

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6166858号
(P6166858)

(45) 発行日 平成29年7月19日(2017.7.19)

(24) 登録日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	Z N A
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

請求項の数 14 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-556899 (P2013-556899)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月2日(2012.3.2)
 (65) 公表番号 特表2014-508164 (P2014-508164A)
 (43) 公表日 平成26年4月3日(2014.4.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/027480
 (87) 国際公開番号 W02012/119072
 (87) 国際公開日 平成24年9月7日(2012.9.7)
 審査請求日 平成27年3月2日(2015.3.2)
 (31) 優先権主張番号 61/448, 446
 (32) 優先日 平成23年3月2日(2011.3.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504006087
 バイオインセプト、エルエルシー
 アメリカ合衆国、08003-3157
 ニュージャージー州、チェリー ヒル、ラ
 ーク レーン 1697
 (74) 代理人 100104411
 弁理士 矢口 太郎
 (72) 発明者 バーネア、エイタン アール、
 アメリカ合衆国、08003 ニュージャ
 ージー州、チェリー ヒル、1697 ラ
 ーク レーン

審査官 六笠 紀子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内損傷の治療のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイコバクテリウム結核菌感染を治療するための薬剤の調製における、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、及び配列 I D 番号 4 の配列からなるペプチド群から選択される P I F ペプチドの使用。

【請求項 2】

請求項 1 記載の使用において、前記薬剤は、さらに、カリウムチャネル阻害剤を有する、使用。

【請求項 3】

結核を治療し、または結核菌の播種を減少させるための薬剤の調製における、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、及び配列 I D 番号 4 の配列からなるペプチド群から選択される P I F ペプチドの使用。

【請求項 4】

請求項 3 記載の使用において、前記薬剤は、さらに、カリウムチャネル阻害剤を有する、使用。

【請求項 5】

アテローム性動脈硬化を治療するための薬剤の調製における、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、及び配列 I D 番号 4 の配列からなるペプチド群から選択される P I F ペプチドの使用。

【請求項 6】

10

20

請求項 5 記載の使用において、前記薬剤は、さらに、カリウムチャネル阻害剤を有する、使用。

【請求項 7】

請求項 5 記載の使用において、前記治療はプラークを減少させ、単球タンパク質を減少させ、脂質を減少させ、サイトカインを減少させ、またはそれらの組み合わせを行うためのものである、使用。

【請求項 8】

請求項 7 記載の使用において、前記治療は大動脈弓または大動脈根において、プラーク、単球タンパク質、脂質、またはサイトカインを減少させるためのものである、使用。

【請求項 9】

腹膜炎を治療するための薬剤の調製における、配列 ID 番号 1、配列 ID 番号 2、配列 ID 番号 3、及び配列 ID 番号 4 の配列からなるペプチド群から選択される P I F ペプチドの使用。

【請求項 10】

請求項 9 記載の使用において、前記薬剤は、さらに、カリウムチャネル阻害剤を有する、使用。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の使用において、前記 P I F ペプチドは、配列 ID 番号 1 の配列からなる、使用。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の使用において、前記 P I F ペプチドは、配列 ID 番号 2 の配列からなる、使用。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の使用において、前記 P I F ペプチドは、配列 ID 番号 3 の配列からなる、使用。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の使用において、前記 P I F ペプチドは、配列 ID 番号 4 の配列からなる、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、35 U.S.C. § 119 のもとに、2011 年 3 月 2 日に提出された米国仮特許出願第 61/448,446、「細胞内損傷の治療のための組成物および方法」に対して優先権を主張するものである。該開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

この出願の発明に関連する先行技術文献情報としては、以下のものがある（国際出願日以降国際段階で引用された文献及び他国に国内移行した際に引用された文献を含む）。

（先行技術文献）

（特許文献）

（特許文献 1） 米国特許第 7,723,290 号明細書

（非特許文献）

（非特許文献 1） VALVERDE et al., Potassium Channel-blockers as Therapeutic Agents to Interfere with Bone Resorption of Periodontal Disease. J. Dental Research, June 2005, vol. 84, no. 6, pp. 488-499; pg. 494, col. 2, para. 4

（非特許文献 2） NAKAMURA et al., Delayed and acute effects of interferon-gamma on activity of an inwardly rectifying K⁺ channel

10

20

30

40

50

l i n c u l t u r e d h u m a n p r o x i m a l t u b u l e c e l l
s . A m J P h y s i o l R e n a l P h y s i o l , J a n u a r y 2 0 0
9 , v o l 2 9 6 , n o 1 , p p F 4 6 - F 5 3 ; P F 5 2 , c o l 1 , p a
r a 1 . c o l 2 , p a r a 2

(非 特 許 文 献 3) I n t e r n a t i o n a l S e a r c h R e p o r t a
n d W r i t t e n O p i n i o n d a t e d N o v e m b e r 5 , 2 0 1 2
f o r P C T / U S 2 0 1 2 / 0 2 7 4 8 0

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0002】

本明細書における実施形態は、細胞内損傷の治療における使用のための着床前因子（P I F）を対象とするものである。実施形態は、細胞内損傷を治療するための方法を対象とするものであり、該方法はそれを必要とする対象にP I Fペプチドを投与する工程を有するものである。いくつかの実施形態において、P I Fペプチドは、治療有効量で投与される。いくつかの実施形態において、該細胞損傷は病気によって生じるものであることができる。いくつかの実施形態において、該病気は、細胞内細菌によって生じるものである。いくつかの実施形態において、細胞内細菌は、リステリア・モノサイトゲネス、マイコバクテリウム結核菌、ヘリコバクター・ピロリ、ボレリア・ブルグドフェリ（*Borrelia burgdorferi sensu stricto*）、ボレリア・アフゼリおよびボレリア・ガリニから選択されることができる。さらなる実施形態において、該病気は、リステリア、マラリア、ライム病、心疾患、十二指腸潰瘍、アテローム性動脈硬化、腹膜炎、および結核から選択されることができる。いくつかの実施形態において、細胞内損傷を治療するための方法はさらにカリウムチャンネル阻害剤を投与する工程を有する。いくつかの実施形態において、該カリウムチャンネル阻害剤は、K v 1 . 3 阻害剤であることができる。いくつかの実施形態において、該カリウムチャンネル阻害剤はI F N であることができる。

【0003】

実施形態は結核を治療するための方法を対象とするものであり、該方法はP I Fペプチドを投与する工程を有する。いくつかの実施形態において、P I Fはマイコバクテリウム結核菌（*M t b*）感染マクロファージによって誘発された局所免疫抑制を中和する、および/またはM t b 感染に対する免疫応答のホストを増大させることができる。さらなる実施形態において、P I Fは結核によって生じた細胞内損傷を予防することができる。いくつかの実施形態において、対象は結核の危険性がある。いくつかの実施形態において、該方法はさらに他の抗結核剤と組み合わせてP I Fを投与する工程を有する。

【0004】

実施形態は、結核菌の播種を減少させるための方法を対象とするものであり、該方法はそれを必要とする対象にP I Fを投与する工程を有する。いくつかの実施形態において、該P I Fペプチドは治療有効量において投与される。いくつかの実施形態において、該方法はさらに他の抗結核剤と組み合わせて投与する工程を有することができる。

【0005】

実施形態は、細胞内損傷における炎症を防ぐための方法を対象とするものであり、該方法はそれを必要とする対象にP I Fペプチドを投与する工程を有する。いくつかの実施形態は、細胞内損傷応答におけるサイトカイン分泌の増大のための方法を記載するものであり、該方法はそれを必要とする対象にP I Fペプチドを投与する工程を有する。いくつかの実施形態において、該P I Fは治療有効量で投与される。いくつかの実施形態において、細胞内損傷は病気によって生じることができる。いくつかの実施形態において、該病気は細胞内細菌によって生じる。さらなる実施形態において、該病気は、リステリア・モノサイトゲネス感染、マラリア、ライム病、心疾患、糖尿病、十二指腸潰瘍、アテローム性動脈硬化および結核から選択されることができる。いくつかの実施形態において、細胞内損傷における炎症を防ぐための方法がさらにカリウムチャンネル阻害剤を投与する工程を有

10

20

30

40

50

する。いくつかの実施形態において、該カリウムチャネル阻害剤は、K v 1 . 3 阻害剤であることができる。いくつかの実施形態において、該カリウムチャネル阻害剤は、I F N であることができる。

【0006】

実施形態は、カリウムチャネルを調節するための方法を対象とし、該方法はP I F ペプチドを投与する工程を有する。いくつかの実施形態において、該カリウムチャネルはK v 1 . 3 である。いくつかの実施形態において、該調節する工程はカリウムチャネルの活性をブロックする工程を有する。いくつかの実施形態において、P I F ペプチドは該チャネルに結合することによって該カリウムチャネルを調節する。いくつかの実施形態において、該P I F は治療の有効量において投与される。

10

【0007】

実施形態は、対象におけるアテローム性動脈硬化の治療の方法に対象とするものであり、該方法はP I F ペプチドを投与する工程を有する。いくつかの実施形態において、P I F の治療の有効量が投与される。いくつかの実施形態において、対象はアテローム性動脈硬化と診断される。いくつかの実施形態において、対象はアテローム性動脈硬化になる危険がある。いくつかの実施形態において、当該方法は、他の抗アテローム性動脈硬化剤との組み合わせにおいてP I F を投与する工程をさらに有することができる。

【0008】

いくつかの実施形態において、P I F は大動脈根におけるプラークを減らすことによってアテローム性動脈硬化を治療することができる。いくつかの実施形態において、P I F は大動脈弓におけるプラークを減らすことによってアテローム性動脈硬化を治療することができる。いくつかの実施形態において、P I F は大動脈弓における単球タンパク質を減らすことによってアテローム性動脈硬化を治療することができる。さらなる実施形態において、当該単球タンパク質は、血管細胞接着分子(V C A M - 1)、単球走化性タンパク質(M C P - 1)および分化クラスター(C D 6 8)から選択されることができる。いくつかの実施形態において、P I F は大動脈根におけるプラークを減らすことによってアテローム性動脈硬化を治療することができる。いくつかの実施形態において、P I F は大動脈根における単球タンパク質を減らすことによってアテローム性動脈硬化を治療することができる。さらなる実施形態において、当該単球タンパク質は、血管細胞接着分子(V C A M - 1)、単球走化性タンパク質(M C P - 1)および分化クラスター(C D 6 8)から選択されることができる。いくつかの実施形態において、P I F は大動脈根における脂質を減らすことによってアテローム性動脈硬化を治療することができる。いくつかの実施形態において、P I F はT H P - 1 細胞におけるサイトカインを減らすことによってアテローム性動脈硬化を治療することができる。さらなる実施形態において、当該サイトカインはインターロイキン12、サブユニットベータ(I L - 12 b)およびインターフェロンガンマ(I F N -)から選択されることができる。大動脈上のプラーク減少における効果は、循環脂質に影響なく直接的である。

20

30

【0009】

実施形態は、P I F ペプチドを投与する工程を有する、対象における腹膜炎の治療の方法に向けられる。いくつかの実施形態において、P I F の治療の有効量が投与される。いくつかの実施形態において、対象は腹膜炎と診断される。いくつかの実施形態においては、対象は腹膜炎になる危険がある。いくつかの実施形態において、当該方法は他の抗腹膜炎剤との組み合わせにおいてP I F を投与する工程をさらに有することができる。

40

【0010】

実施形態において、当該P I F ペプチドは配列I D 番号1、配列I D 番号2、配列I D 番号3、配列I D 番号4、配列I D 番号5、配列I D 番号6、配列I D 番号7、または配列I D 番号から選択されることができる。実施形態において、当該P I F ペプチドは配列I D 番号1、配列I D 番号2、配列I D 番号3および配列I D 番号4から選択されることができる。実施形態において、当該P I F ペプチドは配列I D 番号1、配列I D 番号2および配列I D 番号3から選択されることができる。

50

【図面の簡単な説明】

【0011】

この特許の提出は、少なくとも1つのカラーで作成された写真または図面を含む。カラー図面(s)または写真を有するこの特許のコピーは、要請および必要な料金の支払いに応じて特許商標局によって提供される。

【0012】

本発明の性質および利点のより完全な理解のために、添付の図面に関連した以下の詳細な説明が参照されなければならない。

【図1】図1(A)は、倍率2000倍でFITC-PIF結合(蛍光顕微鏡法)を示す拡大された免疫細胞;該取り込みは細胞内に見える、を示す。(B)は倍率40倍でナイーブPBMC(s)に結合する最小のFITC-PIF(位相差顕微鏡法)を示す。(C)FITC-PIFが全ての非刺激CD14+細胞(右上のパネル)を結合すること;非刺激CD4+およびCD8+細胞(左下および右下パネル)への最小結合を示す。(D)非染色陰性制御および(E)テストヒト血液がRBC溶解手順を受け、15分間PIF-FITC(1μM)またはPBSで培養されたことを示す。結果はPIF-FITCがFSC/SSCに基づいて顆粒白血球集団に主に結合することを示した。(F)ヒトの全血は、PIF-FITC+CD66b(上のグラフ)またはCD14(下のグラフ)によって培養された。結果は、PIF-FITCがCD14陽性単球に続いてCD66b陽性顆粒白血球に強力に結合することを示した。(G)100μMのPIF-FITC(50μl)(上列)が頸静脈を介して25gC57/BL6に注射された。マウスは注射の5分後に選別された。血液はヘパリン管の下大静脈によって集められた。赤血球は溶解緩衝液によって溶解した。細胞はFACSバッファーに再懸濁され、CD14-PE(中列)およびCD45-APC(下列)のために着色された。結果は、顆粒白血球(P3)へのPIF-FITCの結合を示し、これらの顆粒白血球がCD14およびCD45マーカーを有することができることを示した。(H)PIFと相互作用する細胞タイプを示す。マウス血液および骨髓細胞は、PIF-FITC複合体および免疫細胞サブ集団とともに1時間かけて染色された。FACS分析は、PIFがCD11b+単球と好適に相互作用することが明らかにした。(I)CD14+細胞へのFITC-PIFの用量依存性結合、FITC-PIFの10倍高い濃度ですら、CD8+、CD4+、CD56+(NK細胞)およびCD19+細胞の不完全な飽和で結合した。結果は細胞系統につき4~10のサン

ブルの平均値である。

【図2】図2は(A)PIFがMLR分析において用量依存方法における異種リンパ球増殖を減らすことを示す。マウス脾細胞は混合リンパ球反応(MLR)において使用された。Balb/c細胞は、4日間照射されたC57/BL細胞の存在下で培養された。PIFの異なる濃度が培地に加えられた。細胞増殖はH3チミジン取り込みアッセイによってテストされた。PIFは用量依存方法における細胞増殖を減らすことがわかった。陽性制御(Pos.)、150nMおよび200nMのPIFの差異は、重要である(Mann-Whitney: P=0.03)。一つの代表的な実験が4つの実行から示される。(B)PIF治療を受けているCD11b+細胞が、T細胞増殖を阻害するとわかった。骨髓から派生した単球は、200nMのPIFの存在下で10日間培養において生育し、その後、4日間T細胞と共培養された。抗-CD3抗体はT細胞活性化のため培地に加えられた。細胞増殖はH3チミジン取り込みによってテストされた。PIF治療を受けている単球は増殖を減少させたが、それを遮断することはなく、それはおそらくPIFの効果が調節的であり、阻害的ではないからである。(C)PIFはCD11b+細胞におけるB7-H1調節タンパク質をアップ調節する。骨髓から派生した単球は、200nMのPIFの存在下または非存在下で10日間培養において生育した。7日目、100ng/mlのIFNγが加えられた。10日後、細胞は抗B7-H1抗体を使用してFACS分析によって分析された。(D)マウス・マクロファージはGM-CSFと10日間培養された。IFNγは、細胞活性化のため7日目に培養組織に加えられた。sPIFが0または7日目に培地に加えられた場合、B7-H1発現は顕著に増加した。B7-H1が新しく

