

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7010934号

(P7010934)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月17日(2022.1.17)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 38/18 (2006.01)

A 6 1 K 38/18

Z N A

A 6 1 K 38/31 (2006.01)

A 6 1 K 38/31

A 6 1 K 38/27 (2006.01)

A 6 1 K 38/27

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/02

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 0 7

請求項の数 13 (全25頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-517165(P2019-517165)

(86)(22)出願日 平成29年6月9日(2017.6.9)

(65)公表番号 特表2019-522046(P2019-522046  
A)

(43)公表日 令和1年8月8日(2019.8.8)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/064196

(87)国際公開番号 WO2017/212057

(87)国際公開日 平成29年12月14日(2017.12.14)

審査請求日 令和2年6月5日(2020.6.5)

(31)優先権主張番号 16174056.8

(32)優先日 平成28年6月10日(2016.6.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 518435633

レギュラキス

フランス国, 9 3 2 3 0 ロマンビル,  
1 0 2 アベニュー ガストン ルセル

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 カレルリ, クロード

フランス国, 9 2 1 5 0 シュレーヌ,  
6 4 ル ルジェ ド リスル

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変形性関節症の治療のためのペプチド

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象における変形性関節症の治療において軟骨細胞の増殖および分化を誘導するのに使用するための医薬組成物であって、前記医薬組成物は、配列番号1に記載されるアミノ酸配列、またはその変異体、を含む少なくとも1種のペプチドを含み、前記変異体は、配列番号1と少なくとも95%の同一性を示すペプチドであり、配列番号1は：

X<sub>1</sub> - T y r - X<sub>2</sub> - L e u - X<sub>3</sub> - A l a - G l y - X<sub>4</sub> - L y s - A s n - P h e - P h e - X<sub>5</sub> (配列番号1)

であり、式中、

X<sub>1</sub>は、G l y - Z<sub>2</sub> - S e r - A s p - Z<sub>1</sub> - V a l (配列番号7)であり、ここで、Z<sub>1</sub>がアルギニンであり且つZ<sub>2</sub>がスレオニンであるか、あるいはZ<sub>1</sub>がS e r - A s pまたはS e r - A s nであり且つZ<sub>2</sub>がアラニンであり、

X<sub>2</sub>は、G l u - L y s、G l u - S e r、およびA s p - L e uから選択される配列であり、

X<sub>3</sub>は、空であるか、リジンであり、

X<sub>4</sub>は、システイン、セリン、チロシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、およびグリシンから選択されるアミノ酸残基であり、

X<sub>5</sub>は、T r p - L y s - T h r - P h e - T h r - S e r - X<sub>6</sub> (配列番号18)であり、ここで、X<sub>6</sub>は、システイン、セリン、チロシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、およびグリシンから選択されるアミノ酸残基である、

医薬組成物。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 種のペプチドが、11～50 個のアミノ酸残基の範囲のアミノ酸配列で構成される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 種のペプチドが、20～30 個のアミノ酸残基の範囲のアミノ酸配列で構成される、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 種のペプチドが、配列番号 2、3、4、または 20：

G l y - A l a - S e r - A s p - S e r - A s p - V a l - T y r - A s p - L e u -  
L e u - A l a - G l y - S e r - L y s - A s n - P h e - P h e - T r p - L y s -  
T h r - P h e - T h r - S e r - S e r ( 配列番号 2 )

10

G l y - A l a - S e r - A s p - S e r - A s p - V a l - T y r - A s p - L e u -  
L e u - L y s - A l a - G l y - S e r - L y s - A s n - P h e - P h e - T r p -  
L y s - T h r - P h e - T h r - S e r - S e r ( 配列番号 3 )

G l y - T h r - S e r - A s p - A r g - V a l - T y r - G l u - L y s - L e u -  
A l a - G l y - S e r - L y s - A s n - P h e - P h e - T r p - L y s - T h r -  
P h e - T h r - S e r - S e r ( 配列番号 4 )

G l y - A l a - S e r - A s p - S e r - A s n - V a l - T y r - A s p - L e u -  
L e u - L y s - A l a - G l y - S e r - L y s - A s n - P h e - P h e - T r p -  
L y s - T h r - P h e - T h r - S e r - S e r ( 配列番号 20 )

20

の配列を含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記対象は、K e l l g r e n - L a w r e n c e のグレード（または K - L システム）によるグレード 0、1、2 または 3 の変形性関節症に罹患している、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

治療される関節に関節内注射することにより投与される、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

30

前記少なくとも 1 種のペプチドが、10<sup>-3</sup>M～10<sup>-7</sup>M の範囲の最終的な関節内濃度で投与されることになる、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

1 種以上の薬学的に許容される賦形剤を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

薬学的単位剤形として提供される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記薬学的単位剤形が、治療される関節の局所注射のための、使い捨ての、投与前のプレフィルドシリンジである、請求項 9 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 11】

少なくとも 1 種の関節内補充療法剤をさらに含む、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 種の関節内補充療法剤がヒアルロン酸である、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 種の関節内補充療法剤が、0.1%～10% の範囲の濃度のヒアルロン酸である、請求項 11 または 12 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、変形性関節症の治療に関する。特に、本発明は、変形性関節症の治療に使用するためのペプチドに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

変形性関節症は、概して、数百万人もの個体が罹患しており、関節軟骨および下部の骨の破綻をもたらし、該当する対象に、関節痛、関節の腫脹、硬直、および可動域の減少を引き起こす、変性関節疾患の一種に関する。以前は老化の通常の結果と考えられていたが、現在では、変形性関節症は、関節の整合性、遺伝的な素因、局所的な炎症、物理的な力、ならびに細胞上および生化学的なプロセスを含む複数の要因の複雑な相互作用から起ることがわかっている。この症例のうち10%超では、外傷もまた、外傷後変形性関節症を発症させる可能性があり、よって、いずれの年齢の個体もが罹患し得る。

10

## 【0003】

現在の治療および研究は、症状の低減および身体障害の予防を目的としているが、変形性関節症による関節の損傷の進行を予防するための、効率的かつ長期間の薬理的治療は証明されていない。現在利用可能なこれら治療の中で、身体活動が、治療計画の重要な一部とみなされている。研究では、単純な活動および/またはストレッチ運動が、健全な体重を維持し、柔軟性を向上することにより、疼痛を低減することができることが示されている。実際に、過剰な体重は、体重を支えている関節、たとえば尻、膝、脚、および背中などの関節にさらなる応力をかけている。体重を減少させることは、変形性関節症を有する人々の疼痛を低減させ、さらなる関節の損傷を限定させることを支援し得る。鎮痛剤、非ステロイド性抗炎症性薬物、またはコルチコステロイドを含む、疼痛の薬物および抗炎症性薬もまた、多くの場合で、変形性関節症の症状を軽減させるために治療計画で考慮されている。これらは、クリーム、錠剤、または関節内注射として利用可能である。最終的に、より重篤に罹患している患者は、損傷した関節を修復または交換するために、関節形成術、関節固定術、または骨切除術のような外科手術の選択肢を考慮し得る。

20

## 【0004】

近年では、変形性関節症に関する細胞ベースの治療および生物学的な治療が開発されている。たとえば自家培養軟骨細胞移植は、数十年にわたり、骨関節病変の治療に使用されている。軟骨細胞ベースの治療は、変形性関節症の進行を遅延させ、関節置換の外科手術を遅らせる能力を示しているが、肥大、融合妨害、剥離、および移植失敗などの多くの合併症が依然として想定されている。

30

## 【0005】

最終的に、症状よりも疾患の侵攻を標的とした遺伝子療法が、科学者らの関心を集めている。自家培養軟骨細胞へ治療遺伝子を運ぶための、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターの両方が開発されており、ウイルスベクターの免疫原性、および非ウイルスベクターの効率が短期間であり低効率であることについての深刻な懸念が持ち上がっている。これら遺伝子療法は、炎症性経路および異化経路の阻害、基質を復元するための同化経路の刺激、細胞老化の妨害、骨棘の病理的形成の回避、および/またはアポトーシスの防止を目的とする。サイトカインのインターロイキン-1(IL-1)、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)、およびインターロイキン-4(IL-4)、およびそれらの各アンタゴニスト;マトリックス分解阻害剤TIMP(Tissue inhibitor of metalloproteinases)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター(PAI)、またはセルピン;抗アポトーシスB細胞リンパ腫(apoptosis inhibitor B-cell lymphoma 2(Bcl-2));軟骨増殖因子などの、変形性関節症の遺伝子療法に関する多くの候補が、現在までに同定されている。

40

## 【0006】

しかしながら、効果的、安全かつ実施が容易な治療は、現在利用可能ではない。世界保健機関によると、全成年のうち推定10%~15%が、ある度合いの変形性関節症を有して

50

いる。この有病率は、集団の高齢化および肥満などの関連要因の増加により上昇している。国連によると、2050年までに、全世界の1億3,000万人の人々が、変形性関節症を罹患し、そのうちの4,000万人が、この疾患により重度の障害者となる。これら数字は、投与が容易であり、症状を軽減する代わりに治療できる新規の治療を開発することが火急に必要であることを明らかにしている。

【0007】

変形性関節症を治療するためのペプチドを開発することが望まれている中で、本出願人らは、驚くべきことに、ソマトスタチン由来のアミノ酸配列とC末端で結合した成長ホルモン由来のアミノ酸配列を含むキメラペプチドが、軟骨細胞の増殖および分化を効率的に誘導でき、よって、変形性関節症の治療に使用できることを示した。

10

【0008】

よって本発明は、変形性関節症を治療するためのペプチドに関する。

【発明の概要】

【0009】

よって本発明は、対象の変形性関節症の治療に使用するための、配列番号1のアミノ酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体、を含むペプチドであって、配列番号1が以下の通りである、ペプチドに関する：

X<sub>1</sub> - Tyr - X<sub>2</sub> - Leu - X<sub>3</sub> - Ala - Gly - X<sub>4</sub> - Lys - Asn - Phe - Phe - X<sub>5</sub> (配列番号1)

(式中、

20

X<sub>1</sub> は、空であるか、バリンであるか、または

Z<sub>1</sub> - Val

Asp - Z<sub>1</sub> - Val

Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val (配列番号5)

Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val (配列番号6)、および

Gly - Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val (配列番号7)

から選択される配列であり、

Z<sub>1</sub> がアルギニンであり、かつZ<sub>2</sub> がスレオニンであるか、あるいはZ<sub>1</sub> がSer - AspまたはSer - Asnであり、かつZ<sub>2</sub> がアラニンであり、

X<sub>2</sub> は、Glu - Lys、Glu - Ser、およびAsp - Leuから選択される配列であり、

30

X<sub>3</sub> は、空であるか、リジンであるか、あるいは

Lys - Asp

Lys - Asp - Leu

Lys - Asp - Leu - Glu (配列番号8)

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu (配列番号9)

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly (配列番号10)

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile (配列番号11)

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile - Gln (配列番号12)

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile - Gln - Z<sub>3</sub> (配列番号13)、および

40

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile - Gln - Z<sub>3</sub> - Leu (配列番号14)

から選択される配列であり、

Z<sub>3</sub> は、アラニンまたはスレオニンであり、

X<sub>4</sub> は、システイン、セリン、チロシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、およびグリシンから選択されるアミノ酸残基であり、

X<sub>5</sub> は、空であるか、トリプトファン残基であるか、あるいは

Trp - Lys

Trp - Lys - Thr

50

Trp - Lys - Thr - Phe (配列番号 15)  
 Trp - Lys - Thr - Phe - Thr (配列番号 16)  
 Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser (配列番号 17)  
 Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> (配列番号 18) および  
 Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> - Lys - Gln - Ala (配列番号 19)

から選択される配列であり、

X<sub>6</sub> は、システイン、セリン、チロシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、およびグリシンから選択されるアミノ酸残基である)。

【0010】

一実施形態では、本ペプチドは、11～50個のアミノ酸残基の範囲のアミノ酸配列、好ましくは20個および30個のアミノ酸残基の範囲のアミノ酸配列、を本質とする。

【0011】

一実施形態では、X<sub>1</sub>が、Gly - Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Valであり、X<sub>5</sub>が、Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub>である。

【0012】

一実施形態では、本ペプチドは、配列番号2、3、4、または20：

Gly - Ala - Ser - Asp - Ser - Asp - Val - Tyr - Asp - Leu -  
 Leu - Ala - Gly - Ser - Lys - Asn - Phe - Phe - Trp - Lys -  
 Thr - Phe - Thr - Ser - Ser (配列番号2)

Gly - Ala - Ser - Asp - Ser - Asp - Val - Tyr - Asp - Leu -  
 Leu - Lys - Ala - Gly - Ser - Lys - Asn - Phe - Phe - Trp -  
 Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - Ser (配列番号3)

Gly - Thr - Ser - Asp - Arg - Val - Tyr - Glu - Lys - Leu -  
 Ala - Gly - Ser - Lys - Asn - Phe - Phe - Trp - Lys - Thr -  
 Phe - Thr - Ser - Ser (配列番号4)

Gly - Ala - Ser - Asp - Ser - Asn - Val - Tyr - Asp - Leu -  
 Leu - Lys - Ala - Gly - Ser - Lys - Asn - Phe - Phe - Trp -  
 Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - Ser (配列番号20)

の配列を含む。

【0013】

一実施形態では、上記ペプチドは、治療される関節への関節内注射により投与される。

【0014】

一実施形態では、上記ペプチドは、10<sup>-3</sup>M～10<sup>-7</sup>M、または10<sup>-4</sup>M～10<sup>-7</sup>Mの範囲の最終的な関節内濃度で投与される。

【0015】

さらに本発明は、本発明で説明されるように使用するための少なくとも1種のペプチドと、1種以上の薬学的に許容される賦形剤と、を含む医薬組成物に関する。

【0016】

さらに本発明は、本発明で説明されるように使用するための少なくとも1種のペプチドを含む医薬に関する。

【0017】

さらに本発明は、本発明で説明されるように使用するための少なくとも1種のペプチドを含む薬学単位剤形に関する。

【0018】

一実施形態では、単位剤形は、治療される関節への局所注射のための、使い捨ての投与前のプレフィルドシリンジである。

【0019】

さらに本発明は、少なくとも1種の関節内補充療法剤をさらに含む、上述されるような医薬組成物、医薬、または薬学単位剤形に関する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 0 】

一実施形態では、少なくとも 1 種の関節内補充療法剤は、ヒアルロン酸であり、好ましくは、ヒアルロン酸は、0.1%～10%の範囲の濃度である。

## 【 0 0 2 1 】

定義

本発明では、以下の用語は以下の意味を有する。

## 【 0 0 2 2 】

用語「対象」は、哺乳類、好ましくはヒトを表す。本発明の一実施形態では、対象は、ウマ、ウシ、またはペット、たとえばイヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、フェレット、ウサギなどをも表してよい。一実施形態では、対象は「患者」であり得る。

10

## 【 0 0 2 3 】

用語「患者」は、医療の受診を待機している対象、医療を受診している対象、もしくは医療の対象であった対象／医療の対象である対象／医療の対象となるであろう対象、または疾患の発症に関してモニタリングされている対象を表す。

## 【 0 0 2 4 】

用語「年輩者」は、30歳を過ぎた（たとえばおよそ40歳、50歳、60歳、70歳、80歳、90歳以上を過ぎた）ヒトの対象もしくは患者、またはその種に準じて同等の年齢である非ヒトの動物を表す。

## 【 0 0 2 5 】

用語「treating（治療する）」、「treatment（治療）」、または「alleviation（軽減）」は、治療上の処置、および、変形性関節症の予防または遅延（緩和）を目的とする予防的または防止的手段の両方を表す。治療が必要なものは、変形性関節症をすでに有しているもの、ならびに変形性関節症を有する傾向があるもの、または変形性関節症を予防すべきものを含む。本発明に係るペプチドの治療量を投与した後に、患者の対象（または哺乳類）が、以下のうちの1つまたは複数観察可能および／または測定可能な低減を示すか、または以下のうちの1つまたは複数が存在しないことを示す場合、対象または哺乳類の変形性関節症の「治療」が成功している：軟骨構造の分解が低減もしくは遅延すること、軟骨の厚さが維持されるもしくは増加すること、変形性関節症に関連する症状のうちの1つもしくは複数がある程度まで軽減すること；病的状態が低減すること、および／またはクオリティオブライフの問題が改善すること。変形性関節症の治療の成功および改善を評価するための上記のパラメータは、医師によく知られている通常的手段により容易に測定可能である。

20

30

## 【 0 0 2 6 】

用語「治療上有効量」は、標的に対して有意に負のまたは有害な副作用を引き起こすことなく、（1）変形性関節症の発症を遅延もしくは予防すること；（2）変形性関節症の1つもしくは複数の症状の進行、増悪、もしくは悪化を遅延もしくは停止させること；（3）変形性関節症の症状の寛解をもたらすこと；（4）変形性関節症の重症度もしくは頻度を低下させること；または（5）変形性関節症を治癒することを目的とする薬剤のレベルまたは量を意味する。治療上有効量は、防止的もしくは予防的行為のために、変形性関節症の発症の前に投与してもよい。あるいはまたはさらに、治療上有効量を、治療行為のために、変形性関節症の発症後に投与してもよい。

40

## 【 0 0 2 7 】

用語「薬学的に許容される賦形剤」は、動物、好ましくはヒトに投与する場合に、有害反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応をもたらさない賦形剤を表す。これは、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸収遅延剤などを含む。ヒトの投与では、調製物は、たとえばFDA局またはEMAなどの規制局により要求される、滅菌性、発熱性、一般的な安全性、および純度の基準を満たしているべきである。

## 【 0 0 2 8 】

50

ある数字の前の用語「約」は、当該数字の値 $\pm 10\%$ を意味する。

【発明を実施するための形態】

【0029】

詳細な説明

本発明は、変形性関節症の治療に使用するためのペプチドに関する。実際に、本出願人は、驚くべきことに、本発明のペプチドが、軟骨細胞の増殖および分化の局所的な加速を誘導でき、よって変形性関節症の治療に使用できることを、例証した。

【0030】

一実施形態では、本発明のペプチドは、ソマトスタチン配列（たとえば、特に治療する対象がヒトである実施形態ではヒトのソマトスタチン配列など）のフラグメントにアミノ結合を介して連結された成長ホルモン（GH）配列（たとえば、特に治療する対象がヒトである実施形態ではヒトのGH配列など）のフラグメントを含む合成ペプチドである。

【0031】

一実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1、またはそのフラグメントもしくは変異体、を含む、またはそれを本質とし、配列番号1は、以下の通りである：

X<sub>1</sub> - Tyr - X<sub>2</sub> - Leu - X<sub>3</sub> - Ala - Gly - X<sub>4</sub> - Lys - Asn - Phe - Phe - X<sub>5</sub>（配列番号1）

（式中、

X<sub>1</sub>は、空であるか、バリンであるか、または

Z<sub>1</sub> - Val

Asp - Z<sub>1</sub> - Val

Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val（配列番号5）

Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val（配列番号6）、および

Gly - Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val（配列番号7）

から選択される配列であり、

Z<sub>1</sub>がアルギニンであり、かつZ<sub>2</sub>がスレオニンであるか、もしくはZ<sub>1</sub>がSer - AspまたはSer - Asnであり、かつZ<sub>2</sub>がアラニンであり、

X<sub>2</sub>は、Glu - Lys、Glu - Ser、およびAsp - Leuから選択される配列であり、

X<sub>3</sub>は、空であるか、リジンであるか、または

Lys - Asp

Lys - Asp - Leu

Lys - Asp - Leu - Glu（配列番号8）

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu（配列番号9）

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly（配列番号10）

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile（配列番号11）

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile - Gln（配列番号12）

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile - Gln - Z<sub>3</sub>（配列番号13）、および

Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile - Gln - Z<sub>3</sub> - Leu（配列番号14）

から選択される配列であり、

Z<sub>3</sub>は、アラニンまたはスレオニンであり、

X<sub>4</sub>は、システイン、セリン、チロシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、およびグリシンから選択されるアミノ酸残基であり、

X<sub>5</sub>は、空であるか、トリプトファン残基であるか、または

Trp - Lys

Trp - Lys - Thr

Trp - Lys - Thr - Phe（配列番号15）

Trp - Lys - Thr - Phe - Thr（配列番号16）

Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser (配列番号 17)  
 Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> (配列番号 18) および  
 Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> - Lys - Gln - Ala (配列番号 19)

から選択される配列であり、

X<sub>6</sub> は、システイン、セリン、チロシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、およびグリシンから選択されるアミノ酸残基である)。

【0032】

一実施形態では、X<sub>1</sub> が、Gly - Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val (配列番号 7) であり、式中、Z<sub>1</sub> および Z<sub>2</sub> が上述の通りであり；X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、および X<sub>4</sub> が上述の通りであり；X<sub>5</sub> が、Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> (配列番号 18) であり、X<sub>6</sub> が、上述の通りである。

10

【0033】

一実施形態では、X<sub>1</sub> が、Gly - Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val (配列番号 7) であり、式中、Z<sub>1</sub> が、Ser - Asp であり、Z<sub>2</sub> が、アラニンであり；X<sub>2</sub> が、Asp - Leu であり；X<sub>3</sub> が空であり；X<sub>4</sub> がセリンであり；X<sub>5</sub> が、Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> (配列番号 18) であり、X<sub>6</sub> がセリンである。この実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号 2、またはそのフラグメントもしくは変異体、を含むか、またはそれからなり、配列番号 2 は、以下の通りである：

Gly - Ala - Ser - Asp - Ser - Asp - Val - Tyr - Asp - Leu -  
 Leu - Ala - Gly - Ser - Lys - Asn - Phe - Phe - Trp - Lys -  
 Thr - Phe - Thr - Ser - Ser (配列番号 2)。

20

【0034】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は、Gly - Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val (配列番号 7) であり、式中、Z<sub>1</sub> が、Ser - Asp であり、Z<sub>2</sub> が、アラニンであり；X<sub>2</sub> が、Asp - Leu であり；X<sub>3</sub> がリジンであり；X<sub>4</sub> がセリンであり；X<sub>5</sub> が Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> (配列番号 18) であり、X<sub>6</sub> がセリンである。この実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号 3、そのフラグメントまたは変異体、を含むか、またはそれからなり、配列番号 3 は、以下の通りである：

Gly - Ala - Ser - Asp - Ser - Asp - Val - Tyr - Asp - Leu -  
 Leu - Lys - Ala - Gly - Ser - Lys - Asn - Phe - Phe - Trp -  
 Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - Ser (配列番号 3)。

30

【0035】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は、Gly - Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val (配列番号 7) であり、式中、Z<sub>1</sub> がアルギニンであり、Z<sub>2</sub> がスレオニンであり；X<sub>2</sub> が、Glu - Lys であり；X<sub>3</sub> が、空であり；X<sub>4</sub> が、セリンであり；X<sub>5</sub> が Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> (配列番号 18) であり、式中 X<sub>6</sub> がセリンである。この実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号 4、そのフラグメントまたは変異体、を含むか、またはそれからなり、配列番号 4 は、以下の通りである：

Gly - Thr - Ser - Asp - Arg - Val - Tyr - Glu - Lys - Leu -  
 Ala - Gly - Ser - Lys - Asn - Phe - Phe - Trp - Lys - Thr -  
 Phe - Thr - Ser - Ser (配列番号 4)。

40

【0036】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は、Gly - Z<sub>2</sub> - Ser - Asp - Z<sub>1</sub> - Val (配列番号 7) であり、式中、Z<sub>1</sub> が Ser - Asn であり、Z<sub>2</sub> がアラニンであり；X<sub>2</sub> は Asp - Leu であり；X<sub>3</sub> がリジンであり；X<sub>4</sub> はセリンであり；X<sub>5</sub> は Trp - Lys - Thr - Phe - Thr - Ser - X<sub>6</sub> (配列番号 18) であり、X<sub>6</sub> がセリンである。この実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号 20、そのフラグメントまたは変異体、を含むか、またはそれからなり、配列番号 20 は、以下の通りである：

Gly - Ala - Ser - Asp - Ser - Asn - Val - Tyr - Asp - Leu -

50



L e u - L y s - A l a - G l y - S e r - L y s - A s n - P h e - P h e - T r p - L y s - T h r - P h e - T h r - S e r - S e r ( 配列番号 20 )。

【 0037 】

一実施形態では、本発明のペプチドは、約 11 ～ 約 50 個のアミノ酸残基、好ましくは 14 ～ 約 40 個のアミノ酸残基、より好ましくは約 20 ～ 約 30 個のアミノ酸残基、の範囲のアミノ酸配列を本質とする。一実施形態では、本発明のペプチドは、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50 個のアミノ酸を本質とする。

10

【 0038 】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸」は、当該分野でよく知られているアミノ酸の完全名、3文字表記、または1文字表記により表されている。ペプチドのアミノ酸残基は、以下のように略されている：フェニルアラニンは P h e または F；ロイシンは L e u または L；イソロイシンは I l e または I；メチオニンは M e t または M；バリンは V a l または V；セリンは S e r または S；プロリンは P r o または P；スレオニンは T h r または T；アラニンは A l a または A；チロシンは T y r または Y；ヒスチジンは H i s または H；グルタミンは G l n または Q；アスパラギンは A s n または N；リジンは L y s または K；アスパラギン酸は A s p または D；グルタミン酸は G l u または E；システインは C y s または C；トリプトファンは T r p または W；アルギニンは A r g または R；およびグリシンは G l y または G。

20

【 0039 】

本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸」は、天然のアミノ酸および合成のアミノ酸の両方、ならびに D - アミノ酸および L - アミノ酸の両方を含む。「標準的なアミノ酸」または「天然に存在するアミノ酸」は、天然に存在するペプチドで一般に見いだされる 20 個の標準的な L - アミノ酸のいずれかを意味する。「非標準的なアミノ酸残基」は、合成的に調製されたかまたは天然の供給源に由来するかどうかに関わらず、標準的なアミノ酸以外のいずれかのアミノ酸を意味する。たとえば、ナフチルアラニンは、合成を促進するために、トリプトファンと置換することができる。置換され得る他の合成のアミノ酸として、限定するものではないが、L - ヒドロキシプロピル、L - 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニル、アミノ酸、たとえば L - ヒドロキシリジルおよび D - メチルアラニル、L - メチルアラニル、アミノ酸、およびイソキノリルが挙げられる。また、スレオニン、アラニン、トリプトファン、およびフェニルアラニンの残基は、ペプチダーゼに対してより耐性があるペプチドのために、D - 体に属することができる。

30

【 0040 】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸」はまた、限定するものではないが、塩、アミノ酸誘導体（アミドなど）、および置換を含む、化学的に修飾したアミノ酸をも含む。本発明のペプチドの中、特にカルボキシ末端またはアミノ末端に含まれているアミノ酸は、アミノ酸の活性に有害な影響を与えることなく本ペプチドの循環半減期を変えることができる、メチル化、アミド化、アセチル化、または他の化学基との置換により、修飾することができる。さらに、ジスルフィド結合が、本発明のペプチドに存在していてもよく、存在していなくてもよい。

40

【 0041 】

本発明に有用なペプチドは、天然の標準的なアミノ酸または非標準的なアミノ酸を含み得る。ペプチド模倣体は、以下の修飾を有するペプチドを含む：i) ペプチジル - C ( O ) N R - 結合のうちの 1 つまたは複数が、C H 2 - カルバメート結合 ( - C H 2 O C ( O ) N R - )、ホスホン酸結合、- C H 2 - スルホンアミド ( - C H 2 - S ( O ) 2 N R - ) 結合、尿素 ( - N H C ( O ) N H - ) 結合、- C H 2 - 二級アミン結合などの非ペプチジル結合により、またはアルキル化ペプチジル結合 ( - C ( O ) N R - ) ( 式中 R が C 1 ~ C 4 アルキルである ) と、置換されているペプチド；ii) N 末端が、- N R R 1 基、-

50

NRC(O)R基、-NRC(O)OR基、-NRS(O)<sub>2</sub>R基、-NHC(O)NHR基(式中、RおよびR<sup>1</sup>が水素またはC<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキルであり、ただしRおよびR<sup>1</sup>は両方とも水素ではない)に誘導体化されたペプチド; i i i) C末端が、-C(O)R<sup>2</sup>(式中、R<sup>2</sup>が、C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルコキシ、および-NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>からなる群から選択され、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>が、独立して、水素およびC<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>アルキルからなる群から選択される)に誘導体化されたペプチド。

#### 【0042】

一実施形態では、本発明に有用なペプチドのN末端およびC末端は、任意選択でタンパク質分解から保護されていてもよい。たとえば、N末端は、アセチル基の形態であってもよく、および/またはC末端は、アミド基の形態であってもよい。

#### 【0043】

よって、一実施形態では、本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列を含むか、またはこれを本質とする:

Ac-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-NH<sub>2</sub>(N末端をアセチル基で保護し、C末端をアミド基で保護した配列番号2); または

Ac-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-NH<sub>2</sub>(N末端をアセチル基で保護し、C末端をアミド基で保護した配列番号3); または

Ac-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg-Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-NH<sub>2</sub>(N末端をアセチル基で保護し、C末端をアミド基で保護した配列番号4); または

Ac-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asn-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-NH<sub>2</sub>(N末端をアセチル基で保護し、C末端をアミド基で保護した配列番号20)。

#### 【0044】

タンパク質分解に耐性となる本ペプチドの内部の修飾も想定されており、たとえばここで少なくとも-CONH-ペプチド結合が、(CH<sub>2</sub>NH)還元型結合、(NHCO)レトロインベルソ結合、(CH<sub>2</sub>-O)メチレン-オキシ結合、(CH<sub>2</sub>-S)チオメチレン結合、(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)カルバ結合(carbambond)、(CO-CH<sub>2</sub>)ケトメチレン(cetomethylene)結合、(CHOH-CH<sub>2</sub>)ヒドロキシエチレン結合、(N-N)結合、E-アルケン(alcene)結合、または同様に-CH=CH-結合により修飾および置換されている。

#### 【0045】

本発明の一実施形態では、上述したポリペプチドは、当該分野でよく知られている手段、たとえばホスフェート、アセテート、脂質もしくは炭水化物基などの1つもしくは複数の官能基の付加により、および/または1つもしくは複数の保護基の付加により、修飾されている。

#### 【0046】

たとえば、本ポリペプチドは、ホスフェート、アセテート、または様々な脂質および炭水化物などの1つまたは複数の官能基の付加により、修飾することができる。本発明のポリペプチドはまた、ポリペプチド誘導体として存在することもできる。用語「ポリペプチド誘導体」は、アミノ基(-NH-)、特にペプチド結合を有する化合物を表す。ポリペプチドは、置換されたアミドとみなされてもよい。アミド基のように、ペプチド結合は、高い度合の共鳴安定化を示す。ペプチド結合におけるC-N単結合は、概して、約40パーセントの二重結合の特徴を有し、C=O二重結合は、約40パーセントの単結合の特徴

10

20

30

40

50

を有する。「保護基」は、保護されていない官能基を含む望ましくない反応（タンパク質分解など）を防止する基である。アミノ保護基の具体的な例として、ホルミル；トリフルオロアセチル；ベンジルオキシカルボニル；置換されたベンジルオキシカルボニル、たとえば（オルトまたはパラ）クロロベンジルオキシカルボニルおよび（オルトまたはパラ）プロモベンジルオキシカルボニル；ならびに脂肪族オキシカルボニル、たとえば *t*-ブトキシカルボニルおよび *t*-アミロキシカルボニルが挙げられる。アミノ酸のカルボキシル基は、エステル基への変換を介して保護することができる。このエステル基として、ベンジルエステル、置換されたベンジルエステル、たとえばメトキシベンジルエステル；アルキルエステル、たとえばシクロヘキシルエステル、シクロヘプチルエステル、または *t*-ブチルエステルが、挙げられる。グアニジノ部分は、たとえ保護基を必要としていなくても、ニトロ；またはアリールスルホニル、たとえばトシル、メトキシベンゼンスルホニル、またはメシチレンスルホニルにより保護されてもよい。イミダゾールの保護基として、トシル（*tosy*）、ベンジル、およびジニトロフェニルが挙げられる。トリプトファンのインドール基は、ホルミルにより保護されていてもいなくてもよい。

#### 【0047】

本発明において有用なペプチドはまた、低い免疫原性で、尿クリアランスおよび使用する治療用量を減少させるため、ならびに水への溶解度、溶液中の移動性、および血漿中の半減期を増大させるために、C末端またはリジン残基により、ポリエチレングリコール（PEG）分子、特に1500 MWまたは4000 MWのPEGに共有結合することができる。PEGの結合は、Abuchowskiら（*J. Biol. Chem.*, 1977, 252: 3582-3586）により説明されている。本発明のさらなる態様では、2つ以上のPEG分子が、各足場の部位で結合している。さらに別の実施形態では、ペプチドの半減期は、薬物送達システムを形成するミクロスフィア用の生物分解性および生体適合性ポリマー材料に本ペプチドを含めることにより、増大する。ポリマーおよびコポリマーは、たとえばポリ（D, L-ラクチド-コ-グリコリド）（PLGA）（Soon K ap Hahnらの米国特許公開公報第2007/0184015号に例示されている）である。

#### 【0048】

エンドペプチダーゼまたはエキソペプチダーゼによるポリペプチドの分解を防止するために使用される修飾の他の例としては、N末端修飾（アセチル化またはグリコシル化など）、C末端修飾（アミド化など）およびポリペプチド中の特定の部位における非天然のアミノ酸の使用（アミノ酸および -トリフルオロメチルアミノ酸）が挙げられる。

#### 【0049】

ポリペプチドの分子の大きさを増やすための別の代替手段として、ヒトの イムノグロブリンのFcドメインへの本ポリペプチドの遺伝的な融合、またはアルブミンへの本ペプチドの融合がある。

#### 【0050】

一実施形態では、本発明のペプチドは、配列番号1の変異体、好ましくは配列番号2、3、4、または20の変異体である。

#### 【0051】

ペプチド「変異体」は、この用語が本明細書で使用される場合、概して、1つまたは複数の置換、欠失、付加、および/または挿入で、本明細書において具体的に開示されているペプチドとは異なっているペプチドである。このような変異体は、天然に存在していてもよく、または、たとえば上記ペプチドの配列のうちの1つまたは複数を修飾し、本明細書中記載のペプチドの1つまたは複数の生物学的活性を評価し、かつ/もしくは当該分野でよく知られている多くの技術のいずれかを使用することにより、合成的に作製されてもよい。修飾が、ペプチドの構造において行われてもよく、さらに、望ましい特徴を有する変異体または誘導体ペプチドをコードする機能的な分子を入手してもよい。

#### 【0052】

同等の、またはさらに改善した、本発明のリガンドの変異体または一部を作製するために

10

20

30

40

50

、ペプチドのアミノ酸配列を変更することが望ましい場合、当業者は、通常、コードした DNA 配列のコドンのうちの 1 つまたは複数を变化させる。たとえば、特定のアミノ酸が、細胞表面の受容体、好ましくは細胞表面の栄養素輸送体と結合する能力を明らかに失うことなく、タンパク質構造において他のアミノ酸により置換されてもよい。これは、タンパク質の生物学的な機能上の活性を定義するタンパク質の結合能力および性質であるため、特定のアミノ酸配列の置換を、タンパク質の配列、および当然、その根底にある DNA コード配列で行うことができ、それでもなお類似の特性を備えるタンパク質を有することができる。よって、生物学的な有用性または活性を明らかに失うことなく、様々な変更を、本ペプチド配列、または上記ペプチドをコードする対応する DNA 配列で行うことが可能であることが、企図されている。多くの例では、ペプチドの変異体は、1 つまたは複数の保存的置換を含む。「保存的置換」は、ペプチド化学の当業者が、ペプチドの二次構造およびヒドロパシーの性質が実質的に変化しないと予測するように、アミノ酸が、同様の特性を有する別のアミノ酸により置換される置換である。よって、上述されているように、アミノ酸の置換は、一般に、アミノ酸側鎖の置換基の相対的な類似性、たとえばそれらの疎水性、親水性、電荷、大きさなどに基づいている。上記の様々な特徴を考慮する例示的な置換基は、当業者によく知られており、アルギニンおよびリジン；グルタミン酸塩およびアスパラギン酸塩；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンが、挙げられる。アミノ酸の置換はさらに、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基づき作製されてもよい。たとえば、負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含み；正に荷電したアミノ酸は、ヒスチジン、リジン、およびアルギニンを含み；同様の親水性の値を有する非荷電の極性頭部基を有するアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン、およびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、スレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンを含み。保存的变化を呈し得るアミノ酸の他の基として、(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2) cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；および(5) phe、tyr、trp、his が挙げられる。

#### 【0053】

本明細書で使用される場合、用語「保存的アミノ酸の置換」は、以下の 5 つの基：

I．小分子の脂肪族、非極性またはわずかに極性の残基：Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

II．極性、負に荷電した残基およびそれらのアミド：Asp、Asn、Glu、Gln；

III．極性、正に荷電した残基：His、Arg、Lys；

IV．大きな、脂肪族、非極性の残基：Met、Leu、Ile、Val、Cys；

V．大きな、芳香族残基：Phe、Tyr、Trp

のうちの 1 つの中での、アミノ酸の交換としてさらに定義され得る。

#### 【0054】

変異体はまた、あるいは代替的に、非保存的变化を含んでよい。好ましい実施形態では、変異体のペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のアミノ酸の置換、欠失、または付加により、天然の配列と異なる。変異体はまた（またはあるいは）、たとえばペプチドの免疫原性、二次構造、およびヒドロパシーの性質への影響が最小限であるアミノ酸の欠失または付加により、修飾されてもよい。よって、一実施形態では、配列番号 1、2、3、4、または 20 の変異体は、配列番号 1、2、3、4、もしくは 20 のそれぞれの配列に由来する 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のアミノ酸が、存在していない、もしくは任意のアミノ酸により置換されているペプチド、または 1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは 10 個のアミノ酸（連続しているまたは連続していない）が追加されているペプチドである。

#### 【0055】

一実施形態では、配列番号 1、2、3、4、または 20 の変異体は、配列番号 1、2、3

、4、または20の配列と、C末端および/またはN末端に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の追加的なアミノ酸とを有するペプチドである。

【0056】

一実施形態では、配列番号1、2、3、4、または20の変異体は、配列番号1、2、3、4、または20のそれぞれと少なくとも約70%の同一性、好ましくは少なくとも約80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%の同一性またはそれ以上の同一性を示す、ペプチドである。

【0057】

2つ以上のポリペプチドの配列間の関係において使用される場合、用語「同一性」は、2つ以上のアミノ酸残基の鎖(string)間の一致数により決定される、ポリペプチド間の配列の関連性の度合いを表す。「同一性」は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム(すなわち「アルゴリズム」)により提示されるギャップアライメント(存在する場合)で、2つ以上の配列のうち小さな方の配列に合わせた配列間で完全な一致のパーセントを測定する。関連するポリペプチドの同一性は、既知の方法により容易に計算することができる。このような方法として、限定するものではないが、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)に記載されるものが挙げられる。同一性を決定するための好ましい方法は、試験する配列間で最大の一致を提供するように設計されている。同一性を決定する方法は、公で入手可能なコンピュータプログラムで説明されている。2つの配列間で同一性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法として、GAP(Devereux et al., Nucl. Acid. Res. \2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN、およびFASTA(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))を含むGCGプログラムパッケージが挙げられる。BLASTXプログラムは、国立生物工学情報センター(NCBI)および他の供給源(BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra)から公的に入手可能である。よく知られたSmith Watermanアルゴリズムも、同一性を決定するために使用してもよい。

【0058】

一実施形態では、本ペプチドのトリプトファン残基とC<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>アルキル基(メチル、エチル、プロピル、イソプロピル)とを連結して、本ペプチドを酸化に耐性とすることができる。トリプトファン残基は、たとえば、X<sub>5</sub>が配列番号1に記載されている配列にある場合、配列番号2に記載の配列の19位に存在してもよく; 配列番号3または配列番号20に記載の配列の20位に存在してもよく; 配列番号4に記載の配列の18位に存在してもよい。

【0059】

本明細書中記載のペプチドは、当該分野でよく知られているように、化学合成または酵素

10

20

30

40

50

を用いた合成により、合成的に作製することができる。あるいは、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を、タンパク質発現ベクターに導入し、適切な宿主生物（たとえば細菌、昆虫細胞など）で産生させ、次いで精製させることができる。好ましい実施形態では、縮合の間にペプチド結合に関与しているものを除いてアミノ酸官能基を保護しつつ、アミノ酸残基の段階的な縮合、アミノ酸配列をすでに含むあらかじめ形成されたフラグメントの適切な順での縮合、または以前に調製したいくつかのフラグメントの縮合により、ペプチドを得る。特に、本ペプチドは、メリフィールドにより本來說明された方法により、合成することができる。

【0060】

追加的なポリペプチド（「タグ」）を、本ペプチドを精製または同定もしくは精製する目的で追加することができる。タンパク質タグにより、たとえば、基質に本ペプチドを高親和性で吸着させること、および次に、いずれかの有意な度合で複合体を溶出させることなく、基質を適切なバッファーでストリンジェントに洗浄すること、およびその後、吸着した複合体を選択的に溶出させることが、可能となる。当業者に知られているタンパク質タグの例として、（His）<sub>6</sub>タグ、Mycタグ、FLAGタグ、ヘマグルチニンタグ、グルタチオントランスフェラーゼ（GST）タグ、アフィニティキチン結合タグを有するインティン、またはマルトース結合タンパク質（MBP）タグがある。これらタンパク質タグは、N末端、C末端、および/または内部に位置し得る。

【0061】

好適には、反復方法で投与する場合であっても、本明細書中記載のペプチドは、抗体産生を引き起こし、内在性GHの中和、よって生物学的活性の中和をもたらす当該分野の免疫原性ペプチドとは対照的に、抗ペプチドまたは抗GH抗体の産生を誘導しない。

【0062】

また本発明は、本明細書中上述した配列番号1（特に配列番号2～4または20の配列を有するペプチド）、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む少なくとも1種のペプチドを含む、またはからなる、またはから本質的になる組成物に関する。

【0063】

また本発明は、本明細書中上述した配列番号1（特に配列番号2～4または20の配列を有するペプチド）、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む少なくとも1種のペプチドと、少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤とを含む、またはからなる、またはから本質的になる医薬組成物に関する。

【0064】

また本発明は、本明細書中上述した配列番号1、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む少なくとも1種のペプチドを含む、またはからなる、またはから本質的になる医薬に関する。

【0065】

一実施形態では、本発明の組成物、医薬組成物、または医薬は、その必要がある対象の変形性関節症の治療に使用するためのものである。

【0066】

本発明の組成物、医薬組成物、または医薬に関して、本明細書中で使用される用語「～から本質的になる」は、本発明の少なくとも1種のペプチドが、上記組成物、医薬組成物、または医薬の中で生物学的な活性を有する唯一の治療上の作用物質または薬剤であることを意味する。

【0067】

適切な賦形剤の例として、限定するものではないが、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、およびエタノール溶液、グルコース、スクロース、デキストラン、マンノース、マンニトール、ソルビトール、ポリエチレングリコール（PEG）、リン酸塩、酢酸塩、ゼラチン、コラーゲン、Carbopol（登録商標）、植物油などが挙げられる。さらに、適切な保存剤、安定剤、抗酸化剤、抗菌剤、および緩衝剤、たとえばBHA、BHT、クエン酸、アスコルビン酸、テトラサイクリンなどを挙げることができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 8 】

本発明の組成物に使用し得る薬学的に許容される賦形剤の他の例として、限定するものではないが、イオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、たとえばヒト血清アルブミン、緩衝物質、たとえばリン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸、水、塩、もしくは硫酸プロタミンなどの電解質の部分的なグリセリド混合物、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンポリオキシプロプレンプロックポリマー、ポリエチレングリコール、ならびに羊毛脂が挙げられる。

10

## 【 0 0 6 9 】

一実施形態では、本発明の組成物、医薬組成物、または医薬は、いくつかの賦形剤、たとえば界面活性剤（たとえばヒドロキシプロピルセルロース）など；適切な担体、たとえば水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、および液体のポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および、たとえばピーナッツ油およびゴマ油などの植物油を含む、溶媒および分散媒体など；等張剤、たとえば糖または塩化ナトリウムなど；コーティング剤、たとえばレシチンなど；吸収遅延剤、たとえばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなど；保存剤、たとえば塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、クロロブタノール、チメロサルなど；バッファー、たとえばホウ酸、炭酸水素ナトリウムおよび炭酸水素カリウム、ホウ酸ナトリウムおよびホウ酸カリウム、炭酸ナトリウムおよび炭酸カリウム、酢酸ナトリウム、重リン酸ナトリウム（sodium biphosphate）など；等張化剤、たとえばデキストラン 40、デキストラン 70、デキストロース、グリセリン、塩化カリウム、プロピレングリコール、塩化ナトリウムなど；抗酸化剤および安定剤、たとえば亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、チオ尿素など；非イオン性湿潤剤または清澄剤、たとえばポリソルベート 80、ポリソルベート 20、ポロキサマー 282、およびチロキサポールなど；粘度修正剤、たとえばデキストラン 40、デキストラン 70、ゼラチン、グリセリン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ラノリン、メチルセルロース、ワセリン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースなど；などを含んでもよい。

20

30

## 【 0 0 7 0 】

一実施形態では、本組成物、本医薬組成物、または本医薬は、本発明のペプチドの薬学的に許容される塩を含んでもよい。

## 【 0 0 7 1 】

薬学的に許容される塩の例として、無機塩基を含む塩、有機塩基を含む塩、無機酸を含む塩、有機酸を含む塩、塩基性または酸性のアミノ酸を含む塩などが、挙げられる。無機塩基を含む塩の例として、限定するものではないが、アルカリ金属塩、たとえばナトリウム塩およびカリウム塩など；アルカリ土類金属塩、たとえばカルシウム塩およびマグネシウム塩など；アルミニウム塩；ならびにアンモニウム塩が挙げられる。有機塩基を含む塩の例として、限定するものではないが、トリメチルアミンを含む塩、トリエチルアミンを含む塩、ピリジンを含む塩、ピコリンを含む塩、2, 6 - ルチジンを含む塩、エタノールアミンを含む塩、ジエタノールアミンを含む塩、トリエタノールアミンを含む塩、シクロヘキシルアミンを含む塩、ジシクロヘキシルアミンを含む塩、および N, N' - ジベンジルエチレンジアミンを含む塩が挙げられる。無機酸を含む塩の例として、限定するものではないが、塩酸を含む塩、ホウ酸を含む塩、硝酸を含む塩、硫酸を含む塩、およびリン酸を含む塩が挙げられる。有機酸を含む塩の例として、限定するものではないが、ギ酸を含む塩、酢酸を含む塩、トリフルオロ酢酸を含む塩、フタル酸を含む塩、フマル酸を含む塩、シュウ酸を含む塩、酒石酸を含む塩、マレイン酸を含む塩、クエン酸を含む塩、コハク酸を含む塩、リンゴ酸を含む塩、メタンスルホン酸を含む塩、ベンゼンスルホン酸を含む塩、および p - トルエンスルホン酸を含む塩が挙げられる。塩基性アミノ酸を含む塩の例とし

40

50

て、限定するものではないが、アルギニンを含む塩、リジンを含む塩、およびオルニチンを含む塩が挙げられる。酸性アミノ酸を含む塩の例として、限定するものではないが、アスパラギン酸を含む塩およびグルタミン酸を含む塩が挙げられる。適切な塩の列挙は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., p 1418, 1985に開示されており、この開示全体は本明細書中参照として援用されている。

#### 【0072】

一実施形態では、本発明の組成物、医薬組成物または医薬の中の本発明のペプチドの量は、治療上有効量であり、かつ、本発明の組成物、医薬組成物、または医薬の総体積に対して約0.01～90容量%、好ましくは0.1～10容量%、より好ましくは1～5容量%の範囲にある。別の実施形態では、治療上有効量は、約 $10^{-9}$ M～約 $10^{-1}$ M、好ましくは約 $10^{-8}$ M～約 $10^{-2}$ M、より好ましくは約 $10^{-7}$ M～約 $10^{-3}$ Mの範囲にある。これら量は、患者を回復させるように投与するために最良の量を選択することができる当業者によって規定通りに調節可能である。

10

#### 【0073】

一実施形態では、本明細書中記載のペプチドは、少なくとも1種の関節内補充療法剤と共に投与する。よって、一実施形態では、本発明の組成物、医薬組成物、または医薬は、少なくとも1種の関節内補充療法剤をさらに含む。

#### 【0074】

関節内補充療法剤の例として、限定するものではないが、グリコサミノグリカン、最も一般には、ヒアルロン酸、ヒラン(hylan)、ヒアルロナン、および関連する物質を含む非硫酸化グリコサミノグリカンが、挙げられる。

20

#### 【0075】

好ましい実施形態では、少なくとも1種の関節内補充療法剤は、ヒアルロン酸、好ましくは非網状のヒアルロン酸である。一実施形態では、関節内補充療法剤は、約100～約5000kDa、好ましくは約400～約1000kDaの範囲の分子量を有するヒアルロン酸、好ましくは、約100～約5000kDa、好ましくは約400～約1000kDaの範囲の分子量を有する非網状のヒアルロン酸である。一実施形態では、関節内補充療法剤は、約600～約1000kDaの範囲の分子量を有するヒアルロン酸、好ましくは約600～約1000kDaの範囲の分子量を有する非網状のヒアルロン酸である。

30

#### 【0076】

別の実施形態では、関節内補充療法剤、好ましくはヒアルロン酸が、本発明の組成物、医薬組成物、または医薬中に、約0.1%～約10%、好ましくは約0.25%～約5%、好ましくは約0.25%～約2%、好ましくは約1%の範囲の濃度で存在する(パーセンテージは、本組成物の総体積に対する重量のパーセントであり、すなわち1%は、10mg/mlの濃度に対応する)。

#### 【0077】

実際に、本出願人は、ヒアルロン酸が、水溶液中のキメラペプチドの有意な安定化を誘導することを示している(実施例参照)。ラマン分光法の実験は、実際に、配列番号1に記載の配列を有するペプチドの水中での不安定な構造を示した(4つの異なる立体構造の存在が反映されており、このうちの3つは、定量的に当量であった); 対して、ヒアルロン酸の存在下での配列番号1に記載の配列を有するペプチドは、安定したヘアピン立体構造を有している。理論による拘束を望むものではないが、本出願人は、この立体構造により、ソマトスタチン残基が、これらの受容体に対する特異的かつ高親和性の結合のために曝露し得ることを示唆している。

40

#### 【0078】

さらに本発明は、その必要がある対象の変形性関節症の治療のために、任意選択で関節内補充療法剤と組み合わせた、本明細書中記載のペプチドの使用に関する。実際に、本出願人は、本明細書中記載のペプチドが、軟骨細胞で直接作用することにより、これらを分化

50



、倍化、拡散させ、および質の良好な軟骨基質を産生させることが可能であることを例証した。これらペプチドは、関節の厚さおよび軟骨基質の質に及ぼす長期間の効率（注射後最大5カ月間）を示す（実施例参照）。

【0079】

一実施形態では、対象は、変形性関節症を罹患、好ましくは変形性関節症と診断されている。第1の態様では、対象は、変形性関節症を罹患している年輩者の個体（たとえば、30歳超、40歳超、50歳超、60歳超、70歳超、80歳超、90歳以上の個体など）である。第2の態様では、対象は、外傷後変形性関節症を罹患している損傷した個体である。

【0080】

一実施形態では、対象は、Kellgren-Lawrenceのグレード（またはK-Lシステム）により、グレード0、1、2、3、または4の変形性関節症を罹患している。このスコア付けツールによると、グレード0は、変形性関節症のX線検査での特徴を有していないことに対応しており；グレード1は、関節腔の縮小および骨棘形成の可能性のあることに対応しており；グレード2は、関節腔の縮小の可能性がありつつ、明確な骨棘形成に対応しており；グレード3は、複数の骨棘、明確な関節腔の縮小、硬化、および骨の変形の可能性があることに対応しており；グレード4は、大きな骨棘、顕著な関節腔の縮小、重篤な硬化、および明確な骨の変形に対応している。

【0081】

一実施形態では、対象は、グレード0、1、または2の変形性関節症を罹患している。別の実施形態では、対象は、グレード0または1の変形性関節症を罹患している。

【0082】

一実施形態では、本発明のペプチド、組成物、医薬組成物、または医薬は、変形性関節症を予防、好ましくは変形性関節症を発症するリスクのある対象の変形性関節症を予防するためのものである。

【0083】

別の実施形態では、対象は、変形性関節症を発症するリスクがある。リスク因子の例として、限定するものではないが、遺伝的要因、変形性関節症の家族歴、先天的原因または病因により引き起こされる骨のずれ、外傷、力学的な損傷、過体重および肥満、関節を支援する筋肉の強度の喪失、突然の運動または非協調的な運動をもたらす末梢神経の機能障害、アルカプトン尿、関節の先天性障害、糖尿病、エーラス・ダンロス症候群、ヘモクロマトーシスおよびウイルソン病、関節または靱帯への損傷、靱帯の悪化または不安定性、マルファン症候群、関節感染症などが挙げられる。

【0084】

一実施形態では、本発明のペプチド、組成物、医薬組成物、または医薬は、すでに変形性関節症を罹患した対象の変形性関節症を治癒するためのものである。

【0085】

一実施形態では、本発明のペプチド、組成物、医薬組成物、または医薬は、すでに変形性関節症を罹患した対象、たとえばK-Lシステムにしたがいグレード0、1、または2の変形性関節症を有する対象の変形性関節症の増悪を予防するためのものである。

【0086】

一実施形態では、本発明の少なくとも1種のペプチドは、治療する関節への関節内注射により投与される、または投与すべきである。

【0087】

一実施形態では、投与後の関節内の本発明のペプチドの目的の濃度は、約 $10^{-9}$ M～約 $10^{-2}$ M、好ましくは約 $10^{-8}$ M～約 $10^{-3}$ M、より好ましくは約 $10^{-7}$ M～約 $10^{-3}$ Mの範囲にある。一実施形態では、投与後の関節内の本発明のペプチドの目的の濃度は、約 $10^{-7}$ M～約 $10^{-4}$ Mの範囲にある。このような関節内濃度を達成するために、投与するペプチドの治療上有効量の濃度は、関節の大きさおよびその中の滑液の体積に応じて変動する。これら因子は、関節の性質、治療する対象の年齢および種に応じて

10

20

30

40

50

変動する。これらパラメータは、当業者、特に医師および獣医によく知られている。たとえば、膝の中の滑液の体積は、通常、ヒトで約 6 ~ 7 mL、ウサギで約 500  $\mu$ l、およびイヌで約 240  $\mu$ l である。

【0088】

よって、一実施形態では、ヒトの膝の変形性関節症を治療するために、本発明のペプチド（好ましくは配列番号 2 または配列番号 3 または配列番号 20 に記載のペプチド）と、任意選択でヒアルロン酸とを含む組成物 2 mL を、関節に注射することができる。獣医の場合では、この用量を、種に応じて調節することができる。

【0089】

一実施形態では、本組成物、本医薬組成物、または本医薬を、1 回、2 回、または 3 回以上、たとえば 4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、または 10 回、または変形性関節症の治療が完了するまで、投与する。

【0090】

一実施形態では、本組成物、本医薬組成物、または本医薬を数回投与する場合、2 回の投与間の間隔は、約 1、2、3、4、5、6、7 日間、または約 1、2、3、4 週間、または約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは 12 か月以上である。

【0091】

一実施形態では、本発明の組成物、医薬組成物、または医薬を、1 週間間隔で 3 回投与する。

【0092】

一実施形態では、使用前に、本発明のペプチドを、好ましくは濾過またはオートクレーブにより滅菌する。別の実施形態では、使用前に、ペプチドおよび関節内補充療法剤を含む本発明の組成物を、好ましくは濾過またはオートクレーブにより滅菌する。別の実施形態では、本ペプチドおよび関節内補充療法剤は、混合および使用の前に、別々に滅菌する。

【0093】

一実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、薬学的な単位剤形に含まれている。好ましくは、この剤形は、治療する関節の局所注射のための、使い捨ての投与前のプレフィルドシリンジである。よって本発明は、さらに、本発明のペプチドと、任意選択でたとえばヒアルロン酸などの関節内補充療法剤とを含む単位剤形（たとえばプレフィルドシリンジなど）に関する。一実施形態では、この薬学的な単位剤形は、好ましくは濾過により滅菌されている。

【0094】

薬学的な単位剤形におけるペプチドの濃度は、関節の大きさおよびその中の滑液の体積に応じて変動する。これらの因子は、関節の性質、ならびに治療する対象の年齢および種により変動する。

【0095】

一実施形態では、薬学的な単位剤形は、約  $10^{-7}$  M ~ 約  $10^{-3}$  M または約  $10^{-7}$  M ~ 約  $10^{-4}$  M の範囲の最終的な関節内濃度を伴う本ペプチドの投与に適した濃度の本発明のペプチドと、任意選択で関節内補充療法剤（好ましくはヒアルロン酸）と、を含む組成物、医薬組成物または医薬を 2 mL 含む。

【0096】

さらに本発明は、本発明のペプチドを含む第 1 の薬学的な単位剤形と、関節内補充療法剤を含む第 2 の薬学的な単位剤形とを含むキットに関する。

【0097】

一実施形態では、キットの一部の両方の剤形は、使い捨ての投与前のプレフィルドシリンジである。

【0098】

別の実施形態では、キットの一部で、関節内補充療法剤（viscosupplementation agent）を含む薬学的な単位剤形は、使い捨ての投与前のプレフィルドシリンジであり、ここで関節内補充療法剤は、好ましくはオートクレーブにより滅菌され

10

20

30

40

50

ており、本発明のペプチドを含む薬学的な単位剤形はバイアルであり、好ましくは、本ペプチドは、ろ過により滅菌されている。

【0099】

さらに本発明は、その必要がある対象の変形性関節症を治療するための方法であって、上記方法が、本発明のペプチドと、任意選択で関節内補充療法剤（好ましくはヒアルロン酸）とを対象に投与することを含む、方法に関する。好ましくは、本発明のペプチドの治療上有効量を、対象に投与する。

【0100】

実際に、本明細書中記載のペプチドは、関節の軟骨細胞に直接作用する。実施例に示されているように、モルモットから得た *in vivo* でのデータは、関節の厚さおよび軟骨基質の質に関する長期間（5カ月間）の効果的な働きを示している。さらに、ウサギから得た *in vivo* でのデータは、変形性関節症の病変の重症度および大きさの低減に関する短期間の効果的な働きを示している。

【0101】

よって本発明は、さらに、軟骨細胞を分化させ、および/または軟骨細胞を増加させ、および/または軟骨細胞を拡散させ、および/または軟骨基質を産生させるための方法であって、上記方法が、本発明のペプチドと、任意選択で関節内補充療法剤（好ましくはヒアルロン酸）とを投与することを含む、方法に関する。

【0102】

さらに本発明は、対象の軟骨の分解の遅延または予防のための方法であって、上記方法が、本発明のペプチドと、任意選択で関節内補充療法剤（好ましくはヒアルロン酸）とを対象に投与することを含む、方法に関する。一実施形態では、上記対象は、変形性関節症、好ましくはグレード0、1、または2の変形性関節症を罹患している。

【0103】

さらに本発明は、対象の軟骨の厚さを維持または増大させるための方法であって、上記方法が、本発明のペプチドと、任意選択で関節内補充療法剤（好ましくはヒアルロン酸）とを対象に投与することを含む、方法に関する。一実施形態では、上記対象は、変形性関節症、好ましくはグレード0、1、または2の変形性関節症を罹患している。

【0104】

さらに本発明は、対象において、変形性関節症の病変の重症度もしくは大きさを減少させるため、または変形性関節症の病変の重症度もしくは大きさの増大を予防するための方法であって、上記方法が、本発明のペプチドと、任意選択で関節内補充療法剤（好ましくはヒアルロン酸）とを対象に投与することを含む、方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】図1は、ヒアルロン酸対配列番号4に記載の配列を有するペプチド（「ペプチド」）に関して、モルモットで実行した *in vivo* での効率の試験を示したグラフの組み合わせである。（A）このヒストグラムは、関節のいくつかの構造の分解、特に骨棘の存在、基質のプロテオグリカンの分解、滑膜の分解、異常の細胞の存在などを表すスコアの合計を示す。これは、対照およびヒアルロン酸単独の両方と比較して、配列番号4に記載の配列を有するペプチドの存在下で、軟骨構造の分解が有意に減少したことを示している。（B）このヒストグラムは、ヒアルロン酸の存在下、または配列番号4に記載の配列を有するペプチドの存在下の両方で、軟骨の厚さが増大したことを示している。  $p < 0.05$ 。（C）このヒストグラムは、骨棘のスコアの減少を示している。  $p < 0.01$ 。

【図2】図2は、ヒアルロン酸の存在下での配列番号4に記載の配列を有するペプチド（「ペプチド」）の安定化を示すラマンスペクトルである。本明細書中記載のペプチドは、内在性ソマトスタチンまたは当該分野で知られているペプチドと異なっており、安定性が使用する生理的な媒体および疎水性の媒体に応じて変動するヘアピンの分子学的立体構造を呈する。この図面は、配列番号4に記載の配列を有するペプチド単独、ヒアルロン酸

10

20

30

40

50

単独、および配列番号 4 に記載の配列を有するペプチドとヒアルロン酸との混合物に関して得られたラマンデータを例示している。配列番号 4 に記載の配列を有するペプチドは、水中で不安定な構造を有しており、これは、4 つの異なる立体構造の存在を反映しており、このうちの 3 つは定量的に当量である。対して、ヒアルロン酸と共にある配列番号 4 に記載の配列を有するペプチドは、安定した ヘアピン立体構造を有している。この立体構造は、それらの受容体に対する特異的かつ高親和性の結合のために、ソマトスタチン残基を露出させることができる。

【図 3】図 3 は、ヒアルロン酸（「HA」）対 HA と組み合わせた配列番号 4 に記載の配列を有するペプチド（「ペプチド + HA」）に関して、ウサギで実行した *in vivo* での効率の試験を示したグラフである。（A）このヒストグラムは、低いスコアの亜集団（重篤な病変が少ない動物）に関する巨視的な側面についての病変の重症度を表す、全体的な肉眼でのスコアのグレードの合計を例示している。これは、対照およびヒアルロン酸（HA）単独の両方と比較した、HA と組み合わせた配列番号 4 に記載の配列を有するペプチドの存在下でのスコアのグレードの有意な減少を示している。（B）このヒストグラムは、配列番号 4 に記載の配列を有するペプチドの存在下で、全体的な肉眼でのスコアの大きさの合計の減少を示している。\* \* =  $p$  値  $< 0.01$ 。

#### 【実施例】

##### 【0106】

本発明は、さらに以下の実施例により例証されている。

##### 【0107】

実施例 1：本発明のペプチドの *in vivo* での効果

#### 試料の調製

本発明のペプチド（配列番号 4 に対応）を、注射用の水（CDM Lavoisier）に  $2.5 \text{ mg/ml}$  で溶解し、保存溶液として  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。このシリンジを、 $0.9\%$  の NaCl 中  $10^{-7} \text{ M}$ （他の濃度を試験する）で使用する直前に調製したペプチドの標準溶液  $50 \mu\text{l}$  の吸引により、調製し、使用するまで氷上で保存した。

##### 【0108】

#### 動物への IA 注射

この試験を、ヒトの変形性膝関節症（OA）に非常に類似している、自然発症的かつ進行性の膝の変性を年齢と共に罹患している特殊性を有する、雄性的 Duncan-Hartley モルモット（Harlan）で行った。グループあたり 7 匹の月齢 5 ケ月の動物（体重  $879 \text{ g} \pm 58.1$ ）の注射を行った。動物を、施設の動物管理指針にしたがい処置した。動物に、迅速な導入装置を備えた麻酔モジュール（Minerva）で麻酔をかけ（ $4\%$  のイソフルラン）、麻酔を、モルモットの同軸で特定の装置のマスクを使用して維持した（ $2.5\%$  のイソフルラン）。本発明のペプチド、または対照（塩溶液もしくは Hyalgan（登録商標）（分子量  $500 \sim 730 \text{ kDa}$  のヒアルロン酸の  $10 \text{ mg/ml}$  溶液 - Laboratoire Expanscience、市場で入手可能）） $50 \mu\text{l}$  を、動物の各後肢に、側面から関節腔へと  $29 \text{ G}$  の針を使用して注射した。この後に、溶液の関節内分布を促進させるために、膝関節を受動的に動かした。

##### 【0109】

#### 組織解析

注射から 5 か月後に、各動物由来の 2 つの膝関節を、 $10\%$  の緩衝したホルマリンに  $36 \sim 48$  時間固定し、次に、 $70\%$  のエタノールに保存し、次いで、リン酸塩バッファー中  $15\%$  の EDTA で脱灰させた。関節の中心領域のパラフィン切片（ $3 \sim 4 \mu\text{m}$ ）を、軟骨構造の組織解析、すなわち：軟骨基質の喪失、細胞の異常性、関節の軟骨の石灰化前線の外観、骨棘および滑膜の形成の組織解析のため、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した（顕微鏡：Nikon 80i）。半定量的な、改変版の Mankin の組織学的グレードのシステム（Mankin histological grading system）を使用して、OA の重症度を評価した（Kraus et al., The OA RSI histopathology initiative recommendat

10

20

30

40

50

ions for histological assessments of osteoarthritis in the Guinea Pig. Osteoarthritis Cartilage, 2010 (18 S3) S35 - S52)。関節の軟骨領域を、免疫組織化学的検査により定量的に解析した(Pastoureau et al., Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2010 Oct; 18 Suppl 3: S106 - 12)。モルモットの膝の切片を、モノクローナル抗体(モノクローナルの抗ニワトリマウスコラーゲンII、6B3クローン 参照コードMAB887/250, Millipore)で染色した。関節軟骨の総面積の測定を、Color deconvolution H DAB、およびSiox、およびImageJ(“Fit Ellipse” module)による関節の高さの測定を用いて行った。スコア付けおよび定量化の結果の統計的な解析を、PRISMソフトウェアを使用し、Kruskal-Wallisの検定、次いでDunnの検定を使用して行った。

【0110】

結果

次に、すべてが軟骨、骨、および滑膜のレベルでOAの病態を表している、様々な組織形態計測的パラメータを導入する。軟骨の構造上の損傷およびプロテオグリカンの喪失の両方を伴う最も高い重症度は、膝の脛骨内側の表面で明らかであった。

【0111】

結果を、図1に示す。

【0112】

「偽」および「HA」のグループを比較すると、プロテオグリカンおよびタイプIIのコラーゲンの含有量と同様に、軟骨構造のスコアリングに有意差は存在しなかったが、軟骨の厚さは、HAのグループで最も高かった。

【0113】

「偽」および「HA」と「ペプチド」のグループを比較すると、本発明のペプチドを注射した動物で、膝の脛骨内側の表面上での軟骨の構造上の損傷およびプロテオグリカンの喪失、ならびに骨棘のスコアリングの減少の両方で、最も重症度が低いことが見いだされた。最終的に、分解パラメータのスコアリングの合計は、本発明のペプチドを注射した動物の膝関節で最も低い。さらに、本発明のペプチドを投与したモルモットでは、タイプIIのコラーゲンのより多くの合成、および軟骨の厚さの増加を強調する、より長期間の染色が存在している。まとめると、本発明のペプチドを注射した動物は、偽およびHEを注射した動物よりも、最も大きな軟骨の厚さおよび良好な軟骨の質を有している。

【0114】

実施例2：本発明のペプチドの安定性

試料の調製

ペプチド単独を、0.9 mM (2.5 mg/ml)の濃度で、Milliporeのフィルターで処理した水に溶解した。ペプチド+HA溶液は、1% (10 mg/ml)のHA (1.8 MDa)水溶液に0.9 mMで溶解したペプチドからなる。

【0115】

ラマン散乱測定

試料を、suprasilの石英セル(5 mm経路長)に配置し、この試料で約200 mWの出力を有するAr+レーザー(Spectra Physics, CA, USA)の488 nm線により励起させた。直角で散乱した光を、mmあたり1200の溝のホログラフィック回析格子およびホログラフィックノッチフィルターを有する単一のスペクトログラフの構成のJobin-Yvon T64000(HORIBA Jobin-Yvon, France)で解析した。ストークスラマンデータを、液体窒素で冷却したCCD検出システム(Spectrum One, Jobin-Yvon, France)により回収した。効果的なスペクトルのスリット幅は、約5 cm<sup>-1</sup>に設定した。記

録した各スペクトルは、1200秒(s)の総捕捉時間に対応する。観察したラマンスペクトルのバッファ減算および平滑化は、GRAMS/AIパッケージ(Thermoage Galactic, MA, USA)を使用して行うことができた。これらスペクトルの最終的な表示は、SigmaPlotパッケージ(Systat Software Inc., CA, USA)により行った。

【0116】

結果

結果を図2に示す。

【0117】

図2Aは、ペプチドおよびヒアルロン酸(HA)の混合物の水溶液から得たラマンスペクトルを示す。ペプチドのスペクトルは、HAのスペクトルと明らかに異なっている。1669 $\text{cm}^{-1}$ でのマーカーのラマンバンドは、この領域で観察される主要な構成要素であり、ペプチドのH結合した鎖に帰属されている。

10

【0118】

図2A1は、0.9mMのペプチド1%のHAの水溶液で記録したラマンスペクトルのスペクトル領域1646 $\text{cm}^{-1}$ を焦点として示している。本ペプチドの逆平行のシート構造に属しているペプチドの二次構造が観察されている。

【0119】

図2B1は、1686~1645のスペクトル領域で観察された、ペプチド単独のラマンスペクトルの分解を示している。型構造に属しているペプチドのいくつかの(4つの)二次的な立体構造を、バンドの分解により証明することができる：鎖残基は、鎖間の水素結合の存在(約1660 $\text{cm}^{-1}$ でのマーカー)、ならびに逆平行のシート(約1686~1674 $\text{cm}^{-1}$ の周波数間隔において一対、および約1645 $\text{cm}^{-1}$ で1つ)の存在を暗示している。

20

【0120】

図2B2は、リン酸塩バッファ中のソマトスタチンのラマンスペクトルの模式的な結果を示す。固有の構成要素としての1668 $\text{cm}^{-1}$ でのマーカーのラマンバンドの存在は、この領域で観察され、H結合した鎖に帰属されている。

【0121】

よって、水中でペプチド単独のとり立体構造(4つの主要なバンド)とは異なり、ペプチドHAは、典型的なソマトスタチンのシートの立体構造として、単一の二次的立体構造を保持していた。

30

【0122】

実施例3：骨関節軟骨の質および量に及ぼす本発明のペプチドの効果

試料の調製

本発明のペプチド(配列番号4に対応)を、1%(10mg/ml)のヒアルロン酸を含む、0.9%のNaCl溶液に74.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で溶解した。

【0123】

動物へのIA注射

この試験を、雄性のウサギ(New-Zealand)で行った。変形性関節症を、右膝の関節の前十字靱帯の外科的な横切開を介して誘導する(この動物モデルは、ACLTモデルと名付けられており、良好にバリデートされた外傷性変形性関節症のモデルである)。グループあたり10匹の28週齢の動物の注射を行った。ウサギを、ACLTの右膝関節付近で横切開した。ACLTの外科手術から完全に回復させた後(すなわち14日後)、本発明のペプチド/HAの混合物(「ペプチド+HAのグループ」、約 $10^{-5}\text{M}$ の注射後の関節内のペプチド濃度に対応)または生理食塩水(「対照」のグループ)または600kDaの分子量を有する市販のヒアルロン酸(HA600、「HA」のグループ)300 $\mu\text{l}$ を、関節内注射を介して右膝に投与し、1週間間隔で3回繰り返した。ACLTの外科手術から8週間後に、動物を安楽死させた。

40

【0124】

50

### 関節構造の肉眼での評価

肉眼での評価を、関節の4つの区画：内側および外側の大腿骨顆、ならびに内側および外側の脛骨プラトーで行った。各病変を、グレード（重症度、0～4の範囲のスコア）、および大きさ（0～7の範囲のスコア）で評価した。全体的な肉眼でのスコアは、関節のすべての区画におけるすべての病変に関して得たスコアの合計に対応する。このスコアは、大きさ×グレード、または大きさおよびグレードと別々にみなすことができる。4つの区画は、統計解析のために、独立しているとみなされている。

#### 【0125】

##### 結果

各グループの全集団および低い亜集団（重症度の病変が少ない）における全体的な肉眼でのスコア（大きさ×グレード）を解析した。全集団では、ヒアルロン酸と本発明のペプチドの組み合わせの投与は、病変の重症度および病変の大きさの減少をもたらし、対してHA単独は効果を全く示さなかった。

10

#### 【0126】

ウサギの低い亜集団では、「対照」および「HA」のグループにおいて、全体的な肉眼でのスコアのグレードおよび大きさに有意差はなかった。しかしながら、「対照」および「HA」のグループと「ペプチド+HA」を比較すると、HAと組み合わせた本発明のペプチドを注射した動物において、全体的な肉眼でのスコアのグレードの有意な減少が見いだされた（図3A）。さらに、HAと組み合わせた本発明のペプチドを投与したウサギにおいて、一部の動物では0に近い、全体的な肉眼でのスコアの大きさのわずかな減少も見いだされた（図3B）。

20

#### 【0127】

よって、これらの結果は、外傷性変形性関節症モデルにおいて、本発明のペプチドおよびヒアルロン酸の組み合わせの治療上の可能性を例証している。

#### 【0128】

実施例4：軟骨形成に及ぼす本発明のペプチドおよびヒアルロン酸の組み合わせの効果  
材料および方法

正常なヒトの膝由来の関節軟骨細胞（NHAC-kn）を、ウェルあたり $0.22 \times 10^6$ 個の細胞で培養チャンパー（8個のウェル）に播種した。NHAC-kn細胞を、 $10 \mu\text{M}$ の濃度のヒアルロン酸（HA）を伴うまたは伴うことなく、本発明のペプチドの存在下で、ウシ胎児血清（5%）、ゲンタマイシン/アンホテリシンB（0.1%）、ヒト組み換え線維芽細胞増殖因子（0.5%）、R3インスリン様増殖因子1（0.2%）、インスリン（0.2%）、トランスフェリン（0.1%）を含む軟骨細胞増殖培地を使用し、発展させた。培地を2日ごとに交換した。4日間のインキュベーションの後、細胞をホルムアルデヒドで固定し、アルシアンブルーで染色した。

30

#### 【0129】

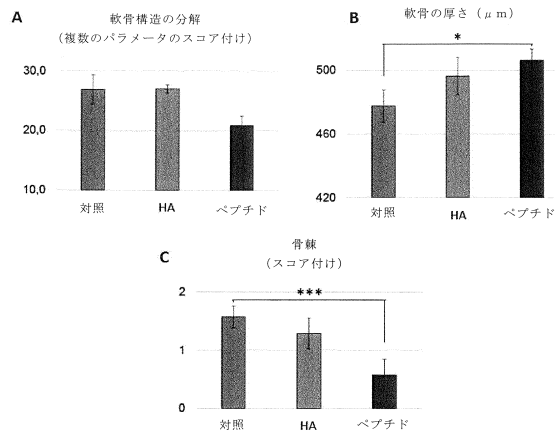
##### 結果

アルシアンブルーでの染色により、軟骨形成の刺激を表す、試験したペプチド単独で処置した細胞に関する細胞クラスターの増加が明らかとなった。ヒアルロン酸の追加は、細胞増殖のわずかな増大を誘導したが、クラスター形成を誘導しなかった。配列番号2に記載のペプチドと組み合わせたヒアルロン酸（HA）の追加は、ペプチド単独と比較してより多くの増殖を、後のクラスター形成に関する効果を伴い誘導した。よって、本ペプチドと組み合わせたヒアルロン酸の追加により、試験したペプチド単独よりも良好な細胞の増殖および長期間の効果が可能となった。

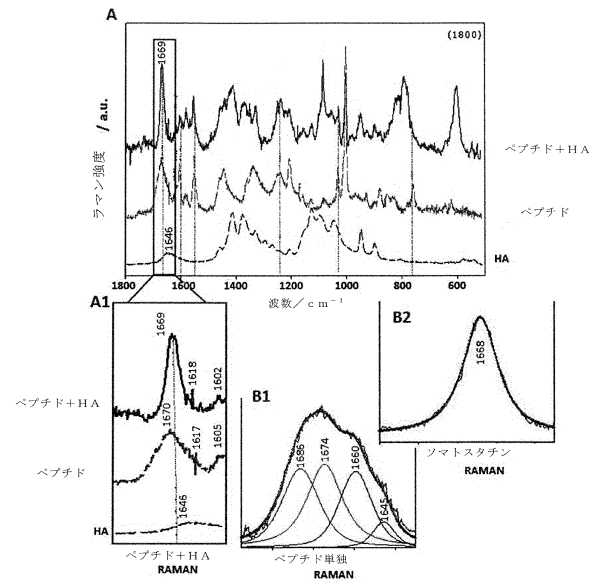
40

【図面】

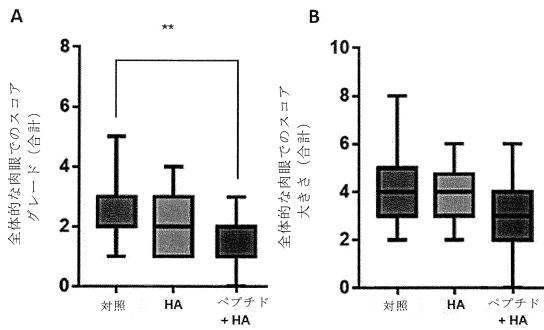
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

0007010934000001.app

10

20

30

40

50



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/728 (2006.01) A 6 1 K 31/728  
A 6 1 K 38/16 (2006.01) A 6 1 K 38/16

## (72)発明者 ベトゥ, クリステル

フランス国, 9 3 1 0 0 モントルイユ, 3 ル イヴ ファルジェ

## (72)発明者 パオリニ, ラファエロ

フランス国, 7 5 0 1 9 パリ, 2 9 アベニュー デ ロミエール

審査官 福山 則明

## (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 2 7 4 0 2 ( U S , A 1 )

国際公開第 2 0 1 0 / 1 0 5 6 8 5 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 0 3 / 0 4 8 2 0 6 ( W O , A 2 )

国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 2 0 7 3 ( W O , A 1 )

特開昭 6 3 - 1 7 9 8 3 2 ( J P , A )

Int J Clin Pharmacol Res, 1994年, Vol. 14, No. 2, pp. 79-85

BONE, 2006年, Vol. 38, pp. 333-341

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )