

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/098838

発行日 平成29年9月28日(2017.9.28)

(43) 国際公開日 平成28年6月23日(2016.6.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B065
<b>C07K 14/435 (2006.01)</b>	C07K 14/435 ZNA	4C084
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/06	4H045
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/08	
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2016-564896(P2016-564896)	(71) 出願人 596165589 学校法人 聖マリアンナ医科大学 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/085286	
(22) 国際出願日 平成27年12月16日(2015.12.16)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-257827(P2014-257827)	(74) 代理人 110001519 特許業務法人太陽国際特許事務所
(32) 優先日 平成26年12月19日(2014.12.19)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 岡本 一起 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1 学校法人 聖マリアンナ医科大学内
	Fターム(参考) 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA25 BB25 BC03 BC07 CA24 CA44 4C084 AA02 AA07 BA17 BA18 CA53 CA59 NA14 ZB11 ZC41 4H045 AA10 BA14 BA15 BA16 BA17 CA40 EA20 FA74 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、形質転換体、NFκB阻害剤、及びNFκB亢進性疾患の治療剤

## (57) 【要約】

本開示のペプチドは、(a) 配列番号1~5のいずれか1つのアミノ酸配列からなるペプチド、(b) 配列番号1~5のいずれか1つにおいて1個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、NFκB阻害作用を有するペプチド、(c) 配列番号1~5のいずれか1つのアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、NFκB阻害作用を有するペプチド、(d) 上記(a)~(c)から選ばれるいずれか1種のペプチドに膜透過ペプチドが融合されたペプチド、(e) 上記(a)~(d)から選ばれるいずれか1種のペプチドのN末端にMet残基、MetAla残基、又はAla残基が付加されたペプチド、のいずれか1種のペプチドであり、NFκB阻害作用を有する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

N F B 阻害作用を有する、下記 ( a ) ~ ( e ) から選ばれるいずれか 1 種のペプチド

- ：
- ( a ) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列からなるペプチド、
  - ( b ) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか 1 つにおいて 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、N F B 阻害作用を有するペプチド、
  - ( c ) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して 8 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、N F B 阻害作用を有するペプチド、
  - ( d ) 前記 ( a ) ~ ( c ) から選ばれるいずれか 1 種のペプチドに膜透過ペプチドが融合されたペプチド、
  - ( e ) 前記 ( a ) ~ ( d ) から選ばれるいずれか 1 種のペプチドの N 末端に M e t 残基、M e t A l a 残基、又は A l a 残基が付加されたペプチド。

10

## 【請求項 2】

前記 ( b ) のペプチドが、配列番号 1 又は 2 において 1 個 ~ 4 個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、N F B 阻害作用を有するペプチドである、請求項 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 3】

前記 ( b ) のペプチドが、配列番号 3 ~ 5 のいずれか 1 つにおいて 1 個又は 2 個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、N F B 阻害作用を有するペプチドである、請求項 1 に記載のペプチド。

20

## 【請求項 4】

前記 ( d ) のペプチドが、前記 ( a ) ~ ( c ) から選ばれるいずれか 1 種のペプチドの C 末端に膜透過ペプチドが融合されたペプチドである、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む N F B 阻害剤。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む N F B 亢進性疾患の治療剤。

30

## 【請求項 7】

前記 N F B 亢進性疾患が炎症性疾患である、請求項 6 に記載の N F B 亢進性疾患の治療剤。

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターが導入された形質転換体。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本開示は、N F B ( nuclear factor-kappa B ) 阻害作用を有する新規なペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、該ベクターが導入された形質転換体、並びに該ペプチドを有効成分として含む N F B 阻害剤及び N F B 亢進性疾患の治療剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

50

炎症反応には種々のサイトカインや細胞接着分子の発現も関わっていることが知られている。この炎症性サイトカインがそれぞれに対応した受容体と結合することによって細胞内で各種分子のリン酸化が生じる。このリン酸化のカスケードは最終的に、核内の転写因子であるNF- $\kappa$ Bを活性化し、各種炎症物質の転写が促進されると考えられている。このように、炎症反応は最終的にNF- $\kappa$ Bの活性化に集約されており、このNF- $\kappa$ Bの活性を効果的に阻害する薬剤として、ステロイド薬が広く用いられている。

【0003】

ステロイド薬は非常に強力な効果を有する一方で、重篤な副作用を引き起こすことも知られている。このため、ステロイド薬に代わるNF- $\kappa$ B阻害剤が望まれていた。

【0004】

このような背景の下、本発明者は、ステロイド薬と同様にNF- $\kappa$ Bの転写促進活性を直接阻害することができる一方、ステロイド薬のようなホルモン作用を有しない新規なペプチドとして、MTI-IIを発見している（例えば、特許第4874798号公報を参照）。

MTI-IIは、102個のアミノ酸残基からなる小さなペプチドであり、その中でNF- $\kappa$ B阻害作用を有する部分は、32番目から75番目までのアミノ酸配列に対応する酸性アミノ酸領域であると考えられている。本発明者は、36番目から75番目までのアミノ酸配列からなるペプチドのC末端に8個のアルギニン残基からなる膜透過ペプチドを融合したペプチド（MPAID（MTI peptide anti-inflammatory drug）とも称する）を化学合成し、HeLa細胞に添加したところ、NF- $\kappa$ Bの転写促進活性が阻害されることが確認された（例えば、「日本ビタミン学会第66回大会、ビタミン、第88巻第4号、第260頁」及び「第87回日本生化学会大会、生化学、第86巻臨時増刊号、第101頁「4T13a-04」、第136頁「3P-006」」を参照）。また、このペプチドをアトピー性皮膚炎モデル動物に塗布投与したところ、*in vivo*での抗炎症効果が確認された（例えば、「第87回日本生化学会大会、生化学、第86巻臨時増刊号、第101頁「4T13a-04」、第136頁「3P-006」」を参照）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記の「日本ビタミン学会第66回大会、ビタミン、第88巻第4号、第260頁」及び「第87回日本生化学会大会、生化学、第86巻臨時増刊号、第101頁「4T13a-04」、第136頁「3P-006」」で用いられているペプチドは、膜透過性ペプチドを含めて48個のアミノ酸残基からなる小さなペプチドであるが、抗原性、生産性等を考慮すると、ペプチド長のより短いペプチドが望まれる。しかし、本発明者の実験によれば、酸性アミノ酸領域のN末端側の断片である36番目から65番目までのアミノ酸配列からなるペプチド、中央部分の断片である41番目から70番目までのアミノ酸配列からなるペプチド、及びC末端側の断片である46番目から75番目までのアミノ酸配列からなるペプチド、のいずれもNF- $\kappa$ B阻害作用を示さなかった。

【0006】

そこで、本発明は、NF- $\kappa$ B阻害作用を有する新規なペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、該ベクターが導入された形質転換体、並びに該ペプチドを有効成分として含むNF- $\kappa$ B阻害剤及びNF- $\kappa$ B亢進性疾患の治療剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、本発明に至った。すなわち、本発明は以下の態様を包含する。

【0008】

< 1 > NF- $\kappa$ B阻害作用を有する、下記（a）～（e）から選ばれるいずれか1種のペプチド：

10

20

30

40

50

- (a) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列からなるペプチド、  
 (b) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか 1 つにおいて 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、  
 欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、NF B 阻害作用を有するペ  
 プチド、  
 (c) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有す  
 るアミノ酸配列からなり、かつ、NF B 阻害作用を有するペプチド、  
 (d) 上記 (a) ~ (c) から選ばれるいずれか 1 種のペプチドに膜透過ペプチドが融合  
 されたペプチド、  
 (e) 上記 (a) ~ (d) から選ばれるいずれか 1 種のペプチドの N 末端に Met 残基、  
 Met Ala 残基、又は Ala 残基が付加されたペプチド。

