

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6078067号
(P6078067)

(45) 発行日 平成29年2月8日(2017.2.8)

(24) 登録日 平成29年1月20日(2017.1.20)

(51) Int.Cl.	F 1	
A 61 K 38/00	(2006.01)	A 61 K 37/02 Z N A
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00
C 07 K 14/775	(2006.01)	C 07 K 14/775
C 07 K 14/47	(2006.01)	C 07 K 14/47

請求項の数 11 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2014-528563 (P2014-528563)
(86) (22) 出願日	平成24年8月29日 (2012.8.29)
(65) 公表番号	特表2014-526440 (P2014-526440A)
(43) 公表日	平成26年10月6日 (2014.10.6)
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/052925
(87) 国際公開番号	W02013/033260
(87) 国際公開日	平成25年3月7日 (2013.3.7)
審査請求日	平成27年8月27日 (2015.8.27)
(31) 優先権主張番号	61/528,447
(32) 優先日	平成23年8月29日 (2011.8.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/624,333
(32) 優先日	平成24年4月15日 (2012.4.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	506115514 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 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607 オークランド フランクリン ストリート 1111 トゥエルフス フロア
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】炎症誘発性状態の治療および予防のためのHDL関連分子の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

HDLミメティックペプチド (SEQ ID NO:7、1、3~6、または8~9) からなる群より選択されるHDL関連分子を含む、腫瘍細胞への接触により腫瘍成長を阻害するための薬学的組成物。

【請求項2】

HDLミメティックペプチド (SEQ ID NO:7、1、3~6、または8~9) からなる群より選択されるHDL関連分子を含む、対象への投与により対象における癌を治療または予防するための薬学的組成物。

【請求項3】

前記HDL関連分子が経口サプリメントである、請求項1~2のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項4】

前記HDLミメティックペプチドがSEQ ID NO:7、1、3~6、および8~9からなる群より選択される、請求項1~2のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記対象が哺乳動物である、請求項1~4のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項6】

前記対象がヒトである、請求項5記載の薬学的組成物。

【請求項7】

10

20

HDLミメティックペプチド (SEQ ID NO:7、1、3~6、または8~9) からなる群より選択される、癌の治療のためのHDL関連分子。

【請求項8】

SEQ ID NO:7、1、3、4、5、6、8、または9に示されたアミノ酸配列からなる、ペプチド。

【請求項9】

前記腫瘍細胞が上皮細胞である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項10】

前記癌が、腫、外陰、卵巣、子宮頸、子宮、前立腺、結腸、乳房、膵臓、肺、皮膚、脳、または胃の癌である、請求項2記載の薬学的組成物。

10

【請求項11】

前記投与が皮下投与である、請求項2記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2012年5月14日出願の米国仮特許出願第61/646,772号、2012年4月15日出願の第61/624,333号、および2011年8月29日出願の第61/528,447号の恩典を主張するものあり、それらの各々の全内容が参照によって本明細書に組み入れられる。

【0002】

本願は、2010年10月4日出願の米国仮特許出願第61/389,618号、ならびに2005年4月25日出願の米国仮特許出願第60/674,489号および2004年7月14日出願の第60/588,007号の恩典を主張する、2005年7月14日出願のPCT/US2005/024985の35 U.S.C. § 371の下での国内段階出願である、2007年7月18日出願の出願第11/571,986号、現在の特許第7,670,792号の分割出願である、2009年12月3日出願の出願第12/630,458号の一部継続出願である、2010年8月20日出願の米国特許出願第12/860,293号に関連しており、それらの各々の全内容が参照によって本明細書に組み入れられる。

20

【0003】

本願の至る所で、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物の開示は、本発明が関係する技術分野の現状をより完全に説明するため、参照によってその全体が本願に組み入れられる。

30

【0004】

発明の技術分野

本発明は、一般に、HDL関連分子の使用を通じた炎症誘発性状態および癌の予防および治療に関する。本発明は、より具体的には、アポリポタンパク質A-I (アポA-I)、HDL、およびHDLミメティックに関し、皮膚および全身性の炎症誘発性状態、具体的には、上皮癌、ならびにアルツハイマー病、炎症性皮膚疾患、炎症性腸疾患、および老化に関連した炎症性疾患を含む、炎症誘発性状態の予防および治療におけるそれらの使用にも関する。これらの標的の発現および/または機能をモジュレートしつつ/または模倣する、全長アポA-Iタンパク質、HDL、抗体、およびアンチセンス/干渉ヌクレオチドを含む分子が、単独でまたは他の抗酸化剤と組み合わせられて、様々な状態の治療のための経口サプリメント、ワクチン、および薬学的組成物において使用され得る。

40

【背景技術】

【0005】

発明の背景

炎症誘発とは、ストレスとの強力な関連性を有しつつ様々な疾患と関係のある、広範囲に及ぶ現象である。炎症誘発活性は、一般に、有害である可能性のある生物学的病原体(細菌、ウイルス、寄生虫等)の感染または侵入を克服するために開始される。侵入に対抗する間、炎症誘発は、有益な能力および増悪させる能力を有し、有害な効果を及ぼす場合がある。不均衡な全身性炎症反応の続発症には、微小循環の混乱、ショック、器官への漏出、および凝固の欠陥が含まれる。不均衡な全身性の代償性抗炎症応答は、しばしば、ア

50

ネルギーおよび免疫抑制をもたらす。

【0006】

炎症誘発性皮膚状態および上皮癌を含む炎症誘発性状態を予防および治療するための改善されたツールが、未だに必要とされつづけている。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、HDL関連分子、ならびに炎症誘発性状態および癌を治療および予防するためのその使用法を提供する。HDL関連分子には、アポA-I、ウシHDL、およびHDLミメティックが含まれる。さらに詳細に以下に記載されるように、アポA-Iは、天然の全長の形態で、UV誘発細胞死および酸化ストレスを防止することができる。様々な癌を治療および予防するため、HDLミメティック、アポA-I、およびウシHDL (bHDL) を使用することができるという予想外の発見も、さらに詳細に以下に記載される。

【0008】

一つの態様において、本発明は、腫瘍成長を阻害する方法を提供する。本法は、(SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28に示されたもののような) HDLミメティックペプチド、ウシHDL、およびアポA-Iからなる群より選択されるHDL関連分子と腫瘍細胞を接触させる工程を含む。もう一つの態様は、対象における癌を治療または予防する方法を提供する。本法は、(SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28に示されたもののような) HDLミメティックペプチド、ウシHDL、およびアポA-Iからなる群より選択されるHDL関連分子を対象へ投与する工程を含む。本発明のさらにもう一つの態様において、酸化ストレスに曝露された上皮細胞における死および/または酸化ストレスを低下させる方法が、提供される。本法は、(SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28に示されたもののような) HDLミメティックペプチド、ウシHDL、およびアポA-Iからなる群より選択されるHDL関連分子と上皮細胞を接触させる工程を含む。一つの態様において、接触は酸化ストレスへの曝露の前に行われる。典型的な態様において、接触は酸化ストレスへの曝露の少なくとも12～24時間前に行われる。酸化ストレスには、例えば、紫外線への曝露が含まれ得る。

【0009】

HDL関連分子は、任意で、経口サプリメントとして投与されてもよい。本発明の方法によって治療される対象は、例えば、哺乳動物対象、典型的には、ヒト対象である。

【0010】

本発明の方法において使用するため、アポA-Iは、全長タンパク質であり得、組換えアポA-Iとしてかつ/または未修飾形態で投与され得る。一つの態様において、アポA-Iは、天然の、未修飾の全長アポA-Iである。

【0011】

HDLミメティックペプチドがSEQ ID NO:1、3～9、12、14、および26～28からなる群より選択される、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【0012】

一つの態様において、本発明は、癌の治療のための、腫瘍成長を阻害するための、かつ/または上皮細胞における死および/もしくは酸化ストレスを低下させるためのHDL関連分子を提供する。HDL関連分子は、HDLミメティックペプチド (SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28) 、ウシHDL、およびアポA-Iからなる群より選択される。一つの態様において、本発明は、SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28に示されたアミノ酸配列を有するものを含む、新規のHDLミメティックペプチドを提供する。典型的な態様において、ペプチドは、SEQ ID NO:1に示されたアミノ酸配列から、またはSEQ ID NO:3～9に示されたアミノ酸配列のいずれかからなる。

[本発明1001]

HDLミメティックペプチド (SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28) 、ウシHDL、およびアポA-Iからなる群より選択されるHDL関連分子と腫瘍細胞を接触させる工程を含む、腫瘍成長を阻害する方法。

[本発明1002]

10

20

30

40

50

HDLミメティックペプチド (SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28)、ウシHDL、およびアポA-1からなる群より選択されるHDL関連分子を対象へ投与する工程を含む、対象における癌を治療または予防する方法。

[本発明1003]

HDLミメティックペプチド (SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28)、ウシHDL、およびアポA-1からなる群より選択されるHDL関連分子と上皮細胞を接触させる工程を含む、酸化ストレスに曝露された上皮細胞における死および/または酸化ストレスを低下させる方法。

[本発明1004]

前記接触工程が酸化ストレスへの曝露の前に行われる、本発明1003の方法。

10

[本発明1005]

前記接触工程が酸化ストレスへの曝露の少なくとも12～24時間前に行われる、本発明1004の方法。

[本発明1006]

前記酸化ストレスが紫外線への曝露を含む、本発明1003、1004、または1005の方法。

[本発明1007]

前記アポA-1が全長タンパク質である、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

前記アポA-1が組換えアポA-1として投与される、本発明1001～1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

前記アポA-1が未修飾形態で投与される、本発明1001～1008のいずれかの方法。

20

[本発明1010]

前記HDL関連分子が経口サプリメントとして投与される、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記HDLミメティックペプチドがSEQ ID NO:1、3～9、12、14、および26～28からなる群より選択される、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記対象が哺乳動物である、本発明1001～1011のいずれかの方法。

30

[本発明1013]

前記対象がヒトである、本発明1012の方法。

[本発明1014]

HDLミメティックペプチド (SEQ ID NO:1、3～9、12、14、または26～28)、ウシHDL、およびアポA-1からなる群より選択される、癌の治療のためのHDL関連分子。

[本発明1015]

SEQ ID NO:1にまたはSEQ ID NO:3～9のうち1つに示されたアミノ酸配列からなる、ペプチド。

【図面の簡単な説明】

【0013】

(図1) UVに曝露されたNIH3T3細胞についての細胞生存率のアッセイの結果をプロットしたものであり、アポA-1処理の防御効果を示す棒グラフ。

40

(図2) 細胞生存率をプロットしたものであり、アポA-1(上パネル)前処理 (10 μg/ml) は、UV誘発細胞死からNIH3T3細胞を防御するが、アポA-1と同様にHDLに関連しているタンパク質であるアポA-II(下パネル)は、NIH3T3細胞のUV誘発細胞死を防止しなかつたことを示す棒グラフ。

(図3) ヒト家族性大腸腺腫症のマウスモデルであるAPC^{min/+}マウスにおける、bHDLによる処理と媒体対照による処理とを比較している、肺重量および腫瘍体積のグラフ図およびデジタル顕微鏡写真。

(図4) L-4FおよびL-4F2によって処理されたマウスと比較した、sc-4Fによって処理されたBALB/cマウスにおける側腹部腫瘍の重量および体積に対する効果のグラフ図および

50

デジタル顕微鏡写真。図4Aおよび4Bは、それぞれ、腫瘍の重量および体積を示す。図4Cおよび4Dは、それぞれ、三群の各々についての、重量および体積の（対照を100%とした）スコアの分布率を示す。三群からの側腹部腫瘍の代表的な写真が、図4Eに示される。

（図5）側腹部にCT26細胞を皮下注射された、28AAペプチドおよび28AA-2ペプチドによって処理されたBALB/cマウスにおける、側腹部腫瘍の重量および体積に対する効果のグラフ図およびデジタル顕微鏡写真。マウスは、CT26細胞が注射された部位の遠位において、15日間毎日、皮下注射によって媒体（n=12）または10mg/kgの28AA（n=10）もしくは28AA-2（n=11）のいずれかによって処理された。図5Aおよび5Bは、それぞれ、腫瘍の重量および体積を示す。図5Cおよび5Dは、三群の各々についての重量および体積の（対照を100%とした）スコアの分布率を示す。三群からの側腹部腫瘍の代表的な写真が、図5Eに示される。

（図6）図6Aおよび6Bは、MTS細胞生存率アッセイの結果をプロットしたものである。CT26細胞が、L-4Fペプチド、L-4F2ペプチド、28AAペプチド、または28AA-2ペプチド（10 μ g/ml）によって処理され、対照と比較された（図6A）。NIH3T3細胞生存率も、4種のペプチド全部による処理によってインビトロで決定された。NIH3T3細胞生存率は、4種のペプチドのいずれによっても影響されなかった（図6B）。

（図7）アポA-1ミメティックペプチドL-4FがインビオおよびインビトロでHIF-1発現を阻害することを示すデジタル顕微鏡写真。図7A、アポA-1ミメティックペプチドL-4Fは、インビオでHIF-1発現および血管形成を阻害する。実施例4に記載されるようにして、野生型C57BL/6Jマウスにおいて側腹部腫瘍が確立された。腫瘍成長の2週間後、マウスは、3週間、スクランブルペプチド（sc-4F）またはL-4F（10mg/kg s.c.、毎日注射）によって処理された。解剖された腫瘍からの凍結切片（5 μ m）が、ヘマトキシリンエオシン（H&E）染色（左）、HIF-1染色（中央）、およびCD31染色（右）に供された。分析は、スライド1枚当たり4個のランダムに選択された視野から行われた（各群n=4マウス）。代表的な図が400倍の倍率で示される。矢印はHIF-1陽性染色を示す。図7B、L-4Fによる前処理は、ヒト卵巣癌細胞株におけるCoCl₂およびインスリンによって誘導されるHIF-1発現を阻害する。細胞を、媒体または異なる濃度のL-4F（1、3、および10 μ g/ml）によって1時間処理し、示された刺激剤をさらに4時間添加した。左、L-4Fによる前処理は、OV2008細胞におけるCoCl₂およびインスリンによって誘導されるHIF-1発現を阻害する。右、L-4Fによる前処理は、CAOV-3細胞におけるCoCl₂およびインスリンによって誘導されるHIF-1

発現を阻害する。図7Cおよび図7D、L-4Fは、OV2008細胞におけるCoCl₂（図7C）およびインスリン（図7D）によって誘導されるHIF-1の核発現を減少させる。細胞を、マウスモノクローナル抗HIF-1一次抗体および二次抗体としてのAlexa Fluor 568（赤色蛍光）によって標識されたヤギ抗マウスIgGによって免疫染色した。核を染色するため、DAPIを使用した（対応する公表された原稿において青色）。画像は200倍の原倍率で示される。点線およびボックスは、拡大された画像が由来する区域を示す。類似した結果を有する2回の独立の実験の代表的な写真が示される。使用された刺激剤の濃度は、CoCl₂については100 μ M、インスリンについては200nMであった。

（図8）OV2008細胞におけるHIF-1標的遺伝子発現がL-4Fによって阻害されることを示す棒グラフ。図8A、CoCl₂によって刺激されるHREレポーター遺伝子転写は、L-4Fによる前処理によって阻害される。OV2008細胞をpGL3-Epo-HRE-Lucプラスミドによってトランスフェクトし、完全成長培地において24時間成長させた。一夜の飢餓の後、細胞を、まず、L-4F（10 μ g/ml）によって1時間処理し、次いで、CoCl₂（100 μ M）によってさらに6時間処理した。実施例4に記載されるようにして、ルシフェラーゼ活性を決定した。図8B、L-4Fは、CoCl₂によって処理された細胞におけるHIF-1標的遺伝子の発現を阻害する。一夜の血清飢餓の後、OV2008細胞をL-4F（10 μ g/ml）によって1時間処理し、次いで、CoCl₂（100 μ M）によってさらに6時間処理した。全RNAを単離し、VEGF、グルコーストランスポーター1(GLUT1)、およびアルドラーゼA(ALDO-A)のmRNA発現レベルを、リアルタイムRT-PCRによって測定した。GAPDHを標準化のために使用した。図8C、インスリンによって刺激されるHREレポーター遺伝子転写は、L-4Fによる前処理によって阻害される。OV2008細

10

20

30

40

50

胞をpGL3-Epo-HRE-Lucプラスミドによってトランスフェクトし、完全成長培地において24時間成長させた。一夜の飢餓の後、細胞をL-4F (10 μ g/ml) によって1時間処理し、次いで、インスリン (200nM) によってさらに16時間処理した。実施例4に記載されるようにして、ルシフェラーゼ活性を決定した。図8D、L-4Fは、インスリンによって処理された細胞におけるHIF-1 標的遺伝子の発現を阻害する。一夜の血清飢餓の後、OV2008細胞をL-4F (10 μ g/ml) によって1時間処理し、次いで、インスリン (200nM) によってさらに16時間処理した。全RNAを単離し、VEGF、グルコーストランスポーター1 (GLUT1)、およびアルドラーーゼA (ALDO-A) のmRNA発現レベルを、リアルタイムRT-PCRによって測定した。GAPDHを標準化のために使用した。#、p < 0.05、対応する対照群と比較して。##、p < 0.01、対応する対照群と比較して。*、p < 0.05、対応するCoCl₂またはインスリンによって処理された群と比較して。**、p < 0.01、対応するCoCl₂またはインスリンによって処理された群と比較して。各群n = 3。 10

(図9) L-4Fによる後処理は、CoCl₂およびインスリンによって処理されたOV2008細胞におけるHIF-1 のタンパク質レベルおよび活性を減少させる。細胞を、CoCl₂ (100 μ M) またはインスリン (200nM) によって24時間処理し、次いで、媒体またはL-4F (10 μ g/ml) によってさらに1時間、2時間、または4時間処理した。図9A、10 μ g/mlのL-4Fによる後処理は、CoCl₂およびインスリンによって処理されたOV2008細胞におけるHIF-1 タンパク質レベルを減少させる。図9B、10 μ g/mlのL-4Fによる4時間の後処理は、OV2008細胞におけるHIF-1 の核レベルのCoCl₂およびインスリンによって誘導される増加を減少させる。細胞を、マウスモノクローナル抗HIF-1 一次抗体および二次抗体としてのAlexa Fluor 5 20 68 (赤色蛍光) によって標識されたヤギ抗マウスIgGによって免疫染色した。核を染色するため、DAPIを使用した (対応する公表された原稿において青色)。画像は400倍の原倍率で示される。類似した結果を有する2回の独立の実験の代表的な写真が示される。図9C および図9D、CoCl₂およびインスリンによって処理された細胞におけるHREレポーター遺伝子転写の、L-4Fによる後処理による阻害。OV2008細胞をpGL3-Epo-HRE-Lucプラスミドによってトランスフェクトし、完全成長培地において24時間成長させた。一夜の飢餓の後、細胞をCoCl₂ (100 μ M) またはインスリン (200nM) によって24時間処理し、次いで、L-4F (10 μ g/ml) によってさらに4時間 (図9C) または24時間 (図9D) 処理した。実施例4に記載されるようにして、ルシフェラーゼ活性を決定した。**、p < 0.01、対応するCoCl₂またはインスリンによって処理された群と比較して。各群n = 3。 30

(図10) OV2008細胞における下流シグナリング分子のインスリンによって刺激される活性化に対するL-4Fの効果。一夜の飢餓の後、OV2008細胞をL-4F (10 μ g/ml) によって1時間処理し、インスリンを200nMの終濃度で添加した。細胞溶解物を様々な時点で収集し、ウエスタンプロット分析に供した。図10A、L-4Fは、OV2008細胞におけるインスリンによって刺激されるp70s6キナーゼのリン酸化およびその後のHIF-1 発現を阻害する。図10 B、OV2008細胞におけるインスリンによって刺激されるERK1/2およびAktのリン酸化に対するL-4Fの効果。 40

