



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118843641 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 25

(21) 申请号 202380024740.6

(22) 申请日 2023.02.20

(30) 优先权数据

2022-032709 2022.03.03 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/005966 2023.02.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/167033 JA 2023.09.07

(71) 申请人 国立大学法人香川大学

地址 日本

(72) 发明人 西山成 北田研人 A·拉赫曼

中神启德 林宏树

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书2页 说明书23页

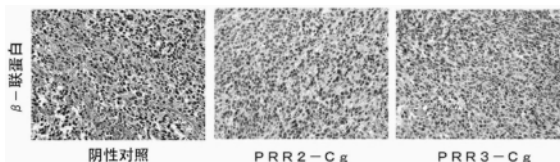
序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称

肾素原受体肽、缀合物及药物组合物

(57) 摘要

提供增强了针对肾素原受体的抗体诱导能力的肾素原受体肽。本发明的肾素原受体肽包括下述(P1)、(P2)或(P3)的多肽：(P1)由序列号1~3中任一项所述的氨基酸序列构成的多肽；(P2)由在序列号1~3中任一项所述的氨基酸序列中缺失、置换或添加1~3个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽；(P3)由相对于序列号1~3中的任一氨基酸序列具有80%以上的同一性的氨基酸序列构成的多核苷酸。



1. 一种肾素原受体肽,其包括下述 (P1)、(P2) 或 (P3) 的多肽:
 - (P1) 由序列号1~3中的任一氨基酸序列构成的多肽;
 - (P2) 由在序列号1~3中的任一氨基酸序列中缺失、置换或添加1~3个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽;
 - (P3) 由相对于序列号1~3中的任一氨基酸序列具有80%以上的同一性的氨基酸序列构成的多核苷酸。
2. 一种缀合物,其包含抗原肽和载体蛋白,
所述抗原肽与所述载体蛋白结合,
所述抗原肽包含权利要求1所述的肾素原受体肽。
3. 根据权利要求2所述的缀合物,其中,所述载体蛋白包含半胱氨酸残基,
所述抗原肽结合于所述载体蛋白的半胱氨酸残基。
4. 根据权利要求2或3所述的缀合物,其中,所述载体蛋白为白喉毒素或其突变体或者为破伤风毒素或其片段。
5. 根据权利要求2至4中任一项所述的缀合物,其中,所述载体蛋白为CRM₁₉₇。
6. 根据权利要求2至5中任一项所述的缀合物,其中,给予于对象的情况下,能够诱导形成在Wnt/ β -联蛋白途径的活性试验中能够抑制Wnt/ β -联蛋白途径的活性的抗体。
7. 根据权利要求2至6中任一项所述的缀合物,其用于肿瘤的处置。
8. 根据权利要求7所述的缀合物,其中,所述肿瘤为肾素原受体阳性。
9. 根据权利要求7或8所述的缀合物,其中,所述肿瘤为家族性腺瘤性息肉病。
10. 根据权利要求9所述的缀合物,其用于合并消化道良性多发肿瘤好发疾病、加德纳综合征、特科特综合征和/或韧带样纤维瘤病的家族性腺瘤性息肉病的处置。
11. 根据权利要求2至6中任一项所述的缀合物,其用于肌少症或衰弱的处置。
12. 一种核酸,其编码权利要求1所述的肽。
13. 一种表达载体,其包含权利要求12所述的核酸。
14. 根据权利要求13所述的表达载体,其中,所述表达载体为病毒载体。
15. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述的肾素原受体肽、权利要求2至11中任一项所述的缀合物、权利要求12所述的核酸和/或权利要求13或14所述的表达载体,并且包含药学上可接受的载体。
16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其还包含免疫激活剂。
17. 根据权利要求15或16所述的药物组合物,其中,给予于对象的情况下,能够诱导形成在Wnt/ β -联蛋白途径的活性试验中能够抑制Wnt/ β -联蛋白途径的活性的抗体。
18. 根据权利要求15至17中任一项所述的药物组合物,其用于肿瘤的处置。
19. 根据权利要求18所述的药物组合物,其中,所述肿瘤为肾素原受体阳性。
20. 根据权利要求18或19所述的药物组合物,其中,所述肿瘤为家族性腺瘤性息肉病。
21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其用于合并消化道良性多发肿瘤好发疾病、加德纳综合征、特科特综合征和/或韧带样纤维瘤病的家族性腺瘤性息肉病的处置。
22. 根据权利要求15至17中任一项所述的药物组合物,其用于肌少症或衰弱的处置。
23. 一种转化体,其包含权利要求1所述的肾素原受体肽、权利要求12所述的核酸、或者权利要求13或14所述的表达载体。

24. 一种肾素原受体肽的制造方法,其包括使权利要求12所述的核酸表达和/或使权利要求13或14所述的表达载体表达的工序。

25. 根据权利要求24所述的制造方法,其中,所述表达工序包括:

培养权利要求23所述的转化体的培养工序、和

单离所述肾素原受体肽的单离工序。

26. 一种肿瘤的处置方法,其包括对对象给予权利要求1所述的肾素原受体肽、权利要求2至10中任一项所述的缀合物、权利要求12所述的核酸、权利要求13或14所述的表达载体和/或权利要求15至21中任一项所述的药物组合物的工序。

27. 一种肌少症或衰弱的处置方法,其包括对对象给予权利要求1所述的肾素原受体肽、权利要求2至6及11中任一项所述的缀合物、权利要求12所述的核酸、权利要求13或14所述的表达载体和/或权利要求15至17及22中任一项所述的药物组合物的工序。

28. 根据权利要求1所述的肾素原受体肽、权利要求2至10中任一项所述的缀合物、权利要求12所述的核酸、权利要求13或14所述的表达载体和/或权利要求15至21中任一项所述的药物组合物,其用于肿瘤的处置。

29. 根据权利要求1所述的肾素原受体肽、权利要求2至6及11中任一项所述的缀合物、权利要求12所述的核酸、权利要求13或14所述的表达载体和/或权利要求15至17及22中任一项所述的药物组合物,其用于肌少症或衰弱的处置。

肾素原受体肽、缀合物及药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及肾素原受体肽、缀合物及药物组合物。

背景技术

[0002] Wnt/ β -联蛋白 (β -catenin) 途径的异常可能成为各种疾病的原因。上述Wnt/ β -联蛋白途径发生异常时,例如会发生家族性腺瘤性息肉病等肿瘤(良性肿瘤)及骨质疏松症等(非专利文献1~4)。近年正在尝试通过切断Wnt/ β -联蛋白来治疗因Wnt/ β -联蛋白途径的异常而发生的疾病。

[0003] 现有技术文献

[0004] 非专利文献

[0005] 非专利文献1:Caldwell,G.M.,et al."Wnt signalling in adenomas of familial adenomatous polyposis patients."British journal of cancer 103.6 (2010):910-917.

[0006] 非专利文献2:Obador-Hevia,Antonia,et al."Oncogenic KRAS is not necessary for Wnt signalling activation in APC-associated FAP adenomas."The Journal of pathology 221.1(2010):57-67.

[0007] 非专利文献3:Zhong,Zhendong A et al."Regulation of Wnt receptor activity:Implications for therapeutic development in colon cancer."The Journal of biological chemistry vol.296(2021):100782.doi:10.1016/j.jbc.2021.100782

[0008] 非专利文献4:Phull,Manjinder Singh et al."A perspective on medicinal chemistry approaches towards adenomatous polyposis coli and Wnt signal based colorectal cancer inhibitors."European journal of medicinal chemistry vol.212 (2021):113149.doi:10.1016/j.ejmech.2020.113149

发明内容

[0009] 发明要解决的问题

[0010] 但是,Wnt/ β -联蛋白途径在生物体中具有各种生理活性。因此,如果切断Wnt/ β -联蛋白途径,则也会抑制上述生物体的各种生理活性,因此存在难以作为治疗靶点的问题。

[0011] 本发明人们发现,肾素原受体有助于Wnt/ β -联蛋白途径的活化,通过使用针对肾素原受体 (PRR) 的抗体可以抑制Wnt/ β -联蛋白途径。因此,本发明人们想到,是否可以通过使用PRR肽来治疗起因于Wnt/ β -联蛋白途径的疾病。另外,研究了使用上述PRR的第200~213位的肽 (PRR0) 在荷瘤模型小鼠中是否可得到抗肿瘤效果。但是,给予了上述PRR0的小鼠中未得到充分的抗肿瘤效果。推测这是由于针对上述PRR的抗体的诱导能力不充分。

[0012] 因此,本发明的目的在于,提供增强了针对肾素原受体的抗体诱导能力的PRR肽。

[0013] 用于解决问题的方案

- [0014] 为了达到上述目的,本发明的肾素原受体肽包括下述 (P1)、(P2) 或 (P3) 的多肽:
- [0015] (P1) 由序列号1~3中任一项所述的氨基酸序列构成的多肽;
- [0016] (P2) 由在序列号1~3中任一项所述的氨基酸序列中缺失、置换或添加1~3个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽;
- [0017] (P3) 由相对于序列号1~3中的任一氨基酸序列具有80%以上的同一性的氨基酸序列构成的多核苷酸。
- [0018] 本发明的缀合物包含抗原肽和载体蛋白,
- [0019] 上述抗原肽与上述载体蛋白结合,
- [0020] 上述抗原肽包含本发明的肾素原受体肽。
- [0021] 本发明的核酸编码本发明的肾素原受体肽。
- [0022] 本发明的表达载体包含本发明的核酸。
- [0023] 本发明的药物组合物包含本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸和/或表达载体且包含药学上可接受的载体。
- [0024] 发明的效果
- [0025] 本发明的PRR肽能增强针对肾素原受体的抗体诱导能力。

附图说明

- [0026] 图1为示出实施例1中的肾素原受体疫苗PRR0的抗体效价的图。
- [0027] 图2为示出实施例1中的肾素原受体疫苗PRR0第一次接种起10周后的小鼠的照片。
- [0028] 图3为示出实施例1中的肾素原受体疫苗PRR1~4的抗体效价的图。
- [0029] 图4为示出实施例1中的肾素原受体疫苗PRR1~4的抗肿瘤效果的图。
- [0030] 图5为示出实施例1中的肾素原受体疫苗PRR2及PRR3的抗肿瘤效果的图。
- [0031] 图6为实施例1中的大肠组织中的 β -联蛋白的染色的照片。
- [0032] 图7为示出实施例1中的短期观察下的肾素原受体疫苗PRR2及PRR3的抗体效价的图。
- [0033] 图8为示出实施例1中的长期观察下的肾素原受体疫苗PRR2及PRR3的抗体效价的图。
- [0034] 图9为示出实施例2中的小鼠中的CRM197-PRR2的抗体效价的图。
- [0035] 图10为示出实施例2中的食蟹猴中的CRM197-PRR2的抗体效价的图。
- [0036] 图11为示出实施例3中的HEK293细胞中的 β -联蛋白的活性的图。
- [0037] 图12为示出实施例3中的腺瘤性息肉病模型小鼠中的息肉形成抑制效果的图。
- [0038] 图13为示出实施例3中的腺瘤性息肉病模型小鼠中的息肉形成抑制效果的图。
- [0039] 图14为实施例3中的肠中的ATP6ap2或活性型 β -联蛋白的染色的照片。
- [0040] 图15为示出实施例3中的腺瘤性息肉病模型小鼠及正常小鼠中的副反应的结果的图。
- [0041] 图16为示出实施例3中的腺瘤性息肉病模型小鼠的生存率的图。
- [0042] 图17为示出实施例4中的疫苗PRR2的抗体效价的图。
- [0043] 图18为示出实施例4中的PRR2所引起的体重变化的图。

具体实施方式

[0044] 以下列举例子对本发明进行说明。以下的说明中, 只要没有特别言及则各发明的说明可以相互援引。

[0045] <定义>

[0046] 本说明书中, “蛋白质”及“多肽”是指由未修饰氨基酸(天然的氨基酸)、修饰氨基酸和/或人工氨基酸构成的肽的聚合物。上述聚合物的形状可列举例如直链、支链及环状等。

[0047] 本说明书中, “肾素原受体”是被鉴定为肾素/血管紧张素系统的构成因子的单次跨膜型蛋白质, 是作为肾素原的受体起作用的蛋白质。上述肾素原受体也被称为ATP6AP2。据推测, 上述肾素原受体间接增强Wnt/ β -联蛋白系统的活性。

[0048] 本说明书中, “缀合物”是指2个以上的氨基酸序列不同的肽通过共价键结合而成的化合物。上述氨基酸序列不同的肽例如为抗原肽、载体肽或载体蛋白。上述抗原肽例如为目的在于通过引起免疫应答、诱导淋巴细胞等的活化、从而诱导抗体的肽。上述载体肽及载体蛋白例如为对上述抗原肽赋予免疫原性的肽或蛋白质、或增强上述抗原肽的免疫原性的肽或蛋白质。上述载体肽及载体蛋白例如也可以称为肽载体及蛋白质载体。

[0049] 本说明书中, “Wnt/ β -联蛋白途径”是指Wnt借助Wnt受体(Frizzled)而活化 β -联蛋白的信号传递途径。上述Wnt/ β -联蛋白途径例如在大肠癌等癌中通过 β -联蛋白的异常蓄积及使Wnt抑制因子的基因表达失活等而帮助诱导疾病。

[0050] 本说明书中, “抑制……活性”是指转变成对象的活性得到抑制的状态或抑制了对象的活性的状态。上述“抑制……活性”与特定的蛋白质或借助上述特定的蛋白质的信号途径组合使用时, 上述“抑制……活性”是指转变成上述特定的蛋白质或借助上述特定的蛋白质的信号途径的功能得到抑制的状态或抑制了上述特定的蛋白质或借助上述特定的蛋白质的信号途径的功能的状态。

[0051] 本说明书中, “肌少症或衰弱(Frail)”是指由于肌肉组织的功能发生障碍而引起的疾病。

[0052] 本说明书中, “阳性”是指: 通过利用抗原抗体反应进行检测的流式细胞术等分析方法, 与使用不表达上述抗原的阴性对照细胞或不与上述抗原反应的抗体的阴性对照反应相比检测到高的信号等。另外, 本说明书中, “阴性”是指: 与使用不表达上述抗原的阴性对照细胞或不与上述抗原反应的抗体的阴性对照反应相比, 检测到同等或其以下的信号等。

[0053] 本说明书中, “处置”是指治疗性处置和/或预防性处置。本说明书中, “治疗”是指疾病、病情或障碍的治疗、治愈、防止、控制、缓解、改善, 或者, 疾病、病情或障碍的进展的停止、控制、降低或延迟。本说明书中, “预防”是指减少疾病或病情发生的可能性或延迟疾病或病情的发生。上述“治疗”例如可以是对发生了对象疾病的对象(患者)的治疗, 也可以是对对象疾病的模型动物的治疗。

[0054] 本说明书中, “对象”是指动物或源自动物的细胞、组织或器官, 尤其以包括人在内的含义来使用。上述动物是指人及非人动物。上述非人动物可列举例如小鼠、大鼠、兔子、狗、猫、牛、马、猪、猴、海豚、海狮等哺乳类动物。

[0055] 本说明书中, “核酸”是指脱氧核糖核苷酸(DNA)、核糖核苷酸(RNA)和/或改变的核苷酸的聚合物。本说明书中, “核酸”与特定的蛋白质组合使用时, 上述“核酸”是指编码蛋白

质的氨基酸序列的核苷酸的聚合物。上述核酸可列举例如基因组DNA、cDNA、mRNA等。上述核酸例如可以为单链或双链等。上述核酸可与“多核苷酸”或“核酸分子”互换。

[0056] 本说明书中，“宿主”是指要导入外源核酸的细胞和/或个体。上述宿主为细胞时，上述宿主也可以称为宿主细胞。

[0057] 本说明书中，“载体”及“表达载体”是指在体外或在体内被送至宿主或宿主细胞的包含核酸的重组质粒或病毒。上述“载体”及“表达载体”可列举病毒载体及非病毒载体。

[0058] 本说明书中，“转化体”是指导入了外源核酸的宿主。

[0059] 本说明书中，“单离”或“单离的”是指：经鉴定且经分离的状态和/或从自然状态下回收了成分的状态。上述“单离”或“单离的”例如可以通过经历至少1个纯化工序来实施。

[0060] 以下列举例子对本发明进行说明，但是本发明不限于以下的例子等，可以任意地变更并实施。另外，只要没有特别声明，则本发明中的各说明可相互援引。需要说明的是，本说明书中使用“~”这种表述时，以包含其前后的数值或物理值的含义来使用。另外，本说明书中，“A和/或B”的表述包括“仅A”、“仅B”、“A及B这两者”。

[0061] <肾素原受体多肽>

[0062] 一个方式中，本发明提供增强了针对肾素原受体的抗体诱导能力的多肽。本发明的肾素原受体肽包括下述(P1)、(P2)或(P3)的多肽：

[0063] (P1)由序列号1~3中的任一氨基酸序列构成的多肽；

[0064] (P2)由在序列号1~3中的任一氨基酸序列中缺失、置换或添加1或数个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽；

[0065] (P3)由相对于序列号1~3中的任一氨基酸序列具有70%以上的同一性的氨基酸序列构成的多肽。

[0066] 本发明人们进行了深入研究，结果得到了如下见解：针对肾素原受体(PRR)的抗体通过控制Wnt/ β -联蛋白途径的活性而显示抗肿瘤效果等。本发明人们进行了进一步研究，结果发现，通过给予具有PRR中的特定的氨基酸序列的肽，能够在生物体内诱导针对PRR的抗体，由此，与针对上述PRR的抗体同样地得到抗肿瘤效果及肌肉量减少抑制效果，从而完成了本发明。推测本发明的PRR肽通过在给予了上述PRR肽的生物体中诱导产生间接控制Wnt/ β -联蛋白途径的活性的抗体，从而显示抗肿瘤效果及肌肉量减少抑制效果。但是，上述推测对本发明没有任何限制。因此，本发明的PRR肽例如可以适宜地用于肿瘤(例如家族性腺瘤性息肉病等良性肿瘤)及肌少症或衰弱的处置。

[0067] 肾素原受体的来源没有特别限制，例如可根据对象的种类适当设定。上述来源可列举例如人、除人以外的非人动物等，上述非人动物可列举例如小鼠、大鼠、狗、猴、兔子、绵羊、马等哺乳类。源自各种动物的肾素原受体例如可以参照现有数据库中登录的信息。作为具体例，作为源自人的肾素原受体，cDNA的情况下可列举例如以NCBI登录号NM_005765登录的下述碱基序列(序列号4)中的第103-1155位的区域(包括终止密码子)，蛋白质的情况下可列举例如以NCBI登录号NP_005756登录的下述的氨基酸序列(序列号5)。序列号4的碱基序列是编码序列号5的氨基酸序列的序列。

[0068] 人肾素原受体cDNA(序列号4)

[0069] ctggacgagtcgagcgcgtcacctcctcacgctgcggctgtcgcccggtgtcccgccggcccggttccg
tgtcgccccgcagtgctgcggccgcccgcgcaccatggctgtgtttgtcgtgctcctggcggttggtggcgggtgtt

ttggggaacgagtttagtatattaaaatcaccagggtctgttgttttccgaaatggaaattggcctataccaggag
agcgatcccagacgtggctgcattgtccatgggcttctctgtgaaagaagacctttcttggccaggactcgcagt
gggtaacctgtttcatcgtcctcgggctaccgtcatggtgatggtgaaggagtgaaactggctctaccccc
ggcagtgatcatttcgtaccctttggagaatgcagttccttttagtcttgacagtggtgcaaattccattcactcct
tattttctgaggaaactcctgttgttttgagttggctcccagtgaggaaagagtgatatggtagggaaggcaaa
ctcagtggttgaagacctttcagtcaccttgccagctccgtaatcgctgtttcaagaaaactctgttctcagt
tcactccccctcaattctctgagtaggaacaatgaagttgacctgctctttctttctgaactgcaagtgtacatg
atatttcaagcttgctgtctcgtcataagcatctagccaaggatcattctcctgatttatattcactggagctggc
aggtttggatgaaattgggaagcgttatggggaagactctgaacaattcagagatgcttctaagatccttgttgac
gctctgcaaaagtttgcagatgacatgtacagtctttatggtgggaatgcagtggttagagtttagtcactgtcaagt
catttgacacctccctcatttaggaagacaaggactatccttgaggcaaaaacaagcgaagaaccagcaagtcctta
taaccttgcatataagtataattttgaatattccgtggttttcaacatggtactttggataatgatcgcttggcc
ttggctgtgattatcacctcttacaatatttggaaacatggatcctggatatgatagcatcatttataggatgacaa
accagaagattcgaatggattgaatgttacctgtgccagaattagaaaagggggttgaaattggctgttttgtta
aaatatatcttttagtgtgctttaaagtagatagtatactttacattttataaaaaaaaaaatcaaattttgttcttta
ttttgtgtgtgcctgtgatgttttctagagtgaattatagtattgacgtgaatccactgtggtatagattccat
aatatgcttgaatattatgatatagccatttaataacattgatttcattctgtttaatgaatttggaaatatgcac
tgaaagaaatgtaaaacatttagaatagctcgtgttatggaaaaagtgcactgaatttattagacaaacttacga
atgcttaacttctttacacagcataggtgaaaatcatatttgggctattgtatactatgaacaatttgtaaatgtc
ttaatttgatgtaaataactctgaaacaagagaaaaggtttttaacttagagtagccctaaaatatggatgtgctt
atataatcgcttagttttggaactgtatctgagtaacagaggacagctgttttttaaccctcttctgcaagtttgt
tgacctacatgggctaatatggatactaaaaatactacattgatctaagaagaaactagccttgtggagtatatag
atgcttttcattatacacacaaaaatccctgagggacattttgaggcatgaatataaaacattttttatttcagtaa
cttttccccctgtgtaagttactatggtttgtggtacaacttcattctatagaatattaagtgggaagtggtgaat
tctactttttatgttggagtggaccaatgtctatcaagagtgcacaaataaagttaatgatgattccaaaaaaaaa

[0070] 肾素原受体(序列号5)

[0071] MAVFVLLALVAGVLGNEFSILKSPGSVFRNGNWPPIGERIPDVAALSMGFSVKEDLSWPGLAVGNLF
HRPRATVMVMVGKVNKLALPPGSVISYPLENAVPFSLDSVANSIHSLFSEETPVVLQLAPSEERVYMGKANSVFED
LSVTLRQLRKRLFQENSVLSSLPLNSHSRNNEVDLLFLSELQVLHDISSLLSRHKHLAKDHSPDLYSLELAGLDEIG
KRYGEDSEQFRDASKILVDALQKFADDMYSLYGGNAVVELTVKSFDTSLIRKTRTILEAKQAKNPASPYNLAYKYN
FEYSVVFNMVLWIMIALALAVIITSYNIWNMDPGYDSIIYRMTNQKIRMD

[0072] 上述(P1)中,由序列号1~3的氨基酸序列构成的多肽是源自人肾素原受体的多肽。上述序列号1的氨基酸序列与人肾素原受体的氨基酸序列(序列号5)中第198~211位的氨基酸序列对应。上述序列号2的氨基酸序列与人肾素原受体的氨基酸序列(序列号5)中第223~236位的氨基酸序列对应。上述序列号3的氨基酸序列与人肾素原受体的氨基酸序列(序列号5)中的第221~230位的氨基酸序列对应。

[0073] PRR1肽(序列号1)

[0074] SRHKHLAKDHSPDL

[0075] PRR2肽(序列号2)

[0076] GKRYGEDSEQFRDA

[0077] PRR3肽 (序列号3)

[0078] EIGKRYGEDS

[0079] 上述 (P2) 的多肽中, “1或数个” 例如优选设为: 在上述 (P2) 的多肽与例如载体蛋白形成缀合物时能够诱导针对PRR的抗体的产生的范围。“1或数个” 在上述 (P1) 的氨基酸序列中为例如1~3个、1或2个、1个。本发明中, 个数的数值范围例如公开了全部的属于该范围的正整数 (以下同样)。

[0080] 上述 (P2) 的多肽中, 置换优选为保守性置换。上述保守性置换是指: 氨基酸残基向具有相似侧链的氨基酸残基的置换。上述保守性置换可列举例如: 赖氨酸、精氨酸、组氨酸等具有碱性侧链的氨基酸残基间的置换; 天冬氨酸、谷氨酸等具有酸性侧链的氨基酸残基间的置换; 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸等具有非带电极性侧链的氨基酸残基间的置换; 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸等具有非极性侧链的氨基酸残基间的置换; 苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸等具有 β -支链侧链的氨基酸残基间的置换; 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸等具有芳香族侧链的氨基酸残基间的置换; 等。

[0081] 上述 (P3) 中, “同一性” 例如优选设为: 在上述 (P3) 的多肽与例如载体蛋白形成缀合物时能够诱导针对PRR的抗体的产生的范围。“同一性” 相对于上述 (P1) 的氨基酸序列例如为70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上。关于上述“同一性” 的计算, 例如可以通过在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 的同源性算法BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 中使用默认的参数来计算 (以下同样)。

[0082] 上述PRR肽例如可以包含接头氨基酸或接头肽。上述接头氨基酸或接头肽为用于在N末端和/或C末端与载体蛋白或载体肽进行结合的附加氨基酸或肽。另外, 上述PRR肽的N末端、C末端、氨基酸的主链和/或氨基酸的侧链可被修饰。上述接头氨基酸例如为半胱氨酸。

[0083] 本发明的PRR肽例如可以通过与载体肽或载体蛋白组合使用来诱导针对上述PRR的抗体。

[0084] <缀合物>

[0085] 另一方式中, 本发明提供增强了针对肾素原受体的抗体诱导能力的缀合物。本发明包含抗原肽和载体蛋白, 上述抗原肽与上述载体蛋白结合, 上述抗原肽包含上述肾素原受体肽。

[0086] 上述缀合物中, 上述载体蛋白只要为能够赋予或增强上述PRR肽的免疫原性的蛋白质即可。上述载体蛋白可列举例如白喉毒素 (DT) 或白喉毒素的突变体、破伤风毒素 (TT) 或破伤风毒素的片段C、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、或这些的功能等效物等。上述功能等效物为: 在具有作为上述载体蛋白的功能的范围内向氨基酸序列中导入突变而形成的突变体。

[0087] 上述白喉毒素的突变体可列举例如无毒化的白喉毒素CRM₁₉₇、CRM₁₉₇的A链 (CN103495161)、CRM176、CRM228、CRM45 (Uchida等 (1973) J. Biol. Chem. 218:3838-3844)、CRM9、CRM102、CRM103、CRM107等。

[0088] 例如从可以制成疫苗组合物而适当使用出发, 上述载体蛋白优选为CRM₁₉₇。关于上

述CRM₁₉₇,作为蛋白质,可列举例如以Uniprot登录号Q5PY51登录的下述氨基酸序列(序列号6)的第52位的甘氨酸被置换成谷氨酸的蛋白质或其功能等效物。

[0089] CRM₁₉₇(序列号6)

[0090] MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNVDDDWEFYSTDNKYDAAGYSVD
NENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVLSLPFAEGSS
SVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKE
HGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEK
TTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPVGLVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYN
RPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVN
GRKIRMCRRAIDGDTVFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSL
FEIKS

[0091] 上述缀合物中,上述抗原肽与上述载体蛋白通过共价键而结合。上述抗原肽中的与上述载体蛋白的结合位置例如为上述抗原肽的N末端、C末端和/或氨基酸的侧链,优选为上述N末端(氨基)和/或C末端(羧基)。

[0092] 上述载体蛋白中的与上述抗原肽的结合位置例如为上述载体蛋白的N末端、C末端和/或氨基酸的侧链,优选为上述氨基酸侧链。上述氨基酸侧链可列举例如半胱氨酸残基的侧链(硫醇基)、赖氨酸残基、精氨酸残基、谷氨酰胺残基或丝氨酸残基的侧链(氨基)、谷氨酸或天冬氨酸的侧链(羧基)等。

[0093] 上述缀合物中,上述抗原肽及上述载体蛋白直接结合或间接结合。上述直接结合是指上述抗原肽与上述载体蛋白的氨基酸直接结合。另一方面,上述间接结合是指上述抗原肽借助接头肽(肽接头)与载体蛋白结合。

[0094] 上述缀合物中,上述抗原肽例如优选结合于上述载体蛋白的半胱氨酸残基。上述抗原肽与上述载体蛋白的结合例如可以基于上述结合中使用的上述抗原肽的反应基团与上述载体蛋白的反应基团来设定。上述抗原肽与上述载体蛋白例如可以通过使上述抗原肽的反应基团与上述载体蛋白的反应基团直接反应而进行结合,也可以通过使用交联剂且使上述交联剂与上述抗原肽及上述载体蛋白反应而进行结合。作为具体例,在使上述抗原肽的氨基与上述载体蛋白的半胱氨酸残基的侧链(硫醇基)结合时,例如可以使用具有不同的反应基团的交联剂、更具体而言使用具有与氨基有反应性的反应基团和与硫醇基有反应性的反应基团的交联剂进行交联,从而使上述抗原肽与上述载体蛋白结合。上述交联剂可列举例如N-ε-马来酰亚胺基己酰氧基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、N-ε-马来酰亚胺基己酰氧基磺基琥珀酰亚胺酯(Sulfo-EMCS)、琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(Sulfo-SMCC)、N-α-马来酰亚胺基乙酰氧基琥珀酰亚胺酯(AMAS)、N-β-马来酰亚胺基丙氧基琥珀酰亚胺酯(BMPS)、N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰亚胺酯(GMBS)等。

[0095] 上述缀合物中,上述载体蛋白与上述抗原肽的比率(分子数比,载体蛋白:抗原肽)可列举例如1:1~1:100或1:1~1:10。

[0096] 上述缀合物优选:给予于对象的情况下具有诱导形成下述抗体的能力,所述抗体为在Wnt/β-联蛋白途径的活性试验中能够抑制Wnt/β-联蛋白途径的活性的抗体。上述Wnt/β-联蛋白途径的活性试验例如为如下体系:基于后述的实施例3(1)的、使用源自给予了上

述对象缀合物的对象的血浆或血清以及报告细胞在体外评价 β -联蛋白途径的活化程度的体系。上述报告细胞是当上述 β -联蛋白途径被活化时可检测到报告(例如荧光素酶)的细胞。

[0097] 上述诱导能力例如可以如下测定:使用作为测定对象的缀合物(测定对象物),对对象给予(接种)上述测定对象物,通过Wnt/ β -联蛋白途径的活性试验对源自上述对象的血清或血浆进行评价,从而测定。具体而言,上述测定对象物例如可与后述的实施例1及2同样地任选与免疫激活剂混合并给予于对象。上述给予优选为2次。接着,例如在末次给予起2~4周从上述对象回收血液,单离血清或血浆。然后,例如如下评价上述诱导能力:使用上述血清或血浆进行上述Wnt/ β -联蛋白途径的活性试验,与源自给予了生理盐水的对象的血浆或血清(对照)的Wnt/ β -联蛋白途径的活性进行比较。

[0098] 例如,以上述Wnt/ β -联蛋白途径的活性试验中上述对照的Wnt/ β -联蛋白途径的活性为基准(100%),上述缀合物具有诱导形成能够将Wnt/ β -联蛋白途径的活性抑制5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上的抗体的能力。

[0099] 上述缀合物例如用于肿瘤的处置。上述肿瘤可以为良性肿瘤,也可以为恶性肿瘤(癌)。上述肿瘤可列举例如肾素原受体阳性的肿瘤。上述肿瘤可列举例如大肠癌、胰腺癌、脑部肿瘤等。上述肿瘤可列举例如良性肿瘤或家族性腺瘤性息肉病等。

[0100] 上述缀合物例如可以适当地用于合并有合并症的家族性腺瘤性息肉病的处置。上述家族性腺瘤性息肉病的合并症可列举例如消化道良性多发肿瘤好发疾病、加德纳(Gardner)综合征、特科特(Turcot)综合征和/或韧带样纤维瘤病等。

[0101] 本发明的缀合物例如可以在体外使用,也可以在体内使用。本发明的缀合物例如可以作为研究用试剂来使用,也可以作为药品来使用。前者时,本发明的缀合物也可以称为试验试剂或试验试剂盒。

[0102] 本发明的缀合物的给予对象没有特别限制。在体内使用本发明的缀合物时,上述对象(给予对象)例如可以援引上述的例示。在体外使用上述本发明的缀合物时,上述给予对象可列举例如细胞、组织、器官等,上述细胞例如可列举从生物体采集的细胞、培养细胞等,上述组织或器官可列举例如从生物体采集的组织(生物体组织)或器官等。上述细胞可列举例如T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞等免疫细胞等。

[0103] 在体内使用本发明的缀合物时,上述给予对象可以是未发生肿瘤的健康者,可以为可能发生了肿瘤者,可以为发生了肿瘤的患者,优选为期望进行处置的对象。另外,上述给予对象罹患了家族性腺瘤性息肉病时,上述给予对象可以为未罹患上述家族性腺瘤性息肉病的合并症的患者,可以为可能罹患了上述家族性腺瘤性息肉病的合并症者,可以为罹患了上述家族性腺瘤性息肉病的合并症的患者,优选期望进行处置的对象。进而,上述给予对象可以为未罹患肌少症或衰弱的健康者,可以为可能罹患了肌少症或衰弱者,可以为罹患了肌少症或衰弱的患者,优选为期望进行处置的对象。

[0104] 本发明的缀合物的使用条件(给予条件)没有特别限制,例如,可以根据上述缀合物中的有效成分的种类(蛋白质、肽、VLP、病毒、核酸等)、给予对象的种类等来适当设定给

予方式、给予时期、给予量等。

[0105] 本发明的缀合物的给予方法可例示例如脑内给予、髓腔内给予、肌肉内给予、皮下给予、静脉内给予等,例如,从不论给予者的技术如何均能够安全及稳定地给予的角度出发,优选肌肉内给予或皮下给予。

[0106] 本发明的缀合物的给予量可以为:给予于对象的情况下,与未给予的对象相比,能够诱导针对肾素原受体的抗体的量,即,有效用量(治疗有效用量)。上述给予量例如可以根据给予对象的年龄、体重、症状等适当确定。

[0107] 本发明的缀合物的给予次数可以为1次或多次。上述多次例如为2次、3次、4次、5次或其以上。上述给予次数可以一边确认对给予对象的处置效果一边适当确定。上述多次给予时,可以一边确认给予对象的处置效果一边适当确定给予间隔,例如,可列举1天1次、1周1次、2周1次、1个月1次、3个月1次、6个月1次等。

[0108] 本发明的缀合物可预防或减轻给予对象中的起因于肿瘤的至少1种症状。发生肿瘤的症状可列举例如全身疲劳感、食欲不振、体重减少等。上述家族性腺瘤性息肉病的症状可列举例如内窥镜下需要摘出的直径5mm以上的息肉数量增加等。本发明的缀合物可以预防或减轻与肿瘤相关的至少1种症状。上述症状的减轻例如可以进行主观评价或客观评价,作为具体例,可列举由上述给予对象自己进行评价;医生评价;QOL(Quality of Life,生存质量)评价;发生肿瘤的症状的进展延迟、或发生肿瘤的症状的严重程度减轻的评价等。上述客观评价可以为利用动物的评价,也可以为利用人的评价。

[0109] 在体内使用本发明的缀合物时,上述给予对象可以是未罹患肌少症或衰弱的健康者,可以为可能罹患肌少症或衰弱者,可以为罹患了肌少症或衰弱的患者。

[0110] 本发明的缀合物可预防或减轻给予对象中的起因于肌少症或衰弱的至少1种症状。肌少症或衰弱的症状可列举例如体重、骨骼肌量、肌肉力量(握力)或身体功能(步行速度)下降等。本发明的缀合物可预防或减轻与肌少症或衰弱相关的至少1种症状。上述症状的减轻例如可以进行主观评价或客观评价,作为具体例,可列举上述给予对象自己进行评价;医生评价;QOL(Quality of Life)评价;肌少症或衰弱的症状的进展延迟、或肌少症或衰弱的症状的严重程度减轻的评价等。上述客观评价可以为利用动物的评价,也可以为利用人的评价。

[0111] 本发明的缀合物包含上述肾素原受体肽,因此能够诱导针对PRR的抗体。因此,本发明的缀合物可以适宜地用于癌的处置及肌少症或衰弱的处置。

[0112] <核酸>

[0113] 另一方式中,本发明提供编码上述PRR肽的核酸。本发明的核酸编码本发明的肾素原受体肽。

[0114] 上述核酸可以由脱氧核苷酸残基构成,也可以由核糖核苷酸残基构成,还可以由两者构成。另外,上述核酸可以由天然的核酸残基构成,也可以由非天然的核酸残基构成,还可以由两者构成。作为具体例,上述核酸例如包括由天然和/或非天然的核酸残基构成的DNA、RNA和/或DNA/RNA。上述非天然的核酸残基可列举例如核苷酸残基中的碱基、糖残基或糖磷酸骨架经修饰的修饰核苷酸残基或修饰核糖核苷酸残基。上述糖残基经修饰时,上述非天然的核酸残基可列举例如cEt(constrained ethyl bicyclic nucleic acid(受限乙基双环核酸)、Ionis Pharmaceuticals公司制)、LNA((商标)、Locked Nucleic Acid,锁核

酸)、ENA(注册商标、2'-0,4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acid(2'-0,4'-C-乙烯桥连核酸))等。上述核酸例如可以在5'末端具有5'帽。

[0115] 上述核酸可以为单链的核酸分子,也可以为双链的核酸分子。

[0116] 本发明的核酸可以基于上述本发明的PRR肽的氨基酸序列通过置换为对应的密码子来设计。上述本发明的核酸的碱基序列例如可以经密码子优化。

[0117] 本发明中,各种核酸及肾素原受体肽例如可以通过基因工程方法或有机合成方法合成,也可以称为cDNA等合成DNA、合成RNA。

[0118] 本发明的核酸编码上述PRR肽,因此可以适当地用于上述PRR肽的合成。另外,本发明的核酸编码上述PRR肽,因此在作为疫苗的有效成分使用时,可以诱导针对上述PRR的抗体。

[0119] <表达载体>

[0120] 另一方式中,本发明提供能够用于肾素原受体肽的合成或表达的表达载体。本发明的表达载体包含上述本发明的核酸。根据本发明的表达载体,能够通过基因工程方法适宜地制造上述本发明的肾素原受体肽。

[0121] 关于上述本发明的表达载体,例如表达载体中可以插入了上述本发明的核酸。上述表达载体例如也可以称为可操作地连接有上述核酸。上述表达载体例如是指:能够将插入的基因输送到细胞等靶标内的核酸分子。

[0122] 上述表达载体例如只要以能够表达上述本发明的核酸的多核苷酸所编码的肾素原受体肽方式包含编码肾素原受体肽的多核苷酸即可,其构成没有特别限制。

[0123] 上述表达载体例如可以通过向成为骨架的载体(以下也称为“基本载体”)中插入编码肾素原受体肽的多核苷酸、即上述本发明的核酸而制作。上述表达载体的种类没有特别限制,例如,可以根据上述宿主的种类适当确定。具体而言,在通过基因工程方法合成上述表达载体时,首先,在上述表达载体的合成中,例如设计并合成上述编码肾素原受体肽的核酸。上述设计及合成例如可以如下进行:以包含上述编码肾素原受体肽的核酸的载体等为模板,使用以可合成出期望的核酸区域的方式设计的引物,通过PCR法来进行设计和合成。然后,将得到的核酸连接到适当的载体上,从而得到蛋白质表达用重组载体(表达载体),将该重组载体以可表达目标基因的方式导入到宿主中,从而可以得到转化体(Sambrook J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (4th edition) (Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012)))。

[0124] 作为转化中使用的宿主,只要能够表达目标核酸则没有特别限制,可列举例如微生物、动物细胞、昆虫细胞、或这些的培养细胞等非人宿主、单离的人细胞或其培养细胞、哺乳类细胞等。将上述表达载体给予于对象时,上述宿主例如为上述给予对象的细胞。上述原核生物可列举例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)等埃希氏菌属、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)等假单胞菌属等的细菌。上述真核生物可列举例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等酵母等。上述动物细胞可列举例如COS细胞、CHO细胞等,上述昆虫细胞可列举例如Sf9、Sf21等。

[0125] 上述表达载体可列举病毒载体及非病毒载体。上述病毒载体可列举例如杆状病毒;痘苗病毒、禽痘病毒、金丝雀痘病毒、鸡痘病毒、浣熊痘病毒、猪痘病毒等痘病毒;狗腺病毒等腺病毒;腺相关病毒;疱疹病毒;逆转录病毒等病毒载体。作为上述导入方法,在通过热

体克法进行宿主的转化时,上述表达载体可列举例如双元载体等。上述表达载体可列举例如pETDuet-1、pQE-80L、pUCP26Km等。在对大肠杆菌等细菌进行转化时,上述表达载体可列举例如pETDuet-1载体(Novagen公司)、pQE-80L(QIAGEN公司)、pBR322、pB325、pAT153、pUC8等。在对上述酵母进行转化时,上述表达载体可列举例如pYepSec1、pMFa、pYES2等。在对上述昆虫细胞进行转化时,上述表达载体可列举例如pAc、pVL等。在对上述哺乳类细胞进行转化时,上述表达载体可列举例如pCDM8、pMT2PC等。

[0126] 上述表达载体例如优选具有调节序列,所述调节序列调节上述编码肾素原受体肽的多核苷酸的表达及上述肾素原受体肽的多核苷酸所编码的上述本发明的肾素原受体肽的表达。上述调节序列可列举例如启动子、终止子、增强子、多聚腺苷酸化信号序列、复制起点序列(ori)等。上述表达载体中,上述调节序列的配置没有特别限制。上述表达载体中,上述调节序列例如以能够可操作地调节上述编码肾素原受体肽的多核苷酸的表达及其所编码的多肽的表达的方式配置即可,可以基于公知的方法配置。上述调节序列例如可以利用上述表达载体预先具备的序列,也可以在上述表达载体中进一步插入上述调节序列,还可以将上述基本载体所具备的调节序列置换为其它调节序列。

[0127] <转化体及转化体的制造方法>

[0128] 另一方式中,本发明提供能够制造肾素原受体肽的转化体及其制造方法。本发明的转化体包含本发明的编码肾素原受体肽的核酸。本发明的转化体的特征在于包含本发明的编码肾素原受体肽的核酸,其它构成及条件没有特别限制。根据本发明的转化体,能够适宜地制造上述本发明的肾素原受体肽。

[0129] 本发明的转化体的制造方法包括向宿主导入上述本发明的核酸的工序。本发明的转化体的制造方法的特征在于向上述宿主导入本发明的核酸,其它工序及条件没有特别限制。根据本发明的转化体的制造方法,能够制造上述转化体。本发明的转化体及其制造方法可以援引上述本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸及表达载体的制造方法的说明。

[0130] 本发明的转化体中,上述编码肾素原受体肽的核酸可以援引上述本发明的编码肾素原受体肽的核酸的说明。作为本发明的核酸,可以使用上述本发明的表达载体。

[0131] 本发明的转化体中,本发明的核酸作为外源性的分子而存在。因此,本发明的转化体例如可以通过向上述宿主中导入上述本发明的核酸而制造。

[0132] 上述核酸的导入方法没有特别限制,可以通过公知的方法进行。上述核酸例如可以通过上述表达载体而导入。向宿主导入上述表达载体的导入方法没有特别限制,可以通过公知的方法来进行。上述导入方法例如可以根据上述宿主的种类而适当设定。上述导入方法可列举例如:利用粒子枪等基因枪的导入法、磷酸钙法、聚乙二醇法、使用脂质体的脂质体转染法、电穿孔法、超声波核酸导入法、DEAE-葡聚糖法、使用微玻璃管等的直接注入法、流体动力学法、阳离子脂质体法、使用导入助剂的方法、借助农杆菌的方法等。上述脂质体可列举例如Lipofectamine及阳离子脂质体等,上述导入助剂可列举例如去端肽胶原、纳米粒子及聚合物等。上述宿主为微生物时,例如尤其优选借助酵母等的方法。上述本发明的肾素原受体肽的多核苷酸例如可以通过上述本发明的表达载体而导入上述宿主。

[0133] <PRR肽及缀合物的制造方法>

[0134] 另一方式中,本发明提供肾素原受体肽的制造方法。本发明的肾素原受体肽的制造方法包括表达本发明的肾素原受体肽的表达工序。本发明的肾素原受体肽的制造方法的

特征在于包括上述表达工序,其它工序及条件没有特别限制。根据本发明的肾素原受体肽的制造方法,能够制造本发明的肾素原受体肽。

[0135] 上述肾素原受体肽的制造例如可以使用酵母等宿主通过基因工程方法来实施,可以使用无细胞系统来实施,可以使用本领域技术人员熟知的方法。上述多肽的制造例如可以参照国际公开第2016/017037号公报(美国专利申请公开2016/0202251号说明书)。

[0136] 在通过上述基因工程方法实施上述肾素原受体肽的制造时,本发明的制造方法中,在上述表达工序之前可以准备包含上述本发明的核酸或表达载体的转化体。这种情况下,上述表达工序例如可以包括培养上述转化体的培养工序、从其培养物中单离肾素原受体肽的单离工序。上述培养工序中,培养的条件可以根据上述转化体的制造中使用的宿主的种类适当设定。上述培养物可以为培养上清,也可以为培养细胞或培养菌体等转化体、或其处理物或破碎物中的任意者。

[0137] 上述培养后在宿主内生产上述肾素原受体肽时,本发明的制造方法例如包括将上述宿主破碎而单离肾素原受体肽的单离工序。另外,在上述宿主外生产上述肾素原受体肽或将上述肾素原受体肽分泌到上述宿主外时,本发明的制造方法例如直接使用培养液或通过离心分离等除去宿主。然后,本发明的制造方法中,例如可以通过将蛋白质的单离纯化中使用的常规生物化学方法、具体而言利用超滤膜的浓缩;硫酸铵沉淀等盐析;凝胶过滤、离子交换色谱、亲和色谱等使用各种柱的色谱单独使用或适当组合使用,从而单离或纯化上述肾素原受体肽。

[0138] 本发明的制造方法中,也可以使用无细胞合成系统通过体外翻译来得到上述肾素原受体肽。这种情况下,本发明的制作方法可以通过以上述编码肾素原受体肽的RNA为模板的方法来实施,也可以通过以上述编码肾素原受体肽的DNA为模板的方法(转录及翻译)来实施。上述无细胞合成系统可以使用市售的系统,作为具体例,可以使用Expressway(商标)系统(Invitrogen公司)等。在上述翻译后,本发明的制造方法例如可以将蛋白质的单离纯化中使用的常规的生物化学方法、具体而言利用超滤膜的浓缩;硫酸铵沉淀等盐析;凝胶过滤、离子交换色谱、亲和色谱等使用各种柱的色谱等单独使用或适当组合使用,从而可以单离或纯化上述肾素原受体肽。上述单离或纯化例如可以与使用上述转化体时同样地实施。

[0139] 通过本发明的制造方法得到的肾素原受体肽例如可以直接作为粗纯化物使用,也可以制成部分纯化后的部分纯化物而使用,还可以制成纯化至单一的纯化物而使用。

[0140] 本发明的制造方法中,可以将得到的肾素原受体肽通过例如冷冻干燥、真空干燥或喷雾干燥等而粉末化。这种情况下,本发明的制造方法中,例如可以将肾素原受体肽预先溶解于乙酸缓冲液、磷酸缓冲液、三乙醇胺缓冲液、Tris盐酸缓冲液、GOOD缓冲液(例如PIPES、MES、MOPS等)等缓冲液中。

[0141] 本发明的制造方法中,还可以使得到的PRR肽与上述载体蛋白结合。上述结合可以根据上述PRR肽和上述载体蛋白的结合位置、并基于该结合位置的取代基(反应基团)来决定。

[0142] <药物组合物>

[0143] 本发明提供能够诱导针对PRR的抗体的药物组合物。本发明的药物组合物是包含上述本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸和/或表达载体、并且包含药学上可接受的载体的药物组合物。本发明的药物组合物的特征在于包含肾素原受体肽、缀合物、核酸和/或表

达载体(以下也一起称为“有效成分”)作为有效成分,其它构成及条件没有特别限制。本发明的药物组合物由于包含上述肾素原受体肽或缀合物、或者编码这些的核酸作为有效成分,因此在作为疫苗的有效成分使用时,能够显示出抗肿瘤效果和/或抗肌肉减少效果。本发明的药物组合物可以援引上述缀合物的说明。

[0144] 本发明的药物组合物例如可以通过给予于给予对象而诱导针对肾素原受体肽或缀合物、或编码这些的核酸的抗体。因此,本发明的药物组合物还可以称为疫苗、疫苗组合物、或疫苗制剂。

[0145] 本发明的药物组合物包含药学上可接受的载体。上述载体可列举用于给予上述有效成分的悬浮剂、溶解助剂、稳定化剂、等渗剂、保存剂、吸附防止剂、表面活性剂、稀释剂、介质、pH调节剂、无痛化剂、缓冲剂、含硫还原剂、抗氧化剂等,可以在不妨碍本发明的效果的范围内适当添加。

[0146] 本发明的药物组合物例如可以还包含免疫激活剂。上述免疫激活剂可列举例如氢氧化铝、磷酸铝、氯化铝、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、CpG寡核苷酸、Poly I:C、脂多糖(LPS)等Toll样受体刺激剂、细胞因子、淋巴因子、趋化因子等。上述细胞因子及淋巴因子可列举例如干扰素(IFN- γ)等干扰素;TNF- α 等炎性细胞因子;IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13等白介素;粒细胞巨噬细胞(GM)集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等生长因子;Flt3配体;B7-1;B7-2;等。

[0147] <肿瘤的处置方法>

[0148] 另一方式中,本发明提供肿瘤的处置方法。本发明的肿瘤的处置方法中,对对象使用上述本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸、表达载体和/或药物组合物(以下也一起称为“有效成分”)。

[0149] 本发明的肿瘤的处置方法例如包括对上述对象给予上述有效成分的工序。上述给予工序中的给予条件可以援引本发明的缀合物中的给予条件的说明。上述给予可以为体外,也可以为体内。

[0150] 本发明的肿瘤的处置方法中,由于包含上述肾素原受体肽、缀合物、或编码这些的核酸作为有效成分,因此在对上述对象进行处置时,能够诱导针对肾素原受体的抗体的产生。因此,本发明的肿瘤的处置方法能够抑制肿瘤。

[0151] <肌少症或衰弱的处置方法>

[0152] 另一方式中,本发明提供对肌少症或衰弱的处置方法。本发明的处置方法为对象的处置方法,对上述对象使用上述本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸、表达载体和/或药物组合物(以下也一起称为“有效成分”)。本发明的处置方法的特征在于使用作为有效成分的肾素原受体肽、缀合物、核酸、表达载体,其它工序及条件没有特别限制。

[0153] 本发明的肌少症或衰弱的处置方法例如包括对上述对象给予上述有效成分的工序。上述给予工序中的给予条件可以援引本发明的缀合物中的给予条件的说明。上述给予可以为体外,也可以为体内。

[0154] 本发明的肌少症或衰弱的处置方法中,由于包含上述肾素原受体肽、缀合物、或编码这些的核酸作为有效成分,因此在对上述对象进行处置时,能够诱导针对肾素原受体的抗体的产生。因此,本发明的肌少症或衰弱的处置方法能够抑制肌少症或衰弱。

[0155] <药物组合物的用途>

[0156] 本发明为用于肿瘤的处置的、本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸、表达载体和/或药物组合物或该用途。本发明为用于制造用于处置肿瘤的药物、本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸、表达载体和/或药物组合物或该用途。本发明为用于肌少症或衰弱的处置的、本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸、表达载体和/或药物组合物、或该用途。本发明为用于制造用于处置肌少症或衰弱的药物的、本发明的肾素原受体肽、缀合物、核酸、表达载体和/或药物组合物、或该用途。

[0157] 实施例

[0158] 以下使用实施例详细地说明本发明,但是本发明不限于实施例记载的方式。

[0159] [实施例1]

[0160] 对于本发明的PRR肽,确认具有针对PRR的抗体的诱导能力及抗肿瘤效果。

[0161] (1) 肾素原受体肽抗原的制作

[0162] 作为人肾素原受体蛋白(序列号5)的肽片段,制备第198-211位的PRR1肽(PRR1、序列号1)、第223-236位的PRR2肽(PRR2、序列号2)、第221-230位的PRR3肽(PRR3、序列号3)、第224-233位的PRR4肽(PRR4、序列号7)及作为比较例的第200-213位的PRR0肽(PRR0、序列号8)。在上述各多肽的氨基酸的N末端,通过公知方法连接作为载体蛋白(carrier protein)的匙孔帽贝蛋白(匙孔血蓝蛋白:KLH),得到与上述多肽0-4对应的PRR0-Cg、PRR1-Cg、PRR2-Cg、PRR3-Cg及PRR4-Cg。将各抗原调整成1mg/ml。在上述连接中,使用交联剂(EMCS)将上述肽的氨基与上述KLH的半胱氨酸残基的侧链的硫醇基交联,由此制备缀合物。

[0163] PRR4肽(序列号7)

[0164] KRYGEDSEQ

[0165] PRR0肽(序列号8)

[0166] HKHLAKDHSPDLYS

[0167] (2) PRR0的抗体效价的测定及抗肿瘤效果的研究

[0168] 针对PRR0的抗体在体内显示出抗肿瘤效果。因此,将上述PRR0-Cg作为肾素原受体疫苗接种于小鼠(Balb/c小鼠、7周龄),进行针对PRR的抗体效价(以下称为“抗体效价”)测定及抗肿瘤效果研究。具体而言,将上述实施例1(1)中得到的PRR0-Cg 5 μ g或20 μ g(1mg/ml)与佐剂(Freund's Complete Adjuvant、Cat No.014-09541、WAKO公司制)一起接种于上述小鼠(各n=4)。在上述接种的2周后和4周后采集血清。在上述第1次接种的5周后,将1 $\times$ 10⁶个小鼠大肠癌细胞CT26移植至上述小鼠。上述血清的抗体效价于450nm的吸光度下进行测定。另外,对肿瘤的效果在上述第1次接种的10周后进行。作为阴性对照,除了对小鼠(n=2)仅接种佐剂以外,通过同样的方法进行。将这些的结果示于图1及图2。

[0169] 图1为示出肾素原受体疫苗PRR0的抗体效价的图。图1中,横轴表示血清的稀释倍率,纵轴表示吸光度。如图1所示,阴性对照小鼠的情况下,第1次给予的2周后及4周后未见抗体效价的上升。另外,接种PRR0-Cg的小鼠与阴性对照相比,第1次给予的2周后及4周后观察到抗体效价的上升倾向,但是未见显著的上升。

[0170] 图2为示出肾素原受体疫苗PRR0-Cg第一次接种起10周后(小鼠大肠癌细胞CT26移植5周后:第35天)的小鼠的照片。图2的上段示出阴性对照小鼠,中段示出接种了5 μ g PRR0-Cg的小鼠,下段示出接种了20 μ g PRR0-Cg的小鼠。如图2所示,不论PRR0-Cg的接种量如何,均未见抗肿瘤效果。由以上结果可知。针对PRR0的抗体虽然显示出抗肿瘤效果,但是作为其

表位的PRR0不作为肾素原受体疫苗起作用。

[0171] (3)PRR1~4的抗体效价测定及抗肿瘤效果研究

[0172] 然后,将作为肾素原受体疫苗的上述缀合物接种于小鼠(Balb/c,7周龄),进行抗体效价测定及抗肿瘤效果研究。具体而言,将实施例1(1)中得到的调节至1mg/ml的50 μ g的PRR1-Cg、PRR2-Cg、PRR3-Cg、或PRR4-Cg与佐剂(Freud's Complete Adjuvant)一起接种于上述小鼠(PRR1-Cg、2-Cg及4-Cg:n=9、PRR3-Cg:n=8)。上述第1次接种2周后,再次将50 μ g的PRR1-Cg、PRR2-Cg、PRR3-Cg、或PRR4-Cg与佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant)一起接种于上述小鼠。上述第1次接种的3周后,将 1×10^5 个小鼠大肠癌细胞CT26移植至上述小鼠。上述第1次接种的7周后,从上述小鼠采集血清。以450nm的吸光度的半值(Half maximum)形式来测定上述血清的抗体效价。另外,在上述第1次接种的3、4、5、6及7周后,测定上述小鼠的肿瘤尺寸。作为阴性对照,对小鼠仅接种佐剂(n=7),除此以外通过同样的方法进行。将这些的结果示于图3及图4。

[0173] 图3为示出肾素原受体疫苗PRR1~4的第1次给予7周后(第2次给予5周后)的抗体效价的图。图3中,横轴表示免疫原的种类,纵轴表示450nm的吸光度的半值。如图3所示,可知接种PRR1-Cg、PRR2-Cg及PRR3-Cg的小鼠中抗体效价上升。进而可知,接种PRR1-Cg及PRR2-Cg的小鼠中,抗体效价显著上升。另一方面,接种PRR4-Cg的小鼠中,未见抗体效价的上升。由以上的结果可知,本发明的PRR1肽、PRR2肽及PRR3肽具有诱导针对PRR的抗体的功能。

[0174] 图4为示出肾素原受体疫苗PRR1~4的抗肿瘤效果的图。图4中,横轴表示CT26移植后的天数,纵轴表示肿瘤的尺寸(mm³)。如图4所示,可知接种PRR1-Cg、PRR2-Cg、或PRR3-Cg的小鼠与仅接种佐剂的小鼠相比,肿瘤的尺寸小。另一方面,接种PRR4-Cg的小鼠与仅接种佐剂的小鼠相比,肿瘤的尺寸未见变化。由以上的结果可知,本发明的PRR1肽、PRR2肽及PRR3肽作为针对大肠癌的肾素原受体疫苗起作用。另外,由于上述PRR1肽、PRR2肽及PRR3肽能够诱导针对PRR的抗体,因此推测上述PRR1肽、PRR2肽及PRR3肽借助通过这些抗原而诱导出的抗体来显示抗肿瘤效果。

[0175] (4)PRR2及PRR3的抗肿瘤效果的研究

[0176] 对于可见抗肿瘤效果的PRR2-Cg及PRR3-Cg,接种于小鼠(Balb/c,6周龄)并进行了抗肿瘤效果的再次研究。具体而言,将上述实施例1(1)中得到的PRR2-Cg或PRR3-Cg 50 μ g(1mg/ml)与佐剂(Freund's Complete Adjuvant)一起接种于上述小鼠(各n=10)。上述第1次接种2周后,再次将50 μ g的PRR2-Cg、或PRR3-Cg与佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant)一起接种于上述小鼠。上述第1次接种的3周后,将 1×10^5 个小鼠大肠癌细胞CT26移植到上述小鼠皮下。移植CT26细胞的14、17、21、24及28天后,测定上述小鼠的肿瘤尺寸。作为阴性对照,对小鼠仅接种佐剂(n=10),除此以外通过同样的方法实施。将这些的结果示于图5。

[0177] 图5为示出肾素原受体疫苗PRR2及PRR3的抗肿瘤效果的图。图5中,横轴表示CT26移植后的天数,纵轴表示肿瘤的尺寸(mm³)。如图5所示,再现了接种PRR2-Cg或PRR3-Cg的小鼠与仅接种佐剂的小鼠相比而言肿瘤的尺寸小的结果。由以上的结果可知,本发明的PRR2肽及PRR3肽作为针对大肠癌的肾素原受体疫苗起作用。

[0178] (5)通过组织染色来研究PRR2及PRR3的抗肿瘤效果

[0179] 大部分的大肠癌可见 β -联蛋白的蓄积。通过免疫组织化学染色研究了通过给予显

示抗肿瘤效果的PRR2-Cg或PRR3-Cg是否可减轻大肠中的 β -联蛋白蓄积。具体而言,从通过与上述实施例1(3)同样的方法得到的、给予了PRR2-Cg或PRR3-Cg的小鼠中采集肿瘤组织。作为阴性对照,对小鼠仅接种($n=5$)代替肽抗原的生理盐水,除此以外通过同样的方法进行,并采集肿瘤组织。在上述采集后,使用4%的多聚甲醛将上述大肠组织固定。在上述固定后,进行上述大肠组织的石蜡包埋,制备厚度 $2\mu\text{m}$ 的石蜡包埋切片。对于得到的石蜡包埋切片,进行与 β -联蛋白相关的免疫组织化学。作为一抗,在 β -联蛋白的染色中使用抗 β -联蛋白抗体(300倍稀释、Cat.No:05-665、Merck Millipore公司制),作为阴性对照,使用兔子血清。将这些的结果示于图6。

[0180] 图6为大肠组织中的活化 β -联蛋白的染色的照片。图6中,上段的照片表示阴性对照的大肠组织的染色图像,下段左边的照片表示接种PRR2-Cg的小鼠的大肠组织的染色图像,下段右边的照片表示接种PRR3-Cg的小鼠的大肠组织的染色图像。如图6所示,给予PRR2-Cg或PRR3-Cg的小鼠的大肠组织中,没怎么看到活化 β -联蛋白的表达。由以上结果可知,通过给予本发明的PRR2肽或PRR3肽,可诱导针对PRR的抗体,由此抑制Wnt/ β -联蛋白途径的活化。

[0181] (6) 短期观察下的PRR2及PRR3的抗体效价的测定

[0182] 对于PRR2-Cg及PRR3-Cg,根据小鼠的性别分别测定短期观察下的抗体效价。具体而言,将上述实施例1(1)中得到的PRR2-Cg或PRR3-Cg $50\mu\text{g}$ 与佐剂(Freund's Complete Adjuvant)一起接种于小鼠(C57BL/6小鼠),采集血清(各 $n=10$)。上述第1次接种2周后,再次将 $50\mu\text{g}$ 的PRR2-Cg或PRR3-Cg与佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant)一起接种于上述小鼠。上述第1次接种2、4及8周后,从上述小鼠采集血清。以450nm的吸光度的半值(Half maximum)形式来测定上述血清的抗体效价。作为阴性对照,对小鼠仅接种佐剂,除此以外通过同样的方法进行。将这些的结果示于图7。

[0183] 图7为示出短期观察下的肾素原受体疫苗PRR2及PRR3的抗体效价的图。图7中,上段示出雄性小鼠的结果,下段示出雌性小鼠的结果。图7中,横轴表示免疫原的种类及第1次接种后的周数,纵轴表示450nm的吸光度的半值。如图7所示,可知对于接种PRR2-Cg或PRR3-Cg的小鼠而言,不论性别,在第1次接种的4周后抗体效价均上升。以上结果表明,PRR2肽及PRR3肽不论性别为何种均能够诱导针对PRR的抗体,能够作为肾素原受体疫苗起作用。

[0184] (7) 长期观察下的PRR2及PRR3的抗体效价的测定

[0185] 对于PRR2-Cg及PRR3-Cg,根据小鼠的性别分别测定长期观察下的抗体效价。具体而言,将上述实施例1(1)中得到的PRR2-Cg或PRR3-Cg $50\mu\text{g}$ 与佐剂(Freund's Complete Adjuvant)一起接种于小鼠(C57BL/6小鼠、7周龄),采集血清(各 $n=10$)。上述第1次接种2周后,再次将 $50\mu\text{g}$ 的PRR2-Cg或PRR3-Cg与佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant)一起接种于上述小鼠。上述第1次接种的2、4、8及89周后(与9、11、15及96周龄对应),从上述小鼠采集血清。以450nm的吸光度的半值(Half maximum)形式测定上述血清的抗体效价。作为阴性对照,对小鼠仅接种佐剂,除此以外通过同样的方法进行。将这些的结果示于图8。

[0186] 图8为示出长期观察下的肾素原受体疫苗PRR2及PRR3的抗体效价的图。图8中,上段表示雌性小鼠的结果,下段表示雄性小鼠的结果。图8中,横轴表示免疫原的种类及小鼠的周龄,纵轴表示450nm的吸光度的半值。如图8所示,可知对于接种PRR2-Cg的小鼠而言,不论性别,抗体效价均维持到第1次接种的89周后(96周龄)。另外,接种PRR3-Cg的雄性小鼠

中,抗体效价维持到第1次接种的89周后(96周龄)。由以上结果可知,PRR2肽不论性别为何种均能够长期维持抗体效价。另外表明,PRR3肽尤其可在雄性中长期维持抗体效价。

[0187] [实施例2]

[0188] 对于本发明的PRR肽,确认在使用CRM₁₉₇作为载体蛋白时也具有针对PRR的抗体的诱导能力及抗肿瘤效果。

[0189] (1) 小鼠中的载体蛋白的研究

[0190] 上述PRR2-Cg及PRR3-Cg的缀合物中,作为载体蛋白(carrier protein),使用了KLH。因此,在本实施例中,使用可用于人体临床的无毒性突变白喉毒素CRM₁₉₇作为上述载体蛋白,来代替KLH。在上述PRR2的多肽的氨基酸的N末端,通过公知方法连接作为载体蛋白的CRM₁₉₇,得到CRM197-PRR2。上述连接中,除了使用CRM₁₉₇代替上述KLH以外,同样地实施。

[0191] 接着,研究上述CRM197-PRR2能否与缀合KLH的PRR2同样地作为肾素原受体疫苗起作用。具体而言,将上述CRM197-PRR2接种于小鼠(C57BL/6小鼠、7周龄),测定抗体效价。将上述CRM197-PRR2调节成7mg/ml的浓度后,进一步稀释10倍。上述稀释后,将30 μ l含有CRM197-PRR2(含有约20 μ g)的稀释液与30 μ l的佐剂(Freund's Complete Adjuvant)一起接种于上述小鼠,采集血清(n=10)。上述第1次接种2周后,再次将30 μ l的上述CRM197-PRR2与佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant)一起接种于上述小鼠。上述小鼠的血清的采集在第1次接种前、第1次接种起2周后及4周后进行。以450nm的吸光度的半值(Half maximum)形式测定上述血清的抗体效价。作为阴性对照,对小鼠仅接种佐剂,除此以外通过同样的方法进行。将这些的结果示于图9。

[0192] 图9为示出小鼠中的CRM197-PRR2的抗体效价的图。图9中,横轴表示第1次给予起的周数,纵轴表示450nm的吸光度的半值。如图9所示,仅接种佐剂的小鼠中,抗体效价未上升。另一方面,给予CRM197-PRR2时,小鼠中,第1次给予起2周后稍微可见抗体效价的上升。进而获知,给予CRM197-PRR2时,小鼠中,第1次给予起4周后抗体效价升高。由以上结果可知,小鼠中,与缀合KLH的PRR2同样地,缀合CRM197的PRR2也可使抗体效价上升。

[0193] (2) 猴中的载体蛋白的研究

[0194] 获知在小鼠中CRM197-PRR2对于升高抗体效价有效。因此,也研究了在猴中CRM197-PRR2是否能诱导针对PRR的抗体。具体而言,将上述CRM197-PRR2接种于食蟹猴,测定抗体效价。将上述CRM197-PRR2调节成7mg/ml的浓度。上述调节后,添加上述CRM197-PRR2和等量的佐剂(2%氢氧化铝)而调节成3.5mg/ml的浓度,由此得到调整物。然后在第1天及第29天,将上述调整物给予至上述食蟹猴的背部皮下(腰背部)。上述给予中,低用量组设为给予140 μ l、高用量组设为给予420 μ l。在给予前、第29天、第57天采集上述食蟹猴的血清。以450nm的吸光度的半值(Half maximum)形式测定上述血清的抗体效价。将这些的结果示于图10。

[0195] 图10是示出食蟹猴中的CRM197-PRR2的抗体效价的图。图10中,横轴表示接种组及第1次给予起的天数,纵轴表示450nm的吸光度的半值。如图10所示,低用量组及高用量组中,抗体效价随着天数的增加而上升。进而可知,抗体效价呈CRM197-PRR2用量依赖性上升。由以上结果可知,食蟹猴中,缀合CRM197的PRR2可使抗体效价上升。

[0196] [实施例3]

[0197] 对于本发明的PRR肽,确认 β -联蛋白抑制效果、抗肿瘤效果及副反应。

[0198] (1) PRR2及PRR3的 β -联蛋白抑制效果的研究

[0199] 对于可见抗肿瘤效果的PRR2-Cg,使用荧光素酶报告试验研究是否可减弱被Wnt3a活化的 β -联蛋白活性。具体而言,使培养细胞HEK293细胞表达pGL4.49[luc2P TCF-LEF RE Hygro]载体(参照图11的(A)、普洛麦格公司制),构建能够在体外评价 β -联蛋白的活化的系统(报告细胞)。上述报告细胞中,如果Wnt/ β -联蛋白途径被活化,则依赖于活化 β -联蛋白而表达荧光素酶。因此,通过测定上述报告细胞的荧光素酶活性,可以测定Wnt/ β -联蛋白途径的活性。对于上述HEK293细胞,与Wnt3a同时添加ATP6ap单克隆抗体(Clone67_3、参照国际公开第2018/084236号)或PRR2纯化抗体,在37°C、24小时的条件下进行培养。上述培养后,添加包含荧光素酶的底物的荧光素酶试验系统(Luciferase assay system)(普洛麦格公司制)50 μ l,使用Centro XS3LB 960(Berthold公司制)测定发光。作为对照组,除了不添加Wnt3a及各抗体以外,通过同样的方法进行。将这些的结果示于图11。

[0200] 图11为示出HEK293细胞中的 β -联蛋白的活性的图。图11的(B)中,横轴表示添加组,纵轴表示荧光素酶活性。如图11的(B)所示,可知ATP6ap单克隆抗体及PRR2纯化抗体的情况下 β -联蛋白的活性得到抑制。由以上结果可知,本发明的PRR2能够诱导能抑制Wnt/ β -联蛋白途径的抗体。另外,启示了本发明的PRR2通过诱导能抑制Wnt/ β -联蛋白途径的抗体而抑制癌。

[0201] (2) 在APC^{min/+}小鼠中研究PRR2及PRR3的息肉形成抑制效果

[0202] 对于可见抗肿瘤效果的PRR2-Cg及PRR3-Cg,研究能否抑制大肠癌(腺瘤性息肉病)模型小鼠的息肉形成。具体而言,对于腺瘤性息肉病模型小鼠(C57BL/6J-Apcmin/+),通过与上述实施例1(3)同样的试验方案给予生理盐水、PRR2-Cg或PRR3-Cg且一起给予佐剂。在上述小鼠为16~20周龄时,从上述小鼠回收肠道(大肠及小肠)。上述回收后,分析肠道的息肉。将这些的结果示于图12及图13。

[0203] 图12为示出腺瘤性息肉病模型小鼠中的息肉形成抑制效果的图。图12中,(A)示出总息肉数的图,(B)示出总息肉面积(mm²)的图,(C)示出仅接种佐剂、接种PRR2-Cg或接种PRR3-Cg时的照片。图12的(A)中,横轴表示接种组,纵轴表示息肉的数量。图12的(B)中,横轴表示接种组,纵轴表示面积(mm²)。如图12所示,可知与接种佐剂的组相比,接种PRR2-Cg或PRR3-Cg的组中,总息肉数及总息肉面积减少。由以上结果可知,本发明的PRR2肽及PRR3肽显示出息肉形成抑制效果。

[0204] 图13为示出腺瘤性息肉病模型小鼠中的息肉形成抑制效果的图。图13中,横轴表示息肉的大小(mm²),纵轴表示息肉的数量。如图13所示,可知与接种生理盐水的腺瘤性息肉病模型小鼠(Control1)相比,通过PRR2-Cg或PRR3-Cg的接种,大小为中型(1.1~2.0mm²)及大型(2.1mm²以上)的息肉的数量减少。以上结果表明,本发明的PRR2肽及PRR3肽通过抑制ATP6ap2而抑制了息肉的增殖。

[0205] (3) 通过免疫染色研究PRR2及PRR3在APC^{min/+}小鼠中的 β -联蛋白活性抑制

[0206] 对于观察到腺瘤性息肉病模型小鼠的息肉形成抑制效果的PRR2及PRR3,使用免疫染色研究是否抑制 β -联蛋白的活性。具体而言,对于腺瘤性息肉病模型小鼠(C57BL/6J-Apcmin/+),通过与上述实施例1(3)同样的试验方案给予生理盐水、PRR2-Cg或PRR3-Cg且给予佐剂。在上述小鼠为16~20周龄时,从上述小鼠回收肠道。上述回收后,使用4%的多聚甲醛将上述肠道固定。上述固定后,对上述肠道进行石蜡包埋,制作厚度2 μ m的石蜡包埋切片。

对于得到的石蜡包埋切片,进行与 β -联蛋白相关的免疫染色。作为一抗,在ATP6ap2(肾素原受体:PRR)的染色中,使用抗ATP6ap2抗体(3000倍稀释、日本东北药科大学提供:参照Takuo Hirose et al.,“Gene expression of (pro)renin receptor is upregulated in hearts and kidneys of rats with congestive heart failure,Peptides,Volume 30,Issue 12,2009,Pages 2316-2322),在活性型 β -联蛋白的染色中,使用抗活性型 β -联蛋白抗体(1000倍稀释、Cat.No:05-665、Merck Millipore公司制),作为二抗,使用辣根过氧化物酶缀合抗兔IgG(Nichirei Biosciences公司制)。将这些的结果示于图14。

[0207] 图14为肠道中的ATP6ap2或活性型 β -联蛋白的染色的照片。图14中,(A)示出ATP6ap2的染色图像,(B)示出活性型 β -联蛋白的染色图像。如图14的(A)所示,接种生理盐水的小鼠的肠道息肉中,ATP6ap2的染色强烈可见。另一方面,接种PRR2-Cg或PRR3-Cg的小鼠的肠道息肉中,ATP6ap2的染色减弱。如图14的(B)所示,接种生理盐水的小鼠(Control)的肠道的核内,活性型 β -联蛋白的染色强烈可见。另一方面,接种PRR2-Cg或PRR3-Cg的小鼠的肠道的核内,活性型 β -联蛋白的染色减弱。由以上结果可知,本发明的PRR2肽及PRR3肽抑制ATP6ap2的表达及 β -联蛋白的活性。

[0208] (4)PRR2及PRR3带来的副反应的研究

[0209] Wnt/ β -联蛋白系统信号抑制剂的情况下,骨病变等副反应已成为问题。因此,研究了PRR2及PRR3的接种是否不产生骨病变等副作用。具体而言,对腺瘤性息肉病模型小鼠(C57BL/6J-Apcmin/+)及正常小鼠(C57BL/6),通过与上述实施例1(3)同样的试验方案给予生理盐水、PRR2-Cg或PRR3-Cg且同时给予佐剂。在上述给予后24周,确认上述腺瘤性息肉病模型小鼠中的副反应。作为上述腺瘤性息肉病模型小鼠的副反应的指标,测定AST(肝脏)、BUN(肾脏)及骨强度。另外,在上述给予后96周,确认上述正常小鼠中的副反应。作为上述正常小鼠的副反应的指标,测定AST(肝脏)、肌酐清除(肾脏)及骨强度。将这些的结果示于图15。

[0210] 图15为示出腺瘤性息肉病模型小鼠及正常小鼠中的副反应的结果的图。图15的(A)~(C)中,上段示出雌性小鼠的结果,下段示出雄性小鼠的结果。图15中,(A)示出腺瘤性息肉病模型小鼠中的AST(肝脏),(B)示出腺瘤性息肉病模型小鼠中的BUN(肾脏),(C)示出腺瘤性息肉病模型小鼠中的骨强度。(D)示出正常小鼠中的AST(肝脏),(E)示出正常小鼠中的肌酐清除(肾脏),(F)示出正常小鼠的骨强度。图15的(A)中,横轴表示接种组,纵轴表示AST酶浓度。图15的(B)中,横轴表示接种组,纵轴表示BUN血中浓度。图15的(C)中,横轴表示接种组及性别,纵轴表示骨强度。图15的(D)中,横轴表示接种组及性别,纵轴表示AST酶浓度。图15的(E)中,横轴表示接种组及性别,纵轴表示肌酐清除值。图15的(F)中,横轴表示接种组及性别,纵轴表示骨强度。如图15的(A)~(C)所示,可知接种了PRR2-Cg或PRR3-Cg的腺瘤性息肉病模型小鼠中,与接种生理盐水的腺瘤性息肉病模型小鼠(Control)显示同样的AST酶浓度。另外,接种PRR2-Cg或PRR3-Cg的腺瘤性息肉病模型小鼠与接种生理盐水的腺瘤性息肉病模型小鼠相比,观察到BUN血中浓度的减少及骨强度的增加或增加倾向。如图15的(D)~(F)所示,可知在接种PRR2-Cg或PRR3-Cg的正常模型小鼠中,显示与接种生理盐水的正常小鼠同样的AST酶浓度、BUN血中浓度及骨强度。由以上结果可知,本发明的PRR2肽及PRR3肽不伴有副反应,并且改善因腺瘤而发生的肾功能下降及骨强度下降。

[0211] (4)PRR2及PRR3所带来的生存率改善的研究

[0212] 腺瘤性息肉病模型小鼠由于随着腺瘤增大而发生的肠梗阻及出血等,经常会观察到死亡。因此,研究了PRR2-Cg及PRR3-Cg的接种是否会提高生存率。具体而言,对于腺瘤性息肉病模型小鼠(C57BL/6J-Apcmin/+),通过与实施例1(3)同样的试验方案给予生理盐水、PRR2-Cg或PRR3-Cg且给予佐剂。对于上述小鼠,从上述给予起计测生存率30周。需要说明的是,上述小鼠的体重减少10%时则视为已死亡,如此地进行生存率的计测。将这些的结果示于图16。

[0213] 图16为示出腺瘤性息肉病模型小鼠的生存率的图。图16中,横轴表示第1次接种起的周数,纵轴表示生存率。如图16所示,可知与接种生理盐水的小鼠(Control)的生存率相比,接种PRR2-Cg或PRR3-Cg的雌性小鼠的生存率上升。由以上结果可知,本发明的PRR2肽及PRR3肽对于改善预后有效。

[0214] [实施例4]

[0215] 对于本发明的PRR肽,确认有肌肉减少抑制效果。

[0216] 研究了本发明的新的肽对于肌肉量下降是否具有抑制效果。已知高食盐饲料会引起小鼠的肌肉量下降。具体而言,将上述实施例2(1)中制作的CRM197-PRR2 20 μ g与30 μ l的生理盐水及佐剂(Freund's Complete Adjuvant, Cat No. F5881, SIGMA公司制)混合,制备第1次给予用的PRR2疫苗。上述制备后,将上述第1次给予用的PRR2疫苗接种于小鼠(C57BL/6J小鼠、雄性、8周龄)。从上述给予起2周后,将上述实施例2(1)中制作的CRM197-PRR2-Cg 20 μ g与30 μ l的生理盐水及佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant, Cat No. F5506, SIGMA公司制)混合,制备第2次给予用的PRR2疫苗。上述制备后,将上述第2次给予用的PRR2疫苗接种于上述小鼠。上述第2次给予起4周后,开始高食盐负荷。上述高食盐负荷通过对上述小鼠给予2周高食盐饲料而进行。进行上述高食盐负荷则小鼠会产生骨骼肌的肌肉量现象,因此上述抗食盐负荷成为肌少症或衰弱的模型。作为实验组,设置(i)仅接种佐剂+常规饲料(n=10)、(ii)仅接种佐剂+高食盐饲料(n=10)、(iii)PRR2疫苗接种+常规饲料(n=10)及(iv)PRR2疫苗接种+高食盐饲料(n=10)这4组。上述仅接种佐剂的组使用生理盐水代替PRR2疫苗。另外,上述第1次接种的6周后,从上述小鼠采集血清。于450nm的吸光度下测定上述血清的抗体效价。将这些的结果示于图17及图18。

[0217] 图17为示出PRR2疫苗的抗体效价的图。图17中,横轴表示实验组,纵轴表示450nm的吸光度的半值。如图17所示,可知在接种PRR2-Cg的小鼠中,无论是否高食盐负荷,抗体效价均上升。另一方面,接种佐剂的对照组的小鼠中,无论是否高食盐负荷,均未见抗体效价的上升。

[0218] 图18为示出PRR2-Cg引起的体重变化的图。图18中,(A)示出仅给予佐剂的对照组(i)及(ii)的体重变化,(B)示出接种PRR2疫苗的组(iii)及(iv)的体重变化。图18的(A)及(B)中,横轴表示高食盐负荷开始后的天数,纵轴表示小鼠的体重。如图18所示,仅接种佐剂的小鼠中,高食盐饲料的组与常规饲料的组相比,体重减少。另一方面,接种PRR2疫苗的小鼠中,高食盐饲料的组与常规饲料的组的体重相同。由以上结果可知,本发明的PRR2肽具有抑制肌肉量下降的效果。

[0219] 以上参照实施方式及实施例对本发明进行了说明,但是本发明不受上述实施方式及实施例限定。对于本发明的构成、细节,可以进行本发明的范围内的本领域技术人员可理解的各种变更。

[0220] 该申请以2022年3月3日提出申请的日本申请特愿2022-032709为基础而要求优先权,将其公开的全部内容引入于此。

[0221] <附录>

[0222] 上述的实施方式及实施例的一部分或全部可以如以下的附录那样来记载,但是不限于以下。

[0223] <PRR肽>

[0224] (附录1)

[0225] 一种肾素原受体肽,其包括下述(P1)、(P2)或(P3)的多肽:

[0226] (P1)由序列号1~3中的任一氨基酸序列构成的多肽;

[0227] (P2)由在序列号1~3中的任一氨基酸序列中缺失、置换或添加1~3个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽;

[0228] (P3)由相对于序列号1~3中的任一氨基酸序列具有70%以上的同一性的氨基酸序列构成的多核苷酸。

[0229] <缀合物>

[0230] (附录2)

[0231] 一种缀合物,其包含抗原肽和载体蛋白,

[0232] 上述抗原肽与上述载体蛋白结合,

[0233] 上述抗原肽包含附录1所述的肾素原受体肽。

[0234] (附录3)

[0235] 根据附录2所述的缀合物,其中,上述载体蛋白包含半胱氨酸残基,

[0236] 上述抗原肽结合于上述载体蛋白的半胱氨酸残基。

[0237] (附录4)

[0238] 根据附录2或3所述的缀合物,其中,上述载体蛋白为白喉毒素或其突变体或者为破伤风毒素或其片段。

[0239] (附录5)

[0240] 根据附录2至4中任一项所述的缀合物,其中,上述载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0241] (附录6)

[0242] 根据附录2至5中任一项所述的缀合物,其中,给予于对象的情况下,能够诱导形成在Wnt/ β -联蛋白途径的活性试验中能够抑制Wnt/ β -联蛋白途径的活性的抗体。

[0243] (附录7)

[0244] 根据附录2至6中任一项所述的缀合物,其用于肿瘤的处置。

[0245] (附录8)

[0246] 根据附录7所述的缀合物,其中,上述肿瘤为肾素原受体阳性。

[0247] (附录9)

[0248] 根据附录7或8所述的缀合物,其中,上述肿瘤为家族性腺瘤性息肉病。

[0249] (附录10)

[0250] 根据附录9所述的缀合物,其用于合并消化道良性多发肿瘤好发疾病、加德纳综合征、特科特综合征和/或韧带样纤维瘤病的家族性腺瘤性息肉病的处置。

[0251] (附录11)

- [0252] 根据附录2至6中任一项所述的缀合物,其用于肌少症或衰弱的处置。
- [0253] <核酸>
- [0254] (附录12)
- [0255] 一种核酸,其编码附录1所述的肽。
- [0256] <表达载体>
- [0257] (附录13)
- [0258] 一种表达载体,其包含附录12所述的核酸。
- [0259] (附录14)
- [0260] 根据附录13所述的表达载体,其中,上述表达载体为病毒载体。
- [0261] <药物组合物>
- [0262] (附录15)
- [0263] 一种药物组合物,其包含附录1所述的肾素原受体肽、附录2至11中任一项所述的缀合物、附录12所述的核酸和/或附录13或14所述的表达载体,并且包含药学上可接受的载体。
- [0264] (附录16)
- [0265] 根据附录15所述的药物组合物,其还包含免疫激活剂。
- [0266] (附录17)
- [0267] 根据附录15或16所述的药物组合物,其中,给予于对象的情况下,能够诱导形成在Wnt/ β -联蛋白途径的活性试验中能够抑制Wnt/ β -联蛋白途径的活性的抗体。
- [0268] <用于肿瘤处置的用途>
- [0269] (附录18)
- [0270] 根据附录15至17中任一项所述的药物组合物,其用于肿瘤的处置。
- [0271] (附录19)
- [0272] 根据附录18所述的药物组合物,其中,上述肿瘤为肾素原受体阳性。
- [0273] (附录20)
- [0274] 根据附录18或19所述的药物组合物,其中,上述肿瘤为家族性腺瘤性息肉病。
- [0275] (附录21)
- [0276] 根据附录20所述的药物组合物,其用于合并消化道良性多发肿瘤好发疾病、加德纳综合征、特科特综合征和/或韧带样纤维瘤病的家族性腺瘤性息肉病的处置。
- [0277] <用于肌少症或衰弱的用途>
- [0278] (附录22)
- [0279] 根据附录15至17中任一项所述的药物组合物,其用于肌少症或衰弱的处置。
- [0280] <转化体>
- [0281] (附录23)
- [0282] 一种转化体,其包含附录1所述的肾素原受体肽、附录12所述的核酸、或者附录13或14所述的表达载体。
- [0283] <制造方法>
- [0284] (附录24)
- [0285] 一种肾素原受体肽的制造方法,其包括使附录12所述的核酸表达和/或使附录13

或14所述的表达载体表达的工序。

[0286] (附录25)

[0287] 根据附录24所述的制造方法,其中,上述表达工序包括:

[0288] 培养附录23所述的转化体的培养工序、和

[0289] 单离上述肾素原受体肽的单离工序。

[0290] <肿瘤的处置方法>

[0291] (附录26)

[0292] 一种肿瘤的处置方法,其包括对对象给予附录1所述的肾素原受体肽、附录2至10中任一项所述的缀合物、附录12所述的核酸、附录13或14所述的表达载体和/或附录15至21中任一项所述的药物组合物的工序。

[0293] <肌少症或衰弱的处置方法>

[0294] (附录27)

[0295] 一种肌少症或衰弱的处置方法,其包括对对象给予附录1所述的肾素原受体肽、附录2至6及11中任一项所述的缀合物、附录12所述的核酸、附录13或14所述的表达载体和/或附录15至17及22中任一项所述的药物组合物的工序。

[0296] <用途>

[0297] (附录28)

[0298] 根据附录1所述的肾素原受体肽、附录2至10中任一项所述的缀合物、附录12所述的核酸、附录13或14所述的表达载体和/或附录15至21中任一项所述的药物组合物,其用于肿瘤的处置。

[0299] (附录29)

[0300] 根据附录1所述的肾素原受体肽、附录2至6及11中任一项所述的缀合物、附录12所述的核酸、附录13或14所述的表达载体和/或附录15至17及22中任一项所述的药物组合物,其用于肌少症或衰弱的处置。

[0301] 产业上的可利用性

[0302] 如上所述,根据本发明能够诱导针对肾素原受体的抗体。另外,根据本发明能够间接抑制Wnt/ β -联蛋白途径的活性。因此,根据本发明的肾素原受体肽,例如,能够对因Wnt/ β -联蛋白途径的异常而产生的疾病进行处置。因此,本发明例如在医药领域等中极为有用。

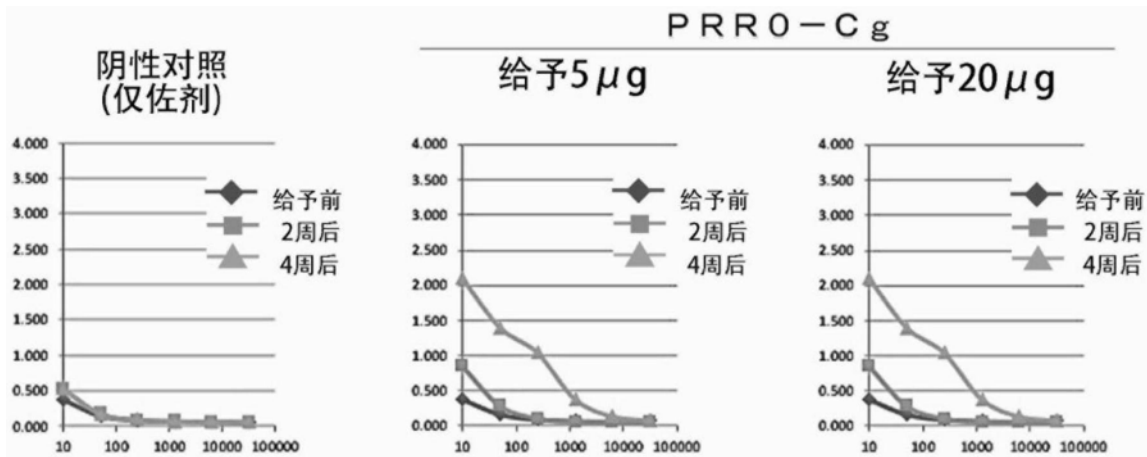


图1

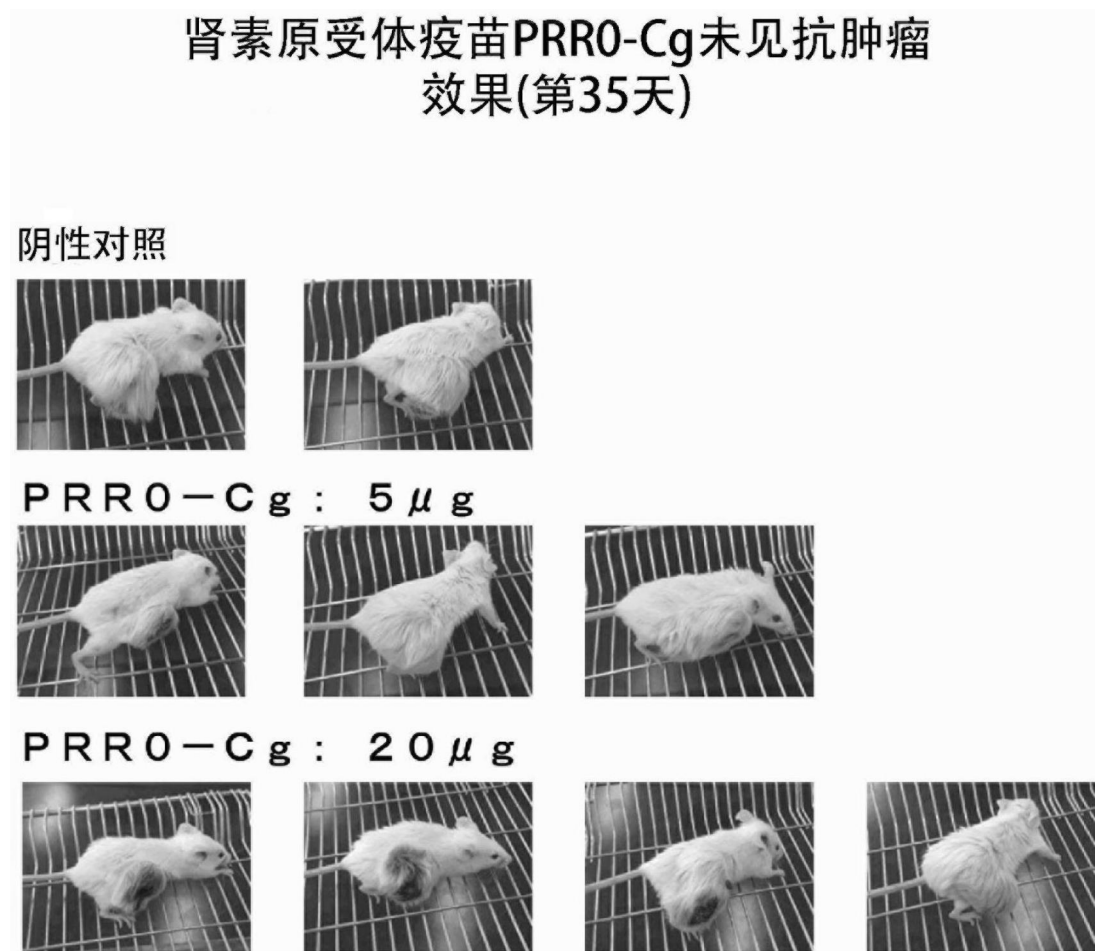


图2

第1次给予起7周后(第2次给予起5周后)的抗体效价

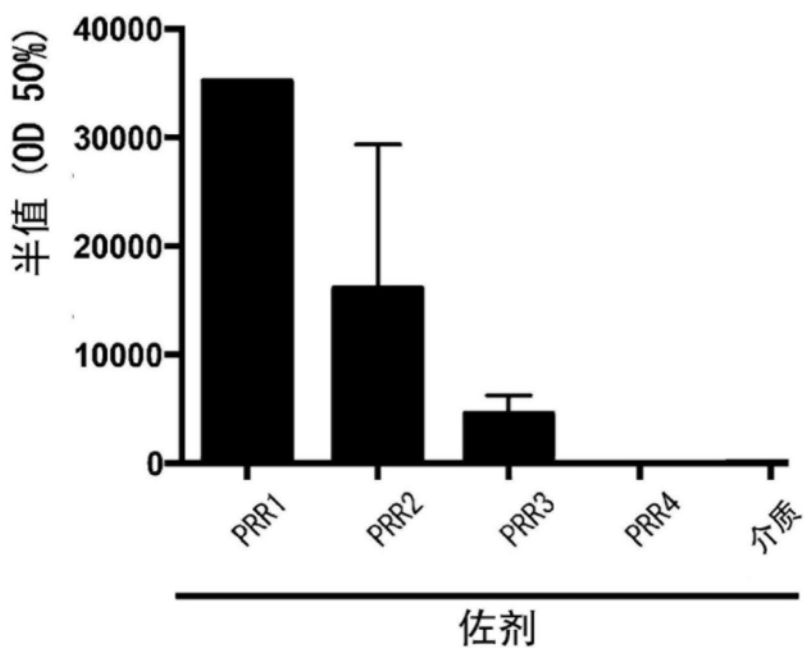


图3

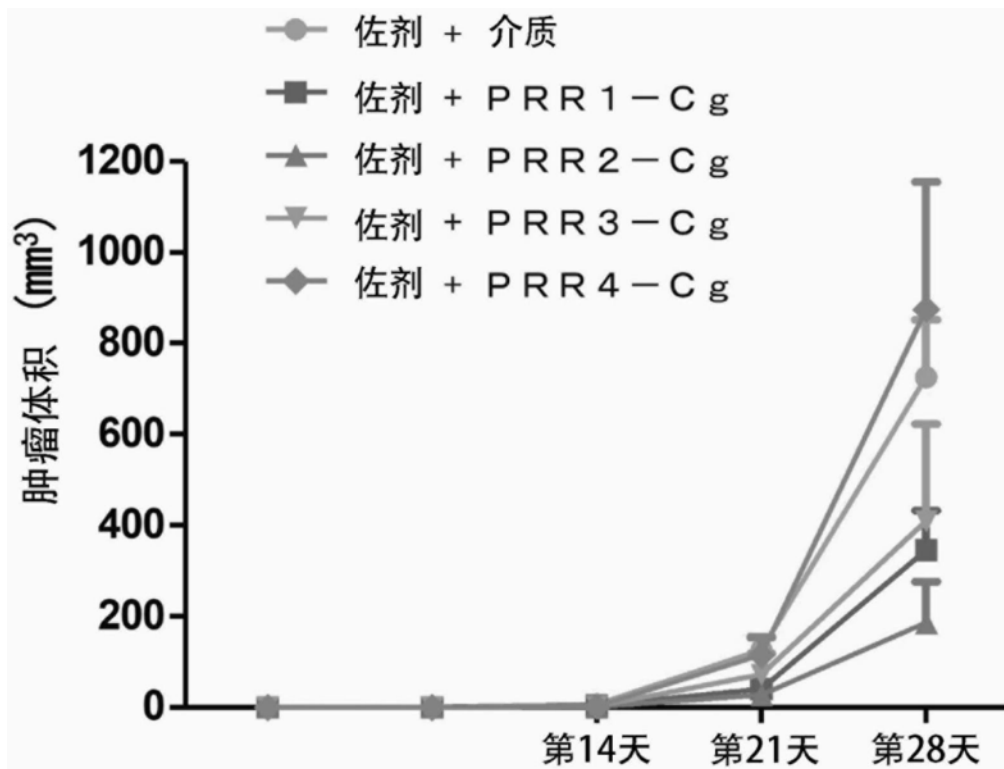


图4

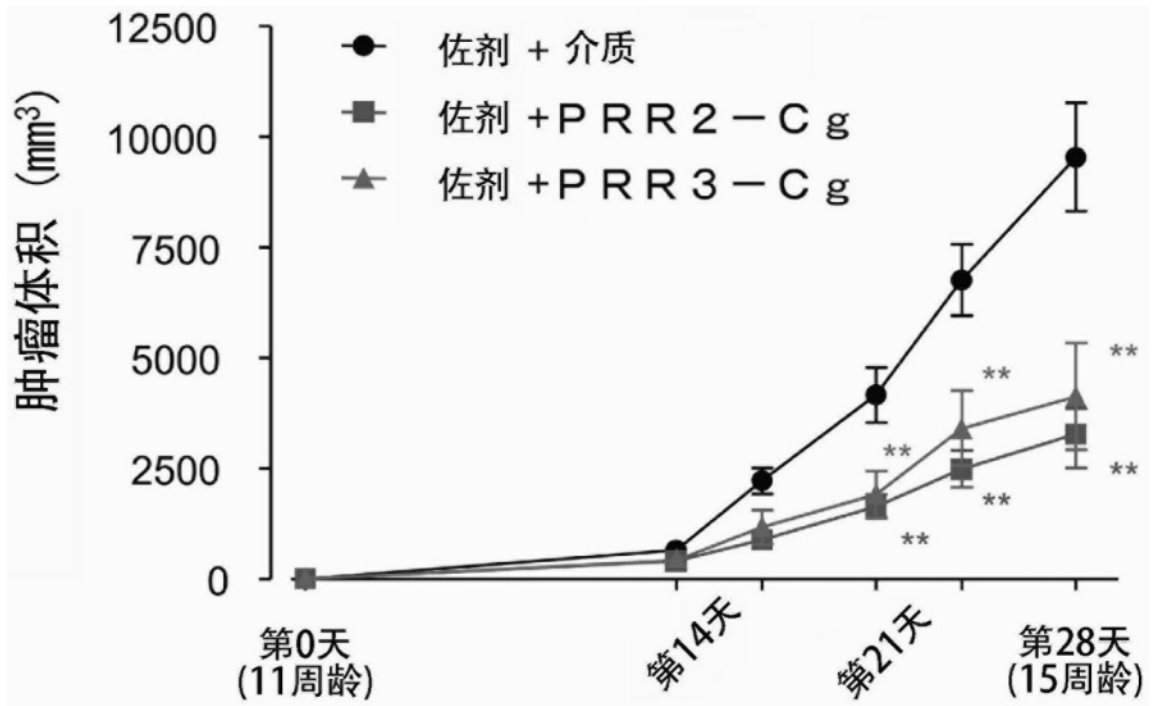


图5

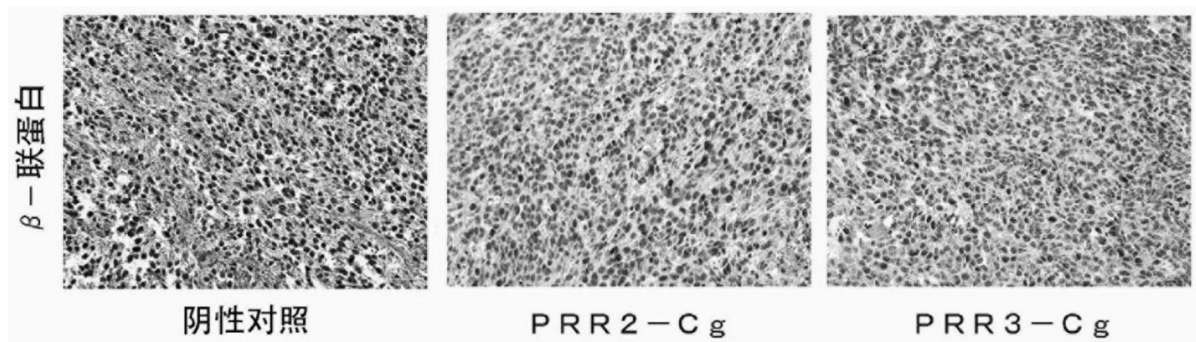


图6

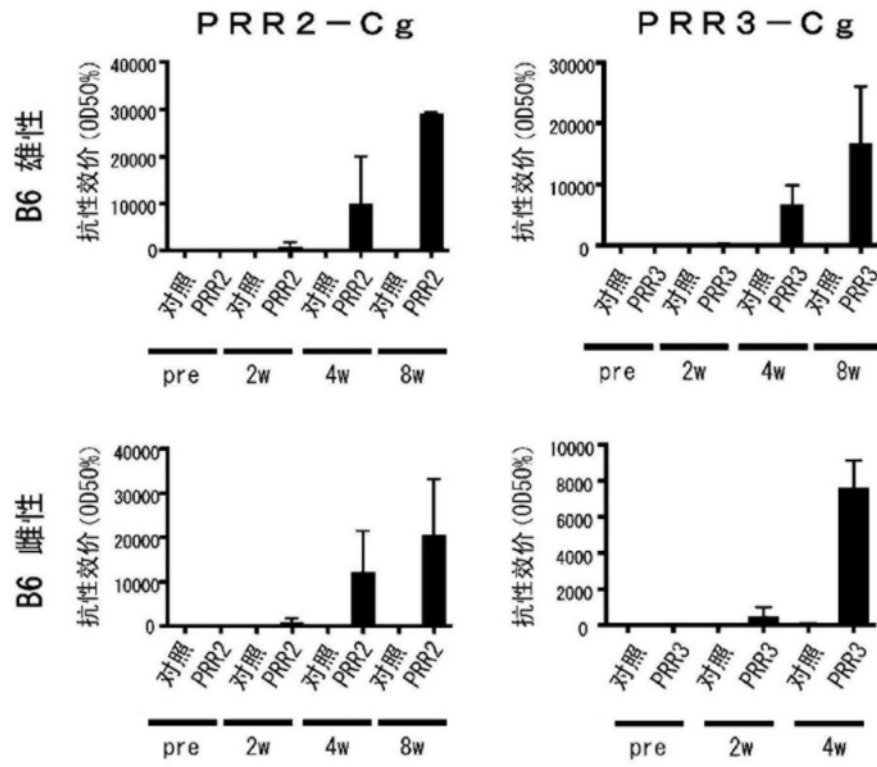


图7

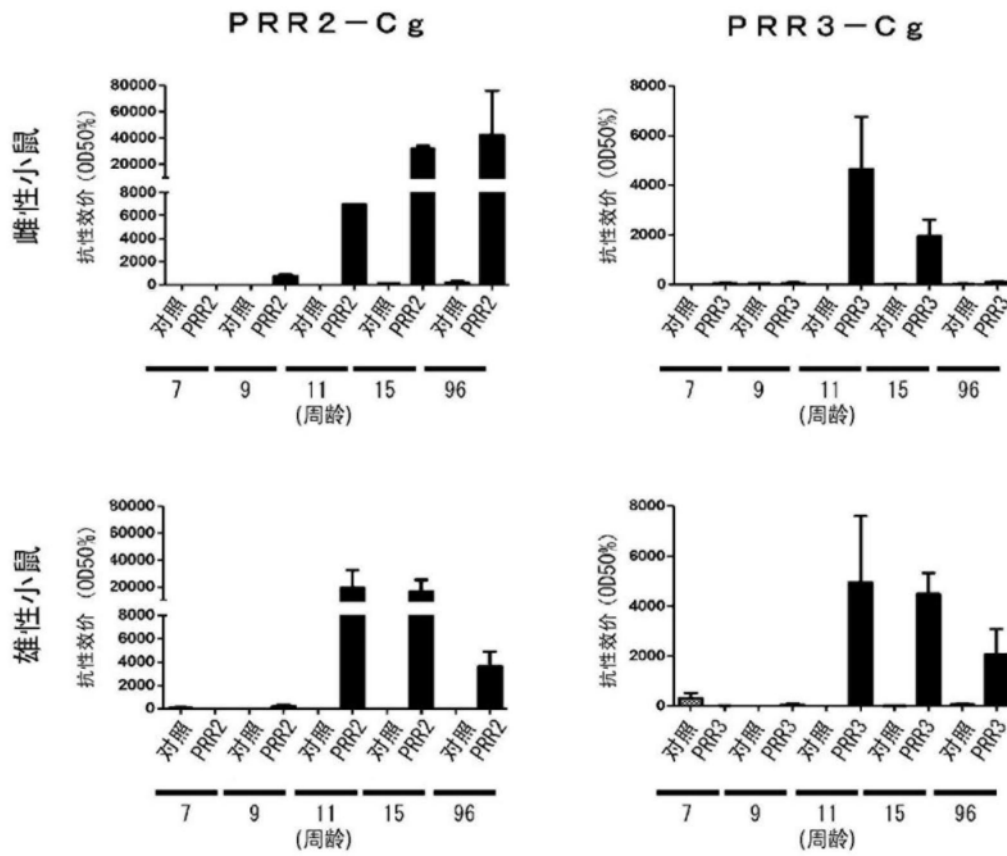


图8

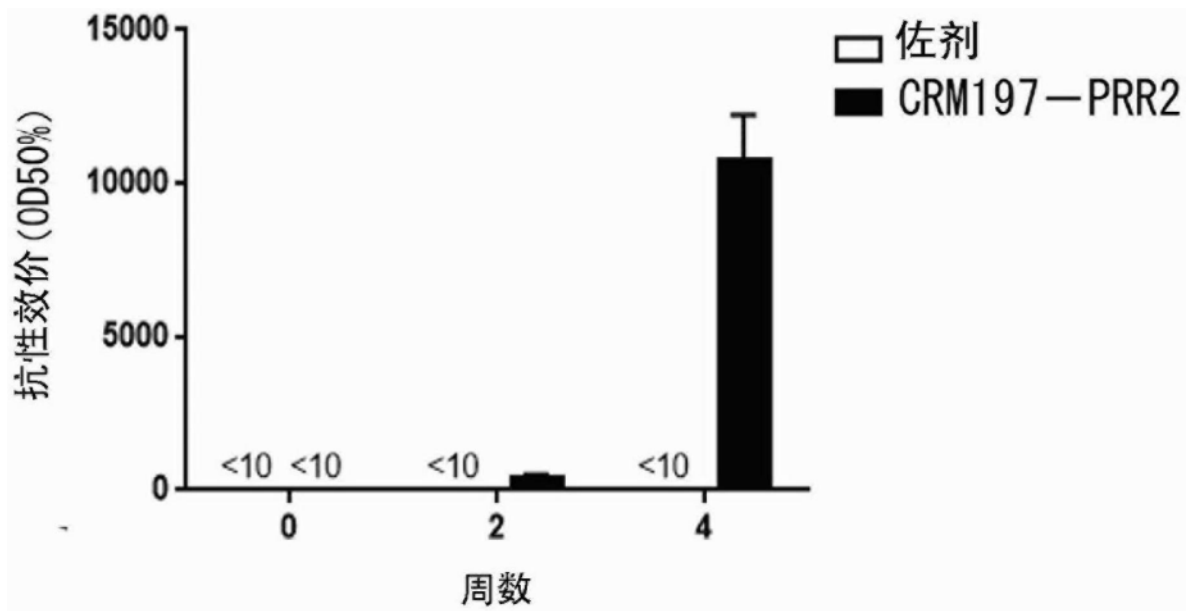


图9

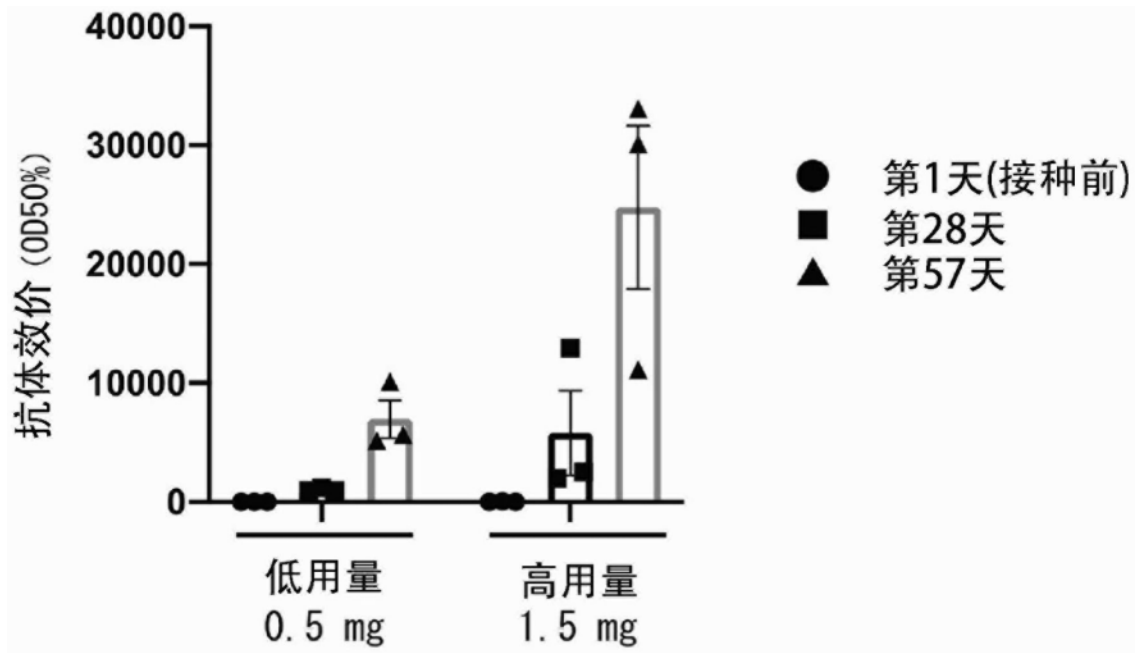
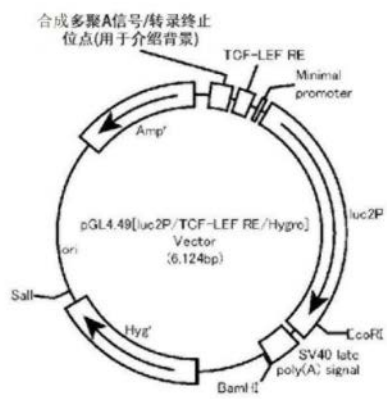


图10

(A)



(B)

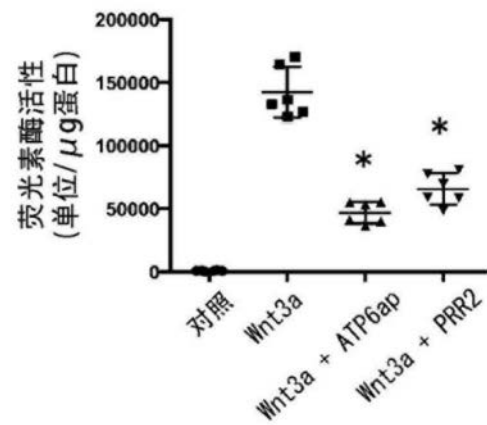


图11

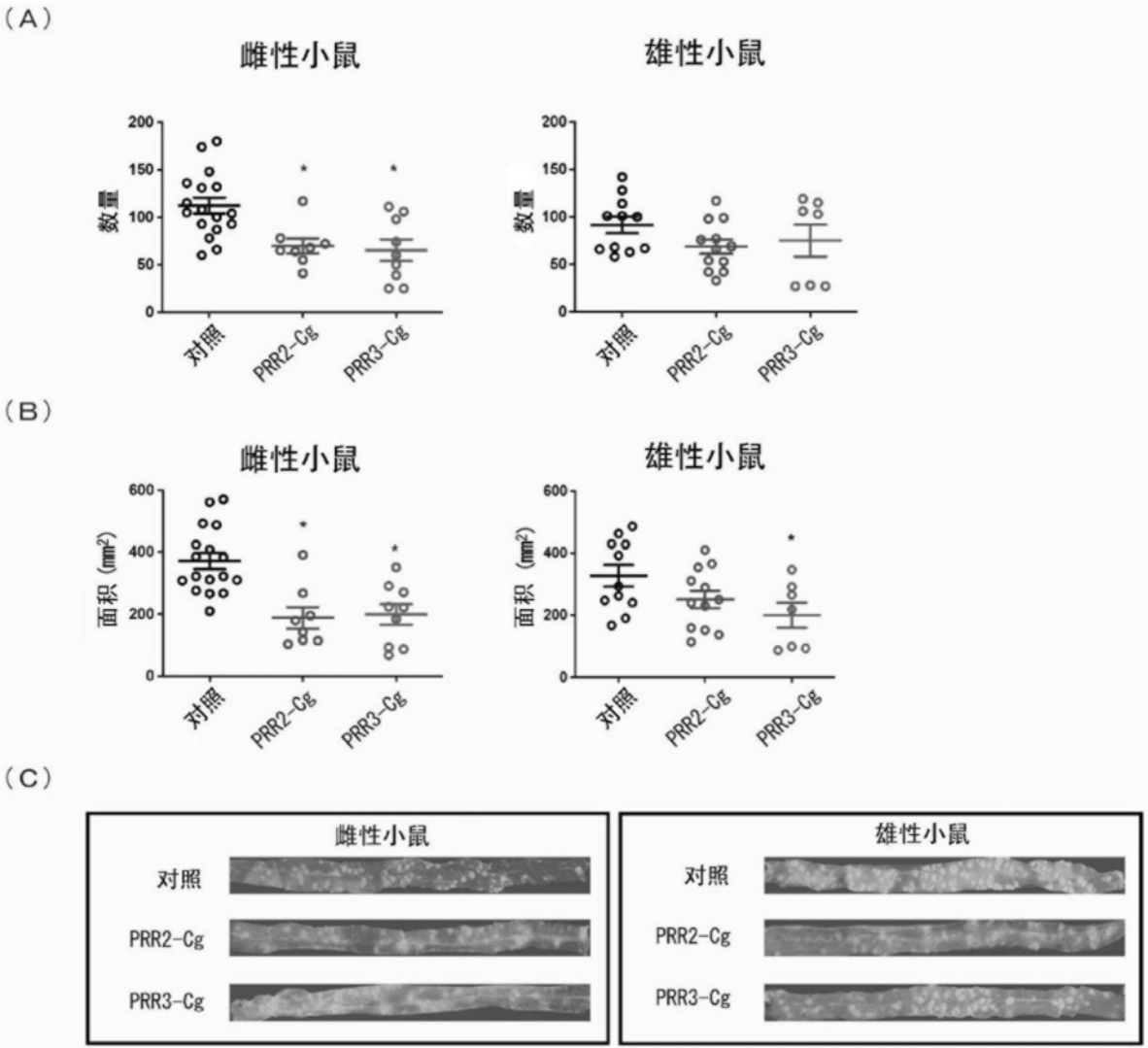


图12

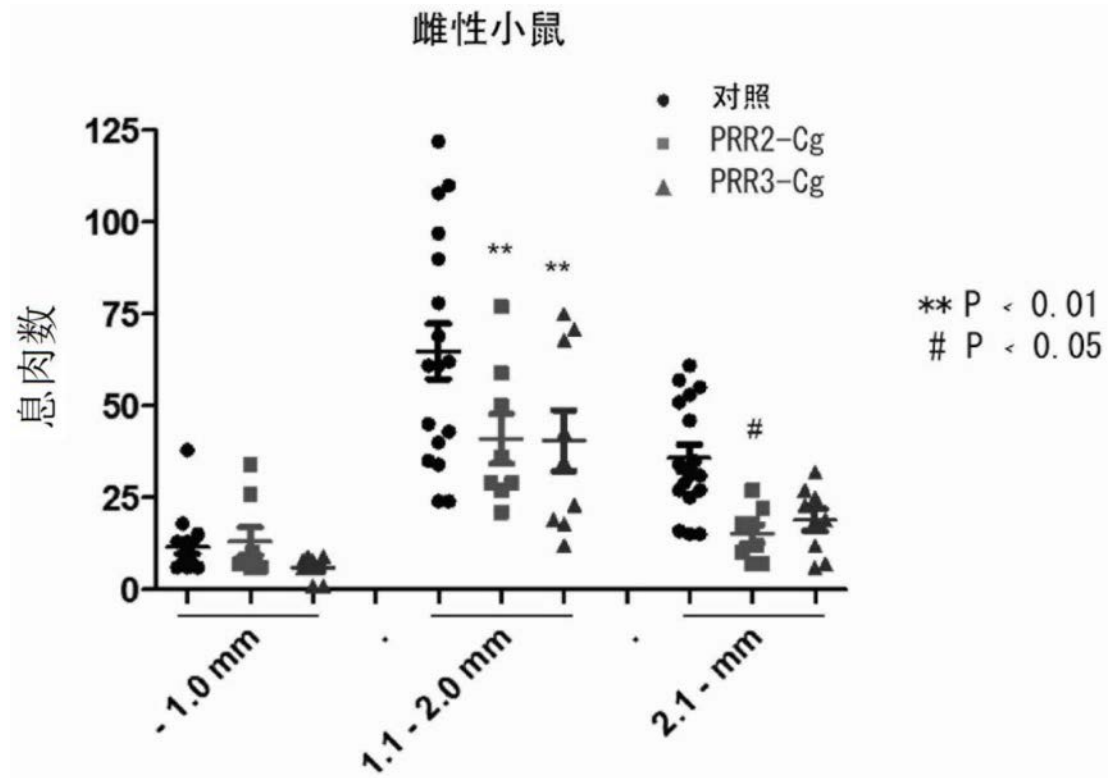


图13

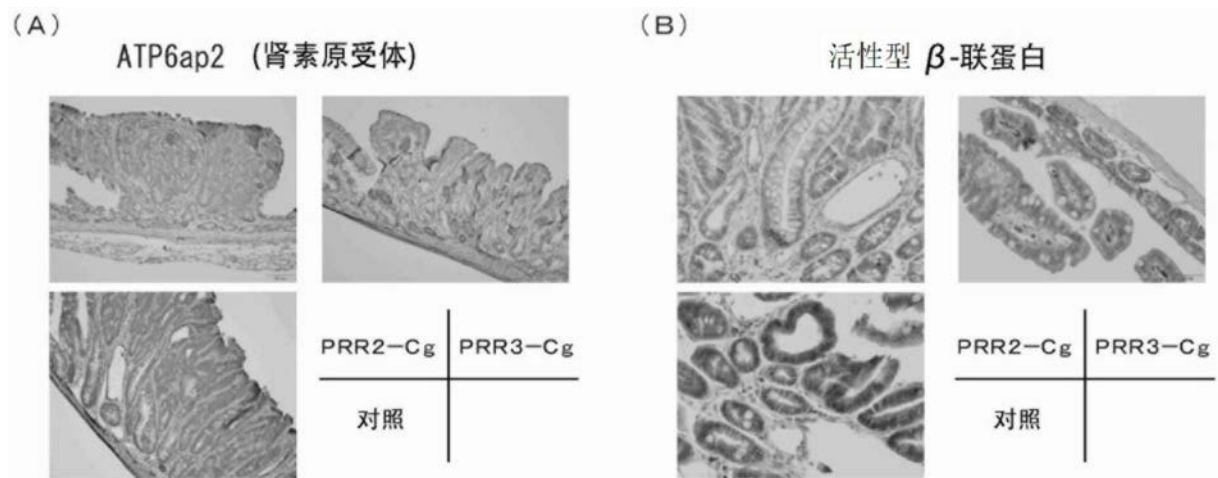


图14

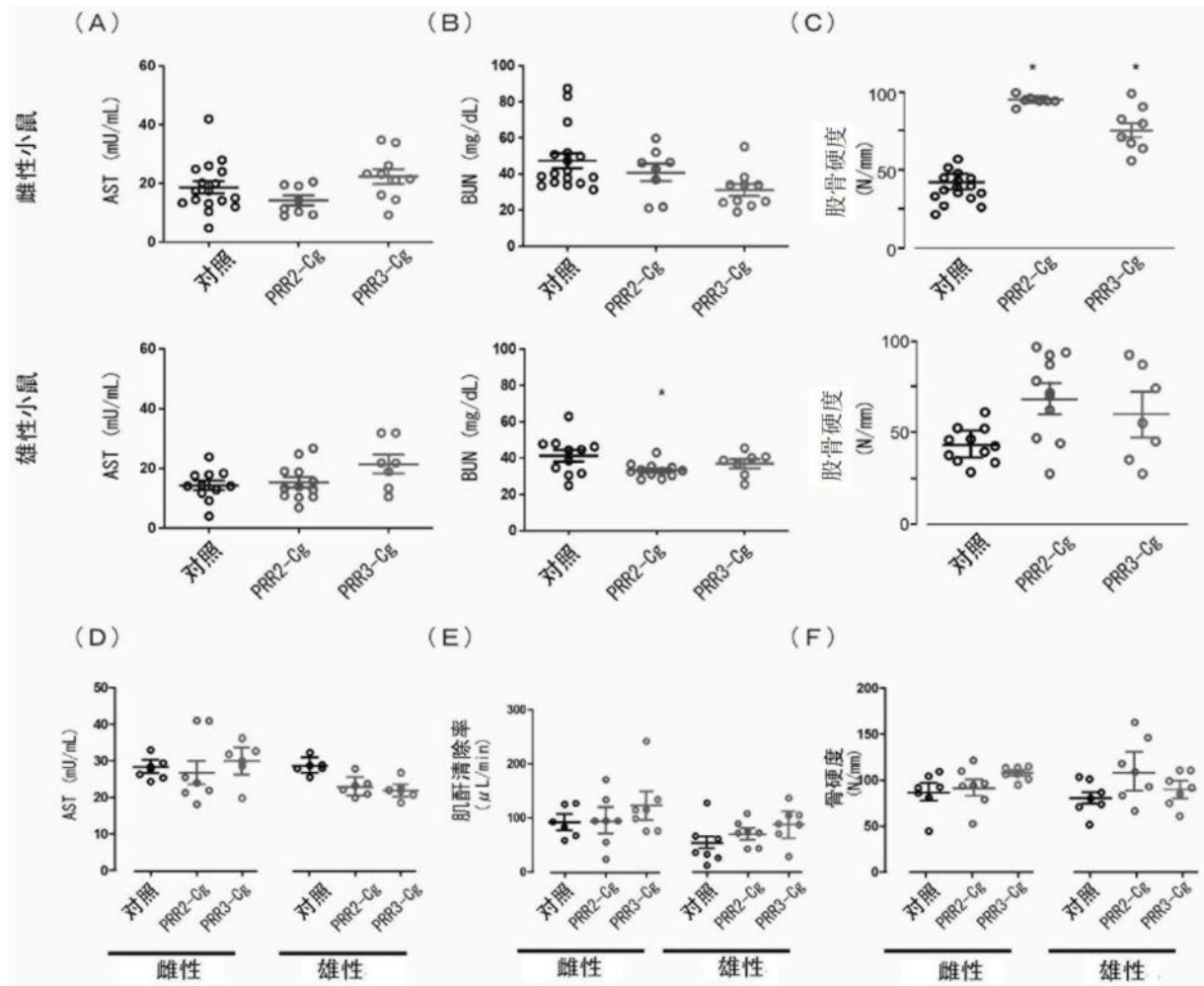


图15

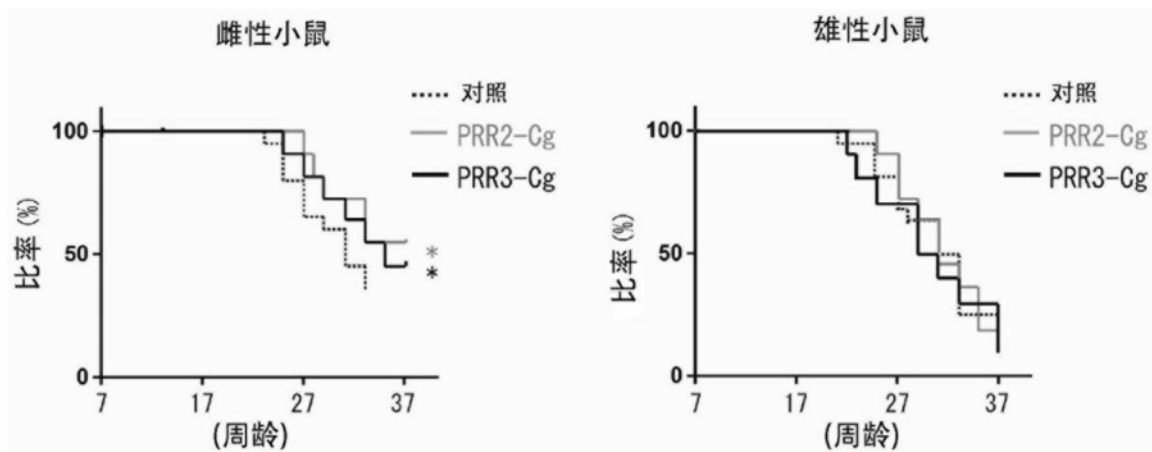


图16

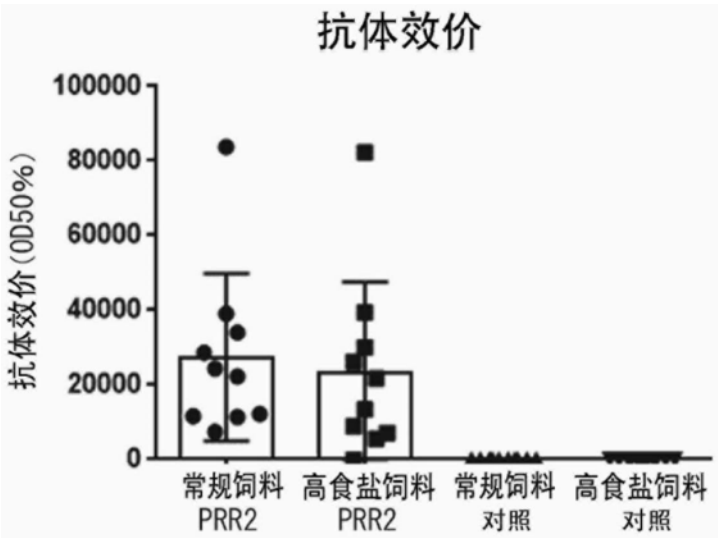


图17

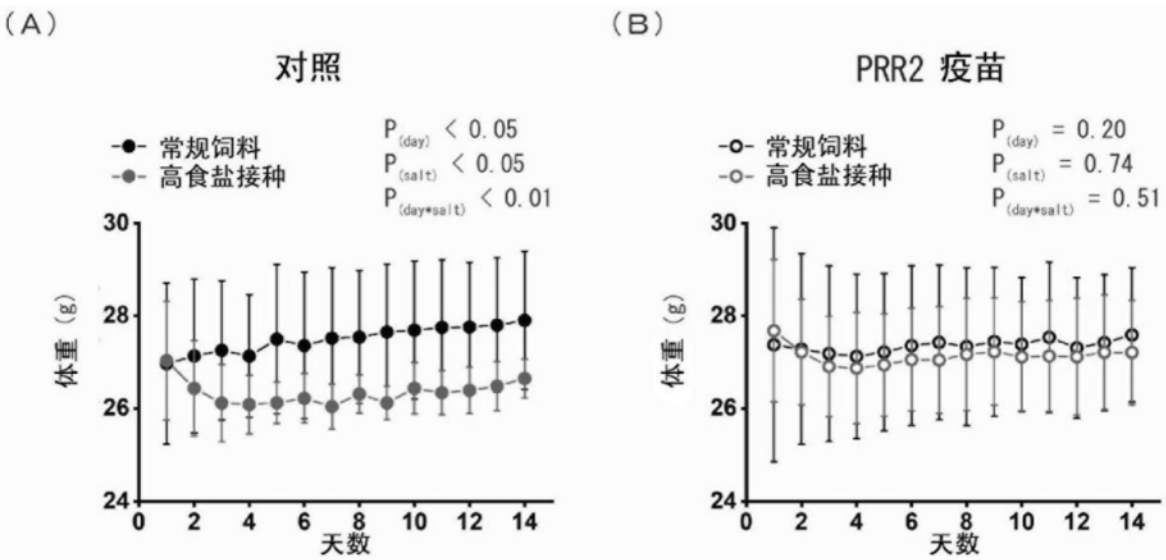


图18