

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4227520号
(P4227520)

(45) 発行日 平成21年2月18日 (2009. 2. 18)

(24) 登録日 平成20年12月5日 (2008. 12. 5)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K	7/06	(2006. 01)	C O 7 K	7/06	
C O 7 K	1/04	(2006. 01)	C O 7 K	1/04	
C 1 2 P	21/02	(2006. 01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	9/16	(2006. 01)	A 6 1 K	9/16	

請求項の数 9 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-525023 (P2003-525023)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月28日 (2002. 8. 28)
 (65) 公表番号 特表2005-501544 (P2005-501544A)
 (43) 公表日 平成17年1月20日 (2005. 1. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2002/000566
 (87) 国際公開番号 W02003/020753
 (87) 国際公開日 平成15年3月13日 (2003. 3. 13)
 審査請求日 平成17年8月29日 (2005. 8. 29)
 (31) 優先権主張番号 01203314.8
 (32) 優先日 平成13年9月3日 (2001. 9. 3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 592099787
 アステラス ファルマ ユーローブ ベス
 ローテン フェンノートシャップ
 オランダ エヌエル2353 エーヴェー
 レイデルドルプ エリザベスホフ 19
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治
 (74) 代理人 100114007
 弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P-セレクトインに対して選択的に結合するペプチド化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト P-セレクトインに対する親和性を有する、配列 $X A_X A_3 A_1 A_2 A_1 Y$ のペプチド化合物。

(式中、

 A_1 が D-若しくは L-システイン (C) 又は D-若しくは L-バリン (V) であり； A_2 が D-若しくは L-アスパラギン酸 (D) であり； A_3 が D-若しくは L-フェニルアラニン (F) 又は D-若しくは L-トリプトファン (W) であり；ここで、前記配列の $A_3 A_1 A_2 A_1$ の部分は F V D V、W V D V 及び W C D V より選択され； A_X が D-若しくは L-グルタミン酸 (E)、D-若しくは L-アスパラギン酸 (D)、D-若しくは L-システイン (C)、D-若しくは L-グリシン (G)、D-若しくは L-リジン (K) 又は D-若しくは L-アラニン (A) であり；

X が配列の N-末端側を示し、かつ、水素又は1から6の D-若しくは L-アミノ酸を含む残基であり、Y が配列の C-末端側を示し、かつ、水素又は1から11の D-若しくは L-アミノ酸を含みヒドロキシル基によって終結される残基であり、X と Y が一緒になって環式系を形成し得る。)

【請求項 2】

アミノ酸配列が C-末端にアミノ酸 A_4 を更に含み、 A_4 が親水性の側鎖を含む D-若しく

10

20

は L-アミノ酸であり、D-若しくは L-セリン (S) である、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

A_x が、D-若しくは L-グルタミン酸 (E) を表すか又は A₂ を含む、請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

A₁ がバリン (V) である、請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 5】

A₃ がトリプトファン (W) である、請求項 1 - 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 6】

X が少なくとも二つのアミノ酸を含み、その一つがアスパラギン酸 (D) である、請求項 1 - 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。 10

【請求項 7】

環式骨格構造又は束縛骨格構造を含む、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8】

請求項 1 - 7 で規定されるペプチドのうちの少なくとも二つを含む多量体であって、P-セレクトインへの結合に関して、前記多量体を構成する各個々のペプチドが示す親和性定数よりも 1/20 以上小さい親和性定数を有する前記多量体。

【請求項 9】

請求項 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の化合物を調製する方法であって、アミノ酸モノマー又はアミノ酸オリゴマーが化学的又は酵素的連結によって組立てられ、その組立てが液相及び/又は機能的固相に対する界面で行われる前記方法。 20

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、接着分子ヒト P-セレクトインに対して選択的に結合する化合物、前記化合物を調製する方法、治療又は診断方法及び医薬組成物における前記化合物の使用、前記化合物のアミノ酸配列を含むタンパク質材料についてコードする核酸、前記核酸を含む遺伝子デリバリーベヒクル、前記化合物に結合する結合分子、並びに化合物が P-セレクトインに対して結合し得るかどうかを決定する方法に関する。 30

【0002】

(背景技術)

近年、細胞表面接着分子は、細胞増殖、分化、免疫細胞の転生(transmigration)及び応答、並びに癌の転移を含む非常に多くの細胞過程における重要なメディエーターとして認識されてきている。四つの主要な分類の接着分子：免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子(CAM)、カドヘリン、インテグリン及びセレクトインが同定されている。セレクトインは、現在三つの膜貫通型糖質結合糖タンパク質、“内皮”E-セレクトイン、“白血球”L-セレクトイン及び“血小板”P-セレクトインのファミリーを表す。三つのセレクトイン全ては、二価の陽イオン(例えばカルシウム)依存性であり、糖質認識モチーフ及び上皮成長因子様モチーフを有する細胞外ドメイン並びに補体調節タンパク質に関連する幾つかの小型ドメインを所有する。 40

ヒト P-セレクトイン(GMP-140、LECAM-3、PADGEM、CD62、CD62Pとも呼ばれる)は、血小板及び内皮細胞によって発現される。それらの細胞表面に発現される場合に、その最も注目すべき効果は白血球が毛細血管を出て後毛細血管細静脈に入るのを遅らせることであり、後毛細血管細静脈が白血球-内皮接着の主要な場所である。そのような減速過程は、相対的に低親和性で最初の接着を示す白血球のローリング現象として観察される。ローリングしている白血球(rolling leukocyte)の強固な接着は、主にインテグリンによって媒介される。

内皮細胞では P-セレクトインがWeibel-Palade体に貯蔵されており、血小板では P-セレクトインが α-顆粒で見出される。活性化に続き、P-セレクトインは、種々の炎症性物質又は 50

血栓形成物質に応答して、数分間の間に細胞表面に対して動員させられる。内皮 P-セレクチンの主な機能は、白血球を後毛細血管細静脈内に補充する(recruit)ことであり、一方血小板 P-セレクチンも血栓の形成を生じる。P-セレクチンの現在既知である天然リガンドの一つは、白血球の表面上に発現される160 kDaのシアロタンパク質、PSGL-1 (P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1) であり、腹肢(uropod)に集中している。P-セレクチンの構造及び機能のより詳細な説明は、J.Panes, Pathophysiology 5, 271(1999) ; F. Chamoun et al., Frontiers in Bioscience 5, e103(Nov.1, 2000) ; S.I. Hayachi, Circulation 102,1710(2000)のような多くの刊行物において見出される。

【 0 0 0 3 】

P-セレクチンの3-硫酸化ガラクトシルセラミド(スルファチドとも呼ばれる)とのCa-非依存性相互作用の研究によって最近示されたように、P-セレクチンは、より直接的に血小板凝集に関与するようである。前記相互作用は、その結合が抗体WASP12.2によって阻害され得るがAK4によっては阻害されず、白血球接着に関与している天然のP-セレクチンリガンドPSGL-1の結合はWASP12.2及びAK4の両方によって阻害されることから、おそらくP-セレクチンの異なる結合部位で起っている。しかしながら、前記結合部位は重複しているようである。スルファチド相互作用が血小板凝集を安定化することが仮定されている。