(図11) OV2008細胞におけるHIF-1 タンパク質安定性に対するL-4Fの効果。図11A、左、L-4Fによる前処理は、OV2008細胞におけるHIF-1 分解を促進する。一夜の飢餓の後、OV2008細胞を、インスリン (200nM) によって3時間、L-4F (10 μ g/ml) によって1時間、CHX (20 μ g/ml) によって様々な期間、処理した。細胞溶解物を収集し、ウエスタンプロット分析に供した。類似した結果を有する3回の独立の実験からの代表的なデータが示される。右、L-4F処理は、OV2008細胞におけるHIF-1 分解を促進する。一夜の飢餓の後、OV2008細胞をインスリン (200nM) によって3時間処理し、次いで、L-4F (10 μ g/ml) およびCHX (20 μ g/ml) によって同時に処理した。細胞溶解物を様々な時点で収集し、ウエスタンプロット分析に供した。類似した結果を有する3回の独立の実験からの代表的なデータが示される。図11B、インスリンによって処理されたOV2008細胞におけるプロテアソームによって媒介されるHIF-1 の分解に対するL-4Fによる前処理の効果。一夜の飢餓の後、OV2008細胞を、MG-132 (10 μ M) によって3時間、L-4F (10 μ g/ml) によって1時間、インスリン (200nM) によってさらに4時間、処理した。細胞溶解物を収集し、ウエスタン 50

ンプロット分析に供した。類似した結果を有する3回の独立の実験からの代表的なデータが示される。

(図12) CoCl_2 およびインスリンによって刺激されるROS産生に対するL-4Fの効果。OV2008細胞をL-4F (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)によって1時間前処理し、次いで、インスリン (200nM) / CoCl_2 (100 μM) およびDCFH-DA (10 μM) によって30分間処理した。PBSで2回細胞を洗浄した後、蛍光顕微鏡によって細胞の画像を捕らえた。代表的な図が、200倍の原倍率で示される。図12A、L-4Fは、OV2008細胞におけるインスリンによって刺激されるROS産生を阻害する。図12B、L-4Fは、OV2008細胞における CoCl_2 によって刺激されるROS産生を阻害する。

(図13) CT26細胞によって媒介される肺腫瘍および側腹部腫瘍は、HDLミメティックL-4Fによって皮下処理されたBALB/cマウスにおいて有意に減少する。実施例5に記載されるようにして、BALB/cマウスにおいて肺腫瘍を確立した(各群n = 11)。CT26細胞を尾静脈注射によって投与した3週間後、マウスを屠殺した。肺を採取し計量した。肺腫瘍を計数した。図13A、示されたデータは、10mg/kgで毎日皮下投与されたsc-4FまたはL-4Fを受容したマウスについての肺重量である。P < 0.01。図13B、示されたデータは、二つのマウス群からの肺表面上で計数された腫瘍の数である。P < 0.001。図13C、肺表面上の腫瘍結節を示す二つのマウス群からの代表的な腫瘍。図13Dおよび図13E、実施例5に記載されるようにして、BALB/cマウスにおいて側腹部腫瘍を確立した。CT26細胞を皮下投与した15日後、マウスを屠殺し、腫瘍重量を測定した。図13D、示されたデータは、10mg/kgのsc-4FまたはL-4Fを毎日皮下に受容したマウスについての腫瘍重量である。P < 0.05。図13E、二つのマウス群からの代表的な腫瘍が示される。w/sc-4F、sc-4Fによって処理されたマウス；w/L-4F、L-4Fによって処理されたマウス。F、Aに示された実験からの血漿IL-6レベル。P < 0.05。

(図14) CT26細胞によって媒介される肺腫瘍は、マウス飼料中に投与されたL-4Fによって処理されたBALB/cマウスにおいて有意に減少する。実施例5に記載されるようにして、BALB/cマウスにおいて肺腫瘍を確立した。CT26細胞を尾静脈注射によって投与した3週間後、マウスを屠殺した。肺を採取し計量した。肺腫瘍を計数した。図14A、示されたデータは、100mg/kg/日 (2mg/マウス/日)で飼料食へ混合されたsc-4F (n = 12) またはL-4F (n = 9) を受容したマウスについての肺重量である。P < 0.05。図14B、示されたデータは、二つのマウス群からの肺表面上で計数された腫瘍数である。P < 0.0001。図14C、肺表面からの腫瘍組織を切片化し、微小血管内の内皮細胞の検出のため、抗CD31抗体によるCD31免疫染色を行った。赤色染色がCD31染色を表す。w/sc-4F、sc-4Fによって処理されたマウス；w/L-4F、L-4Fによって処理されたマウス。図14D、実施例5に記載されるようにして、血漿LPAレベルを測定した。P < 0.01。

(図15) C57BL/6J-APC^{min/+}マウスの腸管内の腫瘍の数およびサイズに対する、飼料食によるL-4F処理の効果。実施例5に記載されるようにして、マウス飼料中に投与されたsc-4FまたはL-4Fによる8週間の処理の後、APC^{min/+}マウスを屠殺した。図15A、対照(即ち、sc-4Fによって処理されたマウス)に対するパーセントとして表された、8週間マウス飼料中に投与されたL-4Fによる処理の後の腸管内の全腫瘍数、P < 0.05。図15B、腫瘍の直径(mm)によって定義された異なるサイズカテゴリーの腫瘍の数。w/sc-4F、sc-4Fによって処理されたマウス；w/L-4F、L-4Fによって処理されたマウス。図15C、血漿LPAレベルは、対照マウスと比較して、L-4Fによって処理されたC57BL/6J-APC^{min/+}マウスにおいて有意に減少する(> 50%)。P < 0.01。

(図16) HDLミメティックL-4Fは、CT26細胞において、生存率を低下させ、増殖を阻害し、細胞周期およびサイクリンタンパク質に影響する。CT26細胞を、実施例5に記載されるようにして培養し、媒体(対照)または10mg/mLの濃度のL-4Fのいずれかと共にインキュベートした。図16A、MTSアッセイキットを使用して、生存率について細胞をアッセイした。P < 0.001。図16B、実施例5に記載されるようにして、BrdUrd取り込みを分析した。P < 0.001。図16C、細胞周期における異なる相にある細胞の定量分析。データは、対照細胞に対するパーセントの平均値 \pm SDとして表される。図16D、サイクリンD1およびサイ

10

20

30

40

50

クリンAの発現。全ての実験が三重に実施され、各アッセイが四重に実施された。

(図17) HDLミメティックL-4Fは、LPAによって誘導されるCT26細胞の生存率を阻害し、細胞培養培地中のLPAレベルを低下させる。図17A、CT26細胞を、実施例5に記載されたようにして培養し、10mg/mLのL-4F、もしくは5mmol/L、10mmol/L、20mmol/Lの濃度のLPAのいずれかと共にインキュベートするか、または細胞をL-4FおよびLPAの両方によって48時間処理した。全ての実験が三重に実施され、各アッセイが四重に実施された。データは、対照細胞に対するパーセントの平均値±SDとして表される。図17B、48時間の処理の後に細胞培養培地中のLPAレベルを測定した。

(図18) G* (L-[113-122]アポJ)ペプチドは、インビボおよびインビトロでL-4Fに類似した効果を有する。実施例5に記載されるようにして、BALB/cにおいて肺腫瘍を確立した。CT26細胞を尾静脈に注射した3週間後、マウスを屠殺した。肺を採取し計量した。肺腫瘍を計数した。図18A、示されたデータは、マウス飼料中に投与された100mg/kg/日(2mg/マウス/日)のsc-4F(n1/4 12)、G*ペプチド(n1/4 12)を受容したマウスについての肺重量である。P<0.05。図18B、示されたデータは、Aの二つのマウス群からの肺表面上の腫瘍数である。P<0.0001。図18C、MTSアッセイを使用して、生存率について細胞をアッセイした。P<0.05。D、図18Aおよび図18Bに記載されたマウスからの血清LPAレベルを、実施例5に記載されるようにして決定した。図18E、ウェスタンプロットによるサイクリンD1およびサイクリンAの発現。w/sc-4F、sc-4Fによって処理されたマウス；w/G*、G*ペプチドによって処理されたマウス。

(図19) 様々なHDLミメティックペプチドによってインビトロで処理されたCT26細胞は、処理の48時間以内に、媒体によって処理された対照と比較して、低下した(MTSアッセイによる)細胞生存率を示す。アッセイされたHDLミメティックは、L-4F、L-4F2、K4,15-4F、K4,15-4F2、ならびに、アポEおよびG*から形成された20アミノ酸ペプチド LRKLRKRLR LVGRQLEEFL (SEQ ID NO: 1)であった。

(図20) CT26細胞の皮下側腹部注射を受容し、その後、皮下HDLミメティックペプチドによって処理されたBALB/cマウスは、腫瘍重量(左パネル)および腫瘍体積(右パネル)の有意な低下を示した。

【発明を実施するための形態】

【0014】

詳細な説明

本発明は、炎症誘発性状態を治療および予防するためにHDL関連分子を使用することができるという発見に基づく。HDL関連分子には、アポA-I、ウシHDL、およびHDLミメティックが含まれる。さらに詳細に以下に記載されるように、アポA-Iは、天然の全長の形態で、UV誘発細胞死および酸化ストレスを防止することができる。様々な癌を治療および予防するため、HDLミメティック、アポA-I、およびウシHDL(bHDL)を使用することができるという予想外の発見も、さらに詳細に以下に記載される。アポA-Iおよびその他のHDL関連分子は、皮膚状態ならびに癌およびアルツハイマー病のようなその他の疾患を含む全身性炎症誘発性状態を含む炎症誘発性状態の治療および予防のための強力な有効な薬剤を提供する。治療される癌には、腫瘍、外陰癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮癌、前立腺癌、結腸癌、乳癌、膵臓癌、肺癌、皮膚癌(例えば、黒色腫)、脳癌(例えば、膠芽腫)、および胃癌のような上皮癌が含まれる。本明細書に記載されたHDL関連分子は、老化過程を遅らせ、酸化ストレスを低下させるかまたは排除するために使用され得るため、抗老化処置においても使用され得、黄斑変性、網膜色素変性症のような眼状態、および関節炎のような自己免疫疾患の治療においても使用され得る。

【0015】

本発明は、酸化ストレスに曝露された上皮細胞における死および/または酸化ストレスを低下させる方法を提供する。本法は、酸化ストレスへの曝露の前に、上皮細胞をHDL関連分子と接触させる工程を含む。いくつかの態様において、酸化ストレスには、紫外線への曝露が含まれる。典型的な態様において、接触は、酸化ストレスへの曝露の少なくとも

10

20

30

40

50

12~24時間前に行われる。

【0016】

定義

本願において使用される全ての科学用語および技術用語は、特記されない限り、当技術分野において一般的に使用されている意味を有する。本願において使用されるように、以下の単語または語句は、指定された意味を有する。

【0017】

本明細書において使用されるように、「HDL関連分子」とは、アポA-I、ウシHDL、ならびにペプチドおよび合成分子を含むHDLミメティックを意味する。

【0018】

本明細書において使用されるように、前後関係がそうでないことを明白に示さない限り、「アポA-I」とは未修飾の全長アポA-Iをさす。例えば、「アポA-Iペプチド」とは、全長アポA-Iの小さな一部分をさす。典型的には、アポA-Iは、244アミノ酸の28.2kDaタンパク質であるヒトアポA-Iである。

【0019】

本明細書において使用されるように、「HDLミメティック」とは、HDLの機能を模倣し、典型的には、増強された効力を有するHDL関連分子を提供する、修飾形態のアポリポタンパク質をさす。典型的には、アポリポタンパク質は、1個以上のアミノ酸を改変するかもしれません置換することによって、かつ/またはキメラHDL関連分子を形成するために2種以上のHDLペプチドを組み合わせることによって修飾される。

【0020】

本明細書において使用されるように、「ポリペプチド」には、天然起源から単離されたか、組換え技術によって作製されたか、または化学合成されたかに関わらない、タンパク質、タンパク質の断片、およびペプチドが含まれる。本発明のポリペプチドは、典型的には、少なくとも約6個のアミノ酸を含む。より短いポリペプチド、例えば、約50アミノ酸未満の長さのものは、典型的には、「ペプチド」と呼ばれる。

【0021】

本明細書において使用されるように、「ベクター」とは、1種以上の関心対象の遺伝子または配列を、宿主細胞へ送達することができ、好ましくは、発現させることができる構築物を意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、裸のDNA発現ベクターまたはRNA発現ベクター、プラスミドベクター、コスミドベクター、ファージベクター、カチオン性縮合剤と会合したDNA発現ベクターまたはRNA発現ベクター、リポソームに封入されたDNA発現ベクターまたはRNA発現ベクター、および産生細胞のようなある種の真核細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0022】

本明細書において使用されるように、「発現調節配列」とは、核酸の転写を指図する核酸配列を意味する。発現調節配列は、構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーターのようなプロモーター、またはエンハンサーであり得る。発現調節配列は、転写される核酸配列と機能的に連結される。

【0023】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの重合体をさし、他に限定されない限り、天然に存在するヌクレオチドに類似した様式で核酸とハイブリダイズする天然ヌクレオチドの公知のアナログを包含する。

【0024】

本明細書において使用されるように、「薬学的に許容される担体」または「賦形剤」には、活性成分と組み合わせられた時、成分が生物学的活性を保持することを可能にし、かつ対象の免疫系と非反応性である材料が含まれる。例には、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、水中油型エマルションのようなエマルション、および様々な型の湿潤剤のような、標準的な薬学的担体のいずれかが含まれるが、これらに限定されない。エアロゾルまたは非

10

20

30

40

50

経口投与のために好ましい希釈剤は、リン酸緩衝生理食塩水または普通の(0.9%)生理食塩水である。

【0025】

そのような担体を含む組成物は、周知の従来の方法によって製剤化される(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990を参照のこと)。

【0026】

本明細書において使用されるように、「ある」または「1つの」とは、そうでないことが明白に示されない限り、少なくとも1つを意味する。

【0027】

HDLミメティック

本発明は、HDLペプチドのキメラ、ならびに、HDLミメティックとして機能する修飾型分子および/または合成分子を含む、HDLミメティックを提供する。一つの態様において、公知のHDLミメティックペプチドにおけるアラニンのアミノイソ酪酸(Aib)への置換は、新規のHDLミメティック(NHM)を生成する。典型的な態様において、キメラは、アポA-I、アポE、およびアポJのペプチドから選択される2種のHDLペプチドを含む。一つの態様において、HDLミメティックは、後述のNHM1~7を生成するため、アポEの10アミノ酸ペプチドとキメラ化されたアポA-Iの18アミノ酸ペプチドにおけるアラニンのアミノイソ酪酸(Aib)への置換を介して入手される。もう一つの態様において、HDLミメティックは、アポEとアポJ(G^{*})との組み合わせを介して得られ、例えば、新規のHDLミメティック

LRKLRKRLLR LVGRQLEEFL (SEQ ID NO: 1) 20

が生成される。

E18A(ref)におけるアラニンのAibへの置換は、一連の7種のNHMをもたらす。

E18Aペプチド(ref) =

LRKLRKRLLRDWLKA**FYDKVAEKLKEAF** (SEQ ID NO: 2)

NHM :

NHM1 = LRKLRKRLLRDWLKA**AibFYDKVAEKLKEAF** (SEQ ID NO: 3)

NHM2 = LRKLRKRLLRDWLKA**FYDKVAibEKLKEAF** (SEQ ID NO: 4) 30

NHM3 = LRKLRKRLLRDWLKA**FYDKVAEKLKEAibF** (SEQ ID NO: 5)

NHM4 - LRKLRKRLLRDWLKA**AibFYDKVAibEKLKEAF** (SEQ ID NO: 6)

NHM5 = LRKLRKRLLRDWLKA**FYDKVAibEKLKEAibF** (SEQ ID NO: 7)

NHM6 = LRKLRKRLLRDWLKA**AibFYDKVAEKLKEAibF** (SEQ ID NO: 8) 40

NHM7 = LRKLRKRLLRDWLKA**AibFYDKVAibEKLKEAibF** (SEQ ID NO: 9)

Oleg F Sharifov, et al., 2011, Apolipoprotein E Mimetics and Cholesterol Lowering Properties, American Journal of Cardiovascular Drugs 11(6):371-381を参照のこと。

【0028】

驚くべきことに、本明細書に記載された新規のHDLミメティックペプチドは、単独でまたは他の抗酸化剤と組み合わせられて、炎症誘発性皮膚状態および癌を含む全身性炎症誘発性状態の予防および治療のために使用され得る。これらの分子は、炎症誘発性皮膚状態および癌を含む全身性炎症誘発性状態の予防および治療のための強力な有効な抗酸化剤を提供する。これは、細胞培養モデルを使用して原理的に立証され、動物モデルにおいて腫

癪発達を阻害するためのインビボ研究を通して示された。

【 0 0 2 9 】

ウシHDL

本明細書に記載されるウシHDL (bHDL) には、ネイティブタンパク質が含まれ、異種配列が存在してもよい。典型的には、bHDLは、天然の、未修飾の、全長形態で使用される。ウシHDLは、典型的には、血清から精製され、例えば、Biomedical Technologies, Inc. (Somerville, MA) から入手され得る。ウシHDLは、アポA-1のレベルが高く、血清レベルが高く、ヒトへの投与のために適当であるため、他の種のHDLに比べて有利である。

【 0 0 3 0 】

アポA-1ポリペプチド

10

本明細書に記載されるアポA-1ポリペプチドには、ネイティブタンパク質が含まれ、異種配列が存在してもよい。典型的には、アポA-1は、天然の、全長の、未修飾の、成熟形態で使用されるヒトアポA-1である。

【 0 0 3 1 】

NCBI参照配列 : NP_000030.1 (SEQ ID NO:10) :

```
1 mkaavltlav lfltgssqarh fwqgdeppqs pwdrvkdlat vyvdvlkdsg rdyvsqfegs
 61 algkqlnlkl ldnwdsvtst fsklreqlqp vtqefwdnle keteglrqem skdleevkak
121 vqpylddfqk kwqeemelyr qkveplrael qegarqklhe lqeklspnge emrdrarahv
181 dalrthlapy sdelrqrlaa rlealkengg arlaeyhaka tehlstlseak paledlrq
241 gllpvlesfk vsflsaleey tkklnq
```

【 0 0 3 2 】

20

上記の配列において、シグナルペプチドはアミノ酸1~18であり、成熟プロタンパク質はアミノ酸19~267であり、成熟アポA-1タンパク質はアミノ酸25~267である：

```
DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEK
ETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPNGEEMRDRARA
HVDALRTHLAPYSDELRQRLAARLEALKENGGAHLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLS
ALEEYTKKLNTQ ( SEQ ID NO: 11 )
```

。

【 0 0 3 3 】

アポA-1ペプチド、特に、アポA-1ミメティックペプチドは、いくつかの使用の分野のため、全長アポA-1タンパク質と比較して類似した機能および／または作製の容易さを有する分子を同定するための試みにおいて開発されたが、これらのアポA-1ミメティックペプチド（例えば、ヘリックスペプチド）の修飾は、それらを天然アポA-1とは完全に異なるものにした；実際、ミメティックペプチドは、全長アポA-1タンパク質分子との構造的類似性を共有しない。さらに、心血管治療の分野において、ミメティックペプチドは、それほど有効でなく、極めて多くの量を必要とするため、これらのペプチドの治療的使用は非現実的である。興味深いことに、ミメティックペプチドという用語は、全長アポA-1タンパク質と何らかの機能的特性を共有し得る、構造的に相違する分子を同定する試みをさす、20年以上前に開発された用語である；実際、これらのヘリックスペプチドと全長アポA-1分子との間に、構造的類似性は存在しない。従って、アポA-1全長タンパク質はミメティックペプチドと構造的に共通であるものを共有しないため、「ミメティックペプチド」という用語は、この状況においては、誤称である。アポA-1ミメティックペプチドは、アポA-1全長タンパク質機能の特性のうちのいくつかを模倣することのみを試みる。

30

【 0 0 3 4 】

バリアントポリペプチド

40

本発明のポリペプチドには、ネイティブタンパク質のバリアントが含まれ得る。本明細書において使用されるように、ポリペプチド「バリアント」とは、ポリペプチドの治療的効力が実質的に縮小されないような、1個以上の置換、欠失、付加、および／または挿入によってネイティブタンパク質と異なるポリペプチドである。換言すると、効力は、ネイティブタンパク質に比べて増強されているかもしくは不变であってもよいし、またはネイティブタンパク質に比べて50%未満、好ましくは、20%未満、縮小されていてもよい。好ましいバリアントには、N末端リーダー配列のような1個以上の部分が除去されたも

50

のが含まれる。その他の好ましいバリアントには、成熟タンパク質のN末端および/またはC末端から小さな一部分（例えば、1~30アミノ酸、好ましくは、5~15アミノ酸）が除去されたバリアントが含まれる。ポリペプチドバリアントは、好ましくは、同定されたポリペプチドとの少なくとも約70%、より好ましくは、少なくとも約90%、最も好ましくは、少なくとも約95%の（上記のように決定される）同一性を示す。

