

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6357470号  
(P6357470)

(45) 発行日 平成30年7月11日 (2018. 7. 11)

(24) 登録日 平成30年6月22日 (2018. 6. 22)

|                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| (51) Int. Cl.                   | F I                |
| <b>C O 7 K 7/06 (2006. 01)</b>  | C O 7 K 7/06 Z N A |
| <b>C O 7 K 17/00 (2006. 01)</b> | C O 7 K 17/00      |
| <b>A 6 1 K 38/08 (2006. 01)</b> | A 6 1 K 38/08      |
| <b>A 6 1 P 7/02 (2006. 01)</b>  | A 6 1 P 7/02       |
| <b>A 6 1 P 29/00 (2006. 01)</b> | A 6 1 P 29/00      |

請求項の数 13 (全 23 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |                     |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2015-517753 (P2015-517753)  | (73) 特許権者 | 591100596           |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年6月19日 (2013. 6. 19)      |           | アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ  |
| (65) 公表番号     | 特表2015-521611 (P2015-521611A) |           | サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ |
| (43) 公表日      | 平成27年7月30日 (2015. 7. 30)      |           | ディカル                |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2013/062806             |           | フランス国、エフー75013 パリ、リ |
| (87) 国際公開番号   | W02013/190014                 |           | ュ・ドゥ・トルビアック 101     |
| (87) 国際公開日    | 平成25年12月27日 (2013. 12. 27)    | (73) 特許権者 | 508266546           |
| 審査請求日         | 平成28年5月19日 (2016. 5. 19)      |           | ユニベルシテ パリ ディドローパリ 7 |
| (31) 優先権主張番号  | 12305697.0                    |           | UNIVERSITE PARIS DI |
| (32) 優先日      | 平成24年6月19日 (2012. 6. 19)      |           | DEROT-PARIS 7       |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    |           | フランス国 エフー75205 パリ セ |
|               |                               |           | デックス 13 リュ トマ マン 5  |
|               |                               |           | 5, rue Thomas Mann  |
|               |                               |           | F-75205 Paris Cedex |
|               |                               |           | 13 FRANCE           |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良されたCD31ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 配列番号 2 のアミノ酸 582 ~ 589 位のアミノ酸配列 ;
- b) (a) の 6 又は 7 個の連続するアミノ酸のフラグメント、ここで、該フラグメントは、モチーフ R V から始まる ;
- c) ヒト CD 3 1 における (a) もしくは (b) に対応するアミノ酸配列、ここで、該アミノ酸配列は、(i) 配列番号 7 であるか、又は (i i) モチーフ R V から始まり、配列番号 7 の 7 個の連続するアミノ酸からなるフラグメントである ; または
- d) 全体アミノ酸配列 が逆位である、(a)、(b) もしくは (c) に対応するアミノ酸配列
- からなる、単離されたペプチド。

【請求項 2】

1 個または複数のアミノ酸が D - 鏡像体型である、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

配列

- (i) H - R V F L A P W K - O H (配列番号 5)、
- (i i) H - k w p a l f v r - O H (配列番号 6)、
- (i i i) H - R V I L A P W K - O H (配列番号 7) または
- (i v) H - k w p a l i v r - O H (配列番号 8)

を有する、請求項 1 又は 2 記載のペプチド。

## 【請求項 4】

前記ペプチドが固体支持体に付着されている、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項記載のペプチド。

## 【請求項 5】

前記固体支持体が血管内人工的補填物である、請求項 4 記載のペプチド。

## 【請求項 6】

前記血管内人工的補填物がステントである、請求項 5 記載のペプチド。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項記載のペプチドを含む薬学的組成物。

## 【請求項 8】

C D 3 1 介在性シグナル伝達の *in vivo* 活性化における使用のための、請求項 1 から 6 のいずれか一項記載のペプチド。

## 【請求項 9】

血栓症または炎症性疾患の処置における使用のための、請求項 1 から 6 のいずれか一項記載のペプチド。

## 【請求項 10】

末梢血 C D 3 1<sup>+</sup> T リンパ球数の増加および / または分断型可溶性 C D 3 1 の血漿中レベル上昇によって特徴づけられる疾患の処置における使用のための、請求項 8 または 9 記載の使用のためのペプチド。

## 【請求項 11】

固体支持体に付着された、請求項 8 から 10 のいずれか一項記載の使用のためのペプチド。

## 【請求項 12】

皮下投与用である、請求項 8 から 10 のいずれか一項記載の使用のためのペプチド。

## 【請求項 13】

前記疾患が、

- アテローム血栓症、アテローム性動脈硬化症、急性冠動脈症候群、虚血性脳卒中、末梢動脈疾患および腹部大動脈瘤からなる群より選択される血栓症；または
- 関節リウマチ、多発性硬化症、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス、グレーブス病、糖尿病、炎症性腸疾患、乾癬、アトピー性皮膚炎、脳アミロイド血管症、血管炎からなる群より選択される炎症性疾患

である、請求項 9 から 12 のいずれか一項記載の使用のためのペプチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は、内皮の生理機能に有利な一方で、血小板および白血球の活性化を阻害する C D 3 1 のフラグメントに対応および関係する合成ペプチドと、疾患の処置におけるそれらの使用とを提供する。これらのペプチドは、特に体液に接触する医療機器上に固定化されたときに、炎症疾患および血栓性疾患の処置に用いられる。

## 【0002】

## 背景

## 血栓症

健康なヒトには、凝血促進（凝固）力と抗凝固および線溶力との間にホメオスタシス均衡が存在する。多数の遺伝的因子、後天的因子、および環境的因子がその均衡を凝固の方に傾けることができ、静脈（例えば深部静脈血栓）、動脈（例えばアテローム血栓症、心筋梗塞、虚血性脳卒中）、または心腔における血栓の病理学的形成に繋がる。血栓は、形成部位で血流を閉塞する、または離解および塞栓形成して遠位血管を遮断する（例えば肺塞栓、脳卒中）おそれがある。

## 【0003】

10

20

30

40

50

増え続ける証拠は、世界で有数の致命的疾患であるアテローム血栓症が、血液白血球および血小板の不適切な活性化に関連して、血管壁内の破壊的炎症応答ならびに線溶カスケードによる血栓閉塞および/または破裂をもたらすことを示している。結果として、血液と血管壁との間の界面での生理学的細胞調節の回復は、アテローム血栓症と戦うための革新的な治療選択肢となるであろう。

#### 【0004】

炎症性疾患および自己免疫疾患

炎症性疾患は、多数のヒト疾患の基礎をなす。しばしば免疫系は、アレルギー反応およびいくつかのミオパチーの両方で実証された炎症性疾患と関係し、多くの免疫系疾患が異常な炎症を招く。病因の発端が炎症過程である非免疫疾患には、ガン、アテローム性動脈硬化症、および虚血性心疾患が挙げられる。

10

#### 【0005】

自己免疫疾患において、免疫系は、内因性抗原に対する抗体を生成する。抗体でコーティングされた細胞は、任意の類似のコーティングをされた外来粒子のように、補体系を活性化して組織傷害を招く。自己免疫疾患には、全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ (RA)、多発性硬化症 (MS)、炎症性腸疾患 (IBD)、グレーブス病および糖尿病が挙げられる。全身性血管炎、慢性静脈不全およびアテローム性動脈硬化関連血管疾患も、ターゲット組織が血管壁ならびに近くの器官および組織である自己免疫炎症性疾患の中に含まれる。

#### 【0006】

20

いくつかのメカニズムが、自己に対する身体の攻撃の理由を説明することができる。自己抗原は、化学的、物理的、または生物的に変化するので、免疫原性になる場合がある。ある種の化学物質は、身体タンパク質と結合して、(接触性皮膚炎で見られるように)それらのタンパク質を免疫原性にする。薬物は、血清または組織タンパク質に共有結合することによって、いくつかの自己免疫反応を惹起しうる(下記参照)。光線過敏症は、物理的に誘導された自己アレルギーの例である。紫外線は皮膚タンパク質を変化させ、そのタンパク質に対して患者はアレルギーになる。動物モデルでは、ホスト組織と合体するRNAウイルスの持続性感染が自己抗原を生物学的に変化させ、SLEに似た自己アレルギー疾患を招く。

#### 【0007】

30

大部分のヒト自己免疫疾患は、抗原特異的な適応免疫細胞(T細胞およびB細胞リンパ球)によって駆動される。特異的抗原エピトープに応答するT細胞およびB細胞クローンは、これらの疾患の開始および/または伝播を担当する。同様に、特異的抗原が駆動するT細胞およびB細胞応答は、臓器同種移植片拒絶を担当する。適応免疫細胞に加えて、顆粒球、単球-マクロファージ、樹状細胞およびナチュラルキラー細胞などの所与の抗原に特異的でない自然免疫系の細胞も、慢性炎症性(自己免疫)疾患の病理発生に関与する。

#### 【0008】

##### CD31 (PECAM-1)

CD31は、全ての内皮細胞、血小板および白血球上に独占的および構成的に存在する単鎖同種親和性膜貫通レセプターである。CD31は、6個のIg様細胞外ドメイン、1個の単鎖膜貫通セグメントおよび1個の細胞質側尾部を含む単鎖130 kDa糖タンパク質からなる。細胞質尾部は、2個の重要なチロシンに基づくモチーフ(Y663およびY686の周辺)を含み、それらは、ホスファターゼと優先的に結合するSH2含有アダプター分子に対する特異的ドッキング部位を形成し、免疫チロシン抑制モチーフ(Immunotyrosine-based Inhibitory Motif) (ITIM)として作用する。CD31の構造を下表に示す。

40

#### 【0009】

【表 1】

| ドメイン              | 配列番号 1 における位置 |
|-------------------|---------------|
| シグナルペプチド          | 1 to 27       |
| 細胞外ドメイン           | 28 ~ 601      |
| 第 1 の Ig 様細胞外ドメイン | 34 ~ 121      |
| 第 2 の Ig 様細胞外ドメイン | 145 ~ 233     |
| 第 3 の Ig 様細胞外ドメイン | 236 ~ 315     |
| 第 4 の Ig 様細胞外ドメイン | 328 ~ 401     |
| 第 5 の Ig 様細胞外ドメイン | 424 ~ 493     |
| 第 6 の Ig 様細胞外ドメイン | 499 ~ 591     |
| 膜近傍ドメイン           | 592 ~ 601     |
| 膜貫通ドメイン           | 602 ~ 620     |
| 細胞質ドメイン           | 621 ~ 738     |

10

## 【 0 0 1 0 】

20

C D 3 1 が内因性キナーゼ活性を有さないことから、細胞内 C D 3 1 I T I M は、休止状態でリン酸化されていない。C D 3 1 分子は、相互作用している細胞間で I g 様ドメイン 1 ~ 2 のトランス同種親和性リエゾンにより相互に結合している。このトランス同種親和性結合は、膜平面上での C D 3 1 分子のクラスタリングをトリガーするために必要であり、そのクラスタリングは、今度はシス同種親和性膜近傍配列を必要とする。それから、C D 3 1 細胞内 I T I M のリン酸化が可能になる。それは、その I T I M が、他のクラスター関連膜レセプター（例えば T 細胞レセプターなど）によって近くに運ばれたチロシンキナーゼの活性に曝されうるからである。細胞内 I T I M のリン酸化は、細胞内 S H 2 含有ホスファターゼの動員および活性化をトリガーする。最も近接する膜レセプターに結合したシグナル伝達アダプターに応じて、S H 2 含有ホスファターゼの活性化は、シグナル伝達カスケードの活性化（例えば G A B / E R K / M A P K、内皮細胞の接着および成長、f o x p 3 発現ならびに調節性表現型へのリンパ球分化を駆動する、能動的な細胞間解離を駆動する）またはそれらの阻害（例えば J A K / S T A T、白血球および血小板の活性化を阻害する）のいずれかに繋がらう。したがって、C D 3 1 の機能は細胞の種類により様々である。

30

## 【 0 0 1 1 】

内皮細胞の細胞内辺縁に C D 3 1 が高密度で存在することは、以前、C D 3 1 が内皮細胞での白血球の血管外遊出に参与する細胞接着分子として機能するという仮説に導いた。しかし、C D 3 1 は内皮細胞のタイトジャンクションから除外され、C D 3 1 欠損マウスにおいて白血球の血管外遊出が増加することから、実験的証拠は、むしろ C D 3 1 が白血球の血管外遊出を防止することを示している。内皮 C D 3 1 は、機械的ストレスを受けるとチロシンリン酸化されるようになり、その機能は内皮構造および血管新生を安定化させるために必要である。

40

## 【 0 0 1 2 】

C D 3 1 は、血小板の活性化および凝集の後にチロシンリン酸化されるようになる。C D 3 1 のクラスタリングがいくつかの活性化レセプターを経由するシグナル伝達をアンカップリングすることによって血小板凝集および血栓形成を阻害するので、これは、負のフィードバックメカニズムを表す。C D 3 1 の免疫調節特性は、C D 3 1 シグナル伝達が血液白血球の相互反発を駆動し、自然免疫細胞および適応免疫細胞の両方の阻害シグナルと刺激シグナルとの間の均衡をモデュレーションするという事実によって支援されている。

50

CD31の遠位Ig様細胞外ドメインの機械的係合は、そのITIMのリン酸化によってトリガーされる外側から内側への阻害シグナル伝達、ならびにSH2含有ホスファターゼの動員および活性化を誘導する。

【0013】

Zehnderら(1995、Blood. 85(5):1282-8)は、混合リンパ球反応(MLR)を特異的および用量依存的に阻害したCD31抗体を同定した。彼らは、さらに、この抗体のエピトープ、すなわちCD31の23個の膜近傍アミノ酸に対応するCD31ペプチドがMLRを強く阻害したことを見出した。彼らは、CD31の23個の膜近傍アミノ酸が機能的に重要な領域を構成し、そしてCD31ペプチドがエピトープとの結合を競合することによってリンパ球活性化を妨害するという仮説を立てた。しかし、Zehnderらは、CD31介在性シグナル伝達がCD31ペプチドによって活性化されるか、または阻害されるかどうかを教示できなかった。

10

【0014】

Chenら(1997、Blood. 89(4):1452-9)は、このペプチドがマウス疾患モデルにおいて移植片対宿主病(GVHD)の発症を遅延させ、長期生存率を増大させたことを示した。彼らは、CD31ペプチドがT細胞活性化における共通経路を阻害するという仮説を立てた。しかし、Chenらも、T細胞活性化においてCD31ペプチドが果たす役割を解明することはできなかった。特に、これらの従前の研究は、CD31シグナル伝達カスケード、より正確にはCD31 ITIMのリン酸化状態にこのペプチドが及ぼす推定的な効果を評価しなかった。

20

【0015】

まだ知られていないメカニズムによって、CD31は、ある種の循環リンパ球上には「欠如している(lost)」。その欠如は、リンパ球活性化の際に観察され、今度はリンパ球CD31シグナル伝達の不在が、アテローム血栓症の発生に關与する病的免疫応答を高めることが最近示された。

【0016】

膜貫通セグメントを欠如する変異型転写物が原因の可溶性CD31も報告されており、したがって、循環CD31の個別の量が遺伝的に決定されていると現在考えられている。その結果、いくつかの従前の研究が、可溶性CD31の血漿レベルと、アテローム血栓症または他の炎症疾患のリスクとの間の相関を見出すことを試みた。しかし、分析された特異的遺伝的多型とは無関係に、データは、幅広い血漿CD31値を示し、これらの異なる研究の結果は矛盾した。

30

【0017】

したがって、CD31の生物学的機能をよりよく理解する必要がある。これは、T細胞活性化に関連づけられた疾患の処置のためのより効果的な治療法の提供を可能にするであろう。

【0018】

本発明者らは、以前に、活性化/メモリーTリンパ球上でのCD31の想定された欠如が実際は不完全であり、第5細胞外Ig様ドメインと第6細胞外Ig様ドメインとの間でのCD31の分断に起因すると報告した(国際特許公報である国際公開公報第2010/000741号に記載)。次に、分断されたCD31細胞外ドメイン(今後「分断型CD31」と呼ぶ)は、循環中に放出され、そこでCD31の可溶性スプライス変異体と一緒に存在する。加えて、本発明者らは、高リスクのアテローム血栓症が循環における分断型CD31の増加およびスプライス変異型CD31の減少と関連し、循環CD31の総レベルとは関連しないことを示した。

40

【0019】

CD31が血液リンパ球上では欠如するのではなく、切断されるだけであるという知見は、分子の残余部分をターゲティングすることによってその生理学的免疫調節機能を救済する独特の機会を提供した。

【0020】

50

本発明者らの従前の研究は、CD31のエクトドメインの膜近傍アミノ酸に対応するペプチドが、循環Tリンパ球の表面からCD31を見かけの上で欠如した患者においてさえ、CD31の生理学的免疫調節機能を救済することができると示した。本発明者らは、そのようなペプチドが、アテローム性動脈硬化症のマウスモデルにおいて疾患の進行および動脈瘤形成を予防できることを実証した。これらのペプチドは、CD31の全てまたは大部分のIg様ドメインを含む可溶性CD31に比べて独特な特性を有する。実際、そのようなペプチドは、BIAcore分析によって判断するとき $K_d = 10^{-7}$ を有するので、高度に同種親和性である。したがって、これらのペプチドは、その切断後に発現され続ける細胞外CD31膜近傍部分に強いホモオリゴマー化により架橋することによってCD31シグナル伝達と係合することができる。これと対照的に、選択的スプライシングされた可溶性CD31は、膜近傍アミノ酸の最初の10個を欠如し、23残基長ペプチドと弱い同種親和性結合を示す(BIAcore分析によって判定したとき $K_d = 17 \mu M$ )。さらに、*in vitro*で、本発明者らによって同定されたペプチドだけが、CD31の切断型アイソフォーム下流でITIM経路と係合できることで、CD31が見かけの上で欠如したTリンパ球におけるCD31シグナル伝達を回復することができる。

