

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成23年10月27日 (2011.10.27)

【公表番号】特表2011-525181(P2011-525181A)

【公表日】平成23年9月15日 (2011.9.15)

【年通号数】公開・登録公報2011-037

【出願番号】特願2011-514778(P2011-514778)

【国際特許分類】

C 0 7 K 7/08 (2006.01)

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

A 6 1 P 3/06 (2006.01)

A 6 1 P 39/06 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

【 F I 】

C 0 7 K 7/08 Z N A

A 6 1 K 47/24

A 6 1 P 3/06

A 6 1 P 39/06

A 6 1 P 29/00

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 9/10 1 0 1

【手続補正書】

【提出日】平成23年7月1日 (2011.7.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2011525181000001.app

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 5 4 】

本発明の他の特徴、目的、および利点、ならびにその好ましい態様は、以下の詳細な説明、実施例、特許請求の範囲、および図面を読むことにより明らかになると考えられる。

[請求項1001]

以下のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド：

X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>

(SEQ ID NO:1)

式中、

X<sub>1</sub>、X<sub>7</sub>、およびX<sub>15</sub>は、EおよびDからなる群より独立して選択されるアミノ酸であり；

X<sub>4</sub>、X<sub>11</sub>、およびX<sub>18</sub>は、E、D、A、およびGからなる群より独立して選択されるアミノ酸で

あり；

$X_2$ 、 $X_6$ 、 $X_9$ 、 $X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ 、 $X_{16}$ 、 $X_{17}$ 、および $X_{20}$ は、F、L、W、I、V、およびAからなる群より独立して選択されるアミノ酸であり；

$X_3$ 、 $X_5$ 、および $X_{19}$ は、R、K、およびCからなる群より独立して選択されるアミノ酸であり；

$X_{14}$ はアミノ酸R、A、E、またはCであり；かつ

$X_8$ はA、G、またはVである。

[請求項1002]

$X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{16}$ 、および $X_{17}$ が、F、L、I、およびWからなる群より独立して選択される、請求項1001記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1003]

$X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{16}$ 、および $X_{17}$ が、FおよびLより独立して選択される、請求項1002記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1004]

$X_9$ がL、F、またはWである、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1005]

$X_2$ 位、 $X_6$ 位、 $X_{12}$ 位、および $X_{17}$ 位のうちの少なくとも3つがLである、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

[請求項1006]

$X_4$ 位、 $X_8$ 位、および $X_{11}$ 位の1つまたは複数Aである、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1007]

$X_8$ がAである、請求項1006記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1008]

$X_4$ 、 $X_{11}$ 、および $X_{18}$ が、DおよびEからなる群より独立して選択される、請求項1001記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1009]

$X_3$ 、 $X_5$ 、 $X_{14}$ 、および $X_{19}$ からなる群より選択される1つの位置にCが存在する、請求項1001記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1010]

以下を含む、請求項1001記載の単離されたポリペプチド：

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7AX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}$

(SEQ ID NO:27)

式中、

$X_1$ 、 $X_7$ 、 $X_{15}$ 、および $X_{18}$ は、DおよびEからなる群より独立して選択され；

$X_2$ はL、I、またはVであり；

$X_4$ および $X_{11}$ は、D、E、およびAからなる群より独立して選択され；

$X_3$ 、 $X_5$ 、および $X_{19}$ は、KおよびRからなる群より独立して選択され；

$X_9$ はW、F、またはLであり；

$X_{14}$ はR、E、またはAであり；かつ

$X_6$ 、 $X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ 、 $X_{16}$ 、 $X_{17}$ 、および $X_{20}$ は、F、L、I、およびWからなる群より独立して選択される。

[請求項1011]

$X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ 、 $X_{16}$ 、 $X_{17}$ 、および $X_{20}$ が、LおよびFからなる群より独立して選択される、請求項1010記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1012]

