

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-201566

(P2004-201566A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 1/16		4 B O 6 4
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 7/06		4 C O 8 4
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 9/00		4 H O 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/04		
審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 16 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2002-374047 (P2002-374047)	(71) 出願人	598164175 谷原 正夫 奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿 舎A-206
(22) 出願日	平成14年12月25日 (2002.12.25)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
特許法第30条第1項適用申請有り	平成14年8月25日 社団法人日本生化学会発行の「生化学 第74巻 第8号」に発表	(74) 代理人	100086405 弁理士 河宮 治
		(72) 発明者	谷原 正夫 奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿 舎A-206
		(72) 発明者	尾形 信一 奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿 舎C-303
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシス抑制ペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】従来、知られているアポトーシス阻害剤に認められる短所を克服した新しいアポトーシスまたは炎症を阻害する物質を提供することを課題とする。

【解決手段】次のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドまたはその塩であって、アポトーシスまたは炎症の誘導を阻害する活性を有するもの：(a) 特定なアミノ酸配列 (b) 上記(a)のいずれかのアミノ酸配列において6個を越えない任意のアミノ酸残基が欠失、付加および/または置換しているアミノ酸配列を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次ぎのいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド（ただし、そのN末端のアミノ基はアシル化されていてもよく、C末端のカルボキシル基はアミド化またはエステル化されていてもよい。）またはその塩であって、アポトーシスまたは炎症の誘導を阻害する活性を有するもの：

（a）下記のいずれかのアミノ酸配列：

Tyr Arg His Ala Trp Ser Glu Asn Leu Ala Gln Cys Phe Asn（配列番号：1）；

Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys（配列番号：2）；

Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His（配列番号：3）；

10

（b）上記（a）のいずれかのアミノ酸配列において6個を越えない任意のアミノ酸残基が欠失、付加および/または置換しているアミノ酸配列。

【請求項 2】

（b）のアミノ酸配列において、欠失、付加および/または置換しているアミノ酸残基の数が3個を越えないものである、請求項1記載のペプチドまたはその塩。

【請求項 3】

（b）のアミノ酸配列において、置換が側鎖官能基の性質に基づいて相同性のあるアミノ酸間で行なわれている、請求項1または2記載のペプチドまたはその塩。

【請求項 4】

N末端のアミノ基のアシル化により、低級アルカノイル基または低級アルコキシカルボニル基が導入されている、請求項1～3のいずれかに記載のペプチドまたはその塩。

20

【請求項 5】

C末端のカルボキシル基のアミド化またはエステル化により、アミド基または低級アルキルエステル基が導入されている、請求項1～3のいずれかに記載のペプチドまたはその塩。

【請求項 6】

塩が酸塩、金属塩またはアミン塩である、請求項1～5のいずれかに記載のペプチドの塩。

【請求項 7】

酸塩が塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、シュウ酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、オレイン酸塩またはパルミチン酸塩である、請求項6に記載のペプチドの塩。

30

【請求項 8】

金属塩がアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩またはアルミニウム塩である、請求項6に記載のペプチドの塩。

【請求項 9】

アミン塩がトリエチルアミン塩、ベンジルアミン塩、ジエタノールアミン塩、t-ブチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩またはアルギニン塩である、請求項6に記載のペプチドの塩。

【請求項 10】

アポトーシスまたは炎症の誘導がTNFによるものである、請求項1～9のいずれかに記載のペプチドまたはその塩。

40

【請求項 11】

アポトーシスまたは炎症の誘導がTRAILによるものである、請求項1～9のいずれかに記載のペプチドまたはその塩。

【請求項 12】

アポトーシスまたは炎症の誘導がFasLによるものである、請求項1～9のいずれかに記載のペプチドまたはその塩。

【請求項 13】

自己免疫疾患、アレルギー、アトピー、動脈硬化症、心筋炎、心筋症、糸球体腎炎、再生不良性貧血、肝炎、AIDS、臓器移植後の拒絶反応、敗血症ショック、うっ血性心不全、脊

50

髓異形成症候群、神経変性疾患または癌の処置に有用な請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のペプチドまたはその塩。

【請求項 14】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載のペプチドまたはその塩を抗原として特異的に認識する抗体。

【請求項 15】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

用いられる抗体が請求項 14 または 15 に記載の抗体である、免疫検定方法。

【請求項 17】

検定方法が酵素免疫検定法、放射性免疫検定法または蛍光免疫検定法である、請求項 16 に記載の免疫検定方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載のペプチドをコードしている核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アポトーシスや炎症を阻害する活性を有する、新規なペプチドおよびその塩に関する。特に、本発明は、TNF、TRAIL、FasLなどによって誘導されるアポトーシスや炎症を阻害し、これが原因となる自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデス、橋本病、慢性関節リウマチ、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、強皮症、グッドパスチャー症候群、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、自然不妊、重症筋無力症、多発性硬化症、パセドー病、特発性血小板減少性紫斑病、インスリン依存性糖尿病など)、アレルギー、アトピー、動脈硬化症、心筋炎、心筋症、糸球体腎炎、再生不良性貧血、肝炎(例えば、劇症肝炎、慢性肝炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎など)、AIDS、臓器移植後の拒絶反応、敗血症ショック、うっ血性心不全、脊髄異形成症候群、神経変性疾患(例えば、脳虚血による神経障害、ハンチントン病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマーなど)および癌などの処置に有用なペプチドならびにその薬学的に許容される塩を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】

アポトーシスは生体の恒常性を保つために必要な自然死であり、その破綻は癌や自己免疫疾患などの重篤な疾患を招く(Annu. Rev. Immunol., 17, 221-253, 1999)。アポトーシスは放射線や薬剤などの外因によっても引き起されるが、内因性の誘導因子としてTNF、TRAIL、FasLなどが報告されている(Pharm Acta Helv, 74, 281-286, 2000; Exp Cell Res, 256, 58-66, 2000)。これらは、標的細胞上のそれぞれに特異的な受容体と結合し、アポトーシスを誘導する(TIBS, 24 February, 47-53, 1999)。

【0003】

一方、TNF、TRAIL、FasLなどの過剰産生は、リウマチ性関節炎(Rheumatoid arthritis)、多発性硬化症(Multiple sclerosis)、AIDS(Acquired immune deficiency syndrome)、癌、敗血症ショック(Septic shock)、うっ血性心不全(Congestive heart failure)、再生不良性貧血(Aplastic anemia)、脊髄異形成症候群(Myelodysplastic syndrome)、クローン病(Crohn's disease)等の疾患の原因となる(Microsc Res Tech, 50, 229-235, 2000)。

【0004】

FasLに特異的に反応するヒト型化免疫グロブリンが知られており、アポトーシスに代表されるFasLとFasとの生理的反応を抑制することが示されている(WO 98 / 10070)。

【0005】

Fas/FasL系の異常に起因する疾患の治療剤として有用な、抗Fas抗体を有効成分として含有する新規医薬組成物が知られている(特開2000-169393)。

【0006】

10

20

30

40

50

Caspase-8と結合しDeath effector domainを持たないタンパク質が、アポトーシス制御能を有することが知られている(特開2000-226400)。

【0007】

Fasの細胞内ドメインに結合するMORT-1、あるいはTRADDに結合して、FasLまたはTNFの効果をモジュレートするタンパク質、さらにはその活性を阻害するペプチドが知られている(特表平11-509422)。

【0008】

上皮細胞増殖因子(EGF)を有効成分とする、細胞障害性T細胞上のFasLと臓器細胞膜上のFasとの相互作用によって惹起されるアポトーシスの抑制剤または予防剤が知られている(特開平10-194988)。

【0009】

天然のTNF結合蛋白のTNF結合機能部分を探索して得られた合成ペプチドが知られており、マウスL-M細胞に対するTNFの細胞毒性を阻害することが示されている(特開平5-194594)。

【0010】

トリアゼピンまたはジアゼピンからなる7員環と2乃至4個の窒素原子を含む5員環との縮合環化合物であることを特徴とするアポトーシス抑制剤が知られている(特開平11-228576)。

【0011】

また、近年カスパーズの阻害作用などによりアポトーシスを阻害する薬剤が脳虚血による神経障害(Proc Natl Acad Sci USA, 95, 15769-15774, 1998)、ハンチントン病(Nature Medicine, 6, 797-801, 2000)、パーキンソン病(J Neurosci, 22, 1763-1771, 2002)、筋萎縮性側索硬化症(Nature, 417, 74-78, 2002)、アルツハイマー等の神経変性疾患の動物モデルにおいて有効な治療効果を示すことが報告されている。

【0012】

抗体に代表されるアポトーシス阻害剤は、特異性は高いが分子量が大きいタンパク質であるので、抗原性、投与方法、安定性などに問題がある。天然のTNF結合蛋白のTNF結合機能部分を探索して得られた合成ペプチドであるアポトーシス阻害剤は、天然のTNF結合蛋白との競合による有効性の低下、血液中の滞留時間が短い等の問題がある。また、低分子有機化合物のアポトーシス阻害剤は、アポトーシスの基本経路を阻害するので、選択性が低いことによる副作用が問題である。

【0013】

【特許文献1】

特開2002-138099号公報

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記した抗体、合成ペプチドおよび低分子有機化合物のような従来知られているアポトーシス阻害剤に認められる短所を克服した、新しいアポトーシスまたは炎症を阻害する物質を提供することを課題とする。すなわち、選択性が高く、有効性が良好で、しかも分子量がそれほど大きくないアポトーシスまたは炎症の阻害物質を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

上記の課題は、本発明により、「次ぎのいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド(ただし、そのN末端のアミノ基はアシル化されていてもよく、C末端のカルボキシル基はアミド化またはエステル化されていてもよい。)またはその塩であって、アポトーシスまたは炎症の誘導を阻害する活性を有するもの:

(a) 下記のいずれかのアミノ酸配列:

Tyr Arg His Ala Trp Ser Glu Asn Leu Ala Gln Cys Phe Asn (配列番号: 1);

Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys (配列番号: 2);

10

20

30

40

50

Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His (配列番号：3)；

(b)上記(a)のいずれかのアミノ酸配列において6個を越えない任意のアミノ酸残基が欠失、付加および/または置換しているアミノ酸配列」を提供することにより、解決される。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明においては各種アミノ酸残基を次の略号で記述する。

Ala : L - アラニン残基

Arg : L - アルギニン残基

Asn : L - アスパラギン残基

Asp : L - アスパラギン酸残基

Cys : L - システイン残基

Gln : L - グルタミン残基

Glu : L - グルタミン酸残基

Gly : グリシン残基

His : L - ヒスチジン残基

Ile : L - イソロイシン残基

Leu : L - ロイシン残基

Lys : L - リジン残基

Met : L - メチオニン残基

Phe : L - フェニルアラニン残基

Pro : L - プロリン残基

Ser : L - セリン残基

Thr : L - トレオニン残基

Trp : L - トリプトファン残基

Tyr : L - チロシン残基

Val : L - バリン残基

10

20

【0017】

また、本明細書においては、常法に従ってペプチドのアミノ酸配列を、そのN末端のアミノ酸残基が左側に位置し、C末端のアミノ酸残基が右側に位置するように記述する。

30

【0018】

本発明のペプチドの製造は、通常のペプチド合成方法により行われる。例えば固相合成法または液相合成法によって調製されるが、固相合成法が操作上簡便である〔例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学(下)」(昭和62年5月20日 株式会社東京化学同人発行)、第641-694頁参照〕。

【0019】

本発明のペプチドの固相合成法による調製は、例えば、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体のような反応溶媒に不溶性である重合体に、目的とするペプチドのC末端に対応するアミノ酸をそれが有する-COOH基を介して結合させ、次いで該アミノ酸に目的とするペプチドのN末端の方向に向かって、対応するアミノ酸またはペプチド断片を該アミノ酸またはペプチド断片が有する-COOH基以外の-アミノ基のような官能基を保護したうえで縮合させて結合させる操作と、該結合したアミノ酸またはペプチド断片における-アミノ基のようなペプチド結合を形成するアミノ基が有する保護基を除去する操作とを順次繰り返すことによってペプチド鎖を伸長させ、目的とするペプチドに対応するペプチド鎖を形成し、次いで該ペプチド鎖を重合体から脱離させ、かつ保護されている官能基から保護基を除去することにより目的とするペプチドを得、次いでこれを精製することによって実施される。ここで、ペプチド鎖の重合体からの脱離および保護基の除去は、トリフルオロ酢酸を用いて同時に行うのが副反応を抑制する観点から好ましい。また、得られたペプチドの精製は逆相液体クロマトグラフィ-やゲルパーミエーションクロマトグラフィ-で行うのが効果的である。

40

50

【0020】

また、本発明のペプチドの塩は、通常の塩生成反応を利用することにより調製される。

【0021】

本発明のペプチドに含まれるべきアミノ酸配列としては、前記したとおり、

(1) : Tyr Arg His Ala Trp Ser Glu Asn Leu Ala Gln Cys Phe Asn (配列番号 : 1)

(2) Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys (配列番号 : 2)、

(3) Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His (配列番号 : 3)、

から選択されたものが挙げられる。

また、上記(b)に含まれるアミノ酸配列の具体例としては、(4) Gln Cys Glu Glu Gly

Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys (配列番号 : 4)、(5) Phe A 10

rg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys Cys Arg Thr (配列番号 : 5)、(6) Phe

Cys Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys (配列番号 : 6)、(7) Phe Ser Asn S

er Thr Val Ser Glu His (配列番号 : 7)などが挙げられる。

【0022】

すなわち、本発明のペプチドには、前記配列番号1~3のいずれかに記載のアミノ酸配列を、配列の全部または一部として有するペプチドが含まれる。場合によっては、当該アミノ酸配列のN末端アミノ酸残基のアミノ基はアシル化されてもよく、例えば当該アミノ基に低級アルカノイル基(例えば、アセチル基など)または低級アルコキシカルボニル基(例えば、メトキシカルボニル基またはブトキシカルボニル基など)が導入されていてもよい

。また、当該アミノ酸配列のC末端アミノ酸残基のカルボキシル基はアミド化またはエステル化されていてもよく、例えば当該カルボキシル基はアミド基または低級アルキルエステル基(例えば、メチルエステル基またはブチルエステル基など)に変換されていてもよい

。また、本発明のペプチドに含まれている前記配列番号1~3のいずれかに記載のアミノ酸配列は、各アミノ酸残基が側鎖官能基の性質に基づき相同性置換されたものでもよい。 20

例えば、CysはSerに、LeuはIle、Valに、SerはThrに、GluはAspに、GlnはAsnに、LysはArgに、PheはTyr、His、Trpにそれぞれ置換可能であり、その逆も置換可能である。さらに、本発明のペプチドに含まれている前記配列番号1~3のいずれかに記載のアミノ酸配列中の任意の位置において、1~6個の任意のアミノ酸残基が、好ましくは1もしくは2個の任意のアミノ酸残基が、さらに好ましくは1個の任意のアミノ酸残基が、それぞれ独立して付加されてもよく(例えば、配列番号2に対応する配列番号4または5)、また、1~ 30

6個の任意のアミノ酸残基が、好ましくは1~3個の任意のアミノ酸残基が、より好ましくは1もしくは2個の任意のアミノ酸残基が、さらに好ましくは1個の任意のアミノ酸残基が、それぞれ独立して欠失してもよい。本明細書における「本発明のペプチド」の記載

には、これらのペプチドすべてが含まれる。

【0023】

本発明のペプチドは、塩、特に薬学的に許容される塩を形成していてもよく、酸塩、金属塩またはアミン塩を形成する。その塩としては、例えば、以下に限らないが、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、シュウ酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩など；アルカリ金属塩(例えば、ナトリウム、カリウムなど)もしくはアルカリ土類金属塩(例えば、カルシウムなど)、またはアルミニウム塩など(これらの塩は、水酸化物イオンまたは炭酸イオンとの間で形成する塩である)；トリエチルアミン塩、ベンジルアミン塩、ジエタノールアミン塩、t-ブチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、アルギニン塩などが挙げられる。 40

【0024】

本発明のペプチドのTNF、TRAIL、FasLなどに対する阻害効果は、通常これらの活性を測定する方法を利用して行われる。例えば、TNFの活性は、(1)マウスL細胞を標的とする細胞障害活性、(2)リポプロテインリパーゼの抑制活性、(3)線維芽細胞に対する増殖促進活性を測定して行われる〔例えば、中嶋暉躬他編 新基礎生化学実験法 6 「生物活性を用いる測定法」(昭和63年4月30日 丸善株式会社発行)、第267-272頁参照〕。また、TNFの活性はマウスL929細胞やNIH3T3細胞に対するアポトーシス 40

【0024】

本発明のペプチドのTNF、TRAIL、FasLなどに対する阻害効果は、通常これらの活性を測定する方法を利用して行われる。例えば、TNFの活性は、(1)マウスL細胞を標的とする細胞障害活性、(2)リポプロテインリパーゼの抑制活性、(3)線維芽細胞に対する増殖促進活性を測定して行われる〔例えば、中嶋暉躬他編 新基礎生化学実験法 6 「生物活性を用いる測定法」(昭和63年4月30日 丸善株式会社発行)、第267-272頁参照〕。また、TNFの活性はマウスL929細胞やNIH3T3細胞に対するアポトーシス 50

誘導で測定できる。TRAILの活性はマウスL929細胞に対するアポトーシス誘導で測定できる。FasLの活性はFas遺伝子を導入したマウスL929細胞やNIH3T3細胞に対するアポトーシス誘導で測定できる(例えば、EMBO J, 13, 4587-4596, 1994.参照)。アポトーシス誘導の検出は、ヨウ化プロピディウム(PI)やヘキスト33258等の核酸染色試薬や、蛍光標識アネキシンVなどの膜構造の変化を検出する方法が好ましく用いられる。中でもヨウ化プロピディウム(PI)、FITC標識アネキシンVが特に好ましい。

【0025】

本発明のペプチドを用いる処置法は、例えば静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、経口投与などの全身的投与や、関節内投与などのように疾患部位にカテーテルや注射針を用いて本発明のペプチドを注入する方法などが挙げられる。

10

【0026】

本発明のペプチドの有効な活性発現のための投与量は、一日量が通常0.01 μ g/kg~2g/kg(体重)であり、好ましくは0.01 μ g/kg~200mg/kg(体重)である。

【0027】

投与形態としてはペプチドを5%ブドウ糖液や生理食塩水などの薬学的に許容し得る溶液に溶解させて得られる溶液が好ましく、また該溶液は薬理的に許容される種々の添加剤を含んでいてもよい。さらにペプチド類をカプセル化またはリポソム化することも可能である。

【0028】

抗体の作成

種々の宿主動物に、1種類以上の本発明のペプチドを含む組成物を注射することによって免疫することが出来る。宿主動物には、ウサギ、マウス、モルモット、ラット、ヒツジ、ヤギなどが含まれる。種々のアジュバントを宿主種に応じて免疫応答を増強させるために使用することが出来、その例として、フロイント(完全又は不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような表面活性物質、プルロニックポリオール類、ポリアニオン類、ペプチド類、油エマルジョン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、ジニトロフェノール及びBCG(無菌化ウシ型結核菌)やコリネバクテリウム・パルブムのような潜在的に有用なヒトアジュバントなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0029】

抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、Fab発現ライブラリーを使用して生産された分子などが含まれる。

【0030】

特定の抗原に対する抗体の均一な集合であるモノクローナル抗体は、上記したペプチドを使用し、標準のハイブリドーマ技術(コーラーら: Nature, 256:495, 1975; コーラーら: Eur. J. Immunol., 6:511, 1976; コーラーら: Eur. J. Immunol., 6:292, 1976; ハマーリングら: In: Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981; アメリカ特許4,376,110; コスポアら: Immunology Today, 4:72, 1983; コールら: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2026, 1983; コールら: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1983)を採用することによって、調製することが出来る。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びそれらのサブクラスを含む、任意のイムノグロブリンのクラスから選択することが出来る。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、イン・ピトロまたはイン・ピボのいずれで培養されてもよい。

40

【0031】

抗体は、例えば診断的検定の部分として生物学的試料中の抗原の存在を検出するために使用することが出来、また、他の治療的方法による医療的処置効果の評価のために使用することも出来る。

【0032】

免疫検定法

50

更なる本発明の実施態様は、1種類以上の本発明のペプチドを抗原として特異的に認識する抗体を用いる免疫検定法の分野に関連する。

【0033】

1種類以上の本発明のペプチドは当該抗原として特異的に認識される。

【0034】

1つの実施態様において、免疫検定法は、酵素結合免疫測定法(ELISA)である。この型では、サンプルおよび所定の試薬は、マイクロタイターウェルプレートのウェル内に含まれ、検定は、酵素標識の検出に適切な検出試薬をウェルに加えることにより開始される。当該検定は、当業者に既知であり、当該免疫検定法の技術に関連する背景情報は、'The Immunoassay Handbook', (Wild, D. G. Ed, Stockton Press, New York, [1994])に見ることができる。

10

【0035】

適当な典型的な酵素標識には、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼが含まれるが、これらに限らない。ワサビのペルオキシダーゼが、本発明の酵素免疫検定法の使用に特に好ましい酵素標識である。

【0036】

更に異なる実施態様では、免疫検定法は、放射性免疫検定法であり、本発明のアッセイ法の使用に適当な放射性同位元素には、トリチウムのような β -放射する同位元素およびオージェ電子を放射するヨウ素-125が含まれる。

20

【0037】

また、更に異なる実施態様では、免疫検定法は、蛍光免疫検定法であり、適当な蛍光標識は、フルオレセイン、ローダミンおよびシアニン色素から選択される。

【0038】

更には、本発明の別態様として、本発明のペプチド以外に、本発明のペプチドをコードしている核酸を提供する。

【0039】

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

30

(実施例1)

式(1): Tyr Arg His Ala Trp Ser Glu Asn Leu Ala Gln Cys Phe Asn (配列番号: 1) で示されるアミノ酸配列を含むペプチドTyr Arg His Ala Trp Ser GluAsn Leu Ala Gln Cys Phe Asn-NH₂をペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-フルオレニルメトキシカルボニル)-アミノメチル)-フェノキシアセトアミド-エチル基を0.62ミリモル/g(樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、Fmocアミドレジ 0.1ミリモルを用い、目的とするペプチドのカルボキシル末端からアミノ末端に向かって順次対応するアミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国ア 40
プライド・バイオシステムズ社製のN⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N⁹-トリチル-L-グルタミン〔Fmocグルタミン〕、N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)- β -ブチル-L-グルタミン酸〔Fmocグルタミン酸〕、N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N⁹-トリチル-L-アスパラギン〔Fmocアスパラギン〕、N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N^G-(2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルフォニル)-L-アルギニン〔Fmocアルギニン〕、N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-S-トリチル-L-システイン〔Fmocシステイン〕、N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-O-t-ブチル-L-セリン〔Fmocセリン〕、N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-ロイシン〔Fmocロイシン〕、N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N^{I m} 50

- トリチル - L - ヒスチジン [F m o c ヒスチジン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - L - フェニルアラニン [F m o c フェニルアラニン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - L - アラニン [F m o c アラニン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - O - t - プチル - L - チロシン [F m o c チロシン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - N^{I n d} - ブトキシ - L - トリプトファン [F m o c トリプトファン] を、各結合ステップについてそれぞれ 1 ミリモルずつ用いた。

【 0 0 4 0 】

得られたペプチド樹脂を、7.5%のフェノール、2.5%のエタンジチオール、5%の水と5%のチオアニソールを含むトリフルオロ酢酸 10 ml で 3 時間処理した。得られた溶液をジエチルエーテルに加えて生じる沈殿をさらに数回ジエチルエーテルで洗浄して、ペプチドの脱保護と樹脂からの脱離を行った。粗生成物を PD 10 カラム (アマシャムファルマシアジャパン) で精製してペプチドを得た。得られた精製ペプチドをファルマシアバイオテック株式会社製 AKTA explorer 10 XT [カラム : ミリポアウオーターズ株式会社製 ノバパック C 18 3.9 mm × 150 mm、移動相 : トリフルオロ酢酸を 0.05 容量% 含有するアセトニトリルと水の混合溶媒 (アセトニトリル濃度を 30 分間で 5 容量% から 50 容量% に直線的に変化させた)、流速 1.0 ml / min] に付したところ、17.3 min に単一のピークが示された。FAB 法マスペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は 1738 であった (理論値 : 1737.92)。

【 0 0 4 1 】

(実施例 2)

式 (2) : Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys (配列番号 : 2)、式 (3) : Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His (配列番号 : 3)、式 (4) : Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys (配列番号 : 4)、式 (5) : Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys Cys Arg Thr (配列番号 : 5)、式 (6) : Phe Cys Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys (配列番号 : 6)、式 (7) : Phe Ser Asn Ser Thr Val Ser Glu His (配列番号 : 7) で示されるアミノ酸配列を含むペプチドを実施例 1 と同様の方法で合成した。ただし、結合反応において、実施例 1 に示したアミノ酸以外に、米国アプライド・バイオシステムズ社製の N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - グリシン [F m o c グリシン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - プロリン [F m o c プロリン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - O - t - プチル - L - トレオニン [F m o c トレオニン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - N - t - ブトキシカルボニル - L - リジン [F m o c リジン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - L - バリン [F m o c バリン]、N - 9 - (フルオレニルメトキシカルボニル) - プチル - L - アスパラギン酸 [F m o c アスパラギン酸] を、各結合ステップについてそれぞれ 1 ミリモルずつ用いた。

【 0 0 4 2 】

Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys-NH₂ で示される精製ペプチドでは、10.0 min に単一のピークが示され、精製ペプチドの分子量は 1496 であった (理論値 : 1495.64)。Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His-NH₂ で示される精製ペプチドでは、10.2 min に単一のピークが示され、精製ペプチドの分子量は 1039 であった (理論値 : 1038.17)。Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys-NH₂ で示される精製ペプチドでは、10.9 min に単一のピークが示され、精製ペプチドの分子量は 2144 であった (理論値 : 2143.30)。Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys Cys Arg Thr-NH₂ で示される精製ペプチドでは、9.8 min に単一のピークが示され、精製ペプチドの分子量は 1856 であった (理論値 : 1856.07)。Phe Cys Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys-NH₂ で示される精製ペプチドでは、9.0 min に単一のピークが示され、精製ペプチドの分子量は 1443 であった (理論値 : 1442.59)。Phe Ser Asn Ser Thr Val Ser Glu His-NH₂ で示される精製ペプチドでは、8.3 min に単一のピークが示され、精製ペプチドの分子量は 1

10

20

30

40

50

006であった(理論値: 1006.04)。

【0043】

(試験例1)

24穴プレート(NUNC社)の各ウエルに、10%のウシ胎児血清を含むイーグル培地(10% FCS/E-MEM)に分散した5万個のL929細胞または10%のウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(10% FCS/D-MEM)に分散した5万個のNIH3T3細胞を、各1mlずつ分注した。37℃、5% CO₂ 下24時間培養して細胞を接着させた後、本発明のペプチドの、リン酸塩緩衝(PBS: 10mM、0.15Mの塩化ナトリウムを含む、pH7.4)溶液を100μl、ならびにrhTNF (R&Dシステムズ)またはrhTRAIL (R&Dシステムズ)またはrhFasL (R&Dシステムズ)のPBS溶液10μlを各ウエルに加えた。rhFasL (R&Dシステムズ)またはrhTRAILを用いる場合には、抗ヒスタグ抗体(R&Dシステムズ)を最終濃度が10μg/mlになるように、さらに加えた。また、NIH3T3細胞を用いる場合には、さらにシクロヘキシミドを最終濃度が5μg/mlになるように加えた。37℃、5% CO₂ 下12時間培養した後、ヨウ化プロピディウム(PI)を培地中に最終濃度が1μg/mlになるように加え、さらに37℃、5% CO₂ 下15分間静置した。共焦点レーザー顕微鏡でPIの蛍光を観察し、アポトーシスに誘導された細胞を判別した。任意に選んだ5視野におけるアポトーシスに誘導された細胞と全細胞の割合を計算し、アポトーシス誘導率とした。

【0044】

L929細胞に対してrhTNF を50ng/ml用い、かつペプチド溶液の代わりにPBSを加えた時のアポトーシス誘導率が61%であった。Tyr Arg His Ala Trp Ser Glu Asn Leu Ala Gln Cys Phe Asn-NH₂のペプチドを最終濃度100μg/mlになるように加えた場合には、アポトーシス誘導率は43%であり、アポトーシス阻害率は29%であった。

【0045】

同じく、L929細胞に対してrhTRAILを50ng/ml用い、かつペプチド溶液の代わりにPBSを加えた時のアポトーシス誘導率が46%であった。Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys-NH₂のペプチドを最終濃度400μg/mlになるように加えた場合のアポトーシス阻害率は59%、Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys-NH₂のペプチドを最終濃度400μg/mlになるように加えた場合のアポトーシス阻害率は47%、Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys Cys Arg Thr-NH₂のペプチドを最終濃度400μg/mlになるように加えた場合のアポトーシス阻害率は44%、Phe Cys Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys-NH₂のペプチドを最終濃度400μg/mlになるように加えた場合のアポトーシス阻害率は61%であった。

【0046】

NIH3T3細胞に対してrhFasLを50ng/ml用い、かつペプチド溶液の代わりにPBSを加えた時のアポトーシス誘導率が61%であった。Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His -NH₂のペプチドを最終濃度200μg/mlになるように加えた場合のアポトーシス阻害率は21%、Phe Ser Asn Ser Thr Val Ser Glu His-NH₂のペプチドを最終濃度200μg/mlになるように加えた場合のアポトーシス阻害率は19%であった。

【0047】

【発明の効果】

本発明により、抗体、合成ペプチドおよび低分子有機化合物のような従来知られているアポトーシス阻害剤に認められる短所を克服した、新しいアポトーシスまたは炎症を阻害する新規なペプチドまたはその塩が提供される。すなわち、選択性が高く、有効性が良好で、しかも分子量がそれほど大きくない、アポトーシスまたは炎症を阻害する新規なペプチドが提供される。

また、上記の実施例および試験例から明らかなように、本発明により提供される新規なペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、TNF、TRAIL、FasLなどによるアポトーシス誘導を効果的に阻害できるので、これらが原因となる自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデス、橋本病、慢性関節リュウマチ、移植片対宿主病、シェーグレン症候群、悪性貧血、アジソン病、強皮症、グッドパスチャー症候群、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、自然不妊、重症筋無力症、多発性硬化症、バセド病、特発性血小板減少性紫斑病、インスリン依存性糖尿病など)、アレルギー、アトピー、動脈硬化症、心筋炎、心筋症、糸球体腎炎、再生不良性貧血、肝炎(例えば、劇症肝炎、慢性肝炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎など)、AIDS、臓器移植後の拒絶反応、敗血症ショック、うっ血性心不全、脊髄異形成症候群、神経変性疾患(例えば、脳虚血による神経障害、ハンチントン病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマーなど)および癌などの処置剤として有用である。

10

【0048】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> masao, tanihara

<120> Apoptosis-inhibiting peptides

10

<130> 186828

<140>

<141>

<160> 7

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
peptide

<400> 1

Tyr Arg His Ala Trp Ser Glu Asn Leu Ala Gln Cys Phe Asn

1

5

10

40

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
peptide

10

<400> 2

Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys

1

5

10

20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
peptide

30

<400> 3

Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His

1

5

40

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
peptide

10

<400> 4

Gln	Cys	Glu	Glu	Gly	Thr	Phe	Arg	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu	Thr	Cys
1				5				10					15		

Arg Lys

20

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
peptide

<400> 5

Phe	Arg	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro	Glu	Thr	Cys	Arg	Lys	Cys	Arg	Thr
1				5				10					15	

40

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
peptide

<400> 6

Phe Cys Glu Glu Asp Ser Pro Glu Thr Cys Arg Lys

1

5

10

20

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
peptide

<400> 7

Phe Ser Asn Ser Thr Val Ser Glu His

1

5

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 7/08	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 梶原 一美

奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 学生宿舎 8 - 5 0 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA01 HA15
 4B064 AG27 CA20 CC24 DA13
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 BA18 BA23 CA59 DC50 MA17
 MA24 MA37 MA52 MA66 ZA012 ZA362 ZA452 ZA552 ZA752 ZB072
 ZB082 ZB112 ZB132 ZB212 ZB262 ZB352 ZC552
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA15 BA16 BA17 BA50 CA40 DA76 DA86
 EA21 EA22 EA23 EA29 EA50 FA30 FA33 FA51