

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6461977号
(P6461977)

(45) 発行日 平成31年1月30日(2019.1.30)

(24) 登録日 平成31年1月11日(2019.1.11)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 38/06	(2006.01)
A 6 1 K 38/07	(2006.01)
A 6 1 K 38/22	(2006.01)
A 6 1 P 17/00	(2006.01)
A 6 1 P 17/02	(2006.01)
A 6 1 K	38/06
A 6 1 K	38/07
A 6 1 K	38/22
A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	17/02

請求項の数 7 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-544285 (P2016-544285)
(86) (22) 出願日	平成26年9月12日 (2014.9.12)
(65) 公表番号	特表2016-540825 (P2016-540825A)
(43) 公表日	平成28年12月28日 (2016.12.28)
(86) 國際出願番号	PCT/KR2014/008497
(87) 國際公開番号	W02015/041430
(87) 國際公開日	平成27年3月26日 (2015.3.26)
審査請求日	平成29年8月18日 (2017.8.18)
(31) 優先権主張番号	10-2013-0111502
(32) 優先日	平成25年9月17日 (2013.9.17)
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)

(73) 特許権者 511055522
ケーネヌユーラインダストリー コーポレーション ファウンデーション
大韓民国 24341 カンウォンード, チュンチョンシ, カンウォンデハクギル 1, Gangwondo aehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do 24341, Republic of Korea

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アディポネクチンに由来するペプチドを含む組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドを活性成分として含み、薬学的に許容可能な担体を含む、皮膚疾患の予防または治療のための医薬組成物。

【請求項 2】

前記皮膚疾患が、皮膚炎、皮膚のしわ、傷、または皮膚乾燥であることを特徴とする請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記皮膚疾患がアレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、尋常性ざ瘡、紫外線による皮膚炎、湿疹、および乾癬からなる群から選択される 1 以上の皮膚炎であることを特徴とする請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドを活性成分として含む、皮膚障害の抑制または改善のための化粧料組成物。

【請求項 5】

前記皮膚障害が皮膚炎、皮膚のしわ、または皮膚乾燥であることを特徴とする請求項 4 に記載の化粧料組成物。

【請求項 6】

前記皮膚障害が皮膚のしわまたは皮膚乾燥であることを特徴とする請求項 5 に記載の化

粧料組成物。

【請求項 7】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アディポネクチンに由来するペプチド断片または低分子ペプチドを含む、医薬組成物または化粧料組成物に関する。前記ペプチドは、皮膚の再生および保湿を促進し、皮膚のしわを抑制し、またアレルギーおよび炎症に対する抑制活性ならびに癌細胞の転移に対する抑制活性を有する。

10

【背景技術】

【0002】

皮膚病変とも呼ばれる傷は、多様な症状、例えば、痛み、出血、瘢痕形成、機能障害などを示す。創傷治癒は、炎症反応、肉芽組織形成、再上皮化および血管新生などの過程を含む。前記過程は、線維芽細胞、脂肪細胞、血液由来細胞、および感覺神経から分泌される多様な成長因子、サイトカイン、神経ホルモンなどの作用を含み、これは上皮細胞増殖および細胞外基質生成につながる。

【0003】

結合組織を再生するため、または損傷していない結合組織の弾性および強度を維持してその破壊を防ぐためには、皮膚に存在する I 型コラーゲン、I I I 型コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチンなどの細胞外基質 (E C M) タンパク質を形成し、維持することが重要である。自然老化または紫外線への慢性露出は、E C M タンパク質の損失を引き起こし、皮膚組織の弾性および強度を低下させるが、これらはしわ形成などの皮膚老化の特性と強く関連している。マトリックスメタロプロテイナーゼ (M M P) は、真皮細胞外基質の分解において、キー酵素として作用する。紫外線照射のようなストレス条件下における、ケラチノサイトおよび皮膚線維芽細胞での M M P の過剰発現は、E C M タンパク質の分解をもたらし、その結果、皮膚上にしわを形成する。

