(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7686069号
(P7686069)

(45)発行日　令和7年5月30日(2025.5.30)

(24)登録日　令和7年5月22日(2025.5.22)

(51)国際特許分類

Ｃ０７Ｋ	*7/08*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	7/08
Ａ６１Ｋ	*38/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/10
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00
Ａ６１Ｐ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10

ＦＩ
ＺＮＡ

請求項の数　5　（全23頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-529123(P2023-529123)
(86)(22)出願日　令和3年12月22日(2021.12.22)
(65)公表番号　特表2023-549894(P2023-549894A)
(43)公表日　令和5年11月29日(2023.11.29)
(86)国際出願番号　PCT/KR2021/019667
(87)国際公開番号　WO2022/139493
(87)国際公開日　令和4年6月30日(2022.6.30)
審査請求日　令和5年5月16日(2023.5.16)
(31)優先権主張番号　10-2020-0182441
(32)優先日　令和2年12月23日(2020.12.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者　304039548
コリア・インスティテュート・オブ・サイエンス・アンド・テクノロジー
大韓民国，ソウル　１３６－７９１，ソンブック－ク，ファランノ　１４－ギル　５
(74)代理人　100120891
弁理士　林　一好
(74)代理人　100165157
弁理士　芝　哲央
(74)代理人　100205659
弁理士　齋藤　拓也
(74)代理人　100126000
弁理士　岩池　満
(74)代理人　100185269
弁理士　小菅　一弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制できる新規なペプチドおよびその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

形質転換成長因子ベータ（Ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－β、ＴＧＦ－β）またはその類似体に由来し、

配列番号５、６又は７のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項２】

前記ペプチドは、ＴＧＦ－βのシグナル伝達を抑制するものである、請求項１に記載のペプチド。

【請求項３】

請求項１又は２に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項４】

請求項３に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項５】

ＴＧＦ－β関連疾患の治療または予防用薬学組成物であって、前記薬学組成物は、薬学的に有効な量の請求項１又は２に記載のペプチドを含み、

前記ＴＧＦ－β関連疾患は、癌、脳神経疾患、線維性皮膚疾患、肺線維症、肝線維症、腎線維症、嚢胞性線維症、心臓線維症、アテローム性硬化症、動脈硬化症、全身性硬化症、または眼線維症である、前記薬学組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】
本発明は、ＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制できる新規なペプチドおよびその用途に関する。
【背景技術】
【０００２】
ＴＧＦ－βサイトカインは細胞群体の形成を刺激する能力によって発見されたが（Ｒｏｂｅｒｔｓ ＡＢ，ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ７８：５３３９－４３，１９８１）、この過程が細胞形質転換の代表的な標識であるため、前記サイトカインは形質転換成長因子ベータと名付けられており、ＴＧＦ－βリガンド（ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３）は多機能性成長因子の原型として認識されている。ＴＧＦ－βは上皮、内皮および造血細胞の増殖阻害剤、細胞外基質の生産と沈着および組織修復連鎖反応の最も強い調節因子の一つとして知られている。
【０００３】
一方、ＴＧＦ－βは癌の進行段階で腫瘍成長、浸潤および転移をすることが知られており、具体的には、ＴＧＦ－βは、腫瘍細胞や他の様々な細胞活性でＥＭＴ（ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ－ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｔｒａｎｓｉｔｉｏｎ）を調節するＲａｓ－ＭＡＰＫやＰＩ３Ｋ－ＡＫＴを含む数多くのＳＭＡＤ非依存的なシグナル経路を活性化して癌化過程で多様な活性を示すことが知られている。
【０００４】
したがって、最近、ＴＧＦ－βが腫瘍成長および転移を予防する標的として考慮されており、ＴＧＦ－βに対する単クローン抗体、低分子化合物（ｋｉｎａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯｓ）、キメラタンパク質を含む様々なＴＧＦ－β阻害剤が、現在、臨床試験されている。ただし、ＴＧＦ－βシグナルの抑制に基づいた治療法の開発は長い間遅々と進まない状態である。
【０００５】
このような問題を解決するために、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路を効果的に抑制できる治療剤の開発が必要である。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
一態様は、形質転換成長因子ベータ（Ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－β、ＴＧＦ－β）またはその類似体に由来するペプチドを提供する。
【０００７】
他の態様は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。
【０００８】
さらに他の態様は、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。
【０００９】
さらに他の態様は、前記ペプチド、前記ポリヌクレオチドまたは前記発現ベクターを有効成分として含むＴＧＦ－β関連疾患の治療または予防用薬学組成物を提供する。
【００１０】
さらに他の態様は、前記ペプチド、前記ポリヌクレオチドまたは前記発現ベクターを有効成分として含む薬学組成物を個体に投与するステップを含むＴＧＦ－β関連疾患の治療または予防方法を提供する。
【００１１】
さらに他の態様は、前記ペプチド、前記ポリヌクレオチドまたは前記発現ベクターを有効成分として含む癌の治療または予防用薬学組成物を提供する。
【００１２】
さらに他の態様は、前記ペプチド、前記ポリヌクレオチドまたは前記発現ベクターを有効成分として含む薬学組成物を個体に投与するステップを含む癌の治療または予防方法を提供する。

【課題を解決するための手段】
【００１３】
一態様は、形質転換成長因子ベータ（Ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－β、ＴＧＦ－β）またはその類似体に由来するペプチドを提供する。
【００１４】
本発明の一実施形態において、前記ペプチドは、ＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制するものであってもよい。
【００１５】
本明細書における用語、「形質転換成長因子ベータ（Ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－β、ＴＧＦ－β）」とは、ＴＧＦ－βスーパーファミリーに属するサイトカインであって、哺乳類で発現するＴＧＦ－βの形態にはＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２およびＴＧＦ－β３の３つが知られている。前記ＴＧＦ－βによるシグナル伝達は多様な生物学的過程で決定的な役割をし、細胞成長抑制、細胞死滅、分化および上皮－間葉形質転換（ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ－ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｔｒａｎｓｉｔｉｏｎ；ＥＭＴ）のような多様な機能を行う。ＴＧＦ－βシグナル伝達系は厳格に調節され、細胞恒常性の維持とともに発生および器官の形成に決定的な役割を果たす。したがって、ＴＧＦ－βシグナル伝達の撹乱は癌、線維症および先天性奇形といった生命を脅かす疾患を誘発しうる。
【００１６】
ＴＧＦ－βは、癌化過程の初期段階では癌抑制活性を示すものの、癌化過程の後期には癌成長を促進することが知られている。特に、ＴＧＦ－β１は大部分の癌組織で多量発現し、ＴＧＦ－β１の発現が高い癌患者の場合、悪性の場合が多く、予後も良くないことが知られている。細胞から分泌したＴＧＦ－βは、タイプＩおよびタイプＩＩ受容体からなる２つのタイプの受容体の異種複合体に結合してシグナル伝達を開始する。ＴＧＦ－βは、ＩＩ型受容体に結合すれば、Ｉ型受容体はこれを認識してＩＩ型受容体に結合をするが、この時、ＩＩ型受容体がＩ型受容体のＧＳ部位をリン酸化させると、Ｉ型受容体キナーゼ（ｋｉｎａｓｅ）が活性化される。リン酸化されたＴＧＦ－β Ｉ型受容体は、Ｓｍａｄ２およびＳｍａｄ３というＴＧＦ－βシグナル伝達媒体のＣ－末端セリン残基をリン酸化させることにより、Ｓｍａｄ２およびＳｍａｄ３の活性化を誘発する。活性化されたＳｍａｄ２およびＳｍａｄ３は、Ｓｍａｄ４と複合体を形成し核に移動して標的遺伝子の発現に関与する。
【００１７】
また、ＴＧＦ－βは、免疫系の多くの構成要素の機能と拡張を阻害することにより、免疫耐性と炎症反応を調節するなど免疫恒常性（ｈｏｍｅｏｓｔａｓｉｓ）と寛容（ｔｏｌｅｒａｎｃｅ）を決定する重要な執行者の役割をすることが知られており、特に、腫瘍微細環境で免疫抑制の仲裁者としてＴＧＦ－βが重要な役割をすることが知られている。したがって、腫瘍の免疫環境内でＴＧＦ－βが癌の成長促進に重要な役割をすることが知られ、免疫抗癌剤と多様なＴＧＦ－βシグナル伝達阻害剤の併用治療が研究開発されている。
【００１８】
前記ペプチドは、ＴＧＦ－β受容体（ＴＧＦＢＲ１および／またはＴＧＦＢＲ２）に結合してＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制するものであってもよいし、具体的には、前記ペプチドは、ＴＧＦ－βと競合してＴＧＦ－β受容体に結合することにより、ＴＧＦ－βサイトカインがＴＧＦ－β受容体に結合することを妨げる機序によりＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制するものであってもよい。
【００１９】
また、前記ペプチドは、細胞のＴＧＦ－βの発現レベル自体を抑制させてＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制するものであってもよいし、具体的には、前記ペプチドは、自己－抑制経路（ａｕｔｏ－ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｐａｔｈｗａｙ）により細胞内のＴＧＦ－βの発現レベルを減少させたり、ＴＧＦ－βの細胞外排出量を減少させる機序によりＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制するものであってもよい。