炎症及び炎症性過程は、非常に多くの疾患及び状態の病理生理学において主要な役割を果たす。セレクチンレベルの増加が見出された脳の状態及びその結果セレクチン媒介性病理生理学的現象に関係し得る脳の状態には、深刻な外傷性脳損傷、再発性-弛張性(remitting)多発性硬化症、大脳動脈閉塞、虚血及び脳卒中が挙げられる。セレクチンが役割を果たすことが示唆されている心臓の状態には、急性心筋梗塞、血管形成によって生成されるもののような動脈損傷、及び虚血が挙げられる。同様にセレクチンは、虚血及び再灌流障害による腎損傷並びに腎不全のような腎臓の状態に関与する。さらにセレクチンは、器官移植拒絶、寒冷(cold)虚血、出血性ショック、敗血性ショック、腫瘍転移、慢性炎症、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、新脈管形成、汎発性血管内凝固症候群、成人呼吸促進症候群及び循環性ショックにおいて役割を果たすようである。

従って、P-セレクチンカスケードを特異的に妨害することによって、内皮細胞及び白血球の活性化並びにP-セレクチンの特異的な動員及び発現に関与する前記状態又は他の状態を改善することが実行可能であろう。このことは、一例を挙げると、ヒトP-セレクチンに対して選択的に結合するが生理活性を有さないリガンドの投与によって行われ得る。この方法によって、動員されたP-セレクチンは不活性化されて、白血球誘導性の組織損傷を防ぎ得る。P-セレクチンのリガンド又はアンタゴニストがペプチド又は改変ペプチドであれば、遺伝子治療によって同じ効果が達成され得る可能性がある。この方法によると、治療を必要とするヒトの体細胞が、P-セレクチンアンタゴニストをコードするDNA配列を有する発現ベクターでトランスフェクションされ得る。

P-セレクチンのリガンド又はアンタゴニストは、上述する疾患及び状態の予防にも用いられ得る。さらに前記リガンドは、前記疾患のin vivo又はin vitro診断にも有用であり得る。

【 0 0 0 4 】

近年、P-セレクチンに対する前記のような選択的リガンドを同定する又は作製する種々の試みが行われている。今までに多数の物質がテストされたが、どの臨床研究も、それらの化合物のいずれかが所望の臨床効果を生じ、同時に副作用の点で許容されるという決定的な証拠は未だ提供していない。

一例を挙げると、P-セレクチンに対する抗体が生成されて、動物モデルにおいてテストされ、虚血性再灌流障害から腎臓を保護することが見出された(H. C. Rabb et al., JASN 5,907, 1997 ; UA-A-6,033,667)。別の研究では、P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1の組換え可溶性形態(rPSGL-Ig)が、ネコにおいて血栓を阻害することに用いられた(M. J. Eppihimer et al., Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 20,

10

20

30

40

50

2483, 2000)。WO-A-96/09309は、E-及びP-セレクチンに対するリガンドのオリゴサッカライド構造物を開示している。WO-A-99/41363は、セレクチンに対して結合するポドカルキシン(podocalyxin)様タンパク質を開示している。WO-A-00/41711は、ヒトセレクチンファミリーのメンバーに対して結合する種々の小型ペプチド又はペプチド配列を開示している。前記配列の大部分が、ロイシン又はイソロイシンの一つ又はそれ以上のユニットを含む。

P-セレクチンカスケードを阻害する別の試みとして、セレクチンファミリーのレクチンドメインに由来する種々のペプチドが、P-セレクチンに対する好中球接着を阻害することが見出された(例えば、US-A-6,111,065及びUS-A-5,916,876)。前記ペプチドは、おそらく白血球上のP-セレクチンレセプターに対して結合するのであろう。

10

WO-A-94/05269では、P-セレクチン、E-セレクチン及びL-セレクチンのようなセレクチンの結合を阻害するペプチドが記載されている。それらのペプチドは、P-セレクチン、E-セレクチン又はL-セレクチンの11-18アミノ酸配列の部分をコア領域として有する。さらにWO-A-95/31210は、内皮白血球接着分子1(ELAM-1)を含むセレクチンに結合するペプチド及び化合物に関する。それらのペプチドは、炎症を抑制する目的で、セレクチンに、すなわち特にE-セレクチンに、しかしP-セレクチン又はL-セレクチンに対しても、白血球の接着を遮断するために用いられる。

これらの努力にも関わらず、P-セレクチンに対する選択的な親和性を有し、血管内皮細胞又は血小板に対する白血球の接着に関与する種々の疾患及び状態の診断、予防及び治療のための医薬組成物を調製することに用いられ得る物質に対する必要性が未だ存在している。P-セレクチンを発現している組織に対する薬物又は遺伝物質の標的化(targeting)のために、医薬組成物において標的化分子又は部分として用いられ得るP-セレクチンリガンドに対する必要性も存在している。

20

【0005】

(発明の目的)

従って、本発明の目的は、ヒトP-セレクチンに対する親和性を有する化合物を提供することである。

特に、本発明の目的は、P-セレクチンのアンタゴニスト又は部分的アンタゴニストとして作用する化合物を提供することである。

本発明の別の目的は、P-セレクチンを発現している細胞及び組織に対する薬物及び遺伝物質を標的とする能力を有する標的化リガンドとして作用する化合物を提供することである。

30

本発明の更なる目的は、前記化合物を調製する方法の提示である。

更に別の目的は、前記化合物及び前記化合物を含む組成物の使用の提示である。

本発明の他の目的は、次の説明に基づいて明らかとなるであろう。

【0006】

(発明の要約)

第一の側面では、本発明は、ヒトP-セレクチンに対する選択的な親和性を有する化合物を提供する。本発明の化合物は、改変ペプチド、ペプチドアナログ(peptide analogue)又はペプチド模倣物質(peptidomimetic)のような、ペプチド又は機能的等価物である。前記化合物は配列 $X A_X A_3 A_1 A_2 A_1 Y$ を含む。

40

(式中、

A_1 がシステイン(C)、メチオニン(M)及びバリン(V)からなる群より選択されるD-若しくはL-アミノ酸、それらのアナログ(analogue)又はそれらの模倣物質(mimetic)であり；

A_2 がアスパラギン酸(D)、そのアナログ又はその模倣物質からなる群より選択されるD-若しくはL-アミノ酸であり；

A_3 がフェニルアラニン(F)、チロシン(Y)及びトリプトファン(W)からなる群より選択されるD-若しくはL-アミノ酸、それらのアナログ又はそれらの模倣物質であり；

A_X がいずれかのD-若しくはL-アミノ酸、そのアナログ又はその模倣物質であり；

50

XがN-末端の基又は配列のいずれかであり；かつ
YがC-末端の基又は配列のいずれかである。）

前記化合物は、ヒトP-セレクチンに対して典型的にはマイクロモル値域の親和性定数を有するが、前記化合物が2又はそれ以上の結合価(valency)を有する多量体として構成される場合に、その親和性は実質的に増加させられる。

