

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6267190号
(P6267190)

(45) 発行日 平成30年1月24日 (2018. 1. 24)

(24) 登録日 平成30年1月5日 (2018. 1. 5)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/10 (2006. 01)	A 6 1 K 38/10
A 6 1 P 3/00 (2006. 01)	A 6 1 P 3/00
C 0 7 K 7/08 (2006. 01)	C 0 7 K 7/08 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 12 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2015-511378 (P2015-511378)	(73) 特許権者	514286826
(86) (22) 出願日	平成25年5月10日 (2013. 5. 10)		ジェムバックス アンド カエル カンパ
(65) 公表番号	特表2015-517489 (P2015-517489A)		ニー, リミティド
(43) 公表日	平成27年6月22日 (2015. 6. 22)		大韓民国, デジョン, ユソンーク テクノ
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/004176		1 1 - ロ, 5 8
(87) 国際公開番号	W02013/169077	(73) 特許権者	514286848
(87) 国際公開日	平成25年11月14日 (2013. 11. 14)		キム サン チェ
審査請求日	平成28年5月10日 (2016. 5. 10)		大韓民国, ソウル 1 3 5 - 9 4 7, カン
(31) 優先権主張番号	10-2012-0050529		ナムーク, クアンピョンーロ 1 0 - キル
(32) 優先日	平成24年5月11日 (2012. 5. 11)		, 1 5, サンノクス アpartment, 1
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		0 1 - 4 0 5
(31) 優先権主張番号	10-2012-0050533	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成24年5月11日 (2012. 5. 11)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 悪液質の予防用または治療用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性成分として、配列番号 1 のアミノ酸配列 からなる ペプチドを含む、悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 2】

前記組成物は、悪液質と係わる症状を除去するために使用されるか、あるいは悪液質を治療または予防するために使用される、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 3】

前記悪液質は、A I D S、癌、股関節部骨折後、慢性心不全、C O L D（慢性閉鎖性肺疾患）と C O P D（慢性閉鎖性肺疾患）とを含む慢性肺疾患、肝硬化症、腎不全、関節リウマチを含む自家免疫疾患、全身性ループス、敗血症、結核、嚢胞性線維症、クローン病及び重度感染から選択される一つ以上によって引き起こされる、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 4】

前記悪液質は、老化によって引き起こされる、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 5】

前記ペプチドは、0. 0 0 1 ~ 1 n g / k g の 1 回投与量で投与される、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

10

20

【請求項 6】

前記ペプチドは、 $0.01 \sim 0.4 \text{ ng/kg}$ の 1 回投与量で投与される、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 7】

前記ペプチドは、1 日～5 日ごとに 1 回投与される、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 8】

前記ペプチドは、1.5 日～2.5 日ごとに 1 回投与される、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 9】

$0.05 \text{ nM} \sim 5 \text{ nM}$ の濃度のペプチドを含む、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 10】

注射用に製剤化される、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 11】

医薬組成物である、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【請求項 12】

食品組成物である、請求項 1 に記載の悪液質の予防または治療のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、悪液質の予防用組成物または治療用組成物に係り、さらに具体的には、テロメラーゼに由来したペプチドを含む悪液質の予防用または治療用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

悪液質は、衰弱とも称される症候群であって、主要症状が漸進的な体重減少、貧血、浮腫、食欲減退などである全身性疾病であり、多くの慢性疾患と共に現れる。悪液質の主な兆候は、脂肪組織だけではなく、筋肉組織、及び甚だしくは、骨組織の重量損失である。そのような非脂肪組織は、また「体制脂肪量」と知られている。また、食欲の損失（食欲減退）、弱化（無力症）及びヘモグロビンレベルの降下（貧血）がある。悪液質は、その

【0003】

悪液質の治療は、単に食事をさらに多く摂取するというだけの問題ではない。個体が食事を望む場合にも、個体が食事する場合にも、個体が胃チューブを介して、あるいは静脈内に栄養素を投与される場合にも、状態が正常に転換されないということが問題である。

【0004】

悪液質に係わる最近の研究において、悪液質状態が内在する疾患の存在に対する身体の反応の部分として見なされるということを明らかにしている (Laviano A. et al., 2005)。

【0005】

悪液質が発病する原因としては、これまで、栄養摂取量低下と、疾患生体の栄養消費の上昇とによる栄養出入りの不均衡や、原因になる病変部位から動員される体液性因子が、全身の代謝に及ぼす影響などを説明されてきた。そのために、悪液質の改善には、圧倒的な栄養あるいはエネルギー不足を補い、免疫能を高めるために、高カロリー水液のような積極的な栄養投与が行われている。

【0006】

そのような背景下で、体重減少のような悪液質症状の進行を改善させたり抑制させたりすることができる治療剤に対する必要性が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】KR 2001-0012613A

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】チェ・サンギユ、「癌的悪液質の最新知見」、腫瘍看護学会誌、2011年、2月

【非特許文献2】Kern et al., Cancer Cachexia, J. Parenteral and Enteral Nutrition, 12, 286-298 (1988)

【非特許文献3】American Journal of Medicine, 85, 289-291 (1988)

10

【非特許文献4】Laviano A. et al., Nat. Clin. Pract. Oncol. 2:158-65 (2005)

【非特許文献5】J. Walsmith et al., "Cachexia in rheumatoid arthritis", International Journal of Cardiology, Vol. 85, Issue 1, pp. 89-99, 2002

【非特許文献6】Diana R. Engineer and Jose M. Garcia, "Leptin in Anorexia and Cachexia Syndrome", International of Peptides, Vol. 2012, Article ID 287457, 13 pages, 2012

【非特許文献7】R. Roubenoff et al., "Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia", Arthritis and rheumatism, Vol. 40, No. 3, pp. 534-539, 1997

【非特許文献8】Michael J. Tisdale, "Mechanisms of Cancer Cachexia", Physiological Reviews, Vo. 89, No. 2, pp. 381-410, 2009

20

【非特許文献9】金ヒョンオク外「関節リウマチの実験動物モデル：方法と活用」, Journal of Rheumatic Disease, Vol. 19, No. 4., August, 2012

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

これにより、本発明者らは、さらに副作用が少なく、効果が優秀な悪液質治療剤を開発すべく鋭意努力した結果、本発明を完成するに至った。

【0010】

本発明者らは、テロメラーゼに由来するペプチドを利用すれば、悪液質と呼ばれる体重減少、貧血、浮腫及び食欲不振などの症状を好転させることができるということを発見し、発明を完成した。

30

【0011】

本発明の目的は、副作用が少なく、悪液質症状に効果がある悪液質の予防用組成物または治療用組成物を提供するところにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の一側面によれば、配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記アミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するペプチド、またはその断片であるペプチドを含む悪液質の予防または治療のための組成物が提供される。

