

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-509984

(P2007-509984A)

(43) 公表日 平成19年4月19日(2007.4.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/48 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/547	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 H O 4 5
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	
<b>A 6 1 P 11/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/16	
<b>A 6 1 P 13/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-538385 (P2006-538385)	(71) 出願人	505045908
(86) (22) 出願日	平成16年10月29日 (2004.10.29)		ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ
(85) 翻訳文提出日	平成18年6月28日 (2006.6.28)		イ
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/036245		アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2
(87) 国際公開番号	W02005/041887		1 8 バルティモアー ノース・チャール
(87) 国際公開日	平成17年5月12日 (2005.5.12)		ズ・ストリート 3 4 0 0
(31) 優先権主張番号	60/515,374	(74) 代理人	100102668
(32) 優先日	平成15年10月29日 (2003.10.29)		弁理士 佐伯 憲生
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	パトリック トン
			アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2
			8 7 - 8 9 8 4 バルティモアー ノース
			・ウルフ・ストリート 6 0 0
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 色素上皮由来因子、その新規な生物活性及びその使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、血管透過性の亢進または血管新生の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法であって、治療有効量の、P E D F、P E D F 4 4 A Aペプチド、P E D F 4 4 A Aペプチドの相同体、アミノ酸残基の1 0 1番目のグルタミン酸、1 0 3番目のイソロイシン、1 1 2番目のロイシン及び1 1 5番目のセリンが置換されていないP E D F 4 4 A Aペプチドの相同体、またはP E D F受容体を活性化する薬剤を患者に投与することを含む方法に関する。治療する疾患には、敗血症、急性呼吸窮迫症候群、ネフローゼ症候群、糖尿病性神経障害、前増殖性の糖尿病性網膜症、癌、または増殖性の糖尿病性網膜症が含まれるが、これらに限定されるものではない。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

治療有効量の P E D F を患者に投与することを含む、血管透過性の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法。

## 【請求項 2】

P E D F が配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

疾患が敗血症である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

疾患が急性呼吸窮迫症候群である、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 5】

疾患がネフローゼ症候群である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

疾患が糖尿病性腎症である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

疾患が増殖性の糖尿病性網膜症である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

治療有効量の P E D F 4 4 A A ペプチドを患者に投与することを含む、血管透過性の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法。

## 【請求項 9】

20

P E D F 4 4 A A ペプチドが配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

疾患が敗血症である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 11】

疾患が急性呼吸窮迫症候群である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 12】

疾患がネフローゼ症候群である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 13】

疾患が糖尿病性腎症である、請求項 8 に記載の方法。

30

## 【請求項 14】

疾患が増殖性の糖尿病性網膜症である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 15】

アミノ酸残基の 101 番目のグルタミン酸、103 番目のイソロイシン、112 番目のロイシン及び 115 番目のセリンが置換されていない、治療有効量の P E D F 4 4 A A ペプチドの相同体を患者に投与することを含む、血管透過性の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法。

## 【請求項 16】

相同体が、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有する P E D F 4 4 A A ペプチドと相同な配列を有するものである、請求項 15 に記載の方法。

40

## 【請求項 17】

疾患が敗血症である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 18】

疾患が急性呼吸窮迫症候群である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 19】

疾患がネフローゼ症候群である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 20】

疾患が糖尿病性腎症である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 21】

疾患が増殖性の糖尿病性網膜症である、請求項 15 に記載の方法。

50

## 【請求項 23】

P E D F 受容体を活性化する薬剤の治療有効量を患者に投与することを含む、血管透過性の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法。

## 【請求項 24】

薬剤が小分子である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

疾患が敗血症である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 26】

疾患が急性呼吸窮迫症候群である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 27】

疾患がネフローゼ症候群である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 28】

疾患が糖尿病性腎症である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 29】

疾患が増殖性の糖尿病性網膜症である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 30】

外因性 P E D F が組織内の血管透過性を低減させるのに十分な条件下で、当該外因性 P E D F を組織の内皮細胞に投与することを含む、組織内の血管透過性を低減させる方法。

## 【請求項 31】

外因性 P E D F 44 A A ペプチドが組織内の血管透過性を低減させるのに十分な条件下で、当該外因性 P E D F 44 A A ペプチドを組織の内皮細胞に投与することを含む、組織内の血管透過性を低減させる方法。

## 【請求項 32】

外因性 P E D F 44 A A ペプチドの相同体が組織内の血管透過性を低減させるのに十分な条件下で、当該外因性 P E D F 44 A A ペプチドの相同体を組織の内皮細胞に投与することを含む、組織内の血管透過性を低減させる方法。

## 【請求項 33】

相同体の、アミノ酸残基の 101 番目のグルタミン酸、103 番目のイソロイシン、112 番目のロイシン及び 115 番目のセリンが置換されていない、請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 34】

組織が眼組織である、請求項 30 ~ 33 に記載の方法。

## 【請求項 35】

組織が肺組織である、請求項 30 ~ 33 に記載の方法。

## 【請求項 36】

組織が腎臓組織である、請求項 30 ~ 33 に記載の方法。

## 【請求項 37】

治療有効量の P E D F 44 A A ペプチドを患者に投与することを含む、血管新生の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法。

## 【請求項 38】

P E D F 44 A A ペプチドが配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 39】

疾患が癌である、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 40】

疾患が増殖性の糖尿病性網膜症である、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 41】

アミノ酸残基の 101 番目のグルタミン酸、103 番目のイソロイシン、112 番目のロイシン及び 115 番目のセリンが置換されていない、治療有効量の P E D F 44 A A ペプチドの相同体を患者に投与することを含む、血管新生の亢進が関与する疾患に罹患

10

20

30

40

50

している患者を治療する方法。

【請求項 4 2】

相同体が、P E D F 4 4 A A ペプチドと相同な配列である配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 4 3】

疾患が癌である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 4 4】

疾患が増殖性の糖尿病性網膜症である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 4 5】

P E D F 受容体を活性化する薬剤の治療有効量を患者に投与することを含む、血管新生の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法。 10

【請求項 4 6】

薬剤が小分子である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

疾患が癌である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 8】

疾患が増殖性の糖尿病性網膜症である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 9】

外因性 P E D F 4 4 A A ペプチドが組織内の血管透過性を低減させるのに十分な条件下で、当該外因性 P E D F 4 4 A A ペプチドを組織の内皮細胞に投与することを含む、組織内の血管新生を低減させる方法。 20

【請求項 5 0】

外因性 P E D F 4 4 A A ペプチドの相同体が組織内の血管透過性を低減させるのに十分な条件下で、当該外因性 P E D F 4 4 A A ペプチドの相同体を組織の内皮細胞に投与することを含む、組織内の血管新生を低減させる方法。

【請求項 5 1】

相同体の、アミノ酸残基の 1 0 1 番目のグルタミン酸、1 0 3 番目のイソロイシン、1 1 2 番目のロイシン及び 1 1 5 番目のセリンが置換されていない、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

組織が眼組織である、請求項 4 9 ~ 5 1 に記載の方法。 30

【請求項 5 3】

組織が癌性組織である、請求項 4 9 ~ 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

治療有効量の P E D F 4 4 A A ペプチドを患者に投与することを含む、神経障害が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法。

【請求項 5 5】

P E D F 4 4 A A ペプチドが配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 5 6】

疾患が神経変性疾患である、請求項 5 4 に記載の方法。 40

【請求項 5 7】

疾患が虚血誘発性のものである、請求項 5 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権の主張

本出願は、2 0 0 3 年 1 0 月 2 9 日出願の米国特許仮出願第 6 0 / 5 1 5 , 3 7 4 号の優先権を主張するものである。

【0 0 0 2】

本発明の分野は、血管透過性、血管新生および／または神経障害が関与する疾患の治療または予防に有用な組成物及び方法に関するものである。

【背景技術】

【0003】

血管透過性およびその調節・制御はホメオスタシスに最も重要である。血管透過性の亢進は、低血圧症を伴う敗血症、急性呼吸窮迫症候群、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、および糖尿病性網膜症の進行において重要な役割を果たす。血管を正常な状態に保つことの生理学的重要性は、十分によく理解されているが、血管を正常な状態に保つ仕組み、および血管透過性がダウンレギュレーションされるか否かについては、未だ解明されていない。

10

【0004】

血管透過性亢進における血管内皮増殖因子（VEGF）の活性は十分に確立されている<sup>1</sup>。モルモットの皮膚において血管透過性を亢進する<sup>1</sup>に加え、VEGFは、インビボでの血管新生の重要なメディエーターであり<sup>2、3</sup>、神経栄養活性／神経保護活性を有している<sup>4～6</sup>。VEGFは、fms様チロシンキナーゼ-1（Flt-1；VEGFR-1）および胎児肝臓キナーゼ-1（Flk-1/KDR；VEGFR-2）の二種類のチロシンキナーゼ受容体を介して内皮細胞に対してその効果を及ぼす<sup>7</sup>。VEGFR-2は、血管透過性を含めた多くのVEGFの生物活性の主要なシグナル受容体である<sup>8、9</sup>。

【0005】

418個のアミノ酸からなる50kDaの糖タンパク質である、色素上皮由来因子（PEDF）は、セリンプロテアーゼ阻害剤（serin protease inhibitor；serpin）ファミリーに含まれる<sup>10、11</sup>。PEDFはプロテアーゼ感受性のループを有すると推定されているが、1-抗キモトリプシン（ACT）等の従来からのserpinとは異なり、プロテアーゼ阻害活性を欠いている。serpinの中で抗プロテアーゼを欠いているのはPEDFだけではなく、serpinファミリーのコラーゲン特異性シャペロンタンパク質である、熱ショックタンパク質47（HSP47）も抗プロテアーゼ活性を欠いている<sup>12</sup>。PEDFは、元来は網膜光受容体間マトリックスの細胞外成分とされていた<sup>13、14</sup>。PEDFは、Y79網膜芽細胞腫細胞内で神経突起生成を促進する<sup>15、16</sup>。ごく最近、PEDFがマウスの虚血誘発性網膜症<sup>18</sup>において血管新生を効果的に阻害する強力な抗血管新生因子であること<sup>17</sup>がわかった。

20

30

【0006】

VEGFおよびPEDFの生物活性は同様の場合もあるが、血管新生においては異なっている。VEGFおよびPEDFは、ともに、血管新生および運動ニューロン残存において活性である。血管内皮細胞システムにおいて、VEGFおよびPEDFは、互いに拮抗する、血管新生誘導活性および抗血管新生誘導活性をそれぞれ有している<sup>17、19～23</sup>。運動ニューロンにおいて、PEDFもVEGFも神経組織栄養剤／神経保護剤として協調して機能する<sup>24～27</sup>。血管新生および運動ニューロン残存におけるPEDFとVEGFとの関係は確立されているが、血管透過性においてVEGFの活性にPEDFがどのように影響するかについては不明である。

40

【0007】

血管透過性および血管新生に関連する疾患の罹患率を考えると、これらの疾患、特に血管透過性および血管新生合併症の両方が関与する、前増殖性の糖尿病性網膜症および増殖性の糖尿病性網膜症等の疾患の有効な予防薬および治療薬の必要性が依然として残されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

血管透過性は、生命及び視力を脅かす多様な疾患において重要な役割を果たしている。血管内皮増殖因子（VEGF）は血管透過性を亢進できる。本発明の基となる知見は、色

50

素上皮由来因子 ( P E D F ) が V E G F に誘導される誘導性血管透過性を効果的に低減するという事を見出したことに関連するものである。特に、P E D F の 4 4 個のアミノ酸領域は、抗血管透過性活性と抗血管新生活性の両方を付与する。さらに、4 個のアミノ酸 ( グルタミン酸<sub>101</sub>、イソロイシン<sub>103</sub>、ロイシン<sub>112</sub>、およびセリン<sub>115</sub> ) は両方の活性に不可欠であることが判明している。P E D F またはその誘導体は、糖尿病性黄斑浮腫による失明および血管新生型加齢黄斑変性症を軽減または修復する可能性を有している。更に、P E D F および / または P E D F の 4 4 個のアミノ酸 ( A A ) ペプチドは、低血圧症を伴う敗血症、ネフローゼ症候群、ならびに過剰な血管透過性および / または過剰な血管新生に由来する視力および生命を脅かす疾患に対する新しい治療法を提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、血管透過性の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法であって、P E D F、P E D F 4 4 A A ペプチド、P E D F 4 4 A A ペプチドの相同体、アミノ酸残基の 1 0 1 番目のグルタミン酸、1 0 3 番目のイソロイシン、1 1 2 番目のロイシン及び 1 1 5 番目のセリンが置換されていない P E D F 4 4 A A ペプチドの相同体、又は P E D F 受容体を活性化する薬剤の治療有効量を当該患者に投与することを含む方法に関する。治療対象の疾患には、敗血症、急性呼吸窮迫症候群、ネフローゼ症候群、糖尿病性神経障害、前増殖性の糖尿病性網膜症、および血管新生型加齢黄斑変性症が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0010】

本発明は、血管新生の亢進が関与する疾患に罹患している患者を治療する方法であって、P E D F 4 4 A A ペプチド、P E D F 4 4 A A ペプチドの相同体、アミノ酸残基の 1 0 1 番目のグルタミン酸、1 0 3 番目のイソロイシン、1 1 2 番目のロイシン及び 1 1 5 番目のセリンが置換されていない P E D F 4 4 A A ペプチドの相同体、又は P E D F 受容体を活性化する薬剤の治療有効量を当該患者に投与することを含む方法にも関する。治療対象の疾患には癌および増殖性の糖尿病性網膜症が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0011】

さらに、本発明は、P E D F 受容体と相互作用し、それを活性化することが可能な候補薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイに関する。これらの候補薬剤には、P E D F の生物学的作用を模倣または達成する能力を有する、分子、タンパク質、または薬剤 ( すなわち、小分子化学物質 ) が含まれる。

30

【0012】

本発明の教示の別の態様、特性、および利点は、開示を目的とする本発明の教示の様々な実施形態についての以下の記載から明らかになるものである。

【0013】

( 発明の詳細な説明 )

本発明は、本明細書に記載の特定の材料および方法のみに限定されるものではないことを理解されたい。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するためのものではなく、本発明の範囲は請求項によってのみ限定されることも理解されたい。本明細書で使用されているように、特に明記されていない限り、単数形の「a」、「an」、および「the」は、複数形も含むものである。例えば、「眼の組織 ( eye tissue ) 」は、当業者に公知の複数の細胞が含まれる。

40

【0014】

特に明記されていない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の一般的な当業者が、通常、共通して理解しているものと同じ意味を有するものである。本明細書に記載のすべての刊行物は、刊行物で報告されており、本発明で使用可能な透過性モデル、プロトコル、試薬、およびベクターについて説明及び開示するために引用されているが、それにより、本発明が先願発明の開示に優先する権利がな

50

いと認めるものではないことを理解されたい。

【0015】

P E D F、V E G F、およびそれらの生物活性における関係

P E D F および V E G F の様々な活性における関係は、完全には明確にはなっていない。初期の研究で、P E D F が神経突起の生成を誘導すること<sup>1 3</sup>、V E G F が血管新生および血管透過性を促進すること<sup>1 ~ 3、3 3 ~ 3 5</sup> が示された。P E D F の抗血管新生活性の報告によって、血管新生における P E D F と V E G F との関係が明らかにされた。様々な種類の神経細胞において、P E D F および V E G F は同様な活性を有し、両方とも神経栄養性であり神経保護性である<sup>5、2 5、3 6</sup>。このように、V E G F は 3 種類の活性、すなわち、( i ) 血管新生の促進、( ii ) 神経細胞の生存と増殖の促進、および ( iii ) 血管透過性の促進、を有している。

10

【0016】

血管透過性は、非増殖性の糖尿病性網膜症のみならず、他の多くの病状においても、病態生理学的に重要な役割を果たしている。網膜の脈管構造は、透明な眼の光学的システムを通して網膜の血管を容易に観察できるため、血管透過性に対する P E D F の効果を研究する上で好ましいモデルである。ヒトの失明の最も一般的な原因の一つである非増殖性の糖尿病性網膜症においては、血管透過性の亢進が糖尿病性網膜浮腫の必須条件である。糖尿病性網膜浮腫の極めて有用な標準的な診断試験方法はフルオレセイン血管造影法であり、この試験方法を用いて V E G F が糖尿病性網膜症の病態生理学において中心的な役割を果たしていることが示された<sup>3 8</sup>。マウスの眼に V E G F を注射すると血管透過性が亢進し、フルオレセインの漏出が増大する。本発明の発見に於いて、P E D F を一緒に注射するとフルオレセイン漏出の増大は認められず、この知見はエバンスブルーアッセイで定量的に裏付けられた。このように、P E D F も V E G F と同様に 3 種類の活性を有している。P E D F は、抗血管新生剤および神経栄養剤 / 神経保護剤として機能するだけでなく、血管透過性の亢進をも病理学的に阻害する。また、P E D F は眼中に、かなりの量が天然に存在しており、眼を生理学的に正常に維持する上で P E D F の作用が有用である可能性がある。

20

【0017】

P E D F の 3 種類の活性のうち、神経栄養機能 / 神経保護機能には受容体が介在している可能性がある<sup>2 4、2 5</sup> ため、抗血管新生活性および抗血管透過性活性にも受容体が介在している可能性がある。これは、P E D F が 0 . 5 n M の I C<sub>50</sub> ( 50 % 阻害濃度 ) で V E G F 刺激性内皮細胞遊走を阻害すること、P E D F<sub>p e p</sub> が 3 . 0 n M の I C<sub>50</sub> で全長 P E D F と同程度に V E G F 刺激性内皮細胞遊走を阻害することから確認された。神経細胞または抗血管新生の活性を最大時の 50 % にするために同程度の P E D F 濃度を要するということは、神経栄養活性 / 神経保護活性および抗血管新生活性に於いて同じく細胞表面の受容体を使用されているとする仮説を裏付けるものである。3 種類の P E D F 活性のすべての活性部位が同一の 44 個のアミノ酸領域 ( これ以降「P E D F 44 A A ペプチド」とし、図面の簡単な説明および実施例に於いては「P E D F<sub>p e p</sub>」とも示す。配列番号 2 を参照のこと ) に局在化していることは、3 種類の活性が同一のまたは類似の受容体によって介在されていることを示唆するものである。

30

40

【0018】

P E D F 44 A A ペプチド内の活性部位の局在をさらに絞り込むため、P E D F 44 A A ペプチド内の基幹アミノ酸残基 ( 図 8 の下線部 ) を A C T または H S P 47 のうちの相当するアミノ酸残基で置換すれば生理活性が失われるとの仮説の下で、キメラペプチド、すなわち C H I M E R A<sub>p e p</sub> を調製した。P E D F 44 A A ペプチド内の 4 個の候補アミノ酸残基を変異させると、生理活性は失われた。内皮細胞遊走アッセイに於いてフルオレセイン血管造影法、またはエバンスブルーアッセイにより、4 個のアミノ酸残基が A C T または H S P 47 のうちの相当するアミノ酸残基で置換されたことを除いては、P E D F 44 A A ペプチドと相同である C H I M E R A<sub>p e p</sub> は、血管系の V E G F 血管新生活性に拮抗して不活性となる。

