発明は、そのような核酸を提供する。それらのコレステロール流出活性に基づき、本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体は、脂質異常症、高コレステロール血症、グルコース代謝異常、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、及び炎症と関連付けられる疾患または状態を治療、緩和、または予防するために有利に使用することができる。

【0033】

本発明の更に別の態様は、少なくとも1つの本明細書に記載のポリペプチドまたはペプチド模倣体を対象に投与することによる、哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症の症状の治療または予防方法を提供する。重ねて、当業者であれば、ポリペプチド（またはペプチド模倣体）の投与の代わりに、そのようなペプチド（またはペプチド模倣体）をコー

ドする核酸が対象に投与され得ることを、理解するであろう。そのような核酸が、本発明によって提供される。この方法の一実施形態では、哺乳動物は、アテローム性動脈硬化症の1つ以上の症状を有すると診断された哺乳動物である。別の実施形態では、哺乳動物は、アテローム性動脈硬化症の危険性があると診断された哺乳動物である。哺乳動物は、ヒトであることが好ましいが、非ヒト動物でもあり得る。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列、または本明細書に記載のその変種を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2、または本明細書に記載のその変種を含む。

【0034】

別の関連した実施形態では、方法は、少なくとも1つの追加の薬剤を投与することを更に含む。そのような薬剤の例としては、グルコース代謝の異常を治療する薬剤、例えば、抗糖尿病薬、アルツハイマー病及び／もしくは前頭側頭型認知症を治療する薬剤、抗体、酵素阻害剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、ステロイド、非ステロイド系抗炎症剤、代謝拮抗剤、サイトカイン、または可溶性サイトカイン受容体が挙げられるが、これらに限定されない。酵素阻害剤は、プロテアーゼ阻害剤またシクロオキシゲナーゼ阻害剤であってもよい。追加の薬剤を、薬学的組成物の一部として添加してもよく、または併用して、もしくは追加の薬剤の生理学的効果が本発明のポリペプチド（複数可）またはペプチド模倣体（複数可）の生理学的効果と重複する期間内に、投与してもよい。例えば、より具体的には、追加の薬剤は、ポリペプチド（複数可）またはペプチド模倣体（複数可）の投与の1週間前、数日前、24時間前、8時間前、または直前に、併用して投与してもよい。あるいは、追加の薬剤は、ポリペプチド（複数可）またはペプチド模倣体（複数可）の投与の1週間後、数日後、24時間後、8時間後、または直後に、投与してもよい。

【0035】

本発明のまた別の態様は、不安定プラークの安定化方法を提供し、該方法は、少なくとも1つの本明細書に記載のポリペプチドまたはペプチド模倣体を哺乳動物に投与することを含む。重ねて、当業者であれば、ポリペプチドの投与の代わりに、そのようなペプチドをコードする核酸が対象に投与され得ることを、理解するであろう。そのような核酸が、本発明によって提供される。この方法の一実施形態では、哺乳動物は、1つ以上の不安定プラークを有すると診断された哺乳動物である。別の実施形態では、哺乳動物は、不安定プラーク（複数可）を有する危険性があると診断される。哺乳動物は、ヒトであることが好ましいが、非ヒト動物でもあり得る。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

【0036】

別の態様では、LDLの低下方法を提供し、該方法は、少なくとも1つの本明細書に記載のポリペプチドまたはペプチド模倣体を哺乳動物に投与することを含む。重ねて、当業者であれば、ポリペプチドの投与の代わりに、そのようなペプチドをコードする核酸が対象に投与され得ることを、理解するであろう。そのような核酸が、本発明によって提供される。この方法の一実施形態では、哺乳動物は、上昇したLDLを有すると診断された哺乳動物である。別の実施形態では、哺乳動物は、上昇したLDLを有する危険性があると診断される。哺乳動物は、ヒトであることが好ましいが、非ヒト動物でもあり得る。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

【0037】

本発明の別の態様では、グルコース代謝異常を有する患者における、例えば、2型もしくは1型糖尿病などの糖尿病、または代謝症候群、または前糖尿病を有する患者における、グルコースレベルの低下方法を提供し、該方法は、少なくとも1つの本明細書に記載のポリペプチドまたはペプチド模倣体を哺乳動物に投与することを含む。重ねて、当業者であれば、ポリペプチドの投与の代わりに、そのようなペプチドをコードする核酸が対象に投与され得ることを、理解するであろう。そのような核酸が、本発明によって提供される

。この方法の一実施形態では、哺乳動物は、グルコース代謝異常を有すると診断された哺乳動物である。別の実施形態では、哺乳動物は、グルコース代謝異常を有する危険性があると診断される。哺乳動物は、ヒトであることが好ましいが、非ヒト動物でもあり得る。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。一部の実施形態では、グルコースを低下させるために投与されるポリペプチドは、本明細書に記載のポリペプチドであるが、但し、該ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含まない。一部の実施形態では、グルコースを低下させるために投与されるポリペプチドは、配列番号2を含む。

【0038】

10

本発明の別の態様では、前頭側頭型認知症、アルツハイマー病、または軽度認知障害の症状の予防または治療方法を提供し、該方法は、少なくとも1つの本明細書に記載のポリペプチドまたはペプチド模倣体を対象に投与することを含む。重ねて、当業者であれば、ポリペプチドの投与の代わりに、そのようなペプチドをコードする核酸が対象に投与され得ることを、理解するであろう。そのような核酸が、本発明によって提供される。この方法の一実施形態では、対象は、アルツハイマー病を有すると診断される。別の実施形態では、対象は、軽度認知障害を有すると診断される。一部の実施形態では、対象は、ApoE4対立遺伝子を有する。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

20

【0039】

本発明はまた、脂質異常症、高コレステロール血症、グルコース代謝異常、炎症、及び／またはアルツハイマー病もしくは前頭側頭型認知症と関連付けられる疾患または状態を治療または予防するためのキットも提供する。一実施形態では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の症状を治療または予防するためのキットを提供し、該キットは、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を収容する容器を備える。一実施形態では、本発明は、グルコース代謝異常、例えば、糖尿病または代謝症候群と関連付けられる疾患を治療または予防するためのキットを提供し、該キットは、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を収容する容器を備える。一実施形態では、本発明は、アルツハイマー病の症状を治療または予防するためのキットを提供し、該キットは、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を収容する容器を備える。キットは、薬学的に許容される担体を更に含み得る。加えて、キットは、疾患または状態を治療または予防するためのポリペプチドまたはペプチド模倣体の使用を教示する説明資料を更に含み得る。本発明のキット中で提供されるポリペプチドは、天然配列または（レトロ）逆位配列のいずれかにある、全ての「L」アミノ酸、全ての「D」アミノ酸、または「L」アミノ酸と「D」アミノ酸との混合物を含むことができる。

30

【0040】

上記のキットに関連して、説明資料は、薬学的組成物の使用のための書面または可聴の使用説明を含む文書または記録媒体を含み得る。説明資料としては、例えば、ボトル上のラベル、箱の中に差し込まれた紙、箱またはカートン上の印字、これらの場所のいずれかに付与されたアドレスのウェブサイトによって提供される説明などが挙げられる。

40

【0041】

また別の態様では、本発明は、哺乳動物、例えば、ヒトにおいてコレステロール流出を媒介するための医薬品の調製における、少なくとも1つの本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体の使用を提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

【0042】

更なる態様では、本発明は、哺乳動物、例えば、ヒトにおいてアテローム性動脈硬化症の症状を治療するための医薬品の調製における、少なくとも1つの本発明のポリペプチド

50

またはペプチド模倣体の使用を提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

【0043】

また更なる態様では、本発明は、哺乳動物、例えば、ヒトにおいて不安定プラークを安定させるための医薬品の調製における、少なくとも1つの本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体の使用を提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

【0044】

また更なる態様では、本発明は、患者において脂質異常症または高コレステロール血症を治療するための医薬品の調製における、少なくとも1つの本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体の使用を提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

【0045】

また更なる態様では、本発明は、哺乳動物、例えば、ヒトにおいて血中グルコースレベルを減少させるための医薬品の調製における、少なくとも1つの本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体の使用を提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

【0046】

また更なる態様では、本発明は、ヒトにおいて、前頭側頭型認知症、アルツハイマー病、または軽度認知障害の症状を予防または治療するための医薬品の調製における、少なくとも1つの本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体の使用を提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸を有するか、または本明細書に記載の変種である。一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するか、または本明細書に記載の変種である。

【0047】

本発明の別の態様は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸、該核酸を含む発現ベクター、該発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0048】

本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体は、研究ツール及び／または診断ツールとしても有用である。例えば、そのようなペプチドを使用して、逆コレステロール欠乏血漿を有する対象、及び逆コレステロール治療への応答者であるそれらの対象を特定することができる。また、本発明のポリペプチドを使用して、他の化合物（例えば、ペプチド模倣体を含む）の抗アテローム性動脈硬化症への潜在力を評価することができる。

【0049】

加えて、本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体は、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体が標識（例えば、放射性標識、蛍光標識など）される場合は特に、動物及び動物モデルにおけるリポタンパク質-受容体間の相互作用を調査するために使用することができる。

【0050】

本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を使用して、脂質代謝経路の解明のために適切な動物モデルを特定することもできる。例えば、ポリペプチドまたはペプチド模倣体を使用して、コレステロール逆輸送に効果を有する、動物モデルならびに遺伝子及び／または薬物相互作用を特定することができる。

【0051】

本発明の他の特徴、目的、及び利点、ならびにその好ましい実施形態は、以下の発明を実施するための形態、実施例、特許請求の範囲、及び図面の読解から明らかとなるであ

10

20

30

40

50

う。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】HDL模倣ペプチドATI-5261の高用量投与は、ラット及びウサギにおいて細胞傷害性応答を誘導する。

【図2】HDL模倣ATI-5261の高用量投与は、ラット及びウサギにおいて血漿トリグリセリド及びコレステロールを増加させる。

【図3】高用量ATI-5261の静脈内注射は、サルにおいて細胞傷害性応答を誘導する。

【図4】ラット、ウサギ、及びカニクイザルに見られたATI-5261の細胞傷害性応答は、マウスにおいて繰り返される。 10

【図5】ペプチド毒性の大部分に寄与するATI-5261の非極性表面と関連付けられる芳香族フェニルアラニン残基である。

【図6】ATI-5261の脂肪族類似体投与後のC57BL/6マウスにおける血漿脂質の濃度である。

【図7】フェニルアラニン残基を欠くATI-5261の脂肪族類似体が、強力なABCA1選択的コレステロール流出活性を保持することを実証する。cAMP有り及び無しのコレステロール流出活性を示すパネルAならびに図面中の全ての同様の2本棒グラフでは、左の棒がcAMPの無いコレステロール流出を表し、右の棒がcAMP後のコレステロール流出（すなわち、ABCA依存性流出）を表す。 20

【図8】ATI-5261におけるリジン残基の毒性特性である。

【図9】ATI-5261におけるアルギニン残基の毒性特性である。

【図10】疎水性を調節して、ATI-5261類似体の残基毒性を減少させることができる。

【図11】疎水性を調節して、ATI-5261類似体の残基毒性を減少させることができるという、更なる証拠である。

【図12】疎水性のより低いアミノ酸へのトリプトファンの更なる置換を使用して、ATI-5261の毒性を減少させることができる。

【図13】疎水性アミノ酸をR14位に使用して、安全かつ効果的なペプチドを創出することができる。 30

【図14】R14L置換を他のATI-5261類似体中で使用して、安全かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出することができる。

【図15】アルギニンのシトルリン置換を使用して、安全かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出することができる。

【図16】ATI-5261のシトルリン類似体は、官能性を保持し、高力価でコレステロール流出を刺激した。

【図17】ATI-5261のシトルリン類似体は、安全で有効なペプチドの生成において他のアミノ酸置換と一致する。

【図18】LeuATI-5261ペプチドは、シトルリン置換を支持して、安全かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出することができる。 40

【図19】ATI-5261のシトルリン類似体は、官能性を保持し、高力価でコレステロール流出を刺激する。

【図20】両親媒性 α ヘリックスの極性表面に沿った負荷電残基の存在は、HDL模倣ペプチドの毒性特性を加減する主要な役割を果たす。

【図21】酸性残基置換を持つペプチドは、細胞コレステロール流出の媒介において官能性を保持する。

【図22】LeuATI-5261の小型の24-mer形態及びそのシトルリン類似体は、ABCAによって媒介されるコレステロール流出の媒介において安全かつ効果的である。

【図23】疎水性ロイシンを使用し、両親媒性 α ヘリックスの脂質/水界面でシトルリン 50

を代置して、安全かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出することができる。

【図24】LeuATI-5261のシトルリン形態は、他のアミノ酸置換を支持して、安全かつ効果的なペプチドを創出する。

【図25】種々のロイシン置換を持つLeuATI-5261のシトルリン形態は、コレステロール流出活性を保持する。

【図26】イソロイシンを使用し、ATI-5261中のフェニルアラニンを代置して、安全かつ効果的なコレステロール流出ペプチドを創出する。

【図27】ATI-5261のイソロイシン形態は、コレステロール流出活性を保持する。

【図28】ペプチドCS6253及びT6991-2は、高力価でABCA1を介して細胞コレステロール流出を刺激する。 10

【図29】Cit.ATI-5261のロイシン形態は、マクロファージABCA1を安定させ、ABCA1に依存する形でコレステロール流出を刺激する。

【図30】ペプチドCS6253は、天然ABCA1オリゴマー形態と相互作用して、細胞脂質流出及び新生HDL集合を媒介する。

【図31】リン脂質を用いて配合したCS6253は、SRB1を介してコレステロール流出を刺激する。

【図32】リン脂質を用いて配合したCS6253は、ABCG1を介してコレステロール流出を刺激する。

【図33】CS6253は、プレβ-HDLの形成を誘導し、ヒト血漿のコレステロール流出活性を強化する。 20

【図34】T6991-2は、プレβ-HDLの形成を誘導し、ヒト血漿のコレステロール流出活性を強化する。

【図35】CS6253は、ハムスターにおけるインビボでのプレβ-HDL形成を誘導する。

【図36】ラットにおけるCS6253の血漿半減期である。S26→Y置換を用いてCS6253を設計して、¹²⁵I（配列は図の上部）による標識化を促進した。

【図37】CS6253は、インビボにおける便へのマクロファージコレステロール逆送(RCT)を刺激する。

【図38】CS6253は、apoE-/-マウスにおいて相当なアテローム性動脈硬化症を減少させた。 30

【図39】CS6253の低用量投与は、apoE-/-マウスにおいて相当なアテローム性動脈硬化症を減少させた。

【図40】皮下(SC)投与したCS6253も、apoE-/-マウスにおいて相当なアテローム性動脈硬化症を減少させた。

【図41】ステーブルペプチドは、ABCA1依存性コレステロール流出を媒介するように設計することができる。

【図42】ATI-5261設計に基づくステーブルペプチドは、濃度に依存する形でABCA1依存性コレステロール流出を媒介する。

【図43】マウスにおけるT6991-2の血中グルコース低下特性である。ペプチドT6991-2： 40

【図44】T6991-2は、DIOマウスにおけるグルコースチャレンジの際に血中グルコース濃度を低下させる。

【図45】T6991-2は、DIOマウスにおいてインスリンへの感受性を向上させる。

【図46】T6991-2は、肥満のob/ob遺伝子マウスモデルにおけるグルコースチャレンジの際に血中グルコース濃度を低下させる。

【図47】CitATI-5261のロイシン形態は、種々のアミノ酸置換を支持して、安全かつ効果的なペプチドを創出する。

【図48】ロイシン置換またはイソロイシン置換のいずれかを持つCitATI-526 50

1の脂肪族形態は、コレステロール流出活性を保持し、マウスにおいて血中グルコースを減少させる。

【図49】漸増する数のイソロイシン残基を持つCS6253の類似体は、安全かつ効果的である。

【図50】漸増するイソロイシン置換を持つCS6253の脂肪族形態は、コレステロール流出活性を保持し、マウスにおいて血中グルコースを減少させる。

【図51】CS6253及びT6991-2は、C57Bl/6マウスにおけるグルコースチャレンジの際に血中グルコース濃度を低下させる。

【図52】ラットにおけるCS6253及びT6991-2の血漿クリアランスである。

【図53】ペプチドT6991-2の全身投与は、マウスにおいて脳のABCトランスポーターを増加させる。

【図54】CS6253またはT6991-2のいずれかの全身投与は、マウスの脳中のapoEレベル及び脂質化を増大させる。

【図55】CS6253またはT6991-2の全身投与は、マウスの脳中のP-tau及びアミロイドβ42を減少させる。

【図56】CS6253及びT6991-2の全身投与は、抑圧されたVGlut1及びapoE受容体2に関するE4表現型を逆転させ、神経可塑性を増大させる。

【発明を実施するための形態】

【0053】

定義

「ABC」または「ATP結合カセット」という用語は、細胞膜にわたる輸送物質 (allocrate) (例えば、コレステロール) の制御された流出及び流入を担う多ドメイン膜タンパク質を指す。ABCタンパク質は、輸送物質の結合及び輸送を担う2つの膜貫通ドメイン (TMD) と、TMDの構造変化へのATP加水分解のエネルギーの連結を担う2つのヌクレオチド結合ドメイン (NBD) との4つのドメインを含む。ファミリーメンバーとして、例えば、ABCA1及びABCA7が挙げられる (例えば、Dean et al., J. Lipid Res., 42:1007-1017 (2001) を参照されたい)。ABCA1は、Denis et al., J. Biol. Chem., 279(40):41529-36 (2004) において特徴付けられる。ABCA1は、コレステロール流出において役割を果たし、コレステロール濃縮条件に曝露される細胞において上方調節され、タンジール病における欠損分子である (Brooks-Wilson et al., Nat. Gen., 22:336-344 (1999)、Bodzioch et al., Nat. Gen., 22:347-351 (1999)、Rust et al., Nat. Gen., 22:352-355 (1999))。ABCA1は急速に代謝回転し、アポリポタンパク質などの好適な安定剤の非存在下では約1時間の半減期を有する (例えば、Wang et al., J. Clin. Invest., 111:99-107 (2003) を参照されたい)。ABCA1配列は、Genbank受託番号AJ012376、NM_173076、NM_015657、NM_005502、NP_005493、O95477に示される。ABCAファミリーメンバーは、Broccardo et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1461:395-404 (1999) に概説される。

【0054】

「両親媒性アルファヘリックス」または「両親媒性αヘリックス」という用語は、一方の表面、すなわち、面が極性であり、主に親水性アミノ酸 (例えば、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、及びGln) から構成され、もう一方の表面が主に疎水性アミノ酸 (例えば、Leu、Ala、Val、Ile、Pro、Phe、Trp、及びMet) を含む非極性面であるらせん状の二次構造を取り得るポリペプチド配列を指す (例えば、Kaiser and Kezdy, Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 16:561 (1987)、及びScience, 223:249 (1984) を参照されたい)。

【0055】

両親媒性 α ヘリックスの極性面は、場合によっては、「負荷電アミノ酸の整列」または「酸性アミノ酸の整列」、すなわち、ポリペプチド二次構造内にほぼ均等に（例えば、ヘリックスターン約1つ、2つ、または3つごとに）位置付けられた一連の負荷電アミノ酸または酸性アミノ酸（例えば、Asp及び／またはGlu）を示す。両親媒性 α ヘリックスは、分子内及び分子間両方のタンパク質間相互作用において役割を果たし、両親媒性 α ヘリックスを含むタンパク質及びリポタンパク質（例えば、アポリポタンパク質を含む）は、脂質（例えば、HDL）輸送及び代謝において役割を果たすと仮定されている（例えば、Anantharamaiah et al., Adv. Exp. Med. Biol., 285:131-40 (1991)を参照されたい）。両親媒性 α ヘリックスの構造及び機能は、例えば、Segrest et al., Proteins, 8(2):103-17 (1990)に概説されている。両親媒性 α ヘリックスを特定するコンピュータによる方法は、例えば、Jones et al., J. Lipid Res., 33(2):141-66 (1992)によって説明されている。例えば、アポリポタンパク質及び血清アミロイドタンパク質を含む、両親媒性 α ヘリックスを含む複数のタンパク質が、特定されている。

10

【0056】

「コレステロール流出」及び「コレステロール流出活性」という用語は、任意の細胞型からのコレステロールの流出を指す。例えば、動脈壁のマクロファージ泡沫細胞は、アポリポタンパク質及び／またはHDLなどの適切なアクセプターにコレステロールを放出（すなわち、搬出）する。コレステロール流出を媒介する化合物は、細胞から細胞外培地または区画へのコレステロールの放出、すなわち移動を強化する。コレステロール流出は、多くの場合、細胞からのリン脂質の流出を伴うか、またはリン脂質の流出に先行される、すなわちリン脂質の流出に続く。コレステロールとリン脂質との両方が協調して放出されると、好適な脂質アクセプター、例えば、アポリポタンパク質またはペプチドの存在下で、HDLがもたらされる。したがって、コレステロール流出及びリン脂質流出の過程は関連しており、相互に同義である。細胞からのコレステロールの放出を強化する化合物は、細胞外に出現するコレステロール及び／またはリン脂質の量を、該化合物の非存在下におけるコレステロール流出のレベルと比較して、少なくとも25%、50%、75%、100%、または少なくとも2倍、4倍、8倍、10倍、もしくはそれ以上増加させる。

20

30

【0057】

「ABCA安定化活性」または「ABCA1安定化」という用語は、その分解を防止することによる、ABCAタンパク質の半減期の強化及び／または延長を指す。ABCA1安定化活性を有する化合物は、タンパク質分解を有意に遅延させることになる。このことは、該化合物の非存在下で検出されるABCA1タンパク質と比較して、少なくとも25%、50%、75%、100%、または少なくとも2倍、4倍、8倍、10倍、もしくはそれ以上の細胞のABCA1タンパク質レベルの増加をもたらす。

【0058】

「抗炎症活性」という用語は、炎症の予防または軽減を指す。炎症は、アテローム性動脈硬化症の発症において役割を果たし、脂質異常症、高コレステロール血症、及び／またはリポタンパク質脂質酸化、ならびに他の疾患と関連付けられると認識される。炎症反応は、動脈壁または脳もしくは他の血管外組織内でのように局所的、及び／あるいは全身的であり得る。抗炎症活性を有するペプチドは、該ペプチドの非存在下の場合と比較して、炎症性メディエータ（例えば、接着分子、サイトカイン、及び／または酸化脂質）の減少、ならびに／またはプラーク及び組織中のマクロファージ及び／もしくはマクロファージ活性化の減少によって測定されるように、炎症反応を減少させることになる。

40

【0059】

「抗酸化活性」という用語は、例えば過酸化水素（ H_2O_2 ）、次亜塩素酸イオン（ $OC1$ ）、ヒドロキシルラジカル（ OH ）、及びスーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）を含む反応性酸素種（ROS）によって起こる酸化の予防または軽減を指す。多くの自然発

50

生物質は、抗酸化活性を保有する。例えば、アポリポタンパク質は脂質の過酸化を阻害し、それによって親油性及び水溶性フリーラジカル開始剤からリン脂質表面を保護することができる（例えば、*Biochemistry*, 41:2089-2096 (2002)を参照されたい）。本発明の背景において、抗酸化活性を持つペプチドは、該ペプチドの非存在下における抗酸化活性よりも、少なくとも25%、50%、75%、100%、または少なくとも2倍、4倍、8倍、10倍、もしくはそれ以上である抗酸化活性を有する。

【0060】

本明細書で使用する「プラーク安定化」とは、泡沫細胞マクロファージからのコレステロールの除去を含むがこれに限定されない、脂質の豊富なプラークからコレステロールを除去することによる、不安定プラークの破裂または侵食の危険性からの安定化を指す。プラークは、血栓形成物質、すなわち、血漿に曝露された場合に、局所的血栓症及び血管閉塞の危険性を伴って、血小板凝集において非常に強力である物質、例えば、組織因子を含む。プラークの破裂及びそのような物質の曝露は、血管からプラークを分離している線維性被膜によって防止される。脂質除去はプラーク安定性を授ける。

【0061】

本明細書で使用する「コレステロール逆輸送(RCT)」とは、マクロファージ泡沫細胞からコレステロールを、及び動脈壁からの脂質の豊富なプラークからコレステロールを除去し、続いて血漿を介して肝臓に運んで、これを取り込み、処理し、便中の中性ステロール(コレステロール)または酸性ステロール(ヒドロキシル化コレステロール/胆汁)として排出する過程を指す。コレステロールはより安定した他の隣接細胞に移行し得るものの、マクロファージ泡沫細胞からのコレステロールの流出は、それ自体がRCTの利益の要件である。しかしながら、排泄のためにHDL様粒子によって肝臓へと輸送することにより、そのようなコレステロールを更に廃棄することが、治療の好ましい態様である。そのような完全なRCTは、動脈中のコレステロール含量の実際の正味除去によって、動脈樹の全般的な若返りを提供する。RCT及びプラーク安定化効果は、ペプチド、もしくはそれらが血漿及び細胞中のリン脂質と自然に形成する複合体によって直接的に授けられるか、または代替的に、ペプチドが内因性HDL粒子に結合し、それによってそれらの特性を変化させ、RCTを促進するのにより効率的となったapoA-I/HDLによって授けられる。

【0062】

「脂質異常症」と関連付けられる疾患または障害とは、組織(すなわち、血液)脂質及びリポタンパク質濃度の改変ならびに/またはコレステロール流出の異常な媒介もしくは異常なABCA安定化に起因する、脂質代謝が異常調節される任意の疾患または障害である。そのような疾患としては、例えば、心疾患、アテローム性動脈硬化病変、卒中、アルツハイマー病、及び貯蔵障害が挙げられる。

【0063】

「アミノ酸」という用語は、自然発生及び合成アミノ酸、ならびに自然発生アミノ酸と同様の形で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を指す。自然発生アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるものであり、また後に修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、及びO-ホスホセリンである。アミノ酸は、側鎖における置換基に応じて、中性、陽性、または陰性であってもよい。「中性アミノ酸」は、非荷電の側鎖置換基を含むアミノ酸を意味する。中性アミノ酸の例としては、アラニン、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、トリプトファン、メチオニン、グリシン、セリン、トレオニン、及びシステインが挙げられる。「陽性アミノ酸」は、側鎖置換基が生理的pHで正荷電されるアミノ酸を意味する。陽性アミノ酸の例としては、リジン、アルギニン、及びヒスチジンが挙げられる。「陰性アミノ酸」は、側鎖置換基が生理的pHで正味の負荷電を担持するアミノ酸を意味する。陰性アミノ酸の例としては、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。アミノ酸類似体とは、自然発生アミノ酸と同一の基本化学構造、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基、及

10

20

30

40

50

びR基に結合しているα炭素有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。そのような類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたポリペプチド骨格を有するが、自然発生アミノ酸と同一の基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、自然発生アミノ酸と同様の形で機能する化合物を指す。アミノ酸はまた、α炭素にLまたはD立体化学を有するアミノ酸を含むことを意味する。アミノ酸及び保存的アミノ酸置換のより詳細な説明は、「ポリペプチド」という表題の節で以下に提供する。

【0064】

「非天然アミノ酸」は、アミノ酸の定義中に含まれ、20種類の一般的な自然発生アミノ酸、または希少な自然発生アミノ酸、例えば、セレノシステインもしくはピロリジンのうちの1つではないアミノ酸を指す。「非天然アミノ酸」という用語と同義に使用される他の用語は、「天然にコードされていないアミノ酸 (non-naturally encoded amino acid)」、「非天然アミノ酸 (unnatural amino acid)」、「非自然発生アミノ酸 (non-naturally-occurring amino acid)」、ならびにそれらの種々にハイフンで結んだ形、及びハイフンで結ばれていない形である。「非天然アミノ酸」という用語は、天然にコードされたアミノ酸の修飾によって天然に発生するがそれら自身は成長するポリペプチド鎖に翻訳複合体により組み込まれないアミノ酸（20種類の一般的なアミノ酸またはピロリジン及びセレノシステインを含むがこれらに限定されない）を含むが、これらに限定されない。天然にコードされていない自然発生アミノ酸の例としては、N-アセチルグルコサミニル-L-セリン、N-アセチルグルコサミニル-L-トレオニン、及びO-ホスホチロシンが挙げられるが、これらに限定されない。加えて、「非天然アミノ酸」という用語は、自然発生せず、合成的に得られるか、または非天然アミノ酸の修飾によって得られてもよいアミノ酸を含むが、これらに限定されない。

【0065】

アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB生化学命名委員会の推奨する、それらの一般に知られている3文字記号または1文字記号のいずれかによって言及され得る。ヌクレオチドも同様に、それらの一般に是認されている1文字コードによって言及され得る。

【0066】

本明細書で使用する「脂肪族」という用語は、1つ以上の官能基で任意に置換される、飽和と不飽和との両方、非芳香族、直鎖（すなわち、非分枝）、分枝、非環式、ならびに環式（すなわち、炭素環式）の炭化水素を含む。当業者なら理解するであろう通り、「脂肪族」は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、及びシクロアルキニル部分を非限定的に含むことを、本明細書では意図する。故に、本明細書で使用する「アルキル」という用語は、直鎖、分枝鎖、及び環式のアルキル基を含む。類似の従来型は、「アルケニル」、「アルキニル」などの他の総称に適用される。なおその上、本明細書で使用する「アルキル」、「アルケニル」、「アルキニル」などという用語は、置換基と非置換基との両方を包含する。ある特定の実施形態では、本明細書で使用する「脂肪族」は、1~20個の炭素原子を有するそれら脂肪族基（環式、非環式、置換、非置換、分枝、または非分枝）を示すために使用される。脂肪族基の置換基としては、安定した部分の形成をもたらす本明細書に記載の置換基のうちいずれもが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、脂肪族、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロ脂肪族、複素環式、アリール、ヘテロアリール、アシル、オキソ、イミノ、チオオキソ、シアノ、イソシアノ、アミノ、アジド、ニトロ、ヒドロキシ、チオール、ハロ、脂肪族アミノ、ヘテロ脂肪族アミノ、アルキルアミノ、ヘテロアルキルアミノ、アリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、アルキルアリール、アリールアルキル、脂肪族オキシ、ヘテロ脂肪族オキシ、アルキルオキシ、ヘテロアルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、脂肪族チオキシ、ヘテロ脂肪族チオキシ、アルキルチオキシ、ヘテロアルキルチオ

キシ、アリールチオキシ、ヘテロアリールチオキシ、アシルオキシなどであり、その各々が更に置換される場合もされない場合もある）。

【0067】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する自然発生アミノ酸の人工的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに自然発生アミノ酸ポリマー及び非自然発生アミノ酸ポリマーに適用される。アミノ酸ポリマーは、完全にL-アミノ酸を含んでもよく、完全にD-アミノ酸を含んでもよく、またはLアミノ酸とDアミノ酸との混合物を含んでもよい。本明細書における「ペプチドまたはペプチド模倣体」という用語の使用は、自然発生アミノ酸及び修飾アミノ酸を含むペプチドを企図することを単に強調するにすぎない。

10

【0068】

本明細書で使用する「ステープリング」または「炭化水素ステープリング」は、少なくとも2つの部分間の少なくとも1つの架橋剤を生成するために試薬と接触させられ得る、炭素間結合形成を助長するための反応を受けることができる少なくとも2つの部分を、ペプチドに導入する。ステープリングは、アルファヘリックス構造などの二次構造に制約を提供する。架橋剤の長さ及び幾何を最適化して、所望の二次構造含量の収率を向上させることができる。提供された制約は、例えば、二次構造の展開を防止することができ、及び／または、二次構造の形状を補強することができる。展開が防止される二次構造は、例えば、より安定である。

20

【0069】

「ステーブル」ペプチドは、選択された数の標準または非標準アミノ酸を含み、炭素間結合形成を助長するための反応を受けることができる少なくとも2つの部分を更に含み、例えばペプチド安定性を調節する、少なくとも2つの部分間の少なくとも1つの架橋剤を生成するために、試薬と接触させられた、ペプチドである。

【0070】

「単離された」、「精製された」、または「生物学的に純粋な」という用語は、その天然状態において見出される、通常それに付随する成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を指す。純度及び均一性は典型的に、ポリアクリルアミド電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技法を使用して決定される。調製物中に存在する優勢種であるタンパク質は、実質的に精製されている。「精製された」という用語は、核酸またはタンパク質が、電気泳動ゲル中で本質的に1本のバンドを生じることを表す。特に、これは、核酸またはタンパク質が少なくとも85%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、最も好ましくは少なくとも99%純粋であることを意味する。

30

【0071】

2つ以上のポリペプチド配列（または2つ以上の核酸）という背景における「同一の」または「同一」率という用語は、以下の配列比較アルゴリズムのうち1つを使用するか、または手動のアライメント及び目視検査によって測定して、比較ウィンドウまたは指定領域にわたって最大限の一致を得るために比較及びアライメントした場合に、同一であるか、あるいは特定の領域（配列番号1の24個のアミノ酸、または配列番号2の24個のアミノ酸など）にわたって、同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドの指定のパーセンテージ、例えば、60%の同一性、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する、2つ以上の配列またはサブ配列を指す。よって、そのような配列は「実質的に同一」とであると称される。この定義はまた、試験配列の相補体を指す。

40

【0072】

配列比較では、典型的に1つの配列が、試験配列を比較する参照配列となる。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列をコンピューターに入力し、必要に応じてサブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。初期

50

設定プログラムパラメータを使用することができ、または代替的なパラメータを指定することもできる。次に、配列比較アルゴリズムによって、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一パーセントが計算される。核酸及びタンパク質の配列比較には、B L A S T及びB L A S T 2. 0アルゴリズム、ならびに初期設定パラメータを使用する。

【0073】

所与のアミノ酸の付番という背景において使用する場合、「を参照して付番される」または「に対応する」または「を参照して決定される」という用語は、所与のアミノ酸配列を参照配列と比較する場合に、指定の参照配列の残基の付番を指す。故に、ポリペプチド中の残基は、該残基が、変種タンパク質に対して、配列番号1のアライメントにあるアミノ酸と整列する場合、配列番号1中の位置のアミノ酸「に対応する」。参照配列に整列されるポリペプチドは、該参照配列と同一の長さである必要はない。

10

【0074】

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、及び一本鎖または二本鎖形態のそれらのポリマーを指す。この用語は、合成、自然発生、及び非自然発生であり、参照核酸と同様の結合特性を有し、かつ参照ヌクレオチドと同様の形で代謝される、既知のヌクレオチド類似体または修飾骨格残基もしくは連結を含む核酸を包含する。そのような類似体の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、メチルホスホン酸、キラルメチルホスホン酸、2-0-メチルリボヌクレオチド、ポリペプチド核酸(PNA)が挙げられるが、これらに限定されない。別途指示のない限り、特定の核酸配列は、その「保存的に修飾された変種」(例えば、縮重コドン置換物)及び相補的配列、ならびに明確に示した配列も包含する。具体的には、縮重コドン置換物は、1つ以上の選択された(または全ての)コドンの第3の位置を混合基及び/またはデオキシイノシン残基で置換した配列を生成することによって得てもよい(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991)、Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260:2605-2608(1985)、Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8:91-98(1994))。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドと互換的に使用される。

20

30

【0075】

「発現ベクター」は、宿主細胞において特定の核酸の転写を可能にする一連の指定の核酸エレメントを伴う、組換えまたは合成により生成された核酸構築物である。発現ベクターは、プラスミド、ウイルス、または核酸断片の一部であり得る。典型的に、発現ベクターは、プロモーターに動作的に連結された転写される核酸を含む。

【0076】

「宿主細胞」とは、発現ベクターを含み、該発現ベクターの複製または発現を支持する細胞を意味する。宿主細胞は、大腸菌などの原核細胞、または酵母、昆虫、両生類、もしくはCHO及びHeLaなどのような哺乳動物細胞などの真核細胞であってもよく、例えば、培養細胞、外植片、及びインビボ細胞であってよい。

40

【0077】

「標識」または「検出可能な標識」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段により検出可能な組成物である。例えば、有用な標識としては、放射性同位体(例えば、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{51}Cr 、または ^{125}I)、蛍光色素、電子密度試薬、酵素(例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、またはELISAで一般的に使用される他のもの)、ビオチン、ジゴキシゲニン、または抗血清もしくはモノクローナル抗体が入手可能なハプテン及びタンパク質が挙げられる(例えば、配列番号1、2、または3によってコードされるポリペプチドを、例えば該ポリペプチドに放射性標識を組み込むことによって検出可能にし、これを使用して、該ポリペプチドと特異的に反応する抗体を検出することができる)。

50

【0078】

本明細書で使用する「緩和する」は、症状の程度を軽減する、低減する、もしくは減少させるか、または疾患徴候のエピソードの発現回数を減少させることを意味する。

【0079】

「予防すること」という用語は、当技術分野で認識されており、高コレステロール血症またはアテローム性動脈硬化などの疾患の再発または発症といった状態に関連して使用する場合、当技術分野において十分に理解されており、組成物を受けていない対象に対して、対象における医学的状态の症状の、頻度を減少させるか、または開始を遅延させる組成物の投与を含む。

【0080】

10

本明細書で使用する「治療すること」は、障害または疾患の進行を遅延させる、停止させる、または逆転させることのいずれかを意味する。好ましい実施形態では、「治療すること」は、障害または疾患が排除する程度まで進行を逆転させることを意味する。

【0081】

本明細書で使用する「阻害する」は、対照試料中で生じ得る量と比較して、量が減少することを意味する。好ましい実施形態では、阻害するは、量が、少なくとも50%以上、または更により好ましくは75%以上、または更には100%、減少することを意味する。

【0082】

本明細書に開示の方法によって治療される「対象」、「患者」、または「哺乳動物」は、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを意味し得る。

20

【0083】

ポリペプチド

本発明は、強力なコレステロール逆輸送(RCT)経路を使用してコレステロール流出を媒介する、非自然発生ポリペプチドのファミリーを提供する。本発明のポリペプチドは、典型的に、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチド、もしくは配列番号1の非自然発生ペプチド変種を含むか、あるいは配列番号2のアミノ酸配列を有するペプチド、もしくは配列番号2の非自然発生変種を含む。配列番号1の変種のアミノ酸位置は、配列番号1を参照して決定される。同様に、配列番号2の変種のアミノ酸位置は、配列番号2を参照して決定される。本発明のペプチドは、アポリポタンパク質(例えば、Apo A-I、Apo Eなど)のものと同様のモル力価でABCA1依存性コレステロール流出を刺激する。ABCA1依存性コレステロール流出の強力かつ選択的なメディエータであることに加えて、該ポリペプチドは、高用量で投与した場合、毒性をほとんどまたは全く有しない。本発明のポリペプチドはまた、ABCA安定化活性、LDL低下活性、抗酸化活性、及び抗炎症活性も有し、グルコース代謝を向上させ、アルツハイマー病の症状を治療するか、これらの活性の任意の組み合わせ、及び好ましくはこれらの活性の全てを有し得る。

30

【0084】

本明細書で使用する「ほとんどまたは全くない毒性」という用語は、「ほとんどまたは全くない細胞傷害性」と互換的に使用され、典型的に、対照のみ、すなわち、ペプチドを含まないPBSなどのビヒクルを使用して得たものと本質的に同等である、高い薬理量で投与した本発明のペプチドについての細胞傷害性レベルを指す。毒性は、インビトロまたはインビボアッセイにおいて測定することができる。例えば、ペプチドを300mg/kgの用量でIP投与した、ラット、マウス、またはウサギモデルにおいては、PBSを50%以上上回る、及び一部の実施形態では、PBSを40%、30%、または20%上回る応答が、有毒であると見なされる。

40

【0085】

本明細書で使用する「高い薬理的用量」は、治療量を上回る、例えば、少なくとも2倍～10倍高い量を指す。例えば、ラット、ウサギ、またはマウスモデルを使用する場合、高い薬理的容量は、30mg/kg～300mg/kgの範囲、または最大500mg/kg

50

kgであってもよい。一部の実施形態では、毒性を評価するための、ラット、マウス、またはウサギモデルにおける高い治療量は、300mg/kgである。

【0086】

両親媒性 α ヘリックスペプチドに関しては、疎水性アミノ酸がヘリックスの片側に集中し、通常は別の側に極性または親水性アミノ酸が集中する。この配置はアポリポタンパク質及び球状タンパク質のアルファヘリックスに共通しており、ヘリックスの片面が疎水性コア方向に配向され、もう一方の面が水に曝露されている表面方向に配向される。異なるアミノ酸配列は、 α ヘリックス構造を形成する異なる傾向を有する。メチオニン、アラニン、ロイシン、グルタミン酸塩、及びリジンはいずれもヘリックス形成傾向が特に高いのに対し、プロリン、グリシン、チロシン、及びセリンはヘリックス形成傾向が比較的低い。プロリンは、アミド水素結合を拠出することができない（アミド水素を有しない）ため、かつその側鎖が立体的に干渉するため、ヘリックスを切断するか、またはもつれさせる傾向にある。その環状構造も、その骨格2面角を -70° 前後に制限し、これは α ヘリックスにはあまり一般的ではない。当業者であれば、プロリンは本明細書に記載の配列中のある特定の位置に存在してもよいが、ヘリックス構造を分断するためには、配列内に3つ以上のプロリンの存在が求められることを理解する。したがって、本発明のポリペプチドは、3つ以下のプロリンを有し、一般的には、アルファヘリックス形成配列中の位置に存在する2つ以下のプロリンを有する。典型的に、プロリンが、本発明のペプチド、例えば、配列番号1のペプチド変種のコアヘリックス構造の配列中に存在するとき、それは、該コアヘリックス配列の1つの位置のみに存在する。

【0087】

コレステロール流出活性を有する本発明のポリペプチドは、非極性表面及び極性表面を有する両親媒性 α ヘリックスであるアミノ酸配列を含み、該極性表面は、脂質/水界面に荷電及び非荷電アミノ酸残基を含む。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1もしくは配列番号2のアミノ酸配列、またはその変種を含み、該変種は、配列番号1または配列番号2と、少なくとも50%、典型的には少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。典型的な実施形態では、変種は、配列番号1を参照して付番される、3位、14位、または23位のうち少なくとも1つに、非荷電残基を有する。一実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0088】

一部の実施形態では、ペプチドは、脂質/水界面に、例えば、配列番号1を参照して付番される、3位、14位、または23位に存在する、シトルリンまたはシトルリンの類似体を有する。一部の実施形態では、変種は、3位及び14位、3位及び23位、または14位及び23位に、シトルリンを有する。

【0089】

配列番号1または配列番号2の変種は、典型的には、限られた数のRアミノ酸残基、典型的には2つ以下のR残基しか有しない。例えば、一部の実施形態では、変種は、5位にR、及び23位にRを有してもよい。一部の実施形態では、変種は、3位及び14位にシトルリンを有し、23位にRを有するか、3位及び23位にシトルリンを有し、14位にRを有するか、または14位及び23位にシトルリンを有し、3位にRを有してもよい。一部の実施形態では、示される位置のRは、K残基で置換してもよい。故に、一部の実施形態では、変種は、5位にKを有し、23位にRを有するか、5位にRを有し、23位にKを有するか、または5位と23位との両方にKを有してもよい。一部の実施形態では、変種は、3位及び14位にシトルリンを有し、23位にKを有するか、3位及び23位にシトルリンを有し、14位にKを有するか、または14位及び23位にシトルリンを有し、3位にKを有してもよい。

【0090】

一部の実施形態では、変種は、配列番号1を参照して決定される、2位、6位、9位、

10位、13位、16位、17位、20位、21位、22位、及び24位のうち、少なくとも1個、または少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個に、疎水性アミノ酸、典型的には脂肪族アミノ酸を含む。一部の実施形態では、配列番号1または配列番号2の変種は、3つ以下、または2つ以下、または1つ以下の芳香族アミノ酸しか含まない。一部の実施形態では、変種は、2位、6位、10位、13位、16位、20位、21位、及び24位の各々に、脂肪族残基を含む。一部の実施形態では、脂肪族アミノ酸は、L、V、A、またはIである。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、10位、13位、16位、及び20位の各々に、同一の脂肪族アミノ酸を含む。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位の各々にある同一の脂肪族アミノ酸は、分枝鎖脂肪族アミノ酸である。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位の各々にある同一の脂肪族アミノ酸は、L、I、またはVからなる群から選択される。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位にあるアミノ酸残基は、Iである。一部の実施形態では、10位、13位、16位、及び20位にあるアミノ酸残基は、Lである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸残基は、VまたはLである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸残基は、Vであり、10位、13位、16位、及び20位にある脂肪族アミノ酸残基は、IまたはLである。一部の実施形態では、2位にある脂肪族アミノ酸はVであり、6位、21位、及び24位にある脂肪族アミノ酸はLであり、10位、13位、16位、及び20位にある脂肪族アミノ酸残基はIまたはLである。一部の実施形態では、変種は、11位及び12位でAを含む。

【0091】

一部の実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1を参照して付番される25位及び26位にアミノ酸を更に含む。典型的な実施形態では、25位にあるアミノ酸残基は、KまたはNであり、26位にあるアミノ酸残基は、S、Y、またはPである。一部の実施形態では、25位にあるアミノ酸はKであり、26位にあるアミノ酸はSである。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列を含む。

【0092】

前述のポリペプチドが本発明のポリペプチドのファミリーを完全には含まないことが、当業者によって容易に理解されるであろう。実際に、本明細書に提供する教示を使用して、他の好適なポリペプチド（例えば、追加的な保存的変種）を、例えば、保存的または半保存的置換（例えば、DのEによる置換）、伸長、欠失などによって日常的に産生することができる。加えて、本明細書に提供するアッセイを使用して、他の好適なポリペプチドは、所望の生物学的活性について日常的にスクリーニングすることができる。

【0093】

同一でないアミノ酸残基は、自然発生または非自然発生であり得る。「同一パーセント」という用語は、2つのアミノ酸配列間（または、同様に本発明によって提供される2つのヌクレオチド配列間）の配列同一性を指す。同一性は、比較の目的で整列され得る各配列中の位置を比較することによって決定することができる。比較する配列中の同等の位置が同一のアミノ酸または塩基によって占有される場合、分子はその位置で同一であり、同等の部位が同一または類似の（例えば、立体的及び／または電気的性質が類似している）アミノ酸残基によって占有される場合、分子はその位置で相同（類似）であると称することができる。相同性、すなわち、類似性、または同一性の率としての表示は、比較する配列によって共有される位置での類似または同一のアミノ酸の数の関数を指す。例えば、FASTA、BLAST、及びENTREZを含む、種々のアライメントアルゴリズム及び／またはプログラムを使用することができる。FASTA及びBLASTは、GCG配列解析パッケージ（University of Wisconsin, Madison, Wis.）の一部として利用可能であり、例えば初期設定で使用することができる。ENTREZは、米国国立衛生研究所下の国立医学図書館の国立生物工学情報センター（Bethesda, MD）を通じて利用可能である。一実施形態では、2つの配列の同一パーセントは、例えば、2つの配列間の単一のアミノ酸ミスマッチであるように各アミノ酸ギャップに荷重するという、ギャップ荷重1で、GCGプログラムによって決定することが

できる。

【0094】

上記の実施形態と重複し得る別の例示的な実施形態では、配列番号1または配列番号2の変種を、保存的（または半保存的）アミノ酸残基で置換する。「保存的アミノ酸置換」という用語は、1つのそのような群からのアミノ酸を、同一の群からの異なるアミノ酸で置換すること（概念的に、またはそれ以外で）を指す。個々のアミノ酸間の共通した特性を規定する機能的な方法は、相同生物の対応するタンパク質間のアミノ酸変化の正規化された頻度を解析することである（例えば、Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlagを参照されたい）。そのような解析に従って、群内のアミノ酸が相互に優先的に交換され、よって全体的なタンパク質構造に及ぼすそれらの影響が相互に最も似ているアミノ酸の群を規定し得る（例えば、Schulz, G. E. and

10

R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlagを参照されたい）。この形で規定される一連のアミノ酸群の一例としては、(i) Glu及びAsp、Lys、Arg、及びHisからなる荷電した群、(ii) Lys、Arg、及びHisからなる正に荷電した群、(iii) Glu及びAspからなる負に荷電した群、(iv) Phe、Tyr、及びTrpからなる芳香族群、(v) His及びTrpからなる窒素環群、(vi) Val、Leu、及びIleからなる大型の脂肪族非極性群、(vii) Met及びCysからなるわずかに極性のある群、(viii) Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln、及びProからなる小型の残基群、(ix) Val、Leu、Ile、Met、及びCysからなる脂肪族群、ならびに(x) Ser及びThrからなる小型のヒドロキシル群が挙げられる。本発明の背景において、アミノ酸の荷電への言及は、生理学的pHでの荷電を指す。

20

【0095】

同様に上記の実施形態と重複し得る別の例示的な実施形態では、「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸による、分子量が類似しているかまたは疎水性が類似している別のアミノ酸の置換を指し得る。「類似の分子量」及び「類似の疎水性」とは、各値の25%、より好ましくは20%、15%、10%、または10%未満内である値を意味する。アミノ酸の分子量及び疎水性についてのデータを表1に示す。疎水性順位を表2に示し、保存的置換は、「＝」と示されるアミノ酸を別のアミノ酸に交換すること（例えば、Tyr＝Trp）、ならびに1つのアミノ酸を、大なり記号及び小なり記号によって示される場合の順位の順番においてそれに隣接している別のアミノ酸に交換することを含む。

30

【0096】

【表 1】

表 1 :

非修飾生理学的 L-α-アミノ酸についてのパラメータ				
アミノ酸	3 文字表記	1 文字表記	分子量 [†]	疎水性 [‡]
アラニン	Ala	A	89.09	0.616
システイン	Cys	C	121.16	0.680
アスパラギン酸塩	Asp	D	133.10	0.028
グルタミン酸塩	Glu	E	147.13	0.043
フェニルアラニン	Phe	F	165.19	1.00
グリシン	Gly	G	75.07	0.501
ヒスチジン	His	H	155.16	0.165
イソロイシン	Ile	I	131.18	0.943
リジン	Lys	K	146.19	0.283
ロイシン	Leu	L	131.18	0.943
メチオニン	Met	M	149.21	0.738
アスパラギン	Asn	N	132.12	0.236
プロリン	Pro	P	115.13	0.711
グルタミン	Gln	Q	146.15	0.251
アルギニン	Arg	R	174.20	0.000
セリン	Ser	S	105.09	0.359
トレオニン	The	T	119.12	0.450
バリン	Val	V	117.15	0.825
トリプトファン	Trp	W	204.23	0.878
チロシン	Tyr	Y	181.19	0.880

【0097】

[†] 所与の分子量は、中性の遊離アミノ酸のものであり、残基重量は、水 1 等量 (18 g / mol) を差し引くことによって得ることができる。

[‡] 所与の疎水性は、「小断片アプローチ」によるコンピュータ log (P) 判定による「調整」値である (“Development of Hydrophobicity Parameters to Analyze Proteins Which Bear Post-or Cotranslational Modifications” Black, S. D. and Mould, D. R., Anal. Biochem., 193:72-82 (1991) を参照されたい)。調整パラメータ = (原パラメータ + 2.061) / 4.484 という式を使用して、原 log (P) 値を所与の調整値に調整する。

【0098】

【表 2】

表 2 :

生理学的 L-α-アミノ酸についての疎水性パラメータの動向
Phe>Leu>Ile>Tyr>Trp>Val>Met>Pro>Cys>Ala>Gly>
Thr>Ser>Lys>Gln>Asn>His>Glu>Asp>Arg

【0099】

2つのポリペプチドが相互の保存的変種であることの別の指標は、2つのポリペプチドが、同一の機能、及び好ましい実施形態では、同一のまたは非常に類似したレベルの活性で同一の機能を実行することである。故に、一実施形態では、本発明のポリペプチドの保存的変種は、配列番号1または配列番号2のポリペプチドに見出される活性の、少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の活性を含み、高用量で投与した場合に毒性を呈さない。重ねて、一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、1つ以上の活性を保有する。例えば、本発明のポリペプチドは、コレステロール流出媒介活性、ABC A安定化活性、LDL低下活性、抗炎症活性、及び抗酸化活性、これらの活性の任意の組み合わせ、または理想的にはこれらの活性の全てを含み得る。保存的変種は、同一の活性のうち1つ以上、及び理想的には同一の活性の全てを有し得る。当業者は、本明細書に記載のスクリーニングアッセイを容易に使用して、2つ以上のポリペプチドが同様の活性を保有するか否かを決定することができる。加えて、当業者は、2つ以上のポリペプチドが同様の生物学的特性または活性を保有するか否かを決定するために使用できる他のスクリーニングアッセイを知るであろう。

10

【0100】

当業者は、そのようなポリペプチドの活性に影響を及ぼすことなく、本発明のポリペプチドのC末端及び／またはN末端にアミノ酸残基を付加し得ることを理解する。故に、本明細書に記載のαヘリックス配列を含む本発明のポリペプチド（例えば、配列番号1または配列番号2）は、24アミノ酸長を超える実施形態、例えば25、26、28、30、32、35、または40アミノ酸長であるペプチドを含む。当業者はまた、本発明のポリペプチドを、例えば、プロリンまたは他のリンカー残基を介して、コレステロール流出を促進し得る別の両親媒性αヘリックスペプチドに連結して、例えば、50、60、70、80、90、または100アミノ酸長の2ヘリックス（b i - h e l i x）または多量体ポリペプチドを形成させ得ることを理解する。したがって、本明細書に記載のペプチドのいずれの配列も、アミノ酸付加を有することができるか、または結合させることができる。例えば、本発明のポリペプチドの1つの分子、例えば、配列番号1もしくは配列番号2、または本明細書に記載のその変種を、プロリン残基を介して該ポリペプチドの別の分子に結合させて、49残基長であるポリペプチドをもたらすことができる。そのようなポリペプチドは、天然の完全長アポリポタンパク質（例えば、A p o A I及びA p o E）のコレステロール流出活性、またはアポリポタンパク質のコレステロール流出媒介ドメインのコレステロール流出活性を超越するコレステロール流出活性を有し得る。当業者は、本明細書に記載の方法論を使用して、C末端及び／またはN末端に追加のアミノ酸を容易に付加し、その後、得られたポリペプチドを所望の活性についてスクリーニングすることができる。

20

30

【0101】

一部の実施形態では、本発明のペプチドは、短い半減期を有する別のペプチドと結合させて、同程度のモル用量で対象に投与する場合に後者のペプチドよりも長い半減期を有する2ペプチド（b i - p e p t i d e）をもたらし得る。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、別の生理学的に活性なペプチドと結合させて、二元機能ハイブリッドペプチドをもたらし得る。一部の実施形態では、本発明のペプチドは、細胞タンパク質からの別の生理学的に活性なペプチドと結合させてもよく、または該生理学的に活性なペプチドは、受容体などの細胞タンパク質を標的にしてもよい。例えば、一部の実施形態では、配列番号1もしくは配列番号2、または本明細書に記載のその変種を、短い半減期を有するA型及びB型ナトリウム利尿ペプチド（A N P、B N P、及びそれらの変種）、ビバリドルジン（ならびに他のトロンビン及びX a阻害剤）、またはグルコース調節ペプチド（G L P - 1、グルカゴン、及びそれらの変種）と結合させてもよい。

40

【0102】

また別の実施形態では、本発明のポリペプチドのペプチド模倣体を提供する。「ペプチド模倣体」としては、リン酸化、キャッピング、脂肪酸修飾、ならびに非天然の骨格構造

50

及び／または側鎖構造の含有を含むがこれらに限定されない、アミノ酸鎖の任意の修飾形態が挙げられる。ペプチド模倣体が、アミノ酸鎖と非ペプチド小分子との間の構造連続体を含むことは、当業者には容易に明らかであろう。ペプチド模倣体は概して、認識可能なポリペプチド様ポリマー単位構造を保持する。故に、ペプチド模倣体は典型的に、天然ポリペプチドが結合する任意の標的分子に結合する機能を保持する。好適なペプチド模倣体の例は、米国特許出願公開第2006/0069030号に開示されており、その教示はあらゆる目的のために参照により組み込まれる。他のペプチド模倣体及びその作製方法は、当業者に既知であろう。

【0103】

本発明のペプチド模倣体は、(i) 代用物、及び(ii) 類似体という2つのカテゴリーのうち1つに分類される。ポリペプチドのアミド結合のために、多くの代用物が開発されてきた。頻繁に活用されるアミド結合用の代用物としては、(i) トランス-オレフィン、(ii) フルオロアルケン、(iii) メチレンアミノ、(iv) ホスホンアミド、及び(v) スルホンアミドという群が挙げられるが、これらに限定されない。そのような代用物の例は、米国特許出願公開第2006/0069030号に開示される。加えて、ポリペプチドの骨格のより実質的な修飾に基づくペプチド模倣体を使用することができる。このカテゴリーに分類されるペプチド模倣体としては、(i) レトロインベルソ類似体、及び(ii) N-アルキルグリシン類似体(いわゆるペプトイド)が挙げられる。重ねて、そのような類似体の例は、米国特許出願公開第2006/0069030号に開示される。

【0104】

本発明の一実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体はレトロインベルソ類似体である。レトロインベルソ類似体は、L-アミノ酸に基づくポリペプチドの合成と同様の形で、当技術分野で既知の方法に従って作製することができる。より具体的には、そのようなレトロインベルソ類似体の調製に好適な方法の例は、Sistoらに発行された米国特許第4,522,752号に記載される。HPLCまたは当業者に既知の任意の他の好適なクロマトグラフィー法によって、最終生成物またはその中間体を精製することができる。

【0105】

別の実施形態において、ペプチドまたはペプチド模倣体はレトロエナンチオ類似体である。レトロエナンチオ類似体は、標準的な固相または液相ポリペプチド合成技法を使用して、市販のD-アミノ酸(またはその類似体)から合成することができる。

【0106】

更に別の実施形態では、ペプチド模倣体はトランス-オレフィン代用ペプチドまたは誘導体である。そのようなトランス-オレフィンペプチドは、Shue et al., Tetrahedron Lett., 28:3225 (1987)の方法に従って、容易に合成することができる。加えて、当技術分野で既知の他の方法も使用することができる。Sjueらの手順または利用可能な他の手順における変動が、トランス-オレフィン誘導体の合成に使用する試薬の性質に応じて必要となり得ることが理解されるであろう。

【0107】

上記の方法によって合成した擬似ジペプチドを他の擬似ジペプチドに結合させて、アミド官能性の代わりにいくつかのオレフィン官能性を持つ擬似ペプチドを作製することも可能である。例えば、標準的な技法により、ある特定のジペプチド配列に対応する擬似ジペプチドを作製し、次いで共に結合させて、残基間に交互にオレフィン結合を有するポリペプチドの類似体を得ることができる。

【0108】

ペプチド模倣体誘導体の更に別のクラスには、ホスホン酸誘導体が含まれる。そのようなホスホン酸誘導体の合成には、既知の合成スキームを適合させることができる(例えば、Loots et al. in "Peptides: Chemistry and Biology," (Escom Science Publishers, Leiden

, p. 118, 1988)、Petrillo et al. in "Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium)," (Pierce Chemical Co. Rockland, Ill., 1985を参照されたい)。

【0109】

他の実施形態では、本発明のポリペプチドは、修飾することができる。修飾の一例は、糖質または脂質部分の導入である。このような修飾により、ポリペプチドを好適な薬学的組成物として有利に調製できるように、種々の媒体におけるポリペプチドの溶解度を変化させることができる。修飾する脂質基としては、ファルネシル基及びミリストイル基が挙げられるが、これらに限定されない。修飾する糖質基としては、任意の自然発生及び／または合成糖の単糖またはオリゴ糖ならびに糖アルコールが挙げられ、これには例えば、グルコース、ガラクトース、ラムノース、マンノース、アラビノース、及びその他の糖、ならびにそれらのそれぞれのアルコールが含まれる。

10

【0110】

ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、翻訳後修飾と類似した修飾をさらに含んでもよい。このような修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化が挙げられるが、これらに限定されない。結果として、修飾したペプチド模倣体は、ポリエチレングリコール、脂質、多糖または単糖、及びリン酸などの非アミノ酸要素を含んでもよい。このような非アミノ酸要素がペプチド模倣体の官能性にもたらす効果は、本明細書に開示のアッセイ法を使用して試験することができる。

20

【0111】

特定の実施形態では、ペプチド模倣体は、自然発生ポリペプチドに対するレトロインベルソポリペプチドなどの、アミノからカルボキシ方向のアミド連結ではない少なくとも1つの骨格連結を含むか、またはアミド連結ではない少なくとも1つの骨格連結を含む。

【0112】

前述のように、本背景における「アミノ酸」への言及は、自然発生アミノ酸と非自然発生アミノ酸との両方を指す。したがって、本発明のペプチドは、1つ以上のアミノ酸類似体を含み得る。アミノ酸類似体の例としては、アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシ、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、スルホ、セレノ、エステル、チオ酸、ホウ酸塩、ボロン酸塩、ホスホ、ホスホノ、複素環、エノン、イミン、アルデヒド、アルコキシアミン、ヒドロキシアミン、ケト、もしくはアミノ置換アミノ酸、またはそれらの任意の組み合わせ；グリコシル化または糖質修飾アミノ酸；ケト含有アミノ酸；糖置換アミノ酸、例えば、糖置換セリンなど；炭素連結糖含有アミノ酸；糖置換システイン；酸化還元活性アミノ酸、 α ヒドロキシ含有酸；アミノチオ酸含有アミノ酸； α 、 α 二置換アミノ酸； β アミノ酸；スルホチロシン、4-ボロノーフェニルアラニン、アミノオキシアミノ酸、アミノオキシリジン、アミノオキシオルニチン、アミノオキシチロシン、またはプロリン以外の環式アミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。他の非天然アミノ酸としては、アルデヒド部分、ケト部分、ベータジケト部分、アルコキシアミン部分、アシルヒドラジド部分、デヒドロアラニン部分、チオエステル部分、エステル部分、ボロン酸部分、アジド部分、アセチレン部分、オレフィン部分、隣接チオールアミン部分などの官能基のうち任意の1つ以上を含む非天然アミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。非天然アミノ酸としては、N-置換グリシン、N-メチルアミノ酸、フェニルアラニン類似体、ならびに自然発生アミノ酸と同様の形で機能する、L-型またはD-型のいずれかにある、リジン(Lys)、オルニチン(Orn)、及び α 、 γ -ジアミノ酪酸(Dbu)の誘導体が挙げられる。

30

40

【0113】

非天然アミノ酸の更なる例としては、アゼチジンカルボン酸、2-アミノアジピン酸、

50

3-アミノアジピン酸、ベータアラニン、アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、第3級ブチルグリシン、2, 4-ジアミノイソ酪酸、デスモシン、2, 2'-ジアミノピメリン酸、2, 3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、ホモプロリン、ヒドロキシリジン、アローヒドロキシリジン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アローイソロイシン、N-メチルアラニン、N-メチルグリシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルペンチルグリシン、N-メチルバリン、ナフトアラニン、ノルバリン、オルニチン、ペンチルグリシン、ピペコリン酸、チオプロリン、アミノフェニルアラニン、ヒドロキシチロシン、及びアミノチロシンが挙げられるが、これらに限定されない。一部の他の実施形態では、非天然アミノ酸は、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸 (Acp)、1-アミノシクロブタン-1-カルボン酸 (Ac b)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (Acp c)、ホモシトルリン (HoCit)、 α -アミノヘキサン二酸 (Aad)、3-(4-ピリジル)アラニン (4-Pal)、3-(3-ピリジル)アラニン (3-Pal)、プロパルギルグリシン (Pra)、 α -アミノイソ酪酸 (Aib)、 α -アミノ酪酸 (Abu)、ノルバリン (Nva)、 α , γ -ジアミノプロピオン酸 (Dpr)、 α , γ -ジアミノ酪酸 (Dbu)、 α -tert-ブチルグリシン (Bug)、3, 5-ジニトロチロシン Tyr (3, 5-ジNO₂)、ノルロイシン (Nle)、3-(2-ナフチル)アラニン (Nal-2)、3-(1-ナフチル)アラニン (Nal-1)、シクロヘキシルアラニン (Cha)、ジ-n-プロピルグリシン (Dpg)、シクロプロピルアラニン (Cpa)、ホモロイシン (Hle)、ホモセリン (HoSer)、ホモアルギニン (Har)、ホモシステイン (Hcy)、メチオニンスルホキシド (Met (O))、メチオニンメチルスルホニウム (Met (S-Me))、 α -シクロヘキシルグリシン (Chg)、3-ベンゾチエニルアラニン (Bta)、タウリン (Tau)、ヒドロキシプロリン (Hyp)、O-ベンジル-ヒドロキシプロリン (Hyp (Bzl))、ホモプロリン (HoPro)、 β -ホモプロリン (β HoPro)、チアゾリジン-4-カルボン酸 (Thz)、ニペコチン酸 (Nip)、イソニペコチン酸 (IsoNip)、3-カルボキシメチル-1-フェニル-1, 3, 8-トリアザスピロ [4, 5] デカン-4-オン (Cptd)、テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボン酸 (3-Tic)、5H-チアゾロ [3, 2-a] ピリジン-3-カルボン酸 (Btd)、3-アミノ安息香酸 (3-Abz)、3-(2-チエニル)アラニン (2-Thi)、3-(3-チエニル)アラニン (3-Thi)、 α -アミノオクタン二酸 (Asu)、ジエチルグリシン (Deg)、4-アミノ-4-カルボキシ-1, 1-ジオキソ-テトラヒドロチオピラン (Acdt)、1-アミノ-1-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)カルボン酸 (Ahch)、1-アミノ-1-(4-ケトシクロヘキシル)カルボン酸 (Akch)、4-アミノ-4-カルボキシテトラヒドロピラン (Actp)、3-ニトロチロシン (Tyr (3-NO₂))、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸 (Ach)、1-アミノ-1-(3-ピペリジニル)カルボン酸 (3-Apc)、1-アミノ-1-(4-ピペリジニル)カルボン酸 (4-Apc)、2-アミノ-3-(4-ピペリジニル)プロピオン酸 (4-App)、2-アミノインダン-2-カルボン酸 (Aic)、2-アミノ-2-ナフチル酢酸 (Ana)、(2S, 5R)-5-フェニルピロリジン-2-カルボン酸 (Ppca)、4-チアゾイルアラニン (Tha)、2-アミノオクタン酸 (Ooa)、2-アミノヘプタン酸 (Aha)、オルニチン (Orn)、アゼチジン-2-カルボン酸 (Aca)、 α -アミノ-3-クロロ-4, 5-ジヒドロ-5-イソアゾール酢酸 (Ac di)、チアゾリジン-2-カルボン酸 (Thz (2-COOH))、アシルグリシン (Agl)、4-シアノ-2-アミノ酪酸 (Cab)、2-ピリジルアラニン (2-Pal)、2-キノイルアラニン (2-Qal)、シクロブチルアラニン (Cba)、フェニルアラニン類似体、リジン誘導体、オルニチン (Orn) 誘導体、 α , γ -ジアミノ酪酸 Dbu 誘導体、それらの立体異性体、及びそれらの組み合わせであってもよい (Liu and Lam, Anal. Biochem., 295: 9-16 (2001)) を参照さ

10

20

30

40

50

れたい)。このように、非天然 α -アミノ酸は、非天然L- α -アミノ酸、非天然D- α -アミノ酸、またはそれらの組み合わせのいずれかとして存在する。追加の好適なアミノ酸類似体としては、 β -アミノ酸及び γ -アミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。 β -または γ -アミノ酸のための好適なR基としては、自然発生アミノ酸及び非天然アミノ酸中に存在する側鎖が挙げられるが、これらに限定されない。N-メチルアミノ酸としては、N-メチル-Ala、N-メチル-Cys、N-メチル-Asp、N-メチル-Glu、N-メチル-Phe、N-メチル-Gly、N-メチル-His、N-メチル-Ile、N-メチル-Arg、N-メチル-Lys、N-メチル-Leu、N-メチル-Met、N-メチル-Asn、N-メチル-Gln、N-メチル-Ser、N-メチル-Thr、N-メチル-Val、N-メチル-Trp、N-メチル-Tyr、N-メチル-Acp、N-メチル-Acb、N-メチル-AcpC、N-メチル-Cit、N-メチル-HoCit、N-メチル-Aad、N-メチル-4-Pal、N-メチル-3-Pal、N-メチル-Pra、N-メチル-Aib、N-メチル-Abu、N-メチル-Nva、N-メチル-Dpr、N-メチル-Dbu、N-メチル-Nle、N-メチル-Nal-2、N-メチル-Nal-1、N-メチル-Cha、N-メチル-Cpa、N-メチル-Hle、N-メチル-HoSer、N-メチル-Har、N-メチル-Hcy、N-メチル-Chg、N-メチル-Bta、N-メチル-2-Thi、N-メチル-3-Thi、N-メチル-Asu、N-メチル-Acdt、N-メチル-Ahch、N-メチル-Akch、N-メチル-Actp、N-メチル-Tyr(3-NO₂)、N-メチル-Ach、N-メチル-3-Apc、N-メチル-4-Apc、N-メチル-4-App、N-メチル-Tha、N-メチル-Aoa、N-メチル-Aha、N-メチル-Orn、N-メチル-Aca、N-メチル-Agl、N-メチル-Cab、N-メチル-2-Pal、N-メチル-Cba、N-メチル-HoPhe、N-メチル-Phg、N-メチル-Phe(4-NH₂)、N-メチル-4-Phe(4-Me)、N-メチル-Phe(4-F)、N-メチル-Phe(4-Cl)、N-メチル-Phe(2-Br)、N-メチル-Phe(3-Br)、N-メチル-Phe(4-Br)、N-メチル-Phe(3-CF₃)、N-メチル-Phe(4-CF₃)、N-メチル-Phe(4-NO₂)、N-メチル-Phe(4-CN)、N-メチル-Bpa、N-メチル-Phg(4-Cl)、N-メチル-Phg(4-Br)、N-メチル-Tyr(Me)、N-メチル-Lys38、N-メチル-Lys27、N-メチル-Lys73、N-メチル-Lys55、N-メチル-Lys28、N-メチル-Lys72、N-メチル-Lys12、N-メチル-Lys123、N-メチル-Lys63、N-メチル-Lys124、N-メチル-Lys82、N-メチル-Lys31、N-メチル-Lys15、N-メチル-Lys125、N-メチル-Lys43、N-メチル-Lys24、N-メチル-Lys5、N-メチル-Lys4、N-メチル-Lys50、N-メチル-Lys81、N-メチル-Orn38、N-メチル-Orn27、N-メチル-Orn73、N-メチル-Orn55、N-メチル-Orn28、N-メチル-Orn72、N-メチル-Orn12、N-メチル-Orn123、N-メチル-Orn63、N-メチル-Orn124、N-メチル-Orn82、N-メチル-Orn31、N-メチル-Orn15、N-メチル-Orn125、N-メチル-Orn43、N-メチル-Orn24、N-メチル-Orn5、N-メチル-Orn4、N-メチル-Orn50、N-メチル-Orn81、N-メチル-Dbu38、N-メチル-Dbu27、N-メチル-Dbu73、N-メチル-Dbu55、N-メチル-Dbu28、N-メチル-Dbu72、N-メチル-Dbu12、N-メチル-Dbu123、N-メチル-Dbu63、N-メチル-Dbu124、N-メチル-Dbu82、N-メチル-Dbu31、N-メチル-Dbu15、N-メチル-Dbu125、N-メチル-Dbu43、N-メチル-Dbu24、N-メチル-Dbu5、N-メチル-Dbu4、N-メチル-Dbu50、N-メチル-Dbu81、これらの立体異性体、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0114】

