

(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2019-512216

(P2019-512216A)

(43) 公表日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/12 (2006.01)	C 12 N 15/12	Z N A	4 B 0 6 5
C 07 K 14/435 (2006.01)	C 07 K 14/435		4 C 0 8 4
C 07 K 7/08 (2006.01)	C 07 K 7/08		4 H 0 4 5
C 12 N 15/85 (2006.01)	C 12 N 15/85	Z	
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-544213 (P2018-544213)	(71) 出願人	500093834 ザ・ユニヴァーシティ・オブ・ノース・カロライナ・アト・チャペル・ヒル アメリカ合衆国ノースカロライナ州27516, チャペル・ヒル, チャーチ・ストリート 109
(86) (22) 出願日	平成29年2月22日 (2017.2.22)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成30年10月22日 (2018.10.22)	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/018840	(74) 代理人	100125380 弁理士 中村 紗子
(87) 國際公開番号	W02017/147128	(74) 代理人	100142996 弁理士 森本 聰二
(87) 國際公開日	平成29年8月31日 (2017.8.31)		
(31) 優先権主張番号	62/298, 204		
(32) 優先日	平成28年2月22日 (2016.2.22)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】カルシウムチャネルのペプチド阻害剤

(57) 【要約】

本発明は、カルシウムチャネルに結合し、そして気道平滑筋及びその他の細胞へのカルシウム流入を阻害するSPLUNC1タンパク質の断片に関する。本発明は、カルシウム流入を制御し、そしてカルシウムチャネルを通してカルシウム流入の調節に応答する障害を治療又は予防する方法に更に關する。

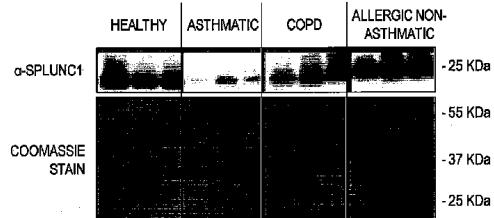


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

S P L U N C 1 タンパク質のカルシウムチャネル結合ドメイン又はその機能的な断片から実質的に構成されるポリペプチド。

【請求項 2】

前記カルシウムチャネルが、O r a i 1 である、請求項 1 に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 3】

前記 S P L U N C 1 タンパク質が、ヒト S P L U N C 1 である、請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 4】

S P L U N C 1 の C 末端を含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 5】

長さがアミノ酸残基 30 個未満である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 6】

長さがアミノ酸残基約 15 個である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 7】

配列番号 1 のアミノ酸 235 ~ 256 又はその機能的な断片を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 8】

配列番号 2 のアミノ酸配列又はその機能的な断片から実質的に構成される、請求項 1 に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 9】

配列番号 2 のアミノ酸配列又はその機能的な断片から構成される、請求項 1 に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 10】

配列番号 1 のアミノ酸 235 ~ 249 又はその機能的な断片を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 11】

配列番号 3 のアミノ酸配列又はその機能的な断片から実質的に構成される、請求項 1 に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 12】

配列番号 3 のアミノ酸配列又はその機能的な断片から構成される、請求項 1 に記載のポリペプチド又はその機能的な断片。

【請求項 13】

請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 15】

請求項 13 に記載のポリヌクレオチド又は請求項 14 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 16】

請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド若しくはその機能的な断片、ポリヌクレオチド、ベクター、又は細胞を含むキット。

【請求項 17】

請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片、及び担体を含む組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 8】

請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の医薬組成物を含む用量送達デバイス。

【請求項 2 0】

吸入器である、請求項 1 9 に記載の用量送達デバイス。

【請求項 2 1】

カルシウムチャネルを通過するカルシウム流入を阻害する方法であって、前記カルシウムチャネルを、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片と接触させ、これにより前記カルシウムチャネルを通過するカルシウム流入を阻害するステップを含む方法。10

【請求項 2 2】

前記カルシウムチャネルが、単離された細胞中に存在する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記単離された細胞が、細胞培養物の一部である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記カルシウムチャネルが、動物の細胞中に存在する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記動物が、疾患モデルである、請求項 2 4 に記載の方法。20

【請求項 2 6】

前記カルシウムチャネルを、ポリペプチド又はその機能的な断片と接触させるステップが、前記ポリペプチド又はその機能的な断片を、前記カルシウムチャネルを含む細胞に送達するステップを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記カルシウムチャネルを、ポリペプチド又はその機能的な断片と接触させるステップが、前記ポリペプチド又はその機能的な断片をコードするポリヌクレオチドを、前記カルシウムチャネルを含む細胞に送達するステップを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

カルシウム流入が、少なくとも 50 % 阻害される、請求項 2 1 に記載の方法。30

【請求項 2 9】

気道平滑筋収縮を阻害する方法であって、気道を、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片と接触させ、これにより気道平滑筋収縮を阻害するステップを含む方法。

【請求項 3 0】

気道過剰反応性を阻害する方法であって、気道を、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片と接触させ、これにより気道過剰反応性を阻害するステップを含む方法。

【請求項 3 1】

前記気道が対象内にある、請求項 2 9 又は 3 0 に記載の方法。40

【請求項 3 2】

対象内の免疫応答を阻害する方法であって、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片を前記対象に送達し、これにより前記免疫応答を阻害するステップを含む方法。

【請求項 3 3】

対象内の炎症を阻害する方法であって、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片を前記対象に送達し、これにより前記炎症を阻害するステップを含む方法。

【請求項 3 4】

それを必要としている対象内のカルシウムチャネルと関連した自己免疫疾患を治療又は50

予防する方法であって、前記対象を、治療上有効な量の請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片と接触させ、これにより前記自己免疫疾患を治療又は予防するステップを含む方法。

【請求項 3 5】

それを必要としている対象内のカルシウムチャネルと関連したがんを治療又は予防する方法であって、前記対象を、治療上有効な量の請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその機能的な断片と接触させ、これにより前記がんを治療又は予防するステップを含む方法。

【請求項 3 6】

前記カルシウムチャネルが、Orai 1 である、請求項 3 4 又は 3 5 に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

それを必要としている対象の気道内カルシウム流入阻害に応答する障害を治療又は予防する方法であって、治療上又は予防上有効な量の請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド若しくはその機能的な断片、又は請求項 1 8 に記載の医薬組成物を前記対象に送達し、これにより前記障害を治療又は予防するステップを含む方法。

【請求項 3 8】

前記障害が、喘息である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記障害が、アレルギーである、請求項 3 7 に記載の方法。

20

【請求項 4 0】

前記障害が、自己免疫障害である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記障害が、がんである、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記ポリペプチド又はその機能的な断片が、吸入により送達される、請求項 3 7 から 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

優先権に関する記載

本出願は、2016年2月22日出願の米国仮特許出願シリアル番号第 6 2 / 2 9 8 , 2 0 4 号の利益を主張し、引用することによりその全内容が本明細書の一部をなすものとする。

【0002】

本発明は、カルシウムチャネルに結合し、そして気道平滑筋及びその他の細胞へのカルシウム流入を阻害する S P L U N C 1 タンパク質の断片に関する。本発明は、カルシウム流入を制御し、そしてカルシウムチャネルを通過するカルシウム流入の調節に応答する障害を治療又は予防する方法に更に関する。

【背景技術】

【0003】

気道平滑筋 (A S M) では、収縮度は、細胞基質の Ca^{2+} 濃度に直接比例する (Jansson, Canadian Respiratory J. , 5 卷 : 491 頁 (1998 年) ; Rouxら, Gen. Pharmacol. , 31 卷 : 349 頁 (1998 年) ; Rodger, Br. Med. Bull. , 48 卷 : 97 頁 (1992 年))。従つて、 A S M の Ca^{2+} ホメオスタシスは、厳密に制御されており、そして多くの場合、間質性相互作用性分子 1 (stromal interacting molecule 1) (S T I M 1) が、筋小胞体 (S R) - 原形質膜接合部に再配置する / 凝集するプロセスであるストア感受性の Ca^{2+} 放出 (S O C E) と関係し、筋小胞体 (S R) - 原形質膜接合部では、 S T I M 1 がカルシウム放出依存性カルシウムチャネルタンパク質 1 (c

50

calcium release-activated calcium channel protein 1) (Orai1) を活性化させて Ca^{2+} 流入を可能にし、収縮の増大を引き起こす (Peelら、Am. J. Respiratory Cell Mol. Biol., 38巻: 744頁 (2008年); Suganumaら、PloS One、7巻: e45056頁 (2012年); Gaoら、Pulmonary Pharmacol. Ther., 23巻: 182頁 (2010年))。SOCEは、喘息患者から得られた ASM 及びその他の細胞、並びにマウス喘息モデルでは欠陥が認められ、Orai1活性の増加を示す (Spine11iら、Pflugers Archiv.: Eur. J. Physiol., 464巻: 481頁 (2012年); Gaoら、J. Asthma, 50巻: 439頁 (2013年))。上皮が除去された気管は気道過剰応答性を示し、そして別の動物に由来する上皮を同一の臓器浴 (organ bath) 内に配置すると収縮性が低下したことを研究者らが最初に実証して以降、上皮由来の平滑筋弛緩因子 (EDSMRF) の存在が仮定されている (Asanoら、Int. Arch. Allergy Immunol., 103巻: 88頁 (1994年); Hayら、Eur. J. Pharmacol., 136巻: 247頁 (1987年))。EDSMRFの候補分子には、NO、アラキドン酸代謝物、及びサイトカインが含まれたが、培地中への直接分泌、及び炎症メディエーターによる急速な調節という2つの必要基準のいずれも認められないで、最終的にすべて棄却された (Vanhoutte、Am. J. Physiol. Cell Physiol., 304巻: C813頁 (2013年); Tarranら、Int. J. Biochem. Cell Biol., 52巻: 130頁 (2014年))。

10

20

30

【0004】

Short palate, Lung and nasal epithelium clone 1 (SPLUNC1) は、その N 末端 S18 領域を利用して、上皮 Na^+ チャネル (ENaC) 原形質膜密度を制御する (Hobbsら、Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 305巻: L990頁 (2013年))。SPLUNC1の生成は、喘息、及びアレルギー性マウスモデルにおいて上方制御されている IL-13 等の Th2 型サイトカインにより阻害されることがこれまでに明らかにされている (Chuら、J. Immunol., 179巻: 3995頁 (2007年))。しかし、喘息の気道平滑筋に対するその効果は記載されていない。

【0005】

本発明は、SPLUNC1タンパク質断片によるカルシウムチャネルの制御、並びにカルシウム流入及び平滑筋収縮を制御し、そしてカルシウム流入調節に応答する障害を治療するこの経路の操作法を開示することにより、当技術分野におけるこれまでの短所に対処する。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、カルシウムチャネルの活性を制御し、並びにその活性を通じて気道平滑筋の収縮性及び反応性を制御する SPLUNC1タンパク質の断片の能力を発見したことに一部基づく。更に、カルシウムチャネルの活性制御は、対象内の免疫応答及び炎症を阻害し、並びにがん細胞の分裂を阻害するのに利用可能である。従って、1つの態様では、本発明は、SPLUNC1タンパク質のカルシウムチャネル結合ドメイン又はその機能的な断片若しくはホモログから実質的に構成されるポリペプチドに関する。1つの実施形態では、カルシウムチャネルは、Orai1である。本発明は、組成物、例えば医薬組成物、及び本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含む用量送達デバイスに更に関する。

40

【0007】

本発明の更なる態様は、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログをコードするポリヌクレオチド、並びに該ポリヌクレオチドを含むベクター及び細胞に関する。

50

【0008】

本発明の追加の態様は、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、及び／又は組成物を含むキットに関する。

【0009】

本発明の別の態様は、カルシウムチャネルを通過するカルシウム流入を阻害する方法であって、カルシウムチャネルを、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これによりカルシウムチャネルを通過するカルシウム流入を阻害するステップを含む方法に関する。

【0010】

本発明の更なる態様は、気道平滑筋収縮を阻害する方法であって、気道を、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これにより気道平滑筋収縮を阻害するステップを含む方法に関する。 10

【0011】

本発明の追加の態様は、気道過剰反応性を阻害する方法であって、気道を、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これにより気道過剰反応性を阻害するステップを含む方法に関する。

【0012】

本発明の別の態様は、対象内の免疫応答を阻害する方法であって、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを対象に送達し、これにより免疫応答を阻害するステップを含む方法に関する。 20

【0013】

本発明の追加の態様は、対象内の炎症を阻害する方法であって、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを対象に送達し、これにより炎症を阻害するステップを含む方法に関する。

【0014】

本発明の更なる態様は、それを必要としている対象内のカルシウムチャネルと関連した自己免疫疾患を治療又は予防する方法であって、対象を、治療上有効な量の本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これにより自己免疫疾患を治療又は予防するステップを含む方法に関する。 30

【0015】

本発明の別の態様は、それを必要としている対象内のカルシウムチャネルと関連したがんを治療又は予防する方法であって、対象を、治療上有効な量の本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これによりがんを治療又は予防するステップを含む方法に関する。

【0016】

本発明の別の態様は、それを必要としている対象の気道内カルシウム流入阻害に応答する障害を治療又は予防する方法であって、治療上有効な量の本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、或いは医薬組成物を対象に送達し、これにより障害を治療又は予防するステップを含む方法に関する。

【0017】

本発明の更なる態様は、それを必要としている対象の気道内カルシウム流入阻害に応答する障害を治療又は予防する方法での、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの使用に関する。 40

【0018】

本発明の追加の態様は、それを必要としている対象の気道内カルシウム流入阻害に応答する障害を治療又は予防する医薬を調製するための、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの使用に関する。

【0019】

本発明のこのような態様、及びその他の態様を、下記の本発明の説明において、より詳細に記載する。 50

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1A～1Eは、SPLUNC1が、マウスにおいて、喘息気道内で減少しており、また気道過剰応答(AHR)と関連することを示す図である。誘発喀痰を、健常コントロール、喘息患者及びCOPD患者、並びにアレルギー性非喘息患者から収集した。(A) SPLUNC1の代表的な免疫プロット(上側)、及びクーマシー・ローディングコントロール(下側)。(B)総タンパク質に対してSPLUNC1の強度を標準化した平均デンシティメトリー。 $n = 6$ / 群。(C) SPLUNC1(-/-)、及びSPLUNC1(+/-)同腹仔コントロールを対象としたメタコリン誘発試験後のFlexiventによる末梢気道抵抗の評価。総気道抵抗は、 $\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{s} / \text{ml}$ として表す。*は、コントロールと比較して $P < 0.05$ で異なることを示す。(D)気管軟骨輪(Tracheal ring)($n = 6$ / 遺伝子型)をSPLUNC1(+/-)及びSPLUNC1(-/-)マウスから取り出し、そしてワイヤーミオグラフシステム上に取り付けた。静止条件及びKC1及びAchを用いた作動薬誘発条件の両方の条件下で収縮力を測定した。(E)作動薬を添加する1時間前、浴槽へのSPLUNC1添加前及び後に収縮力を測定した(すべて $n = 6$)。#及び*は、 $P < 0.05$ を示し、##及び**は、 $P < 0.01$ を示し、###は、 $P < 0.001$ を示す。

【図2】図2A～2Dは、SPLUNC1が、ミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化を抑制することにより気道平滑筋(ASM)の収縮性を減少させることを示す図である。Ex vivoでの気管軟骨輪収縮をワイヤーミオグラフィーにより測定した。24ウェルプレート中のタイプIコラーゲンマトリックス内でヒトASMを増殖させた。Ach及びSPLUNC1有り又は無しの条件でゲルの収縮を測定した。(A)表示する時点におけるゲル収縮アッセイの代表的な画像。(B)60分の時点におけるゲル表面積の減少(%)として表した収縮データの要約($n = 3$)。(C)総MLC及びリン酸化されたMLCについてプローブした代表的な免疫プロット。(D)(C)から取得された平均デンシティメトリー($n = 3$)。*は、 $P < 0.05$ を示し、**は、 $P < 0.01$ を示す。

【図3】図3A～3Dは、アセチルコリン(Ach)が、ミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化を増加させる一方、SPLUNC1がMLCのリン酸化を用量に依存して減少させることを示す図である。(A)AchがMLCのリン酸化を用量に依存して増加させることを示す代表的な免疫プロット。(B)(A)から得た免疫プロットの強度を、ImageJを使用して定量化し、GAPDHに対して標準化し、そして相対強度として表した($n = 3$)。(C)リン酸化されたMLC抗体を用いて探査した代表的な免疫プロット。(D)(A)から得た免疫プロットの強度を、ImageJを使用して定量化し、GAPDHに対して標準化し、そして相対強度として表した($n = 3$)。*は、 $P < 0.05$ を示し、**は、 $P < 0.01$ を示す。

【図4】図4A～4Hは、SPLUNC1が、基底部において分泌され、またASMにおいてストア感受性の Ca^{2+} 流入をブロックすることを示す図である。(A)健康及び喘息性のHBECKから得られたSPLUNC1を示す代表的な免疫プロット。(B)(A)から得た平均デンシティメトリー。(C)fura-2を使用した Ca^{2+} 画像の代表的なトレース。正常及び喘息性のHBECKから得られた基底部培地(Basolateral media)を、ヒトASMと共に1時間にインキュベートした。(D)健康及び喘息性のHBECKからそれぞれ得られた培地と共にインキュベートしたASMのピーク蛍光強度比変化の要約($n = 3$ / 培養)。(E)SPLUNC1は、TGに誘発性された細胞基質の Ca^{2+} 増加を用量に依存して阻害する。ASMを、表示の濃度のSPLUNC1と共にインキュベートし、そしてfura-2発光強度比の変化を経時的にプロットした。データを相対変化(F/F_0)で表し、 F_0 は0時点におけるROIの平均蛍光強度(340 / 380)であった。合計20個の細胞 / カバースリップを記録した。 F/F_0 は、3回の独立した実験の平均ピーク蛍光強度変化を表す。(F)fura-2を使用した Ca^{2+} 画像の代表的なトレース。EGTAを使用して細胞外 Ca^{2+} をキレート化した。サプシガルジン(TG)を最初に添加して、SRから Ca^{2+} を放出させた。

10

20

30

40

50

次に、 Ca^{2+} 流入を引き起こす契機となるように、 Ca^{2+} を表示する時点においてバッファーに再度添加した。(G) TG 及び細胞外 Ca^{2+} が存在する場合のピーク蛍光強度比変化の要約($n = 3$)。(H) ASM Cを、トランケーションされた異なる SPLUNC1ペプチドと共に事前インキュベートしたときのピーク蛍光強度比変化の要約($n = 3$ / 群)。 $*$ は、 $P < 0.05$ を示し、 $**$ は、 $P < 0.01$ を示す。

【図5】喘息性のヒト気管支上皮培養物におけるSPLUNC1 mRNAの減少を示す図である。HBE C由来の全RNAを抽出し、そしてSPLUNC1のmRNAレベルを、qRT-PCRにより測定した($n = 3$)。 $*$ は、 $P < 0.05$ を示す。

【図6】図6A～6Bは、SPLUNC1が、TGの存在下で、細胞基質 Ca^{2+} の上昇を抑制することを示す図である。(A) Ca^{2+} 画像の代表的なトレース。SPLUNC1を、ASM C及びfura-2と共に1時間インキュベートした。fura-2発光強度比を次に経時的に記録した。(B)(A)のピーク蛍光強度比変化の要約($n = 3$)。 $*$ は、 $P < 0.05$ を示す。

【図7】図7A～7Hは、SPLUNC1が、Orai1と相互作用することによりSOCEを調節することを示す図である。(A)及び(B)免疫沈降分析を、V5-SPLUNC1及びHA-Orai1でコトランスフェクトしたHEK293T細胞に由来する細胞ライセートを使用して実施した。HA-Orai1をV5-SPLUNC1によりブルダウンした。V5-SPLUNC1を、HEK293T細胞ライセート中のHA-Orai1によりブルダウンした。データは、1条件当たり3回の独立した免疫沈降を表す。(C) ASM C中のHA-タグ化Orai1、及びDyLight 594標識SPLUNC1の基底状態枯渇式超解像度画像(Ground state depletion super-resolution imag)。スケールバーは $2.5\mu\text{m}$ 。(E)ヒトASM CをSPLUNC1と共にインキュベートし、その後表面ビオチン化、及び表示の抗体を使用した免疫プロットを行った。(F)原形質膜及び総Orai1/GAPDHの平均デンシティメトリーを相対強度として表した($n = 3$)。(G)ヒトASM Cにコントロール及びOrai1のshRNAをそれぞれトランスフェクトした。Orai1のmRNAレベルをqRT-PCRにより測定した。(G)fura-2を使用した Ca^{2+} 画像の代表的なトレース。ヒトASM Cにコントロール及びOrai1のshRNAを、それぞれ72時間トランスフェクトした。fura-2発光強度比を、次に経時的に記録した。(H) TG存在下でのピーク蛍光強度比変化の要約($n = 3$ / 群)。 $*$ は、 $P < 0.05$ を示し、 $**$ は、 $P < 0.01$ を示し、 $***$ は、 $P < 0.001$ を示す。

【図8】SPLUNC1はTRPC3と相互作用しないことを示す図である。V5-SPLUNC1及びMyo-c-TRPC3でコトランスフェクトしたHEK293T細胞から得た細胞ライセートを使用して、免疫沈降分析を実施した。データは、 $n = 3$ のプロットを表す。

【図9】図9A～9Bは、Orai1はSPLUNC1で処理した後に内部移行することを示す図である。(A) SPLUNC1が存在する場合又はしない場合のOrai1の細胞局在を、共焦点顕微鏡により検出した。(B) SPLUNC1が存在する場合のYFP-Orai1内部移行のタイムコース。両方の図のスケールバーは、 $50\mu\text{m}$ を示す。

【図10】Orai1が、タンパク質レベルでノックダウンされることを示す図である。Orai1 shRNAが、ヒトASM CにおいてOrai1タンパク質の発現を減少させることを示す代表的な免疫プロット。

【図11】図11A～11Bは、shRNAを使用してOrai1をノックダウンすると、SPLUNC1のASM Cメンブレンへの結合が減少することを示す図である。(A)ヒトASM Cに、スクランブル化コントロールshRNA及びOrai1 shRNAを、それぞれ72時間トランスフェクトした。SPLUNC1が存在する場合又はしない場合で細胞をインキュベートし、その後表面ビオチン化、及び表示の抗体を使用して免疫プロットを行った。(B)(A)から得た免疫プロットの強度を、ImageJを使用して定量化し、GAPDHに対して標準化し、そして相対強度として表した($n = 3$)。 $*$ は、 $P < 0.05$ を示す。

10

20

30

40

50

【図12】図12A～12Bは、Orai1をノックダウンすると、蛍光性SPLUNC1のASMCへの結合が減少することを示す図である。(A) SPLUNC1を、Dylight-633で標識した。ヒトASMCに、スクランブル化コントロールshRNA及びOrai1 shRNAをそれぞれトランスフェクトした。トランスフェクションから72時間後、細胞を、SPLUNC1-Dylight633を用い、又は用いないで1時間処理し、次に氷冷リンガー溶液で5回洗浄した。Leica SP8を使用して蛍光画像を取得した。スケールバーは75μmを示す。(B) ASMCが結合したSPLUNC1-Dylight633を、蛍光プレートリーダーにより検出した。また、細胞数のコントロールとして、細胞のカルセイン染色も行った。相対蛍光強度を、Dylight633をカルセインに対して標準化することにより計算した。

【図13】SPLUNC1に由来するペプチドは、ヒト気道平滑筋においてサブシガルジン誘発型Ca²⁺放出を阻害することを示す図である。ASMにfurax-AMを負荷し、そして落射蛍光顕微鏡法を使用して、蛍光(F340/F380)の変化を、細胞基質Ca²⁺変化の指標として経時的に測定した。すべてn=3。

【図14】HEK293T細胞において、6ペプチドがサブシガルジン誘発型Ca²⁺シグナリングを阻害することを示す図である。384ウェルプレート中で培養したHEK293T細胞にF1uo4を負荷し、そしてTecanプレートリーダーを使用して蛍光の変化を取得した。完全長SPLUNC1、並びに短い及び長い6ペプチドについて全用量応答を取得した。すべての実験を個別に3回実施した。

【図15】吸入された6ペプチドが、アレルギー性マウスマodelの肺内の炎症細胞数を低下させることを示す図である。SPLUNC1-/-ノックアウトマウスを、0日目及び14日目において、2μgのチリダニ抽出物(HDM)に最初に鼻腔内感作させた。以後、14日目～17日目において、該マウスについて、HDM、20μgで鼻腔内誘発試験を行った。一部のマウスを、15日目及び16日に、320μMの6ペプチドを含むPBSで処理した。気管支肺胞の洗浄物を取得し、そして種類別細胞数計測(differential cell count)を実施した。棒グラフは、総細胞数計測結果、並びにコントロール(ナイープ)、チリダニ(HDM)、及びHDM/6ペプチドの各条件下で規定された個々の細胞集団に関する結果を示す。

【図16】吸入された6ペプチドが、アレルギー性マウスマodelにおいて血中IgEレベルを低下させることを示す図である。SPLUNC1-/-ノックアウトマウスを、0日目及び14日目において、2μgのチリダニ抽出物(HDM)に最初に鼻腔内感作させた。以後、14日目～17日目において、該マウスについて、HDM、20μgで鼻腔内誘発試験を行った。一部のマウスを、15日目及び16日に、320μMの6ペプチドを含むPBSで処理した。血清を次に取得し、そしてHDM特異的IgEレベルを、ELISAにより測定した。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の好ましい実施形態を表す添付図面を参照しながら、本発明は、ここでより詳細に記載される。しかし、本発明は、様々な形態で具体化可能であり、また本明細書に記載する実施形態に限定されるものと解釈してはならない。むしろ、このような実施形態は、本開示が網羅的且つ完全であり、そして当業者に対して本発明の範囲を十分に伝達するよう提示される。

【0022】

別途定義されなければ、本明細書で使用されるすべての技術的及び科学的用語は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解される意味と同一の意味を有する。本発明の説明で使用される用語は、本明細書では、特定の実施形態を記載する目的に限定され、本発明を制限するように意図されない。本明細書で引用されたすべての刊行物、特許出願、特許、特許公開、及びその他の参考文献は、参照を表す文及び/又はパラグラフに関連する教示のため、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0023】

文脈が別途示唆しない限り、本明細書に記載する本発明の様々な特性は、任意の組合せで利用可能であることが特に意図される。

【0024】

更に、本発明は、本発明のいくつかの実施形態において、本明細書に記載する任意の特性又は特性の組合せが除外又は省略可能であることについても検討する。

【0025】

説明を目的としたとき、複合物が構成要素A、B、及びCを含む、と本明細書が記載する場合、A、B、若しくはCのいずれか又はその組合せは省略可能であり、また単独で又は任意の組合せで除外可能であることが特に意図される。

【0026】

本明細書に記載されるすべての刊行物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0027】

アミノ酸は、本明細書では、IUPAC-IUB生化学命名委員会により推奨される方 10 式で表される、又は（アミノ酸の場合）1文字コード若しくは3文字コードのいずれかにより表され、いずれの場合も、米国特許法施行規則第1.822条及び確立された利用法に基づく。

【0028】

本発明の明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」には、文脈において別途明示されない限り、複数形も含まれるように意 20 図される。

【0029】

また、本明細書で用いる場合、「及び／又は」とは、列挙されている関連事項のうちの1つ又は複数のあらゆるすべての可能性がある組合せ、並びに二者択一的用語（「又は」）で解釈したときには、組合せになっていないことを意味し、それを含む。

【0030】

用語「約」は、本明細書で使用する場合、測定可能な数値、例えばポリペプチドの量、用量、時間、温度、酵素活性、又はその他の生物学的活性等を指すとき、所定の量の±20%、±10%、±5%、±1%、±0.5%の変動、又は±0.1%の変動さえも含むように意図されている。

【0031】

用語「から実質的に構成される」（及び文法的变形形態）は、本発明のペプチド配列に適用される場合、列挙した配列（例えば、配列番号）、及びペプチドの機能が顕著に変化しないような、列挙した配列のN末端及び／又はC末端に位置する合計10個以下（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10）の追加のアミノ酸の両方から構成されるペプチドを意味する。合計10以下の追加のアミノ酸には、合算した両方の末端部に位置する追加のアミノ酸の合計数が含まれる。用語「顕著に変化した」とは、本発明のペプチドに適用される場合、列挙した配列からなるペプチドの活性と比較して、少なくとも約50%又はそれ以上の結合活性（例えば、カルシウムチャネルに対する）の増加又は減少を意味する。

【0032】

用語「調節する（modulate）」、「調節する（modulates）」、又は「調節（modulation）」とは、所定のレベル又は活性における強化（例えば、増加）又は阻害（例えば、減少）を意味する。

【0033】

用語「強化する」又は「増加する」とは、所定のパラメーターの少なくとも約1.25倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、12倍の増加、又は15倍の増加さえも意味する。

【0034】

用語「阻害する」又は「低下させる」又はその文法的变化形は、本明細書で使用する場

10

20

30

40

50

合、所定のレベル又は活性の少なくとも約15%、25%、35%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、95%、又はそれ以上の減少又は減退を意味する。特定の実施形態では、阻害又は低下はほとんどない又は実質的に検知不可能な活性（最大でも、無視し得る量、例えば、約10%未満又は更には5%未満）に至る。

【0035】

用語「接触」又はその文法的变化形は、ポリペプチドとカルシウムチャネルについて使用される場合、ポリペプチドとカルシウムチャネルを、一方が他方に対して生物学的効果を発揮するように相互に十分に接近した状態にすることを意味する。いくつかの実施形態では、接触という用語は、ポリペプチドがカルシウムチャネルと結合することを意味する。10

【0036】

用語「治療する」、「治療すること」、又は「の治療」とは、対象の状態の重症度が低下する、又は少なくとも部分的に改善若しくは改変し、そして少なくとも1つの臨床症状の若干の軽減、緩和、又は減少を実現することを意図する。

【0037】

用語「予防する」、「予防すること」、及び「予防」（及びその文法的变化形）とは、対象内での疾患、障害、及び／又は臨床症状（複数可）の発現の予防及び／又は遅延、並びに／或いは本発明の方法が存在しない場合に生ずるものと比較して、疾患、障害、及び／又は臨床症状（複数可）の発現の重症度における低下を意味する。予防は、完全であり得る、例えば疾患、障害、及び／又は臨床症状（複数可）が完全に存在しない。また、予防は、対象内での疾患、障害、及び／又は臨床症状（複数可）の発生及び／又は発現の重症度が、本発明の方法が存在しない場合に生ずるものよりも少なくなるように部分的であり得る。20

【0038】

「治療上有効な」量は、本明細書で使用する場合、対象にある程度の改善又は利益をもたらす量である。言い換えれば、「治療上有効な」量は、対象内の少なくとも1つの臨床症状において、ある程度の軽減、緩和、又は減少をもたらす量である。当業者は、ある程度の利益が対象にもたらされる限り、治療効果は完全又は根治的である必要はないと認識する。

【0039】

「予防上有効な」量は、本明細書で使用する場合、対象内での疾患、障害、及び／又は臨床症状の発現を予防する及び／又は遅延させる、並びに／或いは本発明の方法が存在しない場合に生ずるものと比較して、対象内での疾患、障害、及び／又は臨床症状の発現の重症度を低下及び／又は遅延させるのに十分な量である。当業者は、ある程度の利益が対象にもたらされる限り、予防のレベルは完全である必要はないと認識する。30

【0040】

用語「断片」は、ペプチドに適用される場合、参照ペプチド又はアミノ酸配列と比較して長さが短縮したアミノ酸配列であり、また参照ペプチド又はアミノ酸配列と同一の連続したアミノ酸のアミノ酸配列を含む、実質的にそれから構成される、及び／又はそれから構成されるアミノ酸配列を意味すると理解される。本発明によるそのようなペプチド断片は、該当する場合には、ペプチド断片がその構成成分であるより大きなポリペプチドに含まれる可能性がある。いくつかの実施形態では、そのような断片は、本発明によるペプチド又はアミノ酸配列の、長さが少なくとも約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又はそれより長い連続したアミノ酸を有するペプチドを含み得る、それから実質的に構成され得る、及び／又はそれから構成され得る。その他の実施形態では、そのような断片は、本発明によるペプチド又はアミノ酸配列の、長さが約15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4未満、又はそれより短い連続したアミノ酸を有するペプチドを含み得る、それから実質的に構成され得る、及び／又はそれから構成され得る。40

【0041】

10

20

30

40

50

本明細書で用いる場合、用語「タンパク質」及び「ポリペプチド」は、交換可能に使用され、並びに別途明記しない限り、ペプチド及びタンパク質の両方を含む。

【0042】

ポリペプチドの「N末端」は、N末端アミノ酸残基から開始し、そして最長ポリペプチドの中央まで連続するポリペプチドの任意の部分である。

【0043】

ポリペプチドの「C末端」は、C末端アミノ酸残基から開始し、そして最長ポリペプチドの中央まで連続するポリペプチドの任意の部分である。

【0044】

「融合タンパク質」は、天然では共に融合することが見出されていない2つ（又はそれ以上）の異なるポリペプチドをコードする2つの非相同的ヌクレオチド配列又はその断片が、正しい翻訳リーディングフレーム内で共に融合したときに生成されるポリペプチドである。実例的な融合ポリペプチドとして、本発明のペプチド（又はその断片）と、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、又はレポータータンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、-グルクロニダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等）、赤血球凝集素、c-myc、FLAGエピトープ等の全部若しくは一部との融合が挙げられる。

10

【0045】

本明細書で用いる場合、「機能的な」ペプチド又は「機能的な断片」とは、ペプチド（例えば、カルシウムチャネルに結合する又はそれを阻害する）と通常関連した少なくとも1つの生物学的活性を実質的に保持するものである。特定の実施形態では、「機能的な」ペプチド又は「機能的な断片」は、未修飾のペプチドが有する活性のすべてを実質的に保持する。生物学的活性を「実質的に保持する」とは、ペプチドが、天然のポリペプチドの生物学的活性の少なくとも約50%、60%、75%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又はそれ以上を保持する（そして天然のペプチドよりも高い活性レベルを有する可能性さえある）ことを意味する。「非機能的」ペプチドとは、ペプチドと通常関連した生物学的活性をほとんど示さない又は実質的に検知不可能なものである（例えば、最大でも、無視し得る量に過ぎない、例えば、約10%未満又は更には5%未満）。生物学的活性、例えばタンパク質結合活性及びカルシウムチャネル阻害活性等は、当技術分野において周知されており、また本明細書に記載するようなアッセイ法を使用して測定可能である。

20

【0046】

本明細書で用いる場合、「核酸」、「ヌクレオチド配列」、及び「ポリヌクレオチド」は、交換可能に使用され、またRNA及びDNAの両方を含み、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、合成（例えば、化学的に合成された）DNA又はRNA、並びにRNA及びDNAのキメラ体が挙げられる。核酸という用語は、鎖の長さに関わらずヌクレオチドの鎖を意味する。核酸は、二本鎖又は一本鎖であり得る。一本鎖の場合、核酸は、センス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。核酸は、オリゴヌクレオチド類似体又は誘導体（例えば、イノシン又はホスホロチオエートヌクレオチド）を使用して合成可能である。そのようなオリゴヌクレオチドは、例えば、塩基対形成能力が変化した、又はヌクレアーゼに対する耐性が高まった核酸を調製するのに利用可能である。本発明は、本発明の核酸又はヌクレオチド配列の相補体である（完全な相補体又は部分的な相補体であり得る）核酸を更に提供する。

30

【0047】

「単離されたポリヌクレオチド」は、その起源とする生物の天然のゲノムにおいて、直近で連続するヌクレオチド配列（5'末端に位置する配列、及び3'末端に位置する配列）とは直近で連続していないヌクレオチド配列（例えば、DNA又はRNA）である。従って、1つの実施形態では、単離された核酸は、コーディング配列の直近で連続する5'非コーディング（例えば、プロモーター）配列の一部又は全部を含む。従って、該用語には、例えば、ベクターに、自律複製プラスミド若しくはウイルスに、又は原核生物若しく

40

50

は真核生物のゲノムDNAに組み込まれる、或いはその他の配列とは独立している別個の分子（例えば、PCR又は制限エンドヌクレアーゼ処理により生成するcDNA又はゲノムDNA断片）として存在する組換えDNAが含まれる。該用語には、追加のポリペプチド又はペプチド配列をコードするハイブリッド核酸の一部である組換えDNAも含まれる。遺伝子を含む単離されたポリヌクレオチドは、そのような遺伝子を含む染色体の断片ではなく、むしろ遺伝子と関連したコード領域及び制御領域を含むが、染色体上に天然に見出される追加の遺伝子は含まない。

【0048】

用語「単離された」とは、細胞物質、ウイルス性物質、及び／又は培養培地（組換えDNA技術により生成される場合）、或いは化学的前駆体又はその他の化学物質（化学的に合成される場合）を実質的に含まない核酸、ヌクレオチド配列、又はポリペプチドを意味し得る。更に、「単離された断片」とは、断片として天然ではなく、また天然の状態では見出されない核酸、ヌクレオチド配列、又はポリペプチドの断片である。「単離された」とは、調製物が技術的に純粋（均質）であることを意味するのではなく、それが、意図した目的に沿って利用可能な形態でポリペプチド又は核酸を提供するのに十分純粋であることを意味する。

【0049】

単離された細胞とは、その天然の状態で通常関連するその他の構成要素から分離した細胞を意味する。例えば、単離された細胞は、本発明の培養培地内の細胞及び／又は薬学的に許容される担体内の細胞であり得る。従って、単離された細胞は、対象に送達及び／又は導入され得る。いくつかの実施形態では、単離された細胞は、対象から取り出され、そして本明細書に記載するようにex vivoで操作され、次に対象に戻される細胞であり得る。

【0050】

「ベクター」は、核酸を細胞にクローニング及び／又は移すための任意の核酸分子である。ベクターは、別のヌクレオチド配列が連結し、連結したヌクレオチド配列の複製を可能にし得るレプリコンであり得る。「レプリコン」は、in vivoでの核酸複製における自律的な単位として機能する、すなわちそれ自体の管理下で複製する能力を有する任意の遺伝的要素（例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、染色体、ウイルスゲノム）であり得る。用語「ベクター」には、核酸を細胞にin vitro、ex vivo、及び／又はin vivoで導入するための、ウイルス性及び非ウイルス性（例えば、プラスミド）の核酸分子の両方が含まれる。当技術分野において公知の多数のベクターが、核酸の操作、応答エレメント及びプロモーターの遺伝子への組込み等に利用可能である。例えば、応答エレメント及びプロモーターに対応する核酸断片を適するベクターに挿入する場合、該挿入は、該当する核酸断片を相補的な付着末端を有する選択したベクターにライゲートすることにより実現し得る。或いは、核酸分子の末端部は酵素的に改変され得る、又は任意の部位が、ヌクレオチド配列（リンカー）を核酸末端にライゲートすることにより生成され得る。そのようなベクターは、ベクターを含む、及び／又はベクターの核酸を細胞ゲノムに組み込んだ細胞について、その選択を可能にする選択マーカーをコードする配列を含むように遺伝子工学的に改変され得る。そのようなマーカーは、マーカーによりコードされるタンパク質を組み込み、そして発現する宿主細胞の同定及び／又は選択を可能にする。「組換え」ベクターとは、1つ又は複数の非相同的ヌクレオチド配列（すなわち、導入遺伝子）、例えば2、3、4、5つ、又はそれ以上の非相同的ヌクレオチド配列を含む、ウイルス性又は非ウイルス性のベクターを意味する。

【0051】

ウイルスベクターは、細胞、並びに生きている動物対象において、多種多様な遺伝子送達用途で使用してきた。利用可能なウイルスベクターとして、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ関連ウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、エピスタン・バーウイルス、及びアデノウイルスの各ベクターが挙げられるが、但しこれらに限定されない。非ウイルス性ベクタ

10

20

30

40

50

ーとして、プラスミド、リボソーム、荷電性脂質（サイトフェクチン）、核酸・タンパク質複合体、及びバイオポリマーが挙げられる。目的とする核酸に付加して、ベクターは、1つ又は複数の制御領域、及び／又は核酸移送結果（特定の組織への送達、発現期間等）の選択、測定、及びモニタリングにおいて有用な選択マーカーも含み得る。

【0052】

ベクターは、当技術分野において公知の方法、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、微量注射、形質導入、細胞融合、D E A E デキストラン、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション（リソソーム融合）、遺伝子銃の使用、又は核酸ベクタートランスポーターにより、所望の細胞に導入され得る（例えば、W u ら、J . B i o l . C h e m . , 2 6 7 卷 : 9 6 3 頁 (1 9 9 2 年) ; W u ら、J . B i o l . C h e m . , 2 6 3 卷 : 1 4 6 2 1 頁 (1 9 8 8 年) ; 及び H a r t m u t ら、1 9 9 0 年 3 月 1 5 日に出願のカナダ国特許出願第 2 , 0 1 2 , 3 1 1 号を参照）。 10

【0053】

様々な実施形態では、その他の分子、例えばカチオン性オリゴペプチド（例えば、国際公開第 W O 9 5 / 2 1 9 3 1 号）、核酸結合タンパク質に由来するペプチド（例えば、国際公開第 W O 9 6 / 2 5 5 0 8 号）、及び／又はカチオン性ポリマー（例えば、国際公開第 W O 9 5 / 2 1 9 3 1 号）等が、in vivoでの核酸の送達を円滑化するのに利用可能である。

【0054】

ネイキッド核酸としてin vivoでベクターを導入することも可能である（米国特許第 5 , 6 9 3 , 6 2 2 号、同第 5 , 5 8 9 , 4 6 6 号、及び同第 5 , 5 8 0 , 8 5 9 号を参照）。受容体媒介型の核酸送達アプローチも利用可能である（C u r i e l ら、H u m . G e n e T h e r . , 3 卷 : 1 4 7 頁 (1 9 9 2 年) ; W u ら、J . B i o l . C h e m . , 2 6 2 卷 : 4 4 2 9 頁 (1 9 8 7) ）。 20

【0055】

用語「トランスフェクション」又は「形質導入」とは、細胞による外因性又は非相同性の核酸（R N A 及び／又はD N A ）の取り込みを意味する。外因性又は非相同性の核酸が細胞内部に導入又は送達されたとき、細胞はそのような核酸により「トランスフェクト」又は「形質導入」される。トランスフェクト又は形質導入された核酸が、細胞の表現型変化及び／又は細胞の活性若しくは機能の変化をもたらすとき、細胞は外因性又は非相同性の核酸により「形質転換」される。形質転換した核酸は、細胞のゲノムを構成する染色体D N A に組み込まれ得る（共有結合し得る）、又は安定なプラスミドとして存在し得る。 30

【0056】

ポリヌクレオチドコーディング配列を「発現する」又はその「発現」という用語は、配列が転写され、そして任意選択的に翻訳されることを意味する。典型的には、本発明によれば、本発明のコーディング配列の発現は、本発明のポリペプチドの產生を引き起す。完全に発現したポリペプチド又は断片は、精製されていない未処理細胞内でも機能し得る。

【0057】

本発明の第1の態様は、本明細書に開示する方法を実施するのに利用可能である生成物に関する。従って、本発明の1つの態様は、S P L U N C 1 タンパク質、又はその機能的な断片若しくはホモログのカルシウムチャネル結合ドメインを含む、それから実質的に構成される、又は構成されるポリペプチドに関する。いくつかの実施形態では、カルシウムチャネルは、O r a i 1、例えばヒトO r a i 1である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ヒトS P L U N C 1 タンパク質の機能的な断片又はそのホモログである。 40

【0058】

代表的な実施形態では、ポリペプチドは、カルシウムチャネル結合ドメインを含む、それから実質的に構成される、又はそれから構成されるS P L U N C 1 の断片である。いくつかの実施形態では、S P L U N C 1 タンパク質の断片は、S P L U N C 1 タンパク質の公知のアミノ酸配列（例えば、ジェンバンクで開示され、また本明細書に開示されるよう

10

20

30

40

50

な)を含む、それから実質的に構成される、又はそれから構成される。別の実施形態では、SPLUNC1タンパク質の断片は、公知のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%同一である、例えば少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を含む、それから実質的に構成される、又はそれから構成される。

【0059】

ヒトSPLUNC1(配列番号1)のアミノ酸配列を下記に開示する。43個のアミノ酸によって隔てられ、そして活性にとって重要と考えられる保存性のシステイン残基を示す。

【0060】

SPLUNC1

【化1】

10	20	30	40	50	60	
MFQTGGGLIVF YGLLAQTM AQ FGGLPVPLDQ TLPLNVNPAL PLSPTGLAGS LTNALSNGLL						
70	80	90	100	110	120	
SGGLLGILEN LPLL DILKPG GGTSGGLLGG LLGKVTSVIP GLNNIIDIKV TDPQLLELGL						
130	140	150	160	170	180	
VQSPDGHR LY VTIPLGIKL Q VNTP LVGASL LRLAVKLDIT AEILAVRDK Q ERIHLV LGD C						
190	200	210	220	230	240	
THSPGSLQIS LLDGLGPLPI QGLLDSL TGI LNKVLPELV Q GNVCPLVNEV LRGLDITLVH						
250						
DIVNMLIHGL QFVIKV						

【0061】

本発明のポリペプチドは、SPLUNC1のカルシウムチャネル結合ドメインの機能的な部分、又は断片も含む。ポリペプチドの生物学的活性(例えば、カルシウムチャネル結合活性)を実質的に保持する限り、断片の長さは重要ではない。実例的な断片は、SPLUNC1タンパク質の少なくとも約4、6、8、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200個、又はそれ以上の連続したアミノ酸を含む。その他の実施形態では、断片は、SPLUNC1タンパク質の約200、150、100、75、50、45、40、35、30、25、20、15、12、10、8、6、又は4個以下の連続したアミノ酸を含む。特定の実施形態では、断片は、約5～約30個のアミノ酸、約5～約25個のアミノ酸、約5～約20個のアミノ酸、約10～約30個のアミノ酸、約10～約25個のアミノ酸、約10～約20個のアミノ酸、約15～約30個のアミノ酸、約15～約25個のアミノ酸、又は約15～約20個のアミノ酸である。

【0062】

1つの実施形態では、断片は、SPLUNC1のC末端、例えば100個又はそれ未満のC末端アミノ酸残基、例えば100、90、80、70、60、50、45、40、35、30、25、20、15、10個、又はそれ未満のC末端アミノ酸残基を含む、それから実質的に構成される、又はそれから構成される。

【0063】

1つの実施形態では、機能的な断片は、ヒトSPLUNC1のアミノ酸235～256に対応するアミノ酸配列DITLVHDIVNMLIHGLQFVIKV(配列番号2)、或いはそれに対して少なくとも70%の配列同一性、例えば、それに対して少なくとも

10

20

30

40

50

75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又はその機能的な断片若しくはホモログを含む、それから実質的に構成される、又はそれから構成される。その他の実施形態では、機能的な断片は、ヒトSPLUNC1のアミノ酸235～249に対応するアミノ酸配列DITLVHDIVNMLIHG（配列番号3）、或いはそれに対して少なくとも70%の配列同一性、例えば、それに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又はその機能的な断片若しくはホモログを含む、それから実質的に構成される、又はそれから構成される。

【0064】

同様に、当業者は、本発明は、SPLUNC1タンパク質の断片を含む融合ポリペプチド（及びそれをコードするポリヌクレオチド配列）も含むものと認識する。例えば、市販の抗体（例えば、FLAGモチーフ）により認識され得る融合タンパク質として、又はさもなければより容易に精製可能である（例えば、ポリ-Hisテールの付加により）融合タンパク質としてポリペプチド（若しくは機能的な断片）を発現することが有用であり得る。更に、ポリペプチドの安定性を強化する融合タンパク質、例えばマルトース結合タンパク質（MBP）又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼを含む融合タンパク質が生成可能である。別の代替案として、融合タンパク質は、レポーター分子を含み得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、ポリペプチドの活性と同一の又は異なる機能又は活性、例えば、標的、結合、若しくは酵素活性、又は機能を提供するポリペプチドを含み得る。

【0065】

同様に、本明細書に特に開示されるポリペプチドは、アミノ酸配列内の置換（例えば、保存的な置換）に対して一般的に耐性を有し、そして生物学的活性を実質的に保持するものと理解される。本明細書に特に開示されるポリペプチド以外の本発明のポリペプチドを同定するには、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性又は相違、例えば、疎水性、親水性、電荷、サイズ等を含む当技術分野において公知の任意の特徴に基づくことができる。

【0066】

本明細書に開示されるアミノ酸置換以外のアミノ酸置換は、下記のコドン表に基づき、DNA配列（又はRNA配列）のコドンを変化させることにより達成され得る。

【0067】

10

20

30

【表1】

表1

アミノ酸			コドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCT		
システイン	Cys	C	TGC	TGT				
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAT				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				
フェニルアラニン	Phe	F	TTC	TTT				
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGT		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAT				
イソロイシン	Ile	I	ATA	ATC	ATT			
リジン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	TTA	TTG	CTA	CTC	CTG	CTT
メチオニン	Met	M	ATG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAT				
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCT		
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGT
セリン	Ser	S	AGC	ACT	TCA	TCC	TCG	TCT
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACT		
バリン	Val	V	GTA	GTC	GTG	GTT		
トリプトファン	Trp	W	TGG					
チロシン	Tyr	Y	TAC	TAT				

【0068】

本明細書に特に開示されるポリペプチド以外のポリペプチドをコードするアミノ酸配列を同定する際には、アミノ酸のハイドロパシーインデックス(hyddropathy index)が検討され得る。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与する際に、ハイドロパシーアミノ酸指標(hydropathy amino acid index)が重要であることは当技術分野において一般的に理解されている(Kyte及びDoolittle, J. Mol. Biol., 157巻: 105頁(1982年)を参照。引用することにより本明細書の一部をなすものとする)。アミノ酸の相対的なハイドロパシー特性が、得られるタンパク質の二次構造に寄与し、次にそれは、タンパク質とその他の分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原等との相互作用を定義することが定説となっている。

【0069】

各アミノ酸には、その疎水性及び電荷特性に基づいてハイドロパシーインデックスが指定されており(Kyte及びDoolittle、前出)、イソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン/シスチン(+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); トレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン(-1.6); ヒスチジン(-3.2); グルタミン酸(-3.5); グルタミン(-3.5); アスパラギン酸(-3.5); アスパラ

10

20

30

40

50

ギン(- 3 . 5) ; リジン(- 3 . 9) ; 及びアルギニン(- 4 . 5)である。

【 0 0 7 0 】

従って、本明細書に特に開示されるポリペプチドを改変する際には、アミノ酸（又はアミノ酸配列）のハイドロパシーインデックスが検討され得る。

【 0 0 7 1 】

アミノ酸の置換は、親水性に基づいてなされ得ることも、当技術分野において理解されている。米国特許第4,554,101号（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）では、タンパク質の局所的親水性の最大平均値は、その隣接したアミノ酸の親水性により支配される場合、タンパク質の生物学的特性と相関関係を有することについて記載する。

10

【 0 0 7 2 】

米国特許第4,554,101号に詳記されるように、下記の親水性値がアミノ酸残基に割り振られている。アルギニン(+ 3 . 0) ; リジン(± 3 . 0) ; アスパラギン酸(+ 3 . 0 ± 1) ; グルタミン酸(+ 3 . 0 ± 1) ; セリン(+ 0 . 3) ; アスパラギン(+ 0 . 2) ; グルタミン(+ 0 . 2) ; グリシン(0) ; トレオニン(- 0 . 4) ; プロリン(- 0 . 5 ± 1) ; アラニン(- 0 . 5) ; ヒスチジン(- 0 . 5) ; システイン(- 1 . 0) ; メチオニン(- 1 . 3) ; バリン(- 1 . 5) ; ロイシン(- 1 . 8) ; イソロイシン(- 1 . 8) ; チロシン(- 2 . 3) ; フェニルアラニン(- 2 . 5) ; トリプトファン(- 3 . 4)。

20

【 0 0 7 3 】

従って、本明細書に特に開示されるポリペプチド以外の追加のポリペプチドを同定する際に、アミノ酸（又はアミノ酸配列）の親水性が検討され得る。

【 0 0 7 4 】

本明細書で用いる場合、用語「ホモログ」は、天然のポリペプチドに対する軽微な改変により天然のポリペプチドと異なるが、天然のポリペプチドの生物学的活性を確実に保持する分子を指すのに使用される。軽微な改変には、1つ又はいくつかのアミノ酸側鎖の変化、1つ又はいくつかのアミノ酸に対する変更（欠損、挿入、及び／又は置換を含む）、1つ又はいくつかの原子の立体化学の変化、並びにメチル化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ミリストイル化、プレニル化、パルミトイル化、アミド化、及びグリコシルフォスファチジルイノシトールの付加を非限定的に含む、軽微な誘導体化が非限定的に含まれる。用語「実質的に保持する」とは、本明細書で用いる場合、天然のポリペプチドの活性（例えば、カルシウムチャネルに結合する又はそれを阻害する）の少なくとも約50%、例えば、約70%、80%、90%、又はそれ以上を保持するポリペプチドの断片、ホモログ、又はその他のバリアントを意味する。その他の生物学的活性は、ポリペプチドに応じて、pH感受性、酵素活性、受容体結合、リガンド結合、増殖因子の誘発、細胞シグナル伝達イベント等を含み得る。

30

【 0 0 7 5 】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えば、分解に対してポリペプチドを保護するために、少なくとも1つの改変された末端を含む。いくつかの実施形態では、N末端がアセチル化されており、及び／又はC末端はアミド化されている。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端及び／又はカルボキシル末端に1つ又は2つのD-アラニンを含む。

40

【 0 0 7 6 】

特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの非天然のアミノ酸（例えば、1、2、3個、若しくはそれ以上）、又は少なくとも1つの末端部の改変（例えば、1又は2個）を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、少なくとも1つの非天然のアミノ酸と少なくとも1つの末端部の改変を含む。

【 0 0 7 7 】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、SPLUNC1タンパク質のカルシウムチャネル結合ドメインを模倣する。カルシウムチャネル結合ドメインは、完全長SPLUNC1

50

タンパク質と実質的に同一であるカルシウムチャネルに対する結合活性を有することが必要とされるP L U N Cタンパク質の最低限の断片である。用語「実質的に同一の結合活性」とは、完全長タンパク質の結合活性の少なくとも約50%、例えば、結合活性の少なくとも約60%、70%、80%、又は90%を占める活性を意味する。いくつかの実施形態では、ペプチドは、少なくとも完全長S P L U N C 1タンパク質と同一の結合活性を有する。1つの実施形態では、カルシウムチャネルは、O r a i 1、例えば、ヒトO r a i 1である。別の実施形態では、カルシウムチャネルは、配列及び／又は構造がO r a i 1と類似したチャネルである。

【0078】

本発明の1つの態様は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のいくつかの実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、当業者にとって公知の標準条件下で、当技術分野において公知であるS P L U N C 1タンパク質又はその断片をコードする核酸配列とハイブリダイズし、また機能的なポリペプチド又はその機能的な断片をコードする。

10

【0079】

例えば、P L U N Cタンパク質又は本明細書に特に開示されるその機能的な断片をコードするポリヌクレオチド配列とのそのような配列のハイブリダイゼーションは、ストリンジエンシーが低下した条件、ストリンジエンシーが中程度の条件下、又は更にストリンジエントな条件下でも実施され得る（それぞれ、例えば、37、35～40%のホルムアミドを含む5×デンハート液、0.5%のSDS、及び1×SSPEの洗浄ストリンジエンシーにより表される条件；42、40～45%のホルムアミドを含む5×デンハート液、0.5%のSDS、及び1×SSPEの洗浄ストリンジエンシーにより表される条件；及び42、50%のホルムアミドを含む5×デンハート液、0.5%のSDS、及び1×SSPEの洗浄ストリンジエンシーにより表される条件）。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版（Cold Spring Harbor、NY、1989年）を参照。

20

【0080】

その他の実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、公知の核酸配列（ジェンバンクで開示されている）又はその機能的な断片と少なくとも約70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有し、そして機能的なポリペプチド又はその機能的な断片をコードする。

30

【0081】

更に、遺伝子コードの縮重に起因して、本発明のポリペプチド（及びその断片）をコードするポリヌクレオチド内に可変性が存在し得ることを当業者は認識する。異なる核酸配列が同一のポリペプチドをコードすることを可能にする遺伝子コードの縮重は、文献で周知されている（例えば、表1を参照）。

30

【0082】

当技術分野において公知なように、いくつかの異なるプログラムが、ポリヌクレオチド又はポリペプチドが既知の配列に対して配列同一性又は類似性を有するか同定するのに利用可能である。配列同一性又は類似性は、Smith及びWaterman, Adv. Appl. Math., 2巻: 482頁(1981年)の局所的配列同一性アルゴリズム(local Sequence identity algorithm)を含むがこれらに限定されない、当技術分野において公知の標準的な技術を使用して、Needleman及びWunsch, J. Mol. Biol., 48巻: 443頁(1970年)の配列同一性アライメントアルゴリズムにより、Pearson及びLipman, Proc. Natl. Acad. Sci., 米国、85巻: 2444頁(1988年)の類似性探索法により、このようなアルゴリズムのコンピューター化された導入(Wisconsin Genetics Software PackageのGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA、Genetics Computer Group社、575 Science Drive、Madison、WI)である、Devereu

40

50

xら、Nucl. Acid Res., 12巻:387頁(1984年)により記載され、好ましくはデフォルト設定を使用する、ベストフィット配列プログラム(Best Fit sequence program)により、又は検査により決定され得る。

【0083】

有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、プログレッシブ・ペアワイズアライメント(progressive, pairwise alignment)を使用して、関連する配列の群から多重配列アラインメントを構築する。PILEUPは、アライメントを構築するのに使用されるクラスター関係を表すツリーをプロットすることも可能である。PILEUPは、Feng及びDoollittle, J. Mol. Evol., 35巻:351頁(1987年)のプログレッシブアライメントを単純化した方法を使用する;この方法は、Higgins及びSharp, CABIOS, 5巻:151頁(1989年)により記載される方法と類似している。10

【0084】

有用なアルゴリズムの別の例として、Altschulら, J. Mol. Biol. 215巻:403頁(1990年), 及びKarlinら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80巻:5873頁(1993年)に記載されているBLASTアルゴリズムが挙げられる。特に有用なBLASTプログラムは、Altschulら, Meth. Enzymol., 266巻:460頁(1996年);blast.wustl/edu/blast/README.htmlから得られたWU-BLAST-2プログラムである。WU-BLAST-2は、好ましくはデフォルト値に設定されるいくつかのサーチパラメーターを使用する。該パラメーターは動的な数値であり、そして特定の配列の組成及び目的とする配列がサーチされる特定のデータベースの組成に依存してプログラムそのものにより規定される。但し、該数値は、感度を高めるために調整され得る。20

【0085】

追加の有用なアルゴリズムは、Altschulら、Nucleic Acids Res., 25巻:3389頁(1997年)により報告されたギャップ導入BLAST(gapped BLAST)である。

【0086】

アミノ酸配列同一性の割合(%)を表す数値は、一致する同一残基の数を、アライメントされた領域内の「より長い」配列の合計残基数で割り算することにより決定される。「より長い」配列は、アライメントされた領域内で最も多くの実質的な残基(most actual residues)を有する配列である(アライメントスコアを最大化するためにWU-Blast-2により導入されたギャップは無視される)。30

【0087】

同様に、核酸配列の同一性の割合(%)は、本明細書に開示のポリペプチドのコーディング配列に関して、本明細書に特に開示されるポリヌクレオチド内のヌクレオチドと同一の候補配列内のヌクレオチド残基の割合(%)として定義される。

【0088】

アライメントは、アライメントされる配列内へのギャップ導入を含み得る。更に、本明細書に特に開示されるポリペプチドよりも多くの、又は少ないアミノ酸を含む配列では、1つの実施形態では、配列同一性の割合(%)は、アミノ酸の合計数に関連して、同一アミノ酸の数に基づき決定されるものと理解される。従って、例えば、本明細書に特に開示される配列よりも短い配列の配列同一性は、1つの実施形態では、より短い配列内のアミノ酸の数を使用して決定される。同一性割合(%)の計算では、相対的な重みは、配列変異の様々な出現、例えば挿入、欠損、置換等に対して割り振られない。40

【0089】

1つの実施形態では、同一性のみがプラス(+1)にスコア化され、そしてギャップを含む配列変異のすべての形態に「0」の数値が割り振られ、これにより、以下に記載するように、配列類似性計算において、スケール又はパラメーターに重みを付ける必要性が回避される。配列同一性の割合(%)は、例えば、一致した同一残基数を、アライメントさ50

れた領域内の「より短い」配列の残基の合計数で割り算し、100倍することにより計算可能である。「より長い」配列は、アライメントされた領域内の最も多くの実質的な残基を有する配列である。

【0090】

当業者は、本発明のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドは、しかるべき発現制御配列、例えば、転写／翻訳制御シグナル、及びポリアデニル化シグナルと一般的に関連するものと認識する。

【0091】

様々なプロモーター／エンハンサー要素が、所望のレベル及び組織特異的発現に応じて利用可能であるものと更に認識される。プロモーターは、所望の発現パターンに応じて構成的又は誘導可能であり得る。プロモーターは、天然又は外来であり得、また天然の配列又は合成された配列であり得る。外来とは、転写開始領域が導入される野生型宿主において、該転写開始領域が見出されないことを意図する。目的とする標的細胞（複数可）内で機能するように、プロモーターは選択される。

10

【0092】

説明目的では、ポリペプチドコーディング配列は、サイトメガロウイルス（CMV）主要前初期プロモーター（major immediate-early promoter）、アルブミンプロモーター、伸長因子1-（EF1-）プロモーター、PKプロモーター、MGFプロモーター、又はラウス肉腫ウイルスプロモーターと作動的に結合し得る。

20

【0093】

誘導型プロモーター／エンハンサー要素には、ホルモン誘導型及び金属誘導型エレメント、並びに亜鉛誘導型メタロチオネイン（MT）プロモーター；デキサメタゾン（Dex）誘導型マウス乳房腫瘍ウイルス（MMTV）プロモーター；T7ポリメラーゼプロモーターの系（国際公開第WO98/10088号を参照）；エクジソンインセクトプロモーター（Noら、Proc. Natl. Acad. Sci., 米国、93巻：3346頁（1996年））；テトラサイクリン抑制型の系（Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci., 米国、89巻：5547頁（1992年））；テトラサイクリン誘導型の系（Gossenら、Science, 268巻：1766頁（1995年）；Harveyら、Curr. Opin. Chem. Biol., 2巻：512頁（1998年）も参照）；RU486誘導型の系（Wangら、Nat. Biotech., 15巻：239頁（1997年）；Wangら、Gene Ther., 4巻：432頁（1997年））；及びラバマイシン誘導型の系（Magarilら、J. Clin. Invest., 100巻：2865頁（1997年））を非限定的に含む、外因的に供給される化合物により制御されるその他のプロモーターが含まれる。

30

【0094】

更に、特異的開始シグナルが、挿入されたポリペプチドコーディング配列の効率的な翻訳に一般的に必要とされる。このような翻訳制御配列は、ATG開始コドン及び隣接した配列を含むことができ、天然及び合成の両方に該当する様々な開始点の配列であり得る。

40

【0095】

本発明は、本発明の単離されたポリヌクレオチド及びポリペプチドを含む細胞を更に提供する。細胞は、例えば、治療法、診断法、スクリーニング法、SPLUNC1タンパク質の生物学的作用を試験する方法、ポリペプチドを生成する方法、又は本発明のポリヌクレオチドを維持又は増幅する方法等で使用される、培養された細胞又はin vivoの細胞であり得る。別の実施形態では、細胞は、対象から単離されたex vivoの細胞である。ex vivo細胞は、改変され、次に診断目的又は治療目的で対象に再導入され得る。

【0096】

特定の実施形態では、細胞は、非形質転換型の気道平滑筋細胞又は気道平滑筋細胞株に由来する細胞である。

50

【0097】

単離されたポリヌクレオチドは、発現ベクターに組込み可能である。様々な宿主細胞に適合する発現ベクターは、当技術分野において周知されており、また核酸の転写及び翻訳のための適するエレメントを含む。一般的に、発現ベクターは、5'から3'の方向で、プロモーター、ポリペプチドをコードするコーディング配列であって、プロモーターと作動的に結合する配列、並びに、任意選択で、RNAポリメラーゼに対する終止シグナルを含む終止配列、及びポリアデニラーゼに対するポリアデニル化シグナルを含む「発現カセット」を含有する。

【0098】

本発明のプロモーターの非限定的な例として、CYC1、HIS3、GAL1、GAL4、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TPI、及びアルカリホスファターゼプロモーター（サッカロミセス属（*Saccharomyces*）における発現に有用）；AOX1プロモーター（ピキア属（*Pichia*）における発現に有用）；-ラクタマーゼ、lac、ara、tet、trp、IP_L、IP_R、T7、tac、及びtrcプロモーター（大腸菌（*Escherichia coli*）における発現に有用）；光制御型-、種子特異的-、花粉特異的-、卵巣特異的-、病因又は疾患関連のプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35S、CMV35Sミニマル、キャッサバ葉脈モザイクウイルス（CsVMV）、クロロフィルa/b結合タンパク質、リブロース1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ、徒長枝特異的プロモーター、根特異的プロモーター、キチナーゼ、ストレス誘導型プロモーター、イネツングロ桿菌状ウイルス（rice tungro bacilliform virus）、植物スーパープロモーター、ジャガイモロイシンアミノペプチダーゼ、硝酸レダクターゼ、マンノピンシンターゼ、ノバリンシンターゼ、ユビキチン、ゼインタンパク質、並びにアントシアニンプロモーター（植物細胞における発現に有用）が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0099】

当技術分野において公知の動物及び哺乳動物プロモーターの更なる例として、SV40初期（SV40e）プロモーター領域、ラウス肉腫ウイルス（RSV）の3'長い末端反復配列（LTR）に含まれるプロモーター、アデノウイルス（Ad）のE1A又は主要後期プロモーター（MLP）遺伝子のプロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）初期プロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ（TK）プロモーター、バキュロウイルスIE1プロモーター、伸長因子1（EF1）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、ユビキチン（UBC）プロモーター、アルブミンプロモーター、マウスマタロチオネイン-Lプロモーター及び転写制御領域の制御配列、ユビキタスプロモーター（Hprt、ビメンチン、-アクチン、チューブリン等）、中間フィラメントのプロモーター（デスミン、神経フィラメント、ケラチン、GFAp等）、治療遺伝子のプロモーター（MDR、CFTR、又は第VII因子タイプ等の）、病因及び/又は疾患関連のプロモーター、並びに組織特異性を示すプロモーター、例えば膵臓腺房細胞内で活性なエラスターーゼI遺伝子制御領域；膵細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域、リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域、精巣、乳房、リンパ系の細胞、及びマスト細胞において活性なマウス乳房腫瘍ウイルス制御領域；アルブミン遺伝子プロモーター、肝臓において活性なアポA-I及びアポA-II制御領域、肝臓において活性な-フェトプロテイン遺伝子制御領域、肝臓において活性な1-抗トリプシン遺伝子制御領域、骨髄細胞において活性な-グロビン遺伝子制御領域、脳内の希突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域、骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域、及び視床下部において活性なゴナドトロビン放出ホルモン遺伝子制御領域等、ピルビン酸キナーゼプロモーター、ビリンプロモーター、腸型脂肪酸結合タンパク質のプロモーター、平滑筋細胞の-アクチンのプロモーター等が挙げられるが、但しこれらに限定されない。更に、本発明のこのような発現配列のいずれも、エンハンサー及び/又は制御配列等の付加により改変され得る。

【0100】

本発明の実施形態で使用可能であるエンハンサーとして、S V 4 0 エンハンサー、サイトメガロウイルス (C M V) エンハンサー、伸長因子 I (E F 1) エンハンサー、酵母菌エンハンサー、ウイルス遺伝子エンハンサー等が挙げられるが、但しこれらに限定されない。

【0101】

終止制御領域、すなわち転写終結コドン又はポリアデニル化配列は、好ましい宿主に固有の様々な遺伝子に由来し得る。本発明のいくつかの実施形態では、終止制御領域は、合成配列、合成ポリアデニル化シグナル、S V 4 0 後期ポリアデニル化シグナル、S V 4 0 ポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン (B G H) ポリアデニル化シグナル、ウイルス転写終結コドン配列等を含み得る又はそれらに由来し得る。10

【0102】

任意の適するベクターが、ポリヌクレオチドを細胞又は対象に送達するのに利用可能であることは、当業者にとって明白である。ベクターは、in vivoで細胞に送達され得る。その他の実施形態では、ベクターは、細胞にex vivoで送達することができ、次にベクターを含有する細胞が対象に送達される。送達ベクターの選択は、標的宿主の年齢及び種、in vitroでの送達 / in vivoでの送達、所望の発現のレベル及び持続性、意図した目的（例えば、療法又はスクリーニングのため）、標的細胞又は臓器、送達の経路、単離されたポリヌクレオチドのサイズ、安全への懸念等を含む、当技術分野において公知のいくつかの要因に基づきなされ得る。20

【0103】

適するベクターとして、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルス、アルファウイルス；ワクシニアウイルス；アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、及びその他のパルボウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、又は単純ヘルペスウイルス）、脂質ベクター、ポリリジンベクター、合成ポリアミノポリマーべクター等が挙げられる。

【0104】

当技術分野において公知の任意のウイルスベクターが、本発明で利用可能である。組換えウイルスベクターを生成するためのプロトコール、及び核酸送達するためにウイルスベクターを使用するためのプロトコールは、AusubelらのCurrent Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc.社、及びJohn Wiley & Sons, Inc.社、New York)、及びその他の標準研究室マニュアル（例えば、Vectors for Gene Therapy. In: Current Protocols in Human Genetics. John Wiley and Sons, Inc.社：1997年）に見出され得る。30

【0105】

非ウイルス式の移送法も採用可能である。核酸移送の非ウイルス式の方法の多くは、高分子の取り込み及び細胞内輸送を行うために哺乳動物細胞により使用される通常の機構に準拠する。特定の実施形態では、非ウイルス式の核酸送達システムは、標的対象細胞が核酸分子を取り込むためのエンドサイトーシス経路に準拠する。このタイプの代表的な核酸送達システムとして、リポソーム由来のシステム、ポリリジン複合体、及び人工的なウイルスエンベロープが挙げられる。40

【0106】

特定の実施形態では、プラスミドベクターは、本発明を実践する際に使用される。例えば、ネイキッドプラスミドは、組織内注射により筋肉細胞内に導入され得る。陽性細胞の数は一般的に低いものの、発現は何カ月にもわたり存続可能である (Wolffら、Science, 247巻: 247頁(1989年))。カチオン性脂質が、培養内のいくつかの細胞に核酸を導入するのに役立つことが実証されている (Felgner及びRingold、Nature, 337巻: 387頁(1989年))。カチオン性脂質プラス50

ミドDNA複合体をマウスの循環系に注射すると、肺内でのDNA発現を引き起こすことが明らかにされている(B r i g h a mら、Am. J. Med. Sci., 298巻：278頁(1989年))。プラスミドDNAの1つの長所として、非複製細胞に導入され得ることが挙げられる。

【0107】

代表的な実施形態では、核酸分子(例えば、プラスミド)は、正電荷をその表面に担持し、そして任意選択的に標的組織の細胞表面抗原に対する抗体でタグ化された脂質粒子内に捕捉可能である(M izunoら、No Shinkei Geka, 20巻：547頁(1992年)；PCT公開国際公開第WO91/06309号；日本国特許出願第1047381号；及び欧州特許公開第EP-A-43075号)。

10

【0108】

両親媒性のカチオン性分子から構成されるリポソームは、in vitro及びin vivoでの核酸送達において非ウイルス性ベクターとして有用である(C rystal、S cience, 270巻：404頁(1995年)；B laeseら、Cancer Gene Ther., 2巻：291頁(1995年)；B ehrら、B ioc onjugate Chem., 5巻：382頁(1994年)；R emyら、B ioc onjugate Chem., 5巻：647頁(1994年)；及びG aoら、Gene Therapy, 2巻：710頁(1995年)においてレビューされている)。正に荷電したリポソームは、負に荷電した核酸と静電相互作用により複合化して、脂質：核酸複合体を形成すると考えられている。脂質：核酸複合体は、核酸移送ベクターとしていくつかの長所を有する。ウイルスベクターとは異なり、脂質：核酸複合体は、実質的にサイズ無制限の発現力セットを移送するのに利用可能である。複合体はタンパク質を欠くので、複合体が惹起する免疫原応答及び炎症応答はより少ない。更に、複合体は、複製又は組換えを引き起こし、感染性病原体を形成することはあり得ず、また組込み頻度も低い。いくつかの刊行物では、両親媒性のカチオン性脂質は、in vivo及びin vitroでの核酸送達に関与し得ることが実証されている(F elgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci., 米国、84巻：7413頁(1987年)；L oefflerら、M eth. Enzymol., 217巻：599頁(1993年)；F elgnerら、J. Biol. Chem., 269巻：2550頁(1994年))。

20

【0109】

いくつかのグループが、動物及びヒトの両方において、in vivoでトランスフェクトするための両親媒性のカチオン性脂質：核酸複合体の使用について報告している(G aoら、Gene Therapy, 2巻：710頁(1995年)；Z huら、S cience, 261巻：209頁(1993年)；及びT hierryら、Proc. Natl. Acad. Sci., 米国、92巻：9742頁(1995年)においてレビューされている)。米国特許第6,410,049号は、保管寿命が延長したカチオン性の脂質：核酸複合体を調製する方法について記載する。

30

【0110】

発現ベクターは、原核細胞又は真核細胞内でポリペプチドが発現するように設計され得る。例えば、ポリペプチドは、大腸菌(E. coli)等の細菌細胞、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現系)、酵母菌細胞、植物細胞、又は哺乳動物細胞内で発現され得る。いくつかの適する宿主細胞が、G oedde l、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego、Calif.(1990年)で更に議論されている。細菌ベクターの例として、pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen社)、pBS、pD10、Phage script、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene社)；ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、及びpRIT5(Pharmacia社)が挙げられる。酵母菌のS.セレビシエ(S. cerevisiae)内で発現させるためのベクターの例として、p

40

50

Y e p S e c l (Baldariら、EMBO J. , 6巻：229頁(1987年)) 、 p M F a (Kurjan及びHerskowitz、Cell、30巻：933頁(1982年)) 、 p J R Y 88 (Schultzら、Gene、54巻：113頁(1987年)) 、及び p Y E S 2 (Invitrogen Corporation社、San Diego、Calif.) が挙げられる。昆虫培養細胞(例えば、Sf9細胞)内でタンパク質を産生させるための、核酸の発現において利用可能なバキュロウイルスベクターとして、p Acシリーズ(Smithら、Mol. Cell. Biol., 3巻：2156頁(1983年)) 、及び p V L シリーズ(Lucklow及びSummers、Virology、170巻：31頁(1989年)) が挙げられる。

【0111】

10

哺乳動物発現ベクターの例として、p W L N E O 、 p S V 2 C A T 、 p O G 4 4 、 p X T 1 、 p S G (Stratagene社) 、 p S V K 3 、 P B P V 、 p M S G 、 P S V L (Pharmacia社) 、 p C D M 8 (Seed、Nature、329巻：840頁(1987年)) 、及び p M T 2 P C (Kaufmannら、EMBO J. , 6巻：187頁(1987年)) が挙げられる。哺乳動物細胞で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、多くの場合、ウイルス制御エレメントにより提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、及びシミアンウイルス40に由来する。

【0112】

20

ウイルスベクターは、細胞、並びに生きている動物対象において、多種多様な遺伝子送達用途で使用されてきた。利用可能なウイルスベクターとして、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ関連ウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルス、アデノウイルス、ジェミニウイルス、及びカリモウイルスの各ベクターが挙げられるが、但しこれらに限定されない。非ウイルス性ベクターとして、プラスミド、リポソーム、荷電性脂質(サイトフェクチン)、核酸-タンパク質複合体、及びバイオポリマーが挙げられる。目的とする核酸に付加して、ベクターは、1つ又は複数の制御領域、及び/又は核酸移送結果(特定の組織への送達、発現期間等)の選択、測定、及びモニタリングにおいて有用な選択マーカーも含み得る。

【0113】

30

上記で議論した調節制御配列に付加して、組換発現ベクターは、追加のヌクレオチド配列を含むことができる。例えば、組換発現ベクターは、ベクターが組み込まれた宿主細胞を同定する選択マーカー遺伝子をコードすることができる。

【0114】

40

ベクターDNAは、従来の形質転換又はトランスフェクション技術により、原核細胞又は真核細胞に導入され得る。本明細書で用いる場合、用語「形質転換」及び「トランスフェクション」は、外来核酸(例えば、DNA及びRNA)を宿主細胞に導入するための様々な技術分野において承認されている技術を意味し、これには、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈殿法、D E A E - デキストラノン媒介型トランスフェクション法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、微量注射、DNA担持リポソーム(DNA-loaded liposome)、リポフェクタミン-DNA複合体、細胞超音波処理法、高速ミクロ射出法(high velocity microprojectile)を使用した遺伝子ボンバードメント法、及びウイルス媒介型トランスフェクション法が含まれる。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするための適する方法は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(Cold Spring Harbor, NY, 1989年)、及びその他の研究室マニュアルに見出され得る。

【0115】

50

安定な組込みが望まれる場合には、わずかな一部の細胞(特に、哺乳動物細胞)のみが、外来DNAをそのゲノム内に取り込む場合が多い。組込み体を同定及び選択するために

、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性）をコードする核酸が、目的とする核酸と共に宿主細胞に導入され得る。好ましい選択マーカーとして、薬物、例えばG 4 1 8、ハイグロマイシン、及びメトトレキサート等に対する耐性を付与するマーカーが挙げられる。選択マーカーをコードする核酸が、宿主細胞中、目的とする核酸を含むベクターと同一のベクター上に導入され得る、又は別のベクター上に導入され得る。導入核酸により安定的にトランスクレプトされた細胞は、薬物選択により同定され得る（例えば、選択マーカー遺伝子が組み込まれた細胞は生き残る一方、その他の細胞は死ぬ）。

【0 1 1 6】

本発明の更なる態様は、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、及び担体を含む組成物に関する。いくつかの実施形態では、組成物は、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

10

【0 1 1 7】

本発明の追加の態様は、医薬組成物を含む用量送達デバイスに関する。いくつかの実施形態では、用量送達デバイスは、例えば、経口吸入及び／又は鼻腔吸入により、組成物を対象の気道に送達するための吸入器である。

【0 1 1 8】

本発明の別の態様は、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含み、そして本発明の方法を実施するのに役立つキットに関する。該キットは、該方法を実施するための追加の試薬（例えば、バッファー、容器、追加の治療剤）、並びに説明書を更に含み得る。

20

【0 1 1 9】

本発明の方法は、カルシウムチャネルに結合し、またカルシウムチャネルを含む細胞へのカルシウム流入を阻害するポリペプチドの能力に関する。従って、本発明の1つの態様は、カルシウムチャネルを通過するカルシウム流入を阻害する方法であって、カルシウムチャネルを本発明のポリペプチドと接触させ、これによりカルシウムチャネルを通過するカルシウム流入を阻害するステップを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、カルシウム流入は、ストア感受性カルシウム流入である。1つの実施形態では、カルシウムチャネルは、O r a i 1、例えば、ヒトO r a i 1、又はヒト以外の哺乳動物のO r a i 1である。別の実施形態では、カルシウムチャネルは、配列及び／又は構造がO r a i 1と類似したチャネルである。カルシウムチャネル活性の阻害は、カルシウムの流量、或いはメンブレンを横断する、細胞を横断する、又は天然若しくは人工的内層を横断する電位の変化を測定することを非限定的に含む、当技術分野において公知の、又は本明細書に開示の任意の方法により測定可能である。阻害は、少なくとも約20%、例えば、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%であり得る。

30

【0 1 2 0】

カルシウムチャネルを阻害する方法は、例えば、単離されたカルシウムチャネル、人工的なメンブレン内のカルシウムチャネル、又は細胞内のカルシウムチャネル上で実施可能である。1つの実施形態では、カルシウムチャネルは、単離された細胞、例えば、培養された初代細胞又は細胞株に存在する。特定の実施形態では、細胞は、気道平滑筋細胞、例えば、気道平滑筋細胞培養物の一部である。別の実施形態では、単離された細胞は、上皮細胞培養物の一部、例えば、天然又は人工的な上皮内層、例えば、イオンの流れ及び／又は電位等の特性が内層を横断して測定可能であるデバイス（例えばウッシングチャンバー等）内の細胞培養物である。別の実施形態では、単離された細胞は、免疫系細胞、例えば、白血球、リンパ球、T細胞、マスト細胞、マクロファージ等である。別の実施形態では、単離された細胞は、がん細胞である。別の実施形態では、細胞は、単離された組織又は組織培養物の一部である。更なる実施形態では、細胞は、動物、例えば疾患モデルの動物、又は治療を必要とする対象中に存在し得る。

40

【0 1 2 1】

50

1つの実施形態では、カルシウムチャネルをポリペプチドと接触（例えば、結合）させるステップは、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを、カルシウムチャネルを含む細胞に送達するステップを含む。

【0122】

1つの実施形態では、本発明のポリペプチド又はその断片若しくはホモログは、対象に直接投与される。一般的に、本発明の化合物は、薬学的に許容される担体（例えば、生理食塩水）に懸濁され、そして経口により若しくは静脈内輸液により投与される、又は皮下、筋肉内、髄腔内、腹腔内、直腸内、腔内、鼻腔内、胃内、気管内、若しくは肺内に投与される。別の実施形態では、気管内又は肺内の送達は、標準ネブライザー、ジェットネブライザー、ワイヤーメッシュユネブライザー、乾燥粉末吸入器、又は定量吸入器を使用して実現し得る。本発明の化合物は、疾患又は障害の部位、例えば肺、腎臓、又は腸等に直接送達され得る。必要とされる用量は、投与経路の選択；製剤の性質；患者の疾病的性質；対象のサイズ、体重、表面積、年齢、及び性別；投与されるその他の薬物；及び担当医師の判断に依存する。適する用量は、0.01～100.0 μg / kg の範囲である。必要とされる用量の変動範囲は、利用可能なポリペプチド、断片、及びホモログの多様性、並びに様々な投与経路の効率の相違を考慮すれば、幅広いと予想される。例えば、経口投与は、i.v. 注射による投与よりも高い用量を必要とすると予想される。このような用量レベルの変動は、当技術分野において十分に理解されているように、最適化のための標準的な実験に基づいたルーチンを使用して調節可能である。投与は、単一又は複数回（例えば、2、3、4、6、8、10；20、50、100、150、又はそれ以上の回数）であり得る。ポリペプチド、断片、及びホモログを、適する送達ビヒクル（例えば、ポリマー微粒子又は埋込型デバイス）内にカプセル化すれば、特に経口送達において、送達効率を高めることができる。10

【0123】

特定の実施形態によれば、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログにより、特異的細胞又は組織を *in vivo* で標的とすることができます。リポソームを含む標的用送達ビヒクル及び標的となる系は、当技術分野において公知である。例えば、リポソームは、標的分子が結合可能な特定の細胞又は組織を標的とするために、標的用薬剤、例えば、リポソームと共に組み込まれた抗体、可溶性の受容体又はリガンド等を使用することにより、特定の標的細胞又は組織に誘導可能である。標的用のリポソームは、例えば、Hōら、*Biochemistry*、25巻：5500頁（1986年）；Hōら、*J. Biol. Chem.*、262巻：13979頁（1987年）；Hōら、*J. Biol. Chem.*、262巻：13973頁（1987年）；及び Huang らに対する米国特許第4,957,735号に記載されており、そのそれぞれは、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。30

【0124】

本発明の別の態様は、気道平滑筋収縮を阻害する方法であって、気道を本発明のポリペプチド又は機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これにより気道平滑筋収縮を阻害するステップを含む方法に関する。平滑筋収縮の阻害は、当技術分野において公知の、又は本明細書に開示の技術のいずれかにより測定可能である。収縮の阻害は、本発明のポリペプチド又は機能的な断片若しくはホモログとの接触が存在しない場合に生ずる収縮のレベルと比較して測定される。いくつかの実施形態では、収縮は、少なくとも約10%、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上阻害される。40

【0125】

本発明の別の態様は、気道過剰反応性を阻害する方法であって、気道を本発明のポリペプチド又は機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これにより気道過剰反応性を阻害するステップを含む方法に関する。気道の反応性は、当技術分野において公知の、又は本明細書に開示の技術のいずれかにより測定可能である。過剰反応性の阻害は、本発明のポリペプチド又は機能的な断片若しくはホモログとの接触が存在しない場合に生ずる反応性50

のレベルと比較して測定される。「過剰反応性」とは、本明細書で用いる場合、正常な気道の反応性のレベルと比較して、カルシウムに対する気道の反応性が増加していることを意味する。いくつかの実施形態では、過剰反応性は、少なくとも約10%、例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上阻害される。

【0126】

本発明の別の態様は、対象内の免疫応答を阻害する方法であって、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを対象に送達し、これにより免疫応答を阻害するステップを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、免疫応答は、少なくとも約10%、例えば、少なくとも約10%、25%、50%、75%、又はそれ以上阻害される。免疫応答の阻害は、当技術分野において公知の方法により、例えば、対象の血液若しくは組織内の免疫系細胞及び／又は抗体のレベルを測定することにより定量可能である。10

【0127】

本発明の追加の態様は、対象内の炎症を阻害する方法であって、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを対象に送達し、これにより炎症を阻害するステップを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、炎症は、少なくとも約10%、例えば、少なくとも約10%、25%、50%、75%、又はそれ以上阻害される。炎症の阻害は、当技術分野において公知の方法により、例えば、対象の血液中又は組織内の免疫系細胞、インターロイキン、ケモカイン、又はその他の生物学的エフェクター分子のレベルを測定することにより定量可能である。本発明の方法により治療され得る炎症性障害として、非限定的に、肺の障害、例えば喘息、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、囊胞性線維症、非囊胞性線維症性の気管支拡張症、及び急性又は慢性気管支炎等が挙げられる。20

【0128】

本発明の更なる態様は、それを必要としている対象内のカルシウムチャネル（例えば、Orai1、Orai3）と関連した自己免疫疾患を治療又は予防する方法であって、対象を、治療上有効な量の本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これにより自己免疫疾患を治療又は予防するステップを含む方法に関する。本明細書で用いる場合、「カルシウムチャネルと関連した自己免疫疾患」とは、カルシウムチャネル、又はカルシウムチャネルを活性化させる若しくは阻害するその他の因子（例えば、STIM1、STIM2）の異常な発現又は突然変異により引き起こされる自己免疫疾患又はその症状を意味する。カルシウムチャネル（例えば、Orai1、Orai3）と関連した自己免疫疾患の例として、非限定的に、喘息、シェーグレン症候群、リウマチ性関節炎、糖尿病、自己免疫中枢神経系の炎症、及び多発性硬化症が挙げられる。30

【0129】

本発明の別の態様は、それを必要としている対象内のカルシウムチャネル（例えば、Orai1、Orai3）と関連したがんを治療又は予防する方法であって、対象を、治療上有効な量の本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと接触させ、これによりがんを治療又は予防するステップを含む方法に関する。該方法は、がん細胞の分裂及び／又は転移を予防する又は遅延させることを含み得る。本明細書で用いる場合、「カルシウムチャネルと関連したがん」とは、カルシウムチャネル、又はカルシウムチャネルを活性化させる若しくは阻害するその他の因子（例えば、STIM1、STIM2）の異常な発現又は突然変異により引き起こされるがん（例えば、固形腫瘍又は血球細胞のがん）又はその症状を意味する。カルシウムチャネル（例えば、Orai1、Orai3）と関連したがんの例として、非限定的に、乳房、前立腺、頸管、結腸直腸、脳、及び皮膚の各がんが挙げられる。40

【0130】

本発明の追加の態様は、治療上有効な量の本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、或いは医薬組成物を対象に送達し、これにより障害を治療又は予防するステップを含む、それを必要としている対象の気道内カルシウム流入阻害に応答する障害を治療又は予防することに関する。本明細書で用いる場合、用語「気道内カルシウム流50

「入阻害に応答する障害」とは、気道内のカルシウム流入を阻害することにより治療され得る、及び／又は防ぎ得るあらゆる疾患、障害、又は状態を意味する。本発明の方法における障害は、非限定的な例として、喘息又は呼吸器系アレルギーを挙げることができる。特定の実施形態では、ポリペプチドは、吸入により、例えば、経口吸入及び／又は鼻腔吸入により送達するための吸入器又はネブライザーを使用して送達される。

【0131】

本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、その他の治療剤と連携して任意選択的に送達可能である。追加の治療剤は、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと同時に送達可能である。本明細書で用いる場合、単語「同時に（concurrently）」とは、時間的に十分接近して複合的效果を生成することを意味する（すなわち、同時に（concurrently）とは、同時に（simultaneously）であり得る、又は相前後して短時間内に生ずる2つ若しくはそれ以上の出来事であり得る）。本発明の1つの実施形態では、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、喘息を治療及び／又は予防する化合物、例えば、作動薬又はステロイド等の気管支拡張薬と同時に患者に送達される。その他の実施形態では、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、アレルギーを治療及び／又は予防する化合物、例えば、抗ヒスタミン薬と同時に患者に送達される。特定の実施形態では、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、自己免疫疾患を治療及び／又は予防する化合物、例えば、免疫抑制剤と同時に患者に送達される。特定の実施形態では、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、がんを治療及び／又は予防する化合物、例えば、化学療法薬又は免疫療法薬と同時に患者に送達される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログとその他の治療剤の複合した活性は、その他の治療剤単独よりも優れる。

10

20

30

【0132】

更なる態様として、本発明は、上記で議論した医薬製剤、及びそれを投与して治療効果（例えば、カルシウム流入の調節）のいずれかを実現する方法を提供する。医薬製剤は、薬学的に許容される担体中に、上記で議論した試薬のいずれか、例えば、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含み得る。

【0133】

「薬学的に許容される」とは、生物学的であってもなくても、望ましくないとは言えない物質を意味し、すなわち、該物質は、毒性等の望ましくない生物学的效果を一切引き起こすことなく対象に投与され得る。

40

【0134】

本発明の製剤は、任意選択的に、薬剤、医薬品、担体、アジュバント、分散剤、賦形剤等を含む。

【0135】

本発明のペプチドは、投与用として、公知の技術に基づき医薬担体中に製剤化され得る。例えば、Remington、The Science And Practice of Pharmacy（第9版、1995年）を参照。本発明に基づく医薬製剤の製造において、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ（生理学的に許容されるその塩を含む）は、特に、許容される担体と一般的に混合される。担体は、固体又は液体又はその両方であり得、そしてポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログと共に、単位用量製剤、例えば、0.01重量%又は0.5重量%～9.5重量%又は9.9重量%のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含み得る定量吸入器として製剤化され得る。1つ又は複数のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、薬局の任意の周知技術により調製可能な本発明の製剤に組込み可能である。

50

【0136】

本発明の更なる態様は、対象をin vivoで治療する方法であって、薬学的に許容される担体中に本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含む医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法であり、該医薬組成物は、治療上有効な量で

50

投与される。本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの、それを必要としているヒト対象又は動物への投与は、化合物を投与するための当技術分野において公知の任意の手段により可能である。

【0137】

本発明の製剤には、経口、直腸、局所、バッカル（例えば、舌下）、腔腔、非経口（例えば、皮下、筋肉（骨格筋、心筋、横隔膜筋、及び平滑筋を含む）内、皮内、静脈内、腹腔内）、局所（すなわち、気道表面を含む皮膚及び粘膜の表面の両方）、鼻腔内、経皮、関節内、髄腔内、及び吸入による投与、門脈内送達による肝臓への投与、並びに臓器への直接注射（例えば、肝臓内、中枢神経系に送達するための脳内、肺臓内、又は腫瘍若しくは腫瘍周囲組織内）に適する製剤が含まれる。所与のケースのいずれかを問わず、最も適する経路は、治療される状態の性質及び重症度、並びに使用される具体的なペプチドの性質に依存する。

10

【0138】

注射の場合、担体は、一般的に、滅菌発熱性物質除去蒸留水、通常の無菌生理食塩水、高張生理食塩水、発熱性物質除去リン酸緩衝化生理食塩溶液、静菌水、又はCremophor EL[R]（BASF社、Parsippany、N.J.）等の液体である。他の投与法では、担体は、固体又は液体であり得る。

【0139】

経口投与の場合、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、カプセル、錠剤、及び粉末等の固体剤形、又はエリキシル剤、シロップ、及び懸濁物等の液体剤形として投与され得る。ポリペプチドは、不活性化成分及び粉末化された担体、例えばグルコース、ラクトース、スクロース、マンニトール、スターチ、セルロース又はセルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、サッカリンナトリウム、タルカン、炭酸マグネシウム等と共に、ゼラチンカプセル内にカプセル化可能である。望ましい色、味、安定性、バッファー能力、分散度、又は他の公知の望ましい特性を提供するために添加可能である追加の不活性成分の例として、赤色酸化鉄、シリカゲル、ラウリル硫酸ナトリウム、二酸化チタン、食用白色インク等が挙げられる。類似した賦形剤が、圧縮錠剤を作成するのに利用可能である。錠剤及びカプセルの両方が、数時間にわたり医薬の連続放出を実現する徐放型製品として製造可能である。圧縮錠剤は、あらゆる不快な味を遮蔽し、そして外気から錠剤を保護するために糖コーティング又はフィルムコーティングされ得る、又は胃腸管内で選択的に分解されるように腸溶性コーティングされ得る。経口投用の液体剤形は、患者の許容度が増すように着色料及び着香料を含み得る。

20

【0140】

バッカル（舌下）投与に適する製剤として、風味があるベース、通常スクロース及びアカシア又はトラガント内に化合物を含むロゼンジ；並びに不活性なベース、例えばゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシア等内に化合物を含む香錠が挙げられる。

30

【0141】

非経口投与に適する本発明の製剤は、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの、無菌の水性及び非水性注射溶液を含み、その調製物は、意図したレシピエントの血液と等張であることが好ましい。このような調製物は、抗酸化剤、バッファー、静菌液、及び製剤を意図したレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る。水性及び非水性の無菌懸濁物は、懸濁剤及び増粘剤を含み得る。製剤は、単位投与用又は複数回投与用の容器、例えば密閉されたアンプル及びバイアル内に提供可能であるが、また使用直前に無菌の液体担体、例えば、生理食塩水又は注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥（freeze-dried）（凍結乾燥（lyophilized））条件で保管され得る。

40

【0142】

即時注射溶液及び懸濁物は、これまでに記載した種類の無菌の粉末、顆粒、及び錠剤から調製可能である。例えば、本発明の1つの態様では、本発明のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含む、注射可能で安定な無菌の組成物が、密閉された容器中の単位投与剤形として提供される。ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモロ

50

グ若しくは塩は、薬学的に許容される適する担体で復元して、対象にそれを注射するのに適する液体組成物を形成することが可能な凍結乾燥物の形態で提供される。単位投与剤形は、約1mg～約10グラムのポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、又は塩を一般的に含む。ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、又は塩が実質的に水不溶性の場合、十分量の薬学的に許容される乳化剤が、水性の担体中にペプチド又は塩を乳化するために、十分な量で利用可能である。1つのそのような有用な乳化剤は、ホスファチジルコリンである。

【0143】

直腸投与に適する製剤は、単位用量坐剤として提供されることが好ましい。このような単位用量坐剤は、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを、1つ又は複数の従来の固体担体、例えば、カカオバターと共に混合し、次に得られた混合物を成形することにより調製可能である。10

【0144】

皮膚への局所的投与に適する製剤は、軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ゲル、スプレー、エアゾール、又は油の形態を探ることが好ましい。利用可能な担体として、ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール、経皮促進剤、及びその2つ又はそれ以上の組合せが挙げられる。

【0145】

経皮投与に適する製剤は、長期間、レシピエントの表皮と密着して留まるように適用される分離型のパッチとして提供可能である。経皮投与に適する製剤は、イオン導入法によっても送達可能であり（例えば、*Tyle, Pharm. Res.*, 3巻: 318頁（1986年）を参照）、またポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの任意選択的に緩衝化された水溶液の形態を一般的に採る。適する製剤は、クエン酸塩、又はビスノトリスバッファー（pH6）、又はエタノール／水を含み、また0.1～0.2Mの化合物を含む。20

【0146】

ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、代替的に、任意の適する手段により、鼻腔投与用として製剤化可能、さもなければ対象の肺に投与可能であり、例えば、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含む呼吸域粒子のエアゾール懸濁物を対象が吸い込むことにより投与することができる。呼吸域粒子は、液体又は固体であり得る。用語「エアゾール」には、細気管支又は鼻道中に吸入される能力を有する任意の気体中懸濁相が含まれる。特に、エアゾールには、定量吸入器若しくはネブライザー内、又はミスト噴霧装置内で生成し得るような液滴の気体中懸濁物が含まれる。エアゾールは、空気又はその他のキャリヤガスに懸濁した乾燥粉末組成物も含み、例えば、吸入デバイスからの吹送法により送達可能である。*Ganderton*及び*Jones, Drug Delivery to the Respiratory Tract, Ellis Horwood*（1987年）；*Gonda*（1990年）*Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*、6巻: 273～313頁；及び*Raeburn*ら、*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 27巻: 143頁（1992年）を参照。30

ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含む液体粒子のエアゾールは、当業者にとって周知なよう、任意の適する手段、例えば圧力駆動式のエアゾールネブライザー又は超音波ネブライザー等により生成可能である。例えば、米国特許第4,501,729号を参照。ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含む固体粒子のエアゾールも、医薬品技術分野において公知の技術により、任意の固体微粒子医薬品エアゾール発生装置を用いて同様に生成可能である。40

【0147】

或いは、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、全身的ではなく、局所的に、例えば、デポ又は徐放性の製剤に含めて投与可能である。

【0148】

10

20

30

40

50

更に、本発明は、本明細書に開示のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、及びその塩のリポソーム製剤を提供する。リポソーム懸濁物を形成する技術は、当技術分野において周知されている。ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、又はその塩が水溶性の塩である場合、従来のリポソーム技術を使用して、それを脂質小胞に組込み可能である。そのような事例では、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、又は塩の水溶性に起因して、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、又は塩は、リポソームの親水性の中心又はコア中に実質的に取り込まれる。採用される脂質の層は、任意の従来型の組成物であり得るが、またコレステロールを含んでもよく、又はコレステロールを含まなくてもよい。目的とするポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、又は塩が水不溶性の場合、やはり従来のリポソーム形成技術を利用して、塩は、リポソーム構造を形成する疎水的脂質二重層中に実質的に取り込み可能である。いずれの場合も、生成されるリポソームのサイズは、標準的な超音波処理及びホモナイゼーション技術の使用を通じて低減可能である。

10

【0149】

本明細書に開示のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログ、又はその塩を含有するリポソーム製剤は、水等の薬学的に許容される担体を用いて復元して、リポソーム懸濁物を再生し得る凍結乾燥物を生成するために、凍結乾燥可能である。

20

【0150】

水不溶性のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの場合、医薬組成物は、例えば、水性ベースのエマルジョン中に水不溶性のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを含めて調製可能である。そのような事例では、所望の量のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログを乳化するために、組成物は十分量の薬学的に許容される乳化剤を含む。特に有用な乳化剤として、ホスファチジルコリン及びレシチンが挙げられる。

20

【0151】

特定の実施形態では、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログは、治療上有効な量で対象に投与されるが、当該用語は上記で定義した通りである。薬学的に活性なポリペプチドの用量は、当技術分野において公知の方法により決定可能であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. 社、Easton, Pa) を参照。任意の特異的ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの治療上有効な用量は、化合物によって、また患者によって若干変化し、並びに患者の状態及び送達経路に依存する。一般命題として、塩が採用される場合を含め、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの重量に基づき全重量を計算して、約 0.1 ~ 約 50 mg / kg の用量が治療効果を有する。より高いレベルでは毒性が懸念されることから、低レベル、例えば塩が採用される場合を含め、ポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログの重量に基づき全重量を計算して、最大約 10 mg / kg 等に静脈内用量が制限される可能性がある。約 10 mg / kg ~ 約 50 mg / kg の用量が、経口投与用として採用され得る。一般的に、約 0.5 mg / kg ~ 5 mg / kg の用量が、筋肉内注射用として採用され得る。具体的な用量は約 1 μmol / kg ~ 50 μmol / kg であり、より具体的には、静脈内又は経口投与について、それぞれ ~ 約 22 μmol / kg、及び ~ 33 μmol / kg のポリペプチド又はその機能的な断片若しくはホモログである。

30

【0152】

本発明の特定の実施形態では、2回以上の投与（例えば、2、3、4回、又はそれ以上の投与）が、治療効果を実現するために、様々な時間間隔（例えば、1時間毎、毎日、毎週、毎月等）にわたって採用され得る。

40

【0153】

本発明の発見として、獣医学及び医学用途での使用が挙げられる。適する対象には鳥類及び哺乳動物の両方が含まれ、哺乳動物が好ましい。用語「鳥類」には、本明細書で使用する場合、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、シチメンチョウ、及びキジが含まれる

50

が、但しこれらに限定されない。用語「哺乳動物」には、本明細書で使用する場合、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギ等が含まれるが、但しこれらに限定されない。ヒト対象には、乳児、幼児、青少年、及び成人が含まれる。

【0154】

本発明は、下記の実施例においてより具体的に記載されているが、その中には非常に多くの改変及び変化が存在することが当業者には明白であるので、そのような実施例は説明目的に限定されるように意図されている。

【実施例】

【0155】

[実施例1]

10

実験方法

ヒト喀痰サンプルの収集：すべての試験は、UNC治験審査委員会より承認を受け、そしてインフォームドコンセントをすべての対象から取得した。人口統計学的情報を表2に含める。喀痰誘発をこれまでに公表された通りに、自発的喀出により、又は異なるプロトコールの喀痰誘発により実施した(Alexisら、Clin. Immunol., 97巻: 21頁(2000年); Geiserら、J. Innate Immun., 5巻: 613頁(2013年))。喀痰収集用の高張生理食塩水を用いて喀痰を誘発した。手短に述べると、対象は、Devilbiss UltraNeb 99超音波ネブライザー(Sunrise Medical社)を使用して、濃度が徐々に増加した生理食塩水(3、4、及び5%の生理食塩水)を連続的に吸入し、そして7分間の各吸入セッション後に喀痰を供与した。喀痰サンプル3例をプールした。

20

【0156】

動物、及び気道抵抗の測定：C57BL/6バックグラウンド上のSPLUNC1(-/-)及びSPLUNC1(+/-)同腹仔コントロールマウスは、University of PittsburghのDr. Y. Peter Di及びDr. Paul B. McCray Jrからの親切な寄贈品であり、そして、University of North Carolina at Chapel Hillの、医学部の動物施設内で繁殖及び飼育した。ガイドラインに基づき動物の世話をし、またすべての手順は、UNC実験動物委員会により承認された。

30

【0157】

気道抵抗(RAW)を、これまでの記載に従い麻酔したマウスで測定した(Liら、Plos One、9巻:e102356頁(2014年))。基礎抵抗測定を10秒毎に1分間行った後、10mg/mL、20mg/mL、及び40mg/mLの濃度のエアゾール化メタコリン(Mch)を用いて、マウスに対して連続的に誘発試験を行った。マウスに各濃度のMchを20秒間投与した後、Flexivent(SCIREQ)を使用して、各誘発試験期間直後にRAWを10秒間隔で2分間記録した。

【0158】

DNA構築物：黄色蛍光タンパク質(YFP)でタグ化されたヒトOrai1、及びMyoでタグ化されたTRPC3は、Dr. Craig Montell(Addgeneプラスミド#25902)及びDr. Anjana Rao(Addgeneプラスミド#19756)からそれぞれ寄贈された。HAでタグ化されたヒトOrai1は、La Jolla Institute for Allergy & ImmunologyのDr. Patrick G Hoganからの寛大な寄贈品であった。pcDNA3.1(+-V5-SPLUNC1は、the University of SheffieldのDr. Colin D Bingleからの寛大な寄贈品であった。

40

【0159】

細胞培養、トランスフェクション、及びRNA干渉：ヒト気道平滑筋細胞(hASMC)は、Thomas Jefferson UniversityのDr. Raymond B. Pennからの寛大な寄贈品であった。ラットASMCは、Pennsylvania State UniversityのDr. Mohamed Trebakより

50

提供された。細胞を、10%のウシ胎仔血清(FBS)(Sigma Aldrich社)、及び0.1%のペニシリン・ストレプトマイシン(Life Technologies社)で補充されたダルベッコ変法イーグル培地: Nutrient Mixture F-12(DMEM/F12)(Life Technologies社)内で維持した。HEK293T細胞をATCCから購入し、そしてDMEM(Life Technologies社)内、10%のFBS及び0.1%のペニシリン・ストレプトマイシンの存在下で維持した。ヒト気管支上皮培養物(HBEC)を、正常対象及び喘息対象から新たに切除された気管支の試料から取得し、そしてUniversity of North Carolina Institutional Review Boardにより承認されたプロトコールに基づくこれまでの記載に従い、酵素消化により採取した(Fulcherら、Meth. Mol. Biol., 945巻: 109頁(2013年))。健康ドナー及び喘息ドナーに関する人口統計学的情情報を表3に含める。5%のCO₂を含む改変された気管支上皮増殖培地中、気液界面において、HBECを37で培養し、そして12mmのT-clear insert(Corning社)上に播種してから3~4週間後に使用した。

10

【0160】

Orai1に対する低分子ヘアピン型RNA(shRNA)プラスミド、及びスクランブル化コントロールshRNAプラスミドをSigma Aldrich社から購入した。これらは以前に公表されたものであった(Sheridanら、J. Biol. Chem., 288巻: 33509頁(2013))。すべてのプラスミドDNA及びshRNAのトランスフェクションを、Lipofectamine 2000試薬(Life Technologies社)を使用して、製造業者の説明書に従い実施した。

20

【0161】

抗体、免疫沈降法、及び免疫プロット分析: ウサギ抗Orai1、抗HAエピトープ(Santa Cruz社)、抗GFP、抗ホスホミオシン軽鎖、抗総ミオシン軽鎖、抗GAPDH(グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ)(Cell Signaling Technology社); マウス抗V5エピトープ(Life Technologies社)を、商業的供給元から購入した。全細胞ライセートにおけるタンパク質の発現を検出するために、細胞を25mMのトリス-HCl[pH 7.4]、150mMのNaCl、1%のNP-40、1mMのEDTA、5%のグリセロールを含むPierce(登録商標)IP溶解バッファー中で溶解し、その後にSDS-ポリアクリルアミド電気泳動及び免疫プロットを行った。

30

【0162】

免疫沈降法では、細胞ライセートを、トランスフェクションから48時間後に、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル(PIC)(Roche社)の存在下、Pierce(登録商標)IP溶解バッファー内に収集した。細胞ライセートを、プロテインA/Gアガロースビーズを用いてプレクリア(pre-cleared)し、次にローター上でプロテインA/Gアガロースビーズを用いて、HA(BioLegend社)又はV5(Invitrogen社)に対する抗体、1μgと共に、4、オーバーナイトでインキュベートした。IP溶解バッファーで3回洗浄後、免疫沈降した複合体を、95で5分間、サンプルを加熱することによりサンプルバッファー(50mMのトリス-HCl[pH 6.8]、2%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10%のグリセロール、5%(v/v)の-メルカプトエタノール(BME)、0.1%のプロモフェノールブルー)中に溶出し、SDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動、及び免疫プロット分析を実施した。

40

【0163】

カルシウムイメージング:fura-2を使用したカルシウムイメージングは、これまでに公表されたプロトコールに軽微な修正を加えて改変した(Sheridanら、J. Biol. Chem., 288巻: 33509頁(2013年))。手短に述べると、hASMCに、2μMのfura-2 AM(Invitrogen社)、及びHBEC培養物から得られた漿膜培地(serosal media)、又は組換えSPLUNC1

50

を、37で1時間負荷した。培養物を、標準リンガー溶液(101mMのNaCl、12mMのNaHCO₃、1.2mMのMgCl₂、1.2mMのCaCl₂、0.2mMのKCl、24mMのHEPES、10mMのグルコース、pH7.4)、又はCa²⁺を含まないリンガー溶液で、示す通り洗浄した。培養物を、次にリンガー溶液中に配置し、そして画像を、40×1.4のNA油浸対物レンズを用いて、Nikon Ti-S倒立顕微鏡上で収集した。fura-2蛍光を、LUDLフィルターホールを使用して、340と380nmにおいて(発光>450nm)交互に取得し、それをOrca FLASH4.0 CMOSカメラ(Hammamatsu社)を用いて撮影し、そしてHClimageLiveソフトウェアにより制御した。細胞体を、個々の対象領域(ROI)として同定した。バックグラウンドの減算を、細胞が存在しない領域を使用して実施した。シグナルを相対変化(F/F₀)に変換したが、但しF₀は0時点におけるROIの平均蛍光強度の比(340/380)であった。合計20個の細胞/カバースリップを記録した。F/F₀は、3回の独立した実験の平均ピーク蛍光強度変化を表す。

10

【0164】

マウス気管軟骨輪のミオグラフィー：気管を8週齢のSPLUNC1 WT及びKOマウスから切除した。過剰の結合組織を除去した後、気管を約4mmの環に切断し、DMT620Mミオグラフィー装置上に取り付け、そして酸素供給(95%のO₂/5%のCO₂)を連続的に行なながら、改変されたリンガー溶液(119mMのNaCl、4.7mMのKCl、1.17mMのMgSO₄、1.18mMのKH₂PO₄、2.5mMのCaCl₂、25mMのNaHCO₃、0.027mMのEDTA、5.5mMのグルコース)中に37で20分間、張力を加えずに放置した。次に、最適な他動張力(1mN)を環に加えた。次に、張力が安定した後にベースライン時の力を記録した。各環の誘発された収縮力を、60mMのKCl又は100mMのAch(別途明記しない限り)によりそれぞれ刺激した収縮を測定することにより評価した。

20

【0165】

細胞収縮アッセイ：細胞収縮アッセイを、標準市販キット(Cell Biosciences社)を使用して実施した。ヒトASMを採取し、そしてDMEM中に再懸濁し、2部分の細胞を、8部分のコラーゲンゲル格子混合物と混合し、そして37で1時間播種した。ゲル凝固後、1mlの培地を添加し、そして48時間インキュベートした。次に、ウェルの側面からゲルを遊離させ、そして表示の試薬の添加から0及び1時間後に、Chemidoc(商標)MPイメージヤー(BioRad社)を使用して画像を取得した。ImageJソフトウェアを使用してコラーゲンゲル表面積の変化を分析し、そして0時点におけるゲルの面積に対して標準化した。

30

【0166】

タンパク質の発現、精製、及び蛍光標識：SPLUNC1及びSPLUNC1トランケーション物のcDNAを、BL21-Codon Plusコンピテント細胞(Agilent Technologies社)内で形質転換し、そしてこれまでの記載に従い精製した(Garlandら、Proc.Natl.Acad.Sci.,米国、110巻:15973頁(2013年))。S18ペプチドを合成し、そしてこれまでの記載に従い、UNC Microprotein Sequencing and Peptide Synthesis Facilityにより精製した(Hobbsら、Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.,305巻:L990頁(2013年))。蛍光標識をDyLight594、又はDyLight633NHSeester(Thermo社)を使用して、製造業者の説明書に従い実施した。

40

【0167】

蛍光顕微鏡検査：ヒトASMを蛍光イメージングのため、25mmガラス製カバースリップ上で増殖させた。細胞に、表示の蛍光標識されたタンパク質をトランスフェクトした。トランスフェクション後、24時間経過して、細胞を、SPLUNC1を含め、又は含めないで4時間インキュベートし、その後メタノール固定、及び核のDAPI(1μg/ml)染色を行った。ライブセルイメージングでは、細胞を底部が35mmガラス製のデ

50

イッショウ (In Vivo Scientific社) 上で増殖させ、そしてYFP - Orai1をトランスフェクトした。トランスフェクション後、24時間経過して、細胞をSPLUNC1と共にインキュベートし、そして画像を表示の時点において取得した。すべての画像を、Leica Application Suite Xソフトウェア (Leica社) を使用して、Leica TCS SP8 63×油浸レンズにより取得した。

【0168】

表面標識及び超解像顕微鏡検査：ヒトASMを、 $22 \times 22 \text{ mm}^2$ ガラス製カバースリップ上で増殖させ、そしてHA-Orai1をトランスフェクトした。トランスフェクションから24時間後、4%のパラホルムアルデヒド (PFA) を含むPBSで細胞を固定し、その後、4度、マウス抗HA抗体 (BioLegend) 及びAlexa488ヤギ抗マウス抗体 (Life Technologies社) により表面標識した。氷冷PBSで5回洗浄後、細胞を、イメージング前に、5 μMのSPLUNC1-DyLight 594と共に4度1時間インキュベートした。

10

【0169】

取り付け前に、90 μlの酸素枯渇培地の-Mエルカプトエチルアミン (MEA) を、くぼみスライド (depression slide) のキャビティに添加した。カバースリップを次にくぼみスライド上に取り付け、そしてツインシリ (twinsil) (Picodent社) で密閉した。市販のLEICA GSD超解像顕微鏡により、超解像画像を撮影した。基底状態枯渇 (GSD) を、488 nm及び642 nmのm固体レーザーを使用して実施した。488 nm及び642 nmレーザーを使用してサンプルを励起し、そして製造業者の説明書に従い、405 nmレーザーを使用し、バックポンピングによりサンプル取得を増加させた。顕微鏡には、160×油浸対物レンズを取り付けた。

20

【0170】

蛍光SPLUNC1結合アッセイ：ヒトASMCに、スクランブル化コントロールshRNA及びOrai1 shRNAをそれぞれトランスフェクトした。トランスフェクション後、72時間経過して、細胞を、SPLUNC1-DyLight 633を用い、又は用いないで1時間処理し、次に氷冷リンガー溶液を用いて5回洗浄した。ASMC結合SPLUNC1-DyLight 633を、蛍光プレートリーダー (Tecan社) により検出した。細胞を、細胞数コントロールとして、カルセインAM (Life Technologies社) でも染色した。相対蛍光強度を、658 nmにおける蛍光強度を526 nmに対して標準化することにより計算した。

30

【0171】

表面ビオチン化：hASMCを、SPLUNC1を用い、又は用いないで4時間処理した。細胞を次に予め冷却したPBS⁺⁺ (1 mMのCaCl₂及び1 mMのMgCl₂で補充されたリン酸緩衝生理食塩水) で洗浄し、そして次に0.5 mg/mlのスルホ-NHS-ビオチン (Thermo社) を含むホウ酸バッファー (85 mMのNaCl、4 mMのKCl、15 mMのNa₂B₄O₇、pH 9.0) により、氷上で30分間軽くタンブリングしながら標識した。hASMCを、10%のFBSで補充したPBS⁺⁺バッファー中、4度20分間インキュベートして、遊離したビオチンをクエンチした。冷却したPBS⁺⁺で細胞を再度3回洗浄し、そしてタンパク質を、これまでのように1×PICで補充された溶解バッファー (0.4%のデオキシコール酸ナトリウム、1%のNP-40、50 mMのEGTA、10 mMのトリス-C1、pH 7.4) を使用して抽出した。総インプットを、総タンパク質の4%を占める全細胞サンプルから得た。可溶化タンパク質を、4度回転させながら、100 μlのニュートラアビジンビーズ (Pierce社) と共にオーバーナイトでインキュベートした。サンプルを溶解バッファーで3回洗浄した。ビーズ結合タンパク質を次に溶出させ、そしてSDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動、そして免疫プロット分析を行った。

40

【0172】

HEK293T細胞におけるCa²⁺シグナリング測定：HEK293T細胞を、50

50

μ l の培地 (10% の FBS 及びペニシリン / ストレプトマイシンで補充された DMEM) 中、細胞 15,000 個 / ウェルの密度で、384 ウェル黒色プレート (Costar 社) 内で培養し、そして 37 / 5% の CO₂、オーバーナイトでインキュベートした。2 日目に、細胞に 5 μ M の Fluo 4 を 1 時間負荷し、そして蛍光の変化を、Tecan Infinite Pro プレートリーダーを使用して、37 で取得した。細胞を 488 ± 5 nm で励起し、そして発光を 520 ± 10 nm で取得した。

【0173】

6 ペプチドのマウス鼻腔点滴注入：0 日目及び 7 日目において、2 μ g のチリダニ抽出物を含む 40 μ l の PBS に、SPLUNC1 (-/-) マウスを、鼻腔内曝露させた。以後、14 日目～16 日目において、20 μ g の HDM を含む 40 μ l の PBS を用いて、マウスに再度鼻腔内誘発試験を行った。次に、320 μ M の短い 6 ペプチドを、1 日 1 回、15 日目及び 16 日目において鼻腔内添加し、そして動物を 17 日目に屠殺した。気管支肺胞洗浄物の総細胞数及び種類別細胞数の計測を、Kwick-Diff (商標) 染色キット (Thermo Scientific 社) を使用して実施した。動物を屠殺した後、血液を心臓穿刺により取得し、そして血漿を、全血を遠心分離することにより取得した。血清 HDM - 特異的抗体レベルを、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を使用して測定した。手短に述べると、0.01% の HDM を含む PBS を用いてプレートをオーバーナイトでコーティングし、そしてプロッキングバッファー中で 1 : 10 に稀釈した血清サンプル及び標準を添加する前に、1% の BSA を含む PBS で 1 時間ブロックした。プレートを、0.05% の Tween-20 を含有する PBS で 6 回洗浄した後、2 μ g / ml の濃度でビオチン化された抗マウス IgE (Pharmingen 社) と共に 1 時間インキュベーションした。プレートを更に 6 回洗浄し、ストレプトアビジン - HRP (R&D Systems 社) を 30 分間添加し、そして結合した HDM - 特異抗体の量を、TMB 基質 (Thermo Scientific 社) を使用して測定した。

【0174】

統計分析：すべてのデータは、n 回の実験の平均値 ± SEM として示す。平均値間の差異を、実験に適するように、対応がある又は対応がない t 検定、又は適宜、そのノンパラメトリック同等物を使用して、統計的有意性について検定した。群間の差異を、ANOVA を使用して判断した。そのような比較から、P < 0.05 の差異を有意と判断した。データは、別途明示しない限り、3 回の独立した実験に基づく平均値 ± SEM として示した。統計分析には、Graphpad Prism ソフトウェアを使用した。

【0175】

[実施例 2]

Ca 制御ペプチドの同定

喘息気道病因における SPLUNC1 の役割を調査するために、喀痰 SPLUNC1 レベルを、健康なドナー、喘息患者、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、及び喘息を有さないアトピーの個人を対象に測定したが、後者 2 コホートは疾病コントロールとして位置づけられた。人口統計学的情報を表 2 に示す。免疫プロット分析は、他のドナーと比較して喘息患者サンプルでは SPLUNC1 タンパク質レベルが減少していることを示唆した (図 1A、1B)。SPLUNC1 レベルの減少が ASM 活性異常と関連するか試験するために、SPLUNC1 (-/-) マウスは AHR を示すかどうか試験した。このマウスは、メタコリン (Mch) 誘発試験後、その SPLUNC1 (+/+) 同腹仔コントロールと比較して気道抵抗の有意な増加を示し (図 1C)、SPLUNC1 発現と ASM 收縮との逆相関を示唆した。SPLUNC1 の ASM に対する効果を更に試験するために、気管をこのマウスから切除し、そしてワイヤーミオグラフ上に取り付けて、ex vivo での収縮性を測定した。SPLUNC1 (-/-) マウスに由来する気管軟骨輪は、アセチルコリン (Ach) 又は KCl への曝露後、野生型コントロールと比較して、有意な過収縮性を示した (図 1D)。この効果は、ニコチン受容体 / Ach 受容体を刺激する Ach、及び原形質膜を脱分極して Ca²⁺ 流入を誘発する KCl の両方において認められたので、(Fryerら、Am. J. Respiratory Critical Care

10

20

30

40

50

Med., 158巻: S 154頁(1998年); Ratzら、Am. J. Physiol. Cell Physiol., 288巻: C 769頁(2005年)、この効果は受容体機能の異常に起因するものではないと結論付けられた。更に、組換えSPLUNC1タンパク質で1時間事前処理すると収縮が抑制され(図1E)、SPLUNC1はEDSMRFであることを示唆する。この観察所見の潜在的重要性に起因して、コラーゲンマトリックス中で培養したASM細胞(ASMC)内のASM-SPLUNC1相互作用について更に調査した。ASMC収縮は、組換えSPLUNC1との事前インキュベーションにより有意に低下することが認められた(図2A、2B)。ASMCでは、収縮は、リン酸化されたミオシン軽鎖(MLC)とアクチンの間のクロスブリッジ形成により制御される。Actは、Ca²⁺に依存してMLCのリン酸化を強化し、従って収縮を強化する。MLCのリン酸化は、Actにより増加した一方、SPLUNC1による事前処理は、基底及び誘発性のMLCリン酸化の両方を減少させた(図2C、2D、及び図3A~3D)。

【0176】

【表2】

表2: 図1の喀痰ドナーの人口統計学的情報

ドナーの疾患状態	年齢	性別	FVC	FEV ₁	FVC %PRED	FEV ₁ %PRED
非喘息 /非アレルギー/非喫煙者	21	M	6.48	5.25	117	110
非喘息 /非アレルギー/非喫煙者	23	F	4.2	3.25	117	105
非喘息 /非アレルギー/非喫煙者	20	F	3.64	3.08	84	84
非喘息 /非アレルギー/非喫煙者	23	M	6.05	4.77	106	96
非喘息 /非アレルギー/非喫煙者	28	F	4.6	3.44	115	102
非喘息 /非アレルギー/非喫煙者	20	M	5.15	4.1	107	99
喘息/非喫煙者	22	F	3.76	2.93	101	91
喘息/アレルギー患者	21	F	4.27	3.26	103	90
喘息/アレルギー患者	36	M	5.85	4.66	102	102
喘息/アレルギー患者	31	F	3.52	2.8	105	98
喘息/アレルギー患者	21	F	4.84	3.65	122	106
喘息/アレルギー患者	26	F	4.74	3.32	119	96
COPD	62	F	2.01	1.14	74	54
COPD	46	F	3.82	2.92	101	96
COPD	67	M	3.92	1.82	48	48
COPD	70	F	2.06	1.12	72	51
COPD	52	M	3.4	1.66	72	45
COPD	58	M	4.21	1.2	84	32
健常/アレルギー患者	37	F	3.53	3.07	103	108
健常/アレルギー患者	25	F	4.23	3.47	115	111
健常/アレルギー患者	22	F	2.89	2.59	94	97
健常/アレルギー患者	28	M	4.89	4.09	87	87
健常/アレルギー患者	27	M	4.89	3.86	98	92
健常/アレルギー患者	30	M	5.02	4.18	105	104

【0177】

10

20

30

40

50

次に、SPLUNC1タンパク質レベルを、健康なドナー及び喘息ドナーに由来する一次HBECにおいて測定した。人口統計学的情報を表3に示す。喀痰サンプルデータと整合して(図1A、1B)、免疫プロット分析は、非喘息ドナーと比較して、喘息HBECライセート、漿膜培地、及び粘膜洗浄物中のSPLUNC1レベルが有意に減少したことを明らかにした(図4A、4B)。喘息HBEC中のSPLUNC1 mRNAの減少も検出された(図5)。Chuらは、喘息関連のTヘルパー2細胞(Th2)サイトカイン(例えば、IL-13)は、HBECにおけるSPLUNC1発現を有意に減少させることをこれまでに報告した(Chuら、J. Immunol., 179巻:3995頁(2007年))。このデータに基づき、喘息組織中のSPLUNC1の減少は、Th2応答と緊密に関連し得ると推測される。SPLUNC1はMLCのリン酸化を下方制御したので、SPLUNC1のASMC Ca²⁺シグナリング制御について次に調査した。ASMCを健康なHBECに由来する漿膜培地、又は組換えSPLUNC1に曝露したとき、サブシガルジン(TG)誘発性のCa²⁺流入は、用量に依存して(図4E)有意に低下した(図4C、4D及び図6A~6B)。Ca²⁺はSR及び細胞外環境を含む様々な起源に由来する(Koopmansら、Pulmonary Pharmacol. Ther., 29巻:108頁(2014年))。細胞外Ca²⁺がなければ、TGは、細胞質Ca²⁺をある程度上昇させるに過ぎないが、Ca²⁺を再導入すると、SOCEを誘発した。SPLUNC1で事前処理しても、SR Ca²⁺放出に対して効果を有さなかつたが、SOCEを有意に抑制した(図4F、4G)。

【0178】

【表3】

表3: 図4A~4D、及び図5の喀痰ドナーの人口統計学的情報。

ドナーの疾患状態	年齢	性別
健常/非喘息/非喫煙者	19	M
健常/非喘息/非喫煙者	45	M
健常/非喘息/非喫煙者	49	M
喘息/喫煙患者	50	F
喘息/喫煙患者	25	M
喘息/喫煙患者	38	F

【0179】

この効果に関係したSPLUNC1内の構造的領域を把握するために、一連のSPLUNC1突然変異体/ペプチドを、Ca²⁺シグナリングを抑制するその能力を試験するのに使用した。阻害は、マウス及びヒトSPLUNC1について異ならなかった(図4H)。SPLUNC1のS18領域は、そのENaC制御ドメインとしてこれまでに同定されているが(Hobbsら、Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 305巻:L990頁(2013年))、SOCEを阻害することはなく、SPLUNC1の作用は、ENaC非依存性であることを示唆した。同様に、そのN末端S18領域(44SPLUNC1)を欠いているSPLUNC1は、Ca²⁺シグナリングをなおも阻害した。しかし、ヘリックス6(6SPLUNC1)の欠損は、Ca²⁺シグナリングを阻害するその能力を有意に無効化した(図4H)。

【0180】

Orai1は、SOCEに関係しており、またSPLUNC1が低下しているマウス喘息モデルにおいて過剰活性であるので(Spinelliら、Pflugers Archiv.: Eur. J. Physiol., 464巻:481頁(2012年); Yangら、Exp. Physiol., 97巻:1315頁(2012年))、このようなタンパク質の相互作用について試験した。SPLUNC1及びOrai1は、免疫共沈可能であったが、オルタネイトCa²⁺チャネル(TRPC3)はそうではなかった(図7A、7B、及び図8)。基底状態枯渇式の超解像顕微鏡法を使用すると、SPLUNC1及

10

20

30

40

50

びOrai1は、1時間のインキュベーション後、ASMC原形質膜中に共局在することが判明し、そして表面ビオチン化／ウェスタンプロット及び共焦点顕微鏡検査により、原形質膜Orai1レベルは、4時間のSPLUNC1曝露後に、約50%減少することが実証された(図7C～7E)。一方、細胞基質Orai1は増加することから、SPLUNC1と結合すると、Orai1の細胞内局在性に変化を引き起こすことが示唆される(図9A～9B)。Orai1がSPLUNC1の標的であることを確認するために、ASMC内で、内因性Orai1をshRNAによりノックダウンし、qPCR(図7F)及び免疫プロット(図10)の両方によりそれを確認した。Orai1のノックダウンは、ASMC原形質膜に結合するSPLUNC1を減少させた(図11A～11B、及び12A～12B)。更に、Orai1をshRNAによりノックダウンすると、Ca²⁺シグナリングを阻害するSPLUNC1の能力が失われ、Orai1はSPLUNC1の標的であることが確認された(図7G、7H)。SPLUNC1由来のペプチド(配列番号2)は、ヒトASMCにおいて、サブシガルジン誘発性のカルシウム放出を阻害した(図13)。総じて、このようなデータは、SPLUNC1はOrai1と結合し、そしてこれを阻害することでASMCにおけるCa²⁺流入をブロックし、その結果、MLCのリン酸化及びASM収縮性の減少を引き起こすことを示唆する。

【0181】

SPLUNC1は、ENaCの-サブユニットに細胞外結合することにより、気道上皮におけるENaC活性を制御し、チャネル内部移行を引き起こすことがこれまでに明らかにされている(Garcia-Caballeroら、Proc.Natl.Acad.Sci.,米国、106巻:11412頁(2009年))。ここでは、基底部において分泌されるSPLUNC1は、Orai1と細胞外で結合し、内部移行によるSOCEの阻害(internalization inhibition of SOCE)、及びASM収縮の減少を引き起こすことを示す(図7A～7H)。ENaCを制御するS18領域はSPLUNC1のN末端に位置するが(Tarranら、Intl.J.Biochem.Cell Biol.,52巻:130頁(2014年))、一方、6はSPLUNC1のC末端に位置し、従ってこれら異なる機能的領域は、SPLUNC1の反対側に位置することに留意されたい。ここでは、基底部において分泌されるSPLUNC1がASM内でSOCEを制御する能力について注目する。しかし、SPLUNC1の欠損は、気道上皮におけるENaC及びOrai1の制御に対しても影響を有する可能性がある。実際、粘液は、喘息気道内で脱水していることが明らかにされており、これは、ENaCが過剰活性であることを示唆し得るが、またENaC制御は、喘息患者ではin vivoで機能していないことが明らかにされている(Nakagamiら、J.Immunol.,181巻:2203頁(2008年); Rademacherら、Eur.Respiratory J.,47巻:322頁(2016年); Loughlinら、Respiratory Med.,104巻:29頁(2010年))。更に、粘液分泌はCa²⁺依存性なので、SPLUNC1が存在せずSOCEが増加すると、喘息に認められる粘液分泌過多の表現型に寄与する可能性がある。

【0182】

喘息は、ASM収縮/AHR及び粘液分泌過多に起因する気流制限により特徴付けられる慢性気道疾患である。粘液分泌過多の成分は、Th2駆動型のゴブレット細胞異形成に起因する可能性がある(Cohn、J.Clin.Invest.,116巻:306頁(2006年); Erleら、J.Cell.Biol.,205巻:621頁(2014年))。そういうわけで、転写因子SAM-pointed domain-containing ETS-like factor(SPDEF)及びフォークヘッドオルソログA3(FOXA3)は、喘息において異常な制御を受け、ゴブレット細胞異形成を引き起こす(Rajaveluら、J.Clin.Invest.,125巻:2021頁(2015年); Chenら、Am.J.Respir.Crit.Care Med.,189巻:301頁(2014年))。SPDEF/FOXA3活性が喘息患者におけるSPLUNC1発現低下に関与しているかどうかは、まだ明らかにされていない。更

10

20

30

40

50

に、Chuらは、一般的な喘息治療薬である作動薬は、SPLUNC1発現を増加させ得ることを明らかにしたが(Grossら、BMC Pulmonary Med., 10巻:30頁(2010年))、SPLUNC1発現が、作動薬及びグルココルチコイドを含むその他の主流療法により、どのように制御されるか、その様式をより深く理解すれば、喘息を治療する新規の標的療法をもたらす可能性がある。実際、Chuらは、オバルブミンにより感作したとき、SPLUNC1(-/-)マウスは、好酸球性炎症を含む、WTマウスよりも重症の表現型を有することを実証した(Thaikoottathilら、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 47巻:253頁(2012年))。Chuらは、過剰のバクテリアリポ多糖類は頂端部において分泌されるSPLUNC1により「モップアップされる」と仮定し、そして基底部において分泌されるSPLUNC1を要因としてそのモデルに取り入れなかった。従って、SPLUNC1は基底部において分泌され、そこでSOC-E及びASMの収縮を調節することができる、という本発明の所見は、喘息の病因に関する重要な意味合いを有する基本的に新しい進歩であり、上皮機能障害とAHRの間の直接的な関連性を提示すると共に、喘息に対する将来的な新規治療法を提供する。

10

【0183】

[実施例3]

Ca制御ペプチドの免疫抑制効果

Orai1はHEK293T細胞におけるCa²⁺流入に関与していることが明らかにされているので、6ペプチド(配列番号2及び3)の効果は、気道平滑筋よりも広範に及ぶか調べるために、HEK293T細胞においてCa²⁺流入を阻害するこのペプチドの能力を試験した。HEK293T細胞を384ウェルプレート内で24時間増殖させ、これに10mMのFluo4-AMを30分間負荷し、次にサブシガルジン誘発性のCa²⁺放出を、完全長SPLUNC1、並びに短い(配列番号3)及び長い(配列番号2)6ペプチドが存在する場合としない場合において測定した。蛍光(488±5nmで励起、516±10nmで蛍光を収集)を、Tecan Infinite Proプレートリーダーを使用して30秒毎に収集した。完全用量応答曲線の作図を、図14に示すようにSPLUNC1及び2つのペプチドについて実施した。見てわかる通り、ペプチドの両方は、完全長SPLUNC1と類似したCa²⁺流入阻害を示した。

20

【0184】

6ペプチドがin vivoで有効であったか試験するために、十分に特徴付けがなされたマウスアレルギーモデル、チリダニ曝露マウスを使用した(Wu Tら、Nature Communications, 2017年)。SPLUNC1(-/-)マウスは、自然炎症及び気道過剰反応性を含む喘息様の症状を有するので(Wu Tら、Nature Communications, 2017年; Thaikoottathilら、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 47巻:253頁(2012年))、0日目及び第14日目にいて、SPLUNC1(-/-)マウスを、20μgのHDMに鼻腔内曝露した。以後、第14日目～第17日目にかけて、20μgのHDMを用いて、このマウスに鼻腔内誘発試験を行った。320mMの短い6ペプチドを1日1回、15日目及び16日目に鼻腔内投与し、そして17日目に動物を屠殺した。気管支肺胞洗浄を実施し、そして総細胞数及び種類別細胞数計測を実施した(図15)。見てわかる通り、6ペプチドの添加はHDMマウスにおける総細胞数を有意に低下させ、また、好中球及び好酸球の流入も減少させた。

30

【0185】

免疫グロブリンE(IgE)は、アレルギー性の過敏症において重要な役割を演じている。従って、6ペプチドは循環性IgEレベルを減退させ得るか、次に試験した。図15に記載したのと同一のSPLUNC1(-/-)マウス/HDM誘発試験を使用して、血清を17日目に取得し、そしてIgEをELISAにより測定した。炎症細胞数の減少と整合して、6ペプチドを添加すると、血漿IgEレベルが有意に低下することが判明した(図16)。

40

50

【0186】

以上は、本発明の説明であって、本発明を限定するものとはみなされない。本発明は、下記の特許請求の範囲により定義され、特許請求の範囲の等価物もその中に含まれる。

【図1A】

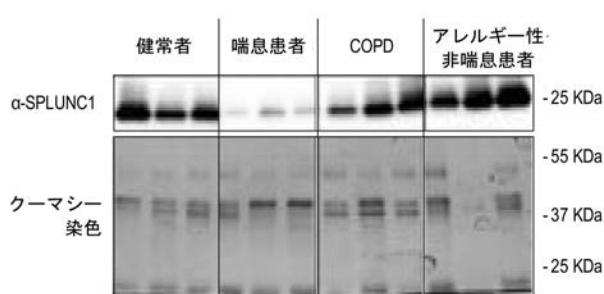


FIG. 1A

【図1C】

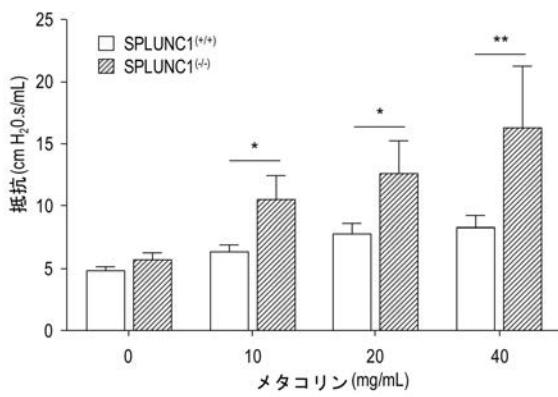


FIG. 1C

【図1B】

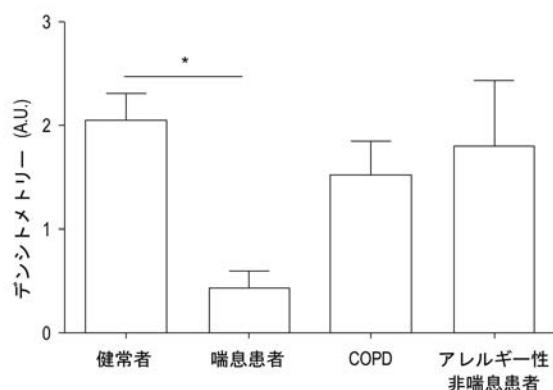


FIG. 1B

【図 1 D】

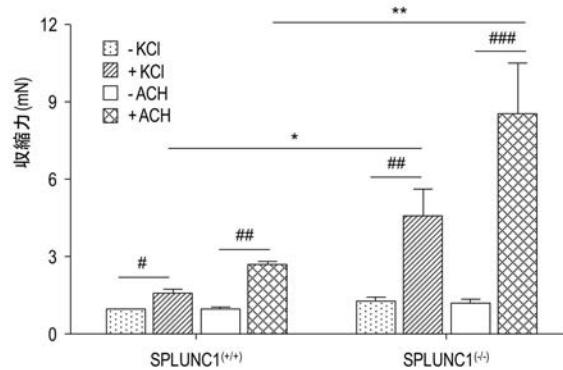


FIG. 1D

【図 1 E】

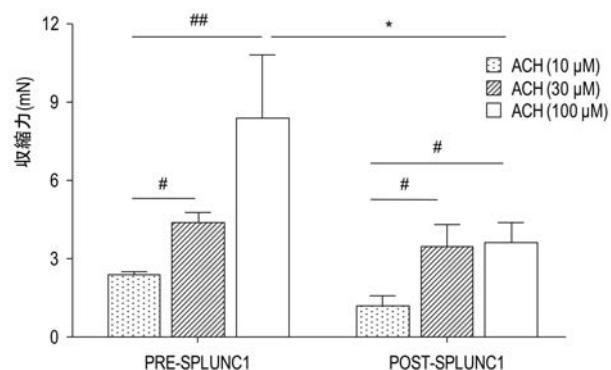


FIG. 1E

【図 2 A】

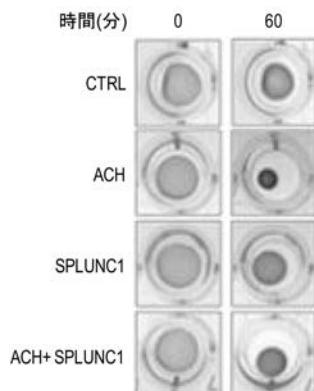


FIG. 2A

【図 2 B】

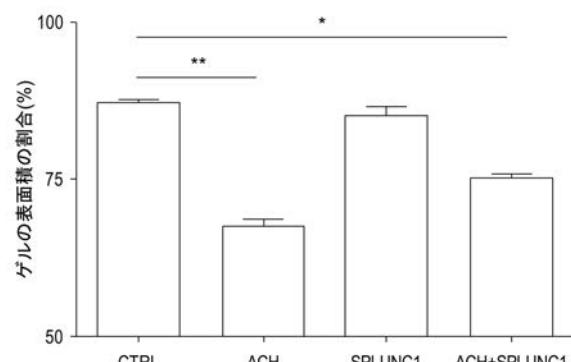


FIG. 2B

【図 2 C】

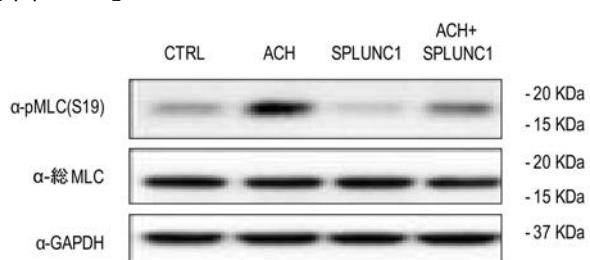


FIG. 2C

【図 2 D】

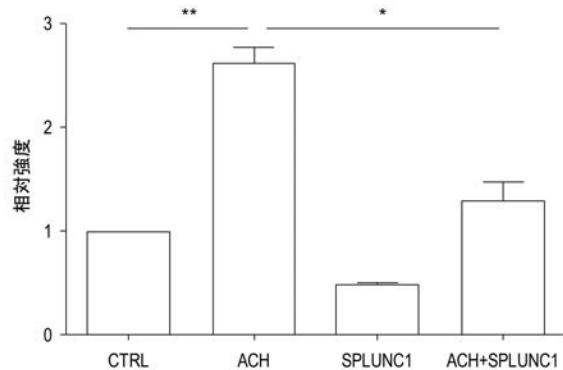


FIG. 2D

【図 3 B】

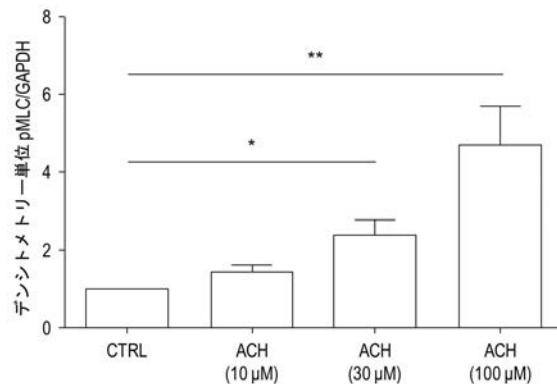


FIG. 3B

【図 3 A】

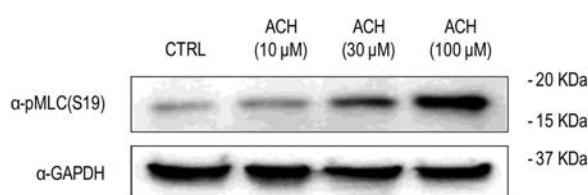


FIG. 3A

【図 3 C】

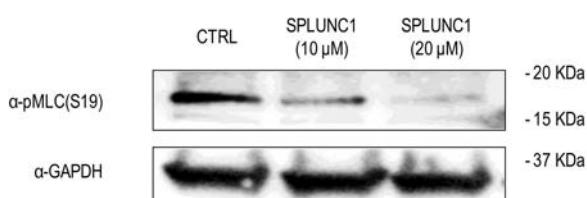


FIG. 3C

【図 3 D】

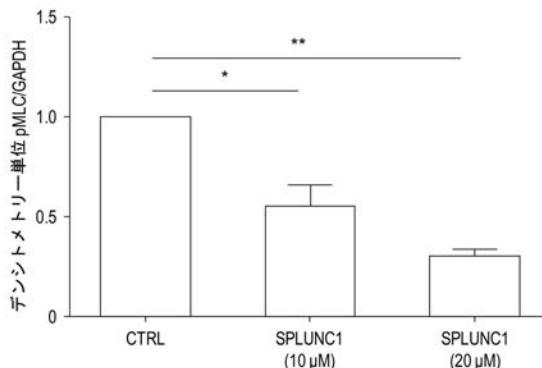


FIG. 3D

【図 4 B】

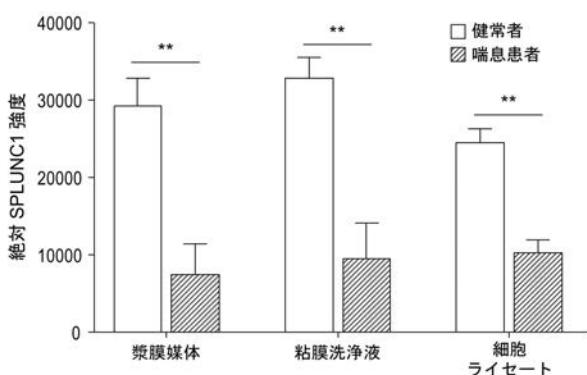


FIG. 4B

【図 4 A】

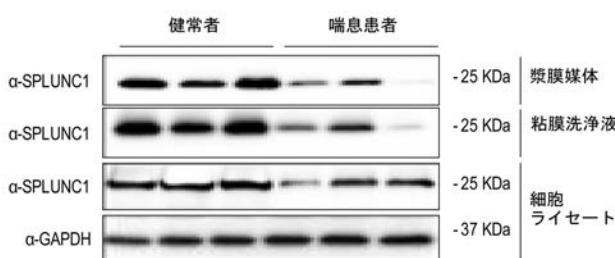


FIG. 4A

【図 4 C】

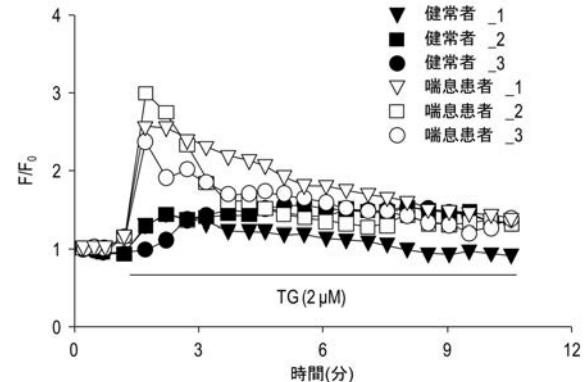


FIG. 4C

【図4D】

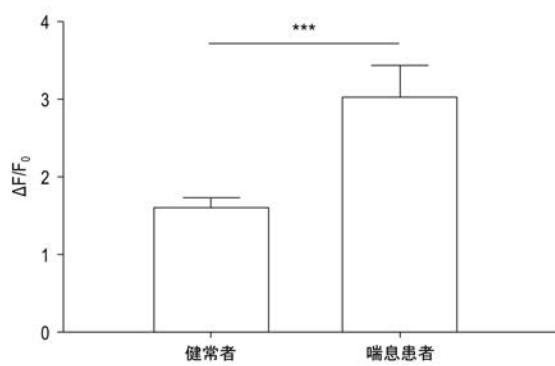


FIG. 4D

【図4E】

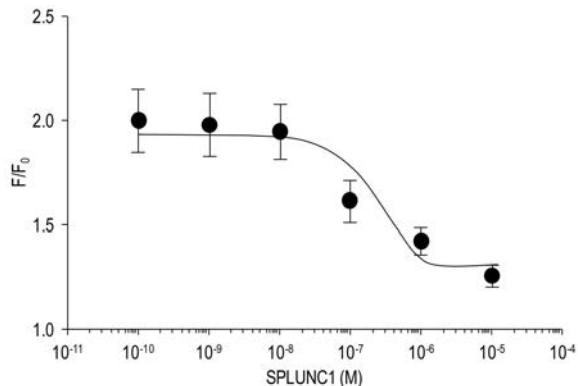


FIG. 4E

【図4F】

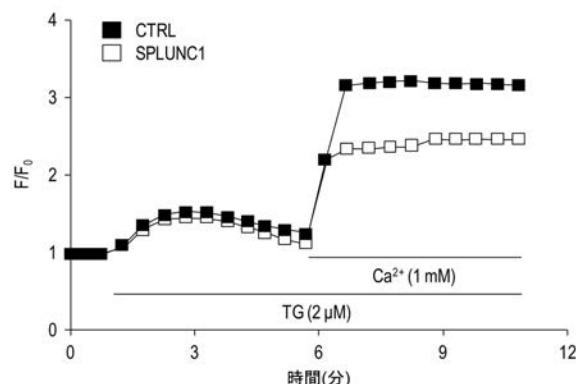


FIG. 4F

【図4H】

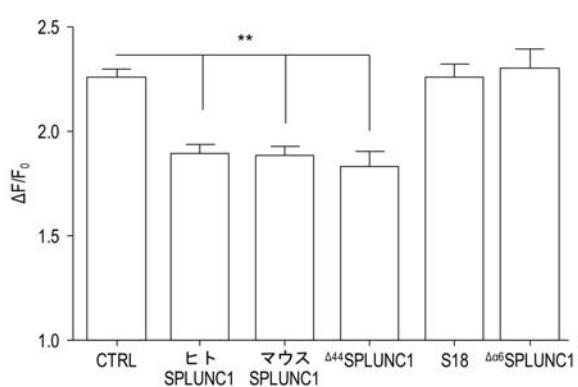


FIG. 4H

【図4G】

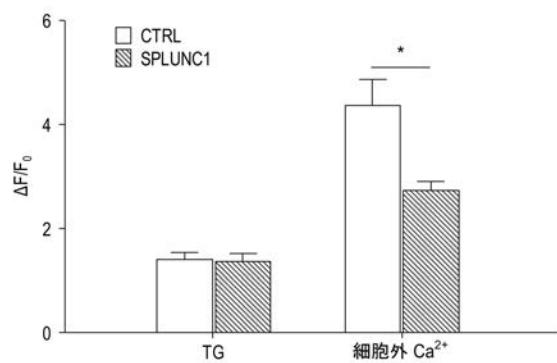


FIG. 4G

【図5】

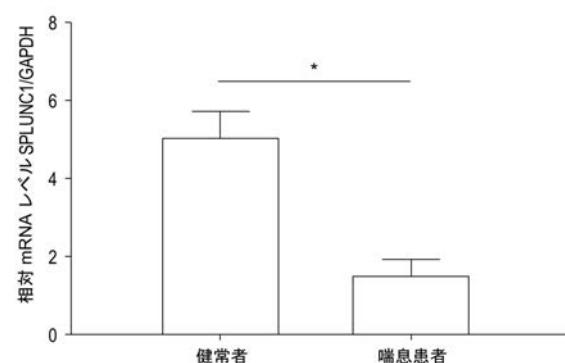


FIG. 5

【図 6 A】

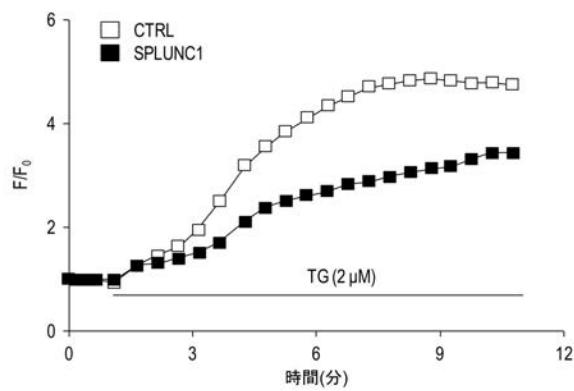


FIG. 6A

【図 6 B】

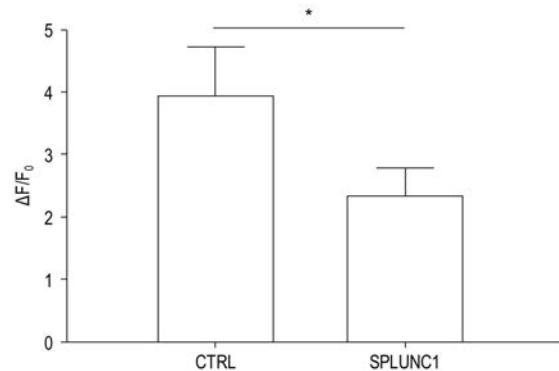


FIG. 6B

【図 7 C】

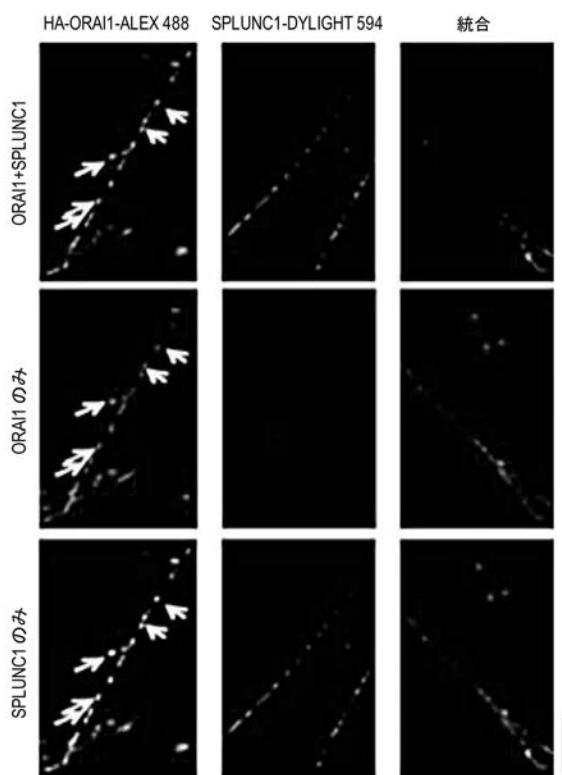


FIG. 7C

【図 7 A】

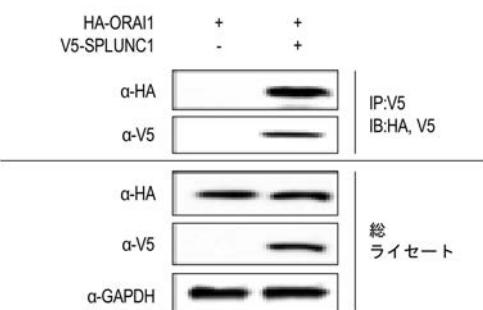


FIG. 7A

【図 7 B】

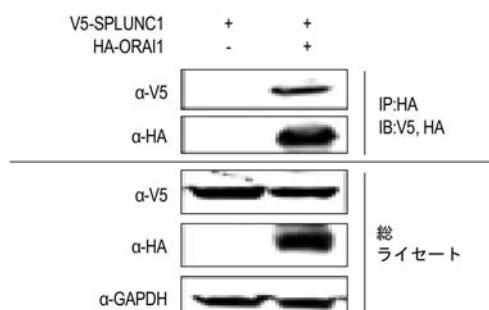


FIG. 7B

【図 7 D】

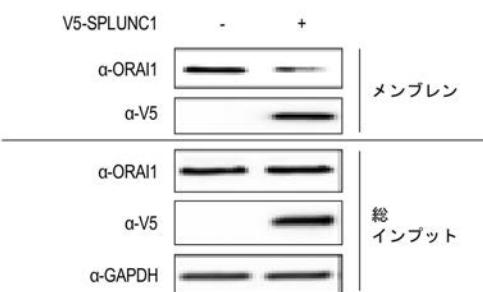


FIG. 7D

【図 7 E】

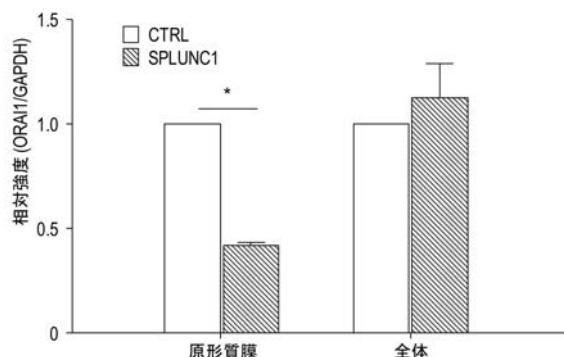


FIG. 7E

【図 7 F】

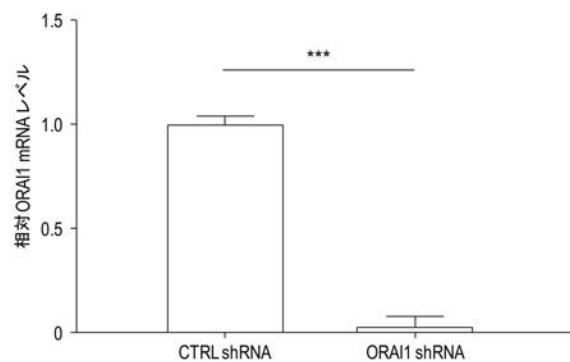


FIG. 7F

【図 7 G】

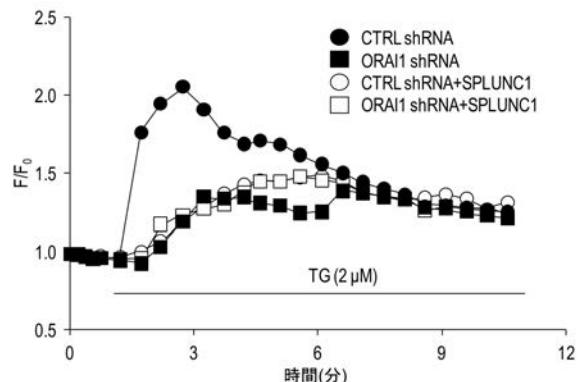


FIG. 7G

【図 7 H】

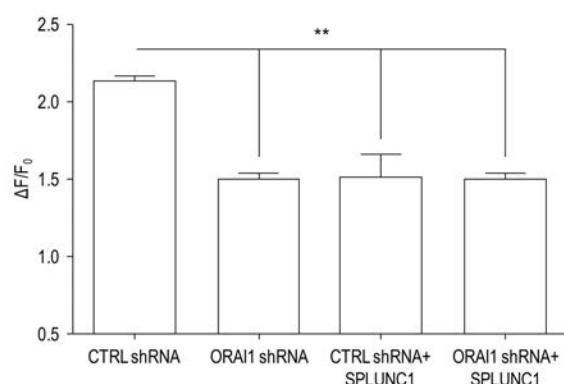


FIG. 7H

【図 8】

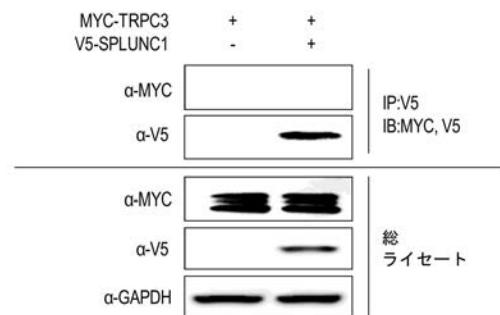


FIG. 8

【図 9 A】

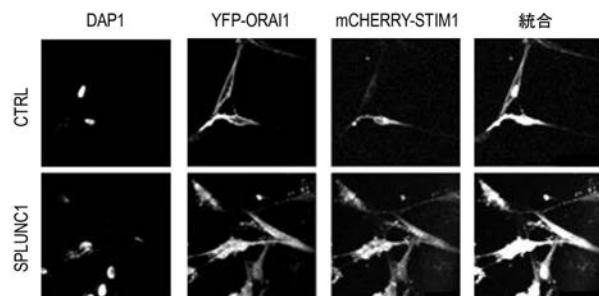


FIG. 9A

【図 9 B】

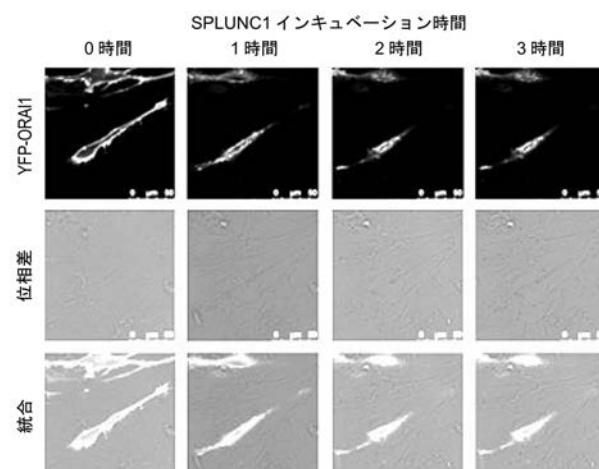


FIG. 9B

【図 10】

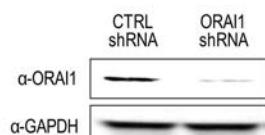


FIG. 10

【図 11A】

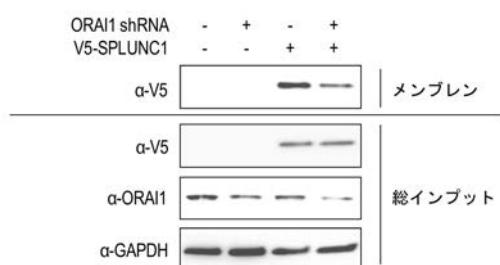


FIG. 11A

【図 11B】

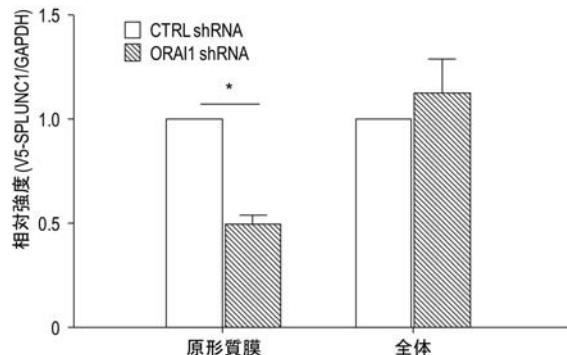


FIG. 11B

【図 12A】

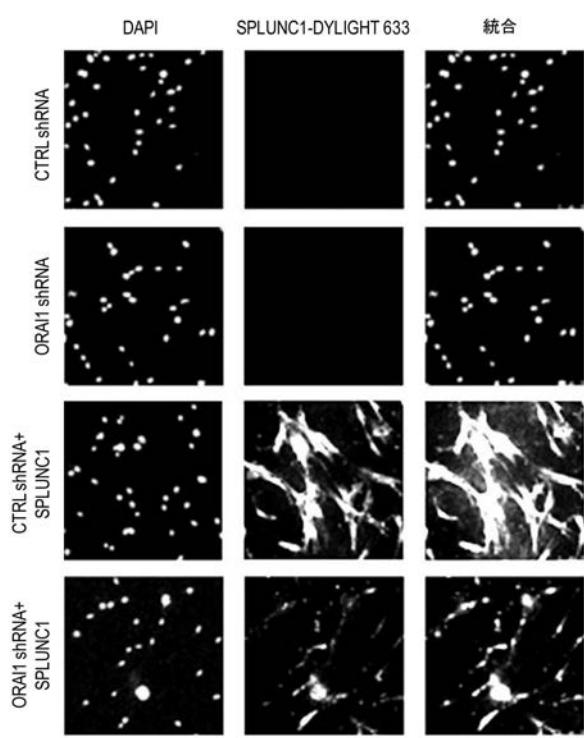


FIG. 12A

【図 12B】

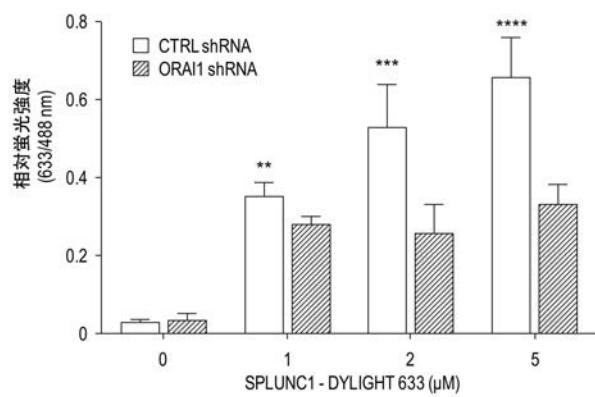


FIG. 12B

【図 1 3】

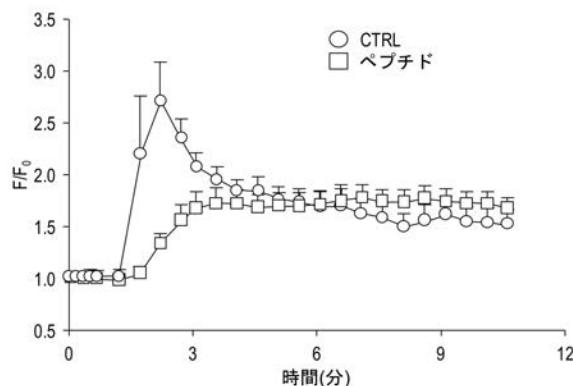
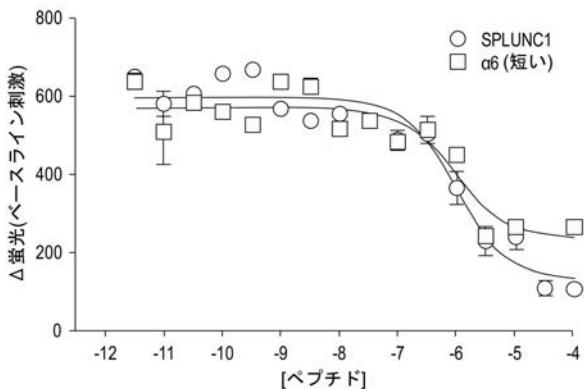


FIG. 13

【図 1 4】



[ペプチド]

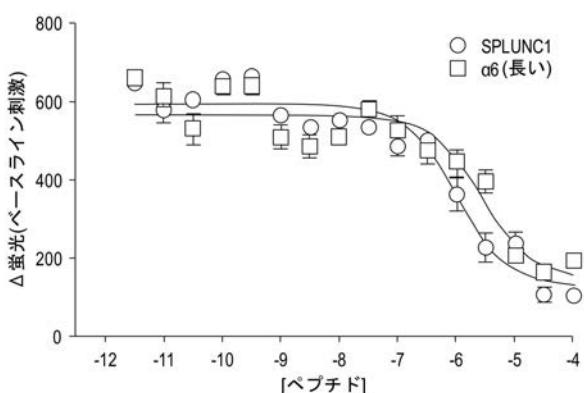


FIG. 14

【図 1 5】

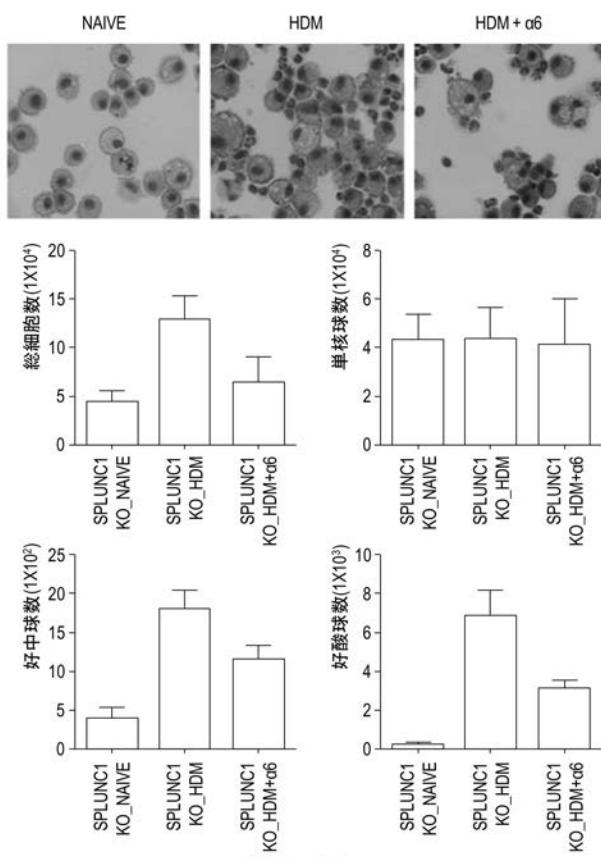


FIG. 15

【図 1 6】

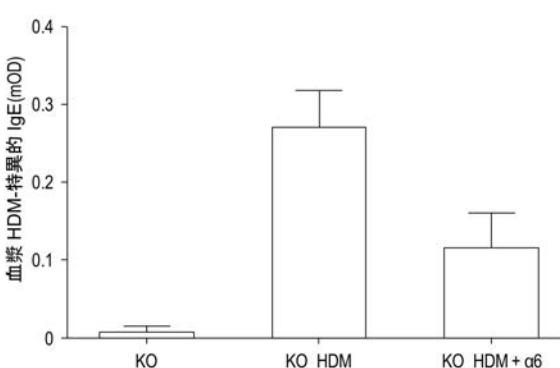


FIG. 16

【配列表】

2019512216000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2017/018840
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (see extra sheet) 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) C07K 14/435, A61K 38/17, A61P 11/06, 35/00, 37/00		
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 practicable, search terms used) E-Library, Espacenet, PatSearch, PATENTSCOPE, RUPTO, NCBI, EMBL-EBI, Google Scholar, PubMed, USPTO, ScienceDirect		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOBBS C.A. et al. «Identification of the SPLUNC1 ENaC-inhibitory domain yields novel strategies to treat sodium hyperabsorption in cystic fibrosis airway epithelial cultures». Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2013, Vol.305, p.L990-L1001, especially Table 1	1-3, 7, 10 13-20 8, 9, 11, 12, 21-42
Y	WO 2013/043720 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL), 28.03.2013, paragraphs [0149], [0264]-[0267], [0272], claims	13-20
A	CHUNLIN OU et al. «SPLUNC1 reduces the inflammatory response of nasopharyngeal carcinoma cells infected with the EB virus by inhibiting the TLR9/NF-κB path-way». ONCOLOGY REPORTS, 2015, Vol.33, p.2779-2788	1-3, 7-42
A	THAIKOOTTATHIL J. V. et al. «SPLUNC1 Deficiency Enhances Airway Eosinophilic Inflammation in Mice». American journal of respiratory cell and molecular biology, 2012, Vol.47, p.253-260	1-3, 7-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family 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		
Date of the actual completion of the international search 03 May 2017 (03.05.2017)		Date of mailing of the international search report 08 June 2017 (08.06.2017)
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Authorized officer S.Il'chenko Telephone No. 495 531 65 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2017/018840
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN P. et al. «SPLUNC1 Regulates Cell Progression and Apoptosis through the miR-141-PTEN/p27 Pathway, but Is Hindered by LMP1». PLoS ONE, 2013, 8(3): e56929, p.1-12, doi:10.1371/journal.pone.0056929	1-3, 7-42
A	CHEN J-P. et al. "TRPM7 regulates the migration of human nasopharyngeal carcinoma cell by mediating Ca ²⁺ influx". Cell calcium, 2010, Vol. 47, no.5, p.425-432	1-3, 7-42

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

<p style="text-align: center;">INTERNATIONAL SEARCH REPORT</p>	<p>International application No. PCT/US 2017/018840</p>
<p>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</p> <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-6 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 	
<p>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</p> <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 	
<p>Remark on Protest</p>	<p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Classification of subject matter

International application No.

PCT/US 2017/018840

C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(特許序注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人	100166268 弁理士 田中 祐
(74)代理人	100170379 弁理士 徳本 浩一
(74)代理人	100180231 弁理士 水島 亜希子
(74)代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(72)発明者	タラン , ロバート アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27516 , チャペル・ヒル , バリス・プレイス 316
(72)発明者	ワー , トンドウ アメリカ合衆国ノースカロライナ州 27516 , チャペル・ヒル , ファン・ブランチ・レイン 200
F ターム(参考)	4B065 AA90X AA91X AB01 AC14 BA02 CA44 4C084 AA02 BA01 BA08 BA18 BA19 BA23 CA53 MA55 NA14 ZA61 ZA62 ZB08 ZB11 ZB13 ZB26 ZC41 4H045 AA10 AA30 BA10 BA17 BA18 CA40 EA20 FA10 FA74