【００２０】
本発明の一実施形態において、前記ペプチドは、配列番号１６で記載される下記一般式１のアミノ酸配列を含むものであってもよい。
【００２１】
［一般式１］
Ｆ－Ｘ$_1$－Ｌ－Ｇ－Ｐ－Ｘ$_2$－Ｐ－Ｙ－Ｉ－Ｗ－Ｘ$_3$－Ｌ－Ｄ－Ｔ
【００２２】
前記一般式１において、Ｘ$_1$、Ｘ$_2$およびＸ$_3$は、それぞれ独立してシステイン（Ｃ）またはセリン（Ｓ）であってもよいし、具体的には、Ｘ$_1$－Ｘ$_2$－Ｘ$_3$は、Ｃ－Ｃ－Ｓ、Ｃ－Ｃ－ＣまたはＳ－Ｓ－Ｓであってもよい。
【００２３】
前記ペプチドは、任意のアミノ酸またはペプチドを追加的に含むものであってもよいし、具体的には、前記ペプチドは、前記一般式１で表されるアミノ酸配列の一末端、好ましくは、Ｃ－末端に任意のアミノ酸またはペプチドが直接的に連結されて追加されたペプチドを含むものであってもよい。前記追加されるアミノ酸またはペプチドは、アラニン（Ａ）、フェニルアラニン（Ｆ）、バリン（Ｖ）、ロイシン（Ｌ）、セリン（Ｓ）、またはこれらの組み合わせであってもよく、非制限的な例としては、アラニン（Ａ）、フェニルアラニン（Ｆ）、バリン－ロイシン－セリン－ロイシン（Ｖ－Ｌ－Ｓ－Ｌ）またはバリン－ロイシン－セリン－フェニルアラニン（Ｖ－Ｌ－Ｓ－Ｆ）であってもよい。
【００２４】
前記ペプチドは、配列番号１～８のうち１つ以上のアミノ酸配列を含むものであってもよいし、具体的には、配列番号１～８のうち１つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。
【００２５】
本発明の一実施形態において、前記ペプチドは、配列番号１７で記載される下記一般式２のアミノ酸配列を含むものであってもよい。
【００２６】
［一般式２］
Ａ－Ｈ－Ｃ－Ｓ－Ｃ－Ｄ
【００２７】
前記ペプチドは、任意のアミノ酸またはペプチドを追加的に含むものであってもよいし、具体的には、前記ペプチドは、前記一般式２のアミノ酸配列の一末端、好ましくは、Ｃ－末端に直接的に連結されて追加されるものであってもよい。前記追加されるアミノ酸またはペプチドは、セリン（Ｓ）、アルギニン（Ｒ）、アスパラギン酸（Ｄ）、アスパラギン（Ｎ）、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、フェニルアラニン（Ｆ）、またはこれらの組み合わせであってもよく、非制限的な例としては、セリン－アルギニン－アスパラギン酸－アスパラギン（Ｓ－Ｒ－Ｄ－Ｎ）またはグリシン－アラニン－フェニルアラニン－アラニン（Ｇ－Ａ－Ｆ－Ａ）であってもよい。
【００２８】
前記ペプチドは、配列番号９および１０のうち１つ以上のアミノ酸配列を含むものであってもよいし、具体的には、配列番号９および１０のうち１つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。
【００２９】
本発明の一実施形態において、前記ペプチドは、配列番号１８で記載される下記一般式３のアミノ酸配列を含むものであってもよい。
【００３０】
［一般式３］
Ｔ－Ｉ－Ｖ－Ｙ－Ｙ－Ｖ－Ｘ$_4$－Ｘ$_5$－Ｋ－Ｐ－Ｋ－Ｖ－Ｅ－Ｑ
【００３１】
前記一般式３において、Ｘ$_4$は、グリシン（Ｇ）、ヒスチジン（Ｈ）またはバリン（Ｖ

）であってもよく、X_5は、アルギニン（Ｒ）、ロイシン（Ｌ）、またはイソロイシン（Ｉ）であってもよいし、具体的には、X_4-X_5は、Ｇ－Ｒ、Ｇ－Ｌ、Ｈ－ＩまたはＶ－Ｉであってもよい。

【００３２】

前記ペプチドは、配列番号１１～１４のうち１つ以上のアミノ酸配列を含むものであってもよいし、具体的には、配列番号１１～１４のうち１つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【００３３】

本発明において、前記ペプチドは、上記の各配列番号で記載したアミノ酸配列だけでなく、前記配列と６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上の相同性を示すアミノ酸配列として実質的に前記各ペプチドと同一または相応の効能を示すペプチドをなすアミノ酸配列であれば制限なく含まれる。また、前記配列と相同性を有する配列として実質的に記載された配列番号のペプチドと同一または相応の生物学的活性を有するアミノ酸配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換または付加されたアミノ酸配列を有する場合も同じく本発明の範疇に含まれることは自明である。

【００３４】

本明細書における用語「相同性」とは、タンパク質をコードする塩基配列やアミノ酸配列の類似する程度を意味するが、相同性が十分に高い場合、当該タンパク質または当該遺伝子の発現産物は同一または類似の活性を有することができる。また、相同性は、与えられたアミノ酸配列または塩基配列と一致する程度に応じて百分率で表される。本明細書において、与えられたアミノ酸配列または塩基配列と同一または類似の活性を有するそれの相同性配列が「％相同性」で表される。例えば、点数（ｓｃｏｒｅ）、同一性（ｉｄｅｎｔｉｔｙ）および類似度（ｓｉｍｉｌａｒｉｔｙ）などのパラメータ（ｐａｒａｍｅｔｅｒ）を計算する標準ソフトウェア、具体的には、ＢＬＡＳＴ２．０を用いたり、定義された厳格な条件（ｓｔｒｉｎｇｅｎｔ ｃｏｎｄｉｔｉｏｎ）下で使用していた混成化実験によって配列を比較することにより確認することができ、定義される適切な混成化条件は当該技術範囲内であり、当業者によく知られた方法（例えば、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９；Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ，Ｓ．Ｂ．ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，ＣＤ．，（１９７０），Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，４８，４４３－４５３）で決定できる。

【００３５】

本発明の一実施例によれば、本発明では、ＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制できる候補ペプチドを作製し、前記ペプチドは、ＴＧＦ－β受容体に結合したり、ＴＧＦ－βの発現レベルまたは細胞外排出量を減少させてＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制し、これに基づいてＴＧＦ－βシグナル伝達関連疾患を治療または予防することができ、ひいては、ＴＧＦ－β発現癌も効果的に治療または予防することができる。

【００３６】

他の態様は、前記ペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。「ＴＧＦ－β」、および「ＴＧＦ－β由来ペプチド」に関する内容は上述した通りである。

【００３７】

本明細書における用語「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドが結合した高分子物質であって、遺伝情報をコードしているＤＮＡを意味する。

【００３８】

本発明において、前記ペプチドをコードする塩基配列は、各配列番号で記載したアミノ酸をコードする塩基配列だけでなく、前記配列と６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上の相同性を示す塩基配列として実質的に前記各ペプチドと同一または相応の効能を示すペプチドをコードする塩基配列であれば制限なく含まれる。さらに、前記配列と相同性を有する配列として実質的に記載された配列番号のペプチドと同一または相応の生物学的活性を有するアミノ酸配列で、例えば、一部の配列が欠失、変形、置換または付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する場合も同じく本発明の範疇に含まれることは自明である。

【００３９】

また、本発明において、前記ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、コドンの縮退性（ｄｅｇｅｎｅｒａｃｙ）によって前記ペプチドを発現させようとする生物で好まれるコドンを考慮して、コーディング領域から発現するタンパク質のアミノ酸配列を変化させない範囲内でコーディング領域に多様な変形が行われる。したがって、前記ポリヌクレオチドは、各ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であれば制限なく含まれる。さらに、公知の配列から調製可能なプローブ、例えば、前記ポリヌクレオチド配列の全体または一部に対する相補配列と厳格な条件下でハイブリッド化して、前記ペプチドの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列であれば制限なく含まれる。

