(19)日本国特許庁(JP)

# (12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7317956号
(P7317956)

(45)発行日　令和5年7月31日(2023.7.31)

(24)登録日　令和5年7月21日(2023.7.21)

| (51)国際特許分類 | | FI | | |
|---|---|---|---|---|
| *C07K 7/08 (2006.01)* | | C07K | 7/08 | |
| *C07K 7/06 (2006.01)* | | C07K | 7/06 | ZNA |
| *A61K 38/08 (2019.01)* | | A61K | 38/08 | |
| *A61K 38/10 (2006.01)* | | A61K | 38/10 | |
| *A61P 21/00 (2006.01)* | | A61P | 21/00 | |

請求項の数　14　（全43頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-522113(P2021-522113)
(86)(22)出願日　令和1年7月4日(2019.7.4)
(65)公表番号　特表2021-530562(P2021-530562A)
(43)公表日　令和3年11月11日(2021.11.11)
(86)国際出願番号　PCT/BR2019/050249
(87)国際公開番号　WO2020/006617
(87)国際公開日　令和2年1月9日(2020.1.9)
審査請求日　令和4年6月16日(2022.6.16)
(31)優先権主張番号　62/694,162
(32)優先日　平成30年7月5日(2018.7.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　16/502,215
(32)優先日　令和1年7月3日(2019.7.3)
最終頁に続く

(73)特許権者　521001478
ビオゼウス・デゼンヴォルヴィメント・ジ・プロドゥトス・ビオファルマセウティコス
BIOZEUS DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS BIOFARMACEUTICOS
ブラジル２２４１０－０００２リオ・デ・ジャネイロ、リオ・デ・ジャネイロ、イパネマ － フア・ヴィスコンジ・ジ・プラジャー６２３番、ノーヌ・アンダル
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100156144
弁理士　落合 康

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　合成ペプチド、プロドラッグ、医薬組成物および使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

薬理学的に活性なペプチドである合成ペプチドであって、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３または配列番号２４の配列からなる、ペプチド。

【請求項２】

Ｈ、アセチル、クロライドまたはトリフルオロアセチルがペプチドのＮ末端に共有結合される、請求項１に記載のペプチド。

【請求項３】

ＯＨまたは$NH_2$がペプチドのＣ末端に共有結合される、請求項１に記載のペプチド。

【請求項４】

Ｎ末端がアセチルに共有結合され、Ｃ末端が$NH_2$に共有結合される、請求項１に記載のペプチド。

【請求項５】

薬理学的に活性なペプチドが配列番号１９の配列のペプチドである、請求項１に記載のペプチド。

【請求項６】

良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進か

らなる群から選択される障害の処置に使用するための、請求項１～５の何れかに記載のペプチド。
【請求項７】
肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)の処置に使用するための、請求項６に記載のペプチド。
【請求項８】
請求項１～７の何れかに記載の１以上のペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項９】
請求項１～７の何れかに記載の１以上のペプチドを薬学的に許容される賦形剤に導入することを含む、医薬組成物を製造する方法であって、ここで、１以上のペプチドが、平滑筋の緊張の調節が有益である障害の処置に十分な量で存在するものである、方法。
【請求項１０】
障害が良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進からなる群から選択される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
障害がＰＡＨである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
平滑筋の緊張の調節を必要とする患者における障害を処置するための医薬組成物であって、請求項１～７の何れかに記載のペプチドを含む、医薬組成物。
【請求項１３】
障害が良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進からなる群から選択される、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
障害がＰＡＨである、請求項１３に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０１８年７月５日出願の米国出願６２／６９４,１６２に基づく優先権の利益を主張し、その内容を引用により本明細書に包含させる。
【０００２】
技術分野
本発明は、平滑筋緊張のモジュレーターである合成ペプチドおよびその組成物に関する。またそのようなペプチドを含む医薬組成物および平滑筋緊張の調節が有益である処置におけるその使用にも関する。
【背景技術】
【０００３】
背景
平滑筋組織は、種々の臓器および系の重要な構造成分および機能の制御体である。平滑筋収縮性障害は様々な臨床所見、特に呼吸器、血管、泌尿生殖器および消化管の疾患と関連する。
【０００４】
多様な機構が局所または全身刺激に応答して平滑筋の緊張を調節する。例えば、一酸化窒素(ＮＯ)などの隣接構造により産生されるメディエイターが、局所レベルで緊張を微調整する。相補的に、自律神経系(ＡＮＳ)の、交感神経または副交感神経線維を介する作用は、知覚され、中枢神経系(ＣＮＳ)により処理された刺激に応答して平滑筋の収縮性を制

御する。しかしながら、神経伝達物質受容体は、平滑筋組織において、そのような細胞が導入されているマクロ構造に依存して異なって発現される。それ故に、平滑筋緊張の薬理学的制御は、呼吸器、血管および泌尿生殖器系の疾患で顕著に異なる。薬理学的アプローチは、別の系では逆の作用(すなわち収縮と弛緩)すら生じさせ得る。

【０００５】

平滑筋細胞は毛細血管およびペリサイトの細静脈以外の全血管の壁にある。存在する限り、平滑筋は血管伸展性の、それ故に、血管径の主制御因子である。故に、平滑筋の緊張の変動が血管径を決定し、末梢抵抗そしてその結果血流に大きく影響する。病的状態では、血管平滑筋は動脈性高血圧の進展および進行に関係し、それ故にまた血流に対する抵抗を減少させる治療的アプローチの標的とされる。このような目的で用いられる薬理学的物質群は、交感神経ＡＮＳ刺激ブロッカー(アドレナリンアンタゴニスト)、アンギオテンシン変換酵素阻害剤またはＮＯドナー血管拡張剤を含む。

【０００６】

同様に、海綿体　－　陰茎の膨張に直接関与する血管構造　－　もまた平滑筋組織の層からなる。勃起は、陰茎を構成する血管、筋肉および神経部分構造の完全性に依存する神経血管性事象である。刺激されたとき、海綿体に隣接する神経末端およびこれらの血管を覆う内皮細胞がＮＯを放出する。後続のシグナル伝達カスケードが海綿体平滑筋の弛緩をもたらし、これらの構造への血流を増加させ、最後に、勃起させる。この機構の、不全は、勃起不全(ＥＤ)を特徴づける、性交に不十分な勃起の障害をもたらす。

【０００７】

ＥＤの回復のための治療は、海綿体平滑筋弛緩と、後続の海綿体内部への血流増加を目的とする。これに関し、ホスホジエステラーゼ－５阻害剤(ＰＤＥ５ｉ)が第一選択処置を占める。しかしながら、患者の３６％は明らかにＰＤＥ５ｉに抵抗性または不耐容であり、他の薬理学的選択肢を使用しなければならない。一般に、代替治療の有効性は限られ、投与(すなわち尿道内または陰茎海綿体内)および有害作用両者の観点から不便であり、故に高い中止率が付随する。しかしながら、第一選択および第二選択処置の何れも海綿体平滑筋弛緩による海綿体への血流の増加を促進する。それ故に、より便利な方法で、同じ効果を生じることができる薬物に対する満たされていない医療の必要性がある。

【０００８】

呼吸器では、平滑筋細胞は上部気道と気管気管支樹全体を統合し、これら構造の口径、そしてその結果気流を能動的に制御する。生理学的状況下での平滑筋緊張は局所メディエイターおよびＡＮＳによっても制御される。しかしながら、例えば、海綿体で起こっていることとは逆に、交感神経シグナルは弛緩を促進し、気道の口径を増加させる。また、この場合、アドレナリンおよびコリン作用性経路の薬理が、病的状況の気道の収縮性調節の基礎となる。

【０００９】

平滑筋組織は、呼吸器の炎症性疾患の特徴である、気道応答性亢進に関連する気管支収縮の中心的エフェクターである。これらの状況において、平滑筋層の過形成および肥大が一般に観察され、これは肥厚および気道収縮性増加に寄与する。Ｂ２－アドレナリンアゴニストは、喘息または慢性閉塞性肺疾患(ＣＯＰＤ)を有する患者における急性気管支収縮のレスキューのための標準処置に組み込まれる。この治療的アプローチは、気道の平滑筋の収縮予防および弛緩誘発の能力のために特に有効である。収縮性減少の同じ原理に従い、ムスカリンアンタゴニストおよびホスホジエステラーゼ４阻害剤(ＰＤＥ４ｉ)は、特に、ＣＯＰＤに関連する増悪に対する第二および第三選択処置として役立つ。

【００１０】

ここに記載するペプチドは、種々の解剖学的構造の平滑筋を弛緩させることができ、それ故に多面的作用機序を有する。それ故に、それらは、血管、消化器、呼吸器および泌尿生殖器管の平滑筋障害が関与する疾患の処置に有用である。

【００１１】

技術－科学論文には、ここに記載するものに類似する生物学的活性を有するペプチドを

報告するものがある。例えば、ブラジル放浪クモとして一般に知られるクモ類フォニュートリア・ニグリヴェンター(Phoneutria nigriventer)[クロドクシボグモ]の毒素は、種々の薬理的効果を有する生理活性ポリペプチドに富む。刺されることにより引き起こされる症状のうち、男性被害者で観察される持続勃起が、薬理学的観点から興味を惹かれている。２００８年にブラジルで出願された特許出願ＰＩ０８００５９６は、ラットの勃起機能におけるＰｎＴｘ２－６の効果を記載する。勃起不全の処置における毒素ＰｎＴｘ－６の治療能は、ＣＮ１０１５８５８７２に始まる特許ファミリーにも記載されている。

【００１２】

その後、ＰｎＴｘ２－６は高血圧動物(ＤＯＣＡ－ｓａｌ)および糖尿病マウスまたは高齢ラットの勃起機能を回復させることも示された(修正版、NUNES, K. P. CARDOSO, F. L, CARDOSO-Jr., H. C, PIMENTA, A. M. C, De LIMA, M. E. Animal toxins as potential pharmacological tools for treatment of erectile dysfunction. In: Animal Toxin: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology. Maria Elena de Lima, Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Marie France Martin-Eauclaire, Russolina Benedeta Zingali and Herve Rochat (editors), 759p., 2009; Nunes, K.P., Costa-Goncalves, A., Lanza, L.F., Cortes, S.F., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Pimenta, A.M., Webb, R.C., Leite, R., De Lima, M.E. Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function. Toxicon, 51(7):197-206, 2008; Antunes, A.A., Iscaife, A., Reis, S.T., Albertini, A., Nunes, M.A., Lucon, A.M., Nahas, W.C., Srougi, M. Can we predict which patients will experience resolution of detrusor overactivity after transurethral resection of the prostate? The Journal of Urology, 9 (10): 2574-81, 2012参照)。これらの効果は、酵素一酸化窒素合成酵素(ＮＯＳ)の活性化およびＮＯの放出が介在すると考えられる(YONAMINE, C.M., TRONCONE, L.R., CAMILLO, M.A. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal Phoneutria nigriventer spider toxin. Toxicon, 44, 169- 172, 2004; NUNES, K.P., COSTA-GONCALVES, A., LANZA, L.F., CORTES, S.F., CORDEIRO, M.N., RICHARDSON, M., PIMENTA, A.M., WEBB, R.C., LEITE, R., DE LIMA, M.E. Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function. Toxicon, 51 (7): 1 197-206, 2008, NUNES, K. P. CARDOSO, F. L, CARDOSO-Jr., H. C, PIMENTA, A. M. C, De LIMA, M. E. Animal toxins as potential pharmacological tools for treatment of erectile dysfunction. In: Animal Toxin: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology. Maria Elena de Lima, Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Marie France Martin-Eauclaire, Russolina Benedeta Zingali and Herve Rochat (editors), 759p., 2009)。さらに、ＮＯ経路に関与するいくつかの遺伝子が、毒素ＰｎＴｘ２－６で処置後、マウスの勃起性組織で発現が増強されていることが示唆された(VILLANOVA F.E., ANDRADE E., LEAL E., ANDRADE, P.M., BORRA, R.C., TRONCONE, L.R., MAGALHAES, L., LEITE, K.R., PARANHOS, M., CLARO, J., SROUGI, M. Erection induced by Tx2-6 toxin of Phoneutria nigriventer spider: expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. Toxicon. 54(6), 793-801, 2009)。米国特許９,２７９,００４は、毒素ＰｎＴｘ２－６から構築された、分子量２,４８５.８５Daの１９アミノ酸の誘導体であるペプチドＰｎＴｘ(１９)を記載する。該開示は、そのペプチドが、エクスビボでのマウス海綿体条片の弛緩の誘導により証明されるとおり、勃起機能を増強できることを明らかにする。後に、Silva et al (SILVA, C.N., NUNES, K.P., TORRES, F.S., CASSOLI, J.S., SANTOS, D.M., ALMEIDA, Fde.M., MATAVEL, A., CRUZ, J.S., SANTOS-MIRANDA, A., NUNES, A.D., CASTRO, C.H., MACHADO DE AVILA, R.A., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., LAUAR, S.S., FELICORI, L., RESENDE, J.M., CAMARGOS, E.R., BORGES, M.H., CORDEIRO, M.N., PEIGNEUR, S., TYTGAT, J., DE LIMA, M.E. PnPP19, a synthetic and nontoxic peptide designed from a Phoneutria nigriventer Toxin, potentiates erectile fu

nction via NO/cGMP. J Urol; 194(5): 1481-90. 2015)は、ＰｎＴｘ(１９)により促進される血管拡張は、ＮＯＳの活性化および、特にＮＯＳの神経型および誘導型アイソフォームによる、ＮＯ産生が介在することを確認した。故に、ＰｎＴｘ(１９)は、ＰＤＥ５ｉに基づく治療に難治性である患者に対して使用される可能性がある、ＥＤ処置の潜在的候補とされた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１３】

本明細書に記載する平滑筋緊張調節ペプチドは、先行文献で報告されたものより強力である。一例として、本ペプチドを、既に科学論文において確立されている平滑筋収縮実験モデルでＰｎＴｘ(１９)と比較して評価した。さらに下記のとおり、本平滑筋モジュレーターペプチドは、対照薬(ＰｎＴｘ(１９))が完全に不活性であるところで顕著な活性を示すか(気道の平滑筋)または明らかに優れた活性を示す(陰茎海綿体の平滑筋)。さらに、ＰｎＴｘ(１９)は、気道平滑筋で炎症促進効果を発揮することが示された。炎症は多くの疾患、とりわけ、喘息およびＣＯＰＤなどの肺疾患の病態生理で、該疾患を誘発するまたは悪化を促進する機構として、重要な部分である。それ故に、このような肺疾患において、炎症促進性化合物の使用は現在禁止されている。本明細書に記載するペプチドは、肺系で炎症促進的に作用せず、むしろ炎症を阻止する。さらに、ここに記載するペプチドの効果は、治療適用の可能性の幅を広げる多面的機構であるＮＯが介在する。

【課題を解決するための手段】

【００１４】

概要

ある実施態様において、ペプチドは、アミノからカルボキシ方向が左から右である式(２)：

【化１】

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Ile-Ala-Trp-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15 (2)

〔式中、
Ｘａａ１、Ｘａａ２およびＸａａ１５の各々は独立して存在しないかまたはＡｌａ、Ａｒｇ、ＬｙｓもしくはＨｉｓであり；
Ｘａａ３は独立して存在しないかまたはＡｌａ、Ｐｈｅ、ＴｒｐもしくはＴｙｒであり；
Ｘａａ４、Ｘａａ５およびＸａａ９の各々は独立して存在しないかまたはＰｈｅ、ＴｒｐもしくはＴｙｒであり；
Ｘａａ１０は独立して存在しないかまたはＨｉｓ、ＬｙｓもしくはＡｒｇであり；
Ｘａａ１１は存在しないかまたはＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｒｏ、ＣｙｓもしくはＭｅｔであり；
Ｘａａ１２は存在しないかまたはＡｌａであり；そして
Ｘａａ１３およびＸａａ１４の各々は独立して存在しないかまたはＡｓｎ、Ｇｌｎ、ＳｅｒもしくはＴｈｒである。〕
の薬理学的に活性なペプチド配列を含み、ここで、該式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列は５以上の連続的アミノ酸残基を有する。

【００１５】

ある実施態様において、式(２)において、Ｘａａ１、Ｘａａ２、Ｘａａ３、Ｘａａ４、Ｘａａ５、Ｘａａ１１、Ｘａａ１２、Ｘａａ１３、Ｘａａ１４およびＸａａ１５からなる群の１以上のアミノ酸残基は存在しない。

【００１６】

ある実施態様において、式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列は、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４または配列番号５である。

【００１７】

ある実施態様において、式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列は、１５～１８個の連続的アミノ酸残基を有する。

【００１８】

ある実施態様において、式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列は、１８個の連続的アミノ酸残基を有する。

【００１９】

ある実施態様において、ペプチドは少なくとも第二ペプチドまたはタンパク質を含む。

【００２０】

ある実施態様において、ペプチドは、式(１)

【化２】

$$-Z-X-Z'- \quad (1)$$

〔式中、
Ｘは上に定義した式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列であり；そして
ＺおよびＺ’の各々は、独立して、２～１５個の天然に存在するアミノ酸を有する細胞浸透増強アミノ酸配列または活性増強アミノ酸配列を含むペプチドである。〕
のペプチドを含む。

【００２１】

ある実施態様において、Ｈ、アセチル、クロライドまたはトリフルオロアセチルが－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－のＮ末端に共有結合する。

【００２２】

ある実施態様において、ＯＨまたは$NH_2$が－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－のＣ末端に共有結合する。

【００２３】

ある実施態様において、Ｚは、ＮからＣ末端で、それぞれアミノ酸残基Ｇｌｙ、ＧｌｕおよびＡｒｇを含む配列であり、Ｘは配列番号５の薬理学的に活性なペプチド配列を有し、Ｚ’は存在しない。

【００２４】

ある実施態様において、上記ペプチドの何れかは、アルブミン結合部分から選択される半減期延長部分に結合する。ある実施態様において、ペプチドは、アセチルであるＮ末端および$NH_2$であるＣ末端を有するペプチドである。

【００２５】

ある実施態様において、多量体形態のペプチドは、アミノ酸ベースの、例えば、Ｃ末端ドメインのエステル化により、開裂可能なリンカーが介在する、２以上の式(２)の配列を有するペプチドを含み、ここで、多量体は所望によりＮ末端がアシル化され、Ｃ末端がアミド化されている。

【００２６】

ある実施態様において、本発明は、平滑筋の収縮性の調節不全と関連する疾患の処置に有用な、平滑筋緊張調節ペプチドおよび薬学的に許容される媒体、賦形剤または添加剤を含む医薬組成物を含む。例えば、ある実施態様において、医薬組成物は、１以上の上に定義したペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。

【００２７】

ある実施態様において、本発明は、勃起不全(ＥＤ)、女性性機能不全(ＦＳＤ)、良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進を含むが、これらに限定されない、平滑筋収縮性の調節により利益が得られる疾患の処置のための、平滑筋緊張調節ペプチドの使用を含む。

【００２８】

例えば、医薬組成物を製造する方法は、平滑筋の緊張の調節が有益である障害の処置の十分な量の上記ペプチドの何れか１以上を、薬学的に許容される賦形剤に導入することを

含む。
【００２９】
ある実施態様において、障害は勃起不全(ＥＤ)、女性性機能不全(ＦＳＤ)、良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の過活性からなる群から選択される。
【００３０】
ある実施態様において、ペプチドは配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３または配列番号２４のアミノ酸配列を有し、さらに、ここで、障害はＰＡＨである。
【００３１】
ある実施態様において、平滑筋の緊張の調節を必要とする患者における障害を処置する方法は、患者に治療有効量の上記ペプチドの何れか１以上を投与することを含む。
【００３２】
ある実施態様において、障害は勃起不全(ＥＤ)、女性性機能不全(ＦＳＤ)、良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の過活性からなる群から選択される。
【００３３】
ある実施態様において、ペプチドは、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３または配列番号２４のアミノ酸を有し、さらに、ここで、障害はＰＡＨである。
【図面の簡単な説明】
【００３４】
【図１】エクスビボでヒスタミンにより誘導した気管軟骨輪の痙攣性収縮に対するＰｎＴｘ(１９)(０.０１～１０μM)の効果を示す。グラフは、異なる動物からの８個の気管軟骨輪で得た結果の平均±ＳＥＭを示す。
【００３５】
【図２】エクスビボでフェニレフリンで予め収縮させた海綿体の条片で電気刺激により誘導した弛緩に対するＰｎＴｘ(１９)($10^{-8}$M)の増強効果を示す。グラフは、異なる動物からの６個の海綿体条片で得た結果の平均±ＳＥＭを示す。
【００３６】
【図３】フェニレフリン(ＰＥ)で収縮させた海綿体の条片の電気刺激により誘導した弛緩に対するエクスビボでの平滑筋緊張調節ペプチドの増強的効果を示す。ペプチド配列番号５(Ａ)、配列番号１９(Ｂ)および配列番号２４(Ｃ)を、当該モデルの代表的モードで評価した。グラフは、異なる動物からの６個の海綿体条片で得た結果の平均±ＳＥＭを示す。
【００３７】
【図４】フェニレフリン(ＰＥ)で予め収縮させた海綿体の条片の電気刺激(８Hz)により誘導した弛緩に対する対照薬ＰｎＴｘ(１９)($10^{-8}$M)および平滑筋緊張調節ペプチドのエクスビボでの効果を示す。グラフは、異なる動物から摘出した、少なくとも６個の海綿体の条片で得た結果の平均±ＳＥＭを示す。群間の差を一元配置分散分析(一元配置ＡＮＯＶＡ)、続くボンフェローニ事後検定により分析した。＊は対照と比較したｐ＜０.０５を示す；＊＊は対照と比較したｐ＜０.０１を示す。
【００３８】
【図５】配列番号１９(０.０６mg／kg)の、１４日間連日処置後の、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)のモノクロタリン誘発モデルにおける、肺動脈圧そしてその結果右心室(ＲＶ)圧の回復におけるインビボでの効果を示す。グラフは、疾患を有しない群(対照)と媒体で処置したモノクロタリン誘発群(ＭＣＴ)で比較した(Ａ)心エコー検査により測定する肺動脈圧のグ

レードと逆相関するＰＡＴ／ＰＥＴ比(肺動脈加速時間(ＰＡＴ)／肺動脈駆出時間(ＰＥＴ)比)；(Ｂ)侵襲性ＲＶカテーテル留置により測定するＲＶ収縮期圧(ＲＶＳＰ)；(Ｃ)ＲＶカテーテル留置により測定する、ＲＶの圧と相関する比ｄＰ／ｄｔ(圧微分／最大時間微分)に対する配列番号１９の効果を示す。グラフは、７匹の異なる動物で得た結果の平均±ＳＥＭを示す。群間の差を、二元配置ＡＮＯＶＡ、続くボンフェローニ事後検定により分析した。＊はｐ＜０.０５を示す；＊＊はｐ＜０.０１を示す；＊＊＊はｐ＜０.００１を示す；全て対照と比較。

【００３９】

【図６】配列番号１９(０.０６mg／kg)の、１４日間連日処置後の、ＰＡＨのモノクロタリン誘発モデルの心臓リモデリングにおけるインビボでの効果を示す。グラフは、非疾患群(対照)および媒体で処置したモノクロタリン誘発群(ＭＣＴ)で比較した(Ａ)ＲＶ出口面積および(Ｂ)ＬＶ面積の面積に対する配列番号１９の効果を示す。グラフは、７匹の異なる動物で得た結果の平均±ＳＥＭを示す。群間の差を、二元配置ＡＮＯＶＡ、続くボンフェローニ事後検定により分析した。＊はｐ＜０.０５を示す；＊＊はｐ＜０.０１を示す；＊＊＊はｐ＜０.００１を示す；全て対照と比較。

【００４０】

【図７】ＰＡＨのモノクロタリン誘発モデルにおける、配列番号１９(０.０６mg／kgの)、２８日間連日処置後のインビボでの抗炎症効果を示す。グラフは、疾患を有しない群(対照)および処置しないモノクロタリン誘発群(ＭＣＴ)で比較した心臓ホモジネートの次の炎症促進性サイトカイン放出の減少に対する配列番号１９の効果を示す：(Ａ)縦隔リンパ節拡大の予防に対する効果、ＥＬＩＳＡで測定した(Ｂ)インターフェロン(ＩＦＮ)－γ、(Ｃ)インターロイキン(ＩＬ)－１β(pg／mgタンパク質で表す)およびグラフ(Ｄ)腫瘍壊死因子(ＴＮＦ)－α。グラフは、７匹の異なる動物で得た結果の平均±ＳＥＭを示す。群間の差を、一元配置ＡＮＯＶＡ、続くボンフェローニ多重比較検定により分析した。＊および＃はそれぞれ対照群およびＭＣＴ群と比較したときのｐ＜０.０５を示す；＊＊＊はｐ＜０.００１を示すおよび＃＃はｐ＜０.０１を示す。

【００４１】

【図８】マウスモデルにおける、ペプチド(１０nMolおよび３０nMol)気管内注入後、曝露６時間後の気管支肺胞間隙における好中球遊走に対するＰｎＴｘ(１９)、配列番号１９および配列番号２４の効果を示す(ｎ＝５)。値は少なくとも５匹の動物からの平均±ＳＥＭを示す、＋＋＋はＰＢＳ処置マウスへのＰＢＳ刺激と比較したｐ＜０.００１を示す。

【発明を実施するための形態】

【００４２】

実施態様の記載

Ⅰ　－　定義

特に断らない限り、ここで使用する全ての用語および表現は、本発明の技術の当業者に対するのと同じ意味を有する。当業者は、特に技術の定義および用語に関して、参考書"Current Protocols in Molecular Biology"を参照のこと(AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, G., SMITH, J.A., STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc., Media Pa. 2015)。

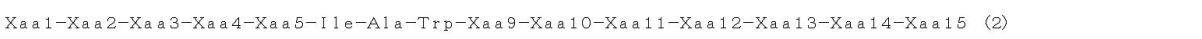
【００４３】

アミノ酸残基の略語は、一般的な２０－Ｌアミノ酸の一つをいうために当分野で使用される標準３文字および／または１文字コードである。

【００４４】

「保存的アミノ酸置換」は、あるポリペプチドまたはタンパク質の平滑筋弛緩活性(例えば、平滑筋弛緩の促進活性)または三次元構造の顕著な修飾をもたらさない置換をいう。このような置換は、一般にあるアミノ酸残基の、類似する物理化学的性質を有する異なる残基による置換を含む。例えば、グルタミン酸(Ｇｌｕ)のアスパラギン酸(Ａｓｐ)での置換は、両アミノ酸が類似サイズの陰性荷電であるため、保存的置換を構成すると考えられる。物理化学的性質によるアミノ酸のグループ分けは当業者に知られる。

【００４５】
「ペプチド」および「ポリペプチド」は、ここでは相互交換可能な様式で使用され、ペプチド結合により結合されたアミノ酸残基の鎖により構成される化合物をいう。特に断らない限り、ペプチドの配列をアミノ末端からカルボキシ末端の順で示す。
【００４６】
配列の「同一性」は、重ね合わせを最大にし、配列のギャップを最少にするためにアラインしたときにポリペプチドのアミノ酸の配列を比較し、続いて配列間の同一残基数を計数することより決定される。２つのアミノ酸または核酸の配列の同一性のパーセンテージは、目視検査および／またはコンピュータープログラムを使用して配列の情報を比較する長い配列で一般に行われる数学的計算により決定され得る。ペプチドおよび核酸の配列比較のために当業者により使用され得るプログラムの例は、National Library of Medicine[ncbi.nlm.nih.gov/BLAST]から自由に利用できる、ＢＬＡＳＴ(ＢＬＡＳＴＰ)およびＢＬＡＳＴＮを含む。好ましいモダリティにおいて、複数配列は、目視検査または適切なコンピュータープログラムを使用して決定したとき、それらのアミノ酸配列が少なくとも５０％同一、より好ましくは配列が７０％または７５％同一、さらにより好ましくは配列が８０％または８５％同一、さらにより好ましくは配列が９０または９５％同一であるならば、互いに相同または同一であるとみなされる。
【００４７】
ペプチドまたはペプチドフラグメントは、元のペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸の配列と同一または相同であるアミノ酸の配列があるならば、元のペプチドまたはペプチドフラグメントに「由来する」。
【００４８】
II　－　平滑筋弛緩ペプチドおよび組成物
ある実施態様において、本発明は、平滑筋、特に気道および血管に存在する平滑筋の弛緩を促進できる合成ペプチドに関する。類似の活性を有する他のペプチドは先行技術に示されているが、ここに記載する化合物を開示するまたは想起させる入手可能な報告はない。当該ペプチドは構造が特有であり、他のペプチドにあまり感受性ではないまたは明らかに非感受性である系に、故にその構造と関連すると考えられ得る生物学的効果を有する。
【００４９】
ある実施態様において、ペプチドは、アミノからカルボキシ方向が左から右である式(２)：
【化３】




〔式中、
Ｘａａ１、Ｘａａ２およびＸａａ１５の各々は独立して存在しないかまたはＡｌａ、Ａｒｇ、ＬｙｓもしくはＨｉｓであり；
Ｘａａ３は独立して存在しないかまたはＡｌａ、Ｐｈｅ、ＴｒｐもしくはＴｙｒであり；
Ｘａａ４、Ｘａａ５およびＸａａ９の各々は独立して存在しないかまたはＰｈｅ、ＴｒｐもしくはＴｙｒであり；
Ｘａａ１０は独立して存在しないかまたはＨｉｓ、ＬｙｓもしくはＡｒｇであり；
Ｘａａ１１は存在しないかまたはＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｒｏ、ＣｙｓもしくはＭｅｔであり；
Ｘａａ１２は存在しないかまたはＡｌａであり；そして
Ｘａａ１３およびＸａａ１４の各々は独立して存在しないかまたはＡｓｎ、Ｇｌｎ、ＳｅｒもしくはＴｈｒである。〕
の薬理学的に活性なペプチド配列を含み、ここで、式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列は５以上の連続的アミノ酸残基を有する。
【００５０】
ある実施態様において、式(２)において、Ｘａａ１、Ｘａａ２、Ｘａａ３、Ｘａａ４、

Ｘａａ５、Ｘａａ１１、Ｘａａ１２、Ｘａａ１３、Ｘａａ１４およびＸａａ１５からなる群の１以上のアミノ酸残基は存在しない。

【００５１】

ある実施態様において、式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列は、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４または配列番号５である。

【００５２】

ある実施態様において、式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列は、１５～１８個の連続的アミノ酸残基を有する。

【００５３】

ある実施態様において、式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列は、１８個の連続的アミノ酸残基を有する。

【００５４】

ある実施態様において、ペプチドは少なくとも第二ペプチドまたはタンパク質を含む。

【００５５】

ある実施態様において、本発明は、式(１)：

【化４】

－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－　(1)

〔式中、
ＺおよびＺ’の各々は、独立して、２～１５個の天然に存在するアミノ酸を有する細胞浸透増強アミノ酸配列または活性増強アミノ酸配列を含むペプチドであり、ここで、Ｈ、アセチルクロライドおよびトリフルオロアセチルは－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－のＮ末端に共有結合され、そしてＸは、アミノからカルボキシ方向が左から右である式(２)：

【化５】

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Ile-Ala-Trp-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15 (2)

の薬理学的に活性なペプチド配列を有するペプチドＸであり、
ここで、
Ｘａａ１、Ｘａａ２およびＸａａ１５の各々は独立して存在しないかまたはＡｌａであるかまたは塩基性側鎖を有するアミノ酸(Ａｒｇ、ＬｙｓまたはＨｉｓ)であり；
Ｘａａ３は独立して存在しないかまたはＡｌａまたは芳香族側鎖を有するアミノ酸(Ｐｈｅ、ＴｒｐまたはＴｙｒ)であり；
Ｘａａ４、Ｘａａ５およびＸａａ９の各々は独立して存在しないかまたは芳香族側鎖を有するアミノ酸(Ｐｈｅ、ＴｒｐまたはＴｙｒ)であり；
Ｘａａ１０は独立して存在しないかまたは塩基性側鎖を有するアミノ酸(Ｈｉｓ、ＬｙｓまたはＡｒｇ)であり；
Ｘａａ１１は存在しないかまたは非極性アミノ酸(Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｒｏ、ＣｙｓまたはＭｅｔ)であり；
Ｘａａ１２は存在しないかまたはＡｌａであり；
Ｘａａ１３およびＸａａ１４の各々は独立して存在しないかまたは非荷電側鎖を有するアミノ酸(Ａｓｎ、Ｇｌｎ、ＳｅｒまたはＴｈｒ)であり；ここで、Ｘは５以上の連続的アミノ酸残基を有する。〕
の薬理学的に活性なペプチド配列を有するペプチドを含む、組成物に関する。

【００５６】

ある実施態様において、Ｘは次の配列を有する：Ａｃ－Ａｒｇ－Ａｌａ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－ＮＨ$_2$（配列番号１）。

【００５７】

ある実施態様において、ペプチドは式(１)

【化６】
－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－　（１）

〔式中、
Ｘは上に定義した式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列であり；そして
ＺおよびＺ’の各々は、独立して、２～１５個の天然に存在するアミノ酸を有する細胞浸透増強アミノ酸配列または活性増強アミノ酸配列を含むペプチドである。〕
のペプチドを含む。

【００５８】
ある実施態様において、Ｈ、アセチル、クロライドまたはトリフルオロアセチルが－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－のＮ末端に共有結合される。

【００５９】
ある実施態様において、ＯＨまたは$NH_2$が－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－のＣ末端に共有結合される。

【００６０】
ある実施態様において、Ｚは、ＮからＣ末端で、それぞれアミノ酸残基Ｇｌｙ、ＧｌｕおよびＡｒｇを含む配列であり、Ｘは配列番号５の薬理学的に活性なペプチド配列を有し、Ｚ’は存在しない。

【００６１】
ある実施態様において、上記ペプチドの何れかは、アルブミン結合部分から選択される半減期延長部分に結合される。ある実施態様において、ペプチドは、アセチルであるＮ末端および$NH_2$であるＣ末端を有するペプチドである。

【００６２】
ある実施態様において、多量体形態のペプチドは、アミノ酸ベースの、例えば、Ｃ末端ドメインのエステル化により、開裂可能なリンカーが介在する、２以上の式(２)の配列を有するペプチドを含み、ここで、多量体は所望によりＮ末端がアシル化され、Ｃ末端がアミド化されている。

【００６３】
ある実施態様において、本発明は、平滑筋の収縮性の調節不全と関連する疾患の処置に有用な、平滑筋緊張調節ペプチドおよび薬学的に許容される媒体、賦形剤または添加剤を含む医薬組成物を含む。例えば、ある実施態様において、医薬組成物は１以上の上に定義したペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。

【００６４】
III　－　ペプチド合成

本発明のペプチドは、組み換えおよび非組み換え方法を含む、当業者に知られるあらゆる方法により製造され得る。合成経路(非組み換え)は、ペプチドの固相化学合成、ペプチドの液相化学合成および生体触媒合成を含むが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、ペプチドは、手動、自動化または半自動化系を使用して、液相または固相で、化学合成により得られる。

【００６５】
固相ペプチド合成(ＳＰＰＳ)は、例えば、MERRIFIELD (MERRIFIELD, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154. 1963)が記載してから知られ、広く用いられている。ＳＰＰＳの様々な変法が当業者に利用可能である(GUTTE, B. Peptide Synthesis, Structures, and Applications. Academic Press, San Diego, CA, Chapter 3, 1995; and WHITE, P.D., and CHAN, W.C. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A practical Approach. OxfordUniversity Press, Oxford, 2004; MACHADO, A., LIRIA, C.W., PROTI, P.B., REMUZGO, C., MIRANDA, T.M. Sinteses quimica e enzimatica de peptideos: principios basicos e aplicacoes. Quim. Nova, 5:781-789 2004参照)。簡潔には、ＳＰＰＳによるペプチドの組み立ては、センスＣ→Ｎ末端で起こる。この目的のために、目的

のＣ末端アミノ酸が固体支持体に結合させる。その後結合されるアミノ酸は、基Ｂｏｃ、Ｆｍｏｃまたは他の適切な保護基で保護されたＮ末端部分を有し、一方Ｃ末端部分は標準的カップリング剤で活性化される。その後、支持体に結合したアミノ酸の遊離末端アミンが、後続のアミノ酸の末端カルボキシ部分と反応する。次いで、ジペプチドの末端アミンが脱保護され、ポリペプチドが完成するまでこの工程が繰り返される。適切である限り、出発アミノ酸の側鎖も保護し得る。

【００６６】

あるいは、本発明のペプチドは組み換え方法により得られる。方法のバリエーションの可能性を限定せずに、例示プロトコールは、目的のペプチドをコードする核酸の組み立て；該核酸の発現ベクターへのクローニング；宿主細胞(細胞、植物、大腸菌などの細菌、サッカロマイセス・セレビシエなどの酵母またはチャイニーズハムスター卵巣細胞などの哺乳動物細胞)の該ベクターでの形質転換；目的のペプチドを産生するための核酸の発現を含む。インビトロおよび原核および真核生物宿主細胞で組み換えポリペプチドを産生および発現する方法は当業者に知られる(U.S.4,868,122およびSAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989参照)。

【００６７】

III.Ａ　－　相関性があるペプチド

本明細書に記載されるもののようなペプチドに、該ペプチドの性質をほとんどまたは全く変えることなく、一定の修飾をなし得ることは、当業者に認められる。それ故に、ここに記載するものと関連するペプチドは、元のペプチドの治療活性の一部または全てを保持する、アナログおよび／または誘導体を含む。この場合、用語「アナログ」は、ここに記載するペプチドのアミノ酸の置換、欠失または付加により得たバリアントを指し；一方「誘導体」は、ここに記載するペプチドおよび／またはそのアナログの一次配列に化学修飾を含むバリアントを指す。ある態様において、このようなバリアントは、ペプチドの治療活性の少なくとも一つの改善を示し得る。さらに、本発明のペプチドは、Ｌ－アミノ酸、Ｄ－アミノ酸または任意の比での両者の組み合わせを含み得る。

【００６８】

他の実施態様は、処置を必要とする患者への投与前、後または途中で活性ペプチドの何れかに化学的または酵素的に変換されるプロドラッグまたは薬物前駆体を含む。このような化合物は、とりわけ、アミノ酸のエステル、Ｎ－アルキル、ホスフェートまたはコンジュゲート(ARNAB, DE, Application of Peptide-Based Prodrug Chemistry in Drug Development; Springer, New York Heidelberg Dordrecht London, 2013)、より親油性のペプチド(CACCETTA, R., BLANCHFIELD, J.T., HARRISON, J., TOTH, I., BENSON, H.A.E. Epidermal Penetration of a Therapeutic Peptide by Lipid Conjugation; Stereo-Selective Peptide Availability of a Topical Diastereomeric Lipopeptide. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 12 (3), 327-333. 2006)を含み、ある場合、このような化合物は、例えば、Ｃ末端ドメインのエステル化による極性リンカーの付加により、より親水性にされる。

【００６９】

本発明は、何らかの線形活性ペプチドに変換され得る、あらゆる環状ペプチドも含む。さらに、グリコシル化またはペグ化などのバイオコンジュゲートまたは高分子での化学修飾を含む(HUTTUNEN, K.M., RAUNIO, H., RAUTIO, J. Prodrugs-from Serendipity to Rational Design. Pharmacol Rev. 63:750-771, 2011)。

【００７０】

本発明は、さらに、アミノ酸の基のバイオエステルに基づく活性構造を投影するための支持体として活性ペプチドの何れかを使用する、ペプチド模倣アプローチを含む(VAGNER, J., QU, H. and HRUBY, V.J. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug Discovery; Curr Opin Chem Biol. 12(3): 292-296. 2008)。

【００７１】

本発明は、ここに記載するペプチドに比して１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個または１２個の保存的または非保存的アミノ酸置換を含む、アナログを含む。望ましいアミノ酸置換は、保存的であれ非保存的であれ、当業者により日常的な方法を使用して決定され得る。本発明のある態様において、平滑筋緊張調節ペプチドは、元のペプチドに類似する機能的および化学的特徴を有するバリアントを生じる、保存的置換を含むアナログを含む。他の態様において、アナログは、元のペプチドにより示されるものと顕著に異なる特徴を生じさせ得る、非保存的置換を含む。

【００７２】

天然アミノ酸は、側鎖の性質の観点で、非極性(非極性：(グリシン(Ｇｌｙ)、アラニン(Ａｌａ)、バリン(Ｖａｌ)、ロイシン(Ｌｅｕ)、イソロイシン(Ｉｌｅ)、メチオニン(Ｍｅｔ))；非荷電極性：(システイン(Ｃｙｓ)、セリン(Ｓｅｒ)、スレオニン(Ｔｈｒ)、プロリン(Ｐｒｏ)、アスパラギン(Ａｓｎ)、グルタミン(Ｇｌｎ))；酸(アスパラギン酸(Ａｓｐ)、グルタミン酸(Ｇｌｕ)；塩基性(ヒスチジン(Ｈｉｓ)、リシン(Ｌｙｓ)、アルギニン(Ａｒｇ))；および芳香族(トリプトファン(Ｔｒｐ)、チロシン(Ｔｙｒ)、フェニルアラニン(Ｐｈｅ))に分類され得る。一例として、非保存的置換は、あるクラスのアミノ酸の異なる群からの他のアミノ酸への交換を含み得る；ペプチドの治療活性に重要でではない領域にそれらをさらに導入し得る。しかしながら、置換は好ましくは保存的である。すなわち、アミノ酸の同じクラスの他のものへの交換を含む。このタイプの修飾は、ペプチドの合成中に頻繁に使用され得るペプチド模倣体および他のアミノ酸の非典型的形態を含む、人工および／または非必須アミノ酸残基による置換も含む。

【００７３】

アミノ酸の置換を決定するための戦略は、側鎖の疎水性度により導かれ得る。ポリペプチドの機能における疎水性アミノ酸の重要性は、当業者により理解されている(KYTE, J. and DOOLITTLE. R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157:105-31. 1982)。各アミノ酸は、疎水性度および荷電の特徴に基づいて決定された疎水性度指数を有する。これらは、Ｉｌｅ(＋４.５)；Ｖａｌ(＋４.２)；Ｌｅｕ(＋３.８)；Ｐｈｅ(＋２.８)；Ｃｙｓ(＋２.５)；Ｍｅｔ(＋１.９)；Ａｌａ(＋１.８)；Ｇｌｙ(－０.４)；Ｔｈｒ(－０.７)；Ｓｅｒ(－０.８)；Ｔｒｐ(－０.９)；Ｔｙｒ(－１.３)；Ｐｒｏ(－１.６)；Ｈｉｓ(－３.２)；Ｇｌｕ(－３.５)；Ｇｌｎ(－３.５)；Ａｓｐ(－３.５)；Ａｓｎ(－３.５)；Ｌｙｓ(－３.９)；およびＡｒｇ(－４.５)である。類似する疎水性度指数を有するアミノ酸を、生物学的活性の顕著な喪失なく相互交換し得ることは、当業者により理解される。

【００７４】

保存的置換は親水性度にも基づき得ることは知られる。隣接する複数アミノ酸の親水性度により決定したポリペプチドの平均親水性度は、該化合物の生物学的性質と相関性がある。米国特許４,５５４,１０１によると、天然アミノ酸は次の親水性度値を有する：Ａｒｇ(＋３.０)；Ｌｙｓ(＋３.０)；Ａｓｐ(＋３.０±１)；Ｇｌｕ(＋３.０±１)；Ｓｅｒ(＋０.３)；Ａｓｐ(＋０.２)；Ｇｌｎ(＋０.２)；Ｇｌｙ(０)；Ｔｈｒ(－０.４)；Ｐｒｏ(－０.５±１)；Ａｌａ(－０.５)；Ｈｉｓ(－０.５)；Ｃｙｓ(－１.０)；Ｍｅｔ(－１.３)；Ｖａｌ(－１.５)；Ｌｅｕ(－１.８)；Ｉｌｅ(－１.８)；Ｔｙｒ(－２.３)；Ｐｈｅ(－２.５)；およびＴｒｐ(－３.４)。

【００７５】

本発明でいう保存的置換体は：

Ａｃ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ－$NH_2$ (配列番号２)

Ａｃ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－$NH_2$ (配列番号３)

Ａｃ－Ａｌａ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－$NH_2$ (配列番号４)

Ａｃ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌ

ｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－ＮＨ$_2$（配列番号５）
Ａｃ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｓｅｒ－Ａｓｎ－Ｌｙｓ－ＮＨ$_2$（配列番号６）
を含むが、これらに限定されない。

【００７６】

本発明のある態様において、ペプチドのアナログは、もともと記載されたペプチドと比較して、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個のアミノ酸欠失を有する。アミノ酸欠失は、Ｎ末端またはＣ末端領域において、両フランキング配列に、ペプチド配列の内部にまたは配列の一方または両方のフランキング配列と内部に見られ得る。アナログが１を超える欠失を有するとき、除去されるアミノ酸は連続的であってよくまたは種々の領域に位置してよい。

【００７７】

本発明により考慮される欠失体は：
Ａｃ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－ＮＨ$_2$（配列番号１７）
Ａｃ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－ＮＨ$_2$（配列番号１８）
Ａｃ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－ＮＨ$_2$（配列番号１９）
Ａｃ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－ＮＨ$_2$（配列番号２０）
Ａｃ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－ＮＨ$_2$（配列番号２２）
Ａｃ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－ＮＨ$_2$（配列番号２３）
Ａｃ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－ＮＨ$_2$（配列番号２４）
を含むが、これらに限定されない。

【００７８】

本発明の他の態様は、もともとここに記載されるペプチドと比較して、１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸付加を有するアナログを含む。当該挿入は、Ｎ末端またはＣ末端領域において、両フランキング配列に、ペプチド配列の内部にまたは配列の一方または両方のフランキング配列および内部に起こり得る。アナログが１を超える付加を有するとき、アミノ酸は連続的にまたは分子の異なる領域に挿入されてよい。

【００７９】

本発明はまた連結基により結合させ、単独活性ペプチドに変換されるかまたは分子全体として医薬活性を示す、２以上の活性ペプチドのあらゆる組み合わせをも含む(HUTTUNEN, K. AND RAUTIO, J. Prodrugs - An Efficient Way to Breach Delivery and Targeting Barriers. Current Topics in Medicinal Chemistry.11, 2265-2287. 2011)。アミノ酸の挿入は、ここに記載するペプチドのＮ末端またはＣ末端領域に付加し得る、アミノ酸のリンカー、融合ペプチドおよび透過増強配列も含む。細胞透過および／または経皮吸収を増強できるペプチド配列は当業者により知られ、例えば、Kumar et al(KUMAR, S., NARISHETTY, S.T., TUMMALA, H. Peptides as Skin Penetration Enhancers for Low Molecular Weight Drugs and Macromolecules. In: Dragicevic N., Maibach H. (eds) Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015)および特許ＵＳ１４，９１１,０１９およびＷＯ２０１２０６４４２９に見られ得る。

【００８０】

ある態様において、上記アミノ酸のリンカー、融合ペプチドおよび透過増強配列は、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個または１５個の付加的アミノ酸を有し得て、配列番号２８、配列番号２９および配列番号３０に例示されるような連結部

分の手段により平滑筋緊張調節ペプチドに結合され得る。このような部分は、所望により治療用ペプチドの他の治療用ペプチドへの結合に使用される、一原子または複数原子の一群であり得る。あるいは、連結分子は、適切な環境への生物学的に活性な部分の放出を可能とするために、タンパク分解性開裂のために設計されたアミノ酸の配列からなり得る。さらに、ここに記載する平滑筋緊張調節ペプチドは、薬理学的性質(薬物動態および／または薬力学的)およびまたは物理化学的性質の改善のために設計されたペプチドに融合させ得る。

【００８１】

本発明により考慮される付加は：

Ａｃ－Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－$NH_2$（配列番号２７）

Ａｃ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－$NH_2$
(配列番号２８)

Ａｃ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ－Ｔｙｒ－Ｔｒｐ－Ａｌａ－Ｉｌｅ－$NH_2$（配列番号２９）

Ａｃ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－$NH_2$（配列番号３０）

を含むが、これらに限定されない。

【００８２】

ある態様において、本発明は、ペプチド鎖の一か所以上の１以上のメチルまたは他の小さなアルキル基による化学修飾を含む誘導体を含む。このような基の例は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチルなどを含む。あるいは、誘導体は、ペプチド配列への１以上のグリコシド部分の結合に由来する。例えば、前記誘導体は、１以上の単糖、二糖または三糖のペプチド配列への結合により得られ得る。例えば、該誘導体は、ペプチドの任意の位置への１以上の単糖、二糖または三糖の結合により得られ得る。グリコシル化は、ペプチドの天然アミノ酸に向けてよくまたはあるいは、１個のアミノ酸を修飾させるために置換または付加し得る。

【００８３】

該グリコシル化ペプチドは、目的の糖アミノ酸をペプチドの合成前に調製し、その後配列の所望の位置に付加する、慣用のＳＰＰＳ技術の方法により得られ得る。それ故に、平滑筋緊張調節ペプチドは、インビトロでグリコシル化され得る。この場合、グリコシル化は前もって起こり得る。参照のために本明細書に包含させる文献ＵＳ５,７６７,２５４、ＷＯ２００５／０９７１５８およびDOORES et al(DOORES, K., GAMBLIN, D.P. AND DAVIS, B.G. Exploring and exploiting the therapeutic potential of glycoconjugates. Chem. Commun., 1401-1403, 2006)は、アミノ酸のグリコシル化を記載する。一例として、セリンおよびスレオニンの残基のアルファまたはベータ選択的グリコシル化をケーニッヒ・クノール反応および中間体シッフ塩基を使用するレミューのインサイチュでのアノマー化の方法を使用して、達成され得る。次いで、グリコシル化シッフ塩基の脱保護を、わずかに酸の条件または水素化分解の手段により実施する。

【００８４】

ここに記載するペプチドのアミノ酸の１以上の残基に導入できる基は、とりわけグルコース(デキストロース)、フルクトース、ガラクトースおよびリボースである。使用に適する可能性のある他の単糖は、とりわけ、グリセルアルデヒド、ジヒドロキシアセトン、エリトロース、トレオース、エリトルロース、アラビノース、リキソース、キシロース、リブロース、キシルロース、アロース、アルトロース、マンノース、Ｎ－アセチルノイラミン酸、フコース、Ｎ－アセチルガラクトサミン、Ｎ－アセチルグルコサミンである。平滑

筋緊張調節ペプチドの修飾に使用する単糖、二糖および三糖などのグリコシドは、合成または天然起源であり得る。ここに記載するアミノ酸の１以上の残基に導入され得る二糖は、スクロース、ラクトース、トレハロース、アロース(alose)、メリビオース、セロビオースなどを含む。三糖はアカルボース、ラフィノースおよびメレジトースであり得る。

【００８５】

本発明のさらなる態様において、平滑筋緊張調節ペプチドをビオチンにカップリングさせ得る。次いで、このようなペプチド－ビオチン複合体をアビジンにカップリングさせ得る。

【００８６】

先に記載のとおり、ここに記載するペプチドを、該ペプチドの生物学的活性および性質を一部しか低減させないかまたは低減させないように修飾し得る。ある場合、このような修飾は、意図する治療活性の改善をもたらすように実現され得る。それ故に、本発明の範囲は、非修飾ペプチドに対して、少なくとも１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％およびこれらから導き出されるあらゆる範囲、、例えば、少なくとも７０％～少なくとも８０％および好ましくは少なくとも８１％～９０％またはさらにより好ましくは、９１％～９９％の治療活性を保持するバリアントを含む。本発明の範囲はまた非修飾ペプチドと比較して、１００倍以上高い活性により証明される、１００％、１１０％、１２５％、１５０％、２００％または３００％以上およびそこから導き出せるあらゆる範囲の高い治療活性を有するバリアントも含む。

【００８７】

本明細書に記載する平滑筋緊張調節ペプチドは、直接的にまたはスペーサー基の手段により水溶性ポリマーに共有結合的にコンジュゲートし得る。本発明範囲に入るペプチド－ポリマーコンジュゲートの例は、脱離可能なまたは安定な様式でペプチドに結合した、特にＮ末端部分に結合した水溶性ポリマーを含むコンジュゲート；脱離可能なまたは安定な様式でペプチドに結合した、特にＣ末端部分に結合した水溶性ポリマーを含むコンジュゲート；脱離可能なまたは安定な様式でペプチドに結合した、特にペプチド鎖内部に位置するアミノ酸に結合した水溶性ポリマーを含むコンジュゲート；例えば、Ｎ末端部分およびペプチド配列内部に位置するアミノ酸(特にリシン)の側鎖などのペプチドの異なる領域に結合した、脱離可能なまたは安定な様式で結合した、１を超える水溶性ポリマーを含むコンジュゲートを含む。あるいは、水溶性ポリマーが結合するアミノ酸を、Ｎ末端部分またはＣ末端部分またはペプチドの一次構造の真ん中に挿入し得る。

【００８８】

一般に、上記ポリマーは、親水性、非ペプチド性、生体適合性および非免疫原性である。これに関し、単独でまたは他の物質(例えば、治療用ペプチドなどの生物学的活性成分)と組み合わせて生存生物に投与することに関連する有益な効果が、臨床的に観察可能なあらゆる有害作用を上回るならば、その物質は生体適合性と見なされる。インビボでの物質の意図する使用が望ましくない免疫学的応答(例えば、抗体の産生)をもたらさないか、免疫学的応答が誘発されるならば、そのような事象が臨床的に顕著または重要と見なされないならば、その物質は非免疫原性と見なされる。このような水溶性ポリマーの例は、ポリエチレングリコール(ＰＥＧ)、ポリプロピレングリコール(ＰＰＧ)、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、ポリオレフィンアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリレート)、硫酸化または非硫酸化多糖、ポリオキサゾリン、ポリ(Ｎ－アクリロイルモルホリン)およびこれらのポリマーのコポリマーおよびターポリマーを含む組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【００８９】

上記水溶性ポリマーは特定の構造に限定されず、直線状または、分岐、二股、多分岐(例

えば、ポリオールコアに結合したＰＥＧ)または樹状(数末端を有する密に分岐した構造)などの非直線状構造を有し得る。ペプチドにポリマーをコンジュゲートする方法は先行文献に記載され、アルキル化剤またはアシル化剤から選択され得る適切な反応材も同様である(HARRIS, J. M. and ZALIPSKY, S., Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications. ACS, Washington, 1997; VERONESE, F., and HARRIS, J.M. Peptide and Protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Reviews, 54(4); 453-609. 2002; ZALIPSKY, S., LEE, C. Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides. in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, ed., Plenus Press, New York, 1992; ZALIPSKY, S. Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. Advanced Drug Reviews, 16:157-182, 1995; and in ROBERTS, M.J., BENTLEY, M.D., HARRIS, J.M., Chemistry for peptide and protein PEGylation. Adv. Drug Delivery Reviews, 54, 459-476, 2002参照)。一般に、水溶性ポリマーの平均分子量は１００ダルトン(Da)～１５０,０００Da(１５０kDa)で変わり得る。例えば、平均分子量２５０Da～８０kDa５００Da～６５kDa７５０Da～４０kDaまたは１kDa～３０kDaの水溶性ポリマーを使用し得る。本発明のさらなる態様において、平滑筋緊張調節ペプチドを、物理化学的、薬物動態学的および／または薬力学的特徴を改善するために、ペプチド鎖の一か所以上でアシル化し得る。例えば、親油性アシル基の導入は、それが結合した基の酸化に対する感受性を低下させるため、治療用ペプチドの血漿半減期延長に広く使用される。ペプチドのアシル化のための方法および反応材は、当業者に知られる。引用により本明細書に包含させる文献ＷＯ９８／０８８７１、ＵＳ２００３／００８２６７１、ＷＯ２０１５／１６２１９５は、ペプチドのアシル化のための反応材および条件を例示する。遊離アミンのアシル基での修飾は、ペプチドおよびタンパク質のアシル化の促進に特に有用である(ABELLO, N., KERSTJENS, H.A., POSTMA, D.S., BISCHOFF, R. Selective acylation of primary amines in peptides and proteins. Journal of proteome research, 6(12): 4770-4776. 2007)。この場合、平滑筋緊張調節ペプチドをＮ末端アミンまたは配列にもともと存在するまたは当該アシル化をさせる目的で導入した１以上のアミノ酸の側鎖でアシル化し得る。

【００９０】

IV　－　医薬形態

本発明のある態様において、１以上の本発明のペプチドを含む医薬形態が提供される。特定のモダリティにおいて、本発明のペプチドを薬学的に許容される媒体および／または賦形剤および／または添加剤と組み合わせる。

【００９１】

本発明の医薬形態を、例えば、英国、欧州および米国薬局方(British pharmacopoeia. Vol. 1. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2018; European pharmacopoeia. 9th ed, Strassbourg: Council of Europe: 2018; United States Pharmacopoeia, 42, National Formulary 37, 2018)、Remington's Pharmaceutical Sciences (REMINGTON, J.P., AND GENNARO, A.R. Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co., 18th ed. 1990)、Martindale: The Extra Pharmacopoeia (MARTINDALE, W. AND REYNOLDS, J.E.F. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. London, The Pharmaceutical Press 31st ed, 1996)およびHarry ’ s Cosmeticology (HARRY, R. AND ROSEN, M.R. Harry ’ s cosmeticology. Leonard Hill Books, 9th ed. 2015)、Pharmaceutical technology (PRISTA, L. V. N., ALVES, A.C., MORGADO, R.M.R. Tecnica Farmaceutica e Farmacia Galenica. 4th ed. Fundacao Calouste Gulbenkian. Servico de Educacao e Bolsas, 1996)に開示されるような慣用の方法により製造および製剤し得る。

【００９２】

医薬形態は、例えば、１部以上の水、緩衝液(例えば、重炭酸ナトリウム、緩衝化中性食塩水溶液またはリン酸で緩衝化された食塩水溶液)、エタノール、鉱油、植物油、ジメチル

スルホキシド、炭水化物(例えば、ラクトース、ソルビトール、トレハロース、グルコース、マンノース、スクロース、アミド、グリセロール、マンニトールまたはデキストラン)、タンパク質、アジュバント(例えばポリマーおよびシクロデキストリンなどの安定化剤)、ポリペプチドまたはアミノ酸(例えばＨｉｓ、Ｇｌｙ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、ＧｌｕおよびＡｒｇ)、抗酸化剤(例えばアスコルビン酸、アルファ－トコフェロール、亜硫酸、ＢＨＡ(ブチルヒドロキシアニソール)、ＢＨＴ(ブチルヒドロキシトルエン)、界面活性剤(例えば非イオン性洗剤 － Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、プルロニックＦ６８、プルロニックＦ８８、プルロニックＦ１２７、Ｂｒｉｊ ３５)、キレート剤(例えばＥＤＴＡおよび／またはグルタチオン)および／または防腐剤(例えばパラベン、ソルビン酸、イミダゾール尿素、アンモニア四級化化合物、ヒダントイン、フェノール誘導体、酸性誘導体、ハロゲン化化合物)を含み得る。

【００９３】

医薬形態は、例えば、局所、経口、経鼻、直腸または非経腸投与を含む、あらゆる投与経路のために製剤され得る。ここで使用する用語非経腸は、皮下注射、皮内注射、血管内注射(例えば、静脈内)、筋肉内注射、脊髄注射、頭蓋内注射、髄腔内注射および腹腔内注射ならびに注射または点滴のあらゆる類似する技術を含む。あるモダリティにおいて、経口使用のための組成物が好ましい。このような組成物は、例えば、丸剤、錠剤、液剤、水性もしくは油性懸濁液剤、分散性粉末剤もしくは顆粒剤、エマルジョン剤、硬もしくは軟カプセル剤もしくはシロップ剤またはエリキシル剤を含む。数あるモダリティの中で、医薬組成物を、凍結乾燥粉末に製剤し得る。

【００９４】

経口使用を意図する医薬形態は、さらに、外観が良くかつのみやすい製剤を提供するために、甘味剤、風味剤、着色剤および／または防腐剤などの他の成分を含み得る。

【００９５】

丸剤は、丸剤の製造に適する生理学的に適合性の賦形剤と混合された活性成分を含む。このような賦形剤は、例えば、不活性希釈剤(例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム)、造粒および崩壊剤(例えば、トウモロコシデンプンまたはアルギン酸)、結合剤(例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア)および滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク)を含む。丸剤は乾燥造粒、直接圧縮および湿式造粒を含む、標準的技術を使用して形成できる。丸剤はコーティングされなくても、既知技術を使用してコーティングされてもよい。

【００９６】

経口用製剤は、活性成分が不活性固形希釈剤(例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリン、タルク、一水和されたラクトース、コロイド状二酸化ケイ素、微結晶セルロース、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムアミドグリコラート)と混合されるゼラチン硬カプセル剤、または活性成分が水または油性媒体(例えば、ピーナツ油、液体ワセリンまたはオリーブ)と混合されるゼラチン軟カプセル剤としても提示され得る。

【００９７】

水性懸濁液剤は、懸濁化剤(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガムおよびアカシアガム)；および分散または湿潤剤(例えば、レシチンなどの天然に存在するフォスファチド、ステアリン酸ポリオキシエチレンなどのアルキレンオキシドと脂肪酸の縮合産物、ヘプタデカ－エチレンオキシ－セタノールなどのエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールの縮合産物、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートなどのエチレンオキシドと脂肪酸および１個のヘキシトール由来の部分エステルの縮合産物またはポリオキシエチレンソルビタンのモノオレイン酸エステルなどのエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール無水物由来のエステルの縮合産物)などの適切な賦形剤と混合された活性物質を含む。水性懸濁液は、ｐ－ヒドロキシ安息香酸のエチルまたはｎ－プロピルエステルなどの１以上の防腐剤、１以上の着色剤、スクロースまたはサッカリンなどの１以上の矯味剤および／または１以上の甘味剤も含み得る。

【００９８】
油性懸濁液剤は、植物油(例えば、ピーナツ油、オリーブ油、ゴマ油またはココナッツ油)または液体パラフィンなどの鉱油中の活性成分の懸濁を使用して製剤され得る。油性懸濁液剤は、蜜蝋、硬パラフィンまたはセチルアルコールなどの濃化剤を含み得る。上記のものなどの甘味剤および／または風味剤をのみやすい経口製剤を提供するために加えてよい。このような懸濁液剤は、アスコルビン酸などの抗酸化剤を用いて保存し得る。
【００９９】
水を加えることにより水性懸濁液剤を調節するのに適する分散性粉末および顆粒は、分散剤または湿潤剤、分散剤および１以上の防腐剤と混合した活性成分を提供する。適切な分散剤または湿潤剤の例は既に上記したものである。甘味剤、矯味剤および着色剤などのさらなる賦形剤も存在し得る。
【０１００】
医薬形態は、油中水型エマルジョンとしても製剤され得る。油性相は、植物油(例えば、ココナッツ油、アーモンド油、グレープシード油、オリーブ油またはピーナツ油)、鉱油(例えば、液体ワセリン)またはそれらの混合物であり得る。適切な乳化剤は、天然に存在するガム(例えば、アカシアガムまたはトラガカントガム)、天然に存在するリン脂質(例えば、ホスファチジルセリン)、無水物(例えば、ソルビタンのモノオレイン酸エステル)および脂肪酸およびヘキシトール由来の部分エステルとエチレンオキシドの縮合産物(例えば、ポリオキシエチレンソルビタンのモノオレイン酸エステル)を含む。エマルジョンは、１以上の甘味剤および／または風味剤も含み得る。
【０１０１】
シロップ剤およびエリキシル剤は、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトールまたはスクロースなどの甘味剤と製剤し得る。このような製剤は、１以上の防腐剤、風味剤および／または着色剤も含み得る。
【０１０２】
局所投与用製剤は、一般に付加的任意的成分を伴いまたは伴わずに、活性剤と組み合わせた局所媒体を含む。適切な付加的成分および局所媒体は当分野で周知であり、媒体の選択は、特に物理的形態および投与方法に依存することは明らかである。局所媒体は、水；アルコール(例えば、エタノールまたはイソプロピルアルコール)またはグリセリンなどの有機溶媒；グリコール(例えば、ブチレン、イソプレンまたはプロピレングリコール)；脂肪族アルコール(例えば、ラノリン)；水と有機溶媒の混合物および有機溶媒の混合物、例えばグリセリンアルコール；脂肪酸、アシルグリセロール(鉱油および動物または合成脂肪などの油を含む)、ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質および蝋などの脂質ベースの物質；コラーゲンおよびゼラチンなどのタンパク質ベースの物質；シリコーンベースの物質(揮発性および非揮発性)；およびマイクロスポンジおよびポリマーマトリクスなどの炭化水素ベースの物質を含む。組成物は、さらに、安定化剤、懸濁化剤、乳化剤、粘性調節剤、ゲル化剤、防腐剤、抗酸化剤、皮膚浸透増強剤、湿潤剤および徐放性物質などの、製剤の安定性または有効性を改善するために適合される、１以上の成分を含み得る。このような成分の例は、Martindale: The Extra Pharmacopoeia(MARTINDALE, W. AND REYNOLDS, J.E.F. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. 31st ed, London, The Pharmaceutical Press. 1996)およびRemington: The Science and Practice of Pharmacy(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st ed., 2005)に記載される。製剤は、マイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンのマイクロカプセル、リポソーム、アルブミンのマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子またはナノカプセルを含み得る。
【０１０３】
局所製剤は、例えば、固形剤、ペースト剤、クリーム剤、フォーム剤、ローション剤、ゲル剤、散剤、水性液剤およびエマルジョン剤を含む、多様な物理的形態の何れかに製剤され得る。このような薬学的に許容される形態の外見および粘性は、乳化剤および粘性調

節剤の存在および該製剤に存在するそれらの量により指向され得る。

【０１０４】

固形剤は、一般に硬くかつ注ぐことができず、一般にバーまたは棒としてまたは粒子の形態で製剤される；固形剤は不透明でも透明でもよく、所望により溶媒、乳化剤、湿潤剤、皮膚軟化剤、香料、着色剤／色素、防腐剤および最終製品の有効性を増強または増大させる他の活性成分を含んでよい。

【０１０５】

クリーム剤およびローション剤はしばしば互いに類似し、主に粘性の点で異なる；ローション剤およびクリーム剤は不透明、半透明または透明であってよく、しばしば乳化剤、溶媒および粘性調節剤ならびに湿潤剤、皮膚軟化剤、香料、着色剤／色素、防腐剤および最終製品の有効性を増強または増加させる他の活性成分を含み得る。

【０１０６】

ゲル剤は、高い粘性の濃厚から低い粘性の薄い一連の粘度で調製し得る。これらの製剤ならびにローション剤およびクリーム剤の製剤は溶媒、乳化剤、湿潤剤、皮膚軟化剤、香料、着色剤／色素、防腐剤および最終製品の有効性を増強または増加させる他の活性成分も含み得る。

【０１０７】

液剤はクリーム剤、ローション剤またはゲル剤より薄く、しばしば乳化剤を含まない。液体局所製品は、しばしば溶媒、乳化剤、湿潤剤、皮膚軟化剤、香料、着色剤／色素、防腐剤および最終製品の有効性を増強または増加させる他の活性成分を含む。

【０１０８】

局所製剤における使用に適する乳化剤は、イオン性乳化剤、セテラリル型アルコール(ceteralylic alcohol)、非イオン性乳化剤、例えばポリオキシエチレンオレイルエーテル、ＰＥＧ－４０ステアレート、セテアリルアルコール、例えばセテアレス－１２、セテアレス－２０、セテアレス－３０、ＰＥＧ－１００ステアレートおよびステアリン酸グリセリルを含むが、これらに限定されない。適切な粘性調節剤は、非イオン性ガムの保護コロイド、例えば、ヒドロキシエチルセルロース、キサンタンガム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、シリカ、微結晶蝋、蜜蝋、パラフィンおよびパルミチン酸セチルを含むが、これらに限定されない。ゲル組成物は、ゲル化剤、例えば、キトサン、メチルセルロース、エチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリクオタニウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボマーまたはグリチルリチン酸とアンモニアを含むが、これらに限定されない。適切な界面活性剤は、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、イオン性界面活性剤およびアニオン性界面活性剤を含むが、これらに限定されない。例えば、ジメチコンコポリオール、ポリソルベート２０、ポリソルベート４０、ポリソルベート６０、ポリソルベート８０、ラウラミドＤＥＡ、コカミドＤＥＡおよびコカミドＭＥＡ、オレイルベタイン、コカミドプロピルホスファチジルＰＧ－ジアンモニウムのクロライドおよびラウレス硫酸アンモニウムの１以上を局所製剤に使用し得る。適切な防腐剤は、抗微生物剤、例えばメチルパラベン、プロピルパラベン、ソルビン酸、安息香酸およびホルムアルデヒドならびに物理的安定化剤および抗酸化剤、例えばビタミン－Ｅ、アスコルビン酸および没食子酸プロピルを含むが、これらに限定されない。適切な湿潤剤は、乳酸および他のヒドロキシ酸およびその塩、グリセリン、プロピレングリコールおよびブチレングリコールを含むが、これらに限定されない。適切な皮膚軟化剤は、ラノリンの誘導体、ワセリン、イソステアリルネオペンタノエートおよび鉱油を含むが、これらに限定されない。適切な香料および着色剤は、FD&C Red No. 40およびFD&C Yellow No. 5を含むが、これらに限定されない。局所的に使用され得る他の適切な付加的成分は、研磨剤、吸収剤、消泡剤、帯電防止剤、収斂剤(例えば、ハマメリス、アルコールおよびカモミール抽出物などのハーブ抽出物)、結合剤／賦形剤、緩衝剤、キレート剤、フィルム形成剤、コンディショニング剤、噴射剤、乳白剤、ｐＨ調節剤および保護剤を含むが、これらに限定されない。

【０１０９】

局所使用のための製剤で、さらに、化合物の皮膚表面での、角質層を経る、経皮系への放出の促進に機能し得る皮膚透過促進剤賦形剤を挙げ得る。医薬の放出に使用される主な振盪促進剤は、アルコール、グリコールおよびグリセリド、例えばエタノール、プロピレングリコール、エトキシジグリコール、１－デカノール、２－(２－エトキシエトキシ)エタノール；脂肪酸およびエステル、例えば、パルミチン酸、カプリン酸、オレイン酸、ミリスチン酸またはラウリン酸((KANIKKANNAN, N. K., KANDIMALLA, K., LAMBA, S.S., SINGH, M. Structure-Activity Relationship of Chemical Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery. Current Medicinal Chemistry, 7(6): 593-608. 2000; JAVADZADEH Y., ADIBKIA K., HAMISHEKAR H. Transcutol(登録商標) (Diethylene Glycol Monoethyl Ether): A Potential Penetration Enhancer. In: Dragicevic N., Maibach H. (eds) Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015)；スルホキシド、例えばジメチルスルホキシドおよびジメチルホルムアミド(WIECHERS, J. W. AND DE ZEEUW, R. A. Transdermal drug delivery: efficacy and potential applications of the penetration enhancer Azone. Drug Des Deliv. (2):87-100. 1990)；リン脂質、例えばホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン；シクロデキストリン(α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリンおよびγ－シクロデキストリン)；ドデシル－N,N－ジメチルアミノアセテート(ＤＤＡＡ)；既に上記したようなポリマー；例えばACSSSPSKHCGなどの小ペプチドおよびトリプシン、パパイン、ブロメラインなどの消化酵素(MAGNUSSON, B. M. and RUNN, P. Effect of Penetration Enhancers on the Permeation of the Thyrotropin Releasing Hormone Analogue PGlu-3-Methyl-His-Pro Amide through Human Epidermis. International Journal of Pharmaceutics, 178(2):149-59. 1999; HOU, Y.W., CHAN, M.H., HSU, H.R., LIU, B.R., CHEN, C.P., CHEN, H.H., LEE, H.J. Transdermal Delivery of Proteins Mediated by Non-Covalently Associated Arginine-Rich Intracellular Delivery Peptides. Experimental Dermatology, 16(12): 999-1006. 2007; LANE, M. E. Skin penetration enhancers. Int J Pharm. 15;447(1-2):12-21. 2013)を含む。浸透増強の他の経路は、イオン泳動(RAIMAN, J., KOLJONEN, M., HUIKKO, K., KOSTIANEN, R., HIRVONEN, J. Delivery and Stability of LHRH and Nafarelin in Human Skin: The Effect of Constant/Pulsed Iontophoresis. European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 21(2-3): 371-77. 2004)、エレクトロポレーション(WANG, Y., TRAKUR, R., FAN, Q., MICHNIAK, B. Transdermal Iontophoresis: Combination Strategies to Improve Transdermal Iontophoretic Drug Delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik, 60(2): 179-91. 2005)およびフォノフォレシス(PARK, E. J., WERNER, J., SMITH, N.B. Ultrasound Mediated Transdermal Insulin Delivery in Pigs Using a Lightweight Transducer. Pharmaceutical Research, 24(7): 1396-1401. 2007)などの物理的方法を含む。

【０１１０】

外的使用のための局所組成物の典型的投与方法は、手袋を使用した手を使用する製品の直接適用；またはスパーテル、投薬シリンジ、投薬定規、接着剤またはスティックなどの物理的塗布器を使用する間接適用；噴霧(霧噴霧、エアロゾルまたは泡を含む)；１mlの一用量小袋の使用；滴数計の適用；散布と濯ぎを含む。局所使用の他の指示される形態は、吸入または結合組織に適応する点眼または耳適用のための耳鼻科的溶液などの、他の異なる組織の皮膚への適用を含む。

【０１１１】

これらの吸入器製剤は、例示的な形態で、エアロゾルのガス状形態(慣用の噴射剤、例えば、ジクロロフルオロメタンまたはトリクロロフルオロメタンを使用)または噴霧乾燥形態

の粒子および噴霧療法により吸入される液体についてエマルジョン、溶液または懸濁液を含む。さらに、眼科または結膜経路、コールドクリーム、再構成後、等張性懸濁液または無菌懸濁液中の点眼剤を点眼器で適用することによる、耳鼻咽喉科経路での、コールドクリームまたは液体等張性医薬形態もドロップディスペンサーで調剤することによる、医薬形態を例示できる。

【０１１２】

代表的モードにおいて、しかしながら、製剤の可能性を限定することなく、本発明のペプチドを、α－シクロデキストリン、ヒドロキシエチルセルロース、ＰＥＧ６０００、ＰＥＧ４００、ヒドロキシプロピルβ－シクロデキストリン、乳化剤および安定化剤ポリソルベート２０(ｔｗｅｅｎ　２０)または８０(ｔｗｅｅｎ　８０)の組成と製剤し得る。

【０１１３】

医薬形態は、無菌注射用水性または油性懸濁液として製剤され得る。ここに提供する化合物は、媒体および使用する濃度によって、上記のような適切な分散剤、湿潤剤および／または懸濁化剤を使用して、既知技術により製剤し得る組成物に懸濁または溶解し得る。用い得る許容される媒体および溶媒は、特に水、１,３－ブタンジオール、リンゲル液および塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムの等張溶液およびシクロデキストリンとの包接複合体などのアジュバントまたはナノエマルジョン、ナノ懸濁液、マイクロエマルジョン、ポリマーミセル、リポソーム、ニオソーム、トランスファーソームおよびエソソームなどの放出系を含み得る賦形剤である(MELKAMU, G., WOHLRAB, J., NEUBERT, R.H. Dermal Delivery of Desmopressin Acetate Using Colloidal Carrier Systems. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 57(4):423-27. 2005; GOEBEL, A. S. B., SCHMAUS, G., NEUBERT, R.H., WOHLRAB, J. Dermal Peptide Delivery Using Enhancer Molecules and Colloidal Carrier Systems--Part I: Carnosine. Skin Pharmacology and Physiology, 25(6):281-87. 2012; MANOSROI, A., KHANRIN, P., LOHCHAROENKAL, W., WERNER, R.G., GOETZ, F., MANOSROI, W., MANOSROI, J. Transdermal Absorption Enhancement through Rat Skin of Gallidermin Loaded in Niosomes. International Journal of Pharmaceutics, 392(1-2): 304-10. 2010; EL MAGHRABY, G. M., WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W. Skin Delivery of Oestradiol from Deformable and Traditional Liposomes: Mechanistic Studies. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51(10):1123-34. 1999; DAYAN, N., and E. TOUITOU. Carriers for Skin Delivery of Trihexyphenidyl HCl: Ethosomes vs. Liposomes. Biomaterials, 21(18): 1879-85. 2000)。

【０１１４】

さらに、無菌固定油を溶媒または懸濁媒体として使用し得る。この目的のために、合成モノグリセリドまたは合成ジグリセリドを含むあらゆる軟固定油が使用され得る。さらに、オレイン酸などの脂肪酸は注射用組成物の調製に有用であり、局所麻酔剤、防腐剤および／または緩衝剤などのアジュバントを媒体に溶解し得る。

【０１１５】

医薬形態は坐薬(例えば、直腸投与用)としても製剤され得る。このような組成物は、薬物と、環境温度では固形であるが直腸温度で液体となり、それ故に直腸で溶解して薬物を放出する適切な非刺激性賦形剤の混合により製造され得る。

【０１１６】

医薬形態は、予定された速度で放出されるよう製剤され得る。即時放出は、例えば、舌下投与(すなわち、活性成分が舌下叢の血管を介して迅速に吸収されるような方法での口からの投与)により得られ得る。

【０１１７】

制御放出製剤(すなわち、投与後活性成分の放出を低減および／または減少させるカプセル剤、丸剤またはコーティング錠剤などの製剤)を、例えば経口、直腸または皮下にまたは標的位置へのインプラントを介して投与し得る。一般に、制御放出製剤は、活性成分と、それ自体放出でおよび／または腸管(またはインプラント位置)での崩壊および吸収を遅延

させ、それにより長期間にわたる遅延したまたは持続した作用を提供するコーティングの使用により速度を変えるマトリックス材の組み合わせの手段により得ることができる。制御放出されたあるこのようなタイプの製剤は、少なくとも一つの活性成分を、一定速度で長期にわたり連続して放出する持続放出製剤である。好ましくは、治療剤は、少なくとも４時間、好ましくは少なくとも８時間およびより好ましくは少なくとも１２時間の時間である期間の間、血液(例えば、血漿)中の濃度が治療範囲内であるが、毒性レベル未満である濃度であるように、放出される。このような製剤は、一般に、周知技術を使用して製剤され得る。このような製剤の内側に使用される媒体は生体適合性であり、生分解性でもあり得る。好ましくは、製剤は、モジュレーターの一定レベルの放出を提供する。持続放出製剤に含まれるモジュレーターの量は、例えば、インプラントされる位置、期待される放出速度および期間および処置または予防される状態の性質による。

【０１１８】

放出速度を、(ａ)コーティング組成物の厚さの変化、(ｂ)コーティングへの可塑剤の負荷量の変化、(ｃ)放出を修飾する薬剤などの付加的成分の添加、(ｄ)マトリックスの組成、粒子径または粒子形態の改変および(ｅ)コーティングを介する１以上の通路の提供を含む当分野で周知の方法を使用して変え得る。持続放出製剤内のモジュレーターの量は、例えば、投与方法(例えば、インプラントの位置)、期待される放出の速度および期間および処置または予防される状態の性質による。

【０１１９】

それ自体制御放出機能を提供してもしなくてもよいマトリックス材は、一般に活性成分を支持する何らかの物質である。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはグリセリルジエステラートなどの物質が用いられ得る。活性成分を、剤形(例えば、丸剤)の形成前にマトリックス材と組み合わせ得る。これとは別にまたはこれに加えて、活性成分を、マトリックス材を含む粒子、顆粒、球体、マイクロスフェア、小球またはペレットの表面にコーティングし得る。このようなコーティングは、活性成分の１以上の他の適切な溶媒への溶解および噴霧などの慣用の手段により得られ得る。所望により、追加の成分をコーティング前に付加する(例えば、活性成分のマトリックス材への結合を助けるため)。次いで、マトリックスを制御放出コーティング適用前に、バリア剤でコーティングし得る。多重コーティングマトリックス単位を、所望により、カプセル封入して、最終剤形を生成させ得る。

【０１２０】

制御放出コーティングは、薄膜、連続的および均一であってよく、顔料および他の添加剤を支持でき、非毒性、不活性および付着がない。モジュレーターの放出を制御するコーティングは、モジュレーターを胃で放出できる、ｐＨ非依存的または依存的コーティングおよび腸溶性コーティング(製剤が胃を無傷で通過し、小腸でコーティングが溶解し、内容物が体内に吸収されることを可能とする)を含む。ｐＨ依存性コーティングは、例えば、シェラック、酢酸フタル酸セルロース、酢酸フタル酸ポリビニル、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸エステルコポリマーおよびゼインを含む。

【０１２１】

あるモダリティにおいて、コーティングは、好ましくは、投与後ゲル化剤の水和を低減させるのに有効な量で使用される、疎水性物質である。適切な疎水性物質は、アルキルセルロース(例えば、エチルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースエーテル)、セルロースエーテル、セルロースエステル、アクリルポリマー(例えば、(ポリ)アクリル酸、(ポリ)メタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸のコポリマー、メチルメタクリレートのコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、アルカミド／メタクリル酸のコポリマー、(ポリ)メチルメタクリレート、ポリアクリルアミド、アンモニウムメタクリレートコポリマー、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、(ポリ)メタクリル酸無水物およびグリシジルメタクリレートコポリマー)およびこれらの混合物を含む。

【０１２２】

水性分散体を代表するエチルセルロースは、例えば、AQUACOAT(登録商標)(FMC Cor

p., Philadelphia, PA)およびSURELEASE(登録商標)(Colorcon, Inc., West Point, PA)を含み、何れも製造業者の指示に基づき適用され得る。代表的アクリルポリマーは、例えば、種々のポリマーEUDRAGIT(登録商標)(Rohm America, Piscataway, NJ)を含み、これは、所望の放出プロファイルにより、単独でまたは組み合わせて使用できる。

【０１２３】

疎水性物質の水性分散体を含むコーティングの物理的性質は、１以上の可塑剤を加えることにより、改善し得る。アルキルセルロースに適する可塑剤は、例えば、セバシン酸ジブチル、フタル酸ジエチル、クエン酸トリエチル、クエン酸トリブチルおよびトリアセチンを含む。アクリルポリマーに適する可塑剤は、例えば、クエン酸トリエチルおよびクエン酸トリブチルなどのクエン酸エステル、フタル酸ジブチル、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、フタル酸ジエチル、トウゴマおよびトリアセチンを含む。

【０１２４】

制御放出コーティングは、一般に水性分散の形態の噴霧の手段など、慣用技術を使用して適用される。所望により、コーティングは、活性成分の放出を促進する細孔または溝を含んでよい。細孔および溝は、使用環境においてコーティングから溶解、抽出または放出される有機または無機物質の付加を含む、周知方法により産生され得る。このような細孔生成物質の一部は、親水性ポリマー、例えばヒドロキシアルキルセルロース(例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース)、セルロースエーテル、水可溶性合成ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン、架橋ポリビニルピロリドンおよびポリエチレンオキシド)、水可溶性ポリデキストロース、サッカリドおよび多糖およびアルカリ金属塩を含む。

【０１２５】

単位用量を産生するために媒体物質と組み合わせ得る活性成分の量は、例えば、処置する患者、特に投与方法、および何らかの他の併用薬物により変わる。投与量単位は、一般に約５μg～約２ｇの活性成分を含む。最適投与量は、当分野で周知の試験および慣用の方法を使用して、確立され得る。

【０１２６】

本発明のある態様において、組成物は、１以上の本発明の平滑筋緊張調節ペプチドに加えて、例えば、鎮痛剤、抗炎症剤、駆虫剤、抗不整脈剤、抗生物質、抗凝血剤、血栓溶解剤、利尿剤、抗鬱剤、抗糖尿病剤、抗てんかん剤、抗ヒスタミン剤、抗高血圧剤、抗ムスカリン剤、抗マイコバクテリア剤、抗新生物剤、免疫抑制剤、免疫調節剤、抗ウイルス剤、抗不安性鎮静剤(睡眠剤および神経遮断剤)、ベーターアドレナリン受容体ブロッカー、血液製剤および代替製剤、変力剤心臓剤、コルチコステロイド、鎮咳剤(去痰剤および粘液溶解剤剤)、利尿剤、ドパミン作動性剤(抗パーキンソン病剤)、止血剤、免疫剤、脂質制御剤、筋弛緩剤、副交感神経興奮剤、プロスタグランジン、ロイコトリエン、気管支拡張剤、性ホルモン(ステロイドを含む)、抗アレルギー剤、交感神経刺激剤、血管拡張剤、消化管運動改善剤、制吐剤、化学療法剤およびキサンチンを含むが、これらに限定されない１以上の付加的活性成分を含み得る。

【０１２７】

ある実施態様において、本発明は、勃起不全(ＥＤ)、女性性機能不全(ＦＳＤ)、良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進を含むが、これらに限定されない、平滑筋収縮性の調節により利益が得られる疾患の処置のための平滑筋緊張調節ペプチドの使用を含む。

【０１２８】

例えば、医薬組成物を製造する方法は、薬学的に許容される賦形剤に、平滑筋の緊張の調節が有益である障害の処置に十分な量の上記ペプチドの何れか１以上を導入することを含む。

【０１２９】

ある実施態様において、障害は勃起不全(ＥＤ)、女性性機能不全(ＦＳＤ)、良性前立腺

肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進からなる群から選択される。

【０１３０】

ある実施態様において、ペプチドは配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３または配列番号２４のアミノ酸配列を有し、さらに、ここで、障害はＰＡＨである。

【０１３１】

Ｖ　－　平滑筋緊張調節ペプチドの適応

本発明の平滑筋緊張調節ペプチドは、平滑筋の緊張の調節により利益が得られる疾患の処置に使用できる。特定の態様において、本発明のペプチドは、平滑筋緊張の、持続性または一過性の、不均衡がある疾患の処置に適用可能である。

【０１３２】

ある実施態様において、平滑筋の緊張の調節を必要とする患者における障害を処置する方法であって、該患者に治療有効量の上記ペプチドの何れか１以上を投与することを含む、方法が提供される。

【０１３３】

ある実施態様において、障害は勃起不全(ＥＤ)、女性性機能不全(ＦＳＤ)、良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進からなる群から選択される。

【０１３４】

ある実施態様において、ペプチドは、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３または配列番号２４のアミノ酸を有し、さらに、ここで、障害はＰＡＨである。

【０１３５】

次の臨床状態は、当該ペプチドの例示的、非網羅的、潜在的治療的適応である。

Ａ)ＥＤ：陰茎の海綿体の平滑筋弛緩は、ＥＤの処置に適用可能な薬理学的クラスの大部分の作用機序で共通する事象である。例えば、ＰＤＥ５ｉ(例えばシルデナフィルおよびタダラフィル)は、ＮＯによる活性化によりグアニル酸シクラーゼにより産生される環状グアノシン一リン酸(ｃＧＭＰ)の分解を阻止し、陰茎の海綿体の弛緩を増強し、故に勃起を促進または増強する。しかしながら、ＰＤＥ５ｉは、陰茎神経および局所血管の内皮から放出されるＮＯの誘導ができる刺激を必要とする。それ故に、ＰＤＥ５ｉは、高血圧、糖尿病を有するまたはさらに神経機能障害を伴う前立腺切除を受けた患者のような神経または内皮傷害を有する患者では無効である(SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. The Lancet, 381(9861): 153-165, 2013)。本発明のペプチドは、神経または内皮傷害があっても、平滑筋組織の弛緩を促進する。それ故に、該ペプチドは、ＰＤＥ５ｉに抵抗性の表現型を含むＥＤの処置に十分に適用され得る。さらに、平滑筋緊張調節ペプチドの作用機序は、ＰＤＥ５ｉとの相乗作用に好ましく、臨床的共投与を可能とする。

【０１３６】

Ｂ)ＦＳＤ：ＦＳＤは、膣および陰核に貫通する動脈ネットワークの血管損傷と関連し得て、後者は、女性のオーガズムの促進のために重要な構造を構築する。陰茎との解剖学的類似性により、陰核はまたＮＯ依存的機序を介して性的刺激に応答して勃起することも知られている(PARK, K., GOLDSTEIN, I., ANDRY, C., SIROKY, M.B., KRANE, R.J., AZADZOI, K.M. Vasculogenic female sexual dysfunction: the hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. International Journal of Impotence Research, 9, 27-38, 1997). Furthermore, the vasodilation and the consequent increase of local blood flow favor the lubrication

and the perception of pleasure (VELTEN, J., CHIVERS, M.L., BROTTO, L.A. Does Repeated Testing Impact Concordance Between Genital and Self-Reported Sexual Arousal in Women? Archives of Sexual Behavior. 47(3): 1-10. 2018)。故に、本発明のペプチドをＦＳＤの処置に使用できる。

【０１３７】

Ｃ)ＢＰＨ：ＢＰＨを特徴づける前立腺の肥大は、尿流出の妨害をもたらす、尿道内の圧増加を引き起こす。最終的に、尿路閉塞は完全となり、ＢＰＨの急性合併症である急性尿閉の事象を引き起こす。急性尿閉の処置はまた尿道平滑筋弛緩、故に尿道内圧の低下ができる作用機序に基づく(THOMAS, K., CHOW, K., KIRBY, R.S. Acute urinary retention: a review of the aetiology and management. Prostate cancer and prostatic diseases, 7(1): 32. 2004)。平滑に対する本発明のペプチドの活性の観点から、ＢＰＨの処置に適用できることが予測される。

【０１３８】

Ｄ)ＰＡＨ：ＰＡＨは、平滑筋細胞の特異的過形成および肥大を伴う、小肺動脈の細胞増殖および線維症が原因の稀な重度慢性心肺疾患である。構造変化の結果、ＰＡＨは、肺血管抵抗の進行性増加により、臨床的に同定される。現在のＰＡＨの治療選択肢は、本質的にプロスタサイクリン、エンドセリン－１およびＮＯの３つのシグナル伝達経路を標的とする。これら薬理学的クラスの全てが血管運動神経緊張度を制御し、血管弛緩および血管抵抗の低減を促進させる(LAU, E.M.T., GIANNOULATOU, E., CELERMAJER, D.S., HUMBERT, M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. Nature Reviews Cardiology, 14(10):603-614. 2017)。ＰＡＨは、さらに、世界保健機構によりその病因により５群に細分される。最大の群は、グループ１　ＰＡＨである、特発性ＰＡＨ(ｉＰＡＨ)、遺伝性ＰＡＨ、薬物および毒素誘発ＰＡＨ、他の疾患に付随するＰＡＨおよび新生児の持続性肺高血圧(ＰＰＨＮ)を含む。これらの中で、ｉＰＡＨの発症率は最大である。(CHESTER, A.H., YACOUB, M.H., MONCADA, S. Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension. Global Cardiology Science and Practice, 14. 2017)。ＰＡＨは、強い全身性炎症と関連することが既に示されており、患者はとりわけＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＴＮＦ－αを含む循環炎症性サイトカインの高いレベルを示す(PRICE, L.C., WORT, S.J., PERROS, F., DORFMUELLER, P., HUERTAS, A., MONTANI, D., COHEN-KAMINSKY, S., HUMBERT, M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. CHEST, 141(1):210-221. 2012)。本発明のペプチドは、肺動脈の血管拡張を促進し、肺動脈圧を低下させ、ＰＡＨ関連二次的心血管変更を改善し、炎症を低減するため、ＰＡＨの処置に使用できる。

【０１３９】

Ｅ)ＳＡＨ：血圧の病的増加は、心臓負債および／または末梢血管抵抗の脱制御をもたらす。現在利用可能な治療的アプローチは、血圧の一方または両方の成分を標的とする。種々の薬理学的クラスが末梢抵抗の低減に用いられているが、その大部分は、血管の平滑筋弛緩または収縮刺激(例えば、交感神経ＡＮＳにより放出されるもの)の作用を遮断する(GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill. p. 846, 2006参照。本明細書に記載する平滑筋緊張調節ペプチドは血管構造を弛緩し、高血圧に二次的な心血管特性を改善し、それ故にＳＡＨの処置に有用であり得る。

【０１４０】

Ｆ)レイノー症候群：本疾患の病態生理は、寒冷または感情ストレスにより誘発される、手の先端の虚血性攣縮により特徴づけられる。示唆される処置は、ニトレート、ＰＤＥ５ｉ、カルシウムチャネルブロッカーおよびプロスタグランジンなどの血管拡張剤物質の局所適用による、局所血管収縮の回復である(BAUMHAEKEL, M., BOEHM M. Recent achievements in the management of Raynaud ' s phenomenonVasc Health Risk Manag. 6: 207-214. 2010)。それ故に、平滑筋弛緩および後続の血管拡張を促進できる本発明のペプチドを、レイノー病の予防および処置に適用できる。

【０１４１】
Ｇ)気道反応性亢進：表現「反応性亢進」は、収縮性刺激に面した気道の収縮の増加を意味する。この現象は、呼吸器系の種々の疾患に一般的であり、喘息、ＣＯＰＤ、気管支炎、アレルギー性鼻炎などを特記し得る。気道の反応性亢進は、上部気道を覆い、細気管支に伸びる軟筋肉組織層が介在する。処置は、気道の反応性亢進に至る炎症過程の無症候性制御を含むが、発作からの回復は、隣接する平滑筋の弛緩を促進する気管支拡張剤を用いて実施される(BRAMAN, S.S., BARROWS, A.A., DECOTIIS, B.A., SETTIPANE, G.A., CORRAO, W.M. Airway hyperresponsiveness in allergic rhinitis: a risk factor for asthma. Chest, 91(5): 671-674. 1987; POSTMA, D. S. and KERTJENS, H. A. M. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. American journal of respiratory and critical care medicine, 158(supplement_2): S187-192, 1998; INMAN, M. D. Airway hyperresponsiveness. CHEST Journal, 123(3): 411S-416S. 2003参照)。本発明のペプチドは、炎症性応答を誘発することなく痙攣性刺激により誘発された気道の収縮を回復させ、それによりこのような物質を、喘息およびＣＯＰＤを例とする、炎症性要素を伴う呼吸器系の疾患の、少なくとも、総体症状の処置に、使用し得る。

【０１４２】
Ｈ)間質性肺疾患(肺線維症)：肺線維症は、間質性肺疾患のサブタイプの一つである。これらの疾患は、肺傷害の結果としての著しい線維増殖により特徴づけられ、この後、炎症過程および次いで上記線維増殖および線維症が続く(REYNOLDS, H.Y. GAIL, D.B., KILEY, J.P. Interstitial pulmonary disease - where we started from and are now going. Sarcoidosis Vasc. Diffuse Pulm. Dis., 22(1):5-12)。初期文献には、ｉＮＯＳ発現の増加が本疾患の病因で顕著であり、疾患進行の重要なマーカーであると考えれると記載されていた(2005; HSU Y.C., WANG, L.F., CHIEN, Y.W. Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis. Free Radic Biol Med, 42(5):599-607, 2007))。３つのＮＯＳアイソフォームについてノックアウトされ、動物で肺線維症を誘発する実験手法であるブレオマイシン処置に付されたマウスを使用した最近のデータで、３つのアイソフォームについてノックアウトされたマウスは、健常動物より予後が悪いことが判明し、それ故に本発明のペプチド組成物は、根底の炎症および現在まだ知られていない因子に作用する可能性があり、肺線維症の処置に使用する候補である(NOGUCHI, S., YATERA, K., WANG, K.Y., ODA, K., AKATA, K., YAMASAKI, K., KAWANAMI, T., ISHIMOTO, H., TOYOSHIRA, Y., SHIMOKAWA, H., YANAGIHARA, N., TSUTSUI, M., MUKAE, H. Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Respir Res, 15(1); 92; 2014)。

【０１４３】
Ｉ)珪肺症：結晶シリカ粉塵への職業的暴露は、慢性肺疾患である珪肺症をもたらし得る。シリカ粒子が吸入されると、肺胞の持続性炎症および肺線維症が誘発される(THAKUR A. S., BEAMER C. A., MIGLIACCIO C. T., HOLIAN A. Critical of MARCO on crystalline silica-induced pulmonary inflammation. Toxicol. Sci. (108): 462-471; 2009)。シリカ粒子は、結果的な線維症の原因である好中球、リンパ球および線維芽細胞の動員を増加させるマクロファージ活性化を誘発する。本明細書作成時には、肺線維症を処置するまたは疾患の進行性の経過を変える有効処置はない(GREENBERG M. I., WAKSMAN J., CURTIS J. (2007). Silicosis: a review. Dis. Mon. (53):394-416; 2007; LEUNG, C.C., YU, I.T., CHEN, W. Silicosis. Lancet, 379(9830):2008-2018; 2012; CARNEIRO, P.J., CLEVELARIO, A.L., PADILHA, G.A., SILVA, J.D., KITOKO, J.Z., OLSEN, P.C., CAPELOZZI, V.L., ROCCO, P.R., CRUZ, F.F. Bosutinib Therapy Ameliorates Lung Inflammation and Fibrosis in Experimental Silicosis. Front Physiol. 2017 Mar 15; 8:159. 2017)。気管軟骨輪の平滑筋細胞弛緩に二次的な本発明の気管支拡張効果は、肺組織炎症を増加させることなく、気流閉塞を有する症候性患者に有用である。

【０１４４】
Ｊ)アレルギー性気管支肺アスペルギルス症(ＡＢＰＡ)：ＡＢＰＡは、喘息および嚢胞性線維症を有する患者におけるアスペルギルス・フミガーツスに対する過敏症反応により特徴づけられる肺障害である。未制御の喘息および肺浸潤再発を示し、喘鳴、喀血、湿性咳、微熱、体重減少、倦怠感および疲労に至る(AGARWAL, R. CHAKRABARTI, A., SHAH, A., GUPTA, D., MEIS, J.F., GULERIA, R., MOSS, R., DENNING, D. W., and For the ABPA complicating asthma ISHAM working group. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. Clinical Et Experimental Allergy, (43):850-873, 2013)。ＡＢＰＡも発症するリスクが高い嚢胞性線維症の患者において、呼息一酸化窒素はリスクが低い患者より低く、ｉＮＯＳがアスペルギルス毒素により下方制御されることが示唆される(LIM, A.Y., CHAMBERS, D.C., AYRES, J.G., STABLEFORTH, D.E., HONEYBOURNE, D. Exhaled nitric oxide in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. Respir Med. 97(4):331-6, 2003)。さらに、気管軟骨輪の平滑筋細胞弛緩に二次的な本発明の気管支拡張効果は、肺組織炎症を増加させることなく、気道閉塞を有する症候性患者に有用である。

【０１４５】
Ｌ)新生児低酸素呼吸不全：これは、本発明により利益がある新生児の状態である。新生児の持続性肺高血圧(ＰＰＨＮ)は、出生時またはその直後の正常肺血管適応の不全であり、高肺血管抵抗に至る。ＰＰＨＮの治療は、肺血管抵抗の低下を目的とし、種々のモダリティの機械的呼吸器がこの目的で使用されている。失敗したとき、静脈内血管拡張(トラゾリン、エポプロステノールおよびエノキシモン)およびＰＤＥ５ｉが使用される。しかしながら、これらの化合物は、一部患者で低血圧、腎不全および出血を引き起こすことが知られる有害リスクプロファイルを有する。吸入一酸化窒素投与は、この群の患者でより良好な安全性プロファイルを有するが、これらの患者の最適以下の肺膨脹は、予想結果を悪くする(MURACA, M.C., NEGRO, S., SUN, B., BUONOCORE, G. Nitric oxide in neonatal hypoxemic respiratory failure. The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, 25(S(1)): 47-50. 2012)。本明細書に記載のペプチドは、適切なデバイスまたは吸入器を介して鼻腔内投与されたとき全身性暴露がないため、良好な安全性プロファイルを有する可能性があり、本発明のペプチドがＮＯＳアイソフォームの発現を誘導でき、それ故に、局所性に利用可能なＮＯを産生するとの事実により、吸入一酸化窒素より効率的である可能性がある。

【０１４６】
それ故に、本発明はまた上記状態を有する個体を処置するための、平滑筋緊張調節ペプチドの使用を意図する。

【０１４７】
本発明はまた上記疾患の処置用医薬の製造における、平滑筋緊張調節ペプチドの使用も意図する。

【０１４８】
平滑筋緊張調節ペプチド、そのアナログおよび誘導体の生物学的活性は、エクスビボおよびインビボで種々の方法により確認され得る。下記実施例は、平滑筋組織に富む構造である気管軟骨輪、肺動脈および陰茎海綿体条片のフラグメントに基づく「単離臓器」モデルにおいて、平滑筋緊張調節ペプチドの、炎症を誘発することない、エクスビボ弛緩活性を記載する。下記の他の実施例は、持続性平滑筋過剰収縮をもたらす肺動脈圧増加により引き起こされる心肺疾患により特徴づけられるモデルである、ＰＡＨラットモデルにおける選択平滑筋緊張調節ペプチドの血管拡張、血流力学パラメータ改善および抗炎症効果による、肺動脈圧低下のインビボ効果を記載する。

【０１４９】
本発明は、故に以後、実施例により記載し、これは本発明をさらに説明するが、本発明の範囲を限定する意図を伴わない。

【実施例】
【０１５０】
実施例１：ペプチドの合成
本発明のペプチドを、Genone社, Rio de Janeiro, Brazilにより産生された樹脂Ｒｉｎｋ－アミド(０.６８mmol／ｇ)の固体支持体で、Ｆｍｏｃ／ｔ－ブチル合成により化学合成した(バッチ：Ｐ１７０３１３－ＴＬ５６９３５６、Ｐ１７０３１３－ＴＬ５６９３５７、Ｐ１７０３１３－ＴＬ５６９３５８、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３６８、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８２、Ｐ１７０３１３－ＴＬ５６９３６１、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３６２、Ｐ１７０３１３－ＴＬ５６９３５９、Ｐ１７０３１３－ＴＬ５６９３６０、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３６３、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３６４、Ｐ１７０３１３－ＴＬ５６９３６６、Ｐ１７０３１３－ＴＬ５６９３６７、ＷＢ１７００２３－Ｐ１７１０２５、ＷＢ１７００２４－Ｐ１７１０２５、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８２、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８３、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８４、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８０、ＷＢ１７００２８－Ｐ１７１０２５、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８１、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８５、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８６、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８７、Ｐ１７０３１５－ＴＬ５６９３８０、ＷＢ１７００１７－Ｐ１７１０２５、ＷＢ１７００２５－Ｐ１７１０２５、ＷＢ１７００２７－Ｐ１７１０２５、ＷＢ１７００２６－Ｐ１７１０２５およびＷＢ１７００２２－Ｐ１７１０２５)。最終開裂および脱保護を水－ＴＦＡ－１.２－エタンジチオール－トリイソプロピルシラン、９２.５－２.５－２.５－２.５(ｖ／ｖ)を用いて、２５℃、１８０分間で実施した。ペプチドを５０％(ｖ／ｖ)アセトニトリル水溶液で抽出し、水ＴＦＡ　０.１％で平衡化した、Ｓｅｐｈａｓｉｌ　Ｃ８ペプチド(５μ　ＳＴ　４.６／１００－ＨＰＬＣ)のカラムの逆相クロマトグラフィー(ＲＰＣ)で精製した。サンプルをアセトニトリルと０.１％のＴＦＡの勾配で、流速２ml／分で、２８０nmで溶出した。精製後、全組成物についてＴＦＡからのカウンターイオン交換を、全ての所望の物理化学的特徴(例えばとりわけ溶解度、ｐＩ、ｐＫ、安定性)を維持するために、クロライドまたはアセテートイオンに交換できる。さらに、溶解度を高めるために、全ペプチドをＮ末端アセチル化およびＣ末端アミド化した。
【０１５１】
実施例２：エクスビボ気道筋肉における弛緩効果
本ペプチドの弛緩効果の強度を、主に新規気管支拡張剤の試験に用いられる、エクスビボ気管軟骨輪の痙攣性収縮のモデルを使用して評価した(CULLUM, V.A., FARMER, J.B., JACK, D., LEVY, G.P. Salbutamol: a new, selective β-adrenoceptive receptor stimulant. British journal of pharmacology, 35(1): 141-151. 1969; KAO, C.H., CHU, Y.H., WANG, H.W. Effects of lidocaine on rat ' s isolated tracheal smooth muscle. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 267(5): 817-820. 2010; SORIANO-URSUA, M.A., VALENCIA-HERNANDEZ, I., ARELLANO-MENDOZA, M.G., CORREA-BASURTO, J., TRUJILLO-FERRARA, J.G. Synthesis, pharmacological and in silico evaluation of 1-(4-dihydroxy-3,5-dioxa-4-borabycyclo [4.4.0] deca-7,9,11-trien-9-yl)-2-(tert-butylamine) ethanol, a compound designed to act as a β2 adrenoceptor agonist. European journal of medicinal chemistry, 44(7): 2840-2846. 2009参照)。
各試験について、Dunkin-Hartleyモルモット(４００～５００ｇ)を$CO_2$雰囲気で麻酔し、その後、気管を露出させ、摘出し、１～３軟骨性気管軟骨輪のセグメントに切開した。各セグメントを、３７℃で、カーボジェニック混合物(９５％の$O_2$および５％の$CO_2$)での一定の通気下、個々のクレブス栄養素溶液(ＮａＣｌ　１１８mM；ＫＣｌ　４.８nM；$CaCl_2$　２.５mM；$MgSO_4$　１.２mM；$KH_2PO_4$　１.２mM；$NaHCO_3$　２４mM；グルコース１１mM)を含む臓器浴系に移した。各系で、基部を容器の底に固定し、他方をフラグメントの支持体を構成するアイソメトリックトランスデューサ(ＧＲＡＳＳ　ＦＴ－０３)に接続した。アイソメトリックトランスデューサに接続したデータデジタル処理システムは、気管軟骨輪収縮により生じる張力変動の記録を可能とした(PowerLab

TM 16/30, LabChart, version 8.1, AD Instruments, Australia)。基底張力を１ｇに調節し、その後、フラグメントの収縮性をカルバコール(２.５μＭ)での刺激により評価した。休息１時間後、基底張力は回復し、組織をヒスタミン(５０μＭ)により誘導させた収縮に付し、その後漸増濃度の処置剤(０.０１～１０μＭ；ｎ＝８)または対照薬ＰｎＴｘ(１９)に暴露した。

【０１５２】

表１は、ソフトウェアGraph Prism 5.0(GraphPad Software, La Jolla, Ca, USA)のシグモイド非線形回帰方程式を使用して少なくとも８つの独立した試験から計算した、最高ヒスタミン誘発収縮の５０％に電圧を減少させる濃度の負の対数として示す力価値(ｐＥＣ$_{50}$)および有効性(Ｅ$_{max}$)の平均±ＳＥＭを記載する。対照薬ＰｎＴｘ(１９)で得た結果を図１に示す。

【表１】

表１：エクスビボで気管軟骨輪の平滑筋の弛緩における活性ペプチドの濃度－応答曲線から得た力価(ｐＥＣ$_{50}$)および有効性値(Ｅ$_{max}$)

| 配列 | 力価(ｐＥＣ$_{50}$)モル濃度 | 有効性(Ｅ$_{max}$)(%) |
|---|---|---|
| 配列番号１ | ７.１±０.４ | ４５.７±４.３ |
| 配列番号２ | ６.９±０.２ | ４０.４±２.６ |
| 配列番号３ | ６.８±０.２ | ３６.７±１.９ |
| 配列番号４ | ６.８±０.３ | ３８.８±３.５ |
| 配列番号５ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号６ | ７.０±０.３ | ２５.３±１.７ |
| 配列番号７ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号８ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号９ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号１０ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号１１ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号１２ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号１３ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号１４ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号１５ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号１６ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号１７ | ６.８±０.３ | ３７.１±２.６ |
| 配列番号１８ | ７.２±０.３ | ３８.０±２.３ |
| 配列番号１９ | ７.３±０.４ | ４０.０±３.４ |
| 配列番号２０ | ７.１±０.３ | ３７.８±２.９ |
| 配列番号２１ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号２２ | ７.０±０.２ | ３５.２±１.８ |
| 配列番号２３ | ７.５±０.３ | ３５.５±２.３ |
| 配列番号２４ | ７.９±０.３ | ２９.０±１.０ |
| 配列番号２５ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号２６ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号２８ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号２９ | 不活性 | 不活性 |
| 配列番号３０ | 不活性 | 不活性 |

【０１５３】

それぞれＸａａ６、Ｘａａ７およびＸａａ８における配列Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐの存

在が、ペプチドの生物学的効果に重要である。例えば、配列配列番号１、配列番号２、配列番号３および配列番号４は、Ｘａａ５とＸａａ９の間にＩｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ有し、それ故に気道筋肉の平滑筋細胞弛緩に有効である。しかしながら、配列配列番号７は、Ｘａａ６としてＩｌｅの代わりにＡｌａを有し、配列配列番号８はＸａａ８としてＴｒｐの代わりにＡｌａを有し、それ故に両者とも不活性である。同様に、配列配列番号２４も、それぞれＸａａ６、Ｘａａ７およびＸａａ８としてＩｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐを有し、気管軟骨輪平滑筋の弛緩に有効である。しかしながら、配列番号２６はＸａａ８位置にＴｒｐの代わりにＴｙｒを有し、それ故に不活性である。

記載のペプチドの生物学的活性の他の態様は、Ｘａａ１、Ｘａａ２およびＸａａ１５が独立して存在しないかまたはＡｌａまたは塩基性天然アミノ酸(Ａｒｇ、ＬｙｓまたはＨｉｓ)であることである。例えば、ペプチド配列番号１、配列番号２、配列番号３および配列番号４の活性配列と比較して、配列配列番号１５は、Ｘａａ１位置に塩基性アミノ酸ではなく酸性アミノ酸Ｇｌｕを有し、それ故に不活性である。同様に、配列配列番号１６は、Ｘａａ１５位置に塩基性アミノ酸ではなくＧｌｕを有し、それ故にまた不活性である。

【０１５４】

記載のペプチドの生物学的活性の他の態様は、Ｘａａ４、Ｘａａ５およびＸａａ９の各々は独立して存在しないかまたは芳香族アミノ酸(ＰｈｅまたはＴｙｒ)であることである。例えば、配列配列番号９、配列番号１０および配列番号１１は、それぞれＸａａ４、Ｘａａ５およびＸａａ９位置に、ペプチド配列番号１、配列番号２、配列番号３および配列番号４の活性配列の芳香族アミノ酸(ＰｈｅまたはＴｙｒ)ではなく、非芳香族アミノ酸であるＡｌａを有し、それ故に不活性である。

記載のペプチドの生物学的活性の他の態様は、Ｘａａ１０は独立して存在しないかまたは塩基性天然アミノ酸(Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ)であることである。例えば、ペプチド配列番号１、配列番号２、配列番号３および配列番号４の活性配列と比較して、配列配列番号１２は、塩基性アミノ酸ではなく非極性アミノ酸であるＡｌａを有し、それ故に不活性である。

【０１５５】

記載のペプチドの生物学的活性の他の態様は、Ｘａａ１２が存在しないかまたはＡｌａであるものである。例えば、配列番号１９と比較して、配列番号２１はＸａａ１２位置にＡｌａではなくＬｅｕを有し、それ故に不活性である。

記載のペプチドの生物学的活性の他の態様は、Ｘａａ１３およびＸａａ１４の各々は独立して存在しないかまたは非荷電極性アミノ酸(Ａｓｎ、Ｇｌｎ、ＳｅｒまたはＴｈｒ)であるものである。例えば、配列配列番号１３および配列番号１４は、それぞれＸａａ１３およびＸａａ１４位置に、ペプチド配列番号１、配列番号２、配列番号３および配列番号４の活性配列の非荷電極性アミノ酸ではなく、非極性アミノ酸であるＡｌａを有し、それ故に不活性である。

【０１５６】

実施例３：エクスビボでの海綿体条片の弛緩効果

海綿条片平滑筋に対する本発明のペプチドの弛緩を、ＥＤの処置に対する薬物候補の試験に広く使用されているモデルであるラットから単離した組織を使用してエクスビボで評価した(ITALIANO, G., CALABRO, A., PAGANO, F. A simplified in vitro preparation of the corpus cavernosum as a tool for investigating erectile pharmacology in the rat. Pharmacological research, 30(4): 325-334. 1994; GEMALMAZ, H., WALDECK, K., CHAPMAN, T.N., TUTTLE, J.B., STEERS, W.D., ANDERSSON, KE. In vivo and in vitro investigation of the effects of sildenafil on rat cavernous smooth muscle. The Journal of Urology, 165(3): 1010-1014.2001)。

Sprague Dawley(ＳＤ)血統の雄性ラットをギロチンで　　殺し、陰茎を外科的に摘出し、クレブス－重炭酸塩溶液(ＮａＣｌ　１１８.１ｍＭ；ＫＣｌ　４.７ｍＭ；$KH_2PO_4$　１.０ｍＭ；$MgSO_4$　１.０ｍＭ；$NaHCO_3$　２５.０ｍＭ；$CaCl_2$　２.５ｍＭおよびグルコース１１.１ｍＭ)を含むペトリ皿に入れた。海綿体亀頭、尿道、海綿様体および背

静脈を除くことにより切開し、次いでそれらの間の線維中隔の切断により分離した。２×２×７mm大の海綿体条片を、９５％の$O_2$および５％の$CO_2$で通気した重炭酸塩溶液－クレブス(ｐＨ７.４)を含む単離臓器用浴に別々に３７℃でマウントした。組織を張力トランスデューサーに接続し、張力の変化を連続的に記録した。海綿体条片をフェニレフリン(１０$^{-5}$Ｍ)で収縮させ、その後種々の周波数(１～３２Hz)の電気刺激で弛緩させた。刺激を、種々の濃度のペプチド配列番号５、配列番号８、配列番号１９および配列番号２４(１０$^{-10}$Ｍ；１０$^{-8}$Ｍ；１０$^{-6}$Ｍ)とインキュベーション１０分後に、説明を目的として、非特異的ＮＯＳブロッカーであるＬ－ＮＡＭＥの存在下または非存在下に実施した。あるいは、ペプチドを、一濃度(１０$^{-8}$Ｍ)、ｎ＝６の対照薬ＰｎＴｘ(１９)と置き換えた。処置と対照間の弛緩パーセンテージ差異を、二元配置分散分析(二元配置ＡＮＯＶＡ)、続くボンフェローニ事後検定を用いて統計的有意差の点で評価した。単一頻度の刺激の観点で処置と対照を比較するために、結果を一元配置分散分析(One-Way ANOVA)、続くボンフェローニ事後検定により評価した。全例で、０.０５未満のｐの全値について、結果を統計的に異なるとした。

【０１５７】

文献に記載のとおり、ＰｎＴｘ(１９)は、予め収縮させた海綿条片の電気刺激により促進される平滑筋弛緩の増強に有効である(図２)。しかしながら、本発明の平滑筋緊張調節ペプチドは、１０$^{-10}$Ｍもの低濃度で海綿体条片の電気刺激誘発弛緩を増強した(図３)。それ故に、ＰｎＴｘ(１９)と比較して、本発明のペプチドは、最適刺激頻度範囲で比較したとき、少なくとも１００倍強力(１０$^{-10}$Ｍ対１０$^{-8}$Ｍ)である(図４)。しかしながら、非特異的ＮＯＳブロッカーであるＬ－ＮＡＭＥ存在下、本発明のペプチドは海綿体の平滑筋弛緩を促進できず、ここに記載する化合物の治療的効果にＮＯが介在することが示される。

本発明を特定のモダリティに関して記載したが、種々の修飾および変動が本発明の範囲および精神から逸脱することなくなし得ることは、当業者には明らかである。

【０１５８】

実施例４：エクスビボでの肺動脈における弛緩効果

フェニレフリンを用いる肺動脈平滑筋収縮のエクスビボモデルは、血管拡張性効果を必要とする肺疾患のための候補化合物のスクリーニングに極めて有用である(ALENCAR, A.K., PEREIRA, S.L., MONTAGNOLI, T.L., MAIA, R.C., KUEMMERLE, A.E., LANDGRAF, S.S., CARUSO-NEVES, C., FERRAZ, E.B., TESCH, R., NASCIMENTO, J.H., DE SANT'ANNA, C.M., FRAGA, C.A., BARREIRO, E.J., SUDO, R.T., ZAPATA-SUDO, G. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Br J Pharmacol, 169: 953-62. 2013)。

この血管拡張がＮＯ産生化合物を介して達成され得るため、種々の組織からの平滑筋弛緩における適用の程度を、雄性Wistarラット肺動脈を使用するエクスビボアッセイで示した。ラットをミダゾラムおよびケタミン(各２mg／kgおよび１００mg／kg)の腹腔内投与により麻酔した。致死量のチオペンタールナトリウム(５０mg／kg)の腹腔内投与による注入後、肺動脈の躯幹を胸骨切開術により注意深く摘出した。肺動脈を注意深く切除し、結合組織を除去した。動脈を力トランスジューサーに接続し、酸素化し、３７℃に維持した、クレブス溶液を満たした垂直チャンバーに入れた。

【０１５９】

１.５グラム張力で２時間の安定化期間後、最大平滑筋収縮を得るために、動脈を漸増用量のフェニレフリン(１nM～１０μM)に曝し、次いで各１nM～１０μM(ｎ＝９)濃度の漸増用量の選択ペプチドに曝した。肺動脈により生じた張力を、各用量について５分間の間隔で評価した(ALENCAR, A.K., PEREIRA, S.L., MONTAGNOLI, T.L., MAIA, R.C., KUEMMERLE, A.E., LANDGRAF, S.S., CARUSO-NEVES, C., FERRAZ, E.B., TESCH, R., NASCIMENTO, J.H., DE SANT'ANNA, C.M., FRAGA, C.A., BARREIRO, E.J., SUDO, R.T., ZAPATA-SUDO, G. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine

A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Br J Pharmacol 169: 953-62. 2013; ALENCAR, A.K., PEREIRA, S.L., DA SILVA, F.E., MENDES, L.V., CUNHA VDO, M., LIMA, L.M., MONTAGNOLI, T.L., CARUSO-NEVES, C., FERRAZ, E.B., TESCH, R., NASCIMENTO, J.H., SANT'ANNA, C.M., FRAGA, C.A., BARREIRO, E.J., SUDO, R.T., ZAPATA-SUDO, G. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. International Journal of Cardiology, 173 (2): 154-62. 2014)。次いで、フェニレフリンで何ら収縮しなかった動脈をこのアッセイから除外した。

【０１６０】

このアッセイの結果を、下表２に要約する。有効性値を、最高フェニレフリン誘発収縮の５０％に電圧を減少させる濃度の負の対数(ｐＥＣ$_{50}$)として示し、平均±ＳＥＭで示す。ある動脈で達成された最大収縮を１００％の収縮と考え、有効性(Ｅ$_{max}$)を最大値に対する弛緩パーセンテージとして表した。結果をシグモイド非線形回帰式を使用して少なくとも３つの独立した試験から計算し、濃度曲線の統計分析を、アゴニスト対応答の対数の非線形フィットの実施により行った。全ての上記計算をソフトウェアGraph Prism 5.0(GraphPad Software, La Jolla, Ca, USA)で実施した。張力分析をソフトウェアLabChart7(AD Instruments, Sydney, Australia)で実施した。生物学的意義を決定するためのカットオフとして、３０％を超える肺動脈弛緩値を生物学的に適切と考え、活性と見なし、そしてＥ$_{max}$値を計算した(SUN, C.K., LIN, Y.C., YUEN, C.M., CHUA, S., CHANG, L.T., SHEU, J.J., LEE, F.Y., FU, M., LEU, S., YIP, H.K. Enhanced protection against pulmonary hypertension with sildenafil and endothelial progenitor cell in rats. International journal of cardiology, 162(1): 45-58. 2012; ALENCAR, A.K., PEREIRA, S.L., DA SILVA, F.E., MENDES, L.V., CUNHA VDO, M., LIMA, L.M., MONTAGNOLI, T.L., CARUSO-NEVES, C., FERRAZ, E.B., TESCH, R., NASCIMENTO, J.H., SANT'ANNA, C.M., FRAGA, C.A., BARREIRO, E.J., SUDO, R.T., ZAPATA-SUDO, G. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. International Journal of Cardiology, 173(2): 154-62. 2014)。

【０１６１】

【表２】

表２：エクスビボで肺動脈平滑筋の弛緩における活性ペプチドの濃度－応答曲線から得た力価(ｐＥＣ$_{50}$)および有効性値(Ｅ$_{max}$)(ｎ＝９)。

| 配列 | ｐＥＣ$_{50}$ | 有効性(Ｅ$_{max}$)(%) |
|---|---|---|
| 配列番号１７ | ７．８±３．０ | １５%±２．６ |
| 配列番号１８ | ６．５±９．３ | １８%±９．１２ |
| 配列番号１９ | ６．９±６．５５ | ２４%±９．７１ |
| 配列番号２０ | ６．１±６．９ | ６%±７．６４ |
| 配列番号２２ | ５．８±３．１ | ８%±２．８３ |
| 配列番号２３ | ６．１±６．２ | ４%±６．０７ |
| 配列番号２４ | ４．４±６．４ | ５%±５．９６ |

試験した全ペプチドは、３０％を超える肺動脈弛緩の絶対値を有し、それ故にそれら全て、ある程度の有効性を有した。配列番号１９を、その高有効性値により、さらに、インビボ実験に選択した。

【０１６２】

実施例５：配列番号１９はインビボで肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)のモノクロタリン誘発モデルで血流力学パラメータの回復を誘導する

モノクロタリン(ＭＣＴ)モデルは、ＰＡＨの最も広く使用されている動物モデルであり、利用可能なモデルの中で最も古くから存在し、最もよく記載されている。このモデルは、単回腹腔内または皮下ＭＣＴ注射後、血管リモデリング、平滑筋細胞増殖、内皮機能不全、炎症性サイトカイン上方制御および右心室不全を含むヒトＰＡＨのいくつかの重要な態様を模倣する利点を提供する(GOMEZ-ARROYO, J.G., FARKAS, L., ALHUSSAINI, A. A., FARKAS, D., KRASKAUSKAS, D., VOELKEL, N.F., BOGAARD, H.J. The Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension in Perspective. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 302(4): L363-9. 2012)。

ＭＣＴ誘発ＰＡＨの研究に現在好ましい種はラットであり、摂食障害、気力低下、体重増加欠如および頻呼吸の形態の本病気の臨床的徴候を、ＭＣＴ注射３～７日後に発症する。肺傷害および血管リモデリングが進行するにつれて、動物は種々の程度の呼吸困難、脱力、下痢および末梢チアノーゼを発症する(SCHOENTAL R., HEAD, M.A. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. Br J Cancer, 9(1):229-37. 1955)。ＭＣＴ注射１週間後、内皮損傷、炎症性浸潤および浮腫が見られ得るが、肺動脈圧(ＰＡＰ)の増加はない。２週間後、ＰＡＰが増加して、薬物投与後３週目までには右心室(ＲＶ)肥大に至る(WEST, J., HEMMES, A. Experimental and transgenic models of pulmonary hypertension. Compr Physiol, 1(2):769-82. 2011)。

【０１６３】

ＰＡＨ処置における配列番号１９の利益の可能性を評価するために、成熟健常雄性Wistarラットを使用し、次いで、これを動物が６０mg／kgのＭＣＴ(C2401, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, Batch Number: WXBC4737V)を腹腔内投与されるモノクロタリン誘発ＰＡＨ(ＭＣＴ、ｎ＝１４)および２)動物が類似体積の食塩水溶液を腹腔内投与される対照(ＣＴＲＬ、ｎ＝７)に無作為化した。これを試験０日目とする。同日、無作為化前、動物を心エコー分析に付して、ベースラインを確立した。１４日目、もう一回心エコー検査を実施し、ＰＡＨ動物を鼻腔内食塩水(ＳＡＬ)または配列番号１９(０.０６mg／kg)を、１４日間１日２回受ける群に無作為化した。２８日目、心エコーを繰り返し、ＲＶ出口面積、左心室(ＬＶ)面積およびＰＡＴ／ＰＥＴ(肺動脈加速時間(ＰＡＴ)／肺動脈駆出時間(ＰＥＴ)比)を得た。ＰＡＨ疾患で、ＰＡＰ増加は、圧増加によるＲＶ面積増加および左心室への血流低下によるＬＶ面積減少に至る。ＰＡＴ／ＰＥＴ比測定は、軽度～中程度ＰＡＨの予測であり、最も予測的な非侵襲性測定の一つであると考えられる(KOSKENVUO, J.W., MIRSKY, R., ZHANG, Y., ANGELI, F.S., JAHN, S., ALASTALO, T.P., SCHILLER, N.B., BOYLE, A.J., CHATTERJEE, K., DE MARCO, T., YEGHIAZARIANS, Y. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. Int J Cardiovasc Imaging, 26(5):509-18. 2010)。ＲＶにおける圧と相関性があるＲＶ収縮期圧(ＲＶＳＰ)およびｄＰ／ｄｔ比(圧微分／最大時間微分)を含む血流力学パラメータを侵襲性ＲＶカテーテル留置により測定した。

実験を二元配置ＡＮＯＶＡ、続くボンフェローニ事後検定により分析して、統計的有意を決定した。また、図５および６のグラフに、対象間の標準偏差を記載する。

【０１６４】

配列番号１９は、媒体で処置したモノクロタリン誘発群(ＭＣＴ＋媒体)と比較したとき、非処置群(対照)に類似する値までＰＡＴ／ＰＥＴ比を増加させ、これは、ＰＡＰの正常値範囲まで戻る減少に対応する(図５Ａ)。この改善は、配列番号１９での処置１４日後に生ずる。ＰＡＰの低減は、ＭＣＴ＋媒体群との比較における配列番号１９処置群のＲＶＳＰおよびｄＰ／ｄｔ　Ｍａｘ比の低減により示されるＲＶ圧低下に至る(それぞれ図５Ｂおよび５Ｃ)。

配列番号１９処置また、ＭＣＴ＋媒体群と比較したとき、対照に類似する価までのＲＶ出口面積減少(図６Ａ)およびＬＶ面積増加(図６Ｂ)をもたらし、これは、配列番号１９が心臓をリモデリングして正常に戻すことができたことを意味する。

これらの結果は、血管拡張剤として以外に、本明細書の他の箇所に既に記載していると

おり、配列番号１９はＰＡＨおよび炎症性要素を伴うまたは伴わない他の肺疾患の処置に使用できる可能性があることを示す。

【０１６５】

実施例６：インビボでの配列番号１９の抗炎症効果

実施例５に記載する実験において、動物を炎症性マーカーについて事後分析するために　殺した。

本明細書の他の箇所に詳述するとおり、喘息、ＣＯＰＤおよびＰＡＨを含むすべての肺疾患には、ある程度炎症が存在し、それは疾患の病態生理学の一部である。これらの疾患の処置に意図される薬物は、炎症を促進してはならない、すなわち、炎症促進性であってはならない。

抗炎症性作用の機序の一つは、平滑筋細胞弛緩が内皮透過性を低減し、そしてその結果血中炎症性因子の遊走を低減し、炎症過程を低減できるということである(WALLACE, J.L. Nitric Oxide as a regulator of inflammatory processes. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100:5-9. 2005)。

【０１６６】

ＰＡＨの患者５名中１名で、縦隔リンパ節が炎症関連浮腫により肥大する(BERGIN, C.J., PARK, K.J. Lymph node enlargement in pulmonary arterial hypertension due to chronic thromboembolism. J Med Imaging Radiat Oncol, 52(1):18-23. 2008)。浮腫性臓器重量は、液体内容物増加により増え、それ故に実施例５の動物のいくつかの臓器を　殺後秤量した。配列番号１９処置は、縦隔リンパ節のＭＣＴ処置により誘導される浮腫性重量増加を低減でき、ＣＴＲＬ群と区別不可能とした(図７Ａ)。

モノクロタリン試験の心臓サンプルを、配列番号１９の潜在的抗炎症性作用を明らかにするため精査した。心臓を全サンプルホモジネーション過程中、氷上に維持した。リン酸緩衝化食塩水(ＰＢＳ)で希釈された１％プロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma)を含む溶解緩衝液を、各サンプルに１mLの割合で加えた。オルトバナジン酸ナトリウム(SIGMA)　１mMも加えた。組織をホモゲナイズし、次いで１０,０００ｇで１０分間遠心分離した。各サンプルの上清を、滅菌が確認されたチューブに、総タンパク質およびサイトカインレベル(腫瘍壊死因子(ＴＮＦ)－α、インターフェロン(ＩＮＦ)－γおよびインターロイキン(ＩＬ)－１β)の測定のために集めた。

【０１６７】

サンプルの総タンパク質値を、製造業者の指示に従いブラッドフォードアッセイ(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を使用して測定した。簡潔には、プロトコールを、１５０μlの最終体積でマイクロプレートで実施した。０.０２５～２.０mg／mlの較正曲線直線範囲をウシ血清アルブミン(BSA, SIGMA)で調製した。タンパク質溶液をデュプリケートでアッセイした。サンプルを、溶解緩衝液で２０倍希釈し、次いでこれらサンプルからの２５μlを各ウェルに充填した。マルチチャネルピペットを使用して、１２５μlのQuick Start™ Bradford 1x Dye Reagent溶液を加えて、１５０μlの最終体積とした。サンプルを室温で５分間インキュベートし、次いで吸光度を５９５nmで分光光度計(SpectraMax Microplate reader, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)で測定した。標準曲線を線形回帰線としてプロットし、これにサンプルの総タンパク質濃度(mg／mlとして表す)を調べるために、各サンプル平均吸光度を内挿した。

ＴＮＦ－α、ＩＮＦ－γおよびＩＬ－１βの濃度を、心臓ホモジネートの酵素結合免疫吸着検定法(ＥＬＩＳＡ)を使用して測定した。ＴＮＦ－α(Catalog# 900-K54)およびＩＮＦ－γ(Catalog# 900-K98)キットをPeprotech(Rocky Hill, CO, USA)から購入し、一方ＩＬ－１β(ＤＹ４０１)キットをR&D Systems(Minneapolis, MI, USA)から購入した。アッセイを製造業者の推奨に従い実施した。

【０１６８】

データ分析を統計ソフトウェアパッケージ(Prism version 5.0, Graph-Pad Software, San Diego, CA)で実施した。データを平均±ＳＥＭとして表した。全ての検定を一元配置分散分析(ＡＮＯＶＡ)、続くボンフェローニ多重比較検定を使用して実施した。ｐ＜０.

０５であれば、統計学的差異を有意とみなした。
心臓ホモジネートで、ＭＣＴ群は、対照群と比較して、測定した全サイトカイン(ＴＮＦ－α、ＩＮＦ－γおよびＩＬ－１β)の増加を示した。配列番号１９は対照に類似する値までサイトカインを減少させた(図７Ｂ、７Ｃ、７Ｄ)。
【０１６９】
実施例７：インビボでＰｎＴＸ(９)と比較した配列番号１９および配列番号２４の抗炎症効果
雄性Ａ／Ｊマウス(１８～２０ｇ)を、Haspelagh et al (HASPESLAGH, E., DEBEUF, N., HAMMAD, H., LAMBRECHT, B.N. Murine Models of Allergic Asthma. Methods Mol Biol, 1559:121-136. 2017)のプロトコールに従いチリダニ(ＨＤＭ)で感作して、急性アレルギー性喘息を確立させた。気管支肺胞洗浄液(ＢＡＬＦ)の炎症性細胞浸潤をフローサイトメトリーで分析した。
マウス(ｎ＝５／群)を媒体(ＰＢＳ)、配列番号１９、配列番号２４またはＰｎＴｘ(１９)で、動物あたり１０nMolおよび３０nMol用量で、気管内注入により処置し、負荷６時間後、物質を採取した。
ＰｎＴｘ(１９)(３０nMol)に暴露したマウスは、ＢＡＬＦにおける総白血球細胞数の有意な増加を示し、これは、主に好中球蓄積によるものであった(図８)。配列番号１９および配列番号２４処置はペプチドの気管内注入６時間後気管支肺胞間隙における好中球蓄積を誘発せず(図８)、両ペプチドが対照薬ＰｎＴｘ(１９)と異なり、マウス肺における炎症促進効果を有しないことが示唆される。喘息およびＣＯＰＤなどの他の肺疾患における慢性炎症は、本過程に参加する主要炎症性細胞である好中球の小気道への浸潤が主に関与することに留意するのは重要である。
【０１７０】
抗炎症性作用の一つの可能性のある機序は、平滑筋細胞弛緩が内皮透過性を低減し、そしてその結果血液炎症性因子の遊走を低減し、炎症過程を低減できることである。それ故に、配列番号２４および配列番号１９などのより強力な血管拡張を誘発する強力なペプチドは、ＰｎＴ(ｘ)１９と比較して、より抗炎症効果を有する。
【０１７１】
配列(Ｘ)一覧
１　Ａｒｇ－Ａｌａ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
２　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ａｌａ
３　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
４　Ａｌａ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
５　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
６　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｓｅｒ－Ａｓｎ－Ｌｙｓ
７　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
８　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
９　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
１０　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
１１　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ａｌａ－Ｌ

ｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
１２　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
１３　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
１４　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ａｌａ－Ｌｙｓ
１５　Ｇｌｕ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
１６　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｇｌｕ
１７　Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ
１８　Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ
１９　Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ
２０　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ
２１　Ｔｙｒ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ
２２　Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ
２３　Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ
２４　Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ
２５　Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｇｌｕ
２６　Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｙｒ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ
２７　Ｇｌｙ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｔｒｐ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ａｓｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ
２８　Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ
２９　Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ－Ｔｙｒ－Ｔｒｐ－Ａｌａ－Ｉｌｅ
３０　Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｔｒｐ－Ｔｙｒ－Ｌｙｓ

さらに、本発明は次の態様を包含する。

１．アミノからカルボキシ方向は左から右で、式(２)：

【化７】

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Ile-Ala-Trp-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15 (2)

〔式中、
Ｘａａ１、Ｘａａ２およびＸａａ１５の各々は独立して存在しないかまたはＡｌａ、Ａｒｇ、ＬｙｓもしくはＨｉｓであり；
Ｘａａ３は独立して存在しないかまたはＡｌａ、Ｐｈｅ、ＴｒｐもしくはＴｙｒであり；
Ｘａａ４、Ｘａａ５およびＸａａ９の各々は独立して存在しないかまたはＰｈｅ、ＴｒｐもしくはＴｙｒであり；
Ｘａａ１０は独立して存在しないかまたはＨｉｓ、ＬｙｓもしくはＡｒｇであり；
Ｘａａ１１は存在しないかまたはＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｒｏ、ＣｙｓもしくはＭｅｔであり；
Ｘａａ１２は存在しないかまたはＡｌａであり；そして
Ｘａａ１３およびＸａａ１４の各々は独立して存在しないかまたはＡｓｎ、Ｇｌｎ、ＳｅｒもしくはＴｈｒである。〕
の薬理学的に活性なペプチド配列を含むペプチドであって、式(２)の薬理学的に活性なペ

プチド配列が５以上の連続的アミノ酸残基を有する、ペプチド。
２．式(２)において、Ｘａａ１、Ｘａａ２、Ｘａａ３、Ｘａａ４、Ｘａａ５、Ｘａａ１１、Ｘａａ１２、Ｘａａ１３、Ｘａａ１４およびＸａａ１５からなる群の１以上のアミノ酸残基が存在しない、項１に記載のペプチド。
３．式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列が配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４または配列番号５である、項２に記載のペプチド。
４．式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列が１５～１８個の連続的アミノ酸残基を有する、項１に記載のペプチド。
５．式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列が１８個の連続的アミノ酸残基を有する、項１に記載のペプチド。
６．少なくとも第二ペプチドまたはタンパク質をさらに含む、項１に記載のペプチド。
７．式(１)
【化８】
－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－　(1)

〔式中、
Ｘは、上に定義した式(２)の薬理学的に活性なペプチド配列であり；そして
ＺおよびＺ’の各々は、は、独立して、２～１５個の天然に存在するアミノ酸を有する細胞浸透増強アミノ酸配列または活性増強アミノ酸配列を含むペプチドである。〕
のペプチドを含む、項１に記載のペプチド。
８．Ｈ、アセチル、クロライドまたはトリフルオロアセチルが－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－のＮ末端に共有結合される、項７に記載のペプチド。
９．ＯＨまたは$NH_2$が－Ｚ－Ｘ－Ｚ’－のＣ末端に共有結合される、項７に記載のペプチド。
１０．ＺがＮからＣ末端で、それぞれアミノ酸残基Ｇｌｙ、ＧｌｕおよびＡｒｇを含む配列であり、Ｘは配列番号５の薬理学的に活性なペプチド配列を有し、Ｚ’は存在しない、項７に記載のペプチド。
１１．ペプチドはアルブミン結合部分から選択される半減期延長部分に結合される、項１に記載のペプチド。
１２．Ｎ末端がアセチルに共有結合され、Ｃ末端が$NH_2$に共有結合される、項１１に記載のペプチド。
１３．アミノ酸ベースの開裂可能リンカーにより離された２以上の式(２)の配列を有するペプチドを含む多量体の形態である、項１に記載のペプチド。
１４．項１に記載の１以上のペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
１５．項１に記載の１以上のペプチドを薬学的に許容される賦形剤に導入することを含む、医薬組成物を製造する方法であって、ここで、１以上のペプチドが、平滑筋の緊張の調節が有益である障害の処置に十分な量で存在するものである、方法。
１６．障害が勃起不全(ＥＤ)、女性性機能不全(ＦＳＤ)、良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進からなる群から選択される、項１５に記載の方法。
１７．ペプチドが配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３または配列番号２４のアミノ酸配列を有し、さらに、ここで、障害がＰＡＨである、項１６に記載の方法。
１８．平滑筋の緊張の調節を必要とする患者における障害を処置する方法であって、患者に治療有効量の項１に記載のペプチドを投与することを含む、方法。
１９．障害が勃起不全(ＥＤ)、女性性機能不全(ＦＳＤ)、良性前立腺肥大(ＢＰＨ)、レイノ

ー症候群、肺動脈性高血圧(ＰＡＨ)、全身性動脈性高血圧(ＳＡＨ)ならびに喘息、ＣＯＰＤ、肺線維症、珪肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、遺伝性血管浮腫および新生児低酸素呼吸不全と関連する気道の反応性亢進からなる群から選択される、項１８に記載の方法。

２０．組成物が配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２２、配列番号２３または配列番号２４のアミノ酸配列を有し、さらに、ここで、障害がＰＡＨである、項１９に記載の方法。

【図面】

【図１】

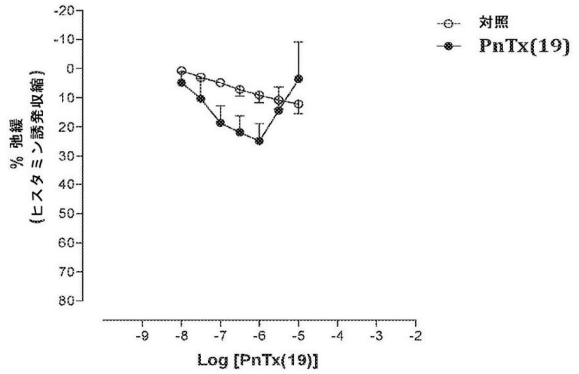



Figure 1

【図２】

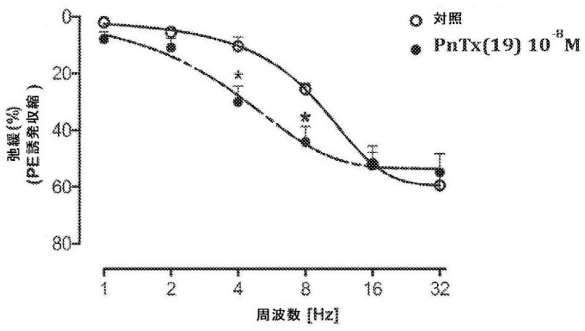



Figure 2

【図３】

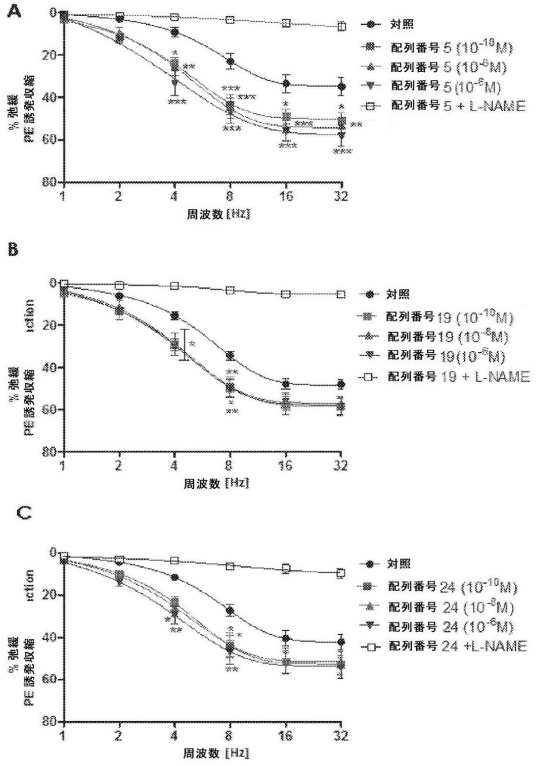



Figure 3

【図４】

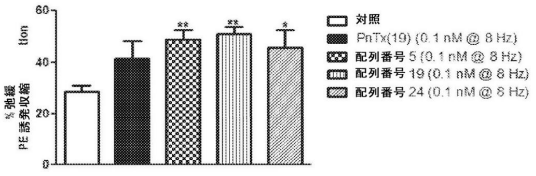



Figure 4

【図５】

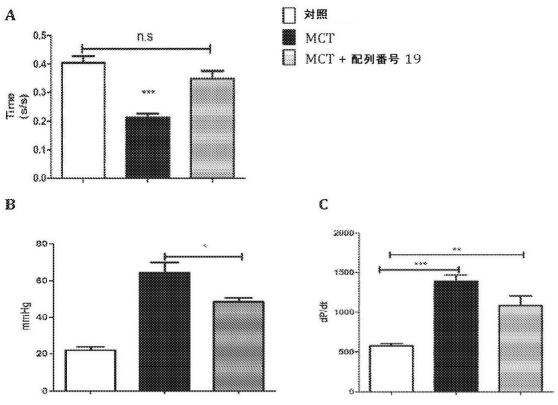



Figure 5

【図６】

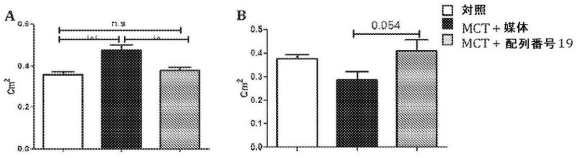



Figure 6

【図７】

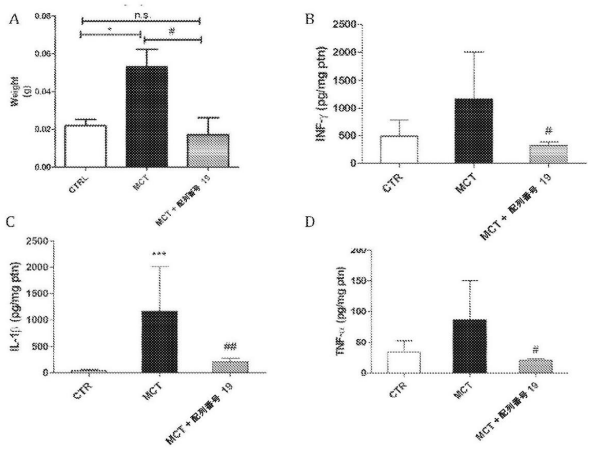



Figure 7

【図８】

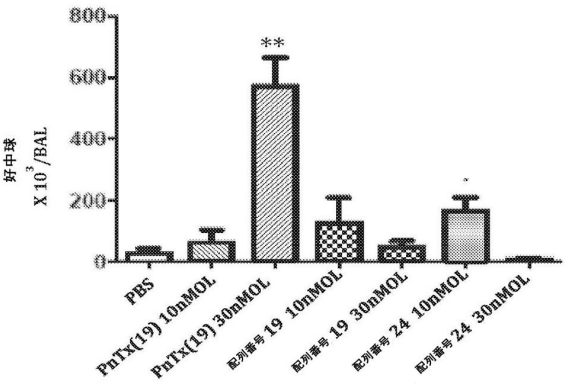



Figure 8

【配列表】

0007317956000001.app

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | | FI | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *A61P* | *15/10* | *(2006.01)* | A61P | 15/10 | |
| *A61P* | *15/00* | *(2006.01)* | A61P | 15/00 | |
| *A61P* | *13/08* | *(2006.01)* | A61P | 13/08 | |
| *A61P* | *9/12* | *(2006.01)* | A61P | 9/12 | |
| *A61P* | *11/06* | *(2006.01)* | A61P | 11/06 | |
| *A61P* | *11/00* | *(2006.01)* | A61P | 11/00 | |
| *A61P* | *9/00* | *(2006.01)* | A61P | 9/00 | |
| *C12N* | *15/09* | *(2006.01)* | C12N | 15/09 | Z |
| *C12N* | *15/63* | *(2006.01)* | C12N | 15/63 | Z |
| *C12P* | *21/02* | *(2006.01)* | C12P | 21/02 | C |
| *C12N* | *1/15* | *(2006.01)* | C12N | 1/15 | |
| *C12N* | *1/19* | *(2006.01)* | C12N | 1/19 | |
| *C12N* | *1/21* | *(2006.01)* | C12N | 1/21 | |
| *C12N* | *5/10* | *(2006.01)* | C12N | 5/10 | |

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 カイオ・ヴィクトル・マシャード・フランサ・ド・ナシメント
ブラジル２０９２１－００５リオ・デ・ジャネイロ、リオ・デ・ジャネイロ、サン・クリストヴァン、フア・サン・ジャヌアリオ５８８番、アパルトメント３０２
(72)発明者 ジエゴ・アロンソ・ホドリゲス・ドス・サントス・ダ・シウヴァ
ブラジル２１２２０－５６０リオ・デ・ジャネイロ、リオ・デ・ジャネイロ、ヴィラ・ダ・ペーニャ、エストラダ・パドレ・ホゼル６２０番、ブロコ２、アパルトメント５０２
(72)発明者 ペルラ・ヴィラニ・ボルジェス・ダ・シウヴァ
ブラジル２０２３１－０８４リオ・デ・ジャネイロ、リオ・デ・ジャネイロ、ラパ、フア・カルロス・サンパイオ２２９番、アパルトメント５０２
(72)発明者 マリア・エレナ・ジ・リマ・ペレス・ガルシア
ブラジル３１３２０－０００ミナスジェライス、ベロ・オリゾンテ、バイホ・エンジェーニョ、フア・デゼンバルガドール・パウロ・モタ１０２０番、アパルトメント２０２
(72)発明者 カロリーナ・ヌーネス・ダ・シウヴァ
ブラジル３０６６０－１３０ミナスジェライス、ベロ・オリゾンテ、バイホ・ジアマンテ、フア・ペドロ・ペレイラ・アウヴェス、ヌメロ８
(72)発明者 アドリアナ・モンテイロ・ジ・カストロ・ピメンタ
ブラジル３３４００－０００ミナスジェライス、ラゴア・サンタ、フア・マリア・ハイムンダ・ジ・ジェズース２４０番、アルト・ド・ジョア
(72)発明者 マルセラ・ヌネス・ジ・メロ・ブラガ
ブラジル３０５７５－２１０ミナスジェライス、ベロ・オリゾンテ、ブリティス、フア・マルコ・アウレーリオ・ジ・ミランダ２９７番、アパルトメント２０１
(72)発明者 パウロ・グスタヴォ・サンパイオ・ラカティヴァ
ブラジル２２２８０－０３０リオ・デ・ジャネイロ、リオ・デ・ジャネイロ、ボタフォゴ、フア・デゼノーヴェ・ジ・フェヴェレイロ４５番、アパルトメント１０５、ブロコ３
(72)発明者 アイロン・フランシスコ・ジ・パウラ・ジュニオール
ブラジル２０５１１－２７０リオ・デ・ジャネイロ、リオ・デ・ジャネイロ、ティジュカ、フア・ドーナ・デウフィナ１５番、アパルトメント４０６
(72)発明者 ゲアハルト・マックス・グロス
ブラジル１２５００－３２０サンパウロ、グアラティンゲタ、フア・フェイジョー１４３番

審査官 北田 祐介

(56)参考文献 特表２０１５－５３５８０８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５０４３３６（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５０３８２３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１６－５０１８５１（ＪＰ，Ａ）

特開２０１６－１４７９０５（ＪＰ，Ａ）
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　７／００－７／６６
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）