20

【0004】

炎症反応は、感染、外傷などによって損傷された組織の構造および機能を回復するための生体の防御反応として知られている。炎症部位への白血球の移動は、感染の迅速な回復および様々な外傷から発生する組織損傷の修復のために重要である。しかし、誤った炎症反応または持続的な炎症反応は、身体組織の損傷または疾患を引き起こす。例えば、炎症性疾患は、脳脊髄膜炎、腸炎、皮膚炎、ブドウ膜炎、脳炎、または成人呼吸窮迫症候群のような細菌やウイルスによる感染や、外傷、自己免疫疾患、または臓器移植拒絶反応のような非感染要因によって発生する。炎症性疾患は、症状または病理学的特徴によって、急性炎症性疾患および慢性炎症性疾患に分類される。アレルギーまたは細菌 / ウィルス感染のような急性炎症は、血流、血管サイズ、および血管透過性の変化、ならびに白血球の浸潤などの局所的症状として現れる。これに対して、リューマチ性関節炎、粥状動脈硬化症、慢性腎臓炎、または肝硬変症などの慢性炎症の主要な病理学的特徴は、炎症性因子の持続的存在による、炎症部位へのマクロファージ、リンパ球、または形質細胞の持続的な浸潤であり、その結果、炎症反応は長期にわたって続く。

30

【0005】

炎症反応を誘導するためには、炎症部位への白血球の遊出が必須である。多くの細胞接着分子が白血球の遊出に関与している。すなわち、白血球の浸潤は、炎症部位から分泌されるケモカインによって、白血球が炎症部位の血管に移動した後、細胞移動の速度を減少させながら、血管内皮細胞の表面上を転動するローリング段階、白血球が回転を止めて血管内皮細胞にしっかりと付着する接着段階、および白血球が毛細血管および基底膜を通過して移動する遊出段階を含む。前記最終段階、すなわち遊出段階は、「漏出」とも呼ばれる。

40

50

【0006】

発癌物質によって誘導された癌細胞は、正常細胞と比べて急速に増殖し、その結果、腫瘍塊を形成し、周辺の組織に浸潤して正常な身体機能を阻害する。癌細胞は、血管新生を誘導することによって栄養および酸素の供給を得るが、癌細胞の転移もまた血管新生によって引き起こされる。癌細胞は、特定部位で無限に成長するだけではなく、原発部位を離れて新しい部位へ移動し、そこで成長することができる。この過程は、「転移」と呼ばれる。転移は、複数の重要な段階：癌細胞から移動能の高い間葉細胞への転換、前記間葉細胞の腫瘍原発部位からの解離、周囲の結合組織および毛細血管への浸潤と拡散、血管を介した移動、血管外への遊出、結合組織を介した移動ならびに第2部位での増殖を含む。

【0007】

一方、アディポネクチンは、脂肪細胞から特異的に分泌されるタンパク質ホルモンであるアディポカインの一種である。アディポネクチンは、インスリンの機能を増進させ、インスリン抵抗性を誘導し、それによって高血糖症、高インスリン血症、肥満、および動脈硬化症などの心血管疾患の抑制において重要な役割を担う。また、アディポネクチンは、癌細胞の転移および炎症反応を抑制する機能を有する。アディポネクチンは、また皮膚で、ケラチノサイトの増殖だけではなく、フィラグリン、ヒアルロン酸、および細胞外基質の発現を促進することによって、創傷治癒機能、線維化の抑制機能、皮膚のしわの改善機能、および保湿機能を担う。

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】**

20

【0008】

本発明者らは、アディポネクチンに由来する特定のペプチド断片または低分子ペプチドが、線維芽細胞の増殖を促進し、コラーゲンなどの細胞外基質の形成を誘導し、創傷治癒および皮膚再生のための優れた活性を示すことを見出した。また、本発明者らは、前記特定のペプチド断片が、フィラグリンの発現を促進して皮膚バリアの形成を誘導し、皮膚保湿作用を示すことを見出した。また、本発明者らは、前記特定のペプチド断片が、白血球の血管外遊出を抑制することによってアレルギー反応および炎症反応（特に、皮膚での炎症反応）を抑制し、癌細胞の浸潤を抑制することによって癌細胞の転移を抑制することを見出した。

【0009】

30

したがって、本発明の目的は、アディポネクチンに由来する特定のペプチド断片を活性成分として含む、医薬組成物および化粧料組成物を提供することである。

【発明を解決するための手段】**【0010】**

本発明の一態様によって、配列番号1～6のペプチドからなる群から選択されるペプチドを活性成分として含み、薬学的に許容可能な担体を含む、皮膚疾患の予防または治療のための医薬組成物が提供される。

【0011】

本発明の医薬組成物において、前記皮膚疾患は、皮膚炎、皮膚のしわ、傷、または皮膚乾燥であってもよく、好ましくはアレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、尋常性ざ瘡、紫外線による皮膚炎、湿疹、および乾癬からなる群から選択される1以上の皮膚炎である。

40

【0012】

本発明の別の態様によって、配列番号1～6のペプチドからなる群から選択されるペプチドを活性成分として含む、皮膚障害の抑制または改善のための化粧料組成物が提供される。