【００４０】

前記「厳格な条件」とは、ポリヌクレオチド間の特異的混成化を可能にする条件を意味する。この条件は、文献（例えば、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、同上）に具体的に記載されている。例えば、相同性が高い遺伝子同士で、４０％以上、具体的には９０％以上、より具体的には９５％以上、さらに具体的には９７％以上、特に具体的には９９％以上の相同性を有する遺伝子同士でハイブリッド化し、それより相同性が低い遺伝子同士でハイブリッド化しない条件、または通常の使用していたハイブリッド化の洗浄条件である６０℃、１ＸＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、具体的には６０℃、０．１ＸＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、より具体的には６８℃、０．１ＸＳＳＣ、０．１％ＳＤＳに相当する塩濃度および温度で、１回、具体的には２回～３回洗浄する条件を列挙することができる。

【００４１】

混成化は、たとえ混成化の厳格度に応じて塩基間のミスマッチ（ｍｉｓｍａｔｃｈ）が可能であっても、２つのポリヌクレオチドが相補的配列を有することを要求する。用語、「相補的」は、互いに混成化可能なヌクレオチド塩基間の関係を記述するのに使われる。例えば、ＤＮＡに関して、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。したがって、本出願はさらに、実質的に類似のポリヌクレオチド配列だけでなく、全体配列に相補的な単離したポリヌクレオチド断片を含むことができる。

【００４２】

具体的には、相同性を有するポリヌクレオチドは、５５℃のＴｍ値で混成化ステップを含む混成化条件を用い、上述した条件を用いて探知することができる。また、前記Ｔｍ値は、６０℃、６３℃または６５℃であってもよいが、これに制限されるわけではなく、その目的に応じて当業者によって適宜調節可能である。

【００４３】

ポリヌクレオチドを混成化する適切な厳格度は、ポリヌクレオチドの長さおよび相補性の程度に依存し、変数は当該技術分野にてよく知られている（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，ｓｕｐｒａ，９．５０－９．５１，１１．７－１１．８参照）。

【００４４】

さらに他の態様は、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。「ＴＧＦ－β」、および「ポリペプチド」に関する内容は上述した通りである。

【００４５】

本明細書における用語「発現ベクター」とは、適当な宿主細胞に導入されて目的タンパク質を発現できる組換えベクターであって、遺伝子挿入物が発現するように作動可能に連

結された必須の調節要素を含む遺伝子作製物をいう。前記用語「作動可能に連結された（ｏｐｅｒａｂｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」とは、一般的な機能を行うように核酸発現調節配列と目的とするタンパク質をコードする核酸配列が機能的に連結されていることを意味する。組換えベクターとの作動的連結は、当該技術分野にてよく知られた遺伝子組換え技術を利用して製造することができ、部位－特異的ＤＮＡ切断および連結は、当該技術分野にて一般的に知られた酵素などを用いて容易にできる。

【００４６】

本発明の好適な発現ベクターは、プロモーター、開始コドン、終結コドン、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーのような発現調節エレメント以外にも、膜標的化または分泌のためのシグナル配列を含むことができる。開始コドンおよび終結コドンは、一般的に免疫原性標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部と見なされ、遺伝子作製物が投与された時、個体で必ず作用を示さなければならず、コーディング配列とインフレーム（ｉｎ　ｆｒａｍｅ）でなければならない。一般プロモーターは、構成的または誘導性であってもよく、原核細胞の場合には、ｌａｃ、ｔａｃ、Ｔ３およびＴ７プロモーター、真核細胞の場合には、サルウイルス４０（ＳＶ４０）、マウス乳房腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、ヒト免疫欠乏ウイルス（ＨＩＶ）、例えば、ＨＩＶの長い末端反復部（ＬＴＲ）プロモーター、モロニーウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーターだけでなく、β－アクチンプロモーター、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、ヒトメタロチオネイン由来のプロモーターなどがあるが、これらに限定されない。

【００４７】

また、前記発現ベクターは、ベクターを含有する宿主細胞を選択するための選択性マーカーを含むことができる。選択マーカーは、ベクターで形質転換された細胞を選別するためのもので、薬物耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性または表面タンパク質の発現のような選択可能表現型を付与するマーカーが使用できる。選択剤（ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ　ａｇｅｎｔ）が処理された環境では、選別マーカーを発現する細胞のみ生存するので、形質転換された細胞が選別可能である。さらに、ベクターが複製可能な発現ベクターの場合、複製が開始される特定の核酸配列である複製原点（ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ　ｏｒｉｇｉｎ）を含むことができる。

【００４８】

外来遺伝子を挿入するための組換え発現ベクターとしては、プラスミド、ウイルス、コスミドなど多様な形態のベクターを使用することができる。組換えベクターの種類は、原核細胞および真核細胞の各種宿主細胞において所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能をする限り特に限定されないが、具体的には、強い活性を示すプロモーターと強い発現力を保有しながら自然状態と類似形態の外来タンパク質を大量生産できるベクターが用いられる。

【００４９】

本発明のペプチドを発現させるために、多様な宿主とベクターとの組み合わせが用いられる。真核宿主に適した発現ベクターとしてはこれに限定されないが、ＳＶ４０、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルス、アデノ－関連ウイルス（ａｄｅｎｏａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒｕｓ）、サイトメガロウイルスおよびレトロウイルスに由来する発現調節配列などが含まれる。細菌宿主に使用可能な発現ベクターとしてはこれに限定されないが、ｐＥＴ、ｐＲＳＥＴ、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ、ｐＧＥＸ２Ｔ、ｐＵＣベクター、ｃｏｌＥ１、ｐＣＲ１、ｐＢＲ３２２、ｐＭＢ９、またはこれらの誘導体などを含む大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）から得られる細菌性プラスミド、ＲＰ４のようにより広い宿主範囲を有するプラスミド、λｇｔ１０、λｇｔ１１またはＮＭ９８９などのファージラムダ（ｐｈａｇｅ　ｌａｍｂｄａ）誘導体として例示できるファージＤＮＡ、およびＭ１３とフィラメント性単鎖ＤＮＡファージのようなその他のＤＮＡファージなどが含まれる。酵母細胞には２℃プラスミドまたはその誘導体などが使用可能であり、昆虫細胞にはｐＶＬ９４１などが使用可能である。

【００５０】
さらに他の態様は、本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の発現ベクターを有効成分として含むＴＧＦ－β関連疾患の治療または予防用薬学組成物を提供する。「ＴＧＦ－β」および「ペプチド」に関する内容は上述した通りである。
【００５１】
本明細書で使われる用語「ＴＧＦ－β関連疾患」または「ＴＧＦ－β疾患」は、本発明のＴＧＦ－βシグナル伝達経路を抑制するペプチドを用いた治療から利得を得るすべての障害、疾病または疾患を意味し、それには個体が疾患にかかりやすい病理状態を含む慢性および急性疾患または疾病が含まれる。
【００５２】
前記ＴＧＦ－β関連疾患は、細胞外マトリックスの蓄積を特徴とする疾病、循環性ＴＧＦ－βまたは局所部位で活性化されたＴＧＦ－βによって誘発された疾病、内因性ＴＧＦ－βの生成による免疫系の抑制によって誘発された疾患、重症傷害、火傷および重病、例えば、ウイルス性または細菌性感染症から始まった急性免疫欠乏症、ＴＧＦ－βの生成または過剰生成による多器官全身病、およびＴＧＦ－β生成腫瘍を含むものであってもよい。
【００５３】
前記ＴＧＦ－β関連疾患の例には、癌、脳神経疾患（例えば、アルツハイマー認知症およびハンチントン病）、線維性皮膚疾患（例えば、皮膚硬化症、ＣＮＳ病理学瘢痕組織、皮膚瘢痕形成、ケロイド瘢痕形成および神経瘢痕形成）、肺、肝および腎臓の線維性疾患（例えば、慢性肝性線維症、急性肝損傷、癲癇性肺および腎線維症、および肝硬化症）、嚢胞性線維症、心臓線維症、アテローム性硬化症および動脈硬化症、全身性硬化症、および眼線維症などが含まれるが、これに限定されるものではない。
【００５４】
本明細書における用語「治療」は、本発明の組成物の投与によって当該疾患の症状が好転または有利に変更するすべての行為を意味する。
【００５５】
本明細書における用語「予防」は、本発明の組成物の投与によって当該疾患または疾患の発病の可能性が抑制または遅延されるすべての行為を意味する。
【００５６】
前記薬学組成物は、薬学的に許容可能な担体を含むことができる。前記「薬学的に許容可能な担体」とは、生物体を刺激することなく、注入される化合物の生物学的活性および特性を阻害しない担体または希釈剤を意味することができる。ここで、「薬学的に許容される」意味は、有効成分の活性を抑制することなく適用（処方）対象が適応可能な以上の毒性を持たないという意味である。
【００５７】
本発明に使用可能な前記担体の種類は、当該技術分野にて通常使用され薬学的に許容される担体であればいずれでも使用可能である。前記担体の非制限的な例としては、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、アルブミン注射溶液、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノールなどが挙げられる。これらは単独で使用されるか２種以上を混合して使用可能である。前記薬学組成物は、有効成分以外に薬学的に許容される担体を含む、当業界にて公知の通常の方法により、投与経路によって経口用剤形または非経口用剤形に製造できる。
【００５８】
前記薬学組成物は、それぞれ通常の方法によって、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エアゾールなどの経口型剤形、外用剤、坐剤または滅菌注射溶液の形態に製剤化して使用可能である。前記薬学組成物を製剤化する場合、一般的に使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、または界面活性剤などの希釈剤または崩壊剤を追加して調製可能である。
【００５９】
前記薬学組成物が経口用剤形に製造される場合、好適な担体と共に、当業界にて公知の