10

20

30

40

50

定義された抑制性B7ファミリー分子の一つであることにより、これは関連する。IFNガンマが強力にAPC上のB7-H1発現を刺激することは既知である。(E)PIFはTHP-1細胞におけるVCAM-1、IL-12bおよびIFNgを減少させる。THP-1細胞は48時間かけて培養され、その後、10ug/TGF-bによって刺激され、0、1、8、12および24時間の時点で集められる。これは特定の時点での遺伝子調節変化を示した。8時間の時点は、細胞刺激の時間を見込んで選択された。遺伝子調節は急速に生じ、選択された時点は刺激のための時間を十分に過不足なく見込む。(F)PIFは*in vivo*のNos2発現およびRAW、*in vitro*のマウス・マクロファージ細胞株からのNO分泌を減少させる。これらの結果は、「マウス炎症性応答および自己免疫」アレイを使用する肝臓における炎症性遺伝子発現のリアル・タイム定量PCR分析の一部として利用された。cDNA試料は通常のマウスまたは半・同種異系(a11o.) / 同系(sin.) 骨髄移植後のマウスから得られ、PIFまたはPBSで処理された。Nos2の発現は半・同種異系のBMTマウスにおいて上昇し、通常のマウスと比較して17倍であった。PIFはこの上昇を完全に防止した。(G)RAW(マクロファージ細胞株)は200nMのPIFとともに異なる時間の期間で培養された。実験の最後の24時間において、LPSは細胞活性のために培地に加えられた。グリース反応テストは上澄みにNO分泌を検出するために実行された。PIFはRAWからNO分泌を減少させるとわかった。

【図3】図3(A)および(B)は、マイトジェン刺激がTおよびB細胞集団へのFITC-PIF結合を強化することを示す。PBMCはPHAと24時間培養された。異なるPBMC集団へのFITC-PIFの結合は、二つの色のフローサイトメトリーによって測定された。結合は低かった(非刺激細胞において<10%、上部パネル左から右)CD4+、CD8+、NK、(CD56+)およびB(CD19+)細胞。しかしながら、b(下部パネル左から右)において結合が~30倍の増加につながったCD4+、CD8+およびB(CD19+)細胞。結合は、72時間の培養期間後でもNK細胞においては変化しなかった。(C)から(F)は、sPIFが刺激されたPBMCsにおいてTH2/TH1サイトカイン・バイアスを促進することを示す。PBMCsは+/ - sPIF 50nM+/ - 抗-CD3-mAbまたは50nM PIF scr+/ - 抗-CD3-mAbとともに4~96時間かけて培養された。(B)sPIF(50nM); (C)PIF scr(50nM); (D)sPIF(50nM)+抗-CD3 mAb; (E)PIF scr+抗-CD3 mAb。sPIFは様々な刺激を与えたPBMCsの個々のサイトカイン分泌に作用した。対症的に、ナイーブPBMCsにおけるいくつかのサイトカイン分泌は減少した(図示せず)。PIF scrはTNF分泌のみに作用した(N=5)。サイトカイン分泌はLuminex 10-plexによって測定された。(F)PIFは、抗CD3/CD28誘発TH2およびTH1サイトカイン分泌を促進する。PBMCsは抗-CD3/抗-CD28-Mabの存在下で24~48時間かけて培養された。PIFはTCR刺激の後に続いてサイトカインの両方のタイプを増加させた。PIF単独では、3つの異なる実験に代表されるように、サイトカイン分泌において顕著な促進効果を有さなかった。48時間でのPBMCsへの効果は、目立たなかった(データ図示せず)。実験終了後、mRNAは抽出され、グローバル遺伝子発現はアフィメトリクス・チップを使用して分析された。

【図4】図4(A)は、IL-1aがMtbによって誘発されたこと、および、その後、PIFおよび抗-Kv1.3によって増殖されたことを示す。IFNの存在下における応答は失われた。(B)は、IL-1bがMtbによって誘発されたこと、および、その後、PIFおよび抗-Kv1.3によって増殖されたことを示す。IFNの存在下における応答は失われた。(C)は、(TNF)aがMtbによって誘発されたこと、および、その後、PIFおよび抗-Kv1.3によって増殖されたことを示す。IFNの存在下における応答は失われた。(D)は、MIP-1がMtbによって誘発されたこと、および、その後、PIFおよび抗-Kv1.3によって増殖されたことを示す。IFNの存在下における応答は失われた。(E)は、KCがMtbによって誘発されたこと、および、そ

10

20

30

40

50

の後、PIFおよび抗-Kv1.3によって増殖されたことを示す。IFNの存在下における応答は失われた。

【図5】図5(A)は、MCP-1(ケモカイン)がMtbによって誘発され、PIFおよびKv1.3阻害剤によって増殖されたことを示す。IFNの投与は、応答を停止させた。低sPIF投与は単離マクロファージによるMCP-1(単球走化性タンパク質-1)分泌を増加させた。Kv1.3阻害剤は100nMでsPIF効果をブロックした。(B)IL-6はMtbによって誘発され、この誘発はPIFによって増加され、抗-Kv1.3によって減少した。IFNの投与は、応答を停止させた。(C)IL-5はMtbによって誘発され、この誘発はPIFによって増加され、抗-Kv1.3によって減少した。IFNの投与は、応答を停止させた。

10

【図6】図6は、PIFがマウス腹膜炎モデルにおいてMCP-1誘発された単球遊走を阻害することを示す。8~12週目のC57b16マウスは媒体制御としてPIFまたはsPIF(0.3nmol/g 腹腔内)またはPBSが注射された。腹膜炎は腹腔内に3ml、4%のチオグリコール酸塩を注射することにより誘発され、20時間後、該マウスは麻酔され、腹腔は5mlの無菌PBSによって勢いよく流された。続いて、単球/マクロファージはフローサイトメリーでF4/80およびCD11bによって定量化された。PIF(1μM&10μM)は、*in vitro*のトランスウェル遊走アッセイにおいてTHP-1細胞のMCP-1誘発された移動を顕著に減少させた(*p<0.01)。PIFは、(B)に記載されたような腹膜炎モデルを使用する生体顕微鏡検査における腸間膜小静脈内の白血球粘着およびローリング、ローダミンによる細胞着色を阻害する。

20

【図7】図7は、PIFが(A)大動脈根および(B)大動脈弓においてアテローム性動脈硬化プラーク面積を減少させることを示す。大動脈根および大動脈弓部分はHEによって染色された。平均アテローム性動脈硬化面積(μm²)±標準誤差が定量化された。PIF 0.1mg/kg/日の治療は、PBS制御と比較して30%大動脈根におけるプラーク面積を顕著に減少させた(**p=0.0008)。46%のより大きな減少がPBSと比較してPIF 1mg/kg/日において明らかとなった(****p<0.0001)。PIFの高投与量は、scrPIFの両投与量と比較して統計的に顕著にプラーク面積を減少させた(****p<0.0001)。PIF 1mg/kg/日の治療は、PBS制御と比較して43%大動脈弓のプラーク面積を顕著に減少させた(**p<0.002)。減少はPIF 1mg/kg/日およびscrPIFの両投与量の間でも確認された(それぞれ、***p=0.0005、****p<0.0001)。

30

【図8】図8(A)から(F)は、PIFが高脂肪食を与えられたApoE-/-マウスの大動脈根および大動脈弓におけるVCAM-1、MCP-1およびCD68を減少させることを示す(それぞれn=8、平均および標準誤差、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001)。

【図9】図9(A)から(D)は、scrPIFではなくPIFが大動脈根弓および大動脈根においてオイルレッドO(ORO)着色を減少させることを示す。ORO組織構造はマウスアテローム性動脈硬化プラークにおける脂質を同定させるのに使用される。脂質は、プラーク±標準誤差の面積の強度率を示す赤色によって定量化される。(A)は、PIF 1mg/kg/日の治療は、大動脈根において、scrPIF 1mg/kg/日と比較して脂肪において顕著な減少を生じる(n=8、**p<0.01、****p<0.0001)。脂質および泡沫細胞の減少が全体として脂肪レベルではなくアテローム性動脈硬化型病変へのPIFの作用によるものであったことを確認するため、Cobasは、異なる治療群からのマウス血漿をコレステロールレベルの測定に用いられた。全ての動物は依然として高いコレステロールレベルを有し、測定値を得るために、該血漿は1:10に希釈された。分析後、統計的差異はTukey's Multiple Comparison Testによって対となった一つの方法であるANOVAを使用するいかなる群の間でもみられなかった。

40

【図10】図10はPIFが：(A)大動脈根(*p=0.0017)および大動脈弓

50

(* * p = 0 . 0 0 3 5) における C D 6 8 を減少させること、および、(B) 大動脈根 (* * * * p = < 0 . 0 0 0 1) および大動脈弓 (* * p = 0 . 0 0 9 3) における脂質を減少させることを示す。

【図 1 1】図 1 1 は P I F が循環脂質に影響しないこと、および、血漿コレステロールにおける顕著な変化はないことを示す。C O B A S 分析器は様々な治療群からマウス血漿を使用することによってコレステロールレベルを測定するのに用いられた。全ての動物は依然として高いコレステロールレベルを有し、測定値を得るために、該血漿は 1 : 1 0 に希釈される必要があった。統計的差異は T u k e y ' s M u l t i p l e C o m p a r i s o n T e s t によって対となった一つの方法である A N O V A を使用するいかなる群の間でもみられなかった。これは、脂質および泡沫細胞の減少が全体として脂肪レベルではなくアテローム性動脈硬化型病変への P I F の作用によるものであったことを立証した。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

本願組成物および方法が記載される前に、本発明が特定のプロセス、組成物または方法論に限定されるものではなく、これらは変化することができるものであることが理解されなければならない。本記載において使用される用語は特定の見解または実施形態のみを記載するためのものであって、添付の特許請求の範囲によってのみ制限されるものである本願発明の範囲を制限することを目的としないことも理解されるものである。そうでなければ定められない限り、本明細書で使用される全ての技術的または科学的用語は従来技術において当業者によって共通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと同様または等しい任意の方法および材料が本願発明の実施形態の実行またはテストにおいて使用されることができるともかかわらず、好適な方法、装置、および材料が現在記載されている。本明細書において言及される全ての刊行物は、その全体において参照により組み込まれる。本明細書は、本発明が従来からの発明による開示に先行する権利がないという承認として解釈されるものでは何らない。

20

【 0 0 1 4 】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形「 a 」 「 a n 」 および「 t h e 」 は、前後関係で明確にそうではないと決定づけられない限り、複数への参照を含むものである。したがって、例えば、「ペプチド」への参照は、一つ以上のペプチドおよびそれらと同等のものへの参照であることは、当業者およびその他にとって公知である。

30

【 0 0 1 5 】

本明細書で使用する場合、用語「約」は使われている数字の数値のプラスまたはマイナス 1 0 % を意味する。したがって、約 5 0 % は 4 5 % ~ 5 5 % の範囲を意味する。

【 0 0 1 6 】

治療薬と併せて使用される場合、「投与する」は、標的組織内または標的組織に直接的に治療薬を投与する、または、治療薬が標的とされる組織に確実に影響することによって患者に治療薬を投与することを意味する。したがって、本明細書で使用されるように、用語「投与する」は着床前因子 (P I F) と併せて使用される場合、これに限定されるわけではないが、標的組織内または標的組織に P I F を提供すること、例えば、治療薬が標的組織に届くことによって、静脈注射で患者に全身的に P I F を提供すること、(例えばいわゆる遺伝子治療技術と呼ばれているものによって) 標的組織にそれらの配列をコードする形式で P I F を提供することを含むことができる。組成物を「投与する」ことは、非経口、経口、または局所投与、またはその他の既知の技術と組み合わせた方法によって達成されることができる。このような組み合わせ技術は、加熱、放射線および超音波を含む。

40

【 0 0 1 7 】

本明細書で使用される用語「動物」または「患者」または「対象」は、これに限定されないが、ヒトおよび野生動物、飼育動物および家畜のようなヒト以外の脊椎動物を含む。好適には、用語「動物」または「患者」または「対象」はヒトに言及する。

50

【 0 0 1 8 】

用語「改善する」は、本発明が、提供、適用、または投与を受けた組織の外観、形態、特徴および／または物理的特性のいずれかを变化させることを伝達するのに使用される。形態における変化は、以下：リステリア・モノサイトゲネス感染、マラリア、ライム病、心疾患、十二指腸潰瘍、アテローム性動脈硬化、腹膜炎および結核のような病気の結果としての感染／炎症の治療、病気の症状の軽減、肉芽腫形成における増加、サイトカイン分泌における増加、パーフォリンおよびグラニュリシンの分泌における増加、疾患感染した食細胞のサイトカイン／ケモカイン分泌の調節および細菌の伝播における減少、の単独または組み合わせの任意によって明示されることができる。

【 0 0 1 9 】

用語「阻害する」は、症状の発現の予防、症状の軽減、または、病気、疾患または疾病を除去するための本願発明の化合物の投与を含む。

【 0 0 2 0 】

「薬学的に許容される」は、担体、希釈剤または賦形剤が製剤の他の成分と適合するものであり、それらの受容体に有害でないことを意味する。

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用される用語「治療的に」は、患者の望ましくない疾患または病気を治療、治す、改善する、予防する、または改善するために使用される薬剤を意味する。一部分において、本願発明の実施形態は結核を治療するための方法を対象とする。

【 0 0 2 2 】

組成物の「治療的有效量」または「有効量」は、所望の効果、つまり、病気または疾患の症状を減少させる、阻害するまたは改善するために予め計算された量である。本方法によって考察された活性は、必要に応じて、医学治療のおよび／または予防的治療の両方を含む。治療のおよび／または予防的効果を得るために本発明にしたがって投与される化合物の特定の投与量は、もちろん、例えば、投与される化合物、投与経路、および治療される疾患を含む症例を取り巻く特定の状況で測定される。該化合物は広い投与量範囲にわたって効果的であり、例えば、通常一日当たりの投与量は、 $0.001 \sim 10 \text{ mg/kg}$ に収まり、より通常は $0.01 \sim 1 \text{ mg/kg}$ の範囲内である。しかしながら、投与される有効量が、治療される疾患、投与される化合物の選択、および選択された投与経路を含む状況に照らして、医師によって測定されること、したがって、上記投与量の範囲は本発明の範囲をいかなる形であれ制限することを意図するものではないことは理解される。本発明の実施形態の化合物の治療的有效量は、典型的には、生理的に許容できる賦形剤組成物において投与される場合の量であり、それは、組織内における有効的な全身濃度または局所濃度を達成するのに十分である。

【 0 0 2 3 】

本明細書で使用される用語「治療する」、「治療される」または「治療」は、治療的処置および予防的または予防手段の両方を意味するものであり、ここにおける目的は、望ましくない生理的状态、疾患または病気を予防または抑制する（減少させる）または、有益または望ましい臨床結果を得ることである。本発明の目的において、有益または望ましい臨床結果は、これに限定されるものではないが、症状の緩和、疾患、障害または病気の程度の減少、疾患、障害または病気の状態の安定（すなわち、悪化しない）、疾患、障害または病気の進行の開始における遅延または減速、疾患、障害または病気の改善、および、検出可能であるか、または検出不可能であるかにせよ鎮静（部分または全体）または疾患、障害または病気の強化または改善を含む。治療は過剰なレベルの副作用なしに臨床的に有意な反応を誘発することを含む。治療はまた、治療を受けなかった場合に予想される生存と比較して、生存を延長させることを含む。

【 0 0 2 4 】

リステリア・サイトモノギネス、グラム陽性条件的細胞内細菌は、食細胞において生存および複製し、肝細胞は続いて該食細胞から逃げる。リステリア感染への生来の免疫応答は、マクロファージ、ケモカイン（MIP）-1 α およびKC、ナチュラルキラー（NK

10

20

30

40

50

細胞および好中球を含む多くの細胞タイプだけではなく、腫瘍壊死因子 (TNF) - a、インターロイキン (IL) - 1、IL - 6、IL - 12、インターフェロン (INF) - c、およびより最近同定された早期Tリンパ球活性化 (Eta) - 1のような窒素中間体およびサイトカインも含む複雑なプロセスである。TNF - aおよび一酸化窒素 (NO)、マクロファージおよび新たに同定されたTNF / iNOS生産樹状細胞から生産された誘導性一酸化窒素シンターゼ (iNOS) の最終生成物が、NKにより主に分泌される、INF - cと関連する早期リステリア感染からのホストの保護の原因となるキー・エフェクター分子であると広く信じられている。多数の研究も、CD8 + T - 細胞免疫応答がINF - c - 媒介機構によって感染したマウスにおけるリステリア・モノサイトギネスの完全なクリアランスにおいて優れた役割を果たし、それによって、食細胞からL・モノサイトギネスが逃れることを阻害し、マクロファージが活性化される。さらに、CD4 + T細胞は、CD40 - CD40L相互作用によるDCsによりB7 - 1 / B7 - 2 - 媒介副刺激を有するCD8 + T細胞を提供することによって、および、免疫応答をTヘルパータイプ1 (Th1) 経路に分極化させることによって、抗リステリア抵抗に關与する。具体的には、B7 - 1およびB7 - 2副刺激分子は、リステリア感染の間Th1 CD4 + T細胞からINF - cおよびIL - 2の生産のために必要であることがある。(CD274およびPD - L1としても知られる) B7 - H1は、陽性または陰性にT細胞応答 (TCR) - 媒介信号を制御するB7系統のメンバーである。拮抗的な抗 - B7 - H1抗体または遺伝子ノックアウトマウスのどちらかを使用する一連のin vivo研究の結果は、内因性B7 - H1の共抑制の役割を支える；例えば、拮抗的なモノクローナル抗体を有するB7 - H1のin vivo遮断は、エフェクターT細胞を活性化させることができ、非肥満糖尿病 (NOD) マウスにおける自己免疫性糖尿病の発病率の増加、通常のマウスにおけるハプテン誘導性接触過敏症、およびB7 - H1ノックアウトマウスの実験的自己免疫性脳髄炎に感染しやすくなることにつながる。しかしながら、b - 島細胞によるB7 - H1のトランスジェニック発現は、自然発症性糖尿病を誘発し、および、同種ホストにおけるb - 島細胞の拒絶を加速し、B7 - H1に対する拮抗的な抗体が炎症性腸疾患の病因を阻害するという研究結果は、B7 - H1がin vivoのT - 細胞免疫において、共刺激な役割を果たすことを示唆する。B7 H1が多くの研究の癌進行、自己免疫および移植片拒否のT細胞免疫に關係するのに対し、感染症モデルの内因性B7 H1の役割を説明している報告はほとんどない。

【0025】

ヒト型結核菌 (Mtb) によって生じる結核 (TB) は、世界中で年間約800万人が感染し、300万人が死亡する深刻かつ致死的な疾患である。Mtbは肺胞マクロファージのエンドソーム内に侵入して複製し、それらの活性を変える。単核細胞肉芽腫における局所的免疫抑制は、続いてMtb感染症を呈する。マクロファージ、T - リンパ球、B - リンパ球および線維芽細胞は、感染したマクロファージを取り囲むリンパ球とともに肉芽腫を形成するのに凝集する細胞の一つである。肉芽腫の機能は播種の予防のみならず、免疫応答の細胞の伝達のための局所的な環境も提供する。肉芽腫内で、Tリンパ球は、それらが感染している細菌を破壊するためにマクロファージを活性化するインターフェロン (INF) - ガンマのようなサイトカインを分泌する。細胞毒性T細胞は、パーフォリンおよびグラニユリシンを分泌することによって感染した細胞を直接的に殺すこともできる。重要なことに、Mtbは潜伏状態になることで、肉芽腫内で生存することができる。

【0026】

ライムボレリア症として知られるライム病は、北半球において最もよくあるダニ媒介の伝染病である。ライム病は、ボレリア属に属する細菌の少なくとも3つの種によって生じる。ボレリア・ブルグドフェリ (Borrelia burgdorferi sensu stricto) 菌は米国においてライム病の大部分の症例を生じるが、ボレリア・アフゼリおよびボレリア・ガリニはヨーロッパにおいてライム病の大部分の症例を生じる。ボレリア属は、マダニ属 (「硬ダニ」) のわずかな種に属する感染したダニに咬まれることによって、ヒトに伝播する。初期症状は、熱、頭痛、疲労、鬱状態、および、遊走性

紅斑（E M）と呼ばれる特徴的な皮膚発疹を含むことができる。治療しないまま放置すると、のちの症状は、関節、心臓、および中枢神経系を含むことができる。

【 0 0 2 7 】

動脈硬化性心疾患（A S V D）として知られているアテローム性動脈硬化は血管壁肥大で有名な疾患である。該肥大は、一般的に、プラークと呼ばれる硬い構造を形成するコレステロールのような脂肪質の蓄積の結果生じる。最近の臨床的および実験的証拠は、血管壁における炎症プロセスが、アテローム性動脈硬化に苦しむ患者における病変形成および臨床開発の率を占める決定的な要因であることを示す。証拠は、アテローム性動脈硬化の病変における単球の保持同様、単球の漸増はプラークの発達に關与することをさらに示した。

10

【 0 0 2 8 】

哺乳類の妊娠は、母体の免疫系が非常に効率的な方法で胎児と相互作用し、それが双方のために有益であるという独特な生理学的事象である。妊娠は免疫パラドックスであり、移植片対宿主または宿主対移植片効果を示さない。妊娠はこのような所望の有効的な免疫保護（抑制のない調節）を提供する、免疫調節状態である。そこにおいて、母体／宿主から新生児／同種移植への垂直感染は低く、H I Vおよび多発性硬化症のような様々な免疫疾患に対して観察される保護に類似している。理論に束縛されることを望まずに、宿主の免疫系の活性化が結核の治療に役立つことができ、胚に特有な保護化合物は結核に対して極めて重要な保護的役割を有することができる。妊娠の免疫調節効果を非妊娠免疫状態にうまく移行することは、T Bを制御するために強力で有効的な非毒性ツールに結果としてなることができる。このように、抗-T B薬剤を有する相乗効果において作用できる薬剤を有することは、この深刻な病気に対する保護において重要な支えとなる要素を示すことができる。

20

【 0 0 2 9 】

新規な着床前因子（P I F）は、胚／同種移植から母体／宿主への早期（二細胞期）メッセージである。P I Fは、必要に応じて病原体攻撃への応答において重要な役割を果たすとともに、免疫寛容および受容をつくる。P I Fの合成類似体（s P I F）は、活性化した末梢血単核細胞（P B M C）増殖およびサイトカイン分泌に対する天然ペプチドの効果を複製し、P B M Cにおける新規のサイトを介して作用し、既知の免疫抑制薬とは区別される効果を有する。本明細書で使用されるように、P I FまたはP I Fペプチドは合成P I Fペプチドまたは単離された天然に存在するP I Fペプチドである。P I Fの保護的効果は、宿主の基本免疫に作用することなく生存能力のある妊娠期全体にわたって生じる。s P I Fは生理的な相対物を模倣し、生存のために必要な基本免疫を損傷することなく免疫損傷の進行を阻害するおよび後退させるために「必要につき」免疫活性を増強する。このように、P I Fは幅広い免疫抑制なしで炎症を制御する。単核細胞肉芽腫内の局所免疫抑制は、以下のM t b感染を呈する。よって、P I FはT Bの治療において役立つことができる。したがって、P I FはK v 1 . 3カリウムチャネルを標的することができる、抗-T B標的と考えられる。

30

【 0 0 3 0 】

理論に束縛されることを望まないが、s P I Fは活性P B M C s増殖を妨げ、T H 2 / T H 1サイトカイン・バイアスを作成し、プロ-拒絶（p r o - r e j e c t i o n）遺伝子を減少するとともにプロ-寛容（p r o - t o l e r a n c e）を進行させる。これはマクロファージおよび免疫抑制薬剤により使用されるK +（C a + +ではない）チャネルにより活性化すると推定されるTおよびB細胞に対して活性化された細胞内でP I Fを結合することで達成される。妊娠子宮内で、P I FはNK細胞内で蓄積し、母性敵対を緩和する。そのため、胚-分泌P I Fは末梢性および局所免疫を調節し、移植における胚のために良好な環境をつくり、栄養芽層への侵入を容易にする。このように、妊娠を促進する際のペプチドの基本的役割を明らかにする。

40

【 0 0 3 1 】

免疫細胞上のP I Fにおいて観察された二相性結合および効果は、妊娠関連の寛容に対

50

して興味深い洞察を提供する。本研究は、刺激された（負荷）細胞および免疫ナイーブ細胞における P I F の効果の違いを明確に示した。M L R に見られる減少は、s P I F への曝露の後に、減退した同種抗原応答を反映する。これは、ドナー胚（同種）がなぜうまく移植できるのか、および、遺伝子の類似または同一の種の増殖は必要ないことを説明できる。P I F は生存に必要な基本的免疫を維持し、胚にとって有害である T 細胞増殖の活性を遮断することにより自分に対する寛容を援助する。

【 0 0 3 2 】

ナイーブまたは刺激された、または共刺激された P B M C s における s P I F の特異的な効果は、サイトカインにおいても明らかである。以前の状況において、s P I F はプロ炎症性 T H 1 応答を減少し、その一方で P B M C s の刺激の後に、s P I F は T H 2 サイトカイン・バイアスを作成した。妊娠中の T H 1 および T H 2 サイトカインの増加した濃度が最近報告された。I L - 2 における減少および（関連する遺伝子）細胞毒性 T 細胞増殖の主な誘因および T N F - ファミリーメンバーは、CCL7、単球機能の調節遺伝子とともにナイーブ細胞、増加において特徴づけられる。刺激された細胞において、病原体に应答する必要があるため、有力な T H 1 サイトカイン（I F N および T N F ）が増加した。I L 1 0 分泌および遺伝子発現における互いに異なる効果（ナイーブ細胞における減少および活性化された細胞における増加）は、P I F が母体免疫に負荷が与えられた場合において、拒絶に対する保護するとともに、基本免疫下で有害な免疫抑制を防止することを示す。

【 0 0 3 3 】

グローバルな P M B C s 遺伝子発現データはさらに、基本および負荷環境における P I F 誘発性差異を増強した。前者において、プロ - 寛容遺伝子は胚性拒絶を促進するものが減らされるとともに、増加した。注目すべきことに、共刺激のもとで、抗 - 拒絶性遺伝子は、病気と闘うことを必要とする防衛機構を促進することによりバランスが保たれなければならない。ナイーブ細胞および刺激された細胞の両方で T G F B R I I 発現が増加した。T G F 結合は T 細胞増殖を阻害し、マクロファージ活性化を防いだ。s P I F は F K B P 1 を増加し、F K 5 0 6 がタンパク質を結合し、寛容誘発において重要なカルシニューリン経路に関係した。興味深いことに、同一の遺伝子が s P I F 曝露に続いてヒト脱落膜においてもアップ調節された。刺激された細胞において、s P I F は、I F N およびシクロフィリン B によって誘発された L - トリプトファンを分解させる I D O を増加させることによる寛容を促進し、寛容はシクロスポリンが結合する分子を誘導した。H L A - G 3 発現にみられる増加は、胚への免疫細胞攻撃を緩和する。一方、母性免疫応答 s P I F を容易にすることは、2 つのチロシンキナーゼ、T C R 連結シグナル形質導入経路内で鍵となる役割を果たす L C K および細胞増殖の制御に関与する F y n を増加させる。C D 3 1 における減少は、C C R 4、プロ炎症性ケモカインの減少につれて、好中球の作用における減少を反映する。全体として、遺伝子データは、病気と闘うために母体免疫を支持することとのバランスをとることに結果としてなる、P I F の二重総合的な調節効果をさらに立証する。

【 0 0 3 4 】

ナイーブ（C D 1 4 + ）または刺激された P M B C （T および B ）のサブセットへの差別的な F I T C - s P I F 結合プロフィールは、観察された免疫調節効果に一致する。生来の免疫は、胚への攻撃を回避するために直ちに保護された。高いリガンド濃度における T および B 細胞および低濃度での活性化した P B M C s における強化された結合は、免疫系の適応できる治療群と効果的な相互作用を反映する。N K 細胞への限定的な結合のみが標的特性を反映するマイトジェン負荷において観察されるのに対し、P I F は T r e g （F o x P 3 + ）活性 T 細胞サブタイプにも結合する。このように、P I F 結合特性はさらに、生来のおよび適応免疫において観察された差異を支持する。

【 0 0 3 5 】

s P I F 機構は独特であり、カルシウムモビリゼーションによって動作せず、P I F が単独で効果を有さず、または P B M C が P H A または P M A / イオノマイシンによって活

10

20

30

40

50

性化されることから、免疫抑制剤（シクロスポリン、FK506）に見られるGPCR/Gq受容体に結合する。しかしながら、PIFは、IL-2、カルシニューリン信号伝達の主要生成物を刺激するために、FK506結合タンパク質アップ調節を促進し、経路における下流の関係を示唆するのに対し、抗-CD3mAbによってシナジーを与える。現在の研究による最近のデータは、K⁺チャネルをPIF誘発性の観察された効果に關与させる。PIFはイオン孔を調節するKv1.3ベータチャネルに結合し、遺伝子発現データはK⁺遺伝子の調節を示す。

【0036】

末梢性免疫を超えて、局所的子宮免疫は、成功的な生殖を達成するために制御されることが必要なこともある。胚-分泌PIFは、母体-胎児の接触面でネズミuNK細胞の顆粒内で局所化されることができ、場合によって、細胞内結合部位を標的とする。PIFは、uNK細胞内に急速に拡散する周囲の栄養芽層細胞に由来する。このように、PIFは、uNK細胞毒性機能をダウン調節することができる、または受胎産物の生存を支持するために、サイトカイン分泌を調節することができる。直接的な胚-母体相互作用が移植の間に起こるときに、PIFは他のプロ-移植要素と呼応して重要な役割を果たす。

【0037】

PIFは、妊娠中にのみ観察される矛盾な「免疫パラドックス」プロフィールによって、完璧な免疫バランスをつくることにおいて本質的で調節的な役割を有することができる。負荷下におけるTH1サイトカインにおける増加は感染に対して保護することができるのに対し、Treg細胞に結合することで連結されるTH2サイトカインにおける増加は、胚を保護することができる。受精直前のPIF発現は、早期の妊娠事象において腫瘍な役割を反映することができる。

【0038】

本明細書に記載の実施形態は、細胞内損傷を治療するためのPIFの使用に向けられている。実施形態は、細胞内損傷を治療する方法に向けられ、それを必要とする被験者にPIFペプチドを投与することを含む。いくつかの実施形態では、前記投与したPIFは、細胞内損傷にตอบสนองしてサイトカイン分泌を増加させる。いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4、配列ID番号5、配列ID番号6、配列ID番号7、および配列ID番号8から選択される。実施形態において、PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、および配列ID番号4から選択される。他の実施形態において、PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、および配列ID番号3から選択される。いくつかの実施形態では、前記PIF投与は、治療的に有効な量である。いくつかの実施形態において、被験者は、細胞内損傷と診断されている。いくつかの実施形態において、被験者は、細胞内損傷の恐れがある。いくつかの実施形態では、細胞内損傷は、疾患の結果生じる。いくつかの実施形態において、前記疾患は、細胞内細菌によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、前記細胞内細菌は、*Listeria monocytogenes*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Helicobacter pylori*、*Borrelia burgdorferi sensu stricto*、*Borrelia afzelii*、及び *Borrelia garinii* から選択される。さらなる実施形態において、前記疾患は、リステリア菌、マラリア、ライム病、心血管疾患、十二指腸消化性潰瘍、アテローム性動脈硬化症、腹膜炎、および結核から選択される。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量のPIFペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも1種のPIFペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、1日1回、1日2回、1日3回、または1日4回投与される。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、1週間、2週間、3週間、4週間、2箇月、3箇月、4箇月、6箇月、7箇月、8箇月

10

20

30

40

50

、9箇月、10箇月、11箇月、12箇月、18箇月、2年、3年、4年または5年間投与される。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、他の抗細胞内損傷剤と組み合わせてPIFを投与する工程を含む。

【0039】

本発明の実施形態において、PIFペプチドを投与する工程を含む、被験者のアテローム性動脈硬化症を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4配列ID番号5、配列ID番号6、配列ID番号7、および配列ID番号8から選択される。実施形態において、前記PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4から選択される。他の実施形態において、前記PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3から選択される。いくつかの実施形態では、PIFの治療有効量を投与する。いくつかの実施形態において、被験者は、アテローム性動脈硬化症と診断されている。いくつかの実施形態において、被験者は、アテローム性動脈硬化症の恐れがある。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量のPIFペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも1種の活性PIFペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、1日1回、1日2回、1日3回、または1日4回投与される。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、1週間、2週間、3週間、4週間、2箇月、3箇月、4箇月、6箇月、7箇月、8箇月、9箇月、10箇月、11箇月、12箇月、18箇月、2年、3年、4年または5年間投与される。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、他の抗アテローム性動脈硬化剤と組み合わせてPIFを投与する工程を含む。

【0040】

いくつかの実施形態において、PIFは大動脈根のプラークを減らすことによって、アテローム性動脈硬化症を治療する。いくつかの実施形態において、PIFは、大動脈弓におけるプラークを減らすことによって、アテローム性動脈硬化症を治療する。いくつかの実施形態では、PIFは、大動脈弓における単球タンパク質を減少させることによって、アテローム性動脈硬化症を治療する。さらなる実施形態において、単球タンパク質は、血管細胞接着分子(vascular cell adhesion molecule)(VCAM-1)、単球走化性タンパク質(monocyte chemotactic proteins)(MCP-1)および分化のクラスター(clusters of differentiation)(CD68)から選択する。いくつかの実施形態では、PIFは、大動脈弓の単球タンパク質を減少させることによって、アテローム性動脈硬化症を治療する。さらなる実施形態において、前記単球タンパク質は、血管細胞接着分子(VCAM-1)、単球走化性タンパク質(MCP-1)および分化のクラスター(CD68)から選択する。いくつかの実施形態では、PIFは、大動脈根の脂質を減少させることによって、アテローム性動脈硬化症を治療する。いくつかの実施形態において、PIFは、THP-1細胞中のサイトカインを減少させることによって、アテローム性動脈硬化症を治療する。さらなる態様において、前記サイトカインは、インターロイキン(interleukin)12、サブユニット(IL-12b)及びインターフェロン(IFN-)から選択する。大動脈上のプラーク減少の効果は、循環脂質に影響を与えることなく、直接的である。実施形態では、循環脂質のレベルが実質的に影響を受けず、あるいはその他実質的に低減されない。

【0041】

本開示の実施形態では、PIFペプチドを投与する工程を含む、被験者の結核を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態では、結核を治療する方法は、PIFペプチドを投与する工程を含んで、結核菌の播種を減らすことを含む。いくつかの実施形態において、結核を治療する方法は、PIFペプチドを投与することを含んで、結核菌感染に应答

してサイトカイン分泌を増加させることを含む。いくつかの実施形態において、P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4、配列 I D 番号 5、配列 I D 番号 6、配列 I D 番号 7、および配列 I D 番号 8 から選択される。実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4 から選択される。他の実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3 から選択される。いくつかの実施形態では、P I F の治療有効量を投与する。いくつかの実施形態において、被験者は、結核と診断されている。いくつかの実施形態において、前記被験者は、結核感染の恐れがある。いくつかの実施形態において、前記被験者は結核菌にさらされていた。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量の P I F ペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は好ましくは経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも 1 種の活性 P I F ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、1 日 1 回、1 日 2 回、1 日 3 回、または 1 日 4 回投与される。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、2 箇月、3 箇月、4 箇月、6 箇月、7 箇月、8 箇月、9 箇月、10 箇月、11 箇月、12 箇月、18 箇月、2 年、3 年、4 年または 5 年間投与される。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、他の抗結核剤と組み合わせて P I F を投与する工程を含む。

10

20

【0042】

本発明の実施形態では、P I F ペプチドを投与することを含む、被験者の結核の症状を治療する方法が提供される。係る方法において、前記結核の症状は胸痛、咳、体重減少、倦怠感、食欲不振、発熱、寝汗、悪寒およびこれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態において、P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4、配列 I D 番号 5、配列 I D 番号 6、配列 I D 番号 7、および配列 I D 番号 8 から選択される。実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4 から選択される。他の実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3 から選択される。いくつかの実施形態では、P I F の治療有効量を投与する。いくつかの実施形態では、P I F ペプチドの治療上有効な量が投与される。いくつかの実施形態において、被験者は、結核と診断されている。いくつかの実施形態において、被験者は、結核感染の恐れがある。いくつかの実施形態において、被験者は結核菌にさらされていた。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量の P I F ペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも 1 種の活性 P I F ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、1 日 1 回、1 日 2 回、1 日 3 回、または 1 日 4 回投与される。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、2 箇月、3 箇月、4 箇月、6 箇月、7 箇月、8 箇月、9 箇月、10 箇月、11 箇月、12 箇月、18 箇月、2 年、3 年、4 年または 5 年間投与される。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、他の抗結核剤と組み合わせて P I F を投与する工程を含む。

30

40

【0043】

本開示の実施形態では、P I F ペプチドを投与することを含む、被験者の腹膜炎の治療方法が提供される。いくつかの実施形態において、P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4、配列 I D 番号 5、配列 I D 番号 6、配列 I D 番号 7、および配列 I D 番号 8 から選択される。実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4 から

50

選択される。他の実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3 から選択される。いくつかの実施形態では、P I F の治療有効量を投与する。いくつかの実施形態において、被験者は、腹膜炎と診断されている。いくつかの実施形態において、前記被験者は、腹膜炎の恐れがある。いくつかの実施形態では、P I F ペプチドは、カリウムチャンネル阻害剤を併用する。さらなる実施形態では前記カリウムチャンネル阻害剤は、I F N、K v 1.3 阻害剤およびこれらの組み合わせから選択する。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量の P I F ペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも 1 種の活性 P I F ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、1 日 1 回、1 日 2 回、1 日 3 回、または 1 日 4 回投与される。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、2 箇月、3 箇月、4 箇月、6 箇月、7 箇月、8 箇月、9 箇月、10 箇月、11 箇月、12 箇月、18 箇月、2 年、3 年、4 年または 5 年間投与される。いくつかの実施形態では、前記方法はさらに、他の抗腹膜炎剤と組み合わせて P I F を投与する工程を含む。

【0044】

実施形態は、B 7 - H 1 を上方制御する方法に向けられ、それを必要とする被験者に P I F ペプチドを投与することを含む。いくつかの実施形態において、B 7 - H 1 は、T 細胞受容体を介するシグナル伝達を正に制御し得る。他の実施形態において、B 7 - H 1 は、T 細胞受容体を介するシグナル伝達を負に制御し得る。いくつかの実施形態は、K v 1.3 チャンネル阻害する方法に向けられ、それを必要とする被験者に P I F ペプチドを投与することを含む。いくつかの実施形態は、K v 1.3 チャンネルを阻害する方法に向けられ、更にそれを必要とする被験者に K v 1.3 の阻害剤を投与することを含む。いくつかの実施形態において、前記 P I F ペプチド投与は、K v 1.3 カリウムチャンネルの活性を遮断する。いくつかの実施形態において、前記 P I F ペプチドは、前記チャンネルに結合することによって K v 1.3 チャンネルの活性を遮断する。いくつかの実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4、配列 I D 番号 5、配列 I D 番号 6、配列 I D 番号 7、および配列 I D 番号 8 から選択される。いくつかの実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4 から選択される。他の実施形態において、前記 P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3 から選択される。いくつかの実施形態では、P I F の治療有効量を投与する。いくつかの実施形態において、前記 P I F ペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量の P I F ペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記 P I F ペプチドは、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも 1 種の活性 P I F ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、前記 P I F ペプチドは、1 日 1 回、1 日 2 回、1 日 3 回、または 1 日 4 回投与される。いくつかの実施形態において、前記 P I F ペプチドは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、2 箇月、3 箇月、4 箇月、6 箇月、7 箇月、8 箇月、9 箇月、10 箇月、11 箇月、12 箇月、18 箇月、2 年、3 年、4 年または 5 年間投与される。

【0045】

実施形態は、細胞内損傷からの炎症を治療する方法に向けられ、それを必要とする被験者に P I F を投与することを含む。いくつかの実施形態は、細胞内損傷にตอบสนองしてサイトカインの分泌を増加させる方法に向けられ、それを必要とする被験者へ P I F を投与することを含む。いくつかの実施形態は、細胞内損傷にตอบสนองしてサイトカインの分泌を増加させる方法に向けられ、更に、それを必要とする被験者へ K v 1.3 阻害剤を投与することを含む。いくつかの実施形態において、P I F ペプチドは、配列 I D 番号 1、配列 I D 番

10

20

30

40

50

号2、配列ID番号3、配列ID番号4、配列ID番号5、配列ID番号6、配列ID番号7、および配列ID番号8から選択される。実施形態において、前記PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4から選択される。他の実施形態において、前記PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3から選択される。いくつかの実施形態では、PIFの治療上有効な量を投与する。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量のPIFペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも1種の活性PIFペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、1日1回、1日2回、1日3回、または1日4回投与される。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、1週間、2週間、3週間、4週間、2箇月、3箇月、4箇月、6箇月、7箇月、8箇月、9箇月、10箇月、11箇月、12箇月、18箇月、2年、3年、4年または5年間投与される。

【0046】

いくつかの態様では、結核菌の播種を減らす方法であって、それを必要とする被験者にPIFを投与する工程を含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、前記PIF投与は、治療的に有効な量である。いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4、配列ID番号5、配列ID番号6、配列ID番号7、および配列ID番号8から選択される。実施形態において、前記PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4から選択される。他の実施形態において、前記PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3から選択される。いくつかの実施形態において、前記PIFペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量のPIFペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも1種の活性PIFペプチドを含む。いくつかの実施形態において、前記PIFペプチドは、1日1回、1日2回、1日3回、または1日4回投与される。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、1週間、2週間、3週間、4週間、2箇月、3箇月、4箇月、6箇月、7箇月、8箇月、9箇月、10箇月、11箇月、12箇月、18箇月、2年、3年、4年または5年間投与される。

【0047】

さらなる実施形態は、Mtbに感染したマクロファージで誘導された局所免疫抑制を中和し、および/またはMtb感染に対するホストの免疫応答を増加するPOIFの使用に向けられている。いくつかの実施形態において、PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4、配列ID番号5、配列ID番号6、配列ID番号7、および配列ID番号8から選択される。実施形態において、前記PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4から選択される。他の実施形態において、前記PIFペプチドは、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3から選択される。いくつかの実施形態において、PIFペプチドの治療上有効な量が投与される。いくつかの実施形態において、被験者は、結核と診断されている。いくつかの実施形態において、被験者は、結核感染のおそれがある。いくつかの実施形態において、被験者は結核菌に曝らされていた。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、医薬組成物で投与され、当該医薬組成物は、治療有効量のPIFペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、非経口、経皮、直腸、経鼻、局所静脈内投与、又は経口投与から選択される経路から投与される。係る医薬組成物は、当技術分野で周知の方法で調製され、薬学的担体と共に、少なくとも1種の活性PIFペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記PIFペプチドは、1日1回、1日2回、1日3回、または1日4回投与される。いくつかの実施

形態において、前記 P I F ペプチドは、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、2 箇月、3 箇月、4 箇月、6 箇月、7 箇月、8 箇月、9 箇月、1 0 箇月、1 1 箇月、1 2 箇月、1 8 箇月、2 年、3 年、4 年または 5 年間投与される。いくつかの実施形態において、前記方法はさらに、他の抗結核剤と組み合わせて P I F を投与する工程を含む。さらに、P I F は結核によって引き起こされる細胞内損傷を防ぐ。大抵の従来の治療法は細胞外で作用するので、細胞内損傷に対処するのに無効になるのに対し、P I F は、細胞内で作用し、それによって免疫細胞が結核菌などの細胞内を襲う細菌に乗っ取られるのを防ぐ。

【 0 0 4 8 】

グルココルチコイドは、免疫系を抑制し、したがって、損傷部位における、炎症およびそれに伴う痛みと腫れとを軽減する。リガンド非結合グルココルチコイド受容体 (" G R ")、H s p 9 0、およびチロシンキナーゼ L C K と F Y N とからなる多タンパク質複合体は、T 細胞における抗原活性化 T 細胞受容体 (T C R) に補充される。この G R 複合体は T C R シグナル伝達に必要である。活性化 P B M C において、P I F は、L C K、F Y N を上方制御するが、B A G 3 発現を減らすことで、H S P 7 0 および 3 2 が活性化される。G R にグルココルチコイドの結合後、この多タンパク質複合体は、解離し、T C R シグナル伝達を遮断し、免疫システムを抑制する。T 細胞受容体 (T C R) に結合することによって、P I F はコルチゾンにとって代わり、免疫抑制を防ぐ。さらに、コルチゾン部位に結合することによって、P I F はコルチゾンの副作用を軽減する。長期間のコルチゾンとの接触は、これらに限定されないが、高血糖、インスリン抵抗性、糖尿病、骨粗しょう症、不安、うつ、胃炎、大腸炎、高血圧症、発作、勃起障害、性腺機能低下症、甲状腺機能低下症、無月経、および網膜症等の他の問題を含む、潜在的に深刻な副作用を多くもたらす。したがって、P I F は、M t b - 感染した食細胞、特にサイトカインおよびケモカインの分泌に影響を与え、また、M t b 誘導免疫抑制を防ぐ。更に、P I F は、主要な免疫細胞機能を調節し、カリウム細束を制御する細胞内カリウムチャンネルの K v 1 . 3 (タンパク質 (K v 1 . 3) のサブユニット) に結合し、また、細胞内インスリン分解酵素に結合し、C D 3 / C D 2 8 で刺激された T 細胞でサイトカイン分泌を増加し得る。理論に束縛されることを望むものではないが、P I F は、K v 1 . 3 のチャンネルに結合することで作用する、クロファジミン (c l o f a m i z i n e) (抗結核薬) と同様の様式で、結核の治療薬として作用し得る。P I F は、N F A T 1 とカルシニューリン経路をも遮断する。したがって s P I F の作用は感染したマクロファージ内で行動直接的な抗菌作用効果と共に。したがって、本発明の態様は、結核の治療のための P I F の使用に向けられている。

【 0 0 4 9 】

その特異的な免疫プロファイルのために、P I F は、相乗的に作用し、抗結核薬の効果を増強し、薬剤耐性及び潜伏性結核の発症の可能性を減少させることで、的確に肉芽腫内の M t b に対する免疫応答を増強し、局所免疫抑制を相殺し得る。最近では、有効である為には、抗 T B 療法は数箇月間使用する必要があり、耐性結核の場合には複数の薬剤が必要とされる。しかし、P I F は、効果的に結核と潜伏性結核 (l a t e n t t u b e r c u l o s i s) (T B および L T B) に対する免疫システムを活性化する。したがって、P I F は、治療期間を短縮するのに役立ち、さらに、複数の薬剤使用の必要性を減少させる。また、P I F は、一般的な T B に関連して発生する他の病理学の側面 (例えば器官損傷) にも対処する。したがって、いくつかの実施形態では、P I F は、他の抗結核薬と組み合わせて投与し得る。係る抗結核薬はイソニアジド (i s o n i a z i d)、リファンピン (r i f a m p i n)、エタンブトール (e t h a m b u t o l)、ピラジナミドン (p y r a z i n a m i d e) およびそれらの組み合わせから選択する。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、P I F は、潜在的に細胞内損傷のすべての段階で使用する : (1) 初期段階の接触後、P I F が付与する免疫力の回復によって前記免疫系が支援される、(2) 後期 (発病が適時に捕捉されなかった場合) で、これに限定されないが、結核などの疾患または感染が進行してしまっている際、P I F は、副作用を最小限に抑え免疫

10

20

30

40

50

系の復元を可能にすると期待される、及び(3)潜伏性感染、例えば、結核で、身体の抵抗の有効性を維持しながら、PIFはツベルクリンで誘導された病気の負担を低下する。

【0051】

本明細書で用いる場合、用語"ペプチド"、"ポリペプチド"および"タンパク質"は交換可能に使用され、アミド結合又は非アミド等価物により共有結合で連結された2個またはそれ以上のアミノ酸を指す。本発明のペプチドは、任意の長さとし得る。例えば、ペプチドは、5~12、12~15、15~18、18~25、25~50、50~75、75~100又はそれ以上の長さなど、約2~約100またはそれ以上の残基を有する。好ましくは、ペプチドは、約2~約18残基である。本発明のペプチドは、L-およびD-異性体とL-およびD-異性体との組み合わせを含む。前記ペプチドは、通常タンパク質の翻訳後処理に関連する、例えば、環化(例えば、ジスルフィドまたはアミド結合)、リン酸化、グリコシル化、カルボキシル化、ユビキチン化、ミリスチル化、または脂質化修飾を含む。

10

【0052】

本明細書で開示されたペプチドは、さらにアミノ酸の構造的および機能的類似体を有する化合物、例えば合成または非天然アミノ酸またはアミノ酸類似体を有するペプチド模倣物であって、該模倣物が本発明の化合物の1つまたはそれ以上の機能または活性を有する限り、それらを含むものである。したがって、本発明の前記化合物は、"模倣物"および"ペプチド模倣物"形態を含む。

【0053】

20

用語「ミメティック(模倣物)」、「ペプチド・ミメティック(ペプチド模倣物)」、及び「ペプチドミメティック(ペプチド模倣物)」は、本明細書で互換的に使用され、通常選択された天然ペプチド、または、タンパク質機能ドメイン(例えば、結合モチーフまたは活性部位)の三次構造結合または活性を模倣するペプチド、部分ペプチドまたは非ペプチド分子を指す。これらのペプチド模倣物は、組換え的にまたは化学的に修飾されたペプチド、及び更に以下に記載するような小分子薬剤模倣物などの非ペプチド剤を含む。

【0054】

いくつかの態様では、本発明は、上記で定義した、PIFペプチドおよび薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む医薬組成物、又は上記に定義した化合物を有効量含む医薬組成物に向けられる。

30

【0055】

本発明の化合物は、これが活性である任意の経路で、従来の方式により投与し得る。投与は、全身、局所、または経口であり得る。例えば、投与は、非経口、皮下、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、経口、口腔内、口腔側、又は眼経路、または腔内、吸入、デポー注射、又は移植によることができるが、限定されない。したがって、本発明の化合物の投与の様式(単独または他の薬剤と組み合わせる)は、舌下、注射可能(速効性、持続性、移植、及びペレット形態で、皮下または筋肉内注射される)、または腔クリーム、坐剤、ペッサリー、腔持続性リング、直腸坐剤、子宮内デバイス、および、貼付剤(patch)及びクリームのような経皮形態の使用であり得るが、これらに限定されない。

40

【0056】

投与の特定様式は、徴候に依る。特定の投与経路および用量レジメンの選択は、最適な臨床応答を得るために公知の方法にしたがって臨床医によって調整または用量決定されるべきである。投与される化合物の量は、治療上有効な量である。投与される用量は、治療中の被験者の特徴、例えば、治療中の特定の動物、年齢、体重、健康状態、併用治療があればその種類、および治療の頻度に依存し、また、当業者により(例えば、臨床医により)容易に決定し得る。

【0057】

本発明の治療薬および適切な担体を含む医薬製剤は、錠剤、カプセル剤、カシェ剤、ペレット、丸剤、粉末および顆粒を含むが、これらに限定されない固体剤形態であり得

50

、溶液、粉末、液体エマルジョン、液体懸濁液、半固体、軟膏、ペースト、クリーム、ゲルおよびゼリー、および発泡体とを含むが、これらに限定されない局所投与形態であり得、また、本発明の重合体または共重合体の有効量を含む溶液、懸濁液、エマルジョン、及び乾燥粉末を含むが、これらに限定されない非経口投与形態であり得る。前記活性成分は、薬学的に許容される希釈剤、充填剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、界面活性剤、疎水性のビヒクル、水溶性ビヒクル、乳化剤、緩衝剤、湿潤剤、保湿剤、可溶化剤、防腐剤などの製剤に含有され得ることも当該技術分野で知られている。投与のための手段及び方法は当該技術分野において公知であり、当業者は手引きとして様々な薬理学の参考文献を参照し得る。例えば、Modern Pharmaceuticals, Banker & Rhodes, Marcel Dekker, Inc. (1979); 及び Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, 6th Edition, MacMillan Publishing Co., New York (1980)を参考にし得る。

10

【0058】

本発明の化合物は、例えば急速投与(bolus)注射または連続注入による非経口投与用に製剤化し得る。前記化合物は、約15分～約24時間の期間をかけて皮下継続持続注入により投与し得る。注射用製剤は、単位剤形態で、保存剤を添加して、例えば、アンプルまたは複数回投与容器で提示し得る。前記組成物は、懸濁液、溶液または油性もしくは水性媒体中のエマルジョンのような形態をとることができ、懸濁化、安定化および/または分散剤などの製剤化剤を含有し得る。

20

【0059】

前記化合物は、経口投与用に、これらの化合物を当該技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることにより、容易に製剤化し得る。係る担体は、本発明の化合物を、治療中の患者による経口摂取用に、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤化し得る。経口用の医薬製剤は、固体の賦形剤を添加して、選択的に得られた混合物を粉碎し、必要に応じて、適切な補助剤を添加後、顆粒の混合物を処理することによって得られ、錠剤または糖衣錠の芯剤を得る。適当な賦形剤は充填剤、例えばラクトース、スクロース、マンニトール、及びソルビトールを含むがこれらに限定されない糖類などを含み、また、玉蜀黍澱粉、小麦澱粉、米澱粉、馬鈴薯澱粉、ゼラチン、トラガカントゴム、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、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及びポリビニルピロリドン(PVP)を含むが、これらに限定されない、セルロース調合剤を含む。所望であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの塩であって、これらに限定されない崩壊剤などを添加し得る。

30

【0060】

糖衣錠芯剤は、適切なコーティングを設け得る。この目的のために、濃縮糖溶液を使用することができ、選択的にアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含み得る。染料または色素は、識別用または有効化合物用量の異なる組み合わせを特徴付けるのに、錠剤または糖衣錠コーティングに添加し得る。

40

【0061】

経口で使用し得る医薬製剤は、ゼラチン製のプッシュ-フィットカプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤からなる軟質密封カプセル剤を含むが、これらに限定されない。前記プッシュ-フィットカプセルは、例えば、ラクトース等の充填剤、例えば、澱粉等の結合剤、および/または、例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤と、選択的に、安定剤などとの混合物中に有効成分を含有し得る。軟カプセルでは、前記有効化合物は、例えば、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体中に溶解または懸濁し得る。更に、安定剤を添加し得る。経口投与のための全ての製剤は、係る投与に適した用量である。口腔

50

類側投与用には、前記組成物は、従来の様式で処方された、例えば、錠剤またはロゼンジ (r o z e n g e s) の形態をとり得る。

【 0 0 6 2 】

吸入による投与用に於いて、本発明で使用する化合物は、加圧パックまたは噴霧吸入器 (ネブライザー) からエアロゾルスプレーのプレゼンテーション (実射) 形態で、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、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、二酸化炭素または他の適切な気体の使用で、簡便に送達される。加圧エアロゾルの場合、用量単位は計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定し得る。吸入器 (i n h a l e r) または注入器 (i n s u f f l a t o r) で使用する、例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、前記化合物とラクトースまたは澱粉などの適切な粉末基剤との粉末混合物を含有するよう製剤化し得る。

10

【 0 0 6 3 】

本発明の化合物はまた、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドのような従来の坐剤基剤を含有する、例えば、坐剤または停留浣腸などの直腸用組成物に製剤化し得る。

【 0 0 6 4 】

前述の製剤に加えて、本発明の化合物はまた、持続性 (デポー) 製剤として製剤化し得る。このような長時間作用性製剤は、移植 (例えば、皮下または筋肉内) または筋肉内注射によって投与し得る。

【 0 0 6 5 】

デポー注射は約 1 ~ 約 6 箇月またはそれ以上の間隔で投与し得る。したがって、例えば、前記化合物は、適切なポリマーまたは疎水性材料 (例えば許容される油中のエマルションとして) またはイオン交換樹脂と共に、或いは難溶性誘導体、例えば、難溶性塩として、配合し得る。

20

【 0 0 6 6 】

経皮投与において、本発明の前記化合物は、例えば、プラスターに適用し得、または結果的に当該生物に供給される経皮治療システムによって適用し得る。

【 0 0 6 7 】

前記化合物の医薬組成物は、適切な固体またはゲル相担体または賦形剤を含み得る。係る担体または賦形剤の例は、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖類、澱粉、セルロース誘導体、ゼラチン、および、例えば、ポリエチレングリコール等のポリマーを含むが、これらに限定されない。

30

【 0 0 6 8 】

本発明の前記化合物はまた、他の有効成分、例アジュバント、プロテアーゼ阻害剤、またはその他の適交換性のある薬物又は化合物であって、そのような組み合わせが 本明細書に記載の方法の所望の効果を達成するのに望ましいまたは有利であると見られる場合それらと組み合わせ投与し得る。

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態では、前記崩壊剤成分は、クロスカルメロースナトリウム (c r o s c a r m e l l o s e s o d i u m) 、カルメロースカルシウム (c a r m e l l o s e c a l c i u m) 、クロスポピドン (c r o s p o v i d o n e) 、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウム、アルギン酸カルシウム、イオン交換樹脂、食品用酸および一種の炭酸アルカリ成分に基づく発泡性システム、クレー、タルク、澱粉、アルファ化澱粉、澱粉グリコール酸ナトリウム、セルロースフロック、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ケイ酸カルシウム、金属炭酸塩、重炭酸ナトリウム、クエン酸カルシウム、又はリン酸カルシウム的一种またはそれ以上を含む。

40

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態では、希釈剤成分は、マンニトール、ラクトース、スクロース、マルチデキストリン、ソルビトール、キシリトール、粉末セルロース、微結晶性セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、澱粉

50

、澱粉グリコール酸ナトリウム、アルファ化澱粉、一つのリン酸カルシウム、一つの金属炭酸塩、一つの金属酸化物、または一つの金属アルミノケイ酸塩の1つまたはそれ以上を含む。

【0071】

いくつかの実施形態では、選択的な潤滑剤成分は、それが存在する場合、ステアリン酸、ステアリン酸金属塩、フマル酸ステアリルナトリウム、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪酸エステル、ベヘン酸グリセリル、鉱油、植物油、パラフィン、ロイシン、シリカ、ケイ酸、タルク、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリアルキレングリコール、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、ポリエトキシ化ステロール、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリエトキシ化植物油、または塩化ナトリウムの一つまたはそれ以上をふくむ。

10

【0072】

一実施形態において、本発明のPIFペプチドは、20個の遺伝的にコードされたアミノ酸（即ちDアミノ酸）の一つまたはそれ以上の天然に存在する側鎖を他の側鎖、例えばアルキル、低級アルキル、環状4 -、5 -、6 -、~7員環アルキル、アミド、低級アルキルアミド、ジ（低級アルキル）アミド、低級アルコキシ、ヒドロキシ、カルボキシ及びその低級エステル誘導体、および4 -、5 -、6 -、~7員環の複素環4のような基で、置換することによって、修飾されペプチド模倣物を生成する。例えば、プロリンアナログは、プロリン残基の環の大きさを、5員から4、6、または7員に変えて形成し得る。環状基は飽和または不飽和であり、不飽和場合は、芳香族または非芳香族であり得る。複素環基は、1つまたはそれ以上の窒素、酸素および/または硫黄ヘテロ原子を含み得る。係る基の例は、フラザニル、フリル、イミダゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、モルホリニル（例えばモルホリノ）、オキサゾリル、ピペラジニル（例えば、1 - ピペラジニル）、ピペリジル（例えば、1 - ピペリジル、ピペリジノ）、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル（例えば、1 - ピロリジニル）、ピロリニル、ピロリル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、チオモルホリニル（例えばチオモルホリノ）、およびトリアゾリルを含む。これらの複素環基は、置換または非置換であり得る。基が置換される場合、当該置換基はアルキル、アルコキシ、ハロゲン、酸素、置換または無置換のフェニル基であり得る。ペプチド模倣物はまた、化学的にリン酸化、スルホン化、ピオチン化、または他の部分の付加または除去によって修飾されたアミノ酸残基を有する。

20

30

【0073】

対応する天然物と同じまたは類似の所望の生物活性を有するが、溶解性、安定性、および/または加水分解またはタンパク質分解に対する感受性に関して、前記ペプチドよりも有利な活性を有するペプチド模倣物を構築するのに、種々の技術が利用可能である、（参照例えば、Morgan & Gainor, Ann. Rep. Med. Chem., 24, 243 ~ 252, 1989）。ある特定のペプチド模倣化合物は、本発明の前記ペプチドのアミノ酸配列に基づいている。多くの場合、ペプチド模倣化合物は、選択されたペプチドの三次元構造に基づいた、三次元構造（すなわち、"ペプチドモチーフ"）を有する合成化合物である。前記ペプチドモチーフは、当該模倣体化合物に所望の生物学的活性を与える、すなわち、PIF受容体への結合であって、該模倣体化合物の結合活性は、実質的に低下せず、多くの場合、模倣物がモデルとした天然ペプチドの活性と同一或いはそれより大きい。ペプチド模倣化合物は、向上した細胞透過性と、より高い親和性および/または結合活性と、延長した生物学的半減期とのような治療への応用を高める更なる特性を有し得る。

40

【0074】

ペプチド模倣のデザイン戦略は当該分野で容易に入手し得る（参照、例えば、Ripka & Rich, Curr. Op. Chem. Biol., 2, 441 ~ 452, 199

50

8 ; Hruby 等 , Curr . Op . Chem . Biol . 1 , 114 ~ 119 , 1997 ; Hruby & Balse , Curr . Med . Chem . 9 , 945 ~ 970 , 2000) 。 ペプチド模倣化合物の一つのクラスは、部分的または完全に非ペプチドであるが、原子対原子でペプチド主鎖を模倣し、同様に天然アミノ酸残基の側鎖の機能を模倣する側基を含む、主鎖を有する。幾つかのタイプの化学結合、例えば、エステル、チオエステル、チオアミド、レトロアミド、還元したカルボニル、ジメチレンおよびケトメチレン結合は、プロテアーゼ耐性ペプチド模倣物の構築においてペプチド結合の通常有用な代替物であることが当技術分野で知られている。ペプチド模倣物の別のクラスは、別のペプチドまたはタンパク質に結合するが、必ずしも天然ペプチドの構造的模倣物ではない、小非ペプチド分子を含む。更に別のクラスペプチド模倣物は、コンビナトリアルケミストリーと大規模な化合ライブラリーの生成から生じている。これらは、一般的に天然ペプチドに構造的に無関係であっても、非ペプチド足場上に配置され、必要な官能基を有し、元のペプチドの"地形学的"模倣体として機能する、新規のテンプレートを有する (Ripka & Rich , 1998、上記参照) 。

10

【 0075 】

本発明の実施形態と方法は、以下のPIFペプチドのいずれかを使用する：Met - Val - Arg - Ile - Lys - Pro - Gly - Ser - Ala (配列ID番号1) ; Met - Val - Arg - Ile - Lys - Pro - Gly - Ser - Ala - Asn - Lys - Pro - Ser (配列ID番号2) ; Met - Val - Arg - Ile - Lys - Pro - Gly - Ser - Ala - Asn - Lys - Pro - Ser - Asp - Asp (配列ID番号3) ; Met - Val - Arg - Ile - Lys - Tyr - Gly - Ser - Tyr - Asn - Lys - Pro - Ser - Asp (配列ID番号4) ; Ser - Gly - Ile - Val - Ile - Tyr - Gln - Tyr - Met - Asp - Asp - Arg - Tyr - Val - Gly - Ser - Asp - Leu (配列ID番号5) ; Val - Ile - Ile - Ile - Ala - Gln - Tyr - Met - Asp (配列ID番号6) ; Ser - Gln - Ala - Val - Gln - Glu - His - Ala - Ser - Thr (配列ID番号7) ; Ser - Gln - Ala - Val - Gln - Glu - His - Ala - Ser - Thr - Asn - Xaa - Gly , ここで、Xaaは任意のアミノ酸であり得る (配列ID番号8) 。

20

【 0076 】

単離した、天然および合成両者のPIFペプチドのリストは、以下の表1に提供される。種々のPIFペプチドとスクランブルしたPIFペプチドに対する抗体も提供されている。

30

【 0077 】

【表 1】

表1 P I Fペプチド

(配列ID番号)	ペプチド	アミノ酸配列 (単離、天然または合成)
配列ID番号1 単離した、天然、スポロゾイト周囲 (C i r c u m s p o r o z o i t e) タンパクの領域に一致 (マラリア)	P I F - 1 ₍₉₎	M V R I K P G S A
配列ID番号2 単離物、天然、スポロゾイト周囲 (C i r c u m s p o r o z o i t e) タンパクの領域に一致 (マラリア)	P I F - 1 ₍₁₃₎	M V R I K P G S A N K P S
配列ID番号3 単離した天然、スポロゾイト周囲 (C i r c u m s p o r o z o i t e) タンパクの領域に一致 (マラリア)	P I F - 1 ₍₁₅₎	M V R I K P G S A N K P S D D
配列ID番号4 単離した天然、スポロゾイト周囲 (C i r c u m s p o r o z o i t e) タンパクの領域に一致 (マラリア)	P I F - 1 ₍₁₄₎	M V R I K Y G S Y N K P S D
配列ID番号5 単離した天然、R e v T r a n s 領域に一致	P I F - 3 ₍₁₈₎	S G I V I Y Q Y M D D R Y V G S D L
配列ID番号6	P I F - 4 ₍₉₎	V I I I A Q Y M D
配列ID番号7 単離した天然、ヒトのレチノイドおよび甲状腺ホルモン受容体領域-SMRTに一致	P I F - 2 ₍₁₀₎	S Q A V Q E H A S T
配列ID番号8 単離した天然、ヒトのレチノイドおよび甲状腺ホルモン受容体領域-SMRTに一致	P I F - 2 ₍₁₃₎	S Q A V Q E H A S T N X G

() = アミノ酸の数

【0078】

(実施例)

本発明および使用する方法と材料とを例示する実施形態は、以下の非限定実施例を参照して更に理解し得る。

【実施例1】

【0079】

ペプチド合成：合成 P I F - 1 ₁₅ (M V R I K P G S A N K P S D D) は、Fmoc (9 - f l u o r e n y l m e t h o x y c a r b o n y l) 化学を用いる、固相ペプチド合成 (P e p t i d e S y n t h e s i z e r , A p p l i e d B i o s y s t e m s 社) で得た。最終的な精製は、逆相 H P L C により行われ、同定は、M A L D I - T O F 質量分析およびアミノ酸分析で確認し、H P L C で > 9 5 % に精製し、質量分析 (テキサス州 B i o s y n t h e s i s 社) により実証されている。

【実施例2】

【0080】

図4に示すように、培養された骨髓由来の食細胞は、P I F (配列番号4ペプチド M

10

20

30

40

50

V R I K P G S A N K P S D D) と、インターフェロン - (食細胞活性化サイトカイン) と、M t b とに、接触させ、カリウムチャネル阻害剤 K v 1 . 3 の存在下または非存在下でサイトカインの応答を測定した。M C P - 1 (ケモカイン) インターロイキン (I L) - 6 および I L - 5 は、M t b で増加し、この誘導は、P I F によって増大し、K v 1 . 3 阻害により遮断された。I F N 活性化食細胞を M t b に接触させ場合、M I G および I P 1 0 ケモカインは P I F によってやや増強され、K v 1 . 3 の阻害は、P I F の効果を減少させた。P I F は、M t b による V E G F と F G F の誘導を増強 (I F N による食細胞の活性化に関係なく) し、K v 1 . 3 の阻害は、この応答を増強した。炎症性サイトカイン T N F、I L - 1 、I L - 1 、M I P 1 、及び K C は、M t b によって誘導され、P I F によって増強され、さらに抗 K v 1 . 3 によって増強された。結論として、P I F で調製されたマクロファージは、M t b に対して変更された応答を示す。P I F は、M t b に対する食細胞応答を調節することができたので、病気の発症を調節し得る。

10

【実施例 3】

【0081】

s P I F は効果的に M t b - 感染したマクロファージを制御する。I n v i t r o 試験は、培地で 24 時間 M t b + / - P I F に接触させた、マウスの骨髄由来樹状細胞 (B M D C s) を使用した。s P I F は、低生理 P I F の濃度 (n M) で M t b に対する食細胞の応答をはっきり調節した。s P I F による前処理は、特異的に B M D C の増強した応答をもたらし、炎症性サイトカイン T N F、I L - 1 a、I L - 1 b および I L - 6 並びに、ケモカイン M C P - 1、M I P 1 a、及び K C が増加した。重要なことに、インターフェロン - によるプレ活性化が存在しない場合にさえ、s P I F は作用して、B M D C の応答性を高めたことである。V E G F 及び F G F b (成長因子) も s P I F で増強されたことで、このものの B M D C の改造活性を調節する、能力を示している。したがって、P I F は、インターフェロン - の前処理によって表されるように、獲得免疫の不在及び存在下の両方で証明される、強力な抗結核菌の応答を発揮する。

20

【0082】

K v 1 . 3 b に結合することが B M D C 関係でも関連しているかどうかを、抗 K v 1 . 3 阻害剤を使用することによって実証された。多くの s P I F 誘導によるサイトカインおよびケモカインの分泌パターンは、阻害剤の存在下で修正された。まとめて言えば、i n v i t r o および i n v i v o データ (B M D C M t b のデータ) は、M t b 感染を制御する s P I F の有効性を支持する。

30

【実施例 4】

【0083】

図 4 及び 5 に示すように、本研究の目的は、(1) M t b に感染した培養食細胞を調節する、及び (2) マウスモデルにおいて慢性取得 M t b の感染を制御する、P I F の能力を評価することであった。結果は、P I F がサイトカイン / ケモカイン分泌を調節することを示した。M C P 1、I L 6、および I L 5 は、M t b によって増加させられ、P I F によってさらに誘導され、K v 1 . 3 の阻害剤によって遮断された。M I G および I P 1 0 は、I F N が M t b に添加された場合、P I F によってやや増強され、K v 1 . 3 阻害剤はこの効果を遮断した。P I F は、V E G F、及び M t b による F G F 誘導 (I F N 活性化に関係なく) を推進し、また、K v 1 . 3 阻害剤は、この効果を増強した。T N F、I L - 1 a、I L - 1 b、M I P 1 a、及び K C は、M t b で誘導されたが、P I F によって増強され、さらに K v 1 . 3 阻害剤によって増強される。マウスは、0 日目にエアロゾルを介して 75 c f u の M t b で感染させた。感染マウスは、次いで 60 ~ 70 日目に、P I F 0 . 1 m g / k g を用いて毎日の注射で治療し、次いで、10 日間観察した。80 日目、治療後 10 日、肺組織の生存 M t b の細菌数を評価した。インビボで、短期間の、低用量 P I F 治療は、M t b の感染を減少させた。この効果は、治療後 10 日持続した (図 5 参照) 。

40

【0084】

50

結論として、P I Fで治療した食細胞は、M t bに対して変更した応答を示した。部分的にK v 1 . 3依存した応答において、P I Fは、M t bに感染した食細胞のサイトカイン/ケモカイン分泌を調節した。P I Fは、慢性的にM t bに感染したマウスに対する治療効果を有していた。P I F R xは低用量、短期であったが、P I F投与終了後に持続する長期的な効果を達成した(0 . 1 m g、1 0日、治療後1 0 ~ 8 0日)。

【実施例5】

【0085】

二つの阻害剤を、刺激されたヒトTリンパ球によるサイトカイン産生のP I F調節への影響について試験した。末梢血は、健康なドナー2名から得た。単核細胞を、F i c o l - H y p a q u e遠心分離で精製した。以下のいずれかのメディアを有する培養物をウェル毎に 8×10^4 細胞で2通り調製した：(1)0、1、10および50 n M mのP I F；(2)100 n MのK v 1 . 3阻害剤、5 μ M I D E阻害剤の不在及び存在か、または両方一緒に抗C D 3 / C D 2 8の刺激、または(3)100 n MのK v 1 . 3阻害剤、5 μ M I D E阻害剤の不在及び存在か、または両方一緒に1、10または50 n mのP I Fと共に抗C D 3 / C D 2 8の刺激。培養上清を治療24時間後に収集し、多重方式(B e n d e r , C a t . N o . B M S 8 1 0 F F。)を用いて11個のT h 1 / T h 2サイトカインについてアッセイした：I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 8、I L - 10、I L - 12 p 70、T N F -、T N F -、I F N -。

【0086】

図3に示すように、結果は、P I Fは単独で1、10及び50 n Mで試験した複数の検体に影響を与えなかったことを示した。C D 3 / C D 2 8は、I L - 12、I L - 4、I L - 5、I L - 1 b及びT N Fの産生を活性化しなかった。C D 3 / C D 2 8誘導無しで、I L - 8のレベルは(定量上限 - 8 . 9 1 n g / m L超過)は非常に高い。C D 3 / C D 2 8はI L - 8産生を下方制御するようである。P I FまたはK v 1 . 3阻害剤、またはI D E阻害剤の有意な効果は、明確ではなかった。C D 3 / C D 2 8 T細胞刺激はI F N g、I L - 2、I L - 6およびT N Fの分泌を誘導した。ドナー2細胞で、わずかにより高い誘導が観察された。1、10および50 n MのP I Fの存在下で、検体のレベルは、5 μ M I D E阻害剤の存在下で減少したが、100 n M、K v 1 . 3の阻害剤の存在下では減少しなかった。両方の阻害剤の存在下では、減少した。

【0087】

結論として、特定のI D E阻害剤を用いた細胞ベースのアッセイにおいて、P I Fは、細胞内のインスリン分解酵素(I D E)と結合することが示された。

【実施例6】

【0088】

P I Fの抗病原効果はさらに、他の多くの遺伝子の中で、P B M C m R N A調節のT O L L受容体に記録されている。前記胚/同種移植は、母親/ホストによって許容され、一方病気と闘う彼女の防御機構を維持する、完全な移植である。着床前因子(P I F)は、生存可能な妊娠で、着床を編成し、おそらく母性免疫を調節し、受け入れを支持するのに必要である。

【0089】

図1に示すように、s P I F(P I Fアナログ)を、ナイーブ(n a i v e)なT C R . c . . 活性化したヒトP B M Cとについてテストし、増殖、サイトカイン分泌及びm R N A発現を評価した。P B M CをサブセットへのF I T C - s P I F結合をフローサイトメトリー(f l o w c y t o m e t r y)を用いて決定した。s P I FのC a + +動員に対する効果は、F l e xステーションによってテストした。P I Fは、抗 - P I Fモノクローナル抗体を用いて、妊娠マウスの子宮内で検出された。s P I FはP B M Cを調節することが判明した：抗C D 3 - M a b刺激による増殖および混合リンパ球反応を遮断した。ナイーブなP B M Cにおいて、s P I Fは、活性化したP B M C中でT H 1(T N F -、I L 2)サイトカインを減少させる。s P I Fは、T H 2(I L - 10、I L 4、I L 5、I L 3)及びT H 1(I L 2、I F N)サイトカインを促進する。共刺激

は、TH2/TH1サイトカイン・バイアスを引き起こし、グローバルな遺伝子解析は、増加した耐性促進性(pro-tolrant)と減少した炎症促進性プロファイルを示した。FITC-sPIFはすべてのCD14+に結合し、また、T細胞、キー規制FOX P3+Tregs(Treg)およびB細胞を活性化した。PIFは、免疫抑制薬のための通常の経路である、Ca++動員を介して作用しない。PIFは、優先的に妊娠マウス子宮内の子宮NK細胞に取り込まれる。

【0090】

結論として、受精後の胚は、その包括的なPIFに基づくシグナリングを通して、免疫抑制せずに周辺免疫を調節し、耐性を作る。負荷(challenged)条件下では、PIFは、病気と闘う母性能力を促進する。NK細胞の制御によって、PIFは、子宮内で胚に向けた母体の拒絶反応を減らし得る。全体的に、PIFは、前記着床プロセスで基本的な役割を果たし、母体の妊娠の認識を統合し、また、抹消及び局所の両方の免疫環境を制御する。PIFは、CD14+細胞に結合し、高い濃度ではTおよびB 580細胞に結合する。未刺激PBMCを24時間培養し、FITC-PIF 581(0.3~25 µg/ml)の特異なPBMC亜集団に対する結合を、二色ステインまたは顕微鏡でフローサイトメトリーにより表面マーカー582を用いて決定した。図1は、細胞内のFITC-PIFの存在を示す。

【実施例7】

【0091】

図2に示すように、細胞(200,000/ウェル)を、プレートに結合した抗CD3抗体、または抗-CD3/抗-CD28MAb 10 µg/ml,または、異種混合リンパ球反応(MLR)を用いて刺激し、2~4日間0~500 nmのsPIFまたはPIFscrを含む無血清培地(カリフォルニア州 GIBCO(登録商標) AIM-V Medium, Invitrogen Corp., Carlsbad)で培養した。いくつかの実験では、組換えIL2r(30 U/ml)+/- sPIFを添加した。増殖は、[3 H]-チミジンの取り込みにより測定した。他の実験では、sPIF 0-1000 nmを、MLRと抗-CD3/抗-CD28MAb 10 µg/ml両方で刺激した、PBMCs上の単独T細胞(CD3+)でテストした。

【実施例8】

【0092】

Invitrogen社のProtein-Protein Interaction Profiling ServicesをProtoArray(登録商標) Human Protein Microarrays v5.0上で実施し、9,000を超えるヒトタンパク質との相互作用を調べた。CARI Reproductive Institute提供による、PIF-Alexa 647と名付けたAlexa Fluor(登録商標)647-抱合した合成ペプチドを使用して、該マイクロアレイを2通り、2つの濃度(250 nmおよび2.5 µM)で調べた。これらのアッセイからの結果は、プローブのタンパク質を除いた、負の対照アッセイと比較した。マイクロアレイ上の固定化タンパク質とのプローブタンパク質のすべての相互作用は、配列内の指定した統計的閾値の基準で評価し、負の対照配列で観察された相互作用と比較した。正のヒットの目視確認も直接アレイ画像を検査することにより行い、前記信号の確実性と品質を確認した。これらの分析から、全部で11組のヒトタンパク質は、PIF、Alexa 647の候補相互作用物質として同定された。

【実施例9】

【0093】

PIFの治療上の可能性を実証するために、オスのApoE-/-マウスは、7週間22%の脂肪と0.15%のコレステロールを含む高脂肪の洋風の食事を食べさせた。次いで、マウスを無作為に6クラスターの1つに割り当てた：即ち種々のPIF用量の3つの介入グループとscrPIF又はPBSの3つのコントロールグループ。治療は、3日毎、150 µL腹腔内注射により合計7週間投与した。

【0094】

図7に示すように、PIF 0.1 mg/kg/日の治療は、大幅にPBSコントロール(D、** p = 0.0008)に比べて大動脈根におけるプラーク面積を30%減少させた。PIF 1 mg/kg/日では、より大きな減少の46%は、PBS(D、** ** p < 0.0001)と比較して、明らかであった。PIFのより高い用量もscr PIFの両方の用量(** ** * P < 0.0001)と比較して、プラーク面積を統計的に有意に減少させた。PIF 1 mg/kg/日の治療は、有意にPBS対照(E、** p < 0.002)と比較して大動脈弓のプラーク面積を43%減少させた。減少することは、PIF 1 mg/kg/日と、scr PIF両用量(** ** * それぞれ p = 0.0005、* ** * P < 0.0001)との間でも、再度明らかになった。さらに、図8~101に示すように、大動脈根と大動脈弓で、PIFは、VCAM-1、MCP-1、CD68および脂質を減少させた。

10

【0095】

結論として、PIFは、前記病気になりやすく、高脂肪食を与えられているマウスモデルのアテローム性動脈硬化症の形成を軽減する。前記保護作用は直接的で、大動脈弓と大動脈根標的部位の両方でアテローム性動脈硬化プラークの減少を導いた。脂肪蓄積の減少は明らかで、炎症性マクロファージの減少及び脂肪泡沫細胞の数値の低下も同様であった。前記防護効果は、循環脂質類のレベルがPIFの投与後に変化しなかったもので、その変化に関連していなかった(図11参照)。当該効果は、PIF scrとPBSによって再現されなかったもので、この効果は特異的であったPIFは、主に先進国の主要な健康障害であるアテローム性動脈硬化症に対する防護のための新しく安全で的を絞った治療を提供する。

20

【実施例10】

【0096】

マウス腹膜炎モデルの研究を行い、PIFがMCP-1誘導単球遊走を阻害することを実証した。このモデルでは、8~12週齢のC57b16マウスに、PIF、scr PIF(0.3 nmol/g、腹腔内)又は溶媒対照群としてPBSのいずれかを注射した。腹膜炎は3mlの4%チオグリコール酸塩を腹腔注射することによって誘導し、20時間後に、マウスを麻酔し、前記腹腔を5mlの滅菌PBSで洗い流した。続いて、単球およびマクロファージは、フローサイトメトリーでF4/80とCD11bとを用いて定量した。

30

【0097】

図6に示すように、該結果は、PIF(1 μM及び10 μM)が、インビトロ・トランスウェル遊走アッセイ(* p < 0.01)において、MCP-1誘導によるTHP-1細胞の遊出を著しく減少させることを示した。PIFはさらに記載されているような腹膜炎モデルとローダミンによる細胞染色とを用い、生体顕微鏡において、腸間膜細静脈における白血球接着とローリング(rolling)を阻害した。

【実施例11】

【0098】

健常な妊娠は、個別にまたはお互いに相乗効果で作用するいくつかの液性因子の調整を必要とする。それらの液性因子の例は、HLA-G、サイトカイン、およびプロゲステロンを含む。前記液性因子類は、感染時に分泌され、これは、胎児の発育に影響を与え、多くの場合、流産に終わり得る合併症を起こす。PIFは、前記胚に自己分泌栄養保護効果を発揮し、胚の着床と栄養膜の侵入を促進する。PIFがマクロファージによるLPS(リポ多糖類)誘導亜酸化窒素(NO)の分泌に影響を与えるかどうか、及びどのようにPIFはグラム陰性菌の主要なエンドトキシンであるLPSにマクロファージの応答を限定するかどうかを測定した。

40

【0099】

マクロファージ細胞株は、2日間及び5日間200 nmのPIF(合成PIFアナログ)と共に培養した。実験の最後の24時間で、LPSを、細胞活性化のために培養物に添

50

加した。Greiss 試薬試験は、当該上清への NO 分泌を検出するために行った。表面プラズモン共鳴分光法 (Surface Plasmon Resonance spectroscopy (SPR)) を用いて PIF 標識したセンサ表面に対する、LPS 及び LPS 結合受容体の結合 (TLR4-MD2 及び CD14) を評価した。LPS のケモタイプ (大腸菌 O55:B5 と大腸菌 EH100 から) 2 種を 3 つの濃度 (5、25、100 μ M) で試験した。

【0100】

その結果は、PIF 200 nM が前記 2 または 5 日間のインキュベーションのいずれかで NO ベースラインに影響を与えなかったことを示した。これとは対照的に、PIF は、LPS による活性化後大幅に NO 産生を下方制御した。2 日目の効果は 5 日目 ($P < 0.05$) でより顕著であった。予備的な結果は、試験した両方の LPS ケモタイプに固定 PIF の結合が明らかに存在しないことを示し、同様に、結合は、コントロール (ランダムな順序で同じアミノ酸のランダムなペプチド) として使用したスクランブルした PIF にも見られなかった。PIF が構造的に完全であることを確認するために、PIF 特異的抗体を精製 PIF とともにインキュベートし、結果は、当該抗体が PIF に結合したことを示した。SPR 分析用に設定された前記条件下において、PIF は、明らかな LPS 結合を示さなかった。

【0101】

結論として、PIF は、休息マクロファージには無い酵素である iNOS によって生成される、主要な LPS 誘導による反応性窒素中間体である、NO 分泌を遮断することが示された。PIF は、直接 LPS に結合しないが、その作用は、CD14、MD2、及びマクロファージスカベンジャー受容体 (SR) などの LPS 関連受容体への結合を含む可能性がある。係るデータは、自然免疫系に対する PIF の標的抗炎症作用を支持する。

【図 1A - 1B】

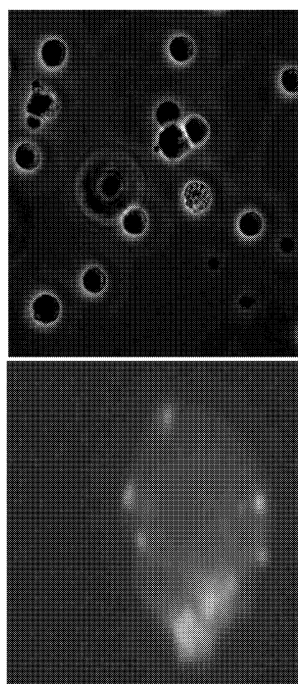


FIG. 1B

FIG. 1A

【図 1C】

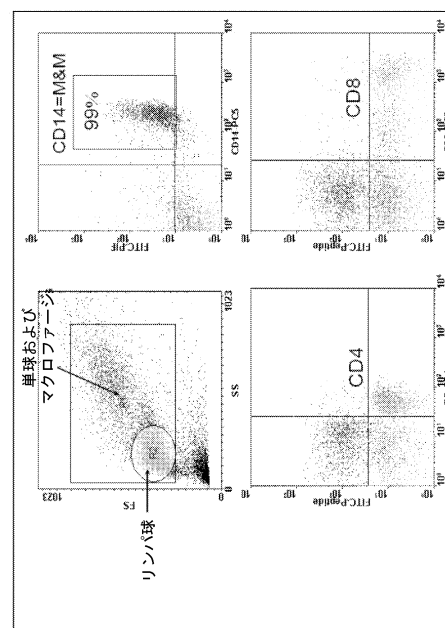
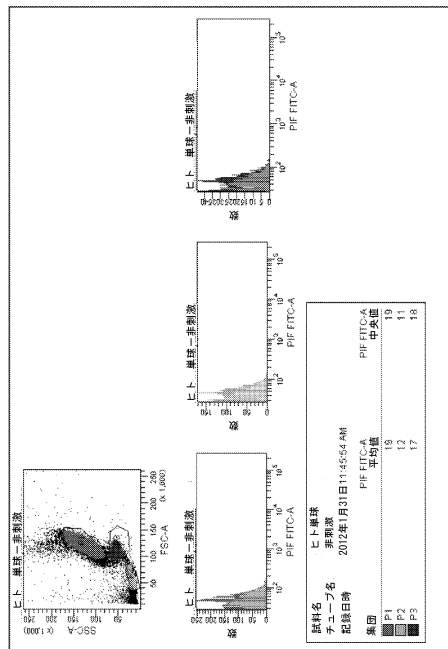
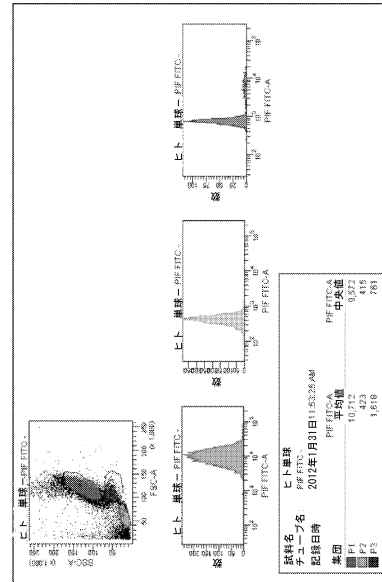


FIG. 1C

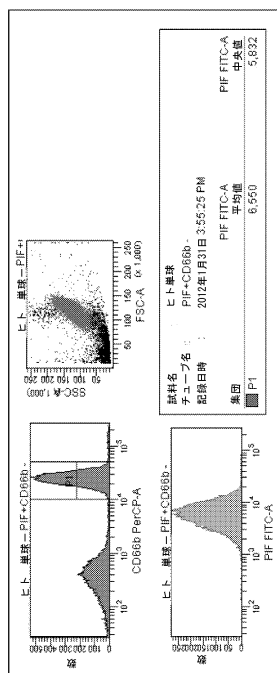
【図 1 D】



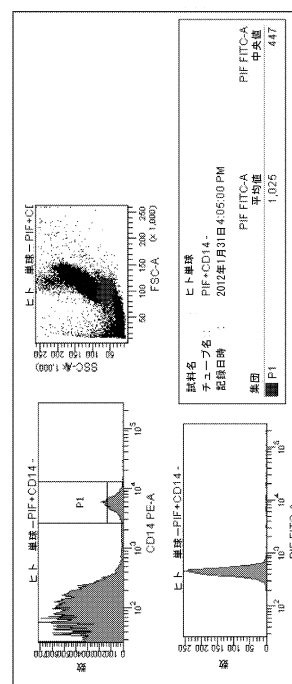
【図 1 E】



【図 1 F】



【図 1 G】



【図 1 H】

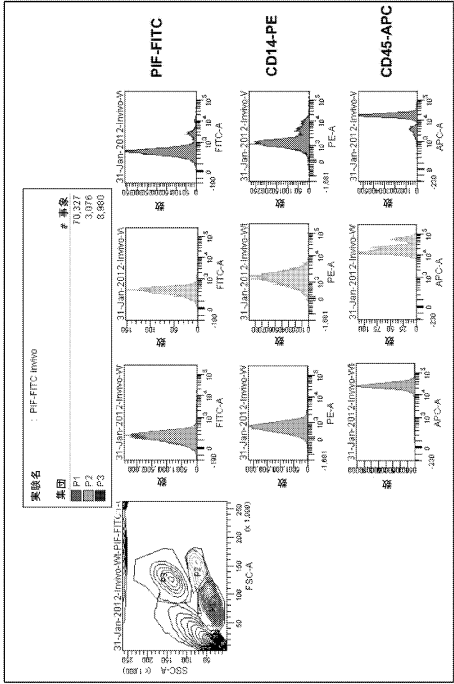


FIG. 1H

【図 1 I】

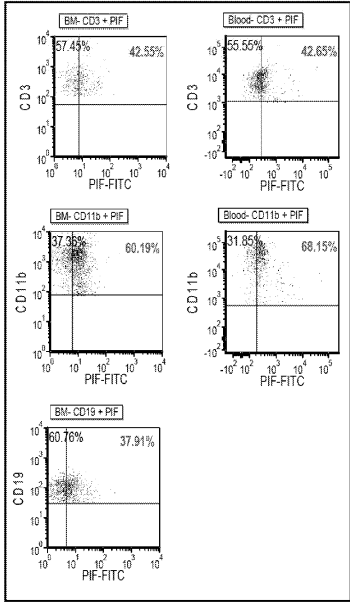


FIG. 1I

【図 1 J】

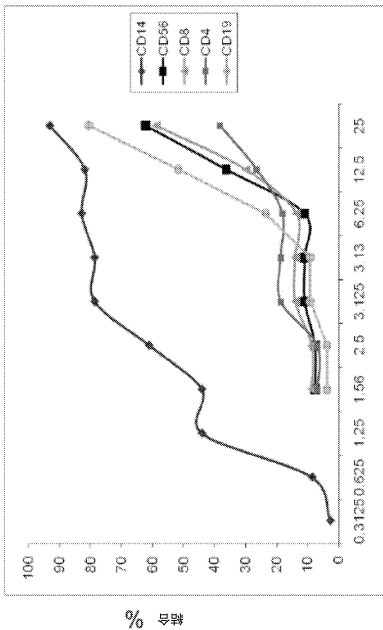


FIG. 1J

【図 2 A】

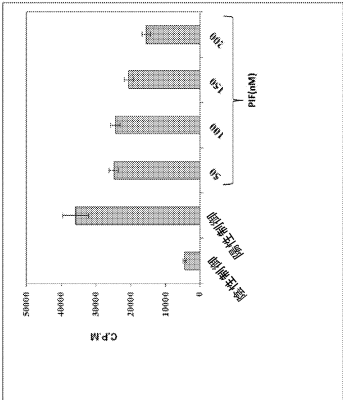


FIG. 2A

【図 2 B - 2 C】

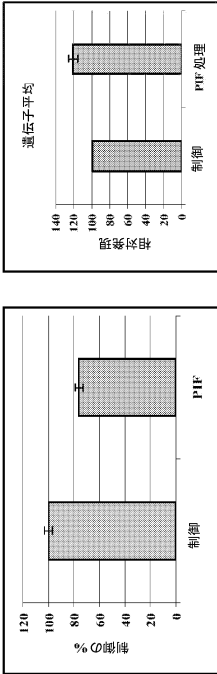


FIG. 2C

FIG. 2B

【図 2 D】

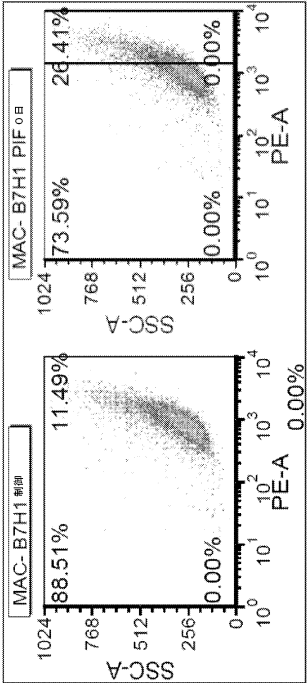


FIG. 2D

【図 2 E】

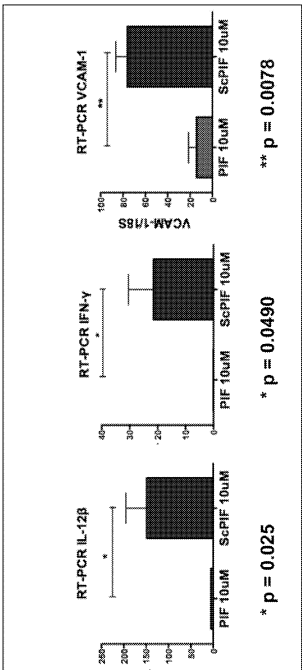


FIG. 2E

【図 2 F】

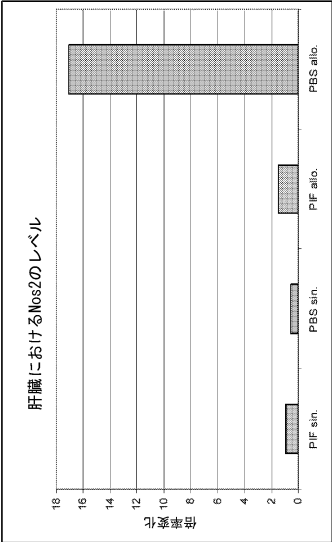


FIG. 2F

【図 2 G】

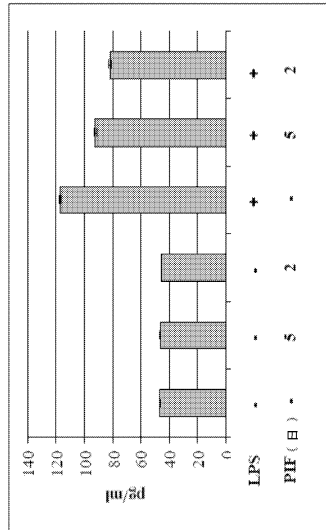


FIG. 2G

【図 3 A】

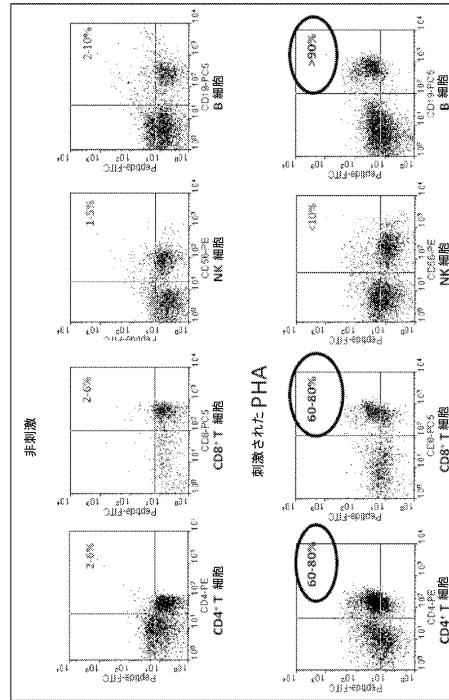


FIG. 3A

【図 3 B】

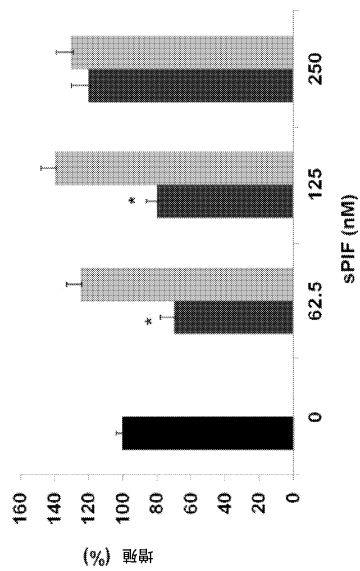


FIG. 3B

【図 3 C - 3 D】

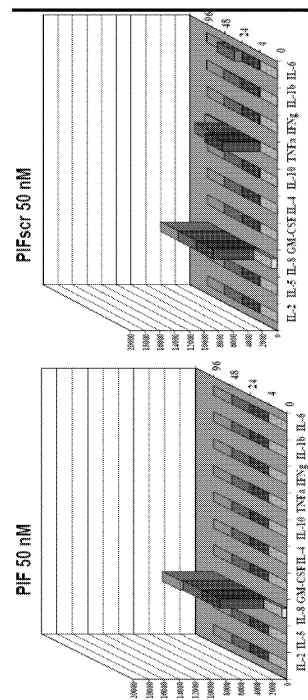


FIG. 3D

FIG. 3C

【図 3 E - 3 F】

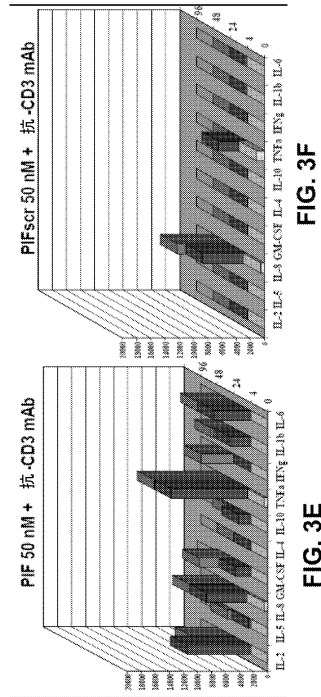


FIG. 3F

FIG. 3E

【図 3 G】

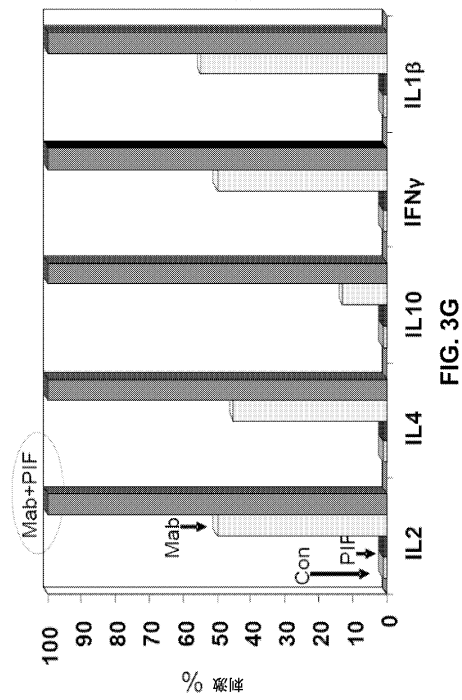


FIG. 3G

【図 4 A】

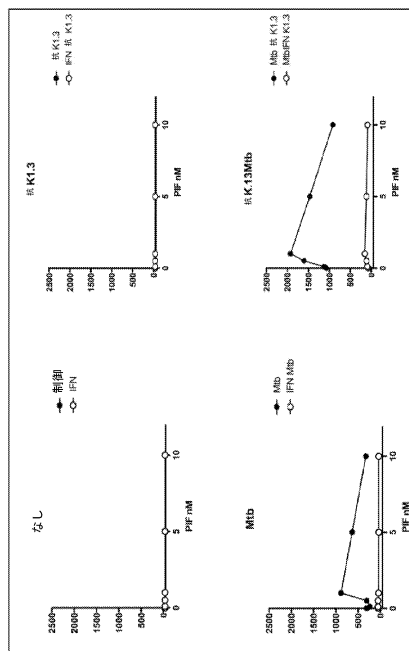


FIG. 4A

【図 4 B】

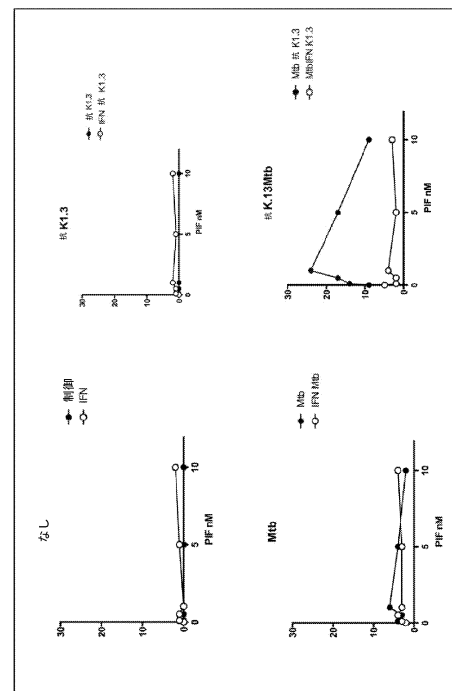


FIG. 4B

【図 4 C】

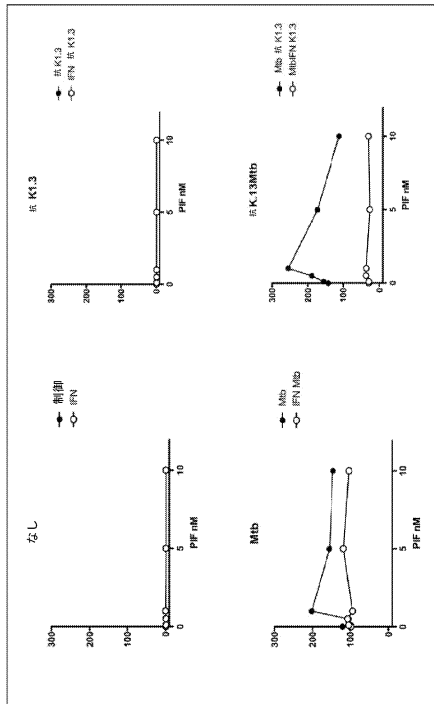


FIG. 4C

【図 4 D】

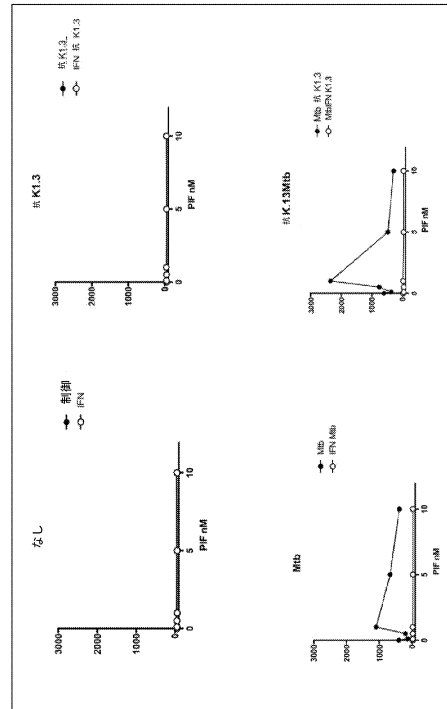


FIG. 4D

【図 4 E】

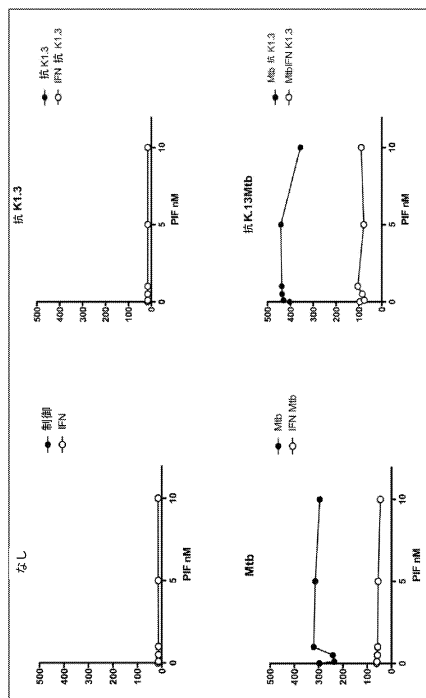


FIG. 4E

【図 5 A】

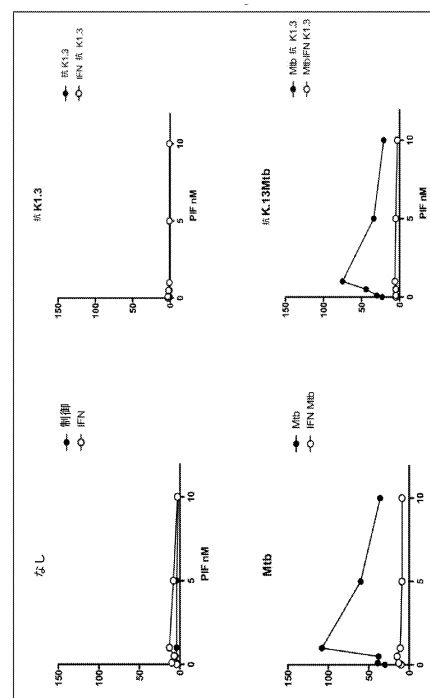


FIG. 5A

【図 5 B】

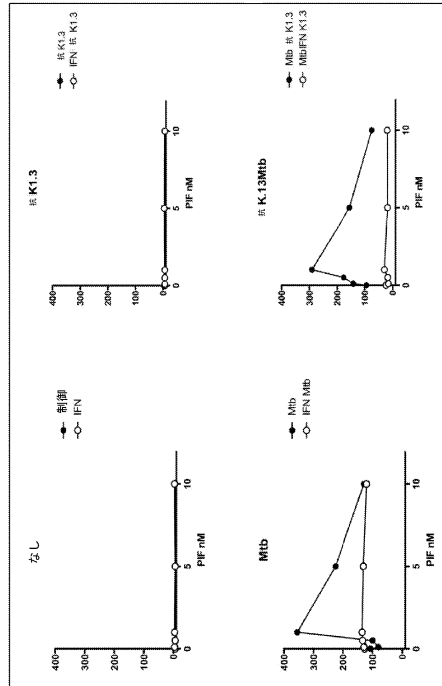


FIG. 5B

【図 5 C】

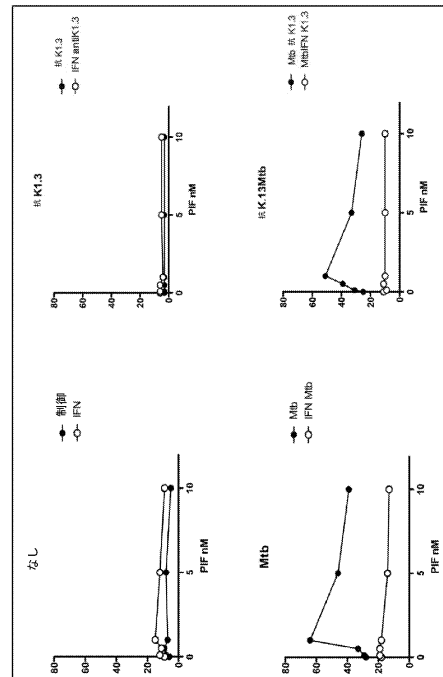


FIG. 5C

【図 6】

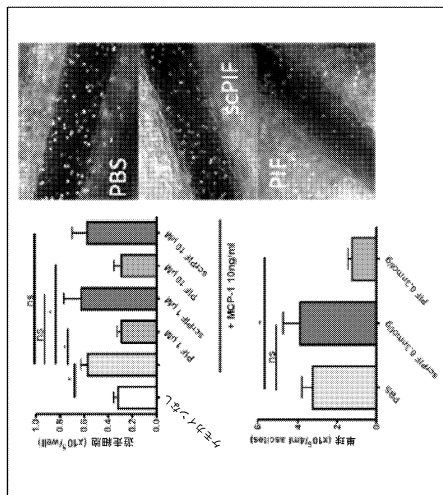


FIG. 6

【図 7 A】

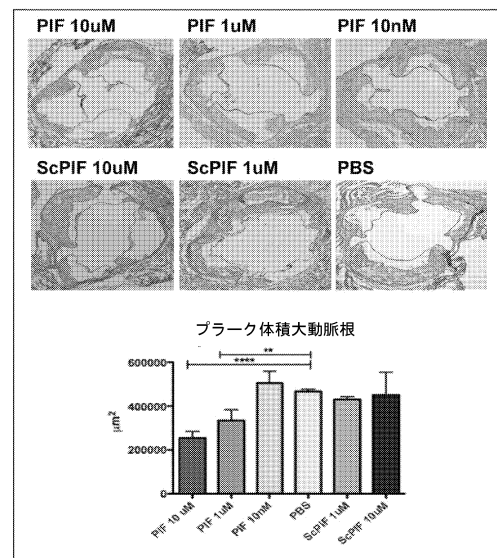


FIG. 7A

【図 7 B】

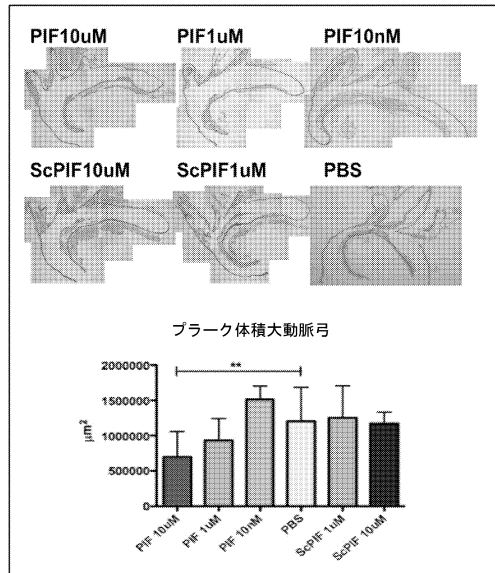


FIG. 7B

【図 8】

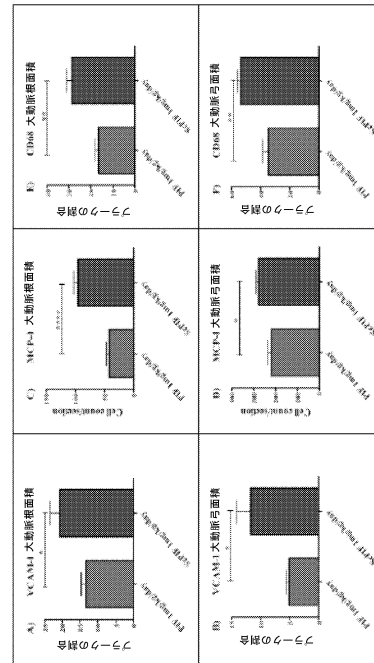


FIG. 8

【図 9】

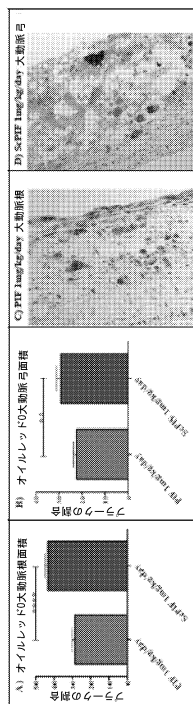


FIG. 9

【図 10 A】

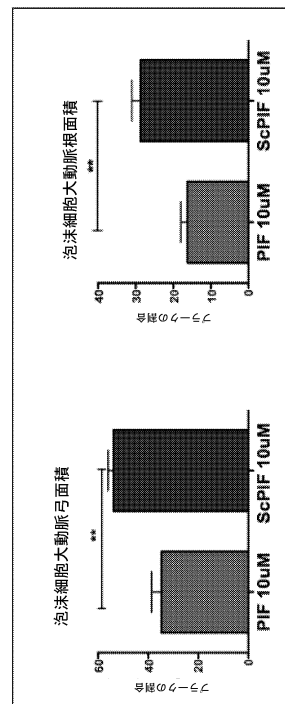


FIG. 10A

【図 10 B】

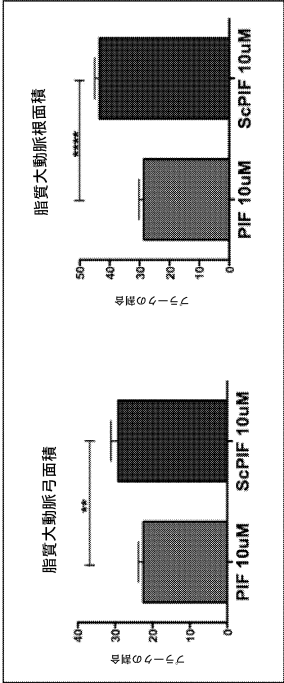
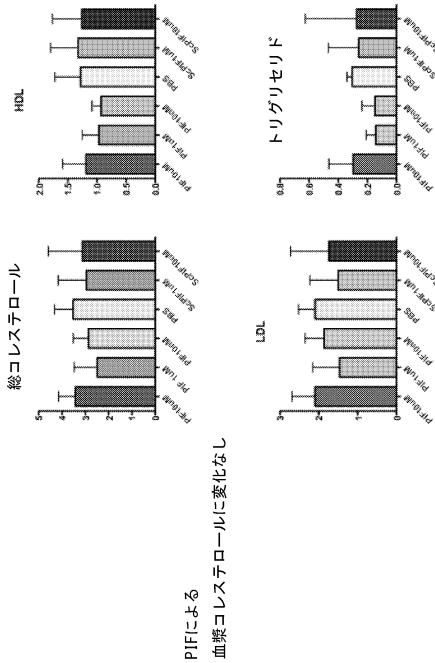


FIG. 10B

【図 11】



PIFによる
血漿コレステロールに変化なし

FIG. 11

【配列表】

0006166858000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	31/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/06	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
C 0 7 K	4/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
			A 6 1 P	29/00	
			A 6 1 K	37/66	G
			C 0 7 K	4/00	

- (56)参考文献 特表 2 0 0 5 - 5 1 2 9 5 3 (J P , A)
 特表 2 0 0 7 - 5 1 6 2 1 8 (J P , A)
 Eur.Surg.Res. , 2 0 0 0 年 , 32 , p.323-330
 The Scientific World Journal , 2 0 1 0 年 , 10 , p.1580-1596

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 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)