50

## 【0019】

PEDFの78番から121番までのアミノ酸残基(PEDF 44 AAペプチド)の神経栄養性/神経保護性領域の同定に加えて、PEDFの多数の他の結合部位、すなわち、酸性のヘパリン結合ドメイン; シートAの鎖2および3ならびにヘリックスF内のコラーゲン結合ドメイン; およびアミノ酸残基367番から387番までのserpin露出ループ<sup>31</sup>、<sup>39</sup>をマッピングした。本発明において、抗血管新生および抗血管透過性の活性部位はアミノ酸残基のグルタミン酸<sub>101</sub>、イソロイシン<sub>103</sub>、ロイシン<sub>112</sub>、セリン<sub>115</sub>に位置決めされ、これら2種類の活性に関連する部位は同一または極めて類似していることが示された。これらの知見は、極めて類似した結合特異性を有する単一の受容体または複数の受容体が、PEDFのこれら2種類の活性または3種類すべての活性に関与していることを示唆している。別の機能を有するが、極めて類似した結合特異性を有する複数の受容体(multiple receptors)の一例として2マンノース-6-リン酸塩受容体<sup>40-42</sup>が挙げられる。

10

## 【0020】

PEDF、PEDF 44 AAペプチド、およびそれらの使用方法

本発明には、血管透過性を阻害し、血管新生を阻害し、神経保護を促進するための、全長の色素上皮由来因子(PEDF、Steelら、1993年、Proc. Natl. Acad. USA 90(4): 1526~1530参照)およびPEDFのすべての誘導体、特にPEDF 44 AAペプチドおよびその相同体、の使用も含まれる。本発明は、特にPEDF 44 AAペプチドおよびその相同体を含む、全長PEDF、抗血管新生または抗血管透過性のPEDFの誘導体の何れをもコードする核酸の使用を包含するものである。

20

## 【0021】

本発明の方法において、PEDFは、血管透過性および血管新生に対する強力な阻害活性を有するタンパク質である。PEDFポリペプチドの一つの形態(全長PEDF)を図6(配列番号1)に示すが、本発明は、この例示的配列のみを用いると限定されるものではない。実際に、その他のPEDF配列が当該技術分野に於いては公知となっている(国際公開公報第95/33480号、国際公開公報第93/24529号を参照のこと)。さらに、異なる種および個体間で遺伝子配列が変化する場合があることも周知のことである。このような天然の対立遺伝子変異も本発明の範囲に含まれる。更にまた、PEDFポリペプチドには、例示した配列または、その他の天然のPEDFポリペプチドに於ける一つまたはそれ以上の点変異も含まれる。したがって、PEDFポリペプチドは、一般に、配列番号1の全てあるいは一部分に対して少なくとも約75%相同であり、好ましくは配列番号1の全てあるいは一部分に対して少なくとも約80%相同であり(例えば、配列番号1に対して少なくとも約85%相同である)、より好ましくはPEDFポリペプチドは配列番号1の全てあるいは一部分に対して少なくとも約90%相同であり(例えば、配列番号1の全てあるいは一部分に対して少なくとも約95%相同である)、最も好ましくはPEDFポリペプチドは配列番号1の全てあるいは一部分に対して少なくとも約97%相同である。実際には、PEDFポリペプチドは、抗原部位標識およびヒスチジン標識等の他のドメインを含むことができる(例えば、PEDFポリペプチドは融合タンパク質であってよい)。

30

40

## 【0022】

本発明において、PEDFポリペプチドまたはPEDF 44 AAペプチドは、公知のPEDF配列またはその誘導体の挿入体、除去体、または置換変異体である、あるいは公知のPEDF配列またはその誘導体の挿入体、除去体、または置換変異体を含むことができる。置換される場合には常に、PEDFポリペプチドの生化学的特性の破壊が最小限にとどめるように用心しなければならない。したがって、アミノ酸残基を置換する際は、正に荷電した残基(H、K、およびR)は正に荷電した残基で置換することが好ましく、負に荷電した残基(DおよびE)は負に荷電した残基で置換することが好ましく、中性の極性残基(C、G、N、Q、S、T、およびY)は中性の極性残基で置換することが好ま

50

しく、中性の非極性残基（A、F、I、L、M、P、V、およびW）は中性の非極性残基で置換することが好ましい。さらに、PEDFポリペプチドは、公知のPEDFポリペプチドまたはその断片の活性な断片であってよく、最も好ましくはPEDF 44 AAペプチドである。当然ながら、挿入体、除去体、または置換変異体はPEDFポリペプチドのグリコシル化に影響する可能性があるが、本発明の方法で用いる場合には、血管透過性および血管新生に必要な阻害活性を得るためにPEDFポリペプチドをグリコシル化する必要はない。

#### 【0023】

本発明には、PEDFのアミノ酸のD型異性体を一つまたはそれ以上含んでもよい、PEDFポリペプチドまたはPEDF 44 AAペプチドの使用も含まれると理解されたい。PEDFペプチドが開示例と同じアミノ酸で構成されているが、少なくとも一つのアミノ酸がD型アミノ酸である、レトロ逆転D型アミノ酸型PEDFペプチドの産生は、本発明においては容易であり、すべてのアミノ酸をD型アミノ酸にすることも容易である。PEDFペプチド内の、おそらくすべてのアミノ酸がD型アミノ酸であり、かつN末端とC末端とが逆転している場合、L型アミノ酸分子の場合と同じ位置に同じアミノ酸がある分子になる。ただし、この分子はタンパク質分解に対してより安定であるので、本明細書に記載する多くの用途において有用である。

#### 【0024】

本発明の方法には、本明細書で定義するように、生物学的に活性なPEDF、またはPEDFの生物活性を有するそのすべての断片をコードする核酸の形でのPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドの使用も含まれると理解されたい。このように、本発明には、PEDFおよびそのすべての誘導体の断片をコードする核酸、または生物学的に活性なPEDFをコードするその断片の使用が含まれると理解されたい。

#### 【0025】

本明細書で用いられる「生物学的に活性なPEDF」という用語は、本明細書に含まれる試験例／実施例に示されるすべてのアッセイにおいて血管透過性および血管新生を阻害できる、すべてのPEDFポリペプチド、その断片または誘導体、特にPEDF 44 AAペプチドを意味する。

#### 【0026】

PEDFの生物学的に活性な断片は、本明細書の実施例でPEDFの44個のアミノ酸からなる断片（44マー）として例示される。この断片の単離方法および同定方法は、当業者のことを考慮して、本明細書に詳細に記載する。これにより、本明細書に記載する指示に従い、本発明において有用なPEDFの生物学的に活性な断片を同定することは容易であり、本発明には、本明細書で開示するような、PEDFのあらゆる相同体、その修飾体および誘導体が含まれるものと理解されたい。さらに、本発明には、本明細書で用語として定義されているPEDFの生物学的に活性な断片をコードするあらゆる核酸が含まれるものと理解されたい。添付の請求項で用いられている「PEDF」という用語には、本明細書で定義した生物学的に活性なPEDFのすべての形態が含まれると理解されたい。

#### 【0027】

本明細書で用いられる「外因性の」という用語は、PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドを表わし、この用語には、細胞内で天然に発現していない、あらゆるPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドが含まれると理解されたい。例えば、「外因性のPEDF」には、組換え技術を用いて細胞内に導入された核酸によって発現されたPEDF、細胞に付加されたPEDF、およびそれらのあらゆる組合せが含まれると理解されたい。したがって、この用語は、PEDF自体を細胞に付加することに限定して解釈すべきではなく、細胞内に導入された核酸によってPEDFが発現される際の細胞内でのPEDFの発現も含まれるように拡大的に解釈されたい。

#### 【0028】

PEDFポリペプチドおよびPEDF 44 AAペプチドは、一部には、細胞間液胞輸送のおよび／または小孔輸送の減衰により、および／または内皮細胞内で強固な細胞間

10

20

30

40

50

結合を維持することによって、血管透過性を阻害する。したがって、本発明は、外因性の P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドを細胞に提供することによって、細胞間液胞輸送及び小孔輸送を阻害し、細胞間結合の強化を促進する方法を提供する。本発明の方法は、血管透過性を低減させるほかに、眼内の血管透過性の刺激が関与する類囊胞黄斑水腫、葡萄膜網膜浮腫 (uveotoc retinal edema)、血管閉塞性疾患等の疾患の治療に有用である。他の器官において、本発明の方法は、脳浮腫、肺浮腫、腸浮腫、および他の滲出性病状に有用である。

#### 【 0 0 2 9 】

P E D F ポリペプチドおよび P E D F 4 4 A A ペプチドは、一部には、活性化された内皮細胞の遊走および / または収縮を低減させることにより、内皮細胞が組織内で膨張する能力を低下させて、血管新生を阻害する。したがって、本発明は、外因性の P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドを細胞に提供することによって、内皮細胞の遊走および膨張を阻害する方法を提供する。血管新生を低減させるほかに、本発明の方法は、内皮細胞の遊走の刺激が関与する、腸管癒着症、クローン病、粥状動脈硬化、硬皮症、およびリウマチ様関節炎等の疾患の治療に有用である。

10

#### 【 0 0 3 0 】

本発明の方法に従い、P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドを目的の組織の内皮細胞に提供する。内皮細胞は、目的の組織に含まれる内皮細胞、組織に導入される外因性内皮細胞、組織内にない隣接する内皮細胞であってもよい。したがって、例えば、内皮細胞は組織内の内皮細胞であってもよく、P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドは内皮細胞と接触するように、内皮細胞にその場で提供される。あるいは、内皮細胞は、組織に導入された内皮細胞であってもよく、この場合、細胞を組織内に導入する前に、P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドをまず (例えば、インビトロで) 細胞内に挿入 (transfer) してもよいし、細胞を組織内に導入した後で、細胞に P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドをその場で挿入してもよい。

20

#### 【 0 0 3 1 】

P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドを細胞内に導入し、次いでその細胞を哺乳動物に挿入する場合、本発明は、P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドが細胞内に導入される方式によって限定されるものではないと理解されたい。本発明は、また、その細胞が哺乳動物に導入される方式によって限定されるものではないとも理解されたい。以下により詳細に記載するように、D N A を細胞内に導入する方法は、細胞を哺乳動物の組織に送達する方法と同様によく知られている。

30

#### 【 0 0 3 2 】

内皮細胞が関与する組織は、(例えば、血管新生を阻害するために)内皮細胞の遊走または膨張の阻害が望まれる、(例えば、血管透過性を阻害するために)経液胞輸送、穿孔、または強い結合間での漏出の阻害が望まれるいかなる組織であってもよい。用途の一つにおいては、組織は眼の組織であり、この場合、外因性の P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドが存在することによって、様々な眼の疾患に関与する、血管透過性および血管新生が阻害される。例えば、本発明の方法は、眼の損傷、低酸素症、感染症、手術、レーザー手術、糖尿病、網膜芽細胞腫、黄斑変性、虚血性網膜症、又はその他の眼病または眼の疾患の治療に有用である。この点で、本発明は、様々な眼の疾患に関与する、視力の回復、失明の予防、失明を遅延させるのに有用である。糖尿病患者の圧倒的多数は、糖尿病に起因する虚血に反応して網膜内の血管が過剰に形成されることによって、最終的に視力を損な損うことになる。同様に、高レベルの酸素に曝された未熟児は、網膜血管の閉塞またはその他の血管の異常若しくは虚血性異常の結果として、網膜症を発症する。本明細書に記載するように、虚血によって誘導される網膜症は、P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドを全身的にまたは局所的に投与することにより、予防または治療することができる。眼のレーザー手術の場合は、P E D F または P E D F 4 4 A A ペプチドを用いて、治療後の血管再生を予防することができる。過剰な血管を減らすためにレーザーを使用することができるが、レーザーにより網膜も損傷して視力が低下する可能性が

40

50

あり、網膜内に損傷ができることにより、ある程度の血管新生も誘発する。P E D FまたはP E D F 4 4 A A ペプチドを全身または局所投与して治療することにより、治療後の血管再生の予防、及びレーザーで損傷を受けた生存能力のある網膜組織の保持に有用である。

#### 【 0 0 3 3 】

欠陥のある非自己増殖性ウイルス粒子に組み込み可能な異種ポリペプチドを共発現する組換えウイルスベクターについて記載されている、米国特許第 5 , 6 1 4 , 4 0 4 号の方法を用いてレトロウイルスの遺伝子導入ベクターを構築することで、P E D FまたはP E D F 4 4 A A ペプチドを送達する遺伝子療法が可能になる。遺伝子導入ベクターとして有用なウイルスには、ヒトの臨床試験において最も一般的に使用されているレトロウイルスが含まれる。遺伝子療法用のベクターを産生するため、感染後のレトロウイルスの逆転写機能および組み込み機能に必須な、二つの長末端反復配列 ( L T R )、プライマーの結合部位、パッケージングシグナル、およびポリプリントラクトを含む複製欠損型レトロウイルスプラスミド内で目的の遺伝子をクローン化する。ウイルスベクターを産生するため、プラスミド型ベクターを、ウイルス粒子への組み込みに必要なレトロウイルス構造タンパク質である G a g、P o l、および E n v を産生するパッケージング細胞株にトランスフェクトする。一般的に、プロデューサー細胞株は選択的マーカー (レトロウイルスベクターによって運ばれる G 4 1 8 耐性遺伝子であることが多い) を用いて産生される。得られた細胞株は、標的細胞を感染させるためのウイルスベクターを分泌する生きたパッケージング細胞を収容する生体適合性カプセルについて、また、標的細胞を有利に感染させるための送達方法を記載している、国際公開公報第 9 7 / 4 4 0 6 5 号に記載されているようにして、カプセルに封入することができる。

#### 【 0 0 3 4 】

本明細書で用いられる「網膜症」という用語は、硝子体まで広がっているまたは広がっていない、網膜内または網膜周辺の血管の異常な発生を意味する。網膜症は、損傷、疾患、虚血性事象、レーザーまたはその他の医原性の処置によって誘発される。

#### 【 0 0 3 5 】

他の実施形態において、組織は腫瘍 (例えば、良性または癌性の増殖体) であり、この場合、本発明の方法は腫瘍内のまたは腫瘍に向かう血管の増殖を阻害し、いくつかの場合には、腫瘍細胞を誘導して分化させ、徐々に分割する。腫瘍内の血管増殖を阻害することにより、腫瘍に十分な栄養と酸素が供給されるのを防ぎ、腫瘍が現在の大きさより大きくなることを阻害する。このように、本発明の方法は、遺伝的素因 (例えば、B R C A - 1 突然変異キャリア、p 5 3 変異を有するリー・フラウメニ症候群患者等) または発癌の外的要因 (例えば、タバコ、アルコール、工業用溶剤等) の存在によって、既に存在している癌細胞から腫瘍の核が形成されるのを阻害することができる。腫瘍形成を阻害する以外に、本発明の方法は、既に存在している腫瘍の増殖を抑制して腫瘍を封じ込めやすく切除しやすくすることができ、腫瘍を退縮させることができる。本発明の適用は、処置の困難な腫瘍 (例えば、脳の腫瘍、前立腺の腫瘍) の治療に極めて有益である。さらに、本発明の方法は、神経芽細胞腫を含めた幼児の腫瘍の治療に有用であるが、これに限定されるものではない。また、腫瘍内に存在する血管の数を減らすことは、腫瘍が転移する可能性を下げることになる。腫瘍の治療において、腫瘍の増殖を制御するため、本発明の方法は単独でまたはその他の治療法と組み合わせて使用できる。実際、本発明の方法を使用することにより、いくつかの種類の腫瘍に関しての他の治療法への応答を強化できる。例えば、本発明の方法は (例えば、治療前のおよそ 1 週間の) 治療前処置として用いてもよく、あるいは化学療法または放射線療法をおこなっている間に継続して用いてもよい。本発明の方法は、生物学的応答修飾物質、例えば、インターフェロン、またはその他の抗血管新生剤と組み合わせて使用することもでき、抗血管新生剤のインビボでの産生を誘導する薬剤と組み合わせて使用することも有用である。さらに、本発明の方法は、細胞の分化を促進する薬剤、特に脳腫瘍細胞の分化を促進する薬剤と組み合わせて使用することができるが、これに限定されるものではない。

## 【 0 0 3 6 】

本発明の方法は他の組織に適用した場合も、血管新生が阻害され患者が効果的に治療される。このように、例えば、本発明の方法は、血管性疾患（例えば、粥状硬化性斑中の血管腫および毛細血管増殖）、筋肉性疾患（例えば、心筋性血管新生症または平滑筋性血管新生症）、関節性疾患（例えば、関節炎、血友病性関節症等）、ならびに血管新生が関与する他の疾患（例えば、オスラー・ウェバー症候群、斑性血管新生症、毛細血管拡張症、血管線維腫、創傷顆粒化等）の治療の一環として使用できる。さらに、本発明は、鼻のポリープ、特に嚢胞性線維症における鼻のポリープ、骨髓細胞の異常増殖による幹細胞性白血病、および前立腺癌の治療に有用である。本発明は一般に良性腫瘍形成の治療にも有用であると考えられる。

10

## 【 0 0 3 7 】

本発明の方法は、血管透過性または血管新生が関与する疾患または疾病の発症予防の手段としても有用である。すなわち、本発明の方法は、疾患に罹る恐れのある患者の罹患を防ぐための予防方法として有用である。例えば、P E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドは、糖尿病患者における糖尿病性網膜症の発症の予防、癌の恐れがある患者における癌の発症の予防、およびその他の予防に使用できるが、これらに限定されるものではない。したがって、本発明の方法は、明白な疾患の治療に限定されると解釈すべきではなく、むしろ発症の恐れがある患者の病気を予防するために有用であるものと理解されたい。

## 【 0 0 3 8 】

本発明には、前癌状態、例えば、鼻のポリープ、特に嚢胞性線維症の患者における鼻のポリープの治療も含まれると理解されたいが、これらに限定されるものではない。これらの患者における鼻のポリープは血管新生症であり、嚢胞性線維症の患者の脳脊髄液には血管新生因子V E G Fが過剰に含まれている。したがって、これらの疾患の緩和、特に嚢胞性線維症の患者において、P E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドの投与を含む緩和は本発明に含まれる。

20

## 【 0 0 3 9 】

本発明の中で、P E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドは単独またはその他の公知の抗血管新生因子と組み合わせて投与できる。例えば、P E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドは、インテグリンの関与を遮断する抗体およびペプチド、金属タンパク質分解酵素（例えば、マーミスタット）を阻害するタンパク質および小分子、内皮細胞内でリン酸化カスケードを遮断する薬剤（例えば、ヘルバマイシン）、血管新生の公知の誘導物質に対する負の受容体として主要なもの、血管新生誘導物質に対する抗体または血管新生誘導物質の活性を遮断するその他の化合物（例えば、スミラン）、あるいは他の手段で作用するその他の化合物（例えば、レチノイド、I L - 4、インターフェロン等）と組み合わせて使用できる。実際、異なる機序で血管新生を調節する因子として、P E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドを他の抗血管新生剤と組み合わせて使用すると、望ましい組織内で血管新生をより強力に（可能性として、場合によっては相乗的に）阻害することができる。P E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドは、一種またはそれ以上の種類の抗血管新生因子と共に使用できる。少なくとも二種の抗血管新生因子をP E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドと組み合わせて使用することが好ましい。

30

40

## 【 0 0 4 0 】

本明細書に記載されているように、P E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドはタンパク質性因子である。したがって、一つのプロトコルにおいて、本発明の方法には、（例えば、好適な組成物中の成分として）P E D FポリペプチドまたはP E D F 4 4 A Aペプチドを細胞に供給するによって、P E D FまたはP E D F 4 4 A Aペプチドを提供することが含まれる。本発明における使用のためにP E D FポリペプチドまたはP E D F 4 4 A Aペプチドを得るには、好適な方法であれば何れを用いてもよい。天然にP E D Fを産生する組織から、または様々なP E D F産生細胞（例えば、網膜芽細胞腫の細胞株であるW E R 1 2 7）により条件付けられた媒体から、数多くの好適なP E D Fポリペプチドを精製することができる。例えば、すべての種類の、筋肉、脾臓の巨核球、線

50

維芽細胞、腎尿細管、脳のプルキンエ細胞、毛包の毛包脂腺、および網膜細胞で P E D F が産生されることが知られている。天然の P E D F の特に良好な供給源は、眼の硝子体液および房水様液である。硝子体液および房水様液（またはその他の供給源）のタンパク質抽出物から P E D F を精製する一つのプロトコルは、30 k D a 限外濾過膜を用いて濃縮 / 透析し、次いで約 65 % から約 95 % までの硫酸アンモニア水でタンパク質を沈降させ、レンティル (lentil) レクチン セファロースカラム上で 0.5 M のメチル - D - マンノピラノシド溶液で溶離し、P H A R M A C I A の H i T r a p ヘパリンカラムから 0.5 M の食塩水でグラジエント溶離 / 定組成無勾配溶離することである。P E D F ポリペプチドを精製するためのその他のプロトコルも当該技術分野で知られている（国際公開公報第 95 / 33480 号、国際公開公報第 93 / 24529 号を参照のこと）。配列番号 1 で示される天然の P E D F ポリペプチドは、S D S - P A G E により約 45 k D a ~ 50 k D a のタンパク質として同定された。その他の P E D F または P E D F 44 A A ペプチドは、固相合成法（例えば、M e r r i f i e l d、1963 年、J . A m . C h e m . S o c . 85 : 2149 ~ 2154 および B a r a n y ー、1987, I n t . J . P e p t i d e P r o t e i n R e s . 30 : 705739 ; 4 および米国特許第 5,424,398 号を参照のこと）等の標準的な直接ペプチド合成技術（例えば、B o d a n s z k y、1984 年、ペプチド合成の原則、S p r i n g e r - V e r l a g、H e i d e l b e r g）を用いて合成できる。当然ながら、P E D F ポリペプチドをコードする遺伝子も知られている（例えば、国際公開公報第 95 / 33480 号、国際公開公報第 93 / 24529 号、および G e n B a n k 登録番号 U29953 を参照のこと）、または本明細書で考察されているポリペプチド配列から推定可能であって、P E D F ポリペプチドまたは P E D F 44 A A ペプチドは標準的な組換え D N A 法で産生可能である。

#### 【0041】

他のプロトコルにおいて、P E D F ポリペプチドまたは P E D F 44 A A ペプチドは、目的の組織を伴うに付随する細胞に対して P E D F をコードする核酸を含む発現ベクターを導入することによって、目的の組織に提供できる。発現ベクターを導入された細胞は、P E D F ポリペプチドを産生して分泌し、P E D F ポリペプチドは組織内の内皮細胞に好適に提供され、（血管新生のための）内皮細胞の収縮または遊走ならびに（血管透過性のための）穿孔、経液胞輸送または結合間輸送を阻害し、全身のまたは目的の組織内の血管透過性および血管新生を低減させる。P E D F ポリペプチドをコードする核酸配列は、公知であり（例えば、国際公開公報第 95 / 33480 号、国際公開公報第 93 / 24529 号、また、G e n B a n k 登録番号 U29953 も参照されたい）、またはその他の核酸配列は本明細書で考察されたポリペプチド配列から推定可能である。したがって、P E D F または P E D F 44 A A ペプチドの発現ベクターには、一般に P E D F または P E D F 44 A A ペプチドの配列と相同な単離された核酸配列が含まれ、例えば P E D F または P E D F 44 A A ペプチドの配列と単離された核酸配列とは、少なくとも軽度ストリンジェントな条件下で少なくとも既知配列の断片とハイブリダイズし、より好ましくは中等度ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、最も好ましくは高度ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする（軽度、中等度、高度の定義は、S a m b r o o k ー、1989 年、分子クローニング：実験室用マニュアル、第 2 版、C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s に記載のものを用了）。40

#### 【0042】

P E D F または P E D F 44 A A ペプチドをコードする核酸に加えて、発現ベクターにはプロモーターが含まれ、本発明において、プロモーターは、細胞内での P E D F または P E D F 44 A A ペプチドの c D N A の発現を推進できなければならない。多くのウイルスプロモーターが、このような発現カセット（例えば、レトロウイルスの I T R、L T R、最初期のウイルスプロモーター (I E p) (ヘルペスウイルスの I E p (例えば、I C P 4 - I E p および I C P 0 - I E p) およびサイトメガロウイルス (C M V) I E p 等) および他のウイルスプロモーター（例えば、後期のウイルスプロモーター、潜在

的に活性なプロモーター（LAP）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、およびマウス白血病ウイルス（MLV）プロモーター）内での使用に適している。他の好適なプロモーターは、エンハンサー配列（例えば、ウサギの  $\beta$ -グロビン調節要素）を含む真核生物のプロモーター、構成的に活性なプロモーター（例えば、P-アクチンプロモーター等）、シグナルおよび/または組織特異性のプロモーター（例えば、誘導性および/または抑圧性のプロモーター、TNFまたはRU486に応答するプロモーター、メタロチオニンプロモーター等）、ならびに腫瘍特異性のプロモーターである。

#### 【0043】

発現ベクター内で、PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドのcDNAとプロモーターとは稼動可能に結合しており、プロモーターはPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドの遺伝子の発現を推進できる。また、発現ベクターは、スプライス部位、ポリアデニル化配列、転写調節要素（例えば、エンハンサー、スプライサー等）、または他の配列等のその他の要素を含んでいてもよい。

10

#### 【0044】

発現ベクターは、発現ベクターに含まれる、PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドをコードする単離された核酸を発現できるように、細胞内に導入されなければならない。好適な発現ベクターであれば、どのようなものでも使用でき、それらの多くは当該技術分野で公知である。そのような発現ベクターの例には、裸のDNAベクター（オリゴヌクレオチドまたはプラスミド等）、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベクター（Bernsら、1995年、Ann. N. Y. Acad. Sci. 772: 95~104）、アデノウイルスベクター（Bainら、1994年、遺伝子療法 1: S68）、ヘルペスウイルスベクター（Finkら、1996年、Ann. Rev. Neurosci. 19: 265~287）、パッケージングされたアンプリコン（Federoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1, 636-1640）、乳頭腫ウイルスベクター、ピコマウイルスベクター、ポリオーマウイルスベクター、レトロウイルスベクター、SV40ウイルスベクター、牛痘ウイルスベクター、およびその他のベクターが含まれる。目的の発現ベクターに加えて、ベクターは、例えば、選択可能なマーカー（例えば、 $\beta$ -ガル、または毒素に対しする耐性を付与するマーカー）をコードする遺伝子、薬理学的に活性なタンパク質、転写因子、または他の生物学的に活性な物質等のその他の遺伝的要素を含むことができる。

20

30

#### 【0045】

選択される発現ベクターは真核細胞内で大量に産生できなければならない。さらに、発現ベクターがPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドの配列と共にまたはPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドの配列なしで目的の細胞に導入できるようにし、PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドの配列を含まない発現ベクターが対照ベクターとして機能し、PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドの配列を含む発現ベクターが試験用または治療用のベクターとなるように構築することが必要である。発現ベクターの核酸を操作する方法は当該技術分野でよく知られており（例えば、上記のSambrookら、を参照のこと）、直接クローニング、組換え酵素を用いる部位特異的組換え、相同的組換え、および組換えベクターを構築する他の好適な方法が含まれる。このようにして、発現ベクターは、望ましい細胞であればどのような細胞内でも複製され、望ましい細胞であればどのような細胞に於いても発現され、さらには望ましい細胞であればどのような細胞のゲノム内に取り込まれるように、構築することができる。

40

#### 【0046】

PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドの発現ベクターは、DNAの細胞内への導入に適したあらゆる手段で細胞内に導入される。数多くのそのような方法が当該技術分野でよく知られている（上記のSambrookら、及びWatsonら、1992年、組換えDNA、第12章、第2版、Scientific American Booksも参照のこと）。こうして、リン酸カルシウム沈降法、電気穿孔法、リポソームが介在する導入法、遺伝子銃、マイクロインジェクション、ウイルスキャプシドが介在する導入

50

法、ポリブレンが介在する導入法、原形質融合法等の方法でプラスミドは導入される。ウイルスベクターは細胞の直接感染によって最も良好に細胞内に導入される。ただし、感染の形態はウイルスおよび細胞の実際の性質によって異なる。

#### 【0047】

PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドのcDNAが導入された細胞は、必要であれば、誘導性プロモーターの調節下で、一時的な形質転換体として本発明の方法において使用できる。このような細胞自体を治療のために哺乳動物に導入することができる。血管透過性または血管新生の阻害のため、このような細胞は一般的に哺乳動物の部位に導入され、PEDFを発現し分泌して望ましい内皮細胞に接触させる。あるいは、特にインビトロで発現ベクターが付加された細胞の場合は、安定な形質転換体を選択するために、まず数回のクローン選択（通常、発現ベクター内の選択可能なマーカー配列を利用することにより容易である）が行われる。安定な形質転換体は次いで治療のために哺乳動物に導入される。

10

#### 【0048】

PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドをコードする単離された核酸を含む発現ベクターを他の細胞の集団内にトランスフェクトすることにより、PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドが他の細胞内で発現され他の細胞から分泌されて、PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドを内皮細胞に付与することもできる。トランスフェクトされた他の細胞の集団は次いで哺乳動物の部位に導入され、そこでPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドが分泌されて内皮細胞に接触し、血管透過性または血管新生を阻害する。他の細胞でPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドを発現および分泌させることは、内皮細胞にとってもメリットがある。PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドをコードするDNAを安定に内皮細胞内に組み込む必要がない。内皮細胞内に組み込まれてないまたは組み込まれたDNAからPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドを発現させ分泌させることができる。

20

#### 【0049】

細胞内で、その細胞がPEDFまたはPEDF 44 AAペプチドを発現し分泌するように、PEDFまたはPEDF 44 AAペプチドの構造体が発現される。遺伝子の発現が成功したか否かについては、標準的な分子生物学的技術（例えば、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、酵素免疫検定法等）を用いて評価することができる。

30

#### 【0050】

目的の組織の位置に応じて、多くの好適な方法でPEDFを目的の組織内の内皮細胞に供給することができる。したがって、例えば、PEDF源（source of PEDF）（すなわち、本明細書に記載したように、PEDFポリペプチドまたはPEDFの発現ベクター、あるいはPEDFを発現する細胞）を含む組成物を体循環に導入することができ、体循環によってPEDF源は目的の組織に分配される。あるいは、PEDF源を含む組成物を目的の組織に局所的に投与する（例えば、腫瘍内または皮内のまたは皮下の部位に注射する、あるいは連続的または単回投与として注入する、眼の表面に滴下する等）ことができる。

#### 【0051】

PEDF源またはPEDF 44 AAペプチド源がPEDFポリペプチドである（例えば、好適な組成物に含まれている）場合、PEDFポリペプチドは、組織内で血管透過性または血管新生を阻害するのに十分な濃度および時間で供給される。

40

#### 【0052】

本発明の方法を容易にするため、本発明は、PEDF源またはPEDF 44 AAペプチド源および好適な希釈剤を含む薬理学的な組成物を提供する。PEDF源またはPEDF 44 AAペプチド源に加えて、組成物には希釈剤が含まれ、希釈剤には一種またはそれ以上の薬理学的に許容される担体が含まれる。本発明に従って使用される医薬組成物は、賦形剤、ならびに活性な化合物の薬剤として使用可能な製剤への調製を容易にする任意の添加剤を含む一種またはそれ以上の薬理学的にまたは生理学的に許容される担体を

50

用いて、従来からの方法で製剤することができる。好適な組成は、選択される投与経路による。したがって、全身投与の場合は、P E D F 源または P E D F 4 4 A A ペプチド源は、水性溶液、好ましくは必要な場合にポリエチレングリコール等の安定剤を含むことができる生理学的に適合する緩衝液の溶液、に製剤することができる。経粘膜投与の場合は、浸透すべきバリアに適合する浸透剤が組成中に用いられる。このような浸透剤は当該技術分野で広く知られている。経口投与の場合、P E D F 源または P E D F 4 4 A A ペプチド源を、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、リポソーム、懸濁液、その他への組込みに適合する担体と組み合わせることができる。吸入投与の場合は、好適な高圧ガスを用いた加圧パックまたは噴霧器によるエアゾールスプレイの形で従来通り送達される。P E D F 源または P E D F 4 4 A A ペプチド源は、例えば、ポーラス投与または連続的な輸液による投与のような、注入による非経口投与用に製剤することができる。そのような組成物は、油性または水性の媒体（ビヒクル）中で懸濁液、溶液または乳液の形状をとることができ、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤等の調合剤を含むことができる。皮膚への適用の場合は、P E D F 源または P E D F 4 4 A A ペプチド源を、好適なゲル、マグマ剤、クリーム、軟膏、またはその他の担体中に製剤化することが可能である。眼への適用の場合は、P E D F 源または P E D F 4 4 A A ペプチド源を、皮膚について記載したものに加えて、水性溶液、好ましくは生理学的に適合する緩衝液に製剤化することができる。P E D F 源または P E D F 4 4 A A ペプチド源は、当該技術分野で公知であるその他の医薬組成物にも製剤化できる。医薬組成物および製剤の詳細な説明は、本明細書に別途記載する。

#### 【0053】

上記のすべてに加え、本発明には、細胞内での外因性 P E D F の発現を調節する方法が含まれると理解されたい。例えば、細胞内を一時的に高酸素状態にすることで、細胞内での P E D F 産生をアップレギュレートすることが可能である。このような処理は、血管新生のダウンレギュレーションを誘導物質にとって有利となる。本発明は、本明細書に記載された各治療法に当該方法の適用も含むものであると理解されたい。

#### 【0054】

（定義）

本明細書で用いる場合には、本セクションで示される以下の用語はそれぞれ独自の意味を有するものである。

#### 【0055】

本明細書で用いる「隣接した」という用語は、介在するヌクレオチドを有さない、互いに直接結合しているヌクレオチド配列を表わす。例えば、5 個のヌクレオチド、5 - A A A A A - 3 と 3 個のヌクレオチド、5 - T T T - 3 は、これら二つが 5 - A A A A A T T T - 3 または 5 - T T T A A A A A - 3 のように結合している場合は隣接していると言える。しかし、これら二つが 5 - A A A A A C T T T - 3 のように結合している場合には隣接しているとはいえない。

#### 【0056】

本明細書で用いる「症状（symptom）を緩和する」という用語は、症状の重篤度を低減することを意味する。

#### 【0057】

本明細書で用いる「アミノ酸」は、下記の表に示すように、正式名称、三文字表記、または一文字表記で表わされる。

#### 【0058】

正式名称、三文字表記、一文字表記：

アスパラギン酸、A s p、D；グルタミン酸／グルタミン酸塩、G l u、E；  
 リシン、L y s、K；アルギニン、A r g、R；ヒスチジン、H i s、H；  
 チロシン、T y r、Y；システイン、C y s、C；アスパラギン、A s n、N；  
 グルタミン、G l n、Q；セリン、S e r、S；トレオニン、T h r、T；  
 グリシン、G l y、G；アラニン、A l a、A；バリン、V a l、V；

10

20

30

40

50

ロイシン、L e u、L ; イソロイシン、I l e、I ; メチオニン、M e t、M ;  
プロリン、P r o、P ; フェニルアラニン、P h e、F ; トリプトファン、T r p、W  
【 0 0 5 9 】

遺伝子の「コード領域」は遺伝子のコード鎖のヌクレオチド残基からなり、遺伝子のコード鎖のヌクレオチドと遺伝子の非コード鎖のヌクレオチドとはそれぞれ遺伝子の転写によって産生されるm R N A分子のコード領域と相同または相補的である。

【 0 0 6 0 】

遺伝子の「m R N A - コード領域」は遺伝子のコード鎖のヌクレオチド残基からなり、遺伝子のコード鎖のヌクレオチドと遺伝子の非コード鎖のヌクレオチドとはそれぞれ遺伝子の転写によって産生されるm R N A分子のコード領域と相同または相補的である。真核細胞内で何かのきっかけでm R N Aプロセッシングが起こる場合、プロセッシングがゲノム内で起こる際に、遺伝子のm R N A - コード領域は単一領域または遺伝子内で互いに分離している複数の領域を含むことが判っている。遺伝子のm R N A - コード領域が遺伝子内の分離した領域を含む場合、「m R N A - コード領域」は、これらの個々の領域及び全体的な領域の両方を意味する。

10

【 0 0 6 1 】

本明細書で用いる「相補的」とは、二つの核酸、例えば、二つのD N A分子の間でのサブユニット配列の相補性を表わす幅広い概念である。両方の分子内のヌクレオチドの位置が互いに正常に塩基対合するヌクレオチドで占められている場合、核酸はこの位置で互いに相補的であると考えられる。したがって、それぞれの分子内で対応する位置の実質的な数（少なくとも5 0 %）が、互いに正常に塩基対合する（例えば、A : TおよびG : Cのヌクレオチド対合）ヌクレオチドで占められている場合、二つの核酸は互いに相補的であると言える。

20

【 0 0 6 2 】

「病状（condition）」はホメオスタシスを維持できない動物の健康状態のことであり、疾患が改善されないとその動物の健康状態は悪化し続ける。疾患の症状の重篤度、患者に症状が起きる頻度、またはその両方が低減すると、疾患は「緩和される」。

【 0 0 6 3 】

「コード化（encoding）」は、定義済みのヌクレオチド配列（すなわち、r R N A、t R N A、およびm R N A）または定義済みのアミノ酸配列のいずれかを有し、又、それらから生じる生物学的特性を有するその他のポリマーおよび巨大分子を合成するための生物学的過程において、鋳型として機能する、遺伝子、c D N A、またはm R N A等のポリヌクレオチド内での特定のヌクレオチド配列に固有な特性を意味する。このように、細胞またはその他の生体系内で、遺伝子に対応するm R N Aの転写および翻訳によってタンパク質が産生されれば、遺伝子がタンパク質をコード化していると言える。コード鎖、すなわち、通常は配列表で示され、m R N Aの配列と同一なヌクレオチド配列と、遺伝子すなわちc D N Aの転写の鋳型として使用される非コード鎖との両方は、遺伝子またはc D N Aからのタンパク質又は他の産物をコード化していると言える。

30

【 0 0 6 4 】

他に明記しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列（nucleotide sequence encoding an amino acid sequence）」は、互いに縮重しており同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチド配列が含まれる。タンパク質およびR N Aをコードする（encode）ヌクレオチド配列は、イントロンを含むことができる。

40

【 0 0 6 5 】

本明細書で用いる「相同な」とは、二つのポリマー分子間の、例えば二つの核酸分子間の、例えば二つのD N A分子間またはR N A分子間の、あるいは二つのポリペプチド分子間の、サブユニット配列の類似性を意味する。二つの分子の両方のサブユニット位置が同じモノマーサブユニットで占められている場合、例えば、二つのD N A分子内の位置が同じアデニンで占められている場合、二つの分子はその位置に関して相同である。二つの配列間の相同性は、合致しているすなわち相同な位置の数の一次関数で表わされ、例えば、

50

二つの化合物配列において半分の位置（例えば、10サブユニット長のポリマーにおいて5つの位置）が相同であれば二つの配列の相同性は50%であり、90%の位置、例えば、10個の位置の中で9個が合致しているすなわち相同ならば、二つの配列は90%の相同性を有していると言える。例えば、DNA配列の3'-ATTGCC-5'と3'-TATGGC-5'とは50%の相同性を有している。

#### 【0066】

本明細書で用いる「相同性（homology）」は「同一性（identity）」と同じ意味で使われる。

#### 【0067】

二つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間の相同率の決定は、数学的アルゴリズムを用いて実施できる。例えば、二つの配列の比較に有用な数学的アルゴリズムは、KarlinおよびAltschulのアルゴリズム（1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264~2268）、KarlinおよびAltschulの修正アルゴリズム（1993年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873~5877）である。これらのアルゴリズムはAltschulらのNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（1990年、J. Mol. Biol. 215: 403~410）に取り込まれ、例えば、ユニバーサル・リソース・ロケータ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> を有する国立バイオ技術情報センター（NCBI）のウェブサイトからアクセスできる。本明細書に記載した核酸配列と相同であるヌクレオチド配列を求めるための、BLASTでのヌクレオチドのサーチは、NBLASTプログラム（NCBIのウェブサイトでは `blastn` となっている）を使い、以下のパラメーター：ギャップペナルティー=5；ギャップエクステンションペナルティー=2；ミスマッチペナルティー=3；マッチリワード=1；期待値=10.0；ワードサイズ=11を用いて実施できる。本明細書に記載したタンパク質分子と相同であるアミノ酸配列を求めるための、BLASTでのタンパク質のサーチは、XBLASTプログラム（NCBIのウェブサイトでは `blastn` となっている）またはNCBIの `blastp` プログラムを使い、以下のパラメーター：期待値=10.0；BLOSUM62スコアリングマトリックスを用いて実施できる。比較の目的でギャップアライメントを求めるためには、Altschulら（1997年、Nucleic Acids Res. 25: 3389~3402）に記載のGapped BLASTを使用できる。あるいは、相同性が低い分子間の関係および共通のパターンを有する分子間の関係を反復してサーチするには、PSI-BLASTまたはPHI-BLASTを使用できる。BLASTプログラム、Gapped BLASTプログラム、PSI-BLASTプログラム、およびPHI-BLASTプログラムを使用する際、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターを使用できる。 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> を参照されたい。

#### 【0068】

二つの配列間の相同率は、ギャップの許容如何にかかわらず、上記と同様の技術を用いて決定できる。相同率を計算する際は、一般に確実に合致した数をカウントする。

#### 【0069】

「単離された核酸」とは、天然の状態で隣接する配列から分離された核酸のセグメントまたは断片、例えば正常な状態で断片に隣接する配列（例えば、天然のゲノム内でゲノム配列に隣接する断片）から分離されたDNA断片、を意味する。この用語は、核酸に天然に付随する他の成分（細胞内で天然に核酸に含まれる、例えばRNA、DNAまたはタンパク質）が除去され、実質的に精製された核酸にも適用される。したがって、この用語には、例えば、ベクター内に、自律的に複製するプラスミドまたはウイルス内に、に取り込まれた組換えDNA、原核細胞または真核細胞のゲノムDNA内に、に取り込まれた組換えDNA、あるいは他の配列から独立して分離された分子として（例えば、PCRまたは制限酵素の消化によって生成されたcDNAまたは、ゲノム若しくはcDNAの断片とし

て) 存在する組換えDNAが含まれる。この用語には、付加的なポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である、組換えDNAも含まれる。

【0070】

「稼動可能に結合された (operably linked)」二つのポリヌクレオチドとは、一本鎖または二本鎖の核酸部位が、二つのポリヌクレオチドの内の少なくとも一方が生理学的効果を発揮できるように他方に対して特徴付けられて核酸内に配置された二つのポリヌクレオチドを含むことを意味する。例えば、遺伝子のコード領域に稼動可能に結合されたプロモーターは、コード領域の転写をプロモートすることができる。

【0071】

「ポリヌクレオチド」は、核酸の一本鎖または平行鎖および逆平行鎖を意味する。したがって、ポリヌクレオチドは一本鎖核酸または二本鎖核酸のいずれであってもよい。 10

【0072】

「核酸」という用語は、一般に、高分子物質であるポリヌクレオチドを意味する。

【0073】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、通常、短いポリヌクレオチド、一般に約50ヌクレオチド未満のポリヌクレオチドを意味する。ヌクレオチド配列がDNA配列(すなわち、A、T、G、C)で表わされる場合、オリゴヌクレオチドには、「T」が「U」に置き換わったRNA配列も含まれる。

【0074】

ポリヌクレオチド配列を記載するのに、本明細書では従来からの表記法を用い、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左端は5'末端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左端方向は5'末端方向と呼ばれている。 20

【0075】

新生RNA転写産物にヌクレオチドが付加される、5'から3'への方向を転写方向と呼ぶ。mRNAと同じ配列を有するDNA鎖は「コード鎖」と呼ばれ、DNA上の基準点より5'側に位置するDNA鎖上の配列は「上流配列」と呼ばれ、DNA上の基準点より3'側に位置するDNA鎖上の配列は「下流配列」と呼ばれる。

【0076】

本明細書で用いる「プロモーター/調節配列」という用語は、プロモーター/調節配列に稼動可能に結合された遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を意味する。いくつかの場合で、この配列はコアプロモーター配列であり、他の場合に、この配列は、エンハンサー配列、および遺伝子産物の発現に必要な他の調節要素も含むことができる。プロモーター/調節配列は、例えば、組織特異的に遺伝子産物を発現するものであってよい。 30

【0077】

「構成的プロモーター」とは、細胞内で一定して、それ自体に稼動可能に結合された遺伝子の発現を促進するプロモーターである。例えば、細胞のハウスキーピング遺伝子の発現を促進するプロモーターは構成的プロモーターと考えられる。

【0078】

「誘導性の」プロモーターとは、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドに稼動可能に結合された時、生きた細胞内で実質的にはプロモーターに対応する誘導物質がその細胞内に存在する場合にのみ、産生すべき遺伝子産物を誘導するヌクレオチド配列である。 40

【0079】

「組織特異的な」プロモーターとは、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドに稼動可能に結合された時、生きた細胞内で実質的にはその細胞がプロモーターに対応する組織種の細胞である場合にのみ、産生すべき遺伝子産物を誘導するヌクレオチド配列である。

【0080】

相同度が少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約90%、あるいは少なくとも約95%であるオリゴヌクレオチドのみがアニールされる条件下で、二つのオリゴヌクレオ 50

チドをアニールする場合、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドとは「高度にストリンジェントな条件下で」アニールされる。二つのオリゴヌクレオチドのアニールに用いられるストリンジェンシーの条件は、他の多くの要因の内、温度、アニーリング媒体のイオン強度、インキュベーション期間、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドのGC含量、そして、もし、分かるならば、二つのオリゴヌクレオチド間で予測される非相溶性の度合い、によって決まる。アニーリング条件のストリンジェンシーを調節する方法は公知である (Sambrookら、1989年、分子クローニング：実験室用マニュアル、第2版、Cold Spring Harbor Press, New York, を参照のこと)。

#### 【0081】

10

「予防的な」治療は、疾患に伴う病理学的症状が進行するリスクを軽減する目的で、疾患の兆候を示さないあるいは疾患の初期の兆候のみを示す患者に対して施す治療である。

#### 【0082】

「治療的な」処置とは、病理学的な兆候を示す患者に対して、病理学的な兆候を軽減させるまたは消退させる目的で、施す処置のことである。

#### 【0083】

化合物の「治療有効量」とは、その化合物が投与された患者に対して有益な効果を与えるのに十分な化合物の量のことである。「ベクター」は、単離された核酸および単離された核酸を細胞の内部に送達するのに使用できるものを含む組成物である。線形ポリヌクレオチド、イオン性のまたは両親媒性の化合物を伴うポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスを含め、数多くのベクターが当該技術分野に於いて公知であるが、これらに限定されるものではない。したがって、「ベクター」という用語には、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスが含まれる。この用語には、核酸の細胞内への転移を容易にする非プラスミド化合物および非ウイルス化合物、例えば、ポリリシン化合物、リボソーム、その他等が含まれると理解されたい。ウイルスベクターの例には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

#### 【0084】

「発現ベクター」とは、発現させようとするヌクレオチド配列に稼動可能に結合された発現調節配列を含む組換えポリヌクレオチドを有するベクターを意味する。発現ベクターには、発現に十分なシス作用要素が含まれ、発現に必要なその他の要素は宿主細胞によって、またはインビトロ発現システム内で供給される。発現ベクターには、当該技術分野で公知な、コスミド、(例えば、裸のまたはリボソームに収納された)プラスミド、および組換えポリヌクレオチドを取り込ませたウイルス等の発現ベクターが含まれる。

30

#### 【0085】

#### ペプチドの修飾および合成

以下のセクションでは、ペプチドの修飾およびペプチドの合成について記載する。当然ながら、本発明の方法において有用なペプチドは、活性に影響することなく修飾されているアミノ酸残基を取り込めるものと理解されたい。例えば、遮断基、すなわち「望ましくない分解」からN末端およびC末端を保護するおよび/または安定化するのに適した化学的置換基を末端に含むように誘導することができ、「望ましくない分解」には、化合物の機能に影響する、すなわち末端で化合物を逐次的に分解する、可能性のある末端での化合物のすべての種類の酵素的分解、化学的分解、または生化学的分解が含まれる。

40

#### 【0086】

遮断基には、ペプチドのインビボ活性に不利に影響することがなく、ペプチド化学の分野で従来から使われてきた保護基が含まれる。例えば、好適なN末端遮断基は、N末端のアルキル化またはアシル化によって導入することができる。好適なN末端遮断基の例には、C<sub>1</sub> ~ C<sub>5</sub> で分岐または非分岐のアルキル基、ホルミル基およびアセチル基等のアシル基、さらにはアセトアミドメチル (Ac<sub>m</sub>) 基等のそれらの置換体が含まれる。アミノ酸の脱アミノ類似体も有用なN末端遮断基であり、ペプチドのN末端に結合させるまたはN

50

末端残基の代わりに使用することができる。C末端のカルボキシル基を取り込む場合または取り込まない場合も、好適なC末端遮断基の例には、エステル基、ケトン基、またはアミド基が含まれる。エステルまたはケトンを形成するアルキル基、特にメチル基、エチル基、およびプロピル基等の低級アルキル基、ならびに第一級アミノ基 ( $-NH_2$ )、メチルアミノ基、エチルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、メチルエチルアミノ基等のモノアルキルアミノ基およびジアルキルアミノ基等のアミド形成アミノ基がC末端遮断基の例である。アグマチン等の脱カルボキシル化アミノ酸類似体も有用なC末端遮断基であり、ペプチドのC末端に結合させるまたはC末端残基の代わりに使用することができる。また、ペプチドの活性に影響することなく、末端のフリーのアミノ基およびカルボキシル基を両方ともペプチドから除去して、脱アミノ基型で脱カルボキシル基型のペプチドを生成できるものと理解されたい。

10

#### 【0087】

ペプチドの生物活性に不利に影響することなく他の修飾を導入することもでき、そのような修飾には、天然のL型のアミノ酸の一つまたはそれ以上をD型等尺のアミノ酸で置換することが含まれるが、これに限定されるものではない。このように、ペプチドは一つまたはそれ以上のD型アミノ酸を含むことができ、あるいはすべてがD型のアミノ酸を含むことができる。本発明によるレトロ逆転型のペプチド、例えば、すべてのアミノ酸がD型のアミノ酸で置換されている逆転ペプチドも含まれる。

#### 【0088】

本発明の酸付加塩も機能上の均等物として含まれる。したがって、本発明によるペプチドを、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸、あるいは、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、蔞酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等の有機酸で処理し、本発明の方法での使用に適したペプチドの水溶性塩を調製する。

20

#### 【0089】

本発明は、本発明に開示する核酸によってコードされるタンパク質すなわちペプチドの類似体も提供する。類似体は、コンサバティブなアミノ酸配列の相違、またはアミノ酸配列に影響しない修飾、あるいはこれらの両方によって、天然のタンパク質すなわちペプチドと異なってもよい。

30

#### 【0090】

例えば、タンパク質すなわちペプチドの一次配列は変えるが、通常はその機能は変えないように、コンサバティブなアミノ酸配列の変更が可能である。一般にコンサバティブなアミノ酸の置換には以下の基に於ける置換が含まれる。

グリシン、アラニン；

バリン、イソロイシン、ロイシン；

アスパラギン酸、グルタミン酸；

アスパラギン、グルタミン；

セリン、トレオニン；

リシン、アルギニン；

フェニルアラニン、チロシン；

40

#### 【0091】

前記のように、修飾（通常は一次配列を変えない）には、ポリペプチドのインビボまたはインビトロでの化学的誘導、例えば、アセチル化、またはカルボキシル化が含まれる。例えば、その合成中、プロセッシング中、その先のプロセッシングステップ中にポリペプチドのグリコシル化パターンを変更すること、例えば、グリコシル化に影響する酵素、例えば哺乳動物のグリコシル化酵素または脱グリコシル化酵素にポリペプチドを曝らすことによって、グリコシル化の変更も誘導される。リン酸化されたアミノ酸残基、例えば、リン酸化チロシン、リン酸化セリン、またはリン酸化トレオニン、を有する配列も含まれる。

#### 【0092】

50

通常の分子生物学的技術を用いて、タンパク質分解への耐性を改善した、または溶解特性を最適化した、あるいは治療薬として改善した、ポリペプチドも含まれる。そのようなポリペプチドの類似体には、天然のL型アミノ酸以外の残基、例えば、D型アミノ酸または非天然の合成アミノ酸、を含むポリペプチドが含まれる。本発明のペプチドは、本明細書に記載した特定の例示のプロセスの産物に限定されるものではない。

#### 【0093】

本発明のペプチドは、Stewartら、固相ペプチド合成、第2版、1984年、Pierce Chemical Company、Rockford、Ill.、並びにBodanszkyおよびBodanszky、ペプチド合成の実際、1984年、Springer-Verlag、New Yorkに記載のように、標準的で十分によく確立された固相ペプチド合成法(SPPS)で容易に調製できる。最初に、好適に保護したアミノ酸残基をそのカルボキシル基を介して、架橋したポリスチレンまたはポリアミド樹脂等の誘導体である不溶性のポリマー支持体に結合する。「好適に保護した」とは、アミノ酸の - アミノ基と側鎖の官能基を保護基で保護したことを意味する。側鎖の保護基は一般に合成中に用いられる、溶剤、試薬、および反応条件に対して安定であり、最終的なペプチド産物に影響しない条件下で除去可能である。最初のアミノ酸からN-保護基を除去し、そこに望ましいペプチドの配列中の次のアミノ酸のカルボキシル末端を結合させることにより、オリゴペプチドの逐次的合成を実施する。このアミノ酸も好適に保護する。組み込まれたアミノ酸のカルボキシル基は、対称な酸無水物であるカルボジイミド、あるいはヒドロキシベンゾトリアゾール基またはペンタフルオロフェニルエステル基等の「活性なエステル」基と反応性基を形成して活性化され、支持体に結合されたアミノ酸のN末端と反応する。

10

20

#### 【0094】

固相ペプチド合成法の例には、アミノ保護基としてt-ブチルオキシカルボニル基を用いるBOC法、およびアミノ酸残基の - アミノ基の保護に9-フルオレニルメチロキシカルボニル基を用いるFMOC法が含まれ、いずれの方法も当業者によく知られている。従来からの固相ペプチド合成法のプロトコルを用いてN-遮断基および/またはC-遮断基の取込みも実施できる。C末端の遮断基を取り込むために、例えば、望ましいペプチドの合成は一般に、樹脂との結合を切断するとペプチドが望ましいC末端遮断基を有するように化学的に修飾された支持体樹脂を固相として用いて実施される。C末端に第一級アミノ基の遮断基を有するペプチドを調製するため、例えば、合成は、ペプチド合成が終了した時にフッ化水素酸で処理すると望ましいC末端がアミド化されたペプチドが放出されるように、p-メチルベンズヒドリルアミン(MBHA)を用いて実施される。同様に、C末端でのN-メチルアミン遮断基の取込みは、HFで処理するとC末端がN-メチルアミド化されたペプチドが放出される、N-メチルアミノエチル化DVB樹脂を用いて実施される。エステル化によるC末端の遮断も従来からの手順に従って実施できる。この場合は、次に望ましいアルコールとの反応を可能にしてエステル基が形成されるように、側鎖であるペプチドの樹脂からの放出を可能にする、樹脂と遮断基との組合せが必要である。メトキシアルコキシベンジルアルコールまたはそれに相当するリンカーを有するDVB樹脂誘導体と組み合わせたFMOC保護基は、ジクロロメタン中のTFAで支持体から切断され、この目的で使用できる。例えばDCCで、好適に活性化されたカルボキシル基のエステル化は、望ましいアルコールを加えることで実施でき、その後エステル化されたペプチド産物の脱保護および単離が行われる。

30

40

#### 【0095】

N末端遮断基の取込みは、合成されたペプチドが樹脂に結合している間に、例えば、好適な酸無水物およびニトリルで処理することによって実施される。N末端にアセチル遮断基を取り込むため、例えば、樹脂に結合したペプチドをアセトニトリル中の20%酢酸無水物で処理することができる。次にN遮断ペプチド産物を樹脂から切断し、脱保護、続いて単離を行うことができる。

#### 【0096】

50

化学的合成法または生物学的合成法で得られたペプチドが望ましいペプチドであることを確認するため、ペプチド組成物を分析する必要がある。このようなアミノ酸組成物の分析は、ペプチドの分子量を決定するため、高解像マス・スペクトル法を用いて実施できる。また更に、ペプチドのアミノ酸含量は、ペプチドを水性酸中で加水分解し、分離し、混合物の成分をHPLCまたはアミノ酸分析器を用いて同定および定量することによって確認できる。ペプチドを逐次的に分解してアミノ酸を順番に同定する、タンパク質配列決定装置もペプチドの配列を確実に決定するのに使用できる。

#### 【0097】

本発明の方法における使用に先立って、ペプチドを精製して不純物を除去する。この点に関して、しかるべき規制機関が定めた基準に適合するようにペプチドを精製することを理解されたい。従来からの数多くの精製法のいずれか一つ、例えば、C<sub>4</sub>-、C<sub>8</sub>-、またはC<sub>18</sub>-シリカ等のアルキル化シリカカラムを用いる逆相高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、を使用して必要な純度レベルを達成できる。有機含量が増大するグラジエント移動相、例えば、通常は少量のトリフルオロ酢酸を含む、水性緩衝液中のアセトニトリル、が一般的に精製に使用される。イオン交換クロマトグラフィーもその電荷に基づいてペプチドを分離するのに使用できる。

10

#### 【0098】

##### PEDFの生物活性を有する候補薬剤を同定するためのアッセイ

本明細書で用いる「薬剤」または「化合物」という用語は、PEDFの生物学的作用を模倣するまたは達成する能力を有する、例えば、タンパク質または薬剤等の分子を示す。一般に、異なる薬剤濃度の複数のアッセイ混合物を並行して分析し、様々な濃度に対する反応差を求める。通常、これらの濃度の内の一つ、すなわち濃度がゼロまたは検出域以下のもの、が陰性対照として使用される。

20

#### 【0099】

候補薬剤(化合物)には多数の化学種が含まれるが、通常それらは有機分子であり、好ましくは50ダルトン超、約2,500ダルトン未満の分子量を有する小有機化合物である。候補薬剤には、タンパク質との構造的な相互作用、特に水素結合、のために必要な官能基が含まれ、一般的に、少なくとも、アミン基、カルボニル基、水酸基、またはカルボキシル基、好ましくは、少なくとも二つの官能性化学基が含まれる。候補薬剤には、一つまたはそれ以上の上記の官能基で置換された、環状炭素構造またはヘテロ環構造および/または芳香族構造またはポリ芳香族構造が含まれることが多い。候補薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体、構造類似体、または組合せを含む生体分子から見出される場合もあるが、それらに限定されるものではない。

30

#### 【0100】

候補薬剤は、合成または天然の化合物のライブラリーを含め、幅広い源(sources)から得られる。例えば、ランダム化されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含め、幅広い有機化合物および生体分子のランダムなまたは直接的な合成のための多くの手段を利用できる。あるいは、細菌、真菌、植物、および動物からの抽出物としての天然の化合物のライブラリーが利用できる、または容易に構築できる。さらに、天然にまたは合成的に生成されたライブラリーおよび化合物は、従来からの、化学的手段、物理的手段、および生化学的手段を介して容易に修飾でき、組合せライブラリーの構築に使用できる。公知の薬理学的薬剤は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化等の直接的なまたはランダムな化学的修飾に供して、構造類似体を調製することができる。スクリーニングは、公知の薬理学的に活性な化合物およびその化学的類似体を対象にすることができる。

40

#### 【0101】

スクリーニングアッセイがPEDFの受容体を利用する結合測定法(米国特許仮出願第60/493,713号、2003年8月7日出願を参照されたい。また、参照することにより、その全てを本明細書に取り込むものとする。)である場合、分子の一つまたはそれ以上を標識に結合することができ、標識は直接的にまたは間接的に検出可能なシグナル

50

を提供できる。様々な標識には、放射性同位元素、蛍光体、化学発光剤、酵素、特異的結合分子、粒子、例えば磁性粒子等が含まれる。特異的結合分子には、ビオチンとストレプトアビジン、ジゴキシンと抗ジゴキシン等の対が含まれる。特異的結合部材の場合、公知の手順にしたがって、通常は相補的な部材が特異的結合分子で標識され、検出可能になる。

#### 【0102】

様々な他の試薬もスクリーニングアッセイに含めることができる。好適なタンパク質 - タンパク質結合を容易にするためにおよび / または非特異的な相互作用またはバックグラウンドでの相互作用を低減するために使用される、塩のような試薬、中性のタンパク質、例えばアルブミン、界面活性剤等が含まれる。プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等のアッセイの有効性を改善する試薬も使用できる。各成分の混合物は、必要な結合を可能とする順に加えられる。インキュベーションは、好適な温度、一般には4 ~ 40で行われる。インキュベーション時間は、最適な活性が得られるように選択されるが、高速ハイスループットスクリーニングに合わせることもできる。

10

#### 【0103】

##### 医薬組成物

本明細書に記載する方法のいずれかを用いて同定され、本明細書に開示する疾患の治療のために製剤して投与できる、化合物を説明する。

#### 【0104】

本発明には、有効成分として本発明の方法において有用な化合物を含む医薬組成物の調製および使用が含まれる。このような医薬組成物は、有効成分のみを、患者に対して適した形態で投与することができ、あるいは医薬組成物は、有効成分および、一種またはそれ以上の薬学的に許容される担体、一種またはそれ以上の追加成分、またはこれらのいくつかの組合せを含むことができる。有効成分は、当該技術分野でよく知られているように、医薬組成物内で、生理学的に許容されるカチオンまたはアニオンとの組合せのような生理学的に許容されるエステルまたは塩の形で存在できる。

20

#### 【0105】

本明細書で用いる「薬学的に許容される担体」という用語は、それと有効成分を組み合わせることが可能であり、組合せることにより有効成分を患者に投与するために使用できる、化学組成物を意味する。

30

#### 【0106】

本明細書で用いる「生理学的に許容される」エステルまたは塩は、医薬組成物の他のいかなる成分とも親和性を有し、医薬組成物を投与する患者に有害ではない、有効成分のエステルまたは塩の形を意味する。

#### 【0107】

本明細書に記載する医薬組成物の製剤は、公知の方法または薬理学の分野で今後開発されるいかなる方法によっても調製することができる。一般に、このような調製方法には、有効成分を担体あるいは一種またはそれ以上の添加成分と組み合わせるステップと、その後、必要もしくは望ましい場合に、製剤を単回投与単位または多回投与単位に成型またはパッキングするステップとが含まれる。

40

#### 【0108】

本明細書に記載の医薬組成物は、主にヒトへの投与に適した医薬組成物を対象としているが、そのような組成物が一般にすべての種類の動物への投与にも適していることは、当業者であれば理解されるところである。ヒトへの投与に適した医薬組成物を、様々な動物への投与に適した組成物とするために改変することはよく知られており、当業者たる獣医薬理学者であれば、必要に応じて通常の実験を行うだけで、改変を設計・実施することができる。本発明の医薬組成物の投与対象と考えられるものには、ヒトおよび他の霊長類、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、およびイヌ等の商業用途で飼育される哺乳動物等の哺乳動物、ニワトリ、カモ、ガチョウ、およびシチメンチョウ等の商業用途で飼育される鳥類等の鳥類が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の方法において有

50

用な医薬組成物は、経口、直腸、膣、非経口、局所、肺、鼻腔内、口腔内、眼、クモ膜下、またはその他の投与経路に適した製剤で、調製、梱包、または販売することができる。他に考えられる製剤には、注入用のナノ粒子、リポソーム製剤、有効成分を含んで放出される赤血球、免疫学に基づく製剤がある。

#### 【0109】

本発明の医薬組成物は、単回投与単位としてまたは単回投与単位の複数回分として大量に、調製、梱包、または販売することができる。本明細書で用いる「単位投与」とは、所定量の有効成分を含む個別量の医薬組成物のことである。一般に有効成分の量は、患者に投与される有効成分の用量または、例えば用量の半分または三分の一等の好都合な部分用量に等しい量である。

10

#### 【0110】

本発明の医薬組成物における、有効成分、薬学的に許容される担体、および追加成分の相対的な量は、成分自体、医薬組成物の大きさ、治療される患者の状態によって、さらには医薬組成物を投与する経路によって異なる。例えば、医薬組成物は0.1%~100% (w/w) の有効成分を含むことができる。

#### 【0111】

有効成分に加えて、本発明の医薬組成物はさらに一種またはそれ以上の追加の医薬として有効な薬剤を含むことができる。特に考えられる追加の薬剤には、制吐剤、並びにシアン化物およびシアン酸塩捕捉剤等の捕捉剤が含まれる。

#### 【0112】

本発明の医薬組成物の放出制御型製剤または徐放性製剤も従来からの技術を用いて調製できる。

20

#### 【0113】

経口投与に適した本発明の医薬組成物の製剤は、それぞれが所定量の有効成分を含む、錠剤、硬質または軟質のカプセル、カシェ剤、トローチ、あるいはロゼンジを含め、個別の固形の投与単位で、調製、梱包、または販売することができるが、これらに限定されるものではない。経口投与に適した他の製剤としては、粉末状または顆粒状の製剤、水性または油性の懸濁液、水性または油性の溶液またはエマルジョンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0114】

本明細書で用いる「油性の」液体とは、炭素を含む液体分子を含み、水より低い極性を示す、液体のことである。

30

#### 【0115】

有効成分を含む錠剤は、例えば、有効成分を、一種またはそれ以上の追加成分を含んでもよいが、圧縮または成型することで調製される。圧縮成型錠剤は、好適な装置内で、粉末状または顆粒状等の自由流動型の有効成分を、一種またはそれ以上の結合剤、潤滑剤、賦形剤、界面活性剤、および分散剤を混合してもよいが、圧縮することによって調製できる。成型錠剤は、好適な装置内で、有効成分、薬学的に許容される担体、および少なくとも混合物を湿潤するのに十分な液体の混合物を、成型加工することによって調製できる。錠剤の調製において使用される薬学的に許容される賦形剤には、不活性な希釈剤、顆粒化剤および崩壊剤、結合剤、および潤滑剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の分散剤には馬鈴薯のデンプンおよびデンプングリコール酸ナトリウムが含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の界面活性剤にはラウリル硫酸ナトリウムが含まれるが、これに限定されるものではない。公知の希釈剤には、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、微結晶セルロース、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、およびリン酸ナトリウムが含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の顆粒化剤および崩壊剤にはコーンスターチおよびアルギン酸が含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の結合剤には、ゼラチン、アラビアゴム、ゼラチン化前のトウモロコシのデンプン、ポリビニルピロリドン、およびヒドロキシプロピルメチルセルロースが含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の潤滑剤には、ステアリン酸マグネシ

40

50

ウム、ステアリン酸、シリカ、およびタルクが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0116】

錠剤は被覆されていなくてもよいが、有効成分が徐放吸収されるように、患者の胃腸管内での崩壊を遅らせるために公知の方法を用いて被覆されていてもよい。錠剤を被覆するのに、例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の材料を用いてもよい。例えば、米国特許第4,256,108号、第4,160,452号、及び第4,265,874号に記載の方法を用いて、錠剤を被覆して、浸透性の放出制御型錠剤を調製することができる。錠剤はさらに、甘味料、香味料、着色剤、保存料、または洗練され口当たりの良い製剤にするために、これらのいくつかの組合せを含むことができる。

10

【0117】

有効成分を含む硬質カプセルは、ゼラチン等の生理学的に分解される組成物を用いて調製できる。このような硬質カプセルは有効成分を含み、さらには、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、またはカオリン等の不活性な固形希釈剤を含む追加成分を含むことができる。

【0118】

有効成分を含む軟質カプセルは、ゼラチン等の生理学的に分解される組成物を用いて調製できる。このような軟質カプセルは有効成分を含み、有効成分は、水あるいは落花生油、液状パラフィン、またはオリーブ油等の油性媒体と混合することができる。

20

【0119】

経口投与に適した、本発明の医薬組成物の液状製剤は、液状で、あるいは使用前に水またはその他の好適な媒体（ビヒクル）で再構成するように乾燥製品の形で、調製、梱包、及び販売することができる。

【0120】

液状懸濁製剤は、従来からの方法を用いて、有効成分を水性または油性の媒体中に懸濁させて、調製することができる。水性媒体には、例えば、水および等張性生理食塩水が含まれる。油性媒体には、例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、落花生油、オリーブ油、ゴマ油、またはココナツ油等の植物油、分別植物油、および液状パラフィン等の鉱油が含まれる。液状懸濁製剤はさらに、懸濁剤、分散剤または湿潤剤、乳化剤、粘滑剤、保存料、緩衝液、塩、香味料、着色剤、および甘味料を含む、一種またはそれ以上の追加成分を含むことができるが、これらに限定されるものではない。油性懸濁製剤はさらに粘稠化剤を含むことができる。公知の懸濁剤には、ソルビトールシロップ、水素化食用脂、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩、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等のセルロース誘導体が含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の分散剤または湿潤剤には、レクチン等の天然由来のリン脂質、アルキレンオキシドと、脂肪酸、長鎖脂肪族アルコール、脂肪酸およびヘキシトール由来の部分エステル化誘導体、または脂肪酸およびヘキシトール無水物由来の部分エステル化誘導体（例えば、それぞれ、ステアリン酸ポリオキシエチレン、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール、およびモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン）との縮合産物が含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の乳化剤には、レクチンおよびアラビアゴムが含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の保存料には、p - ヒドロキシ安息香酸メチルまたはp - ヒドロキシ安息香酸エチルまたはp - ヒドロキシ安息香酸n - プロピル、アスコルビン酸、およびソルビン酸が含まれるが、これらに限定されるものではない。公知の甘味料には、例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、蔗糖、およびサッカリンが含まれる。油性懸濁製剤のための公知の粘稠化剤には、例えば、蜜蝋、硬質パラフィン、およびセチルアルコールが含まれる。

30

40

【0121】

50

有効成分の水性または油性溶媒中の液状溶液は、液状懸濁製剤と実質的に同じやり方で調製でき、主な違いは、有効成分が溶媒に溶解しており、懸濁しているのではないことである。本発明の医薬組成物の液状溶液は、液状懸濁製剤に関して記載済みの成分のいずれをも含むことができ、有効成分の溶媒への溶解を助けるのに懸濁剤は不必要であることは理解されるものである。水性溶媒には、例えば、水および等張性生理食塩水が含まれる。油性溶媒には、例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、落花生油、オリーブ油、ゴマ油、またはココナツ油等の植物油、分別植物油、および液状パラフィン等の鉱油が含まれる。

#### 【0122】

本発明の医薬組成物の粉末状または顆粒状の製剤は、公知の方法を用いて調製できる。このような製剤は、例えば、錠剤として、カプセルに充填して、あるいは水性または油性の媒体に添加して、水性または油性の懸濁液または溶液として、患者に直接投与することができる。これらの製剤のそれぞれはさらに、一種またはそれ以上の、分散剤または湿潤剤、懸濁剤、および保存料を含むことができる。これらの製剤内に、充填剤および甘味料、香料、または着色剤等の付加的な賦形剤も含むことができる。

10

#### 【0123】

本発明の医薬組成物は、水中油型エマルジョンまたは油中水型エマルジョンの形でも、調製、梱包、または販売することができる。油相は、オリーブ油または落花生油等の植物油、液状パラフィン等の鉱油、またはこれらの組合せであってよい。このような組成物はさらに、アラビアゴムまたはトラガカントゴム等の天然のゴム、大豆油またはリン酸化レクチン等の天然由来のリン脂質、モノオレイン酸ソルビタン等の脂肪酸とヘキシトール無水物由来のエステルまたは部分エステル、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン等のエチレンオキシドとこれらの部分エステルとの縮合産物等の一種またはそれ以上の乳化剤を含むことができる。これらのエマルジョンは、例えば、甘味料または香料を含む、追加成分も含むことができる。

20

#### 【0124】

本発明の医薬組成物は、直腸投与に適した製剤の形で、調製、梱包、または販売することができる。そのような製剤は、例えば、坐剤、停留浣腸製剤、および直腸灌注用または結腸灌注用の溶液の形であってよい。

#### 【0125】

坐剤製剤は、有効成分と、通常室温（すなわち、約20℃）で固形であって、患者の直腸の温度（すなわち、健常なヒトの場合、約37℃）で液状である、非刺激性の薬学的に許容される賦形剤とを組み合わせることで調製することができる。薬学的に許容される好適な賦形剤には、カカオバター、ポリエチレングリコール、および種々のグリセリドが含まれるが、これらに限定されるものではない。坐剤製剤はさらに、抗酸化剤および保存料を含め、多様な追加成分を含むことができるが、これらに限定されるものではない。

30

#### 【0126】

停留浣腸製剤および直腸灌注用または結腸灌注用の溶液は、有効成分を薬学的に許容される液体担体とを組み合わせることによって調製できる。当該技術分野でよく知られているように、停留浣腸製剤は、患者の直腸の解剖学的構造に適合した送達器具を用いて、あるいは送達器具に充填して、投与することができる。停留浣腸製剤はさらに、抗酸化剤および保存料を含む多様な追加成分を含むことができるが、これらに限定されるものではない。

40

#### 【0127】

本発明の医薬組成物は、経膣投与に適した製剤の形で、調製、梱包、または販売することができる。そのような組成物は、例えば、坐剤、タンポン等の膣に挿入可能な含浸したまたは被覆した材料、膣灌製剤、又は膣灌注用のゲル、クリーム若しくは溶液であってよい。

#### 【0128】

材料を化学組成物で含浸または被覆する方法は当該技術分野で知られており、化学組成

50

物を表面上に浸漬または結合させる方法、材料（すなわち、生理学的に許容される材料等）の合成中に材料の構造内に化学組成物を取り込む方法、水性または油性の溶液または懸濁液を吸収性の材料に吸収させ、その後に乾燥させてもよいし、乾燥させなくてもよい方法が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0129】

腔灌製剤または腔灌注用の溶液は、有効成分と薬学的に許容される液体担体とを組み合わせることによって調製できる。当該技術分野でよく知られているように、腔灌製剤は、患者の腔の解剖学的構造に適合する送達器具を用いて、あるいは送達器具に充填して、投与することができる。腔灌製剤はさらに、抗酸化剤、抗生物質、抗真菌剤、および保存料を含め、多様な追加成分を含むことができるが、これらに限定されるものではない。

10

#### 【0130】

本明細書で用いる医薬組成物の「非経口投与」には、患者の組織の物理的な裂け目の特徴とする投与経路、およびその組織の裂け目を介する医薬組成物の投与が含まれる。このように、非経口投与には、組成物の注射による、外科的切開部を介する組成物の適用による、組織を貫通する非外科的創傷を介する組成物の適用等による、医薬組成物の投与が含まれるが、これらに限定されるものではない。特に、非経口投与には、皮下注射、腹膜内注射、筋肉注射、胸骨内注射、および腎臓透析注入法が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0131】

非経口投与に適した医薬組成物の製剤には、有効成分と、滅菌水または滅菌した等張性生理食塩水等の薬学的に許容される担体との組合せが含まれる。そのような製剤は、ボーラス投与または連続投与に適した形態で、調製、梱包、または販売することができる。注射可能な製剤は、アンプルまたは保存料を含む多用量容器等の単位投与形態で、調製、梱包、または販売することができる。非経口投与用の製剤には、懸濁液、溶液、油性または水性の媒体中のエマルジョン、ペースト、および皮下に埋め込み可能な、徐放性または生分解性の製剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。このような製剤はさらに、懸濁剤、安定化剤、または分散剤等の一種またはそれ以上の追加成分を含むことができるが、これらに限定されるものではない。非経口投与用の製剤の一態様では、非経口投与する前に組成物を好適な媒体（例えば、発熱物質除去した滅菌水）で再構成するために、有効成分は乾燥状態（すなわち、粉末状または顆粒状）で提供される。

20

30

#### 【0132】

本発明の医薬組成物は、滅菌され注射可能な水性または油性の懸濁液または溶液の形で、調製、梱包、または販売することができる。このような懸濁液または溶液は、当該技術分野で公知の方法に従って調製することができ、本明細書に記載するように、有効成分に加えて、分散剤、湿潤剤、または懸濁剤等の追加成分を含むことができる。このように滅菌され注射可能な製剤は、例えば、水または1,3-ブタンジオール等の非毒性で非経口投与に許容される希釈剤または溶剤を用いて調製することができる。他の許容される希釈剤または溶剤には、リンゲル液、等張性の食塩水、合成された合成のモノグリセリドまたはジグリセリド等の不揮発性油が含まれるが、これらに限定されるものではない。他の有用で非経口投与が可能な製剤には、有効成分を微結晶状態で含む製剤、リポソーム内に含

40

#### 【0133】

局所投与に適した製剤には、リニメント剤、のような液状または半液状の製剤；ローション；クリーム、軟膏またはペースト等の水中油型または油中水型のエマルジョン、あるいは溶液および懸濁液が含まれるが、これらに限定されるものではない。局所投与が可能な製剤は、例えば、約1%から約10%（w/w）までの有効成分を含むことができるが、有効成分の濃度は、有効成分の溶媒中の溶解限度と同程度であってもよい。局所投与用

50

の製剤はさらに、一種またはそれ以上の本明細書に記載する追加成分を含むことができる。

【0134】

本発明の医薬組成物は、口腔を介した肺への投与に適した剤形で、調製、梱包、または販売することができる。このような製剤は、有効成分を含み、直径が約0.5 nm～約7 nmの、好ましくは約1 nm～約6 nmの乾燥した粒子を含むことができる。このような組成物は、器具を使用して投与するため乾燥粉末の形態であることが好都合であるが、投与には、乾燥粉末が入っており、発射剤が吐出して粉末を分散させる容器を備えた器具を使用するか、または、有効成分が低沸点の発射剤に溶解または懸濁している密封容器を備えた、自己推進性の溶媒/粒子分散用の器具を使用する。このような粉末の粒子は、少なくとも98重量%の粒子の直径が0.5 nmを超えるもので、少なくとも95%の個数の粒子の直径が7 nm未満であることが好ましい。より好ましくは、少なくとも95重量%の粒子の直径が1 nmを超え、少なくとも90%の個数の粒子の直径が6 nm未満である。乾燥粉末の組成物が、砂糖等の固形の微細な粉末状希釈剤を含むことが好ましく、単位投与形態で好都合に提供される。

10

【0135】

一般に低沸点の発射剤には、常圧下で華氏65°未満の沸点を有する液状発射剤が含まれる。一般に発射剤は、組成物の50%～99.9%(w/w)を占めることができ、有効成分は組成物の0.1%～20%(w/w)を占めることができる。発射剤はさらに、液状の非イオン性界面活性剤、固形のアニオン性界面活性剤または(好ましくは、粒径が有効成分を含有する粒子と同レベルである)固形の希釈剤等の追加成分を含むことができる。

20

【0136】

肺への送達用に製剤された本発明の医薬組成物は、有効成分を溶液または懸濁液の液滴の形態で提供することもできる。そのような製剤は、水性のまたはアルコールで希釈された溶液または懸濁液として、滅菌されていてもよく、有効成分を含んで、噴霧器または霧吹き器を用いて好都合に投与が可能であるように調製、梱包、または販売することができる。そのような製剤はさらに、サッカリンナトリウム塩等の香味料、揮発性の油、緩衝剤、界面活性剤、またはヒドロキシ安息香酸メチル等の保存料を含んだ、一種またはそれ以上の追加成分を含むことができるが、これらに限定されるものではない。この投与経路で投与される液滴は、平均直径が約0.1 nm～約200 nmであることが好ましい。

30

【0137】

本明細書に記載する肺への送達に有用な製剤は、本発明の医薬組成物の鼻腔内への送達にも有用である。

【0138】

鼻腔内投与に適した他の製剤は、有効成分を含み、平均粒径が約0.2 μmから500 μmまでの、粒度の高い粉末である。そのような製剤は、嗅剤が吸収されるように投与される、すなわち、外鼻孔近くに保持された粉末の容器から鼻腔を介して急速に吸入される。

【0139】

鼻への投与に適した製剤は、例えば、わずかに約0.1%(w/w)～100%(w/w)もの有効成分を含むことができ、さらに、本明細書に記載する一種またはそれ以上の追加成分を含むことができる。

40

【0140】

本発明の医薬組成物は、口腔投与に適した製剤の形で、調製、梱包、または販売することができる。このような製剤は、例えば、従来からの方法を用いて調製された、錠剤またはロゼンジの形状であってよく、例えば、有効成分を0.1%～20%(w/w)含み、その他の成分として、口腔内で溶解するまたは分解される組成物を、そして任意に本明細書に記載の一種またはそれ以上の追加成分を含んでいてもよい。あるいは、口腔投与に適した製剤は、有効成分を含有する、粉末または、エアゾール化した若しくは霧状の溶液若

50

しくは懸濁液を含むことができる。このように粉末化、エアゾール化、または霧状にした製剤は、分散する際、平均粒径または液滴の大きさが約 0.1 nm ~ 約 200 nm の範囲内であることが好ましく、さらに、本明細書に記載する一種またはそれ以上の追加成分を含んでいてもよい。

#### 【0141】

本発明の医薬組成物は、眼への投与に適した製剤の形で、調製、梱包、または販売することができる。このような製剤は、例えば、0.1% ~ 1.0% (w/w) の有効成分が水性または油性の液状の担体に溶解または懸濁した、点眼剤の形態であってよい。このような点眼剤はさらに、本明細書に記載する、緩衝剤、塩、あるいは一種またはそれ以上の追加成分を含むことができる。他の有用である、眼に投与可能な製剤には、有効成分を微結晶状にまたはリポソーム内に含む製剤が含まれる。

10

#### 【0142】

本明細書で用いる時、「追加成分」には、一種またはそれ以上の、賦形剤；界面活性剤；分散剤；不活性な希釈剤；顆粒化剤および崩壊剤；結合剤；潤滑剤；甘味料；香料；着色剤；保存料；ゼラチン等の生理学的に分解可能なされる成分；水性の媒体水性媒体および溶剤；油性媒体および溶剤；懸濁剤；分散剤または湿潤剤；乳化剤；抗酸化剤；調粘剤；緩衝剤；塩；粘稠化剤；充填剤；乳化剤；抗酸化剤；抗生物質；抗真菌剤；安定剤；および薬学的に許容されるポリマー性または疎水性の材料が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の医薬組成物に含まれる、その他の「追加成分」は、当該技術分野公知であり、例えば、Genaro 編集、1985 年、レミントン社の薬剤科学、Mac k Publishing Co.、Easton、Pa に記載されている。当該記載は、これを参照して本明細書に取り込む。

20

#### 【0143】

PEDF を含む徐放性組成物は、特に有用である。例えば、徐放性組成物は、硝子体内および眼の裏側でも使用することができる。本明細書に記載したように、徐放性組成物は、PEDF の全身投与またはその他の送達経路において有用である。当業者であれば、目的の疾患を治療して望ましい結果を得るために使用できる好適な徐放性組成物を承知しているところである。

#### 【0144】

動物、好ましくはヒト、に投与できる、本発明の化合物の用量は一般に、動物の体重 1 kg 当り 1  $\mu$ g ~ 約 100 g である。投与される精確な用量は、動物の種類および治療対象の疾患の状態、動物の年齢、および投与の経路を含め、数多くの因子によって変るが、それらに限定されるものではない。本発明の化合物の用量は、動物の体重 1 kg 当り約 1 mg ~ 約 10 g であることが好ましい。用量が、動物の体重 1 kg 当り約 10 mg ~ 約 1 g であることがより好ましい。

30

#### 【0145】

本発明の化合物は、1 日数回の頻度で動物に投与することができ、あるいは、本発明の化合物は、1 日 1 回、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、1 月 1 回、といったより低い頻度で、あるいは、数ヶ月に 1 回または 1 年に 1 回またはそれ以下というさらに低い頻度で投与することができる。投与回数は、当業者には明らかであるが、治療する疾患の種類および重篤度、動物の種類および年齢等の数多くの因子によって異なるが、それらに限定されるものではない。

40

#### (実施例)

#### 【0146】

以下の実施例に於いて本発明をさらに説明するが、これらの実施例は説明の目的にのみ提供されるもので何ら本発明を限定するものではなく、寧ろ、本発明の教示により明らかになった如何なる変形も全て本発明に含まれるものと理解されたい。本明細書全般で引用された、引用文献、特許、公開された特許出願、さらには図も、参照して本明細書に取り込むものとする。

#### 【0147】

50

例証

次の実施例に於いて、以下にしめされる方法および材料を用いた。

**【0148】**PEDFの調製

ヒト組換えPEDFを、引用文献19に記載のようにして、ヒトの胎児の腎臓癌細胞293で産生した。引用文献43に記載の手順に従って、条件設定した媒体を用いてPEDFタンパク質を精製した。EDFは、モノS F P L Cカラムを通しNaClの直線勾配をかけてP溶出した(20 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 6.2、0 mMから500 mMのNaCl; 10%のグリセロール)。

**【0149】**合成ペプチドの調製

3種類のペプチド(図4a)を合成した。PEDFペプチド(PEDF<sub>pep</sub>)は、PEDFタンパク質の78番から121番のアミノ酸残基(GenBank(商標)の受託番号P36955)に相当する。ACTペプチド(ACT<sub>pep</sub>)は、PEDFタンパク質の73番から118番のアミノ酸残基(受託番号P01011)に相当する。キメラペプチド(CHIMERAP<sub>pep</sub>)は長さが44個のアミノ酸であり、PEDFからの40個のアミノ酸残基にACTまたはHSP47(受託番号P29043)からの4個のアミノ酸残基を加えたものである。

**【0150】**血管透過性に関する生理活性を評価するための硝子体内への注入

6~8週齢のC57BL/6Jマウスを、視力および眼科学研究協会の眼および視力研究における動物の使用に関する説明に基づいて処置した。麻酔するために、0.3~0.4 mlのリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS、1.06 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.15 MのNaCl、および3.00 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 7.4)中に溶解した20 mg/kgのケタミン、20 mg/kgのキシラジンおよび800 mg/kgのウレタンをそれぞれのマウスに筋肉注射した。10倍に希釈した、1 μlのマウスVEGF<sub>164</sub>(PBS中で12.6 ng/μl、R & D Systems社、ミネアポリス、ミネソタ州)を、先端の直径が13~20 μmで20°の斜端のガラスピペットを用いてマウスの一方の眼に注入した。もう一方の眼には、同じ容積のPBSのみを、または、12.6 ngのVEGF<sub>164</sub>および20倍モルのPEDF(232 ng)、ACT(278 ng)、HSP47(278 ng)、PEDF<sub>pep</sub>(28.1 ng)、ACT<sub>pep</sub>(29.7 ng)、またはCHIMERAP<sub>pep</sub>(28.2 ng)を含有するPBSを注入した。

**【0151】**フルオレセイン血管造影法

硝子体内注入の24時間後に、各瞳孔を1%の硫酸アトロピン1滴で膨張させた。25%のフルオレセイン0.1 mlを腹腔内注入した後、Kowa Genesisカメラで連続的に網膜の写真を撮った。最初の写真は、フルオレセインの腹腔内注入から20秒以内にとった。右目と左目の網膜写真を交互に撮影する際の経過時間は平均で10秒であった。フルオレセインの漏出は、不明瞭な血管の境界が蛍光でますます不明瞭になることで示された。

**【0152】**エバンスブルーアッセイ

本発明者らは、Qaumら記載の方法<sup>44</sup>を一部変更して用いた。簡単に説明すると、各マウスの硝子体内にタンパク質またはペプチドを注入し、エバンスブルー<sup>44</sup>を頸静脈に注射した。2時間後に、血液200 μlを採取し、エバンスブルーの量を測定した。網膜を押し出して、硝子体および付着している網膜の色素上皮と分離した。

**【0153】**

エバンスブルー-アルブミン複合体の濃度を測定するため、網膜抽出物および血漿サンプルの光学濃度を620 nmおよび740 nmで測定した。引用文献32、44に記載の式を用いて、網膜の乾燥重量、血漿中のエバンスブルー濃度、および循環時間で正規化し

10

20

30

40

50

た網膜内のエバンスブルーから網膜血管透過性を計算した。この実験では片方の眼に V E G F だけを注入したため、V E G F を注入した眼の網膜血管透過性は、片方の眼に P B S を注入されたマウスとセットにして正規化した。V E G F により誘導された血管透過性の増大を 100% とした。

#### 【0154】

##### B R C E C 遊走アッセイ

引用文献 45 に記載のように、ウシの網膜毛細血管内皮細胞 (B R C E C) を単離して培養した。アセチル化低密度リポタンパク質で標識した 1, 1' - ジオクタデシル - 3, 3', 3' - テトラメチル - インドカルボシアミンパークロレート (D i I - A c - L D L ; B i o m e d i c a l T e c h n o l o g i e s 社、ストートン、マサチューセッツ州) で処理した後に、B R C E C を蛍光細胞選別機でさらに精製した。継代 5 ~ 継代 9 の細胞を、D 型バリンおよび 2% ウシ胎児性血清を含む M E M 中で一晩、飢餓状態にした。ポリカーボネートフィルター (孔径 10  $\mu$ m、P V P F ; O s m o n i c 社、ミネトンカ、ミネソタ州) を 100  $\mu$ g /  $\mu$ l のコラーゲンで被覆した。M E M D 型バリン (28  $\mu$ l) 内の四分割した試験サンプル、および M E M D 型バリン (50  $\mu$ l) 内の 10<sup>4</sup> 個の細胞をそれぞれ、細胞走化性チャンバー (microchemotaxis chamber) (N e u r o P r o b e 社、ガイタースベルグ、メリーランド州) の下側のウェルと上側のウェルに配置した。37 で 8 時間インキュベートした後、フィルターの上側表面の遊走しなかった細胞を除去し、フィルターをハリス社のヘマトキシリンで染色した。各試験サンプルについて、各フィールド毎に 400 倍で四分割した試験サンプルの細胞数をカウントした。四つのフィールドの合計細胞数から、四分割分の平均細胞数および標準誤差を計算した。ベースライン遊走は、タンパク質またはペプチドを加えない M E M D 型バリンで遊走した細胞数とした。ベースラインと V E G F を加えて遊走した細胞数との差を最大合計遊走とした。

#### 【0155】

##### 統計的分析

結果はすべて平均  $\pm$  標準誤差で表わした。スチューデントの t - 検定をペアで行い、同じ動物の眼を比較した。一元配置 A N O V A でグループ間の相違を分析した。p < 0.05 の場合、統計的に有意な相違があるとされた。

#### 【実施例 1】

#### 【0156】

##### P E D F は V E G F が誘導する網膜血管透過性を定性的に阻害する

臨床的な診断法であるフルオレセイン血管造影法によって、V E G F が誘導する血管透過性を本発明の因子が調節する効果を写真で確認する。反対側の眼に比べて片方の目で蛍光が減少したのは、両方の目に注入された本発明の薬剤に起因するものである。V E G F は血管透過性を亢進する<sup>2 8</sup> ため、生理食塩水を注入した反対側の眼に比べ、V E G F<sub>164</sub> (ヒトの V E G F<sub>165</sub> と相同なマウスの分子種) を注入した眼におけるフルオレセインの漏出は予想通り増大した (図 1 a)。P E D F を V E G F<sub>164</sub> と共に注入すると、V E G F が誘導する血管透過性は認められなかった (図 1 b)。

#### 【0157】

抗血管透過活性が P E D F に特異的であることを示すため、本発明者らは、同じアッセイにおいて A C T および H S P 47 の効果を試験した。A C T および H S P 47 は、P E D F が属するサブファミリーとは異なる、セルピンスーパーファミリー (セリンプロテアーゼ阻害剤のスーパーファミリー) の二つのサブファミリー<sup>2 9</sup> に由来する。セルピンファミリー間の高レベルの構造的保存関係<sup>3 0、3 1</sup> にも関わらず、A C T および H S P 47 は、マウスの網膜において V E G F が誘導するフルオレセインの漏出に対して何の効果も示さなかった (図 1 c、d)。したがって、V E G F が誘導する血管透過性を阻害する P E D F の阻害効果は、P E D F に特異的である。

#### 【実施例 2】

#### 【0158】

10

20

30

40

50

P E D F は V E G F が誘導する網膜の血管透過性を定量的に阻害する

V E G F が誘導する血管透過性に対する P E D F の阻害効果を定量し確認するために、  
 改変されたエバンスブルーアッセイ<sup>3 2</sup>を行った。フルオレセイン血管造影実験の際に硝  
 子体内に P E D F を注入したマウスの 2 4 時間後の血管内のエバンスブルーの量を測定し  
 た。P E D F は V E G F が誘導する血管透過性をほぼ消滅せしめ ( $95.6 \pm 21.2\%$   
 $3.4 \pm 18.2\%$  および  $19.4 \pm 22.3\%$  であった) (図 2)。これらのデータは  
 、フルオレセイン血管造影実験で定性的に認められたこと、すなわち、P E D F は V E G  
 F が誘導する網膜の血管透過性を阻害することを裏付ける。

【実施例 3】

10

【0159】

P E D F<sub>p e p</sub> は V E G F が誘導する血管透過性を阻害する

P E D F の神経栄養活性 / 神経保護活性は 4 4 個のアミノ酸領域に同定されている<sup>2 4</sup>  
 、<sup>2 5</sup> ため、この領域が血管透過性の調節活性も有しているものかと考えた。ヒト P E D  
 F の 7 8 番 ~ 1 2 1 番のアミノ酸残基からなる P E D F<sub>p e p</sub> の等モル量を、全長 P E D  
 F の代わりに硝子体内に注入した。フルオレセイン血管造影アッセイにおいて、P E D F  
<sub>p e p</sub> は V E G F が誘導する血管透過性を効果的に阻害した (図 3 a)。A C T の相当す  
 る領域からの 4 6 個のアミノ酸のペプチド (7 3 番 ~ 1 1 8 番、A C T<sub>p e p</sub> と呼ぶ) は  
 、V E G F が誘導する血管透過性に何れの効果も示さなかった。

【0160】

20

エバンスブルーアッセイはフルオレセイン血管造影アッセイでの知見を裏付けた (図 3  
 b)。P E D F<sub>p e p</sub> は、V E G F が誘導するエバンスブルー - アルブミン複合体に対す  
 る血管透過性を  $83.7 \pm 17.1\%$  ブロックした。全長 A C T と同様に、A C T<sub>p e p</sub>  
 は V E G F が誘導する血管透過性を阻害しなかった ( $-26.4 \pm 34.3\%$ )。全長 P  
 E D F および P E D F<sub>p e p</sub> は、同じモル濃度で同じように強力であった。一元配置 A N  
 O V A による分析で、全長 P E D F および P E D F<sub>p e p</sub> の効果に有意な相違がないこと  
 が示された。P E D F の N 末端近くの 4 4 個のアミノ酸の領域は、V E G F が誘導する血  
 管透過性に対して P E D F による阻害活性を示した。

【実施例 4】

【0161】

30

P E D F<sub>p e p</sub> 内の四つのアミノ酸残基は V E G F が誘導する血管透過性活性を阻害す  
 るのに必要である

生理活性に必要なアミノ酸残基を同定するため、A C T、H S P 4 7、および P E D F  
 の配列および結晶学的構造を比較し (図 4 a、b)、キーとなる主要な残基を評価するた  
 め、P E D F 内の四つの候補アミノ酸残基を選択した。引用文献 2 4、2 5 および本発明  
 者らの予備研究により、活性な部位として P E D F の 7 8 番 ~ 1 2 1 番の残基を指定した  
 。結晶構造から、4 4 個のアミノ酸の領域には、完璧な二次構造要素の s 6 B、h B、お  
 よび h C、1 巻きの h D、ならびに結合性のループ<sup>3 1</sup> が含まれている。s 6 B および h  
 B は P E D F の内部に隠れている。要素の h C、h D およびそれらを結びつけるループは  
 、大部分が露出し、アクセス可能な表面を形成している。このため、本発明者らは、h C  
 、結合性のループ、および一巻きの h D が含まれる、9 9 番 ~ 1 2 1 番の領域に的を絞っ  
 た。

40

【0162】

本発明者らは、キーとなるアミノ酸は、P E D F と血管透過性の調節活性を欠く二つの  
 セルピンファミリー (A C T および H S P 4 7) との間で異なる残基 (図 4 a) であるは  
 ずだと考えた。これを基に、6 個のアミノ酸を同定した。これら 6 個のアミノ酸残基の内  
 の 2 個は除外した。アルギニン<sub>99</sub> は、それをアラニンに代えても P E D F の生理活性が  
 変らなかった (未発表の結果) ため、除外した。プロリン<sub>116</sub> は、プロリンの役割がペ  
 プチドの骨格構造の維持であるため、除外した。P E D F<sub>p e p</sub> 内の他の四つの残基 (グ  
 ルタミン酸<sub>101</sub>、イソロイシン<sub>103</sub>、ロイシン<sub>112</sub>、およびセリン<sub>115</sub>) を修飾

50

してCHIMERA<sub>p e p</sub>を合成した。アラニンスキャンの場合と同様に、グルタミン酸<sub>101</sub>をHSP47内の相当する残基であるアラニンに代えた。イソロイシン<sub>103</sub>、ロイシン<sub>112</sub>、およびセリン<sub>115</sub>は、ACT内の相当する残基であるグルタミン酸に代えた。これら三つの残基の位置で、ACTおよびHSP47は共に電荷の多い側面基（HSP47におけるグルタミンまたはアスパラギン酸）を有している。

#### 【0163】

フルオレセイン血管造影アッセイ（図4c）とエバンスブルーアッセイ（図4d）の両方において、CHIMERA<sub>p e p</sub>はVEGFが誘導する血管透過性を阻害することができなかった。CHIMERA<sub>p e p</sub>は、VEGFが誘導するエバンスブルー-アルブミン複合体の漏出を $16.0 \pm 27.8\%$ だけ阻害した。一元配置ANOVA検定では、VEGFが誘導する血管透過性の阻害において、CHIMERA<sub>p e p</sub>はPEDFに比べて有意に劣っていた。

10

#### 【実施例5】

#### 【0164】

PEDFの同じ領域はVEGF<sub>164</sub>により促進された内皮細胞の遊走を阻害する

発明者らは、血管新生活性の代わりに、ウシの網膜毛細血管内皮細胞（BRCEC）を備えた細胞走化性チャンバーアッセイ（microchemotaxis chamber assay）を用いた。PEDFは、用量依存的に、 $0.5 \text{ nM}$ の $50\%$ 抑制濃度（ $\text{IC}_{50}$ ）で、VEGFにより促進された内皮細胞の遊走を阻害した。ACTおよびHSP47は同濃度で、遊走活性に対して効果を示さなかった。PEDFと同様に、PEDF<sub>p e p</sub>は、用量依存的に、 $3.0 \text{ nM}$ の $\text{IC}_{50}$ で、VEGFにより促進された内皮細胞の遊走を効果的に阻害した。ACT<sub>p e p</sub>もCHIMERA<sub>p e p</sub>も同じアッセイにおいて効果を示さなかった（図5b）。したがって、内皮細胞の遊走は、同じ4個のアミノ酸残基に依存する。

20

#### 【0165】

本明細書で開示したすべての刊行物および特許出願は、参考にしてその全てを本明細書に取り込むものとし、本発明において使用可能である。

#### 【0166】

当業者であれば、本発明がその目的を遂行し、本発明の効果および利点を得る上で好適なものであり、また、その効果および利点は本発明に固有のものであることは理解されるところである。本発明を実施するにあたり、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、様々な変更および改変がなされることは当業者には明らかなことである。当業者であれば思いつくであろう変更およびその他の使用も、本発明の特許請求の範囲によって定められているように、本発明の精神に含まれるものであり、またその均等物である。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0167】

【図1】図1は、VEGFが誘発する網膜の血管透過性をPEDFが阻害することを定性的に示す写真である。組換えマウスVEGF<sub>164</sub>（VEGF）を一方の眼内に注射し、もう一方の眼内に試験薬剤をVEGFと共に注射した。フルオレセイン血管造影法によって、網膜内および硝子体内への漏出の程度が示される。これによりVEGFは、リン酸緩衝食塩水（PBS）（a）を注入した場合に比べ、はるかに高いレベルで血管からの漏出を誘発した。VEGFと共に注入された他の試験薬剤は、組換えヒトPEDF（PEDF）（b）、1-抗キモトリプシン（ACT）（c）、熱ショックタンパク質47（HSP47）（d）である。写真はすべて、4匹またはそれ以上のマウスそれぞれからの結果の中で最も特徴的なものである。

40

【図2】図2は、VEGFが誘発する網膜の血管透過性をPEDFが阻害することを定量的に示す図である。一方の眼の硝子体内に組換えマウスVEGF<sub>164</sub>（VEGF）を、もう一方の眼の硝子体内に試験薬剤を注射してから24時間後の網膜内のエバンスブルーの量が、血管からの漏出を特徴付けるものであり、VEGFが誘導した血管からの漏出量（対照と比べて増加した量）を $100\%$ とし、対照（PBS）を注入した場合の漏出量を $0\%$ とした（ $n = 29$ ）。血管透過性に対する効果を試験するため、第二の試験薬剤をV

50

EGFと共に注射した。ヒトPEDF ( $n = 26$ )はVEGFが誘発する血管透過性を低減させたが、ACT ( $n = 27$ )およびHSP47 ( $n = 28$ )では効果が認められなかった。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表わし、 $n$ は各グループ内のマウスを表わし、\*はVEGFが誘発する血管透過性と比較して、 $p < 0.05$ で有意に異なることを示す。

【図3】図3は、VEGFが誘発する網膜の血管透過性をヒトPEDFからの44個のアミノ酸のペプチド、すなわちPEDF<sub>p e p</sub>が効果的に阻害することを示す図である。(a)(上側の写真)では、VEGFと共に注射されたPEDF<sub>p e p</sub>がVEGFに誘発された網膜脈管構造からのフルオレセインの漏出を効果的に阻害している。下側の写真では、VEGFと共にマウスの眼に注射されたACT<sub>p e p</sub>、すなわちACTのPEDF<sub>p e p</sub>に相当する領域から得られたペプチドは、VEGFのみが注射された眼に較べて識別可能な違いを示さなかった。(b)では、VEGFと共に注射されたPEDF<sub>p e p</sub>がVEGFに誘発された血管透過性を効果的に阻害することが、エバンスブルーアッセイにより定量的に示された。VEGF誘発性のエバンスブルー量の増加は、VEGFと共に注射されたPEDF<sub>p e p</sub>によって効果的に阻害された( $n = 26$ )。VEGFと共に注射された、PEDF<sub>p e p</sub>と等モル量のACT<sub>p e p</sub>に於いては、VEGFに誘発された血管透過性の阻害は認められなかった( $n = 28$ )。データは平均 $\pm$ 標準誤差を表わし、 $n$ は各グループ内のマウスを表わし、\*はVEGFが誘発する血管透過性と比較して、 $p < 0.05$ で有意に異なることを示す。

【図4】図4は、PEDF<sub>p e p</sub>の4個のアミノ酸残基をACTまたはHSP47のうちの相当するアミノ酸残基で置換することにより、血管透過性の調節能が失われることを示す図である。PEDF<sub>p e p</sub>内の4個のアミノ酸残基が置換されてCHIMERA<sub>p e p</sub>になった。(a)にPEDF<sub>p e p</sub>、CHIMERA<sub>p e p</sub>、ACT<sub>p e p</sub>、およびHSP47の配列を並べて示す。同一または類似したアミノ酸残基はそれぞれ暗色または淡青色で網かけし、置換されてCHIMERA<sub>p e p</sub>となるPEDF<sub>p e p</sub>内のアミノ酸残基は黄色で強調した。(b)にPEDFの結晶学的構造(Protein Data Bank、ID; 1IMV)およびACTの結晶学的構造(Protein Data Bank、ID; 1QMN)を示す。PEDFおよびACTの相当する領域内でPEDF<sub>p e p</sub>およびACT<sub>p e p</sub>をそれぞれ淡青色リボンとしてハイライト表示する。PEDF<sub>p e p</sub>とCHIMERA<sub>p e p</sub>との間で置換される4個のアミノ酸残基は暗青色で強調表示し、赤字で示した。両方のタンパク質の番号は分泌信号ペプチドから始まる。VEGFを一方の眼に注射し、もう一方の眼にはVEGF+CHIMERA<sub>p e p</sub>を注射した。CHIMERA<sub>p e p</sub>(図3aのPEDF<sub>p e p</sub>と当モル)はVEGFに誘発された網膜血管透過性に識別可能な効果を及ぼさないことが、(c)のフルオレセイン血管造影または(d)のエバンスブルーアッセイ( $n = 27$ )により判明した。

【図5】図5は、PEDFの2種類の活性-内皮細胞の遊走および血管透過性を阻害すること-が、いずれも同一の4個のアミノ酸を必要とすることを説明する図である。(a)は、種々の濃度のPEDF、ACT、またはHSP47の存在下で、VEGF<sub>164</sub>で刺激されたウシ網膜毛細血管内皮細胞の遊走を測定したものである。PEDFは解離定数( $K_d$ ) $0.5$  nMで用量依存的にVEGF誘発性の遊走を阻害した。ACTおよびHSP47は遊走阻害活性を欠く。VEGF<sub>164</sub>の存在下で遊走した内皮細胞の数から、薬剤の非存在下で遊走した内皮細胞の数を引いたものを100%(最大遊走)とする。グラフ上の各点は4匹の平均 $\pm$ 標準誤差を示す。(b)は、(a)の一部として、VEGF<sub>164</sub>で刺激されたウシ網膜毛細血管内皮細胞の遊走を測定したものである。PEDF<sub>p e p</sub>はVEGFで刺激されたウシ網膜毛細血管内皮細胞の遊走を阻害したが、ACT<sub>p e p</sub>またはCHIMERA<sub>p e p</sub>では、阻害は認められなかった。PEDF<sub>p e p</sub>は全長PEDFと同程度にVEGFで刺激された内皮細胞の遊走( $K_d = 3$  nM)を阻害した。ACT<sub>p e p</sub>およびCHIMERA<sub>p e p</sub>はVEGFで刺激された内皮細胞の遊走に対して何の効果も示さなかった。

【図6】図6は、一文字表記を用いて、全長PEDFのアミノ酸配列(配列番号1)を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 7】図 7 は、一文字表記を用いて、P E D F 4 4 A A ペプチドのアミノ酸配列（配列番号 2）を示す図である。

【図 8】図 8 は、P E D F の 4 4 個のアミノ酸ペプチドで 1 0 1 番目のグルタミン酸、1 0 3 番目のイソロイシン、1 1 2 番目のロイシン及び 1 1 5 番目のセリンを下線で示した、P E D F 4 4 A A ペプチドのアミノ酸配列（配列番号 3）を一文字表記で表した図である。

【0168】

#### 参考文献

1. Senger, D. R. ら、腫瘍細胞は、腹水の蓄積を促進する、血管透過性因子を分泌する、*Science* 219, 983~5 (1983年) (Senger, D. R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219,983-5 (1983)) 10
2. Connolly, D. T. ら、腫瘍の血管透過性因子は内皮細胞の増殖および血管新生を刺激する、*J. Clin. Invest.* 84、1470~8 (1983年) (Connolly, D. T. et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 84, 1470-8 (1983))
3. Keck, P. J. ら、血管透過性因子、内皮細胞の遊走は P D G F に関する、*Science* 246、1309~1312 (1989年) (Keck, P. J. et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246,1309-12 (1989)) 20
4. Oosthuyse, B. ら、血管内皮細胞の増殖因子からの低酸素症応答要素の除去が運動ニューロンの変性を誘導する、*Nat. Genet.* 28、131~138 (2001年) (Oosthuyse, B. et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28, 131-8 (2001))
5. Sondell, M., Lundborg, G. および Kanje, M., 血管内皮細胞の増殖因子は神経栄養活性を有し、軸索の成長を刺激し、末梢神経系における内皮細胞の生存およびシュワン細胞の増殖を促進する、*J. Neurosci.* 19、5731~5740 (1999年) (Sondell, M., Lundborg, G. & Kanje, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 19,5731-40 (1999)) 30
6. Wick, A. ら、前提条件としての低酸素状態における神経保護には、血管内皮細胞増殖因子受容体および Akt の継続的な活性化が必要である、*J. Neurosci.* 22、6401~6407 (2002年) (Wick, A. et al. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* 22,6401-7 (2002))
7. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. および Heldin, C. H., K D R および F l t 1 の異なる信号伝達特性、血管内皮細胞増殖因子の二つの受容体、*J. Biol. Chem.* 269、26988~26995 (1994年) (Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. & Heldin, C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *JBiol Chem* 269,26988-95 (1994)) 40
8. Gille, H. ら、F l t - 1 ( V E G F R - 1 ) および K D R ( V E G F R - 2 ) の生物学的効果および発信特性の分析。新規な受容体特異的な血管内皮細胞増殖因子変異体を用いた再評価、*J. Biol. Chem.* 276、3222~3230 (2001年) (Gille, H. et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 276,3222-30 ( 50

2001))

9. Bernatchez, P. N., Soker, S. および Sirois, M. G.、血管内皮細胞増殖因子は内皮細胞の増殖、遊走に影響し、血小板活性化因子の合成は Flk-1 に依存する、J. Biol. Chem.、274、31047~31054 (1999年) (Bernatchez, P. N., Soker, S. & Sirois, M. G. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is 274,31047-54 (1999))

10. Steele, F. R., Chader, G. J., Johnson, L. V. および Tombran-Tink, J.、色素上皮由来因子：細胞栄養活性およびセリンプロテアーゼ阻害体遺伝子ファミリーの一員としての同定、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90、1526~1530 (1993年) (Steele, F. R., Chader, G. J., Johnson, L. V. & Tombran-Tink, J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. Proc Natl Acad Sci USA 90,1526-30 (1993))

11. Becerra, S. P., Sagasti, A., Spinella, P. および Notario, V.、色素上皮由来因子は非阻害性セルピンと同様の挙動を示す。細胞栄養活性にセルピンの反応性ループは不要である。J. Biol. Chem.、270、25992~25999 (1995年) (Becerra, S. P., Sagasti, A., Spinella, P. & Notario, V. Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. activity does not require the serpin reactive loop. J Biol Chem 270,25992-9 (1995))

12. Dafforn, T. R., Della, M. および Miller, A. D.、熱ショックタンパク質 47 (Hsp47) の分子的相互作用およびそれらのコラーゲン合成における意味、J. Biol. Chem.、276、49310~49319 (2001年) (Dafforn, T. R., Della, M. & Miller, A. D. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. J Biol Chem 276,49310-9 (2001))

13. Tombran-Tink, J. および Johnson, L. V.、ヒト RPE 細胞で調整された培地でインキュベートされた網膜芽細胞の神経分化、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30、1700~7 (1989年) (Tombran-Tink, J. & Johnson, L. V. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 30, 1700-7 (1989))

14. Tombran-Tink, J., Chader, G. G. および Johnson, L. V.、PEDF：強力な神経分化活性を有する色素上皮由来因子、Exp. Eye Res. 53、411~4 (1991年) (Tombran-Tink, J., Chader, G. G. & Johnson, L. V. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. Exp Eye Res 53,411-4 (1991))

15. Becerra, S. P. ら、大腸菌におけるヒト胎児性色素上皮由来因子の過剰発現。機能的に活性な神経栄養因子。、J. Biol. Chem.、268、23148~23156 (1993年) (Becerra, S. P. et al. Overexpression of fetal human pigment epithelium-derived factor in Escherichia coli. A functionally active neurotrophic factor. J Biol Chem 268,23148-56 (1993))

16. Seigel, G. M. ら、色素上皮由来因子および光受容体間マトリックス洗浄による網膜芽細胞 Y79 の分化：腫瘍発生能に対する効果。、Growth Factors 10、289~97 (1994年) (Seigel, G. M. et al. Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. Growth Factors 10,289-97 (1994))

17. Dawson, D. W. ら、色素上皮由来因子：血管新生の強力な阻害剤、Sc 50

ience 285、245～8(1999年)(Dawson, D. W. et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. Science 285, 245-8 (1999))

18. Stellmach, V., Crawford, S. E., Zhou, W. および Bouck, N., 天然の抗血管新生剤である色素上皮由来因子による虚血誘発性網膜症の予防、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98、2593～7(2001年)(Stellmach, V., Crawford, S. E., Zhou, W. & Bouck, N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. Proc Natl Acad Sci USA 98, 2593-7 (2001))

19. Duh, E. J. ら、色素上皮由来因子は、虚血誘発性網膜血管新生ならびに VEGF 誘発性の遊走および増殖を抑制する。、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43、821～9(2002年)(Duh, E. J. et al. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. Invest Ophthalmol Vis Sci 43, 821-9 (2002))

20. Gao, G. ら、褐色ドブネズミおよびSDラットでの、網膜血管新生症に対する感受性の相違に寄与する、虚血調節における血管内皮増殖因子と色素上皮由来因子の違い、Diabetes 51、1218～25(2002年)(Gao, G. et al. Difference in ischemic regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in brown norway and sprague dawley rats contributing to different susceptibilities to retinal neovascularization. Diabetes 51, 1218-25 (2002))

21. Gao, G. ら、血管内皮増殖因子のダウンレギュレーションと色素上皮由来因子のアップレギュレーション：プラスミノゲンクリングル5の抗血管新生活性において考えられる機序、J. Biol. Chem.、277、9492～7(2002年)(Gao, G. et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5. J Biol Chem 277, 9492-7 (2002))

22. Gao, G. ら、虚血誘発性網膜血管新生症における VEGF と PEDF のアンバランスな発現、FEBS Lett. 489、270～276(2001年)(Gao, G. et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. FEBS Lett 489, 270-6 (2001))

23. Ohno-Matsui, K. ら、年齢が関係する斑変性の新規な機序：抗血管新生因子の VEGF と PEDF との平衡シフト、J. Cell Physiol. 189、323～33(2001年)(Ohno-Matsui, K. et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. J Cell Physiol 189, 323-33 (2001))

24. Alberdi, E., Aymerich, M. S. および Becerra, S. P., 色素上皮由来因子(PEDF)と網膜芽細胞および小脳顆粒状ニューロンへの結合。PEDF受容体の証拠、J. Biol. Chem.、274、31605～12(1999年)(Alberdi, E., Aymerich, M. S. & Becerra, S. P. Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. J. Biol Chem 274, 31605-12 (1999))

25. Bilak, M. M. ら、色素上皮由来因子の神経保護分子領域の同定および運動ニューロン上のその結合部位、J. Neurosci. 22、9378～86(2002年)(Bilak, M. M. et al. Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. J Neurosci 22, 9378-86 (2002))

26. Cao, W. ら、色素上皮由来因子は、培養した網膜ニューロンを過酸化水素が

誘導する細胞死から保護する、J. Neurosci. Res. 57、789～800 (1999年) (Cao, W. et al. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. J Neurosci Res 57, 789-800 (1999))

27. Taniwaki, T., Becerra, S. P., Chader, G. J. および Schwartz, J. P.、色素上皮由来因子は、培養中の小脳顆粒状細胞が生存するための因子である、J. Neurochem. 64、2509～17 (1995年) (Taniwaki, T., Becerra, S. P., Chader, G. J. & Schwartz, J. P. Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. J Neurochem 64, 2509-17 (1995))

28. Derevjani, N. L. ら、マウスにおける血液 - 網膜バリアの整合性の定性的評価、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43、2462～7 (2002年) (Derevjani, N. L. et al. Quantitative assessment of the integrity of the blood-retinal barrier in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 43, 2462-7 (2002))

29. Gettins, P. G.、セルピンの構造、機序、および機能、Chen. Rev. 102、4751～4804 (2002年) (Gettins, P. G. Serpin structure, mechanism, and function. Chem Rev 102, 4751-804 (2002))

30. Becerra, S. P.、PEDFに関する構造 - 機能の研究。神経栄養活性を有する非阻害性セルピン、Adv. Exp. Med. Biol.、425、223～37 (1997年) (Becerra, S. P. Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. Adv Exp Med Biol 425, 223-37 (1997))

31. Simonovic, M., Gettins, P. G. および Volz, K.、強力な抗血管新生因子および神経突起成長誘導因子である、ヒト PEDF の結晶構造、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98、11131～5 (2001年) (Simonovic, M., Gettins, P. G. & Volz, K. Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. Proc Natl Acad Sci USA 98, 11131-5 (2001))

32. Xu, Q., Qaum, T. および Adamis, A. P.、エバンズブルーを用いる血液 - 網膜バリアの破壊の高感度定量、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.、42、789～94 (2001年) (Xu, Q., Qaum, T. & Adamis, A. P. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. Invest Ophthalmol Vis Sci 42, 789-94 (2001))

33. Conn, G. ら、ラットグリオーマ由来細胞系からの糖タンパク質血管内皮細胞分裂促進因子の精製、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87、1323～7 (1990年) (Conn, G. et al. Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. Proc Natl Acad Sci USA 87, 1323-7 (1990))

34. Gospodarowicz, D., Abraham, J. A. および Schilling, J.、下垂体由来小胞星状細胞によって産生された血管内皮細胞分裂促進因子の単離と特徴付け、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86、7311～7315 (1989年) (Gospodarowicz, D., Abraham, J. A. & Schilling, J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. Proc Natl Acad Sci USA 86, 7311-5 (1989))

35. Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. および Ferrara, N.、血管内皮増殖因子は分泌された血管新生分裂促進因子である、Science、246、1306～9 (1989年) (Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246, 1306-9 (1989))

10

20

30

40

50

1306-9 (1989))

36. Gettins, P. G., Simonovic, M. および Volz, K. 強力な抗血管新生特性および神経突起成長促進特性を有するセリンである、色素上皮由来因子 (PEDF)、*Biol. Chem.*、383、1677~1682 (2002年) (Gettins, P. G., Simonovic, M. & Volz, K. Pigment epithelium-derived factor (PEDF), a serpin with potent anti-angiogenic and neurite outgrowth-promoting properties. *Biol Chem* 383, 1677-82 (2002))

37. Clermont, A. C., Cahill, M. T., Bursell, S. E., Bouck, N. および Aiello, L. P.、色素上皮由来因子 (PEDF) は、内皮細胞増殖因子 (VEGF) が誘導する網膜透過性および血流をインビボで阻害する、*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*、42、S92 (2001年) (Clermont, A. C., Cahill, M. T., Bursell, S. E., Bouck, N. & Aiello, L. P. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) -induced retinal permeability and blood flow in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, S92 (2001))

38. Aiello, L. P. および Wong, J. S.、色素上皮由来因子の糖尿病性血管の合併症における役割、*Kidney Int. Suppl.* 77、S113~S119 (2000年) (Aiello, L. P. & Wong, J. S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl* 77, S113-9 (2000))

39. Meyer, C., Notari, L. および Becerra, S. P.、色素上皮由来因子上のタイプIコラーゲン結合部位のマッピング。その抗血管新生活性の意味、*J. Biol. Chem.* (2002年) (Meyer, C., Notari, L. & Becerra, S. P. Mapping the type I collagen binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* (2002))

40. Roberts, D. L., Weix, D. J., Dahms, N. M. および Kim, J. J.、リソソーム酵素認識の分子的基础：カチオン依存性マンノース6-ホスフェート受容体の三次元構造、*Cell* 93、639~48 (1998年) (Roberts, D. L., Weix, D. J., Dahms, N. M. & Kim, J. J. Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 93, 639-48 (1998))

41. Tong, P. Y., Gregory, W. および Kornfeld, S.、カチオン依存性マンノース6-ホスフェート受容体のリガンドとの相互作用：マンノース6-ホスフェート結合のストイキオメトリー、*J. Biol. Chem.*、264、7962~9 (1989年) (Tong, P. Y., Gregory, W. & S. Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding. *J Biol Chem* 264,7962-9 (1989))

42. Tong, P. Y. および Kornfeld, S.、カチオン依存性マンノース6-ホスフェート受容体のリガンドとの相互作用：カチオン独立性マンノース6-ホスフェート受容体との比較、*J. Biol. Chem.*、264、7970~7975 (1989年) (Tong, P. Y. S. Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 264,7970-5 (1989))

43. Stratikos, E., Alberdi, E., Gettins, P. G. および Becerra, S. P.、組換えヒト色素上皮由来因子 (PEDF)：真核細胞で過剰発現され、分泌された PEDF の特徴付け、*Protein Sci.*、5、2575~82 (1996年) (Stratikos, E., Alberdi, E., Gettins, P. G. & Becerra, S. P. Recombinant human pigment epithelium-derived factor (PEDF): characterization of PEDF overexpressed and secreted by eukaryotic cells. *Protein Sci* 5,2575-82 (1996))

10

20

30

40

50

44. Qaum, T. ら、初期の糖尿病における、VEGF誘導血液 - 網膜バリアの破壊、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.、42、2408～13 (2001年) (Qaum, T. et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 42,2408-13 (2001))

45. Gardner, T. W.、ヒスタミン、ZO-1および糖尿病性網膜症における血液 - 網膜バリアの透過性の亢進、Trans. Am. Ophthalmol. Soc.、93、583～621 (1995年) (Gardner, T. W. Histamine, ZO-1 and increased blood-retinal barrier permeability in diabetic retinopathy. Trans Am Ophthalmol Soc 93,583-621 (1995))

【図1】

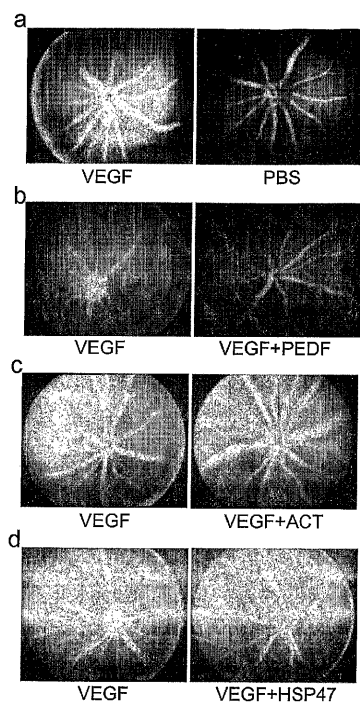


図1

【図2】

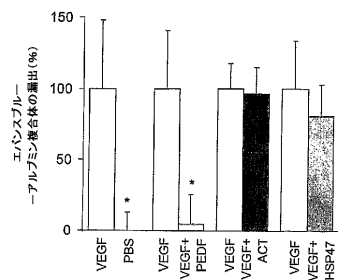


図2

【 図 3 】

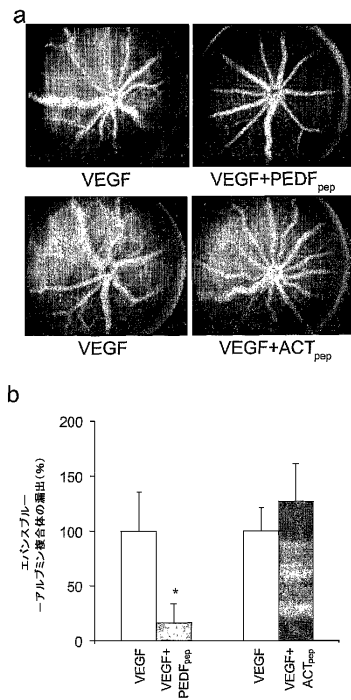


図3

【 図 5 】

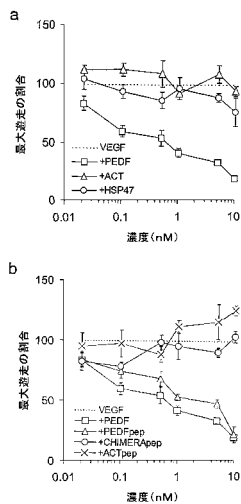


図5

【 図 4 】

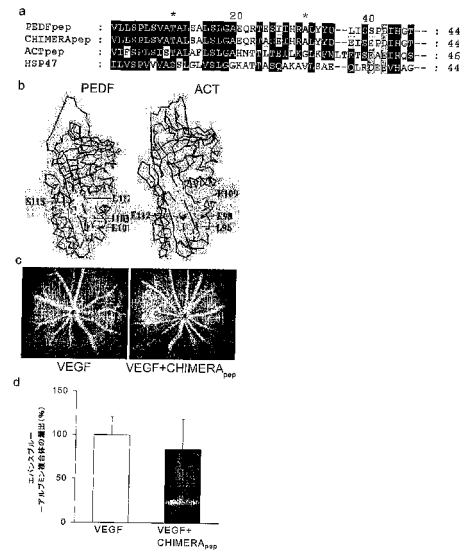


図4

【 図 6 】

PEDFの全長配列:

```

MQALVLLLC/GALLGHSSCQNPASPPPEEGSPDPDSTGALVEEEDPFFKVPVKNL
AAAVSNFGYDLYRVSSMSPTTNVLLSPLSVATLALSALSGAEQRTESIHRALY
YDLISSPDHGTGTYKELDTVAPQKILKASRIVFEKKLRKSSFVAPLEKSYGTR
PRVLTGNPRLDLOEINNWWQAMKGLARSTKEIPDEISILLGVAFKQGWVT
KFDSRKTSLEDLYDEERTVRVPMMSDPKAVLRVGLDSDLSCKIAQLPLTGSM
SIIFPLPKVTQNLTLIEESLTSEFIRHIDRELKTVQAVLTPVKLKLSEYGEVTKSLQ
EMKLSLFDSPDFSKITGPKIKLTQVEHRAQFEWNEDGAGITTPSPGLQPAHLTF
PLDYHLNQPFIFVLRDITDTGALLFGIKILDPRGP
  
```

図6  
配列番号1

【 図 7 】

PEDFの配列:

VLLSPLSVATLALSALSGAEQRTESIHRALYDILSSPDHGT

図7  
配列番号2

## 【 図 8 】

PEDF<sub>pep</sub>内の四つの重要なアミノ酸残基:

VLLSPLSVATALSALS~~SL~~GAEQRTES~~II~~HRALYYD~~L~~ISS~~PD~~IHGT

図8  
配列番号3

## 【 配 列 表 】

2007509984000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/36245										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 38/18 US CL : 514/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/12 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST Dialog, keywords: PEDF, pigment epithelial derived factor, sepsis, nephropathy, neuropathy, ARDS												
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	US 6,451,763 (Tombran-Tink et al.), issued 17 September 2002	1, 3										
Y		1, 3, 4										
Y	Lechin AE et al. 1994. Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS): The basics. Journal of Emergency Medicine, 12:63-68.	1, 4										
Y	Abramson et al. 2003. Journal of Pediatric Surgery 38:336-342. See esp. Discussion.	1, 6										
Y	Duh et al. 2002. Investigative Ophthalmology and Visual Science 43:821-829	1,6,7										
Y	Stellmach et al. (2001). PNAS 98:2593-2597. See abstract, especially final sentence, and p. 2594, second column.	1, 7										
Y	Osterby et al. 1999. Nephrology Dialysis Transplantation. 14:348-352.	1,6										
Y	Blom ML et al. 1994. Del Med Jrl 66:379-388. See esp. p. 384, first column on preproliferative diabetic retinopathy	1,7										
Y	Ferrara et al. US Patent Application Publication 2001/0021382, published 13 September 2001	1,5										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 29 July 2005 (29.07.2005)		Date of mailing of the international search report 29 AUG 2005										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>[Signature]</i> Daniel Kolker Telephone No. (571) 272-1600										

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/36245

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US04/36245

**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1 - 7, drawn to methods of treating patients by administering PEDF.

Group 2, claim(s) 8 - 14 and 55, drawn to methods of treating patients by administering PEDF 44 AA.

Group 3, claim(s) 15 - 21 and 42 - 44 drawn to methods of treating patients by administering PEDF 44 AA homologs.

Group 4, claim(s) 23 - 29 and 46 - 48, drawn to methods of treating patients by administering agents which activate the PEDF receptor.

Group 5, claim(s) 30 and 34 - 36 (in part), drawn to methods of decreasing vascular permeability in tissue by administering PEDF.

Group 6, claim(s) 31 and 34 - 36 (in part), drawn to methods of decreasing vascular permeability in tissue by administering PEDF 44 AA.

Group 7, claim(s) 32 - 33 and 34 - 36 (in part), drawn to methods of decreasing vascular permeability in tissue by administering a homolog of PEDF 44 AA.

Group 8, claim(s) 37 - 40, drawn to methods of treating patients with conditions involving increased angiogenesis by administering PEDF 44 AA.

Group 9, claim(s) 41, drawn to a method of treating patients with conditions involving increased angiogenesis by administering a homolog of PEDF 44 AA.

Group 10, claim(s) 45, drawn to methods of treating patients with conditions involving increased angiogenesis by administering an agent that activates the PEDF receptor.

Group 11, claim(s) 49 and 52 - 53 (in part), drawn to a method of decreasing angiogenesis by administering PEDF 44 AA.

Group 12, claim(s) 50 - 51 and 52 - 53 (in part), drawn to a method of decreasing angiogenesis by administering a homolog of PEDF 44 AA.

Group 13, claim(s) 54 and 56 - 57, drawn to methods of treat patients with neuropathy by administering PEDF 44 AA.

The inventions listed as Groups 1 - 13 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: In order for a technical feature to be a special technical feature, it must make a contribution over the prior art. The first stated technical feature is a method of treating a patient with a condition involving increased vascular permeability by administering PEDF. This is not a contribution over the prior art.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT****International application No.**  
**PCT/US04/36245**

Tombran-Tink et al. (U.S. Patent 6,451,763, issued 17 September 2002) teach administration of PEDF is useful as a treatment for septic shock (column 19, lines 44 - 57). Therefore the first claimed technical feature is not a special technical feature, so there cannot be a special technical feature which links all inventions.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

<b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	
<b>A 6 1 P 27/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 27/02	
<b>A 6 1 P 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/10	
<b>A 6 1 P 9/14 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/14	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 7/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/10	
<b>A 6 1 P 1/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/04	
<b>A 6 1 P 17/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/10	1 0 1
<b>A 6 1 P 19/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/00	
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 19/02	
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	1 0 1
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00	
<b>A 6 1 P 35/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10	
<b>A 6 1 P 7/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/04	
<b>A 6 1 P 11/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/04	
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/02	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	
<b>C 1 2 N 9/99 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1
<b>C 0 7 K 14/435 (2006.01)</b>	C 1 2 N 9/99	
	C 0 7 K 14/435	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ホア リュー

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 8 7 - 8 9 8 4 バルティモアー ノース・ウルフ・ストリート 6 0 0

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA19 BA22 BA34 CA25 DC03 NA14  
 ZA011 ZA331 ZA341 ZA361 ZA441 ZA451 ZA531 ZA591 ZA601 ZA661  
 ZA681 ZA811 ZA891 ZA961 ZB071 ZB111 ZB151 ZB261 ZB271 ZB321  
 ZB351 ZC021 ZC351  
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA56 EA20