

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5048772号  
(P5048772)

(45) 発行日 平成24年10月17日 (2012.10.17)

(24) 登録日 平成24年7月27日 (2012.7.27)

(51) Int. Cl.

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>37/02</b>	<b>Z N A</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>17/02</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>13/12</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>13/12</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>9/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>9/10</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/16</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>1/16</b>	

請求項の数 12 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-519633 (P2009-519633)
(86) (22) 出願日	平成19年7月10日 (2007.7.10)
(65) 公表番号	特表2009-543800 (P2009-543800A)
(43) 公表日	平成21年12月10日 (2009.12.10)
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/073144
(87) 国際公開番号	W02008/008772
(87) 国際公開日	平成20年1月17日 (2008.1.17)
審査請求日	平成21年3月9日 (2009.3.9)
(31) 優先権主張番号	60/830, 279
(32) 優先日	平成18年7月12日 (2006.7.12)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	60/849, 041
(32) 優先日	平成18年10月2日 (2006.10.2)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	509010883
	ジ アリゾナ ボード オブ レジェンツ 、ア ボディ コーポレート アクティン グ フォア アンド オン ビハーフ オ ブ アリゾナ ステート ユニバーシティ アメリカ合衆国、アリゾナ 85281、 テムペ、サウス ミル アベニュー 69 9、ザ ブリックヤード、スウィート 6 01、ルーム 691 エイエイ
(74) 代理人	100064012
	弁理士 浜田 治雄
(72) 発明者	ロベス, ルシアーナ, ピアジーニ
	アメリカ合衆国、ニュー ヨーク 120 65、クリフトン パーク、ピア ダビ ンチ 21

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維性疾患及びケロイドを治療及び抑制する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

著しく色素沈着している個体が必要とする線維性疾患を治療および／または抑制するための薬剤の製造におけるポリペプチドの使用であって、ポリペプチドは、Y A R A A A R Q A R A ( S E Q I D N O : 2 8 1 ) からなる共有結合性導入ドメインからなり、

ポリペプチドのC末端側にはさらにW L R R A S A P L P G L K ( S E Q I D N O : 3 0 0 ) からなり、S残基がリン酸化される

著しく色素沈着している個体が必要とする線維性疾患を治療および／または抑制するための薬剤の製造におけるポリペプチドの使用。

【請求項 2】

個体が必要とするケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡を治療および／または抑制するための薬剤の製造におけるポリペプチドの使用であって、ポリペプチドは、Y A R A A A R Q A R A ( S E Q I D N O : 2 8 1 ) からなる共有結合性導入ドメインからなり、

ポリペプチドのC末端側にはさらにW L R R A S A P L P G L K ( S E Q I D N O : 3 0 0 ) からなり、S残基がリン酸化され、

個体が著しく色素沈着している

個体が必要とするケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡を治療および／または抑制するための薬剤の製造におけるポリペプチドの使用。

【請求項 3】

10

20

薬剤がケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡を治療または抑制するために用いられ、それを必要とする個体が、アジア系またはアフリカ系の血統である請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

薬剤が糖尿病性ネフロパシ、糸球体硬化症、I g A ネフロパシ、糖尿病性網膜症、黄斑変性、肝硬変、胆汁閉鎖症、鬱血性心不全、硬皮症及び腹部癒着からなる群から選択される一つ以上の線維性疾患を治療または抑制するために用いられる請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 5】

必要とする個体がアジア系またはアフリカ系の血統である線維性疾患を治療または抑制するための請求項 1 に記載の使用。

10

【請求項 6】

ポリペプチドが Y A R A A A R Q A R A W L R R A p S A P L P G L K ( S E Q I D N O : 3 1 5 ) からなり、p S はリン酸化セリン残基を示す請求項 1 - 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 7】

著しく色素沈着している個体が必要とする医薬組成物であって、ポリペプチドは、Y A R A A A R Q A R A ( S E Q I D N O : 2 8 1 ) からなり、

ポリペプチドの C 末端側にはさらに W L R R A S A P L P G L K ( S E Q I D N O : 3 0 0 ) からなり、S 残基がリン酸化される共有結合性導入ドメインからなる、著しく色素沈着している個体が必要とする線維性疾患を治療および / または抑制するための医薬組成物。

20

【請求項 8】

個体が必要とする医薬組成物であって、ポリペプチドは、Y A R A A A R Q A R A ( S E Q I D N O : 2 8 1 ) からなる共有結合性導入ドメインからなり、

ポリペプチドの C 末端側にはさらに W L R R A S A P L P G L K ( S E Q I D N O : 3 0 0 ) からなり、S 残基がリン酸化され、

個体が著しく色素沈着している、ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡を治療および / または抑制するための医薬組成物。

30

【請求項 9】

必要とする個体が、アジア系またはアフリカ系の血統である請求項 8 に記載のケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡を治療および / または抑制するための医薬組成物。

【請求項 10】

糖尿病性ネフロパシ、糸球体硬化症、I g A ネフロパシ、糖尿病性網膜症、黄斑変性、肝硬変、胆汁閉鎖症、鬱血性心不全、硬皮症及び腹部癒着からなる群から選択される一つ以上の線維性疾患を治療または抑制するために用いられる請求項 7 または 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

必要とする個体がアジア系またはアフリカ系の血統である請求項 7 に記載の線維性疾患を治療および / または抑制するための医薬組成物。

40

【請求項 12】

ポリペプチドが Y A R A A A R Q A R A W L R R A p S A P L P G L K ( S E Q I D N O : 3 1 5 ) からなり、p S はリン酸化セリン残基を示す請求項 7 - 11 のいずれかに記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、2006 年 7 月 12 日の米国暫定特許出願第 60 / 830, 279 号、及び 2006 年 10 月 2 日に出願の第 60 / 849, 041 号の優先権を主張し、両方とも本

50

願明細書において全体として引用された。

【政府支援についての記載】

【0002】

本事業は、少なくとも一部分においてN I H認可K 2 5 H L 0 7 4 9 6 8及びN I H S T T R認可6 R 4 2 H L 0 7 1 3 0 9 - 0 3によって支援された。アメリカ政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

ケロイド及び肥厚性瘢痕は、過剰産生、細胞外基質の堆積及び収縮による過度の傷によって特徴づけられ、それは線維増殖性異常回復疾患であり、機能的及び表面的奇形を引き起こす(Leask及びAbraham(2004))。現段階において前記状況に対する効果的治療はない。

【発明の概要】

【0004】

第1態様において、本発明は、線維性疾患を治療および/または抑制するのに十分な量の、一般式I: X1 - A(X2)APLP - X3(SEQ ID NO: 302及びSEQ ID NO: 316)による配列を含むポリペプチドをそれを必要とする個体に投与する方法を含む、線維性疾患を治療および/または抑制する方法を提供する。

(前記一般式において、X1は、SEQ ID NO: 298の残基1及び14間の熱ショックタンパク質20の配列の0 - 14アミノ酸であり；

X2は、S、T、Y、D、E、ヒドロキシリジン、ヒドロキシプロリン、ホスホセリン・アナログ及びホスホチロシン・アナログからなる群から選択され；

X3は、(a)SEQ ID NO: 298の残基21及び160の0 - 140アミノ酸及び、(b)一連のZ1 - Z2 - Z3属の0、1、2又は3のアミノ酸からなる群から選択され、ここにおいて、Z1は、G及びDからなる群から選択され；

Z2は、L及びKからなる群から選択され；

Z3は、S、T及びKからなる群から選択される。)

【0005】

第2の態様において、本発明は、ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡を治療および/または抑制するのに十分な量の、一般式I: X1 - A(X2)APLP - X3(SEQ ID NO: 302及びSEQ ID NO: 316)による配列を含むポリペプチドをそれを必要とする個体に投与することを含み、ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡を治療および/または抑制する方法を提供する。

(前記一般式において、X1は、SEQ ID NO: 298の残基1及び14間の熱ショックタンパク質20の配列の0 - 14アミノ酸であり；

X2は、S、T、Y、D、E、ヒドロキシリジン、ヒドロキシプロリン、ホスホセリン・アナログ及びホスホチロシン・アナログからなる群から選択され；

X3は、(a)SEQ ID NO: 298の残基21及び160の0 - 140アミノ酸、及び(b)一連のZ1 - Z2 - Z3属の0、1、2または3アミノ酸からなる群から選択され、ここにおいて、Z1は、G及びDからなる群から選択される。)

【0006】

本発明の第1および/または第2態様の各種の実施例において、それを必要とする個体は、アジア系またはアフリカ系であり、および/または、それを必要とする個体が標的組織において、TGF $\beta$ 1発現、TGF $\beta$ 2発現、CTGF発現、リン酸化コフィリン、リン酸化HSP27、及び $\alpha$ -平滑筋肉アクチン発現からなる群から選択される一つ以上の生体指標の高いレベルを有する。

【発明の詳細】

【0007】

主に本願明細書において、アミノ酸のための単文字指定が使われる。当業者によって周知のとおり、その単文字指定は、次の通りである：

10

20

30

40

50

Aは、アラニンであり； Cは、システインであり； Dは、アスパラギン酸であり； Eは、グルタミン酸であり； Fは、フェニルアラニンであり； Gは、グリシンであり； Hは、ヒスチジンであり； Iは、イソロイシンであり； Kは、リジンであり； Lは、ロイシンであり； Mは、メチオニンであり； Nは、アスパラギンであり； Pは、プロリンであり； Qは、グルタミンであり； Rは、アルギニンであり； Sは、セリンであり； Tは、トレオニンであり； Vは、バリンであり； Wは、トリプトファンであり；及び、Yはチロシンである。

#### 【0008】

ここで使用しているように、文脈が特にはっきり指図しない限り、単数形「a」、「an」及び「the」は、複数形の指示物も含む。例えば、「ポリペプチド」への言及は、一つ以上のポリペプチドを意味する。