【0013】

本発明の化粧料組成物において、前記皮膚障害は、皮膚炎、皮膚のしわ、または皮膚乾燥であってもよく、好ましくは皮膚のしわまたは皮膚乾燥である。

【発明の効果】

50

【0014】

本発明のペプチド、すなわち配列番号1～6のペプチドからなる群から選択されるペプチドは、線維芽細胞の増殖を促進し、コラーゲンなどの細胞外基質の形成を誘導し、創傷治癒および皮膚再生のための優れた活性を示す。また、本発明のペプチドは、フィラグリンの発現を促進することによって皮膚バリアの形成を誘導し、皮膚保湿作用を示す。したがって、前記ペプチドは、創傷治癒または創傷治癒促進のための医薬組成物ならびに皮膚におけるしわ形成の抑制および皮膚保湿のための化粧料組成物に有用に使用することができる。

【0015】

また、本発明のペプチドは、白血球の血管外遊出を抑制することによってアレルギー反応および炎症反応（特に、皮膚における炎症反応）を抑制し、癌細胞の浸潤を抑制することによって癌細胞の転移を抑制する。したがって、前記ペプチドは、アレルギーまたは炎症性疾患の予防または治療のための医薬組成物、皮膚アレルギーまたは皮膚炎の抑制または改善のための化粧料組成物、および癌細胞の転移の抑制のための医薬組成物にも有用に使用することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】線維芽細胞の増殖において、本発明のペプチドの効果を評価して得られた結果を示す。

【図2】線維芽細胞でのコラーゲン合成において、本発明のペプチドの効果を評価して得られた結果を示す。

20

【図3】プロフィラグリン合成において、本発明のペプチドの効果を評価して得られた結果を示す。

【図4a】NF-B活性化において、本発明のペプチドの効果を評価して得られた結果を示す。

【図4b】NF-B活性化において、本発明のペプチドの効果を評価して得られた結果を示す。

【図4c】NF-B活性化において、本発明のペプチドの効果を評価して得られた結果を示す。

【図4d】NF-B活性化において、本発明のペプチドの効果を評価して得られた結果を示す。

30

【図5】本発明のペプチドで処理した後の、ヒト単核球細胞株（U937）の血管外遊出を測定して得られた結果を示す。

【図6】本発明のペプチドで処理した後の、マトリケルへのヒト乳癌細胞株（MCF-7）の浸潤を測定して得られた結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本明細書において、「皮膚疾患」は、全ての皮膚疾患を含み、特にアディポネクチン媒介の皮膚機能での異常に起因する疾患を含む。前記皮膚疾患としては、皮膚炎、皮膚のしわ、傷、および皮膚乾燥が挙げられる。前記皮膚炎は、アレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、尋常性ざ瘡（またはざ瘡様発疹）、紫外線による皮膚炎、湿疹、乾癬などを含む。前記皮膚のしわは、UV刺激および/または老化によるしわを含む。前記傷は、火傷またはUV刺激に起因する皮膚損傷を含む。前記乾燥皮膚は、乾皮症、シェーグレン症候群などを含む。

40

【0018】

「皮膚障害」は、全ての皮膚障害を含み、特にアディポネクチン媒介の皮膚機能での異常に起因する障害を含む。前記皮膚障害は、皮膚炎、皮膚のしわ、および皮膚乾燥を含む。前記皮膚炎は、アレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、尋常性ざ瘡、紫外線による皮膚炎、湿疹、乾癬などを含む。前記皮膚のしわは、UV刺激および/または老化によるしわを含む。前記皮膚乾燥は、乾皮症、シェーグレン症候群などを含む。

50

【0019】

本発明者らは、アディポネクチンに由来する様々な断片を製造して、その活性を研究した。驚くべきことに、本発明者らは、アディポネクチンに由来する3～5個のアミノ酸を有する特定の低分子ペプチド断片が、線維芽細胞の増殖を促進し、コラーゲンなどの細胞外基質の形成を誘導し、創傷治癒および皮膚再生のための優れた活性を示すことを見出した。また、本発明者らは、前記ペプチド断片が、フィラグリンの発現を促進することによって皮膚バリアの形成を誘導し、皮膚保湿作用を示すことを見出した。また、本発明者らは、前記ペプチド断片が、白血球の血管外遊出を抑制することによってアレルギー反応および炎症反応（特に、皮膚での炎症反応）を抑制し、癌細胞の浸潤を抑制することによって癌細胞（特に、皮膚癌細胞）の転移を抑制することを見出した。前記ペプチド断片を下記表1に示す。