方法によって、粉末、顆粒、錠剤、丸剤、糖衣錠剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、懸濁液、ウエハーなどの剤形に製造できる。この時、薬学的に許容される好適な担体の例としては、ラクトース、グルコース、スクロース、デキストロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトールなどの糖類、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、コムギデンプンなどのデンプン類、セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ナトリウム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などのセルロース類、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、マグネシウムステアレート、鉱物油、麦芽、ゼラチン、タルク、ポリオール、植物性油などが挙げられる。製剤化の場合、必要に応じて、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤および／または崩壊剤を含んで製剤化することができる。

【００６０】

前記薬学組成物が非経口用剤形に製造される場合、好適な担体と共に、当業界にて公知の方法によって、注射剤、経皮投与剤、鼻腔吸入剤および坐剤の形態に製剤化できる。注射剤に製剤化する場合、好適な担体としては、滅菌水、エタノール、グリセロールやプロピレングリコールなどのポリオール、またはこれらの混合物が挙げられ、好ましくは、リンゲル溶液、トリエタノールアミンが含有されたＰＢＳ（ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ｓａｌｉｎｅ）や注射用滅菌水、５％デキストロースのような等張溶液などを使用することができる。経皮投与剤に製剤化する場合、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、外用液剤、パスタ剤、リニメント剤、エアゾール剤などの形態に製剤化できる。鼻腔吸入剤の場合、ジクロロフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素などの好適な推進剤を用いてエアゾールスプレー形態に製剤化されてもよいし、坐剤に製剤化する場合、その基剤としては、ウィテップゾール（ｗｉｔｅｐｓｏｌ）、ツイーン（ｔｗｅｅｎ）６１、ポリエチレングリコール類、カカオ脂、ラウリン脂、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンステアレート類、ソルビタン脂肪酸エステル類などが使用できる。

【００６１】

前記薬学組成物は、薬学的に有効な量で投与されるが、前記用語「薬学的に有効な量」とは、医学的治療または予防に適用可能な合理的なベネフィット／リスクの比率で疾患を治療または予防するのに十分な量を意味し、有効用量レベルは、疾患の重症度、薬物の活性、患者の年齢、体重、健康、性別、患者の薬物に対する敏感度、使用された本発明の組成物の投与時間、投与経路および排出比率治療期間、使用された本発明の組成物と配合または同時使用される薬物を含む要素およびその他の医学分野にてよく知られた要素によって決定できる。前記薬学組成物は、単独で投与したり、公知の当該疾患に対する治療効果を示すことが知られた成分と併用して投与される。前記要素をすべて考慮して副作用なしに最小限の量で最大効果が得られる量を投与することが重要である。

【００６２】

前記薬学組成物の投与量は、使用目的、疾患の中毒度、患者の年齢、体重、性別、既往歴、または有効成分として使用される物質の種類などを考慮して当業者が決定することができる。例えば、本発明の薬学組成物は、成人１人あたり約０．１ｎｇ～約１，０００ｍｇ／ｋｇ、好ましくは１ｎｇ～約１００ｍｇ／ｋｇで投与することができ、本発明の組成物の投与頻度は特にこれに限定されないが、１日１回投与するか、または用量を分割して数回投与することができる。前記投与量または投与回数は、いかなる面でも本願の範囲を限定するものではない。

【００６３】

さらに他の態様は、個体に、前記ＴＧＦ－β関連疾患の治療または予防用薬学組成物を投与するステップを含むＴＧＦ－β関連疾患の治療または予防方法を提供する。前記「ＴＧＦ－β関連疾患」および「薬学組成物」に関する説明は上述した通りである。

【００６４】

本明細書で使われる用語「個体」は、ＴＧＦ－β関連疾患が発病したり、発病する危険

があるネズミ、家畜、ヒトなどを含む哺乳動物、鳥類、爬虫類、養殖魚類などを制限なく含むことができる。

【００６５】

前記薬学組成物は、薬学的に有効な量で単一または多重投与できる。この時、組成物は、液剤、散剤、エアゾール、注射剤、輸液剤（リンゲル）、カプセル剤、丸剤、錠剤、坐剤またはパッチの形態に剤形化されて投与することができる。前記癌の予防または治療用薬学組成物の投与経路は、目的組織に到達できるいかなる一般的な経路を通しても投与可能である。

【００６６】

前記薬学組成物は特にこれに限定されないが、目的によって、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、経皮パッチ投与、経口投与、鼻内投与、肺内投与、直腸内投与などの経路を通して投与可能である。ただし、経口投与時には剤形化されない形態でも投与することができ、胃酸によって前記薬学組成物の有効成分が変性または分解されうるため、経口用組成物は、活性薬剤をコーティングしたり、胃での分解から保護されるように剤形化された形態または経口用パッチ形態で口腔内に投与してもよい。また、前記組成物は、活性物質が標的細胞に移動できる任意の装置によって投与可能である。

【００６７】

本発明の一実施例によれば、前記組成物に含まれたペプチドは、ＴＧＦ－β受容体に結合したり、ＴＧＦ－βの発現レベルまたは細胞外排出量を減少させるなどでＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制することができ、これによって、ＴＧＦ－β関連疾患を効果的に治療または予防することができる。

【００６８】

さらに他の態様は、本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明の発現ベクターを有効成分として含む、癌の治療または予防用薬学組成物を提供する。「ＴＧＦ－β」、「ペプチド」および「薬学組成物」に関する内容は上述した通りである。

【００６９】

本明細書における用語「癌」は、身体組織の自律的な過剰成長によって異常成長した腫瘍、または腫瘍を形成する病気を意味する。前記癌は、ＴＧＦ－βを発現する癌、より好ましくは、ＴＧＦ－βの過度の活性化を特徴とする癌であってもよいし、具体的には、肝臓癌、肺癌、膵臓癌、非小細胞性肺癌、結腸癌、骨癌、皮膚癌、頭部または頸部癌、皮膚または眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、胃癌、肛門付近癌、結腸癌、乳癌、卵管癌、子宮内膜癌腫、子宮頸癌腫、膣癌腫、陰門癌腫、ホジキン病（Ｈｏｄｇｋｉｎ’ｓ ｄｉｓｅａｓｅ）、食道癌、小腸癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性または急性白血病、リンパ球リンパ腫、膀胱癌、腎臓または輸尿管癌、腎細胞癌腫、腎骨盤癌腫、中枢神経系（ＣＮＳ；ｃｅｎｔｒａｌ ｎｅｒｖｏｕｓ ｓｙｓｔｅｍ）腫瘍、１次中枢神経系リンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫または脳下垂体腺腫であってもよいが、これに限定されるものではない。

【００７０】

さらに他の態様は、個体に、前記癌の治療または予防用薬学組成物を投与するステップを含む癌の治療または予防方法を提供する。前記「癌」、および「薬学組成物」に関する説明は上述した通りである。

