

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6578546号  
(P6578546)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int. Cl. F I  
**A 6 1 K 38/16 (2006.01)** A 6 1 K 38/16 2 0 0  
**A 6 1 P 31/04 (2006.01)** A 6 1 P 31/04  
**C 0 7 K 14/00 (2006.01)** C 0 7 K 14/00 Z N A

請求項の数 3 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2015-123217 (P2015-123217)	(73) 特許権者	503027931 学校法人同志社 京都府京都市上京区今出川通烏丸東入玄武町601番地
(22) 出願日	平成27年6月18日(2015.6.18)	(74) 代理人	100093230 弁理士 西澤 利夫
(65) 公開番号	特開2016-27018 (P2016-27018A)	(72) 発明者	西川 喜代孝 京都府京田辺市多々羅部谷1-3 同志社大学内
(43) 公開日	平成28年2月18日(2016.2.18)	(72) 発明者	高橋 美帆 京都府京田辺市多々羅部谷1-3 同志社大学内
審査請求日	平成30年5月31日(2018.5.31)	(72) 発明者	谷川 哲也 京都府京田辺市多々羅部谷1-3 同志社大学内
(31) 優先権主張番号	特願2014-128632 (P2014-128632)		
(32) 優先日	平成26年6月23日(2014.6.23)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

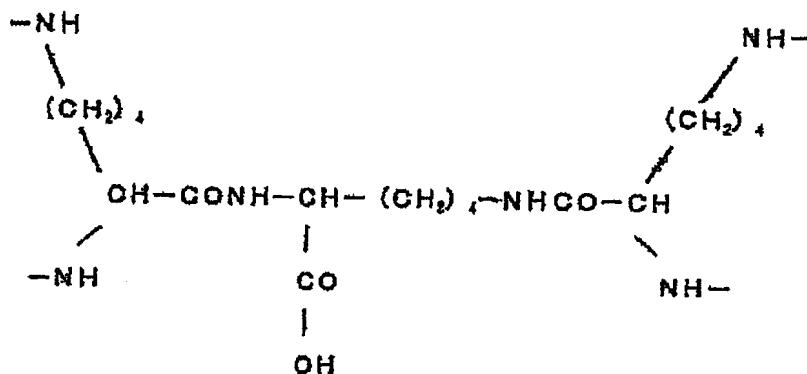
(54) 【発明の名称】 LT阻害4価ペプチドおよびE T E C感染症治療薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

易熱性エンテロトキシン(LT)に結合して毒性を阻害するLT阻害4価ペプチドであって、3つのリジン(Lys)が結合して形成された以下の分子核構造、

【化1】



の端部に位置する4つのアミノ基の各々に、配列番号1-4のペプチドモチーフのうちのいずれか1種が、直接またはスペーサーを介して結合していることを特徴とするLT阻害4価ペプチド。

【請求項2】

それぞれの前記ペプチドモチーフの末端のNH<sub>2</sub>がアセチル化されていることを特徴とする請求項1のLT阻害4価ペプチド。

【請求項3】

請求項1または2のLT阻害4価ペプチドを含有することを特徴とするETEC感染症治療薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、LT阻害4価ペプチドおよびETEC感染症治療薬に関する。

【背景技術】

【0002】

毒素原性大腸菌(enterotoxigenic E.coli;ETEC)は発展途上国における乳幼児下痢症の原因菌であり、全世界での感染者数は年間2億人を超え、5歳児未満の乳幼児の死者は40万人に及ぶと報告されている。同時に、我が国を含め先進国における旅行者下痢症の主要な病原菌である。ETEC感染症は激しい水溶性下痢を主症状とし、治療の中心は下痢による脱水症状で失われた水分や電解質を補う輸液や抗生物質の投与が主流となっている。その一方で、ETECは抗生物質に対して急速に耐性を獲得しつつあることから、新たな治療薬の開発が急務となっている。

【0003】

ETECの主要な病原因子は、ETECが産生する易熱性エンテロトキシン(heat-labile enterotoxin;以下、「LT」と記載する)である。LTは、AB5型の毒素であり、タンパク質のADP-リボシル化酵素であるA-サブユニット1分子と、標的細胞上に存在する受容体を認識して結合し、その後A-サブユニットを細胞内に輸送する役割を担うB-サブユニット(LTB)5量体から構成されている。細胞内に侵入したA-サブユニットはGTP結合タンパク質であるGをADP-リボシル化し、活性化状態に保持することによって、チャンネルを介したイオンならびに水の持続的な流出を引き起こす。標的細胞上に存在するLT受容体は糖脂質の1種である、ガングリオシドGM1(Gal 1-3GalNAc 1-4[NeuAc 2-3]Gal 1-4Glc 1-1Cer)であることが知られている。LTB1分子はGM1の末端糖鎖部を特異的に認識し、従ってLTB5量体は、最大5分子のGM1を結合しうる。この5:5の結合によって結合親和性は著しく増加することが知られており、この現象はクラスター効果と呼ばれている。また、このときLTB1分子上には、GM1の末端ガラクトースの認識に関わるポケットと、末端シアル酸の認識に関わるポケットがそれぞれ存在しており、両ポケットが同時にGM1の認識に関与している(非特許文献1)。

【0004】

一方、これまでに本発明者らは、クラスター効果に基づく強い相互作用を阻害する新技術、多価型ペプチドライブラリー法を開発し、腸管出血性大腸菌(Enterohaemorrhagic E.coli;EHEC)が産生するShiga toxin(Stx)を標的として、一連の新規Stx阻害ペプチドを開発している(特許文献1、2)。さらに、本発明者らは、この多価型ペプチドライブラリーを応用したスクリーニング方法も開発している。具体的には、配列既知のペプチドをクラスター効果が発揮できるよう多価形の形状で、1枚のセルロースシート上に多数スポット合成し、このシート上にスポット合成された多価型ペプチドを、Stx1aのBサブユニットグロボ3糖結合部位、サイト2との高親和性結合を指標にスクリーニングすることにより、11種の新規なStx1a阻害ペプチドを開発している(特許文献3)。

【0005】

そして、本発明者らは、これまでに確立してきた上記の技術と知見に基づいて、コレラ菌が産生するコレラ毒素(Cholera toxin:CT)の毒性を阻害するCT阻害4価ペプチドの開発にも成功している(特願2014-050828)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

10

20

30

40

50

【特許文献 1】W02006 / 001542号公報

【特許文献 2】特開2011 079808号公報

【特許文献 3】特開2011 158341号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】Protein Science(1994),3:166-175

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、LTの標的細胞への結合を担うLTBを標的とした新規LT阻害ペプチドを提供すること、およびETEC感染症治療薬を提供することを課題としている。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記の課題を解決するために、本発明のLT阻害4価ペプチドは、易熱性エンテロトキシン(LT)に結合して毒性を阻害するLT阻害4価ペプチドであって、3つのリジン(Lys)が結合して形成された分子核構造の端部に位置する4つのアミノ基の各々に、配列番号1-4のペプチドモチーフのうちのいずれか1種が、直接またはスペーサーを介して結合していることを特徴としている。

【0010】

このLT阻害4価ペプチドでは、N末端がアセチル化されていることが好ましい。

20

【0011】

本発明のETEC感染症治療薬は、前記LT阻害4価ペプチドを含有することを特徴としている。

【発明の効果】

【0012】

本発明のLT阻害4価ペプチドによれば、LTに対して高い結合親和性で結合して、細胞毒性を効果的に阻害することができる。したがって、このLT阻害4価ペプチドを含有する本発明のETEC感染症治療薬は、LTに起因する下痢症などの症状を改善することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】WT-LTBおよびE51A-LTBのGM1結合活性を示す図である。

【図2】スクリーニングに使用した多価型ペプチドライブラリーの構造を示す図である。

【図3】多価型ペプチドライブラリースクリーニングの結果を示す図である。上から各ライブラリーの構造と、それらを用いてスクリーニングを行なった結果を示す。図中のposition番号は、各ライブラリーのdegenerate positionのN末側からの位置を示している。

【図4】セルロースシート上に合成した4価ペプチドの構造を示した概略図である。

【図5】(A)は、各4価ペプチドが持つペプチドライブラリー部の構造ならびにシート上の位置情報を示す図である。図中右に示すモチーフ中のXは、各位置に示したアミノ酸を示している。図中I-5のMAは、ペプチドライブラリー部を欠損し、その他の構造は全て保持している化合物を示している。(B)は、各シートと<sup>125</sup>I-標識WT-LTBまたは<sup>125</sup>I-標識E51A-LTBの結合を示す図である。

30

【図6】LT処理によるCHO細胞の形態変化に及ぼすAAR-tetならびにMA-tetの効果を示す図である。

【図7】LTのcAMP産生作用に対するAAR-tetの効果を示す図である。96wellプレートで培養し、分化させたCaco-2細胞を1.0 μg/mlのLTで刺激した場合のcAMP産生量(0.18 nmol/mg of protein)を100%として表示している(n=5)。

【図8】(A)は、各4価ペプチドが持つペプチドライブラリー部の構造ならびにシート上の位置情報を示した図である。図中右に示すモチーフ中のXは、各位置に示したアミノ酸を示している。図中、A-1はベースとなるGGRHRRRモチーフを有する化合物を、G-10のMAはペプチドライブラリー部を欠損し、その他の構造は全て保持している化合物を、それぞ

40

50

れ示す。(B)は、各シートと<sup>125</sup>I-標識WT-LTBまたは<sup>125</sup>I-標識E51A-LTBの結合を示す図である。

【図9】LT処理によるCHO細胞の形態変化に及ぼすNNR-tet、ENR-tetならびにGGR-tetの効果(n=3)を示す図である。

【図10】LTのcAMP産生作用に対するNNR-tet、ENR-tetおよびGGR-tetの効果を示す図である。96 wellプレートで培養し、分化させたCaco-2細胞を1.0 μg/mlのLTで刺激した場合のcAMP産生量(0.18 nmol/mg of protein)を100%として表示している(GGR-tetはn=3、他はn=5)。

【図11】(A)(B)は、LTによってマウス腸管に水分貯留が引き起こされることを示す図である。

【図12】LTによる水分貯留に対するGGR-tetの阻害効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明のLT阻害4価ペプチドは、LTに高い結合親和性で結合することによって、LTの細胞毒性を阻害するものである。

【0015】

本発明のLT阻害4価ペプチドは、3つのリジン(Lys)が結合して形成された分子核構造の端部に位置する4つのアミノ基の各々に、

以下のペプチドモチーフ；

配列番号1：Ala-Ala-Arg-Arg-His-His-His (AARRHHH)

配列番号2：Asn-Asn-Arg-His-Arg-Arg-Arg (NNRHRRR)

配列番号3：Glu-Asn-Arg-His-Arg-Arg-Arg (ENRHRRR)

配列番号4：Gly-Gly-Arg-His-Arg-Arg-Arg (GGRHRRR)

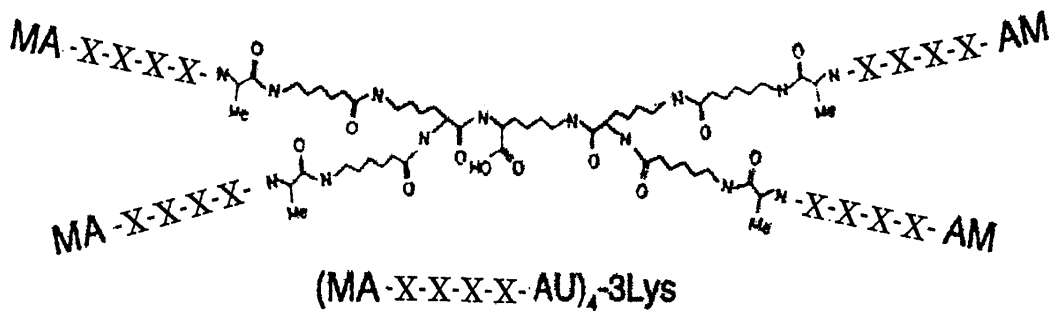
のうちのいずれか1種が結合したものである。

【0016】

すなわち、本発明のLT阻害4価ペプチドは、例えば、以下の化学式、

【0017】

【化1】



多価型ペプチドライブラリー

【0018】

において、3つのリジン(Lys)からなる分子核構造の端部に位置するXXXX部に、配列番号1-4のペプチドモチーフのうちのいずれか1種が4つ組み込まれた4価ペプチドが例示される。なお、上記の化学式1では、ペプチドモチーフが組み込まれる位置を便宜的に「XXXX」と記載している。

【0019】

また、配列番号1-4のペプチドモチーフのうち、配列番号4のペプチドモチーフ(GGRHRRR)を有するLT阻害4価ペプチドは、下痢発症に密接に関係しているcAMP産生増加を強力に阻害することから、特に好ましい。

## 【0020】

以下、配列番号1のペプチドモチーフを有するLT阻害4価ペプチドを「AAR-tet」、配列番号2のペプチドモチーフを有するLT阻害4価ペプチドを「NNR-tet」、配列番号3のペプチドモチーフを有するLT阻害4価ペプチドを「ENR-tet」、配列番号4のペプチドモチーフを有するLT阻害4価ペプチドを「GGR-tet」と記載する場合がある。

## 【0021】

また、上記化学式1では、分子核構造の両端に位置する4つのアミノ基の各々に、スペーサーが結合している形態を例示しているが、スペーサーを介さず、4つのアミノ基の各々に、直接、配列番号1-4のいずれかのペプチドモチーフを結合させることもできる。スペーサーを結合させる場合、LT毒性に対する阻害活性を損なわないものであればよく、具体的な分子、長さは限定されない。スペーサーとしては、例えば、末端にアミノ酸を有する炭素数4~10程度の鎖長のものが好ましく、LT毒性阻害活性としては、特に上記化学式1中の「U」で示される、amino hexanoic acid  $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}]$  (アミノカプロン酸)を好ましく例示することができる。また、スペーサーに含まれるアミノ酸としては、例えば、アラニン(A)を例示することができる。

10

## 【0022】

さらに、本発明のLT阻害4価ペプチドは、配列番号1-4のペプチドモチーフの各々の末端に修飾分子を有していることが好ましい。

## 【0023】

また、ペプチドモチーフの末端に $\text{NH}_2$ が露出するとプラス電荷になることから、電荷調節の観点からは、配列番号1-4のペプチドモチーフの各々の末端に、修飾分子として、電荷がない分子、さらには、疎水性の分子を結合させることも考慮される。例えば、LT阻害4価ペプチド、またはこれを含む治療薬を経口投与する場合、消化管内でのプロテアーゼによる分解を抑えるための安定化を目的として、末端の $\text{NH}_2$ をアセチル基により保護することができる。これによって、本発明のLT阻害4価ペプチドは、LT毒性に対する阻害活性が増大する。このように、ペプチドモチーフの末端の修飾分子は適宜選択することができる。

20

## 【0024】

なお、上記化学式1で例示するペプチドは、末端にMA (Met-Ala)を有しているが、これは、後述の実施例において、スクリーニングの際に導入したものを例示しており、上記化学式1のMAは、本発明のLT阻害4価ペプチドにおいては必ずしも必要ではない。

30

## 【0025】

そして、本発明のLT阻害4価ペプチドの作成方法は特に限定されず、公知の方法を適宜採用することができる。例えば、ペプチド合成装置等を利用するなどの方法によって作製することができる。

## 【0026】

以上のとおり、本発明のLT阻害4価ペプチドは、配列番号1-4のペプチドモチーフのうちいずれか1種を4つ有する4価のペプチドであり、クラスター効果によって、LTに対して強い結合親和性を発揮し、効果的にLTの細胞毒性を阻害することができる。

## 【0027】

そして、本発明のLT阻害4価ペプチドはLT阻害活性を有することから、このLT阻害4価ペプチドを含む薬剤は、LTに起因する下痢症などのETEC感染症を治療することができる治療薬となる。

40

## 【0028】

本発明のETEC感染症治療薬には、上記LT阻害4価ペプチド以外に、任意の製薬上許容される担体、賦形剤または安定化剤と混合することにより調製され保存することができる。

## 【0029】

許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、用いられる用量および濃度において患者に非毒性であることを条件として、剤形や投与経路に応じて適宜に選択することができる。

50

## 【0030】

具体的には、例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む単糖類、二糖類、および他の炭水化物EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）、ポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤などを例示することができる。

10

## 【0031】

なお、体内に投与される薬剤は無菌であることが望ましい。また、徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、固体疎水性ポリマーの半透性マトリクス（例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形状）である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸などを例示することができる。

20

## 【0032】

このようにして製剤化したETEC感染症治療薬は、例えば、症状に応じて、経口投与、局所投与、あるいは静脈等を介して全身投与することができるが、LTは腸管内で産生されること、また標的となる細部は主に腸管上皮細胞であることから、経口投与が特に好ましい。この場合、消化管でのプロテアーゼによる分解を受けないように、本発明のLT阻害4価ペプチドに適宜な修飾を施すことが好ましい。具体的には、本発明のLT阻害4価ペプチドのN末端をアセチル化することが好ましく、これによって、経口投与時の治療効果を格段に高めることができる。

30

## 【0033】

また、本発明のETEC感染症治療薬の投与量は、患者の体重、症状等に応じて決定することができる。例えば、1回当たり約5～100mg/Kg、目安としては、約5～10mg/Kg程度を目安とすることができる。

## 【0034】

本発明のETEC感染症治療薬は、LT阻害4価ペプチドを含有し、LTに起因する下痢症などの症状の治療に有効利用することができる。LTを標的とした本発明のETEC感染症治療薬は、ETEC自体に毒性を示さないために、耐性の問題がなく、現在急速に広がっている抗生物質に対する薬剤耐性の問題を克服できると期待される。さらに、本発明のLT阻害4価ペプチドに組み込まれるペプチド性化合物（ペプチドモチーフ）は、4価の核構造に順次アミノ酸を付加することにより合成でき、1価のペプチド合成と同様の手法にて簡便にバルク合成が可能である。

40

## 【実施例】

## 【0035】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

<実施例1>スクリーニングに使用する野生型LTBならびLTB変異体の作成

スクリーニングにはビーズに固定された状態でのLTBが大量に必要となる。そこで、LTB遺伝子のC末端側にHis-tagを導入した組み替えLTB（WT-LTB）を大腸菌発現系を用いて大量に調製し、Ni-ビーズを用いてビーズ上に固定化した。一部について、イミダゾールを

50

用いてビーズから溶出し、バッファー交換後、可溶性WT-LTBを調整した。

【0036】

一方、受容体結合部位に変異を有するLTB変異体作成にあたっては、GM1の末端ガラクトース結合部位を標的とした。すでに明らかにされているLTBの結晶構造解析から、GM1の末端ガラクトースとの結合に関与していると考えられているGlu51に着目し、このアミノ酸をAlaに置換した、E51A-LTBを同様に大量調製した。

【0037】

得られた組み替えLTBの活性の評価は、GM1との特異的な結合をELISA法を用いて検討することによって行った。具体的には、ELISAプレートにphosphatidylcholine:GM1 (または asialo-GM1) =1:0.005 (µg/plate、GM1は0.5%)をコートし、各濃度の組み替えLTBを結合後、洗浄し、残存しているLTBを特異的抗体を用いて検出した。

10

【0038】

結果を図1に示す。図1に示したように、WT-LTBは濃度依存的に強くGM1に結合することが確認された。一方、GM1から末端シアル酸を除去したアシアロGM1 (AGM1) に対してはほとんど結合活性がみられないこと、すなわちWT-LTBは末端シアル酸依存的にGM1を特異的に認識していることが示された。E51A-LTBのGM1に対しする結合量は、1µg/mlの濃度ではWT-LTBの約1/2に減弱していた。また、アシアロGM1 (AGM1) に対する結合は野生型と同様にほとんど観察されなかった。

【0039】

以上のことから、E51は確かにLTBの受容体認識に重要な役割を果たしていること、すなわちLT阻害薬開発において優れた標的部位となりうることが確認された。

20

【0040】

<実施例2> 多価型ペプチドライブラリー法を用いたE51特異的結合モチーフの同定  
実施例1において、E51がLTBの受容体認識に重要な役割を果たしていることが確認されたことから、以下の多価型ペプチドライブラリーのスクリーニングは、E51A-LTBに比べてWT-LTBに高い結合活性を示すことを指標に行った。

【0041】

スクリーニングに使用した多価型ペプチドライブラリーの構造を図2に示す。図中M, A, UはそれぞれMet, Ala, アミノカプロン酸を示す。また、図2中の「XXXX」はライブラリー部を示し、X (degenerate position)は、Cys以外の19種のアミノ酸の混合物を使用して合成を行ったことを示す。

30

【0042】

1次ライブラリーとして、ライブラリー部が、XXXRXXX、XXXKXXX (degenerate position が6つ) の2種の多価型ペプチドライブラリーを用いてスクリーニングを行った。まず、各LTB固定化ビーズ (LTB量で200 µg) と多価型ペプチドライブラリー (100 µg) を300 µlのPBS中で4、18時間インキュベートした。ビーズを洗浄後、30%酢酸でLTBに結合したペプチドを溶出し、回収後、N末端から順次アミノ酸シーケンスを行った。各degenerate positionについて、検出された19種のアミノ酸の量比を算出し、その和が19になるように補正した。さらに、各アミノ酸について、野生型LTBを用いた場合に得られた値を、LTB-E51Aを用いた場合に得られた値で割ってその比を算出し、改めてすべてのアミノ酸についての値の和が19になるように補正した。従って、仮に野生型LTBとLTB-E51Aとの間で各アミノ酸の選択性に差がなければその値は全て1となる。選択性の指標として、この値が1.2を超えた場合に野生型LTBに対して強い選択性がみられたと判断した。その結果、6カ所のすべてのdegenerate positionについて、塩基性アミノ酸の選択性が強いことが示された (図3)。

40

【0043】

そこで、RXRのモチーフをposition 3-5に持つ2次ライブラリーを作成し、同様のスクリーニングを行ったところ、依然としてposition 6、7においてはArgが選択されるものの、position 1、2ではAlaが選択されることが示された (図3下段)。

【0044】

50

< 実施例 3 > 多価型ペプチドシートスクリーニング法による新規LTB結合モチーフの同定

実施例 2 の結果に基づき、多価型ペプチドシート合成技術を用いて、一連の配列既知の 4 価型ペプチドライブラリーをシート上に作製した。

【 0 0 4 5 】

多価型ペプチドシート合成技術法の概略図を図 4 に示す。この方法は、本発明者らが特許文献 3 において提案しているものであり、図 2 に示した多価型ペプチドライブラリーと同一視できる核構造を有する配列既知の 4 価ペプチドを、セルロースシート上に数百のレベルでスポット合成する手法である。スポット合成したペプチドを、放射標識した WT-LTB ならびに E51A-LTB との結合能力を指標にスクリーニングすることにより、より厳格なモチーフ同定を試みた。

10

【 0 0 4 6 】

合成に際しては、Intavis AG 社のスポットペプチドシンセサイザーを使用した。まずセルロースシート (Intavis AG 社) 上に存在するアミノ基に対して、Fmoc-Ala、続いて Fmoc-アミノカプロン酸を反応させ、十分なスパーサー長を確保した。次にペプチド鎖を 4 価に分岐させるために、FmocLys(Fmoc) を 2 回連続で反応させ、形成された 4 個のアミノ基に対して均等にそれ以降の配列を与えるよう伸長反応を行った。この操作により、セルロースシート上に合成される 4 価ペプチドは、図 2 に示す多価型ペプチドライブラリーの核構造と同一視できる核構造を有していると考えられる (図 4)。

【 0 0 4 7 】

20

シート上に合成する各ペプチドライブラリーの構造は、position 4-7 には塩基性アミノ酸のクラスターを固定化 (RHHH あるいは HKHH) し、さらにそのアミノ末端側 (position 1-3) には Ala を基本とした、XAA、AXA、AAX、XA、AX (X は Cys 以外の 19 種のアミノ酸を順次導入)、を導入した。

【 0 0 4 8 】

以上の操作により、シート上にスポット合成された各 4 価ペプチドが持つペプチドライブラリー部の構造と、シート上での位置情報を図 5 (A) に示す。

【 0 0 4 9 】

さらに、4 価ペプチド性化合物がスポット合成されたシートを 5% Skim Milk Powder を用いてブロッキング後、<sup>125</sup>I-標識 WT-LTB (1 μg/ml)、あるいは <sup>125</sup>I-標識 E51A-LTB (1 μg/ml) と、それぞれ 4 、 1 時間インキュベーション後、洗浄し、BAS3000 にてシート上に結合した放射活性を検出し (図 5 (B))、定量解析を行った (表 1、2)。

30

【 0 0 5 0 】

標識 WT-LTB でプロットした場合、ならびに標識 E51A-LTB でプロットした場合、それぞれについて各スポットの濃さ (PSL) を定量し、各スポットの PSL 値の総計がスポットの数である 92 になるように補正表示した。すなわち、各化合物の間で結合に差が全く存在しない場合には、値は全て 1.0 となる。また、結合特異性を示す指標として、補正後の WT-LTB への結合量 (WT-LTB 結合力) を、補正後の E51A-LTB への結合量 (E51A-LTB 結合力) で割った値、WT-LTB/E51A-LTB (結合比) を算出し、この値についても総計が 92 になるように補正して表示した。さらに、WT-LTB への結合力、ならびに結合比、双方に優れていることを示す指標として、補正後の WT-LTB への結合量と補正後の結合比をかけた値 (WT-LTB 結合力 × 結合比) を用いた。表 1、表 2 では、WT-LTB 結合力 × 結合比の値の高い順に表示している (表 1 : ランキング 1 - 60、表 2 : ランキング 61 - 92)。

40

【 0 0 5 1 】



【表1】

ランキング	シートポジション	配列	WT-LTB結合力	E51A-LTB結合力	WT/E51A結合比	WT結合力×結合比
1	D6	AARRHHH	2.204	1.339	1.623	3.575
2	B10	ARARHHH	1.956	1.397	1.380	2.700
3	A10	KAARHHH	1.415	0.821	1.700	2.406
4	E2	AAKRHHH	1.534	0.989	1.529	2.345
5	B5	YAARHHH	1.780	1.401	1.253	2.230
6	G1	FAHKHHH	1.355	0.866	1.542	2.089
7	E8	AAVRHHH	1.738	1.536	1.115	1.938
8	F3	RAHKHHH	1.461	1.153	1.249	1.825
9	E1	AAARHHH	1.298	0.971	1.317	1.709
10	F10	KAHKHHH	1.163	0.790	1.450	1.687
11	D10	AAHRHHH	1.276	0.966	1.302	1.661
12	C8	AFARHHH	1.566	1.456	1.060	1.659
13	C3	AHARHHH	1.260	0.958	1.297	1.634
14	E7	AATRHHH	1.171	0.832	1.388	1.625
15	B9	AGARHHH	1.342	1.119	1.182	1.586
16	A3	RAARHHH	1.646	1.793	0.905	1.490
17	A9	LAARHHH	1.335	1.181	1.114	1.488
18	D1	AYARHHH	1.451	1.602	0.893	1.295
19	D3	ANARHHH	1.210	1.154	1.033	1.250
20	G4	TAHKHHH	0.925	0.689	1.323	1.225
21	F1	GAHKHHH	0.920	0.683	1.328	1.222
22	G10	ARHKHHH	1.384	1.548	0.882	1.220
23	B8	WAARHHH	1.227	1.219	0.993	1.218
24	C6	AKARHHH	1.245	1.259	0.975	1.213
25	B7	NAARHHH	1.298	1.379	0.928	1.204
26	F9	LAHKHHH	1.010	0.858	1.160	1.172
27	E3	AAMRHHH	1.070	0.979	1.078	1.153
28	C9	APARHHH	1.181	1.197	0.973	1.149
29	A1	GAARHHH	0.982	0.839	1.154	1.134
30	F2	AAHKHHH	0.800	0.563	1.400	1.120
31	G3	SAHKHHH	0.868	0.665	1.288	1.118
32	C10	ASARHHH	1.281	1.454	0.869	1.112
33	B3	SAARHHH	1.302	1.510	0.850	1.107
34	H6	AKHKHHH	1.045	0.975	1.057	1.104
35	A5	QAARHHH	1.012	0.918	1.087	1.100
36	B1	FAARHHH	1.212	1.323	0.903	1.094
37	H11	ATHKHHH	0.960	0.836	1.132	1.086
38	G9	AGHKHHH	0.824	0.617	1.317	1.085
39	G2	PAHKHHH	0.918	0.789	1.148	1.054
40	H5	ALHKHHH	0.836	0.659	1.250	1.045
41	F5	QAHKHHH	0.824	0.642	1.266	1.044
42	D2	AVARHHH	1.078	1.115	0.953	1.027
43	C7	AMARHHH	1.117	1.201	0.917	1.024
44	H1	AQHKHHH	0.689	0.463	1.465	1.009
45	H10	ASHKHHH	0.890	0.777	1.130	1.006
46	E5	AAPRHHH	1.084	1.166	0.916	0.993
47	A2	AAARHHH	1.004	1.011	0.979	0.983
48	E4	AAFRHHH	1.256	1.595	0.776	0.975
49	F8	IAHKHHH	1.003	1.027	0.963	0.966
50	E9	AAVRHHH	1.157	1.369	0.833	0.964
51	C4	AIARHHH	1.086	1.212	0.883	0.960
52	I1	AYHKHHH	1.033	1.108	0.919	0.949
53	E10	AANRHHH	0.993	1.041	0.941	0.934
54	H3	AHHKHHH	0.883	0.824	1.056	0.932
55	G6	VAHKHHH	0.925	0.911	1.001	0.927
56	D11	AAIRHHH	1.201	1.540	0.769	0.924
57	H8	AFHKHHH	1.085	1.269	0.843	0.914
58	D8	AAQRHHH	0.963	1.010	0.940	0.906
59	E11	AAWRHHH	0.999	1.098	0.897	0.897
60	I2	AVHKHHH	0.829	0.772	1.059	0.878

10

20

30

40

【表 2】

ランキング	シートポジション	配列	WT-LTB結合力	E51A-LTB結合力	WT/E51A結合比	WT結合力×結合比
61	A7	HAARHHH	1.083	1.370	0.779	0.844
62	H4	AHKHHH	0.910	0.968	0.926	0.842
63	G8	WAHKHHH	0.891	0.940	0.934	0.833
64	I4	AWHKHHH	0.782	0.725	1.062	0.830
65	A8	IAARHHH	1.098	1.436	0.754	0.828
66	B4	TAARHHH	1.033	1.274	0.799	0.826
67	D4	AWARHHH	0.976	1.189	0.809	0.790
68	F11	MAHKHHH	0.735	0.682	1.062	0.780
69	B2	PAARHHH	0.767	0.747	1.013	0.777
70	C5	ALARHHH	1.096	1.606	0.673	0.737
71	F7	HAHKHHH	0.796	0.881	0.891	0.710
72	C11	ATARHHH	0.909	1.151	0.779	0.708
73	G7	NAHKHHH	0.778	0.856	0.896	0.697
74	C1	AQARHHH	0.898	1.146	0.772	0.693
75	D5	AAGRHHH	0.904	1.177	0.757	0.684
76	I3	ANHKHHH	0.578	0.489	1.166	0.674
77	H2	AEHKHHH	0.395	0.232	1.679	0.663
78	A11	MAARHHH	0.759	0.896	0.835	0.633
79	E6	AASRHHH	0.868	1.273	0.672	0.584
80	B6	VAARHHH	0.912	1.422	0.632	0.576
81	H7	AMHKHHH	0.628	0.705	0.878	0.552
82	H9	APHKHHH	0.642	0.790	0.801	0.515
83	G5	YAHKHHH	0.798	1.403	0.561	0.448
84	F6	EAHKHHH	0.295	0.266	1.093	0.322
85	G11	ADHKHHH	0.404	0.575	0.693	0.280
86	D7	AADRHHH	0.277	0.452	0.604	0.167
87	F4	DAHKHHH	0.295	0.532	0.547	0.162
88	A4	DAARHHH	0.260	0.446	0.576	0.150
89	D9	AAERHHH	0.184	0.367	0.494	0.091
90	A6	EAARHHH	0.209	0.543	0.379	0.079
91	C2	AEARHHH	0.166	0.467	0.351	0.058
92	B11	ADARHHH	0.113	0.556	0.200	0.023

10

20

## 【 0 0 5 3 】

その結果、WT-LTBへの結合力、ならびに結合比、双方に優れていることを示す指標である、WT-LTB結合力×結合比の値の最も高い、AARRHHH（配列番号1）を新規LTB結合モチーフとして選択し、以下の検討に使用した。すなわち、このAARRHHH（配列番号1）からなるペプチドモチーフを、図2に示す多価型ペプチドライブラリーの4か所のXXXX部に組み入れ、4価のペプチド性化合物、AAR-tetを合成した。

30

## 【 0 0 5 4 】

< 実施例 4 > AAR-tetのLTB結合能の評価

実施例3で合成したAAR-tetの、WT-LTBに対する結合活性を、GEヘルスケア・ジャパン株式会社製Biacoreを用いて検討した。具体的には、Biacoreを用いて、AAR-tetのWT-LTBに対するKd値ならびにR<sub>umax</sub>（maximum resonance unit、AUはBiacore systemでのarbitrary unitを示す）を算出した。10 μg/mlのWT-LTBを用いてセンサーチップ上にWT-LTBを固定化後、各濃度のAAR-tetを結合させ、各センサーグラムから、Kd値、R<sub>umax</sub>を算出した。

40

## 【 0 0 5 5 】

結果を表3に示す。

## 【 0 0 5 6 】

【表 3】

tetrameric peptide	K <sub>D</sub> (μM)	R <sub>umax</sub> (AU)
AAR-tet ; (MA-AARRHHH-AU) <sub>4</sub> -3Lys	1.49 ± 0.1	1006 ± 58
MA-tet ; (MA-AU) <sub>4</sub> -3Lys	-	-

mean ± SE (n=3)

50

## 【0057】

表3に示したように、図2に示すXXXX部にモチーフを持たず、3Lysの核構造のみから成る4価ペプチドであるMA-tetでは全く結合がみられないのに対し、AAR-tetはWT-LTBに対して強い結合親和性を示すことが明らかとなった。

## 【0058】

<実施例5> LTによるCHO細胞の形態変化誘導に対するAAR-tetの阻害効果

CHO細胞は、LT処理によって形態が著しく変化し、紡錘形を示すようになることが知られている。本系は簡便かつ幅広く用いられているLT活性評価系である。そこで、LT処理によって誘導されるCHOの形態変化に及ぼす各ペプチド性化合物(AAR-tet、MA-tet)の効果を検討した。各ペプチド性化合物(AAR-tet: 5.6  $\mu$ M, 18.5  $\mu$ M、MA-tet: 51.4  $\mu$ M)存在あるいは非存在下、CHO細胞を1  $\mu$ g/mlのLTで処理し、7時間37  $^{\circ}$ Cインキュベート後の細胞形態の変化を、顕微鏡下で観察した。1処理あたり、約300個の細胞を観察し、形態が著しく伸展し、紡錘形を示すと認められる細胞の割合を算出した。

10

## 【0059】

結果を図6に示す。

## 【0060】

図6に示したように、MA-tetと比較して、AAR-tetを共存させた場合には容量依存的に紡錘形を示す細胞の割合が減少し、18.5  $\mu$ Mでは40%以下にまで減少することが示された。このことは、AAR-tetがLTBの受容体結合部位に結合することにより、LTのCHOに対する作用を阻害したためであると考えられる。

20

## 【0061】

<実施例6> LTによるCaco-2細胞でのcAMP産生に対するAAR-tetの阻害効果

LTが腸管上皮細胞に受容体を介して取り込まれると、逆行輸送を經由して、細胞質内にAサブユニットが運び込まれ、アデニレートシクラーゼにカップルしたGsをADPリボシル化することによって活性化し、その結果、細胞内のcAMP濃度が増加し、Aキナーゼが活性化し、リン酸化を介してClチャンネルが開放され、Clイオンが流出し、大量の水が浸透圧に従って流出し、下痢を引き起こすことが知られている。

## 【0062】

そこで、ヒト結腸がん由来上皮細胞株であるCaco-2を用いて、LTによるcAMP増加に対するAAR-tetの阻害効果を検討することにした。

30

## 【0063】

Confluent状態のCaco-2細胞を、AAR-tetおよびMA-tet(AAR-tet: 5.6  $\mu$ M, 18.5  $\mu$ M、MA-tet: 51.4  $\mu$ M)存在あるいは非存在下で、30分37  $^{\circ}$ Cインキュベート後、1.0  $\mu$ g/mlのLTを加え、5時間37  $^{\circ}$ Cインキュベート後、細胞ライセートを調製した。PerkinElmerのcAMP Alpha Screen Kitを用いて、各ライセート中のcAMP産生量を測定した。

## 【0064】

結果を図7に示す。

## 【0065】

図7に示したように、LT処理後5時間でcAMPの顕著な増加が確認できた。MA-tetはLT処理によるcAMP産生を全く阻害しないのに対し、AAR-tetは容量依存的にcAMP産生を抑制し、18.5  $\mu$ Mでは60%にまで阻害することが確認された。このことは、AAR-tetが優れたLT阻害能力を有していることを示している。

40

## 【0066】

<実施例7> 多価型ペプチドシートスクリーニング法による新規LTB結合モチーフの同定

本発明者らは、コレラ菌が産生するコレラ毒素(Cholera toxin: CT)の毒性を阻害するCT阻害4価ペプチドの開発に成功している(特願2014-050828)。そして、CTのBサブユニット(CTB)とLTBは非常に高い相同性を有していることから、CT阻害4価ペプチドのモチーフの一つとして見出されたGGRHRRR(配列番号4)をベースとして、新規LTB結合モチーフの同定を試みた。

50

## 【 0 0 6 7 】

具体的には、実施例3と同様に、多価型ペプチドライブラリーのスクリーニングは、E51A-LTBに比べてWT-LTBに高い結合活性を示すことを指標にし、多価型ペプチドシート合成技術を用いて、一連の配列既知の4価型ペプチドライブラリーをシート上に作製した。

## 【 0 0 6 8 】

GGRHRRR (配列番号4) のposition 3-6 (RHRR) を固定化し、それ以外のpositionをX (degenerate position) としてCys以外の19種のアミノ酸を導入した。GGRHRRR (配列番号4) は、図8 (A) 中の位置番号A-1に対応している。また、ペプチドライブラリー部を欠損し、その他の構造は全て保存している化合物 (MAと表示; 図8 (A) 中の位置番号G-10に対応) も同時に合成した。この4価ペプチド性化合物がスポット合成されたシートを5% Skim Milk Powderを用いてブロッキング後、<sup>125</sup>I-標識WT-LTB (1 μg/ml)、あるいは<sup>125</sup>I-標識E51A-LTB (1 μg/ml) と、それぞれ4、1時間インキュベーション後、洗浄し、BAS3000にてシート上に結合した放射活性を検出し (図8 (B))、定量解析を行った (表4、表5)。

10

## 【 0 0 6 9 】

標識WT-LTBでプロットした場合、ならびに標識E51A-LTBでプロットした場合のそれぞれについて各スポットの濃さ (PSL) を定量し、各スポットのPSL値の総計がスポットの数である75 (MAは除く) になるように補正表示した。すなわち、各化合物の間で結合に差が全く存在しない場合には、値は全て1.0となる。また、結合特異性を示す指標として、補正後のWT-LTBへの結合量 (WT-LTB結合量) を、補正後のE51A-LTBへの結合量 (E51A-LTB結合量) で割った値、WT-LTB/E51A-LTB (結合比) を算出し、この値についても総計が75になるように補正して表示した。さらに、WT-LTBへの結合量、ならびに結合比、双方に優れていることを示す指標として、補正後のWT-LTBへの結合量と補正後の結合比をかけた値 (WT-LTB結合量 × 結合比) を用いた。表4、表5では、WT-LTB結合量 × 結合比の値の高い順に表示してある (表4: ランキング1 - 60、表5: ランキング61 - 75)。

20

## 【 0 0 7 0 】

【表4】

ランキング	シートポジション	配列	WT-LTB結合力	E51A-LTB結合力	WT/E51A結合比	WT結合力×結合比
1	G8	NNRHRRR	1.210	0.760	1.567	1.897
2	F7	ENRHRRR	1.311	1.019	1.265	1.659
3	D8	GNRHRRR	1.278	1.010	1.244	1.590
4	B4	SGRHRRRL	1.012	0.655	1.520	1.539
5	F4	RNRHRRR	1.322	1.134	1.147	1.516
6	G6	YNRHRRR	1.481	1.431	1.018	1.508
7	F5	DNRHRRR	1.176	0.933	1.241	1.459
8	G1	MNRHRRR	1.145	0.909	1.239	1.418
9	E1	GNRHRRH	0.955	0.635	1.479	1.412
10	G5	TNRHRRR	1.249	1.105	1.112	1.389
11	D1	GTRHRRRL	1.073	0.835	1.263	1.354
12	C10	GPRHRRRL	1.154	0.998	1.137	1.311
13	D5	GWRHRRRL	1.067	0.861	1.219	1.300
14	G4	SNRHRRR	1.102	0.927	1.169	1.287
15	F8	HNRHRRR	1.217	1.188	1.008	1.227
16	G2	FNRHRRR	1.145	1.091	1.032	1.182
17	E10	GNRHRRY	1.229	1.274	0.949	1.166
18	G3	PNRHRRR	1.211	1.241	0.960	1.162
19	D3	GVRHRRRL	1.019	0.887	1.130	1.152
20	C5	GIRHRRRL	1.132	1.115	0.998	1.130
21	C1	GDRHRRRL	0.861	0.650	1.303	1.122
22	D2	GYRHRRRL	1.219	1.312	0.914	1.114
23	F11	KNRHRRR	1.053	0.995	1.041	1.096
24	B7	VGRHRRRL	1.113	1.120	0.977	1.088
25	A1	GGRHRRR	0.953	0.831	1.128	1.075
26	C11	GSRHRRRL	0.932	0.812	1.128	1.051
27	C7	GKRHRRRL	1.028	0.994	1.017	1.045
28	C4	GHRHRRRL	1.095	1.130	0.953	1.043
29	G7	VNRHRRR	1.120	1.200	0.918	1.028
30	E4	GNRHRRK	0.989	0.962	1.011	0.999
31	G9	WNRHRRR	1.061	1.114	0.937	0.995
32	C9	GFRHRRRL	1.077	1.149	0.922	0.993
33	A11	KGRHRRRL	0.905	0.824	1.081	0.978
34	B6	YGRHRRRL	1.131	1.293	0.861	0.974
35	B11	GRRHRRRL	1.084	1.190	0.896	0.971
36	E6	GNRHRRF	1.084	1.217	0.876	0.950
37	E7	GNRHRRP	0.929	0.894	1.022	0.949
38	F2	GNRHRRW	0.745	0.575	1.275	0.949
39	F10	LNRHRRR	1.147	1.366	0.826	0.947
40	B1	MGRHRRRL	0.850	0.754	1.108	0.941
41	E2	GNRHRRR	0.915	0.877	1.027	0.940
42	E8	GNRHRRS	0.981	1.009	0.957	0.939
43	E9	GNRHRRT	0.937	0.925	0.997	0.934
44	E3	GNRHRRRL	0.987	1.030	0.942	0.930
45	B3	PGRHRRRL	1.007	1.074	0.921	0.927
46	E5	GNRHRRM	1.065	1.204	0.870	0.926
47	F6	QNRHRRR	0.998	1.074	0.914	0.912
48	A4	RGRHRRRL	1.005	1.090	0.907	0.911
49	A10	LGRHRRRL	0.997	1.078	0.910	0.907
50	A6	QGRHRRRL	0.924	0.952	0.955	0.882
51	F1	GNRHRRN	0.831	0.782	1.045	0.869
52	C8	GMRHRRRL	0.948	1.019	0.915	0.867
53	C6	GLRHRRRL	0.963	1.054	0.899	0.866
54	B2	FGRHRRRL	0.900	0.933	0.949	0.854
55	D10	GNRHRRQ	0.853	0.846	0.992	0.847
56	A9	IGRHRRRL	0.931	1.015	0.902	0.840
57	D7	GNRHRRR	0.894	0.941	0.934	0.835
58	D6	GNRHRRG	0.905	0.983	0.905	0.819
59	B10	GARHRRRL	0.907	0.988	0.902	0.818
60	B9	WGRHRRRL	0.910	1.022	0.876	0.796

10

20

30

40

【表5】

ランキング	シートポジション	配列	WT-LTB結合力	E51A-LTB結合力	WT/E51A結合比	WT結合力×結合比
61	C2	GQRHRRL	0.915	1.035	0.869	0.795
62	A3	AGRHRRL	0.832	0.864	0.947	0.788
63	F9	INRHRRR	0.961	1.170	0.807	0.776
64	B8	NGRHRRL	0.889	1.007	0.868	0.772
65	C3	GERHRRL	0.792	0.823	0.946	0.749
66	A8	HGRHRRL	0.937	1.155	0.798	0.748
67	E11	GNRHRRV	0.756	0.854	0.870	0.657
68	B5	TGRHRRL	0.851	1.087	0.770	0.656
69	F3	ANRHRRR	0.906	1.240	0.718	0.650
70	A7	EGRHRRL	0.797	0.970	0.808	0.645
71	A5	DGRHRRL	0.726	0.835	0.856	0.622
72	D4	GNRHRRL	0.838	1.117	0.737	0.617
73	A2	GGRHRRL	0.748	0.906	0.811	0.607
74	D9	GNRHRRD	0.728	0.861	0.831	0.605
75	D11	GNRHRRE	0.605	0.789	0.754	0.456

10

## 【0072】

表4、表5に示したように、WT-LTBへの結合力、ならびに結合比、双方に優れていることを示す指標である、WT-LTB結合力×結合比の値が1.65以上を示した、NNRHRRR（配列番号2）ならびにENRHRRR（配列番号3）を新規LTB結合モチーフとして選択し、以下の検討に使用した。すなわち、NNRHRRR（配列番号2）およびENRHRRR（配列番号3）のそれぞれを、図2に示す多価型ペプチドライブラリーにおける4か所のXXXX部に組み入れ、4価のペプチド性化合物、NNR-tetならびにENR-tetを合成し、以下の実施例8において使用した。

20

## 【0073】

<実施例8> NNR-tet、ENR-tetならびにGGR-tetのLTB結合能の評価

NNR-tetおよびENR-tetの、WT-LTBに対する結合活性をGEヘルスケア・ジャパン株式会社製Biacoreを用いて検討した。同時に、ベースとなるモチーフGGRHRRR（配列番号4）を4価で有する化合物（GGR-tet）についても同様の検討を行った。具体的には、GEヘルスケア・ジャパン株式会社製Biacoreを用いて、NNR-tet、ENR-tetおよびGGR-tetのWT-LTBに対するKd値ならびにRUmax（maximum resonance unit、AUはBiacore systemでのarbitrary unitを示す）を算出した。10 µg/mlのWT-LTBを用いてセンサーチップ上にWT-LTBを固定化後、各濃度の化合物を結合させ、各センサーグラムから、KD値、RUmaxを算出した。

30

## 【0074】

この結果を表6に示す。

## 【0075】

## 【表6】

tetrameric peptide	K <sub>D</sub> (µM)	Rumax (AU)
NNR-tet ; (MA-NNRHRRR-AU) <sub>4</sub> -3Lys	0.42±0.02	1163±160
ENR-tet ; (MA-ENRHRRR-AU) <sub>4</sub> -3Lys	2.0±0.12	681±28
GGR-tet ; (MA-GGRHRRR-AU) <sub>4</sub> -3Lys	1.66±0.29	714±75
MA-tet ; (MA-AU) <sub>4</sub> -3Lys	-	-

40

mean ± SE (n=3)

## 【0076】

表6に示したように、3Lysの分子核構造のみから成る4価ペプチドであるMA-tetでは全く結合がみられないのに対し、いずれの化合物もWT-LTBに対して高い結合親和性を示すこと、なかでもNNR-tetは最も高い結合親和性を示すことが明らかとなった。

## 【0077】

<実施例9> LTによるCHO細胞の形態変化誘導に対するNNR-tet、ENR-tetおよびGGR-tetの阻害効果

50

実施例 5 と同様に、LT 処理によって誘導される CHO の形態変化に及ぼす各ペプチド性化合物 (NNR-tet、ENR-tet、GGR-tet) の効果を検討した。各濃度のペプチド性化合物 (NNR-tet、ENR-tet、GGR-tet) 存在あるいは非存在下、CHO 細胞を  $1 \mu\text{g/ml}$  の LT で処理し、7 時間 37 °C インキュベート後の細胞形態の変化を、顕微鏡下で観察した。1 処理あたり、約 300 個の細胞を観察し、形態が著しく伸展し、紡錘形を示すと認められる細胞の割合を算出した。

【 0 0 7 8 】

結果を図 9 に示す。

【 0 0 7 9 】

図 9 に示したように、NNR-tet、ENR-tet あるいは GGR-tet を共存させた場合には容量依存的に紡錘形を示す細胞の割合が減少し、 $17 \mu\text{M}$  では、NNR-tet で 56%、ENR-tet で 47%、GGR-tet で 51% の阻害効果を示すことが確認された。一方、MA-tet は、 $51.4 \mu\text{M}$  を用いた場合でも、その阻害効果は 18% に留まることが確認された。

【 0 0 8 0 】

< 実施例 1 0 > LT による Caco-2 細胞での cAMP 産生に対する NNR-tet、ENR-tet および GGR-tet の阻害効果

実施例 6 と同様に、ヒト結腸がん由来上皮細胞株である Caco-2 細胞を用いて、LT による cAMP 増加に対する NNR-tet、ENR-tet および GGR-tet の阻害効果を検討した。

【 0 0 8 1 】

結果を図 1 0 に示す。

【 0 0 8 2 】

図 1 0 に示したように、LT 処理後 5 時間で cAMP の顕著な増加が確認できた。そして MA-tet は LT 処理による cAMP 産生を全く阻害しないのに対し、NNR-tet、ENR-tet は容量依存的に cAMP 産生を抑制し、 $17 \mu\text{M}$  では共に 20% の阻害効果を示した。一方、GGR-tet は容量依存的に顕著な阻害効果を示し、 $17 \mu\text{M}$  では 69% の阻害効果を示した。

【 0 0 8 3 】

実施例 9、1 0 の結果は、NNR-tet、ENR-tet および GGR-tet のいずれも有効な LT 阻害薬となりうること、なかでも GGR-tet は、下痢発症に密接に関係している cAMP 産生増加を強力に阻害することから、最も有効な LT 阻害薬になり得ると考えられる。

【 0 0 8 4 】

< 実施例 1 1 > LT によって引き起こされるマウス腸管での水分貯留に対する GGR-tet の効果

図 1 1 ( A ) ( B ) に示したように、LT によってマウス腸管における水分貯留が引き起こされることが知られている。したがって、マウス腸管へ GGR-tet を投与することで、LT による水分貯留の阻害効果を検討した。

【 0 0 8 5 】

具体的には、麻酔下でマウス ( ICR マウス ( 雌、5 - 6 週 ) ) の腸管を結紮し、LT (  $0.3 \mu\text{g}$  ) および GGR-tet (  $300 \mu\text{g}$  ) を投与し、8 時間後、腸管を取り出し、腸管 1cm あたりの水分量を水分貯留量 FA として評価した。

【 0 0 8 6 】

結果を図 1 2 に示す。図 1 2 に示したように、LT による著しい水分貯留に対し、GGR-tet は 90% の阻害効果を示すことが明らかになった。この結果は、GGR-tet が LT の個体毒性を阻害する治療薬 ( ETEC 感染症治療薬 ) となり得ることを示している。

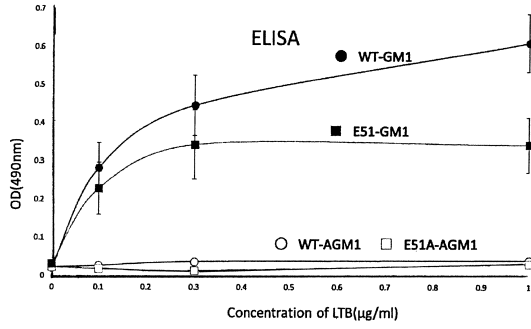
10

20

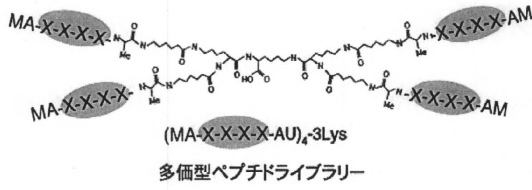
30

40

【 図 1 】



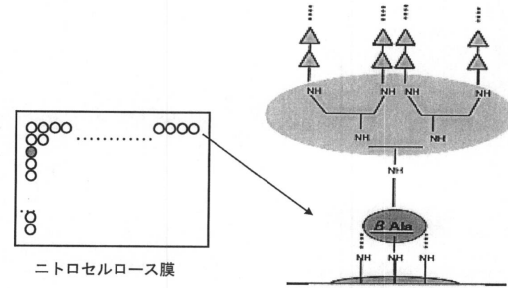
【 図 2 】



【 図 3 】

Peptido library	Position						
	1	2	3	4	5	6	7
(MA-XXXXXXXX-AU) <sub>4</sub> -3Lys	R(1.5)	H(1.8)	H(1.6)	R	H(1.3)	H(1.4)	H(1.4)
	H(1.3)	R(1.6)	R(1.5)		G(1.2)	K(1.2)	K(1.2)
	R(1.2)	K(1.2)	K(1.2)		K(1.2)	G(1.2)	G(1.2)
	G(1.2)		G(1.2)				
(MA-XXXXXXXX-AU) <sub>4</sub> -3Lys	R(1.3)	R(1.2)	H(1.3)	K	H(1.9)	H(1.7)	H(1.6)
			R(1.2)		R(1.2)	R(1.4)	K(1.3)
						K(1.2)	
(MA-XXXXXXXX-AU) <sub>4</sub> -3Lys	A(1.6)	A(1.3)		A(1.2)	R	R(1.1)	R(1.3)
	M(1.4)	M(1.2)					

【 図 4 】

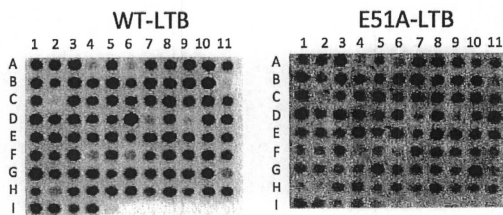


【 図 5 】

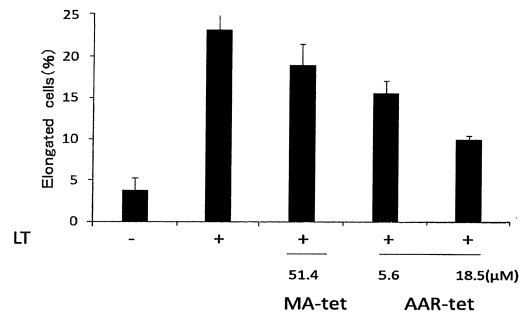
(A)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	G	A	R	D	Q	E	H	I	L	K	M	X-AARHHH(A1-B8)
B	F	P	S	T	Y	V	N	W	G	R	D	A-X-ARHHH (B9-D4)
C	Q	E	H	I	L	K	M	F	P	S	T	
D	Y	V	N	W	G	R	D	Q	E	H	I	AA-X-RHHH(D5-E11)
E	L	K	M	F	P	S	T	Y	V	N	W	
F	G	A	R	D	Q	E	H	I	L	K	M	X-AHKHHH(F1-G8)
G	F	P	S	T	Y	V	N	W	G	R	D	
H	Q	E	H	I	L	K	M	F	P	S	T	A-X-HKHHH(G9-I4)
I	Y	V	N	W	MA							

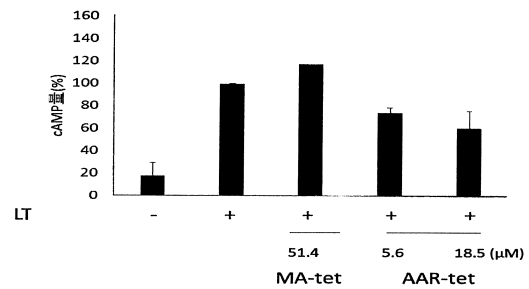
(B)



【 図 6 】



【 図 7 】



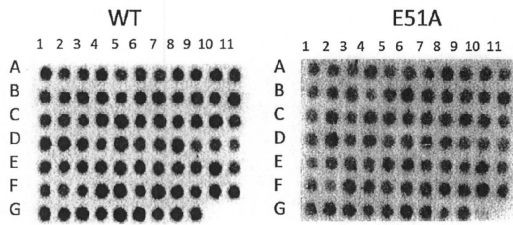


【 8 】

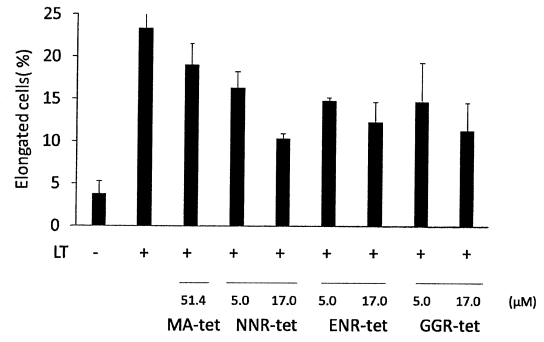
(A)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	GGR HRRR	G	A	R	D	Q	E	H	I	L	K		X-GRHRRRL(A2-B9)
B		M	F	P	S	T	Y	V	N	W	A	R	G-X-RHRRRL(B10-D5)
C		D	Q	E	H	I	L	K	M	F	P	S	GNRHRR-X(D6-F2)
D		T	Y	V	N	W	G	A	R	D	Q	E	
E		H	I	L	K	M	F	P	S	T	Y	V	
F		N	W	A	R	D	Q	E	H	I	L	K	X-NRHRRR(F3-G9)
G		M	F	P	S	T	Y	V	N	W	MA		

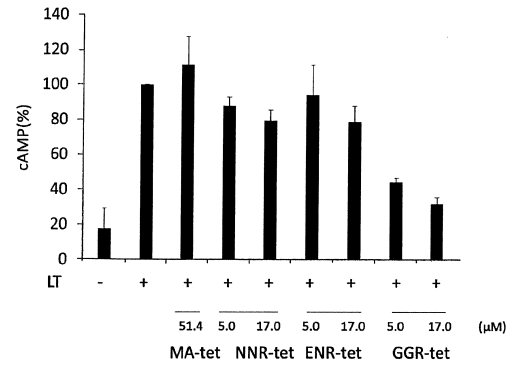
(B)



【 9 】

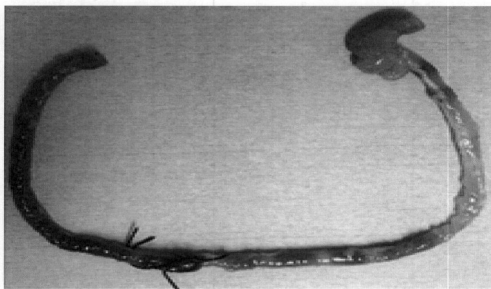


【 10 】



【 11 】

(A)



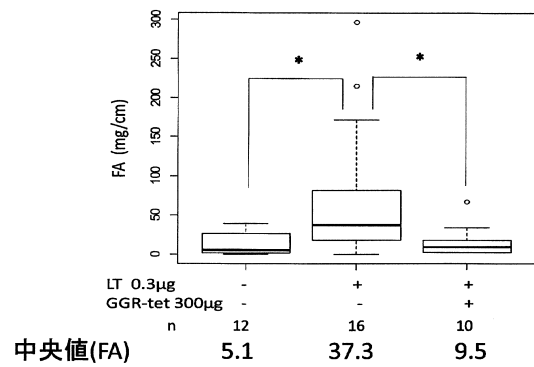
LT(-) 8h

(B)



LT(+) 1μg/ml, 8h

【 12 】



Wilcoxon rank sum test p<0.05\*

【配列表】

0006578546000001.app

---

フロントページの続き

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特開2014-198711(JP,A)  
特開2012-158525(JP,A)  
特開2011-079808(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/16

A61P 31/04

C07K 14/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)

UniProt/GeneSeq