10

#### 【0009】

この開示は、本発明の方法に用いられるポリペプチドが、形質転換成長因子 1 ( TGF - 1 ) - 誘導結合組織成長因子 ( CTGF ) 発現を減少させ、関連するコラーゲン合成を減少させることを証明する。効果は、細胞形態学における変化 ( 星形形態及び張線維の分裂 ) に関連する。アクチン細胞骨格が CTGF 発現のために完全でなければならないという理由から、細胞骨格力学を変更する本発明のポリペプチドの能力が、ケロイド線維芽細胞内の CTGF レベルの減少に重要な意味を持つことを示した。CTGF が発育及び線維症反応の保全において中心的な役割を果たすので、本発明の方法は、ケロイド及び広い範囲の線維性疾患を治療するのに広く適用できる。

20

#### 【0010】

したがって、一つの形態において、本発明は、ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される線維性疾患及び/または傷跡を治療および/または抑制するのに十分な量の、一般式 I : X1 - A ( X2 ) APLP X3 ( SEQ ID NO : 302 及び SEQ ID NO : 316 ) による配列のポリペプチド構成及び成分をそれを必要とする個体に投与することからなる、ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される線維性疾患及び/または傷跡を治療および/または抑制する方法を提供する。

( 前記一般式において、X1 は、SEQ ID NO : 298 の残基 1 及び 14 間の熱ショックタンパク質 20 の配列の 0 - 14 アミノ酸であり；

X2 は、S、T、Y、D、E、ヒドロキシリジン、ヒドロキシプロリン、ホスホセリン・アナログ及びホスホチロシン・アナログからなる群から選択され；

30

及び、X3 は、( a ) SEQ ID NO : 298 の残基 21 及び 160 の 0 - 140 アミノ酸、及び ( b ) 一連の Z1 - Z2 - Z3 属の 0、1、2 または 3 アミノ酸からなる群から選択され；ここで、Z1 は、G 及び D からなる群から選択され；

Z2 は、L 及び K からなる群から選択され；

及び、Z3 は、S、T 及び K からなる群から選択される。 )

#### 【0011】

好ましい実施例において、X1 は、WLRR ( SEQ ID NO : 1 ) であり； Z1 は、G であり； Z2 は、L であり； Z3 は K である。本実施例において、一般式のポリペプチドは、SEQ ID NO : 300 ( WLRRAPSAPLPG LK ) に基づくアミノ酸配列を含むかまたは同アミノ酸配列からなり、そこにおいて、「pS」はリン酸化セリン残基を示すことが好ましい。別の好ましい実施例において、本発明の方法に用いられるポリペプチドは、式に従うアミノ酸配列：B1 - WLRRAPSAPLPG LK - B2 ( SEQ ID NO : 317 ) を含むかまたは同アミノ酸配列から構成され、ここで、少なくとも一つの B1 及び B2 が、YARAAARQARA ( SEQ ID NO : 281 ) 及び YGRKKRRQRRR ( SEQ ID NO : 299 ) からなる群から選択される。

40

#### 【0012】

ある実施例において、「それを必要とする個体」は、ケロイド及び肥厚性瘢痕および/または線維性疾患からなる群から選択される傷跡形成になるかまたは、ケロイド及び肥厚

50

性瘢痕および／または線維性疾患からなる群から選択される傷跡形成をもたらした傷を負うかまたは苦しめる個体である。ここで使用しているように、用語「傷」は、広く皮膚及び皮下の組織の怪我を指す。そのような傷は、裂傷、熱傷、穿刺、褥瘡、床擦れ、口腔潰瘍、外傷、咬傷、瘻管、潰瘍、伝染によって生じる疾患、歯周病、歯内傷、口腔しゃく熱症候群、開腹傷、外科創傷、切開傷、熱傷の後の痙攣、及び表面外科手術から起こる傷を含むが、これだけに限定されるわけではない。

【 0 0 1 3 】

ここで使用しているように、「ケロイド」は、治療された皮膚損傷の部位における組織の発育過多をもたらす傷跡である。ケロイドは、通常ひどい痒さ、激痛及び肉質の変化を伴う。ひどいケースにおいて、それは皮膚の動きに作用することもある。ここで使用しているように、「肥厚性瘢痕」は、最初の傷の境界を越えて育たなくて、時間とともに還元する隆起傷跡である。

10

【 0 0 1 4 】

ここで使用しているように、表現「ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される還元傷跡形成」とは、患者に治療的または表面利点を提供し、ケロイドまたは肥厚性瘢痕形成のあらゆる減少を意味する。そのような治療的または皮膚表面利点は、例えば、本発明の方法による治療がない場合に、ケロイドまたは肥厚性瘢痕の形成について、ケロイドまたは肥厚性瘢痕のサイズおよび／または深さを減少させることによって、または既存のケロイドまたは肥厚性瘢痕のサイズを還元することによって、達成されることができる。

【 0 0 1 5 】

20

本願発明は、ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡形成を還元する、方法を提供することによって、ケロイド及び肥厚性瘢痕の形成を縮小する臨床的に全ての種類の傷の治療、最初のケロイドまたは肥厚性瘢痕の形成の縮小、及び既存のケロイドまたは肥厚性瘢痕の治療学上の治療（すなわち：形成後のケロイドまたは肥厚性瘢痕の切断、本発明の化合物によるその治療、及びケロイドまたは肥厚性瘢痕の慢性治療）のために役立つ。

【 0 0 1 6 】

好ましい実施例において、ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される傷跡を治療または抑制する必要がある個体は、著しく色素沈着している個体であり、アジア系またはアフリカ系の血統の個体を含むがこれだけに限るわけではなく、ケロイド及び肥厚性瘢痕に影響されやすく、したがって、ケロイドまたは肥厚性瘢痕の発育を抑制するとともに、ケロイドまたは肥厚性瘢痕を治療する予防治療のために、本発明の方法から恩恵をうけることができる。

30

【 0 0 1 7 】

各種の他の好ましい実施例において、線維性疾患を治療または限定のための治療を必要とする個体は、組織線維症以外の症状（原因不明の肺線維症、肝臓線維症、腎臓線維症、腹膜後腔線維症、嚢胞性線維症、血管線維症及び心臓の組織線維症及び、その他を含む）、糖尿病性ネフロパシ、糸球体硬化症及びIgAネフロパシ（腎臓機能不全の原因、及び透析及び再移植のためのニーズ）、糖尿病性網膜症及び黄斑変性（目の線維症及び盲目の主要な原因）、肝硬変及び胆汁閉鎖症（肝臓線維症及び肝不全の主要な原因）、鬱血性心不全、肺線維症、硬皮症、腹部癒着、及び間質性線維症などを含む、TGF-誘導CTGF発現と関連している一つ以上の線維性疾患になる危険性または苦しみを有する患者である。

40

【 0 0 1 8 】

本願明細書において開示される全ての実施例の各種の他の好ましい実施例において、ケロイド及び肥厚性瘢痕からなる群から選択される線維性疾患および／または傷跡を治療および／または制限のための治療を必要とする個体は、一つ以上の高いレベルの下記生体指標を有する人である：

形質転換成長因子受容体 1（「TGF 1」）発現、

形質転換成長因子受容体 2（「TGF 2」）発現、

50

結合組織成長因子（「CTGF」）発現、  
 リン酸化コフィリン、  
 リン酸化HSP27、及び  
 - 平滑筋肉アクチン発現。

#### 【0019】

下記で開示されたとおり、本発明のポリペプチドは、ヒト・ケロイド線維芽細胞におけるTGFB1 - 誘導CTGF発現、 - SMAのTGFB1 - 誘導発現及びリン酸化コフィリン及びリン酸化HSP27を抑制し、線維症状における前記指標の数値の上昇は、これらの生体指標の高値のレベルを有する個体が、特に本発明の方法から利益を得ることができることを示す。ここで使用しているように、一つ以上生体指標の「高値の」レベルは、その個体、又は適切な標的組織において同様の状態にある個体の標準を越えるいかなる増加を意味する。そのような標的組織は、上記に開示されたもの（皮膚、腎臓、肺、肝臓、腹膜、血管、心臓、網膜、その他）を含むがこれだけに限らない線維症に影響を受ける組織から取り出される生検、傷滲出液、血液を含むがこれだけに限らない線維症状に影響を受けるものである。各種の更なる実施例において、それを必要とする個体は、5%、10%、15%、20%、25%、50%、75%、100%または上記通常レベルより高い列挙された生体指標の一つ以上のレベルを有するものである。一つ以上の生体指標レベルを決定することは、開示された下記の内容を含むがこれだけに限らないタンパク質および/または遺伝子発現を測定するための従来技術における標準技術を使用して、行われることができる。

#### 【0020】

これらの一つ以上の生体指標の「通常の」レベルは、いかなる適切な手段によって確立されてもよく、それは、その個体、または線維症状および/またはケロイドの非存在下の同様に状態にある個体の通常のレベルを決定すること、または参考のための標準を確立する他のいかなる適切な手段を含むがこれだけに限らない。

#### 【0021】

ここで使用しているように、用語「治療」または、「治療する」は、以下の一つ以上を達成することを意味する：（a）疾患のひどさを減らす；（b）治療される疾患の症状特性の発症を限定又は防止する；（c）治療される疾患の症状特性の悪化を抑制する；（d）以前疾患を有した患者の疾患の再発を限定又は防止する；（e）すでに疾患前兆を示した患者の症状の再発を限定または予防する。

#### 【0022】

ここで使用しているように、用語「制限」または「抑制する」は、個体の疾患を発病する危険を抑制することを意味する。

#### 【0023】

更なる態様において、本発明は、本発明の治療方法の効果をモニタするための方法を提供し、その方法は、本願明細書において開示されるとおり個体を治療すること、及び下記生体指標の一つ以上のレベルをその後に決定することを含む：

TGFB1 発現；  
 TGFB2 発現；  
 CTGF 発現；  
 リン酸化コフィリン；  
 リン酸化HSP27；  
 及び - 平滑筋肉アクチン発現。

#### 【0024】

これらの実施例において、一つ以上の生体指標のレベルが、治療前のレベルを確立するための治療の前に測定され、治療後の生体指標レベルの測定が後に続くのが好ましい。その後の生体指標レベル測定のためのタイミングは、主治医によって役立つと考えられる間隔で良い。（即ち、治療後に週一度、週二度、一週おきに、その他に）。治療の有効性が、個体によって経験される症状に対する効果によって確立されることができると共に、生

10

20

30

40

50

体指標レベルのモニタリングは、追求する治療法を決定する際に主治医に有益である、治療の有効性に関する追加的な情報を提供することができる。例えば、治療法が、個体の症状に顕著な改善を引き起こさなかった場合でも、生体指標レベルは、治療が生体指標レベルを減らし、そして、医師が同じ投薬量及び頻度で治療法を続けることを決めてもよいことを示す。あるいは、症状または生体指標レベルが治療によってインパクトを与えられていない場合、主治医は、投薬量および/または頻度を増やすかまたは組合せ治療を追求することに決めてもよい(TGF - 抗体治療、および/または - 平滑筋アクチン発現を抑制するように、および/またはHSP27および/またはコフィリンを脱リン酸化するよう意図されている治療を含むがこれに限らない。 )。

#### 【0025】

10

一般式からすると、HSP20の残基16で置換可能なHSP20からの残基15 - 21は、一般式I(A(X2)APLP)(SEQ ID NO:2)によるポリペプチドの構造上のコアを形成する。HSP20の完全な配列が、SEQ ID NO:298として提供され、下で示される:

Met	Glu	Ile	Pro	Val	Pro	Val	Gln	Pro	Ser	
Trp	Leu	Arg	Arg	Ala	Ser	Ala	Pro	Leu	Pro	
Gly	Leu	Ser	Ala	Pro	Gly	Arg	Leu	Phe	Asp	
Gln	Arg	Phe	Gly	Glu	Gly	Leu	Leu	Glu	Ala	
Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Pro	Thr	Thr	Leu	
Ala	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Ala	Pro	Ser	Val	20
Ala	Leu	Pro	Val	Ala	Gln	Val	Pro	Thr	Asp	
Pro	Gly	His	Phe	Ser	Val	Leu	Leu	Asp	Val	
Lys	His	Phe	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Ala	Val	
Lys	Val	Val	Gly	Glu	His	Val	Glu	Val	His	
Ala	Arg	His	Glu	Glu	Arg	Pro	Asp	Glu	His	
Gly	Phe	Val	Ala	Arg	Glu	Phe	His	Arg	Arg	
Tyr	Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	Val	Asp	Pro	Ala	
Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Leu	Ser	Pro	Glu	Gly	
Val	Leu	Ser	Ile	Gln	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	
Ala	Gln	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Lys	30

。

#### 【0026】

下線を引かれた残基は、アミノ酸15 - 21を示す。

#### 【0027】

X1は、SEQ ID NO:298の残基1及び14間のSEQ ID NO:298の0 - 14アミノ酸である(上のイタリック体にて示される)。したがって、もしX1が、SEQ ID NO:298の1及び14残基の5アミノ酸である場合、X1は残基15 - 21に隣接する5アミノ酸であり、例えば:SWLRR(SEQ ID NO:303)である。同様に、X1がSEQ ID NO:298の残基1 - 14のアミノ酸の以下の数字である場合、その本体は下記で示される:

40

1アミノ酸 SEQ ID NO:298: R

2アミノ酸 SEQ ID NO:298: RR

3アミノ酸 SEQ ID NO:298: LRR (SEQ ID NO:304

)

4アミノ酸 SEQ ID NO:298: WLRR (SEQ ID NO:1)

6アミノ酸 SEQ ID NO:298: PSWLRR (SEQ ID NO:305)

7アミノ酸 SEQ ID NO:298: NPSWLRR (SEQ ID NO:306)

8アミノ酸 SEQ ID NO:298: VNPSWLRR (SEQ ID N

50

O : 3 0 7 )

9 アミノ酸 SEQ ID NO : 2 9 8 : P V N P S W L R R ( SEQ ID NO : 3 0 8 )

1 0 アミノ酸 SEQ ID NO : 2 9 8 : V P V N P S W L R R ( SEQ ID NO : 3 0 9 )

1 1 アミノ酸 SEQ ID NO : 2 9 8 : P V P V N P S W L R R ( SEQ ID NO : 3 1 0 )

1 2 アミノ酸 SEQ ID NO : 2 9 8 : I P V P P V N P S W L R R ( SEQ ID NO : 3 1 1 )

1 3 アミノ酸 SEQ ID NO : 2 9 8 : E I P V P P V N P S W L R R ( SEQ ID NO : 3 1 2 ) 10

1 4 アミノ酸 SEQ ID NO : 2 9 8 : M E I P V P P V N P S W L R R ( SEQ ID NO : 3 1 3 )

#### 【 0 0 2 8 】

他の実施例で、X 1 は、配列 W L R R ( SEQ ID NO : 1 ) の 0、1、2、3、または 4 アミノ酸である。

#### 【 0 0 2 9 】

他の一実施例において、X 3 は、SEQ ID NO : 2 9 8 の残基 2 1 及び 1 6 0 間の 0 - 1 4 0 アミノ酸である。この実施例によれば、X 3 は、SEQ ID NO : 2 9 8 の残基 2 1 及び 1 6 0 間の 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 2 0、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9 又は 1 4 0 アミノ酸であることができる。 20 30

#### 【 0 0 3 0 】

例えば、X 3 が SEQ ID NO : 2 9 8 の残基 2 1 及び 1 6 0 間の 5 アミノ酸である場合、X 3 は残基 1 5 - 2 1 に隣接する 5 アミノ酸であり、例えば：G L S A P ( SEQ ID NO : 3 1 4 ) である。他の可能な X 3 配列は、本願明細書において提供される教示に基づいて当業者にとって明らかである。

#### 【 0 0 3 1 】

他の一実施例において、X 3 は一連の属 Z 1 - Z 2 - Z 3 の 0、1、2 または 3 アミノ酸であり、ここで Z 1 は G 及び D からなる群から選択され； Z 2 は、L 及び K からなる群から選択され； Z 3 は S、T 及び K からなる群から選択される。 40

#### 【 0 0 3 2 】

例えば、X 3 が属 Z 1 - Z 2 - Z 3 の配列の 2 アミノ酸である場合、X 3 の可能性は G L、G K、D L 及び D K である。本実施例における可能な他の X 3 配列は、本願明細書において提供される教示に基づいて当業者にとって明らかである。

#### 【 0 0 3 3 】

一般式 I のポリペプチドの各種の実施例によれば、X 2 は、S、T、Y、D、E、ホスホセリン模倣体またはホスホチロシン模倣体である。X 2 が S、T または Y であることが、好まれ；より好ましくは X 2 が S または T であり、X 2 が S であることが一番好ましい。X 2 が S、T または Y であるこれらの実施例において、X 2 がリン酸化されることが、 50



最も好適である。X 2 が D または E であるときに、これらの残基はリン酸化状態を模倣する負電荷を有する。X 2 がリン酸化、ホスホセリンまたはホスホチロシン模倣体であるかまたはリン酸化アミノ酸残基（例えば D または E 残基）の別の模倣体である場合に、一般式 I のポリペプチドは、最適に本発明の方法に効果的である。模倣体ホスホセリンの実施例は、スルホセリン、リン酸塩酸素のためのメチレン置換を含んでいるアミノ酸模倣体、4 - ホスホノ（ジフルオロメチル）フェニルアラニン、及び L - 2 - アミノ - 4 - （ホスホノ） - 4 , 4 - ジフルオロブタン酸を含むが、これに限定されるわけではない。他のホスホセリン模倣体は、当業者によって作られることができる。ホスホチロシン模倣体の実施例は、ホスホノメチルフェニルアラニン、ジフルオロホスホノメチルフェニルアラニン、フルオロ - O - マロニルチロシン及び O - マロニルチロシンを含むが、これに限定されるわけではない。

10

# 【 0 0 3 4 】

したがって、これらの各種の実施例によれば、本発明の方法のための一般式 I に基づくポリペプチドの代表的なサンプルは、以下の配列を含むかまたは以下の配列から構成されるポリペプチドを含むが、これに限定されるわけではない：( A S A P L P ) ( S E Q I D N O : 3 ) ; ( A T A P L P ) ( S E Q I D N O : 4 ) ; ( R A S A P L P ) ( S E Q I D N O : 5 ) ; ( R A T A P L P ) ( S E Q I D N O : 6 ) ; ( A Y A P L P ) ( S E Q I D N O : 7 ) ; ( R A Y A P L P ) ( S E Q I D N O : 8 ) ; ( R R A S A P L P ) ( S E Q I D N O : 9 ) ; ( L R R A S A P L P ) ( S E Q I D N O : 1 0 ) ; ( W L R R A S A P L P ) ; ( S E Q I D N O : 1 1 ) ( R R A T A P L P ) ( S E Q I D N O : 1 2 ) ; ( L R R A T A P L P ) ( S E Q I D N O : 1 3 ) ; ( W L R R A T A P L P ) ( S E Q I D N O : 1 4 ) ; ( R R A Y A P L P ) ( S E Q I D N O : 1 5 ) ; ( L R R A Y A P L P ) ( S E Q I D N O : 1 6 ) ; ( W L R R A Y A P L P ) ( S E Q I D N O : 1 7 ) ; ( R R A S A P L P G ) ( S E Q I D N O : 1 8 ) ; ( R R A S A P L P D ) ( S E Q I D N O : 1 9 ) ; ( R R A S A P L P G L ) ( S E Q I D N O : 2 0 ) ; ( R R A S A P L P G K ) ( S E Q I D N O : 2 1 ) ; ( R R A S A P L P D L ) ( S E Q I D N O : 2 2 ) ; ( R R A S A P L P D K ) ( S E Q I D N O : 2 3 ) ; ( R R A S A P L P G L S ) ( S E Q I D N O : 2 4 ) ; ( R R A S A P L P G L T ) ( S E Q I D N O : 2 5 ) ; ( R R A S A P L P G K S ) ( S E Q I D N O : 2 6 ) ; ( R R A S A P L P G K T ) ( S E Q I D N O : 2 7 ) ; ( R R A S A P L P D L S ) ( S E Q I D N O : 2 8 ) ; R R A S A P L P D L T ) ( S E Q I D N O : 2 9 ) ; ( R R A S A P L P D K S ) ( S E Q I D N O : 3 0 ) ; ( R R A S A P L P D K T ) ( S E Q I D N O : 3 1 ) ; ( L R R A S A P L P G ) ( S E Q I D N O : 3 2 ) ; ( L R R A S A P L P D ) ( S E Q I D N O : 3 3 ) ; ( L R R A S A P L P G L ) ( S E Q I D N O : 3 4 ) ; ( L R R A S A P L P G K ) ( S E Q I D N O : 3 5 ) ; ( L R R A S A P L P D L ) ( S E Q I D N O : 3 6 ) ; ( L R R A S A P L P D K ) ( S E Q I D N O : 3 7 ) ; ( L R R A S A P L P G L S ) ( S E Q I D N O : 3 8 ) ; ( L R R A S A P L P G L T ) ( S E Q I D N O : 3 9 ) ; ( L R R A S A P L P G K S ) ( S E Q I D N O : 4 0 ) ; ( L R R A S A P L P G K T ) ( S E Q I D N O : 4 1 ) ; ( L R R A S A P L P D L S ) ( S E Q I D N O : 4 2 ) ; ( L R R A S A P L P D L T ) ( S E Q I D N O : 4 3 ) ; ( L R R A S A P L P D K S ) ( S E Q I D N O : 4 4 ) ; ( L R R A S A P L P D K T ) ( S E Q I D N O : 4 5 ) ; ( W L R R A S A P L P G ) ( S E Q I D N O : 4 6 ) ; ( W L R R A S A P L P D ) ( S E Q I D N O : 4 7 ) ; ( W L R R A S A P L P G L ) ( S E Q I D N O : 4 8 ) ; ( W L R R A S A P L P G K ) ( S E Q I D N O : 4 9 ) ; ( W L R R A S A P L P D L ) ( S E Q I D N O : 5 0 ) ; ( W L R R A S A P L P D K ) ( S E

20

30

40

50

Q ID NO:51); (WLRRASAPLPGLS) (SEQ ID NO:  
52); (WLRRASAPLPGLT) (SEQ ID NO:53); (WL  
RRASAPLPGKS) (SEQ ID NO:54); (WLRRASAPLP  
GKT) (SEQ ID NO:55); (WLRRASAPLPDLS) (SE  
Q ID NO:56); (WLRRASAPLPDLT) (SEQ ID NO:  
57); (WLRRASAPLPDKS) (SEQ ID NO:58); (WL  
RRASAPLPDKT) (SEQ ID NO:59); (RRATAPLP  
G) (SEQ ID NO:60); (RRATAPLPD) (SEQ ID NO:  
61); (RRATAPLPGL) (SEQ ID NO:62); (RRATA  
PLPGK) (SEQ ID NO:63); (RRATAPLPDL) (SEQ  
ID NO:64); (RRATAPLPDK) (SEQ ID NO:65);  
(RRATAPLPGLS) (SEQ ID NO:66); (RRATAPLP  
GLT) (SEQ ID NO:67); (RRATAPLPGKS) (SEQ  
ID NO:68); (RRATAPLPGKT) (SEQ ID NO:69);  
(RRATAPLPDLS) (SEQ ID NO:70); (RRATAPLP  
DLT) (SEQ ID NO:71); (RRATAPLPDKS) (SEQ  
ID NO:72); (RRATAPLPDKT) (SEQ ID NO:73);  
(LRRATAPLPG) (SEQ ID NO:74); (LRRATAPLP  
D) (SEQ ID NO:75); (LRRATAPLPGL) (SEQ ID  
NO:76); (LRRATAPLPGK) (SEQ ID NO:77); (L  
RRATAPLPDL) (SEQ ID NO:78); (LRRATAPLPD  
K) (SEQ ID NO:79); (LRRATAPLPGLS) (SEQ I  
D NO:80); (LRRATAPLPGLT) (SEQ ID NO:81);  
(LRRATAPLPGKS) (SEQ ID NO:82); (LRRATAP  
LPGKT) (SEQ ID NO:83); (LRRATAPLPDLS) (S  
EQ ID NO:84); (LRRATAPLPDLT) (SEQ ID NO:  
85); (LRRATAPLPDKS) (SEQ ID NO:86); (LRR  
ATAPLPDKT) (SEQ ID NO:87); (WLRRATAPLP  
G) (SEQ ID NO:88); (WLRRATAPLPD) (SEQ ID N  
O:89); (WLRRATAPLPGL) (SEQ ID NO:90); (W  
LRRATAPLPGK) (SEQ ID NO:91); (WLRRATAPLP  
DL) (SEQ ID NO:92); (WLRRATAPLPDK) (SEQ  
ID NO:93); (WLRRATAPLPGLS) (SEQ ID NO:94  
); (WLRRATAPLPGLT) (SEQ ID NO:95); (WLRR  
ATAPLPGKS) (SEQ ID NO:96); (WLRRATAPLP  
GKT) (SEQ ID NO:97); (WLRRATAPLPDLS) (SEQ  
ID NO:98); (WLRRATAPLPDLT) (SEQ ID NO:99  
); (WLRRATAPLPDKS) (SEQ ID NO:100); (WLR  
RATAPLPDKT) (SEQ ID NO:101); (RRAYAPLP  
G) (SEQ ID NO:102); (RRAYAPLPD) (SEQ ID NO  
:103); (RRAYAPLPGL) (SEQ ID NO:104); (RR  
AYAPLPGK) (SEQ ID NO:105); (RRAYAPLPDL)  
(SEQ ID NO:106); (RRAYAPLPDK) (SEQ ID NO  
:107); (RRAYAPLPGLS) (SEQ ID NO:108); (R  
RAYAPLPGLT) (SEQ ID NO:109); (RRAYAPLP  
GKS) (SEQ ID NO:110); (RRAYAPLPGKT) (SEQ ID  
NO:111); (RRAYAPLPDLS) (SEQ ID NO:112);  
(RRAYAPLPDLT) (SEQ ID NO:113); (RRAYAPL  
PDKS) (SEQ ID NO:114); (RRAYAPLPDKT) (SE  
Q ID NO:115); (LRRAYAPLPG) (SEQ ID NO:11

6); (LRRAYAPLPD) (SEQ ID NO:117); (LRRAY  
APLPGL) (SEQ ID NO:118); (LRRAYAPLP GK) (S  
SEQ ID NO:119); (LRRAYAPLPDL) (SEQ ID NO  
:120); (LRRAYAPLPDK) (SEQ ID NO:121); (L  
RRAYAPLPGLS) (SEQ ID NO:122); (LRRAYAPLP  
GLT) (SEQ ID NO:123); (LRRAYAPLP GKs) (SE  
Q ID NO:124); (LRRAYAPLP GKt) (SEQ ID NO:  
125); (LRRAYAPLPDLS) (SEQ ID NO:126); (L  
RRAYAPLPDLT) (SEQ ID NO:127); (LRRAYAPLP  
DKS) (SEQ ID NO:128); (LRRAYAPLPDKT) (SE 10  
Q ID NO:129); (WLRRAYAPLP G) (SEQ ID NO:1  
30); (WLRRAYAPLPD) (SEQ ID NO:131); (WLR  
RAYAPLPGL) (SEQ ID NO:132); (WLRRAYAPLP G  
K) (SEQ ID NO:133); (WLRRAYAPLPDL) (SEQ  
ID NO:134); (WLRRAYAPLPDK) (SEQ ID NO:13  
5); (WLRRAYAPLPGLS) (SEQ ID NO:136); (WL  
RRAYAPLPGLT) (SEQ ID NO:137); (WLRRAYAPL  
PGKS) (SEQ ID NO:138); (WLRRAYAPLP GKt) (S  
SEQ ID NO:139); (WLRRAYAPLPDLS) (SEQ ID  
NO:140); (WLRRAYAPLPDLT) (SEQ ID NO:141) 20  
; (WLRRAYAPLPDKS) (SEQ ID NO:142); 及び (W  
LRRAYAPLPDKT) (SEQ ID NO:143); ((F/Y/W)R  
RASAPLP) (SEQ ID NO:144); ((F/Y/W)LRRASA  
PLP) (SEQ ID NO:145); ((F/Y/W)WLRRASAPL  
P); (SEQ ID NO:146) ((F/Y/W)RRATAPLP) (S  
EQ ID NO:147); ((F/Y/W)LRRATAPLP) (SEQ I  
D NO:148); ((F/Y/W)WLRRATAPLP) (SEQ ID N  
O:149); ((F/Y/W)RRAYAPLP) (SEQ ID NO:150  
); ((F/Y/W)LRRAYAPLP) (SEQ ID NO:151); ( 30  
(F/Y/W)WLRRAYAPLP) (SEQ ID NO:152); ((F/  
Y/W)RRASAPLP G) (SEQ ID NO:153); ((F/Y/W)  
RRASAPLPD) (SEQ ID NO:154); ((F/Y/W)RRAS  
APLPGL) (SEQ ID NO:155); ((F/Y/W)RRASAPL  
PGK) (SEQ ID NO:156); ((F/Y/W)RRASAPLPDL  
) (SEQ ID NO:157); ((F/Y/W)RRASAPLPDK) 1  
(SEQ ID NO:158); ((F/Y/W)RRASAPLPGLS) (S  
EQ ID NO:159); ((F/Y/W)RRASAPLPGLT) (SEQ  
ID NO:160); ((F/Y/W)RRASAPLP GKs); (SEQ  
ID NO:161); ((F/Y/W)RRASAPLP GKt) (SEQ ID  
NO:162); ((F/Y/W)R 40  
RASAPLPDLS) (SEQ ID NO:163); ((F/Y/W)RRA  
SAPLPDLT) (SEQ ID NO:164); ((F/Y/W)RRASA  
PLPDKS) (SEQ ID NO:165); ((F/Y/W)RRASAPL  
PDKT) (SEQ ID NO:166); ((F/Y/W)LRRASAPLP  
G) (SEQ ID NO:167); ((F/Y/W)LRRASAPLPD)  
(SEQ ID NO:168); ((F/Y/W)LRRASAPLPGL) (S  
EQ ID NO:169); ((F/Y/W)LRRASAPLP GK) (SE  
Q ID NO:170); ((F/Y/W)LRRASAPLPDL) (SEQ  
ID NO:171); ((F/Y/W)LRRASAPLPDK) (SEQ ID  
NO:172); ((F/Y/W)LRRASAPLPGLS) (SEQ ID 50