【0013】

40

本発明の一側面による悪液質(cachexia)の予防または治療のための組成物において、前記断片は、3個以上のアミノ酸から構成された断片でもある。

【0014】

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記ペプチドは、ヒトテロメラーゼに由来したものでもある。

【0015】

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記組成物は、悪液質と係わる症状を実質的に除去するか、あるいは治療または予防するものでもある。

【0016】

50

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記悪液質は、AIDS、癌、股関節部骨折後、慢性心不全、COLD（慢性閉鎖性肺疾患）とCOPD（慢性閉鎖性肺疾患）とを含む慢性肺疾患、肝硬化症、腎不全、関節リウマチを含む自家免疫疾患、全身性ループス、肺血症、結核、嚢胞性線維症、クローン病及び重度感染から選択される一つ以上を原因とするものでもある。

【0017】

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記悪液質は、老化を原因とするものでもある。

【0018】

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記組成物は、5 nM以下の濃度で提供されてもよい。

10

【0019】

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記組成物は、0.15 nM～5 nMの濃度で提供されてもよい。

【0020】

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記組成物は、皮膚外用剤組成物でもある。

【0021】

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記組成物は、医薬組成物でもある。

20

【0022】

本発明の一側面による悪液質の予防または治療のための組成物において、前記組成物は、食品組成物でもある。

【0023】

本発明の他の一側面によれば、前述の有効量の組成物を、治療を必要とする対象に投与する段階を含む悪液質の予防方法または治療方法が提供される。

【0024】

本発明の他の一側面による悪液質の予防方法または治療方法において、前記組成物は、5 nM/Kg/日以下で対象に投与されるものでもある。

【0025】

30

本発明の他の一側面による悪液質の予防方法または治療方法において、前記組成物は、0.15 nM/Kg/日～5 nM/Kg/日の範囲で対象に投与されるものでもある。

【0026】

本発明の他の一側面によれば、悪液質の治療及び予防のための前述の組成物の用途が提供される。

【0027】

一側面で、配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記ペプチド配列と80%以上の配列同一性を有するペプチド、またはその断片であるペプチド；及びペプチドの投与量、投与経路、投与回数及び適応症のうち一つ以上を開示した指示書；を含む悪液質予防または治療のためのキットが提供される。

40

【発明の効果】

【0028】

本発明による悪液質の予防用組成物または治療用組成物は、悪液質と呼ばれる体重減少、貧血、浮腫及び食欲不振などの症状を好転させる効果にすぐれ、副作用が少ないという長所がある。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】PBMC由来モノサイトを、LPS（10 ng/ml）で2時間刺激させた後、それぞれのペプチドである、FITC、FITC-TAT、PEP1-FITC及びFITC-ペプチドを2時間処理し、その細胞培養液でTNF-α ELISAを遂行した結

50

果を示したグラフである (** $P < 0.01$; compared with the negative control (FITC及びFITC-TAT))。

【図2】悪液質マーカーであるレプチンに対するPEP-1の影響をリアルタイムqPCRを介して確認したグラフである。

【図3】悪液質マーカーであるIL-1 β に対するPEP-1の影響をリアルタイムqPCRを介して確認したグラフである。

【図4】図2～図4は悪液質マーカーであるIL-6に対するPEP-1の影響をリアルタイムqPCRを介して確認したグラフである。

【図5】CIA動物モデルを利用した関節リウマチ誘導及びペプチド処理のための一次実験での経時的なスケジュールを図示した図面である。

【図6】CIA動物モデルを利用した関節リウマチ誘導及びペプチド処理のための二次実験での経時的なスケジュールを図示した図面である。

【図7】対照群と治療群との体重変化を示したものであり、Y軸は、体重(weight)軸であり、数値は、g単位の体重変化を表示したものであり、X軸は、処置及び治療の経過日数を示したものである。

【図8】二次実験結果であり、対照群及び0.2 nM、1 nM、2 nM、5 nMの体重変化を示したものであり、Y軸は、体重(weight)軸であり、数値は、g単位の体重変化を表示したものであり、X軸は、処置及び治療の経過日数を示したものである。

【図9】図8のグラフにおいて、効果がさらに優秀であると見られる低濃度ペプチド処理群(0.2 nM、1 nM)の結果のみを別途に図示したものであり、Y軸は、体重(weight)軸であり、数値は、g単位の体重変化を表示したものであり、X軸は、処置及び治療の経過日数を示したものである。

【図10】HeLa細胞で遂行したPEP-1の毒性試験結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明は、多様な変換を加えることができ、さまざまな実施例を有することができるが、以下、本発明についてさらに具体的に説明する。しかし、それは、本発明を特定の実施形態について限定するものではなく、本発明の思想及び技術範囲に含まれる全ての変換、均等物ないし代替物を含むものであると理解されなければならない。本発明の説明において、関連公知技術に係わる具体的な説明が、本発明の要旨を不明確にすると判断される場合、その詳細な説明を省略する。

【0031】

テロメア(telomere)は、染色体の末端に反復的に存在する遺伝物質であって、当該染色体の損傷や、他の染色体との結合を防止すると知られている。細胞が分裂するたびに、テロメアの長さは少しずつ短くなるが、一定回数以上の細胞分裂があれば、テロメアは非常に短くなり、その細胞は、分裂を止めて死ぬ。一方、テロメアを長くすれば、細胞の寿命が延長されると知られており、その例として、癌細胞では、テロメラゼ(telomerase)という酵素が分泌され、テロメアが短くなることを防ぐために、癌細胞が死なずに、続けて増殖すると知られている。

【0032】

最近、腫瘍壊死因子(TNF:tumor necrosis factor)など、マクロファージから動員されるモノカインやサイトカインが、悪液質(cachexia)の原因として注目されている。腫瘍壊死因子(TNF)は、最近に入って、癌患者や重度感染重症患者の体重減少などの衰弱、すなわち、悪液質の原因になること、または炎症反応を引き起こす原因として、サイトカインであるということが明らかにされて、TNFの多様な作用が研究されている実情である。

【0033】

このように、癌悪液質の原因物質と見られてきたカケクチン(cachectin)が腫瘍壊死因子(TNF)と同一因子であるということが明らかにされ、インターロイキン1(IL(interleukin)-1)であるか、あるいはIL-6、LIF、IFNのようなサイトカ

10

20

30

40

50

インでも、同一の作用が明らかにされた (KR2001-0012613A)。

【0034】

また、J. Walsmith et al., 2002では、体重減少が神経性無食欲症 (anorexia) 単独で発生するのではなく、慢性炎症も体重減少モデルの重要な要因であるという事実が研究されていた。その後、ネズミアジュバント関節炎 (adjuvant arthritis) が体重減少だけではなく、筋肉重量や線維部分にも現れるということを示す研究があり、ネズミアジュバント関節炎は、骨格筋肉で、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 及びインターロイキン1 β (IL-1 β) 遺伝子の発現を誘導するということをこの研究が示している。重要なことは、骨格筋肉において、TNF- α とIL-1 β との発現が、骨格筋肉線維部分と否定的な相関関係を有するということが確認された。