【0007】

WO-A-00/34303では、610アミノ酸を含む配列が記載されており、その配列は配列Asn-Val-Val-Glu-Cys (N V V E C) 及びGly-Phe-Val-Glu-Cys (G F V E C) を含む。P-セレクチンは、前記WO-A-00/34303では言及されていない。与えられた前記二つの配列は、本発明の化合物のアナログでも模倣物質でもない。

10

第二の側面では、本発明は、前記化合物を調製する方法を提供する。この方法は、アミノ酸のモノマー又はオリゴマーを化学的及び酵素的に連結して化合物を組立てることを含む。前記方法は、化合物をコードする核酸配列を有し宿主細胞をトランスフェクションするためのベクターを用いて、化合物をコードする核酸配列を宿主細胞において発現させることを含む。

更なる側面では、本発明は、in vitro及びin vivoで血小板及び内皮細胞に対する白血球の結合を阻害すること並びに血小板凝集を直接的に阻害することに適する医薬又は診断組成物を調製するための本発明の化合物の使用に関する。前記組成物は、薬物として、血栓性疾患、虚血、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、腎不全、寄生虫症、腫瘍及び腫瘍転移のような、白血球の血小板及び内皮細胞に対するP-セレクチン媒介性結合の活性化に関係する状態及び疾患の治療及び予防に有用であり得る。さらに、前記化合物及び前記組成物は、血栓症、脳卒中及び心臓発作のような、血小板凝集に関係する疾患及び状態の診断、予防及び治療に有用であり得る。

20

本発明の化合物を含む医薬組成物は、非経口、経口、経粘膜(transmucosal)、鼻又は肺のような、種々の投与経路に適合させ得る。前記医薬組成物は、薬物標的化合物、生体利用効率増強剤又は本発明の化合物以外の有効成分を更に含んでもよく、即時放出又は修飾放出を提供する。

【0008】

やはり更なる側面では、本発明は、分子がP-セレクチンに対する結合親和性を含むかどうかを決定する方法に関し、前記方法は、P-セレクチン又はその機能的等価物を前記分子及び本発明の化合物に接触させる工程、それに続いて、前記P-セレクチン又はその機能的等価物に対する前記化合物の結合が減少させられるかどうかを決定する工程を含む。

30

さらに本発明は、アミノ酸配列 $X A_X A_3 A_1 A_2 A_1 Y$ (A_X 、 A_3 、 A_1 及び A_2 が上のように定義され、Xが前記配列のN-末端側であり、Yが前記配列のC-末端側である)又はその機能的等価物を含むタンパク質分子をコードする核酸に関する。本明細書で用いられるタンパク質分子は、タンパク質、オリゴペプチド及びポリペプチドのようなアミノ酸配列に基づく化合物、それらの誘導体又はそれらのアナログである。前記核酸は薬物を調製することに用いられ得るが、加えて、前記核酸を含む遺伝子デリバリービヒクルも本発明の範囲内に含まれる。

40

更なる側面では、本発明は、本発明の化合物を特異的に結合し得る結合分子も含む。

さらに本発明は、化合物がヒトP-セレクチンに対して結合し得るかどうかを決定する方法に関し、前記方法は、本発明の化合物においてアミノ酸を保存的なアミノ酸で置換する工程、及び生じた化合物が前記P-セレクチンに対して結合し得るかどうかを決定する工程を含む。

【0009】

(発明の詳細な説明)

本発明の化合物は、血管内皮細胞及び血小板によって発現される膜糖タンパク質であり内皮及び血小板に対する白血球接着に関与するヒトP-セレクチンに対して親和性を有する。前記化合物のP-セレクチンに対する親和性又は結合の特性は、例えば親和性定数(K

50

C₅₀) に関して、定量化され得る。典型的には、約50-100 μM以下の親和性定数が、親和性及び結合の証拠として考えられ得る。望ましいリガンドは、約10 μM以下の親和性定数を有する物質である。本発明の相互作用又は結合において役割を果たす非共有型結合に対して到達し得る最も高い親和性定数は、約10⁻¹⁵ Mである。しかしながら一般的に親和性定数は約10⁻¹² Mより高く、ほとんどの場合、約10⁻⁹ Mより高い。

さらに本発明の化合物は、ペプチド又はペプチドに関連する分子構造物（本明細書では機能的等価物と呼ばれる）を含む。

ペプチドは、ある酸のアミノ基と別の酸のカルボキシル基との結合によって二つ以上のアミノ酸から得られるアミドとして定義される（Merriam Webster Medical Dictionary 2001）。本明細書で用いられるペプチドは、分子内のペプチド構造にも言及し得る。典型的には、ペプチドは天然に存在するL-アミノ酸で構成され、前記天然に存在するL-アミノ酸はアラニン（Ala又はA）、アルギニン（Arg又はR）アスパラギン（Asn又はN）、アスパラギン酸（Asp又はD）、システイン（Cys又はC）、グルタミン（Gln又はQ）、グルタミン酸（Glu又はE）、グリシン（Gly又はG）、ヒスチジン（His又はH）、イソロイシン（Ile又はI）、ロイシン（Leu又はL）、リジン（Lys又はK）、メチオニン（Met又はM）、フェニルアラニン（Phe又はF）、プロリン（Pro又はP）、セリン（Ser又はS）、トレオニン（Thr又はT）、トリプトファン（Trp又はW）、チロシン（Tyr又はY）及びバリン（Val又はV）である。

【0010】

本発明のペプチドの機能的等価物は、本質的には同じヒトP-セレクチン結合活性を含むタンパク質分子であるが必ずしも同じ量を含む必要はなく、一例を挙げると、改変ペプチド、ペプトイド、ペプチドアナログ又はペプチド模倣物質であり得る。

改変ペプチドは、天然に存在するアミノ酸には存在しない置換基又は官能基の導入によってペプチドから得られる分子である。改変ペプチドという用語は、ペプチドと他の化学的分類に由来する分子（この分子は天然に存在するものか又は存在しないもののどちらか）との反応によって得られる分子も含む。一例を挙げると、ビオチン化ペプチド、糖タンパク質及びリポタンパク質は天然において頻繁に見出され、一方PEG化インターフェロン-2b（Peg-Intron（登録商標））のようなポリエチレングリコールで改変されたペプチドは、ペプチドの性質の全てではなく一部を変えて設計されている化学的に改変されたペプチドの例である。

ペプチドに似ているペプトイドは、典型的には二つ以上のアミノ酸のアミドである。しかしながらペプトイドはしばしば、天然に存在するアミノ酸から直接的に得られるのではなく、種々の種類の化学的に合成されたL-又はD-アミノ酸から得られる。

【0011】

ペプチド模倣物質は、広い視野では、多かれ少なかれペプチドに類似する機能的構造が存在するが、骨格に非ペプチド結合も含み得るか又はD-アミノ酸を含み得る化合物である。一般にペプチド模倣物質は、レセプターと酵素との相互作用において、天然ペプチドの代用として機能する（Pharmaceutical Biotechnology, Ed. D. J. A. Crommelin and R. D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, p.138）。ペプチド模倣物質の一種である偽性ペプチド(pseudopeptide)は、アミド結合の代わりにアミド結合イソスター(isostere)を含む化合物である（同書、pp.137-140）。

本発明の化合物は、医薬として許容される酸又は塩基付加塩のような、ペプチド又は機能的等価物の塩も含む。

本発明の化合物は、配列 X A_x A₃ A₁ A₂ A₁ Y を含む点において特徴付けられる（式中、

A₁ が D-若しくは L-システイン（C）、D-若しくは L-メチオニン（M）、D-若しくは L-バリン（V）又はそれらのアナログであり；

A₂ が D-若しくは L-アスパラギン酸（D）又はそれらのアナログであり；

A₃ が D-若しくは L-フェニルアラニン（F）、D-若しくは L-チロシン（Y）、D-若しくは L-トリプトファン（W）又はそれらのアナログであり；

A_x がD-又はL-アミノ酸であり；かつ

Xが前記配列のN-末端側を示し、Yが前記配列のC-末端側を示す；又は

XとYが一緒になって環式系を形成し得る）。

より詳しくは、Xが水素又は1から6のD-若しくはL-アミノ酸を含む残基であり、Yが水素又は1から11のD-若しくはL-アミノ酸を含みヒドロキシシル基によって終結される残基である。

【0012】

本発明によると、前記配列に含まれる A_1 の二つのユニットは独立に選択され、同一であってもよく又は互いに異なってもよい。好ましくは少なくとも一つの A_1 ユニットがバリン(V)を表す。より好ましくは両方の A_1 ユニットがバリン(V)である。別の態様では、 A_1 がシステイン(C)、メチオニン(M)又はバリン(V)のアナログ又は模倣物質である。天然に存在するアミノ酸の適切なアナログ又は模倣物質を選択する技術は、当業者によく知られている。例えば偽性ペプチドアプローチは、ペプチドの高度な化学的又は酵素的安定性を達成するとともにその生理活性を保持することを目的とする。in vivoで急速な分解を受けるペプチド結合は、他の官能基と置き換えられて、バイオイソスター(bioisostere)又はアミド結合代理物を生じる。バイオイソスター基の例は、N-メチルアミド基、チオエステル基、チオアミド基、ケトメチレン基、メチレンアミノ基、レトロインバース(retro-inverse)アミド基、メチレンチオ基及びメチレンオキシ基である(同書、pp.138-139)。ペプチドの選択性を改良するアプローチは、潜在的レセプター又は酵素相互作用の数を減少させる立体配座束縛(conformational constraint)を骨格に導入することである。前記束縛はほとんどの場合、炭素-炭素二重結合(オレフィンアナログ)及び環構造の導入によって達成される(同書)。システイン(C)、メチオニン(M)又はバリン(V)のようなアミノ酸の機能的構造を模倣するアナログを同定するための更なる方法は、コンピュータによるモデリングである。好ましい模倣構造物は、前記アミノ酸と類似する電荷又は電気陰性度、疎水性及び空間位置(spatial orientation)を有する側鎖を有する。別の態様では、一つ又は両方の A_1 ユニットが、システイン(C)、メチオニン(M)又はバリン(V)のD-アミノ酸アナログである。

【0013】

述べたように、本発明は前記ペプチドの機能的等価物も含む。等価物は、特に、保存的アミノ酸交換(conservative amino acid change)を用いるアミノ酸置換によって見出され得る。特に本発明は、化合物がヒトP-セレクチンに対して結合し得るかどうかを決定する方法も含み、前記方法は、本発明の化合物においてアミノ酸を保存的なアミノ酸に置換する工程、及び生じた化合物が前記P-セレクチンに対して結合し得るかどうかを決定する工程を含む。この観点から、ペプチドの正確なアミノ酸組成が(少なくともアミノ酸 A_2 及び A_3 に対しては)ペプチドのアミノ酸の数が増加するのに伴って幾らかそれほど重要でなくなることが見出され、またそれらも本発明の一部である。一例を挙げると、10より多いアミノ酸、好ましくは12より多いアミノ酸を含み、 A_3 としてトリプトファン(W)の代わりにフェニルアラニン(F)を含むペプチドが、ヒトP-セレクチンに対して特異的に結合し得ることが見出された。さらに、前記ペプチドが6アミノ酸を含む場合に、フェニルアラニンによる前記トリプトファンの置換は、特異的に結合するペプチドを生じない。本発明の等価物の別の例は、アミノ酸配列 $X A_x A_3 A_1 A_2 A_1 Y$ を含み、位置 A_2 でアスパラギン酸(D)の代わりにグルタミン酸(E)を含む15アミノ酸を含み、特異的なP-セレクチン結合を生じさせるペプチドである。しかしながら、そのペプチド鎖が6アミノ酸のみである場合、同じ置換は特異的に結合するペプチドを生じさせない。例えば配列EWVEVAは1,600 μ Mの結合親和性を有するが、15-merを有する前記配列は、10 μ M未満の結合親和性を有する。いずれの理論に拘束されることも望まないが、ペプチドの長さの効果は、結合能力に影響を有するペプチドの立体配座に関係しているようである。本発明のペプチドが少なくとも10-mer、好ましくは少なくとも12-merである場合、 A_3 と A_2 はそれぞれFとEを表し得る。

【0014】

本発明によると、 A_2 は、生理的pHでは負電荷を有する溶媒露出側鎖を有しアスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)からなる群より選択されるD-若しくはL-アミノ酸、それらのアナログ又はそれらの模倣物質である。好ましい態様では、 A_2 がL-グルタミン酸(E)又はL-アスパラギン酸(D)のいずれかである。他の態様では、 A_2 がアスパラギン酸(D)又はグルタミン酸(E)の関連するアナログ構造物である。適切なアナログを同定するために、 A_1 に関連して示したのと同じ原理を用いる。

A_3 は、芳香族側鎖を有しフェニルアラニン(F)、チロシン(Y)及びトリプトファン(W)からなる群より選択されるD-若しくはL-アミノ酸、それらのアナログ又はそれらの模倣物質である。より好ましくは、 A_3 が前記の群より選択されるL-アミノ酸である。最も好ましくはトリプトファン(W)である。他の態様では、 A_3 が上に定義するような、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)又はトリプトファン(W)に関連するアナログ構造物である

A_X は、いずれかのD-若しくはL-アミノ酸、それらのアナログ又はそれらの模倣物質であり得る。しかしながら、 A_X を含まない化合物が A_X を含む同様な化合物と比較してP-セレクトインに対して一般的に弱い結合を示すことが見出されたことから、 A_X の存在が必要とされる。好ましい態様の一つでは、 A_X がアスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)からなる群より選択されるD-若しくはL-アミノ酸、それらのアナログ又はそれらの模倣物質である。前記態様では、 A_X の特性が A_2 の特性と似ており、前記化合物が配列 $X A_2 A_3 A_1 A_2 A_1 Y$ を含むものとして規定され得る。しかしながら A_2 の2ユニット(A_1 の2ユニットと同様に)は独立に選択される、すなわち同一であってもよく又は互いに異な

【0015】

Xは、N-末端の基又は配列のいずれかとして定義される。例えば、Xが単純に水素であり得る。より好ましくはXが、一つ以上のアミノ酸の配列、そのアナログ又はその模倣物質である。好ましい態様の一つでは、Xが少なくとも二つのアミノ酸を含む。より好ましくは、Xがバリン(D)、好ましくは他のアミノ酸の一つからなるスペーサーを介して A_X と連結しているバリンを含む。

Yは、C-末端の基又は配列のいずれかとして定義される。いずれのアミノ酸又はアナログもYに含まれない場合には、C-末端基がヒドロキシル基であり得る。好ましい態様では、Yが約5アミノ酸ユニットまでの配列である。負電荷側鎖を有する少なくとも一つのアミノ酸がYに存在することも好ましく、前記Yは残りの $X A_X A_3 A_1 A_2 A_1$ 配列から1-3のアミノ酸によって分離されるのが好ましい。P-セレクトインによる認識は、N-末端における置換基よりもC-末端における置換基に対して、より寛容である。当業者は、この点に関して適切なアミノ酸を見出し得る。

本発明の化合物は、環式又は他の束縛された骨格を有し得る。その場合には、 $X + Y$ が一緒になって、シス-シス結合を通じて適切に連結され得るが、勿論、アミド結合、チオエーテル結合、カルバメート結合又はエステル結合のような、他の種類の(化学的)結合も存在し得る。

$X + Y$ 基の長さは、コア配列がP-セレクトインによって認識される限りは、特に重要ではない。一般的に $X + Y$ の最小の長さは、5-6アミノ酸の長さに一致する。

このような態様の一つでは、本発明は、上に示す構造的特性に加えてC-又はN-末端にユニット A_4 を有する化合物を提供し、このとき A_4 が親水性側鎖を有するD-若しくはL-アミノ酸、それらのアナログ又はそれらの模倣物質である。好ましくは A_4 が、セリン(S)、グリシン(G)、リジン(K)、アルギニン(R)又はグルタミン酸(E)である。最も好ましくはセリン(S)である。 A_4 にとって好ましい位置はYと配列の残りの部分との間であり、配列 $X A_X A_3 A_1 A_2 A_1 A_4 Y$ 及び配列 $X A_2 A_3 A_1 A_2 A_1 A_4 Y$ によって表される。

【0016】

本発明の化合物は、直線骨格、分枝骨格、環式骨格又は束縛骨格を有する。一例を挙げると、少なくとも二つのシステイン(C)ユニットを有するペプチド又は機能的等価物が

、酸化によって環化され得る。化合物がそのようなジスルフィド結合を介して環化される場合には、XとYそれぞれのメンバーのシステインユニットが参加することが好ましい。環式構造物は、実際には、立体配座的に束縛された骨格の例である。他の種類の束縛構造も導入されて、化合物の立体配座的柔軟性を減少させ得る。特に骨格におけるオレフィン結合又は小型の環構造の存在が、前記目的に役立つ。このような束縛の例は、Pharmaceutical Biotechnology, Ed. D. J. A. Crommelin and R. D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, p. 139fにおいて与えられている。

好ましい態様の一つでは、本発明の化合物が、ペプチド又は機能的等価物の多量体として提供される。本明細書で用いられるように、ペプチド化学においてはオリゴマーとも呼ばれる多量体は、ペプチド、タンパク質、ペプトイド、ペプチド模倣物質又はそれらのアナログを指し、二つ以上のペプチド鎖で構成される。例えば、配列 $X A_X A_3 A_1 A_2 A_1 Y$ を含むビオチン化ペプチドの四量体は、それを構成するペプチドよりも実質的に高いP-セレクチンに対する親和性を有することが見出された。本発明の好ましい多量体は、対応するペプチドの親和性定数の1/20より下、特に1/100より下のP-セレクチンに対する親和性定数を有する。

本発明の化合物を形成するために作製され得る別の種類の多量体では、一つ又は複数のペプチド鎖が、ヒト血清アルブミン、ヒト化抗体、リボソーム、ミセル、合成高分子、ナノ粒子及びファージのような、生体適合性タンパク質に連結される。多量体は、スパーサーを介して互いに連続的に連結されているペプチド配列、すなわちコンカテマー、デンドリマー又はクラスターも表し得る。

【0017】

前記化合物は、ペプチド及び類似する物質の調製についての既知の方法によって一般的に調製され得る。少数のアミノ酸又は類似するユニットのみを含む、好ましくは30-50ユニット以下を含む小型の化合物は、反応が溶液若しくは懸濁液で行われる古典的アプローチを用いるか、又はペプチドが高分子ビーズのような固体表面に固定されている間に組立てられる、より現代的な固相アプローチを用いて、化学的又は酵素的連結技術によって調製され得る。大型の化合物は、典型的には自動固相ペプチド合成機によって合成される。

あるいは、前記化合物は、既知の遺伝子工学技術によって調製され得る。このアプローチは、化合物が実際ペプチド又は僅かに改変したペプチドである場合に、特に有効である。一例を挙げると、化合物をコードするDNA配列が、細胞をトランスフェクションし得る発現ベクターと付随され得る又は結合され得る。前記方法の別の工程では、宿主細胞又は標的細胞が、トランスフェクションし得る条件下でその細胞をベクター及びベクター付随DNAと接触させることによって、前記DNAによりトランスフェクションされる。さらなる工程では、宿主又は標的細胞が、前記化合物の発現を可能にし得る条件下で培養される。続いて、前記化合物が単離され得る。前記化合物自体はコードされ得ない又は発現され得ないが、非常に類似するペプチドがコードされ得る又は発現され得る場合は、前記方法が用いられて前記化合物に類似する前記ペプチドを調製し、続いて一つ以上の工程で化学的又は酵素的技術によって前記ペプチドが改変されて、前記化合物が調製される。

前記目的に対して、ウイルスベクター、リポプレックス(lipoplexes)、ポリプレックス(polyplexes)、ミクロスフェア、ナノスフェア、デンドリマー、裸のDNA、ペプチドデリバリーシステム、脂質、特に陽イオン性脂質又はそれらで作製されたりリボソーム、ポリマーベクター、特に多価陽イオンポリマーで作成されたポリマーベクターのような、種々の種類のベクターが用いられる。中でも好ましいウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス及びピロソームである。好ましい非ウイルスベクターには、キトサン、SPLP、PLGAに基づくポリマーシステム、ポリエチレンイミン、ポリリジン、ポリフォスフォアミデート、ポリ(メタ)アクリレート、ポリフォスファゼン(polyphosphazenes)、DOPE、DOTAP及びDOTMAが挙げられる。

【0018】

前記化合物の調製に用いられ得るより包括的な方法の概要の幾つかは、次の文献に記載されている：W. F. Anderson, Nature 392 Supp., 30 April 1998, p.25-30 ; Pharmaceut

10

20

30

40

50

ical Biotechnology, Ed. D. J. A. Crommelin and R. D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, p.53-70, 167-180, 123-152, 8-20 ; Protein Synthesis Methods and Protocols, Ed. R. Martin, Humana Press, 1998, p.1-442 ; Solid-Phase Peptide Synthesis, Ed. G. B. Fields, Academic Press, 1997, p.1-780 ; Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press, 1997, p.1-89.

ペプチド又は機能的等価物の塩は既知の方法によって調製され、その方法は典型的にはペプチド若しくはペプチドと医薬として許容される酸とを混合して酸付加塩を形成すること、又はペプチド若しくはペプチドと医薬として許容される塩基とを混合して塩基付加塩を形成することを含む。酸又は塩基が医薬として許容されるかどうかは、前記化合物の具体的な用途を考慮した後に当業者によって容易に決定され得る。一例を挙げると、*in vitro*の診断用組成物において許容される酸及び塩基の全てが、治療用組成物に対して使用できるとは限らない。用途に応じて、医薬として許容される酸には、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸、グリコール酸、シュウ酸、ピルビン酸、コハク酸、マレイン酸、マロン酸、ケイヒ酸、硫酸、塩酸、臭化水素酸、硝酸、過塩素酸、リン酸及びチオシアン酸のような有機酸及び無機酸が挙げられ、ペプチド及び機能的等価物の遊離アミノ基とアンモニウム塩を形成する。医薬として許容される塩基は、ペプチド及び機能的等価物の遊離カルボキシル基とカルボン酸塩を形成し、エチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、トリエチルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、他のモノ-、ジ-及びトリアルキルアミン、並びにアリアルアミンを含む。さらに、水和物又はエツレート(ethurate)のような医薬として許容される溶媒和物、複合体、付加生成物も含まれる。

【0019】

多量体は、例えばペプチド又はペプチドの鎖のN-末端をビオチン化し、続いてストレプトアビジンと複合体形成することによって調製され得る。ストレプトアビジンは、4つのビオチン分子又は複合体と高度の親和性によって結合し得ることから、この方法によって非常に安定な四量体ペプチド複合体が形成され得る。多量体は、同一又は異なるペプチド又は機能的等価物で構成され得る。しかしながら好ましくは、本発明の多量体は、二つ以上の同一のペプチド又は機能的等価物で構成される。

本発明の更なる側面は、開示化合物の使用に言及する。前記化合物はP-セ렉チンに対して選択的に結合することから、結合後のP-セ렉チンとの相互作用の種類に応じて、アンタゴニスト、部分的アンタゴニスト又はP-セ렉チンを発現している細胞若しくは組織に対して共役物質を標的とする単なる標的手段として機能し得る。従って前記化合物は、医薬組成物において有利に用いられ得る。本発明によると、さらにそのような医薬組成物が提供される。

本明細書で用いられる“医薬組成物”という用語は、治療用及び診断用組成物、並びに前記組成物を含む薬物及び診断薬を指す。治療用組成物及び薬物は、改善が望まれる哺乳動物の疾患及び他の状態の予防又は治療に用いられる。診断薬及び診断用組成物は、前記のような疾患の*in vivo*及び*in vitro*の診断に用いられる。

前記化合物の好ましい使用は、血管内皮及び血小板に対する単球及び好中球のような白血球の接着に係る疾患及び状態、またさらに血小板凝集に係る疾患及び状態を予防又は改善するための治療用組成物又は薬物を調製することである。前記化合物は、P-セ렉チン媒介性細胞内シグナルの阻害が望まれる疾患を治療するための組成物にも用いられ得る。

【0020】

一例を挙げると、本発明の一つ以上の化合物を含む組成物は、白血球媒介性炎症過程を制御することに貢献し得る。活性化された白血球は正常組織を損傷し得る毒性分子を放出することが知られている。そのような炎症性応答は種々の病理的状态の一部であり、その幾つかはP-セ렉チン媒介性血小板活性化も伴う。前記病理的状态は、例えば移植拒絶、寒冷虚血、出血性ショック、敗血性ショック、腫瘍転移、慢性炎症、関節性リウマチ、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、新脈管形成、汎発性血管内凝固症候群、成人呼吸促進症候群、循環性ショック、重篤な外傷性脳損傷、再発性-弛張性多発性硬

化症、大脳動脈閉塞、虚血、脳卒中、急性心筋梗塞、血管形成によって生成するもののような動脈損傷、心筋虚血、虚血及び再灌流障害による腎損傷、並びに腎不全である。

別の態様では、前記化合物は、診断用組成物又は製品の調製に用いられる。そのような組成物は、*in vitro*のテストに用いられ、上述の疾患及び状態のマーカーとして体液中のP-セレクチン濃度を定量化し得る。前記組成物は、*in vivo*の診断イメージング法にも用いられ、P-セレクチン媒介性アテローム性動脈硬化症、動脈瘤、経皮的経管的冠状動脈形成術に続く再狭窄（PTCA後再狭窄）、及びP-セレクチンが動員される状態から選択される他の状態をモニターし得る。前記使用に対する選択肢として、本発明の化合物は、キレート剤と結合され、前記キレート剤は続いて、選択されるモニタリングシステムによって検出可能な等方性標識と錯化され得る。

10

前記化合物の別の使用は、研究におけるツールとしての使用である。一例を挙げると、前記化合物は、P-セレクチン又はP-セレクチンの機能的等価物に対して分子の結合親和性をテストすることに用いられ得る。前記テスト方法を実施するために、P-セレクチン又はP-セレクチンの機能的等価物が、結合親和性についてテストされる分子及び本発明の化合物と接触させられてインキュベートされ得る。本発明の化合物の結合が減少することが、分子のP-セレクチンに対する親和性を示し得る。

【0021】

P-セレクチンが天然に存在するカルパインファミリーのメンバーによって切断され得ることも、本発明者により見出された。興味深いことに、カルパインファミリーのプロテアーゼの幾つかが、本発明の化合物の好ましいペプチド配列の一つであるコアモチーフE W V D Vを含む天然ポリペプチド構造物のみであるらしい。カルパイン1及びカルパイン2の過度の活性化はおそらくは、アルツハイマー病、外傷性脳損傷、脳卒中及び白内障のような神経性疾患に関連している。カルパイン3の活性化は幾つかの種類の筋ジストロフィーに関連している場合があり、カルパイン9の活性化は胃癌に関連している場合があり、一方カルパイン8及び10はII型糖尿病において役割を果たすようである。種々のヒト疾患におけるカルパインの関与の更なる側面は、Y. Huang及びK. Wangの総論The calpain family and human disease, trends Mol. Med. 7, 355-362, 2001によって記述されている（これは参照により、本明細書に含まれるものとする）。

20

さらに本発明の化合物は、カルパインによって誘導されるL-セレクチン及びP-セレクチンの切断を、P-セレクチンに対してのより高度な親和性、典型的には約100倍の親和性によって阻害し得ることが見出された。メカニズムの観点から、このことはカルパインがセレクチンの活性化に関与することを示唆している。より詳細には、セレクチンが発現されている細胞の表面からのセレクチンの分断がカルパインによって誘導され得る。結論として、本発明の化合物は、P-セレクチンとカルパインとの間の相互作用を阻害することが望ましいアプリケーションのいずれにも有用である。

