

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6049718号
(P6049718)

(45) 発行日 平成28年12月21日 (2016.12.21)

(24) 登録日 平成28年12月2日 (2016.12.2)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/64
A 6 1 Q 7/00 (2006.01)	A 6 1 Q 7/00

請求項の数 17 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-524449 (P2014-524449)	(73) 特許権者	514033541
(86) (22) 出願日	平成24年8月10日 (2012.8.10)		フォリクム・アクチエボラーク
(65) 公表番号	特表2014-525394 (P2014-525394A)		スウェーデン国エスー223 70ルンド
(43) 公表日	平成26年9月29日 (2014.9.29)		. シェーレヴェーゲン15. ルンド ユニ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2012/051955		ヴァーシティ バイオサイエンス アクチ
(87) 国際公開番号	W02013/021212		エボラーク
(87) 国際公開日	平成25年2月14日 (2013.2.14)	(74) 代理人	100127926
審査請求日	平成27年7月31日 (2015.7.31)		弁理士 結田 純次
(31) 優先権主張番号	1113770.0	(74) 代理人	100140132
(32) 優先日	平成23年8月10日 (2011.8.10)		弁理士 竹林 則幸
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ヤーン・アレンファール
			スウェーデン国エスー234 37ロンマ
			. ニーボヴェーゲン79

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規組成物及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1、5 及び 6 3 から成る群から選択されるアミノ酸配列から成る修飾オステオポンチンポリペプチド; 及び

(b) 薬学的に許容される及び／又は化粧品的に許容される添加剤、担体又は希釈剤：を含んでなる哺乳動物の発毛を促進する組成物。

【請求項 2】

修飾オステオポンチンポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列から成る、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

修飾オステオポンチンポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列から成る、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

修飾オステオポンチンポリペプチドは、配列番号 6 3 のアミノ酸配列から成る、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

局所投与のための請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

経皮投与のための請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

10

20

皮内投与のための請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

配列番号 6 3 のアミノ酸配列から成るポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 5 のアミノ酸配列から成るポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号 1 のアミノ酸配列から成るポリペプチド。

【請求項 11】

脱毛に関連する疾患又は病態の処置又は予防に用いる、請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

10

【請求項 12】

脱毛に関連する疾患又は病態の処置又は予防に用いる、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

脱毛症の処置又は予防に用いる、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

脱毛症が成長期毛又は休止期毛の喪失に関連する、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

脱毛症が：

(a) 男性ホルモン性脱毛症；

(b) 牽引性脱毛症；

(c) アナゲン脱毛；

(d) テロゲン脱毛；

(e) 円形脱毛症；

(f) 完全脱毛症；

(g) 全身性脱毛症；

(h) 脱毛性毛瘡；

(i) ムチン性脱毛症；

(j) 腫瘍性脱毛症；

(k) 瘢痕性脱毛症 (cicatricial alopecia)；及び

(l) 瘢痕性脱毛症 (scarring alopecia)；

から成る群から選択される、請求項 12 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

30

【請求項 16】

哺乳動物の発毛促進のための薬剤の調製における請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の修飾オステオポンチンポリペプチドの使用。

【請求項 17】

薬剤は、脱毛症の処置又は予防のためである、請求項 16 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物の発毛を促進する作用物質に関する。特に、哺乳動物（人間を含む）の発毛を促進するための修飾オステオポンチンポリペプチドを含んでなる組成物、及びその医薬品及び化粧品用途が提供される。

40

【背景技術】

【0002】

発毛は循環性であり、3段階：成長期、活性成長期；退行期、退行変性期；及び休止期、休止期で生じる。休止期後、古い毛髪繊維は脱落し、そして新しい毛が繰り返しサイクルの一部として生成される。

【0003】

脱毛症、又は脱毛は男性及び女性の両者に起こり、そして加齢、ホルモンレベル、スト

50

レス、及び化学療法を含む多くの原因によって生じる。これらの状況では、毛包はますます休止期段階にとどまり、毛髪繊維長及び直径の漸減をきたし、最終的に部分又は完全禿頭になる。

【0004】

円形脱毛症、アンドロゲン性脱毛症、アナゲン脱毛、自己誘導脱毛、テロゲン脱毛、及び瘢痕性脱毛症を含む、種々のタイプの脱毛が知られている。自己免疫障害と考えられる円形脱毛症は、頭皮の円形斑の脱毛から始まる。円形脱毛症は、頭皮の軽度の斑点状脱毛、並びに完全脱毛症として知られる全頭髪脱毛、及び全身性脱毛症として知られる全頭髪脱毛及び体毛脱毛を含む。男性型及び女性型禿頭症を含むアンドロゲン性脱毛症は、遺伝性素因、加齢、及びアンドロゲンホルモンレベルの組み合わせに起因すると考えられる。アンドロゲン性脱毛症はアンドロゲン刺激増加に関連して、毛包に悪影響を与える。アンドロゲン刺激増加は、他の機構の中でも就中、テストステロンをジヒドロテストステロンに変換する酵素、5 α -レダクターゼのレベル上昇によって生み出されることができる。アナゲン脱毛は、癌の化学療法又は放射線療法のような化学物質又は放射線に因る脱毛である。自己誘導脱毛は、毛髪に対する意識的又は無意識的自傷損傷に起因する脱毛を含む。自傷脱毛の2つの一般的タイプは、抜毛癖、又はある人が継続的に自分の毛髪を引っ張り又は引き抜くときに起こる脱毛、及び毛髪を継続的に引っ張るポニーテール又はお下げ髪のようなヘアスタイルに起因する牽引性脱毛症である。テロゲン脱毛は、例えば、外科、出産、又は妊娠中絶のような事象に起因するストレス関連脱毛である。テロゲン脱毛の更なる原因は、経口避妊薬及び他の処方薬の使用、甲状腺異常、糖尿病、狼瘡、及び情動ストレスを含む。瘢痕性脱毛症は、毛包の感染及び炎症に起因する脱毛、及び熱傷又は他の外傷に起因する脱毛を含む。

【0005】

脱毛は、多少 (by some) 美容上見栄えしないと考えられ、そしてしばしば関係個人に情緒的苦痛をもたらす広範囲にわたる問題である。その帰結として、脱毛症処置には大きな需要がある。多くの組成物が、例えば、成長期を促進又は延長させることにより発毛を促進するそれらの能力について試験されている。そのような組成物の例は、ミノキシジル (Regaine RTM., Pharmacia Corp.) 及びジアゾキシドのようなカリウムチャンネル開口薬；フィナステリド (Propecia RTM., Merck & Co.) のような5 α -レダクターゼ阻害剤；及び免疫抑制薬シクロスポリンAを含む。

【0006】

しかしながら、発毛を促進する公知の処置は限られた有効性を示し、そして望ましくない副作用を引き起こす。例えば、他の望ましくない副作用のうち、カリウムチャンネル開口薬は心血管作用を引き起こし、フィナステリドは妊娠している又は妊娠する可能性のある女性には安全ではなく、そしてシクロスポリンAは免疫系を抑制する。更に、発毛が望まれる領域に局所適用されるときでも、脱毛症の公知処置はしばしば、女性の顔の毛のような、体の望まれない領域の発毛を引き起こす。脱毛症を処置する公知の組成物のそのような欠点は、脱毛を経験する多くの個人がかつら及び男性かつらに頼るきっかけを作っている。他の個人は、高価な、十分有効ではない、そして時に例えば、化学療法中の患者には可能ではない植毛手術を求める。

【0007】

従って、医療的及び化粧用途の両方で用いるのに好適な発毛を促進するための新しい処置の必要性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の第1の態様は、

(a) RGDドメインが不活性化される修飾オステオポンチンポリペプチド；及び

(b) 薬学的に許容される及び／又は化粧品的に許容される添加剤、担体又は希釈剤；を含んでなる哺乳動物の発毛を促進する組成物を提供する。

【0009】

このように、本発明の組成物の活性成分は天然型オステオポンチンタンパク質に由来する（即ち本ポリペプチドは、天然型オステオポンチンタンパク質の修飾、例えば変異バージョンの配列に対応したアミノ酸配列を含む）。

【0010】

骨シアロ蛋白質 I（BSP-1 又は BNSP）、初期 T-リンパ球活性化（ETA-1）、分泌リン蛋白質 1（SPP1）、2ar 及びリケッチア耐性（Ric）としても公知のオステオポンチンは、幾つかの哺乳動物種に保存されている遺伝子産物である。

【0011】

その遺伝子は 7つのエキソンを有し、5 キロベース長に及びそしてヒトではそれは染色体 4 領域 13（4q13）のロングアーム上に位置している。タンパク質は～300 アミノ酸から構成されそして酸性残基が多い：30-36% はアスパラギン酸か又はグルタミン酸である。オステオポンチンは、ゴルジ装置での翻訳後修飾中にタンパク質に付着する 10 のシアル酸残基を含み、～30 の付着糖残基を有する。

【0012】

オステオポンチンは、石灰化骨マトリックス上へ破骨細胞を固定する骨中の新規シアロ蛋白質として最初に発見された（Franzen & Heinegard, 1985, Biochem. J. 232(3)715-24）。オステオポンチンの名前は骨中の（oste-）タンパク質の存在、及び骨細胞とミネラル相間での架橋（-ons）を形成するその能力から由来する。配列解析及びそれに続く構造研究は、オステオポンチンが、オステオポンチンのミネラル結合特性を媒介すると考えられるある種の 10 アスパラギン酸残基の高酸性領域から成る 32 kDa の糖タンパク質であることを示した。更に、オステオポンチン分子の中央部分には、R-G-D 配列を通して媒介される細胞接着ドメインもある（Oldberg et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(23):8819-23）。

【0013】

オステオポンチンは、構成的に骨芽細胞に及び幾つかの上皮細胞タイプに発現され、オステオポンチンが多くの体液中に分泌されるに至る。骨は沈着する唯一の組織タイプであり、そしてそこから大量に再生できる。オステオポンチンの発現はまた血管平滑筋細胞に、種々の癌細胞タイプにそして炎症細胞（具体的にマクロファージ及び T リンパ球）に誘導できる。幾つかの重要な細胞機能は、接着、増殖、移動、抗アポトーシス及び化学誘引などオステオポンチンによって生じる。これら機能の幾つかは、種々のインテグリンと、主として $\alpha v \beta 3$ しかし $\alpha v \beta 1$ 、及び $\alpha v \beta 5$ と相互作用する RGD 細胞接着を介して媒介されると考えられる（検討用として Scatena et al., 2007, Arterio. Thromb. Vasc. Biol. 27:2302-2309 を参照されたい）。

【0014】

近年、オステオポンチンは炎症及び免疫反応に関与する幾つかの細胞タイプを調節することができる強力なサイトカインとして注目されている。オステオポンチンによって生じる広範囲な機能は複雑で、単一の細胞結合 RGD 配列ではすべてを説明することができない。オステオポンチン中の 11 のアミノ酸ペプチド $R^{145}-G-D-S-L-A-Y-G-L-R-S^{155}$ （配列番号 122）（UniProt コード P10923 のアミノ酸 144～154 に対応）が同定され、そしてその後機能的にマッピングされたとき、説明ができた。 $\alpha v \beta 3$ インテグリンへの結合を媒介する既知の $R^{145}-G-D^{155}$ 部位に加えて、オステオポンチン分子中の 2 つの更なる必須領域、即ち、高特異的トロニン切断部位、即ち $R^{154}-S^{155}$ 、及び $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンに結合する潜在的インテグリン結合部位、即ち $S^{148}-L-A-Y-G-L-R^{154}$ （配列番号 123）が発見された（Scatena et al., 上記参照）。 $\alpha 4 \beta 1$ に対する更なる結合部位もまた同定されている（Scatena et al., 上記参照）。

【0015】

本発明の組成物におけるオステオポンチン誘導ポリペプチドの特徴的機能は、オステオポンチン中に天然に存在する RGD ドメインは、それが非機能的であるように（少なくとも

10

20

30

40

50

も部分的に)不活性化されていることである。例えば、RGDドメインの不活性化は、オステオポンチン誘導ポリペプチドが天然型オステオポンチンタンパク質を結合する1つ又はそれ以上のインテグリンに結合するのを阻止し得る。

【0016】

このように、「修飾オステオポンチンポリペプチド」では、RGDドメインは、非機能的である(少なくとも部分的に)天然型オステオポンチンタンパク質の修飾形態に対応するポリペプチド、並びに「完全長」修飾オステオポンチンの毛髪刺激特性を保持するそのフラグメント及びバリエーションを含む。例えば、修飾オステオポンチンポリペプチドの非機能的RGDドメインは、インテグリン $\alpha v \beta 3$ を結合することができないと考えられる(Scatena et al., 上記参照)。

10

【0017】

有利なこととして、天然型オステオポンチンタンパク質は哺乳動物、例えばヒト由来である。

【0018】

本発明の組成物中に存在する修飾オステオポンチンポリペプチドは哺乳動物の発毛を促進することができる。

【0019】

1つの実施態様では、ポリペプチドはヒトの発毛を促進することができる。

【0020】

更なる実施態様では、ポリペプチドはインビボにおいて発毛を促進することができる。

20

【0021】

更なる実施態様では、ポリペプチドはインビボにおいて野生型ヒトオステオポンチンより大きな効果で発毛を促進することができる。この文脈において「より大きな効果」とは、より低い用量でより速やかな作用及び／又は効果の発現及び／又はより大きい最大効果(例えばより大きい新卵胞数又は毛髪密度)を含む。1つの実施態様では、ポリペプチドは、同じ用量で、野生型ヒトオステオポンチンよりもより速やかな作用及びより大きい最大発毛効果の発現によって、インビボにおいて発毛を促進することができる(例えば実施例B参照)。

【0022】

当業者には当然のことながら、発毛促進は現存する毛包の効果により及び／又は新しい毛包の形成を誘導することにより媒介され得る。

30

【0023】

このように、1つの実施態様では、修飾オステオポンチンポリペプチドは現存する毛包(例えば、休止卵胞が活性になるように成長期を延長することにより及び／又は休止期段階を短縮することにより)を刺激することができる。

【0024】

更なる実施態様では、ポリペプチドは、新しい毛包、又はそれを産生するための幹細胞の形成を誘導することができる。

【0025】

天然型オステオポンチンタンパク質は通常約300アミノ酸長である。しかしながら、当業者には当然のことながら、本発明の組成物中に存在する修飾オステオポンチンポリペプチドはこの長さ異なってもよい。

40

【0026】

通常、ポリペプチドは500アミノ酸長未満で、例えば、400、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、200、150、100、50、40、30、20、15、10未満又はより少ないアミノ酸長である。

【0027】

1つの実施態様では、ポリペプチドは250と350アミノ酸長間であり、例えば、280と300アミノ酸長間(例えば293アミノ酸長)である。

50

【0028】

別の実施態様では、ポリペプチドは10と20アミノ酸長間であり、例えば、12と18アミノ酸長間（例えば15アミノ酸長）である。

【0029】

上記のように、修飾オステオポンチンポリペプチドは、天然型オステオポンチンタンパク質に通常見出される活性トリペプチド配列「アルギニン－グリシン－アスパラギン酸」を欠く。当業者には当然のことながら、このRGDドメインは多くの異なる方法によって不活性化され得る。

【0030】

1つの実施態様では、RGDドメインは、それが天然型オステオポンチンタンパク質に対して1つ若しくはそれ以上の欠失、置換及び／又は付加、又はその組み合わせを含有するように、修飾オステオポンチンポリペプチドにおいて1つ又はそれ以上のアミノ酸で変異される。

【0031】

例えば、RGDドメインは、アルギニン及び／又はグリシン及び／又はアスパラギン酸残基が不存在であるように、少なくとも部分的に欠失され得る。

【0032】

あるいは、又は加えて、RGDドメインは1つ又はそれ以上のアミノ酸で置換され得る。例えば、アルギニン及び／又はグリシン及び／又はアスパラギン酸残基は別のアミノ酸で置換され得る。そのような置換は保存的又は非保存的であってよい。

【0033】

同様に、RGDドメインは、

- (a) アルギニン残基の置換並びにグリシン及びアスパラギン酸残基の欠失；
 - (b) アルギニン及びグリシン残基の置換並びにアスパラギン酸残基の欠失（例えば、－RGD－トリペプチドはジペプチド配列－DI－と置換できる）；
 - (c) アルギニン及びアスパラギン酸残基の置換並びにグリシン残基の欠失；又は
 - (d) アルギニン及びアスパラギン酸残基の欠失並びにグリシン残基の置換；
- を含む置換及び欠失の組み合わせによって不活性化され得る。

【0034】

トリペプチド－RGD－配列はジペプチド－DI－配列によって置換される。

【0035】

理論によって拘束されるものではないが、RGD配列の不活性化は、オステオポンチンポリペプチドの立体配座変化（対応する天然型オステオポンチンタンパク質に対して）をもたらし得ると考えられ、それは周囲の環境へ新たな部位の創出／露出を導く。

【0036】

1つの好ましい実施態様では、修飾オステオポンチンポリペプチドは配列番号1（ここで不活性化RGDドメインを包含する領域には下線が引かれている）：

MRLAVICFCLFGIASSLPVKVTDSSGSSSEKLYSLHPDPIA
TWLVPDPSQKQNL LAPQNAVSSSEKDDFKQETLPSNSNES
HDHMDDDDDDDDDG DHAES EDSVDSDESDESHHSD E SDE
TVTASTQADTF TP IVP TVDVPNG DISLAYGLRS KSR SFQV
SDEQYPDATDEDLT SHMKSGESKESLDVIPVAQLLSMPSD
QDNNGKGSHESSQLDEPSLETHRLEHSKESQESADQSDVI
DSQASSKASLEHQSHKFHSHKDKLVLDPKSKEDDRYLKFR
ISHELESSSEVN

配列番号1

又は配列番号1のアミノ酸配列の発毛促進活性を（少なくとも部分的に）保持するそのフラグメント、バリエント、誘導体又は融合物（又は該フラグメント、バリエント又は誘導体の融合物）のアミノ酸配列を含み又はそれから成る。

【0037】

本明細書に使用される用語「アミノ酸」は、標準の20の遺伝子コード化アミノ酸及びそれらの対応する（天然の「L」型と比べて）「D」型の立体異性体、 ω アミノ酸及び他の天然型アミノ酸、非従来型アミノ酸（例えば、 α 、 α -ジ置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸など）及び化学誘導アミノ酸を含む（下記参照）。

【0038】

アミノ酸が「アラニン」又は「Ala」又は「A」のように具体的に列挙されるとき、用語は、別に明示しない限りL-アラニン及びD-アラニンの両方をいう。他の非従来型アミノ酸もまた、目的の機能特性がポリペプチドによって保持されている限り、本発明のポリペプチドに好適な成分であり得る。示されたポリペプチドに対して、必要に応じて各コード化アミノ酸残基は、従来型アミノ酸の慣用名に対応して一文字記号表示によって表される。

10

【0039】

慣例に従って、本明細書に開示のアミノ酸配列はN末端からC末端まで与えられる。

【0040】

通常、本発明の組成物中で使用される修飾オステオポンチンポリペプチドはL-アミノ酸を含み又はそれから成る。

【0041】

1つの実施態様では、ポリペプチドは配列番号1のアミノ酸配列のフラグメント、又はそのバリエーションを含み又はそれから成り得る。

20

【0042】

「フラグメント」では、配列番号1のアミノ酸配列の少なくとも6個の連続するアミノ酸、例えば配列番号1の少なくとも7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、100、150、200、210、220、230、240、250、255、260、265、270、275、280、285、286、287、288、289、290、291又は292個の連続するアミノ酸を含む。

【0043】

有利なこととして、フラグメントは配列番号2の不活性化RGDドメイン配列、即ち：

D I S L A Y G L R S

配列番号2

30

を含み又はそれから成る。

【0044】

例えば、フラグメントは配列番号5～62のいずれかによるアミノ酸配列を含み又はそれから成り得る。

【0045】

1つの特定の実施態様では、ポリペプチドは配列番号5のアミノ酸配列を含み又はそれから成る。

VDVPNGDISLAYGLR 配列番号5 [「FOL-004」]

【0046】

更なる実施態様では、ポリペプチドは配列番号1、又はそのフラグメントのアミノ酸配列のバリエーションを含み又はそれから成る。

40

【0047】

「バリエーション」とは、ポリペプチドは、配列番号1と100%アミノ酸配列同一性を共有しない、即ち配列番号1の1つ又はそれ以上のアミノ酸は変異される必要がないことを意味する。例えば、ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも50%同一性、より好ましくは該配列と少なくとも60%、70%又は80%又は85%又は90%同一性、そして最も好ましくは該アミノ酸配列と少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%同一性のアミノ酸配列を含み又はそれから成り得る。

【0048】

百分率同一性は、例えば L A L I G N プログラム (Huang and Miller, Adv. Appl. Mat

50

h. (1991) 12:337-357) を用いて Expasyファシリティサイト
(http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)

で、パラメータとしてグローバルアラインメントオプション、スコアリングマトリックス
B L O S U M 6 2、オープニングギャップペナルティー 1 4、拡大ギャップペナルティー
1 4を用いて、当技術分野で周知の方法によって決定できる。

【0049】

あるいは、2つのポリペプチド間の百分率配列同一性は、好適なコンピュータープログラム、例えばthe University of Wisconsin Genetic Computing GroupのG A Pプログラムを用いて決定され得て、そして当然のことながら、百分率同一性はその配列が最適に配列されているポリペプチドに関して計算される。

10

【0050】

「変異された」とは、特定位置におけるアミノ酸は、配列番号1によるポリペプチド中のアミノ酸と比べて変わっていることを意味する。例えば、特定位置においてアミノ酸は欠失され、置換され得て、又は1つ又はそれ以上のアミノ酸の挿入／付加の部位であってよい。当業者には当然のことながら、置換は保存的又は非保存的であってよい。

【0051】

あるいは、又は加えて、特定位置においてアミノ酸は化学修飾（誘導体化）され得る；下記参照。

【0052】

1つの実施態様では、バリエーションポリペプチドは、1つ又はそれ以上のアミノ酸が保存的に置換される配列番号1、又はそのフラグメントのアミノ酸配列を含み又はそれから成る。「保存的に置換された」とは、ポリペプチドの機能が顕著に変わらないように、1つのアミノ酸の類似の特性（サイズ、疎水性など）をもつ別のアミノ酸との置換を意味する。このように、「保存的置換」とは、G l y、A l a；V a l、I l e、L e u；A s p、G l u；A s n、G l n；S e r、T h r；L y s、A r g；及びP h e、T y rなど目的とする組み合わせである。

20

【0053】

有利なこととして、バリエーションは配列番号2の不活性化R G Dドメイン配列、即ち：

D I S L A Y G L R S

配列番号2

を含み又はそれから成る。

30

【0054】

バリエーションポリペプチドはまた、配列番号1のアミノ酸配列内のN-及び／又はC-末端に及び／又は内部に挿入される、1つ又はそれ以上の更なるアミノ酸を含んでよい。例えば、ポリペプチドは、N-及び／又はC-末端に及び／又は内部に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15又は20の更なるアミノ酸を含み又はそれから成り得る。

【0055】

有利なこととして、バリエーションポリペプチドは非天然型である。

【0056】

1つの好ましい実施態様では、修飾オステオポンチンポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列の種相団体（species homologue）である。

40

【0057】

このように、ポリペプチドは、R G Dドメインが不活性化される修飾ヒトオステオポンチンタンパク質、又はそのフラグメントのアミノ酸配列を含み又はそれから成り得る。好適なヒトオステオポンチンタンパク質配列は当技術分野で周知であり、例えばデータベース受入番号A A A 5 9 9 7 4. 1、A A C 2 8 6 1 9. 1、A A A 8 6 8 8 6. 1を参照されたい。

【0058】

例えば、修飾オステオポンチンポリペプチドは、配列番号3（ここで不活性化R G Dドメインを包含する領域には下線が引かれている）：

50

M R I A V I C F C L L G I T C A I P V K Q A D S G S S E E K Q L Y N K Y P D A V
 A T W L N P D P S Q K Q N L L A P Q T L P S K S N E S H D H M D D M D D E D D D
 D H V D S Q D S I D S N D S D D V D D T D D S H Q S D E S H H S D E S D E L V T
 D F P T D L P A T E V F T P V V P T V D T Y D G D I S V V Y G L R S K S K K F R
 R P D I Q Y P D A T D E D I T S H M E S E E L N G A Y K A I P V A Q D L N A P S
 D W D S R G K D S Y E T S Q L D D Q S A E T H S H K Q S R L Y K R K A N D E S N
 E H S D V I D S Q E L S K V S R E F H S H E F H S H E D M L V V D P K S K E E D
 K H L K F R I S H E L D S A S S E V N

配列番号 3

10

又は配列番号 3 のアミノ酸配列の発毛促進活性を保持するそのフラグメント、バリエーション、誘導体又は融合物（又は該フラグメント、バリエーション又は誘導体の融合物）のアミノ酸配列を含み又はそれから成る。

【0059】

有利なこととして、フラグメント又はバリエーションは配列番号 4 の不活性化 R G D ドメイン配列、即ち：

D I S V V Y G L R S

配列番号 4

を含み又はそれから成る。

【0060】

例えば、フラグメント又はバリエーションは配列番号 6 3 ～ 1 2 0 のいずれかによるアミノ酸配列を含み又はそれから成り得る（下記に詳述）。

20

【0061】

1 つの特定の実施態様では、ポリペプチドは配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含み又はそれから成る。

V D T Y D G D I S V V Y G L R 配列番号 6 3 [「FOL-005」]

【0062】

更なる実施態様では、修飾オステオポンチンポリペプチドは、配列番号 1 若しくは 3、又はそのフラグメント、バリエーション若しくは融合物のアミノ酸配列の誘導体を含み又はそれから成る。

【0063】

30

有利なこととして、誘導体は配列番号 3 又は 4 の不活性化 R G D ドメイン配列を含む。

【0064】

例えば、ポリペプチドは配列番号 5 又は 6 3 のアミノ酸配列の誘導体を含み又はそれから成る。

【0065】

1 つ又はそれ以上のアミノ酸の化学的誘導体は官能側基との反応によって実現され得る。そのような誘導体化分子は、例えば遊離アミノ基がアミン塩酸塩を形成するために誘導体化されているそれらの分子、p-トルエンスルホニル基、カルボキシベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基又はホルミル基を含む。遊離カルボキシ基は、塩、メチル及びエチルエステル又は他のタイプのエステル及びヒドラジドを形成するために誘導体化され得る。遊離ヒドロキシ基は、O-アシル又はO-アルキル誘導体を形成するために誘導体化され得る。20 の標準アミノ酸の天然型アミノ酸誘導体を含むそれらのペプチドはまた化学的誘導体として含まれる。例えば：4-ヒドロキシプロリンはプロリンと置換され得る；5-ヒドロキシリジンはリジンと置換され得る；3-メチルヒスチジンはヒスチジンと置換され得る；ホモセリンはリジンの代わりにセリン及びオルニチンと置換され得る。誘導体はまた、必要な活性が維持される限り 1 つ又はそれ以上の付加又は欠失を含むペプチドを含む。他に含まれる修飾は、アミド化、アミノ末端アシル化（例えば、アセチル化又はチオグリコール酸アミド化）、末端カルボキシルアミド化（例えばアンモニア又はメチルアミンによる）、及び同様の末端修飾である。

40

【0066】

50

当業者には更に当然のことながら、上記に詳述した修飾オステオポンチンポリペプチドの立体配座及び望ましい機能を模倣するペプチド類似化合物もまた有用であり得る。このように、「ポリペプチド」では、配列番号1のポリペプチドの発毛促進活性を有するペプチド類似化合物を含む。

【0067】

例えば、本発明のポリペプチドは、アミノ酸残基がペプチド ($-CO-NH-$) 結合によって連結される分子だけでなく、ペプチド結合が保存される分子をも含む。そのようなレトロインバースペプチド類似体は当技術分野で公知の方法、例えばMezriere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237に記載のような方法を用いて作製され得て、これは参照することにより本明細書に組み入れられる。このアプローチは骨格に關与する変化を含有する擬似ペプチドを作製することを含み、そして側鎖の配向を含まない。 $CO-NH$ ペプチド結合の代わりに $CO-NH$ 結合を含有するレトロインバースペプチドはタンパク質分解にはるかに抵抗性である。あるいは、本発明のポリペプチドは、1つ又はそれ以上のアミノ酸残基が従来のアミド結合に代わりに $-y(CH_2NH)-$ 結合によって連結されるペプチド類似化合物であり得る。

【0068】

更なる選択肢では、但しアミノ酸残基の炭素原子間に間隔を保持する適切なリンカー部分が使用されるという条件でペプチド結合は全く省かれ得る；それは、ペプチド結合として、リンカー部分が実質的に同じ電荷分布及び実質的に同じ平面性を有することは有利となり得る。

【0069】

当然なことながら、ポリペプチドは、エキソタンパク質分解消化に対する感受性を下げるのに資するために、そのN-又はC-末端で適宜ブロックされ得る。

【0070】

D-アミノ酸及びN-メチルアミノ酸などの種々の非コード又は修飾アミノ酸はまた、哺乳動物のポリペプチドを修飾するのに使用されている。また、推定生物活性立体配座は、環化のような共有結合修飾によって又はラクタムの取り込み若しくは他のタイプの架橋によって安定化され得て、例えばVeber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2636 and Thursell et al., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111:166を参照されたく、これは参照することにより本明細書に組み入れられる。

【0071】

多くの合成戦略のうちで共通するテーマは、ペプチドベースの骨格へのある環状部分の導入となっている。環状部分はペプチド構造の立体配座空間を限定し、そしてこれはしばしば特定の生物受容体に対するペプチドの特異性増加をもたらす。本方法の更なる利点は、ペプチドへの環状部分の導入もまた細胞性ペプチダーゼの感受性低下を有するペプチドをもたらし得ることである。

【0072】

このように、本発明の例示的ポリペプチドは末端システインアミノ酸を含む。そのようなポリペプチドは、末端システインアミノ酸中のメルカプト基のジスルフィド結合形成によるヘテロデティック (heterodetic) 環形に、又は末端アミノ酸間でのアミドペプチド結合形成によるホモデティック (homodetic) 形に存在し得る。上記のように、N-とC-末端領域システイン間のジスルフィド又はアミド結合を通した小ペプチドを環化することは、タンパク質分解を減少させそしてまた構造の剛性を増加させることにより、線形ペプチドで時に見られる特異性及び半減期の問題を回避し得て、高特異性化合物をもたらし得る。ジスルフィド結合によって環化されるポリペプチドは、尚タンパク質分解を受けやすい可能性がある遊離アミノ酸及びカルボキシ末端を有し、一方でペプチドはN末端アミンとC末端カルボキシル間のアミド結合の形成により環化され、そしてそれ故にもはや遊離アミノ又はカルボキシ末端を含有しない。このように、本発明のペプチドは、C-N連結又はジスルフィド連結によって連結できる。

【0073】

本発明はペプチドの環化方法がいずれであれ限定されるものではなく、その環状構造が
いずれの合成方法によっても実現され得るペプチドを包含する。それ故、ヘテロデティッ
ク結合は。限定されるものではないが、ジスルフィド、アルキレン又はスルフィド架橋を
介する形成を含んでよい。ジスルフィド、スルフィド及びアルキレン架橋を含む環状ホモ
デティックペプチド、及び環状ヘテロデティックペプチドの合成法は、U S 5, 6 4 3,
8 7 2に開示され、参照することにより本明細書に組み入れられる。環化方法の他の例は
、クリック化学を通じた環化、エポキシド、アルデヒド-アミン反応、並びにU S 6, 0
0 8, 0 5 8に開示される方法を含み、参照することにより本明細書に組み入れられる。

【0074】

そのような末端修飾は、周知のようにプロテイナーゼ消化による感受性を減少させるの
に、そしてそれ故溶液中の、特にプロテアーゼが存在し得る体液中でペプチドの半減期を
延長するのに有用である。ポリペプチド環化はまた、環化によって形成される安定構造故
に、そして環状ペプチドで認められる生物活性の点で有用な修飾である。

【0075】

このように、1つの実施態様では、本発明の第1態様のポリペプチドは環状である。

【0076】

しかしながら、別の実施態様では、ポリペプチドは線形である。

【0077】

1つの好ましい実施態様では、しかしながら、修飾オステオポンチンポリペプチドは、
P E G化、アミド化、エステル化、アシル化、アセチル化及び／又はアルキル化によって
修飾又は誘導化される1つ又はそれ以上のアミノ酸を含む。

【0078】

当業者には当然のことながら、修飾オステオポンチンポリペプチドは1つ又はそれ以上
のアミノ酸においてグリコシル化され得る。例えば、ポリペプチドは、対応する（「親」
）オステオポンチンタンパク質の1つ又はそれ以上のグリコシル化部位を保持し得て、糖
質基はそれに結合され得る。

【0079】

更なる実施態様では、修飾オステオポンチンポリペプチドは、配列番号1若しくは3、
又はそのフラグメント若しくはバリエーションのアミノ酸配列の融合物を含み又はそれから成
る。

【0080】

例えば、ポリペプチドは、配列番号5又は63のアミノ酸配列の融合物を含んでよい。

【0081】

ポリペプチドの「融合物」では、その他のポリペプチドに融合物される配列番号1又は
3（又はそのフラグメント若しくはバリエーション）に対応するアミノ酸配列を含む。例えば
、前記ポリペプチドは、該ポリペプチドの精製を容易にするために、グルタチオン-S-
トランスフェラーゼ（GST）又はプロテインAのようなポリペプチドに融合され得る。
そのような融合物の例は当業者に周知である。同様に、前記ポリペプチドは、H i s 6の
ようなオリゴヒスチジンタグに又は周知のM y c タグエピトープのような抗体によって
認識されるエピトープに融合され得る。前記ポリペプチドのいずれのバリエーション又は誘導
体への融合物も本発明の範囲に含まれ得る。

【0082】

融合物は、本発明の前記ポリペプチドに望ましい機能を与える更なる部分を含んでよく
；例えばその部分は発毛促進効果を増加又は延長するのに有用であり得る。例えば、1つ
の実施態様では、融合物はヒト血清アルブミン又は類似のタンパク質を含む（U S 2 0 0
9 / 0 0 0 5 3 1 2に開示され、その開示は参照することにより本明細書に組み入れられ
る）。

【0083】

あるいは、融合部分は、当業者に公知のように、ポリペプチドの細胞取り込みを促進す
ることができる親油性又はポリペプチドドメインであってよい。

【0084】

更なる実施態様では、修飾オステオポンチンポリペプチドはアミノ酸配列の縦列反復を含み又はそれから成る。例えば、ポリペプチドは、1つ又はそれ以上の介在アミノ酸により互いに直接隣接し又は分離され得る、配列番号2及び／又は4（又はその組み合わせ）の縦列反復を含み又はそれから成り得る。

【0085】

あるいは、ポリペプチドは、配列番号5又は63のアミノ酸配列の縦列反復を含み又はそれから成り得る。

【0086】

しかしながら、1つの好ましい実施態様では、修飾オステオポンチンポリペプチドは、単に配列番号1又は3のアミノ酸配列を含み又はそれから成る。例えば、ポリペプチドは、配列番号1又は3によるポリペプチドから成り得る。