10

【0035】

また、前記先行文献では、TNF- α を単独で遮断するより、TNF- α 及びIL-1 β を同時に遮断する方が、体重損失と、ネズミアジュバント関節炎による骨格筋体重損失とをさらに効果的に防止することができるという事実も確認した。これは、TNF- α 及びIL-1 β の組み合わせが、ネズミアジュバント関節炎による筋肉消耗効果を発揮すると見られ、TNF- α だけではなく、IL-1 β の作用によって、悪液質が形成されるという根拠を提示する。

【0036】

悪液質は、脂肪組織の減少及び食欲不振のように、各種慢性疾患において見い出される無脂肪質量減少によって、身体質量の枯渇を誘導する特徴を有した独特の疾病である。神経性食欲不振症悪液質 (anorexia cachexia) は癌、CHF、COPD、CKD及び老化などで観察される。それらは、TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-1 β のような炎症因子と関連性がある。そのような炎症マーカーは、視床下部のフィードバックメカニズムを調節することができ、悪液質の進行に寄与すると確認されている。また、レプチンは、脂肪細胞によって分泌され、視床下部に作用し、飲食物摂食を減らし、エネルギー消費を刺激することによって体重を減少させる作用を有する最も代表的なホルモンである。CKD (chronic kidney disease) 及びCHF (congestive heart failure) による悪液質においては、高レベルのレプチンが報告されている (Diana R. Engineer et al., 2012)。

20

【0037】

R. Roubenoff et al., 1997では、関節リウマチ (RA) などで見られる慢性炎症は、身体細胞質量の損失と関連性があるということを確認している。そのような症状を炎症性悪液質 (inflammatory cachexia) というが、関節リウマチでは、吸収障害 (malabsorption) なしに、代謝過多症 (hypermetabolism) と伴って現れたり、あるいはタンパク質の崩壊時に加速されたりする。すなわち、実験を介して、アジュバント関節炎が体重減少を起こし、関節が腫れ上がる現象を確認し、体重減少は、細胞の質量減少によるものであり、体重減少の比率より高く示されたという事実も確認した。このように、炎症による体重減少は、飲食物摂取量の減少と、脾臓細胞 (splenocytes) で生産量が増加したTNF- α 及びIL-1が係わっている (R. Roubenoff et al., 1997)。

30

40

【0038】

また、Michael J. Tisdale, 2009の研究では、悪液質で示される筋肉萎縮が、IL-6を過発現するIL-6形質転換マウスで、IL-6受容体抗体によって完全に遮断されるということを確認することができた。この研究では、IL-6循環量が多いマウスは、深刻な悪液質症状とポリープ存在量とが示されたが、ApcMin+/IL6-/-では、損失が見られず、ポリープの存在量も低く、IL-6過発現をなしたマウスでは、骨格筋損失とポリープ形成とが誘発されたが、腫瘍がないマウスでは、骨格筋損失が誘発されなかったという事実を実験を介して確認した。また、IL-6を投与したネズミにおいて、筋肉全体と根源線維タンパク質との分解が甚だしく活性化されたという実験結果を介して、IL-6が増加することによって、非リソソーム (例えば、プロテアソーム) タ

50

ンパク質分解経路及びリソソーム（カテプシン）タンパク質分解経路を活性化し、筋肉のタンパク質が分解されるという事実を提示した（Michael J. Tisdale, 2009）。

【0039】

悪液質は、衰弱とも称される症候群であり、例えば、さまざまな疾患、AIDS、癌、股関節部骨折後、慢性心不全、慢性肺疾患、例えば、COLD（慢性閉鎖性肺疾患）及びCOPD（慢性閉鎖性肺疾患）、肝硬化症、腎不全、自家免疫疾患、例えば、関節リウマチ及び全身性ループス、肺血症、結核、嚢胞性線維症、クローン病並びに重度感染と共に観察される。また、そのような衰弱は、老化でも観察される。

【0040】

本発明の一側面で、配列番号1のペプチド、配列番号1の断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上の配列同一性を有するペプチドは、テロメラーゼ、具体的には、ヒトテロメラーゼに由来したペプチドを含む。

10

【0041】

本明細書に開示されたペプチドは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の配列相同性を有するペプチドも含む。また、本明細書に開示されたペプチドは、配列番号1を含むペプチドまたはその断片と、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、6個以上のアミノ酸または7個以上のアミノ酸が変化したペプチドと、を含んでもよい。

【0042】

20

本発明の一側面において、アミノ酸変化は、ペプチドの物理化学的特性を変更させる性質に属する。例えば、ペプチドの熱安定性を向上させ、基質特異性を変更させ、最適のpHを変化させるようなアミノ酸変化が行われる。

【0043】

本明細書において「アミノ酸」というのは、自然にペプチドに統合される22個の標準アミノ酸だけではなく、D-アイソマー及び変形されたアミノ酸を含む。それにより、本発明の一側面においてペプチドは、D-アミノ酸を含むペプチドでもある。一方、本発明の他の側面においてペプチドは、翻訳後の変形（post-translational modification）が行われた非標準アミノ酸なども含む。翻訳後の変形の例は、リン酸化（phosphorylation）、糖化（glycosylation）、アシル化（acylation）（例えば、アセチル化（acetylation）、ミリスチル化（myristoylation）及びパルミトイル化（palmitoylation）を含む）、アルキル化（alkylation）、カルボキシル化（carboxylation）、ヒドロキシル化（hydroxylation）、糖化反応（glycation）、ビオチニル化（biotinylation）、ユビキチニル化（ubiquitinylation）、化学的性質の変化（例えば、ベータ除去脱イミド化、脱アミド化）及び構造的変化（例えば、二硫化物ブリッジの形成）を含む。また、ペプチドコンジュゲートを形成するための架橋剤（crosslinker）との結合過程で起こる化学反応によって生ずるアミノ酸の変化、例えば、アミノ基、カルボン酸基、または側鎖での変化のようなアミノ酸の変化を含む。

30

【0044】

本明細書に開示されたペプチドは、自然そのままの供給源から同定されて分離された野生型ペプチドでもある。一方、本明細書に開示されたペプチドは、配列番号1の断片であるペプチドと比較し、一つ以上のアミノ酸が置換、欠失及び／または挿入されたアミノ酸配列を含む、人工変異体でもある。人工変異体だけではなく、野生型ポリペプチドでのアミノ酸変化は、タンパク質のフォールディング（folding）及び／または活性に、有意の影響を及ぼさない保存性アミノ酸置換を含む。保存性置換の例は、塩基性アミノ酸（アルギニン、リシン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ルシン、イソロイシン及びメチオニン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、及び小アミノ酸（グリシン、アラニン、セリン及びトレオニン）の群の範囲内にある。一般的に、特異的活性を変更させないアミノ酸置換が、本分野に公知されている。最も一

40

50

般的に発生する交換は、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu及びAsp/Gly、並びにそれらと反対のものである。保存的置換の他の例は、次の表1の通りである。