リジン(Lys)、オルニチン(Orn)、及び α 、 γ -ジアミノ酪酸(Dbu)とし

10

20

30

40

50

ては、Lys 38、Lys 27、Lys 73、Lys 55、Lys 28、Lys 72、Lys 12、Lys 123、Lys 63、Lys 124、Lys 82、Lys 31、Lys 15、Lys 125、Lys 43、Lys 24、Lys 5、Lys 4、Lys 50、Lys 81、Orn 38、Orn 27、Orn 73、Orn 55、Orn 28、Orn 72、Orn 12、Orn 123、Orn 63、Orn 124、Orn 82、Orn 31、Orn 15、Orn 125、Orn 43、Orn 24、Orn 5、Orn 4、Orn 50、Orn 81、Dbu 38、Dbu 27、Dbu 73、Dbu 55、Dbu 28、Dbu 72、Dbu 12、Dbu 123、Dbu 63、Dbu 124、Dbu 82、Dbu 31、Dbu 15、Dbu 125、Dbu 43、Dbu 24、Dbu 5、Dbu 4、Dbu 50、Dbu 81、これらの立体異性体、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。Orn及びDbuの誘導体は、それぞれ、Orn及びDbuの側鎖に付着した対応するカルボン酸を持つリジン誘導体と同様である。ロイシン、バリン、イソロイシン、グリシン、アラニン、メチオニンの疎水性アミノ酸類似体としては、ノルバリン(Nva)、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(Acp)、1-アミノシクロブタン-1-カルボン酸(Acb)、 α -シクロヘキシルグリシン(Chg)、 α -アミノイソ酪酸(Aib)、 α -アミノ酪酸(Abu)、3-(2-チエニル)アラニン(2-Thi)、3-(3-チエニル)アラニン(3-Thi)、3-(3-ピリジル)アラニン(3-Pal)、3-(2-ナフチル)アラニン(Nal-2)、2-アミノ-2-ナフチル酢酸(Ana)、3, 5-ジニトロチロシン(Tyr(3, 5-ジNO₂))、ジエチルグリシン(Deg)、4-アミノ-4-カルボキシ-1, 1-ジオキソテトラヒドロチオピラン(Acdt)、1-アミノ-1-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)カルボン酸(Ahch)、1-アミノ-1-(4-ケトシクロヘキシル)カルボン酸(Akch)、4-アミノ-4-カルボキシテトラヒドロピラン(Actp)、3-ニトロチロシン(Tyr(3-NO₂))、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸(Ach)、2-アミノインダン-2-カルボン酸(Aic)、(2S, 5R)-5-フェニルピロリジン-2-カルボン酸(Ppca)、4-チアゾイルアラニン(Tha)、2-アミノオクタン酸(Aoa)、2-アミノヘプタン酸(Aha)、及びそれらの立体異性体が挙げられる。プロリン類似体はヒドロキシプロリンであることが好ましい。

【0115】

負荷電アミノ酸の類似体としては、 α -アミノヘキサン二酸、 α -アミノオクタン二酸、ホモアスパラギン酸、 γ -カルボキシグルタミン酸、4-カルボキシフェニルアラニン、及びそれらの立体異性体が挙げられる。他の実施形態では、負荷電アミノ酸は、Aad、Bec、及びBmcから選択される。

【0116】

保護基

例えばレトロインベルソペプチド模倣体を含む、本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体は、構成アミノ酸及び／または末端アミノ酸上のR基が保護基によって遮断される、すなわち、保護されるように、修飾することができる。特にアミノ酸及び／またはカルボキシ末端の遮断は、経口送達を大いに向上させ、血清半減期を有意に増大させることが分かっている。本明細書で使用する「保護基」は、望ましくない化学変換から、反応性である可能性のある官能基を保護する、一時的な置換基を指す。このような保護基の例としては、概して、カルボン酸のエステル、アルコールのシリルエーテル、ならびにアルデヒド及びケトンそれぞれのアセタール及びケタールが挙げられる。保護基化学の分野は概説されている(Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1991)。

【0117】

多くの保護基がこの目的に好適である。そのような基としては、アセチル、CH₃-(CH₂)_n-CO-、アミド、Fmoc、t-ブトキシカルボニル(t-BOC)、9-フルオレンアセチル基、1-フルオレンカルボン酸基、9-フルオレンカルボン酸基、9-

フルオレノン-1-カルボン酸基、ベンジルオキシカルボニル、キサントール (Xan)、トリチル (Trit)、4-メチルトリチル (Mtt)、4-メトキシトリチル (Mmt)、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチル-ベンゼンスルホニル (Mtr)、メシチレン-2-スルホニル (Mts)、4, 4-ジメトキシベンズヒドリル (Mbh)、トシル (Tos)、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル (Pmc)、4-メチルベンジル (MeBzl)、4-メトキシベンジル (MeOBzl)、ベンジルオキシ (Bzlo)、ベンジル (Bzl)、ベンゾイル (Bz)、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys)、1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソシクロヘキシルリデン)エチル (Dde)、2, 6-ジクロロベンジル (2, 6-Diclbzl)、2-クロロベンジルオキシカルボニル (2-Cl-Z)、2-ブロモベンジルオキシカルボニル (2-Br-Z)、ベンジルオキシメチル (Bom)、シクロヘキシルオキシ (cHxO)、t-ブトキシメチル (Bum)、t-ブトキシ (tBuO)、t-ブチル (tBu)、及びトリフルオロアセチル (TFA) が含まれるが、これらに限定されない。変数「n」は、0~12の整数であり、典型的には0~4などの0~6である。他の好適な保護基は、米国特許第6, 933, 279号に開示されており、その教示は参照により組み込まれる。

【0118】

一実施形態では、好ましい保護基としては、アセチル基、アミド基、及びアルキル基が挙げられるがこれらに限定されず、アセチル基及びアルキル基がN末端の保護に特に好ましく、アミド基がカルボキシル末端の保護に特に好ましい。好ましい一実施形態では、アセチル基を使用してアミノ末端を保護し、アミド基を使用してカルボキシル末端を保護する。この実施形態では、アセチル化は、無水酢酸を使用して、ポリペプチドが樹脂上にある合成中に達成することができる。アミド保護は、合成に適切な樹脂の選択によって達成し得る。例えば、リンクアミド樹脂を使用することができる。合成の完了後に、Asp及びGluなどの酸性の二官能性アミノ酸、及びLysなどの塩基性アミノ酸、ならびにTyrのヒドロキシル上の半永久的保護基を全て同時に除去する。酸処理を使用してそのような樹脂から放出されたポリペプチドは、N末端がアセチルとして保護され、C末端がNH₂として保護され、同時に他の保護基の全てが除去された状態で得られる。

【0119】

特に好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載の1つ以上のD-アミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、どのアミノ酸も（例えば、どの鏡像異性アミノ酸も）D-アミノ酸である。全てのD-アミノ酸を含むポリペプチドは、L-アミノ酸ポリペプチドのように、高資質及び高親和性でコレステロール流出を刺激することが見出されている。D-アミノ酸は、単純に化学的合成においてD型の誘導体化アミノ酸残基を使用することによって、ポリペプチド中の1つ以上の位置に容易に組み込まれる。固相ポリペプチド合成のためのD型残基は、複数の供給業者から市販されている（例えば、Advanced Chem Tech, Louisville, KY, Nova Biochem, San Diego, CA, Sigma, St Louis, MO, Bachem California Inc., Torrance, CAなどを参照されたい）。D型アミノ酸は、所望のように、ポリペプチド中の任意の位置に組み込むことができる。故に、例えば、一実施形態では、ポリペプチドは単一のD-アミノ酸を含むことができ、一方で他の実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも2個、一般的には少なくとも3個、より一般的には少なくとも4個、最も一般的には少なくとも5個、好ましくは少なくとも6個、より好ましくは少なくとも7個、及び最も好ましくは少なくとも8個のDアミノ酸を含む。一実施形態では、本質的にどの他の（鏡像異性）アミノ酸も、D型アミノ酸である。ある特定の実施形態では、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の鏡像異性アミノ酸が、D型アミノ酸である。特に好ましい一実施形態では、本質的にどの鏡像異性アミノ酸も、D型アミノ酸である。

【0120】

好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドは、自然発生アミノ酸、または自然発生

10

20

30

40

50

アミノ酸のD型を利用するが、非自然発生アミノ酸（例えば、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム、ノルロイシン、エピシロン-アミノカプロン酸、4-アミノブタン酸、テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、8-アミノカプリル酸、4-アミノ酪酸、Lys(N(イプシロン)-トリフルオロアセチル)、 α -アミノイソ酪酸など）を用いる置換を、本発明のポリペプチド中で使用することもできる。他のアミノ酸置換と同様、非自然発生アミノ酸は、典型的に、置換の際に、それらが置換する残基の空間的及びイオンまたは非イオン特徴を保持するように置換される。

【0121】

一部の実施形態では、シトルリンは、シトルリン類似体アミノ酸によって代置される。このような類似体及びそれらの調製は、当業者に既知である。例えば、Sonke, et al., in *Stereoselective Biocatalysis* (2000), pp. 23-58, and *Greene: Protective Groups in Organic Synthesis* (Wiley, New York 1999)。シトルリンアミノ酸類似体の例は、米国特許第7, 888, 133号中に見出される。

10

【0122】

一部の実施形態では、非自然発生アミノ酸が、長い、例えば、 $C_5 \sim 8$ の炭素アルケニルまたはアルカニル側鎖を有するペプチド中の位置に、非自然発生アミノ酸を用いる。

【0123】

一部の実施形態では、配列番号1または配列番号2の変種は、化学的ステープルを含んでもよい。例えば、長さの異なるオレフィン側鎖を含む α -メチル化アミノ酸を、ペプチド配列の位置(i)及び(i+7)に導入し、その後、オレフィンメタセシスによって環化する。本明細書で使用する(i)は参照アミノ酸残基を指し、(i+x)という用語は(i)アミノ酸からのアミノ酸x残基を指す。ペプチドに分解に対する耐性をより持たせ、それらの細胞取り込みを可能にすることにより、炭化水素ステープルは、ペプチド治療薬の伝統的な欠点の一部を克服する。ステープルペプチドは、その天然の形状を保持し、分解に耐性があり、かつ細胞中に入ってそれらの意図した機能を発揮することができる。ステープルペプチドは、当技術分野で既知である。(例えば、Verdine and Helinski *Methods Enzymol.* 2012; 503: 3-3; Schafmeister et al. *J Am Chem Soc* 122: 5891-92 (2000)を参照されたい)。また、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第US 2005/0250680も参照されたい。本発明では、化学的ステープルが、特定の残基に、例えば、配列番号1もしくは配列番号2またはそれらの変種の3位、14位、または23位に存在すると考えられる場合、ペプチド中に、例えば、4位、またはステープル連結を形成するために同様にステープリング残基である引用の位置から7残基に、対応する残基がある。

20

30

【0124】

更なる実施形態では、本発明は、コレステロール流出活性を有するペプチドの毒性を減少させる方法を提供し、該ポリペプチドは、非極性及び極性表面を有する両親媒性 α -ヘリックスを形成するアミノ酸配列を含み、該極性表面は、該極性表面が正荷電及び非荷電アミノ酸を含むように、脂質/水界面に正荷電アミノ酸を有する。非荷電アミノ酸を持つ陽イオン残基の代置により、a)高い薬理的用量で無毒であり、b)効率的に細胞コレステロール流出を刺激する、ポリペプチドが創出される。典型的な実施形態では、本方法は、脂質/水界面の陽イオン残基の代わりにシトルリン及び/またはその類似体を利用することを含む。一部の実施形態では、ATI-5261などのペプチドを修飾して、3位、14位、及び23位のうち少なくとも1つ、典型的には2つで、脂質/水界面にある陽イオン残基を非荷電アミノ酸によって代置することができる。参照により組み込まれるWO 2008/115303は、本発明に従って修飾し得る、すなわち、例えば、3位、14位、及び23位のうち少なくとも1つ、典型的には2つで、脂質/水界面にある陽イオン残基を非荷電アミノ酸によって代置する、ATI-5261の変種を加えて説明する。

40

50

【0125】

ペプチドの調製

本発明のポリペプチドは、既知の技法を使用して調製することができる。例えば、ペプチドは、例えば固相合成を含む、当技術分野で公知の方法を使用して、化学的に合成することができる（例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963) 及びAbelson et al., Methods in Enzymology, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis (1st ed., 1997) を参照されたい）。ポリペプチド合成を行って、完全長ペプチドを生成することができる。あるいは、ポリペプチドの種々の断片を別個に化学的に合成し、その後、化学的方法を使用して組み合わせ、完全長ポリペプチドを産生することもできる。

10

【0126】

特にポリペプチドが「D」アミノ酸残基を含まない場合には、組換えにより発現させることもできる。この実施形態は、組換え遺伝学の分野における日常的な技法に依存する。概して、本明細書に記載の組換えDNA技術における命名法及び実験手順は、当技術分野で周知であり、一般に使用されているものである。クローニング、核酸の単離、増幅、及び精製には、標準的な技法を使用する。組み換えDNA操作を行うための指示を提供する多くの手引書、例えば、Sambrook & Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd Ed, 2001)、及びCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel, et al., John Wiley and Sons, New York, 2009, supplements through 2013) が利用可能である。当業者であれば、既知の技法を使用して、本発明のポリペプチドをコードする核酸を生成し、高レベル発現を得ることができる。

20

【0127】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列などの核酸配列の高レベル発現を得るには、典型的に、本発明のポリペプチド配列をコードする核酸配列を発現ベクターにサブクローニングし、次いで発現に好適な宿主細胞にトランスフェクションする。プロモーター、選択可能なマーカーをコードする配列などを含む発現ベクター成分は、当技術分野で公知である。遺伝子情報を細胞へと輸送するために使用する特定の発現ベクターは、特に重要ではない。真核細胞または原核細胞における発現のために使用する従来型のベクターのいずれを使用してもよい。

30

【0128】

所望の活性を持つポリペプチドの特定方法

本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、当業者に周知の方法を使用して、それらのコレステロール流出を媒介する能力及び／またはABCA（例えば、ABCA1）を安定させる能力について、容易に評価することができる。ペプチドは、更に毒性について評価し得る。

【0129】

いくつかの異なるスクリーニングプロトコルを利用して、コレステロール流出を媒介する及び／またはABCA（例えば、ABCA1）を安定させる本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を特定することができる。一実施形態では、スクリーニング方法は、複数の試験ポリペプチドをスクリーニングして、例えばヒト細胞を含む哺乳動物細胞においてコレステロール流出を媒介する及び／またはABCA（例えば、ABCA1）を安定させるポリペプチドを特定することを伴う。

40

【0130】

コレステロール流出を媒介する能力及び／またはABCAを安定させる能力に関するスクリーニングに加えて、候補の試験ポリペプチドを、例えば抗酸化活性及び抗炎症活性を含む他の活性についてスクリーニングすることもできる。いくつかの異なるスクリーニングプロトコルを利用して、抗酸化活性及び／または抗炎症活性を有する本発明のポリペ

50

チドまたはペプチド模倣体を特定することができる。

【0131】

本明細書に開示のものに加えて数々の他のスクリーニングアッセイを使用して、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を所望の生物学的活性についてスクリーニングできることは、当業者に容易に明らかであろう。

【0132】

活性アッセイーコレステロール流出活性

好適なコレステロール流出アッセイは、例えば、Bieliński, J. K. and Oda, M. N., Biochemistry, 41:2089-2096 (2002)、Jia et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 297:206-213 (2002)に記載される。一部の実施形態では、コレステロール流出を媒介することが知られているポリペプチド（例えば、Apo A-Iのヘリックス9/10）を使用して、細胞系アッセイにおいて、コレステロール流出のさらなるメディエータについてスクリーニングする。例えば、ABCA1タンパク質発現を上方調節するcAMP類似体を使用してコレステロール流出を強化することができる細胞株（例えば、J774マクロファージ）を簡便に使用して、コレステロール流出を媒介する本発明のポリペプチドの能力を評定することができる。細胞を、細胞によるコレステロール取り込みに適した条件下で、標識したコレステロール（例えば、 $[^3\text{H}]$ コレステロール）と共にインキュベートする。故に、細胞コレステロール流出の開始前に、すなわち細胞を試験ポリペプチドと接触させる前に、cAMPまたはcAMP類似体（例えば、CPT-cAMP）を、好適な時間、細胞と共にインキュベートする。培地中に出現する標識したコレステロールの測定値を使用して、試験ポリペプチドのコレステロール流出媒介活性を決定する。

【0133】

活性アッセイーABCA安定化活性

当技術分野で公知の複数のアッセイを使用して、本発明のポリペプチドのABCA安定化活性を測定することができる。例えば、結合アッセイを使用して、試験ポリペプチドがABCA（例えば、ABCA1）に結合する能力を試験することができる。ABCA安定化活性を有するポリペプチドは、コレステロール流出のメディエータである可能性も高いことが見出されている。このように、好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、コレステロール流出を媒介する能力、及びABCAを安定させる能力を有する。1つのスクリーニング実施形態では、結合アッセイは競合アッセイであり得る。他のアッセイとしては、例えば、試験ポリペプチドとの接触後のABCA（例えば、ABCAタンパク質または核酸）の直接測定が挙げられる。

【0134】

結合アッセイ

結合アッセイは通常、ABCAを1つ以上の試験ポリペプチドと接触させること、及びABCAと試験ポリペプチドが結合複合体を形成するのに十分な時間を与えることを伴う。形成された任意の結合複合体は、いくつかの確立された分析技法のいずれかを使用して、検出することができる。タンパク質結合アッセイとしては、免疫組織化学的結合アッセイ、フローサイトメトリー、または他のアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、競合アッセイを使用して、試験ポリペプチドがABCA安定化活性を有するか否かを決定する。競合アッセイは当技術分野で公知である。典型的には、競合化合物、すなわち、ABCAと結合することが知られている化合物を、（例えば、ABCAに結合し得る本発明の試験ポリペプチドの漸増量の存在下で）ABCAへの結合の差が測定できるように標識する。ABCAへの試験化合物の結合に有意に干渉しない限り、アッセイに使用する特定の標識または検出可能な基は、本発明の重要な態様ではない。本明細書に記載のように、検出可能な基（または代替的に、検出可能な部分もしくは標識）は、検出可能な物理的または化学的性質を有する任意の物質であり得る。そのような検出可能な標識は、免疫測定法の分野で十分に開発されており、概して、そのような方法で有

用な大部分の任意の標識を本発明に適用することができる。故に、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的手段により検出可能な任意の組成物である。本発明で有用な標識としては、磁気ビーズ（例えば、DYNABEA DSTM（商標））、蛍光色素（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、Texas red、ローダミンなど）、放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P ）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びELISAで一般的に使用されるその他のもの）、及びコロイド金または着色ガラスまたはプラスチックビーズ（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）などの比色標識が挙げられるが、これらに限定されない。

【0135】

一部の実施形態では、ABCA発現及びABCA非発現細胞を使用して、試験ポリペプチド及び競合化合物（例えば、完全長Apo A-I AまたはApo A-I 9/10ポリペプチド）のABCAに対する相対的なABCA結合親和性を測定することにより、試験ポリペプチドのABCA（例えば、ABCA1）安定化活性を測定する。一部の実施形態では、例えばRemaley et al., J. Lipid Res., 44: 828-836 (2003)に記載のように、ABCAへの完全長Apo A-I Aの結合親和性を、本発明の標識したポリペプチドの結合親和性と比較する。ABCAを発現している細胞を競合化合物の存在下及び非存在下でインキュベートし、その後、一連の濃度の個々の標識した試験ポリペプチド（例えば、本発明の放射性標識ポリペプチド）に曝露する。典型的には、試験ポリペプチドの濃度は、約 $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ～約 $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、約 $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ～約 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、約 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ～約 $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、または約 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ～約 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ の範囲となる。

【0136】

ABCAの直接測定

一部の実施形態では、細胞系アッセイを使用して、ABCA（例えば、ABCAタンパク質または核酸）の直接測定によってABCAの安定化を測定する。細胞系アッセイは、ABCAでトランスフェクションした細胞（例えば、HeLa細胞）を含む、ABCAが発現されている任意の細胞（例えば、J774マクロファージ）中で行うことができる。任意の細胞型を使用することができる。例えば、J774マクロファージを使用して、本発明のポリペプチドの存在下及び非存在下における、相対ABCA1タンパク質レベルを評価することができる。最初に、細胞を、ABCAを誘導する化合物（例えば、cAMP、または8-ブromo-cAMPなどのcAMP類似体）と接触させてABCA（例えば、ABCA1）発現を上方調節し、その後、cAMP刺激の非存在下において、本発明のポリペプチドの存在下及び非存在下で合成ABCA1タンパク質レベルに曝露して、ABCA1タンパク質が安定したかまたは分解されたか否かを評価する。ABCA1タンパク質の相対レベルは、例えば、細胞膜の免疫ブロット解析（Oram et al., J. Biol. Chem., 278: 52379-52385 (2003)）、またはABCA mRNAに対する核酸プローブのハイブリダイゼーションを含む、当技術分野で既知の任意の手段を使用して評価することができる。

【0137】

毒性アッセイ

本発明のペプチドまたはペプチド模倣体は、既知のアッセイを使用して、毒性について評価することができる。そのようなアッセイの例は実施例の節で例解する。毒性は、典型的に、ラット、マウス、サル、またはイヌモデルにおいてアッセイする。実施例1で説明するものなどの例解的アッセイでは、ペプチドを、ウサギまたはラットモデルを使用して、3、30、及び300mg/kgで静脈内投与し、ビヒクルのみも、48時間間隔、全4回の注射で投与する。その後、血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、及びクレアチンキナーゼ（CK）を含む血中の安全性化学パネルを決定することができる。対照の正常値と比較して血中でこれらの酵素のレベルの上昇がある場合、それは毒性を示す。本発明のペプチドは典型的に

、最高用量、この例解的アッセイでは300mg/kgを使用した結果が、ビヒクルのみを受けた対照動物について測定した値と同等である（標準偏差内である）か、またはビヒクルのみで得られたバックグラウンドの2または3倍以下である場合に、無毒であるか、毒性をほとんど有しないと見なされる。一部の実施形態では、毒性アッセイは、本発明のペプチドの毒性をATI-5261のものと比較する場合に行う。毒性をほとんどまたは全く有しない本発明のペプチドは典型的に、300mg/kgの用量で、マウス、ラット、またはウサギに投与した場合、例えば、注射から4時間後に、ATI-5261で観察された毒性の50%未満、好ましくは20%未満、またはより好ましくは10%未満を呈する。他の動物モデル、例えばサルを使用して、毒性を評価してもよい。

【0138】

10

抗酸化活性

本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、当技術分野で既知の方法を使用して、抗酸化活性について評価することができる。例えば、米国特許公開第2003/0087819号は、例えばミセル基質アッセイを含む、ポリペプチドの抗酸化活性を決定するために使用できる複数のアッセイを説明する。リン脂質（例えば、1-パルミトイル-2-リノレオイルホスファチジルコリン）を含むミセル基質を使用して、特定の酵素（例えば、大豆リポキシゲナーゼ及び／またはキサンチン／キサンチンオキシダーゼ）によって触媒される脂質の過酸化の速度を測定する。本発明の組換えポリペプチドをリン脂質ミセルに添加した後、酵素で脂質の過酸化を開始する。共役ジエン（脂質の過酸化の産物）の増加を、25℃で紫外線吸収分光法（234nm）によりモニターする。リン脂質ヒドロペルオキシドの質量を、共役ジエンのモル吸光係数（ $\epsilon = 29,500 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ）を使用して計算する。酸化曲線の直線部分の勾配から、リポキシゲナーゼが媒介する脂質の過酸化の初速度を計算し、形成されたリン脂質過酸化物nmol/分として結果を表すことができる。ポリペプチドの非存在下で得られた脂質過酸化物の蓄積の最大レベル（すなわち、酸化曲線に関連するプラトー）に基づいて、本発明のポリペプチドの効力に関する定量的情報（例えば、脂質の過酸化に対して50%の保護をもたらすポリペプチドの濃度）を導出することが可能である。他の方法は、LDL、VLDL、及びLp(A)としてのApoBリポタンパク質の酸化を防止するポリペプチド資質についてのスクリーニングに関する。

20

【0139】

30

抗酸化活性についてのスクリーニングのための他のアッセイは、PCT公開第WO02/15923号に開示され、その教示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0140】

抗炎症活性

本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、当技術分野で既知の任意の手段を使用して、抗炎症活性について評価することができる。例えば、炎症事象に感受性のある酵素（例えば、レシチン：コレステロールアセチルトランスフェラーゼ（LCAT）またはパラオキシナーゼ（PON））の活性を評定するアッセイを使用して、本発明のポリペプチドの抗炎症活性を評定することができる。好適なアッセイは、例えば、外因性プロテオリポソーム基質を使用するLCAT活性の定量化を説明するChen et al., J. Lipid Res., 23:680-691 (1982)、及びPON活性の定量化を説明するForte et al., J. Lipid Res., 43:477-485 (2002)に記載される。その他のスクリーニングとしては、種々の刺激（例えば、接着分子、TNF- α 、LPS、またはそれらの組み合わせ）後の標的細胞のmRNA発現及び／またはタンパク質産生を阻害するポリペプチド資質をモニターすることが挙げられる。

40

【0141】

更なる試験

コレステロール流出を媒介するかまたはABCAと相互作用すると最初に特定されるポリペプチドを更に試験して、それらのコレステロール流出を媒介する能力及び／またはA

50

B C Aを安定させる能力を確認することができる。このような方法の基本的形式は、最初のスクリーニング中に特定されたリード化合物を、モデルとなる動物に投与することを伴う。確認研究に利用される動物モデルは、概して、任意の種類の哺乳動物である。好適な動物の具体例としては、霊長類（例えば、チンパンジー、サルなど）及びげっ歯類（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギなど）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、A p o E-/-マウス、A p o A-I I-/-マウス、またはA p o C-I I I-/-マウスを使用する。更なる動物モデルは、例えば、M a r s c h a n g e t a l. , S e m. C e l l D e v. B i o l. , 14:25-35 (2003)に記載される。

【0142】

ペプチドは更に、実施例の節、例えば、実施例31で例解する方法を使用して、グルコースを低下させる能力についてスクリーニングしてもよい。例えば、グルコースを低下させる能力は、マウスまたはラットなどの動物モデルを使用して、評価することができる。通常の研究室用固形飼料食を与えたマウス、例えば、C57B1/6マウスに、評価を受けているペプチドを、例えば300mg/kgの用量でI P注射し、注射後、例えば6時間といった期間で血中のグルコースレベルを測定し、それをP B Sを受けた対照動物中の血中グルコースのレベルと比較する。あるいは、ペプチドは、グルコースを低下させる能力について、実施例36で例解するようにスクリーニングしてもよい。例えば、絶食動物に300mg/kgのペプチドをI P注射した3時間後に、2g/kgのグルコースを注射してグルコース負荷試験を行い、その間、120分の間グルコース濃度を監視する。グルコース低下活性を有するペプチドは、対照に対して統計的に有意なグルコースの低下を示す。典型的に、ペプチドは、対照に対して少なくとも5%、多くの場合に少なくとも10%以上、グルコースを低下させる。ペプチドは、肥満の動物モデル、例えば、D I Oマウスにおけるグルコース低下活性についても評価し得る。更に、ペプチドは、例えば、実施例の節の実施例31に記載のように、インスリンへの感受性を向上させる能力について評価してもよい。

【0143】

加えて、ペプチドは、実施例の節で例解するものなどの既知の方法を使用して、a p o E 4及びa p o E 3対立遺伝子関連のアルツハイマー病に与える一般的または選択的効果を含む、アルツハイマー病の症状を治療する能力についてスクリーニングし得る。このようなアッセイの例は、実施例40で提供する。この例では、ヒトa p o E 3またはa p o E 4を発現する、ヒトa p o E 3またはa p o E 4代置マウスの脳におけるP-t a u及び/またはアミロイドβ 42のレベル。アルツハイマー病の症状を治療する能力を有するペプチドは、対照に対して統計的に有意なP-t a u及び/またはアミロイドβ 42レベルの低下を示す。

【0144】

ペプチドは、任意の形式を使用して、活性についてスクリーニングしてもよい。例えば、ハイスループットスクリーニング(H T S)法を使用して、コレステロール流出を媒介する及び/またはA B C Aを安定させる本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を特定し得る。H T S法は、多数の可能性のある治療用化合物（すなわち、コレステロール流出を媒介するか、またはA B C Aを安定させるポリペプチドまたはペプチド模倣体）を含む組み合わせポリペプチドライブラリーを提供することを伴う。次に、そのようなライブラリーを、本明細書に記載するように1つ以上のアッセイでスクリーニングして、所望の特徴的活性を示すライブラリーメンバー（すなわち、特定のポリペプチドまたはペプチド模倣体）を特定する。このようにして特定された化合物は、従来型の「リード化合物」となり得るか、またはそれ自体を可能性のある治療薬または実際の治療薬として使用することができる。

【0145】

薬物動態及び細胞標的化

ペプチドは、H D Lと結合し、ラットで8時間（実施例の節におけるラットP K実施例

10

20

30

40

50

、図36及び52Aを参照されたい)、ヒトで3～5日であると推定される長いHDL半減期を仮定するため、長い間隔での投与が可能となる。他のペプチドと結合した場合のペプチド、小分子、または部分(積荷分子)は、類似の形でこれらの分子の半減期を増大させることができる。血漿中のHDL結合特性及びペプチドのABCA1細胞結合は、心不全、血管疾患、真性糖尿病、癌、及び神経疾患を含むがこれらに限定されない診断及び治療目的に使用することができる、ペプチド及びその積荷の固有のPK、組織、及び細胞分布特性を創出する。

【0146】

使用方法

本発明の非自然発生ポリペプチドは、強力なコレステロール逆輸送(RCT)経路を使用して、コレステロール流出を媒介する。本発明のポリペプチドは、ABCA1依存性コレステロール流出の強力かつ選択的なメディエータであることに加えて、ABCA安定化活性、抗糖尿病活性、抗酸化活性、及び抗炎症活性、これらの活性の任意の組み合わせ、ならびに好ましくはこれらの活性の全ても有する。

【0147】

それらの生物活性、及び特にそれらのコレステロール流出を媒介する能力を考慮して、本発明のポリペプチド(またはそのペプチド模倣体)を使用し、哺乳動物におけるコレステロールレベルの上昇を治療すること、またはコレステロールレベルの上昇をきたす危険性のある哺乳動物を予防的に治療することができる。加えて、哺乳動物における脂質パラメータを向上させるために、ポリペプチドまたはペプチド模倣体を使用することもできる。「脂質パラメータ」の向上としては、例えば、リポタンパク質の血管接着傾向の低下、アテローム性動脈硬化性プラーク量の減少(たとえ、血漿LDL及び/またはHDL濃度が有意に変化し得なくとも)、HDLまたはLDL粒子の酸化能の低下、アテローム性動脈硬化症の退行(例えば、頸動脈造影または超音波により測定される)、及び心臓事象の減少のうちの1つ以上が挙げられる。故に、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を使用して、本明細書に開示する疾患及び状態などの、脂質異常症、高コレステロール血症、及び炎症に関連する疾患及び状態、または脂質パラメータを改変することによって治療可能な疾患及び状態を、治療または予防する(すなわち、予防的に治療する)ことができる。一部の実施形態では、ペプチドを使用して、本明細書に記載の疾患の合併症を有する患者を治療することができる。故に、一部の実施形態では、患者は、大血管もしくは微小血管疾患、慢性腎疾患、または鬱血性心不全を有する。

【0148】

本明細書に具体的に開示する疾患及び状態に加えて、当業者は、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を用いて治療または予防できる、脂質異常症、高コレステロール血症、及び炎症に関連する他の疾患及び状態について知っていると考えられる。

【0149】

アテローム性動脈硬化症の症状(複数可)の治療または予防

一実施形態では、本発明は、アテローム性動脈硬化症の1つ以上の症状を治療、緩和、及び/または予防するための方法を提供する。本方法は、生物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトへの本発明の1つ以上のポリペプチド(またはそのようなポリペプチドのペプチド模倣体)の投与を伴うことが好ましい。ポリペプチド(複数可)は、本明細書に記載のように、注射、坐剤、経鼻スプレー、徐放性インプラント、経皮パッチ、経口などを含むがこれらに限定されないいくつかの標準的な方法のいずれかに従って投与することができる。特に好ましい一実施形態では、ポリペプチド(複数可)を経口投与する(例えば、シロップ剤、カプセル剤、錠剤などとして)。

【0150】

本発明の方法は、アテローム性動脈硬化症の1つ以上の症状(複数可)(例えば、高血圧、血管狭窄、プラークの形成及び破裂、心臓発作、狭心症、または卒中、高レベルの血漿コレステロール、高レベルの低濃度リポタンパク質、高レベルの超低濃度リポタンパク質、または炎症性タンパク質など)を有するヒトまたは非ヒト動物の治療に限定されず、

予防的な意味でも非常に有用である。故に、本発明のポリペプチド（またはその模倣体）をヒトまたは非ヒト動物などの生物に投与して、アテローム性動脈硬化症の1つ以上の症状の開始、すなわち発症を予防することができる。予防的治療に好適な候補対象は、例えば、アテローム性動脈硬化症に対する1つ以上の危険因子（例えば、家族歴、アテローム性動脈硬化症と相関する遺伝子マーカー、高血圧、肥満、アルコールの大量摂取、喫煙、高血中コレステロール、高血中トリグリセリド、血中LDL、VLDL、IDLの上昇、もしくは低HDL、糖尿病、または糖尿病、高血中脂質、心臓発作、狭心症、もしくは卒中の家族歴など）を有する対象が含まれる。

【0151】

治療により、侵襲的手段及び血管手術の必要性を補完するかまたは取り除くことができ、抗アテローム性動脈硬化症治療を全身的にし、かつ持続可能にする。故に、ペプチドは、手術前に循環を最適化するための介入の前に、脈管構造もしくはその近傍に局所投与するために手術中に、または手術介入による機械的外傷によって起きた炎症及びアテローム性動脈硬化症を低減するために手術後に、施与することができる。

【0152】

急性炎症反応に関連付けられるアテローム性動脈硬化症の症状（複数可）の治療または予防

本発明のアテローム性動脈硬化症阻害ポリペプチドは、いくつかの他の背景においても有用である。特に、心血管系合併症（例えば、アテローム性動脈硬化症、卒中など）は、頻繁に、急性期炎症反応の開始を伴うか、またはこれに続くことが見出されている。このような急性期炎症反応は、多くの場合、再発性炎症性疾患（例えば、ハンセン病、結核症、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎など）、ウイルス感染（例えば、インフルエンザ、HIVなど）、細菌感染、真菌感染、臓器移植、創傷または他の外傷、埋め込み人工器官、バイオフィームなどに関連付けられる。

【0153】

それらの抗酸化活性を考慮して、本明細書に記載のポリペプチドを使用し、急性期炎症反応中またはその後の酸化リン脂質の形成を軽減または予防することによって、そのような状態に関連付けられる心血管系合併症を和らげるか、または排除することができる。炎症応答も、アルコール性及び非アルコール性肝臓疾患、慢性腎臓疾患、ならびに鬱血性心不全においてのように、より慢性的性質であり得る。

【0154】

グルコース代謝異常を伴う障害の治療または予防

更なる態様では、本発明は、グルコース代謝異常を有する哺乳動物の改変方法を提供する。一部の実施形態では、哺乳動物は、2型糖尿病を有する。一部の実施形態では、哺乳動物は、1型糖尿病を有する。一部の実施形態では、哺乳動物は、前糖尿病または代謝症候群を有する。一部の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。一部の実施形態では、哺乳動物は、空腹時の血中グルコースレベルが100mg/dLを上回るヒトである。一部の実施形態では、哺乳動物は、大血管もしくは微小血管疾患、腎疾患、または鬱血性心不全としての糖尿病の合併症を有する。

【0155】

一部の実施形態では、配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ を含むペプチドを哺乳動物に投与し、式中、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は、酸性アミノ酸であり、 X_4 は極性アミノ酸であり、 X_5 は正荷電アミノ酸であり、 X_2 、 X_6 、 X_9 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 、及び X_{24} は、疎水性アミノ酸であり、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、同一の脂肪族アミノ酸残基、例えば、同一の分枝鎖脂肪族アミノ酸残基であり、 X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} は、非荷電アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_3 位、 X_{14} 位、及び X_{23} 位のうち少なくとも2つは、シトルリンであり、第3の位置は、RまたはKである。一部の実施形態では、 X_4 は極性非荷電アミノ酸であり、 X_2 、 X_6 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 、及び X_{24} のうち2つ以上は、脂肪族アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_2 、 X_6 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、

X_{21} 、 X_{22} 、及び X_{24} は、全て脂肪族アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_9 はWである。一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} はIである。一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} はLである。一部の実施形態では、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は独立して、D及びEから選択され； X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} はIであるか、または X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} はLであり； X_{11} 及び X_{22} は、脂肪族アミノ酸であり、 X_4 は、S、T、G、またはYであり； X_9 はW、 X_5 はRまたはKであり； X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} は、 X_3 及び X_{14} がシトルリン、 X_{23} がRまたはKであり；3位及び23位にシトルリン、14位にRまたはK；14位及び23位にシトルリン、3位にRまたはK、から選択される。

【0156】

10

アルツハイマー病または軽度認知障害の治療または予防

更なる態様では、本発明は、アルツハイマー病もしくは軽度認知障害、前頭側頭型認知症、または血管性認知症を有する患者を治療する方法を提供する。

【0157】

本明細書で使用する「アルツハイマー病」は、国立神経障害・脳卒中研究所（National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke）及びアルツハイマー病・関連障害協会（Alzheimer's disease and Related Disorders Association）によって定められた基準、及び／または米国精神医学会が出版する精神障害の診断と統計マニュアル（DSM-IV-TR）に記載される基準などの、当技術分野で一般に受け入れられている基準を使用して診断された老年性認知症を指す。DSM-IV-TRとしても知られる精神障害の診断と統計マニュアル（第4版、2000年改訂）は、アルツハイマー病の診断のための詳細に渡る一連の基準を概説する。

20

【0158】

一部の実施形態では、患者は、軽度から中等度の認知症または早期のアルツハイマー病を有してもよく、それらは神経学的検査及び他の臨床評価項目を使用して特定することができる。例えば、軽度から中等度の認知症、例えば、アルツハイマー病を持つ対象は、ミニメンタルステート検査（MMSE）を使用して特定することができ、典型的に、16～26点（共にその数字を含む）が軽度から中等度のアルツハイマー病を示す。進行したアルツハイマー病を持つ患者も、臨床的指標に基づいて特定することができる。この形態のアルツハイマー病を持つ対象は、もはやアセチルコリンエステラーゼ阻害剤による療法には反応しない場合があり、著明に低下したアセチルコリンレベルを有し得る。

30

【0159】

一部の実施形態では、本発明のペプチドによって治療される患者は、軽度認知障害を有し得る。このような患者は、アルツハイマー病発症の危険性がある。軽度認知障害は、心理学または精神医学の分野で公知であり受け入れられている多くの客観試験または基準のいずれを使用しても、診断及び評価することができる。

【0160】

「前頭側頭型認知症」は、主に前頭葉及び／または側頭葉に関わる進行性のニューロン脱落を特徴とする神経変性疾患である。本障害は、アミロイドプラーク、神経原線維変化、またはレビー小体を伴わずに現れるという事実に基づいてそれをアルツハイマー病及びレビー小体認知症と区別したKirk Wilhelmsenらによって、1994年に初めて特定された。「前頭側頭葉変性」または「FTLD」という用語は、前頭側頭型認知症症候群を引き起こす特定の病理的疾患を説明するために使用される。これらは、前頭脳構造及び側頭脳構造に与えるそれらの影響によってつながっている。細分類化は、ニューロン封入体内に見出される特定のタンパク質に基づく。ほとんどの変性細分類は、ピック病、CBD、及びPSPを含み、それら全てがtau含有封入体を示すFTLD-tau、またはTDP-43含有封入体が見られるいくつかの細分類を含むFTLD-TDPのいずれかである。

40

50

【0161】

一部の実施形態では、配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ を含むペプチドを、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、もしくは血管性認知症を有する患者、またはアルツハイマー病を有する危険性のある患者、例えば、軽度認知障害を有する患者に投与し、式中、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は、酸性アミノ酸であり、 X_4 は極性アミノ酸であり、 X_5 は正荷電アミノ酸であり、 X_2 、 X_6 、 X_9 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 、及び X_{24} は、疎水性アミノ酸であり、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、同一の脂肪族アミノ酸残基、例えば、同一の分枝鎖脂肪族アミノ酸残基であり、 X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} は、非荷電アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_3 位、 X_{14} 位、及び X_{23} 位のうち少なくとも2つは、シトルリンであり、第3の位置は、RまたはKである。一部の実施形態では、 X_4 は極性非荷電アミノ酸であり、 X_2 、 X_6 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 、及び X_{24} のうち2つ以上は、脂肪族アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_2 、 X_6 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 、及び X_{24} は、全て脂肪族アミノ酸である。一部の実施形態では、 X_9 はWである。一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、Iである。一部の実施形態では、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、Lである。一部の実施形態では、 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 、及び X_{19} は独立して、D及び3から選択され； X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} は、Iであるか、または X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 、及び X_{20} はLであり； X_{11} 及び X_{22} は、脂肪族アミノ酸であり、 X_4 は、S、T、G、またはYであり； X_9 はW、 X_5 はRまたはKであり； X_3 、 X_{14} 、及び X_{23} は、 X_3 及び X_{14} がシトルリン、 X_{23} がRまたはKであり；3位及び23位にシトルリン、14位にRまたはK；14位及び23位にシトルリン、3位にRまたはK、から選択される。

10

20

【0162】

更なる治療的使用

一部の実施形態では、本発明のペプチドを使用して、治療薬剤を送達し得る。故に、例えば、一部の実施形態では、ペプチドは、癌を治療するための毒素または放射性標識などの作用剤と連結させてもよい。いかなる型の癌も治療することができる。

【0163】

他の実施形態では、本発明のポリペプチドを使用して、酸化したリン脂質の形成を減少させるか、または防止する。このような方法においては、本発明のポリペプチドをヒトまたは非ヒト動物に投与して、酸化したリン脂質の形成を減少させるか、または予防することにより、リウマチ性多発筋痛症、結節性多発性動脈炎、強皮症、特発性肺線維症、慢性閉塞性肺疾患、AIDS、冠動脈石灰化、石灰沈着性大動脈狭窄症、骨粗鬆症などの疾患の症状を阻害または予防することができる。

30

【0164】

典型的に、上記の方法の全ては、本発明の単一の本発明のポリペプチドの投与、または代替的に2つ以上の異なる本発明のポリペプチドの投与を伴う。このようなポリペプチドは、単独で投与するか、または本明細書に記載のものなどの他の薬剤と併用して投与することができる。ポリペプチドは、モノマーとして、またはダイマー、オリゴマー、もしくはポリマー形態で提供することができる。ある特定の実施形態では、マルチマー形態は、関連したモノマー（例えば、イオンのまたは疎水的に連結した）を含んでもよいのに対し、他の実施形態では、他のマルチマー形態は、共有的に連結したモノマー（直接的に連結した、またはリンカーを介して）を含む。

40

【0165】

加えて、前述の方法の全ては本明細書ではヒトに関して記載するが、このような方法は、他の動物、すなわち家畜への使用にも有用であることが、当業者には容易に明らかであろう。故に、好ましい生物としては、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ウマ、ネコ、ブタ、有蹄動物、ウサギなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0166】

不安定プラークの安定化

50

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えばコレステロール逆輸送を通してプラークの脂質含量を減少させることにより、血栓性動脈閉塞を引き起こす可能性の高い不安定プラークの破裂傾向を安定させることができる。故に、別の実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチド（またはこのようなポリペプチドのペプチド模倣体）のうち1つ以上を哺乳動物（及びより好ましくはヒト）に投与することで、哺乳動物の血管中の不安定プラークを安定させる方法を提供する。「不安定」プラークは、概して、適当なコラーゲン及び平滑筋細胞支持を欠いた薄膜化した線維性被膜を持つ、脂質の豊富なプラークとして定義される。哺乳動物、好ましくは、ヒトは、温度検出手法、標識手法、撮像手法（例えば、磁気共鳴、超音波、赤外線、蛍光、可視光、電波、X線などを利用するデバイス）、不安定プラークを周辺の正常な維管束組織から見分けるための一般的な手法などを
10 含む既知の方法を使用して、1つ以上の不安定プラークを有すると診断され得る（例えば、米国特許第6,245,026号、同第6,475,159号、同第6,475,210号、及び同第7,118,567号を参照されたい）。別の実施形態では、哺乳動物、好ましくはヒトは、1つ以上の不安定プラークを有する危険性がある。この実施形態では、該哺乳動物が1つ以上の不安定プラークを有する危険性があることを当業者が信じるに至る、臨床症状が発症している、及び／または臨床事象が発生している。

【0167】

併用療法

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、アテローム性動脈硬化症を含む心血管疾患などの、脂質異常症、高コレステロール血症、及び炎症と関連
20 付けられる疾患及び障害を治療及び予防するための1つ以上の追加の治療薬剤と併用して投与する。例えば、一実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えば、スタチン（例えば、アトルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、またはロスバスタチン）、Niemann-Pick C1-like 1ステロールトランスポーターチャネル阻害剤（例えば、エゼチミブ）、胆汁酸結合剤（例えば、コレステラミンまたはコレステポール）、血小板凝集阻害剤（例えば、アスピリン、チクロピジン、またはクロピドグレル）、ナイアシン／ニコチンアミド、PPAR活性化剤、ビタミンE、手術介入（例えば、血管形成術、ステント、ステント、または動脈内膜切除術）、及び生活習慣の変更（例えば、低脂肪食、減量、及び運動）を含む、アテローム性動脈硬化症のための標準的治療のうち任意のものと併用して投与する。
30

【0168】

より具体的には、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、独立単位または多剤混合のいずれかとして、不要な炎症性分子と結合する抗体、もしくはインターロイキン6、インターロイキン8、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、及び腫瘍壊死因子などのサイトカイン；プロテアーゼ阻害剤アプロチニンもしくはシクロオキシゲナーゼ阻害剤などの酵素阻害剤；アモキシシリン、リファンピシン、エリスロマイシンなどの抗生物質；アシクロビルなどの抗ウイルス剤；糖質コルチコイドなどのステロイド性抗炎症薬；アスピリン、イブプロフェン、もしくはアセトアミノフェンなどの非ステロイド性抗炎症薬；またはインターロイキン4もしくはインターロイキン10などの非炎症性サイトカインのうち1つ以上と併用して使用することができる。インターフェロンβ、腫瘍壊死因子、
40 抗血管新生因子、エリスロポエチン、トロンプオエチン、インターロイキン、成熟因子、走化性タンパク質、ならびに同様の生理学的活性を保持するそれらの変種及び誘導体などの、他のサイトカイン及び増殖因子も、追加の薬剤として使用し得る。

【0169】

本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、例えば糖尿病患者における脂質障害を治療するために一般に使用される薬物と併用して使用することができる。このような薬物としては、HMG-CoA還元酵素阻害剤、ニコチン酸、エゼチミド、胆汁酸抑制薬、フィブリン酸誘導体、MTP阻害剤、ACAT阻害剤、及びCETP阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。HMG-CoA還元酵素阻害剤の例としては、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、及びアトルバスタ
50

チンが挙げられる。胆汁酸抑制薬の例としては、コレスチラミン、コレスチポール、及びコレセベラムが挙げられる。フィブリン酸誘導体の例としては、ゲムフィブロジル及びフェノフィブラートが挙げられる。

【0170】

本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体はまた、例えば、利尿薬、 β 遮断薬、カテプシンS阻害剤、メチルドーパ、 $\alpha 2$ アドレナリン作動薬、グアナドレル、レセルピン、 β アドレナリン受容体拮抗薬、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬、ヒドララジン、ミノキシジル、カルシウムチャネル拮抗薬、ACE阻害剤、及びアンジオテンシンII受容体拮抗薬などの抗高血圧性薬物と併用して使用することもできる。 β 遮断薬の例としては、アセブトロール、ビソプロロール、エスモロール、プロパノロール、アテノロール、ラベタロール、カルベジロール、及びメトプロロールが挙げられる。ACE阻害剤の例としては、カプトプリル、エナラプリル、リシノプリル、ベナゼプリル、フォシノプリル、ラミプリル、キナプリル、ペリンドプリル、トランドラプリル、及びモエキシプリルが挙げられる。

10

【0171】

本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体はまた、カルシウムチャネル拮抗薬、 β アドレナリン受容体拮抗薬及び作動薬、アルドステロン拮抗薬、ACE阻害剤、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、ニトロ系血管拡張薬、ならびに強心配糖体などの心血管薬物と併用して使用することもできる。本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体はまた、H1受容体拮抗薬、H2受容体媒介作動薬及び拮抗薬、COX-2阻害剤、NSAID、サリチル酸塩、アセトアミノフェン、プロピオン酸誘導体、エノール酸、ジアリール置換フアノン、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、ならびにブラジキニン作動薬及び拮抗薬などの抗炎症性薬物と併用して使用することもできる。

20

【0172】

本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体との併用における使用に好適な他の治療薬剤は、2005年6月30日公開の米国特許出願公開第2005/0142180号に開示され、その教示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0173】

ポリペプチド（またはそのペプチド模倣体）及び追加の治療薬剤は、同時にまたは連続して投与することができる。例えば、ポリペプチドを最初に投与し、次に追加の治療薬剤を投与してもよい。あるいは、追加の治療薬剤を最初に投与し、次に本発明のポリペプチドを投与してもよい。一部の 경우에는、本発明のポリペプチド及び追加の治療薬剤を、同一の製剤中で投与する。他の場合には、ポリペプチド及び追加の治療薬剤を、異なる製剤中で投与する。ポリペプチド及び追加の治療薬剤を異なる製剤中で投与する場合、それらの投与は、同時または連続的であってもよい。

30

【0174】

薬学的製剤

本発明の方法を実行するためには、1つ以上の本発明のポリペプチドまたはそのペプチド模倣体を、脂質異常症、高コレステロール血症、及び炎症と関連付けられる疾患もしくは障害（例えば、アテローム性動脈硬化症の1つ以上の症状を有するか、またはアテローム性動脈硬化症の危険性があると診断された個体に）、またはグルコース代謝異常と関連付けられる疾患、またはアルツハイマー病を有するか、または有する危険性があると診断された個体に投与する。ポリペプチドまたはそれらのペプチド模倣体は、それらの「天然」形態か、または所望の場合は、例えば、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、誘導体などの形態で投与することができるが、但し、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、または誘導体が、薬理的に好適である、すなわち、本発明の方法において効果的であることが条件である。

40

【0175】

本明細書に記載の方法の一実施形態では、投与経路は、経口、腹腔内、経皮、皮下、静脈内もしくは筋肉内注射により、吸入により、局所、病巣内、点滴；リポソーム媒介送達

50

；局所、髄腔内、歯肉ポケット、直腸、経鼻、経粘膜、腸管、眼内、または経耳送達、あるいは当業者であれば容易に理解し得る当技術分野で既知の任意の他の方法によることができる。本発明の組成物の他の実施形態は、非経口、経肺、経鼻、及び経口を含む種々の投与経路に対する、微粒子形態、保護コーティング、プロテアーゼ阻害剤、または透過促進剤を組み込む。薬学的組成物は、投与方法／様式に応じて、種々の単位剤形において投与することができる。好適な単位剤形としては、粉末剤、錠剤、丸薬、カプセル剤、坐薬、パッチ剤、経鼻スプレー、注射剤、埋め込み型持続放出性製剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0176】

このように、別の態様では、本発明は、薬学的に有効な量の本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体ならびに許容される担体及び／または賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。薬学的に許容される担体としては、生理学的に適合性があり、ポリペプチドまたはペプチド模倣体の活性に干渉しないか、それを阻害しないことが好ましい、任意の溶媒、分散媒、またはコーティングが挙げられる。担体は、静脈内、筋肉内、経口、腹腔内、経皮、局所、または皮下投与に好適であることが好ましい。薬学的に許容される担体は、例えば、組成物を安定させるように、または活性剤（複数可）の吸収を増大もしくは減少させるように作用する、1つ以上の生理学的に許容される化合物（複数可）を含有することができる。生理学的に許容される化合物としては、例えば、グルコース、スクロース、もしくはデキストランなどの糖質、アスコルビン酸もしくはグルタチオンなどの抗酸化物質、キレート剤、低分子量タンパク質、活性剤のクリアランスもしくは加水分解を減少させる組成物、または賦形剤、または他の安定化剤及び／もしくは緩衝液が挙げられる。

【0177】

他の生理学的に許容される化合物としては、微生物の増殖または活動を防止するために特に有用である、湿潤剤、乳化剤、分散剤、または防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない。例えばフェノール及びアスコルビン酸を含む種々の防腐剤が公知である。当業者であれば、生理学的に許容される化合物を含む薬学的に許容される担体（複数可）の選択は、例えば、ポリペプチド（複数可）またはペプチド模倣体（複数可）の投与経路、及びポリペプチド（複数可）またはペプチド模倣体（複数可）の特定の生理化学的特徴に依存することを理解するであろう。

【0178】

好ましい実施形態では、薬学的に許容される担体は生理食塩水である。他の薬学的に許容される担体及びそれらの製剤が公知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science (18th Ed., ed. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990) に概して記載される。種々の薬学的に許容される賦形剤が、当技術分野で公知であり、例えば、Handbook of Pharmaceutical Excipients (4th ed., Ed. Rowe et al., Pharmaceutical Press, Washington, D. C.) に見出すことができる。重ねて、薬学的組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、カプセル剤、錠剤、または他の好適な形態として製剤化することができる。活性成分は、活性の標的部位に到達する前の環境による不活性化からそれを保護するための物質でコーティングしてもよい。

【0179】

ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、当業者に公知の標準的な方法に従って、経口的に（例えば、錠剤によって）、または注射剤として、投与することができる。他の好ましい実施形態では、ポリペプチドまたはペプチド模倣体はまた、従来型の経皮的薬物送達システム、すなわち、経皮「パッチ」を使用して、皮膚を通して送達することもでき、ここで、ポリペプチド（複数可）またはペプチド模倣体（複数可）は典型的に、薬物送達デバイスとして働く積層構造内に含有されて、皮膚に貼付される。このような構造において、薬物組成物は典型的に、上部パッキング層の下にある層、または「貯留部」中に含有される。この背景における「貯留部」という用語は、皮膚

の表面への送達のために最終的に利用可能である「活性成分（複数可）」の量を指す。故に、例えば、「貯留部」は、パッチのバックング層上の接着剤における、または当業者に既知である種々の異なるマトリックス製剤のうちのいずれにもおける、活性成分（複数可）を含んでもよい。パッチは、単一の貯留部を含んでもよく、または複数の貯留部を含んでもよい。

【0180】

一実施形態では、貯留部は、薬物送達中にシステムを皮膚に貼付する働きをする薬学的に許容される接触接着性物質のポリマーマトリックスを含む。好適な皮膚接触接着性物質の例としては、ポリエチレン、ポリシロキサン、ポリイソブチレン、ポリアクリレート、ポリウレタンなどが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、薬物含有貯留部及び皮膚接触接着剤は、貯留部の下にある接着剤を持つ別個かつ異なる層として存在し、この貯留部は、この場合、上記のポリマーマトリックスであり得るか、液体もしくはヒドロゲル貯留部であり得るか、または他の形態を取るかのいずれかであってもよい。デバイスの上面となるこれらの積層中のバックング層は、「パッチ」の主要な構造要素として機能し、デバイスにその柔軟性の大半を提供することが好ましい。バックング層のために選択される物質は、活性剤（複数可）及び存在する一切の他の物質に対して実質的に不浸透性であることが好ましい。

【0181】

局所薬物送達のための他の製剤としては、軟膏剤及びクリーム剤が挙げられるが、これらに限定されない。軟膏剤は、典型的にワセリンまたは他の石油誘導体に基づく半固体の調製物である。選択された活性剤を含有するクリーム剤は、典型的に、粘稠液または半固体乳剤であり、多くの場合に、水中油型または油中水型のいずれかである。クリーム剤系は典型的に、水洗性であり、油相、乳化剤、及び水相を含有する。ときに「内相」とも呼ばれる油相は、概してワセリン、及びセチルまたはステアシルアルコールなどの脂肪アルコールからなり、水相は、必ずしもそうではないが通常は油相の容積を超越し、概して保湿剤を含有する。クリーム製剤中の乳化剤は概して、非イオン性、陰イオン性、陽イオン性、または両性の界面活性剤である。使用する特定の軟膏またはクリーム基剤は、当業者なら理解するであろう通り、最適な薬物送達を提供するものである。他の担体またはビヒクルと同様に、軟膏基剤は、不活性、安定性、非刺激性、及び非感作性である必要がある。

【0182】

一部の実施形態では、埋め込みデバイス（例えば、溶出ステントを含む動脈及び静脈内ステント、及びカテーテル）を使用して、本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体を含む製剤を送達する。例えば、本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体を含む水溶液を、ステント及びカテーテルを通して直接投与する。一部の実施形態では、ステント及びカテーテルは、本明細書に記載のポリペプチド及びペプチド模倣体を含む製剤でコーティングしてもよい。一部の実施形態では、ポリペプチド及びペプチド模倣体は、徐放性製剤中にあり、ステントから溶出される。好適なステントは、例えば、米国特許第6,827,735号、同第6,827,735号、同第6,827,732号、同第6,824,561号、同第6,821,549号、同第6,821,296号、同第6,821,291号、同第6,818,247号、同第6,818,016号、同第6,818,014号、同第6,818,013号、同第6,814,749号、同第6,811,566号、同第6,805,709号、同第6,805,707号、同第6,805,705号、同第6,805,704号、同第6,802,859号、同第6,802,857号、同第6,802,856号、及び同第496,802,849号に記載される。好適なカテーテルは、例えば、米国特許第6,829,497号、同第6,827,798号、同第6,827,730号、同第6,827,703号、同第6,824,554号、同第6,824,553号、同第6,824,551号、同第6,824,532号、及び同第6,819,951号に記載される。

【0183】

L型またはD型アミノ酸を含むこれらのポリペプチドは、胃酸などによるタンパク質分解に対する保護なしで投与することができる。とはいえ、ある特定の実施形態では、ポリペプチド送達は、当技術分野で既知のように保護用賦形剤の使用により強化することができる（例えば、米国特許第5,391,377号を参照されたい）。

【0184】

上昇した血清半減期は、持続放出性ポリペプチド「包装」システムの使用によって維持することができる。このような持続放出システムは、当業者に公知である。好ましい一実施形態では、タンパク質及びポリペプチドのためのProLease生分解性マイクロスフェア送達システムを使用し(Tracy, Biotechnol. Prog., 14:108 (1998)、Johnson et al., Nature Med., 2:795 (1996)、Herbert et al., Pharmaceut. Res., 15:357 (1998))、これは、他の作用剤の有無に関わらず乾燥製剤として調合することができるポリマーマトリックス中にポリペプチドを含有する生分解性ポリマーマイクロスフェアからなる乾燥粉末の使用を伴う。

10

【0185】

別の実施形態では、溶液の1つ以上の成分は、例えば、希釈に備えた保管容器中の（例えば、予め測定した容積で）、または水の容積への添加に備えた可溶性カプセル剤中の「濃縮物」として提供することができる。

【0186】

本発明のある特定の実施形態では、薬学的組成物は、持続放出性製剤である。本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、周辺環境へのコポリマーの放出速度を制御する生物学的に適合性のあるポリマーまたはマトリックスと混合してもよい。放出制御性または持続放出性組成物としては、親油性デポー（例えば、脂肪酸、ワックス、油）における製剤が挙げられる。ポリマー（例えば、ポロキサマーまたはポロキサミン）でコーティングした微粒子組成物も、本発明が企図するものである。本発明の組成物の他の実施形態は、非経口、経肺、経鼻、及び経口を含む種々の投与経路に対する、微粒子形態、保護コーティング、プロテアーゼ阻害剤、または透過促進剤を組み込む。許容される担体としては、カルボキシメチルセルロース(CMC)及び修飾CMCが挙げられる。

20

【0187】

本発明の薬学的組成物は、送達時に無菌及び非発熱性であることが好ましく、製造及び保管の条件下で安定であることが好ましい。これらの薬学的組成物は、従来型の既知である滅菌技法によって滅菌することができる。

30

【0188】

治療的適用では、本発明の組成物を、疾患、状態、及び／もしくはその合併症を治癒させるか、または少なくとも部分的に防止もしくは抑止するのに十分な量で、脂質異常症、高コレステロール血症、及び炎症と関連付けられる疾患もしくは障害（及び好ましい実施形態では、アテローム性動脈硬化症の1つ以上の症状を有するか、またはアテローム性動脈硬化症の危険性があると診断された個体に）、またはグルコース代謝異常と関連付けられる疾患、またはアルツハイマー病を有するか、または有する危険性があると診断された個体に投与する。これを達成するのに適正な量は「治療有効用量」として定義される。この使用に有効な量は、疾患の重症度及び患者の健康の一般状態に依存することになる。組成物の単回または複数回投与は、患者が必要とし忍容できる用量及び頻度に応じて投与することができる。いずれにせよ、組成物は、十分な量の本発明の製剤の活性剤、すなわちポリペプチドまたはペプチド模倣体を提供し、個体または患者を効果的に治療（1つ以上の症状を緩和）するはずである。

40

【0189】

ポリペプチドまたはペプチド模倣体の濃度は、大きく異なり得、選択する特定の投与様式及び患者のニーズに従って、主に、液量、粘性、体重、ポリペプチドの循環血漿レベル、ポリペプチド毒性、疾患（例えばアテローム性動脈硬化症）の進行度、ポリペプチドに特異的に結合する抗体の産生などに基づいて選択されることになる。典型的に、ポリペ

50

チドまたはペプチド模倣体の用量当量は、体重1 kg 当たり約0.1～約50 mg、好ましくはkg 当たり約1～約25もしくは30 mg、またはkg 当たり約1～約20 mgである。このような用量を変化させて、特定の対象または対象群における治療計画を最適化し得ることが、理解されるであろう。

【0190】

投与については、本発明のポリペプチドは、患者の体重及び健康全般に適した、ポリペプチドのLD50及び種々の濃度でのポリペプチドの副作用によって決定される速度で、投与することができる。投与は、単回または分割用量、例えば、一時期の間（例えば、2、3、4、5、6日または1～3週間以上）定期的に（例えば、連日）投与する用量によって達成することができる。

10

【0191】

本明細書で説明されるように、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、いくつかの異なる方法で修飾することができる。例えば、ポリペプチドは、構成アミノ酸及び／または末端アミノ酸上のR基が保護基によって遮断される、すなわち、保護されるように、修飾することができる。特にアミノ及び／またはカルボキシ末端の遮断は、経口送達を大いに向上させ、血清半減期を有意に増大させ得ることが分かっている。加えて、インビボにおける送達及び／または生物学的活性を強化するために、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体の、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、及び他の誘導体は、合成有機化学の当業者に既知であり、例えば、March (1992) *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*, 4th Ed. N. Y. Wiley-Interscience

20

【0192】

例えば、酸付加塩は、好適な酸との反応を典型的に伴う従来型の方法論を使用して、遊離塩基から調製する。概して、塩基形態の薬物をメタノールまたはエタノールなどの極性有機溶媒中に溶解し、それに酸を添加する。得られた塩は、沈殿させるか、またはより極性の低い溶媒の添加によって溶液から取り出してもよい。酸付加塩を調製するために好適な酸としては、有機酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などと、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などとの両方が挙げられる。酸付加塩は、好適な塩基で処理することにより、遊離塩基に再変換し得る。本明細書に記載のポリペプチドの特に好ましい酸付加塩は、塩酸または臭化水素酸を使用して調製し得るものなどのハロゲン化物塩である。逆に、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体の塩基性塩の調製物は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、トリメチルアミンなどの薬学的に許容される塩基を使用して、同様の形で調製する。特に好ましい塩基性塩としては、アルカリ金属塩、例えば、ナトリウム塩及び銅塩が挙げられる。

30

【0193】

エステルの調製は典型的に、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体内に存在し得るヒドロキシル基及び／またはカルボキシル基の官能基化を伴う。エステルは典型的に、遊離アルコール基のアシル置換誘導体、すなわち、式中Rがアルキル、好ましくは低級アルキルである式RCOOHのカルボン酸に由来する部分である。エステルは、所望の場合、従来型の水素化分解または加水分解手順を使用することによって、遊離酸に再変換できる。

40

【0194】

アミド及びプロドラッグも、当業者に既知であるか、または関連文献に記載の技法を使用して調製することができる。例えば、アミドは、好適なアミン反応剤を使用してエステルから調製し得るか、あるいはアンモニアまたは低級アルキルアミンとの反応によって無水物または酸塩化物から調製してもよい。プロドラッグは典型的に、個体の代謝系によ

50

て修飾されるまでは治療的に不活性である化合物をもたらす、部分の共有結合によって調製する。

【0195】

前述の製剤及び投与方法は、例示的であり、決して限定的ではないことを明確に意図する。本明細書で提供する教示を使用して、他の好適な製剤及び投与様式を容易に考案できることが理解されるであろう。

【0196】

脂質系製剤

別の態様では、本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体は、1つ以上の脂質と共に投与することが好ましい。脂質は、ポリペプチドまたはペプチド模倣体の輸送／取り込みを保護及び／または強化するために賦形剤として製剤するか、または別個に投与することができる。

10

【0197】

脂質は、リポソーム、ナノカプセル、微小粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、脂質小胞などに製剤することができる。このような脂質製剤は、カプセル化した本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体を使用することができ、及び／または単にこのようなポリペプチド及びペプチド模倣体と複合体化／混合することができる。当業者は、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体をカプセル化または複合体化するためのこのような脂質製剤の使用方法を知るであろう。例えば、リポソームの製剤及び使用は、概して当業者に既知である。昨今、向上した血清安定性及び循環半減期を持つリポソームが開発された（米国特許第5,741,516号を参照されたい）。更に、可能性のある薬物担体としてのリポソーム及びリポソーム様調製物の種々の方法が概説されている（米国特許第5,567,434号、同第5,552,157号、同第5,565,213号、同第5,738,868号、及び同第5,795,587号を参照されたい）。

20

【0198】

一実施形態では、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、その教示が参照により本明細書に組み込まれる2005年6月30日公開の米国特許出願公開第2005/0142180号に開示のものと同様の形で、リン脂質（例えば、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロールホスファチジルコリン（「POPC」）などの脂質と複合体化する。このように、本発明は、コレステロールを細胞から流出させる能力が増大したポリペプチド-脂質複合体（または代替的に、ペプチド模倣体複合体）を提供する。典型的に、脂質は、投与前にポリペプチドと混合する。本発明のポリペプチド及び脂質は、適切な割合で水溶液中で混合することができ、凍結乾燥、透析前の界面活性剤可溶性、マイクロ流体化、超音波処理、及び均質化を含むがこれらに限定されない当技術分野で既知の方法によって複合体化することができる。複合体効率、例えば、圧力、超音波周波数、または界面活性剤濃度を変化させることによって最適化することができる。ポリペプチド-脂質複合体を調製するために一般に使用される界面活性剤の例は、コール酸ナトリウムである。

30

【0199】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド-脂質（例えば、リン脂質）複合体は、適切な薬学的希釈剤または担体を持つ溶液中にあることができる。他の実施形態では、凍結乾燥（freeze-dried）または凍結乾燥（lyophilized）したポリペプチド-脂質複合体の調製物は、投与前に、適切な薬学的希釈剤によって水和させるかまたは再構成することができる。別の実施形態では、ポリペプチド-脂質複合体は凍結した調製物であることができ、それを必要とする対象への投与前に、均質な溶液が達成されるまで解凍する。

40

【0200】

脂質は、当業者に既知である任意の好適な脂質であり得る。一実施形態では、ステアリン、ドデシルアミン、パルチミン酸アセチル、（1,3）-D-マンノシル-（1,3）ジグリセリド、アミノフェニルグリコシド、3-コレステリル-6'-（グリコシ

50

ルチオ)ヘキシルエーテル糖脂質、N-(2,3-ジ(9-(Z)-オクタデセニルオキシ))-プロパー-1-yl-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド、及び脂肪酸アミドを含む、脂質を含有する非リンを使用することができる。

【0201】

別の実施形態では、リン脂質またはリン脂質の混合物を使用する。好適なリン脂質としては、小アルキル鎖リン脂質、ホスファチジルコリン、卵ホスファチジルコリン、大豆ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、大豆ホスファチジルグリセロール、卵ホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジラウリルホスファチジルコリン、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン、1-オレオイル-2-パルミチルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロイルホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ジミリストイルホスファチジン酸、ジパルミトイルホスファチジン酸、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルセリン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、脳ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、スフィンゴ脂質、脳スフィンゴミエリン、ジパルミトイルスフィンゴミエリン、ジステアロイルスフィンゴミエリン、ガラクトセレブロシド、ガングリオシド、セレブロシド、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、セファリン、カルジオリピン、リン酸ジセチル、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン、ならびにコレステロール及びその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。同様に、リン脂質は、前述のリン脂質のうちいずれの誘導体もしくは類似体でもあることができるか、または重ねて、前述のリン脂質のうちいずれのうちの2つ以上の混合物でもあり得る。このようなリン脂質は、市販の供給源から、天然の供給源から、または当業者に既知の合成もしくは半合成手段によって、得ることができる。

【0202】

好ましい実施形態では、ポリペプチド-脂質複合体は、ポリペプチド-リン脂質複合体である。より好ましい実施形態では、脂質は、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン(「POPC」)または(「1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン」)である。

【0203】

本発明のポリペプチド及び脂質、好ましくはリン脂質を含む複合体は、該複合体がコレステロール流出を媒介し、結果、それと関連する疾患または症状を治療するのに有効であることを条件に、任意の量の脂質及び任意の量のポリペプチドを含むことができることが、当業者に容易に明らかであろう。上で言及したように、本発明のポリペプチドを、例えば約1:0.5~約1:5(ポリペプチド:POPC)の範囲の割合でPOPCと複合体化するとき、約5~約20nmの間のサイズを有する異なる脂質-ポリペプチド粒子が形成され、それにより、有意に強化された資質、すなわち、コレステロールを細胞から流出させる能力が得られることが、意外にも見出された。しかしながら、本発明のポリペプチド-脂質複合体は、約100:1、約10:1、約5:1、約3:1、約2:1、約1:1、約1:2、約1:3、約1:5、約1:10、及び約1:100(ポリペプチドのwt/脂質のwt)など、リン脂質対ポリペプチドの他の割合で複合体を含むことができる。

【0204】

本発明のポリペプチド-脂質複合体は、当業者に既知のいずれの方法によっても作製することができる。一部の場合には、投与前に脂質とポリペプチドとを混合することが望ましい。脂質は、溶液中、または均質化、超音波処理、もしくは押出などの標準的な技法を使用して形成したリポソームもしくは乳剤の形態にあることができる。超音波処理は概して、氷浴中で、Branson製チップソニファイアー (tip sonifier) などのチップソニファイアーを用いて行う。典型的には、懸濁液を数回の超音波処理周期に供する。押出は、Lipex Biomembrane Extruder, TM. (Lipex Biomembrane Extruder, Inc. Vancouver, Canada) などの生体膜押出機によって実行することができる。押出フィルタ中の規定した孔径によって、特性のサイズの単層リポソーム小胞を生成することができる。リポソームはまた、Norton Company, Worcester, MAから市販されているCeraflow Microfilter, TM. などの非対称セラミックフィルタを介してか、またはポリカーボネートフィルタもしくは当業者に既知であるほかの型の重合材料 (例えば、プラスチック) を介して、押出によって形成することもできる。

10

【0205】

上で言及したように、本発明のポリペプチド-脂質複合体は、小胞、リポソーム、またはプロテオリポソームを含むがこれらに限定されない種々の形態で調製することができる。当業者に公知の種々の方法を使用して、ポリペプチド-脂質複合体を調製することができる。リポソームまたはプロテオリポソームを調製するためのいくつかの利用可能な技法を使用することができる。例えば、本発明のポリペプチド (例えば、配列番号1もしくは配列番号2のポリペプチド、またはその変種) を適切な脂質と共に超音波処理して (浴槽またはプローブ超音波処理機を使用)、ポリペプチド-脂質複合体を形成させ得る。ある特定の実施形態では、ポリペプチドを、予め形成した脂質小胞と組み合わせて、ポリペプチド-脂質複合体の自発的形成をもたらすことができる。別の実施形態では、ポリペプチド-脂質複合体はまた、界面活性剤透析法によって作製することもできる。この方法では、ポリペプチド、脂質、及びコール酸ナトリウムなどの界面活性剤の混合物を透析して、界面活性剤を除去し、再構成して、ポリペプチド-脂質複合体を作製し得る (例えば、Jonas et al., Methods Enzymol., 128:553-82 (1986) を参照されたい)。

20

30

【0206】

他の実施形態では、ポリペプチド-脂質複合体は、その両方の教示全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第6, 287, 590号及び同第6, 455, 088号に記載のように、共凍結乾燥によって作製することができる。他の方法は、例えば、その全ての教示全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第6, 004, 925号、同第6, 037, 323号、及び同第6, 046, 166号で開示される。ポリペプチド-脂質複合体を調製する他の方法は、当業者には明らかであろう。

【0207】

好ましい一実施形態では、ポリペプチド-脂質複合体は、均質化によって作製することができる。

40

【0208】

核酸

別の実施形態では、本発明は、本明細書に開示のポリペプチドをコードする単離核酸、核酸を含む発現ベクター、及び発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。より具体的には、本発明は、分子当たりの基準で、完全長アポリボタンパク質と同様のコレステロール流出活性を有し、かつ完全長アポリボタンパク質と同様の形でABAC1に対する高選択性を有する、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸を提供し、該ポリペプチドとしては、配列番号1もしくは配列番号2のアミノ酸配列または本明細書に記載の変種を有するポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0209】

50

ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、インビトロ及びインビボにおける細胞のトランスフェクションのために使用される。これらの核酸は、以下に記載のように、標的細胞及び生物のトランスフェクションのために、いくつかの公知のベクターのうちのいずれにも挿入することができる。核酸は、ベクターと標的細胞との相互作用を介して、エクスピボまたはインビボで、細胞中にトランスフェクトする。プロモーターの制御下にある核酸はその後、本発明のポリペプチドを発現し、それにより、脂質異常症、高コレステロール血症、炎症、グルコース代謝異常、またはアルツハイマー病と関連付けられる疾患の影響を和らげる。

【0210】

研究ツールとしての使用及び診断方法における使用

10

本発明のポリペプチド及びペプチド模倣体は、研究ツールとしても有用である。例えば、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、動物及び動物モデルにおけるリポタンパク質-受容体間の相互作用を調査するために使用することができる。加えて、本発明のポリペプチドを使用して、脂質代謝経路の解明のために適切な動物モデルを特定することもできる。例えば、脂質の過酸化がアテローム性動脈硬化症の進行に寄与する場合、ポリペプチドを使用して動物モデルを特定することができる。その上、本発明のポリペプチドを使用して、他の化合物（例えば、ペプチド変種及び他のペプチド模倣体を含む）の抗アテローム性動脈硬化症への潜在力を評価することができる。

【0211】

一部の場合には、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体を使用することで、治療薬剤は、A B C Aを発現している細胞及び組織を標的にする。

20

【0212】

他の実施形態では、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体は、異常なコレステロール流出またはA B C Aと関連付けられる疾患及び障害の診断方法において使用することができる。例えば、ペプチドをアッセイ中で使用して、コレステロール逆輸送不全を診断し、またペプチド治療への応答者であることが予測される個体を特定することができる。このような診断的アッセイとしては、インビトロアッセイが挙げられる。例えば、コレステロール流出は、本発明のポリペプチドを対象からの血漿と混合し、細胞に曝露させて、対象が治療に反応し得るか否かを見るアッセイ中で評価することができる（例えば、ペプチドの非存在下での血漿媒介性流出と比較したペプチドの存在下での流出の大規模な増加は、対象が反応し得ることを示唆する）。同様に、本発明のポリペプチドは、対象からの血漿と混合して、HDLサブクラス分布の変化を検出する、及び／またはペプチドの存在下での血漿の抗酸化特性の変化を検出することができる。

30

【0213】

一部の実施形態では、ポリペプチドまたはペプチド模倣体は、インビボでの撮像方法のために使用される。ポリペプチドまたはペプチド模倣体を、検出可能な部分と共役させ、対象（例えば、ヒトなどの哺乳動物）に投与する。検出可能な部分の検出によって、例えばアテローム性動脈硬化の病変またはアミロイドプラークを含む、目的とする細胞、組織、または器官の撮像が可能となる。

【0214】

40

撮像方法は当技術分野で公知である。撮像モダリティの例としては、磁気共鳴、核磁気共鳴、ラジオシンチグラフィ、陽電子放出断層撮影法、コンピュータ断層撮影法、近赤外蛍光、X線、超音波、紫外線光、または可視光が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Dahnher t, Radiology Review Manual (4th ed. 1999)、Brant et al., Fundamentals of Diagnostic Radiobiology (2nd ed. 1999)、Weissleder et al., Primer of Diagnostic Imaging (2nd ed. 1997)、Buddinger et al., Medical Magnetic Resonance A Primer, Society of Magnetic Resonance, Inc. (1988)、及びWeissle

50

der et al., Nature Biotech., 17:375-378 (1999)を参照されたい)。

【0215】

本明細書で使用する「検出可能な部分」という語句は、本明細書に記載または当業者に既知の手順またはモダリティによって、インビボ、エクスビボ、またはインビトロで撮像及び／または検出することができる部分または標識を指す。検出可能な部分は、本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体に直接的または間接的に連結することができる。検出可能な部分の本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体への連結は、公知の方法を使用して共有的または非共有的手段によって達成し得、それは通常、検出可能な部分、リンカー、及び／またはポリペプチド上に位置する1つ以上の官能基との相互作用を伴う。特定のリンカーは、本発明の重要な態様ではない。当技術分野で既知のいずれのリンカーも、それが適正な期間、すなわち、ポリペプチドが、所望の標的、及び検出されるのに十分な期間、ポリペプチドまたはペプチド模倣体と検出可能な部分とを共に結合する限り、使用し得る。

10

【0216】

本発明の方法で使用する検出可能な部分は、本発明に記載または当業者に既知の撮像手順において直接的に、あるいは間接的に検出可能ないかなる部分でもあり得る。これらとしては、検出可能な放射線を放出するかまたは放出させられ得る部分（例えば、放射性崩壊、蛍光励起、スピン共鳴励起などによって）、局所電磁場に影響する部分（例えば、常磁性、超常磁性、フェリ磁性、または強磁性種）、放射エネルギーを吸収するかまたは散乱させる部分（例えば、発色団、粒子（小胞を含有する気体または液体を含む）、重元素、及びそれらの化合物など）、及び検出可能な物質を生成する部分（例えば、気体微小気泡生成体）が挙げられる。例えば、米国特許第5,228,446号、同第4,647,447号、同第4,863,715号、同第4,770,183号、及び同第5,387,080号、PCT公開番号WO97/25073、WO96/09840、WO85/02772、WO92/17212、WO97/29783、WO91/15243、WO93/05818、WO96/23524、WO95/26205、及びWO96/17628、EP-A-554213、及びGB9624918.0、WO91/14460、WO89/00557、WO92/17215、WO96/40287、及びWO96/22914、及び米国特許第4,647,447号、同第5,367,080号、及び同第5,364,613号、Matsuoka, Topics in Applied Chemistry: Infrared absorbing dyes (1990)、Waring et al., Topics in Applied Chemistry: The Chemistry and Application of Dyes (1990)、“Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals” Haugland, Molecular Probes Inc, 1996, DE-A-4445065, DE-A-4326466, JP-A-3/228046, Narayanan et al., J. Org. Chem., 60:2391-2395 (1995), Lipowska et al., Heterocyclic Comm., 1:427-430 (1995), Fabian et al., Chem. Rev., 92:1197 (1992)、PCT公開番号WO96/23525:Strekowska et al., J. Org. Chem., 57:4578-4580 (1992)、及びPCT公開番号WO96/17628、visible dyes as described in, Waring and Hallas, The Chemistry and Application of Dyes, Topics in Applied Chemistry (1990)、Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th ed. 1996)を参照されたい。

20

30

40

【0217】

50

ある特定の状況では、リンカーは、投与後に生分解することが望ましい場合がある。適切に生分解可能なリンカーを選択することにより、ポリペプチド及び／または検出可能な部分の生体内分布及び生物学的排除パターンを修飾することが可能である。

【0218】

キット

別の態様では、本発明は、脂質異常症、高コレステロール血症、及び炎症と関連付けられる疾患もしくは障害、すなわち状態、またはグルコース代謝異常と関連付けられる疾患もしくは状態、またはアルツハイマー病の治療、すなわち緩和または予防のためのキットを提供する。好ましい実施形態では、本発明は、疾患の1つ以上の症状の治療、すなわち緩和のため、または疾患の危険性がある対象（例えば、ヒトまたは動物）の予防的治療のためのキットを提供する。キットは、本発明のポリペプチド（またはペプチド模倣体）のうち1つ以上を含む容器を備えることが好ましい。ポリペプチドまたはペプチド模倣体は、単位剤形（例えば、錠剤、カプレット、パッチ、坐薬など）で提供することができ、及び／または任意に1つ以上の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせることができる。

10

【0219】

キットは、任意に、脂質異常症、高コレステロール血症、及び炎症と関連付けられる疾患もしくは状態（心疾患及び／またはアテローム性動脈硬化症など）、またはグルコース代謝異常と関連付けられる疾患もしくは状態、またはアルツハイマー病の治療に使用される1つ以上の他の作用剤を更に含むことができる。このような作用剤としては、上の節及び「併用療法」の節と関連して上に示したものが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ある特定の実施形態では、キットは、ベータ遮断薬、血管拡張剤、アスピリン、スタチン、ACE阻害剤またはACE受容体阻害剤（ARB）などを含むことができる。

20

【0220】

加えて、キットは、任意に、本発明の「治療薬」または「予防薬」の方法または使用の実践のための指示（すなわちプロトコル）を提供する、ラベル及び／または説明資料を含み得る。好ましい説明資料は、例えば、アテローム性動脈硬化症の1つ以上の症状を和らげるため、及び／またはアテローム性動脈硬化症の危険性がある個体におけるこのような症状のうち1つ以上の開始もしくは増大を予防するため、またはグルコース代謝異常と関連付けられる疾患の1つ以上の症状を和らげるため、またはアルツハイマー病もしくは軽度認知障害の1つ以上の症状を和らげるための、1つ以上の本発明のポリペプチドまたはペプチド模倣体の使用を説明する。説明資料はまた、任意に、好ましい投薬／治療計画及び禁忌などを教示することができる。

30

【0221】

説明資料は典型的に文書または印刷物を含むが、これらに限定されない。このような説明を記憶し、それらをエンドユーザーに伝達することが可能な一切の媒体が、本発明によって企図される。このような媒体としては、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップなど）及び光媒体（例えば、CD ROM）などが挙げられるが、これらに限定されない。このような媒体は、このような説明資料を提供するインターネットサイトのアドレスを含んでもよい。

40

【0222】

本発明を、特定の実施例によってより詳細に説明する。以下の実施例は例解目的で提供するのであり、いかなる形においても本発明を限定することは意図しない。当業者であれば、本質的に同一の結果を得るために変更または修飾することができる種々の重要なパラメータを容易に認識するであろう。

【実施例】

【0223】

実施例1

この実施例は、ペプチドを高用量で投与した場合のペプチドATI-5261の毒性を示す。

【0224】

50

高用量でのHDL模倣ペプチドATI-5261の細胞傷害性を、ラット及びウサギにおいて評価した(図1)。固形飼料を与えた雄のウィスターラット(パネルA及びB)に、ペプチドATI-5261(無脂質)を、3、30、及び300mg/kgの用量で、またはビヒクルのみを、48時間間隔、全4回の注射で、静脈内(IV)投与した。血液を、指示された時間で血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT、パネルA)及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST、パネルB)活性について評定するために採取した。標準的な固形飼料を与えた雄のニュージーランドホワイトウサギ(パネルC及びD)に、3、30、または300mg/kgのATI-5261の単回急速IV注射を投与し、次いでALT(パネルC)及びAST(パネルD)の評定のために血液を採取した。値は、平均値±SD、n=群当たり5動物であり、ラットに対しては0.2~24hで二重反復測定を行った。結果は、高用量投与がラット及びウサギにおいて細胞傷害性応答を誘導することを示した。

10

【0225】

高用量投与はまた、血漿トリグリセリド及びコレステロールも増加させた(図2)。図2中の実験のため、固形飼料を与えた雄のウィスターラット(パネルA及びB)に、図1に記載のように、ATI-5261を、3、30、及び300mg/kgの用量で投与した。血漿トリグリセリド(TG、パネルA)及び非エステル化コレステロール(パネルB)濃度を、指示された時間で酵素的に決定した。雄のニュージーランドホワイトウサギ(パネルC及びD)に、3、30、または300mg/kgのATI-5261の単回急速静注を投与し、血漿TG(パネルC)及び非エステル化コレステロール(パネルC)を決定した。値は、平均値±SD、n=群当たり5動物であり、ラットに対しては0.2~24hで二重反復測定を行った。

20

【0226】

高用量ATI-5261の静脈内注射は、更にサルにおいて細胞傷害性応答を誘導した(図3)。雄(上部パネル)及び雌(下部パネル)のカニクイザルに、ATI-5261を、100mg/kgの固定用量で、96時間ごと全4回の注射で、IV注射(60分)によって投与した。注射の24時間後に血液を採取し、血漿ALT、AST、クレアチンキナーゼ(CPK)、ならびに総及び間接的ビリルビンのレベルを決定した。値を、倍数増加対投薬前レベルとして表す。血漿クレアチンキナーゼの著明な増加が最初の注射後に見られ(雄及び雌のサル)、後続の注射では基準値に回帰する比較的穏やかな増加が見られた。

30

【0227】

ラット、ウサギ、及びカニクイザルに見られたATI-5261の高用量細胞傷害性応答は、マウスにおいて更に繰り返される(図4)。固形飼料を与えた雄のC57b1/6マウスに、30または300mg/kgの無脂質ATI-5261を腹腔内(IP)注射した。CPK(パネルA)ならびにALT及びAST活性(パネルB、左の棒がALT、右の棒がAST)の測定のため、ペプチド注射の4時間後に眼窩後方の神経叢を介して血液を採取し、次いで血漿を得た。値は、平均値±SD、n=群当たり4マウスである。高レベルの細胞傷害性マーカーが、300mg/kgのATI-5261の投与後に見られた。

40

【0228】

実施例2

この実施例は、ATI-5261の非極性表面と関連付けられる芳香族フェニルアラニン残基がペプチド毒性の大部分に寄与したことを例解する(図5)。脂肪族ロイシン(L)を持つATI-5261の類似体を創出して、毒性を評価した(図5)。フェニルアラニン(F)を代置するために体系的に使用した脂肪族ロイシン(L)を持つATI-5261の変種(配列表パネルA)を、固形飼料を与えた雄のC57B1/6マウスにIP注射した。血漿の単離のため、注射の4時間後に眼窩後方の神経叢を介して血液を採取した。血漿CPK(パネルA)、ALT(パネルB)、及びAST(パネルC)のレベルを、図1に記載のように決定した。値は、平均値±SD、n=群当たり4マウスである。パネ

50

ルA中の挿入図は、フェニルアラニン残基を欠く全脂肪族類似体（T5055-13、すなわち、ゼロまたはFなし）対ビヒクルのみ（PBS対照）と関連付けられる残留毒性を示す。

【0229】

ATI-5261の脂肪族類似体の投与後のC57Bl/6マウスにおける血漿脂質の濃度も決定した。図6は、300mg/kgでのペプチドの投与後の、図5でマウスから採取した血液の血漿中の脂質濃度を示す。全ての値（mg/dl）は、ペプチドを用いた治療の4及び6時間後に決定した、平均値±SD、n=4である。ATI-5261は、芳香族フェニルアラニン残基を欠く脂肪族類似体（すなわちT5055-13）を使用して大いに弱力化させた、血漿TG、総及び非エステル化（遊離）コレステロール（FC）の著明な増加をもたらした。

10

【0230】

フェニルアラニン残基を欠くATI-5261の脂肪族類似体は、強力なABCA1選択的コレステロール流出活性を保持した（図7）。J774マクロファージマクロファージを、 $[^3\text{H}]$ コレステロールで標識（48h）し、cAMP類似体で処理（18h）して、ABCA1タンパク質発現を誘導した。cAMPの非存在下でインキュベートした細胞（左の棒）を対照とした。パネルA—ATI-5261の全脂肪族類似体（LeuATI-5261、すなわちT5055-13）は、ABCA1に依存する形でコレステロール流出を刺激した。ペプチドは、コレステロール流出活性の促進に最適である30μg/mlの濃度で使用した。パネルB—ペプチドの濃度へのコレステロール流出の依存性。コレステロール流出における同様の飽和がおおよそ3μg/mlのペプチドで得られ、それは、LeuATI-5261類似体が、親ATI-5261ペプチドと同様に、高い効率でコレステロール流出を刺激する能力を保持したことを示す。パネルCは、種々のロイシン置換を持つペプチドのABCA1依存性コレステロール流出活性の要約を示す。結果を、cAMP処理対無処理J774細胞を使用して観察されたコレステロール流出（%/4h）の差異として表す。値は、平均値±SD、n=3である。結果は、フェニルアラニン残基を欠くATI-5261の脂肪族類似体が強力なABCA1選択的コレステロール流出活性を保持したことを示す。

20

【0231】

実施例3

30

ATI-5261の細胞傷害性応答がアルギニンまたはリジン残基に優先的に連結されたか否かを試験するために、リジン排除またはR>K置換を持つATI-5261のペプチド類似体を、マウスにおいて創出及び評価した（図8）。パネルA—安全性及びTG上昇効果を、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC57Bl/6マウスにペプチド（300mg/kg）を注射（IP）することによって評価した。値は、平均値SD、n=4である。切除（T5766-5）またはアミノ酸置換（K25→N、T5594-4）のいずれかによるATI-5261のC末端からのリジン25（K25）の除去は、血漿中の減少したCPK活性（左のパネル）によって判断して、筋肉毒性を大いに減少させ、これは、リジン残基が毒性を促進することを示す。全リジン残基を持つペプチド（すなわち、R>K置換、T5594-5）も、ペプチドの悪影響を媒介することにおけるリジンまたはアルギニンのいずれかの役割と一致する、細胞傷害性活性及びTG上昇活性を示した。パネルB— $[^3\text{H}]$ コレステロールで標識したJ774マクロファージを使用して決定したペプチドのABCA1依存性コレステロール流出活性。結果を、図7に記載のように、流出のABCA1成分として表す。全ペプチドは官能性であり、親ATI-5261ペプチドを使用して見られたものと同様に、3μg/mlの飽和濃度で高レベルのコレステロール流出を刺激した。

40

【0232】

ATI-5261の毒性反応における特定の荷電残基の役割を更に評価するために、アルギニン残基を非荷電グルタミン（Q）またはアスパラギン（N）で代置した（図9）。パネルA—安全性及びTG上昇効果を、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC5

50

7 B 1 / 6 マウスにペプチド (300 mg / kg) を注射 (I P) することによって評価した。値は、平均値 S D、n = 4 である。それぞれ 3 位及び 14 位にグルタミンかアスパラギンか、すなわち、R 3、14 > Q (T 5 7 6 6 - 3)、または R 3、14 > N (T 5 7 6 6 - 4) のいずれかを使用することは、A T I - 5 2 6 1 の C P K 及び T G 上昇効果の増大を大いに減少させ、これは、正荷電アルギニンがペプチドの毒性反応に一部寄与していたことを示す。パネル B - [³H] コレステロールで標識した J 7 7 4 マクロファージを使用して決定したペプチドの A B C A 1 依存性コレステロール流出活性。結果を、図 7 に記載のように、流出の A B C A 1 成分として表す。全ペプチドは官能性であり、親 A T I - 5 2 6 1 ペプチドを使用して見られたものと同様に、3 µ g / ml の飽和濃度で高レベルのコレステロール流出を刺激した。

10

【0233】

実施例 4

この実施例は、疎水性を調節して A T I - 5 2 6 1 類似体の残基毒性を減少させ得ることを実証する。A T I - 5 2 6 1 の毒性を排除する荷電残基に加えて因子を特定するために、アラニン置換を使用して疎水性を体系的に減少させた (図 10)。パネル A - 安全性及び T G 上昇効果を、図 5 に記載のように、固形飼料を与えた雄の C 5 7 B 1 / 6 マウスにペプチド (300 mg / kg) を注射 (I P) することによって評価した。値は、平均値 S D、n = 4 である。L e u A T I - 5 2 6 1 ペプチドにおけるアラニン置換への単一ロイシン (L 2 4 A または L 2 1 A、すなわち T 4 8 8 3 - 6 または T 4 8 8 3 - 7) の使用は、残留筋肉毒性 (すなわち C P K 活性) を排除するのに十分であり、細胞傷害性反

応及び T G 上昇効果を更に減少させた。パネル B - [³H] コレステロールで標識した J 7 7 4 マクロファージを使用して決定したペプチドの A B C A 1 依存性コレステロール流出活性。結果を、図 7 に記載のように、流出の A B C A 1 成分として表す。単一 L 2 4 A または L 2 1 A 置換を持つペプチドは官能性であり、親 A T I - 5 2 6 1 ペプチドを使用して見られたものと同様に、3 µ g / ml の飽和濃度で高レベルのコレステロール流出を刺激した。パネル C - ペプチドの強力な官能性を検証する詳細な研究。標識した [³H] コレステロール、c A M P で処理した J 7 7 4 細胞を、漸増する濃度のペプチドと共にインキュベートし、4 h 後に媒体へのコレステロール流出を評定した。単一アラニン置換を持つペプチドは、コレステロール流出における低 K m (3 µ g / ml 以下) 及び飽和によって判断して、極めて強力な流出活性を支持し、これは、全体的な疎水性を減少させるアミノ酸置換を使用して、安全かつ効果的なペプチドを創出し得ることを示す。

20

30

【0234】

疎水性を調節して A T I - 5 2 6 1 類似体の残留毒性を減少させ得ることの更なる証拠を、図 11 に提供する結果において提供する。A T I - 5 2 6 1 類似体の残留毒性を減少させるために使用することができる追加のアミノ酸置換を特定するために、アラニンを体系的に使用して、ペプチドの異なる領域内でバリン (V) またはロイシン (L) を代置した。パネル A - 安全性及び T G 上昇効果を、図 5 に記載のように、固形飼料を与えた雄の C 5 7 B 1 / 6 マウスにペプチド (300 mg / kg) を注射 (I P) することによって評価した。値は、平均値 S D、n = 4 である。トリプトファン (W) 置換 (T 5 5 0 5 - 9) と組み合わせたアラニン置換への単一ロイシン (L 2 4 A) の使用は、血漿 C P K 及び A S T、ならびに T G 上昇活性の増大を著明に減少させた。この組み合わせは、V 2 及び L 10 を伴う置換が、A T I - 5 2 6 1 と比較して大いに減少したレベルではあるが一部の細胞傷害性及び T G 上昇効果を保持したため、最も好ましいと思われた。パネル B - [³H] コレステロールで標識した J 7 7 4 マクロファージを使用して決定したペプチドの A B C A 1 依存性コレステロール流出活性。結果を、図 7 に記載のように、流出の A B C A 1 成分として表す。全ペプチドは官能性であり、10 µ g / ml の飽和濃度で高レベルのコレステロール流出を刺激した。パネル C - 図 11 について記載のように決定した、ペプチド T 5 5 0 5 - 9 (L 2 4 A、W 9 L 置換) の強力な官能性を検証する詳細な研究。ペプチド T 5 5 0 5 - 9 は、濃度約 3 µ g / ml で、コレステロール流出における低 K m (0.58 µ g / ml) 及び飽和によって判断して、高い効率で細胞コレステロール流

40

50

出を刺激した。

【0235】

疎水性のより低いアミノ酸へのトリプトファンの更なる置換を使用して、A T I - 5 2 6 1の毒性を減少させることができる(図12)。トリプトファン(W)のアラニン(A)置換またはバリン(V)置換のいずれかを持つペプチドを、毒性反応、TG上昇効果、及び細胞コレステロール流出の媒介における官能性について評価した。パネルA-安全性及びTG上昇効果を、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC 5 7 B 1 / 6マウスにペプチド(300mg/kg)を注射(IP)することによって評価した。値は、平均値SD、n=4である。W→AまたはV置換を持つペプチドは、A T I - 5 2 6 1と比較して、低レベルの血漿CPK、AST、及びTG上昇効果をもたらした。パネルB-[³H]コレステロールで標識したJ 7 7 4マクロファージを使用して決定したペプチドのA B C A 1依存性コレステロール流出活性。cAMPで処理した細胞及び処理していない細胞からのコレステロール流出を示す。全ペプチドは官能性であり、A B C A 1に依存する形でコレステロール流出を刺激した。パネルC-W 9 AまたはL 2 4 A、W 9 V置換を持つペプチド類似体は、濃度約3µg/mlでのコレステロール流出における低Km及び飽和によって判断して、高い効率で細胞コレステロール流出を刺激した。

【0236】

実施例5

この実施例は、疎水性アミノ酸をR 1 4位に使用して、安全かつ効果的なペプチドを創出し得ることを実証する。L e u A T I - 5 2 6 1の長さの下部での複数のアラニン置換の使用は、A T I - 5 2 6 1類似体の低い毒性及び大いに小さくなったTG上昇効果をもたらした(図11、ペプチドT 5 5 0 5 - 1 2)。しかしながら、アラニン置換の過剰使用は、細胞コレステロール流出の媒介における官能性の喪失をもたらす。複数のアラニン置換を持つペプチドのコレステロール流出活性を救援するため、T 5 5 0 5 - 1 2またはA T I - 5 2 6 1内でR 1 4を削除したか、またはR 1 4を疎水性ロイシンで置き換えた(図13)。これらの削除/置換は、ペプチドの脂質/水界面から有害な正荷電残基を除去しながら、疎水性表面を拡大する。パネルA-安全性及びTG上昇効果を、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC 5 7 B 1 / 6マウスにペプチド(300mg/kg)を注射(IP)することによって評価した。値は、平均値SD、n=4である。R 1 4 L置換を持つペプチド(T 5 2 1 1 - 2)は、種々の位置(V 2、L 6、及びL 2 4 > A)におけるアラニンの使用にもかかわらず、血漿中の毒性反応及び低TGをほとんどまたは全く示さなかった。パネルB-[³H]コレステロールで標識したJ 7 7 4マクロファージを使用して決定したペプチドのA B C A 1依存性コレステロール流出活性。結果を、図7に記載のように、流出のA B C A 1成分として表す。R 1 4 L置換を持つT 5 0 5 5 - 1 2のペプチド類似体(すなわちT 5 2 1 1 - 2)は、飽和濃度(10µg/ml)で、A T I - 5 2 6 1と同様の、及び親T 5 0 5 5 - 1 2ペプチドに対して著明に向上した高レベルのコレステロール流出活性を示した。故に、両親媒性αヘリックスペプチドの脂質/水界面での疎水性ロイシン残基の使用は、アラニン置換の使用によって毒性が低下したペプチドのコレステロール流出活性を回復するために使用することができる。

【0237】

実施例6

この実施例は、R 1 4 L置換を他のA T I - 5 2 6 1類似体中で使用して、安全かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出し得ることを実証する。種々のアラニン残基をバリン(V)で置換することによって、R 1 4 L置換を含むT 5 2 1 1 - 2のペプチド類似体を創出した(図14)。パネルA-安全性及びTG上昇効果を、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC 5 7 B 1 / 6マウスにペプチド(300mg/kg)を注射(IP)することによって評価した。値は、平均値SD、n=4である。単一または複数のA→V置換を含みC末端残基KSを欠くT 5 2 1 1 - 2のペプチド類似体は、A T I - 5 2 6 1陽性対照と比較して、比較的低い細胞傷害性応答を呈した。パネルB-[³H]コレステロールで標識したJ 7 7 4マクロファージを使用して決定したペプチドのA B C A 1依存性

コレステロール流出活性。T 5 2 1 1-2 のペプチド類似体は官能性であり、A T I-5 2 6 1 と同様の濃度 (1 0 μ g / m l) で、A B C A 1 に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネル C-濃度依存性研究は、バリン置換を持つ R 1 4 L ペプチド及び持たない R 1 4 L ペプチドが、極めて効率的な形でコレステロール流出を刺激し、3 μ g / m l でコレステロール流出の低 K m 及び飽和を示したことを実証した。左のパネルは、R 1 4 L ペプチド (バッチ # T 6 0 2 3-3、すなわち T 5 2 1 1-2 原型) の流出活性を示し、これは、R 1 4 L 置換が、親 T 5 0 5 5-1 2 ペプチドの弱い活性と比較して強力な官能性を授けたことを例解する (図 1 1、パネル C を参照されたい)。

【0 2 3 8】

実施例 7

この実施例は、アルギニンのシトルリン置換を使用して、安全かつ効果的な H D L 模倣ペプチドを創出し得ることを実証する (図 1 5)。シトルリンは、正荷電を欠くが、塩橋構成を保存するために水素結合を保持するアルギニンの天然アミノ酸類似体である。正荷電の欠如それ自体が A T I-5 2 6 1 の毒性及び T G 上昇効果を排除するか否かを試験するために、一連のペプチド類似体を、3 位、1 4 位、及び 2 3 位での R → シトルリン置換を用いて創出した (図 1 5 中の配列表を参照されたい)。本図及び表は、図 5 に記載のように、固形飼料を与えた雄の C 5 7 B 1 / 6 マウスに I P 注射したペプチド (3 0 0 m g / k g) の安全性及び T G 上昇効果を示す。値は、平均値 S D、n = 4 である。試験したペプチドについては、3 位及び 1 4 位でのシトルリンの使用が A T I-5 2 6 1 の筋肉毒性を大いに減少させたが、一方で、全体的な一般毒性 (A S T) 及び血漿 T G は増加したままであった。

【0 2 3 9】

A T I-5 2 6 1 のシトルリン類似体は、官能性を保持し、高力価でコレステロール流出を刺激した。図 1 6 は、[3 H] コレステロールで標識した J 7 7 4 マクロファージを使用して決定したコレステロール流出を刺激するペプチドの活性を示す。結果を、図 7 に記載のように、流出の A B C A 1 成分として表す。高レベルの A B C A 1 依存性コレステロール流出が、A T I-5 2 6 1 と同様に、飽和濃度 (3 μ g / m l) の全ペプチドで得られた。コレステロール流出の媒介に対するペプチド力価を特徴付ける K m 及び V m a x 値を表で示す。三つ組みの R 3、1 4、2 3 → シトルリン置換 (T 5 4 2 6-7) を除外した試験した全ペプチドが、親 A T I-5 2 6 1 ペプチドと同様に低 K m (すなわち、A B C A 1 に対する高親和性) によって判断して、コレステロール流出の媒介において極めて効率的であると証明された。

【0 2 4 0】

実施例 8

この実施例は、A T I-5 2 6 1 のシトルリン類似体が他のアミノ酸置換を支持することを実証する。種々の疎水性アミノ酸 (W → L、V、または A) 置換を A T I-5 2 6 1 の二重シトルリン形態 (すなわち、R 3、1 4 → シトルリン、T 5 4 2 6-4) で創出して、該ペプチドが毒性反応及び T G 上昇効果を更に排除するために他のアミノ酸変化を支持し得るか否かを試験した。これらの実験の結果を図 1 7 に示す。パネル A-安全性及び T G 上昇効果を、図 5 に記載のように、固形飼料を与えた雄の C 5 7 B 1 / 6 マウスにペプチド (3 0 0 m g / k g) を注射 (I P) することによって評価した。値は、平均値 S D、n = 4 である。W 9 → L、V、または A 置換 (複数可) を持つ A T I-5 2 6 1 のシトルリン形態は、血漿中の毒性反応及び T G 上昇反応をほとんどまたは全く示さなかった。パネル B-J 7 7 4 マクロファージを使用して決定したペプチドの A B C A 1 依存性コレステロール流出活性。結果を、図 7 に記載のように、流出の A B C A 1 成分として表す。シトルリン置換を持つペプチド類似体は官能性であり、A T I-5 2 6 1 と同様に、飽和濃度 (3 μ g / m l) で高レベルのコレステロール流出活性を示した。

【0 2 4 1】

実施例 9

この実施例は、L e u A T I-5 2 6 1 ペプチドが、シトルリン置換を支持して、安全

10

20

30

40

50

かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出し得ることを実証する。正荷電アルギニン及び芳香族フェニルアラニン（F）残基の両方の排除が、強力なコレステロール流出活性を保持した安全なペプチドを創出したか否かを試験するために、一連のシトルリン置換をLeuATI-5261類似体中で創出した（図18中の配列表を参照されたい）。ペプチドを評価した結果を図18に提供する。本グラフ及び表は、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC57BL/6マウスにIP注射したペプチド（300mg/kg）の安全性及びTG上昇効果を示す。値は、平均値SD、n=4である。試験したペプチドについては、3位及び14位でのシトルリンの使用が、ATI-5261の筋肉毒性（CPK活性）及び全体的な細胞障害反応（ALT及びAST）及びTG上昇効果を大いに減少させた。最も注目すべきは、3位及び14位での2つのシトルリン置換（すなわち、R3、14→シトルリン）を持つペプチドが、PBS対照と比較して検出可能な筋肉毒性または肝毒性を示さなかったことである。これは、F残基を保有するATI-5261のシトルリン形態（図15、すなわちT5426ペプチド）で観察されたAST及びTGの穏やかな増加とは対照的であり、LeuATI-5261のシトルリン類似体が、高用量で投与したときにひときわ安全であったことを示す。

10

【0242】

ATI-5261のシトルリン類似体は、官能性を保持し、高力価でコレステロール流出を刺激した（図19）。本棒グラフは、[3H]コレステロールで標識したJ774マクロファージからのコレステロール流出を刺激するペプチドの活性を示す。結果を、図7に記載のように、流出のABCA1成分として表す。高レベルのコレステロール流出が、ATI-5261と同様に、1つの（R3→シトルリン）置換または2つの（R3、14→シトルリン）置換のいずれかを保有する飽和濃度（3μg/ml）のペプチドで得られた。これは、試験したペプチドが高い効率でコレステロール流出を刺激するための低Km値を保有した、表に示す詳細な用量反応研究によって検証した。

20

【0243】

実施例10

この実施例は、両親媒性αヘリックスの極性表面に沿った負荷電残基の存在が、HDL模倣ペプチドの毒性特性を加減する主要な役割を果たすことを示す（図20）。非荷電グルタミン（Q）を使用して、図20中の配列表に示すように、ATI-5261、LeuATI-5261、及びそのシトルリン類似体全体の種々の位置で負荷電グルタミン酸塩（E）を代置した。ペプチドの正味の荷電は、示す配列について+1（T5554-1）〜-1（T5554-5及びT5554-6）の範囲であった。本グラフ及び表は、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC57BL/6マウスにIP注射したペプチド（300mg/kg）の安全性及びTG上昇効果を示す。値は、平均値SD、n=4である。ATI-5261からの酸性残基の除去（E7、18→Q、すなわちT5554-1）は、親ATI-5261ペプチドで見られたものと比較して、毒性反応の大規模な増加をもたらした。これは、好ましいシトルリン置換（すなわち、T5554-5及びT5554-4）の存在下では多少減退したが、共に強い毒性反応（CPK、ALT、及びAST）及びTG上昇反応を保持した。これらの結果は、HDL模倣ペプチドATI-5261の安全性特性が、負荷電アミノ酸の存在及び位置に部分的に依存したことを示す。

30

40

【0244】

酸性残基置換を持つペプチドは、細胞コレステロール流出の媒介において官能性を保持した。図21に示す棒グラフは、[3H]コレステロールで標識したJ774マクロファージからのコレステロール流出を刺激するペプチドの活性を示す。結果を、図7に記載のように、流出のABCA1成分として表す。高レベルのコレステロール流出が全ペプチドの飽和濃度（3μg/ml）で得られ、これは、ペプチドが、ABCA1依存性コレステロール流出の媒介に十分な酸性残基、構造、及び荷電特徴を保有したことを示す。

【0245】

実施例11

この実施例は、LeuATI5261の小型の24-mer形態及びそのシトルリン

50

類似体が安全かつ効果的であることを実証する（図22）。C末端残基の除去は、ペプチド活性を改変することなくATI-5261の毒性反応を減少させるように思われた（図8、T5766-5）。この効果がATI-5261の他のより安全な形態で繰り返されるかどうかを試験するために、アミノ酸25及び26（それぞれKS）をLeuATI-5261及びそのシトルリン類似体から削除した（図22）。パネルA—安全性及びTG上昇効果を、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC57B1/6マウスにペプチド（300mg/kg）を注射（IP）することによって評価した。値は、平均値SD、n=4である。C末端残基KSを欠くペプチドは、比較的低い細胞傷害性応答を呈したが、ATI-5261に基づく24-merを使用して見られたように、TG上昇効果を保持した（図8）。パネルB—[3H] コレステロールで標識したJ774マクロファージを使用して決定したペプチドのコレステロール流出活性。ペプチドは官能性であり、LeuATI-5261のシトルリン形態に基づく親26-merペプチド（CS6253、すなわち、バッチT5237-4と同等）と同様の濃度（10µg/ml）で、ABCA1に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネルC—24-merペプチドが極めて効率的な形でコレステロール流出を刺激し、3µg/mlでコレステロール流出の低Km及び飽和を示したことを実証する用量反応。

10

【0246】

実施例12

この実施例は、疎水性ロイシンを使用し、両親媒性αヘリックスの脂質/水界面でシトルリンを代置して、安全かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出し得ることを実証する（図23）。LeuATI-5261の二重シトルリン形態（T5237-4）をプラットフォームとして使用して安全かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出し得ることを検証するために、疎水性ロイシンを3位で使用するか、または2位でバリンの代わりに使用した。パネルA—安全性及びTG上昇効果を、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC57B1/6マウスにペプチド（300mg/kg）を注射（IP）することによって評価した。値は、平均値SD、n=4である。ロイシン置換を持つペプチドは、R14L置換を持つ類似体と同様に、細胞傷害性特性をほとんどまたは全く示さなかった（図13）。これは、R3位及び14位が極めて頑強であり、多様なアミノ酸置換によって標的化されて、安全かつ効果的なHDL模倣ペプチドを創出し得ることを示す。パネルB—[3H] コレステロールで標識したJ774マクロファージを使用して決定したペプチドのコレステロール流出活性。ペプチドは官能性であり、LeuATI-5261の親シトルリン形態（CS6253、すなわち、T5237-4のバッチと同等）と同様の濃度（10µg/ml）で、ABCA1に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネルC—ロイシン置換を持つペプチドが極めて効率的な形でコレステロール流出を刺激し、3µg/mlでコレステロール流出の低Km及び飽和を示したことを実証する用量反応。

20

30

【0247】

実施例13

この実施例は、LeuATI-5261のシトルリン形態が、他のアミノ酸置換を支持して、安全かつ効果的なペプチドを創出することを実証する（図24）。LeuATI-5261の種々の類似体を、3位及び14位にあるロイシンまたはシトルリンのいずれか、または2位のロイシンによって創出した。パネルA—安全性及びTG上昇効果を、図5に記載のように、固形飼料を与えた雄のC57B1/6マウスに代表的なペプチド（300mg/kg）を注射（IP）することによって評価した。値は、平均値SD、n=4である。14位にロイシンを保有する（シトルリン14→L）ペプチドは、R14L置換を持つ類似体と同様に、細胞傷害性特性をほとんどまたは全く示さなかった（図13）。

40

【0248】

実施例14

この実施例は、種々のロイシン置換を持つLeuATI-5261のシトルリン形態がコレステロール流出活性を保持したことを実証する。[3H] コレステロールで標識し、

50

A B C A 1 発現を調節するために c A M P で処理した J 7 7 4 マクロファージ（右の棒）及び処理していない J 7 7 4 マクロファージ（左の棒）を使用して、ペプチドのコレステロール流出活性（図 2 5）を決定した。パネル A—シトルリン及び／またはロイシン置換を持つペプチド類似体は官能性であり、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、A B C A に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネル B—T 6 2 7 5—5 ペプチド（単一シトルリン 1 4→L 置換）が極めて効率的な形でコレステロール流出を刺激し、 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ でコレステロール流出の低 K_m 及び飽和を示したことを実証する用量反応。

【0249】

実施例 15

この実施例は、イソロイシンを使用し、A T I—5 2 6 1 中のフェニルアラニンを代置して、安全かつ効果的なコレステロール流出ペプチドを創出し得ることを実証する（図 2 6）。A T I—5 2 6 1 のペプチド類似体を創出し、非極性表面で使用することができるアミノ酸置換を特定して、安全なペプチドを創出した。安全性及び T G 上昇効果を、図 5 に記載のように、固形飼料を与えた雄の C 5 7 B 1 / 6 マウスにペプチド（ $300 \text{mg}/\text{kg}$ ）を注射（I P）することによって評価した。本棒グラフ（左下）は、イソロイシン置換（F 1 0、1 3、1 6、2 0→I）を保有する A T I—5 2 6 1（T 6 9 9 1—1）及び C i t. A T I—5 2 6 1（T 6 9 9 1—2）の類似体が、C P K 上昇に関係する細胞傷害性特性をほとんどまたは全く示さないことを示す。血清 A L T 及び A S T 値も、イソロイシンペプチド対 A T I—5 2 6 1 対照で著明に減少した（表）。対照的に、非極性表面でのセリンまたはチロシン置換を持つ A T I—5 2 6 1 の類似体は、比較的高い C P K、A L T、及び A S T 反応を誘導し、これは、ペプチドの脂質結合表面上の極性残基の位置が細胞傷害性応答を低下させなかったことを示した。これらの結果は、A T I—5 2 6 1 の毒性特性が芳香族及び正荷電残基に関係し、シトルリン及び脂肪族アミノ酸残基の戦略的使用によってこれを排除し得るものの証拠を提供する。値は、平均値 S D、 $n = 4$ である。

【0250】

実施例 16

この実施例は、A T I—5 2 6 1 のイソロイシン形態がコレステロール流出活性を保持することを実証する（図 2 7）。[3 H] コレステロールで標識し、A B C A 1 発現を調節するために c A M P で処理した J 7 7 4 マクロファージ（右の棒）及び処理していない J 7 7 4 マクロファージ（左の棒）を使用して、ペプチドのコレステロール流出活性を決定した。パネル A—A T I—5 2 6 1（T 6 9 9 1—1）及び C i t. A T I—5 2 6 1（T 6 9 9 1—2）のイソロイシン形態は官能性であり、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、A B C A に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネル B—A T I—5 2 6 1 のイソロイシン形態が極めて効率的な形で A B C A 1 コレステロール流出を刺激したことを実証。パネル C—C i t. A T I—5 2 6 1（T 6 9 9 1—2）のイソロイシン形態が極めて効率的な形で A B C A 1 コレステロール流出を刺激したことを実証。パネル D—非極性表面にセリンまたはチロシンを持つペプチド（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）は、A B C A 1 に依存する形で、すなわち、c A M P で処理した J 7 7 4 細胞及び処理していない J 7 7 4 細胞を使用して、高レベルのコレステロール流出を媒介する能力を保持した。パネル E—ペプチド T 6 9 9 1—2 及び C S 6 2 5 3 が、J 7 7 4 マクロファージからの完全長 a p o A—I と同一の速度動態でコレステロール流出を刺激したことを示すデータ。ペプチド及び a p o A—I を、濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の無脂質形態で使用した。値は、平均値 S D、 $n = 4$ である。

【0251】

実施例 17

この実施例は、ペプチド C S 6 2 5 3 及び T 6 9 9 1—2 が高力価で A B C A 1 を介して細胞コレステロール流出を刺激したことを実証する。（図 2 8）。[3 H] コレステロールで標識し、A B C A 1 発現を調節するために c A M P で処理した J 7 7 4 マクロファージ（右の棒）及び処理していない J 7 7 4 マクロファージ（左の棒）を使用して、ペプ

チドのコレステロール流出活性を決定した。パネルA-C i t. A T I-5 2 6 1のロイシン (C S 6 2 5 3) 及びイソロイシン (T 6 9 9 1-2) 形態は官能性であり、10 μ g / m l の濃度で、A B C A 1 に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネルB-ミカエリス・メンテン式 (G r a p h - P a d P r i s m 5 ソフトウェア) を使用して計算した、ペプチド、a p o A-I、a p o E、及びa p o E C末端 (C T) ドメインについてのコレステロール流出力価 (K m 値)、ならびにc A M P 処理したJ 7 7 4 細胞から得た流出データの要約。K m 値を質量 (μ g / m l) またはモル基準 (μ M) で表す。後者は、C S 6 2 5 3 及びT 6 9 9 1-2 が、a p o E の天然流出ドメイン (C T) と比較した場合に特に、近いアポリポタンパク質モル力価でコレステロール流出を刺激したことを示す。パネルC-T 6 9 9 1-2 及びC S 6 2 5 3 が極めて効率的な形でコレステロール流出を刺激し、3 μ g / m l でコレステロール流出の低K m 及び飽和を示したことを実証する用量反応。

10

【0252】

実施例18

この実施例は、C i t. A T I-5 2 6 1のロイシン形態が、マクロファージA B C A 1 を安定させ、A B C A 1 に依存する形でコレステロール流出を刺激することを実証する。(図29)。J 7 7 4 マクロファージを実験に使用した。パネルA-細胞を、3 H コレステロールで標識 (48時間) し、A B C A 1 発現を調節するためにc A M P 類似体を用いて (右の棒) 及び用いずに (左の棒) 処理した。アポリポタンパク質 (a p o) A-I、E、a p o E のC末端 (C T) ドメイン、及びペプチドC S 6 2 5 3 を無脂質形態で細胞に添加して (10 μ g / m l)、細胞コレステロール流出を開始させた。4時間後、流出した [3 H] コレステロールについて培地をアッセイした。値及び平均値 $\pm$ S D、n = 3。c A M P を使用したA B C A 1 反応対c A M P 非存在下の低反応に対して上方調節した細胞を使用した全アポリポタンパク質及びペプチドに高レベルのコレステロール流出が見られた。したがって、ペプチドC S 6 2 5 3 は、天然アポリポタンパク質と同様にA B C A 1 依存性コレステロール流出を刺激した。パネルB-c A M P によるJ 7 7 4 細胞の処理後のA B C A 1 タンパク質発現を示す全細胞溶解液のウェスタンブロット (レーン1、t = 0)。A B C A 1 が、後続の6時間の追跡の間、ペプチドC S 6 2 5 3 (レーン4) またはa p o A-I (レーン5) のいずれかの継続した存在下で高レベルで維持されたのに対し、A B C A 1 タンパク質は、無血清培地のみで分解された (レーン3)。これらのデータは、C i t. A T I-5 2 6 1のロイシン形態が細胞膜中のA B C A 1 タンパク質を安定させたことを示す。パネルC-C S 6 2 5 3 : リン脂質複合体のA B C A 1 依存性コレステロール流出活性。C S 6 2 5 3 ペプチドとP O P C との7 ~ 8 n m の小型の複合体を、コール酸塩透析によって調製し、c A M P を用いて及び用いて処理した [3 H] コレステロール標識化J 7 7 4 細胞と共にインキュベートした。値は、平均値 $\pm$ S D、n = 3である。P O P C と複合体化した新しく安全なペプチドC S 6 2 5 3 のコレステロール流出活性は、対応する親A T I-5 2 6 1 ペプチドと同一であったため、保持された官能性についての更なる補助データを提供する。

20

30

【0253】

実施例19

この実施例は、ペプチドC S 6 2 5 3 が、天然A B C A 1 オリゴマー形態と相互作用して、細胞脂質流出及び新生H D L 集合を媒介することを実証する (図30)。A B C A 1 によって安定してトランスフェクトしたB H K 細胞または模擬トランスフェクトした対照細胞を、図5に記載のように、[3 H] コレステロールで標識した。パネルA-ペプチドまたはa p o A-I のいずれかに対する抗体を使用した架橋アッセイ及びウェスタンブロット分析によって決定した、C S 6 2 5 3 が、A T I-5 2 6 1 及びa p o A-I と同様に細胞膜中の天然形態のA B C A 1 と相互作用したことの实証。パネルB-C S 6 2 5 3 は、a p o A-I 及びA T I-5 2 6 1 と同様に、高力価でA B C A 1 を介してコレステロール流出を刺激した。パネルC-ペプチドは、天然P A G E によって決定した、a p o A-I と比較して同様のサイズの新生H D L 粒子の集合を媒介した。データは、C S 6 2

40

50

53を例とする本発明の単一の α ヘリックスペプチドが、コレステロール及びリン脂質流出を含むABC A1脂質流出を高力価で媒介し、新生HDL粒子の集合／構造を支持するのに十分であったことを示す。

【0254】

実施例20

この実施例は、リン脂質を用いて配合したペプチドCS6253が、SRB1を介してコレステロール流出を刺激したことを実証する(図31)。CS6253の可能性のある抗動脈硬化性機序を更に評価するために、細胞脂質流出媒介のためのSR-B1を主に発現するFu5AH細胞を、[3H]コレステロールで標識し、流出実験で使用した。POPCを用いて脂質化したCit. ATI-5261のロイシン形態(CS6253)を、50 μ gのペプチド/ml濃度の培地においてコレステロールアクセプターとして使用した。パネルA-SR-B1によって媒介されたコレステロール流出の経時変化。CS6253:POPCの複合体は、無脂質ペプチドの低い活性と対比して、高レベルのコレステロール流出を刺激し、これは、基質として脂質化アクセプター粒子を必要とするSR-B1の関与と一致する。パネルB-SR-B1を介した細胞コレステロール流出の媒介におけるCS6253とATI-5261との間の比較。[3H]コレステロール標識化Fu5AH細胞を、無脂質ペプチドかPOPCを用いて配合したペプチドかのいずれかと共にインキュベートした。CS6253:POPC複合体への比較的高レベルのコレステロール流出(4時間)が達成され、これは、ATI-5261:POPC複合体で得られたものを超越した。データは、リン脂質を持つペプチド製剤が、SR-B1を介したコレステロール流出の媒介において極めて効果的であるHDL様粒子をもたらしたことを示す。

【0255】

実施例21

この実施例は、リン脂質を用いて配合したペプチドCS6253が、ABCG1を介してコレステロール流出を刺激することを実証する(図32)。CS6253の可能性のある抗動脈硬化性機序を更に評価するために、ABCG1によって安定してトランスフェクトしたBHK細胞または模擬トランスフェクトした対照細胞を、[3H]コレステロールで標識し、流出実験で使用した。POPCを用いて脂質化したCit. ATI-5261のロイシン形態(CS6253)及びATI-5261を、50 μ gのペプチド/ml濃度の無血清培地でコレステロール流出アクセプターとして使用した。パネルA-細胞から無脂質CS6253ペプチドまたはCS6253:POPC複合体へのABCG1によって媒介されたコレステロール流出の経時変化。CS6253:POPCの複合体は、無脂質ペプチドの低い活性と対比して、高レベルのコレステロール流出を刺激し、これは、基質として脂質化粒子を必要とするABCG1の関与と一致する。パネルB-ABCG1を介した細胞コレステロール流出の媒介におけるCS6253とATI-5261との間の比較。[3H]コレステロール標識化BHK細胞(ABCG1対模擬トランスフェクト化、左の棒が対照BHK、右の棒がG1-BHK)を、無脂質ペプチドかPOPCを用いて配合したペプチドかのいずれかと共にインキュベートした。意外にも、比較的高レベルのコレステロール流出(4時間)がCS6253:POPC複合体を使用して観察されたのに対し、ATI-5261(遊離ペプチドまたはPOPC複合体)は活性が低かった。したがって、CS6253は、種々の細胞表面受容体を介したコレステロール流出を媒介するための安全性及び活性を含むいくつかの基準に基づいて、秀でたペプチドであることが証明された。

【0256】

実施例22

この実施例は、CS6253が、プレ β -HDLの形成を誘導し、ヒト血漿のコレステロール流出活性を強化することを示す。(図33)。CS6253が生物学的環境において抗動脈硬化効果を発揮するか否かを試験するために、ヒト血漿を無脂質ペプチドに曝露した(5分)。血漿中でのHDLとのCS6253の相互作用、及びコレステロール流出を刺激する血漿の活性を、後者には[3H]コレステロールで標識したJ774マクロフ

ァージを使用して評定した。パネルA—無脂質ペプチドで処理した血漿のコレステロール流出活性。ヒト血漿を、5分間300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドと共にインキュベートし(4℃)、無血清RPMI-1640培地中で1%に希釈し、すぐに[3H]コレステロール標識化J774細胞に添加した。ペプチド(CS6253またはATI-5261)で処理した血漿は、ビヒクルのみで処理した対照血漿(左の棒)と対比して、ABCA1を介した細胞からの(すなわち、cAMP処理した細胞からの(右の棒))コレステロール流出を刺激するより優れた資質を保有した。パネルB—CS6253によるヒト血漿処理後のプレβ HDLの誘導。血漿を少量のペプチド対内因性apoA-I(それぞれ1:10モル比)に曝露し、プレβ HDLの形成を2Dの非変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(NDGGE)及びウエスタンブロット分析によって評定した。左のパネルは、apoA-Iに対する抗体を使用して判断した、ペプチド処理していない血漿中のプレβ HDLの量(総HDLの5~6%)を示す。右のパネルは、ペプチド処理したプレβ HDLの増加、及びα-移動性HDL種(apoA-I抗体)の対応する減少を示す。中央のパネルは、CS6253に対する抗体を使用して判断して、CS6253が血漿中のα-HDLと関連したことを例解する。結果は、CS6253が、α-HDLの表面からapoA-Iを動かして、プレβ HDL形成及びコレステロール流出活性を誘導したことを示す(パネルA)。結果は、全て内因性apoA-Iからなる真正プレβ HDL粒子の産生と一致する。

【0257】

実施例23

この実施例は、ペプチドT6991-2が、プレβ-HDLの形成を誘導し、ヒト血漿のコレステロール流出活性を強化することを実証する(図34)。T6991-2が生物学的環境において抗動脈硬化効果を発揮するか否かを試験するために、ヒト血漿を無脂質ペプチドに曝露した(5分)。血漿中のHDLとのT6991-2の相互作用、及びコレステロール流出を刺激する血漿の活性を、[3H]コレステロールで標識したJ774マクロファージを使用して評定した。パネルA—無脂質ペプチドで処理した血漿のコレステロール流出活性。ヒト血漿を、5分間300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドと共にインキュベートし(4℃)、無血清RPMI-1640培地中で1%に希釈し、すぐに[3H]コレステロール標識化J774細胞に添加した。ペプチド(T6991-2またはCS6253)で処理した血漿は、ビヒクルのみで処理した対照血漿(左の棒)と対比して、ABCA1を介した細胞からの(すなわち、cAMP処理した細胞からの(右の棒))コレステロール流出を刺激するより優れた資質を保有した。パネルB—T6991-2によるヒト血漿処理後のプレβ HDLの誘導。血漿を少量のペプチド対内因性apoA-I(それぞれ1:10モル比)に曝露し、プレβ HDLの形成を2Dの非変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(NDGGE)及びウエスタンブロット分析によって評定した。左の2つのパネル(すなわち、2回の実行)は、apoA-Iに対する抗体を使用して判断した、ペプチド処理していない血漿中のプレβ HDLの量(総HDLの約6%)を示す。右のパネルは、ペプチド処理したプレβ HDLの増加、及びα-移動性HDL種(apoA-I抗体)の対応する減少を示す。結果は、T6991-2が、ペプチドCS6253と同様に、ABCA1を介したコレステロール流出の媒介において機能的である血漿中のプレβ HDL粒子を誘導したことを示す。

【0258】

実施例24

この実施例は、CS6253がハムスターにおけるインビボでのプレβ HDL形成を誘導することを実証する(図35)。マウスよりもよりヒト様のHDL代謝を有することで知られるゴールデンシリアンハムスターに、高脂肪の西洋食を4週間与え、30 mg/kg の無脂質CS6253ペプチドを皮下(SC)注射した。注射後1、2、及び4時間で、apoA-Iに対する抗体を使用する天然2D PAGE及びウエスタンブロット法によるプレβ HDLレベルの分析のために、血漿を採取した。パネルA—ビヒクル対照注射(4時間の時点)について及びペプチド(1、2、及び4時間)についてのプレβ 1

HDL (左の棒) 及び主要な α -HDL 移動性種 (右の棒) として、HDL 種の分布を示す棒グラフ。対照と対比してペプチド治療でプレ β 1 HDL の大規模な増加 (約 8 倍) が観察され、これは、CS 6 2 5 3 がインビボにおいて HDL と相互作用し、HDL を好ましく調節することが可能であることを示す。パネル B-PBS 対照及び CS 6 2 5 3 注射についての HDL 亜種の分布を示す 2D-PAGE ゲル (天然) の代表的なウエスタンブロット (apo A-I 抗体) (4 時間データ)。パネル C-ゴールデンシリアンハムスターにおけるペプチド治療によるわずかな HDL 増加及び LDL 低下についての用量反応。ハムスターに、10、30、及び 100 mg/kg のペプチドを SC 注射し、4 時間後に PBS (n =群当たり 3) 及び血漿を採取した。遠心分離によるアルブミンの除去の後、血漿を注射し、リポタンパク質を気相示差電気泳動高分子移動度に基づく方法 (イオン移動度または IM) (Caulfield et al. Clin Chem 2008 54:8 1307-16) によって分離した。プレ β HDL 増加についての用量反応は、LDL 粒子、特にサイズの小さい LDL 粒子と関連付けられた。

【0259】

実施例 25

この実施例は、ラットにおける CS 6 2 5 3 の半減期を示す (図 36)。S26→Y 置換を用いて CS 6 2 5 3 を設計して、 ^{125} I (配列は図の上部) による標識化を促進した。その後、放射性標識したペプチドを、固形飼料を与えた雄のウィスターラットに種々の投与経路によって注射し、その血漿中の取り込みを定量化した。パネル A- ^{125} I-CS 6 2 5 3 の注射後の血漿からのクリアランス動態。表 (右) は、クリアランス曲線から計算した CS 6 2 5 3 の半減期、及び注射した用量の % としてのその生物学的利用能を示す。パネル B-[3H] コレステロールで標識した J774 マクロファージを使用して決定した CS 6 2 5 3 の Y26 形態のコレステロール流出活性。ペプチドは官能性であり、親 CS 6 2 5 3 ペプチドと同様の濃度 (10 μ g/ml) で、ABCA1 に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネル C-ペプチドが高い効率でコレステロール流出を刺激し、3 μ g/ml でコレステロール流出の低 K_m 及び飽和を示したことを実証する用量反応。

【0260】

実施例 26

この実施例は、T6991-2 及び CS 6 2 5 3 が、インビボにおける便へのマクロファージコレステロール逆輸送 (RCT) を刺激したことを示す (図 37)。アセチル化 LDL (100 μ g/ml) を充填し、[3H] コレステロールで標識した J774 マクロファージ泡沫細胞を、10 または 30 mg/kg の用量で、ビヒクルのみ (PBS) または指示された無脂質ペプチドと共に、生後 4 ヶ月の雄のアテローム性動脈硬化性 apoE 欠乏 (apoE-/-) マウスに IP 注射した。[3H] ステロールの評定のために 24 時間で便を採取した。パネル A 及び B-PBS ビヒクル治療群と比較した T6991-2 注射に反応しての [3H] ステロールの排出。結果を、便 1 グラム当たりの dpm として (パネル A)、または注射した [3H] コレステロールの % として (B) 表した。パネル C-CS 6 2 5 3 に反応しての [3H] ステロールの排出。平均してペプチドは、マクロファージ特異的コレステロール逆輸送を増大させた。値は、平均値 $\pm$ SD、 n =群当たり 4 マウスである。

【0261】

実施例 27

この実施例は、CS 6 2 5 3 が apoE-/- マウスにおいて相当なアテローム性動脈硬化症を減少させたことを示す。(図 38)。生後 8 週の雄の apoE-/- マウスに高脂肪の西洋食を 14 週間与えた。次いで、マウスを、6 週間 48 時間間隔でビヒクルのみ (左の棒) の IP 注射を受ける対照群、または無脂質ペプチド (30 mg/kg) の IP 注射を受ける群のいずれかに任意抽出した。ATI-5261 ペプチドを含有するロイシンの 2 つのシトルリン形態を評価した。T5460-1 (中央の棒) は単一の R3→シトルリン置換を保有する T5237-1 と同等であり、T5460-2 (右の棒) は R3、

14→シトルリンを保有するCS6253（すなわち、T5237-4）と同等であった（図18を参照されたい）。Oil-Red O染色によって決定した、脂肪性病変で覆われた全大動脈の範囲を示す。値は、平均値±SD、n=群当たり10マウスである。

【0262】

実施例28

この実施例は、CS6253の低用量投与がapoE-/-マウスにおいて相当なアテローム性動脈硬化症を減少させたことを示す（図39）。生後8週の雄のapoE-/-マウスに高脂肪の西洋食を14週間与えた。次いで、マウスを、10週間48時間間隔でビヒクルのみ（左の棒）のIP注射を受ける対照群、または無脂質CS6253（10mg/kg、右の棒）のいずれかに任意抽出した。Oil-Red O染色によって決定した、脂肪性病変で覆われた全大動脈の範囲を示す。値は、平均値±SD、n=群当たり10マウスである。

【0263】

実施例29

この実施例は、皮下（SC）投与したCS6253も、apoE-/-マウスにおいて相当なアテローム性動脈硬化症を減少させたことを示す。（図40）。生後8週の雄のapoE-/-マウスに高脂肪の西洋食を14週間与えた。1つの群は、基準値対照として治療開始前に終了した。次いで、マウスを、ビヒクルのみ、30mg/kgのCS6253、または60mg/kgのCS6253皮下（SC）注射を6週間隔日で受ける3部門のうち1つに任意抽出した。最初の4治療週の間は、マウスは高脂肪の西洋食を続け、最後の2週の間は、固形飼料食に切り替えた。Oil-Red O染色によって決定した、脂肪性病変で覆われた全大動脈の範囲を示す。値は、平均値±SD、n=群当たり10マウスである。

【0264】

実施例30

この実施例は、ステープルペプチドがABCA1依存性コレステロール流出を媒介するように設計し得ることを示す。

【0265】

3位及び23位に非荷電アラニン（A）を持つATI-5261、すなわちペプチドCS6257、ならびに3位及び23位にグルタミン（Q）を持つATI-5261のロイシン形態、ペプチドCS6259を設計した。両方が、配列中に示されるように、化学的ステープルを保有した（図41）。cAMPで処理した（右の棒）及び処理していない（左の棒）[3H]コレステロール標識化J774マクロファージからのコレステロール流出を刺激するペプチドの能力を評価した。ペプチドを、10µg/mlの濃度の無脂質形態で使用した。値は、平均値±SD、n=3ウェルである。両ペプチド（すなわちCS6257及びCS6259）へのコレステロール流出は、全体的なより大きい流出反応を刺激したATI-5261と同程度に、極めてABCA1に依存的であった。

【0266】

ATI-5261設計に基づくステープルペプチドは、濃度に依存する形でABCA1依存性コレステロール流出を媒介した（図42）。ATI-5261ペプチドを、3位及び23位に非荷電アラニン（A）を用いて構築し（上のペプチドCS6257）、3位及び23位にグルタミン（Q）を用いて構築した（ペプチドCS6256A）。また両方が、配列中に示されるように、化学的ステープルを保有した。パネルAは、コレステロール流出を刺激するペプチドの能力が、[3H]コレステロールで標識し、ABCA1発現を調節するためにcAMPで処理したJ774マクロファージ（右の棒）及び処理していないJ774マクロファージ（左の棒）を使用して決定されたことを示す。ペプチドを、10µg/mlの濃度の無脂質形態で使用した。値は、平均値±SD、n=3ウェルである。両ペプチド（すなわちCS6257A及びCS6256A）へのコレステロール流出は、より大きい流出反応を刺激したATI-5261と同程度に、極めてABCA1に依存的であった。パネルBは、ペプチドが官能性であり、濃度に依存する形でABCA1コレ

ステロール流出を刺激したことを示すグラフである。

【0267】

実施例 31

この実施例は、例解的な本発明のペプチドの血中グルコース低下特性を例解する。

【0268】

T6991-2の血中グルコース低下特性をマウス中で評価した。ペプチドT6991-2は、ATI-5261のイソロイシン形態中でR3、14→シトルリン(C*)を持つ配列EVC*SKLEEWI A A I C*E I A E E I L A R L K Sを有する。固形飼料食を与えたC57B1/6マウス(n=3)にペプチド300mg/kgのIP注射を投与した6時間後のコレステロール及びグルコースを示す(図43)。T6991-2は、n=群当たり3であるPBS注射を受けている動物と比較して、有意に低い総コレステロール(TC)値、コレステロールエステル(CE)値、及びグルコース(G)値を示した。グラフはまた、高用量(300mg/kg)で見られるATI-5261毒性反応の特徴であるトリグリセリド(TG)上昇効果も示し、これを陽性対照として使用した。

【0269】

T6991-2はまた、DIOマウスにおけるグルコースチャレンジの際に血中グルコース濃度も低下させた(図44)。雄のC57B1/6マウスに60%の高脂肪食を6週間与え(DIOモデル)、その後6週間隔日で、ビヒクルのみ、または10もしくは30mg/kgの無脂質T6991-2のいずれかを腹腔内(IP)注射した。治療の後、グルコース1g/kgのIP注射によるグルコース負荷試験を行った。指定された時間で尾静脈を介して血液を採取し、グルコメータを使用して血中グルコースを測定した。パネルA及びB-それぞれ、曲線プロット下の対応する領域と共にt=0で対照値のパーセントとして表した血中グルコース濃度。パネルC及びD-それぞれ、曲線下の対応する領域と共にグルコースチャレンジ後の経時的な絶対値として表した血中グルコース濃度。値は、平均値±SD、n=群当たり4マウスである。(パネルB及びD:左の棒がPBS、中央の棒が10mg/kgのT6991-2、右の棒がT6991-2、30mg/kg)データは、低用量のT6991-2がグルコースチャレンジの際に血中グルコース反応を弱力化させたこと、及び効果が用量依存性であったことを示した。

【0270】

T6991-2はまた、DIOマウスにおいてインスリンへの感受性も向上させた(図45)。雄のC57B1/6マウスに60%の高脂肪食を6週間与え(DIOモデル)、その後、図44に記載のように、6週間隔日で、ビヒクルのみ、または10もしくは30mg/kgの無脂質T6991-2のいずれかを腹腔内(IP)注射した。治療の後、0.75単位/kgのIP注射によるインスリン負荷試験(ITT)を行った。指定された時間で尾静脈を介して血液を採取し、グルコメータを使用して血中グルコースを測定した。パネルA及びB-それぞれ、曲線プロット下の対応する領域と共に対照値のパーセントとして表した血中グルコース濃度。パネルC及びD-それぞれ、曲線下の対応する領域と共にグルコースチャレンジ後の経時的な絶対値として表した血中グルコース濃度。値は、平均値±SD、n=群当たり4マウスである。(図の右側-パネルB及びD:左の棒がPBS、中央の棒が10mg/kgのT6991-2、右の棒がT6991-2、30mg/kg)データは、低用量のT6991-2がインスリンへの感受性を向上させたこと、及び効果が用量依存性であったことを示した。

【0271】

加えて、T6991-2は、肥満のob/ob遺伝子マウスモデルにおけるグルコースチャレンジの際に血中グルコース濃度を低下させた(図46)。雄のob/obマウスに固形飼料食を6週間与え(DIOモデル)、その後6週間隔日で、ビヒクルのみ(棒グラフの左の棒)、または10mg/kgの無脂質T6991-2(棒グラフの右の棒)のいずれかを腹腔内(IP)注射した。治療の後、グルコース1g/kgのIP注射によるグルコース負荷試験を行った。指定された時間で尾静脈を介して血液を採取し、グルコメータを使用して血中グルコースを測定した。パネルA及びB-それぞれ、曲線プロット下の

対応する領域と共に $t = 0$ で対照値のパーセントとして表した血中グルコース濃度。パネル C 及び D - 6 時間の絶食及び 2 回の事後ペプチド注射後の C - ペプチド及びインスリン濃度は、治療したマウスにおいてより低く、これは、パネル A 及び B で示した向上したグルコースチャレンジ反応がインスリン媒介性ではないことを示す。値は、平均値 $\pm$ SD、 $n =$ 群当たり 4 マウスである。データは、低用量 T 6 9 9 1 - 2 が o b / o b マウスにおけるグルコースチャレンジの際に血中グルコース反応を弱力化させたことを示した。

【0272】

実施例 3 2

この実施例は、C i t A T I - 5 2 6 1 のロイシン形態が、種々のアミノ酸置換を支持して、安全かつ効果的なペプチドを創出することを例解する (図 4 7)。A T I - 5 2 6 1 の類似体を、1 0 位、1 3 位、1 6 位、2 0 位にイソロイシン (I)、ならびに / または 3 位及び 1 4 位にシトルリン、同様に C 末端 K S 残基を欠くより短い 2 4 - m e r を用いて、創出した (配列 - 図 4 7 の上部、すなわちペプチドの T 7 9 8 3 シリーズ)。パネル A - 安全性及び T G 上昇効果を、図 5 に記載のように、固形飼料を与えた雄の C 5 7 B 1 / 6 マウスにペプチド (3 0 0 m g / k g) を注射 (I P) することによって評価した。値は、平均値 SD、 $n = 4$ である。特定の位置において種々の組み合わせでシトルリン、ロイシン、及びイソロイシンを有する全ペプチドは、安全であり、T G 上昇効果をほとんどまたは全く示さなかった。

【0273】

実施例 3 3

この実施例は、ロイシン置換またはイソロイシン置換のいずれかを持つ C i t A T I - 5 2 6 1 の脂肪族形態が、コレステロール流出活性を保持し、マウスにおいて血中グルコースを減少させることを例解する (図 4 8)。試験したペプチドは図 4 7 から、すなわち、T 7 9 8 3 シリーズであった。パネル A - [3 H] コレステロールで標識し、A B C A 1 発現を調節するために c A M P で処理した J 7 7 4 マクロファージ (右の棒) 及び処理していない J 7 7 4 マクロファージ (左の棒) を使用して、ペプチドのコレステロール流出活性を決定した。ロイシン、イソロイシン、及び / またはシトルリン置換を持つペプチド類似体は官能性であり、1 0 μ g / m l の濃度で、A B C A に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネル B - T 7 9 8 3 ペプチド 3 0 0 m g / k g の単回 I P 注射後の、図 4 7 で使用した C 5 7 B 1 / 6 マウス (固形飼料を与えた) の血中のグルコース濃度。ほぼ全ての試験したペプチドが、単回注射後の血中グルコースレベルを減少させた。

【0274】

実施例 3 4

この実施例は、漸増する数のイソロイシン残基を持つ C S 6 2 5 3 の類似体が安全かつ効果的であることを例解する (図 4 9)。漸増する数のイソロイシン残基を、疎水性のペプチドの長さを下った異なる場所での L $\rightarrow$ I 置換によって C S 6 2 5 3 中に体系的に導入した (配列 - 図 4 9 の上部、すなわちペプチドの T 8 2 1 2 シリーズ)。パネル A - 安全性及び T G 上昇効果を、図 5 に記載のように、固形飼料を与えた雄の C 5 7 B 1 / 6 マウスにペプチド (3 0 0 m g / k g) を注射 (I P) することによって評価した。値は、平均値 SD、 $n = 4$ である。特定の位置において種々の組み合わせのロイシン及びイソロイシンを有する全ペプチドは、安全であり、T G 上昇効果をほとんどまたは全く示さなかった。

【0275】

実施例 3 5

この実施例は、漸増するイソロイシン置換を持つ C S 6 2 5 3 の脂肪族形態が、コレステロール流出活性を保持し、マウスにおいて血中グルコースを減少させることを例解する (図 5 0)。試験したペプチドは図 4 9 から、すなわち、T 8 2 1 2 シリーズであった。パネル A - C [3 H] コレステロールで標識し、A B C A 1 発現を調節するために c A M P で処理した J 7 7 4 マクロファージ (右の棒) 及び処理していない J 7 7 4 マクロファ

ージ（左の棒）を使用して、ペプチドのコレステロール流出活性を決定した。漸増するイソロイシン置換を持つペプチド類似体は官能性であり、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、ABCAに依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネルB-Rつまたは2ついずれかのL→I置換を持つ代表的なCS6253ペプチドは、濃度に依存する形かつ高力価で、ABCA1コレステロール流出を刺激する。cAMPで処理したJ774マクロファージを使用して結果を得た。パネルC-T8212ペプチド300mg/kgの単回（IP）注射後の、図49で使用したC57B1/6マウス（固形飼料を与えた）の血中のグルコース濃度（左の棒が4時間、右の棒が6時間）。ほぼ全ての試験したペプチドが、単回注射後、PBSと比較して血中グルコースレベルを減少させた。

【0276】

10

実施例36

この実施例は、CS6253及びT6991-2が、C57B1/6マウスにおけるグルコースチャレンジの際に血中グルコース濃度を低下させる（図51）。固形飼料食の雄の絶食C57B1/6マウスは、図5で安全性研究について記載したように、ビヒクルのみまたは300mg/kgの無脂質ペプチドのいずれかの単回腹腔内（IP）注射を受けた。治療の後、グルコース2g/kgのIP注射によるグルコース負荷試験を行った。指定された時間で尾静脈から血液を採取し、グルコメータを使用して血中グルコースを測定した。パネルA及びB-それぞれ、曲線下の対応する領域と共にグルコースチャレンジ後の経時的な質量値として表した血中グルコース濃度。（棒グラフ、パネルB、棒は左から右にそれぞれ、PBS、CS6253、T699102、2、4、5、6、及び9）値は、平均値±SD、n=群当たり4マウスである。10位、13位、16位、及び20位に全ロイシン（CS6253）または全イソロイシン（T6991-2）のいずれかを持つATI-5261の2つのシトルリン形態は、グルコースチャレンジの際に血中グルコース濃度を低下させた。対照的に、種々の組み合わせのロイシン及びイソロイシン残基を持つペプチド2、4、5、6、及び9（図49中の配列T8212-2、T8212-4、T8212-5、T8212-6、及びT8212-9に対応する）は、血中グルコース反応の低下における活性が低かった。総じてこれらのデータは、HDL模倣ペプチドの長さを下った重要な位置にロイシンまたはイソロイシンのいずれかを均質に使用することが、極めて有効な抗糖尿病性化合物の創出における因子であることを示す。

20

【0277】

30

実施例37

この実施例は、ラットにおけるCS6253及びT6991-2の血漿クリアランスを例解する（図52）。図36に記載のように、S26→Y置換を用いて両ペプチドを設計して、 ^{125}I による標識化を促進した。放射性標識したペプチドを、固形飼料を与えた雄のウィスターラットにIP注射し、その出現及び後続の血漿からのクリアランスを定量化した。パネルA-両ペプチドについておよそ7.5時間の血漿半減期を示す、 ^{125}I -CS6253または ^{125}I -T6991-2ペプチドの注射後の血漿動態。パネルB-注射後6及び24時間の ^{125}I ペプチドの組織分布（CS6253=左の棒、T6991-2=右の棒）。少量の両ペプチドが脳中出现し、それが経時的に増加したことに留意されたい。パネルC-[3H]コレステロールで標識したJ774マクロファージを使用して決定したT6991-2及びそのY26類似体（T7983-11）のコレステロール流出活性（ABCA依存性流出を右の棒に示す）。ペプチドは官能性であり、濃度（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で、ABCA1に依存する形で、高レベルのコレステロール流出を媒介した。パネルD-T6991-2及びそのY26類似体（T7983-11）が高い効率でコレステロール流出を刺激し、 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ でコレステロール流出の低Km及び飽和を示したことを実証する用量反応。

40

【0278】

実施例38

この実施例は、本発明のペプチドがマウスにおいて脳のABCトランスポーターを増加させることを例解する。ペプチドT6991-2の全身投与がマウスにおいて脳のABC

50

トランスポーターを増加させたことを示す例解的なデータを、図53に提供する。T6991-2: EVC*SKLEEWIAAIC*EIAEEILARLKS、(C*)、ATI-5261のイソロイシン形態を、1日1回5週間、30mg/kg/48時間で、ApoE3マウスにIP投与した。終了時に、海馬を、ELISAによって、ABCA1、ABCG1、及びapoEについて評定した。T6991-2(右の棒)は、PBS(左の棒)と比較して、その濃度($p < 0.05$)を有意に増大させた。

【0279】

実施例39

この実施例は、本発明のペプチドが、ヒトapoE3及びE4代置マウスモデルを使用して、脳のapoEレベル及び脂質化を増大させることを例解する。CS6253またはT6991-2のいずれかの全身投与が脳のapoEレベル及び脂質化を増大させたことを示す例解的なデータを、図54に提供する。T5237-4(すなわちCS6253): EVC*SKLEEWLAALC*ELAEELLARLKS(C*=シトルリン)、ATI-5261のロイシン形態、及びT6991-2: EVC*SKLEEWIAAIC*EIAEEILARLKS、(C*)、ATI-5261のイソロイシン形態を、5週間、30mg/kg/48時間のIPで、ヒトapoE3(huApoE3)及びE4(huApoE4)代置マウスに投与し、PBSと比較した(n=群当たりのマウス)。すなわち「AD研究」である。終了時に、海馬をapoEタンパク質レベル(SDSゲル)及び脂質化(天然ゲル)について評定した。パネルA-ペプチド治療による、及びそれらの各マウスモデルにおけるapoEタンパク質の相対レベル、すなわちE3対E4タンパク質を示す代表的なプロット。パネルB及びC-それぞれ、E3マウス(無色の棒)対E4マウス(塗りつぶした棒)における脂質化apoEタンパク質(天然)及び総apoEタンパク質のレベル(SDS-PAGE)。脂質化apoEは、対応するレベルのhuApoE4よりも、huApoE3マウスにおいて著明に高かった。ペプチド、特にCS6253は、T6991-2で治療したマウスの対応する試料に対して脂質化apoE4の量を増大させた。T6991-2は、huApoE3マウスにおいてapoEレベルを増大させた。

【0280】

実施例40

この実施例は、本発明のペプチドの全身投与が、マウスの脳中でP-tau及びアミロイドβ42を減少させたことを例解するデータ(図55)を提供する。実施例39及び図54に記載したAD研究の終了時に、海馬のCA3領域をP-Tau(AT-8 a. b.)及びアミロイドβ42について評定した。huApoE4マウス中では、CS6253は、PBSと比較して、P-Tau($p < 0.001$)及びアミロイドβ42($p = 0.04$)を著明に減少させた。ペプチドT6991-2も、huApoE3及びhuApoE4マウス両方において、P-Tau及びアミロイドβ42を減少させた。

【0281】

実施例41

この実施例は、本発明のペプチドの全身投与が、E4表現型を逆転させたことを例解するデータを提供する。CS6253またはT6991-2の全身投与が、抑圧されたVGLUT1及びapoE受容体2に関する病理的apoE4表現型を逆転させたことを示す例解的なデータを、図56に提供する。実施例39の図54に記載したAD研究の終了時に、海馬のCA3領域をVGLUT1(グルタミン酸作動性ニューロン)及びapoE受容体2について評定した。両ペプチドは、PBSと比較して、huApoE4マウスのVGLUT1及びapoER2のレベルにおける欠乏を逆転させた。

【0282】

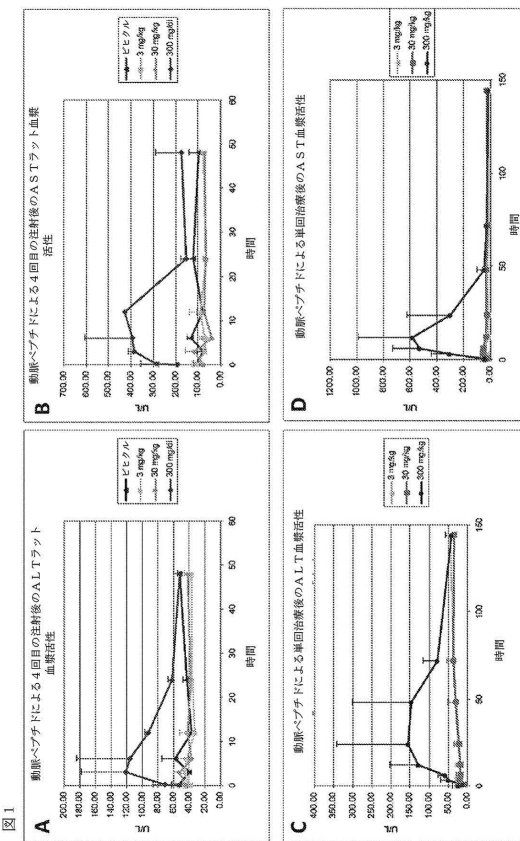
上で提供した例示的なデータは、本発明のポリペプチドが、細胞傷害性をほとんどまたは全く呈さず、それらのインビボにおける有効性を実証し、グルコース低下効果を有し、マウスにおいてアルツハイマー病の表現型指標を逆転させたことを実証した。抗糖尿病、抗アテローム性動脈硬化症、及び脳中の効果が、薬理的用量、例えば、 $\leq 30 \text{ mg/kg}$

で見出された。

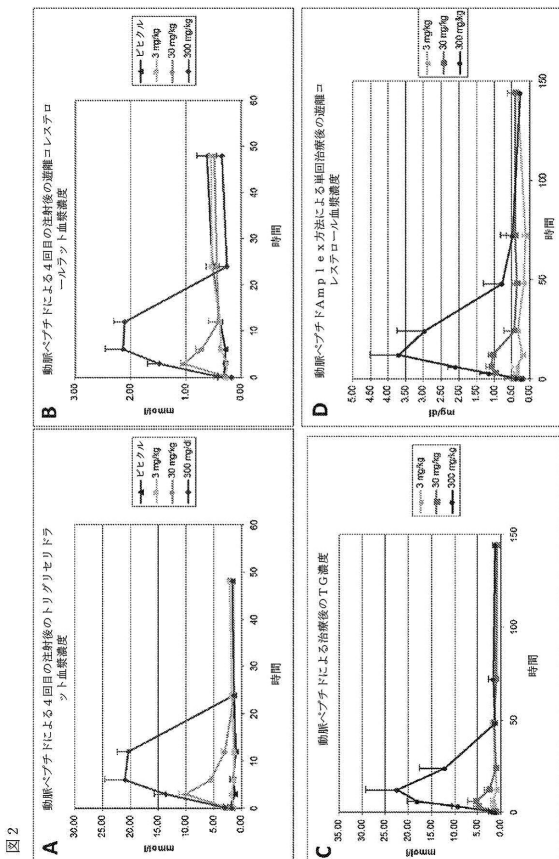
【0283】

上の説明が例解的であり、限定的ではないことが意図されていると理解されるべきである。上の説明を一読すると、多くの実施形態が当業者に明らかとなるであろう。本発明の範囲は、したがって、上の説明を参照して決定されるのではなく、代わりに、添付の特許請求の範囲、及びこのような特許請求の範囲が権利を有する均等物の全範囲を参照して決定されるべきである。特許出願書、公開文書、及び受託番号を含む全ての論文及び参考文献の開示は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【図1】



【図2】



【図 3】

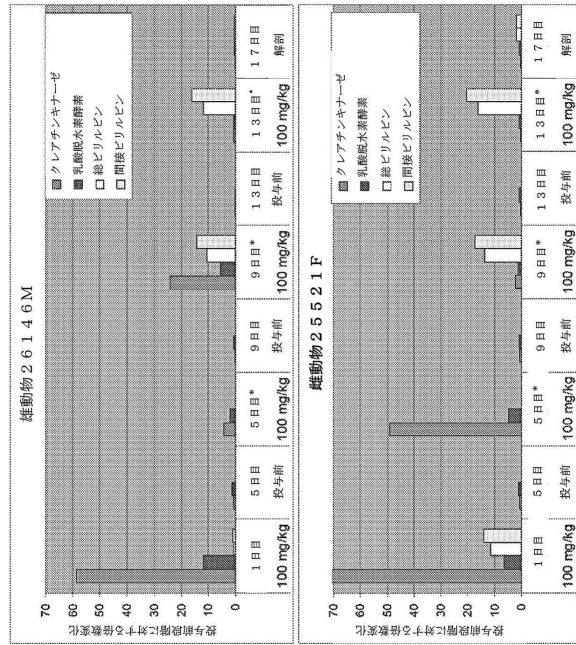


図 3

【図 4】

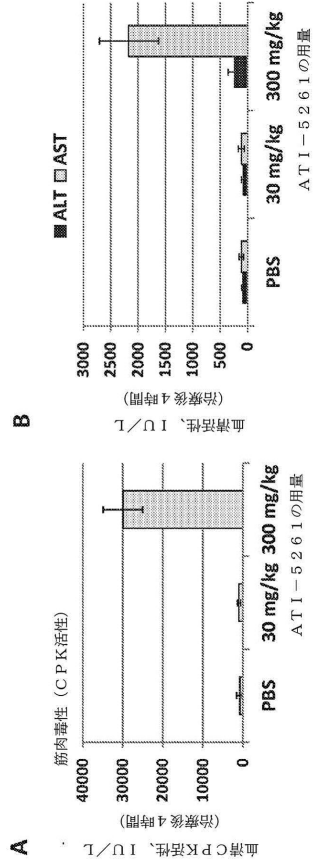


図 4

【図 5】

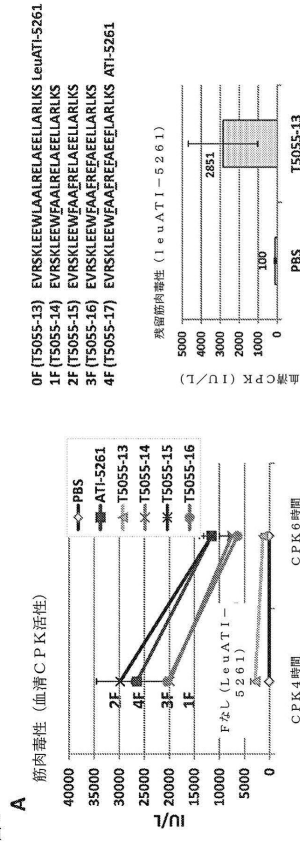


図 5

【図 6】

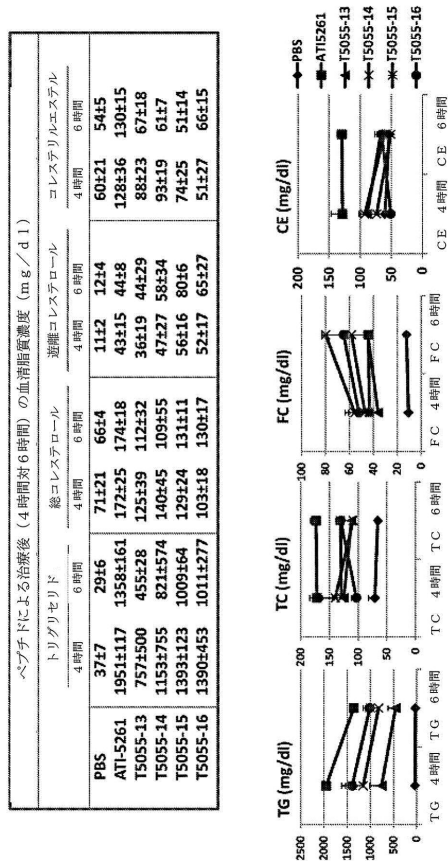
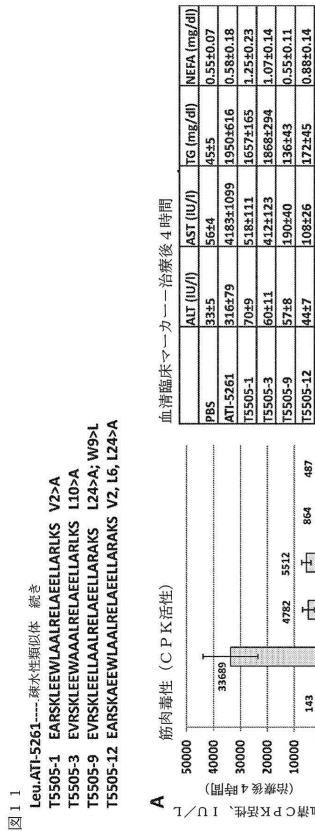
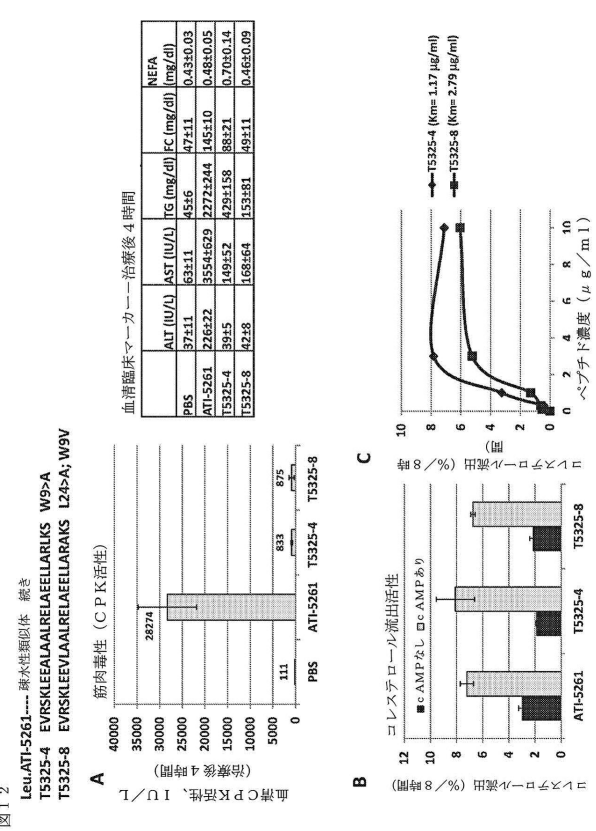


図 6

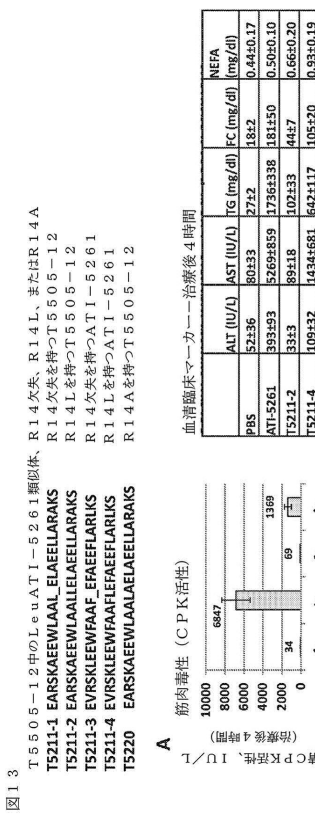
【図 1 1】



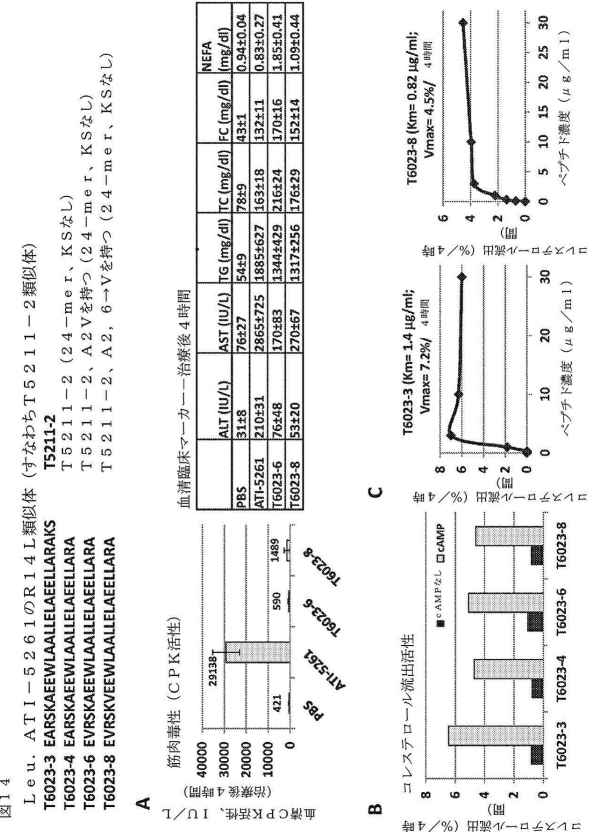
【図 1 2】



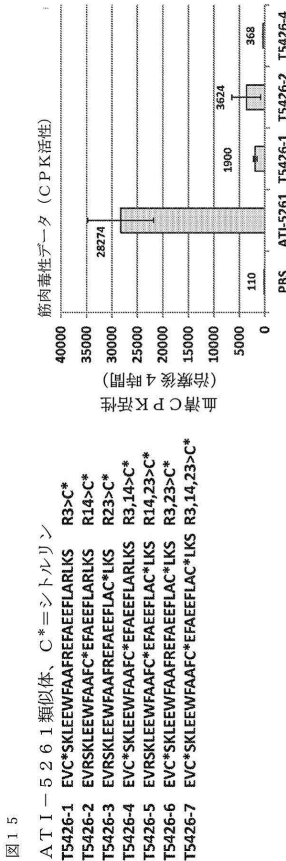
【図 1 3】



【図 1 4】



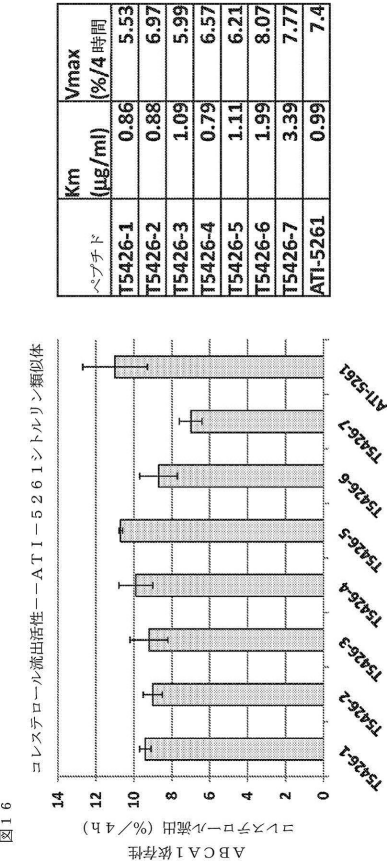
【図 15】



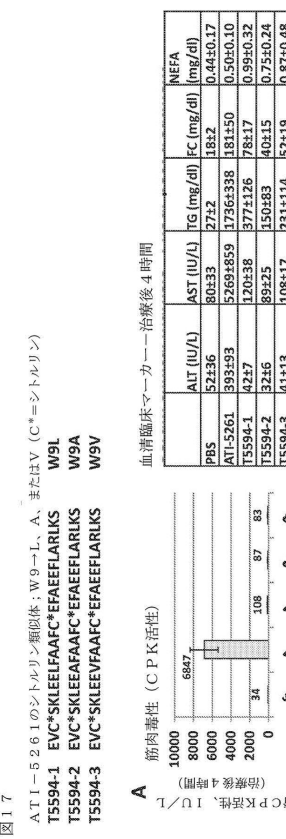
血清臨床マーカー—治療後 4 時間

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TG (mg/dl)	FC (mg/dl)	NEFA (mg/dl)
PBS	37±11	63±11	45±6	47±11	0.43±0.03
ATI-5261	226±22	3554±629	2272±244	145±10	0.48±0.05
T5426-1	49±5	241±41	1620±150	143±10	0.62±0.14
T5426-2	55±11	453±173	1434±190	138±15	0.58±0.03
T5426-4	44±12	119±18	1054±248	136±12	0.60±0.11

【図 16】



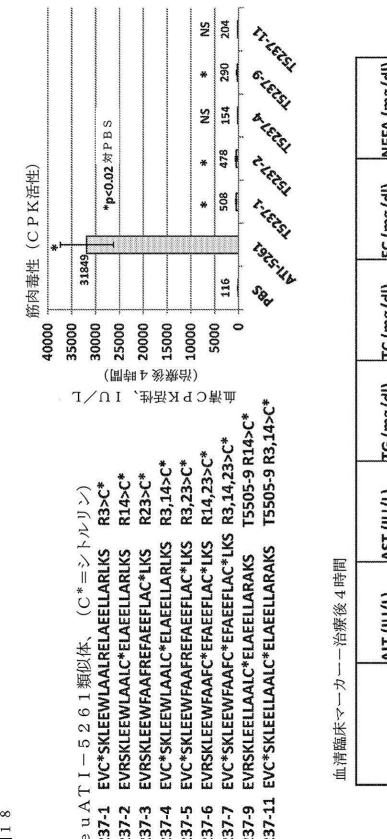
【図 17】



血清臨床マーカー—治療後 4 時間

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TG (mg/dl)	FC (mg/dl)	NEFA (mg/dl)
PBS	52±36	80±33	27±2	18±2	0.44±0.17
ATI-5261	393±93	5269±859	1736±338	181±50	0.50±0.10
T5594-1	42±7	120±38	377±126	78±17	0.99±0.32
T5594-2	32±6	89±25	150±83	40±15	0.75±0.24
T5594-3	41±13	108±17	231±114	52±19	0.87±0.48

【図 18】



血清臨床マーカー—治療後 4 時間

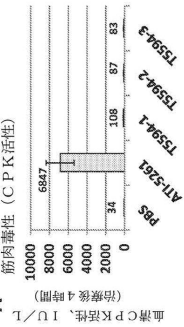
	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TG (mg/dl)	FC (mg/dl)	NEFA (mg/dl)
PBS	58±8	53±9	57±8	81±18	0.51±0.1
ATI-5261	240±54	3640±959	3202±168	212±22	0.80±0.14
T5237-1	38±3	100±20	1539±469	176±20	0.89±0.11
T5237-2	47±11	147±59	447±372	138±68	0.81±0.21
T5237-4	36±4	68±4	321±79	79±15	0.78±0.09
T5237-9	43±7	99±10	51±8	41±15	0.49±0.05
T5237-11	36±5	76±14	40±13	34±22	0.50±0.02

図 17

ATI-5261のシトルリン類似体、W9→L、A、またはV (C*=シトルリン)

T5594-1 EVC*SKLEWFAAFC*EFAEEFLARLKS R3>C* W9L
T5594-2 EVC*SKLEWFAAFC*EFAEEFLARLKS W9A
T5594-3 EVC*SKLEWFAAFC*EFAEEFLARLKS W9V

A



3

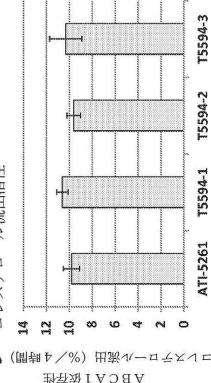
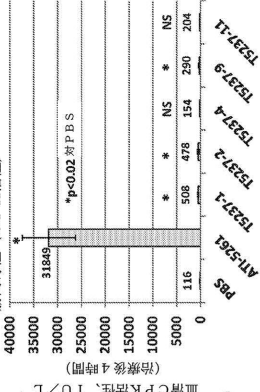


図 18

LeuATI-5261類似体、(C*=シトルリン)

T5237-1 EVC*SKLEWLAALC*ELAEELLARLKS R3>C*
T5237-2 EVRSKLEWLAALC*ELAEELLARLKS R14>C*
T5237-3 EVRSKLEWFAAFREFAEFLAC*LKS R23>C*
T5237-4 EVC*SKLEWLAALC*ELAEELLARLKS R3,14>C*
T5237-5 EVC*SKLEWFAAFREFAEFLAC*LKS R3,23>C*
T5237-6 EVRSKLEWFAAFC*EFAEEFLAC*LKS R14,23>C*
T5237-7 EVC*SKLEWFAAFC*EFAEEFLAC*LKS R3,14,23>C*
T5237-9 EVRSKLEWLAALC*ELAEELLARLKS T5505-9 R14>C*
T5237-11 EVC*SKLEWLAALC*ELAEELLARLKS T5505-9 R3,14>C*