10

【0020】

【表1】

ペプチド名	配列番号	アミノ酸配列
adipo-pep A4	配列番号1	Tyr-His-Ile-Thr
adipo-pep A3	配列番号2	His-Ile-Thr
adipo-pep B5	配列番号3	Leu-Phe-Thr-Tyr-Asp
adipo-pep B4	配列番号4	Leu-Phe-Thr-Tyr
adipo-pep B3	配列番号5	Phe-Thr-Tyr
adipo-pep C3	配列番号6	His-Leu-Thr

20

したがって、本発明は、配列番号1～6のペプチドからなる群から選択されるペプチドを活性成分として含み、薬学的に許容可能な担体を含む、皮膚疾患の予防または治療のための医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物において、前記皮膚疾患は、皮膚炎、皮膚のしわ、傷、または皮膚乾燥であってもよく、好ましくはアレルギー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、尋常性ざ瘡、紫外線による皮膚炎、湿疹、および乾癬からなる群から選択される1以上の皮膚炎である。

【0021】

30

本発明は、配列番号1～6のペプチドからなる群から選択されるペプチドを活性成分として含み、薬学的に許容可能な担体を含む、癌の転移を抑制するための、好ましくは皮膚癌の転移を抑制するための医薬組成物をさらに提供する。

【0022】

本発明の医薬組成物は、例えば、乳糖またはトウモロコシ澱粉などの賦形剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、入手可能な乳化剤、懸濁剤、緩衝剤、等張化剤などの薬学的に許容可能な担体を含んでもよい。本発明の医薬組成物は、経口または非経口投与形態で投与することができ、好ましくは非経口投与形態で投与する。筋肉内、腹腔内、皮下、または静脈内投与用に、活性成分の滅菌溶液が一般に製造されている。この場合、前記滅菌溶液は、所望のpH値を達成するために緩衝剤を含んでもよい。静脈内投与用の製剤に関しては、製剤に等張性が付与されるように、等張化剤を使用してもよい。本発明の医薬組成物は、pH7.4の生理食塩水などの薬学的に許容可能な担体を含む水溶液剤に製剤化することができる。前記水溶液剤は、局所ボーラス注射によって患者の筋肉内血流に導入することができる。本発明の医薬組成物は、皮膚アレルギー、皮膚炎、皮膚のしわ、傷、皮膚乾燥などの様々な皮膚疾患および癌に罹患している患者に、1日約1～2000mg/kgの投与量で投与することができる。適切な投与量は通常、患者の年齢、体重、および症状によって変更される。

40

【0023】

また、本発明は、その範囲内に、前記ペプチドを活性成分として含む機能性化粧料組成物を含む。すなわち、本発明は、配列番号1～6のペプチドからなる群から選択されるペ

50

ペプチドを活性成分として含む、皮膚障害の抑制または改善のための化粧料組成物を提供する。本発明の化粧料組成物において、前記皮膚障害は、皮膚炎、皮膚のしわ、または皮膚乾燥であってもよく、好ましくは皮膚のしわまたは皮膚乾燥である。

【0024】

本発明の化粧料組成物は、従来の方法にしたがって多様な形態に製造することができる。例えば、前記化粧料組成物は、化粧品、化粧水、クリーム、ローションなどの形態で製造されてもよく、このような使用のために、クレンジングウォーター、収斂液、保湿液で希釈してもよい。また、前記化粧料組成物は、化粧料組成物の分野で従来使用されている、安定剤、溶解補助剤、ビタミン、顔料、着香剤などの従来の添加剤を含んでもよい。前記化粧料組成物において、前記ペプチドは、皮膚アレルギーまたは炎症を改善するための効果をもたらすのに十分な量で含まれてもよく、例えば組成物の全重量に対して、0.01～10重量%の範囲の量で含まれてもよく、好ましくは約0.01～1重量%の範囲の量で含まれる。

【0025】

以下、本発明を下記実施例および実験例によりさらに具体的に説明する。しかし、下記実施例および実験例は、本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0026】

実施例1. ペプチドの合成

配列番号1～6のペプチド（上記表1）は、自動ペプチド合成器（P e p t r E x - R 48、P e p t r o n 社製、テジョン、大韓民国）を用いて、F M O C 固相法によって合成した。合成されたペプチドは、C 18 分析用R P カラム（資生堂カプセルパック）を使用した逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相H P L C）（P r o m i n e n c e L C - 2 0 A B、島津製作所製、日本）を用いて精製および分析し、質量分析器（H P 11 0 0 シリーズ L C / M S D、H e w l e t t - P a c k a r d 社製、R o s e v i l l e、米国）を使用して単離した。

【0027】

実施例2. ペプチド含有組成物の製造

配列番号1～6のペプチドを、1Mの濃度になるように、リン酸緩衝食塩水（P B S）にそれぞれ溶解した。得られたタンパク質溶液をP B Sで希釈した後、下記実験例で使用した。

【0028】

実験例1. マウス線維芽細胞株N I H 3 T 3 の増殖促進試験

N I H 3 T 3 細胞（マウス線維芽細胞株、A T C C C R L - 1 6 5 8、米国）を100 μ lのダルベッコ変法イーグル培地（D M E M）とともに、1ウェル当たりの細胞数が 5×10^3 個となるように96ウェルマイクロプレートの各ウェルに加えた後、37の5%CO₂インキュベーターで24時間培養した。配列番号1、2、3または5の各ペプチドを10 μ Mの濃度で含むペプチド溶液（100 μ l）を各ウェルに加えた。細胞を24、48、および72時間培養しながら、10 μ lのC C K - 8（同仁化学研究所製、日本）を各ウェルに加えた後、475 nmにおけるそれぞれの吸光度をS p e c t r a m a x p l u s 1 9 0 プレートリーダー（M o l e c u l a r D e v i c e s 社製、米国）を用いて測定した。結果を図1に示す。図1に示すように、N I H 3 T 3 細胞の増殖は、配列番号1、2、3および5のペプチドで処理した群で有意に増加した。これらの結果は、本発明のペプチドが、線維芽細胞の増殖の促進による創傷治癒活性および皮膚再生活性を有することを示す。

【0029】

実験例2. 線維芽細胞でのI型プロコラーゲン発現活性化の評価

コラーゲン纖維合成の促進は、皮膚老化を抑制するための主要な手段の一つであるため、本発明者らは、線維芽細胞でのコラーゲン合成が本発明のペプチドによる処理によって

10

20

30

40

50

促進されるか否かをN I H 3 T 3 細胞（マウス線維芽細胞株、A T C C C R L - 1 6 5 8、米国）を用いて評価した。線維芽細胞を、濃度が0.1、1および10 μMである、配列番号1、2、3および5の各ペプチドで処理した。48時間後、I型プロコラーゲンの発現を測定するために、細胞抽出物を対象としてウエスタンプロッティングアッセイを行った。結果を図2に示す。図2に示すように、I型プロコラーゲンの発現は、配列番号1、2、3および5のペプチドによる処理によって、濃度依存的に増加した。したがって、本発明のペプチドは、コラーゲンの損失に由来する皮膚の老化、特に皮膚のしわを抑制できることが分かる。

【0030】

実験例3.ヒトケラチノサイト細胞株H a C a Tでプロフィラグリン発現調節の評価

10

プロフィラグリンは、皮膚バリアを構成するための主要な要素の一つであるため、本発明者らは、ケラチノサイトでのプロフィラグリン合成が本発明のペプチドによる処理によって促進されるか否かをH a C a T細胞（ヒトケラチノサイト細胞株、D K F Z、H e i d e l b e r g、ドイツ）を用いて評価した。H a C a T細胞を、濃度が0.1、1.0および10 μMである配列番号3および5のペプチドで処理した。48時間後、プロフィラグリンの発現を測定するために、細胞抽出物を対象としてウエスタンプロッティングアッセイを行った。結果を図3に示す。図3に示すように、プロフィラグリンの発現は、配列番号3および5のペプチドによる処理によって、濃度依存的に増加した。したがって、本発明のペプチドは、プロフィラグリン発現の促進による皮膚保湿作用を有することが分かる。

20

【0031】

実験例4.N F - B活性抑制試験

転写因子N F - Bの活性化における本発明のペプチドの効果を、in situ近接ライゲーションアッセイ法にしたがって分析した。前記分析は、D u o l i n k（登録商標）I n S i t u試薬（O l i n k B i o s c i e n c e社製、スウェーデン）を用いて行った。