【0045】

【表1】

表1

本来のアミノ酸	例示的な残基置換	望ましい残基置換
Ala(A)	val; leu; ile	Val
Arg(R)	lys; gln; asn	Lys
Asn(N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp(D)	glu; asn	Glu
Cys(C)	ser; ala	Ser
Gln(Q)	asn; glu	Asn
Glu(E)	asp; gln	Asp
Gly(G)	ala	Ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	Leu
Leu(L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys(K)	arg; gln; asn	Arg
Met(M)	leu; phe; ile	Leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro(P)	ala	Ala
Ser(S)	thr	Thr
Thr(T)	ser	Ser
Trp(W)	tyr; phe	Tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	Leu

【0046】

ペプチドの生物学的特性における実在的な変形は、(a)置換領域内のポリペプチド骨格の構造、例えば、シートまたは螺旋立体構造の維持におけるそれらの効果、(b)標的部位での前記分子の電荷または疎水性の維持におけるそれらの効果、または(c)側鎖のバルク維持におけるそれらの効果がかなり異なる置換部を選択することによって行われる。天然残基は、通常の側鎖特性に基づいて、次のグループに区分される：

【0047】

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：gly、pro；及び
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

【0048】

非保存的置換は、それら部類のうち1つの構成員を他の部類に交換することによって行われる。ペプチドの適切な立体構造の維持と関連性のないいかなるシステイン残基も、一般的にセリンで置換され、前記分子の酸化的安定性を向上させ、異常な架橋結合を防止することができる。逆に言えば、システイン結合を前記ペプチドに加え、その安定性を向上させることができる。

【0049】

ペプチドの他類型のアミノ酸変異体は、抗体のグリコシル化パターンが変化したものである。変化という意味は、ペプチドで発見された一つ以上の炭水化物残基の欠失、及び（または）ペプチド内に存在しない一つ以上のグリコシル化部位の付加を示す。

【0050】

ペプチドのグリコシル化は、典型的にN連結されるか、あるいはO連結されたものである。N連結されているということは、炭水化物残基が、アスパラギン残基の側鎖に付着したことをいう。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニン（ここで、Xは、プロリンを除いた任意のアミノ酸）は、炭水化物残基をアスパラギン側鎖に酵素的に付着させるための認識配列である。従って、それらトリペプチド配列のうち一つがポリペプチドに存在することによって、潜在的なグリコシル化部位が生成される。O連結されたグリコシル化は、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースのうち一つを、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的には、セリンまたはトレオニンに付着させることを意味するが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンを使用することもできる。

10

【0051】

ペプチドへのグリコシル化部位の付加は、一つ以上の前述のトリペプチド配列を含むように、アミノ酸配列を変化させることによって便利に行われる（N連結されたグリコシル化部位の場合）。そのような変化は、一つ以上のセリン残基またはトレオニン残基を、最初の抗体の配列に付加するか、それら残基で置換することによって行われる（O連結されたグリコシル化部位の場合）。

20

【0052】

本発明での配列番号1（以下、「PEP 1」）は、テロメラーゼ由来ペプチドであって、下記のように16個のアミノ酸からなるペプチドである。

【0053】

配列番号1：E A R P A L L T S R L R F I P K

【0054】

また、本発明の一側面による配列番号1の配列を有するペプチド、配列番号1の配列の断片であるペプチド、または前記ペプチド配列と80%以上の配列相同性を有するペプチドは、細胞内毒性が低く、生体内安定性が高いという長所を有する。

30

【0055】

一側面において本発明は、有効成分として、配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記ペプチド配列と80%以上の配列相同性を有するペプチド、またはその断片であるペプチドを含む悪液質の予防または治療のための組成物に係わるものである。

【0056】

一側面において本発明は、有効量の配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記ペプチド配列と80%以上の配列相同性を有するペプチド、またはその断片であるペプチドを悪液質の予防または治療を必要とする対象に投与することを含む悪液質の予防方法または治療方法に係わるものである。

【0057】

一側面において本発明は、有効量の配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記ペプチド配列と80%以上の配列相同性を有するペプチド、またはその断片であるペプチドの悪液質の予防または治療への用途に係わるものである。

40

【0058】

一側面において本発明は、悪液質の予防または治療のための配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記ペプチド配列と80%以上の配列相同性を有するペプチド、またはその断片であるペプチドに係わるものである。

【0059】

一側面において本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記ペプチド配列と80%以上の配列同一性を有するペプチド、またはそれらの断片であるペプチド；及

50

びペプチドの投与量、投与経路、投与回数及び適応症のうち一つ以上を開示した指示書；を含む悪液質の予防または治療のためのキットに係わるものである。

【0060】

一側面において前記断片は、3個以上のアミノ酸から構成された断片でもある。他の側面において、前記断片は、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上または15個以上のアミノ酸から構成された断片でもある。

【0061】

一側面において前記ペプチドは、ヒトテロメラーゼに由来したものであってもよい。具体的には、配列番号1のペプチドは、ヒトテロメラーゼ全体配列（1，132個のアミノ酸、配列番号2）のうち611～626位置のペプチドを意味する。

10

【0062】

一側面において前記ペプチドは、悪液質と係わる症状を実質的に除去するか、あるいは治療または予防する悪液質の予防または治療のためのものでもある。

【0063】

一側面において前記ペプチドは、0.001～1 ng/kgまたは0.01～0.4 ng/kgの1回投与量で投与される。他の側面において前記投与量は、0.001 ng/kg以上、0.005 ng/kg以上、0.01 ng/kg以上、0.02 ng/kg以上または0.03 ng/kg以上でもある。他の側面において前記投与量は、1 ng/kg以下、0.9 ng/kg以下、0.8 ng/kg以下、0.7 ng/kg以下、0.6 ng/kg以下、0.5 ng/kg以下、0.4 ng/kg以下、0.3 ng/kg以下または0.2 ng/kg以下でもある。

20

【0064】

一側面において前記ペプチドは、1日～5日ごとに1回、または1.5日～2.5日ごとに1回投与される。

【0065】

一側面において前記組成物は、ペプチドの濃度が0.05 nM～5 nMの濃度でもある。

【0066】

一側面において前記組成物は、注射剤でもある。

30

【0067】

本発明の一側面による悪液質の治療用及び予防用の組成物は、配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記アミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するペプチド、またはその断片であるペプチドを、0.1 µg/mg～1 mg/mg、具体的には、1 µg/mg～0.5 mg/mg、さらに具体的には、10 µg/mg～0.1 mg/mgの含量で含んでもよい。前記範囲で含む場合、本発明の意図した効果を示すのに適切なだけではなく、組成物の安定性及び安全性をいずれも満足し、コスト対比の効果の側面でも、前記範囲で含むことが適切である。

