

明 細 書

発明の名称：ペプチドとその用途

技術分野

[0001] 本願は、ペプチドとその用途に関する。

本願は、2022年12月27日出願の日本国特許出願第2022-209604号に対して優先権を主張するものであり、該出願の全内容を参照により本願に一体化させる。

背景技術

[0002] 外傷性脳損傷（Traumatic Brain Injury：TBI）は、外部からの機械的な力によって生じる脳への障害を指し、世界的に罹患率や致死率の主要な原因の一つとして認識されている。それにもかかわらず、TBIに対する治療選択肢は現在のところ限定されており、効果的な薬理学的アプローチは存在せず、主に医学的支援およびリハビリテーションから構成される。したがって、TBIの治療に効果的な薬剤の開発が望まれている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] 本願は、ペプチドとその用途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

[0004] 本発明者らは、これまでに行った独自の研究結果に基づいて配列番号：1のアミノ酸配列からなる人工配列ペプチドを設計したところ、該人工配列ペプチドが外傷性脳損傷に対して治療効果を示すことを見出した。これら知見に基づき、本願は、配列番号：1のアミノ酸配列からなる人工配列ペプチド等のペプチドとその用途を提供する。

[0005] すなわち、本願は以下を提供する。

[1]

以下から選択されるペプチドを含む、脳損傷の予防または治療に用いるための医薬組成物：

- (a) 配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド；
- (b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；および
- (c) 配列番号：1のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[2]

脳損傷が、局所性脳損傷、または、びまん性脳損傷である、[1]に記載の医薬組成物。

[3]

脳損傷が、脳挫傷、硬膜外血腫、硬膜下血腫、脳内血腫、脳しんとう、びまん性軸索損傷、およびクモ膜下出血から選択される、[1]に記載の医薬組成物。

[4]

脳損傷が、外傷性脳損傷である、[1]に記載の医薬組成物。

[5]

以下から選択されるペプチド：

- (a) 配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド；
- (b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；および
- (c) 配列番号：1のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[6]

[5]に記載のペプチドを含む、組成物。

[7]

[5]に記載のペプチドを含む、医薬組成物。

[8]

[5]に記載のペプチドをコードする核酸。

[9]

〔８〕に記載の核酸を含む、ベクター。

〔１０〕

〔８〕に記載の核酸、または、〔９〕に記載のベクターを含む、宿主細胞。

〔１１〕

〔８〕に記載の核酸、または、〔９〕に記載のベクターを含む、組成物。

〔１２〕

〔８〕に記載の核酸、または、〔９〕に記載のベクターを含む、医薬組成物。

〔Ａ１〕

以下から選択されるペプチドの有効量を対象に投与する工程を含む、脳損傷を予防または治療する方法：

（ａ）配列番号：１のアミノ酸配列を含むペプチド；

（ｂ）配列番号：１のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；および

（ｃ）配列番号：１のアミノ酸配列と約８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

〔Ａ２〕

脳損傷が、局所性脳損傷、または、びまん性脳損傷である、〔Ａ１〕に記載の方法。

〔Ａ３〕

脳損傷が、脳挫傷、硬膜外血腫、硬膜下血腫、脳内血腫、脳しんとう、びまん性軸索損傷、およびクモ膜下出血から選択される、〔Ａ１〕に記載の方法。

〔Ａ４〕

脳損傷が、外傷性脳損傷である、〔Ａ１〕に記載の方法。

〔Ａ５〕

〔Ａ１〕に規定されるペプチドの有効量を対象に投与する工程を含む、疾

患または病的状態を予防または治療する方法。

〔A 6〕

〔A 1〕に規定されるペプチドをコードする核酸、または、該核酸を含むベクターを対象に投与する工程を含む、疾患または病的状態を予防または治療する方法。

〔B 1〕

脳損傷の予防または治療に用いるための、以下から選択されるペプチド：

- (a) 配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド；
- (b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；および
- (c) 配列番号：1のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

〔B 2〕

脳損傷が、局所性脳損傷、または、びまん性脳損傷である、〔B 1〕に記載のペプチド。

〔B 3〕

脳損傷が、脳挫傷、硬膜外血腫、硬膜下血腫、脳内血腫、脳しんとう、びまん性軸索損傷、およびクモ膜下出血から選択される、〔B 1〕に記載のペプチド。

〔B 4〕

脳損傷が、外傷性脳損傷である、〔B 1〕に記載のペプチド。

〔B 5〕

疾患または病的状態の予防または治療に用いるための、〔B 1〕に規定されるペプチド。

〔B 6〕

疾患または病的状態の予防または治療に用いるための、〔B 1〕に規定されるペプチドをコードする核酸。

〔B 7〕

疾患または病的状態の予防または治療に用いるための、〔B 1〕に規定されるペプチドをコードする核酸を含むベクター。

〔C 1〕

脳損傷の予防または治療のための医薬の製造における、以下から選択されるペプチドの使用：

(a) 配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド；

(b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；および

(c) 配列番号：1のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

〔C 2〕

脳損傷が、局所性脳損傷、または、びまん性脳損傷である、〔C 1〕に記載の使用。

〔C 3〕

脳損傷が、脳挫傷、硬膜外血腫、硬膜下血腫、脳内血腫、脳しんとう、びまん性軸索損傷、およびクモ膜下出血から選択される、〔C 1〕に記載の使用。

〔C 4〕

脳損傷が、外傷性脳損傷である、〔C 1〕に記載の使用。

〔C 5〕

疾患または病的状態の予防または治療のための医薬の製造における、〔C 1〕に規定されるペプチドの使用。

〔C 6〕

疾患または病的状態の予防または治療のための医薬の製造における、〔C 1〕に規定されるペプチドをコードする核酸、または、該核酸を含むベクターの使用。

〔C 7〕

疾患または病的状態の予防または治療のための医薬の製造における、〔C

1] に規定されるペプチドをコードする核酸を含むベクターの使用。

図面の簡単な説明

[0006] [図1-1] (急性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのビームバランステストにおける踏外し回数の推移を示すグラフである (* $p < 0.05$)。

[図1-2] (急性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのビームバランステストにおける到達秒数の推移を示すグラフである (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

[図2-1] (亜急性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのビームバランステストにおける踏外し回数の推移を示すグラフである (** $p < 0.01$)。

[図2-2] (亜急性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのビームバランステストにおける到達秒数の推移を示すグラフである (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

[図3-1] (慢性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのビームバランステストにおける踏外し回数の推移を示すグラフである (** $p < 0.001$)。

[図3-2] (慢性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのビームバランステストにおける到達秒数の推移を示すグラフである (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

[図4] (慢性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのローターロードテストにおけるローターの上に留まっていられる時間の推移を示すグラフである (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

[図5] Y-迷路試験に用いた装置の写真である。同じ大きさの3本のアーム (A, B, C) が 120° で Y 字に連結されている。

[図6] (重度) 外傷性脳損傷モデルマウスの Y-maze 試験における alternation (%) (Y-maze 正解率と記載) の推移を示すグラフである。

[図7-1] (亜急性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのビームバランステストにおける踏外し回数の推移を示すグラフである (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

[図7-2] (亜急性期) 外傷性脳損傷モデルマウスのビームバランステストにおける到達秒数の推移を示すグラフである (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

発明を実施するための形態

[0007] 本願は、特定のペプチド、該ペプチドを含む組成物、該ペプチドを含む医薬組成物、該ペプチドをコードする核酸、該核酸を含む組成物、および該核

酸を含む医薬組成物を提供する。

[0008] 本願において、「ペプチド」は「人工配列ペプチド」を包含する。本願において、「人工配列ペプチド」とは、天然には存在しないアミノ酸配列を有するペプチドをいう。また、本願においては「人工配列ペプチド」を単に「人工ペプチド」とも称する。

[0009] 本願におけるペプチドとしては、例えば以下から選択されるペプチドが挙げられる：

- (a) 配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド；
- (b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；および
- (c) 配列番号：1のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。

[0010] 上記(a)から(c)に記載のペプチドは、以下から選択されるペプチドを含む：

- (1) 配列番号：1のアミノ酸配列からなるペプチド；
- (2) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド；
- (3) 配列番号：1のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるペプチド；
- (4) 配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなるペプチド；
- (5) 配列番号：2の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされる、ペプチド；および
- (6) 配列番号：2の塩基配列からなるDNAによりコードされる、ペプチド。

[0011] 上記(a)から(c)および(2)から(6)に記載のペプチドは、例えば、脳損傷における運動機能改善作用または記憶機能の回復作用を有するペプチドである。また、上記(a)から(c)および(2)から(6)に記載のペプチドは、例えば、配列番号：1のアミノ酸配列からなるペプチドと機能的に同等なペプチド（機能同等物）であり、配列番号：3、5、7、9、

11、13、15、17、19、21、23、25、27に記載のアミノ酸配列からなるペプチド等が例示される。本願において、「機能的に同等」とは、脳損傷における運動機能改善作用または記憶機能の回復作用が同等であることを意味する。これらの作用については、例えば本願実施例に記載の実験系で評価することができる。

[0012] 本願において、「複数」としては、例えば、2個～6個、2個～5個、2個～5個、2個～4個、2個～3個、または2個が挙げられる。

[0013] 本願において、「約80%以上」としては、例えば、約80%以上、約85%以上、約90%以上、約91%以上、約92%以上、約93%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上または約99%以上が挙げられる。

[0014] 本願において、「配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド」は、「配列番号：1のアミノ酸配列からなるペプチド」を包含する。本願において、「配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド」は、30～X（つまり30以上X以下）あるいは31～X（つまり31以上X以下）のアミノ酸長である。例えば、Xは、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、39、38、37、36、35、34、33、32、および31から選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0015] 本願において、「配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド」は、配列番号：1のアミノ酸配列のN末端および／またはC末端に1または複数のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるペプチドを包含する。本願において、「および／または」は、「両方またはいずれか一方」と互換的に用いられる。

[0016] 本願において、「配列番号：1のアミノ酸配列の一部からなるペプチド」は、Y～29（つまりY以上29以下）のアミノ酸長である。例えば、Yは、10、15、20、21、22、23、24、25、26、27、および28から選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0017] 本願において、「ストリンジентな条件」とは、例えば、6×SSC、40%ホ

ルムアミド、25℃でのハイブリダイゼーションと、1×SSC、55℃での洗浄といった条件を示すことができる。ストリンジェンシーは、塩濃度、ホルムアミドの濃度、あるいは温度といった条件に左右されるが、当業者であればこれらの条件を必要なストリンジェンシーを得られるように設定することができる。

[0018] ハイブリダイゼーションをストリンジェントな条件下で実施すれば、塩基配列として相同性の高いDNAが選択され、その結果として単離されるペプチドには、配列番号：1のアミノ酸配列からなるペプチドと機能的に同等なペプチドが含まれる可能性が高まる。相同性の高い塩基配列とは、例えば、約60%以上、約70%以上、または、約80%以上の同一性を示すことができる。

[0019] 配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26および28に記載の塩基配列は、それぞれ配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25および27に記載のペプチドをコードするDNAの塩基配列の一例である。本願のペプチドをコードする他のDNA配列は、当業者に公知のコドン表を用いて、ペプチドのアミノ酸残基を対応するコドンに変換する方法（逆翻訳）によって作成することができる。逆翻訳は、所望により、アミノ酸および核酸配列の解析用に開発されている種々のソフトウェア（プログラム、アルゴリズム等を含む）を利用して行うことができる。

[0020] 本願におけるペプチドは、それをコードするDNAを適当な発現系に組み込んで遺伝子組換え体（recombinant）として得ることができるし、または、人工的に合成することもできる。よって、本願におけるペプチドには、細胞を用いて製造されたペプチド、および、人工的に合成されたペプチド（いわゆるsynthetic peptide）も含まれる。

[0021] 本願におけるペプチドを遺伝子工学的な手法によって得るためには、該ペプチドをコードするDNAを適当な発現系に組み込んで発現させればよい。

[0022] 本願に応用可能なホストとしては、原核生物の細胞、真核生物の細胞が挙

げられるが、これらに限定されない。また、本願に応用可能なホストとしては、細菌（例えば大腸菌）、酵母、動物細胞（例えばHEK293細胞やCHO細胞などの哺乳動物細胞、カイコ細胞などの昆虫細胞）、植物細胞などもまた挙げられるが、これらに制限されない。

[0023] 本願に応用可能なホスト／ベクター系としては、例えば、発現ベクターpGEXと大腸菌を示すことができる。pGEXは外来遺伝子をグルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現させることができる（Gene, 67:31-40, 1988）ので、本願のペプチドをコードするDNAを組み込んだpGEXをヒートショックでBL21のような大腸菌株に導入し、適当な培養時間の後に isopropylthio- β -D-galactoside（IPTG）を添加してGST融合ペプチドの発現を誘導する。本願におけるGSTはグルタチオンセファロース4Bに吸着するため、発現生成物はアフィニティークロマトグラフィーによって容易に分離・精製することが可能である。

[0024] 本願のペプチドの遺伝子組換え体を得るためのホスト／ベクター系としては、この他にも次のようなものを応用することができる。まず細菌をホストに利用する場合には、タグ等を利用した融合タンパク質の発現用ベクターが市販されている。また、本願の遺伝子組換え体には、タグやその一部のペプチドが付加した状態のものも含まれる。

[0025] 本願のペプチドに付加されるタグとしては、本願のペプチドの活性に影響しない限り、特に制限はなく、例えば、ヒスチジンタグ（例えば6×His、10×His）、HAタグ、FLAGタグ、GSTタグ、T7-タグ、HSV-タグ、E-タグ、Ickタグ、B-タグなどが挙げられる。

[0026] 酵母では、Pichia属酵母が糖鎖を備えたタンパク質の発現に有効なことが公知である。糖鎖の付加という点では、昆虫細胞をホストとするバキュロウイルスベクターを利用した発現系も有用である（Bio/Technology, 6:47-55, 1988）。更に、哺乳動物の細胞を利用して、CMV、RSV、あるいはSV40等のプロモーターを利用したベクターのトランスフェクションが行われており、これらのホスト／ベクター系は、いずれも本願のペプチドの発現系として利用

することができる。また、プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター、センダイウイルスエンベロープベクター、パピローマウイルスベクター等のウイルスベクターを利用して遺伝子を導入することもできるが、これらに限定されるものではない。該ベクターには、遺伝子発現を効果的に誘導するプロモーターDNA配列や、遺伝子発現を制御する因子、DNAの安定性を維持するために必要な分子が含まれてもよい。

[0027] 得られた本願のペプチドは、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なペプチドとして精製することができる。ペプチドの分離、精製は、通常のペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればペプチドを分離、精製することができる。

[0028] クロマトグラフィーとしては、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Marshak et al., *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Ed Daniel R, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば、HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0029] また、本願のペプチドは、実質的に精製されたペプチドであることが好ましい。ここで「実質的に精製された」とは、本願のペプチドの精製度（タンパク質成分全体における本願のペプチドの割合）が、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、100%若しくは100%に近いことを意味する。100%に近い上限は当業者の精製技術や分析技術に依存するが、例

えば、99.999%、99.99%、99.9%、99%などである。

[0030] また、上記の精製度を有するものであれば、如何なる精製方法によって精製されたものでも、実質的に精製されたペプチドに含まれる。例えば、上述のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、または組み合わせることにより、実質的に精製されたペプチドを例示できるが、これらに限定されるものではない。

[0031] 一方、本願のペプチドを人工的に合成することも出来る。本願におけるペプチド合成法では、ペプチド液相合成法およびペプチド固相合成法等の方法によってペプチドを化学合成することができる。ペプチド固相合成法はペプチドを化学的に合成する際に、一般的に用いられる方法のひとつである。表面をアミノ基で修飾した直径0.1mm程度のポリスチレン高分子ゲルのビーズなどを固相として用い、ここから脱水反応によって1つずつアミノ酸鎖を伸長していく。目的とするペプチドの配列が出来上がったら固相表面から切り出し、目的の物質を得る。固相合成法により、バクテリア中で合成させることの難しいリボソームペプチドの合成や、D体や安定同位元素（ ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 等）置換体などの非天然アミノ酸の導入、重原子置換体（例えばセレノメチオニンなどのセレノアミノ酸）の導入、ペプチド及びタンパク質主鎖の修飾なども可能である。固相法において70から100個を超える長いペプチド鎖を合成する場合、ネイティブケミカルライゲーション法を用いて、2つのペプチド鎖を結合させる事により合成することが可能である。非修飾のペプチドだけでなく、修飾されたペプチドも、本願のペプチドに含まれる。

[0032] 本願において、核酸は、DNAおよびRNAを含む。RNAとしては、例えばmRNAが挙げられるが、これに限定されるものではない。本願の核酸は、実質的に精製された核酸であることが好ましい。非修飾の核酸だけでなく、修飾された核酸も、本願の核酸に含まれる。

[0033] 本願において、1もしくは複数のペプチド、または、1もしくは複数の核酸

を組成物に含めることができる。本願のペプチド、核酸、または本願のペプチドを含むベクターは、組成物中において、溶媒に溶解または懸濁されていてもよい。溶媒としては、水、生理食塩水、または緩衝液などが挙げられるが、これらに限定されない。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、またはリン酸緩衝液などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0034] 本願の組成物は、医薬組成物または試薬組成物として利用できる。本願において、「医薬組成物」という用語は、「医薬」、「薬剤」または「薬学的組成物」と互換的に用いられ、「試薬組成物」という用語は、「試薬」と互換的に用いられる。

[0035] 本願において、「含む医薬組成物」という用語は、「有効成分として含む医薬組成物」と互換的に用いられる。

[0036] 本願におけるペプチドまたは核酸は、外傷性脳損傷の予防または治療に用いることができる。外傷性脳損傷では、頭部への物理的衝撃により、脳実質組織の破壊、脳実質の血管の破綻、および脳表面の血管の破綻が生じる。また、硬膜やクモ膜など脳周囲の出血、脳実質の出血、および脳表面の出血は、血腫となり脳を圧迫し脳損傷を引き起こす。このような病因および／または病態を考慮すると、本願におけるペプチドは、外傷性脳損傷の治療のみならず、脳損傷の治療または予防にも用いることができると考えられる。

[0037] 本願における脳損傷としては、局所性脳損傷、びまん性脳損傷、外傷性脳損傷、脳挫傷、硬膜外血腫、硬膜下血腫、脳内血腫、脳しんとう、びまん性軸索損傷、またはクモ膜下出血が挙げられるが、これらに限定されるものではない。上記疾患は、外傷性の疾患または非外傷性（例えば内因性）の疾患を含む。上記疾患は、急性期、亜急性期、または慢性期の疾患を含む。

[0038] これら疾患に関する診断基準は周知であり、その周知の診断基準に基づき、当該疾患の予防および治療を評価することができる。

[0039] 本願のペプチドまたは核酸は、例えば、基礎研究、臨床研究等にも用いることができる。本願は、基礎研究または臨床研究のための医薬または試薬の製造における、本願のペプチドの使用もまた提供する。

- [0040] 本願における対象としては、特に制限はなく、哺乳類、鳥類、魚類等が挙げられる。哺乳類としては、ヒト又は非ヒト動物が挙げられ、例えば、ヒト、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌ、ウサギ、ハムスター、モルモット、ウマ、ヒツジ、クジラなどが例示できるが、これらに限定されるものではない。本願において、「対象」という用語は、「患者」、「個体」または「動物」と互換的に用いられる。
- [0041] 本願のペプチドもしくはそれを含む医薬組成物、本願の核酸もしくはそれを含む医薬組成物、または、本願のベクターもしくはそれを含む医薬組成物（以下、医薬組成物等と称する）の有効量が、本明細書に記載の疾患や症状の治療のために対象に投与される。
- [0042] 本願における有効量とは、本明細書に記載の疾患または病的状態の予防または治療に十分な量をいう。本願における治療には、軽減、遅延、阻止、改善、寛解、治癒、完治などが含まれるが、これらに限定されない。また本願における予防には、軽減、遅延、阻止などが含まれるが、これらに限定されない。
- [0043] 本願の医薬組成物等の投与部位に制限はなく、疾患または病的状態の症状が現れる部位もしくはその近傍、それらとは異なる部位（それら以外の部位）、疾患または病的状態の症状が現れる部位から離れた部位、疾患または病的状態の症状が現れる部位から遠位にある部位、または、疾患または病的状態の症状が現れる部位に対して遠位かつ異所である部位など、いかなる部位に投与されても、本願の医薬組成物等は、その効果を発揮することができる。
- [0044] また本願の医薬組成物等は、疾患または病的状態の症状が現れる組織とは異なる組織、疾患または病的状態の症状が現れる組織から離れた組織、疾患または病的状態の症状が現れる組織から遠位にある組織、または、疾患または病的状態の症状が現れる組織に対して遠位かつ異所にある組織など、いかなる組織に投与されても、その効果を発揮することができる。
- [0045] 本願の医薬組成物等の投与方法としては、経口投与または非経口投与が挙

げられ、非経口投与方法としては、血管内投与（動脈内投与、静脈内投与等）、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられるが、これらに限定されない。また、本願の医薬組成物等を、注射投与、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって全身または局部的（例えば、皮下、皮内、皮膚表面、眼球あるいは眼瞼結膜、鼻腔粘膜、口腔内および消化管粘膜、膣・子宮内粘膜、または損傷部位など）に投与できる。つまり、本願の医薬組成物等の投与方法としては、全身投与、局所投与などが挙げられる。

[0046] また、本願のペプチドは、該ペプチドをコードする核酸、該核酸を含むベクター、該ペプチドを分泌する細胞、該ペプチドをコードするDNAが挿入された遺伝子治療用ベクターという態様で用いることもできる。

[0047] 本願のペプチドは、該ペプチドの医薬上許容される塩の形態であってもよい。医薬上許容される塩としては、塩酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本願のペプチドは、該ペプチドの溶媒和物、または、該ペプチドの医薬上許容される塩の溶媒和物の形態であってもよい。溶媒和物とは、溶質分子に任意の数の溶媒分子が配位しているものをいい、例えば、水和物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、本願のペプチドは、あらゆる光学異性体、あるいは、構造異性体のものであってもよい。

[0048] 本願の核酸もまた、医薬上許容される塩の形態であってもよい。医薬上許容される塩としては、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、金属塩、無機塩、無機酸塩、アミン塩、低級アルカンスルホン酸塩、アリアルスルホン酸塩、有機塩、有機酸塩、アミノ酸塩等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0049] 本願の核酸は、例えば、リポソーム、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびワクシニアベクターを利用して、対象に投与され得る。

[0050] また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。本

願の医薬組成物等を投与する場合、例えば、一回の投与につき、体重1 kgあたり0.0000001mgから1000mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.00001から100000mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。本願のペプチドを分泌する細胞や該ペプチドをコードするDNAが挿入された遺伝子治療用ベクターを投与する場合も、該ペプチドの量が上記範囲内となるように投与することができる。しかしながら、本願における医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0051] 本願の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば、界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体や添加物が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類、グルコース等を挙げることができる。

[0052] なお、本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

[0053] 本発明は、下記の実施例によってさらに例示されるが、それらに限定されるものではない。

実施例

[0054] 実施例 1

急性期外傷性脳損傷に対する人工配列ペプチドの有効性の評価

[0055] (1) 材料および方法

i) ペプチドの製造

配列番号：1のアミノ酸配列からなる人工配列ペプチドを化学的に合成した（得られたペプチドはトリフルオロ酢酸または塩酸（TFAまたはHCl）塩の形態である）。

[0056] ii) 外傷性脳損傷（TBI）モデルマウスの作製

日本クレア社より購入したC57BL/6J Jcl雄性マウス（8週齢）を用いて、5日以上馴化した。手術前に、マウスを吸入によりイソフルランで麻酔し、マウスの頭頂部を剪毛した後、マウスの頭部を脳位固定装置にセットした。70%エタノールで頭頂部を消毒した後、メスにて頭頂の皮膚を正中切開した。筋膜を綿棒で除去し、頭蓋骨を露出させ、ブレグマを確認し、ブレグマから右外側2 mm、尾側2 mmの頭蓋骨に印を付け、この印を中心に周囲に直径3 mmの円を描き、歯科用ドリルを用いて、円に沿って骨を削り、硬膜に達したらピンセットで頭蓋骨片をゆっくり取り外した。出血のある場合は綿棒で拭き止血した。次いで、インパクト（ライカ社）を用いて、直径2 mm、深度1.0 mm、速度4.0 m/秒、時間0.2秒、斜度10度でマウスの皮質表面に対して垂直に外傷性の挫傷を生じさせた。この手順は、外傷性脳損傷に関する研究を実施する研究者によって広く用いられ、損傷の最も一貫性があり再現性のある形態である。損傷後、マウスを脳位固定装置から外し、呼吸を確保した。切開部分をクリップで簡易縫合し、ゲンタシンを塗布した後、ホームケージに戻した。偽手術（Sham）マウスは、頭蓋骨を取り外してインパクトによる挫傷を生じさせる行為なしで、上記と同じ外科的処置を施した。硬膜の破れや傷のあるものは作製時に除外し、それ以後の実験に使用しないこととした。

[0057] iii) ペプチドの投与

上記の通り作製した外傷性脳損傷モデルマウスを人工配列ペプチド投与群（n=6）と対照群（n=6）に分けた。ペプチド（塩酸塩）（ $1.39\text{mg/kg} \div 0.3\text{ }\mu\text{mol/kg}$ ）の投与は、TBI手術3時間後に1回（投与容量10mL/kg）行った。対照群には、同じタイミングで生理食塩水を同様の投与容量で尾静脈に注入した。また、偽手術（Sham）マウス（n=6）にも、対照群と同様に生理食塩水を尾静

脈注入した。

[0058] i v) 運動機能の評価

運動機能の評価は、ビームバランステスト (Beam balance test) により行った。具体的には、長さ 1 m、幅 1 cm のステンレス棒を、傾斜 10° で手前 (スタート地点とする) から奥にかけて、その上を自発歩行させた。スタート地点からマウスが渡りきるまでに要した時間 (到達秒数) とその間に踏外した回数をカウントした。試験はペプチド投与前に実施し、基本的には 1 日 1 回、週に 1 回行った。なお、TBI 手術前に、1 匹のマウスにつき 2 回、2 日間に分けて訓練を実施した。

[0059] v) 統計処理方法

各測定値は、平均値および標準誤差 (mean ± SEM) で表した。対照群とペプチド投与群で踏外し回数は Mann-Whitney U test、到達秒数は Student-t test を行い、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、および $p < 0.001$ の場合に統計学的に有意差があるとみなした。

[0060] (2) 結果

ペプチド投与群では、ビームバランステストにおいて、対照群に比べて、有意な踏外し回数の低減 (* $p < 0.05$) および到達秒数の低減 (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$) が認められた (図 1-1 および図 1-2)。以上の結果より、急性期の外傷性脳損傷における運動機能改善に対する本人工配列ペプチドの有効性が示された。

[0061] 実施例 2

亜急性期外傷性脳損傷に対する人工配列ペプチドの有効性の評価

[0062] (1) 材料および方法

i) 外傷性脳損傷モデルマウスの作製

実施例 1 と同様の方法により、外傷性脳損傷モデルマウスと偽手術 (Sham) マウスを作製した。

[0063] i i) ペプチドの投与

上記の通り作製した外傷性脳損傷モデルマウスをペプチド投与群 (n=6) と

対照群 (n=6) に分けた。ペプチド (トリフルオロ酢酸塩) ($1.77\text{mg/kg} \div 0.3 \mu\text{mol/kg}$) の投与は、TBI手術後14日目に1回尾静脈注入 (投与容量 10mL/kg) により行った。対照群には、生理食塩水を同タイミング、同様の投与容量で尾静脈に注入した。また、偽手術 (Sham) マウス (n=6) にも、対照群と同様に生理食塩水を尾静脈注入した。

[0064] i i i) 運動機能の評価

実施例 1 と同様に、運動機能の評価はビームバランステスト (Beam balance test) により行った。

[0065] (2) 結果

ペプチド投与群では、ビームバランステストにおいて、対照群に比べて、有意な踏外し回数の低減 (** $p < 0.01$) および到達秒数の低減 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) が認められた (図 2-1 および図 2-2)。以上の結果より、亜急性期の外傷性脳損傷における運動機能改善に対する本人工配列ペプチドの有効性が示された。

[0066] 実施例3

慢性期外傷性脳損傷に対する人工配列ペプチドの有効性

[0067] (1) 材料および方法

i) 外傷性脳損傷モデルマウスの作製

実施例 1 と同様の方法により、外傷性脳損傷モデルマウスと偽手術 (Sham) マウスを作製した。

[0068] i i) ペプチドの投与

上記の通り作製した外傷性脳損傷モデルマウスをペプチド投与群 (n=10) と対照群 (n=10) に分けた。ペプチド (トリフルオロ酢酸塩) ($3\text{mg/kg} \div 0.5 \mu\text{mol/kg}$) の投与は、TBI手術後48日目から1日1回5日間連続投与した後、翌週から週2回投与の合計16回尾静脈注入 (投与容量 10mL/kg) により行った。対照群には、生理食塩水を同タイミング、同様の投与容量で尾静脈に注入した。また、偽手術 (Sham) マウス (n=9) にも、対照群と同様に生理食塩水を尾静脈注入した。

[0069] i i i) 運動機能の評価

実施例1と同様に、運動機能の評価はビームバランステストを採用した。さらに、ローターロッドテスト (R o t o r o d t e s t) を実施した。具体的には、1匹のマウスにつき10rpm、2分間の訓練を実施し、30分間休ませた後、本番の試験は、R o t o r o dの設定を5分間で0から40rpmまで加速させる。マウスをローターの上にのせて回転速度についていけなくなるまでの時間(秒数)を測定した。なお、手術3日前から2日間、1マウスにつき1日1回、10rpm、2分間で事前訓練を行った。

[0070] i v) 統計処理方法

各測定値は、平均値および標準誤差(mean±SEM)で表した。対照群とペプチド投与群で踏外し回数はMann-Whitney U test、到達秒数およびローターロッドにおける時間はStudent-t testを行い、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、および $p<0.001$ の場合に統計学的に有意差があるとみなした。

[0071] (2) 結果

ペプチド投与群では、ビームバランステストにおいて、対照群に比べて、有意な踏外し回数の低減 (** $p<0.001$) および到達秒数の低減 (** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$) が認められた(図3-1および図3-2)。また、ローターロッドテストにおいても、ペプチド投与群では、対照群に比べ、ローターの上に留まっていられる時間が有意に増加した (** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$) (図4)。以上の結果より、慢性期の外傷性脳損傷においても、本人工配列ペプチドの運動機能に対する改善効果が認められた。

[0072] 実施例4重度外傷性脳損傷に対する人工配列ペプチドの有効性の評価

[0073] (1) 材料および方法

i) 重度外傷性脳損傷(TBI)モデルマウスの作製

インパクトで挫傷を生じさせる条件(深度のみを2.0mm)を変更したことを除き、実施例1と同様の方法により、外傷性脳損傷モデルマウスと偽手術(Sham)マウスを作製した。インパクトの深度を深くすることでより重

症度の高い外傷性脳損傷モデルマウスの作製が可能となる。

[0074] i i) ペプチドの投与

上記の通り作製した外傷性脳損傷モデルマウスをペプチド投与群 (n=9) と対照群 (n=9) に分けた。ペプチド (塩酸塩) ($1.39\text{mg/kg} \div 0.3\mu\text{mol/kg}$) の投与は、TBI手術後32日目から1日1回5日間連続投与した後、翌週から週2回投与の合計16回尾静脈注入 (投与容量 10mL/kg) により行った。対照群には、生理食塩水を同タイミング、同様の投与容量で尾静脈に注入した。また、偽手術 (Sham) マウス (n=7) にも、対照群と同様に生理食塩水を尾静脈注入した。

[0075] i i i) 運動機能の評価

実施例3と同様に、運動機能の評価はビームバランステストとローターロッドテストにより行った。

[0076] i i i) 記憶機能の評価

記憶機能の評価は、Y-迷路試験 (Y-maze test) により行った。試験は、図5に示すような3本の同じ大きさのアーム (仮に、A, B, C) がY字に連結された装置を用いた。具体的には、Cに向かう入口を板で塞ぎ、2方向 (A, B) のみ歩行可能にして1マウスにつき3分間訓練を行った後、Y字型迷路の記録はマウスがY字のAからB、C・・・と進入した方向 (アルファベットA or B or C) を1匹あたり8分間記録した。その際、体全体が各エリア内に入った場合に進入と判断した。3回連続で異なるアームに進入した回数 (例えば、A→B→Cとなれば、カウントする。よって、A→B→Aの場合は、カウントしない) と総アーム進入回数をカウントした。空間作業記憶の指標 (交替反応 alternation) は以下の式により算出した。

$$\text{[0077]} \quad \text{Alternation (\%)} = \frac{\text{交替行動数 (3回連続で違うアームに入った数)}}{\text{総アーム進入回数} - 2} \times 100$$

[0078] i v) 統計処理方法

各測定値は、平均値および標準誤差 (mean±SEM) で表した。対照群とペプチド投与群で踏外し回数はMann-Whitney U test、到達秒数およびローターロ

ッドにおける時間はStudent-t testを行い、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 、および $p<0.001$ の場合に統計学的に有意差があるとみなした。

[0079] (2) 結果

ペプチド投与群では、ビームバランステストにおいて、対照群に比べて、有意な踏外し回数の低減および到達秒数の低減が認められ、また、ロータールットテストにおいても、ペプチド投与群では、対照群に比べ、ローターの上に留まっていられる時間が有意に増加した（図は示していない）。さらに、Y-迷路試験において、ペプチド投与群では、対照群と比べて、記憶機能の回復傾向が認められた（図6）。以上の結果より、重度の外傷性脳損傷に対しても、本人工配列ペプチドの有効性が認められた。

[0080] 実施例5

亜急性期外傷性脳損傷に対する人工配列ペプチドの有効性の評価

[0081] (1) 材料および方法

i) ペプチドの製造

配列番号：3のアミノ酸配列からなる人工配列ペプチドを化学的に合成した（得られたペプチドは塩酸（HCl）塩の形態である）。

[0082] ii) 外傷性脳損傷モデルマウスの作製

実施例1と同様の方法により、外傷性脳損傷モデルマウスを作製した。

[0083] iii) ペプチドの投与

上記の通り作製した外傷性脳損傷モデルマウスをペプチド投与群（ $n=6$ ）と対照群（ $n=6$ ）に分けた。ペプチド（塩酸塩）（ $1.28\text{mg/kg} \div 0.3\mu\text{mol/kg}$ ）の投与は、TBI手術後14日目に1回尾静脈注入（投与容量 10mL/kg ）により行った。対照群には、生理食塩水を同タイミング、同様の投与容量で尾静脈に注入した。

[0084] iv) 運動機能の評価

実施例1と同様に、運動機能の評価はビームバランステスト（Beam balance test）により行った。

[0085] (2) 結果

ペプチド投与群では、ビームバランステストにおいて、対照群に比べて、有意な踏外し回数の低減（* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ ）および到達秒数の低減（* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ ）が認められた（図7-1および図7-2）。以上の結果より、配列番号：3のアミノ酸配列からなるペプチドについても、配列番号：1のアミノ酸配列からなるペプチド同様に、亜急性期の外傷性脳損傷における運動機能改善に対する有効性が示された。

[0086] また、配列番号：5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25および27のアミノ酸配列からなるペプチド（塩酸塩の形態）を上記のように合成、ならびに、調製し、実施例5と同様の試験を行ったところ、外傷性脳損傷における運動機能の改善傾向が認められた。

産業上の利用可能性

[0087] 本願のペプチドまたは核酸は、脳損傷の予防または治療に用いることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 以下から選択されるペプチドを含む、脳損傷の予防または治療に用いるための医薬組成物：
- (a) 配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド；
 - (b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；および
 - (c) 配列番号：1のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。
- [請求項2] 脳損傷が、局所性脳損傷、または、びまん性脳損傷である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 脳損傷が、脳挫傷、硬膜外血腫、硬膜下血腫、脳内血腫、脳しんとう、びまん性軸索損傷、およびクモ膜下出血から選択される、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 脳損傷が、外傷性脳損傷である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 以下から選択されるペプチド：
- (a) 配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチド；
 - (b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含むペプチド；および
 - (c) 配列番号：1のアミノ酸配列と約80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチド。
- [請求項6] 請求項5に記載のペプチドを含む、組成物。
- [請求項7] 請求項5に記載のペプチドを含む、医薬組成物。
- [請求項8] 請求項5に記載のペプチドをコードする核酸。
- [請求項9] 請求項8に記載の核酸を含む、ベクター。
- [請求項10] 請求項8に記載の核酸、または、請求項9に記載のベクターを含む、宿主細胞。

[請求項11] 請求項8に記載の核酸、または、請求項9に記載のベクターを含む、組成物。

[請求項12] 請求項8に記載の核酸、または、請求項9に記載のベクターを含む、医薬組成物。