【0032】

N I H 3 T 3 細胞（ 2.5×10^4 個）を、各ウェルの底面に12 mmのガラスを有する24ウェルプレートに塗抹した。前記細胞を24時間安定化させた後、濃度が0.1、1.0および10 μMである、配列番号1、2、3および5の各ペプチドで処理した。前記処理から1時間後、各ウェルの細胞をT N F - B（25 μg / ml）で2時間処理した。4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を0.1%トリトンXで処理した後、細胞にプロッキング溶液を1滴加え、これを37 ℃で30分間培養した。N F - Bの核への移行レベルを測定するために、前記細胞を抗p 5 0マウスモノクローナル抗体（N F - B p 5 0（4 D 1）:s c - 5 3 7 4 4、S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y, I N C . 社製、米国）および抗p 6 5ウサギモノクローナル抗体（N F - B p 6 5（D 1 4 E 1 2）X P（登録商標）r a b b i t m A b、C e l l s i g n a l i n g T e c h n o l o g y社製、米国）を用いて37 ℃で処理した。30分後、前記細胞をP L Aプローブ溶液を用いて37 ℃で1時間、ライゲーション溶液を用いて30分間処理した後、増幅溶液を用いて100分間処理した。細胞を洗浄した後、赤い点で示されたN F - Bのうち核内に移行した点の数を、共焦点顕微鏡で測定した。結果を図4a～図4dに示す。図4a～図4dに示すように、配列番号1、2、3および5のペプチドで処理した群での移行は、対照群と比べて顕著に減少した（約25～60%減少）。これらの結果は、本発明のペプチドが、炎症性サイトカインの合成で重要な役割を果たすN F - Bの活性化を抑制することを示す。

30

【0033】

実験例5.単核球のインビトロ経内皮血管外遊出に対する抑制活性試験

ヒト臍帯静脈内皮細胞（H U V E C）をボイデンチャンバーの上室で培養した。上澄みを除去し、未処理の、または実施例2で製造した配列番号3～5のペプチド（30 μg / ml）を含むタンパク質溶液で1時間処理したヒト単核球（U 9 3 7）を 2×10^5 細胞

40

50

/ チャンバーとなるよう接種した。チャンバーの下室には、0.005% ビタミン C および 0.1% ウシ血清アルブミン (B S A) を含有する無血清 D M E M 培地中で N I H / 3 T 3 マウス線維芽細胞を 16 時間培養することによって得た培養物を、遠心分離した後にその上澄みも含めて入れ、単核球の浸潤を誘導した。前記チャンバーで細胞を 6 時間培養し、下室に移動した細胞数を測定した。この試験を 3 回繰り返して実施した。結果を図 5 に示す。対照群は、ペプチドを有さない P B S のみで処理した。図 5 に示すように、本発明のペプチドで処理した群において移動した単核球の数は、対照群と比べて顕著に減少した（約 50 ~ 70 % 減少）。白血球が血管を通じて炎症部位に移動するためには、血管外遊出が必須であることを考慮すると、本発明のペプチドは、効果的に炎症反応を抑制できることが期待される。

10

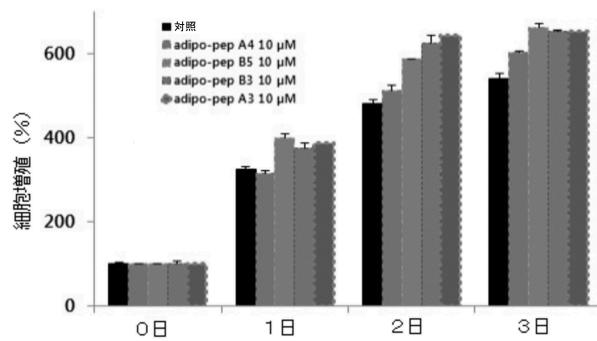
【 0 0 3 4 】

実験例 6 . 癌細胞の浸潤に対する抑制活性試験

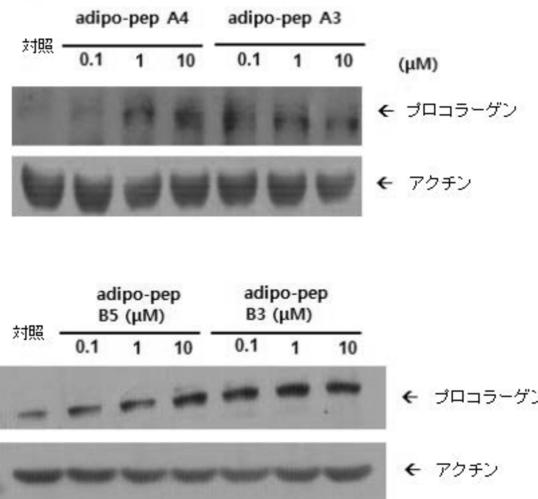
基底膜成分であるマトリケルを、トランスウェル内で重合させた後、ヒト乳癌細胞 M C F - 7 細胞 (1.5×10^5 個) をトランスウェルの上室に入れ、濃度が 1 μ M である、配列番号 3 ~ 5 の各ペプチドで処理した。この細胞を 37 の 5 % C O₂ インキュベーターで培養した。0.1% B S A をトランスウェルの上室に加えた。浸潤誘導培地 (N I H 3 T 3 細胞を 0.005% ビタミン C および 0.1% ウシ血清アルブミンを含有する無血清 D M E M 培地で 24 時間培養した後、分離した上澄み) を、各下室に入れ、トランスウェルの下室に移動した細胞を、24 時間おきに 3 回測定した後、結果を統計分析した。対照群は、ペプチドを有さない P B S のみで処理した。結果を図 6 に示す。図 6 に示すように、本発明の配列番号 3 ~ 5 のペプチドで処理した群におけるヒト乳癌細胞の基底膜の浸潤率は、対照群と比べて、約 80 % に減少した。癌細胞が血管外に遊出し、基底膜または周囲の結合組織に浸潤した後、第 2 の部位に拡散することを考慮すると、本発明のペプチドが癌細胞の転移を効果的に抑制できることが分かる。

20

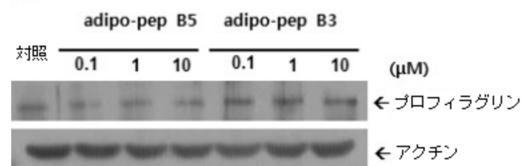
【 図 1 】



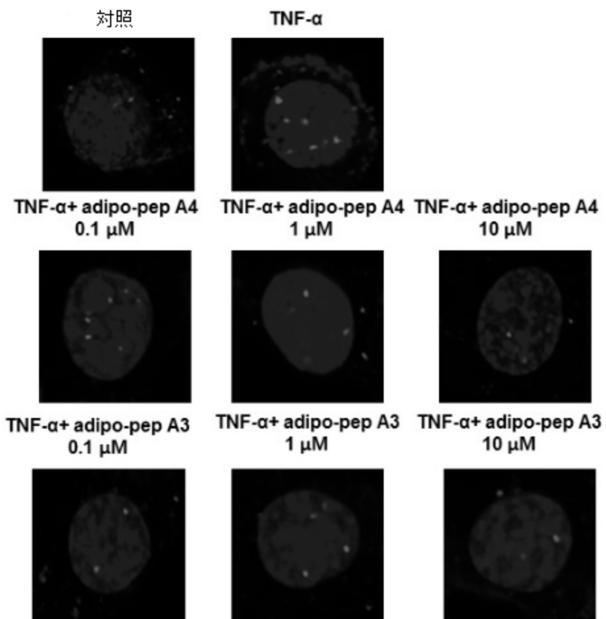
【 図 2 】



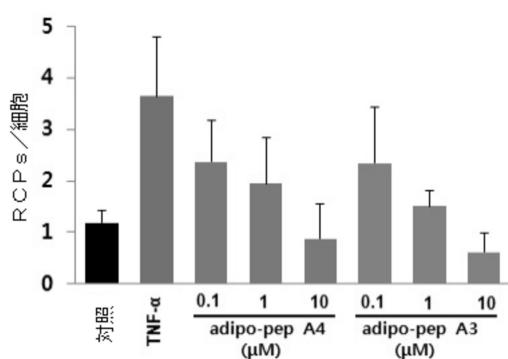
【 図 3 】



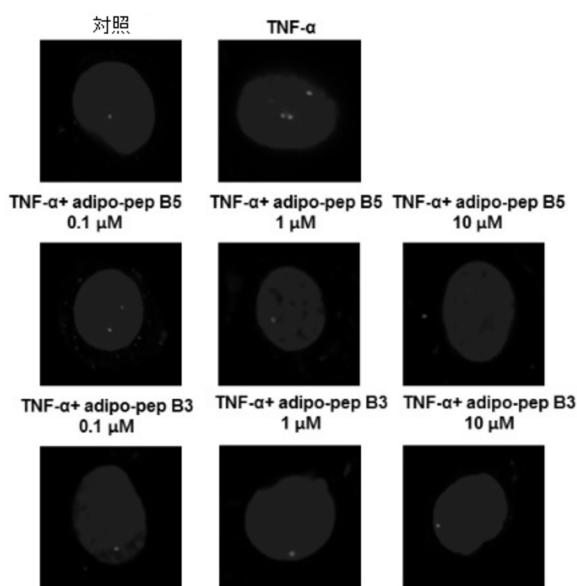
【図4 a】



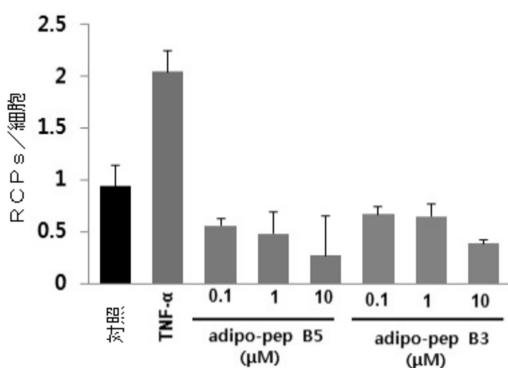
【図4 b】



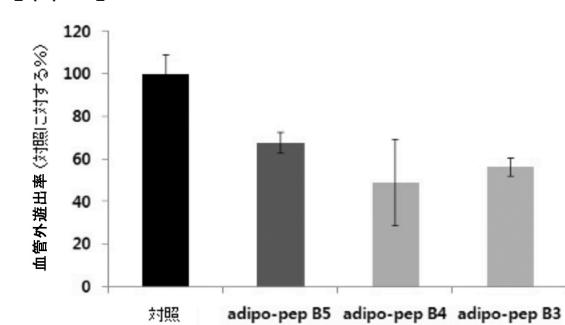
【図4 c】



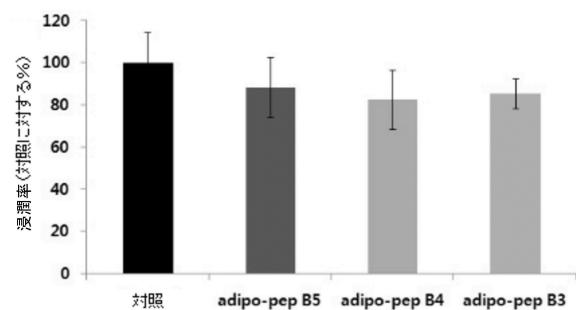
【図4 d】



【図5】



【図6】



【配列表】

0006461977000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	17/16	(2006.01) A 6 1 P 17/16
A 6 1 P	29/00	(2006.01) A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	37/08	(2006.01) A 6 1 P 37/08
A 6 1 P	17/06	(2006.01) A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	17/10	(2006.01) A 6 1 P 17/10
A 6 1 K	8/64	(2006.01) A 6 1 K 8/64
A 6 1 Q	19/00	(2006.01) A 6 1 Q 19/00
C 0 7 K	14/575	(2006.01) C 0 7 K 14/575
C 0 7 K	5/107	(2006.01) C 0 7 K 5/107
C 0 7 K	5/097	(2006.01) C 0 7 K 5/097

(73)特許権者 512104502

スパデリクサー インコーポレイテッド
 大韓民国 2 4 3 4 1 カンウォン - ド , チュンチョン - シ , カンウォンデハク - ギル 1 , メデ
 ィカル スクール ビルディング 1 - 4 1 0
 Medical School Building 1 - 4 1 0 , 1 , Gangwondaeha
 k - g i l , Chuncheon - s i , Gangwon - do 2 4 3 4 1 , Republic
 o f K o r e a

(74)代理人 100077012

弁理士 岩谷 龍

(72)発明者 ハン , チャンヒ

大韓民国 2 0 0 - 8 8 3 カンウォン - ド , チュンチョン - シ , トンネ - ミョン , エソル - ギル
 1 9 ボン - ギル 8 0 - 7 # 1 0 5 - 9 0 3

(72)発明者 リム , トンヨン

大韓民国 2 0 0 - 9 3 6 カンウォン - ド , チュンチョン - シ , エマゴル - ギル 1 1 ボン - ギ
 ル 1 9 # 2 0 1

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特開2 0 0 4 - 3 3 1 5 9 0 (J P , A)

特表2 0 0 7 - 5 3 0 4 2 6 (J P , A)

特開2 0 0 1 - 3 0 2 6 9 0 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 6
 A 6 1 K 8 / 6 4
 A 6 1 K 3 8 / 0 7
 A 6 1 K 3 8 / 2 2
 A 6 1 P 1 7 / 0 0
 A 6 1 P 1 7 / 0 2
 A 6 1 P 1 7 / 0 6
 A 6 1 P 1 7 / 1 0
 A 6 1 P 1 7 / 1 6
 A 6 1 P 2 9 / 0 0
 A 6 1 P 3 7 / 0 8
 A 6 1 Q 1 9 / 0 0
 C 0 7 K 5 / 0 9 7

C 0 7 K 5 / 1 0 7

C 0 7 K 1 4 / 5 7 5

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)