

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6932506号
(P6932506)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月20日(2021.8.20)

| | |
|--------------------------------|---------------------|
| (51) Int.Cl. | F I |
| C 1 2 N 15/00 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 |
| A 6 1 K 47/42 (2017.01) | A 6 1 K 47/42 |
| C 0 7 K 7/06 (2006.01) | C 0 7 K 7/06 |
| C 0 7 K 19/00 (2006.01) | C 0 7 K 19/00 |

請求項の数 34 (全 42 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2016-534133 (P2016-534133) | (73) 特許権者 | 503469393 |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年11月20日(2014.11.20) | | イエール ユニバーシティ |
| (65) 公表番号 | 特表2017-500849 (P2017-500849A) | | アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー |
| (43) 公表日 | 平成29年1月12日(2017.1.12) | | ヘブン トゥ ホイットニー アベニュー |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2014/066619 | | ー |
| (87) 国際公開番号 | W02015/080943 | (74) 代理人 | 100102978 |
| (87) 国際公開日 | 平成27年6月4日(2015.6.4) | | 弁理士 清水 初志 |
| 審査請求日 | 平成29年11月17日(2017.11.17) | (74) 代理人 | 100102118 |
| 審査番号 | 不服2020-199 (P2020-199/J1) | | 弁理士 春名 雅夫 |
| 審査請求日 | 令和2年1月8日(2020.1.8) | (74) 代理人 | 100160923 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/908,963 | | 弁理士 山口 裕孝 |
| (32) 優先日 | 平成25年11月26日(2013.11.26) | (74) 代理人 | 100119507 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US) | | 弁理士 刑部 俊 |
| | | (74) 代理人 | 100142929 |
| | | | 弁理士 井上 隆一 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞透過組成物およびそれを用いる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択されるアミノ酸配列のペプチドを含む積荷部分に連結されたアミノ酸配列RRPPR (SEQ ID NO: 1) からなる輸送ペプチドを含む、単離された輸送構築物、またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 2】

SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択されるアミノ酸配列のペプチドを含む積荷部分に連結されたSEQ ID NO: 1からなる、請求項1記載の輸送構築物。

【請求項 3】

薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物の一部である、請求項1記載の輸送構築物。

【請求項 4】

積荷部分に連結されたSEQ ID NO: 1からなる輸送ペプチドを含む、単離された輸送構築物、またはその塩もしくは溶媒和物であって、該積荷部分が、核酸；オリゴ糖；脂質；糖脂質；リポタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リポソームおよびウイルスからなる群より選択される少なくとも1つである、輸送構築物、またはその塩もしくは溶媒和物。

【請求項 5】

積荷部分が、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている、請求項4記載の輸送構築物。

10

20

【請求項 6】

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、請求項5記載の輸送構築物。

【請求項 7】

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、請求項5記載の輸送構築物。

【請求項 8】

薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物の一部である、請求項4記載の輸送構築物。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される少なくとも1つの積荷部分をコードする追加的な核酸をさらに含む、SEQ ID NO: 1からなる輸送ペプチドをコードする単離された核酸を含む、組成物。

10

【請求項 10】

SEQ ID NO: 1からなる輸送ペプチドをコードする核酸を含み、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される少なくとも1つの積荷部分をコードする追加的な核酸をさらに含む、ベクター。

【請求項 11】

輸送ペプチドをコードする核酸の発現を可能にする転写活性化エレメントをさらに含む、請求項10記載のベクター。

20

【請求項 12】

輸送ペプチドをコードする核酸とインフレームで積荷部分をコードする核酸をさらに含む、請求項10記載のベクター。

【請求項 13】

SEQ ID NO: 1からなる輸送ペプチドをコードする外来性核酸を含み、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される少なくとも1つの積荷部分をコードする追加的な核酸をさらに含む、単離された宿主細胞。

【請求項 14】

積荷部分を単離された標的細胞にまたはその中に送達する方法であって、該標的細胞を、SEQ ID NO: 1からなる輸送ペプチドに連結されている積荷部分を含む輸送構築物と接触させ、それにより該積荷部分が該標的細胞にまたはその中に送達される段階を含み、該積荷部分が、核酸；オリゴ糖；脂質；糖脂質；リポタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リポソームおよびウイルスからなる群より選択される少なくとも1つである、方法。

30

【請求項 15】

積荷部分が、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、請求項15記載の方法。

40

【請求項 17】

単離された標的細胞が、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、および脳細胞からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項14記載の方法。

【請求項 18】

単離された細胞が単離された哺乳動物細胞である、請求項14記載の方法。

【請求項 19】

哺乳動物がヒトである、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択されるアミノ酸配列のペプチドを含む積荷部分を、それを必要とする対象の標的細胞にまたはその中に送達するための、SEQ ID NO: 1から

50

なる輸送ペプチドに連結されている該積荷部分を含む輸送構築物の治療的有効量を含む薬学的組成物。

【請求項 2 1】

積荷部分が、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 2】

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、請求項21記載の薬学的組成物。

【請求項 2 3】

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端またはC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、請求項21記載の薬学的組成物。

10

【請求項 2 4】

標的細胞が、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、および脳細胞からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 5】

輸送構築物が、経口、経粘膜、局所、経皮、皮内、皮下、眼、硝子体内、結膜下、脈絡膜上、前房内、吸入、気管支内、肺、静脈内、動脈内、十二指腸内、膀胱内、非経口、クモ膜下腔内、筋肉内、および胃内からなる群より選択される少なくとも1つの経路によって対象に投与される、請求項20記載の薬学的組成物。

20

【請求項 2 6】

対象が哺乳動物である、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 7】

哺乳動物がヒトである、請求項26記載の薬学的組成物。

【請求項 2 8】

積荷部分を単離された標的細胞にまたはその中に送達する方法であって、該標的細胞を、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される配列を含む積荷部分に連結されたSEQ ID NO: 1からなる輸送ペプチドを含む輸送構築物と接触させ、それにより該積荷部分が該標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む、方法。

【請求項 2 9】

輸送ペプチドが、リンカーまたは化学結合を通して積荷部分に共有結合で連結されている、請求項28記載の方法。

30

【請求項 3 0】

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端またはC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、請求項29記載の方法。

【請求項 3 2】

単離された標的細胞が、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、および脳細胞からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項28記載の方法。

40

【請求項 3 3】

単離された細胞が単離された哺乳動物細胞である、請求項28記載の方法。

【請求項 3 4】

哺乳動物がヒトである、請求項33記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

50

本出願は、2013年11月26日に出願された米国特許仮出願第61/908,963号に対して35 U.S.C. § 119(e)の下で優先権を主張し、その出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦支援の研究または開発についての声明

本発明は、National Institutes of Healthによって授与されたHL064793、HL061371、HL096670、およびHL081190の下、政府の援助でなされた。政府は、本発明においてある一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

細胞膜（形質膜または細胞質膜としても公知である）は、細胞の内部を外側の環境から分離し、細胞をその周囲から保護する生体膜である。膜は、埋め込まれたタンパク質を伴うリン脂質二重層を含み、細胞接着、イオン伝導性、および細胞シグナル伝達などの細胞プロセスに参与している。

【0004】

細胞膜は、細胞の内外の物質の移動を制御し、イオンおよび有機分子に対して選択的に透過性である。物質の膜を横切った移動は、受動的（すなわち、細胞エネルギーの投入なしで起こる）または能動的（すなわち、それを輸送する際に細胞がエネルギーを消費することを必要とする）であり得る。細胞膜は、このように、受動的な浸透および拡散、膜貫通タンパク質チャンネル輸送、エンドサイトーシスおよびエキソサイトーシスなどの輸送機構を使用して、選択的フィルターとして働く。

【0005】

細胞膜は、細胞外の極性化合物に対して著しく不透過性であるため、生物学的活性化合物の細胞内送達は、困難である。したがって、積荷分子を生細胞の内側に運搬するための「トロイの木馬」として作用することができる新規の細胞透過性ペプチド（「CPP」）を特定することに、大きな関心がある。CPPは、オリゴヌクレオチド（Astria-Fisher et al., 2000, *Biochem. Pharmacol.* 60:83-90（非特許文献1）；Eguchi et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26204-26210（非特許文献2））、プラスミド（Morris et al., 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:3510-3517（非特許文献3））、ウイルス（Gratton et al., 2003, *Nat. Med.* 9:357-362（非特許文献4））、ペプチド（Gratton et al., 2003, *Nat. Med.* 9:357-362（非特許文献4）；Soomets et al., 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1467:165-176（非特許文献5））、および蛍光体（Bucci et al., 2000, *Nat. Med.* 6:1362-1367（非特許文献6））の細胞内送達において使用されている。アンテナペディアホメオドメイン（「AP」；ショウジョウバエ属（*Drosophila*）転写因子である16アミノ酸ペプチド）、およびHIVの転写トランス活性化因子（「TAT」；15アミノ酸）は、中でも、記載されている最初のCPPであり、より最近では、ポリアルギニン（Arg₇またはArg₉）およびC105Y（17アミノ酸ペプチド）などのCPP配列が記載されている。

【0006】

積荷を細胞中に移行させるCPPの能力によって、それらは、細胞不透過性の治療用化合物のための魅力的な送達剤になり得る。しかしながら、ヒトにおけるCPPの治療効果、動態、安全性プロファイル、および特異性は、依然として知られていない。増強された内部移行能力、増強された全体的な治療有効性および安全性、最小のペプチド排出/分解、ならびに高い治療活性/費用の比を有する、新規の標的化されたCPPが、必要とされている。

【0007】

カベオリン（caveolin）は、シグナル伝達経路を調節し得るコレステロール結合タンパク質である（Smart et al., 1999, *Mol. Cell. Biol.* 19:7289-7304（非特許文献7）；Kurczalia & Parton, 1999, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:424-431（非特許文献8））。最近の研究は、それらの細胞内輸送および内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の調節に焦点

10

20

30

40

50

を合わせている。eNOS由来のNOは、全身の血圧の維持、血管リモデリング、血管新生、および創傷治癒に必要である (Huang et al., 1995, Nature 377:239-242 (非特許文献9) ; Murohara et al., 1998, J. Clin. Invest. 101:2567-2578 (非特許文献10) ; Rudic et al., 1998, J. Clin. Invest. 101:731-736 (非特許文献11) ; Lee et al., 1999, Am. J. Physiol. 277:H1600-1608 (非特許文献12))。eNOSは、カベオリン-1およびカベオリン-3と、82~101残基の間に位置するそれらの推定上の足場ドメインに結合することによって物理的に相互作用することができ (Li et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:29182-29190 (非特許文献13))、この相互作用が、eNOSをその「活性がより低い」状態にする (Garcia-Cardena et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:25437-25440 (非特許文献14) ; Ju et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:18522-18525 (非特許文献15) ; Michel et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:25907-25912 (非特許文献16))。eNOSの負の調節因子としてのカベオリンのモデルと一貫して、カベオリン-1の足場ドメイン由来のペプチドは、eNOSのカベオリンに対する結合を破壊し、NOSの還元酵素ドメインから酸素添加酵素ドメインへの電子束を遅くすることによって、インビトロで用量依存様式でNOS活性を阻害する ($C_{50} = 1 \sim 3 \mu M$) (Garcia-Cardena et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:25437-25440 (非特許文献14) ; Ju et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:18522-18525 (非特許文献15) ; Ghosh et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:22267-22271 (非特許文献17))。

【0008】

効率的に細胞膜を透過する新規分子を特定する必要性が、当技術分野においてある。そのような分子は、治療剤、核酸、ペプチド、糖類、脂質、リポソームなどのような、積荷分子の細胞膜を横切った送達を促進するのに有用であろう。本発明は、このまだ対処されていない必要性を満足させる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Astriab-Fisher et al., 2000, Biochem. Pharmacol. 60:83-90

【非特許文献2】Eguchi et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:26204-26210

【非特許文献3】Morris et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27:3510-3517

【非特許文献4】Gratton et al., 2003, Nat. Med. 9:357-362

【非特許文献5】Soomets et al., 2000, Biochim. Biophys. Acta 1467:165-176

【非特許文献6】Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-1367

【非特許文献7】Smart et al., 1999, Mol. Cell. Biol. 19:7289-7304

【非特許文献8】Kurzchalia & Parton, 1999, Curr. Opin. Cell. Biol. 11:424-431

【非特許文献9】Huang et al., 1995, Nature 377:239-242

【非特許文献10】Murohara et al., 1998, J. Clin. Invest. 101:2567-2578

【非特許文献11】Rudic et al., 1998, J. Clin. Invest. 101:731-736

【非特許文献12】Lee et al., 1999, Am. J. Physiol. 277:H1600-1608

【非特許文献13】Li et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:29182-29190

【非特許文献14】Garcia-Cardena et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:25437-25440

【非特許文献15】Ju et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:18522-18525

【非特許文献16】Michel et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:25907-25912

【非特許文献17】Ghosh et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:22267-22271

【発明の概要】

【0010】

本発明は、アミノ酸配列RRPPR (SEQ ID NO: 1) を含む、単離された輸送ペプチド、またはその塩もしくは溶媒和物を提供する。

【0011】

本発明はさらに、積荷部分に連結されSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む、単離された輸送構築物、またはその塩もしくは溶媒和物を提供する。

【0012】

10

20

30

40

50

本発明はさらに、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される配列を含む積荷部分に連結されSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む、単離された輸送構築物、またはその塩もしくは溶媒和物を提供する。

【0013】

本発明はさらに、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする単離された核酸を含む、組成物を提供する。

【0014】

本発明はさらに、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される少なくとも1つの積荷部分をコードする追加的な核酸をさらに含む、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする単離された核酸を含む、組成物を提供する。

10

【0015】

本発明はさらに、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする核酸を含む、ベクターを提供する。

【0016】

本発明はさらに、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする外来性核酸を含む、単離された宿主細胞を提供する。

【0017】

本発明はさらに、積荷部分を標的細胞(中)に送達する方法を提供する。

【0018】

本発明はさらに、積荷部分を、それを必要とする対象の標的細胞(中)に送達する方法を提供する。

20

【0019】

ある特定の態様において、輸送ペプチドは、SEQ ID NO: 1からなる。他の態様において、輸送ペプチドおよび/または構築物は、薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物の一部である。さらに他の態様において、積荷部分は、核酸；ペプチド；タンパク質；オリゴ糖；脂質；糖脂質；リボタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リポソームおよびウイルスからなる群より選択される少なくとも1つである。さらに他の態様において、核酸は、5'-CGGCGCCCGCCTCGT-3' (SEQ ID NO: 7)

を含む。さらに他の態様において、組成物は、SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1；SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1；SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1；およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される、輸送構築物をコードする核酸を含む。さらに他の態様において、組成物は、ペプチド；タンパク質；生物学的活性化合物；標識；イメージング剤；診断剤；治療剤；および予防剤からなる群より選択される少なくとも1つの積荷部分をコードする核酸をさらに含む。

30

【0020】

ある特定の態様において、積荷部分は、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている。他の態様において、リンカーはジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合はジスルフィド結合を含む。さらに他の態様において、積荷部分は、ペプチド部分を含む。さらに他の態様において、積荷部分は、ペプチドまたはタンパク質を含む。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、積荷部分のペプチド部分のN末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、積荷部分のペプチド部分のC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている。

40

【0021】

ある特定の態様において、輸送構築物は、SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1；SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1；SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1；およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される少なくとも1つの配列を含む。他の態様

50

において、輸送構築物は、SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6 ; SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1 ; SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1 ; SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1 ; およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される。

【0022】

ある特定の態様において、ベクターは、輸送ペプチドをコードする核酸の発現を可能にする転写活性化エレメントをさらに含む。他の態様において、ベクターは、輸送ペプチドをコードする核酸とインフレームで積荷部分をコードする核酸を含む。さらに他の態様において、核酸は、(a) 輸送ペプチドをコードする核酸、および(b) 該輸送ペプチドをコードする核酸とインフレームで積荷部分をコードする核酸を含むベクターである。さらに他の態様において、宿主細胞は、宿主細胞における(a)の核酸および(b)の核酸の発現を可能にする転写活性化エレメントをさらに含む。

10

【0023】

ある特定の態様において、輸送ペプチドは、標的細胞に結合し、および/または細胞膜を通過する。他の態様において、輸送構築物は、標的細胞に結合し、および/または細胞膜を通過する。さらに他の態様において、標的細胞は、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、および脳細胞からなる群より選択される少なくとも1つを含む。さらに他の態様において、細胞は哺乳動物である。さらに他の態様において、哺乳動物はヒトである。

【0024】

ある特定の態様において、方法は、標的細胞を、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドに連結されている積荷部分を含む輸送構築物と接触させ、それにより該積荷部分が該標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む。

20

【0025】

ある特定の態様において、方法は、標的細胞を、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される配列を含む積荷部分に連結されSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む輸送構築物と接触させ、それにより該積荷部分が該標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む。

【0026】

ある特定の態様において、方法は、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドに連結されている積荷部分を含む輸送構築物の治療的有効量を対象に投与し、それにより該積荷部分が該対象の標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む。

30

【0027】

ある特定の態様において、方法は、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される配列を含む積荷部分に連結されSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む輸送構築物の治療的有効量を対象に投与し、それにより該積荷部分が該対象の標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む。

【0028】

ある特定の態様において、本発明の化合物および/または組成物は、経口、経粘膜、局所、経皮、皮内、皮下、眼、硝子体内、結膜下、脈絡膜上、前房内、吸入、気管支内、肺、静脈内、動脈内、十二指腸内、膀胱内、非経口、クモ膜下腔内、筋肉内、および胃内からなる群より選択される少なくとも1つの経路によって対象に投与される。

40

[本発明1001]

アミノ酸配列RRPPR (SEQ ID NO: 1) を含む、単離された輸送ペプチド、またはその塩もしくは溶媒和物。

[本発明1002]

SEQ ID NO: 1からなる、本発明1001の輸送ペプチド。

[本発明1003]

薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物の一部である、本発明1001の輸送ペプチド。

50

[本発明1004]

積荷部分に連結されSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む、単離された輸送構築物、またはその塩もしくは溶媒和物。

[本発明1005]

輸送ペプチドがSEQ ID NO: 1からなる、本発明1004の輸送構築物。

[本発明1006]

積荷部分が、核酸；ペプチド；タンパク質；オリゴ糖；脂質；糖脂質；リポタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リポソームおよびウイルスからなる群より選択される少なくとも1つである、本発明1004の輸送構築物。

10

[本発明1007]

積荷部分が、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている、本発明1004の輸送構築物。

[本発明1008]

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、本発明1007の輸送構築物。

[本発明1009]

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端またはC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、本発明1007の輸送構築物。

20

[本発明1010]

SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される配列を含む積荷部分に連結されSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む、単離された輸送構築物、またはその塩もしくは溶媒和物。

[本発明1011]

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端またはC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、本発明1010の輸送構築物。

[本発明1012]

SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1；SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1；SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1；およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される少なくとも1つの配列を含む、本発明1011の輸送構築物。

30

[本発明1013]

SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5；SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6；SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1；SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1；SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1；およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される、本発明1011の輸送構築物。

[本発明1014]

薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物の一部である、本発明1010の輸送構築物。

40

[本発明1015]

SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする単離された核酸を含む、組成物。

[本発明1016]

輸送ペプチドがSEQ ID NO: 1からなる、本発明1015の組成物。

[本発明1017]

核酸が、
5'-CGGCGCCCGCCTCGT-3' (SEQ ID NO: 7)
を含む、本発明1015の組成物。

[本発明1018]

ペプチド；タンパク質；生物学的活性化合物；標識；イメージング剤；診断剤；治療剤

50

；および予防剤からなる群より選択される少なくとも1つの積荷部分をコードする核酸をさらに含む、本発明1015の組成物。

[本発明1019]

SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される少なくとも1つの積荷部分をコードする追加的な核酸をさらに含む、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする単離された核酸を含む、組成物。

[本発明1020]

SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6 ; SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1 ; SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1 ; SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1 ; およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される輸送構築物をコードする核酸を含む、本発明1019の組成物。

10

[本発明1021]

SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする核酸を含む、ベクター。

[本発明1022]

輸送ペプチドがSEQ ID NO: 1からなる、本発明1021のベクター。

[本発明1023]

輸送ペプチドをコードする核酸の発現を可能にする転写活性化エレメントをさらに含む、本発明1021のベクター。

[本発明1024]

輸送ペプチドをコードする核酸とインフレイムで積荷部分をコードする核酸をさらに含む、本発明1021のベクター。

20

[本発明1025]

SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする外来性核酸を含む、単離された宿主細胞。

[本発明1026]

核酸が、(a) 輸送ペプチドをコードする核酸、および(b) 該輸送ペプチドをコードする核酸とインフレイムで積荷部分をコードする核酸を含むベクターである、本発明1025の宿主細胞。

[本発明1027]

宿主細胞における(a)の核酸および(b)の核酸の発現を可能にする転写活性化エレメントをさらに含む、本発明1026の宿主細胞。

30

[本発明1028]

積荷部分を標的細胞にまたはその中に送達する方法であって、該標的細胞を、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドに連結されている積荷部分を含む輸送構築物と接触させ、それにより該積荷部分が該標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む、方法。

[本発明1029]

積荷部分が、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている、本発明1028の方法。

[本発明1030]

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、本発明1029の方法。

40

[本発明1031]

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端またはC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、本発明1029の方法。

[本発明1032]

輸送ペプチドがSEQ ID NO: 1からなる、本発明1028の方法。

[本発明1033]

積荷部分が、核酸；ペプチド；タンパク質；オリゴ糖；脂質；糖脂質；リポタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リボソームおよびウイルスからなる群より選択される少なくとも1つである、

50

本発明1028の方法。

[本発明1034]

標的細胞が、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、および脳細胞からなる群より選択される少なくとも1つを含む、本発明1028の方法。

[本発明1035]

細胞が哺乳動物である、本発明1028の方法。

[本発明1036]

哺乳動物がヒトである、本発明1035の方法。

[本発明1037]

積荷部分を、それを必要とする対象の標的細胞にまたはその中に送達する方法であって、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドに連結されている積荷部分を含む輸送構築物の治療の有効量を該対象に投与し、それにより該積荷部分が該対象の標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む、方法。

10

[本発明1038]

積荷部分が、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている、本発明1037の方法。

[本発明1039]

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、本発明1038の方法。

[本発明1040]

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端またはC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、本発明1038の方法。

20

[本発明1041]

輸送ペプチドがSEQ ID NO: 1からなる、本発明1037の方法。

[本発明1042]

積荷部分が、核酸；ペプチド；タンパク質；オリゴ糖；脂質；糖脂質；リポタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リポソームおよびウイルスからなる群より選択される少なくとも1つである、本発明1037の方法。

[本発明1043]

標的細胞が、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、および脳細胞からなる群より選択される少なくとも1つを含む、本発明1037の方法。

30

[本発明1044]

輸送構築物が、経口、経粘膜、局所、経皮、皮内、皮下、眼、硝子体内、結膜下、脈絡膜上、前房内、吸入、気管支内、肺、静脈内、動脈内、十二指腸内、膀胱内、非経口、クモ膜下腔内、筋肉内、および胃内からなる群より選択される少なくとも1つの経路によって対象に投与される、本発明1037の方法。

[本発明1045]

対象が哺乳動物である、本発明1037の方法。

[本発明1046]

哺乳動物がヒトである、本発明1045の方法。

40

[本発明1047]

積荷部分を標的細胞にまたはその中に送達する方法であって、該標的細胞を、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される配列を含む積荷部分に連結されSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む輸送構築物と接触させ、それにより該積荷部分が該標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む、方法。

[本発明1048]

輸送ペプチドが、リンカーまたは化学結合を通して積荷部分に共有結合で連結されている、本発明1047の方法。

[本発明1049]

50

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、本発明1048の方法。

[本発明1050]

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端またはC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、本発明1048の方法。

[本発明1051]

輸送構築物が、SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6 ; SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1 ; SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1 ; SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1 ; およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される少なくとも1つの配列を含む、本発明1047の方法。

10

[本発明1052]

標的細胞が、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、および脳細胞からなる群より選択される少なくとも1つを含む、本発明1047の方法。

[本発明1053]

細胞が哺乳動物である、本発明1047の方法。

[本発明1054]

哺乳動物がヒトである、本発明1053の方法。

[本発明1055]

積荷部分を、それを必要とする対象の標的細胞にまたはその中に送達する方法であって、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される配列を含む積荷部分に連結されSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む輸送構築物の治療的有効量を該対象に投与し、それにより該積荷部分が該対象の標的細胞にまたはその中に送達される段階を含む、方法。

20

[本発明1056]

輸送ペプチドが、リンカーまたは化学結合を通して積荷部分に共有結合で連結されている、本発明1055の方法。

[本発明1057]

リンカーがジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合がジスルフィド結合を含む、本発明1056の方法。

[本発明1058]

積荷部分がペプチド部分を含み、かつ輸送ペプチドが、該積荷部分のペプチド部分のN末端またはC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている、本発明1056の方法。

30

[本発明1059]

輸送構築物が、SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5 ; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6 ; SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1 ; SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1 ; SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1 ; およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される少なくとも1つの配列を含む、本発明1055の方法。

[本発明1060]

標的細胞が、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、および脳細胞からなる群より選択される少なくとも1つを含む、本発明1055の方法。

[本発明1061]

輸送構築物が、経口、経粘膜、局所、経皮、皮内、皮下、眼、硝子体内、結膜下、脈絡膜上、前房内、吸入、気管支内、肺、静脈内、動脈内、十二指腸内、膀胱内、非経口、クモ膜下腔内、筋肉内、および胃内からなる群より選択される少なくとも1つの経路によって対象に投与される、本発明1055の方法。

40

[本発明1062]

対象が哺乳動物である、本発明1055の方法。

[本発明1063]

哺乳動物がヒトである、本発明1062の方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 9 】

50

以下の本発明の具体的態様の詳細な説明は、添付の図面とともに読むと、より良好に理解されるであろう。本発明を例証する目的で、具体的態様を図面に示す。しかしながら、本発明は、図面に示されている態様の正確な配置および手段に限定されないことが、理解されるべきである。

【0030】

【図1】バイオパンニング中の細胞透過性ファージの指数関数的濃縮を示すグラフである。内皮細胞（「EC」）における6ラウンドのバイオパンニングについて、表1由来の回収されたファージのパーセンテージをプロットしている。指数関数的相関が、0.975の R^2 値で確立されている。

【図2A】VEGF誘導性NO放出の遮断においてEndo5-CavがAP-Cavよりも強力であるという知見を示す棒グラフである。Endo5-Cavは、VEGF誘導性NO放出を完全に遮断した。培養BAECを、6時間、示されているペプチド（ 10^{-5} M）で前処置し、示されているように30分間、VEGF（ 10^{-9} M）で刺激した。ビヒクルと比較して * $P < 0.05$ 、AP-Cav + VEGFと比較して † $P < 0.05$ 。三連で $n = 4$ 。

10

【図2B】VEGF誘導性NO放出の遮断においてEndo5-CavがAP-Cavよりも強力であるという知見を示す棒グラフである。AP-CavおよびEndo5-Cavは、用量依存性効果を示した。培養BAECを、6時間、ペプチド（ $1 \sim 50 \times 10^{-6}$ M）で前処置し、図2Aに記載されているようにVEGFで刺激した。ビヒクルと比較して * $P < 0.05$ 、AP-Cav + VEGFと比較して † $P < 0.05$ 。二連で $n = 4$ 。

【図2C】VEGF誘導性NO放出の遮断においてEndo5-CavがAP-Cavよりも強力であるという知見を示す棒グラフである。AP-CavおよびEndo5-Cavは、時間依存性効果を示した。BAECを、1、2、4、または6時間、ペプチド（ 10^{-5} M）で処置し、図2Aに記載されているようにVEGFで刺激した。ビヒクルと比較して * $P < 0.05$ 、AP-Cav + VEGFと比較して † $P < 0.05$ 。二連で $n = 4$ 。

20

【図2D】VEGF誘導性NO放出の遮断においてEndo5-CavがAP-Cavよりも強力であるという知見を示す棒グラフである。AP-Cavの細胞透過配列およびCavドメインの両方の最適化によって、より短くより強力なeNOS阻害剤がもたらされた。APからEndo5への置換、およびCav（82-101）からCavAB（82-95）への短縮（Endo5-CavAB； 10^{-5} M）は、VEGF誘導性NO放出を完全に遮断したのに対して、より少ない用量のはるかに短いペプチドEndo5-CavAB（ 2×10^{-6} M）は、AP-Cav（ 10^{-5} M）と同様の効果を有していた。

30

【図3A】Endo5-Cavはインビボでエバンスブルー管外遊出を遮断するという知見を示す。マウスのAP-Cav（1mg/kg）またはEndo5-Cav（モルベースで同一用量）での1時間の前処置により、カラシ油誘導性の血管透過性の増大（右耳；30分）が阻止されたのに対して、対照ペプチドは、有意な効果を有さなかった。左耳は鉍油単独（ビヒクル）を塗布し、ベースライン対照とみなした。マウスに、エバンスブルーをあらかじめ注射した。対照ペプチドと比較して * $P < 0.05$ 、AP-Cav + カラシ油と比較して † $P < 0.05$ 。二連で群あたり $n = 6$ または8。

【図3B】Endo5-Cavはインビボでエバンスブルー管外遊出を遮断するという知見を示す。図3Aに呈示されているデータの代表的な値を示す。

【図4】培養内皮細胞においてEndo5がAPよりも速く内部移行するという知見を示すグラフである。図4A：図4Bにおいて使用した同一の細胞溶解溶液に溶解した、類似した濃度のローダミン-AP（rhod-AP）およびカルボキシフルオレセイン-Endo5（cFluo-Endo5）の蛍光読み取りを行って、溶液中のペプチド濃度と蛍光値との間の直線性を確認した。干渉を阻止するために、ペプチドは別々に使用した。図4B：カルボキシフルオレセイン-Endo5の内部移行速度は、ローダミン-APのものよりも速かった。培養BAECを、個々のペプチドと1、2、4、または6時間インキュベーションし、酸洗浄し、リンスし、トリプシン処理し、溶解して、全内部蛍光を決定し、標準曲線を用いることにより 10^6 あたりのペプチドのモルに変換した。ペプチドと5分間インキュベーションして、記載されているように処置した細胞を、内部移行していない染色のためのバックグラウンドとして用いた。

40

【図5A】Endo5およびAPの内部移行が、内皮細胞においてオーバーラップする細胞経路

50

を用いるという知見を示す。培養HUVECを、カルボキシフルオレセイン-Endo5（緑色）またはローダミン-AP（赤色； 10^{-5} M）で1時間処置（パルス）し、リンスして、未固定細胞における生きている状態でのイメージングを、落射蛍光顕微鏡を用いて行った。両方のペプチドでの点状の染色および核染色の欠如（楕円形の暗い帯域）に注意されたい。マージした画像は、両方のペプチド間の局在（黄色）を示した。代表的な細胞を示す。

【図5B】Endo5およびAPの内部移行が、内皮細胞においてオーバーラップする細胞経路を用いるという知見を示す。図5Aに記載されている処置後に、ペプチド局在を、生HUVEC中で2時間チェースして、視覚化した。両方のペプチド間の共局在（黄色）は、依然として観察可能であった。

【図5C】Endo5およびAPの内部移行が、内皮細胞においてオーバーラップする細胞経路を用いるという知見を示す。Endo5およびAPは、VEGF誘導性NO放出のAP-CavおよびEndo5-Cavによる阻害を阻止した。培養BAECを、APまたはEndo5（ 5×10^{-5} M）のいずれかで前処置し、AP-CavまたはEndo5-Cav（ 10^{-5} M）のいずれかで6時間インキュベーションして、図2に記載されているようにVEGFで刺激した。ピヒクルと比較して * $P < 0.05$ 。三連で群あたり $n = 6$ 。

【発明を実施するための形態】

【0031】

発明の詳細な説明

本発明は、一部、短い5アミノ酸ペプチドであるEndo5（RRPPR；SEQ ID NO: 1）の、細胞透過性ペプチド（CPP）としての予想外の特定に関連する。

【0032】

ある特定の態様において、Endo5は、細胞膜を通過する輸送ペプチドである。他の態様において、ひとたび積荷部分がEndo5に連結されると、結果として生じた構築物は、積荷部分自体よりも効率的に細胞膜を通過する。ある特定の態様において、積荷部分は、核酸；ペプチド；タンパク質；オリゴ糖；脂質；糖脂質；リポタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リボソームおよびウイルスからなる群より選択される。他の態様において、積荷部分は、共有結合性または非共有結合性の連結を通して、輸送ペプチドに連結されている。

【0033】

本明細書において実証されているように、短い5ペプチドであるEndo5が、ファージディスプレイライブラリーベースのアプローチを用いて、予想外に単離された。Endo5は、ヒト内皮細胞においてファージの内部移行を増大させるその能力について選択された。機能解析によって、Endo5-Cavは、インビトロでの内皮細胞における血管内皮成長因子（VEGF）誘導性の一酸化窒素放出の阻害およびインビボでの透過性において、AP-Cavよりも強力であることが明らかになった。薬物動態研究および競合研究によって、Endo5はAPよりも速い速度で内皮細胞により内部移行されること、および、Endo5-Cav活性はAPにより競合的に阻害され、Endo5およびAPの取り込み経路の類似性の証拠を提供することが示された。本明細書において報告されているデータによって支持されるように、Endo5は、本発明の時点で公知である最も短いCPP配列であるだけでなく、特に内皮細胞への高い内部移行速度のために操作された最初のCPPでもある。

【0034】

定義

別の方法で定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じの意味を有する。本明細書に記載されているものと同様または同等の任意の方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、非限定的な方法および材料を説明する。

【0035】

「a」および「an」という冠詞は、冠詞の文法上の目的語の1つまたは1つより多く（すなわち、少なくとも1つ）を指すように、本明細書において使用される。例として、「

10

20

30

40

50

エレメント (an element) は、1つのエレメントまたは1つより多いエレメントを意味する。

【0036】

本明細書において使用される際、量、持続時間などのような測定可能な値を指す場合の「約」という用語は、指定された値から±20%または±10%、より具体的には±5%、さらにより具体的には±1%、およびまたより具体的には±0.1%の変動を、そのような変動が開示される方法を行うために適切であるように、包含することを意味する。

【0037】

疾患または障害は、疾患または障害の症状の重症度、そのような症状を患者が経験する頻度、またはその両方が低減される場合に、「緩和される」。

10

【0038】

「アミノ酸配列バリエーション」という用語は、本来の配列ポリペプチドからある程度まで異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。通常、アミノ酸配列バリエーションは、本来のポリペプチドに対して少なくとも約70%の相同性、少なくとも約80%の相同性、少なくとも約90%の相同性、少なくとも約95%の相同性、少なくとも約96%の相同性、少なくとも約97%の相同性、少なくとも約98%の相同性、または少なくとも約99%の相同性を保有すると考えられる。アミノ酸配列バリエーションは、本来のアミノ酸配列のアミノ酸配列内のある特定の位置に、置換、欠失、および/または挿入を保有する。

【0039】

本明細書において使用される際、「AP」という用語は、アンテナペディアホメオドメイン (ショウジョウバエ属転写因子である16アミノ酸ペプチド) を指し、これはSEQ ID NO: 2のペプチドまたはその塩もしくは溶媒和物である。

20

【0040】

本明細書において使用される際、「BAEC」という用語は、ウシ大動脈内皮細胞を指す。

【0041】

本明細書において使用される際、「結合」という用語は、酵素の基質に対する、抗体の抗原に対する、DNA鎖のその相補鎖に対するなどであるがこれらに限定されない、分子の別の分子に対する付着を指す。結合は、分子表面の一部の形状および化学的性質が相補的であるために起こる。一般的なモデルは、いかに酵素がその基質に適合するかを説明するために使用される「鍵と鍵穴」である。非限定的な例において、カベオリンタンパク質の結合は、eNOSの酸素添加酵素ドメインおよび/またはeNOSの還元酵素ドメインなどであるがこれらに限定されない、eNOSの1つまたは複数のドメインで起こり得る。

30

【0042】

本明細書において使用される際、「カベオリン足場ドメイン」という用語は、任意のカベオリンタンパク質の推定上の足場ドメインを含むドメインを指す。したがって、本明細書において使用される用語は、推定上の足場ドメインに限定されない。ヒトCav-1の完全なmRNA配列は、GenBankアクセッション番号BAG70230.1 (SEQ ID NO: 3) で見出され得る。ヒトCav-3の完全なタンパク質コードは、GenBankアクセッション番号AAC39758.1 (SEQ ID NO: 4) で見出され得る。

【0043】

カベオリン足場ドメインの例は、ヒトカベオリン-1のアミノ酸82-101 (⁸²DGIWKASFTTFTVTKYWFYR¹⁰¹) (SEQ ID NO: 5)

40

またはその同等物；ヒトカベオリン-1のアミノ酸82-95

(⁸²DGIWKASFTTFTVT⁹⁵) (SEQ ID NO: 6)

またはその同等物を含むが、これらに限定されない。

【0044】

本明細書において使用される際、本明細書において使用される「保存的変異」または「保存的置換」という用語は、アミノ酸残基の、別の生物学的に類似した残基による置き換

50

えを指す。保存的変異または置換は、ペプチド鎖の形状を変化させる可能性は低い。保存的変異または置換の例は、イソロイシン、バリン、ロイシン、もしくはメチオニンなどの1個の疎水性残基への別のものからの置き換え、または、アルギニンへのリジンからの、グルタミン酸へのアスパラギン酸からの、もしくはグルタミンへのアスパラギンからの置換などの、1個の極性残基への別のものからの置換を含む。

【0045】

「疾患」とは、動物が恒常性を維持できず、かつ、疾患が改善されない場合には動物の健康が悪化し続ける、動物の健康状態である。

【0046】

動物における「障害」とは、動物が恒常性を維持することができるが、動物の健康状態が、障害の非存在下でそうであろうよりも順調ではない、健康状態である。処置しないままにしておいても、障害は、動物の健康状態のさらなる低下を必ずしも引き起こさない。

【0047】

本明細書において使用される際、「ドメイン」という用語は、疎水性、極性、球状、およびらせん状のドメインまたは特性などであるがこれらに限定されない、一般的な物理化学的特徴を共有する、分子または構造の一部を指す。結合ドメインの具体例は、DNA結合ドメインおよびATP結合ドメインを含むが、これらに限定されない。

【0048】

本明細書において使用される際、「EC」という用語は、内皮細胞を指す。

【0049】

本明細書において使用される際、「Endo5」という用語は、SEQ ID NO: 1のペプチドまたはその塩もしくは溶媒和物を指す。

【0050】

本明細書において使用される際、「エバンスブルー」という用語は、(6E,6E')-6,6-[(3,3'-ジメチルピフェニル-4,4'-ジイル)ジ(1E)ヒドラジン-2-イル-1-イリデン]ビス(4-アミノ-5-オキソ-5,6-ジヒドロナフタレン-1,3-ジスルホナート)の任意の塩または溶媒和物を指す。

【0051】

本明細書において使用される際、「異種ペプチド」という用語は、その配列の膜移行ドメインとの融合の産物が、任意の膜移行ドメインに隣接する野生型配列とは異なる配列を有するように、配列が選択されている任意のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を指す。

【0052】

本明細書において使用される際、「膜移行ドメイン」という用語は、細胞の膜を透過することができるが、付着されたペプチドをインピボで細胞中に輸送するために使用されるペプチドを指す。

【0053】

本明細書において使用される際、「患者」、「個体」、または「対象」という用語は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物を指す。非ヒト哺乳動物は、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、およびネズミの哺乳動物などの、家畜およびペットを含む。ある特定の態様において、患者、個体、または対象は、ヒトである。

【0054】

本明細書において使用される際、「ペプチド」という用語は、典型的に、短いポリペプチドを指す。ポリペプチド配列を表すために、従来の表示法が、本明細書において使用される：ポリペプチド配列の左側の端がアミノ末端であり、ポリペプチド配列の右側の端がカルボキシル末端である。

【0055】

本明細書において使用される際、「薬学的組成物」または「組成物」という用語は、本発明内で有用な少なくとも1つの化合物の、薬学的に許容される担体との混合物を指す。薬学的組成物は、患者への化合物の投与を容易にする。静脈内、経口、エアロゾル、吸入

10

20

30

40

50

、直腸、膣、経皮、鼻内、頬、舌下、非経口、クモ膜下腔内、胃内、眼、肺、および局所投与を含むがこれらに限定されない、化合物を投与する複数の技術が、当技術分野に存在している。ある特定の態様において、投与の経路は、経皮、経粘膜（例えば、舌下、舌、（経）頬、（経）尿道、膣（例えば、経膣および膣周囲）、鼻（内）、および（経）直腸）、膀胱内、肺内、十二指腸内、胃内、クモ膜下腔内、皮下、筋肉内、皮内、動脈内、静脈内、気管支内、吸入、胸膜、腹膜、皮下、硬膜外、耳、眼内、ならびに/または局所投与を含む。

【 0 0 5 6 】

本明細書において使用される際、「薬学的に許容される」という用語は、化合物の生物活性または特性を排除せず、かつ比較的非毒性である、担体または希釈剤などの材料を指し、すなわち、その材料は、望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、または、それが中に含有される組成物の構成要素のいずれとも有害な様式で相互作用することなく、個体に投与され得る。

10

【 0 0 5 7 】

本明細書において使用される際、「薬学的に許容される担体」という用語は、本発明内で有用な化合物を、その意図される機能を果たし得るように患者内でまたは患者へ運搬または輸送することに関与する、液体もしくは固体の充填剤、安定剤、分散剤、懸濁剤、希釈剤、賦形剤、濃化剤、溶媒、またはカプセル化材料などの、薬学的に許容される材料、組成物、または担体を意味する。典型的に、そのような構築物は、身体の1つの器官または部分から、身体の別の器官または部分へと運搬または輸送される。各担体は、本発明内で有用な化合物を含む、製剤の他の成分と適合性であり、かつ患者に対して有害ではない意味で、「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として働き得る材料のいくつかの例は、ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖；コーンスターチおよびバレイショデンプンなどのデンプン；セルロース、ならびに、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、およびセルロースアセタートなどのその誘導体；トラガント末；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバターおよび坐剤ワックスなどの賦形剤；落花生油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；界面活性剤；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張食塩水；リンガー溶液；エチルアルコール；リン酸緩衝溶液；ならびに、薬学的製剤において使用される他の非毒性適合物質を含む。本明細書において使用される際、「薬学的に許容される担体」はまた、本発明内で有用な化合物の活性と適合性であり、かつ患者に生理学的に許容される、任意のおよびすべてのコーティング、抗細菌および抗真菌剤、ならびに吸収遅延剤なども含む。補足的な活性化合物がまた、組成物中に組み入れられてもよい。「薬学的に許容される担体」は、さらに、本発明内で有用な化合物の薬学的に許容される塩を含んでもよい。本発明の実施において使用される薬学的組成物に含まれ得る他の追加的な成分が、当技術分野において公知であり、例えば、参照により本明細書に組み入れられるRemington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA)に記載されている。

20

30

40

【 0 0 5 8 】

本明細書において使用される際、「薬学的に許容される塩」という言語は、その無機酸、無機塩基、有機酸、無機塩基、溶媒和物、水和物、および包接化合物を含む、薬学的に許容される非毒性の酸および塩基から調製される、投与される化合物の塩を指す。適した薬学的に許容される酸付加塩は、無機酸から、または有機酸から調製され得る。無機酸の例は、硫酸塩、硫酸水素塩、塩化水素酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸、およびリン酸（リン酸水素塩およびリン酸二水素塩を含む）を含む。適切な有機酸は、有機酸の脂肪族類、脂環式類、芳香族類、芳香脂肪族（araliphatic）類、複素環式類、カルボキシル基を有する類、およびスルホン基を有する類から選択されてもよく、この例

50

は、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、アントラニル酸、4-ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸、エンボン酸（パモ酸）、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パントテン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、スルファニル酸、シクロヘキシルアミノスルホン酸、ステアリン酸、アルギン酸、 α -ヒドロキシ酪酸、サリチル酸、ガラクトール酸、およびガラクトuron酸を含む。本発明の化合物の適した薬学的に許容される塩基付加塩は、例えば、アンモニウム塩、ならびに、例えば、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、および亜鉛の塩などの、アルカリ金属、アルカリ土類金属、および遷移金属の塩を含む金属塩を含む。薬学的に許容される塩基付加塩はまた、例えば、N,N'-ジベンジルエチレン-ジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン（N-メチルグルカミン）、およびプロカインなどの塩基性アミンから作られた有機塩も含む。これらの塩のすべては、例えば、適切な酸または塩基を化合物と反応させることによって、対応する化合物から調製され得る。

10

【0059】

本明細書において使用される際、「薬学的有効量」および「有効量」および「治療的有效量」という用語は、非毒性であるが、望ましい生物学的結果を提供するのに十分な、作用物質の量を指す。その結果は、疾患の兆候、症状、もしくは原因の低減および/もしくは緩和、または生物系の任意の他の望ましい変更であり得る。任意の個々の症例における適切な治療用の量は、日常的な実験法を用いて当業者により決定され得る。

20

【0060】

本明細書において使用される際、「PNA」という用語は、ペプチド核酸を指す。

【0061】

本明細書において使用される際、「ポリペプチド」という用語は、ペプチド（またはアミド）結合を介して連結されている、アミノ酸残基、その関連する天然に存在する構造バリエーション、および合成の天然に存在しないアナログから構成されるポリマーを指す。合成ポリペプチドは、例えば、自動ポリペプチド合成機を用いて合成され得る。

【0062】

本明細書において使用される際、「予防する」または「予防」という用語は、何も起きていない場合には障害もしくは疾患の発症がないこと、または、既に障害もしくは疾患の発症がある場合にはさらなる障害もしくは疾患の発症がないことを意味する。また、障害もしくは疾患と関連する症状のいくつかまたはすべてを予防する、人の能力が考慮される。

30

【0063】

本明細書において使用される際、「タンパク質」という用語は、典型的に、大きなポリペプチドを指す。

【0064】

本明細書において使用される際、「RHMVEC」という用語は、ラット心臓微小血管内皮細胞を指す。

40

【0065】

本明細書において使用される際、「溶媒和物」という用語は、溶液中または固相中に存在し得る、分子と溶媒分子との複合体を指す。ある特定の態様において、溶媒は、水、メタノール、エタノール、n-プロパノール、2-プロパノール、DMSO、DMF、エチルエーテル、アセトン、およびピリジンからなる群より選択される少なくとも1つを含む。

【0066】

本明細書において使用される際、「輸送構築物」という用語は、細胞膜を通過する構築物であって、輸送ペプチドおよび少なくとも1つの積荷部分を含み、該積荷部分が、該輸送構築物よりも遅い速度でまたはより低い程度までで細胞膜を通過する、構築物を指す。ある特定の態様において、積荷部分は、核酸；ペプチド；タンパク質；オリゴ糖；脂質；

50

糖脂質；リポタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リポソームおよびウイルスからなる群より選択される。他の態様において、積荷部分は、共有結合性または非共通結合性の連結を通して輸送ペプチドに連結されている。

【0067】

本明細書において使用される際、「輸送ペプチド」または「CPP」という用語は、細胞膜を透過することができる、および/または通過することができるペプチドとして定義される、細胞透過性ペプチドを指す。

【0068】

本明細書において使用される際、「処置」または「処置すること」という用語は、患者に対する、治療剤、すなわち、本発明内で有用な化合物の適用もしくは投与（単独または別の薬学的作用物質との組み合わせで）、または、患者から単離された組織もしくは細胞株に対する治療剤の適用もしくは投与（例えば、診断またはエクスピボ適用のため）であって、該患者が、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害を発症する可能性を有し、該疾患もしくは障害、該疾患もしくは障害の症状、または該疾患もしくは障害を発症する可能性を治す、治癒する、緩和する、軽減する、変更する、修復する、改善する、改良する、または影響を及ぼす目的の、適用もしくは投与として定義される。そのような処置は、ゲノム薬理学の分野から得られた知識に基づいて、特異的に調整または改変されてもよい。

【0069】

範囲：本開示を通して、本発明の種々の局面を範囲形式で表すことができる。範囲形式での記載は、単に便利さおよび簡潔さのためであり、本発明の範囲に対する柔軟性を欠く限定と解釈されるべきではないことが、理解されるべきである。したがって、範囲の記載は、可能な部分範囲ならびにその範囲内の個々の数値をすべて、具体的に開示しているとみなされるべきである。例えば、1~6のような範囲の記載は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などのような部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6を具体的に開示しているとみなされるべきである。これは、範囲の幅にかかわらずあてはまる。

【0070】

説明

本発明は、短い5ペプチド（RRPPR）であるEndo5が非常に強力なCPPであるという、予想外の知見に関連する。本明細書に記載されているように、Endo5は、血管内皮細胞によって急速に内部移行されるその能力のために、競合選択プロセスを通して単離された。Endo5は、さらに、細胞による積荷の取り込みを増大させ、かつそれが結合した積荷の治療活性を増大させることが示された。

【0071】

本明細書に記載されているように、Endo5は、内皮細胞によって急速に内部移行される能力について選択されるファージの表面で発現された際に、最も高度に濃縮された、ランダムに生成されたペプチドであった。VEGF誘導性NO放出を阻害するEndo5-Cavの最大効力は、同様のモルベースでAP-Cavのものよりも大きかった。さらに、そのより小さなサイズにもかかわらず（APが16mer酸ペプチドであるのに対し、Endo5は5merペプチドである）、Endo5の取り込み速度は、APのものよりも3倍速かった。Endo5-Cavは、インピボでの血管透過性の阻害においてAP-Cavよりも強力であることが見出された。

【0072】

機構としては、Endo5の取り込みに関与する細胞経路は、APのものに類似しているように見られる。これは、以下の知見によって支持される：初期のエンドサイトーシスおよび細胞内分布中のEndo5とAPとの有意な共局在；APによるEndo5-Cav効果の競合阻害、およびEndo5によるAP-Cav活性の競合阻害。本明細書において報告される知見は、十分に確立されたAPと比較してより高い、Endo5の「アミノ酸あたりの内部移行効率」の能力についての証拠を提供する。

【 0 0 7 3 】

内皮細胞にとって強力なCPPを設計するための原理は、異常な内皮細胞活性を特徴とする種々の疾患に存在するだけでなく、血液とその下にある組織との間の内皮細胞の戦略的な局在からもまた存在する。吸収後に、血管区画を通った薬物分布は、排出および分解を通して急速に損なわれ得る。これらの正常な薬物不活性化機構は、作用の部位での迅速な内部移行によって相殺され得る。本システムが試験することを可能にする、ランダムに生成されたCPPのプールと比較した、内皮細胞におけるEndo5内部移行の規模の証拠は、T7選択システムにおいてファージの取り込みを促進するその能力によって示される。このシステムは、ファージあたり1つ未満のペプチドコピーの表面発現を可能にするため、排他的に内皮細胞に対する高親和性の結合を通じた迅速な取り込みに好都合である。ある特定の態様において、Endo5は、競合選択アプローチを通して、高い内皮細胞内部移行のために特異的に操作された最初のCPPである。

10

【 0 0 7 4 】

いずれかの理論によって限定されることを望まないが、2つの完全に異なるCPP (Endo5またはAP) に融合されたCavが、eNOS活性を減衰させ、血管透過性を阻害し、かつ2時間の「チェース」後に共局在したという事実に基づいて、積荷のその標的に向かう細胞内分布は、少なくとも部分的にCPP配列とは無関係であり得る。さらに、Endo5、および他のCPPは、内部移行オルガネラからの種々の出口経路を可能にし得、かつ/または、積荷分子の細胞内局在を異なるように方向づけ得ることが可能である。しかしながら、Endo5とAPとの間の取り込み速度の差は、Endo5-CavとAP-Cavとの間の効力の差を合理化する、可能性が高い機構である。これはまた、生細胞におけるEndo5およびAPの類似した局在を記録するデータによっても支持される。他方で、Endo5に融合された際のCav効力の増大、および高用量でのeNOS活性に対するAP-Cav効果の近飽和により、AP-Cav効果が、ファーマコフォア (Cav) の限界によってではなく、むしろ内部移行および排出/分解のオーバーラップする速度によって限定され得ることが示唆される。いずれかの理論によって限定されることを望まず、これは、Endo5を含む配列などの、非常に強力なCPP配列を特定する関心を強調する。

20

【 0 0 7 5 】

組成物

本発明は、細胞膜を通過する単離された輸送ペプチドを含む。ある特定の態様において、ペプチド、またはその塩もしくは溶媒和物は、アミノ酸配列RRPPR (SEQ ID NO: 1) を含む。他の態様において、輸送ペプチド、またはその塩もしくは溶媒和物は、SEQ ID NO: 1から本質的になる。さらに他の態様において、輸送ペプチド、またはその塩もしくは溶媒和物は、SEQ ID NO: 1からなる。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、標的細胞に結合するか、または細胞膜を通過する。さらに他の態様において、細胞は、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、または脳細胞を含む。さらに他の態様において、細胞は、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、または脳細胞からなる。

30

【 0 0 7 6 】

本発明はさらに、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチド、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物を提供する。

40

【 0 0 7 7 】

ある特定の態様において、本発明の組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【 0 0 7 8 】

ある特定の態様において、輸送構築物は、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドに連結されている積荷部分を含む。他の態様において、輸送ペプチドは、SEQ ID NO: 1からなる。さらに他の態様において、積荷部分は、核酸 (および、ペプチド核酸または「PNA」などのそのアナログ) ; ペプチド ; タンパク質 ; オリゴ糖 ; 脂質 ; 糖脂質 ; リポタンパク質 ; 治療薬 ; 紫外可視、蛍光、または放射性標識 ; イメージング剤 ; 診断剤 ; 予防剤 ; リポソームおよびウイルス (T-7バクテリオファージなど) からなる群より選択される少なくとも1つである。

50

【0079】

ある特定の態様において、積荷部分は、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される少なくとも1つである。他の態様において、輸送構築物は、SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1; およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される少なくとも1つの配列を含む。さらに他の態様において、輸送構築物は、SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 3-SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 5-SEQ ID NO: 1; およびSEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 1からなる群より選択される。

10

【0080】

積荷部分は、本発明の輸送構築物を形成するように、輸送ペプチドと結合されるか、またはそれに連結され得る。輸送ペプチドおよび積荷部分は、輸送構築物を使用される条件下で（例えば、輸送構築物が個体に投与される条件下で）結合または連結されたままであるような様式で、結合または連結される。ある特定の態様において、積荷部分は、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている。他の態様において、リンカーはジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合はジスルフィド結合を含む。さらに他の態様において、積荷部分は、ペプチド部分を含む。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、積荷部分のペプチド部分のN末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、積荷部分のペプチド部分のC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、積荷部分のペプチド部分のN末端およびC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている。あるいは、輸送ペプチドおよび積荷部分は、静電的相互作用および/または疎水性相互作用などの非共有結合性の連結を通して結合されている。

20

【0081】

本発明は、本明細書において他の場所に記載されているペプチドの機能的に同等のバリエーションを含む。そのようなバリエーションは、元のペプチドの機能的完全性を維持するアミノ酸置換を有するペプチドを含む。アミノ酸置換の例は、元のアミノ酸の類似した電荷、極性、疎水性、または構造が維持されているペプチドへの変化を結果としてもたらすものを含む。ペプチドバリエーションはまた、ペプチド模倣物も含む。ペプチド模倣物は、化学的に修飾されたペプチド、および天然に存在しないアミノ酸を含有するペプチド様分子を含む。

30

【0082】

ある特定の態様において、本発明のペプチドは、それが天然に存在する供給源から取得され得るか、または、化学合成もしくは遺伝子操作法（例えば、組み換えDNAまたはRNA技術）などの公知の技術を用いて産生され得る。他の態様において、本発明のペプチドは、当技術分野において公知であるように、標準的な固相（または液相）のペプチド合成法を用いて調製され得る。加えて、これらのペプチドをコードするDNAは、市販されているオリゴヌクレオチド合成機器を用いて合成され得、標準的な組み換え生産システムを用いて組み換え生産され得る。

40

【0083】

ある特定の態様において、本発明の単離されたペプチドは、無関係のペプチド、ならびに、通常、細胞においてペプチドと会合しているかまたはライブラリーにおいてペプチドと会合している、混入しているポリペプチド、脂質、核酸、および他の細胞材料を比較的含まない。

【0084】

本発明の輸送構築物は、積荷部分の細胞膜を横切った送達のために有用である。本発明の輸送構築物はまた、標的細胞（例えば、心臓細胞、内皮細胞、または免疫細胞などであるがこれらに限定されない、具体的な細胞タイプ）への積荷部分の送達のため、ならび

50

に標的細胞へのおよび/または標的細胞の膜を横切った積荷部分の送達のためにも有用である。

【0085】

本発明の輸送ペプチドは、細胞の細胞膜を通過する（例えば、細胞中に内部移行する）能力を有する。例えば、本発明のある特定の態様において、輸送ペプチドは、細胞の細胞外環境から移行し、細胞膜の脂質二重層を透過し、かつ細胞の細胞内環境中へと細胞膜を通過する。他の態様において、本発明の輸送ペプチドは、標的細胞に結合する。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、標的細胞に結合し、および標的細胞の細胞膜を通過する。標的細胞は、例えば、心臓細胞、免疫細胞、皮膚細胞（例えば、内皮細胞）、骨格筋細胞、または脳細胞（例えば、ニューロン）などの具体的な細胞タイプであるが、ヒトおよび非ヒト細胞を含む任意の細胞であってもよい。

10

【0086】

非限定的な例において、本発明の輸送ペプチドは、積荷部分に連結され、細胞の細胞膜を横切って積荷部分を輸送する。例えば、ある特定の態様において、輸送ペプチドに連結されている、カベオリンまたは転写因子などのタンパク質は、細胞の細胞外環境から運搬され、細胞膜を横切って、細胞の細胞内環境中へと輸送される。他の態様において、積荷部分に連結されている本発明の輸送ペプチドは、積荷部分を標的細胞（例えば、心臓細胞）に結合させる。さらに他の態様において、積荷部分に連結されている輸送ペプチドは、積荷部分を標的細胞（例えば、心臓細胞）に結合させ、かつ、標的細胞の細胞外環境から、細胞膜を横切って、標的細胞の細胞内環境中へと積荷部分を輸送する。

20

【0087】

ある特定の態様において、積荷部分は、有機化合物または無機化合物を含む。有機化合物は、天然から（例えば、それが存在する細胞から）単離され得るか、または、遺伝子操作法（例えば、組み換えDNAまたはRNA技術）もしくは化学合成法などの公知の方法を用いて産生され得る。例えば、有機分子は、RNA分子、ポリペプチド、またはその断片であってもよく、それは、細胞から単離されるか、組み換え核酸分子から発現されるか、または化学的に合成され得る。有機分子はまた、天然に存在しない分子であることもできる。天然に存在しない分子の非限定的な例は、天然に存在しないヌクレオシドアナログ、または、ヌクレオチドを連結し、ヌクレアーゼによる分解から保護するホスホロチオエート結合を含有する核酸配列である。リボース残基の2'-炭素原子に結合した、正常のヒドロキシル基の代わりに2'-メチル基を含有するリボヌクレオチドは、酵素的および化学的な分解に耐性である、天然に存在しないRNA分子の例である。天然に存在しない有機分子の他の例は、2'-アミノピリミジン含有するRNA（そのようなRNAは、天然に存在するRNAと比較した際に、ヒト血清および尿において1,000倍、より安定である；Lin et al., 1994, Nucl. Acids Res. 22:5229-5234、およびJellinek et al., 1995, Biochemistry, 34:11363-11372）を含む。

30

【0088】

ある特定の態様において、積荷部分は、DNA、RNA、または核酸アナログを含む。DNAまたはRNAは、任意の長さのオリゴ（デオキシ）ヌクレオチドであり得る。そのような核酸分子は、直鎖状、環状、もしくはスーパーコイル状であり得る；一本鎖もしくは二本鎖のDNAもしくはRNAであり得る；または、DNA/RNAハイブリッドであり得る。核酸アナログは、ホスホナート（例えば、メチルホスホナート）、ホスホリアミダート（N3'またはN5'）、チオホスファート、非荷電のモルホリノベースのポリマー、およびペプチド核酸（PNA）などの、荷電および非荷電のバックボーンアナログを含む。そのような分子は、例えば、酵素置換療法、遺伝子療法、およびアンチセンス療法を含む、様々な治療レジメンにおいて使用され得る。ペプチド核酸（PNA）は、DNAのアナログである。PNAのバックボーンは、リン酸エステルよりもむしろペプチド結合によって形成され、アンチセンス適用に十分適応するようになる。バックボーンは非荷電であるため、PNA/DNAまたはPNA/RNAの二重鎖は、通常の熱安定性よりも高くを呈する。PNAは、ヌクレアーゼまたはプロテアーゼによって認識されないという追加的な利点を有する。PNAは、標準的なt-Boc化学を用いて、自

40

50

動ペプチド合成機で合成され得る。PNAは、当技術分野において公知の方法を用いて、本発明の輸送ペプチドに連結され得る。

【0089】

ある特定の態様において、積荷部分は、ポリペプチドである。他の態様において、積荷部分は、カベオリンまたはその断片を含む。さらに他の態様において、積荷部分は、転写因子または核局在化ペプチドである。さらに他の態様において、1つが転写因子を含み、もう1つが核局在化ペプチドを含む2つの積荷部分が、本発明の輸送構築物中に存在する。

【0090】

ある特定の態様において、積荷部分は、色素または放射性標識化合物などの、標識を含む。他の態様において、積荷部分は、ローダミンを含む。さらに他の態様において、積荷部分は、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、ビオチン、またはそれらの混合物などの、マーカーを含む。

10

【0091】

非限定的な例において、輸送ペプチドをコードするDNAまたはRNAを、積荷部分をコードするDNAまたはRNAと接続すること、およびコードされた生成物を適切な宿主細胞（輸送構築物を発現することができる細胞）において発現させることなどの組み換え技術が、輸送ペプチドを積荷部分に共有結合で付加するために使用され得る。あるいは、公知の技術を用いて、2種の別々のヌクレオチド配列を細胞において発現させてもよく、または、化学合成し、その後結合することができる。あるいは、輸送ペプチド-積荷部分を単一のアミノ酸配列として化学合成してもよく、したがって、それらを結合することが必要ない。

20

【0092】

ある特定の態様において、輸送ペプチドに連結されている1つより多い積荷部分が存在する場合、前記1つより多い部分は、同一でもよく、または異なってもよい。他の態様において、1つまたは複数の積荷部分は、輸送ペプチドのN末端またはC末端のいずれかで輸送ペプチドに連結されている。輸送ペプチドに連結されている少なくとも2つの積荷部分が存在する場合は、1つの積荷部分が輸送ペプチドのN末端で連結されていてもよく、1つの積荷部分が輸送ペプチドのC末端で連結されていてもよい。あるいは、1つより多い積荷部分が、輸送ペプチドのN末端またはC末端のいずれかに連結されていてもよい。

【0093】

ある特定の態様において、積荷部分は、直接的に（すなわち、化学結合を通して）、またはリンカーにより間接的にのいずれかで、本発明の輸送ペプチドに連結されていてもよい。リンカーは、例えば、1個または複数のアミノ酸残基を含む。リンカーは、例えば、10アミノ酸残基（例えば、1~10、1~5、または1~4アミノ酸残基）の短い配列であってもよく、任意で、それを通してリンカーが輸送構築物の輸送ペプチドまたは積荷部分に結合する、システイン残基を含んでもよい。リンカーはまた、スルフヒドリル基またはカルボキシル基などの基であってもよい。適したリンカーは、二官能性および多官能性のアルキル、アリール、アラキル、もしくはペプチド部分、アルキル、アリール、もしくはアラキルアルデヒド、酸、エステル、および無水物、スルフヒドリル基もしくはカルボキシル基、例えば、マレイミド安息香酸誘導体、マレイミドプロピオン酸誘導体、およびスクシンイミド誘導体を含むか、または、臭化シアヌルもしくは塩化シアヌル、カルボニルジイミダゾール、スクシンイミジルエステル、もしくはスルホン酸ハロゲン化物に由来してもよい。一方でリンカーと積荷部分との間の、他方でリンカーと輸送ペプチドとの間の共有結合を形成するために使用されるリンカー上の官能基は、例えば、アミノ基、ヒドラジン基、ヒドロキシル基、チオール基、マレイミド基、カルボニル基、およびカルボキシル基のうち2つ以上であってもよい。

30

40

【0094】

ある特定の態様において、輸送構築物は、化学的または酵素的な切断により、インビトロまたはインビボで積荷部分および輸送ペプチドに解離し得る。他の態様において、リンカーはアミノ酸残基を含み、インビトロまたはインビボの切断は、リンカー内で起きる。

【0095】

50

積荷部分がポリペプチドである、ある特定の態様において、積荷部分は、組み換え技術により融合タンパク質として輸送ペプチドに連結されている。融合タンパク質は、それらのタンパク質をコードする核酸分子の遺伝子発現を通じた、そのポリペプチドバックボーンを介した2つ以上のタンパク質の共直線性共有結合連結物である。融合タンパク質の積荷部分をコードする核酸は、輸送ペプチドをコードする核酸とインフレームである。「インフレーム」とは、積荷部分をコードする核酸配列が、輸送ペプチドをコードする核酸配列のように正確なリーディングフレームにあることを示す。したがって、融合タンパク質の輸送ペプチドおよび積荷部分の両方について、正確なアミノ酸配列が翻訳される。

【0096】

ある特定の態様において、積荷部分は、化学的架橋を介して輸送ペプチドに結合される。多数の化学的架橋法が公知であり、本発明の輸送ペプチドを積荷部分に連結するために有用である。積荷部分と輸送ペプチドのカップリングは、カップリング剤または連結剤を介して達成され得る。利用され得る分子間架橋試薬は、Means & Feeney, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1974, pp. 39-43、およびWong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991)において例証されている。これらの試薬の中には、例えば、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(「SPDP」)またはN,N'-(1,3-フェニレン)ビスマレイミド(これらの両方は、スルフヒドリル基に非常に特異的であり、不可逆な連結を形成する); N,N'-エチレン-ビス-(ヨードアセトアミド)または6~11炭素のメチレン架橋を有する他のそのような試薬(比較的スルフヒドリル基に特異的である); ならびに1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(アミノ基およびチロシン基と不可逆な連結を形成する)がある。本目的のために有用な他の架橋試薬は、p,p'-ジフルオロ-m,m'-ジニトロジフェニルスルホン(アミノ基およびフェノール基と不可逆な架橋を形成する); ジメチルアジピミダート(アミノ基に特異的である); フェノール-1,4-ジスルホニルクロリド(主としてアミノ基と反応する); ヘキサメチレンジイソシアナートもしくはジイソチオシアナート、またはアゾフェニル-p-ジイソシアナート(主にアミノ基と反応する); グルタルアルデヒド(様々な側鎖と反応する)ならびにジスジアゾベンジジン(disdiazobenzidine)(最初にチロシンおよびヒスチジンと反応する)を含む。

【0097】

ある特定の態様において、架橋試薬は、細胞条件下で本質的に切断不可能である輸送構築物を生じる。他の態様において、架橋試薬は、細胞条件下で切断可能である、ジスルフィドなどの共有結合を含有する。例えば、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオナート)(「DSP」)、トラウト(Traut's)試薬、およびN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(「SPDP」)は、周知の切断可能な架橋剤である。切断可能な架橋試薬の使用によって、標的細胞中への送達後に輸送ペプチドが積荷部分から分離することが可能になる。直接ジスルフィド連結を含む構築物がまた、本発明の方法内で有用であり得る。ある特定の態様において、積荷部分は、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている。他の態様において、N-マレイミドブチリルオキシ-スクシンイミドエステル(「GMBS」)およびスルホ-GMBSなどの架橋試薬は、低減された免疫原性を有する。

【0098】

本発明はさらに、融合ペプチドを有するポリペプチドをコードする単離された核酸分子、およびその保存的ヌクレオチド置換を、ある特定の態様においては、本発明の組成物を生成するための単離された形態において含む、組成物を含む。保存的ヌクレオチド置換は、大抵のアミノ酸が1個より多いコドンに有するために、特定のアミノ酸をコードすることに影響を及ぼさない、ヌクレオチド置換を含む。保存的ヌクレオチド置換は、したがってまた、サイレント変異および異なるコドン使用頻度も含む。

【0099】

ある特定の態様において、核酸は、SEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドをコードする。他の態様において、核酸は、SEQ ID NO: 1からなる輸送ペプチドをコードする。他の態様に

10

20

30

40

50

において、核酸は、
5'-CGGCGCCCGCCTCGT-3' (SEQ ID NO: 7)
を含む。

【0100】

ある特定の態様において、組成物は、少なくとも1つの積荷部分をコードする核酸をさらに含む。他の態様において、積荷部分は、ペプチド；タンパク質；生物学的活性化化合物；標識；イメージング剤；診断剤；治療剤；および予防剤からなる群より選択される。さらに他の態様において、積荷部分は、SEQ ID NO: 3~6からなる群より選択される少なくとも1つを含む。さらに他の態様において、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

10

【0101】

本発明はさらに、SEQ ID NO: 1を含むペプチドをコードする核酸を含む、発現ベクターおよび単離された宿主細胞を含む。ある特定の態様において、ペプチドは、SEQ ID NO: 1からなる。

【0102】

本発明はまた、SEQ ID NO: 1を含むペプチドに連結されている積荷部分をコードする核酸を含む、発現ベクターおよび単離された宿主細胞も含む。ある特定の態様において、ペプチドは、SEQ ID NO: 1からなる。

【0103】

ある特定の態様において、輸送構築物は、融合タンパク質を含む。他の態様において、ベクターまたは宿主細胞は、輸送ペプチドをコードする核酸の発現を可能にする転写活性化エレメントをさらに含む。タンパク質発現のために必要な調節エレメント、および、所望の配列のベクター中へのクローニングを容易にする制限エンドヌクレアーゼ部位を組み込んでいる発現系ベクターは、当業者に公知である。ある特定の態様において、積荷部分は、輸送ペプチドをコードする核酸とインフレームである。

20

【0104】

非限定的な例において、以前に記載されているエレメントを含有する組み換えDNA発現ベクターが、適切な宿主細胞（すなわち、輸送構築物を発現することができる細胞）中に導入され、そこで、宿主細胞の細胞機構が、組み換えDNA発現ベクターによってコードされている融合タンパク質の発現を方向づける。あるいは、当業者に公知である無細胞系が、融合タンパク質の発現のために使用され得る。

30

【0105】

発現ベクター宿主細胞系によって産生された精製融合タンパク質を、次に、標的細胞に投与してもよく、そこで、輸送ペプチドは、標的細胞の細胞膜を通じた細胞の内部中への融合タンパク質の移入を媒介する。標的細胞は、例えば、心臓細胞、免疫細胞、上皮細胞などの皮膚細胞；骨格筋細胞、または脳細胞（例えば、ニューロン）などの具体的な細胞タイプであるが、ヒトおよび非ヒト細胞を含む任意の細胞であってもよい。

【0106】

発現ベクター宿主細胞系は、当業者に公知である数々のそのような系の中から選択され得る。ある特定の態様において、融合タンパク質は、大腸菌 (*Escherichia coli*) などの単離された宿主細胞において発現され得る。他の態様において、融合タンパク質は、他の細菌発現系、ウイルス発現系、真核細胞発現系、または無細胞発現系において発現され得る。当業者によって使用される細胞宿主は、例えば、パチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・カールスベルゲネシス (*Saccharomyces carlsbergensis*)、サッカロミセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*)、およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの酵母、ならびに、NIH3T3、HeLa、HEK293、HUVEC、ラット大動脈平滑筋細胞、および成体ヒト平滑筋細胞などの哺乳動物細胞のような、単離された宿主細胞を含むが、これらに限定されない。当業者によって選択される発現ベクターは、融合タンパク質がその中で発現される宿主細胞または無細胞系にとって適切な、プロモーターエレメントおよび他の調節エレ

40

50

メントなどの転写活性化エレメントを含む。哺乳動物発現系において、例えば、適した発現ベクターは、DNAプラスミド、DNAウイルス、およびRNAウイルスを含み得る。細菌発現系において、適したベクターは、プラスミドDNAおよびバクテリオファージベクターを含み得る。

【0107】

具体的な発現ベクター系の例は、転写調節因子AraCによって調節される、大腸菌におけるタンパク質発現のためのpBAD/gIIIベクター (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 系を含む。哺乳動物発現のためのベクターの例は、pcDNA3.1/V5-His-TOPO真核細胞発現ベクター (Invitrogen) である。このベクターにおいて、輸送構築物は、強いサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの制御下で、高レベルで発現され得る。C末端のポリヒスチジン (His₆) タグによって、ニッケルキレート樹脂を用いた輸送構築物の精製が可能になる。このベクターによって産生された分泌タンパク質は、抗His (C末端) 抗体を用いて検出され得る。

10

【0108】

バキュロウイルス発現系がまた、輸送ペプチド、およびポリペプチドである積荷部分を含む輸送構築物の産生のために使用され得る。一般的に使用されるバキュロウイルスは、AcMNPVである。輸送構築物DNAのクローニングは、相同組み換えを用いることによって達成され得る。非限定的な例において、輸送構築物DNA配列は、バキュロウイルスDNA、特にポリヘドリン遺伝子由来のDNAが隣接したバキュロウイルスプロモーターを含有するトランスファベクター中にクローニングされる。このDNAを昆虫細胞中にトランスフェクトし、そこで、輸送構築物DNAを親ウイルスのゲノム中に挿入する相同組み換えが起こる。組み換え体は、ブランク形態の変更によって同定される。

20

【0109】

積荷部分が、細菌発現系において適切に翻訳後修飾され得ないペプチドまたはタンパク質である多くの輸送構築物は、代わりに、バキュロウイルスベクターで発現され得る。細菌発現系において適切に翻訳後修飾され得ない、酵素、シグナル伝達分子、細胞周期制御の媒介物質、転写因子、抗原性ペプチド、ワクチン療法における使用のためのウイルス、細菌、または他の起源の完全長タンパク質産物、癌ワクチン療法における使用のためのヒト細胞のタンパク質産物、毒素、および、細胞内シグナル伝達系に關与するタンパク質が、バキュロウイルスベクターで発現され得る。

30

【0110】

上記のようなタンパク質はまた、哺乳動物ウイルス発現系により、本発明の方法によって産生され得る。エクジソン誘導性哺乳動物発現系 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) がまた、融合タンパク質である輸送構築物を発現するために使用され得る。

【0111】

ある特定の態様において、ピキア・パストリスなどの酵母宿主細胞が、本発明の方法による輸送構築物の産生のために使用され得る。ピキアを形質転換したプラスミドからの異種タンパク質の発現は、Sreekrishnaらによる米国特許第5,002,876号によって記載されている。本発明の輸送ペプチド、およびペプチドまたはタンパク質である積荷部分を含む融合タンパク質のピキアにおける発現のためのベクターは、ピキア発現キット (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) の一部として市販されている。

40

【0112】

ピキアにおいて産生された異種タンパク質の精製は、Craigらによる米国特許第5,004,688号によって記載され、酵母発現系からのタンパク質精製のための技術は、当業者に周知である。ピキア系において、市販されているベクターは、ポリペプチドである選択した積荷部分のために適切なタンパク質発現が最適化され得るように、細胞質の非グリコシル化タンパク質の産生により適したもの、および分泌されるグリコシル化タンパク質の産生により適したもの、または細胞内オルガネラに方向づけられるものの中から選択され得る。

【0113】

方法

50

本発明は、積荷部分を、標的細胞にまたはその中に（標的細胞（中））にとも言及される）送達する方法を含む。ある特定の態様において、方法は、標的細胞を、積荷部分、およびSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む輸送構築物と接触させ、それにより該積荷部分が該標的細胞（中）に送達される段階を含む。

【0114】

本発明はさらに、積荷部分を、それを必要とする対象の標的細胞（中）に送達する方法を含む。ある特定の態様において、方法は、積荷部分、およびSEQ ID NO: 1を含む輸送ペプチドを含む輸送構築物を含む、薬学的に許容される組成物の治療的有効量を対象に投与し、それにより該積荷部分が該対象の標的細胞（中）に送達される段階を含む。

【0115】

ある特定の態様において、積荷部分は、リンカーまたは化学結合を通して輸送ペプチドに共有結合で連結されている。他の態様において、リンカーはジスルフィド結合を含むか、または、積荷部分と輸送ペプチドとの間の化学結合はジスルフィド結合を含む。さらに他の態様において、積荷部分は、ペプチド部分を含む。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、積荷部分のペプチド部分のN末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、積荷部分のペプチド部分のC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている。さらに他の態様において、輸送ペプチドは、積荷部分のペプチド部分のN末端およびC末端にアミド結合を通して共有結合で連結されている。

【0116】

ある特定の態様において、輸送ペプチドは、SEQ ID NO: 1からなる。他の態様において、積荷部分は、核酸；ペプチド；タンパク質；オリゴ糖；脂質；糖脂質；リポタンパク質；低分子化合物；治療薬；紫外可視、蛍光、または放射性標識；イメージング剤；診断剤；予防剤；リポソームおよびウイルスからなる群より選択される少なくとも1つである。さらに他の態様において、標的細胞は、内皮細胞、心臓細胞、免疫細胞、骨格筋細胞、または脳細胞を含む。さらに他の態様において、本発明の組成物は、経口、経粘膜、局所、経皮、皮内、皮下、眼、硝子体内、結膜下、脈絡膜上、前房内、吸入、気管支内、肺、静脈内、動脈内、十二指腸内、膀胱内、非経口、クモ膜下腔内、筋肉内、および胃内からなる群より選択される少なくとも1つの経路によって対象に投与される。さらに他の態様において、対象は哺乳動物である。さらに他の態様において、哺乳動物はヒトである。

【0117】

併用療法

本発明内で有用な組成物は、本発明内で企図される疾患または障害を処置するために有用な1つまたは複数の追加的な化合物との組み合わせで、本発明の方法において有用であるように意図される。これらの追加的な化合物は、本発明の化合物、または、本発明内で企図される疾患もしくは障害の症状を処置、予防、もしくは低減することが公知である化合物、例えば、市販されている化合物を含み得る。

【0118】

相乗効果は、例えば、シグモイド- E_{max} 方程式 (Holford & Scheiner, 19981, Clin. Pharmacokinet. 6: 429-453)、Loewe加法性の方程式 (Loewe & Muischnek, 1926, Arch. Exp. Pathol Pharmacol. 114: 313-326)、および半数影響方程式 (Chou & Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55) などの適した方法を例えば用いて、計算され得る。上記で言及されている各方程式を実験データに適用して、薬物併用の効果を評価する手助けをするための対応するグラフを生成してもよい。上記で言及されている方程式と関連する対応するグラフは、それぞれ、濃度-効果曲線、アイソボログラム (isobologram) 曲線、および併用指数曲線である。

【0119】

投与 / 投薬量 / 製剤

投与のレジメンは、有効量を構成するものに影響を及ぼし得る。治療用製剤は、疾患または障害の発生の前または後のいずれかに、患者に投与され得る。さらに、いくつかの分

10

20

30

40

50

割された投薬量、および時差的な投薬量が、毎日もしくは逐次的に投与されてもよく、または、用量は、継続的に注入されてもよく、もしくはボラス注射であってもよい。さらに、治療用製剤の投薬量は、治療または予防の状況の緊急性により示されるように、比例して増加または減少させてもよい。

【0120】

患者、ある特定の態様においては哺乳動物、他の態様においてはヒトへの、本発明内で有用な組成物の投与は、公知の手順を用いて、患者における疾患または障害を処置するために有効な投薬量でかつ有効な期間、実施され得る。治療効果を達成するために必要な治療用化合物の有効量は、患者における疾患または障害の状態；患者の年齢、性別、および体重；ならびに、患者における疾患または障害を処置する治療用化合物の能力などの要因にしたがって、変動し得る。投薬レジメンは、最適な治療応答を提供するために調整され得る。例えば、いくつかの分割された用量が、毎日投与されてもよく、または、用量を、治療の状況の緊急性により示されるように、比例して低減させてもよい。本発明の治療用化合物についての有効用量範囲の非限定的な例は、約1~5,000 mg/kg体重/日である。当業者は、過度の実験をすることなく、関連する要因を研究し、治療用化合物の有効量に関する決定を行うことができるであろう。

10

【0121】

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬レベルは、特定の患者、組成物、および投与の様式にとって望ましい治療応答を、患者に毒性であることなく達成するのに有効な活性成分の量を得るように、変動され得る。

20

【0122】

とりわけ、選択される投薬レベルは、使用される特定の化合物の活性、投与の時間、化合物の排泄の速度、処置の持続期間、化合物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、または材料、処置されるべき患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康、および事前の病歴、ならびに医療分野において周知の同様の要因を含む、様々な要因に依存する。

【0123】

当技術分野において通常の技能を有する医師、例えば、内科医または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定し、処方し得る。例えば、内科医または獣医師は、薬学的組成物において使用される本発明の化合物の用量を、望ましい治療効果を達成するために必要とされるレベルよりも低いレベルで開始し、望ましい効果が達成されるまで徐々に投薬量を増大させることができる。

30

【0124】

特定の態様において、投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、化合物を単位剤形に製剤化することが特に有利である。本明細書において使用される単位剤形とは、処置されるべき患者にとって単位の投薬量として適する物理的に別個の単位を指し；各単位は、必要とされる薬学的ビヒクルと関連して望ましい治療効果を生じるように計算されているあらかじめ決定された量の治療用化合物を含有する。本発明の単位剤形は、(a) 治療用化合物の特有の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに (b) 患者における疾患または障害の処置のためにそのような治療用化合物を調合/製剤化する、当技術分野において固有の限界、によって規定され、かつ、それらに直接依存する。

40

【0125】

ある特定の態様において、本発明内で有用な組成物は、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤または担体を用いて製剤化される。ある特定の態様において、本発明の薬学的組成物は、本発明内で有用な化合物の治療的有效量、および薬学的に許容される担体を含む。

【0126】

担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適した混合物、ならびに植物油を含有する、溶媒または分散媒であり得る。妥当な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合には必要とされる粒子サイズの維持によっ

50

て、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の阻止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、およびチメロサルによって達成され得る。多くの場合に、等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウム、または、マンニトールおよびソルビトールなどのポリアルコールを、組成物に含めることができる。注射可能な組成物の長期の吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンを組成物に含めることによって、もたらされ得る。

【0127】

ある特定の態様において、本発明内で有用な組成物は、1日あたり1~5回またはそれより多くの範囲にわたる投薬量で患者に投与される。他の態様において、本発明内で有用な組成物は、1日に1回、2日毎、3日毎から1週間に1回、および2週間に1回を含むがそれらに限定されない投薬量の範囲で、患者に投与される。本発明内で有用な種々の併用組成物の投与の頻度は、年齢、処置されるべき疾患または障害、性別、全体的な健康、および他の要因を含むがそれらに限定されない多くの要因に依存して、個体によって変動すると考えられる。したがって、本発明は、いかなる特定の投薬レジメンにも限定されるようには解釈されるべきではなく、任意の患者に投与されるべき正確な投薬量および組成物は、患者に関するすべての他の要因を考慮に入れて、主治医によって決定されることになる。

【0128】

投与のための化合物は、約1 μ g~約10,000 mg、約20 μ g~約9,500 mg、約40 μ g~約9,000 mg、約75 μ g~約8,500 mg、約150 μ g~約7,500 mg、約200 μ g~約7,000 mg、約3050 μ g~約6,000 mg、約500 μ g~約5,000 mg、約750 μ g~約4,000 mg、約1 mg~約3,000 mg、約10 mg~約2,500 mg、約20 mg~約2,000 mg、約25 mg~約1,500 mg、約50 mg~約1,000 mg、約75 mg~約900 mg、約100 mg~約800 mg、約250 mg~約750 mg、約300 mg~約600 mg、約400 mg~約500 mg、ならびにこれらの間の任意およびすべての全体または部分的な増加分の範囲にあり得る。

【0129】

ある特定の態様において、化合物の用量は、約1 mg~約2,500 mgである。他の態様において、本明細書に記載されている組成物において使用される本発明の化合物の用量は、約10,000 mg未満、または約8,000 mg未満、または約6,000 mg未満、または約5,000 mg未満、または約3,000 mg未満、または約2,000 mg未満、または約1,000 mg未満、または約500 mg未満、または約200 mg未満、または約50 mg未満である。同様に、ある特定の態様において、本明細書に記載されているような第2の化合物(すなわち、疾患または障害を処置するために使用される薬物)の用量は、約1,000 mg未満、または約800 mg未満、または約600 mg未満、または約500 mg未満、または約400 mg未満、または約300 mg未満、または約200 mg未満、または約100 mg未満、または約50 mg未満、または約40 mg未満、または約30 mg未満、または約25 mg未満、または約20 mg未満、または約15 mg未満、または約10 mg未満、または約5 mg未満、または約2 mg未満、または約1 mg未満、または約0.5 mg未満、ならびにこれらの任意およびすべての全体または部分的な増加分である。

【0130】

ある特定の態様において、本発明は、本発明の化合物の治療的有効量を、単独でまたは第2の薬学的作用物質と組み合わせて保持する容器;および、患者における疾患または障害の1つまたは複数の症状を処置、予防、または低減するのに化合物を用いるための指示書を含む、パッケージングされた薬学的組成物に向けられる。

【0131】

製剤は、従来賦形剤、すなわち、当技術分野に公知の、経口、非経口、鼻、静脈内、皮下、経腸、または任意の他の適当な投与の様式に適する、薬学的に許容される有機または無機の担体物質との混合物において使用されてもよい。薬学的調製物は、滅菌されていてもよく、望ましい場合、補助剤、例えば、潤滑剤、保存薬、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝剤、着色剤、香味剤、および/または芳香物質などと混合されてもよい。それらはまた、望ましい所で、他の活性剤、例えば、他の認知改善

10

20

30

40

50

剤と組み合わせられてもよい。

【0132】

「容器」という用語は、薬学的組成物を保持するための任意の入れ物を含む。例えば、ある特定の態様において、容器は、薬学的組成物を含有するパッケージングである。他の態様において、容器は、薬学的組成物を含有するパッケージングではなく、すなわち、容器は、パッケージングされた薬学的組成物またはパッケージングされていない薬学的組成物、および薬学的組成物の使用のための指示書を含有する、箱またはバイアルなどの入れ物である。さらに、パッケージング技術は、当技術分野において周知である。薬学的組成物の使用のための指示書は、薬学的組成物を含有するパッケージング上に、指示書が、パッケージングされた製品と増大した機能的関係を形成するように含有されてもよいことが、理解されるべきである。しかしながら、指示書は、化合物の、その意図される機能、例えば、患者における疾患または障害を処置、予防、または低減することを果たす能力に関連する情報を含有し得ることが、理解されるべきである。

10

【0133】

本発明の組成物のいずれかの投与の経路は、経口、頬、局所、経皮、皮内、皮下、経粘膜〔例えば、舌下、舌、（経）頬、（経）尿道、膣（例えば、経膣および膣周囲）、鼻（内）、および（経）直腸〕、眼（例えば、硝子体内、結膜下、脈絡膜上、前房内）、吸入、気管支内、肺、十二指腸内、静脈内、動脈内、膀胱内、非経口、クモ膜下腔内、筋肉内、または胃内経路を含む。本発明における使用のための化合物は、本明細書において考慮される任意の適した経路による投与のために製剤化され得る。

20

【0134】

適した組成物および剤形は、例えば、錠剤、カプセル剤、カプレット剤、丸剤、ジェルカプセル剤（gel cap）、トローチ剤、分散剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤、顆粒剤、ペースト剤、経皮貼付剤、ゲル剤、粉剤、ペレット剤、マグマ剤、ロゼンジ剤、クリーム剤、ペースト剤、硬膏剤、ローション剤、ディスク剤、坐剤、鼻投与または経口投与のための液体スプレー、吸入のための乾燥粉末またはエアロゾル化製剤、膀胱内投与のための組成物および製剤などを含む。本発明において有用であろう製剤および組成物は、本明細書に記載されている特定の製剤および組成物に限定されないことが、理解されるべきである。

【0135】

経口投与

経口適用のためには、錠剤、糖衣剤、液体剤、滴剤、坐剤、または、カプセル剤、カプレット剤、およびジェルカプセル剤が特に適している。経口用途が意図される組成物は、当技術分野において公知の任意の方法にしたがって調製され得、そのような組成物は、錠剤の製造に適している、不活性、非毒性の薬学的賦形剤からなる群より選択される1つまたは複数の剤を含有し得る。そのような賦形剤は、例えば、ラクトースなどの不活性希釈剤；コーンスターチなどの顆粒化および崩壊剤；デンプンなどの結合剤；ならびにステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤を含む。錠剤は、コーティングされていなくてもよいし、または、優雅のためもしくは活性成分の放出を遅延させるために、公知の技術によってコーティングされていてもよい。経口用途のための製剤はまた、活性成分が不活性希釈剤と混合されている硬いゼラチンカプセル剤として提示され得る

30

40

【0136】

経口投与のために、化合物は、結合剤（例えば、ポリピニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、もしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、コーンスターチ、ラクトース、微結晶性セルロース、もしくはリン酸カルシウム）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、もしくはシリカ）；崩壊剤（例えば、デンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容される賦形剤とともに、従来手段によって調製された錠剤またはカプセル剤の形態であり得る。望ましい場合、錠剤は、Colorcon, West Point, Pa. から入手可能なOPADRY（商標）フィルムコーティングシステム（例えば、OPADRY（商標）OYタイプ、OYCタイプ、有機腸溶性OY-Pタイプ、水性腸溶性OY-Aタイプ、OY-PMタイプ、およびOP

50

ADRY (商標) White、32K18400) などの、適した方法およびコーティング材料を用いてコーティングされ得る。経口投与のための液体調製物は、液剤、シロップ剤、または懸濁剤の形態であり得る。液体調製物は、懸濁剤 (例えば、ソルビトールシロップ、メチルセルロース、または硬化食用脂) ; 乳化剤 (例えば、レシチンまたはアカシア) ; 非水性ビヒクル (例えば、扁桃油、油性エステル、またはエチルアルコール) ; および保存薬 (例えば、メチルもしくはプロピルp-ヒドロキシベンゾアート、またはソルビン酸) などの薬学的に許容される添加物とともに、従来手段によって調製され得る。

【0137】

造粒技術は、活性成分の出発粉末または他の粒子状材料を修飾するために、薬学分野において周知である。粉末を、典型的には、結合剤材料と混合して、より大きな永続的に易流動性の集塊または顆粒にする。これが「造粒」と呼ばれる。例えば、溶媒を用いる「湿式」造粒プロセスは、一般的に、粉末を結合剤材料と組み合わせて、湿った顆粒状塊の形成をもたらす条件下で、水または有機溶媒で湿らせ、そこから溶媒をその後蒸発させなければならないことを特徴とする。

10

【0138】

熔融造粒は、一般的に、本質的に添加される水または他の液体溶媒の非存在下で、粉末材料または他の材料の造粒を促進するように、室温で固体または半固体である (すなわち、比較的低い軟化点または融点範囲を有する) 材料の使用である。融点の低い固体は、融点範囲中の温度まで加熱された際に、液化して結合剤または造粒媒質として作用する。液化した固体は、それ自体が、接触している粉末材料の表面にわたって広がり、冷却すると、最初の材料が中で一緒に結合している固体顆粒状塊を形成する。結果として生じた熔融造粒物は、その後、錠剤プレスに提供されてもよく、または、経口剤形を調製するためにカプセル化されてもよい。熔融造粒は、固体分散物または固体溶液を形成することによって、活性物 (すなわち、薬物) の溶解速度および生物学的利用能を改善する。

20

【0139】

米国特許第5,169,645号は、改善された流動特性を有する、圧縮性ワックス含有顆粒を直接開示する。顆粒は、ワックスを、融解物においてある特定の流動改善添加物と混合し、その後混合物の冷却および造粒を行った際に得られる。ある特定の態様においては、ワックス自体のみが、ワックスおよび添加物の融解物組み合わせにおいて融解し、他の場合には、ワックスおよび添加物の両方が、融解することになる。

30

【0140】

本発明はまた、本発明の1つまたは複数の化合物の遅延放出を提供する層、および、疾患または障害の処置のための薬剤の即時放出を提供するさらなる層を含む、多層錠も含む。ワックス/pH感受性ポリマー混合物を用いて、活性成分が閉じ込められていてその遅延放出を確実にする、胃で不溶性の組成物が得られる。

【0141】

非経口投与

非経口投与のために、化合物は、注射もしくは注入、例えば、静脈内、筋肉内、もしくは皮下の注射もしくは注入用に、または、ポラス用量での投与および/もしくは連続注入用に、製剤化されてもよい。懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの他の製剤作用物質を任意で含有する、油性または水性ビヒクルにおける溶液、懸濁液、乳濁液が、使用され得る。

40

【0142】

追加的な投与形態

本発明の追加的な剤形は、米国特許第6,340,475号、第6,488,962号、第6,451,808号、第5,972,389号、第5,582,837号、および第5,007,790号に記載されているような剤形を含む。本発明の追加的な剤形はまた、米国特許出願第2003/0147952号、第2003/0104062号、第2003/0104053号、第2003/0044466号、第2003/0039688号、および第2002/0051820号に記載されているような剤形も含む。本発明の追加的な剤形はまた、PCT出願第WO 03/35041号、第WO 03/35040号、第WO 03/35029号、第WO 03/35177号、第WO 03/35039号、第WO 02/96

50

404号、第WO 02/32416号、第WO 01/97783号、第WO 01/56544号、第WO 01/32217号、第WO 98/55107号、第WO 98/11879号、第WO 97/47285号、第WO 93/18755号、および第WO 90/11757号に記載されているような剤形も含む。

【0143】

制御放出性製剤および薬物送達システム

ある特定の態様において、本発明の製剤は、短期の、迅速な消失の、ならびに制御された、例えば、持続放出性、遅延放出性、および拍動放出性の製剤であり得るが、これらに限定されない。

【0144】

持続放出という用語は、長期の期間にわたる薬物の徐々の放出を提供し、必ずではないが、長期の期間にわたる薬物の実質的に一定の血液レベルを結果としてもたらし得る薬物製剤を指すように、その従来の意味で使用される。期間は、1か月以上のように長くてもよく、ポラス形態で投与される同量の作用物質よりも長い放出であるべきである。

10

【0145】

持続放出のために、化合物は、化合物に持続放出特性を提供する適したポリマーまたは疎水性材料とともに製剤化され得る。そのように、本発明の方法における使用のための化合物は、微粒子の形態で、例えば注射によって、または、ウエハーもしくはディスクの形態で、埋め込みによって、投与され得る。

【0146】

ある特定の態様において、本発明の化合物は、持続放出性製剤を用いて、単独でまたは別の薬学的作用物質との組み合わせで、患者に投与される。

20

【0147】

遅延放出という用語は、薬物投与に続いていくらかの遅延後に、薬物の最初の放出を提供し、必ずではないが、約10分から約12時間までの遅延を含む薬物製剤を指すように、その従来の意味で明細書において使用される。

【0148】

拍動放出という用語は、薬物投与後に薬物のパルス状血漿プロファイルを生じるような様式で薬物の放出を提供する薬物製剤を指すように、その従来の意味で本明細書において使用される。

【0149】

即時放出という用語は、薬物投与直後に薬物の放出を提供する薬物製剤を指すように、その従来の意味で使用される。

30

【0150】

本明細書において使用される際、短期とは、薬物投与後の、約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、約40分、約20分、または約10分までおよびそれを含む任意の時間、ならびにその任意またはすべての全体または部分的な増加分を指す。

【0151】

本明細書において使用される際、迅速な消失とは、薬物投与後の、約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、約40分、約20分、または約10分までおよびそれを含む任意の時間、ならびにその任意およびすべての全体または部分的な増加分を指す。

40

【0152】

投薬

化合物の治療的有効量または用量は、患者の年齢、性別、および体重、患者の現在の医学的状态、ならびに処置されるべき患者におけるパーキンソン病の進行に依存すると考えられる。当業者は、これらの要因および他の要因に依存して、適切な投薬量を決定することができるであろう。

【0153】

本発明の化合物の適した用量は、約0.1 mg ~ 約1,000 mgなどの、1日あたり約0.01 mg ~

50

約5,000 mg、例えば、1日あたり約5 mg～約250 mgなどの、約1 mg～約500 mgの範囲であり得る。用量は、単一投薬量でまたは複数投薬量で、例えば、1日あたり1～4回またはそれより多い回数、投与され得る。複数投薬量を使用される場合、各投薬量の量は、同じであってもよく、または異なってもよい。例えば、1日あたり1 mgの用量が、2回の0.5 mg用量として、用量の間が約12時間の間隔で投与され得る。

【0154】

1日あたりに投与される化合物の量は、非限定的な例において、毎日、1日おき、2日毎、3日毎、4日毎、または5日毎に投与されることが、理解される。例えば、1日おき投与では、1日あたり5 mgの用量が月曜日に開始され、水曜日に投与される1日あたり5 mgの用量が最初に続き、金曜日に投与される1日あたり5 mgの用量が2番目に続く、などであり得る。

10

【0155】

本発明の方法における使用のための化合物は、単位剤形において製剤化され得る。「単位剤形」という用語は、処置を受ける患者のための一体の投薬量として適している物理的に分かれた単位を指し、各単位は、任意で、適した薬学的担体とともに、望ましい治療効果を生じるように計算された活性材料のあらかじめ決定された量を含む。単位剤形は、単一の1日用量または複数の1日用量（例えば、1日あたり約1～4回またはそれより多い回数）のうちの一つであり得る。複数の1日用量が使用される場合、単位剤形は、各用量について同じであってもよく、または異なってもよい。

【0156】

20

当業者は、本明細書に記載されている具体的な手順、態様、特許請求の範囲、および実施例に対する多数の同等物を認識するか、または、日常的に過ぎない実験法を用いて確認することができるであろう。そのような同等物は、本発明の範囲内であるとみなされ、本明細書に添付されている特許請求の範囲によって包含されていた。例えば、反応時間、反応サイズ/容積、ならびに、溶媒、触媒、圧力、大気条件、例えば窒素雰囲気、および還元剤/酸化剤などの実験試薬を含むがこれらに限定されない、当技術分野で認識されている代替物のおよび日常的に過ぎない実験法を用いた、反応条件における改変が、本出願の範囲内であることが理解されるべきである。

【0157】

値および範囲が本明細書において提供されている場合は必ず、これらの値および範囲によって包含されているすべての値および範囲は、本発明の範囲内に包含されるように意図されていることが、理解されるべきである。さらに、これらの範囲内に入るすべての値、および値の範囲の上限または下限もまた、本出願によって企図される。

30

【0158】

以下の実施例は、本発明の局面をさらに例証する。しかしながら、それらは、本明細書において示されているような本発明の教示または開示の限定ではまったくなく。

【実施例】

【0159】

本発明を次に、以下の実施例に関して説明する。これらの実施例は、例証のみの目的で提供され、本発明は、これらの実施例に限定されず、むしろ、本明細書において提供されている教示の結果として明らかであるすべての変形物を包含する。

40

【0160】

材料および方法

細胞単離および培養：

培養ラット心臓微小血管内皮細胞（RHMVEC）は、VEC Technologies（Rensselaer, NY）から購入し、フィブロネクチンコーティングプレート上で、MCDB-131完全培地（VEC Technologies）中で増殖させた。BAECは、地元の屠殺場より得られたウシ大動脈から単離し、10% FBS（Hyclone）およびpen/strepを補給したDMEM（高グルコース；Cellgro）中で増殖させた。HUVECSは、ヒト臍帯から現地で単離し、内皮細胞増殖サプリメント（Invitrogen）、10% FBS、L-グルタミン（Invitrogen）、およびpen/strepを補給したM199培地（I

50

nvitrogen) 中で増殖させた。

【 0 1 6 1 】

T7ファージライブラリー構築：

Novagen T7selectファージディスプレイシステムを、7merペプチドをランダムにコードするオリゴヌクレオチドのプールとともに、内皮細胞の取り込みを容易にするペプチドのランダムスクリーニングのために使用した。HindIII/XhoI部位を含有する7merランダムペプチドプライマーを、以下のように設計した：センスプライマー：

5'-GCTAGAATTCNNNBNNBNNBNNBNNBNNBNNBAAGCTTACTGCAGTAGCATG-3' (SEQ ID NO: 9)

；アンチセンスプライマー

5'-CATGCTACTGCAGTAAGCTT-3' (SEQ ID NO:10)

；配列中、N=A、T、C、G；およびB=G、C、T。

【 0 1 6 2 】

同様の量の各プライマーを混合して、95 °Cで5分間アニールさせ、その後、室温まで冷却した。その後、Klenow酵素を用いて平滑端DNA断片を生成することによって、フィルイン反応を行った。HindIII/XhoI消化の後、0.06 pmolのインサートをT7select415-1bベクター中にライゲーションした。インビトロパッケージングのために、ライゲーション反応物をT7パッケージング抽出物に直接添加し、 3×10^7 pfuのファージライブラリーを生成した。増幅のため、ライブラリーをBL21培養物(0.5~1.0のOD₆₀₀)に接種して、細胞溶解が観察されるまで37 °Cで2時間、1 mM IPTGで誘導した。ファージを含有する溶解物を、80 20
00 x gで10分間の遠心分離によって清澄化し、上清を滴定して、アリコートで4 °Cで保存した。

【 0 1 6 3 】

ECにおけるエンドサイトーシスによるファージ選択および増幅：

RHMVEC(80%コンフルエント；およそ 2×10^7 細胞/100mmディッシュ)をPBSで洗浄して、無血清培地中、37 °Cで30分間プレインキュベーションし、250の感染多重度(MOI)に達するようにT7ファージライブラリーの抽出物(5×10^9 pfu)を接種した。1時間、37 °Cでのインキュベーション後に、結合していないファージおよび弱く会合しているファージを細胞表面から除去するため、細胞を、氷冷PBSで洗浄し、0.1N HCl、pH 2.2で15秒間酸洗浄した。細胞をその後、トリプシン処理し、遠心分離して、氷上にて滅菌脱イオン水で溶解 30
した。細胞破片を遠心分離により除去して、その前に内部移行したファージを含有する上清を、上述のように増幅し、各ラウンドの間に滴定して、各連続するラウンドの開始時に 5×10^9 pfuの投入ファージを用いることを確実にした。6ラウンドの選択/増幅の完了後に、大腸菌BL21に結果として生じたファージを感染させてプレーティングし、個々のブランクを採取し、増幅し、配列決定した。

【 0 1 6 4 】

ペプチド合成：

そのC末端

(カベオリン-1アミノ酸 82-101; DGIWKASFTTFTVTKYWFYR) (SEQ ID NO: 5)

に融合された積荷を含むかまたは含まない、

Endo5 (RRPPR) (SEQ ID NO: 1) またはアンテナペディア

(RQIKIWFQNRRMKWKK) (SEQ ID NO: 2)

に対応するペプチドを、Yale University School of MedicineのW.M. Keck biotechnology resource centerによって、標準的なFmoc化学を用いて合成し、質量分析法により解析して、純度を確認した。蛍光体(Endo5についてはカルボキシフルオレセイン、およびAPについてはローダミン)を、合成後にN末端に付加した。

【 0 1 6 5 】

各実験の前に、乾燥させたペプチドを秤量し、ジメチルスルホキシド(DMSO; J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)中に $5 \times 10^{-2} \sim 10^{-2}$ Mになるように溶解して、蒸留水で 10^{-3} Mに 50

なるように希釈した。

【0166】

NO放出：

VEGF誘導性NO放出実験を、以前に記載されているように行った。簡潔に言うと、コンフルエントのBAECを、ペプチドとともに6時間、無血清DMEM中でインキュベーションした。培地を除去して、VEGF (10^{-9} M) を含むかまたは含まない新鮮な無血清DMEMを30分間添加した。培地を収集し、細胞をトリプシン処理して計数し、上清中の亜硝酸レベルを、Sieve's NO化学発光分析器を用いることによって測定した。

【0167】

改変マイルス (Miles) アッセイ：

マウス皮膚における血漿漏出を、以前に記載されているようなマイルスアッセイを用いて研究した。簡潔に言うと、オスのスイスマウス (30~35 g) に麻酔をかけて、エバンスブルー (PBS中30 mg/kg; Sigma) を注射した。カラシ油のアナログであるフェニルイソチオシアナート (鉍油中5%) (Pierce, Rockford, Illinois) を、綿棒で右耳上に塗布した。左耳は、対照として使用し、鉍油単独で処置した。30分後、麻酔をかけた動物を屠殺し、かん流して、耳を切除し、乾燥し、秤量した。エバンスブルーを、ホルムアミドで耳から抽出して、595 nmで分光光度的に定量した。

【0168】

内部移行の定量：

培養BAECを、6ウェルプレートにおいてコンフルエントに達するまで増殖させた。細胞を洗浄して、標識ペプチド (10^{-6} M) を含有する1 mLのDMEM中で1、2、4、または6時間37°Cでインキュベーションし、0.1 Mグリシンを含有する冷PBS (pH 4) で3回洗浄して、非特異的な表面染色を除去した。完全な培地除去の後、細胞をトリプシン処理し、遠心分離して、150 μ LのSDSベースまたはTriton X-100溶解緩衝液を添加することによってタンパク質を抽出した。膜を遠心分離によって除去し、内部移行したペプチドを、蛍光プレートリーダー (Perseptive Biosystems) を用いることによって定量した。記載されているようにペプチドと5分間インキュベーションして洗浄した細胞を、基本の表面染色として使用した。使用した両方の蛍光体の直線性は、溶解溶液を用いて濃度-蛍光曲線を行うことによって決定した。各蛍光体での実験は、交差干渉を阻止するために個々で行った。

【0169】

生HUVECにおけるCPPイメージング：

新しく単離したHUVECを、グルタミン、10%FBS、および内皮細胞増殖サプリメントを補給したM199培地中で、ガラス底を有するペトリ皿上で増殖させた。CPPは非特異的にガラスに結合するため、ガラス底ペトリ皿を、1%FBSを含む無色M199培地中に非標識APおよびEndo5を含有する (5×10^{-5} M) ブロッキング溶液で30分間前処置することによって、バックグラウンドの蛍光を低減させた。細胞播種後に、培地を除去して、カルボキシフルオレセイン標識Endo5およびローダミン標識APを細胞に添加し (10^{-5} M)、細胞を37°C、5% CO₂ で1時間インキュベーションした (パルス)。培地を除去して、細胞を温かい培養培地で1回リンスし、Zess Axiovert倒立蛍光顕微鏡上で、捕捉した画像のZスタックおよびその後の容積デコンボリューションを行うことによって (Openlabソフトウェア)、ペプチドの取り込みを迅速に視覚化した。新たな培地を細胞上にさらに2時間 (全体で3時間) 置いてCPPの局在をチェースし、細胞を再び視覚化した (チェース)。

【0170】

統計解析：

データは、平均 \pm S.E. である。分散の解析およびその後の独立スチューデントt検定によって、統計学的比較を行った。p < 0.05の値が観察された場合に、データを有意に異なるとみなした。

【0171】

実施例1：ファージ内部移行を媒介するペプチドについてのファージライブラリーのスクリーニング

10

20

30

40

50

平均で0.1~1コピーのランダムに生成された7merペプチドをキャプシド上に発現するT7ファージディスプレイライブラリーを、生成した。キャプシド上の少ないペプチド数によって、その標的に強く結合するペプチドの選択に適するようになるため、このシステムを使用した。一定量の投入ファージ (5×10^9) を培養RHMVECに添加して、これらのファージを、細胞単層により急速に内部移行される(細胞の取り込み)能力について選択した。6ラウンドの感染/精製後に、同一の開始条件下で、0.018%(ラウンド1)から1.8%(ラウンド6)への、回収されたファージのパーセンテージの100倍の増加が観察され(表1)、結果として生じたファージライブラリーが、増強された内皮細胞内部移行特性を提示する証拠を提供した。各ラウンドの選択後の、ファージライブラリーの内皮細胞における内部移行の能力の解析によって、取り込みパーセンテージの指数関数的増加が示唆される(図1、指数関数との相関について $R^2 = 0.975$)。

10

【0172】

バイオパンニングおよび濃縮の完了後に、結果として生じたファージをプレーティングし、個々のプラークを増幅して配列決定した。単離した24種の個々のファージのうち、5種のファージは、Endo5と呼ばれる予想外に短い5merペプチドRRPPR (SEQ ID NO: 1) をコードしており、これは最も頻繁に同定されたペプチドであった(21%)。Endo5をコードするファージのDNA配列のコドン解析によって、コーディング配列 (CGGCGCCCGCCTCGTTGAGGG) (SEQ ID NO: 8)

中の終止コドンのランダムなかつ予想外の挿入が明らかになり、これは、我々のアプローチが生成することができる理論的なCPPサイズ(7アミノ酸)と比較してより小さいEndo5のサイズを、合理的に説明した。

20

【0173】

いずれかの理論によって限定されることを望まず、ファージバイオパンニング後のEndo5の高い回収は、バイオパンニングアプローチがそのために設計されている理論的な7merペプチドと比較して相対的に小さいサイズに起因する可能性がある。しかしながら、4~7アミノ酸の範囲にわたる他のCPPが、本明細書に記載されている技術で単離され、そのうちどれもEndo5の高い回収率を提示せず、サイズ依存性選択に反論した。

【0174】

実施例2: eNOS阻害活性

AP-Cavは、培養内皮細胞においてアゴニスト誘導性eNOS活性を遮断し(Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-7)、この生物活性は、AP-Cavの内部移行、投薬量、および前処置時間に依存する。本研究において、培養BAECによるNO放出に対する、Cavに融合されたEndo5 (endo5-Cav) の効果を試験することによって、Endo5の取り込み潜在能力をAPのものと比較した。

30

【0175】

積荷を有さないAPもしくはEndo5、またはAP-CavもしくはEndo5-Cav (10^{-5} M)でのBAECの6時間の前処置は、NO特異的な化学発光によってアッセイした際に、基本の(刺激されていない)NO放出に対して有意な効果を有さなかった(図2A)。APまたはEndo5での同様の前処置は、VEGF誘導性NO放出に対して有意な効果を示さなかったが、AP-Cav (10^{-5} M)での前処置は、VEGF活性を48%遮断した(Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-7)。興味深いことに、Endo5-Cav (10^{-5} M)での同様の前処置は、BAECのNO放出に対するVEGF活性を完全に損ない(図2A)、Endo5媒介性の取り込みがAPのものよりも効率的であった証拠を提供した。

40

【0176】

VEGF誘導性NO放出に対するEndo5-Cavの薬理学的効果を、用量依存性阻害実験を行うことによってさらに研究した。Endo5-Cav (10^{-6} ~ 10^{-5} M)での前処置は、 10^{-5} Mでほぼ最大効果で、VEGF誘導性NO放出の用量依存性阻害を引き起こした(図2B)。AP-Cav活性は、より多い用量でのペプチド不溶性のために、 2.5×10^{-5} Mで最大阻害に達したが、ずっとより弱い阻害活性を提示した(61%阻害)。用量応答曲線およびその後の非線形回帰(曲線適合)の解析により、AP-CavおよびEndo5-Cavの EC_{50} は、それぞれ 1.8×10^{-6} Mおよび7.5

50

$\times 10^{-6}$ Mであることが明らかになった。

【0177】

VEGF誘導性eNOS活性に対するEndo5-Cavの阻害は、同様の濃度でAP-Cavのものよりも堅牢であったため、eNOS活性に対するAP-CavとEndo5-Cavとの間の効果の時間依存性比較を行った。AP-Cav (10^{-5} M)は、BAECにおけるVEGF誘導性NO放出に対して時間依存性効果を有していた(図2C)が、4時間と6時間とのインキュベーション時点の間には小さな差が観察され(それぞれ、57%対49%)、AP-Cavの取り込みと細胞内分解/排出との間でほぼ完全な平衡に達している可能性があることを示唆する。

【0178】

Endo5-Cavの阻害効果もまた、時間依存性であったが、4時間で完全なeNOS阻害を有して、より堅牢であり、Endo5のより速い内部移行を示唆した。さらに、データにより、AP-Cav (10^{-5} M)での6時間の前処置が、同様の濃度でのEndo5-Cavでの2時間の前処置と比較した際にVEGF誘導性NO放出に対して同様の効果を有し、Endo5-Cavの取り込み速度がAP-Cavのもののおよそ3倍であるという証拠を提供したことが示された(図2C)。

【0179】

Cav ABドメイン(アミノ酸82-95; SEQ ID NO: 6)は、eNOS阻害を媒介する(Bernatchez et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. 102:761-66)。Endo5は、積荷の内部移行の促進についてAPよりも強力であるように見られるため、AP-Cavと比較して治療効果/サイズの比を最大にするように、AP-Cavのリーダー配列および積荷配列の両方を改変した。したがって、Endo5-CavAB(19merペプチド)を合成し、その活性をAP-Cav(36mer酸ペプチド)のものと比較した。Endo5-CavAB (10^{-5} M)での6時間のBAECの前処置は、VEGF誘導性NO放出を完全に遮断したが、AP-Cavは、同様の用量で52%のみVEGF効果を阻害した(図2D)。興味深いことに、Endo5-CavAB (2×10^{-6} M)での前処置は、AP-Cav (10^{-5} M)と同様の効果を有し、VEGF誘導性NO放出を49%阻害した。

【0180】

まとめると、これらのデータにより、分子あたりまたはアミノ酸あたりの治療潜在能力を最大にするために、AP-Cavの細胞取り込み配列および積荷の両方を最適化する実現可能性が示唆される。

【0181】

実施例3: 抗炎症特性

EC由来のNO産生は、一部、毛細血管内圧の増大およびそれに続く血管透過性の増大を促進することにより、炎症において能動的役割を果たす。AP-Cavでのマウスの前処置は、マイルスアッセイにおいて血管漏出を遮断する(Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-7; Bernatchez et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102:761-6)。したがって、この確立されたモデルは、Endo5融合ペプチドのインピボ効力を評価するための価値あるツールであり得る。

【0182】

AP-Cav(1 mg/kg)でのマウスの1時間の前処置(図3A)は、AP単独(分子量ベースで同様の用量)で処置したマウスと比較して37%(群あたりn=6)減衰させた。Endo5-Cavは、Endo5前処置単独(群あたりn=6または8)と比較して58%、カラシ油誘導性血管漏出を阻害し、AP-Cavよりも統計学的に有意に大きな阻害活性を示した($\dagger P < 0.05$)。図3Bに示されているように、AP-CavおよびEndo5-Cavの両方は、対照ペプチドと比較して、耳皮膚および組織におけるエバンスブルー管外遊出を減衰させるが、Endo5-Cavがより強力であった。いずれかの理論によって限定されることを望まず、カラシ油誘導性炎症に対してEndo5-Cavにより提示される不完全な阻害は、NOがこのモデルにおいて血管透過性を媒介する際に部分的な役割のみを果たすという観察によって説明され得る(Bucci et al., 2000, Nat. Med. 6:1362-7)。

【0183】

実施例4: 内皮細胞による内部移行

APは、ニューロンの膜を通過するCPPである(Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad

10

20

30

40

50

. Sci. U S A 88:1864-8)。本明細書において他の場所で議論されているように、Endo5は、予想外に、内皮細胞においてファージの高い内部移行を促進することが見出され、Endo5-Cavは、予想外に、eNOS活性化および血管透過性の阻止においてAP-Cavよりも強力であることが見出された。

【0184】

本研究において、Endo5の内部移行速度をAPのものと、それぞれ、各ペプチドのカルボキシフルオレセインおよびローダミン標識形態を用いることによって直接比較した。各蛍光体結合ペプチドの直線性を、標準的な濃度/蛍光曲線を行うことによって確認した。図4Aに示されているように、両方の蛍光体について同様の吸収値を得るために、(各蛍光体について利得設定を調整することにより)較正を行った。BAECを、別々に、蛍光体標識ペプチド (10^{-6} M) と1、2、4、または6時間インキュベーションし、酸洗浄し、溶解して、全ペプチド取り込みを、蛍光を定量することによって決定した。

【0185】

AP内部移行の直線的増加が時間とともに観察され(図4B)、6時間で、 1.07×10^{-9} モルのAP/ 10^6 細胞の値でピークとなった。これにより、時間0で添加された総量のローダミン-APのうちのおよそ11%が、設定においてコンフルエントBAEC単層によって内部移行され、能動的濃度機構の証拠を提供することが示される。カルボキシフルオレセイン-Endo5の内部移行速度は、APのものよりも速く、また6時間で、 2.85×10^{-9} モルのEndo5/ 10^6 細胞の値でピークとなり、添加されたペプチドの30.5%が約6時間後に内部移行したことを示唆した(図4B)。

【0186】

実施例5：生内皮細胞への内部移行

細胞中へのCPP侵入に参与する取り込み機構に光をあてようと試みた以前の研究では、固定化細胞においてイメージングを行った。これらの研究の結果は、細胞固定がCPPの予想外の核移行をもたらすという増えていく証拠を考慮して、信頼できない可能性がある(Richard et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:585-90)。

【0187】

本研究では、Endo5の取り込み機構をAPと比較するために、落射蛍光顕微鏡観察実験を、生HUVECにおいて行った。標識ペプチドの非特異的結合を最小にするために、ガラス底ペトリ皿を非標識APおよびEndo5でブロッキングした後に、新たに単離したHUVECを50%コンフルエントまで増殖させ、カルボキシフルオレセイン-Endo5およびローダミン-AP (10^{-6} M) の「パルス」で1時間標識して、リンスし、その後2時間の「チェース」が続き、全体で3時間であった。デコンボリューションした画像を、「パルス」および「チェース」期間後に捕捉した。Endo5(緑色チャンネル)およびAP(赤色チャンネル)の両方は、生HUVECにおいて37℃で1時間のインキュベーション後に、散在性の点状の細胞質染色を提示した(図5A)。核染色は、ほぼ完全になかった(暗い中心領域)。興味深いことに、マージした画像によって、黄色を特徴とする、Endo5とAPとの間の高度の共局在が明らかになった(図5A、左)。この観察によって、Endo5とAPとの間の初期内部移行経路の類似性が示唆される。HUVECとローダミン-APとの個々のインキュベーションは、カルボキシフルオレセイン-Endo5チャンネルにおいてシグナルをほとんどまたは全く引き起こさず、逆もまた同様であり、有意なブリードスルーがないことを示唆した。

【0188】

CPPの非存在下での2時間の「チェース」期間後に、Endo5およびAPの両方についての点状の染色は依然として顕著であったが、散在パターンよりもむしろより濃縮されたパターンを提示しており、能動的な細胞内濃度/局在化機構を強調した(図5B、左)。マージした画像によって再び、細胞表面からの最初の内部移行後の、細胞内ペプチド濃度のこの長期相(チェース)中の、Endo5とAPとの間の共局在が明らかになった。代表的な細胞を示した。まとめると、これらのデータによって、Endo5とAPとの間の内部移行および細胞内分布の類似性が示された。

【0189】

Endo5とAPとの間の内部移行経路の類似性を、競合研究を行い、細胞中への積荷の侵入を促進するEndo5およびAPの能力を定量することによって確認した。図5Cに示されているように、VEGF誘導性NO放出に対するAP-Cav (10^{-5} M)の部分的効果は、APまたはEndo5 (5×10^{-5} M)のいずれかでの前処置によって遮断された。Endo5-Cavによって媒介されるVEGF誘導性NO放出のほぼ完全な阻害は、APまたはEndo5 (5×10^{-5} M)のいずれかでの前処置によって部分的に阻止された。図5Cに示されているように、Endo5-CavによるVEGF誘導性NO放出の91%阻害は、AP (30%阻害) またはEndo5 (13%阻害) によって阻止された。まとめると、これらの結果によって、APおよびEndo5は、ECにおいて同様の経路を通して内部移行されることが示唆される。

【 0 1 9 0 】

10

(表1) 6ラウンドのバイオパンニング後のファージ内部移行能力の濃縮

RHMVECを、1時間、 5.0×10^9 ファージ(投入)とともにインキュベーションし、溶解して、回収されたファージを定量し(細胞取り込み)、次のラウンドのバイオパンニングのために増幅した。回収パーセンテージを、投入ファージに対する回収されたファージの比として表す。

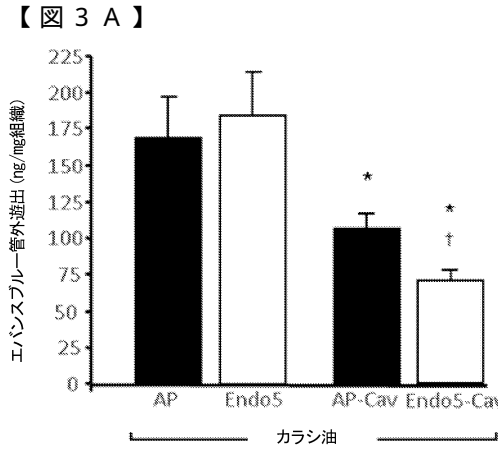
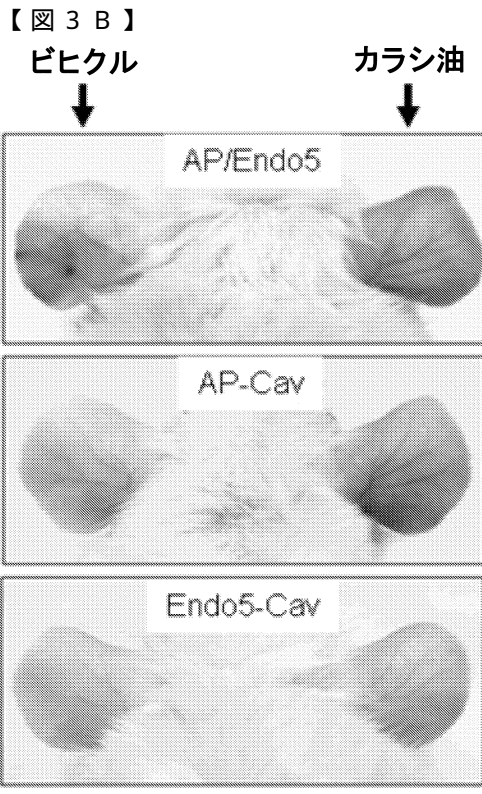
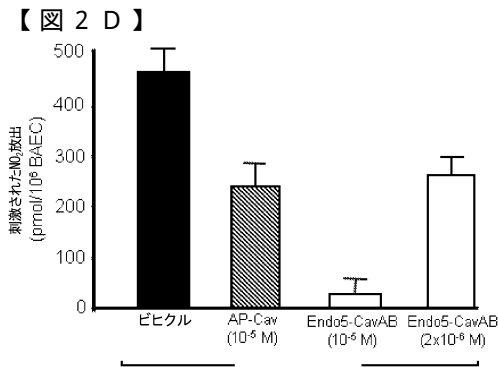
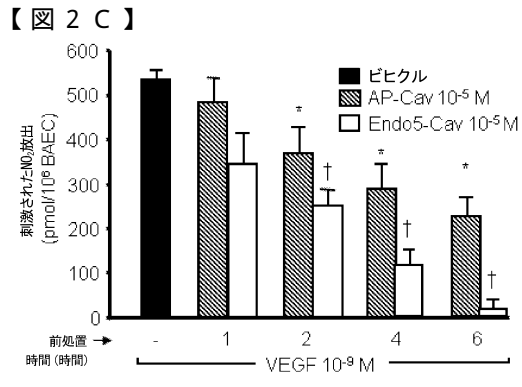
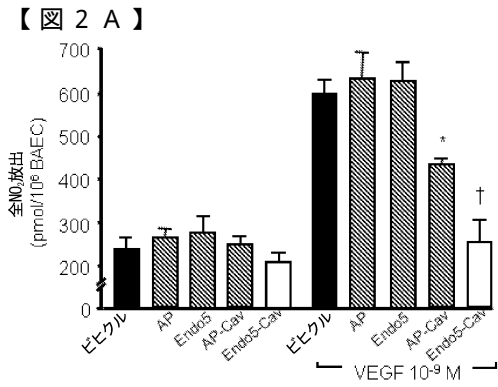
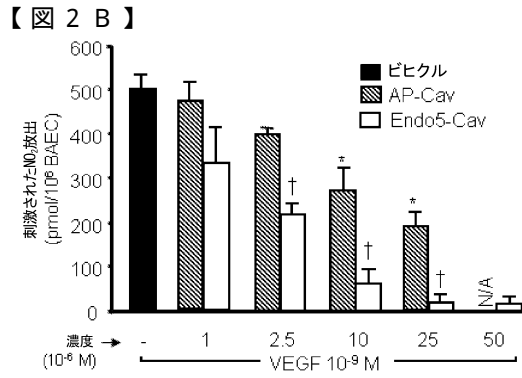
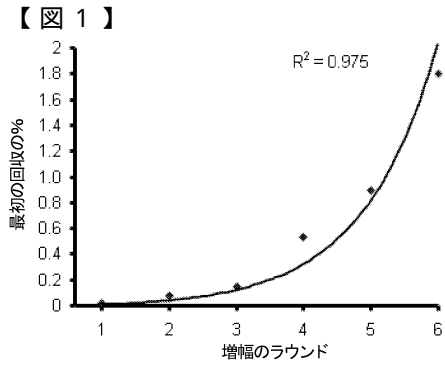
| 感染のラウンド | 投入ファージ (上清) | 回収されたファージ (細胞取り込み) | 回収 % |
|---------|-------------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | 5.0×10^9 | 9.4×10^5 | 0.018 |
| 2 | 5.0×10^9 | 3.8×10^6 | 0.076 |
| 3 | 5.0×10^9 | 7.5×10^6 | 0.15 |
| 4 | 5.0×10^9 | 2.8×10^7 | 0.56 |
| 5 | 5.0×10^9 | 4.5×10^7 | 0.90 |
| 6 | 5.0×10^9 | 9.0×10^7 | 1.8 |
| | | | 24の個別の ファージが単離された |

20

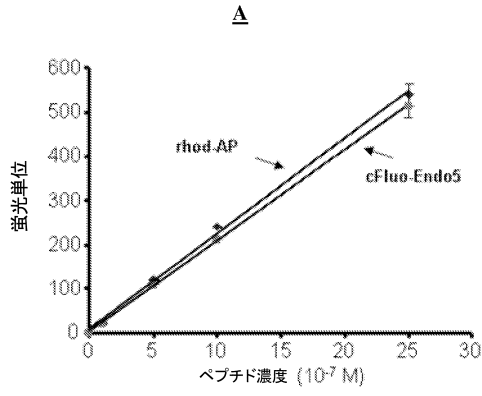
30

【 0 1 9 1 】

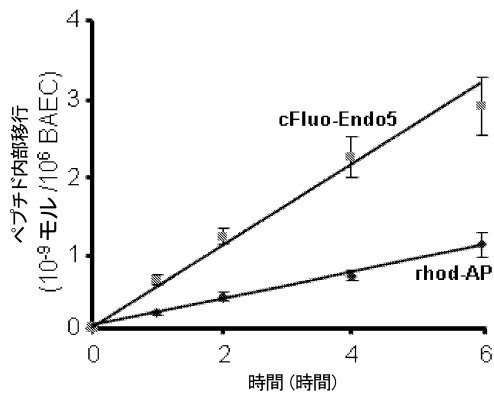
本明細書において引用されている各々のかつあらゆる特許、特許出願、および刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明が、具体的態様に関して開示されているが、本発明の他の態様および変形物が、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、当業者によって考案され得ることが明らかである。添付の特許請求の範囲は、すべてのそのような態様および同等の変形物を含むと解釈されるように意図される。



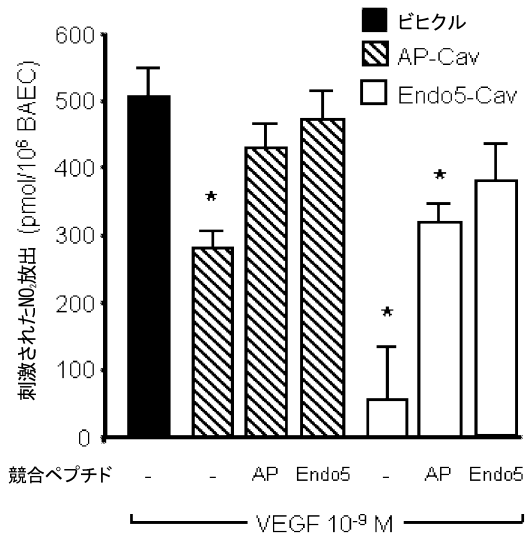
【 図 4 】



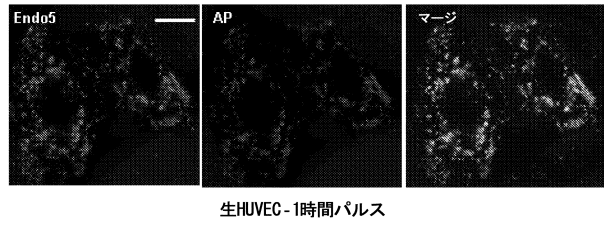
B



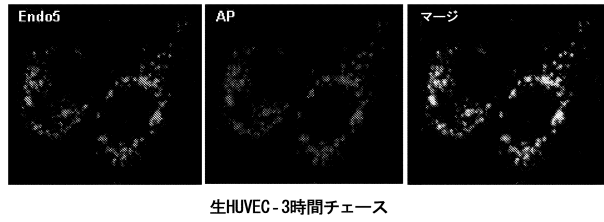
【 図 5 C 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【配列表】

0006932506000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 セッサ ウィリアム シー .

アメリカ合衆国 コネチカット州 マディソン リッチボロー ロード 4

(72)発明者 ジョルダノ フランク ジェイ .

アメリカ合衆国 コネチカット州 マディソン パートレット ドライブ 4 1 2

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 一宮 里枝

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表2011-514160(JP,A)

特表2009-510057(JP,A)

特表2002-528512(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K1/00-19/00

CAPLUS/REGISTRY(STN)

PubMed