

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6499967号  
(P6499967)

(45) 発行日 平成31年4月10日 (2019. 4. 10)

(24) 登録日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/775 (2006. 01)

C O 7 K 14/775 Z N A

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 N

A 6 1 K 38/16 (2006. 01)

A 6 1 K 38/16

A 6 1 P 37/06 (2006. 01)

A 6 1 P 37/06

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/09 Z

請求項の数 14 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-540267 (P2015-540267)  
 (86) (22) 出願日 平成25年11月6日 (2013. 11. 6)  
 (65) 公表番号 特表2016-505514 (P2016-505514A)  
 (43) 公表日 平成28年2月25日 (2016. 2. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/059948  
 (87) 国際公開番号 W02014/072916  
 (87) 国際公開日 平成26年5月15日 (2014. 5. 15)  
 審査請求日 平成28年10月31日 (2016. 10. 31)  
 (31) 優先権主張番号 12191474. 1  
 (32) 優先日 平成24年11月6日 (2012. 11. 6)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 515061651  
 レ オピト ユニベルシテル ドゥ ジュ  
 ネーブ  
 LES HOPITAUX UNIVER  
 SITAIRES DE GENEVE  
 スイス国、セーアシュール 205 ジュネ  
 ーブ、リュ ガブリエルペレ ジャンテ  
 ィ 4  
 (73) 特許権者 503083421  
 ユニベルシテ ドゥ ジュネーブ  
 スイス国、1211 ジュネーブ 4、リ  
 ュ デュ ジェネラル デュフル、24

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 模倣ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物被験体の生体液サンプルにおける内因性抗 A p o A - I 抗体を検出する方法であって、

( a ) 哺乳動物被験体由来の生体液サンプルを用意する工程と、  
 ( b ) 前記生体液サンプルを、少なくとも 1 つのアポリポタンパク質 A - I ( A p o A - I ) のエピトープの模倣ペプチドがカップリングされた固体マトリックスと接触させる工程であって、

ここで、前記模倣ペプチドが、配列番号： 9、配列番号： 15、配列番号： 16、配列番号： 17、配列番号： 19、配列番号： 20 であり、

少なくとも 1 つの前記模倣ペプチドの配列が、少なくとも 2 つの非連続アミノ酸間の内部架橋を有する工程と、

( c ) 前記固体マトリックスの表面から未結合の抗体を除去する工程と、そして  
 ( d ) 前記固体マトリックスに結合している抗原 - 抗体複合体の存在を検出する工程とを少なくとも含んでなり、

前記複合体の存在により、前記生体液サンプルが内因性抗 A p o A - I 抗体を含むことが示されることを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記抗原抗体複合体の存在が、前記被験体が心血管疾患を患っていることを示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記抗原抗体複合体の存在が、前記被験体が、急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っていることを示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

心血管疾患用バイオマーカーとして、生体液サンプルにおける抗 A p o A - I 抗体を検出するための模倣ペプチドの使用であって、

当該模倣ペプチドが、配列番号：9、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19、または配列番号：20からなり、かつ少なくとも1つの前記アミノ酸配列が少なくとも2つの非連続アミノ酸間の内部架橋を有し、

さらに、当該模倣ペプチドは、抗 A p o A - I 抗体に特異的に結合することができるものであることを特徴とする、使用。

## 【請求項 5】

前記アミノ酸配列が、配列番号：9である、請求項 4 に記載の使用。

## 【請求項 6】

前記内部架橋が、前記ペプチド配列の n 位および n + 4 位の 2 つのアミノ酸 X a a 間に形成されるラクタム架橋であり、n 位の X a a が、式 ( I ) :  $-NH-C(H)(R)-C(O)-(式中、Rは、n+4位の後続残基に連結するラクタム架橋-(CH_2)_2-CO-NH-(CH_2)_4-である)$  の修飾アミノ酸であり、n + 4 位の X a a が、式 ( I ) :  $-NH-C(H)(R')-C(O)-(式中、R'は、前記n位のX a a からラクタム架橋に連結する単結合である)$  の修飾アミノ酸である、請求項 5 に記載の使用。

## 【請求項 7】

前記内部架橋が、前記ペプチド配列の n 位および n + 7 位の 2 つのアミノ酸 X a a を連結する炭化水素ステープルであり、n 位の X a a が、式 ( I ) :  $-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-(式中、Rは、n+7位の後続X a a に連結する炭化水素ステープル-(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_3-である)$  の修飾アラニンであり、n + 7 位の X a a が、式 ( I ) :  $-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-(式中、R'は、前記n位のX a a から炭化水素ステープルに連結する単結合である)$  の修飾アラニンである、請求項 4 に記載の使用。

## 【請求項 8】

前記内部架橋が、前記ペプチド配列の n 位および n + 4 位の 2 つのアミノ酸 X a a を連結する炭化水素ステープルであり、n 位の X a a が、式 ( I ) :  $-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-(式中、Rは、n+4位の後続X a a に連結する炭化水素ステープル-(CH_2)_3-CH=CH-(CH_2)_3-である)$  の修飾アラニンであり、n + 4 位の X a a が、式 ( I ) :  $-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-(式中、R'は、前記n位のX a a から炭化水素ステープルに連結する単結合である)$  の修飾アラニンである、請求項 4 に記載の使用。

## 【請求項 9】

模倣ペプチドが下記 ( i ) ~ ( i v ) のいずれか 1 つである、請求項 4 に記載の使用 :  
( i ) アミノ酸配列が配列番号：19 からなり、内部架橋が、19 位のグルタミン酸 ( E ) および 23 位のリジン ( K ) を連結するラクタム架橋であり、前記位置が、アミノ酸配列に関するものである ;

( i i ) アミノ酸配列が配列番号：15 からなり、内部架橋が、16 位の ( R ) - 2 - ( 7 ' - オクテニル ) - アラニンおよび 23 位の ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンを連結する炭化水素ステープルであり、前記位置が、アミノ酸配列に関するものである ;

( i i i ) アミノ酸配列が配列番号：16 からなり、内部架橋が、13 位の ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンおよび 17 位の ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンを連結する炭化水素ステープルであり、前記位置が、アミノ酸配列に関するものである ;

10

20

30

40

50

( i v ) アミノ酸配列が配列番号： 17 からなり、内部架橋が、 9 位の ( R ) - 2 - ( 7 ' - オクテニル ) - アラニンおよび 16 位の ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンを連結する炭化水素ステープルであり、前記位置が、アミノ酸配列に関するものである。

【請求項 10】

模倣ペプチドのアミノ酸配列が配列番号： 19 である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 11】

模倣ペプチドの N 末端がアセチル化され、C 末端がアミド化されてなる、請求項 4 ~ 10 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 12】

抗 A p o A - I I g G 自己抗体に関連する疾患の予防または治療に用いるための医薬としての模倣ペプチドの使用であって、当該模倣ペプチドが配列番号 19 からなるものであることを特徴とする、使用。

【請求項 13】

治療有効量の模倣ペプチドを成分として含む、抗 A p o A - I I g G 自己抗体に関連する疾患の予防または治療に用いるための医薬組成物であって、当該模倣ペプチドが配列番号 19 からなるものであることを特徴とする、医薬組成物。

【請求項 14】

心血管疾患用バイオマーカーとして、生体液サンプルにおける抗 A p o A - I 抗体を検出するためのキットであって、配列番号： 9、配列番号： 15、配列番号： 16、配列番号： 17、配列番号： 19、配列番号： 20 の少なくとも 1 つの模倣ペプチドを含んでなる、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、心血管疾患の予後予測、診断または治療に有用なペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

アポリタンパク質 A - I ( A p o A - I ) は、高密度リポタンパク質 ( H D L ) の最も豊富なタンパク質 ( 70 % ) であり、その濃度は、心血管リスクと逆相関することが知られている。HDL 結合 A p o A - I は、逆コレステロール輸送を調節し、それを肝臓に送達することによって、コレステロール恒常性において重要な役割を果たす ( Y a n c e y e t a l , ; 2003 , A r t e r i o s c l e r . T h r o m b . V a s c . B i o l . 23 : 712 - 719 ) 。HDL 結合 A p o A - I はまた、抗炎症特性を有し、抗酸化特性を有する。

【0003】

心血管疾患 ( C V ) を高いリスクで伴う自己免疫症状である全身性エリテマトーデス ( S L E ) を患っている患者において、A p o A - I に対する I g G サブクラスの自己抗体 ( 抗 A p o A - I I g G ) が高レベルであることが報告されている ( D i n u e t a l , 1998 , L u p u s 7 : 355 - 360 ) 。心筋梗塞 ( M I ) の患者 ( V u i l l e u m i e r e t a l , 2010a , E u r . H e a r t J . 31 : 815 - 823 ) 、関節リウマチ ( R A ) を有する患者 ( V u i l l e u m i e r e t a l , 2010b , A r t h r i t i s R h e u m . 62 : 2640 - 2650 ) 、急性胸痛を有する患者 ( K e l l e r e t a l , 2012 , J . I n t e r n . M e d . 271 : 451 - 462 ) および重度の頸動脈狭窄症を有する患者 ( M o n t e c u c c o e t a l , 2011 , E u r . H e a r t J . 32 : 412 - 421 ) を含む他の高 C V リスク集団においても、抗 A p o A - I I g G 自己抗体について報告されている。M I 患者および R A 患者において、抗 A p o A - I I g G 自己抗体は、高 C V リスク集団における C V 疾患のリスク増加に独立して関連することが示されている ( V u i l l e u m i e r e t a l , 2010a a n d b , 上記 ; K e l l e r e t a l ,

10

20

30

40

50

2012, 上記)。また、重度の頸動脈狭窄症を有する患者において、抗ApoA-I IgG自己抗体は、アテローム動脈硬化性プラークの脆弱性の増大に関連していた(Montecucco et al, 2011, Eur. Heart J. 32: 412-421)。最後に、最近の直接比較研究において、抗ApoA-I IgG自己抗体は、MI後のCV予後にとって最良の体液性自己免疫マーカーであり(Vuilleumier, 2011, J. Clin. Exp. Immunol. Cardiol. 2: 69)、RA患者におけるCVリスク層別化のために、追加の予後情報を伝統的な心血管リスク因子に提供する唯一のバイオマーカーである(Finckh et al, 2012, Arthritis Care Res (Hoboken) 64: 817-825)ことが示されている。

10

#### 【0004】

病態生理学的観点から、抗ApoA-I IgG自己抗体は、ApoE欠損マウスに投与した場合にアテローム性動脈硬化の病変サイズおよび脆弱性を増大させることによって、アテローム生成および関連合併症の潜在的なメディエータであることが示されている(Montecucco et al, 2011, 上記)。これらのアテローム生成促進効果は完全には理解されていないが、それらはいくつかの異なるレベルにおいて相乗的に作用するという証拠がある。抗ApoA-I IgG自己抗体は、(i)高密度リポタンパク質のアテローム生成抑制効果を減退させ(Batuca et al, 2009, Rheumatology (Oxford) 48: 26-31)、(ii)Toll様受容体2/CD14複合体を介して無菌性炎症を促進し(Pagano et al, 2012, J. Intern. Med. 1365-2796)、(iii)L型カルシウムチャネルのミネラルコルチコイド受容体の下流活性化を介して催不整脈促進因子(pro-arrhythmogenic factors)として作用し(Rossier et al, 2012, Endocrinology 153: 1269-1278)、(iv)好中球走化性を促進する(Montecucco et al, 2011, 上記)ことが示されている。

20

#### 【0005】

被験体における抗ApoA-I自己抗体の存在を評価することに基づく心血管障害の予後予測/診断方法が開発されている。

#### 【0006】

しかしながら、これらの方法は、一般に、前記抗体と完全長ApoA-Iとの間の免疫学的反応に基づくものである(Dinu et al, 1998, 上記; Vuilleumier et al, 2010a, 上記; Keller et al, 2012, 上記; Montecucco et al, 2011, 上記; Batuca et al, 2009, 上記)。このような診断的イムノアッセイにおいて完全長ApoA-Iを使用することの主な制限は、大量かつ不安定性のタンパク質を生産するコストに関するものであり、これがアッセイの効率を損なう。従来技術の予後予測/診断方法の問題を解決するために、本発明は、より低コストに生産され、より安定であり、心血管疾患を患っている患者由来の抗ApoA-I自己抗体に特異的に結合するペプチドに基づく新規診断的イムノアッセイを提供する。本発明の方法は、高い心血管リスクを有する患者のサブ集団において最初のまたは再発性の心血管事象を防ぎ、患者の特定の要求に適した治療を選択するために、および心血管障害の発症を予防する措置を講ずるために特に有用である。

30

40

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

第一の態様において、本発明は、アポリポタンパク質A-I(ApoA-I)のエピトープの模倣ペプチドであって、当該ペプチドが、

(a) 15~80アミノ酸長のアミノ酸配列を有し、

(b) 下記：

(i) 配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号

50

: 10、配列番号: 11、配列番号: 12、配列番号: 13、配列番号: 14、配列番号: 15、配列番号: 16、配列番号: 17、配列番号: 19、配列番号: 20、配列番号: 22、配列番号: 24; またはそれらの変異体、

(ii) 前記模倣ペプチドの抗 ApoA - I 抗体への特異的結合能が損なわれることなく、前記(i)の配列の1、2、3、4、5または6アミノ酸が置換、欠失、挿入および/または化学修飾されていること以外は、前記(i)の配列のいずれか1つと同一のアミノ酸配列、または

(iii) (i) および/または(ii)のアミノ酸配列の2つの任意の組み合わせのいずれか1つを含むアミノ酸配列を有し、かつ

(c) 前記b)のアミノ酸配列の少なくとも2つの非連続アミノ酸間の内部架橋を有し、さらに、当該模倣ペプチドは、抗 ApoA - I 抗体に特異的に結合することができるものであることを特徴とする、模倣ペプチドに関する。

#### 【0008】

第二の態様において、本発明は、アポリポタンパク質 A - I (ApoA - I) のエピトープの模倣ペプチドであって、当該ペプチドが、

(a) 15 ~ 80 アミノ酸長のアミノ酸配列を有し、

(b) 下記:

(i) 配列番号: 5、配列番号: 21、配列番号: 23; またはそれらの変異体、

(ii) 配列番号: 8、配列番号: 9 もしくは配列番号: 25; またはそれらの変異体

(iii) 前記模倣ペプチドの抗 ApoA - I 抗体への特異的結合能が損なわれることなく、前記(iii)の配列の1、2、3、4、5または6アミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは化学修飾されていること以外は、前記(i)および/または(ii)の配列のいずれか1つと同一のアミノ酸配列、または

(iv) (i)、(ii) および/もしくは(iii)のアミノ酸配列の2つの任意の組み合わせ

のいずれか1つ配列を含むアミノ酸配列を有し、

さらに、当該模倣ペプチドは、抗 ApoA - I 抗体に特異的に結合することができるものであることを特徴とする、模倣ペプチドに関する。

#### 【0009】

本発明の第三の態様は、前記模倣ペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む組換えベクター、前記組換えベクターを含む宿主細胞、前記模倣ペプチドの調製方法であって、培養培地において前記宿主細胞を培養し、該培養培地から、または宿主細胞溶解後の宿主細胞溶解物から前記ペプチドを分離する工程と、場合により、ジスルフィド架橋、ラクタム架橋または炭化水素ステープルを介して、得られたペプチドの2つの非連続アミノ酸残基を架橋する工程とを含む方法に関する。

#### 【0010】

本発明の第四の態様は、少なくとも1つの本発明の模倣ペプチドを含む診断組成物、免疫アッセイ調製物または免疫アッセイプレートに関する。

#### 【0011】

第五の態様において、本発明は、少なくとも1つの本発明の模倣ペプチドを含む医薬組成物を提供する。

#### 【0012】

第六の態様において、本発明は、心血管疾患用バイオマーカーとして、生体液サンプルにおける抗 ApoA - I 抗体を検出するためのキットであって、少なくとも1つの本発明の模倣ペプチドまたはその組み合わせを含むキットに関する。

#### 【0013】

本発明の第七の態様は、哺乳動物被験体の生体液サンプルにおける内因性抗 ApoA - I 抗体を検出する方法であって、

(a) 哺乳動物被験体由来の生体液サンプルを用意する工程と;

(b) 前記生体液サンプルに存在する抗 A p o A - I 抗体が、抗原 - 抗体相互作用により、少なくとも 1 つの前記模倣ペプチドに結合するのに十分な条件下において、前記生体液サンプルを、少なくとも 1 つの本発明の模倣ペプチドがカップリングされた固体マトリックスと接触させる工程と；

(c) 前記固体マトリックスの表面から未結合の抗体を除去する工程と；

(d) 前記固体マトリックスに結合している抗原 - 抗体複合体の存在を検出する工程とを少なくとも含み、

前記複合体の存在により、前記生体液サンプルが内因性抗 A p o A - I 抗体を含むことが示される方法に関する。

#### 【 0 0 1 4 】

10

第八の態様は、哺乳動物被験体の生体液サンプルから心血管疾患またはリスクプロファイルを検出する方法であって、

(a) 哺乳動物被験体由来の生体液サンプルを用意する工程と；

(b) 前記生体液サンプルに存在する抗 A p o A - I 抗体が、抗原 - 抗体相互作用により、少なくとも 1 つの前記模倣ペプチドに結合するのに十分な条件下において、前記生体液サンプルを、少なくとも 1 つの本発明の模倣ペプチドがカップリングされた固体マトリックスと接触させる工程と；

(c) 前記固体マトリックスの表面から未結合の抗体を除去する工程と；

(d) 前記固体マトリックスに結合している抗原 - 抗体複合体の存在を検出する工程とを少なくとも含み、

20

前記複合体の存在により、前記生体液サンプルが 1 つ以上の心血管疾患に関連する抗 A p o A - I 自己抗体を含むことが示される方法に関する。

#### 【 0 0 1 5 】

第九の態様は、それを必要とする被験体における心血管疾患を予防および／または治療する方法であって、前記模倣ペプチド、その医薬製剤、または前記模倣ペプチドの三次元構造類似体を前記被験体に投与することを少なくとも含むことを特徴とする方法に関する。

#### 【 0 0 1 6 】

第十の態様は、急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っている被験体における心血管疾患を予防および／または治療する方法であって、

30

(a) 本発明の方法によって、哺乳動物被験体の生体液サンプルにおける内因性抗 A p o A - I 抗体を検出する工程と；

(b) (i) 本発明の模倣ペプチドまたはその医薬製剤、(ii) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の模倣ペプチドの三次元構造類似体、(iii) A p o A - I を含む医薬組成物、ならびに(iv) 心血管疾患の予防および／または治療に適切な薬剤から選択される少なくとも 1 つの薬剤を投与する工程と

を少なくとも含むことを特徴とする方法に関する。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかであろう。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【 0 0 1 8 】

【図 1 A B】溶液中の本発明のペプチド内にジスルフィド架橋を形成するための化学反応 (A)、F m o c ベースの固相ペプチド合成を使用して本発明のペプチド内に炭化水素ステープルを形成するための化学反応 (B)。「D M S O」はジメチルスルホキシドである。大カッコの隣の m、k および l は、ペプチド配列におけるアミノ酸の位置を指す。

【図 1 C】固相上の本発明のペプチド内にラクタム架橋を形成するための化学反応 (C)。「P y B O P」はベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェートであり、「D I E A」は N, N - ジイソプロピルエチルアミンであり、「アロック基」はアリルオキシカルボニル基であり、「アリル基」は構造式 H

50

$_2 \text{C} = \text{CH} - \text{CH}_2 -$  を有する。

【図2】本発明のペプチド内の内部架橋の例の展開化学式 (developed chemical formula) : ジスルフィド架橋 (A)、炭化水素ステーブル (B)、ラクタム架橋 (C)。(A)において、kは3または6であり、Rは任意のアミノ酸側鎖である；(B)において、n位およびn+4位の残基間の架橋については、kは3であり、nは1であり、\*は(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンであり；n位およびn+7位の残基間の架橋については、kは6であり、nは4であり、\*は(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンであり；Rは任意のアミノ酸側鎖である；(C)において、Xが-CO-NH-である場合、nは2であり、pは4であり、kは3であり；Xが-NH-CO-である場合、nは4であり、pは2であり、kは3であり；Rは任意のアミノ酸側鎖である；大カッコの隣のm、kおよびlは、ペプチド配列におけるアミノ酸の位置を指す。

10

【図3AB】模倣ペプチドF3L1およびF3S2A (F3S2A = F3S2) (A)、F3S1BおよびF4S2B (B)、F3L1およびF4L1 (C)のCD分光法は、-ヘリックス含量が非ステーブル対照F3ペプチドと比較して増加していることを示す。

【図3C】図3ABと同様。

【図4】競合ELISAは、模倣ペプチドF3L1が、抗ApoA-I抗体に対する結合について、インタクトなApoA-Iと有効に競合することを示す。抗ApoA-I抗体について陽性であることが公知の患者由来の血清を、図に示されている濃度の模倣ペプチドF3L1と共にプレインキュベートし、次いで、インタクトなApoA-IによってコーティングしたELISAプレートに加え、続いて、標準的なプロトコールにしたがってアッセイ工程を行った(A)。競合としてApoA-Iを用いて行った競合ELISAアッセイの比較結果(B)。

20

【図5A】競合ELISAは、模倣ペプチドF3L1が、抗ApoA-I抗体に対する結合について、インタクトなApoA-Iと有効に競合することを示す。抗ApoA-I抗体について陽性(+)であることが公知の3人の患者由来の血清を、図に示されている濃度の模倣ペプチドF3L1 (A)、F3 (B)またはスクランブルF3 (C)と共にプレインキュベートし、次いで、インタクトなApoA-IによってコーティングしたELISAプレートに加え、続いて、標準的なプロトコールにしたがってアッセイ工程を行った。対照は、抗ApoA-I抗体について陰性(-)であることが公知の3人の患者由来の血清である。

30

【図5B】図5Aと同様。

【図5C】図5Aと同様。

【図6A】模倣ペプチドF3L1は、抗ApoA-I IgG関連の炎症促進性応答を阻害する。抗ApoA-I IgG (A)によって、または抗ApoA-I抗体について陽性である患者由来のIgGのプール(B)によって誘導されるマクロファージによるTNF- $\alpha$ 産生に対する効果。

【図6B】図6Aと同様。

【図7】模倣ペプチドF3L1は、抗ApoA-I IgG関連の変時応答を阻害する。

【図8】リジン(K)残基における消化を使用したApoA-Iエピトープの同定。各収集画分中に存在するペプチドに対する、陽性(A)および陰性(B)患者血清由来の自己抗体の免疫反応性。

40

【図9】アルギニン(R)残基における消化を使用したApoA-Iエピトープの同定。各収集画分中に存在するペプチドに対する、陽性(A)および陰性(B)患者血清由来の自己抗体の免疫反応性。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書において「ApoA-I」および「ApoA-1」とも称される「アポリポタンパク質A-1」は、ヒトにおいてはAPOA1遺伝子によってコードされるタンパク質である。ヒトにおいて、ApoA-Iは、28kDaのタンパク質である(Unipro

50

t登録番号P02647)。成熟ヒトAPO-A1は、243アミノ酸を含む(配列番号:1)。ApoA-Iタンパク質は、脂質代謝において特定の役割を有する。アポリポタンパク質A-Iは、血漿中の高密度リポタンパク質(HDL)の主なタンパク質成分である。このタンパク質は、排泄のため組織から肝臓へのコレステロール流出を促進する。それは、ほとんどの血漿コレステリルエステルの形成に関与するレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)の補因子である。ApoA-Iはまた、プロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)安定化因子として単離されたため、抗凝固効果を有し得る。それをコードする遺伝子の欠陥は、タンジール病を含むHDL欠乏症および全身性非神経障害性アミロイドーシスに関連する。ApoA-Iは、少なくとも2つの極めて異なるコンホメーション(脂質非結合型コンホメーションおよび脂質結合型コンホメーション)間を切り替わることができる立体構造的に柔軟で動的なタンパク質である。インタクトな脂質非結合型アポリポタンパク質A-1の構造研究は、以下のように6つのヘリックスが存在することを示す:配列番号:1の10位のアルギニンから39位のグリシンまでのヘリックスA;配列番号:1の48位のアスパラギンから84位のグルタミンまでのヘリックスB;配列番号:1の94位のリジンから136位のグルタミン酸までのヘリックスC;配列番号:1の146位のグルタミン酸から187位のアラニンまでのヘリックスD;配列番号:1の196位のアラニンから212位のグルタミン酸までのヘリックスE;配列番号:1の220位のプロリンから243位のグルタミンまでのヘリックスF。

#### 【0020】

本明細書において使用される「エピトープの模倣ペプチド」(「ミモトープ」とも称される)という用語は、標的タンパク質のエピトープを模倣するペプチドを指す。前記模倣ペプチドは、ネイティブなエピトープに対する特異的な抗体によって認識され得る標的タンパク質のネイティブなエピトープに十分に類似し(したがって、抗原特性を有する)、おそらくは、ネイティブなエピトープに対して特異的な免疫反応も誘導する(したがって、免疫特性を有する)。より具体的には、「ApoA-Iのエピトープの模倣ペプチド」という用語は、アポリポタンパク質A-Iの抗原決定基を模倣するペプチドであって、したがって、アポリポタンパク質A-Iに特異的に結合する抗体(ApoA-I抗体とも称される)によって認識されるペプチドを指す。

#### 【0021】

本明細書において「エピトープ」または「抗原決定基」とも称される「エピトープ」という用語は、免疫系によって、具体的には抗体、B細胞またはT細胞によって認識される抗原の一部である。

#### 【0022】

「抗原性」はエピトープの抗原特性を指し、分泌された抗体および/またはT細胞上の表面受容体などの免疫反応の最終産物にエピトープが結合する能力に対応する。「免疫原性」はエピトープの免疫原特性を指し、体液性免疫反応および/または細胞性免疫反応を誘導するエピトープの能力に対応する。免疫原特性を有するすべてのエピトープは抗原特性も有するが、その逆は真ではない。

#### 【0023】

アミノ酸配列に適用される「2つの非連続アミノ酸」という表現は、本明細書において、前記アミノ酸配列を有するペプチドの一次構造において連続的ではない(すなわち、互いに隣接していない)2つのアミノ酸を表す。

#### 【0024】

本明細書において使用される「ApoA-I抗体」または「抗ApoA-I抗体」という用語は、ApoA-Iタンパク質、例えば脂質非結合型ApoA-Iまたはその断片に選択的に結合することができる抗体断片、ドメイン抗体または一本鎖抗体を含む任意の抗体またはその変異体形態を指すが、これらに限定されない。特に、ApoA-I抗体としては、哺乳動物(特に、ヒト)ApoA-I(特に、配列番号:1のアミノ酸配列のApoA-I)のエピトープ、または特に配列番号:2~配列番号:9もしくは配列番号:23のアミノ酸配列のいずれか1つからなる領域内に局在する任意のエピトープに結合する

10

20

30

40

50

ことができる A p o A - I 抗体が挙げられる。A p o A - I 抗体としては、A p o A - I タンパク質またはその断片などに対するマウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体もしくは完全ヒト抗体、遺伝子操作抗体または二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体およびそれらの断片、例えば一本鎖抗体 ( s c F v ) またはドメイン抗体が挙げられる。抗 A p o A - I 抗体は、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、または実質的に同じ抗原特異性を有するそれらの断片もしくは誘導体であり得る。特に、抗 A p o A - I 抗体は、高い心血管リスクを有する患者、特に、急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っているものなどの患者集団において産生される自己抗体 ( 内因性抗体とも称される ) であり得る。「選択的に」という用語は、抗体が、すなわち任意の他の抗原またはエピトープに対するよりも高い親和性によって、標的ポリペプチドもしくはエピトープを優先的に認識し、および / または標的ポリペプチドもしくはエピトープに優先的に結合することを示す ( すなわち、標的ポリペプチドに対する結合は、他の抗原に対する非特異的結合と区別され得る ) 。当業者であれば、例えば、スキャッチャード分析 ( S c a t c h a r d e t a l . , 1 9 4 9 , A n n . N . Y . A c a d . 1 9 4 9 . 5 1 , 6 6 0 - 6 7 2 ) によって抗体の結合親和性を容易に決定し得る。

10

【 0 0 2 5 】

「薬学的に許容され得る」という用語は、生物学的にまたは他の点で望ましくないものではない物質から構成される担体を指す。

【 0 0 2 6 】

20

「担体」という用語は、医薬製剤中に存在する活性剤以外の任意の成分を指し、したがって、希釈剤、結合剤、潤滑剤、崩壊剤、充填剤、着色剤、湿潤剤または乳化剤、pH 緩衝剤、保存剤などが挙げられる。

【 0 0 2 7 】

本明細書において使用される「治療 ( t r e a t m e n t ) 」および「治療する ( t r e a t i n g ) 」などは、一般に、所望の薬理学的および生理学的な効果を得ることを意味する。効果は、疾患、その症候もしくは症状を予防もしくは部分的に予防する点から予防的なものでもよいし、および / または疾患、症状もしくは症候もしくは該疾患に起因する有害効果の部分的もしくは完全な治癒の点から治療的なものでもよい。本明細書において使用される「治療」という用語は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、( a ) 疾患にかかりやすい可能性があるが、例えば家族歴に基づいてそれを有するとまだ診断されていない被験体において疾患が発症するのを予防すること ; ( b ) 疾患を阻害すること、すなわち、その進行を停止すること ; または疾患を緩和すること、すなわち、疾患および / またはその症候もしくは症状の退縮を引き起こすこと、例えば、損傷の改善または修復を含む。

30

【 0 0 2 8 】

特に、心血管疾患の治療は、例えば、一般集団 ( 一次予防 ) における、またはこのような事象を既に患っていた患者 ( 二次予防 ) における心筋梗塞脳卒中または末梢動脈疾患の有病率および罹患率を低下させることによって、疾患または障害の症候を予防、低減またはさらには根絶することを含む。

40

【 0 0 2 9 】

「心血管疾患」という用語は、本明細書において、心臓または血管に影響を与える疾患または障害と定義される。心血管疾患または心血管障害の非限定的な例としては、主に、動脈硬化症の急性徴候および慢性徴候、例えば急性冠症候群、脳卒中、一過性脳虚血発作、不整脈、心不全および末梢動脈疾患が挙げられる。

【 0 0 3 0 】

「心血管疾患リスク」または「心血管リスク」という用語は、本明細書において、主なアテローム性動脈硬化症をまだ発症していない被験体に関する心血管疾患を発症する確率と定義される。この確率は、典型的には、フラミンガムリスクスコアなどのリスクスコア表としても公知の様々な伝統的な心血管リスク因子、例えば性別、年齢、家族歴、喫煙、

50

糖尿病、高血圧（高血圧症）、高コレステロール（脂質異常症）、肥満、運動不足および不健康な食事の観察に基づいて評価される（D'Agostino et al, 2008, Circulation 117:743-53）。10年グローバルフラミンガムリスクスコアに基づいて、心血管疾患を発症する10年リスクが10%超である場合に、被験体は、「高い心血管リスク」を有する資格がある（D'Agostino, et al, 2008, Circulation 117:743-53）。

【0031】

本明細書において使用される「被験体」という用語は、哺乳動物を指す。例えば、本発明によって意図される哺乳動物としては、ヒト、霊長類、家畜、例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、実験用齧歯類などが挙げられる。

10

【0032】

「生体液サンプル」という表現は、哺乳動物由来の体液、例えば唾液、血液および尿から採取された試験用の臨床液体サンプルを指す。例えば、生体液サンプルは、ヒト被験体由来の血清サンプルである。

【0033】

「対照サンプル」という表現は、陽性対照サンプルまたは陰性対照サンプルを指す。陰性対照サンプルとしては、ApoA-I自己抗体についてアッセイすべき被験体と同種または同族種の被験体であって、正常な生物学的状態を有する（例えば、ApoA-Iに対する検出可能な自己抗体を有しないか、またはApoA-Iと免疫反応性のある抗体を含有しない溶液を有する）ことが公知の被験体から採取された体液サンプルが挙げられる。陽性対照サンプルとしては、自己抗体についてアッセイすべき被験体と同種または同族種の被験体であって、ApoA-Iに対する検出可能な自己抗体を有するか、またはApoA-Iと免疫反応性のある抗体を含有する溶液を有することが公知の被験体から採取された体液サンプルが挙げられる。

20

【0034】

本明細書において言及されるペプチドまたはポリペプチドに適用される「変異体」という用語は、ペプチドまたはポリペプチドが参照ペプチド配列と実質的に相同であるが、1つ以上のアミノ酸欠失、挿入および/または置換のために参照配列のものと異なるアミノ酸配列を有することを意味する。実質的に相同とは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのアミノ酸残基の欠失、挿入および/または置換を除いて参照ペプチド配列と同一の変異アミノ酸配列を意味する。2つのアミノ酸配列の同一性は、目視検査および/もしくは数学的計算によって、またはより容易には、配列比較に使用される公知のコンピュータプログラム、例えばClustal packageバージョン1.83を使用して配列情報を比較することによって決定され得る。変異体は、少なくとも1つの保存的に置換されたアミノ酸（これは、所定のアミノ酸残基が、類似の物理化学的特徴を有する残基によって置換されていることを意味する）を有する配列を含み得る。一般に、元のポリペプチド中に存在する1つ以上のアミノ酸の置換は、保存的になされるべきである。保存的置換の例としては、ある脂肪族残基の別のものによる置換、例えばIle、Val、LeuもしくはAlaの別のものによる置換、またはある極性残基の別のものによる置換、例えばLysおよびArg間の置換；GluおよびAsp間の置換；もしくはGlnおよびAsn間の置換が挙げられる。他のこのような保存的置換、例えば類似の疎水性特性を有する領域全体の置換が周知である（Kyte, et al, 1982, J. Mol. Biol., 157:105-132）。例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置におけるアミノ酸残基の極性または電荷に対する影響がほとんどないかまたは全くないように、非ネイティブな残基によってネイティブなアミノ酸残基を置換することを含み得る。当業者であれば、このような置換が望まれる場合に、所望のアミノ酸置換（保存的または非保存的にかかわらず）を決定し得る。例示的なアミノ酸置換を以下の第1表に示す。「変異体」という用語はまた、参照ペプチド配列と実質的に相同であるが、1つ以上のアミノ酸が化学修飾されているかまたはアミノ酸類似体によって置換されているために、参照配列のものと異なるアミノ酸配列を有するペプチドまたはポリペプチドを含む。例えば、1、

30

40

50

2、3、4、5または6アミノ酸が化学修飾されている。1つ以上のアミノ酸残基の化学修飾は、炭化水素ステープルを確立するための修飾、例えば配列の任意の残基を(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンまたは(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンに化学修飾することを含む。したがって、本明細書において定義される変異体はまた、炭化水素ステープルを確立するために、配列の1つ以上のアミノ酸残基が(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンまたは(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンによって置換された参照ペプチド配列を含む。

【0035】

【表1】

第1表

元の残基	置換の例
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser, Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys
Trp (W)	Phe, Tyr
Thr (T)	Ser
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン

【0036】

変異体はまた、 $\alpha$ -ヘリックス構造を安定化するための $\alpha$ -ジアルキル化残基、例えば2-アミノイソ酪酸を含有する本発明の模倣ペプチドを包含する。 $\alpha$ -ジアルキル化残基を付加するための好ましい位置は、固有の区別可能なヘリックス形成傾向を有しない残基、例えばプロリン、グリシンまたはバリンの位置に関し、後者は、シート構造を安定化する固有の傾向を有する。本明細書において記載される炭化水素ステープルを形成するのに使用され得る(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンおよび(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンはまた、この化合物ファミリーに属する。前記ペプチドに関する任意の治療用途がある場合、このような残基はまた、ペプチドのタンパク質分解

10

20

30

40

50

的切断を受けやすい位置に組み込まれ得る。 、 - ジアルキル化残基が A p o A - I アミノ酸配列に付加され得る位置の例としては、F ヘリックス領域内の位置、例えば 2 2 9 位のプロリン、2 2 0 位のバリン、2 2 1 位のフェニルアラニン、2 2 5 位のリジン、2 2 6 位のバリンまたは 2 2 8 位のフェニルアラニンが挙げられ、前記位置は、配列番号：1 の成熟 A p o A - I アミノ酸配列に関するものである。

#### 【0037】

「固体マトリックス」という用語は、本発明のイムノアッセイまたは方法を実施するのに適切な任意の固相支持体を含む。固体マトリックスとしては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ニトロセルロース、石英、セラミック、デキストランまたは他の物質から形成されたかまたはこれらによってコーティングされたビーズ、マイクロ粒子、ナノ粒子、チューブ、繊維またはプレート、フィルム、スライド、ウェルが挙げられる。例えば、固体マトリックスは、9 6 ウェルマイクロタイタープレートなどのマイクロタイターウェルの形態である。

10

#### 【0038】

「キット」という用語は、固体マトリックスにカップリングされるかまたは固体マトリックスに既にカップリングされた本明細書において記載される少なくとも 1 つの本発明の模倣ペプチドまたはその変異体またはそれらの組み合わせと、場合により取扱説明材料とを含む。

#### 【0039】

本発明の治療または方法の「有効性」という用語は、本発明の使用または方法に応じて、疾患または症状の経過の変化に基づいて測定され得る。例えば、本発明の治療または方法の有効性は、i) 様々な関連する臨床エンドポイント（例えば：全死亡率、心血管関連の死亡率、急性冠症候群または脳卒中の再発、入院 . . . ）および / または ii) 代理マーカーに対するその影響、例えば様々な動物またはインビトロ系における治療化合物の影響によって測定され得る。

20

#### 【0040】

本明細書において使用される「有効量」という用語は、前記模倣ペプチドが投与される被験体における心血管疾患の症候の検出可能な軽減を誘発する少なくとも 1 つの本発明の模倣ペプチドまたはその医薬製剤の量を指し、これらの症候としては、全死亡率、心血管関連の死亡率、急性冠症候群または脳卒中の再発、C V 関連の入院が挙げられ得る。

30

#### 【0041】

#### A p o A - I のエピトープの模倣ペプチド

本発明の一つの態様は、脂質非結合型アポリボタンパク質 A - 1 コンホメーションのエピトープを模倣するペプチドであって、心血管疾患または心血管障害を患っている患者由来の抗 A p o A - I 自己抗体に特異的に結合することができるペプチドに関する。

#### 【0042】

第一の態様において、模倣ペプチドは、内部架橋を有する。

#### 【0043】

一つの態様において、本発明は、A p o A - I のエピトープの模倣ペプチドであって、当該ペプチドが、

40

( a ) 1 5 ~ 8 0 アミノ酸長のアミノ酸配列を有し、

( b ) 下記：

( i ) 配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：2 1、配列番号：2 3、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：2 5、配列番号：1 0、配列番号：1 1、配列番号：1 2、配列番号：1 3、配列番号：1 4、配列番号：1 5、配列番号：1 6、配列番号：1 7、配列番号：1 9、配列番号：2 0、配列番号：2 2、配列番号：2 4；またはそれらの変異体、

( i i ) 前記模倣ペプチドの抗 A p o A - I 抗体への特異的結合能が損なわれることなく、前記 ( i ) の配列の 1、2、3、4、5 または 6 アミノ酸が置換、欠失、挿入および / または化学修飾されていること以外は、前記 ( i ) の配列のいずれか 1 つと同一のアミ

50

ノ酸配列、または

( i i i ) ( i ) および / または ( i i ) のアミノ酸配列の 2 つの任意の組み合わせのいずれか 1 つの配列を含むアミノ酸配列を有し、かつ

( c ) 前記 b ) のアミノ酸配列の少なくとも 2 つの非連続アミノ酸間の内部架橋を有し、

さらに、当該ペプチドは、抗 A p o A - I 抗体に特異的に結合することができるものであることを特徴とする模倣ペプチドに関する。

【 0 0 4 4 】

一つの態様において、上記模倣ペプチドは、20 ~ 55、特に 25 ~ 55、より具体的には 25 ~ 40 アミノ酸長を有する。

【 0 0 4 5 】

別の態様において、上記模倣ペプチドは、20 ~ 40 ; 21 ~ 40 ; 22 ~ 40 ; 23 ~ 40 ; 24 ~ 40 ; 25 ~ 40 ; 26 ~ 40 ; 27 ~ 40 ; 28 ~ 40 ; または 30 ~ 40 アミノ酸長を有する。

【 0 0 4 6 】

別の態様において、上記模倣ペプチドは、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、50、55、60、65、70、75 または 80 アミノ酸長を有する。特に、本発明の模倣ペプチドは、17、18、22、26、28、32、37、38、39、40、42、44 または 55 アミノ酸を有する。

【 0 0 4 7 】

一つの態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、( i ) 配列番号 : 2、配列番号 : 3、配列番号 : 4、配列番号 : 5、配列番号 : 21、配列番号 : 23、配列番号 : 6、配列番号 : 7、配列番号 : 8 および配列番号 : 9 もしくはそれらの変異体のいずれか 1 つ、または ( i i ) 配列番号 : 2、配列番号 : 3、配列番号 : 4、配列番号 : 5、配列番号 : 21、配列番号 : 23、配列番号 : 6、配列番号 : 7、配列番号 : 8 および配列番号 : 9 もしくはそれらの変異体から選択される 2 つの配列の組み合わせを含む。

【 0 0 4 8 】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、( i ) 配列番号 : 10、配列番号 : 11、配列番号 : 12、配列番号 : 13、配列番号 : 14、配列番号 : 15、配列番号 : 16、配列番号 : 17、配列番号 : 19、配列番号 : 20、配列番号 : 22、配列番号 : 24 および配列番号 : 18 もしくはそれらの変異体のいずれか 1 つ、または ( i i ) 配列番号 : 10、配列番号 : 11、配列番号 : 12、配列番号 : 13、配列番号 : 14、配列番号 : 15、配列番号 : 16、配列番号 : 17、配列番号 : 19、配列番号 : 20、配列番号 : 22、配列番号 : 24 ; もしくはそれらの変異体から選択される 2 つの配列の組み合わせを含む。

【 0 0 4 9 】

一つの態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、( i ) 配列番号 : 2、配列番号 : 3、配列番号 : 4、配列番号 : 5、配列番号 : 21、配列番号 : 23、配列番号 : 6、配列番号 : 7、配列番号 : 8 および配列番号 : 9 もしくはそれらの変異体のいずれか 1 つ、または ( i i ) 配列番号 : 2、配列番号 : 3、配列番号 : 4、配列番号 : 5、配列番号 : 21、配列番号 : 23、配列番号 : 6、配列番号 : 7、配列番号 : 8 および配列番号 : 9 もしくはそれらの変異体から選択される 2 つの配列の組み合わせからなる。

【 0 0 5 0 】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、( i ) 配列番号 : 10、配列番号 : 11、配列番号 : 12、配列番号 : 13、配列番号 : 14、配列番号 : 15、配列番号 : 16、配列番号 : 17、配列番号 : 19、配列番号 : 20、配列番号 : 22、配列番号 : 24 および配列番号 : 18 もしくはそれらの変異体のいずれか 1 つ、または ( i i ) 配列番号 : 10、配列番号 : 11、配列番号 : 12、配列番号 : 13、配列番号 : 14、配列番号 : 15、配列番号 : 16、配列番号 : 17、配列番号 : 19、配列番号 :

10

20

30

40

50

20、配列番号：22および配列番号：24；もしくはそれらの変異体から選択される2つの配列の組み合わせからなる。

【0051】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：8もしくは配列番号：9；またはそれらの変異体のいずれか1つを含む。

【0052】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：25；またはその変異体を含む。

【0053】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：8もしくは配列番号：9；またはそれらの変異体のいずれか1つからなる。

10

【0054】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：25；またはその変異体からなる。

【0055】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：5；またはその変異体を含む。

【0056】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：5のC末端部における最後の2つのアミノ酸EおよびNが欠失した配列番号：5を含む。

20

【0057】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：21；またはその変異体を含む。

【0058】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：5；またはその変異体からなる。

【0059】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：5のC末端部における最後の2つのアミノ酸EおよびNが欠失した配列番号：5からなる。

【0060】

30

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：21；またはその変異体からなる。

【0061】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：23を含むかもしくは配列番号：23からなるか、または1、2、3、4、5または6アミノ酸、特に5アミノ酸が付加された配列番号：23からなる。

【0062】

また他の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：20；またはそれらの変異体のいずれか1つを含む。

40

【0063】

また他の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：19；またはその変異体を含む。

【0064】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：20；またはそれらの変異体いずれか1つからなる。

【0065】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：19；またはその変異体からなる。

50

## 【 0 0 6 6 】

また他の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号： 1 3、配列番号： 2 2もしくは配列番号： 2 4またはそれらの変異体を含む。

## 【 0 0 6 7 】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号： 1 3、配列番号： 2 2もしくは配列番号： 2 4またはそれらの変異体のいずれか 1 つからなる。

## 【 0 0 6 8 】

また他の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号： 1 3を含むか、または配列番号： 1 3からなる。

## 【 0 0 6 9 】

特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号： 1 8またはその変異体を含む。

## 【 0 0 7 0 】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号： 1 8またはその変異体からなる。

## 【 0 0 7 1 】

別の態様において、本発明のペプチドは、前記模倣ペプチドの抗 A p o A - I 抗体への特異的結合能が損なわれることなく、前記アミノ酸配列の 1、2、3、4、5または6アミノ酸が置換、欠失および/または挿入されていること以外は前記アミノ酸配列を有する。

## 【 0 0 7 2 】

本発明の特定の態様において、前記配列の 1、2、3、4、5または6アミノ酸は、内部架橋を設けるのに適切なアミノ酸残基、例えばラクタム架橋を設けるためのグルタミン酸 ( E ) 残基および/もしくはリジン ( K ) 残基、または例えばジスルフィド架橋を設けるためのシステイン ( C ) 残基によって置換される。

## 【 0 0 7 3 】

場合により、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列に含まれる 2、4または6アミノ酸は、前記模倣ペプチドの抗 A p o A - I 抗体への特異的結合能が損なわれることなく、内部架橋を設けるために化学修飾される。例えば、特定の態様において、本発明のペプチドのアミノ酸配列に含まれる少なくとも 2 つ、例えば 2 つまたは 4 つのアミノ酸残基、例えばフェニルアラニン ( F )、ロイシン ( L )、メチオニン ( M )、バリン ( V )、リジン ( K ) およびチロシン ( Y ) をアラニン残基に置換し、前記アラニン残基を ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンまたは ( R ) - 2 - ( 7 ' - オクテニル ) - アラニンに化学修飾して、2つの化学修飾アラニン残基間に炭化水素ステープルを設ける。

## 【 0 0 7 4 】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドの N 末端および/または C 末端は、それぞれ遊離アミノ末端および/または遊離カルボキシ末端に存在し得る電荷が除去されるようにさらに修飾される。特定の態様において、前記ペプチドの N 末端の遊離アミノ基は、アシル基 (例えば、アセチル、プロピオニル、パルミトイルなど) に共有結合される。別の態様において、前記ペプチドの C 末端の遊離カルボキシ基は、アミド化される。さらなる態様において、模倣ペプチドの N 末端および C 末端は両方とも修飾され、特に、前記ペプチドの N 末端の遊離アミノ基は、アシル基 (例えば、アセチル、プロピオニル、パルミトイルなど) に共有結合され、前記ペプチドの C 末端の遊離カルボキシ基は、アミド化される。

## 【 0 0 7 5 】

本発明のさらなる態様において、上記模倣ペプチドのアミノ酸配列内に含まれる 2 つの非連続アミノ酸間の内部架橋は、ラクタム架橋、炭化水素ステープル、ジスルフィド架橋などの共有結合、または前記 2 つの非連続アミノ酸残基間の任意の他の強固なリンカー、例えば主鎖水素結合代替安定化によって作製されたもの ( Chapman et al , J Am Chem Soc , 2004 , 126 : 12252 - 12253 ) もしくは図

10

20

30

40

50

1 および 2 に示されているものを介して行われる。

【 0 0 7 6 】

本発明の一つの態様において、架橋されたペプチドのアミノ酸残基は、 $n$  位と、 $n + 3$  位、 $n + 4$  位、 $n + 5$  位、 $n + 6$  位、 $n + 7$  位、 $n + 8$  位、 $n + 9$  位、 $n + 10$  位、 $n + 11$  位の各位置とにある。前記位置は、ペプチドの一次アミノ酸配列（すなわち、ペプチドの一次構造におけるアミノ酸残基の各位置）を指し、「 $n$ 」は、アミノ酸残基のうちの 1 つの位置を示し、「 $n + 3$ 」は、他のアミノ酸残基が、当該ペプチドのアミノ酸配列の  $n$  位に対して 3 アミノ酸離れた位置にあることを示し、「 $n + 4$ 」は、他のアミノ酸残基が、当該ペプチドのアミノ酸配列の  $n$  位に対して 4 アミノ酸離れた位置にあることを示し、「 $n + 5$ 」は、他のアミノ酸残基が、当該ペプチドのアミノ酸配列の  $n$  位に対して 5 ア

10

【 0 0 7 7 】

本発明の特定の態様において、ジスルフィド架橋は、ペプチド配列内の  $n$  位のシステイン（C）残基と、前記ペプチド配列の  $n + 3$  位の別のシステイン（C）残基との間に設けられる。溶液中のペプチド内にジスルフィド架橋を形成するための化学反応を図 1 A に表す。ペプチド内のジスルフィド架橋を図 2 A に表す。

【 0 0 7 8 】

本発明の別の特定の態様において、炭化水素ステープルは、ペプチド配列内の  $n$  位の化学修飾アラニン（A）と、前記ペプチド配列の  $n + 4$  位または  $n + 7$  位の別の化学修飾アラニン（A）との間において設けられる。特に、炭化水素ステープルは、 $\alpha$ -二置換アミノ酸、例えば 2 - アミノイソ酪酸、（S）- 2 - （4' - ペンテニル）- アラニンおよび（R）- 2 - （7' - オクテニル）- アラニンを含む修飾アラニン残基間に設けられる。さらなる態様において、内部架橋は、1 つの（S）- 2 - （4' - ペンテニル）- アラニンと 1 つの（R）- 2 - （7' - オクテニル）- アラニンとの間の炭化水素ステープルである。別の態様において、内部架橋は、2 つの（S）- 2 - （4' - ペンテニル）- アラニン間の炭化水素ステープルである。代替的な態様において、炭化水素ステープルは、ペプチド配列内の  $n$  位の化学修飾アラニン（A）と、前記ペプチド配列の  $n + 3$  位の別の化学修飾アラニン（A）との間に設けられる。

20

【 0 0 7 9 】

Fmoc ベースの固相ペプチド合成を使用してペプチド内に炭化水素ステープルを形成するための化学反応を図 1 B に表す。ペプチド内の炭化水素ステープルを図 2 B に表す。

30

【 0 0 8 0 】

本発明において有用な炭化水素ステープルの例としては、図 2 B に示されているものが挙げられる。例えば、炭化水素ステープルは、 $n$  位および  $n + 7$  位の 2 つのアミノ酸 Xaa を連結し得、 $n$  位の Xaa は、式（I）： $-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-$ （式中、R は、 $n + 7$  位の後続 Xaa に連結された炭化水素ステープル -  $(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_3-$  である）の修飾アラニンであり、 $n + 7$  位の Xaa は、式（I）： $-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-$ （式中、R' は、上において定義した  $n$  位の Xaa から炭化水素ステープルに連結された単結合である）の修飾アラニンである。他の例として、炭化水素ステープルは、 $n$  位および  $n + 4$  位の 2 つのアミノ酸 Xaa を連結し得、 $n$  位の Xaa は、式（I）： $-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-$ （式中、R は、 $n + 4$  位の後続 Xaa に連結された炭化水素ステープル -  $(CH_2)_3-CH=CH-(CH_2)_3-$  である）の修飾アラニンであり、 $n + 4$  位の Xaa は、式（I）： $-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-$ （式中、R' は、上において定義した  $n$  位の Xaa から炭化水素ステープルに連結された単結合である）の修飾アラニンである。

40

【 0 0 8 1 】

本発明の特定の態様において、ラクタム架橋は、ペプチド配列内の  $n$  位のグルタミン酸（E）残基と、前記ペプチド配列の  $n + 4$  位または  $n + 7$  位、好ましくは  $n + 4$  位のリジン（K）残基との間に設けられる。

【 0 0 8 2 】

50

別の態様において、ラクタム架橋は、ペプチド配列内の  $n$  位のリジン (K) 残基と、前記ペプチド配列の  $n + 4$  位または  $n + 7$  位、好ましくは  $n + 4$  位のグルタミン酸 (E) 残基との間に設けられる。

【0083】

固相上のペプチド内にラクタム架橋を形成するための化学反応を図1Cに表す。ペプチド内のラクタム架橋を図2Cに表す。

【0084】

本発明において有用なラクタム架橋の例としては、図2Cに示されているものが挙げられる。例えば、ラクタム架橋は、ペプチド配列の  $n$  位および  $n + 4$  位の2つアミノ酸 X a a 間に形成され、 $n$  位の X a a は、式 (I) :  $-NH-C(H)(R)-C(O)-$  (式中、R は、 $n + 4$  位の後続残基に連結されたラクタム架橋  $-(CH_2)_2-CO-NH-(CH_2)_4-$  である) の修飾アミノ酸であり、 $n + 4$  位の X a a は、式 (I) :  $-NH-C(H)(R')-C(O)-$  (式中、R' は、上において定義した  $n$  位の X a a からラクタム架橋に連結された単結合である) の修飾アミノ酸である。別の例は、ペプチド配列の  $n$  位および  $n + 4$  位の2つアミノ酸 X a a 間において形成されたラクタム架橋であり、 $n$  位の X a a は、式 (I) :  $-NH-C(H)(R)-C(O)-$  (式中、R は、 $n + 4$  位の後続残基に連結されたラクタム架橋  $-(CH_2)_4-NH-CO-(CH_2)_2-$  である) の修飾アミノ酸であり、 $n + 4$  位の X a a は、式 (I) :  $-NH-C(H)(R')-C(O)-$  (式中、R' は、上において定義した  $n$  位の X a a からのラクタム架橋に連結された単結合である) の修飾アミノ酸である。

【0085】

さらなる態様において、本発明の模倣ペプチドは、以下の表2に表されるペプチドの中から選択され、内部架橋は、下線付のグルタミン酸 (E) 残基およびリジン (K) 残基間のラクタム架橋を介して、または R 8 および S 5 (R<sub>8</sub> は (R) - 2 - (7' - オクテニル) - アラニンに対応し、S<sub>5</sub> は (S) - 2 - (4' - ペンテニル) - アラニンに対応する) 間の炭化水素ステープルを介して実施される。

【0086】

10

20

## 【表 2】

第 2 表. 本発明の模倣ペプチドおよびそれらのアミノ酸配列の例。R<sub>8</sub>は (R) - 2 - (7' - オクテニル) - アラニンに対応し、S<sub>5</sub>は (S) - 2 - (4' - ペンテニル) - アラニンに対応し、これらは、図 2 B の炭化水素ステープルにおいて結合される。下線付の E および K は、図 2 C のラクタム架橋において結合される。場合により、本発明のペプチドは、アセチル化 N 末端に遊離アミノ基を有し、アミド化 C 末端に遊離カルボキシ基を有する。

VKDLR <sub>8</sub> TVYVDV <u>S</u> <sub>5</sub> KDSGRDYVSQFEGSAL 5 位の R <sub>8</sub> および 1 2 位の S <sub>5</sub> を連結する図 2 B の炭化水素ステープルを有する 配列番号: 1 0 によって表される	10
DSVTSTR <sub>8</sub> SKLREQ <u>S</u> <sub>5</sub> GPVTQEFWDNLEKETEG 7 位の R <sub>8</sub> および 1 4 位の S <sub>5</sub> を連結する図 2 B の炭化水素ステープルを有する 配列番号: 1 1 によって表される	
YLDDFQKKWQEER <sub>8</sub> ELYRQK <u>S</u> <sub>5</sub> EPLRAELQEGARQKLHEL 1 3 位の R <sub>8</sub> および 2 0 位の S <sub>5</sub> を連結する図 2 B の炭化水素ステープルを有する 配列番号: 1 2 によって表される	
EEMDRARARHR <sub>8</sub> DALRTH <u>S</u> <sub>5</sub> APYSDELRLAARLEALKEN 1 1 位の R <sub>8</sub> および 1 8 位の S <sub>5</sub> を連結する図 2 B の炭化水素ステープルを有する 配列番号: 1 3 によって表される	
ATEHR <sub>8</sub> STLSEK <u>S</u> <sub>5</sub> KPALED 5 位の R <sub>8</sub> および 1 2 位の S <sub>5</sub> を連結する図 2 B の炭化水素ステープルを有する 配列番号: 1 4 によって表される	20
GLLPVLESFKVSFLSALE <u>EYTK</u> KLNT 1 9 位の E および 2 3 位の K を連結する図 2 C のラクタム架橋を有する 配列番号: 1 9 によって表される	
GLLPVLESFKVSFLSR <sub>8</sub> LEEYTK <u>S</u> <sub>5</sub> LNT 1 6 位の R <sub>8</sub> および 2 3 位の S <sub>5</sub> を連結する図 2 B の炭化水素ステープルを有する 配列番号: 1 5 によって表される	

【表 3】

GLLPVLESFKVSS <sub>5</sub> LSAS <sub>5</sub> EEYTKKLNT 13位のS5および17位のS5を連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する 配列番号：16によって表される	
VLESFKVSR <sub>8</sub> LSALEES <sub>5</sub> TKKLNT 9位のR8および16位のS5を連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する 配列番号：17によって表される	
VLESFKVSFLSALE <sub>5</sub> EYTKKLNT 前記配列の15位のEおよび19位のKを連結する図2Cのラクタム架橋を有する 配列番号：20によって表される	10
CAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLR§GLLPVLESFKVSFLSALE EYTKKLNTC 28位の§=Gln類似体（側鎖はCH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub> ではなくCH <sub>2</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub> ）、ならびに47位のEおよび51位のKを連結する図2Cのラクタム架橋を有する 配列番号：18によって表される	
VKDLX <sub>aa</sub> TVYVDVX <sub>aa</sub> KDSGRDYVSQFEGSAL（配列番号：10、5位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R）-C（O）-（式中、Rは、12位の後続X <sub>aa</sub> に連結された炭化水素ステープル-（CH <sub>2</sub> ） <sub>6</sub> -CH=CH-（CH <sub>2</sub> ） <sub>3</sub> -である）の修飾アラニンに置換されており、12位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R'）-C（O）-（式中、R'は、上において定義した5位のX <sub>aa</sub> から炭化水素ステープルに連結された単結合である）の修飾アラニンである）	20
DSVTSTX <sub>aa</sub> SKLREQX <sub>aa</sub> GPVTQEFWDNLEKETEG（配列番号：11、7位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R）-C（O）-（式中、Rは、14位の後続X <sub>aa</sub> に連結された炭化水素ステープル-（CH <sub>2</sub> ） <sub>6</sub> -CH=CH-（CH <sub>2</sub> ） <sub>3</sub> -である）の修飾アラニンであり、14位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R'）-C（O）-（式中、R'は、上において定義した7位のX <sub>aa</sub> から炭化水素ステープルに連結された単結合である）の修飾アラニンである）	
YLDDFQKKWQEEEX <sub>aa</sub> ELYRQKX <sub>aa</sub> EPLRAELQEGARQKLHEL（配列番号：12、13位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R）-C（O）-（式中、Rは、20位の後続X <sub>aa</sub> に連結された炭化水素ステープル-（CH <sub>2</sub> ） <sub>6</sub> -CH=CH-（CH <sub>2</sub> ） <sub>3</sub> -である）の修飾アラニンであり、20位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R'）-C（O）-（式中、R'は、上において定義した13位のX <sub>aa</sub> から炭化水素ステープルに連結された単結合である）の修飾アラニンである）	30
EEMRDRARAHX <sub>aa</sub> DALRTHX <sub>aa</sub> APYSDELRLAARLEALKEN（配列番号：13、11位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R）-C（O）-（式中、Rは、18位の後続X <sub>aa</sub> に連結された炭化水素ステープル-（CH <sub>2</sub> ） <sub>6</sub> -CH=CH-（CH <sub>2</sub> ） <sub>3</sub> -である）の修飾アラニンであり、18位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R'）-C（O）-（式中、R'は、上において定義した11位のX <sub>aa</sub> から炭化水素ステープルに連結された単結合である）の修飾アラニンである）	
LSPLGEEMRDRARAHX <sub>aa</sub> DALRTHX <sub>aa</sub> APYSDELRLAARLEALK（配列番号：22、16位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R）-C（O）-（式中、Rは、23位の後続X <sub>aa</sub> に連結された炭化水素ステープル-（CH <sub>2</sub> ） <sub>6</sub> -CH=CH-（CH <sub>2</sub> ） <sub>3</sub> -である）の修飾アラニンであり、23位のX <sub>aa</sub> は、式（I）：-NH-C（CH <sub>3</sub> ）（R'）-C（O）-（式中、R'は、上において定義した16位のX <sub>aa</sub> から炭化水素ステープルに連結された単結合である）の修飾アラニンである）	40

【表 4】

<p>EEMRDRARAH<u>X a a</u>DALRTH<u>X a a</u>APYSDELRLAARLEALK (配列番号: 24、11位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、Rは、18位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-<math>(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、18位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、R'は、上において定義した11位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p>	
<p>ATEH<u>X a a</u>STLSEK<u>X a a</u>KPALED (配列番号: 14、5位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、Rは、12位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-<math>(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、12位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、R'は、上において定義した5位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p>	10
<p>GLLPVLESFKVSFLSALE<u>X a a</u>YTK<u>X a a</u>LNT (配列番号: 19、19位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、Rは、23位の後続X a aに連結されたラクタム架橋-<math>(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-</math>である)の修飾アミノ酸であり、23位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、R'は、上において定義した19位のX a aからラクタム架橋に連結された単結合である)の修飾アミノ酸である)</p>	
<p>GLLPVLESFKVSFLS<u>X a a</u>LEEYTK<u>X a a</u>LNT (配列番号: 15、16位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、Rは、23位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-<math>(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、23位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、R'は、上において定義した16位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p>	20
<p>GLLPVLESFKVS<u>X a a</u>LSA<u>X a a</u>EEYTKKLNT (配列番号: 16、13位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、Rは、17位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-<math>(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、17位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、R'は、上において定義した13n位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p>	
<p>VLESFKVS<u>X a a</u>LSALEE<u>X a a</u>TKKLNT (配列番号: 17、9位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R})-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、Rは、16位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-<math>(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、16位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、R'は、上において定義した9位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p>	30
<p>VLESFKVSFLSALE<u>X a a</u>YTK<u>X a a</u>LNT (配列番号: 20、15位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、Rは、19位の後続X a aに連結されたラクタム架橋-<math>(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-</math>である)の修飾アミノ酸であり、19位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、R'は、上において定義した15位のX a aからラクタム架橋に連結された単結合である)の修飾アミノ酸である)</p>	
<p>CAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLR<u>X a a</u>GLLPVLESFKVSFLSALE<u>X a a</u>YTK<u>X a a</u>LNTC (配列番号: 18、28位のX a aは、側鎖として<math>\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2</math>を有するGln類似体であり、47位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、Rは、51位の後続X a aに連結されたラクタム架橋-<math>(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-</math>である)の修飾アミノ酸であり、51位のX a aは、式(I): <math>-\text{NH}-\text{C}(\text{H})(\text{R}')-\text{C}(\text{O})-</math> (式中、R'は、上において定義した47位のX a aからラクタム架橋に連結された単結合である)の修飾アミノ酸である)</p>	40

## 【0087】

特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号: 8もしくは配列番号: 9; またはそれらの変異体を含む。

## 【0088】

特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号: 25; また

はその変異体を含む。

【0089】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：5；またはその変異体を含む。

【0090】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：5のC末端部における最後の2つのアミノ酸EおよびNが欠失した配列番号：5を含む。

【0091】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：21もしくは配列番号：23；またはそれらの変異体を含む。

10

【0092】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19もしくは配列番号：20；またはそれらの変異体を含む。

【0093】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および/またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：15を含む。

【0094】

20

別の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および/またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：16を含む。

【0095】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および/またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：17を含む。

【0096】

30

別の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および/またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：19を含む。

【0097】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および/またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：20を含む。

【0098】

40

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：13、配列番号：22または配列番号：24を含む。

【0099】

特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および/またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：13を含む。

【0100】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および/またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、ア

50

セチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：22を含む。

【0101】

特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および/またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：24を含む。

【0102】

さらなる特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、以下のいずれか1つを含む：

(i) 19位のEおよび23位のKを連結する図2Cのラクタム架橋を有する配列番号：19；

(ii) 16位の(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンおよび23位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する配列番号：15；

(iii) 13位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンおよび17位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する配列番号：16；

(iv) 9位の(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンおよび16位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する配列番号：17。

【0103】

さらなる特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19もしくは配列番号：20；またはそれらの変異体のいずれか1つを含む。

【0104】

さらなる特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：13、配列番号：22もしくは配列番号：24；またはそれらの変異体のいずれか1つを含む。

【0105】

またさらなる特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、以下のいずれか1つからなる：

(i) 19位のEおよび23位のKを連結する図2Cのラクタム架橋を有する配列番号：19；

(ii) 16位の(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンおよび23位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する配列番号：15；

(iii) 13位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンおよび17位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する配列番号：16；

(iv) 9位の(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンおよび16位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する配列番号：17。

【0106】

さらなる特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19もしくは配列番号：20；またはそれらの変異体のいずれか1つからなる。

【0107】

さらなる特定の態様において、本発明の模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：13、配列番号：22もしくは配列番号：24；またはそれらの変異体のいずれか1つから

10

20

30

40

50

なる。

【 0 1 0 8 】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドは、内部架橋を有しない。

【 0 1 0 9 】

一つの態様において、本発明は、アポリポタンパク質 A - I ( A p o A - I ) のエピトープの模倣ペプチドであって、当該ペプチドが、

( a ) 1 5 ~ 8 0 アミノ酸長のアミノ酸配列を有し、

( b ) 下記：

( i ) 配列番号： 5、配列番号： 2 1、配列番号： 2 3；またはそれらの変異体、

( i i ) 配列番号： 8、配列番号： 9、配列番号： 2 5；またはそれらの変異体、

( i i i ) 前記模倣ペプチドの抗 A p o A - I 抗体への特異的結合能が損なわれることなく、前記 ( i ) または ( i i ) の配列の 1、2、3、4、5 または 6 アミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは化学修飾されていること以外は、前記 ( i ) または ( i i ) の配列のいずれか 1 つと同一のアミノ酸配列、または

( i v ) ( i )、( i i ) および/または ( i i i ) のアミノ酸配列の 2 つの任意の組み合わせ

のいずれか 1 つの配列を含むアミノ酸配列を有し、

さらに、当該模倣ペプチドは、抗 A p o A - I 抗体に特異的に結合することができるものであることを特徴とする模倣ペプチドに関する。

【 0 1 1 0 】

一つの態様において、上記模倣ペプチドは、2 0 ~ 5 5、特に 2 5 ~ 5 5、より具体的には 2 5 ~ 4 0 アミノ酸長を有する。

【 0 1 1 1 】

別の態様において、上記模倣ペプチドは、2 0 ~ 4 0；2 1 ~ 4 0；2 2 ~ 4 0；2 3 ~ 4 0；2 4 ~ 4 0；2 5 ~ 4 0；2 6 ~ 4 0；2 7 ~ 4 0；2 8 ~ 4 0；または 3 0 ~ 4 0 アミノ酸長を有する。

【 0 1 1 2 】

別の態様において、上記模倣ペプチドは、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5 または 8 0 アミノ酸長を有する。特に、本発明の模倣ペプチドは、1 7、1 8、2 2、2 6、2 8、3 2、3 7、3 8、3 9、4 0、4 2、4 4 または 5 5 アミノ酸を有する。

【 0 1 1 3 】

別の態様において、本発明の模倣ペプチドの N 末端および/または C 末端は、それぞれ遊離アミノ末端および/または遊離カルボキシ末端に存在し得る電荷が除去されるようにさらに修飾される。特定の態様において、前記ペプチドの N 末端の遊離アミノ基は、アシル基（例えば、アセチル、プロピオニル、パルミトイルなど）に共有結合される。別の態様において、前記ペプチドの C 末端の遊離カルボキシ基は、アミド化される。さらなる態様において、模倣ペプチドの N 末端および C 末端は両方とも修飾され、特に、前記ペプチドの N 末端の遊離アミノ基は、アシル基（例えば、アセチル、プロピオニル、パルミトイルなど）に共有結合され、前記ペプチドの C 末端の遊離カルボキシ基は、アミド化される。

【 0 1 1 4 】

特定の態様において、前記本発明の模倣ペプチドは、配列番号： 5、配列番号： 2 1 または配列番号： 2 3 を含む。

【 0 1 1 5 】

別の態様において、前記模倣ペプチドは、配列番号： 5 の C 末端部における最後の 2 つのアミノ酸 E および N が欠失した配列番号： 5 を含む。

【 0 1 1 6 】

特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および／またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：5またはその変異体を含む。

【0117】

特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および／またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：21またはその変異体を含む。

【0118】

特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および／またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：23またはその変異体を含む。

【0119】

特定の態様において、前記模倣ペプチドは、配列番号：8、配列番号：9または配列番号：25を含む。

【0120】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および／またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：8またはその変異体を含む。

【0121】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および／またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：9またはその変異体を含む。

【0122】

別の特定の態様において、本発明の模倣ペプチドは、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、および／またはアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有し、より具体的には、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、およびアミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：25またはその変異体を含む。

【0123】

別の態様によれば、本発明は、診断組成物として使用するための本発明の模倣ペプチドを提供する。

【0124】

特に、本発明は、心血管疾患の診断および／または予後予測に使用するための本発明の模倣ペプチドを提供する。

【0125】

別の態様において、本発明は、医薬として使用するための本発明の模倣ペプチドを提供する。

【0126】

別の態様において、本発明は、心血管疾患の治療に使用するための本発明の模倣ペプチドを提供する。

【0127】

別の態様によれば、心血管疾患用バイオマーカーとして、生体液サンプルにおける抗ApoA-I抗体を検出するのに有用なイムノアッセイ調製物であって、少なくとも1つの本発明の模倣ペプチドまたはその変異体を含むイムノアッセイ調製物が提供される。

【0128】

さらなる態様によれば、心血管疾患用バイオマーカーとして、生体液サンプルにおける

10

20

30

40

50

抗ApoA-I抗体を検出するのに有用なイムノアッセイ調製物であって、少なくとも1つの本発明の模倣ペプチドまたはその変異体を含むイムノアッセイ調製物が提供される。

【0129】

別の態様によれば、イムノアッセイを実施するための固体マトリックスのコーティングのための、本発明のイムノアッセイ調製物の使用が提供される。

【0130】

さらなる態様によれば、心血管疾患用バイオマーカーとして、生体液サンプルにおける抗ApoA-I抗体を検出するのに有用なイムノアッセイプレートであって、固体マトリックス上にカップリングおよび/またはコーティングされた少なくとも1つの本発明の模倣ペプチドまたはその変異体を含むイムノアッセイプレートが提供される。

10

【0131】

本発明の模倣ペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明の別の態様は、本発明の模倣ペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0132】

特定の態様において、本発明は、本発明の模倣ペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、内部架橋が、前記模倣ペプチドのアミノ酸配列の2つの非連続システイン残基間のジスルフィド架橋である、単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0133】

本発明のペプチドの生産および精製

20

本発明の別の態様は、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えベクターを提供する。

【0134】

染色体、エピソームおよび誘導型ウイルスを含む多数の発現系が使用され得るが、これらに限定されない。より具体的には、使用される組換えベクターは、細菌性プラスミド、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入要素、酵母染色体要素、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パピローマウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、キツネポックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルスに由来し得る。

【0135】

これらの組換えベクターは、等しく、コスミドまたはファージミド誘導体であり得る。ヌクレオチド配列は、当業者に周知の方法、例えばMOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, Sambrook et al., 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001に記載されているものなどによって組換え発現ベクターに挿入され得る。

30

【0136】

組換えベクターは、ポリヌクレオチド発現の調節を制御するヌクレオチド配列、ならびに本発明のポリヌクレオチドの発現および転写と、本発明のポリペプチドの翻訳とを可能にするヌクレオチド配列を含み得、これらの配列は、使用される宿主細胞に応じて選択される。

【0137】

したがって、例えば、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが小胞体の内腔に向かうように、ペリプラズム空間に向かうように、膜上に向かうように、または細胞外環境に向かうように、適切な分泌シグナルを組換えベクターに組み込み得る。適切な分泌シグナルの選択は、後のタンパク質精製を容易にし得る。

40

【0138】

さらなる態様において、本発明の組換えベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0139】

宿主細胞内への組換えベクターの導入は、当業者に周知の方法、例えばBASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 2nd ed., McGraw-Hill Professional Publis

50

hing, 1995, and MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (上記)に記載されているもの、例えばリン酸カルシウムによるトランスフェクション、DEAEデキストランによるトランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン性脂質によるトランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入または感染によって行われ得る。

【0140】

宿主細胞は、例えば、細菌細胞、例えば*E. coli*、真菌細胞、例えば酵母細胞および*Aspergillus*、*Streptomyces*の細胞、昆虫細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、C127マウス細胞株、シリアンハムスター細胞のBHK細胞株、ヒト胎児腎臓293(HEK293)細胞であり得る。

10

【0141】

宿主細胞は、例えば、本発明の模倣ペプチドを発現させるのに使用され得る。標準的な方法による精製後、本発明のペプチドは、以下において記載される方法に使用され得る。

【0142】

本発明のさらなる態様は、本発明のペプチドを調製するための方法であって、培養培地において上記宿主細胞を培養し、該培養培地から、または宿主細胞溶解後の宿主細胞溶解物から前記ペプチドを分離することを含む方法を提供することである。上記方法において得られたペプチドの2つの非連続アミノ酸残基の内部架橋が、2つのシステイン残基間のジスルフィド架橋の形成を介して行われる場合、前記架橋は、ペプチドの合成および精製の工程、またはさらなる独立した工程のいずれかにおいて行われ得る。

20

【0143】

本発明のペプチドの2つの非連続アミノ酸残基の内部架橋が、ラクタム架橋の組み込みを介してまたは炭化水素ステープルの形成を介して行われ、ペプチドが、上記方法のような組換え技術により生産される場合、本発明の模倣ペプチドの調製は、ペプチドの前記内部架橋が本明細書において記載されるように行われるさらなる工程を必要とし得る。

【0144】

あるいは、本発明の模倣ペプチドは、固相ペプチド合成などの化学合成法によって調製され得る。これらのペプチドの精製は、タンパク質/ペプチド精製の分野において公知の任意の技術によって行われ得る。例示的な技術としては、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよび免疫親和性法が挙げられる。

30

【0145】

フルオレニルメチル-エステル/カルバメート保護基を20%ピペリジン塩基を媒介させて1時間切断した後、Boc化学反応において進行させ、ラクタム架橋を樹脂上に形成する場合、本発明のペプチドの内部架橋は、オルトゴナル保護(O-FmocおよびFmoc)を使用して、ペプチドのグルタミン酸残基およびリジン残基間のラクタム架橋形成を介して行われ得る。Fmoc化学反応において進行させる場合、オルトゴナル保護は、例えばO-アリルおよびアロックであり、3倍過剰のテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(O)のCHCl<sub>3</sub>/AcOH/NMM溶液を用いて、2時間樹脂上において切断される。3当量のPycklockおよび9当量のDIEAを用いて、ペプチドのラクタム環化を2日間行い、カイザーニンヒドリン試験(Kaiser et al., 1970, Anal Biochem 34: 595-598)によってモニタリングし得る。

40

【0146】

別の態様において、本発明のペプチドの内部架橋は、固相ペプチド合成における鎖伸長中に2つの-メチル、-アルケニルアミノ酸が組み込まれたペプチドの閉環メタセシス(RCM)を使用して、炭化水素ステープル形成を介して行われる。RCMは、Kim et al., 2011(Nat Protoc 6: 761-771)に記載されているように、触媒としてジクロロ(o-イソプロポキシフェニルメチレン)(トリシクロヘキシルホスフィン)ルテニウム(II)を用いて、MBHA-Rinkアミド樹脂上のFmoc保護ペプチドに対して実施される。実施例の欄に記載されているプロトコールを

50

使用して、最後の脱保護（およびアセチル化）およびそれに続く樹脂からの本発明の模倣ペプチドの切断を実施し得る。

【0147】

本発明の組成物およびキット

本発明は、本発明の模倣ペプチドを含む組成物を提供する。

【0148】

一つの態様によれば、本発明は、診断組成物またはイムノアッセイ調製物として使用するための、本発明の模倣ペプチドを含む組成物を提供する。

【0149】

特に、本発明は、心血管疾患の診断および/または予後予測に使用するための、本発明の模倣ペプチドを含む組成物を提供する。

10

【0150】

別の態様において、本発明は、医薬として使用するための、本発明の模倣ペプチドを含む組成物（特に、医薬組成物）を提供する。

【0151】

本発明はまた、心血管疾患の治療に使用するための、本発明の模倣ペプチドを含む組成物を提供する。

【0152】

本発明の別の態様によれば、心血管疾患用バイオマーカーとして、生体液サンプルにおける抗ApoA-I抗体を検出するためのキットであって、少なくとも1つの本発明の模倣ペプチド、その変異体またはそれらの組み合わせを含むキットが提供される。

20

【0153】

特定の態様において、本発明のキットは、そのアミノ酸配列が配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24および配列番号：18またはそれらの変異体のいずれか1つを含む少なくとも1つの模倣ペプチドを含む。

【0154】

30

別の特定の態様において、本発明のキットは、そのアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：9またはそれらの変異体のいずれか1つを含む少なくとも1つの模倣ペプチドを含む。

【0155】

別の特定の態様において、本発明のキットは、そのアミノ酸配列が配列番号：25を含む少なくとも1つの模倣ペプチドを含む。

【0156】

別の特定の態様において、本発明のキットは、そのアミノ酸配列が配列番号：5またはその変異体を含む少なくとも1つの模倣ペプチドを含む。

【0157】

40

特に、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号：5のC末端部における最後の2つのアミノ酸EおよびNが欠失した配列番号：5を含む。

【0158】

別の特定の態様において、本発明のキットは、そのアミノ酸配列が配列番号：21を含む少なくとも1つの模倣ペプチドを含む。

【0159】

別の特定の態様において、本発明のキットは、そのアミノ酸配列が配列番号：23を含む少なくとも1つの模倣ペプチドを含む。

【0160】

またさらなる態様において、本発明のキットは、下記から選択される少なくとも1つの

50

模倣ペプチドを含む：

( i ) 配列番号： 19 を含むアミノ酸配列を有し、かつ 19 位のグルタミン酸 ( E ) および 23 位のリジン ( K ) を連結する図 2 C のラクタム架橋である内部架橋を有する模倣ペプチド；

( i i ) 配列番号： 15 を含むアミノ酸配列を有し、かつ 16 位の ( R ) - 2 - ( 7' - オクテニル ) - アラニンおよび 23 位の ( S ) - 2 - ( 4' - ペンテニル ) - アラニンを連結する図 2 B の炭化水素ステープルである内部架橋を有する模倣ペプチド；

( i i i ) 配列番号： 16 を含むアミノ酸配列を有し、かつ 13 位の ( S ) - 2 - ( 4' - ペンテニル ) - アラニンおよび 17 位の ( S ) - 2 - ( 4' - ペンテニル ) - アラニンを連結する図 2 B の炭化水素ステープルである内部架橋を有する模倣ペプチド；

( i v ) 配列番号： 17 を含むアミノ酸配列を有し、かつ 9 位の ( R ) - 2 - ( 7' - オクテニル ) - アラニンおよび 16 位の ( S ) - 2 - ( 4' - ペンテニル ) - アラニンを連結する図 2 B の炭化水素ステープルである内部架橋を有する模倣ペプチド。

【 0 1 6 1 】

またさらなる態様において、本発明のキットは、下記から選択される少なくとも 1 つの模倣ペプチドを含む：

( i ) 配列番号： 15、配列番号： 16、配列番号： 17、配列番号： 19 または配列番号： 20 を含むアミノ酸配列を有する模倣ペプチド；

( i i ) 配列番号： 13、配列番号： 22 または配列番号： 24 を含むアミノ酸配列を有する模倣ペプチド。

【 0 1 6 2 】

さらなる態様によれば、本発明は、本発明の方法を実施するためのキットに関する。

【 0 1 6 3 】

本発明のキットは、本明細書に記載されるように、固相支持体として固体マトリックスにカップリングするための、または固体マトリックスに既にカップリングされた、少なくとも 1 つの本発明の模倣ペプチドまたはその変異体またはそれらの組み合わせを含む。

【 0 1 6 4 】

ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ニトロセルロース、石英、セラミック、デキストランまたは他の物質を含む様々な固体マトリックスが使用され得るが、これらに限定されない。固体マトリックスの適切な形態としては、これらの物質から形成されたかまたはこれらの物質でコーティングされたビーズ、マイクロ粒子、ナノ粒子、チューブ、繊維またはプレート、フィルム、スライド、ウェルが挙げられる。典型的には、固体マトリックスは、96 ウェルマイクロタイタープレートなどのマイクロタイターウェルを含む。

【 0 1 6 5 】

本発明のキット内の固体マトリックスへの本発明の模倣ペプチドのカップリングまたは固定は、固相支持体への吸着または化学的カップリングによって行われ得る。タンパク質またはペプチドを固体支持体に固定化するための当技術分野において公知の任意の手段が使用され得る。本発明のペプチドは、アミド結合もしくはエステル結合または吸着を介して共有結合などの技術によって、固体マトリックスに共有結合または非共有結合され得る。ビオチンおよびアビジンまたは抗体および抗原などの結合対を使用して、ペプチドを結合させ得る。ペプチドを固体マトリックスに付加した後、固体マトリックスを ( ウシ血清アルブミンなどのブロッキングタンパク質を含有する ) ブロッキング溶液と共にインキュベートして、試験サンプル中の抗体の支持体表面への非特異的吸着を減少させ得る。一つの態様によれば、本発明の模倣ペプチドは、本発明のキットの固体マトリックス上において直接合成され得る。

【 0 1 6 6 】

一つの態様によれば、キットが、固相支持体としての固体マトリックスにカップリングするための少なくとも 1 つの本発明の模倣ペプチドまたはその変異体またはそれらの組み合わせを含む場合、キットは、イムノアッセイを実施するためのカップリング試薬および/または固体マトリックスを場合によりさらに含んでいてもよい。

## 【0167】

別のさらなる態様によれば、バックグラウンドノイズの検出を回避するために、本発明のキットは、検出前に未結合の物質を洗浄するための少なくとも1つの洗浄試薬をさらに含む。典型的には、洗浄試薬は、当技術分野において公知の標準的な緩衝液を含む。

## 【0168】

別のさらなる態様によれば、本発明のキットは、検出された抗ApoA-I抗体の定量に関する校正情報と場合により一緒に、少なくとも1つの対照サンプルをさらに含む。

## 【0169】

別の態様によれば、本発明は、固相支持体としての固体マトリックスにカップリングされた少なくとも1つの本発明の模倣ペプチド、その変異体またはそれらの組み合わせを含むイムノアッセイプレートを提供する。

10

## 【0170】

本発明の使用および方法

一つの態様によれば、本発明は、哺乳動物被験体の生体液サンプルにおける内因性抗ApoA-I抗体を検出する方法であって、

- (a) 哺乳動物被験体由来の生体液サンプルを用意する工程と；
- (b) 前記生体液サンプルに存在する抗ApoA-I抗体が、抗原-抗体相互作用により、少なくとも1つの本発明の模倣ペプチドに結合するのに十分な条件下において、前記生体液サンプルを、前記少なくとも1つの模倣ペプチドがカップリングされた固体マトリックスと接触させる工程と；
- (c) 前記固体マトリックスの表面から未結合の抗体を除去する工程と；
- (d) 前記固体マトリックスに結合している抗原-抗体複合体の存在を検出する工程とを少なくとも含み、

20

前記複合体の存在により、前記生体液サンプルが内因性抗ApoA-I抗体を含むことが示される方法を提供する。

## 【0171】

別の態様によれば、本発明は、哺乳動物被験体の生体液サンプルから心血管疾患を検出する方法であって、

- (a) 哺乳動物被験体由来の生体液サンプルを用意する工程と；
- (b) 前記生体液サンプルに存在する抗ApoA-I抗体が、抗原-抗体相互作用により、少なくとも1つの本発明の模倣ペプチドに結合するのに十分な条件下において、前記生体液サンプルを、前記少なくとも1つの模倣ペプチドがカップリングされた固体マトリックスと接触させる工程と；
- (c) 前記固体マトリックスの表面から未結合の抗体を除去する工程と；
- (d) 前記固体マトリックスに結合している抗原-抗体複合体の存在を検出する工程とを少なくとも含み、

30

前記複合体の存在により、前記生体液サンプルが1つ以上の心血管疾患に関連する抗ApoA-I自己抗体を含むことが示される方法を提供する。

## 【0172】

さらなる態様によれば、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24および配列番号：18およびそれらの任意の変異体から選択されるアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

40

## 【0173】

特定の態様によれば、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9およびそれらの任意の変異体

50

から選択されるアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

【0174】

特定の態様において、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：8、配列番号：9およびそれらの任意の変異体から選択されるアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

【0175】

特定の態様において、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：25のアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

【0176】

別の特定の態様において、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：5のアミノ酸配列およびその任意の変異体、特に、配列番号：5のC末端部における最後の2つのアミノ酸EおよびNが欠失した配列番号：5を含む変異体を含む本発明の方法が提供される。

10

【0177】

特定の態様において、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：21のアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

【0178】

特定の態様において、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：23のアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

【0179】

20

別の特定の態様によれば、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24および配列番号：18およびそれらの任意の変異体から選択されるアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

【0180】

さらなる態様によれば、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：20およびそれらの任意の変異体から選択されるアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

【0181】

30

さらなる態様によれば、前記少なくとも1つの模倣ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：13、配列番号：22または配列番号：24およびそれらの任意の変異体から選択されるアミノ酸配列を含む本発明の方法が提供される。

【0182】

またさらなる態様によれば、前記少なくとも1つの模倣ペプチドが、下記のいずれか1つを含む本発明の方法が提供される：

(i) その配列の19位のEおよび23位のKを連結する図2Cのラクタム架橋を有する配列番号：19のアミノ酸配列；

(ii) その配列の16位の(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンおよび23位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルを有する配列番号：15のアミノ酸配列；

40

(iii) 配列番号：16のアミノ酸配列であって、c)の内部架橋が、前記配列の13位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンおよび17位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルであるもの；

(iv) 配列番号：17のアミノ酸配列であって、c)の内部架橋が、前記配列の9位の(R)-2-(7'-オクテニル)-アラニンおよび16位の(S)-2-(4'-ペンテニル)-アラニンを連結する図2Bの炭化水素ステープルであるもの。

【0183】

またさらなる態様によれば、前記少なくとも1つの模倣ペプチドが、下記のいずれか1つを含む本発明の方法が提供される：

50

( i ) 配列番号： 1 3、配列番号： 2 2または配列番号： 2 4のアミノ酸配列；  
( i i ) 配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、配列番号： 1 9または配列番号： 2 0のアミノ酸配列。

【 0 1 8 4 】

別の態様によれば、前記少なくとも 1 つの模倣ペプチドが、下記のいずれか 1 つからなる本発明の方法が提供される：

( i ) その配列の 1 9 位の E および 2 3 位の K を連結する図 2 C のラクタム架橋を有する配列番号： 1 9 のアミノ酸配列；

( i i ) その配列の 1 6 位の ( R ) - 2 - ( 7 ' - オクテニル ) - アラニンおよび 2 3 位の ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンを連結する図 2 B の炭化水素ステープルを有する配列番号： 1 5 のアミノ酸配列；

( i i i ) b ) のアミノ酸配列が配列番号： 1 6 を含み、 c ) の内部架橋が、前記配列の 1 3 位の ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンおよび 1 7 位の ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンを連結する図 2 B の炭化水素ステープルであるもの；

( i v ) b ) のアミノ酸配列が配列番号： 1 7 を含み、 c ) の内部架橋が、前記配列の 9 位の ( R ) - 2 - ( 7 ' - オクテニル ) - アラニンおよび 1 6 位の ( S ) - 2 - ( 4 ' - ペンテニル ) - アラニンを連結する図 2 B の炭化水素ステープルであるもの。

【 0 1 8 5 】

またさらなる態様によれば、前記少なくとも 1 つの模倣ペプチドが、下記のいずれか 1 つからなる本発明の方法が提供される：

( i ) 配列番号： 1 3、配列番号： 2 2、配列番号： 2 4 のアミノ酸配列；またはそれらの変異体；

( i i ) 配列番号： 1 5、配列番号： 1 6、配列番号： 1 7、配列番号： 1 9、配列番号： 2 0 のアミノ酸配列またはそれらの変異体。

【 0 1 8 6 】

別のさらなる態様によれば、少なくとも 1 つの模倣ペプチドまたはその変異体がカップリングされた工程 ( b ) の前記固体マトリックスと、前記生体液サンプルとを接触させる本発明の方法が提供される。

【 0 1 8 7 】

別のさらなる態様によれば、検出工程 ( d ) において得られたシグナルを、少なくとも 1 つの対照サンプルについて得られた同じシグナルと比較する工程をさらに含む本発明の方法であって、前記少なくとも 1 つの対照サンプルについて得られたシグナルを、前記生体液サンプルの検出工程 ( d ) の前に、それと同時にまたはその後収集する本発明の方法が提供される。

【 0 1 8 8 】

工程 ( d ) における捕捉 / 結合抗体の検出は、表面上の捕捉抗体またはタンパク質を検出するための当技術分野における公知の任意の適切な方法、例えば光学的な検出 (例えば、E L I S A)、質量変化の検出 (例えば、表面プラズモン共鳴、質量分析)、電気的な検出 (例えば、インピーダンス分光法、電気化学的方法) 技術によって行われ得る。

【 0 1 8 9 】

アッセイの結果は、定性的または定量的であり得る。固体マトリックスに結合した捕捉 / 結合抗体の量を、陽性対照および陰性対照と比較し得る。対照については、典型的には、試験すべきサンプルと同時に行われる。陽性対照は、A p o A - I と免疫反応性のある抗体を含む血清または溶液であり得る。陰性対照は、A p o A - I と免疫反応性のある抗体を含まない血清または溶液であり得る。定量的ために、既知量の抗 A p o A - I 抗体を使用した較正曲線を作成および / または使用し得る。陽性対照として使用するための抗体は、A p o A - I のアミノ酸配列の全体または断片を使用して生産され得る。

【 0 1 9 0 】

正常で健常な生体液サンプルとの比較は、様々な方法によって達成され得る。一つの態様によれば、それは、非罹患血液サンプルとの対照反応を含むことによって行われ得る。

別の態様によれば、それは、健常被験体由来の典型的な生体液サンプルの内因性抗 A p o A - I 抗体濃度の値を用いることによって行われ得る。典型的には、調査中のサンプル中に存在する内因性抗 A p o A - I 抗体レベルの比較は、各単一試験手順において決定された値または所定値に対して実施され得る。所定値は、一般の試験手順のために決定されたものでもよいし、あるいはこの値は、試験試薬の特定のバッチについてのみ有効であり得る。例えば、基準値は、規定の較正期間のみ有効でもよいし、試験過程の較正時に再定義してもよい。

【 0 1 9 1 】

本発明の方法、キットおよび使用は、スクリーニング目的および診断目的に適切であり得、一次診断において、および治療中または治療後の疾患経過のモニタリングにおいて適用され得る。

10

【 0 1 9 2 】

特に、本発明の方法、キットおよび使用は、以下のものに適切であり得る：

i ) 心筋虚血を除外または考慮するための急性胸痛患者における診断目的、したがって急性冠症候群の診断のため、

i i ) 本発明は、高い心血管リスクを有する患者のサブセットの同定を可能にし、したがって、抗 A p o A - I 抗体の有害効果を減弱させることを目的とする（本明細書において記載される）特定治療から利益を受け得る患者のサブセットの同定を可能にするので、急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を有する患者における予後予測および場合により治療目的。

20

【 0 1 9 3 】

上記診断目的、予後予測目的および治療目的は、一次予防および二次予防に適用され得る。

【 0 1 9 4 】

本発明の方法、キットおよび使用は、特に、急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っている患者であって、通常的心血管リスク因子（タバコの使用、アルコールの使用、高血圧、高コレステロール、肥満、運動不足、不健康な食事を含む）が観察されない患者が、それにもかかわらず、本発明の少なくとも1つの模倣ペプチドを投与することを含む方法などの心血管疾患の予防療法または治療法から利益を受け得るかを決定するのにも適切であり得る。

30

【 0 1 9 5 】

本明細書に記載される予後予測および/または診断アッセイは、被験体が、心血管疾患を予防および/または治療するための薬剤（例えば、薬物）の投与から利益を得るかを決定するのに使用され得る。例えば、このようなアッセイは、心血管疾患を治療するのに適切な治療剤、例えば A p o A - I、本発明の模倣ペプチド、静脈内 ( i n t r a v e i n o u s ) 免疫グロブリン ( I V I G ) またはエブレレノンの投与が被験体に有益であり得るかを決定するのに使用され得る。

【 0 1 9 6 】

静脈内免疫グロブリン ( I V I G ) は、静脈内投与される血液製剤である。それは、1 0 0 0 人を超える血液ドナーの血漿から抽出されたプールされた多価 I g G 免疫グロブリンを含有する。典型的には、I V I G の投与量は、症状に依存する。一次免疫不全の場合、1 0 0 ~ 4 0 0 m g / k g 体重が3 ~ 4 週間毎に施される。神経学的疾患および自己免疫疾患の場合、2 グラム / キログラム体重が3 ~ 6 カ月にわたって月1回5日間施される。次いで、3 ~ 4 週間毎の1 0 0 ~ 4 0 0 m g / k g 体重の維持療法が続く。

40

【 0 1 9 7 】

エブレレノン（系統 I U P A C 名：プレゲン - 4 - エン - 7 , 2 1 ジカルボン酸、9 , 1 1 - エポキシ - 1 7 - ヒドロキシ - 3 - オキソ、 - ラクトン、メチルエステル（7 , 1 1 , 1 7 ））は、慢性心不全の管理における補助薬として使用されるアルドステロンアンタゴニストである。それは、特に、心筋梗塞後の患者における心血管リスクを減少

50

させるために市販されている。

【0198】

したがって、本発明の別の態様は、被験体、特に、急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っている被験体が、心血管疾患を予防および／または治療するための治療剤の投与から利益を受け得るかを決定する方法である。

【0199】

本発明の別の態様は、治療中または治療後の被験体における心血管疾患の経過をモニタリングする方法である。この目的のために、被験体の生物学的サンプル中の抗ApoA-I抗体の検出は、治療を受ける前、治療を受けている間または治療を受けた後の被験体由来の生物学的サンプルにおいて決定され得る。治療後に検出された抗ApoA-I抗体の量の減少は、同じ治療によって被験体をさらに治療し得ることを示す。治療後の抗ApoA-I抗体の非存在は、治療を中断し得るか、またはより低頻度および／もしくはより低投与量において継続し得ることを示す。

10

【0200】

上記アッセイの実施から得られた情報は、個体の健康状態に影響を与える疾患および他の有害な症状の予後予測、進行の判定および臨床管理に有用である。この情報は、より具体的には、特に急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っている患者のサブ集団における心血管疾患を治療するための治療法または他の治療計画を臨床医が決定するのを支援する。

20

【0201】

本発明の別の態様において、それを必要とする被験体における心血管疾患または心血管障害を予防および／または治療するための方法であって、本発明の模倣ペプチドまたはその医薬製剤を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。

【0202】

本発明の別の態様において、それを必要とする被験体における心血管疾患または心血管障害を予防および／または治療するための方法であって、本発明の模倣ペプチドの三次元構造類似体を投与することを含む方法が提供される。

【0203】

本発明に関し、模倣ペプチドの三次元構造類似体は、化学ライブラリーにおいて見出されたか、または前記模倣ペプチドの三次元構造と類似の三次元構造を示すように設計された任意の化学分子、特に任意の低分子であり得る。

30

【0204】

特定の態様において、本発明は、被験体における心血管疾患を予防および／または治療するための方法であって、(i)本発明の模倣ペプチドまたはその医薬製剤、(ii)本発明の模倣ペプチドの三次元構造類似体、(iii)ApoA-Iを含む医薬組成物、ならびに(iv)心血管疾患の予防および／または治療に適切な薬剤、例えば静脈内免疫グロブリンまたはエプレレノンの少なくとも1つを、本発明の方法によって内因性抗ApoA-I抗体を有すると診断された被験体に投与することを含む方法を提供する。

【0205】

特定の態様において、上記方法は、特に急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っている被験体に適用される。

40

【0206】

さらなる態様において、心血管疾患を予防および／または治療するための本発明の方法は、特に急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っている被験体であって、本発明の検出方法後に内因性抗ApoA-I抗体を有すると診断された被験体において行われる。

【0207】

またさらなる態様において、被験体は、通常観察される心血管リスク因子、例えばタバ

50

コの使用、アルコールの使用、高血圧、高コレステロール、肥満、運動不足、不健康な食事を示さない。

【0208】

別の態様において、本発明は、医薬の調製のための、特に、心血管疾患を予防および/または治療するための医薬の調製のための、本発明の模倣ペプチドの使用を提供する。さらなる態様において、本発明は、診断組成物またはイムノアッセイ調製物の調製のための、特に心血管疾患を診断するための、本発明の模倣ペプチドの使用を提供する。

【0209】

投与形態

本発明の組成物、特に医薬組成物およびその製剤は、経口、非経口、静脈内、皮下、直腸またはそれらの組み合わせを含む任意の方法によって投与され得る。非経口投与としては、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、皮内および筋肉内が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の組成物はまた、組成物の徐放および持続制御静脈内(i.v.)注入を可能にするインプラントの形態において投与され得る。

【0210】

特に、本発明の化合物、組成物、特に医薬組成物およびその製剤は、皮下投与される。

【0211】

本発明の一つの態様において、本発明の組成物の投与は、複数回の連続注射を必要とする。

【0212】

本発明の特定の態様において、医薬組成物は、反復投与または連続投与され得る。医薬組成物は、少なくとも1週間、2週間、3週間もしくは4週間；2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、8カ月間、10カ月間もしくは12カ月間；または2年間、3年間、4年間もしくは5年間の期間にわたって反復投与または連続投与され得る。

【0213】

組み合わせ

本発明によれば、本発明の模倣ペプチドまたはその医薬組成物は単独で、または心血管疾患の予防および/もしくは治療に有用な助剤と組み合わせて投与され得る。

【0214】

別の態様において、医薬組成物は、心血管疾患を予防または治療するのに有用な別の治療剤、例えばアスピリン、 $\beta$ -遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤およびスタチンと共に投与され得る。

【0215】

本発明は、心血管疾患の予防および/または治療に有用な他の治療計画または助剤(例えば、複数の薬物計画)の前に、これらと同時に、またはこれらの後に、治療有効量において模倣ペプチドが個体に投与される本発明の模倣ペプチドの投与を包含する。前記助剤と同時に投与される本発明の模倣ペプチドは、同じ組成物または異なる組成物において、および同じ投与経路または異なる投与経路によって投与され得る。

【0216】

患者

一つの態様において、本発明の患者は、心血管疾患を患っているか、またはこのような疾患を患っていると疑われる患者である。

【0217】

特定の態様において、本発明の患者は、急性胸痛によって救急科に入院したものである。

【0218】

別の態様において、本発明の患者は、急性胸痛によって救急科に入院した患者であって、本発明の予後予測および/または診断アッセイ後に心血管疾患を患っていると診断された患者である。

【0219】

10

20

30

40

50

また他の態様において、本発明の患者は、特に急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っている患者である。

【0220】

またさらなる態様において、本発明の患者は、通常観察される心血管リスク因子、例えばタバコの使用、アルコールの使用、高血圧、高コレステロール、肥満、運動不足、不健康な食事を示さない。

【0221】

さらなる態様において、本発明の患者は、特に急性胸痛、急性冠症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重度の頸動脈狭窄症、末期腎疾患または歯周炎を患っている患者であって、本発明の予後予測および/または診断アッセイ後に心血管疾患を患っていると診断された患者である。

10

【0222】

本明細書において引用されている参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本発明は、本明細書において記載される特定の態様による範囲内に限定されるものではなく、これらは本発明の個々の態様の一例示を意図するものであり、機能的に同等な方法および成分は本発明の範囲内である。実際、上記説明および添付の図面から、当業者であれば、本明細書において示され記載されているものに加えて、本発明の様々な改変が明らかであろう。このような改変は、添付の特許請求の範囲内に含まれるものである。

【0223】

20

説明した本発明、すなわち以下の実施例は、限定ではなく例示目的で示されているものである。

【実施例】

【0224】

以下の略語は、それぞれ以下の定義を指す：

a a (アミノ酸)；AUC (曲線下面積)、h (時間)、μl (マイクロリットル)、μM (マイクロモル)、mM (ミリモル)、mg (ミリグラム)、min (分)、nm (ナノメートル)、BSA (ウシ血清アルブミン)、CI (信頼区間)、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (ジクロロメタン)、DIPEA (ジイソプロピルエチルアミン)、DMF (ジメチルホルムアミド)、EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、HCTU (2 - (6 - クロロ - 1 - H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチル - アミニウムヘキサフルオロ - ホスフェート)、Hobt (N - ヒドロキシ - ベンゾトリアゾール)、OR (オッズ比)、PBS (リン酸緩衝生理食塩水)、PyBOP (ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス - ピロリジノ - ホスホニウムヘキサフルオロ - ホスフェート)、PyClock (6 - クロロ - ベンゾトリアゾール - イル - オキシ - トリス - ピロリジノ - ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)、TFA (トリフルオロ酢酸)、TIS (トリイソプロピルシラン)。

30

【0225】

材料および方法

ペプチド合成

40

Boc 化学反応 (Wilken and Kent, 1998, Curr Opin Biotechnol 9: 412 - 426) に適合されている ABI 433A ペプチドシンセサイザーにおいて、Boc ベースのメリフィールド固相ペプチド合成を使用することによって、ネイティブケミカルライゲーション (Dawson et al, 1994, Science 266: 776 - 779) 用の C 末端チオエステル誘導体である直鎖状ペプチドおよび特定のラクタム架橋類似体 (F3L1) を合成した。フッ化水素を用いて、樹脂からの切断を実施した。

【0226】

ラクタム架橋の組み込みの場合、オルトゴナル保護 (O - Fm および Fmoc) をそれぞれ Glu および Lys に使用し、フルオレニルメチル - エステル / カルバメート保護基

50

を20%ピペリジン塩基を媒介させて1時間切断した後、ラクタム架橋を樹脂上に形成した。3当量のPyckockおよび9当量のDIEAを用いて、ペプチドのラクタム環化を2日間にわたって行い、カイザーニンヒドリン試験(Kaiser et al, 1970, Anal Biochem 34:595-598)によってモニタリングした。

#### 【0227】

ペプチドEF (Ala<sup>190</sup> - Thr<sup>242</sup> ApoA - I、すなわち53残基)の長さは、ネイティブゲル電気泳動(Dawson et al, 1994, Science 266:776-779)によってアセンブルした2つの断片(Ala<sup>190</sup> - Arg<sup>215</sup> およびGln<sup>216</sup> - Thr<sup>242</sup>)を介した合成を必要とした。このアプローチは、C末端断片上にN末端Cysを必要とするので、ApoA - I配列内のGln<sup>216</sup>をCys残基によって置換する必要がある。ライゲーション工程後にヨードアセトアミドによってこの残基をアルキル化して、Gln類似体(側鎖はCH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - CONH<sub>2</sub>ではなくCH<sub>2</sub> - S - CH<sub>2</sub> - CONH<sub>2</sub>)を得た。さらに、ペプチドの末端がジスルフィド架橋によって環化されたので、Cys(Acm)残基をAla<sup>190</sup> - Arg<sup>215</sup>のN末端およびGln<sup>216</sup> - Thr<sup>242</sup>のC末端に付加した。ライゲーション生成物のアルキル化後にHgOAcによってこれらを脱保護し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって酸化した。pH7.0において30分間にわたって20当量のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を使用し、その直後にRP - HPLCによって精製したところ、環化について最良の結果が得られた。

#### 【0228】

ラクタム架橋を有する直鎖状ペプチドのいくつかを作製するために、Fmocベースの固相合成も使用した。この場合、オルトゴナル保護基のペア(アリル/アロック)をグルタミン酸およびリジン残基に使用した。ペプチドの環化前に、Kates et al. (30)の手順にしたがって、2時間にわたって3当量のPd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>のCHCl<sub>3</sub> - AcOH - N - メチルモルホリン(37:2:1)溶液を用いて、これらの保護基を除去した。

#### 【0229】

Preludeシンセサイザー(Protein Technologies Inc., Tucson, U.S.A.)を用いて、100μmolスケールのMBHA - Rinkアミド樹脂(0.56mmol/gローディング)上において標準的なFmoc化学反応を使用して、すべての炭化水素ステープルペプチドを合成した。ペプチド伸長の1サイクルは、以下の工程から構成されていた:(i)最初に、ロードした樹脂をDMF(3×30秒間)によって洗浄し、20%ピペリジン/DMF(2×10分間)によって末端Fmoc保護基を除去した;(ii)次いで、脱保護した樹脂をDMF(6×30秒間)によって洗浄し、5当量の適切なFmoc - アミノ酸、5当量のHCTUおよび10当量のDIEAを含有する溶液によって30分間処理した;(iii)次いで、樹脂をNMP(3×30秒間)によって3回洗浄し、10%v/v無水酢酸のDMF溶液による処理(1×10分間)によって未反応のアミノ基をアセチル化し、キャップした樹脂をDMFによって洗浄した(6×30秒間)。ペプチド配列が完成するまでこれらの工程を繰り返した。

#### 【0230】

少し改変した以外は先に記載されているように(Kim et al, 2011, Nat Protoc 6:761-771)、-メチル, -アルケニルグリシンのカップリングを手動で実施した。2当量のアミノ酸、2当量のPyckockおよび4当量のDIEAを含有する溶液によって、脱保護した樹脂を2時間処理した。二重カップリングが必要な場合、この工程を繰り返した。5当量のアミノ酸、5当量のPyckockおよび15当量のDIEAを含有する溶液を用いた1時間にわたる二重カップリング工程において、配列内の以下のアミノ酸も手動で組み込んだ。

#### 【0231】

最後のFmoc保護基を除去したら、10%(v/v)無水酢酸および1%(v/v)DIEAのDMF溶液によって樹脂を処理(1×10分間)して、アセチル - キャップ

N末端を得た。続いて、DMF (5 × 30 秒間) および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 30 秒間) によって樹脂を洗浄し、真空下で20分間乾燥し、次いで、2.5% (v/v) 水、2.5% (v/v) トリイソプロピルシランおよび5% フェノール TFA 溶液を含有する切断溶液によって90分間処理した。

#### 【0232】

##### 閉環メタセシス

先に記載されているように (Kim et al, 2011, Nat Protoc 6: 761 - 771)、触媒としてジクロロ (o-イソプロポキシフェニルメチレン) (トリシクロヘキシルホスフィン) ルテニウム (II) を用いて、MBHA-Rink アミド樹脂上の Fmoc 保護ペプチドに対して、オレフィンアミノ酸誘導体を含むすべてのペプチドの閉環メタセシス (RCM) を実施した。DCM および DCE によって樹脂を順次洗浄し、グラブス第一世代触媒の 6 mM DCE 溶液 (樹脂置換に関して 4.9 mg/ml、0.2 当量) によって2時間処理したところ、溶液全体に少量だが継続的な N<sub>2</sub> バブリングが伴った。RCM を2回繰り返した。樹脂から小サンプルを切断する際に、HPLC および ESI-MS によって、メタセシス反応の進行をモニタリングした。上記プロトコールを使用して、最後の脱保護 (およびアセチル化) およびそれに続く樹脂からのペプチドの切断を実施した。

#### 【0233】

##### ペプチドの精製および分析

Micromass-Platform LCZ 質量分析計において、質量スペクトルを取得した。Phenomenex-Aeris widepore, 3.6 μm XBC8, 4.6 mm × 1150 mm カラムを使用して、214 nm UV 検出器と接続された Waters 2795 HPLC モジュールにおいて、分析的逆相高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) を実施した。Vydac C8 カラム (内径 (i.d.) 250 × 22 mm、粒径 10 μm) を使用して、2487 UV 検出器と接続された Delta 6000 モジュールにおいて、分取 HPLC を実施した。溶離液は、0.1% 含水 TFA および 0.1% TFA のアセトニトリル: 水 (9:1, v:v) 溶液であった。

#### 【0234】

粗反応混合物の HPLC および ESI-MS 分析によって、各合成の収率を最初に評価した。次いで、逆相 HPLC によって、ペプチドを均一になるまで精製した。分析的 HPLC および質量分析によって、精製ペプチドの同一性および純度を評価した。

#### 【0235】

##### 抗 ApoA-I 自己抗体を有するまたは有しない急性胸痛患者由来の血清のスクリーニング

使用した血清サンプルは、急性胸痛によって救急科 (ED) に入院した 138 人の患者を対象にした以前に発表された研究に記載されているものと同じである (Keller et al, 2012, J Intern Med 271: 451 - 462)。本研究の目的は、(i) 非 ST 部分上昇型心筋梗塞 (NSTEMI) および (ii) それに続くトロポニン I の上昇のために、ED において採取された最初の血漿サンプル中の ApoA-I に対する IgG 免疫反応性の診断精度を決定することであった。サンプルの採取および処理、エンドポイントの定義ならびに対象/除外基準の詳細は、Keller et al (2012, J Intern Med 271: 451 - 462) に記載されている。6 人の患者については材料不足であったので、残りの 132 人の患者由来のサンプルに対して、ペプチドの分析を実施した。

#### 【0236】

##### 患者血清の酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

先に記載されているように (Vuilleumier et al, 2010, Eur Heart J 31: 815 - 823)、ELISA によって、患者血清との免疫反応性を測定した。簡潔に言えば、精製ヒト由来脱脂 ApoA-I (20 μg/mL; 50 μL ウェル) または合成 ApoA-I 由来ペプチド (20 μg/mL; 50 μL ウェル)

のいずれかによって、Maxisorpプレート(Nunc(商標), Roskilde, Denmark)を37℃で1時間コーティングした。洗浄後、2%BSAを含むPBSによって、ウェルを37℃で1時間ブロッキングした。次いで、1/50希釈したデュプリケートの血清サンプルをウェルに加え、1時間インキュベートした。血清サンプルを非コーティングウェルにも加えて、個々の非特異的結合を評価した。6回洗浄した後、PBS/BSA溶液によって1/1000希釈した(50μLウェル)アルカリホスファターゼコンジュゲート抗ヒトIgG(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)をウェルに加え、37℃で1時間インキュベートした。再度6回洗浄した後、ジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)に溶解したアルカリホスファターゼ基質のp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム(Sigma-Aldrich)を加えることによって、ウェルを展開した。37℃で20分間インキュベートした後、プレートリーダー(Molecular Devices Versa Max(商標); Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)を使用して、ELISAシグナル(吸光度OD<sub>405nm</sub>)を測定した。対応する非特異的結合を、各サンプルの平均吸光度から差し引いた。

10

#### 【0237】

選択した合成ペプチドを使用して競合ELISA実験も行った。様々な濃度の合成ペプチド(2%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSに溶解したもの)を、高レベルの抗ApoA-I IgGを含有する患者血清と共に室温で2時間コインキュベートしてから、上記アッセイの展開前に、上記のように精製ヒト由来脱脂ApoA-Iによってコーティングしたウェルに追加した。

20

#### 【0238】

##### 統計分析

statistica(商標)ソフトウェア(StatSoft, Tulsa, OK, USA)を使用して、分析を実施した。適切な場合には、フィッシャー両側直接確率検定およびマンホイットニーU検定を使用した。異なるペプチドに対する免疫反応性と研究のエンドポイントとの間の関連性は、オッズ比(OR)および対応する95%信頼区間(95%CI)として示される。多変量ロジスティック回帰分析を使用して、変数間の関連性を評価した。このモデルにおいては、サンプルサイズが制限されているので、エンドポイントを従属変数として設定し、(単一連続変数内において14日時点の患者転帰の主なC

30

#### 【0239】

##### 細胞ベースの実験：抗ApoA-I IgG関連の炎症促進性応答

先に記載されているように(Pagano et al, 2012, J Intern Med)、インターフェロン(IFN)- $\gamma$ によりヒト単球を24時間処理することによって、ヒト単球由来マクロファージ(HMDM)を得た。次いで、96ウェルトレイにおいて、漸増濃度(5~40μg/mL)のポリクローナル抗ヒトApoA-I(Academy Bio-Medical Company, Houston, TX, USA)または対照抗体(Meridian Life Science, Saco, ME, USA)、すなわち、プール+またはプール-からのIgG(500μg/mL)のいずれかによってHMDMを24時間刺激した。このモデルにおいては、40μg/mLの最適刺激によって、LPSフリー抗ApoA-I IgGは、TNF- $\alpha$ およびIL-6の産生を用量依存的に促進することが示されている(Pagano et al, 2012, J Intern Med)。

40

#### 【0240】

50

競合阻害実験のために、合成ペプチドを  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  のポリクローナル抗 Apo A - I Ig G と共に室温で 2 時間コインキュベートしてから、96 ウェルプレート中の HMDM に加え、続いて、Luminex MAP (商標) Technology を使用して細胞上清中の IL - 6 および TNF - のレベルを評価した。3 人の異なるドナー由来の血液を用いて、実験を実施した。

#### 【0241】

##### 細胞ベースの実験：抗 Apo A - I Ig G 関連の変時応答

低トリプシン EDTA および 2 型コラゲナーゼによる消化によって、1 ~ 2 日齢ウイスターラットの心室から、新生仔ラット心室心筋細胞 (NRVC) を単離した。NIH 刊行の Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (publication 85 - 23) および地方動物局 (local county veterinary office) の承認 (1012/3134/0 - R) にしたがって、いかなる麻酔も鎮痛も神経筋遮断薬の投与も行わずに断頭によって、動物を殺処分した。新たに単離した細胞をプラスチックフラスコに播種して、心臓線維芽細胞の選択的な接着を可能にした。その後、フラスコから心筋細胞をデカントし、ラミニンコーティング 90 mm ペトリ皿に分配した。

#### 【0242】

1 ~ 2 日間培養した後、無血清 DMEM 中において、適切な濃度のモノクローナル抗 Apo A - I Ig G (Abcam, Nottingham, UK) またはビヒクルと共に、細胞を時間間隔毎にインキュベートした。プレインキュベーション期間の終了時 ( $t = 0$ ) および様々な物質を加えた後の異なる時点において、自然に収縮する小細胞単層の拍動回数を直ぐに測定した。(実験条件を把握していない) 技術者が光学顕微鏡を使用して、皿の 3 つの異なる位置における単位時間当たりの収縮数をカウントすることによって、回数測定を実施した。蛍光カルシウムプローブを用いて細胞質ゾルの遊離カルシウムの変動をモニタリングすることによって、細胞収縮の規則性が以前に評価されている (Maturana et al, 2009, Endocrinology 150: 3726 - 3734)。抗 Apo A - I Ig G の最大変時作用は、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  において達成されることが以前に実証されているため (Vuilleumier et al, 2010, Eur Heart J 31: 815 - 823)、すべての実験において、この抗体濃度を維持した。同じ実験条件を使用して、合成ペプチドとの競合阻害実験を実施した。合成ペプチドを  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のモノクローナル抗 Apo A - I (Abcam, Nottingham, UK) と共に室温で 2 時間コインキュベートしてから、皿内の NRVC に加え、上記のように拍動回数を測定した。

#### 【0243】

##### ヘリックス含量を測定するための CD 分光法

Jasco J - 815 分光偏光計において、20 °C の  $185 \sim 240 \text{ nm}$  における円偏光二色性 (CD) スペクトルを収集した。凍結乾燥ペプチドを 25 % トリフルオロエタノール水溶液に溶解して 2 mM の濃度を得、次いで、この溶液を水で 20 倍希釈し、石英キュベット (路長 0.2 cm) にロードすることによって、典型的なサンプルを調製した。1.25 % TFE 水溶液のベースライン CD スペクトルを実験スペクトルから差し引いた。波長  $222 \text{ nm}$  における平均残基楕円率 ( $[\theta]_{\text{m r w}}$ ) を計算することによって、データを正規化した。

#### 【0244】

##### 実施例 1：本発明の模倣ペプチドの例

上記材料および方法の欄に記載されているように、以下の表 3 に記載されている模倣ペプチドを合成し、質量分析によってさらに特性決定した。

【表 5】

第3表. 本発明の模倣ペプチドおよびそれらのアミノ酸配列の例

<p>A c - V K D L <u>X a a</u> T V Y V D V <u>X a a</u> K D S G R D Y V S Q F E G S A L - N H<sub>2</sub> (配列番号: 10、5位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-</math> (式中、Rは、12位の後続X a aに連結された炭化水素ステープルー <math>(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_3-</math>である)の修飾アラニンに置換されており、12位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-</math> (式中、R'は、上において定義した5位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p> <p>アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する</p>	AIS2	
<p>A c - D S V T S T <u>X a a</u> S K L R E Q <u>X a a</u> G P V T Q E F W D N L E K E T E G L - N H<sub>2</sub> (配列番号: 11、7位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-</math> (式中、Rは、14位の後続X a aに連結された炭化水素ステープルー <math>(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、14位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-</math> (式中、R'は、上において定義した7位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p> <p>アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する</p>	BIS2	10
<p>A c - Y L D D F Q K K W Q E E <u>X a a</u> E L Y R Q K <u>X a a</u> E P L R A E L Q E G A R Q K L H E L - N H<sub>2</sub> (配列番号: 12、13位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-</math> (式中、Rは、20位の後続X a aに連結された炭化水素ステープルー <math>(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、20位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-</math> (式中、R'は、上において定義した13位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p> <p>アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する</p>	CIS2	20
<p>A c - E E M R D R A R A H <u>X a a</u> D A L R T H <u>X a a</u> A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K E N - N H<sub>2</sub> (配列番号: 13、11位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-</math> (式中、Rは、18位の後続X a aに連結された炭化水素ステープルー <math>(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、18位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-</math> (式中、R'は、上において定義した11位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p> <p>アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する</p>	DIS2A	30
<p>A c - A T E H <u>X a a</u> S T L S E K <u>X a a</u> K P A L E D - N H<sub>2</sub> (配列番号: 14、5位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R)-C(O)-</math> (式中、Rは、12位の後続X a aに連結された炭化水素ステープルー <math>(CH_2)_6-CH=CH-(CH_2)_3-</math>である)の修飾アラニンであり、12位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(CH_3)(R')-C(O)-</math> (式中、R'は、上において定義した5位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)</p> <p>アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する</p>	EIS2	
<p>A c - G L L P V L E S F K V S F L S A L E <u>X a a</u> Y T K <u>X a a</u> L N T - N H<sub>2</sub> (配列番号: 19、19位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(H)(R)-C(O)-</math> (式中、Rは、23位の後続X a aに連結されたラクタム架橋 <math>(CH_2)_2-CO-NH-(CH_2)_4-</math>である)の修飾アミノ酸であり、23位のX a aは、式(I): <math>-NH-C(H)(R')-C(O)-</math> (式中、R'は、上において定義した19位のX a aからラクタム架橋に連結された単結合である)の修飾アミノ酸である)</p> <p>アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する</p>	F3L1	40

【表 6】

Ac-GLLPVLESFKVSFLS <u>Xaa</u> LEEYTK <u>Xaa</u> LNT-NH <sub>2</sub> (配列番号: 15、16位のXaaは、式(I): -NH-C(CH <sub>3</sub> )(R)-C(O)- (式中、Rは、23位の後続Xaaに連結された炭化水素ステープルー(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -である)の修飾アラニンであり、23位のXaaは、式(I): -NH-C(CH <sub>3</sub> )(R')-C(O)- (式中、R'は、上において定義した16位のXaaから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである) アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する	F3S2A
Ac-GLLPVLESFKVS <u>Xaa</u> LSA <u>Xaa</u> EEYTKKLNT-NH <sub>2</sub> (配列番号: 16、13位のXaaは、式(I): -NH-C(CH <sub>3</sub> )(R)-C(O)- (式中、Rは、17位の後続Xaaに連結された炭化水素ステープルー(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -である)の修飾アラニンであり、17位のXaaは、式(I): -NH-C(CH <sub>3</sub> )(R')-C(O)- (式中、R'は、上において定義した13n位のXaaから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである) アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する	F3S1B
Ac-VLESFKVS <u>Xaa</u> LSALEE <u>Xaa</u> TKKLNT-NH <sub>2</sub> (配列番号: 17、9位のXaaは、式(I): -NH-C(CH <sub>3</sub> )(R)-C(O)- (式中、Rは、16位の後続Xaaに連結された炭化水素ステープルー(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -である)の修飾アラニンであり、16位のXaaは、式(I): -NH-C(CH <sub>3</sub> )(R')-C(O)- (式中、R'は、上において定義した9位のXaaから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである) アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する	F4S2B
Ac-VLESFKVSFLSALE <u>Xaa</u> YTK <u>Xaa</u> LNT-NH <sub>2</sub> (配列番号: 20、15位のXaaは、式(I): -NH-C(H)(R)-C(O)- (式中、Rは、19位の後続Xaaに連結されたラクタム架橋-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -である)の修飾アミノ酸であり、19位のXaaは、式(I): -NH-C(H)(R')-C(O)- (式中、R'は、上において定義した15位のXaaからラクタム架橋に連結された単結合である)の修飾アミノ酸である) アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する	F4L1
*CAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLR <u>Xaa</u> GLLPVLESFKVSFLSALE <u>Xaa</u> YTK <u>Xaa</u> LNTC-NH <sub>2</sub> (配列番号: 18、28位のXaaは、側鎖としてCH <sub>2</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub> を有するGln類似体であり、47位のXaaは、式(I): -NH-C(H)(R)-C(O)- (式中、Rは、51位の後続Xaaに連結されたラクタム架橋-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -である)の修飾アミノ酸であり、51位のXaaは、式(I): -NH-C(H)(R')-C(O)- (式中、R'は、上において定義した47位のXaaからラクタム架橋に連結された単結合である)の修飾アミノ酸である) ジスルフィド架橋形成のために酸化されたCys残基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する	EFL1

10

20

30

## 【0245】

上記のラクタム架橋に加えて、模倣ペプチドEFL1は、非常に近接しているApo-AIヘリックスEおよびF由来の2つの領域を架橋するためのジスルフィド架橋も含んでいた。EFL1の場合におけるジスルフィド架橋を介したペプチドの環化は、2Daの損失および分析的HPLCにおけるピークシフトによって確認された。これは、ラクタム架橋形成および閉環メタセシスの場合も同様であり、質量損失はそれぞれ18Da(H<sub>2</sub>Oの脱離)および28Da(エチレンの除去)であった。

40

## 【0246】

断片C1S2の閉環メタセシスの間に、質量は予想通りだがRP-HPLC移動度が異なる2つの異性体が得られた。これらを別々に精製し、独立に試験した。

## 【0247】

ApoA-IのヘリックスF由来のペプチドF3を、実施例の欄における対照として選

50

折した。ペプチド F 3 は、アセチル化 N 末端に遊離アミノ基を有し、アミド化 C 末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：9 のアミノ酸配列を有し、いかなる内部架橋も含んでいない。

配列番号：9：G L L P V L E S F K V S F L S A L E E Y T K K L N T

【0248】

#### 実施例 2：本発明の模倣ペプチドの $\alpha$ - ヘリックス含量

上記材料および方法の欄に記載されているように、CD 分光法によって、模倣ペプチド F 3 L 1、F 3 S 2 A、F 3 S 1 B、F 4 S 2 B および F 4 L 1（第 3 表を参照のこと）の  $\alpha$  - ヘリックス含量を評価した。図 3 に示されている結果は、ステープル F 3 S 2 A、架橋 F 3 L 1 および架橋 F 4 L 1、ならびにステープル F 3 S 1 B およびステープル F 4 S 2 B が、非ステープル対照ペプチド F 3 と比較して増加した  $\alpha$  - ヘリックス含量（208 および 222 nm における特徴的なトラフ型）を示すことを示している。

【0249】

#### 実施例 3：本発明の模倣ペプチドの抗原性および診断性能

患者血清 E L I S A アッセイを使用して、132 人の急性胸痛患者コホート由来の血清との反応性について、模倣ペプチド F 3 L 1、F 3 S 2 A、F 3 S 1 B および F 4 S 2 B（第 3 表を参照のこと）を評価し、結果を統計分析に付した。第 4 表に示されている結果は、炭化水素ステープル F 3 S 2 A、F 3 S 1 B および F 4 S 2 B 模倣ペプチド、並びにラクタム架橋 F 3 L 1 模倣ペプチドによってもたらされる診断精度が、非ステープル対照ペプチド（F 3）と比べて増加していることを明らかに示している。実際、これらの模倣ペプチド、特に F 3 L 1 の統計パラメータはコペプチンの統計パラメータと有利に匹敵し、インタクトな Apo - A - 1 を用いて得られる統計パラメータに近い。コペプチンは内部対照であり、使用した患者コホートが実際に、典型的な急性胸痛患者であることを立証する（Reichel et al, 2009, J Am Coll Cardio 1.54(1):60-8）。c - ter プロバソプレシンとしても公知のコペプチンは、水分の恒常性において重要なホルモンであるバソプレシンの前駆体であり、急性冠症候群においては、その循環レベルから強力な予後予測値が得られることが示されている（Lippi et al, 2012, Clin Chem Lab Med. 50(2):243-5）。

【0250】

10

20

30

## 【表 7】

第4表. 患者血清ELISAアッセイ由来の132人のACP患者におけるNSTEMI診断およびそれに続くcTnI上昇に関する模倣ペプチドの診断特性。インタクトなApoA-Iおよびコペプチンの結果は比較のために含まれており、同じ期間に行った実験から得られた。統計的に有意な結果 ( $p < 0.05$ ) は、太字で示されている。\*NSTEMI-TIMIスコアについて調整；リスク分析について：コペプチンのカットオフ： $< 9 \text{ pmol/L}$  (Reichlin et al, 2009, JACC)；\*\*適合したカットオフおよび研究集団分布の80パーセンタイルの位置。

捕捉試薬	NSTEMI 予測			後の cTnI 予測		
	AUC (95%CI)	単変量 OR	調整* OR	AUC (95%CI)	単変量 OR	調整* OR
F3	0.55 (0.41-0.68) $p=0.25$	1.92 $p=0.41$	2.53 $p=0.33$	0.58 (0.40-0.76) $p=0.20$	1.47 $p=0.53$	1.57 $p=0.50$
F3L1	0.64 (0.52-0.76) $p=0.01$	6.87 $p=0.001$	7.02 $p=0.005$	0.68 (0.51-0.85) $p=0.01$	4.32 $p=0.05$	3.68 $p=0.10$
F3S2A	0.64 (0.51-0.77) $p=0.01$	<b>** 3.09</b> $p=0.01$	<b>** 3.6</b> $p=0.02$	0.69 (0.51-0.87) $p=0.01$	<b>**2.72</b> $p=0.14$	<b>**2.69</b> $p=0.17$
F3S1B	0.56 (0.42-0.69) $p=0.20$	3.03 $p=0.03$	4.12 $p=0.02$	0.50 (0.29-0.72), $p=0.48$	1.42 $p=0.66$	1.43 $p=0.67$
F4S2B	0.62 (0.51-0.74) $p=0.01$	3.78* $p=0.004$	3.46* $p=0.01$	0.66 (0.52-0.80) $p=0.01$	2.21 $p=0.23$	1.70 $p=0.45$
ApoA-I	0.75 (0.64-0.85) $p<0.0001$	9.8 $p<0.0001$	6.43 $p=0.005$	0.80 (0.68-0.91) $p<0.0001$	6.4 $p=0.009$	3.82 $p=0.07$
コペプチン	0.63 (0.51-0.75) $p=0.01$	2.12 $p=0.11$	3.40 $p=0.10$	0.72 (0.54-0.90) $p=0.008$	6.03 $p=0.01$	3.41 $p=0.10$

## 【0251】

図3に示されているように、競合ELISAアッセイにおいて、抗ApoA-I抗体について陽性であることが知られている患者由来の血清を、様々な濃度のペプチドF3L1と共にプレインキュベートし、次いで、インタクトなApoA-IによってコーティングしたELISAプレートに加え、続いて、標準的なプロトコールにしたがってアッセイ工程を行った。結果は、模倣ペプチドF3L1が、抗ApoA-I抗体について陽性であることが知られている患者血清由来のIgGのインタクトなApoA-Iに対する結合を用量依存的に競合阻害することができたことを実証している（図4）。

## 【0252】

F3、スクランブルF3およびF3L1を用いて行った競合ELISAアッセイの結果（図5）は、スクランブルペプチドについては用量依存的な阻害がないことを示しており、これは、F3L1と、ラクタム架橋を含まない対応するペプチドとを用いて観察された効果の特異性を裏付けている。より一般的には、それは、ヘリックスF由来の対応する領域の適切な二次構造の重要性を強調している。スクランブルF3：Ac-KELYLLKF T V E S K V G S T E L P L N F S L A - N H<sub>2</sub> は、アセチル化N末端に遊離アミノ基を有し、アミド化C末端に遊離カルボキシ基を有する配列番号：26のアミノ酸配列に対

応する。

【0253】

実施例4：本発明の模倣ペプチドF3L1は、抗ApoA-I IgG関連の炎症促進性応答を阻害する

40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最適濃度において適用したポリクローナル抗ApoA-I IgG (Academy Bio-Medical Company; Houston, TX, USA)は、単球由来ヒトマクロファージによるTNF- $\alpha$ 産生の有意な増加を誘発した(図6A)。細胞培養培地へ加える前に、抗ApoA-I IgGをペプチドF3L1と共に室温で2時間プレインキュベートすると、この産生が抑制された。抗ApoA-I抗体について陽性であることが知られている患者から得られたIgGのプールを使用する第二の実験において、同じ効果が観察されたが(図6B)、プールしたIgGによって誘発されたTNF- $\alpha$ 産生のレベルは、ポリクローナル抗ApoA-I IgGによって誘発されたものよりも有意に低かった。

【0254】

これらの結果は、模倣ペプチドF3L1が、抗ApoA-I IgG関連の炎症促進性応答を阻害することを示している。

【0255】

実施例5：模倣ペプチドF3L1は、抗ApoA-I IgG関連の変時応答を阻害する

培養ラット心筋細胞において、抗ApoA-I抗体の添加は強い変時応答を誘発した(図7の左の最初のバーの群)。培養細胞へ加える前に、抗体を模倣ペプチドF3L1(75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )と共に室温で2時間プレインキュベートすると、この応答は完全に抑制された(図7の左から2番目のバーの群)。最後に、単独で加えると、ペプチドF3L1は、基本収縮頻度率および10 nMアルドステロンの存在下における収縮率をいずれも変化させなかったが(図7の右の最後のバーの群)、これは、F3L1の抗ApoA-I IgG関連の変時応答を抑制する能力が、F3L1の抗ApoA-I抗体と相互作用する能力に直接関係することを示唆している。

【0256】

これらの結果は、模倣ペプチドF3L1が、抗ApoA-I IgG関連の変時応答を阻害することを示している。

【0257】

実施例3および4に記載されている結果は、F3L1が、心血管疾患の治療に有益な効果を有し得ることを示している。

【0258】

実施例6：抗ApoA-I抗体に対して免疫反応性のあるApoA-Iのエピトープの質量分析による同定

ApoA-Iの特定の内在性エピトープ同定するために、精製ApoA-Iを酵素消化に付して、リジンのカルボキシル側またはアルギニンのカルボキシル側特異的にタンパク質を加水分解し、続いて、逆相高速液体クロマトグラフィーによってペプチドを分離および精製し、質量分析によってペプチドを同定した。自己抗体の力価が高い3人の患者由来の血清サンプル、および自己抗体の力価が低い3人の患者由来の血清サンプルを使用して、ELISAによって消化タンパク質および各画分に対する免疫反応性を試験した。

【0259】

リジン残基において消化されたApoA-Iの場合、酵素エンドプロテイナーゼLys-C (Roche Applied Science)を使用した(酵素量1:50はタンパク質重量で1/50であった。インキュベーションは37°Cで18時間、pH8.5)。Lys-CによるApoA-I消化により、配列番号:1のApoA-Iの成熟アミノ酸配列を基準にしてアミノ酸残基141~182に対応するアミノ酸配列のこれまで未報告の免疫反応性ペプチドエピトープであって、配列番号:5の最後の2つのアミノ酸が欠失した配列番号:5のヘリックスD由来の領域を含む免疫反応性ペプチドエピトープを含む画分70および71(図8)を同定することができた。このエピトープのアミノ酸

配列は、配列番号：21である。

【0260】

アルギニン残基において切断されたペプチド断片を作製するために、従来の方法は酵素 Arg C を使用するであろう。しかしながら、Arg C 酵素は特異性の欠如が認められており、トリプシンペプチドが生成されて免疫反応性が無くなった。これを克服するために、消化前に、無水マレイン酸によって Apo A 1 をリジン残基において可逆的に遮断し、アルギニン特異的な切断を達成した (Butler et al, 1967, Biochemical Journal, 103 (3) : 78P - 79P; Butler et al, Biochemical Journal, 112 (5) : 679 - 689)。このアプローチにより、配列番号：1 の Apo A - I の成熟アミノ酸配列を基準にしてアミノ酸残基 216 ~ 243 に対応するアミノ酸配列の別の免疫反応性ペプチドエピトープであって、配列番号：8 のヘリックス F 由来の領域 1 を含む免疫反応性ペプチドエピトープを含む画分 74 および 80 (図 9) を同定することができた。このエピトープのアミノ酸配列は、配列番号：25 である。

10

【0261】

実施例 6 に記載されている結果は、本実施例において同定された特定のエピトープ、より一般的には、配列番号：5 のヘリックス D 由来の領域、ならびにそれぞれ配列番号：8 および配列番号：9 のヘリックス F 由来の領域 1 および領域 2 が、免疫反応性がより低かった配列番号：1 の成熟 Apo A - 1 のアミノ酸残基 189 ~ 215 に対応するペプチドに含まれる他のヘリックス、特にヘリックス E を含む他の Apo A - I 断片に比べて抗 Apo A - I 抗体に対してより免疫反応性が高かったことを示している。したがって、そのアミノ酸配列がこれらの領域の少なくとも 1 つを含むペプチドを有利に使用して、抗 Apo A - I 自己抗体を検出し得る。

20

【0262】

より多くのサンプル (n = 9) を用いて、実施例 4 および 5 に記載されているのと同様の実験を繰り返して、上記実施例に示されている結果を確認している。

【0263】

配列表

ヒト Apo A - I : 配列番号 : 1

DEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGK  
QLNLKLLDNWDSVTSTFSKLRQLGPVTQEFWDNLEKETEG  
GLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEEMELRYRQKVE  
PLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGGEEMRDRARAHVDALR  
THLAPYSDELRLQRLAARLEALKENG GARLA EYHAKATEHL  
STLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESF KVSFLSALE EYT KKL  
NTQ

30

ヘリックス A 由来の領域 : 配列番号 : 2 :

VKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSAL

ヘリックス B 由来の領域 : 配列番号 : 3 :

DSVTSTFSKLRQLGPVTQEFWDNLEKETEG L

40

ヘリックス C 由来の領域 : 配列番号 : 4 :

YLDDFQKKWQEEEMELRYRQKVEPLRAELQEGARQKLHE

ヘリックス D 由来の領域 : 配列番号 : 5 :

EEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELRLQRLAARLEALKEN

ヘリックス E 由来の領域 1 : 配列番号 : 6 :

ATEHLSTLSEKAKPALE

ヘリックス E 由来の領域 2 : 配列番号 : 7 :

LA EYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLR

ヘリックス F 由来の領域 1 : 配列番号 : 8 :

VLESF KVSFLSALE EYT KKLNT

50

ヘリックスF由来の領域2：配列番号：9：

G L L P V L E S F K V S F L S A L E E Y T K K L N T

アセチル化およびアミド化を含まないA1S2：

V K D L R<sub>8</sub> T V Y V D V S<sub>5</sub> K D S G R D Y V S Q F E G S A L

前記配列の5位のR<sub>8</sub>および12位のS<sub>5</sub>を連結する炭化水素ステープルを有し、

V K D L X a a T V Y V D V X a a K D S G R D Y V S Q F E G S A L (配列番号：10、5位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R)-C(O)-(式中、Rは、12位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-である)の修飾アラニンに置換されており、12位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R')-C(O)-(式中、R'は、上において定義した5位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)によって表される。

10

アセチル化およびアミド化を含まないB1S2：

D S V T S T R<sub>8</sub> S K L R E Q S<sub>5</sub> G P V T Q E F W D N L E K E T E G L

前記配列の7位のR<sub>8</sub>および14位のS<sub>5</sub>を連結する炭化水素ステープルを有し、

D S V T S T X a a S K L R E Q X a a G P V T Q E F W D N L E K E T E G L (配列番号：11、7位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R)-C(O)-(式中、Rは、14位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-である)の修飾アラニンであり、14位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R')-C(O)-(式中、R'は、上において定義した7位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)によって表される。

20

アセチル化およびアミド化を含まないC1S2：

Y L D D F Q K K W Q E E R<sub>8</sub> E L Y R Q K S<sub>5</sub> E P L R A E L Q E G A R Q K L H E L

前記配列の13位のR<sub>8</sub>および20位のS<sub>5</sub>を連結する炭化水素ステープルを有し、

Y L D D F Q K K W Q E E X a a E L Y R Q K X a a E P L R A E L Q E G A R Q K L H E L (配列番号：12、13位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R)-C(O)-(式中、Rは、20位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-である)の修飾アラニンであり、20位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R')-C(O)-(式中、R'は、上において定義した13位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)によって表される。

30

アセチル化およびアミド化を含まないD1S2A：

E E M R D R A R A H R<sub>8</sub> D A L R T H S S<sub>5</sub> A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K E N

前記配列の11位のR<sub>8</sub>および18位のS<sub>5</sub>を連結する炭化水素ステープルを有し、

E E M R D R A R A H X a a D A L R T H X a a A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K E N (配列番号：13、11位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R)-C(O)-(式中、Rは、18位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-である)の修飾アラニンであり、18位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R')-C(O)-(式中、R'は、上において定義した11位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)によって表される。

40

アセチル化およびアミド化を含まないE1S2：

A T E H R<sub>8</sub> S T L S E K S<sub>5</sub> K P A L E D

前記配列の5位のR<sub>8</sub>および12位のS<sub>5</sub>を連結する炭化水素ステープルを有し、

A T E H X a a S T L S E K X a a K P A L E D (配列番号：14、5位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R)-C(O)-(式中、Rは、12位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-である)の修飾アラニンであり、12位のX a aは、式(I)：-NH-C(CH<sub>3</sub>)(R')-C

50

(O) - (式中、R' は、上において定義した5位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)によって表される。

アセチル化およびアミド化を含まないF 3 L 1 :

G L L P V L E S F K V S F L S A L E E E Y T K K L N T

前記配列の19位のEおよび23位のKを連結するラクタム架橋を有し、

G L L P V L E S F K V S F L S A L E X a a Y T K X a a L N T (配列番号: 19、19位のX a aは、式(I): -NH-C(H)(R)-C(O)-(式中、Rは、23位の後続X a aに連結されたラクタム架橋-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-である)の修飾アミノ酸であり、23位のX a aは、式(I): -NH-C(H)(R')-C(O)-(式中、R' は、上において定義した19位のX a aからラクタム架橋に連結された単結合である)の修飾アミノ酸である)によって表される。

10

アセチル化およびアミド化を含まないF 3 S 2 A :

G L L P V L E S F K V S F L S R<sub>8</sub> L E E Y T K S<sub>5</sub> L N T

前記配列の16位のR<sub>8</sub>および23位のS<sub>5</sub>を連結する炭化水素ステープルを有し、

G L L P V L E S F K V S F L S X a a L E E Y T K X a a L N T (配列番号: 15、16位のX a aは、式(I): -NH-C(CH<sub>3</sub>)(R)-C(O)-(式中、Rは、23位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-である)の修飾アラニンであり、23位のX a aは、式(I): -NH-C(CH<sub>3</sub>)(R')-C(O)-(式中、R' は、上において定義した16位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)によって表される

20

アセチル化およびアミド化を含まないF 3 S 1 B :

G L L P V L E S F K V S S<sub>5</sub> L S A S<sub>5</sub> E E Y T K K L N T

前記配列の13位のS<sub>5</sub>および17位のS<sub>5</sub>を連結する炭化水素ステープルを有し、

G L L P V L E S F K V S X a a L S A X a a E E Y T K K L N T (配列番号: 16、13位のX a aは、式(I): -NH-C(CH<sub>3</sub>)(R)-C(O)-(式中、Rは、17位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-である)の修飾アラニンであり、17位のX a aは、式(I): -NH-C(CH<sub>3</sub>)(R')-C(O)-(式中、R' は、上において定義した13位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)によって表される

30

アセチル化およびアミド化を含まないF 4 S 2 B :

V L E S F K V S R<sub>8</sub> L S A L E E S<sub>5</sub> T K K L N T

前記配列の9位のR<sub>8</sub>および16位のS<sub>5</sub>を連結する炭化水素ステープルを有し、

V L E S F K V S X a a L S A L E E X a a T K K L N T (配列番号: 17、9位のX a aは、式(I): -NH-C(CH<sub>3</sub>)(R)-C(O)-(式中、Rは、16位の後続X a aに連結された炭化水素ステープル-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-である)の修飾アラニンであり、16位のX a aは、式(I): -NH-C(CH<sub>3</sub>)(R')-C(O)-(式中、R' は、上において定義した9位のX a aから炭化水素ステープルに連結された単結合である)の修飾アラニンである)によって表される。

40

アミド化を含まない直鎖状E F L 1 :

C A E Y H A K A T E H L S T L S E K A K P A L E D L R X G L L P V L E S F K V S F L S A L E E Y T K K L N T C、

28位のX = G l n類似体(側鎖はCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>ではなくCH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>)、および前記配列の47位のEおよび51位のKを連結するラクタム架橋を有し、

C A E Y H A K A T E H L S T L S E K A K P A L E D L R X a a G L L P V L E S F K V S F L S A L E X a a Y T K X a a L N T C (配列番号: 18、28位のX a aは、側鎖としてCH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>を有するG l n類似体であり、47位のX a aは、式(I): -NH-C(H)(R)-C(O)-(式中、Rは、51位の後続X a a

50

に連結されたラクタム架橋 - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - CO - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - である) の修飾アミノ酸であり、51位のXaaは、式(I) : - NH - C(H)(R') - C(O) - (式中、R'は、上において定義した47位のXaaからラクタム架橋に連結された単結合である) の修飾アミノ酸である) によって表される。

アセチル化およびアミド化を含まないF4L1 : 配列番号 : 20 :

V L E S F K V S F L S A L E X a a Y T K X a a L N T

15位のXaaは、式(I) : - NH - C(H)(R) - C(O) - (式中、Rは、19位の後続Xaaに連結されたラクタム架橋 - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - CO - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - である) の修飾アミノ酸であり、19位のXaaは、式(I) : - NH - C(H)(R') - C(O) - (式中、R'は、上において定義した15位のXaaからラクタム架橋に連結された単結合である) の修飾アミノ酸である。

10

D2(a a 1 4 1 - 1 8 2) : 配列番号 : 21 :

L S P L G E E M R D R A R A H V D A L R T H L A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K

D2S2A : 配列番号 : 22 :

L S P L G E E M R D R A R A H X a a D A L R T H X a a A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K

16位のXaaは、式(I) : - NH - C(CH<sub>3</sub>)(R) - C(O) - (式中、Rは、23位の後続Xaaに連結された炭化水素ステープル - (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> - CH = CH - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - である) の修飾アラニンであり、23位のXaaは、式(I) : - NH - C(CH<sub>3</sub>)(R') - C(O) - (式中、R'は、上において定義した16位のXaaから炭化水素ステープルに連結された単結合である) の修飾アラニンである。

20

D3 : 配列番号 : 23 :

E E M R D R A R A H V D A L R T H L A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K

D3S2A : 配列番号 : 24 :

E E M R D R A R A H X a a D A L R T H X a a A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K

11位のXaaは、式(I) : - NH - C(CH<sub>3</sub>)(R) - C(O) - (式中、Rは、18位の後続Xaaに連結された炭化水素ステープル - (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> - CH = CH - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - である) の修飾アラニンであり、18位のXaaは、式(I) : - NH - C(CH<sub>3</sub>)(R') - C(O) - (式中、R'は、上において定義した11位のXaaから炭化水素ステープルに連結された単結合である) の修飾アラニンである。

30

F5 : 配列番号 : 25 :

Q G L L P V L E S F K V S F L S A L E E Y T K K L N T Q

アセチル化およびアミド化を含まないスクランブルF3 : 配列番号 : 26 :

K E L Y L L K F T V E S K V G S T E L P L N F S L A

本配列表において、R<sub>8</sub>は、(R) - 2 - (7' - オクテニル) - アラニンに対応し、S<sub>5</sub>は、(S) - 2 - (4' - ペンテニル) - アラニンに対応する。

## 【図 1 A B】

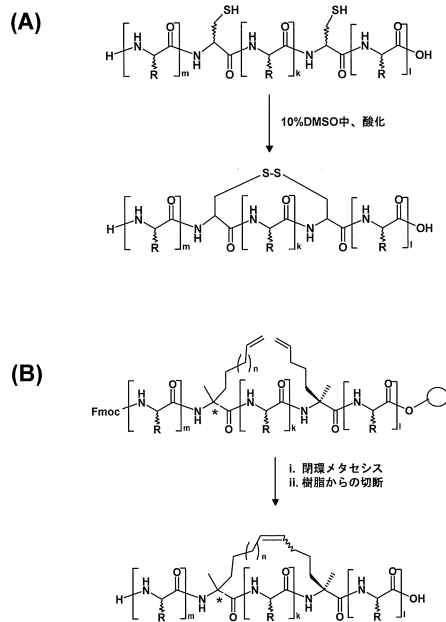


Figure 1

## 【図 1 C】

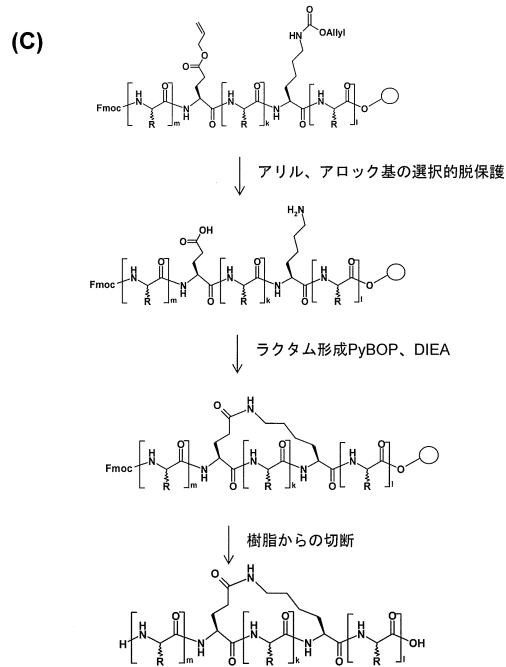


Figure 1 (continued)

## 【図 2】

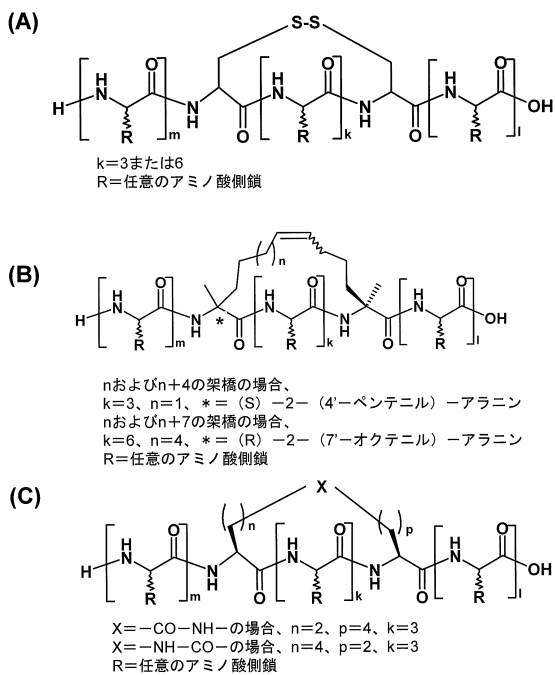


Figure 2

## 【図 3 A B】

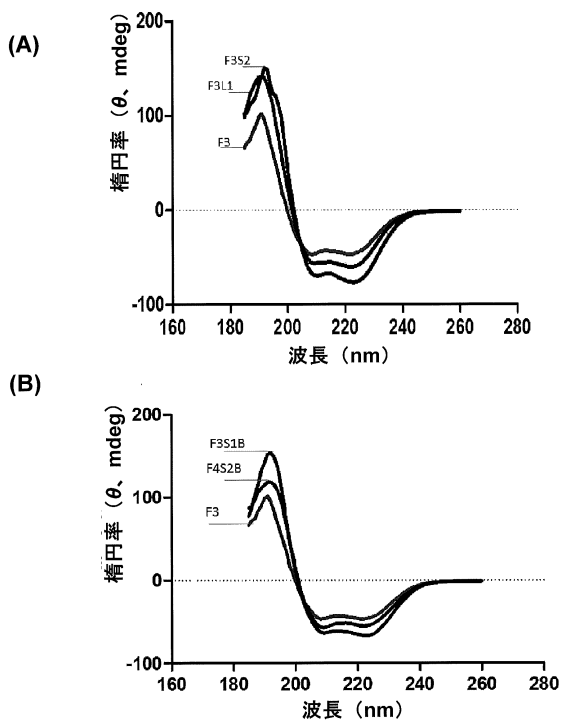


Figure 3

【図 3 C】

(C)

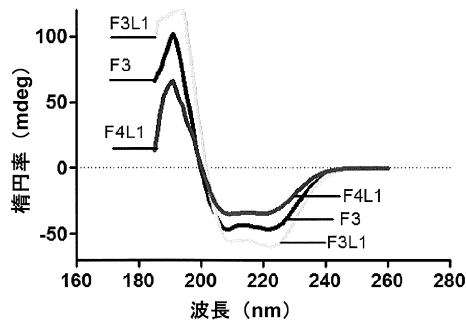
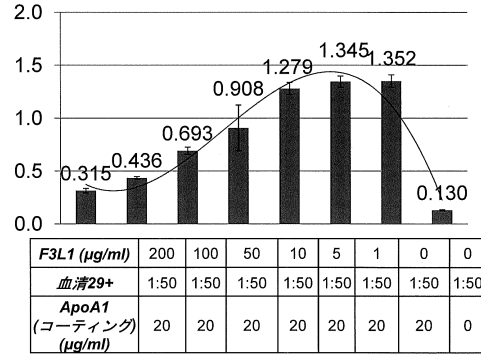


Figure 3 (continued)

【図 4】

(A)



(B)

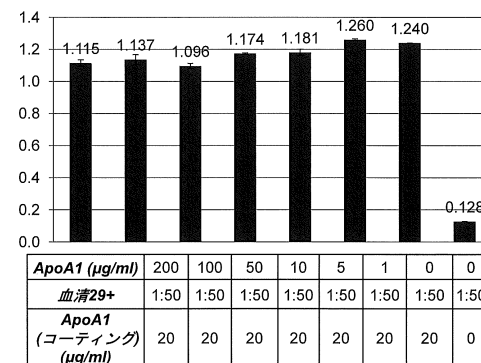


Figure 4

【図 5 A】

(A)

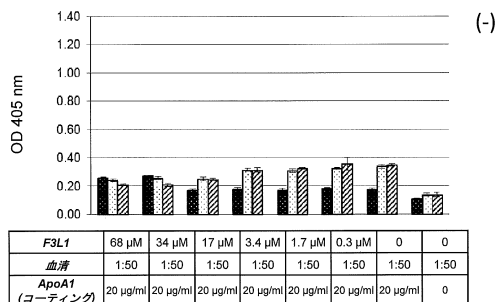
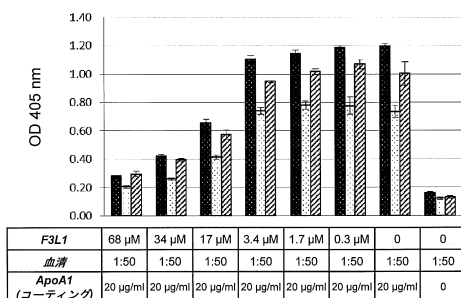


Figure 5

【図 5 B】

(B)

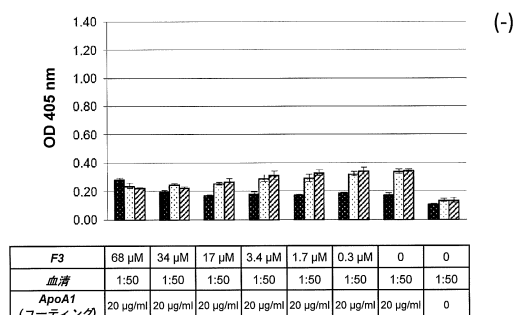
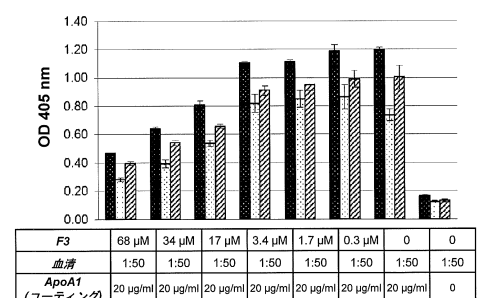


Figure 5 (continued)

【図 5 C】

(C)

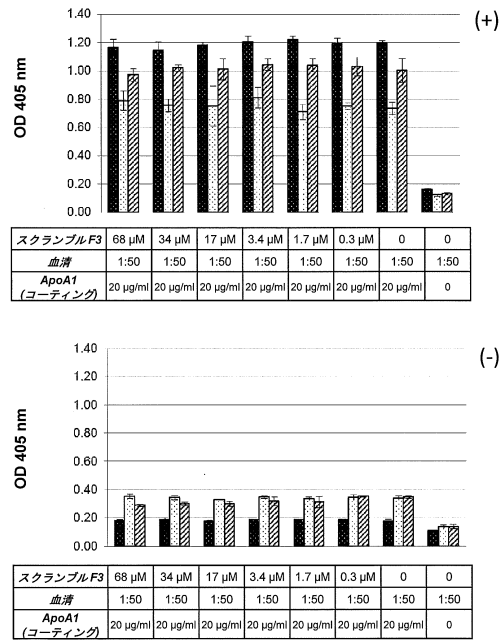


Figure 5 (continued)

【図 6 A】

(A)

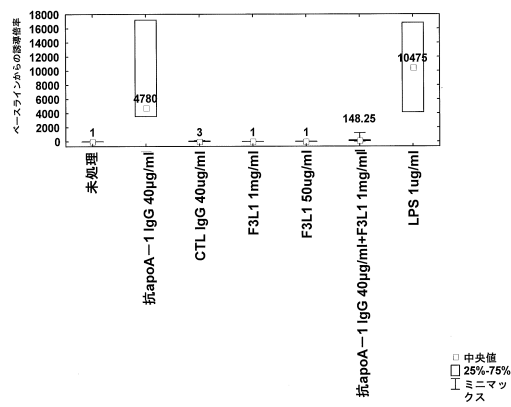


Figure 6

【図 6 B】

(B)

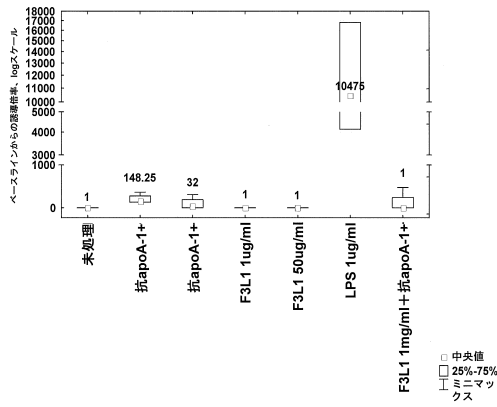


Figure 6 (continued)

【図 7】

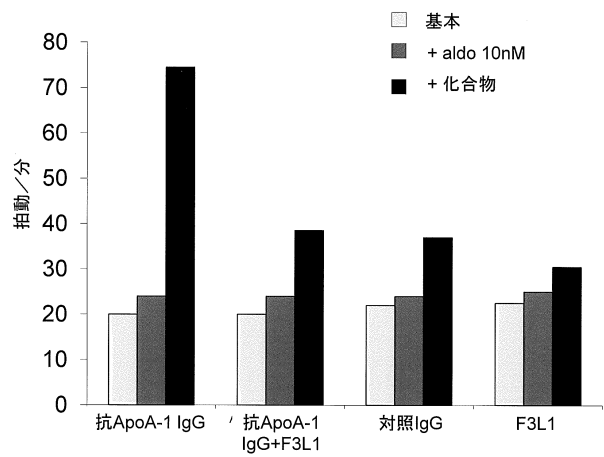


Figure 7

【 図 8 】

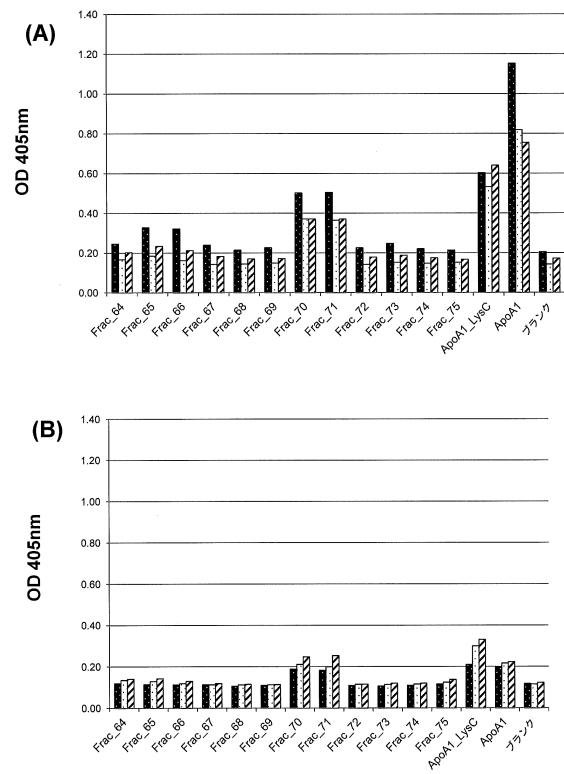


Figure 8

【 図 9 】

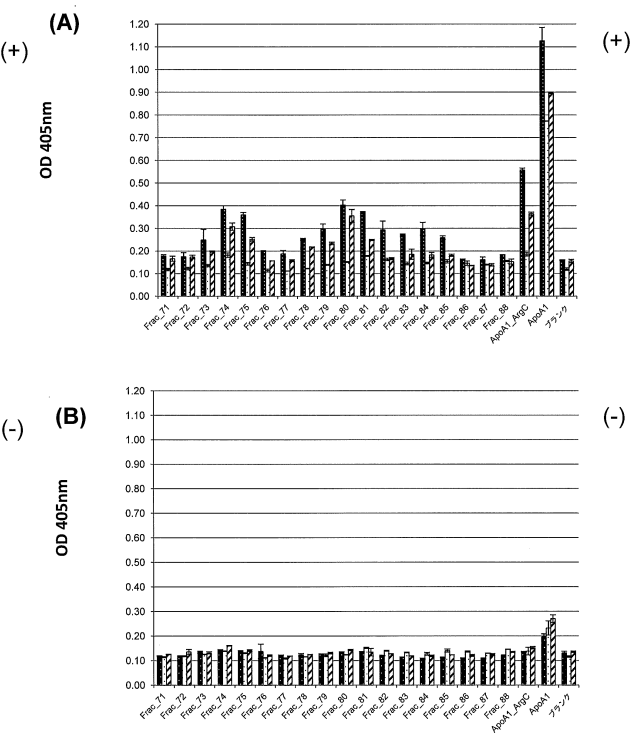


Figure 9

【 配 列 表 】

0006499967000001 . app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
			A 6 1 P 1/02

(73)特許権者 591003013

エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー  
 F . HOFFMANN - LA ROCHE AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ 1 2 4

(74)代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100103447

弁理士 井波 実

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100180873

弁理士 田村 慶政

(72)発明者 ヴュイユミエール、ニコラ

スイス国 セーアシュ - 1 2 2 5 ジュネーブ、シュマン プティ ベル - エール、4 1

(72)発明者 パガノ、サブリーナ

スイス国 セーアシュ - 1 2 0 8 ジュネーブ、シュマン ドゥ ラ フロランス、1 3

(72)発明者 アートレ、オリヴィエ

スイス国 セーアシュ - 1 2 2 7 カルージュ、シュマン ドゥ ラ グラン ピエス、1

(72)発明者 ガートナー、ユベール

フランス国 エフ - 7 4 1 6 0 アルシャン、ルート ドゥ プレシャン、1 3 6 9

(72)発明者 カミッロ テイシェイラ、プリシラ

スイス国 ツェーハー - 4 0 5 2 バーゼル、エンゲルガッセ 6

(72)発明者 クトラー、パウル

スイス国 ツェーハー - 4 0 5 7 バーゼル、ベーレンフェルザーシュトラッセ 1 1

(72)発明者 フェルベール、フィリップ

フランス国 エフ - 6 8 9 6 0 ウィエ、リュ デ セニユー、1 8

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 1 4 9 5 6 3 (WO, A 1)

特表 2 0 0 4 - 5 2 9 1 4 3 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 4 / 7 7 5

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)