【００７１】

本明細書で使われる用語「個体」は、癌疾患が発病したり、発病する危険があるネズミ、家畜、ヒトなどを含む哺乳動物、鳥類、爬虫類、養殖魚類などを制限なく含むことができる。

【００７２】

本発明の一実施例によれば、前記組成物に含まれたペプチドは、ＴＧＦ－β受容体に結合したり、ＴＧＦ－βの発現レベルまたは細胞外排出量を減少させるなどでＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制することができる。したがって、前記組成物は、癌化過程または癌微細環境の調節に重要な役割をするＴＧＦ－β関連シグナル伝達経路を効果的に抑制できるこ

とから、これを用いて癌を治療または予防することができる。
【発明の効果】
【００７３】
本発明の新規なペプチドは、ＴＧＦ－βによるシグナル伝達経路を抑制できることから、ＴＧＦ－β関連疾患、ＴＧＦ－βによって誘導される腫瘍成長および転移などの癌化過程を効果的に阻害することができる。したがって、前記ペプチドを含む組成物は、効果的にＴＧＦ－β関連疾患、ひいては、癌を治療または予防できるというメリットがある。
【図面の簡単な説明】
【００７４】
【図１】ＴＧＦ－βシグナル伝達抑制候補ペプチドの配列をまとめて示す図である。
【図２】本発明のペプチドのＴＧＦ－β受容体結合を分析した図である。
【図３】Ｂｘｐｃ３およびＡｓｐｃ１細胞株においてＴＧＦ－β処理によるｐＳｍａｄ２／３の発現レベルの変化を時間ごとに示す図である。
【図４】膵臓癌細胞株のＴＧＦ－βの発現レベルを示す図である。
【図５】膵臓癌細胞株におけるＴＧＦ－β受容体の発現レベルを示す図である。
【図６】本発明のペプチド処理によるＴＧＦ－βサイトカインの濃度変化を示す図である。
【図７】膵臓癌細胞株であるＡｓｐｃ１における本発明のペプチド処理によるｐＳｍａｄ２／３の発現レベルの変化を示す図である。
【図８】膵臓癌細胞株であるＢｘｐｃ３における本発明のペプチド処理によるｐＳｍａｄ２／３の発現レベルの変化を示す図である。
【図９】膵臓癌細胞株であるＰａｎｃ１における本発明のペプチド処理によるｐＳｍａｄ２／３の発現レベルの変化を示す図である。
【図１０】膵臓癌細胞株であるＡｓｐｃ１における本発明のペプチド処理による癌細胞増殖能の変化を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００７５】
一態様は、以下の新規ペプチド；これをコードするポリヌクレオチド；または前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター；を提供する。
【００７６】
本発明の一実施形態において、前記ペプチドは、配列番号１６で記載される下記一般式１のアミノ酸配列を含むものであってもよい。
【００７７】
［一般式１］
Ｆ－X_1－Ｌ－Ｇ－Ｐ－X_2－Ｐ－Ｙ－Ｉ－Ｗ－X_3－Ｌ－Ｄ－Ｔ
【００７８】
前記一般式１において、X_1、X_2およびX_3は、それぞれ独立してシステイン（Ｃ）またはセリン（Ｓ）であってもよいし、具体的には、X_1－X_2－X_3は、Ｃ－Ｃ－Ｓ、Ｃ－Ｃ－ＣまたはＳ－Ｓ－Ｓであってもよい。
【００７９】
前記ペプチドは、任意のアミノ酸またはペプチドを追加的に含むものであってもよいし、具体的には、前記ペプチドは、前記一般式１で表されるアミノ酸配列の一末端、好ましくは、Ｃ－末端に任意のアミノ酸またはペプチドが直接的に連結されて追加されたペプチドを含むものであってもよい。前記追加されるアミノ酸またはペプチドは、アラニン（Ａ）、フェニルアラニン（Ｆ）、バリン（Ｖ）、ロイシン（Ｌ）、セリン（Ｓ）、またはこれらの組み合わせであってもよく、非制限的な例としては、アラニン（Ａ）、フェニルアラニン（Ｆ）、バリン－ロイシン－セリン－ロイシン（Ｖ－Ｌ－Ｓ－Ｌ）またはバリン－ロイシン－セリン－フェニルアラニン（Ｖ－Ｌ－Ｓ－Ｆ）であってもよい。
【００８０】
前記ペプチドは、配列番号１～８のうち１つ以上のアミノ酸配列を含むものであってもよいし、具体的には、配列番号１～８のうち１つのアミノ酸配列からなるものであっても

よい。
【００８１】
本発明の一実施形態において、前記ペプチドは、配列番号１７で記載される下記一般式２のアミノ酸配列を含むものであってもよい。
【００８２】
［一般式２］
Ａ－Ｈ－Ｃ－Ｓ－Ｃ－Ｄ
【００８３】
前記ペプチドは、任意のアミノ酸またはペプチドを追加的に含むものであってもよいし、具体的には、前記ペプチドは、前記一般式１で表されるアミノ酸配列の一末端、好ましくは、Ｃ－末端に任意のアミノ酸またはペプチドが直接的に連結されて追加されたペプチドを含むものであってもよい。前記追加されるアミノ酸またはペプチドは、セリン（Ｓ）、アルギニン（Ｒ）、アスパラギン酸（Ｄ）、アスパラギン（Ｎ）、グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、フェニルアラニン（Ｆ）、またはこれらの組み合わせであってもよく、非制限的な例としては、セリン－アルギニン－アスパラギン酸－アスパラギン（Ｓ－Ｒ－Ｄ－Ｎ）またはグリシン－アラニン－フェニルアラニン－アラニン（Ｇ－Ａ－Ｆ－Ａ）であってもよい。
【００８４】
前記ペプチドは、配列番号９および１０のうち１つ以上のアミノ酸配列を含むものであってもよいし、具体的には、配列番号９および１０のうち１つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。
【００８５】
本発明の一実施形態において、前記ペプチドは、下記の配列番号１８で記載される一般式３のアミノ酸配列を含むものであってもよい。
【００８６】
［一般式３］
Ｔ－Ｉ－Ｖ－Ｙ－Ｙ－Ｖ－$Ｘ_4$－$Ｘ_5$－Ｋ－Ｐ－Ｋ－Ｖ－Ｅ－Ｑ
【００８７】
前記一般式３において、$Ｘ_4$は、グリシン（Ｇ）、ヒスチジン（Ｈ）またはバリン（Ｖ）であってもよく、$Ｘ_5$は、アルギニン（Ｒ）、ロイシン（Ｌ）、またはイソロイシン（Ｉ）であってもよいし、具体的には、$Ｘ_4$－$Ｘ_5$は、Ｇ－Ｒ、Ｇ－Ｌ、Ｈ－ＩまたはＶ－Ｉであってもよい。
【００８８】
前記ペプチドは、配列番号１１～１４のうち１つ以上のアミノ酸配列を含むものであってもよいし、具体的には、配列番号１１～１４のうち１つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。
【００８９】
他の態様は、上記のペプチド；上記のポリヌクレオチド；または上記の発現ベクター；の用途であって、ＴＧＦ－β関連疾患、特にＴＧＦ－βが発現する癌の治療または予防の用途を提供する。
【００９０】
前記ＴＧＦ－β関連疾患の例には、癌、脳神経疾患（例えば、アルツハイマー認知症およびハンチントン病）、線維性皮膚疾患（例えば、皮膚硬化症、ＣＮＳ病理学瘢痕組織、皮膚瘢痕形成、ケロイド瘢痕形成および神経瘢痕形成）、肺、肝および腎臓の線維性疾患（例えば、慢性肝性線維症、急性肝損傷、癲癇性肺および腎線維症、および肝硬化症）、嚢胞性線維症、心臓線維症、アテローム性硬化症および動脈硬化症、全身性硬化症、および眼線維症などが含まれるが、これに限定されるものではない。
【００９１】
前記癌は、肝臓癌、肺癌、膵臓癌、非小細胞性肺癌、結腸癌、骨癌、皮膚癌、頭部または頸部癌、皮膚または眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、胃癌、肛門付近癌、結腸癌

、乳癌、卵管癌、子宮内膜癌腫、子宮頸癌腫、膣癌腫、陰門癌腫、ホジキン病（Ｈｏｄｇｋｉｎ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）、食道癌、小腸癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性または急性白血病、リンパ球リンパ腫、膀胱癌、腎臓または輸尿管癌、腎細胞癌腫、腎骨盤癌腫、中枢神経系（ＣＮＳ；ｃｅｎｔｒａｌ　ｎｅｒｖｏｕｓ　ｓｙｓｔｅｍ）腫瘍、１次中枢神経系リンパ腫、脊髄腫瘍、脳幹神経膠腫または脳下垂体腺腫であってもよいが、これに限定されるものではない。