【0068】

本発明の一側面による組成物は、ヒト、犬、ニワトリ、豚、牛、羊、ギニアピッグまたは猿を含む全ての動物に適用される。

40

【0069】

本発明の一側面において、組成物は、配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド、前記アミノ酸配列と80%以上の配列相同性を有するペプチド、またはその断片であるペプチドを有効成分として含む悪液質の治療用及び予防用の医薬組成物を提供する。本発明の一側面による医薬組成物は、経口、直腸、経皮、静脈内、筋肉内、腹腔内、骨髄内、硬膜内または皮下などに投与されてもよい。

【0070】

経口投与のための剤形は、錠剤、丸剤、軟質または硬質のカプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤または乳濁剤でもあるが、それらに制限されるものではない。非経口投与のための剤

50

形は、注射剤、点滴剤、ローション、軟膏、ゲル、クリーム、懸濁液剤、乳剤、坐剤、パッチまたは噴霧剤でもあるが、それらに制限されるものではない。

【0071】

本発明の一側面による医薬組成物は、必要によっては、希釈剤、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、緩衝剤、分散剤、界面活性剤、着色剤、香料または甘味剤などの添加剤も含む。本発明の一側面による医薬組成物は、当業界の一般的な方法によって製造される。

【0072】

本発明の一側面による医薬組成物の有効成分は、投与される対象の年齢、性別、体重、病理状態及びその深刻度、投与経路または処方者の判断によって異なる。そのような因子に基づいた適用量決定は、当業者のレベル内にあり、その1日投与用量は、例えば、0.000001 ng/kg/日～10, 000 ng/kg/日、または0.00001 ng/kg/日～100 ng/kg/日、具体的には、0.0001 ng/kg/日～10 ng/kg/日、さらに具体的には、0.001 ng/kg/日～1 ng/kg/日、一層具体的には、0.01 ng/kg/日～0.4 ng/kg/日にもなるが、それらに制限されるものではない。本発明の一側面による医薬組成物は、1日～5日に1回～3回投与されるが、それらに制限されるものではない。

10

【0073】

本明細書において使用された用語は、特定具体例について説明するための目的だけに意図されたものであり、本発明を限定する意図ではない。名詞の前に個数が省略された用語は、数量を制限するものではなく、言及された名詞物品が一つ以上存在するということを示すのである。用語「含む」、「有する」及び「含有する」というのは、開かれた用語として解釈される（すなわち、「含むが、それに限定されるものではない」という意味）。

20

【0074】

数値範囲の言及は、単にその範囲内に属するそれぞれの別個の数値を個別的に言及することの代わりをする容易な方法であるために、そうではないということが明示されていない限り、各別個の数値は、まさしく個別的に明細書に言及されているように、本明細書に統合される。全範囲の終値は、その範囲内に含まれ、独立して組み合わせ可能である。

【0075】

本明細書に言及された全ての方法は、取り立てて明示されていたり、あるいは文脈によって明白に矛盾しない限り、適する手順で遂行される。ある一実施例及び全ての実施例、あるいは例示的言語（例えば、「～のような」）を使用することは、特許請求の範囲に含まれていない限り、単に本発明についてさらに良好に記述するためであり、本発明の範囲を制限するものではない。明細書のいかなる言語も、いかなる非請求の構成要素を、本発明の実施に必須なものであると解釈されてはならない。取り立てての定義がない限り、本明細書に使用される技術的及び科学的な用語は、本発明が属する技術分野で当業者によって通常理解されるような意味を有する。

30

【0076】

本発明の望ましい具体例は、本発明を実施するために発明者に知られた最適のモードを含む。望ましい具体例の変動は、先行する記載に触れれば、当業者に明白になるであろう。本発明者らは、当業者がかような変動を適切に利用するということを期待し、本発明者らは、本明細書の記載と異なる方式で本発明が実施されるということを期待する。従って、本発明は、特許法によって許容されているように、特許請求の範囲で言及された発明の要旨の均等物及び全ての変形を含む。さらに、全ての可能な変動内で、前述の構成要素のいかなる組み合わせも、ここで異なって明示されるか、あるいは文脈上明白に矛盾しない限り、本発明に含まれるものである。本発明は、例示的な具体例を参照して具体的に示されて記述されたが、当業者は、特許請求の範囲によって定義される発明の精神及び範囲を外れずとも、形態及びディテールにおいて、多様な変化が行われるということを十分に理解するであろう。

40

【0077】

以下、実施例及び実験例を挙げ、本発明の構成及び効果についてさらに具体的に説明す

50

る。しかし、下記の実施例及び実験例は、本発明に係わる理解の一助とするために、例示の目的にのみ提供されたものであり、本発明の範疇及び範囲は、それらによって制限されるものではない。

【実施例】

【0078】

実施例1：ペプチドの合成

配列番号1のペプチドを従来に知られた固相ペプチド合成法（SPPS：solid phase peptide synthesis）によって製造した。具体的には、ペプチドは、ASP48S（Pepton、Inc.，大韓民国・大田）を利用して、Fmoc固相合成法を介して、C末端からアミノ酸一つずつカップリングすることによって合成した。次のように、ペプチドのC末端の最初のアミノ酸が樹脂に付着されたものを使用した。例えば、次の通りである：

【0079】

$\text{NH}_2\text{-Lys (Boc)-2-chloro-Trityl Resin}$

$\text{NH}_2\text{-Ala-2-chloro-Trityl Resin}$

$\text{NH}_2\text{-Arg (Pbf)-2-chloro-Trityl Resin}$

【0080】

ペプチド合成に使用した全てのアミノ酸原料は、N-termがFmocで保護（protection）され、残基はいずれも酸で除去される、Trt、Boc、t-Bu（t-butyl ester）、Pbf（2，2，4，6，7-pentamethyl dihydro-benzofuran-5-sulfonyl）などで保護されたものを使用した。例えば、次の通りである：

【0081】

Fmoc-Ala-OH 、 Fmoc-Arg (Pbf)-OH 、 $\text{Fmoc-Glu (OtBu)-OH}$ 、 Fmoc-Pro-OH 、 Fmoc-Leu-OH 、 Fmoc-Ile-OH 、 Fmoc-Phe-OH 、 Fmoc-Ser (tBu)-OH 、 Fmoc-Thr (tBu)-OH 、 Fmoc-Lys (Boc)-OH 、 Fmoc-Gln (Trt)-OH 、 Fmoc-Trp (Boc)-OH 、 Fmoc-Met-OH 、 Fmoc-Asn (Trt)-OH 、 Fmoc-Tyr (tBu)-OH 、 Fmoc-Ahx-OH 、 $\text{Trt-Mercaptoacetic acid}$ 。

【0082】

カップリング試薬（Coupling reagent）としては、HBTU [2-（1H-Benzotriazole-1-yl）-1，1，3，3-tetamethylaminium hexafluorophosphate] / HOBt [N-Hydroxybenzotriazole] / NMM [4-Methylmorpholine] を使用した。Fmoc除去は、20%のDMF内で、ピペリジン（piperidine in DMF）を利用した。合成されたペプチドをResinから分離し、残基の保護基除去には、切断カクテル（Cleavage Cocktail）[TFA（trifluoroacetic acid）/ TIS（triisopropylsilane）/ EDT（ethanedithiol）/ H_2O = 92.5 / 2.5 / 2.5 / 2.5] を使用した。

【0083】

アミノ酸保護基が結合された出発アミノ酸が固相支持体に結合されている状態を利用して、ここに当該アミノ酸をそれぞれ反応させ、溶媒で洗浄した後、脱保護する過程を反復することにより、各ペプチドを合成した。合成されたペプチドを樹脂から切り取った後、HPLCで精製し、合成いかんをMSで確認して凍結乾燥させた。

【0084】

配列番号1のペプチド（PEP 1）の製造に係わる具体的な過程について説明すれば、次の通りである。

【0085】

1) カップリング

$\text{NH}_2\text{-Lys (Boc)-2-chloro-Trityl Resin}$ で保護されたアミノ酸（8当量）と、カップリング試薬HBTU（8当量）/ HOBt（8当量）/ NMM（16当量）とをDMFに溶解させて添加した後、常温で2時間反応させ、DMF、MeOH、DMFの順に洗浄した。

【0086】

2) Fmoc脱保護

20%のDMF中のピペリジン (piperidine in DMF) を加え、常温で5分間2回反応させ、DMF、MeOH、DMFの順に洗浄した。

【0087】

3) 1及び2の反応を反復して行い、ペプチド基本骨格 $\text{NH}_2\text{-E (OtBu)-A-R (Pbf)-P-A-L-L-T (tBu)-S (tBu)-R (Pbf)-L-R (Pbf)-F-I-P-K (Boc)-2-chloro-Trityl Resin}$ を作った。

【0088】

4) 切断 (Cleavage) : 合成が完了したペプチドResinに、切断カクテル (Cleavage Cocktail) を加え、ペプチドをResinから分離した。 10

【0089】

5) 得られた混合物に、Cooling diethyl etherを加えた後、遠心分離して得られたペプチドを沈澱させる。

【0090】

6) Prep-HPLCで精製した後、LC/MSで分子量を確認して凍結させ、パウダーに製造した。

【0091】

実施例2: PEP 1の肝臓癌細胞株でのTNF α 阻害活性検証

細胞株の培養

健常者から血液を採血 (50 ml) した後、Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) を使用して、PBMC (peripheral blood mononuclear cell) 層を回収した。回収されたPBMCは、ヒト血清 (20%) が添加されたRPMI 1640培地 (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で富化させ、30分ほどヒト血清をコーティングした100 mmポリスチレン細胞培養プレートに移し、2時間ほど37℃、5%培養器で2時間培養した。その後、底に付着したモノサイトを、冷たいPBS (phosphate buffered saline) (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で引き離した後、96ウェルプレートにウェル当たり 1×10^5 セルになるように、RPMI 1640培地 (supplemented with penicillin-streptomycin; 100 mg/ml, human serum; 20%) で富化させ、実験前日に培養させておいた。 30

【0092】

また、TLR 2 (toll-like receptor 2) が安定して発現されるHEK293 (human embryonic kidney 293) 細胞株 (HEK293/TLR 2)、及び一般的なHEK293 (HEK293/null) 細胞株を、ソウル大学校歯科大学院から分譲され、ルシフェラーゼ (luciferase) 分析に使用した。HEK293/nullとHEK293/TLR 2との細胞株は、ルシフェラーゼ分析実験の前日に、12ウェルプレートに、ウェル当たり 2.5×10^5 セルになるように、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地 (supplemented with blasticidin; 10 μ g/ml, fetal bovine serum; 10%) (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で富化させて培養した。 40

【0093】

TNF- α 分析 (cytokine assay)

PEP 1がいかなる影響を及ぼすかということを調べるために、TNF- α に対するELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 実験を行った。PBMCに由来したモノサイトを、96ウェルプレートに、ウェル当たり 1×10^5 セルになるように、前日に培養させた。その後、LPS (lipopolysaccharide; 10 ng/ml, Sigma) を2時間処理し、PBSで3回洗浄した。OPTI-MEM培地 (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を入れ、1時間飢餓状態処理 (starvation) を行った後、FITC (fluorescein isothiocyanate)、FITC-TAT、PEP 1-FITC 50

及び F I T C - P E P 1 で $4 \mu\text{M}$ 処理し、2 時間培養した。培養が終わった後、細胞培養液を集め、E L I S A (R & D, Minneapolis, MN, U S A) キットマニュアルによって、T N F - α を定量した。具体的な定量方法は、次の通りである。

【0094】

T N F 測定は、サンドイッチ (sandwich) E L I S A 法を利用する。あらかじめコーティングされている 96 ウェルプレートに、T N F α 一次抗体を $100 \mu\text{l}$ ずつ入れ、 4°C で一晩おく。翌日 0.5 % tween 20 ウォッシュ溶液で、5 分ずつ 3 回洗浄した後、測定するサンプルと標準溶液とを $100 \mu\text{l}$ ずつ入れ、2 時間常温で反応させる。前記の通りに洗浄した後、H R P - conjugated 二次抗体を各 $100 \mu\text{l}$ ずつ入れ、2 時間常温で反応させる。その後、さらに洗浄し、アビジン / ビオチンを添加して発色させ、吸光度を測定する。標準吸光度から標準曲線を求め、それを利用して、各サンプルの吸光度から T N F α の量を定量する。

10

【0095】

P B M C 由来モノサイトを、エンドトキシン (endotoxin) である L P S ($10 \text{ ng} / \text{ml}$) で 2 時間刺激させ、1 時間 O P T I - M E M で、飢餓状態処理した後、F I T C、F I T C - T A T、P E P 1 - F I T C 及び F I T C - P E P 1 を $4 \mu\text{M}$ の濃度で 2 時間反応させた。反応後、細胞培養液の T N F - α レベルを E L I S A で測定した結果、F I T C 及び F I T C - T A T の場合、L P S によって、T N F - α レベルが高く測定されたが (6.2 及び $6.7 \text{ ng} / \text{ml}$)、P E P 1 - F I T C 及び F I T C - P E P 1 の場合、T N F - α レベルが大きく低下した傾向を示し (0.17 及び $0.25 \text{ ng} / \text{ml}$)、その差は、統計学的に有意の結果であると確認された ($P < 0.01$) (図 1)。

20

【0096】

実施例 3：悪液質マーカーレプチン、I L - 1β 、I L - 6 に対する影響の確認

T H P - 1 細胞の培養

悪液質マーカーに対する影響を確認するために、T H P - 1 細胞を培養した。T H P - 1 細胞 (human monocytic leukemia derived cell line) は、A T C C (American Type Culture Collection, Manassas, VA, U S A) から購入し、10 % F B S (Life technologies)、1 % ペニシリン / ストレプトマイシン、及び 0.05 mM 2 - mercaptoethanol (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, U S A) が補強された R P M I - 1 6 4 0 (Life technologies, Carlsbad, CA, U S A) 培地で、 37°C 、5 % CO_2 条件で培養した。

