

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3645905号

(P3645905)

(45) 発行日 平成17年5月11日(2005.5.11)

(24) 登録日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int.Cl.⁷

F I

C O 7 K 14/52

C O 7 K 14/52

A 6 1 K 38/00

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 29/00

C O 7 K 7/06 Z N A

C O 7 K 7/06

A 6 1 K 37/02

請求項の数 16 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願平7-502990	(73) 特許権者	キュラティブ テクノロジーズ, インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成6年6月17日(1994.6.17)		アメリカ合衆国 11733 ニューヨーク州 セトーケット, リサーチ ウェイ 14 番地
(65) 公表番号	特表平9-501415		
(43) 公表日	平成9年2月10日(1997.2.10)	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔
(86) 国際出願番号	PCT/US1994/006888		
(87) 国際公開番号	W01995/000543	(74) 代理人	弁理士 石井 貞次
(87) 国際公開日	平成7年1月5日(1995.1.5)		
審査請求日	平成13年6月13日(2001.6.13)	(74) 代理人	弁理士 早川 康
(31) 優先権主張番号	080,371		
(32) 優先日	平成5年6月18日(1993.6.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗炎症性ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列 $X-Thr_1-Thr_2-Ser_3-Gln_4-Val_5-Arg_6-Pro_7-Arg_8-R'$ (ここで、1、2、5、6 または 7 位のアミノ酸残基のいずれか 1 つが D-立体異性体であり、X は水素又は $R-(C=O)$ (R は低級アルキル) であり、そして R' は水素及びアミドより成る群から選ばれる) から成るペプチドを含む、抗炎症活性を示す抗炎症用医薬組成物。

【請求項 2】

前記ペプチドのアミノ酸配列が $D-Thr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg$ である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記ペプチドのアミノ酸配列が $Thr-D-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg$ である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】

前記ペプチドのアミノ酸配列が $Thr-Thr-Ser-Gln-D-Val-Arg-Pro-Arg$ である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 5】

前記ペプチドのアミノ酸配列が $Thr-Thr-Ser-Gln-Val-D-Arg-Pro-Arg$ である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 6】

前記ペプチドのアミノ酸配列が $Thr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-D-Pro-Arg$ である請求

10

20

項1記載の組成物。

【請求項7】

前記ペプチドが、本質的にアミノ酸配列Thr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Argから成る環化誘導体であって、該誘導体の第1のアミノ酸残基のアミン基が該誘導体の第2の非隣接アミノ酸残基のカルボキシル基に共有結合で結合されて環化したペプチドである請求項1記載の組成物。

【請求項8】

アミノ酸配列 $X-Thr_1-Thr_2-Ser_3-Gln_4-Val_5-Arg_6-Pro_7-Arg_8-R'$ （ここで、1、3、4、5、6または7位のアミノ酸残基のいずれか1つがGluで置換され、Xは水素又は $R-(C=O)$ （Rは低級アルキル）であり、そしてR'は水素及びアミドより成る群から選ばれる）から成るペプチドを含む、抗炎症活性を示す抗炎症用医薬組成物。

10

【請求項9】

前記ペプチドのアミノ酸配列がThr-Thr-Glu-Gln-Val-Arg-Pro-Argである請求項8記載の組成物。

【請求項10】

前記ペプチドのアミノ酸配列がThr-Thr-Ser-Glu-Val-Arg-Pro-Argである請求項8記載の組成物。

【請求項11】

前記ペプチドのアミノ酸配列がThr-Thr-Ser-Gln-Val-Glu-Pro-Argである請求項8記載の組成物。

20

【請求項12】

アミノ酸配列 $X-Thr_1-Thr_2-Ser_3-Gln_4-Val_5-Arg_6-Pro_7-Arg_8-R'$ （ここで、2、4、5、6、7または8位のアミノ酸残基のいずれか1つがLysで置換され、Xは水素又は $R-(C=O)$ （Rは低級アルキル）であり、そしてR'は水素及びアミドより成る群から選ばれる）を含むペプチドを含む、抗炎症活性を示す抗炎症用医薬組成物。

【請求項13】

前記ペプチドのアミノ酸配列がThr-Lys-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Argである請求項12記載の組成物。

【請求項14】

前記ペプチドのアミノ酸配列がThr-Thr-Ser-Lys-Val-Arg-Pro-Argである請求項12記載の組成物。

30

【請求項15】

前記ペプチドのアミノ酸配列がThr-Thr-Ser-Gln-Lys-Arg-Pro-Argである請求項12記載の組成物。

【請求項16】

前記ペプチドのアミノ酸配列がThr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Lysである請求項12記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

関連出願のクロスレファレンス

この出願は1993年6月18日に提出された出願番号08/080,371号の一部継続出願であり、これは1993年3月24日に提出された出願番号08/037,486号の一部継続出願であり、これは現在放棄されている1990年12月21日に提出された出願番号07/631,823号の一部継続出願であり、これら全体の開示が参考として本明細書に含まれる。

40

1. 序論

本発明は抗炎症活性を示す血小板因子4（配列番号9）に関連するペプチドおよびペプチド誘導体、並びに類似ペプチド、前記ペプチドを含む医薬組成物、並びに本発明のペプチドを使用する炎症の抑制方法に関する。

2. 発明の背景

2.1. 血小板因子4

70アミノ酸ヘパリン結合タンパク質である血小板因子4（PF4）（配列番号9）は活性化

50

血小板の α 顆粒から放出される。PF4（配列番号9）の正確な生物学的機能は知られていないが、PF4（配列番号9）は走化性、凝固、炎症、および細胞増殖に関する多重遺伝子族の一員である（Eismanら,1990,Blood 76:336-344）。PF4遺伝子のゲノム配列（配列番号9）、および高度に相同の遺伝子、PF4 altが最近報告された（Eismanら, 上記の文献）。PF4（配列番号9）の報告された生物学的活性の中に、マウスにおけるコンカナバリンA誘導免疫抑制の軽減（Zuckerら,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.86:7571-7574）；内皮細胞に結合し、侵入する能力（Rybakら,1989,Blood 73:1534-1539）；好中球走化性、リソソーム酵素放出および増大された付着性の誘発（Bebawyら,1986,J.Leukocyte Biol.39:423-434）；平滑筋細胞または内皮細胞ではなく周皮細胞の移動の刺激（Bernsteinら,1982,J.Cell.Sci.56:71-82）；および潜在的な抗血栓効果（Weerasingheら,1984,Thromb.Res.33:625-632）がある。PF4（配列番号9）の増大されたレベルが、糖尿病患者（Guastamacchiaら,1985,Boll.Soc.Ital.Biol.Sper.61:499-502;Cortellaroら,1990,Thromb.Res.58:571-576;Cellaら,1986,Folia Haematol.113:646-654）およびベーチェット病を有する患者（Schmitz-HuebnerおよびKnap,1984,Thromb.Res.34:277-286）で同定された。

2.2. 炎症

皮膚炎症は、リン脂質からエンドペルオキシドひいてはシクロオキシゲナーゼによりプロスタグランジンへ、またはリン脂質から5-HETEひいてはリポキシゲナーゼによりロイコトリエンへのいずれかの変換により一部媒介される（KragballおよびVoorhees,1985,Curr.Probl.Derm.13:1-10）。これらの経路のいずれかまたは両方の抑制は、非ステロイド抗炎症剤が炎症応答を阻止する手段である。抗炎症性ステロイドは、アラキドン酸（これはその後いずれかの経路により炎症の媒介物質に変換し得る）の放出を抑制することにより作用する（Blackwellら,1980,Nature 287:147-149）。サイトカインはまた炎症プロセスを媒介し、そして炎症応答の良好な抑制、または少なくとも同等の抑制がサイトカイン産生を抑制することにより、または炎症細胞浸潤物の細胞表面におけるそれらのレセプターとのサイトカインの相互作用の抑制により得られることが提案されていた。

過去数年以内に、サイトカインの異なるドメインが、IL-1 β 断片の例により説明されるように異なる生理応答を誘導できることが認められていた。IL-1 β のソムノゲニック（somnogenetic）性および発熱性は断片IL-1 β （208-240）にあり、一方、IL-1 β のその他の異なる別の断片はT細胞産生を刺激する（Obalら,1990,Am.J.Physiol.259:R439-R446）。

3. 発明の概要

本発明は抗炎症活性を示す血小板因子4（PF4）（配列番号9）に関連するペプチドおよびペプチド誘導体、並びに類似ペプチド、前記ペプチドを含む医薬組成物、並びに前記ペプチドを使用する。炎症の抑制方法に関する。本発明は、オタクペプチドCT-112（配列番号1）、およびCT-112（配列番号1）の誘導体および類似体が炎症のマウス耳／アラキドン酸モデルにおいて抗炎症活性を有するという発見に一部基いている。

本発明のペプチド、特にCT-112（配列番号1）は炎症応答を抑制するのに特に有益であり得る。例えば、限定のためではないが、CT-112（配列番号1）またはその類似体もしくは誘導体が自己免疫疾患、移植片対宿主病、再灌流組織損傷、アテローム性動脈硬化症、および喘息における炎症を抑制するのに使用し得る。

4. 図面の説明

図1. 抗炎症性ペプチドCT-112のアミノ酸配列（配列番号1）およびWohl-2～Wohl-8として先に表示されたペプチドのアミノ酸配列（配列番号2～8）

図2. 成熟PF4のアミノ酸配列（配列番号9）

図3. 好中球細胞に対するCT-112（配列番号1）の効果。棒グラフは530nmで蛍光により測定された、f-Met-Leu-Pheへの好中球の走化性に対するCT-112（配列番号1）の効果を示す。線グラフは、トリパンプルー排除により測定された、細胞生存度に対するCT-112（配列番号1）の効果を示す。棒グラフ値は三つのウェルの平均 $\pm$ SDを表す。

図4. 530nmで蛍光により測定された、ロイコトリエンB₄（LTB₄）への好中球の走化性に対するCT-112（配列番号1）の効果。値は三つのウェルの平均 $\pm$ SDを表す。

図5. 530nmで蛍光により測定された、インターロイキン-8への好中球の走化性に対するCT-112（配列番号1）の効果。値は三つのウェルの平均±SDを表す。

図6. カラゲナン誘導炎症細胞流入に関するCT-112（配列番号1）の効果。□、正常；□、カラゲナンのみ；■、カラゲナン+CT-112（配列番号1）。*は同時点でのカラゲナン処理対照動物からの有意差（ $p \leq 0.05$ ）を示す。

図7. CT-112（配列番号1）、CT-112（配列番号1）の誘導体およびその他のペプチドの、マウス耳の厚さのAA誘導増大の抑制により測定された抗炎症活性。TTSQVRPR（配列番号1）=CT-112；VTRPTQRS（配列番号11）=CT-120、ランダムオクタペプチド；TTSQIHPK（配列番号12）=CT-127、結合組織活性化ペプチドIII（CTAP-III）から誘導されたペプチド；Ac-TTSQVRPR=アセチル基ブロッキングアミノ末端を有するCT-112（配列番号1）の誘導体；TTSQVRPR-NH₂=アミド基ブロッキングカルボキシル末端を有するCT-112（配列番号1）の誘導体；Ac-TTSQVRPR-NH₂=アセチル基ブロッキングアミノ末端およびアミド基ブロッキングカルボキシル末端を有するCT-112（配列番号1）の誘導体。

図8. CT-112（配列番号1）の切断型誘導体（配列番号3、4、6、24~28）の、マウス耳の厚さのAA誘導増大の抑制により測定された抗炎症活性。TTSQVRPR（配列番号1）；TSQVRPR（配列番号25）；SQVRPR（配列番号3）；QVRPR（配列番号24）；VRPR（配列番号4）；TTSQVRP（配列番号26）；TTSQVR（配列番号27）；TTSQV（配列番号6）；TTSQ（配列番号28）。

図9. CT-112（配列番号1）の類似体（配列番号25、26、29~73）の、マウス耳の厚さのAA誘導増大の抑制により測定された抗炎症活性。

図10. コラーゲン誘導関節炎を発症しているマウスの%に対するCT-112（配列番号1）の効果。

図11. コラーゲン誘導関節炎を発症しているマウスにおける関係した足の累積数に対するCT-112（配列番号1）の効果。

図12. コラーゲン誘導関節炎を発症しているマウスにおける累積関節炎指数に対するCT-112（配列番号1）の効果。

図13. マウスにおけるコラーゲン誘導関節炎の組織病理学に対するCT-112（配列番号1）の効果。値は対照群からの23の足、10mgのCT-112/kgで処置を受けた群からの26の足、および100mgのCT-112/kgで処置を受けた群からの16の足の平均±SEMを表す。*は対照群からの有意差（ $p \leq 0.05$ ）を示す。図14. 405nmにおけるO.D.により測定された、コラーゲンで免疫感作されたマウスにおける循環抗コラーゲン抗体に対するCT-112（配列番号1）の効果。

5. 発明の詳細な説明

限定のためでなく、開示の明瞭化の目的で、本発明の詳細な説明が下記の細項目に示される。

- (i) 血小板因子4（配列番号9）の調製、
- (ii) 本発明のペプチドおよびそれらの調製、
- (iii) 抗炎症性ペプチドの同定、および
- (iv) 抗炎症剤としての本発明のペプチドの使用。

5.1. 血小板因子4の調製

血小板因子4（PF4）（配列番号9）は、当業界で知られているあらゆる方法を使用して精製し得る。本発明の好ましい実施態様において、PF4（配列番号9）は、Mediciら（1989, Thrombos. Res. 54: 277-287）により記載された方法の改良によりトロンビン活性化血小板抽出物から精製し得る。PF4（配列番号9）は、1.7MのNaClで因子を溶離するヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィー、続いて約15%のアセトニトリルの存在下にNaClで溶離されるポリスルホエチルアスパルトアミドカラムによる強イオン交換クロマトグラフィー、そして最後に水中約0.1%のトリフルオロ酢酸（TFA）中の線形アセトニトリル勾配で溶離されるVydac RPC₄ 逆相HPLC分析カラムによる分離により単離し得る。

5.2. 本発明のペプチドおよびそれらの調製

本発明のペプチドとして、(i) PF4（配列番号9）（そのアミノ酸配列（配列番号9）

10

20

30

40

50

が図2に示される)の少なくとも4アミノ酸部分、もしくは機能上均等な配列;または(ii)図2に示されるPF4配列(配列番号9)の一部に少なくとも66%相同である少なくとも6アミノ酸配列、もしくは機能上均等な配列を含むあらゆるペプチド、ペプチド誘導体若しくはペプチド類似体が挙げられる。相同性は、本明細書中で異なるペプチドにより共有されたアミノ酸残基間の同一性を言うものと解されるべきである。例えば、PF4の6アミノ酸断片に66%相同である6アミノ酸残基ペプチドは、必ずしも一緒に結合されていないPF4(配列番号9)断片と4アミノ酸残基を共有する。

本発明の好ましい実施態様において、ペプチド、ペプチド誘導体またはペプチド類似体は、配列Thr-Ser-Glnおよび/またはVal-Arg-Pro、更に好ましくはThr-Thr-Ser-Gln(配列番号10)および/またはVal-Arg-Pro-Arg(配列番号4)(先に“Wohl-4”と称された)、またはThr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg(配列番号1)を含む。特に好ましい実施態様において、ペプチドはThr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg(配列番号1)(即ち、“CT-112”)である。更に別の好ましい実施態様において、ペプチド、ペプチド誘導体またはペプチド類似体は、配列Val-Lys-Thr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg(配列番号2)(先の“Wohl-2”)、またはSer-Gln-Val-Arg-Pro-Arg(配列番号3)(先の“Wohl-3”)、またはThr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg-His-Ile-Thr(配列番号5)(先の“Wohl-5”)、またはThr-Thr-Ser-Gln-Val(配列番号6)(先の“Wohl-6”)、またはThr-Ser-Gln-Val-Arg(配列番号7)(先の“Wohl-7”)、またはThr-Thr-Ser-Gly-Ile-His-Pro-Lys(配列番号8)(先の“Wohl-8”)(図1)を含む。

本発明のペプチドはまたPF4(配列番号9)に相同性を殆ど有しないか、または全く有しない部分(例えば、キャリアタンパク質)を含んでいてもよい。更に、これらのペプチドは、炭水化物、脂質、ホスフェート、澱粉、抗体、Fab、Fab₂、酵素、アミノ酸、ペプチド、または成長因子化合物を含むがこれらに限定されないその他の化合物に接合により誘導化されてもよい。

図2に示されるようなPF4のアミノ酸配列(配列番号9)、または機能上同等な配列は、PF4配列(配列番号9)が(i)図2に示された配列(配列番号9)または(ii)或る残基がサイレント変化を生じる機能上同等なアミノ酸により置換されている、図2に示されるような配列(配列番号9)であり得ることを意味するものと解されるべきである。例えば、その配列内の一種以上のアミノ酸残基は、機能上の同等物として作用して、サイレント変化を生じ同様の極性をもつ別のアミノ酸により置換し得る。その配列内のアミノ酸の置換基は、そのアミノ酸が属するクラスのその他のメンバーから選択し得る。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸として、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられる。極性の中性アミノ酸として、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが挙げられる。正に帯電される(塩基性)アミノ酸として、アルギニン、リシンおよびヒスチジンが挙げられる。負に帯電される(酸性)アミノ酸として、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。その他の実施態様において、本発明は抗炎症剤としてのCT-112(配列番号1)の類似体および/または誘導体、例えば、ペプチドのアミノ末端がR-(C=O)-基(Rは低級アルキル、シクロアルキル、アリールおよびヘテロアリールからなる群から選ばれ、そのアリールまたはヘテロアリールは未置換またはハロゲン、メトキシ、アミノもしくはアルキル官能基で置換されている)の付加により修飾されているもの、或いはペプチドのカルボキシル末端がR'-基(R'はアミド、低級アルキルエステル、シクロアルキルエステル、アリールエステルおよびヘテロアリールエステルからなる群から選ばれ、そのアリールエステルまたはヘテロアリールエステルは未置換またはハロゲン、メトキシ、アミノもしくはアルキル官能基で置換されている)の付加により修飾されているもの、或いはペプチドの両末端がこのように修飾されているものを提供するが、但し、前記類似体および/または誘導体が、例えば、下記の第5.3節に示されるアッセイにより測定して、抗炎症活性を示すことを条件とする。本明細書に使用される“低級アルキル”および“低級アルキルエステル”という用語は、1~6個の炭素原子を含

10

20

30

40

50

む基を包含することが意図されている。本明細書に使用される“アリール”および“アリールエステル”という用語は、6員環または7員環構造を含む基を包含することが意図されており、例えば、ピリジニウム基、イミダゾリウム基およびキノキサリン基を含む。

その他の実施態様において、本発明は抗炎症剤としてのCT-112（配列番号1）の誘導体を提供し、この場合、いずれかの一つ以上の側鎖アミノ基がアシル化またはアリール化により誘導体化され、またはいずれかの一つ以上の側鎖ヒドロキシル基がアルキルエステルもしくはアリールエステルの付加により誘導体化され、或いはアミン側鎖基およびヒドロキシル側鎖基の両方がこのように誘導体化されている。但し、前記誘導体は、例えば、下記の第5.3節に示されるアッセイにより測定して、抗炎症活性を示すことを条件とする。

その他の実施態様において、本発明は抗炎症剤としてのCT-112（配列番号1）の誘導体を提供し、この場合、CT-112（配列番号1）、またはその一部が、非隣接残基間の共有結合により環化されている。但し、前記誘導体は、例えば、下記の第5.3節に示されるアッセイにより測定して、抗炎症活性を示すことを条件とする。

その他の実施態様において、本発明は抗炎症剤としてのCT-112（配列番号1）の類似体を提供し、この場合、CT-112（配列番号1）のいずれかの一つ以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸類似体または擬体により置換されて、例えば、カルバザート（carbazates）またはターシャリーセンターを生じ、そのとり込みはペプチドのタンパク質分解的開裂を回避または低減するのに利用できる。但し、前記類似体は、例えば、下記の第5.3節に示されるアッセイにより測定して、抗炎症活性を示すことを条件とする。

その他の実施態様において、本発明は抗炎症剤としてのCT-112（配列番号1）の切断型類似体を提供する。但し、前記切断型類似体は、例えば、下記の第5.3節に示されるアッセイにより測定して、抗炎症活性を示すことを条件とする。

その他の実施態様において、本発明は抗炎症剤としてのCT-112（配列番号1）の置換誘導体を提供し、この場合、CT-112（配列番号1）の一つ以上のアミノ酸残基が、例えば、特別なアミノ酸残基のD-アミノ酸形態、またはいずれかの異なるL-アミノ酸残基により置換されている。但し、CT-112（配列番号1）の前記置換誘導体は、例えば、下記の第5.3節に示されるアッセイにより測定して、抗炎症活性を示すことを条件とする。例えば、本発明はアミノ酸配列 $\text{Thr}_1-\text{Thr}_2-\text{Ser}_3-\text{Gln}_4-\text{Val}_5-\text{Arg}_6-\text{Pro}_7-\text{Arg}_8$ （ここで、1位、2位、5位、6位または7位にあるいずれかの一つ以上のアミノ酸残基はD-立体異性体である）を有し、抗炎症活性を示すペプチドを提供する。

加えて、本発明はアミノ酸配列 $\text{Thr}-\text{X}-\text{Ser}-\text{Gln}-\text{Val}-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}$ （XはL-Lys、L-Orn、L-Met、L-Arg、L-Ser、L-Trp、L-Tyr、L-CysおよびL-Hisからなる群から選ばれる）を有し、抗炎症活性を示すペプチドを提供する。

加えて、本発明はアミノ酸配列 $\text{Thr}-\text{Thr}-\text{X}-\text{Gln}-\text{Val}-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}$ （XはL-Glu、L-Asp、L-Asn、L-Gln、L-Cys、L-His、L-Lys、L-Orn、L-Thr、L-TrpおよびL-Tyrからなる群から選ばれる）を有し、抗炎症活性を示すペプチドを提供する。

加えて、本発明はアミノ酸配列 $\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{X}-\text{Val}-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}$ （XはL-Lys、L-Orn、L-Arg、L-Asp、L-Cys、L-Glu、L-His、L-Met、L-Ser、L-ThrおよびL-Tyrからなる群から選ばれる）を有し、抗炎症活性を示すペプチドを提供する。

加えて、本発明はアミノ酸配列 $\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Gln}-\text{X}-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}$ （式中、XはVal以外の全ての天然産L-アミノ酸、好ましくはL-Lysからなる群から選ばれる）を有し、抗炎症活性を示すペプチドを提供する。

加えて、本発明はアミノ酸配列 $\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Gln}-\text{Val}-\text{X}-\text{Pro}-\text{Arg}$ （XはArg以外の全ての天然産L-アミノ酸、好ましくはL-AlaまたはL-Gluからなる群から選ばれる）を有し、抗炎症活性を示すペプチドを提供する。

加えて、本発明はアミノ酸配列 $\text{Thr}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Gln}-\text{Val}-\text{Arg}-\text{X}-\text{Arg}$ （XはPro以外の全ての天然産L-アミノ酸からなる群から選ばれる）を有し、抗炎症活性を示すペプチドを提供する。

10

20

30

40

50

加えて、本発明はアミノ酸配列Thr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-X (XはL-Lys、L-Orn、L-Asn、L-Asp、L-Cys、L-Glu、L-His、L-Met、L-SerおよびL-Tyrからなる群から選ばれる)を有し、抗炎症活性を示すペプチドを提供する。

その他の実施形態において、本発明は抗炎症剤としてのCT-112(配列番号1)の類似体を提供し、この場合、CT-112(配列番号1)の一つ以上のアミノ酸残基が省かれている。但し、CT-112(配列番号1)の前記類似体は、例えば、下記の第5.3節に示されるアッセイにより測定して、抗炎症活性を示すことを条件とする。

その他の実施態様において、本発明はアミノ酸配列R-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-R" (RはHまたはR'-(C=O)-(R'は低級アルキル、シクロアルキル、アリールおよびヘテロアリールからなる群から選ばれ、そのアリールまたはヘテロアリールは未置換、またはハロゲン、メトキシ、アミノまたはアルキル官能基で置換されている)であり、R"はH、アミド、低級アルキルエステル、シクロアルキルエステル、アリールエステルおよびヘテロアリールエステルからなる群から選ばれ、そのアリールエステルまたはアリールエステルは未置換であり、またはハロゲン、メトキシ、アミノまたはアルキル官能基で置換されており、X₁はL-Thrであり、X₂はL-Thr、L-Lys、L-Orn、L-Met、L-Arg、L-Ser、L-Trp、L-Tyr、L-CysおよびL-Hisからなる群から選ばれ、X₃はL-Ser、L-Glu、L-Asp、L-Asn、L-Gln、L-Cys、L-His、L-Lys、L-Orn、L-Thr、L-TrpおよびL-Tyrからなる群から選ばれ、X₄はL-Gln、L-Lys、L-Orn、L-Arg、L-Asp、L-Cys、L-Glu、L-His、L-Met、L-Ser、L-ThrおよびL-Tyrからなる群から選ばれ、X₅、X₆およびX₇はあらゆる天然産L-アミノ酸であり、並びにX₈はL-Arg、L-Lys、L-Orn、L-Asn、L-Asp、L-Cys、L-Glu、L-His、L-Met、L-SerおよびL-Tyrからなる群から選ばれる)を有するペプチドを提供する。但し、R-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-R"は少なくとも4アミノ酸残基を含み、Val-Arg-Pro-Arg(配列番号4)、またはThr-Thr-Ser-Gln-Val(配列番号6)、またはSer-Gln-Val-Arg-Pro-Arg(配列番号3)、またはThr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg(配列番号1)ではないことを条件とし、そのペプチドは誘導体化されていてもよく、または類似体が上記のようにしてペプチドから合成されてもよく、そしてそのペプチド、ペプチド誘導体またはペプチド類似体は例えば、下記の第5.3節に示されるアッセイにより測定して、抗炎症活性を示す。

全ての場合において、本発明のペプチドは下記の第5.3節に特定されるような抗炎症活性を示す。

本発明のペプチドは当業界で知られているあらゆる方法により調製し得る。例えば、限定のためではなく、ペプチドは(i)大きなペプチド、例えば、PF4(配列番号9)(これに限定されない)からの開裂、(ii)組換えDNA発現方法、および(iii)BaranyおよびMerrifield(1980, "ペプチド"2巻, GrossおよびMeienhofer編集, アカデミック プレス, N. Y.)により記載されているような固相技術を含む化学合成により合成し得る。

本発明の好ましい特別な実施態様において、PF4ペプチド断片を生産するためにPF4(配列番号9)のトリプシン消化を行ってもよい。例えば、第5.1節に記載されたようにして調製された凍結乾燥PF4(配列番号9)は、微小遠心分離管中で0.4MのNa₂CO₃/8M尿素(pH9)50μlに溶解し得る。次にそのタンパク質は50°Cで約15分間にわたって緩衝液(pH8)中の約45mMのジチオスレイトールの添加により還元し得る。次にそのタンパク質を0.5NのNaOH中ヨード酢酸5μlの添加によりカルボキシメチル化し、そして暗所で室温で約15分間インキュベートし得る。次に脱イオン水約140μlおよびシーケンサー用トリプシン(200μg/ml)の1mMのHCl溶液5μlを添加し、その試料を37°Cで約24時間インキュベートし得る。次に、得られるトリプシン消化物を適当な逆相クロマトグラフィーカラム、例えば、2.7%のアセトニトリル/0.1%のTFA/H₂Oで平衡にされたVydac C18カラムに注入し、そして適当な流量、例えば、0.5ml/分でクロマトグラフィーにかけ、1.0分間の画分を回収し得る。溶離プログラムは、例えば、約10分間で緩衝液A(水中0.1%のTFA)中2.7%の緩衝液B(95%のアセトニトリル)、そして123分間で約27~95%の緩衝液Bの勾配であってもよい。ペプチドの溶離は、210nmの波長で分光光度計で監視し得る。好ましくは、B

eckman System Gold HPLC Systemをタンパク質および消化物の両方のクロマトグラフィーに使用してもよい。上記の例として示されたクロマトグラフィープロトコルを使用して、CT-112ペプチド（配列番号1）はペプチド番号4として溶離するものと予想し得る（下記の第6.2節を参照のこと）。PF4（配列番号9）のペプチド断片は、本発明によれば、必要により化学修飾されてもよく、そして次の節に示されるようにして抗炎症活性について試験し得る。

5.3. 抗炎症性ペプチドの同定

上記のペプチドは、抗炎症活性に関して因子を評価するために当業界で知られている *in vitro* または *in vivo* のアッセイ系を使用して、抗炎症活性を有するものと測定し得る。“抗炎症活性”という用語は、本明細書中で炎症性細胞流入および／または免疫細胞の活性化または免疫応答と関連する活性を抑制する能力を表すものと解されるべきである。こうして、“抗炎症活性”という用語は免疫調節剤または免疫変調剤として作用する能力を含むことが意図されている。

例えば、限定のためではないが、ペプチドはマウス耳モデルにおいて炎症を抑制する能力につき試験されてもよく、この場合、アラキドン酸（AA）が炎症反応を誘導するのに使用される（Youngら、1984, *J. Invest. Dermatol.* 82:367-371; Dohertyら、1988, *J. Invest. Dermatol.* 91:298-302）。例示の目的で、下記の第7節を参照のこと。

5.4. 抗炎症剤としての本発明のペプチドの使用

本発明のペプチドは、急性または慢性のいずれかの炎症性細胞流入が生じる疾患または障害を患っており、このような治療を要する患者の組織中の炎症を抑制する方法に使用し得る。患者はヒト患者または非ヒト患者であってもよい。本発明のペプチドが治療価値を有し得る特定の症状として、望ましくない免疫応答が生じた状況が挙げられ、これらとして、自己免疫疾患、例えば、インスリン依存性糖尿病、グッドパスツール症候群（Goodpasture's syndrome）、天疱瘡および類天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、強皮症、混合結合組織疾患およびエリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症性ショック、再灌流組織損傷（心筋梗塞または脳梗塞後の障害を含む）、アテローム性動脈硬化症、喘息および炎症性肺疾患が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の好ましい特別な実施態様において、炎症を抑制するのに使用されるペプチドはCT-112（Thr-Thr-Ser-Gln-Val-Arg-Pro-Arg）（配列番号1）である。

本発明のペプチドは、静脈内注射、皮下注射、皮膚内注射、鼻内注射、吸入（例えば、肺エアロゾルまたは肺洗浄）、筋肉内注射、眼内注射、腹腔内注射、腹腔洗浄、心臓穿刺、心臓カテーテル注入、経口注入、髄腔内注射または心室内注射、脊柱または頭蓋腔注射、腔または直腸（例えば、座薬による）、皮膚パッチまたは局所軟骨を含む薬剤投与のあらゆる好適な認められている経路により投与されてもよく、そして水溶液、マイクロカプセル、リポソームを含むあらゆる好適な医薬担体中に含まれていてもよく、または親水性もしくは疎水性担体をベースとする移植片を含む徐放性移植片によるものであってもよい。本発明のペプチドは、通常の技術を用いて測定して患者の炎症を抑制するのに有効である投薬量で投与し得る。“炎症の抑制”は、炎症の兆候および症候のかなりの減少を表すものと解されるべきである。例えば、限定のためではないが、患者が不快から主観的に軽減されるようになる症候軽減は、治療の多くの満足な結果のうちの一つと考えられるであろう。或る特定の限定されない実施態様において、炎症の量は約50%低減し得る。ED₅₀は約2.5~5.0mg/kgの投薬量であると推定された。本発明の特別な実施態様において、CT-112（配列番号1）は約2.5mg/kg~約500mg/kgの投薬量でヒト患者に投与し得る。本発明の特定の限定されない好ましい実施態様において、ヒト患者に皮下投与される投薬量は、治療される炎症が軽度、中度、または重度／永続的であるか否かに応じて約5mg/kg、50mg/kg、または100mg/kgであってもよい。その投薬量は、例えば、限定のためではないが、毎日、または週に1回、2回、若しくはまたは3回の適当な間隔で投与し得る。

6. 実施例：抗炎症性ペプチドの調製

6.1. 材料および方法

6.1.1. PF4の調製

10

20

30

40

50

PF4（配列番号9）を、Mediciら（1989, Thrombos. Res. 54:277-287）により記載された方法の改良によりトロンビン活性化血小板抽出物から精製した。PF4（配列番号9）を、1.7 MのNaClを用いてその因子を溶離するヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィー、続いて15%のアセトニトリルの存在下でNaClで溶離されるポリスルホエチルアスパルトアミドカラムによる強イオン交換クロマトグラフィー、そして最後に水中0.1%のTFA中の線形アセトニトリル勾配で溶離されるVydac RPC₄逆相HPLC分析カラムによる分離により単離した。

6.1.2. PF4のトリプシン消化

凍結乾燥PF4（配列番号9）を微小遠心分離管中で50 μ lの0.4 M Na₂CO₃/8 Mの尿素（pH9.0）に溶解することによりトリプシン消化を行った。次にそのタンパク質を50°Cで15分間にわたってpH9.0の45 mMのDTT 5 μ lを添加して還元した。タンパク質を0.5 NのNaOH中でヨード酢酸5 μ lの添加によりカルボキシメチル化し、暗所で室温で15分間インキュベートした。最後に、脱イオン水140 μ lおよびシーケンサー用のトリプシン（200 μ g/ml）の1 mMのHCl溶液5 μ lを添加し、その試料を37°Cで24時間インキュベートした。

トリプシン消化物を2.7%アセトニトリル/0.1%TFA/H₂Oで平衡化したVydac C₁₈カラムに注入し、0.5 ml/分の流量でクロマトグラフィーにかけ、1.0分の画分を回収した。溶離パターンは以下のとおりであった。10分間にわたって緩衝液A（水中0.1%のTFA）中2.7%の緩衝液B（95%のアセトニトリル）、123分間で2.7%~95%の緩衝液B。ペプチドの溶離を210 nmで監視した。Beckman System Gold HPLC Systemをタンパク質および消化物の両方のクロマトグラフィーに使用した。

6.2. 結果および考察

CT-112（配列番号1）を逆相HPLCにおいて4番目のペプチドとして溶離し、そしてPortonの適当なペプチド担体への吸着後にPorton 2090eシーケンサーで配列決定した。ペプチドの配列はThr-27.5 pm、Thr-23.5 pm、Ser-30.0 pm、Gln-26.5 pm、Val-22.6 pm、Arg-10.5 pm、Pro-9.2 pm、Arg-4.7 pmであった。Beckman Dabsyl Chloride方法を使用するアミノ酸分析によりペプチドの全配列が確かめられた。

7. 実施例：CT-112は抗炎症活性を示す

7.1. 材料および方法

抗炎症活性に関する標準化されたアッセイ、即ち、アラキドン酸（AA）を炎症反応の誘導に使用するマウス耳モデル（Youngら, 1984, J. Invest. Dermatol. 82:367-371; Dohertyら, 1988, J. Invest. Dermatol. 91:298-302）を使用してCT-112（配列番号1）の抗炎症性を分析した。

7.1.1. 試薬

塩化物塩またはトリフルオロ酢酸塩のいずれかであるCT-112（配列番号1）を、Multiple Peptide System（サンジエゴ、CA USA）によるペプチドの通常の有機合成スキームを使用して合成した。フェニドンおよびAAをSigma Chemical社（セントルイス、MO USA）から入手した。試験動物に皮下移植されるAlzetミニポンプ（モデル2001、7日、1 μ l/時間を送達するようにセットした）をAlza Corporation（パロアルト、CA USA）から入手した。AAを適用する前に200 mg/mlで試薬用のアセトンに溶解した。

7.1.2. 動物治療

雌のマウス（C57BL/6UAF、Charles River Breeding Laboratories、約15~18 g）を入手し、使用前に2週間にわたって順化した。動物は実験の開始時に生後約14週であった。移植用のミニポンプを調製するために、CT-112（配列番号1）をPBSに溶解した。その物質を毎日動物当たりCT-112（配列番号1）0.05 mg（5匹の動物）、0.1 mg（10匹の動物）、1 mg（10匹の動物）、または2.5 mg（5匹の動物）を送達するようにセットしたAlzetミニポンプに装填した。対照動物への移植用のミニポンプはPBSのみを含んでいた。陽性対照として、10匹のマウスの一組は抗炎症剤として作用する強力な5-リポキシゲナーゼインヒビターであるフェニドン100 mg/kgを、AAによるチャレンジの15分前に受けた。

ミニポンプの皮下移植につき、動物をケタミン/キシラジンで麻酔した。ケタミン（Aveco Lot # 440140）を80 mg/kgで注射し、キシラジン（Rugby Laboratories Lot # 26040-B

10

20

30

40

50

）を16mg/kgで注射し、そしてAlzetポンプを背胸領域で皮下移植した。動物を回収し、次に収容し、そして5日間にわたって食物および水を随時与えた。

ポンプ移植後の6日目に、AA0.01mlを自動マイクロリットルピペットにより右の耳の内表面および外表面に適用した。AA適用の1時間後に、マウスを殺し、耳の厚さをMitsutoyo No.7300ゲージ カリパスで測定した。また、左の耳を内部対照として測定した。

耳組織中のミエロペルオキシダーゼ活性を多形核白血球（PMN）の存在または不在のマーカースとして測定した（Baroneら,1991,J.Neurosci.Res.29:336-345）。耳の厚さの測定後に、耳をマウスから切開し、そして4℃で50mMのトリス-HCL、pH7.4中で均一にして10%（w/v）のホモジネートを得た。ホモジネートのアリコートを使用して、組織中に存在するミエロペルオキシダーゼ活性の量をオージアニシジン（Sigma Chemical社、セントルイスM0）および基質としての過酸化水素を使用し、そして460nmで発色団生成を監視して測定した（Baroneら,1991,J.Neurosci.Res.29:336-345）。

7.2結果および考察

5-リボキシゲナーゼ阻害剤フェニドンによる動物の前処理により局所AA適用に対する炎症応答が有効に抑制された。こうしてこの非ステロイドの抗炎症剤はこの実験においてAA誘発皮膚炎症の抑制の陽性対照として利用できた。

CT-112（配列番号1）によるマウスの前処理はPBS対照と較べて炎症プロセスをかなり抑制した。1日あたりCT-112（配列番号1）0.05mgでマウスを前処理することによりAAに
応答して耳の膨潤のかかなりの低下（43.1%、 $p \leq 0.05$ ）を生じた（表I）。CT-112（配
列番号1）を1日あたり2.5mgそれぞれの動物に投与した時、AAに対する応答の最大の低
下（95.6%）を得た。炎症応答のこの抑制は有意であり（ $p \leq 0.01$ ）、フェニドンに対す
る応答に匹敵した。

1日あたりCT-112（配列番号1）0.05~1mgでマウスを前処理することにより、用量依
存的に、AA処理された耳におけるミエロペルオキシダーゼ活性を低下した。試験中の変化が
大きいために、フェニドンまたは0.1mg/日のCT-112（配列番号1）を受けたグループの
みが対照ミエロペルオキシダーゼ活性と比較された場合に活性のかかなり異なるレベル（ $p \leq 0.05$ ）を示した（表II）。

これらのデータは、CT-112（配列番号1）がAAの局所投与による急性皮膚炎症応答を抑制
できることを示す。また、この効果は少数のPMNの存在下でミエロペルオキシダーゼ活
性により測定して炎症応答を生じ得る。

10

20

30

表 I

アラキドン酸誘発炎症に対するCT-112の効果

処置	耳の厚さ (インチ)	耳膨潤の 低下率、%
対照(PBS)	0.01999±0.00452 (5)	0.0%
フェニドン(100mg/kg)	0.01176±0.00080 (10)**	84.1%
CT-112(0.05mg/動物/日)	0.01577±0.00155 (5) *	43.1%
CT-112(0.1mg/動物/日)	0.01577±0.00191 (10)**	43.1%
CT-112(1.0mg/動物/日)	0.01128±0.00291 (10)**	89.0%
CT-112(2.5mg/動物/日)	0.01060±0.00175 (5) **	95.6%
対照耳(アラキドン酸 なし)	0.01020±0.00272 (50)**	--

10

20

これらの値は括弧中の耳の数の平均±SDを表す。* はStudent の t - 試験を使用して、 $p \leq 0.05$ で対照のPBS 処置群とは有意に異なることを示す。**はStudent の t - 試験を使用して、 $p \leq 0.01$ で対照の処置群とは有意に異なることを示す。

表II

マウス耳におけるアラキドン酸誘発ミエロペルオキシダーゼ活性
に及ぼすCT-112の効果

治療

ミエロペルオキシダーゼ活性

(生成した発色団の μ モル数/分)

対照(PBS)	28.0 $\pm$ 5.8	(4)
フェニドン(100mg/ 動物/ 日)	14.5 $\pm$ 8.6	(5)*
CT-112(0.05mg/動物/ 日)	19.6 $\pm$ 15.6	(5)
CT-112(0.1mg/ 動物/ 日)	17.0 $\pm$ 9.6	(5)*
CT-112(1.0mg/ 動物/ 日)	14.7 $\pm$ 13.3	(5)

10

これらの値は括弧中の耳の数の平均 $\pm$ SDを表す。* はマン ウィ
ットニィ試験を使用して $p \leq 0.05$ で対照PBS 治療群とは有意に異
なることを示す。

20

8.実施例：好中球走化性のCT-112抑制

特定の炎症プロセスを阻止するCT-112（配列番号1）の能力を好中球活性のその抑制により実証し、これを以下に記載されるようにして調べた。

8.1.材料および方法

種々の薬剤に応答する好中球の走化性を抑制するCT-112（配列番号1）の能力を、好中球走化性チャンバーを使用して分析した。これらのアッセイにつき、好中球を、細胞を1',7'-ビス（2-カルボキシエチル）-5-（6）-カルボキシフルオレセインで標識した後に Ca^{2+} および Mg^{2+} を含むハックス平衡塩溶液中で再度懸濁させて 5×10^6 の細胞/mlの懸濁液を得た。好中球を走化性チャンバーへの添加の前に約15分間にわたってCT-112（配列番号1）にさらした。CT-112（配列番号1）はチャンバーの上部および下部の両方に存在し、そして化学誘引物質、f-Met-Leu-Phe、ロイコトリエン B_4 またはインターロイキン-8をチャンバーの下部に添加した。膜を通して移動した細胞を、アッセイ開始の1時間後に530nmで蛍光により測定した。

30

8.2.結果および考察

CT-112（配列番号1）はf-Met-Leu-Pheおよび LTB_4 の両方への好中球の走化性移動を有効に抑制したが（図3、4）、インターロイキン-8への走化性移動を抑制しなかった（図5）。加えて、CT-112（配列番号1）は、トリパンブルー排除を使用する生存度試験により測定して好中球に対し細胞毒性ではなかった（図3）。この実験は、好中球と関連する少なくとも一つの活性、走化性移動の活性がCT-112（配列番号1）により少なくとも部分的に抑制されることを示す。

40

9.実施例：CT-112への暴露の期間の効果

9.1.材料および方法

マウスにアルゼット ミニポンプセットを移植して7日、3日または1日にわたって60mg/kg/日を送達した。5匹のマウスの別の群はAAチャレンジの24時間、1時間そして0.25時間前にCT-112（60mg/kg/注射）の3回の腹腔内注射を受けた。CT-112（配列番号1）を、その化合物をダルベッコPBSに溶解して5mg/mlの最終CT-112（配列番号1）濃度を得る

50

ことにより注射用に調製した。対照マウスに、PBSを7日間にわたって送達するアルゼット ミニポンプを移植した。AAチャレンジは実施例7に上記されたものと同じであった。

9.2. 結果および考察

結果を表IIIに示す。炎症の抑制の差異が7日、3日そして1日の暴露の結果として検出されなかった。全ての期間は、さもなくばAAの局所適用により誘発される急性炎症を有意に抑制した ($p \leq 0.05$)。腹腔内注射は炎症を抑制したが、結果は対照とは有意差がなかった。これらの結果は、CT-112 (配列番号1) への長期暴露、即ち、 > 1 日が炎症を抑制するのに必要ではなかったことを示す。

表 III

CT-112の活性に及ぼす暴露の期間の効果

治療群	厚みの差 (左-右)(インチ)	炎症の 抑制率 (%)
対照 (PBS)	0.00594 ± 0.00342	0
フェニドン (100mg/kg)	0.00073 ± 0.00153 *	88
7 日 ポンプ 注入	-0.00051 ± 0.00116 *	108
3 日 ポンプ 注入	-0.00115 ± 0.00058 *	119
1 日 ポンプ 注入	-0.00074 ± 0.00119 *	112
-24 、 1 、 0.25時間、 ip	0.00226 ± 0.00124	62

これらの値は5匹の動物の平均 ± SDを表す。* は $p \leq 0.05$ で PBS

治療群とは有意に異なることを示す。

10. 実施例: CT-112の腹腔内注射の効果

10.1. 材料および方法

複数回の腹腔内注射によるCT-112 (配列番号1) (60mg/kg/注射) の投与を、AAチャレンジ前の下記の時間に行った。

- a) 6、3、1そして0.25時間
- b) 3、1そして0.25時間；または
- c) 1そして0.25時間。

さらに、腹腔内注射によるCT-112 (配列番号1) (60mg/kg) の1回投与の効果をAAチャレンジの1時間または3時間前に行った。対照マウスはAAチャレンジの前に7日間にわたってPBSを送達するように移植されたアルゼット ミニポンプを有していた。AAチャレンジは実施例7に上記したものと同じであった。複数回投薬レジメおよび1時間そして3時間の1回投薬レジメの結果を、治療当たり5匹の動物を使用して60mg/kg/日を7日間送達するようにセットされたアルゼット ミニポンプにより送達されたCT-112 (配列番号1) の抗炎症活性と比較した。

別の実験において、AAチャレンジの6、3、1そして0.25時間前または16、3、1そして0.25時間前のCT-112 (配列番号1) の複数回腹腔内注射の効果を分析した。両方の複数回投薬レジメの結果をフェニドン (AAチャレンジの15分前に投与された100mg/kg) およびアルゼット ミニポンプ (7日間にわたって60mg/kg/日) により投与されたCT-112 (配列番号1) の両方と比較した。この後の実験において、CT-112 (配列番号1) の1回注射を受ける動物の数を5匹から10匹に増やした。

10.2. 結果および考察

複数回投薬実験および1回（1時間および3時間）投薬実験の結果を表IVに示す。全ての複数回投与レジメおよび3時間の1回投与レジメは、炎症プロセスを94%抑制するアルゼットミニポンプによる7日間の投与と比較して炎症プロセスを約70%有意に抑制した（ $p \leq 0.01$ ）。AAチャレンジの1時間前に投与されたCT-112（配列番号1）の1回投与は炎症プロセスを有意に抑制しなかったが、43%の抑制が観察された。

AAチャレンジの6、3、1そして0.25時間前または16、3、1そして0.25時間前のCT-112（配列番号1）の複数回IP注射の投与は炎症の有意な減少（56～61%）（ $p \leq 0.01$ ）をもたらした（表V）。しかしながら、CT-112（配列番号1）の7日間のアルゼットミニポンプ投与およびAAチャレンジの15分前のフェニドンの1回投与は炎症の大きな減少を生じた。

これらの結果は、腹腔内注射により投与されたCT-112（配列番号1）が急性皮膚炎症を有意に抑制し得ることを示す。

表IV

活性に及ぼすCT-112の腹腔内投与の効果

治療群	厚みの差 (左-右)(インチ)	炎症の 抑制率 (%)
対照(PBS)	0.00539±0.00173	0.0
7日ポンプ注入	0.00033±0.00065 **	93.9
-6、3、1、0.25時間、ip	0.00144±0.00126 **	73.2
-3、1、0.25時間、ip	0.00141±0.00138 **	73.8
-1、0.25時間、ip	0.00192±0.00148 **	64.4
-3時間、ip	0.00116±0.00100 **	78.5
-1時間、ip	0.00308±0.00189 **	42.9

これらの値は5匹の動物の平均±SDを表す。 ** は $p \leq 0.01$ で PB

S 治療群とは有意に異なることを示す。

表 V

活性に及ぼすCT-112の腹腔内投与の効果

治療群	厚みの差 (左-右)(インチ)	炎症の 抑制率 (%)
対照(PBS)	0.00647±0.00170(5)	0.0
フェニドン(100mg/kg)	0.00102±0.00038(5)**	84.2
7日ポンプ注入	-0.00003±0.00120(5)**	100.5
-6、3、1、0.25時間、ip	0.00249±0.00170(10) **	61.4
-16、3、1、0.25時間、ip	0.00283±0.00218(10) **	56.3

これらの値は括弧内に示された動物の数の平均±SDを表す。

**は $p \leq 0.01$ で PBS 治療動物とは有意に異なることを示す。

11. 実施例: CT-112の皮下注射の効果

この実施例は、皮下注射により投与されたCT-112（配列番号1）が炎症応答を抑制するのに有効であることを実証する。

11.1. 材料および方法

AAチャレンジの前の複数回皮下注射によるCT-112（配列番号1）（60mg/kg/注射）のマウスへの注射を、

- a) 6、3、1そして0.25時間；
- b) 3、1そして0.25時間；または
- c) 1そして0.25時間に行った。

さらに、その他のマウスはAAチャレンジの3時間または1時間前にCT-112（配列番号1）（60mg/kg）の1回の皮下注射のみを受けた。対照マウスにAAチャレンジの3日間にPBSで充満されたアルゼットミニポンプを移植した。AAチャレンジは実施例7に上記したものと同一であった。これらの投薬レジメの結果を、60mg/kg/日を7日間送達するようにセットされたアルゼットミニポンプにより送達されたCT-112（配列番号1）の抗炎症活性と比較した。また、急性抗炎症活性に対するCT-112（配列番号1）の活性の期間をCT-112（配列番号1）の皮下注射後に分析した。

11.2. 結果および考察

結果を表VIおよびVIIに示す。

皮下注射につき、複数回投薬レジメおよび1回投薬レジメの全てが、炎症プロセスを87%抑制するアルゼットミニポンプによる7日間の投与に較べて炎症プロセスを約70%有意に抑制した（ $p \leq 0.05$ ）（表VI）。

期間実験において、AAチャレンジの6時間前に皮下投与されたCT-112（配列番号1）による治療のみがAA誘発急性炎症を有意に抑制したが（ $p \leq 0.05$ ）（表VII）、これらの結果は活性の期間が6時間より大きいことを示唆する。この特定の実験において、アルゼットミニポンプによるCT-112（配列番号1）の60mg/kg/日の投与は炎症の通常観察される80~90%の抑制を達成できなかった。これらの結果は、CT-112（配列番号1）がチャレンジの6時間前に皮下注射により投与された時に急性皮膚炎症を抑制するのに活性であったことを示す。

表VI

活性に及ぼすCT-112の皮下投与の効果

治療群	厚みの差 (左-右)(インチ)	炎症の 抑制率 (%)
対照(PBS)	0.00617±0.00315	0.0
7日ポンプ注入	0.00083±0.00084 **	86.5
-6、3、1、0.25時間、sc	0.00147±0.00041 *	76.2
-3、1、0.25時間、sc	0.00193±0.00070 *	68.7
-1、0.25時間、sc	0.00195±0.00131 *	68.4
-3時間、sc	0.00213±0.00089 *	65.5
-1時間、sc	0.00174±0.00128 *	71.8

10

20

これらの値は5匹の動物の平均±SDを表す。

* は $p \leq 0.05$ でPBS 処理動物とは有意に異なることを示す。**は $p \leq 0.01$ でPBS 処理動物とは有意に異なることを示す。

表VII

活性に及ぼすCT-112の1回皮下投与の効果

治療群	厚みの差 (左-右)(インチ)	炎症の 抑制率 (%)	
対照(PBS)	0.00385±0.00187	0.0	10
3日ポンプ注入	0.00127±0.00128 *	67.0	
-3時間、ip	0.00242±0.00187	37.2	
-6時間、sc	0.00117±0.00066 *	69.6	
-3時間、sc	0.00243±0.00107	36.9	
-1時間、sc	0.00214±0.00122	44.5	
-0.25時間、sc	0.00252±0.00128	34.7	20

これらの値は5匹の動物の平均±SDを表す。

* は $p \leq 0.05$ でPBS 処理動物とは有意に異なることを示す。

12. 実施例: CT-112の経口投与の効果

12.1. 材料および方法

炎症を有効に抑制するように経口送達されたCT-112（配列番号1）の能力をマウスで分析した。

複数回の胃管栄養法（gavage）によるCT-112（配列番号1）（200mg/kg/回）の投与をAAチャレンジ前の下記の時間で行った。

- a) 6、3、1そして0.25時間；
- b) 3、1そして0.25時間；または
- c) 1そして0.25時間。

さらに、AAチャレンジの3時間または1時間前に投与されたCT-112（配列番号1）（200mg/kg）の1回胃管栄養法の効果を分析した。AAチャレンジは実施例7に上記したものと同じであった。これらの複数回投薬レジメまたは1回投薬レジメの結果を、60mg/kg/日を3日間送達するようにセットされたアルゼット ミニポンプにより送達されたCT-112（配列番号1）の抗炎症活性と比較した。

12.2. 結果および考察

結果を表IIIに示す。CT-112（配列番号1）がAAチャレンジの3、1、そして0.25時間前に投与された投薬レジメを除いて、経口投与された、複数回投薬レジメおよび1回投薬レジメの全てが炎症プロセスを有意に抑制した（52～94%）（ $p \leq 0.01$ または ≤ 0.05 ）。この投薬レジメは炎症プロセスを44%だけ抑制し、統計上の有意差を得ることができなかった。この実験において、アルゼット ミニポンプによる3日間の投与は炎症プロセスを88%抑制した。これらの結果は、CT-112（配列番号1）がチャレンジの少なくとも1時間前並びにチャレンジの3時間前までにマウスに経口投与される時に活性であることを示す。

表VIII

活性に及ぼすCT-112の経口投与の効果

治療群	厚みの差 (左-右)(インチ)	炎症の 抑制率 (%)
対照(PBS)	0.00501±0.00188	0.0
3日ポンプ注入	0.00058±0.00086 **	88.4
-6、3、1、0.25時間、po	0.00134±0.00257 *	73.3
-3、1、0.25時間、po	0.00280±0.00114	44.1
-1、0.25時間、po	0.00241±0.00124 *	51.9
-3時間、po	0.00031±0.00198 **	93.8
-1時間、po	0.00139±0.00122 **	72.3

これらの値は5匹の動物の平均±SDを表す。

* は $p \leq 0.05$ でPBS 処理動物とは有意に異なることを示す。**は

$p \leq 0.01$ でPBS 処理動物とは有意に異なることを示す。

13. 実施例：腹膜炎のカラゲナン誘発モデルに及ぼすCT-112の効果

炎症を抑制するCT-112（配列番号1）の能力を腹膜炎のカラゲナン誘発モデルにおいて更に調べた。このモデルはマウス耳AA誘発急性炎症モデルよりも炎症を抑制するCT-112（配列番号1）の能力の更に厳密な試験を提供する（Hannaら, 1990, Drugs Exp. Clin. Res. 16(4):137-178; BrownおよびLeslie, 1976, Surg. Gynecol. Obstet. 143:738-740）。

13.1. 材料および方法

マウス（C57BL/6UAF、雌、12週令）に、60mgのCT-112/kg/日を送達するようにセットされたアルゼット ミニポンプを移植した。移植後6日目に、マウスにPBS中のカラゲナン（10mg/ml）0.3mlの腹腔内注射でチャレンジした。腹腔をハanks平衡塩溶液（ Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない）15mlでチャレンジの24時間、48時間そして72時間後に洗浄した。洗浄液を遠心分離（500g、5分）し、ロイコスタット固定液で固定し、そしてロイコスタット染色液で染色した。スライドを顕微鏡下で異なる型の炎症細胞、例えば、マクロファージ、リンパ球および好中球につき分析した。48時間の時点で、5匹の対照マウスも洗浄した。

別の実験において、腹腔洗浄液をチャレンジ24時間後に合計のロイコトリエン B_4 （ LTB_4 ）およびプロスタグランジン E_2 （ PGE_2 ）含量につき分析した（Griswoldら, 1991, Biochem. Pharmacol. 42(4):825-831）。

13.2. 結果および考察

結果を表IXおよび図6に示す。CT-112（配列番号1）はカラゲナン注射に応答する腹膜への好中球流入を減少した。この減少はチャレンジ72時間後に腹膜中の好中球の数の低下を生じ、これは統計上有意であった（ $p \leq 0.05$ ）。この実験において、マクロファージの数はCT-112（配列番号1）の投与に応答して増加するようであった。リンパ球に関する有意な効果は観察されなかった。これらの結果は、CT-112が炎症部位でマクロファージの漸増を抑制しないことを示す。

LTB₄およびPGE₂の分析の結果を表Xに示す。CT-112（配列番号1）の投与後に、PGE₂の量の統計上有意な（ $p \leq 0.05$ ）減少が腹腔洗浄液で認められ、一方、LTB₄の量は影響されなかった。これらの結果は、炎症に関与するAA代謝経路の少なくとも一部が抑制されることを示す。

表 IX

腹膜炎のモデルにおける炎症細胞流入に及ぼすCT-112の効果

		絶対細胞数			10	
カラゲナン後の					マクロ	
時間	治療	リンパ球	好中球	ファージ		
正常（なし）	なし	18.4 ± 11.9	4.4 ± 5.2	21.6 ± 18.7		
24時間	対照	15.7 ± 9.9	132 ± 32	17.1 ± 8		
	CT-112	16.9 ± 5.9	106 ± 29	19.5 ± 10		
48時間	対照	14.1 ± 8.1	199 ± 48	72.7 ± 14	20	
	CT-112	12.5 ± 7.6	134 ± 77	126 ± 43*		
72時間	対照	21.0 ± 20	157.5 ± 93	229 ± 106		
	CT-112	45.1 ± 42	48.4 ± 28*	255 ± 125		

これらの値は5匹の動物の平均 ± SDを表す。

* は $p \leq 0.05$ で同時点でカラゲナン処理された動物からの有意差を示す。

表 X

腹膜炎における炎症媒介物質に対するCT-112の効果

治療群	LTB ₄	PGE ₂
	(腹腔洗浄液中のpg)	
対照 (PBS)	15.8 ± 4.3(5)	21.4 ± 3.8(5)
CT-112 (60mg/kg/日)	16.8 ± 11.5(5)	13.1 ± 6.9(5) *

これらの値は5匹の動物の平均 ± SDを表す。

* は $p \leq 0.05$ でPBS 処理された動物からの有意差を示す。

14. 実施例：構造と活性の関係

14.1. CT-114およびCT-112の抗炎症活性の比較

14.1.1.材料および方法

CT-112（配列番号1）の類似体であるCT-114（Thr-Thr-Ser-Gln-Val）（配列番号6）をマウス耳の急性炎症モデルにおいて潜在的な二次薬物団として別に試験した。この実験において、CT-114（配列番号6）およびCT-112（配列番号1）をそれぞれ別々に調製し、6mgまたは60mgのペプチド/kg/日を送達するようにセットされた異なるアルゼット

ミニポンプに装填した。移植の3日後に、マウスを左の耳へのAAの適用によりチャレンジした。AAチャレンジは実施例7に上記されたものと同じであった。

14.1.2.結果および考察

結果を表XIに示す。CT-112（配列番号1）6mg/kg/日で治療されたマウスの炎症は対照とは統計上異ならなかった。CT-114（配列番号6）の6mg/kg/日の投与は対照と比較して炎症プロセスを有意に抑制し（ $p \leq 0.05$ ）、CT-112（配列番号1）により生じた炎症の抑制とCT-114（配列番号6）により生じた炎症の抑制の間に統計上の有意差（ $p \leq 0.05$ ）を生じた。CT-112（配列番号1）およびCT-114（配列番号6）の両方は60mg/kg/24時間で炎症プロセスを有意に抑制し（それぞれ、 $p \leq 0.01$ および $p \leq 0.05$ ）、これらの二つの群の間に統計上の差がなかった。これらの結果はCT-112（配列番号1）およびCT-114（配列番号6）が両方とも急性皮膚炎症を抑制できることを示す。

表XI

CT-112とCT-114の活性の比較

治療群	厚みの差 (左-右)(インチ)	炎症の 抑制率 (%)
対照(PBS)	0.00644 ± 0.00258	0.0
6mg/kgのCT-112	0.00381 ± 0.00066	40.8
6mg/kgのCT-114	0.00262 ± 0.00092 * †	59.3
60mg/kg のCT-112	0.00095 ± 0.00064 **	85.2
60mg/kg のCT-114	0.00242 ± 0.00074 *	62.4

これらの値は5匹の動物の平均±SDを表す。* は $p \leq 0.05$ でPBS処理された動物からの有意差を示す。**は $p \leq 0.01$ でPBS 処理された動物からの有意差を示す。† は $p \leq 0.05$ でCT-112(6mg/kg/日)治療された動物からの有意差を示す。

14.2. その他のペプチドの抗炎症活性

CT-112（配列番号1）およびCT-114（配列番号6）は α -ケモカインファミリーの一員であるPF4（配列番号9）から誘導されたペプチドであるので、またCT-112（配列番号1）およびCT-114（配列番号6）の両方は α -ケモカイン（Edgington,1993,Bio/Technology11:676-678;Broxmeyerら,1993 J.Immunol.150:3448-3458）の高度に保存されたCXC部分からカルボキシル末端の方にある二つのアミノ酸残基に位置されるので、 α -ケモカインファミリーのその他のメンバーの同じ遺伝子座に見られる一連のペプチドが合成され、そしてマウス耳の急性炎症モデルにおいて抗炎症活性につき試験された。

さらに、 β -ケモカインファミリーから同じ位置（CCモチーフのカルボキシル末端に向かって二つのアミノ酸残基）から誘導された一連のペプチドをまた試験した（注： α -ケモ

カインは好中球およびT細胞に特異的な活性を有し、また β -ケモカインはマクロファージおよび単球に特異的な活性を有する)。成長因子から無関係の配列であるランダムオクタペプチド、CT-120 (Val-Thr-Arg-Pro-Thr-Gln-Arg-Ser) (配列番号11)、およびアルブミンをまた試験した。

14.2.1.材料および方法

それぞれペプチドを、60mg/kg/日を送達するようにセットしたアルゼット ポンプにより24時間にわたって投与した。この実験における多数の動物のために、化合物のグループをランダムに試験し、CT-112 (配列番号1) またはPBS単独で処理された動物と比較し、そして炎症を抑制するそれらの能力につき評価した。AAチャレンジは実施例7に上記されたものと同じであった。

10

14.2.2.結果および考察

これらの結果を表XII~XVに示す。活性の容易に認められるパターンが同定されなかったが、下記の結果を観察した。化合物はAA誘発炎症を抑制するのにCT-112 (配列番号1) よりも有効ではなかった。最も有効な化合物 (CT-112以外) はCT-119 (配列番号21)、CT-164 (配列番号16) およびCT-220 (配列番号23) であった。これらの化合物のうち、CT-164のみが α -ケモカインファミリー (hENA78) から誘導される。アミノ酸残基のランダム配列であるCT-120 (配列番号11) はAA誘発耳炎症の抑制に有効ではなかった。アルブミンは炎症の適度の抑制を生じたが、この現象は他の人達により観察されたもので、生物学上顕著とみなされない。これらの結果は、 α -ケモカインおよび β -ケモカインの両方に見られる配列から誘導された幾つかのペプチドが急性皮膚炎症を抑制し得ることを示す。しかしながら、試験した配列のうち、いずれもがCT-112 (配列番号1) よりも有効ではなかった。

20

表XII

ペプチド類とCT-112の抗炎症活性の比較

化合物	下記のペプチド からの誘導	配列番号	アミノ酸配列	% 抑制率
α-ケモカイン				
CT-112	PF4	1	C L C V K T T S Q V R P R	78
CT-127	CTAPIII	12	C M C I K T T S G I H P K	41
CT-123	IL-8	13	C Q C I K T Y S K P F H K	65
CT-176	GRO- α	14	C Q C L Q T L Q G I H P K	67
CT-173	NAP-4	15	C L C I D L Q V K T V K Q V S	58
CT-164	hENA78	16	C V C L Q T T Q G V H P K	76
β-ケモカイン				
CT-201	RANTES β	17	C C I F A Y I A R P L P R	48
CT-183	hACT2 β	18	C C I F S Y T A R K L P R N F	51
CT-144	hMIP1b β	19	C C I F S Y T R E A S S N F	51
CT-135	PECAM	20	T T S H V K P Q	73
CT-119	TNF- α	21	T H V L L T H T I	74
CT-125	PDGF-B	22	V Q V R K I E I V R K K P I	56
CT-220	PDGF-A	23	T T S L N P D Y R	73
CT-120	ランダム	11	V T A P T Q R S	32
CT-XXX	アルブミン			47

陰影領域は試験化合物を表す。

30

40

表XIII

ペプチド類とCT-112の抗炎症活性の比較

	厚みの差	
治療	(左-右)(インチ)	
PBS	0.00658 ± 0.00290	10
CT-112	0.00132 ± 0.00086*	
CT-125	0.00288 ± 0.00075	
CT-135	0.00178 ± 0.00073*	
CT-123	0.00228 ± 0.00072*	
CT-127	0.00390 ± 0.00112	20
CT-176	0.00220 ± 0.00137	

これらの値は5匹の動物の平均±SDを表す。

* は $p \leq 0.05$ でPBS 処理された動物からの有意差を示す。

表XIV

種々のペプチド類とCT-112の抗炎症活性の比較

	厚みの差	30
治療	(左-右)(インチ)	
PBS	0.00604 ± 0.00067	
CT-112	0.00134 ± 0.00044**	
CT-119	0.00158 ± 0.00040**	
CT-120	0.00412 ± 0.00168	
CT-173	0.00252 ± 0.00102**	40
CT-164	0.00146 ± 0.00053**	
CT-220	0.00164 ± 0.00160	

これらの値は5匹の動物の平均±SDを表す。

**は $p \leq 0.01$ でPBS 処理された動物からの有意差を示す。

表XV

種々のペプチド類とCT-112の抗炎症活性の比較

厚みの差		10
治療	(左-右)(インチ)	
PBS	0.00696 ± 0.00212	10
CT-112	0.00154 ± 0.00092**	
CT-201	0.00362 ± 0.00040*	
CT-183	0.00342 ± 0.00077*	
CT-144	0.00344 ± 0.00120*	
アルブミン	0.00368 ± 0.00105*	

これらの値は5匹の動物の平均±SDを表す。*は $p \leq 0.05$ でPBS
 処理された動物からの有意差を示す。**は $p \leq 0.01$ でPBS 処理さ
 れた動物からの有意差を示す。

14.3. CT-112のブロックされた変種、置換変種および末端切断型変種の抗炎症活性

CT-112（配列番号1）の抗炎症効果を、それらのアミノ末端もしくはカルボキシル末端でブロックされ、または両末端でブロックされ、或いは種々末端切断され、或いは特別なアミノ酸残基が置換または欠失された種々のCT-112類似体および誘導体の抗炎症効果と比較した。

14.3.1. 材料および方法

CT-112誘導体化ペプチドの最初の組を化学合成した。これらはペプチドのアミノ末端に付加されたアセチル基を有するCT-112（配列番号1）オクタペプチド（Ac-TTSQVRPR）、ペプチドのカルボキシル末端に付加されたアミド基を有するCT-112（配列番号1）（TTSQVRPR-NH₂）、および両末端でこうしてブロックされたCT-112（配列番号1）（Ac-TTSQVRPR-NH₂）を含んでいた。加えて、第14.2節に記載されたように先に使用された、ランダムオクタペプチドであるCT-120（VTRPTQRS）（配列番号11）を、 α -ケモカインファミリーの一員である結合組織活性化ペプチドIII（CTAP III）から誘導されたペプチドであるCT-127（TTSGIHPK）（配列番号12）と同様に試験した。

CT-112の全ての末端切断型ト変種であるCT-112（配列番号1）類似ペプチド（配列番号3、4、6、24~28）の第二の組を化学合成した。

CT-112（配列番号1）類似ペプチド（配列番号25、26、29~73）の第3の組を化学合成した。ここで、CT-112（配列番号1）を構成する8種のアミノ酸残基のそれぞれを逐次置換または欠失した。特定の残基が置換されたペプチドのそれぞれの種において、アミノ酸残基をそのD-アミノ酸対応物、またはアラニル残基、グルタミル残基、リシル残基もしくはロイシル残基で置換した。

三つの組のそれぞれ中のペプチドを、マウス耳の急性炎症モデルを使用して抗炎症活性につき試験した。AAチャレンジは実施例7上記されたものと同じであった。7~10匹の動物をそれぞれの試験ペプチドにつき使用した。全ての動物はAAによるチャレンジの4時間前に1回の6mg/kgの皮下投与を受けた。耳の厚みの測定をチャレンジ1時間後に行った。

14.3.2 結果および考察

10

20

30

40

50

結果は図7-9及び表XVI, XVIIに示す。CT-112から派生したペプチドの第一番目のセットについては、CT-112（配列番号1, IDは連続番号）の一方の末端または両端をブロックしたものでは炎症抑制能の有意の減少が認められた（図7、表XVI）。CT-120（配列番号11）はランダムなペプチドであり、以前に実験したときはほとんど活性を示さなかったが、本実験では炎症を有意に抑制した（図7）。さらに、CT-127（配列番号12）も炎症抑制に有意に有効であった。これらの結果は別の α -ケモカイン由来のペプチドが炎症抑制能を有していることを示している。

CT-112類縁のペプチドの第二番目のセット（配列番号3, 4, 6, 24-28）については、CT-112（配列番号1）の両端のアミノ酸残基を一つまたはそれ以上切り取ったものには炎症抑制能の有意の減少が認められた（図8、表XVI）。第二セットの結果からはCT-112（配列番号1）の炎症抑制能はインタクトなオクタペプチドの状態が最も活性が高いことが示されている。

10

CT-112類縁のペプチドの第三番目のセット（配列番号25, 26, 29-73）については、アミノ酸残基のどれかをそのアミノ酸に対応するD-アミノ酸に置換した場合の影響はその置換された残基によって異なる結果であった（図9、表XVII）。例えば、L-Thr₁またはL-Thr₂をD-Thrに置換した場合、そのペプチドにはかなりの抗炎症活性が残存していたが、Gln₄またはArg₈の置換は活性を有意に低下させた。

Thr₁またはSer₃をAlaで置換した場合には活性は低下したが、Arg₆をAlaで置換した場合には抗炎症活性はわずかながら増強された。

Thr₂またはArg₈をGluで置換した場合には活性は低下したが、Ser₃またはArg₆をGluで置換した場合には抗炎症活性はわずかながら増強された。

20

アミノ酸残基をLysで置換した場合には概してほとんど影響がないようだが、Thr₁をLysで置換した場合には活性の低下が見られた。

Gln₄またはArg₈をLeuで置換した場合には得られたペプチドの活性の顕著な低下が見られた。

Pro₇を除くどのアミノ酸についてもそれを取り除いた場合には得られたペプチドの活性の低下が認められた。

これらの結果は、CT-112（配列番号1）投与によって認められた活性は、ペプチドの非特異的な作用によるのではなく、ペプチド分子の特定の構造特性に関連があることを示している。活性はそのペプチドのアミノ酸列を特異的に変えることによって増強または、低下しうる。

30

表 XVI

CT-112の抗炎症活性に及ぼすアミノ酸の
末端切断及び末端ブロックの影響

ペプチド*	抑制率 (%)	
無処置	0.0	10
VRPR (4)	29.7	
QVRPR (24)	37.8	
SQVRPR (3)	16.2	
TSQVRPR (25)	27.0	
TTSQVRPR (1)	64.9	20
TTSQVRP (26)	29.7	
TTSQVR (27)	29.7	
TTSQV (6)	10.8	
TTSQ (28)	29.7	30
Ac-TTSQVRPR	29.7	
TTSQVRPR-NH ₂	32.4	
Ac-TTSQVRPR-NH ₂	13.5	

* ペプチドの表記には一文字アミノ酸略号を用いており、カッコ
内の番号は配列番号である。

表 XV

CT-112の抗炎症活性に及ぼすアミノ酸置換の影響

D-アミノ酸との置換ペプチド群＊		抑制率(%)	
(D-T)TSQVRPR	(66)	75.7	
T(D-T)SQVRPR	(67)	64.9	10
TT(D-S)QVRPR	(68)	45.9	
TTS(D-Q)VRPR	(69)	37.8	
TTSQ(D-V)RPR	(70)	62.2	
TTSQV(D-R)PR	(71)	51.4	
TTSQVR(D-P)R	(72)	51.4	
TTSQVRP(D-R)	(73)	37.8	20
アミノ酸一個を除去したペプチド群＊		抑制率(%)	
T()SQVRPR	(25)	27.0	
TT()QVRPR	(45)	24.3	
TTS()VRPR	(46)	37.8	
TTSQ()RPR	(47)	37.8	30
TTSQV()PR	(48)	45.9	
TTSQVR()R	(49)	54.1	
TTSQVRP()	(26)	29.7	

グルタミン酸との置換ペプチド群＊

抑制率(%)

ETSQVRPR	(29)	64.9
TESQVRPR	(30)	43.2
TTEQVRPR	(31)	81.1
TTSEVRPR	(32)	75.7
TTSQERPR	(33)	54.1
TTSQVEPR	(34)	86.5
TTSQVRER	(35)	62.2
TTSQVRPE	(36)	37.8

10

リジンとの置換ペプチド群＊

抑制率(%)

KTSQVRPR	(50)	32.4
TKSQVRPR	(51)	75.7
TTKQVRPR	(52)	48.6
TTSKVRPR	(53)	70.3
TTSQKRPR	(54)	73.0
TTSQVKPR	(55)	54.1
TTSQVRKR	(56)	62.2
TTSQVRPK	(57)	70.3

20

30

アラニンとの置換ペプチド群＊

抑制率(%)

ATSQVRPR	(37)	40.5
TASQVRPR	(38)	62.2
TTAQVRPR	(39)	35.1
TTS AVRPR	(40)	62.2
TTSQARPR	(41)	56.8
TTSQVAPR	(42)	75.7
TTSQVRAR	(43)	64.9
TTSQVRPA	(44)	62.2

10

ロイシンとの置換ペプチド群＊

抑制率(%)

LTSQVRPR	(58)	43.2
TLSQVRPR	(59)	35.1
TTLQVRPR	(60)	43.2
TTSLVRPR	(61)	2.7
TTSQLRPR	(62)	51.4
TTSQVLPR	(63)	51.4
TTSQVRLR	(64)	54.1
TTSQVRPL	(65)	13.5

20

30

＊ペプチドの表記には一文字アミノ酸略号を用いており、カッコ内の番号は配列番号である。

15.実施例：遅延型過敏症に対するCT-112の効果

15.1材料および方法

CT-112（配列番号1）の免疫応答調節能をマウスの遅延型過敏症モデル（Filippら,1984,Allergy,39:499-507;Diezelら,1989,J.Invest.Dermatol.93:322-326）を用いて調べた。本実験で用いたのは8週令の雌の無毛マウス（Jackson Laboratories）である。マウスは接触アレルゲン（1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン、DNCB）を用いて感作した。感作は、0.5%DNCB溶液（75%アセトン:25%植物油に溶解したもの）50μlを1日2回、5日間連続してマウスの背胸部に塗布することによって行った。DNCBチャレンジ前の24時間はすべてのマウスを休息させた。感作開始後6日目に50μlのDNCB溶液を左耳に塗ることによりチャレンジした。24時間後に耳の厚さを測定し、チャレンジしていない側の耳と比較した。

処置群は次の通り

40

50

- a) PBS対照
- b) プレドニゾン (25mg/kgをチャレンジの2時間前に腹腔内投与)
- c) 7日間ポンプ投与 (60mg CT-112/kg/24hr)
- d) CT-112 (一回当たり60mg/kgをチャレンジの3時間前,1時間前,15分前及び3,6,21時間後に腹腔内投与)
- e) DMSO対照 (チャレンジの3時間前,1時間前,15分前に50 μ lを局所投与)
- f) CT-112のDMSO溶液 (20mg/ml溶液を50 μ l,チャレンジの3時間前,1時間前,15分前及び3,6,21時間後に局所投与)

15.2結果および考察

結果は表XVIIIに示す。DNCBによって惹起された遅延型過敏症の抑制能に関してCT-112 (配列番号1) はプレドニゾンに匹敵するものであった。CT-112 (配列番号1) DMSO溶液の局所投与群と、ビヒクル (DMSO) のみの局所投与群との間には統計学的有意差が認められた。CT-112 (配列番号1) の局所投与は遅延型過敏症の減少に関してPBS対照 (DMSOのみの局所投与を受けていない) との間には統計学的有意差は認められなかった。本実験の結果は、CT-112 (配列番号1) は全身投与した場合には遅延型過敏症の防止に有効であることを示している。このことはCT-112 (配列番号1) の活性は好中球に厳格に特異的というのではなくT細胞を介した免疫応答にも影響を及ぼすことを示唆している。

表 XII

CT-112の遅延型過敏症に及ぼす効果

治療群	耳の厚みの差 (左-右、インチ)	炎症 抑制率(%)
対照(PBS) ポンプ注入	0.00428 $\pm$ 0.001578	0.0
プレドニゾン	0.00014 $\pm$ 0.000446* *	96.7
CT-112ポンプ注入	0.00087 $\pm$ 0.000398* *	79.7
CT-112腹腔内投与	0.00169 $\pm$ 0.000643*	68.4
DMSO(対照)	0.00448 $\pm$ 0.000693	-4.7
2CT-112局所投与 (DMSO溶液)	0.00350 $\pm$ 0.000408†	18.2

上記の数値は5匹の平均 $\pm$ SD。*は $p \leq 0.05$ で対照群と有意差あり。* *は $p \leq 0.01$ で対照群と有意差あり。†は $p \leq 0.05$ でDMSO処置群と有意差あり。

16.実施例:II型コラーゲン誘発関節リウマチに対するCT-112の効果

CT-112 (配列番号1) のII型コラーゲン誘発関節炎 (CIA) の発症抑制に対する効果を調べた。CIAは関節炎の実験モデルであり、病理学的、免疫学的小および遺伝子学的に多くの点で関節リウマチと共通するものを持っている (Wooley, 1988, Meth. Enzym. 162:361-373

）。CIAはII型のコラーゲンでその作用を受けやすいマウスの系統を免疫することによって誘発しうる。免疫後、進行性で炎症性の関節炎が免疫された動物の大多数で発症し、それは臨床的には紅斑および浮腫で特徴づけられる。このモデルは、宿主自身の結合組織の分子群、すなわち、関節の軟骨組織に見出されるII型のコラーゲンに対して免疫応答が起る病態をまねようと作り出されたものである（Wooley,1988同上）。

16.1材料および方法

マウス（DBA/1,10-12週令,Jackson Laboratories）は1群各12匹、計3群に無作為に割り付けた。CT-112（配列番号1）は滅菌したPBSで溶解し注射用として。CT-112（配列番号1）は次の投与スケジュールに従い連日投与した。

a) 対照群（0.1ml滅菌PBS）（7匹）

b) CT-112低投与量群（0.1ml滅菌PBS中に0.25mgのCT-112を含有する溶液を用い、10mg/kgで投与）（8匹）

c) CT-112高投与量群（0.1ml滅菌PBS中に2.5mgのCT-112を含有する溶液を用い、100mg/kgで投与）（8匹）

CT-112（配列番号1）の初回投与の3日後に全てのマウスの尾の基部に100 μ gのウシII型コラーゲンをフロイドの完全アジュバントとともに皮内に注入した。マウスの観察は症状の発現については毎日行い、体重は週に2回、全般的な健康状態とともに記録した。関節炎の発症が見られたマウスについては週に5回、免疫後10週間まで臨床的評価を行った。足の測定は週3回実施した。免疫後10週間経過しても関節炎の兆候が現れなかったマウスは発病なしと見なした。

すべてのマウスは実験開始前に採血し、さらに、免疫2週間後、4週間後、CIAの発症時点、及び本実験終了時点で採血を行った。血清を分離し-80℃で保存した。抗コラーゲン抗体濃度の測定はELISAで行った。脾臓とリンパ節は屠殺時に取り出し、単細胞懸濁液を作った。Con A及びLPSに対するマイトジェン反応、II型コラーゲンに対する抗原特異的反応についても調べた。

適切な統計学的解析法（カイ二乗検定、StudentのT検定及びノンパラメトリック中央値比較検定）をSPSS/PCソフトウェアを用いて行い、低投与量及び高投与量CT-112（配列番号1）のコラーゲン誘発関節炎の発症率・発症時期・重篤度および進行度、コラーゲンに対する抗体形成、T細胞及びB細胞のマイトジェン反応、II型コラーゲンに対するT細胞特異的応答に及ぼす影響について調べた。

16.2結果および考察

CIAの発症率と発症時期を図10に示した。関節炎の発症時期についてはCT-112（配列番号1）の低及び高投与量群とも対照群に比べいくらか遅くなった。最終的なCIAの発症率は対照群（87.5%）は高投与量群（50%）及び低投与量群（62.5%）のいずれよりも高かった。これら2つの結果とも対照群に比し統計学的には有意差はなかったが、高投与量群における関節炎発症率においては統計学的に有意な減少までは至らなかったもののその傾向は明瞭であった（ $p=0.14$ ）。

低投与量群では関節炎の病状の進行は有意に少ない数の足で見られ（ $p=0.035$ ）、重篤度においては対照群に比し統計学的に有意差の認められる程度に近い減少を示した（ $p=0.058$ ）。関節炎の各パラメーターを経時的に分析したところ、CT-112（配列番号1）の高、低投与量群とも今回の実験の対象となっていない方の肢への関節炎の進行を遅らせ、「病状進行度」指数、この指数は炎症性疾患から関節のびらん性障害への進行を特徴づけるものだが、これに顕著な影響を及ぼすことが示唆された（図12）。

興味深いことに、低投与量群では本実験で対象とした足の25%に実験終了時に緩解が認められたのに対し、対照群では6.3%であった。しかしこの差は統計学的には有意ではなかった。足の腫脹の最大値はCT-112（配列番号1）投与の影響を受けなかった。

CT-112（配列番号1）高投与量、低投与量の両群ともCIAの病理組織所見に影響を及ぼした（図13）。つまり、関節炎の発症によって惹起された関節のびらんの減少と、関節の構造の損傷の有意の減少（ $p \leq 0.05$ ）が生じた。しかしCT-112（配列番号1）は滑膜炎とパニヌスに対して有意な影響を及ぼさなかった。これはおそらくCT-112（配列番号1

10

20

30

40

50

）が炎症細胞の全タイプに効果があるわけではないからであろう。すなわち、顆粒球、マクロファージ、線維芽細胞及びその他の炎症関連細胞の炎症刺激に対する応答についてはおそらく変わっていないのであろう。このことはCT-112（配列番号1）が炎症反応系の特定のところを抑制しているとの結論を支持している。

CT-112（配列番号1）の高、低投与量群ともマウス血清中の抗コラーゲン抗体価を低下させるようである。免疫4週後の抗体価は高投与量群では統計学的に有意に低下していた（ $p=0.028$ ）（図14）。抗コラーゲン抗体価の差は発症時に最も大きなものとなったが、この時点ではサンプルサイズが小さすぎ、統計学的有意差には至らなかった。

実験終了時点では低投与量群の抗コラーゲン抗体価は対照群に比べ有意に高かった。対照群における抗体価の低下がこの差をもたらしたのだが、これはこの実験モデルに典型的な現象である。このデータは、CT-112（配列番号1）はコラーゲンに対する血清学的反応を抑制すると言うよりはむしろ遅延させることを示唆している。

リンパ節細胞におけるマイトジェン及び抗原（II型コラーゲン）に対する細胞性反応は対照群、投与群とも同様であった。CT-112（配列番号1）投与群マウスの脾臓細胞のCon A及びLPSに対する応答から見て免疫抑制も亢進も起こっていないことが示唆される。全群において繁殖性については関節炎を発症したマウスとしないマウスで同様であった。

血液学的検査値に変化は認められず、全ての被験動物は、全観察期間を通じて同程度の速さで体重の増加が見られた。

17. 実施例：毒性試験

次の実施例はCT-112（配列番号1）の毒性を調べるために行った各種の実験を要約したものである。

CT-112（配列番号1）の変異原性を調べた。CT-112（配列番号1）は100-5,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲でラット肝ミクロソーム酵素で活性化したものとししないもののどちらについてもサルモネラ復帰突然変異試験（Arnesら, 1975, Mutation, Res. 31:347-364）で復帰突然変異体（ヒスチジン非依存性の増殖を示す）の数を増加させなかった。CT-112（配列番号1）は1,260-4,990 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲でラット肝ミクロソーム酵素で活性化したものとししないもののどちらについてもチャイニーズハムスター卵巣細胞アッセイ法（Evans, H. J., 1962, Int. Rev. Cyt. 13:221-321）で染色体異常を誘発しなかった。

CT-112（配列番号1）は500-5,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲でラット肝ミクロソーム酵素で活性化したものとししないもののどちらについてもヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）陽性のチャイニーズハムスター卵巣細胞に前進突然変異（フォワードミューティション）を起こさなかった。前進突然変異をこれらの細胞が起こすと、HGPRTの発現能を失い、有毒なプリン類縁体に対する感受性を失う（Hsiehら, 1975, Somat. Cell Genet. 1:247-261）。

CT-112（配列番号1）は62.5, 125及び250mg/kgの濃度でマウス骨髄多染性赤血球アッセイ法（Heddle et al., 1983, Mut. Res. 123:61-118）で24, 48, 72時間後のいずれにおいても小核の有意な増加を誘発しなかった。

CT-112（配列番号1）の急性毒性をマウス及びラットで調べた。マウスについては100, 500または1,000mg/kgを静注した。一過性の臨床症状がわずかながら見られた。それらは行動抑制と過敏症状で投与日に500mg/kgで1匹、1000mg/kgで2匹に認められたが、これらのマウスはその翌日に正常な外観に戻った。平均体重及び体重増加の平均値については対照群と投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。剖検ではマウスにも病変は認められなかった。

ラットに対してはCT-112（配列番号1）を100, 500または1,000mg/kg投与した。一過性の臨床症状（行動抑制、過敏症状、よたつき歩行、チアノーゼ及び立ち直り反射の消失）が投与日に500mg/kg及び1,000mg/kg群の数匹のラットに認められた。これらのラットは全て翌日には正常な外観に戻った。平均体重及び体重増加の平均値については対照群と投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。剖検ではどのラットにも病変は認められなかった。

本発明について、上記の実施態様を特に言及しながら詳細に記述してきた。しかしながら

10

20

30

40

50

、本発明は上記の実施態様、それは本発明のある態様を例示するものであるが、そのみに本発明の範囲を限定すべきものではないと理解するべきである。

事実、ここに記述した事柄に加えて本発明にいろいろな改変を加えることは当業者にとっては自明なことであろう。そのような改変は本発明の特許請求の範囲に包含されるものとする。

本明細書中に引用された各種の参照文献は、参考としてその全体を本明細書中に組み込むことにする。

配列表

配列番号:1

配列の長さ:8

10

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

配列番号:2

配列の長さ:10

20

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Val Lys Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5 10

配列番号:3

配列の長さ:6

30

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

配列番号:4

配列の長さ:4

40

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Val Arg Pro Arg
1

配列番号:5

配列の長さ:11

50

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr
1 5 10

配列番号:6

配列の長さ:5

10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val
1 5

配列番号:7

配列の長さ:5

20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Ser Gln Val Arg
1 5

配列番号:8

配列の長さ:8

30

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys
1 5

配列番号:9

配列の長さ:70

40

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Glu Ala Glu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr
 1 5 10 15
 Ser Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala
 20 25 30
 Gly Pro His Cys Pro Thr Ala Gln Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly
 35 40 45
 Arg Lys Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile
 50 55 60
 Lys Lys Leu Leu Glu Ser
 65 70

10

配列番号:10

配列の長さ:4

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln

1

20

配列番号:11

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Val Thr Arg Pro Thr Gln Arg Ser

1

5

30

配列番号:12

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys

1

5

40

配列番号:13

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Lys

1

5

50

配列番号:14

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Leu Gln Gly Ile His Pro Lys
1 5

10

配列番号:15

配列の長さ:9

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Gln Val Lys Thr Val Lys Gln Val Ser
1 5

20

配列番号:16

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Gln Gly Val His Pro Lys
1 5

30

配列番号:17

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Tyr Ile Ala Arg Pro Leu Pro Arg
1 5

40

配列番号:18

配列の長さ:10

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Tyr Thr Ala Arg Lys Leu Pro Arg Asn Phe
1 5 10

50

配列番号:19

配列の長さ:9

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Tyr Thr Arg Glu Ala Ser Ser Asn Phe
1 5

10

配列番号:20

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser His Val Lys Pro Gln
1 5

20

配列番号:21

配列の長さ:9

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
1 5

30

配列番号:22

配列の長さ:14

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile
1 5 10

40

配列番号:23

配列の長さ:9

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg
1 5

50

配列番号:24

配列の長さ:5

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Gln Val Arg Pro Arg
1 5

10

配列番号:25

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

20

配列番号:26

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro
1 5

30

配列番号:27

配列の長さ:6

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg
1 5

40

配列番号:28

配列の長さ:4

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln
1

50

配列番号:29

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Glu Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

10

配列番号:30

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Glu Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

20

配列番号:31

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Glu Gln Val Arg Pro Arg
1 5

30

配列番号:32

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Glu Val Arg Pro Arg
1 5

40

配列番号:33

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Glu Arg Pro Arg
1 5

50

配列番号:34

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Glu Pro Arg
1 5

10

配列番号:35

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Glu Arg
1 5

20

配列番号:36

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Glu
1 5

30

配列番号:37

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Ala Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

40

配列番号:38

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Ala Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

50

配列番号:39

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ala Gln Val Arg Pro Arg
1 5

10

配列番号:40

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Ala Val Arg Pro Arg
1 5

20

配列番号:41

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Ala Arg Pro Arg
1 5

30

配列番号:42

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Ala Pro Arg
1 5

40

配列番号:43

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Ala Arg
1 5

50

配列番号:44

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Ala
1 5

10

配列番号:45

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Gln Val Arg Pro Arg
1 5

20

配列番号:46

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Val Arg Pro Arg
1 5

30

配列番号:47

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Arg Pro Arg
1 5

40

配列番号:48

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Pro Arg
1 5

50

配列番号:49

配列の長さ:7

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Arg
1 5

10

配列番号:50

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Lys Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

20

配列番号:51

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Lys Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

30

配列番号:52

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Lys Gln Val Arg Pro Arg
1 5

40

配列番号:53

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Lys Val Arg Pro Arg
1 5

50

配列番号:54

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Lys Arg Pro Arg
1 5

10

配列番号:55

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Lys Pro Arg
1 5

20

配列番号:56

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Lys Arg
1 5

30

配列番号:57

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Lys
1 5

40

配列番号:58

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Leu Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

50

配列番号:59

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Leu Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

10

配列番号:60

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Leu Gln Val Arg Pro Arg
1 5

20

配列番号:61

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Leu Val Arg Pro Arg
1 5

30

配列番号:62

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Leu Arg Pro Arg
1 5

40

配列番号:63

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Leu Pro Arg
1 5

50

配列番号:64

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Leu Arg
1 5

10

配列番号:65

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Leu
1 5

20

配列番号:66

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列の特徴

特徴を表す記号:Modified-site

存在位置:1

30

他の情報:/label=D-Thr/note="X=D-Threonine"

配列

Xaa Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

配列番号:67

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイポセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列の特徴

特徴を表す記号:Modified-site

存在位置:2

40

他の情報:/label=D-Thr/note="X=D-Threonine"

配列

Thr Xaa Ser Gln Val Arg Pro Arg
1 5

配列番号:68

配列の長さ:8

50

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Modified-site

存在位置：3

他の情報：/label=D-Ser/note="X=D-Serine"

配列

Thr Thr Xaa Gln Val Arg Pro Arg
1 5

10

配列番号：69

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Modified-site

存在位置：4

他の情報：/label=D-Gln/note="X=D-Glutamine"

配列

Thr Thr Ser Xaa Val Arg Pro Arg
1 5

20

配列番号：70

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Modified-site

存在位置：5

他の情報：/label=D-Val/note="X=D-Valine"

配列

Thr Thr Ser Gln Xaa Arg Pro Arg
1 5

30

配列番号：71

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

配列の特徴

特徴を表す記号：Modified-site

存在位置：6

40

50

他の情報:/label=D-Arg/note="X=D-Arginine"

配列

Thr Thr Ser Gln Val Xaa Pro Arg
1 5

配列番号:72

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイボセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列の特徴

特徴を表す記号:Modified-site

存在位置:7

他の情報:/label=D-Pro/note="X=D-Proline"

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Xaa Arg
1 5

配列番号:73

配列の長さ:8

配列の型:アミノ酸

トポロジー:不明

配列の種類:ペプチド

ハイボセティカル:NO

アンチセンス:NO

配列の特徴

特徴を表す記号:Modified-site

存在位置:8

他の情報:/label=D-Arg/note="X=D-Arginine"

配列

Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Xaa
1 5

10

20

30

【図10】

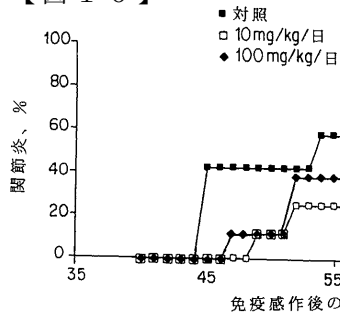


FIG.10

【図1】

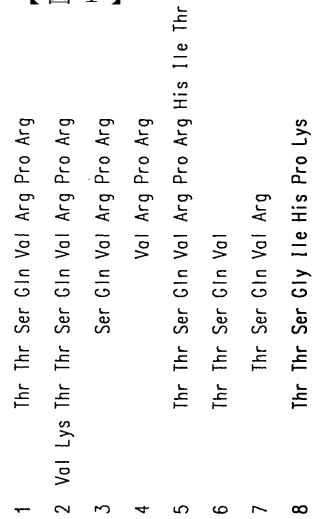


FIG.1

【図2】

5 10 15 20 25 30

E A E E D G D L Q C L C V K T T S Q V R P R H I T S L E V
I K A G P H C P T A Q L I A T L K N G R K I C L D L Q A P L
Y K K I I K K L L E S

3文字略号	1文字記号
Ala	A
Arg	R
Asn	N
Asp	D
Asx	B
Cys	C
Gln	Q
Glu	E
Glx	Z
Gly	G
His	H
Ile	I
Leu	L
Lys	K
Met	M
Phe	F
Pro	P
Ser	S
Thr	T
Trp	W
Tyr	Y
Val	V

FIG.2

【図3】

トリパンブルー排除により測定された生存細胞、%

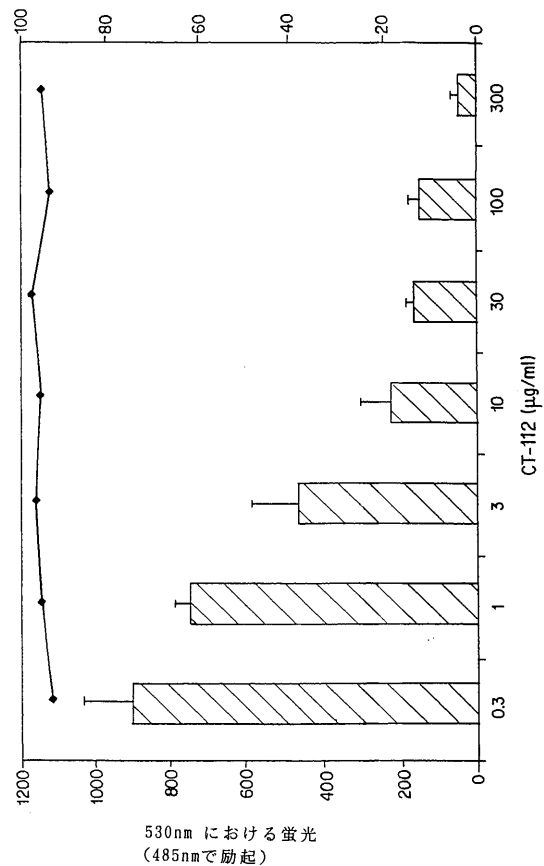


FIG. 3

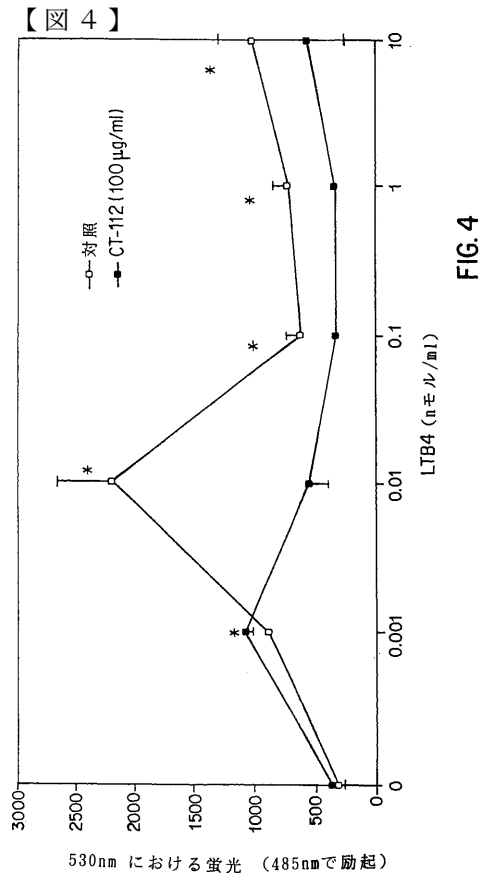


FIG. 4

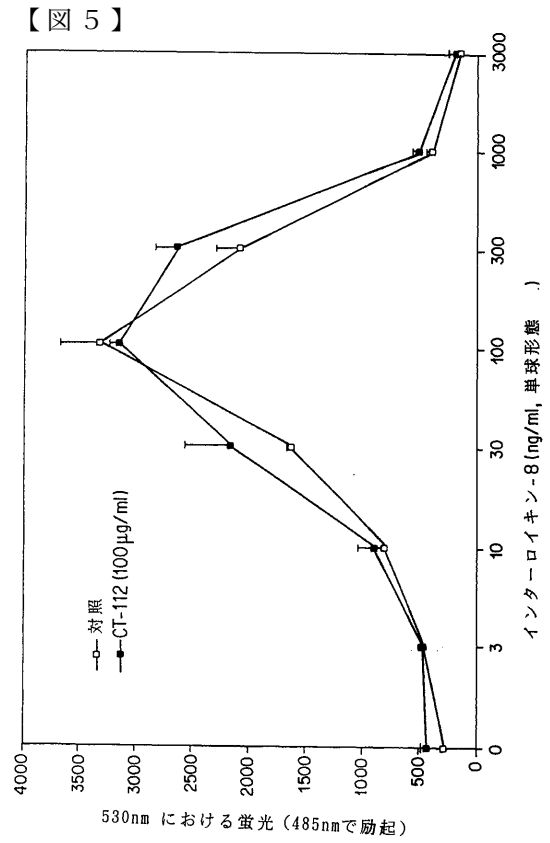


FIG. 5

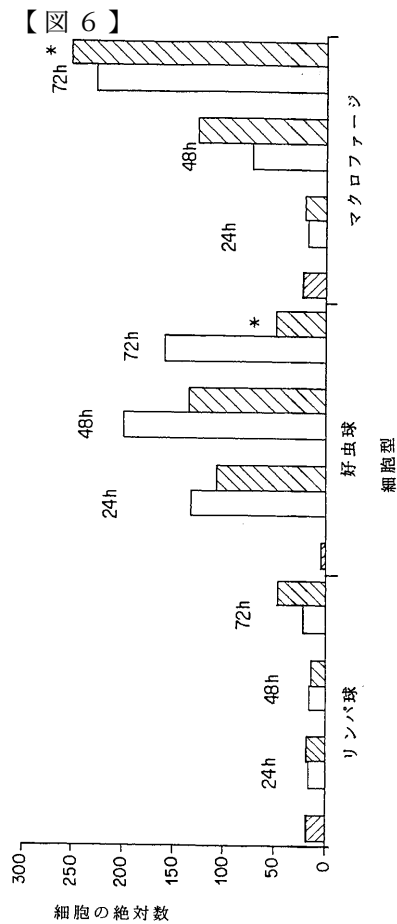


FIG. 6

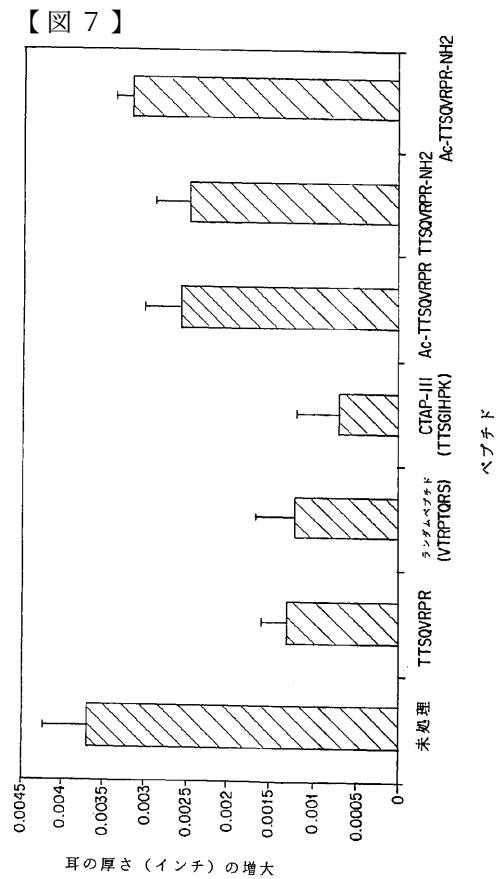


FIG. 7

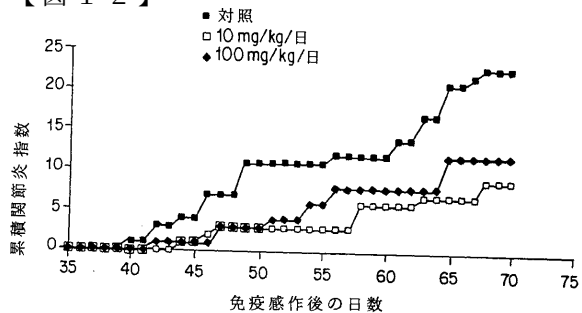
【图 9】



【 図 1 3 】



FIG.12



【図 14】

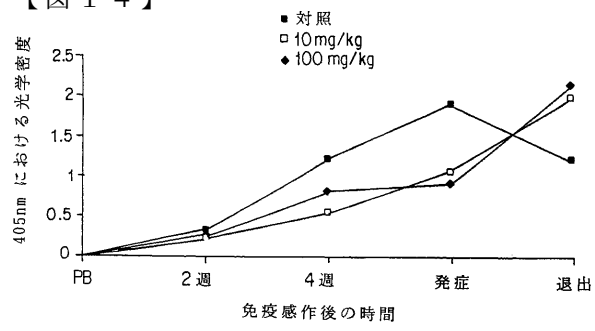


FIG.14

フロントページの続き

(72)発明者 カウンツ, デイヴィッド エフ.

アメリカ合衆国 11727 ニューヨーク州 コーラム, サマンサ ドライブ 22番地

(72)発明者 ダフ, ロナルド ジー.

アメリカ合衆国 11940 ニューヨーク州 イースト モリチズ, インレット ビュー パス
67番地

審査官 鈴木 恵理子

(56)参考文献 国際公開第92/011021 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C07K 14/52

C07K 5/06 ~ 7/10

A61K 38/00 ~ 10

SA(STN)

REGISTRY(STN)