

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7072508号

(P7072508)

(45)発行日 令和4年5月20日(2022.5.20)

(24)登録日 令和4年5月12日(2022.5.12)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 0 7 K 7/06

Z N A

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 14/47

A 6 1 K 38/08 (2019.01)

A 6 1 K 38/08

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 33/243 (2019.01)

A 6 1 K 33/243

請求項の数 15 (全51頁)

(21)出願番号 特願2018-540383(P2018-540383)

(86)(22)出願日 平成29年2月3日(2017.2.3)

(65)公表番号 特表2019-512004(P2019-512004
A)

(43)公表日 令和1年5月9日(2019.5.9)

(86)国際出願番号 PCT/IL2017/050132

(87)国際公開番号 WO2017/134671

(87)国際公開日 平成29年8月10日(2017.8.10)

審査請求日 令和2年1月29日(2020.1.29)

(31)優先権主張番号 62/291,003

(32)優先日 平成28年2月4日(2016.2.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 516040109

イエダ リサーチ アンド ディベロッ
プメント カンパニー リミテッド
YEDA RESEARCH AND D
EVELOPMENT CO., LTD.
イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォ
ト, ビー.オー. ボックス 95, ア
ット ザ ワイツマン インスティテュート
オブ サイエンス
at the Weizmann Ins
titute of Science,
P.O.Box 95, 7 6 1 0 0 0 2
Rehovot, Israel

(74)代理人 100133503

弁理士 関口 一哉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異型 p 5 3 と関連している疾患、障害または病状の処置におけるペプチドおよびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：4 2 6、4 2 7、4 2 9、4 3 0、4 3 1 および 4 4 6 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離ペプチドであって、前記ペプチドが p 5 3 の DNA 結合ドメイン (D B D) と、p C A P 2 5 0 (配列番号：1) が前記 D B D に結合する際の前記 D B D 内の少なくとも 1 個の残基によって相互作用するものであり、前記ペプチドが少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質を再活性化させるものである単離ペプチドであって、

前記相互作用が前記 D B D のヘリックス - 2 と L 1 によるものである、単離ペプチド。

【請求項 2】

前記相互作用が、前記 D B D のヘリックス - 2 および / または L 1 の構造安定性に影響を及ぼすものである (N M R によるアッセイ時)、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 個の残基が、前記 p 5 3 の L 1 の H 1 1 5、G 1 1 7 ならびに Y 1 2 6 および V 2 7 4 および G 2 7 9 および R 2 8 0 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

【請求項 4】

前記相互作用が前記アミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸によるものである、または前記相互作用が前記アミノ酸配列の少なくとも 2 個のアミノ酸によるものである、または前記相互作用が前記アミノ酸配列の少なくとも 3 個のアミノ酸によるものである、または

前記相互作用が前記アミノ酸配列の少なくとも４個のアミノ酸によるものである、請求項１に記載の単離ペプチド。

【請求項５】

さらに細胞膜透過部分を含むものである、請求項１～４のいずれか１項に記載の単離ペプチド。

【請求項６】

配列番号：４２９に示すアミノ酸配列を含むものである、請求項１～５のいずれか１項に記載の単離ペプチド。

【請求項７】

配列番号：４２６、４２７、４２９、４３０、４３１および４４６からなる群より選択される、請求項１～５のいずれか１項に記載の単離ペプチド。

10

【請求項８】

配列番号：４２９に示すものである、請求項７に記載の単離ペプチド。

【請求項９】

変異型 p 5 3 タンパク質と関連している疾患、障害または病状の処置のために用いられる、請求項１～８のいずれか１項に記載の単離ペプチド。

【請求項１０】

前記疾患が、がんである、請求項９に記載の単離ペプチド。

【請求項１１】

前記がんが、乳がん、結腸がん、卵巣がんおよび肺がんからなる群より選択される、請求項１０に記載の単離ペプチド。

20

【請求項１２】

連続輸注および皮下投与から選択される投与経路により、処置を必要とする被験体に治療有効量投与することに用いられる、請求項９～１１のいずれか１項に記載の単離ペプチド。

【請求項１３】

前記治療有効量が、１日あたり 0 . 0 1 ~ 0 . 3 m g / k g である、請求項１２に記載の単離ペプチド。

【請求項１４】

前記処置が治療有効量の白金ベースの化学療法薬を投与することをさらに含む、請求項９～１３のいずれか１項に記載の単離ペプチド。

30

【請求項１５】

前記白金ベースの化学療法薬がシスプラチン含む、請求項１４に記載の単離ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、その一部の実施形態において、変異型 p 5 3 と関連している疾患、障害または病状の処置におけるペプチドおよびその使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

がんは、先進諸国における主要死因であり、人口の平均年齢は上がり続けているため、診断症例数および経済的関連性も増え続けている。がんは単一疾患ではなく、異常な細胞の制御不能な増殖および拡張を特徴とする 2 0 0 を超える一群の疾患である。がんは、高度に不均一性の疾患であり、同じ型および悪性度のがんを有する患者間であっても、腫瘍細胞表面マーカーの発現および分布において分子レベルで大きな差がある。さらに、細胞の変異は、がんが進行するにつれて蓄積される傾向にあり、腫瘍の不均一性がさらに大きくなる。ほとんどの腫瘍細胞は、癌遺伝子の高発現および癌抑制遺伝子の不活性化を伴うゲノム不安定性を示す。

40

【０００３】

p 5 3 遺伝子は、がんの進行に対する大きな障壁としての機能を果たす最も重要な癌抑制遺伝子であると考えられている。p 5 3 タンパク質は種々の型の細胞ストレスに応答し、

50

細胞周期の停止、アポトーシスまたは老化を誘発する。これは、p53 DNA結合モチーフを有する特定の標的遺伝子の転写のトランス活性化によって行なわれる。p53経路が、ほぼすべてのヒトのがんに関与していることは広く承知されている。p53における変異は、悪性形質転換プロセスにおける極めて重要な段階とみなされており、50%を超えるがんの症例でp53遺伝子に変異を有している。このような変異のほとんどは、p53のDNA結合コアドメイン(DBD)を標的化し、それによりp53のその標的部位に対する特異的DNA結合を無効にするミスセンス点変異である。このような変異により、p53依存性の転写が妨げられ、そのため、p53媒介性の腫瘍抑制が妨げられる。多様な型のヒト腫瘍においてp53変異の頻度が並外れて高いことにより、p53は、腫瘍発生に関与する遺伝子の中でも特殊であり、変異したp53(Mut-p53)は、新規ながん治療のための興味深い標的となっている。

10

【0004】

構造の研究により、p53のDBDにおける腫瘍由来ミスセンス変異は、共通の効果：生理学的温度でのDBDのフォールディングの不安定化をもたらすことが明らかになっている(Joerger, A.C., M.D. Allen, and A.R. Fersht, Crystal structure of a superstable mutant of human p53 core domain. Insights into the mechanism of rescuing oncogenic mutations. J Biol Chem, 2004. 279(2): p. 1291-6)。一部の変異型は、より低温では野生型コンホメーションに戻ってDNAに結合することができるため、この不安定化は可逆的であり得る。したがって、p53のほとんどの変異は、生理学的温度でp53タンパク質のフォールディングを不安定化させ、部分的変性を引き起こす。

20

【0005】

変異型p53タンパク質は腫瘍細胞内に高レベルで蓄積される。これは、主に、p53の自身の破壊因子Mdm2の発現を上方調節することができないためである。さらに、多くのp53活性化性ストレスシグナル(低酸素、ゲノム不安定性および癌遺伝子の発現など)が、がん細胞において構成的に誘導されている。したがって、Mut-p53の再活性化は、大きな抗腫瘍効果を奏することが予測される。さらに、マウスモデルにおいてp53機能の復元は正常組織において耐容性が良好であり、視認可能な毒性効果はもたらされないことが示されている(Ventura, A., et al., Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. Nature, 2007. 445(7128): p. 661-5)。

30

【0006】

構造の研究では、変異型間でミスフォールディングの程度は異なっている。しかしながら、明確な代用倍率はなく、むしろ部分的変性であることが示されている。これは、フォールディングに対するp53変異の効果を逆転させるための「小分子」アプローチが広範な変異型形態に適用可能であるかもしれないことを示唆する。構造の研究からの別の重要な予想は、該タンパク質のうち正しくフォールディングされたものに結合するリガンドは、質量作用の法則に従って平衡を天然状態のフォールディングにシフトさせることが予測されるというものである。

40

【0007】

いくつかの修正アプローチがp53のコンホメーション領域において試みられた。ペプチドを安定化させるコンホメーションの原理証明がFriedlerおよび共同研究者らによって示された(Friedler, A., et al., A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: chaperone strategy for rescue of oncogenic mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. 99(2): p. 937-42)。9残基のペプチドであるCDB3は、p53 DBDとASPPの複合体の結晶構造に基づいて設計された(Samuels-Lev, Y., et al., ASPP proteins specifically stimulate the

50

apoptotic function of p53. *Mol. Cell*, 2001. 8 (4): p. 781 - 94)。このペプチドはMut - p53に結合し、シャペロンとしての機能を果たし、PAb1620に対する反応性の増大によって示されるように、平衡をWTのコンホメーションにシフトさせることが示された。しかしながら、CDB3の生物学的効果 (Issaeva, N., et al., Rescue of mutants of the tumor suppressor p53 in cancer cells by a designed peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003. 100 (23): p. 13303 - 7) は、Mut - p53 / CDB3複合体のコンホメーションはWTと変異型の間の中間状態であるため部分的であるにすぎない。

10

【0008】

Mut - p53を標的化する小分子化合物が、タンパク質ベースのアッセイまたは細胞ベースのアッセイのいずれかを用いて同定されている (Peng, Y., et al., Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. *Oncogene*, 2003. 22 (29): p. 4478 - 87)。CP - 31398は、単離p53 DBDを熱変性から保護する (タンパク質の加熱時のPAb1620の反応性の維持によって評価される) 分子についてスクリーニングすることにより同定された (Foster, B. A., et al., Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science*, 1999. 286 (5449): p. 2507 - 10)。CP - 31398の作用機序は不明なままである。NMR試験では、p53 DBDに対するCP - 31398の結合は全く検出することができなかった (Rippin, T. M., et al., Characterization of the p53-rescue drug CP - 31398 in vitro and in living cells. *Oncogene*, 2002. 21 (14): p. 2119 - 29)。CP - 31398は遺伝子の発現に影響を及ぼし、p53依存性および非依存性の両方の様式で細胞死を誘導する。したがって、CP - 31398は、その細胞毒性の説明となり得るp53以外の細胞標的を有すると思われる。

20

【0009】

がん生細胞のp53機能をレスキューする2つの他の小分子、PRIMA - 1およびMIRA - 1が、細胞ベースのスクリーニングアッセイを用いることによって見出された。PRIMA - 1とMIRA - 1は同様の活性プロフィールを有する (Bykov, V. J., et al., Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J Biol Chem*, 2005. 280 (34): p. 30384 - 91) が、構造的には無関連である。PRIMA - 1はプロドラッグであり、これは、変異型p53に結合するが他の分子にも結合する活性化化合物に変換され (Cell Death Dis. 2015 Jun 18; 6: e1794. doi: 10.1038/cddis.2015.143.)、その効果の一部のものは、変異型p53の状態に無関係のようである (BMC Cancer. 2015 Oct 13; 15: 684. doi: 10.1186/s12885-015-1667-1.)。

30

40

【0010】

本発明の一部の実施形態の発明者らは、以前に、mut p53再活性化ペプチドを選択するためのファージディスプレイの使用を報告している (WO 2015 / 019318)。ファージペプチドディスプレイライブラリーは、化学物質ライブラリーよりもずっと高い複雑性を有する。この選択プロセスは、固定化した標的に対するペプチドの結合、溶出および増幅、最後にシーケンシングによる同定に基づいたものであり、大量数の分子を短時間でスクリーニングすることが可能であった。異なる選択ストラテジーを併用し、いろいろなペプチドライブラリーおよび選択したプールのディープシーケンシングからリードを選択した。リードペプチドは、インビトロでmut p53にWT p53様活性を付与

50

し、生細胞において、いくつかの異種移植片モデルのmut p 5 3 担持腫瘍の退縮を引き起こすことが示された。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【文献】国際公開第2015/019318号

【非特許文献】

【0012】

【文献】Joergger, A. C., M. D. Allen, and A. R. Fersht, Crystal structure of a superstable mutant of human p53 core domain. Insights into the mechanism of rescuing oncogenic mutations. J Biol Chem, 2004 279(2): p. 1291 - 6

10

Ventura, A., et al., Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. Nature, 2007. 445(7128): p. 661 - 5

Friedler, A., et al., A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: chaperone strategy for rescue of oncogenic mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. 99(2): p. 937 - 42

20

Samuels-Lev, Y., et al., ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. Mol. Cell, 2001. 8(4): p. 781 - 94

Issaeva, N., et al., Rescue of mutants of the tumor suppressor p53 in cancer cells by a designed peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003. 100(23): p. 13303 - 7

Peng, Y., et al., Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. Oncogene, 2003. 22(29): p. 4478 - 87

30

Foster, B. A., et al., Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. Science, 1999. 286(5449): p. 2507 - 10

Rippin, T. M., et al., Characterization of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells. Oncogene, 2002. 21(14): p. 2119 - 29

Bykov, V. J., et al., Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. J Biol Chem, 2005. 280(34): p. 30384 - 91

40

Cell Death Dis. 2015 Jun 18; 6:e1794. doi: 10.1038/cddis.2015.143.

BMC Cancer. 2015 Oct 13; 15:684. doi: 10.1186/s12885-015-1667-1

【発明の概要】

【0013】

本発明の一部の実施形態の一態様により、ある空間および立体構成で配置されたアミノ酸配列を含む単離ペプチドであって、該空間および立体構成が、該ペプチドがp 5 3のDNA結合ドメイン(DBD)と、pCAP 250(配列番号: 1)が該DBDに結合する

50

際の該 D B D 内の少なくとも 1 個の残基によって相互作用することを可能にするものであり、ここで、該ペプチドは少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質を再活性化させるものである、ただし、該ペプチドは配列番号： 5 9 ~ 3 8 2 のものでないものとする単離ペプチドを提供する。

本発明の一部の実施形態によれば、該相互作用が該 D B D のヘリックス - 2 および L 1 によるものである。

【 0 0 1 4 】

本発明の一部の実施形態によれば、該相互作用が、該 D B D のヘリックス - 2 および / または L 1 の構造安定性に影響を及ぼすものである (N M R によるアッセイ時) 。

【 0 0 1 5 】

本発明の一部の実施形態によれば、該少なくとも 1 個の残基が、 p 5 3 の L 1 の H 1 1 5 、 G 1 1 7 ならびに Y 1 2 6 および V 2 7 4 および G 2 7 9 および R 2 8 0 からなる群より選択される。

【 0 0 1 6 】

本発明の一部の実施形態によれば、該相互作用が該アミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸によるものである。

【 0 0 1 7 】

本発明の一部の実施形態によれば、該相互作用が該アミノ酸配列の少なくとも 2 個のアミノ酸によるものである。

【 0 0 1 8 】

本発明の一部の実施形態によれば、該相互作用が該アミノ酸配列の少なくとも 3 個のアミノ酸によるものである。

【 0 0 1 9 】

本発明の一部の実施形態によれば、該相互作用が該アミノ酸配列の少なくとも 4 個のアミノ酸によるものである。

【 0 0 2 0 】

本発明の一部の実施形態によれば、該ペプチドが：

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ (配列番号： 5 3)

のアミノ酸配列を含むものであり、

ここで、

X₁ および X₅ は正荷電アミノ酸であり；

X₂ は、 S e r、T h r、A s n、G l n、P r o、A l a および G l y からなる群より選択され；

X₃ は任意のアミノ酸であり；

X₄ および X₆ は、メチルアミノ酸および プレイカーアミノ酸からなる群より選択される。

【 0 0 2 1 】

本発明の一部の実施形態によれば、該ペプチドが：

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ (配列番号： 5 4)

のアミノ酸配列を含むものであり、

ここで、

X₁ および X₅ は、 H i s、A r g および L y s からなる群より選択され；

X₂ は、 S e r、T h r、A s n、G l n、P r o、A l a および G l y からなる群より選択され；

X₃、X₄、X₆ は任意のアミノ酸である。

【 0 0 2 2 】

本発明の一部の実施形態によれば、正荷電アミノ酸が、 H i s、ジアミノ酪酸 (D a b)、A r g および L y s からなる群より選択される。

【 0 0 2 3 】

本発明の一部の実施形態によれば、X₃ が D - アミノ酸である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

本発明の一部の実施形態によれば、 X_3 がリン酸化アミノ酸である。

【 0 0 2 5 】

本発明の一部の実施形態によれば、 X_3 が、リン酸化が可能でないアミノ酸である。

【 0 0 2 6 】

本発明の一部の実施形態によれば、 X_3 が非水素結合性アミノ酸である。

【 0 0 2 7 】

本発明の一部の実施形態によれば、 X_3 が、極性無電荷アミノ酸および疎水性アミノ酸からなる群より選択される。

【 0 0 2 8 】

本発明の一部の実施形態によれば、 X_2 が S e r である。

【 0 0 2 9 】

本発明の一部の実施形態によれば、 X_4 が メチルアミノ酸であり、 X_6 がアラニンである。

【 0 0 3 0 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドがアミノ酸配列 H S A P H P (配列番号 : 4 9) または H S E P H P (配列番号 : 5 0) を有するものである。

【 0 0 3 1 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドが、該アミノ酸配列の C 末端に結合している少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸 (X_7) を含むものである。

【 0 0 3 2 】

本発明の一部の実施形態によれば、該少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸が負荷電アミノ酸である。

【 0 0 3 3 】

本発明の一部の実施形態によれば、該少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸が、A s p、G l u、G l y、A l a および S e r からなる群より選択される。

【 0 0 3 4 】

本発明の一部の実施形態によれば、該少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸が 2 個のさらなるアミノ酸 ($X_7 - X_8$) を含み、 X_8 が、H i s、D a b、A s p および G l u からなる群より選択される。

【 0 0 3 5 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドが、該アミノ酸配列の N 末端に結合している少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸を含むものである。

【 0 0 3 6 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドが、該アミノ酸配列の N 末端に結合している少なくとも 2 個のさらなるアミノ酸を含むものである。

【 0 0 3 7 】

本発明の一部の実施形態によれば、該アミノ酸配列の N 末端に結合している該少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸が A r g である。

【 0 0 3 8 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドがさらに細胞膜透過部分を含むものである。

【 0 0 3 9 】

本発明の一部の実施形態によれば、細胞膜透過部分が該ペプチドの N 末端に結合している。

【 0 0 4 0 】

本発明の一部の実施形態によれば、細胞膜透過部分が、脂肪酸部分、タンパク質性部分およびその組合せからなる群より選択される。

【 0 0 4 1 】

本発明の一部の実施形態によれば、脂肪酸部分がミリストイル脂肪酸を含み、タンパク質性部分が少なくとも 1 個の正荷電アミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチド 2 0 アミノ酸長より長くない。

【 0 0 4 3 】

本発明の一部の実施形態によれば、該ペプチドが、少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質のコンホメーションを野生型 (W T) p 5 3 タンパク質のコンホメーションに変化させるものである。

【 0 0 4 4 】

本発明の一部の実施形態によれば、該ペプチドが、少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質のコンホメーションを、変異型 p 5 3 タンパク質が、W T p 5 3 タンパク質に対して指向されるモノクローナル抗体によって認識されるように変化させるものである。

10

【 0 0 4 5 】

本発明の一部の実施形態によれば、変異型 p 5 3 タンパク質が、W T p 5 3 タンパク質に対して指向されるモノクローナル抗体によって認識されないものである。

【 0 0 4 6 】

本発明の一部の実施形態によれば、変異型 p 5 3 タンパク質が、該ペプチドに結合すると、W T p 5 3 タンパク質に対して指向されるモノクローナル抗体によって認識されるものである。

【 0 0 4 7 】

本発明の一部の実施形態によれば、該モノクローナル抗体が A b 1 6 2 0 である。

【 0 0 4 8 】

20

本発明の一部の実施形態によれば、該ペプチドが、少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質の活性を W T p 5 3 タンパク質の活性に復元させるものである。

【 0 0 4 9 】

本発明の一部の実施形態によれば、該活性が、変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞のバイアビリティを低下させることである。

【 0 0 5 0 】

本発明の一部の実施形態によれば、該活性が、変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞のアポトーシスを促進させることである。

【 0 0 5 1 】

本発明の一部の実施形態によれば、該活性が、変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞内の p 5 3 コンセンサス D N A 結合エレメントに対する結合である。

30

【 0 0 5 2 】

本発明の一部の実施形態によれば、該コンセンサス D N A 結合エレメントが、配列番号： 5 5 および 5 6) に示す核酸配列を含むものである。

【 0 0 5 3 】

本発明の一部の実施形態によれば、該結合が、内在性 p 5 3 標的遺伝子の少なくとも一部活性化をもたらすものである。

【 0 0 5 4 】

本発明の一部の実施形態によれば、内在性標的遺伝子が、p 2 1、M D M 2 および P U M A からなる群より選択される。

40

【 0 0 5 5 】

本発明の一部の実施形態によれば、変異型 p 5 3 タンパク質が、W T p 5 3 タンパク質と異なるコンホメーションのものである。

【 0 0 5 6 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドが配列番号： 4 2 9 または 4 4 8 に示すものである。

【 0 0 5 7 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドが配列番号： 4 2 9、4 4 8、4 4 6、4 4 9 または 4 6 2 に示すものである。

【 0 0 5 8 】

50

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドが、配列番号： 8 および 4 1 2 ~ 4 6 4 からなる群より選択される。

【 0 0 5 9 】

本発明の一部の実施形態によれば、単離ペプチドが配列番号： 5 9 ~ 3 8 2 に示すいずれかのペプチドではない。

【 0 0 6 0 】

本発明の一部の実施形態の一態様により、変異型 p 5 3 タンパク質と関連している疾患、障害または病状の処置方法であって、処置を必要とする被験体に治療有効量の本明細書に記載の単離ペプチドを投与し、それにより該疾患、障害または病状を処置することを含む方法を提供する。

10

【 0 0 6 1 】

本発明の一部の実施形態によれば、該方法がさらに、該被験体に治療有効量の白金ベースの化学療法薬を投与することを含むものである。

【 0 0 6 2 】

本発明の一部の実施形態の一態様により、変異型 p 5 3 タンパク質と関連している疾患、障害または病状の処置方法であって、処置を必要とする被験体に治療有効量で、白金系化学療法薬と、ある空間および立体構成を有するアミノ酸配列を含む単離ペプチドとを投与することを含み、該空間および立体構成が、該ペプチドが p 5 3 の DNA 結合ドメイン (D B D) と、 p C A P 2 5 0 (配列番号： 1) が該 D B D に結合するのと同じ様式で結合することを可能にするものであり、該ペプチドは少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タン

20

【 0 0 6 3 】

本発明の一部の実施形態の一態様により、変異型 p 5 3 タンパク質と関連している疾患、障害または病状の処置方法であって、処置を必要とする被験体に治療有効量で、ある空間および立体構成を有するアミノ酸配列を含む単離ペプチドを投与することを含み、該空間および立体構成が、該ペプチドが p 5 3 の DNA 結合ドメイン (D B D) と、 p C A P 2 5 0 (配列番号： 1) が該 D B D に結合するのと同じ様式で結合することを可能にするものであり、該ペプチドは少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質を再活性化させるものであり、該治療有効量が 0 . 0 1 ~ 0 . 3 m g / k g / 日であり、それにより該疾患、障害または病状を処置する方法を提供する。

30

【 0 0 6 4 】

本発明の一部の実施形態によれば、該ペプチドが本明細書に記載のペプチドである。

【 0 0 6 5 】

本発明の一部の実施形態によれば、該ペプチドが p C A P 2 5 0 (配列番号： 1) である。

【 0 0 6 6 】

本発明の一部の実施形態によれば、該投与が皮下投与を含む。

【 0 0 6 7 】

本発明の一部の実施形態によれば、該投与が連続輸注を含む。

40

【 0 0 6 8 】

本発明の一部の実施形態によれば、該疾患ががんである。

【 0 0 6 9 】

特に定義していない限り、本明細書で用いる技術用語および / または科学用語はすべて、本発明が関する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様または同等の方法および材料が、本発明の実施形態の実施または試験において使用され得るが、例示的な方法および / または材料を以下に説明する。矛盾する場合は、本明細書 (定義を含む) に支配される。また、材料、方法および実施例は例示にすぎず、必ずしも限定を意図するものではない。

【 図面の簡単な説明 】

50

【 0 0 7 0 】

本発明の一部の実施形態を、単なる一例として、添付の図面を参照しながら本明細書に記載する。次に、図面について具体的に詳細に参照するが、図示した具体的詳細は一例にすぎず、本発明の実施形態の実例の論考の目的のためであることを強調しておく。これに関連して、本記載により、図面とともに考慮すると、当業者には、どのようにして本発明の実施形態が実施され得るかが明らかとなる。

【 0 0 7 1 】

図面において：

【図 1】図 1 は、E S 2 卵巣がん細胞のバイアビリティアッセイにおける p C A P - 2 5 0 (配列番号：1) の単独またはシスプラチンとの組合せでの用量応答である。細胞を 9 6 ウェルプレート内で、3 0 0 0 個の細胞 / ウェルで培養した。p C A P - 2 5 0 の段階希釈列を単独または 1 μ g / m l のシスプラチンと一緒にいずれかで添加し、プレートをさらに 4 8 時間、3 7 ° でインキュベートした。次いで、培地を除去し、細胞のバイアビリティを、細胞をクリスタルバイオレット (0 . 0 5 %) (メタノール / P B S (1 : 5 , v / v) 中) で 1 0 分間、染色した後、P B S で 3 回洗浄することによって測定した。1 0 % 酢酸を各ウェルに 1 0 分間、添加した。O D を 5 9 5 n m において測定した。1 μ g / m l で処理した E S 2 細胞のバイアビリティは 3 9 % であった。p C A P - 2 5 0 の I C 5 0 は 3 . 2 μ M であると推定され、シスプラチンとの組合せでの p C A P - 2 5 0 の I C 5 0 は 1 . 9 μ M であると推定され、この 2 つの化合物の相乗効果が示された。

【図 2】図 2 は、E S 2 卵巣がん細胞のバイアビリティアッセイにおける p 5 3 D B D との結合に対する p C A P - 2 5 0 (配列番号：1) およびいろいろな誘導体 (配列番号：2 ~ 1 9) の効果 (M S T による測定時) を示す棒グラフである。内在性 m p 5 3 S 2 4 1 F を発現している細胞 E S 2 C o n、および m u t p 5 3 に対する特異性の対照にするために C R I S P R / C a s 9 を用いて p 5 3 を安定的にノックアウトした E S 2 K O 細胞 (E S 2 p 5 3 K O) を 9 6 ウェルプレート内で、3 0 0 0 個の細胞 / ウェルで培養した。表示したペプチドを 8 μ g / m l の濃度で添加し、プレートをさらに 4 8 時間、3 7 ° でインキュベートした。次いで、培地を除去し、細胞のバイアビリティを、細胞をクリスタルバイオレット (0 . 0 5 %) (メタノール / P B S (1 : 5 , v / v) 中) で 1 0 分間、染色した後、P B S で 3 回洗浄することによって測定した。1 0 % 酢酸を各ウェルに 1 0 分間、添加した。O D を 5 9 5 n m において測定した。E S K O と比べたときの E S 2 C o n に対する特定のペプチドの効果の差は、m u t p 5 3 発現に対するペプチドの特異性を示す。アラニンに置換したアミノ酸 (例えば、セリンおよびヒスチジン) のいくつかのペプチド誘導体は E S 2 C o n 細胞に対する効果の低下を示し、ペプチドの有効性のためのこのようなアミノ酸の重要性を示す。

【図 3 A】図 3 A は、蛍光標識した W T p 5 3 D B D (図 3 A) または完全長 p 5 3 (図 3 B) および表示したペプチド (配列番号：1、4、9) の結合に関するマイクロスケール熱泳動 (M S T) 解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった；表示した各ペプチドの 1 0 の段階希釈列；(図 3 A - p C A P - 2 5 0) (図 3 A、F、H、I、K p C A P 4 0 2、p C A P 4 0 4、p C A P 4 0 9 および p C A P 3 6 4) を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光 w t p 5 3 D B D の移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。M S T 解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

【図 3 B】図 3 B は、蛍光標識した W T p 5 3 D B D (図 3 A) または完全長 p 5 3 (図 3 B) および表示したペプチド (配列番号：1、4、9) の結合に関するマイクロスケール熱泳動 (M S T) 解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった；表示した各ペプチドの 1 0 の段階希釈列；(図 3 A - p C A P - 2 5 0) (図 3 A、F、H、I、K p C A P 4 0 2、p C A P 4 0 4、p C A P 4 0 9 および p C A P 3 6 4) を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光 w t p 5 3 D B D の移動について、温度勾配において、いろいろ

10

20

30

40

50

な濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

【図3C】図3Cは、蛍光標識したWT p53 DBD (図3A) または完全長 p53 (図3B) および表示したペプチド (配列番号: 1、4、9) の結合に関するマイクロスケール熱泳動 (MST) 解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった; 表示した各ペプチドの10の段階希釈列; (図3A - pCAP - 250) (図3A、F、H、I、K pCAP 402、pCAP 404、pCAP 409 および pCAP 364) を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光 wt p53 DBD の移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

10

【図3D】図3Dは、蛍光標識したWT p53 DBD (図3A) または完全長 p53 (図3B) および表示したペプチド (配列番号: 1、4、9) の結合に関するマイクロスケール熱泳動 (MST) 解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった; 表示した各ペプチドの10の段階希釈列; (図3A - pCAP - 250) (図3A、F、H、I、K pCAP 402、pCAP 404、pCAP 409 および pCAP 364) を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光 wt p53 DBD の移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

20

【図3E】図3Eは、蛍光標識したWT p53 DBD (図3A) または完全長 p53 (図3B) および表示したペプチド (配列番号: 1、4、9) の結合に関するマイクロスケール熱泳動 (MST) 解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった; 表示した各ペプチドの10の段階希釈列; (図3A - pCAP - 250) (図3A、F、H、I、K pCAP 402、pCAP 404、pCAP 409 および pCAP 364) を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光 wt p53 DBD の移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

【図3F】図3Fは、蛍光標識したWT p53 DBD (図3A) または完全長 p53 (図3B) および表示したペプチド (配列番号: 1、4、9) の結合に関するマイクロスケール熱泳動 (MST) 解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった; 表示した各ペプチドの10の段階希釈列; (図3A - pCAP - 250) (図3A、F、H、I、K pCAP 402、pCAP 404、pCAP 409 および pCAP 364) を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光 wt p53 DBD の移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

30

【図3G】図3Gは、蛍光標識したWT p53 DBD (図3A) または完全長 p53 (図3B) および表示したペプチド (配列番号: 1、4、9) の結合に関するマイクロスケール熱泳動 (MST) 解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった; 表示した各ペプチドの10の段階希釈列; (図3A - pCAP - 250) (図3A、F、H、I、K pCAP 402、pCAP 404、pCAP 409 および pCAP 364) を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光 wt p53 DBD の移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

40

【図3H】図3Hは、蛍光標識したWT p53 DBD (図3A) または完全長 p53 (図3B) および表示したペプチド (配列番号: 1、4、9) の結合に関するマイクロスケール熱泳動 (MST) 解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なっ

50

た；表示した各ペプチドの10の段階希釈列；（図3A - pCAP - 250）（図3A、F、H、I、K pCAP402、pCAP 404、pCAP409およびpCAP364）を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光wtp53DBDの移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

【図3I】図3Iは、蛍光標識したWTp53DBD（図3A）または完全長p53（図3B）および表示したペプチド（配列番号：1、4、9）の結合に関するマイクロスケール熱泳動（MST）解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった；表示した各ペプチドの10の段階希釈列；（図3A - pCAP - 250）（図3A、F、H、I、K pCAP402、pCAP 404、pCAP409およびpCAP364）を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光wtp53DBDの移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

10

【図3J】図3Jは、蛍光標識したWTp53DBD（図3A）または完全長p53（図3B）および表示したペプチド（配列番号：1、4、9）の結合に関するマイクロスケール熱泳動（MST）解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった；表示した各ペプチドの10の段階希釈列；（図3A - pCAP - 250）（図3A、F、H、I、K pCAP402、pCAP 404、pCAP409およびpCAP364）を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光wtp53DBDの移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

20

【図3K】図3Kは、蛍光標識したWTp53DBD（図3A）または完全長p53（図3B）および表示したペプチド（配列番号：1、4、9）の結合に関するマイクロスケール熱泳動（MST）解析のグラフである。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった；表示した各ペプチドの10の段階希釈列；（図3A - pCAP - 250）（図3A、F、H、I、K pCAP402、pCAP 404、pCAP409およびpCAP364）を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光wtp53DBDの移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のペプチドを用いて解析した。MST解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

30

【図4A】図4Aは、種々の投与様式の薬物動態を示す。図4A - 1mg/kg iv投与後のpCAP - 250の時間に対する血漿濃度のプロファイル（平均±SD, n=3）。

【図4B】図4Bは、種々の投与様式の薬物動態を示す。図4B - 7日間の連続皮下投与後のpCAP - 250の時間に対する血漿濃度のプロファイル（平均±SD, n=3）。

【図4C】図4Cは、種々の投与様式の薬物動態を示す。図4C - 1mg/kg iv投与後のpCAP - 250の時間に対する血漿濃度のプロファイル（平均±SD, n=3）。

【図4D】図4Dは、種々の投与様式の薬物動態を示す。図4D - 1mg/kgの皮下投与後のpCAP - 250の時間に対する血漿濃度のプロファイル（平均±SD, n=3）。

40

【図5】図5Aは、マウス異種移植片モデルにおけるpCAP - 250ペプチドのインビボ効果である。ルシフェラーゼを発現している2*10⁵個のES2細胞をヌードマウスの臀部に注射した。生物発光を測定した。注射の12日後、マウスを無作為に4つの群に分け、週に3回、2つの対照ペプチドの混合物（pCAP 76および12；5μgの各ペプチド）またはpCAP - 250（10μg）のいずれかを腫瘍内注射した。択一的に、マウスに、0.8mg（PBS中）の対照ペプチドまたは0.8mg（PBS中）のpCAP - 250を入れたアルゼットミニポンプを埋め込んだ。図5A、実験終了時（21日目）の対照群マウスおよび腫瘍内pCAP - 250処置マウスのライブイメージング。

50

【図5B】図5Bは、マウス異種移植片モデルにおけるpCAP-250ペプチドのインビボ効果である。ルシフェラーゼを発現している 2×10^5 個のES2細胞をヌードマウスの臀部に注射した。生物発光を測定した。注射の12日後、マウスを無作為に4つの群に分け、週に3回、2つの対照ペプチドの混合物(pCAP 76および12; 5 μ gの各ペプチド)またはpCAP-250(10 μ g)のいずれかを腫瘍内注射した。択一的に、マウスに、0.8mg(PBS中)の対照ペプチドまたは0.8mg(PBS中)のpCAP-250を入れたアルゼットミニポンプを埋め込んだ。図5B-実験終了時(14日目)の対照群マウスおよびアルゼットミニポンプによるpCAP-250処置マウスのライブイメージング。

【図5C】図5A~Dは、マウス異種移植片モデルにおけるpCAP-250ペプチドのインビボ効果である。ルシフェラーゼを発現している 2×10^5 個のES2細胞をヌードマウスの臀部に注射した。生物発光を測定した。注射の12日後、マウスを無作為に4つの群に分け、週に3回、2つの対照ペプチドの混合物(pCAP 76および12; 5 μ gの各ペプチド)またはpCAP-250(10 μ g)のいずれかを腫瘍内注射した。択一的に、マウスに、0.8mg(PBS中)の対照ペプチドまたは0.8mg(PBS中)のpCAP-250を入れたアルゼットミニポンプを埋め込んだ。図5C-対照マウスおよび有効pCAP-250群：箱ひげ図は、時間の関数としての腫瘍のルシフェラーゼの読取り値を示す；平均(横線)、標準偏差(箱)、処置の開始の前(0日目まで)および後の最大および最小の読み値を示す。IVISシステムのバックグラウンド検出レベルの閾値は約 5×10^6 光子であった。

【図5D】図5A~Dは、マウス異種移植片モデルにおけるpCAP-250ペプチドのインビボ効果である。ルシフェラーゼを発現している 2×10^5 個のES2細胞をヌードマウスの臀部に注射した。生物発光を測定した。注射の12日後、マウスを無作為に4つの群に分け、週に3回、2つの対照ペプチドの混合物(pCAP 76および12; 5 μ gの各ペプチド)またはpCAP-250(10 μ g)のいずれかを腫瘍内注射した。択一的に、マウスに、0.8mg(PBS中)の対照ペプチドまたは0.8mg(PBS中)のpCAP-250を入れたアルゼットミニポンプを埋め込んだ。図5D-対照マウスおよび有効pCAP-250群：箱ひげ図は、時間の関数としての腫瘍のルシフェラーゼの読取り値を示す；平均(横線)、標準偏差(箱)、処置の開始の前(0日目まで)および後の最大および最小の読み値を示す。IVISシステムのバックグラウンド検出レベルの閾値は約 5×10^6 光子であった。

【図6A】図6Aは、P53 DNA結合ドメイン(DBD)の表面上に対するHSTP HPDペプチド配列の任意選択の予測されるペプチド結合位置を示す。DBDをカートン(carton)シアン表示で示し、予測されるペプチドをマゼンタの棒として示す。図6A-DBDペプチド複合体の概要。

【図6B】図6Bは、P53 DNA結合ドメイン(DBD)の表面上に対するHSTP HPDペプチド配列の任意選択の予測されるペプチド結合位置を示す。DBDをカートン(carton)シアン表示で示し、予測されるペプチドをマゼンタの棒として示す。図6B-DBD-ペプチド結合界面のより精密な検査。

【図6C】図6Cは、P53 DNA結合ドメイン(DBD)の表面上に対するHSTP HPDペプチド配列の任意選択の予測されるペプチド結合位置を示す。DBDをカートン(carton)シアン表示で示し、予測されるペプチドをマゼンタの棒として示す。図6C-該DBD(鎖B)と予測されるペプチド結合位置(鎖A)間の非結合型相互作用の詳細な原子リスト。

【図7】図7は、p53変異型p53R273Hを含む三連SW480細胞株でのp53再活性化ペプチドの用量応答効果を示す。細胞を96ウェルプレート内で、3000個の細胞/ウェルで培養した。いろいろなペプチドの段階希釈列を添加し、プレートをさらに72時間、37℃でインキュベートした。次いで、培地を除去し、細胞のバイアビリティを、細胞をクリスタルバイオレット(0.05%) (メタノール/PBS(1:5, v/v)中)で10分間、染色した後、PBSで3回洗浄することによって測定した。10%

10

20

30

40

50

酢酸を各ウェルに10分間、添加した。ODを595nmにおいて測定した。結果は、非処理細胞のバイアビリティ100%に対して標準化している。

【図8】図8は、三連でのp53再活性化ペプチドの用量応答効果を示す。p53変異型S241Fを含むES2細胞株。細胞を96ウェルプレート内で、3000個の細胞/ウェルで培養した。いろいろなペプチドの段階希釈列を添加し、プレートをさらに48時間、37℃でインキュベートした。次いで、培地を除去し、細胞のバイアビリティを、細胞をクリスタルバイオレット(0.05%) (メタノール/PBS(1:5, v/v)中)で10分間、染色した後、PBSで3回洗浄することによって測定した。10%酢酸を各ウェルに10分間、添加した。ODを595nmにおいて測定した。結果は、非処理細胞のバイアビリティ100%に対して標準化している。

10

【図9】図9は、293Kにおいて取得した野生型p53コアダメイン(DBD)の¹H-15N HSQCスペクトル、DBD(配列番号: 44の94~312)のスペクトルを示し、Wong et al.によって得た残基の割り当てを黒で示す[Wong, K. B., et al., Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(15): p. 8438-42]。遊離DBD(94~296)およびDBD-pCAP 250複合体について得られたNMRスペクトルを、それぞれ青および赤で示す。中くらい(C277とR280)および大きなピークの変化(G117)の例を、それぞれマゼンタおよび茶色で強調している。H115およびY126のピーク領域を黄色で強調している。

20

【図10】図10は、DBDに対するpCAP 250(配列番号: 1)の結合の結果としての¹H-15N HSQCスペクトルの変化に対するDBDの構造のマッピングを示す。DBDの構造をカートゥーン表示で示し、DNAを黄色に彩色している。Wong et al. (上掲)の解析で割り当てられなかった残基を緑に彩色し、pCAP 250の添加の際のピークの変化に關与する残基をマゼンタに彩色している。

【図11A】図11Aは、H115、G117およびY126の構造の再組織化を示す。DBDの構造をカートゥーン表示で示し、DNAを黄色に彩色している。H115、G117およびY126を緑の棒として示し、L1ループをマゼンタに彩色している。図11Aおよび11Bは、それぞれ、NMR(pdbコード2FEJ)によって得られた最良および2番目に最良のエネルギーDBDコンホメーションを示す。

30

【図11B】図11Bは、H115、G117およびY126の構造の再組織化を示す。DBDの構造をカートゥーン表示で示し、DNAを黄色に彩色している。H115、G117およびY126を緑の棒として示し、L1ループをマゼンタに彩色している。図11Aおよび11Bは、それぞれ、NMR(pdbコード2FEJ)によって得られた最良および2番目に最良のエネルギーDBDコンホメーションを示す。

【図12】図12は、293Kにおいて取得した野生型p53 DBD-ペプチド複合体の¹H-15N HSQCスペクトルを示す。DBD-pCAP 250およびDBD-pCAP 615(配列番号: 465)タンパク質ペプチド複合体について得られたNMRスペクトルを、それぞれ赤および緑で示す。H115およびY126のピークを丸で強調している。

40

【図13】図13は、293Kにおいて取得した野生型p53 DBDおよびDBD-pCAP 553(配列番号: 429)複合体の¹H-15N HSQCスペクトルを示す。遊離DBDおよびDBD-pCAP 553タンパク質ペプチド複合体について得られたNMRスペクトルを、それぞれ青および赤で示す。pCAP 553ペプチドの編集時に特異的に出現した、割り当てられなかった強いピークを緑の楕円として強調している。DBD-pCAP 553複体内でより密集して丸い状態になっているピークの数少ない例を茶色の楕円で強調している。

【図14】図14は、DBD-pCAP 250複合体の上位2つの予測されるペプチド結合モデルを示す。DBDの構造をカートゥーン表示で示し、DNAを黄色に彩色してい

50

る。H 1 1 5、G 1 1 7およびY 1 2 6を緑の棒として示し、L 1 ループをマゼンタに彩色している。D B D - p C A P 2 5 0 複合体の上位 2 つの予測されるペプチド結合モデルをシアンに彩色している。

【発明を実施するための形態】

【0072】

本発明は、その一部の実施形態において、変異型 p 5 3 と関連している疾患、障害または病状の処置におけるペプチドおよびその使用に関する。

【0073】

本発明の少なくとも 1 つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、必ずしもその適用が、以下の説明に示す詳細事項または本実施例に例示する詳細事項に限定されるものではないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態が可能である、または種々の様式で実施または行なうことが可能である。

【0074】

本発明の一部の実施形態の発明者らは、以前に、m u t p 5 3 再活性化ペプチドを選択するためのファージディスプレイの使用を報告している (W O 2 0 1 5 / 0 1 9 3 1 8 , これは、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。p C A P 2 5 0 (配列番号: 1) を含むリードペプチドは、インビトロで m u t p 5 3 に W T p 5 3 様活性を付与し、生細胞において、いくつかの異種移植片モデルの m u t p 5 3 担持腫瘍の退縮を引き起こすことが示された。

【0075】

本発明の実施化にあたり、本発明者らは、p C A P 2 5 0 が p 5 3 の D N A 結合ドメイン (D B D) に結合することを見出した。アラニンスキャニングを用いた構造解析 / 機能解析により、該 D B D に対する p C A P 2 5 0 の結合のためのコンセンサス部が明らかになった。

【0076】

N M R の実験結果は、p 5 3 タンパク質の W T D B D に対する p C A P 2 5 0 およびそのペプチドバリエーションの顕在結合のさらなる証拠を示す。このような結果は、マイクロスケール熱泳動 (M S T) 解析を用いた該 D B D に対する p C A P 2 5 0 の結合に関する所見 (図 3 A ~ K) をサポートする。N M R の結果はさらに、p C A P 2 5 0 およびそのペプチドバリエーションの結合によって該 D B D において構造変化が誘導され、この構造変化が、D N A に対する該 D B D の結合能に必須である該 D B D - D N A 結合界面領域、すなわち、ヘリックス - 2 および L 1 ループ構造モチーフの完全性および安定性に直接影響を及ぼすことを示す。p C A P 2 5 0 およびそのペプチドバリエーションの結合はさらに、ヘリックス 2 および L 1 ループ構造モチーフの周囲のさらなる残基に影響を及ぼし、該 D B D 表面上に比較的大きいが確固たる被影響パッチが作出される。

【0077】

このような所見により、p 5 3 の D B D と同じ相互作用を共有しており、少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質を再活性化させることができる新規なペプチドの設計が可能になり、抗がん活性が賦与されたかかるペプチドを実施例 5 に示す。

【0078】

したがって、本発明の一態様により、ある空間および立体構成で配置されたアミノ酸配列を含む単離ペプチドであって、該空間および立体構成が、該ペプチドが p 5 3 の D N A 結合ドメイン (D B D) と、p C A P 2 5 0 (配列番号: 1) が該 D B D に結合する際と同じ該 D B D 内の少なくとも 1 個の残基によって相互作用することを可能にするものであり、前記ペプチドは少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質を再活性化させるものである単離ペプチドを提供する。

【0079】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドが W O 2 0 1 5 / 0 1 9 3 1 8 の配列番号: 1 ~ 3 3 8、3 6 8 ~ 3 8 2 (すなわち、本明細書における配列番号: 5 9 ~ 3 8 2) ではない。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドが、W O 2 0 1 5 / 0 1 9 3 1 8（これは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）に変異型 p 5 3 を再活性化させる活性を有すると教示されたいずれかのペプチドではない。

【 0 0 8 1 】

本明細書で用いる場合、用語「単離（された）」とは、天然環境、例えば体内から、またはペプチドライブラリーから少なくとも部分的に分離されていることをいう。

【 0 0 8 2 】

本明細書で用いる場合、用語「p 5 3」（「T P 5 3」としても知られている）は、一般的に転写因子としての機能を果たし、細胞周期を調節し、したがって野生型形態では癌抑制遺伝子としての機能を果たす E C 2 . 7 . 1 . 3 7 のタンパク質産物をコードしている遺伝子配列をいう。具体的な一実施形態によれば、p 5 3 はヒト p 5 3 である。

10

【 0 0 8 3 】

本明細書で用いる場合、用語「野生型 p 5 3」、「w t p 5 3」および「W T p 5 3」は互換的に使用され得、野生型 p 5 3 タンパク質のコンホメーションを有し、したがって野生型 p 5 3 タンパク質の活性を有する野生型 p 5 3 タンパク質を指す。一部の実施形態では、野生型 p 5 3 は特異的モノクローナル抗体によって同定され得る。一部の特定の実施形態では、該モノクローナル抗体が A b 1 6 2 0 である。

【 0 0 8 4 】

該タンパク質の構造データは P D B e R C S B から入手可能である。

20

【 0 0 8 5 】

タンパク質に関する用語「コンホメーション」は、空間内におけるタンパク質の構造的配置（フォールディング）を指す。

【 0 0 8 6 】

本明細書で用いる場合、用語「変異型 p 5 3」、「M u t - p 5 3」、「変異した p 5 3」および「p 5 3 変異型」は互換的に使用され得、標的細胞において効率的に機能することができない変異した p 5 3 タンパク質を指す。一部の実施形態では、M u t - p 5 3 が、その標的部位に結合することができないものである。一部の実施形態では、M u t - p 5 3 が、DNA 結合ドメイン（D B D）領域が変異しているものである。一部の実施形態では、M u t - p 5 3 が、不活性なコンホメーションにおいてミスフォールディングされたものである。一部の例示的な実施形態では、M u t - p 5 3 が、温度感受性（t s）m u t p 5 3 R 2 4 9 S（R 2 4 9 S p 5 3）、ホットスポット完全長変異型 p 5 3 M u t - p 5 3 R 1 7 5 H（R 1 7 5 H p 5 3）、または任意の他の M u t - p 5 3 タンパク質である。一部の実施形態では、M u t - p 5 3 が、p 5 3 のミスフォールディングコンホメーション（p 5 3 の変異によって誘導される）を認識し得る特異的モノクローナル抗体によって同定されるものである。一部の実施形態では、M u t - p 5 3 が、特異的モノクローナル抗体によって同定されるものである。一部の特定の実施形態では、該モノクローナル抗体が A b 4 2 0 である。

30

【 0 0 8 7 】

一部の特定の実施形態では、変異型 p 5 3 タンパク質が、R 1 7 5 H、V 1 4 3 A、R 2 4 9 S、R 2 7 3 H、R 2 8 0 K、P 3 0 9 S、P 1 5 1 S、P 1 5 1 H、C 1 7 6 S、C 1 7 6 F、H 1 7 9 L、Q 1 9 2 R、R 2 1 3 Q、Y 2 2 0 C、Y 2 2 0 D、R 2 4 5 S、R 2 8 2 W、D 2 8 1 G、S 2 4 1 F、C 2 4 2 R、R 2 4 8 Q、R 2 4 8 W、D 2 8 1 G、R 2 7 3 C および V 2 7 4 F からなる群より選択される変異を含むものである。各可能性は本発明の個々の実施形態を表す。

40

【 0 0 8 8 】

本明細書において言及する場合、用語「再活性化ペプチド」、「M u t - p 5 3 再活性化ペプチド」または「該ペプチド」は互換的に使用され得、M u t - p 5 3 に対する活性を少なくとも部分的に復元させ得るペプチドを指す。フレーズ「変異型 p 5 3 タンパク質の再活性化」は、本明細書で用いる場合、変異型 p 5 3 タンパク質と相互作用すると、該変

50

異型 p 5 3 タンパク質の活性の少なくとも 1 つが高まるペプチドをいい、ここで、該活性は野生型 p 5 3 タンパク質の活性である。例えば、本発明によって提供されるペプチドと相互作用すると、変異型 p 5 3 タンパク質は、がん細胞において、カスパーゼなどのアポトーシス促進タンパク質の発現が、同様の状況における野生型 p 5 3 タンパク質で考えられ得るものと同様の様式で直接または間接的に高まり得るか、あるいはインビボで腫瘍が抑制され得る（これは、該疾患の異種移植片マウスモデルを用いてアッセイされ得る）。

【 0 0 8 9 】

理論に拘束されないが、該再活性化性ペプチドは、mut p 5 3 に該 DBD において結合し、WT p 5 3 タンパク質のフォールディングを熱力学的に安定化させ、したがって腫瘍抑制機能を復元させると提案される。

【 0 0 9 0 】

一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドは Mut - p 5 3 を、Mut - p 5 3 のコンホメーションに影響を及ぼし、天然状態の WT p 5 3 にもっと類似した、または同一のコンホメーションにすることにより再活性化させ得るものである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドは Mut - p 5 3 を、標的 DNA 内の WT p 5 3 結合部位への Mut - p 5 3 の結合が復元されるように再活性化させ得るものである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドは、Mut - p 5 3 の生化学的特性を復元させ得るものである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドは、Mut - p 5 3 タンパク質が、がん細胞の p 5 3 選択的阻害を示すことを誘導し得るものである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドは Mut - p 5 3 を、WT p 5 3 タンパク質と同様（すなわち、Mut - p 5 3 と WT p 5 3 間の差が ± 1 0 % , 2 0 % , 3 0 % ）または同一の構造特性、生化学的特性、生理学的特性および / または機能特性を有するように再活性化させ得るものである（例えば、本明細書に記載の結合アッセイ / 構造アッセイ、例えば MST および NMR において測定時）。

【 0 0 9 1 】

一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 3 ~ 3 0 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 7 ~ 3 0 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 1 2 ~ 3 0 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 3 ~ 2 5 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 7 ~ 2 5 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 1 2 ~ 2 5 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 3 ~ 2 2 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 7 ~ 2 2 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 1 2 ~ 2 2 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 7 ~ 9 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 6 ~ 9 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 7 ~ 1 0 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 6 ~ 1 0 アミノ酸長を有するペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが、9 ~ 1 0 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 8 ~ 1 0 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 6 ~ 9 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 6 ~ 8 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 6 ~ 7 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 7 ~ 8 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 7 ~ 9 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 5 ~ 2 0 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 6 ~ 1 5 アミノ酸長であるペプチドである。一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドが 7 または 1 2 アミノ酸長であるペプチドである。

【 0 0 9 2 】

10

20

30

40

50

用語「少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質を再活性化させ得る」または「少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質を再活性化させる」は、本明細書において互換的に用いており、変異型 p 5 3 タンパク質に結合すると、該変異型 p 5 3 タンパク質が、野生型 p 5 3 タンパク質の対応する活性と同様の活性を獲得するか、または該活性が高まるペプチドをいう。

【 0 0 9 3 】

本明細書で用いる場合、「p 5 3 の DNA 結合ドメイン」または「DBD」は、標的タンパク質内の p 5 3 応答性エレメントに結合する p 5 3 のドメインであって（例えば、コンセンサス DNA 結合エレメントは、配列番号：44 に示すアミノ酸配列を含むもの、または該アミノ酸配列からなるものである）、典型的には、ヒト p 5 3（完全長 p 5 3 GenBank：BAC16799.1，配列番号：44）残基 94～292、91～292、94～293、94～296、91～296、91～293、94～312 または 92～312 に帰属されるドメインをいう。具体的な一実施形態によれば、該 DBD は、変異した p 5 3 のものである。

10

【 0 0 9 4 】

記載のように、該ペプチドは、ある空間および立体構成で配置されたアミノ酸配列を含むものであって、該空間および立体構成が、該ペプチドが p 5 3 の DBD と、pCAP 250（配列番号：1）が該 DBD に結合する際の該 DBD 内の少なくとも 1 個の残基によって相互作用することを可能にするものである。

【 0 0 9 5 】

20

したがって、本発明の一部の実施形態による再活性化性ペプチドは p 5 3 の該 DBD ドメインと、典型的には、該 DBD 内において有効濃度の該ペプチドの存在が可能となるように該ペプチドの反応性基（1 つまたは複数）が該 DBD 内の対応する反応性基（1 つまたは複数）（典型的には、アミノ酸残基の側鎖）に十分に近接して位置するように会合し、また、該ペプチドの反応性基が正しい向きで位置し、オーバーラップ、したがって、強力な化学的相互作用および低解離が可能となるように会合している。したがって、本発明の一部の実施形態による再活性化性ペプチドは、典型的には、該相互作用に関与することがわかっている構造要素を含むものであり、また、p 5 3 の DBD との会合に影響を及ぼすか、または弱めるかもしれないコンホメーションの変化が回避されるようにコンホメーションの柔軟性を制限するものを有していてもよい。

30

【 0 0 9 6 】

一部の実施形態によれば、該相互作用が前記 DBD のヘリックス - 2 と L 1 によるものである。

【 0 0 9 7 】

典型的には、helix - 2 はアミノ酸 276～289 間に位置し、L 1 はアミノ酸 112～124 間に位置する。

【 0 0 9 8 】

一部の実施形態によれば、該相互作用が、前記 DBD のヘリックス - 2 および / または L 1 の構造安定性に影響を及ぼすものである（NMR によるアッセイ時）。

【 0 0 9 9 】

40

一部の実施形態によれば、該ペプチドとの該相互作用を媒介する該 DBD 内の該少なくとも 1 個の残基が、p 5 3 の L 1 の H 115、G 117 ならびに p 5 3（wt または変異型（アミノ酸の違いが典型的にはアミノ酸の番号付けに有意に影響しない 1 種類のアミノ酸である）の Y 126 および V 274 および G 279 および R 280 からなる群より選択される。しかしながら、当業者であれば、どのようにして対応アミノ酸を見つけるか（変異型 p 5 3 における組成および位置に関して）がわかるであろう

【 0 1 0 0 】

一部の実施形態によれば、該ペプチドと該 DBD との該相互作用が非共有結合性、例えば、水媒介性水素結合性相互作用である。

【 0 1 0 1 】

50

一部の実施形態によれば、該相互作用が該アミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸によるものである。

【0102】

一部の実施形態によれば、該相互作用が該アミノ酸配列の少なくとも2個のアミノ酸によるものである。

【0103】

一部の実施形態によれば、該相互作用が該アミノ酸配列の少なくとも3個のアミノ酸によるものである。

【0104】

一部の実施形態によれば、該相互作用が該アミノ酸配列の少なくとも4個のアミノ酸によるものである。

10

【0105】

具体的な一実施形態によれば、該相互作用が、ヒトp53のアミノ酸Trp146および/またはGln144とのものである。この相互作用は、おそらく、pCAP 250のSerまたは本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるものである。

【0106】

具体的な一実施形態によれば、該相互作用がヒトp53のアミノ酸Tyr126、Asn128および/またはAsp268とのものである。

【0107】

別の具体的な実施形態によれば、該相互作用が、pCAP 250のAsp10または本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるヒトp53のアミノ酸Lys101とのものである。

20

【0108】

別の具体的な実施形態によれば、該相互作用が、pCAP 250のAsp10または本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるヒトp53のアミノ酸Thr102とのものである。

【0109】

別の具体的な実施形態によれば、該相互作用が、pCAP 250のThr6または本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるヒトp53のアミノ酸Phe113とのものである。

30

【0110】

別の具体的な実施形態によれば、該相互作用が、pCAP 250のSer5または本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるヒトp53のアミノ酸Trp146とのものである。

【0111】

別の具体的な実施形態によれば、該相互作用が、pCAP 250のThr6または本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるヒトp53のアミノ酸Ser5とのものである。

【0112】

別の具体的な実施形態によれば、該相互作用が、pCAP 250のThr6または本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるヒトp53のアミノ酸His8とのものである。

40

【0113】

別の具体的な実施形態によれば、該相互作用が、pCAP 250のSer5または本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるヒトp53のアミノ酸Gly112とのものである。

【0114】

別の具体的な実施形態によれば、該相互作用が、pCAP 250のThr6または本明細書において以下にさらに記載する類似構造内の同様のものによるヒトp53のアミノ酸

50

G l y 1 1 2 とのものである。

【 0 1 1 5 】

該相互作用のための p 5 3 D B D の表面上の他の提案される位置を図 6 A ~ C (これは本明細書の一部とみなし、ここで、各可能性は独立した実施形態を表す) に示す。

【 0 1 1 6 】

該相互作用のための p 5 3 D B D の表面上の他の提案される位置を図 9 ~ 1 4 (これは本明細書の一部とみなし、ここで、各可能性は独立した実施形態を表す) に示す。

【 0 1 1 7 】

該ペプチド内または該 D B D 内のいずれかの該相互作用に極めて重要なアミノ酸を解明する方法は当該技術分野でよく知られており、限定されないが、結晶学ならびにコンピューターベースのアルゴリズム、例えば Anchor Dock (Ben Shimon Structure, 2015 May 5; 23(5): 929-40)、Virtual crystallographic Calculators V. 2. などの使用が挙げられる。

10

【 0 1 1 8 】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドがコンセンサスモチーフを含むものである。

【 0 1 1 9 】

用語「コンセンサスモチーフ」は、本明細書で用いる場合、連続であっても非連続であってもよい少なくとも 3 個のアミノ酸、4、5 または 6 個のアミノ酸のアミノ酸配列をいう。具体的な一実施形態によれば、コンセンサスモチーフは連続 6 アミノ酸長である。

20

【 0 1 2 0 】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドが：

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ (配列番号：53)

のアミノ酸配列を含むものであり、

ここで、

X₁ および X₅ は正荷電アミノ酸であり；

X₂ は、Ser、Thr、Asn、Gln、Pro、Ala および Gly からなる群より選択され；

X₃ は任意のアミノ酸であり；

X₄ および X₆ は、メチルアミノおよび - ブレイカーアミノ酸からなる群より選択される。

30

【 0 1 2 1 】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドが：

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ (配列番号：54)

のアミノ酸配列を含むものであり、

ここで、

X₁ および X₅ は、His、Arg および Lys からなる群より選択され；

X₂ は、Ser、Thr、Asn、Gln、Pro、Ala および Gly からなる群より選択され；

X₃、X₄、X₆ は任意のアミノ酸である。

40

【 0 1 2 2 】

本明細書で用いる場合、「正荷電アミノ酸」は、生理学的 pH で正電荷を有し得る(すなわち、プロトン化され得る)アミノ酸である。

【 0 1 2 3 】

一実施形態によれば、正荷電アミノ酸が、ジアミノ酪酸(Dab)、Arg および Lys からなる群より選択される(である)。

【 0 1 2 4 】

具体的な一実施形態によれば、X₃ が D - アミノ酸である。

【 0 1 2 5 】

具体的な一実施形態によれば、X₃ が、リン酸化型(例えば、ホスホセリン)またはその

50

リン酸化模倣体（例えば、G l uもしくはA s p）である。

【0126】

具体的な一実施形態によれば、X₃が、リン酸化が可能でないアミノ酸（例えば、V a l）である。

【0127】

具体的な一実施形態によれば、X₃が非水素結合性アミノ酸（例えば、A l a）である。

【0128】

具体的な一実施形態によれば、X₃が、極性無電荷アミノ酸（例えば、S e r）および疎水性アミノ酸（例えば、I l e）からなる群より選択される。

【0129】

具体的な一実施形態によれば、X₂がS e rである。

【0130】

具体的な一実施形態によれば、X₄およびX₆が、S e r、T h r、P r o、A l aおよびG l yからなる群より選択される。

【0131】

具体的な一実施形態によれば、X₄がメチルアミノ酸またはブレイカー、例えば、P r o、A i bまたはA l aである。

【0132】

具体的な一実施形態によれば、X₄がメチルアミノ酸である。

【0133】

具体的な一実施形態によれば、X₆がA l aである。

【0134】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドがアミノ酸配列H S A P H P（配列番号：46）を有するものである。

【0135】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドが、前記アミノ酸配列のC末端に結合している少なくとも1個のさらなるアミノ酸（X₇）を含むものである。

【0136】

具体的な一実施形態によれば、該少なくとも1個のさらなるアミノ酸が負荷電アミノ酸（すなわち、典型的には、生理学的pHで負電荷を有する（すなわち、脱プロトン化される）アミノ酸）または小分子アミノ酸（例えば、G l y、A l a、V a l）である。

【0137】

具体的な一実施形態によれば、該少なくとも1個のさらなるアミノ酸が、A s p、G l u、G l y、A l aおよびS e rからなる群より選択される。

【0138】

具体的な一実施形態によれば、該少なくとも1個の負荷電アミノ酸がA s pである。

【0139】

具体的な一実施形態によれば、該少なくとも1個のさらなるアミノ酸が2個のさらなるアミノ酸（X₇-X₈）を含み、前記X₈が、H i s、D a b、A s pおよびG l uからなる群より選択される。

【0140】

具体的な一実施形態によれば、該少なくとも1個の負荷電アミノ酸がA s pまたは連続する2個のA s p残基である。

【0141】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドが、前記アミノ酸配列のN末端に結合している少なくとも1個のさらなるアミノ酸を含むものである。

【0142】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドが、前記アミノ酸配列のN末端に結合している少なくとも2個のさらなるアミノ酸を含むものである。

【0143】

10

20

30

40

50

具体的な一実施形態によれば、前記アミノ酸配列のN末端に結合している該少なくとも1個のさらなるアミノ酸がA r gまたは連続する2個のA r g残基である。

【0144】

該D B Dに対する該ペプチドの結合は、当該技術分野で知られた任意の方法を用いて、例えば、可溶性D B Dを競合剤として使用する競合アッセイを用いて調べることができる。

【0145】

用語「組換えまたは合成のペプチド」は、本明細書で用いる場合、当該技術分野で知られた標準的なバイオテクノロジーによる方法によって、例えば、細菌内での発現または固相ペプチド合成(S P P S)によって作製されたペプチドをいう。

【0146】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドがさらに細胞膜透過部分を含むものであり、これは、該ペプチドのN末端に結合していても、該ペプチドのC末端に結合していても、該ペプチドの両末端に結合していてもよい。また、この部分は、該D B Dに対する該ペプチドの結合に干渉しない限り、末端ではなく該ペプチドの主部に結合していてもよいことは認識されよう。この部分は、天然状態では同じ様式(すなわち、位置またはケミストリー)で該ペプチドに結合していない異種部分であることは認識されよう。

【0147】

用語「浸透性」は、本明細書で用いる場合、薬剤または物質がバリア、膜または皮膚層を透過する、しみこむ、または全体に拡散することができる能力をいう。「細胞浸透性」または「細胞透過」部分は、分子が膜を透過するのを助長または向上させることができる当該技術分野で知られた任意の分子をいう。

【0148】

本明細書で用いる場合、フレーズ「浸透性向上性部分」は、結合した該ペプチド(あれば)が細胞膜を通過して輸送されるのを向上させる薬剤をいう。

【0149】

細胞内への組成物の浸透性を能動的もしくは受動的に助長する、または向上させる当該技術分野で知られた任意の部分が、本発明による該ペプチドのコアとのコンジュゲーションに使用され得る。非限定的な例としては：疎水性部分、例えば脂肪酸、ステロイドおよびバルキーな芳香族もしくは脂肪族の化合物；細胞膜受容体もしくは担体を有するものであり得る部分、例えばステロイド、ビタミン類および糖類、天然アミノ酸(例えば、正荷電アミノ酸、例えばL y sもしくはA r g)および非天然アミノ酸ならびにタンパク質性部分、例えばトランスポーターペプチド(「細胞膜透過ペプチド」もしくはC P Pとも称される)、ポリアルギニンもしくはポリリシン、その組合せまたは抗体が挙げられる。一部の実施形態によれば、該タンパク質性部分がC P Pである。一部の実施形態によれば、該タンパク質性部分がポリアルギニンである。一部の実施形態によれば、疎水性部分が脂質部分またはアミノ酸部分である。本発明の一部の実施形態によれば、細胞膜透過部分は、タンパク質性部分と脂質ベースの部分の組合せ(例えば、該ペプチドのN末端に一方およびC末端に他方)である。

【0150】

細胞膜透過ペプチド(C P P)は、ほぼどの細胞の内側にもアクセスできる能力を有する短いペプチド(40個のアミノ酸)である。このペプチドはカチオン性が高く、通常、アミノ酸アルギニンおよびリシンを高含有である。実際に、本発明者らは、正荷電アミノ酸(いずれかのペプチド末端に)またはポリカチオンアミノ酸(少なくとも2、例えば2~12個)のポリ-A r gを使用し、該ペプチドに細胞浸透性を付与した。このペプチドは、細胞内に、共有結合および非共有結合によってコンジュゲートされた多種多様な積荷、例えばタンパク質、オリゴヌクレオチド、さらには200nmのリボソームをも運ぶという並外れた特性を有する。したがって、さらなる例示的な実施形態によれば、C P Pは、該ペプチドを細胞の内側に輸送するために使用され得る。

【0151】

T A T(H I V - 1由来の転写アクチベータ)、p A n t p(ペネトラチンとも称される

10

20

30

40

50

、ショウジョウバエのアンテナペディア (*Drosophila antennapedia*) ホメオドメイン転写因子) および VP22 (単純ヘルペルウイルス由来) は、細胞内に無毒性で効率的な様式で進入することができ、本発明の一部の実施形態での使用に好適であり得る CPP の例である。CPP - 積み荷コンジュゲートの作製およびかかるコンジュゲートでの細胞の感染のためのプロトコルは、例えば、L Theodore et al. [The Journal of Neuroscience, (1995) 15 (11): 7158 - 7167]、Fawell S, et al. [Proc Natl Acad Sci USA, (1994) 91: 664 - 668]、および Jing Bian et al. [Circulation Research (2007) 100: 1626 - 1633] をみるとよい。

10

【0152】

しかしながら、本開示はそれに限定されず、当業者に知られた任意の適当な透過剤が使用され得る。

【0153】

本発明のペプチドが細胞膜透過ペプチドに結合されている場合、ペプチドの全長は 50 個以下のアミノ酸、40 個以下のアミノ酸、35 個以下のアミノ酸、30 個以下のアミノ酸、25 個以下のアミノ酸、22 個以下のアミノ酸、20 個以下のアミノ酸、15 個以下のアミノ酸、12 個以下のアミノ酸、10 個以下のアミノ酸、9 個以下のアミノ酸、8 個以下のアミノ酸、または 7 個以下のアミノ酸であることが想定される。

【0154】

20

非タンパク質性の細胞膜透過部分の非限定的な例としては：疎水性部分、例えば脂質、脂肪酸、ステロイドおよびバルキーな芳香族もしくは脂肪族の化合物；細胞膜受容体もしくは担体を有するものであり得る部分、例えばステロイド、ビタミン類および糖類、ナノ粒子ならびにリボソームが挙げられる。

【0155】

用語「脂肪酸部分」は、本明細書で用いる場合、対応する完全脂肪酸起源の分子と同様の特定の一組の化学的および薬理学的特徴を示す脂肪酸の一部をいう。この用語はさらに、脂肪（カルボン酸）酸のアシル成分を含む任意の分子種および/または分子断片をいう。

【0156】

本発明による浸透性向上性部分は、好ましくは、該ペプチドの配列に直接結合またはリンカーによって共有結合により連結され、ペプチドコンジュゲートを形成するものである。浸透性向上性部分は、該ペプチドの部分内の任意の位置に直接またはスペーサーを介して、好ましくは該ペプチドのアミノ末端に連結され得る。一部の特定の実施形態によれば、浸透性向上性部分は脂肪酸である。

30

【0157】

本発明による疎水性部分は、好ましくは脂質部分またはアミノ酸部分を含むものであり得る。具体的な一実施形態によれば、疎水性部分は：リン脂質、ステロイド、スフィンゴシン、セラミド、オクチル - グリシン、2 - シクロヘキシルアラニン、ベンゾリルフェニルアラニン、プロピオニル (C₃)；ブタノイル (C₄)；ペンタノイル (C₅)；カプロイル (C₆)；ヘプタノイル (C₇)；カプリロイル (C₈)；ノナノイル (C₉)；カプリル (C₁₀)；ウンデカノイル (C₁₁)；ラウロイル (C₁₂)；トリデカノイル (C₁₃)；ミリストイル (C₁₄)；ペンタデカノイル (C₁₅)；パルミトイル (C₁₆)；フタノイル ((CH₃)₄)；ヘプタデカノイル (C₁₇)；ステアロイル (C₁₈)；ノナデカノイル (C₁₉)；アラキドイル (C₂₀)；ヘンエイコサノイル (heniecosanoyl) (C₂₁)；ベヘノイル (C₂₂)；トルシサノイル (trucisanoyl) (C₂₃)；およびリグノセロイル (C₂₄) からなる群より選択され；ここで、前記疎水性部分は前記キメラポリペプチドに、アミド結合、スルフヒドリル、アミン、アルコール、フェノール基または炭素 - 炭素結合により結合している。

40

【0158】

本発明に従って使用され得る脂質性部分の他の例：リポフェクタミン、Transfec

50

tace、Transfectam、Cytfectin、DMRIE、DLRIE、GAP-DLRIE、DOTAP、DOPE、DMEAP、DODMP、DOPC、DDAB、DOSPA、EDLPC、EDMPC、DPH、TMADPH、CTAB、リシル-PE、DC-Cho、-アラニルコレステロール；DCGS、DPPEs、DCPE、DMAP、DMPE、DOGS、DOHME、DPEPC、ブルロニック、Tween、BRIL、プラズマロゲン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、グリセロール-3-エチルホスファチジルコリン、ジメチルアンモニウムプロパン、トリメチルアンモニウムプロパン、ジエチルアンモニウムプロパン、トリエチルアンモニウムプロパン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド、スフィンゴ脂質、スフィンゴミエリン、リゾ脂質、糖脂質、スルファチド、スフィンゴ糖脂質、コレステロール、コレステロールのエステル、コレステロールの塩、油、N-スクシニルジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール、1,3-ジパルミトイル-2-スクシニルグリセロール、1,2-ジパルミトイル-sn-3-スクシニルグリセロール、1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロホスファチジルエタノールアミン、パルミトイルホモシステイン、N,N'-ビス(ドデシルアミノカルボニルメチレン)-N,N'-ビス((N,N,N-トリメチルアンモニウムエチル-アミノカルボニルメチレン)エチレンジアミン)テトラヨージド；N,N"-ビス(ヘキサデシルアミノカルボニルメチレン)-N,N'-N"-トリス((N,N,N-トリメチルアンモニウムエチルアミノカルボニルメチレンジエチレントリアミン)ヘキサヨージド；N,N'-ビス(ドデシルアミノカルボニルメチレン)-N,N"-ビス((N,N,N-トリメチルアンモニウムエチルアミノカルボニルメチレン)シクロヘキシレン-1,4-ジアミン)テトラヨージド；1,7,7-テトラ-((N,N,N,N-テトラメチルアンモニウムエチルアミノ-カルボニルメチレン)-3-ヘキサデシルアミノカルボニル-メチレン-1,3,7-トリアザヘプタン)ヘプタヨージド；N,N,N',N'-テトラ((N,N,N,N-トリメチルアンモニウムエチルアミノカルボニルメチレン)-N'-((1,2-ジオレオイルグリセロ-3-ホスホエタノールアミノカルボニルメチレン)ジエチレントリアミン)テトラヨージド；ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、脂肪酸、リゾ脂質、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンシトール、スフィンゴ脂質、糖脂質、グルコリピド、スルファチド、スフィンゴ糖脂質、ホスファチジン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、オレイン酸、ポリマー担持脂質、スルホン化糖担持脂質、コレステロール、トコフェロールヘミスクシネート、エーテル結合した脂肪酸を有する脂質、エステル結合した脂肪酸を有する脂質、重合脂質、リン酸ジアセチル、ステアリンアミン、カルジオリピン、6~8炭素長の脂肪酸を有するリン脂質、非対称アシル鎖を有するリン脂質、6-(5-コレステレン-3b-イルオキシ)-1-チオ-b-D-ガラクトピラノシド、ジガラクトシルジグリセリド、6-(5-コレステレン-3b-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-b-D-ガラクトピラノシド、6-(5-コレステレン-3b-イルオキシ)ヘキシル-6-アミノ-6-デオキシ-1-チオ-a-D-マンノピラノシド、12-(((7'-ジエチルアミノ-クマリン-3-イル)カルボニル)メチルアミノ)-オクタデカン酸；N-[12-(((7'-ジエチルアミノクマリン-3-イル)カルボニル)メチル-アミノ)オクタデカノイル]-2-アミノパルミチン酸；コレステリル)4'-トリメチル-アンモニオ)ブタノエート；N-スクシニルジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン；1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール；1,2-ジパルミトイル-sn-3-スクシニル-グリセロール；1,3-ジパルミトイル-2-スクシニルグリセロール、1-ヘキサデシル-2-パルミトイルグリセロ-ホスホエタノールアミン、およびパルミトイルホモシステイン。

【0159】

用語「ポリペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において互換的に用いており、アミノ酸残基のポリマーをいう。この用語は、1個以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の化学的的人工アナログであるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在する

10

20

30

40

50

アミノ酸ポリマーに適用される。

【0160】

用語「ペプチド」は、本明細書で用いる場合、天然状態のペプチド（分解産物、合成により合成されたペプチドまたは組換えペプチドのいずれも）およびペプチド模倣物（典型的には、合成により合成されたペプチド）、ならびにペプチドアナログであり、例えば、該ペプチドを体内でより安定にする修飾または細胞内への透過能をより大きくする修飾を有するものであり得るペプチドおよび半ペプチドを包含している。かかる修飾としては、限定されないが、N末端の修飾、C末端の修飾、ペプチド結合の修飾、主鎖の修飾および残基の修飾が挙げられる。ペプチド模倣化合物の調製方法は当該技術分野でよく知られており、例えば、Quantitative Drug Design, C. A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992) に明記されており、これは、引用により、あたかも本明細書にすべてが示されているかのごとく組み込まれる。これに関するさらなる詳細は本明細書において以下に示す。

10

【0161】

該ペプチド内のペプチド結合（-CO-NH-）を、例えば、N-メチル化アミド結合（-N(CH₃)-CO-）、エステル結合（-C(=O)-O-）、ケトメチレン結合（-CO-CH₂-）、スルフィニルメチレン結合（-S(=O)-CH₂-）、-アザ結合（-NH-N(R)-CO-）（ここで、Rは任意のアルキル（例えば、メチル）である）、アミン結合（-CH₂-NH-）、スルフィド結合（-CH₂-S-）、エチレン結合（-CH₂-CH₂-）、ヒドロキシエチレン結合（-CH(OH)-CH₂-）、チオアミド結合（-CS-NH-）、オレフィン性二重結合（-CH=CH-）、含フッ素オレフィン性二重結合（-CF=CH-）、レトロアミド結合（-NH-CO-）、ペプチド誘導体（-N(R)-CH₂-CO-）（ここで、Rは、炭素原子上に天然状態で存在している「通常の」側鎖である）で置き換えてもよい。

20

【0162】

このような修飾は、該ペプチド鎖上のどの結合に行なってもよく、さらには、いくつか（2～3）の結合に同時に行なってもよい。

【0163】

「保存的置換」は、あるクラスのアミノ酸の同じクラスのアミノ酸での置換をいい、ここで、クラスは、例えば、標準的なデイホフ頻度交換行列またはBLOSUM行列による測定時の、共通する物理化学的なアミノ酸側鎖の特性および自然界にみられる相同タンパク質における高い置換頻度によって規定される。アミノ酸側鎖の6つの一般的なクラスがカテゴリ化されており、：クラスI（Cys）；クラスII（Ser、Thr、Pro、Ala、Gly）；クラスIII（Asn、Asp、Gln、Glu）；クラスIV（His、Arg、Lys）；クラスV（He、Leu、Val、Met）；およびクラスVI（Phe、Tyr、Trp）を含む。例えば、Aspの別のクラスIII残基、例えばAsn、GlnまたはGluでの置換は保存的置換である。

30

【0164】

他の分類としては、正電荷アミノ酸（Arg、His、Lys）、負電荷アミノ酸（Asp、Glu）、極性無電荷（Ser、Thr、Asn、Gln）、疎水性側鎖（Ala、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Tyr、Trp）が挙げられる。

40

【0165】

「非保存的置換」は、あるクラスのアミノ酸の別のクラスのアミノ酸での置換；例えば、クラスII残基であるAlaのクラスIII残基、例えばAsp、Asn、GluまたはGlnでの置換をいう。

【0166】

天然の芳香族アミノ酸Trp、TyrおよびPheを、非天然の芳香族アミノ酸、例えば1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸（Tic）、ナフチルアラニン、Pheの環メチル化誘導体、Pheのハロゲン化誘導体またはO-メチル-Tyr

50

で置換してもよい。他の合成の選択肢を本明細書において以下に表 2 に示す。

【 0 1 6 7 】

また、本発明の一部の実施形態のペプチドは、1 個以上の修飾アミノ酸または 1 個以上の非アミノ酸モノマー（例えば、脂肪酸、複雑な糖鎖など）を含むものであってもよい。

【 0 1 6 8 】

用語「アミノ酸（“ amino acid ”または“ amino acids ”）」は、天然に存在する 20 種類のアミノ酸；しばしばインビボで翻訳後修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホトレオニンなど；ならびに他の珍しいアミノ酸、例えば限定されないが、2 - アミノアジピン酸、ヒドロキシリシン、イソデスモシン、ノル - バリン、ノル - ロイシンおよびオルニチンを包含していると理解されたい。さらに、用語「アミノ酸」は、D - アミノ酸および L - アミノ酸の両方を包含している。

【 0 1 6 9 】

以下の表 1 および 2 に、本発明の一部の実施形態で使用され得る天然に存在するアミノ酸（表 1 ）および非通常または修飾アミノ酸（例えば合成のもの、表 2 ）を示す。

【表 1】

アミノ酸	三文字表記	一文字記号
アラニン	A l a	A
アルギニン	A r g	R
アスパラギン	A s n	N
アスパラギン酸	A s p	D
システイン	C y s	C
グルタミン	G l n	Q
グルタミン酸	G l u	E
グリシン	G l y	G
ヒスチジン	H i s	H
イソロイシン	I l e	I
ロイシン	L e u	L
リシン	L y s	K
メチオニン	M e t	M
フェニルアラニン	P h e	F
プロリン	P r o	P
セリン	S e r	S
トレオニン	T h r	T
トリプトファン	T r p	W
チロシン	T y r	Y
バリン	V a l	V
上記の任意のアミノ酸	X a a	X

【表 2】

非通常アミノ酸	コード	非通常アミノ酸	コード
オルニチン	O r n	ヒドロキシプロリン	H y p
α-アミノ酸	A b u	アミノノルボルニル-カルボキシレート	N o r b
D-アラニン	D a l a	アミノシクロプロパン-カルボキシレート	C p r o
D-アルギニン	D a r g	N-（3-グアニジノプロピル）グリシン	N a r g
D-アスパラギン	D a s n	N-（カルバミルメチル）グリシン	N a s n
D-アスパラギン酸	D a s p	N-（カルボキシメチル）グリシン	N a s p
D-システイン	D c y s	N-（チオメチル）グリシン	N c y s
D-グルタミン	D g l n	N-（2-カルバミルエチル）グリシン	N g l n
D-グルタミン酸	D g l u	N-（2-カルボキシエチル）グリシン	N g l u
D-ヒスチジン	D h i s	N-（イミダゾリルエチル）グリシン	N h i s
D-イソロイシン	D i l e	N-（1-メチルプロピル）グリシン	N i l e
D-ロイシン	D i e u	N-（2-メチルプロピル）グリシン	N i e u
D-リシン	D i y s	N-（4-アミノプロピル）グリシン	N i y s
D-メチオニン	D m e t	N-（2-メチルチオエチル）グリシン	N m e t
D-オルニチン	D o r n	N-（3-アミノプロピル）グリシン	N o r n
D-フェニルアラニン	D p h e	N-ベンジルグリシン	N p h e
D-プロリン	D p r o	N-（ヒドロキシメチル）グリシン	N s e r
D-セリン	D s e r	N-（1-ヒドロキシエチル）グリシン	N t h r
D-トレオニン	D t h r	N-（3-インドリルエチル）グリシン	N h t r p
D-トリプトファン	D t r p	N-（p-ヒドロキシフェニル）グリシン	N t y r
D-チロシン	D t y r	N-（1-メチルエチル）グリシン	N v a l
D-バリン	D v a l	N-メチルグリシン	N m g l y
D-N-メチルアラニン	D n m a l a	L-N-メチルアラニン	N m a l a
D-N-メチルアルギニン	D n m a r g	L-N-メチルアルギニン	N m a r g
D-N-メチルアスパラギン	D n m a s n	L-N-メチルアスパラギン	N m a s n
D-N-メチルアスパラテート（aspartate）	D n m a s p	L-N-メチルアスパラギン酸	N m a s p
D-N-メチルシステイン	D n m c y s	L-N-メチルシステイン	N m c y s
D-N-メチルグルタミン	D n m g l n	L-N-メチルグルタミン	N m g l n
D-N-メチルグルタメート	D n m g l u	L-N-メチルグルタミン酸	N m g l u
D-N-メチルヒスチジン	D n m h i s	L-N-メチルヒスチジン	N m h i s
D-N-メチルイソロイシン	D n m i l e	L-N-メチルイソロイシン（isoileu o i n e）	N m i l e
D-N-メチルロイシン	D n m l e u	L-N-メチルロイシン	N m l e u
D-N-メチルリシン	D n m l y s	L-N-メチルリシン	N m l y s
D-N-メチルメチオニン	D n m m e t	L-N-メチルメチオニン	N m m e t
D-N-メチルオルニチン	D n m o r n	L-N-メチルオルニチン	N m o r n
D-N-メチルフェニルアラニン	D n m p h e	L-N-メチルフェニルアラニン	N m p h e
D-N-メチルプロリン	D n m p r o	L-N-メチルプロリン	N m p r o
D-N-メチルセリン	D n m s e r	L-N-メチルセリン	N m s e r
D-N-メチルトレオニン	D n m t h r	L-N-メチルトレオニン	N m t h r
D-N-メチルトリプトファン	D n m t r p	L-N-メチルトリプトファン	N m t r p

10

20

30

40

50

D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	L-N-メチルチロシン	Nmtyr
D-N-メチルバリン	Dnmval	L-N-メチルバリン	Nmval
L-ノルロイシン	Nlie	L-N-メチルノルロイシン	Nmnlie
L-ノルバリン	Nve	L-N-メチルノルバリン	Nmnve
L-エチルグリシン	Ete	L-N-メチル-エチルグリシン	Nmete
L-トープチルグリシン	Tbue	L-N-メチル-トープチルグリシン	Nmtbue
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L-N-メチル-ホモフェニルアラニン	Nmhphe
α-ナフチルアラニン	Anap	N-メチル-α-ナフチルアラニン	Nmanap
ベニシラミン	Pen	N-メチルベニシラミン	Nmpen
γ-アミノ酪酸	Gabu	N-メチル-γ-アミノブチレート	Nmgabu
シクロヘキシルアラニン	Chexa	N-メチル-シクロヘキシルアラニン	Nmchexa
シクロペンチルアラニン	Cpen	N-メチル-シクロペンチルアラニン	Nmpen
α-アミノ-α-メチルブチレート	Aebu	N-メチル-α-アミノ-α-メチルブチレート	Nmaebu
α-アミノイソ酪酸	Aib	N-メチル-α-アミノイソブチレート	Nmaib
D-α-メチルアルギニン	Dmaarg	L-α-メチルアルギニン	Maarg
D-α-メチルアスパラギン	Dmasn	L-α-メチルアスパラギン	Masn
D-α-メチルアスパルテート	Dmasp	L-α-メチルアスパルテート	Masp
D-α-メチルシステイン	Dmoy	L-α-メチルシステイン	Moy
D-α-メチルグルタミン	Dmgln	L-α-メチルグルタミン	Mgln
D-α-メチルグルタミン酸	Dmglu	L-α-メチルグルタメート	Mglu
D-α-メチルヒスチジン	Dmhis	L-α-メチルヒスチジン	Mhis
D-α-メチルイソロイシン	Dmle	L-α-メチルイソロイシン	Mle
D-α-メチルロイシン	Dmleu	L-α-メチルロイシン	Mleu
D-α-メチルリシン	Dmlys	L-α-メチルリシン	Mlys
D-α-メチルメチオニン	Dmmet	L-α-メチルメチオニン	Mmet
D-α-メチルオルニチン	Dmor	L-α-メチルオルニチン	Mor
D-α-メチルフェニルアラニン	Dmphe	L-α-メチルフェニルアラニン	Mphe

10

20

D-α-メチルプロリン	Dmpro	L-α-メチルプロリン	Mpro
D-α-メチルセリン	Dmse	L-α-メチルセリン	Mse
D-α-メチルトレオニン	Dmthr	L-α-メチルトレオニン	Mthr
D-α-メチルトリプトファン	Dmtrp	L-α-メチルトリプトファン	Mtrp
D-α-メチルチロシン	Dmtyr	L-α-メチルチロシン	Mtyr
D-α-メチルバリン	Dmval	L-α-メチルバリン	Mval
N-シクロブチルグリシン	Ncbut	L-α-メチルノルバリン	Mnve
N-シクロヘプチルグリシン	Nchep	L-α-メチルエチルグリシン	Mete
N-シクロヘキシルグリシン	Nchex	L-α-メチル-トープチルグリシン	Mtbue
N-シクロデシルグリシン	Ncdec	L-α-メチル-ホモフェニルアラニン	Mhphe
N-シクロドデシルグリシン	Ncdod	α-メチル-α-ナフチルアラニン	Manap
N-シクロオクタチルグリシン	Ncoot	α-メチルベニシラミン	Mpen
N-シクロプロピルグリシン	Ncp	α-メチル-γ-アミノブチレート	Mgabue
N-シクロウンデシルグリシン	Ncund	α-メチル-シクロヘキシルアラニン	Mchexa
N-(2-アミノエチル)グリシン	Naee	α-メチル-シクロペンチルアラニン	Mcpen
N-(2,2-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhm	N-(N-(2,2-ジフェニルエチル)カルバミルメチル-グリシン	Nnbhm
N-(3,3-ジフェニルプロピル)グリシン	Nbhe	N-(N-(3,3-ジフェニルプロピル)カルバミルメチル-グリシン	Nnbhe
1-カルボキシー-1-(2,2-ジフェニルエチルアミノ)シクロプロパン	Nmbc	1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸	Tico
ホスホセリン	pSer	ホスホトレオニン	pThr
ホスホチロシン	pTyr	O-メチル-チロシン	
2-アミノアジピン酸		ヒドロキシリシン	

30

40

【0170】

本発明の一部の実施形態のペプチドは、好ましくは線状形態で使用されるが、環化がペプチドの特徴に大幅に干渉しない場合は、環状形態の該ペプチドもまた使用され得ることは認識されよう。

【0171】

50

バイオアベイラビリティを改善するため、該ペプチドに少なくとも1個のDアミノ酸を含めてもよい(例えば、2~7、2~6、2~5、2~4、2~3個)。具体的な一実施形態によれば、該ペプチドのすべてのアミノ酸がDアミノ酸である。

【0172】

一部の実施形態では、該ペプチドが化学修飾されたものである。

【0173】

「化学修飾された」とは、アミノ酸が、天然のプロセスまたは当該技術分野でよく知られた化学的修飾手法のいずれかによって修飾されていることをいう。数多くの既知の修飾の中でも、典型的だが排他的でない例としては：アセチル化、アシル化、アミド化、ADP-リボシル化、グリコシル化、グリコサミノグリカン化、GPIアンカー形成、脂質または脂質誘導体の共有結合、メチル化、ミリストイル化(myristylation)、ペグ化、プレニル化、リン酸化、ユビキチン化、または任意の同様のプロセスが挙げられる(例えば配列番号：2、17~19参照)。

【0174】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドはC末端のアミド化を含むものであり得る。

【0175】

さらに、択一的または付加的に、該ペプチドを非タンパク質性の無毒性部分に、例えば限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリ(スチレンコマレイン酸無水物)(SMA)およびジビニルエーテルとマレイン酸無水物のコポリマー(DIVEMA)にコンジュゲートさせてもよい。

【0176】

また、本発明のペプチドに、所望の活性(例えば、p53変異型の再活性化)を示すペプチドホモログ(また、本明細書において機能的等価物とも称する)を使用してもよいことは認識され、ここで、ペプチドホモログの活性は、当該技術分野で知られた方法、例えば本明細書に記載の方法に従って調べる。かかるホモログは、配列番号：53または54または1(ただし、WO2015/019318に開示されたペプチド(例えば、配列番号：286~321ではないものとする)と、例えば、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一のものであり得る。

【0177】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドは、配列番号：8、412~464に示すアミノ酸配列を含むもの、または該配列番号に示すものである。

【0178】

具体的な一実施形態によれば、該ペプチドは、配列番号：429、448、449、446および462配列の群から選択される。

【0179】

一部の特定の実施形態では、該ペプチドが、少なくとも部分的に変異型p53タンパク質のコンホメーションを野生型(WT)p53タンパク質のコンホメーションに変化させるものである。

【0180】

当該技術分野において、野生型p53タンパク質のみを特異的に認識する抗体が知られている。かかる抗体は、特定のp53タンパク質が、野生型であれ変異型であれ、野生型の機能性p53タンパク質のコンホメーションを保持しているかどうかを調べるのに非常に有用である。したがって、一部の特定の実施形態では、該ペプチドが、少なくとも部分的に変異型p53タンパク質のコンホメーションを、変異型p53タンパク質が、WT p53タンパク質に対して排他的に指向されるモノクローナル抗体によって、またはWT p53タンパク質のコンホメーションを保持しているp53タンパク質に対するモノクロ

10

20

30

40

50

ーナル抗体によって認識されるように変化させるものである。一部の特定の実施形態では、該モノクローナル抗体が A b 1 6 2 0 である。

【 0 1 8 1 】

p 5 3 はどちらの対立遺伝子からも発現されるため、細胞内 p 5 3 の全体的な内容は、野生型 (w t / w t)、w t および変異型 p 5 3 の混合 (w t / m u t) または変異型 p 5 3 のみ (両方の対立遺伝子が発現している場合 (m u t / m u t)、もしくは一方の対立遺伝子が欠失している場合 (m u t / -)) のいずれかであり得ることは理解されよう。がんでは、この状況は多くの場合、w t / m u t、m u t / m u t または m u t / - である。p 5 3 は四量体として機能を果たすため、変異型 p 5 3 タンパク質は、がんの細胞内に存在しているかもしれない野生型 p 5 3 タンパク質の活性を消去し得る。したがって、本発明によって提供されるペプチドは、野生型 p 5 3 タンパク質レベルの増大が豊かでないがんの処置に特に有用である。

10

【 0 1 8 2 】

一部の特定の実施形態では、該ペプチドが、少なくとも部分的に変異型 p 5 3 タンパク質の活性を W T p 5 3 タンパク質の少なくとも 1 つの活性に復元させるものである。

【 0 1 8 3 】

本明細書で用いる場合、用語「低下する」とは、特定の表現型が、同じアッセイ条件下で対照 (例えば、対照ビヒクルで処置した、または全く処置していない同じ細胞 / 動物の系) と比べて少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 5 % またはさらには 1 0 0 %、統計学的に有意に減少することをいう。

20

【 0 1 8 4 】

本明細書で用いる場合、用語「高まる / 増大する (i n c r e a s i n g)」または「改善する」とは、特定の表現型が、同じアッセイ条件下で対照 (例えば、対照ビヒクルで処置した、または全く処置していない同じ細胞 / 動物の系) と比べて少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 5 % またはさらには 1 0 0 %、統計学的に有意に高まる / 増大することをいう。

【 0 1 8 5 】

用語「変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞」は、本明細書で用いる場合、少なくとも一方の対立遺伝子から変異型 p 5 3 タンパク質を発現する細胞をいう。一部の特定の実施形態では、用語「変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞」は「がん細胞」と互換的である。

30

【 0 1 8 6 】

用語「アポトーシス促進遺伝子」は、直接 (例えば、特定のカスパーゼ) または間接的 (例えば、シグナル伝達カスケードの一部として) のいずれかでアポトーシスに関与している遺伝子または多数の遺伝子をいう。

【 0 1 8 7 】

一部の特定の実施形態では、該活性が、変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞のバイアビリティを低下させることである。一部の特定の実施形態では、該活性が、変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞のアポトーシスを促進させることである。一部の特定の実施形態では、該活性が、前記変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞のアポトーシス促進遺伝子を活性化させることである。一部の特定の実施形態では、アポトーシス促進遺伝子が、C D 9 5、B a x、D R 4、D R 5、P U M A、N O X A、B i d、5 3 A I P 1 および P E R P からなる群より選択される。各可能性は本発明の個々の実施形態を表す。

40

【 0 1 8 8 】

一部の特定の実施形態では、該活性が、変異型 p 5 3 タンパク質発現細胞内の p 5 3 コンセンサス D N A 結合エレメントに対する結合である。一部の特定の実施形態では、該コンセンサス D N A 結合エレメントが、配列番号 : 5 5 および 5 6 に示すヌクレオチド配列を含むもの、または該ヌクレオチド配列からなるものである。

【 0 1 8 9 】

本発明の任意のペプチドによって誘導される細胞の変化をモニタリングする方法は当該技術分野で知られており、例えば、M T T 試験、これは、生細胞が、黄色の塩 M T T (3 -

50

(4、5 - ジメチルチアゾリル - 2) - 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウムブロミド) (Sigma , Aldrich St Louis , MO , USA) を青紫の不溶性ホルマザン沈殿物に還元する選択能に基づいたものである ; BrDuアッセイ [Cell Proliferation ELISA BrdU比色分析キット (Roche , Mannheim , Germany) ; TUNELアッセイ [Roche , Mannheim , Germany] ; アネキシンVアッセイ [ApoAlert (登録商標) Annexin V Apoptosis Kit (Clontech Laboratories , Inc. , CA , USA)] ; 老化関連 - - ガラクトシダーゼアッセイ (Dimri GP , Lee X , et al . 1995 . A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo . Proc Natl Acad Sci U S A 92 : 9363 - 9367) ; ならびに本明細書において以下にさらに記載する種々のRNAおよびタンパク質の検出方法 (発現レベルおよび / または活性レベルを検出するもの) が挙げられる。

10

【 0190 】

一部の特定の実施形態では、該結合が、内在性 p 53 標的遺伝子の少なくとも一部活性化をもたらすものである。一部の特定の実施形態では、該内在性標的遺伝子が、p 21、MDM2 および PUMA からなる群より選択される。各可能性は本発明の個々の実施形態を表す。

【 0191 】

20

一部の特定の実施形態では、変異型 p 53 タンパク質が、WT p 53 タンパク質と異なるコンホメーションのものである。一部の特定の実施形態では、変異型 p 53 タンパク質が、WT p 53 タンパク質と比べて少なくとも部分的に不活性化する。

【 0192 】

一部の特定の実施形態では、変異型 p 53 タンパク質が、WT p 53 タンパク質に対して指向されるモノクローナル抗体によって認識されないものである。一部の特定の実施形態では、変異型 p 53 タンパク質、該ペプチドに結合すると、WT p 53 タンパク質に対して指向されるモノクローナル抗体によって認識されるものである。一部の特定の実施形態では、該モノクローナル抗体が Ab 1620 である。

【 0193 】

30

一部の実施形態では、該再活性化性ペプチドは Mut - p 53 を、WT p 53 タンパク質と同様または同一の構造特性、生化学的特性、生理学的特性および / または機能特性を有するように再活性化させ得るものである。

【 0194 】

一部の実施形態により、約 3 ~ 25 個のアミノ酸の長さである Mut - p 53 再活性化ペプチドを提供する。一部の実施形態では、Mut - p 53 再活性化ペプチドが約 4 ~ 15 個のアミノ酸の長さである。一部の実施形態では、Mut - p 53 再活性化ペプチドが約 7 ~ 12 個のアミノ酸の長さである。一部の実施形態では、Mut - p 53 再活性化ペプチドが 7 個のアミノ酸の長さである。一部の実施形態では、Mut - p 53 再活性化ペプチドが 12 個のアミノ酸の長さである。各可能性は本発明の個々の実施形態を表す。

40

【 0195 】

本出願書類の至る箇所に他のペプチド長を記載している。各可能性は本発明の個々の実施形態を表す。

【 0196 】

一部の実施形態によれば、Mut - p 53 再活性化ペプチドは Mut - p 53 に、これが、WT p 53 結合エレメントをそのプロモーター内に有するレポーター遺伝子 (例えば、ルシフェラーゼ) をトランス活性化し得るように影響を及ぼし得るものである。一部の実施形態では、レポーター遺伝子のトランス活性化がインピトロ (例えば、試験管もしくはウェル内) で、またはインピボで、該レポーター遺伝子構築物を有する細胞内で行なわれ得る。

50

【0197】

一部の実施形態によれば、Mut - p53再活性化ペプチドは、変異したp53のDNA結合ドメイン(DBD)に結合し得るものである。一部の実施形態では、変異したp53は変異をそのDNA結合ドメイン(DBD)内に有するものである。

【0198】

用語「医薬組成物」は、本明細書で用いる場合、少なくとも1種類の医薬活性成分を含む任意の組成物をいう。

【0199】

用語「変異型p53タンパク質と関連している」とは、本明細書で用いる場合、任意の疾患、障害または病状が変異型p53タンパク質によって引き起こされるものであるか、あるいはその進行が、細胞または器官内における変異型p53タンパク質の存在と関連していることをいう。

10

【0200】

p53はどちらの対立遺伝子からも発現されるため、細胞内p53の全体的な内容は、野生型(wt/wt)、wtおよび変異型p53の混合(wt/mut)または変異型p53のみ(両方の対立遺伝子が発現している場合(mut/mut)、もしくは一方の対立遺伝子が欠失している場合(mut/-))のいずれかであり得ることは理解されよう。がんでは、この状況は多くの場合、wt/mut、mut/mutまたはmut/-である。p53は四量体として機能を果たすため、変異型p53タンパク質は、がんの細胞内に存在する野生型p53タンパク質の活性を消去し得る。したがって、本発明によって提供されるペプチドは、がんの処置に特に有用である。特筆すべきことに、該細胞は、2つより多いp53対立遺伝子を有し、そのうちの少なくとも1つが変異型p53であるものであってもよい。

20

【0201】

用語「治療有効量」は、本明細書で用いる場合、個体において疾患、障害または病状が低減、減少および/または抑止されるのに十分な本発明によるペプチド含有組成物の量をいう。

【0202】

本発明の一態様により、変異型p53タンパク質と関連している疾患、障害または病状の処置方法であって、処置を必要とする被験体に治療有効量の本明細書に記載の単離ペプチド(例えば、配列番号: 8、412~464)を投与し、それにより前記疾患、障害または病状を処置することを含む方法を提供する。

30

【0203】

本発明の一態様により、変異型p53タンパク質と関連している疾患、障害または病状の処置方法であって、処置を必要とする被験体に治療有効量で、ある空間および立体構成を有するアミノ酸配列を含む単離ペプチドを投与することを含み、該空間および立体構成が、該ペプチドがp53のDNA結合ドメイン(DBD)と、pCAP 250(配列番号: 1)が前記DBDに結合するのと同じ様式で結合することを可能にするものであり、前記ペプチドは少なくとも部分的に変異型p53タンパク質を再活性化させるものであり、前記治療有効量が0.01~0.3mg/kg/日または0.01~0.2mg/kg/日(例えば、0.01~0.35mg/kg/日、0.01~0.35mg/kg/日、0.01~0.15mg/kg/日、0.01~0.1mg/kg/日、0.01~0.095mg/kg/日、0.01~0.09mg/kg/日、0.01~0.085mg/kg/日、0.01~0.08mg/kg/日、0.01~0.075mg/kg/日、0.01~0.07mg/kg/日、0.01~0.065mg/kg/日、0.01~0.06mg/kg/日、0.01~0.055mg/kg/日、0.01~0.05mg/kg/日、0.01~0.45mg/kg/日、0.01~0.04mg/kg/日、0.01~0.035mg/kg/日、0.01~0.03mg/kg/日)であり、それにより前記疾患、障害または病状を処置する方法を提供する。

40

【0204】

50

本明細書において言及する場合、用語「疾患を処置する」または「病状を処置する」とは、少なくとも１種類の薬剤を含む疾患と関連している症状を改善するのに有効な組成物を投与して、該疾患の重症度を低下させる、もしくは該疾患を治癒すること、または、被験体において該疾患が起こるのを妨げることを指す。投与には、任意の投与経路が包含され得る。一部の実施形態では、疾患が、細胞、組織、器官、身体などにおける変異した p 5 3 の存在によって引き起こされる疾患または該存在と関連している疾患である。一部の実施形態では、疾患ががんである。一部の実施形態では、がんが、乳がん、結腸がん、卵巣がんおよび肺がんからなる群より選択される。

【 0 2 0 5 】

一部の実施形態では、がんが転移性がんである。

10

【 0 2 0 6 】

一部の実施形態では、がんが転移性乳がん、転移性結腸がん、転移性卵巣がんまたは転移性肺がんである。

【 0 2 0 7 】

各可能性は本発明の個々の実施形態を表す。一部の実施形態では、被験体가가哺乳類、例えばヒトである。一部の実施形態では、被験体が哺乳類の動物である。一部の実施形態では、被験体が哺乳類でない動物である。一部の実施形態では、被験体が、該疾患、病状または障害と診断された被験体である。

【 0 2 0 8 】

一部の実施形態では、がんが副腎皮質癌、肛門がん、膀胱がん、脳腫瘍、脳幹膠腫、脳腫瘍、小脳星状細胞腫、脳星状細胞腫 (c e r e b r a l a s t r o c y t o m a) 、上衣細胞腫、髄芽細胞腫、テント上原始神経外胚葉 (s u p r a t e n t o r i a l p r i m i t i v e n e u r o e c t o d e r m a l) 、松果体部腫瘍、視床下部神経膠腫、乳がん、カルチノイド腫瘍、癌、子宮頸がん、結腸がん、子宮内膜がん、食道がん、肝臓外胆管がん、ユーイングファミリー腫瘍 (p n e t) 、頭蓋外胚細胞腫瘍、目のがん、眼内黒色腫、胆嚢がん、胃がん、胚細胞腫瘍、性腺外、妊娠性絨毛腫瘍、頭頸部がん、下咽頭がん、島細胞癌、喉頭がん、白血病、急性リンパ芽球性、白血病、口腔がん、肝臓がん、肺がん、小細胞、リンパ腫、A I D S 関連、リンパ腫、中枢神経系 (原発性) 、リンパ腫、皮膚 T 細胞性、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキン病、悪性中皮腫、黒色腫、メルケル細胞癌、転移性扁平上皮癌、多発性骨髄腫、形質細胞性新生物、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性障害、鼻咽腔がん、神経芽細胞腫、口腔咽頭がん、骨肉腫、卵巣上皮がん、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵がん、外分泌、膵がん、島細胞癌、副鼻腔および鼻腔のがん、副甲状腺がん、陰茎がん、褐色細胞腫がん、下垂体がん、形質細胞新生物、前立腺がん、横紋筋肉腫、直腸がん、腎細胞がん、唾液腺がん、セザリー症候群、皮膚がん、皮膚 T 細胞性リンパ腫、皮膚がん、カポジ肉腫、皮膚がん、黒色腫、小腸のがん、軟部組織肉腫、軟部組織肉腫、精巣がん、胸腺腫、悪性、甲状腺がん、尿道がん、子宮がん、肉腫、珍しい小児がん、膣がん、外陰がんまたはウィルムス腫瘍である。

20

30

【 0 2 0 9 】

一部の実施形態では、がんが肺がんである。

【 0 2 1 0 】

一部の実施形態では、がんが卵巣がんである。

40

【 0 2 1 1 】

一部の実施形態では、がんがトリプルネガティブ乳がんである。

【 0 2 1 2 】

一部の実施形態では、がんが転移性肺がんである。

【 0 2 1 3 】

一部の実施形態では、がんが転移性卵巣がんである。

【 0 2 1 4 】

一部の実施形態では、がんが転移性トリプルネガティブ乳がんである。

【 0 2 1 5 】

50

一部の実施形態では、がんが非充実性腫瘍、例えば血液のがんである。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが白血病またはリンパ腫である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが急性リンパ芽球性白血病（ALL）である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが急性骨髄性（myelogenous）白血病（AML）である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが慢性リンパ球性白血病（CLL）である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが小リンパ球性リンパ腫（SLL）である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが慢性骨髄性白血病（CML）である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが急性単球性白血病（AMOL）である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんがホジキンリンパ腫（4つの亜型のいずれか）である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが非ホジキンリンパ腫（いずれかの亜型）である。別の実施形態では、非充実性腫瘍または血液のがんが骨髄性（myeloid）白血病である。

10

【0216】

本発明の方法における使用のため、該再活性化性ペプチドは慣用的な様式で、医薬組成物を形成するための当該技術分野で知られた、特にタンパク質である活性薬剤に関する1種類以上の薬学的に許容され得る担体、安定剤または賦形剤（ビヒクル）を用いて製剤化され得る。担体（1種類または複数種）は、組成物のその他の成分と適合性であり、そのレシピエントに対して有害でないという意味において「許容され得る」ものである。好適な担体としては典型的には、生理食塩水またはエタノール、ポリオール、例えばグリセロールもしくはプロピレングリコールが挙げられる。

20

【0217】

該再活性化性ペプチドを中性形態または塩形態として製剤化してもよい。薬学的に許容され得る塩としては、酸付加塩（遊離アミノ基とともに形成される）が挙げられ、これは、無機酸、例えば塩酸もしくはリン酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸およびマレイン酸などの有機酸を用いて形成される。また、遊離カルボキシル基とともに形成される塩は、無機塩基、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化第二鉄、ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジンおよびプロカインなどの有機塩基から誘導され得る。

【0218】

組成物は、静脈内、筋肉内、皮下または腹腔内投与のために好適に製剤化され得、好都合には、該再活性化性ペプチドの滅菌された水性液剤（これは好ましくはレシピエントの血液と等張性である）を含むものであり得る。かかる製剤は典型的には、固形の活性成分を、生理学的に適合性の物質、例えば塩化ナトリウム、グリシンなどを含有しており、生理学的条件と適合性の緩衝pHを有する水に溶解させて水性液剤を作製し、前記液剤を滅菌状態にすることにより調製される。該製剤は、単位用量容器に調製してもよく、反復用量容器、例えば、密封されたアンプルまたはバイアルに調製してもよい。

30

【0219】

組成物には安定剤、例えばポリエチレングリコール、タンパク質、糖類（例えば、トレハロース）、アミノ酸、無機酸など、およびその混合物が組み込まれ得る。安定剤は、水性液剤において適切な濃度およびpHで使用される。水性液剤のpHは、5.0～9.0の範囲内、好ましくは6～8の範囲内となるように調整される。該再活性化性ペプチドの製剤化において、吸着防止剤を使用してもよい。他の好適な賦形剤としては、典型的には酸化防止剤、例えばアスコルビン酸が挙げられ得る。

40

【0220】

組成物を制御放出調製物として製剤化してもよく、これは、該タンパク質を複合体化または吸収するポリマーの使用によって得られ得る。制御放出製剤のための適切なポリマーとしては、例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレン酢酸ビニルおよびメチルセルロースが挙げられる。考えられ得る別の制御放出方法は、該再活性化性ペプチドを、高分子物質、例えばポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ（乳酸）またはエチレン酢酸ビニルコポリマーの粒子内に組み込むことである。あるいは

50

また、このような薬剤をポリマー粒子内に組み込む代わりに、この物質を、例えばコアセルベーション手法または界面重合によって調製されるマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンのマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル内に、あるいは、コロイド状薬物送達系内、例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル内またはマクロエマルジョン中に閉じ込めることも可能である。

【0221】

一部の実施形態では、本発明の再活性化性ペプチドは、経口（“peroral”または“oral”）用組成物に製剤化され得、一部の実施形態では、液状の液剤、乳剤、懸濁剤などを構成し得る。一部の実施形態では、かかる組成物の調製に適した薬学的に許容され得る担体は当該技術分野でよく知られている。一部の実施形態では、液状の経口用組成物は約0.001%～約0.9%または別の実施形態では約0.01%～約10%の該再活性化性ペプチドを含むものである。

10

【0222】

一部の実施形態では、本発明の方法における使用のための組成物は液剤または乳剤を構成し、これは、一部の実施形態では、安全で有効な量の該再活性化性ペプチドおよび任意選択で他の化合物を含む、経表面鼻腔内投与が意図された水性の液剤または乳剤である。

【0223】

一部の実施形態では、本発明の注射用液剤が水性液剤に製剤化される。一実施形態では、本発明の注射用液剤が、生理学的に適合性のバッファー、例えばハanks液、リンゲル液または生理学的塩バッファーで製剤化される。一部の実施形態では、経粘膜投与のため、バリアを透過するのに適切な透過剤が製剤に使用される。かかる透過剤は当該技術分野で一般的に知られている。

20

【0224】

一実施形態では、本明細書に記載の調製物は、例えばボーラス注射または連続輸注による非経口投与のために製剤化される。一部の実施形態では、注射用製剤は、任意選択で保存料を添加した単位投薬形態に、例えば、アンプルまたは反復用量容器内に提示される。一部の実施形態では、組成物は、油性または水性のビヒクル中の懸濁剤、液剤または乳剤であり、例えば懸濁化剤、可溶化剤および/または分散化剤などの製剤化剤が含有されている。

30

【0225】

本発明の再活性化性ペプチドは、経口、経表面、経皮または非経口投与から選択される任意の適当な投与経路によって投与され得る。一部の実施形態によれば、投与経路は、皮膚経由、経腔、経直腸、吸入、鼻腔内、接眼、経耳および口腔内から選択される経表面適用によるものである。一部の実施形態によれば、投与経路は、非経口注射によるものである。種々の実施形態において、投与工程は、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、動脈内、脳内、脳室内、骨内および髄腔内からなる群より選択される非経口経路によって行なわれる。例えば、該再活性化性ペプチドは、例えば非経口経路、例えば腹腔内（i.p.）、静脈内（i.v.）、皮下または筋肉内経路によって全身投与され得る。本発明の再活性化性ペプチドおよび/または任意選択の任意のさらなる薬剤を、例えば、鼻腔内投与によって全身投与してもよい。本発明の再活性化性ペプチドおよび/または任意選択の任意のさらなる薬剤を、例えば経口投与により、タンパク質に対する経口バイオアベイラビリティをもたらし得る特定の組成物または製剤を使用することによって全身投与してもよい。本発明の再活性化性ペプチドおよび/または任意選択の任意のさらなる薬剤を局所投与してもよい。

40

【0226】

具体的な一実施形態によれば、該投与は皮下投与を含む。

【0227】

択一的または付加的に、具体的な一実施形態によれば、該投与は連続輸注を含む。

【0228】

50

したがって、該再活性化性ペプチド（例えば、配列番号：１、８、または４１２～４６４もしくは４２９、４４８、４４９、４４６、４６２）はまた、低速放出送達系、ポンプ、および連続輸注のための他の既知の送達系によって、例えば、以下の用量、例えば０．０１～０．３ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．１５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．１ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０９５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０９ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０８５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０８ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０７５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０７ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０６５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０６ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０５５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．４５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０４ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０３５ｍｇ／ｋｇ／日、０．０１～０．０３ｍｇ／ｋｇ／日）で送達され得る。投薬レジメンは、具体的な再活性化性ペプチドの所望の循環レベルがもたらされるように、その薬物動態に基づいて変更してもよい。したがって、用量は、治療用薬剤の所望の循環レベルが維持されるように計算される。

10

【０２２９】

典型的には、有効用量は、該再活性化性ペプチドの活性および被験体の病状、ならびに処置対象の被験体の体重または体表面積によって決定される。また、用量サイズおよび投与レジメン（*regime*）は、具体的な被験体における該再活性化性ペプチドの投与に付随する有害な副作用（あれば）の存在、性質および程度によっても決定される。

【０２３０】

一部の実施形態において、p53関連の病状を処置または予防するためのキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、Mut-p53再活性化ペプチドを適当なバッファー中に含めた容器（例えば、バイアル）と、該再活性化性ペプチドの投与のための使用のための使用説明書とを備えている。

20

【０２３１】

本発明のペプチドでの処置の有効性は、ゴールドスタンダード処置（例えば、抗がん治療）と併用すると増大する場合があります。したがって、該ペプチドは、p53と関連している疾患または病状（本明細書に上記のもの）を処置するために単独で使用してもよく、かかる障害のための他の確立された治療レジメンまたは実験的治療レジメンと組み合わせて使用してもよい。さらなる治療方法または治療用組成物を用いた処置は、かかる処置薬の有効臨床用量が有意に低減され、それにより、該処置の多くの場合、計り知れないマイナスの副作用および高額のコストが低下するという可能性を有することは認識されよう。

30

【０２３２】

本発明の一部の実施形態のペプチドまたは該ペプチドをコードしているポリヌクレオチドとの組合せに適したがんの処置のための治療レジメンとしては、限定されないが、化学療法、放射線療法、光線療法および光線力学療法、手術、栄養療法、アブレーション治療、放射線療法と化学療法の併用、小線源療法（*brachiotherapy*）、陽子線治療、免疫療法、細胞療法および光子線放射線治療（*photon beam radio surgical therapy*）が挙げられる。具体的な一実施形態によれば、化学療法薬は白金ベースである。

40

【０２３３】

抗がん薬

本発明の化合物とともに共投与され得る抗がん薬としては、限定されないが、アシピシン；塩酸アコダゾール；アクロニン；アクラルピシン；アドリアマイシン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン（*Ambomycin*）；酢酸アメタントロン（*Ametantrone Acetate*）；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン；アザシチジン；アゼテパ（*Azetepa*）；アゾトマイシン（*Azotomycin*）；バチマスタット；ベンゾデパ；ピカルタミド；塩酸ピサントレン；ビスナフィドジメシレート；ピセレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナール（*Brequinar*）ナトリウム

50

; プロピリミン; ブスルファン; カクチノマイシン (Cactinomycin); カルステロン; カラセミド; カルベチマー; カルボプラチン; カルムスチン; 塩酸カルピシン; カルゼレシン; セデフィンゴール; クロラムブシル; シロレマイシン (Cirolemycin); シスプラチン; クラドリピン; メシル酸クリスナトール; シクロホスファミド; シタラビン; ダカルバジン; ダクチノマイシン; 塩酸ダウノルピシン; デシタビン; デクスオルマプラチン (Dexormaplatin); デザグアニン (Dezaguanine); メシル酸デザグアニン; ジアジクオン; ドセタキセル; ドキソルピシン; 塩酸ドキソルピシン; ドロロキシフェン; クエン酸ドロロキシフェン; プロピオン酸ドロモスタノロン; デュアゾマイシン (Duazomycin); エダトレキサート; 塩酸エフロルニチン; エルサミツルシン (Elsamitrucin); エンロプラチン; エンプロマート; エピプロピジン (Epipropidine); 塩酸エピルピシン; エルブゾール (Erbulozole); 塩酸エソルピシン; エストラムスチン; エストラムスチンリン酸エステルナトリウム; エタニダゾール; エトポシド; リン酸エトポシド; エトプリン; 塩酸ファドロゾール; ファザラビン; フェンレチニド; フロクスウリジン; リン酸フルダラビン; フルオロウラシル; フルオロシタビン; ホスキドン; ホストリエシンナトリウム; ゲムシタビン; 塩酸ゲムシタビン; ヒドロキシ尿素; 塩酸イダルピシン; イホスファミド; イルモホシン; インターフェロン - 2a; インターフェロン - 2b; インターフェロン - n1; インターフェロン - n3; インターフェロン - Ia; インターフェロン - Ib; イプロプラチン; 塩酸イリノテカン; 酢酸ランレオチド; レトロゾール; 酢酸リュープロリド; 塩酸リアロゾール; ロメトレキサールナトリウム; ロムスチン; 塩酸ロソキサントロン; マソプロコール; メイタンシン; 塩酸メクロレタミン; 酢酸メゲストロール; 酢酸メレンゲストロール (MelenGESTROL); メルファラン; メノガリル; メルカプトプリン; メトトレキサート; メトトレキサートナトリウム; メトプリン; メツレデバ; ミチンドミド (Mitindomide); ミトカルシン (Mitocarcin); ミトクロミン (Mitocromin); ミトギリン (Mitogillin); ミトマルシン (Mitomalcin); マイトマイシン; ミトスペル (Mitospers); ミトタン; 塩酸ミトキサントロン; ミコフェノール酸; ノコダゾール; ノガラマイシン; オルマプラチン; オキシスラン; パクリタキセル; ペグアスパラガーゼ; ペリオマイシン (Peliomycin); ペンタムスチン (Pentamustine); 硫酸ペプロマイシン; パーホスファミド (Perfosfamide); ピボプロマン; ピボスルファン; 塩酸ピロキサントロン; プリカマイシン; プロメスタン; ポルフィマーナトリウム; ポルフィロマイシン; プレドニムスチン; 塩酸プロカルバジン; ピューロマイシン; 塩酸ピューロマイシン; ピラゾフリン; リボプリン; ログレチミド (Rogletimide); サフィンゴール; 塩酸サフィンゴール; セムスチン; シムトラゼン; スパルホセート (Sparfosate) ナトリウム; スパルソマイシン; 塩酸スピロゲルマニウム; スピロムスチン (Spiromustine); スピロプラチン; ストレプトニグリン; ストレプトゾシン; スロフェナル (Sulofenur); タリソマイシン; タキソール; テコガラン (Tecogalan) ナトリウム; テガフル; 塩酸テロキサントロン (Teloxantrone); テモポルフィン; テニポシド; テロキシロン; テストラクトン; チアミプリン (Thiamiprine); チオグアニン; チオテパ; チアゾフリン; チラパザミン; 塩酸トポテカン; クエン酸トレミフェン; 酢酸トレストロン; リン酸トリシリピン; トリメトレキセート; グルクロン酸トリメトレキセート; トリプトレリン; 塩酸ツプロゾール; ウラシルマスタード; ウレデバ; バブレオチド; ベルテポルフィン; 硫酸ビンブラスチン; 硫酸ビンクリスチン; ビンデシン; 硫酸ビンデシン; 硫酸ビネピジン (Vinepidine); 硫酸ビングリシナート; 硫酸ビンロイロシン; 酒石酸ビノレルピン; 硫酸ビノロシジン (Vinrosidine); 硫酸ビンゾリジン (Vinzolidine); ボロゾール; ゼニプラチン; ジノスタチン; 塩酸ゾルピシンが挙げられる。さらなる抗新生物剤としては、Chapter 52, Antineoplastic Agents (Paul Calabresi and Bruce A. Chabner) およびその序論、Goodman and Gilman,

10

20

30

40

50

s “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division) の 1202 ~ 1263 に開示されているものが挙げられる。

【0234】

本発明の別の態様により、変異型 p53 タンパク質と関連している疾患、障害または病状の処置方法であって、処置を必要とする被験体に治療有効量で、白金系化学療法薬と、ある空間および立体構成を有するアミノ酸配列を含む単離ペプチド（例えば、配列番号：1、8、412 ~ 464、429、448、449、446、462）とを投与することを含み、該空間および立体構成が、該ペプチドが p53 の DNA 結合ドメイン（DBD）と、pCAP 250（配列番号：1）が前記 DBD に結合するのと同じ様式で結合することを可能にするものであり、前記ペプチドは少なくとも部分的に変異型 p53 タンパク質を再活性化させるものであり、それにより前記疾患、障害または病状を処置する方法を提供する。

10

【0235】

白金ベースの化学療法薬の具体例としては、限定されないが、シスプラチン（最初に開発された）、カルボプラチン（第2世代の白金ベースの抗新生物剤）、オキサリプラチン、サトラプラチン、ピコプラチン、ネダプラチン、トリプラチン、リボプラチン（リボソーム型のシスプラチン）が挙げられる。

20

【0236】

本明細書に記載の併用処置（例えば、該ペプチドと一緒に白金ベースの化学療法薬）を行なうためのキットおよび製造物品もまた本明細書において想定される。

【0237】

また、59 ~ 382 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドで上記の方法において実施することも可能であることは認識されよう。

【0238】

本明細書で用いる場合、用語「約」は ± 10 % をいう。

【0239】

用語 “comprises (~ を含む)”、“comprising (~ を含む)”、“includes (~ を含む)”、“including (~ を含む)”、“having (~ を有する)” およびこれらの活用形は “including but not limited to (限定されないが、 ~ を含む)” を意味する。

30

【0240】

用語 “consisting of (~ からなる)” は “including and limited to (~ を含み、それに限定される)” を意味する。

【0241】

用語 “consisting essentially of (本質的に ~ からなる)” は、組成物、方法または構造がさらなる成分、工程および / または部分を含んでもよいが、該さらなる成分、工程および / または部分が請求項に記載の組成物、方法または構造の基本的および新規な特徴を実質的に改変しない場合に限ることを意味する。

40

【0242】

本明細書で用いる場合、単数形 “a”、“an” および “the” は、本文中にそうでないことを明白に記載していない限り、複数の言及を包含している。例えば、用語 “a compound (化合物)” または “at least one compound (少なくとも 1 つの化合物)” には、複数の該化合物（その混合物を含む）が包含され得る。

【0243】

この出願書類全体を通して、本発明の種々の実施形態を範囲形式で示している場合があり得る。範囲形式での記載は、便宜上、略しているにすぎず、本発明の範囲に対する融通の利かない限定であると解釈すべきでないことは理解されよう。したがって、範囲の記載は、該範囲内の考えられ得るすべての部分範囲ならびに個々の数値が具体的に開示されてい

50

ると解釈されたい。例えば、範囲の記載、例えば 1 ~ 6 は、部分範囲、例えば 1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、2 ~ 4、2 ~ 6、3 ~ 6 など、ならびに該範囲内の個々の数字、例えば、1、2、3、4、5 および 6 が具体的に開示されていると解釈されたい。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0244】

本明細書において数値範囲を示している場合はいつでも、表示した範囲内の挙げられる任意の数（分数または整数）を包含していることを意図する。“*ranging / ranges between*” 表示された第 1 の数字と（*and*）表示された第 2 の数字（の範囲である / の範囲）、および“*ranging / ranges from*” 表示された第 1 の数字“*to*（から）” 表示された第 2 の数字（の範囲である / の範囲）というフレーズは本明細書において互換的に用いており、表示した第 1 および第 2 の数字ならびに両者間のすべての分数および整数を包含していることを意図する。

10

【0245】

本明細書で用いる場合、用語「方法」は、所与の仕事を行なうための様式、手段、手法および手順、例えば限定されないが、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実務者に知られているか、または該実務者により既知の様式、手段、手法および手順から容易に開発されるかのいずれかである様式、手段、手法および手順をいう。

【0246】

本明細書で用いる場合、用語「処置する」には、病状を消去すること、病状を実質的に抑止すること、その進行を低速化もしくは逆転させること、病状の臨床症状もしくは美容的症状を実質的に改善すること、または病状の臨床症状もしくは美容的症状の出現を実質的に抑制することが包含される。

20

【0247】

具体的な配列表に言及している場合、かかる言及は、例えば、シーケンシングエラー、クローニングエラーまたは塩基置換、塩基欠失もしくは塩基付加をもたらす他の改変に起因する軽微な配列の差異を含むためその相補配列に実質的に対応する配列もまた包含していると理解されたい。ただし、かかる差異の頻度は 50 個のヌクレオチド中 1 個未満、あるいはまた 100 個のヌクレオチド中 1 個未満、あるいはまた 200 個のヌクレオチド中 1 個未満、あるいはまた 500 個のヌクレオチド中 1 個未満、あるいはまた 1000 個のヌクレオチド中 1 個未満、あるいはまた 5,000 個のヌクレオチド中 1 個未満、あるいはまた 10,000 個のヌクレオチド中 1 個未満であるものとする。

30

【0248】

明瞭性重視のため、別々の実施形態の状況において記載している本発明の特定の特色はまた、単一の実施形態において組み合わせ提供してもよいことは認識されよう。逆に、簡潔性重視のため、単一の実施形態の状況において記載している本発明の種々の特色はまた、別々に、または任意の適当な下位の組合せで、もしくは本発明の記載の任意の他の実施形態において適するものとして提供してもよい。種々の実施形態の状況において記載した特定の特色は、このような要素なしでは該実施形態が実施不可である場合を除き、該実施形態の必須の特色であるとみなされるべきでない。

【0249】

本明細書において上記に記載し、以下の特許請求の範囲のセクションの請求項に記載する本発明の種々の実施形態および態様は、以下の実施例において、実験による裏付けが見出されよう。

40

【0250】

実施例

次に、以下の実施例について言及するが、この実施例は上記の説明とともに、非限定的な様式で本発明の実例を示すものである。

【0251】

一般的に、本明細書で用いる専門用語および本発明で使用する実験手順は分子的、生化学的、微生物学的および組換え DNA の手法を含むものである。かかる手法は文献において

50

十分に説明されている。例えば、“Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I - III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1 - 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号; 同第4,683,202号; 同第4,801,531号; 同第5,192,659号および同第5,272,057号に示された方法論; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I - III Cellis, J.E., ed. (1994); “Current Protocols in Immunology” Volumes I - III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., New York (1980)を参照のこと; 利用可能なイムノアッセイは特許および化学文献に広範囲にわたって記載されており、例えば、米国特許第3,791,932号; 同第3,839,153号; 同第3,850,752号; 同第3,850,578号; 同第3,853,987号; 同第3,867,517号; 同第3,879,262号; 同第3,901,654号; 同第3,935,074号; 同第3,984,533号; 同第3,996,345号; 同第4,034,074号; 同第4,098,876号; 同第4,879,219号; 同第5,011,771号および同第5,281,521号; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M.J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B.D., and Higgins S.J., Eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R.I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) and “Methods in Enzymology” Vol. 1 - 317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996)を参照のこと; これらはすべて、引用により、あたかも本明細書にすべてが示されているかのごとく組み込まれる。他の一般的な参考文献は本文書の至る箇所に示している。それに示された手順は当該技術分野でよく知られていると考えられているものであり、読み手の便宜のために示している。該参考文献に含まれている情報はすべて引用により本明細書に組み込まれる。

【0252】

実験手順

クリスタルバイオレット バイアビリティアッセイ

細胞を96ウェルプレート内で、2500～4000個の細胞/ウェルで培養した。いろいろなペプチドの段階希釈列を添加し、プレートをさらに48時間、37℃でインキュベートした。次いで、培地を除去し、細胞のバイアビリティを、細胞をクリスタルバイオレット(0.05%) (メタノール/PBS(1:5, v/v)中)で10分間、染色した後、PBSで3回洗浄することによって測定した。10%酢酸を各ウェルに10分間、添加した。ODを595nmにおいて測定した。

【0253】

ChIP解析

細胞を、ホルムアルデヒド(1%終濃度)を用いて室温で10分間架橋した。ホルムアルデヒドをグリシン0.25Mで5分間中和した。細胞を10mlの氷冷PBSで2回洗浄し、掻き取ることによって収集した。最後に、細胞を0.3mlの溶解バッファー(1%SDS, 10mMEDTA, 50mMTris-HCl, pH8.1, プロテアーゼ阻害薬カクテル)中に再懸濁させ、超音波浴中で6分間、超音波処理した後、10分間、氷上で遠心分離し、200～500bpの断片を得た。上清みを回収し、ChIP希釈バッファー(1%Triton X-100, 2mMEDTA, 150mMNaCl, 20mMTris-HCl, pH8.1)中で10倍希釈した後、40μlの予備ブロックプロテインA-セファロースを2μgの断片化処理したサケ精子DNAおよび10μgのBSAとともに用いて4℃で2時間、免疫洗浄(immuno-clearing)した。免疫沈降は、特異的 p53または RNApolIIポリクローナル抗体を用いて4℃で一晩行なった。免疫沈降後、40μlのプロテインA-セファロースを添加し、さらに1時間、さらにインキュベートした。続いて、沈殿物をTSE I(0.1%SDS, 1%Triton X-100, 2mMEDTA, 20mMTris-HCl, pH8.1, 150mMNaCl)、TSE II(500mMNaCl)、およびバッファーIII(0.25MLiCl, 1%NP-40, 1%デオキシコレート, 1mMEDTA, 10mMTris-HCl, pH8.1)中で洗浄した。沈殿物をTEバッファーで3回洗浄し、1%SDS, 0.1MNaHCO₃で2回抽出した。溶出液をプールし、65℃で一晩加熱し、ホルムアルデヒド架橋を戻した。DNA断片を、QIAquick Spin Kit(Qiagen, CA)を用いて精製した。免疫沈降反応は三連で実施した。ビーズのみを非特異的対照として使用した。クローンのChIP産物における活性な、および抑制性のヒストンマークの定量解析を定量RT-PCRによって評価した。免疫沈降(IP)の効率を標準化するため、クロマチンIPの標準化を、necdinプロモーター領域および5'領域に特異的なプライマーを用いて行なった。

【0254】

CRISPR p53ノックアウト

TP53エキソン3短鎖ガイドRNA(sgRNA)を含むプラスミド#42230はAddgene製であった。ES2細胞を、jetPEI試薬(Polyplus)を製造業者のプロトコルに従って用いてトランスフェクトした。48時間後、細胞を96ウェルプレート内に単一細胞クローンとして播種した。単一細胞クローンを拡大培養し、そのp53の状態を、DO-1抗p53抗体を用いたウェスタンブロット解析によって調べた。

sgRNA配列:

F: 5' - C A C C G C C A T T G T T C A A T A T C G T C C G - 3' (配列番号: 47)

R: 5' - A A C C G G A C G A T A T T G A A C A A T G G - 3' (配列番号: 48)

【0255】

ペプチドの前臨床試験

マウス(6週齢, 胸腺欠損, ノード)の各大腿部に2×10⁵～10⁶個の細胞を皮下注射した。この実験で使用した細胞株はすべて、ライブイメージングによる腫瘍の増殖のモニタリングを可能にするためのルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に発現するものである。4～18日後、腫瘍が視認可能なサイズに達したら、マウスを無作為に、いくつかの群: いずれかの1種類の対照ペプチドで処置する対照群、およびいずれかの1種類の

ペプチドの有効なペプチドで処置する群に分けた。ペプチドは、 $10\mu\text{g}$ のペプチド($40\mu\text{l}$ のPBS中)/腫瘍を週に3回の腫瘍内注射または 0.8mg をアルゼットミニポンプのいずれかによって2週間投与した。経時的な腫瘍の増殖をライブイメージングにより、IVIS2000システムを用いて測定した。露光時間は20秒間に校正した。各腫瘍に対して、8分間で16個の画像を撮影し、ピーク発光値を得た。実験は、腫瘍が最大許容サイズ 1cm^3 に達するまで実施し、この時点でマウスを致死させ、腫瘍を取り出し、測定し、重量計測した。

【0256】

RT-PCR

RNAを、Macherey-Nagel NucleoSpin RNA II Kitを細胞ペレットで製造業者のプロトコルに従って用いて取得した。 $0.4\sim 1\mu\text{g}$ アリコート、Bio-RT 2000 (Bio-Lab)およびランダムヘキサマープライマーを用いて逆転写した。QRT-PCRは、ABI 7300装置 (Applied Biosystems)において、SYBR Green FastMix ROX (Quanta)を用いて実施した。RT-PCRプライマー (プライマー配列はすべて、5'から3'に向かって示している) :

プライマーリスト

遺伝子	フォワードプライマー (配列番号: 20~31)	リバースプライマー (配列番号: 32~43)
p53	CCCAAGCAATGGATG ATTGA	GGCATTCITGGAGCTTC ATCT
p21	GGCAGACCAGCATGA CAGATT	GCGGATTAGGGCTTCCT CIT
PUMA	GACCTCAACGCACAG TACGAG	AGGAGTCCCATGATGAG AIIGT
MDM2	AGGCAATGTGCAAT ACCAACA	GGTTA CAGCACCATCA GIAGGTACAG
CD95	ACTGTGACCCCTTGCA CCAAAT	GCCACCCCAAGTITAGAT CTGG
Btg2	AGGCACCTCACAGAGC ACTACAAAC	GCCCTTGGACGGCTTTT C
GAPDH	ACCCACTCCTCCACC TITGA	CTGTGCTGTAGCCAAA TTCGT
p21 (ChIP)	GTTGGCTCTGATTGGC TTTCTG	CTTGGGCTGCCTGTTTT CAG
PUMA (ChIP)	GCGAGACTGTGGCCT TGIGTC	ACTTGTGGACCTGGGA ACG
MDM2 (ChIP)	GGTTGACTCAGCTTT TCCCTTIG	TATTTAAACCATGCATT TTCC
CD95 (ChIP)	GGATAATTAGACGTA CGTGGGC	GGACAATTGACAAAATC AGTATC
GAPDH (ChIP)	GTATTCCTCCAGGTT TACAT	AGGAGTGAGTGGAAAGAC AGAA

【0257】

NMR

精製15N標識p53コアダメイン(1ml $40\mu\text{M}$) (aa 94~296)を1LのNMRバッファー-(52.5mMのNaClと2.625mMのDTTを含有している157.5mMのリン酸ナトリウムバッファーpH7.2)に対して48時間透析し、バッファーを交換し、試料を1LのNMRバッファーに対してさらに24~48時間(合計72時間)透析した。 0.5ml の試料を高分解能NMRに供した。NMR解析はワイツマン科学研究所で行なわれた。

【0258】

15N-p53の単独および表示したペプチドと複合体形成時の二次元 ^1H - ^{15}N 異種核一量子コヒーレンス(Heteronuclear Single Quantum Coherence)(HSQC)スペクトルを293Kにおいて記録した。スペクトルは、5mmの逆配置検出用三重共鳴CryoProbe(TCI)を備えたBruker AVIII-800 NMR分光器で取得した。溶媒消去はWATERGATE配列を用いて行なった。

【実施例1】

【0259】

実施例1

pCAP-250はシスプラチンとともに、ES2卵巣がん細胞のバイアピリティの低下

において相乗作用をもたらす

ES2細胞を96ウェルプレート内で、3000個の細胞/ウェルで培養した。pCAP-250の段階希釈列を単独または1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のシスプラチンと一緒にいずれかで添加し、プレートをさらに48時間、37℃でインキュベートした。次いで、培地を除去し、細胞のバイアビリティを、細胞をクリスタルバイオレット(0.05%) (メタノール/PBS(1:5, v/v)中)で10分間、染色した後、PBSで3回洗浄することによって測定した。10%酢酸を各ウェルに10分間、添加した。ODを595nmにおいて測定した。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理したES2細胞のバイアビリティは39%であった。pCAP-250のIC50は3.2 μM であると推定され、シスプラチンとの組合せでのpCAP-250のIC50は1.9 μM であると推定され、この2つの化合物の相乗効果が示された。

10

【0260】

図1は、実験の結果を示す。明らかに、がん細胞のバイアビリティは、pCAP 250の存在下で有意に低下した。相乗効果は、pCAP 250と白金ベースの化学療法薬との併用処置によるものであると予想される。

【実施例2】

【0261】

実施例2

pCAP-250およびいろいろな誘導体の活性の特性評価

内在性mp53S241Fを発現している細胞ES2 Con、およびmutp53に対する特異性の対照にするためにCRISPR/Cas9を用いてp53を安定的にノックアウトしたES2 KO細胞(ES2 p53KO)を96ウェルプレート内で、3000個の細胞/ウェルで培養した。表示したペプチドを8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、プレートをさらに48時間、37℃でインキュベートした。次いで、培地を除去し、細胞のバイアビリティを、細胞をクリスタルバイオレット(0.05%) (メタノール/PBS(1:5, v/v)中)で10分間、染色した後、PBSで3回洗浄することによって測定した。10%酢酸を各ウェルに10分間、添加した。ODを595nmにおいて測定した。

20

【0262】

図2は、ES2 KOと比べたときのES2 Conに対する特定のペプチドの効果の差は、mutp53発現に対するペプチドの特異性を示す。アラニンに置換したアミノ酸(例えば、セリンおよびヒスチジン)のいくつかのペプチド誘導体はES2 Con細胞に対する効果の低下を示し、ペプチドの有効性のためのこのようなアミノ酸の重要性を示す。

30

【0263】

この結果を、後述する親和性結合アッセイにおいてさらに拡張した。

【実施例3】

【0264】

実施例3

p53 DBDに対するpCAP 250の結合

図3A~Kは、蛍光標識したWT p53 DBDおよびpCAP-250の結合のマイクロスケール熱泳動解析を示す。実験は、製造業者の使用説明書に従って行なった; pCAP-250の10の段階希釈列を調製し、標識タンパク質を各ペプチド試料に添加し、キャピラリーにロードした。これらの試料を蛍光wt p53 DBDの移動について、温度勾配において、いろいろな濃度のpCAP-250を用いて解析した。マイクロスケール熱泳動解析の結果を、製造業者のデータ解析ソフトウェアにより得られた曲線として示す。

40

【実施例4】

【0265】

実施例4

薬物動態試験 - pCAP 250の投与様式および血漿中半減期

図4A~Dの結果は、pCAP 250(配列番号: 1)は、静脈内投与した場合、0.8~1.8時間の血漿中半減期を有することを示す。この結果はさらに、pCAP 25

50

0 は、皮下投与した場合、3 ～ 8 時間の血漿中半減期を有することを示す。

【実施例 5】

【0 2 6 6】

実施例 5

マウス異種移植片モデルにおける p C A P - 2 5 0 ペプチドのインビボ効果

図 5 A ～ D は、卵巣がん異種移植片モデルにおいて 0 . 4 m g / k g を週 3 回の用量の腫瘍内注射によって投与した場合の p C A P 2 5 0 (配列番号 : 1) は、E S 2 細胞の腫瘍発生に対して有意な効果を有することを示す。さらに、p C A P 2 5 0 は、卵巣がん異種移植片モデルにおいてアルゼットミニポンプによって 2 . 3 m g / k g / 日の用量を皮下投与した場合、E S 2 細胞の腫瘍発生に対して有意な効果を有することを示す。

【実施例 6】

【0 2 6 7】

実施例 6

インビトロでの細胞のバイアビリティアッセイによる測定時の p C A P 2 5 0 ペプチドバリエーションの抗がん活性

【表 3】

配列番号 :	p C A P 番号	ペプチド配列
412	483	m y r - R R H S T P H P G E
413	485	m y r - R R H S T P H P S E
414	488	m y r - R R H S T P H P A D
415	489	m y r - R R H S T P H P A E
416	504	m y r - R R H S S P H P D
417	505	m y r - R R H S V P H P D
418	507	m y r - R R H S C P H P D
419	513	m y r - R R H S e P H P D
420	514	m y r - R R H S t P H P D
421	515	m y r - R R H S s P H P D
422	516	m y r - R R H S v P H P D
423	518	m y r - R R (L - D A B) S T P H P D
424	519	m y r - R R H S T P (L - D A B) P D
425	530	m y r - R R H S T P H P D D - c h 3
426	541	m y r - R R H S T P H A D
427	551	m y r - R R H S K P H P D
428	552	m y r - R R H S S P (L - D A B) P D
429	553	m y r - R R H S v P (L - D A B) P D
430	554	m y r - R R H S T P (L - D A B) A D
431	590	m y r - R R H S s P (L - D A B) P D
432	594	m y r - R R H S K P H P D D - N H 2
433	595	m y r - R R (L - D A B) S T P (L - D A B) P D
434	596	m y r - R R H S K P (L - D A B) P D
435	597	m y r - R R (L - D A B) S K P H P D
436	598	m y r - R R (L - D A B) S K P (L - D A B) P D
437	599	m y r - R R H S K P H A D
438	600	m y r - R R H S K P H A S E
439	601	m y r - R R H S K P H P S E
440	602	m y r - R R (L - D A B) S s P (L - D A B) P D
441	603	m y r - R R (L - D A B) S v P (L - D A B) P D
442	606	m y r - R R H S T P H A S E
443	607	m y r - R R H S k P H P D
444	608	m y r - R R H S (L - D A B) P H P D
445	609	m y r - R R H S (L - D A B) P H A D
446	610	m y r - R R H S E P (L - D A B) P D
447	611	m y r - R R (L - D A B) S E P H P D
448	622	m y r - R R H S v P (L - D A B) P D - N H 2
449	624	m y r - R R H S T (A l b) H A D
450	630	m y r - R R H S T P H P D I E G R
451	632	m y r - R R H S T P H P D I E G R G W Q R P S S W
452	633	m y r - R R (L - D A B) S E P (L - D A B) P D
453	634	m y r - R R H S E P (L - D A B) P D - N H 2
454	635	m y r - R R (L - D A B) S E P H P D

455	636	m y r - R R H S (P S E R) P (L - D A B) P D
456	637	m y r - R R H S (p s e r) P (L - D A B) P D
457	638	m y r - R R H S (P S E R) P (L - D A B) P D - N H 2
458	639	m y r - R R H S K P (L - D A B) P D
459	640	m y r - R R (L - D A B) S K P H P D
460	642	m y r - R R H S T P H P A H
461	643	m y r - R R H S T P H P A (L - D A B)
462	644	m y r - R R H S T P H P D H
463	645	m y r - R R H S v P (L - D A B) P D H
464	646	m y r - R R H S T P H A D H

表 3 : 53 p C A P - 2 5 0 ペプチドバリエーションのリスト。m y r はミリストイル基を表し、大文字および小文字はそれぞれ、L-型アミノ酸およびD-型アミノ酸を表す。L-D A B はL-型ジアラミノ酸を表す。P S E R および p s e r はそれぞれ、L-型ホスホセリンおよびD-型ホスホセリンを表す。A l B はアミノイソ酪酸を表す。

【0 2 6 8】

ペプチドは、抗がんアッセイにおいて2つの細胞株で試験した。図7～8においてわかるように、細胞のバイアピリティ（クリスタルバイオレットによるバイアピリティアッセイ）による測定時、表示したペプチドは抗がん活性が賦与されている。

【実施例7】

【0269】

実施例7

pCAP - 250 - DBD複合体およびそのペプチドバリエーションのNMR実験。

p53 DBDに対するpCAP - 250ペプチド（pCAP 250）の結合によって誘導される構造の効果を評価するため、NMR実験（¹H - ¹⁵N HSQCスペクトル）を行なった。以前に残基のピークの割り当てによってWT DBD（配列番号：44の94～312）が得られていたため[Wong et al. 上掲]、このNMR実験を、Wong et al. [上掲]に記載のものと同じ条件を維持してWT DBD（94～296、配列番号：44）を用いて実施した。

【0270】

図9は、Wong et al.（上掲）によって得られたNMRピークの割り当てを、遊離DBDおよびDBD - pCAP 250複合体について得られたNMRピークマップと一緒に示す。図9から、一般的に、2つのDBD構築物のC末端の長さが296に対して312と異なっているにもかかわらず、Wong et al.（上掲）のマップが成功裡に再現されたことがわかる。さまざまな強度の多くのピークの変化、例えば、割り当てられなかったいくつかのピークの消失および出現が遊離DBDとDBD - pCAP 250のマップ間で観察され、したがって、WT DBDに対するpCAP 250の結合を明白に示す。DBDの構造に関するこのような変化のマッピングにより、pCAP 250の結合によって影響される3次元構造領域に関する明確な像がもたらされる。この領域は主に、DBD - DNA界面モチーフのヘリックス - 2とL1ループを含み、これはさらに、該タンパク質の中心領域内に延在している（図10のマゼンタ参照）。C277およびR280は、ヘリックス - 2に存在する残基の中程度のピークの移動の一例であり、ここで、最も劇的なピークの移動は、L1ループに存在するG117で観察される（図9のマゼンタおよび茶色の丸参照）。

【0271】

興味深いことに、Wong et al.（上掲）によって当初観察されたH115およびY126の比較的低い強度のピークは遊離DBDでは観察されないが、pCAP 250ペプチドが付加すると出現している（図10の黄色の丸参照）。ピークの割り当てにおけるかかる有意な違いは、pCAP 250によって誘導される最も支配的なピークの変化とみなすことができる。遊離DBDスペクトルの当初では低い強度のピークおよびピークの非存在は、このような残基が該タンパク質の低安定性の構造領域（これは、1つより多くの支配的な安定なコンホメーションをとり得る）内に存在し、したがって、タンパク質の状態の小さな変化に非常に敏感であることを示す。実際、NMRによって解像されたDBDの構造の上位2つの低エネルギーコンホメーションを比較すると、劇的な構造の再組織化がH115およびY126で示されている（pdbコード2FEJ）。特筆すべきことには、H115とY126の3次元組織がG117と非常に近接していて、これに直接影響を及ぼすことができ、同時に、これらの3個の残基はL1ループの構造の完全性に高度に関連している（図11A～B参照）。ペプチドが付加するとH115とY126のピークが出現することを、さらなるNMR実験により、異なるpCAP 250ペプチドバリエーション、pCAP - 615（RRHSTP{DAB}PD）、配列番号：465を用いてさらに検証した（図12参照）。

【0272】

pCAP - 553（myr - RRHSvP（L - DAB）PD、vはD - 型バリンを表す、配列番号：429）pCAP 250ペプチドバリエーションは、変異型p53R273Hを有するSW - 480細胞ベースのアッセイにおいて、P - 250より2倍強力であることがわかった（図7参照）。NMR解析は、pCAP - 553（P553）は該DBDに

10

20

30

40

50

、親和性の改善を伴って結合する傾向にあることを示す。これは主に、D B D - p C A P 5 5 3 複合体で得られたNMRピークマップで、遊離D B Dとの比較において7つの異なる新規な非常に強い、割り当てられなかったピークの出現によって反映される。さらに、D B D - p C A P 5 5 3 複合体で得られたピークの形状の方が統一化されており、丸い傾向にあり、P 5 5 3 ペプチドの結合によって該D B Dの構造安定性が改善されることを示す(図13参照)。

【0273】

NMR実験の結果は、p 5 3 タンパク質のW T D B Dに対するp C A P 2 5 0 およびそのペプチドバリエーションの顕在結合のさらなる証拠を示す。このような結果は、M S T 方法論を用いた該D B Dに対するp C A P 2 5 0 の結合に関する所見(図3A~K)をサポートする。NMRの結果はさらに、p C A P 2 5 0 およびそのペプチドバリエーションの結合によって該D B Dにおいて構造変化が誘導され、この構造変化が、D N A に対する該D B Dの結合能に必須である該D B D - D N A 結合界面領域、すなわち、ヘリックス-2 およびL 1 ループ構造モチーフの完全性および安定性に直接影響を及ぼすことを示す。p C A P 2 5 0 およびそのペプチドバリエーションの結合はさらに、ヘリックス2 およびL 1 ループ構造モチーフの周囲のさらなる残基に影響を及ぼし、該D B D 表面上に比較的大きいが確固たる被影響パッチが作出される。

【0274】

本発明を、その具体的な実施形態に関連して説明したが、多くの代替例、修正例および変形例が当業者に自明であろうことは明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の趣旨および広い範囲に含まれるかかる代替例、修正例および変形例のすべてを包含していることを意図する。

【0275】

本明細書において挙げた刊行物、特許および特許出願はすべて、引用によりその全体が、あたかも個々の各刊行物、特許または特許出願が具体的に個々に示されて引用により本明細書に組み込まれているのと同程度に、本明細書に組み込まれる。また、本出願書類における任意の参考文献の引用および特定は、かかる参考文献が本発明の先行技術として利用可能であるという是認と解釈されるべきでない。セクションの見出しを使用している点において、これは、必ずしも限定していると解釈されるべきでない。

10

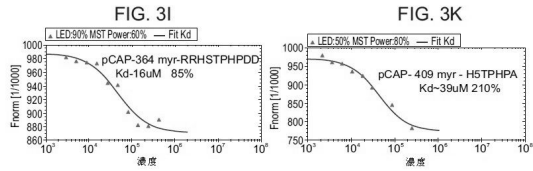
20

30

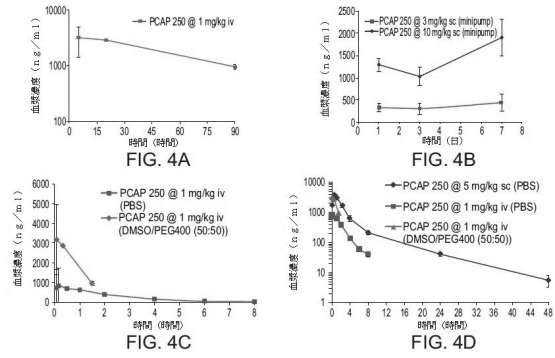
40

50

【図 3 I - 3 K】

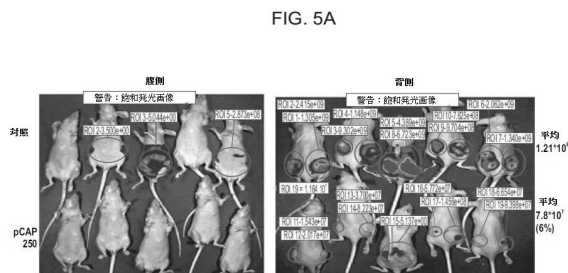


【図 4 A - 3 D】

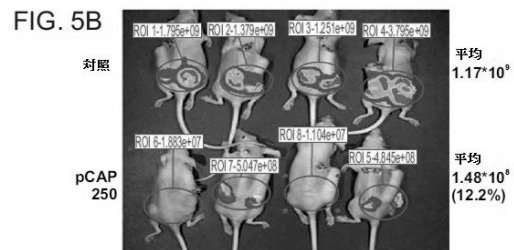


10

【図 5 A】

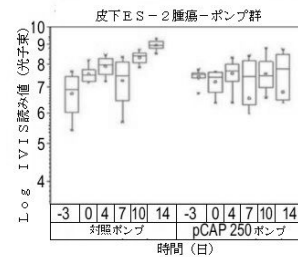


【図 5 B - 5 D】



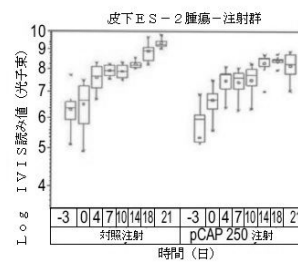
20

FIG. 5C



30

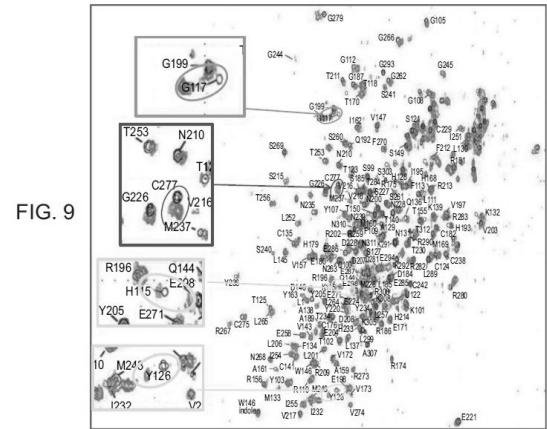
FIG. 5D



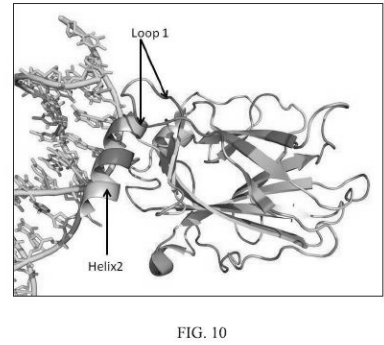
40

50

【 図 9 】

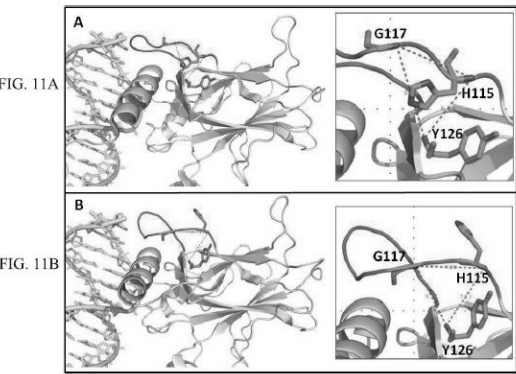


【 図 10 】

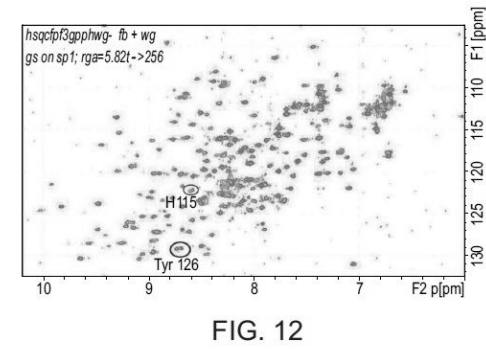


10

【 図 11 A - 11 B 】



【 図 12 】



20

30

40

50

【 図 1 3 】

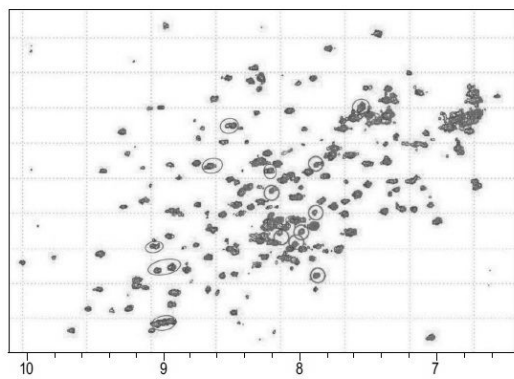


FIG. 13

【 図 1 4 】

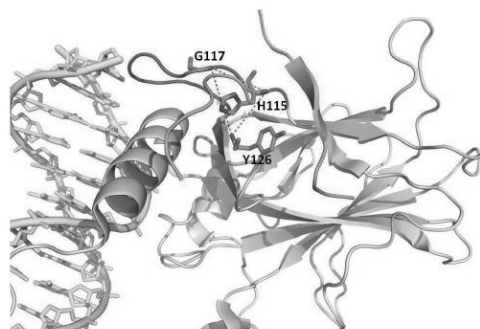


FIG. 14

【 配 列 表 】

0007072508000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 ロッター, ヴァルダ
 イスラエル国 7610002 レホヴォト, ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス,
 ネーヴェ ウィルナー, クリル ストリート 1
- (72)発明者 オーレン, モシェ
 イスラエル国 7610002 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ ワイツ
 マン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カ
 ンパニー リミテッド気付
- (72)発明者 タル, ペリー
 イスラエル国 7610002 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ ワイツ
 マン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カ
 ンパニー リミテッド気付
- (72)発明者 アイゼンベルガー, シェイ
 イスラエル国 7610002 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ ワイツ
 マン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カ
 ンパニー リミテッド気付
- (72)発明者 ベン - シモン, アヴィ
 イスラエル国 7610002 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ ワイツ
 マン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カ
 ンパニー リミテッド気付
- 審査官 小金井 悟
- (56)参考文献 国際公開第2013/036208 (WO, A1)
 国際公開第2015/019318 (WO, A1)
 Cell Cycle, 2009年01月01日, Vol.8, No.1, pp.137-148
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
 C07K 1/00 - 19/00
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 Caplus/REGISTRY (STN)