30

【0097】

普通サスペンション (suspension) の状態で育つ T H P - 1 細胞は、分化培地 (complete growth medium containing $100 \text{ ng} / \text{mL}$ phorbol 12 - myristate 13 - acetate (PMA, Sigma - Aldrich)) で、24 時間、粘着性大食細胞型 (adherent macrophage - like phenotype) に分化された。分化のために、T H P - 1 細胞 ($3 \times 10^6 \text{ cells} / \text{plate}$ 、 $\sim 95\%$ confluency) は、 10 cm の組織培養プレートに入れて培養した。

【0098】

P E P 1 処理

T H P - 1 細胞を分化させた後、大食細胞類似 T H F - 1 細胞を、完全成長培地 (complete growth medium) で 2 回洗浄した。その後、細胞を、 $10 \text{ ng} / \text{mL}$ L P S (Sigma - Aldrich) 及び / または $20 \mu\text{M}$ P E P - 1 で 4 時間 37°C で処理した。

40

【0099】

T H P - 1 細胞での R N A 分離及び c D N A 合成

全体 R N A を抽出し、メーカーのプロトコルによって、Qiagen の R Neasy ミニキット (Valencia, CA, U S A) を使用して精製した。そして、c D N A を、メーカーのプロトコルによって、Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, U S A) を使用して合成した。

【0100】

リアルタイム q P C R

50

その後、THP-1細胞からのcDNAサンプルを、リアルタイム定量PCR分析（qPCR）のためのテンプレートとして使用した。リアルタイムPCRは、下記表2に示したレプチン、IL-1 β 及びIL-6に対するプライマー、SYBR Green Master Mix（Qiagen）及びBio-Rad（Mercurius, CA, USA）CFX 96 real-time PCR instrumentを利用して実施した。熱循環（thermocycling）条件は、次の通りである：

【0101】

95℃で10秒、95℃で15秒、55℃で30秒、72℃で30秒の50回増幅サイクル。

【0102】

図2から図4に示した結果のグラフは、それぞれ3回の実験を実施して平均値を示したものであり、未処理対照群と対比した各geneの正規分布値で示したfold expressionである。ベータアクチン（beta actin）は、ハウスキーピング遺伝子（housekeeping gene）として使用した。

【0103】

【表2】

表2

Gene	フォワードプライマー	リバースプライマー
beta actin	AGAAAATCTGGCACCACACC	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA
leptin	TGCCTTCCAGAAACGTGATCC	CTCTGTGGAGTAGCCTGAAGC
IL1 β	GGACAAGCTGAGGAAGATGC	TCGTTATCCCATGAGTCGAA
IL6	CCTGAACCTTCCAAAGATGGC	TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA

【0104】

前記実験の結果、LPSによって炎症が誘発されたTHP-1細胞にPEP-1処理を施せば、レプチン、IL-1 β 及びIL-6のレベルが低くなることを確認することができた（図2～図4）。

【0105】

実施例4：関節リウマチ悪液質効果の確認

CIA（Collagen induced arthritis）動物モデル構築

本発明によるペプチドを含む組成物が、関節リウマチ（RA）による悪液質に及ぼす効果を調べるために、コラーゲン誘発関節リウマチ（CIA：Collagen-induced rheumatoid arthritis）を起こしたマウスの体重変化を測定した。

【0106】

CIA動物モデルについては、先行文献である金ヒョンオク外（2012）に詳細に記述されている。それを参照し、本実施例では、次のようにCIA動物モデルを構築した。

【0107】

下記一次実験及び二次実験において、前記実施例1によって得られた凍結乾燥パウダー形態のPEP-1を、0.9%食塩水に溶解させて使用した。PEP-1の純度に対する補正（純度：97.3%、含量：85.3%）を実施し、投与直前に0.9%食塩水を賦形剤にし、それぞれの濃度で注射用溶液を調剤した。全ての投与は、前記溶液を100 μ Lの量で行われた。

【0108】

一次実験

DBA/1Jマウス5週齢のオス（Orient Bio Inc., 韓国）を使用して、初日に38匹のネズミに一次誘導を進め、CIAを起こす前に、ペプチド組成物を投与する初期治療群（preventive）16匹（1nM、100 μ L（すなわち、約0.2ngの投与量）8匹；10nM、100 μ L（すなわち、約2ngの投与量）8匹）、CIAを起こし

10

20

30

40

50

た後、ペプチド組成物を投与する後期治療群 (therapeutic) 16匹 (1 nM、100 μ L 8匹; 10 nM、100 μ L 8匹) 及びPBS処理群6匹に区分した。

【0109】

初期治療群には、2, 4, 6日目、21, 23, 25日目、35, 37, 39日目にそれぞれの濃度に合うように、ID (intradermal injection) 方法で治療を進めた。19日目に、38匹のネズミに二次誘導を進め、21日目からは、後期治療群に、21, 23, 25, 35, 37, 39日目に、各濃度でID (intradermal injection) 方法で治療を進めた (図5)。

【0110】

関節炎指数評価は、二次誘導日から2日間隔で、42日まで進め、42日目に全てのネズミを犠牲にし、関節及び血清を収集した。

10

【0111】

前記PEP 1投与の間、ネズミは、いずれも生存していた。

【0112】

二次実験

前記一次実験時のように、5週齢のネズミを使用して、初日に、38匹のネズミに一次誘導を進め、CIAを起こさせた後、ペプチド組成物を投与する治療群32匹 (0.2 nM、100 μ L (すなわち、約0.04 ng) 8匹; 1 nM、100 μ L (すなわち、約0.2 ng) 8匹; 2 nM、100 μ L (すなわち、約0.4 ng) 8匹; 5 nM、100 μ L (すなわち、約1 ng) 8匹)、PBS処理群6匹に区分した。

20

【0113】

21日目に、コラーゲン二次誘導を進め、各治療群に、23, 25, 27日目にそれぞれの濃度に合うように、ID (intradermal injection) 方法で治療を進めた (図6)。

【0114】

前記PEP 1投与の間、ネズミは、いずれも生存していた。

【0115】

一次実験結果

初期治療群 (pre-1 nM及びpre-10 nM) 並びに後期治療群 (thera-1 nM及びthera-10 nM) の体重変化を調べれば、PEP 1処理を施した治療群が、CIA対照群に比べ、全体的に体重増加が確認され、10 nMに比べ、1 nMの処理群において、体重増加程度にすぐれる (図7)。

30

【0116】

二次実験結果

各濃度のペプチド処理群とCIA対照群との体重変化を調べれば、全体的にPEP 1処理群が、CIA対照群に比べ、体重増加を示し、特に1 nM以下の低い濃度処理群において、目立った体重増加を確認することができた (図8、図9)。