【0035】

好ましくは、バリアントは保存的置換を含有している。「保存的置換」とは、ペプチド化学の技術分野の当業者がポリペプチドの二次構造およびヒドロパシー性が実質的に不变であると予想するような、あるアミノ酸が、類似した特性を有しているもう一つのアミノ酸に置換されるものである。アミノ酸置換は、一般に、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基づき、なされ得る。例えば、負の電荷を有するアミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ；正の電荷を有するアミノ酸には、リジンおよびアルギニンが含まれ；類似した親水性値を有する、電荷を有しない極性頭部を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、およびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが含まれる。保存的変化を表し得るアミノ酸のその他の群には、(1)ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2)cys、ser、tyr、thr；(3)val、ile、leu、met、ala、phe；(4)lys、arg、his；および(5)phe、tyr、trp、hisが含まれる。バリアントは、付加的にまたは代替的に非保存的変化を含有してもよい。好ましい態様において、バリアントポリペプチドは、5個以下のアミノ酸の置換、欠失、または付加によってネイティブ配列と異なる。バリアントは、例えば、ポリペプチドの免疫原性、二次構造、およびヒドロパシー性に対する最小の影響を有するアミノ酸の欠失または付加によって、付加的に（または代替的に）修飾されていてもよい。

10

20

【0036】

ポリペプチドの調製

ポリペプチドは、翻訳と同時にまたは翻訳後にタンパク質の移動を指図するシグナル（リーダー）配列を、タンパク質のN末端に含み得る。ポリペプチドは、リンカー、またはポリペプチドの合成、精製、もしくは同定を容易にするためのその他の配列にコンジュゲートされてもよい。

【0037】

30

ポリペプチドは、血清のような天然起源から精製され得る。いくつかの態様において、ポリペプチドは、組成物が投与されるであろう同一の対象から精製される。他の態様において、ポリペプチドは、ヒトへの投与のため、ウシHDLまたはアポA-Iのような異種の種から精製されたものである。

【0038】

本明細書に記載されるDNA配列によってコードされた組換えポリペプチドは、当業者に公知の多様な発現ベクターのいずれかを使用して、DNA配列から容易に調製され得る。発現は、組換えポリペプチドをコードするDNA分子を含有している発現ベクターによって形質転換されたまたはトランスフェクトされた適切な宿主細胞において達成され得る。適当な宿主細胞には、原核生物、酵母、および高等真核細胞が含まれる。好ましくは、利用される宿主細胞は、大腸菌（E.coli）、酵母、昆虫細胞、またはCOSもしくはCHOのような哺乳動物細胞株である。組換えのタンパク質またはポリペプチドを培養培地中へ分泌する適当な宿主/ベクター系からの上清を、市販のフィルターを使用して、まず濃縮することができる。濃縮後、濃縮物を、アフィニティマトリックスまたはイオン交換樹脂のような適当な精製マトリックスへアプライすることができる。最後に、組換えポリペプチドをさらに精製するため、1個以上の逆相HPLC工程を使用することができる。

40

【0039】

約100個未満のアミノ酸、一般には、約50個未満のアミノ酸を有する一部分およびその他のバリアントは、当業者に周知の技術を使用して、合成手段によっても生成され得る。例えば、そのようなポリペプチドは、成長中のアミノ酸鎖にアミノ酸が逐次的に付加され

50

る、メリフィールド固相合成法のような、市販の固相技術のいずれかを使用して合成され得る。Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963を参照のこと。ポリペプチドの自動合成のための装置は、Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA) のような供給元から市販されており、製造業者の説明に従って操作され得る。

【0040】

ポリペプチドは、HPTU (O-ベンゾトリアゾールN,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート) 活性化と共にFmoc化学を使用して、Perkin Elmer/Applied Bio systems Division 430Aペプチド合成装置で合成され得る。コンジュゲーション、固定化された表面との結合、またはペプチドの標識の方法を提供するため、Gly-Cys-Gly配列を、ペプチドのアミノ末端に付着させることができる。以下の切断混合物：トリフルオロ酢酸：エタンジチオール：チオアニソール：水：フェノール (40:1:2:2:3) を使用して、固体支持体からのペプチドの切断を実施することができる。2時間の切断の後、ペプチドを冷メチル-t-ブチルエーテルで沈殿させることができる。次いで、ペプチドペレットを、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を含有している水に溶解させ、凍結乾燥させた後、C18逆相HPLCにより精製することができる。水中0% ~ 60% アセトニトリル (0.1% TFAを含有) の勾配を、ペプチドを溶出させるために使用することができる。純粋な画分の凍結乾燥の後、ペプチドを、エレクトロスプレーまたはその他の型の質量分析を使用して、アミノ酸分析によって特徴決定することができる。

【0041】

融合タンパク質

いくつかの態様において、ポリペプチドは、本明細書に記載されるポリペプチドを複数種含むか、または本明細書に記載される少なくとも1種のポリペプチドと、無関係な配列とを含む融合タンパク質である。いくつかの態様において、融合タンパク質は、アポA-Iポリペプチドと免疫原性ポリペプチドとを含む。免疫原性ポリペプチドは、例えば、付加的なタンパク質の全部または一部分を含み得る。

【0042】

付加的な融合パートナーが付加されてもよい。融合パートナーは、例えば、Tヘルパーエピトープ、好ましくは、ヒトによって認識されるTヘルパーエピトープの提供を補助することによって、免疫学的融合パートナーとして機能することができる。もう一つの例として、融合パートナーは、ネイティブ組換えタンパク質より高い収率でのタンパク質の発現を補助する、発現エンハンサーとして機能することができる。ある種の好ましい融合パートナーは、免疫学的融合パートナーおよび発現増強融合パートナーの両方である。その他の融合パートナーは、タンパク質の可溶性を増加させるか、または所望の細胞内区画へのタンパク質のターゲティングを可能にするため、選択され得る。さらなる融合パートナーには、タンパク質の精製を容易にするアフィニティタグが含まれる。

【0043】

融合タンパク質は、一般に、化学的コンジュゲーションを含む、標準的な技術を使用して調製され得る。好ましくは、融合タンパク質は、発現系において、非融合タンパク質に比べて増加したレベルの産生を可能にする組換えタンパク質として発現される。簡単に説明すると、ポリペプチド成分をコードするDNA配列を、別々に組み立て、適切な発現ベクターへライゲートすることができる。配列のリーディングフレームが一致するよう、1種のポリペプチド成分をコードするDNA配列の3'末端を、ペプチドリンカーを用いて、または用いずに、第2のポリペプチド成分をコードするDNA配列の5'末端にライゲートする。これは、両方の成分ポリペプチドの生物学的活性を保持する単一融合タンパク質への翻訳を可能にする。

【0044】

ペプチドリンカー配列は、各ポリペプチドが二次構造および三次構造へ折り畳まれることを確実にするために十分な距離だけ第1のポリペプチド成分と第2のポリペプチド成分とを分離するために使用され得る。そのようなペプチドリンカー配列は、当技術分野において周知の標準的な技術を使用して、融合タンパク質へ組み入れられる。適当なペプチドリ

10

20

30

40

50

ンカー配列は、以下の要因に基づき選ばれ得る：(1) フレキシブルな拡張されたコンフォメーションをとり得ること；(2) 第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの機能性エピトープと相互作用する可能性のある二次構造をとり得ないこと；ならびに(3) ポリペプチド機能性エピトープと反応する可能性のある疎水性のまたは電荷を有する残基が存在しないこと。好ましいペプチドリンカー配列は、Gly残基、Asn残基、およびSer残基を含有している。ThrおよびAlaのような、その他のほぼ中性のアミノ酸も、リンカー配列において使用され得る。リンカーとして有用に使用され得るアミノ酸配列には、Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985 ; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986 ; 米国特許第4,935,233号および米国特許第4,751,180号に開示されたものが含まれる。

リンカー配列は、一般に、1～約50アミノ酸長であり得る。第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが、機能性ドメインを分離し、立体干渉を妨害するために使用され得る非必須のN末端アミノ酸領域を有する時、リンカー配列は必要とされない。 10

【0045】

ライゲートされたDNA配列は、適当な転写または翻訳の制御要素と機能的に連結される。DNAの発現を担う制御要素は、第1のポリペプチドをコードするDNA配列の5'に位置する。同様に、翻訳を終了させるために必要とされる終止コドンおよび転写終結シグナルは、第2のポリペプチドをコードするDNA配列の3'に存在する。

【0046】

無関係の免疫原性タンパク質と共に本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質も、提供される。好ましくは、免疫原性タンパク質は記憶応答を誘発することができる。そのようなタンパク質の例には、破傷風タンパク質、結核タンパク質、および肝炎タンパク質が含まれる(例えば、Stoute et al., New Engl. J. Med. 336:86-91, 1997を参照のこと)。 20

【0047】

好ましい態様において、免疫学的融合パートナーは、グラム陰性菌ヘモフィルス・インフルエンザ(Haemophilus influenza)Bの表面タンパク質であるプロテインD(WO 91/18926)に由来する。好ましくは、プロテインD誘導体は、タンパク質の最初のおよそ3分の1(例えば、N末端の最初の100～110アミノ酸)を含み、プロテインD誘導体は脂質付加されていてもよい。その他の融合パートナーには、インフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質、NS 1(赤血球凝集素)が含まれる。典型的には、N末端の81アミノ酸が使用されるが、Tヘルパーエピトープを含む異なる断片が使用されてもよい。 30

【0048】

もう一つの態様において、免疫学的融合パートナーは、LYTAとして公知のタンパク質、またはその一部分(好ましくは、C末端部分)である。LYTAは、アミダーゼLYTA(LytA遺伝子)によってコードされる；Gene 43:265-292, 1986)として公知のN-アセチル-L-アラニンアミダーゼを合成する肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)に由来する。LYTAは、ペプチドグリカン骨格内のある種の結合を特異的に分解する自己溶菌酵素である。LYTAタンパク質のC末端ドメインは、コリンまたはDEARのようないくつかのコリンアナログに対する親和性を担っている。この特性は、融合タンパク質の発現のために有用な大腸菌C-LYTA発現プラスミドの開発のために活用されている。アミノ末端にC-LYTA断片を含有しているハイブリッドタンパク質の精製は記載されている(Biotechnology 10:795-798, 1992を参照のこと)。好ましい態様において、LYTAのリピート部分が融合タンパク質に組み入れられ得る。リピート部分は、残基178から開始するC末端領域に見出される。特に好ましいリピート部分は、残基188～305が組み入れられたものである。 40

【0049】

一般に、本明細書に記載される(融合タンパク質を含む)ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、単離されている。「単離された」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとは、その最初の環境から除去されているものである。例えば、天然に存在するタンパク質は、天然の系において共存する材料のいくらかまたは全部から分離されている場合、単離されている。好ましくは、そのようなポリペプチドは、少なくとも約90%純粋、より好ましくは、少なくとも約95%純粋、最も好ましくは、少なくとも約99%純粋である。ポリヌク 50

レオチドは、例えば、天然環境の一部でないベクターへクローニングされている場合、単離されないと見なされる。

【0050】

本発明のポリヌクレオチド

本発明は、bHDL、アポA-I、およびHDLミメティックを含む、1種以上のHDL関連ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。そのような配列に完全に相補的なポリヌクレオチドも、本発明に包含される。ポリヌクレオチドは、一本鎖（コード鎖またはアンチセンス鎖）または二本鎖であり得、DNA分子（ゲノム、cDNA、もしくは合成）またはsiRNAを含むRNA分子であり得る。RNA分子には、イントロンを含有しており、1対1でDNA分子に対応するhnRNA分子、およびイントロンを含有していないmRNA分子が含まれる。付加的なコード配列または非コード配列が、本発明のポリヌクレオチドに存在してもよいが、存在しなくてもよく、ポリヌクレオチドは、他の分子および/または支持材料と連結されていてもよいが、連結されていなくてもよい。そのようなポリヌクレオチドの一部分は、関連分子の増幅および検出のためのプライマーおよびプローブとして有用であり得る。

【0051】

ポリヌクレオチドは、ネイティブ配列（即ち、HDL関連ポリペプチドまたはその一部分をコードする内在性配列）を含んでいてもよいし、またはそのような配列のバリアントを含んでいてもよい。ポリヌクレオチドバリアントは、コードされたポリペプチドの免疫原性がネイティブタンパク質に比べて縮小されないような、1個以上の置換、付加、欠失、および/または挿入を含有している。バリアントは、好ましくは、ネイティブタンパク質またはその一部分をコードするポリヌクレオチド配列との少なくとも約70%の同一性、より好ましくは、少なくとも約80%の同一性、最も好ましくは、少なくとも約90%の同一性を示す。

【0052】

2種のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列は、下記のように最大に一致するように整列化された時、2種の配列のヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が、同一である場合、「同一である」と言われる。2種の配列の間の比較は、典型的には、配列類似性の局所的領域を同定し比較するため、比較ウィンドウにおいて配列を比較することによって実施される。「比較ウィンドウ」とは、本明細書において使用されるように、2種の配列を最適に整列化した後、配列を、同じ連続位置数の参照配列と比較することができる、少なくとも約20、一般的には、30~約75、40~約50の連続位置のセグメントをさす。

【0053】

比較のための配列の最適アライメントは、デフォルトパラメーターを使用して、Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 内のMegalignプログラムを使用して実施され得る。このプログラムは、以下の参照に記載された数種のアライメントスキームを具現する：Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358 ; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA ; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5: 151-153 ; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4: 11-17 ; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor. 11: 105 ; Santou, N., Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425 ; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA ; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 726-730。

【0054】

好ましくは、「配列同一率」は、少なくとも20位置の比較ウィンドウにおいて2種の最適に整列化された配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の一部分は、2種の配列の最適アライメントのため、（付加または欠失を含まない）参照配列と比較して、20パーセント以下、一般的には、5

10

20

30

40

50

~15パーセント、または10~12パーセントの付加または欠失(即ち、ギャップ)を含んでいてもよい。率は、両方の配列に同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して、マッチする位置の数を得、マッチする位置の数を、参照配列内の位置の総数(即ちウインドウサイズ)で割り、その結果に100を掛けて、配列同一率を得ることによって計算される。

【0055】

バリアントは、付加的にまたは代替的に、ネイティブ遺伝子またはその一部分もしくは相補鎖に実質的に相同であってもよい。そのようなポリヌクレオチドバリアントは、ネイティブタンパク質をコードする天然に存在するDNA配列(または相補配列)と中程度にストリンジエントな条件の下でハイブリダイズすることができる。

10

【0056】

適当な「中程度にストリンジエントな条件」には、5×SSC、0.5%SDS、1.0mM EDTA(pH 8.0)の溶液による予備洗浄；50~65、5×SSC、一夜のハイブリダイゼーション；その後の0.1%SDSを含有している2×SSC、0.5×SSC、および0.2×SSCの各々による20分間の65での2回の洗浄が含まれる。

【0057】

本明細書において使用されるように、「高度にストリンジエントな条件」または「高ストリンジエンシー条件」とは、(1)洗浄のために低いイオン強度および高温、例えば、0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、50

を利用するもの；(2)ハイブリダイゼーションにおいて、42で、750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを含む、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)と共に、ホルムアミド、例えば、50%(v/v)ホルムアミドのような変性剤を利用するもの；または(3)50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハート液、超音波処理されたサケ精子DNA(50 μg/ml)、0.1%SDS、および10%デキストラン硫酸、42を利用し、0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)、42および50%ホルムアミド、55での洗浄、続いて、EDTAを含有している0.1×SSC、55からなる高ストリンジエンシー洗浄を利用するものである。当業者は、プローブ長等のような因子に適応するよう、必要に応じて、温度、イオン強度等を調整する方法を認識しているであろう。

20

【0058】

遺伝暗号の縮重の結果として、本明細書に記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が多く存在することが、当業者によって認識されるであろう。これらのポリヌクレオチドのうちのいくつかは、ネイティブ遺伝子のヌクレオチド配列と最小の相同性を保持する。にもかかわらず、コドン使用の差によって変動するポリヌクレオチドは、本発明によって具体的に企図される。さらに、本明細書に提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、ヌクレオチドの欠失、付加、および/または置換のような1個以上の変異の結果として改変される内在性遺伝子である。生じるmRNAおよびタンパク質は、改変された構造または機能を有する場合があるが、必ずしもそうではない。対立遺伝子は、(ハイブリダイゼーション、増幅、および/またはデータベース配列比較のような)標準的な技術を使用して同定され得る。

30

【0059】

ポリヌクレオチドは、当技術分野において公知の多様な技術のいずれかを使用して調製され得る。アポA-Iタンパク質をコードするDNAは、対応するmRNAを発現する組織から調製されたcDNAライブラリーから入手され得る。従って、ヒトアポA-I DNAは、ヒト組織から調製されたcDNAライブラリーから便利に入手され得る。アポA-Iタンパク質をコードする遺伝子は、ゲノムライブラリーから入手されてもよいし、またはオリゴヌクレオチド合成によって入手されてもよい。ライブラリーは、関心対象の遺伝子またはそれによってコードされたタンパク質を同定するために設計された(アポA-Iに対する抗体または少なくとも約20~80塩基のオリゴヌクレオチドのような)プローブによってスクリーニングされ得

40

50

る。選択されたプローブによるcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーのスクリーニングは、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されたもののような標準的な手法を使用して実施され得る。アポA-Iをコードする遺伝子を単離するための代替的な手段は、PCR方法論を使用することである (Sambrook et al. (前記); Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995))。

【0060】

プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、偽陽性が最小化されるよう十分に長く、十分に低い多義性を有するべきである。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、スクリーニングされているライブラリーの中のDNAとハイブリダイズした際に検出され得るよう標識される。標識の方法は、当技術分野において周知であり、³²P標識ATPのような放射標識の使用、ビオチン化、または酵素標識を含む。中ストリンジエンシーおよび高ストリンジエンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、Sambrook et al. (前記) に提供されている。

10

【0061】

ポリヌクレオチドバリアントは、一般に、例えば、固相ホスホラミダイト化学合成による化学合成を含む、当技術分野において公知の任意の方法によって調製され得る。オリゴヌクレオチド指定部位特異的変異誘発 (Adelman et al., DNA 2:183, 1983を参照のこと) のような標準的な変異誘発技術を使用して、ポリヌクレオチド配列に修飾が導入されてもよい。あるいは、(T7またはSP6のような) 適当なRNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターへDNAが組み入れられるのであれば、RNA分子は、アポA-Iタンパク質をコードするDNA配列またはその一部分のインビトロまたはインビボの転写によって生成され得る。本明細書に記載されるように、ある種の一部分が、コードされたポリペプチドを調製するために使用されてもよい。付加的にまたは代替的に、一部分は、コードされたポリペプチドがインビボで生成されるよう、患者へ投与され得る。

20

【0062】

任意のポリヌクレオチドを、インビボでの安定性を増加させるためにさらに修飾してもよい。可能な修飾には、5'末端および/もしくは3'末端に隣接配列を付加すること; 骨格にホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオエートもしくは2'-O-メチルを使用すること; ならびに/またはイノシン、キューオシン、およびワイプトシン、ならびに、アデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンのアセチル型、メチル型、チオ型、およびその他の修飾型のような非伝統的な塩基を含めることが含まれる。

30

【0063】

確立された組換えDNA技術を使用して、ヌクレオチド配列を、多様な他のヌクレオチド配列と接合することができる。例えば、ポリヌクレオチドを、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、およびコスミドを含む多様なクローニングベクターのいずれかへクローニングすることができる。特に重要なベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、および配列決定ベクターが含まれる。一般に、ベクターは、少なくとも1種の生物において機能性の複製起点、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1種以上の選択マーカーを含有するであろう。その他の要素は、所望の使用に依り、当業者に明白であろう。

40

【0064】

ある種の態様において、哺乳動物の細胞への進入が可能となり、そこで発現が可能となるよう、ポリヌクレオチドを製剤化することができる。下記のように、そのような製剤は、治療目的のために特に有用である。当業者は、標的細胞におけるポリヌクレオチドの発現を達成する多くの手段が存在し、任意の適当な方法が利用され得ることを認識するであろう。例えば、アデノウイルス、アデノ隨伴ウイルス、レトロウイルス、またはワクシニアウイルスもしくはその他のポックスウイルス (例えば、トリポックスウイルス) のような (これらに限定されない) ウイルスベクターへ、ポリヌクレオチドを組み入れることができる。そのようなベクターへDNAを組み入れるための技術は、当業者に周知である。

