

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 506410

(P2003 - 506410A)

(43)公表日 平成15年2月18日(2003.2.18)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コード* (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
45/00		A 6 1 P 31/12	4 B 0 6 3
A 6 1 P 31/12		31/18	4 C 0 8 4
31/18		C 0 7 K 5/08	4 H 0 4 5
C 0 7 K 5/08		C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 96数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 514972(P2001 - 514972)

(86) (22)出願日 平成12年6月29日(2000.6.29)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月12日(2002.2.12)

(86)国際出願番号 PCT/IB00/00961

(87)国際公開番号 W001/010456

(87)国際公開日 平成13年2月15日(2001.2.15)

(31)優先権主張番号 09/370,368

(32)優先日 平成11年8月9日(1999.8.9)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 トリベップ アクチ ボラゲット  
スウェーデン エス - 141 57 フディング  
ハルソバゲン 7

(72)発明者 パールネ, アンダーズ  
スウェーデン ホバス エス - 436 50 ウ  
エンデルスバーグ 4

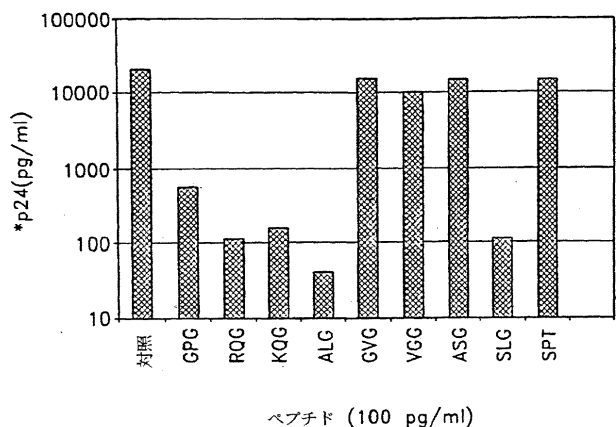
(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウィルス感染性を阻止するペプチドおよびその使用方法

(57)【要約】

ヒト免疫不全症候群ウィルス ( H I V ) 感染を含むウィルス感染を阻害する、アミド型のペプチドの発見を開示する。 H I V 感染等のウィルス感染の治療および予防のための薬剤での使用を含む、ペプチドの使用の方法もまた開示される。



\*感染後7日目

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 ウィルスに感染した宿主細胞でのウィルス複製を阻害するための組成物であって、式 $X_1X_2X_3-NH_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量含み、前記ペプチドは $Gly-Pro-Gly-NH_2$ ではなく、さらに前記組成物はウィルスのカプシド集合を阻害することでウィルス複製を阻害する組成物。

【請求項2】 前記ペプチドは、式： $Gly-Lys-Gly-NH_2$ 、 $Arg-Gln-Gly-NH_2$ 、 $Cys-Gln-Gly-NH_2$ 、 $Lys-Gln-Gly-NH_2$ 、 $Ala-Leu-Gly-NH_2$ 、 $Gly-Val-Gly-NH_2$ 、 $Val-Gly-Gly-NH_2$ 、 $Ala-Ser-Gly-NH_2$ 、 $Ser-Leu-Gly-NH_2$ 、および $Ser-Pro-Thr-NH_2$ を有するペプチドからなる群から選択される請求項1に記載の組成物。

【請求項3】  $X_3$ はグリシンである請求項1に記載の組成物。

【請求項4】 前記アミド型のペプチドは、式 $X_4X_5X_1X_2X_3-NH_2$ （式中、 $X_4$ および $X_5$ は任意のアミノ酸）を有し、任意の1個または2個のアミノ酸が欠けている請求項1に記載の組成物。

【請求項5】 前記トリペプチド $X_1X_2X_3$ は前記ウィルスのカプシドタンパク質のアミノ酸配列中に見いだされる、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】 前記ペプチドは支持体に結合している請求項1に記載の組成物。

【請求項7】 前記ペプチドは薬学的に許容可能な担体を有する薬剤に組み込まれている請求項1に記載の組成物。

【請求項8】 式： $Gly-Lys-Gly-NH_2$ を有するアミド型のペプチド。

【請求項9】 支持体に結合した請求項8に記載のペプチド。

【請求項10】 式： $Arg-Gln-Gly-NH_2$ を有するアミド型のペプチド。

【請求項11】 支持体に結合した請求項10に記載のペプチド。

【請求項12】 式： $Cys-Gln-Gly-NH_2$ を有するアミド型の

ペプチド。

【請求項13】 支持体に結合した請求項12に記載のペプチド。

【請求項14】 式： $\text{Lys} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ を有するアミド型のペプチド。

【請求項15】 支持体に結合した請求項14に記載のペプチド。

【請求項16】 式： $\text{Ala} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ を有するアミド型のペプチド。

【請求項17】 支持体に結合した請求項16に記載のペプチド。

【請求項18】 式： $\text{Ser} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ を有するアミド型のペプチド。

【請求項19】 支持体に結合した請求項18に記載のペプチド。

【請求項20】 宿主細胞でのHIV複製を阻害する方法であって、式 $X_1 X_2 X_3 - \text{NH}_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量、前記細胞に投与することを含み、前記ペプチドは $\text{Gly} - \text{Pro} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ ではない方法。

【請求項21】 前記ペプチドは、式： $\text{Gly} - \text{Lys} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Arg} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Cys} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Lys} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ala} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Gly} - \text{Val} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Val} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ala} - \text{Ser} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ser} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、および $\text{Ser} - \text{Pro} - \text{Thr} - \text{NH}_2$ を有するペプチドからなる群から選択される請求項20に記載の方法。

【請求項22】 ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤からなる群から選択される抗ウイルス治療薬を投与する過程をさらに含む請求項20に記載の方法。

【請求項23】 前記ペプチドは支持体に結合している請求項20に記載の方法。

【請求項24】 前記ペプチドは薬学的に許容可能な担体を含む薬剤中で投与される、請求項20に記載の方法。

【請求項25】 宿主細胞でのHIV複製を阻害するための組成物であって、式： $X_1X_2X_3-NH_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量含み、前記ペプチドは、Gly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>ではなく、前記組成物はカプシドの集合体を遮ることでHIV複製を阻害する組成物。

【請求項26】 前記ペプチドは、式：Gly-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>、Arg-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Cys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Lys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、Gly-Val-Gly-NH<sub>2</sub>、Val-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>、Ser-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、およびSer-Pro-Thr-NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択される請求項25に記載の組成物。

【請求項27】  $X_3$ はグリシンである請求項25に記載の組成物。

【請求項28】 前記アミド型のペプチドは、式 $X_4X_5X_1X_2X_3-NH_2$ （式中、 $X_4$ および $X_5$ は任意のアミノ酸である）を有し、任意の1個または2個のアミノ酸が欠けている請求項25に記載の組成物。

【請求項29】 前記トリペプチド $X_1X_2X_3$ はHIVのカプシドタンパク質のアミノ酸配列に見いだされる請求項25に記載の組成物。

【請求項30】 前記ペプチドは支持体に結合している請求項25に記載の組成物。

【請求項31】 前記ペプチドは薬学的に許容可能な担体を有する薬剤に組み込まれている請求項25に記載の組成物。

【請求項32】 宿主細胞でのウィルス複製を阻害するための方法であって、式： $X_1X_2X_3-NH_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量、前記細胞に投与することを含み、前記ペプチドはGly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>ではない方法。

【請求項33】 前記ペプチドは、式：Gly-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>、Arg-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Cys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Lys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、Gly-Val-Gly-NH<sub>2</sub>、Val-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>

、Ser - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、およびSer - Pro - Thr - NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択される請求項32に記載の方法。

【請求項34】ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤からなる群から選択される抗ウイルス治療薬を投与する過程をさらに含む請求項32に記載の方法。

【請求項35】前記ペプチドは支持体に結合している請求項32記載の方法。

【請求項36】前記ペプチドは薬学的に許容可能な担体を含む薬剤中で投与される、請求項32に記載の方法。

【請求項37】ウィルスカプシド集合を遮るための方法であって、式： $X_1X_2X_3 - NH_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量、細胞と接触させることを含み、前記ペプチドはGly - Pro - Gly - NH<sub>2</sub>ではない方法。

【請求項38】前記ペプチドは式：Gly - Lys - Gly - NH<sub>2</sub>、Arg - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Cys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Lys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、Gly - Val - Gly - NH<sub>2</sub>、Val - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Ser - Gly - NH<sub>2</sub>、Ser - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、およびSer - Pro - Thr - NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択される請求項37に記載の方法。

【請求項39】 $X_3$ はグリシンである請求項37に記載の方法。

【請求項40】前記アミド型のペプチドは、式 $X_4X_5X_1X_2X_3 - NH_2$ （式中、 $X_4$ および $X_5$ は任意のアミノ酸である）を有し、任意の1個または2個のアミノ酸が欠けている請求項37に記載の方法。

【請求項41】前記トリペプチド $X_1X_2X_3$ は前記ウィルスのタンパク質のアミノ酸配列に見いだされる請求項37に記載の方法。

【請求項42】前記ペプチドは支持体に結合している請求項37に記載の組成物。

【請求項43】抗ウイルス薬剤へ組み込むためのペプチド剤を同定するた

めの方法であって、

ウィルスが感染した複数の細胞に対して、ペプチドがGly - Pro - Gly - NH<sub>2</sub>ではない有効量のペプチド剤を接触させ、

不完全なカプシド形成について前記ウィルスを分析し、

不完全なカプシド形成を誘導するペプチド剤を選択すること、

を含む方法。

【請求項44】 前記カプシド形成の分析は顕微鏡を用いる、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 前記ウィルスは、HIV - 1、HIV - 2、およびSIVからなる群から選択される請求項43に記載の方法。

【請求項46】 前記ペプチド剤は、トリペプチド、オリゴペプチド、およびペプチド疑似体からなる群から選択される請求項43に記載の方法。

【請求項47】 前記ペプチド剤は、式：Gly - Lys - Gly - NH<sub>2</sub>、Arg - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Cys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Lys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、Gly - Val - Gly - NH<sub>2</sub>、Val - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Ser - Gly - NH<sub>2</sub>、Ser - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、およびSer - Pro - Thr - NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択される請求項43に記載の方法。

【請求項48】 前記ペプチド剤は、p24のアミノ酸配列と一致するアミノ酸配列を有する請求項43に記載の方法。

【請求項49】 ウィルスタンパク質に結合するペプチド剤を同定するための方法であって、

ウィルスタンパク質を提供し、

Gly - Pro - Gly - NH<sub>2</sub>ではない有効量のペプチド剤と前記ウィルスタンパク質とを接触させ、

前記ウィルスタンパク質と前記ペプチド剤とを含む複合体の形成を検出すること、

を含む方法。

【請求項50】 前記ウィルスタンパク質は、HIV - 1、HIV - 2、お

およびS I Vからなる群から選択されるウイルス由来である請求項49に記載の方法。

【請求項51】 前記ペプチド剤は、トリペプチド、オリゴペプチド、およびペプチド疑似体からなる群から選択される請求項50に記載の方法。

【請求項52】 前記ペプチド剤は、式： $\text{Gly} - \text{Lys} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Arg} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Cys} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Lys} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ala} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Gly} - \text{Val} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Val} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ala} - \text{Ser} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ser} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、および $\text{Ser} - \text{Pro} - \text{Thr} - \text{NH}_2$ を有するペプチドからなる群から選択される請求項50に記載の方法。

【請求項53】 請求項49で同定されたペプチド剤を薬剤に組み込むことを含む薬剤の製造方法。

【請求項54】 薬剤を製造するための方法であって、

式： $\text{X}_1\text{X}_2\text{X}_3 - \text{NH}_2$ （式中、 $\text{X}_1$ 、 $\text{X}_2$ 、および $\text{X}_3$ は任意のアミノ酸である）を有し、かつ $\text{Gly} - \text{Pro} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ ではない、有効量のアミド型のペプチドを細胞に投与し、

前記細胞内でのウイルス複製阻害を検出し、そして

前記薬剤の中に前記ウイルス複製阻害を引き起こすペプチドを組み込むこと、を含む方法。

【請求項55】 前記ペプチドは、式： $\text{Gly} - \text{Lys} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Arg} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Cys} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Lys} - \text{Gln} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ala} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Gly} - \text{Val} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Val} - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ala} - \text{Ser} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、 $\text{Ser} - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{NH}_2$ 、および $\text{Ser} - \text{Pro} - \text{Thr} - \text{NH}_2$ を有するペプチドからなる群から選択される請求項54に記載の方法。

【請求項56】 ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤からなる群から選択される抗ウイルス化合物を前記薬剤の中に組み込む過程をさらに含む請求項54に記載の方法。

【請求項57】 薬剤に担体を組み込む過程をさらに含む請求項54に記載の方法。

【請求項58】 ウィルスに感染した宿主細胞でのウィルス複製を阻害する組成物であって、式： $X_1X_2X_3 - R$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有し、かつGly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>ではないペプチドを有効量含み、Rは前記ペプチドのカルボキシル末端に結合した修飾基であり、またRはアミド基、または類似の電荷および立体バルクを有する他の部分を含み、前記組成物はウィルスカプシド集合を遮ることでウィルス複製を阻害する組成物。

【請求項59】 前記ペプチドは、式：Gly-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>、Arg-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Cys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Lys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、Gly-Val-Gly-NH<sub>2</sub>、Val-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>、Ser-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、およびSer-Pro-Thr-NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択される請求項58に記載の組成物。

【請求項60】  $X_3$ はグリシンである請求項58に記載の組成物。

【請求項61】 前記ペプチドは、式： $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_1X_2X_3 - R$ （式中、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_8$ 、 $X_9$ 、および $X_{10}$ は任意のアミノ酸である）を有し、任意の1、2、4、5、6、または7個のアミノ酸が欠けており、Rは前記ペプチドのカルボキシル末端に結合した修飾基であり、さらにRはアミド基、または類似の電荷および立体バルクを有する他の部分を含む請求項58に記載の組成物。

【請求項62】 前記ペプチド $X_1X_2X_3$ は、前記ウィルスのカプシドタンパク質のアミノ酸配列に見いだされる請求項58に記載の組成物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## [発明の分野]

本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染等のウイルス感染を阻止するペプチドの発見に関する。特に、HIV感染等のウイルス感染の治療および予防で使用するために、種々の小さなペプチドを含む医薬品が開示されている。

**【0002】**

## [発明の背景]

全てのウイルスは、コアを含有する核酸を包む、タンパク質からなる外殻から構成される。ウイルスの核酸を直接包んでるタンパク質外殻は、カプシドと呼ばれている。一方、カプシドと核酸との両方を有する完全なタンパク質-核酸複合体はヌクレオカプシドと呼ばれる。アレナウイルス、ロタウイルス、オルビウイルス、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、パピローマウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、ミクソウイルス、およびヘパドナウイルス(hepadnavirus)は全てそのような一般的な構造的特徴を示す(Virology, Fields ed., third edition, Lippencott-Raven publishers, pp 1513, 1645, 1778, 2047, 2113, 2221, and 2717 (1996))。

**【0003】**

カプシドは、多くのサブユニット(キャプソマー)から構成され、キャプソマーはタンパク質のいくつかのホモまたはヘテロポリマーから形成される。ウイルス集合体内のキャプソマー間の非共有結合は、折り畳みタンパク質のドメインを安定化させるものと同種である。2つのサブユニット間の界面は単一のドメインによく似ており、アミノ酸側鎖が互いに強く束ねられている。分析されたウイルス構造のほとんどに共通した特徴は、1個のキャプソマーからのポリペプチド鎖は隣接するキャプソマードメインの下または上に伸ばすことができることである。そのような伸ばしたポリペプチドの腕が他のポリペプチドの腕に絡まり、疎水性相互作用、水素結合、および塩橋が生ずることによってカプシドが安定化するための補助となる。個々のキャプソマー間の接触は、またいくつかのウイルスにとってはコアタンパク質との接触は、全体的なカプシド構造を決めるもので、ま

た多数の同一のキャプソマーがかかっている場合、接触の繰り返しが生じ、結果として得られる構造が対称性を持ったものとなる (Virology, Fields ed., third edition, Lippencott-Raven publishers, p 62 (1996))。

#### 【0004】

いくつかの単純なウィルスは、その解離した構成要素から自然発生的に形成され、一方他のウィルスでは集合の誘発にキャプソマーの酵素触媒修飾を必要とする。ウィルスの自己集合は、好ましい結合条件下でタンパク質サブユニット間の相互作用の安定性によって促進される。より複雑なウィルスは、自己集合プロセスを行った複数の亜集合(subassemblies)からしばしば構築される (Virology, Fields ed., third edition, Lippencott-Raven publishers, pp 62, 70, 1646 and 1888 (1996))。多くのウィルスのカプシドはタンパク質組成の点で異なるが、一般的なウィルス構造のデザインは、タンパク質のいくつかのホモまたはヘテロポリマーから順々に構成される重合したキャプソマーによって特徴づけられるように進化してきた。

#### 【0005】

H I Vは、ヒトに感染して後天性免疫不全症候群 ( A I D S ) を引き起こすレンチウィルスに付けられた名称である。ヒト由来のレンチウィルス分離株は、血清学的性質、および分子クローニングしたウィルスゲノムの配列分析に基づいて2通りのタイプ ( H I V - 1 および H I V - 2 ) のうちの一つに区分化される。遺伝学的に識別可能なレンチウィルスは、ヒト以外のいくつかの霊長類種、例えばアフリカミドリザル、スーティーマンガベイ (sooty magabays)、マンドリル、チンパンジー、およびサイケ ( syke ) から得られている。集合的に、ヒト以外の霊長類由来のレンチウィルス分離株を S I V と呼ぶ。配列分析によって、いくつかの S I V 株ならびに H I V - 1 および H I V - 2 株のゲノムが高度の相同性を示すことが明らかにされている。さらに、電子顕微鏡によって H I V および S I V の超構造が、両方ともエンベロープ糖タンパク質スパイクを含む脂質二重層膜によって囲まれた円錐形のヌクレオカプシドを持つ直径約 1 1 0 n m のビリオンを有する点で、類似していることが明らかにされている (Virology, Fields ed., third edition, Lippencott-Raven publishers, pp 1882-1883 (1996))。

## 【0006】

H I Vは、少なくとも7つの遺伝子を含む複合レトロウイルスである。g a g、p o l、およびe n vと呼ばれるウイルスの構造遺伝子は、それぞれウイルスコアタンパク質、逆転写酵素、およびウイルスエンベロープのウイルス糖タンパク質をコードする。残りのH I V遺伝子は、ウイルス複製に關与するアクセサリ遺伝子(accessory gene)である。g a gおよびe n v遺伝子は、ポリタンパク質をコードするもので、すなわちそれらの遺伝子の各々から合成されたタンパク質が翻訳後いくつかのより小さなタンパク質に切断されている。

## 【0007】

H I VおよびS I Vのビリオンの全体的な形状が球形であるにもかかわらず、ヌクレオカプシドは非対称的であって、長さが約100 nm、幅広の自由端部の幅が約40~60 nm、および狭い端部の幅が約20 nmである。各成熟ビリオン内のヌクレオカプシドは、G a g前駆体ポリペプチドからタンパク質分解を生ずるようにプロセシングされたタンパク質によって封入されたウィルス一本鎖RNAゲノムの2分子から構成される。ウィルスによってコードされたプロテアーゼ(P R)によって行われるg a g遺伝子ポリタンパク質P r 5 5<sup>gag</sup>の切断によって、複数の成熟カプシドタンパク質が生成される。それらのg a g遺伝子産物は、ヌクレオカプシドとビリオンエンベロープとの間に位置するものと考えられているマトリックスタンパク質(p 17)、カプシド外殻を形成する主カプシドタンパク質(p 24)、およびウィルスRNAゲノムに結合するヌクレオカプシドタンパク質(p 9)である。このような感染細胞でのタンパク質分解を生ずるプロセシングは、ビリオン形態形成に關連している(Virology, Fields ed., third edition, Lippencott-Raven publishers, pp 1886-1887 (1996))。

## 【0008】

主カプシドタンパク質p 24(C Aとも呼ぶ)は、約240個のアミノ酸を含み、24~27 k Dの分子量を示す。タンパク質p 24は自己結合することで二量体、および十二量体ほどの大きさのオリゴマー複合体を形成する。H I V - 1 g a gポリタンパク質における突然変異を用いた遺伝子研究によって、分子のC末端側半分と多様なレトロウイルスのp 24タンパク質に保存されているアミノ

酸20個に及び主相同領域(MHR)とを含むいくつかの機能的ドメインがp24タンパク質にあることがわかった。これらの突然変異は、前駆体ヌクレオカプシド集合に影響を及ぼすと思われる(Virology, Fields ed., third edition, Lippencott-Raven publishers, pp 1888-1889 (1996))。

#### 【0009】

AIDSの病原体としてHIV-1が発見されてから、ウィルスが疾患を生じさせるメカニズムを理解する上で、著しい進歩がなされてきた。多くの診断学的検査が開発される一方で、ウィルスの非均一的な性質と適当な動物モデルを欠いていることが大きな原因となり、HIVワクチン治療の進歩は遅れている(Martin, Nature, 345:572-573 (1990)を参照)。

#### 【0010】

多くの薬学的作用物質がAIDS治療の試みに使用されてきた。しかし、すべてを網羅していないかもしれないが、それらの薬物の多くは、治療薬としての有用性を大きく制限する重大な副作用を生ずる。HIV逆転写酵素は、ウィルス複製における重要な役割を持つことから、薬物標的の一つである。いくつかのヌクレオシド誘導体がHIV逆転写酵素を阻害することがわかっており、誘導体としてはアジドチミジン(AZT、チドビジン)が挙げられる。AZTは、多くの患者がその投与に耐えることができないほどの重大な副作用を引き起こす。HIV逆転写酵素を阻害する他のヌクレオシド類似体がAZTよりも大きな副作用を引き起こすことがわかっている。別の薬物標的は、ウィルスの分化に重要であるHIVプロテアーゼ(PR)である。PRはアスパラギン酸プロテアーゼであり、合成化合物によって阻害し得る(Richards, FEBS Lett., 253:214-216 (1989))。プロテアーゼ阻害剤は、逆転写酵素阻害剤よりも効果的にHIVの増殖を阻害するが、長期に及び治療はリポジストロフィ、高脂血症、およびインシュリン耐性等の代謝疾患と結びつく。

#### 【0011】

さらに、HIVはヌクレオシド/ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤に対する耐性を素早く獲得する。この耐性は、また患者間でも広がり得る。研究によれば、例えば、HIVに感染して間もない固体の10人

に1人で、すでにAZTに対する耐性を獲得していることが分かっており、それはおそらく感染時にAZTに耐性を示すウィルスを持った人に感染させられるためである。

#### 【0012】

副作用がたとえあったとしても僅かである特異的かつ選択的な治療薬を得ることがHIVおよびSIVを含むウィルス感染の治療および予防に有用である。

#### 【0013】

##### [ 発明の概要 ]

本発明は、ウィルス感染を阻害する小さなペプチド(2~10アミノ酸長)に関する。完全なカプシド構造がビリオンの感染性にとって極めて重要である。二量化、三量化、四量化、または重合に依存している感染性のためのカプシドタンパク質巨大分子の集合を妨げる方法は、そのようなタンパク質間相互作用に影響を及ぼす小さな分子を構築することである。カルボキシル末端の水酸基がアミド基で置換された小さなペプチドがカプシドタンパク質相互作用に対するそのような阻害効果を有することが発見された。したがって、本発明の態様はウィルスのカプシド集合に対して作用する修飾小ペプチドに関する。

#### 【0014】

望ましい実施形態では、短ペプチドは、HIV-1、HIV-2、およびSIVのキャプソマー組織化およびカプシド集合に関与し、かつそれによって適当なカプシド集合、ひいてはウィルス感染を阻害および/または防止するタンパク質に結合する。小さなペプチド: Gly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>(GPG-NH<sub>2</sub>)、Gly-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>(GKG-NH<sub>2</sub>)、Cys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>(CQG-NH<sub>2</sub>)、Arg-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>(RQG-NH<sub>2</sub>)、Lys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>(KQG-NH<sub>2</sub>)、Ala-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>(ALG-NH<sub>2</sub>)、Gly-Val-Gly-NH<sub>2</sub>(GVG-NH<sub>2</sub>)、Val-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>(VGG-NH<sub>2</sub>)、Ala-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>(ASG-NH<sub>2</sub>)、Ser-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>(SLG-NH<sub>2</sub>)、およびSer-Pro-Thr-NH<sub>2</sub>(SPT-NH<sub>2</sub>)が好ましい種類である。これらの小さなペプチドおよびそれらの構造に類似したペプチド疑似体(p

eptidemimetic) (集合的に「ペプチド剤」と呼ぶ)は、単量体または多量体の形態で使用される。本発明のペプチド剤は、ウイルスに感染した、ヒトを含む哺乳動物における治療および予防上の用途に適している。

#### 【0015】

一実施形態において、ウイルスに感染した宿主細胞でのウイルス複製を阻害するための組成物は、式： $X_1X_2X_3-NH_2$  (式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である)を有するアミド型のペプチドを有効量含むもので、ペプチドはGly-Pro-Gly- $NH_2$ ではなく、さらに前記組成物はウイルスのカプシド集合を阻害することでウイルス複製を阻害する。望ましくは、それらのペプチドの $X_3$ は、グリシンである。また、上記した組成物は、式：Gly-Lys-Gly- $NH_2$ 、Arg-Gln-Gly- $NH_2$ 、Cys-Gln-Gly- $NH_2$ 、Lys-Gln-Gly- $NH_2$ 、Ala-Leu-Gly- $NH_2$ 、Gly-Val-Gly- $NH_2$ 、Val-Gly-Gly- $NH_2$ 、Ala-Ser-Gly- $NH_2$ 、Ser-Leu-Gly- $NH_2$ 、およびSer-Pro-Thr- $NH_2$ を有するペプチドからなる群から選択されるアミド型のペプチドを含み得る。

#### 【0016】

別の関連した実施形態では、上記した組成物は、式： $X_4X_5X_1X_2X_3-NH_2$  (式中、 $X_4$ および $X_5$ は任意のアミノ酸である)を有するアミド型のペプチドであり、任意の1個または2個のアミノ酸が欠けている。この実施形態は、式： $X_1X_2X_3$ を有するトリペプチドであってもよく、前記配列はウイルスのカプシドタンパク質のアミノ酸配列に見いだされる。

#### 【0017】

いくつかの実施形態では、上記した組成物は支持体に結合しており、別の実施形態では上記した組成物が薬学的に許容可能な担体を有する薬剤に組み込まれる。例えば、アミド型のペプチドは式Gly-Lys-Gly- $NH_2$ を有することができ、かつ支持体に結合し得る。

#### 【0018】

さらに、アミド型のペプチドは、例えばArg-Gln-Gly- $NH_2$ 、C

ys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Lys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、またはSer - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>の式を有し得る。これらのペプチドも支持体に結合し得る。

【0019】

宿主細胞でのHIV複製を阻害する方法も実施形態として挙げられる。例えば、一つのアプローチは、式： $X_1X_2X_3 - NH_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量、細胞に投与することを含み、また前記ペプチドはGly - Pro - Gly - NH<sub>2</sub>ではないものである。したがって、上記ペプチドは、式：Gly - Lys - Gly - NH<sub>2</sub>、Arg - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Cys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Lys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、Gly - Val - Gly - NH<sub>2</sub>、Val - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Ser - Gly - NH<sub>2</sub>、Ser - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、およびSer - Pro - Thr - NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択し得る。上記の方法は、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤からなる群から選択される抗ウイルス治療薬を投与する過程をさらに含み得る。上記方法で使用するペプチドを支持体に結合、または薬学的に許容可能な担体を含む薬剤中で投与し得る。

【0020】

別の実施形態では、宿主細胞でのHIV複製を阻害するための組成物は、式： $X_1X_2X_3 - NH_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量含むもので、またペプチドは、Gly - Pro - Gly - NH<sub>2</sub>ではなく、前記組成物はカプシドの集合体を遮ることでHIV複製を阻害する。望ましくは、この実施形態のペプチドにおいて、 $X_3$ はグリシンである。好ましくは、この実施形態のペプチドは、式：Gly - Lys - Gly - NH<sub>2</sub>、Arg - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Cys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Lys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、Gly - Val - Gly - NH<sub>2</sub>、Val - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Ser - Gly - NH<sub>2</sub>、Ser - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、およびSer - Pro - Thr

-NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択される。また、上記したアミド型のペプチドは、式： $X_4X_5X_1X_2X_3-NH_2$ （式中、 $X_4$ および $X_5$ はアミノ酸である）を有することができ、また任意の1個または2個のアミノ酸が欠けている。これらの組成物は、例えばHIVのカプシドタンパク質のアミノ酸配列に見いだされるトリペプチド $X_1X_2X_3$ を有し得る。いくつかの実施形態では、これらのペプチドは支持体に結合しており、別の実施形態ではこれらのペプチドが薬学的に許容可能な担体を有する薬剤に組み込まれる。

#### 【0021】

別の方法では、宿主細胞でのウィルス複製を阻害するためのアプローチが提供され、前記アプローチは式： $X_1X_2X_3-NH_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量、前記細胞に投与することが含まれ、また前記ペプチドはGly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>ではない。この方法では、ペプチドは式： $Gly-Lys-Gly-NH_2$ 、 $Arg-Gln-Gly-NH_2$ 、 $Cys-Gln-Gly-NH_2$ 、 $Lys-Gln-Gly-NH_2$ 、 $Ala-Leu-Gly-NH_2$ 、 $Gly-Val-Gly-NH_2$ 、 $Val-Gly-Gly-NH_2$ 、 $Ala-Ser-Gly-NH_2$ 、 $Ser-Leu-Gly-NH_2$ 、および $Ser-Pro-Thr-NH_2$ を有するペプチドからなる群から選択し得る。この方法は、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤からなる群から選択される抗ウイルス治療薬を投与する過程をさらに含む得る。さらに本方法で使用するペプチドを支持体に結合、または薬学的に許容可能な担体を含む薬剤中で投与し得る。

#### 【0022】

別の方法では、ウィルスカプシド集合を遮るためのアプローチが提供される。このアプローチは、式： $X_1X_2X_3-NH_2$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを有効量、細胞と接触させることを含み、また前記ペプチドはGly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>ではない。望ましくは、本方法で使用するペプチドは式： $Gly-Lys-Gly-NH_2$ 、 $Arg-Gln-Gly-NH_2$ 、 $Cys-Gln-Gly-NH_2$ 、 $Lys-Gl$

n - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、Gly - Val - Gly - NH<sub>2</sub>、Val - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Ser - Gly - NH<sub>2</sub>、Ser - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、およびSer - Pro - Thr - NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、この方法で使用するペプチドにおいて、X<sub>3</sub>はグリシンである。

#### 【0023】

他の実施形態では、方法は式：X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>（式中、X<sub>4</sub>およびX<sub>5</sub>はアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドを用い、また任意の1個または2個のアミノ酸が欠けている。さらに、方法は、ウィルスのタンパク質のアミノ酸配列に見いだされるトリペプチドX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>の使用を含み得る。

#### 【0024】

多くの場合、本方法のペプチドは支持体に結合、または薬剤に組み込まれている。

#### 【0025】

ペプチド剤の同定方法も提供する。一つの方法では、例えば、抗ウィルス薬剤に組み込むためのペプチド剤は、ウィルスが感染した複数の細胞に対して有効量のペプチド剤（ここで、前記ペプチドはGly - Pro - Gly - NH<sub>2</sub>ではない）を接触させ、不完全なカプシド形成についてウィルスを分析し、さらに不完全なカプシド形成を誘導するペプチド剤を選択することによって同定される。この方法は鏡検を用いてカプシド形成を分析するもので、ウィルスはHIV - 1、HIV - 2、およびSIVからなる群から選択し得る。さらに、同定されたペプチド剤は、トリペプチド、オリゴペプチド、およびペプチド疑似体からなる群から選択し得る。例えば、上記ペプチド剤は、式：Gly - Lys - Gly - NH<sub>2</sub>、Arg - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Cys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Lys - Gln - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、Gly - Val - Gly - NH<sub>2</sub>、Val - Gly - Gly - NH<sub>2</sub>、Ala - Ser - Gly - NH<sub>2</sub>、Ser - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>、およびSer - Pro - Thr - NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択し得る。好ましい実施形態では、上記方法で使用されるペプチド剤は、p 24のアミノ酸配列と一致するアミノ酸配列を

有する。

【0026】

別の実施形態では、ウイルスタンパク質に結合するペプチド剤を同定するための方法を提供し、前記方法は、ウィルス・タンパク質を提供し、有効量のペプチド剤（前記ペプチド剤はGly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>ではない）とウイルスタンパク質とを接触させ、ウイルスタンパク質とペプチド剤とを含む複合体の形成を検出することを含む。上記のように、この方法は、HIV-1、HIV-2、およびSIVからなる群から選択されるウィルス由来のウイルスタンパク質を使用することを含む。さらに、いくつかの態様では、ペプチド剤は、トリペプチド、オリゴペプチド、およびペプチド疑似体からなる群から選択される。望ましくは、上記方法は、式：Gly-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>、Arg-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Cys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Lys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、Gly-Val-Gly-NH<sub>2</sub>、Val-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>、Ser-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、およびSer-Pro-Thr-NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択されるペプチド剤を使用する。さらに、上記方法で同定されたペプチド剤が薬剤に組み込まれる、薬剤の製造方法を提供する。

【0027】

薬剤を製造するための別のアプローチも提供され、前記アプローチは、式：X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>（式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、およびX<sub>3</sub>は任意のアミノ酸である）を有し、かつGly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>ではないアミド型のペプチドを有効量、細胞に投与し、細胞内でのウィルス複製阻害を検出し、薬剤の中にウィルス複製阻害を引き起こすペプチドを組み込むことを含む。この方法では、式：Gly-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>、Arg-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Cys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Lys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、Gly-Val-Gly-NH<sub>2</sub>、Val-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>、Ser-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、およびSer-Pro-Thr-NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択されるペプチドの使用を含み得る。さらに、上記方法は、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、又

クレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤からなる群から選択される抗ウイルス化合物を薬剤の中に組み込む過程を含み得る。さらに、上記方法は薬剤に担体を組み込む過程を含み得る。

#### 【0028】

別の実施形態では、ウイルスに感染した宿主細胞でのウイルス複製を阻害する組成物は、式： $X_1X_2X_3 - R$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有し、かつGly-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>ではないペプチドを有効量含むもので、Rは前記ペプチドのカルボキシル末端に結合した修飾基であり、またRはアミド基、または類似の電荷および立体バルク（steric bulk）を有する他の部分を含み、前記組成物はウイルスカプシド集合を遮ることでウイルス複製を阻害する。この組成物は、式：Gly-Lys-Gly-NH<sub>2</sub>、Arg-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Cys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Lys-Gln-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、Gly-Val-Gly-NH<sub>2</sub>、Val-Gly-Gly-NH<sub>2</sub>、Ala-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>、Ser-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>、およびSer-Pro-Thr-NH<sub>2</sub>を有するペプチドからなる群から選択されるペプチドとし得る。望ましくは、それらの実施形態において、 $X_3$ はグリシンである。

#### 【0029】

さらに、上記組成物は、式： $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_1X_2X_3 - R$ （式中、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$ 、 $X_8$ 、 $X_9$ 、および $X_{10}$ は任意のアミノ酸である）を有するペプチドを含むことができ、任意の1、2、3、4、5、6、または7個のアミノ酸が欠けており、またRは前記ペプチドのカルボキシル末端に結合した修飾基であり、さらにRはアミド基、または類似の電荷および立体バルクを有する他の部分を含む。

#### 【0030】

好ましくは、上記組成物は、ウイルスのカプシドタンパク質のアミノ酸配列に見いだされるペプチド $X_1X_2X_3$ を含む。

#### 【0031】

## [ 好ましい実施形態の詳細な説明 ]

本発明者は、ウイルスカプシドタンパク質に対応した配列を有する修飾小ペプチドが適当なヌクレオカプシド形成を遮ることによってウイルス感染を抑制および/または阻害することを発見した。そのようなペプチドは、ウイルス性疾患の治療、特にHIV/AIDS患者の治療に有用であり、またウイルス感染、特にHIV感染の危険性を有する患者に対する予防薬として有用であり、さらにウイルスにさらされる危険性が顕著である医療機器の使用に有用である。

## 【0032】

以下の開示では、本発明者は、培養液上清中に存在するカプシドタンパク質の量または逆転写酵素活性をモニタするウイルス感染性アッセイによって測定し、ウイルスタンパク質に対応する配列を有するアミド形状の小ペプチド、例えばGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>が、HIV-1、HIV-2、およびSIV等のウイルス複製を阻害することを実証する。さらに、本発明者は、それらの小ペプチドがDNA、RNA、およびタンパク質合成の後の段階で、V3ループとは独立の機構でウイルス感染を阻害するという証拠を提示する。

## 【0033】

小ペプチドによって処理されたHIV粒子の電子顕微鏡写真は、新規な種類の抗ウイルス剤がプロテアーゼ阻害剤とは異なる方法で適当なカプシド集合を遮ることを明らかにする。さらに、インビトロ(in vitro)結合アッセイによって、小ペプチドがHIV-1の主カプシドタンパク質(p24)に結合することが明らかになる。アレナウイルス、ロタウイルス、オルビウイルス、レトロウイルス、パピローマウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、ミクソウイルス、およびヘパドナウイルス科のウイルス等の、いくつかのウイルスカプシドタンパク質の配列が公知であることから、それらの配列に対応するいくつかの小ペプチドは、ウイルス感染性アッセイまたは電子顕微鏡法、またはここに記載したものの両方、または本開示が与えられた当業者にとって明らかであるようなそれらのアッセイの改変を用いることで、選択および迅速なスクリー

ングによりどのペプチドがウイルス感染を有効に阻害および/または予防するかを同定することが可能である。

#### 【0034】

ウイルスカプシドタンパク質の配列に対応する小ペプチドおよびペプチド(「ペプチド剤」と総称する)を含む生物工学的ツールおよび薬学的組成物を製造するためのいくつかのアプローチを以下に示す。好ましいペプチド剤は、GPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>等のカルボキシル末端にアミド基を有するトリペプチドであるが、本発明者は、宿主細胞でのHIV複製を含むウイルス複製を阻害する、式：X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>または式：X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>(式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>およびX<sub>5</sub>は任意のアミノ酸である)を有するアミド型の、任意の1または2のアミノ酸を欠くことができるペプチドを含有する組成物および方法も提供する。好ましい実施形態は、X<sub>3</sub>としてグリシン残基を有する。いくつかの実施形態では、ペプチド剤は単量体のかたちで提供され、他の実施形態では、ペプチド剤は多量体のかたちで、または多量化されたかたちで提供される。支持体結合ペプチド剤もまたいくつかの実施形態で使用される。ペプチド剤を含む薬学的組成物は、ウイルス疾患、好ましくはHIV感染の治療および/または予防のために、治療薬または予防薬、またはその両方として、投与される。いくつかの実施形態では、ペプチド剤を含む薬学的組成物はヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤等の他の抗ウイルス治療薬と組み合わせて投与される。本発明は、小ペプチドが酸加水分解に対して耐性を有すること、被験者に投与した場合にかなりの量の小ペプチドが効果的に血液、血漿、および器官組織に送達されること、さらに被験者に対して小ペプチドを大量に投与しても相対的に非毒性であることの証拠も提供する。

#### 【0035】

さらに、本発明者は、ウイルス複製を阻害または予防、またはウイルスカプシド集合を妨害、またはそれら両方を行うペプチド剤を同定するためのいくつかの

方法を開示する。一つのアプローチでは、有効量のペプチド剤をウィルス感染細胞と接触させ、ウィルス複製またはウィルス産物の存在についてかかる細胞を分析する。さらに、電子顕微鏡を用いることで、カプシド集合を妨害するペプチド剤の能力を容易に判断し得る。さらに、カプシドタンパク質（例えば、p 24）に結合するペプチド剤を同定し、それによってカプシド集合、さらにウィルス複製を妨害する方法を開示する。したがって、カプシドタンパク質（例えば、p 24）をペプチド剤、例えば式： $X_1 - X_2 - X_3$ （式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ は任意のアミノ酸である）を有するアミド型のペプチドと接触させ、ペプチド剤が結合したカプシドタンパク質（例えば、p 24）を含む複合体を同定する。ウィルスタンパク質（例えば、p 24）およびペプチド剤を有する反応混合物や、ペプチド剤に結合したウィルスタンパク質（例えば、p 24）を有する生体分子複合体もまた本開示で教示される。

#### 【0036】

以下の表1に示すアミド型の小ペプチドを試験した。それらの小ペプチドの多くを選択かつ合成した。なぜなら、それらは完全または部分的にHIVおよび/またはSIVウィルスタンパク質に含まれる配列に一致するからである。表1の小ペプチドを以下の実施例1に開示された方法にもとづいて合成した。しかし、もちろん当業者に周知の任意の方法によっても合成されてもよい。

#### 【0037】

#### 【表1】

表 1

## 試験を行ったペプチドのアミノ酸配列

Leu-Lys-Ala (LKA)	Arg-Gln-Gly (RQG)
Iso-Leu-Lys (ILK)	Lys-Gln-Gly (KQG)
Gly-Pro-Gln (GPG)	Ala-Leu-Gly (ALG)
Gly-His-Lys (GHK)	Gly-Val-Gly (GVG)
Gly-Lys-Gly (GKG)	Val-Gly-Gly (VGG)
Ala-Cys-Gln (ACQ)	Ala-Ser-Gly (ASG)
Cys-Gln-Gly (CQG)	Ser-Leu-Gly (SLG)
Ala-Arg-Val (ARV)	Ser-Pro-Thr (SPT)
Lys-Ala-Arg (KAR)	Gly-Ala-Thr (GAT)
His-Lys-Ala (HKA)	Lys-Ala-Leu (KAL)
Gly-Pro-Gly (GPG)	

## 使用した略語：

Leu- ロイシン	Lys- リジン
Gln- グルタミン	Ala- アラニン
His- ヒスチジン	Ileu- イソロイシン
Cys- システイン	Gly- グリシン
Pro- プロリン	Arg- アルギニン
Val- バリン	Thr- スレオニン
Ser- セリン	

## 【 0 0 3 8 】

## 実施例 1

この実施例では、表記した小ペプチドを得るために使用されるアプローチを開示する。自動ペプチド合成装置 (Syro, Multisyntech, Tubingen, Germany) を用いて、いくつかのトリペプチドを合成した。合成は、標準的なプロトコルにしたがって、9 - フルオレニルメトキシカルボニル (f m o c) 保護アミノ酸 (Milligen, Bedford, Mass) を用いて実行した。全てのペプチドを凍結乾燥し、続いて適当な濃度でリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に溶解した。ペプチドの分析は、P e p S - 1 5 C 1 8 カラム (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いる逆相高性能液体クロマトグラフィ (R P - H P L C) によって行った。

## 【0039】

多くの実施形態で、ペプチド(「修飾ペプチド」)のカルボキシル末端に結合した修飾基を有するペプチドを用いた。いくつかの例では、ペプチドの末端カルボキシル基に通常存在するヒドロキシル残基をアミノ基で置換することによって、修飾ペプチドを生成した。すなわち、COOH末端の代わりに、CO-NH<sub>2</sub>を持つようにペプチドを合成した。例えば、好ましい小ペプチドとして、グリシル-リシル-グリシンアミド(GKF-NH<sub>2</sub>)、シスチル-グルタミニル-グリシンアミド(GQG-NH<sub>2</sub>)、グリシル-プロリル-グリシンアミド(CPG-NH<sub>2</sub>)、アルギニル-グルタミニル-グリシンアミド(RQG-NH<sub>2</sub>)、リシル-グルタミニル-グリシンアミド(KQG-NH<sub>2</sub>)、アラニル-ロイシル-グリシンアミド(ALG-NH<sub>2</sub>)、グリシル-バリル-グリシンアミド(GVG-NH<sub>2</sub>)、バリル-グリシル-グリシンアミド(VGG-NH<sub>2</sub>)、アラニル-セリル-グリシンアミド(ASG-NH<sub>2</sub>)、セリル-ロイシル-グリシンアミド(SLG-NH<sub>2</sub>)、およびセリル-プロリル-スレオニンアミド(SPT-NH<sub>2</sub>)が挙げられる。合成されたものに加えて、多くのトリペプチドもまた、Bachem Ag, Switzerlandから購入し、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、およびGPG-NH<sub>2</sub>が挙げられるが、これに限定されるものではない。

## 【0040】

従来の抗ウイルス治療と組み合わせた小ペプチド治療の効果を評価する実験および毒性実験において、ペプチドは以下のようにして得た。初期の実験に対しては、アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)430Aペプチド合成装置(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて固相ペプチド合成を行った。各合成では、p-メチルベンジルヒドリルアミン固相支持体樹脂(Peptide International, Louisville, KY)を用いて、酸加水分解によって固相支持体からペプチドが劈開される時にカルボキシル末端アミドを得た。合成に使用する全てのアミノ酸は、-NH<sub>2</sub>基を保護するt-ブチルカルボニル基を含むもので、Novabiochem AG, Switzerlandから入手した。トリフルオロメタンスルホン酸処理によって固相支持体樹脂から劈開した合成ペプチドから保護基を除去することで、カルボキシル末端に水酸(-OH)基のかわりに、アミノ(-NH<sub>2</sub>)

修飾基を有するペプチドが得られた。使用に先立って、逆相高性能液体クロマトグラフィーによってペプチドの精製を行い、さらにアプライドバイオシステムズ437Aペプチドシーケンサ上で前記ペプチドの配列決定を行った。また、アミド(CO-NH<sub>2</sub>; GPG-NH<sub>2</sub>)またはカルボキシル(COOH; GPG-OH)末端を有するトリペプチドGPGをBachem AG, Switzerlandから購入した。

#### 【0041】

以下の開示では、HIV-1、HIV-2、およびSIV感染を阻害する小ペプチドを同定するために使用したいくつかのアッセイについて説明する。

#### 【0042】

##### HIVおよびSIV感染性アッセイ

実施例1に基づいて合成したペプチドをいくつかのHIV-1、HIV-2、およびSIV感染性アッセイで用いた。HIV-1、HIV-2、およびSIV感染の効率を逆転写酵素活性、細胞上清中のp24タンパク質の濃度、およびHIV-1融合細胞形成の鏡検によってモニタした。

#### 【0043】

最初の実験では、いくつかのトリペプチドに対して、H9細胞におけるHIV-1、HIV-2、およびSIV感染を阻害する能力についてのスクリーニングを行った。ひとたび阻害性のトリペプチドが同定されると、よりいっそう特異的なアッセイを実施して選択されたトリペプチドの濃度変化と組み合わせ治療(例えば、複数のトリペプチドを組み合わせ使用)との効果を判断した。

#### 【0044】

以下の実施例では、HIV-1、HIV-2、およびSIV感染を阻害する能力について、いくつかのトリペプチドをスクリーニングするために使用したアプローチについて開示する。

#### 【0045】

##### 実施例2

この実施例では、種々のトリペプチドのHIV-1、HIV-2、およびSIV複製阻害能についての分析に使用した複数の方法について開示する。実験1および2では、約200,000のH9細胞に対してHIV-1、HIV-2、お

よびSIVを25 TCID<sub>50</sub>で感染させて、以下の合成トリペプチド、すなわちLKA-NH<sub>2</sub>、ILK-NH<sub>2</sub>、GPQ-NH<sub>2</sub>、GHK-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、ACQ-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、ARV-NH<sub>2</sub>、KAR-NH<sub>2</sub>、HKA-NH<sub>2</sub>、GAT-NH<sub>2</sub>、KAL-NH<sub>2</sub>、およびGPG-NH<sub>2</sub>の阻害効果について試験した。したがって、H9細胞を、10% (v/v) 加熱不活性化ウシ胎仔血清 (FBS)、ペニシリン (100 u/ml)、およびストレプトマイシン (100 u/ml) (これらはすべてGIBCOを通じて入手可能) とSigmaを通じて入手可能なポリブレン (Polybrene) (g/ml) とを補充した1 mlのRPMI 1640培地中に、異なるペプチド (約100 μM) の存在または非存在下で再懸濁した。その後、ウイルスを25 TCID<sub>50</sub>で20~30 μlの容量で加えた。細胞をウイルスとともに37 °Cで1時間インキュベートし、続いて170 x g、7分でペレットにした。次に細胞を、室温において、ペプチドを含まないRPMI培地中で3回洗浄し、上記のように170 x g、7分でペレットにした。最後の洗浄の後、細胞を24ウェルプレート (Costar corporation) 内の、ペプチドを含むRPMI培地中に再懸濁し、保湿5% CO<sub>2</sub>中で37 °Cに保持した。

#### 【0046】

感染後4、7、10、および14日目に培地を交換する際に、培養液上清を回収して分析した。ウイルスの複製をモニタするために、市販のレンチ (Lenti) - 逆転写酵素 (RT) 活性キット (Cavidi Tech, Uppsala, Sweden) を用いて上清中のRT活性をアッセイした。RTの量は、標準物質の回帰線を用いて決定した。結果は、吸光度 (OD) として表し、吸光度が高いことはタンパク質濃度が高いこと、またウイルス感染がより大きいことを示している。融合細胞形成も鏡検によってモニタした。表2および表3は実験1および2の細胞培養液上清の吸光度をそれぞれ示す。

#### 【0047】

実験3 (表4) では、約200,000のH9細胞に対してHIV-1、HIV-2、およびSIVを25 TCID<sub>50</sub>で感染させて、異なる濃度のペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>およびこれらのペプチドの組み

合わせ（示した濃度は各トリペプチドの濃度に一致する）の阻害効果を試験した。上記したように、H9細胞を、10%（v/v）加熱不活性化ウシ胎仔血清（FBS）、ペニシリン（100 u/ml）、およびストレプトマイシン（100 u/ml）とポリブレン（g/ml）とを補充した1mlのRPMI 1640培地中に、濃度を変えた異なるペプチドの存在または非存在下で再懸濁した。その後、ウィルスを25 TCID<sub>50</sub>で20～30 μlの容量で加えた。細胞を表示ウィルスとともに37℃で1時間インキュベートし、続いて170×g、7分でペレットにした。次に細胞を、室温において、ペプチドを含まないRPMI培地中で3回洗浄し、上記のように170×g、7分でペレットにした。最後の洗浄の後、細胞を、24ウェルプレート（Costar corporation）内の、ペプチドを含むRPMI培地中に再懸濁し、保湿5%CO<sub>2</sub>中で37℃に保持した。

#### 【0048】

感染後4、7、および11日目に培地を交換する際に、培養液上清を回収した。上記のように、レンチ-逆転写酵素（RT）活性キット（Cavidi Tech）を用いて上清中のRT活性を検出することで、各ウィルスの複製をモニタした。RTの量は、標準物質の回帰直線を用いて決定した。結果は、吸光度（OD）として表し、吸光度が高いことはタンパク質濃度が高いこと、またウィルス感染がより大きいことを示している。表4は実験3の細胞培養液上清の吸光度を示す。

#### 【0049】

実験4（表5）では、約200,000のH9細胞に対してHIV-1を25 TCID<sub>50</sub>で感染させて、異なる濃度のペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>およびこれらのペプチドの組み合わせ（示した濃度は各トリペプチドの全濃度に一致する）の阻害効果を試験した。上記したように、H9細胞を、10%（v/v）加熱不活性化ウシ胎仔血清（FBS）、ペニシリン（100 u/ml）、およびストレプトマイシン（100 u/ml）とポリブレン（g/ml）とを補充した1mlのRPMI 1640培地中に、濃度を変えた異なるペプチドの存在または非存在下で再懸濁した。その後、ウィルスを25 TCID<sub>50</sub>で20～30 μlの容量で加えた。細胞を表示ウィルスとともに37℃で1時間インキュベートし、続いて170×g、7分でペレットにした。次に細

胞を、室温において、ペプチドを含まないP R M I培地中で3回洗浄し、上記のように170 x g、7分でペレットにした。最後の洗浄の後、細胞を、24ウェルプレート (Costar corporation) 内の、ペプチドを含むR P M I培地中に再懸濁し、湿気を持った5% C O<sub>2</sub>中で37 に保持した。

#### 【0050】

感染後4、7、および11日目に培地を交換する際に、培養液上清を回収した。上記のように、レンチ - 逆転写酵素 (R T) 活性キット (Cavidi Tech) を用いて上清中のR T活性を検出することで、各ウィルスの複製をモニタした。R Tの量は、標準物質の回帰線を用いて決定した。結果は、吸光度 (O D) として表し、吸光度が高いことはタンパク質濃度が高いこと、またウィルス感染がより大きいことを示している。表5は実験4の細胞培養液上清の吸光度を示す。検出がよりいっそう正確に判断されるように、11日目で分析した上清を5倍希釈した。

#### 【0051】

実験5 (表6) では、約200,000のH9細胞に対してH I V - 1を25 T C I D<sub>50</sub>で感染させて、異なる濃度のペプチドG P G - N H<sub>2</sub>、G K G - N H<sub>2</sub>、C Q G - N H<sub>2</sub>およびこれらのペプチドの組み合わせの阻害効果を試験した。上記したように、H9細胞を、10% (v/v) 加熱不活性化ウシ胎仔血清 (F B S)、ペニシリン (100 u/ml)、ストレプトマイシン (100 u/ml)、およびポリブレン (g/ml) とを補充した1mlのR P M I 1640培地中に、濃度を変えた異なるペプチドの存在または非存在下で再懸濁した。その後、ウィルスを25 T C I D<sub>50</sub>で20~30 μlの容量で加えた。細胞を表示ウィルスとともに37 で1時間インキュベートし、続いて170 x g、7分でペレットにした。次に細胞を、室温において、ペプチドを含まないP R M I培地中で3回洗浄し、上記のように170 x g、7分でペレットにした。最後の洗浄の後、細胞を、24ウェルプレート (Costar corporation) 内の、ペプチドを含むR P M I培地中に再懸濁し、湿気を持った5% C O<sub>2</sub>中で37 に保持した。

#### 【0052】

感染後4、7、および14日目に培地を交換する際に、培養液上清を回収した。上清中のp24の存在を検出することで各ウイルスの複製をモニタした。HIV p24抗原は、市販のHIV p24抗原検出キット(Abbott)を用いて確定した。結果は、吸収値(OD)として表し、吸収値が高いことはタンパク質濃度が高いこと、またウイルス感染がより大きいことを示している。いくつかの場合では、p24濃度をよりいっそう正確に検出するために、上清を連続希釈した。表6は、実験5の細胞培養液上清の吸収値を示す。以下に詳細に説明するように、トリペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>およびこれらのペプチドの組み合わせがHIV-1、HIV-2、およびSIV感染を効果的に阻害することがわかった。

#### 【0053】

実験6(表7および図1)では、約200,000のHUT78細胞に対してHIV-1を25 TCID<sub>50</sub>で感染させて、GPG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>の阻害効果を試験した。HUT細胞を、上記した異なる小ペプチド(100 μM)の存在または非存在下で、10%(v/v)加熱不活性化ウシ胎仔血清(FBS)、ペニシリン(100 u/ml)、ストレプトマイシン(100 u/ml)、およびポリブレン(Sigma、2 μg/ml)とを補充した1mlのRPMI 1640培地中に再懸濁した。その後、HIV-1ウイルスを25 TCID<sub>50</sub>で20 μlの容量で加えた。細胞を、ウイルスとともに37 °Cで1時間インキュベートし、続いて170 × g、7分でペレットにした。次に細胞を、室温において、ペプチドを含まないRPMI培地中で、上記のように170 × g、7分の細胞沈降によって3回洗浄した。最後の洗浄の後、細胞を、24ウェルプレート(Costar corporation)内の、ペプチドを含むRPMI培地中に再懸濁し、湿気を持った5%CO<sub>2</sub>中で37 °Cに保持した。感染後4、7、および11日目に培地を交換する際に、培養液上清を回収し、ウイルスp24産生をHIV-1 p24 ELISAキット(Abbott Laboratories, North Chicago, USA)を用いてモニタした。以下で議論するように、小ペプチドRQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-

NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>は効果的にHIV

-1感染を阻害することがわかった。

【0054】

【表2】

表2

実験1-(その場で作成されたペプチド)

7日目のRT活性

10日目のRT活性

トリペプチド (100M)	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1 シンシチウム
LKA-NH <sub>2</sub>	0.568*	3.649	3.577	2.429	2.769	2.452	陽性
ILK-NH <sub>2</sub>	0.365	3.467	3.180	2.033	2.791	2.255	陽性
GPD-NH <sub>2</sub>	0.204	3.692	1.542	1.965	2.734	2.176	陽性
GHK-NH <sub>2</sub>	0.289	3.522	0.097	2.151	2.931	2.384	陽性
GKG-NH <sub>2</sub>	0.080	0.160	0.421	0.074	0.147	0.099	陰性
ACQ-NH <sub>2</sub>	0.117	3.418	1.241	0.904	2.753	2.746	陽性
CQG-NH <sub>2</sub>	0.091	0.217	0.747	0.108	0.296	0.110	陰性
ARV-NH <sub>2</sub>	0.156	3.380	0.210	1.528	3.003	1.172	陽性
KAR-NH <sub>2</sub>	0.380	3.419	0.266	2.779	2.640	1.722	陽性
HKA-NH <sub>2</sub>	0.312	3.408	0.416	2.546	2.669	2.520	陽性
GAT-NH <sub>2</sub>	0.116	3.461	0.892	1.565	2.835	2.343	陽性
KAL-NH <sub>2</sub>	0.246	3.372	1.091	1.995	2.749	2.524	陽性
GPG-NH <sub>2</sub>	0.068	0.735	0.138	0.074	0.145	0.103	陰性
ペプチド対照 なし	0.251	1.675	1.227	2.217	2.657	3.030	陽性

\*値は光学密度 (OD) を表す

【0055】

【表3】

表3

実験2-(その場で作成されたペプチド)

7日目のRT活性

10日目のRT活性

トリペプチド (100M)	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1 シンシチウム
LKA-NH <sub>2</sub>	0.894*	1.689	0.724	2.989	2.637	2.797	陽性
ILK-NH <sub>2</sub>	0.581	1.692	0.515	2.950	2.557	2.632	陽性
GPQ-NH <sub>2</sub>	0.884	1.511	0.574	2.848	2.382	2.319	陽性
GHK-NH <sub>2</sub>	0.829	1.936	0.396	3.013	2.418	2.394	陽性
GKG-NH <sub>2</sub>	0.145	0.283	0.116	0.345	1.637	0.204	陰性
ACQ-NH <sub>2</sub>	0.606	1.661	0.612	2.831	2.505	2.606	陽性
COG-NH <sub>2</sub>	0.143	1.241	0.120	1.546	2.501	1.761	陰性
ARV-NH <sub>2</sub>	0.618	2.237	0.212	2.829	2.628	3.004	陽性
KAR-NH <sub>2</sub>	0.753	1.904	1.034	2.928	2.742	2.672	陽性
HKA-NH <sub>2</sub>	1.081	1.678	0.455	2.794	2.560	2.623	陽性
GAT-NH <sub>2</sub>	0.776	1.707	0.572	2.800	2.565	2.776	陽性
KAL-NH <sub>2</sub>	0.999	1.757	0.511	2.791	2.383	2.663	陽性
GPG-NH <sub>2</sub>	0.090	0.093	0.067	0.143	0.575	0.139	陰性
ペプチド対照 なし	0.809	1.774	0.578	2.711	2.528	2.911	陽性

\*値は光学密度 (OD) を表す

【0056】

【表4】

表4

実験3-(Bachem から入手したペプチド)

7日目のRT活性

10日目のRT活性

トリペプチド	HIV-1	HIV-2	SIV	HIV-1	HIV-2	SIV
ペプチド対照なし	1.558*	1.718	1.527	2.521	2.716	2.091
GPG-NH <sub>2</sub> 5μM	1.527	1.735	0.753	2.398	2.329	2.201
GPG-NH <sub>2</sub> 20μM	0.239	0.252	0.197	0.692	1.305	0.779
GKG-NH <sub>2</sub> 5μM	1.587	1.769	0.271	1.683	2.510	1.709
GKG-NH <sub>2</sub> 20μM	1.616	1.759	1.531	2.036	2.646	2.482
GKG-NH <sub>2</sub> 100μM	0.823	0.828	1.005	1.520	1.947	1.382
COG-NH <sub>2</sub> 5μM	1.547	1.760	1.159	2.028	2.466	2.821
COG-NH <sub>2</sub> 20μM	1.578	1.748	0.615	1.484	2.721	2.158
COG-NH <sub>2</sub> 100μM	1.520	1.715	0.795	2.014	2.815	2.286
GPG-NH <sub>2</sub> + GKG-NH <sub>2</sub> 5μM	1.430	1.738	1.131	1.998	2.770	2.131
GPG-NH <sub>2</sub> + GKG-NH <sub>2</sub> 20μM	0.129	0.244	0.123	0.164	1.110	0.309
GPG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 5μM	1.605	1.749	1.737	1.866	2.814	2.206
GPG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 20μM	0.212	0.194	0.523	0.397	1.172	0.910
GKG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 5μM	1.684	1.717	1.725	1.848	2.778	2.949
GKG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 20μM	1.490	1.792	1.670	1.891	2.799	2.889
GPG-NH <sub>2</sub> + GKG-NH <sub>2</sub> 5μM	1.652	1.743	1.628	1.999	2.777	2.659
GPG-NH <sub>2</sub> + GKG-NH <sub>2</sub> 20μM	0.165	0.119	0.317	0.307	0.447	0.389

\*値は光学密度 (OD) を表す

【0057】

【表5】

表5

実験4- (Bachem から入手したペプチド)

7日目のRT活性      10日目のRT活性

トリペプチド	HIV-1	HIV-1 (1:5)
ペプチド対照なし	3.288*	1.681
GPG 5 $\mu$ M	2.970	1.107
GPG 15 $\mu$ M	0.894	0.095
GPG 45 $\mu$ M	0.177	0.034
GPG 100 $\mu$ M	0.150	0.033
GKG 5 $\mu$ M	3.303	1.287
GKG 15 $\mu$ M	3.551	1.530
GKG 45 $\mu$ M	3.126	0.410
COG 5 $\mu$ M	2.991	1.459
COG 15 $\mu$ M	2.726	1.413
COG 45 $\mu$ M	3.124	1.364
GPG-NH <sub>2</sub> + GKG-NH <sub>2</sub> 5 $\mu$ M	2.266	0.438
GPG-NH <sub>2</sub> + GKG-NH <sub>2</sub> 15 $\mu$ M	0.216	0.044
GPG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 5 $\mu$ M	2.793	0.752
GPG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 15 $\mu$ M	0.934	0.110
GKG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 5 $\mu$ M	3.534	1.305
GKG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 15 $\mu$ M	3.355	2.013
GPG-NH <sub>2</sub> + GKG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 5 $\mu$ M	2.005	0.545
GPG-NH <sub>2</sub> + GKG-NH <sub>2</sub> + COG-NH <sub>2</sub> 15 $\mu$ M	0.851	0.110

\*値は光学密度 (OD) を表す

【0058】

【表6】

表6

実験5 - (その場で作成されたペプチド)

トリペプチド ( $\mu\text{m}$ )	p24 (OD)	p24 (pg/ml)	減少率 (%)
7日目 HIV-1			
ペプチド対照なし	$1.093 \times 10^2$	$3.94 \times 10^4$	0
GPG-NH <sub>2</sub> (20)	1.159	$4.21 \times 10^2$	99
GPG-NH <sub>2</sub> (100)	0.508	$1.60 \times 10^2$	100
GPG-NH <sub>2</sub> (300)	0.557	$1.80 \times 10^2$	100
GKG-NH <sub>2</sub> (100)	$0.566 \times 10^1$	$1.83 \times 10^3$	95
GKG-NH <sub>2</sub> (300)	1.08	$3.88 \times 10^2$	99
GKG-NH <sub>2</sub> (1000)	0.79	$2.73 \times 10^2$	100
CQG-NH <sub>2</sub> (100)	$1.51 \times 10^1$	$5.62 \times 10^3$	86
CQG-NH <sub>2</sub> (300)	$0.59 \times 10^1$	$1.92 \times 10^3$	95
CQG-NH <sub>2</sub> (1000)	0.91	$3.20 \times 10^2$	99
*混合ペプチド	0.65	$2.17 \times 10^2$	100
14日目 HIV-1			
ペプチド対照なし	$0.46 \times 10^4$	$1.41 \times 10^6$	0
GPG-NH <sub>2</sub> (20)	$1.12 \times 10^2$	$4.06 \times 10^4$	97
GPG-NH <sub>2</sub> (100)	1.76	$6.63 \times 10^2$	100
GPG-NH <sub>2</sub> (300)	1.35	$4.98 \times 10^2$	100
GKG-NH <sub>2</sub> (100)	$1.48 \times 10^3$	$5.51 \times 10^5$	61
GKG-NH <sub>2</sub> (300)	$0.33 \times 10^1$	$8.70 \times 10^2$	100
GKG-NH <sub>2</sub> (1000)	$0.11 \times 10^1$	$2.40 \times 10^2$	100
CQG-NH <sub>2</sub> (100)	$0.48 \times 10^4$	$1.47 \times 10^6$	0
CQG-NH <sub>2</sub> (300)	$0.11 \times 10^2$	$2.40 \times 10^2$	100
CQG-NH <sub>2</sub> (1000)	$0.13 \times 10^1$	$2.80 \times 10^2$	100
*混合ペプチド	1.01	$3.61 \times 10^2$	100

\*100 $\mu\text{M}$  GPG-NH<sub>2</sub> + GKG-NH<sub>2</sub> + CQG-NH<sub>2</sub>

\*値は光学密度 (OD) を表す

【0059】

【表7】

表7

## 実験6- (その場で作成されたペプチド)

トリペプチド (100 $\mu$ m)	p24 (pg/ml)	減少率 (%)
7日目 HIV-1		
ペプチド対照なし	$2.0 \times 10^4$	0
GPG-NH <sub>2</sub>	$5.6 \times 10^2$	97
RQG-NH <sub>2</sub>	$1.13 \times 10^2$	99
KQG-NH <sub>2</sub>	$1.54 \times 10^2$	99
ALG-NH <sub>2</sub>	$0.42 \times 10^2$	100
GVG-NH <sub>2</sub>	$1.5 \times 10^4$	25
VGG-NH <sub>2</sub>	$1.0 \times 10^4$	50
ASG-NH <sub>2</sub>	$1.5 \times 10^4$	25
SLG-NH <sub>2</sub>	$1.14 \times 10^2$	99
SPT-NH <sub>2</sub>	$1.5 \times 10^4$	25

## 【0060】

小ペプチドによるHIV-1、HIV-2、およびSIV感染の阻害および/または防止

## 【0061】

表1に列挙する小ペプチドのうちで、GPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>は、HIV-1感染を阻害および/または防止し、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、およびGPG-NH<sub>2</sub>はHIV-2およびSIV感染に対する阻害または防止も示した。小ペプチドRQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>に対しては、HIV-2またはSIV感染を防止または阻害する能力についての分析を行わなかったが、小ペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>の対応する領域にあるカプシドタンパク質構造の顕著な相同性がHIV-2およびSIVと共通である

という事実から、HIV-2またはSIV感染、またはその両方の阻害または防止が期待されるということが理解される。

#### 【0062】

実験1～6(表2～7および図1に示す)の結果は、カルボキシル末端のアミノ酸としてグリシンを有するウイルスカプシドタンパク質配列に対応するアミド型の小ペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、およびSLG-NH<sub>2</sub>がHIV感染を阻害または防止することが示している。カルボキシル末端アラニン残基Leu-Lys-Ala(LKA)およびHis-Lys-Ala(HKA)またはカルボキシル末端グルタミン残基Gly-Pro-Gln(GPQ)およびAla-Cys-Gln(ACQ)を有するペプチドは、HIV感染を防ぐことができなかった。しかし、アミノ末端グリシン残基Gly-Pro-Gln(GPQ)、Gly-His-Lys(GHK)、およびGly-Ala-Thr(GAT)を有するペプチドが感染およびHIV-1融合細胞形成を防げなかったことから、アミノ末端にあるグリシンは抑制因子ではない。さらに、Gly-Pro-Gln(GPQ)、Ala-Cys-Gln(ACQ)、およびGly-Ala-Thr(GAT)等の他の非荷電極性側鎖、またはAla-Arg-Val(ARV)、His-Lys-Ala(HKA)、およびLys-Ala-Leu(KAL)、ならびにLeu-Lys-Ala(LKA)等のカルボキシル末端の非極性側鎖を有するペプチドは、感染を防ぐことができなかった。カルボキシル末端にあるグリシン残基がHIVおよびSIV感染の阻害に関係していると思われるが、小ペプチドのカルボキシル末端にある他のアミノ酸残基または修飾アミノ酸残基もまたHIVおよびSIV感染を阻害し得る。例えば、Ser-Pro-Thr(SPT)がHIV-1感染を阻害または防止することが示された。

#### 【0063】

いくつかの実験では、HIV-1、HIV-2、およびSIV感染に対する小ペプチドの効果は濃度および時間に依存するようだった。5 μMおよび20 μMほどに低濃度のGKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、およびGPG-NH<sub>2</sub>およびそ

これらの組み合わせは、HIV-1、HIV-2、およびSIV感染を減少させる効果が認められた。しかし、100 μM以上では、トリペプチドGKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、およびGPG-NH<sub>2</sub>ならびにそれらの組み合わせはよりいっそう効率的にHIV-1、HIV-2、およびSIV感染を阻害した。表6に示すように、300 μMのGKG-NH<sub>2</sub>およびCQG-NH<sub>2</sub>は、細胞上清に含まれるp24抗原の存在によって検出したところ約100%までHIV-感染性を減少させた。表6に示した減少率の計算は、ペプチド処理試料で検出されたp24抗原の量を対照群試料で検出されたp24抗原の量で割り、この数に100を掛けて割合を出し、割られた割合を100%から差し引くことで行った。例えば、GPG-NH<sub>2</sub>によって表される減少率は以下の通りである。

【0064】

【数1】

$$\frac{5.6 \times 10^2}{2.0 \times 10^4} \times 100 = 3\%、\text{そして } 100\% - 3\% = 97\%$$

【0065】

最初の5つの実験(表2~6)では、トリペプチドGKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、およびGPG-NH<sub>2</sub>およびそれらの組み合わせが5 μM以上の濃度でHIV-1、HIV-2、およびSIV感染を阻害することが示された。

【0066】

6番目の実験(表7および図1)では、小ペプチドRQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>が100 μMで効果的にHIV-1感染を阻害および/または防止することが示された。表7に示すように、小ペプチドRQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、およびSLG-NH<sub>2</sub>によって、上清中のカプシドタンパク質p24の量によって測定されるように、ウィルスをほぼ100%減少させることができた。GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>は100 μMではHIV-1感染に対する阻害または防止効果が少なかったが、より高い濃度でトリペプチドがよりいっそう高い効果を示すと考えられる。表2~7に示す実験1~7のデータは、ウィルスカプシド

タンパク質の配列に対応する小ペプチドが幅広い濃度範囲で有効な抗ウイルス薬剤であることを示している。

【0067】

小ペプチドを媒介としたウイルス阻害をよりいっそう理解するために、DNA合成、RNA合成、およびタンパク質発現に対するいくつかの研究を行った。それらの実験を以下に説明する。

【0068】

DNA合成、RNA合成、およびタンパク質発現の後の段階での小ペプチド阻害ウイルス感染性

【0069】

プロウイルスDNAおよびウイルスRNA合成を調べるために、小ペプチド存在下で培養したHIV-1感染H-9細胞由来のDNAおよびRNAを、種々の時点(0~48h)で調製した。サザンブロット分析によって、HIV-1 DNAがGPG-NH<sub>2</sub>存在下で合成され、かつほぼ最初の24時間ではプロウイルスDNAの量が小ペプチドの種々の濃度(0~2,000μM)とほぼ等しかった。それらの結果は、GPG-NH<sub>2</sub>等の小ペプチドがHIV-1侵入およびDNA合成に対して阻害効果を持たず、小ペプチドがHIV-1逆転写酵素活性を阻害しないという知見と一致するということを証明している。

【0070】

ノーザンブロット分析による分析では、感染後24~48時間で3種類のRNAバンド(9.2、4.3、および2.0kb)が検出された。9.2kbのRNAは、gagおよびpol遺伝子に関してゲノムRNAおよびmRNAの両方として機能する。4.3kbの単一スプライスRNA(singly-spliced RNA)は、少なくともenv遺伝子を表し、また2kbの多重スプライスRNAは、調節遺伝子をコードする。感染後48時間まで、GPG-NH<sub>2</sub>は20μMでそれらのRNAの発現に対して何ら阻害効果を示さなかった。200μMおよび2,000μMで、感染後48時間でHIV-1 RNAの減少が認められ、それは第2の複製サイクルの阻害を反映していると思われる。これらの結果によって、転写段階ではHIV-1複製を小ペプチドが阻害しないこと、そしてまた小ペプチドは

転写産物のスプライシングに影響を及ぼさないことが明らかになった。

#### 【0071】

小ペプチド存在下でHIV-1が適当にタンパク質を発現するかどうかを判断することを意図した実験では、タンパク質発現または修飾に対して著しい効果は観察されなかった。しかし、一つの実験では、ポリアクリルアミドゲル上でgp160/gp120の異常な移動が認められた。GPG-NH<sub>2</sub> (20 μM以上)存在下で、gp160および/またはgp120は分子量がわずかに120,000 Daをわずかに下回る分子量を表すポリアクリルアミドゲル上の位置に電気泳動することが観察された。この結果は、再現性がなく、またgagタンパク質p17またはp24の移動における変化は観察されなかった。GPG-NH<sub>2</sub>存在下でのウィルスタンパク質のグリコシレーション(glycosylation)を分析するための研究によれば、N-またはO-結合グリコシレーションのいずれに対しても影響がなかった。また、組み換えによって(ワクシニア・ウィルスで)産生されたgp160に対するグリコシレーションは、GPG-NH<sub>2</sub>によっては影響されなかった。さらに、GPG-NH<sub>2</sub>は、HIV-1特異的プロテアーゼ活性に対して影響を及ぼさないことがわかった。

#### 【0072】

上記した実験では、小ペプチドがHIV複製サイクルの後期の段階でHIV感染性と干渉することが示された。GPG-NH<sub>2</sub>は、DNA合成、RNA合成、タンパク質合成、およびタンパク質グリコシレーションを妨害することができなかった。以下の開示では、小ペプチド、例えばGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>が複製サイクルの後段でウィルス感染を阻害するより多くの証拠が開示されており、より広い意味で、HIVまたはSIV感染等のウィルス感染を阻害する能力について他の小ペプチドまたはその誘導体をスクリーニングする別の技術を提供し得る。したがって、HIV-1感染細胞が小ペプチドの存在または非存在下でインキュベートされたいくつかの電子顕微鏡実験を以下で議論する。

#### 【0073】

## ヌクレオカプシドの集合体に干渉する小ペプチド

## 【0074】

小ペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>がHIV感染を阻害したことがひとたび発見されると、小ペプチドと一緒にインキュベートしたHIV感染細胞をさらに分析するために電子顕微鏡法が用いられた(図2、3、および4を参照)。図4に示すように、電子顕微鏡による分析でGPG-NH<sub>2</sub>との接触が適当なウィルスヌクレオカプシド形成を妨害することがわかった。

## 【0075】

このような一群の実験では、37℃、1時間、300TCID<sub>50</sub>でHIV-1SF-2ウィルスをHUT78細胞に感染させた。続いて、実施例2に示すように、感染細胞に対して洗浄およびペレット化を3回行った。その後、10%FBS、抗体(100U/ml)、およびポリブレン(3.2μg/ml)を添加したRPMI培地に細胞を再懸濁した。次に、感染後3、5、または7日に1μMまたは10μMの濃度で細胞培養中にGPG-NH<sub>2</sub>を添加した。対照群の試料に対しては、0.5μMリトナビル(プロテアーゼ阻害剤)を投与した。

## 【0076】

14日目まで細胞を培養し、この時点で細胞を従来的手段によって2.5%グルタルアルデヒドで固定した。固定細胞を次に1%OsO<sub>4</sub>で後固定し、さらに脱水してエポキシ樹脂に包埋し、そしてブロックを重合させた。ヌクレオカプシドの幅に合うように約60~80nmの厚さのウィルス感染細胞のエポキシ切片を作った。1.0%酢酸ウラニルで染色したグリッド(grid)に切片を載せ、加速電圧80kVでツアイス(Zeiss)CEM909顕微鏡で分析した。画像品質を改善するために顕微鏡に分光器を備え付け、また液体窒素冷却トラップを用いてビームによる損傷を少なくした。対照およびGPG-NH<sub>2</sub>でインキュベートした細胞の切片を有するグリッドをいくつかの盲検試験で調べた。

## 【0077】

未処理のHIVウィルスの電子顕微鏡による鏡検によって、特徴的な円錐状の

ヌクレオカプシドと、前記ヌクレオカプシドの長さに延びた均一に染色されたRNAとが明らかになった(図2参照)。それとは対照的に、図3はウィルスプロテアーゼ阻害剤リトナビルの存在下で産生されたいくつかのHIV-1粒子を示す電子顕微鏡写真が提示されている。リトナビル処理された感染細胞は、予想通りに、認識可能なヌクレオシドを持たない奇形構造を示した(図3参照)。図4は、GPG-NH<sub>2</sub>存在下で産生されたウィルス粒子を示す電子顕微鏡写真を提示している。GPG-NH<sub>2</sub>で処理されたHIV-1粒子を持つ細胞は、リトナビル処理粒子とは異なる識別可能なカプシド構造を持つHIV-1粒子を示した。さらに特徴的なことは、いくつかのトリペプチド処理ウィルス粒子では、円錐形状のカプシド構造が相対的に完全ではあるが、RNAはカプシドの外側または前記カプシドの上面(幅広の端部)のいずれかでボール状の形態の中に蓄積された。さらに、いくつかのカプシドは正常なヌクレオカプシドに僅かに類似している、または全く類似していない誤って生じた構造を持つことが観察され、また一端でその構造の外側または前記構造の内側にあるように見えるRNAが観察された。それらの研究から、小ペプチドがヌクレオカプシドの適当な形成に干渉し、それによってこのようなカプシド発達の阻害がプロテアーゼ阻害剤リトナビルの作用とは異なる段階で生ずることが明らかとなった。

#### 【0078】

アミド型のトリペプチド、例えばGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>がカプシド集合に干渉することについてのさらなる証拠は、標的生体分子としてのp24による結合アッセイを実施することによって明らかになった。p24結合アッセイの詳細を以下に提供する。

#### 【0079】

主カプシドタンパク質(p24)に対する小ペプチドの結合

#### 【0080】

小ペプチドが成熟カプシドタンパク質(CA)またはp24と相互作用する能力を有し、それによってヌクレオカプシドに干渉するかどうかについて直接調べ

るために、実験を行った。この群の実験では、放射性標識GPG-NH<sub>2</sub>がp24に結合する能力を評価するp24結合アッセイを実施した。

#### 【0081】

孔径が10kD未満の透析膜(Slide-A-Lyzer, Pierce)を用いて透析をベースとする結合アッセイを行った。BSA(Sigma)および組み換え体タンパク質p24およびgp120(AIDSプログラム、NCIBからの無償提供)の10μMストックの50μlを別々の透析膜にインキュベートし、タンパク質を4で2日間、150mMのNaCl、50mMのTris-HCl緩衝液(pH7.4)、および27.5Mの<sup>14</sup>C-GPG-NH<sub>2</sub>(Amersham Ltd. UK)から構成される500ml溶液に対して透析した。続いて、透析したp24、gp120、およびBSAから10または5μlを分取し、シンチレーション・バイアル内の3mlリーディ・セーフ(ReadySafe)(Beckman)と混合した。次に、<sup>14</sup>Cをシンチレーション計数によって検出した。

#### 【0082】

代表的な透析実験の結果を表8に示す。注目すべきことに、GPG-NH<sub>2</sub>によるp24の結合が透析平衡状態で観察された。p24に結合した放射性GPG-NH<sub>2</sub>の量は緩衝液中に存在する量よりも7.5倍多かった。それとは対照的に、透析緩衝液に存在する量を上回る感知可能な量の放射性GPG-NH<sub>2</sub>はgp120またはBSAのいずれとも結合しなかった。これらのことから、GPG-NH<sub>2</sub>等の小ペプチドがp24に結合するが、この相互作用が適当なヌクレオカプシド形成を妨害することが判明した。

#### 【0083】

#### 【表8】

表8

試料	透析緩衝液	p24	gp120	BSA
μCi/ml	1.816	13.712	1.745	1.674
緩衝液との比較(倍)	1.000	7.551	0.961	0.922

## 【0084】

以下の開示では、AZTまたはリトナビルがHIVまたはSIV感染を阻害する方法とは異なる機構で、小ペプチド、例えばGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>がHIVおよびSIV感染を阻害するさらなる証拠が提供される。

## 【0085】

AZTまたはリトナビルに対して耐性を示すHIV-1株を阻害する小ペプチド

## 【0086】

ヌクレオシド類似体AZTまたはプロテアーゼ阻害剤リトナビルのいずれか一方に対する耐性を持つHIV-1株を阻害する小ペプチドの能力。HIV-1耐性分離株を末梢血単核球(PBMC)内で培養し、上清をウィルスストックとして回収した。TCID<sub>50</sub>(50%組織培養感染量)の力価測定をPBMCで行い、力価をリードおよびムエンチ(Read and Muench)の式に基づいて計算した。37℃、1時間での吸着によって25TCID<sub>50</sub>のそれらのウィルス(HIV-1 SF162を対照群として使用)によって400,000PBMCを感染させた、その後3回洗浄した。細胞を、薬物を含まない培地、またはGPG-NH<sub>2</sub>(100μM)、AZT(5μM)、またはリトナビル(0.1μM)のいずれかを含む培地に再懸濁し、保湿CO<sub>2</sub>、37℃の条件下でインキュベートした。4日毎に培地を変え、上清に含まれるHIV-1 p24抗原タンパク質をELISAによってモニタした(表9)。

## 【0087】

表9に示すように、GPG-NH<sub>2</sub>はAZTまたはリトナビル耐性HIV株のいずれかに対して強力な抗ウィルス効果を有していた。この実験の結果は、上記したデータを実証するものであり、小ペプチドがAZTおよびリトナビルとは異なる段階でHIV複製を阻害することを明らかにしている。さらに、Vahln e他の米国特許第5,627,035号(本明細書でその全体を引用する)に開示されているように、HIVの「街上株(street strain)」の処置はGPG-N

H<sub>2</sub>によって達成された。それらがHIVウィルスタンパク質の配列からも誘導されると考えるならば、ペプチド、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>もまた、HIVの街上株と同様に、AZTおよびリトナビル耐性HIV感染の治療に有用である。

【0088】

【表9】

表9

型	番号	対照 (%)	GP6 100μM (減少率%)	AZT 5μM (減少率%)	Rito <sup>a</sup> 0.1μM (減少率%)
低AZT	p7261	130000* (0)	< 500 (100%)	< 500 (100%)	nt
中AZT	p7163	107000 (0)	< 500 (100%)	22200 (79%)	nt
高AZT	p7227	114000 (0)	< 500 (100%)	68000 (40%)	nt
低PI	p7300	146000 (0)	< 500 (100%)	nt <sup>b</sup>	64000 (56%)
高PI	p7141	114000 (0)	< 500 (100%)	nt	98000 (14%)

\*HIV-1 の p24 の値は pg/ml で示されており、感染後 14 日の重複試験の平均値である

<sup>a</sup>試験せず

<sup>b</sup>リトナビル

低 AZT: AZT に対して低い耐性を有しつつ単離された株

中 AZT: AZT に対して中間の耐性を有しつつ単離された株

高 AZT: AZT に対して高い耐性を有しつつ単離された株

低 PI: プロテアーゼ阻害剤に対して低い耐性を有しつつ単離された株

高 PI: プロテアーゼ阻害剤に対して高い耐性を有しつつ単離された株

【0089】

上に示したデータをさらに支持するものとして、いくつかの HIV-1 感染性実験を、V3 ループに GPG-共通配列が欠損している HIV-1 突然変異体に対して実施した。以下に詳細に説明するこれらの実験によって、GPG-NH<sub>2</sub> 媒介 HIV-1 感染が V3 ループに依存しない様式で生じることを確立した。HIV-1 env 糖タンパク質 gp120 の V3 ループは、ループの先端に保存 G

P G配列を含むもので、ウィルス複製に関与すると思われる。V 3ループ相互作用をかき乱すことでG P G - N H<sub>2</sub>がH I V - 1感染を阻害するかどうかを判断するために、V 3ループH I V - 1突然変異体プロウィルスを構築した。G P Gドメインを欠損したこの突然変異体プロウィルスを、感染性アッセイにおいて細胞に感染する能力について試験し、また免疫細胞化学および電子顕微鏡検査によって分析した。以下の実施例は突然変異体プロウィルスの構成、H I V - 1感染性のアッセイ、免疫細胞化学および電子顕微鏡検査による突然変異体ウィルス粒子の構造の決定、さらにG P G - N H<sub>2</sub>が突然変異体ウィルス粒子による感染を阻害することの発見について説明する。

### 【0090】

#### 実施例3

感染性クローンp B R u - 2に基づいたG P G欠損プロウィルスは、分子生物学上の従来の方法を用いて構築した。サブクローニング、突然変異誘発、およびプラスミドDNAの増幅のために、大腸菌 (*Escherichia coli*) D H 5 株およびN M 5 2 2 m u t S株を用いた。p u c 1 8 プラスミドをサブクローニングのベクターとして用い、また完全長のH I V - 1 / B r u ( L A V、L A Iとも呼ぶ) の複製コンピテントクローンを含むH I V - 1プロウィルスクローンp B r u - 2を突然変異体ウィルス生成のために用いた。

### 【0091】

p B R u - 2由来のe n v遺伝子をコードする2.7kb S a l I - t o - B a m H Iフラグメントをp u c 1 8ベクターのS a l IおよびB a m H I部位にサブクローニングした。G P G欠失は、U . S . E .突然変異誘発キット ( P h a r m a c i a ) を用いた部位特異的突然変異誘発によって達成した。2つのオリゴヌクレオチドを必要とした。変異原性オリゴヌクレオチドは、5'リン酸化 C G T A T C C A G A G G A G A G C A T T T G T T A C A A T A G G - 3' (Scandinavian Gene Synthesis AB, Stockholm, Swedenから入手) である。選択的オリゴヌクレオチドは、5'リン酸化 G T G C C A C C T G T C G A C T A A G A A A C C A T - 3' 独自の制限部位、すなわちp u c 1 8ベクターのA s t I Iを取り除くように設計された。し

たがって、野生型DNAは、対応するエンドヌクレアーゼAatIIによって消化することで、野生型および突然変異DNAの混合プールから選択的に排除された。突然変異誘発反応生成物をE. coliに形質転換してプラスミドDNAを増幅させた。突然変異体は、自動レーザ蛍光ALF（登録商標）DNAシーケンサー（Pharmacia）を用いてDNAのポリメラーゼ鎖反応（PCR）シーケンシングによって確認した。GPGをコードするオリゴヌクレオチドから切り出されたSalI-BamHIフラグメントをpBRu-2にクローニングして、プロウィルスプラスミドを生成した。いくつかの細菌コロニーから得た突然変異体DNAをQIAGENプラスミド・キットを用いて増幅および精製した。それらのうちの2つ、すなわちmp8およびmp10DNAを細胞に組み込んだ。

#### 【0092】

DEAEデキストラン法（Palmer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1932-1936 (1988)）を用いて、野生型DNAおよび突然変異体DNA（mp8およびmp10）をHeLa、HUT<sub>78</sub>、またはMT-2細胞に組み込んだ。簡単に言えば、トランスフェクション前24時間に10<sup>6</sup>細胞を調製した。次に、培地を取り除き、事前に温めておいたリン酸緩衝塩類溶液（PBS）で細胞を1回洗浄し、さらにTBS-D（Tris緩衝食塩水-0.1%デキストラン）で1回洗浄した。約0.5 μgのDNAをTBS-D/DEAE-デキストランと混合し、それを細胞に加えた後、30分間、37℃でインキュベートした。次に、溶液を除去し、細胞をTBS-Dで1回洗浄し、さらにPBSで1回洗浄した。10%血清および5 μgのクロロキンニリン酸塩を添加し、かつ事前に温めた培地5 mlに細胞を混ぜ、37℃で1時間インキュベートした後、血清を含まない培地で3回洗浄した。最後に、細胞を10 mlの培地で維持し、37℃で4日間インキュベートした。

#### 【0093】

ウィルス含有上清を回収し、0.45 μg孔径フィルタで濾過し、いっさいの細胞を取り除き、分取して-70℃でウィルスストックとして保存した。ウィルスの力価測定は、ウィルスを連続希釈してMT-2細胞に感染させることで行った。ウィルス上清の5倍連続希釈のそれぞれから100 μlを取り、それを20

0,000MT2細胞の接種材料とした。16時間にわたる吸着の後に、細胞を5回洗浄し、24ウェルプレート(Costar Corporation)に入った1.5ml培地に再懸濁した。感染後4、7、および11日目に培地を取り替え、上清に含まれるp24生成物を14日目に試験した。50%組織培養感染量(TACID<sub>50</sub>)終了点をリードおよびムエンチ(Read and Muench)の式に基づいて計算した(Reed and Muench, Am. J. Hygiene 27: 493-497 (1938))。

#### 【0094】

CD4+T細胞株MT-2、C91-PL、C8166、CEM、HUT<sub>78</sub>、H9、Jurkat、およびMolt-3、単球様細胞株U937およびTHP-1を、10%(v/v)加熱不活性化ウシ胎仔血清(GIBCO)、ペニシリン(100U/ml)、およびストレプトマイシン(100U/ml)を添加したRPMI 1640培地(GIBCO)中で増殖および維持した。HeLa細胞を、2%FBS、0.8%デキストロース、および抗生物質を添加したハンクス塩溶液を含む培地199で増殖させた。

#### 【0095】

末梢血単核球(PBMC)をフィコール-ヒパーク(Ficoll-Hypaque)密度勾配遠心によって精製し、感染前に、フィットヘマグルチニン(KEBO Lab)で3日間、上記の添加物が加えられたRPMI 1640培地中で刺激した。樹状細胞(DC)を血液単球から生成し、Rorman et al., J. Exp. Med. 180:83-93 (1994)に記載されたようにして、プラスチックに粘着させることで、単核分画から精製した。簡単に言えば、血液単核球を上記のようにして精製し、接着は2時間にわたってRPMI培地中で組織培養フラスコ上で行い、次に接着しなかった細胞をPBSで洗い流した。接着細胞は、GM-CSF(25U/ml)およびIL-4(4.5U/ml)を含む培地中で7日間培養し、さらにウイルスを感染させた。

#### 【0096】

感染は、細胞株MT-2、C91-PL、C8166、CEM、HUT<sub>78</sub>、H9、Jurkat、Molt-3、U937、THP-1、PBMC、および樹状細胞(DC)で行った。CD4+細胞株に関しては、100TCID<sub>50</sub>で16

時間、野生型または突然変異体ウイルスと37℃で200,000細胞をインキュベートし、次に5回洗浄し、10% FBS、抗生物質、およびポリブレン (Sigma、2 µg/ml) を添加した1.5 ml の新鮮RPMI媒体に再懸濁し、さらに湿気を持った5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で24ウェルプレートでインキュベートした。PBMCに関しては、500,000細胞を用い、プロロイキン (Eurocetus、150 U/ml)、ヒドロコルチゾン (Sigma、5 µg/ml)、およびポリブレン (Sigma、2 µg/ml) を添加したRPMI培地で培養した。DCに関しては、Grannelli-Piperno et al, J. Exp. Med. 184:2433-2438 (1996)に記載されているように、800,000細胞をウイルスに対して1、16、および48時間、それぞれさらし、その後PBMCで3回洗浄し、さらに37℃、5分間、0.05%トリプシンで穏やかに処理していっさいの表面結合ウイルスを取り除く。対照群として、PBMCを同様の方法でmp8にさらした。細胞を洗浄し、回収し、溶解させ、フェノール/クロロホルム抽出でDNAを単離し、続いて半定量的なPCR検出LTRシーケンスを実行した。10倍の連続希釈をDNAに対して行い、すでに説明したような3つのプライマーが「入れ子」となった構成を用いて、LTR PCRを40サイクル実行した (Hwang et al., Science 253: 71-74 (1991))。DC - PBMC同時培養およびDC - MT - 2同時培養実験に関しては、250,000 DCを16時間にわたってウイルスにさらし、その後、p24が検出されなくなる (5 pg/ml未満) まで5回洗浄を行った。次に、細胞を0.05%のトリプシンで穏やかに処理し、CD4上のHIV-1結合エピトープを破壊し、いっさいの表面結合ウイルスを除去した。洗浄後、細胞を200,000 PBMC細胞または100,000 MT - 2細胞が混合されたRPMI培地に再懸濁した。

#### 【0097】

感染実験のために、感染後4、7、11、14、および17日目に培地を変え、HIV-1 p24 ELISAキット (Abbott Laboratories, North Chicago, USA) を用いてp24濃度によってウイルスの増殖を判断した。p24アッセイのELISA定量を用いて各ウイルス試料中のp24濃度を定量したところ、このアッセイはp24の線形用量応答範囲が20 pgから640 pg/mlを有

した。全てのウイルス試料を多重希釈によってアッセイし、p 2 4の量を回帰直線を用いて決定した。感染後17日間培養した細胞からDNAを単離し、V3領域の直接シーケンシングをこれらのDNAに対して行うことで突然変異を確認した。

#### 【0098】

すでにKowalski et al., Science 237:1351-1355 (1987)に記載されているようなAPAAP（アルカリホスファターゼ抗アルカリホスファターゼ免疫複合体）サンドイッチ法によって、感染および未感染のMT-2細胞に対する免疫細胞化学も実行した。細胞をPBSで2回洗浄し、15分間にわたってアセトン処理することで細胞をスライド上に固定した。次に、細胞を、一連のマウス抗HIV-1 p 2 4一次抗体、ウサギ抗マウス免疫グロブリン二次抗体、およびマウスAPAAPモノクローン抗体（DAKO）に対して、それぞれ37、30分間、加湿チャンバ内でインキュベートし、その後、PBSで5分間洗浄した。色素産生基質を添加し、室温で20分間にわたってインキュベートし、スライドをH<sub>2</sub>Oで洗浄し、グリセロールの中に置いて顕微鏡観察（倍率×100）を行った。ウシ腸アルカリホスファターゼおよびウシ腸アルカリホスファターゼ（APAAP、希釈1：20）に対するモノクローン抗体（Mabs）マウス抗HIV-1 p 2 4（DAKO、希釈1：20）、ウサギ抗マウス免疫グロブリン（希釈1：25）、およびMabのマウス免疫複合体を用いて免疫細胞化学アッセイを行った。

#### 【0099】

さらに、電子顕微鏡検査を感染細胞に対して実施した。新鮮な感染細胞を7日目に2.5%グルタルアルデヒドで固定し、1%OSO<sub>4</sub>で後固定した。細胞を脱水し、エポキシ樹脂に包埋し、さらに1%酢酸ウラニルで染色した。ウイルスに感染した細胞のエポン（Epon）切片を60～80nmの厚さに作った。画像品質を改善するために分光器を備え付けたツァイス（Zeiss）CEM902を用いて加速電圧80kVで、試料の分析を行った。また液体窒素冷却トラップを用いてビームによる損傷を少なくした。

#### 【0100】

別の群の実験では、V3ループ阻害以外の機構によってGPG-NH<sub>2</sub>がHIV-1感染を阻害するさらなる証拠が得られた。したがって、MT-2細胞における野生型およびV3-ループ欠失突然変異体(GPGドメイン)の感染性を阻害するGPG-NH<sub>2</sub>の能力が決定される。これらの実験では、GPG-NH<sub>2</sub>の阻害効果を試験するために、25 TCID<sub>50</sub>でHIV-1<sub>B<sub>r</sub>U</sub>野生型およびGPG欠失突然変異体mp8およびmp10を約200,000MT-2細胞に感染させた。濃度が20 μMおよび100 μMのGPG-NH<sub>2</sub>存在下または非存在下で10%(v/v)加熱不活性化ウシ胎仔血清(FBS、GIBCO)、ペニシリン(100 μ/ml)、ストレプトマイシン(100 μ/ml)、およびポリブレン(シグマ2 μg/ml)とを添加した1mlのRPMT 1640培地にMT-2細胞を再懸濁した。その後、ウイルスを25 TCID<sub>50</sub>で20~30 μl量で添加した。細胞を37℃で16時間にわたってウイルスとともにインキュベートし、その後、170×gで7分間遠心することで緩やかにペレット化させた。次に、室温で、上記のように170×g、7分間の細胞遠心沈降によって、ペプチド無しのRPMI培地で細胞を3回洗浄した。最後の洗浄を行った後、24ウェルプレート(Costar corporation)内のRPMI培地に細胞を再懸濁し、加湿5%CO<sub>2</sub>中、37℃に保った。培地を感染後4、6、11、および14日目に交換する時に、培養液上清を回収した。ウイルスの複製をモニタするために、7日目および14日目の上清に含まれるHIV-1 p24抗原タンパク質をp24の線形用量応答範囲が20 pgから640 pg/mlであるELISAキット(Abbott Laboratories)によってアッセイし、p24量を回帰直線によって決定し得る。

#### 【0101】

この実施例で記載した実験から得られた結果は、以下に詳細に説明するが、GPG-NH<sub>2</sub>がV3ループに依存しない方法でHIV-1感染を阻害することを証明する。

#### 【0102】

V3ループに依存しない方法での小ペプチドによるHIV-1感染の阻害

#### 【0103】

V3ループでのGPG欠失がウィルスの産生に影響を及ぼすかどうかを判断するために、プロウィルスプラスミドDNA（野生型および突然変異体の両方）をCD4陰性細胞株Hera、ならびに、CD4陽性細胞株MT-2およびHUT<sub>78</sub>にトランスフェクトした。培養液上清を毎日採取し、ウィルス産生をp24濃度測定によってモニタした。6日間の時間枠内で、類似の増殖パターンが野生型ウィルス（WT）とHeraトランスフェクションからの突然変異体とで観察された。p24濃度は4日目まで増加し続け、その後プラトーに達した。したがって、突然変異体および野生型のプロウィルスDNAはそれらの細胞で等しく十分に発現した。類似の結果は、HUT<sub>78</sub>トランスフェクタントから得られ、またこれらのトランスフェクトされたHUT<sub>78</sub>細胞にシンシチウム（syncytia）が観察された。しかし、MT-2トランスフェクションによるp24産生のパターンは、HeraおよびHUT<sub>78</sub>細胞で観察されるものと著しく異なっていた。p24産生レベルは、4日をすぎても増加し続けたが、突然変異体ウィルス/プロウィルスDNAによってトランスフェクトされた細胞のp24産生は野生型ウィルス・プロウィルスDNAによってトランスフェクトされたものよりも低かった。トランスフェクション後6日目で、野生型が1,380 ng/mlのp24を産生したが、mp8およびmp10のp24産生はそれぞれ15.8 ng/mlおよび13.7 ng/mlであった。これらの結果は、GPG欠失突然変異体の子孫ウィルスが産生され、非トランスフェクションCD4+MT-2細胞に感染することができたにもかかわらず、あきらかに野生株の子孫よりも効率的ではないことを示している。これらのトランスフェクトされた細胞由来のDNAの塩基配列を決定し、GPG欠失をmp8およびmp10の子孫の双方について確認した。

#### 【0104】

次に、感染を確立することが可能なウィルス粒子を生成する突然変異体分子クローンの能力について、さらに分析を行った。Hera細胞およびMT-2細胞をプロウィルスDNAによってトランスフェクトし、前記トランスフェクション後4日目に培養液上清を回収し、濾過し、p24レベルについてアッセイを行い、分取量を-70℃で凍らせてウィルスストックとした。ウィルスの力価測定（

TCID<sub>50</sub>)をMT-2細胞で行った。p24が等量含まれるように調製したMT-2トランスフェクタントからの上清は、野生型ウイルスでは83,300TCID<sub>50</sub>/ml産生し、一方突然変異体mp8およびmp10はそれぞれ16,700TCID<sub>50</sub>/mlおよび25,000TCID<sub>50</sub>/ml産生し、野生型で得られたものよりも約5倍少なかった。HeLaトランスフェクタント上清の低p24産生にしたがって、前記上清が生ずる力価もまた非常に低く、野生型および突然変異体でそれぞれ70TCID<sub>50</sub>/mlおよび10TCID<sub>50</sub>/mlであった。したがって、突然変異体ウイルスが感染性を依然として持っている、V3におけるGPGモチーフの欠失によってそれらの細胞でのウイルス病原性が減少するかもしれない。このことは、MT-2細胞の感染によってさらに試験され、子孫ウイルスの産生についてモニタされた。HeLaおよびMT-2トランスフェクションの両方からのウイルス・ストックを次に使用して、MT-2細胞に感染させた(MT-2トランスフェクタント上清から100TCID<sub>50</sub>野生型または突然変異体ウイルス、またはHeLaトランスフェクタントストックから5TCID<sub>50</sub>のウイルス)。細胞をウイルスとともに16時間インキュベートし、続いて洗浄した。その後、細胞を再懸濁し、37℃でインキュベートした。ウイルス複製をp24レベルの測定および細胞変性効果によってモニタした。MT-2トランスフェクタント由来のウイルス、野生型(WT)、同様に、突然変異体ウイルス(mp8およびmp10)によって、すべてがp24産生によってウイルス複製を示した。野生型は感染後11日目でp24のピーク濃度が2,150ng/mlに達し、一方突然変異体は約4日遅れてピーク濃度を表し、感染後14日目でmp8およびmp10はそれぞれ1,580ng/mlおよび1,760ng/mlのp24ピーク値を示した。HeLaトランスフェクタント由来のウイルスによるMT-2細胞の感染(5TCID<sub>50</sub>)でもまた、MT-2細胞産生ウイルスで得られたものと類似の増殖反応速度でWTおよび突然変異体の両方でp24産生が生じた。DNAを全ての感染細胞から単離し、V3シーケンシングによって突然変異体を確認したところ、突然変異体ウイルスの増殖が野生型配列の逆転または獲得によるものではないことが示された。

【0105】

シンシチウム形成 (syncytium formation) もまた、WTおよび突然変異体の両方が感染したMT-2細胞で観察された。細胞培養を感染後7日目で固定し、APAAPサンドイッチ法を用いる免疫細胞化学で使用した。感染細胞を免疫染色して赤色に染めた。シンシチウムはWTおよび突然変異体ウイルス感染MT-2細胞の両方で観察されたが、WT(感染後4日目に誘導)は突然変異体(感染後6日目に誘導)よりも早くシンシチウムを誘導した。電子顕微鏡検法(EM)は、突然変異体ウイルス感染MT-2細胞がHIV-1粒子を産生することをさらに明らかにした。特徴的な円錐形状のコアを有するHIV-1粒子が見られた。これらのデータによって、GPG欠失突然変異体がMT-2細胞において感染性を残していることが確認された。

#### 【0106】

V3ループ相互作用とは異なる機構によるウイルス感染をGPG-NH<sub>2</sub>が阻害する決定的な証拠は、MT-2細胞での野生型およびV3ループ欠失突然変異体(GPGドメイン)の感染性を阻害するGPG-NH<sub>2</sub>の能力を評価する実験を実行した時に得られた。感染後7日目および14日で、野生型および突然変異体ウイルス感染の著しい減少が見られた。表10を参照されたい。20 μMおよび100 μMで、GPG-NH<sub>2</sub>が野生型感染およびGPG欠失構成体mp8およびmp10によって媒介された感染を効果的に減少させた。実際、野生型、mp8、およびmp10について、感染後7日目および100 μMのGPG-NH<sub>2</sub>で、ウイルス感染性が等しく完全に減少することが観測された。これらの結果は、GPG-NH<sub>2</sub>がV3ループのGPGドメインとの相互作用とは別の機構によってHIV-1感染を阻害していることを示している。

#### 【0107】

#### 【表10】

表10

7日目	p24 pg/ml				
	対照	GPG 20 $\mu$ M	減少率%	GPG 100 $\mu$ M	減少率%
野生株	33800	23900	29	3390	90
mp8	3170	2420	24	208	93
mp10	3120	1560	50	173	94

14日目					
野生株	357000	223000	38	181000	49
mp8	148000	69100	53	7410	95
mp10	470000	51500	89	47700	90

## 【0108】

ここに示したデータは、修飾カルボキシル末端を持つ小ペプチドがウィルス感染（例えば、HIV-1、HIV-2、およびSIV感染）を阻害し、p24に結合し、そして適当なカプシド集合を妨害することを示している。上記した多くのアッセイは、任意の小ペプチド、修飾小ペプチド、オリゴペプチド、またはペプチド疑似体の能力を同定して、HIVまたはSIV感染を防止または阻害することに使用可能である。同様の技術を、他のウィルス感染の防止または阻害に対して任意の小ペプチド、修飾小ペプチド、オリゴペプチド、またはペプチド疑似体の能力を同定するために使用することもできる。

## 【0109】

いくつかのウィルスカプシドタンパク質の配列が公知であることから、異なるウィルスカプシドの適当な集合を防ぐアミド型の小ペプチドのデザイン、製造、および同定は簡単である。例えば、いくつかのウィルスカプシドタンパク質は、主相同領域（MHR）と呼ばれる、長さが20アミノ酸の相同領域を有しており、これは多くの腫瘍ウィルスおよびレンチウィルスのカルボキシル末端ドメイン内に存在する（図5参照）。図5は、HIV-1のカルボキシル末端ドメイン（146～231残基）を示し、この配列を、他のウィルス（そのうちのいくつかは、鳥、マウス、およびサルに感染する）のカプシドタンパク質配列と比較している。注目すべきことは、それらのウィルスカプシドタンパク質の配列と顕著な相同性が見いだされることである。発明者らは、HIV-1におけるカプシドの二量体化およびウィルス集合にとってカルボキシル末端ドメインが必要であるこ

とを観察した (Gamble et al., Science 278: 849 (1997)、本明細書で全体的に引用する)。この開示で説明したアッセイにおいて抗ウイルス活性を示した小ペプチドがHIV - 1、HIV - 2、またはSIVのカルボキシル末端ドメインの領域と完全または部分的に一致する一方で、ウイルスのN - 末端ドメインの領域がカプシド集合にとって重要であり、またウイルスカプシドタンパク質のN末端領域のアミノ酸と完全または部分的に一致する小ペプチドのデザインおよび合成は本発明の好ましい実施形態である。しかし、MHR領域およびウイルスカプシドタンパク質のカルボキシル末端ドメイン内のアミノ酸配列に完全または部分的に一致する小ペプチドの使用は、本発明の好ましい実施形態である。

#### 【0110】

本発明は、3種類の異なるウイルスのカプシドタンパク質配列に完全または部分的に一致するアミド型のいくつかの新規の小ペプチドが、これらのウイルスによる感染を効果的に阻害および/または防止することを示した。ここで用いた戦略は、他のウイルスのカプシドタンパク質配列に完全または部分的に一致するアミド型の別の小ペプチドの産生に用いることができる。図5に開示した配列の領域に対応する小ペプチド、オリゴペプチド、および/またはペプチド疑似体をデザインおよび製造することで、当業者に容易に理解されるように、例えば、HIV、SIV、RSV、HTLV - 1、MMTV、MPMV、およびMMLV感染を阻害する新規の分子を、上記したスクリーニング方法またはそれらのアッセイの変形例を用いることで素早く同定し得る。さらに、他のウイルスカプシドタンパク質の多くの配列、例えばアレナウイルス、ロタウイルス、オルビウイルス、レトロウイルス、パピローマウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、ミクソウイルス、およびヘパドナウイルス科のウイルス等が知られている。それらの配列に完全または部分的に一致するいくつかの小ペプチド、オリゴペプチド、および/またはペプチド疑似体を、ここで説明したウイルス感染性アッセイおよび/または電子顕微鏡検査法を用いて、または本発明の開示によって当業者が容易に想到できるそれらのアッセイの変形例によって、ウイルス感染を効果的に阻害および/または防止するものを同定するために、選択または素早くスクリーニングし得る。

## 【0111】

好ましい実施形態は、カプシド集合を妨害し、ウィルス感染を阻害するために使われる修飾カルボキシ末端を有する小ペプチド（アミノ酸1個以上、かつアミノ酸10個以下の長さ）を含む。好ましくは、HIVまたはSIVカプシドで見いだされる配列を有するジペプチド、トリペプチド、およびオリゴペプチド、さらに対応のペプチド疑似体を用いる。例えば、本発明のオリゴペプチドは、4個のアミノ酸、5個のアミノ酸、6個のアミノ酸、7個のアミノ酸、8個、または9個または10個のアミノ酸を有するものであってもよく、本発明のペプチド疑似体は4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸に類似した構造を有するものであってもよい。これらのオリゴペプチドは、望ましくはトリペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>で見いだされる完全または部分的配列も含む。ジペプチド、トリペプチド、およびオリゴペプチドに類似したペプチド疑似体も、好ましくは、GPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>で見いだされる配列に一致する。好ましくは、小ペプチドは、カルボキシル基(COOH)よりもむしろカルボキシ末端(CO-NH<sub>2</sub>)に修飾基(例えば、アミド基)を有する。他の修飾基をカルボキシル末端に有する小ペプチドも使用し得るが、望ましくは、結合修飾基はアミド基と同一電荷を持ち、かつ立体的に同じ振る舞いをする(カルボキシル末端に異なる置換基を有するペプチドを比較するアッセイに関するVahlne他の米国特許第5,627,035号を参照されたい)。いくつかの実施形態では、小ペプチドの組み込みの改善、またはエキソプロテアーゼ消化の防止、またはその両方のために、アセチルまたはメチル基を小ペプチドのいずれかの末端に付加することが望ましい。

## 【0112】

以下の開示では、ジペプチド、トリペプチド、アミノ酸が10個以下のオリゴペプチド、およびトリペプチド、ならびにアミノ酸が10個以下のオリゴペプチ

ドに類似したペプチド疑似体（総称して「ペプチド剤」と呼ぶ）を含む生物工学的ツールおよび薬学的組成物を作成するために、いくつかのアプローチが提供される。ここで注目すべき点は、「ペプチド剤」という用語には、ジペプチド、トリペプチド、およびアミノ酸が10個以下のオリゴペプチドが含まれるということである。「ペプチド剤」は、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸からなるペプチド、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸からなるペプチドに類似したペプチド疑似体である。さらに、「ペプチド剤」は、以下に説明するように、多量体または多量体化薬剤として提供される2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸からなるペプチド、あるいは2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸からなるペプチドに類似したペプチド疑似体である。

#### 【0113】

予防薬または治療薬として望まれる生物工学的ツールあるいはコンポーネントは、HIV-1、HIV-2、およびSIV等のウィルスに対して十分な親和性または阻害が得られる形態または方法で、ペプチド剤を提供する。天然の単量体ペプチド剤（例えば、各々がたった一つの結合エピトープを持つペプチド剤の個々のユニットとして現れる）が、p24等のキャプソマータンパク質に結合し、かつ/またはカプシド集合に干渉し、かつ/またはHIV-1、HIV-2、またはSIV感染等のウィルス感染を防ぐのに十分である一方で、合成リガンドまたは多重結合リガンド（例えば、いくつかの結合エピトープを持つペプチド剤の複数のユニットとして現れる）は、p24等のキャプソマータンパク質に結合し、かつ/またはカプシド集合に干渉し、かつ/またはHIV-1、HIV-2、またはSIV感染等のウィルス感染を防ぐ能力が著しく高い場合がある。ここで注目すべき点は、「多重結合的（multimeric）」という用語は複数のユニットからなるリガンドが存在することを意味し、例えばトリペプチド、オリゴペプチド、またはペプチド疑似体のいくつかの個々の分子であり、単一の個々のユニットとして結合した複数のリガンドの存在、例えば一列に結合したいくつかのトリペプチド、オリゴペプチド、またはペプチド疑似体分子等を意味する「多量体化（multimerized）」という用語は区別されることである。

## 【0114】

多重結合支持体および多量体リガンドの調製

## 【0115】

p24等のキャプソマータンパク質への結合、および/またはカプシド集合への干渉、および/またはHIV-1、HIV-2、またはSIV感染等の阻害を行う多重結合剤(合成または天然)は、トリペプチド、オリゴペプチド、またはペプチド疑似体を高分子支持体に結合させて得られ得る。ここで用いられる「支持体」という用語は、ペプチド剤を結合、固定、または安定化する担体、樹脂、または任意の高分子構造を含む。固相支持体として、反応トレイのウェルの壁部、試験管、ポリスチレン・ビーズ、磁気ビーズ、ニトロセルロース片、膜、ラテックス粒子等の微粒子、ヒツジ(または他の動物)赤血球細胞、人工細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。また、支持体という用語には、前記用語が薬剤の調製のためのものであると理解されることから、担体も含まれる。

## 【0116】

高分子支持体は、疎水性非共有相互作用によってペプチド剤の一部と相互作用する疎水性の表面を有するものであってもよい。支持体の疎水性面は、プラスチック等のポリマー、または疎水基が結合しているポリスチレン、ポリエチレン、またはポリビニル等の他の任意のポリマーであってもよい。あるいは、ペプチド剤は、タンパク質およびオリゴ/ポリサッカリド(例えば、セルロース、澱粉、グリコーゲン、キトサン、アミノ化セファロース)を含む担体に共有結合したものであり得る。これらの後の実施形態では、共有結合を作るように担体上の反応基との結合にペプチド剤上の反応基、例えば水酸基またはアミノ基を使用してもよい。支持体は、ペプチド剤と相互作用する帯電した表面を有するものであってもよい。また、支持体はペプチド剤を結合させるように、化学的に活性化される他の反応基を有するものであってもよい。例えば、臭化シアン活性化マトリックス、エポキシ活性化マトリックス、チオおよびチオプロピルゲル、ニトロフェニルクロロホルメート、およびN-ヒドロキシスクシンイミドクロロホルメートリンケージ、およびオキシランアクリル支持体が当業者にとって一般的である。

## 【0117】

支持体は、ペプチド剤が、水酸基、カルボキシ基、またはアミノ基、および担体上の反応基を介して共有結合する、酸化珪素材料（例えば、シリカゲル、ゼオライト、珪藻土、またはアミノ化ガラス）等の無機担体を含むものであってもよい。さらに、いくつかの実施形態では、リポソームまたは脂質二重層（天然または合成）が支持体として考慮され、ペプチド剤はリポソームエンジニアリングの技術によって膜表面に結合されるか、または前記膜に取り込まれる。一つのアプローチによれば、リポソーム多重結合支持体は、二重層の表面に露出したペプチド剤と、ペプチド剤を脂質二重層につなぎとめる第2のドメインとを有する。アンカー(anchor)は、周知の膜貫通ドメインに類似した疎水性のアミノ酸残基から構成されるものであってもよく、あるいは従来技術によって第1のドメインに結合するセラミドを含むものであってもよい。

#### 【0118】

体内（例えば、予防または治療の用途で）で使用するための支持体または担体は、生理学的に非毒性であることが望まれ、好ましくは免疫的に非反応性である。体内での使用のために考えられる担体として、ポリ-L-リジン、ポリ-D,L-アラニン、リポソーム、およびクロモソルブ(Chromosorb)（商標）(Johns-Manville Products, Denver Co.)が挙げられる。リガンド共役クロモソルブ（商標）(Synsorb-Pk)は、溶血性尿毒性症候群の予防のためにヒトで試験され、副作用がないことが報告されている(Armstrong et al. J. Infectious Diseases, 171:1042-1045 (1995))。いくつかの実施形態のために、本発明の発明者は、被験者の体内にペプチド剤が結合する能力を有する「むき出しの(naked)」担体（すなわち、結合ペプチド剤が欠けている）の投与を検討する。このアプローチによって、むき出しの担体がペプチド剤とは別に投与され、ひとたび両方が被験者の体内に入ると、担体とペプチド剤とが集合して多重結合複合体となる「プロドラッグタイプ(prodrug-type)」の治療が想定される。

#### 【0119】

適当な長さのリンカー等のリンカーをペプチド剤と支持体との間に挿入することで、ペプチド剤の融通性をより大きくし、それによって支持体によって生ずる可能性のある任意の立体障害を克服することも考えられる。p24等のキャブ

ソマータンパク質に最適に結合し、かつ/またはカプシド集合に干渉し、かつ/またはHIV-1、HIV-2、またはSIV感染等のウィルス感染を阻害することを可能とする適当な長さのリンカーは、本開示で詳細に述べられたアッセイにおいてリンカーを変えることでペプチド剤をスクリーニングすることによって、決定し得る。

#### 【0120】

複数の種類のペプチド剤を含む複合支持体もまた、一つの実施形態である。「複合支持体」とは、p24等のキャプソマータンパク質に結合し、かつ/またはカプシド集合に干渉し、かつ/またはHIV-1、HIV-2、またはSIV感染等のウィルス感染を阻害する2つまたはそれ以上の異なるペプチド剤に結合または前記ペプチド剤を固定するために使用される担体、樹脂、または任意の高分子構造であってもよい。いくつかの実施形態では、リポソームまたは脂質二重層（天然または合成）が複合支持体の構築に使用することが考えられ、ペプチド剤はリポソーム・エンジニアリングの技術によって膜表面または前記膜に取り込まれる。

#### 【0121】

上記のように、適当な長さのリンカー等のリンカーをペプチド剤と支持体との間に挿入することで、分子内の融通性をより大きくし、それによって任意の立体障害を克服することも考えられる。p24等のキャプソマータンパク質に結合し、かつ/またはカプシド集合に干渉し、かつ/またはHIVまたはSIV感染等のウィルス感染を阻害することを可能とする適当な長さのリンカーは、本開示で詳細に述べられたアッセイにおいてリンカーを変えることでペプチド剤をスクリーニングすることによって、決定し得る。

#### 【0122】

本発明の別の実施形態では、「多量体化-多重結合支持体」および「多量体化-複合支持体」をそれぞれ生成するように、上記した多重結合および複合支持体が多量体化リガンドに結合したものであってもよい。多量体化リガンドは、例えば、従来の分子生物学上の技術を用いて2つまたはそれ以上のペプチド剤を一列に並べて結合させることによって得ることができる。リガンドの多量体化の形態

は、p24等のキャプソマータンパク質に結合し、かつ/またはカプシド集合に干渉し、かつ/またはHIVまたはSIV感染等のウィルス感染を阻害する能力がより良くなった薬剤を得ることが可能となるため、多くの用途で有利であり得る。さらに、リンカーまたはスペーサ、例えばフレキシブル リンカーを、多量体化薬剤を構築する個々のドメイン間に取り込むことは、有利な実施形態である。適当な長さの リンカーを、例えばタンパク質結合ドメイン間に挿入することは、分子内の融通性をより大きくし、それによって立体障害の克服を可能とする。同様に、リンカーを多量体化リガンドと支持体との間に挿入することで、融通性をより大きくし、支持体によって表される立体障害の制限を可能とする。p24への最適な結合、かつ/またはカプシド集合への干渉、かつ/またはHIVまたはSIV感染の阻害を可能とするリンカーの適当な長さの決定は、本開示で詳細に述べられたアッセイにおいてリンカーを変えることでリガンドをスクリーニングすることによって、決定し得る。

#### 【0123】

好ましい実施形態では、上記した支持体の様々な種類は、トリペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>を用いることで生成される。集合的に「支持体結合薬」と呼ばれる多重結合支持体、複合支持体、多量体化-多重結合支持体、または多量体化-複合支持体もまた、好ましくは、トリペプチドGPG-NH<sub>2</sub>、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>を用いて構成される。

#### 【0124】

以下の説明では、治療および/または予防用途を持つ本発明のいくつかの実施形態が記載されている。

#### 【0125】

治療および予防上の用途

#### 【0126】

ここに記載した単量および多重結合のペプチド剤は、HIVまたはSIV感染等のウィルス感染を避けるための予防対策として、またはすでにHIVまたはSIV等のウィルスに感染した被験者を治療するための治療薬として、被験者の治療に適している。だれもが予防薬としてペプチドによる処置を受けることができるが、もっとも適当な被験者は、ウィルス感染の危険にさらされている人たちである。そのような被験者として、同性愛者、売春者、静脈麻薬常習者、血友病患者、ウィルス感染した母親から生まれた子供、および患者または生物学的試料に触れた医療従事者が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0127】

本発明の薬学的に活性な化合物は、患者、例えばヒトを含む哺乳動物に対して投与するための医薬品を生産するために、ガレノス式製剤調製法(galenic pharmacy)の従来の方法にもとづいて加工し得る。ペプチド剤は、修飾して、または修飾することなしに、薬学的産物に取り込むことができる。さらに、いくつかの経路によって小ペプチドをコードする核酸配列またはペプチド剤を運ぶ医薬品または治療薬の製造は、実施形態である。例えば、限定するためのものではないが、カプシド集合を妨害することでウィルスの複製を阻害する小ペプチドをコードする配列を持つDNA、RNA、およびウィルスベクターを考えることができる。所望のペプチド剤をコードする核酸は、単独で、またはペプチド剤と組み合わせて投与し得る。

#### 【0128】

ここに記載した化合物は、従来の賦形剤、すなわちペプチド剤とは有害な反応を起こさない非経口投与、経腸（例えば、内服）または局所投与に適した薬学的に許容される有機または無機の担体物質と混和して用いることができる。薬学的に許容される適当な担体として、水、塩溶液、アルコール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロースあるいはスターチ等の炭水化物、ステアリン酸マグネシウム、滑石、ケイ酸、粘着性のパラフィン、芳香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、ペンタエリスリトール脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられるが、これらに限定されない。製薬的配合物

は滅菌することができ、もし必要ならば、活性化化合物と有害な反応を起こさない助剤、例えば潤滑剤、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼす塩、緩衝液、着色剤、風味剤、および/または芳香性の物質等を混合し得る。また、ビタミン等、他の所望の活性剤と共に、それらを組み合わせることもできる。

#### 【0129】

いくつかの実施形態では、ペプチド剤を含む治療薬は、良好なウィルス応答を達成するように、HIV感染等、ウィルス感染を治療する他の治療薬と組み合わせて投与される。現時点では、ヒトへのHIV-1感染に対する抗ウィルス治療で臨床的に使われる薬物には4種類ある。それらは、(i)ジドビジン、ラミブジン、スタブジン、ジダノシン、アバカビル、およびザルシタビン等のヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤(NRTI)、(ii)アデトビルおよびピバキシル等のヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、(iii)エファビレンツ、ネビラピン、およびデラビルジン等の非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤(NNRTI)、および(iv)インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、サキナビル、およびアンプレナビル等のプロテアーゼ阻害剤である。ペプチド剤の投与に関連させて、2、3、または4つの異なる種類の薬物を同時に投与することで、HIVが耐性を発達させる可能性が低くなる。なぜなら、異なる種類の薬物およびペプチド剤を克服する多重突然変異体が同一のウィルス粒子に生ずる可能性は少ないからである。

#### 【0130】

したがって、当業者に周知の投与量および方法によって、ペプチド剤をヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤と組み合わせて与えることが本発明の好ましい実施形態である。ペプチド剤と、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、およびプロテアーゼ阻害剤とを含む医薬品もまた、本発明の実施形態である。

#### 【0131】

GPG-NH<sub>2</sub>と従来の抗ウイルス薬との組み合わせによるHIV感染の治療の有効性に関する研究は、以下に提供する実施形態に見いだすことができる。

#### 【0132】

##### 実施例4

この実施例では、アミド型の小ペプチドとAZTとの複数の異なる組み合わせを試験し、2種類の化合物が補完し合ってHIV-1複製を阻害するかどうかを判断することが示されている(図6参照)。したがって、異なる濃度のGPG-NH<sub>2</sub>、AZT、またはリトナビル(Ritro™)およびそれらの化合物の組み合わせの存在または非存在下で、200,000 HUT<sub>78</sub>細胞を25 TCID<sub>50</sub>でHIV-1 SF-2ウイルスを感染させた。図6に示す数字は阻害化合物のマイクロモル濃度を表している。細胞は、種々の阻害剤存在下、37℃、1時間にわたってウイルスとともにインキュベートし、続いて3回洗浄した。次に、細胞を、抗ウイルス薬、および/またはペプチドを含有する、10%(v/v)加熱不活性化ウシ胎仔血清(FBS GIBCO)、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(100U/ml)、およびポリブレン(Sigma、2μg/ml)とを添加したRPMI 1640培地中に再懸濁し、24ウェルプレート(Costar corporation)において、湿った状態で5%CO<sub>2</sub>にて、37℃で培養した。培養液上清を4日毎に回収し、感染後14日目までに培地を変えた。ウイルスの複製をモニタするために、上清に含まれるHIV-1 p24抗原タンパク質を市販のキット(Abbott)を用いてアッセイした。

#### 【0133】

GPG-NH<sub>2</sub>は、AZT存在下でHIV-1の複製阻害を相乗的に高めた。一方、小ペプチドはプロテアーゼ阻害剤であるリトナビルの効果に対して、付加的な抗ウイルス効果のみを示した。それにもかかわらず、これらの実験は、ヌクレオシド類似体およびプロテアーゼ阻害剤がウイルスの複製を妨害する方法とは別の機構によってその小ペプチドがHIV-1を阻害するという上記のデータを立証する。さらに、これらの実験は、小ペプチドおよびAZTおよび/またはリトナビルを含むHIV-1感染に対する新規な治療プロトコルが有効であることを示す。

## 【0134】

以下の開示では、投与量および投与の方法を提供する。

## 【0135】

## 投与量および投与の方法

特定のペプチド剤製剤の有効量および投与方法は、当業者に周知の他の因子と同様に、個々の患者および疾患の段階に応じて変動する。そのような化合物の治療上の有効性および毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順、例えばED<sub>50</sub>（集団の50%で治療的效果がある投与量）およびLD<sub>50</sub>（集団の50%が致死する投与量）によって判断し得る。治療的效果に対する毒性の用量比が治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>という比で表すことができる。大きな治療指数を示す薬学的組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータを用いて、ヒトでの使用のための投与量範囲の定式化が行われる。そのような化合物の投与量は、好ましくは毒性がほとんどないED<sub>50</sub>を有する循環濃度の範囲内である。投与量は、用いた投与形態、患者の感受性、および投与の経路に応じてこの範囲で変化する。

## 【0136】

個々の医師が治療の対象である患者を観察して正確な投与量を選択する。投与量および投与は、活性部分が十分な量提供されるように、または所望の効果を保つようにして、調製される。考慮すべき他の因子として、患者の病状の重症度、年齢、体重、および性別、食事、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応感度、および治療に対するトレランス/応答が挙げられる。短時間作用の薬学的組成物は、日々投与されるが、長時間作用の薬学的組成物は、2、3日から4日毎、一週間毎、または二週間に1回の頻度で投与される。特定の製剤の半減期およびクリアランス率に応じて、本発明の薬学的組成物は、1日に1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、10回、またはそれ以上の回数で投与される。

## 【0137】

通常の投与量は、投与の経路に応じて、約1～100,000 μgの範囲で変動し、全投与量は最大で約10グラムである。所望の投与量として、250 μg

、500 $\mu$ g、1mg、50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、1g、1.1g、1.2g、1.3g、1.4g、1.5g、1.6g、1.7g、1.8g、1.9g、2g、3g、4g、5g、6g、7g、8g、9g、および10gが含まれる。さらに、ペプチド剤の濃度は、局所形態で薬剤を投与する実施形態ではかなり高くし得る。ペプチド剤のモル濃度は、いくつかの実施形態で使用し得る。局所投与および/または塗布用医療器具のための所望の濃度は、100 $\mu$ M~800mMの範囲である。それらの実施形態に用いる好ましい濃度は、500 $\mu$ M~500mMの範囲である。例えば、局所塗布および/または塗布用医療器具のための好ましい濃度としては、500 $\mu$ M、550 $\mu$ M、600 $\mu$ M、650 $\mu$ M、700 $\mu$ M、750 $\mu$ M、800 $\mu$ M、850 $\mu$ M、900 $\mu$ M、1mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、300mM、325mM、350mM、375mM、400mM、425mM、450mM、475mM、および500mMが挙げられる。特定の投与量および送達方法に関するガイダンスは文献（例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、または第5,225,212号を参照）および以下に記載されている。

#### 【0138】

特に、本明細書で記載したペプチド剤の投与量は、p24等のキャプソマータンパク質の結合、および/またはカプシド集合に対する干渉、および/またはHIVおよびSIV感染等のウィルス感染の阻害を含む所望の効果を達成するために十分なペプチド剤を提供する量である。したがって、ペプチド剤の投与量は、好ましくは組織または血液濃度、またはその両方が約0.1 $\mu$ M~500mMとなる量である。所望の投与量は、組織または血液濃度、またはその両方が約1~800 $\mu$ Mとなる量である。好ましくは、投与量は組織または血液濃度が、約1

0  $\mu$ M ~ 約500  $\mu$ Mを上回るようにする量である。好ましくは、投与量は、例えば、組織または血液濃度、またはその両方が10  $\mu$ M、15  $\mu$ M、20  $\mu$ M、25  $\mu$ M、30  $\mu$ M、35  $\mu$ M、40  $\mu$ M、45  $\mu$ M、50  $\mu$ M、55  $\mu$ M、60  $\mu$ M、65  $\mu$ M、70  $\mu$ M、75  $\mu$ M、80  $\mu$ M、85  $\mu$ M、90  $\mu$ M、95  $\mu$ M、100  $\mu$ M、110  $\mu$ M、120  $\mu$ M、130  $\mu$ M、140  $\mu$ M、145  $\mu$ M、150  $\mu$ M、160  $\mu$ M、170  $\mu$ M、180  $\mu$ M、190  $\mu$ M、200  $\mu$ M、220  $\mu$ M、240  $\mu$ M、250  $\mu$ M、260  $\mu$ M、280  $\mu$ M、300  $\mu$ M、320  $\mu$ M、340  $\mu$ M、360  $\mu$ M、380  $\mu$ M、400  $\mu$ M、420  $\mu$ M、440  $\mu$ M、460  $\mu$ M、480  $\mu$ M、および500  $\mu$ Mとなるのに必要な小ペプチドの量である。組織濃度が800  $\mu$ Mを上回るようにする投与量は好ましくはないが、本発明のいくつかの実施形態では使用し得る。ペプチドを一定量注射することで、血液レベルによって測定されるような組織内での安定した濃度を保つこともできる。

#### 【0139】

ペプチドの毒性が低いことにより、危害なく組織濃度をよりいっそう高く保つことができる。HIV-1の小ペプチド耐性株（例えば、GPG-NH<sub>2</sub>耐性株）を選択する試みは、これまでのところ成功していない。HIV-1株HTLV-IIIBは、連続希釈（限界希釈）したGPG-NH<sub>2</sub>の存在下で6ヶ月より長く、インビトロで耐性の分化のあからさまな兆候を示すことなく継代培養された。

#### 【0140】

ペプチド剤の投与経路は、限定されるものではないが、局所、経皮、非経口、経腸、経気管支、および経歯槽である。局所投与は、局所的に塗布されたペプチド含有のクリーム、ゲル、リンス等を介して達成される。経皮投与は、ペプチド剤が皮膚を透過して血流に入ることを可能とさせるクリーム、リンス、ゲル等の塗布によって達成される。投与の非経口の経路は、限定されるものではないが、電氣的または直接注射、例えば中心静脈内、静脈内、筋肉内、腹腔内あるいは皮下への電氣的または直接注射が含まれる。経腸投与は、限定されるものではないが、食物摂取、および直腸が含まれる。経気管支および経歯槽は、限定されるも

のではないが、経口または鼻腔のいずれかを介した吸入が含まれる。

#### 【0141】

局所投与に適切なペプチド剤含有化合物の組成物は、限定されるものではないが、生理学的に許容されるインプラント、軟膏、クリーム、リンス、およびゲルが含まれる。ペプチドが少なくとも最小限の可溶性となっている任意の液体、ゲル、または固形の薬学的に許容される塩が本発明での局所的使用にとって適している。局所投与の組成物は、HIVの伝播を防ぐために性交の間、特に有用である。そのような使用に適した組成物は、限定されるものではないが、膣、肛門の坐薬、クリーム、および膣洗浄器である。

#### 【0142】

経皮投与に適したペプチド剤の組成物は、限定されるものではないが、皮膚に対して直接塗布、または経皮装置（「経皮貼布」）等の保護担体に取り込んで適用される薬学的に許容される懸濁液、オイル、クリーム、および軟膏である。適当なクリーム、軟膏等の例は、医師のデスクレファレンスに見いだすことができ、また当業者に公知である。適当な経皮装置の例として、例えば、Chinen他の米国特許第4,818,540号（1989年4月4日発行、本明細書で引用する）に記載されている。

#### 【0143】

非経口投与に適したペプチド剤の組成物は、限定されるものではないが、薬学的に許容される滅菌した等張液である。そのような溶液としては、限定されるものではないが、中心静脈へ注射するための生理食塩水およびリン酸生理食塩水、ペプチド剤の静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下注射である。

#### 【0144】

経気管支および経歯槽投与に適切なペプチドの組成物は、限定されるものではないが、吸入のための種々のタイプのエアロゾルが含まれる。例えば、ペンタミジンはエアロゾルを介して経鼻腔投与の形でAIDS患者に投与され、ニューモシスティスカリニ(pneumocystis carinii)肺炎によって生ずる肺炎を防ぐ。ペプチドの経気管支および経歯槽に適した装置もまた実施形態である。そのような装置は、限定されるものではないが、アトマイザーと気化器が挙げられる。現在利

用可能なアトマイザーおよび気化器の多くのタイプはペプチド剤の送達に容易に適用し得る。

#### 【0145】

経腸投与に適したペプチド剤の組成物は、限定されるものではないが、薬学的に許容される粉末、錠剤、食物摂取用液体および直腸投与用の坐薬が含まれる。HIV感染症の最も一般的な経路および使いやすさにより、胃腸経由の投与、特に経口が本発明の最も好ましい実施形態でありトリペプチド(GPG-NH<sub>2</sub>)を有する500ミリグラムのカプセルを調製したところ、4で貯蔵した場合に少なくとも12ヶ月間安定であることがわかった。他のウィルス-宿主系で示されているように、小ペプチドの特異的抗ウィルス活性は、経口投与後に血漿中で検出し得る(Miller et al., Appl. Microbiol., 16:1489 (1968))。なぜなら、小ペプチドは明らかに患者の消化器系での分解から免れるため、それらは経口投与にとって理想的である)。

#### 【0146】

ペプチド剤は、HIV感染の予防が重要であるような状況下での使用にも適している。例えば、医療従事者は、分泌物または体液にHIVウィルスを含むHIV陽性と思われる患者と常に接している。さらに、ペプチド剤は、HIVの伝播を防ぐために性交中に使用するための抗ウィルス組成物に処方し得る。そのような組成物は当業者に知られており、本明細書でその全体を引用するModak他のPCT公報第WO90/04390号(1990年3月3日)として発行された国際特許出願にも記載されている。

#### 【0147】

本発明の態様は、手袋、シーツ、作業面等の医療用器具をHIV伝播から保護するコーティングも含む。代替的に、ペプチド剤は高分子医療装置に含浸させることができる。特に好ましくは、医療用手袋およびコンドームのコーティングである。医療装置での使用に適したコーティングは、ペプチドを含む粉末によって、またはペプチド剤が懸濁されている高分子コーティングによって提供される。コーティングまたは装置用の適当な高分子材料は、生理学的に許容され、またそれを介して治療上有効な量のペプチド剤が拡散し得るものである。適当なポリマ

ーとして、限定されるものではないが、ポリウレタン、ポリメタクリレート、ポリアミド、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニルクロリド、アセチルセルロース、シリコーンエラストマー、コラーゲン、シルク等が挙げられる。そのようなコーティングは、例えばFox他に対して1986年9月16日に発行された米国特許第4,612,337号に記載されており、その全体を本明細書で引用する。

#### 【0148】

以下の開示では、小ペプチドに対するいくつかの毒性学的研究が提供され、他のペプチド剤の毒性についての試験に対するアプローチが開示される。

#### 【0149】

##### 小ペプチドの毒性学的研究

GPG-NH<sub>2</sub>に対するいくつかの毒性学的研究が実施されてきており、それらのアッセイをより多くのペプチド(例えば、GKG-NH<sub>2</sub>、CQG-NH<sub>2</sub>、RQG-NH<sub>2</sub>、KQG-NH<sub>2</sub>、ALG-NH<sub>2</sub>、GVG-NH<sub>2</sub>、VGG-NH<sub>2</sub>、ASG-NH<sub>2</sub>、SLG-NH<sub>2</sub>、およびSPT-NH<sub>2</sub>)を用いて再現できる(Vahine他の米国特許第5,627,035号を参照)。培養リンパ球に対するGPG-NH<sub>2</sub>の効果を以下の例で提供する。

#### 【0150】

##### 実施例5

この実施例では、培養リンパ球に対する小ペプチドの効果に取り組んだいくつかの毒性学的研究を提示する。一般に、2mMまでの濃度で試験したHIV-1のウィルス阻害アッセイで使用したペプチドは、その形態学的外観、トリパンブルー染色、および細胞増殖によって判断されるように、使用した細胞に対していかなる毒性的効果をも示さなかった。GPG-NH<sub>2</sub>の毒性については、(i) プラーク減少アッセイ、および(ii) HSV-1の産生阻害アッセイによってさらに試験した。GPG-NH<sub>2</sub>は、1mMまでの濃度でHSV-1複製を減少することはなかったが、その毒性が欠如していることが確認されただけでなく、小ペプチドが選択的にHIV-関連のウィルスを阻害することが確認された。この知見は、GPG-NH<sub>2</sub>がインフルエンザまたはポリオウィルスのいずれも

阻害しなかったという観察によって強く確信した。

#### 【0151】

次に、正常なヒト・リンパ単球様細胞 (P B M C) に対する毒性について調べた。2 mMほどの高濃度の投与量で、かつ4日間にわたってさらした場合、培養した単核白血球およびリンパ球の生存に対して、検出できるほどの影響をG P G - N H<sub>2</sub>が与えることはなかった。ヒト単核細胞のインビトロ増殖応答に対するG P G - N H<sub>2</sub>の効果も試験した。T細胞に対して直接的な抗増殖特性があったとしてもG P G - N H<sub>2</sub>の影響はほんのわずかであり、20 μMの用量でアクセサリ細胞 (例えば、単核白血球および樹状細胞) の機能に影響を及ぼすようなことはなかった。

#### 【0152】

種々の細胞株のインビトロ50%細胞毒性濃度 (C C<sub>50</sub>) についても評価した。したがって、T細胞株H U T<sub>78</sub>、H 9、C E M - S S、M T - 2、および (非) 誘導A C H - 2、同様にマクロファージ誘導細胞株J u r k a t - t a t I I I、T H P - 1、および (非) 誘導U - 1細胞の培地に対して、異なる濃度のG P G - N H<sub>2</sub>、最大で40 mMのG P G - N H<sub>2</sub>を添加した。3日間インキュベーションした後、細胞の数を数えた。トリパンブルー色素排除試験およびH U T<sub>78</sub>、M T - 2、およびJ u r k a t - t a t I I Iの細胞計数によって、40 mMのG P G - N H<sub>2</sub>存在下での3日間の培養で細胞増殖の約40%阻害が見られた。H 9、C E S S - S S、およびT H P - 1はこのG P G - N H<sub>2</sub>の濃度では細胞数の減少が20%未満であった。したがって、インビトロでのC C<sub>50</sub> / I C<sub>50</sub>の比は、> 10<sup>4</sup>であった。上記の毒性試験によって、高濃度でも小ペプチドのリンパ球に対する毒性が低いことがわかった。

#### 【0153】

齧歯類に対する大量の小ペプチドの効果もまた分析し、それらの実験を次の実施例に示す。

#### 【0154】

##### 実施例6

この実施例では、大量に齧歯類に投与された小ペプチドに対するいくつかのイ

ンビボ(in vivo)毒性研究の結果を示す。最初の実験では、多めの単一投与量からなる小ペプチドをマウスに与え、毒性効果を分析した。体重1kgあたり最大で1gの濃度でアダルトマウスの尾部静脈にGPG-NH<sub>2</sub>を静脈内注射したが、これらの動物には明らかな毒性効果はなかった。第2の実験では、小ペプチドの投与量をいくつかの異なる量にしてほぼ3週間にわたりマウスに与えた。マウス群(1群あたり5匹のマウス)に対して、齢6日からGPG-NH<sub>2</sub>の腹腔内注射(それぞれ0.01、0.1、および1g/kg体重/日)を開始した。注射を18日間にわたって毎日行った。対照群と比較すると、マウスに対するGPG-NH<sub>2</sub>の顕著な影響は認められなかった。同様の実験では、GPG-NH<sub>2</sub>の4週間毒性研究をデンマークのスカントックス(Scantox)A/Sで行った。GPG-NH<sub>2</sub>をラットに対して、最大1g/kg体重/日で28日間経口投与した。動物に対する毒性の兆候は認められなかった。このようなインビボ毒性実験によって、ここに記載した小ペプチドが哺乳動物に対して毒性が低く、投与量が多くても安全に提供できることがわかった。

#### 【0155】

さらなる研究では、ヒト血液および血漿での小ペプチドの安定性を分析した。以下の実施例では、そのような実験を説明する。

#### 【0156】

##### 実施例7

この実施例では、ヒト血液および血漿内での小ペプチドの安定性について評価するために実施した幾つかの研究を説明する。したがって、ヒト血液は新鮮なものを採取してEDTAで処理した。血清は、2,500rpmで20分間の遠心を行うことで分離した。GPG-NH<sub>2</sub>を10mMまたは50mMの濃度で血液または血漿に添加し、その後37℃で、1、2、および4時間にわたって、それぞれインキュベートした。対照群として、10%(v/v)加熱不活性化ウシ胎仔血清(FBS、GIBCO)、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(100U/ml)、およびポリブレン(Sigma、2μg/ml)が加えられているRPMI 1640培地に対してGPG-NH<sub>2</sub>を添加し、同様にしてインキュベートを行った。37℃で20分間のインキュベートを行った

後、GPG-NH<sub>2</sub>含有血液を2,500rpmで20分間遠心し、血漿を単離した。いくつかの血漿試料を5mMの濃度のCaCl<sub>2</sub>で、37℃、10分間処理し、続いて、30分間、13,000rpmで遠心し、この上清をCaCl<sub>2</sub>処理血漿と呼ぶ。そして、すべてのGPG-NH<sub>2</sub>含有血漿試料をRPMI培地で希釈して、最終濃度が20μMまたは100μMのGPG-NH<sub>2</sub>(500倍希釈)が得られ、それをHIV-1複製アッセイで使用した。

#### 【0157】

複製アッセイをHUT<sub>78</sub>細胞で行い、またHIV-1SF-2ウィルスを使用した。すなわち、約200,000細胞を希釈GPGアミド含有培地、血漿、または血液からの血漿に再懸濁した。GPG-NH<sub>2</sub>含有培地、血漿、または血液からの血漿を細胞とともに、37℃で1時間、2時間、または4時間にわたってインキュベートした。その後、SF-2ウィルスを25TCID<sub>50</sub>で添加した。1時間の吸着後、細胞をRPMI培地で3回洗浄し、その後適当なGPGアミド含有プラズマに再懸濁して湿った状態で5%のCO<sub>2</sub>にて、37℃でインキュベートした。培養液上清を4日毎に回収し、感染後14日まで培養液を交換した。ウィルスの複製をモニタするために、上清に含まれるHIV-1 p24抗原タンパク質を市販のキット(Abbott)を用いてアッセイした。HIV-1 p24アッセイは、感染後7日目および14日目の上清に対して実施した。GPG-NH<sub>2</sub>添加培地、血漿、または血液からの血漿によってHIV-1を阻害する能力については顕著な差は認められなかった。

#### 【0158】

ヒト血漿中でのGPG-NH<sub>2</sub>の安定性もまた、薄層クロマトグラフィ(TLC)によって化学的に評価した(図7参照)。この実験では、<sup>14</sup>C-GPG-NH<sub>2</sub>をヒト血漿とともに37℃、30分、2時間、または8時間にわたってインキュベートし、続いてタンパク質をTLCによって分離し、クロマトグラフをオートラジオグラフィフィルムに露出することで視覚化した。図7に示すように(レーン:Hp0、Hp0.5、Hp2、およびHp8)、小ペプチドのわずかな移動度の変化が観察された。小ペプチドの移動度は、37℃でヒト血漿で30分間インキュベートした後、若干増加したが、8時間まで移動度がさらに変化する

ことはなかった。TLCスポットの質量分析計による分析(エレクトロスプレー分析(electrospray analysis))によって、全てのスポットを確認したところ、移動度が増加したスポットが含まれ、それはGPG-NH<sub>2</sub>であった。上記の実験では、本明細書に記載した小ペプチドがヒト血液および血漿で安定しており、抗ウィルス特性を保持し、さらに血漿プロテアーゼによっては分解しない。

#### 【0159】

以下の開示では、小ペプチドの吸着、分配、および代謝に関するいくつかの研究が提供されている。

#### 【0160】

##### 小ペプチドの吸着、分配、および代謝

小ペプチドを含有する薬剤の経口投与が求められることから、小ペプチドの酸安定性を、種々の時間で、50mMKClおよび0.1MHVlからなる溶液に<sup>14</sup>C標識GPG-NH<sub>2</sub>をインキュベートすることによって評価した。酸加水分解後、放射標識トリペプチドを薄層クロマトグラフィ(TLC)で分析し、HPTLCプレートを25%メタノール:25%イソプロパノール:15%ブタノール:35%(0.1N HOAcおよび0.1N NaOAc)によって現像した。図8からわかるように、24時間に至るトリペプチドのインキュベーションは移動度に影響を及ぼさず、そのためGPG-NH<sub>2</sub>の分子構造にも影響を及ぼさなかった。このことから胃で見いだされる酸性条件と類似の酸性条件で小ペプチドが生き残ることがわかった。

#### 【0161】

さらに、培地から細胞への小ペプチドのインビトロでの取り込みを一連の実験で調べた。したがって、HUT<sub>78</sub>、Jurkat-tat III、およびMT-2細胞を<sup>14</sup>C標識GPG-NH<sub>2</sub> 165nCi(0.7μMのGPG-NH<sub>2</sub>と等しい)とともにインキュベートした。小ペプチドの取り込みが観察され、GPG-NH<sub>2</sub>の8%(Jurkat-tat III)と20%(HUT<sub>78</sub>細胞)との間が細胞に組み込まれた。この結果は、いくつかの細胞種への小ペプチドの組み込みが有効であることを示している。

#### 【0162】

さらに、小ペプチドのインビトロでの取り込みについてラットで分析した。ラットに $^{14}\text{C}$ -GPG-NH<sub>2</sub>を供給し、その後、種々の時間点で、血液、尿、および組織資料を前記動物から採取した。給餌後8時間に採取したラットの尿試料と、給餌後、30分、2時間、および8時間で採取したラット血漿とをTCプレート上で、図7に示すように分離させた(したがって、尿8、rp0.5、rp2、およびrp8とした)。全ての組織は剖検の後、任意のアッセイを実行するまで-20℃に保存した。10~30ミリグラムの組織試料を分析した各器官の異なる3カ所の位置から採取し、器官組織を次に45℃で4~8時間、250μlの組織溶解剤(OptiSolv, LKB-Wallac)に溶解した。3mlの0.05MHCl酸性シンチレーションカクテル(Luma Gel, Lumac/3M)を添加する前に、均質化した組織溶液に50μlの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と100μlのイソプロパノールを添加することによって脱色した。放射能は、ベータシンチレーションカウンタ(LKB-Wallac 1218 Rack Beta)によって決定した。血漿中のフリー/未結合GPG-NH<sub>2</sub>を血漿1容とエタノール2容を用いた沈殿によって回収し、その後1時間にわたって-70℃でインキュベーションし、20,000×gで15分間、4℃遠心した。10μlの混合物をサンプリングして組織試料として分析する前に、血液細胞試料をPBSで希釈(PBS1容に対して血液細胞2容の比率で)した。定量化に先立って、5ないし20μlの血漿および尿の試料を直接3mlのReadySafe(Beckman)流体と混合した。最大取り込みを計算するための基礎と分布とを与える結果を表10および表11に示す。値はnCiで表す。

【0163】

【表11】

表11

動物番号* nCi/ml もしくはg 組織	1	2	3	4	5	平均
脳	48	34	31	30	33	35
腎臓	450	491	467	446	477	466
肝臓	599	413	454	507	503	495
脾臓	383	428	414	195	413	366
胸腺	366	288	290	338	372	331
血球	90	81	99	95	101	93
血漿	140	126	121	142	124	130
尿	5,846	5,068	6,841	4,557	5,986	5,660
全尿	7,016	7,096	3,284	283	2,395	4,015

\*動物は4時間後に屠殺した。

【0164】

【表12】

表12

動物番号*	6	7	8	9	10	平均
脳	43	27	28	25	29	30
腎臓	255	488	461	401	468	415
肝臓	537	419	478	458	578	494
脾臓	307	281	257	336	285	293
胸腺	340	350	323	349	311	334
血球	51	72	87	71	108	78
血漿	138	123	135	129	148	135
尿	2,992	5,040	3,121	4,297	2,175	3,525
全尿	6,463	6,653	11,173	10,227	7,613	8,426

\*動物は8時間後に屠殺した。

【0165】

最大取り込みの計算は、以下のようにして決定した。全給餌は  $800 \mu\text{Ci} / \text{kg}$  ラット体重（動物あたり合計  $160 \mu\text{Ci}$ ）。GPG-NH<sub>2</sub> およびその代謝産物が等しく体内に分配されると仮定すると、組織中に存在するGPG-NH<sub>2</sub> は、動物全数によって、調べた動物の全数を割り、さらに体重と係数0.9とを掛けることで得られる異なる組織からの平均カウント/gである。血液の容積が平均体重の約10%であると概算されることから、血液の容積を省略するために、この係数が導き出される。例えば（動物1～5のデータから）、もし5匹の

ラットの体重合計が207gで、種々の組織から検出された放射性活性が(35+466+495+366+331)または1,693 nCiであり、血液から検出された放射性活性は(93+130)または223 nCiであり、さらに尿で検出された放射性活性は4,015 nCiであり、小ペプチドの最大取り込みは、以下のように計算し得る。

【0166】

組織：  $(35 + 466 + 495 + 366 + 331) / 5 \cdot 207 \cdot 0.9 = 63,240 \text{ nCi}$

流体： 血液  $(93 + 130) \cdot 207 \cdot 0.1 = 4,642 \text{ nCi}$

尿： 4,015 nCi

合計：  $(63.24 + 4.642 + 4.015) / 800 \cdot 0.207 = 0.4342$ 、or 43% 最大取り込み

【0167】

保持/固定化GPG-NH<sub>2</sub>と試料組織内のその代謝産物との相対的分布は、肝臓で最大であり、続いて、腎臓、脾臓、胸腺、脳の順に続くことが観察された。尿での放射能は3時間と8時間との間で倍となることが観察された。TLCプレートからの尿の放射性スポットの質量分析のデータ(エレクトロスプレイ質量分析法)は、尿中の放射能の僅かな部分のみが完全なGPG-NH<sub>2</sub>であることを示した(図7参照)。上記のインビトロでの研究から得られた結果によれば、著しい量の小ペプチドが効果的に血液、血漿、およびいくつかの異なる組織に運ばれることがわかった。

【0168】

さらに、図9および図10に示すように、顕著な量の小ペプチドが長時間にわたって血漿分画に残っている。図9では、血液細胞と、結合した血漿タンパク質との間の放射能の分布、同様に非タンパク質結合(フリー)血漿放射能が示されている。血漿分画からの放射能の除去は図10に示され経路リペプチドGPG-NH<sub>2</sub>は半減期が86.5分である。タンパク質結合放射能を、99.5%エタノールを2容加えることによる沈殿の後にアッセイした。取り込みおよび分布データと上記TLCデータとから、血漿から回収した完全なGPG-NH<sub>2</sub>の最小

取り込みを計算し、ラットの給餌後1時間以内に、少なくとも1%の供給GPG-NH<sub>2</sub>が血漿中に遊離GPG-NH<sub>2</sub>として回収される。

【0169】

小ペプチドを与えられた動物の血漿中の生物学的活性GPG-NH<sub>2</sub>を評価するために、血漿試料を最終給餌1日後、4週毒性研究のラットから得た血液から調製した。血漿試料をRPMI培地で1/5希釈し、上記したように、HIV-1のSF162株によって感染したPBMCを投与した。つぎに、市販の検出アッセイ(Abbott)を用いることで上清中のp24の量を検出することによって、感染後7日目、11日目、および14日目にウイルス感染性をモニタした。表12に示すように、小ペプチドで処理したラットから得た血清はウイルス感染性を阻害する能力を保持した。いくつかの例では、10μMほど少量のGPG-NH<sub>2</sub>を投与することで、十分な濃度の小ペプチドが血漿に与えられ、それによってHIV-1複製の阻害が可能となった。減少率は表6に示すように計算した。これらの実験結果から、動物の体内でHIV複製を阻害するのに有効な濃度で本明細書で説明した小ペプチドが保持される。

【0170】

【表13】

表13

動物#.	供与 GPG(mg/ml)	p24 (pg/ml)	減少率%
実験1 7日目			
14	0	543.0	0
34	10	93.3	82.8
53	30	24.0	95.6
73	100	174.7	67.8
14日目			
14	0	22678	0
34	10	1636	92.8
53	30	938	95.9
73	100	9211	59.4
実験2 7日目			
16	0	321.8	0
36	10	219.2	31.9
56	30	194.3	39.6
76	100	173.5	46.1
14日目			
16	0	4075.4	0
36	10	4760.8	0
56	30	3574.4	12.3
76	100	2203.7	45.9
実験3 日			
18	0	183.9	0
38	10	255.6	0
58	30	107.3	41.7
78	100	96.9	47.3
14日目			
18	0	7578.4	0
38	10	6700.6	11.6
58	30	6893.0	9.1
78	100	7578.4	0
実験4 11日目			
13	0	242	0
33	10	170	29.8
52	30	487.4	0
71	100	51.7	78.6
実験5 7日目			
15	0	304.8	0
35	10	79.6	73.9
55	30	439.3	0
75	100	60	80.3

## 【0171】

全血清から得たタンパク質もまたカラムクロマトグラフィで分析して分取し、粗タンパク質をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル(10%)電気泳動(SDS/PAGE)で分離した。ラット血漿試料を10mM Tris-H

Cl (pH 8.3) および 50 mM KCl からなる緩衝液中でサイズ排除 (セファロース G-50, Pharmacia) クロマトグラフィ (0.4 x 6 cm) によって部分精製した。溶出液を 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 緩衝液で NaCl の濃度勾配を段階的に高めたことで、アニオン交換クロマトグラフィで分離した (セファロース, CL-6B DEAE, 0.4 x 6 cm)。溶出液は、放射能 (Ready Safe, Beckman; LKB1218, Sweden) にもとづいてモニタおよびブールした。強シグナルのタンパク質分画を 10% SDS-PAGE で分離し、エドマン N 末端アミノ酸シーケンシング (Applied Biosystems Procise Sequencer, USA) にかける前に、続いて PVDF (ポリビニリデンジフルオリド、BioRad) 膜上にブロッティングした。

#### 【0172】

図 11 に示すように、動物に給餌後 60 分にタンパク質に共有結合したと思われる僅かな放射能が観察された。B-1 ~ B-4 と記されたタンパク質をシーケンシングし、B-1 抗トリプシン (B1)、ペントキシン (B-2)、C-反応性タンパク質 (B-3) とし、さらに B-4 は同定することができなかった。これらのタンパク質はすべて肝臓で合成されたものである。一つの解釈は、加水分解された GPG-NH<sub>2</sub> が肝臓のタンパク質合成で再利用されたということである。これらの実験から、小ペプチドが体内で代謝され、同定された結合タンパク質 (B-1、B-2、および B-3) が全て肝臓で合成されることから、小ペプチドの加水分解および再利用は肝臓で起こることが明らかになった。

#### 【0173】

特定の実施形態および実施例を参照して本発明を記述したが、本発明の精神から逸脱することなく種々の変形例が可能であることを理解すべきである。したがって、本発明は併記の特許請求の範囲によってのみ限定される。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

図 1 は、HUT 78 細胞で行った HIV 感染性についての研究から得られた結果を示すグラフである。

##### 【図 2】

図2は、未処理のHIV粒子の複数の電子顕微鏡写真である。

【図3】

図3は、プロテアーゼ阻害剤リトナビルを接触させたHIV粒子の複数の電子顕微鏡写真である。

【図4】

図4は、GPG-NH<sub>2</sub>と接触させたHIV粒子の複数の電子顕微鏡写真である。

【図5】

図5は、HIV-1のp24タンパク質(146~231残基)のカルボキシル末端に対応するタンパク質配列と、HIV-2、SIV、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、マーソン-ファイザー・サル・ウイルス(Mason-Pfizer monkey virus、MPMV)、およびモロニー・マウス白血病ウイルス(MMLV)のタンパク質配列との整合を示す図である。棒線は、主相同領域(MHR)を示す。

【図6】

図6は、GPG-NH<sub>2</sub>、リトナビル(Rito)、AZT、またはそれらの薬剤の組み合わせの存在下または非存在下で培養したHIV感染細胞の上清に検出されたp24(pg/ml)のグラフである。

【図7】

図7は、<sup>14</sup>C-GPG-NH<sub>2</sub>を経口投与した後に採取したラットの尿およびラットの血漿(rp)、ならびに<sup>14</sup>C-GPG-NH<sub>2</sub>とともにインキュベートしたヒト血漿(Hp)から得られた非タンパク質結合放射性標識化合物が分離された薄層クロマトグラフィ支持体を示す図であって、採取時間が付されており、またR1~R13は同定された放射性化合物の位置を示す役割を持つ。

【図8】

図8は、0.1NのHClおよび50mMのKClによって処理され、かつ24時間にわたって採取された<sup>14</sup>C-GPG-NH<sub>2</sub>が分離された薄層クロマトグラフィ支持体を示す図であって、数字は酸暴露時間を示し、またRは同定された

$^{14}\text{C} - \text{GPG} - \text{NH}_2$ の位置を示す役割を持つ。

【図9】

図9は、ラット血液中での $^{14}\text{C} - \text{GPG} - \text{NH}_2$ とその代謝産物との分配を示すグラフである。

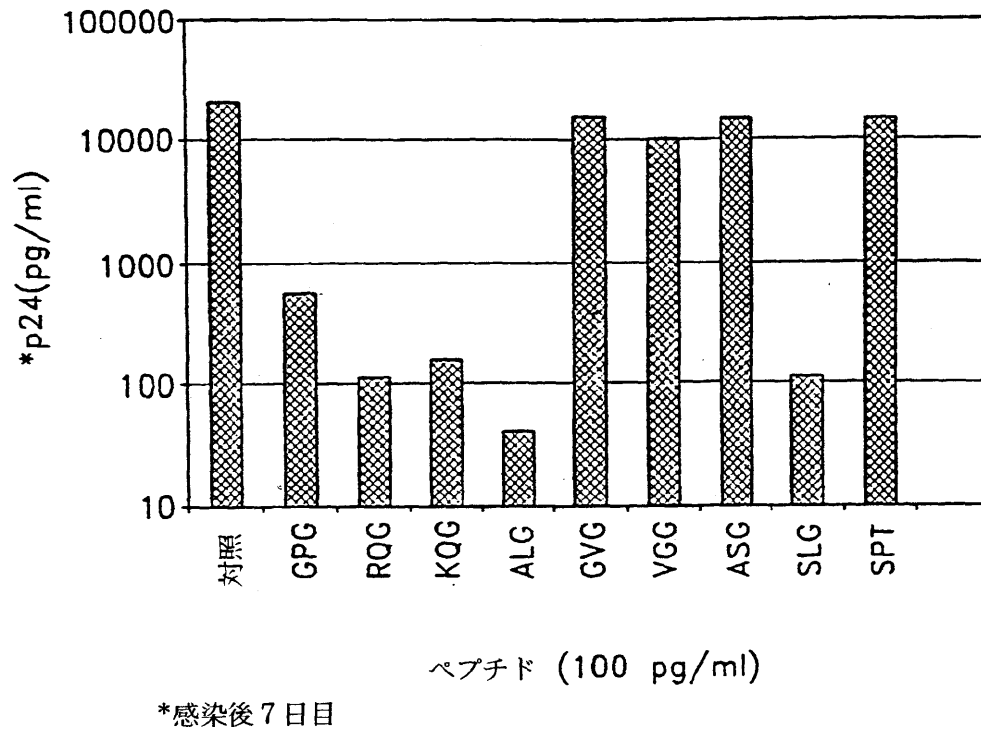
【図10】

図10は、 $^{14}\text{C} - \text{GPG} - \text{NH}_2$ を経口投与したラットの血漿分画からの放射能の排除を示すグラフである。

【図11】

図11は、10% SDS / PAGE上で分離したラット血漿粗タンパク質および分画化ラット血漿タンパク質を示す図であって、8 - f 3は $^{14}\text{C} - \text{GPG} - \text{NH}_2$ の投与8時間後の試料から採取した第3の分画を指し、8 - f 1は $^{14}\text{C} - \text{GPG} - \text{NH}_2$ の投与8時間後の試料から採取した第1の分画を指し、4 - f 3は $^{14}\text{C} - \text{GPG} - \text{NH}_2$ の投与4時間後の試料から採取した第3の分画を指し、4 - f 1は $^{14}\text{C} - \text{GPG} - \text{NH}_2$ の投与4時間後の試料から採取した第1の分画を指し、8 h、4 h、2 h、および1 hは $^{14}\text{C} - \text{GPG} - \text{NH}_2$ の投与後に試料を採取した時間を指し、さらにB 1 ~ B 4は同定されたタンパク質の位置を示す役割を持つ。

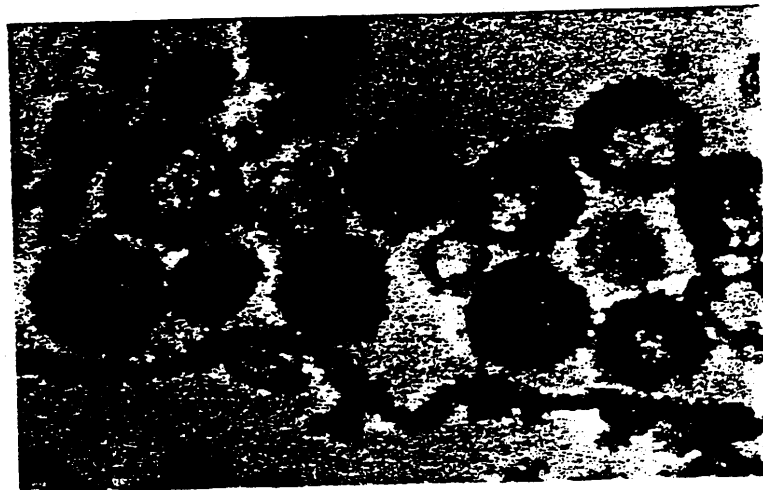
【図1】



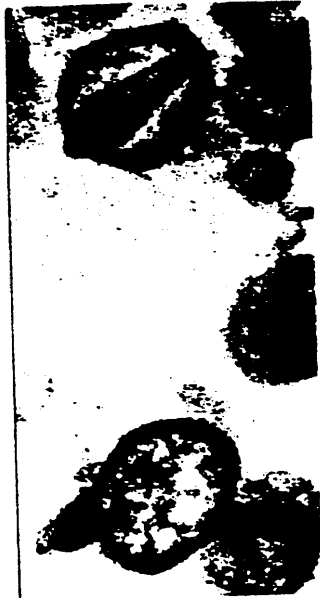
【図2】



【図3】



【図4】

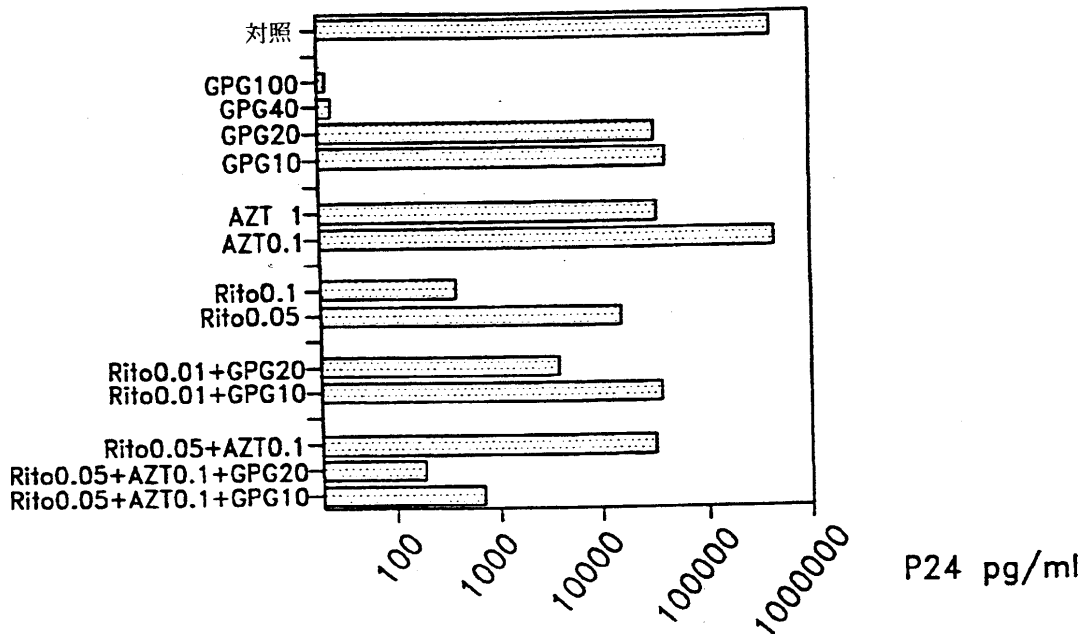


- III V-1 SPTS-ILDIKQPKPERDYVDRFYKTLRAEQA---SQEVKNWMTETLLVQNAVDPCKTILKALG-PAATLE-EMMTAC---QQVGGPGHK-ARKVL// (配列番号 3)
- III V-2 NPTN-ILDIKQPKPEFQSYVDRFYKSLRAEQT---DPAVKXNWMQTLLIQNAVDPCKLVKGLG-MNPTLEEMLTAC---QQVGGPGQK-ARLM// (配列番号 4)
- SIV NPVN-ILDIKQPKPEFQSYVDRFYKSLRAEQA---DPAVKXNWMTQTLIQNAVDPCKLVKGLG-MNPTLEEMLTAC---QQVGGPGQK-ARLM// (配列番号 5)
- HTLV-1 DPS--WASILQGLEEPTIAFVERLNIALDNGLP---EGTPKDPIRLSLAYSNAKCECQLLQARG--ITNSPLGDMRLR AC--Q-TWTPDKX-TKVL---// (配列番号 6)
- MPMV DPOASLTGVKQGPDEPFADFVHRLITTAGRIFG---SAEAGVDYVKQLAYENANPACQAAJFYR--KKTDLTGYI LC--SDIGPSYQQGLAMA---// (配列番号 7)
- MMTV -----LAGIKQGNESYETFISRLJEAVYRMMP---RGEUSDIL IKQLAWENAN SLCCQDLIRPIR-KTQTQDYI KAC--LDASPAV VQGMAY---// (配列番号 8)
- MMLV TN LAKVKGITQGNESPSAFLERLKEAYRRTYTPEDIPQGETNVSMSFIWQSA-PDIGRKLERLEDLRNKTL-QDLVREA---ERIFNKRE-----// (配列番号 9)
- RSV EPTDPWADIMQGTSESFYDFANRLIKAVEGSDL---P PSARAPVIIDCFROKSPDIQQLIRAAP--STLTTTGEIHKY VLDRQKTAPLTDQGIJAAAM// (配列番号 10)

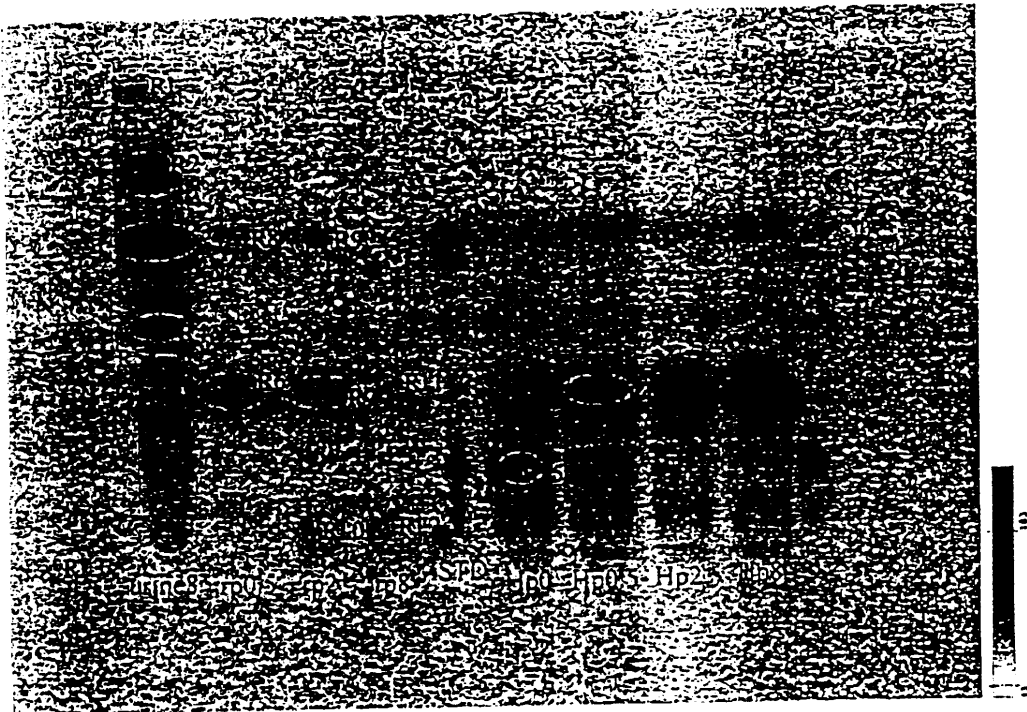
MIIR

【図6】

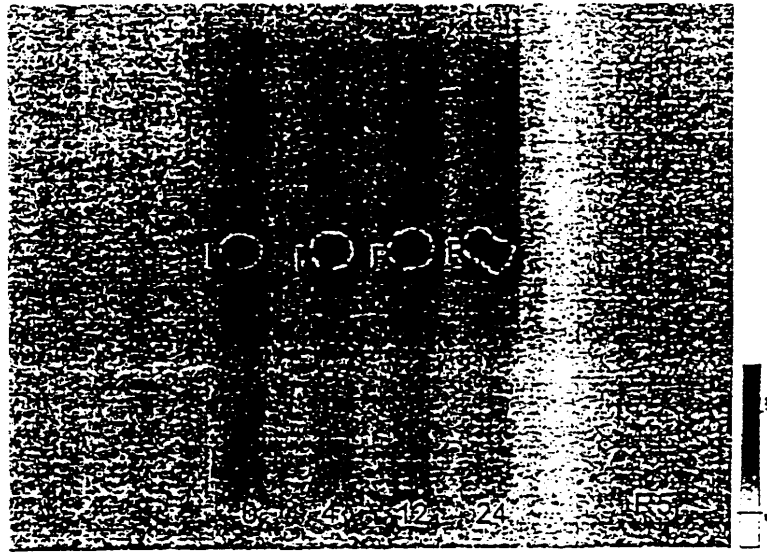
感染後14日間



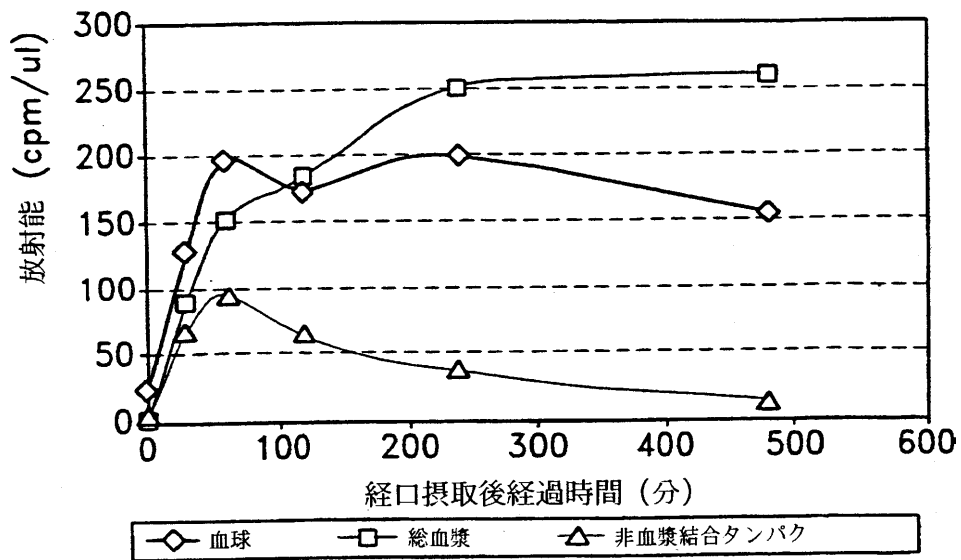
【図7】



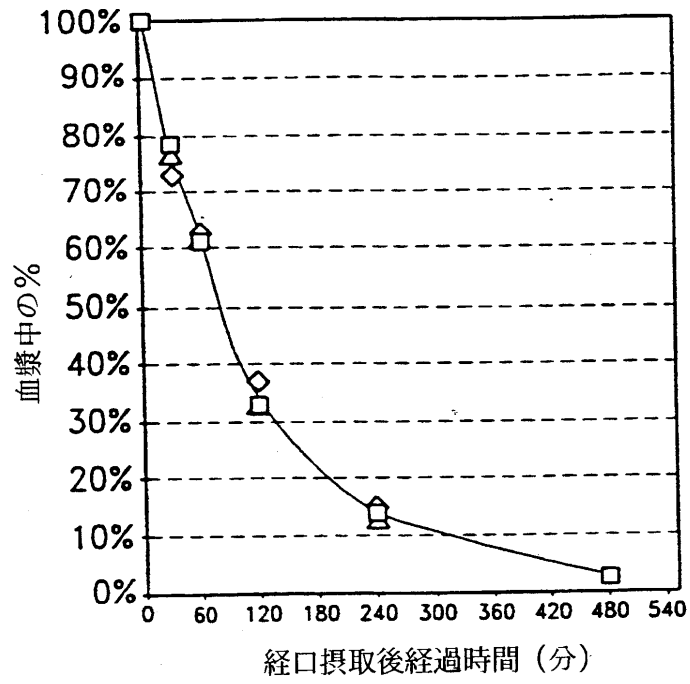
【図8】



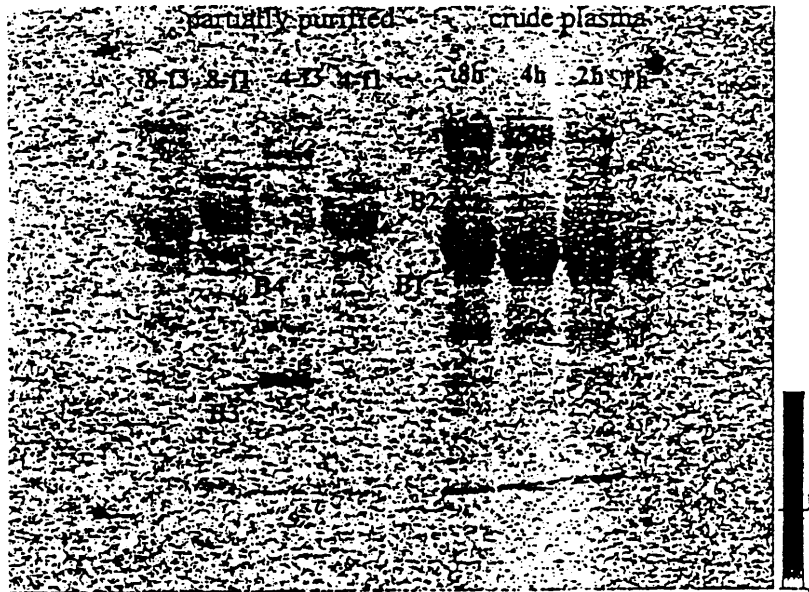
【図9】



【図10】



【図11】





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 00/00961

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 872 210 A (MEDABALIMI JOHN L) 16 February 1999 (1999-02-16)	49, 51, 53
Y	* see col.3 lines 29-39 and 64-67, col.4 lines 50-59, col.5 lines 58-60, col.6 lines 38-49, col.9 lines 8-22 and example 6 *	1, 3, 6-27, 30-39, 42-46, 54-60
X	WO 99 09056 A (UNIV MEDICINE AND DENTISTRY OF) 25 February 1999 (1999-02-25)	1, 7, 20, 22, 24, 25, 31, 32, 34, 36, 37, 54, 56-58, 60
Y	* see pages 1 and 13, cl. 2-7 and 16-22 *	1-3, 6-27, 30-39, 42, 54-60
X	WO 98 09985 A (EISENBACH SCHWARTZ MICHAL ; BESERMAN PIERRE (IL); YEDA RES & DEV (I)) 12 March 1998 (1998-03-12) * see abstract, page 14 and cl. 3-7 *	1, 3, 7, 25, 27, 31
X	EP 0 421 074 A (PRODOTTI ANTIBIOTICI SPA) 10 April 1991 (1991-04-10) * see abstract and claim 10 *	1, 7, 25, 31
X	WO 98 35062 A (LINGAPPA JAISRI R ; LINGAPPA VISHWANATH R (US)) 13 August 1998 (1998-08-13)	43, 44, 46
Y	* see cl. 13-20 *	43-46
X, P	WO 00 09158 A (NEWCOMB WILLIAM W ; BROWN JAY C (US); UNIV VIRGINIA (US)) 24 February 2000 (2000-02-24) * see claim 1 *	43, 46

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB 00/00961

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 4-5, 28-29, 40-41, 61-62  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/IB 00 00961

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 20-24,32-39,42 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----  
Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 4-5,28-29,40-41,61-62

The scope of the claims is so broad that no meaningful search was possible. Although claims 4-5, 28-29, 40-41 and 61-62 are formally dependent claims, their scope is actually broader than the scope of the independent claims.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/IB 00 00961

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-3,6-27,30-39,58-60

Tripeptides having the formula  $X1-X2-X3-NH2$ , wherein  $X1$ ,  $X2$  and  $X3$  may be any aminoacid and wherein the tripeptide is not  $GP6-NH2$ . Pharmaceutical compositions comprising such tripeptides, their use as antiviral agents and possibly in vitro uses.

2. Claims: 43-57

Methods for screening antiviral peptides.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/IB 00/00961

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5627035 A	06-05-1997	AT 173934 T	15-12-1998
		AU 667290 B	21-03-1996
		AU 8433291 A	17-03-1992
		BR 9106772 A	20-07-1993
		CA 2088788 A	23-02-1992
		DE 69130571 D	14-01-1999
		DE 69130571 T	17-06-1999
		DK 545991 T	16-08-1999
		EP 0545991 A	16-06-1993
		ES 2128322 T	16-05-1999
		FI 930519 A	21-04-1993
		GR 3029523 T	30-06-1999
		HU 63177 A	28-07-1993
		JP 3115596 B	11-12-2000
		JP 6504035 T	12-05-1994
		KR 220531 B	01-10-1999
		MC 2306 A	27-09-1993
		NO 930401 A	17-02-1993
		OA 10051 A	14-10-1996
		WO 9203147 A	05-03-1992
US 5346989 A	13-09-1994		
US 5872210 A	16-02-1999	AU 7117496 A	28-04-1997
		WO 9712907 A	10-04-1997
WO 9909056 A	25-02-1999	AU 8912698 A	08-03-1999
WO 9809985 A	12-03-1998	US 6126939 A	03-10-2000
		AU 4030097 A	26-03-1998
		AU 4030197 A	26-03-1998
		EP 0927190 A	07-07-1999
		EP 0927191 A	07-07-1999
		WO 9809984 A	12-03-1998
		JP 2001500491 T	16-01-2001
JP 2001500492 T	16-01-2001		
EP 0421074 A	10-04-1991	IT 1231342 B	28-11-1991
		DE 69018914 D	01-06-1995
		DE 69018914 T	16-11-1995
		ES 2071710 T	01-07-1995
		JP 3090098 A	16-04-1991
		PT 95112 A,B	18-04-1991
		US 5182265 A	26-01-1993
WO 9835062 A	13-08-1998	NONE	
WO 0009158 A	24-02-2000	AU 5556799 A	06-03-2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト' (参考)	
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50		33/53	D
	33/53		33/569	G
	33/569	A 6 1 K	37/02	
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
Fターム(参考)	2G045 BA20 CB21 DA36 FB03 4B063 QA05 QA06 QQ10 QQ79 QR77 QR79 QR80 QS31 QX01 QX10 4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA08 BA15 BA23 CA62 DC50 NA01 NA14 ZB332 ZC552 4H045 AA10 AA20 AA30 BA12 BA13 BA14 BA15 BA42 BA60 EA29 FA20 FA51			

专利名称(译)	阻断病毒感染性的肽及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003506410A</a>	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2001514972	申请日	2000-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	TRIPEP		
申请(专利权)人(译)	Toripeppu 激活 Boragetto		
[标]发明人	パールネアンダーズ		
发明人	パールネ, アンダーズ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/06 A61K45/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 C07K5/08 C07K14/155 C07K14/16 C12Q1/02 C12Q1/70 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/005 C12N2740/15022 C12N2740/16122 Y10S977/916		
FI分类号	A61K45/00 A61P31/12 A61P31/18 C07K5/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/569.G A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/BA20 2G045/CB21 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA05 4B063/QA06 4B063/QQ10 4B063/QQ79 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS31 4B063/QX01 4B063/QX10 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA15 4C084/BA23 4C084/CA62 4C084/DC50 4C084/NA01 4C084/NA14 4C084/ZB332 4C084/ZC552 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA42 4H045/BA60 4H045/EA29 4H045/FA20 4H045/FA51		
优先权	09/370368 1999-08-09 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了抑制病毒感染，包括人免疫缺陷病毒（HIV）感染的酰胺型肽的发现。还公开了使用所述肽的方法，包括在药物中用于治疗 and 预防病毒感染，例如HIV感染。