【0117】

前記のような一次及び二次の試験結果を総合してみれば、各グループ別体重変化を測定した結果、PEP 1治療群が、CIA対照群に比べ、体重増加を概して示しており、他のグループに比べ、1 nM後期治療群グループの体重減少が最も少なかった。これを介して、関節リウマチによる悪液質の治療に、PEP 1が効果を示すということを確認することができる。

40

【0118】

実施例5：毒性実験

(1) 細胞の準備

ATCCから得たHeLa細胞株を、MEM (Minimum Essential Medium) に10%ウシ胎児血清 (Invitrogen, USA) とEarle's salts、non-essential amino acids、ビルビン酸ナトリウム、100 μ g/ml ペニシリン及び100 units/ml ストレプトマイシン (streptomycin) を添加し、37℃、5% CO₂ 培養器で培養した。

【0119】

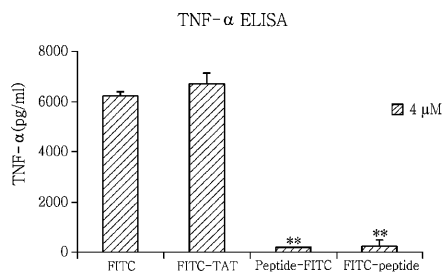
50

(2) 細胞生存率及び毒性分析

一方、前記培養された細胞株を、96ウェルプレートに分周し、培地に10%ウシ胎児血清 (Invitrogen, USA) と、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ペニシリン及び $100\text{units}/\text{ml}$ ストレプトマイシンとを添加し、 37°C 、5% CO_2 培養器で12時間培養した。PBS洗浄後、MEM (Minimum Essential Medium) で1時間の飢餓 (starvation) を行った。各 PEP 1 $20\mu\text{M}$ 水溶液を $100\mu\text{L}$ で処理し、 37°C で24時間培養した後、MTTアッセイ方法を利用して、細胞生存率及び毒性を分析した。その結果は、図10に示した通りである。

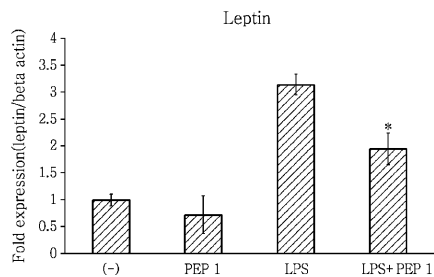
【図1】

[Fig. 1]



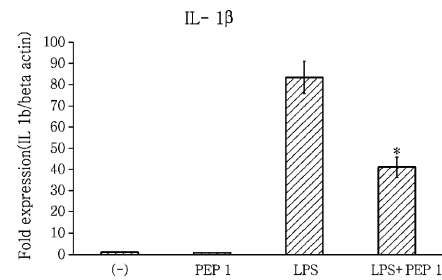
【図2】

[Fig. 2]



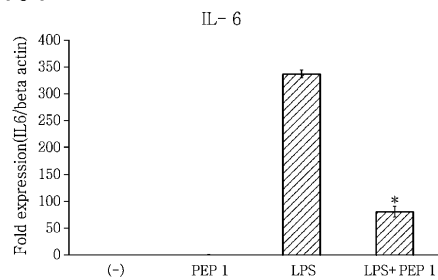
【図3】

[Fig. 3]



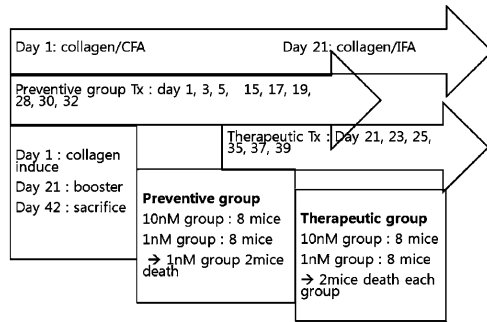
【図4】

[Fig. 4]



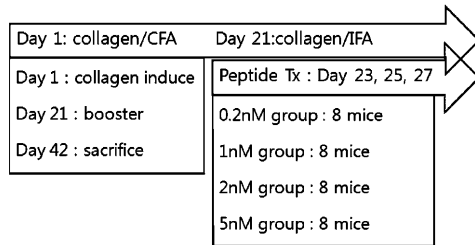
【図 5】

[Fig. 5]



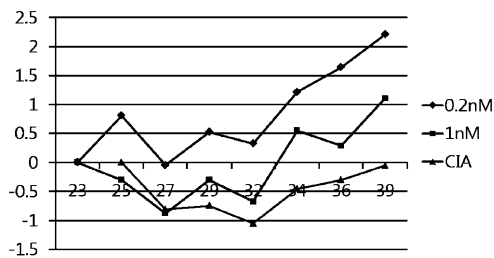
【図 6】

[Fig. 6]



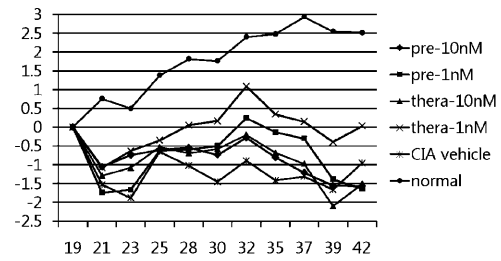
【図 9】

[Fig. 9]



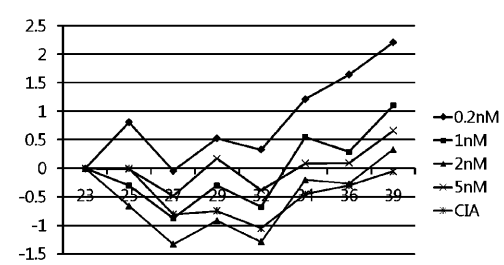
【図 7】

[Fig. 7]



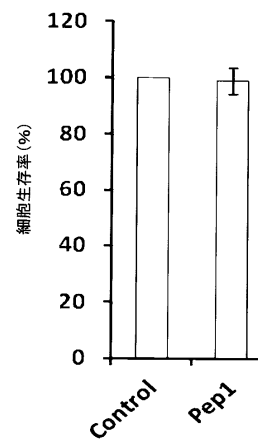
【図 8】

[Fig. 8]



【図 10】

図10



【配列表】

0006267190000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 10-2012-0071989

(32)優先日 平成24年7月2日(2012.7.2)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(31)優先権主張番号 10-2012-0104207

(32)優先日 平成24年9月19日(2012.9.19)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100164563

弁理士 佐々木 貴英

(72)発明者 キム サン チェ

大韓民国, ソウル 135-947, カンナムーク, クアンピョンーロ 10-キル, 15, サン
ノクス アパートメント, 101-405

審査官 幸田 俊希

(56)参考文献 特表2015-521039(JP, A)

特表2002-520293(JP, A)

Expert Opin. Investig. Drugs, 2009, vol.18, No.5, p.687-694

Clin. Cancer Res., 2011, vol.17, No.21, p.6847-6857

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPI