

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4206272号
(P4206272)

(45) 発行日 平成21年1月7日(2009.1.7)

(24) 登録日 平成20年10月24日(2008.10.24)

(51) Int. Cl.	F 1		
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	Z N A
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K 9/48 (2006.01)	A 6 1 K	9/48	
A 6 1 K 9/72 (2006.01)	A 6 1 K	9/72	

請求項の数 22 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-576949 (P2002-576949)
 (86) (22) 出願日 平成14年3月28日(2002.3.28)
 (65) 公表番号 特表2004-532208 (P2004-532208A)
 (43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/009551
 (87) 国際公開番号 W02002/078683
 (87) 国際公開日 平成14年10月10日(2002.10.10)
 審査請求日 平成17年3月24日(2005.3.24)
 (31) 優先権主張番号 60/279,438
 (32) 優先日 平成13年3月29日(2001.3.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/279,437
 (32) 優先日 平成13年3月29日(2001.3.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502051210
 サイナージィ ファーマスーティカルズ、
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、ニュージャージー、サマ
 セット、 ツー イグゼクティブ ドラ
 イブ、スウィート 450
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100140556
 弁理士 新村 守男
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織炎症及び発癌を治療するためのグアニル酸シクラーゼ受容体アゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 0 のアミノ酸配列から本質的になるペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドが、(4 , 1 2 ; 7 , 1 5) 二環である、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

原発性若しくは転移性の癌又はポリープを予防又は治療するためのあるいは患者の細胞でのアポトーシスを誘導するための薬剤の有効量の製造における、配列番号 2 0 の配列を有するグアニル酸シクラーゼ受容体アゴニストの使用。

【請求項 4】

前記ペプチドが、(4 , 1 2 ; 7 , 1 5) 二環性ペプチドである、請求項 3 記載の使用

【請求項 5】

前記癌が、乳、結腸、直腸、肺、卵巣、膵臓、膀胱、前立腺、腎臓又は精巣からなる群から選択されるメンバーである、請求項 3 記載の使用。

【請求項 6】

前記薬剤が、c G M P 依存性ホスホジエステラーゼの阻害剤の有効量と共に投与するためのものである、請求項 3、4 又は 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記 c G M P 依存性ホスホジエステラーゼ阻害剤が、スルジナックスルホン、ザプリナ

スト及びモタピゾンからなる群から選択される、請求項6記載の使用。

【請求項 8】

炎症を予防又は治療するための薬剤の有効量の製造における、配列番号 20の配列を有するグアニル酸シクラーゼ受容体アゴニストの使用。

【請求項 9】

前記ペプチドが、(4, 12; 7, 15)二環性ペプチドである、請求項8記載の使用。

【請求項 10】

前記炎症が、喘息、腎炎、肝炎、膵炎、気管支炎及び嚢胞性線維症からなる群から選択される炎症性疾患である、請求項8記載の使用。

10

【請求項 11】

前記患者を胃腸管の炎症性疾患に関して治療する請求項8記載の使用。

【請求項 12】

前記胃腸管の炎症性疾患が、潰瘍性大腸炎及びクローン病からなる群から選択される炎症性腸疾患である、請求項11記載の使用。

【請求項 13】

前記薬剤が、c G M P 依存性ホスホジエステラーゼの阻害剤の有効量と共に投与するためのものである、請求項8記載の使用。

【請求項 14】

前記 c G M P 依存性ホスホジエステラーゼ阻害剤が、スルジナックスルホン、ザプリナスト及びモタピゾンからなる群から選択される、請求項13記載の使用。

20

【請求項 15】

c G M P 依存性ホスホジエステラーゼ阻害剤、抗炎症剤、抗ウイルス剤及び抗癌剤からなる群から選択される少なくとも1つの化合物もまた患者に投与するためのものである、請求項3記載の使用。

【請求項 16】

配列番号 20の配列を有するグアニル酸シクラーゼ受容体アゴニストペプチドを含み、前記ペプチドが治療上有効な量で存在する、単位剤形の薬剤組成物。

【請求項 17】

c G M P 依存性ホスホジエステラーゼ阻害剤、抗炎症剤、抗ウイルス剤及び抗癌剤からなる群から選択される少なくとも1つの化合物をさらに含み、前記少なくとも1つの化合物が治療上有効な量で存在する、請求項16記載の単位剤形の薬剤組成物。

30

【請求項 18】

単位剤形が、錠剤、カプセル、溶液及び吸入製剤からなる群から選択される、請求項16又は17に記載の薬剤組成物。

【請求項 19】

1つ又は複数の賦形剤をさらに含む請求項16又は17に記載の薬剤組成物。

【請求項 20】

配列番号 20の配列を有するペプチドに結合したポリエチレングリコール(PEG)を含み、ペプチドがグアニル酸シクラーゼ受容体に結合してc G M Pの生成を刺激し、そして前記ペプチドが(4, 12; 7, 15)二環性ペプチドである、ペプチド複合体。

40

【請求項 21】

患者の癌、炎症又はポリープを治療するための薬剤の有効量の製造における、請求項20記載のペプチド複合体の使用。

【請求項 22】

前記ペプチドが、(4, 12; 7, 15)二環性ペプチドである、請求項16、17、18又は19に記載の薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本出願は、2001年3月29日に出願された米国仮出願第60/279,438号、2001年3月29日に出願された第60/279,437号、2001年6月27日に出願された第60/300,850号、2001年7月10日に出願された第60/303,806号、2001年7月25日に出願された第60/307,358号、及び2002年1月17日に出願された第60/348,646号の特典を特許請求するものである。

【0002】

本発明は、細胞内でのcGMPの生成を高めるための手段としての、グアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストの治療的使用に関する。このアゴニストは単独で、あるいはcGMP特異的ホスホジエステラーゼの阻害剤と組み合わせて使用して、特に胃腸管及び肺に

10

【背景技術】

【0003】

ウログアニリン、グアニリン及び細菌STペプチドは、構造的に関連があるペプチドであり、これらはグアニル酸シクラーゼ受容体に結合し、環状グアノシンーリン酸(cGMP)の細胞内での生成を刺激する(1~6)。これによって、腸管の内側の腸細胞から塩化物を流出させるために、嚢胞性線維症膜貫通型調節タンパク質(CFTR)、先端の膜チャンネルの活性化がもたらされる(1~6)。CFTRの活性化、及びその後の塩化物の経上皮分泌の増大が、腸の管腔へのナトリウム及び水の分泌を刺激することにつながる

20

【0004】

上皮再生のプロセスは、管腔中のGI細胞の増殖、移動、分化、老化、及び最終的な損失を含む(7、8)。GI粘膜は、上皮細胞の増殖指標に基づいて、3つの異なるゾーンに分けることができる。これらのゾーンの1つである増殖ゾーンは、新しい細胞の一定の源を提供することを担う未分化幹細胞からなる。幹細胞は、それらが突出する管腔に向かい上方に移動する。細胞は移動するとき、分裂するその能力を失い、GI粘膜の専門的機能を行うための分化した状態になる(9)。GI粘膜の再生は非常に迅速であり、完全な代謝回転が24~48時間以内に起こる(9)。このプロセス中に、突然変異した望ましくない細胞が、新しい細胞で補充される。したがって、GI粘膜の恒常性は、増殖とアポトーシス率の間のバランスを連続的に維持することによって調節される(8)。

30

【0005】

腸管上皮の細胞増殖とアポトーシスの比は、広くさまざまな異なる状況において、たとえば加齢、炎症性シグナル、ホルモン、ペプチド、増殖因子、化学物質及び食習慣などの生理学的刺激に応答して、増大又は減少する可能性がある。さらに、増大した増殖率は、代謝回転時間の減少及び増殖ゾーンの拡大と関連していることが多い(10)。増殖指標は、潰瘍性大腸炎及び他のGI障害の病症例において、非常に高いことが観察されてきている(11)。したがって腸管の過形成は、胃腸管の炎症及び発癌の主要な促進要因である。

