(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-513059
(P2004-513059A)
(43)公表日　平成16年4月30日(2004.4.30)

(51)Int.Cl.[7]	F I	テーマコード（参考）
A61K 38/00	A61K 37/02	4C076
A61K 9/127	A61K 9/127	4C084
A61K 47/48	A61K 47/48	4H045
A61P 11/00	A61P 11/00	
A61P 17/02	A61P 17/02	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 46 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-590684(P2000-590684)
(86)(22)出願日　平成11年12月15日(1999.12.15)
(85)翻訳文提出日　平成13年6月25日(2001.6.25)
(86)国際出願番号　PCT/EP1999/009964
(87)国際公開番号　WO2000/038733
(87)国際公開日　平成12年7月6日(2000.7.6)
(31)優先権主張番号　98204396.0
(32)優先日　平成10年12月24日(1998.12.24)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

(71)出願人　598109246
ユセベ，ソシエテ　アノニム
ベルギー国，ベー－１０７０　ブリュッセル，ア　レ　デュ　ラ　ルシェルシェ，６０
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100092624
弁理士　鶴田　準一
(74)代理人　100114340
弁理士　大関　雅人
(74)代理人　100082898
弁理士　西山　雅也
(74)代理人　100081330
弁理士　樋口　外治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ペプチド産物、方法及び組成物

(57)【要約】
本発明は、テトラペプチド：アセチル－グルタミル－グルタミル－グルタミル－アスパルチルを細胞に導入させることができる化学物質とあわせて前記テトラペプチドを含むペプチド産物に関する。本発明は、少くとも１つの医薬として許容される賦形剤及び有効量の本発明によるペプチド産物を含む医薬組成物にも関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
テトラペプチド：アセチル－グルタミル－グルタミル－グルタミル－アスパルチルを細胞に導入することができる化学物質とあわせて前記テトラペプチドを含むペプチド産物。
【請求項２】
前記化学物質が、リポソーム、脂質及び／又は脂肪酸から作られた脂質ベシクル、カチオン性ベシクル又はそれらの混合物である請求項１に記載のペプチド産物。
【請求項３】
前記化学物質が少くとも８アミノ酸のポリペプチドである請求項１に記載のペプチド産物。
【請求項４】
前記ポリペプチドがｔａｔに媒介されるタンパク質である請求項３に記載のペプチド産物。
【請求項５】
前記ポリペプチドがホメオボックスポリペプチドである請求項３に記載のペプチド産物。
【請求項６】
前記テトラペプチドが前記化学物質にスペーサーを介して連結されている請求項１～５のいずれか一に記載のペプチド産物。
【請求項７】
ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）；ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）；ＡｃＥＥＥＤ－β－Ａ－β－Ａ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ＡｃＥＥＥＤ－β－Ａ－β－Ａ－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）；ＡｃＥＥＥＤ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ＡｃＥＥＥＤ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）；ＡｃＥＥＥＤ－Ｃ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ＡｃＥＥＥＤ－Ｃ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）；α－（ＢｉｏｔｙｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：α－（Ｂｉｏｔｉｎｙｌ－ＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）；ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}）（次の構造で表される：ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＰＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）；及びα－（ＢｉｏｔｙｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}），（次の構造で表される：α－（ＢｉｏｔｉｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＰＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）からなる群から選択される請求項１に記載のペプチド産物。
【請求項８】
少くとも１の医薬として許容される賦形剤と、有効量の請求項１～７のいずれか一に記載のペプチド産物と、を含む医薬組成物。
【請求項９】
薬剤の製造のための、請求項８に記載の医薬組成物又は請求項１～７のいずれか一に記載のペプチド産物の使用。
【請求項１０】
α－ＳＭアクチン発現に関連する疾患の予防及び／又は治療における請求項９に記載の使用であって、前記疾患が、創傷収縮、肥大性瘢痕、線維腫症及び線維症状態からなる群から選択される使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明は、活性なテトラペプチド：アセチル－グルタミル－グルタミル－グルタミル－アスパルチルを細胞に導入させるベクターとあわせて前記テトラペプチドを含むペプチド産

物に関する。
本発明は、前記ペプチド産物を含む医薬組成物、並びに創傷収縮、肥大性瘢痕、線維腫症、特にいわゆるデュプイトラン病及び線維症状態（特に肺線維症）の予防及び／又は治療のためのその使用に関する。
Ｓｋａｌｌｉら（Ｊ．ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｖｏｌ．１０３　Ｎｏ．６，ｐｐ．２７８７－２７９６（１９８６））は、α平滑筋（α－ＳＭ）アクチンを排他的に認識する抗体（抗α－ＳＭ－１）は、担体分子に結合したα－ＳＭアクチンのアミノ末端の合成デカペプチドでのＢＡＬＢ／ｃマウスの免疫化の後に選択されキャラクタライズされることを記載する。
【０００２】
α－ＳＭアクチンは実験的創傷治癒の間、ミオフィブロブラストにおいて一時的に発現されることも知られている（Ｄａｒｂｙら、Ｌａｂｏｒａｔｏｎ，ｔｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ　Ｖｏｌ．６３，２１～２９（１９８０））、Ｃｈａｐｏｎｎｉｅｒら（Ｊ．ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｖｏｌ．１３０　Ｎｏ．４，８８７－８９５（１９９５））は、特定のモノクローナル抗体抗α－ＳＭ－１の結合へのα－ＳＭアクチンのアミノ末端デカペプチド（ＡｃＥＥＥＤＳＴＡＬＶＣ）のブロッキング効果を記述する。
抗α－ＳＭ－１は、単一のアクチンアイソフォームに特異的であると記述される最初のモノクローナル抗体であり、生理学的及び病理学的過程における脈管ＳＭ細胞及びミオフィブロブラスト表現型調節の研究のための信頼できるツールである。
この文献は、前記抗体（特にそのＦａｂフラグメント）が試験管内α－ＳＭアクチン重合を増加させることを示す。その文献はテトラペプチドＡｃＥＥＥＤが、α－ＳＭアクチン発現が調節される生理学的及び病理学的状態において、ＳＭ細胞、フィブロブラスト、ミオフィブロブラスト又は筋上皮細胞のような細胞においてα－ＳＭアクチンの機能の研究のために用いることができる。その文献は、テトラペプチドＡｃＥＥＥＤが、マイクロインジェクション技術を用いる時にＳＭ細胞の培養において張力繊維へのα－ＳＭアクチンの組込みを阻害することも示唆する。
【０００３】
張力繊維へのα－ＳＭアクチンの活性をターンホーバーが存在すること、及びＡｃＥＥＥＤがα－ＳＭアクチンのアミノ末端配列と相互作用し重合を活性化するタンパク質を捕獲することも示されている（Ｃｈａｐｏｎｎｉｅｒ，Ｃ．ら、Ｅｘｐｅｒｉｅｎｔｉａ，１９９５，５１．Ａ６２）。
Ｊａｒｌｅｂａｒｋ，Ｌら（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　ａｎｄ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，１９９６，２２９（２），３６３～３６９）は、アデノシン５′－カルボン酸の特定のペプチジル誘導体が、特定のＰ２プリン受容体保有生物システム（グリオーメ及び平滑筋細胞系及び単離された平滑筋組織調製物）において阻害効果を有することを開示する。
本発明は、試験管内及び生体内で張力繊維における、α－ＳＭ－アクチン組織化を妨害するために、細胞内への導入を許容する特定のテトラペプチドＡｃＥＥＥＤを含むペプチド産物を供することを目的とする。
【０００４】
本発明の別の目的は、α－ＳＭアクチン発現に関連する種々の疾患、例えば創傷収縮、肥大性瘢痕、線維腫症、特にデュプイトラン病及び線維症状態（特に肺線維症）を治療及び／又は予防するために、そのペプチド産物を含む医薬組成物を供することである。
本発明は、活性なテトラペプチド：アセチル－グルタミル－グルタミル－グルタミル－アスパルチル（以後、式：ＡｃＥＥＥＤで示す）を細胞に導入することができる化学物質と会合した前記テトラペプチドを含むペプチド産物に関する。
本発明によれば、活性なテトラペプチドにおいて、Ａｃはアセチルを意味し、Ｅはグルタミン酸残基を意味し、Ｄはアスパラギン酸残基を意味する。
本発明によれば、化学物質には、ベクターがある。
【０００５】

本発明によれば、細胞には、生体内細胞、例えば生きている動物もしくはヒトの器官もしくは組織を構成する細胞、又は生きている動物もしくはヒト中に見い出される微生物；又は試験管内細胞、例えば培養した動物細胞、ヒト細胞もしくは微生物がある。好ましくは、それはヒト細胞、より好ましくは繊維芽細胞又は平滑筋細胞を意味する。
本発明の第１の実施形態によれば、化学物質は、リポソーム、脂質及び／又は脂肪酸から作られた脂質ベシクル、又はカチオン性ベシクル。例えばＧａｏ　Ｘ及びＨｕａｎｇ　Ｌ．（Ｃａｔｉｏｎｉｃ　Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ　Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ，　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ，　ｐｐ．７１０－７２２（１９９５））に記載されるもの及び／又はそれらの混合物であり得る。
本発明の第２の実施形態によれば、化学物質は好ましくは少くとも約８アミノ酸、好ましくは８～４０、より好ましくは１０～３０アミノ酸を有するポリペプチドである。
【０００６】
本発明の別の実施形態によれば、前記ポリペプチドは、有利には特定細胞の膜レセプターと結合する能力を有するｔａｔ媒介タンパク質である。
異種ペプチドの細胞へのデリバリーのための、本発明によるテトラペプチドへのｔａｔ媒介タンパク質のような化学物質の好ましい連結は、引用により本明細書に組み込まれる国際特許公報ＷＯ９４／０４６８６に記載される。式：ｔａｔ３７－７２，ｔａｔ３７－５８，ｔａｔ３８－５８ＧＧＣ，ｔａｔＣＧＧ４７－５８，ｔａｔ４７－５８ＧＧＣ及びｔａｔΔＣで最も良い結果が得られている。
本発明の好ましい実施形態によれば、化学物質はホメオボックスペプチド、好ましくは、引用により本明細書に組み込まれる国際特許公報ＷＯ９７／１２９１２に記載されるｐＡｎｔｐペプチドである。ペプチドｐＡｎｔｐ［４３－５８］、及びペプチドｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}で最も良い結果が得られている。ペプチドｐＡｎｔｐ［４３－５８］は、Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ｉｌｅ－Ｌｙｓ－Ｉｌｅ－Ｔｒｐ－Ｐｈｅ－Ｇｌｎ－Ａｓｎ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｍｅｔ－Ｌｙｓ－Ｔｒｐ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓを意味する。ここで、この記載について、第１のアミノ酸Ａｒｇは位置４３のアミノ酸と呼ばれ、最後のアミノ酸Ｌｙｓは位置５８のアミノ酸と呼ばれる。ペプチドｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}は、ｐＡｎｔｐ［４３－５８］と同じ配列であってＧｌｎが位置５０でＰｒｏに置換されているものを示す。
【０００７】
本発明は、当業者に知られた方法、例えば脂質ベシクル（Ｍａｒｔｉｎ Ｆ．Ｇ．，　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ ｏｆ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ，　Ｐｒａｖｅｅｎ Ｔｙｌｅ Ｅｄ．，　Ｓｐｅｃｉａｌｉｓｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，　Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｃｋｅｒ，　Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３））、自動ペプチド合成、分子間架橋の方法を用いるこれら産物の調製方法にも関する。
おそらく、テトラペプチドは、スペーサー、好ましくはペプチドスペーサーを介して、化学物質に連結される。そのスペーサーは、好ましくはアミノ酸又は５以下のアミノ酸を含むペプチドである。好ましくは、スペーサーとして用いるアミノ酸は、ＡｃＥＥＥＤテトラペプチドがα－アミノ基を介してもしくはε－アミノ基を介して結合するリシル残基（“Ｋ”）、又はＡｃＥＥＥＤテトラペプチドがα－アミノ基を介して結合するシステール残基（“Ｃ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃ”により表される、ジスルフィド結合を形成するそれらのβスルフィド官能基により連結される２つのシスティニル残基（“Ｃ”）を意味する）、又はＡｃＥＥＥＤテトラペプチドがα－アミノ基を介して結合するβ－アラニル－β－アラニルジペプチド（“β－Ａ－β－Ａ”）、又はＡｃＥＥＥＤテトラペプチドがε－アミノ基を介して結合するリシル残基（“Ｋ”）、及びＡｃＥＥＥＤテトラペプチドがα－アミノ基を介して結合するビオチニルＧＧ残基（２つの連続的グリシル残基にそのカルボキシル官能基を介して結合するビオチニル官能基を意味する）である。
【０００８】
α－アミノ基を介して又はリシル残基のε－アミノ基を介して連結されたＡｃＥＥＥＤテトラペプチドで、最も優れた結果が得られている。

本発明によれば、ペプチド産物は、好ましくは、
ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］），
ＡｃＥＥＥＤ－β－Ａ－β－Ａ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］），
ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］），
ＡｃＥＥＥＤ－β－Ａ－β－Ａ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}），
ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}），
ＡｃＥＥＥＤ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}），
ＡｃＥＥＥＤ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］），
ＡｃＥＥＥＤ－Ｃ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］），
ＡｃＥＥＥＤ－Ｃ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}）．
α－（ＢｉｏｔｙｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］），
ε－ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}），
α－（ＢｉｏｔｙｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}），
からなる群から選択される。

【０００９】

ペプチド産物は、より好ましくは、
ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）（以後、“産物１”と呼ぶ）；
ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）（以後、“産物２”と呼ぶ）；
ＡｃＥＥＥＤ－β－Ａ－β－Ａ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ＡｃＥＥＥＤ－β－Ａ－β－Ａ－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）（以後、“産物３”と呼ぶ）；
ＡｃＥＥＥＤ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ＡｃＥＥＥＤ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）（以後、“産物４”と呼ぶ）；
ＡｃＥＥＥＤ－Ｃ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：ＡｃＥＥＥＤ－Ｃ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）（以後、“産物５”と呼ぶ）；
α－（ＢｉｏｔｙｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）（次の構造で表される：α－（Ｂｉｏｔｉｎｙｌ－ＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）（以後、“産物６”と呼ぶ）；
ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}）（次の構造で表される：ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＰＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）（以後、“産物７”と呼ぶ）；
α－（ＢｉｏｔｙｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}）（次の構造で表される：α－（ＢｉｏｔｉｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＰＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ）（以後、“産物８”と呼ぶ）
からなる群から選択される。

【００１０】

最も優れた結果は、産物α－（ＢｉｏｔｙｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］－Ｐｒｏ^{50}）及び産物ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）で得られる。

産物１～８において、α－（　）－Ｋ－は、括弧内の官能基がリシル残基のα－アミノ基上に結合していることを意味し；ε－（　）－Ｋ－は、括弧内の官能基がリシル残基のε－アミノ基上に結合していることを意味し；－β－Ａは、β－アラニル残基を示し；そしてＣ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃは、それらのβスルフィド機能を介して結合し、ジスルフィド架橋を形成する２つのシスティニル残基を示す。産物１，５～８は直鎖でなく、分枝鎖配

列であり；産物２，３及び４は直鎖状で、非分枝鎖配列である。配列表において産物２は配列番号：１の配列で示され；産物３は配列番号：２の配列で示され；ここでＸａａはβＡｌａを意味し；そして産物４は配列番号：３の配列で示される。
産物１はε－（Ａｃｅｔｙｌ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ａｓｐ）Ｌｙｓ Ａｒｇ Ｇｌｎ Ｉｌｅ Ｌｙｓ Ｉｌｅ Ｔｒｐ Ｐｈｅ Ｇｌｎ Ａｓｎ Ａｒｇ Ａｒｇ Ｍｅｔ Ｌｙｓ Ｔｒｐ Ｌｙｓ Ｌｙｓ ＯＨである。
産物２はＡｃｅｔｙｌ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ａｓｐ Ｌｙｓ Ａｒｇ Ｇｌｎ Ｉｌｅ Ｌｙｓ Ｉｌｅ Ｔｒｐ Ｐｈｅ Ｇｌｎ Ａｓｎ Ａｒｇ Ａｒｇ Ｍｅｔ Ｌｙｓ Ｔｒｐ Ｌｙｓ Ｌｙｓ ＯＨである。
産物３はＡｃｅｔｙｌ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ａｓｐ βＡｌａ βＡｌａ Ａｒｇ Ｇｌｎ Ｉｌｅ Ｌｙｓ Ｉｌｅ Ｔｒｐ Ｐｈｅ Ｇｌｎ Ａｓｎ Ａｒｇ Ａｒｇ Ｍｅｔ Ｌｙｓ Ｔｒｐ Ｌｙｓ Ｌｙｓ ＯＨである。
産物４はＡｃｅｔｙｌ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ａｓｐ Ａｒｇ Ｇｌｎ Ｉｌｅ Ｌｙｓ Ｉｌｅ Ｔｒｐ Ｐｈｅ Ｇｌｎ Ａｓｎ Ａｒｇ Ａｒｇ Ｍｅｔ Ｌｙｓ Ｔｒｐ Ｌｙｓ Ｌｙｓ ＯＨである。
【００１１】
産物５はＡｃｅｔｙｌ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ａｓｐ Ｃｙｓ［Ｓ－Ｓ］Ｃｙｓ Ｌｙｓ Ａｒｇ Ｇｌｎ Ｉｌｅ Ｌｙｓ Ｉｌｅ Ｔｒｐ Ｐｈｅ Ｇｌｎ Ａｓｎ Ａｒｇ Ａｒｇ Ｍｅｔ Ｌｙｓ Ｔｒｐ Ｌｙｓ Ｌｙｓ ＯＨである。
【００１２】
産物６はα－（Ｂｉｏｔｉｎｙｌ Ｇｌｙ Ｇｌｙ）ε－（Ａｃｅｔｙｌ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ａｓｐ）Ｌｙｓ Ａｒｇ Ｇｌｎ Ｉｌｅ Ｌｙｓ Ｉｌｅ Ｔｒｐ Ｐｈｅ Ｇｌｎ Ａｓｎ Ａｒｇ Ａｒｇ Ｍｅｔ Ｌｙｓ Ｔｒｐ Ｌｙｓ Ｌｙｓ ＯＨである。
産物７はε－（Ａｃｅｔｙｌ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ａｓｐ）Ｌｙｓ Ａｒｇ Ｇｌｎ Ｉｌｅ Ｌｙｓ Ｉｌｅ Ｔｒｐ Ｐｈｅ Ｐｒｏ Ａｓｎ Ａｒｇ Ａｒｇ Ｍｅｔ Ｌｙｓ Ｔｒｐ Ｌｙｓ Ｌｙｓ ＯＨである。
産物８はα－（Ｂｉｏｔｉｎｙｌ Ｇｌｙ Ｇｌｙ）ε－（Ａｃｅｔｙｌ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ｇｌｕ Ａｓｐ）Ｌｙｓ Ａｒｇ Ｇｌｎ Ｉｌｅ Ｌｙｓ Ｉｌｅ Ｔｒｐ Ｐｈｅ Ｐｒｏ Ａｓｎ Ａｒｇ Ａｒｇ Ｍｅｔ Ｌｙｓ Ｔｒｐ Ｌｙｓ Ｌｙｓ ＯＨである。
本発明は、化学物質と会合した活性をテトラペプチドＡｃＥＥＥＤを含むペプチド産物を調製するための方法にも関する。
本発明のペプチド産物は、当業者に知られた方法、例えば段階的固相合成、ペプチドの直接（ストレートフォワード）合成、ペプチドの合成的又は生物的調製（例えば”Ｔｈｅ ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｂｉｏｌｏｇｙ”；ｖｏｌ．１ ｔｏ ９，Ｓ．Ｕｄｅｎｆｒｉｅｎｄ，Ｊ．Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，ｅｄｓ，１９７７ ｔｏ １９８７，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ－Ｙｏｒｋ；ｏｒ ｉｎ ”Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”，ｖｏｌ．３５，Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｍ．Ｗ．Ｐｅｎｎｉｎｇｔｏｎ ＆ Ｂ．Ｍ．Ｄｕｎｎ（Ｅｄｓ），１９９４，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ Ｎ．Ｊ．．に記載）を用いて調製することができる。
【００１３】
本発明は、薬剤として用いるための化学物質と会合した活性なテトラペプチドＡｃＥＥＥＤを含むペプチド産物にも関する。
本発明の別の態様は、少くとも１の医薬として許容される担体、ビヒクル又は賦形剤、及びペプチド産物を含む医薬組成物に関する。
前記医薬組成物での医学的調製物は、１～３ｍｇペプチド／１ｍＬ塩類溶液の有効投与量で局所的に適用され、本発明による最も優れた効能を与える。
本発明の治療の方法を行うために、上述の医薬組成物は、有効量のペプチド産物を含む。有効量は、慣用的な技術を用いることにより、及び同様の環境下で得られる結果を観察することにより直ちに得ることができる。有効量を決定することにおいて、これらに限られ

たいが、次のいくつかの因子が考えられる：患者の種類；その大きさ、年齢、及び全般的な健康状態；関連する特定の疾患；その関連の程度又はその疾患の激しさ；個々の患者の応答；投与する特定の化合物；投与の態様；投与する調製物のバイオアベイラビリティー特性；選択した投与管理；及び付随する投薬の使用。

【００１４】

本発明の組成物中のペプチド産物の有効量は、広くは、１日当り体重１キログラム当り約１マイクログラム（μｇ／ｋｇ／日）～約５００ミリグラム／ｋｇ体重／日であろう。１日１回又は２回の約１００μｇ～約１０ｍｇの薬量（投与量）が好ましい。

前記医薬組成物での医学的調製物は、いずれの形態で調剤してもよく、種々の経路又は態様で投与することができる。これには、これらに限らないが、臨床適応に従って、静脈内注入、筋肉注入、吸入、経粘膜又は経皮デリバリー、経鼻投与、経口投与、経腸及び直腸投与がある。製剤を調製する当業者は、治療すべき病状の特徴、その病気の段階、及び他の関連する状況により、投与の正確な形態及び態様を直ちに選択することができる。

本発明の組成物は、少くとも１の医薬として許容される担体又は賦形剤と組み合わせてペプチド産物を含み得る。その割合及び性質は、選択した組成物の溶解度及び化学的特性、選択した投与の経路、及び標準的な医薬的プラクティスにより決定される。

【００１５】

より詳しくは、本発明は１又は複数の医薬として許容される担体又は賦形剤（集合的に以後“担体”材料と呼ぶ）との混合物において又はさもなければそれと会合して治療に有効な量の上述のペプチド産物から本質的になる医薬組成物に関する。

担体材料は、活性成分のためのビヒクル又は媒体として機能し得る固体、半固体、又は液体機能であり得る。好適な担体材料は当業界で公知である。本発明の医薬組成物は、局所的、注入又は他の使用のために適合し得、注入、クリーム、軟骨、粉末、エリキシル、シロップ、溶液、懸濁液等の形態で患者に投与することができる。本発明の医薬組成物は、直腸の使用のためにも適合し得、製剤の形態で患者に投与することができる。

担体材料は、好適には、意図した投与の形態に関して選択し、慣用的な医薬プラスティスと一致すべきである。任意に、本発明の医薬組成物は、バインダー、例えば微結晶性セルロース、ガム又はゼラチン、分解剤、例えばアルギン酸、滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、グリダント（ｇｌｉｄａｎｔ）、例えばコロイド状二酸化ケイ素、甘味剤、例えばスクロース又はサッカリン、着色剤又は芳香剤、例えば、ペパーミント又はメチルサリチレートも含む。

【００１６】

それらの容易な投与のため、クリーム及び溶液は最も有利な局所的投与単位形態である。上述の一般的な投与に加え、本発明の組成物は、徐放手段及びデリバリー装置によっても投与することができる。

このような溶液又はクリームは、次のアジュバントのうちの１又は複数も含み得る：滅菌希釈液、例えば注入用水、生理食塩水、油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロリピレングリコール又は他の合成溶媒；抗微生物剤、例えばベンジルアルコール；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミンテトラ酢酸；緩衝液、例えばアセテート、シトレート又はホスフェート及び張度の調節のための剤、例えば塩化ナトリウム又はデオストロース。その調製物は、アンプル、又はガラスもしくはプラスチックから得られた多重投与容器に入れることができる。

医薬として許容される賦形剤は、投与の態様により多様であり得、医薬組成物の治療特性を改善するため、又はその可能性ある副作用を減少させるために、アジュバントと組み合わせることができよう。

【００１７】

好適な医薬として許容される賦形剤は当業界で公知であり、一般に、薬剤師又は医師により適用される方法に従って選択され、そして固体、液体又は気体の非毒性の医薬として許容されるビヒクルを含み得る。活性産物対医薬として許容される賦形剤のパーセンテージは、極めて大きな範囲内で多様であり得、ヒトを含む、動物への許容性及び可能性ある副

作用により、及び投与の頻度によってのみ制限される。
本発明は、薬剤の製造のための前記医薬組成物又は前記ペプチド産物の使用にも関する。
本発明は、細胞へのα－ＳＭアクチン発現（細胞への過剰発現又はα－ＳＭアクチンを通常、発現しない細胞における発現）に関連する疾患の予防及び／又は治療における薬剤の製造のための前記医薬組成物又は前記ペプチド産物の使用にも関する。好ましくは、前記疾患は、創傷収縮（ｗｏｕｎｄ　ｃｏｎｔｒａｃｔｉｏｎ）、肥大性瘢痕、線維腫症（特にＤｕｐｕｙｔｒｅｎ’ｓ病）及び線維症状態（特に肺繊維症）からなる群から選択される。
本発明は、薬剤を製造するための方法であって、前記ペプチド産物を用いる方法にも関する。

【００１８】
本発明の別の態様は、前記病気の治療及び／又は予防の方法であって、前記ペプチド産物又は前記医薬組成物を、前記病気又は該病気の症状を示す哺乳動物、特にヒトに投与する方法に関する。
本発明は、以下の非限定的例に詳細に記載されよう。
実施例１～８：ペプチド産物合成
ペプチド産物を、”Ｔｈｅ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ，　Ａｎａｌｙｓｉｓ，　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，　Ｂｉｏｌｏｇｙ”；ｖｏｌ．１　ｔｏ　９，　Ｓ．Ｕｄｅｎｆｒｉｅｎｄ，　Ｊ．Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，　ｅｄｓ，　１９７７　ｔｏ　１９８７，　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｎｅｗ－Ｙｏｒｋ．に記載されるようにメリフィールド合成により合成で調製した。

【００１９】
アミノ酸は、不溶性樹脂に段々と加える。
（リシンを除く）各々のアミノ酸は、そのα－アミノ基で、ｔ－ブトキシカルボニル基（Ｂｏｃ－と呼ぶ）で保護することができ、そして他の官能基は、保護基により保護される。
－セリン（Ｓ）及びトレオニン（Ｔ）のヒドロキシル官能基は、ベンジル基で保護することができ；
－アルギニン（Ｒ）のグアニジノ官能基はトシル基で保護することができ；
－トリプトファン（Ｗ）のインドール環のアミノ基はホルミル基で保護することができ；
－リシン（Ｋ）のα－アミノ官能基は、Ｂｏｃ－基又はフルオレニルメトキシカルボニル基（Ｆｍｏｃ－）又はベンジルオキシカルボニル基（Ｚ－）で保護することができ、そしてリシンのε－アミノ基は、Ｂｏｃ－基又は２－クロロベンジルオキシカルボニル基で保護することができ；
－アスパラギン酸（Ｄ）のβ－カルボキシ官能基はシクロヘキシル基で保護することができ；
－グルタミン酸（Ｅ）のγ－カルボキシル官能基はベンジル基で保護することができる。

【００２０】
カルボキシルＣ末端ペプチドは、クロロメチルスチレン／１％ジビニルベンゼン樹脂上で合成した、アシドＣ末端ペプチドは、４－メチルベンズヒドリルアミンポリスチレン／１％ジビニルベンゼン樹脂上で、”Ｔｈｅ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ，　Ａｎａｌｙｓｉｓ，　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，　Ｂｉｏｌｏｇｙ”；ｖｏｌ．１　ｔｏ　９，　Ｓ．Ｕｄｅｎｆｒｉｅｎｄ，　Ｊ．Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，　ｅｄｓ，　１９７７　ｔｏ　１９８７，　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｎｅｗ－Ｙｏｒｋに記載される方法に従って合成した。
クロロメチルスチレン樹脂の場合、最初のアミノ酸（ＡＡ）は次の通り導入される：Ｂｏｃ－ＡＡ（Ｂｏｃ－ＡＡは、そのα－アミノ基上のｔ－ブトキシカルボニル基により保護されるアミノ酸を意味する）のセシウム塩を形成し、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中の１等量のセシウムカーボネートを加え、そしてこの塩をＤＭＦ中のクロロメチル樹脂に加える。その混合物を５０℃で一晩、撹拌する。
最初のＡＡによる樹脂の置換レベルは、塩酸（ＨＣｌ）加水分解後のアミノ酸分析により

決定される。
【００２１】
次のアミノ酸を標準的な手順（”Ｔｈｅ ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｂｉｏｌｏｇｙ”；ｖｏｌ．１ ｔｏ ９，Ｓ．Ｕｄｅｎｆｒｉｅｎｄ，Ｊ．Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，ｅｄｓ，１９７７ ｔｏ １９８７，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ－Ｙｏｒｋに記載の方法）を用いて段々と加える：
－トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）／CH_2Cl_2 中でのＡＡのＮ末端Ｂｏｃ基の脱プロトン化：
－CH_2Cl_2 での洗浄；
－トリエチルアミン（ＴＥＡ）／CH_2Cl_2 中での中和；
－CH_2Cl_2 での洗浄；
－以下の条件下での次のＢｏｃ－ＡＡのカップリング：
２．５等量のＢｏｃ－ＡＡを、ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣｃ）／ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）を伴うＤＭＦ中でプレ活性化する。その得られた活性化されたＢｏｃ－ＡＡ－ベンゾトリアゾレートをＤＭＦ中の樹脂－ペプチドに加えた。その反応の完了を、Ｋａｉｓｅｒ ａｎｄ Ｃｈｌｏｒａｎｙｌテスト（各々、Ｅ．Ｋａｉｓｅｒ，Ｒ．Ｌ．Ｃｏｌｅｓｃｏｔｔ，Ｌ．Ｄ．Ｂａｓｓｉｎｇｅｒ，Ｐ．Ｉ．Ｃｏｏｋ；Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，３４，５９５（１９７０）ａｎｄ ｉｎ Ｔ．Ｖｏｊｋｏｖｓｋｙ，Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，ｖｏｌ．８，ｎ° ４，２３６－２３７（１９９５）に記載）により制御する。
【００２２】
その反応が完了したなら、樹脂－ペプチドのＤＭＦでの洗浄後、再カップリング手順を用いる：１．２５等量のＢｏｃ－ＡＡをＤＭＦ中の１．２５等量の２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート（ＴＢＴＵ）及び１．２５等量のＨＯＢｔと一緒に加える。再カップリング手順後のテストの１つが陽性であるなら、残りのアミノ官能基のアセチル化を無水酢酸を用いて行う
－ＤＭＦ，CH_2Cl_2，CH_3OHでの洗浄。
全てのアミノ酸を加えた時、ペプチド－樹脂を真空下で乾燥させ、そのペプチドを標準的低－高ＨＦ開裂に従って樹脂から開裂する。これで得られた脱プロトン化ペプチドをＴＦＡ０．１％／CH_3CNシステムで逆相ＨＰＬＣで精製する。凍結乾燥の後、純粋なペプチドを白色粉末として得る。
テストしたペプチド産物を、後に、それらの特徴と共に同定する。
【００２３】
実施例１のペプチド産物は、次の構造：ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ で表される。その式は、$C_{131}H_{208}N_{40}O_{34}S_1$である。その分子量（Ｍ．Ｗ．）は２９１９．４である。そのＦＡＢ／ＭＳ分析は、次の結果：$[M+H]^+$ ＝２９２１を与える。ここで、ＦＡＢ／ＭＳは、高速原子衝撃質量分析法を意味し、この分析法は、”Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”，ｖｏｌ．３６；Ｐｅｐｔｉｄｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｍ．Ｗ．Ｐｅｎｎｉｎｇｔｏｎ ＆ Ｂ．Ｍ．Ｄｕｎｎ（Ｅｄｓ），１９９４，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ Ｎ．Ｊ．に記載される。
実施例２のペプチド産物は、次の構造：ＡｃＥＥＥＤ－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨで示される。その式は、$C_{131}H_{208}N_{40}O_{34}S_1$である。その分子量（Ｍ．Ｗ．）は２９１９．４である。そのＦＡＢ／ＭＳ分析は、次の結果：$[M+H]^+$ ＝２９２０を与える。
【００２４】
実施例３のペプチド産物は、次の構造：ＡｃＥＥＥＤ－β－Ａ－β－Ａ－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨで表される。その式は、$C_{131}H_{206}N_{40}O_{35}S_1$である。その分子量（Ｍ．Ｗ．）は２９３３．４である。そのＦＡＢ／ＭＳ分析は、次の結果：$[M+H]^+$ ＝２９３４を与える。

【００２５】
実施例４のペプチド産物は、次の構造：ＡｃＥＥＥＤ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨで表される。その式は、Ｃ１２５ Ｈ１９６ Ｎ３８ Ｏ３３ Ｓ１である。その分子量（Ｍ．Ｗ．）は２７９１．３である。そのＦＡＢ／ＭＳ分析は、次の結果：［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ＝２７９２を与える。
実施例５のペプチド産物は、次の構造：ＡｃＥＥＥＤ－Ｃ－［Ｓ－Ｓ］－Ｃ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨで表される。その式はＣ１３１ Ｈ２０６ Ｎ４０ Ｏ３６ Ｓ３である。その分子量（Ｍ．Ｗ．）は２９３３．４である。そのＦＡＢ／ＭＳ分析は、次の結果：［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ＝２９３４を与える。
【００２６】
実施例６のペプチド産物は、次の構造：α－（Ｂｉｏｔｉｎｙｌ－ＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨで示される。その式は、Ｃ１４５ Ｈ２２８ Ｎ４４ Ｏ３８ Ｓ２である。その分子量（Ｍ．Ｗ．）は３２５９．８である。そのＦＡＢ／ＭＳ分析は、次の結果：［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ＝３２６０を与える。
実施例７のペプチド産物は、次の構造：ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＰＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨ で表される。その式は、Ｃ１３１ Ｈ２０８ Ｎ４０ Ｏ３２ Ｓ１である。その分子量（Ｍ．Ｗ．）は２８８７．４である。そのＥＳ／ＭＳ分析は、次の結果２８８７．６を与える。ＥＳ／ＭＳはエレクトロスプレー質量分析を意味する。ＥＳ／ＭＳの一般的な原理は、Ｊ．Ｂ．Ｆｅｎｎ，Ｍ．Ｍａｎｎ，Ｃ．Ｋ．Ｍｅｎｇ，Ｃ．Ｍ．Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４６，ｐ．６４－７１，１９８９ ｏｒ ｉｎ Ｒ．Ｄ．Ｓｍｉｔｈ，Ｊ．Ａ．Ｌｏｏ，Ｃ．Ｇ．Ｅｄｍｏｎｄｓ，Ｃ．Ｊ．Ｂａｒｉｎａｇａ，Ｈ．Ｒ．Ｕｄｓｅｔｈ，Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．，６２，ｐ．８８２－８９９，１９９０に記載される。
実施例７のアミノ酸分析は次の通りである：
【００２７】
【表１】

	Asp	Glu	Pro	Met	Ile	Phe	Trp	Lys	Arg
Theo.	2	4	1	1	2	1	2	5	3
Exp.	1.93	4.06	1.01	0.97	1.95	1.00	-	4.95	3.12

【００２８】
Ｔｈｅｏ．＝理論値、Ｅｘｐ．＝実験値。
アミノ酸分析の一般的な原理は、Ｓ．Ｍｏｏｒｅ，Ｗ．Ｈ．Ｓｔｅｉｎ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２００．ｐ．８０３，１９５３に記載される。
実施例８のペプチド産物は、次の構造：α－（ＢｉｏｔｉｎｙｌＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－ＲＱＩＫＩＷＦＰＮＲＲＭＫＷＫＫ－ＯＨで表される。その式は、Ｃ１４５ Ｈ２２８ Ｎ４４ Ｏ３６ Ｓ２である。その分子量（Ｍ．Ｗ．）は３２２７．８である。そのＥＳ／ＭＳ分析は、次の結果：３２２７．２を与える。実施例８のペプチド産物のアミノ酸分析は次の通りである：
【００２９】
【表２】

	Asp	Glu	Pro	Gly	Met	Ile	Phe	Trp	Lys	Arg
Theo.	2	4	1	2	1	2	1	2	5	3
Exp.	1.89	4.10	1.02	2.02	0.98	1.95	1.01	-	4.89	3.15

【００３０】

実施例９：試験管内実験

濃度依存性アッセイ

実施例１～８に従うペプチド産物は、α－ＳＭアクチンに対する結合性抗αＳＭ－１モノクローナル抗体へのブロッキング効果を示す。培養中の細胞に侵入するそれらの効率を研究するため、及び以下のテストによりストレスファイバーにおけるα－ＳＭアクチン形成を妨害するため、いくつかのテストを行った。

ペプチド産物の培養地への添加の後、細胞を固定し、透過性にし、α－ＳＭアクチン及び全体のアクチン（Ｃｈａｐｏｎｎｉｅｒら（１９９５）に記載されるようなペプチドの浸透及び効果のための通常の対照）について染色した。

実施例１～８に従うペプチド産物は、１０％胎児ウシ血清及び２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ（Ｇｉｂｃｏ，Ｃａｔ Ｎｏ １５６３０－０５６）を補給したＤｕｂｅｌｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ），Ｇｉｂｃｏ Ｃａｔ Ｎｏ．４１９６５－０３９，Ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ 中、異なる濃度：０．１、０．２、０．５、１、２及び４ｍｇ／ｍＬ（ペプチド産物のｍｇ、細胞培養培地のｍＬ）で３時間の脈管平滑筋（ＶＳＭＣ）の培養物への接種の後、ストレスファイバーへのα－ＳＭアクチン組込みを阻害することにおいて十分に活性であった。

ＶＳＭＣは、Ｃｈａｐｏｎｎｉｅｒら（１９９５）及びＢｏｃｈａｔｏｎ－Ｐｉｏｌｌａｔら（Ａｒｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ ａｎｄ Ｖａｓｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．１６，８１５～８２０（１９９６））に記載されるように、ラット大動脈の酵素消化により調製した。

【００３１】

時間経過アッセイ

ペプチドへの時間経過効果をより注意深くアッセイするために、実施例１～８のペプチド産物で多数の実験を行った。それらの実験は、細胞へのデリバリーの後のビオチニル化ペプチドの位置を研究するためにも用いた。ビオチニル化ペプチドの検出は、フルオレセイン（ＦＩＴＣ）接合ストレプトアビジン（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｒｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｖｉｅｓ，Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅｓ，ＰＡ，ＵＳＡ；Ｃａｔ Ｎｏ ０１６－０９０－０８４）で染色することによりアッセイした。

実施例１～８によるペプチド産物を、１０％胎児ウシ血清及び２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ（Ｇｉｂｃｏ，Ｃａｔ Ｎｏ １５６３０－０５６）を補給した。Ｄｕｂｅｌｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ），（Ｇｉｂｃｏ Ｃａｔ Ｎｏ．４１９６５－０３９，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を含む培地中で、３，５，１０，１５，３０及び６０分、２ｍｇ／ｍＬの濃度で培養したＶＳＭＣ中でインキュベートした。

実施例１～８のペプチド産物は、細胞の９０％においてα－ＳＭアクチン張力繊維形成を阻害することができた。その活性は、３分のインキュベーション後に既に明確に検出することができた。張力繊維でのビオチニル化ペプチドの局在化は、早い時間でも得るのが困難であった。染色のほとんどは膜に局在化し、細胞質内にいくらか染色が拡散した。最初の１５分の間、特定の細胞内でのみ強力な染色が検出され、その後、染色は細胞質内で、更に全ての細胞内でさえ明るくなった。張力繊維に沿ったＦＩＴＣ－ストレプトアビジン

染色は、より長いペプチドインキュベーションの時間の後でさえ、検出できなかった。

【００３２】

それゆえ、実施例１～８のペプチド産物の細胞へのインキュベーションは、特に迅速であるようであり、時間経過アッセイにより追跡することは困難であり得るが、顕微鏡下でペプチド侵入の“ｉｎ　ｌｉｖｅ”観察を許容する他のマーカーペプチド（即ち蛍光ペプチド）を用いることにより追跡することができる。

張力繊維へのｰＳＭアクチン回収の時間経過

実施例１～８のペプチド産物を細胞と共に、３時間、１０％胎児ウシ血清及び２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（Ｇｉｂｃｏ，Ｃａｔ　Ｎｏ　１５６３０－０５６）を補給したＤｕｂｅｌｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ），Ｇｉｂｃｏ　Ｃａｔ　Ｎｏ　４１９６５－０３９，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄを含む媒地中でインキュベートした。

その後、細胞を洗浄し、培地（ペプチドを含まない培地）を異なる時間（１５分、３０分、１時間及び２時間）、残した。

これらの実験は、α－ＳＭ陽性張力繊維は、１時間後に少し再組織化し始めるが、２時間後に明確に組織化することを示す。

【００３３】

実施例１０：ビオチニル化ペプチドを用いる細胞への組込み

この実験は、実施例６のペプチド産物（ペプチドα－（ビオチニルＧＧ），ε－（ＡｃＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）の侵入及び排出（“ｉｎ及びｏｕｔ”）を制御するために用いた。

ＶＳＭＣ細胞を、１０％胎児ウシ血清及び２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（Ｇｉｂｃｏ，Ｃａｔ　Ｎｏ　１５６３０－０５６）を補給したＤｕｂｅｌｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ），Ｇｉｂｃｏ　Ｃａｔ　Ｎｏ．４１９６５－０３９，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄを含む培地中でインキュベートした。実施例６のペプチド産物と共に３０分、そしてそのペプチドを回収した後、その細胞を、０．５分、３０分、１時間及び２時間、培養地と共にインキュベートした。その細胞を、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１３４：５９７～６０３，１９８９，Ｇｅｌｓｏｌｉｎ　ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ　ｉｎ　ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ　ａｎｄ　ｓｔｒｏｍａｌ　ｃｅｌｌｓ　ｏｆ　ｍａｍｍａｒｙ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ，Ｃｈａｐｏｎｎｉｅｒ　ａｎｄ　Ｇａｂｂｉａｎｉに記載されるように、０．０８Ｍ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ，ｐＨ６．８；２％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）；０．１Ｍ　ジチオトレイトール（ＤＴＴ）；０．００１Ｍ　フェニルメチルスルホニルフルオライド（ＰＭＳＦ）；１０％グリセロールを含む、サンプル緩衝液中での異なる時間のインキュベーションの後に抽出した。

全タンパク質抽出物を、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１３０：８８７－８９５，１９９５，Ｃｈａｂｏｎｎｉｅｒらに記載される方法に従って、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルに流し、ＰＶＤ下膜に移した。

【００３４】

次にその膜を、Ｌｅｖｙ－Ｔｏｌｅｄａｎｏら（Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ　１３３：１８０３－１８０８，１９９３）に記載される方法に従って、ビオチニル化ペプチドを検出するためにストレプトアビジンペルオキシダーゼと共にインキュベートした。

３０分のペプチドインキュベーション後及びペプチドの除去５分後に強力なシグナルが観察され、３０分の洗浄後に明らかに減少し、そしてペプチドの除去１時間後に明るいシグナルのみが観察された。この実験は、上述のように免疫蛍光染色を確認し、細胞へのペプチド産物の可能性ある“イン及びアウト”を追跡するためのアッセイを許容する。

【００３５】

実施例１１：α－ＳＭアクチン生合成へのペプチド産物の効果

表２は、１０％胎児ウシ血清及び２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（Ｇｉｂｃｏ，Ｃａｔ　Ｎｏ．１５６３０－０５６）を補給したＤｕｂｅｌｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍ

ｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ），Ｇｉｂｃｏ Ｃａｔ Ｎｏ．４１９６５－０３９，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ を含む培地中での３７℃でのＶＳＭＣ上での２０時間のインキュベーション時間後の、α－ＳＭアクチン合成への、実施例１のペプチド産物（ペプチド産物：ε－（ＡｃＥＥＥＤ）－Ｋ－（ｐＡｎｔｐ［４３－５８］）の効果の４つの実験の結果を示す。

【００３６】

【表３】

表２

実験	1	2	3	4	平均
0時間	100	100	100	100	100
20時間	72	56	44	48	55

【００３７】

この表において、コントロール条件の値は、１００％出発値（時間＝０時間）で標準化した。

この表は、２０時間の実施例１のペプチド産物（２ｍｇ／ｍＬ培養培地）のインキュベーションは、コントロール条件と比べて、（S^{35}メチオニン組込みを用いて研究して）α－ＳＭアクチン合成の５５％減少（４回の実験の平均値）を引きおこすことを示す。

【００３８】

実施例１２：生体内実験

ラットにおける開いた“副木を施した創傷”でのテスト

排他的に収縮を測定するために、本発明者らは、Ｇａｂｂｉａｎｉ Ｇ．ら、Ｊ．ｏｆ Ｅｘｐ．Ｍｅｄ，ｖｏｌ．１３５ ｐｐ７１９－７３４（１９７２）の技術に基づき“副木を施した創傷（Ｓｐｌｉｎｔｅｄ ｗｏｕｎｄ）”モデルを開発した。

ラットの背中の２×２ｃｍの創傷を、０日目に縫合系（Ｓｕｐｒａｍｉｄ，ｍｅｔｒｉｃ３，Ｂｒａｕｎ，Ｅｍｍｅｎｂｕｅｃｋｅ）を用いて、その縁をプラスチックフレームに縫合することにより固定する。これは、肉芽組織の発達は影響を受けずに、創傷収縮を阻害する。ペプチド産物を、通常３日間、７日目から始めて開いた創傷に適用し、そのフレームの縫合をはずし、これによりコントロールにおいて４８時間以内に約２１３の創傷の領域を減少させる加速した収縮を許容する。

【００３９】

我々は、面積測定（ＫＳ４００，Ｚｅｉｓｓ Ｖｉｓｉｏｎ）により創傷の収縮（グループ当り５匹のラット）を形態計測により測定し、組織学的技術、Ｇａｂｂｉａｎｉら、Ｊ．Ｅｘｐ，Ｍｅｄ．１９７２（ｐ．１５，ｌｉｎｅ８）及びＤａｒｂｙら、Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．１９９０（ｐ．１，ｌｉｎｅ２４－２５）に記載される方法に従ってα－ＳＭアクチン抗体での免疫蛍光法により形態学的に組織を研究した。

表３は、０日目に測定した創傷サイズのパーセンテージとして、３日目に測定した創傷サイズ（表面（cm^2））を示す。

ラットは、３ｍｇ／ｍＬ（ペプチド産物のｍｇ、０．９％ＮａＣｌのｍＬ）の投与量で実施例１のペプチド産物で処理した。

【００４０】

【表４】

表３

処理	創傷表面*
（0.9% NaCl）塩類溶液	30.59 ± 1.57
実施例１のペプチド産物	48.42 ± 2.02

【００４１】
この結果は、ラットを３ｍｇ／ｍＬの投与量で実施例１のペプチド産物で局所的に処理した時の、収縮活性の現象を示唆する。

【国際公開パンフレット】

PCT WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 7 : A61K 47/48 — A1

(11) International Publication Number: **WO 00/38733**

(43) International Publication Date: 6 July 2000 (06.07.00)

(21) International Application Number: PCT/EP99/09964

(22) International Filing Date: 15 December 1999 (15.12.99)

(30) Priority Data:
98204396.0 24 December 1998 (24.12.98) EP

(71) Applicant: UCB-BIOPRODUCTS, S.A. [BE/BE]; Allée de la Recherche 60, B-1070 Bruxelles (BE).

(72) Inventors: GABBIANI, Giulio; Chemin des Crets de Champel 16, CH-1206 Geneve (CH). SCARSO, Alain; Avenue de la Wallonie 61, B-6180 Courcelles (BE).

(74) Agent: LECHIEN, Monique; UCB, S.A. – I.P.D. Department, Allée de la Recherche 60, B-1070 Bruxelles (BE).

(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published
With international search report.
Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.

(54) Title: PEPTIDIC PRODUCT, PROCESS AND COMPOSITION

(57) Abstract

The present invention is related to a peptidic product comprising the tetrapeptide Acetyl-glutamyl-glutamyl-glutamyl-aspartyl associated with a chemical entity that is able to introduce said tetrapeptide into a cell. The present invention is also related to the pharmaceutical composition comprising at least one pharmaceutically acceptable excipient and an effective amount of the peptidic product according to the invention.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	**ES**	Spain	**LS**	Lesotho	**SI**	Slovenia
AM	Armenia	**FI**	Finland	**LT**	Lithuania	**SK**	Slovakia
AT	Austria	**FR**	France	**LU**	Luxembourg	**SN**	Senegal
AU	Australia	**GA**	Gabon	**LV**	Latvia	**SZ**	Swaziland
AZ	Azerbaijan	**GB**	United Kingdom	**MC**	Monaco	**TD**	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	**GE**	Georgia	**MD**	Republic of Moldova	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagascar	**TJ**	Tajikistan
BE	Belgium	**GN**	Guinea	**MK**	The former Yugoslav Republic of Macedonia	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Greece			**TR**	Turkey
BG	Bulgaria	**HU**	Hungary	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	**IE**	Ireland	**MN**	Mongolia	**UA**	Ukraine
BR	Brazil	**IL**	Israel	**MR**	Mauritania	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Iceland	**MW**	Malawi	**US**	United States of America
CA	Canada	**IT**	Italy	**MX**	Mexico	**UZ**	Uzbekistan
CF	Central African Republic	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**VN**	Viet Nam
CG	Congo	**KE**	Kenya	**NL**	Netherlands	**YU**	Yugoslavia
CH	Switzerland	**KG**	Kyrgyzstan	**NO**	Norway	**ZW**	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Democratic People's Republic of Korea	**NZ**	New Zealand		
CM	Cameroon			**PL**	Poland		
CN	China	**KR**	Republic of Korea	**PT**	Portugal		
CU	Cuba	**KZ**	Kazakstan	**RO**	Romania		
CZ	Czech Republic	**LC**	Saint Lucia	**RU**	Russian Federation		
DE	Germany	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Denmark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Sweden		
EE	Estonia	**LR**	Liberia	**SG**	Singapore		

PEPTIDIC PRODUCT, PROCESS and COMPOSITION

The present invention relates to a peptidic product comprising an active tetrapeptide Acetyl-glutamyl-glutamyl-glutamyl-aspartyl associated with a vector which allows the introduction of said tetrapeptide into a cell.

The present invention is also related to pharmaceutical compositions comprising said peptidic product and to its use for the prevention and/or the treatment of wound contractions, hypertrophic scars, fibromatosis, in particular the so-called Dupuytren disease and fibrotic conditions (in particular lung fibrosis).

Skalli et al. (J. of Cell Biology Vol. 103 No. 6, pp. 2787-2796 (1986)) describe that an antibody (anti-alpha SM-1) recognising exclusively the alpha smooth muscle (α-SM) actin could be selected and characterised after immunisation of BALB/c mice with the amino terminal synthetic decapeptide of α-SM actin coupled to a carrier molecule.

It is also known that the α-SM actin is transiently expressed in myofibroblast during experimental wound healing (Darby et al., Laboratory Investigation Vol. 63, 21-29 (1990)). Chaponnier et al. (J. of Cell Biology Vol. 130 No. 4, 887-895 (1995)) describes the blocking effects of an amino terminal decapeptide of α-SM actin (AcEEEDSTALVC) on the binding of specific monoclonal antibody anti-alpha SM-1. This document indicates that the portion AcEEED is the epitope for the anti-alpha SM-1.

The anti-alpha SM-1 is the first monoclonal antibody described to be specific for a single actin isoform and is a reliable tool for the study of vascular SM

cells and myofibroblast phenotypic modulation in physiological and pathological processes.

This document shows that said antibody (especially its Fab fragment) increases *in vitro* α-SM actin polymerisation. Said document also suggests that the tetrapeptide AcEEED may be used for the study of the functions of the α-SM actin in cells such as SM cells, fibroblasts, myofibroblasts or myoepithelial cells in physiological and pathological situation during which α-SM actin expression is modulated. Said document also suggests that the tetrapeptide AcEEED inhibits the incorporation of α-SM actin into stress fibers in the culture of SM cells when using microinjection technology.

It is also shown that an active turnover of α-SM actin into stress fibers exists and that AcEEED traps a protein interacting with the amino-terminal sequence of α-SM actin and activating polymerization (Chaponnier, C. et al., Experientia, 1995, 51, A62).

Järlebark, L. et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 229 (2), 363-369), disclose that some peptidyl derivatives of adenosine 5'-carboxylic acid have inhibitory effects in certain P2 purinoceptor-carrying biological systems (gliome and smooth muscle cell lines and isolated smooth muscle tissue preparations).

The present invention aims to provide a peptidic product comprising the specific tetrapeptide AcEEED which allows its introduction into a cell, in order to interfere, *in vitro* and *in vivo*, with α-SM-actin organisation in stress fibers.

Another aim of the present invention is to provide a pharmaceutical composition comprising said peptidic product in order to treat and/or to prevent

various diseases related to α-SM actin expression such as wound contraction, hypertrophic scars, fibromatosis, in particular Dupuytren diseases, and fibrotic condition (in particular lung fibrosis).

The present invention is related to a peptidic product comprising the active tetrapeptide Acetyl-glutamyl-glutamyl-glutamyl-aspartyl (identified hereafter by the formulation AcEEED) associated with a chemical entity which is able to introduce said tetrapeptide into a cell.

According to the invention, in the active tetrapeptide Ac means Acetyl, E means glutamic acid residue, D means aspartic acid residue.

According to the invention, by a chemical entity we understand a vector.

According to the invention, by a cell we understand in vivo cells, such as cells composing the organs or tissues of living animals or humans, or microorganisms found in living animals or humans; or in vitro cells, such as cultured animal cells, human cells or microorganisms. Preferably it means human cells, and more preferably fibroblastic or smooth muscle cells.

According to a first embodiment of the present invention, the chemical entity can be a liposome, a lipidic vesicle made of lipids and/or fatty acids or a cationic vesicle such as the one described by Gao X. and Huang L. (Cationic Liposomes - Mediated Gene Transfer, Gene Therapy, pp. 710-722 (1995)) and/or a mixture thereof.

According to a second embodiment of the present invention, the chemical entity is a polypeptide having preferably at least about 8 amino acids, preferably between 8 and 40, more preferably between 10 and 30 amino acids.

According to another embodiment of the present invention, said polypeptide is the tat mediated protein, having advantageously a capacity of binding with membranous receptor(s) of specific cell(s).

The preferred linking of a chemical entity like the tat mediated protein to the tetrapeptide according to the invention for the delivery of heterologous peptides into a cell, is described in the International Patent Publication WO 94/04686 incorporated herein by reference. The best results have been obtained with the tat mediated protein of formula tat37-72, tat37-58, tat38-58GGC, tatCGG47-58, tat47-58GGC and tatΔC.

According to a preferred embodiment of the present invention, the chemical entity is a homeobox peptide, preferably the pAntp peptide described in the International Patent Publication WO 97/12912, also incorporated herein by reference. The best results have been obtained with the peptide pAntp[43-58], and the peptide pAntp[43-58]-Pro^{50}. The peptide pAntp[43-58] means Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys, wherein, for this description, the first amino acid Arg is named amino acid in position 43 and the last amino acid Lys is named amino acid in position 58. The peptide pAntp[43-58]-Pro^{50} represents the same sequence of pAntp[43-58] wherein Gln has been substituted by Pro in position 50.

The present invention relates also to the preparation method of such product, using known methods by the person skilled in the art such as preparation methods of lipidic vesicles (Martin F.G., *Pharmaceutical Manufacturing of Liposomes*, Praveen Tyle Ed., Specialised Drug Delivery Systems, Marcel Decker, New York (1993)),

automatic peptides synthesis, cross-linking between molecules.

Possibly, the tetrapeptide is linked through a spacer, preferably a peptidic spacer, to the chemical entity. Said spacer is preferably an amino acid or a peptide comprising no more than 5 amino acids. Preferably, said amino acid used as a spacer is a Lysyl residue ("K") to which the AcEEED tetrapeptide is linked through the α-amino group, or through the ε-amino group, or a Cystinyl residue (meaning two Cysteinyl residues ("C") linked by their β sulfide functions forming a disulfide link represented by "C-[S-S]-C") to which the AcEEED tetrapeptide is linked through the α-amino group, or a β-Alanyl-β-Alanyl dipeptide ("β-A-β-A") to which the AcEEED tetrapeptide is linked through the α-amino group, or through a Lysyl residue ("K") to which the AcEEED tetrapeptide is linked through the ε-amino group and a BiotynylGG residue (meaning a biotinyl functionnal group linked through its carboxylic function to two successive glycyl residues) to which the AcEEED tetrapeptide is linked through the α-amino group.

The best results have been obtained with the AcEEED tetrapeptide linked through the α-amino group, or through the ε-amino group of a Lysyl residue.

According to the invention, the peptidic product is preferably selected from the group consisting of

ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]),

AcEEED-β-A-β-A-(pAntp[43-58]),

AcEEED-K-(pAntp[43-58]),

AcEEED-β-A-β-A-(pAntp[43-58]-Pro^{50}),

AcEEED-K-(pAntp[43-58]-Pro^{50}),

AcEEED-(pAntp[43-58]-Pro^{50}),

AcEEED-(pAntp[43-58]),

AcEEED-C-[S-S]-C-(pAntp[43-58]),

AcEEED-C-[S-S]-C-(pAntp[43-58]-Pro^{50}).

α-(BiotynylGG),ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]),

ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]-Pro^{50}),

α-(BiotynylGG),ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]-Pro^{50}),

The peptidic product is more preferably selected from the group consisting of AcEEED- K-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH (identified hereafter by the term "product 1");

AcEEED- K-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : AcEEED-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH (identified hereafter by the term "product 2");

AcEEED-β-A-β-A-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : AcEEED-β-A-β-A-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH(identified hereafter by the term "product 3");

AcEEED-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : AcEEED-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH(identified hereafter by the term "product 4");

AcEEED-C-[S-S]-C-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : AcEEED-C-[S-S]-C-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH(identified hereafter by the term "product 5");

α-(BiotynylGG),ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : α-(Biotinyl-GG), ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH(identified hereafter by the term "product 6");

ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]-Pro^{50}), represented by the following structure : ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFPNRRMKWKK-OH(identified hereafter by the term "product 7");

α-(BiotynylGG),ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]-Pro^{50}), represented by the following structure : α-(BiotinylGG), ε-

(AcEEED)-K-RQIKIWFPNRRMKWKK-OH(identified hereafter by the term "product 8").

The best results have been obtained with the product α-(BiotynylGG),ε-(AcEEED)-K-(pAntp[43-58]-Pro ^{50}) and the product ε-(AcEEED)-K-(pAntp[43-58]).

In products 1 to 8, α-( )-K- means that functionnal group in brackets is linked on the alpha-amino group of lysyl residue; ε-( )-K- means that functionnal group in brackets is linked on the epsilon-amino group of lysyl residue; -β-A represents beta-alanyl residue; and -C-[S-S]-C represents two cysteinyl residues linked through their β sulfide function, forming a disulfide bridge. Products 1, 5 to 8 are not linear, are branched sequences; products 2, 3 and 4 are linear, are unbranched sequences. In the sequence listing, product 2 is represented by the sequence SEQ ID NO:1; product 3 is represented by the sequence SEQ ID NO:2, where Xaa means β Ala; and product 4 is represented by the sequence SEQ ID NO:3.

Product 1 is ε-(Acetyl Glu Glu Glu Asp) Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys OH.

Product 2 is Acetyl Glu Glu Glu Asp Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys OH.

Product 3 is Acetyl Glu Glu Glu Asp βAla βAla Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys OH.

Product 4 is Acetyl Glu Glu Glu Asp Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys OH.

Product 5 is Acetyl Glu Glu Glu Asp Cys[S-S]Cys Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys OH.

Product 6 is α-(Biotinyl Gly Gly) ε-(Acetyl Glu Glu Glu Asp) Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys OH.

Product 7 is ε-(Acetyl Glu Glu Glu Asp) Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys OH.

Product 8 is α-(Biotinyl Gly Gly) ε-(Acetyl Glu Glu Glu Asp) Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys OH.

The present invention concerns also a process for preparing the peptidic product comprising the active tetrapeptide AcEEED associated with a chemical entity.

The peptidic product of the invention can be prepared using known methods by the person skilled in the art, such as the step-wise solid-phase synthesis, the straightforward synthesis of a peptide, the synthetic or biologic preparation of peptide (described for examples in "The peptides, Analysis, Synthesis, Biology"; vol. 1 to 9, S. Udenfriend, J. Meienhofer, eds, 1977 to 1987, Academic Press, New-York; or in "Methods in Molecular Biology", vol. 35, Peptide Synthesis Protocols, M.W. Pennington & B.M. Dunn (Eds), 1994, Humana Press, Totowa N.J..).

The present invention concerns also a peptidic product comprising the active tetrapeptide AcEEED associated with a chemical entity for use as a medicament.

Another aspect of the present invention concerns a pharmaceutical composition comprising at least one pharmaceutically acceptable carrier, vehicle or excipient and the peptidic product.

A medical preparation with the said pharmaceutical composition has been applied topically at an effective dose of 1-3 mg peptide/1 ml saline, resulting in the best efficacy according to the present invention.

For implementing the method of treatment of the invention, the pharmaceutical composition herein above described should contain an effective amount of the peptidic product. An effective amount can be readily determined by the use of conventional techniques and by observing results obtained under analogous circumstance. In determining the effective amount, a number of factors are considered including, but not limited to: the species of patient; its size, age, and general health; the specific disease involved; the degree of or involvement or the severity of the disease; the response of the individual patient; the particular compound administered; the mode of administration; the bioavailability characteristics of the preparation administered; the dose regimen selected; and the use of concomitant medication.

An effective amount of the peptidic product in the composition of the invention will generally vary from about 1 microgram per kilogram of body weight per day (μg/kg/day) to about 500 milligram /kg body weight/day. A posology (dose) of about 100 μg to about 10 mg once or twice per day is preferred.

The medical preparation with the said pharmaceutical composition can be formulated in any form and administered by various routes or modes, including but not limited to intravenous injection, intramuscular injection, inhalation, transmucosal or transdermal delivery, nasal administration, oral administration, intestinal and rectal administration, according to clinical indications. A person skilled in the art of preparing formulations can readily select the proper form and mode of administration depending upon the particular characteristics of the disease state to be treated, the stage of the disease, and other relevant circumstances.

The compositions of the invention can comprise the peptidic product in combination with at least one pharmaceutically acceptable carrier or excipient, the proportion and nature of which are determined by the solubility and chemical properties of the composition selected, the chosen route of administration, and standard pharmaceutical practice.

More particularly, the present invention contemplates pharmaceutical compositions consisting essentially of a therapeutically effective amount of the above-described peptidic product in admixture or otherwise in association with one or more pharmaceutically acceptable carriers or excipients (collectively referred to hereafter as "carrier" materials).

The carrier material may be a solid, semi-solid, or liquid material which can serve as a vehicle or medium for the active ingredient. Suitable carrier materials are well known in the art. The pharmaceutical compositions of the invention may be adapted for topical, injection or other use and may be administered to the patient in the form of injection, cream, ointment, powders, elixirs, syrups, solutions, suspensions, or the like. The pharmaceutical composition of the invention may also be adapted for rectal use and may then be administered to the patient in the form of suppositories.

The carrier material should be suitably selected with respect to the intended form of administration, and consistent with conventional pharmaceutical practice. Optionally, the pharmaceutical composition of the invention also contain a binder such as microcrystalline cellulose, gum or gelatine, a disintegrating agent such as alginic acid, a lubricant such as magnesium stearate, a glidant such as colloidal silicon dioxide, a sweetening agent such as sucrose or saccharin, a

coloring agent or a flavouring agent such as peppermint or methyl salicylate

Because of their easy administration, cream and solution represent the most advantageous topical dosage unit form.

In addition to the common dosage forms set out above, the compositions of the present invention may also be administered by controlled release means and delivery devices.

Such solutions or cream may also include one or more of the following adjuvants: a sterile diluent such as water for injection, physiologic saline solution, oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylene diaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for adjusting of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The preparation can be enclosed in ampules, or multiple dose vials made of glass or plastic.

The pharmaceutically acceptable excipient may vary according to the mode of administration and could be combined with an adjuvant in order to improve the therapeutical properties of the pharmaceutical composition or reduce its possible side-effects.

Suitable pharmaceutically acceptable excipients are well known in the art and are selected according to the methods generally applied by pharmacists or doctors, and may include solid, liquid or gaseous, non-toxic pharmaceutically acceptable vehicles. The percentage of active product versus pharmaceutically acceptable excipient may vary within very large ranges, only limited by the tolerance and the possible side-effects upon the

animal, including the human, and by the frequency of administration.

The present invention concerns also the use of said pharmaceutical composition or said peptidic product for the manufacture of a medicament. The present invention concerns also the use of said pharmaceutical composition or said peptidic product for the manufacture of a medicament in the prevention and/or the treatment of a disease related to α-SM actin expression into a cell (surexpression into a cell or expression in a cell which normally does not express α-SM actin). Preferably, said disease is selected from the group consisting of wound contraction, hypertrophic scars, fibromatosis (especially Dupuytren's disease) and fibrotic conditions (especially lung fibrosis).

The invention concerns also a method for manufacturing a medicament, wherein the peptidic product is used.

Another aspect of the present invention is related to a method of treatment and/or prevention of said diseases wherein said peptidic product or said pharmaceutical composition is administered to a mammal, in particular to a human, suffering from said diseases or presenting the symptoms of said diseases.

The present invention will be described in details in the following non-limiting examples.

Examples 1 to 8: peptidic products synthesis

Peptidic products were prepared synthetically by Merrifield synthesis, as described in "The peptides, Analysis, Synthesis, Biology"; vol. 1 to 9, S. Udenfriend, J. Meienhofer, eds, 1977 to 1987, Academic Press, New-York.

The amino acids are added step by step to an insoluble resin.

Each amino acid (except Lysine) may be protected with a t-Butoxycarbonyl group (which is called Boc-) at its α-amino group and the other functionalities are protected by protecting groups:

- the hydroxyl function of Serine (S) and Threonine (T) may be protected by a benzyl group
- the guanidino function of Arginine (R) may be protected by a Tosyl group
- the amino group of the indole cycle of Tryptophane (W) may be protected by a formyl group;
- the α-amino function of Lysine (K) may be protected by a Boc- group or a fluorenylmethoxycarbonyl group (Fmoc-) or a benzyloxycarbonyl group (Z-) and the ε-amino function of Lysine may be protected by a Boc- group or a 2-chlorobenzyloxycarbonyl group
- the β-carboxylic function of aspartic acid (D) is protected by a cyclohexyl group
- the γ-carboxylic function of glutamic acid (E) is protected by a benzyl group.

The carboxylic C-terminal peptides were synthesised on a chloromethylstyrene / 1% divinylbenzene resin. The amide C-terminal peptides were synthesised on a 4-methybenzhydrylamine polystyrene / 1% divinylbenzene resin according to a method also described in "The peptides, Analysis, Synthesis, Biology"; vol. 1 to 9, S. Udenfriend, J. Meienhofer, eds, 1977 to 1987, Academic Press, New-York .

In the case of chloromethylstryrene resin, the first amino acid (AA) is introduced as follows: the Cesium salt of the Boc-AA (Boc-AA means amino acid protected by a t-butoxycarbonyl group on its α-amino group) is formed, adding 1 equivalent of Cesium carbonate in dimethylformamide (DMF) and this salt is added to the

chloromethyl resin in DMF. The mixture is stirred at 50 °C overnight.

The substitution level of the resin by the first AA is determined by amino acid analysis after hydrochloric acid (HCl) hydrolysis.

The next amino acids are added step by step using the standard procedure (method described in "The peptides, Analysis, Synthesis, Biology"; vol. 1 to 9, S. Udenfriend, J. Meienhofer, eds, 1977 to 1987, Academic Press, New-York):

- deprotection of the N-terminal Boc group of the AA on resin in trifluoroacetic acid (TFA) / CH_2Cl_2;
- washing with CH_2Cl_2 ;
- neutralisation in triethylamine (TEA) / CH_2Cl_2;
- washing with CH_2Cl_2 ;
- coupling of the next Boc-AA in the following conditions: 2.5 equivalents of the Boc-AA is preactivated in DMF with dicyclohexylcarbodiimide (DCC)/Hydroxybenzotriazole (HOBt). The activated Boc-AA- benzotriazolate obtained is added to the resin-peptide in DMF. The completion of the reaction is controlled by the Kaiser and the Chloranyl tests (as described in E. Kaiser, R.L. Colescott, L.D. Bassinger, P.I. Cook; Anal. Biochem., 34, 595 (1970) and in T. Vojkovsky, Peptide Research, vol.8, n° 4, 236-237 (1995), respectively).

If the reaction is incomplete, a recoupling procedure is used after washing of the resin-peptide with DMF: 1.25 equivalent of the Boc-AA is added together with 1.25 equivalent of 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) and 1.25 equivalent of HOBt in DMF. If one of the tests remains positive after the recoupling procedure, an acetylation of

the remaining amino functions is performed using acetic anhydride;

- washing with DMF, CH_2Cl_2, CH_3OH.

When all the amino acids are added, the peptide-resin is dried under vacuum and the peptide is cleaved from the resin following a standard low-high HF cleavage. The deprotected peptides so obtained are purified on reverse phase HPLC in a TFA 0.1% / CH_3CN system. After lyophilisation, the pure peptide is obtained as a white powder.

The peptidic products that were tested are identified hereafter along with their characteristics.

The peptidic product of example 1 is represented by the following structure : ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH. Its formula is C131 H208 N40 O34 S1. Its molecular weight(M.W.) is 2919.4.Its FAB/MS analysis gives the following results $[M+H]^+$= 2921,FAB/MS means Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy, this analytical method is described in "Methods in Molecular Biology", vol. 36; Peptide Analysis Protocols, M.W. Pennington & B.M. Dunn (Eds), 1994, Humana Press, Totowa N.J..

The peptidic product of example 2 is represented by the following structure : AcEEED-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH. Its formula is C131 H208 N40 O34 S1 . Its molecular weight(M.W.) is 2919.4.Its FAB/MS analysis gives the following results $[M+H]^+$= 2920.

The peptidic product of example 3 is represented by the following structure : AcEEED-β-A-β-A-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH. Its formula is C131 H206 N40 O35 S1 . Its molecular weight(M.W.) is 2933.4 .Its FAB/MS analysis gives the following results $[M+H]^+$ 2934.

The peptidic product of example 4 is represented by the following structure : AcEEED-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH. Its formula is C125 H196 N38 O33 S1 . Its molecular weight(M.W.) is 2791.3.Its FAB/MS analysis gives the following results $[M+H]^+$ 2792.

The peptidic product of example 5 is represented by the following structure : AcEEED-C-[S-S]-C-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH. Its formula is C131 H206 N40 O36 S3 . Its molecular weight(M.W.) is 2933.4. Its FAB/MS analysis gives the following results $[M+H]^+$ 2934.

The peptidic product of example 6 is represented by the following structure : α-(Biotinyl-GG), ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH. Its formula is C145 H228 N44 O38 S2. Its molecular weight(M.W.) is 3259.8.Its FAB/MS analysis gives the following results $[M+H]^+$ 3260.

The peptidic product of example 7 is represented by the following structure : ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFPNRRMKWKK-OH. Its formula is C131 H208 N40 O32 S1. Its molecular weight(M.W.) is 2887.4. Its ES/MS analysis gives the following results (M.W.) is 2887.6. ES/MS means Electrospray Mass Spectroscopy. General principle of ES/MS analysis is described in J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, C.M. Whitehouse, Science, 246, p. 64-71, 1989 or in R.D. Smith, J.A. Loo, C.G. Edmonds, C.J. Barinaga, H.R. Udseth, Anal.chem., 62, p. 882-899, 1990.

The amino acid analysis of the peptide product of example 7 is as follows :

	Asp	Glu	Pro	Met	Ile	Phe	Trp	Lys	Arg
Theo.	2	4	1	1	2	1	2	5	3
Exp.	1.93	4.06	1.01	0.97	1.95	1.00	-	4.95	3.12

Theo. = Theoretical, Exp. = Experimental

General principle of amino acid analysis is described in S. Moore, W.H. Stein, J. Biol. Chem., 200, p. 803, 1953.

The peptidic product of example 8 is represented by the following structure : α-(BiotinylGG), ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFPNRRMKWKK-OH. Its formula is C145 H228 N44 O36 S2. Its molecular weight(M.W.) is 3227.8.Its ES/MS analysis gives the following result 3227.2. The amino acid analysis of the peptide product of example 8 is as follows:

	Asp	Glu	Pro	Gly	Met	Ile	Phe	Trp	Lys	Arg
Theo.	2	4	1	2	1	2	1	2	5	3
Exp.	1.89	4.10	1.02	2.02	0.98	1.95	1.01	-	4.89	3.15

Example 9: in vitro experiments

Concentration dependence assay

Peptidic products according to examples 1 to 8 show blocking effects on the binding anti-α SM-1 monoclonal antibody to the α-SM actin. A number of experiments were performed in order to investigate their efficiency to penetrate into the cells in culture and to interfere with α-SM actin organisation in stress fibers by the following tests.

After addition of the peptidic products to the culture medium, the cells have then been fixed, permeabilised and stained for α-SM actin and total actin (usual control for the penetration and effect of the peptide as described by Chaponnier et al. (1995)).

The peptidic products according to examples 1 to 8 were well active in inhibiting α-SM actin incorporation into stress fibers after inoculation on cultures of vascular smooth muscle cells (VSMC) for 3 h at

different concentrations: 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 and 4 mg/ml (mg of peptidic product, ml of cell culture medium) in a medium comprising Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco Cat No 41965-039, Life Technologies, Basel, Switzerland, supplemented with 10% fetal calf serum and 20mM Hepes (Gibco, Cat No 15630-056).

The VSMC were prepared by enzymatic digestion of rat aorta as described by Chaponnier et al. (1995) and Bochaton-Piallat et al. (Artherosclerosis and Vascular Biology Vol. 16, 815-820 (1996)).

Time course assay

A large number of experiments were performed with the peptidic products of examples 1 to 8 in order to assay more carefully the time course effect on the peptides. Said experiments were also used to investigate the location of the biotinylated peptides after delivery into the cells. The detection of the biotinylated peptides was assayed by staining with Fluorescein (FITC)-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Groves, PA, USA), Cat No 016-090-084.

The peptidic products according to examples 1 to 8 were incubated in cultured VSMC at a concentration of 2 mg/ml for 3, 5, 10, 15, 30 and 60 minutes in a medium comprising Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco Cat No 41965-039, Life Technologies, Basel, Switzerland, supplemented with 10% fetal calf serum and 20mM Hepes (Gibco, Cat No 15630-056).

Peptidic products of the examples 1 to 8 were able to inhibit the α-SM actin stress fiber organisation in 90% of the cells. The activity was clearly detectable already after 3 min of incubation. The localisation of the biotinylated peptides with stress fiber was difficult to obtain even in the early time. Most of the staining was

localised at the membrane, with some diffuse staining in the cytoplasm. Strong staining was detected only in some cells during the first 15 min, and thereafter, staining appeared lighter in the cytoplasm but even in all cells. No FITC-streptavidin staining along the stress fibers was detectable even after longer time of peptides incubation.

Therefore, the incubation of the peptidic products of examples 1 to 8 into the cells appears to be particularly fast and may be difficult to follow by time course assay, but can be followed by using other marker peptides (i.e. fluorescent peptides), which allow "in live" observation of the peptides entry under the microscope.

Time course of α-SM actin recovery into stress fibers

The peptidic products of examples 1 to 8 were incubated with cells for 3 hours in a medium comprising Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco Cat No 41965-039, Life Technologies, Basel, Switzerland, supplemented with 10% fetal calf serum and 20mM Hepes (Gibco, Cat No 15630-056).

The cells were thereafter washed and the medium (medium without peptides) was left for different periods of time (15 min, 30 min, 1 h and 2 h).

These experiments show that α-SM positive stress fibers start to reorganise slightly after 1 hour, but clearly after 2 hours.

Example 10: Incorporation into the cells using a biotinylated peptide

This experiment was used to control the entrance and exit ("in and out") of the peptidic product of example 6 (peptide α-(BiotynylGG),ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]).

The VSMC cells were incubated in a medium comprising Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco

Cat No 41965-039, Life Technologies, Basel, Switzerland, supplemented with 10% fetal calf serum and 20mM Hepes (Gibco, Cat No 15630-056) 30 min with the peptidic product of example 6 and after withdrawal of the peptide, the cells were incubated with culture medium for 0, 5 min, 30 min, 1 h and 2 h. The cells were extracted after different times of incubation, in sample buffer comprising 0.08M Tris-Cl, ph 6.8; 2% sodium dodecyl sulfate (SDS); 0.1M Dithiothreitol (DTT); 0.001M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 10% glycerol as described in Am. J. Pathol. 134:597-603, 1989, Gelsolin modulation in epithelial and stromal cells of mammary carcinoma, Chaponnier and Gabbiani.

The total protein extracts were run on a SDS-PAGE gel and transferred on a PVDF membrane, according to a method described in J. Cell Biol. 130:887-895, 1995, Chaponnier et al..

The membrane was then incubated with streptavidin peroxidase to detect the biotinylated peptide, according to a method described in Levy-Toledano et al. in Endocrinology 133:1803-1808,1993.

A strong signal was observed after 30 min peptide incubation and after 5 min withdrawal of the peptide, and a clear decrease after 30 min of washing and only a light signal after 1 hour withdrawal of the peptide. This experiment confirms the immunofluorescent staining as above-described and allows an assay to follow the possible "in and out" of the peptidic product into the cells.

Example 11: Effect of the peptidic product on α-SM actin biosynthesis

Table 2 shows the results of four (4) experiments on the effect of the peptidic product of example 1 (peptidic product : ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-

58])on α-SM actin synthesis after 20 hours incubation time on VSMC in a medium comprising Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco Cat No 41965-039, Life Technologies, Basel, Switzerland, supplemented with 10% fetal calf serum and 20mM Hepes (Gibco, Cat No 15630-056)at a temperature of 37 °C.

Table 2

Experiment	1	2	3	4	Mean
0 hour	100	100	100	100	100
20 hours	72	56	44	48	55

In this table, the values of the control conditions were standardised at a 100% starting value (time = 0 hour).

This table shows that the incubation of the peptidic product of example 1 (2 mg/ml culture medium) for 20 hours provokes 55% decrease (mean value for the 4 experiments) of the α-SM actin synthesis (studied by means of S^{35} methionine incorporation) compared to control conditions.

Example 12: in vivo experiments

Test upon an open "splinted wound" in rats

In order to measure exclusively contraction, the inventors have developed the "splinted wound" model, based upon the technique of Gabbiani G. et al., J. of Exp. Med. Vol. 135 pp. 719-734 (1972).

The wound 2 x 2 cm in the back of the rat is fixed by suturing its margins to a plastic frame using suture thread (Supramid, metric 3, Braun, Emmenbrücke) on day 0. This results in an inhibition of wound contraction while the development of granulation tissue is not

affected. The peptidic product is applied on the open wound starting at the 7th day usually for 3 days and releases the suture of the frame, thus allowing an accelerated contraction which in controls reduces the area of the wound of about 2/3 within 48 hours.

We have measured morphometrically the contraction of the wound (5 rats per group) by means of planimetry (KS 400, Zeiss Vision) and studied the tissues morphologically by means of histological techniques, immunofluorescence with the α-SM actin antibody according to a method described in Gabbiani et al., J. Exp. Med. 1972 (p.15, line 8) and Darby et al. Lab. Invest. 1990 (p.1, line 24-25).

Table 3 presents the wound size (surface in cm^2) measured on day 3 as a percentage of the wound size measured on day 0.

The rats were treated with the peptidic product of example 1 at a dose of 3 mg/ml (mg of peptidic product, ml of 0.9% NaCl).

Table 3

Treatment	Wound surface *
(0.9% NaCl) saline solution	30.59 ± 1.57
Peptidic product of example 1	48.42 ± 2.02

This result suggests a decrease in contractile activity when the rats were treated topically with the peptidic product of example 1 at dose of 3 mg/ml.

CLAIMS

1. A peptidic product comprising the tetrapeptide Acetyl-glutamyl-glutamyl-glutamyl-aspartyl associated with a chemical entity that is able to introduce said tetrapeptide into a cell.

2. The peptidic product according to claim 1, wherein the chemical entity is a liposome, a lipidic vesicle made of lipids and/or fatty acids, a cationic vesicle or a mixture thereof.

3. The peptidic product according to claim 1, wherein the chemical entity is a polypeptide of at least 8 amino acids.

4. The peptidic product according to claim 3, wherein the polypeptide is the tat mediated protein.

5. The peptidic product according to claim 3, wherein the polypeptide is a homeobox polypeptide.

6. The peptidic product according to any one of the claims 1 to 5, wherein the tetrapeptide is linked to the chemical entity through a spacer.

7. The peptidic product according to claim 1, selected from the group consisting of
ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH;
AcEEED- K-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : AcEEED-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH ;
AcEEED-β-A-β-A-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : AcEEED-β-A-β-A-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH;
AcEEED-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : AcEEED-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH;
AcEEED-C-[S-S]-C-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : AcEEED-C-[S-S]-C-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH;

α-(BiotynylGG),ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]), represented by the following structure : α-(Biotinyl-GG), ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFQNRRMKWKK-OH;

ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]-Pro^{50}), represented by the following structure : ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFPNRRMKWKK-OH; and

α-(BiotynylGG),ε-(AcEEED)- K-(pAntp[43-58]-Pro^{50}), represented by the following structure : α-(BiotinylGG), ε-(AcEEED)-K-RQIKIWFPNRRMKWKK-OH.

8. Pharmaceutical composition comprising at least one pharmaceutically acceptable excipient and an effective amount of the peptidic product according to any one of the claims 1 to 7.

9. Use of the pharmaceutical composition according to claim 8 or of the peptidic product according to any one of the claims 1 to 7, for the manufacture of a medicament.

10. Use according to claim 9 in the prevention and/or the treatment of a disease related to α-SM actin expression into a cell, said disease is selected from the group consisting of wound contraction, hypertrophic scars, fibromatosis and fibrotic conditions.

SEQUENCE LISTING

<110> UCB-BIOPRODUCTS S.A.

<120> Peptidic product, process and composition

<130> 16-83

<140>
<141>

<150> EP 98204396.0
<151> 1998-12-24

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 1
Glu Glu Glu Asp Lys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg
1 5 10 15

Met Lys Trp Lys Lys
20

<210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 2
Glu Glu Glu Asp Xaa Xaa Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg
1 5 10 15

Arg Met Lys Trp Lys Lys
20

<210> 3
<211> 20
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:SYNTHETIC PEPTIDE

<400> 3
Glu Glu Glu Asp Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met
1 5 10 15

Lys Trp Lys Lys
20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intl. Jonal Application No
PCT/EP 99/09964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHAPONNIER, C. ET AL: "The specific NH-2-terminal sequence Ac - EEED of alpha-smooth muscle actin plays a role in polymerization." EXPERIENTIA (BASEL), (1995) VOL. 51, NO. ABSTR., PP. A62. MEETING INFO.: 27TH ANNUAL MEETING OF THE SWISS SOCIETIES FOR EXPERIMENTA BIOLOGY (USGEB/USSBE) FRIBOURG, SWITZERLAND MARCH 30-31, 1995 ISSN: 0014-4754., XP002107291 abstract -/--	1-10

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 June 2000	14/06/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Berte, M

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intl Jonal Application No
PCT/EP 99/09964

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US DN=126:99664, JAERLEBARK, LEIF ET AL: "Peptidyl conjugates of adenosine 5'-carboxylic acid synthesized and evaluated as ligands for P2 purinoceptors" XP002107292 *abstract S13-06* & BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1996), 229(2), 363-369 CODEN: BBRCA9;ISSN: 0006-291X, ---	1,2,8
Y	WO 94 04686 A (BARSOUM JAMES G ;BIOGEN INC (US); FAWELL STEPHEN E (US); PEPINSKY) 3 March 1994 (1994-03-03) cited in the application claims ---	1-10
E	WO 00 01417 A (WANG SHUDONG ;CYCLACEL LIMITED (GB); FISCHER PETER MARTIN (GB)) 13 January 2000 (2000-01-13) page 91 -page 92; claims ---	1-10
P,A	WO 99 11809 A (IMP COLLEGE INNOVATIONS LTD ;CRISANTI ANDREA (GB)) 11 March 1999 (1999-03-11) claims; figure 1 -----	1

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inte. onal Application No
PCT/EP 99/09964

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9404686 A	03-03-1994	AT 173016 T	15-11-1998
		AU 667244 B	14-03-1996
		AU 5083293 A	15-03-1994
		CA 2135642 A	03-03-1994
		DE 69321962 D	10-12-1998
		DE 69321962 T	01-07-1999
		DE 656950 T	14-03-1996
		EP 0656950 A	14-06-1995
		EP 0903408 A	24-03-1999
		ES 2123062 T	01-01-1999
		FI 945248 A	05-01-1995
		JP 2869396 B	10-03-1999
		JP 10033186 A	10-02-1998
		JP 2702285 B	21-01-1998
		JP 7503617 T	20-04-1995
		KR 153027 B	15-10-1998
		NO 944273 A	17-02-1995
		NZ 255831 A	24-04-1997
		US 5674980 A	07-10-1997
		US 5670617 A	23-09-1997
		US 5652122 A	29-07-1997
		US 5747641 A	05-05-1998
WO 0001417 A	13-01-2000	AU 4519899 A	24-01-2000
		GB 2340121 A	16-02-2000
WO 9911809 A	11-03-1999	AU 8877698 A	22-03-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/00	
Ｃ０７Ｋ 5/103	Ｃ０７Ｋ 5/103 ＺＮＡ	
Ｃ０７Ｋ 7/04	Ｃ０７Ｋ 7/04	
Ｃ０７Ｋ 14/00	Ｃ０７Ｋ 14/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ガブビアニ，ジウリオ
スイス国，ツェーハー－１２０６ ジェネーブ，シュマン デ クレト ドゥ シャンペル １６
(72)発明者 スカルソ，アラン
ベルギー国，ベー－６１８０ クールセル，アブニュ ドュ ラ ウォロニ ６１

Ｆターム(参考) 4C076 AA01 AA07 AA08 AA12 AA13 AA14 AA17 AA19 AA24 AA29
AA36 AA95 BB01 BB05 BB07 BB13 BB15 BB16 BB17 BB25
BB27 BB29 BB31 CC15 CC19 CC27 CC41 DD41N DD63N EE41N
EE51N EE59N FF34
4C084 AA01 AA02 AA03 AA07 BA01 BA11 BA16 BA23 BA41 BA46
CA59 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA35 MA43 MA52
MA59 MA60 MA63 MA66 NA13 ZA592 ZA892 ZB262 ZC542
4H045 AA10 AA30 BA13 BA16 BA17 BA18 BA19 BA42 EA20