【実施例】

【００９２】

以下、実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これらの実施例は例として説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

【００９３】

実施例１：ＴＧＦ－β－シグナル伝達抑制ペプチドの設計

本発明のＴＧＦ－βシグナル伝達抑制ペプチドを開発するために、ＴＧＦ－β受容体を標的とするＴＧＦ－β由来の１４個の候補アミノ酸配列を設計して作製した。候補配列の具体的な情報は下記表１および図１に記載した。

【００９４】

【表１】

候補ペプチド	アミノ酸配列	標的	配列番号
P1	FCLGPCPYIWSLDTA	TGFβRI/II	1
P2	FCLGPCPYIWCLDT	TGFβRI/II	2
P3	FSLGPSPYIWSLDT	TGFβRI/II	3
P4	FCLGPCPYIWSLDTF	TGFβRI/II	4
P5	FCLGPCPYIWCLDTF	TGFβRI/II	5
P6	FCLGPCPYIWSLDTVLSL	TGFβRI/II	6
P7	FCLGPCPYIWCLDTVLSL	TGFβRI/II	7
P8	FCLGPCPYIWCLDTVLSF	TGFβRI/II	8
P9	AHCSCDSRDN	TGFβRI/II	9
P10	AHCSCDGAFA	TGFβRI/II	10
P11	TIVYYVGRKPKVEQ	TGFβRII	11
P12	TIVYYVGLKPKVEQ	TGFβRII	12
P13	TIVYYVHIKPKVEQ	TGFβRII	13
P14	TIVYYVVIKPKVEQ	TGFβRII	14
P144（対照群）	TSLDASIWAMMQNA	TGFβRII	15

【００９５】

上記の候補ペプチドの作製のために、タンパク質データバンク（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ）の登録されたタンパク質の結晶構造（ＰＤＢ：３ＫＦＤ）を用いて、ＴＧＦ－β受容体１（ＴＧＦＢＲ１）に結合可能な部位を予測し、これに基づいて特定のペプチドをデザインした後、分子モデリングプログラムであるＡｕｔｏｄｏｃｋにより結合の可能性を確認した後、予測された構造を生成した。その結果、代表的にＰ３、Ｐ５、Ｐ３／５ハイブリッドおよびＰ６ペプチドの場合、ＴＧＦ－β受容体１に結合できることを確認した（図２）。

【００９６】

前記結果に基づいて、本発明で作製した候補ペプチドがＴＧＦ－β受容体に結合することにより、ＴＧＦ－βによって誘導されるシグナル伝達経路を抑制できることが分かる。

【００９７】

実施例２：ＴＧＦ－β－シグナル伝達抑制効果確認条件の確立

前記実施例１で作製した候補ペプチドのＴＧＦ－βシグナル伝達の抑制効果を確認するための条件を確立するために、下記の実験を行った。

【００９８】

ＴＧＦ－βシグナル伝達経路はＴＧＦ－β受容体から進行し、ＴＧＦ－βによってＴＧＦ－β受容体が活性化されると、Ｓｍａｄ２／３タンパク質がリン酸化される過程によりＴＧＦ－βシグナル伝達経路が進行することが知られている。したがって、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路の活性または抑制はリン酸化－Ｓｍａｄ２／３（ｐ－Ｓｍａｄ２／３）の発現レベルの変化により確認できることから、ＴＧＦ－β処理によるｐ－Ｓｍａｄ２／３の誘導条件を確認した。

【００９９】

具体的には、時間ごとに細胞から発現するリン酸化－Ｓｍａｄ２／３の発現をウェスタンブロッティング（Ｗｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔｔｉｎｇ）実験で分析するために、膵臓癌細胞株であるＢｘｐｃ３とＡｓｐｃ１にＴＧＦ－βサイトカインを５０ｎｇ／ｍｌで処理した後、時間ごとに得た細胞にプロテアーゼ抑制剤（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が含まれた細胞溶解緩衝液を添加して溶解させた後、サンプリングしてウェスタンブロッティングのためのサンプルを作製した。前記サンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥに電気泳動し、これをニトロセルロース膜に移動させた後、脱脂粉乳を用いてブロッキングした。次に、前記膜をＳｍａｄ２／３またはｐＳｍａｄ２／３に対する一次抗体と４℃で１日間インキュベーションさせウォッシュした後、前記一次抗体に結合できるｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈペルオキシダーゼ－結合二次抗体で室温で２時間インキュベーションさせた。この後、ウエスタンＥＣＬ基質（Ｔｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて化学発光によって可視化され、前記得られた発光イメージをＣｈｅｍｉｄｏｃ（ｂｉｏｒａｄ）で分析した。

【０１００】

その結果、Ｂｘｐｃ３およびＡｓｐｃ１細胞株の場合、ＴＧＦ－βを処理し、１２～２４時間でｐＳｍａｄ２／３の発現レベルが高いことを確認したことから（図３）、以下の実験ではＴＧＦ－βを処理し、２４時間後のｐＳｍａｄ２／３の発現レベルを確認してＴＧＦ－βシグナル伝達経路の抑制の有無を確認した。

【０１０１】

次に、膵臓癌細胞株のＴＧＦ－βの発現レベルを確認するために、膵臓癌細胞株であるＢｘｐｃ３、Ａｓｐｃ１、Ｐａｎｃ１、Ｃａｐａｎ２およびｍｉａｐａｃａ２と患者に由来する癌細胞株であるＳＮＵ２１３を、４８時間６ウェルプレートで1×10^{6}／ウェルで培養した後、培養液におけるＴＧＦ－βサイトカインの濃度をＥＬＩＳＡ手法で分析した。

【０１０２】

その結果、ＢｘＰＣ３、ＡｓＰＣ１、Ｐａｎｃ１、Ｃａｐａｎ２、Ｍｉａｐａｃａ２およびＳＮＵ２１３細胞におけるＴＧＦ－βサイトカインレベルを示すことを確認した（図４）。これにより、前記細胞株はＴＧＦ－βの発現量を抑制する機序によるＴＧＦ－βシグナル伝達抑制効果確認実験に使用できることが分かる。

【０１０３】

次に、膵臓癌細胞株におけるＴＧＦ－βが結合するＴＧＦ－β受容体（ＴＧＦＢＲ）の発現を確認するために、膵臓癌細胞株ＢｘＰＣ３、ＡｓＰＣ１、Ｍｉａｐａｃａ２細胞においてＴＧＦＢＲ１、ＴＧＦＢＲ２、ＴＧＦＢＲ３受容体に対する発現をウェスタンブロッティング実験で分析した。具体的には、各細胞に細胞溶解緩衝液を添加して溶解させた後、サンプリングしてウェスタンブロッティングサンプルを作製し、実施例２に記載されたウェスタンブロッティング方法によりＴＧＦＢＲ１、ＴＧＦＢＲ２、ＴＧＦＢＲ３を検出できる各一次抗体を用いて各受容体に対する発現を比較した。

【０１０４】

その結果、ＡｓＰＣ１膵臓癌細胞株は概して高いＴＧＦＢＲ１、ＴＧＦＢＲ２、ＴＧＦ

ＢＲ３の発現レベルを示すことを確認し、他の細胞株もＴＧＦＢＲが発現することを確認した（図５）。これにより、前記細胞株はＴＧＦ－βとＴＧＦ－β受容体との結合を阻害する機序によるＴＧＦ－βシグナル伝達抑制効果確認実験に使用できることが分かる。

【０１０５】

実施例３：候補ペプチドのＴＧＦ－βの発現量抑制効果の確認

前記実施例１で作製した候補ペプチドが細胞外ＴＧＦ－βの発現レベルを抑制できるかを確認するために、下記の実験を行った。

【０１０６】

具体的には、膵臓癌細胞株であるＡｓｐｃ１を９６ウェルプレートに２×１０^{4}／ウェルの濃度でシーディングして１日間培養した後、ＴＧＦ－β５０ｎｇ／ｍｌ単独またはＴＧＦ－β＋抑制物質（候補ペプチドおよび対照群ペプチド）を４８時間処理後に、癌細胞培養液におけるＴＧＦ－βサイトカインの濃度をＥＬＩＳＡ手法で分析した。ＴＧＦ－β検出ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔを用いて、細胞外排出されたＴＧＦ－βサイトカインの濃度をマルチプレートリーダーで吸光度を測定してグラフ化した。

【０１０７】

その結果、Ａｓｐｃ１細胞の場合、候補ペプチドのうちＰ５、Ｐ６、Ｐ７、Ｐ１４ペプチドが直接的にＴＧＦ－βサイトカインの排出量自体を抑制することを確認した（図６）。前記結果に基づいて、本発明のＴＧＦ－β抑制ペプチドは、ＴＧＦ－βの発現レベル、具体的には、ＴＧＦ－βの細胞外排出量自体を抑制させることにより、ＴＧＦ－βシグナル伝達経路を抑制できることが分かる。

【０１０８】

実施例４：候補ペプチドのＴＧＦ－β－シグナル伝達抑制効果の確認

前記実施例１で作製した候補ペプチドのＴＧＦ－βシグナル伝達の抑制効果を確認するために、下記の実験を行った。

【０１０９】

具体的には、膵臓癌細胞株であるＡｓｐｃ１、Ｂｘｐｃ３およびＰａｎｃ１細胞株を６ウェルプレートに１×１０^{6}／ウェルの濃度でシーディングして１日間培養した後、翌日、ＴＧＦ－βまたはＴＧＦ－β＋候補ペプチドを２４時間処理し（対照群：１５％ＡＣＮ－候補ペプチド溶媒、ＤＭＳＯ－Ｐ１４４ペプチド溶媒、Ｐ１４４）ｐＳｍａｄ２／３と全体Ｓｍａｄ２／３の発現レベルを、実施例２に記載されたウェスタンブロッティング方法で分析した。

【０１１０】

その結果、Ａｓｐｃ１細胞の場合、本発明によるペプチドがｐＳｍａｄ２／３の発現レベルを抑制することが確認され、その中では特にＰ６ペプチドがｐＳｍａｄ２／３の発現レベルの抑制能に最も優れていることが確認された（図７）。また、Ｂｘｐｃ３およびＰａｎｃ１細胞株の場合でも、本発明によるペプチドがｐＳｍａｄ２／３の発現レベルを著しく抑制することを確認した（図８および図９）。前記結果に基づいて、本発明で作製したＴＧＦ－βシグナル伝達抑制ペプチドは、実際にＴＧＦ－βシグナル伝達を効果的に抑制できることが分かる。

【０１１１】

実施例５：候補ペプチドの癌細胞成長抑制の確認

前記実施例１で作製した候補ペプチドのＴＧＦ－βシグナル伝達の抑制による癌細胞増殖抑制効果を確認するために、下記の実験を行った。

【０１１２】

具体的には、膵臓癌細胞株であるＡｓｐｃ１を９６ウェルプレートに２×１０^{4}／ウェルの濃度でシーディングして１日間培養した後、ＴＧＦ－β５０ｎｇ／ｍｌまたはＴＧＦ－β＋抑制物質（候補ペプチド、ガルニセルチブまたはＬＹ２１０９７６１）を２４時間処理後に、ＣＣＫ－８アッセイ試薬（ｓｉｇｍａ）を用いて、生存細胞の比率をマルチプレートリーダーで吸光度を測定してグラフ化した。ガルニセルチブ（Ｇａｕｎｉｓｅｒｔｉｂ）およびＬＹ２１０９７６１は周知のＴＧＦ－β抑制剤として１００μｍの濃度で使

用した。
【０１１３】
その結果、前記癌細胞株に先立ち、ＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制することが確認された本発明によるペプチドを処理する場合、癌細胞の増殖能が抑制されることを確認することができた（図１０）。
【０１１４】
前記結果に基づいて、本発明で作製したＴＧＦ－βシグナル伝達抑制ペプチドは、ＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制する機序により癌細胞の増殖を抑制できることが分かる。
【０１１５】
上述した本発明の説明は例示のためのものであり、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は本発明の技術的思想や必須の特徴を変更しなくても他の具体的な形態に容易に変形可能であることを理解することができる。そのため、以上に記述した実施例はすべての面で例示的であり、限定的ではないと理解しなければならない。
【産業上の利用可能性】
【０１１６】
本発明は、ＴＧＦ－βシグナル伝達を抑制できるペプチドとその用途であって、ＴＧＦ－βシグナル伝達関連疾患、ひいては、ＴＧＦ－βが発現する癌を治療または予防する方法に関する。
【０１１７】
[配列リストＦｒｅｅ　Ｔｅｘｔ]
〈110〉　Korea Institute of Science and Technology
〈120〉　Novel peptides capable of inhibiting TGF-beta signaling and uses thereof
〈130〉　OP21-013PCT
〈150〉　KR 10-2020-0182441
〈151〉　2020-12-23
〈160〉　18
〈170〉　KoPatentIn 3.0
〈210〉　1
〈211〉　15
〈212〉　PRT
〈213〉　Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉　P1
〈400〉　1
Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Ala
1　　5　　10　　15
〈210〉　2
〈211〉　14
〈212〉　PRT
〈213〉　Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉　P2
〈400〉　2
Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Cys Leu Asp Thr
1　　5　　10
〈210〉　3
〈211〉　14
〈212〉　PRT
〈213〉　Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 P3
〈400〉 3
Phe Ser Leu Gly Pro Ser Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr
1 5 10
〈210〉 4
〈211〉 15
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P4
〈400〉 4
Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Phe
1 5 10 15
〈210〉 5
〈211〉 15
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P5
〈400〉 5
Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Cys Leu Asp Thr Phe
1 5 10 15
〈210〉 6
〈211〉 18
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P6
〈400〉 6
Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Val Leu
1 5 10 15
Ser Leu
〈210〉 7
〈211〉 18
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P7
〈400〉 7
Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Cys Leu Asp Thr Val Leu
1 5 10 15
Ser Leu
〈210〉 8
〈211〉 18
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P8
〈400〉 8

Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Cys Leu Asp Thr Val Leu
1 5 10 15
Ser Phe
〈210〉 9
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P9
〈400〉 9
Ala His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn
1 5 10
〈210〉 10
〈211〉 10
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P10
〈400〉 10
Ala His Cys Ser Cys Asp Gly Ala Phe Ala
1 5 10
〈210〉 11
〈211〉 14
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P11
〈400〉 11
Thr Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln
1 5 10
〈210〉 12
〈211〉 14
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P12
〈400〉 12
Thr Ile Val Tyr Tyr Val Gly Leu Lys Pro Lys Val Glu Gln
1 5 10
〈210〉 13
〈211〉 14
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P13
〈400〉 13
Thr Ile Val Tyr Tyr Val His Ile Lys Pro Lys Val Glu Gln
1 5 10
〈210〉 14
〈211〉 14

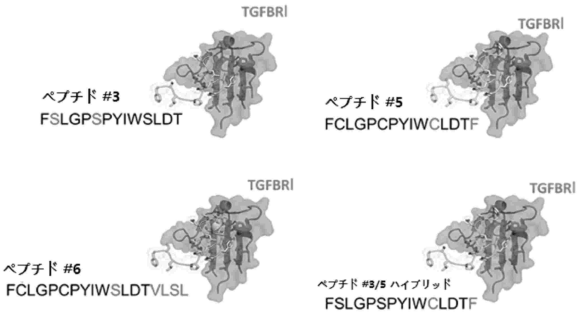
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P14
〈400〉 14
Thr Ile Val Tyr Tyr Val Val Ile Lys Pro Lys Val Glu Gln
1 5 10
〈210〉 15
〈211〉 14
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 P144
〈400〉 15
Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Trp Ala Met Met Gln Asn Ala
1 5 10
〈210〉 16
〈211〉 14
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 peptide 1
〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (2)
〈223〉 Xaa is cysteine or serine
〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (6)
〈223〉 Xaa is cysteine or serine
〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (11)
〈223〉 Xaa is cysteine or serine
〈400〉 16
Phe Xaa Leu Gly Pro Xaa Pro Tyr Ile Trp Xaa Leu Asp Thr
1 5 10
〈210〉 17
〈211〉 6
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 peptide 2
〈400〉 17
Ala His Cys Ser Cys Asp
1 5
〈210〉 18
〈211〉 14
〈212〉 PRT
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈223〉 peptide 3
〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (7)
〈223〉 Xaa is glycine, histidine or valine
〈220〉
〈221〉 MISC_FEATURE
〈222〉 (8)
〈223〉 Xaa is arginine, leucine or isoleucine
〈400〉 18
Thr Ile Val Tyr Tyr Val Xaa Xaa Lys Pro Lys Val Glu Gln
1 5 10