以下を含む、請求項1010記載の単離されたポリペプチド：

$X_1LRAX_5LX_7AX_9X_{10}AX_{12}X_{13}RX_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RX_{20}$  (SEQ ID NO:28)

式中、

$X_1$ 、 $X_7$ 、 $X_{15}$ 、および $X_{18}$ は、DおよびEからなる群より独立して選択され；

$X_5$ はKまたはRであり；

$X_9$ はF、L、またはWであり；かつ

$X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ 、 $X_{16}$ 、 $X_{17}$ 、および $X_{20}$ は、FおよびLからなる群より独立して選択される。

[請求項1013]

以下を含む、請求項1010記載の単離されたポリペプチド；

$X_1LRX_4X_5LX_7AX_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}RX_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RX_{20}$  (SEQ ID NO:29)

式中、

$X_1$ 、 $X_4$ 、 $X_7$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{15}$ 、および $X_{18}$ は、DおよびEからなる群より独立して選択され；

$X_5$ はKまたはRであり；

$X_9$ はF、L、またはWであり；かつ

$X_{10}$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ 、 $X_{16}$ 、 $X_{17}$ 、および $X_{20}$ は、FおよびLからなる群より独立して選択される。

[請求項1014]

ELR(D/E)(K/R)LEA(W/F/L)(F/L)(D/E)L(F/L)RE(F/L)LER(F/L) (SEQ ID NO:30)

含む、請求項1013記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1015]

C、K、Y、またはLからなる群より選択される $X_{21}$ をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1016]

SまたはCである $X_{22}$ をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1017]

$X_{21}$ がKである、請求項1015記載の単離されたペプチド。

[請求項1018]

$X_{22}$ がSである、請求項1017記載の単離されたペプチド。

[請求項1019]

$X_{21}$ または $X_{22}$ がCである、請求項1016記載の単離されたペプチド。

[請求項1020]

保護基をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1021]

前記保護基が、アセチル(Ac)、アミド、炭素3～20個のアルキル基、Fmoc、t-ブトキシカルボニル(Tboc)、9-フルオレンアセチル基、1-フルオレンカルボン酸基、9-フルオレンカルボン酸基、9-フルオレノン-1-カルボン酸基、ベンジルオキシカルボニル、キサントリル(Xan)、トリチル(Trt)、4-メチルトリチル(Mtt)、4-メトキシトリチル(Mmt)、4-メトキシ-2,3,6-トリメチル-ベンゼンスルホニル(Mtr)、メシチレン-2-スルホニル(Mts)、4,4-ジメトキシベンズヒドリル(Mbh)、トシル(Tos)、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル(Pmc)、4-メチルベンジル(MeBzl)、4-メトキシベンジル(MeOBzl)、ベンジルオキシ(BzIO)、ベンジル(Bzl)、ベンゾイル(Bz)、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシルイデン)エチル(Dde)、2,6-ジクロロベンジル(2,6-DiCl-Bzl)、2-クロロベンジルオキシカルボニル(2-Cl-Z)、2-ブromoベンジルオキシカルボニル(2-Br-Z)、ベンジルオキシメチル(Bom)、シクロヘキシルオキシ(cHxO)、t-ブトキシメチル(Bum)、t-ブトキシ(tBuO)、t-ブチル(tBu)、およびトリフルオロアセチル(TFA)からなる群より選択される保護基である、請求項1020記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1022]

前記保護基がアミノ末端またはカルボキシ末端に結合している、請求項1020または1021記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1023]

アミノ末端に結合している第1保護基、およびカルボキシル末端に結合している第2保護基を含む、請求項1020、1021、または1022記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1024]

前記第1保護基が、アセチル、プロピオニル、および炭素3～20個のアルキルからなる群より選択される保護基である、請求項1023記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1025]

前記第1保護基がアセチルである、請求項1024記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1026]

前記第2保護基がアミドである、請求項1023、1024または1025記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1027]

鏡像異性アミノ酸がすべて「D」アミノ酸である、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1028]

鏡像異性アミノ酸が「L」アミノ酸と「D」アミノ酸との混合物である、請求項1001～1026のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1029]

請求項1001記載の配列を有する第2ペプチドに結合している、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1030]

前記第2ペプチドが第1ペプチドと同じ配列を有する、請求項1029記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1031]

コレステロール流出活性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1032]

ヒト血漿中でプレ 形成を誘導した、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1033]

ABCA1安定化活性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1034]

酸化剤による酸化からリン脂質を保護する、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1035]

薬学的に許容される担体と混合される、前記請求項のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド。

[請求項1036]

請求項1001～1034のいずれか一項記載のポリペプチドと実質的に類似している三次元高次構造を有する、ペプチド模倣体。

[請求項1037]

レトロ-インベルソ(retro-inverso)類似体である、請求項1036記載のペプチド模倣体。

[請求項1038]

レトロ-エナンチオ類似体である、請求項1036記載のペプチド模倣体。

[請求項1039]

請求項1001～1034のいずれか一項記載のポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体、および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

[請求項1040]

心血管疾患を治療するための治療剤をさらに含む、請求項1039記載の組成物。

[請求項1041]

前記治療剤が、スタチン、胆汁酸結合剤、血小板凝集阻害剤、ニコチンアミド、PPAR活性化剤、ビタミンE、およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1040記載の組成物。

[請求項1042]

脂質と複合体化された請求項1001～1034のいずれか一項記載のポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体を含む、組成物。

[請求項1043]

前記脂質がリン脂質である、請求項1042記載の組成物。

[請求項1044]

前記リン脂質が1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン(「POPC」)である、請求項1043記載の組成物。

[請求項1045]

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項1042～1044のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1046]

請求項1001～1034のいずれか一項記載のポリペプチドを哺乳動物に投与し、それによってコレステロール流出が媒介される段階を含む、哺乳動物におけるコレステロール流出を媒介する方法。

[請求項1047]

前記ポリペプチドがABCAを安定化する、請求項1046記載の方法。

[請求項1048]

前記ABCAがABCA1である、請求項1047記載の方法。

[請求項1049]

前記ポリペプチドが抗酸化活性を有する、請求項1046記載の方法。

[請求項1050]

前記ポリペプチドが抗炎症活性を有する、請求項1046記載の方法。

[請求項1051]

前記哺乳動物がヒトである、請求項1046記載の方法。

[請求項1052]

前記哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、請求項1046記載の方法。

[請求項1053]

請求項1001～1034のいずれか一項記載のポリペプチドの治療的有効量を哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化の症状を治療するための方法。

[請求項1054]

前記哺乳動物が、アテローム性動脈硬化の1つまたは複数の症状を有すると診断された哺乳動物である、請求項1053記載の方法。

[請求項1055]

前記哺乳動物が、アテローム性動脈硬化のリスクがあると診断された哺乳動物である、請求項1053記載の方法。

[請求項1056]

前記哺乳動物がヒトである、請求項1053記載の方法。

[請求項1057]

前記哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、請求項1053記載の方法。

[請求項1058]

請求項1001～1034のいずれか一項記載のポリペプチドを哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物の管腔壁内の不安定プラークを安定化するための方法。

[請求項1059]

前記哺乳動物が、1つまたは複数の不安定ブランクを有すると診断された哺乳動物である、請求項1058記載の方法。

[請求項1060]

前記哺乳動物が、1つまたは複数の不安定ブランクを有するリスクがあると診断された哺乳動物である、請求項1058記載の方法。

[請求項1061]

両親媒性 ヘリックスを含むポリペプチド変種を作製する方法であって、  
該変種がコレステロール流出活性および/またはABCA安定化活性を有し、  
該方法が、

(a) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する段階；

(b) ポリペプチド変種を生成するために、該ポリペプチドの少なくとも1つのアミノ酸位を置換する段階；

(d) コレステロール流出活性および/またはABCA安定化活性について該ポリペプチド変種をスクリーニングする段階；

(e) SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有する該ポリペプチドのコレステロール流出活性の少なくとも80%を有する該ポリペプチド変種を選択する、および/またはSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有する該ポリペプチドのABCA安定化活性の少なくとも80%を有する該ポリペプチド変種を選択する段階；ならびに

(f) 選択された該ポリペプチド変種を合成する段階  
を含む、  
方法。

[請求項1062]

前記ポリペプチド変種がDアミノ酸を少なくとも1つ含む、請求項1061記載の方法。

[請求項1063]

前記ポリペプチド変種のカルボキシ末端がDアミノ酸を含み、かつ該ポリペプチド変種のアミノ末端がDアミノ酸を含む、請求項1061記載の方法。

[請求項1064]

前記ポリペプチド変種がすべてDアミノ酸を含む、請求項1061記載の方法。

[請求項1065]

請求項1001～1034のいずれか一項記載のポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体を含む容器を含む、アテローム性動脈硬化の症状を治療するためのキット。

[請求項1066]

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項1065記載のキット。

[請求項1067]

単位剤形中で、前記ポリペプチドが薬学的に許容される担体と混合されている、請求項1065記載のキット。

[請求項1068]

薬剤として使用するための、請求項1001～1034のいずれか一項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体。

[請求項1069]

脂質異常症に関連する障害の治療において使用するための、請求項1001～1034のいずれか一項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体。

[請求項1070]

コレステロール流出障害の治療において使用するための、請求項1001～1034のいずれか一項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体。

[請求項1071]

高コレステロール血症の治療において使用するための、請求項1001～1034のいずれか一

項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体。

[請求項1072]

炎症の治療において使用するための、請求項1001～1034のいずれか一項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体。

[請求項1073]

アテローム性動脈硬化の治療においてまたはアテローム性動脈硬化の症状を予防するための治療において使用するための、請求項1001～1034のいずれか一項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体。

[請求項1074]

プラークの安定化に関する治療において使用するための、請求項1001～1034のいずれか一項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体。

[請求項1075]

インビトロでABCAに結合させるための、請求項1001～1034のいずれか一項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体の使用。

[請求項1076]

検出可能な部分に直接または間接的に結合している、請求項1001～1034のいずれか一項記載の単離されたポリペプチドまたは請求項1036～1038のいずれか一項記載のペプチド模倣体

を含む、検出可能な親和性リガンド。

[請求項1077]

標識が、蛍光色素、金属、発色団色素、化学発光化合物、生物発光タンパク質、酵素、放射性同位体、磁性酸化鉄粒子、気体含有小胞、および量子ドットからなる群より選択される、請求項1076記載の検出可能な親和性リガンド。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

【図1】ペプチドN257-11(SEQ ID NO:34)のヘリックスホイールを示す。

【図2】本発明のペプチド、SEQ ID NO:2のヘリックスホイール図およびヘリックスネット図を示す。パネルAは、このペプチドの両親媒性を示すヘリックスホイール図を示す。パネルBは、極性表面の長軸下方に切断して、平板化したペプチドを示すヘリックスネット図を示す。影付きの丸は酸性アミノ酸を示し、部分的に影付きの丸はカチオン残基を示す。両パネル中の数字は、アミノ酸の一次配列を示す。

【図3】SEQ ID NO:2と全長アポA-Iのコレステロール流出活性を示すデータを提供する。パネルAは、濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す(脂質を含まないSEQ ID NO:2ペプチド(四角)；脂質を含まないアポリポタンパク質(アポ)A-I(丸))。パネルBは、cAMPで処理したおよびcAMPなしで処理した細胞を用いて決定した、ABCA1発現に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図4】C末端に残基KSが付加されたSEQ ID NO:2の22mer 類似体がABCA1コレステロール流出を促進することを示すデータを提供する。

【図5】ABCA1コレステロール流出活性に悪影響を及ぼすことなく、SEQ ID NO:2中のトリプトファン(W)に対してロイシン(L)またはフェニルアラニン(F)を置換することができることを実証するデータを提供する。パネルAは、表示のペプチドによる処理にตอบสนองして培地中に出現した細胞[<sup>3</sup>H]コレステロールの割合を示す。パネルBは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図6】活性に悪影響を及ぼすことなく、コレステロール流出ペプチドの非極性表面上の

ロイシンに対してバリンを置換することができることを示すデータを提供する。パネルAは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合(8時間)を示す。パネルBは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図7】ABCA1コレステロール流出の促進が、ペプチド中の疎水性ロイシン残基の数に影響を受けることを示すデータを提供する。パネルAは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。パネルBは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図8】ABCA1コレステロール流出活性に悪影響を及ぼすことなく、非極性表面上のロイシン残基またはロイシン残基とイソロイシン残基の組み合わせを用いて、本発明のペプチドを改変することができることを示すデータを提供する。パネルAおよびBは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。パネルCは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図9】ABCA1コレステロール流出を促進する能力に悪影響を及ぼすことなく、非極性表面上のフェニルアラニン残基の数を増加させて、本発明のペプチドを改変することができることを示すデータを提供する。パネルAは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。パネルBは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図10】ABCA1コレステロール流出を促進する能力に悪影響を及ぼすことなく、本発明のペプチドのロイシンおよびフェニルアラニン残基をイソロイシンで置換することができることを示すデータを提供する。パネルAは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。パネルBは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図11】ABCA1コレステロール流出を促進する能力に悪影響を及ぼすことなく、ペプチド中の正に荷電したリジンに対して正に荷電したアルギニンを置換することができることを示すデータを提供する。パネルAは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。パネルBは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図12】ABCA1コレステロール流出を促進する能力に悪影響を及ぼすことなく、負に荷電したグルタミン酸に対して負に荷電したアスパラギン酸を置換することができることを示すデータを提供する。パネルAは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。パネルBは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図13】本明細書に記載のペプチドにおいてアスパラギン酸残基とグルタミン酸残基に互換性があること、およびいずれも他のアミノ酸置換と組み合わせを用いることができることを示すデータを提供する。結果は、SEQ ID NO:2ペプチドを用いて得られた対照活性に対する割合(8時間)として表す。

【図14】ABCA1コレステロール流出を促進するペプチドの能力に悪影響を及ぼすことなく、12位のロイシン(L)に対してトリプトファン(W)またはフェニルアラニン(F)を置換することができることを示すデータを提供する。パネルAおよびBは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。

【図15】ABCA1コレステロール流出を促進する能力に悪影響を及ぼすことなく、すべてDアミノ酸である、または逆配列を有する本発明のペプチドを用いることができることを示すデータを提供する。図15は、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。

【図16】極性表面上のアラニン置換により、ABCA1コレステロール流出を促進する本発明のペプチドの能力が有利に増加することを示すデータを提供する。パネルAおよびBは、表示のペプチドによる処理に应答して培地中に出現した細胞<sup>[3H]</sup>コレステロールの割合を示す。パネルCは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図17】ABCA1コレステロール流出を促進する能力に悪影響を及ぼすことなく、アルギ



ニン14(R14)およびグルタミン酸18(E18)に対してアラニンを置換することができることを示すデータを提供する。パネルAは、表示のペプチドによる処理にตอบสนองして培地中に出現した細胞 [ $^3\text{H}$ ] コレステロールの割合を示す。パネルBは、ペプチドの濃度に対するコレステロール流出の依存性を示す。

【図18】本発明のペプチドをリン脂質と共に製剤化して、ABCA1依存性的および非依存性的機構を介して高レベルの細胞コレステロール流出を支持する複合体を生成することができることを示すデータを提供する。パネルAは、ペプチド:POPC複合体の粒子サイズを実証するゲル写真を示す。パネルBは、ペプチド:POPC複合体のコレステロール流出活性を示す。

【図19】本発明のペプチドが、高脂肪の西洋式食餌を与えたアポリポタンパク質E欠損マウスにおいて確立されたアテローム性動脈硬化を軽減したことを示すデータを提供する。パネルAは、病変によって覆われた大動脈の割合として表示した、対照およびペプチドで処理したマウスにおけるアテローム性動脈硬化の程度を示す。パネルBは、オイルレッドO染色により決定した、大動脈洞プラークの脂質含量を示す。

【図20】ミエロペルオキシダーゼ(MPO)由来の酸化生成物に対する抵抗性を付与するためのアミノ酸置換の使用を示すデータを提供する。パネルAは、アクロレインと共におよびアクロレインなしでインキュベートしたSEQ ID NO:2ペプチドのコレステロール流出活性を示す。パネルBは、SEQ ID NO:12ペプチドのコレステロール流出活性を示す。

【図21】本発明のペプチドが、明確なHDL亜集団が関与する高度に特異的な機構を介して、ヒト血漿中のプレ-1 HDL形成を誘導したことを示すデータを提供する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

SEQ ID NO:27は、

| 位置 <sup>1</sup> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| AA              | E | L | R | E | K | F | E | A | F | F  | E  | F  | F  | R  | E  | F  | F  | E  | R  | F  |
|                 | D | I | K | D | R | L | D |   | L | L  | D  | L  | L  | E  | D  | L  | L  | D  | K  | L  |
|                 |   | V |   | A |   | I |   |   | W | W  | A  | I  | I  | A  |    | I  | I  |    |    | W  |

である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

SEQ ID NO:28は、

| 位置 <sup>1</sup> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| AA              | E | L | R | A | K | L | E | A | F | F  | A  | F  | F  | R  | E  | F  | F  | E  | R  | F  |
|                 | D |   |   |   | R |   | D |   | L | L  |    | L  | L  |    | D  | L  | L  | D  |    | L  |
|                 |   |   |   |   |   |   |   |   | W |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

そのようなポリペプチドの好ましい態様は、SEQ ID NO:1~33ならびにそれらの保存的

変種の配列に基づく。いくつかの態様において、本発明のポリペプチドは、アミノ酸配列 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、またはSEQ ID NO:30を有する。いくつかの態様において、本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO:2～26および31～33のいずれか1つのアミノ酸配列を有する。本発明は、そのようなポリペプチドを含む組成物、そのようなポリペプチドを同定、スクリーニング、および合成する方法、ならびにそのようなポリペプチドを投与することにより、例えば心疾患、アテローム性動脈硬化病変、卒中、アルツハイマー病(すなわち、プラーク沈着の改善による)、および貯蔵障害などの、脂質異常症、高コレステロール血症、および炎症に関連する疾患および障害を治療、予防、または診断する方法を提供する。本発明は、脂質異常症、高コレステロール血症、および炎症、ならびに脂質貯蔵障害に関連する疾患および障害を治療、予防、または診断するためのキットをさらに提供する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0133

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0133】

遺伝情報を細胞内に輸送するために使用する特定の発現ベクターの種類は、特に重要ではない。真核細胞または原核細胞における発現に用いられる従来のベクターのいずれも使用してもよい。標準的な細菌発現ベクターには、pBR322ベースのプラスミド、pSKF、pET23Dなどのプラスミド、ならびにGSTおよびLacZなどの融合発現システムが含まれる。簡便な単離方法を提供するために、例えばHisタグといったエピトープタグを組換えポリペプチドに付加することもできる。場合によっては、酵素切断配列(例えば、第Xa因子切断部位を形成するMet-(His)g-Ile-Glu-Gly-Arg(SEQ ID NO:62))を組換えポリペプチドに付加する。ポリペプチドを発現させるための細菌発現システムは、例えば大腸菌、バチルス属(*Bacillus*)種、およびサルモネラ属(*Salmonella*)において利用可能である(Palva et al., Gene 22:229-235(1983); Mosbach et al., Nature 302:543-545 (1983))。このような発現システム用のキットは市販されている。哺乳動物細胞、酵母、および昆虫細胞用の真核生物発現システムは当技術分野で周知であり、同様に市販されている。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0221

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0221】

前述の通り、本発明のポリペプチド-脂質複合体は、小胞、リボソーム、またはプロテオリボソームを含むがこれらに限定されない、種々の形態で調製することが可能である。当業者に周知の種々の方法を使用して、ポリペプチド-脂質複合体を調製することができる。リボソームまたはプロテオリボソームを調製するために利用可能ないくつかの技法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチド(例えばSEQ ID NO:1～26またはSEQ ID NO:31～33のポリペプチド)を、適切な脂質と共に同時に超音波処理して(浴またはプローブ超音波処理器を使用)、ポリペプチド-脂質複合体を形成することができる。特定の態様では、ポリペプチドを予め形成された脂質小胞と混合し、結果としてポリペプチド-脂質複合体を自発的に形成させることができる。別の態様では、界面活性剤透析法によって、ポリペプチド-脂質複合体を作製することもできる。この方法では、ポリペプチド、脂質、およびコール酸ナトリウムなどの界面活性剤の混合物を透析して界面活性剤を除去し、再構成してポリペプチド-脂質複合体を作製することができる(例えば、Jonas et al., Methods Enzymol., 128:553-82 (1986)を参照されたい)。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 2 5 6

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 5 6 】

N257-11は、生物活性を伴って改変に成功した22mer ペプチドに相当する。ペプチドN257-11のアミノ酸配列は、

ELREKLEAWREAFEEFFARFKS

(SEQ ID NO:34)(図1、ペプチドのヘリックスホイルを示す)である。N257-11は概して高い能力でABCA1コレステロール流出を促進したが、活性には高濃度が必要であり、よって該ペプチドは弱い流出効率を示した。

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 5 7

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 5 7 】

ペプチド系列#: N257-11

ABCA1コレステロール流出活性を有する22mer ペプチド

**ELREKLEAWREAFEEFFARFKS (SEQ ID NO:34)**

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 6 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 6 1 】

表A. ペプチド系列#: N356

N257-11の設計に基づいた22mer、21mer、および20mer ペプチドコレステロール流出の効率を増大させるために置換を設計。

**ELREKLEAWREAFEEFFARFKS (SEQ ID NO:34)** 親N257-11配列(上記)

| 配列                            | 系列番号   | アミノ酸の数 | SEQ ID NO: |
|-------------------------------|--------|--------|------------|
| <b>ELREKLEAWFEAFEEFFARFKS</b> | N356-1 | 22 mer | <u>35</u>  |
| <b>ELREKLEAWRELFEFFARFKS</b>  | N356-2 | 22 mer | <u>36</u>  |
| <b>ELREKLEAWFELFEFFARFKS</b>  | N356-3 | 22 mer | <u>37</u>  |
| <b>ELREKLEAWFELFAEFFARFKS</b> | N356-4 | 22 mer | <u>38</u>  |
| <b>ELREKLEAWFELFAEFFARFK</b>  | N356-5 | 21 mer | <u>39</u>  |
| <b>ELREKLEAWFELFAEFFARF</b>   | N356-6 | 20 mer | <u>40</u>  |
| <b>ELRAKLEAWFEAFAEFFARF</b>   | N356-7 | 20 mer | <u>41</u>  |

下線の残基は、リスト中の最初の配列(すなわちN257-11)に対してなされた変更を表す。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 6 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 2 6 2 】

結果

N356ペプチド系列: コレステロール流出データ(J774マクロファージ+ABCA1を上方制御す

る cAMP)

コレステロール流出率(%) / 8時間

|        | <u>N356-1</u> | <u>N356-2</u> | <u>N356-3</u> | <u>N356-4</u> | <u>N356-5</u> | <u>N356-6</u> | <u>N356-7</u>    |
|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------|
| cAMPなし | 0.86±0.06     | 1.27±0.14     | 0.82±0.07     | 1.72±0.14     | 2.18±0.17     | 2.09±0.15     | <u>2.78±0.40</u> |
| cAMP添加 | 4.16±0.38     | 6.52±0.37     | 3.94±0.50     | 4.25±0.60     | 5.97±0.47     | 4.04±0.72     | <u>7.00±0.94</u> |

【 手 続 補 正 1 3 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 2 6 4

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 2 6 4 】

表B. ペプチド系列#: N965

N257-11およびN365の設計に基づいた22mer、21mer、および20mer ペプチド

| 配列                     | 系列番号   | アミノ酸の数 | <u>SEQ ID NO:</u> |
|------------------------|--------|--------|-------------------|
| EVREKLEAWFEAFREFAERFKS | N965-1 | 22 mer | <u>42</u>         |
| EVREKLEAWFELFREFAERFKS | N965-2 | 22 mer | <u>43</u>         |
| EVREKLEAWFELFREFAERFLS | N965-3 | 22 mer | <u>44</u>         |
| EVREKLEAWFELFREFLERFKS | N965-4 | 22 mer | <u>45</u>         |
| EVREKLEAWFELFREFLERFLS | N965-5 | 22 mer | <u>46</u>         |
| EVREKLEAWFELFREFLERFL  | N965-6 | 21 mer | <u>47</u>         |
| EVREKLEAWFELFREFLERF   | N965-7 | 20 mer | <u>48</u>         |
| ELREKLEAWFELFREFLERF   | N965-8 | 20 mer | <u>49</u>         |
| ELREKLEAWRELFEFFARFLS  | N965-9 | 22 mer | <u>50</u>         |

下線の残基は、リスト中の最初の配列(すなわちN965-1)に対してなされた変更を表す。

【 手 続 補 正 1 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 2 6 7

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 2 6 7 】

表C. ペプチド系列#: N1154

N965-8に基づいた20mer ペプチド

**ELREKLEAWFELFREFLERF**(SEQ ID NO:49) 親N965-8(ATI-185)

| 配列                                 | 系列番号     | アミノ酸の数 | <u>SEQ ID NO:</u> |
|------------------------------------|----------|--------|-------------------|
| <b>ELRERLEAWFELFREFLERF</b>        | N1154-1  | 20 mer | <u>51</u>         |
| <b>ELRDKLEAWFDLFREFLERF</b>        | N1154-2  | 20 mer | <u>52</u>         |
| <b><u>DLRDKLDAWFDLFRDFLDRF</u></b> | N1154-3  | 20 mer | <u>53</u>         |
| <b>ELRDRLEAWFDLFREFLERF</b>        | N1154-4  | 20 mer | <u>54</u>         |
| <b><u>DLRDRLDAWFDLFRDFLDRF</u></b> | N1154-5  | 20 mer | <u>55</u>         |
| <b>ELREKLEAWLELLRELLERL</b>        | N1154-6  | 20 mer | <u>56</u>         |
| <b>ELRERLEAWLELLRELLERL</b>        | N1154-7  | 20 mer | <u>57</u>         |
| <b>ELRDKLEAWLDLLRELLERL</b>        | N1154-8  | 20 mer | <u>58</u>         |
| <b><u>DLRDKLDAWLDLLRDLLDRL</u></b> | N1154-9  | 20 mer | <u>59</u>         |
| <b>ELRDRLEAWLDLLRELLERL</b>        | N1154-10 | 20 mer | <u>60</u>         |
| <b><u>DLRDRLDAWLDLLRDLLDRL</u></b> | N1154-11 | 20 mer | <u>61</u>         |

下線の残基は、ATI-185に対してなされた変更を表す。