

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-149745

(P2017-149745A)

(43) 公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	

審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-76042 (P2017-76042)
 (22) 出願日 平成29年4月6日(2017.4.6)
 (62) 分割の表示 特願2014-513744 (P2014-513744) の分割
 原出願日 平成24年6月1日(2012.6.1)
 (31) 優先権主張番号 61/492,753
 (32) 優先日 平成23年6月2日(2011.6.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591052398
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 THE REGENTS OF THE
 UNIVERSITY OF CALIF
 ORNIA
 アメリカ合衆国・94607-5200・
 カリフォルニア州・オークランド・12階
 ・フランクリン ストリート・1111
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

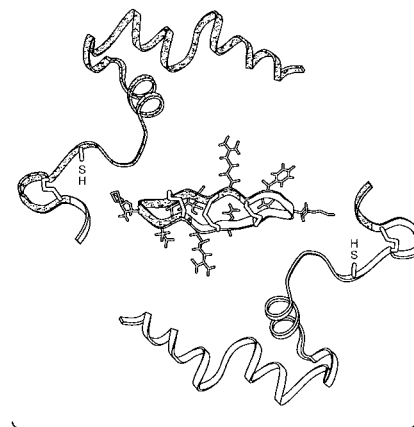
(54) 【発明の名称】 シータデフェンシンによる炎症性プロテアーゼの遮断

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 炎症性病態の治療を目的に、腫瘍壊死因子 (TNF-) 変換酵素 (TACE) またはその他の炎症誘発性プロテアーゼおよび/またはシェダーゼ、例えば RTD-1-27、RTD-1-28 または RTD-1-29 などの臨床的に意義のある阻害をもたらすのに有効な薬物組成物の提供。

【解決手段】 デフェンシン、その類似体または誘導体が デフェンシン-1、デフェンシン-1類似体、デフェンシン-1誘導体、デフェンシン-2、デフェンシン-2類似体、デフェンシン-2誘導体、デフェンシン-3、デフェンシン-3類似体、デフェンシン-3誘導体、デフェンシン-4、デフェンシン-4類似体、デフェンシン-4誘導体、デフェンシン-5、デフェンシン-5類似体、デフェンシン-5誘導体、および RTD-1 から選択される薬物組成物を投与する方法。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

必要とする対象において腫瘍壊死因子（TNF - ）変換酵素（TACE）活性を阻害するために使用する薬剤組成物であって、

デフェンシン、その類似体または誘導体を含み、

デフェンシン、その類似体または誘導体が、必要とする対象においてTACE活性を阻害するのに有効な量で提供される、

薬物組成物。

【請求項 2】

デフェンシン、その類似体または誘導体が デフェンシン - 1、 デフェンシン - 1 類似体、 デフェンシン - 1 誘導体、 デフェンシン - 2、 デフェンシン - 2 類似体、 デフェンシン - 2 誘導体、 デフェンシン - 3、 デフェンシン - 3 類似体、 デフェンシン - 3 誘導体、 デフェンシン - 4、 デフェンシン - 4 類似体、 デフェンシン - 4 誘導体、 デフェンシン - 5、 デフェンシン - 5 類似体、 デフェンシン - 5 誘導体、 および RTD - 1 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の薬物組成物。

10

【請求項 3】

デフェンシン - 1 類似体が RTD - 1 - 28 である、請求項 1 に記載の薬物組成物。

【請求項 4】

デフェンシン - 1 類似体が RTD - 1 - 28 である、請求項 1 に記載の薬物組成物。

【請求項 5】

デフェンシン - 1 類似体が RTD - 1 - 29 である、請求項 1 に記載の薬物組成物。

20

【請求項 6】

前記 TACE 活性がシェダーゼ活性である、請求項 1 に記載の薬物組成物。

【請求項 7】

前記薬物組成物が経口製剤である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の薬物組成物。

【請求項 8】

過剰な TNF - 活性に関連する疾患を治療するための動物への投与のための医薬の製造方法であって、

前記医薬が、 デフェンシン、その類似体または誘導体の少なくとも 1 つを TACE 活性を阻害するのに有効な量で含む、

30

方法。

【請求項 9】

デフェンシン、その類似体または誘導体が デフェンシン - 1、 デフェンシン - 1 類似体、 デフェンシン - 1 誘導体、 デフェンシン - 2、 デフェンシン - 2 類似体、 デフェンシン - 2 誘導体、 デフェンシン - 3、 デフェンシン - 3 類似体、 デフェンシン - 3 誘導体、 デフェンシン - 4、 デフェンシン - 4 類似体、 デフェンシン - 4 誘導体、 デフェンシン - 5、 デフェンシン - 5 類似体、 デフェンシン - 5 誘導体、 および RTD - 1 からなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記医薬が RTD - 1 - 27、 RTD - 1 - 28 および RTD - 1 - 29 の少なくとも 1 つを含む、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記 TACE 活性がシェダーゼ活性である、請求項 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2011年6月2日に出願された米国仮特許出願第61/492753号の優先権の利益を主張する。

【0002】

50

本発明は、各種疾患におけるシグナル伝達経路および炎症経路を含めたサイトカイン活性を調節する環状ペプチドの使用に関する。より具体的には、環状ペプチドは、シェダーゼおよびその他の関連するプロテアーゼ（メタロプロテイナーゼおよびシステインプロテアーゼ）の阻害などのこれまで未知の生物活性を有し、上記プロテアーゼの活性疾患の発生病序に関連するあらゆる疾患に適用されるものである。

【背景技術】

【0003】

本明細書に記載されている刊行物はすべて、各刊行物または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に明記された場合と同様に、参照により組み込まれるものとする。以下の記載は、本発明を理解するのに有用であると思われる情報を含むものである。本明細書に提供される情報が、本出願で特許請求される発明の先行技術であること、あるいは本出願で特許請求される発明に関連する事柄であること、また具体的または暗示的に参照される刊行物が先行技術であることは認められない。

10

【0004】

本明細書に記載の環状ペプチドは、臨床的に重要であることが知られている炎症誘発性酵素の経路、例えば病的炎症、組織分解および癌細胞増殖を促進する増殖因子の動員に参与する腫瘍壊死因子（TNF- α ）変換酵素（「TACE」、ADAM17としても知られる）およびその他の金属酵素（例えば、シェダーゼおよびマトリックスメタロプロテイナーゼ（「MMP」））などの経路を標的とする最近発見された治療剤である。

20

【0005】

メタロプロテイナーゼは、発生プログラミングから組織損傷または感染症に対する応答、癒痕再形成および細胞分裂の刺激にわたる多数の生物学的過程を調節する（3）。メタロプロテイナーゼ活性の調節は、細胞および組織の恒常性にきわめて重要である。病的状態の多くが金属酵素活性の過剰発現によるものである。例えば、リウマチ性関節炎およびその他の形態の関節炎に罹患した関節では、MMPならびにTACE（7、8、13、16）によってプロTNF α 発現細胞の細胞表面から放出されるTNF- α のレベルが高くなる。RAの治療には、低用量メトトレキサートなどの一次治療薬に奏効しない関節リウマチ（RA）患者のかなりの割合で、モノクローナル抗体によるTNF- α の遮断が有効であることが示されている。RAに対するTNF- α の遮断が全症例に有効であるとは限らないこと、TNF- α 遮断薬による重篤な副作用が一部の患者にみられることから、これに代わる抗炎症戦略を開発する努力が続けられている。これに関連して多数の製薬会社がTACE阻害剤を発見する創薬プログラムに集中的に取り組んできたが（17）、いずれも未だにFDAによる承認を受けていない。

30

【0006】

シートデフェンシン（デフェンシン）は、アカゲザル、ヒヒなどの旧世界ザルの組織で発現される天然の環状ペプチドである。デフェンシンは、ヒトその他のヒト科動物では発現されない。天然のデフェンシンは、既知のいずれのデフェンシンでも保存されているジスルフィド結合により安定化した18アミノ酸の環からなる（9、21~23、25）。デフェンシンは最初、他のデフェンシンと同じくペプチドの抗微生物特性に基づき発見されたものである。しかし、本発明者らは、デフェンシンの強力な抗炎症因子としてのこれまでに知られていない第二の特性を発見した。本明細書に詳細に記載する通り、天然の構造および修飾された構造のデフェンシンにより、*ex vivo*でも*in vivo*でも炎症をダウンレギュレートすることが可能である。デフェンシンおよびデフェンシンの構造から誘導されるペプチド（例えば、環状ペプチド）により、TNF- α 炎症の重要な因子TACEを阻害することが可能であることが発見されたのは最も重要なことである。デフェンシンが天然のTACE阻害剤であるというこの全く新しい発見により、対象内に既に内在するサイトカイン関連経路を介して炎症を調節することが可能な分子のきわめて重要な入手源がもたらされる。このペプチドは、動物で発現され、可溶性のTACE調節物質である唯一の既知の天然産物である。したがって、機能障害を起こしたサイトカイン活性に起因する自己免疫疾患およびその他の炎症性疾患などの様々な

40

50

病的状態または病態ならびに霊長類進化の過程での デフェンシン発現の喪失に起因すると考えられるヒトの様々な炎症性疾患および/または病態の全般にわたって、環状ペプチドを治療薬として用いることができる。

【0007】

さらに、TACEなどの因子は、細胞外タンパク質ドメインを切断する生物活性を有し、シェダーゼとして知られる分子のさらに広いクラスのメンバーである。この切断活性は、シェダーゼADAM10阻害によるトラスツズマブ(Herceptin)などの乳癌に使用する特定の治療法の有効性を高める治療経路をもたらすものである。通常、ADAM10シェダーゼによりHer2が切断されると、恒常的キナーゼ活性を有するHer2フラグメントが生じ、増殖細胞にリガンド非依存性の増殖シグナルおよび生存シグナルが伝えられる。しかし、この過程の有害な作用は、シェダーゼ阻害により抑制することができる。したがって、シェダーゼ阻害活性を有する環状ペプチドは、メタロプロテイナーゼの構造、発現および/または機能の変化が発生機序に關与する疾患および/または病態を含めたさらに多岐にわたる疾患および/または病態の治療法をもたらすものである。

10

【0008】

この10年ほどの間、製薬会社ではTACE阻害剤を開発する努力が続けられてきた(14、17)。数種類の小分子(ほとんどがヒドロキサメートである)がRAの動物モデルにおいて有効であること示されたが、これらの化合物はいずれも、ヒトでは許容できない毒性により承認されていない(14、17)。実際、米国では依然として、既存のTNFアンタゴニストにはすべて、薬剤に付され得る米国食品医薬品局(FDA)による最も厳しい警告の黒枠警告が付されて販売されている。

20

【0009】

したがって、RAなどの疾患に有効な非毒性のTACE阻害剤が登場すれば、RA、關連する自己免疫および炎症性疾患のみならず、メタロプロテイナーゼ活性に關連する癌などの他の疾患に対する有用な新たな治療法になると考えられる。さらに一般的に言えば、炎症性病態および炎症に關連する病態、特に慢性炎症性病態を治療する薬剤ならびにこのような薬剤を製造し、販売し、投与方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、炎症性病態を治療するために デフェンシンまたはその類似体もしくは誘導体を含む薬物組成物を研究し販売する装置、システムおよび方法を提供する。

30

【0011】

本出願日の時点で、好適な薬物組成物にはRTD-127、RTD-1-28およびRTD-1-29のうち少なくとも1つが含まれる。

【0012】

本発明の研究的側面では、毒性、有効性および用量反応に關する試験が企図される。このような試験はいずれも、製薬会社などの会社が自社の研究所で直接実施しても、子会社、さらには非關連会社で間接的に実施してもよいが、本明細書では、これらはすべて薬物組成物の有効性を判定するという概念に含まれるものであることを理解するべきである。

40

【0013】

本明細書で企図される抗炎症性作用(1つまたは複数)は、例えば、腫瘍壊死因子(TNF-)変換酵素(TACE)、カテプシンCまたはその他の炎症性プロテアーゼ、メタロプロテアーゼのADAMファミリーおよびその他のシェダーゼの阻害を含めた、臨床的に意義のある炎症關連の化合物の阻害をすべて、広範囲に含むものであると解釈されるべきである。

【0014】

本明細書では、薬物組成物を市場に提供する段階は、商業量の薬物組成物を製造することもしくは製造された商業量の薬物組成物、または商業量の薬物組成物の製造を監視すること、管理することもしくは他の任意の方法で指示することであると解釈されるべきである。企図される最小限の商業量としては、1つ以上の生産施設において任意の1年間で合

50

計1キログラム、10キログラム、100キログラムおよび1000キログラムが挙げられる。

【0015】

企図される デフェンシンまたはその類似体もしくは誘導体の興味深い側面の1つは、この化合物の多くが酸およびプロテアーゼに対する安定性が高く、経口製剤の形で投与することができるという点である。

【0016】

少なくとも部分的には、企図される治療用組成物がTACEおよび/またはシェダーゼに影響を及ぼし得るという理由から、例えば、関節リウマチ、炎症性腸疾患およびその他の慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、急性菌血症、敗血症、嚢胞性線維症、癌、アルツハイマー病、変形性関節症、炎症関連神経変性疾患およびその他の疾患関連疾患を含めた多岐にわたる炎症性病態を治療し得ると考えられる。特に、本明細書で企図される方法および組成物を、抗TNF療法に奏効しない患者を治療するために販売するのが有利であろうと考えられる。

10

【0017】

このほか、ヒトまたは非ヒト動物に投与する薬剤および薬剤の製造方法が企図され、ここでは薬剤が、本明細書または優先出願に開示され炎症性病態を治療するために販売される新規な デフェンシンまたはその類似体もしくは誘導体を少なくとも1つ含む。特に対象となるのがRTD-1-27、RTD-1-28およびRTD-1-29である。

【0018】

以下の好適な実施形態の詳細な説明から、本発明の様々な目的、特徴、態様および利点がさらに明らかになるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】 デフェンシンの生合成および構造の図である。置換基ノナペプチド(色分けされている)が切り取られ、スプライスされて成熟ペプチドRTD-1が生成する((21)より)。

【図2】 プレプロ デフェンシンの配列比較の図である。A. cDNAから予想されるRTD-a~dのアミノ酸配列をRTD1a~1cおよびヒト デフェンシン偽遺伝子(HTDp)と手で整列させたものである。整列した配列中の点は、RTD-aと一致するアミノ酸を表し、星印は終止コドンの位置を表し、#記号は翻訳を早期に終了させる停止コドンを表す。B. cDNA配列から推定される10種類のRTDペプチドの環状構造。

30

【図3】 RTD-1がマウス多菌性敗血症の致死率を低下させることを示す図である。T=0時に成体Balb/cマウスに盲腸結紮穿孔(CLP)を実施した。マウスには、CLP術の4時間後に通常の生理食塩水50μl(、n=10)を、あるいはCLP術の4時間後(、n=11)または24時間後(、n=5)にRTD-1を5mg/kg含有する生理食塩水を単回注射した。

【図4】 デフェンシンの抗TNF活性を示す図である。A. RTD1~6(23)の共有結合構造を示す図であり、色分けされた部分が成分ノナペプチドの誘導を示している(23)。B. ヒト全血(1:10)を大腸菌(E.coli)生菌100CFU/mlとともに、デフェンシンRTD-1および2種類のヒト デフェンシン(HNP-2およびHNP-4)の0~10μg/ml存在下で4時間インキュベートし、ELISAによりTNF-を定量化した。C. RTD1~5について、パネルBに示されるヒト全血からのTNF-放出に対する効果を試験した。ELISAによりTNF-を定量化し、PMN中に微量にしか存在しないRTD-6については試験しなかった。

40

【図5】 デフェンシンが、複数のTLRアゴニストによって誘導される炎症誘発性サイトカイン/ケモカインを阻害することを示す図である。ヒト末梢血細胞(5×10⁵個/ml)をRPMI1640+5%ヒト血漿中、RTD-1単独10μg/ml(アゴニストを含まない対照)もしくはペプチド溶媒(0.01%HOAc)とともに、またはTLRアゴニストと同時に、37、5%CO₂中で4時間、穏やかに攪拌しながらインキュ

50

ベートした。遠心分離により上清を回収し、Milliplex サイトカイン/ケモカインパネルを用いて、Luminex xMAP 分析によりサイトカイン/ケモカインレベルを定量化した。アゴニスト：TLR2 熱殺菌したリステリア菌 (*L. monocytogenes*) 1×10^8 個；TLR4 大腸菌 (*E. coli*) K12 の LPS 3.3 ng/ml ；TLR5 ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) のフラジェリン 30 ng/ml ；TLR8 ssRNA40 $0.9 \mu\text{g/ml}$ 。

【図6】 デフェンシンがTACEの競合阻害剤であることを示す図である。A. 組換えTACE (rTACE) を図示される濃度のペプチド+TACE-特異的基質 (Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂) とともにインキュベートし、酵素活性を蛍光定量により測定した。B. パネルAに示されるTACE阻害についてRTD1~5を分析した。C. ペプチド濃度 0 ng/ml 、 50 ng/ml 、 100 ng/ml および 150 ng/ml におけるRTD-1によるrTACE阻害のLineweaver-Burke解析。D. RTD-1と「天然の」非環状類似体 (S-7) の構造の比較。E. RTD-1 および RTD-1-S7類似体によるrTACEの相対的阻害。F. 休止THP-1細胞またはLPS刺激した(2時間)THP-1細胞でのRTD-1によるTACE阻害(1)。

10

【図7】 デフェンシンがADAM10の強力な阻害剤であることを示す図である。組換えADAM10と基質 (Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂； $0.05 \mu\text{g/ml}$) をRTD1~3とともに37℃で60分間インキュベートし、蛍光定量により酵素活性を測定した。

20

【図8】 ミニ デフェンシンの *in vivo* 有効性ならびに抗TNF 活性およびTACE遮断活性を示す図である。A. ミニ デフェンシンの共有結合構造。B. CLP敗血症に対するミニ デフェンシンの効果。T=0時にBALB/cマウスにCLP術を実施した。手術の4時間後、i.v. PBS (偽対照) またはPBS中 5 mg/kg の図示されるミニ デフェンシンによりマウスを治療した。最大15日間の生存率として治療効果をモニターした。C. ミニ デフェンシンについて、ヒト全血からのTNF 放出に対する効果を評価した。EDTAで抗凝固処置した全血をRPMI 1640で1:10に希釈し、RTD-1 (天然 デフェンシン) または図示される3種類のミニ デフェンシンを加えて大腸菌 (*E. coli*) 生細胞とともに4時間インキュベートした。D. TACE活性に対するRTD-1および3種類のミニ デフェンシンの効果を図5に記載されている通りに判定した。

30

【図9】 ラットプリスタン関節炎 (PIA) に対するRTD-1の効果を示す図である。本文中に記載されている通りにDAラットにPIAを誘発し、無作為化により、生理食塩水 (N=10) を毎日注射するグループと 5 mg/kg のRTD-1 (N=11) を毎日注射するグループに割り付けた。肉眼的病理所見を評価しスコア化した(20)。各記号は各個体の肉眼的病理所見のスコアを表す。いずれの場合にも、RTD-1治療により、正常な歩行運動の回復をみる関節疾患の解消がもたらされた。

【発明を実施するための形態】

【0020】

(詳細な説明)

本明細書で引用される参考文献はすべて、その全体が完全に記載された場合と同様に参照により組み込まれるものとする。特に定義されない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は、本発明の属する分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。Singletonら, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 第3版, J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 第5版, J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); および Sambrook および Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第3版, Cold Spring H

40

50

arbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001) は、本願で使用される多くの用語に関する一般的な指針を当業者に提供するものである。

【0021】

当業者には、特許請求される発明の実施に使用することができ、本明細書に記載のものとはほぼ同等のまたは同等である方法および材料が多数認識されるであろう。実際、本発明は、記載されている方法および材料に限定されるものであると解釈されるべきではない。本目的のために、次の用語を以下で定義する。

【0022】

文脈上他の意味に解される場合を除き、本明細書に記載される範囲はすべて、その終点を含むものであると解釈されるべきであり、限界が定められていない範囲については、商業上実施可能な数値を含むものであると解釈されるべきである。同様に、列挙される数値はすべて、文脈上他の意味に解される場合を除き、中間にある数値を含むものであると解釈されるべきである。

10

【0023】

本明細書で使用される「シータデフェンシン」または「デフェンシン」という用語は、旧世界ザルおよび無尾猿（例えば、アカゲザル、アヌビスヒヒ、フクロテナガザルおよびオランウータン）などの各種の霊長類にみられるデフェンシンタンパク質のデフェンシンファミリーのメンバーを包含し、ここでは、デフェンシン前駆体が転写発現され、翻訳後修飾によりプロセッシングされてデフェンシンとなる。この用語はさらに、類人猿（例えば、ヒト、チンパンジー、ボノボおよびゴリラ）にみられる偽遺伝子を包含し、ここでは、当該技術分野で容易に知ることができる技術により、デフェンシン偽遺伝子の遺伝子修飾を改変し、哺乳動物細胞内でのデフェンシンタンパク質発現を可能にし得る。この用語はほかに、核酸配列および/またはアミノ酸配列の比較ウィンドウに配列相同性または保存されている構造を示すコンピュータモデリング技術あるいは相同なデフェンシンを同定する核酸プローブを用いる選択的ハイブリダイゼーション技術などの当該技術分野で容易に知ることができる技術により、同じ種または異なる種で同定され得るデフェンシンタンパク質を包含する。デフェンシンは、内在する入手源から単離する、自己細胞系もしくは異種細胞系で産生させる、ペプチド合成により作製する、あるいは利用可能な当業者に既知の任意の方法に従って入手することができる。デフェンシンの例としては、RTD-1、RTD-2、RTD-3、RTD-4、RTD-5、RTD-6、BTD-1、BTD-2、BTD-3、BTD-4、BTD-5、BTD-6、BTD-7、BTD-8、BTD-9、BTD-10またはHTDpが挙げられる。

20

30

【0024】

本明細書で使用される「シェダーゼ」は、膜貫通タンパク質の細胞外部分を切断する酵素タンパク質を包含する。具体例としては、特にタンパク質のディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼファミリー（ADAM）、タンパク質のアスパラギン酸プロテアーゼ（BACE）ファミリーのメンバーが挙げられる。シェダーゼであるADAMタンパク質の例としては、ADAM2、ADAM7、ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM11、ADAM12、ADAM15、ADAM17、ADAM18（ADAM27としても知られる）、ADAM19、ADAM20、ADAM21（ADAM31としても知られる）、ADAM22、ADAM23、ADAM28、ADAM29、ADAM30およびADAM33が挙げられる。

40

【0025】

本明細書でデフェンシンに適用される用語「類似体」とは、サイトカイン活性を調節すること、タンパク質分解シェダーゼ活性を阻害すること、細胞表面受容体に関連する酵素機能を変化させることが可能であり、かつ/または抗微生物活性を有するデフェンシンなどのデフェンシンに由来するコア構造を含むポリペプチドおよびペプチドのことである。具体例としては、複数のシステイン残基または実質的にほぼ同じ置換体の間にジスルフィド結合を1つ、2つ、3つ、4つまたはそれ以上含む環状ペプチドが挙げられ、ここ