【0087】

更に好ましい実施態様では、修飾オステオポンチンポリペプチドは、単に配列番号5又は63のアミノ酸配列を含み又はそれから成る。例えば、ポリペプチドは、配列番号5又は63によるポリペプチドから成り得る。

【0088】

本発明の組成物で用いるのに好適な修飾オステオポンチンポリペプチドは、当業者に周知のインビトロ細胞ベース発現方法（例えば Sambrook & Russell, 2000, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照されたく、これは参照することにより本明細書に組み入れられる）によって作られ得る。使用しようとする発現ベクター及び宿主細胞の選択は多くの要素によって決まり得る。例えば、修飾オステオポンチンポリペプチドがグリコシル化されようとする場合、哺乳動物発現系が必要とされ得る。

【0089】

好適な発現ベクター及び宿主細胞は多くの供給元から市販されている。

【0090】

あるいは、修飾オステオポンチンポリペプチドは、液相及び固相合成などの公知方法によって合成され得る（例えば、t-Boc固相ペプチド合成及びBOP-SPPS）。

【0091】

当業者には当然ことながら、本発明はまた、上記修飾オステオポンチンポリペプチドの薬学的に及び／又は化粧品的に許容される酸又は塩基付加塩を含む。本発明に有用な前記塩基化合物の薬学的に及び／又は化粧品的に許容される酸付加塩を調製するのに使用される酸は、非毒性酸付加塩、即ち塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、過リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、酸性酒石酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、糖酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩及びなかんずくパモエート〔即ち1, 1'-メチレン-bis-(2-ヒドロキシ-3ナフトエ酸塩)〕塩などの、薬学的に及び／又は化粧品的に許容されるアニオンを含有する塩を形成する酸である。

【0092】

薬学的に及び／又は化粧品的に許容される塩基付加塩はまた、修飾オステオポンチンポリペプチドの薬学的に及び／又は化粧品的に許容される塩形態を形成するのに使用され得る。事実上酸性である本化合物の薬学的に及び／又は化粧品的に許容される塩基塩を調製するために試薬として使用され得る化学塩基は、そのような化合物と非毒性塩基塩を形成する塩基である。そのような非毒性塩基塩は、限定されるものではないが、アルカリ金属カチオン（例えばカリウム及びナトリウム）及びアルカリ土類金属カチオン（例えばカルシウム及びマグネシウム）のような薬学的に及び／又は化粧品的に許容されるカチオン、アンモニウム又はN-メチルグルカミン（メグルミン）のような水溶性アミン付加塩、及び低級アルカノールアンモニウム及びなかんずく薬学的に許容される有機アミンの他の塩

10

20

30

40

50

基塩から由来する塩基塩を含む。

【0093】

更に当然のことながら、本発明の修飾オステオポンチンポリペプチドは、貯蔵のために凍結乾燥され得てそして使用より前にて好適な担体中に再構成され得る。いずれの好適な凍結乾燥方法（例えば噴霧乾燥、ケーキ乾燥）及び／又は再構成技術も使用できる。当業者には当然のことながら、凍結乾燥及び再構成は種々の程度の活性ロスをもたらし得て、そして使用レベルは補償するのに上方へ調整される必要があり得る。好ましくは、凍結乾燥（フリーズドライ）ポリペプチドは、再水和される（凍結乾燥より前で）その活性の高々約20%、又は高々約25%、又は高々約30%、又は高々約35%、又は高々約40%、又は高々約45%、又は高々約50%を失う。

10

【0094】

修飾オステオポンチンポリペプチドは、ポリペプチド及び予定の投与経路及び標準的薬学又は美容実践（practice）に関して選択される、薬学的に許容される及び／又は化粧品的に許容される添加剤、担体又は希釈剤を含んでなる組成物の形態で提供される（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USAを参照されたく、これは参照することにより本明細書に組み入れられる）。

【0095】

「薬学的に許容される」とは、製剤は無菌でそして発熱物質なしであることが含まれる。好適な医薬品担体は薬剤学の分野で周知である。1つ又は複数の担体は本発明の化合物と適合性であり及びそのレシピエントに有害でないという意味で「許容される」必要がある。通常担体は無菌でそして発熱物質なしになり得る水又は食塩水であり得る；しかしながら他の許容される担体を使用され得る。このように、「薬学的に許容される担体」及び「薬学的に許容される添加剤」は、単に担体として作用することを目的とし、即ちそれ自体生物活性を有することを目的としない、製剤の一部を形成するのに使用されるいずれもの1つ又は複数の化合物を含む。薬学的に許容される担体又は添加剤は、一般的に安全、非毒性、及び生物学的にもその他でも不要ではない。本明細書で使用される薬学的に許容される担体又は添加剤は、1つ及びそれ以上のそういう担体又は添加剤の1つを含む。

20

【0096】

同様に、用語「化粧品的に許容される」は化粧品として好適な製剤を意味するのに使用される。シャンプー、ローション、クリーム及び他のそのような製品に一般的に使用されるものなど、好適な化粧品担体は当技術分野で周知である。

30

【0097】

添加剤は、1つ又はそれ以上の糖類、高分子、脂質及びミネラルであってよい。糖類の例は、例えば、凍結乾燥を容易にするために組成物に加えられるラクトース、蔗糖、マンニトール、及びシクロデキストリンを含む。高分子の例は、澱粉、セルロースエーテル、セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸塩、カラギーナン、ヒアルロン酸及びその誘導体、ポリアクリル酸、ポリスルホン酸塩、ポリエチレングリコール／ポリエチレンオキシド、ポリエチレンオキシド／ポリプロピレンオキシド共重合体、異なる加水分解度のポリビニルアルコール／ポリビニルアセタート、及びポリビニルピロリドン、異なる分子量のすべてであり、それらは例えば、粘度調整のため、生体接着を実現するため、又は化学的及びタンパク質分解から脂質を保護するために組成物に加えられる。脂質の例は、脂肪酸、リン脂質、モノ、ジ、及びトリグリセリド、セラミド、スフィンゴ脂質及び糖脂質、異なるアシル鎖長及び飽和度のすべて、卵レシチン、大豆レシチン、水素化卵及び大豆レシチンであり、それらは高分子に対するのと同じ理由で組成物に加えられる。ミネラルの例は、タルク、酸化マグネシウム、酸化亜鉛及び酸化チタンであり、それらは脂質蓄積減少又は有益な色素特性などの利点を得るために組成物に加えられる。

40

【0098】

50

用語「希釈剤」は、医薬製剤中のペプチドを希釈する目的での水溶液又は非水溶液を意味することを目的とする。希釈剤は、1つ又はそれ以上の食塩水、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノール又はオイル（サフラワー油、トウモロコシ油、綿実油又はゴマ油）であってよい。

【0099】

希釈剤は又緩衝剤として機能する。用語「緩衝剤」は、pHを安定化する目的で酸－塩基混合物を含有する水溶液を意味することを目的とする。緩衝剤の例は、T r i z m a、B i c i n e、T r i c i n e、M O P S、M O P S O、M O B S、T r i s、H e p e s、H E P B S、M E S、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、グリコール酸塩、乳酸塩、ホウ酸塩、A C E S、A D A、酒石酸塩、A M P、A M P D、A M P S O、B E S、C A B S、カコジル酸塩、C H E S、D I P S O、E P P S、エタノールアミン、グリシン、H E P P S O、イミダゾール、イミダゾール酢酸、P I P E S、S S C、S S P E、P O P S O、T A P S、T A B S、T A P S O及びT E Sである。

10

【0100】

場合により、組成物は補助剤を含んでよい。用語「補助剤」は、ペプチドの生物学的作用を増加させるために製剤に加えられるいずれの化合物をも意味することを目的とする。補助剤は、異なるアニオン、例えば限定されるものではないが、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、チオシアナート、亜硫酸塩、水酸化物、リン酸塩、炭酸塩、乳酸塩、グリコール酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩、酒石酸塩、及び異なるアシル組成物の酢酸塩との、1つ又はそれ以上の亜鉛、銅又は銀塩であってよい。

20

【0101】

本発明の医薬組成物はまた、生分解性ミクロスフェアの形態であってよい。ポリ（乳酸）（P L A）、ポリ（グリコール酸）（P G A）などの脂肪族ポリエステル、P L A及びP G A（P L G A）又はポリ（カルプロラクトン）（poly(carpolactone)）（P C L）の共重合体、及びポリ酸無水物は、ミクロスフェアの製造において生分解性高分子として広く使用されている。そのようなミクロスフェアの調製はU S 5, 8 5 1, 4 5 1 及びE P 0 2 1 3 3 0 3に見出されることができる。

【0102】

本発明の医薬組成物はまた高分子ゲルの形態であってよく、ここでは、澱粉、セルロースエーテル、セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸塩、カラギーナン、ヒアルロン酸及びその誘導体、ポリアクリル酸、ポリスルホン酸塩などの高分子が含まれる。

30

【0103】

修飾オステオポンチンポリペプチドは、使用されている特定のポリペプチドの有効性／毒性に応じて、種々の濃度で製剤化され得る。好ましくは、組成物は、1 n Mと1 Mの間、例えば0. 1 μ Mと1 m Mの間、1 μ Mと1 0 0 μ Mの間、5 μ Mと5 0 μ Mの間、1 0 μ Mと5 0 μ Mの間、2 0 μ Mと4 0 μ Mの間、及び場合により約3 0 μ Mの濃度で修飾オステオポンチンポリペプチドを含む。エキソビボ及びインビトロ適用では、組成物は、例えば0. 0 0 2 5 μ Mと1 μ Mの間で、より低い濃度の修飾オステオポンチンポリペ

40

【0104】

当業者には当然ことながら、本発明の組成物は、種々の経路、例えば局所、経皮、非経口又は経口投与によって投与され得る。

【0105】

有利なこととして、本発明の組成物は、局所投与又は皮内投与に好適である。

【0106】

このように、本発明の組成物は、皮膚（例えば、頭皮）に局所投与され得る。例えば、組成物は、例えば、1つ又はそれ以上の下記：鉱油、流動パラフィン、白色ワセリン、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化ワック

50

ス及び水との混合物に懸濁又は溶解した活性ポリペプチドを含有する軟膏の形態で提供され得る。あるいは、ポリペプチドは、1つ又はそれ以上の下記：鉱油、ソルビタンモノステアレート、ポリエチレングリコール、流動パラフィン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール及び水との混合物に懸濁又は溶解した好適なローション剤又はクリーム剤として製剤化できる。

【0107】

場合により、局所投与のための組成物は、透過促進剤を含んでよい（例えば、Osborne & Henke, 1997, Pharmaceutical Technology, November: 58-82 and Pathan & Setty, 2009, Tropical Journal of Pharmaceutical Research 8 (2): 173-179に記載され、その開示は参照することにより本明細書に組み入れられる）。

10

【0108】

あるいは、本発明の組成物は非経口で、例えば皮内投与され得る。そのような組成物は、他の物質、例えば血液と等張の溶液を作るために十分な塩又はグルコースを含有し得る滅菌水溶液の形態で最もよく使用される。水溶液は、必要に応じて好適に緩衝化され得る（好ましくは3～9のpHに）。無菌状態下での好適な非経口製剤の調製は、当業者に周知の標準調剤技術によって容易に達成される。

【0109】

非経口投与に好適な組成物は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤を予定のレシピエントの血液と等張にする溶質；及び懸濁剤及び増粘剤を含んでよい水性及び非水性滅菌懸濁剤を含有し得る水性及び非水性滅菌注射液を含む。製剤は、1回用量又は複数回用量容器、例えば密封アンプル及びバイアル中にあり得て、そして使用直前に無菌液体担体、例えば注射用水の添加だけを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存し得る。即時注射液及び懸濁液は既述のような無菌散剤、顆粒剤及び錠剤から調製され得る。

20

【0110】

修飾オステオポンチンポリペプチドを送達するためのミクロスフェア製剤のような持続放出システムを使用するのは有利であり得る。

【0111】

あるいは、組成物は、活性ポリペプチドを所要の部位（即ち表皮）に直接放出する外科的埋込デバイスによって投与できる。

30

【0112】

本発明の組成物はまた経皮的方法によって送達され得る。

【0113】

例えば、エレクトロポレーション療法（EPT）及び／又はイオン泳動投与システムは、タンパク質及びポリペプチドの投与に用いられることができる。そのような方法では、デバイスはパルス電場を細胞に送達するのに使用され、薬物に対する細胞膜の透過性増加及び細胞内薬物送達の顕著な増強をもたらす。

【0114】

別の経皮的方法、電気取り込み（electroincorporation）は、エレクトロポレーションで使用されるのと同じ又は同様の皮膚経験電気パルスの表面で最大30ミクロンの径の小粒子を利用する。粒子は角質層を通してそして皮膚のより深い層へ推進される。粒子は薬物又は遺伝子を担持又は被覆されることができ、又は単にそれを通して薬物が入ることができる皮膚に孔を生成させる「弾丸」として作用できる。

40

【0115】

更なる経皮的方法も、PowderJect Pharmaceuticals（現在は Novartis AGがオーナー）によって開発されている。

【0116】

本発明のポリペプチド及び組成物の投与の好適な方法は当技術分野では周知であり、例えば、Therapeutic Protein and Peptide Formulation and Delivery, Zahra Shahrokh et al. (Eds), 1997, American Chemical Society, ISBN13: 9780841235281を参照された

50

い。

【0117】

本発明の第2の態様は、配列番号63、又は配列番号63のアミノ酸配列の発毛促進活性を保持するそのフラグメント、バリエーション、誘導体又は融合物（又は該フラグメント、バリエーション又は誘導体の融合物）のアミノ酸配列を含んでなる又はそれから成るポリペプチドを提供する。

【0118】

1つの実施態様では、ポリペプチドは単離される（例えば哺乳動物の体外で）。

【0119】

用語「フラグメント」、「バリエーション」、「誘導体」又は「融合物」は本発明の第1の態様に関連して上記のように定義される。

【0120】

関連態様では、ポリペプチドは、（RGDドメインの1つ又はそれ以上のアミノ酸の置換又は欠失により及び／又はRGDドメイン内の1つ又はそれ以上のアミノ酸の付加により）不活性化されるRGDドメインを含んでなるヒトオステオポンチンのフラグメントである。例えば、野生型ヒトオステオポンチンタンパク質の「R-G-D」ドメインの3つのアミノ酸は2つのアミノ酸、「D-I」によって置換され得る。好ましくは、フラグメントは、5と30のアミノ酸長間、例えば10と20のアミノ酸長間にある。

【0121】

例えば、ポリペプチドは、配列番号5～62のいずれか、又はそのフラグメント、バリエーション、誘導体又は融合物のアミノ酸配列を含み又はそれから成り得る。

【0122】

好ましい15-アミノ酸ペプチド

VDVPNG DISLAYGLR [「FOL-004」] 配列番号5
DVPNG DISLAYGLRS 配列番号6

好ましい14-アミノ酸ペプチド：

VDVPNG DISLAYGL 配列番号7 30
DVPNG DISLAYGLR 配列番号8
VPNG DISLAYGLRS 配列番号9

好ましい13-アミノ酸ペプチド：

VDVPNG DISLAYG 配列番号10
DVPNG DISLAYGL 配列番号11
VPNG DISLAYGLR 配列番号12
PNG DISLAYGLRS 配列番号13

好ましい12-アミノ酸ペプチド：

VDVPNG DISLAY 配列番号14
DVPNG DISLAYG 配列番号15
VPNG DISLAYGL 配列番号16
PNG DISLAYGLR 配列番号17
NG DISLAYGLRS 配列番号18

好ましい11-アミノ酸ペプチド：

VDVPNG DISLA 配列番号19 50

D V P N G D I S L A Y
V P N G D I S L A Y G
P N G D I S L A Y G L
N G D I S L A Y G L R
G D I S L A Y G L R S

配列番号 2 0
 配列番号 2 1
 配列番号 2 2
 配列番号 2 3
 配列番号 2 4

好ましい 10-アミノ酸ペプチド：

V D V P N G D I S L
D V P N G D I S L A
V P N G D I S L A Y
P N G D I S L A Y G
N G D I S L A Y G L
G D I S L A Y G L R
D I S L A Y G L R S

配列番号 2 5
 配列番号 2 6
 配列番号 2 7
 配列番号 2 8
 配列番号 2 9
 配列番号 3 0
 配列番号 3 1

10

好ましい 9-アミノ酸ペプチド：

V D V P N G D I S
D V P N G D I S L
V P N G D I S L A
P N G D I S L A Y
N G D I S L A Y G
G D I S L A Y G L
D I S L A Y G L R
I S L A Y G L R S

配列番号 3 2
 配列番号 3 3
 配列番号 3 4
 配列番号 3 5
 配列番号 3 6
 配列番号 3 7
 配列番号 3 8
 配列番号 3 9

20

好ましい 8-アミノ酸ペプチド：

V D V P N G D I
D V P N G D I S
V P N G D I S L
P N G D I S L A
N G D I S L A Y
G D I S L A Y G
D I S L A Y G L
I S L A Y G L R

配列番号 4 0
 配列番号 4 1
 配列番号 4 2
 配列番号 4 3
 配列番号 4 4
 配列番号 4 5
 配列番号 4 6
 配列番号 4 7

30

好ましい 7-アミノ酸ペプチド：

V D V P N G D
D V P N G D I
V P N G D I S
P N G D I S L
N G D I S L A
G D I S L A Y
D I S L A Y G
I S L A Y G L

配列番号 4 8
 配列番号 4 9
 配列番号 5 0
 配列番号 5 1
 配列番号 5 2
 配列番号 5 3
 配列番号 5 4
 配列番号 5 5

40

好ましい 6-アミノ酸ペプチド：

50

D V P N G <u>D</u>	配列番号 5 6
V P N G <u>D I</u>	配列番号 5 7
P N G <u>D I S</u>	配列番号 5 8
N G <u>D I S L</u>	配列番号 5 9
G <u>D I S L A</u>	配列番号 6 0
<u>D I S L A Y</u>	配列番号 6 1
<u>I S L A Y G</u>	配列番号 6 2

【0123】

好ましい実施態様では、ポリペプチドは配列番号5のアミノ酸配列を含み又はそれから成る。 10

【0124】

別の実施態様では、ポリペプチドは配列番号5のアミノ酸配列のバリエーションを含み又はそれから成る。

【0125】

例えば、ポリペプチドは、配列番号63～120のいずれか、又はそのフラグメント、バリエーション、誘導体又は融合物のアミノ酸配列を含み又はそれから成り得る。

【0126】

好ましい15-アミノ酸ペプチド：

20

V D T Y D G <u>D I S V V Y G L R</u>	配列番号 6 3
V D T Y D G <u>D I S V V Y G L S</u>	配列番号 6 4

好ましい14-アミノ酸ペプチド：

V D T Y D G <u>D I S V V Y G L</u>	配列番号 6 5
D T Y D G <u>D I S V V Y G L R</u>	配列番号 6 6
T Y D G <u>D I S V V Y G L R S</u>	配列番号 6 7

好ましい13-アミノ酸ペプチド：

30

V D T Y D G <u>D I S V V Y G</u>	配列番号 6 8
D T Y D G <u>D I S V V Y G L</u>	配列番号 6 9
T Y D G <u>D I S V V Y G L R</u>	配列番号 7 0
Y D G <u>D I S V V Y G L R S</u>	配列番号 7 1

好ましい12-アミノ酸ペプチド：

V D T Y D G <u>D I S V V Y</u>	配列番号 7 2
D T Y D G <u>D I S V V Y G</u>	配列番号 7 3
T Y D G <u>D I S V V Y G L</u>	配列番号 7 4
Y D G <u>D I S V V Y G L R</u>	配列番号 7 5
D G <u>D I S V V Y G L R S</u>	配列番号 7 6

40

好ましい11-アミノ酸ペプチド：

V D T Y D G <u>D I S V V</u>	配列番号 7 7
D T Y D G <u>D I S V V Y</u>	配列番号 7 8
T Y D G <u>D I S V V Y G</u>	配列番号 7 9
Y D G <u>D I S V V Y G L</u>	配列番号 8 0

50

D G D I S V V Y G L R
 G D I S V V Y G L R S

配列番号 8 1

配列番号 8 2

好ましい 10 - アミノ酸ペプチド :

V D T Y D G D I S V
 D T Y D G D I S V V
 T Y D G D I S V V Y
 Y D G D I S V V Y G
 D G D I S V V Y G L
 G D I S V V Y G L R
D I S V V Y G L R S

配列番号 8 3

配列番号 8 4

配列番号 8 5

配列番号 8 6

配列番号 8 7

10

配列番号 8 8

配列番号 8 9

好ましい 9 - アミノ酸ペプチド :

V D T Y D G D I S
 D T Y D G D I S V
 T Y D G D I S V V
 Y D G D I S V V Y
 D G D I S V V Y G
 G D I S V V Y G L
D I S V V Y G L R
I S V V Y G L R S

配列番号 9 0

配列番号 9 1

配列番号 9 2

配列番号 9 3

20

配列番号 9 4

配列番号 9 5

配列番号 9 6

配列番号 9 7

好ましい 8 - アミノ酸ペプチド :

V D T Y D G D I
 D T Y D G D I S
 T Y D G D I S V
 Y D G D I S V V
 D G D I S V V Y
 G D I S V V Y G
D I S V V Y G L
I S V V Y G L R

配列番号 9 8

配列番号 9 9

配列番号 1 0 0

30

配列番号 1 0 1

配列番号 1 0 2

配列番号 1 0 3

配列番号 1 0 4

配列番号 1 0 5

好ましい 7 - アミノ酸ペプチド :

V D T Y D G D
 D T Y D G D I
 T Y D G D I S
 Y D G D I S V
 D G D I S V V
 G D I S V V Y
D I S V V Y G
I S V V Y G L

配列番号 1 0 6

配列番号 1 0 7

40

配列番号 1 0 8

配列番号 1 0 9

配列番号 1 1 0

配列番号 1 1 1

配列番号 1 1 2

配列番号 1 1 3

好ましい 6 - アミノ酸ペプチド :

D T Y D G D

配列番号 1 1 4

50

T Y D G D I

配列番号 1 1 5

Y D G D I S

配列番号 1 1 6

D G D I S V

配列番号 1 1 7

G D I S V V

配列番号 1 1 8

D I S V V Y

配列番号 1 1 9

I S V V Y G

配列番号 1 2 0

【0127】

好ましい実施態様では、ポリペプチドは配列番号 63 のアミノ酸配列を含み又はそれから成る。

【0128】

10

本発明のポリペプチドは、脱毛（下記に詳述）に関連する疾患又は病態の処置又は予防において医療用であり得る。

【0129】

本発明は更に、哺乳動物における発毛を促進するための本発明のポリペプチドの使用を提供し、ここでその使用は化粧品用又は商業用である（下記に詳述）。

【0130】

本発明の第3の態様は、哺乳動物の発毛促進に用いるための本発明の第1の態様による組成物を提供する。

【0131】

このように、組成物は、現存する毛包を刺激し及び／又は新しい毛包（又はそれを産生するための幹細胞）の成長を誘導するのに用いられ得る。

20

【0132】

1つの実施態様では、組成物は、脱毛症のような脱毛に関連する疾患又は病態の処置又は予防に用いるためである。

【0133】

脱毛症は通常、成長期毛の喪失に関連する。しかしながら、当然のことながら、本発明の組成物はまた、休止期毛の喪失に関連する病態の処置に使用され得る。

【0134】

1つの実施態様では、脱毛症は：

(a) 男性ホルモン性脱毛症（アンドロゲン性脱毛症、男性型禿頭症又は女性型禿頭症としても知られる）；

30

(b) 牽引性脱毛症；

(c) アナゲン脱毛 (anagen effluvium) ；

(d) テロゲン脱毛 (telogen effluvium) ；

(e) 円形脱毛症；

(f) 完全脱毛症；

(g) 全身性脱毛症；

(h) 脱毛性毛瘡 (alopecia barbae) ；

(i) ムチン性脱毛症；

(j) 腫瘍性脱毛症；

40

(k) 瘢痕性脱毛症 (cicatricial alopecia) ；及び

(l) 瘢痕性脱毛症 (scarring alopecia) ；

から成る群から選択される。

【0135】

例えば、脱毛症は男性ホルモン性脱毛症であってよい。

【0136】

あるいは、脱毛症はアナゲン脱毛であってよい。休止期段階への毛髪の早期発現から発生するこの病態は、摂食障害、発熱、出産、慢性疾患、大手術、貧血、重度感情障害、急激なダイエット、甲状腺機能低下症、及び薬物を含む種々の原因に因ると考えられる。

【0137】

50

このように、1つの実施態様では、脱毛は放射線療法及び／又は化学療法剤によって誘発される。例えば、脱毛はシスプラチン、エトポシド及びパクリタキセルなどの化学療法薬による処置の一般的及び窮迫的副作用である。

【0138】

都合のいいことに、哺乳動物はヒトである。

【0139】

関連した、本発明の第4の態様は、哺乳動物の発毛を促進するための薬剤の調製における本発明の第1の態様に関連して上記に記載の修飾オステオポンチンポリペプチドの使用を提供する。

【0140】

このように、薬剤は、現存する毛包を刺激し及び／又は新しい毛包（又はそれを産生するための幹細胞）の成長を誘導するためであり得る。

【0141】

1つの実施態様では、薬剤は、脱毛症（例えばアナゲン脱毛に伴う）のような脱毛に伴う疾患又は病態の処置又は予防用である。

【0142】

1つの実施態様では、脱毛症は：

（a）男性ホルモン性脱毛症（アンドロゲン性脱毛症、男性型禿頭症又は女性型禿頭症としても知られる）；

（b）牽引性脱毛症；

（c）アナゲン脱毛；

（d）テロゲン脱毛；

（e）円形脱毛症；

（f）完全脱毛症；

（g）全身性脱毛症；

（h）脱毛性毛瘡；

（i）ムチン性脱毛症；

（j）腫瘍性脱毛症；

（k）瘢痕性脱毛症；及び

（l）瘢痕性脱毛症；

から成る群から選択される。

【0143】

例えば、脱毛症は、男性ホルモン性脱毛症であってよい。

【0144】

あるいは、脱毛症は、例えば放射線療法及び／又は化学療法剤によって誘発されるアナゲン脱毛であってよい（上記参照）。

【0145】

都合のいいことに、哺乳動物はヒトである。

【0146】

関連した、本発明の第5の態様は、本発明の第4の態様に関連して上記の修飾オステオポンチンポリペプチドの有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物の発毛を促進するための方法を提供する。

【0147】

このように、方法は、現存する毛包を刺激し及び／又は新しい毛包（又はそれを産生するための幹細胞）の成長を誘導するためであり得る。

【0148】

本発明のポリペプチド組成物は有効量を患者に投与される。本明細書に記載の「治療的有效量」、又は「有効量」、又は「治療的有效」は、発毛促進効果をもたらす量をいう。これは、所望の治療効果をもたらすために計算された活性物質の所定の量である。当業者には当然なことながら、化合物の量はその特異活性に応じて変動し得る。好適な投薬量は

10

20

30

40

50

、所要の希釈剤と関連して所望の治療効果をもたらすために計算された活性組成物の所定の量を含有し得る。本発明の組成物の製造の方法と使用では、治療的有效量の活性成分が提供される。治療的有效量は、当技術分野で周知の、年齢、体重、性別、病態、合併症、他の疾患などのような患者特性に基づいて、通常の技量を持つ医学又は獣医学従事者によって決定できる。

【0149】

1つの実施態様では、方法は、脱毛症（例えば成長期毛の喪失に関連する）のような脱毛に関連する疾患又は病態の処置又は予防のためである。

【0150】

1つの実施態様では、脱毛症は：

10

（a）男性ホルモン性脱毛症（アンドロゲン性脱毛症、男性型禿頭症又は女性型禿頭症としても知られる）；

（b）牽引性脱毛症；

（c）アナゲン脱毛；

（d）テロゲン脱毛；

（e）円形脱毛症；

（f）完全脱毛症；

（g）全身性脱毛症；

（h）脱毛性毛瘡；

（i）ムチン性脱毛症；

20

（j）腫瘍性脱毛症；

（k）瘢痕性脱毛症；及び

（l）瘢痕性脱毛症；

からなる群から選択される。

【0151】

例えば、脱毛症は、男性ホルモン性脱毛症であってよい。

【0152】

あるいは、脱毛症は、例えば放射線療法及び／又は化学療法によって誘発されるアナゲン脱毛であってよい（上記参照）。

【0153】

30

都合のいいことに、哺乳動物はヒトである。

【0154】

当業者には当然なことながら、本発明の第1態様の組成物はまた、限定されるものではないが、しかし化粧剤としても使用され得る（それらは、そのように、いずれの身体的健康改善をもたらさず、しかしただ哺乳動物に美的利益をもたらすという意味において）。

【0155】

このように、本発明の第6の態様は、哺乳動物の発毛を促進するための本発明の第1態様による組成物の使用を提供し、ここで使用は化粧用途である。

【0156】

このように、化粧品組成物は、現存する毛包を刺激し及び／又は新しい毛包（又はそれを産生するための幹細胞）の成長を誘導するためであり得る。

40

【0157】

1つの実施態様では、化粧品組成物は、後退している生え際（receding hairline）及び／又は薄くなっている生え際（thinning hairline）に関連する、禿頭症の処置又は予防に使用される。

【0158】

そのような組成物は、頭皮に使用するためだけではなく、体の他所（髭、睫毛、眉毛などの成長を促進するための顔への適用を含む）に適用され得る。

【0159】

都合のいいことに、哺乳動物はヒトである。

50

【0160】

当業者には当然なことながら、本発明の組成物は単独で又は治療薬又は化粧剤と併用で使用され得る。例えば、本発明の組成物は、既存毛髪の脱毛を阻止するため及び／又は新しい発毛を促進するために、既存治療法、例えばミノキシジル (Regaine RTM., Pharmacia Corp.) 及びジアゾキシドのようなカリウムチャンネル開口薬；フィナステリド (Propecia RTM., Merck & Co.) のような5 α -レダクターゼ阻害剤；及び免疫抑制薬シクロスポリンAとの併用で使用され得る。

【0161】

更に当業者には当然なことながら、本発明の組成物はインビボ、エキソビボ又はインビトロで使用され得る。

10

【0162】

このように、哺乳動物に直接適用又は投与されることに加えて、組成物は、エキソビボで、例えば哺乳動物へ移植より前にて皮膚外植片における発毛促進に使用され得る。

【0163】

あるいは、組成物はインビトロで、例えば細胞培養においてエキソビボで毛包を成長させるのに使用され得て、次いで患者に移植され得る。

【0164】

従って、本発明の更なる態様は、インビトロ又はエキソビボで発毛を促進するための本発明の第1の態様によるポリペプチドの使用を提供する。

【0165】

20

1つの実施態様では、ポリペプチドは毛包（又はその幹細胞前駆体）の成長を促進するために使用される。

【0166】

本発明の尚更なる態様は、本発明の第1の態様により組成物を作製する方法を提供し、その方法は、RGDドメインは薬学的に許容される及び／又は化粧品的に許容される添加剤、担体又は希釈剤で不活性化される、修飾オステオポンチンポリペプチドを混和することを含む。

【0167】

本発明のある態様を具体化する好ましい非限定的実施例がここで下記の図面を参照して記載され得る：

30

【図面の簡単な説明】

【0168】

【図1】マウス皮膚のサンプリング領域の配置図を示す。

【図2】修飾オステオポンチンポリペプチドで処置した48時間後のマウスの皮膚断面の代表写真である。表皮内の卵胞が矢印で示される。卵胞の線密度は18.3卵胞/mm (32.65mmの表皮中598卵胞)であった。

【図3】陰性対照組成物で処置した48時間後のマウスの皮膚断面の代表写真である。表皮内の毛包が矢印で示される。毛包の線密度は11.7毛包/mm (32.50mmの表皮中379毛包)であった。

【図4A】0の発毛スコアを有する14日目の対照処置動物の代表写真を示す。

40

【図4B】1.5の発毛スコアを有する14日目の例示的「完全長」ポリペプチド「Cx」（配列番号1に対応ししかし初期の16番目のアミノ酸シグナルペプチドなし、60nM）で処置した動物の代表写真を示す。

【図4C】2.5の発毛スコアを有する5日目に例示的短縮ペプチド「FOL-004」（配列番号5、60nM）で処置した動物の代表写真を示す。

【図4D】2.0の発毛スコアを有する5日目に例示的短縮ペプチド「FOL-005」（配列番号5、63nM）で処置した動物の代表写真を示す。

【図5】発毛に対する本発明の例示的「完全長」ポリペプチド「Cx」及びポリペプチド配列番号5及び63の効果を示す。

【図6】野生型マウスオステオポンチンからの対応するポリペプチド配列番号121と比

50

べた、発毛に対する例示的ポリペプチド配列番号5の効果を示す。

【実施例】

【0169】

〔実施例A〕マウスにおける変異マウスオステオポンチンの発毛効果のインビボ研究
材料及び方法

試験ポリペプチドの症出及び産生

修飾オステオポンチンポリペプチド配列番号1は、XhoI及びBamHI制限酵素部位の使用によりpCEP4発現ベクターへクローニングした。pCEP4発現ベクターは、細菌に発現のためにアンピシリン耐性遺伝子を、そして真核EBNA細胞に発現のためにヒグロマイシン耐性遺伝子を含有した。ベクターを含有するポリペプチドをコンピテン

10

【0170】

試験ポリペプチドの単離

産生ポリペプチドを含有するEBNA細胞培養からの培地を培養の3～4日後に回収した。pCEP4プラスミドによって産生したポリペプチドは、Ni-セファロースゲルクロマトグラフィー（Invitrogen）による分離を容易にするのに使用される、挿入Hisタグを含有した。回収培地を結合緩衝液（20mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、pH7.8）で希釈し、Ni-セファロース懸濁液を4℃で一夜シェーカーに

20

【0171】

全般研究デザイン

研究は4実験群から成り、各々5匹の雄C57BL/6Nマウスを含んだ。

【0172】

1日目に全関与マウスの首を約1.5x1.0cm平方に慎重に剃毛して、そして小さい残ったヘアピースを除去した。次の日（0日）に、各動物は、剃毛した長方形内の離れた位置（各々約1.5x0.5cm）で各々25μlの4回皮内注射を受けた（図1参照）。

30

【0173】

各動物は、配列番号1の例示的修飾オステオポンチンポリペプチドを含んでなる組成物（「試験ポリペプチド」又は「Cx」、PBS中60nmol/l）の25μlの2回注射を、そして25μlのPBS（表1に示したスキームによる）の2回の陰性対照注射を受けた。

【0174】

【表 1】

表 1 研究デザイン

群		皮内適用		動物数
		容量	適用後のタイムスケジュール	
1	試験 ポリペプチド + PBS	25 μ l	24 h 後剖検（1 日）	5
2	試験 ポリペプチド + PBS	25 μ l	48 h 後剖検（2 日）	5
3	試験 ポリペプチド + PBS	25 μ l	96 h 後剖検（4 日）	5
4	試験 ポリペプチド + PBS	25 μ l	336 h 後剖検（14 日）	5

【0175】

処置群 1～4 の動物は、化合物適用後それぞれ 24 h (群 1)、48 h (群 2)、96 h (群 3) 及び 336 h (14 日、群 4) に犠牲にした。

【0176】

全例で、首のマークした皮膚領域を除き、そして以下のように処理した：ポリペプチド処置皮膚サンプルの 1 つ及び PBS 処置対照皮膚サンプルの 1 つは 4 % パラホルムアルデヒド中で固定し、そしてその後パラフィン包埋した。2 つの他の皮膚サンプル (ポリペプチド処置及び PBS 処置) は液体窒素中でスナップ凍結しそして約 -80°C に保存した。

【0177】

パラフィン包埋切片のヘマトキシリン染色を行った。

【0178】

動物

理論的根拠

研究の目的で受け入れられた試験系

マウス株

雄 w t C 5 7 B L / 6 N

供給元

Charles River GmbH

Sandhofer Weg 7

D 97633 Sulzfeld

動物の総数

20

受入時の年齢

5 - 6 週

体重及び範囲

約 30 g

(順化時)

識別

耳標による標識化

順化

2 月 17 日～3 月 1 日、2011

【0179】

飼育 (Husbandry)

条件

最適衛生条件、10 - 15 回の換気 / h による空調、そして温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 及び相対湿度 30 - 70 % の目標範囲で環境の連続的モニタリング、12 h の人工蛍光灯 / 12 h 暗中

収容

最大 3 動物 / ケージ

飼料

M-Zucht ssniff Spezialdiäten GmbH

Ferdinand Gabriel Weg 16
D-59494 Soest
市中水道水

水

【0180】

試験ポリペプチド

識別 配列番号1の修飾オステオポンチンポリペプチド
保存条件 4℃でH e p e s緩衝液中保存
安全注意事項 摂取防止、吸入防止、手袋及び皮膚マスク着用、皮膚接触
後の石鹼及び水洗浄；特別な注意事項なし
サンプル調製 受入原液は注射前に60nM実働溶液を得るためにPBS 10
で15xに希釈した

【0181】

媒体 (vehicle)

同一性 PBS pH 7.4

【0182】

処置

投与経路： 皮内
投与頻度 0日目に単回適用
投薬量 25 µl

【0183】

観察

下記のパラメータを記録した：

生存／死亡 毎日
臨床的徴候 毎日

【0184】

群1のパラフィン包埋切片のヘマトキシリン染色用プロトコル

1. キシレン浴5分
 2. キシレン浴5分
 3. EtOH 100%浴5分
 4. EtOH 95%浴5分 30
 5. EtOH 70%浴5分
 6. PBS浴5分
 7. ヘマトキシリン浴約20秒 (Harrys ヘマトキシリン) a), b)
 8. 水浴3回3分
 9. EtOH 70%浴5分
 10. EtOH 95%浴5分
 11. EtOH 100%浴5分
 12. キシレン浴5分
 13. キシレン浴5分
 14. Permount及びカバースリップを用いたマウントスライド。 40
- a) 時間は使用したヘマトキシリンのタイプによって決まり、20秒～10分（試験スライドの使用によって決定することができる）
b) 使用前に濾過する

【0185】

結果

毛包密度に対する修飾オステオポンチンポリペプチド（配列番号1）による処置の効果は、下記の表1（a）及び（b）にまとめた。

【0186】

【表 2】

表 1 (a) ポリペプチド処置動物

ポリペプチド処置 スライド 1	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	18	0.90
エリア a2	21	0.90
エリア a3	25	0.95
エリア b1	13	0.90
エリア b2	21	0.90
エリア b3	26	0.95
合計	124	5.50

10

ポリペプチド処置 スライド 2	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	16	0.90
エリア a2	18	0.90
エリア a3	25	0.95
エリア b1	14	0.90
エリア b2	18	0.90
エリア b3	19	0.95
合計	110	5.50

20

ポリペプチド処置 スライド 3	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	18	0.90
エリア a2	13	0.90
エリア a3	19	0.95
エリア b1	20	0.90
エリア b2	17	0.90
エリア b3	14	0.90
合計	101	5.45

30

ポリペプチド処置 スライド 4	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	18	0.90
エリア a2	17	0.90
エリア a a3	15	0.90
エリア b1	18	0.90
エリア b2	17	0.90
エリア b3	13	0.90
合計	98	5.40

40

【0187】

【表 3】

表 1 (a) 続き

ポリペプチド処置 スライド 5	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	13	0.90
エリア a2	10	0.90
エリア a3	21	0.90
エリア b1	12	0.90
エリア b2	10	0.90
エリア b3	16	0.90
合計	82	5.40

10

ポリペプチド処置 スライド 6	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	18	0.90
エリア a2	10	0.90
エリア a3	10	0.90
エリア b1	18	0.90
エリア b2	17	0.90
エリア b3	10	0.90
合計	83	5.40

20

ポリペプチド処置 スライド 7	毛包数	表皮長, mm
スライド 34	124	5.50
スライド 38	110	5.50
スライド 42	101	5.45
スライド 46	98	5.40
スライド 50	82	5.40
スライド 54	83	5.40
総計	598	32.65

30

【 0 1 8 8 】

【表 4】

表 1 (b) 対照処置動物

対照処置 スライド 1	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	9	0.90
エリア a2	17	0.90
エリア a3	7	0.90
エリア b1	11	0.90
エリア b2	14	0.95
エリア b3	10	0.90
合計	68	5.45

10

対照処置 スライド 2	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	12	0.90
エリア a2	17	0.90
エリア a3	7	0.90
エリア b1	12	0.90
エリア b2	13	0.90
エリア b3	10	0.90
合計	71	5.40

20

対照処置 スライド 3	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	8	0.90
エリア a2	7	0.90
エリア a3	11	0.90
エリア b1	19	0.95
エリア b2	8	0.90
エリア b3	14	0.90
合計	67	5.45

30

対照処置 スライド 4	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	21	0.90
エリア a2	5	0.90
エリア a3	2	0.90
エリア b1	16	0.90
エリア b2	11	0.90
エリア b3	3	0.90
合計	58	5.40

40

【 0 1 8 9 】

【表 5】

表 1 (b) 続き

対照処置 スライド 5	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	13	0.90
エリア a2	2	0.90
エリア a3	9	0.90
エリア b1	12	0.90
エリア b2	7	0.90
エリア b3	15	0.90
合計	58	5.40

対照処置 スライド 6	毛包数	表皮長, mm
エリア a1	7	0.90
エリア a2	11	0.90
エリア a3	10	0.90
エリア b1	6	0.90
エリア b2	8	0.90
エリア b3	15	0.90
合計	57	5.40

対照処置 スライド 7	毛包数	表皮長, mm
スライド 18	68	5.45
スライド 22	71	5.40
スライド 26	67	5.45
スライド 34	58	5.40
スライド 38	58	5.40
スライド 42	57	5.40
総計	379	32.50

【0190】

結果の要約を下記の表 2 に示す。

【表 6】

表 2

	分析卵胞数	卵胞数/mm
配列番号 1 で処置	356	18.3
対照群	356	11.7

【0191】

処置及び対照動物中で卵胞を示す代表的組織切片を図 2 及び 3 に示す。

【0192】

比較によって、野生型マウスのオステオポンチンは発毛に対して検出可能な効果を持たないことが認められた（データは示されず）。

【0193】

結論

データは、配列番号1の例示的修飾オステオポンチンポリペプチドが、約60%毛包数/mm表皮を増加させることを示す。

【0194】

これらの所見は、発毛促進における本発明のオステオポンチン様ポリペプチドの有用性を確認するものである。

【0195】

〔実施例B〕マウスにおける配列番号5及び3の発毛効果のインビボ研究
材料及び方法

動物

マウス（C57BL/6）は6～8週齢で使用した。

【0196】

研究デザインの総括

- ・発毛の休止期段階における動物の選択。
- ・動物の背部部のクリッピング
- ・試験ペプチド／媒体の皮下注射
- ・視覚分析：百分率成長期誘導；平均発毛スコア；視覚メラニン形成；
- ・組織学的解析：皮下組織における卵胞数；皮膚厚み用の形態計測。

【0197】

処置群

- ・動物をランダムに処置群に割り付けた（表3参照）

【表7】

表3

処置	動物数	用量	容量
“Cx”	5	60 nM	25 µl
“FOL-004” (= 配列番号:5)	5	60 nM	25 µl
“FOL-005” (=配列番号:63)	5	60 nM	25 µl
媒体対照	5	-	25 µl

- ・動物に1、5及び9日目に規定の処置を投与した
- ・処置は背部クリップ皮膚へ皮下注射によって投与した

【0198】

採点基準

- ・処置効果は表4の基準に従って毎日観察しそしてスコア化した

【表 8】

表 4

背部皮膚の観察	発毛スコア
無発毛, ピンク色皮膚	0
目視発毛のないピンク色から灰色までの皮膚色変化	0.5
成長期の発現を示す、目視発毛のないピンク色から灰色又は黒色までの皮膚色変化	1
薄い発毛	1.5
拡散性短い発毛	2
中等度発毛	2.5
高密度、正常コートヘア	3

10

20

【0199】

結果

発毛に対する本発明の例示的ポリペプチドの効果を表5に示す。

【0200】

【表 9】

表 5

動物	日											
	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
(A) 媒体 (対照)												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
5	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1	NA	NA
平均	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	-	-
(B) “Cx” (配列番号 1－初期の 16 アミノ酸シグナルペプチド)												
1	0	0	0	1	1.5	2	2.5	3	3	3	NA	NA
2	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	NA	NA
3	0	0	0	0.5	0.5	0.5	1	1.5	1.5	1.5	NA	NA
4	0	0	0	0.5	0.5	0.5	1	1.5	1.5	1.5	NA	NA
5	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1.5	2	NA	NA
平均	0.0	0.0	0.0	0.5	0.6	0.7	1.1	1.6	1.7	1.8	-	-
(C) FOL-004 (配列番号 5)												
1	0	0	0.5	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2.5	3
2	0	0	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3	3	3
3	0	0	2.5	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3	3
4	0	0	1.5	2.5	3	3	3	3	3	3	3	3
5	0	0	1.5	2	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3
平均	0.0	0.0	1.7	2.1	2.4	2.5	2.6	2.7	2.7	2.7	2.9	3.0

【 0 2 0 1 】

【表 10】

動物	日											
	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
(D) FOL-005 (配列番号 63)												
1	0	0	2	2.5	3	3	3	3	3	3	3	3
2	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3	0	0	0.5	0.5	1	1	1.5	2.5	2.5	2.5	3	3
4	0	0	2	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3	3
5	0	0	0	0	0	0.5	1	2	2.5	2.5	3	3
平均	0.0	0.0	1.3	1.7	1.9	2.1	2.3	2.7	2.8	2.8	3.0	3.0

【0202】

図4は、(a) 0の発毛スコアを有する14日目での対照処置動物、(b) 1.5の発毛スコアを有する14日目に例示的「完全長」ポリペプチド「Cx」(配列番号1、60 nM)で処置した動物、(c) 2.5の発毛スコアを有する5日目に例示的短ペプチド「FOL-004」(配列番号5、60 nM)で処置した動物及び(d) 2.0の発毛スコアを有する5日目に例示的短ペプチド「FOL-005」(配列番号5、63 nM)で処置した動物の代表的写真を示す。

【0203】

結果は図5にまとめた。

【0204】

例示的ポリペプチドのFOL-004(配列番号5)及びFOL-005(配列番号63)の両方は迅速な発毛を誘導したが、それは5日から顕著でありそして評価期間(16日)の終了まで持続した。

【0205】

本発明の「完全長」ポリペプチド、「Cx」はまた、FOL-004(配列番号5)又はFOL-005(配列番号63)よりも遅い発現ではあるが顕著な発毛を誘導した。

【0206】

媒体対照で処置した動物は実験期間中発毛徴候をほとんど示さなかった。

【0207】

試験したどのポリペプチドも、動物にいずれの副作用ももたらさなかった(いずれの体重減少及びその他目に見える有害徴候なし)。

【0208】

結論

試験した変異オステオポンチンポリペプチドはすべてインビボで顕著な発毛効果を示して、より短い例示的ポリペプチドFOL-004(配列番号5)及びFOL-005(配列番号63)は特に速い作用発現を示した。

【0209】

〔実施例C〕配列番号5と同等の野生型オステオポンチンフラグメントのマウスにおける発毛効果のインビボ研究

材料及び方法

実施例 B に記載の上記の、動物は、表 6 に記載したように処置した：
【表 1 1】

表 6

処置	動物数	用量	容量
“FOL-001”* (= 配列番号 1 2 1)	6	60 nM	25 μ l

【0 2 1 0】

10

* 「FOL-001」は下記のアミノ酸配列から成る：

VDVPNGRGDSLAYGLR [配列番号 1 2 1]

【0 2 1 1】

この配列は野生型マウスオステオポンチンのフラグメントであり、そして「FOL-004」が由来するタンパク質の領域に対応する（即ち「FOL-004」は野生型フラグメント「FOL-001」の変異バージョンである）。

- ・動物に 1、5 及び 9 日目に規定の処置を投与した
- ・処置は背部クリップ皮膚へ皮下注射によって投与した

【0 2 1 2】

採点基準

20

- ・処置効果は実施例 B に記載のように毎日観察しそしてスコア化した。

【0 2 1 3】

結果

発毛に対するポリペプチド「FOL-001」の効果は表 7 及び図 6 に示す。

【0 2 1 4】

【表 1 2】

表 7

動物	日											
	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
FOL-001 (配列番号 121, 60nM)												
1	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	1	2	2	2.5	2.5	NA
2	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	1	2	2	2.5	2.5	NA
3	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1	1	1	NA
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA
5	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1	1	1	NA
6	0	0	0	0	0	0	0.5	1	1	1	1	NA
平均	0	0	0.17	0.17	0.17	0.17	0.58	1.17	1.17	1.33	1.33	-

【0 2 1 5】

ペプチド F O L - 0 0 4 (配列番号 1 2 1) はマウスにおいて遅効性であるが検出可能な発毛効果をもたらし、約 9 日で顕著となり、そして約 1 . 3 のスコアでプラトーに達した。

【0 2 1 6】

結論

本発明の対応の変異ペプチド配列 (F O L - 0 0 4 ; 配列番号 5) と比べて、同等の非変異野生型配列は F O L - 0 0 4 で認められたものの 5 0 % 未満の最大効果で発毛促進の遅延発現を呈した。

【0 2 1 7】

このように、例示的ポリペプチドは同等の非変異野生型配列よりもはるかに大きい効果を示した。

【0 2 1 8】

〔実施例 D〕剥離皮膚における成長期誘導のインビボ研究
材料及び方法

動物及び処置は実施例 B で上記に記載の通りであった。

すべての動物は 1 6 日目に犠牲にした。

【0 2 1 9】

メラニン形成の観察

実施例 B での発毛評価期間の完了後、動物を安楽死させ、そして内面の観察のために背部皮膚を剥離しそして除いた。

【0 2 2 0】

組織学的解析

剥離皮膚切片を実施例 A に記載のように組織学的解析のために調製した。皮下組織にお

10

20

30

40

50

ける卵胞数及び次いで皮膚厚みを測定した。

【0221】

結果

結果を下記の表8及び9にまとめた。

【0222】

【表13】

表8
メラニン形成の観察

群	皮膚色 (外表)	%成長期 誘導*	剥離皮膚中 の黒色度 (16日)	%成長期 誘導**	発毛を示す 動物数
Cx (60nM)	黒色 (5/5 動物)	100	3/5	60	5/5
FOL-004 (60nM)	黒色 (5/5 動物)	100	1/5	20	5/5
FOL-005 (60nM)	黒色 (5/5 動物)	100	3/5	60	5/5
媒体	ピンク色 (4/5 動物)	20	1/5	20	1/5

* ピンク色から黒色までの外表皮膚色変化について

** 剥離皮膚の黒色について

【0223】

【表14】

表9 a (全動物)

群	検討した動物数	平均 ± sem	
		皮下組織中の卵胞数 (個数)	皮膚厚み
Cx (60nM)	5	22.20 ± 10.69	308.8 ± 21.94
FOL-004 (60nM)	5	6.20 ± 5.80	312.2 ± 15.60
FOL-005 (60nM)	5	34.80 ± 14.58	348.80 ± 40.05
媒体	4*	0 ± 0	246.5 ± 8.35

* 動物番号5は有意な異常値 ($p < 0.05$, Grubb's 検定) であることが分かり、
それ故解析において無視した

【0224】

【表 15】

表 9 b (成長期だけの動物)

群	検討した動物数	平均 $\pm$ sem	
		皮下組織中の卵胞数 (個数)	皮膚厚み
Cx (60nM)	3/5	36.67 $\pm$ 10.69	308.8 $\pm$ 21.94
FOL-004 (60nM)	1/5	29 $\pm$ 5.8	312.2 $\pm$ 15.60
FOL-005 (60nM)	3/5	58 $\pm$ 14.58	348.80 $\pm$ 40.05
媒体	0/4*	0 $\pm$ 0	246.5 $\pm$ 8.35

10

【0225】

発毛サイクルは3相から成る：休止期段階（C57BL/6皮膚は淡いピンク色）、活性発毛成長期（ここでは皮膚は暗灰色又は黒色になる）、そして最後に退行期（ここでは発毛は停止し、そして皮膚は休止期段階へ逆移行し、淡いピンク色に戻る）。

20

【0226】

本研究では、動物はピンク色皮膚に事前選択され（休止期段階）、そして試験ポリペプチドを皮下／局所経路で投与した。優れた発毛促進剤は休止期段階から活性退行期への移行をトリガーし、そしてその結果明るい皮膚から暗い皮膚へ移行した。この暗色色素沈着は、成長期中の新しい発毛に備えて、毛包中へのメラニンの堆積から生じると考えられる。毛包メラノサイトのメラニン合成は成長期と厳密に連結し、退行期中に中止し、そして休止期段階にはなくなった。それ故、優れた発毛促進剤は背部皮膚の黒化をもたらした。終了時点で、動物の背部皮膚を次いで剥離することにより切除しそして剥離皮膚を反転し、そして視覚性暗黒化によって示されるメラニン形成の誘導を観察した。組織学的解析は卵胞数及び皮膚厚みを示した。優れた発毛促進剤は皮下組織中の卵胞数及び皮膚厚みを増加させた。

30

【0227】

本研究では、3つの試験ポリペプチドはすべて、3回の皮下注射後に高密度発毛の出現をもたらした（上記の実施例B参照）。毛髪の完全成長後幾らかの動物では、皮膚色は退行期に特徴的に黒色から灰色へそしてピンク色へ変化した。研究で採取した剥離皮膚は、メラニン細胞抑制に因る発毛サイクルの成長期（活性期）を示す、黒色パッチを示した。これらの動物において、組織学的結果は、多数の毛包及び皮膚厚みの増加を示した。しかし退行期が生じた場合に、幾らかの動物では、被毛状態がインタクトでも、剥離皮膚はピンク色であることが認められた。このように、そのような剥離皮膚断片の解析は、皮下組織における卵胞の欠損を、しかし尚皮膚厚みの相当な増加を実証した。

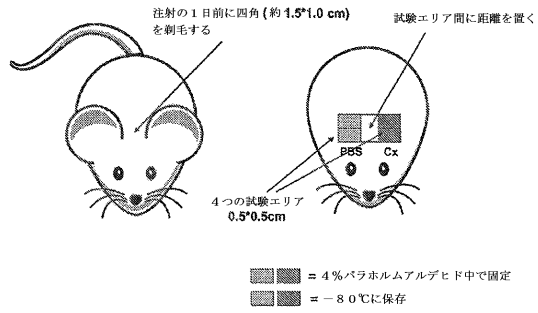
40

【0228】

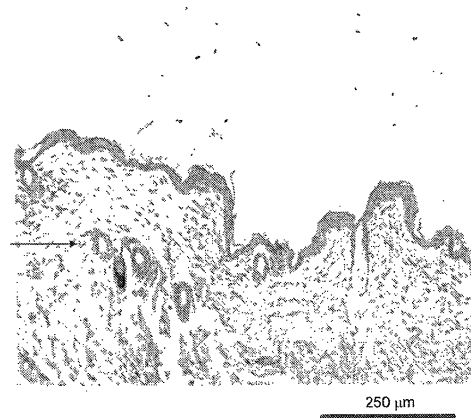
結論

本発明の例示的変異オステオポンチンポリペプチドは、皮下組織における毛包数の増加及び／又は皮膚厚みの増強からも明らかなように、成長期の顕著な誘導を示した。

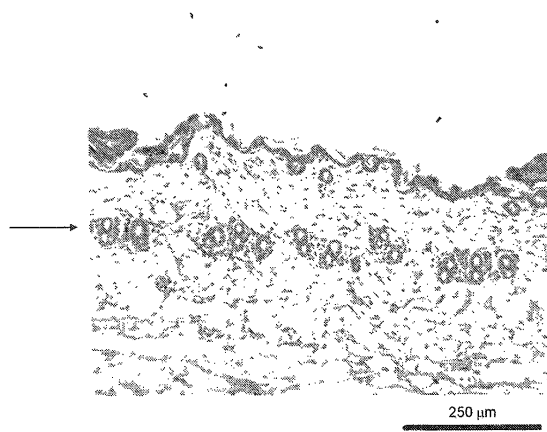
【図 1】



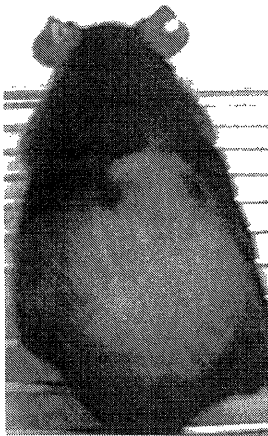
【図 3】



【図 2】



【図 4 A】



【図 4 B】



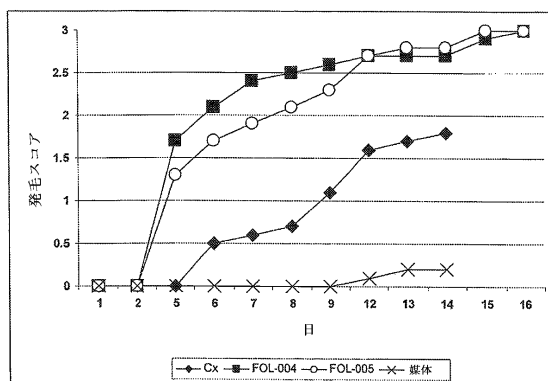
【図 4 C】



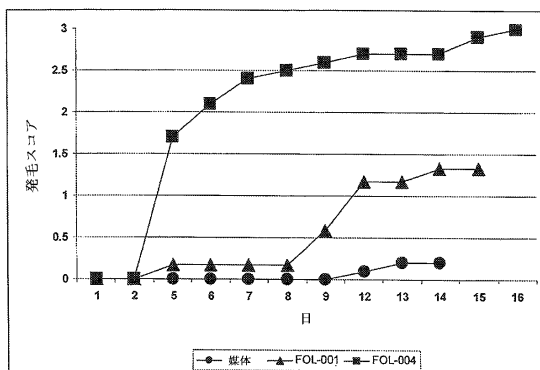
【図 4 D】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0006049718000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 17/14 (2006.01) A 6 1 P 17/14
A 6 1 P 5/26 (2006.01) A 6 1 P 5/26

(72)発明者 ポントゥス・ドゥネール
スウェーデン国エスー２２７ ６２ルンド．オステンウンデンスガータ３５
(72)発明者 アンナ・フルトゴード・ニルソン
スウェーデン国エスー２４７ ９９ジェンナルプ．トッペルアデュゴード３３１

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 DA-WEN YU, THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, 英国, 2001年12月 1日, V11
7 N6, P1554-1558

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 38/00
A 6 1 K 8/64
A 6 1 P 5/26
A 6 1 P 17/14
A 6 1 Q 7/00
C 0 7 K 7/08
C 0 7 K 14/47
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)