10

## 【0009】

< 2 > 上記 (b) のペプチドが、配列番号 1 又は 2 において 1 個 ~ 4 個のアミノ酸残基  
 が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、NF B 阻害作用を  
 有するペプチドである、上記 < 1 > に記載のペプチド。

## 【0010】

< 3 > 上記 (b) のペプチドが、配列番号 3 ~ 5 のいずれか 1 つにおいて 1 個又は 2 個  
 のアミノ酸残基が置換、欠失、及び / 又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、NF  
 B 阻害作用を有するペプチドである、上記 < 1 > に記載のペプチド。

## 【0011】

< 4 > 上記 (d) のペプチドが、上記 (a) ~ (c) から選ばれるいずれか 1 種のペプ  
 チドの C 末端に膜透過ペプチドが融合されたペプチドである、上記 < 1 > ~ < 3 > のい  
 ずれか 1 項に記載のペプチド。

20

## 【0012】

< 5 > 上記 < 1 > ~ < 4 > のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む NF  
 B 阻害剤。

## 【0013】

< 6 > 上記 < 1 > ~ < 4 > のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む NF  
 B 亢進性疾患の治療剤。

## 【0014】

< 7 > 上記 NF B 亢進性疾患が炎症性疾患である、上記 < 6 > に記載の NF B 亢進  
 性疾患の治療剤。

30

## 【0015】

< 8 > 上記 < 1 > ~ < 4 > のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオ  
 チド。

## 【0016】

< 9 > 上記 < 8 > に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

## 【0017】

< 10 > 上記 < 9 > に記載のベクターが導入された形質転換体。

## 【0018】

< 11 > 上記 < 1 > ~ < 4 > のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む医  
 薬組成物を投与することを含む NF B 亢進性疾患の治療方法。

40

## 【発明の効果】

## 【0019】

本発明によれば、NF B 阻害作用を有する新規なペプチド、該ペプチドをコードする  
 ポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、該ベクターが導入された形質転  
 換体、並びに該ペプチドを有効成分として含む NF B 阻害剤及び NF B 亢進性疾患の  
 治療剤を提供することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0020】

【図 1】実施例 1 のペプチドを発現するベクターを HeLa 細胞にトランスフェクトした

50

ときのTNF 誘導NF B転写促進活性の阻害作用を示す図である。

【図2】実施例1のペプチドを発現するベクターをHeLa細胞にトランスフェクトしたときのTNF 誘導NF B転写促進活性の阻害作用を示す図である。

【図3】実施例1のペプチドを発現するベクターをHeLa細胞にトランスフェクトしたときのTNF 誘導NF B転写促進活性の阻害作用を示す図である。

【図4】20A5675（配列番号24）を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトしたときの、TNF 添加後のCOX2量及びGAPDH量の変化を示す図である。

【図5】12A5162（配列番号27）を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトしたときの、TNF 添加後のCOX2量及びGAPDH量の変化を示す図である。

【図6】実施例4のペプチドを発現するベクターをHeLa細胞にトランスフェクトしたときのTNF 誘導NF B転写促進活性の阻害作用を示す図である。

【図7】実施例6のペプチドを発現するベクターをHeLa細胞にトランスフェクトしたときのTNF 誘導NF B転写促進活性の阻害作用を示す図である。

【図8】12A5162-pep（配列番号39）又は6A5661-pep（配列番号40）のペプチドの存在下でHeLa細胞を培養したときのTNF 誘導NF B転写促進活性の阻害作用を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、本発明を実施するための形態について説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

アミノ酸配列の記載は左側がN末端側であり、アミノ酸残基は本技術分野で周知の一字表記（例えば、アラニン残基であれば「A」）又は三文字表記（例えば、アラニン残基であれば「Ala」）で表記する。

【0022】

<NF B阻害作用を有するペプチド>

本開示のペプチドは、下記（a）～（e）から選ばれるいずれか1種である。

（a）配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列からなるペプチド。

（b）配列番号1～5のいずれか1つにおいて1個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、NF B阻害作用を有するペプチド。

（c）配列番号1～5のいずれか1つのアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、NF B阻害作用を有するペプチド。

（d）上記（a）～（c）から選ばれるいずれか1種のペプチドに膜透過ペプチドが融合されたペプチド。

（e）上記（a）～（d）から選ばれるいずれか1種のペプチドのN末端にMet残基、MetAla残基、又はAla残基が付加されたペプチド。

【0023】

本開示のペプチドの作製手法は、遺伝子工学的的手法及び有機合成化学的手法のいずれであってもよい。遺伝子工学的的手法の場合、後述する本開示の形質転換体を利用することができる。

【0024】

上記（a）のペプチドは、詳細には以下のいずれか1つのアミノ酸配列からなる（アミノ酸残基は一字表記で示す）。

G E D D D E G D E E D E E E E E E E D E（配列番号1）

E T A E D G E D D D E G（配列番号2）

E D G E D D（配列番号3）

10

20

30

40

50

G E D D D E (配列番号4)

D E E D E E (配列番号5)

【0025】

配列番号1のアミノ酸配列は、MTI - IIの56番目から75番目までのアミノ酸配列に対応する。また、配列番号2のアミノ酸配列は、MTI - IIの51番目から62番目までのアミノ酸配列に対応する。また、配列番号3のアミノ酸配列は、MTI - IIの54番目から59番目までのアミノ酸配列に対応する。また、配列番号4のアミノ酸配列は、MTI - IIの56番目から61番目までのアミノ酸配列に対応する。また、配列番号5のアミノ酸配列は、MTI - IIの63番目から68番目までのアミノ酸配列に対応する。

10

MTI - IIの中でNF B阻害作用を有する部分は、32番目から75番目までのアミノ酸配列に対応する酸性アミノ酸領域であると考えられている。しかし、本発明者の実験によれば、酸性アミノ酸領域のN末端側の断片である36番目から65番目までのアミノ酸配列からなるペプチド、中央部分の断片である41番目から70番目までのアミノ酸配列からなるペプチド、及びC末端側の断片である46番目から75番目までのアミノ酸配列からなるペプチド、のいずれもNF B阻害作用を示さなかった。配列番号1～5のように短い断片であるペプチドがNF B阻害作用を示すことは驚くべきことである。

【0026】

上記(b)のペプチドは、配列番号1～5のいずれか1つにおいて1個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、NF B阻害作用を有するペプチドである。

20

置換、欠失、及び/又は付加されるアミノ酸残基の数は、NF B阻害作用が維持される限り特に限定されない。置換、欠失、及び/又は付加されるアミノ酸残基の数は、例えば、1個～4個であってもよく、1個～3個であってもよく、1個又は2個であってもよく、1個であってもよい。

【0027】

任意のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換する場合、置換前後でアミノ酸側鎖の性質が保存されていることが望ましい。アミノ酸側鎖の性質によってアミノ酸を分類する場合、例えば、親水性アミノ酸(D、E、K、R、H、S、T、N、Q)；疎水性アミノ酸(A、G、V、I、L、F、Y、W、M、C、P)；酸性アミノ酸(D、E)；塩基性アミノ酸(K、R、H)；脂肪族側鎖を有するアミノ酸(A、G、V、I、L)；芳香族基含有側鎖を有するアミノ酸(F、Y、W)；硫黄含有側鎖を有するアミノ酸(M、C)；等に分類することができる(括弧内のアルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す)。

30

【0028】

アミノ酸残基が置換、欠失、及び/又は付加される位置は、NF B阻害作用が維持される限り特に限定されない。

例えば、配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチドの場合、C末端側に酸性アミノ酸残基が13個連続した領域が存在するため、この領域の1個又は数個のアミノ酸残基を他の酸性アミノ酸残基に置換してもよく、この領域の1個又は数個のアミノ酸残基を欠失させてもよく、この領域に1個又は数個の酸性アミノ酸残基を付加してもよい。

40

また、配列番号2のアミノ酸配列からなるペプチドの場合、N末端側から7番目～11番目に酸性アミノ酸残基が5個連続した領域が存在するため、この領域の1個又は数個のアミノ酸残基を他の酸性アミノ酸残基に置換してもよく、この領域の1個又は数個のアミノ酸残基を欠失させてもよく、この領域に1個又は数個の酸性アミノ酸残基を付加してもよい。

また、配列番号3又は4のアミノ酸配列からなるペプチドの場合、1個のグリシン残基を除いて酸性アミノ酸残基で構成されるため、1個又は2個の酸性アミノ酸残基を他の酸性アミノ酸残基に置換してもよく、1個又は2個の酸性アミノ酸残基を付加してもよい。

また、配列番号5のアミノ酸配列からなるペプチドの場合、酸性アミノ酸残基で構成さ

50

れるため、1個又は2個の酸性アミノ酸残基を他の酸性アミノ酸残基に置換してもよく、1個又は2個の酸性アミノ酸残基を付加してもよい。

【0029】

上記(b)のペプチドの具体例としては、以下のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる(アミノ酸残基は一文字表記で示す)。

G E D D D E G D E E D E E E E E D D D E (配列番号6)

E T A E D G E D D D G (配列番号7)

E T A E D G E D D D D G (配列番号8)

E T A E D G D E D D E G (配列番号9)

E D G D E D (配列番号10)

G E D D D D (配列番号11)

G D E D D E (配列番号12)

D E E D E D (配列番号13)

10

【0030】

配列番号6のペプチドは、配列番号1のN末端側から17番目及び18番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に置換したものである。

配列番号7のペプチドは、配列番号2のN末端側から11番目のグルタミン酸残基を欠失させたものである。

配列番号8のペプチドは、配列番号2のN末端側から11番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に置換したものである。

20

配列番号9のペプチドは、配列番号2のN末端側から7番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に置換するとともに、N末端側から8番目のアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に置換したものである。

配列番号10のペプチドは、配列番号3のN末端側から4番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に置換するとともに、N末端側から5番目のアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に置換したものである。

配列番号11のペプチドは、配列番号4のC末端のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に置換したものである。

配列番号12のペプチドは、配列番号4のN末端側から2番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に置換するとともに、N末端側から3番目のアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に置換したものである。

30

配列番号13のペプチドは、配列番号5のC末端のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に置換したものである。

なお、上記(b)のペプチドがこれらの例に限定されるものでないことは勿論である。

【0031】

上記(c)のペプチドは、配列番号1~5のいずれか1つのアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、NF B阻害作用を有するペプチドである。

配列番号1~5のいずれか1つのアミノ酸配列との相同性は、NF B阻害作用が維持される限り特に限定されないが、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上がさらに好ましく、98%以上が特に好ましい。

40

上記(c)のペプチドの具体例としては、配列番号6~13のいずれか1つのアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。なお、上記(c)のペプチドがこれらの例に限定されるものでないことは勿論である。

【0032】

上記(d)のペプチドは、上記(a)~(c)から選ばれるいずれか1種のペプチドに膜透過ペプチドが融合されたペプチドである。膜透過ペプチドが融合されることにより、細胞内への導入が促進されて、NF Bの転写促進活性を効果的に阻害することができる。

【0033】

50

膜透過ペプチドとしては、細胞膜透過性を付与することができるペプチドであれば特に制限されない。膜透過ペプチドの具体例としては、オリゴアルギニン（ $R_n$ ； $n$ はアルギニン残基の数であり6～12）、HIV-TAT（配列番号14）、HSV/VP22（配列番号15）、ANTENNAPEPIA（配列番号16）等が挙げられる。この中でも、オリゴアルギニン（ $R_n$ ； $n$ はアルギニン残基の数であり6～12）が好ましい。なお、オリゴアルギニンは核移行シグナルとしても機能する。

#### 【0034】

膜透過ペプチドの融合位置は、NF- $\kappa$ B阻害作用が維持される限り特に限定されない。例えば、上記(a)～(c)から選ばれるいずれか1種のペプチドのN末端側又はC末端側に膜透過ペプチドが融合されていてもよい。また、上記(a)～(c)から選ばれるいずれか1種のペプチドの途中に膜透過ペプチドが融合され、上記(a)～(c)から選ばれるいずれか1種のペプチドが膜透過ペプチドによって分断されていてもよい。NF- $\kappa$ B阻害作用を維持する観点から、膜透過ペプチドの融合位置は、上記(a)～(c)から選ばれるいずれか1種のペプチドのC末端側であることが好ましい。

10

#### 【0035】

上記(a)～(c)から選ばれるいずれか1種のペプチドのN末端側又はC末端側に膜透過ペプチドが融合される場合、膜透過ペプチドは、上記(a)～(c)から選ばれるいずれか1種のペプチドに直接融合されたものであってもよく、リンカーを介して融合されたものであってもよい。リンカーとしては、例えば1個～10個のアミノ酸残基からなるものが挙げられる。

20

#### 【0036】

なお、本開示のペプチドが膜透過ペプチドを含まない場合であっても、リボソーム等の公知の細胞導入手段を用いて、本開示のペプチドを細胞内に導入することが可能である。

#### 【0037】

上記(e)のペプチドは、上記(a)～(d)から選ばれるいずれか1種のペプチドのN末端にMet残基、MetAla残基、又はAla残基が付加されたペプチドである。

本開示のペプチドを遺伝子工学的な手法で作製する場合、ポリヌクレオチドの5'末端に開始コドンが付加されることにより、Met残基がN末端に付加した状態のペプチドが得られることがある。また、後述する実施例に示すように、Met残基に対応する開始コドン(ATG)を発現ベクターの制限酵素サイトの開始部位(NcoI、CCATGG)に合わせるため、MetAla残基に対応するヌクレオチド配列(ATGGCG)がポリヌクレオチドの5'末端に付加されることにより、MetAla残基がN末端に付加した状態のペプチドが得られることもある。後者の場合、Met残基が翻訳後切断される結果、Ala残基がN末端に付加した状態のペプチドが得られることもある。本開示のペプチドは、このようにN末端にMet残基、MetAla残基、又はAla残基が付加されたペプチドであってもよい。

30

#### 【0038】

本開示のペプチドを構成するアミノ酸残基は、NF- $\kappa$ B阻害作用が維持される限り、L体及びD体のいずれであってもよい。生体内でのペプチドの分解を抑制する観点からは、本開示のペプチドを構成するアミノ酸残基の少なくとも一部をD体とすることが好ましい。

40

#### 【0039】

また、本開示のペプチドを構成するアミノ酸残基は、用途に応じて種々の修飾が施されていてもよい。このようなアミノ酸修飾としては、アミノ基修飾（ビオチン化、ミリスチル化、パルミトイル化、アセチル化、マレイミド化等）；カルボキシ基修飾（アミド化、エステル化等）；チオール基修飾（ファルネシル化、ゲラニル化、メチル化、パルミトイル化等）；水酸基修飾（リン酸化、硫酸化、オクタノイル化、パルミトイル化等）；各種蛍光標識；PEG化（ポリエチレングリコール化）；等が挙げられる。

#### 【0040】

本開示のペプチドは、ステロイド薬と同様にNF- $\kappa$ Bの転写促進活性を直接阻害するこ

50



とができる一方、ステロイド薬のようなホルモン作用を有しないため、副作用の懸念が少ない。また、既報のMTI-IIIやその酸性アミノ酸領域のペプチドと比較してペプチド長が非常に短いため、抗原性が低く、かつ、多量生産にも適している。

【0041】

<ポリヌクレオチド>

本開示のポリヌクレオチドは、本開示のペプチドをコードするものである。該ポリヌクレオチドは、DNA、RNA、DNA/RNAキメラのいずれであってもよい。また、該ポリヌクレオチドは、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。二本鎖の場合、二本鎖DNA、二本鎖RNA、DNA及びRNAのハイブリッドのいずれであってもよい。

【0042】

本開示のポリヌクレオチドは、公知の配列情報に基づき、公知の遺伝子組換え技術を利用することにより容易に製造することができる。例えば、配列情報に基づき適当なプライマーを設計し、本開示のペプチドをコードするDNAをPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）によって増幅し、DNAフラグメントをリガーゼ等の適切な酵素を用いて連結することにより、本開示のポリヌクレオチドを製造することができる。また、配列情報に基づいて、ポリヌクレオチド合成装置により本開示のポリヌクレオチドを合成してもよい。

取得された本開示のポリヌクレオチドは、必要に応じて制限酵素で消化するかリンカーを付加した後に使用してもよく、そのまま使用してもよい。

【0043】

<ベクター>

本開示のベクターは、本開示のポリヌクレオチドを含むものである。このベクターは、本開示のポリヌクレオチドをベクター中のプロモーターの下流に機能的に連結することにより作製することができる。

【0044】

ベクターの種類としては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等があり、用いる宿主に応じて適宜選択することができる。プラスミドベクターとしては、大腸菌由来のプラスミドベクター、枯草菌由来のプラスミドベクター、酵母由来のプラスミドベクター等が挙げられる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40ベクター等が挙げられる。

【0045】

プロモーターとしては、trpプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーター、CMVプロモーター、SRプロモーター等があり、用いる宿主に応じて適宜選択することができる。

【0046】

本開示のベクターは、必要に応じて、エンハンサー、スプライシングシグナル、選択マーカ等を含んでいてもよい。選択マーカとしては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0047】

<形質転換体>

本開示の形質転換体は、本開示のベクターが導入されたものである。

ベクターが導入される宿主としては、細菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞等がある。細菌としては、エシェリヒア属菌(Escherichia coli等)、バチルス属菌(Bacillus subtilis等)等が挙げられる。哺乳動物細胞としては、HeLa細胞、COS-7細胞、CHO細胞、CV-1細胞等が挙げられる。

宿主にベクターを導入する方法としては、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション法、DEAEデキストラン法、遺伝子銃法等が挙げられる。

【0048】

10

20

30

40

50

なお、本開示のベクターとして発現ベクターを用い、この発現ベクターを適切な宿主に導入した場合、得られる形質転換体は本開示のペプチドを発現し得る。したがって、形質転換体を宿主の種類に応じた方法で培養し、培養物から本開示のペプチドを単離することにより、本開示のペプチドを製造することができる。本開示のペプチドを単離又は精製するには、例えば、菌体溶解液や培養上清を、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等に供すればよい。

【0049】

<NF B阻害剤>

本開示のNF B阻害剤は、本開示のペプチドを有効成分として含むものである。上記のとおり本開示のペプチドはNF B阻害作用を有するため、本開示のペプチドを用いることにより、NF B阻害剤を製造することができる。

10

【0050】

本開示のNF B阻害剤は、使用態様に応じて本開示のペプチド以外の成分を含んでもよい。本開示のペプチド以外の成分としては、薬剤の調製に一般に用いられる媒質及び製剤用添加物を挙げることができる。媒質及び製剤用添加物の種類は特に制限されない。媒質としては、固体媒質（例えば、ゼラチン、乳糖）及び液体媒質（例えば、アルコール、水、生理食塩水）が挙げられる。製剤用添加物としては、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、界面活性剤、緩衝剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、懸濁化剤、乳化剤、増粘剤、湿潤剤、防腐剤等が挙げられる。

【0051】

本開示のNF B阻害剤の形態は特に制限されず、固体組成物及び液体組成物のいずれであってもよい。

20

【0052】

<NF B亢進性疾患の治療剤>

本開示のNF B亢進性疾患の治療剤（以下、単に「治療剤」ともいう。）は、本開示のペプチドを有効成分として含むものである。上記のとおり本開示のペプチドはNF B阻害作用を有するため、本開示のペプチドを用いることにより、NF B亢進性疾患の治療剤（医薬組成物）を製造することができる。

【0053】

NF B亢進性疾患は、NF B阻害作用が有効な疾患であれば特に制限されない。具体的には、関節リウマチ、膠原病、全身性エリテマトーデス、アトピー性皮膚炎、乾癬、乾燥性角結膜炎（ドライアイ）、花粉症、気管支喘息、肺炎、肝炎、腎炎、炎症性腸疾患、痛風、悪性腫瘍（がん）等が挙げられる。本開示の治療剤は、例えば炎症性疾患の治療に好適に用いられる。

30

なお、「治療」には、NF B亢進性疾患に起因する症状を消失又は軽減させることのほか、症状の進行の度合いを抑制することも含まれる。

【0054】

本開示の治療剤は、使用態様に応じて本開示のペプチド以外の成分を含んでもよい。本開示のペプチド以外の成分としては、薬剤の調製に一般に用いられる媒質及び製剤用添加物を挙げることができる。媒質及び製剤用添加物の種類は特に制限されない。媒質としては、固体媒質（例えば、ゼラチン、乳糖）及び液体媒質（例えば、アルコール、水、生理食塩水）が挙げられる。製剤用添加物としては、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、界面活性剤、緩衝剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、懸濁化剤、乳化剤、増粘剤、湿潤剤、防腐剤等が挙げられる。

40

【0055】

本開示の治療剤の剤形は特に制限されず、注射剤、点眼剤、点鼻剤、外用剤等の非経口投与に適した剤形；錠剤、カプセル剤、液剤等の経口投与に適した剤形；等のいずれであってもよい。

【0056】

本開示の治療剤をNF B亢進性疾患の患者に投与することにより、NF B亢進性疾

50

患の治療方法が提供される。すなわち、本開示のペプチドを有効成分として含む医薬組成物を投与することを含む N F B 亢進性疾患の治療方法が提供される。

【実施例】

【0057】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0058】

<実施例1>

配列番号17~29のアミノ酸配列からなる13種類のペプチドをコードするDNAを合成し、このDNAをpTriEx-4ベクター(Novagen社製、カタログ番号:70824-3)のNcoI-EcoRI部位に組み込むことによって、各ペプチドを発現するペプチド発現ベクターを構築した。

実施例1における13種類のペプチドと、MTI-IIの酸性アミノ酸領域(MTI-IIの36番目から75番目までのアミノ酸配列;AR(36-75))との位置関係を表1に示す。

【0059】

【表1】

名称	配列	配列番号
AR(36-75)	EVVEEEENGAEIIIIIIETAEDGEDDDEGDEEIIIIIIIEDE	-
30A3665	MA-EVVEEEENGAEIIIIIIETAEDGEDDDEGDEE-RRRRRR	17
30A4170	MA-EENGAEIIIIIIETAEDGEDDDEGDEEIIIIIE-RRRRRR	18
30A4675	MA-EEEEETAEDGEDDDEGDEEIIIIIIIEDE-RRRRRR	19
21A3656	MA-EVVEEEENGAEIIIIIIETAEDG-RRRRRR	20
20A4160	MA-EENGAEIIIIIIETAEDGEDDD-RRRRRR	21
20A4665	MA-EEEEETAEDGEDDDEGDEE-RRRRRR	22
20A5170	MA-ETAEDGEDDDEGDEEIIIIIE-RRRRRR	23
20A5675	MA-GEDDDEGDEEIIIIIIIEDE-RRRRRR	24
13A3951	MA-EEEENGAEIIIIIE-RRRRRR	25
11A4353	MA-NGAEIIIIIIETA-RRRRRR	26
12A5162	MA-ETAEDGEDDDEG-RRRRRR	27
11A5666	MA-GEDDDEGDEED-RRRRRR	28
13A6375	MA-DEEIIIIIIIEDE-RRRRRR	29

【0060】

表1に示す13種類のペプチドはいずれも、MTI-IIの断片であるペプチドのN末端にMetAla残基を付加し、C末端に膜透過ペプチドであるオリゴアルギニン(RRRRRR)を付加したものである。ペプチドの名称中、「A」の前の2桁の数字は、MTI-IIの断片であるアミノ酸残基の残基数を示す。また、「A」の後の4桁の数字は、MTI-IIの断片のN末端側の位置(前半2桁)及びC末端側の位置(後半2桁)を示す。例えば、「30A3665」は、MTI-IIの36番目から65番目までの30アミノ酸残基からなるペプチドのN末端にMetAla残基を付加し、C末端にオリゴアルギニン(RRRRRR)を付加したペプチドを示す。

【0061】

ポジティブコントロール用プラスミド(pTri-MTI)は、pTriEx-4ベクターのNcoI-EcoRI部位にMTI-II(Gene Bank Accession No. M24398)のcDNAを組み込むことによって構築した。

ネガティブコントロール用プラスミド(pTri-NC)は、pTriEx-4ベクターをXcmI、EcoRIで切断し、切断断片を除去した後にセルフライゲーションを行うことによって構築した。

【0062】

なお、NFB依存性ホタルルシフェラーゼレポーターベクターとしては、pGL4.32(プロメガ社製、カタログ番号:E8491)を準備した。

## 【 0 0 6 3 】

## &lt; 実施例 2 &gt;

本開示のペプチドの NF- $\kappa$ B 阻害作用を確認するため、以下のようなルシフェラーゼアッセイを行った。

## 【 0 0 6 4 】

まず、HeLa細胞（DS Pharma Biomedical社製、カタログ番号：03-117）を、48ウェルマイクロプレート（IWAKI社製、カタログ番号：3830-048）に1ウェル当たり $0.12 \times 10^5$ 細胞となるように播種し、10%ウシ胎児血清（ハイクローン社製、カタログ番号：SH30070.03）及びペニシリン-ストレプトマイシン（Sigma社製、カタログ番号：P0781）を添加したDMEM培地（Sigma社製、カタログ番号：D6047）中で5%CO<sub>2</sub>及び37°Cの条件下で培養した。18時間後に、培地中の種々のホルモンを除く目的で、チャコール・デキストラン処理した10%ウシ胎児血清（ハイクローン社製、カタログ番号：SH30068.03）入りのDMEM培地に換えた。

## 【 0 0 6 5 】

次いで、NF- $\kappa$ B依存性ホタルルシフェラーゼレポーターベクター（1ウェル当たり60ng）と、各ペプチド発現ベクター、pTri-MTI、及びpTri-NCから選ばれる1種（1ウェル当たり120ng）とを混合した後、トランスフェクション試薬（プロメガ社製FuGENE HD、カタログ番号：E2311）（FuGENEは登録商標）を加え、DNA/トランスフェクション試薬混合液を調製した。このDNA/トランスフェクション試薬混合液を培地交換24時間後の細胞に添加してインキュベートすることにより、各DNAをHeLa細胞にトランスフェクトした。

## 【 0 0 6 6 】

次いで、DNA/トランスフェクション試薬混合液の添加48時間後の細胞に、終濃度1ng/mLとなるようにTNF- $\alpha$ （Sigma社製、カタログ番号：T0157）を添加した。TNF- $\alpha$ の添加4時間後に、1ウェル当たり50 $\mu$ Lの細胞溶解剤（プロメガ社製、カタログ番号：E1941）を添加して細胞をウェル中で溶解した後、細胞溶解液を回収した。そして、細胞溶解液中のNF- $\kappa$ B依存性ホタルルシフェラーゼ発現量（発光量）を、デュアル・ルシフェラーゼ定量試薬（プロメガ社製、カタログ番号：E1980）を用い、ルミノメーター（プロメガ社製TD-20/20、カタログ番号：E2351）で測定した。結果を図1～3に示す。図1～3の縦軸はNF- $\kappa$ Bの転写促進活性に依存したルシフェラーゼ発現量（発光量）を示す。

## 【 0 0 6 7 】

図1～3に示されるとおり、20A5675又は12A5162を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトした場合には、TNF- $\alpha$ を添加したときのルシフェラーゼ発現量（発光量）が顕著に抑制されていた。すなわち、TNF- $\alpha$ 誘導性のNF- $\kappa$ B転写促進活性が顕著に阻害されていた。これに対して、他のペプチドを発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトした場合には、NF- $\kappa$ B転写促進活性の阻害効果は確認できなかった。

## 【 0 0 6 8 】

## &lt; 実施例 3 &gt;

本開示のペプチドのNF- $\kappa$ B阻害作用をルシフェラーゼアッセイ以外の方法で確認するため、NF- $\kappa$ Bにより誘導されるCOX2と誘導されないGAPDHとについて、TNF- $\alpha$ 添加後の発現量の変化をウエスタンブロット法により解析した。

## 【 0 0 6 9 】

まず、HeLa細胞（DS Pharma Biomedical社製、カタログ番号：03-117）を、48ウェルマイクロプレート（IWAKI社製、カタログ番号：3830-048）に1ウェル当たり $0.12 \times 10^5$ 細胞となるように播種し、10%ウシ胎児血清（ハイクローン社製、カタログ番号：SH30070.03）及びペニシリン-ストレプトマイシン（Sigma社製、カタログ番号：P0781）を添加したDMEM培地（Sigma社製、カタログ番号：D6047）中で5%CO<sub>2</sub>及び37°Cの条件下で培養した。18時間後に、培地中の種々のホルモンを除く目的で、チャ

コール・デキストラン処理した10%ウシ胎児血清（ハイクローン社製、カタログ番号：SH30068.03）入りのDMEM培地に換えた。

【0070】

次いで、20A5675を発現するペプチド発現ベクター、12A5162を発現するペプチド発現ベクター、及びpTri-NCから選ばれる1種（1ウェル当たり120ng）をトランスフェクション試薬（プロメガ社製FuGENE HD、カタログ番号：E2311）（FuGENEは登録商標）と混合し、DNA/トランスフェクション試薬混合液を調製した。このDNA/トランスフェクション試薬混合液を培地交換24時間後の細胞に添加してインキュベートすることにより、各DNAをHeLa細胞にトランスフェクトした。

【0071】

次いで、DNA/トランスフェクション試薬混合液の添加48時間後の細胞に、終濃度1ng/mLとなるようにTNF（Sigma社製、カタログ番号：T0157）を添加した。TNFの添加0~10時間後に、1ウェル当たり50μLの細胞溶解剤（プロメガ社製、カタログ番号：E1941）を添加して細胞をウェル中で溶解した後、細胞溶解液を回収した。そして、細胞溶解液50μLに10μLの6×SDSバッファを添加後、100で10分間の加熱を行い、SDS処理サンプルを得た。このSDS処理サンプルを12.5%アクリルアミドゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルからタンパク質をPVDF膜に転写した。タンパク質を転写したPVDF膜上のCOX2及びGAPDHを、抗COX2抗体（アブカム社製、COX2 rabbit polyclonal antibody (ab52237)）、抗GAPDH抗体（アブカム社製、GAPDH rabbit polyclonal antibody (ab9485)）及びHRP（ワサビペルオキシダーゼ）標識抗ウサギIgG抗体（ミリポア社製、12-348）で検出した。検出には、GEヘルスケア社製のECL-plus化学発光試薬を用いた。

【0072】

20A5675を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトしたときの、TNF添加後のCOX2量及びGAPDH量の変化を図4に示す。また、12A5162を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトしたときの、TNF添加後のCOX2量及びGAPDH量の変化を図5に示す。図4、5の横軸はTNF添加後の経過時間を示し、縦軸はTNF添加0時間後のCOX2又はGAPDHの量を100としたときの相対量を示す。

図4、5に示されるとおり、20A5675又は12A5162を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトした場合には、NF-κBによるCOX2の誘導が阻害されたが、GAPDH量には影響を与えなかった。このことから、20A5675及び12A5162はNF-κBの転写促進活性を阻害することが分かる。

【0073】

<実施例4>

配列番号30~33のアミノ酸配列からなる4種類のペプチドをコードするDNAを合成し、このDNAをpTriEx-4ベクター（Novagen社製、カタログ番号：70824-3）のNcoI-EcoRI部位に組み込むことによって、各ペプチドを発現するペプチド発現ベクターを構築した。

実施例4における4種類のペプチドと、MTI-IIの酸性アミノ酸領域（MTI-IIの36番目から75番目までのアミノ酸配列；AR(36-75)）との位置関係を表2に示す。

【0074】

【表2】

名称	配列	配列番号
AR(36-75)	EVVEEEENGAEIIIEEETAEDGEDDDEGDEEDEEEEEEEDE	-
20AEEDD	MA-GEDDDEGDEEDEEEEEEDDDE-RRRRRR	30
12AdeIE	MA-ETAEDGEDDD-G-RRRRRR	31
12AED	MA-ETAEDGEDDDDG-RRRRRR	32
12AEDDE	MA-ETAEDGDEDEDEG-RRRRRR	33

10

20

30

40

50

【 0 0 7 5 】

2 0 A E E D D は、2 0 A 5 6 7 5 の N 末 端 側 か ら 1 9 番 目 及 び 2 0 番 目 の グ ル タ ミ ン 酸 残 基 を ア ス パ ラ ギ ン 酸 残 基 に 置 換 し た も の で あ る。

1 2 A d e l E は、1 2 A 5 1 6 2 の N 末 端 側 か ら 1 3 番 目 の グ ル タ ミ ン 酸 残 基 を 欠 失 さ せ た も の で あ る。

1 2 A E D は、1 2 A 5 1 6 2 の N 末 端 側 か ら 1 3 番 目 の グ ル タ ミ ン 酸 残 基 を ア ス パ ラ ギ ン 酸 残 基 に 置 換 し た も の で あ る。

1 2 A E D D E は、1 2 A 5 1 6 2 の N 末 端 側 か ら 9 番 目 の グ ル タ ミ ン 酸 残 基 を ア ス パ ラ ギ ン 酸 残 基 に 置 換 す る と と も に、N 末 端 側 か ら 1 0 番 目 の ア ス パ ラ ギ ン 酸 残 基 を グ ル タ ミ ン 酸 残 基 に 置 換 し た も の で あ る。

10

【 0 0 7 6 】

ポ ジ テ ィ ブ コ ン ト ロ ー ル と し て は、2 0 A 5 6 7 5 又 は 1 2 A 5 1 6 2 を 発 現 す る ペ プ チ ド 発 現 ベ ク タ ー を 準 備 し た。

ネ ガ テ ィ ブ コ ン ト ロ ー ル と し て は p T r i - N C を 準 備 し、N F B 依 存 性 ホ タ ル ル シ フ ェ ラ ー ゼ ポ ー タ ー ベ ク タ ー と し て は p G L 4 . 3 2 ( プ ロ メ ガ 社 製、カ タ ロ グ 番 号 : E 8 4 9 1 ) を 準 備 し た。

【 0 0 7 7 】

< 実 施 例 5 >

実 施 例 4 で 構 築 し た ペ プ チ ド 発 現 ベ ク タ ー を 用 い、ポ ジ テ ィ ブ コ ン ト ロ ー ル と し て 2 0 A 5 6 7 5 又 は 1 2 A 5 1 6 2 を 発 現 す る ペ プ チ ド 発 現 ベ ク タ ー を 用 い た 以 外 は、実 施 例 2 と 同 様 に し て ル シ フ ェ ラ ー ゼ ア ッ セ イ を 行 っ た。結 果 を 図 6 に 示 す。図 6 の 縦 軸 は N F B の 転 写 促 進 活 性 に 依 存 し た ル シ フ ェ ラ ー ゼ 発 現 量 ( 発 光 量 ) を 示 す。

20

【 0 0 7 8 】

図 6 に 示 さ れ る と お り、2 0 A E E D D を 発 現 す る ペ プ チ ド 発 現 ベ ク タ ー を H e L a 細 胞 に ト ラ ン ス フ ェ ク ト し た 場 合 に は、T N F を 添 加 し た と き の ル シ フ ェ ラ ー ゼ 発 現 量 ( 発 光 量 ) が 顕 著 に 抑 制 さ れ て い た。す な わ ち、T N F 誘 導 性 の N F B 転 写 促 進 活 性 が 顕 著 に 阻 害 さ れ て い た。ま た、1 2 A d e l E、1 2 A E D、又 は 1 2 A E D D E を 発 現 す る ペ プ チ ド 発 現 ベ ク タ ー を H e L a 細 胞 に ト ラ ン ス フ ェ ク ト し た 場 合 に は、T N F を 添 加 し た と き の ル シ フ ェ ラ ー ゼ 発 現 量 ( 発 光 量 ) が 有 意 に 抑 制 さ れ て い た。す な わ ち、T N F 誘 導 性 の N F B 転 写 促 進 活 性 が 有 意 に 阻 害 さ れ て い た。

30

【 0 0 7 9 】

< 実 施 例 6 >

配 列 番 号 3 4 ~ 3 8 の ア ミ ノ 酸 配 列 か ら な る 5 種 類 の ペ プ チ ド を コ ー ド す る D N A を 合 成 し、こ の D N A を p T r i E x - 4 ベ ク タ ー ( N o v a g e n 社 製、カ タ ロ グ 番 号 : 7 0 8 2 4 - 3 ) の N c o I - E c o R I 部 位 に 組 み 込 む こ と に よ っ て、各 ペ プ チ ド を 発 現 す る ペ プ チ ド 発 現 ベ ク タ ー を 構 築 し た。

実 施 例 6 に お け る 5 種 類 の ペ プ チ ド と、M T I - I I の 酸 性 ア ミ ノ 酸 領 域 ( M T I - I I の 3 6 番 目 か ら 7 5 番 目 ま で の ア ミ ノ 酸 配 列 ; A R ( 3 6 - 7 5 ) ) と の 位 置 関 係 を 表 3 に 示 す。

【 0 0 8 0 】

40

【 表 3 】

名称	配列	配列番号
AR(36-75)	EVVEEEENGAEIIIEEETAEDGEDDDEGDEEDEEEEEEEDE	-
6A5156	MA-ETAEDG-RRRRRR	34
6A5459	MA-EDGEDD-RRRRRR	35
6A5661	MA-GEDDDE-RRRRRR	36
6A5762	MA-EDDDEG-RRRRRR	37
6A6368	MA-DEEDED-RRRRRR	38

【 0 0 8 1 】

表 3 に 示 す 5 種 類 の ペ プ チ ド は い ず れ も、M T I - I I の 断 片 で あ る ペ プ チ ド の N 末 端

50

に Met Ala 残基を付加し、C末端に膜透過ペプチドであるオリゴアルギニン (RRR RRR) を付加したものである。

【0082】

ポジティブコントロールとしては pTri-MTI を準備し、ネガティブコントロールとしては pTri-NC を準備した。また、NF B 依存性ホタルルシフェラーゼレポーターベクターとしては pGL4.32 (プロメガ社製、カタログ番号：E8491) を準備した。

【0083】

<実施例7>

実施例6で構築したペプチド発現ベクターを用いた以外は、実施例2と同様にしてルシフェラーゼアッセイを行った。結果を図7に示す。図7の縦軸はNF Bの転写促進活性に依存したルシフェラーゼ発現量(発光量)を示す。

【0084】

図7に示されるとおり、6A5661を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトした場合には、TNF を添加したときのルシフェラーゼ発現量(発光量)が顕著に抑制されていた。すなわち、TNF 誘導性のNF B転写促進活性が顕著に阻害されていた。また、6A5459又は6A6368を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトした場合には、TNF を添加したときのルシフェラーゼ発現量(発光量)が有意に抑制されていた。すなわち、TNF 誘導性のNF B転写促進活性が有意に阻害されていた。これに対して、6A5156又は6A5762を発現するペプチド発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクトした場合には、NF B転写促進活性の阻害効果は確認できなかった。

【0085】

<実施例8>

化学合成した本開示のペプチドのNF B阻害作用を確認するため、表4に示す2種類のペプチドを化学合成した。

【0086】

【表4】

名称	配列	配列番号
12A5162-pep	ETAEDGEDDDEG-RRRRRRRR	39
6A5661-pep	GEDDDE-RRRRRRRR	40

【0087】

上記の2種類のペプチドを用いて、以下のようなルシフェラーゼアッセイを行った。

【0088】

まず、HeLa細胞(DS Pharma Biomedical社製、カタログ番号：03-117)を、48ウェルマイクロプレート(IWAKI社製、カタログ番号：3830-048)に1ウェル当たり $0.12 \times 10^5$ 細胞となるように播種し、10%ウシ胎児血清(ハイクローン社製、カタログ番号：SH30070.03)及びペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma社製、カタログ番号：P0781)を添加したDMEM培地(Sigma社製、カタログ番号：D6047)中で5%CO<sub>2</sub>及び37°Cの条件下で培養した。18時間後に、培地中の種々のホルモンを除く目的で、チャコール・デキストラン処理した10%ウシ胎児血清(ハイクローン社製、カタログ番号：SH30068.03)入りのDMEM培地に換えた。

【0089】

次いで、NF B依存性ホタルルシフェラーゼレポーターベクター(1ウェル当たり60ng)とトランスフェクション試薬(プロメガ社製FuGENE HD、カタログ番号：E2311)(FuGENEは登録商標)とを混合し、DNA/トランスフェクション試薬混合液を調製した。このDNA/トランスフェクション試薬混合液を培地交換24時間後の細胞に添加してインキュベートすることにより、ルシフェラーゼレポーター遺伝子をHeLa細胞にトランスフェクトした。

【0090】

10

20

30

40

50

次いで、DNA / トランスフェクション試薬混合液の添加10時間後に、12A5162-pep (終濃度1.5 mg/mL又は3.0 mg/mL)又は6A5661-pep (終濃度1.5 mg/mL又は3.0 mg/mL)と、チャコール・デキストラン処理した10%ウシ胎児血清(ハイクロン社製、カタログ番号:SH30068.03)とを添加したDMEEM培地に換えた。ネガティブコントロール(NC)としては、ペプチドの代わりにPBS(リン酸緩衝生理食塩水)を添加した。

【0091】

次いで、培地交換38時間後の細胞に、終濃度1 ng/mLとなるようにTNF (Sigma社製、カタログ番号:T0157)を添加した。TNFの添加4.5時間後に、1ウェル当たり50 µLの細胞溶解剤(プロメガ社製、カタログ番号:E1941)を添加して細胞をウェル中で溶解した後、細胞溶解液を回収した。そして、細胞溶解液中のNF B依存性ホタルルシフェラーゼ発現量(発光量)を、デュアル・ルシフェラーゼ定量試薬(プロメガ社製、カタログ番号:E1980)を用い、ルミノメーター(プロメガ社製TD-20/20、カタログ番号:E2351)で測定した。結果を図8に示す。図8の縦軸はNF Bの転写促進活性に依存したルシフェラーゼ発現量(発光量)を示す。

10

【0092】

図8に示されるとおり、12A5162-pep又は6A5661-pepの存在下でHeLa細胞を培養した場合には、TNFを添加したときのルシフェラーゼ発現量(発光量)が濃度依存的に抑制されていた。すなわち、TNF誘導性のNF B転写促進活性が濃度依存的に阻害されていた。

20

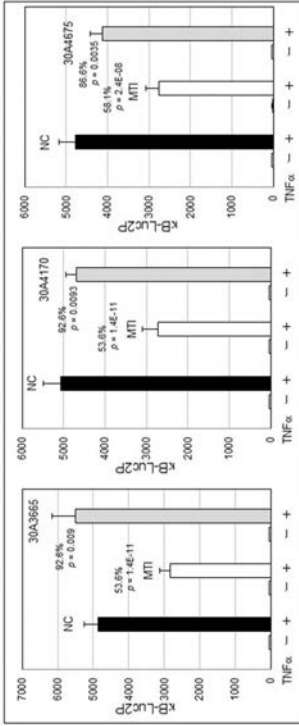
【0093】

2014年12月19日に出願された日本出願2014-257827の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

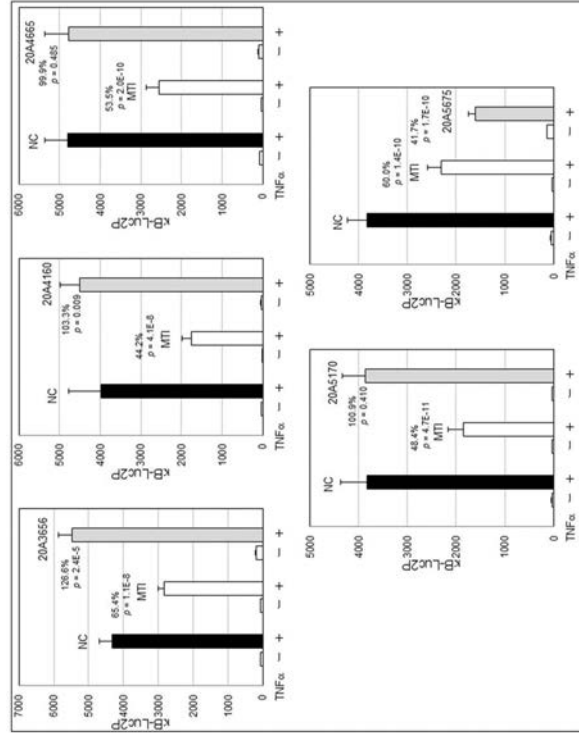
本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。



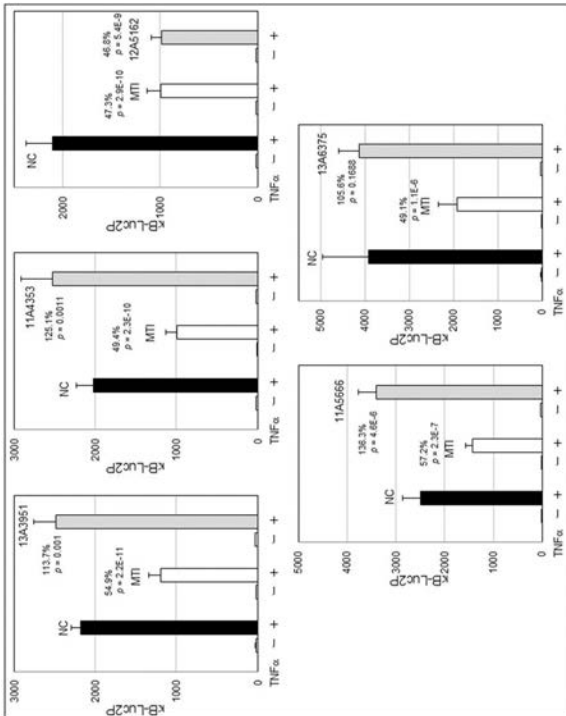
【 図 1 】



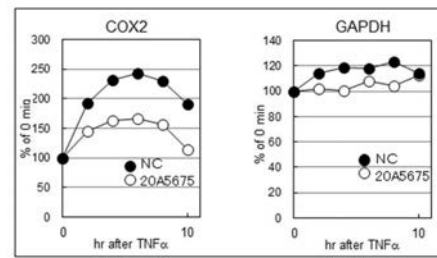
【 図 2 】



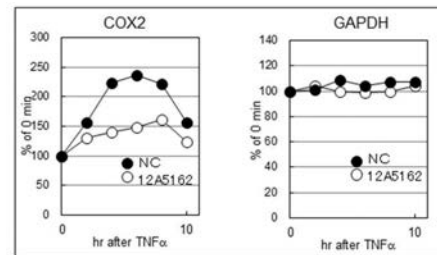
【 図 3 】



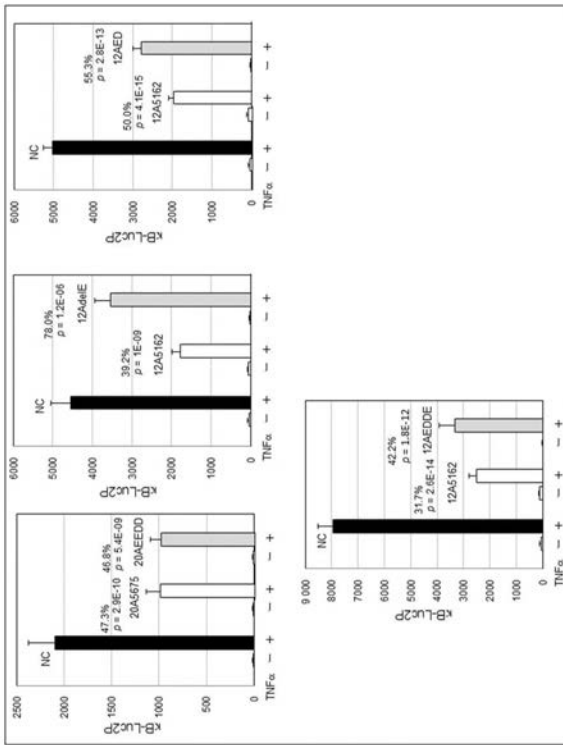
【 図 4 】



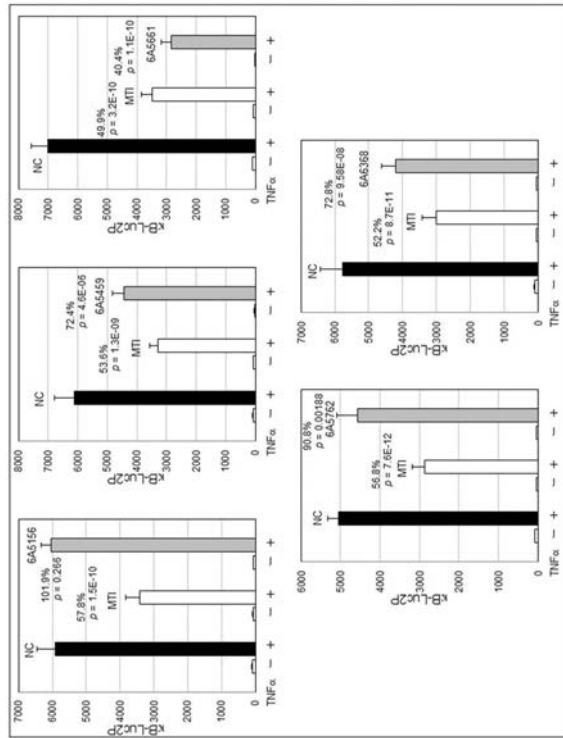
【 図 5 】



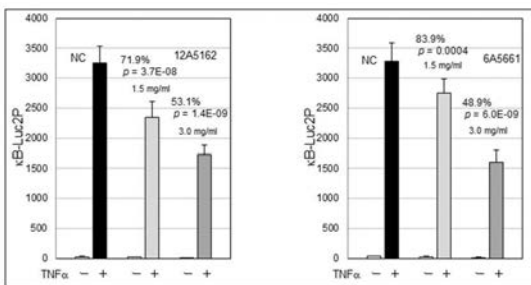
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【配列表】

2016098838000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/085286
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K38/00, A61K48/00, A61P29/00, C07K14/47, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY (STN), CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 4874798 B2 (St. Marianna University, School of Medicine), 15 February 2012 (15.02.2012), example 6 & US 2008/0287351 A1 & WO 2006/001453 A1 & EP 1769802 A1	1-10
A	Kazuki OKAMOTO et al., "NF-κB Sogaiyaku", Inflammation & Immunology, 2013, vol.21, no.3, pages 229 to 233	1-10
<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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 February 2016 (12.02.16)		Date of mailing of the international search report 23 February 2016 (23.02.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085286

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kazuki OKAMOTO et al., "(4T13a-04) Atarashii Type no Kakunai Receptor·Coactivator (MTI-II) o Riyo shita NF-κB Sogaiyaku no Kaihatsu", The Japanese Biochemical Society Dai 87 Kai Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Yoshishu, 01 October 2014 (01.10.2014), page 445, 3P-006	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 8 5 2 8 6													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))															
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i															
B. 調査を行った分野															
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))															
Int.Cl. C12N15/09, A61K38/00, A61K48/00, A61P29/00, C07K14/47, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの															
<table> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2016年														
日本国実用新案登録公報	1996-2016年														
日本国登録実用新案公報	1994-2016年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)															
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY (STN), Cplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
A	JP 4874798 B2 (学校法人 聖マリアンナ医科大学) 2012.02.15, 実施例6 & US 2008/0287351 A1 & WO 2006/001453 A1 & EP 1769802 A1	1-10													
A	岡本一起 他, NF-κB 阻害薬, 炎症と免疫, 2013, Vol. 21, No. 3, pp.229-233	1-10													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 12.02.2016		国際調査報告の発送日 23.02.2016													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高山 敏充	4B 4153												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/085286
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	岡本一起 他, (4T13a-04)新しいタイプの核内レセプター・コアクティベーター (MTI-II)を利用した NF- $\kappa$ B 阻害薬の開発, 日本生化学会 第87回日本生化学会大会要旨集, 2014. 10. 01, pp. 445, 3P-006	1-10

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K	38/08	(2006.01)	A 6 1 K	38/08		
A 6 1 K	38/10	(2006.01)	A 6 1 K	38/10		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		

(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, RO, 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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。