50

レトロウイルスベクターは、(形質導入された細胞の同定または選択を援助するための)選択マーカーのための遺伝子、および/または、ベクターを標的特異的にするための、特異的な標的細胞上の受容体のリガンドをコードする遺伝子のような、ターゲティングモティを、さらに移入するかまたは組み入れることができる。ターゲティングは、当業者に公知の方法によって、抗体を使用して達成されてもよい。

【0065】

治療目的のためのその他の製剤には、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型エマルション、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む脂質に基づく系のようなコロイド分散系が含まれる。インビトロおよびインビボで送達媒体として使用するための好ましいコロイド系は、リポソーム(即ち、人工膜小胞)である。そのような系の調製および使用は、当技術分野において周知である。

10

【0066】

薬学的組成物

本発明は、薬学的組成物に組み入れられるアポA-Iポリペプチド、ポリヌクレオチド、および関連分子を提供する。典型的な態様において、ポリペプチドは、天然の、全長の、未修飾形態のアポAIである。当技術分野において理解されているように、アポAIは高密度リポタンパク質(HDL)の重要な成分である。従って、HDLを投与することによって、アポAIを投与することができる。

【0067】

薬学的組成物は、1種以上のそのような化合物を含み、任意で、生理学的に許容される担体を含む。アポAIの投与は、例えば、ミセルを形成させるための、不活性脂質による調製によって容易になる。典型的な態様において、アポAIは、経口サプリメントの一部分として、経口投与される。あるいは、それは、対象の皮膚に貼付されるパッチのように、経皮投与されてもよい。

20

【0068】

当業者に公知の任意の適当な担体が、本発明の薬学的組成物において利用され得るが、担体の型は、投与のモードに依って変動するであろう。本発明の組成物は、例えば、局所投与、経口投与、経鼻投与、静脈内投与、頭蓋内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、経皮投与、または筋肉内投与を含む、適切な投与の様式のために製剤化され得る。皮下注射のような非経口投与のため、担体は、好ましくは、脂肪を含み、任意で、水、生理食塩水、アルコール、ロウ、または緩衝液を含む。経口投与のため、上記の担体のいずれか、またはマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、ショ糖、および炭酸マグネシウムのような固体担体が利用され得る。生分解性マイクロスフェア(例えば、乳酸グリコール酸共重合体)も、本発明の薬学的組成物のための担体として利用され得る。

30

【0069】

さらに、担体は、製剤のpH、モル浸透圧濃度、粘性、透明度、色、無菌性、安定性、溶解速度、または芳香を修飾するかまたは維持するため、その他の薬理学的に許容される賦形剤を含有していてもよい。同様に、担体は、分子の安定性、溶解、放出、もしくは吸収の速度、または血液脳関門の通過を修飾するかまたは維持するため、その他の薬理学的に許容される賦形剤をさらに含有していてもよい。そのような賦形剤は、単位用量形態もしくは多用量形態での非経口投与のため、または植え込まれたポンプからの連続的もしくは周期的な注入によるCSFへの直接注入のため、投薬量を製剤化するために一般的に慣習的に利用されている物質である。

40

【0070】

そのような組成物は、緩衝液(例えば、中性緩衝生理食塩水もしくはリン酸緩衝生理食塩水)、炭水化物(例えば、グルコース、マンノース、ショ糖、もしくはデキストラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、もしくはグリシンのようなアミノ酸、抗酸化剤、EDTAもしくはグルタチオンのようなキレート剤、アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)、および/または保存剤も含み得る。あるいは、凍結乾燥物として、本発明

50

の組成物を製剤化することができる。周知のテクノロジーを使用して、リポソーム内に化合物を封入してもよい。

【0071】

薬学的組成物は、ポリペプチドがインサイチューで生成されるよう、上記のポリペプチドのうちの1種以上をコードするDNAを含有することができる。上述のように、DNAは、核酸発現系、細菌発現系、およびウイルス発現系を含む、当業者に公知の多様な送達系のいずれかに存在し得る。Rolland,Crit.Rev.Therap.Drug Carrier Systems 15:143-198,1998およびその中に引用された参照によって記載されたもののような多数の遺伝子送達技術が、当技術分野において周知である。適切な核酸発現系は、(適当なプロモーターおよび終結シグナルのような)患者における発現のために必要なDNA配列を含有している。細菌送達系は、細胞表面上にポリペプチドの免疫原性部分を発現するか、またはそのようなエピトープを分泌する(カルメットグラン桿菌のような)細菌の投与を含む。

【0072】

好ましい態様において、DNAは、複製能を有する非病原性(欠陥)ウイルスの使用を含み得る、ウイルス発現系(例えば、ワクシニアもしくはその他のポックスウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルス)を使用して導入され得る。適当な系は、例えば、Fisher-Hoch et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:317-321,1989; Flexner et al., Ann.N.Y. Acad Sci.569:86-103,1989; Flexner et al., Vaccine 8:17-21,1990; 米国特許第4,603,112号、第4,769,330号、および第5,017,487号; WO 89/01973; 米国特許第4,777,127号; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner-Biotechniques 6:616-627,1988; Rosenfeld et al., Science 252:431-434,1991; Kolls et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:2 15-219,1994; Kass-Eisler et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:11498-11502,1993; Guzman et al., Circulation 88:2838-2848,1993; ならびにGuzman et al., Cir.Res.73:1202-1 207,1993に開示されている。そのような発現系へDNAを組み入れるための技術は、当業者に周知である。DNAは、例えば、Ulmer et al., Science 259:1745-1749,1993に記載され、Cohen, Science 259:1691-1692,1993に概説されているような「裸」であってもよい。裸のDNAの取り込みは、細胞へ効率的に輸送される生分解性ビーズにDNAをコーティングすることによって増加し得る。

【0073】

多様なアジュバントのうちの任意のものを、本発明の組成物において利用することができる。大部分のアジュバントが、水酸化アルミニウムまたは鉱油のような、急速な異化からペプチドを防御するために設計された物質、およびリピドA、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)または結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)に由来するタンパク質のような、免疫応答の刺激剤を含有している。適当なアジュバントは、例えば、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント(Difco Laboratories,Detroit,MI); Merck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); 水酸化アルミニウムゲル(ミョウバン)またはリン酸アルミニウムのようなアルミニウム塩;カルシウム、鉄、または亜鉛の塩;アシル化チロシンアシル化糖の不溶性懸濁物;陽イオン性または陰イオン性に誘導体化された多糖;ポリホスファゼン生分解性マイクロスフェア;モノホスホリルリピドAおよびクイル(quill)Aとして、市販されている。GM CSF、またはインターロイキン2、インターロイキン7、もしくはインターロイキン12のようなサイトカインも、アジュバントとして使用することができる。

【0074】

本明細書に記載された組成物は、徐放性製剤(即ち、投与後の化合物の徐放を達成するためのカプセルまたはスponジのような製剤)の一部分として投与されてもよい。そのような製剤は、一般に、周知のテクノロジーを使用して調製され得、例えば、口腔内、直腸、もしくは皮下への植え込みによって、または腫瘍の外科的切除の部位のような所望の標的部位への植え込みによって投与され得る。徐放性製剤は、担体マトリックスに分散した、かつ/または速度調節膜に包囲されたレザバーに含有されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体を含有することができる。そのような製剤において使用するための担

10

20

30

40

50

体は、生体適合性であって、生分解性であってもよい；好ましくは、製剤は、活性成分放出の比較的一定のレベルを提供する。徐放性製剤に含有される活性化合物の量は、植え込みの部位、放出の速度および予想される期間、ならびに治療または予防される状態の性質に依る。

【0075】

投与および投薬量

組成物は、任意の適當な様式で、しばしば、薬学的に許容される担体と共に、または薬学的に許容される塩の形態で投与される。本発明に係るアポA-1を対象へ投与する適當な方法は、利用可能であり、複数種の経路が、特定の組成物を投与するために使用され得るが、特定の経路が、しばしば、他の経路より即効性の、より有効な反応を提供することができる。

10

【0076】

本発明に関して、患者へ投与される用量は、経時的に患者における有益な治療的応答を達成するか、または疾患進行を阻害するために十分なものでなければならない。従って、組成物は、疾患からの症候および／または合併症を軽減させるか、低下させるか、治癒させるか、または少なくとも部分的に阻止するために十分な量で対象へ投与される。これを達成するために適切な量が、「治療的に有効な用量」として定義される。一般に、1種以上のポリペプチドを含む薬学的組成物について、1用量中に存在する各ポリペプチドの量は、宿主1kg当たり約100 μg～5mgの範囲である。適當な容量は、患者のサイズによって変動するであろうが、典型的には、約0.1mL～約5mLの範囲であろう。

20

【0077】

本明細書に開示された治療用組成物の投与の経路および頻度、ならびに投薬量は、個体によって変動し、標準的な技術を使用して容易に確立され得る。一般に、薬学的組成物は、注射（例えば、皮内、腫瘍内、筋肉内、静脈内、もしくは皮下）によって、鼻腔内に（例えば、吸入によって）、または経口的に投与され得る。好ましくは、1～10用量が52週間にわたり投与され得る。好ましくは、6用量が1ヶ月間隔で投与され、その後、追加予防接種が定期的に与えられてもよい。別のプロトコルが、個々の患者にとって適切であり得る。一つの態様において、2種以上の経口サプリメントが10日間隔で投与される。

【0078】

一般に、適切な投薬量および処置計画は、治療的利益および／または予防的利益を提供するために十分な量で活性化合物を提供するものである。そのような応答は、処置された患者において、未処置の患者と比較して改善された臨床的転帰（例えば、より高頻度の寛解、完全な、もしくは部分的な、またはより長い無病生存期間）を確立することによってモニタリングされ得る。

30

【0079】

処置には、予防および治療が含まれる。予防または治療は、单一または複数の部位への単一の時点または複数の時点での単回投与によって達成され得る。投与は、複数の部位へほぼ同時になされてもよい。患者または対象には、ヒト属、ウシ属、ウマ属、イヌ属、ネコ属、ブタ属、およびヒツジ属の動物のような哺乳動物が含まれる。対象は、好ましくは、ヒトである。典型的な態様において、処置は、天然の、全長の、未修飾形態のアポAIを対象へ投与する工程を含む。

40

【実施例】

【0080】

以下の実施例は、本発明を例示し、その作成および使用のため当業者を補助するために提示される。実施例は、決して、本発明の範囲を限定するためのものではない。

【0081】

実施例1：アポA-1はNIH-3T3纖維芽細胞におけるUV誘発細胞死および酸化ストレスを防止する

この実施例は、アポA-1処理が、NIH-3T3纖維芽細胞（皮膚細胞）におけるUV誘発細胞死および酸化ストレスを防止することを証明する。NIH 3T3 (1×10^6) 細胞を、4枚の別々の

50

96穴プレートに播種した。24時間後、細胞を一夜飢餓状態にした。細胞を24時間処理するため、アポA-1をある濃度(10 μg/ml)で使用した。処理後、細胞をPBSで洗浄した。1枚のプレートを、UV処理なしの対照として使用した。残りの3枚のプレートを、5、10、および20mJ/cm²でのUV処理のために使用した。UV処理後、細胞に完全培地を与え、さらに24時間培養した。以前に記載されたようにして(Ganapathy E, et al., 2011, D-4F, an apoA-1 mimetic peptide inhibits proliferation and tumorigenicity of epithelial ovarian cancer cells by upregulating the antioxidant enzyme MnSOD, Int J Cancer 130:1071-1081)、全てのプレートについて細胞生存率を測定した。

【0082】

結果は、UV処理がNIH3T3細胞の細胞生存率を低下させることを示した(図1)。アポA-1処理(10 μg/ml)は、UV誘発細胞死からNIH3T3細胞を防御する(図2)。アポA-1と同様にHDLに関連しているタンパク質、アポA-IIは、NIH3T3細胞のUV誘発細胞死を防止しなかつた(図2)。従って、アポA-1は、NIH-3T3纖維芽細胞(皮膚細胞)におけるUV誘発細胞死および酸化ストレスを効果的に防止する。アポA-1は、炎症誘発性皮膚状態の予防および治療における可能性のある役割を有している。

【0083】

実施例2：ウシHDLを使用した腫瘍の成長および発達の阻害

この実施例は、結腸癌のマウスモデルにおいて、bHDL(ウシHDL)が、腫瘍の成長および発達のような炎症誘発性状態に影響することを証明する。bHDLは、マウス結腸腺癌細胞株CT26細胞の生存率および増殖を低下させ、皮下投与または経口投与された時、BALB/cマウスにおけるCT26細胞によって媒介される腫瘍量を減少させた。bHDLミメティックを受容したマウスにおいては、結腸癌の血清バイオマーカーであるリゾホスファチジン酸(LPA)の血漿レベルも有意に低下し、このことから、炎症誘発性脂質の結合および除去が、bHDLによる腫瘍発達の阻害についての可能性のある機序であることが示唆された。さらに、bHDLは、ヒト家族性大腸腺腫症のマウスモデルであるAPC^{Min/+}マウスにおいてポリープのサイズおよび数を有意に低下させた。

【0084】

最近の研究は、HDLレベルが結腸癌リスクと逆の関係にあることを示唆している。様々な構造を有する多数のペプチドおよびタンパク質から構築されたHDLミメティックは、HDLに似た抗炎症特性および抗酸化特性を保有する。この実施例に提示された結果は、bHDL分子が、結腸癌のような誘導型および自然発症型両方の炎症誘発性状態の発症を阻害するために有効であることを示している。これらの結果から、結腸癌の予防および治療によって本明細書において例証された、炎症誘発性状態の治療のための新規の治療戦略として、bHDLが初めて同定される。

【0085】

マウス

Animal Research Committee at the University of California at Los Angelesによって、全てのマウスプロトコルが承認された。6週齢BALB/c雌マウスおよび6週齢C57BL/6J-APC^{Min/+}雄マウスは、Jackson Laboratoryから購入された。

【0086】

bHDL

bHDLは、Biomedical Technologies Inc.から入手された。食事でのbHDLの投与のため、ウエスタン(Western)食について以前に記載された技術(18)を本質的に使用して、bHDLを標準的なマウス飼料(Ralston Purina)へ混合した。しかしながら、本明細書において報告される実験において、ウエスタン食は投与されず；マウスは、bHDLを含むかまたは含まない標準的なマウス飼料のみを受容した。

【0087】

細胞培養実験

BALB/c起源のN-ニトロソ-N-メチルウレタンによって誘導されたマウス結腸癌に由来するCT26細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Co

10

20

30

40

50

llection) (ATCC) から購入された。CT26細胞 (1ウェル当たり2,000細胞) を、96穴培養プレートにおいて完全培地においてまず培養し、24時間後、培地を無血清培地に交換した。一夜のインキュベーションの後、細胞を、媒体によって処理するか (対照)、または10 μ g/mLのbHDLによって処理した。bHDLはH2Oに溶解していた。細胞をさらに48時間インキュベートし、製造業者のプロトコルに従って、MTSアッセイキット (Promega) を使用して、生存率についてアッセイした。増殖アッセイのため、48時間のインキュベーションのうちの最後の4時間、細胞をBrdUによって標識した。その後、細胞を洗浄し、固定し、マウス抗BrdU抗体と共に室温で1時間インキュベートし、ペルオキシダーゼ連結ヤギ抗マウス二次抗体 (Calbiochem) によって検出した。吸光度を二重波長450nmおよび540nmを使用して測定した。

10

【 0 0 8 8 】

腫瘍量研究

6週齢BALB/c雌マウスに、PBSで単一細胞懸濁物として調製された 1×10^6 CT26細胞の100 μ L皮下注射を与え、マウスを、15日間毎日、皮下 (SQ) 投与された10mg/kgのbHDLまたはBHDLによって処理した。マウスを屠殺し、腫瘍重量を測定した。

【 0 0 8 9 】

インビボ肺転移

BALB/cマウスに、尾静脈注射を介して、100 μ LのPBSで 2×10^4 CT26細胞を静脈内注射し、マウスを、3週間、SQ投与された10mg/kg/日のbHDLによって処理するか；または、3週間、飼料食中に投与された100mg/kg/日のbHDLによって処理した。3週間の処理の後、マウスを屠殺し；肺を採取し、計量し、ブアン液 (Sigma) で固定した。肺表面上の腫瘍結節を計数した。

20

【 0 0 9 0 】

APC^{Min/+}マウス研究

C57BL/6Jバックグラウンドの6週齢APC^{Min/+}雄マウスを、飼料食中に投与されたbHDL 10 0mg/kg/日によって処理した。8週間の処理の後、マウスを屠殺した。腸全体を直ちに除去し、ホルマリンおよび70%エタノールで固定した。腫瘍を計数し測定するため、解剖顕微鏡下で腸を切開し調査した。

【 0 0 9 1 】

免疫組織化学 (IHC) 染色

30

肺表面からの腫瘍組織を固定し、パラフィンで包埋し、5 μ mの厚さに切片化した。切片を、キシレンによって脱パラフィンし、100%、90%、70%、および50%エタノールによって親水化し、20 μ g/mLのプロティナーゼKによって30分間処理し、内在性ペルオキシダーゼを阻害するため、3%H₂O₂によって室温で30分間処理し、PBSで調製された10%正常ヤギ血清および4%BSAによって3時間ブロッキングし、次いで、1:50ラット抗マウスモノクローナルCD31抗体と共に4 で一夜インキュベートした。切片を、対応するビオチン化二次抗体と共に1時間インキュベートした後、Vectastain ABC Elite試薬と共にインキュベートした。

【 0 0 9 2 】

細胞周期分析

40

CT26細胞を6穴プレートにおいて一夜培養し、次いで、48時間血清飢餓状態にした。細胞を、媒体 (対照) によって処理するか、または10 μ g/mLのBHDLもしくはG⁺bHDLによって処理し、さらに48時間インキュベートした。細胞を収集し、PBSで洗浄し、70%氷冷メタノールにより4 で一夜固定した。固定された細胞を、遠心分離によって収集し、PBSで洗浄し、40 μ g/mL RNaseAおよび100 μ g/mLヨウ化プロピジウムを含有している0.3mlのPBSに再懸濁させ、BD BiosciencesからのFACScanによるフローサイトメトリー細胞周期分析に供した。

【 0 0 9 3 】

ウエスタンプロット分析

50mMトリス緩衝液 (pH7.5) 中に0.1M NaCl、5mM EDTA、50mMバナジン酸ナトリウム、1

50

%トリトンX-100、およびプロテアーゼ阻害剤タブレットを含有している細胞溶解緩衝液による処理の後、全細胞タンパク質を収集した。20 μgの全タンパク質を、SDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に移し、5%スキムミルクおよび0.1%Tween-20において一次抗体と共に4 ℃でインキュベートした。抗サイクリンD1および抗サイクリンAウサギポリクローナル抗体は1:1000希釈で使用され、抗アクチンポリクローナル抗体は1:2000希釈で使用された。

【0094】

ELISA分析

血漿中のII-6濃度を、製造業者のプロトコル (Invitrogen) に従って、競合ELISAによって測定した。

10

【0095】

LPA結合親和性および血清LPAレベル

LPA(20:4)は、Avanti Polar Lipidsから購入された。以前に記載されたようにして (Mraph et al., 2007, Methods Enzymol 433:1-25)、LPAレベルを決定した。

【0096】

統計分析

データは各群について平均値 ± SDとして示される。本発明者らは、独立t検定によって統計分析を実施した。全ての結果を、P < 0.05で統計的に有意であると見なした。

【0097】

結果

20

結果は図3に示される。肺重量および腫瘍体積の両方の評価、ならびに目視検査は、bHD Lが、ヒト家族性大腸腺腫症のマウスモデルであるAPC^{min/+}マウスにおいて、ポリープのサイズおよび数を有意に低下させることを示した。

【0098】

実施例3：HDLミメティックを使用した腫瘍発達の阻害

この実施例は、結腸癌のマウスモデルにおいて、腫瘍発達を阻害するために、HDLミメティックを使用することができることを証明する。

【0099】

マウス

Animal Research Committee at the University of California at Los Angelesによって、全てのマウスプロトコルが承認された。6週齢BALB/c雌マウスはJackson Laboratoryから購入された。

30

【0100】

ペプチド

アポA-1ミメティックペプチドL-4F

(Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂; SEQ ID NO: 12)

、および、4Fペプチドと同一のアミノ酸を含有しているが、クラスA両親媒性ヘリックスの形成を妨害する順序で並べられたスクランブルペプチド (sc-4F)

(Ac-D-W-F-A-K-D-Y-F-K-K-A-F-V-E-E-F-A-K-NH₂; SEQ ID NO: 13)

40

は、全てL-アミノ酸から合成された。A¹¹およびA¹⁷がアミノイソ酪酸 (Aib) に置換された、L-4F2と命名されたもう一つのペプチド

(Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-Aib-E-K-F-K-E-Aib-F-NH₂; SEQ ID NO: 14)

も、試験した。ペプチドAc-hE18A-NH₂ (28AA) は、アポEのヘパリン結合ドメイン141 ~ 150 (L-R-K-L-R-K-R-L-R; SEQ ID NO: 15) のクラスA両親媒性ヘリックスペプチド18Aとの共有結合に由来する二重ドメインを有するアミノ酸配列

L-R-K-L-R-K-R-L-L-R-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO: 2)

を有する。A¹¹およびA¹⁷がアミノイソ酪酸 (Aib) に置換された配列

L-R-K-L-R-K-R-L-L-R-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-Aib-E-K-L-K-E-Aib-F (SEQ ID NO: 7)

50

を有するペプチド28AA-2。全てのペプチドをH₂Oに溶解させた。

【0101】

細胞培養実験

CT26細胞およびNIH3T3細胞（1ウェル当たり2,000細胞）を、96穴培養プレートにおいて完全培地においてまず培養し、24時間後、培地を無血清培地に交換した。一夜のインキュベーションの後、細胞を、媒体（対照）によって処理するか、または10 μg/mLのL-4FペプチドもしくはL-4F2ペプチドもしくは28AAペプチドもしくは28AA-2ペプチドによって処理した。細胞をさらに48時間インキュベートし、製造業者のプロトコルに従って、MTSアッセイキット（Promega）を使用して、生存率についてアッセイした。

【0102】

10

腫瘍量研究

6週齢BALB/c雌マウスに、PBSで単一細胞懸濁物として調製された1×10⁶ CT26細胞の100 μl皮下注射を与え、15日間毎日、SQで10mg/kgのペプチドによって処理した。マウスを屠殺し、腫瘍重量を測定した。腫瘍体積を、式V = 1/2 (L × W²) を使用して測定した。

【0103】

LPA結合親和性および血清LPAレベル

LPA(20:4)は、Avanti Polar Lipidsから購入された。以前に記載されたようにして（18）、血清LPAレベルを決定した。

【0104】

20

統計分析

データは各群について平均値 ± SDとして示される。本発明者らは、独立t検定によって統計分析を実施した。全ての結果を、P < 0.05で統計的に有意であると見なした。

【0105】

ペプチドはBALB/cマウスにおけるCT26細胞注射後の腫瘍発達を阻害する

CT-26は、免疫適格BALB/cマウスへ静脈内導入された時、転移性肺腫瘍を発症させる結腸腺癌細胞株である。本発明者らは、側腹部に1×10⁶ CT26細胞を皮下注射されたBALB/cマウスにおける側腹部腫瘍形成に対する、10mg/kg/日でSQ投与されたL-4F、L-4F2、およびsc-4F（4Fペプチドと同一のアミノ酸を含有しているが、クラスA両親媒性ヘリックスの形成を妨害する順序で並べられたスクランブルペプチド）の効果をまず調査した。マウスを、CT26細胞が注射された部位から遠位で、15日間毎日、皮下注射によって10mg/kgのsc-4F（n = 9）またはL-4F（n = 8）またはL-4F2（n = 10）のいずれかによって処理した。側腹部腫瘍の重量および体積は、予想通り、L-4Fによって処理されたマウスと比較して、sc-4Fによって処理されたBALB/cマウスにおいて有意に大きかった（273mg対179mg、P < 0.05；555mm³対313mm³、P < 0.05。図4A、4B）；腫瘍の重量および体積は、L-4F2によって処理されたマウスと比較しても、sc-4Fによって処理されたマウスにおいて有意に大きかった（273mg対118mg、P < 0.001；555mm³対197mm³、P < 0.001。図4A、4B）。L-4F2によって処理されたマウスからの腫瘍は、L-4Fによって処理されたマウスと比較して、有意に小さかった（179mg対118mg、P < 0.05；313mm³対197mm³。図4A、4B）。三群からの側腹部腫瘍の代表的な写真が図4Eに示される。図4Cおよび4Dは、三群の各々についての、重量および体積の（対照を100%とした）スコアの分布率を示す。

30

【0106】

40

本発明者らは、次に、28AAペプチドおよび28AA-2ペプチドによる処理が、BALB/cマウスの側腹部における腫瘍の発達に影響するか否かを調査した。6週齢BALB/c雌マウスに、側腹部において、1×10⁶ CT26細胞を皮下注射した。マウスを、CT26細胞が注射された部位から遠位で、15日間毎日、皮下注射によって10mg/kgの媒体（n = 12）または28AA（n = 10）または28AA-2（n = 11）のいずれかによって処理した。側腹部腫瘍のサイズおよび重量は、28AAによって処理されたマウスと比較して、媒体によって処理されたBALB/cマウスにおいて有意に大きかった（371mg対188mg、P < 0.05）（図5A、5B）。図5Cおよび5Dは、三群の各々についての重量および体積の（対照を100%とした）スコアの分布率を示す。三群からの側腹部腫瘍の代表的な写真が図5Eに示される。

50

【0107】

ペプチドはインビトロでCT26細胞生存率を阻害するがNIH3T3細胞生存率は阻害しない

マウスにおけるCT26細胞により媒介される腫瘍発達をペプチドが阻害する機序を調査するため、CT26細胞生存率に対するペプチドの効果をインビトロで決定した。対照と比較した時、L-4F (10 µg/ml) によって処理されたCT26細胞において、細胞生存率が20%超 (P < 0.05) 低下し (図6A)、対照と比較して、L-4F2 (10 µg/ml) によって処理されたCT26細胞においても、細胞生存率が30%超 (P < 0.0001) 低下した (図6A)。さらに、CT26細胞生存率は、L-4F処理と比較して、L-4F2による処理によって有意に低下した (P < 0.05) (図6A)。28AAペプチドおよび28AA-2ペプチドによる処理によって、インビトロでCT26細胞生存率を決定した。細胞生存率は、対照と比較した時、28AAペプチド (10 µg/ml) によって処理されたCT26細胞において70% (P < 0.0001) 低下し、28AA-2 (10 µg/ml) によって処理された細胞において64% (P < 0.0001) 低下した (図6A)。NIH3T3細胞生存率も、4種のペプチドの全部による処理によってインビトロで決定した。NIH3T3細胞生存率は4種のペプチドのいずれにも影響されなかった (図6B)。

【0108】

実施例4：アポリポタンパク質A-1ミメティックペプチドはヒト卵巣癌細胞株およびマウス卵巣癌モデルにおいて低酸素誘導因子1の発現および活性を阻害する

この実施例は、血管形成因子の産生および血管形成において重要な役割を果たす低酸素誘導因子1 (HIF-1) の発現および活性を、アポA-1ミメティックペプチドが阻害することを証明する。腫瘍組織におけるHIF-1 の発現を調査するため、免疫組織化学染色を使用した。ヒト卵巣癌細胞株におけるHIF-1 の発現および活性を決定するため、イムノプロッティング、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応、免疫蛍光、およびルシフェラーゼ活性アッセイを使用した。免疫組織化学染色は、L-4F処理がマウス卵巣腫瘍組織におけるHIF-1 発現を劇的に減少させることを証明した。L-4Fは、2種のヒト卵巣癌細胞株OV2008 およびCAOV-3において、低酸素濃度、塩化コバルト (CoCl₂、低酸素模倣化合物)、リゾホスファチジン酸、およびインスリンによって誘導されるHIF-1 の発現および活性を阻害した。L-4Fは、Aktのインスリンによって誘導されるリン酸化に対しては効果を有しなかったが、細胞外シグナル制御キナーゼおよびp70s6キナーゼの活性化を阻害し、HIF-1 合成の阻害をもたらした。L-4Fによる前処理は、インスリン処理細胞およびCoCl₂処理細胞の両方においてHIF-1 のプロテアソーム依存性のタンパク質分解を劇的に加速した。HIF-1 発現に対するL-4Fの阻害効果は、L-4Fの活性酸素種除去効果によって、一部分、媒介される。アポA-1ミメティックペプチドは、インビボモデルおよびインビトロモデルの両方においてHIF-1 の発現および活性を阻害し、このことは、HIF-1 の阻害が、アポA-1ミメティックペプチドによる腫瘍進行の抑制を担う重要な機序であり得ることを示唆している。

【0109】

腫瘍血管形成は、卵巣癌を含む固形腫瘍の成長および進行において重要な役割を果たす (Folkman, 1971 ; Hanahan and Folkman, 1996 ; Carmeliet and Jain, 2000 ; 実施例4における参考の完全な引用は、Gao et al., 2012, J. Pharm. Exper. Ther. 342:255-262に見出され得ることに注意すること)。血管形成因子の中でも、血管内皮増殖因子 (VEGF) は、内皮細胞の増殖、遊走、侵入、管形成、ならびにVEGF受容体1陽性細胞および内皮前駆細胞を含む様々な型の血管形成関連細胞の動員を含む、新血管形成の全ての工程に関与している (Rafii et al., 2002 ; Adams and Alitalo, 2007 ; Ellis and Hicklin, 2008)。より最近、本発明者らは、腫瘍成長の抑制が、少なくとも一部分、VEGFの産生およびその後の腫瘍血管形成の阻害によって媒介されることを示した (Gao et al., 2011)。

【0110】

低酸素誘導因子1 (HIF-1) の発現および活性は、腫瘍組織におけるVEGFおよびその他の血管形成因子の産生にとって重要である。HIF-1は、構成的に発現されるHIF-1 と誘導性サブユニットHIF-1 とからなるヘテロ二量体転写因子である。腫瘍組織が過成長した時、血管から100 µm超離れて位置する腫瘍細胞は、低酸素条件下におかれる。HIF-1 分

10

20

30

40

50

解の酸素依存性の性質のため、低酸素濃度はタンパク質分解の減少をもたらし、HIF-1蓄積をもたらす。他方、インスリンおよびリゾホスファチジン酸（LPA）を含むいくつかのホルモンおよび増殖因子も、正常酸素条件下で様々なシグナリング経路を活性化することによって、HIF-1 のタンパク質蓄積を促進する（Cao et al., 2004 ; Lee et al., 2006, 2009）。HIF-1 はHIF-1 と結合し、核内へ移行し、血管形成（VEGFおよびアンジオポエチンを含む）、グルコース輸送、ならびに細胞生存（Semenza, 2003 ; Pouysse'gur and Mchta-Grigoriou, 2006 ; Pouyssegur et al., 2006）のために必要とされるタンパク質産物を与える下流遺伝子の転写活性化を通して腫瘍形成に寄与する。この実施例において、本発明者らは、アポA-1ミメティックペプチドの抗血管形成効果および抗腫瘍形成効果の機序を解明するため、ヒト卵巣癌細胞株およびマウス卵巣腫瘍組織におけるHIF-1 の発現および活性に対するL-4FおよびL-5Fの効果を調査した。 10

【 0 1 1 1 】

細胞、細胞培養、および試薬

OV2008細胞は、10%ウシ胎仔血清、ペニシリン（100U/ml）、ストレプトマイシン（100 μg/ml）、1×最小必須培地非必須アミノ酸溶液（Invitrogen, Carlsbad, CA）、およびインスリン（0.25U/ml）（Invitrogen）を含むRPMI1640培地において培養された。CAOV-3細胞は、高グルコースおよびL-グルタミン（2mM）を含むダルベッコ修飾イーグル培地、10 %ウシ胎仔血清、ペニシリン（100U/ml）、ストレプトマイシン（100 μg/ml）、ならびにインスリン（0.02U/ml）からなる完全培地において培養された。低酸素条件を作出するため、細胞を、低酸素チャンバー（モデル3130 ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）へ移し、そこで、5%CO₂、1%O₂、および94%N₂を含有している雰囲気において37 で維持した。L-4F（全てLアミノ酸から合成されたペプチド 20

Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂ (SEQ ID NO: 12)

）は、1mg/mlで水に溶解させ（毎回、新鮮に調製した）、1~10 μg/mlで使用した。L-5Fは、Peptisyntha Inc. (Torrance, CA) によって合成されたものであり、1mg/mlでABCT緩衝液（0.1mg/ml Tween 20を含有している50mM重炭酸アンモニウム（pH7.0））に溶解させ、使用前に必要とされる濃度に希釈した。塩化コバルト（CoCl₂）、インスリン、シクロヘキシミド（CHX）、およびN-(ベンジルオキシカルボニル)ロイシニルロイシニルロイシナール - Z-Leu-Leu-Leu-al (MG-132) は、Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) から購入した。クロロホルム中のLPA (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) は、製造業者によって推奨されたように乾燥させ、ストック溶液として20mMの濃度でエタノールに溶解させ、使用前に対応する細胞培養培地で必要とされる濃度に希釈した。 30

【 0 1 1 2 】

定量的リアルタイムPCR

Purelink RNA Mini Kit (Invitrogen) を使用することによって、全RNAを細胞から抽出した。RNAの量および質を、SmartSpec 3000 Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を使用することによって査定した。製造業者の説明に従って、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用することによって、cDNAを合成した。CFX96リアルタイムPCR系 (Applied Biosystems) を使用することによって、PCRを実施した。サイクリング条件は、以下の通りであった：95 3分、続いて、95 10秒；60 10秒；72 30秒を40サイクル、続いて、72 10分の最終伸張。各25 μl反応物は、スクレアーゼ不含水中に0.4 μgのcDNA、12.5 μlのSYBR Green qPCR SuperMix (Bio-Rad Laboratories) 、ならびに250nMの順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含有していた。使用されたプライマーは、 40

HIF-1 α , 5'-TCC AGT TAC GTT CCT TCG ATC A-3' (SEQ ID NO: 16) および 5'-TTT GAG GAC TTG CGC TTT CA-3' (SEQ ID NO: 17), VEGF, 5'-CGG CGA AGA GAA GAG ACA CA-3' (SEQ ID NO: 18) および 5'-GGA GGA AGG TCA ACC ACT CA-3' (SEQ ID NO: 19); グルコーストランスポーター 1, 5'-CGG GCC AAG AGT GTG CTA AA-3' (SEQ ID NO: 20) および 5'-TGA CGA TAC CGG AGC CAA TG-3' (SEQ ID NO: 21); アルドラーゼ A, 5'-TGC TAC TAC CAG CAC CAT GC-3' (SEQ ID NO: 22) および 5'-ATG CTC CCA GTG GAC TCA TC-3' (SEQ ID NO: 23); ならびに GAPDH, 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA-3' (SEQ ID NO: 24) および 5'-GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CAC T-3' (SEQ ID NO: 25)

10 であった。実験を一回繰り返し、各実験において三重測定を行った。

【0113】

ウエスタンプロット分析

以前に記載されたようにして (Gao et al., 2011)、ウエスタンプロット分析を実施した。簡単に説明すると、50mM トリス緩衝液 (pH7.5) 中に 0.1M NaCl、5mM EDTA、50 μ M バナジン酸ナトリウム、1% トリトン X-100、およびプロテアーゼ阻害剤タブレット (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) を含有している溶解緩衝液に、細胞溶解物を収集し、4~12% Bis-Tris ゲル (Invitrogen) にロードし、フッ化ポリビニリデン膜に移し、適切な抗体と共にインキュベートした。抗 pThr²⁰²/Tyr²⁰⁴-Erk 抗体、抗 Erk 抗体、抗 pThr³⁸⁹-p70 S6 キナーゼ 抗体、抗 p70 S6 キナーゼ 抗体、抗 pSer⁴⁷³-Akt 抗体、および抗 Akt 抗体は、Cell 20 Signaling Technology (Danvers, MA) から購入し；マウス抗ヒト HIF-1 抗体は BD Pharmingen (San Diego, CA) から購入し；ウサギ抗マウス HIF-1 抗体は Abcam Inc. (Cambridge, MA) から購入し；抗 GAPDH 抗体は、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) から購入した。

【0114】

細胞活性酸素種の測定

以前に記載されたようにして (Zhou et al., 2007; Lee et al., 2009)、OV2008 細胞を、1 ウェル当たり 4×10^4 細胞で 24 穴プレート内のカバーガラス (Thermo Fisher Scientific) 上に播種し、通常の培養条件で一夜培養し、無血清培地で一夜飢餓状態にし、L-4F (10 μ g/ml) によって 1 時間処理した。次いで、ジクロロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA、10 μ M) およびインスリン (200nM) / CoCl₂ (100 μ M) を添加し、さらに 0.5 時間、細胞と共にインキュベートした。細胞を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した。蛍光顕微鏡 (Olympus IX70; Olympus, Tokyo, Japan) によって画像を捕らえた。

【0115】

低酸素応答要素レポーターアッセイ

簡単に説明すると、OV2008 細胞を 1 ウェル当たり 2×10^5 細胞で 6 穴プレートに播種し、完全培地において一夜成長させた。次いで、pGL3-Epo-低酸素応答要素 (HRE)-Luc プラスマドを、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用することによって、細胞へトランسفェクトした。24 時間後、細胞を一夜飢餓状態にし、刺激剤の存在下または非存在下で L-4F 処理に供した。レポーターアッセイ系 (Promega, Madison, WI) を、ルシフェラーゼ活性の測定のために使用した。

【0116】

HIF-1 の免疫蛍光染色

以前に記載されるようにして (Lee et al., 2006)、免疫蛍光染色を実施した。簡単に説明すると、OV2008 細胞を 1 ウェル当たり 4×10^4 細胞で 24 穴プレート内のカバーガラス (Thermo Fisher Scientific) 上に播種し、完全培地において一夜成長させた。一夜の飢餓の後、細胞を刺激剤の存在下または非存在下で L-4F 処理に供した。次いで、細胞を、4% 中性緩衝ホルムアルデヒドで室温で 25 分間固定し、PBS 中の 0.5% トリトン X-100 によって 10 分間透過性化し、PBS で調製された 10% 正常ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミン、および 0.3M グリシンによって 1 時間ブロッキングした。細胞を、マウス抗 HIF-1 (1:200) と共に

10

20

30

40

50

4 で一夜インキュベートし、Alexa Fluor 568ヤギ抗マウスIgG (Invitrogen) と共に1時間インキュベートした。最後に、DAPIを含有しているVectaMount溶液 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で細胞を覆い、蛍光顕微鏡 (Olympus IX70) によって画像を捕らえた。

【 0 1 1 7 】

インビボ腫瘍モデル

9週齢C57BL/6J雌マウスに、等量の冷Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) と混合された、PBSで単一細胞懸濁物として調製された 5×10^6 ID8細胞の0.5ml皮下注射を与えた。2週間後、マウスは、ID8細胞が注射された部位から遠位で、皮下注射によってスクリンブル4Fペプチド (sc-4F) またはL-4F (10mg/kg) を、3週間毎日、受容し始めた。3週間後、腫瘍の収集およびさらなる分析のため、マウスを屠殺した。 10

【 0 1 1 8 】

免疫組織化学染色

凍結腫瘍組織を、5 μ mの厚さに切片化し、-20 で10分間、冷アセトンで固定した。切片を、PBSで調製された10%正常ヤギ血清および4%ウシ血清アルブミンによって3時間ブロッキングし、直ちに、ウサギ抗マウスピリクローナルHIF-1 抗体 (1:200) (Abcam Inc.) またはラット抗マウスモノクローナルCD31抗体 (1:25) (Abcam Inc.) と共に4 で一夜インキュベートした。次いで、切片を、対応するビオチン化二次抗体 (Vector Laboratories) と共に室温で30分間インキュベートした後、染色を可視化するため、Vectastain ABC Elite試薬 (Vector Laboratories) と共にインキュベートした。最後に、切片を、ヘマトキシリンで軽く対比染色し、脱水し、Vecta-Mount溶液 (Vector Laboratories) を用いてカバーガラスを被せた。 20

【 0 1 1 9 】

統計

データは各群について平均値 \pm SDとして示される。本発明者らは、独立t検定によって統計分析を実施した。全ての結果を、P < 0.05で統計的に有意であると見なした。

【 0 1 2 0 】

L-4FはインビボでHIF-1 発現および血管形成を阻害する

本発明者らの以前のデータは、アポA-1ミメティックペプチドL-4FおよびL-5Fが、上皮癌細胞株ID8を使用した卵巣癌の免疫適格マウスモデルにおいて、腫瘍成長および血管形成を阻害することを示した (Gao et al., 2011)。HIF-1 は腫瘍血管形成に関与している重要な増殖因子VEGFの産生において重要であるため、本発明者らは、同モデルを使用することによってHIF-1 発現に対するL-4Fの効果をまず調査した。免疫組織化学染色は、L-4F処理が、対照ペプチド (sc-4F) 処理群と比較して、腫瘍組織におけるHIF-1 発現を減少させることを示した (図7A)。本発明者らの以前の報告 (Gao et al., 2011) と一致して、本発明者らは、対照群と比較した、L-4F処理マウスにおける血管の数の低下を観察した (図7A ; Gao et al., 2012, JPET 342:255-262のオンラインバージョンに含まれる補足材料も参照のこと)。 30

【 0 1 2 1 】

L-4FおよびL-5Fは細胞培養物におけるHIF-1 発現を阻害する

L-4Fが低酸素条件下で細胞におけるHIF-1 発現を阻害するか否かを調査するため、ヒト卵巣癌細胞株OV2008におけるHIF-1 発現を誘導するため、低酸素濃度 (1% O₂) および低酸素模倣化学物質CoCl₂を使用した。ウエスタンプロット分析は、L-4Fが、低酸素によって誘導されるHIF-1 タンパク質発現を用量依存的に抑制することを示した (図7B ; オンラインバージョンの補足材料も参照のこと)。OV2008細胞を、100nMおよび200nMのインスリン (図7B) ならびに20 μ MのLPAによって処理した時にも、類似した結果が観察された (補足材料も参照のこと)。 40

【 0 1 2 2 】

HIF-1 発現におけるL-4Fの阻害的役割をさらに確認するため、2種の他のヒト卵巣癌細胞株CAOV-3およびSKOV3を研究した。OV2008細胞についてのデータと一致して、L-4Fは、C 50

AOV-3細胞（図7A）およびSKOV3細胞の両方において、CoCl₂およびインスリンによって誘導されるHIF-1 発現を用量依存的に阻害した。

【0123】

HIF-1 に対する阻害効果がL-4Fに特異的であるか否かを調査するため、もう1種のアボA-1ミメティックペプチドL-5Fを、OV2008細胞を処理するために使用した。L-4F処理に類似して、L-5Fは、低酸素およびCoCl₂によって刺激されるHIF-1 発現を用量依存的に阻害した（補足材料を参照のこと）。

【0124】

転写因子として、HIF-1 は、核内で機能し、下流遺伝子の発現を活性化する。HIF-1 タンパク質の核レベルに対するL-4Fの効果を調査するため、免疫蛍光染色を使用した。CoCl₂およびインスリンによる処理は、OV2008細胞の核におけるHIF-1 の蓄積を大幅に増加させ、L-4F前処理はこれらの効果を劇的に逆転させた（図7、CおよびD）。

【0125】

L-4FによるHIF-1 依存性遺伝子転写の阻害

HIF-1 によって駆動される遺伝子転写をL-4Fが阻害するか否かを決定するため、OV2008細胞を、HRE含有ルシフェラーゼレポータープラスミドによってトランスフェクトした。L-4F処理は、CoCl₂およびインスリンによって媒介されるルシフェラーゼ活性の誘導を有意に阻害した（図8、AおよびC）。さらに、L-4F処理は、VEGF、グルコーストランスポーター1、およびアルドラーゼAを含むHIF-1 標的遺伝子のmRNAレベルのCoCl₂およびインスリンによって誘導される増加を抑止し（図8、BおよびD）、このことから、L-4FがHIF-1 タンパク質発現および活性の両方を阻害することが示唆された。

【0126】

L-4Fによる後処理はCoCl₂およびインスリンによって処理されたOV2008細胞におけるHIF-1 タンパク質のレベルおよび活性を減少させる

HIF-1 発現は臨床的に示される進行腫瘍において上昇するため、本発明者らは、次に、低酸素または増殖因子による刺激の後に与えられたL-4Fが、HIF-1 発現を阻害するか否かを調査した。OV2008細胞を、3時間（補足材料を参照のこと）または24時間（図9）、CoCl₂またはインスリンによってまず刺激し、次いで、様々な期間、L-4Fによって処理した。L-4Fによる後処理は、OV2008細胞におけるHIF-1 発現を有意に減少させた（図9A；補足材料も参照のこと）。免疫蛍光分析は、L-4Fによる後処理により減少したHIF-1 の核発現を示した（図9B；補足材料も参照のこと）。さらに、核におけるHIF-1 タンパク質のダウンレギュレーションは、下流HIF-1 標的遺伝子の転写の阻害と相關した（図9C；補足材料も参照のこと）。

【0127】

L-4FはHIF-1 転写に影響しない

L-4Fが転写レベルでHIF-1 合成に影響するか否かを決定するため、本発明者らは、HIF-1 mRNAレベルの変化がタンパク質の変化に先行するか否かを決定するため、HIF-1 mRNA含量を定量した。リアルタイムRT-PCR分析は、L-4FがHIF-1 mRNAの基底レベルに対する効果を有しないことを示した（補足材料を参照のこと）。さらに、以前の報告と一致して（Semenza, 2003；Pouysse'gur et al., 2006；Lee et al., 2009）、低酸素およびインスリンは、HIF-1 遺伝子転写に影響せず（補足材料を参照のこと）、このことから、L-4FによるHIF-1 タンパク質発現の制御が転写後レベルで起こることが示唆された。

【0128】

L-4FはERK依存的にS6キナーゼリン酸化を阻害する

S6キナーゼの活性化は、インスリンによって誘導されるHIF-1 の新規合成にとって重要である（Semenza, 2003）。L-4FによるHIF-1 阻害の分子機序を決定するため、本発明者らは、L-4Fが、インスリンによって刺激されるHIF-1 のタンパク質合成に影響するか否かを試験した。本発明者らのデータは、10 μg/mlのL-4FがS6キナーゼのリン酸化を妨害することを示した（図10A）。S6キナーゼリン酸化は、上流シグナリング分子ERKおよびAktの活性化によって制御される。図10Bに示されるように、L-4Fは、ERK1/2の活性化を阻害

10

20

30

40

50

したが、0.5時間目以外は、Aktのリン酸化に対する効果を有しておらず、このことから、S6キナーゼ活性化の阻害は、ERKリン酸化の抑制の結果である可能性が最も高いことが示唆された。OV2008細胞におけるERK、Akt、およびS6キナーゼのリン酸化に対してCoCl₂の効果が観察されなかったことは注目に値する（補足材料を参照のこと）。CoCl₂処理は、低酸素を模倣して、HIF-1 タンパク質分解の減少をもたらすため（Pouysse'-gur and Mechta-Grigoriou,2006）、この結果は驚くべきものではない。

【0129】

L-4F処理はプロテアソーム依存性タンパク質分解を促進する

本発明者らは、次に、L-4FがHIF-1 タンパク質の安定性を変化させるか否かを調査した。新しいタンパク質合成を妨害する化合物CHXを、新規HIF-1 タンパク質合成を阻害するために使用した。本発明者らのデータは、インスリンと組み合わせられたCHXによって処理されたOV2008細胞が、時間の関数としてのHIF-1 の漸減を示し、同時L-4F処理が、HIF-1 タンパク質の分解を加速することを示した（図11A）。本発明者らは、CoCl₂によって処理されたOV2008細胞に対するL-4Fの類似した効果を観察した（補足材料を参照のこと）。さらに、プロテアソーム阻害剤MG-132は、インスリンによって媒介されるHIF-1 発現に対するL-4Fの阻害効果の逆転をもたらした（図11B）。これらの結果は、L-4Fが、一部分、HIF-1 タンパク質の分解を加速させることによって、卵巣癌細胞におけるインスリンおよびCoCl₂によって誘導されるHIF-1 の発現および活性を阻害することを示唆する。

【0130】

インスリンおよびCoCl₂によって誘導されるROS産生のL-4F処理による阻害

インスリン処理（Zhou et al., 2007 ; Lee et al., 2009）およびCoCl₂処理（Chandel et al., 2000 ; Griguer et al., 2006）は、細胞ROSレベルを有意に増加させ、それが、その後、HIF-1 の合成を促進し、分解を阻害することが報告されている。ジクロロフルオレスцин酸化アッセイによって示されたように（図12）、インスリンおよびCoCl₂による処理は、OV2008細胞における細胞ROSレベルの増加をもたらした。L-4Fによる前処理は、インスリンおよびCoCl₂によって誘導される細胞ROS産生を劇的に防止し（図12）、このことから、HIF-1 発現に対するL-4Fの阻害的役割が、ROS蓄積の阻害の結果である可能性が示唆された。

【0131】

考察

HIF-1は低酸素下での重要な細胞生存タンパク質であり、様々な固形腫瘍における腫瘍の進行および転移に関連している（Seeber et al., 2011）。HIF-1 を標的とすることは、魅力的な抗癌治療戦略であり得る（Se-menza, 2003 ; Belozerov and Van Meir, 2005 ; Se-ber et al., 2011）。HIF-1 の発現は、低酸素刺激および非低酸素刺激の両方によって増加する。低酸素濃度または低酸素模倣化合物CoCl₂による処理は、HIF-1 の分解を阻害し、HIF-1 タンパク質の安定性および蓄積を増加させる。インスリンおよびLPAを含む数種の増殖因子も、転写後のタンパク質合成を促進し、HIF-1 の発現および活性をアップレギュレートする（Semenza, 2003 ; Pouysse'gur and Mechta-Grigoriou, 2006 ; Pouysse'gur et al., 2006）。この文書において、本発明者らは、（1）L-4Fがマウス腫瘍組織におけるHIF-1 発現を阻害すること（図7A）；（2）L-4FおよびL-5Fによる前処理および後処理が、ヒト卵巣癌細胞株における、低酸素、CoCl₂、インスリン、およびLPAによって誘導されるHIF-1 の発現および核レベルを減少させること（図7および9；補足材料も参照のこと）；ならびに（3）L-4Fが、CoCl₂およびインスリンによって刺激される、HREによって駆動されるレポーター遺伝子の発現およびHIF-1 標的遺伝子の活性化を阻害すること（図8および9；補足材料も参照のこと）を証明する。リアルタイムRT-PCR分析は、L-4FがOV2008細胞におけるHIF-1 遺伝子転写に対して効果を有しないことを示し（補足材料を参照のこと）、このことから、L-4FによるHIF-1 タンパク質の制御が転写後レベルで起こることが示された。

【0132】

10

20

30

40

50

ROSが、正常酸素下でも低酸素下でもHIF-1 の制御において重要な役割を果たすという説得力のある証拠が存在する (Pouysse'gur and Mechta-Grigoriou, 2006)。以前に報告されたように、低酸素濃度 (Chadel et al., 2000 ; Guzy et al., 2005 ; Guzy and Schumacker, 2006) 、 CoCl_2 (Chadel et al., 2000 ; Griguer et al., 2006) 、インスリン (Zhou et al., 2007 ; Lee et al., 2009) 、およびLPA (Chen et al., 1995 ; Saunders et al., 2010) による細胞の処理は、ROS生成をもたらす。ROS産生は、細胞におけるHIF-1 発現にとって重要であり、ROSの除去は、低酸素およびインスリンによって誘導されるHIF-1 蓄積を損なう (Brunelle et al., 2005 ; Mansfield et al., 2005 ; Carnesecchi et al., 2006 ; Biswas et al., 2007)。Ganapathy et al. (2012) は、アポA-1ミメティックペプチドD-4F が、ID8細胞において、過酸化物およびH2O2の産生を有意に減少させ、酸化状態を改善することを報告した。しかしながら、ペプチド処理が低酸素または増殖因子によって媒介されるROS産生に影響するか否かは未知である。本明細書において、本発明者らは、L-4F処理がOV2008細胞におけるインスリンおよび CoCl_2 によって誘導されるROS産生を劇的に阻害することを報告する (図12)。さらに、L-4Fは、インスリンおよび CoCl_2 に曝露された癌細胞におけるHIF-1 分解を加速させた (図11A ; 補足材料も参照のこと)。26Sプロテアソーム阻害剤であるMG-132は、インスリンによって媒介されるHIF-1 発現に対するL-4F の阻害効果を逆転させた (図11B)。総合すると、これらのデータは、L-4Fが、少なくとも一部分、ROS除去効果によって、HIF-1 のタンパク質安定性を減少させ、転写活性型HIF-1 の蓄積を阻害することを証明する。
10

【0133】

20

HIF-1 阻害の分子機序を見出す努力の中で、本発明者らは、L-4FがHIF-1 タンパク質の合成に影響するか否かを決定した。インスリンは受容体チロシンキナーゼおよび下流シグナリング分子、最も顕著には、S6キナーゼを活性化し、mRNA翻訳の増加およびHIF-1 の新規合成をもたらす (Treins et al., 2002 ; Semenza, 2003)。L-4Fは、様々な時点で、インスリンによって刺激されるS6キナーゼのリン酸化を阻害し、HIF-1 タンパク質レベルの減少をもたらす (図10A)。さらなる実験は、S6キナーゼ活性のダウンレギュレーションが、Aktではなく、ERK1/2の活性化の阻害の結果であり得ることを示した (図10B)。ROSは、ERK1/2およびS6キナーゼのインスリンによって刺激されるリン酸化に関与しているが、Aktのリン酸化には関与していないことが報告されていることは注目に値する (Zhou et al., 2007)。このことは、ROS除去も、L-4FによるHIF-1 の新規合成の阻害に関与している可能性を示している。
30

【0134】

以前の報告は、対照ラットおよび糖尿病ラットからの大動脈において、D-4F (L-4Fと同一のアポA-1ミメティックペプチドであるが、全てDアミノ酸で合成された) が、2種の抗酸化酵素、ヘムオキシゲナーゼ1および細胞外スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の発現および活性を増加させることを示した (Kruger et al., 2005)。より最近、本発明者らは、D-4Fが、ID8細胞における抗酸化酵素Mn-SODをアップレギュレートすること、Mn-SOD のノックダウンが、マウス卵巣癌モデルにおけるD-4Fの抗腫瘍形成効果の完全な損失をもたらすことも証明した (Ganapathy et al., 2012)。SOD活性はROS産生および細胞酸化ストレスをモジュレートするため、SODの誘導は、アポA-1ミメティックペプチドの作用機序の重要な一部であり得る。
40

【0135】

結論として、本発明者らのデータは、アポA-1ミメティックペプチドが、インビボでも細胞培養物でも、HIF-1 の発現および活性を阻害することを証明する。HIF-1 の阻害は、アポA-1ミメティックペプチドによる腫瘍進行の抑制を担う重要な機序であり得る。

【0136】

参照

実施例4において提供された参照の引用の完全なリストは、Gao et al., 2012, J.Pharm. Exper. Ther. 342:255-262に見出され得る。この文書のオンラインバージョンは、実施例4において参照された補足材料も含有している。

50

【0137】

実施例5：HDLミメティックは誘導型および自然発症型の両方の結腸癌のマウスモデルにおいて腫瘍発達を阻害する

この実施例は、HDLミメティック、L-4F（アポリポタンパク質A-Iミメティックペプチド）およびG*（アポリポタンパク質Jミメティックペプチド）が、結腸癌のマウスモデルにおいて、腫瘍の成長および発達に影響することを証明する。HDLミメティックは、マウス結腸腺癌細胞株CT26細胞の生存率および増殖を低下させ、皮下投与または経口投与された時、BALB/cマウスにおけるCT26細胞によって媒介される腫瘍量を減少させた。結腸癌の血清バイオマーカーであるリゾホスファチジン酸（LPA）の血漿レベルは、HDLミメティックを受容したマウスにおいて有意に低下し、このことから、炎症誘発性脂質の結合および除去がHDLミメティックによる腫瘍発達の阻害についての可能性のある機序であることが示唆された。さらに、L-4Fは、ヒト家族性大腸腺腫症のマウスモデルであるAPC^{min/+}マウスにおけるポリープのサイズおよび数を有意に低下させ、このことから、HDLミメティックが誘導型および自然発症型の両方の結腸癌の発達を阻害するために有効であることが示唆された。これらの結果から、HDLミメティックが、結腸癌の治療のための新規の治療戦略として同定される。

10

【0138】

マウス

Animal Research Committee at University of California at Los Angelesによって、全てのマウスプロトコルが承認された。6週齢BALB/c雌マウスおよび6週齢C57BL/6J-APC^{min/+}雄マウスは、Jackson Laboratoryから購入された。

20

【0139】

ペプチド

HDLミメティック、アポA-IペプチドL-4F
(Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂; SEQ ID NO: 12)
、および4Fペプチドと同一のアミノ酸を含有しているが、クラスA両親媒性ヘリックスの形成を妨害する順序で並べられたスクランブルペプチド（sc-4F）
(Ac-D-W-F-A-K-D-Y-F-K-K-A-F-V-E-E-F-A-K-NH₂; SEQ ID NO: 13)

、ならびに、G*ペプチドと命名されたアポJミメティック{アポJのアミノ酸113～122に相当する

30

Ac-L-V-G-R-Q-L-E-E-F-LNH₂ (SEQ ID NO: 26)

(L-[113-122]アポJ) }は、全てL-アミノ酸から合成された。注射による投与のためのペプチドは、H₂Oに溶解させられた。食事でのペプチドの投与のためのペプチドは、ウエスタン食について以前に記載されたような技術（18）を本質的に使用して、標準的なマウス飼料（Ralston Purina）へ混合された。しかしながら、本明細書において報告された実験において、ウエスタン食は投与されず；マウスは、ペプチドを含むかまたは含まない標準的なマウス飼料のみを受容した。

【0140】

細胞培養実験

40

BALB/c起源のN-ニトロソ-N-メチルウレタンによって誘導されたマウス結腸癌に由来するCT26細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクションから購入された。CT26細胞（1ウェル当たり2,000細胞）を、96穴培養プレートにおいて完全培地においてまず培養し、24時間後、培地を無血清培地に交換した。一夜のインキュベーションの後、細胞を、媒体（対照）によって処理するか、または10mg/mLのL-4FペプチドもしくはG*ペプチドのいずれかによって処理した。ペプチドはH₂Oに溶解していた。細胞をさらに48時間インキュベートし、製造業者のプロトコルに従って、MTSアッセイキット（Promega）を使用して、生存率についてアッセイした。増殖アッセイのため、48時間のインキュベーションのうちの最後の4時間、細胞をブロモデオキシリジン（BrdUrd）によって標識した。その後、細胞を洗浄し、固定し、マウス抗BrdUrd抗体と共に室温で1時間インキュベートし、ペルオ

50

キシダーゼ連結ヤギ抗マウス二次抗体 (Calbiochem) によって検出した。吸光度を二重波長450nmおよび540nmを使用して測定した。

【0141】

腫瘍量研究

6週齢BALB/c雌マウスに、PBSで単一細胞懸濁物として調製された 1×10^6 CT26細胞の100mL皮下注射を与え、マウスを、15日間毎日、皮下投与された10mg/kgのsc-4FまたはL-4Fによって処理した。マウスを屠殺し、腫瘍重量を測定した。

【0142】

インビボ肺転移

BALB/cマウスに、尾静脈注射を介して、 2×10^4 CT26細胞を含む100mLのPBSを静脈内注射し、マウスを、3週間、皮下投与された10mg/kg/日のL-4Fもしくはsc-4Fによって処理するか、または3週間、飼料食中に投与された100mg/kg/日のsc-4FもしくはL-4FもしくはG*ペプチドによって処理した。3週間の処理の後、マウスを屠殺し；肺を採取し、計量し、ブアン液 (Sigma) で固定した。肺表面上の腫瘍結節を計数した。

10

【0143】

APC^{min/+}マウス研究

C57BL/6Jバックグラウンドの6週齢APC^{min/+}雄マウスを、飼料食中に投与された100mg/kg/日のL-4Fまたはsc-4Fによって処理した。8週間の処理の後、マウスを屠殺した。腸全体を直ちに除去し、ホルマリンおよび70%エタノールで固定した。腫瘍を計数し測定するため、腸を解剖顕微鏡下で切開し調査した。

20

【0144】

免疫組織化学染色

肺表面からの腫瘍組織を、固定し、パラフィンで包埋し、5mmの厚さに切片化した。切片をキシレンで脱パラフィンし、100%、90%、70%、および50%エタノールによって親水化し、20mg/mLのプロテイナーゼKによって30分間処理し、内在性ペルオキシダーゼを阻害するため、3%H₂O₂によって室温で30分間処理し、PBSで調製された10%正常なヤギ血清および4%ウシ血清アルブミンによって3時間ブロッキングし、次いで、1:50ラット抗マウスモノクローナルCD31抗体と共に4度一夜インキュベートした。切片を、対応するビオチン化二次抗体と共に1時間インキュベートし、その後、Vectastain ABC Elite試薬と共にインキュベートした。

30

【0145】

細胞周期分析

CT26細胞を、6穴プレートにおいて一夜培養し、次いで、48時間血清飢餓状態にした。細胞を、媒体(対照)によって処理するか、または10mg/mLのL-4FもしくはG*ペプチドによって処理し、さらに48時間インキュベートした。細胞を収集し、PBSで洗浄し、70%氷冷メタノールにより4度一夜固定した。固定された細胞を、遠心分離によって収集し、PBSで洗浄し、40mg/mL RNaseAおよび100mg/mLヨウ化プロピジウムを含有している0.3mLのPBSに再懸濁させ、BD BiosciencesからのFACScanによるフローサイトメトリー細胞周期分析に供した。

40

【0146】

ウエスタンプロット分析

50mmol/Lトリス緩衝液 (pH7.5) 中に0.1mol/L NaCl、5mmol/L EDTA、50mmol/Lバナジン酸ナトリウム、1%トリトンX-100、およびプロテアーゼ阻害剤タブレットを含有している細胞溶解緩衝液による処理の後、全細胞タンパク質を収集した。20マイクログラムの全タンパク質を、SDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に移し、5%スキムミルクおよび0.1%Tween-20において一次抗体と共に4度インキュベートした。抗サイクリンD1および抗サイクリンAウサギポリクローナル抗体は、1:1,000希釈で使用され、抗アクチンポリクローナル抗体は、1:2,000希釈で使用された。

【0147】

ELISA分析

50

血漿中のインターロイキン(IL)6濃度を、製造業者のプロトコル(Invitrogen)に従って、競合ELISAによって測定した。

【0148】

LPA結合親和性および血清LPAレベル

LPA(20:4)は、Avanti Polar lipidsから購入された。以前に記載されたようにして(19)、LPAレベルを決定した。

【0149】

統計分析

データは各群について平均値±SDとして示される。本発明者らは、独立t検定によって統計分析を実施した。全ての結果を、P<0.05で統計的に有意であると見なした。

10

【0150】

HDLミメティックL-4FはBALB/cマウスにおけるCT26細胞注射後の腫瘍発達を阻害する

CT26は、免疫適格BALB/cマウスへ静脈内導入された時、転移性肺腫瘍を発症させる結腸腺癌細胞株である(20~22)。CT26細胞株は、マウスモデルにおいて癌のための治療的適用を研究するため、同系腫瘍モデルとして広く使用されており、従って、本発明者らは、HDLミメティック研究における結腸癌研究のためにCT26細胞を選んだ。本発明者らは、尾静脈を介して 2×10^4 CT26細胞を注射されたBALB/cマウスにおける肺腫瘍形成に対する、3週間、10mg/kg/日で皮下投与されたL-4Fおよびsc-4F(4Fペプチドと同一のアミノ酸を含有しているが、クラスA両親媒性ヘリックスの形成を妨害する順序で並べられたスクランブルペプチド)の効果をまず調査した。L-4Fによって処理されたBALB/cマウス(各群n=1)における肺重量(図13A)および肺表面上で計数された腫瘍数(図13B)は、sc-4Fによって処理されたマウスと比較して、有意に低下した(280対225mg、P<0.01; 33対18、P<0.001)。二群からの肺腫瘍の代表的な写真は図13Cに示される。本発明者らは、次に、L-4F処理がBALB/cマウスの側腹部における腫瘍の発達に影響するか否かを調査した。6週齢BALB/c雌マウスに、側腹部において 1×10^6 CT26細胞を皮下注射した。マウスを、CT26細胞が注射された部位から遠位で、15日間毎日、皮下投与された10mg/kgのsc-4F(n=9)またはL-4F(n=8)のいずれかによって処理した。側腹部腫瘍重量は、sc-4Fによって処理されたBALB/cマウスにおいて、L-4Fによって処理されたマウスと比較して、有意に大きかった(778対389mg、P<0.05; 図13D)。二群からの側腹部腫瘍の代表的な写真は図13Eに示される。本発明者らは、図13Aに示される実験から血漿中のIL-6レベルを測定した。IL-6は、L-4F処理を受けたマウスにおいて、対照群と比較して、有意に減少した(図13F)。

20

【0151】

CT26細胞注射後の腫瘍発達はマウス飼料中に投与されたL-4Fによって処理されたマウスにおいて有意に減少する

本発明者らは、皮下投与されるかまたは経口投与されるかに関わらず、4Fがアテローム性動脈硬化症の動物モデルにおいて有効であることを最近報告した(18)。経口投与された時、L-4Fが腫瘍発達を低下させ得るか否かを決定するため、BALB/cマウスに尾静脈を介して 2×10^4 CT26細胞を注射し、3週間、飼料食中に投与された100mg/kg/日のL-4F(n1/4=9)またはsc-4F(n=12)によって処理した。sc-4Fによって処理されたBALB/cマウスにおける肺重量(図14A)および腫瘍数(図14B)は、L-4Fによって処理されたマウスと比較して、有意に大きかった(296対238mg、P<0.05; 21対12、P<0.0001)。本発明者らは、L-4Fがインビボで血管形成を阻害することを以前に報告した(23)。この実験からの腫瘍切片の免疫組織化学的染色は、L-4Fによって処理されたマウスに由来する腫瘍におけるCD31発現の、対照マウスと比較した、有意な減少を示した(図14C)。さらに、血漿LPAレベルが、対応する対照マウスと比較して、L-4Fペプチドを受容したマウスにおいて有意に低下した、P<0.01(図14D)。

40

【0152】

腸管内の腫瘍の数およびサイズはマウス飼料中に投与されたL-4Fによって処理されたC57BL/6J-Apc^{min/+}マウスにおいて有意に減少する

本発明者らは、次に、HDLミメティックが結腸癌の自然発症モデルにおける結腸腫瘍の

50

発達に影響し得るか否かを調査した。APC^{min/+}マウスは、結腸癌の確立されたマウスモデルであり、ヒトにおける家族性大腸腺腫症の発症を反映する(24、25)。6週齢C57BL/6J-Apc^{min/+}雄マウスを、8週間、マウス飼料中に投与された100mg/kg/日のL-4F(n=5)またはsc-4F(n=6)によって処理した。L-4Fによって処理されたマウスからの腸管内の腫瘍の数およびサイズは、sc-4Fによって処理されたマウスと比較して、有意に低下した(100%対60%、P<0.05; 1~3mm: 56.5対36.8、P<0.05; >3mm: 12.8対5、P<0.05; 図15Aおよび15B)。この実験からの血漿LPAレベルは、L-4Fペプチドを受容したマウスにおいて、対照マウスと比較して、有意に低下した、P<0.01(図15C)。

【0153】

L-4FはインビトロでCT26細胞の生存率、増殖、細胞周期、および細胞周期関連タンパク質の発現を改変する

HDLミメティックL-4FがマウスにおけるCT26細胞によって媒介される腫瘍発達を阻害する機序を調査するため、CT26細胞生存率に対するL-4Fの効果をインビトロで決定した。細胞生存率は、対照と比較した時、L-4F(10mg/mL)によって処理されたCT26細胞において25%超低下した(P<0.001)(図16A)。さらに、L-4Fは、BrdUrd取り込みによって測定されるCT26細胞の増殖を有意に阻害した(P<0.001)(図16B)。L-4Fが細胞周期進行の変化を通して細胞増殖を阻害するのか否かを調査するため、細胞周期プロフィールに対するL-4Fの効果をCT26細胞において査定した。細胞周期分析は、48時間のL-4F処理が、G0/G1期の増加およびS期の停止を誘導することを示した(図16C)。さらに、ウエスタンプロット分析は、細胞周期タンパク質サイクリンD1およびサイクリンAの発現が、L-4Fによって処理された細胞において有意に低いことを示した(図16D)。

【0154】

HDLミメティックL-4FはLPAによって誘導されるCT26細胞の生存率を阻害する

LPAは、ヒトにおける腫瘍の発達、進行、および転移の重要なメディエーターとして同定されている(26、27)。本発明者らは、アポAIミメティックペプチドが、ID8細胞のLPAによって誘導される生存率を阻害し、ID8細胞を注射されたマウスにおいて血清LPAレベルを低下させることを以前に示した(17)。L-4Fは、LPAに結合し(17)、予想通り、LPA(10~20mmol/L)は、CT26細胞成長を有意に改善し、L-4Fは、LPAによって誘導される生存率を、試験された全ての用量で、有意に低下させた、P<0.001(図17A)。本発明者らは、液体クロマトグラフィ質量分析によって細胞培養培地中のLPAレベルを測定し、LPA 16:0および18:0が、対照培地と比較して、L-4F処理によって有意に減少することを見出した。LPA 20:4および18:1は細胞培養培地中に検出不可能であった(図17B)。

【0155】

HDLミメティックG*ペプチド(L-[113-122]アポJ)はCT26細胞成長およびCT26によって媒介される腫瘍発達を阻害する

G*(L-[113-122]アポJ)ペプチドを、インビオおよびインビトロで研究を繰り返すために使用した。CT26細胞注射後の肺腫瘍発達は、3週間、マウス飼料中に投与された100mg/kg/日のG*ペプチドによって処理されたマウスにおいて有意に減少した(肺重量は296対250mgであった、P<0.05;腫瘍数は21対10であった、P<0.0001;図18Aおよび18B)。細胞生存率は、未処理と比較した時、G*ペプチド(10mg/mL)によって処理されたCT26細胞においておよそ40%低かった(図18C)。図18Aおよび18Bに示されるマウス実験において、血漿LPAレベルは、対応する対照マウスと比較して、G*ペプチドを受容したマウスにおいて有意に低下した、P<0.05(図18D)。ウエスタンプロットは、サイクリンD1およびサイクリンAの発現が、未処理と比較して、G*ペプチド処理によって低くなることを示した(図18E)。

【0156】

考察

脂質代謝と癌との間には有意な相関が存在し、炎症性酸化ストレスは癌の病態生理学に関連していると長く考えられてきた(28~30)。脂質酸化およびその結果の酸化された脂質により媒介される炎症は、多数の炎症性疾患の病因に共通しているようであり(31、32

10

20

30

40

50

)、このことは、癌を含む数種の疾患の発達および進行におけるリポタンパク質の役割を暗示している。HDLは、自然免疫系の不可欠の部分として認識されている。HDLは、複雑な高分子であり、その機能レパートリーには、抗酸化活性、抗炎症活性、および抗微生物活性が含まれる。LDLと異なり、HDLは、HDLの構造的完全性および機能的完全性を決定する、タンパク質および脂質の異種混合物である。リン脂質転移タンパク質、コレステロールエステル転移タンパク質、およびレシチンコレステロールアシル転移酵素を含む、HDLの数種のタンパク質／酵素成分は、その形成および成熟にとって重要であり、アポリポタンパク質A-1(アポA-1)、アポJ、およびパラオキソナーゼ1(PON1)のようなその他のタンパク質／酵素成分は、HDLに機能的特性を付与する(33)。過去十年間に、HDLミメティックは、多数の炎症性疾患についての前臨床研究において極めて大きな治療的見込みを示した(34~40)。

10

【0157】

本発明者らは、2種のアポA-1ミメティックペプチド、L-4FおよびL-5Fが、マウス卵巣癌細胞(ID-8細胞)およびシスプラチン抵抗性ヒト卵巣癌細胞の生存率および増殖を低下させ、皮下投与または経口投与された時、C57BL/6JマウスにおけるID-8細胞によって媒介される腫瘍量を減少させることを最近示した(17)。本発明者らは、アポA-1ミメティックペプチドが(i)血管形成を阻害し(23)、(ii)MnSODの発現および活性を誘導することによって(41)、腫瘍形成を阻害することをさらに示した。血管形成および酸化還元経路は多くの癌の共通の特色であるため、本発明者らは、結腸癌の発達および進行における、2種のHDLミメティック、アポA-1ミメティックペプチドL-4FおよびアポJミメティックペプチドG*の効果を調査した(42)。本発明者らの仮説と一致して、本発明者らの結果は、HDLミメティックが、免疫適格BALB/cマウスへCT26細胞を注射することによって生成される結腸癌の発達を阻害することを示した。さらに、本発明者らは、HDLミメティックの経口投与が、マウスモデルにおける結腸癌の自然発症を抑制し得ることを、FAP(APC^{min/+})マウスモデルを使用して、本明細書において初めて示す。

20

【0158】

4Fペプチドを使用した2セットの臨床試験が存在する。Bloedonら(43)は、4.3および7.14mg/kgの用量の4Fの経口投与が、極めて低い血漿レベル(8~16ng/mL)にもかかわらず、HDLの抗炎症特性を有意に改善することを見出した。Bloedonら(43)は、0.43および1.43mg/kgの用量のペプチドの投与が有効ではないことも見出した。Watsonら(44)は、血漿レベルを標的とし、冠動脈心疾患を有する患者において、静脈内注入によって7日間、または皮下注射によって28日間、毎日、L-4Fを投与した。0.43mg/kgの用量を使用して、Watsonら(44)は、極めて高い血漿レベルを達成したが、HDLの抗炎症特性の改善は達成されなかった。ヒトにおけるHDLの機能を改善するために必要とされる用量は、Watsonら(44)によって使用されたものよりはるかに高く、Bloedonら(43)によって使用されたものと少なくとも同等に高い可能性があることが結論付けられた。最近、Navabら(45)は、達成される血漿レベルではなく、投与されたHDLミメティックペプチド4Fの用量が、効力を決定すること、腸が、投与経路に関わらず、ペプチドの主な作用部位であり得ることを報告した。本発明者らの結果は、HDLミメティックが、Bloedonら(43)によって使用されたものより大きな用量で、マウスモデルにおいて、経口で与えられてもまたは皮下に与えられても有効であることを示している。マウス結腸癌モデルにおけるHDLミメティックによる本発明者らの結果、および血漿レベルではなく用量が効力を決定することを示すNavabら(45)の結果から、将来の臨床試験においては、本明細書において使用された高用量を試験することが重要であろう。

30

【0159】

HDLミメティックの抗腫瘍形成活性の一般的機序のための下流標的の一つは、処理された腫瘍におけるCD31染色の低下に見られるように、血管形成であるようである。LPAは、炎症、血管形成、および癌において重要な役割を果たしており、治療のための見込みのある標的となっている(46)。本発明者らの以前の所見(17、23)および最新の所見と一致して、LPAのような炎症誘発性／血管形成誘発性脂質の結合および除去は、HDLミメティック

40

50

クの作用機序の主要部分であり得る。

【0160】

結論として、結果は、HDLミメティックが、マウスにおいて誘導型および自然発症型の両方の結腸癌の発達を阻害することを示している。HDLミメティックペプチドによる腫瘍形成誘発性脂質の結合および除去は、腫瘍細胞の増殖能のみならず、腫瘍に関連した血管形成も改変する可能性が高い。標的脂質の同定は、これらのHDLミメティックの具体的な作用機序の解明における重要な次の工程である。

【0161】

参照

(括弧内の数字によって同定される)実施例5において提供された参考の引用の完全なリストは、Su et al., 2012, Mol. Cancer Ther. 11(6):1311-1319に見出され得る。

10

【0162】

実施例6：付加的なHDLミメティックが結腸癌のマウスモデルにおける腫瘍の成長および発達を阻害する

この実施例は、様々なHDLミメティックペプチドによってインビトロで処理されたCT26細胞が、媒体処理対照と比較して、処理の48時間以内に、低下した(上記のMTSアッセイによる)細胞生存率を示すことを証明する(図19)。アッセイされたHDLミメティックは、L-4F(SEQ ID NO:12)、L-4F2(SEQ ID NO:14)、K4,15-4F(SEQ ID NO:27)、K4,15-4F2(SEQ ID NO:28)、および新規の20アミノ酸ペプチド(「20AA」)LRKLRKRLLR LVGRQLEEFL(SEQ ID NO:1)

20

であった。K4,15-4Fペプチド(SEQ ID NO:27)およびK4,15-4F2ペプチド(SEQ ID NO:28)は、Nayyar et al., 2012, J. Lipid Res. 53(5):849-58に記載されたK14,15ペプチドに基づいており、残基4および15においてリジンがアルギニンに置換され、後者K4,15-4F2は、11位および17位においてアラニンのAibへの置換を導入するため、さらに修飾されていた。

新規の20アミノ酸ペプチドは、ペプチド

LRKLRKRLLR LVGRQLEEFL(SEQ ID NO:1)

を作出するため、アポEおよびG^{*}のペプチドから形成された。

【0163】

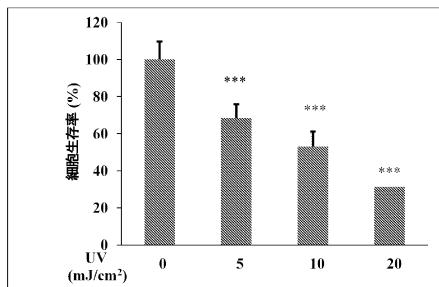
さらに、CT26細胞の皮下側腹部注射を受容し、その後、皮下HDLミメティックペプチドによって処理されたBALB/cマウスは、腫瘍重量および腫瘍体積の有意な低下を示した(図20)。これらの結果は、HDLミメティックの広いクラスが、癌の治療において使用され得ることを確認する。

30

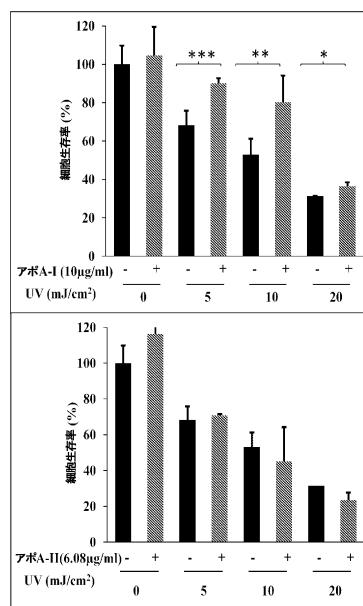
【0164】

以上より、本発明の具体的な態様が例示のために本明細書に記載されたが、様々な修飾が本発明の本旨および範囲から逸脱することなくなされ得ることが認識されるであろう。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲以外には限定されない。

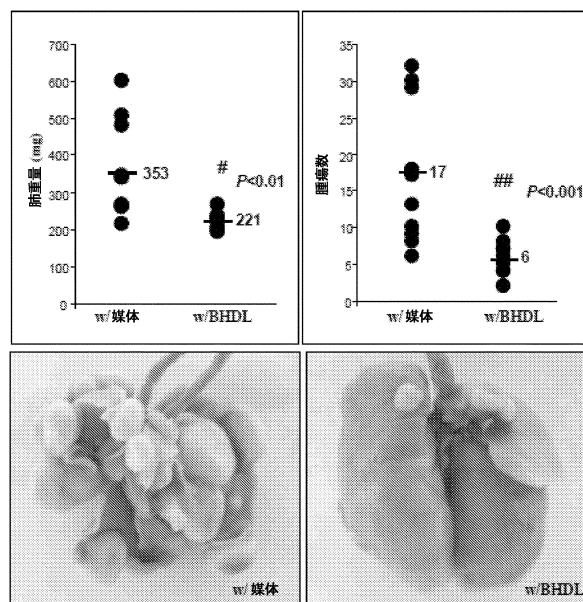
【図1】



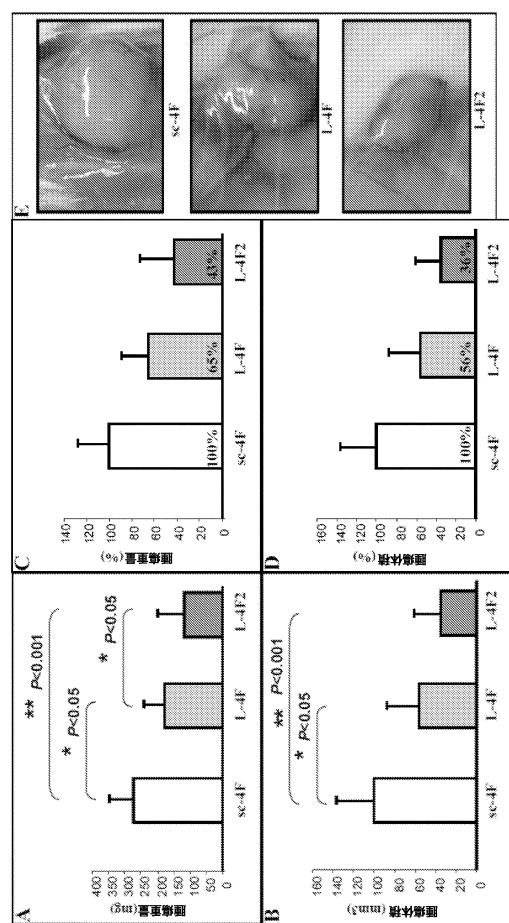
【図2】



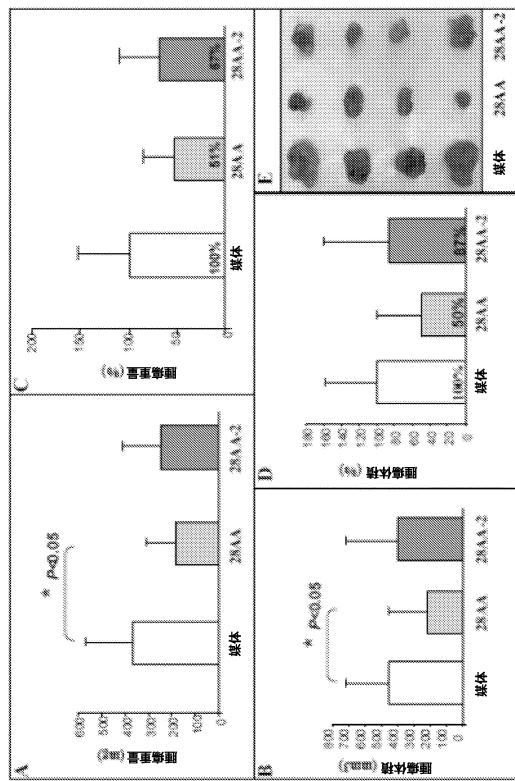
【図3】



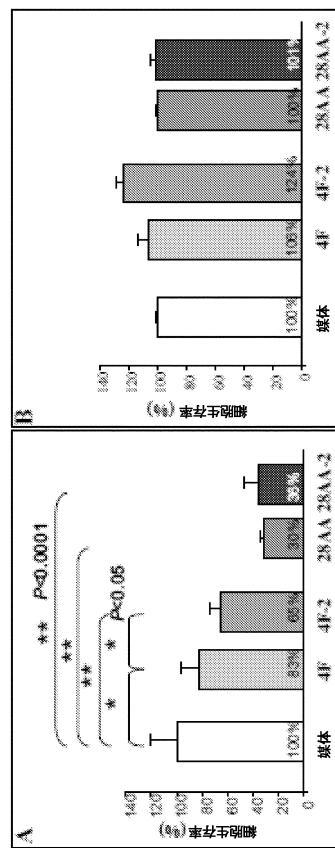
【図4】



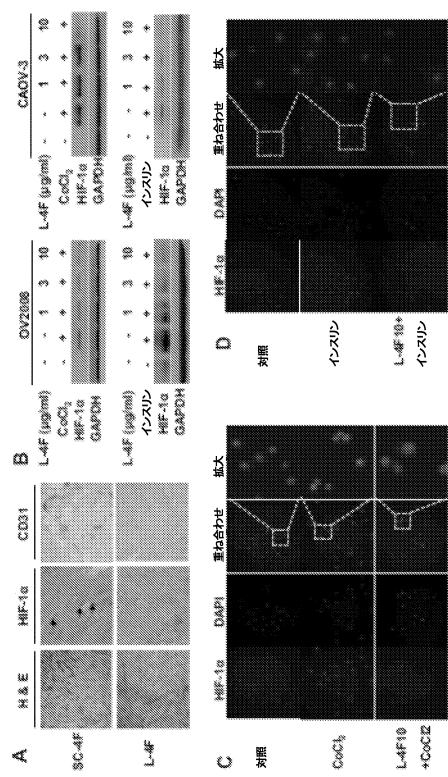
【図5】



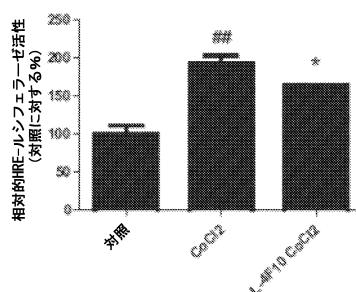
【図6】



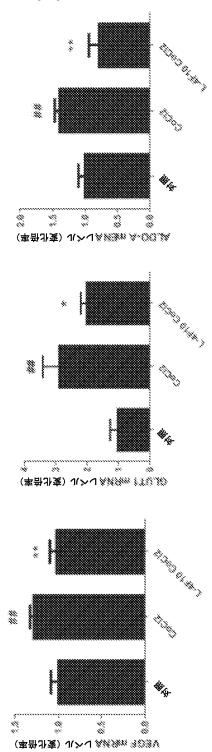
【図7】



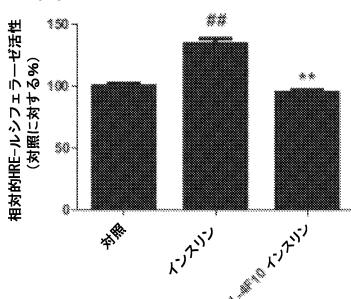
【図8 A】



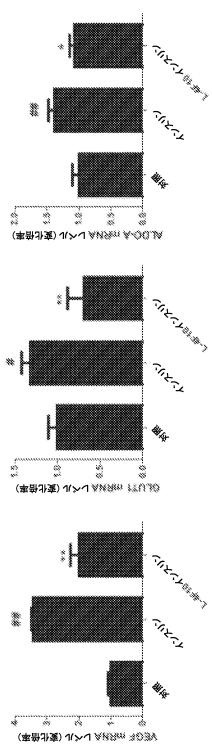
【図 8 B】



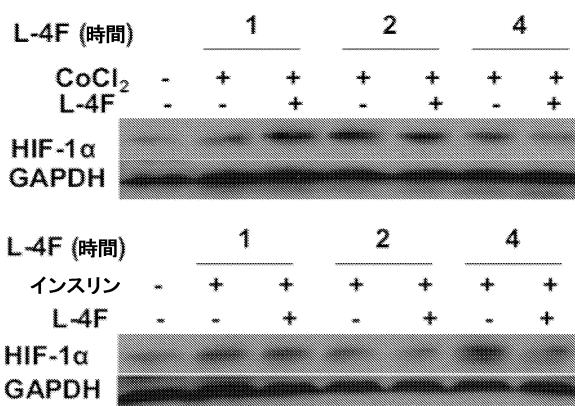
【図 8 C】



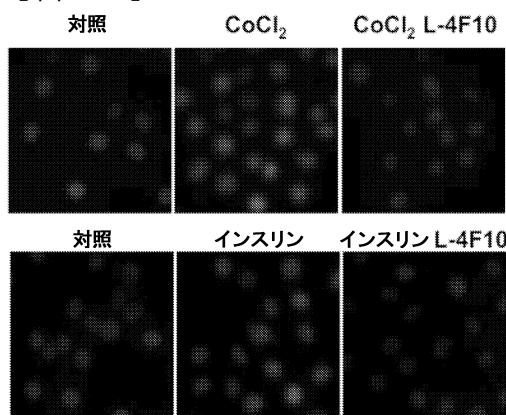
【図 8 D】



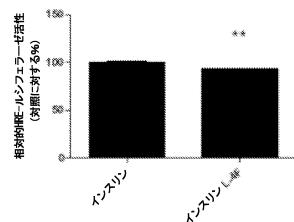
【図 9 A】



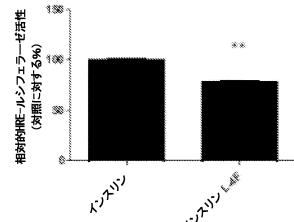
【図 9 B】



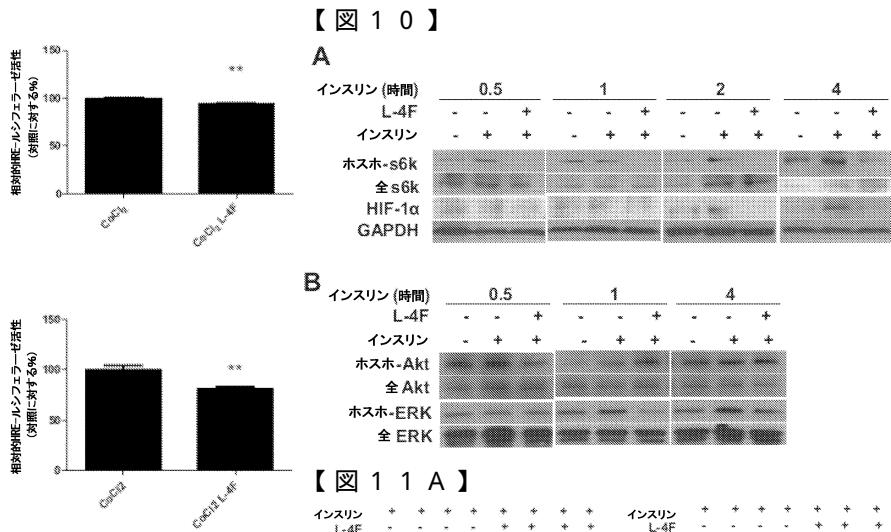
【図 9 C】



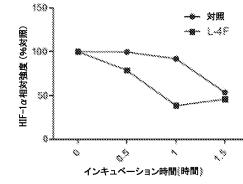
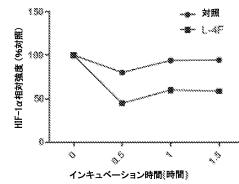
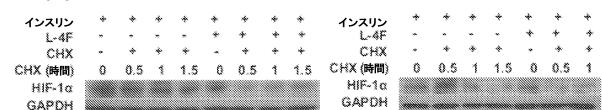
【図 9 D】



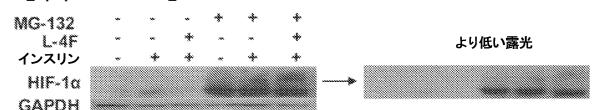
【図 10】



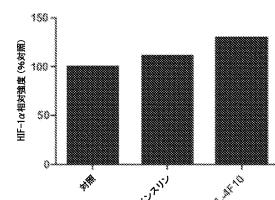
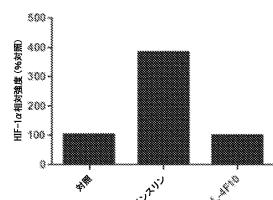
【図 11 A】



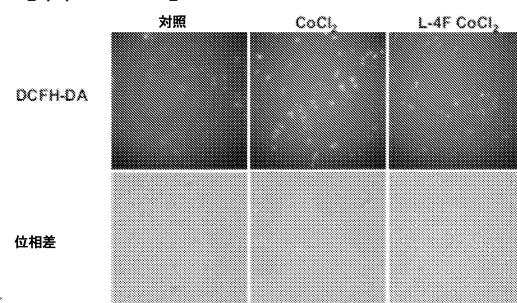
【図 11 B】



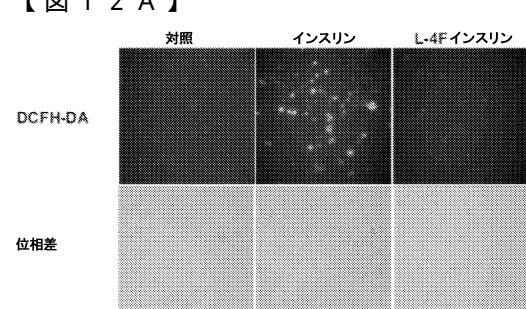
より低い露光



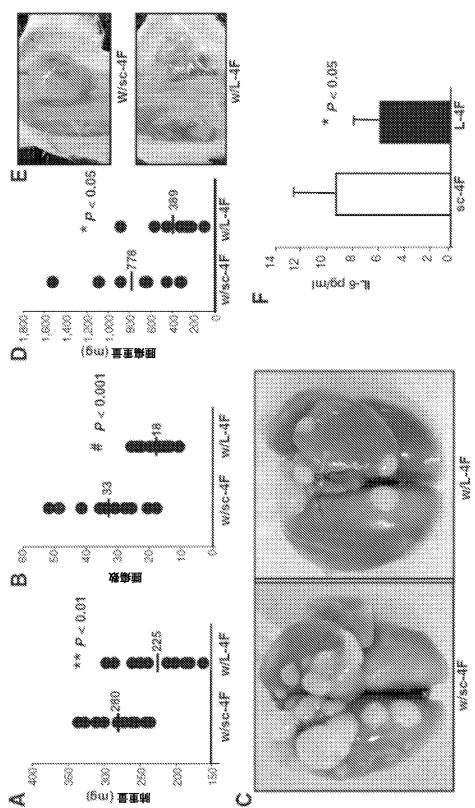
【図 12 B】



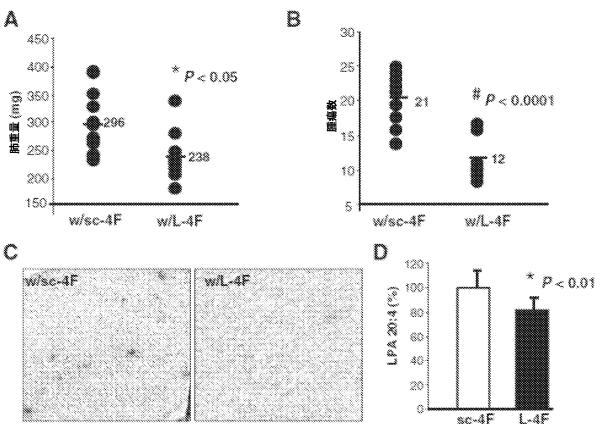
【図 12 A】



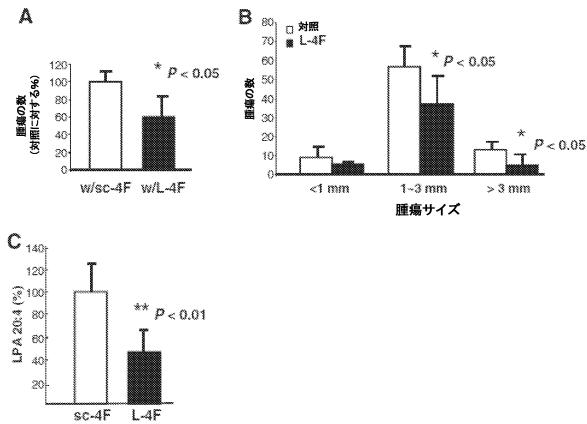
【図13】



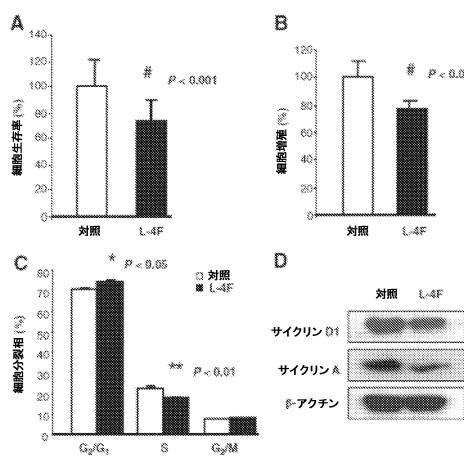
【図14】



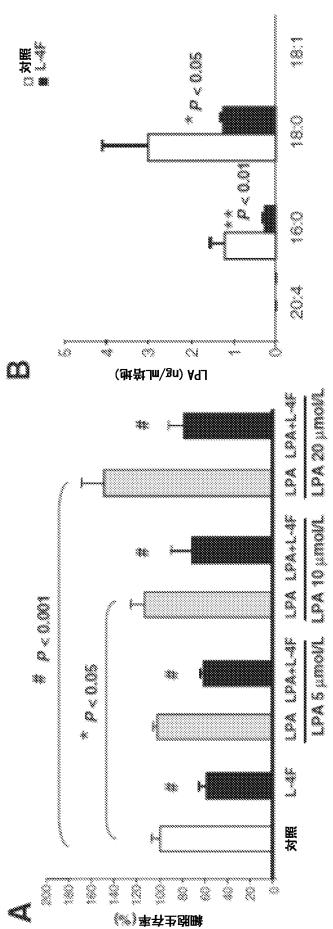
【図15】



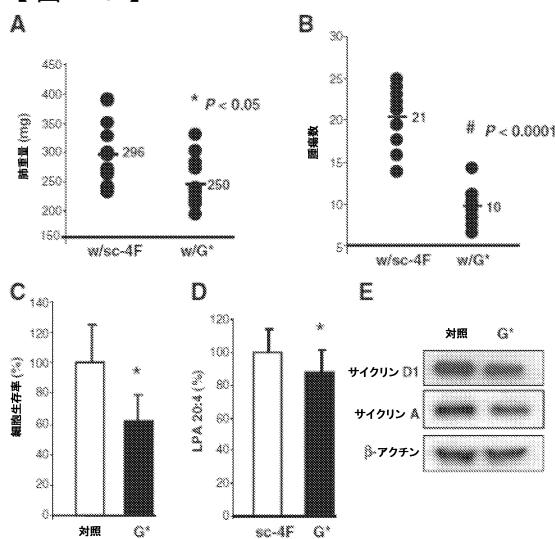
【図16】



【図17】

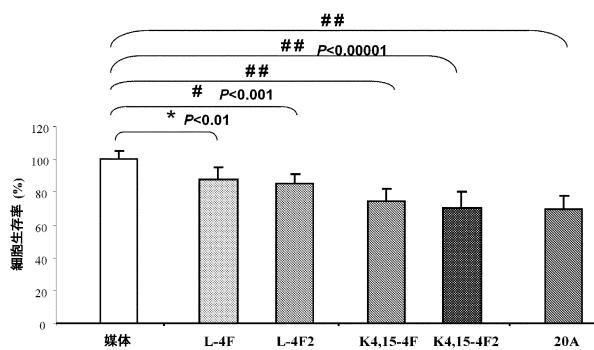


【図18】

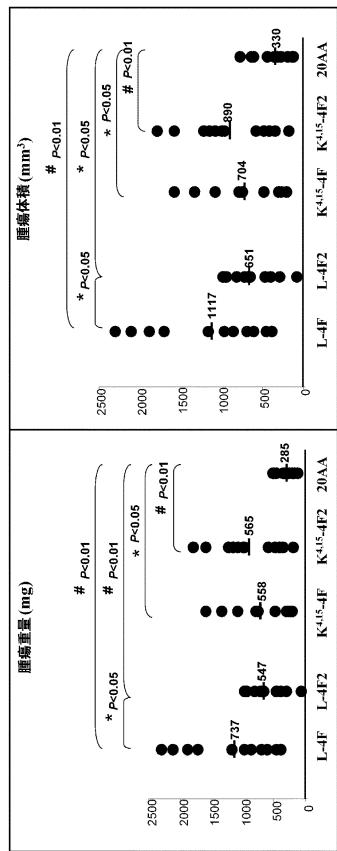


【図19】

MTS ----- 48時間処理したCT26細胞



【図20】



【配列表】

0006078067000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/646,772
(32)優先日 平成24年5月14日(2012.5.14)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ファリアス アイスナー ロビン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カラバサス パーク ベルモンテ 23725
(72)発明者 レディ シュリニヴァーサ ティー。
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 セリトス ミスティー プレイス 12650

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 特表2010-538005 (JP, A)
米国特許出願公開第2008/0095821 (US, A1)
PNAS, 2010年, Vol.107, No.46, p.19997-20002
Integr Biol, 2011年 4月, Vol.3, p.479-489
Biopolymers (Pept Sci), 2001年, Vol.60, p.351-365
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007年, Vol.15, p.4434-4443
Biochim Biophys Acta, 1980年, Vol.617, p.489-502

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 61 K 38/00
C 07 K 14/00
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
GenBank / EMBL / DDBJ / GenSeq