D NO:225); ((F/Y/W)WLRRATAPLP GK) (SEQ ID NO:226); ((F/Y/W)WLRRATAPLP DL) (SEQ ID NO:227); ((F/Y/W)WLRRATAPLP DK) (SEQ ID NO:228); ((F/Y/W)WLRRATAPLP GLS) (SEQ ID NO:229); ((F/Y/W)WLRRATAPLP GLT) (SEQ ID NO:230); ((F/Y/W)WLRRATAPLP GKS) (SEQ ID NO:231); ((F/Y/W)WLRRATAPLP GKT) (SEQ ID NO:232); ((F/Y/W)WLRRATAPLP DLS) (SEQ ID NO:233); ((F/Y/W)WLRRATAPLP DLT) (SEQ ID NO:234); ((F/Y/W)WLRRATAPLP DKS) (SEQ ID NO:235); ((F/Y/W)WLRRATAPLP DKT) (SEQ ID NO:236); ((F/Y/W)RRAYAPLP G) (SEQ ID NO:237); ((F/Y/W)RRAYAPLP D) (SEQ ID NO:238); ((F/Y/W)RRAYAPLP GL) (SEQ ID NO:239); ((F/Y/W)RRAYAPLP GK) (SEQ ID NO:240); ((F/Y/W)RRAYAPLP DL) (SEQ ID NO:241); ((F/Y/W)RRAYAPLP DK) (SEQ ID NO:242); ((F/Y/W)RRAYAPLP GLS) (SEQ ID NO:243); ((F/Y/W)RRAYAPLP GLT) (SEQ ID NO:244); ((F/Y/W)RRAYAPLP GKS) (SEQ ID NO:245); ((F/Y/W)RRAYAPLP GKT) (SEQ ID NO:246); ((F/Y/W)RRAYAPLP DLS) (SEQ ID NO:247); ((F/Y/W)RRAYAPLP DLT) (SEQ ID NO:248); ((F/Y/W)RRAYAPLP DKS) (SEQ ID NO:249); ((F/Y/W)RRAYAPLP DKT) (SEQ ID NO:250); ((F/Y/W)LRRAYAPLP G) (SEQ ID NO:251); ((F/Y/W)LRRAYAPLP D) (SEQ ID NO:252); ((F/Y/W)LRRAYAPLP GL) (SEQ ID NO:253); ((F/Y/W)LRRAYAPLP GK) (SEQ ID NO:254); ((F/Y/W)LRRAYAPLP DL) (SEQ ID NO:255); ((F/Y/W)LRRAYAPLP DK) (SEQ ID NO:256); ((F/Y/W)LRRAYAPLP GLS) (SEQ ID NO:257); ((F/Y/W)LRRAYAPLP GLT) (SEQ ID NO:258); ((F/Y/W)LRRAYAPLP GKS) (SEQ ID NO:259); ((F/Y/W)LRRAYAPLP GKT) (SEQ ID NO:260); ((F/Y/W)LRRAYAPLP DLS) (SEQ ID NO:261); ((F/Y/W)LRRAYAPLP DLT) (SEQ ID NO:262); ((F/Y/W)LRRAYAPLP DKS) (SEQ ID NO:263); ((F/Y/W)LRRAYAPLP DKT) (SEQ ID NO:264); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP G) (SEQ ID NO:265); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP D) (SEQ ID NO:266); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP GL) (SEQ ID NO:267); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP GK) (SEQ ID NO:268); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP DL) (SEQ ID NO:269); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP DK) (SEQ ID NO:270); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP GLS) (SEQ ID NO:271); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP GLT) (SEQ ID NO:272); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP GKS) (SEQ ID NO:273); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP GKT) (SEQ ID NO:274); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP DLS) (SEQ ID NO:275); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP DLT) (SEQ ID NO:276); ((F/Y/W)WLRRAYAPLP

DKS) (SEQ ID NO: 277); 及び ((F/Y/W)WLRRAYAPLPDKT) (SEQ ID NO: 278)。ここにおいて、(F/Y/W)は、残基がF、Y及びWから選ばれることを意味する。一般式Iの範囲内である他の特定のポリペプチドは、本願明細書における教示に基づいて当業者が容易に想到可能であることは明らかである。

#### 【0035】

本発明の方法に使われるために、強化の有効性を提供するため、一般式Iのポリペプチドは、多数のコピーに存在してもよい。例えば、ポリペプチドは1、2、3、4または5コピーに存在してもよい。他の実施例において、一般式Iに従う配列を含んでいるポリペプチドは、範囲X1 - A(X2)APLP - X3 (SEQ ID NO: 302 及び SEQ ID NO: 316) から異なる配列の組合せを含む。本実施例において、例えば、ポリペプチドは、SEQ ID NO: 9のコピー、及びSEQ ID NO: 143のコピーから構成されることができる。異なる実施例において、ポリペプチドは、SEQ ID NO: 200の2コピー及びSEQ ID NO: 62の3コピーから構成されることができる。多数の、そのような組合せが、本願発明の教示に基づいて可能であることは、当業者にとって明らかなことである。

#### 【0036】

好ましい実施例において、一般式Iに基づくポリペプチドは、一つ以上の導入ドメインを更に含む。ここで使用しているように、用語「導入ドメイン」は、細胞膜を横切ってポリペプチドを伝達できるアミノ酸配列を意味する。これらのドメインは、細胞膜全体に結合されたポリペプチドの動きを導くために他のポリペプチドにリンクされることができる。場合によっては、変換分子は、共有結合して活性ポリペプチドに結合される必要はない。好ましい実施例において、導入ドメインは、ペプチド結合によって、他のポリペプチドにリンクされる。そのような導入ドメインの例は、(R)<sub>4-9</sub> (SEQ ID NO: 279); GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 280); YARRAAARQARA (SEQ ID NO: 281); DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRP RPVE (SEQ ID NO: 282); GWTLNSAGYLLGLINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 283); PLSSIFSRIGDP (SEQ ID NO: 284); AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 285); AAVLLPVLLAAP (SEQ ID NO: 286); VTVLALGALAGVGVG (SEQ ID NO: 287); GALFLGWLGAAGSTMGAWSQP (SEQ ID NO: 288); GWTLNSAGYLLGLINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 289); KLALKLALKALKALKLA (SEQ ID NO: 290); KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 291); KAFAKLAAARLYRKAGC (SEQ ID NO: 292); KAFAKLAAARLYRAAGC (SEQ ID NO: 293); AAFAKLAAARLYRKAGC (SEQ ID NO: 294); KAFAAALAAARLYRKAGC (SEQ ID NO: 295); KAFAKLAAQLYRKAGC (SEQ ID NO: 296), GGGGYGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 297), 及び YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 299)を含むが、これに限定されるものではない。

#### 【0037】

他の実施例において、ポリペプチドは式B1 - X1 - A(X2)APLP - X3 - B2 (SEQ ID NO: 318 及び SEQ ID NO: 319) のポリペプチドを含むかまたは同ポリペプチドから成る。ここで、X1、X2及びX3は、上記の定義通りであり、そして、B1及びB2は、それぞれ上記通りの導入ドメインを含むかまたは欠ける。

#### 【0038】

好ましい実施例において、B1およびB2の一方または両方は、YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 299) および/または YARRAAARQARA (SEQ I

10

20

30

40

50

D NO : 281) のアミノ酸配列を含むかまたは同アミノ酸配列からなる。最も好ましい実施例において、本願明細書において開示される一般式に一致したポリペプチドは、ポリペプチド YGRKKRRQRRLRRAPSAPLPLGLK (SEQ ID NO : 301) または YAAAAARQARAWLRRAPSAPLPLGLK (SEQ ID NO : 315) を含むかまたはから構成され、ここで、「pS」はリン酸化セリン残基を示す。

#### 【0039】

本発明の方法の更なる実施例において、ポリペプチドは下記式のポリペプチドを含むかまたは同ポリペプチドから構成される：J2-X1-A(X2)APLP-X3-J3 (SEQ ID NO : 320 及び SEQ ID NO : 321) ここで X1、X2 及び X3 は上記の定義通りであり、ここで J2 及び J3 はそれぞれ上記通りの導入ドメインを含むかまたは欠ける。

10

#### 【0040】

本発明の方法に用いられるポリペプチドは、強化された半減期を提供するために、例えば、ポリエチレングリコールとつながることによって更に誘導体化されることができる。本発明のポリペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸（これは、インビボにおいて L-アミノ酸特有のプロテアーゼに耐性がある）、D-及び L-アミノ酸の組合せ、及び特別な特性を伝達する各種の「デザイナー」アミノ酸（例えば、 $\alpha$ -メチル・アミノ酸、 $\beta$ -メチル・アミノ酸及び N-メチル・アミノ酸、その他）を含んでもよい。合成アミノ酸は、リジンのためのオルニチン及びロイシンまたはイソロイシンのためのノルロイシンを含む。

20

#### 【0041】

加えて、ポリペプチドは新しい特性を有するポリペプチドを生産するためにペプチド模倣結合、例えばエステル結合を有することができる。例えば、減らされたペプチド結合を組み込むペプチドが、生成されることができ、すなわち、R1 及び R2 がアミノ酸残基または配列である  $R_1 - CH_2 - NH - R_2$  である。減らされたペプチド結合は、ジペプチド・サブユニットとして導入されてもよい。そのようなポリペプチドは、プロテアーゼ活性に耐性があり、インビボにおいて拡張半減期を所有する。

#### 【0042】

用語「ポリペプチド」が、アミノ酸、アミノ酸アナログまたはペプチド模倣薬の一連のサブユニットを指すことに、最も広義に使われる。ポリペプチドが更なる半分を含むことができ、それがペプチド結合によって必ずしもポリペプチドにリンクされるというわけではないにも関わらず、サブユニットは、ペプチド結合によって連結される。例えば（上記のように）、ポリペプチドは芳香族のリングを含む非アミノ酸分子を更に含むことができる。

30

#### 【0043】

本願明細書において記載されているポリペプチドは、化学的に合成されるかまたは遺伝子技術によって発現されてもよい。組み換え型発現は、従来技術における標準の方法を使用して達成されることができ、それは発現媒体動物へポリペプチドの発現を導くことができる核酸配列のクローニングを一般に含むことであり、それは、ポリペプチドの発現を実行するための細胞機構を提供するために、宿主細胞をトランスフェクションまたは変換させるために用いることができる。そのような発現ベクトルは細菌またはウィルス発現ベクトルを含むことができるとともに、そのような宿主細胞は原核または真核であることができる。

40

#### 【0044】

好ましくは、本発明の方法に用いられるポリペプチドは、化学的に合成される。固相、液相の周知技術またはペプチド凝結技術またはそれらのいずれかの組合せを使用して調製される合成ポリペプチドは、天然及び非天然アミノ酸を含むことができる。ペプチド合成のために使用されるアミノ酸は、標準の脱保護を有する標準の Boc (N-アミノ保護の N- $\alpha$ -tertブチルオキシカルボニル) アミノ酸樹脂、中和、標準の固相手順の結合及び洗

50

浄プロトコル、または塩基変化 N - アミノ保護の 9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) アミノ酸であってもよい。Fmoc 及び Boc N - アミノ被保護アミノ酸は、シグマ、Cambridge Research Biochemical、または当業者によく知られている他の化学会社から取得されることができる。加えて、ポリペプチドは、当業者によく知られている他の N - 保護群によって合成されることができる。

【0045】

固相ペプチド合成は、自動シンセサイザを用いて、当業者によく知られている技術によって達成され、提供される。

【0046】

ここで使用しているように、一つ以上のポリペプチドの「効果的な量」は、治療の意図された利点を提供するのに十分な量である。使用されることができるポリペプチドの効果的な量は、一般的に約 0.01 µg/kg 比体重及び約 10 mg/kg 比体重の間で変動し、好ましくは約 0.05 µg/kg 及び約 5 mg/kg 比体重の間で変動する。しかし、投薬量レベルは、様々な要素に基づくものであり、損傷のタイプ、世代、重量、性別、個体の医学状態、状態のひどさ、投与のルート及び使用される特定の合成物である。したがって、用量は広く変化してもよく、標準の方法を使用している医師によって通常決定されることができる。

【0047】

ポリペプチドは、殺菌のような従来の製薬工程に委ねられてもよく、および/または、例えば防腐剤、スタビライザ、湿潤剤、乳化剤、バッファなどの通常アジュバントを含んでもよい。

【0048】

投与のために、ポリペプチドは通常投与の表示ルートに適当な一つ以上のアジュバントと結合される。合成物は、ラクトース、蔗糖、澱粉粉、アルカン酸、ステアリン酸、タルク、マグネシウム・ステアリン酸塩、酸化マグネシウムのセルロース・エステル、リン酸及び硫酸のナトリウム及びカルシウム塩、アカシア、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリジン、デキストラン硫酸塩、ヘパリン含有ゲルおよび/またはポリビニルアルコールと混ぜられてもよく、通常の投与のために錠剤にされるかまたはカプセル化されてもよい。あるいは、本発明の合成物は、食塩水、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、カルボキシメチル・セルロース・コロイド溶液、エタノール、トウモロコシ油、落花生油、綿実油、胡麻油、トラガカントゴムおよび/または各種のバッファにおいて分解されてもよい。投与の他のアジュバント及びモードが、製薬技術で周知である。キャリアまたは希釈剤は、例えば、グリセリル・モノステアリン酸またはグリセリル・ジステアリン酸またはワックスを有するグリセリル・ジステアリン酸、または公知技術の他の材料のような遅延材料を含んでもよい。

【0049】

ポリペプチドまたはその製薬配合は、口で、親から、吸入噴霧、直腸にまたは、通常の薬学的に受け入れられるキャリアを含む投薬量ユニット処方、アジュバント及び媒体を含むいかなる適切なルートによって投与されてもよい。本願明細書において使用する期間非経口は、皮下、静脈、動脈内、筋肉内、胸骨内、腱内、髄腔内、頭蓋内、胸腔内、または、腹膜組織内注入技術を含む。投与のための好ましい実施例は、治療状態に関連して変化する。好ましい実施例において、ポリペプチドまたは製薬配合は、創傷被覆材または他の局所性投与に配置される。そのような創傷被覆材は、従来技術において使用されるいずれかであることができる。具体的に、フィルム（例えばポリウレタン・フィルム）、親水コロイド（ポリウレタン・フォームに結合される親水性コロイド粒子）、ヒドロゲル（少なくとも 60% の水を含んでいるクロスリンクされたポリマー）、フォーム（泡沫）（親水性または疎水性）、カルシウム・アルギン酸塩（カルシウム・アルギン酸塩からのファイバの不織布複合物）、セロハン、及び例えば米特許出願公開第 20030190364 号明細書（2003 年 10 月 9 日公開）に記載されている生物学的ポリマーなどを含むがこ

10

20

30

40

50



れに限らない。

#### 【0050】

ポリペプチドは、固体の状態（微粒、粉または坐薬を含む）、または液体の状態（例えば溶液、懸濁液またはエマルジョン）で構成されてもよい。本発明のポリペプチドは、様々な溶液において利用されてもよい。本発明に基づく方法に適切な溶液はポリペプチドの十分な量を殺菌、分解し、提案された利用のために有害でない。

#### 【実施例1】

#### 【0051】

ケロイド及び肥厚性瘢痕は、線維増殖性異常回復疾患であり、過剰産生、細胞外基質の堆積及び収縮のための過剰傷によって特徴づけられ、それは、機能的及び表面奇形になる（Leask及びAbraham 2004）。現在この状況の効果的な治療法はない。

#### 【0052】

負傷 - 治療カスケードを始めることに関係している一次制御因子のうちの1つが、形質転換成長因子（TGF）である。3つの指定される哺乳類イソ型、TGF-1、-2及び-3がある。TGF-は、細胞状況及び表示されたイソ型のバランスに依存する効果的多機能分子である。TGF-3が抗線維症機能を有してもよいのに対して、TGF-1は、線維症反応の開始に関与していると思われる（Leask及びAbraham、2004、Miller及びNanchahal、2005）。

#### 【0053】

線維芽細胞において、TGF-は、結合組織成長因子（CTGF）の発現を刺激する。CTGFは、TGF-の下流の媒体として作用するシステインに富むペプチドであり、線維芽細胞増殖、胞外基質製造（コラーゲン及びフィブロネクチン含有）及び肉芽組織形成を促進する（Duncan他、1999、Leask及びAbraham、2004）。CTGFの発現は、さらに組織損傷において発散される他の合成物、例えばトロンビン及びエンドセリンによって調整され（Chambers他、2000、Shi-Wen他、2004、Rodriguez-Vita他、2005）、したがって、細胞-マトリックス・サイトカイン相互作用の複合のネットワークが、傷が治る過程及び病理学的線維性疾患の開始を調整することを提案する（Duncan他、1999）。ケロイド及び肥厚性瘢痕におけるCTGFの過剰発現がTGF-への線維化誘導性反応を強化するので、CTGFは、傷跡線維症の病因に関与すると考えられている（Colwell他、2004）。それゆえに、CTGF発現の封鎖は、結合組織細胞増殖及びマトリックス堆積を予防することによって、病理学的傷の線維増殖性反応を減らすことができると考えられる。

#### 【0054】

サイトカイン及びプロテアーゼに加えて、細胞構造における変更態様は、CTGFの発現に影響を及ぼす。したがって、微小管を崩壊させ、RhoAを起動させ、アクチン・ファイバを安定させる薬品は、腎臓線維芽細胞のCTGF発現を増やすことが証明されたが、アクチン解重合に導く薬品（例えばラトランクリン）は、CTGF発現を減少させた（Ott他、2003）。

#### 【0055】

タンパク質導入ドメイン（PTD）と呼ばれているペプチド・キャリアに結合されるP20ペプチド（熱ショックタンパク質20に対するリンペプチド・アナログ）が、細胞に透過し、血清またはリゾホスファチジン酸による刺激に対して繊維応力形成を抑制することが最近証明された（Dreiza他、2004）。これは、P20ペプチドによる細胞骨格分裂が、CTGF形成を抑制し、線維増殖性状況を抑制できることを仮定させた。この仮説を検証するために、我々はPTD-P20ペプチド処理がTGF-刺激ケロイド線維芽細胞によって、CTGF及びコラーゲン発現を減らすかどうか調査した。

#### 【0056】

方法

線維芽細胞培養物：

ヒト・ケロイド線維芽細胞は、10%のFBS及び追加的なペニシリン及びストレプトマイシン(1%)でDMEMの70%の集合に、37及び10%のCO<sub>2</sub>で10cm<sup>2</sup>皿において育てられた。細胞は、実験の前に48時間、0.5%のFBSを含んでいるDMEMにおいて血清飢餓培養された。分析の開始時に、新しい培養基が、皿に加えられ、細胞は、TGF- $\beta$ 1、(0.6から5ng/mLまで変動している投与)、P20リンペプチド(50-200 $\mu$ Mで変動している投与)、ホルスコリン(10 $\mu$ M、FSK)またはSNAP(500 $\mu$ M)で24時間非処理(対照)または処理される。血清飢餓の影響を検査するために、我々はさらに培養基(対照の高い血清)を含んでいる10%のFBSで細胞を処理した。

【0057】

10

ウエスタンブロット法分析：

実験終了後、細胞はPBSで洗い落され、UDCバッファを使用して均質にした。溶解物は、混合され、20分間遠心分離機で分離され(6000 $\times$ g)、上澄みは、CTGF及びコラーゲン発現の判定のために使われた。サンプル(20 $\mu$ gのタンパク質)は、15または10%のSDS-PAGEゲル上に載せられ、タンパク質は電気泳動法でイモビロン膜組織へ転送された。非特異的結合を抑止するために、膜組織は、1:1(v/v)トリス緩衝食塩水(TBS)ブロッキングバッファ(オデッセイ)で培養され、CTGF(トーリー・パイン)及びコラーゲン(皮質)に対する一次抗体で室温で1時間染色され、TBSで3回洗浄された。続いて、膜組織は、第2の抗ウサギ及び抗マウス抗体によって培養され、トゥイーンを含んでいるTBSによって洗浄された。タンパク質-抗体複合体は、オデッセイ直接的赤外線蛍光性画像処理システム(Li-Cor, Lincoln, NE)を使用して視覚化された。

20

【0058】

免疫細胞学：

ヒト・ケロイド線維芽細胞は、 $2.5 \times 10^5$ の細胞/ウェルでのカバースリップで6-wellウェルに育てられた。それらは、24時間飢餓培養され、その後興奮剤で処理される。非処理(対照)またはTGF- $\beta$ 1(1.2または2.5ng/mL)および/またはP20リンペプチド(50M)で処理された細胞は、4%のバラホルムアルデヒドによって取り付けられ、0.1%のトリトンXによって透過処理された。細胞は、それからアクチン・フィラメントを視覚化するためにAlexa 350 phalloidinで染色された。蛍光イメージは、UVフィルタ及びツァイス・ソフトウェアを備えているツァイス顕微鏡を使用して取得された。

30

【0059】

統計分析：

全ての数値データは、3-6実験から平均値標準偏差として示される。Tukey事後試験が続く分散分析が、実験群を比較するために用いられた。有意水準は、 $p < 0.05$ にセットされた。

【0060】

結果

TGF- $\beta$ 1及びCTGF発現：

40

ヒト・ケロイド線維芽細胞は、48時間0.5%のFBSを含んでいるDMEM培養基において飢餓培養され、24時間TGF- $\beta$ 1の異なる投与によって処理される。CTGF発現は、違いをロードすることを修正するために、ウエスタンブロット法の濃度学によってGAPDH発現と関連づけられる。対照セルのCTGFの発現は、異なる弱点の比較のために1にセットされた。データは、24時間の用量依存的TGF- $\beta$ 1処理が、ヒト・ケロイド線維芽細胞の(2.1-から4.6-フォールド)CTGF発現を強化したことを証明した。

【0061】

P20処理及びCTGF発現：

ヒト・ケロイド線維芽細胞は、48時間0.5%のFBSを含んでいるDMEM培養基

50

において飢餓培養され、1.2から5 ng/mLまで変動しているTGF- $\beta$ 1投与によって刺激され、24時間P20リンペプチド(50、100または200  $\mu$ M)で付随して処理される。ウエスタンブロット法バンドは、濃度学によって定量化され、CTGF発現は、違いをロードするために修正するGAPDH発現と関連づけられた。対照細胞のCTGFの発現は、異なる弱点の比較のための1にセットされた。データは、PTD-P20( $p < 0.05$ )処理が、ケロイド線維芽細胞におけるTGF- $\beta$ 1-誘導CTGF発現をかなり減らしたことを示す。53%及び29%の減少は、それぞれ、1.2及び2.5 ng/mLのTGF- $\beta$ 1のために観察された。他方、5 ng/mLのTGF- $\beta$ 1が細胞を刺激するために用いるときに、より高い投与(100及び200  $\mu$ M)で使われるときでも、PTD-P20処理はCTGF発現を減らさなかった。

10

#### 【0062】

P20処理及びコラーゲン製造:

PTD-P20処理が1.2及び2.5 ng/mLのTGF- $\beta$ 1によって刺激される細胞におけるCTGF発現を減らしたことを観測して、我々はコラーゲン合成が同様に減らされるかどうか、次に調査した。ヒト・ケロイド線維芽細胞は、48時間0.5%のFBSを含んでいるDMEM培養基において飢餓培養され、1.2から2.5 ng/mLまでのTGF- $\beta$ 1投与によって刺激され、24時間P20リンペプチド(50  $\mu$ M)で付随して処理される。ウエスタンブロット法バンドは、濃度学によって定量化され、コラーゲン発現は、違いをロードするために修正するGAPDH発現と関連づけられた。対照細胞のコラーゲンの発現は、異なる弱点の比較のために1にセットされた。データは、PTD-P20処理が、48%までコラーゲン合成を減らしたことを証明する。

20

#### 【0063】

環状アデノシンリン酸及び環状GMPを高める合成物による処理:

我々は、次にケロイド線維芽細胞におけるCTGF発現上の環状アデノシンリン酸(ホルスコリン(FSK))または環状GMP(SNAP)を高める合成物の影響を評価した。ヒト・ケロイド線維芽細胞は、0.5%のFBSを含んでいるDMEM培養基において48時間飢餓培養されて、2.5 ng/mLのTGF- $\beta$ 1投与によって刺激され、付随して24時間FSK(10  $\mu$ M)で処理された。ウエスタンブロット法バンドは濃度学によって定量化され、CTGF発現は違いをロードするように修正するGAPDH発現と関連づけられた。対照細胞におけるCTGFの発現は、異なるプロットの比較のために1にセットされた。FSKによるTGF- $\beta$ 1-刺激線維芽細胞(2.5 ng/mLのTGF- $\beta$ 1投与)の処理は、~50%のCTGF発現の減少を結果した。非刺激された線維芽細胞がFSKで処理されるときに、非処理の細胞と比較して違いはCTGF発現において観察されなかった。他方、SNAPによるTGF- $\beta$ 1-刺激細胞の処理は、CTGF発現を減少させなかった。加えて、非刺激細胞のSNAP処理は、非処理の(対照)細胞と比較して、CTGF発現の著しい増加( $p < 0.05$ (二倍増加))を引き起こした。これらの結果は、CTGF発現に対する抑制効果が環状アデノシンリン酸を高める薬品のために選択的に見えたことを示している前の報告(Duncan他、1999)に基づく。加えて、最近の研究は、外因性一酸化窒素に対するケロイド線維芽細胞の暴露が、投与依存方法(Hsu他、2006)の増加するコラーゲン発現を引き起こしたことを証明した。

30

40

#### 【0064】

細胞のアクチン細胞骨格でのPTD-P20処理の影響:

ヒト・ケロイド線維芽細胞は0.5%のFBSを含んでいるDMEM培養基において48時間飢餓培養され、そして、TGF- $\beta$ 1(1.2または2.5 ng/mL)および/またはP20(50  $\mu$ M)によって24時間刺激された。細胞は、それからアクチン細胞骨格上のPTD-P20処理の影響を評価するためにファロイジンで染色された。PTD-P20処理は、放射状の細胞形態学に導き、非刺激細胞のアクチン細胞骨格を崩壊させ、それらは1.2 ng/mLのTGF- $\beta$ 1によって刺激される。TGF- $\beta$ 1投与が2.5 ng/mLであるときに、この効果は明白ではなかった。

50

## 【 0 0 6 5 】

## 概要

現在、ケロイド及び他の線維性疾患のための効果的治療方法がない。現在、研究された治療学の大部分は、カスケードの信号を送っている T G F - の範囲内で細胞表面受容体または酵素を目標とする。我々のグループによって確認されたキナーゼ・カスケードでの下流タンパク質の治療的な使用を提案するという理由から、ここで示される方法は、革新的である。本願明細書において提示される結果は、P T D - P 2 0 が、T G F - 1 - 誘導の C T G F 発現 ( F S K に匹敵するレベル ) を減少させ、関連するコラーゲン合成を減らすことを証明する。P T D - P 2 0 の効果は、細胞形態学 ( 繊維応力の放射状形態学及び分裂 ) の変化に関連した。アクチン細胞骨格が C T G F 発現のために完全でなければなら

10

## 【 0 0 6 6 】

## 実施例 1 の参考文献

- Leask A, Abraham DJ. FASEB J., 18 ( 7 ) : 8 1 6 - 2 7, 2 0 0 4
- Miller MC, Nanchahal J. BioDrugs, 19 ( 6 ) : 3 6 3 - 8 1, 2 0 0 5
- Duncan MR, et al. FASEB J., 13 ( 1 3 ) : 1 7 7 4 - 8 6, 1 9 9 9
- Chambers et al. J Biol Chem., 10 ; 2 7 5 ( 4 5 ) : 3 5 5 8 4 - 9 1, 2 0 0 0
- Shi-Wen X, et al. Mol Biol Cell., 15 ( 6 ) : 2 7 0 7 - 1 9, 2 0 0 4
- Rodriguez-Vita J et al. Circulation, 111 ( 1 9 ) : 2 5 0 9 - 1 7, 2 0 0 5
- Colwell AS et al. Plast Reconstr Surg., 116 ( 5 ) : 1 3 8 7 - 9 0, 2 0 0 5
- Ott C et al. J Biol Chem., 278 ( 4 5 ) : 4 4 3 0 5 - 1 1, 2 0 0 3
- Dreizler et al. FASEB J., 19 ( 2 ) : 2 6 1 - 3, 2 0 0 5
- Hsu et al. Nitric Oxide., 14 ( 4 ) : 3 2 7 - 3 4, 2 0 0 6

20

30

## 【実施例 2】

## 【 0 0 6 7 】

線維芽細胞は、広く線維症、創傷治癒及び組織修復にかかわるクリティカルな細胞型として認められる。筋線維芽細胞に対する線維芽細胞の形質転換が、それらの機能を実行する細胞のキー、おそらくもっと重要な、イベントであるという概念は、あまり理解されなかった ( Powell 他、1 9 9 9 及び Tomasek 他、2 0 0 2 )。筋線維芽細胞は、 - 平滑筋線アクチン ( - SMA ) を表示し、アクチン・フィラメントから成る収縮装置及び顕著な繊維応力に有機物化される関連するタンパク質を含む平滑筋線維芽細胞である ( Tomasek 他、2 0 0 2 )。組織ホメオスタシスの通常役割及び修復に加えて、筋線維芽細胞の変更された数及び機能は、増加する細胞外基質 ( ECM ) 堆積及び結果的線維症の疾患に関わり、例えばそれらは肺 ( 肺線維症 )、血管 ( 内膜過形成 )、心臓 ( 心臓線維症 ) 及び皮膚 ( ケロイド ) を含む ( Desmouliere 他、2 0 0 3、Desmouliere 他、2 0 0 5、Hewitson 他、1 9 9 5、Mitchell 他、1 9 8 9、Zhang 他、1 9 9 4、Naugle 他、2 0 0 6、Chipev 他、2

40

50

000、Pepper他、1997、Heusinger-Ribeiro他、2001)。したがって、線維芽細胞から筋線維芽細胞表現型変調の抑制は、興奮剤（例えばTGF- $\beta$  1及び他の媒体）に応じて、線維症を抑制するために平均値を提供してもよい。

#### 【0068】

タンパク質導入ドメイン（PTD）と呼ばれているペプチド・キャリアに結合されるP20ペプチド（熱ショックタンパク質20に対するリンペプチド・アナログ）が、細胞に浸透し、血清またはリゾホスファチジン酸により刺激に対する張線維形成を抑制することが最近証明された（Dreiza他、2004）。上記のように、このペプチドPTD-P20は、さらにヒト・ケロイド線維芽細胞のTGF- $\beta$  1-誘導CTGF発現を抑制する。これらの実験において、PTD-P20の抗線維症活性は、追加的な線維症分子に対する効果を決定することによって更に調べられた：-SMA及びアクチン・アクセサリ・タンパク質コフィリン及びHSP27。アクチン・フィラメントを解重合するために脱リン酸化されると、コフィリンが活性化されるが、HSP27はリン酸化に活性化され、張線維形成と関連している。したがって、線維症表現型は、コフィリン及びHSP27の増加するリン酸化と関連している。これらの結果は、PTD-P20が-SMAのTGF- $\beta$  1-誘導発現及びコフィリン及びHSP27のリン酸化を抑制することを示す。このような情報は、PTD-P20の治療のメカニズムの理解を増加し、PTD-P20または線維症疾患状態のいずれかの活性を検出するために用いることができた潜在的な生体指標を確認する。

#### 【0069】

##### 方法

##### 線維芽細胞培養：

ヒト・ケロイド線維芽細胞は、10%FBS及び追加的なペニシリン及びストレプトマイシン（1%）を有するDMEM内の70%集合に、10cm<sup>2</sup>皿で、37℃及び10%CO<sub>2</sub>で育てられた。細胞は、実験の前に48時間0.5%のFBSを含んでいるDMEMにおいて飢餓培養された。分析の開始時に、新しい培養基が皿に加えられ、細胞は、TGF- $\beta$  1（0.6から5ng/mLまでの投与）、P20リンペプチド（50-200 $\mu$ Mの投与）、ホルスコリン（10 $\mu$ M、FSK）またはSNAP（500 $\mu$ M）で24時間処理されるかまたは処理されない（対照）。血清飢餓の影響を検査するために、我々はさらに培養基（対照、高血清）を含んでいる10%のFBSに細胞をおいた。

#### 【0070】

##### ウエスタンブロット法分析：

実験終了後、細胞はPBSで洗い落され、UDCバッファを使用して均質化した。溶解物は混合され、20分間遠心分離機で分離され（6000 $\times$ g）、上澄みはタンパク質発現の判定のために使われた。サンプル（20 $\mu$ gのタンパク質）は15または10%のSDS-PAGEゲル上に載せられ、タンパク質は電気泳動法でイモビロン膜組織へ転送された。非特異的結合を抑制するために、膜組織は、1:1（v/v）トリス緩衝食塩水（TBS）：ブロッキングバッファ（オデッセイ）で培養され、室温で、1時間-平滑筋肉アクチン発現に対する一次抗体、リン酸化HSP27及びリン酸化コフィリンで染色され、TBSで3回洗浄された。続いて、膜組織は第2の抗ウサギ及び抗マウス抗体によって培養され、トウイーンを含んでいるTBSによって洗浄された。タンパク質-抗体複合体は、オデッセイ直接的赤外線蛍光性画像処理システム（the Odyssey direct infrared fluorescence imaging system）（Li-Cor、Lincoln、NE）を使用して視覚化された。

#### 【0071】

##### 統計分析：

全ての数値的なデータは、3-6実験からの平均標準偏差として示される。チューキー後知恵実験に続く分散分析が、実験群を比較するために用いられた。有意水準が、 $p < 0.05$ にセットされた。

#### 【0072】

## 結果

P 2 0 処理及び - 平滑筋肉アクチン発現：

ヒト・ケロイド線維芽細胞が、0.5%のFBSを含んでいるDMEM培養基の中で48時間飢餓培養され、TGF- $\beta$ 1 (2.5 ng/mL)の有無にかかわらず、PTD-P20 (50  $\mu$ M)で24時間処理された。 - SMA及び - アクチンの発現レベルが、ウエスタンブロット法の濃度学によって定量化され、違いをロードするように修正するためにGAPDH発現に正常化された。対照細胞のタンパク質発現が、異なるブロットの比較のために1にセットされた。データは、PTD-P20 ( $p < 0.05$ )処理が、TGF- $\beta$ 1処理(図1)の有無にかかわらず、ケロイド線維芽細胞において - SMA発現をかなり減らしたことを示す。他方、PTD-P20は、その活性が - SMAに特有なことを示唆する - アクチン発現(キー線維症マーカー)に、影響を及ぼさなかった。

10

## 【0073】

P 2 0 処理及びHSP27及びコフィリンのリン酸化：

ヒト・ケロイド線維芽細胞が、48時間0.5%のFBSを含んでいるDMEM培養基において飢餓培養され、TGF- $\beta$ 1 (2.5 ng/mL)の有無にかかわらず、PTD-P20 (50  $\mu$ M)で24時間処理される。リン酸化コフィリン及びHSP27の発現レベルは、ウエスタンブロット法の濃度学によって定量化され、違いをロードするために修正するGAPDH発現に正常化された。対照細胞におけるタンパク質発現が、異なるブロットを比較するために1にセットされた。データは、PTD-P20処理が、コフィリンのTGF- $\beta$ 1 - 誘導増加及びケロイド線維芽細胞のHSP27リン酸化をかなり ( $p < 0.05$ )減らしたことを証明する。完全コフィリン及びHSP27(リン酸化プラス非リン酸化)のレベルは、変化しなかった。これらのデータは、PTD-P20がアクチン細胞骨格に影響を与える多様なレベルでTGF- $\beta$ 1線維症反応を抑制することを示唆する。

20

## 【0074】

## 概要

本願明細書において提示される結果は、PTD-P20がTGF- $\beta$ 1 - 誘導の - SMA発現を低下させ、コフィリン及びHSP27のリン酸化を減らすことを証明する。前の結果は、PTD-P20処理が、細胞形態学(放射状の形態学及び張線維の分裂)の変化及びCTGF発現の抑制と関連することを示した。完全なアクチン細胞骨格がCTGF発現にとって重要であるので、これらのデータはPTD-P20が細胞骨格の動態を変更することによって線維症反応を抑制することを示唆する。アクチン細胞骨格が、線維症反応の発症及び保全に中心的な役割を果たすので、PTD-P20の使用は、ケロイド及び他の線維性疾患を治療するための潜在的方法を示す。総合すれば、これらの結果は、さらにPTD-P20または線維症疾患状態のいずれかの活性を検出するために用いることができた潜在的な生体指標(CTGF、 - SMA、コフィリン及びHSP27)を識別する。

30

## 【0075】

「06-558-PCT\_ST25.txt」と名称を与えられ、2007年7月5日につくられ、86,964バイトの大きさを有する、これと共に提出される配列リストのテキストファイルは、全体として本願明細書に引用された。

## 【0076】

40

## 実施例2の参考文献

Chipev et al. (2000) Cell Death Differ 7, 166-176  
Desmouliere et al. (2003) Lab Invest 83, 1689-1707  
Desmouliere et al. Wound Repair Regen 13, 7-12  
Heusinger-Ribeiro et al. (2001) J Am 28-37  
Hewitson et al. (1995) Am J Nephrol 15,

50

411 - 417  
Mitchell et al. (1989) Lab Invest 60, 6  
43 - 650  
Naugle et al. (2006) Am J Physiol Heart  
Circ Physiol 290, H323 - 330  
Pepper, M. S. (1997) Cytokine Growth Fa  
ctor Rev 8, 21 - 43  
Powell et al. (1999) Am J Physiol 277,  
C1 - 9  
Tomasek et al. (2002) Nat Rev Mol Cell 10  
Biol 3, 349 - 363  
Zhang et al. (1994) Am J Pathol 145, 11  
4 - 125

【配列表】

0005048772000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 P 9/04 (2006.01) A 6 1 P 9/04  
 A 6 1 P 17/00 (2006.01) A 6 1 P 17/00

- (72)発明者 ファーニッシュ, エリザベス, ジェイ  
 アメリカ合衆国、アリゾナ 8 5 2 8 2、テムペ、ウェスト フー - エスタ ドライブ 1 3 5
- (72)発明者 フライン, チャールズ, ロバート  
 アメリカ合衆国、アリゾナ 8 5 2 4 8、チャンドラー、ウェスト レイブン ドライブ 2 0 2
- (72)発明者 コマラピラス, パドミニ  
 アメリカ合衆国、アリゾナ 8 5 2 8 3、テムペ、ウェスト グローブ パークウェイ 9 0 0、  
 # 1 1 0 9
- (72)発明者 パニッチ, アリッサ  
 アメリカ合衆国、インディアナ 4 7 9 0 6、ウェスト ラファイエット、ヒルクレスト ロード  
 6 0 7
- (72)発明者 ブロフィー, コリーン, エム  
 アメリカ合衆国、テネシー 3 7 2 0 4、ナッシュビル、ドッジ プレース 3 6 1 2

審査官 横井 宏理

- (56)参考文献 特表2005-506836(JP, A)  
 米国特許出願公開第2003/0060399(US, A1)  
 POLO, M., ANN PLAS SURG., 1999年 8月, V43 N2  
 DREIZA, C.M., et al., Transducible heat shock protein 20 (HSP20) phosphopeptide alters  
 cytoskeletal dynamics, The FASEB Journal, 2005年 2月 1日, Vol.19, No.2, p.261  
 -263  
 DREIZA, C.M., et al., Transducible heat shock protein 20 (HSP20) phosphopeptide alters  
 cytoskeletal dynamics, The FASEB Journal, 2004年12月14日, p.1-14, [online]、[  
 平成23年7月27日検索]、インターネット<URL:http://www.fasebj.org/content/early/2005  
 /01/27/fj.04-2911fje>  
 FLYNN, C.R., et al., Transduction of biologically active motifs of the small heat shoc  
 k-related protein HSP20 leads to relaxation of vascular smooth muscle, The FASEB Journ  
 al, 2003年 7月, Vol.17, p.1358-1360

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00  
 A61P 1/00-16  
 A61P 9/00-10  
 A61P 13/00-12  
 A61P 17/00-02  
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)