50

では類似体は、長さが 8 ~ 24 アミノ酸の範囲内であってよく、正味の正電荷をもつ。

【0026】

デフェンシンは、脊椎動物、無脊椎動物のみならず植物にもみられるように進化的に高度に保存され、小型でシステインに富む陽イオン性タンパク質である。このタンパク質は、細菌、真菌ならびに多くのエンベロープ型ウイルスおよび非エンベロープ型ウイルスなどの広範囲の生物体に対する生物活性を有する。デフェンシンは一般に、6個（脊椎動物）~ 8個の保存されたシステイン残基を含めた18 ~ 45個のアミノ酸からなる。好中球、顆粒球などの各種免疫細胞およびほぼすべての上皮細胞は、宿主細胞としてこのペプチドを含み、貪食された微生物または細胞外微生物の殺作用という重要な機能を有する。デフェンシンの多くは微生物の細胞膜と結合することによって機能し、膜に組み込まれると膜に細孔様の欠損部分を形成し、必須のイオンや栄養素を流出させて微生物の完全性を崩壊させる。しかし、本明細書でさらに述べるように、デフェンシンを含めたデフェンシンタンパク質の特定のメンバーは、宿主の細胞免疫機能の調節を介しても作用する。これにはTNF - などのサイトカインに関連する炎症経路が含まれる。

10

【0027】

デフェンシン一般

デフェンシンは、白血球および各種上皮によって産生され、陽イオン性でジスルフィドを3つ含む抗微生物ペプチドである。デフェンシンはさらにデフェンシン、デフェンシン、デフェンシンのサブファミリーに分けられ、これらはペプチドの大きさおよびジスルフィドモチーフの違いによって区別される。ヒトでは、4種類のデフェンシン（HN P - 1 ~ HN P - 4）が好中球から単離されており、また2種類の腸デフェンシン（HD - 5およびHD - 6）が小腸陰窩のパネート細胞によって発現される。このほか、女性泌尿生殖管でHD - 5の発現が検出されている。3種類のヒトデフェンシン（hBD - 1 ~ hBD - 3）が各種器官の上皮細胞種および非上皮細胞種から単離されており、またcDNA解析によって、あるいはヒトゲノム解析から、ほかにも数種類のデフェンシンの発現が推定されている。皮膚、呼吸上皮、泌尿生殖管および各種白血球（すなわち、好中球、単球およびNK細胞）においてデフェンシンが抗微生物エフェクター機能を示すことが多数の証拠から示唆されている。さらにデフェンシンは、自然免疫応答および適応免疫応答に参与する細胞とともに活性化し、このことは、デフェンシンが2系統の免疫内で作用し、2つを結び付けることを示唆している。

20

30

【0028】

大環状デフェンシン

デフェンシンは、76アミノ酸のデフェンシン関連前駆体から生じる2つのノナペプチドの転写後スプライシングによって形成される環状オクタデカペプチドである。ヒトでは、進化の過程でオランウータンが出現した頃に、ペプチド前駆体に早期停止コドンをもたらした突然変異によってデフェンシンが発現されなくなったため、デフェンシンペプチドの発現はみられない。

【0029】

デフェンシンは、デフェンシン前駆体から生じる2つの9アミノ酸配列の頭尾スプライシングを用いて生合成することができる。デフェンシンは最初、アカゲザルの好中球および単球で同定され、のちの系統発生的調査から、他の旧世界ザルおよび2種類の無尾猿（フクロテナガザルおよびオランウータン）でデフェンシン遺伝子の存在が明らかになったが、新世界ザルまたは原猿類ではデフェンシンの存在は未だ報告されていない。ヒト、チンパンジー、ボノボおよびゴリラではデフェンシン偽遺伝子が発現するが、その前駆体mRNAにはシグナル配列内に停止コドンを生じる突然変異が含まれているため、デフェンシン前駆体の翻訳が行われない。アカゲザルデフェンシン - 1（RTD - 1）は、2つのデフェンシン前駆体pr oRTD 1 aおよびpr oRTD 1 bのヘテロ二量体スプライシングから生成する。RTD - 2およびRTD - 3の単離によってpr oRTD 1 aおよびpr oRTD 1 bを含むホモ二量体の除去/連結反応が明らかとなったが、RTD - 1、RTD - 2およびRTD - 3には細菌および真菌に対する強力な殺菌

40

50

活性があり、またこれらが1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)および単純ヘルペスウイルス(HSV)に対する抗ウイルス活性を有することが知られている。

【0030】

本発明者らは、抗菌活性および抗ウイルス活性を有する天然デフェンシンの配列に基づいて、合成デフェンシンの設計を作製した。さらに、デフェンシンが炭疽菌(*Bacillus anthracis*)の致死毒素と結合して不活性化することが報告されている。デフェンシンは、生理的濃度の塩、二価陽イオンおよび血清の存在下では殺菌性がある。これに対し、デフェンシンおよびデフェンシンの抗微生物活性は、塩および二価陽イオンの存在下で著明に低下する。非環状RTD-1は、生理食塩水中で黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)に対して不活性であるが、天然の環状型のペプチドはこのような条件下で強力な殺作用を保持することがわかっている。ここに挙げたデータは、デフェンシンの環状骨格構造が塩に対する非感受性をもたらすと同時に、生理的に適切な条件下で強力な生物学的活性を保持することができる安定な分子をもたらすことを示している。

10

【0031】

デフェンシンの抗微生物活性

典型的なデフェンシンペプチドは、18アミノ酸大環状ペプチドのアカゲザルデフェンシン-1(RTD-1)である(22)。記載されているように、成熟ペプチドは、短縮されたデフェンシン様前駆体から生じる2つの9アミノ酸ペプチドが頭尾型のスプライシングを受け、3つのジスルフィドによって安定化された大環状分子を形成する固有の過程によって生成する(図1)。成熟大環状デフェンシンが生じる生合成経路は新規なものである。アカゲザル(22、23、25)およびアヌビスヒビ(9)ではそれぞれ、3つおよび4つのデフェンシン前駆体が発現する。各前駆体から、すべて2要素の組合せで同一のナノペプチド(ホモ二量体スプライシング)または異なるナノペプチド(ヘテロ二量体スプライシング)と対になった固有のナノペプチドが生じる。これにより、6種類の固有のマカクデフェンシンおよび10種類のヒビデフェンシンの生成が可能となる。本発明者らは、予測されるマカクペプチド全6種類を単離し(23)、ヒビで予測されるペプチドのうち7種類を単離した(9)。

20

【0032】

デフェンシンなどの他のデフェンシンと同じく、デフェンシンはマカクおよびヒビ好中球の一次顆粒内に封入されており、また単球でも発現する(23)。微生物が好中球、単球およびマクロファージによって貪食されると、デフェンシンが食胞に動員されて、殺菌物質として細胞内殺作用に関与する。デフェンシンは、グラム陽性菌、真菌に対してマイクロモル以下の濃度で殺菌性を示し(9、22、25)、HIV-1の細胞内取込みを阻害する(5、6、27、28)。本発明者らは特異的中和抗体を用いて、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)、大腸菌(*E. coli*)およびカンジダ・アルビカンス(*C. albicans*)に対して示されるマカク好中球の顆粒による抗微生物活性の大部分にデフェンシンが関与していることを*in vitro*で示した(23)。さらに、ヒト好中球顆粒抽出物より優れたマカクPMN顆粒抽出物の殺作用活性にデフェンシンが関与していることが示された(23)。ヒトで全身性炎症(例えば、敗血症)が起こると、デフェンシンが直接的な方法および/または偶発的な方法で細胞外間隙に放出される(2、18)。ヒビデフェンシン(22)も菌血症個体の血清中に同じように放出される。さらに、本明細書で詳細に記載するように、細胞外デフェンシンは、げっ歯類からヒトにわたる種で作用する抗炎症機序を介して炎症を調節する能力を有すると思われる。したがって、デフェンシンおよびデフェンシンの構造から得られるペプチドは、免疫機能調節因子の重要なクラスである。

30

40

【0033】

TNF- および炎症

腫瘍壊死因子(「TNF-」、カヘキシンまたはカケクチンとしても知られる)は全身性炎症に関与するサイトカインであり、急性期反応を誘発するサイトカイン群のメン

50

パーである。

【0034】

TNF- は、アポトーシス細胞死の誘発、炎症の促進、腫瘍形成およびウイルス複製の阻害を含めた免疫細胞の調節に重要な役割を演じている。広範囲に及ぶTNF- 活性の作用を考慮すれば、TNF- の発現、産生およびシグナル伝達の調節異常が、特に関節リウマチ、アルツハイマー病、結核、クローン病を含めた様々なヒト疾患に關与することが明らかになっても驚くべきことではない。

【0035】

TNF- シグナル伝達はまず、成熟時に細胞膜内に挿入される26kDa、212アミノ酸長のII型膜貫通タンパク質として生成される。細胞表面では、膜結合TNF- (「プロTNF- 」)は生物学的に活性な状態にあり、ジャクスタクリン細胞間シグナル伝達を介して免疫応答を誘導することができる。しかし、プロTNF- は、そのAla76-Val77アミド結合の部分でメタロプロテイナーゼTNF- 変換酵素(「TACE」、ADAM17としても知られる)によるタンパク質分解切断を受けることがある。この膜に組み込まれた形態から、パラクリンシグナル伝達に極めて重要で、一般にTNF- として知られる可溶性の17kDa細胞外ドメイン(外部ドメイン)が解離する。

10

【0036】

TNF- 活性を標的とする既存の治療戦略は一般に、可溶性かつ/または膜貫通型のTNF- に対する抗体を投与して、受容体の結合または可溶性のハイブリッド融合受容体の形成を阻害し、血中TNF- レベルを低下させることに焦点を当てるものである。この治療法には重要な便益性があるが、患者の1/3前後がいずれの形態の抗TNF- 療法にも奏効しない一方で、免疫原性、感染症、遅延型過敏症型反応ならびに薬剤誘発性の狼瘡および脱髄などの自己免疫疾患を含めた有害作用が複数報告されている。

20

【0037】

TACEおよびシェダーゼ活性

記載したように、TNF- シグナル伝達活性の重要な段階は、「シェディング」として知られる過程のTACEによる触媒作用を受けて、膜結合型のタンパク質が遊離し、可溶性の血中TNF- になることである。TACEは824個のアミノ酸からなる70kDaのタンパク質で、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼからなるADAMタンパク質ファミリー(A Disintegrin And Metalloprotease)に属する。ADAMタンパク質ファミリーのメンバーは、進化的に保存された構造および膜結合プロタンパク質から可溶性の外部ドメインを切断し解離する機能の両方を有する。炎症過程におけるTNF- の強力で極めて重要なメディエーターとしての役割を考慮すれば、TACE阻害剤として機能する環状ペプチドが、現在用いられている抗体または可溶性受容体ベースの組成物などの抗TNF- 剤の極めて重要な代用になると考えられる。

30

【0038】

さらに、複数の異なるタンパク質に及ぶ「シェディング」活性の幅と多様性ならびに多数の異なる病的状態および/または病態に關与することを考慮すれば、TNF- およびTACEは、環状ペプチドの治療活性のいくつか考えられる治療標的のうちのわずか2つにすぎない。TACEおよびその他のADAMファミリー分子が、さらに大きい「シェダーゼ」ファミリーのメンバーのほとんどを構成している。しかし、他のシェダーゼには、アスパラギン酸プロテアーゼ(BACE)タンパク質ファミリーのメンバーが含まれている。シェダーゼ活性の機能は、シェダーゼの種類を越えて、膜貫通タンパク質受容体外部ドメイン(例えば、Her2)の切断を介して、あるいはアゴニストと受容体との結合後にシグナル伝達を活性化することに始まり、遊離したアゴニストにさらに別の受容体(例えば、EGFR)を刺激させることに及ぶ。シグナル伝達機能を可能にし伝播するのに極めて重要なこの役割から、シェダーゼ活性の阻害が、新たな治療法への道を開き、既存の薬物治療の有効性を高める重要な治療戦略となる。例えば、Her2がADAM10

40

50

シェダーゼにより切断されると、恒常的キナーゼ活性を有する Her 2 フラグメントが生じ、増殖細胞にリガンド非依存性の増殖シグナルおよび生存シグナルが伝達される。この過程の有害な作用は、トラスツズマブ (h e r c e p t i n) の投与および A D A M 1 0 シェダーゼ活性の阻害により抑制することができる (3 0 、 3 1) 。その結果、環状ペプチドを用いて、免疫機能に関連する有害なサイトカイン活性を阻害するとともに、癌などの疾患あるいはシェダーゼ機能不全によるその他の疾患および / または病態を治療する機会をさらに広げることができる。内在性のシェダーゼ阻害活性を有する デフェンシンのこの側面は、霊長類進化の過程で デフェンシン発現を喪失したことによりヒト対象にみられる多数の自己免疫、炎症性疾患およびその他の疾患状態を説明するものである。したがって、 デフェンシンおよび各種 デフェンシンの構造から得られる環状ペプチドを、

10

【 0 0 3 9 】

各種実施形態において、本発明は環状ペプチドを提供する。一実施形態では、環状ペプチドはデフェンシン、その類似体または誘導体である。別の実施形態では、環状ペプチドは デフェンシン、 デフェンシン、 デフェンシン、その類似体または誘導体である。別の実施形態では、環状ペプチドは デフェンシン、その類似体または誘導体である。

【 0 0 4 0 】

別の実施形態では、 デフェンシンは霊長類で内因性に発現するものである。別の実施形態では、 デフェンシンはアカゲザルで内因性に発現するものである。別の実施形態では、 デフェンシンは R T D - 1 、 R T D - 2 、 R T D - 3 、 R T D - 4 、 R T D - 5 または R T D - 6 である。別の実施形態では、 デフェンシンはアヌビスヒヒで内因性に発現するものである。別の実施形態では、 デフェンシンは B T D - 1 、 B T D - 2 、 B T D - 3 、 B T D - 4 、 B T D - 5 、 B T D - 6 、 B T D - 7 、 B T D - 8 、 B T D - 9 または B T D - 1 0 である。別の実施形態では、 デフェンシンはヒトで内因性に発現するものである。別の実施形態では、 デフェンシンはヒト デフェンシン偽遺伝子 (H T D p) である。別の実施形態では、 デフェンシンはフクロテナガザルまたはオランウータンで発現するものである。

20

【 0 0 4 1 】

別の実施形態では、 デフェンシンは哺乳動物から単離されるものである。別の実施形態では、 デフェンシンは霊長類から単離されるものである。別の実施形態では、 デフェンシンはヒトから単離されるものである。別の実施形態では、 デフェンシンは、哺乳動物から得られた生物試料から精製されるものである。別の実施形態では、 デフェンシンは、霊長類から得られた生物試料から精製されるものである。別の実施形態では、 デフェンシンは、ヒトから得られた生物試料から精製されるものである。

30

【 0 0 4 2 】

別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが 8 アミノ酸、 9 アミノ酸、 1 0 アミノ酸、 1 1 アミノ酸、 1 2 アミノ酸、 1 3 アミノ酸、 1 4 アミノ酸、 1 5 アミノ酸、 1 6 アミノ酸、 1 7 アミノ酸、 1 8 アミノ酸、 1 9 アミノ酸、 2 0 アミノ酸、 2 1 アミノ酸、 2 2 アミノ酸、 2 3 アミノ酸または 2 4 アミノ酸である。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが 2 4 アミノ酸を上回る。特定の実施形態では、環状ペプチドは、長さが 1 4 アミノ酸である。別の実施形態では、環状ペプチドは、ジスルフィド結合を 1 つ形成する少なくとも 2 つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、環状ペプチドは、ジスルフィド結合を 2 つ形成する 4 つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、環状ペプチドは、ジスルフィド結合を 3 つ形成する 6 つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、環状ペプチドは合成アミノ酸を含む。別の実施形態では、環状ペプチドは正味の正電荷を有する。別の実施形態では、環状ペプチドは、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 、配列番号 6 および / または配列番号 7 と約 2 0 % 、 2 5 % 、 3 0 % 、 3 5 % 、 4 0 % 、 4 5 % 、 5 0 % 、 5 5 % 、 6 0 % 、 6 5 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % またはそれ以上のパーセント未満の同一性を有するポリヌクレオチドによってコード

40

50

され得る。当業者は、参照配列と第二のポリヌクレオチド配列との間に比較ウィンドウを設定してパーセント同一性の程度を確認することを含めた、当該技術分野で公知の方法に従ってパーセント同一性を確認することができる。

【0043】

別の実施形態では、環状ペプチドは炎症を調節する。別の実施形態では、環状ペプチドはサイトカインおよび/またはケモカインの活性を調節する。別の実施形態では、環状ペプチドはTNF- α の活性を調節する。別の実施形態では、環状ペプチドは、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼファミリーのメンバーとの競合阻害を介してTNF- α の活性を調節する。別の実施形態では、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼファミリーのメンバーはシェダーゼである。別の実施形態では、シェダーゼはTACEである。別の実施形態では、シェダーゼはADAM10である。別の実施形態では、環状ペプチドはタンパク質分解酵素活性を調節することができる。別の実施形態では、環状ペプチドは抗菌殺作用が可能である。

10

【0044】

各種実施形態において、本発明はさらに、環状ペプチドを用いて炎症性疾患および/または病態を治療する方法を提供し、この方法は、一定量の環状ペプチドを準備する段階と、炎症性疾患および/または病態の治療を必要とする対象にその量の環状ペプチドを投与する段階とを含み、環状ペプチドは炎症を調節することにより対象を治療することができる。別の実施形態では、環状ペプチドはデフェンシン、その類似体または誘導体である。別の実施形態では、デフェンシンはRTD-1、RTD-2、RTD-3、RTD-4、RTD-5、RTD-6、RTD-7、RTD-8、RTD-9またはRTD-10である。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸または24アミノ酸である。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが24アミノ酸を上回る。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが14アミノ酸である。別の実施形態では、環状ペプチドは、ジスルフィド結合を1つ形成する少なくとも2つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、環状ペプチドは、2つ以上のジスルフィド結合を形成する少なくとも4つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、投与する環状ペプチドの量は環状ペプチドの治療有効量である。別の実施形態では、対象は哺乳動物である。別の実施形態では、対象はヒトである。

20

30

【0045】

各種実施形態において、炎症性疾患および/または病態は、急性もしくは慢性炎症または自己免疫疾患である。別の実施形態では、炎症性疾患および/または病態は、サイトカインまたはケモカインの活性に関連するものである。別の実施形態では、炎症性疾患および/または病態は、TNF- α の活性に関連するものである。別の実施形態では、炎症性疾患および/または病態は関節リウマチ、強直性脊椎炎、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、自閉症腸炎、乾癬、乾癬性関節炎、クローン病、ベーチェット病、狼瘡、化膿性汗腺炎、難治性喘息、大腸炎、皮膚炎、憩室炎、肝炎、腎炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化症、ブドウ膜炎およびアレルギーである。

40

【0046】

各種実施形態において、本発明はさらに、環状ペプチドを用いて炎症性疾患および/または病態の治療の有効性を高める方法をさらに提供し、この方法は、一定量の環状ペプチドを準備する段階と、炎症性疾患および/または病態の治療を受けている対象にその量の環状ペプチドを投与する段階とを含み、環状ペプチドは、炎症性疾患および/または病態の治療の有効性を高めることにより治療の有効性を高めることができる。別の実施形態では、環状ペプチドを炎症性疾患および/または病態を治療することができる組成物と同時に投与する。別の実施形態では、環状ペプチドを、炎症性疾患および/または病態を治療

50

することができる組成物の投与前または投与後に逐次的に投与する。別の実施形態では、対象は哺乳動物である。別の実施形態では、対象はヒトである。

【0047】

各種実施形態において、本発明はさらに、環状ペプチドを用いて対象の疾患および/または病態を治療する方法をさらに提供する。別の実施形態では、疾患および/または病態は癌または神経変性疾患である。各種実施形態において、本発明はさらに、環状ペプチドを用いて疾患および/または病態の治療の有効性を高める方法を提供する。別の実施形態では、環状ペプチドを疾患および/または病態を治療することができる組成物と同時に投与する。別の実施形態では、環状ペプチドを、疾患および/または病態を治療することができる組成物の投与前または投与後に逐次的に投与する。好ましい実施形態では、対象は哺乳動物であり、特に好ましい実施形態では、対象はヒトである。

10

【0048】

各種実施形態において、本発明はさらに医薬組成物を提供する。別の実施形態では、医薬組成物は、環状ペプチドと薬学的に許容される担体とを含む。別の実施形態では、環状ペプチドはデフェンシン、その類似体または誘導体である。別の実施形態では、デフェンシンはRTD-1、RTD-2、RTD-3、RTD-4、RTD-5、RTD-6、BTD-1、BTD-2、BTD-5、BTD-4、BTD-5、BTD-6、BTD-7、BTD-8、BTD-9またはBTD-10である。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸または24アミノ酸である。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが14アミノ酸である。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが24アミノ酸を上回る。別の実施形態では、環状ペプチドは、ジスルフィド結合1つ形成する少なくとも2つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、環状ペプチドは、2つ以上のジスルフィド結合を形成する少なくとも4つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、医薬組成物中の環状ペプチドは治療有効量のサイクリンペプチドを含む。別の実施形態では、医薬組成物は1つ以上の環状ペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む。

20

【0049】

各種実施形態において、本発明はさらに、環状ペプチドの製造方法を提供する。別の実施形態では、製造方法は、環状ペプチドをコードするポリヌクレオチドを1つ以上準備する段階と、1つ以上のポリヌクレオチドを宿主細胞内で発現させる段階と、宿主細胞から環状ペプチドを抽出する段階とを含む。別の実施形態では、製造方法は、1つ以上のポリヌクレオチドを宿主細胞内で発現させる段階と、宿主細胞から環状ペプチドを抽出する段階とを含む。別の実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは配列番号1、配列番号2および/または配列番号3を含む。別の実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチドは配列番号4、配列番号5、配列番号6および/または配列番号7を含む。

30

【0050】

別の実施形態では、環状ペプチドはデフェンシン、その類似体または誘導体である。別の実施形態では、デフェンシンはRTD-1、RTD-2、RTD-3、RTD-4、RTD-5、RTD-6、BTD-1、BTD-2、BTD-3、BTD-4、BTD-5、BTD-6、BTD-7、BTD-8、BTD-9またはBTD-10である。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸または24アミノ酸である。別の実施形態では、環状ペプチドは、長さが14アミノ酸である。別の実施形態では、ジスルフィド結合1つ形成する少なくとも2つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、2つ以上のジスルフィド結合を形成する少なくとも4つのシステイン残基を含む。別の実施形態では、製造方法は、液相合成または固相合成を用いるペプチド合成の段階を含む。別の実施形態では、固相合成はFmoc

40

50

合成またはBOC合成である。

【0051】

本明細書で企図される組成物の製造は、例えば発現ベクターの使用を含めた任意の適切な方法で実施することができる。当業者には、適切な発現ベクターを選択することが可能であり、また選択肢が多数存在することが認識されるであろう。このようなベクターの多くはウイルスプロモーターを用いるものである。例えば細菌、酵母、昆虫細胞および植物を含めた細胞系の選択肢の多くが、宿主細胞に適するものである。以下、本発明の実施形態について

【実施例】

【0052】

実施例1 多面的な デフェンシンに固有の特性および抗炎症性

デフェンシンは、大腸菌 (*E. coli*) 細胞の取込みを媒介する細胞外膜に小孔を形成することによってその細胞を死滅させる (24)。この研究では、本発明者らは、デフェンシンが多くの デフェンシンおよび デフェンシンとは異なり、宿主細胞に対して非毒性であり (24)、各種経路でマウスに投与することができる (29) という注目すべき事実を発見した。この点に関して、マウスは少なくとも用量 80 mg / kg の3種類の異なる デフェンシンの i.v. 投与を容易に許容する。さらに本発明者らは、成体チンパンジー2個体に i.v. 用量を増加させて (最大 3 mg / kg) RTD-1 を投与した。すべての注射の後、いずれの項目にも臨床毒性は認められず、また臨床化学検査値および血液学検査値がすべて正常範囲内であった。いずれの動物種も RTD-1 に対する抗体を産生しなかったことは、様々な哺乳動物種に対する毒性および免疫原性の著明な欠如を示している。ここに挙げたデータおよびその他のデータに基づき、盲腸結紮穿孔 (CLP) により重度の敗血症を誘発したマウスモデルを用いて、RTD-1 の有効性を試験した (12)。図2に示されるように、CLP手術の4時間後または24時間後にペプチドを投与した場合、RTD-1 (5 mg / kg) の単回注射によりBALB/cマウスの死亡率が著明に減少した (第4日および第7日で $P < 0.01$)。第7日に生存していた個体は、第15日に屠殺されるまで臨床的に正常であった。デフェンシンのCLP敗血症に対するこの治療効果は再現性が高いものであった (N = 5の実験)。しかし、多菌性敗血症のマイクロビームがきわめて大きいことから、デフェンシンのこの有効性の高さは、このモデルでのRTD-1の有効性が主として抗菌作用によって媒介されたものではないことを示唆していた。むしろ、示された治療効果の高さは、さらに抗炎症機序により媒介されると考えられた。この可能性を検証するため、本発明者らは新たな実験を実施し、CLPマウスをRTD-1で治療したところ、TNF- α 、IL-6およびMIFを含めた多種多様な血清炎症性サイトカインの著明な減少がみられた。

【0053】

ほかの研究では、天然のAMP (10、15) または設計された (11) AMP が敗血症のげっ歯類モデルに有効であることが示されている。いずれの場合にも、明らかな防御機序は、ペプチドが細菌LPSと結合して、宿主細胞のタンパク質 (LPS結合タンパク質) または受容体 (TLR-4、CD14) との相互作用を回避するというものであった。この点に関して、分析したAMPのほぼすべてがLPSと結合して中和することが示されたが、このことは、これが抗敗血症活性を媒介する主要な機序であるという結論を裏付けるものである (19)。

【0054】

しかし、デフェンシンはLPSを直接中和する効果が比較的 low、内毒素を中和する活性がポリミキシンBより100倍低い。むしろ、以下で述べるように、デフェンシンが、宿主細胞との相互作用によって炎症を調節する主要な手段を含めた複数の機能を有することが研究により明らかになっている。この発見は、SARSコロナウイルス (SARS-CoV) 間質性肺炎のマウスモデルを用いてRTD-1の有効性を評価したこれまでの研究結果と一致する (29)。この研究では、本発明者らは、RTD-1の鼻腔内投与がウイルス感染マウスの死亡を防ぐのに100%有効であることを発見した。RTD-1

10

20

30

40

50

がSARS-CoVに対して殺ウイルス作用を示さなかったことは重要である。しかし、ペプチド投与により肺の炎症および数種類の炎症誘発性サイトカインの発現が減少したことから、治療効果がRTD-1の抗炎症性によって媒介されることが示唆された。特定の理論に束縛されるものではないが、デフェンシンが炎症誘発性の刺激に対する宿主の応答を調節するという本発明者らの考えは、RTD-1がラットのプリスタン誘発性関節炎（図9；以下で述べる）およびコラーゲン誘導性関節炎の治療に有効であることを示すさらなる実験によって確認された。

【0055】

実施例2 RTD-1の活性は、抗微生物作用ではなく宿主細胞の相互作用によって媒介される。

典型的なデフェンシンRTD-1が、抗微生物作用を介してではなく、宿主細胞との相互作用によってその抗炎症効果を発揮することが、複数のデータにより示されている（29）。これらの知見をもとに、大腸菌（*E. coli*）または黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）で刺激したヒト全血によるTNF- α 産生に及ぼすRTDの効果の評価するさらなる実験を実施した。図4（BおよびC）に示した代表的な実験では、RTD1~5（図4A）が大腸菌（*E. coli*）によって誘発されるTNF- α 放出を阻害することが示されている；異なるデフェンシンの間にも阻害能力の著しい差がみられることに留意されたい。黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）を用いた実験でもほぼ同じ結果が得られた。対照実験では、本発明者らは、デフェンシンがELISA標準曲線を変化させないこと、またイムノアッセイでは活性な三量体TNF- α のみが検出されることを示す結果に基づき、デフェンシンは他の多くのデフェンシンとは異なり、TNF- α タンパク質と直接相互作用しないということを見出した。ここに挙げた実験およびその他の実験の結果は、RTD-1のCLP敗血症における防御作用（図3）が、抗微生物作用ではなく免疫調節活性によるものであることを示唆していた。この結果を受けて、本発明者らは、10 μ g/mlのRTD-1を同時に加えて、あるいは加えずに、ヒト末梢血白血球（PBL）をTLR1~9のアゴニストで4時間刺激した。図5に示されるように、PBLとRTD-1を共インキュベートしたところ、TLR2、4、5および8のアゴニストによって誘発されるTNF- α 放出が著明に減少した。さらに、RTD-1は、各アゴニストによって刺激されるIL-1 α およびIL-6の放出も阻害し、IL-8は、TLR2アゴニストの存在下を除くすべての誘発において強力に阻害された。RTD-1は、無刺激細胞には実質的にいかなる効果も示さなかった（図5、左上のパネル）。RTD-1治療のMCP-1レベルに対する効果には差がみられた。本発明者らは、マウスSARS間質性肺炎でRTD-1が肺MCP-1レベルを著明に減少させたことから（29）、このケモカインを分析に含めた。これは、ウイルスssRNAで刺激したPBLに及ぼすRTD-1の効果と一致している（図5）。最後に、本発明者らはさらに、RTD-1が、*ex vivo*でエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）により刺激したヒトPBMCによるIL-17Aの発現を用量依存性に抑制する（85%を上回る減少）ことを見出した。

【0056】

実施例3 デフェンシンによるTACEの阻害

ここに挙げた結果は、デフェンシンが細菌（図4）、各種TLRアゴニスト（図5）および動物で測定されたもの（上を参照）によって誘発されたTNF- α の阻害を媒介することを示していることから、TNF- α 変換酵素の活性がデフェンシンによって打ち消されるといふ一つの作用機序が考えられた。このTNF- α 変換酵素（「TACE」、ADAM（*a* *d* *i* *s* *i* *n* *t* *e* *g* *r* *i* *n* *a* *n* *d* *m* *e* *t* *a* *l* *l* *o* *p* *r* *o* *t* *e* *i* *n* *a* *s* *e*）ファミリー）のメンバー、ADAM17としても知られる）は、膜結合TNF- α の放出に関与するシタダーゼである。驚くべきことに、本発明者らは、RTD-1が、IC50約0.1 μ g/ml（48 nM）の強力な組換えTACE（rTACE）の阻害剤であることを見出した。注目すべきことは、ヒトデフェンシン（HNP-2、HNP-4）がいずれもrTACEを阻害しないという点で（図6A）、デフェンシンの活性がデフ

10

20

30

40

50

エンシンのなかでも独特なものであったということである。天然のデフェンシン(RTD 1~5; 図4Aの構造)の相対的阻害活性を試験したところ、IC₅₀値に約10倍の範囲にわたる差がみられた(図6B)。注目すべきことは、RTD 1~5によるTACE阻害の序列とヒト血液中のペプチドによるTNF-阻害との間に強い相関がみられるということである(図4C)。RTD-1によるTACE阻害がTACEとの15分間のブレインキュベーションによって増強されなかったという結果は、迅速な結合および競合阻害を示唆するものである。このことは酵素反応速度データの二重逆数プロット解析によって確認され(図6C)、RTD-1がTACEの偽基質として作用することを示している。RTD-1の開鎖類似体(S-7; 図6D)をTACE阻害について試験し、活性がRTD-1の20%未満であることがわかったが、このことは、効果的なTACE阻害に環状構造が必要であることを示している(図6E)。

【0057】

細胞ベースのアッセイでTACEの阻害をさらに確認した。Alvarez-Iglesiasら(1)によって記載されているアッセイを修正して用いて、RTD-1が休止THP-1細胞およびLPS刺激THP-1細胞のTACE発現を阻害することが示された(図6F)。細胞ベースのアッセイで得られたRTD-1のIC₅₀は約15 μg/ml(7.4 μM)であった。この値は、THP-1細胞のTACE遮断に関する研究での小分子TACE阻害剤GM6001のIC₅₀(5.5 ± 3 μM)に決して劣るものではない。

【0058】

実施例4 デフェンシンはADAM10を阻害する

各種ADAMが、膜に固定された増殖因子、サイトカインおよび受容体を解離する調節シグナルに関係があるとされている(3)。ADAMは、炎症および癌の調節を含めた多数の重要な生物学的過程に関与することから、ADAM阻害剤の同定は研究の盛んな分野となっている。本発明者らは、天然のデフェンシンRTD 1~3が、TACEの阻害で観察されたものとほぼ同じIC₅₀(図6を参照)でADAM10を阻害する(図7)ことを確認した。したがって、デフェンシンは少なくとも2種類のADAMのメタロプロテアーゼ阻害剤である。

【0059】

実施例5 ミニ デフェンシンによる抗TNF- およびTACE阻害

天然デフェンシンおよび修飾デフェンシンの構造活性解析から、これらのペプチドの抗炎症作用を媒介すると予測される特定の配列特性が示唆された。一例をあげると、天然デフェンシンの抗炎症作用に重要であると考えられる特性をもつよう3種類のテトラデカペプチド(ミニデフェンシン)を設計した。これらを図8Aに示すペプチドの配列中に組み込んだ。各ペプチドをマウスCLP敗血症に対する有効性について評価した。図8Bに示されるように、ミニデフェンシン3種類ともPBS偽治療よりマウスの致死率を低下させた。本発明者らはさらに、刺激したヒト血液からのTNF-放出に及ぼす効果(図8C)およびTACEに対する阻害活性(図8D)について各ミニデフェンシンを評価した。図8のデータに示されるように、ミニデフェンシンは、CLPアッセイ(図3と比較)、TNF-阻害アッセイ(図8C)またはTACE阻害アッセイ(図8D)でRTD-1とほぼ同じか、これを上回る活性を示した。

【0060】

成熟デフェンシンペプチドRTD-1は、デフェンシンおよびデフェンシンと同様に3つのジスルフィドによって安定化された2本鎖のベータシートである。しかし、RTD-1ジスルフィド配列の平行配向により、その短軸付近には相当な柔軟性がみられる。デフェンシンおよびデフェンシンとは異なり、RTD-1には両親媒性のトポロジーがなく、いかなる理論にも束縛されるものではないが、このようなおよびこれと同様の構造の差により、デフェンシンに固有の免疫調節能力が説明され得る。

【0061】

実施例6 ラットプリスタン誘発性関節炎(PIA)におけるデフェンシンの効果

50

本発明者らは、*in vivo*または*ex vivo*でのデフェンシンによるTNF- α の遮断がこのペプチドの抗炎症作用の中心的な役割を担っているとすれば、TNF- α によって進むことが知られている疾患の経過を調節するはずであると考えた。本発明者らは次に、確立されたPIAを有するラットに及ぼすRTD-1の効果を試験した。代表的な実験(N=3)では、Vingsboら(26)に記載されている通りに、第0日にプリスタン0.3mlを成体Dark Agouti(DA; OLAHsd系統)ラット(N=21)に皮下注射した。臨床疾患の最初の徴候がみられた時点(第14~21日; 肉眼的病理スケールに基づく参考文献(4))で、ラットを生理食塩水群(N=10)またはRTD-1治療群(N=11)に交互に割り付けた。関節炎の重症度(3人の観察者によって最大36日間、毎日盲検的に採点)が以前のゼロに戻るまで(生理食塩水群ではN=1; RTD-1群ではN=8)最大14日間、毎日、尾静脈注射によって生理食塩水(0.2~0.25ml)またはRTD-1(0.2~0.25ml生理食塩水中5mg/kg)の盲検投与を実施した。第7日からRTD-1治療個体に関節病理の統計的に有意な(*= 対照側Student T検定によりp<0.05)減少がみられた。このモデルではこのほか、同じRTD-1の用量および製剤の皮下注射によって効果が示された。治療中止後少なくとも45日間、疾患再発の証拠はみられなかった。

10

【0062】

実施例7 デフェンシンは安定性が高い

デフェンシン RTD-1をヒト血漿、ヒト血清中50 μ g/mlまたはヒト血清アルブミン中50mg/ml、室温で72時間インキュベートした。定量HPLC分析を実施したところ、各試験条件下でペプチドの95%超が変化しなかった。さらにデフェンシンは、低pH(約pH2.5)または中性pH(pH7.4)条件下での長期間保管に対しても安定である。

20

【0063】

総括すると、デフェンシンには、炎症誘発性のTACEなどのプロテアーゼおよびその他の金属酵素の遮断によって媒介される抗炎症特性がある。デフェンシンは、感染性の炎症性疾患および非感染性の炎症性疾患の動物モデルにおいて有効であり、全身投与時に高い耐容性が認められ、非免疫原性である。さらに、他の抗炎症薬とは異なり、デフェンシンは免疫抑制性ではない。

30

【0064】

薬物組成物、用量、剤形および投与経路

本発明による組成物は経口経路、非経口経路、吸入による経路、局所経路、直腸内経路、経鼻経路または埋め込みリザーバーを介した経路を含めた各種経路を用いて投与することができ、ここでは、本明細書で使用される「非経口」という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、髄腔内、肝内、病巣内および頭蓋内への各投与(通常は注射または注入)を包含する。好ましくは、組成物を経口的に、皮下に、腹腔内にまたは静脈内に投与する。

【0065】

例えば、企図される化合物の無菌注射用形態は、水溶液剤または油性懸濁剤であり得る。この懸濁剤は当該技術分野で公知の技術に従い、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いて製剤化され得る。また無菌注射用製剤は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒を用いた無菌注射用液または無菌注射用懸濁液、例えば、1,3-ブタンジオールの溶液として調製され得る。許容される賦形剤および溶媒のなかでも特に企図される液体としては、水、リンガー溶液および等張塩化ナトリウム溶液が挙げられる。さらに、共溶媒または(例えば、天然または合成のモノグリセリドまたはジグリセリド)として無菌の不揮発性油を用いてもよい。このほか脂肪酸を用いてもよく、適切な脂肪酸としては、オレイン酸およびそのグリセリド誘導体、オリーブ油、ヒマシ油、特にこれらをポリオキシエチル化したものが挙げられる。このような油性液剤または懸濁剤は、長鎖アルコール希釈剤または分散剤をさらに含有し得る。

40

【0066】

50

別の例では、企図される化合物をカプセル剤、錠剤、水性懸濁剤または液剤を含めた任意の経口的に許容される剤形で経口投与し得る。経口使用の錠剤の場合、あらゆる薬学的に許容される担体（例えば、ラクトース、コーンスターチなど）が適切であると考えられる。同様に、各種滑沢剤を添加し得る（例えば、ステアリン酸マグネシウム）。カプセル形態の経口投与には、有用な希釈剤としてラクトースおよび乾燥コーンスターチが挙げられる。経口使用に水性懸濁剤が必要な場合、有効成分を乳化剤および懸濁化剤と組み合わせる。このほか必要に応じて、特定の甘味剤、香味剤または着色剤を添加してもよい。

【0067】

特に治療標的が眼球、皮膚、下部腸管または外科的介入時に露出する領域の疾患を含めた、局所適用によって容易に到達できる領域または器官を含む場合、本発明の医薬組成物を局所投与し得ることが考慮される。当該技術分野で公知の局所製剤が多数存在し、このような製剤はすべて、本明細書での使用に適するものであると考えられる。

10

【0068】

局所適用では、1種類以上の担体中に懸濁または溶解した有効成分を含有する適切な軟膏として、企図される組成物を製剤化し得る。本発明の化合物を局所投与するための担体としては、鉱油、液体ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化剤および水が挙げられる。あるいは、1つ以上の薬学的に許容される担体に懸濁または溶解した有効成分を含有する適切なローションまたはクリームとして、医薬組成物を製剤化することができる。適切な担体としては、鉱油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテ

20

【0069】

本発明による医薬組成物はほかにも、経鼻エアロゾルまたは吸入によって投与することができる。このような組成物は医薬製剤の分野で周知の技術に従って調製され、ベンジルアルコールもしくはその他の適切な保存剤、バイオアベイラビリティを増大させる吸収促進剤、フッ化炭素および/またはその他の従来の可溶化剤もしくは分散剤を用いて生理食塩水溶液として調製され得る。

【0070】

組成物中の企図される化合物の量については、具体的な量は通常、具体的な製剤、有効成分および所望の目的によって決まることを認識するべきである。したがって、企図される化合物の量に大きな差がみられることを認識するべきである。しかし一般的には、化合物は、治療効果をもたらす、かつ/あるいは *in vitro* および/または *in vivo* で可視化するのに有効な最小量で存在するのが好ましい。

30

【0071】

したがって、ほとんどの好適な液体製剤では、企図される化合物が約 20 mg/ml ~ 約 30 mg/ml の量、より一般的には典型的には約 24 mg/ml ~ 約 26 mg/ml の量、最も一般的には約 25 mg/ml の量で存在する。製剤が固体またはゲルである場合、企図される化合物が約 1 mg/g ~ 約 100 mg/g の量で存在する。投与単位については一般に、所望の治療効果を得るのに有効な用量あるいは *in vitro* および/または *in vivo* で可視化するのに有効な用量で、企図される化合物を投与することが考慮される。

40

【0072】

ヒトおよび非ヒト哺乳動物では、企図される化合物の適切な用量が約 1 ~ 10 mg/kg の範囲内に収まるべきである。

【0073】

炎症性疾患の治療および/または予防には一般に、本発明による化合物または組成物を薬学的に許容される方法で製剤化することが好ましい。適切な製剤としては、好ましくは前眼房および/または後眼房内に注射するための液体製剤または側頭骨の半規管、蝸牛および/または骨迷路内に注射するための液体製剤が挙げられる。上記の代わりにまたは上

50

記に加えて、担体が治療有効量の化合物または組成物を含むよう、また担体が化合物または組成物を制御され予め定められた様式で放出できるよう植え込み可能な担体（例えば、生分解性／溶解性のもの）を製剤化してもよい。適切な担体のなかでも、放出は経時的なものおよび／または１種類以上の波長の光を照射されることによって開始されるものであり得る。

【 0 0 7 4 】

本発明による医薬組成物が少なくとも１つの企図される化合物（例えば、RTD-1-27、RTD1-28およびRTD-1-29のうちの一つ以上）を薬学的に許容される担体とともに含むことが考慮される。具体的な使用に応じて、製剤、経路および／または投与スケジュールが大きく異なることが認識されるべきであり、また特定の製剤、経路および／または投与が本発明を限定するものではないことが一般に考慮される。

10

【 0 0 7 5 】

しかし、医薬組成物の投与量には大きな差がみられ、具体的な用量が、少なくとも部分的には（a）所望の治療反応を得るのに有効な有効成分の量、（b）企図される化合物の製剤、（c）投与経路、（d）具体的な化合物の薬物動態特性および薬力学特性ならびに（e）治療する患者の年齢、性別、体重、全般的健康状態およびこれまでの既往歴を含めたその他の因子によって決まることを理解するべきである。当業者であれば必要な有効量の医薬組成物を容易に決定し処方することができ、例えば、医師であれば、所望の治療効果に通常必要とされるレベルより低いレベルで患者に投与を開始し、その後、所望の効果が得られるまで用量を増加させるであろう。

20

【 0 0 7 6 】

一般に、本発明による化合物は非経口使用のための製剤として調製され得るものであり、特に企図される非経口製剤が注射用の液体製剤であることが考慮される。したがって、適切な製剤は一般に、薬学的に許容される溶媒（例えば、無菌の等張水溶液または非水溶液）を含み、分散液、懸濁液または乳液として調製され得るものである。あるいは、非経口製剤を、企図される化合物と他の成分とを含み、使用前に液体製品に再構成され得るキットとして提供してもよい。さらなる企図される態様では、本発明による化合物を、宿主細胞内で化合物が発現できる方法で組換え核酸として投与してもよい。例えば、アデノウイルスベクター、脂質もしくはリポソームを用いるトランスフェクション、エレクトロポレーションまたはその他の当該技術分野で周知の方法を介して、組換え核酸を標的組織に投与することができる。

30

【 0 0 7 7 】

医薬組成物に使用し得る適切な水性担体および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、植物油ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。例えば、レシチンなどのコーティング物質を使用することにより、分散液剤の場合は必要な粒子径を維持することにより、また界面活性剤を使用することにより、適切な流動性を維持することができる。最も一般的には、適切な液体は無菌であり、有効成分の安定性および注射部位またはその他の使用に適したpHが維持されるよう緩衝されている。

40

【 0 0 7 8 】

企図される化合物を薬学的に許容される塩（１つまたは複数）として調製することができる、このような塩としては特に、企図される化合物中に存在し得る酸性基または塩基性基の塩が挙げられる。例えば、本来塩基性の企図される化合物は、各種無機酸および有機酸と多種多様な塩を形成し得る。適切な塩からは薬理的に許容される陰イオンが生じ、このような陰イオンとしては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸、硫酸、硫酸水素、リン酸、酸性リン酸、イソニコチン酸、酢酸、乳酸、サリチル酸、クエン酸、酸クエン酸、酒石酸、パントテン酸、酒石酸水素、アスコルビン酸、コハク酸、マレイン酸、ゲンチジン酸、フマル酸、グルコン酸、グルカロン酸イオン（glucuronate）、サッカリン酸、ギ酸、安息香酸、グルタミン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンス

50

ルホン酸、p-トルエンスルホン酸およびパモ酸 [1, 1' -メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトアート)] の各陰イオンが挙げられる。同様に、本来酸性の化合物は、各種薬理的に許容される陽イオンと塩基性塩を形成することができ、特に適切な陽イオンとしては、アルカリ金属またはアルカリ土類金属のイオン（例えば、ナトリウム陽イオンおよびカリウム陽イオン）が挙げられる。

【0079】

さらに、本発明による化合物がプロドラッグとしても調製され得ることが特に考慮され、このようなプロドラッグが標的器官または標的細胞での薬物（またはプロドラッグの代謝産物）の濃度を増大させる限り、プロドラッグのあらゆる既知の様式およびタイプが本明細書での使用に適するものであると考えられる。

10

【0080】

例えば、化合物が遊離のアミノ基、アミド基、ヒドロキシ基、チオ基またはカルボキシル基が有する場合、このような基を用いて、薬物をプロドラッグに変換する部分と共有結合させるか、放出可能なように結合させることが可能であることが考慮される。したがって、プロドラッグとしては特に、企図される化合物が別の切断可能な部分とエステル結合、アミド結合またはジスルフィド結合を形成するプロドラッグが挙げられる。このような部分は薬物の器官または細胞に特異的な送達を補助し得るものであり、例えば、カルボキシル基を誘導体化し、エーテル基、アミン基および/またはカルボン酸基を含み得るアミドエステルまたはアルキルエステルを形成することができる。D. Fieischer, R. Bong, B. H. Stewart, *Advanced Drug Delivery Reviews* (1996) 19, 115に概説されている通りに、ヘミスクシナート、リン酸エステル、ジメチルアミノアセタートおよびホスホリルオキシメチルオキシカルボニルを用いて遊離ヒドロキシ基を誘導体化することができる。ヒドロキシ基の炭酸エステルプロドラッグおよび硫酸エステルと同様に、ヒドロキシ基およびアミノ基のカルバミン酸エステルプロドラッグも挙げられる。アシル基がアルキルエステル（任意選択で置換されている）であり得る、あるいはアシル基がアミノ酸エステルである（アシルオキシ）メチルおよび（アシルオキシ）エチルエーテルとしてのヒドロキシ基の誘導体化も考慮される（このタイプのプロドラッグはR. P. Robinsonら, *J. Medicinal Chemistry* (1996) 39: p. 10に記載されている）。

20

【0081】

このほかさらに、企図される化合物が細胞内または細胞外区画で代謝され、このような代謝産物が同じ薬理効果を示すこともあれば、異なる薬理効果を示すこともあることを認識するべきである。例えば、企図される化合物がリン酸化されて、親化合物より活性が高くなることがある。逆に、還元またはグリコシル化が企図される化合物のバイオアベイラビリティに影響を及ぼすこともある。したがって、企図される化合物には、上記の化合物ほかにその代謝産物も含まれる。

30

【0082】

諸記

上記の各種方法および技術は、本発明に関連する方法を実施する方法を多数提供するものである。当然のことながら、記載されている目的または利点が、本明細書に記載の任意の特定の実施形態に従えば必ずしも達成されるわけではないということを理解するべきである。したがって、例えば、本明細書で教示または示唆され得る他の目的または利点の達成を必ずしも必要とすることなく、本明細書で教示されるような1つの利点または一群の利点を達成する、または最大限に活用する方法でこれらの方法を実施することができることを当業者は認識するであろう。本明細書では、様々な有利な代替物および不利な代替物が挙げられている。好ましい実施形態にも、1つの、別のまたは複数の有利な特徴を特に含むものがあり、1つの、別のまたは複数の不利な特徴を特に除外するものがあり、さらには1つの、別のまたは複数の有利な特徴を含むことによって既存の不利な特徴を軽減するものもあることを理解するべきである。

40

【0083】

50

さらに、当業者は様々な実施形態の各種特徴の適用性を認識するであろう。同様に、上述の各種要素、特徴および段階ならびにこのような要素、特徴または段階それぞれの他の既知の同等物は、当業者が組み合わせ適合させて、本明細書に記載の原理に従った方法を実施することが可能なものがある。各種要素、特徴および段階のうち、多様な実施形態において特に含まれるものもあれば、特に除外されるものもある。

【0084】

本発明は、特定の実施形態および実施例に照らして開示されているが、当業者には、本発明の実施形態が、具体的に開示されている実施形態にとどまらず他の代替的な実施形態および/または使用ならびにその修正形態および均等物に及ぶことが理解されよう。

【0085】

本発明の実施形態には変形形態および代替要素が多数開示されている。当業者にはさらにほかの変形形態および代替要素が明らかになるであろう。このような変形形態には、特に限定されないが、デフェンシンを含めた環状ペプチドの入手源、デフェンシン、その類似体および誘導体を調製する、単離するまたは精製する方法、デフェンシン、その類似体および誘導体を用いて各種疾患および/または病態を治療する方法、そこで使用する技術および溶液の組成と使用ならびに本明細書の教示によって作製される製品の特定の使用が含まれる。各種実施形態には、このような変形形態または要素のいずれかが特に含まれることも、除外されることもある。

【0086】

いくつかの実施形態では、特定の実施形態を説明し特許請求するのに使用され、成分量、濃度、反応条件のような特性などを表す数値が、「約」という用語によって修飾される場合があることを理解するべきである。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書および添付の特許請求の範囲に記載されている数値パラメータは、特定の実施形態によって得ようとする所望の特性によって大きく異なり得る近似値である。いくつかの実施形態では、報告される有効数字の桁数を考慮し、通常の上捨五入法を適用することによって数値パラメータを解釈するべきである。いくつかの実施形態の広い範囲を記載する数値の範囲およびパラメータは近似値であるが、特定の実施例に記載されている数値は、実行可能な程度に正確に報告されている。いくつかの実施形態では示される数値には、個々の試験測定結果にみられる標準偏差から必然的に生じる一定の誤差が含まれ得る。

【0087】

本明細書の記述および後の請求項全体で使用される場合、「a」、「an」および「the」の意味には、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数形の指示対象が含まれる。同様に、本明細書の記述で使用される場合、「in」の意味には、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、「in」と「on」が含まれる。

【0088】

本明細書における数値の範囲の記載は、単にその範囲内にある個々の数値を個別に明記する簡便な方法として用いることを意図したものである。本明細書で特に明示されない限り、個々の数値については、それが本明細書に個々に記載された場合と同様に本明細書に組み込まれるものとする。本明細書に記載の方法はすべて、本明細書に特に明示されない限り、あるいは文脈上明らかに否定されない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書の特定の実施形態について記載されるあらゆる実施例または例示語（例えば、「~などの」）の使用は、単に本発明の理解を容易にすることを意図するものであり、特許請求される発明の範囲を限定するものではない。本明細書中のいずれの言葉も、特許請求される発明の実施に不可欠な特許請求されていない任意の要素を示すものとして解釈されるべきではない。

【0089】

本明細書に開示される本発明の択一的な要素または実施形態の分類は、限定的なものであると解釈されるべきではない。各グループのメンバーが個別に言及され特許請求される場合もあれば、グループ内の他のメンバーまたは本明細書に記載されている他の要素と任意に組み合わせられて特許請求される場合もある。利便性および/または特許性を理由に、

10

20

30

40

50

グループの1つ以上のメンバーがグループに含まれるか、グループから削除されることがある。このような何らかの包含または削除が生じた場合、本明細書は、修正され添付の特許請求の範囲で使用されるすべてのマーカッシュ群の記載事項を満たすグループを含むものと見なされる。

【0090】

本発明の好ましい実施形態は、特許請求される発明を実施するための、本発明者らが知る最良の形態を含めて本明細書に記載されている。前述の説明を読めば、このような好ましい実施形態に対する変更が当業者に明らかとなるであろう。当業者が必要に応じてこのような変更を用いることが可能であり、特許請求される発明を本明細書に具体的に記載されている以外の方法で実施することが可能であることが考慮される。したがって、特許請求される発明は、準拠法によって認められる、記載されている対象物のあらゆる修正物および同等物を包含するものとして解釈されるべきである。さらに、本明細書に特に明示されない限り、あるいは文脈上明らかに否定されない限り、上記要素をそのあらゆる可能な変更形態で任意に組み合わせたものが、対応する特許請求される発明に含まれる。

10

【0091】

さらに、本明細書全体を通して特許および刊行物が多数参照されている。上で引用された参考文献および刊行物はそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【0092】

本明細書に開示される実施形態は、本発明の原理を説明するものであることを理解するべきである。したがって、特に限定されないが、具体例を挙げれば、本明細書の教示に従って本発明の代わりとなる立体配置を用いることができる。したがって、本発明の実施形態は、図示され記載されている通りのものに限定されるわけではない。

20

【0093】

本願は、以下の発明をも包含する。

(1)

薬物組成物を販売する方法であって、

前記薬物組成物が デフェンシン、その類似体または誘導体を含み、

前記方法が、

前記薬物組成物の有効性をヒトにおける抗炎症性効果に関して判定することと、

炎症性病態を治療するために前記薬物組成物を市場に提供することと

を含む方法。

30

(2)

前記薬物組成物が R T D - 1 - 27 である、(1)に記載の方法。

(3)

前記薬物組成物が R T D - 1 - 28 である、(1)に記載の方法。

(4)

前記薬物組成物が R T D - 1 - 29 である、(1)に記載の方法。

(5)

前記有効性を判定する段階が、前記薬物組成物に関する毒性試験、有効性試験および用量反応試験のうち少なくとも1つを依頼することを含む、(1)に記載の方法。

40

(6)

前記有効性を判定する段階が、前記薬物組成物に関する毒性実験、有効性試験および用量反応試験のうち少なくとも1つに関して別の者によって得られたデータを利用することを含む、(1)に記載の方法。

(7)

前記炎症性効果が、臨床的に意義のある炎症誘発性プロテアーゼの阻害を含む、(1)に記載の方法。

(8)

前記炎症誘発性プロテアーゼが腫瘍壊死因子 (T N F -) 変換酵素 (T A C E) で

50

ある、(7)に記載の方法。

(9)

前記炎症性効果が、臨床的に意義のある炎症誘発性プロテアーゼの阻害を含む、(1)に記載の方法。

(10)

前記炎症性効果が、臨床的に意義のあるシェダーゼの阻害を含む、(1)(1)に記載の方法。

(11)

前記炎症性効果が、臨床的に意義のあるカテプシンCの阻害を含む、(1)に記載の方法。

10

(12)

前記薬物組成物を市場に提供する段階が、販売のために前記薬物組成物を少なくとも1キログラム生産することを含む、(1)に記載の方法。

(13)

前記生産する段階が、前記薬物組成物を少なくとも1キログラム製造することを含む、(12)に記載の方法。

(14)

前記薬物組成物を経口製剤として包装することをさらに含む、(1)に記載の方法。

(15)

前記炎症性病態がタンパク質分解による疾患である、(1)に記載の方法。

20

(16)

前記炎症性病態が関節リウマチを含む、(1)に記載の方法。

(17)

前記炎症性病態が自己免疫疾患を含む、(1)に記載の方法。

(18)

前記薬物組成物を癌の治療薬として販売することをさらに含む、(1)に記載の方法。

(19)

前記薬物組成物を神経変性疾患の治療薬として販売することをさらに含む、(1)に記載の方法。

(20)

前記薬物組成物を炎症性腸疾患の治療薬として販売することをさらに含む、(1)に記載の方法。

30

(21)

前記薬物組成物をアルツハイマー病の治療薬として販売することをさらに含む、(1)に記載の方法。

(22)

前記薬物組成物を変形性関節症の治療薬として販売することをさらに含む、(1)に記載の方法。

(23)

抗TNF-療法に奏効しない患者を治療するために前記薬物組成物を販売することをさらに含む、(1)に記載の方法。

40

(24)

動物に投与して炎症性病態を治療するための薬剤を製造する方法であって、前記薬剤が、デフェンシン、その類似体または誘導体のうちの少なくとも1つを含む方法。

(25)

前記薬剤が、RTD-1-27、RTD-1-28およびRTD-1-29のうちの少なくとも1つを含む、(24)に記載の方法。

(26)

前記薬剤が、臨床的に意義のある炎症誘発性プロテアーゼの阻害をもたらすのに有効である、(24)に記載の方法。

50

(27)

前記炎症誘発性プロテアーゼが腫瘍壊死因子 (TNF-) 変換酵素 (TACE) である、(26)に記載の方法。

(28)

前記薬剤が、臨床的に意義のある炎症誘発性プロテアーゼの阻害をもたらすのに有効である、(25)に記載の方法。

(29)

前記薬剤が、臨床的に意義のあるシダーゼの阻害をもたらすのに有効である、(24)に記載の方法。

(30)

前記炎症性病態が関節リウマチを含む、(24)に記載の方法。

(31)

前記炎症性病態が自己免疫疾患を含む、(24)に記載の方法。

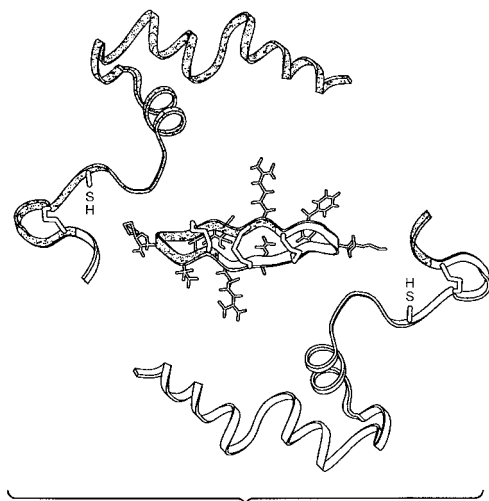
(32)

前記薬物組成物を癌の治療薬として販売することをさらに含む、(24)に記載の方法。

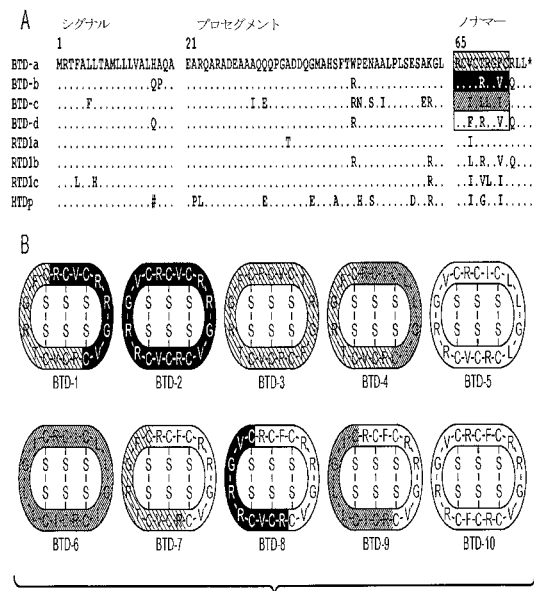
(33)

前記薬物組成物を神経変性疾患の治療薬として販売することをさらに含む、(24)に記載の方法。

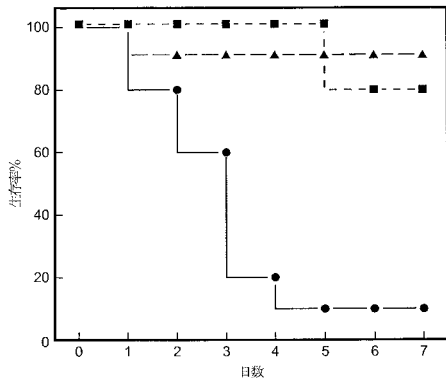
【図1】



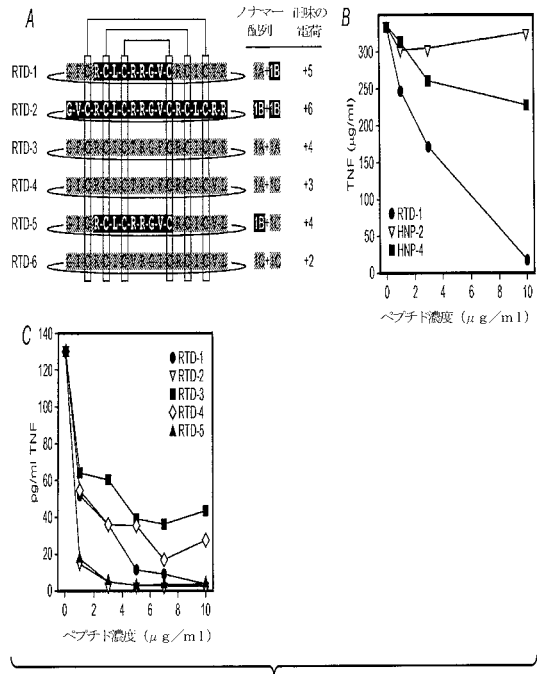
【図2】



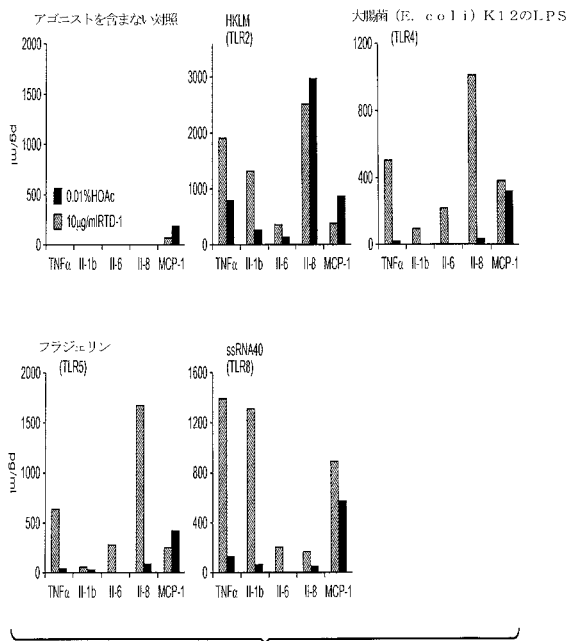
【 図 3 】



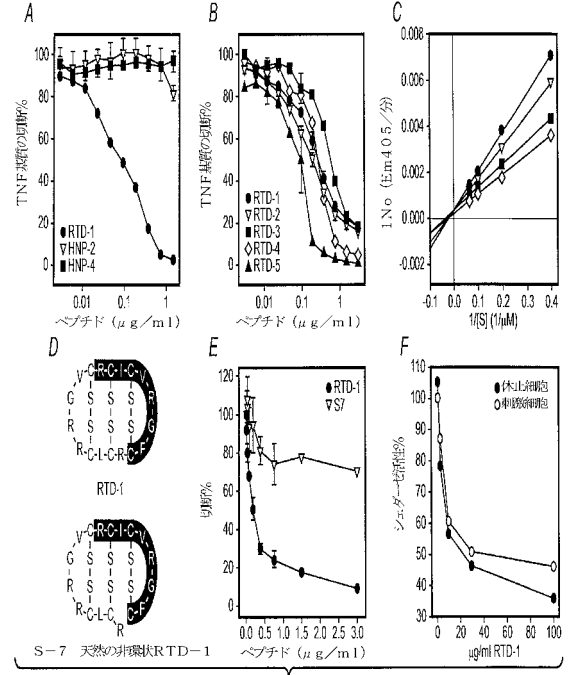
【 図 4 】



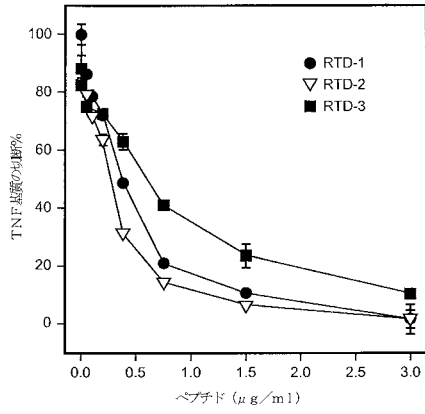
【 図 5 】



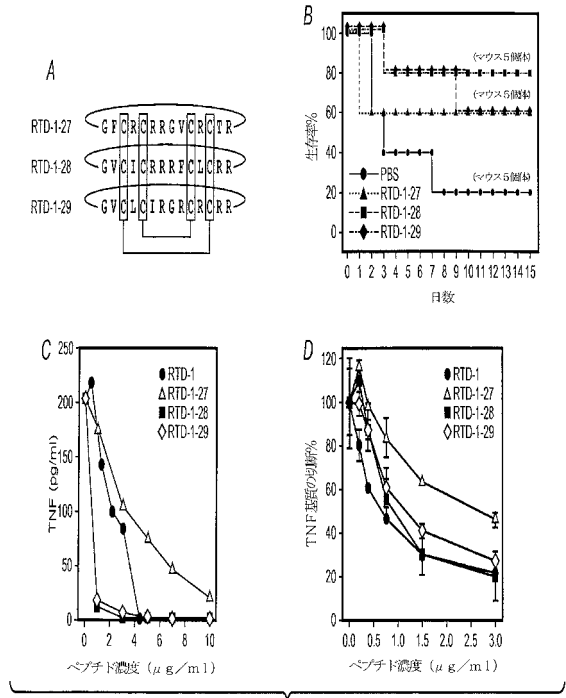
【 図 6 】



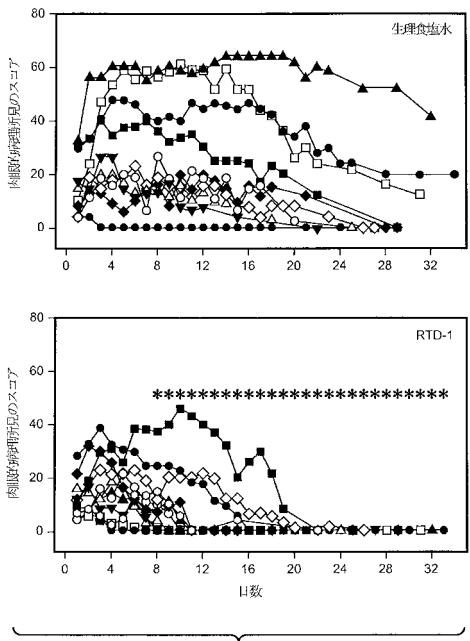
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2017149745000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	11/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
		C 0 7 K	11/02	

(72)発明者 セルステッド, マイケル イー .
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 1 0 4 , パサデナ, 8 1 0 ノース チェスター アベ
 ニュー

(72)発明者 トラン, ダット キュー .
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 8 0 4 , アナハイム, 3 1 1 9 ウェスト パソ ロブ
 レス ドライブ

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA18 BA26 BA44 MA17 MA23 MA35 MA37 MA52 MA55
 MA57 MA59 MA60 MA66 NA14 ZA151 ZA161 ZA661 ZA961 ZB081
 ZB111 ZB151 ZB261 ZC201 ZC411
 4H045 AA10 AA30 BA05 BA17 BA32 CA40 EA20 FA74