10

#### 【0021】

##### 発明の説明

本発明者らは、細胞外CD31の膜近傍部分内にアミノ酸8個の特異的ペプチドを同定した。そのペプチドは、血小板および白血球の活性化の阻害ならびに血栓症または炎症性疾患の処置に特に有用性がある。この配列が水溶性であるという事実は、薬理学的観点から有利である。本発明者らは、さらに、逆位および/またはD-鏡像体などの非天然アミノ酸を含むこのアミノ酸8個のフラグメントに対応するペプチド配列もこれらの活性を保持するか、または活性の改善を実証することを示した。治療的使用に向けたペプチドへの非天然アミノ酸の組み入れは、ペプチドの安定性、特に*in vivo*安定性を増大させることに有用である。

20

#### 【0022】

したがって、本発明は、マウスCD31配列番号2のアミノ酸582~589位のアミノ酸配列、またはヒトCD31(配列番号1)、ブタCD31(配列番号4)もしくはウシCD31(配列番号3)などの別の哺乳類CD31中のこの配列に対応するアミノ酸配列からなるペプチドを提供する。対応する配列は、図1のアライメントまたは本明細書記載のように行われた任意の他のアライメントを参照することによって同定することができる。したがって、本発明は、配列番号1のアミノ酸593~600位のアミノ酸配列からなる単離されたペプチドも提供する。本発明は、2個以上のアミノ酸の位置が逆位または置換されている上記配列からなるペプチドも提供する。1個または複数のアミノ酸がD-鏡像体型である上記ペプチドも提供される。好ましくは、ペプチドは単離されたペプチドである。

30

#### 【0023】

好ましくは、本発明のペプチドは、水などの有機または非有機溶媒に可溶性である。

#### 【0024】

配列番号2のアミノ酸582~589の該アミノ酸配列のフラグメント、またはヒトCD31(配列番号1)、ブタCD31(配列番号4)もしくはウシCD31(配列番号3)などの別の哺乳類CD31におけるこの配列に対応するアミノ酸配列からなる配列を含むペプチドも提供される。対応する配列は、図1のアライメントまたは本明細書記載のように行われた任意の他のアライメントを参照することによって同定することができる。「フラグメント」は、連続するアミノ酸配列を表す。例えば、該フラグメントは、1、2、3、4、5、6または7個のアミノ酸のフラグメントでありうる。

40

#### 【0025】

本発明のCD31ペプチドは、例えば対応するD-鏡像体による1個または複数の天然アミノ酸(L鏡像体)の置換などのキラリティーの変化を含みうる。アミノ酸のD-鏡像体は、それらの対応するL-鏡像体と同じ文字であるが、小文字で表される。したがって

50

、例えば、アルギニンのL - 鏡像体は「R」と表され、一方でD - 鏡像体は「r」と表される。例えば、ペプチド中の1、2、3、4、5、6、7または8個のアミノ酸はD - 鏡像体型でありうる。ペプチドは、下記のようにそれらの修飾型または非天然アミノ酸を含みうる。

【0026】

本発明のCD31ペプチドは、逆位配列、すなわちアミノ酸鎖の逆位（C末端からN末端）を含みうる。ペプチドの全体アミノ酸配列が逆位の場合があり、またはアミノ酸配列の部分が逆位の場合がある。例えば、アミノ酸2、3、4、5、6、7または8個の連続する配列が逆位の場合がある。本明細書における「逆位の」アミノ酸への言及は、その配列中の連続するアミノ酸配列の逆位を表す。ペプチドは、アミノ酸鎖の逆位（C末端からN末端）と一緒に、1個または複数の天然アミノ酸（L - 鏡像体）が対応するD - 鏡像体によって置換されているレトロ逆位（retro-inversion）を含みうる。

10

【0027】

したがって、本発明のペプチドは、配列：

配列番号2のアミノ酸582～589のアミノ酸配列に対応するH - RVFLAPWK - OH（配列番号5）；（P8F）

D - 鏡像体型の配列番号2のアミノ酸582～589の逆位配列、すなわち該配列のレトロ逆位に対応するH - kwpalivr - OH（配列番号6）；（P8RI）

配列番号1のアミノ酸593～600のアミノ酸配列に対応するH - RVILAPWK - OH（配列番号7）；

20

D - 鏡像体型の配列番号1のアミノ酸593～600の逆位配列、すなわち該配列のレトロ逆位に対応するH - kwpalivr - OH（配列番号8）

を有しうる。

【0028】

好ましい態様では、本発明のペプチドは、モチーフRVから始まる。

【0029】

下記のような、本発明のペプチドをコードする単離された核酸および該ペプチドを含む薬学的組成物も提供される。

【0030】

CD31フラグメントに加えて、ペプチドは、場合によりCD31と異種の配列を含みうる。これらの異種配列は、例えばキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）、卵アルブミン（OVA）、サイログロブリン（THY）または多抗原性ペプチド（MAP）などの担体分子に対応しうる。したがって、本発明は、異種配列に加えて本発明のペプチドを含むペプチドを提供する。

30

【0031】

本発明によるCD31ペプチドの配列は、好ましくはヒトまたはマウスCD31の配列に由来する。しかし、CD31の配列は、任意の非ヒト哺乳類CD31配列に由来しうる。図1に、ヒト、マウス、ウシおよびブタCD31配列の間のアライメントを示す。当業者は、図1に示される配列との配列アライメントを行うことによって、別の非ヒト哺乳類CD31タンパク質中から対応する配列を容易に同定することができる。配列アライメントおよび配列同一性の決定のための方法は、当技術分野において周知であり、例えばBioPerl、BLAST、BLAST - 2、CS - BLAST、FASTA、ALIGN、ALIGN - 2、LALIGN、Jaligner、matcherまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェア、ならびにNeedleman-WunschおよびSmith-Watermanアルゴリズムなどのアライメントアルゴリズムを使用する。

40

【0032】

本発明によるCD31ペプチドは、in vitro T細胞増殖の用量依存性阻害を発揮するおよび/または混合リンパ球反応（MLR；血小板凝集阻害；血小板活性化阻害；血小板によるトロンピン生成阻害および/または内皮細胞のVCAM - 1発現阻害を阻害する生

50

物学的活性を有しうる。それらの生物学的活性は、例えば、実施例 1、2、3 もしくは 4 または Zehnder et al. 1995, Blood. 85(5):1282-8、Fornasa et al. 2010, J Immunol 184: 6585-6591; Fornasa et al., 2012, Cardiovascular Research 94: 30-37 に記載されたように測定することができる。

#### 【0033】

T 細胞増殖アッセイは、被験化合物存在下または不在下のいずれかで培養された T 細胞中に取り込まれた放射能を比較することを含みうる。このアッセイは、例えば、以下のように行うことができる：

- 抗 CD 3 抗体を補充された完全培地を含むマルチウェルプレートを提供する；
- ウェルに漸増する濃度の被験化合物を補充する；
- 末梢血単核細胞（または脾臓細胞、またはリンパ節細胞）を播種する；
- 細胞を約 72 時間培養する；
- ( $^3\text{H}$ ) チミジンを添加し、細胞を約 16 時間培養する；
- 放射能を測定する；および
- 被験化合物の存在下で測定された放射能を、該化合物の不在下および / または参照化合物の存在下および / または陰性対照の存在下で測定された放射能と比較する。

10

#### 【0034】

または、T 細胞増殖アッセイは、Nature Protocols, 2007, 2: 2049-2056 および Fornasa et al., 2012, Cardiovascular Research 94: 30-37 に記載のカルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (CFSE) の使用を含みうる：

20

- 完全培養培地の存在下で末梢血単核細胞（または脾臓細胞、またはリンパ節細胞）中に最適量の蛍光プローブ (CFSE) を取り込ませる；
- CFSE 染色細胞および刺激（抗 CD 3 抗体）を含むマルチウェルプレートを提供する；
- ウェルに漸増する濃度の被験化合物を補充する；
- フローサイトメトリーによる蛍光染色強度に基づき娘細胞数（増殖）を比較する。

#### 【0035】

または、白血球活性化は、被験化合物の存在下または不在下のいずれかで培養された白血球（血液単核細胞または脾臓細胞、またはリンパ節細胞）中の早期活性化マーカー CD 69 の発現レベルを比較することによって判断することができる。このアッセイは、例えば以下のように行うことができる：

30

- （血液単核細胞もしくは脾臓細胞、もしくはリンパ節細胞）または精製白血球亜集団を提供すること；
- 適切な刺激（抗 CD 3 精製抗体および骨髓由来樹状細胞；または LPS もしくは ConA、PHA、PWM などのレクチン）の付加によって該細胞を刺激すること；
- 細胞を最大 48 時間培養すること；ならびに
- 早期活性化マーカー CD 69 の発現について例えばフローサイトメトリーによって該細胞を分析すること；ならびに
- 被験化合物の存在下での CD 69 発現を比較すること。

#### 【0036】

40

本発明による CD 31 ペプチドは、固相合成、液相合成または遺伝子工学などの、当技術分野において周知の任意の手順によって調製することができる。固相合成として、例えば合成されるべきペプチドの C 末端に対応するアミノ酸は、有機溶媒に不溶性の支持体に結合され、アミノ基および側鎖官能基が適切な保護基で保護されたアミノ酸が C 末端から N 末端への順序で 1 個ずつ縮合される一反応、および樹脂に結合したアミノ酸またはペプチドのアミノ基の保護基が放出される一反応という反応の交互反復によって、ペプチド鎖がこのように伸長される。所望のペプチドの合成後に、ペプチドは脱保護反応および固体支持体からの切断に供される。

#### 【0037】

本発明の CD 31 ペプチドは、場合によりそれらの安定性および / またはそれらのバイ

50



オアベイラビリティーを改善することを目指して、追加的な化学的修飾を場合により含む。そのような化学的修飾は、*in vivo*酵素分解に対するペプチドの保護増大および/または膜障壁を通過する能力の増大を有するペプチドを得ることで、その半減期を延長し、生物学的活性を維持または改善することを目指す。当技術分野において公知の任意の化学的修飾は、本発明により採用することができる。そのような化学的修飾には、：

- 例えばN末端アシル化（好ましくはアセチル化）もしくは脱アミノ化などのペプチドのN末端および/もしくはC末端に対する修飾、またはアミドもしくはアルコール基へのC末端カルボキシル基の修飾；

- 2個のアミノ酸の間のアミド結合での修飾：2個のアミノ酸を連結しているアミド結合の窒素原子または炭素でのアシル化（好ましくはアセチル化）またはアルキル化（好ましくはメチル化）；

- 例えば2個のアミノ酸を連結しているアミド結合の炭素でのアシル化（好ましくはアセチル化）またはアルキル化（好ましくはメチル化）などの、2個のアミノ酸を連結しているアミド結合の炭素での修飾；

- アミノ酸鎖（C末端からN末端）の修飾；

- 1個または複数の炭素が窒素原子により置換されたアザペプチド；ならびに/あるいは

- 1個または複数のアミノ酸のアミノ基が炭素よりもむしろ炭素に結合したペプチド

が挙げられるが、これらに限られない。

#### 【0038】

ポリペプチドには、翻訳後プロセッシングなどの自然工程または当技術分野において周知の化学的修飾技法のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列が含まれる。そのような修飾は、基礎的な教科書およびより詳細なモノグラフ、ならびに膨大な研究文献に十分に記載されている。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含めた、ポリペプチド中のどこにでも起こりうるので、同じ種類の修飾が所与のポリペプチドのいくつかの部位に同じまたは多様な程度で存在しうることが理解されよう。また、所与のポリペプチドは、多種の修飾を含みうる。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分岐している場合があり、分岐と共に、または分岐なしに環状の場合がある。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは、天然の翻訳後プロセッシングに起因する場合があり、また合成法によって調製される場合がある。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アライド化（araiddation）、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合による架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミメートの形成、ホルミル化、カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのタンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA介在性付加、およびユビキチン化が挙げられる。

#### 【0039】

「単離された」ペプチドによって、ペプチドが生きた生物内に、例えばヒトの体内に存在しないことを意図する。むしろ、単離されたペプチドは、組成物またはキットの部分でありうる。単離されたペプチドは、好ましくは精製されている。

#### 【0040】

本発明の化合物は、化学合成法および組換え法を含めた当技術分野で周知の任意の手順によって生成させることができる。

#### 【0041】

化学合成法の例は、固相合成および液相合成である。固相合成として、例えば合成されるべきペプチドのC末端に対応するアミノ酸は、有機溶媒に不溶性の支持体に結合され、アミノ基および側鎖官能基が適切な保護基で保護されたアミノ酸がC末端からN末端への

10

20

30

40

50

順序で1個ずつ縮合される一反応、および樹脂に結合したアミノ酸またはペプチドのアミノ基の保護基が放出される一反応という反応の交互反復によって、ペプチド鎖がこのように伸長される。固相合成法は、使用される保護基の種類に応じてt B o c法およびF m o c法に大きく分類される。典型的に使用される保護基には、アミノ基についてはt B o e ( t - ブトキシカルボニル)、C l - Z ( 2 - クロロベンジルオキシカルボニル)、B r - Z ( 2 - ブロモベンジルオキシカルボニル)、B z l ( ベンジル)、F m o c ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル)、M b h ( 4 , 4 ' - ジメトキシジベンズヒドリル)、M t r ( 4 - メトキシ - 2 , 3 , 6 - トリメチルベンゼンスルホニル)、T r t ( トリチル)、T o s ( トシル)、Z ( ベンジルオキシカルボニル)およびC l z - B z l ( 2 , 6 - ジクロロベンジル) ; グアニジノ基についてはN O 2 ( ニトロ)およびP m c ( 2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホニル) ; ならびにヒドロキシル基についてはt B u ( t - ブチル) ) が挙げられる。所望のペプチドの合成後、そのペプチドは、脱保護反応および固体支持体からの切断に供される。そのようなペプチド切断反応は、B o c法についてはフッ化水素またはトリフルオロメタンスルホン酸を用いて、およびF m o c法についてはT F Aを用いて実施することができる。

10

#### 【 0 0 4 2 】

または、ペプチドは、組換え法を用いて合成することができる。この場合、本発明によるペプチドをコードする核酸(今後「本発明による核酸」と呼ぶ)は、発現ベクターにクローニングされる。本発明の核酸は、好ましくは、その発現を可能にする発現シグナル(例えばプロモーター、ターミネーターおよび/またはエンハンサー)のコントロール下に置かれる。次に、発現ベクターが宿主細胞(例えばヒト、C H O、マウス、サル、真菌または細菌宿主細胞)にトランスフェクションされ、トランスフェクション後の宿主細胞が、ペプチドの発現に適した条件で培養される。

20

#### 【 0 0 4 3 】

ペプチドを生成させる方法は、場合により該ペプチドを精製するステップ、該ペプチドを化学的に修飾するステップ、および該ペプチドを薬学的組成物に製剤化するステップを含む。

#### 【 0 0 4 4 】

好ましくは、本発明のペプチドは、有機溶媒または非有機溶媒に、例えば水または9 g / L N a C l、P B S、トリスまたはトリス - リン酸などの水性緩衝液に可溶性である。そのような可溶性のおかげで、ペプチドは、例えば1マイクロモル、10マイクロモル、50マイクロモル、100マイクロモル、500マイクロモル、1 mM、50 mM、100 mMまたはそれよりも大きい濃度で水に溶解することができる。

30

#### 【 0 0 4 5 】

血栓症および炎症性疾患の処置のためのC D 3 1ペプチドの使用

本発明によるC D 3 1ペプチドがC D 3 1<sup>+</sup>(すなわちC D 3 1<sup>s h e d</sup>) Tリンパ球においてもC D 3 1介在性シグナル伝達を活性化できることが見出された。加えて、そのようなペプチドは、アテローム性動脈硬化症のマウスモデルにおいて疾患進行および動脈瘤形成を予防し、多発性硬化症のマウスモデルにおいて臨床スコアを改善することができる。

40

#### 【 0 0 4 6 】

したがって、本発明は、C D 3 1介在性シグナル伝達の活性化における使用のための本発明のペプチドも提供する。これらのペプチドは、好ましくは、in vitroでT細胞増殖の用量依存性阻害を発揮する。C D 3 1介在性シグナル伝達の活性化は、in vitro活性化またはin vivo活性化でありうる。本発明のペプチドを使用してin vitroまたはin vivoでC D 3 1介在性シグナル伝達を活性化する方法も提供される。in vivo法は、下記に定義される処置方法でありうる。

#### 【 0 0 4 7 】

本明細書にわたり使用される用語「C D 3 1介在性シグナル伝達」は、C D 3 1が関与するシグナル伝達経路を表す。そのような経路は、当技術分野において周知であり、それ

50

らには、例えば、NewmanおよびNewman (2003 Arterioscler Thromb Vasc Biol 23:953-964) ならびにNewton-NashおよびNewman (1999. J Immunol 163:682-688) に記載されているような経路が挙げられる。

#### 【0048】

したがって、本発明は、血栓症または炎症性疾患の処置における使用のための本発明のペプチドも提供する。これらのペプチドは、好ましくは、*in vitro*でT細胞増殖の用量依存性阻害を発揮する。CD31介在性シグナル伝達の活性化は、*in vitro*活性化または*in vivo*活性化でありうる。本発明のペプチドを使用した血栓症または炎症性疾患の処置方法、好ましくはそれを必要とする個体への該ペプチドの投与を含む方法も提供される。

#### 【0049】

本明細書にわたり使用される用語「血栓症」には、アテローム血栓症、アテローム性動脈硬化症、急性冠動脈症候群、虚血性脳卒中、末梢動脈疾患および腹部大動脈瘤が挙げられるが、これらに限られない。

#### 【0050】

本明細書にわたり使用される用語「炎症性疾患」には、炎症性腸疾患、乾癬、アトピー性皮膚炎、脳アミロイド血管症、血管炎などの慢性炎症性疾患が挙げられるが、これらに限られない。この用語には、関節リウマチ(RA)、多発性硬化症(MS)、炎症性腸疾患(IBD)、全身性エリテマトーデス(SLE)、グレーブス病および糖尿病を含めた自己免疫疾患も挙げられるが、これらに限られない。移植片対宿主病(GVHD)および敗血症性ショックを含めた急性および慢性移植片拒絶などの他の状態がこの用語に包含されうる。例えば、本発明のペプチドは、敗血症性ショックを(場合により抗生物質療法、例えば広域抗生物質療法と組合せて)処置するために、および骨髄、腎臓、心臓、肝臓または肺移植などの移植に、使用することができる。

#### 【0051】

本発明の好ましい一態様では、該血栓症または炎症性疾患は、CD31<sup>+</sup>Tリンパ球表現型の欠如と関連する。実際、驚くことに、CD31<sup>-</sup>Tリンパ球表現型を有する個体であってもCD31ペプチドがCD31シグナル伝達を回復することが見出された。したがって本発明に関連して、CD31ペプチドは、好ましくはCD31<sup>-</sup>Tリンパ球表現型を有する個体および/または患者の部分群を処置するために使用される。

#### 【0052】

本明細書に使用される用語「CD31<sup>-</sup>Tリンパ球表現型」は、用語「CD31<sup>s h e d</sup>Tリンパ球表現型」と互換的に使用される。これらの用語は、CD31を検出する従来の先行技術の方法、例えばStockingerら(Immunology, 1992, 75(1):53-8)、Demeureら(Immunology, 1996, 88(1):110-5)、Caligiuriら(Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(8):1659-64)またはCaligiuriら(Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(3):618-23)に記載された方法などが使用された場合に、循環T細胞上にCD31を見かけの上で欠如した個体の表現型を表す。そのような方法では、CD31を検出するために使用された抗体は、第1~第5細胞外Ig様ドメインの任意の一つに位置するエピトープに結合する。

#### 【0053】

好ましくは、CD31<sup>-</sup>Tリンパ球表現型を有する個体は、それらの個体の循環Tリンパ球の少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、90%または95%がCD31<sup>s h e d</sup>リンパ球であることを意味する。T細胞由来切断型CD31の血漿中濃度またはCD31<sup>+</sup>Tリンパ球に比したCD31<sup>-</sup>Tリンパ球数のいずれかを測定することができる。

#### 【0054】

本発明は、また、本明細書記載のペプチドまたはそれをコードする核酸の有効量を、それを必要とする個体に投与するステップを含む、血栓症または炎症性疾患を治療または予防する方法に関する。前記それを必要とする個体は、好ましくは、血栓症または炎症性疾患を患うか、または患うリスクがある。最も好ましくは、該個体は、CD31<sup>-</sup>Tリンパ

10

20

30

40

50

球表現型を有する。

【0055】

「有効量」は、処置されるべき疾患を予防、治療または減速できるペプチドの濃度を達成するために十分な量を意味する。そのような濃度は、当業者が日常的に決定することができる。実際に投与される化合物の量は、典型的には、処置される状態、選択された投与経路、投与される実際の化合物、個別の患者の年齢、体重および応答、患者の症状の重症度などを含めた、関連する状況に照らして医師が決定する。用量が投与されるペプチドの安定性に依存しうることも、当業者によって了解されている。

【0056】

本発明の枠内で処置されるべき個体は、好ましくはヒト個体である。しかし、他の哺乳類を処置するためのCD31ペプチドの獣医学的使用も、本発明によって意図されている。

10

【0057】

薬学的組成物

本明細書記載のCD31ペプチドは、薬学的組成物に製剤化することができる。したがって、本発明は、上記CD31ペプチドの任意の1種および生理学的に許容されうる担体を含む薬学的組成物を意図する。生理学的に許容されうる担体は、当業者に公知の任意の方法によって調製することができる。

【0058】

少なくとも1種の本発明のペプチドを含む薬学的組成物には、意図される目的を達成するために有効な量でペプチド(1種または複数)が含有される全ての組成物が含まれる。加えて、薬学的組成物は、薬学的に使用することができる調製物への活性化化合物の加工を容易にする賦形剤および佐剤を含む、適切な薬学的に許容されうる担体を含む。適切な薬学的に許容されうるビヒクルは、当技術分野において周知であり、例えば当技術分野における標準的な参考書であるRemington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, USA, 1985)に記載されている。薬学的に許容されうるビヒクルは、投与様式、ペプチドの溶解性および安定性に依りて日常的に選択することができる。例えば、静脈内投与用の製剤には、緩衝剤、希釈剤および他の適切な添加剤も含有しうる無菌水性液剤が含まれる。薬物送達のための生体材料および他のポリマーの使用、ならびに特定の投与用式を検証するための種々の技法およびモデルが、文献に開示されている。

20

30

【0059】

本発明のペプチドは、意図される目的を達成する任意の手段によって投与することができる。例えば、投与は、皮下、静脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、脳内、くも膜下腔内、鼻腔内、経口、直腸、経皮、口内、局部、局所、吸入または皮下使用が含まれるが、これらに限られない、いくつかの異なる経路によって達成することができる。

【0060】

本発明のペプチドは、ステントなどの固体担体に付着させることができる。例えば、ペプチドは、ステント、動脈チューブおよび機械弁などの血管内人工的補填物での使用のためにポリマー上に、または直接、アミノ化金属表面に共有結合的にグラフトすることができる。固定化ペプチドは、血小板および白血球の接着ならびに人工的補填物への活性化を防止する一方で、内皮細胞の付着および成長に味方することによって体内での機器の許容性/組み入れを促進する。

40

【0061】

後者の使用には、チューブおよびステントなどの血管内人工的補填物、人工心臓弁、骨および義歯を挙げることができる。

【0062】

投与されるべき投薬量は、(本発明者らのピーズに基づく方法を用いて血漿中の細胞特異的切断型CD31を測定することによって定量される場合がある)個別の必要性、所望の効果および選択された投与経路に依存する。投与される投薬量は、年齢、性別、健康状態、およびレシピエントの体重、もしあれば併用処置、処置の頻度、および所望の効果の

50

性質に依存することが理解されている。各処置に必要な合計用量は、複数回または単回投与することができる。

【 0 0 6 3 】

意図される送達経路に応じて、化合物は、液体（例えば液剤、懸濁剤）、固体（例えば丸剤、錠剤、坐剤）または半固体（例えばクリーム剤、ゲル剤）の形態として製剤化するか、または医療機器の表面に固定化することができる。

【 0 0 6 4 】

好ましい一態様では、組成物は、正確な投薬を容易にするために単位投薬形態で提供される。用語「単位投薬形態」は、ヒト対象および他の哺乳類用の単位投薬量として適切な、物理的に別個の単位であって、各単位が所望の治療効果を生じると計算された予定量の活性物質を適切な薬学的賦形剤と共に含有する単位を表す。典型的な単位投薬形態には、液体組成物の予備充填、予備測定されたアンプルもしくはシリンジ、または固体組成物の場合は丸剤、錠剤、カプセル剤などが挙げられる。そのような組成物では、本発明の化合物は、通常、少ない方の成分（約 0 . 1 ~ 約 5 0 重量%または好ましくは約 1 ~ 約 4 0 重量%）であり、残りは、様々なビヒクルまたは担体、および所望の剤形を形成するために役立つ加工助剤である。

【 0 0 6 5 】

本発明の化合物は、また、徐放形態で、または徐放薬物送達システムから投与することができる。

【 0 0 6 6 】

表現「生理学的に許容されうる」は、活性成分の生物学的活性の有効性を妨害しない任意の担体であって、投与されるホストに無毒な担体を包含することが意味される。例えば、非経口投与のために、上記活性成分は、食塩水、デキストロース溶液、血清アルブミンおよびリンゲル液などのビヒクル中の注射用単位投薬形態に製剤化することができる。

【 0 0 6 7 】

薬学的に許容されうる担体以外に、本発明の組成物は、安定化剤、賦形剤、緩衝剤および保存料などの少量の添加剤も含みうる。

【 0 0 6 8 】

本発明は、例えば遺伝子治療による処置の枠内の、本発明のペプチドをコードする核酸を含む薬学的組成物も考えている。この場合、核酸は、ペプチドをコードする配列が発現シグナル（例えばプロモーター、ターミネーターおよび/またはエンハンサー）のコントロール下に置かれてその発現を可能にするベクターに好ましくは存在する。ベクターは、例えばアデノウイルスまたはレンチウイルスベクターなどのウイルスベクターに対応しうる。

【 0 0 6 9 】

本発明は、さらに、本発明の C D 3 1 ペプチドを含む薬学的組成物と、投与様式に関する説明書とを含むキットを提供する。これらの説明書は、例えば、医療適用および/または投与経路および/または投薬量および/または処置されるべき患者群を示しうる。

【 0 0 7 0 】

予防および治療

「治療」には、治療的処置と予防的または防止的処置との両方が含まれ、ここで、その目的は、ターゲットとなる病状または疾患を予防または減速することである。治療を必要とする対象には、すでに疾患を有する対象と同様に、疾患を起こしやすい対象または疾患が予防されるべき対象が挙げられる。用語「治療法」、「治療的」、「治療」または「治療する」には、疾患の症状または進行を軽減、緩和または阻害または排除すること、および該症状または進行を軽減、緩和または阻害または排除することが意図される治療が含まれる。治療の所望の効果には、疾患の発生または再発を予防すること、症状の緩和、疾患の任意の直接または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行速度を低下させること、病状の回復または緩和、および寛解または予後改善が挙げられる。いくつかの態様では、本発明の方法および組成物は、疾患もしくは障害の発生を遅延させる

10

20

30

40

50

、または疾患もしくは障害の進行を減速するために使用される。

【0071】

好ましくは、有効量、好ましくは本発明のタンパク質またはベクターの治療有効量が投与される。「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効な量を表す。有効量は、タンパク質またはベクターが同時投与される薬物またはプロドラッグに応じて異なりうる。

【0072】

本発明のペプチドの「治療有効量」は、個体の病状、年齢、性別、および体重、ならびにタンパク質が所望の治療結果を誘発する能力などの要因に応じて変動しうる。治療有効量は、タンパク質の任意の毒性または有害作用よりも治療有益効果の方が勝る量を包含する。治療有効量は、有益性、例えば臨床的有益性を付与するのに十分な量も包含する。

10

【0073】

本明細書にわたり、「含む (comprises)」、「含まれる (comprised)」、「含んでいる (comprising)」などの用語は、大部分の特許管轄において、好ましくは問題となる管轄においてそれらに帰せられる意味を有しうる。例えば、それらの用語は、「含む (includes)」、「含まれる (included)」、「含んでいる (including)」などを意味する。「からなる」、「から本質的になっている」および「から本質的になるは、大部分の特許権限において、好ましくは問題となる権限においてそれらに帰せられる意味を有する。例えば、それらの用語は、他の要素の全て、大部分、もしくは無視できる量を除く全ての除外を意味しうる、あるいは、それらの用語は、明示的に列挙されていない要素を考慮しうるが、先行技術から見出される要素または本発明の基本的特徴もしくは新規特徴に影響する要素を除外する。

20

【0074】

量、時間などの測定可能な値を参照するときに、本明細書に使用される用語「約」は、特定の値からの $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、いっそうより好ましくは $\pm 1\%$ 、なおより好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。それは、そのような変動が開示された方法を行うために適切であるからである。

【0075】

以下の図面および実施例を含むがこれらに限られない手段により、本発明をこれからより詳細に説明する。雑誌論文または抄録、公表された、もしくは未公表の特許出願、発行された特許または任意の他の参考文献を含めた本明細書に引用される全ての参考文献は、引用された参考文献に発表された全てのデータ、表、図面および本文を含めて、参照により本明細書に全体的に組み入れられる。

30

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1-1】ヒト、マウス、ブタおよびウシCD31のアミノ酸配列の間のアライメントを示す図である。配列番号1 (ヒトCD31) のアミノ酸593~600によって定義される配列ならびにマウス、ブタおよびウシCD31における対応する配列を、配列の上の直線によって示す。

【図1-2】ヒト、マウス、ブタおよびウシCD31のアミノ酸配列の間のアライメントを示す図である。配列番号1 (ヒトCD31) のアミノ酸593~600によって定義される配列ならびにマウス、ブタおよびウシCD31における対応する配列を、配列の上の直線によって示す。

40

【図2】T細胞活性化にP8F (配列番号5) ペプチドおよびP8R1 (配列番号6) ペプチドが及ぼす作用を示す図である。Jurkat T細胞をfluo3-AMカルシウムプローブと共に予備インキュベーションし、TCRを抗CD3抗体および二次抗体F(ab')<sub>2</sub>フラグメントと交差結合させることによって刺激した。図に、以下のようにTCR刺激後のカルシウム動員に60 μg/mlの各ペプチドが及ぼす作用を示す：ペプチドなしの対照 (四角)、P8F (配列番号5) ペプチド (丸) およびP8RI (配列番号6) ペプチド (三角)。

50

【図3】アミノ化固体表面に固定化されたP8RIが白血球の接着および活性化を阻害することを示す図である。末梢血単核細胞（細胞 $5 \times 10^5$ 個/ml）をP8RIコーティング済みImmulon（登録商標）ウェルおよび対照Immulon（登録商標）ウェルに移し、 $1 \mu\text{g/ml}$  LPSで60分間刺激した。COOH基の無関係な供給源として対照ウェルに（EDC/NHSで）酢酸をコーティングする（対照）か、または未コーティングのままとした（裸）。左：PBSで3回洗浄後、対照ウェルはいくつかの接着した白血球を含み、それに相違してP8RIウェルには白血球は実質的に不在であった。右：LPS活性化白血球から放出された可溶性L-セレクチン（sCD62L）およびインターロイキン-1（細胞測定用ビーズCBA（登録商標）により分析）は、P8RIコーティング済みウェルにおいて有意に減少した。\*対照に比べて $p < 0.05$ 。スケールバー =  $100 \mu\text{m}$

【図4】固定化P8RIが血小板活性化を防止することを示す図である。トロンビン生成は、アミノ化ポリスチレンウェル中で組織因子（ $0.5 \mu\text{M}$ ）の存在下で多血小板血漿中の較正済み自動トロンボグラムによって37で測定した。P8RIをウェルに共有結合させた。陰性対照としてスクランブルペプチドを使用した。図4：代表的なトロンボグラム；図5：ピーク/ピークまでの時間（遅滞時間）として計算されたトロンビン活性の速度指数は、裸のウェルおよび対照ウェルに比べてP8RIで有意に減少した。図6：血小板によって放出された可溶性P-セレクチン（sCD62P）の濃度は、P8RIコーティング済みウェルの上清では有意に減少した。データは、8回の独立した実験からのものである、\* $p < 0.01$ 。

【図5】固定化P8RIが血小板活性化を防止することを示す図である。トロンビン生成は、アミノ化ポリスチレンウェル中で組織因子（ $0.5 \mu\text{M}$ ）の存在下で多血小板血漿中の較正済み自動トロンボグラムによって37で測定した。P8RIをウェルに共有結合させた。陰性対照としてスクランブルペプチドを使用した。図4：代表的なトロンボグラム；図5：ピーク/ピークまでの時間（遅滞時間）として計算されたトロンビン活性の速度指数は、裸のウェルおよび対照ウェルに比べてP8RIで有意に減少した。図6：血小板によって放出された可溶性P-セレクチン（sCD62P）の濃度は、P8RIコーティング済みウェルの上清では有意に減少した。データは、8回の独立した実験からのものである、\* $p < 0.01$ 。

【図6】固定化P8RIが血小板活性化を防止することを示す図である。トロンビン生成は、アミノ化ポリスチレンウェル中で組織因子（ $0.5 \mu\text{M}$ ）の存在下で多血小板血漿中の較正済み自動トロンボグラムによって37で測定した。P8RIをウェルに共有結合させた。陰性対照としてスクランブルペプチドを使用した。図4：代表的なトロンボグラム；図5：ピーク/ピークまでの時間（遅滞時間）として計算されたトロンビン活性の速度指数は、裸のウェルおよび対照ウェルに比べてP8RIで有意に減少した。図6：血小板によって放出された可溶性P-セレクチン（sCD62P）の濃度は、P8RIコーティング済みウェルの上清では有意に減少した。データは、8回の独立した実験からのものである、\* $p < 0.01$ 。

【図7】D3内皮細胞におけるVCAM-1発現に及ぼす可溶性ペプチドの作用を示す図である。VCAM-1の発現に及ぼすP8RIの作用は、TNF $\alpha$ （ $50 \text{ ng/ml}$ ）およびIFN $\gamma$ （ $100 \text{ ng/ml}$ ）を用いた一晩刺激を受けさせた不死化ヒト脳内皮細胞系HCEC/D3を用いた定量FACS分析によって評価した。

【図8】多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳炎におけるP8RIペプチドの治療効果を実証する図である。治療アッセイは、薬学的対照としてプレドニゾンを使用して、EAEマウスモデルにおいて上行性麻痺（スコア1）の発症後に $2 \text{ mg/kg/日}$ のP8RIの皮下投与を開始することにより行った。図に、ビヒクル（四角）、 $2 \text{ mg/kg/日}$ のプレドニゾン（丸）または $2 \text{ mg/kg/日}$ のP8RI（三角）で処置されたマウスにおける活動性脳炎に関連した上行性麻痺（臨床スコア）を示す。

【図9】急性血栓症のマウスモデルにおけるP8Fペプチドの治療効果を実証する図である。アスピリンを陽性対照、ビヒクルを陰性対照として、アテローム性動脈硬化マウスを2.5、5または $10 \text{ mg/kg/日}$ のP8Fで処置した。1000切片/試料からの閉塞性血

10

20

30

40

50

栓を示す切片の数は、ビヒクルに比べてP 8 F処置マウスの方が有意に低下していた。アスピリンおよび5 mg/ml群のどちらからも閉塞性血栓を見出すことはできなかった。

【図10】図9に示されるデータのCochran-Mantel-Haenszel検定(カイ二乗)解析を示す図である。カラムの幅は、各群に含まれるマウスの数に比例する(アスピリン=5、「2.5」=7、「5」=11、「10」=7、ビヒクル=8)。ビヒクル(Veh)に比べて全群で $P < 0.05$ 。

【0077】

#### 配列リストの簡単な説明

配列番号1は、ヒトCD31の配列に対応する。

配列番号2は、マウスD31の配列に対応する。

配列番号3は、ウシCD31の配列に対応する。

配列番号4は、ブタCD31の配列に対応する。

配列番号5は、P8FペプチドH-RVFLAPWK-OHに対応する。

配列番号6は、P8RIペプチドH-kwpalfvr-OHに対応する。

配列番号7は、P8Fペプチドのヒト等価物H-RVILAPWK-OHに対応する。

配列番号8は、P8RIペプチドのヒト等価物H-kwpalivr-OHに対応する。

。

【0078】

#### 実施例

実施例1：T細胞活性化に及ぼす作用：

Jurkat T細胞( $1.0 \times 10^6$  個/ml)をfluor3-AMカルシウムプローブと共に予備インキュベーションし、TCRを抗CD3抗体および二次抗体F(ab')<sub>2</sub>フラグメントと交差結合させることによって刺激した。図2に、刺激ペプチドを加える前後の連続的フローサイトメトリー取得を示す。図に示すように、60 µg/mlのP8RI(H-kwpalfvr-OH)およびP8F(H-RVFLAPWK-OH)の存在は、細胞内カルシウム動員の遅延および減少に繋がる(Jurkat細胞のTCR刺激後のfluor3-AMプローブの中央値蛍光強度(FMI)によって決定)。

【0079】

実施例2：血小板凝集に及ぼす可溶性ペプチドの作用：

Vena8 Fluoro+ (商標) バイオチップ(幅400 µm×深さ100 µm×長さ20 mm、Cellix)のマイクロキャピラリーに2.5 mg/ml不溶性ウマI型コラーゲンを4で一晩コーティングし、次に0.1% HSAで1時間室温でブロッキングした。P-PACK(直接トロンビン阻害剤、非キレート剤)で抗凝固処理されたヒト末梢全血を5 µM DiOC6で10分間標識し、その後、Cellixポンプを用いて1500 秒<sup>-1</sup>でコーティング済みキャピラリーを通過させて灌流した。血小板とマトリックスとの相互作用を蛍光顕微鏡でリアルタイムに観察し、オフライン分析のために保存した。凝集した血小板に覆われた表面を、最初の5分間フレーム毎に分析し(24フレーム/s)、被覆度%として表現した。可溶性P8RI(H-kwpalfvr-OH)およびP8F(H-RVFLAPWK-OH)は、両方ともヒト血小板の凝集を用量依存的に阻害することが示された。

【0080】

実施例3：血小板活性化およびトロンビン生成に及ぼす固定化ペプチドの作用

トロンビン生成は、アミノ化ポリスチレンウェル(Covalink, Immunon(登録商標) 2HB, Stago)において組織因子(0.5 pM)の存在下で多血小板血漿(血小板 $1.5 \times 10^8$  個/ml)で校正済み自動トロンボグラムにより37で測定した(Hemker et al. Thromb Haemost. 2000; 83(4): 589-91)。配列番号8(P8RI、H-kwpalfvr-OH、MW1016.26、TFA塩をHCl塩に交換、純度100%、50 µMで水に溶解、pH4~4.5)をEDC/NHS(モル比10:1)で前処理し、Immunon(登録商標)ウェルに共有結合させた。対照ペプチドとしてスクランブルペプチドを使用した。図4~6に、ピーク/ピークまでの時間(遅延時間)として計算されたトロンビン活性が裸のウェルおよび対照ウェルに比べてP8RIで有意に減少し、血小板によって放

10

20

30

40

50



出された可溶性 P - セレクチン ( s C D 6 2 P ) の濃度が P 8 R I コーティング済みウェルの上清で有意に減少したことを示す。

【 0 0 8 1 】

実施例 4 : 内皮細胞に及ぼす可溶性ペプチドの作用 :

本発明者らは、V C A M - 1 の発現に及ぼす P 8 R I の作用を、T N F a ( 5 0 ng/ml ) および I F N g ( 1 0 0 ng/ml ) で一晩刺激を受けさせた不死化ヒト脳内皮細胞系 H C M E C / D 3 を用いた免疫蛍光によって評価した。V C A M - 1 発現の増加は印象的ではなかったものの、ペプチドの存在は、その増加を防止した ( データは示さず ) 。同じ実験条件の F A C S による定量分析 ( 図 7 ) は、「ペプチド」ウェルで観察された V C A M - 1 発現の減少が統計的に有意であった ( n = ウェル 3 個 / 条件 ) ことを示した。効果はす

10

【 0 0 8 2 】

P 8 R I ( H - k w p a l f v r - O H ( 配列番号 6 ) 、 M W 1 0 1 6 . 2 6 、 T F A 塩を H C l 塩によって置換、純度 1 0 0 % 、水に 5 0 μ M で溶解、p H 4 ~ 4 . 5 ) を E D C / S - N H S ( 1 0 : 1 モル比 ) で前処理し、アミノ化ポリスチレンウェル ( Covalink, Immunon ( 登録商標 ) 2HB, Stago ) に共有結合させた。C O O H 基の無関係な供給源として対照ウェルに ( E D C / S - N H S で ) 酢酸をコーティングした。3 % F C S を補充した内皮細胞培養培地でウェルをブロッキングし、その後初代ヒト臍帯内皮細胞 ( H U V E C 、 5 × 1 0 <sup>5</sup> 個 / ml ) を播種した。3 日後に、P 8 R I 被覆ウェルは接着している

20

【 0 0 8 3 】

実施例 5 : 多発性硬化症モデルにおける治癒プロトコール

in vivo 治療プロトコールにおけるペプチドの有効性を実証するために、E A E マウスモデル ( 実験的自己免疫性脳炎、多発性硬化症のマウスモデル ) において参照薬としてプレドニゾンを使用して治癒アッセイを行った。P 8 R I を 2 mg/kg/日 で皮下投与した。使用したプロトコールでは、臨床スコアが 1 ( 尾の麻痺 ) になった後にのみ処置を開始し、組み入れられたマウスを毎日 1 2 日間経過観察した。参照薬 ( プレドニゾン ) を同じ投

30

【 0 0 8 4 】

実施例 6 : 急性血栓症モデルにおける治癒プロトコール

左総頸動脈の結紮に供されたアテローム性動脈硬化マウス ( a p o E K O 、 3 5 週齢、雄、固形飼料給餌 ) ( 急性血栓症のモデル ) にも P 8 F 配列を in vivo で使用した ( 異なる用量の皮下投与 : 2 . 5 、 5 および 1 0 mg/kg/d ) 。高齢のせいで、大部分のマウスは、結紮が行われた部位近くにアテローム性動脈硬化病変を発生していた。エバンスブルー ( 赤色チャンネルに蛍光 ) で染色した断面の蛍光光学顕微鏡観察から、未処置マウスにおけるアテローム性動脈硬化病変にわたる閉塞性血栓の発生が示された。ペプチドは、全ての被験用量で閉塞性血栓の出現の防止に有効であった。用量 5 mg/Kg/d は、参照薬 ( アスピリン、1 5 0 mg/kg/d を皮下投与 ) と同程度の抗血栓作用を示した。1 0 0 0 切片 / 試料からの閉塞性血栓を示す切片の数は、ビヒクルに比べて P 8 F 処置マウスの方が有意に低下していた ( 図 9 および 1 0 ) 。アスピリンおよび 5 mg/ml 群のどちらからも閉塞性血栓を見出すことはできなかった。

40

【 0 0 8 5 】

実施例 : 7 P 8 F および P 8 R I と既存のペプチドとの比較

P 8 F および P 8 R I ペプチドの溶解性、活性および安定性 ( 凍結 / 融解への耐性 ) を、以前に使用された C D 3 1 の膜近傍配列を含むペプチドと比較した。

50

比較に使用したペプチドは：

P 8 F

P 8 R I

P 2 3 H u m - 配列番号 1 のヒト C D 3 1 配列のアミノ酸 5 7 9 ~ 6 0 1 位

P 2 2 m o u s e - 配列番号 2 のマウス C D 3 1 配列のアミノ酸 5 6 9 ~ 5 9 0 位

P e p R e g - 配列番号 2 のマウス C D 3 1 配列のアミノ酸 5 8 1 ~ 5 9 0 位

であった。

#### 【 0 0 8 6 】

活性は、上記のように Jurkat T 細胞を使用するカルシウム動員試験を用いて決定した。結果を下表 1 に示し、E D 5 0 ( 抗 C D 3 + F a b 抗体で刺激された Jurkat 細胞における細胞内カルシウム動員の得られる最大阻害の 5 0 % を生じる最小用量 ) として表現する。

10

#### 【 0 0 8 7 】

安定性は、ペプチドを反復凍結融解サイクルに供し、その後に E D 5 0 の増加および / または生物学的活性の消失がおこるサイクル数を決定することによって決定した。ペプチドの活性は、表 1 に示される凍結融解サイクル数の後に減少または消失した。

#### 【 0 0 8 8 】

下記の表 1 からわかるように、P 8 F および P 8 R I は、試験した全ての事項において以前に使用されたペプチドよりも優れていた。これらのペプチドは、増加した溶解性、より低い E D 5 0 および従来以上の安定性を示した。加えて、以前に使用されたペプチドが有機溶媒を必要としたのに対して、P 8 F および P 8 R I は水溶性であり、そのことがこれらのペプチドを医学適用により適切にした。

20

#### 【 0 0 8 9 】

#### 【表 2】

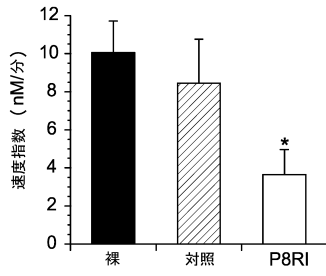
表 1

|              | 最小純度<br>(%) | 最小限の溶媒              | 最大溶解度<br>(mg/ml) | ED 50 (μM) | 最大凍結／<br>融解サイクル |
|--------------|-------------|---------------------|------------------|------------|-----------------|
| P8F          | 99          | water               | 28,1             | 25         | 3               |
| P8RI         | 100         | water               | 30,5             | 12,5       | 5               |
| P23 Hum      | 97          | 10%アセトニトリル          | 8,6              | 100        | 2               |
| P22<br>mouse | 96          | 10%アセトニトリル,<br>5%酢酸 | 15,9             | 100        | 2               |
| PepReg       | 98          | 10%アセトニトリル,<br>5%酢酸 | 8,1              | 50         | 3               |

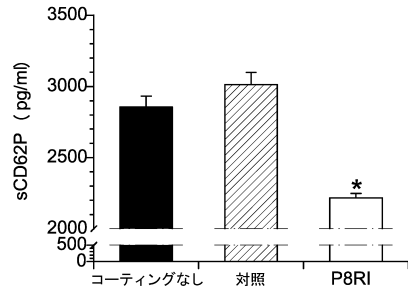
30



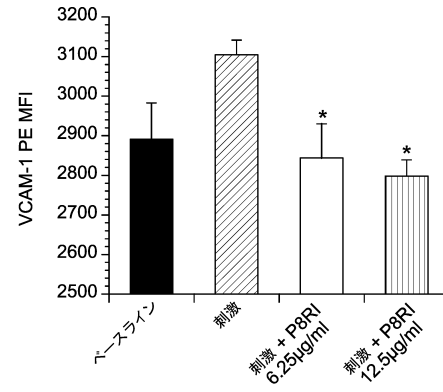
【図 5】



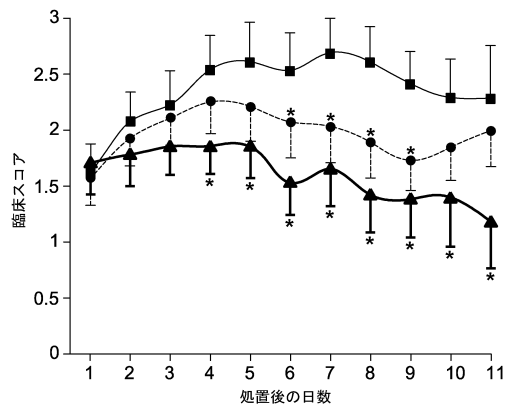
【図 6】



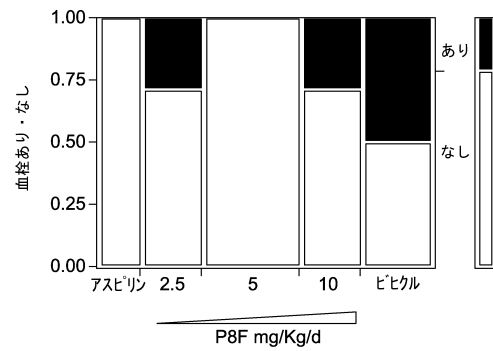
【図 7】



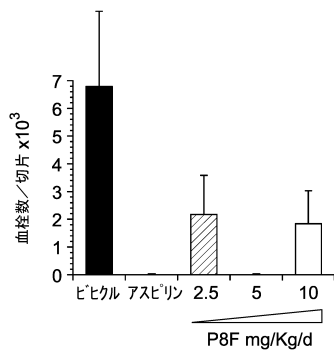
【図 8】



【図 10】



【図 9】



【配列表】

0006357470000001.app

## フロントページの続き

|             |       |           |         |             |
|-------------|-------|-----------|---------|-------------|
| (51)Int.Cl. |       | F I       |         |             |
| A 6 1 P     | 37/02 | (2006.01) | A 6 1 P | 29/00 1 0 1 |
| A 6 1 P     | 1/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 37/02       |
| A 6 1 P     | 3/08  | (2006.01) | A 6 1 P | 1/00        |
| A 6 1 P     | 17/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 3/08        |
| A 6 1 P     | 17/06 | (2006.01) | A 6 1 P | 17/00       |
| A 6 1 F     | 2/06  | (2013.01) | A 6 1 P | 17/06       |
|             |       |           | A 6 1 F | 2/06        |

(73)特許権者 505429360

ユニヴェルシテ パリ 13

UNIVERSITE PARIS 13

フランス、エフ - 9 3 4 3 0 ヴィルタヌーズ、アヴェニュー ジャン - バプティスト クレマン、  
9 99 9 , avenue Jean - Baptiste Clement , F - 9 3 4 3 0 Vill  
etaneuse , FRANCE

(73)特許権者 591140123

アシスタンス ピュブリク - オピトー ドゥ パリ

ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS

フランス国 , 7 5 0 0 4 パリ , アベニュー ビクトリア 3 番地

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74)代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74)代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100145104

弁理士 膝館 祥治

(74)代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74)代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74)代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74)代理人 100125081

弁理士 小合 宗一

(72)発明者 カリジウリ , ジュゼッピーナ

フランス国、エフ - 7 5 0 1 8 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 4 6、ユエムエールエス 6 9  
8 ( アンセルム、ペ 7 / ペ 1 3 )

(72)発明者 ニコレッティ , アントニーノ

フランス国、エフ - 7 5 0 1 8 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 4 6、ユエムエールエス 6 9  
8 ( アンセルム、ペ 7 / ペ 1 3 )

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 特表 2 0 1 1 - 5 2 6 4 8 5 ( J P , A )

特開2005-053855(JP, A)

Liang, O. D. et al., J. Biol. Chem., 2001年 8月 3日, Vol. 276, No. 31, pp. 28946-28953

Burns-Hamuro, L. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 米国, 2003年 4月 1日, Vol. 100, No. 7, pp. 4072-4077

上妻 謙, 冠疾患誌, 2005年, Vol. 11, pp. 121-125

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

A61K 38/00 - 38/58

A61P 1/00 - 37/08

A61L 33/00 - 33/18

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE  
/BIOSIS/WPIDS(STN)