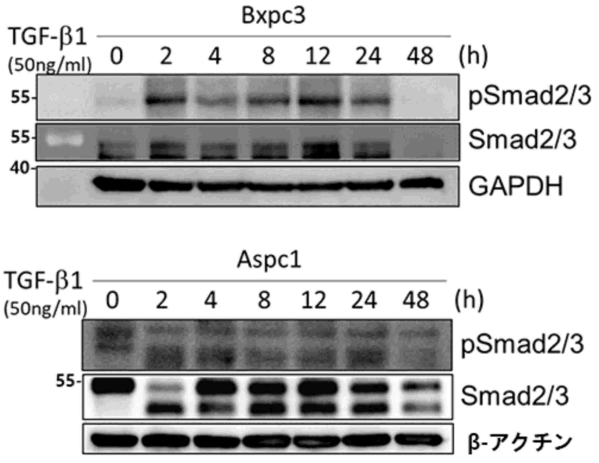
【図面】
【図１】



【図２】

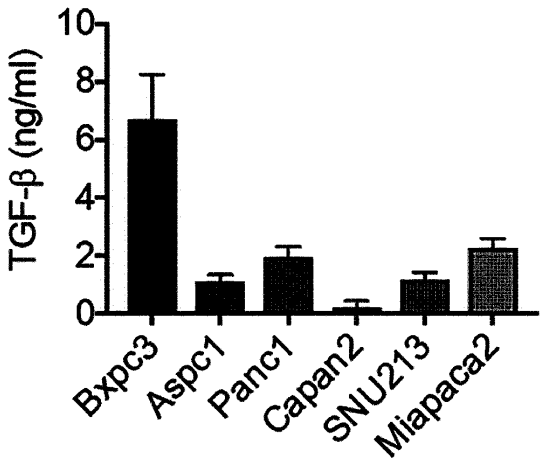


【図３】

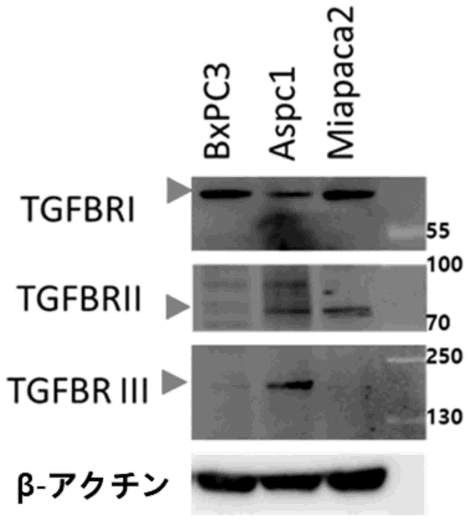


【図４】

[도4]

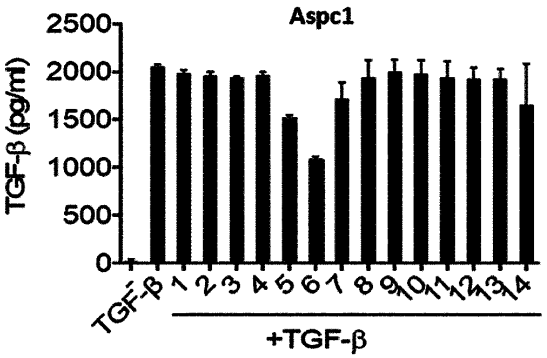


【図５】

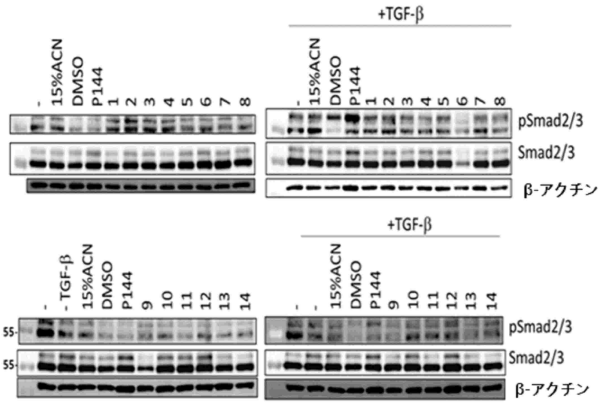


【図６】

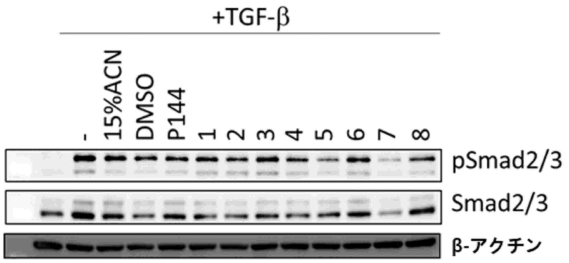
[도6]



【図７】

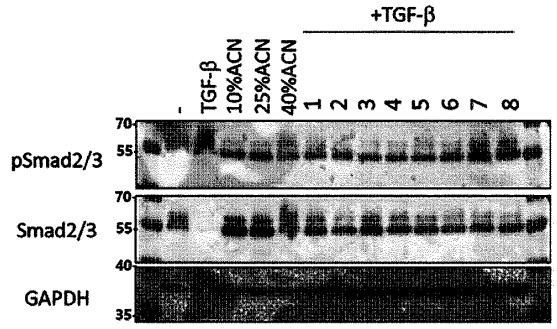


【図８】

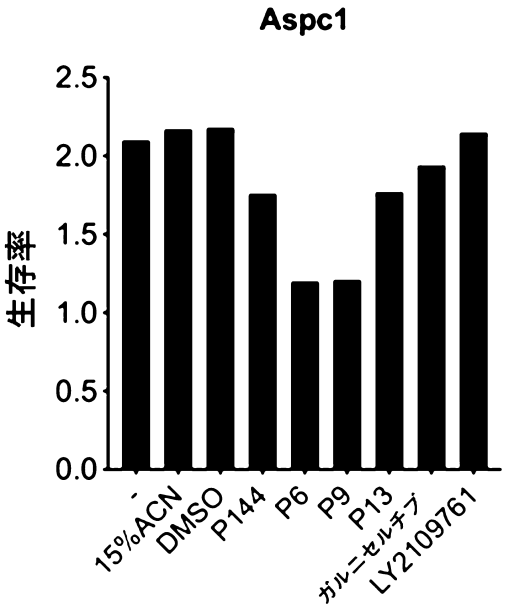


【図９】

[도9]



【図１０】



【配列表】

0007686069000001.xml

フロントページの続き

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｐ　11/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　9/10　１０１
Ａ６１Ｐ　13/12　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　11/00
Ａ６１Ｐ　17/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　13/12
Ａ６１Ｐ　25/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　17/00
Ａ６１Ｐ　27/02　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　25/00
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　27/02
Ａ６１Ｐ　37/06　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　35/00
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　37/06
Ｃ１２Ｎ　15/19　(2006.01)	Ａ６１Ｐ　43/00　１１１
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ　15/19
	Ｃ１２Ｎ　15/63　Ｚ

(72)発明者　ジャン ミーヒ
大韓民国，ソウル ソンブックーク，ファランノ １４ーギル ５
(72)発明者　ユク チェーミン
大韓民国，ソウル ソンブックーク，ファランノ １４ーギル ５
(72)発明者　ゴ ガーヨン
大韓民国，ソウル ソンブックーク，ファランノ １４ーギル ５
(72)発明者　イ ヨンーウン
大韓民国，ソウル ソンブックーク，ファランノ １４ーギル ５
(72)発明者　シン サンーチョル
大韓民国，ソウル ソンブックーク，ファランノ １４ーギル ５

審査官　西澤 龍彦

(56)参考文献

特表２００２－５３０４３１（ＪＰ，Ａ）
特表２０１３－５２０４０５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５１６８７９（ＪＰ，Ａ）
中国特許出願公開第１０４２１１７７８（ＣＮ，Ａ）
特表２０１９－５３３００３（ＪＰ，Ａ）
特表２０２０－５００５１１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０２０／２４５２６４（ＷＯ，Ａ１）
CAS REGISTRY NO. 605685-10-7，DATABSE REGISTRY, [online]，2003年10月16日，[検索日2024.04.17], Retrieved from: STN

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)

Ｃ０７Ｋ
Ｃ１２Ｎ
Ａ６１Ｋ
Ａ６１Ｐ
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）