40

【0006】

腸の流体及びイオン分泌の調節物質としてのウログアニリン及びグアニリンの役割に加えて、これらのペプチドは、GI粘膜の連続的再生とも関連がある可能性がある。WO01/25266中の以前に公開されたデータによって、ウログアニリンの活性ドメインを有するペプチドは、結腸内のポリープ進行の阻害剤として機能することができ、結腸癌の治療物質を構成することができることが示唆される。しかしながら、起こることが主張されているこの機構は、WO01/25266が、GC-Cと呼ばれるグアニル酸シクラーゼ受容体に特異的に結合し、大腸菌の熱安定性エンテロトキシン(ST)の受容体として最初は記載された、ウログアニリンアゴニストペプチドを教示している点において疑わし

50

い(4)。このグアニル酸シクラーゼ受容体が欠けているノックアウトマウスは、腸内でSTに対する耐性を示すが、ウログアニリン及びSTの影響が、*in vivo*で腎臓内において害されることはない(3)。これらの結果は、グアニリンによって誘導された膜の脱分極はゲニステイン、チロシンキナーゼ阻害剤によって害されたが、ウログアニリンによって誘導された過分極は影響を受けなかったという事実によってさらに支持された(12、13)。これらのデータを一緒にして考えると、ウログアニリンは、GC-Cとは異なる現在知られていない受容体にも結合することが示唆される。

【0007】

他の論文によって、ウログアニリン及びグアニリンの生成は、前癌性の結腸ポリープ及び腫瘍組織中では劇的に減少することが報告されている(14~17)。さらに、ウログアニリン及びグアニリンの両方の遺伝子は、ヒト結腸癌腫の異型接合性の損失と関連があることが多い、ゲノムの領域に局在することが示されてきている(18~20)。これらの発見を一緒にして考えると、ウログアニリン、グアニリン、及び類似の活性を有する他のペプチドは、異常な結腸での増殖の予防又は治療において使用することができることが示される。この提案は、ウログアニリンの経口投与がマウスにおけるポリープ形成を阻害することを実証している、近年の研究によって支持される(15、16)。

【0008】

ウログアニリン及びグアニリンペプチドは、細胞のイオンの流れを調節することによって、アポトーシスも助長しているようである。アポトーシスにおける変化は、転移性表現型への腫瘍の進行と関連してきている。原発性胃腸(GI)癌は小腸、結腸、及び直腸に限られるが、骨、リンパ節、肝臓、肺、腹膜、卵巣、脳などの場所に転移及び分散する可能性がある。K⁺の流出及びCa⁺⁺の流入を増大させることによって、ウログアニリン及び関連ペプチドは、形質転換細胞の死を助長し、これによって転移を阻害することができる。

【0009】

低下したCFTR活性の臨床的症状の1つは、気道の炎症である(21)。この影響は、NF-kB、ケモカイン及びサイトカインの発現を調節するCFTRによるものである可能性がある(22~25)。近年の報告によって、CFTRチャンネルは、酸化ストレスによって引き起こされる炎症に対する保護において重要な役割を果たす抗酸化剤である、還元グルタチオンの輸送及び維持と関連があることも示唆されてきている(39)。グアニル酸シクラーゼの活性化による、あるいはcGMP特異的ホスホジエステラーゼの阻害によるcGMPの細胞内レベルの増大によって、これらの炎症性の刺激が下方調節されるであろうと思われる。したがって、ウログアニリン型アゴニストは、肺(たとえば喘息)、腸(たとえば潰瘍性大腸炎及びクローン病)、膵臓及び他の器官の炎症性疾患の予防及び治療において有用であるはずである。

【0010】

概して、ウログアニリンなどのグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストには、広くさまざまな炎症状態、癌(特に結腸癌)の治療において、並びに抗転移剤として、潜在的な治療価値があると結論付けることができる。したがって、新しいアゴニストの開発は臨床非常に重要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、グアニル酸シクラーゼ受容体の新しいアゴニストの開発、及び天然に存在するアゴニストの新たな使用に基づくものである。これらのアゴニストはウログアニリンの類似体であり、これらの多くは低いpHでの受容体の活性化、安定性、活性が向上しており、あるいは悪影響が低下している点で、優れた性質を有している。これらのペプチドを使用して、増大したcGMPの細胞内レベルにตอบสนองする任意の状態を治療することができる。cGMPの細胞内レベルは、細胞内でのcGMPの生成を増大させることによって、かつ/あるいはcGMP特異的ホスホジエステラーゼによるその分解を阻害することによ

10

20

30

40

50

って増大させることができる。治療又は予防することができる特異的な状態には、炎症状態、癌、ポリープ、及び転移がある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

その第1の状態において本発明は、配列番号2～21の任意の1つのアミノ酸配列から本質的になるペプチド、及びこれらのペプチドを含む治療用組成物を対象とする。「本質的に～なる」という語は、列挙した配列の同定番号と同一であるペプチド、及び構造又は機能の点で実質的には異なっていない他の配列を含む。本出願の目的のために、配列番号2～21のペプチドからのアミノ酸4つ以上その構造が変わる場合、あるいは細胞のcGMP生成のその活性化が50%を超えて減少又は増大する場合、ペプチドは実質的に異なっているものとする。好ましくは、実質的に類似であるペプチドはアミノ酸は2つまで異なり、cGMP生成の活性化に関しては約25%を超えては異ならないべきである。最も好ましいペプチドは、配列番号20の配列を有する二環である。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

ペプチドは、1つ又は複数の薬剤として許容される賦形剤を含む、単位剤形の薬剤組成物であってよい。「単位剤形」という語は、1つの薬剤送達の実体、たとえば錠剤、カプセル、溶液又は吸入製剤を指す。存在するペプチドの量は、患者に投与されたときに好ましい治療効果があるほど充分でなければならない(典型的には100µgと3gの間)。「好ましい治療効果」を構成するものは、治療される個々の状態に依存し、当業者によって容易に理解される状態の任意の著しい改善を含むであろう。たとえば、これが炎症の低下、ポリープ又は腫瘍の縮小、転移性病巣の減少などをもたらす可能性がある。

20

【0014】

本発明は、単独あるいはcGMP依存性ホスホジエステラーゼの阻害剤、抗炎症剤又は抗癌剤と共に投与される、グアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストを使用する併用療法も包含する。これらの作用物質は、患者に投与されたときに治療上有効であることが当分野で知られている量で存在しなければならない。抗腫瘍薬はアルキル化剤、エピポドフィロトキシン、ニトロソウレア、代謝拮抗物質、ピンカルカロイド、アントラサクリン抗生物質、ナイトロジェンマスタード剤などを含んでよい。具体的な抗腫瘍薬は、タモキシフェン、タクソール、エトポシド及び5-フルオロウラシルを含んでよい。抗ウイルス及びモノクローナル抗体療法剤は、患者の特定の必要性に適合させた治療養生法を考案する際に、少なくとも1つのグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストを含む化学療法用組成物と組み合わせることができる。

30

【0015】

他の態様では本発明は、有効な量のグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニスト、好ましくは合成グアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストを含む組成物を投与することによって、被験者の癌、特に上皮細胞の癌、又はポリープの発症を予防、治療する、あるいは遅延させるための方法を対象とする。「有効な量」という語は、細胞内でのcGMPのレベルを適度に増大させるのに十分なアゴニストを指す。「合成」という語は、グアニル酸シクラーゼ受容体を結合させるために作製されたが、ウログアニリンなどの知られている内因性グアニル酸シクラーゼのアゴニスト中には存在しない、いくつかのアミノ酸配列の置換体を含むペプチドを指す。アゴニストは、配列番号2～21によって定義されるペプチドから選択され、表2及び3に挙げられているペプチドでなければならない。本発明は、ウログアニリン、及びグアニリン及び大腸菌STペプチドからなる群から選択される有効な用量のペプチドを投与することによって、原発性結腸癌以外の原発性の癌を治療する方法も含む。任意の知られている形のウログアニリン又はグアニリンを、この目的のために使用することができるが、ヒトのペプチドが好ましい。

40

【0016】

本発明は、原発性の腫瘍塊からの腫瘍転移を予防又は治療する方法も含む。グアニル酸シクラーゼ受容体を有する転移性腫瘍細胞は、本発明に従って生成されるペプチドによ

50

いる。

【0021】

前に記載した方法において使用するグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストは、経口的、全身的あるいは局所的に投与することができる。剤形には吸入又は注射用の調製物、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、カプセル、局所用軟膏剤及びローション、経皮組成物、他の知られているペプチド製剤、及びPEG化(pegylated)ペプチド類似体がある。組成物の有効な用量は、典型的には身体重量1kg当たり約1 μ gと約10mgの間であり、好ましくは身体重量1kg当たり約10 μ g~5mgの化合物であろう。用量の調整は、当分野では日常的である方法を使用して行われ、使用される個々の組成物及び臨床上の考慮事項に基づくであろう。アゴニストは単独の活性剤として、あるいは他の薬剤、たとえばcGMP依存性ホスホジエステラーゼの阻害剤と組み合わせて投与することができる。すべての場合において、既存の技術を指針として使用し、治療上有効である用量で追加的な薬剤を投与しなければならない。薬剤は単独の組成物の形で、あるいは逐次的に投与することができる。

10

【0022】

本発明は、いくつかの概念に基づく。第1の概念は、細胞増殖とアポトーシスの間のバランスを調節するcGMP依存性の機構が存在すること、ウログアニリン/グアニリンの欠乏による、及び/又はcGMP特異的ホスホジエステラーゼの活性化による、cGMPレベルの低下は、悪性形質転換の初期の重要なステップであることである。第2の概念は、炎症のプロセス中にcPLA₂、COX-2及びおそらく5-リボキシゲナーゼの活性化をもたらす、膜リン脂質からのアラキドン酸の放出は、cGMP依存性の機構によって下方調節され、プロスタグランジン及びロイコトリエンの低下したレベルがもたらされること、したがってcGMPの細胞内レベルが増大することによって、抗炎症性の応答が生み出される可能性があることである。さらに、cGMP依存性の機構は、前炎症性プロセスの制御と関連があると考えられている。したがって、cGMPの細胞内レベルを評価することは、潰瘍性大腸炎及びクローン病などの炎症性腸疾患、及び他の器官の炎症(たとえば喘息、腎炎、肝炎、膵炎、気管支炎、嚢胞性線維症と関連があるもの)を治療及び制御する手段として使用することができる。

20

【0023】

任意の理論によって縛られることは考えずに、原形質膜を越えたイオン輸送は、cGMP濃度を変える組成物によって影響を受けるであろう、細胞増殖とアポトーシスの間のバランスの重要な調節要因であることを判明させることができることが想定される。ウログアニリンは、胃腸管内でのK⁺の流出、Ca⁺⁺の流入、及び水の輸送を刺激することが示されてきている(3)。さらに、特定のグアニル酸シクラーゼ受容体にも結合するペプチドである、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)も、cGMPの機構によって、ラットのメサングウム細胞のアポトーシスを誘導し、心臓の筋細胞のアポトーシスを誘導することが示されてきている(26~29)。本発明のアゴニストがグアニル酸シクラーゼ受容体に結合することによって、cGMPの生成が刺激されると考えられる。したがって、一連のcGMP依存性タンパク質キナーゼ及びCFTRの活性化による、このリガンド-受容体の相互作用は、標的細胞においてアポトーシスを誘導すると予想される。したがって、表2及び3に示すような配列番号2~21によって定義される新規なペプチド、又はウログアニリン、又はグアニリン、又は大腸菌STペプチドを投与することによって、GI管の炎症性疾患及び全身の器官の炎症(たとえば喘息、腎炎、肝炎、膵炎、気管支炎、嚢胞性線維症)の発症を排除する、あるいは少なくとも遅らせると予想される。

30

40

【0024】

他の態様では本発明は、有効な量のグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニスト、好ましくは合成グアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストを含む組成物を投与することによって、被験者の癌、特に上皮細胞の癌の発症を予防、治療する、あるいは遅延させるための方法を対象とする。「有効な量」という語は、細胞内でのcGMPのレベルを適度に増大させるのに十分なアゴニストを指す。「合成」という語は、グアニル酸シクラーゼ受容体を

50

結合させるために作製されたが、ウログアニリンなどの知られている内因性グアニル酸シクラーゼのアゴニスト中には存在しない、いくつかのアミノ酸配列の置換体を含むペプチドを指す。アゴニストは、配列番号 2 ~ 21 によって定義されるペプチドから選択され、表 2 及び 3 に挙げられているペプチドでなければならない。本発明は、ウログアニリン、グアニリン及び大腸菌 S T ペプチドからなる群から選択される有効な用量のペプチドを投与することによって、原発性結腸癌以外の原発性又は転移性の癌を治療する方法も含む。任意の知られている形のウログアニリン又はグアニリンを、この目的のために使用することができるが、ヒトのペプチドが好ましい。

【 0 0 2 5 】

転移性腫瘍細胞の細胞増殖とアポトーシスの間のバランスを調節する c G M P 依存性の機構は、転移性腫瘍を標的化及び治療するための機構として働くことができる。肝臓は、原発性の結腸直腸癌からの転移の最も一般的な部位である。疾患の後期段階に向かって、結腸直腸転移性細胞は、身体の他の部分も侵襲する可能性がある。胃腸管中の原発部位に由来する転移性細胞は、典型的にはグアニル酸シクラーゼ受容体を発現し続け、したがってこれらの細胞は、腸のグアニル酸シクラーゼ受容体によって仲介されるアポトーシス療法に対して感受性があるに違いないことを記しておくことは重要である。ウログアニリン活性を有するペプチドも、単独あるいは c G M P - ホスホジエステラーゼの特異的阻害剤と組み合わせて使用すると、c G M P 仲介の機構により細胞増殖とアポトーシスの間の健全なバランスを回復させることによって、腸管上皮の発癌の発症を遅らせる。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用するように、「グアニル酸シクラーゼ受容体」という語は、本発明のアゴニストペプチド又は本明細書に記載した天然のアゴニストが結合する任意の細胞タイプに対する、グアニル酸シクラーゼ受容体のクラスを指す。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用するように、「グアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニスト」という語は、グアニル酸シクラーゼ受容体に結合し c G M P 生成を刺激する、ペプチド及び/又は他の化合物を指す。この語は、配列番号 1 のアミノ酸残基 3 ~ 15 を含む結合ドメインの少なくとも一部分と、実質的に均等であるアミノ酸配列を有するすべてのペプチドも含む。この語は、グアニル酸シクラーゼ受容体に結合し c G M P 生成を刺激する、断片及びプロペプチドも含む。「実質的に均等である」という語は、結合ドメインのそれと均等であるアミノ酸配列を有するペプチドを指し、この場合いくつかの残基は、グアニル酸シクラーゼ受容体に結合し c G M P 生成を刺激するペプチドの能力を害することなく、欠失しているかあるいは他のアミノ酸に置換されていてよい。

【 0 0 2 8 】

新規なグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストの戦略及び設計

ウログアニリンは、胃腸粘膜の内側の杯状細胞及び他の上皮細胞によって、機能的に不活性な形であるプロウログアニリンとして分泌されるペプチドである。ヒトのプロペプチドは、内因性プロテアーゼによって腸の管腔中で、配列番号 1 (ヒトのウログアニリンの配列、表 2 参照) に述べた機能的に活性がある 16 個のアミノ酸ペプチドへと後に転換される。ウログアニリンは熱耐性、酸耐性、及びタンパク質分解耐性ペプチドであるので、このペプチド及び/又は配列番号 1 の機能的に活性がある 16 個のアミノ酸ペプチド配列と類似している他のペプチドの、経口性又は全身性投与は、治療法において有効に使用することができる。

【 0 0 2 9 】

以前の知られているウログアニリンペプチドと比較して、優れた c G M P 向上性及び/又は他の有益な特性(たとえば改善された温度安定性、向上したプロテアーゼ安定性、又は好ましい pH での優れた活性)を生み出すいくつかのペプチドを含めた、ウログアニリンと類似しているがこれとは異なるペプチドを、以下に記載する。G I の炎症を阻害するため、管の炎症と関連があるポリープ形成の発症を治療又は予防するために、これらのペプチドを使用することができる。癌細胞が形成されやすい上皮組織も、治療することがで

10

20

30

40

50

きる。記載したグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストは、表2及び3に示すアミノ酸配列を有している。アゴニスト-受容体相互作用に関する「結合ドメイン」は、配列番号1のアミノ酸残基3～15を含む。

【0030】

(30)に詳細に述べた方法を使用して、新規なグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストの設計に、分子モデル化を適用した。これは、グアニル酸シクラーゼ受容体と相互作用することが知られている3つの化合物、すなわちヒトのウログアニリン、二環[4, 12; 7, 15]Asn¹-Asp²-Asp³-Cys⁴-Glu⁵-Leu⁶-Cys⁷-Val⁸-Asn⁹-Val¹⁰-Ala¹¹-Cys¹²-Thr¹³-Gly¹⁴-Cys¹⁵-Leu¹⁶(UG、配列番号1);ヒトのグアニリン、二環[4, 12; 7, 15]Pro¹-Gly²-Thr³-Cys⁴-Glu⁵-Ile⁶-Cys⁷-Ala⁸-Tyr⁹-Ala¹⁰-Ala¹¹-Cys¹²-Thr¹³-Gly¹⁴-Cys¹⁵(GU、配列番号22);及び大腸菌のわずかに熱安定性であるエンテロトキシン、三環[6, 10; 7, 15; 11~18]Asn¹-Ser²-Ser³-Asn⁴-Tyr⁵-Cys⁶-Cys⁷-Glu⁸-Leu⁹-Cys¹⁰-Cys¹¹-Asn¹²-Pro¹³-Ala¹⁴-Cys¹⁵-Thr¹⁶-Gly¹⁷-Cys¹⁸-Tyr¹⁹(ST、配列番号23)のエネルギー計算からなっていた。これら3つの化合物に関する、考えられるすべての低エネルギー状態における立体配座の形状の比較を使用して、生物学的活性がある立体配座、すなわちおそらく受容体との相互作用中にGU、UG及びSTによってとられている立体配座の「鋳型」として働く、共通の3D構造を明らかにした。分子モデル化により、さまざまなアミノ酸残基に関する個々の置換基を選択することによって、他の低エネルギー状態における立体配座を犠牲にして、生物学的活性がある立体配座である配座の割合が大幅に増大した新規な類似体を設計することができた。

【0031】

段階的手順(30)を使用することによって、エネルギー計算を行った。ECEPP/2電位場(31、32)を使用し、ST中のPro¹³に関するものを含めて、平面のトランス-ペプチド結合に関する厳密な価電子の形状を推測した。Pro¹³中の角度は変えることができた。脂肪族及び芳香族水素は1つの原子中心のCH_nタイプに概して含まれ、H-原子及びアミド水素は以下に明確に記載された。

【0032】

主要な計算スキームは、いくつかの連続的なステップを含んでいた。最初に、2つの単環モデル断片(STの3つの断片)、Ac-cyclo(Cysⁱ-...-Cys^j)-NMeの配列を考慮し、この場合、Cys、Gly及びPro以外のすべての残基をアラニンに置換し、i及びjの値はGU、UG及びSTの配列に対応するものであった。このステップでは、それぞれのアミノ酸残基のペプチド骨格に関する局所的最小値、すなわち、Ala残基に関するE、F、C、D、A及びA*タイプ((33)中の表記に従う)、Gly残基に関するE*、F*、C*、D*、A、E、F、CD及びA*タイプ、及びProに関するF、C及びAタイプの、ラマチャンドランマップにおける最小値の考えられるすべての組合せを考慮した。それぞれの骨格の立体配座に関しては、ECEPP電位場に固有の放物線ポテンシャル関数を使用して環を閉じるための、1つの最適な可能性を、D-Cys残基に関する二面角φ₁の周りの回転のエネルギープロフィールを調べることによって見出した。

【0033】

全体として、それぞれの環状成分に関して約180,000もの立体配座を考慮した。したがって、 $E - E_{min} < E = 15 \text{ kcal/mol}$ という規準を満たし、任意の骨格の二面角の少なくとも1つの値が40°を超えて異なる配座異性体を選択した(異なるモデル断片に関して約3,000~8,000個の立体配座)。次のステップでは、整合性単環断片の選択した立体配座を重複させて、二環モデル断片の考えられる立体配座を作製した(STの場合は三環断片)。典型的には、この手順によって、約20,000~30,000個の立体配座が生み出された。これらすべての立体配座をエネルギー計算の新し

10

20

30

40

50

いサイクルに施し、これによってSTモデル断片に関して $E - E_{\min} < E = 20 \text{ kcal} / \text{mol}$ という規準を満たす191個の立体配座、GU/UGモデル断片に関して同じ規準を満たす6,965個の立体配座が生じた。この後に、モデル断片中の失われた側鎖を回復させ、エネルギー計算を再度行い、骨格の側鎖基及び末端基の二面角の値(Cys残基に関する1角は除く)を、エネルギー最小化の前に最適にし、以前に記載されたアルゴリズム(34)を使用して、それらの最も好ましい空間的配置を得た。UG4~15断片に関しては、632個の立体配座が $E = 20 \text{ kcal} / \text{mol}$ という規準を満たし、そのうちの164個が $E = 12 \text{ kcal} / \text{mol}$ というより厳しい規準を満たし、これは $1 \text{ kcal} / \text{mol} / \text{残基}$ という認められている規準に対応する(30)。UG4~15断片の3~16、次いでUG分子全体への二次的な伸長を、同じ段階の手順によって行った。最後に、UGの31個の骨格の立体配座が、 $E = 16 \text{ kcal} / \text{mol}$ という規準を満たすことを見出した。

10

【0034】

配座異性体の幾何学的比較を、以下の方法で行った。1対の配座異性体の原子中心に関する重ね合わせの最適性を評価して、(35)に従って、2つの配座異性体間の幾何学的類似性のレベルを調べた。幾何学的類似性に関する規準はrms値であり、これは1対の配座異性体AとBに関して、以下のように計算した。

【0035】

【数1】

$$\text{rms} = (1/N) \sum_{i=1}^N [(x^{A_i} - x^{B_i})^2 + (y^{A_i} - y^{B_i})^2 + (z^{A_i} - z^{B_i})^2]^{1/2},$$

20

上式で、Nは重ね合わせのために選択したC-原子対の数であり、x、y及びzはデカルト座標である。幾何学的類似性が $\text{rms} < 2.0$ であるという規準によって、立体配座が厳密である断片UG4~15の低エネルギー状態における立体配座は、7つの立体配座のファミリーの範疇のものであった。このうちの1つは、1UYAと1ETNの両方に類似している同じ6つの配座異性体からなり、このファミリーはUGの低エネルギー状態における配座異性体も含む。(1UYA及び1ETNは、それぞれ実験によって定義したUG及びSTの3D構造であり、これらは高い生物活性を有することが知られており(36、37);これらの3D構造体はProtein Data Bankにおいて入手可能であった。)

30

【0036】

【表 1】

表 1. UGの「鑄型」立体配座中のペプチド骨格に関する二面角（度）値

残基	角度	配座異性体の番号#					
		1	3	9	22	25	27
Cys ⁴	ψ	-37	-41	-40	-55	-38	-54
Glu ⁵	ϕ	-71	-67	-72	-69	-68	-70
	ψ	-50	-47	-48	-33	-43	-22
Leu ⁶	ϕ	-86	-86	-85	-81	-88	-91
	ψ	163	165	160	153	160	156
Cys ⁷	ϕ	-79	-82	-79	-83	-79	-81
	ψ	74	68	78	67	75	72
Val ⁸	ϕ	-120	-114	-126	-124	-125	-128
	ψ	-65	-57	-62	-55	-60	-64
Asn ⁹	ϕ	-83	-95	-82	-88	-89	-82
	ψ	119	113	134	118	111	116
Val ¹⁰	ϕ	-84	-82	-97	-90	-82	-82
	ψ	-21	-13	-16	-4	-15	-16
Ala ¹¹	ϕ	-79	-86	-87	-89	-85	-80
	ψ	-32	-21	-35	-35	-18	-27
Cys ¹²	ϕ	-86	-92	-78	-79	-95	-90
	ψ	-52	-53	-55	-57	-53	-54
Thr ¹³	ϕ	-129	-121	-127	-119	-118	-130
	ψ	111	153	141	155	141	119
Gly ¹⁴	ϕ	-64	-78	-78	-80	-78	-68
	ψ	83	64	68	62	67	78
Cys ¹⁵	ϕ	-139	-160	-150	-156	-78	-131

【 0 0 3 7 】

このUG断片の全体的な3D形状を決定する値である、二面角 ϕ 及び ψ は類似している（表1）。これによって、さまざまなタイプのアミノ酸によって課される知られている局所的な配座の制限を使用して、この個々の立体配座のファミリーを安定化させることを目的とする、新しい類似体の予備設計を行うことができた。

【 0 0 3 8 】

たとえばGlyは、任意の他のL型アミノ酸残基と比較して、立体配座的により柔軟であることは知られている。なぜならGlyは、 ϕ 及び ψ に関する記号の任意の4つの組合せ、すなわち - , + ; - , - ; + , + ; 及び + , - で、立体配座をとることができるからである。この最後の組合せは、AlaなどのL型アミノ酸に関しては、立体的に許されない。したがって、Gly¹⁴のAla¹⁴への置換によって、表1に記載した立体配座を保ち

10

20

30

40

50

ながら、位置14の立体配座の柔軟性が制限されるはずである。さらに、Aib(-Me-Ala、ジ-メチル-アラニン)に関する置換によって、ただ2つの領域近くの局所的な立体配座の柔軟性、すなわち-, -及び+, +に関して制限されるはずであり、第1の領域は表1中のAla¹¹の配座異性体と適合性がある。したがって、1つのより望ましい置換基はAib¹¹である。Proでは、値は-75°に固定され、この残基はその疎水性によってバリンにも類似している。したがって、Val¹⁰をPro¹⁰に置換することができ、これによってさらなる局所的な立体配座の制約が表1中のUG配座異性体に加えられる。Proによる置換には、前の残基が正の値のみを有することも必要であり、表1中のAsn⁹がこの要件を満たす。Pro残基は、STの対応する位置に既に存在している。以下に示した配列番号1中に示唆した置換基(たとえばPro¹⁰、Aib¹¹又はAla¹⁴)はいずれも、非脂肪族アミノ酸(Asn、Asp又はThrなど)の化学的性質を変えることはなく、このことは受容体との実際の相互作用に関して重要である可能性がある。前者の置換は、UGの立体配座の平衡状態を示唆される「鑄型」3D形状に移す、立体配座の制限のみをもたらすはずである。

10

【0039】

表1に定義した3D構造に基づいて、ウログアニリンの3次元の薬理作用団を定義し、これによって、受容体と直接相互作用すると考えられるウログアニリンの官能基間の距離を決定することができた。受容体と直接相互作用すると考えられる基は、骨格配列の位置3、5、9及び13の残基の側基である。これらの残基は、配列番号2及び配列番号20に示すような、Glu³、Glu⁵、Asn⁹、及びThr¹³であることが好ましい。したがって、これらの側鎖間の距離によって任意選択の生物活性が与えられるように、位置3、5、9及び13における残基の4つの側鎖の空間的配置を生み出すことができる、ウログアニリンの3次元の薬理作用団を記載する。これらの距離(対応する残基のC原子間の距離として測定した)は以下の通りである: 3と5の距離に関しては5.7~7.6、3と9に関しては4.0~6.0、3と13に関しては7.7~8.3、5と9に関しては9.4~9.5、5と13に関しては9.4~9.5、及び9と13に関しては5.8~6.3。

20

【0040】

前述の距離は、ペプチド骨格の立体配座のみに依存する。しかしながら、いくつかの場合は、側鎖そのものの立体配座も重要である。たとえば、それらの低エネルギー状態における立体配座を鑑みると、UG(SP301)、[Glu²]-UG(SP303)、[Glu³]-UG(SP304)及び[Glu²、Glu³]-UG(SP302)の骨格間では立体配座の違いがないことが計算によって示された。しかしながら、位置3のAspの-カルボキシル及びGluの-カルボキシルの空間的位置には顕著な違いがある。すなわち、位置3のGlu残基の-カルボキシルは、Asp残基の対応する-カルボキシルより遠く、分子の塊の「外側に」明らかに伸びている。前述の観察によって、位置3の側鎖の負に帯電したカルボキシル基は、受容体上の正に帯電した結合部位と特異的に相互作用し、したがってAsp³ではなくGlu³を含む類似体はさらに活性が強いはずであることが強く示唆される。同時に、この特定の相互作用の効率を確実なものにするために、リガンドと受容体間の広範囲の静電的相互作用の全体系は、バランスが良くなければならない。Glu²側鎖はAsp²側鎖と比較して立体配座の可能性が高いので、このバランスはSP304(Asp³がGlu³に1つ置換されている)と比較して、SP302(AspがGluに二重に置換されている)ではわずかに変わってよい。

30

40

【0041】

表1に記載した低エネルギー立体配座をとることができる化合物を、表2に列挙する。化合物はすべて、[4, 12; 7, 15]二環である。

【0042】

【表 2】

表 2

1. 親化合物：ウログアニリン

配列番号 1

2. システインが改変されていない化合物：

共通配列（配列番号 2）：



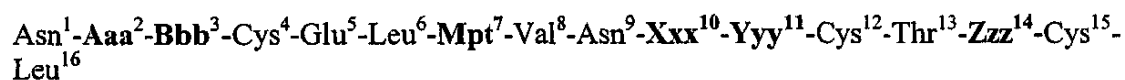
この場合 A a a = A s p, G l u ; B b b = A s p, G l u である、

ただし A a a 及び B b b は、同一分子中で共に A s p とはならない、

この場合 X x x = Val, Pro; Y y y = Ala, Aib; Z z z = Gly, Ala である。

3. 7位のシステインをメルカプトプロリン (M p t) で置換した化合物：

共通配列（配列番号 3）：

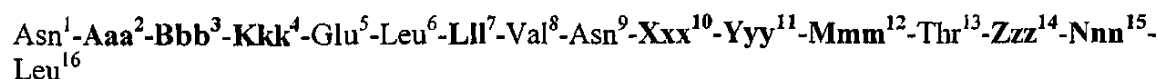


この場合 A a a = Asp, Glu; B b b = Asp, Glu である、

この場合 X x x = Val, Pro; Y y y = Ala, Aib; Z z z = Gly, Ala である。

4. システインをペニシラミン (β, β-ジメチルシステイン, P e n) で置換した化合物：

共通配列（配列番号 4）：



この場合 A a a = Asp, Glu; B b b = Asp, Glu である、

この場合 X x x = Val, Pro; Y y y = Ala, Aib; Z z z = Gly, Ala である、

及び、K k k, L l l, M m m 及び N n n は C y s 又は P e n である（ただし、同一の配座異性体中ですべてが C y s とはならない）。

10

20

30

40

5. ジスルフィド架橋をラクタム架橋で置換した化合物：

共通配列（配列番号5）：

Asn¹-Aaa²-Bbb³-Kkk⁴-Glu⁵-Leu⁶-Lll⁷-Val⁸-Asn⁹-Xxx¹⁰-Yyy¹¹-Mmm¹²-Thr¹³-Zzz¹⁴-Nnn¹⁵-Leu¹⁶

この場合 Aaa = Asp, Glu; Bbb = Asp, Glu である、

この場合 Xxx = Val, Pro; Yyy = Ala, Aib; Zzz = Gly, Ala である、
及び以下のすべての組合せ（Dprはジアミノプロピオン酸である）：

10

KkkはDprであり、MmmはAsp又はGluである、

KkkはAsp又はGluであり、MmmはDprである、

LllはCys又はPenである、

NnnはCys又はPenである、

又は

LllはDprであり、NnnはAsp又はGluである、

LllはAsp又はGluであり、NnnはDprである、

20

KkkはCys又はPenである、

MmmはCys又はPenである。

【0043】

表2に示したいくつかのペプチドは16個のアミノ酸残基を含み、その中でシステイン残基は、Cys⁴とCys¹²の間、及びCys⁷とCys¹⁵の間でそれぞれジスルフィド架橋を形成する。これらのペプチドは、WO01/25266中に記載されたペプチド配列とは異なり、ペプチドの立体配座及びエネルギー計算に基づいて設計される。

【0044】

さらに、表3に示す長さがアミノ酸13～16個でさまざまであるペプチドを、エネルギー計算及び3次元構造に基づいて設計して、生物学的に活性がある配座異性体の安定化を促進し、生物学的に不活性である配座異性体への相互転換を最小限にするかあるいは失くす。これらのペプチドは、タンパク質分解及び高温に対する安定性を促進するためにも設計される。これらのペプチドの設計は、グルタミン酸及びアスパラギン酸などの、低いpH値においてイオン電荷を含むアミノ酸残基の修飾を含む。

30

【0045】

【表 3】

表 3

配列番号 6	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 7	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 8	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 9	X1 Asp Asp Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	10
配列番号 10	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 11	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 12	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 13	X1 Asp Asp Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 14	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 15	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	20
配列番号 16	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 17	Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9	
配列番号 18	Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys	
配列番号 19	X1 Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16	
配列番号 20	Asn Asp Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu	30
配列番号 21	Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16	

X1～X9は任意のアミノ酸であってよい。ジスルフィド架橋はCys残基4と12の間、及び7と15の間でそれぞれ形成される。配列番号18はこれらのペプチドがグアニル酸シクラーゼ受容体に結合するための最小の長さ要件を表す。

【0046】

薬剤組成物及び製剤

本発明のグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニスト（表2、配列番号2～5、及び表3、配列番号6～21）、及びウログアニリン、グアニリン及び/又は細菌エンテロトキシンSTは、経口、局所又は全身性投与用に、さまざまな賦形薬、媒体又はアジュバントと組み合わせるかあるいは調合することができる。ペプチド組成物は、溶液、粉末、懸濁液、エマルジョン、錠剤、カプセル、経皮パッチ、軟膏剤、又は他の製剤の形で投与することができる。製剤及び剤形は、当分野でよく知られている方法を使用して作製することができる（たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., A. Oslo ed., Easton, PA (1980)を参照のこと）。

【0047】

10

20

30

40

50

c G M P 依存性ホスホジエステラーゼの阻害剤は、c G M P の分解を特異的に妨げる、小分子、ペプチド、タンパク質又は他の化合物であってよい。阻害化合物には、スルジナックスルホン、ザプリナスト、モタピゾン、及びc G M P 特異的ホスホジエステラーゼの酵素活性を害する他の化合物がある。1つ又は複数のこれらの化合物を、配列番号2～21、ウログアニリン、グアニリン及び大腸菌S T ペプチドで例示したグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストと併用することができる。

【0048】

担体（たとえばリン酸緩衝生理食塩水すなわちP B S）、及び組成物中に使用するのに適した他の成分の選択は、十分に当分野の技術のレベル内である。1つ又は複数のグアニル酸シクラーゼ受容体のアゴニストを含むことに加えて、このような組成物は薬剤として許容される担体、及び投与を容易にするかつ/あるいは取り込みを高めることが知られている他の成分を取り込むことができる。ミクロスフェア、ナノ粒子、リポソーム、PEG化タンパク質又はペプチドなどの他の製剤、及び免疫学的に基本となる系も使用することができる。例には、全身の半減期及び安定性を高めるための、ポリマ（たとえば20% w/vポリエチレングリコール）又はセルロースを使用する製剤、又は腸溶性製剤及びPEG化ペプチド類似体がある。

【0049】

治療法

「治療」という語は、被験者の症状を低下又は軽減させること、症状の悪化又は進行を妨げること、又は疾患の進行を妨げること指す。所与の被験者に関して、症状の改善、その悪化、退行、又は進行は、典型的には当業者によって使用される任意の客観的又は主観的測定によって決定することができる。癌の場合の治療の有効性は、罹病率又は死亡率（たとえば選択した個体群に関する生存曲線の増大）の改善として測定することができる。したがって有効な治療は、既存の疾患の療法、疾患の進行を遅らせるかあるいは停止させることによる疾患の調節、疾患の発生の予防、症状の数又は重度の低下、又はこれらの組合せを含むと思われる。その効果は、1つ又は複数の統計上有意な規準を使用して、規定の研究において示すことができる。

【0050】

1つ又は複数の内科/外科手順、及び/又は少なくとも1つの他の化学療法剤との併用療法を、本発明に関して実施することができる。併用療法において有用な他の適切な作用物質には、たとえばステロイド又は非ステロイド抗炎症薬（NSAIDs）など、アスピリンなどの抗炎症薬がある。再発の発生を予防するかあるいは低下させるための予防法も、治療とみなす。

【0051】

組成物に対して反応すると予想される癌には、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、胃癌、膀胱癌、肝臓癌、食道癌及び精巣癌がある。グアニル酸シクラーゼ受容体の少なくとも1つのアゴニストを含む療法剤に対して、反応することが確かと思われる癌性又は前癌性組織がかかわる疾患のさらに他の例には、癌（たとえば基底細胞、基底扁平細胞、ブラウンピアース、腺管、エルリッヒ腫瘍、*in situ*、クレブス、メルケル細胞、小又は非小細胞肺、燕麦細胞、乳頭、細気管支、扁平上皮細胞、移行細胞、ウォーカー）、白血病（たとえばB-細胞、T-細胞、HTLV、急性又は慢性であるリンパ球性、マスト細胞、骨髄性）、組織球腫、組織球増殖症、ホジキン病、非ホジキンリンパ腺、プラズマ細胞腫、細胞内皮増殖症、腺腫、腺癌、腺線維腫、腺リンパ腺、腺芽腫、被角血管腫、好酸球増多随伴性血管類リンパ組織増殖症、硬化性血管腫、血管腫症、アブドーマ、鰓腫、悪性カルチノイド症候群、カルチノイド心疾患、癌肉腫、セメント質腫、胆管腫、コレステリン腫、軟骨肉腫、軟骨芽細胞腫、軟骨肉腫、脊索腫、迷芽腫、クラニオファリンジーム、脊索腫、円柱腫、嚢胞腺癌、嚢胞腺腫、葉状嚢胞性肉腫、未分化胚細胞腫、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、線維腫、線維肉腫、巨細胞腫、神経節細胞腫、こう芽細胞腫、グロムス血管腫、顆粒膜細胞腫、男女性胚細胞腫、過誤腫、血管内皮芽細胞腫、血管腫、血管外皮細胞腫、血管肉腫、肝腫、鳥細胞腫、カボジー肉腫、平

10

20

30

40

50

滑筋腫、平滑筋肉腫、白血肉腫、ライディッヒ細胞腫、脂肪腫、脂肪肉腫、リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管肉腫、髓芽細胞腫、髓膜腫、間葉腫、中腎腫、中皮腫、筋芽細胞腫、筋腫、筋肉腫、粘液腫、粘液肉腫、神経鞘腫、神経腫、神経芽細胞腫、神経上皮腫、神経線維腫、神経線維症、歯芽腫、骨腫、骨肉腫、乳頭腫、パラガングリオーマ、非クロム親和性パラガングリオーマ、松果体腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、セルトリ細胞腫、奇形腫、莢膜腫、及び細胞が形成異常、不朽状態になっているか、あるいは形質転換されている他の疾患がある。

【0052】

多量の本発明の組成物を、短時間に投与することができる。1日1回が、特に前述の疾患状態の1つを治療するための、好都合な投与スケジュールである。あるいは有効な1日の用量を、投与の目的で多数の用量、たとえば1日当たり2~12の用量に分けることができる。使用するために選択される用量レベルは、化合物の生物学的利用能、活性、及び安定性、投与の経路、治療される疾患の重度、及び治療を必要とする被験者の状態に依存するであろう。1日の用量は典型的には、身体重量1kg当たり約10µgと約2mgの間(たとえば約100µg~1mg)の化合物であろうと企図される。投与される化合物の量は、たとえば化合物の化学的性質、投与の経路、癌の位置及びタイプなどの当業者に知られている要因に依存する。被験者の哺乳動物は、任意の動物又はヒト患者であってよい。したがって、本発明に従って、獣医学的及び医学的治療の両方を想定する。

10

【0053】

本発明を、以下の非制限的な実施例によってさらに記載する。

20

【実施例】

【0054】

材料及び方法

細胞培養：52継代のヒトT84結腸癌細胞を、American Type Culture Collectionから得た。細胞は、10%ウシ胎児血清、100Uペニシリン/ml、及び100µg/mlストレプトマイシンを補った、ハムのF-12培地とダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)の1:1混合物中で増殖させた。細胞には3日に1度新鮮な培地を与え、約80%の集合状態で分けた。

【0055】

cGMPの細胞内レベルを決定するためのT84細胞系アッセイ：ペプチド類似体を、Multiple Peptide Systems、San Diego、CAによって、及びPrinceton Biomolecules、Langhorne、PAによって注文合成した。合成ペプチドの生物活性を、前に報告したようにアッセイした(15)。簡潔には、24ウエルのプレート中の集合した単層のT84細胞を、50mMのHEPES(pH7.4)を含む250µlのDMEMで2回洗浄し、50mMのHEPES(pH7.4)及び1mMのイソブチルメチルキサンチン(IBMx)を含む250µlのDMEMと共に37°Cで10分間前培養し、次にペプチド類似体(0.1nM~10µM)と共に30分間培養した。この培地を吸引し、3%過塩素酸を加えることによって、反応を停止させた。遠心分離、0.1NのNaOHを用いた中和の後に、ELISAキット(Cayman Chemical、Ann Arbor、MI)を使用するcGMPの測定用に、上澄みを直接使用した。

30

40

【0056】

結果

表4に示すペプチドは注文合成し、公開されている手順(38)を使用して精製したものである(>95%純度)。ペプチド類似体をT84細胞系アッセイにおいて、cGMPの細胞内レベルを増大させるそれらの能力に関して評価した。表4に示すように、SP304(配列番号20)は、試験したすべての類似体の中で、細胞内cGMPの最大の増大をもたらした。SP316(配列番号21)は有効性が2番目であり、それに対してSP301、SP302及びSP303の生物活性は、いずれも幾分弱かった。ペプチド類似体SP306及びSP310は、このアッセイでは活性がなかった。これらの結果によ

50

てSP304が、cGMPを増大させることに関して最も強力なペプチドであることが示される。これらの結果は、位置7のシステイン残基を、[7,15]ジスルフィド結合の成分としてのペニシラミンで置換することはできず、位置9のAsn残基をGlnに変えることはできないことも示唆する。

【0057】

【表4】

表4. T84細胞のバイオアッセイで生物活性を評価したペプチドアゴニスト

配列番号*	化合物コード	cGMPレベル** (pmol/ウエル)	
1	SP 301	205	10
6	SP 302	225	
7	SP 303	195	
20	SP 304	315	
14	SP 306	0	20
4	SP 310	0	
21	SP 316	275	

* SP301、SP304及びSP316の配列番号は、本文中に示したこれらの類似体の正確なアミノ酸配列である。

** それぞれのペプチドアゴニストの1マイクロモル溶液を用いた30分間の処理後に、T84細胞で認めた細胞内cGMPレベル。SP304の観察値は、 $P > 0.5$ で統計上有意であった。

30

【0058】

熱安定性を調べるために、ペプチド類似体の10マイクロモル溶液を、95℃で90分まで加熱した。処理中の特定の時間に、T84細胞系アッセイにおける生物活性に関してサンプルを試験した。SP301、SP302、SP303及びSP304の生物活性が、加熱の60分後に著しく変わることはなかった。90分後、SP301、SP302及びSP303の活性は、それらの元の値の約80%に低下し、一方SP304の生物活性は変わらなかった。これによってSP304は、試験した他のペプチドと比較して、熱変性に対してより安定性があることが示される。エネルギー計算及び3D構造に基づいて、配列番号1の位置3の側鎖の負に帯電したカルボキシル基は、受容体上の正に帯電した結合部位と特異的に相互作用すると、我々は予想した。この相互作用を増大させることができる場合は、SP304に関して見出されたのと同様に、Asp3ではなくGlu3を含む類似体はさらに活性が強いはずである。同時に、この特定の相互作用の効率を確実なものにするために、リガンドと受容体の間の広範囲の静電的相互作用の全体系は、バランスが良くなければならない。Glu²側鎖はAsp²側鎖と比較して立体配座の可能性が高いので、このバランスはSP304 (Asp³がGlu³に1つ置換されている)と比較して、SP302 (AspがGluに二重に置換されている)ではわずかに変わってよい。実際、SP304の生物活性は、評価した類似体の中では最高である。

40

【0059】

合成ペプチドSP301、SP302、SP303及びSP304を、T84細胞系ア

50

ッセイの異なる pH 値での、それらの活性についても試験した。これらのペプチドはすべて、5 ~ 7 の範囲の pH で c G M P の増大した細胞内生成を示したが、S P 3 0 4 は 6 . 5 と 7 の間の範囲で最大の増大を示した。大腸の生理学的 pH は類似の範囲内にあることを記すことは重要であり、したがって S P 3 0 4 は、結腸癌の治療に非常に有効であることが予想されると思われる。

【 0 0 6 0 】

我々は、T 8 4 細胞系アッセイにおいて単独、あるいは c G M P 依存性ホスホジエステラーゼの阻害剤（たとえばザプリナスト又はスルジナックスルホン）と組み合わせて使用したペプチドも、c G M P の細胞内レベルの増大に関して評価した。c G M P 依存性ホスホジエステラーゼの阻害剤と S P 3 0 4 の組合せによって、これらの実験における c G M P レベルの増大において劇的な効果が示された。合成ペプチド S P 3 0 4 は、ザプリナスト又はスルジナックスルホンのみの存在下で達したレベルよりも、c G M P レベルを大幅に増大させた。ザプリナスト又はスルジナックスルホンと組み合わせた S P 3 0 4 でウエルを処理することによって、細胞内 c G M P レベルの相乗的増大がもたらされた。これらの増大は、p 値 < 0 . 5 で統計上有意であった。これらのデータは、グアニル酸シクラーゼ受容体のペプチドアゴニストと、1 つ又は複数の c G M P 依存性ホスホジエステラーゼの阻害剤を組み合わせた処理によって、c G M P 濃度の付加的ではなく大きな増大をもたらすことを示す。

10

【 0 0 6 1 】

本発明を詳細に、かつその特定の実施形態を参照しながら記載してきたが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、さまざまな変更および改変を行うことができることは、当業者には明らかであろう。

20

【 0 0 6 2 】

(参考文献)

1. Currie, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:947-951 (1992).
2. Hamra, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10464-10468 (1993).
3. Forte, L., *Reg. Pept.* 81:25-39 (1999).
4. Schulz, *et al.*, *Cell* 63:941-948 (1990).
5. Guba, *et al.*, *Gastroenterology* 111:1558-1568 (1996).
6. Joo, *et al.*, *Am. J. Physiol.* 274:G633-G644 (1998). 10
7. Evan, *et al.*, *Nature (London)* 411:342-348 (2001).
8. Eastwood, G., *J. Clin. Gastroenterol.* 14:S29-33 (1992).
9. Lipkin, M. *Arch. Fr. Mal. Appl Dig.* 61:691-693 (1972).
10. Wong, *et al.*, *Gut* 50:212-217 (2002).
11. Potten, *et al.*, *Stem Cells* 15:82-93. 20
12. Basoglu, *et al.*, in: Proceedings of the Second FEPS Congress, June 29-July 4, 1999, Prague, Czech Republic., <http://www.lf2.cuni.cz/physiolres/feeps/basoglu.htm>.
13. Sindic, *et al.*, *J. Biol. Chem.* March 11, 2002, manuscript M110627200 (in press).
14. Zhang, *et al.*, *Science* 276:1268-1272 (1997).
15. Shailubhai, *et al.*, *Cancer Res.* 60:5151-5157 (2000).
16. Shailubhai, *et al.*, In: Proceedings of the 1999 AACR-NCI-EORTC International Conference. Nov. 1999, Abstract # 0734. 30
17. Cohen, *et al.*, *Lab. Invest.* 78:101-108 (1998).
18. Sciaky, *et al.*, *Genomics* 26:427-429 (1995).
19. Whitaker, *et al.*, *Genomics* 45:348-354 (1997).
20. Leister, *et al.*, *Cancer Res.* 50:7232-7235 (1990).
21. Cheng, *et al.*, *Cell* 63:827-834 (1990). 40
22. Welsh, *et al.*, *Cell* 73:1251-1254 (1993).
23. Weber, *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281(1):L71-78 (2001).
24. Venkatakrishnan, *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23(3):396-403 (2000).
25. Hudson, *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.* 30:1440-1461 (2001).

26. Bhakdi, *et al.*, *Infect. Immun.* 57:3512-3519 (1989).
27. Hughes, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:30567-30576 (1997).
28. Cermak, *et al.*, *Pflugers Arch.* 43:571-577 (1996).
29. Wu, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:14860-14866 (1997).
30. Nikiforovich, G., *Int. J. Pept. Prot. Res.* 44:513-531 (1994).
31. Dunfield, *et al.*, *J. Phys. Chem.* 82:2609-2616 (1978). 10
32. Nemethy, *et al.*, *J. Phys. Chem.* 87:1883-1887 (1983).
33. Zimmerman, *et al.*, *Biopolymers* 16:811-843 (1977).
34. Nikiforovich, *et al.*, *Biopolymers* 31:941-955 (1991).
35. Nyburg, S., *Acta Crystallographica B30 (part 1)*:251-253 (1974).
36. Chino, *et al.*, *FEBS Letters* 421:27-31 (1998). 20
37. Schulz, *et al.*, *J. Peptide Res.* 52:518-525 (1998).
38. Klodt, *et al.*, *J. Peptide Res.* 50:222-230 (1997).
39. Shailubhai, I., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:261-268 (2002)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SYNERGY PHARMACEUTICALS

<120> GUANYLATE CYCLASE RECEPTOR AGONISTS FOR THE TREATMENT
OF TISSUE INFLAMMATION AND CARCINOGENESIS

<130> 81361/141030

<140>

<141>

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.1

10

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DISULFID

<222> (4)..(12)

<220>

<221> DISULFID

<222> (7)..(15)

<400> 1

Asn Asp Asp Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
1 5 10 15

20

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>

<221> DISULFID

<222> (4)..(12)

<220>

<221> DISULFID

<222> (7)..(15)

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)

<223> Asp or Glu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> Asp or Glu

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (10)
 <223> Val or Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)
 <223> Ala or Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> Gly or Ala

<400> 2
 Asn Xaa Xaa Cys Glu Leu Cys Val Asn Xaa Xaa Cys Thr Xaa Cys Leu
 1 5 10 15

10

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(12)

20

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (7)..(15)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)
 <223> Asp or Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)
 <223> Asp or Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)
 <223> Mpt

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)
 <223> Val or Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)
 <223> Ala or Aib

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (14)
<223> Gly or Ala

<400> 3
Asn Xaa Xaa Cys Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Cys Thr Xaa Cys Leu
1 5 10 15

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
guanylate cyclase receptor agonist peptide

10

<220>
<221> DISULFID
<222> (4)..(12)

<220>
<221> DISULFID
<222> (7)..(15)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> Asp or Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> Asp or Glu

20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Cys or Pen

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> Cys or Pen

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
<223> Val or Pro

30

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
<223> Ala or Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> Cys or Pen

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)

<223> Gly or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)

<223> Cys or Pen

<400> 4

Asn Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Leu
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>

<221> DISULFID

<222> (4)..(12)

<220>

<221> DISULFID

<222> (7)..(15)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)

<223> Asp or Glu

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)

<223> Asp or Glu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> Dpr, Cys, Pen, Asp or Glu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)

<223> Dpr, Cys, Pen, Asp or Glu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)

<223> Val or Pro

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)

<223> Ala or Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

<223> Dpr, Cys, Pen, Asp or Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> Gly or Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)
 <223> Dpr, Cys, Pen, Asp or Glu

<400> 5
 Asn Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Leu
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(12)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (7)..(15)

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(11)
 <223> Any amino acid

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(14)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)
 <223> Any amino acid

<400> 6

Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
<221> DISULFID
<222> (4)..(12)

10

<220>
<221> DISULFID
<222> (7)..(15)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(6)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Any amino acid

20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(11)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(14)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> Any amino acid

30

<400> 7
Xaa Glu Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>

<221> DISULFID

<222> (4)..(12)

<220>

<221> DISULFID

<222> (7)..(15)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> Any amino acid

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(6)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(11)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(14)

<223> Any amino acid

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)

<223> Any amino acid

<400> 8

Xaa Asp Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>

<221> DISULFID

<222> (4)..(12)

<220>

<221> DISULFID

<222> (7)..(15)

<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(6)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(11)
<223> Any amino acid

10

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(14)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> Any amino acid

<400> 9
Xaa Asp Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

20

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
<221> DISULFID
<222> (4)..(12)

<220>
<221> DISULFID
<222> (7)..(15)

30

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(6)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES

<222> (8)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(11)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(14)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> Any amino acid

10

<400> 10
Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
guanylate cyclase receptor agonist peptide

20

<220>
<221> DISULFID
<222> (4)..(12)

<220>
<221> DISULFID
<222> (7)..(15)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(6)
<223> Any amino acid

30

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(11)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(14)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)

<223> Any amino acid

<400> 11

Xaa Asp Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>

<221> DISULFID

<222> (4)..(12)

<220>

<221> DISULFID

<222> (7)..(15)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> Any amino acid

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(6)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(11)

<223> Any amino acid

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(14)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)

<223> Any amino acid

<400> 12

Xaa Glu Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(12)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (7)..(15)

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)⁻
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)⁻..(6)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)⁻
 <223> Any amino acid

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)⁻..(11)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)⁻..(14)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)⁻
 <223> Any amino acid

<400> 13
 Xaa Asp Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

30

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(12)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (7)..(15)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> Any amino acid

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(11)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(14)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)
 <223> Any amino acid

20

<400> 14
 Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRF
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(12)

30

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (7)..(15)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (5)..(6)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(11)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(14)
 <223> Any amino acid

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)
 <223> Any amino acid

<400> 15
 Xaa Asp Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(12)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (7)..(15)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> Any amino acid

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(11)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD RES

<222> (13)..(14)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD RES

<222> (16)

<223> Any amino acid

<400> 16

Xaa Glu Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

10

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>

<221> DISULFID

<222> (2)..(10)

<220>

<221> DISULFID

<222> (5)..(13)

20

<220>

<221> MOD RES

<222> (3)..(4)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD RES

<222> (6)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD RES

<222> (8)..(9)

<223> Any amino acid

30

<220>

<221> MOD RES

<222> (11)..(12)

<223> Any amino acid

<220>

<221> MOD RES

<222> (14)

<223> Any amino acid

<400> 17

Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (2)..(10)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (5)..(13)

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 <223> Any amino acid

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(12)
 <223> Any amino acid

<400> 18
 Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys
 1 5 10

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

30

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (3)..(11)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (6)..(14)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> Any amino acid
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (4)..(5)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(10)
 <223> Any amino acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(13)
 <223> Any amino acid

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)
 <223> Any amino acid

<400> 19
 Xaa Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (4)..(12)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (7)..(15)

<400> 20
 Asn Asp Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
 1 5 10 15

30

<210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 guanylate cyclase receptor agonist peptide

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (2)..(10)

<220>
<221> DISULFID
<222> (5)..(13)

<400> 21
Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
1 5 10

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DISULFID
<222> (4)..(12)

10

<220>
<221> DISULFID
<222> (7)..(15)

<400> 22
Pro Gly Thr Cys Glu Ile Cys Ala Tyr Ala Ala Cys Thr Gly Cys
1 5 10 15

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<220>
<221> DISULFID
<222> (6)..(10)

20

<220>
<221> DISULFID
<222> (7)..(15)

<220>
<221> DISULFID
<222> (11)..(18)

<400> 23
Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10 15

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	Z T D
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/18	(2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/10	(2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1

- (31)優先権主張番号 60/300,850
(32)優先日 平成13年6月27日(2001.6.27)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/303,806
(32)優先日 平成13年7月10日(2001.7.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/307,358
(32)優先日 平成13年7月25日(2001.7.25)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/348,646
(32)優先日 平成14年1月17日(2002.1.17)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (72)発明者 シャイルバーイ、クンワール
アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア、ブルー ベル、 ウィック レイン 6 0 0
- (72)発明者 ニキフォロヴィッチ、グレゴリー
アメリカ合衆国 ミズーリ、セント ルイス、アラミス ドライブ 7 5 1
- (72)発明者 ジェイコブ、ゲイリー、エス
アメリカ合衆国 ミズーリ、クレーブ クール、 メイソン フォレスト ドライブ 1 2 5 4 1

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 Cancer Res., vol.60, pp.5151-5157 (2000)
BBRC., vol.219, pp.644-648 (1996)

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C07K 7/00

C12N 15/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
CA(STN)