(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4689664号
(P4689664)
(45)発行日　平成23年5月25日(2011.5.25)　(24)登録日　平成23年2月25日(2011.2.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06	ZNA
A23L 1/305	(2006.01)	A23L	1/305	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61P 7/00	(2006.01)	A61P	7/00	
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/12	

請求項の数 13　(全 41 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-509950 (P2007-509950)
(86)(22)出願日　平成17年4月25日 (2005.4.25)
(65)公表番号　特表2008-501642 (P2008-501642A)
(43)公表日　平成20年1月24日 (2008.1.24)
(86)国際出願番号　PCT/EP2005/004419
(87)国際公開番号　WO2005/105832
(87)国際公開日　平成17年11月10日 (2005.11.10)
審査請求日　平成20年4月11日 (2008.4.11)
(31)優先権主張番号　60/566,455
(32)優先日　平成16年4月28日 (2004.4.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　505473983
シィ・エム・エス・ペプチド・パテント・ホールディング・カンパニー・リミテッド
CMS PEPTIDES PATENT HOLDING COMPANY LIMITED
英国領バージン諸島、トルトラ、ロード・タウン、ピィ・オゥ・ボックス・１４６、トライデント・チャンバーズ
(74)代理人　100064746
弁理士　深見　久郎
(74)代理人　100085132
弁理士　森田　俊雄
(74)代理人　100083703
弁理士　仲村　義平

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物学的に活性なペプチドＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ誘導体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２４のアミノ酸配列よりなる実質的に純粋なペプチド。
【請求項２】
配列番号２４のアミノ酸配列よりなる実質的に純粋なペプチドを含む医薬組成物。
【請求項３】
該ペプチドの投与の効果が細胞増殖の抑制、腫瘍成長の抑制、および免疫系の変調よりなる群から選択される効果を含む請求項２に記載の医薬組成物。
【請求項４】
該細胞増殖がイン・ビボでの肉腫細胞の発生である請求項３に記載の医薬組成物。
【請求項５】
免疫系の該変調がイン・ビボでのＴ－リンパ球形質転換、イン・ビトロにおけるＣｏｎＡによるＴ－リンパ球形質転換、およびＮＫ細胞増強よりなる群から選択される変調である請求項３に記載の医薬組成物。
【請求項６】
配列番号２４のアミノ酸配列よりなるペプチドを供し、次いで、該ペプチドを医薬上許容される担体と混合することを含む、医薬組成物の製法。
【請求項７】
ヒト病気の効果を低下させるための医薬組成物の製造における配列番号２４のアミノ酸配列よりなる実質的に純粋なペプチドの使用。

【請求項８】
該ヒト病気は細胞増殖性障害および免疫学的障害よりなる群から選択される状態である、請求項７に記載の実質的に純粋なペプチドの使用。
【請求項９】
該細胞増殖性障害が癌、肉腫および腫瘍よりなる群から選択される状態である、請求項８に記載の実質的に純粋なペプチドの使用。
【請求項１０】
免疫系の変調のための医薬組成物の製造における配列番号２４のアミノ酸配列よりなる実質的に純粋なペプチドの使用。
【請求項１１】
該変調がイン・ビボでのＴ－リンパ球形質転換、イン・ビトロにおけるＣｏｎＡによるＴ－リンパ球形質転換、およびＮＫ細胞増強よりなる群から選択される、請求項１０に記載の実質的に純粋なペプチドの使用。
【請求項１２】
栄養補給物の製造における実質的に純粋なペプチドの使用であって、該ペプチドは配列番号２４のアミノ酸配列よりなる、該使用。
【請求項１３】
配列番号２４のアミノ酸配列よりなるペプチドの増強された誘導体を含む分子であって、該増強された誘導体は該ペプチドに操作可能に連結された増強分子を含み、該増強分子は該ペプチドの治療的有効性を増強させることを特徴とする該分子。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の背景
発明の分野
本発明は、短いペプチドおよびその使用に関する。特に、本発明は生物学的活性を持つ短いペプチドに関する。
【背景技術】
【０００２】
関連技術の記載
ペプチドは、病気の治療用に、および医薬組成物として当該分野で知られている。例えば、米国特許第６，１９１，１１３号は平滑筋細胞の成長についての阻害活性を有し、従って、アテローム性動脈硬化症、血管形成術後の再狭窄、血管移植後の管腔狭窄、および平滑筋肉腫のような平滑筋細胞の成長に関連する病理学的疾患を予防および治療するのに有用なペプチドを開示する。米国特許第６，１８４，２０８号は、上皮成長ゾーンおよび毛髪成長の重量獲得活性のような生理学的プロセスを変調することが見出されたもう１つのペプチドを開示する。さらに、ＰＣＴ出願ＷＯ　０３／００６４９２および米国特許出願第１０／２３７，４０５号は、ある種のペプチドおよびそれらの医薬組成物が生物学的に活性であって、免疫応答を変調できることを示唆する。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
従って、本発明の目的は、生物学的活性を有する短いペプチドまたは複数ペプチドを提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【０００４】
発明の概要
本発明の１つの態様は、生物学的活性を含むことが見出された、１８アミノ酸－含有ペプチドＣＭＳ－０１０（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（配列番号１）から誘導されたペプチドに関し、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まな

い。テスト目的では、これらのペプチドの試料はＬ－アミノ酸で化学的に合成した。本発明のさらなる態様は、配列番号２ないし３１から選択される配列を含み、実質的にそれよりなり、またはそれよりなる単離されたまたは精製されたペプチドを含み、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０（配列番号１）の配列を含まない。もう１つの態様は配列番号２ないし３１から選択されるペプチドを含む実質的に純粋なペプチドに関し、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。

【０００５】

本発明のもう１つの態様は、配列番号２ないし３１から選択される配列を含む、それより実質的になる、またはそれよりなるペプチドの投与であり、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まず、ここに、該投与の効果は免疫細胞形質転換の抑制、ＮＫ細胞活性の抑制、ＮＫ細胞活性の増強、イン・ビボでの抗体形成の抑制、細胞増殖の抑制、腫瘍成長の抑制、腎炎の抑制、および蛋白血症の減少よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、免疫細胞形質転換の抑制はイン・ビトロにおけるＣｏｎＡによるＴ－リンパ球形質転換の抑制である。いくつかの実施形態において、免疫細胞形質転換の抑制は、イン・ビボでのＴ－リンパ球形質転換の抑制である。いくつかの実施形態において、細胞増殖の抑制はイン・ビボでの肉腫細胞の発生の抑制である。いくつかの実施形態において、腎炎の抑制は抗－腎臓エピトープ抗体による腎炎の抑制である。

【０００６】

本発明のさらなる態様は、Ｌ－アミノ酸よりなる配列番号２ないし３１から選択される配列を含み、実質的にそれよりなり、またはそれよりなるペプチドに関し、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。いくつかの実施形態において、配列番号２ないし３１より選択される配列を含み、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドは実質的に純粋な形態であり、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。

【０００７】

本発明のもう１つの態様は、配列番号２ないし３１から選択される配列を含むペプチドを含む医薬組成物に関し、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。いくつかの実施形態において、配列番号２ないし３１から選択される配列を含むペプチドを含む医薬組成物は、Ｌ－アミノ酸よりなるペプチドを含み、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。

【０００８】

本発明のなおもう１つの態様は、配列番号２ないし３１から選択される配列を含むペプチドを供し、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まず、次いで、該ペプチドを医薬上許容される担体と混合することを特徴とする、医薬組成物の製法である。

【０００９】

本発明のさらにもう１つの態様は、医薬上有効量の、配列番号２ないし３１から選択される配列を含むペプチドを投与することを含むヒト病気の効果を低下させる方法であり、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。いくつかの実施形態において、該ヒトは細胞増殖性および／または免疫学的障害に罹っている。いくつかの実施形態において、該細胞増殖性障害は癌、肉腫および／または腫瘍である。

【００１０】

本発明のさらなる態様は、医薬上有効量の、配列番号２ないし３１から選択させる配列を含むペプチドを投与することを含み、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まないことを特徴とする、個体の免疫系を変調する方法である。

【００１１】

本発明のもう１つの態様は、医薬化合物としての、配列番号２ないし３１から選択される配列を含むペプチドの使用であり、ここに、該ペプチドは、ペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。いくつかの実施形態において、ペプチドは細胞増殖性障害および／または免疫学的障害の形態である病気状態を治療するのに用いられる。いくつかの実施形態に

おいて、治療すべき細胞増殖性障害は肉腫である。

【００１２】

本発明のなおもう１つの態様は、免疫系モジュレーターとしての、配列番号２ないし３１から選択される配列を含むペプチドの使用であり、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。いくつかの実施形態において、免疫系の変調はＮＫ細胞活性の増強または抑制である。

【００１３】

本発明のさらなる態様は、栄養補強剤としての、配列番号２ないし３１から選択される配列を含むペプチドの使用であり、ここに、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。

【００１４】

本発明のもう１つの態様は、当該ペプチドに操作可能に連結された増強分子を含む、配列番号２ないし３１から選択される配列を含むペプチドの増強された誘導体を含む分子であり、ここに、該増強分子は該ペプチドの治療効果を増強させ、該ペプチドはペプチドＣＭＳ－０１０の配列を含まない。

【００１５】

５つの図面の各々は、ペプチドをステロイド分子に連結させるための例示的化学反応を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１６】

好ましい実施形態の詳細な記載

Ｉ．緒言

配列ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫを有するペプチドＣＭＳ－０１０（配列番号１）は、生物学的免疫－調節活性を有することが見出され（米国特許出願第１０／１７８，６８４号）、ヒト使用のための治療的潜在能力を有する。本発明は、生物学的活性を有するＣＭＳ－０１０の断片および誘導体に関する。特別な実施形態において、本発明は、その配列が配列番号２ないし３１として与えられる断片および誘導体を含む。いくつかの実施形態において、断片は置換および／またはさらなる分子基を有するか、またはＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）の機能的誘導体であり得る。ＣＭＳ－０１０断片および誘導体の使用は細胞および組織の調整を含む。ＣＭＳ－０１０断片および誘導体は医薬製剤および栄養補強剤に配合することができる。

【００１７】

本発明を実施するもう１つの方法として、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドのアミノまたはカルボキシル末端にさらなるアミノ酸を付加することは可能であろうと理解され、ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない。そのような実施形態において、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドは本明細書中に記載された治療または機能的特性の１つまたは複数を維持し、ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない。例えば、いくつかの実施形態において、その生物学的機能に影響することなく、１または２のアミノ酸を開示されたペプチドに付加することができる。いくつかの実施形態において、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）のいくつかの部分を含有する小さな分子は、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）に由来する配列の単一ストレッチを含む。他の実施形態において、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）のいくらかの部分を含有するより小さな分子は、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）の別々の非連続部分に由来する配列２以上のストレッチを含む。例えば、いくつかの実施形態において、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）のいくらかの部分を含有するより小さな分子は、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）における２つの配列の間で見出されたいずれの介入配列も無くして、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－

０１０）のＮ－末端近くに見出される配列、ならびにＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）のＣ－末端近くに見出される配列を含む。さらなる実施形態において、３または４のアミノ酸を付加し、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）の断片（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体よりなる群から選択されるペプチドの機能を依然として維持することも可能である。これらは全て同一ペプチドの変種という。さらに、同一機能クラス内のもう１つに代えての１つのアミノ酸の保存的置換のようなペプチドの誘導体を用いて、本発明のもう１つの態様を実施することができる。例えば、非－極性または疎水性側鎖を有するペプチドは、生物学的活性を低下させることなく、もう１つに代えて１つの側鎖を置換することが可能であろう。いくつかの実施形態において、ＣＭＳ－０１０のペプチド断片は、元のペプチド断片の活性を依然として保有しつつ、配列から排除された１、２またはそれ以上のアミノ酸を有することができる。例えば、長さが１０アミノ酸であるＣＭＳ－０１０のペプチド断片は、配列中のＮ－末端からの５番目のアミノ酸無くして再度合成される。かくして、得られた変種は長さがただ９つのアミノ酸であり、元の配列中のＮ－末端から６番目のアミノ酸に共有結合したＮ－末端から４番目のアミノ酸を有し、なお依然として、１０アミノ酸を持つ元のペプチド断片と同一の活性を有する。２以上のアミノ酸がＣＭＳ－０１０のペプチド断片の配列から排除されるいくつかの実施形態において、排除されるアミノ酸は元のペプチド断片配列において相互に隣接する。２以上のアミノ酸がＣＭＳ－０１０のペプチド断片の配列から排除された他の実施形態において、アミノ酸は元の配列において相互に隣接しないが、むしろ、短縮された変種ペプチドに残るアミノ酸によって元の配列中の相互から分離される。３以上のアミノ酸がＣＭＳ－０１０のペプチド断片から排除される追加の実施形態において、元のペプチド断片配列から排除されたいくつかのアミノ酸は相互に隣接し、他方、元の配列から排除された１つまたは複数のアミノ酸は、排除される元の配列からのいずれの他のアミノ酸にも隣接しない。本発明の追加の実施形態において、リンカー／スペーサー配列をペプチドに挿入して、変種を形成することができるが、該変種は本実験で用いる元のペプチドとしてのそれらの活性部位を依然として保有する。これらはやはりペプチドの変種と考えられる。本明細書中で用いるペプチドアナログは、天然アミノ酸構造を模倣するアミノ酸分子を有するペプチド、例えば、異なる骨格構造、Ｄ－アミノ酸置換を持つアナログを含む。さらなる実施例として、ペプチドを合成するのに用いられるアミノ酸はそれらのＬ光学異性形であるが、Ｄ－形態で置換された配列におけるアミノ酸の１つまたは複数を持つペプチドは同様な生物学的活性を有することができる。特許請求の範囲で用いる用語「機能的誘導体」は、ペプチドの断片、変種、アナログまたは化学的誘導体を含むことを意味する。

【００１８】

「実質的に純粋なペプチド」とは、純度が少なくとも１０％ｗ／ｗ、より好ましくは２０％、なおより好ましくは４０％、かなりより好ましくは６０％、はるかにより好ましくは９０％純度を超えるペプチドをいう。最も好ましい実施形態において、純度は９９％よりも大きい。実質的に純粋なペプチドを用いて、後に記載する複合体混合物であり得る医薬および栄養処方を調製することができる。

【００１９】

「変調」とは、本発明のペプチドの投与、または該ペプチドへの暴露によって媒介される細胞に対する効果をいい、ここに、細胞へのペプチドの投与または暴露は細胞の活性の変化を引き起こす。該変化は細胞の活性を増強し、または抑制することができる。細胞の活性の増強または抑制は細胞の分裂および複製の速度の増強または抑制、細胞の他のエレメントへの反応の増強または抑制、および／または細胞からの蛋白質または化合物の生成および／または分泌の速度の増強または抑制であり得る。

【００２０】

「細胞増殖」とは、存在する細胞の数の増加をいい、それは細胞の形質転換または不死化によるものであり得る。細胞増殖障害は、限定されるものではないが、癌、良性成長、腫瘍および肉腫を含み、いずれかの数の細胞を含むことができる。「免疫学的障害」とは

、免疫細胞または免疫系の他の部分の機能不全または有害機能をいう。そのような障害は、細胞または分子の活性の抑制、または細胞または分子の活性の増強によって引き起こされ得る。

【００２１】

医薬処方における、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドの使用は、免疫学的障害または病気に対する可能な処置として使用することができ、ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない。該処方は、他のペプチドを含めた、他の活性なまたは不活性な構成要素と混合された、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなり、またはそれよりなるペプチドを有することができ、ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まず、例えば、２ないし数個（例えば、３ないし５の）ペプチドを他の成分と共に、またはそれなくして同一処方に加えることができる。別法として、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドを用いて、本明細書中でリストされていないペプチドと共に処方を調製することができ、ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない。それらは、静脈内、筋肉内、皮内、皮下または経皮の形態で投与することができる。投与の態様は、問題の器官に直接的に導かれる動脈内注射であってもよい。投与の他の態様は経皮、粉末またはスプレーとしての吸入、および当業者によって知られた他の送達形態である。処方は経口投与することもでき、経口摂取後にペプチドの胃での消化を妨げるように用いることができる担体、または当該分野で公知のいずれかの他の担体（例えば、リポソームのような経皮送達用の担体）を含有することができる。

【００２２】

本明細書中で用いるように、用語「ハイブリッドペプチド」は、前記で特定した配列を有する元の生物学的に活性なペプチドまたはその機能的誘導体に挿入されたさらなるペプチドを含有するが、依然として実質的に同様な活性を保有するペプチドをいうのに用いられる。さらなるペプチドは、例えば、ハイブリッド蛋白質の外部または細胞への分泌用のシグナルとしての１つまたは複数の原核生物または真核生物細胞によって認識されるアミノ酸配列を含有するリーダーペプチドを含む。分泌は直接的分泌、または分泌小胞を通じる間接的なものであっても良い。

【００２３】

本明細書中で用いるように、用語「より実質的になる」とは、カルボキシルおよび／またはアミノ末端におけるさらなるアミノ酸と共に、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなり、またはそれよりなり、かつ本明細書中で供された該ペプチドの活性の１つまたは複数を有するペプチドまたはポリペプチドをいい、ここに、該ペプチドは、ＣＭＳ－０１０の配列を含まない。かくして、非限定的な実施例として、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなり、またはそれよりなるペプチド（該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）の活性が、細胞増殖性または免疫学的障害または病気を治療しおよび／または予防することにある場合、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれを含むペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）「より実質的になる」ペプチドまたはポリペプチドは、そのペプチドに関して本明細書中で供された障害または病気を治療および／または予防する活性を保有し、かつ細胞増殖性または免疫学的障害を治療または予防する該ペプチドまたはポリペプチドの能力を実質的に低下させる、または前記障害または病気のための治療、および／またはその予防体としてのペプチドの基本的かつ新規な特徴に対する重要な変化を構成する（１つまたは複数の生物学的に活性な分子への付着による修飾前の）それ自体における、およびそれ自体のいずれの特徴も保有しないであろう。かくして、これまでの実施例において、細胞増殖性または免疫学的障害を治療しおよび／または予防する以外の一次的活性を有し、かつ配列番号２ないし３１およびその機能的誘導

体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなる、またはそれよりなる（しかし、ＣＭＳ－０１０の配列を含まない）全長の天然に生じるポリペプチドは、その配列全長の天然に生じるポリペプチドに含まれる、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド「より実質的になる」ペプチドまたはポリペプチドを構成しないであろう。同様に、これまでの実施例において、細胞増殖性または免疫学的障害を治療または予防する以外の一次的活性を有するが、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなり、またはそれよりなるペプチド（しかし、ＣＭＳ－０１０の配列を含まない）のアミノ酸配列を含む遺伝子工学により作成されたペプチドまたはポリペプチドは、その配列が遺伝子工学により作成されたペプチドまたはポリペプチドに含まれる、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（しかし、ＣＭＳ－０１０の配列を含まない）「より実質的になる」ペプチドまたはポリペプチドを構成しないであろう。

【００２４】

当業者であれば、ペプチドまたはポリペプチドが、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）ペプチドの断片および誘導体に関して本明細書中で供された、細胞増殖性または免疫学的障害を治療し、または予防するためのアッセイを用い、該ペプチドまたはポリペプチドの活性を測定することによって、これまでの定義下で、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）より実質的になるか否かを容易に決定することができる。

【００２５】

好ましい実施形態において、用語「より実質的になる」は、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドに加えて５アミノ酸未満の残基を有するペプチドまたはポリペプチドをいうこともでき、ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない。より好ましい実施形態において、同一用語は、配列番号２ないし３１から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドに加えて２アミノ酸残基を持つペプチドをいい、ここに、該ペプチドはＣＭＤ－０１０の配列を含まない。なおより好ましい実施形態において、同一用語は、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドに加えて１つのアミノ酸残基を持つペプチドをいい、ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない。

【００２６】

医薬処方は公知の医薬担体のいずれかを含むことができる。適当な担体の実施例は当業者に知られた標準的な医薬上許容される担体のいずれかを含む。これらは、限定されるものではないが、生理食塩水、水、油および水混合物またはトリグリセリドエマルジョンを含めたエマルジョン、および他のタイプの剤、充填剤、被覆された錠剤およびカプセル剤を含む。適当な担体は、医薬組成物の投与の態様に基づいて選択することができる。

【００２７】

配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなり、またはそれよりなる群から選択されるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）は、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、および皮下移植を介して投与することができる。該ペプチドは、修飾することなく、または遅延放出形態にて、あるいは胃腸保護を行って、または行うことなく、通常の形態の錠剤、カプセル、懸濁液、溶液などのような経口投与のいずれかの形態で投与することもできる。該ペプチドは、さらに、経皮促進デバイスの有りまたは無しにて、軟膏、クリーム、ゲルなどのような局所適用のいずれかの形態で適用することができる。また、該ペプチドは、その遺伝子配列に解釈することもでき、それ自体にて、あるいは他のペプチド配列と組み合わせて、発現系にクローン化して、本明細書中に記載されたペプチドの活性を利用する得られたペプチド分子を生じさせることができる。

【００２８】
各ペプチドの用量は体重１ｋｇ当たり１ｎｇないし１０ｇであり得る。好ましい用量は投与の注射態様ではｋｇ当たり１０ｎｇないし１０ｍｇ、より好ましくはｋｇ当たり１μｇないし１ｍｇである。しかしながら、効果的な用量は体重ｋｇ当たり１ｎｇと低くすることができる。というのは、ペプチドの１つまたは複数は、正常な生理学的応答のカスケードを誘導する受容体を通じて操作することができるからである。別法として、ペプチドの１つまたは複数は反応の全カスケードについての丁度開始剤であり得る。経口摂取では、該量は体重ｋｇ当たり１日につき１ｎｇないし１０ｇ、より好ましくは体重ｋｇ当たり１日につき０．１μｇないし１ｇ、なおより好ましくは１日につき１μｇないし１０ｍｇである。

【００２９】
ＩＩ．遺伝子治療および治療の方法
前記ペプチドに基づく遺伝子治療は、これらのペプチドの１つをコードする核酸配列を設計することによって行われる。該核酸は化学的に合成し、プロモーターに操作可能に連結させ、発現ベクターにクローン化することができる。次いで、発現ベクターは、ヒト細胞における発現についての遺伝子治療の形態でヒト身体に投与される。本明細書中で用いる用語「遺伝子ベクター」はこれらの発現ベクターを含む。遺伝子治療で用いることができるベクターはアデノ－関連ウイルス（Ｍｉｚｕｎｏ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．（１９９８）．Ｊｐｎ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　８９，７６－８０）、ＬＮＳＸベクター（Ｍｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ　２１７，５８１－５９９）およびレンチウイルス（Ｇｏｌｄｍａｎ，Ｍ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　８，２２６１－２２６８）を含む。

【００３０】
ペプチド送達のための他のビヒクルは、宿主生物の健康に対する有意な有害効果無くして、それにペプチドを投与することが望まれる宿主生物において複製することができる生物に導入することができる所望のペプチドをコードする発現ベクターを含む。例えば、発現ベクターは、それにペプチドを投与することが望まれる宿主生物に対して病原性でない生物に導入することができる。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、それにペプチドが投与されるべき宿主生物の健康に対して有意な有害効果を有しない細菌または真菌生物において所望のペプチドを生じさせる。例えば、所望のペプチドをコードする発現ベクターは、乳酸菌、Ｅ．ｃｏｌｉ、または酵母のような生物において所望のペプチドを生じさせる発現ベクターであり得る。１つの実施形態において、発現ベクターは、哺乳動物腸で通常見出される微生物、または哺乳動物消化管によって許容される微生物において所望のペプチドを生じさせる。所望のペプチドが発現され得る微生物種のいくつかは、限定されるものではないが、Ｌ．ａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｓ、Ｌ．ａｍｙｌｏｖｏｒｕｓ、Ｌ．ｃａｓｅｉ、Ｌ．ｃｒｉｓｐａｔｕｓ、Ｌ．ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ、Ｌ．ｇａｓｓｅｒｉ、Ｌ．ｊｏｈｎｓｏｎｉｉ、Ｌ．ｐａｒａｃａｓｅｉ、Ｌ．ｐｌａｎｔａｒｕｍ、Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ、Ｌ．ｒｈａｍｎｏｓｕｓその他のようなＬａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ種；Ｂ．ａｄｏｌｅｓｃｅｎｔｉｓ、Ｂ．ａｎｉｍａｌｕｓ、Ｂ．ｂｉｆｉｄｕｍ、Ｂ．ｂｒｅｖｅ、Ｂ．ｉｎｆａｎｔｉｓ、Ｂ．ｌａｃｔｉｓ、Ｂ．ｌｏｎｇｕｍその他のようなＢｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ種；Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆａｅｃａｌｉｓまたはＥｎｔ．ｆａｃｉｕｍ；Ｓｐｏｒｏｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｉｎｕｌｉｎｕｓ；Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓまたはＢａｃｉｌｌｕｓ　ｃｅｒｅｕｓ；Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ；Ｐｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｆｒｅｕｄｅｎｒｅｉｃｈｉａ；またはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む。

【００３１】
化学的に合成された、あるいは限定されるものではないが、ｃＤＮＡ分子を生じさせるためのｍＲＮＡの逆転写を含めた他の手段によって生じさせた、本発明のペプチドのいずれかをコードする核酸配列は、当業者が精通した遺伝子工学の方法によって所望の生物へ

の遺伝子導入のために発現ベクターに取り込まれる。発現ベクターはＤＮＡベクターまたはＲＮＡベクターであり得る。例えば、発現ベクターはプラスミドまたはウイルス遺伝子エレメントに基づくことができる。発現ベクターは染色体外で複製するベクター、または染色体に組み込まれるベクターであり得る。

【００３２】

発現ベクターは本発明のペプチドをコードする核酸に操作可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターのような調節可能なプロモーターであり得る。いくつかの実施形態において、プロモーターは所望のレベルのペプチド発現を生じさせるように選択することができる。加えて、所望ならば、発現ベクターはペプチドの生成、提示および／または分泌を促進するための他の配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、本発明のペプチドをコードする核酸は、ペプチドの分泌を指令する核酸配列に操作可能に連結される。例えば、本発明のペプチドをコードする核酸はシグナルペプチドをコードする核酸に操作可能に連結させることができる。

【００３３】

いくつかの実施形態において、本発明のペプチドをコードするように作成された発現ベクターは、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ種およびＢａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓのような、哺乳動物の正常な腸フローラをなす細菌種において本発明のペプチドを発現させるのに適合される発現ベクターであり得る。そのような発現ベクターの実施例は、各々、Ｃａｓａｓに対する米国特許第６，１００，３８８号、およびＢｅｌｌｉｎｉに対する米国特許第５，７２８，５７１号で見出すことができる。これらの書類は、ここに明示的に引用してその全体を援用する。当該ペプチドを投与すべき宿主生物の健康に対して有害でない生物における本発明のペプチドの発現を容易とするいずれの発現ベクターを用いることもできると認識される。

【００３４】

いくつかの実施形態において、本発明のペプチドをコードするように作成された発現ベクターは、ヒト腸で集落を形成でき、下痢のある種の形態を治療するのに用いられる、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ；または好ましくはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｂｏｕｌａｒｄｉｉのような哺乳動物腸によってよく許容される酵母種において本発明のペプチドを発現するのに適合される発現ベクターであり得る。異種蛋白質およびペプチドを構成的に発現し、高度に安定であり、かくして、有糸分裂および減数分裂の間に子孫細胞によく伝達される酵母発現ベクターを用いることができ、これは、高レベルの組換え蛋白質分泌を指令するシグナルペプチドまたは複数ペプチドについてのコーディング配列を含むことができる。そのような酵母ベクターの実施例は、ここに明示的に引用してその全体を援用する、Ｊａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．に対する米国特許第６，３９１，５８５号に与えられている。

【００３５】

本発明のペプチドをコードする発現ベクターは、その中で、当該分野で公知の技術を介してペプチドを発現することが意図される生物に導入することができる。これらの技術は、例えば、化学的にコンピテントな細菌細胞、エレクトロポレーションまたは酢酸リチウム形質転換（酵母用）の使用を介して細菌、酵母または他の微生物を形質転換する伝統的方法、ならびにこれらの手法で御しがたい細菌種の形質転換における最近の進歩を含む。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、その開示をここに引用してその全体を援用する、Ｌｅｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（ＷＯ　９５／３５３８９）によって開示された方法を用いる形質転換では扱い難いことが知られている乳酸細菌に導入される。導入された配列は微生物染色体ＤＮＡに組み込むことができ、あるいは染色体外ＤＮＡエレメントとして残ることもできる。

【００３６】

次いで、発現ベクターを含有するこの遺伝子工学作成微生物を消化管、膣、器官などに接種して、維持された免疫療法を達成することができる。いくつかの実施形態において、

本発明のペプチドを発現する生物は不活性形態または好ましくは生きた形態で摂取される。腸においては、これらの微生物は該ペプチドを生成し、分泌によって、または微生物の溶解によって、それらを管腔に放出し、あるいはペプチドを宿主に提示し、それにより、ペプチドは宿主生物に対してそれらの意図された効果を生じさせる。他の実施形態において、ペプチドは、鼻通路、膣、または小腸の粘膜において宿主に提示される。

【００３７】

治療のもう１つの方法は、ヒト身体中の細胞へ特異的核酸を送達するための手段としてのリポソーム使用である。（配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）をコードする核酸を含有する発現ベクターのような）核酸を、Ｇａｏ，Ｘ．ａｎｄ Ｈｕａｎｇ，Ｌ．（１９９５）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２，７１０－７２２および米国特許第６，２０７，４５６号に記載されているように、細胞摂取および染色体組込みを刺激する環境に送達する。別法として、該ペプチドそれ自体はリポソームにカプセル化し、米国特許第６，２４５，４２７号に記載された方法を用いて直接的に送達することができる。前記で示した全ての科学的刊行物および特許はここに引用してその全体を援用する。

【００３８】

前記した遺伝子治療および治療の方法で有用な核酸配列は、これらのペプチドおよびその機能的誘導体をコードする配列を含む。多数の核酸配列のいずれか１つを用いて、縮重コドン系に基づいてこれらのペプチドおよびそれらの誘導体をコードさせることができる。

【００３９】

以下の文献をここに引用してその全体を援用する。

１．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｒｅ－ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ｏｆ Ｎｅｗ Ｄｒｕｇｓ，Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｃｈｉｎａ．１９９３，７：１３４－１３５Ｓｈｕｙｕｎ Ｘｕ，Ｒｕｌｉａｎ Ｂｉａｎ，Ｘｉｕ Ｃｈｅｎ．Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｙ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ．Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｈｅａｌｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｈｏｕｓｅ．１９９１，１２２１－１２３４

２．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅ ｏｆ ｎｅｗ ｄｒｕｇ ｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎ ｐｒｅ－ｃｌｉｎｉｃ ｉｓｓｕｅｄ ｂｙ Ｍｉｎｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｃｈｉｎａ．１９９３，７：１４０

３．Ｊｉｎｓｈｅｎｇ Ｈｅ，Ｒｕｉｚｈｕ Ｌｉ，Ｔｉｎｇｙｉ Ｚｏｎｇ．Ｔｈｅ ｓｔｕｄｙ ｏｎ ＭＴＴ ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ｔｅｓｔｉｎｇ ＮＫ ｃｅｌｌ ａｃｔｉｖｉｔｙ．Ｃｈｉｎａ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｊｏｕｒｎａｌ．１９９６，１（６）：３３６－３５８

４．Ｑｉａｎ Ｗａｎｇ．Ｍｏｄｅｒｎ ｍｅｄｉｃａｌ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ ｍｅｔｈｏｄ．Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｈｅａｌｔｈ Ｐｕｂｌｉｃｈｉｎｇ Ｈｏｕｓｅ．１９９８，４８２－４８３

５．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅ ｏｆ ｎｅｗ ｄｒｕｇ ｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎ ｐｒｅ－ｃｌｉｎｉｃ ｉｓｓｕｅｄ ｂｙ Ｍｉｎｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｃｈｉｎａ．１９９３，７：１４１

６．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅ ｏｆ ｎｅｗ ｄｒｕｇ ｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎ ｐｒｅ－ｃｌｉｎｉｃ ｉｓｓｕｅｄ ｂｙ Ｍｉｎｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｃｈｉｎａ．１９９３，７：１３２－１３３

７．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅ ｏｆ ｎｅｗ ｄｒｕｇ ｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎ ｐｒｅ－ｃｌｉｎｉｃ ｉｓｓｕｅｄ ｂｙ Ｍｉｎｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｒｅｐｕｃｂｌｉｃ ｏｆ Ｃｈｉｎａ．１９９３，７：１２８－１２９

８．Ｙｕａｎｐｅｉ Ｚｈａｎｇ，Ｈｕａｉｄｅ Ｓｕ．Ｐｈａｒｍａｌｏｇｉｃａｌ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ（ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ）．Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｈｅａ

lth Publishing House. 1998, 137－138
9. Jiatai Li, clinical pharmacology（second edition）. People's Health Publishing House. 1998, 1338－1339.

【００４０】

ＩＩＩ．配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体を含み、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該試薬はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）へのペプチドコンジュゲーション、およびそれを含む処方

本発明の生物学的に活性なペプチドは他の生物学的に効果的なまたは有用な分子にコンジュゲートして、さらなる効果または用途を提供し、またはそれらの治療的効果を増強させることができる。多くの潜在的コンジュゲーティング分子、それらの生物学的効果およびペプチドへの分子のコンジュゲーションのための方法は当該分野で知られている。他の候補コンジュゲーションパートナーでは、本ペプチドをそれにコンジュゲートさせるための化学反応は、過度な実験無くして当業者によって推測できる。効果的分子を以下に記載する。どのようにして本発明による種々のペプチドをそれらの効果的な分子にコンジュゲートできるか、および得られたコンジュゲーション産物の生物学的特性の特別な実施例が記載される。本発明の他のペプチドを同様な反応においてコンジュゲートすることもできる。

【００４１】

配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド断片は特定の細胞または細胞型に対して区別される治療効果を有することができ、ここに、該ペプチド断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない。ペプチド薬物に分子をコンジュゲートする１つの重要な目的は、治療すべき個体の身体内の特定の位置または区画へペプチドを標的化することである。このようにして、ペプチド薬物およびその効果は、それに対してそれが意図した治療効果を有する細胞または細胞型の位置に濃縮させることができる。これは、同様なモラー量の遊離した未コンジュゲーテッドペプチドが有するであろう効果を増大させることができる。逆に、その治療活性部位に標的化されるコンジュゲーテッドペプチド薬物の用量は、薬物の遊離した未コンジュゲーテッド形態からの同一治療効果を得るのに必要な用量よりも有意に低くできる。

【００４２】

その活性が最も望まれる部位へペプチド薬物を標的化するもう１つの有利な効果は、望まない副作用の低下である。特定の細胞または組織型の変化を行うために投与されるペプチド薬物もまた、時々、有害効果を伴って、個体内の他の場所で作用し得る。標的化分子へのコンジュゲーションを介して活性の所望の位置へペプチドを標的化することによって、個体における他の箇所のペプチドの濃度および引き続いての副作用を低下させることができる。

【００４３】

配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチドは、個体の身体全体の種々の位置に標的化するための種々の分子にコンジュゲートさせることができ、ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない。ペプチドを所望の位置に標的化するための以下に記載するコンジュゲーション技術、ならびに当業者が精通した他のコンジュゲーション技術のいずれも、本発明のペプチドのいずれかで使用することができる。例えば、抗－Ｂ型肝炎薬物の肝臓細胞への選択的送達は示されている（ここに引用してその全体を援用する、Ｆｉｕｍｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｔａｌ Ｊ Ｇｅｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ Ｈｅｐａｔｏｌ，２９（３）：２７５，１９９７）。この研究においては、研究者は、Ｂ型肝炎ウイルスに対して活性な、アデニンアラビノシドモノホスフェート（ａｒａ－ＡＭＰ）、リン酸化ヌクレオシドアナログをラクトサミン化ヒトアルブミン、ガラクトシド－末端マクロ分子にコンジュゲートさせた。肝臓細胞は、高い親和性でもって末端ガラクトシド残基と相互作用する受

容体蛋白質を発現する。この受容体への結合を介して、コンジュゲートされた薬物は肝臓細胞によって選択的に摂取されるであろう。吸収の後、コンジュゲートされた薬物はリソソームに送達され、そこで、コンジュゲートされた薬物の２つの成分の間の結合は切断され、その活性な形態のａｒａ－ＡＭＰを放出する。前記引用の研究において、コンジュゲートされた薬物は慢性Ｂ型肝炎感染を持つ患者を治療するのに遊離ａｒａ－ＡＭＰと同程度効果的であったが、遊離ａｒａ－ＡＭＰの投与が引き起こす神経毒性のような臨床的副作用を引き起こさなかった。そのようなアプローチを、本発明のペプチドのいずれかで用いることができる。

【００４４】

同一研究チームによる前記したものに対する関連研究において（Ｄｉ　Ｓｔｅｆａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，６１（４）：４５９，２００１）、抗－癌化学療法剤である５－フルオロ－２－デオキシウリジン（ＦＵｄＲ）をラクトサミン化ポリ－Ｌ－リシンにコンジュゲートして、該化合物を肝臓に標的化し、肝臓ミクロ転移を治療した。薬物は、ＦＵｄＲおよび標的化分子の間の結合を切断する肝臓細胞によって選択的に摂取される。次いで、遊離ＦＵｄＲの一部は肝臓細胞を出て、局所化された治療濃度の抗－癌剤が作り出される。この濃度は、肝臓に浸潤した転移性細胞に対する薬理学的活性が十分である。該薬物は肝臓で選択的に濃縮されるため、コンジュゲートした薬物の用量は遊離した未コンジュゲーテッド化合物の最小薬理学的活性用量よりも有意に小さくできる。この戦略は本発明のペプチドのいずれでも利用することができる。例えば、ラクトサミン化ポリ－Ｌ－リシンの、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択された配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）へのコンジュゲーションは、肝臓細胞に関与する細胞増殖性障害を治療または予防するのに必要な用量を有意に低下できた。

【００４５】

身体内の特定の組織または細胞型への化合物の標的化は、多数の異なる組織または細胞型で達成されている。例えば、腫瘍細胞は、しばしば、ボンベシン、黄体ホルモン－放出ホルモン、およびソマトスタチンのような、それらの表面の異常に高レベルのペプチドホルモン受容体を発現する。１つの研究において、抗－癌化合物であるパクリタキセル（タキソール）は、オクトレオチド、ソマトスタチンのアナログと薬物をコンジュゲートさせることによって、高密度でソマトスタチン受容体を発現するホルモン－分泌腫瘍細胞に選択的に標的化された。オストレオチド－コンジュゲーテッドタキソールは丁度遊離タキソールと同程度に効果的であったが、正常な細胞に対する毒性は低下していた（Ｈｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，７（７）：４５３，２０００）。本発明のペプチドをペプチドホルモン受容体のアナログにコンジュゲートさせるためのＨｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．の技術を用い、アゴニストは、高レベルのその特定のペプチドホルモン受容体を発現する細胞を特異的に標的化する処置を作り出すであろう。このアプローチは、いずれかの数のペプチドホルモン受容体を過剰発現する標的細胞に適合させることができる。薬物を特定の組織型に標的化するもう１つの実施例において、ポリ（Ｌ－アスパラギン酸）を担体分子として用いて、薬物送達を特異的に結腸細胞に標的化した（Ｌｅｏｐｏｌｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔ．Ｂｉｏｐｈａｒｍ．，２３（４）：３９７、１９９５）。

【００４６】

特定の細胞または組織型へのペプチド薬物の特異的標的化を超えて、担体分子への、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該配列はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）のコンジュゲーションは、ペプチド薬物の送達を増強させ、それにより、それらの治療効果を増加させ、またはそうでなければ改良する他の方法を提供することができる。後に記載されるコンジュゲーション技術のいずれかは、当業者が精通する他の技術に関して、本発明のペプチドのいずれでも用いることができる。いずれの薬物の有効性も、もし化

合物がその標的に効果的に送達できなければ障害となるであろう。薬物は、代謝プロセッシングまたは分解による活性の実質的喪失無くして、その活性の部位へ能動的にまたはそうでなくして輸送されなければならない。ペプチド薬物はペプチダーゼの活性に従い、高度に荷電された分子として、血液－脳関門のような脂質細胞膜および内皮細胞膜を横切る輸送が困難であり得る。他の分子へのコンジュゲーションは、分解からペプチド保護し、通常は該化合物を排除するであろう細胞または解剖学的区画へのペプチド薬物の吸収を促進する方法を提供する。

【００４７】

通常はそれからそれらが排除されるであろう身体内の位置へペプチドを接近させることによって、コンジュゲーション技術は薬物の投与のための新しい経路を開くことができる。その化学が以下の実施例５に詳細に記載され、ここに引用してその全体が一体化されるＰａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，８（３）：４３４，１９９７において、研究者は優れた鎮痛剤であることが知られたペプチド薬物、ヘプタペプチドデルトルフィンを、ペプチドが血液－脳関門を横切るのを可能とするように特異的に設計された有機分子にコンジュゲートさせた。これは、脳内脳室注射による代わりに薬物が静脈内投与されるのを可能とする。

【００４８】

Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．における担体分子は、ペプチドが関門を横切るのを可能とするに加えて、血液－脳関門を含む内皮細胞を特異的に標的化するように設計された。血液脳関門を含めた、身体全体の内皮細胞膜は、配列特異性、およびそれらの表面に提示される膜－結合エンドペプチダーゼの濃度に関して不均一である。分子の設計はこの特徴を利用して、担体分子およびその輸送体の標的化を可能とする。該分子は、その遊離末端が、血液脳関門のエンドペプチダーゼと優先的に相互作用するであろうジペプチドＡｒｇ－Ｐｒｏでキャップされた３つの脂肪酸鎖を含有する。次いで、親油性遊離酸鎖によって、荷電ペプチド薬物分子の輸送が可能とされる。かくして、ジペプチド－キャップドトリグリセリド分子は標的化、および血液脳関門を横切っての輸送を共に可能とする。

【００４９】

コンジュゲーション方法はペプチド薬物の活性のキネティックスも増強させることができる。ペプチドの活性のキネティックスを増強させるための以下に記載するコンジュゲーション技術ならびに当業者が精通した他のコンジュゲーション技術のいずれも、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択された配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）で用いることができる。Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．は、鎮痛剤ペプチドのコンジュゲートした形態は血流から脳に進入できるのみならず、同様に遊離ペプチドと比較して維持された作用を有したことを見出した。静脈内投与された薬物は治療効果を有するのにより長い時間を要したが、効果はより長く継続し、頭蓋内注射された遊離ペプチドの効果よりもゆっくりと減少した。研究者らは、コンジュゲートしたペプチド分子は血清中で顕著に安定性であるが、脳内脳室に注射した場合に効果を有しないことを見出し、これは、担体分子が、血流から脳へのその輸送の間に分解し、除去されるようであることを示す。彼らは、コンジュゲートを輸送し、担体分子を分解するのに必要な時間が改変されたキネティックスの原因でないかと考えた。遅延のメカニズムにかかわらず、臨床的状況において、コンジュゲートされたペプチド分子の静脈内安定性、および延長された開始および薬物の効果の活性は、それが頻度低く投与できることを意味する。頻度のより低い、かくして、より便宜な投与スケジュールは治療オプションとしての薬物の現実的価値を高める。

【００５０】

当業者に明らかなように、Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．の技術および手法は、本発明のペプチドのいずれも含めた限定されたサイズ範囲内に入るいずれのペプチドの送達にも容易に適合させることができる。例えば、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫの断片（ＣＭＳ－０１０）のような細胞増殖性または免疫学的障害を治療しおよび／または予防する本発明のペプチドは、Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．によって用いられる同一分子にコンジュ

ゲートさせることができた。脳に影響する感染を持つ個体の治療において、コンジュゲートした分子はＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫの断片（ＣＭＳ－０１０）が血流から脳に接近することを可能とし、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫの断片（ＣＭＳ－０１０）が脳中の細胞または組織に対してそれらの効果を発揮することを可能とするであろう。担体分子の標的化を変化させる修飾もまたそのような個人に明らかであろう。担体分子の標的化特徴は、脂肪酸鎖の末端においてジペプチドマスクを含む２つのアミノ酸の同一性の関数である。Ａｒｇ－Ｐｒｏジペプチドは血液脳関門の内皮膜の表面に見出される膜－結合エンドペプチダーゼの組と優先的に相互作用する。他の内皮細胞および膜は他のジペプチド組合せによって潜在的に標的化できるであろう。

【００５１】

コンジュゲーションは、消化管を通じて、または経皮的に効果的に吸収できるペプチド薬物を作り出すために研究者によってやはり用いられてきた。以下に記載する吸収を増強させるためのコンジュゲーション技術、ならびに当業者が精通した他のコンジュゲーション技術のいずれかを用いて、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）の吸収を増強させることができる。Ｋｒａｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．は、ペプチド薬物を胆汁酸にカップリングさせるための手法を記載する。該化合物の経口送達に続いてのコンジュゲートした分子についての吸収速度は、ペプチド単独と比較して有意に増強される（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９（１４）：１０６２１，１９９４）。Ｔｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，４２（１９）：４０１０，１９９９）は、吸収速度を増大させ、かつ抗－癌ペプチドのその活性部位への送達を増強させるための、抗－腫瘍特性を持つペプチド薬物のリポアミノ酸（ＬＡＡ）またはリポ多糖（ＬＳ）へのコンジュゲーションを記載する。それらの研究において、強い抗－増殖性特性を示すが、損なわれたファルマコキネティックスを有するソマトスタチンの誘導体をＬＡＡまたはＬＳいずれかにコンジュゲートさせる。得られたコンジュゲート薬物は皮膚および腸上皮を横切る吸収プロフィールを改良し、腫瘍細胞に対して依然として活性でありつつ、分化に対する抵抗性を増加させた。これらの技術は、本発明のペプチドのいずれかとのコンジュゲーションで非常に有用であろう。腸上皮を横切る分子の吸収速度を増加させることによって、ペプチドのより多くを血流に送達し、治療すべき個体に対してその効果を発揮させることができる。

【００５２】

また、コンジュゲーションを用いて、ペプチド薬物の維持された放出を提供することもできる。維持された放出を供するためのコンジュゲーション技術、ならびに当業者が精通した他のコンジュゲーション技術のいずれかを用いて、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）の維持された放出を供することができる。Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．の業績において前記で分かるように、ペプチド薬物の維持された送達はコンジュゲーション方法で達成することができる。もう１つの実施例はＫｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ，２３：２３１１，２００２）の仕事であり、そこでは、生分解性ポリ（乳酸－コ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）マイクロスフィアへのマイクロカプセル化前に、組換えヒト表皮成長因子（ｒｈＥＧＦ）がポリエチレングリコール（ＰＥＧ）にコンジュゲートされた。ＰＬＧＡにおけるマイクロカプセル化は、種々の成長因子および形態形成性蛋白質を送達するためにいくつかのグループによって用いられてきた（Ｍｅｉｎｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌ．，７０：１９３，２００１）。ＰＥＧへのコンジュゲーションを通じて、ｒｈＥＧＦは、未コンジュゲーテッド遊離ｒｈＥＧＦと比較して、ＰＬＧＡとのミセル形成の間に、水溶性凝集体への形成に対して、および水－有機相界面への吸着に対して抵抗性となった。コンジュゲートされたホルモンでの処方の薬物動態が改良され、遊離ホルモンとよりも長く継続し、より定常的であって、かつ総じてより大きな薬物活性を示し、これは、研究者が推測するには、ＰＥＧにコンジュゲートしたホルモンの増強された物理的安定

性によるものである。同様な戦略を使用して、本発明のポリペプチドのいずれかの維持放出処方を作成できよう。例えば、以下の実施例１で見られるように、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）の特定の断片および誘導体は優れた抗－増殖性および免疫調節効果を呈する。ＰＥＧをこのペプチドにコンジュゲートさせ、コンジュゲートさせた薬物をＰＬＧＡマイクロスフィアに取り込むことによって、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）の断片および誘導体の抗－増殖性および免疫－調節効果はより長く継続でき、より安定であり得る。というのは、薬物の用量は、それがそのＰＥＧコンジュゲートから放出されるにつれ、より均一であり、感染の部位へのペプチド薬物のより一定な送達を確実とする。

【００５３】

ペプチド薬物の延長された放出はその活性を有意に増強させることができる。以下に記載するペプチドの延長された放出を提供するコンジュゲーション技術、ならびに当業者が精通する他のコンジュゲーション技術のいずれかを用いて、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含み、実質的にそれよりなり、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）の延長された放出を供することができる。Ｏｌｄｈａｍ ｅｔ ａｌ．（Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１６：１２５，２０００）は、薬物の新しい形態に対する抗癌剤パクリタキセル、ポリ（Ｌ－グルタミン酸）にコンジュゲートしたパクリタキセル（ＰＧ－ＴＸＬ）を比較する。ＰＧ－ＴＸＬは、遊離パクリタキセルと比較した優れた抗－腫瘍活性を有するように見え、これは、薬物が薬物動態学特性を有し、作用の優れた方法でさえあり得ることを示唆する。しかしながら、研究者は、ＰＧ－ＴＸＬが、遊離薬物と同一の作用メカニズムによってその効果を奏し、微小管サブユニットの重合を乱すことによって細胞周期阻止を誘導することを見出した。エビデンスは、コンジュゲートした薬物の優れた抗－腫瘍活性がコンジュゲートからの遊離薬物の連続的かつ定常的放出から生起し、遊離ペプチドの当量と比較してより長時間その治療濃度を維持することを示唆する。感染と戦う特性を持つ本発明のペプチドへのポリ（Ｌ－グルタミン酸）テイルの付加は、同様に、それらの特性を増強させ得るであろう。

【００５４】

ペプチドの酵素分解は、いくつかの場合において、薬物としてのペプチドの有効性を低下させ得る。以下に記載するペプチドの酵素分解を低下させるためのコンジュゲーション技術、ならびに当業者が精通する他のコンジュゲーション技術のいずれかを用いて、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）の酵素分解を低下させることができる。研究者らは、腸における管腔に分泌されたプロテアーゼならびに膜－結合ペプチダーゼからペプチドを保護するために多数のアプローチを開発した。後者は全ての粘膜組織の表面に見出され、その交差は、しばしば、ペプチド薬物の進入経路である。Ｂｅｒｎｋｏｐ－Ｓｃｈｕｒｃｈ ｅｔ ａｌ．（Ｊ．Ｄｒｕｇ Ｔａｒｇｅｔ，７：５５，１９９９）は、ペプシンの阻害剤を含有するペプチド薬物処方の創製を報告する。ペプスタチンのアナログをムコ接着性ポリマーに共有結合させ；この新規なペプシン阻害剤はインスリンを含有する錠剤に含めた。消化を刺激する実験室条件下でのインキュベーションの後、制御錠剤からのインスリンの全ては代謝され、他方、該阻害剤を含有する錠剤からのインスリンのほぼ５０％が分解から保護された。もう１つの実験において、同一のグループは、生物学的に活性なペプチドの分解を阻害する毒性副作用を通常は引き起こす用量にてプロテアーゼ阻害剤を利用した（Ｂｅｒｎｋｏｐ－Ｓｃｈｎｕｒｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌ．Ｒｅｖ．，５２：１２７，２００１）。このアプローチは、甲殻綱動物および他の生物で見出される主要構造多糖であるキチンから抽出されたセルロースに関連するアミノ多糖であるキトサンを利用する。ペプチダーゼ阻害剤をキトサンにコンジュゲートさせ、かつこのコンジュゲートした分子をペプチド薬物の処方に含めることによって、消化管プロテアーゼの有意な阻害が観察され、遊離プロテアーゼ阻害剤の投与では予測される副作用なくして、ペプチドの生物学

的利用性を増加させた。該研究においては、種々のプロテアーゼ阻害剤が、単独で、および組み合わされて、キトサン担体へのコンジュゲーションのために利用された。キトサン－ＥＤＴＡコンジュゲートが、活性のためにある種のプロテアーゼによって必要とされるミネラル補因子に結合することによって同様に内因性プロテアーゼを阻害した。当業者に容易に明らかなように、担体分子およびエフェクター部位の間の非常に多数の可能な組合せを作りだして、ペプチド処方に対する有益な特性を供することができ、そのいずれも、本発明のペプチドで用いるのに容易に適合させることができよう。キトサンに結合したプロテアーゼ阻害剤を用いるペプチドの経口送達用の処方を作成することによって、本発明のペプチドの経口送達を筋肉内注射の代わりに用いることができよう。このアプローチは、このペプチドおよびその誘導体についてのなおより大きなレベルの生物学的利用性を作り出すために、この処方において、（前記パラグラフで議論した）配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなる。ペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０配列を含まない）のより吸収可能なコンジュゲーテッドバージョンを用いることを排除しない。

【００５５】

もう１つの分子によってある位置に標的化されることに加えて、ペプチドそれ自体は標的とする分子として働くことができる。後に記載する所望の位置へ分子を標的化するペプチドを用いるためのコンジュゲーション技術、ならびに当業者が精通した他のコンジュゲーション技術のいずれも、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドがＣＭＳ－０１０の配列を含まない）で用いることもできる。例えば、研究者らは、抗癌薬物ジフルオロメチルオルニチン（ＤＦＭＯ）を取り、それを標的化目的でペプチドにコンジュゲートした。ＤＦＭＯは種々の腫瘍細胞型を殺すにおいて効果的な高度に細胞傷害性剤である。しかしながら、それは身体から迅速に排出されるため、その治療価値は制限される。この研究において、ＤＦＭＯは、αメラノトロピンの特定の断片、およびヒトメラノーマ細胞系上のメラノトロピン受容体に優先的に結合することが示された２つのアミノ酸置換を含有する該断片のアナログにコンジュゲートされた（Ｓｕｌｉ－Ｖａｒｇｈａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．，８６：９９７，１９９７）。アミノペプチダーゼによるペプチド断片からのＤＦＭＯの遊離を容易とするために、薬物は該ペプチドのＮ－末端にコンジュゲートされた。研究者らは、コンジュゲートされた薬物が未コンジュゲッテッド薬物単独よりもメラノーマ細胞を殺傷するにおいてより効果的であることを見出した。

【００５６】

本発明のペプチドの効果は、ペプチドそれ自体における固有の標的化能力に部分的にはよるものであろう。例えば、αメラノトロピン断片のように、本発明の特定のペプチドは、細胞の区別されるタイプの表面に見出されるある種の受容体に結合することができる。そのペプチドをコンジュガントとして用いることによって、薬物を、薬物で治療すべき個体の身体内の細胞の位置に標的化することができよう。

【００５７】

コンジュゲートとしてのペプチドは標的化以外の機能を発揮することができる。以下に記載するペプチドの治療的有効性を増強するためのコンジュゲーション技術、ならびに当業者が精通した他のコンジュゲーション技術のいずれかを用いて、配列番号２ないし３１およびその機能的誘導体から選択される配列を含む、実質的にそれよりなる、またはそれよりなるペプチド（ここに、該ペプチドはＣＭＳ－０１０の配列を含まない）の治療的有効性を増強させることもできる。Ｆｉｔｚｐａｔｒｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．は、２つの分子の間のペプチドスペーサーを用いることによってコンジュゲートされた抗癌剤を改良した（Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ，１０：１，１９９５）。メトトレキセートは、腫瘍細胞に対する活性によってその摂取を増強させるためにヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）に既にコンジュゲートされている。一旦細胞によって摂取されると、メトトレキセートのいくらかはリソソーム中の酵素によってコンジュゲートから遊離され、つい

で、その細胞傷害性効果を発揮することができる。４アミノ酸リンカーペプチドを、メトトレキセート、およびリソソーム酵素によって容易に消化されるＨＳＡの間に挿入することによって、コンジュゲート分子から細胞内で生じた活性メトトレキセートの量を増加させた。本発明のペプチドは、特定の酵素との特定の相互作用を介してそれらの効果を発揮させることができる。薬物およびその担体分子の間のリンカーセグメントとして、またはもう１つのリンカーセグメントに加えて、コンジュゲートされた分子に本発明のペプチドを取り込むことによって、薬物動態を改変することができる。これは、引き続いて、コンジュゲートからの薬物分子放出の速度を減少させまたは増加させる、プロテアーゼの活性に対してより抵抗性またはより感受性であるプロドラッグを作り出すことができる。前記したコンジュゲーテッド化学療法剤の実施例で見られるように、薬物分子送達のその速度の変化は、薬物の有効性を大いに増強させることができる。

【００５８】

特定の細胞に対する薬物の効果は、細胞の活性化状態、または細胞近くのまたは細胞内の他の分子シグナルの存在に依存して変化させることができる。いくつかの場合において、薬物が効果を有するためには、もう１つの分子またはシグナルが存在する必要がある。Ｄａｍｊａｎｃｉｃ　ｅｔ　ａｌ．（Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎ．，９５：３１５，１９９０）が、欠乏した内因性グルココルチコイド合成を持つ患者に対するヒト心房ナトリウム利尿性ペプチド（ｈＡＮＰ）の効果を調べた。ペプチドは、グルココルチコイド療法の中断の間に、またはデキサメタゾンを用いる療法の引き続いての再開の間に患者に与えられた。患者は、ペプチドホルモンが同時デキサメタゾン治療の間に認められた場合にのみ、利尿およびナトリウム排出の増加に伴ってｈＡＮＰに応答した。グルココルチコイド療法の中断の間でのｈＡＮＰでの処置は効果を有しなかった。同時ステロイドホルモン投与の効果は、ペプチドの活性を増強することもできる。Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｃｔａ　Ｐｈａｒｍ．Ｓｉｎｉｃａ，２８：１６６，１９９３）からの報告において、鎮痛剤ペプチドキオトルフィン（ＫＴＰ）の活性は、ペプチド単独の作用と比較して、短いリンカーセグメントを介するヒドロコルチゾンへのコンジュゲーションによって有意に増強された。ヒドロコルチゾン単独の投与では効果は観察されなかった。

【００５９】

これらの研究の結果は、コンジュゲーテッド分子としての、または処方における成分としてのステロイドホルモンの能力は生物学的に活性なペプチドの活性を可能とし、または増強させることができることを示す。本発明のペプチドのいずれも、ステロイドホルモンへのコンジュゲーション、またはステロイドホルモンの共適用によって変調し、または活性化することもできる。Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．技術は、本発明のペプチドへのステロイド分子のコンジュゲーションに容易に適合させることができる。図１ないし５も、また、本発明のペプチドのいずれかへステロイドホルモンを連結させるための段階的合成反応の実施例を提供する。

【００６０】

前記で示した実施例は、本発明のペプチドのいずれかの有用性および活性を増加させる例示的な方法を提供する。この分野におけるさらなる発展は、効果的なペプチド－ベースの臨床的治療に対するバリアーを克服するのを助ける。当業者に明らかなように、ペプチド生化学、医薬研究および臨床試験で用いるために開発された技術、試薬およびプロトコルは本発明のペプチドのいずれにも全て容易に適用することができる。

【００６１】

実施例

背景

ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）の配列内では、いくつかのアミノ酸は他のものよりも生物学的活性につき非常に重要であり得ると予測された。本発明のいくつかの実施形態において、ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）内の活性な部位／複数部位を見出すことによって、ペプチドの活性に寄与しない配列中のアミノ酸は、生物学的活性分子をより短くすることができるように除去することが

できる。ペプチドの異なる活性部位の組換えを行って、修飾された生物学的活性を有する新しいペプチド分子を得ることもできる。生物学的活性ペプチド分子の短縮化は、生物学的および経済的重要性双方を有することができる。より短い配列を有することによって、ペプチドの生物学的特性を修飾し、そのような修飾が、修飾された生物学的半減期、受容体親和性、または副作用プロフィールのような潜在的治療的利点を有することができる。また、より短いペプチドは生成するのがより安価であり、生成コストを低減させることができる。

【００６２】

ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ（ＣＭＳ－０１０）内の活性な部位を決定するために、我々は一連の切断実験を行った。ＣＭＳ－０１０を、アミノ末端からカルボキシル末端へペプチド結合の各々を切断した。我々は、もし活性部位が切断されると、ペプチドの得られた対の生物学的活性は減少し、消失し、または幾分修飾されると予測する（生物学的活性の活性化／不活化）。活性な部位／複数部位をＣＭＳ－０１０内で突き止めた後、ペプチドの新しい組を、異なる活性部位の組合せによって構築することができる。

【００６３】

切断された、または組換えペプチドの組を、有力な治療としてのヒトへのまたは生物学的な用途を有する生物活性を有するものとして我々の実験で同定した。ペプチドのこの組を以下の表１に掲げる。我々の知見は、表１後の実施例で報告する。

【００６４】

【表１】

表１：ＣＭＳ－０１０の配列に基づく切形されたおよび組換えペプチド

ペプチド	配列	配列番号
CMS-010.02	APEEHPTLLTEAPLNPK	2
CMS-010.03	VAPEEHPTLLTEAPLNP	3
CMS-010.04	PEEHPTLLTEAPLNPK	4
CMS-010.05	VAPEEHPTLLTEAPLN	5
CMS-010.07	VAPEEHPTLLTEAPL	6
CMS-010.08	VAPEEHPTLLTEAP	7
CMS-010.09	EHPTLLTEAPLNPK	8
CMS-010.11	HPTLLTEAPLNPK	9
CMS-010.12	VAPEEHPTLLTE	10
CMS-010.13	PTLLTEAPLNPK	11
CMS-010.14	VAPEEHPTLLT	12
CMS-010.15	TLLTEAPLNPK	13
CMS-010.16	VAPEEHPTLL	14
CMS-010.17	LLTEAPLNPK	15
CMS-010.18	VAPEEHPTL	16
CMS-010.19	LTEAPLNPK	17
CMS-010.20	VAPEEHPT	18
CMS-010.21	TEAPLNPK	19
CMS-010.22	VAPEEHP	20
CMS-010.23	EAPLNPK	21
CMS-010.24	APLNPK	22
CMS-010.25	VAPEEH	23
CMS-010.26	PLNPK	24
CMS-010.27	VAPEE	25
CMS-010.28	LNPK	26
CMS-010.29	VAPE	27
CMS-010.31	NPK	28
CMS-010.32	VA	29
CMS-010.103	VALLT	30
CMS-010.105	VANPK	31

【００６５】

実施例１

イン・ビトロにおいてＣｏｎＡによって誘導されたマウスＴ－リンパ球形質転換に対するペプチドの効果

１．１．材料

１．１．１．ペプチド

関連する全てのアミノ酸はＬ形のものであった：ＣＳ　Ｂｉｏ　Ｃｏ．，ＵＳＡ

１．１．２　対照および他の試薬

生理食塩水：ＯＴＳＵＫＡ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ，ＰＲ Ｃｈｉｎａ。ＲＰＭＩ－１６４０培養基および胎児ウシ血清（ＦＢＳ）：Ｇｉｂｃｏｌ Ｃｏ．，ＵＳＡ。ＭＴＴおよびＣｏｎＡ：Ｓｉｇｍａ　Ｃｏ．，ＵＳＡ

１．２　動物

ＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｈ－２^{d}，ＳＰＦ，６ないし８週齢、体重１８ないし２２ｇ：Ｍｉｌｉｔａｒｙ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ，ＰＲ Ｃｈｉｎａ。

【００６６】
１．３　方法［１］
健康なマウスから脾臓を無菌的に摘出し、注射針を用いて１０％ＦＢＳ　ＲＰＭＩ－１６４０溶液に手動により分散させた。分散させた細胞懸濁液をさらに１００－ゲージ１５０μｍ直径ステンレス鋼シーブを通してさらに篩った。脾臓細胞懸濁液を４×１０^{6}／ｍＬの密度に調製し、１００μＬ／ウェルにて９６－ウェル細胞培養プレートにアリコートした。ペプチドを純なＲＰＭＩ－１６４０に溶解させた。グループ分けの設計を以下に掲げる。
【００６７】
ペプチド群：１００μＬ作用ペプチド溶液＋７５μＬ脾臓細胞懸濁液＋２５μＬ　ＣｏｎＡ作用溶液
ＣｏｎＡ対照群：１００μＬ　ＲＰＭＩ－１６４０＋７５μＬ脾臓細胞懸濁液＋２５μＬ　ＣｏｎＡ作用溶液
陰性対照群：１２５μＬ　ＲＰＭＩ－１６４０＋７５μＬ脾臓細胞懸濁液
ウェル中のＣｏｎＡの最終濃度は５μｇ／ｍＬであった。ウェル中のペプチドの最終濃度は８０μｇ／ｍＬ、１６μｇ／ｍＬ、３．２μｇ／ｍＬ、０．６４μｇ／ｍＬ、および０．１２８μｇ／ｍＬであった。各ペプチド群が３つの平行ウェル、および対照群のための８または１２のウェルを含んだ。細胞を３７℃、５％CO_2にて６８時間インキュベートした。ＭＴＴ方法を用いて、ＥＬＩＳＡリーダーにて６３０ｎｍで参照した各ウェルのOD_{570}ｎｍの数値を得た。
【００６８】
１．４　結果
【００６９】
【表２】

表２　イン・ビトロにおいてＣｏｎＡによって誘導されたマウスーＴーリンパ球形質転換に対するペプチドの効果

群	濃度	N	OD
CMS-010.26	80μg/ml	3	0.353±0.016*
CMS-010.26	16μg/ml	3	0.356±0.006*
CMS-010.26	3.2μg/ml	3	0.332±0.015*
CMS-010.26	0.64μg/ml	3	0.348±0.025*
CMS-010.26	0.128μg/ml	3	0.354±0.017*
CMS-010.105	80μg/ml	3	0.407±0.019*
CMS-010.105	0.64μg/ml	3	0.386±0.008*
陰性対照	-	12	0.134±0.011*
ＣｏｎＡ対照	5μg/ml	12	0.467±0.043

＊：ＣｏｎＡ陰性対照群と比較、Ｐ＜０．０５

【００７０】

【表３】

表３　イン・ビトロにおいてＣｏｎＡによって誘導されたマウスＴ－リンパ球形質転換に対するペプチドの効果

群	濃度	N	OD
CMS-010.32	80μg/ml	3	0.276±0.034*
CMS-010.32	16μg/ml	3	0.273±0.023*
CMS-010.32	3.2μg/ml	3	0.309±0.030*
CMS-010.32	0.64μg/ml	3	0.321±0.048
CMS-010.32	0.128μg/ml	3	0.306±0.033*
陰性対照	5μg/ml	8	0.108±0.012*
ＣｏｎＡ対照	-	8	0.358±0.028

＊：ＣｏｎＡ陰性対照群と比較、Ｐ＜０．０５

【００７１】

１．５　結論

ＣＭＳ－０１０．２６、ＣＭＳ－０１０．３２およびＣＭＳ－０１０．１０５は、適当な濃度において、ＣｏｎＡ陽性対照と比較して統計学的有意性をもって（Ｐ＜０．０５）、イン・ビトロにてＣｏｎＡによって誘導されたマウスＴ－リンパ球形質転換を抑制することができることが見出された。

【００７２】

実施例２

イン・ビボにおけるマウスＴ－リンパ球形質転換およびＮＫ細胞活性に対するペプチドの効果

２．１　材料

２．１．１　ペプチド

関連する全てのアミノ酸はＬ形のものであった：ＣＳ　Ｂｉｏ　Ｃｏ．，ＵＳＡ

２．１．２　対照および他の試薬

サイクロスポリンＡ：Ｎｏｖａｒｔｉｓ　Ｐｈａｒｍａ　ＡＧ．，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ。生理食塩水：ＯＴＳＵＫＡ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏ．Ｌｔｄ，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。ＲＰＭＩ－１６４０培養基および胎児ウシ血清（ＦＢＳ）：ＧＩＢＣＯＬ，ＵＳＡ。ＭＴＴおよびＣｏｎＡ：Ｓｉｇｍａ　Ｃｏ．，ＵＳＡ

２．１．３　動物

ＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｈ－２^{d}、ＳＰＦ、６ないし８週齢、体重１８ないし２２ｇ、５０％雌および５０％雄）：Ｍｉｌｉｔａｒｙ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。

【００７３】

２．２　方法

２．２．１　動物のグループ分けおよび投与

全ての動物は２つのペプチド群（２００μｇ／ｋｇ／日および５０μｇ／ｋｇ／日）、サイクロスポリンＡ群（１０ｍｇ／ｋｇ／日）および生理食塩水群（０．５ｍＬ／日）にランダム化した。各群は１０匹のマウスを含み、そこでは、半分が雌であって半分が雄であった。全てのテスト物質を０．５ｍＬ生理食塩水に溶解させ、１日１回２０日間、腹腔内投与した。Ｔ－リンパ球形質転換およびＮＫ細胞活性を、最後の注射直後の日に調べた。

【００７４】
２．２．２　Ｔ－リンパ球形質転換［１－２］
最後のテスト物質投与の後の日に、マウスを頸部脱臼によって犠牲にした。脾臓を無菌的に摘出し、注射針を用いて１０％ＦＢＳ　ＲＰＭＩ－１６４０溶液に手動で分散させた。分散させて細胞懸濁液を、さらに、１００ゲージ１５０μｍ直径のステンレス鋼シールを通して篩い、４×１０^{6}／ｍＬに調製した。細胞懸濁液を、以下の設計にて、９６ウェル細胞培養プレート、１００μＬ／ウェルに摂取した。
【００７５】
アッセイウェル：１００μＬ細胞懸濁液＋１００μＬ　ＣｏｎＡ
対照ウェル：１００μＬ細胞懸濁液＋１００μＬ　ＲＰＭＩ－１６４０
４つのアッセイおよび４つの対照ウェルを各動物につき設定した。プレートを３７℃、５％CO_2にて６８時間インキュベートした。次いで、ＭＴＴを加え、プレートを、ＥＬＩＳＡリーダーにて、６３０ｎｍにおいて参照するＯＤ５７０ｎｍで読んだ。刺激指数ＳＩ（％）＝（アッセイウェルＯＤ／対照ウェルＯＤ）×１００％
２．２．３　ＮＫ細胞活性に対するペプチドの効果［３－５］
ＹＡＣ－１標的細胞を対数期までもってゆき、１×１０^{5}／ｍＬの密度に調製した。マウス脾臓細胞を前記セクション２．２．２に調製し、４×１０^{6}／ｍＬの密度に調製し、エフェクター細胞として用いた。細胞懸濁液を９６ウェル細胞培養プレートに以下のように摂取した：
エフェクター細胞ウェル：１００μＬ脾臓細胞懸濁液＋１００μＬ　ＲＰＭＩ－１６４０
アッセイウェル：１００μＬ脾臓細胞懸濁液＋１００μＬ　ＹＡＣ－１細胞懸濁液
標的細胞ウェル：１００μＬ　ＹＡＣ－１細胞懸濁液＋１００μＬ　ＲＰＭＩ－１６４０
３つのアッセイウェルおよび３つのエフェクター細胞ウェルを各動物につき設計し、１２の標的細胞ウェルを細胞培養プレート当たり設定した。プレートを３７℃、５％CO_2にて４時間インキュベートし、次いで、ＭＴＴを加え、プレートを、ＥＬＩＳＡリーダーにて、６３０ｎｍにて参照するＯＤ５７０ｎｍで読んだ。ＮＫ細胞活性（％）＝１－［（アッセイウェルＯＤ－エフェクター細胞ウェルＯＤ）／標的細胞ウェルＯＤ］×１００％
２．３　結果
２．３．１　Ｔ－リンパ球形質転換の実験
【００７６】
【表４】

表４　マウスＴ－リンパ球形質転換に対するペプチドの効果(1)

群	用量	N	SI
CMS-010.24	５０μｇ／ｋｇ／日	10	2.40±0.31**
CMS-010.26	２００μｇ／ｋｇ／日	7	2.19±0.59**
CMS-010.28	２００μｇ／ｋｇ／日	9	2.70±0.37**
生理食塩水	０．５ｍＬ／日	8	3.63±0.69

＊＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０１

【００７７】

【表５】

表５　マウスＴ－リンパ球形質転換に対するペプチドの効果（２）

群	用量	N	SI
CMS-010.25	２００μｇ／ｋｇ／日	10	2.43±0.69*
生理食塩水	０．５ｍＬ／日	10	3.15±0.83

＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０５

【００７８】
【表６】

表６　マウスＴ－リンパ球形質転換に対するペプチドの効果（３）

群	用量	N	SI
CMS-010.04	５０μｇ／ｋｇ／日	8	1.56±0.25**
生理食塩水	０．５ｍＬ／日	9	2.24±0.52

＊＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０１

【００７９】
【表７】

表７　マウスＴ－リンパ球形質転換に対するペプチドの効果（４）

群	用量	N	SI
CMS-010.12	５０μｇ／ｋｇ／日	10	2.12±0.42**
CMS-010.14	５０μｇ／ｋｇ／日	9	2.12±0.51**
生理食塩水	０．５ｍＬ／日	10	2.96±0.61

＊＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０１

【００８０】
２．３．２　ＮＫ細胞活性の実験
【００８１】

【表８】

表８　マウスＮＫ細胞活性に対するペプチドの効果（1）

群	用量	N	ＮＫ細胞活性（%）
CMS-010.24	２００μｇ／ｋｇ／日	10	69.0±7.4*
CMS-010.24	５０μｇ／ｋｇ／日	10	56.0±6.0**
CMS-010.26	２００μｇ／ｋｇ／日	9	67.7±5.3**
CMS-010.26	５０μｇ／ｋｇ／日	10	68.5±7.2*
CMS-010.28	２００μｇ／ｋｇ／日	9	70.3±6.7*
生理食塩水	０．５ｍＬ／日	10	76.0±4.3

＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０５　＊＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０１

【００８２】

【表９】

表９　マウスＮＫ細胞活性に対するペプチドの効果（2）

群	用量	N	ＮＫ細胞活性（%）
CMS-010.11	５０μｇ／ｋｇ／日	9	63.5±4.7**
CMS-010.13	５０μｇ／ｋｇ／日	10	70.9±17.5*
CMS-010.14	２００μｇ／ｋｇ／日	8	43.1±13.7*
CMS-010.14	５０μｇ／ｋｇ／日	9	75.3±9.0**
生理食塩水	０．５ｍＬ／日	10	55.3± 6.1

＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０５　＊＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０１

【００８３】

２．４　結論

適当な用量において、ＣＭＳ－０１０．０４、ＣＭＳ－０１０．１２、ＣＭＳ－０１０．１４、ＣＭＳ－０１０．２４、ＣＭＳ－０１０．２５、ＣＭＳ－０１０．２６、およびＣＭＳ－０１０．２８は、生理食塩水対照と比較して統計学的に有意性をもって（Ｐ＜０．０５）、イン・ビボにてマウスＴ－リンパ球形質転換を抑制することが判明した。

【００８４】

適当な用量において、ＣＭＳ－０１０．２４、ＣＭＳ－０１０．２６、およびＣＭＳ－０１０．２８は、生理食塩水対照と比較して統計学的有意性をもって（Ｐ＜０．０５）、イン・ビボにてマウスＮＫ細胞活性を抑制することが判明した。

【００８５】

適当な用量において、ＣＭＳ－０１０．１１、ＣＭＳ－０１０．１３、およびＣＭＳ－０１０．１４は、生理食塩水対照と比較して統計学的有意性をもって（Ｐ＜０．０５）、イン・ビボにてマウスＮＫ細胞活性を増強することが判明した。

【００８６】

実施例３

イン・ビボにおけるマウス抗体形成に対するペプチドの効果

３．１　材料

３．１．１　ペプチド
関係する全てのアミノ酸はＬ形のものであった：ＣＳ　Ｂｉｏ　Ｃｏ．，ＵＳＡ。
【００８７】
３．１．２　対照および他の試薬
サイクロスポリンＡ：Ｎｏｖａｒｔｉｓ　Ｐｈａｒｍａ　ＡＧ．，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ。生理食塩水：ＯＴＳＵＫＡ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏ．Ｌｔｄ．，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。
３．１．３　動物
ＢＡＬＢ／ｃマウス（Ｈ－２^{d}、ＳＰＦ、６ないし８週齢、体重１８ないし２２ｇ、５０％雌および５０％雄）：Ｍｉｌｉｔａｒｙ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。
【００８８】
３．２方法
３．２．１　動物のグループ分けおよびテスト物質の投与
マウスを３つの群：ペプチド（２００μｇ／ｋｇ／日）、サイクロスポリンＡ（１０ｍｇ／ｋｇ／日）、および生理食塩水（０．５ｍＬ）にランダム化した。各群は１２匹のマウス、６匹の雌および６匹の雄を含んだ。テスト物質を０．５ｍＬの生理食塩水に溶解させ、２０連続日の間、１日当たり１回腹腔内適用した。
【００８９】
３．２．２　抗体の生起および定量［７］
ヒツジ赤血球細胞（ＳＲＢＣ）を生理食塩水で２％（ｖ／ｖ）に再懸濁させ、０．２ｍＬの再懸濁させた細胞溶液をテスト物質投与から１６日に各マウスに腹腔内適用した。最後のテスト物質投与後の日に、血液を内眼角から収集し、血清滲出のために１時間室温に放置した。１０分間の２００ｇにおける遠心の後、ノーマル生理食塩水で血清を２００倍希釈した。
【００９０】
補体作用溶液の調製のために、１０用量の真正なモルモット血清を１容量の遠心－充填ＳＲＢＣに加えた。この混合物を４℃にて３０分間穏やかに振盪した。次いで、１０分間の２００ｇにおける遠心によってＳＲＢＣを除去した。１０容量のノーマル生理食塩水を上清に加えて、作用補体溶液を得た。
【００９１】
マウス抗体力価のアッセイのために、０．２ｍＬの１％ＳＲＢＣ懸濁液を各マウスからの１ｍＬの希釈された氷冷マウス血清に加えた。次いで、１ｍＬの作用補体溶液を加え、混合物を３７℃にて２０分間インキュベートした。各試料を氷上で１０分間冷却することによって、反応を停止させた。次いで、試料を２００ｇにおいて１０分間遠心して、上清を得た。１ｍＬのこの上清に、３ｍＬのＤｒａｂｋｉｎ溶液を加え、室温にて１０分間放置し、次いで、OD_{540nm}を測定した。OD_{540nm}における参照溶解－５０の数値は、ＳＲＢＣの半分を生理食塩水で置き換え、未溶解ＳＲＢＣの遠心除去を行わない以外は、試料として正確な手法に従うことによって決定した。試料血清指標（HC_{50}）＝試料のOD_{540nm}／溶解－５０　OD_{540nm}×２００。
【００９２】
３．３　結果
【００９３】

【表１０】

表１０　マウス抗体形成に対するペプチドの効果

群	用量	N	HC_{50}
CMS-010.26	200μg/kg/日	10	141.3±29.3*
サイクロスポリンA	10mg/kg/日	12	148.9±21.7*
生理食塩水	0.5ml/日	11	167.6±21.5

＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０５

【００９４】

３．４　結論

適当な用量におけるＣＭＣ　０１０．２６は、生理食塩水対照群と比較して統計学的有意性をもって（Ｐ＜０．０５）、イン・ビボにてマウス抗体形成を抑制することが判明した。

【００９５】

実施例４

イン・ビボにおけるＫＭマウス－移植Ｓ１８０肉腫細胞の成長速度に対するペプチドの効果

４．１　材料

４．１．１　ペプチド

全ての関与するアミノ酸はＬ形のものであった：ＣＳ　Ｂｉｏ　Ｃｏ．，ＵＳＡ

４．１．２　対照および他の試薬

生理食塩水：ＯＴＳＵＫＡ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏ．Ｌｔｄ．，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。アドリアマイシン：Ｚｈｅｊｉａｎｇ　Ｈａｉｚｈｅｎｇ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ．，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。

【００９６】

４．１．３　動物

健康な雌ＫＭマウス（ＳＰＦ、６ないし８週齢、体重１８ないし２２ｇ）：Ｍｉｌｉｔａｒｙ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。

【００９７】

４．２　方法

４．２．１　動物のグループ分け、テスト物質の投与および腫瘍細胞の移植［８］

S_{180}肉腫細胞を６ないし８日間でＫＭマウスに腹腔内移植し、腹水液を無菌的に収集した。細胞の濃度を１０％ＦＢＳ　ＲＰＭＩ－１６４０でｍＬ当たり1×10^{7}に調整し、肉腫担持マウスモデルを開発するために、０．２ｍＬの細胞懸濁液をアームピットを通して各ＫＭマウスに注射した。S_{180}肉腫細胞を移植したマウスを５つの群：ペプチド（２つの群：５０μｇ／ｋｇ／日および１０μｇ／ｋｇ／日）、アドリアマイシン（２ｍｇ／ｋｇ／日）、シクロホスファミド（４０ｍｇ／ｋｇ／日）、および生理食塩水（０．５ｍＬ／日）にランダム化した。テスト物質の腹腔内注射は腫瘍移植直後の日に開始し、２０連続日の間、１日当たり１回継続した。

【００９８】

４．２．２　肉腫発生決定

最後のテスト物質投与後の日に、肉腫をマウスから摘出し、重量を測定した。３つの面（Ａ、Ｂ、Ｃ）上の各肉腫の直径をノギスによって測定した。肉腫の容量は式：Ｖ＝（１／６）πＡＢＣによって計算した。腫瘍成長阻害指標は式：腫瘍成長阻害因子＝（対照群の腫瘍重量－処理群の腫瘍重量）／対照群の腫瘍重量×１００％によって計算した。

【００９９】

４．３　結果

【０１００】
【表１１】

表１１　イン・ビボにおけるマウス－移植Ｓ$_{180}$肉腫細胞の発生に対するペプチドの効果(1)

群	用量	N	肉腫重量
CMS-010.31	５０μｇ／ｋｇ／日	17	1.20±1.60*
CMS-010.31	１０μｇ／ｋｇ／日	14	1.05±1.28*
CMS-010.103	５０μｇ／ｋｇ／日	15	1.48±1.44*
CMS-010.103	１０μｇ／ｋｇ／日	15	1.72±1.53*
アドリアマイシン	２ｍｇ／ｋｇ／日	17	1.52±1.75*
生理食塩水	０．５ｍＬ／日	12	5.07±5.46

＊：ノーマル生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０５

表１２　イン・ビボにおけるマウス－移植Ｓ$_{180}$肉腫細胞の発生に対するペプチドの効果(2)

群	用量	N	肉腫重量	肉腫容量
CMS-010.02	500μg/kg/日	10	0.97±0.85*	0.65±0.67*
CMS-010.02	250μg/kg/日	10	0.68±0.72*	0.36±0.40*
CMS-010.03	500μg/kg/日	10	0.33±0.35*@	0.27±0.33*@
CMS-010.03	250μg/kg/日	10	0.68±0.46*	0.31±0.22*
CMS-010.04	500μg/kg/日	10	0.62±0.44*	0.40±0.28*
CMS-010.04	250μg/kg/日	10	0.27±0.19*@	0.17±0.12*@
CMS-010.05	500μg/kg/日	10	0.47±0.29*@	0.34±0.22*
CMS-010.05	250μg/kg/日	10	0.56±0.33*	0.23±0.19*@
CMS-010.07	500μg/kg/日	10	0.52±0.25*	0.37±0.20*
CMS-010.07	250μg/kg/日	10	0.32±0.14*@	0.24±0.13*@
CMS-010.08	500μg/kg/日	10	1.05±0.64*	1.01±0.63
CMS-010.08	250μg/kg/日	10	0.38±0.27*@	0.20±0.14*@
CMS-010.09	500μg/kg/日	10	0.85±0.70*	0.84±0.84
CMS-010.09	250μg/kg/日	10	0.45±0.38*@	0.37±0.44*
CMS-010.11	500μg/kg/日	10	1.14±0.74*	0.95±0.54
CMS-010.11	250μg/kg/日	10	0.64±0.31*	0.63±0.40*
CMS-010.13	500μg/kg/日	10	0.73±0.43*	0.38±0.23*
CMS-010.13	250μg/kg/日	10	0.92±0.56*	0.91±0.59
CMS-010.14	500μg/kg/日	9	0.67±0.70*	0.56±0.53*
CMS-010.14	250μg/kg/日	10	0.44±0.30*@	0.29±0.21*
CMS-010.15	500μg/kg/日	10	0.68±0.36*	0.63±0.35*
CMS-010.15	250μg/kg/日	9	0.45±0.35*@	0.41±0.37

【０１０１】

【表１２】

（表12のつづき）

CMS-010.16	500μg/kg/日	10	0.99±0.42*	0.92±0.36
CMS-010.16	250μg/kg/日	9	0.63±0.47*	0.61±0.44*
CMS-010.17	500μg/kg/日	10	0.91±0.46*	0.55±0.34*
CMS-010.17	250μg/kg/日	9	0.65±0.41*	0.40±0.24*
CMS-010.18	500μg/kg/日	9	0.59±0.48*	0.58±0.42*
CMS-010.18	250μg/kg/日	9	0.44±0.31*@	0.27±0.20*@
CMS-010.19	500μg/kg/日	9	0.68±0.68*	0.40±0.42*
CMS-010.19	250μg/kg/日	10	0.41±0.45*@	0.46±0.58*
CMS-010.20	500μg/kg/日	10	0.59±0.46*	0.54±0.51*
CMS-010.20	250μg/kg/日	9	1.00±0.76*	0.88±0.77
CMS-010.21	500μg/kg/日	10	0.44±0.22*@	0.44±0.21*
CMS-010.21	250μg/kg/日	10	0.51±0.29*	0.44±0.22*
CMS-010.22	500μg/kg/日	10	0.85±0.73*	0.73±0.87
CMS-010.22	250μg/kg/日	10	0.28±0.12*@	0.24±0.08*@
CMS-010.23	250μg/kg/日	9	0.27±0.18@	0.21±0.15*@
CMS-010.24	500μg/kg/日	10	1.20±0.79*	0.62±0.47*
CMS-010.24	250μg/kg/日	10	0.61±0.39*	0.36±0.30*
CMS-010.25	500μg/kg/日	10	0.52±0.38*	0.26±0.21*@
CMS-010.25	250μg/kg/日	9	0.65±0.53*	0.48±0.37*
CMS-010.27	500μg/kg/日	9	1.05±0.86*	0.51±0.33*
CMS-010.27	250μg/kg/日	10	0.78±0.68*	0.58±0.58*
CMS-010.29	500μg/kg/日	10	0.55±0.41*	0.40±0.11*
CMS-010.29	250μg/kg/日	10	1.24±0.72*	1.02±0.66
CMS-010.31	500μg/kg/日	10	0.78±0.89*	0.43±0.50*
CMS-010.31	250μg/kg/日	10	0.27±0.19*@	0.25±0.20*@
CMS-010.32	500μg/kg/日	10	0.41±0.35*@	0.40±0.31*
CMS-010.32	250μg/kg/日	10	0.38±0.24*@	0.25±0.14*@
シクロホスファミド	40mg/kg/日	10	1.07±0.80*	0.76±0.66*
生理食塩水	0.5ml/日	10	1.87±0.52	1.20±0.28

＊：ノーマル生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０５
@：シクロホスファミド群と比較、Ｐ＜０．０５

【０１０２】
４．４　結論
適当な用量において、ＣＭＳ－０１０．１０３、ＣＭＳ－０１０．０２、ＣＭＳ－０１０．０３、ＣＭＳ－０１０．０４、ＣＭＳ－０１０．０５、ＣＭＳ－０１０．０７、ＣＭＳ－０１０．０８、ＣＭＳ－０１０．０９、ＣＭＳ－０１０．１１、ＣＭＳ－０１０．１

３、ＣＭＳ－０１０．１４、ＣＭＳ－０１０．１５、ＣＭＳ－０１０．１６、ＣＭＳ－０１０．１７、ＣＭＳ－０１０．１８、ＣＭＳ－０１０．１９、ＣＭＳ－０１０．２０、ＣＭＳ－０１０．２１、ＣＭＳ－０１０．２２、ＣＭＳ－０１０．２３、ＣＭＳ－０１０．２４、ＣＭＳ－０１０．２５、ＣＭＳ－０１０．２７、ＣＭＳ－０１０．２９、ＣＭＳ－０１０．３１、およびＣＭＳ－０１０．３２は、ノーマル生理食塩水対照群と比較して統計学的有意性をもって（Ｐ＜０．０５）、イン・ビボにてＫＭマウス－移植$Ｓ_{180}$肉腫細胞の発生を抑制することが判明した。

【０１０３】

実施例５

ウサギにおける馬杉腎炎に対するペプチドの効果

５．１　材料

５．１．１　ペプチド

関連する全てのアミノ酸はＬ形のものであった：ＣＳ　Ｂｉｏ　Ｃｏ．，ＵＳＡ。

【０１０４】

５．１．２　対照および他の試薬

デキサメタゾンリン酸ナトリウム注射：Ｔｉａｎｊｉｎ　Ｊｉｎｙａｏ　Ａｍｉｎｏｐｈｅｎａｌ　Ｌｔｄ．，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。生理食塩水：ＯＴＳＵＫＡ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏ．Ｌｔｄ．，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。ＢＣＧワクチン：Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。ラノリン：Ｔｉａｎｊｉｎ第６化学製品工場、ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。流動パラフィン：Ｔｉａｎｊｉｎ第６化学製品工場、ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。血清ＢＵＮについての診断試薬：ＢＥＣＫＭＡＮ４４３３５０，ＵＳＡ。血清クレアチニンについての診断試薬：ＢＥＣＫＭＡＮ　４４３３４０，ＵＳＡ。

【０１０５】

５．１．３　動物

１匹の雄ヒツジ（８月齢）：Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ，Ｔｉａｎｊｉｎ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。ウサギ（ＭＤＡ、雄、２ないし２．５ｋｇ）：Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｆｕｈａｏ　Ｂｒｅｅｄ　Ｆａｒｍ，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。

【０１０６】

５．２　方法［９－１０］

５．２．１　ヒツジ抗－ウサギ腎臓皮質抗血清の調製

５．２．１．１　ウサギ腎臓皮質抗原の調製

健康なウサギを耳介静脈内注射によって４ｍＬ／ｋｇ　２５％ウレタンで麻酔し、全身ヘパリン化のために１２５０Ｕ／ｋｇのヘパリンを静脈内注射した。ウサギ腹部を無菌的に切開し、腎臓動脈および静脈を露出させた。腎臓動脈をカテーテル処理し、腎臓静脈を切り離した。腎臓を、腎臓組織が灰色に変化するまで生理食塩水で圧注した。次いで、腎臓を切除した。腎臓皮質を摘出し、０．５容量の氷冷生理食塩水中にホモゲナイズし、次いで、－２０℃にて貯蔵した。

【０１０７】

５．２．１．２　ヒツジ抗血清の調製

７．５ｍＬの腎臓皮質ホモゲネートを２．５ｍＬのフロイントの完全アジュバントと混合した（５ｍｇ／ｍＬのＢＣＧワクチンと共に、１：５の比率の流動パラフィンに対するラノリン）。完全な乳化の後、抗原を５つの異なる背側位置において、位置当たり１ｍＬ、２週間ごとに１回、合計３ラウンドの注射にてヒツジに抗原を注射した。４番目の免疫化で出発し、５ｇの腎臓皮質を１容量の生理食塩水でホモゲナイズし、ヒツジの５つの位置に、位置当たり１ｍＬ、２週間毎に１回筋肉内注射した。ヒツジ抗－ウサギ腎臓皮質抗体の力価を、２週間後のベースで二重免疫拡散によってモニターした。力価が１：３２に到達すると、ヒツジ抗血清を頚動脈から収集した。ヒツジ抗血清を等容量のウサギ赤血球細胞と混合し、抗－ウサギ赤血球細胞抗体の除去のために４℃にて１２時間置いた。次い

で、抗血清を遠心によって収集し、５６℃に置いて、補体およびプロテアーゼを不活化した。抗血清を－２０℃で貯蔵した。

【０１０８】

５．２．２　動物のグループ分け、テスト物質の投与、および馬杉腎炎モデルの確立

２２匹の健康なウサギを５つの群：ペプチド（１０７．３μｇ／ｋｇ／日および５８．５μｇ／ｋｇ／日、群当たり４匹のウサギ）、デキサメタゾン（０．１ｍｇ／ｋｇ／日、４匹のウサギ）、生理食塩水処理（１ｍ／日、７匹のウサギ）、および正常な健康（３ウサギ）にランダム化した。ウサギにおける病気状態の確立の前に、血清ＢＵＮ、クレアチニンおよび尿蛋白の２４時間にわたる測定を各ウサギにつき行った。もしこれらの測定において異常性がなければ、馬杉腎炎モデルは、耳介静脈を介し、注射当たり０．５ｍＬ、３０分ごとに１回の注射、ウサギ当たり合計４回の注射にて、ヒツジ抗－ウサギ腎臓皮質抗血清の静脈内注射によって、実験ウサギにおいて確立した。正常な健康（対照）ウサギ群に同様にして生理食塩水を注射した。耳介静脈を介するテスト物質の静脈内投与は、抗血清の注射後の日に開始し、１日１回、注射当たり１ｍＬで３０連続日行った。

【０１０９】

５．２．３　治療効果のモニタリング

５．２．３．１　尿蛋白の定量

尿は１週間当たり１回２４時間にわたって各ウサギから収集し、蛋白質含有量はスルホサリチル酸方法によって測定した。

【０１１０】

５．２．３．２　病理学的調査

馬杉腎炎ウサギからのヒツジ抗－ウサギ腎臓皮質ＩｇＧ抗体のクリアランスに対するペプチドの効果の観察のために、最後のテスト物質投与後の日に、窒息によってウサギを犠牲にし、ウサギ腎臓を切除し、フリーズ－エッジし、次いで、ヒツジＩｇＧの存在について免疫蛍光染色した。各糸球体の蛍光－陽性領域をカウントした。ウサギ当たり３０の糸球体を調べ、糸球体当たりの平均陽性領域を計算した。

【０１１１】

５．２．３．３　統計学

統計学的有意性はＳＰＳＳソフトウェアのｔ－検定によって決定した。

【０１１２】

５．３　結果

【０１１３】

【表１３】

表１３　馬杉腎炎ウサギの蛋白血症に対するペプチドの効果（ｍｇ／ｄＬ）

群	用量／日	N	週０	週１	週２	週３	週４
CMS-010.26	107.3μg/kg	4	9.84±4.29	187±184	114±145	26±24*	28±32*
CMS-010.26	58.5μg/kg	4	9.53±4.64	77±62	150±123	20±12*	36±16*
デキサメタゾン	0.1mg/kg	4	9.48±8.46	29±12	13.6±6.3*	13.7±3.1*	25±19
生理食塩水処理	0.5ml	7	11.72±3.18	122±91	160±138	145±33	157±71
正常健康	-	3	23.43±18.42	7.7±2.0*	-	6.9±4.5*	24±7*

＊：生理食塩水処理群と比較、Ｐ＜０．０５

【０１１４】

【表１４】

表１４　馬杉腎炎ウサギからのヒツジ抗－ウサギ腎臓皮質ＩｇＧ抗体のクリアランスに対するペプチドの効果

群	用量／日	N	陽性領域カウント／糸球体
CMS-010.26	107.3μg/kg	5	5.6±1.2**
CMS-010.26	58.5μg/kg	4	6.3±1.4**
デキサメタゾン	0.1mg/kg	4	7.5±1.0
生理食塩水処理	0.5ml	7	8.7±0.9
正常健康	-	3	-

＊＊：生理食塩水処理群と比較、Ｐ＜０．０１

【０１１５】

５．４　結論

ＣＭＳ－０１０．２６は、生理食塩水処理対照群と比較して統計学的有意性をもって（Ｐ＜０．０５）、馬杉腎炎ウサギにてイン・ビボにおいて、蛋白血症の酷さを減少させ、ヒツジ抗－ウサギ腎臓皮質抗体のクリアランスを促進できることが判明した。

【０１１６】

実施例６

イン・ビボにおけるＨｅｙｍａｎｎ腎炎ラットに対するペプチドの効果

６．１　材料

６．１．１　ペプチド

用いた全てのアミノ酸はＬ形のものであった：ＣＳ　Ｂｉｏ　Ｃｏ．，ＵＳＡ。

【０１１７】

６．１．２　対照および他の試薬

デキサメタゾンリン酸ナトリウム注射：Ｔｉａｎｊｉｎ　Ｊｉｎｙａｏ　Ａｍｉｎｏｐｈｅｎａｌ　Ｌｔｄ．，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。生理食塩水：ＯＴＳＵＫＡ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏ．Ｌｔｄ．，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。ＢＣＧワクチン：Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ。ラノリン：Ｔｉａｎｊｉｎ化学製品の第６工場、ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。流動パラフィン：Ｔｉａｎｊｉｎ化学製品の第６工場、ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。血清ＢＵＮについての診断試薬：ＢＥＣＫＭＡＮ　４４３３５０，ＵＳＡ。血清クレアチニについての診断試薬：ＢＥＣＫＭＡＮ　４４３３４０，ＵＳＡ。

【０１１８】

６．１．３　動物

Ｗｉｓｔａｒラット（ＳＰＦ、６ないし８週齢、体重１５０ないし２００ｇ）：Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｖｉｔａｌ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ．，ＰＲ　Ｃｈｉｎａ。

【０１１９】

６．２　方法［１１－１２］

６．２．１　ラット腎臓ホモゲネートの調製

健康なＷｉｓｔａｒラット腹部を無菌的に切開した。門静脈および下大静脈を露出した。門静脈をカテーテル処理し、下大静脈を切り離した。腎臓組織が灰色に変化するまで、腎臓を生理食塩水によって圧注した。腎臓を摘出し、腎臓皮質を担持した。次いで、腎臓皮質を氷上でホモゲナイズし、－２０℃で貯蔵した。

【０１２０】

６．２．２　ラット腎臓皮質抗原の調製

ラノリンを１：２ｖ／ｖ比率で流動パラフィンと混合し、振盪しつつ７０℃まで加熱し、次いで、オートクレーブ処理した。十分なＢＣＧワクチンをラノリン／パラフィン混合物に加えて、３ｍｇ／ｍＬのワクチン濃度を生じさせ、フロイントの完全アジュバントを形成した。腎臓皮質ホモゲネート、フロイントの完全アジュバント、および生理食塩水を乳鉢処理しつつ完全に乳化されるまで１：１：２に比率で混合した。

【０１２１】

６．２．３　動物のグループ分けおよびモデルの確立

２０匹の健康なＷｉｓｔａｒラットを２つの群：ペプチド（２００μｇ／ｋｇ／日）および生理食塩水処理（２ｍＬ／日）にランダム化した。２ｍＬの抗原を各ラットに、２週間ごとに１回、合計５ラウンドの注射にて、腹腔内注射した。腹腔内注射によるテスト物質の投与を第三免疫化の後の日に開始し、実験の最後まで１日当たり１回行った。

【０１２２】

６．２．４効力のモニタリング

６．２．４．１　尿蛋白の定量

尿蛋白の定量はモデル確立の第３週において開始した。尿試料は２週間毎に１回２４時間にわたって各ラットから収集し、スルホサリチル酸方法によって尿蛋白含有量を定量した。

【０１２３】

６．２．５　統計学

ＳＰＳＳソフトウェアを用いるｔ－検定によって試料値を比較した。

【０１２４】

６．３結果

【０１２５】

【表１５】

表１５　Ｈｅｙｍａｎｎ腎炎を持つラットの２４時間尿蛋白質濃度（ｍｇ／ｄＬ）に対するペプチド投与の効果

群	N	週３	週５	週７	週９
CMS-010.26	10	6.2±2.3	3.1±1.4	3.9±1.6*	3.8±2.2*
生理食塩水処理	10	4.1±1.3	3.1±0.8	10.9±2.8	12.6±1.2

＊：生理食塩水群と比較、Ｐ＜０．０５

【０１２６】

６．４　結論

適当な用量において、ＣＭＳ－０１０．２６は、生理食塩水処理群と比較して統計学的有意性をもって（Ｐ＜０．０５）、イン・ビボにてＨｅｙｍａｎｎ腎炎ラットにおける蛋白血症の重症度を低下させることが判明した。

【０１２７】

実施例１ないし６の文献

１．Ｓｈｕｙｕｎ Ｘｕ，Ｒｕｌｉａｎ Ｂｉａｎ，Ｘｉｕ Ｃｈｅｎ．Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｙ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ．Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｈｅａｌｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｈｏｕｓｅ．２００２，１：１４２６－１４２８

２．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｒｅ－ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ｏｆ Ｎｅｗ Ｄｒｕｇｓ，Ｐｅｏｐｌｅ’ｓ Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｃｈｉｎａ．１９９３，７：１３４－１３５

３．Ｓｈｕｙｕｎ Ｘｕ，Ｒｕｌｉａｎ Ｂｉａｎ，Ｘｉｕ Ｃｈｅｎ．Ｍｅｔｈｏｄ

ology of pharmacological experiment. People's Health Publiching House. 2002, 1:1429
4. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. The study on MTT reduction method of testing NK cell activity. China Immunology Journal. 1996, 1(6):356-358
5. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China, 1993, 7:128-129
6. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Pharmacological experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 137-138
7. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 2002, 1:1429
8. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:137-139
9. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:96
10. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 2002, 1:1227-1228
11. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:97
12. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 2002, 1:1227

【0128】

実施例7

遺伝子工学により作成したLactobacillus細菌種を介するペプチドの送達

以下に、本発明のペプチドを前記した宿主に送達するための1つの例示的方法を提供する。CMS-010の断片（VAPEEHPTLLTEAPLNPK）およびその機能的誘導体よりなる群から選択されるペプチド（ここに、該断片はCMS-010の配列を含まない）をコードするDNA配列は化学的手段によって合成され、このDNA配列は、当業者が精通した遺伝子工学の標準的技術を用いて発現ベクターに挿入される。発現ベクターはLactobacilliで機能する構成的プロモーター、DNA配列の特異的5'ないし3'向きでの導入のためのマルチプルクローニング部位、ならびに抗生物質に対する耐性を付与して（クローニング手法を助ける）選択マーカー遺伝子を含有し、シグナルペプチド配列のような、ペプチドの生成および／または分泌を助けるための他の配列を含むこともできる。そのようなベクターの実施例は、ここに引用してその全体を援用するPavlaに対する米国特許第5，592，908号によって供される。簡単に述べれば、この特許は、Lactobacillus種で機能するいくつかの公知のプロモーター、ならびに該細菌において新規なプロモーターを発見するための方法を議論し、そのいずれも、Lactobacilliにおいてペプチドを発現させるために本発明のペプチドをコードする核酸に操作可能に連結させることができる。前記引用の米国特許第5，529

，９０８号に記載されたＬａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌａｃｔｉｓにおいて活性な１６ないし３５のほとんど疎水性のアミノ酸を含むペプチドのような単一ペプチドをコードする核酸は、該シグナルペプチドをコードする核酸が本発明のペプチドをコードする核酸に対して枠内にあるように、プロモーターおよび本発明のペプチドをコードする核酸の間に入れられる。

【０１２９】

ペプチドのコーディング配列に加えて、合成されたＤＮＡ配列は、該ＤＮＡの発現ベクターへの連結およびクローニングを助けるための配列を含むことができる。例えば、ベクターのマルチプルクローニング部位で見出されたものに対応する制限酵素認識部位は、配列をベクター内に適当な向きにクローン化することができるように、配列の５’および３’末端にて合成されたＤＮＡに取り込むことができる。該ベクターおよび合成されたＤＮＡは共に特定の制限酵素で消化し、次いで、精製する。ベクターおよび合成されたＤＮＡでの連結反応に続いて、Ｅ．ｃｏｌｉの適当な株に形質転換される。形質転換された細菌を、それに対してベクターが抵抗性を付与する抗生物質を含有する培地上で平板培養する。形質転換された細菌のコロニーを成長培養およびプラスミド調製手法のために選択し；正しい向きでの合成されたＤＮＡの存在を確認する。

【０１３０】

次いで、この発現ベクターをＬ．ａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｓのようなＬａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ種の細菌宿主細胞に形質転換する。形質転換された細胞はベクター配列内で見出される選択マーカーによって選択され、ペプチドの分泌は、ウェスターンブロットを行い、成長培地に存在するペプチドのゲル電気泳動または他の標準的技術を行うことによって確認することができる。細菌の形質転換されたコロニーを選択し、それを用いて、遺伝子工学作成細菌の大規模な培養を調製する。所望のペプチドを発現する遺伝子工学作成細菌の培養を増殖させ、その少なくとも一部分を消化管、膣、気管または細菌がそこで複製可能な宿主生物の他の領域に投与する。所望により、細菌培養を種々の方法で処理して、宿主による腸消費用の補充物を生成することができる。これらの処理は、溶液、溶媒、分散媒体、遅延剤、エマルジョンなどのような、担体剤と細菌とを組み合わせるのに加えて、細菌の凍結乾燥または保存の他の方法を含む。補充物を調製するためのこれらの剤の使用は当該分野でよく知られている。例えば、細菌を用いて、ペプチドを発現する生物が宿主生物の腸で集落を形成するように、ヒト消費のための培養した乳製品または他の食料を作成することができる。乳酸菌の特異的株をヨーグルト、キムチ、チーズおよびバターのような食品に取り込むための多数の異なる方法が、ここに引用してその全体を援用する、Ｏｈに対する米国特許第６，０３６，９５２号に開示されている。多数の経路のうちの１つを介する細菌の消費に際して、作成された生物は腸で集落を形成でき、本発明のペプチドの腸の粘膜層を介する提示および／または吸収を可能とする。

【０１３１】

実施例８

Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓの遺伝子工学作成形態を通じてのペプチドの送達

以下に、前記した宿主に本発明のペプチドを送達するためのもう１つの例示的方法を提供する。ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）およびその機能的誘導体よりなる群から選択されるペプチド（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）をコードするＤＮＡ配列は化学的手段によって合成され、このＤＮＡ配列を、全ての技術が当該分野で知られている遺伝子工学の技術を介して発現ベクターに挿入する。選択された発現ベクターはＥ．ｃｏｌｉおよびＢ．Ｓｕｂｔｉｌｉｓ双方で増殖でき、かつ形質転換された細菌のコロニーを選択するための抗生物質耐性遺伝子を含有する、ｐＴＺ１８Ｒ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）のようなシャトルベクターを含む。このベクターは、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓのＳａｃ　Ｂ遺伝子に由来するプロモーターのようなＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓで活性な構成的プロモーター、ならびに細菌細胞からの発現された異種蛋白質の効果的な抽出を指令するＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓで活性なシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有することができる。そのようなベ

クターの実施例は、その開示をここに引用してその全体を援用する、Ｆａｈｎｅｓｔｏｃｋに対する米国特許第６，２６８，１６９号に開示されている。簡単に述べれば、前記で詳細を述べたように、本発明のペプチドをコードするＤＮＡを制限酵素部位および／または他の配列にて合成して、当業者が精通した技術を介してＤＮＡのクローニングを容易とする。Ｅ．ｃｏｌｉへの形質転換、平板培養、選択、およびプラスミドストックを作成するためのプラスミドの増殖の後に、次いで、該プラスミドをＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓに形質転換し、形質転換体を平板培養培地中で抗生物質に対する耐性に選択する。

【０１３２】

遺伝子工学作成Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓにおけるペプチド生成、およびそれからのペプチド分泌は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析またはウェスターンブロッティング後におけるオートラジオグラフィー検出用のペプチドの放射性標識のような、当業者に良く知られた技術を用いて確認する。

【０１３３】

遺伝子工学作成細菌の培養を増殖させ、その少なくとも一部分を消化管、膣、気管、または細菌がそこで複製することができる宿主生物の他の領域に投与する。

【０１３４】

実施例９

遺伝子工学により作成されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母種を介するペプチドの送達

以下に、前記した宿主へ本発明のペプチドを送達するためのもう１つの例示的方法を掲げる。ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）およびその機能的誘導体よりなる群から選択されるペプチド（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）をコードするＤＮＡ配列を化学的手段によって合成し、このＤＮＡ配列を、全ての技術が当該分野で知られている遺伝子工学の技術を介して発現ベクターに挿入される。選択された発現ベクターは、ｐＡＤＨ１のような構成的酵母プロモーター、酵母およびＥ．ｃｏｌｉ双方におけるベクターの複製用の部位、選択目的でプロトトロピーを栄養要求性酵母突然変異体に付与する遺伝子または複数遺伝子、マルチプルクローニング部位（ＭＣＳ）および、所望により、単一ペプチドをコードする配列を含む、安定に維持された酵母蛋白質発現ベクターを含む。このようなベクターは商業的に入手可能であって、当該分野で良く知られているか、あるいは標準的技術を用いて容易に構築することができる。合成されたＤＮＡの酵母ベクターへの挿入の後、Ｅ．ｃｏｌｉへの形質転換、形質転換されたＥ．ｃｏｌｉの選択された培地への平板培養、形質転換された細菌コロニーの選択、および該コロニーからの細菌の成長培養からのプラスミドＤＮＡの調製の後、ベクターを酢酸リチウム形質転換またはエレクトロポレーションのような良く知られた技術を介してＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅに形質転換する。形質転換につき選択されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅの株は、最小培地プレート上で増殖させるためにプラスミド上の遺伝子を必要とする突然変異体栄養要求株である。形質転換された酵母コロニーは、ベクターに供された遺伝子を欠く成長培地上で酵母を平板培養することによって単離される。ベクターおよびその選択遺伝子を受領し、かつその遺伝子産物を発現している酵母のみが最小培地上でコロニーまで成長できるであろう。ペプチド分泌の確認は、ウェスターンブロットを行い、増殖基に存在するペプチドのゲル電気泳動または他の標準的技術を行うことによって得ることができる。

【０１３５】

酵母の形質転換されたコロニーを選択し、これを用いて大規模な培養を調製する。所望のペプチドを発現する遺伝子工学作成酵母の培養を増殖させ、少なくともその一部を消化管、膣、気管、またはそこで細菌が複製することができる宿主生物の他の領域に投与する。所望により、酵母培養は種々の方法で処理して、宿主による腸消費についての補充物を生成することができる。これらの処理は、溶液、溶媒、分散媒体、遅延剤、エマルジョンなどのような、担体剤と細菌とを組み合わせることに加えて、凍結乾燥、または酵母を維持する他の方法を含む。補充物を調製するためのこれらの剤の使用は当該分野で良く知ら

れている。もう１つの実施形態において、形質転換された酵母は、ヨーグルトおよびケフィールのような発酵乳製品のような食料製品の作成において、当業者に公知の技術によって用いられる。これらの食料品における生きた乳酸菌培養に関して、形質転換された酵母は少なくとも一過的に腸で集落を形成し、腸管腔を介して宿主にペプチドを提示するように働く。

【０１３６】

実施例１０

ペプチドの特定の位置への標的化

以下に、身体内の特定の区画、器官、細胞型または位置へ本発明のペプチドを選択的に送達する例示的方法を供する。この場合、細胞増殖障害は、ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）およびその機能的誘導体の断片よりなる群から選択されるペプチド（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の断片を含まない）を個体の腎臓中の組織に標的化することによって治療される。例えば、ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体は、当該分野で知られた化学反応を介する共有結合によって低分子量（ＬＭＷ）リソソーム、腎臓組織において特異的に濃縮される商業的に入手可能な蛋白質部位に連結される。ＬＭＷリソソームへの分子のコンジュゲーションを達成するための技術は記載されている（Ｆｏｌｇｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，１３６：１１０７，２００２）。蛋白質またはペプチドを相互にコンジュゲートさせるための一般的技術もまた当該分野の文献で教示される（Ｆｉｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．，１２：８２５，２００１）。次いで、新しく作成されたコンジュゲートしたペプチド試料を、カチオン交換ＦＰＬＣおよび／またはグラジエント遠心のようなクロマトグラフィー方法によって連結プロセスで用いる化学試薬から精製する。一旦精製されれば、コンジュゲートしたペプチドは腎炎細胞増殖性障害についての療法を必要とする個体に投与される。その抗－増殖性活性のため、ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的断片は、それらおよびＬＭＷリソソームの間のリンクによって腎臓組織に優先的に標的化され、これは、腎臓の近位細管の細胞に対するＬＭＷリソソームの親和性によって腎臓組織に選択的に濃縮される。この優先的送達は，ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体それ自体のモラー等量のそれと比較してより大きな抗－増殖性効果を可能とする。逆に、それは、あるレベルの抗－増殖性活性を達成するのに必要なペプチド薬物の量を低下することができる。

【０１３７】

実施例１１

ペプチドのその活性な部位への送達の増強

以下に、神経活性ペプチドの脳への送達を増加させる例示的方法を掲げる。脳のニューロンによって発現される受容体に対するその効果を発揮する本発明のペプチドは当業者に知られた科学的方法によって合成される。別法として、前記例で詳細を記載したように、それは作成された微生物によって発現させ、そのような生物の培養から回収することができる。純粋な形態で一旦得られれば、該ペプチドを一連の有機化学反応で利用して、ペプチドに結合したトリグリセライドエステルコンジュゲーテッド部位を作り出す。コンジュゲーテッド部位はペプチドの末端カルボキシル炭素とのアミド結合を介して本発明のペプチドに連結された第四級置換炭素中心よりなる。第四級炭素中心に結合した他の３つの基は、１６炭素脂肪酸鎖への炭素エステル結合よりなる。脂肪酸鎖それ自体は、該鎖をより親水性とし、それらを血液－脳関門内皮細胞膜に特異的に標的化する、ペプチドマスクとして知られた、末端ジペプチド基で終了する。この合成のための手法は、Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，８（３）：４３４，１９９７に詳細に説明されており、これは、当業者が精通した共通の試薬および機器を利用する。

【０１３８】

一旦末梢位置にて個体に導入されるが、化合物は循環系を介して身体全体を移動し、血液の関門の内皮膜と相互作用する。血液－脳関門の上皮層を横切っての分子の輸送の間におけるジペプチドマスクおよび脂質鎖の段階的分解の結果、本発明のペプチドが脳区画に放出される。そこで、ペプチドはニューロンの表面の受容体と相互作用して、脳機能に対してその効果を発揮することができる。担体部位の同時分解を伴う、薬物が脳血液関門に到達し、脳に輸送されるのに必要な時間は薬物の活性のキネティックスを変化させ、遊離ペプチドの脳内脳室注射と比較してより安定でより長い継続効果を作り出す。

【０１３９】

実施例１２

酵素分解に対して耐性であるペプチド処方の作成

以下に、消化管の表面に，および表面に沿って見出されるプロテアーゼおよびペプチダーゼの活性に対して耐性である経口投与用の生物学的に活性なペプチドの処方を作り出す例示的方法を掲げる。この実施例において、ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）およびその機能的誘導体よりなる群から選択されるペプチド（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）を、患者への経口投与用の医薬処方を作成するのに利用する。Ｌａｒｉｏｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．，（Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａ．，１８９：１７１，１９９９）に記載されているように、該ペプチドは可溶性澱粉およびプロテアーゼ阻害剤であるアプロチニン、すなわち、種々の管腔内に分泌されたおよび刷子縁膜－結合プロテアーゼの強力な阻害剤とでのミクロ粒子の作成で用いる。簡単に述べれば、可溶性澱粉、該プロテアーゼ阻害剤アプロチミンおよび本発明のペプチドを水性緩衝液に溶解させる。可溶性澱粉、アプロチニン、およびペプチドの比率は当業者が精通した実験的方法によって決定される；例えば、Ｌａｒｉｏｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．はイン・ビトロ刺激消化アッセイを利用して、彼らの実験で用いた蛋白質についての最も効果的な比率および調製条件を決定した。水性溶液は、５％Ｓｐａｎ－８０、ノニオン界面活性剤を含有するシクロヘキサン中で機械的攪拌下で乳化される（１：３比率，ｖ／ｖ）。クロロホルム中の塩化テレフタロイル溶液をエマルジョンに加え、攪拌を３０分間継続し、その間に、澱粉分子はアプロチニンおよびペプチドと架橋する。そのプロセスで作成されたミクロ粒子を、順次、シクロヘキサン、２％ｖ／ｖＴｗｅｅｎ８５洗剤を含む９５％エタノール溶液、９５％エタノール溶液および水で洗浄する。ミクロ粒子を水に再懸濁し、凍結乾燥する。凍結乾燥した乾燥物は治療を必要とする個体への蛍光送達のためにゼラチンカプセルに入れることができる。

【０１４０】

一旦消化されれば、化合物はゼラチンカプセルが溶解するにつれて放出される。ミクロ粒子は澱粉分子に対するαアミラーゼの作用によって小腸で分解され、アプロチミンおよび本発明のペプチドを徐々に放出することに導く。ペプチドと同一時点および位置における優れたプロテアーゼ阻害剤アプロチニンの同時放出はペプチドの酵素分解を減少させ、腸膜を通じての吸収で利用できる無傷ペプチドの割合を増加させる。

【０１４１】

前記した方法およびデータ、およびある場合にはＣＭＳ－０１０ペプチド（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）の断片およびその機能的誘導体の特別な例を用いて本発明を記載してきたが、これは例に過ぎず、本発明に対する限定として捉えられるべきではないことが理解される。また、ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体は本発明の特別な実施形態を表し、本発明の同一原理は、ＣＭＳ－０１０の断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体の生物学的機能に影響することなく、修飾された他の機能的に同等なペプチドにも適用できることも理解されるべきである。例えば、ＣＭＳ－０１０のペプチド断片（ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体の同等体は、保存的アミノ酸置換（すなわち、疎水性、親水性、正にまたは負に荷電した基のような、同一生化学タイプ内の残基を

有するもう１つのアミノ酸によって置き換えられたＶ、Ａ、Ｐ、Ｅ、Ｈ、Ｌ、Ａ、Ｎ、ＫまたはＴのいずれか１つ）を有するものを含む。ＣＭＳ－０１０のペプチド断片ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体の同等ペプチドのもう１つの実施例は、同一生物学的活性を保有する、１または１アミノ酸より長いもののような、わずかにより長いペプチドである。さらに、ＣＭＳ－０１０の断片は、（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体の医学的適用についての前記した病気または障害は細胞増殖性および免疫学的障害および／または病気を特異的に引用するが、これらの医学的適用は非限定的例のみとして用いられ、特許請求の範囲の範囲を限定するように用いるべきではない。いずれかの免疫および／または細胞増殖性障害および／または病気を持つ正常な個人または患者の免疫系を変調するための、健康食品補充物として用いられるもののような、ＣＭＳ－０１０の断片ＶＡＰＥＥＨＰＴＬＬＴＥＡＰＬＮＰＫ）（ここに、該断片はＣＭＳ－０１０の配列を含まない）およびその機能的誘導体の多の可能な／意図した使用があるのは明瞭である。いずれのそのような使用も本発明の範囲内に入る。

【図面の簡単な説明】

【０１４２】

【図１】図１は、ペプチドを共有結合でエストロン分子に連結させるための一連の化学反応を示す。

【図２】図２は、図１におけるのと同一の結合を作り出すための第二の別の組の反応を示す。

【図３】図３は、ペプチドを共有結合でエストラジオールの分子に連結させるように設計された一連の化学反応を含む。

【図４】図４は、図３と同一の結合を作り出すための第二の一連の化学反応を含む。

【図５】図５は、ヒドロコルチゾンの分子へ共有結合を介してペプチドを連結させる方法を示す。

【図１】

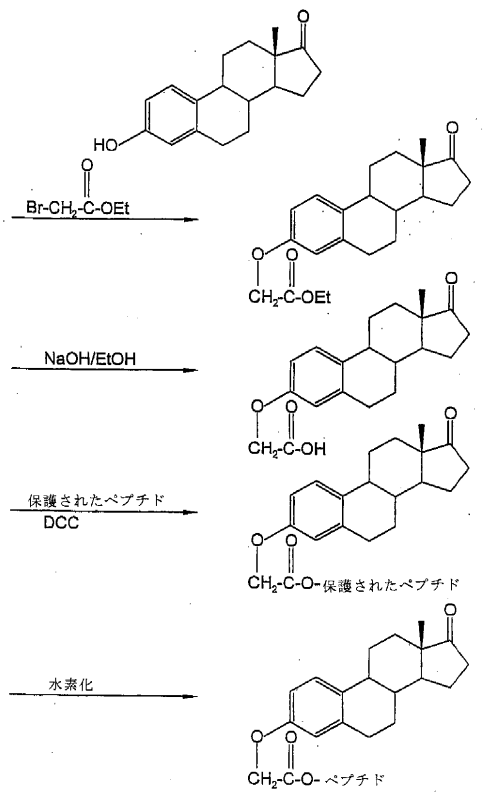


FIG. 1

【図２】

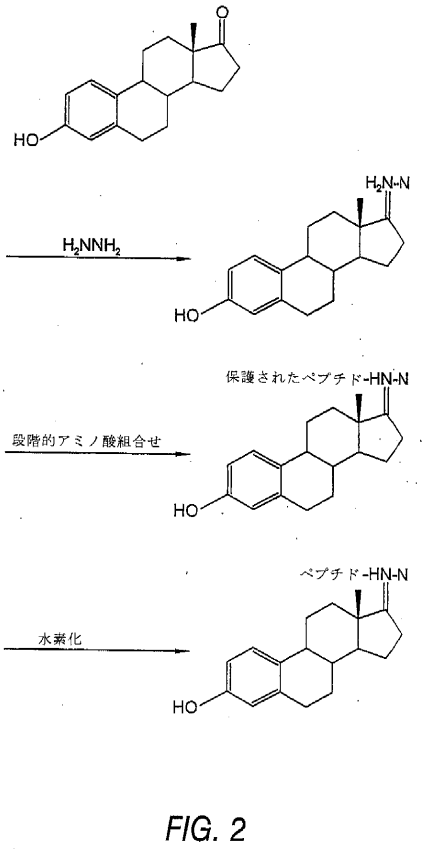


FIG. 2

【図３】

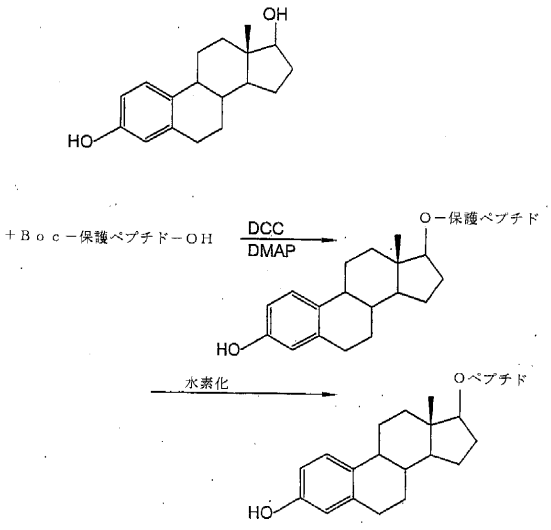


FIG. 3

【図４】

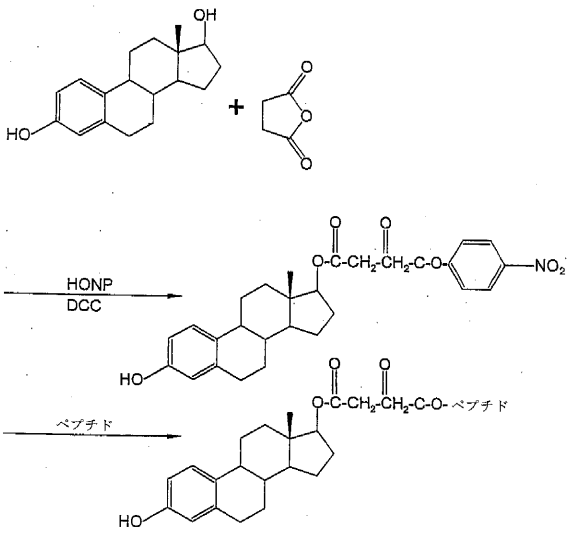


FIG. 4

【図５】

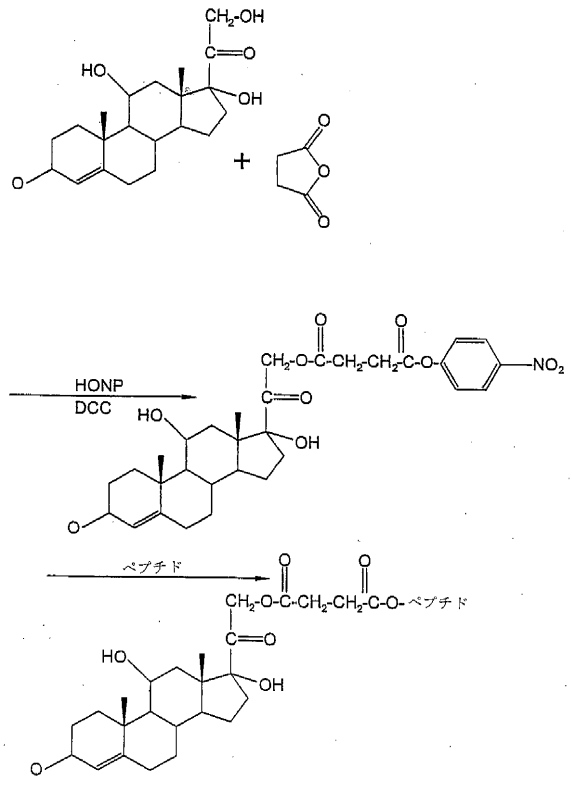


FIG. 5

【配列表】
0004689664000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00	
A61P 37/00	***(2006.01)***	A61P	37/00	
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	43/00	105

(74)代理人 100096781
弁理士 堀井 豊
(74)代理人 100098316
弁理士 野田 久登
(74)代理人 100109162
弁理士 酒井 將行
(72)発明者 ウォン, ワイ・ミン
中華人民共和国、ホンコン、ケイン・ロード、９５、フローラ・コート、ユニット・２４・エイ
(72)発明者 ラム, コン
中華人民共和国、５１８０２０ シェンチェン、トゥエンティエイス・トレーニング・ロード、バイシダ・ガーデン、バイユイ・ユアン、ビルディング・１９、９・ディ

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第２００２／６８６０１（WO, A2）
国際公開第９８／５３３２２（WO, A1）
国際公開第２００３／０６４９２（WO, A2）
Journal of Immunology, １９９８年, Vol. 160, p. 2815-2823

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 7/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
REGISTRY(STN)