筋肉毒性 (C P K活性)



【図 27】

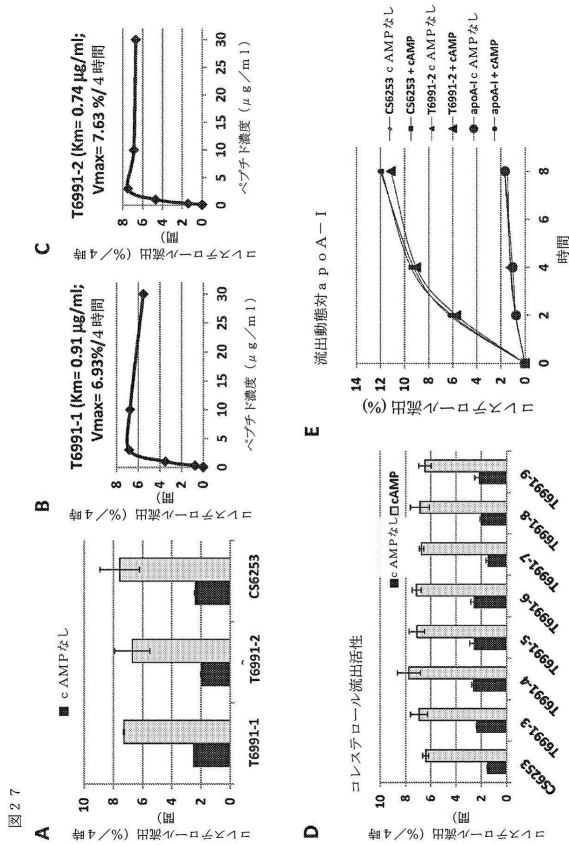


図 27

【図 29】

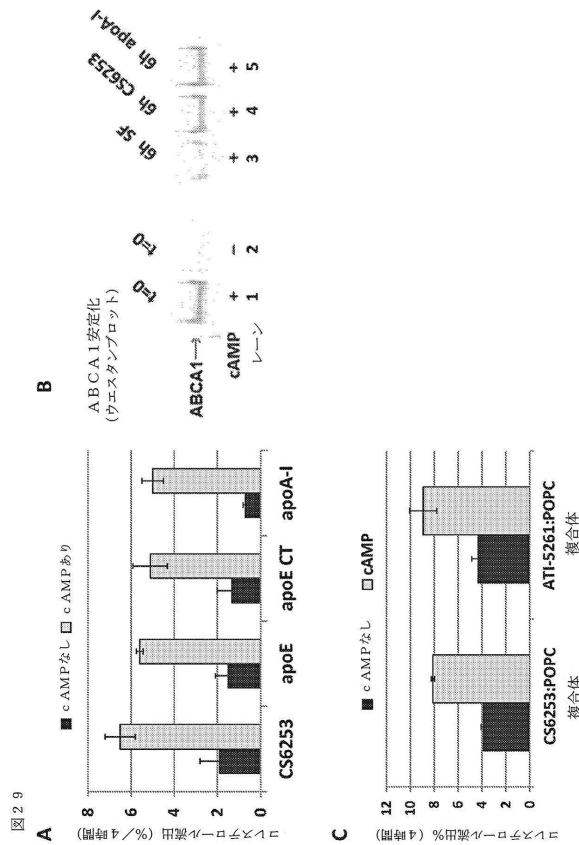


図 29

【図 28】

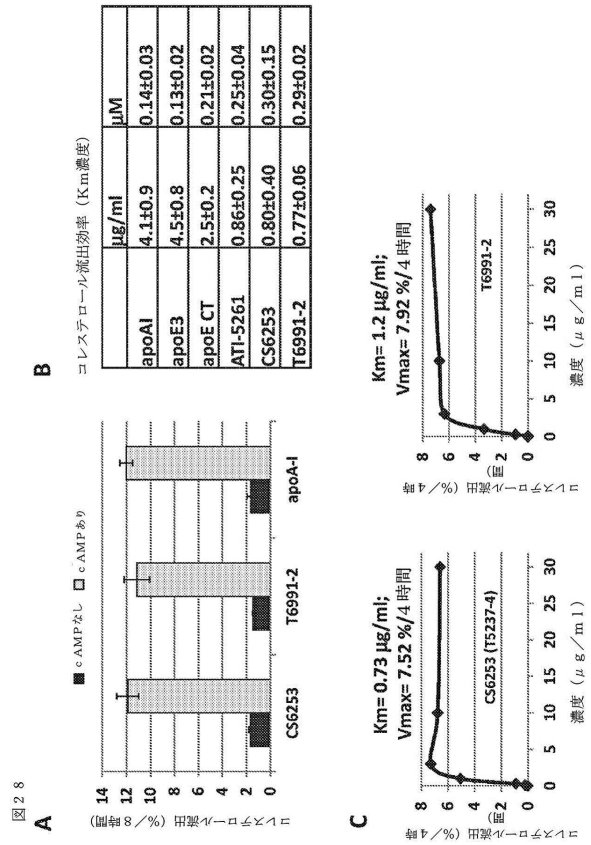


図 28

【図 30】

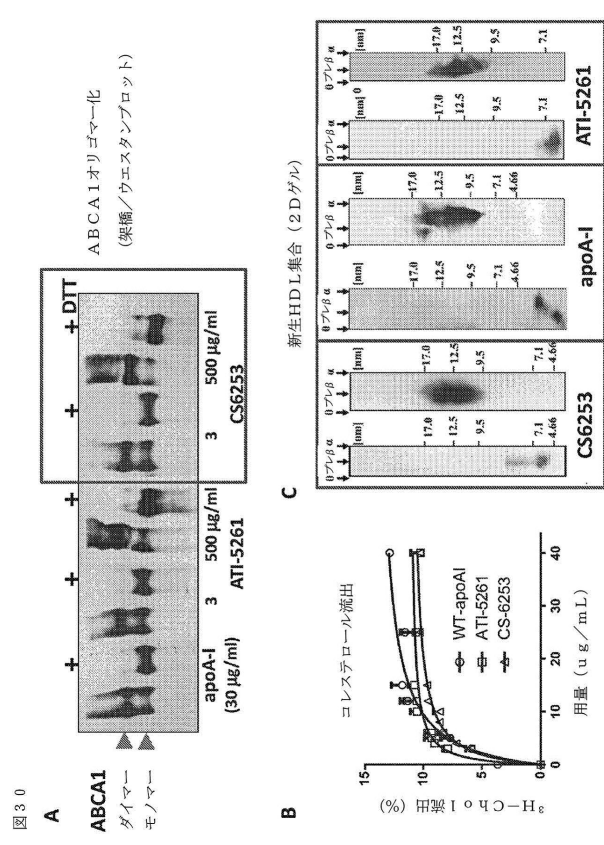
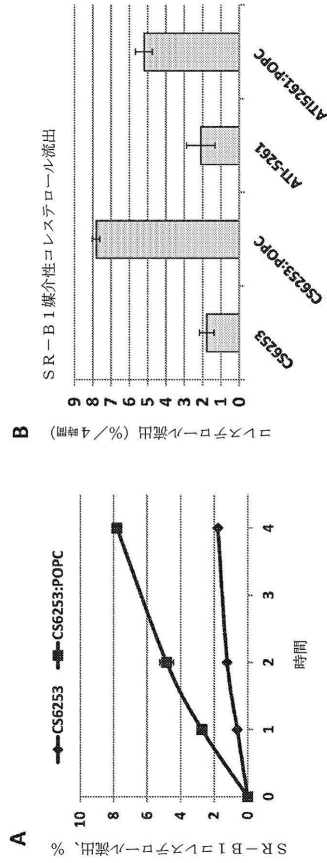
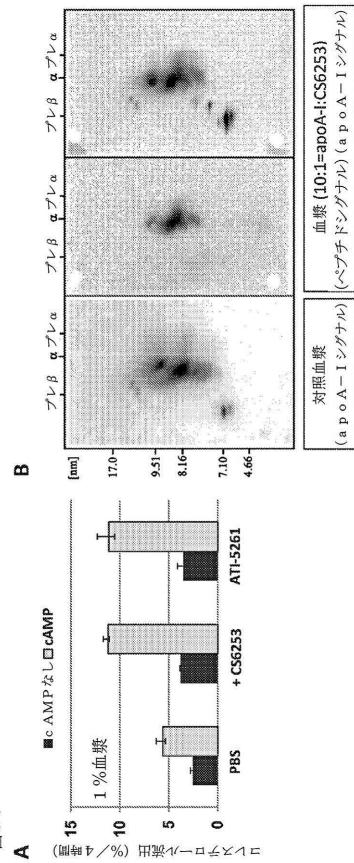


図 30

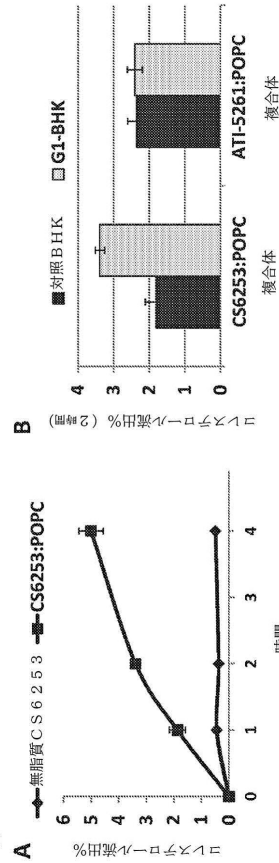
【図 3 1】



【図 3 3】



【図 3 2】



【図 3 4】

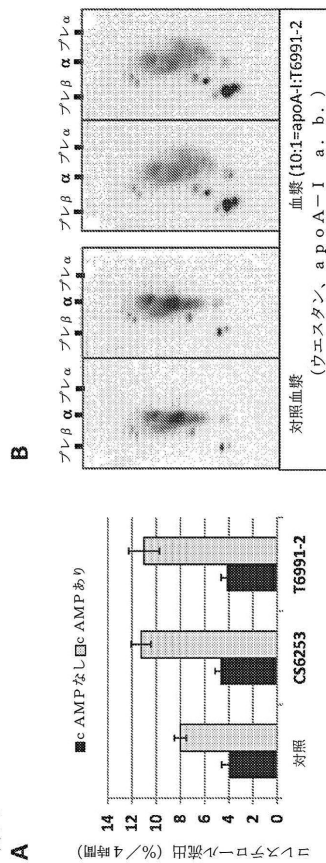
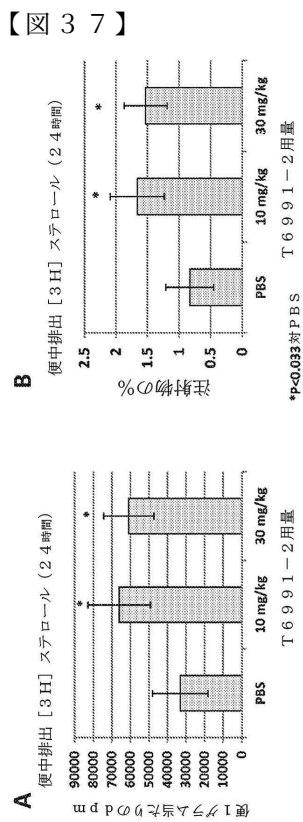
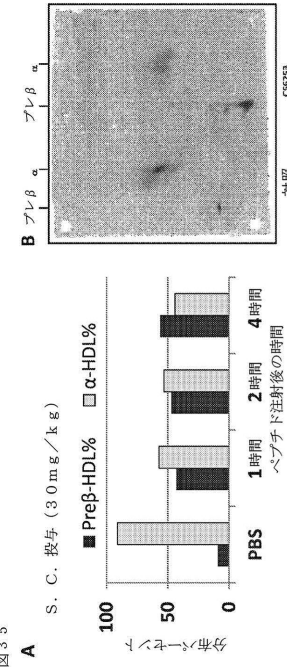


図 3 7



【図 3 7】

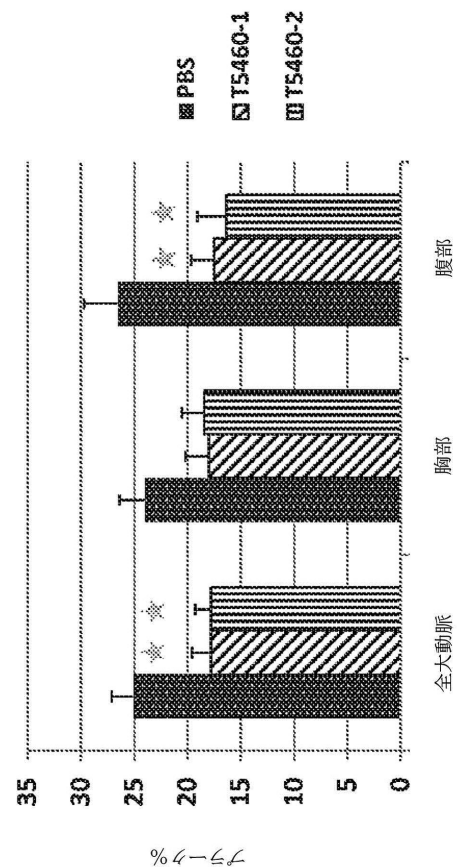
図 3 5



【図 3 5】

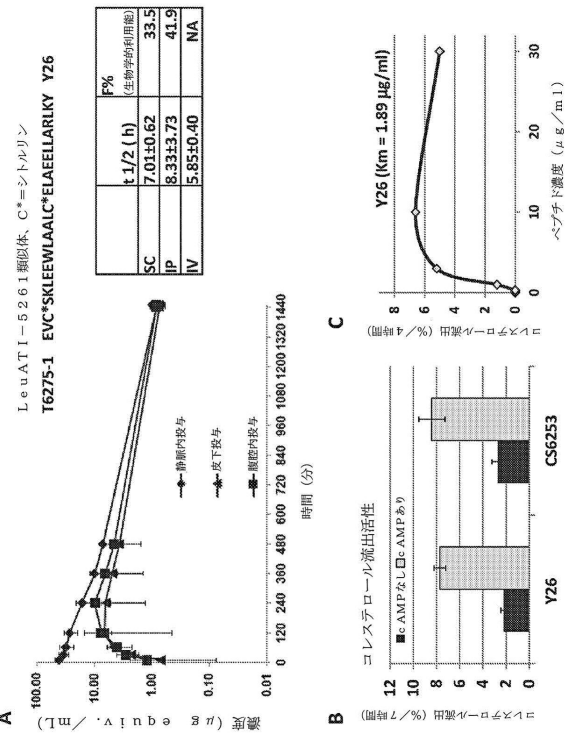
図 3 8

全大動脈アテローム性動脈硬化症、総表面領域の%



【図 3 8】

図 3 6



【図 3 6】

【図 39】

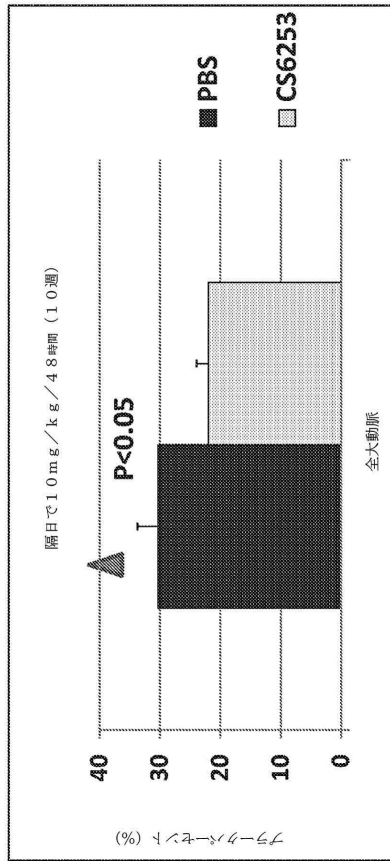


図 39

【図 41】

図 41

ステープルペプチドは、J774細胞からのABC A1媒介性コレステロール流出を媒介するようにを設計することができる

CS6257 (ATI-5261, R3,23→14位及び21位 [S5-R8] にステープルを持つA)

EVASKLEEWFAAF(S5)EFAEEF(R8)AALKS

CS6259 (LeuATI-5261, R3,23→14位及び21位 [S5-R8] にステープルを持つQ)

EVQSKLEEWLAAL(R8)ELAEEL(S5)AALKS

流出% 4時間 (10 µg/ml のペプチド)		SD値	
CS6257	ATI-5261	CS6257	ATI-5261
cAMPなし	0.45	0.67	1.4
cAMPあり	3.06	3.28	7.81
		0.05	0.04
		0.84	0.73
		0.22	0.91

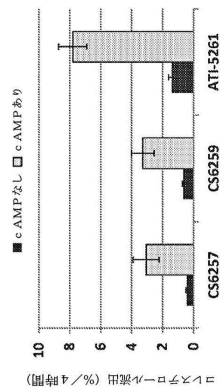


図 42

【図 42】

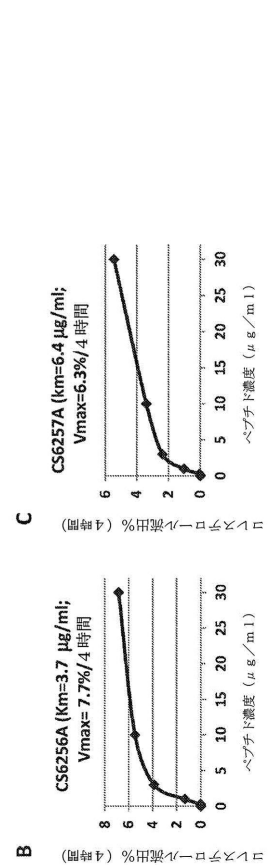
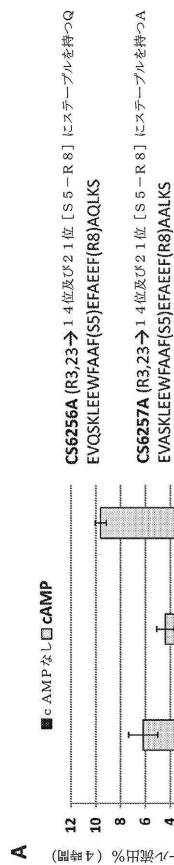
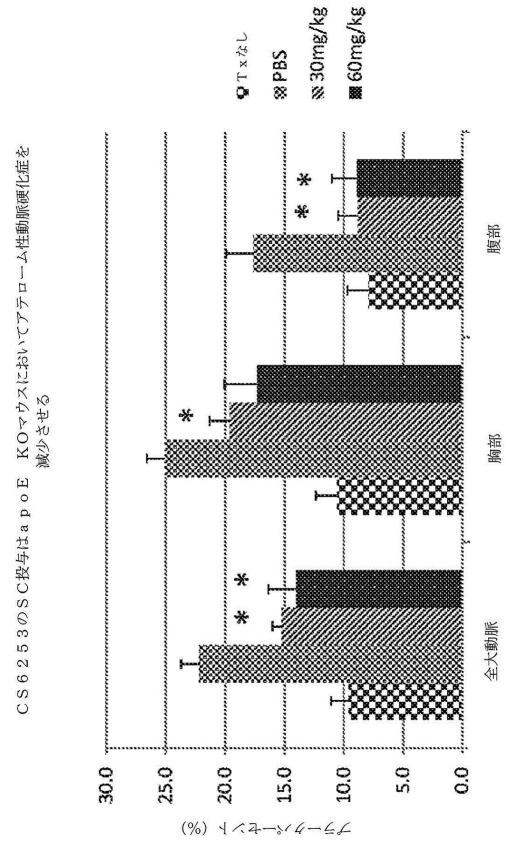


図 40

【図 40】

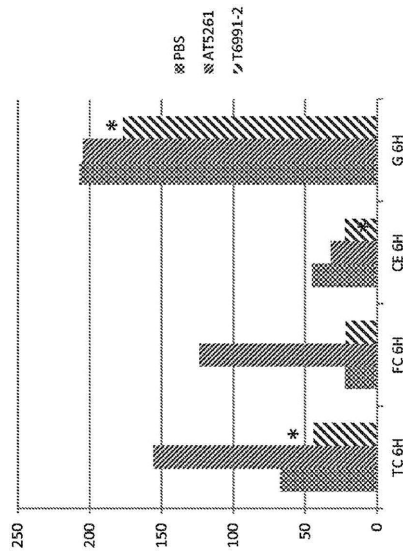


CS6253のSC投与はapoE KOマウスにおいてアテローム性動脈硬化症を減少させる

*活性治療対PBS治療によってp<0.05

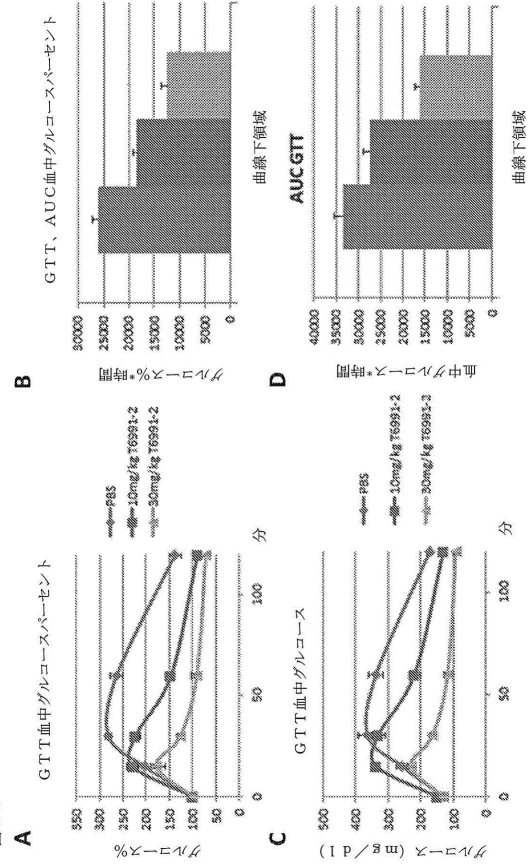
【図 4 3】

ABCA1リガンドペプチドは、コレステロール低下特性及びグルコース低下特性を有するように設計することができる

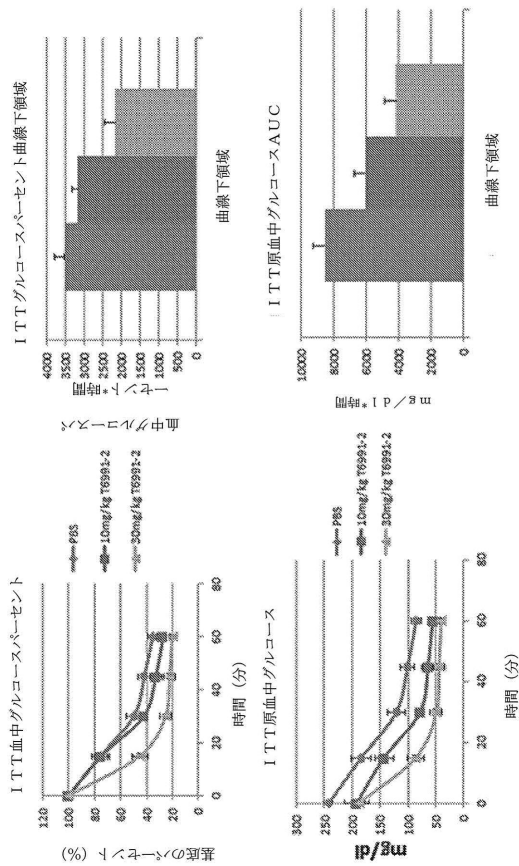


* p < 0.05 T6991-2 対 PBS

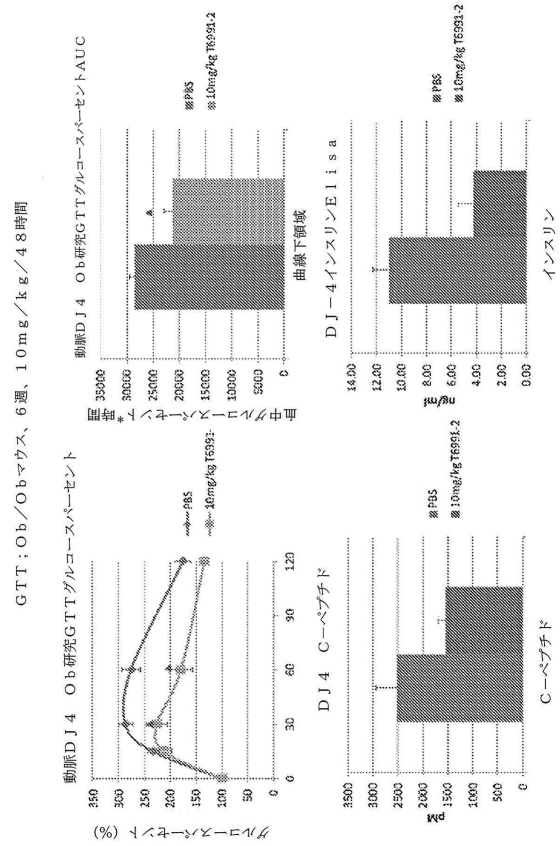
【図 4 4】



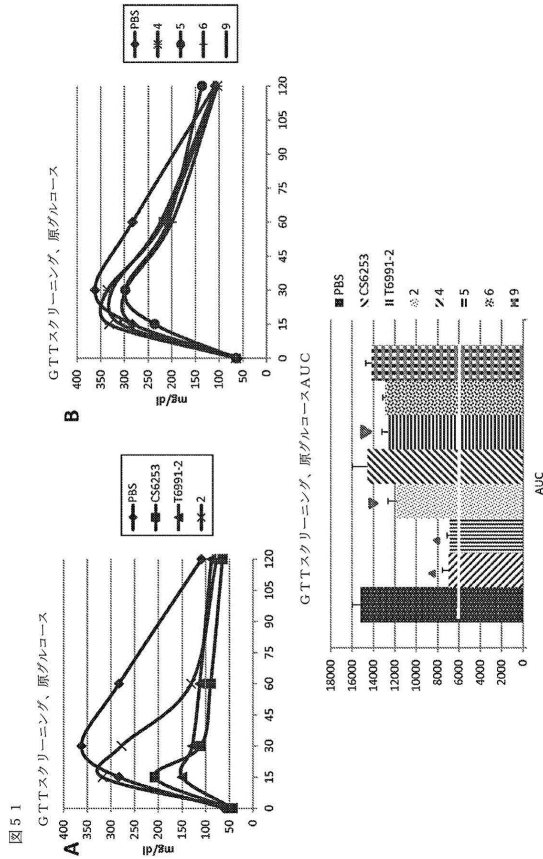
【図 4 5】



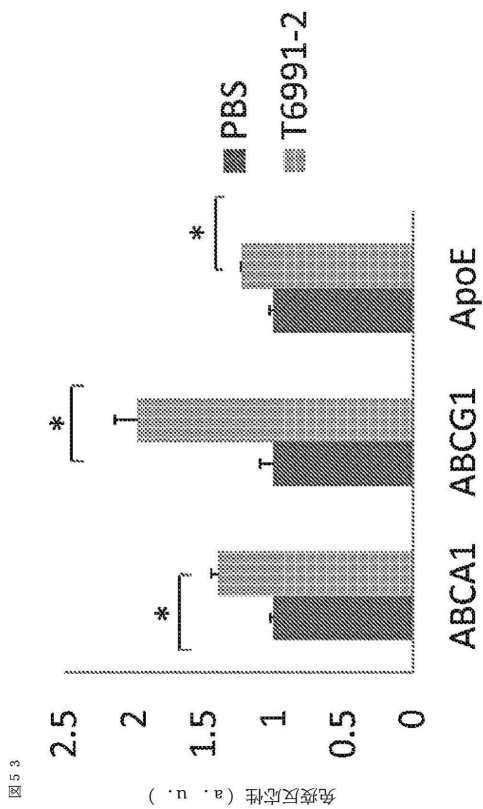
【図 4 6】



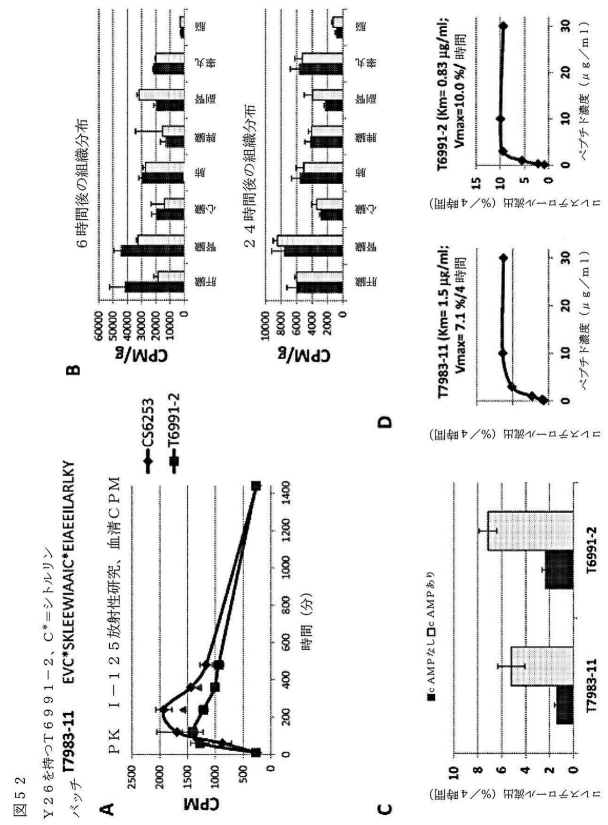
【図 5 1】



【図 5 3】



【図 5 2】



【図 5 4】

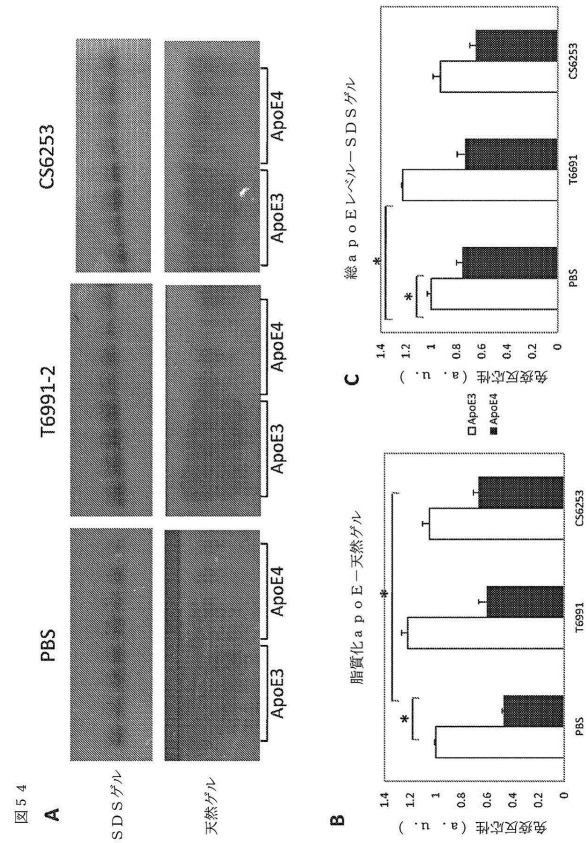


図 5 5

【図 5 5】

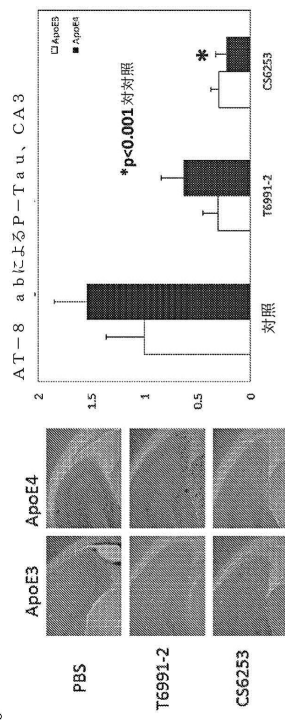
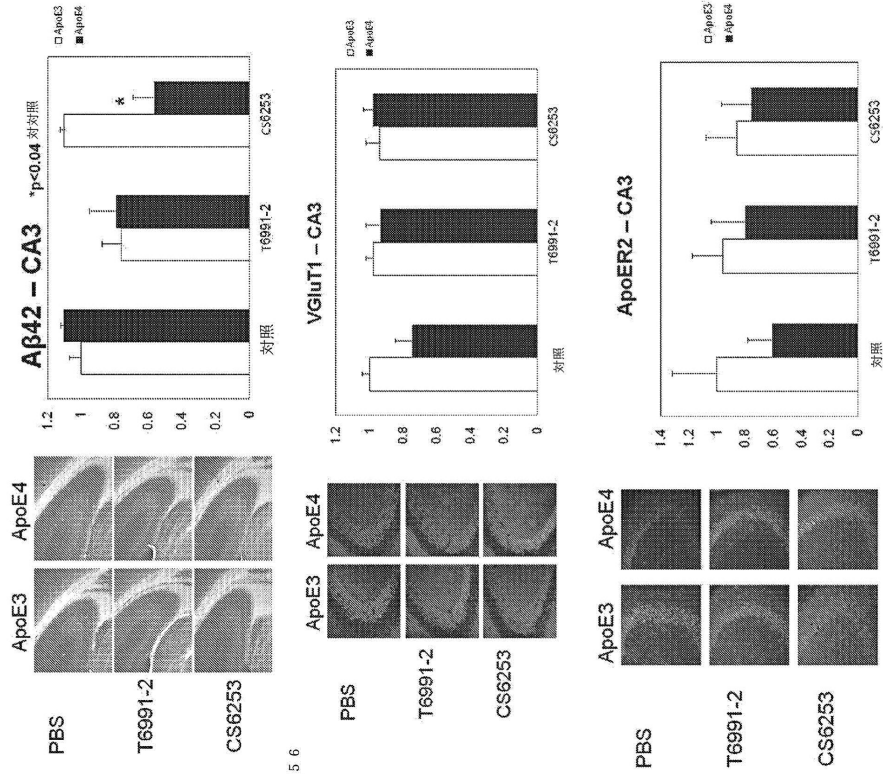


図 5 6

【図 5 6】



【配列表】

0006549554000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 3/10 (2006.01) A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28
C 1 2 N 15/12 (2006.01) C 1 2 N 15/12

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100173107
弁理士 胡田 尚則

(72)発明者 ジョン ケー. ビエリッキー
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 2, サン ラモン, レーカーリッジ プレイス 1 0
0 8

(72)発明者 ジャン ヨハンソン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 3, サン ラモン, デューバースタイン ドライブ
1 0

(72)発明者 ワリード ダンホ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 1 4, デル マー, マンゴ ドライブ 1 4 2 4 9, シ
ー/オー ダンホ アソシエイツ インコーポレイティド

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 特表2010-513311 (JP, A)
特表2010-505395 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q