30

前記化合物は、P-セレクチンを発現している組織に対する薬物又は遺伝物質の標的化のために、標的化分子又は複合体としても医薬組成物に用いられ得る。複合体のように、前記化合物は、前記組織に送達される活性分子又は核酸と直接的に連結され得る。あるいは前記化合物は、リポソーム又は他の脂質ビヒクル、エマルジョン液滴、ポリマー、ナノ-又はミクロ粒子の中に組込まれて又はその表面に固定されて、P-セレクチン発現組織に送達される薬物又は遺伝物質のための標的ビヒクルが得られ得る。

40

【0022】

前記医薬組成物は、好ましくは、本明細書に開示されているようなP-セレクチン親和性を有する一つ以上の化合物と少なくとも一つの担体又は賦形剤とを含む。本明細書で用いられる担体又は賦形剤は、実質的な薬理的活性を有さない医薬として許容される物質又は前記物質の混合物のいずれかであって、それらはビヒクル又は補助物質として用いられ、安定かつ容易に投与される剤形に化合物を調剤し得る。医薬として許容される賦形剤の例は、全ての主要な薬局方のモノグラフにおいて見出される。

一態様では、前記組成物が注射剤、好ましくは静脈注射又は動脈注射のような血管注射用として、また筋肉内、皮下、病巣内、腹膜内又は他の非経口投与経路用にも調剤され加

50

工される。前記投与経路のために他の薬物の処方を支配するのと同じ原理は、当業者に前記組成物を調製する方法も教示するであろう。一例を挙げると、非経口剤形の要求の一つは、その無菌性である。他の要求は、全ての主要な薬局方に記載されている（例えばUSP 24のモノグラフ“General Requirements for Tests and Assays. 1. Injections” p.1775-1777）。非経口投与製剤の安定性を増加させるために、投与され得る前に水を加えて元に戻されなければならない乾燥した剤形を提供することが必要とされ得る。そのような剤形の例は、凍結乾燥製剤である。

本発明の化合物が非経口制御放出剤形として投与されて、頻繁な注入を回避し、治療の有効性及び利便性を向上させることが望まれ得る。そのようなデポ（depot）製剤を調製する種々の方法は既知である。長期にわたる放出は、固形インプラント、ナノ粒子、ナノカプセル、ミクロ粒子、ミクロカプセル、エマルジョン、懸濁剤、油性溶液、リポソーム又は同様な構造物によって提供され得る。

【0023】

非経口製剤の調製に特に有用な賦形剤は：滅菌水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ブタンジオール、脂肪油、短鎖及び中鎖トリグリセリド、レシチン、ポリオキシエチレン キャスターオイル誘導体のような、溶媒、共溶媒及び液体又は半固体担体；糖、特にグルコース、糖アルコール、特にマンニトール、塩化ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸、アセテート、フォスフェート、リン酸、塩酸、水酸化ナトリウム等のような、浸透圧及びpHを調整するための物質；アスコルビン酸、硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、EDTA、ベンジルアルコール等のような、安定剤、抗酸化剤及び防腐剤；アルブミン、デキストラン等のような他の賦形剤及び凍結乾燥補助剤である。

あるいは医薬組成物が、経口投与のために設計され、それに応じて加工され得る。適切な経口剤形には、錠剤、ハードカプセル、ソフトカプセル、散剤、顆粒、経口崩壊剤形、シロップ剤、滴剤、懸濁剤、発泡錠、チュアブル錠、経口フィルム、凍結乾燥剤形、徐放剤形、制御放出剤形が挙げられる。好ましい態様の一つでは、経口剤形が腸溶固体剤形であり、胃の酸性かつタンパク質分解性の環境から前記化合物を保護することを提供する。

本発明の化合物が経粘膜剤形で投与されることも有利である。この投与経路は、非侵襲性であり患者にやさしい。同時に、特に化合物が消化器系の分泌液において安定でない場合又は大きすぎて腸から効率的に吸収されない場合に、前記投与経路が、経口投与と比較して化合物の生体利用率の改善をもたらし得る。経粘膜投与は、例えば鼻、頬、舌下、歯肉又は膈を介する剤形が可能性である。前記剤形は、既知の技術によって調製され得る。前記剤形は、点鼻剤、スプレー、挿入物、フィルム、パッチ、ゲル、軟膏又は錠剤に相当するように調剤され得る。好ましくは経粘膜剤形に用いられる賦形剤が粘膜付着を提供する一つ以上の物質を含み、従って剤形の吸収部位との接触時間を延長し、それにより吸収の程度を潜在的に増加させる。

【0024】

更なる態様では、計量式吸入器、ネブライザー、エロゾルスプレー又は乾燥散剤吸入器を用いて、化合物が肺経路を介して投与される。適切な製剤は、既知の方法及び技術によって調製され得る。経皮投与、直腸投与又は眼投与も、時として適し得る。

本発明の化合物をより効率的に送達する先進の薬物デリバリー法又は標的化法の使用が有利であり得る。一例を挙げると、非腸管外投与経路が選択される場合に、適切な剤形は生体利用率増強剤を含み得る。前記生体利用率増強剤は、化合物の有用性を増加させる物質のいずれか又はそれらの混合物であり得る。化合物の有用性を増加させることは、一例を挙げると、例えば酵素阻害剤又は抗酸化剤により、分解から化合物を保護することによって達成され得る。より好ましくは、前記増強剤が吸収障壁の浸透性を増加させることによって、前記化合物の生体利用率を増加させる。前記吸収障壁は典型的には粘膜である。浸透性エンハンサーは種々のメカニズムを解して作用し得る。前記エンハンサーの幾つかは粘膜の膜流動性を増加させ、一方他のものは粘膜細胞の間のギャップ結合を開く又は広げる。さらに他のエンハンサーは、粘膜細胞層を覆っている粘液の粘性を減少させ

る。中でも好ましい生体利用効率エンハンサーは、コール酸誘導体、リン脂質、エタノール、脂肪酸、オレイン酸、脂肪酸誘導体、EDTA、カルボマー、ポリカルボフィル(polycarbophil)及びキトサンのような両親媒性物質である。

更なる側面では、上に開示する化合物に結合し得る分子が本発明の範囲に含まれる。一例を挙げると、標準的なハイブリダイゼーション技術が化合物に対する特異的なモノクローナル抗体を調製することに利用され得る。他の技術は、本発明の化合物に対して結合し得る小型分子を設計し調製することに利用可能である。

次の実施例は本発明をさらに説明することを意図するが、本明細書に提示する態様の範囲を制限することを意図しない。

【 0 0 2 5 】

10

(実施例 1)

次のペプチドを、HBTU/HOBtを活性化剤として用いる標準Fmoc化学反応により、自動合成機上の固相合成によって調製した。

【 0 0 2 6 】

20

【表 1】

 $A_x A_3 A_1 A_2 A_1$
TM1 :	C P E F V D V E G D P G A L L A C
TM2 :	C G W V D V I A S G D T A T L A C
TM11 :	C D V E W V D V S S L E W D L P C
TM16 :	C P D W V D V F K L V E G V M L C
TM17 :	C L M G C W C D V G V G G E S L C
SH31 :	V G L D P R D W V D V S D Y A
SH32 :	D W V D V R E V L T G E Q R V
A17 :	C D V E W V D V S C
A18 :	C D V E W V D V S
A19 :	D V E W V D V S
A27 :	D V E W V D V A

30

【 0 0 2 7 】

これらのペプチドは、各ペプチド配列のN-末端にAhxリンカーを結合させ、続いてこの複合体をビオチンと連結することによって、ビオチン化した。TM11は酸化によって環化構造でも調製し、従ってN-末端システインとC-末端システインとの間にジスルフィド結合を形成している。TM11及びSH31の四量体は、10 μ Mのストレプトアビジンとビオチン化ペプチドを1対4のモル比で2時間、室温(RT)にてインキュベートすることによって得た。これらのペプチドの品質は、質量分析及びHPLCによって確認した。

40

前記化合物のP-セレクチンに対する親和性を、適合するELISA法を用いることによって調べた。ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(strepPO)をTM11-ビオチンと1対4のモル比で2時間、室温にてインキュベートし、これにより四量体ペプチドstrepPO複合体を形成した。競合研究のために、マイクロタイターウェルを、P-セレクチン結合ファージの単離のために記述されるようなキメラヒトP-セレクチンでコーティ

50

ングした。次にウェルを、ヒトP-セレクチンに対する結合において競合するペプチドの力価測定した量の存在下で、アッセイ緩衝液中の2.5 nM TM11-strepP0複合体によって1時間、4 にてインキュベートした。鎖状化合物を、凝集形成を妨げるDTTの存在下でテストした。アッセイ緩衝液により6回洗滌した後に、ウェルを100 μ l TMB/H₂O₂で15分間、室温にてインキュベートした。この反応を1 M H₂SO₄で停止させ、450 nmで吸光度を読んだ。得られた結果から、親和性定数を次のようにして計算した。

10

20

【0028】

【表2】

	親和性
ビオチン-TM1 :	82 μ M
ビオチン-TM2 :	49 μ M
ビオチン-TM11 :	2 μ M
ビオチン-TM11 (環式) :	2 μ M
ビオチン-TM16 :	12 μ M
ビオチン-TM17 :	7 μ M
ビオチン-SH31 :	19 μ M
ビオチン-A17 :	0.1 μ M
ビオチン-A19 :	12 μ M
四量体TM11 :	10.7 nM
四量体SH31 :	61.3 nM

30

【0029】

化合物の親和性を、細胞接着アッセイによって確かめた。前記アッセイでは、ヒトP-セレクチンを発現しているチャイニーズハムスター卵巣細胞を、力価測定した量の前記化合物の存在下で、PSGL-1を発現しているHL60細胞と共にインキュベートした。

40

【0030】

(比較例2)

次の化合物を実施例1のように調製し、ヒトP-セレクチンに対する親和性についてテストした。次の化合物は実施例1の化合物と非常に類似しているが、請求項1の構造的な要求を完全に満たしておらず、従って本発明の化合物ではないことを留意すべきである。

【0031】

【表 3】

								親和性 [μM]
D	V	E	A	V	D	V	S	400,000
D	V	E	W	A	D	V	S	1,400
D	V	E	W	V	A	V	S	21,000
D	V	E	W	V	D	A	S	13,000
		E	W	V	K	V	A	13,000

【0032】

10

(実施例 3：血小板凝集の阻害)

下記の化合物を実施例 1 に記述するように調製し、血小板凝集の阻害の効果についてテストした。

ヒト血小板をADVによって活性化し、EWDV含有ペプチドの存在下又は非存在下で血小板凝集の程度を測定した。

DVEWVDVS(A19)及びCDVEWVDVSC(A17)

が血小板凝集の第二段階を著しく障害して、それぞれ約45%及び約25%まで減少させたことが示された。

【0033】

20

(実施例 4：化合物とスルファチドリポソームとの相互作用)

下記の化合物を実施例 1 に記述するように調製して、22%のスルファチドを有するリポソームとの相互作用についてテストした。化合物とスルファチドとの相互作用は、本発明の化合物の活性の付加かつ任意の側面である。P-セレクトインに対して結合し且つ請求項 1 に規定するコンセンサスモチーフを含む限りは、スルファチドと相互作用しない化合物もやはり本発明の化合物を表し得る。

リポソームは、卵黄フォスファチジルコリン、コレステロール及びスルファチドを全てクロロホルム/メタノール(1:1、v/v)に質量比4:0.8:1.33で溶解したのから超音波処理によって調製した。トレーサー量の [^3H] -コレステロール (1.3×10^8 dpm) を添加し、その混合物を窒素流の下で乾燥させた。生じた脂質層をPBS中でボルテックスにかけ、続いて超音波処理して、平均粒子直径59-62 nmを有するリポソームが得られた。

30

コーティング緩衝液(50 mM NaHCO_3 、pH 9.6)中のFc-特異的ヤギ抗ヒトIgGを、ハイバインディング96ウェルプレートでインキュベートした。翌日、ウェルをアッセイ緩衝液(20 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM CaCl_2 、pH 7.4)で洗滌し、ブロッキング緩衝液(3% BSAを含むアッセイ緩衝液)でインキュベートした。洗滌の後、ウェルをヒトP-セレクトイン-IgGでインキュベートして、洗滌し、続いて [^3H] -コレステロール標識したリポソームで、前記化合物の存在下又は非存在下、2時間、4 にてインキュベートした。結合していないリポソームを除去した後、結合したリポソームを収集して、シンチレーションカウンターを用いてカウントした。

化合物D**VEWVDVS**、D**VEWVDVA**及びCD**VEWVDVSC**

40

はP-セレクトインに対するスルファチドの結合を有意に阻害したが、

化合物**DVEAVDVS**及び**EWVDV**

は阻害しなかったことが見出された。上に規定するコア配列に加えて、コア配列の外側に二つの位置のアスパラギン酸(D、下線)が、スルファチドの効果的な阻害に必要な不可欠な特徴のようである。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/20	
A 6 1 K	9/28	(2006.01)	A 6 1 K	9/28	
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K	9/48	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
			A 6 1 P	43/00	1 0 5

- (72)発明者 モレナール トーマス ヤコブス マリア
 オランダ エヌエル - 2 3 1 2 カーウェー レイデン ホーイグラヒト 8 2 アー
- (72)発明者 クイペル ヨハン
 オランダ エヌエル - 2 8 0 6 エーバー ゴウダ クリューゲルラーン 3 7
- (72)発明者 ファン ベルケル テオドルス ヨセフス コルネリス
 オランダ エヌエル - 2 0 2 4 デーバー ハールレム ファン ネスストラート 4 4
- (72)発明者 ビーセン エリック アンナ レオナルデュス
 オランダ エヌエル - 2 3 3 1 エルイックス レイデン マルガ クロンペストラート 4 0

審査官 斎藤 真由美

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/00-19/00
 C12N 15/00-90
 C12N 1/00-5/28
 C12P 21/00-08
 C12Q 1/00-70
 G01N 33/00-98
 A61K 31/00-48/00
 A61P 1/00-43/00
 PubMed、MEDLINE(STN)
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq