

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509504

(P2015-509504A)

(43) 公表日 平成27年3月30日 (2015. 3. 30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-558892 (P2014-558892)  
(86) (22) 出願日 平成25年2月22日 (2013. 2. 22)  
(85) 翻訳文提出日 平成26年10月21日 (2014. 10. 21)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/027430  
(87) 国際公開番号 W02013/126775  
(87) 国際公開日 平成25年8月29日 (2013. 8. 29)  
(31) 優先権主張番号 61/602, 418  
(32) 優先日 平成24年2月23日 (2012. 2. 23)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508298488  
コーネル ユニヴァーシティー  
アメリカ合衆国ニューヨーク州14850  
、 イサカ、 パイン ツリー ロード  
395、 スイート 310、 コーネル  
センター フォー テクノロジー、 エ  
ンタープライズ アンド コマーシャリゼ  
ーション  
(74) 代理人 100092093  
弁理士 辻居 幸一  
(74) 代理人 100082005  
弁理士 熊倉 禎男  
(74) 代理人 100084663  
弁理士 箱田 篤

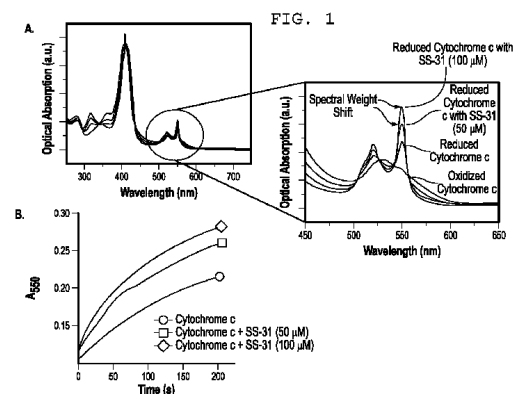
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 芳香族陽イオン性ペプチドおよびその使用

## (57) 【要約】

本開示は、芳香族陽イオン性ペプチド組成物およびその使用方法を提供する。本方法は、電子伝達、カルジオリピン過酸化の抑制、およびアポトーシスおよびネクローシスの抑制にペプチドを使用し、自己免疫疾患または病態の症状を治療、予防、または寛解させることを含む。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

カルジオリピン抗体の増大した濃度を特徴とする自己免疫疾患に罹患した対象を治療する方法であって、

治療に有効な量の芳香族陽イオン性ペプチドまたはその薬剂的に許容される塩を、前記対象に投与することを含むことを特徴とする、方法。

## 【請求項 2】

前記芳香族陽イオン性ペプチドが、 $2', 6' - \text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-02)、 $\text{Phe} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-20)、 $\text{D} - \text{Arg} - 2', 6' - \text{Dmt} - \text{Lys} - \text{Phe} - \text{NH}_2$  (SS-31)、 $2', 6' - \text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - (\text{atn}) \text{Dap} - \text{NH}_2$  (SS-19) ((atn) Dap は -アントラニロイル-L-, -ジアミノプロピオン酸)、および  $2', 6' - \text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Ala} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-36) (Ala は - (6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン) からなる群より選択される 1 以上のペプチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記塩が、酢酸塩またはトリフルオロ酢酸塩である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記ペプチドが、 $\text{D} - \text{Arg} - 2', 6' - \text{Dmt} - \text{Lys} - \text{Phe} - \text{NH}_2$  (SS-31) を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデスおよび抗リン脂質抗体症候群からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記治療が、全身性エリテマトーデスの 1 以上の症状を緩和または寛解させることを含み、前記全身性エリテマトーデスの症状が、増大したカルジオリピン抗体濃度、発熱、血管内血栓、血小板減少症、心臓弁疾患、網状皮斑、胸膜炎、胸水、ループス肺炎、慢性びまん性間質性肺疾患、肺高血圧症、肺動脈塞栓、肺出血、縮小肺症候群、心膜炎、心筋炎、心内膜炎、貧血、低血小板数および低白血球数、延長した部分トロンボプラスチン時間、骨関節結核、筋肉痛、頬部発疹、円盤状ループス、脱毛症、口、鼻、尿路および腔内の潰瘍、多発性神経障害、ならびに頭蓋内圧亢進症候群、からなる群より選択される 1 以上の症状である、請求項 5 に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

前記芳香族陽イオン性ペプチドが、経口で、非経口で、静脈内で、皮下に、経皮に、局所にまたは吸入により投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

自己免疫疾患に罹患した対象のカルジオリピン酸化を低減させる方法であって、

有効な量の芳香族陽イオン性ペプチドまたはその薬剂的に許容される塩を、前記対象に投与することを含むことを特徴とする、方法。

## 【請求項 9】

前記芳香族陽イオン性ペプチドが、 $2', 6' - \text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-02)、 $\text{Phe} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-20)、 $\text{D} - \text{Arg} - 2', 6' - \text{Dmt} - \text{Lys} - \text{Phe} - \text{NH}_2$  (SS-31)、 $\text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - (\text{atn}) \text{Dap} - \text{NH}_2$  (SS-19)、((atn) Dap は -アントラニロイル-L-, -ジアミノプロピオン酸)、および  $2', 6' - \text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Ala} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-36) (Ala は - (6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン) から選択される 1 以上である、請求項 8 に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

前記塩が、酢酸塩またはトリフルオロ酢酸塩である、請求項 8 に記載の方法。

50

## 【請求項 11】

前記自己免疫疾患が、カルジオリピンに対する抗体の増大した濃度を特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデスおよび抗リン脂質抗体症候群からなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記方法が、全身性エリテマトーデスの 1 以上の症状を緩和または寛解させることを含み、前記全身性エリテマトーデスの症状が、増大したカルジオリピン抗体濃度、発熱、血管内血栓、血小板減少症、心臓弁疾患、網状皮斑、胸膜炎、胸水、ループス肺炎、慢性びまん性間質性肺疾患、肺高血圧症、肺動脈塞栓、肺出血、縮小肺症候群、心膜炎、心筋炎、心内膜炎、貧血、低血小板数および低白血球数、延長した部分トロンボプラスチン時間、骨関節結核、筋肉痛、頬部発疹、円盤状ループス、脱毛症、口、鼻、尿路および膣内の潰瘍、多発性神経障害、ならびに頭蓋内圧亢進症候群、からなる群より選択される 1 以上の症状である、請求項 12 に記載の方法。

10

## 【請求項 14】

前記芳香族陽イオン性ペプチドが、経口で、非経口で、静脈内で、皮下に、経皮に、局所にまたは吸入により投与される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 15】

自己免疫疾患に罹患した対象の炎症を低減する方法であって、  
有効な量の芳香族陽イオン性ペプチドまたはその薬剂的に許容される塩を、自己免疫疾患を有する対象に投与することを含むことを特徴とする、方法。

20

## 【請求項 16】

前記芳香族陽イオン性ペプチドが、 $2', 6' - \text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-02)、 $\text{Phe} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-20)、 $\text{D} - \text{Arg} - 2', 6' - \text{Dmt} - \text{Lys} - \text{Phe} - \text{NH}_2$  (SS-31)、 $2', 6' - \text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Phe} - (\text{atn}) \text{Dap} - \text{NH}_2$  (SS-19) ( $(\text{atn}) \text{Dap}$  は  $\alpha$ -アントラニロイル-L- $\alpha$ -ジアミノプロピオン酸)、および  $2', 6' - \text{Dmt} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Ala} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (SS-36) ( $\text{Ala}$  は  $\alpha$ -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン) からなる群より選択される 1 以上である、請求項 15 に記載の方法。

30

## 【請求項 17】

前記塩が、酢酸塩またはトリフルオロ酢酸塩である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記自己免疫疾患が、カルジオリピンに対する抗体を生成する、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデスおよび抗リン脂質抗体症候群からなる群より選択される、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記方法が、全身性エリテマトーデスの 1 以上の症状を緩和または寛解させることを含み、前記全身性エリテマトーデスの症状が、増大したカルジオリピン抗体濃度、発熱、血管内血栓、血小板減少症、心臓弁疾患、網状皮斑、胸膜炎、胸水、ループス肺炎、慢性びまん性間質性肺疾患、肺高血圧症、肺動脈塞栓、肺出血、縮小肺症候群、心膜炎、心筋炎、心内膜炎、貧血、低血小板数および低白血球数、延長した部分トロンボプラスチン時間、骨関節結核、筋肉痛、頬部発疹、円盤状ループス、脱毛症、口、鼻、尿路および膣内の潰瘍、多発性神経障害、ならびに頭蓋内圧亢進症候群、からなる群より選択される 1 以上の症状である、請求項 19 に記載の方法。

40

## 【請求項 21】

前記芳香族陽イオン性ペプチドが、経口で、非経口で、静脈内で、皮下に、経皮に、局

50

所に、または吸入により投与される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ペプチドが、 $D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH_2$  (SS - 31) を含む、請求項 8 または 15 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ペプチドが、 $2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH_2$  (SS - 19) ((atn) Dap は - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸) を含む、請求項 1、8、または 15 に記載の方法。

【請求項 24】

前記ペプチドが、 $2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH_2$  (SS - 36) (Ald は - (6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル)アラニン) を含む、請求項 1、8、または 15 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2012年2月23日に提出された米国特許出願第61/602,418号の優先権の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

(技術分野)

20

本技術は、概して、芳香族陽イオン性ペプチド組成物および自己免疫疾患または病態の症状の治療、抑制、または寛解に使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

自己免疫疾患は、身体の自己組織に影響を与える免疫反応を特徴とする。自己免疫疾患は、主要な臨床的特徴および病理学的疾患の特徴に従い、大きく2種類のカテゴリー：多くの臓器に損傷を与える疾患（全身性）、および1種類の臓器または組織のみが直接的に自己免疫過程で損傷を受ける疾患（局在性）に分けることができる。全身性自己免疫疾患（なかでも関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、抗リン脂質抗体症候群および全身性硬化等）はしばしば、多種多様な自己抗原（例えばDNA、細胞表面分子、および細胞内マトリックスタンパク質等）との自己抗体反応を特徴とする。全身性自己免疫疾患の原因は未だ不明のままであるが、数種類の免疫機構が、遺伝的要因および環境要因と共に関与している。

30

【発明の概要】

【0004】

いくつかの態様では、本技術は、芳香族陽イオン性ペプチドもしくはその薬剤的に許容される塩の治療に有効な量を自己免疫疾患に罹患した対象に投与することにより、自己免疫疾患に罹患した対象を治療する、自己免疫疾患に罹患した対象のカルジオリピン酸化を低減させる、および/または対象の炎症を低減させる方法を提供する。本方法のいくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、カルジオリピンに対する抗体の増大した濃度を特徴とする。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は全身性エリテマトーデスまたは抗リン脂質抗体症候群である。

40

【0005】

本明細書に開示の方法のいくつかの実施形態では、対象に投与される芳香族陽イオン性ペプチドとしては、 $2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - NH_2$  (SS - 02)、 $Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH_2$  (SS - 20)、 $D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH_2$  (SS - 31)、 $2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH_2$  (SS - 19) ((atn) Dap は - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸)、および  $2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH_2$  (SS - 36) (Ald は - (6' - ジメチルアミ

50

ノ - 2' - ナフトイル)アラニン)からなる群より選択される1以上のペプチドが挙げられる。いくつかの実施形態では、塩は酢酸塩またはトリフルオロ酢酸塩である。いくつかの実施形態では、ペプチドはD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)を含む。

#### 【0006】

いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドまたはその薬剂的に許容される塩の治療に有効な量を、投与する必要がある対象(例えば、自己免疫疾患に罹患した対象の自己免疫疾患を治療する、カルジオリピン酸化を低減させるおよび/または炎症を緩和させる必要がある)に投与することで、自己免疫疾患の1以上の症状が緩和される。例えば、いくつかの実施形態では、対象は、全身性エリテマトーデスに罹患した状態であり、芳香族陽イオン性ペプチドの投与が全身性エリテマトーデスの1以上の症状を緩和または寛解させる。この場合、全身性エリテマトーデスの症状は、以下の症状:増大したカルジオリピン抗体濃度、発熱、血管内血栓、血小板減少症、心臓弁疾患、網状皮斑、胸膜炎、胸水、ループス肺炎、慢性びまん性間質性肺疾患、肺高血圧症、肺動脈塞栓、肺出血、縮小肺症候群(shrinking lung syndrome)、心膜炎、心筋炎、心内膜炎、貧血、低血小板数および低白血球数、延長した部分トロンボプラスチン時間、骨関節結核、筋肉痛、頬部発疹、円盤状ループス(discoid lupus)、脱毛症(allopecia)、口、鼻、尿路および腔内の潰瘍、多発性神経障害、ならびに頭蓋内圧亢進症候群からなる群より選択される1以上の症状である。

10

#### 【0007】

いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは経口で、非経口で、静脈内で、皮下に、経皮的に、局所にまたは吸入により投与される。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0008】

【図1】図1Aおよび1Bは、ペプチドD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)がシトクロムc還元率を上昇させることを示す図である。

【図2】図2(上側パネル)は、ペプチドD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)がシトクロムcを介した電子拡散を促進することを示す図である。図2(下側パネル)は、SS - 31の用量の増加による、溶液中のシトクロムのサイクリックボルタモグラムの示すグラフである(20mM トリス - ホウ酸塩 - EDTA (TBE)緩衝液pH7、100mV/s)。

30

【図3A】図3Aおよび3Bは、ペプチドD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)がシトクロムcの電子容量(electron capacity)を増強させることを示す図である。

【図3B】図3Aおよび3Bは、ペプチドD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)がシトクロムcの電子容量(electron capacity)を増強させることを示す図である。

【図4】図4は、ペプチドD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)がシトクロムcのヘム周辺に新規の - 相互作用を誘導することを示す図である。

40

#### 【0009】

【図5A】図5Aおよび5Bは、ペプチドD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)が単離されたミトコンドリアでO<sub>2</sub>消費を上昇させることを示す図である。

【図5B】図5Aおよび5Bは、ペプチドD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)が単離されたミトコンドリアでO<sub>2</sub>消費を上昇させることを示す図である。

#### 【0010】

【図6】図6は、ペプチドD - Arg - 2' , 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)が単離されたミトコンドリアでATP合成を上昇させることを示す図である

50

。

【図 7】図 7 は、ペプチド D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) がシトクロム c - 枯渇ミトブラストの呼吸を促進させることを示す図である。

。

【図 8】図 8 は、ペプチド D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) および P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 2 0 ) がシトクロム c 還元を容易にすることを示す図である。

【図 9】図 9 は、ペプチド D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) および P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 2 0 ) が、単離されたラット腎臓ミトコンドリアの O<sub>2</sub> 消費で測定されたように、電子の流れを促進することを示す図である。

10

【図 10】図 10 は、ペプチド D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) および P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 2 0 ) が単離されたミトコンドリアでの A T P 生成速度を増大させることを示す図である。

【 0 0 1 1 】

【図 11 A】図 11 A ~ 11 C は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) ( 図 11 A )、2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 6 ) ( 図 11 C ) および 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 7 ) ( 図 11 B ) とカルジオリピンとの相互作用を示す図である。

20

【図 11 B】図 11 A ~ 11 C は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) ( 図 11 A )、2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 6 ) ( 図 11 C ) および 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 7 ) ( 図 11 B ) とカルジオリピンとの相互作用を示す図である。

【図 11 C】図 11 A ~ 11 C は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) ( 図 11 A )、2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 6 ) ( 図 11 C ) および 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 7 ) ( 図 11 B ) とカルジオリピンとの相互作用を示す図である。

30

【 0 0 1 2 】

【図 12 A】図 12 A ~ 12 D は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) とシトクロム c との相互作用を示す図である。

【図 12 B】図 12 A ~ 12 D は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) とシトクロム c との相互作用を示す図である。

【図 12 C】図 12 A ~ 12 D は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) とシトクロム c との相互作用を示す図である。

【図 12 D】図 12 A ~ 12 D は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) とシトクロム c との相互作用を示す図である。

40

【 0 0 1 3 】

【図 13 A】図 13 A ~ 13 D は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) ( 図 13 A、13 B )、2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 7 ) ( 図 13 C )、および 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 6 ) ( 図 13 D ) と、シトクロム c およびカルジオリピン ( C L ) との相互作用を示す図である。

【図 13 B】図 13 A ~ 13 D は、ペプチド 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) ( 図 13 A、13 B )、2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 7 ) ( 図 13 C )、および 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 6 ) ( 図 13 D ) と、シトクロム c およびカルジオリピン ( C L ) との相互作用を示す図である。

50

【図13C】図13A～13Dは、ペプチド2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub>(SS-19)(図13A、13B)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH<sub>2</sub>(SS-37)(図13C)、および2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-36)(図13D)と、シトクロムcおよびカルジオリピン(CL)との相互作用を示す図である。

【図13D】図13A～13Dは、ペプチド2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub>(SS-19)(図13A、13B)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH<sub>2</sub>(SS-37)(図13C)、および2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-36)(図13D)と、シトクロムcおよびカルジオリピン(CL)との相互作用を示す図である。

10

【0014】

【図14A】図14A～14Eは、シトクロムcのヘム環境をカルジオリピンのアシル鎖から保護するペプチド2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub>(SS-19)(図14B)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-20)(図14D)、D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SS-31)(図14A)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-36)(図14C)およびD-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SPI-231)(図14E)を示す図である。

【図14B】図14A～14Eは、シトクロムcのヘム環境をカルジオリピンのアシル鎖から保護するペプチド2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub>(SS-19)(図14B)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-20)(図14D)、D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SS-31)(図14A)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-36)(図14C)およびD-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SPI-231)(図14E)を示す図である。

20

【図14C】図14A～14Eは、シトクロムcのヘム環境をカルジオリピンのアシル鎖から保護するペプチド2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub>(SS-19)(図14B)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-20)(図14D)、D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SS-31)(図14A)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-36)(図14C)およびD-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SPI-231)(図14E)を示す図である。

30

【図14D】図14A～14Eは、シトクロムcのヘム環境をカルジオリピンのアシル鎖から保護するペプチド2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub>(SS-19)(図14B)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-20)(図14D)、D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SS-31)(図14A)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-36)(図14C)およびD-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SPI-231)(図14E)を示す図である。

【図14E】図14A～14Eは、シトクロムcのヘム環境をカルジオリピンのアシル鎖から保護するペプチド2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub>(SS-19)(図14B)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-20)(図14D)、D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SS-31)(図14A)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-36)(図14C)およびD-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SPI-231)(図14E)を示す図である。

40

【0015】

【図15A】図15A～15Cは、ペプチドD-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SS-31)(図15A、15B)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(SS-20)(図15C)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH

50

<sub>2</sub> (SPI - 231) (図15C) が、カルジオリピンにより引き起こされるシトクロム c 還元の抑制を、阻止することを示す図である。

【図15B】図15A～15Cは、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) (図15A、15B)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20) (図15C)、D - Arg - Tyr - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SPI - 231) (図15C) が、カルジオリピンにより引き起こされるシトクロム c 還元の抑制を、阻止することを示す図である。

【図15C】図15A～15Cは、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) (図15A、15B)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20) (図15C)、D - Arg - Tyr - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SPI - 231) (図15C) が、カルジオリピンにより引き起こされるシトクロム c 還元の抑制を、阻止することを示す図である。

10

【0016】

【図16A】図16A～16Bは、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) (図16A) および Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20) (図16B) が単離されたミトコンドリアの O<sub>2</sub> 消費を増強させることを示す図である。

【図16B】図16A～16Bは、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) (図16A) および Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20) (図16B) が単離されたミトコンドリアの O<sub>2</sub> 消費を増強させることを示す図である。

20

【0017】

【図17】図17は、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) が単離されたミトコンドリアの ATP 合成を上昇させることを示す図である。

【図18】図18は、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) がシトクロム c - 枯渴ミトブラストの呼吸を増強させることを示す図である。

【0018】

【図19A】図19A～19Cは、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) (図19A、19B)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS - 19)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 36)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS - 37) および D - Arg - Tyr - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SPI - 231) (図19C) が、シトクロム c / カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性を抑制することを示す図である。

30

【図19B】図19A～19Cは、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) (図19A、19B)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS - 19)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 36)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS - 37) および D - Arg - Tyr - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SPI - 231) (図19C) が、シトクロム c / カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性を抑制することを示す図である。

40

【図19C】図19A～19Cは、ペプチド D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) (図19A、19B)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS - 19)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 36)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub>

50



(SS-37) および D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S P I - 2 3 1 ) ( 図 1 9 C ) が、シトクロム c / カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性を抑制することを示す図である。

【 0 0 1 9 】

【 図 2 0 A 】 図 2 0 A は、ペプチド類似体 SS - 0 2 、 [ a t n ] SS - 0 2 ( SS - 1 9 と 同 称 す ) 、 [ a l d ] SS - 0 2 ( SS - 3 6 と 同 称 す ) 、 お よ び SS - 3 1 の 化学構造図である。2 0 B は、1 μ M [ a t n ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 0 C は、1 μ M [ a l d ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 0 D は、1 μ M [ a l d ] SS - 0 2 添 加 後 の P O P S 、 P O P A 、 D P P G 、 お よ び カ ル ジ オ リ ピ ン の 代 表 的 な 発 光 ス ペ ク ト ル を 示 す 。 図 2 0 E は、カルジオリピン ( C L ) 、 D P P G 、 P O P S 、 P O P A 、 P E 、 お よ び P O P C に 添 加 し た [ a l d ] SS - 0 2 の 相 対 蛍 光 量 ( fluorescence ) を 示 す 棒 グ ラ フ で あり ます 。 図 2 0 F は、リボソーム中のカルジオリピンお よ び カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度に 添 加 し た [ a t n ] SS - 0 2 の 相 対 蛍 光 量 を 比 較 し た グ ラ フ で あり ます 。 図 2 0 G は、1 μ M [ a t n ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度 ( 2 5 、 5 0 、 7 5 、 1 0 0 μ g / m L ) の 相 対 蛍 光 量 を 示 す グ ラ フ で あり ます 。

10

【 図 2 0 B 】 図 2 0 A は、ペプチド類似体 SS - 0 2 、 [ a t n ] SS - 0 2 ( SS - 1 9 と 同 称 す ) 、 [ a l d ] SS - 0 2 ( SS - 3 6 と 同 称 す ) 、 お よ び SS - 3 1 の 化学構造図である。2 0 B は、1 μ M [ a t n ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 0 C は、1 μ M [ a l d ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 0 D は、1 μ M [ a l d ] SS - 0 2 添 加 後 の P O P S 、 P O P A 、 D P P G 、 お よ び カ ル ジ オ リ ピ ン の 代 表 的 な 発 光 ス ペ ク ト ル を 示 す 。 図 2 0 E は、カルジオリピン ( C L ) 、 D P P G 、 P O P S 、 P O P A 、 P E 、 お よ び P O P C に 添 加 し た [ a l d ] SS - 0 2 の 相 対 蛍 光 量 ( fluorescence ) を 示 す 棒 グ ラ フ で あり ます 。 図 2 0 F は、リボソーム中のカルジオリピンお よ び カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度に 添 加 し た [ a t n ] SS - 0 2 の 相 対 蛍 光 量 を 比 較 し た グ ラ フ で あり ます 。 図 2 0 G は、1 μ M [ a t n ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度 ( 2 5 、 5 0 、 7 5 、 1 0 0 μ g / m L ) の 相 対 蛍 光 量 を 示 す グ ラ フ で あり ます 。

20

【 図 2 0 C 】 図 2 0 A は、ペプチド類似体 SS - 0 2 、 [ a t n ] SS - 0 2 ( SS - 1 9 と 同 称 す ) 、 [ a l d ] SS - 0 2 ( SS - 3 6 と 同 称 す ) 、 お よ び SS - 3 1 の 化学構造図である。2 0 B は、1 μ M [ a t n ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 0 C は、1 μ M [ a l d ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 0 D は、1 μ M [ a l d ] SS - 0 2 添 加 後 の P O P S 、 P O P A 、 D P P G 、 お よ び カ ル ジ オ リ ピ ン の 代 表 的 な 発 光 ス ペ ク ト ル を 示 す 。 図 2 0 E は、カルジオリピン ( C L ) 、 D P P G 、 P O P S 、 P O P A 、 P E 、 お よ び P O P C に 添 加 し た [ a l d ] SS - 0 2 の 相 対 蛍 光 量 ( fluorescence ) を 示 す 棒 グ ラ フ で あり ます 。 図 2 0 F は、リボソーム中のカルジオリピンお よ び カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度に 添 加 し た [ a t n ] SS - 0 2 の 相 対 蛍 光 量 を 比 較 し た グ ラ フ で あり ます 。 図 2 0 G は、1 μ M [ a t n ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度 ( 2 5 、 5 0 、 7 5 、 1 0 0 μ g / m L ) の 相 対 蛍 光 量 を 示 す グ ラ フ で あり ます 。

30

【 図 2 0 D 】 図 2 0 A は、ペプチド類似体 SS - 0 2 、 [ a t n ] SS - 0 2 ( SS - 1 9 と 同 称 す ) 、 [ a l d ] SS - 0 2 ( SS - 3 6 と 同 称 す ) 、 お よ び SS - 3 1 の 化学構造図である。2 0 B は、1 μ M [ a t n ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 0 C は、1 μ M [ a l d ] SS - 0 2 に 添 加 し た カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 0 D は、1 μ M [ a l d ] SS - 0 2 添 加 後 の P O P S 、 P O P A 、 D P P G 、 お よ び カ ル ジ オ リ ピ ン の 代 表 的 な 発 光 ス ペ ク ト ル を 示 す 。 図 2 0 E は、カルジオリピン ( C L ) 、 D P P G 、 P O P S 、 P O P A 、 P E 、 お よ び P O P C に 添 加 し た [ a l d ] SS - 0 2 の 相 対 蛍 光 量 ( fluorescence ) を 示 す 棒 グ ラ フ で あり ます 。 図 2 0 F は、リボソーム中のカルジオリピンお よ び カ ル ジ オ リ ピ ン の 様 々な濃度に 添 加 し た [ a t n ] SS - 0 2 の 相 対 蛍 光 量 を 比 較 し

40

50

たグラフである。図 20 G は、 $1 \mu\text{M}$  [ a t n ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度 ( 2 5 、 5 0 、 7 5 、  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$  ) の相対蛍光量を示すグラフである。

【図 20 E】図 20 A は、ペプチド類似体 S S - 0 2 、 [ a t n ] S S - 0 2 ( S S - 1 9 と称す ) 、 [ a l d ] S S - 0 2 ( S S - 3 6 と称す ) 、および S S - 3 1 の化学構造図である。20 B は、 $1 \mu\text{M}$  [ a t n ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 20 C は、 $1 \mu\text{M}$  [ a l d ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 20 D は、 $1 \mu\text{M}$  [ a l d ] S S - 0 2 添加後の P O P S 、 P O P A 、 D P P G 、およびカルジオリピンの代表的な発光スペクトルを示す。図 20 E は、カルジオリピン ( C L ) 、 D P P G 、 P O P S 、 P O P A 、 P E 、および P O P C に添加した [ a l d ] S S - 0 2 の相対蛍光量 ( fluorescence ) を示す棒グラフである。図 20 F は、リボソーム中のカルジオリピンおよびカルジオリピンの様々な濃度に添加した [ a t n ] S S - 0 2 の相対蛍光量を比較したグラフである。図 20 G は、 $1 \mu\text{M}$  [ a t n ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度 ( 2 5 、 5 0 、 7 5 、  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$  ) の相対蛍光量を示すグラフである。

【図 20 F】図 20 A は、ペプチド類似体 S S - 0 2 、 [ a t n ] S S - 0 2 ( S S - 1 9 と称す ) 、 [ a l d ] S S - 0 2 ( S S - 3 6 と称す ) 、および S S - 3 1 の化学構造図である。20 B は、 $1 \mu\text{M}$  [ a t n ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 20 C は、 $1 \mu\text{M}$  [ a l d ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 20 D は、 $1 \mu\text{M}$  [ a l d ] S S - 0 2 添加後の P O P S 、 P O P A 、 D P P G 、およびカルジオリピンの代表的な発光スペクトルを示す。図 20 E は、カルジオリピン ( C L ) 、 D P P G 、 P O P S 、 P O P A 、 P E 、および P O P C に添加した [ a l d ] S S - 0 2 の相対蛍光量 ( fluorescence ) を示す棒グラフである。図 20 F は、リボソーム中のカルジオリピンおよびカルジオリピンの様々な濃度に添加した [ a t n ] S S - 0 2 の相対蛍光量を比較したグラフである。図 20 G は、 $1 \mu\text{M}$  [ a t n ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度 ( 2 5 、 5 0 、 7 5 、  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$  ) の相対蛍光量を示すグラフである。

【図 20 G】図 20 A は、ペプチド類似体 S S - 0 2 、 [ a t n ] S S - 0 2 ( S S - 1 9 と称す ) 、 [ a l d ] S S - 0 2 ( S S - 3 6 と称す ) 、および S S - 3 1 の化学構造図である。20 B は、 $1 \mu\text{M}$  [ a t n ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 20 C は、 $1 \mu\text{M}$  [ a l d ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度の代表的な発光スペクトルを示す。図 20 D は、 $1 \mu\text{M}$  [ a l d ] S S - 0 2 添加後の P O P S 、 P O P A 、 D P P G 、およびカルジオリピンの代表的な発光スペクトルを示す。図 20 E は、カルジオリピン ( C L ) 、 D P P G 、 P O P S 、 P O P A 、 P E 、および P O P C に添加した [ a l d ] S S - 0 2 の相対蛍光量 ( fluorescence ) を示す棒グラフである。図 20 F は、リボソーム中のカルジオリピンおよびカルジオリピンの様々な濃度に添加した [ a t n ] S S - 0 2 の相対蛍光量を比較したグラフである。図 20 G は、 $1 \mu\text{M}$  [ a t n ] S S - 0 2 に添加したカルジオリピンの様々な濃度 ( 2 5 、 5 0 、 7 5 、  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$  ) の相対蛍光量を示すグラフである。

#### 【 0 0 2 0 】

【図 21 A】図 21 A は、様々な濃度 ( 2 、 4 、  $6 \mu\text{M}$  ) のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2 (  $1 \mu\text{M}$  ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 21 B は、様々な濃度 ( 2 、 4 、  $6 \mu\text{M}$  ) のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2 (  $1 \mu\text{M}$  ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 21 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること (  $1 \sim 10 \mu\text{M}$  ) による [ a t n ] S S - 0 2 (  $1 \mu\text{M}$  ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 21 D は、カルジオリピン (  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  ) を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2 (  $1 \mu\text{M}$  ) およびシトクロム c (  $2 \mu\text{M}$  ) の経時的な相対蛍光強度を示すグラフである。図 21 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2 (  $1 \mu\text{M}$  ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 21 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン ( C L ) を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光ス

10

20

30

40

50

ペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、2  $\mu$  M のシトクロム c を逐次添加 ( 図 2 1 H では標識 C ) 、7 5  $\mu$  g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 H では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加 ( 図 2 1 I では標識 C ) 、7 5  $\mu$  g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 I では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光を示す。

【図 2 1 B】図 2 1 A は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6  $\mu$  M ) のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 B は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6  $\mu$  M ) のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること ( 1 ~ 1 0  $\mu$  M ) による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 ( M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 D は、カルジオリピン ( 1 0  $\mu$  g / m l ) を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) およびシトクロム c ( 2  $\mu$  M ) の経時的な相対蛍光強度を示すグラフである。図 2 1 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン ( C L ) を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、2  $\mu$  M のシトクロム c を逐次添加 ( 図 2 1 H では標識 C ) 、7 5  $\mu$  g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 H では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加 ( 図 2 1 I では標識 C ) 、7 5  $\mu$  g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 I では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光を示す。

【図 2 1 C】図 2 1 A は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6  $\mu$  M ) のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 B は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6  $\mu$  M ) のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること ( 1 ~ 1 0  $\mu$  M ) による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 ( M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 D は、カルジオリピン ( 1 0  $\mu$  g / m l ) を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) およびシトクロム c ( 2  $\mu$  M ) の経時的な相対蛍光強度を示すグラフである。図 2 1 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン ( C L ) を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、2  $\mu$  M のシトクロム c を逐次添加 ( 図 2 1 H では標識 C ) 、7 5  $\mu$  g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 H では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加 ( 図 2 1 I では標識 C ) 、7 5  $\mu$  g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 I では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光を示す。

【図 2 1 D】図 2 1 A は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6  $\mu$  M ) のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 B は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6  $\mu$  M ) のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること ( 1 ~ 1 0  $\mu$  M ) による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 ( M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 D は、カルジオリピン ( 1 0  $\mu$  g / m l ) を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2 ( 1  $\mu$  M ) およびシトクロム c ( 2  $\mu$  M ) の経時的な相対蛍光強度を示すグラ

10

20

30

40

50

フである。図 2 1 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン ( C L ) を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、2 μ M のシトクロム c を逐次添加 ( 図 2 1 H では標識 C ) 、7 5 μ g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 H では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加 ( 図 2 1 I では標識 C ) 、7 5 μ g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 I では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光を示す。

【図 2 1 E】図 2 1 A は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6 μ M ) のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 B は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6 μ M ) のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること ( 1 ~ 1 0 μ M ) による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 ( M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 D は、カルジオリピン ( 1 0 μ g / m l ) を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) およびシトクロム c ( 2 μ M ) の経時的な相対蛍光強度を示すグラフである。図 2 1 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン ( C L ) を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、2 μ M のシトクロム c を逐次添加 ( 図 2 1 H では標識 C ) 、7 5 μ g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 H では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加 ( 図 2 1 I では標識 C ) 、7 5 μ g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 I では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光を示す。

【図 2 1 F】図 2 1 A は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6 μ M ) のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 B は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6 μ M ) のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること ( 1 ~ 1 0 μ M ) による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 ( M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 D は、カルジオリピン ( 1 0 μ g / m l ) を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) およびシトクロム c ( 2 μ M ) の経時的な相対蛍光強度を示すグラフである。図 2 1 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) 蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン ( C L ) を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、2 μ M のシトクロム c を逐次添加 ( 図 2 1 H では標識 C ) 、7 5 μ g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 H では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加 ( 図 2 1 I では標識 C ) 、7 5 μ g / m l の B S A をさらに添加 ( 図 2 1 I では標識 A ) することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光を示す。

【図 2 1 G】図 2 1 A は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6 μ M ) のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 B は、様々な濃度 ( 2 、 4 、 6 μ M ) のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2 ( 1 μ M ) の代表的な

10

20

30

40

50

な発光スペクトルを示す。図 2 1 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること（ $1 \sim 10 \mu\text{M}$ ）による [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \text{ (M)}$ ）蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 D は、カルジオリピン（ $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）およびシトクロム c（ $2 \mu\text{M}$ ）の経時的な相対蛍光強度を示すグラフである。図 2 1 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン（C L）を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、 $2 \mu\text{M}$  のシトクロム c を逐次添加（図 2 1 H では標識 C）、 $75 \mu\text{g} / \text{ml}$  の B S A をさらに添加（図 2 1 H では標識 A）することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加（図 2 1 I では標識 C）、 $75 \mu\text{g} / \text{ml}$  の B S A をさらに添加（図 2 1 I では標識 A）することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光を示す。

【図 2 1 H】図 2 1 A は、様々な濃度（ $2$ 、 $4$ 、 $6 \mu\text{M}$ ）のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 B は、様々な濃度（ $2$ 、 $4$ 、 $6 \mu\text{M}$ ）のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること（ $1 \sim 10 \mu\text{M}$ ）による [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \text{ (M)}$ ）蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 D は、カルジオリピン（ $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）およびシトクロム c（ $2 \mu\text{M}$ ）の経時的な相対蛍光強度を示すグラフである。図 2 1 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン（C L）を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、 $2 \mu\text{M}$  のシトクロム c を逐次添加（図 2 1 H では標識 C）、 $75 \mu\text{g} / \text{ml}$  の B S A をさらに添加（図 2 1 H では標識 A）することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加（図 2 1 I では標識 C）、 $75 \mu\text{g} / \text{ml}$  の B S A をさらに添加（図 2 1 I では標識 A）することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光を示す。

【図 2 1 I】図 2 1 A は、様々な濃度（ $2$ 、 $4$ 、 $6 \mu\text{M}$ ）のシトクロム c に添加した [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 B は、様々な濃度（ $2$ 、 $4$ 、 $6 \mu\text{M}$ ）のシトクロム c に添加した [ a l d ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）の代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 C は、シトクロム c 濃度を増加させて添加させること（ $1 \sim 10 \mu\text{M}$ ）による [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \text{ (M)}$ ）蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 D は、カルジオリピン（ $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）を含むまたは含まない [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）およびシトクロム c（ $2 \mu\text{M}$ ）の経時的な相対蛍光強度を示すグラフである。図 2 1 E は、カルジオリピン単独またはリボソームと混合したカルジオリピンの増大させた濃度での、シトクロム c による [ a t n ] S S - 0 2（ $1 \mu\text{M}$ ）蛍光の消失を示す折れ線グラフである。図 2 1 F は、[ a l d ] S S - 0 2 の単独の、カルジオリピン（C L）を含んだ、およびカルジオリピンおよびシトクロム c を含んだ代表的な発光スペクトルを示す。図 2 1 G は、[ a t n ] S S - 0 2 蛍光消失をミトコンドリア対シトクロム c - 欠乏ミトプラストで比較した棒グラフである。図 2 1 H は、 $2 \mu\text{M}$  のシトクロム c を逐次添加（図 2 1 H では標識 C）、 $75 \mu\text{g} / \text{ml}$  の B S A をさらに添加（図 2 1 H では標識 A）することにより消失した [ a n t ] S S - 0 2 からの代表的な蛍光発光スペクトルを示す。図 2 1 I は、T M R M の逐次添加（図 2 1 I では標識 C）、 $75 \mu\text{g} / \text{ml}$  の B S A をさらに添加（図 2 1 I では標識 A）することにより消失した [ a n t ] S S

10

20

30

40

50

- 02からの代表的な蛍光発光を示す。

【0021】

【図22A】図22Aは、様々な濃度(0、10、20、40 $\mu$ M)のSS-31ペプチドを添加したシトクロムcとカルジオリピンの混合物の、 $A_{550}/A_{570}$ 変化のプロットである。図22Bは、異なるペプチド(対照、SS-02、[atn]SS-02、[ald]SS-02、およびSS-31)についてのシトクロムc酸化率を比較した棒グラフである。

【図22B】図22Aは、様々な濃度(0、10、20、40 $\mu$ M)のSS-31ペプチドを添加したシトクロムcとカルジオリピンの混合物の、 $A_{550}/A_{570}$ 変化のプロットである。図22Bは、異なるペプチド(対照、SS-02、[atn]SS-02、[ald]SS-02、およびSS-31)についてのシトクロムc酸化率を比較した棒グラフである。

10

【0022】

【図23】図23は、鉄(III)シトクロムc単独またはSSペプチド類似体を含むもしくは含まないカルジオリピン(CL)との複合体での、ソーレー帯の代表的な円二色性スペクトルを示す図である。

【図24】図24は、SS-02、[atn]SS-02、[ald]SS-02、およびSS-31について、シトクロムc過酸化率を対照の割合として比較した棒グラフである。

【図25】図25は、アスコルベートにより誘導されるカルジオリピン-シトクロムc複合体の還元の促進能力について、異なるペプチド類似体(40 $\mu$ M; SS-02、[atn]SS-02、[ald]SS-02、およびSS-31)を比較した棒グラフである。CLは、添加されるSSペプチド類似体を含まないカルジオリピン-シトクロムc複合体である。

20

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明の実質的な理解を得るために、本発明のある態様、様式、実施形態、変形および特性が、あらゆるレベルで詳細に後述されることは、十分に理解されるべきである。本明細書に使用されるある用語の定義を以下に示す。別段の定義がないかぎり、本明細書で用いられる全ての技術用語および科学用語は、概して本発明が属する当業者により共通して理解されるものと同じ意味を有する。

30

【0024】

本開示を実施する際、細胞生物学、分子生物学、タンパク質生化学、免疫学、および細菌学の多くの従来技術が、使用される。これらの技術は当業者に周知であり、利用可能なあらゆる刊行物(例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)等)で提供される。

【0025】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる場合、単数形「a」、「an」および「the」には、その内容が別段明確に示されないかぎり、複数の指示物(referent)が含まれる。例えば、「細胞(a cell)」への言及は、2以上の細胞等の組み合わせを含む。

40

【0026】

本明細書で用いられる場合、薬剤、薬物、またはペプチドの対象への「投与」には、対象に意図する機能を実施する化合物を導入または送達するいずれの経路が含まれる。投与は、いずれの好適な経路(例えば経口で、経鼻で、非経口で(静脈内で、筋肉内に、腹腔内で、または皮下に)、局所的に、皮膚に、直腸内に、皮内に、経皮的に、吸入で、動脈内に、大脳内に、骨内(interosseously)に、髄腔内に、イオン泳動的、経眼的に、腔内(intravaginally))で実施され得る。投与には、自己投与および他者による投与が含ま

50

れる。

【 0 0 2 7 】

本明細書で用いられる場合、用語「アミノ酸」には、天然由来のアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然由来のアミノ酸に類似した方法で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体が含まれる。天然由来のアミノ酸は、遺伝子情報によりコードされるもの、ならびに後修飾を受けるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 $\alpha$ -カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然由来のアミノ酸と同じ基本化学構造を有する、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基と結合する $\alpha$ -炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。そのような類似体は、修飾R基（例えば、ノルロイシン）または修飾ペプチド骨格を有するが、天然由来のアミノ酸と同様の基本化学構造を維持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造と異なる化学構造を有するが、天然由来のアミノ酸と似た方法で機能する化合物を指す。本明細書では、アミノ酸は、通常知られる3つの文字記号、またはIUPAC-IUB生化学命名法委員会により推奨される1文字記号で示され得る。

10

【 0 0 2 8 】

本明細書で用いられる場合、用語「有効な量」は、所望の治療効果および/または予防効果を達成するのに十分な量を指す。治療用途または予防用途の文脈では、対象に投与される組成物の量は、疾患の種類および重症度、ならびに個体の特徴（全体的な健康、年齢、性別、体重および薬物耐性等）に依る。これは疾患の段階、重症度および種類にも依る。当業者は、これらのおよび他の因子に依り、適切な用量を決定することができる。組成物はまた、1以上のさらなる治療化合物と併用投与し得る。いくつかの実施形態では用語「有効な量」は、所望の治療効果を達成させる、例えば、疾患または病態（抗リン脂質抗体症候群または全身性エリテマトーデス等）の徴候もしくは症状、を緩和または改善するのに十分な量を指す。

20

【 0 0 2 9 】

本明細書で用いられる場合、「外因性核酸」は、宿主細胞内に天然に存在しないが、外部の供給源より導入される核酸（例えば、DNA、RNA）を指す。本明細書で用いられる場合、外因性核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれていないが、別々に維持している核酸、細菌プラスミドの核酸等を指す。本明細書で用いられる場合、「細菌プラスミド」は、対象となる配列の担体として、および細菌の宿主細胞でその配列を発現する手段としての役割を果たす細菌起源の環状DNAを指す。

30

【 0 0 3 0 】

「単離」もしくは「精製」ポリペプチドまたはペプチドは、薬剤の由来源となる細胞または組織源より得られる細胞物質または他の混入ポリペプチドを実質的に有さない、または化学合成の場合、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。例えば、単離された芳香族陽イオン性ペプチドまたは単離されたシトクロムcタンパク質は、薬剤の診断用途または治療的使用を妨げる、またはペプチドの伝導性（conductance）もしくは電気特性を妨げる物質を有さない。そのような妨害物質としては、酵素、ホルモンならびに他のタンパク性および非タンパク性溶質が挙げられる。

40

【 0 0 3 1 】

本明細書で用いられる場合、「誘導プロモータ」は、ある条件（温度または特定の分子の存在等）に影響を受け、これらの条件を満たした時のみ対象となる作動可能に連結された核酸配列の発現を促進するプロモータを指す。

【 0 0 3 2 】

本明細書で用いられる場合、「構成的（constitutive）プロモータ」は、全てのまたは大部分の環境条件下で、対象となる作動可能に連結された核酸配列の発現を容易にするプロモータを指す。

【 0 0 3 3 】

本明細書で用いられる場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」

50

という用語は、本明細書では、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわち、ペプチドイソスターによって互いに結合した2以上のアミノ酸を含む高分子と同じ意味で利用される。ポリペプチドは、通常はペプチド、グリコペプチドまたはオリゴマーと称する短鎖と、概してタンパク質と称する長鎖の両方を指す。ポリペプチドは、20遺伝子-コードアミノ酸以外のアミノ酸を含有してもよい。ポリペプチドには、自然過程（翻訳後プロセシング等）により、または当技術分野で周知である化学修飾技術により修飾されたアミノ酸配列が含まれる。

#### 【0034】

本明細書で用いられる場合、「組換え細菌」は、1以上の外因性核酸（例えば、DNA）配列を担持および/または発現させるために遺伝子操作された細菌を指す。

10

#### 【0035】

本明細書で用いられる場合、用語「治療すること」もしくは「治療」または「緩和（alleviation）」は、治療的療法（therapeutic treatment）および予防策または予防的対策の両方を指し、この場合、その目的は、標的の病理学的病態または障害を抑制または減速（低下（lessen））させることである。記載のような臨床的病態の様々な治療または予防様式は、治療または予防の全体だけでなく全体より少ないことも含む「実質的な」ものを意味することを意図し、この場合、いくつかの生物学的結果または医学的関連性のある結果が達成されることも、当然理解される。

#### 【0036】

本明細書で用いられる場合、障害または病態の「抑制」または「抑制すること」は、未治療の対照試料と比較して、治療試料での障害または病態の発症を低減する、または未治療の対照試料と比較して障害または病態の1以上の症状の始まりを遅延もしくはその重症度を低減する化合物を指す。

20

#### 芳香族陽イオン性ペプチド

#### 【0037】

本技術は、芳香族陽イオン性ペプチドの使用に関する。いくつかの実施形態では、ペプチドは、抗カルジオリピン抗体の存在を特徴とする症状、病態または疾患（抗リン脂質抗体症候群および全身性エリテマトーデス等）を治療または寛解させることに関連する態様に有用である。

#### 【0038】

芳香族陽イオン性ペプチドは、水溶性でかつ高い極性をもつ。これらの性質にもかかわらず、ペプチドは細胞膜を容易に貫通することができる。芳香族陽イオン性ペプチドは、典型的にはペプチド結合で共有結合した最低3アミノ酸または最低4アミノ酸を含む。芳香族陽イオン性ペプチドに存在するアミノ酸の最大数は、ペプチド結合により共有結合した約20アミノ酸である。好適には、アミノ酸の最大数は約12、約9、または約6である。

30

#### 【0039】

芳香族陽イオン性ペプチドのアミノ酸は、いずれのアミノ酸であり得る。本明細書で用いられる場合、用語「アミノ酸」は、少なくとも1アミノ基および少なくとも1カルボキシル基を含有するいずれの有機分子を指すために使用される。典型的には、少なくとも1アミノ基は、カルボキシル基に対して1位にある。アミノ酸は、天然由来のものであってもよい。天然由来のアミノ酸としては、例えば、哺乳類タンパク質に天然に見られる最も一般的な20左旋性（L）アミノ酸、すなわち、アラニン（Ala）、アルギニン（Arg）、アスパラギン（Asn）、アスパラギン酸（Asp）、システイン（Cys）、グルタミン（Gln）、グルタミン酸（Glu）、グリシン（Gly）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、リジン（Lys）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、プロリン（Pro）、セリン（Ser）、トレオニン（Thr）、トリプトファン、（Trp）、チロシン（Tyr）、およびバリン（Val）が挙げられる。他の天然由来のアミノ酸としては、例えば、タンパク質合成に関連しない代謝過程で合成されるアミノ酸が挙げられる。例えば、アミノ酸、オルニチンお

40

50



よびシトルリンは、哺乳類の代謝で、尿素生成中に合成される。天然由来のアミノ酸の別の例としては、ヒドロキシプロリン (Hyp) が挙げられる。

【0040】

ペプチドは、随意に1以上の非天然由来のアミノ酸を含有する。最適には、ペプチドは、天然由来のアミノ酸を有していない。非天然由来のアミノ酸は、左旋性 (L-)、右旋性 (D-)、またはその混合物であってもよい。非天然由来のアミノ酸は、典型的には生物の通常の代謝過程では合成されずタンパク質では通常生じないアミノ酸である。さらに、非天然由来のアミノ酸はまた、好適には通常のプロテアーゼにより認識されない。非天然由来のアミノ酸は、ペプチドのいずれの場所でも存在し得る。例えば、非天然由来のアミノ酸は、N末端、C末端、またはN末端とC末端の間のいずれの位置にも存在し得る。

10

【0041】

非天然アミノ酸は、例えば、天然アミノ酸では見られないアルキル基、アリール基、またはアルキルアリール基を含んでいてもよい。非天然アルキルアミノ酸のいくつかの例としては、-アミノ酪酸、-アミノ酪酸、-アミノ酪酸、-アミノ吉草酸、および-アミノカプロン酸が挙げられる。非天然アリールアミノ酸のいくつかの例としては、オルト-、メタ、およびパラ-アミノ安息香酸が挙げられる。非天然アルキルアリールアミノ酸のいくつかの例としては、オルト-、メタ-、およびパラ-アミノフェニル酢酸、および-フェニル-アミノ酪酸が挙げられる。非天然由来のアミノ酸には、天然由来のアミノ酸の誘導体が含まれる。天然由来のアミノ酸の誘導体には、例えば、天然由来のアミノ酸の1以上の化学基を付加したものが含まれてもよい。

20

【0042】

例えば、1以上の化学基を、フェニルアラニンまたはチロシン残基の芳香環の2'、3'、4'、5'、または6'位の位置、またはトリプトファン残基の芳香環の4'、5'、6'、または7'位の位置の1以上に付加し得る。この基は、芳香環に付加し得るいずれの化学基でもあり得る。そのような基のいくつかの例としては、分岐または非分岐C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル (メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、またはt-ブチル等)、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルオキシ (すなわち、アルコキシ)、アミノ、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルアミノおよびC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ジアルキルアミノ (例えば、メチルアミノ、ジメチルアミノ等)、ニトロ、ヒドロキシル、ハロ (すなわち、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード) が挙げられる。天然由来のアミノ酸の非天然由来誘導体のいくつかの具体例としては、ノルバリン (Nva) およびノルロイシン (Nle) が挙げられる。

30

【0043】

ペプチド中のアミノ酸の別の修飾例は、ペプチドのアスパラギン酸またはグルタミン酸残基のカルボキシル基の誘導体化がある。誘導体化の一例は、アンモニアまたは第一級もしくは第二級アミン (例えばメチルアミン、エチルアミン、ジメチルアミンまたはジエチルアミン) によるアミド化である。誘導体化の別の例としては、例えばメチルまたはエチルアルコールによるエステル化が挙げられる。そのような修飾の別の例としては、リジン、アルギニン、またはヒスチジン残基のアミノ基の誘導体化が挙げられる。例えば、そのようなアミノ基は、アシル化され得る。いくつかの好適なアシル基としては、例えば、上述のC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル基 (アセチルまたはプロピオニル基等) のいずれかを含むベンゾイル基またはアルカノイル基が挙げられる。

40

【0044】

非天然由来のアミノ酸は、好適には通常のプロテアーゼに耐性を示すか、または無反応である。プロテアーゼに耐性を示すまたは無反応である非天然由来のアミノ酸の例としては、上述の天然由来のL-アミノ酸のいずれかの右旋性 (D-) 形態、ならびにL-および/またはD-非天然由来のアミノ酸が挙げられる。D-アミノ酸は、タンパク質では通常生じないが、細胞の通常のリボソームタンパク質合成機構以外の手段で合成されるあるペプチド抗生物質では認められる。本明細書で用いられる場合、D-アミノ酸は、非天然由来のアミノ酸とみなされる。

【0045】

50

プロテアーゼ感受性を最小限に抑えるため、ペプチドは、アミノ酸が天然由来であるか否かにかかわらず、通常のプロテアーゼで認められる5未満の、4未満の、3未満の、または2未満の隣接するL-アミノ酸であるべきである。一実施形態では、ペプチドは、D-アミノ酸、および非L-アミノ酸のみを有する。ペプチドがアミノ酸のプロテアーゼ感受性配列を含有する場合、アミノ酸の少なくとも1つは、好ましくは非天然由来のD-アミノ酸であり、これにより、プロテアーゼ耐性がもたらされる。プロテアーゼ感受性配列の例としては、通常のプロテアーゼ(エンドペプチダーゼやトリプシン等)に容易に切断される2以上の隣接する塩基性アミノ酸が挙げられる。塩基性アミノ酸の例としては、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが挙げられる。

#### 【0046】

芳香族陽イオン性ペプチドは、ペプチドでのアミノ酸残基の総数と比較して、生理学的pHで、最小数の正味正電荷を有するべきである。正味正電荷の生理学的pHでの最小数は、以下( $p_m$ )と称される。ペプチドでのアミノ酸残基の総数は、以下( $r$ )と称される。以下に説明される正味正電荷の最小数は、全て生理学的pHでの値である。本明細書で用いられる場合、用語「生理学的pH」は、哺乳類身体の組織および臓器の細胞での通常のpHを指す。例えば、ヒトの生理学的pHは、通常およそ7.4であるが、哺乳類での通常の生理学的pHは、約7.0~約7.8のpHのいずれかである場合がある。

#### 【0047】

本明細書で用いられる場合、「正味電荷」は、ペプチドに存在するアミノ酸が帯びている正電荷の数および負電荷の数の差し引き(balance)を指す。本明細書では、正味電荷が生理学的pHで測定されることが理解されよう。生理学的pHで正の電荷を帯びた天然由来のアミノ酸としては、L-リジン、L-アルギニン、およびL-ヒスチジンが挙げられる。生理学的pHで負の電荷を帯びた天然由来のアミノ酸としては、L-アスパラギン酸およびL-グルタミン酸が挙げられる。

#### 【0048】

典型的には、ペプチドは、正の電荷を帯びたN末端アミノ基および負の電荷を帯びたC末端カルボキシル基を有する。電荷は、生理学的pHで互いに打ち消し合う。正味電荷の計算例として、ペプチドTyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Argは、負の電荷を帯びた1アミノ酸(すなわち、Glu)および正の電荷を帯びた4アミノ酸(すなわち、2Arg残基、1Lys残基、および1His残基)を有する。したがって、上述のペプチドは3の正味正電荷を有する。

#### 【0049】

一実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、 $3p_m$ が $r+1$ 以下の最大数である、生理学的pHでの正味正電荷の最小数( $p_m$ )とアミノ酸残基の総数( $r$ )との間に関係性を有する。本実施形態で、正味正電荷の最小数( $p_m$ )とアミノ酸残基の総数( $r$ )との関係性は以下のとおりである：

#### 【0050】

##### 【表1】

表1. アミノ酸数および正味正電荷 ( $3p_m \leq r+1$ )

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
( $p_m$ )	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

#### 【0051】

別の実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、 $2p_m$ が $r+1$ 以下の最大数である、正味正電荷の最小数( $p_m$ )とアミノ酸残基の総数( $r$ )との間に関係性を有する。本実施形態、正味正電荷の最小数( $p_m$ )とアミノ酸残基の総数( $r$ )との関係性は以下の

とおりである：

【 0 0 5 2 】

【 表 2 】

表 2. アミノ酸数および正味正電荷 ( $2 p_m \leq p + 1$ )

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p <sub>m</sub> )	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

10

【 0 0 5 3 】

一実施形態では、正味正電荷の最小数 ( $p_m$ ) およびアミノ酸残基の総数 ( $r$ ) は等しい。別の実施形態では、ペプチドは、3 または 4 アミノ酸残基および最小 1 の正味正電荷を有し、好適には、最小 2 の正味正電荷、およびより好ましくは最小 3 の正味正電荷を有する。

【 0 0 5 4 】

芳香族陽イオン性ペプチドは、正味正電荷の総数 ( $p_t$ ) と比較して、芳香族基の最小数を有することも重要である。芳香族基の最小数は、以下 ( $a$ ) と称される。芳香族基を有する天然由来のアミノ酸としては、アミノ酸、ヒスチジン、トリプトファン、チロシン、およびフェニルアラニンが挙げられる。例えば、ヘキサペプチド  $Lys - Glu - Tyr - D - Arg - Phe - Trp$  は、2 の正味正電荷 (リジンおよびアルギニン残基が寄与) および 3 つの芳香族基 (チロシン、フェニルアラニンおよびトリプトファン残基が寄与) を有する。

20

【 0 0 5 5 】

芳香族陽イオン性ペプチドはまた、 $p_t$  が 1 のとき  $a$  も 1 の可能性がある場合を除き、 $3a$  が  $p_t + 1$  以下の最大数である、生理学的 pH での芳香族基の最小数 ( $a$ ) と正味正電荷の総数 ( $p_t$ ) との間に関係性を有するべきである。本実施形態で、芳香族基の最小数 ( $a$ ) と正味正電荷の総数 ( $p_t$ ) との関係性は以下のとおりである：

【 0 0 5 6 】

【 表 3 】

表 3. 芳香族基および正味正電荷 ( $3a \leq p_t + 1$  または  $a - p_t - 1$ )

30

(p <sub>t</sub> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

【 0 0 5 7 】

別の実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、 $2a$  が  $p_t + 1$  以下の最大数である、芳香族基の最小数 ( $a$ ) と正味正電荷の総数 ( $p_t$ ) との間に関係性を有するべきである。本実施形態で、芳香族アミノ酸残基の最小数 ( $a$ ) と正味正電荷の総数 ( $p_t$ ) との関係性は以下のとおりである：

40

【 0 0 5 8 】

【表 4】

表 4. 芳香族基および正味正電荷 ( $2a \leq p_t + 1$  または  $a = p_t = 1$ )

( $p_t$ )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

## 【0059】

別の実施形態では、芳香族基の数 ( $a$ ) および正味正電荷の総数 ( $p_t$ ) は等しい。

10

## 【0060】

カルボキシル基、特に C 末端アミノ酸の末端カルボキシル基は、例えば、C 末端アミドを形成するアンモニアによりアミド化される。あるいは、C 末端アミノ酸の末端カルボキシル基は、いずれの第一級または第二級アミンによりアミド化されてもよい。第一級または第二級アミンは、例えばアルキル、特に分岐もしくは非分岐  $C_1 - C_4$  アルキル、またはアリールアミンであってもよい。したがって、ペプチドの C 末端でのアミノ酸は、アミド、N - メチルアミド、N - エチルアミド、N, N - ジメチルアミド、N, N - ジエチルアミド、N - メチル - N - エチルアミド、N - フェニルアミドまたは N - フェニル - N - エチルアミド基に変換されてもよい。芳香族陽イオン性ペプチドの C 末端で生じないアスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸残基の遊離型カルボキシレ

20

## 【0061】

一実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、2 の正味正電荷および少なくとも 1 つの芳香族アミノ酸を有するトリペプチドである。特定の実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは 2 の正味正電荷および 2 つの芳香族アミノ酸を有するトリペプチドである。

## 【0062】

なお別の態様では、本技術は芳香族陽イオン性ペプチドまたはその薬剂的に許容される塩（酢酸塩またはトリフルオロ酢酸塩等）を提供する。いくつかの実施形態では、ペプチドは以下のものを含む。

30

1. 少なくとも 1 の正味正電荷；
2. 最小 3 アミノ酸；
3. 最大約 20 アミノ酸；
4.  $3p_m$  が  $r + 1$  以下の最大数である、正味正電荷の最小数 ( $p_m$ ) とアミノ酸残基の総数 ( $r$ ) との関係性；および
5.  $a$  が 1 のとき、 $p_t$  も 1 の可能性がある場合を除き、 $2a$  が  $p_t + 1$  以下の最大数である、芳香族基の最小数 ( $a$ ) と正味正電荷の総数 ( $p_t$ ) との関係性。

## 【0063】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、アミノ酸配列 Tyr - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 01)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 02)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20) または D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31) を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは以下の 1 以上を含む：

40

## 【0064】

D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH<sub>2</sub>；  
 D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH<sub>2</sub>；  
 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-Met-NH<sub>2</sub>；

H-D-Arg-Dmt-Lys(*N*<sup>α</sup>Me)-Phe-NH<sub>2</sub>;  
H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(*N*Me)-NH<sub>2</sub>;  
H-D-Arg-Dmt-Lys(*N*<sup>α</sup>Me)-Phe(*N*Me)-NH<sub>2</sub>;  
H-D-Arg(*N*<sup>α</sup>Me)-Dmt(*N*Me)-Lys(*N*<sup>α</sup>Me)-Phe(*N*Me)-NH<sub>2</sub>;

D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH<sub>2</sub>;  
D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH<sub>2</sub>;  
D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH<sub>2</sub>;  
D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH<sub>2</sub>; 10  
H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>;  
H-D-Arg-[CH<sub>2</sub>-NH]Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>;  
H-D-Arg-Dmt-[CH<sub>2</sub>-NH]Lys-Phe-NH<sub>2</sub>;  
H-D-Arg-Dmt-Lys[CH<sub>2</sub>-NH]Phe-NH<sub>2</sub>;  
H-D-Arg-Dmt-[CH<sub>2</sub>-NH]Lys-[CH<sub>2</sub>-NH]Phe-NH<sub>2</sub>;  
Lys-D-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>;  
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>;  
Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH<sub>2</sub>; 20  
D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>;  
H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH<sub>2</sub>;  
Lys-D-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>;  
D-Tyr-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>;  
Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>;  
Tyr-His-D-Gly-Met;  
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH<sub>2</sub>;  
Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg;  
D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg;  
Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH<sub>2</sub>; 30  
Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His;  
Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>;  
Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>;  
Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys;  
Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH<sub>2</sub>;  
Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys;  
Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH<sub>2</sub>;  
D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH<sub>2</sub>;  
Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe;  
Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe; 40  
Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH<sub>2</sub>;  
Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr;  
Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys;  
Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH<sub>2</sub>;;  
Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly;  
D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH<sub>2</sub>;  
Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe;  
His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH<sub>2</sub>;  
Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Ly  
s-Asp; 50

Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH<sub>2</sub>;

Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub> ((atn)Dap は -アントラニロイル-L-, -ジアミノプロピオン酸);

Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH<sub>2</sub> (Aldは -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン);

Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH<sub>2</sub> (Aldは -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン);

Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH<sub>2</sub> ((dns)Dapは -ダンシル-L-, -ジアミノプロピオン酸);

D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>;および

D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>。

10

【0065】

いくつかの実施形態では、「Dmt」は、2', 6'-ジメチルチロシン(2', 6'-Dmt)または3', 5'-ジメチルチロシン(3', 5'-Dmt)を指す。

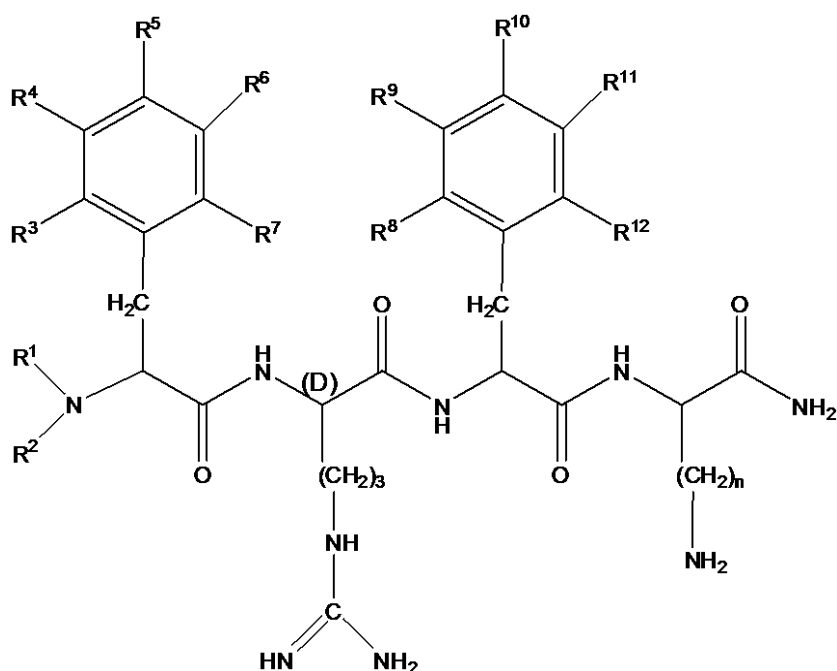
【0066】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、式Iにより定義される:

【0067】

【化1】

20



30

(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は各々独立して

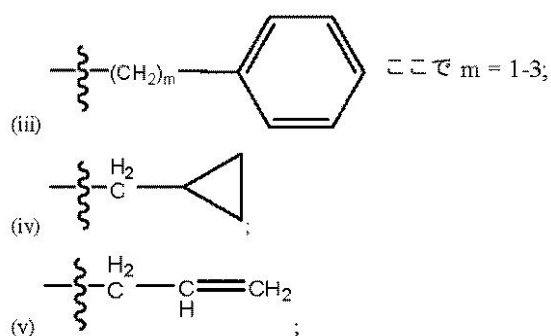
(i) 水素;

(ii) 直鎖または分岐C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル;

【0068】

【化2】

40



50

$R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$  および  $R^{12}$  は各々独立し以下より選択される

- (i) 水素；
- (ii) 直鎖または分岐  $C_1 - C_6$  アルキル；
- (iii)  $C_1 - C_6$  アルコキシ；
- (iv) アミノ；
- (v)  $C_1 - C_4$  アルキルアミノ；
- (vi)  $C_1 - C_4$  ジアルキルアミノ；
- (vii) ニトロ；
- (viii) ヒドロキシル；
- (ix) ハロゲン、(「ハロゲン」はクロロ、フルオロ、プロモ、およびヨードを包含し、

$n$  は 1 ~ 5 の整数である) より選択される)。

【0069】

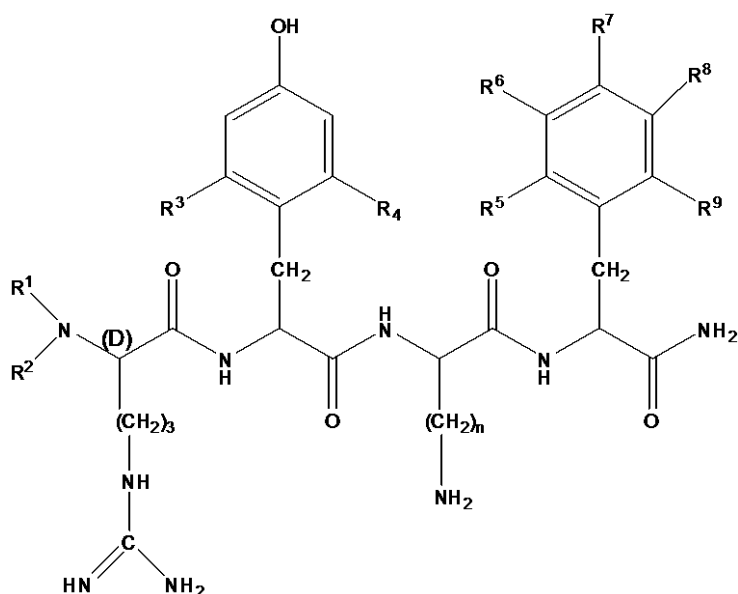
いくつかの実施形態では、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、および  $R^{12}$  は全て水素であり； $n$  は 4 である。別の実施形態では、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、および  $R^{11}$  は全てが水素であり； $R^8$  および  $R^{12}$  はメチルであり； $R^{10}$  はヒドロキシルであり；および  $n$  は 4 である。

【0070】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、式 II により定義される：

【0071】

【化 3】



式中、 $R^1$  および  $R^2$  は各々独立して以下より選択される

- (i) 水素；
  - (ii) 直鎖または分岐  $C_1 - C_6$  アルキル；
- 【0072】

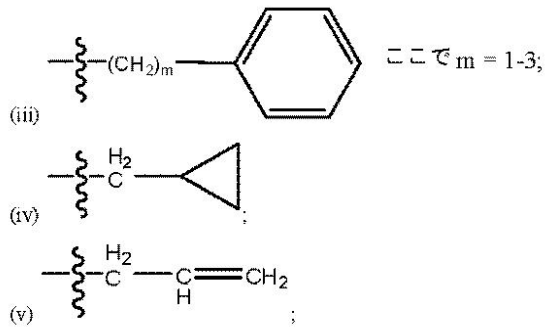
10

20

30

40

## 【化 4】



10

$R^3$  および  $R^4$  は各々独立して以下から選択される

- (i) 水素；
  - (ii) 直鎖または分岐  $C_1 - C_6$  アルキル；
  - (iii)  $C_1 - C_6$  アルコキシ；
  - (iv) アミノ；
  - (v)  $C_1 - C_4$  アルキルアミノ；
  - (vi)  $C_1 - C_4$  ジアルキルアミノ；
  - (vii) ニトロ；
  - (viii) ヒドロキシル；
  - (ix) ハロゲン（「ハロゲン」はクロロ、フルオロ、ブロモ、およびヨードを包含し；
- $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、および  $R^9$  は各々独立して以下より選択される

20

- (i) 水素；
- (ii) 直鎖または分岐  $C_1 - C_6$  アルキル；
- (iii)  $C_1 - C_6$  アルコキシ；
- (iv) アミノ；
- (v)  $C_1 - C_4$  アルキルアミノ；
- (vi)  $C_1 - C_4$  ジアルキルアミノ；
- (vii) ニトロ；
- (viii) ヒドロキシル；
- (ix) ハロゲン、（「ハロゲン」はクロロ、フルオロ、ブロモ、およびヨードを包含し、 $n$  は 1 ~ 5 の整数である）。

30

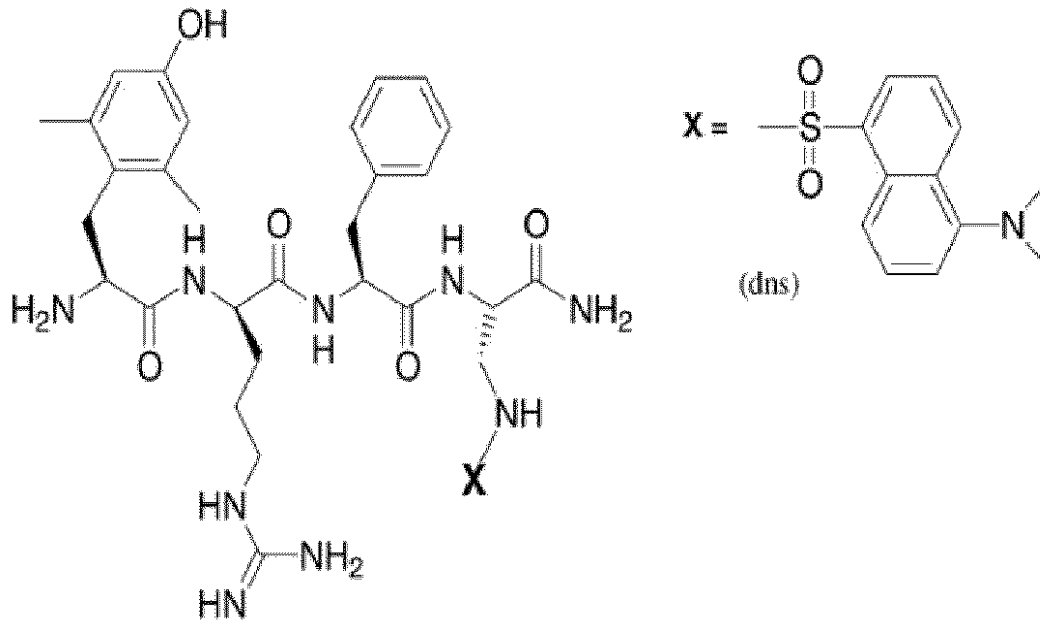
## 【0073】

いくつかの実施形態では、式により定義され：

## 【0074】



## 【化5】



また、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (dns) Dap - NH<sub>2</sub>、((dns) Dap は - ダンシル - L - , - ジアミノプロピオン酸) (SS - 17) と表される。

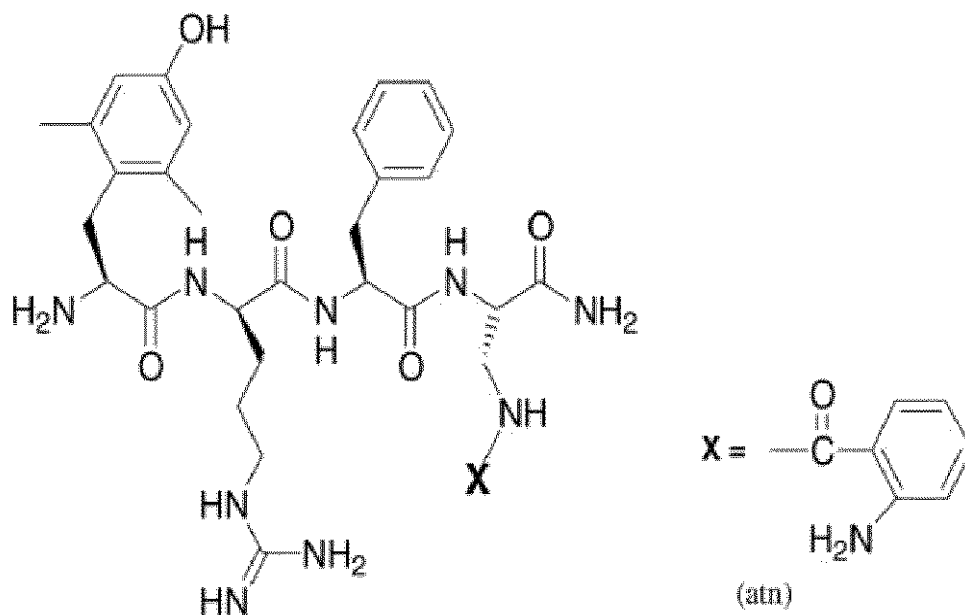
20

## 【0075】

いくつかの実施形態では、ペプチドは以下の式により定義される：

## 【0076】

## 【化6】



また、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> ((atn) Dap は - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸) (SS - 19) と表される。SS - 19 はまた、[atn] SS - 02 とも称される。

## 【0077】

特定の実施形態では、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は水素であり；R<sup>3</sup> および R<sup>4</sup> はメチルであり；R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、および R<sup>9</sup> は全て水素であり；n は 4 である。

50

## 【 0 0 7 8 】

一実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、芳香族アミノ酸およびカチオン性アミノ酸を交互にしたコア構造モチーフ (core structural motif) を有する。例えば、ペプチドは、以下に記載の式 I I I ~ V I のいずれかにより定義されるテトラペプチドであってもよい：

芳香族 - カチオン性 - 芳香族 - カチオン性 (式 I I I)

カチオン性 - 芳香族 - カチオン性 - 芳香族 (式 I V)

芳香族 - 芳香族 - カチオン性 - カチオン性 (式 V)

カチオン性 - カチオン性 - 芳香族 - 芳香族 (式 V I)

(式中、芳香族アミノ酸は、P h e ( F )、T y r ( Y )、T r p ( W )、およびシクロヘキシルアラニン ( C h a ) からなる群より選択される残基であり；カチオン性アミノ酸は、A r g ( R )、L y s ( K )、ノルロイシン ( N l e )、および 2 - アミノ - ヘプタン酸 ( A h e ) からなる群より選択される残基である。)

## 【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の芳香族陽イオン性ペプチドは全て、左旋性 ( L ) アミノ酸を含む。

## 【 0 0 8 0 】

一実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは以下を有する

1 . 少なくとも 1 の正味正電荷；

2 . 最小 3 アミノ酸；

3 . 最大約 2 0 アミノ酸；

4 .  $3 p_m$  が  $r + 1$  以下の最大数である、正味正電荷の最小数 (  $p_m$  ) とアミノ酸残基の総数 (  $r$  ) との関係性；および

5 .  $a$  が 1 のとき  $p_t$  も 1 の可能性がある場合を除き、 $2 a$  が  $p_t + 1$  以下の最大数である、芳香族基の最小数 (  $a$  ) と正味正電荷の総数 (  $p_t$  ) との関係性。

## 【 0 0 8 1 】

別の実施形態では、本発明は、ミトコンドリア膜透過性遷移 ( M P T ) を受けているミトコンドリア数を減少させる、または哺乳類の摘出臓器でのミトコンドリア膜透過性遷移を抑制する、または抗カルジオリピン抗体の存在を特徴とする症状、病態もしくは疾患 ( 抗リン脂質抗体症候群および全身性エリテマトーデス等 ) を治療または寛解させる方法を提供する。本方法は、以下を有する芳香族陽イオン性ペプチドの有効な量を摘出臓器に投与することを含む：

少なくとも 1 の正味正電荷；

最小 3 アミノ酸；

最大約 2 0 アミノ酸；

$3 p_m$  が  $r + 1$  以下の最大数である、正味正電荷の最小数 (  $p_m$  ) とアミノ酸残基の総数 (  $r$  ) との関係性；および

$a$  が 1 であるとき  $p_t$  も 1 の可能性がある場合を除き、 $2 a$  が  $p_t + 1$  以下の最大数である、芳香族基の最小数 (  $a$  ) と正味正電荷の総数 (  $p_t$  ) との関係性。

## 【 0 0 8 2 】

なお別の実施形態では、本発明は、ミトコンドリア膜透過性遷移 ( M P T ) を受けているミトコンドリア数を減少させる、またはミトコンドリア膜透過性遷移を抑制する必要がある哺乳類の摘出臓器でのミトコンドリア膜透過性遷移を抑制する、または抗カルジオリピン抗体の存在を特徴とする症状、病態または疾患 ( 抗リン脂質抗体症候群および全身性エリテマトーデス等 ) を治療または寛解させる方法を提供する。本方法は、以下を有する芳香族陽イオン性ペプチドの有効な量を哺乳類に投与することを含む：

少なくとも 1 の正味正電荷；

最小 3 アミノ酸；

最大約 2 0 アミノ酸；

$3 p_m$  が  $r + 1$  以下の最大数である、正味正電荷の最小数 (  $p_m$  ) とアミノ酸残基の総数

10

20

30

40

50

( $r$ ) との関係性 ; および

$a$  が 1 のとき  $p_t$  も 1 の可能性がある場合を除き、 $3a$  が  $p_t + 1$  以下の最大数である、芳香族基の最小数 ( $a$ ) と正味正電荷の総数 ( $p_t$ ) との関係性。

【 0 0 8 3 】

芳香族陽イオン性ペプチドとしては、これに限定されないが、以下の例示的なペプチドが挙げられる :

【 0 0 8 4 】

H-Phe-D-Arg Phe-Lys-Cys-NH<sub>2</sub>

D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH<sub>2</sub>;

D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH<sub>2</sub>;

D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH<sub>2</sub>;

H-D-Arg-Dmt-Lys(*N*<sup>α</sup>Me)-Phe-NH<sub>2</sub>;

H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(*M*Me)-NH<sub>2</sub>;

H-D-Arg-Dmt-Lys(*N*<sup>α</sup>Me)-Phe(*M*Me)-NH<sub>2</sub>;

H-D-Arg(*N*<sup>α</sup>Me)-Dmt(*M*Me)-Lys(*N*<sup>α</sup>Me)-Phe(*M*Me)-NH<sub>2</sub>;

D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH<sub>2</sub>;

D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH<sub>2</sub>;

D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH<sub>2</sub>;

D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH<sub>2</sub>;

H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>;

H-D-Arg- [CH<sub>2</sub>-NH]Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>;

H-D-Arg-Dmt- [CH<sub>2</sub>-NH]Lys-Phe-NH<sub>2</sub>;

H-D-Arg-Dmt-Lys [CH<sub>2</sub>-NH]Phe-NH<sub>2</sub>; および

H-D-Arg-Dmt- [CH<sub>2</sub>-NH]Lys- [CH<sub>2</sub>-NH]Phe-NH<sub>2</sub>,

Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>,

2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>,

Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>,

Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH<sub>2</sub>,

D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>,

H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH<sub>2</sub>,

Lys-D-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>,

D-Tyr-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>,

Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>,

Tyr-His-D-Gly-Met,

Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH<sub>2</sub>,

Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg,

D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg,

Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH<sub>2</sub>,

Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His,

Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>,

Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>,

Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys,

Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH<sub>2</sub>,

Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys,

Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg- D-Gly-Lys-NH<sub>2</sub>,

D-His-Lys-Tyr- D-Phe-Glu- D-Asp- D-His- D-Lys-Arg-Trp-NH<sub>2</sub>,

Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe,

Tyr-D-His-Phe- D-Arg-Asp-Lys- D-Arg-His-Trp-D-His-Phe,

10

20

30

40

50

Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH<sub>2</sub>,  
 Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr,  
 Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys,  
 Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH<sub>2</sub>,  
 Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly,  
 D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH<sub>2</sub>,  
 Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe,  
 His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH<sub>2</sub>,  
 Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp, および  
 Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH<sub>2</sub>;  
 Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub> ((atn)Dapは -アントラニロイル-L-, -ジアミノプロピオン酸);  
 Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH<sub>2</sub> ((dns)Dapは -ダンシル-L-, -ジアミノプロピオン酸);  
 Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH<sub>2</sub> (Aldは -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン);  
 Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH<sub>2</sub> (Aldは -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン  
 および D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>); および  
 D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>.

10

20

## 【0085】

いくつかの実施形態では、本発明の方法に有用なペプチドは、チロシン残基またはチロシン誘導体を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、チロシン誘導体としては、2'-メチルチロシン(Mmt); 2', 6'-ジメチルチロシン(2' 6' Dmt); 3', 5'-ジメチルチロシン(3' 5' Dmt); N, 2', 6'-トリメチルチロシン(Tmt); および2'-ヒドロキシ-6'-メチルチロシン(methyltryosine)(Hmt)が挙げられる。

## 【0086】

一実施形態では、ペプチドは式Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(本明細書ではSS-01と称する)を有する。SS-01は、3の正味正電荷(アミノ酸、チロシン、アルギニン、およびリジンが寄与)を有し、また2芳香族基(アミノ酸、フェニルアラニンおよびチロシンが寄与)を有する。SS-01のチロシンは、式2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(本明細書ではSS-02と称する)を有する化合物を生成するチロシンの修飾誘導体、2', 6'-ジメチルチロシン等であり得る。

30

## 【0087】

好適な実施形態では、N末端のアミノ酸残基はアルギニンである。そのようなペプチドの例としては、D-Arg-2', 6' Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(本明細書ではSS-31と称する)がある。

## 【0088】

別の実施形態では、N末端のアミノ酸はフェニルアラニンまたはその誘導体である。いくつかの実施形態では、フェニルアラニンの誘導体としては、2'-メチルフェニルアラニン(Mmp)、2', 6'-ジメチルフェニルアラニン(Dmp)、N, 2', 6'-トリメチルフェニルアラニン(Tmp)、および2'-ヒドロキシ-6'-メチルフェニルアラニン(Hmp)が挙げられる。そのようなペプチドの例としては、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>(本明細書ではSS-20と称する)がある。一実施形態では、DmtをN末端にしないように、SS-02のアミノ酸配列が再配列される。芳香族陽イオン性ペプチドの例は、式D-Arg-2', 6' Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>(SS-31)を有する。

40

## 【0089】

50

なお別の実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは式  $\text{Phe} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Dmt} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  (本明細書では  $\text{SS} - 30$  と称する) を有する。あるいは、N 末端フェニルアラニンは、フェニルアラニンの誘導体、2', 6' - ジメチルフェニルアラニン (2', 6' Dmp) 等であり得る。アミノ酸 1 位に 2', 6' - ジメチルフェニルアラニンを含む  $\text{SS} - 01$  は、式  $2', 6' - \text{Dmp} - \text{D} - \text{Arg} - \text{Dmt} - \text{Lys} - \text{NH}_2$  を有する。

#### 【0090】

いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap -  $\text{NH}_2$  ( $\text{SS} - 19$ ) ((atn) Dap は - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys -  $\text{NH}_2$  ( $\text{SS} - 36$ ) (Ald は - (6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル) アラニン)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald -  $\text{NH}_2$  ( $\text{SS} - 37$ ) (Ald は - (6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル) アラニン)、D - Arg - Tyr - Lys - Phe -  $\text{NH}_2$  (SPI - 231)、および 2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (dns) Dap -  $\text{NH}_2$  ((dns) Dap は - ダンシル - L - , - ジアミノプロピオン酸) ( $\text{SS} - 17$ ) を含む。

#### 【0091】

本明細書に記載のペプチドおよびその誘導体にはさらに、機能的類似体が含まれる。ペプチドは、類似体が上述のペプチドと同様の機能を有する場合に、機能的類似体とみなされる。類似体は、例えば、ペプチドの置換変異体であってもよく、これは 1 以上のアミノ酸が別のアミノ酸に置換されている。ペプチドの好適な置換変異体には、保存的アミノ酸置換が含まれる。アミノ酸は、それらの物理化学的特性にしたがって以下のように分類することができる：

- (a) 非極性アミノ酸：Ala (A) Ser (S) Thr (T) Pro (P) Gly (G) Cys (C)；
- (b) 酸性アミノ酸：Asn (N) Asp (D) Glu (E) Gln (Q)；
- (c) 塩基性アミノ酸：His (H) Arg (R) Lys (K)；
- (d) 疎水性アミノ酸：Met (M) Leu (L) Ile (I) Val (V)；および
- (e) 芳香族アミノ酸：Phe (F) Tyr (Y) Trp (W) His (H)。

#### 【0092】

同じ群の別のアミノ酸によるペプチド内でのアミノ酸の置換は保存的置換と称され、元来のペプチドの物理化学的特性を保持することもある。それに対し、異なる群の別のアミノ酸によるペプチド内でのアミノ酸の置換は、概して元来のペプチドの特性を変化させる可能性が高い。本発明の実施に有用な類似体の非限定的な例としては、これに限定されないが、表 5 に示す芳香族陽イオン性ペプチドが挙げられる。

#### 【0093】

10

20

30

## 【表 5 - 1】

表 5. ペプチド類似体の例

アミノ酸 1 位	アミノ酸 2 位	アミノ酸 3 位	アミノ酸 4 位	アミノ酸 5 位	アミノ酸 6 位	アミノ酸 7 位	C-末端修飾
D-Arg	Dmt	Lys	Phe				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	Phe	Lys				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Phe	Lys	Dmt				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Phe	Dmt	Lys				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Lys	Dmt	Phe				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Lys	Phe	Dmt				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Cys			NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Glu	Cys	Gly	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Ser	Cys		NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Gly	Cys		NH <sub>2</sub>
Phe	Lys	Dmt	D-Arg				NH <sub>2</sub>
Phe	Lys	D-Arg	Dmt				NH <sub>2</sub>

10

20

## 【 0 0 9 4 】

## 【表 5 - 2】

表 5. ペプチド類似体の例 (続き)

アミノ酸 1 位	アミノ酸 2 位	アミノ酸 3 位	アミノ酸 4 位	アミノ酸 5 位	アミノ酸 6 位	アミノ酸 7 位	C-末端修飾
Phe	D-Arg	Phe	Lys				NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Cys			NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Glu	Cys	Gly	NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Ser	Cys		NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Gly	Cys		NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Dmt	Lys				NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Cys			NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Glu	Cys	Gly	NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Ser	Cys		NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Gly	Cys		NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Lys	Dmt				NH <sub>2</sub>
Phe	Dmt	D-Arg	Lys				NH <sub>2</sub>
Phe	Dmt	Lys	D-Arg				NH <sub>2</sub>
Lys	Phe	D-Arg	Dmt				NH <sub>2</sub>
Lys	Phe	Dmt	D-Arg				NH <sub>2</sub>
Lys	Dmt	D-Arg	Phe				NH <sub>2</sub>
Lys	Dmt	Phe	D-Arg				NH <sub>2</sub>
Lys	D-Arg	Phe	Dmt				NH <sub>2</sub>
Lys	D-Arg	Dmt	Phe				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp				NH <sub>2</sub>
Trp	D-Arg	Phe	Lys				NH <sub>2</sub>
Trp	D-Arg	Tyr	Lys				NH <sub>2</sub>
Trp	D-Arg	Trp	Lys				NH <sub>2</sub>
Trp	D-Arg	Dmt	Lys				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Trp	Lys	Phe				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Trp	Phe	Lys				NH <sub>2</sub>

【表 5 - 3】

アミノ酸 1 位	アミノ酸 2 位	アミノ酸 3 位	アミノ酸 4 位	アミノ酸 5 位	アミノ酸 6 位	アミノ酸 7 位	C-末端修飾
D-Arg	Trp	Lys	Dmt				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Trp	Dmt	Lys				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Lys	Trp	Phe				NH <sub>2</sub>
D-Arg	Lys	Trp	Dmt				NH <sub>2</sub>
Cha	D-Arg	Phe	Lys				NH <sub>2</sub>
Ala	D-Arg	Phe	Lys				NH <sub>2</sub>

10

C h a = シクロヘキシル

【 0 0 9 6 】

ある状況下では、オピオイド受容体の作動薬活性をも有するペプチドの使用は有利である場合もある。本発明の実施に有用な類似体の例としては、これに限定されないが、表 6 に示した芳香族陽イオン性ペプチドが挙げられる。

【 0 0 9 7 】

20

【表 6 - 1】

表 6. オピオイド受容体の作動薬活性をもつペプチド類似体

アミノ酸 1 位	アミノ酸 2 位	アミノ酸 3 位	アミノ酸 4 位	アミノ酸 5 位 (存在する場合)	C-末端修飾
Tyr	D-Arg	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - NH-dns		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - NH-atn		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys	Cys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Ahp		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>

30

40

【 0 0 9 8 】

50



【表 6 - 2】

表 6. オピオイド受容体の作動薬活性をもつペプチド類似体 (続き)

アミノ酸 1 位	アミノ酸 2 位	アミノ酸 3 位	アミノ酸 4 位	アミノ酸 5 位 (存在する場 合)	C-末端修飾
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2-アミノヘ ブタン酸)		NH <sub>2</sub>
Bio- 2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Lys		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Orn		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dab		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dap		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Orn		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dab		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dap		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Lys		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Orn		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Dab		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys	Cys	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>

【表 6 - 3】

表 6. オピオイド受容体の作動薬活性をもつペプチド類似体 (続き)

アミノ酸 1 位	アミノ酸 2 位	アミノ酸 3 位	アミノ酸 4 位	アミノ酸 5 位 (存在する場合)	C-末端修飾
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Lys		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Orn		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dab		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dap		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Lys		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Orn		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dab		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dap		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	atnDap		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Lys		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Orn		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dab		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dap		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Orn	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Dab	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Dap	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Dab	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Dap	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg		NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg		NH <sub>2</sub>

【 0 1 0 0 】

【表 6 - 4】

表 6. オピオイド受容体の作動薬活性をもつペプチド類似体 (続き)

アミノ酸 1 位	アミノ酸 2 位	アミノ酸 3 位	アミノ酸 4 位	アミノ酸 5 位 (存在する場合)	C-末端修飾
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Orn	2'6'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Dab	2'6'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Dap	3'5'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Orn	3'5'Dmt	Arg		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Arg	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Arg	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Arg	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Arg	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Lys		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Orn		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Dab		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Dap		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>

【 0 1 0 1 】

【表 6 - 5】

表 6. オピオイド受容体の作動薬活性をもつペプチド類似体 (続き)

アミノ酸 1 位	アミノ酸 2 位	アミノ酸 3 位	アミノ酸 4 位	アミノ酸 5 位 (存在する場合)	C-末端修飾
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Orn	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Dab	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Dap	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Arg	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Orn	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Dab	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Dap	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Orn	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Dab	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Dap	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Arg		NH <sub>2</sub>

10

20

30

40

50

D a b = ジアミノ酪酸

D a p = ジアミノプロピオン酸

D m t = ジメチルチロシン

M m t = 2' - メチルチロシン

T m t = N, 2', 6' - トリメチルチロシン

H m t = 2' - ヒドロキシ, 6' - メチルチロシン

d n s D a p = - ダンシル - L - , - ジアミノプロピオン酸

a t n D a p = - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸

B i o = ビオチン

## 【0102】

オピオイド受容体の作動薬活性を有するさらなるペプチドとしては、2', 6' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 6 ) ( A l d は - ( 6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル ) アラニン )、および 2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 7 ) ( A l d は - ( 6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル ) アラニン ) が挙げられる。

## 【0103】

ミュー - オピオイド受容体の作動薬活性を有するペプチドは、典型的には、チロシン残基またはチロシン誘導体を N 末端 ( すなわち第一のアミノ酸位置 ) に有するペプチドである。チロシンの好適な誘導体としては、2' - メチルチロシン ( M m t ) ; 2', 6' - ジメチルチロシン ( 2' 6' - D m t ) ; 3', 5' - ジメチルチロシン ( 3' 5' D m t ) ; N, 2', 6' - トリメチルチロシン ( T m t ) ; および 2' - ヒドロキシ - 6' - メチルチロシン ( methyltyrosine ) ( H m t ) が挙げられる。

## 【0104】

ミュー - オピオイド受容体の作動薬活性を有さないペプチドは、概して、チロシン残基またはチロシン誘導体を N 末端 ( すなわち、アミノ酸 1 位 ) に有していない。N 末端のア

ミノ酸は、チロシン以外のいずれの天然由来または非天然由来のアミノ酸であり得る。一実施形態では、N末端のアミノ酸は、フェニルアラニンまたはその誘導体である。フェニルアラニンの例示的な誘導体としては、2'-メチルフェニルアラニン(Mmp)、2',6'-ジメチルフェニルアラニン(2',6'-Dmp)、N,2',6'-トリメチルフェニルアラニン(Tmp)、および2'-ヒドロキシ-6'-メチルフェニルアラニン(Hmp)が挙げられる。

#### 【0105】

表5および表6に示すペプチドのアミノ酸は、L-またはD-の立体配置のいずれかであってよい。

#### 【0106】

いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、少なくとも1つのアルギニンおよび/または少なくとも1つのリジン残基を含む。いくつかの実施形態では、アルギニンおよび/またはリジン残基は、電子受容体としての役割を果たし、かつプロトン共役の電子伝達(electron transport)に関与する。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、SS-31に存在する「電荷-環-電荷-環(charge-ring-charge-ring)」のような立体配置をもたらし配列を含む。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドとしては、チオール含有残基(システインおよびメチオニン等)が挙げられる。いくつかの実施形態では、チオール含有残基を含むペプチドは、電子を直接供与して、シトクロムcを還元する。いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、システイン(vysteine)がペプチドのN末端および/またはC末端に含まれる。

#### 【0107】

いくつかの実施形態では、ペプチド多量体を提供する。例えばいくつかの実施形態では、SS-20二量体:Phe-D-Arg-Phe-Lys-Phe-D-Arg-Phe-Lys等の二量体を提供する。いくつかの実施形態では、二量体はSS-31二量体:D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>である。いくつかの実施形態では、多量体は三量体、四量体および/または五量体である。いくつかの実施形態では、多量体としては、異なる単量体ペプチドの組合せ(例えばSS-31ペプチドと連結したSS-20ペプチド)が含まれる。いくつかの実施形態では、これらの比較的長い類似体は、治療的分子として有用である。

#### 【0108】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の芳香族陽イオン性ペプチドは全て、左旋性(L)アミノ酸を含む。

#### ペプチド合成

#### 【0109】

ペプチドは、当技術分野で周知のいずれの方法により合成されてもよい。タンパク質を化学的に合成する好適な方法としては、例えばStuartおよびYoungによる、Solid Phase Peptide Synthesis, Second Edition, Pierce Chemical Company (1984)、およびMethods Enzymol., 289, Academic Press, Inc, New York (1997)に記載したものが挙げられる。

#### 【0110】

ペプチドを酵素分解に対し安定化させる1つの方法は、切断されているペプチド結合でのL-アミノ酸のD-アミノ酸への置き換えがある。すでに存在するD-Arg残基に加えて1以上のD-アミノ酸残基を含有する芳香族陽イオン性ペプチド類似体が調製される。酵素分解を防ぐ別の方法は、ペプチドの1以上のアミノ酸残基での-アミノ基のN-メチル化である。この方法は、いずれのペプチダーゼによるペプチド結合切断をも防ぐ。例としては、

$\text{H-D-Arg-Dmt-Lys (N}^{\alpha}\text{Me) -Phe-NH}_2$ ;  $\text{H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe (NMe) -NH}_2$ ;  $\text{H-D-Arg-Dmt-Lys (N}^{\alpha}\text{Me) -Phe (NMe) -NH}_2$ ; および  $\text{H-D-Arg (N}^{\alpha}\text{Me) -Dmt (NMe) -Lys (N}^{\alpha}\text{Me) -Phe (NMe) -NH}_2$

が挙げられる。N - メチル化類似体は、水素結合能が比較的低く、また腸管透過性の向上が見込まれ得る。

#### 【0111】

ペプチドアミド結合 ( - CO - NH - ) を酵素分解に対し安定化させる代替的方法是、還元アミド結合 ( [ CH<sub>2</sub> - NH ] ) によるペプチドアミド結合の置き換えである。この方法は、Boc - アミノ酸 - アルデヒドと、ペプチド固相合成法で増大するペプチド鎖のN末端アミノ酸残基のアミノ基との還元アルキル化反応で達成され得る。還元されたペプチド結合は、減少した水素結合能のために、改善された細胞透過性をもたらすと予測される。その例としては： $\text{H-D-Arg - [CH}_2\text{ - NH] Dmt - Lys - Phe - NH}_2$ 、 $\text{H-D-Arg - Dmt - [CH}_2\text{ - NH] Lys - Phe - NH}_2$ 、 $\text{H-D-Arg - Dmt - Lys - [CH}_2\text{ - NH] Phe - NH}_2$ 、 $\text{H-D-Arg - Dmt - [CH}_2\text{ - NH] Lys - [CH}_2\text{ - NH] Phe - NH}_2$ 、等が挙げられる。

#### 脂質

#### 【0112】

カルジオリピンは、ミトコンドリア内膜の重要な成分であり、総脂質組成物の約20%を構成する。哺乳類細胞では、カルジオリピンはミトコンドリア内膜でほぼ例外なく認められるわけではなく、そのミトコンドリア内膜では、カルジオリピンはミトコンドリア代謝に關与する酵素を最適に機能させるために不可欠である。

#### 【0113】

カルジオリピンは、二量体構造を形成するためにグリセロール骨格と連結した2つのホスファチジルグリセロールを含むジホスファチジルグリセロール脂質の一種である。カルジオリピンは4つのアルキル基をもち、潜在的に2つの負電荷を保持している。カルジオリピンには別個の4つのアルキル鎖があるため、分子が非常に複雑である可能性が高い。しかしながら、大部分の動物組織では、カルジオリピンは、それぞれに2つの不飽和結合をもつC18脂肪酸アルキル鎖 ( fatty alkyl chain ) を含有する。哺乳類ミトコンドリアの内膜タンパク質へのカルジオリピンの高い親和性のためには、( 18 : 2 ) 4のアシル鎖の立体配置は、重要な構造必要条件であると提唱されてきた。しかしながら、単離酵素の調製研究で、その重要性は、検討するタンパク質によって異なる場合があることが示唆されている。

#### 【0114】

分子中の2つのリン酸のそれぞれは、1つのプロトンを捕獲し得る。これは対称構造を有しているが、1つのリン酸のイオン化は、酸性度の異なるレベルで起こり、このとき、両方が  $\text{pK}_1 = 3$  および  $\text{pK}_2 > 7.5$  でイオン化する。したがって、通常の生理学的条件下 ( pH がおよそ 7.0 ) では、分子はただ1の負電荷のみを保持している場合がある。リン酸の水酸基 ( - OH および - O - ) は、安定した分子内水素結合を形成し、二環式の共鳴構造を形成する。この構造が1つのプロトンを捕捉し、プロトンは酸化的リン酸化をもたらす。

#### 【0115】

複合体IVにより触媒される酸化的リン酸化の間、大量のプロトンが膜の片側から別の側に移動し大きなpH変化が生じる。学説に拘束されることを望むものではないが、カルジオリピンは、ミトコンドリア膜内でプロトン捕獲として機能し、厳密にはプロトンプール ( proton pool ) に局在し、ミトコンドリア内膜空間のpHを最小限にすることが提案されてきた。この機能は、負電荷を保持しながら二環式構造内でプロトンを捕捉することができる、カルジオリピンの特有の構造によるものであると考えられる。したがって、カ

ルジオリピンは、プロトンを放出または吸収し、ミトコンドリア膜付近の pH を維持する電子緩衝液プールとしての役割を果たすことができる。

#### 【 0 1 1 6 】

さらに、カルジオリピンは、アポトーシスの役割を果たすことが示されてきた。アポトーシスカスケードの初期変化は、カルジオリピンに關与する。以下に詳述するように、カルジオリピン - 特異的オキシダーゼは、脂質に立体構造変化を起こすカルジオリピン - ヒドロペルオキシドを生成する。ひいては、酸化カルジオリピンが、ミトコンドリア内膜からこれを介して、シトクロム c がサイトゾルに放出される孔を形成すると考えられているミトコンドリア外膜に移行する。シトクロム c はカルシウム放出を刺激する IP3 受容体と結合し、カルシウム放出がさらにシトクロム c の放出を促進する。細胞質カルシウム濃度が毒性量に達すると細胞が死ぬ。さらに、細胞外ミトコンドリアのシトクロム c は、アポトーシス活性因子と相互作用し、アポトソーム複合体 (apoptosomal complex) の形成およびタンパク質分解のカスパーゼカスケードの活性化を引き起こす。

#### 【 0 1 1 7 】

別の結果としては、シトクロム c はミトコンドリア内膜上のカルジオリピンと高い親和性で相互作用し、電子伝達に非生産的なカルジオリピンとの複合体を形成するが、カルジオリピン - 特異的オキシダーゼ / ペルオキシダーゼとして機能する。実際に、カルジオリピンとシトクロム c との相互作用により、通常はその酸化還元電位が約 - 400 mV であるインタクトなシトクロム c とより負の値の複合体が得られる。結果として、シトクロム c / カルジオリピン複合体は、ミトコンドリアの複合体 I I I から電子を受取ることができず、その不均化により  $H_2O_2$  が得られる超酸化物の増強した生成を導く。シトクロム c / カルジオリピン複合体はまた、超酸化物から電子を受け取ることができない。さらに、高い親和性をもつカルジオリピンとシトクロム c との相互作用により、シトクロム c が、多価不飽和分子であるカルジオリピンの過酸化方向への選択的な触媒活性を有するカルジオリピン特異的ペルオキシダーゼを、活性化する。シトクロム c / カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ反応は、酸化当量源としての  $H_2O_2$  により生じる。最終的には、この活性により、カルジオリピン酸化生成物、主にカルジオリピン - OOH およびその還元生成物、カルジオリピン - OH が蓄積する。上述のように、酸化カルジオリピン種はミトコンドリア膜の膜透過化 (permeabilization) の役割を果たし、またプロアポトーシス因子 (そのシトクロム c を含む) をサイトゾルに放出することが示されてきた。例えば、Kaganら Advanced Drug Delivery Reviews, 61 (2009) 1375-1385; Kaganら Mol. Nutr. Food Res. 2009 January; 53(1): 104-114, (その両方が引用により本明細書中に組み込まれる) を参照のこと。

#### 【 0 1 1 8 】

シトクロム c は、その主要な機能がミトコンドリア電子伝達系での複合体 I I I (シトクロム c レダクターゼ) から複合体 I V (シトクロム c オキシダーゼ) への電子伝達体としての役割を果たす、球状タンパク質である。補欠分子ヘム基は、シトクロム c に Cys 14 および Cys 17 で結合し、さらに 2 配位の軸配位子 His 18 および Met 80 により結合している。Met 80 への第 6 配位結合は、Fe と他のリガンド、 $O_2$ 、 $H_2O_2$ 、NO 等との相互作用を抑制する。

#### 【 0 1 1 9 】

シトクロム c のプールは、膜間腔に分布し、その残余はミトコンドリア内膜 (IMM) に静電相互作用および疎水性相互作用の両方により関連している。シトクロム c は、IMM で静電相互作用によりアニオン性リン脂質、カルジオリピンと緩く結合する高カチオン性タンパク質 (中性 pH で 8+ の正味電荷) である。また上述のように、シトクロム c はまた、疎水性相互作用によりカルジオリピンと堅く結合することができる。このシトクロム c のカルジオリピンへの強固な結合は、脂質膜外のカルジオリピンのアシル鎖が延長して、シトクロム c 内部の疎水性チャネルにいたったことに起因する (Tuominen ら, 2001; Kalanxhi & Wallace, 2007; Sinibaldi ら, 2010)。これより、シトクロム c のヘムポケットでの Fe - Met 80 結合の破壊が生じ、ソーレー帯領域での負のコットンピーク

10

20

30

40

50

(negative Cotton peak) の消失に示されるように、ヘム環境に変化をもたらす (Sinabala ら、2008)。また、これにより、ヘム Fe が  $H_2O_2$  および NO への曝露される。

#### 【0120】

天然のシトクロム c は、その第 6 配位のため、ペルオキシダーゼ活性が低い。しかしながら、カルジオリピンに疎水性結合するとすぐに、シトクロム c は、Fe-Met80 配位を破壊する構造変化を受けて、ヘム Fe の  $H_2O_2$  への曝露を増加させ、また、シトクロム c は電子伝達体からペルオキシダーゼへ転換し、カルジオリピンが一次基質となる (Vladimirov ら、2006; Basova ら、2007)。上述のように、カルジオリピン過酸化により、ミトコンドリアの膜構造を変化させ、シトクロム c を IMM から放出させてカスパーゼ - 介在性細胞死を引き起こされる。

10

#### 【0121】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示の芳香族陽イオン性ペプチド (D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)DapNH<sub>2</sub> ((atn)Dap は -アントラニロイル-L-, -ジアミノプロピオン酸)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (Ala は - (6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH<sub>2</sub> (Ala は - (6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH<sub>2</sub> ((dns)Dap は -ダンシル-L-, -ジアミノプロピオン酸)、またはその薬剂的に許容される塩 (酢酸塩またはトリフルオロ酢酸塩等) 等) は、投与の必要がある対象に投与される。学説に拘束されることを望むものではないが、ペプチドは、(例えば標的)シトクロム c、カルジオリピンまたはその両方と接触し、カルジオリピン-シトクロム c 相互作用を妨害、カルジオリピン/シトクロム c 複合体のオキシゲナーゼ/ペルオキシダーゼ活性を抑制、カルジオリピン-ヒドロペルオキシド形成を抑制、カルジオリピンの外膜への移行を抑制および/またはシトクロム c の IMM から放出を抑制すると、考えられている。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、本明細書に開示の芳香族陽イオン性ペプチドには以下の特徴および機能の 1 以上が含まれる: (1) 細胞膜透過性を有しミトコンドリア内膜を標的化する; (2) ペプチドとシトクロム c との相互作用を容易にする静電気相互作用によりカルジオリピンと選択的に結合する; (3) 遊離しているシトクロム c、およびカルジオリピンと緩くまたは強く結合しているシトクロム c と相互作用する; (4) シトクロム c の疎水性ヘムポケットを保護するおよび/またはカルジオリピンの Fe-Met80 結合分裂を阻害する; (5) ヘムポルフィリン (porphyrin) との \* 相互作用を促進する; (6) シトクロム c ペルオキシダーゼ活性を抑制する; (7) シトクロム c 還元速度 (kinetics) を促進する; (8) カルジオリピンにより引き起こされるシトクロム c の還元抑制を防ぐ; (9) ミトコンドリアの電子伝達系での電子の流れ (electron flux) および ATP 合成を促進する。いくつかの実施形態では、ペプチドの電子伝達を促進する能力は、ペプチドがシトクロム c / カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性を抑制する能力と関連していない。したがって、いくつかの実施形態では、投与されたペプチドは、カルジオリピンとシトクロム c との相互作用を抑制、遅延または緩和させる。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、投与されたペプチドは、シトクロム c / カルジオリピン複合体の形成を抑制、遅延または低減させる。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、投与されたペプチドは、シトクロム c / カルジオリピン複合体のオキシゲナーゼ/ペルオキシダーゼ活性を抑制、遅延または低減させる。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、投与されたペプチドは、アポトーシスを抑制、遅延または緩和させる。

20

30

40

#### 【0122】

さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、本方法は、シトクロム c を含有する試料を芳香族陽イオン性ペプチドまたはその塩 (酢酸塩またはトリフルオロ酢酸塩等)

50



の有効な量に接触させることを含む、試料でのシトクロム c 還元を増加させることに關する。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、本方法は、シトクロム c を含有する試料を芳香族陽イオン性ペプチドの有効な量に接触させることを含む、試料でのシトクロム c を介した電子拡散を増強させることに關する。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、本方法は、シトクロム c を含有する試料を芳香族陽イオン性ペプチドの有効な量に接触させることを含む、試料でのシトクロム c で電子容量 (electron capacity) を増強させることに關する。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、本方法は、シトクロム c を含有する試料を芳香族陽イオン性ペプチドの有効な量に接触させることを含む、試料でのシトクロム c 周辺で新規の - 相互作用を誘導することに關する。いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> を含む。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H <sub>2</sub> を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、試料を芳香族陽イオン性ペプチド (例えば D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> または P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H <sub>2</sub>) およびカルジオリピンに接触させることを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、試料をカルジオリピンに接触させることを含む。いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H <sub>2</sub> ( S S - 1 9 ) ( ( a t n ) D a p は - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸 )、2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 6 )、( A l d は - ( 6 ' - ジメチルアミノ - 2 ' - ナフトイル ) アラニン )、2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 7 ) ( A l d は - ( 6 ' - ジメチルアミノ - 2 ' - ナフトイル ) アラニン )、D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S P I - 2 3 1 )、および 2 ' , 6 ' - D m t - D - A r g - P h e - ( d n s ) D a p - N H <sub>2</sub> ( ( d n s ) D a p は - ダンシル - L - , - ジアミノプロピオン酸 ) ( S S - 1 7 ) を含む。

#### 芳香族陽イオン性ペプチドの予防的使用および治療的使用

##### 【 0 1 2 3 】

本明細書に記載の芳香族陽イオン性ペプチドは、疾患の予防または治療に有用である。特に、本開示は、本明細書に記載の芳香族陽イオン性ペプチドを投与することにより、疾患のリスクがある (または感染しやすい) 対象を治療する予防的および治療的方法の両方を提供する。したがって、本方法は、疾患の予防および / または治療を必要とする対象に、芳香族陽イオン性ペプチドの有効な量を投与することによる、対象の疾患の予防および / または治療を提供する。

##### 【 0 1 2 4 】

一態様では、本開示は、ミトコンドリア膜透過性遷移 ( M P T ) を受けているミトコンドリア数を減少させる、またはその必要がある哺乳類でのミトコンドリア膜透過性遷移を防ぐ方法を提供し、本方法は、哺乳類に本明細書に記載の芳香族陽イオン性ペプチドの 1 以上の有効な量を投与することを含む。別の態様では、本開示は、A T P 合成速度を増加させる必要がある哺乳類の A T P 合成速度を増加させる方法を提供し、本方法は哺乳類に本明細書に記載の芳香族陽イオン性ペプチドの 1 以上の有効な量を投与することを含む。なお別の態様では、本開示は、酸化損傷を減少させる必要がある哺乳類の酸化損傷を減少させる方法を提供し、本方法は哺乳類に本明細書に記載の芳香族陽イオン性ペプチドの 1 以上の有効な量を投与することを含む。

##### 【 0 1 2 5 】

酸化損傷。本明細書に開示のペプチドは、酸化損傷を低減させる必要がある哺乳類の酸化損傷を低減させるのに有用である。酸化損傷を低減させる必要がある哺乳類は、酸化損傷に関連する疾患、病態または治療を受けている哺乳類である。典型的には、酸化損傷は、反応性酸素種 ( R O S ) および / または反応性窒素種 ( R N S ) 等のフリーラジカルにより引き起こされる。R O S および R N S の例としては、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオンラジカル、一酸化窒素、水素、次亜塩素酸 ( H O C l )

およびペルオキシ亜硝酸塩が挙げられる。酸化損傷は、哺乳類、摘出臓器、または細胞の酸化損傷量が上述の芳香族陽イオン性ペプチドの有効な量を投与した後に減少する場合に「低減した」とみなされる。典型的には、酸化損傷は、ペプチドにより治療されていない対象と比較して、酸化損傷が少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、または少なくとも約90%減少する場合に、低減したとみなされる。

#### 【0126】

いくつかの実施形態では、治療を受ける哺乳類は、酸化損傷に関連する疾患または病態に罹患している哺乳類であり得る。酸化損傷は、哺乳類のいずれの細胞、組織または臓器で発生し得る。ヒトでは、酸化ストレスは、多くの疾患に関与している。例としては、アテローム性動脈硬化、パーキンソン病、心不全、心筋梗塞、アルツハイマー病、統合失調症、双極性障害、脆弱性X症候群および慢性疲労症候群が挙げられる。

10

#### 【0127】

いくつかの実施形態では、哺乳類は酸化損傷に関連する治療を受けていてもよい。例えば、哺乳類は再灌流を受けていてもよい。再灌流は、血流が低下または妨げられているいずれの臓器または組織への血流の復元を指す。再灌流中の血流の復元は、呼吸バーストおよびフリーラジカルの形成につながる。

#### 【0128】

一実施形態では、哺乳類は、低酸素症または虚血のため、血流が低下または妨げられることがある。例えば、低酸素症または虚血中の血液供給の欠乏または深刻な減少は、血栓塞栓性脳卒中、冠動脈アテローム性動脈硬化、または末梢血管疾患によるものである可能性がある。多くの臓器および組織は、虚血または低酸素症の対象となる。そのような臓器の例としては、脳、心臓、腎臓、腸および前立腺が挙げられる。影響を受ける組織は、典型的には、心筋、骨格筋、または平滑筋等の筋肉である。例えば、心筋の虚血または低酸素症は、通常、心臓動脈および毛細血管血液供給による心臓組織への酸素送達の減少または欠乏をもたらすアテローム性動脈硬化または血栓症の閉塞により引き起こされる。そのような心虚血または低酸素症は、影響を受けた心筋の疼痛およびネクロシスを引き起こす可能性があり、最終的には心不全に至る場合がある。

20

#### 【0129】

本方法はまた、いずれの神経変性疾患または病態に関連する酸化損傷の減少に使用され得る。神経変性疾患は、中枢神経系および末梢神経系のいずれの細胞、組織または臓器に影響を与え得る。そのような細胞、組織および臓器としては、脳、脊髄、神経細胞、神経節、シュワン細胞、星状膠細胞、オリゴデンドロサイトおよび小膠細胞が挙げられる。神経変性病態は、脳卒中、または外傷性脳損傷または脊髄損傷等の急性病態であり得る。別の実施形態では、神経変性疾患または病態は、慢性の神経変性病態であり得る。慢性の神経変性病態では、例えばフリーラジカルがタンパク質に損傷を与え得る。そのようなタンパク質の例は、アミロイドタンパク質がある。フリーラジカルによる損傷に関連する慢性の神経変性疾患の例としては、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病および筋萎縮性側索硬化症（またルー・ゲーリック病で知られる）が挙げられる。

30

#### 【0130】

ミトコンドリア膜透過性遷移。本明細書に開示のペプチドは、ミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)に関連するいずれの疾患または病態を治療するのに有用である。そのような疾患および病態としては、これに限定されないが、組織または臓器の虚血および/または再灌流、低酸素症および多くの神経変性疾患のいずれかが挙げられる。MPTを抑制または予防する必要がある哺乳類とは、これらの疾患または病態に罹患した哺乳類である。

40

#### 【0131】

アポトーシス。本明細書に開示のペプチドは、アポトーシスに関連する疾患または病態の治療に有用である。例示的な疾患または病態としては、これに限定されないが、癌、例えば結腸直腸癌、神経膠腫、肝臓癌、神経芽細胞腫、白血病およびリンパ腫、および前立腺癌等；自己免疫疾患、例えば重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、炎症性疾患、気

50

管支喘息、炎症性腸疾患、肺炎等；ウイルス性感染、例えばアデノウイルスおよびバキュロウイルスおよびHIV-AIDS等；神経変性疾患、例えばアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、網膜色素変性症および癲癇等；血液疾患、例えば再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、CD4陽性Tリンパ球減少症、およびG6PD欠損症等；例えば心筋梗塞、脳血管障害、虚血性腎傷害および多嚢胞性腎等が原因の組織損傷、が挙げられる。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示ののような芳香族陽イオン性ペプチド(D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH<sub>2</sub> ((atn)Dapは -アントラニロイル-L- , -ジアミノプロピオン酸)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (Alaは - (6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH<sub>2</sub> (Alaは - (6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニン)およびD-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH<sub>2</sub> ((dns)Dapは -ダンシル-L- , -ジアミノプロピオン酸)またはその薬剂的に許容される塩(酢酸塩またはトリフルオロ酢酸塩等)等)は、投与する必要がある対象(例えば、ヒト等の哺乳類)に投与される。上述のように、ペプチドは、(例えば標的)シトクロムc、カルジオリピンまたはその両方と接触し、カルジオリピン-シトクロムc相互作用を妨害、カルジオリピン-ヒドロペルオキシド形成を抑制、カルジオリピンの外膜への移行を抑制および/またはオキシゲナーゼ/ペルオキシダーゼ活性を抑制すると、考えられている。したがって、いくつかの実施形態では、投与されたペプチドは、カルジオリピンとシトクロムcとの相互作用を抑制、遅延または低減させる。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、投与されたペプチドは、シトクロムc/カルジオリピン複合体の形成を抑制、遅延または低減させる。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、投与されたペプチドは、シトクロムc/カルジオリピン複合体のオキシゲナーゼ/ペルオキシダーゼ活性を抑制、遅延または低減させる。さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態では、投与されたペプチドは、アポトーシスを抑制、遅延または低減させる。

#### a. 抗リン脂質抗体症候群および全身性エリテマトーデス

##### 【0132】

本明細書に開示のペプチドは、自己免疫疾患または病態(全身性自己免疫疾患等)を治療するのに有用である。抗リン脂質抗体症候群(APS)および全身性エリテマトーデス(SLE)は、例えば抗カルジオリピン抗体、抗<sub>2</sub>糖タンパク質I、およびループス性抗凝固因子等の、循環自己抗体の存在を特徴とする全身性自己免疫疾患の例である。他の自己免疫疾患と同様に、免疫系は身体の細胞および組織を攻撃し、結果として炎症および組織損傷を引き起こす。APSは、血管内血栓、血小板減少症、心臓弁疾患、網状皮斑、および/または妊娠期間中の病的状態(胎児死亡、流産、および妊娠高血圧腎症等)に関連する。SLEは、結合組織に関与する炎症反応を特徴とするAPSのサブセットである場合がある。SLEの炎症性症状または病態としては：発熱；肺疾患(胸膜炎、胸水、ループス肺炎、慢性びまん性間質性肺疾患、肺高血圧症、肺動脈塞栓、肺出血、および縮小肺症候群(shrinking lung syndrome)等)；心臓の炎症(例えば心膜炎、心筋炎、および心内膜炎)；血液に関する病態(貧血、低血小板数および低白血球数等)；延長した部分トロンボプラスチン時間；筋骨格系の問題(関節の痛みおよび炎症、骨関節結核、ならびに筋肉痛等)；皮膚の病態(頬部発疹、円盤状ループス、脱毛症、口、鼻、尿路および腔内の潰瘍等)；神経の病態(頭痛、鬱病、不安症、多発性神経障害、精神病、頭蓋内圧亢進症候群等)が挙げられる。疾患の経過は、寛解と交互に起こる急性増悪(acute flare)の期間を特徴とする。現在、APSまたはSLEの特定の治療は存在せず、通例、利用可能な治療は、発症した場合に急性増悪を防ぎ、その重症度および持続期間を低減させることのみに関連するものである。

##### 【0133】

カルジオリピン酸化は、APSおよびSLEの両方の炎症側面に重要な過程である場合

がある。したがって、本開示の芳香族陽イオン性ペプチド（これらに限定されるものではないが、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 02)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20) および D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)、Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS - 19) ((atn) Dap は - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸)、および 2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 36) (Ald は - (6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル)アラニン)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS - 37)、またはその薬剤的に許容される塩（酢酸塩およびトリフルオロ酢酸塩等）等）を使用して、対象でのカルジオリピン酸化、細胞アポトーシス、およびカルジオリピンのカルジオリピン抗体への細胞外での曝露により生じた炎症、および/または対象でのカルジオリピン抗体の生成を防ぐことにより、これらの疾患の両方を治療し得る。

#### 1. カルジオリピンの酸化およびアポトーシス細胞での細胞外の曝露

##### 【0134】

本明細書に開示のペプチドは、カルジオリピン酸化を予防、抑制または低下させるのに有用である。カルジオリピンは、ミトコンドリア内膜上に、および外膜および内膜と接触する接触部位に、ほぼ例外なく認められるわけではない特有のリン脂質である。カルジオリピンドメインは、クリステ形成に必要なものであり、これらは呼吸複合体を高次元の超複合体 (supercomplex) に構成することに関与し、電子伝達を容易にする。カルジオリピンはまた、有効な電子伝達のために、シトクロム c を呼吸複合体とごく近接した状態に維持するのに必要である。正電荷のシトクロム c は、高いアニオン性のカルジオリピンと、静電相互作用により相互作用する。

##### 【0135】

このカルジオリピン - シトクロム c 相互作用は、カルジオリピン過酸化により衰退 (weakened) し、このサイトゾル方向へ遊離するシトクロム c の喪失 (loss) がカスパーゼ - 依存性のアポトーシスを起こす (Shidoji ら、1999, Biochem Biophys Res Commun 264, 343-347)。脂質膜の再形成はアポトーシスの間に起こり、ホスファチジルセリンが細胞膜の内葉 (inner leaflet) から外葉 (outer leaflet) に移動する。同様に、カルジオリピンおよびその代謝産物は、ミトコンドリアから他の細胞内の細胞小器官および細胞表面に移動し得る (M. Sorice ら、2004, Cell Death Differ 11, 1133-1145)。したがって、アポトーシス細胞表面のカルジオリピンは、抗カルジオリピン抗体の誘因となる可能性がある。

#### 2. カルジオリピンの酸化および APS

##### 【0136】

カルジオリピンは、アポトーシス細胞の表面に発現することが示されてきたが、カルジオリピンはまた、APS に罹患した患者からの精製された抗リン脂質抗体により認められる (M. Sorice ら、2004, Cell Death Differ 11, 1133-1145)。さらに、カルジオリピン発現は、ホスファチジルセリンの細胞表面への移行および DNA 断片化より先に生じる。Horkko らは、抗リン脂質抗体が酸化されたカルジオリピンとのみと結合し、還元されたカルジオリピンとは結合しないことを報告している (Horkko ら、1997, Proc Natl Acad Sci U S A 94:10356-10361)。これは、カルジオリピンがシトクロム c を放出し細胞表面に移動するためには、酸化されなければならないという事実と一致する。さらに、酸化されたカルジオリピンの反応基は、<sub>2</sub> GP 1 と共有結合付加体を形成する場合もあり、これらの付加体は、抗カルジオリピン抗体のエピトープである可能性がある。

#### 3. ミトコンドリアの ATP 枯渇および SLE

##### 【0137】

本明細書に開示のペプチド（これらに限定されるものではないが、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 02)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20) および D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)、Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (S

10

20

30

40

50

S - 19) ( ( a t n ) D a p は - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸)、および 2', 6' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H<sub>2</sub> ( S S - 36 )、( A l d は - ( 6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル)アラニン)、2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H<sub>2</sub> ( S S - 37 )、またはその薬剤的に許容される塩(酢酸塩およびトリフルオロ酢酸塩等)等は、機能不全ミトコンドリアの A T P 濃度を増加させるのに有用である。異常な T - 細胞活性化および細胞死は、S L E 病変の根底をなすと考えられ、A P S と同様に、カルジオリピン過酸化がこの現象に関与している可能性がある。A P S のように、抗カルジオリピン抗体は S L E 患者には認められない(Wooら、Korean J Lab Med. 2010 Feb;30(1):38-44)。S L E 患者由来のリンパ球および P M N はミトコンドリアの上昇した電位、上昇した反応性酸素種生成、低減した細胞内 A T P、増大した乳酸濃度、および減少した細胞内グルタチオンを示す(Perlら、2004, Int Rev Immunol 23:293-313; Perlら、2004, Trends Immunol 25, 360-367; Gergely, Jr.ら、2002, Arthritis Rheum 46:175-190; Li ら、2012, Clin Dev Immunol 2012, 548516)。したがって S L E 患者の免疫細胞は、ミトコンドリア機能不全および酸化ストレスを起こす傾向がある。本学説と一致して、S L E の T 細胞は、増強した自発的アポトーシスを示す(Perlら、2004, Trends Immunol 25, 360-367)。

10

#### 【0138】

リンパ球ネクロシスはまた、S L E によく見られる炎症性反応の一因となる場合がある。リンパ球の細胞内 A T P 濃度は、アポトーシスまたはネクロシスにより死亡する細胞選択のキースイッチ(key switch)であると考えられる。細胞内 A T P の欠損により、リンパ球がネクロシスで死ぬ可能性が高くなり、これが S L E 患者の炎症の一因となる場合がある。したがって、学説に拘束されることを望むものではないが、S L E 患者のリンパ球での A T P 欠損により、リンパ球がネクロシスにより死亡する傾向になり、上昇した炎症性症状をもたらす可能性がある。

20

#### 4. 芳香族陽イオン性ペプチドを用いた A P S または S L E の炎症の予防

#### 【0139】

本明細書に開示の芳香族陽イオン性ペプチド(これらに限定されるものではないが、2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - N H<sub>2</sub> ( S S - 02 )、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H<sub>2</sub> ( S S - 20 )および D - A r g - 2', 6' - D m t - L y s - P h e - N H<sub>2</sub> ( S S - 31 )、D m t - D - A r g - P h e - ( a t n ) D a p - N H<sub>2</sub> ( S S - 19 ) ( ( a t n ) D a p は - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸)、および 2', 6' - D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H<sub>2</sub> ( S S - 36 ) ( A l d は - ( 6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル)アラニン)、2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H<sub>2</sub> ( S S - 37 )、またはその薬剤的に許容される塩(酢酸塩およびトリフルオロ酢酸塩等)等は、カルジオリピンの過酸化を防ぐのに有用である。そのようなペプチドはまた、カルジオリピンの細胞表面への移動を抑制してカルジオリピン抗体産生のためのエピトープを取り除くこと、カルジオリピンと抗カルジオリピン抗体との反応を阻害すること、またはリンパ球での A T P 枯渇および結果として生じるネクロシスを防ぐことにより、A P S および S L E の炎症を抑制するのに有用である。カルジオリピン過酸化は、主にシトクロム c のペルオキシダーゼ活性により仲介される。ミトコンドリアのシトクロム c の約 15 ~ 20 % は、複合体では疎水性相互作用によりカルジオリピンと強く結合され、それ故カルジオリピンの 1 以上のアシル鎖がシトクロム c の疎水性チャネルに挿入されている。アシル鎖のシトクロム c への挿入は M e t 80 と H e m F e との間の配位結合を分断し、H e m F e の第 6 配位を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に曝露させ、したがって、この酵素をカルジオリピン酸化を選択的に触媒し得るペルオキシダーゼに変換させる。

30

40

#### 【0140】

本明細書に開示の芳香族陽イオン性ペプチド(これらに限定されるものではないが 2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - N H<sub>2</sub> ( S S - 02 )、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H<sub>2</sub> ( S S - 20 )および D - A r g - 2', 6' - D m t -

50

Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)、Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS - 19) ((atn) Dapは - アントラニロイル - L - , - ジアミノプロピオン酸)、および2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 36)、(Aldは - (6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル)アラニン)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS - 37)、またはその薬剂的に許容される塩(酢酸塩およびトリフルオロ酢酸塩等)等は、細胞透過性を有し、ミトコンドリア内膜で選択的に標的化し集中し得る。芳香族陽イオン性ペプチドは、アニオン性リン脂質(カルジオリピン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、およびホスファチジルグリセロール等)を、選択的に標的化し、カルジオリピンはいくつかのペプチドと高い親和性を有するようになる(例えば実施例21を参照)。いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcと相互作用し、その相互作用はカルジオリピンの存在下で増強される。いくつかの実施形態では、ペプチドは、ヘムのごく近くのシトクロムcタンパク質内で浸透し得、この浸透は、カルジオリピンの存在下で増強される(例えば、実施例22~25参照)。

10

20

30

40

50

#### 【0141】

学説に拘束されることを望むものではないが、シトクロムcのヘム環境に貫通することにより、芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンとcytcとの構造的相互作用を妨げる可能性が高く、Met80 - Fe配位の破壊(rupture)を阻止し、シトクロムcがベルオキシダーゼとなるのを抑制する(例えば、実施例24を参照のこと)。これらの芳香族陽イオン性ペプチドはまた、ヘム領域の - 相互作用を増加させ、シトクロムc還元を促進させる。

#### 【0142】

本明細書に開示の芳香族陽イオン性ペプチドはまた、ミトコンドリアの呼吸を増強させ、酸化リン酸化能力を増加させ、またミトコンドリアの反応性酸素種を減少させ得る(例えば、実施例16および20を参照のこと)。結果として、芳香族陽イオン性ペプチドは、リンパ球のミトコンドリア機能を保護し、カルジオリピン過酸化を減少させ、アポトーシスおよびネクローシスを抑制し、および、抗体生成の誘因となるカルジオリピンの曝露を抑制または減少させ、および/またはカルジオリピンとカルジオリピン抗体との接触を抑制し得る。

#### 【0143】

芳香族陽イオン性ペプチドに基づく治療薬の生物学的効果の決定。様々な実施形態では、好適なin vitroまたはin vivo分析を実施して、特定の芳香族陽イオン性ペプチドに基づく治療薬の効果、およびその投与が治療に適応されるどうかを決定する。様々な実施形態では、in vitro分析は、代表的な動物動物モデルで実施し、所定の芳香族陽イオン性ペプチドに基づく治療薬が疾患を予防または治療する所望の効果を発揮するかどうかを決定し得る。治療用の化合物は、ヒト対象に試験する前に、好適な動物モデル系(例えば、これらに限定されるものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ブタ、ウシ、サル、ウサギ等)で試験し得る。同様に、in vivo試験に、当技術分野で公知のいずれの動物モデル系が、ヒト対象への投与前に使用され得る。

#### 【0144】

予防方法。一態様では、本発明は、対象に病態の発病または進行を抑制する芳香族陽イオン性ペプチドを投与することにより、対象の疾患を防ぐ方法を提供する。予防的用途では、芳香族陽イオン性ペプチドの医薬組成物または薬物が、疾患または病態に感染しやすい対象、またはその他リスクがある対象に、疾患(疾患の生化学的、組織学的および/または行動的症状、その合併症、ならびに疾患の発症中での中期病理学的表現型を含む)のリスクを排除または低減させる、重症度を低下させる、または発生を遅延させるのに十分な量で、投与される。予防的な芳香族カチオンの投与は、疾患または障害が予防される、あるいはその進行が遅延するように、異常の症状特性の兆候の前に実施し得る。適する化合物は、上述のスクリーニング分析に基づき決定し得る。

#### 【0145】

治療方法。 本技術の別の態様には、治療目的の対象の疾患を治療する方法が含まれる。治療用途では、組成物または薬物が、そのような疾患の疑いがあるかまたは既に罹患した対象に、疾患（その合併症およびその疾患の発症での中期病理学的表現型を含む）の症状を治療するまたは少なくとも部分的に進行を抑えるのに十分な量で投与される。

#### 投与様式および有効投薬量

##### 【0146】

当業者に公知の、細胞、臓器または組織をペプチドと接触させるいずれの方法を使用してもよい。好適な方法には、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*方法が含まれる。*In vivo*方法は、典型的には、上述のような芳香族陽イオン性ペプチドの、哺乳類、好適にはヒトへの投与が挙げられる。治療目的で*in vivo*で使用する場合、芳香族陽イオン性ペプチドは、対象に有効な量（すなわち所望の治療効果を有する量）投与される。用量および投薬計画は、対象の傷害程度、使用する特定の芳香族陽イオン性ペプチドの特性（例えばその治療指数）、対象、および対象の病歴による。

10

##### 【0147】

有効な量は、医師および臨床医によく知られている方法により前臨床試験および臨床試験中に決定されてもよい。本方法に有用なペプチドの有効な量は、投与を必要とする哺乳類に、医薬化合物（*pharmaceutical compound*）を投与する多くの周知の方法により投与してもよい。ペプチドは、全身または局所に投与してもよい。

##### 【0148】

ペプチドは、薬剂的に許容される塩として製剤化されてもよい。用語「薬剂的に許容される塩」は、哺乳類等の患者への投与に許容される塩基または酸から調製された塩（例えば、所定の投与計画に対して許容される哺乳類の安全性を有する塩）を意味する。しかしながら、患者への投与を意図しない中間化合物の塩等は、薬剂的に許容される塩である必要はないことは理解されるべきである。薬剂的に許容される塩は、薬剂的に許容される無機塩基または有機塩基に、および薬剂的に許容される無機酸または有機酸に由来し得る。さらに、ペプチドが塩基性部分（アミン、ピリジンまたはイミダゾール等）および酸性部分（カルボン酸またはテトラゾール等）の両方を含む場合、両性イオンが形成されることがあり、これは本明細書で用いられる用語「塩」の範囲に含まれる。薬剂的に許容される無機塩基に由来する塩としては、アンモニア、カルシウム、銅、第二鉄、第一鉄、リチウム、マグネシウム、第二マンガン、第一マンガン、カリウム、ナトリウム、および亜鉛の塩等が挙げられる。薬剂的に許容される有機塩基に由来する塩としては、置換アミン、環状アミン、天然由来のアミン等を含む第一、第二および第三アミン、例えばアルギニン、バタイン、カフェイン、コリン、*N, N'*-ジベンジルエチレンジアミン、ジエチルアミン、2-ジエチルアミノエタノール、2-ジメチルアミノエタノール、エタノールアミン、エチレンジアミン、*N*-エチルモルフォリン、*N*-エチルピペリジン、グルカミン、グルコサミン、ヒスチジン、ヒドラミン、イソプロピルアミン、リジン、メチルグルカミン、モルフォリン、ピペラジン、ピペラジン（*piperadine*）、ポリアミン樹脂、プロカイン、プリン類、テオプロミン、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリプロピルアミン（*tripropylamine*）、トロメタミン（*tromethamine*）の塩等が挙げられる。薬剂的に許容される無機酸に由来する塩としては、ホウ酸、炭酸、ハロゲン化水素酸（臭化水素酸、塩酸、フッ化水素酸またはヨウ化水素酸）、硝酸、リン酸、スルファミン酸および硫酸の塩が挙げられる。薬剂的に許容される有機酸に由来する塩としては、脂肪族ヒドロキシル酸（例えば、クエン酸、グルコン酸、グリコール酸、乳酸、ラクチオン酸、リンゴ酸、および酒石酸）、脂肪族モノカルボン酸（例えば、酢酸、酪酸、ギ酸、プロピオン酸およびトリフルオロ酢酸）、アミノ酸（例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸）、芳香族カルボン酸（例えば、安息香酸、*p*-クロロ安息香酸、ジフェニル酢酸、ゲンチシン酸、馬尿酸、およびトリフェニル酢酸）、芳香族ヒドロキシル酸（例えば、*o*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、1-ヒドロキシナフタレン-2-カルボン酸および3-ヒドロキシナフタレン-2-カルボン酸）、アスコルビン酸、ジカルボン酸（例えば、フマル酸、マレイン酸、シュウ酸およびコハク酸）、グルクロン酸、マンデル酸、

20

30

40

50

粘液酸、ニコチン酸、オロチン酸、パモン酸、パントテン酸、スルホン酸（例えば、ベンゼンスルホン酸、カンファースルホン酸、エジシル酸、エタンスルホン酸、イセチオン酸、メタンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、ナフタレン - 1, 5 - ジスルホン酸、ナフタレン - 2, 6 - ジスルホン酸および p - トルエンスルホン酸）、キシナフォン酸等の塩が挙げられる。いくつかの実施形態では、塩は酢酸塩である。さらに、またはあるいは、他の実施形態では、塩はトリフルオロ酢酸塩である。

#### 【0149】

本明細書に記載の芳香族陽イオン性ペプチドは、本明細書に記載の障害の治療または予防のために、対象に単独でまたは組み合わせて投与する医薬組成物に組み込まれ得る。そのような組成物としては、典型的には、活性剤および薬剂的に許容される担体が挙げられる。本明細書で用いられる場合、用語「薬剂的に許容される担体」としては、薬剤の投与と適合性のある食塩水、溶剤、分散媒質、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等が挙げられる。補助的な活性化化合物もまた、組成物に組み込む得る。

10

#### 【0150】

医薬組成物は、典型的には、その意図する投与経路に適合性のあるように製剤化される。投与経路の例としては、非経口（例えば、静脈内、皮内、腹腔内または皮下）、経口、吸入、経皮（局所）、眼内、イオン泳動的、および経粘膜投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下用途に使用される溶液または懸濁液としては、以下の成分が挙げられる：無菌希釈剤（注射用水、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶剤等）；抗菌剤（ベンジルアルコールまたはメチルパラベン等）；酸化防止剤（アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム等）；キレート剤（エチレンジアミン四酢酸等）；緩衝液（酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩等）、および張性を調整する薬剤（塩化ナトリウムまたはデキストロース等）。pHは、酸または塩基（塩酸または水酸化ナトリウム等）で調整され得る。非経口調製品（preparation）は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または数回投与用バイアルに封入し得る。患者または治療する医師の都合で、投薬製剤（dosing formulation）は、治療経過（例えば、7日間の治療）に必要な全ての機器（例えば、薬品のバイアル、希釈剤のバイアル、注射器および針）が含まれるキットで提供され得る。

20

#### 【0151】

注射用に好適な医薬組成物には、無菌の注射剤または分散剤の即席の調製用に、無菌の水溶液（水溶性の場合）または分散剤および無菌粉末が含まれ得る。静脈内投与用に、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水（bacteriostatic water）、Cremophor EL（商標）（BASF、Parshippany、N.J.）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合で、非経口投与用の組成物は無菌でなければならず、容易に注射可能な程度まで流動的である必要がある。非経口投与用の組成物は、製造および保存条件下で安定であり、かつ細菌や菌類等の微生物の汚染作用を防ぐものである必要がある。

30

#### 【0152】

芳香族陽イオン性ペプチド組成物には、担体を含み得、その担体は、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等）、ならびにその好適な混合物を含有する溶剤または分散剤であり得る。適した流動性は、例えば、被覆剤（レシチン等）の使用により、分散液の場合はその必要とする粒径の維持により、また、界面活性剤の使用により、維持され得る。微生物作用の抑制は、様々な抗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、チオメラゾール（thiomerasol）等により達成し得る。グルタチオンおよび他の酸化防止剤は、酸化を防ぐために含まれ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール（マンニトール、ソルビトール等）、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。注射組成物の持続的吸収は、組成物中に、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンが含まれることにより実現され得る。

40

50



## 【 0 1 5 3 】

無菌注射剤は、上述に列挙した成分の1つまたはその組み合わせと共に、適する溶剤に活性化化合物を必要量組み込み、必要に応じ、その後に濾過滅菌することにより調製され得る。概して、分散剤は、活性化化合物を無菌賦形剤に組み込むことにより調製され、これには塩基性分散媒や上記で列挙した他の必要な成分が含まれる。無菌注射剤調製用の無菌粉末の場合、調製の典型的な方法としては、真空乾燥および凍結乾燥が挙げられ、これらの方法により、事前に滅菌濾過したその溶液から、活性成分といずれの所望の追加成分の粉末が回収し得る。

## 【 0 1 5 4 】

経口組成物は、概して、不活性希釈剤または可食性担体を含む。経口での治療的投与の目的で、活性化化合物は、賦形剤 (excipient) により組み込まれ、錠剤、トローチ、またはカプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形態で使用され得る。経口組成物はまた、洗口液として使用される液体担体を用いて調製され得る。薬学的に適合する結合剤および/または補助物質 (adjuvant material) が、組成物の一部として含有し得る。錠剤、丸薬、カプセル、トローチ等は、以下の成分、または同様の性質の化合物のいずれかを含有し得る：結合剤 (結晶セルロース、ガムトラガカンスまたはゼラチン等)；賦形剤 (デンプンまたは乳糖)；崩壊剤 (アルギン酸、プリモゲル (Primogel)、またはコーンスターチ等)；滑沢剤 (ステアリン酸マグネシウムまたはステロート等)；流動促進剤 (コロイド状二酸化ケイ素等)；甘味剤 (スクロースまたはサッカリン等)；または着香剤 (ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバ等)。

## 【 0 1 5 5 】

吸入による投与では、化合物は、好適な推進剤、例えば、気体 (二酸化炭素等) を含む加圧容器もしくはディスペンサ、または噴霧器からのエアゾルスプレーの形態で、送達され得る。そのような方法には、米国特許第 6, 4 6 8, 7 9 8 号に記載の方法が含まれる。

## 【 0 1 5 6 】

本明細書に記載の治療化合物の全身投与はまた、経粘膜または経皮手段によりなされ得る。経粘膜投与または経皮投与用に、浸透を受ける障壁 (barrier) に適した浸透剤が製剤中に使用される。そのような浸透剤は、概して当技術分野に公知であり、また、例えば、経粘膜投与用に、洗浄剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、経鼻スプレーの使用により達成し得る。経皮投与には、活性化化合物は、概して当技術分野で公知のように、軟膏剤 (ointment)、軟膏 (salve)、ゲル、またはクリームに製剤化され得る。一実施形態では、経皮投与は、イオントフォoresisにより実施されてもよい。

## 【 0 1 5 7 】

治療用のタンパク質またはペプチドは、担体系で製剤化され得る。担体は、コロイド系であり得る。コロイド系は、リボソーム、リン脂質二重層賦形剤であり得る。一実施形態では、治療用のペプチドは、ペプチドの完全性を維持しながら、リボソームにカプセル化される。当業者が十分理解しているように、リボソームを調製する方法には様々なものがある (Lichtenbergら, Methods Biochem. Anal., 33:337-462 (1988); Anselemら, Liposome Technology, CRC Press (1993)を参照のこと)。リボソーム製剤は、クリアランスを遅延させ、細胞取込みを増加させ得る (Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923 (2000)を参照のこと)。活性剤はまた、薬剂的に許容される成分 (例えばこれらに限定されるものではないが、可溶性、不溶性、透過性、非透過性、生分解性または胃保持型高分子またはリボソーム) から調製された粒子内に投入され得る。そのような粒子としては、これに限定されないが、ナノ粒子、生分解性ナノ粒子、微小粒子、生分解性微小粒子、ナノスフェア、生分解性ナノスフェア、ミクロスフェア、生分解性ミクロスフェア、カプセル、エマルジョン、リボソーム、ミセルおよびウイルスベクター系が挙げられる。

## 【 0 1 5 8 】

担体はまた、高分子、例えば、生分解性で生体適合性の高分子マトリックスであり得る

。一実施形態では、治療用ペプチドは、タンパク質の完全性を維持しながら、高分子マトリックス中にカプセル化され得る。高分子は、天然高分子（ポリペプチド、タンパク質または多糖類等）、または合成高分子（ポリ - ヒドロキシ酸等）であり得る。例としては、例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、エラスチン、酢酸セルロース、硝酸セルロース、多糖類、フィブリン、ゼラチン、およびそれらの組合せ等から作製される担体が挙げられる。一実施形態では、高分子はポリ乳酸（PLA）または乳酸/グリコール酸共重合体（PGA）ある。高分子マトリックスは、様々な形態および大きさに調製および単離され得、例えばミクロスフェアおよびナノスフェアが挙げられる。高分子製剤により、治療効果の持続期間を延長することができる。（Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923 (2000) を参照のこと）ヒト成長ホルモン（hGH）用の高分子製剤が臨床試験で使用されてきた。（Kozarich および Rich, Chemical Biology, 2:548-552 (1998) を参照のこと）。

10

#### 【0159】

高分子ミクロスフェアの徐放性製剤の例は、PCT公開、国際公開第99/15154号（Tracyら）、米国特許第5,674,534号および第5,716,644号（共にZaleら）、PCT公開、国際公開第96/40073号（Zaleら）、およびPCT公開、国際公開第00/38651号（Shahら）に記載されている。米国特許第5,674,534号および第5,716,644号およびPCT公開、国際公開第96/40073号には、塩との凝集に対して安定化させたエリスロポエチンの粒子を含有する高分子マトリックスが記載されている。

20

#### 【0160】

いくつかの実施形態では、治療化合物は、担体と共に調製され、この担体は治療化合物の体内からの迅速な排出から保護するものであり、例えばインプラントおよびマイクロカプセル化送達系等の放出制御製剤である。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸等の生分解性で生体適合性の高分子が使用され得る。そのような製剤は、公知の技術を用いて調製され得る。物質はまた、市販で例えば、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals、Inc.等からも入手できる。リボソーム懸濁液（例えば細胞特異的抗原に対するモノクローナル抗体を有する特定の細胞を標的にしたりリボソーム）はまた、薬剤的に許容される担体として使用され得る。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に記載のように、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

30

#### 【0161】

治療化合物はまた、細胞内送達を促進させるために製剤化され得る。例えば、リボソーム送達系が当技術分野で公知であり例えば、ChonnおよびCullis, "Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems," Current Opinion in Biotechnology 6:698-708 (1995); Weiner, "Liposomes for Protein Delivery: Selecting Manufacture and Development Processes," Immunomethods, 4(3):201-9 (1994); および Gregoriadis, "Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems," Trends Biotechnol., 13(12):527-37 (1995) を参照のこと。Mizguchiら, Cancer Lett., 100:63-69 (1996)、には、*in vivo* および *in vitro* の両方で細胞にタンパク質を送達する融合性リボソームの使用が記載されている。

40

#### 【0162】

治療薬の投与量、毒性および治療効果は、細胞培養または実験動物での標準的な製薬手順（pharmaceutical procedure）により決定され得、例えばLD50（個体群の50%で死に至る用量）およびED50（個体群の50%で治療上有効な用量）の決定について評価され得る。毒性と治療効果との用量比が治療指数であり、これは、LD50/ED50比で表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。中毒性副作用を示す化合物は使用されてもよいが、非感染細胞に対する損傷の可能性を最小限に抑えるために、そのような化合物を罹患組織の部位に標的化する送達系の設計には注意する必要がある、これにより、副作用を低減する。

50

## 【0163】

細胞培養分析および動物試験から得られるデータは、ヒト用の広範な用量を製剤化するのに使用され得る。そのような化合物の投与量は、好ましくは、低い毒性または無毒性のED50を含む広範な血中濃度の範囲内にある。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に依りこの範囲を変えてもよい。本方法に使用されるいずれの化合物について、細胞培養分析から最初に治療に有効な量を推定し得る。用量は、細胞培養で決定されるように、IC50（すなわち、症候の最大半量の抑制を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成する動物モデルで公式化され得る。そのような情報は、ヒトで有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中の濃度は、例えば高性能液体クロマトグラフィにより測定してもよい。

10

## 【0164】

典型的には、治療効果または予防効果を達成するのに十分な芳香族陽イオン性ペプチドの有効な量は、約0.000001mg/体重1kg/日～約10,000mg/体重1kg/日の範囲である。好適には、投与量範囲は、約0.0001mg/体重1kg/日～約100mg/体重1kg/日である。例えば、投与量は毎日、2日毎、または3日毎に1mg/体重1kgまたは10mg/体重1kg、または毎週、2週間毎、または3週間毎に1～10mg/体重1kgの範囲内であってもよい。一実施形態では、ペプチドの単回投与量は、0.1～10,000μg/体重1kgの範囲である。一実施形態では、担体での芳香族陽イオン性ペプチド濃度は、0.2～2000μg/（送達される製剤1mL）の範囲である。例示的な治療計画では、1日1回または週に1回の投与を必要とする。治療用途では、疾患の進行が遅くなるかまたは停止するまで、また好適には、対象が疾患の症状の部分的または全体的な改善を示すまで、相対的に短い間隔で相対的に高い用量が必要になることがよくある。その後、患者に投薬計画を施し得る。

20

## 【0165】

いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドの治療に有効な量を、 $10^{-12}$ ～ $10^{-6}$ 、例えば約 $10^{-7}$ モルの標的組織でのペプチドの濃度として定義してもよい。この濃度は、0.01～100mg/kgの全身用量、または体表面積で同等の用量で送達されるものであってもよい。標的組織で治療濃度を維持するように、用量のスケジュールが最適化されることになり、最も好ましくは、1日1回または週1回の投与であるが、連続投与（例えば、静脈注入または経皮的投与）を含む。

30

## 【0166】

いくつかの実施形態では、芳香族陽イオン性ペプチドの投与量は、約0.001～約0.5mg/kg/h、好適には約0.01～約0.1mg/kg/hで提供される。一実施形態では、投与量は、約0.1～約1.0mg/kg/h、好適には約0.1～約0.5mg/kg/hで提供される。一実施形態では、用量は、約0.5～約10mg/kg/h、好適には約0.5～約2mg/kg/hで提供される。

## 【0167】

例えば、これらに限定されるものではないが、疾患または障害の重症度、前治療、全体的な健康状態および/または対象の年齢、および他の疾患の存在等のある因子が、対象を効果的に治療するのに必要な用量およびタイミングに影響を与えることがあることは、当業者なら十分理解されよう。さらに、本願明細書に記載の治療組成物を治療に有効な量を用いた対象の治療には、単回治療または一連の治療が含まれる。

40

## 【0168】

本方法に従って治療される哺乳類は、例えば、家畜（ヒツジ、ブタ、ウシ、およびウマ等）；愛玩動物（イヌおよびネコ等）；実験動物（ラット、マウスおよびウサギ等）等のいずれの哺乳類であり得る。好ましい実施形態では、哺乳類はヒトである。

電子伝達での芳香族陽イオン性ペプチド

## 【0169】

ミトコンドリアのATP合成は、ミトコンドリア内膜（IMM）の電子伝達系（ETC）を介した電子の流れにより引き起こされる。電子伝達系を介した電子の流れは、一連の

50

酸化／還元過程として記載され得る。電子は電子供与体（NADHまたはQH<sub>2</sub>）から、一連の電子受容体（Complex I - IV）を介して通過し、最終的に末端電子受容体、酸素分子に至る。シトクロムc（IMMと緩く結合している）は、電子を複合体IIとIVとの間で移動させる。

#### 【0170】

ETCを介した電子の迅速な短絡（shunting）は、電子脱出（electron escape）およびフリーラジカル中間体の発生につながる短絡の抑制に重要なものである。電子供与体と電子受容体との間の電子伝達（ET）速度は、その距離と共に急激に低下し、超交換ETは、20に制限される。長距離ETは、多段階電子ホッピング過程で達成されるが、この場合、供与体と受容体との全体の距離が一連の比較的短い距離に分けられ、そのためよりET段階が早くなる。ETCでは、長距離にわたる有効なETは、FMN、FeSクラスター、およびヘムを含み、IMMに沿って戦略的に局在している補因子により支援される。芳香族アミノ酸（Phe、TyrおよびTrp等）はまた、オーバーラッピングクラウド（overlapping cloud）を介したヘムへの電子伝達を容易にし得、このことは、シトクロムcについて特に示された（実施例を参照のこと）。好適な酸化電位をもつアミノ酸（Tyr、Trp、Cys、Met）は、中間電子伝達体として機能することによる足掛かり（stopping stone）の役割を果たし得る。さらに、Tyrの水酸基は、電子を伝達する際にプロトンを失う可能性があり、Lys等の周囲に塩基性基が存在すると、さらに有効なプロトン共役型ETが得られる可能性がある。

10

20

#### 【0171】

ミトコンドリアを標的化するカタラーゼ（mCAT）の過剰発現は、マウスにおいて、老化を改善（例えば、症状を低減させる）、また生存期間を延長させることが示された。これらの例が、ミトコンドリアの酸化ストレスを低減しミトコンドリア機能を保護することができる「医薬品となり得る（druggable）」化合物を特定する。ミトコンドリアは細胞内の反応性酸素種（ROS）の主な供給源であるので、抗酸化物質が、ミトコンドリアのDNA、電子伝達系（ETC）のタンパク質、およびミトコンドリア脂質膜まで酸化的損傷を制限するために、抗酸化物質がミトコンドリアまで送達されなければならない。発明者らは、ミトコンドリア内膜（IMM）で選択的に標的化して集中する合成芳香族カチオンテトラペプチドのファミリーを発見した。これらのペプチドの一部は、1電子酸化されて、ミトコンドリア標的抗酸化物質として働くことができる酸化還元活性のあるアミノ酸を含有する。本明細書に開示のペプチド（ペプチドD-Arg-2'6'-Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>等）は、細胞試験および動物試験で、ミトコンドリアのROSを減少させ、またミトコンドリア機能を保護する。最近の研究では、このペプチドが、ミトコンドリアのカタラーゼ過剰発現で見られるものに匹敵するミトコンドリアの酸化ストレスを防ぎ得ることが示されている。ラジカル消去が酸化ストレスを低減させる最もよく使用される方法ではあるが、電子リーク（electron leak）を低減させて電子伝達を容易にすること、およびミトコンドリアの還元電位を改善することを含む、使用され得る他の電子機構（electron mechanism）が存在する。

30

#### 【0172】

十分な状況証拠により、酸化ストレスが、正常の老化やいくつかの主要な疾患（例えば心疾患、糖尿病、神経変性疾患、および癌等）の多くの影響に寄与していることが示唆される。酸化ストレスは、概して、酸化促進物質および抗酸化物質のバランスとして定義される。しかしながら、増加した酸化的組織損傷を裏付ける多くの科学的根拠にもかかわらず、抗酸化物質を用いた大規模な臨床研究は、これらの疾患に有意な健康効果を実証していない。理由の1つは、酸化促進生成（prooxidant production）部位に達することができる抗酸化物質の喪失に起因する場合がある。

40

#### 【0173】

ミトコンドリアの電子伝達系（ETC）は、ROSの主要な細胞内産生物であり、ミトコンドリア自体は酸化ストレスに最も脆弱である。したがって、ミトコンドリア機能を保護することは、ミトコンドリアの酸化ストレスにより生じる細胞死を予防するための必須

50

条件になる。ペルオキシソーム (pCAT) ではなく、ミトコンドリアを標的とするカタラーゼ (mCAT) を過剰発現させる有効性により、ミトコンドリア標的抗酸化物質が老化の有害作用を解決するのに必要になるという概念実証が得られた。しかしながら、化学的抗酸化物質の IMM への適切な送達は、依然として課題がある。

#### 【0174】

1つのペプチド類似体、D - Arg - 2', 6' - Dmt - Tyr - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> は、修飾されたチロシン残基が酸化還元活性をもち一電子酸化を受ける可能性があることから、内因性の抗酸化能力を有する。本発明者らは、このペプチドが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ヒドロキシルラジカル、およびペルオキシ亜硝酸を中和し、脂質の過酸化を抑制し得ることを示してきた。ペプチドは、虚血再灌流傷害、神経変性疾患、および代謝症候群の動物モデルに顕著な効果を実証した。

10

#### 【0175】

ミトコンドリア標的ペプチドの設計は、以下の作用様式の1以上を包含しかつ増強する：(i) 過剰な ROS の排除 (scavenging)、(ii) 電子伝達を容易にすることによる ROS 生成の減少、または (iii) ミトコンドリアの還元能の増加。ペプチド分子の利点は、ミトコンドリア標的化に必要とされる芳香族カチオンモチーフを維持しながら、酸化還元中心として機能する、電子伝達を容易にする、またはスルフヒドリル基を増加させることができる天然または非天然のアミノ酸を包含することができる。

#### 【実施例】

#### 【0176】

以下の実施例により、本発明をさらに例示するが、これらはいかなる様式においても、本発明を制限するものと解釈されるべきではない。

20

#### 【0177】

##### 一般的方法

シトクロムcの還元：次第に増加する量の芳香族陽イオン性ペプチドを、酸化型シトクロムcの溶液に添加した。還元型シトクロムcの生成を、500nmでの吸光度によりモニタした。シトクロムcの還元率を、非線形解析 (Prizmソフトウェア) により測定した。

#### 【0178】

時間分解紫外・可視吸収分光法を用いて、ペプチド存在下における、シトクロムcの電子伝達プロセスを調査した。還元型シトクロムcを、広帯域のスペクトル範囲 (200 ~ 1100nm) の吸光度によりモニタした。光路長1または2mmの水晶セルを用いて、紫外/可視分光光度計 (Ultrospec 3300 pro、GEヘルスケア社) で、吸光度の変化を記録した。N - アセチルシステイン (NAC) およびグルタチオンを、電子供与体として用いて、酸化型シトクロムcを還元した。シトクロムcの還元速度定数を、種々の濃度のペプチドを添加することにより推定した。ペプチドの用量依存性は、シトクロムcの還元動態と関連した。

30

#### 【0179】

ミトコンドリアの O<sub>2</sub> 消費および ATP 生成：前述のとおり、ラットの腎臓から、新鮮なミトコンドリアを単離した。C1 (グルタメート/マレート)、C2 (サクシネート)、および C3 (TMPD / アスコルベート) 用に異なる基質を用いて、前述のとおり、O<sub>2</sub> 消費 (Oxygraph クラーク電極) により、電子束を測定した。酵素反応の飽和を避けるために、アッセイは、低基質条件下で実施した。96ウェルの発光プレートリーダー (モレキュラーデバイス社 (Molecular Devices)) において、ルシフェラーゼ法 (バイオサーマ社 (Biotherma)) を用いて、単離したミトコンドリアにおける ATP の生成を、動態学的に測定した。初期の最大 ATP 合成速度を、最初の1分間に渡って測定した。

40

#### 【0180】

サイクリックボルタメトリー：電位 + 0.237V の、Ag / AgCl / 1M KCl の基準電極とそれに対する NHE (バイオメトラ社 (Biometra))、ドイツ、ゲッティンゲ

50

ン)、および白金対電極を用いて、Bioanalytical System CV-50W Voltammetric Analyzerを使用して、サイクリックボルタメトリーを実施した。確立されたプロトコルに従って、金ワイヤ電極を洗浄した。メルカプトプロパノール修飾電極を用いて、溶液中のシトクロムcの電気化学的調査を実施した(20 mMのメルカプトプロパノール中、24時間のインキュベーション)。1 MのKClおよび10 mMのリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4/7.8中の、20  $\mu$ Mのシトクロムcを用いて、サイクリックボルタモグラムを記録した。異なる走査速度(100~400 mV/s)、およびRandles-Sevcik方程式に基づいた異なる走査速度でのピーク電流からの拡散係数で、陽極ピークおよび陰極ピーク電位間の中間点として、見掛け電位を算出した。

10

#### 【0181】

#### 実施例1. 芳香族陽イオン性ペプチドの合成

固相ペプチド合成を用いる。すべてのアミノ酸誘導体は市販されている。ペプチドの構築完了後、通常の方法でペプチドを樹脂から切断する。未精製のペプチドを、分取逆相クロマトグラフィーにより精製する。ペプチドの構造的同一性を、FAB質量分析法により確認し、分析逆相HPLCおよび薄層クロマトグラフィーにより、3つの異なるシステムにおいて、それらの純度を評価する。98%超の純度が達成される。一般的に、5 gの樹脂を用いた1回の合成により、約2.0~2.3 gの純粋なペプチドが生成される。

#### 【0182】

実施例2. ペプチド: D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (SS-31) は、シトクロムcの還元を促進する。

20

吸収分光法(UltroSpec 3300 Pro; 220~1100 nm)を使用して、SS-31がシトクロムcの還元を調節するかどうかを判定した(図1)。グルタチオンによるシトクロムcの還元は、Q帯(450~650 nm)における複数のシフトを伴い、550 nmでは顕著なシフトがみられる。SS-31の添加は、550 nmでの有意なスペクトルウェイトのシフトをもたらした(図1A)。時間依存分光法は、SS-31がシトクロムcの還元率を増加させたことを示す(図1B)。これらのデータは、SS-31が、シトクロムcの電子構造を変化させ、Fe<sup>3+</sup>からFe<sup>2+</sup>へムへの還元を促進したことを示唆する。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcの構造および酸化状態を変化させるために有用であり、ならびに、シトクロムcの調節不全を特徴とする疾患または障害の予防または治療のために有用である。

30

#### 【0183】

実施例3. ペプチド: D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (SS-31) は、シトクロムcを介した電子拡散を促進する。

サイクリックボルタメトリー(CV)を実施して、SS-31がシトクロムcの電子流および/または還元/酸化電位を変化させたかどうかを判定した(図2、上部パネル)。Au作用電極、Ag/AgCl基準電極、およびPt補助電極を用いて、CVを実施した。SS-31は、シトクロムcの還元および酸化プロセス双方の電流を増加させた(図2、上部パネル)。SS-31は、還元/酸化電位を変化させなかったが(図2、上部パネル)、むしろシトクロムcを介して電子流を増加させており、これは、SS-31が、複合体IIIとIVの間の抵抗を減少させることを示唆している。図2(下部パネル)では、全てのボルタメトリー測定を、BASi C3セルスタンドに連結されたBASi-50Wボルタメトリーアナライザーを用いて実施した。Ag/AgCl電極を基準電極として用い、ガラス状炭素電極および白金電極を標準的測定に使用した。電極の汚損を回避するために、各測定の前に、溶液を窒素により完全に脱気した。図2に示すとおり、トリス-ボレート-EDTA(TBE)緩衝液、緩衝液+シトクロムc、および緩衝液+シトクロムc+2つの異なるSS-31の用量について、サイクリックボルタモグラムを記録した(下部パネル)。シトクロムcに対してSS-31の用量を倍増させると(シトクロムc:SS-31=1:2)、電流(電子拡散速度)は、ほぼ200%増加する。結果は、SS-31が、シトクロムcにおける電子拡散を促進することを示す。このように、本開示

40

50

の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcの調節不全を特徴とする疾患または障害の予防または治療、シトクロムcを介した電子拡散の増強、およびより感受性の高い生体検出器の設計のために有用である。

【0184】

実施例4．ペプチド：D - A r g - 2' , 6' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) は、シトクロムcにおける電子容量を増加させる。

光ルミネッセンス法 ( P L ) を実施して、電子伝達を担うエネルギー状態である、シトクロムcのヘムの伝導帯の電子構造における、S S - 3 1 の作用を調査した ( 図 3 ) 。 N d : Y D O 4 レーザー ( 5 3 2 . 8 n m ) を使用して、シトクロムc中の電子を励起した ( 図 3 A ) 。 6 5 0 n m にて、シトクロムc状態における強力な P L 発光を明確に特定することができる ( 図 3 B ) 。 P L 強度は、S S - 3 1 の添加に伴って用量依存的に増加し、シトクロムcの伝導帯における利用可能な電子状態の増加を示唆している ( 図 3 B ) 。これは、S S - 3 1 がシトクロムcの伝導帯の電子容量を増加させることを示唆し、S S - 3 1 に媒介される、シトクロムcを介した電流の増加と一致している。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcの調節不全を特徴とする疾患または障害の予防または治療、シトクロムcにおける電子容量の増加、およびシトクロムc電子容量の調節不全を特徴とする疾患または障害の治療のために有用である。

【0185】

実施例5．ペプチド：D - A r g - 2' , 6' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) は、シトクロムcのヘムの周辺での新規な - 相互作用を誘起する。

シトクロムcにおける - \* ヘム環境の調査として、円二色性法 ( O l i s 分光偏光計、D S M 2 0 ) を実施して、ソーレー帯 ( 4 1 5 n m での陰性ピーク ) をモニタした ( 図 4 ) 。 S S - 3 1 は、このピークの 4 4 0 n m への「赤方」偏移を促進し、これは S S - 3 1 が、変性を伴わずに、シトクロムc内の新規なヘム - チロシン - \* 遷移を誘起することを示している ( 図 4 ) 。これらの結果は、S S - 3 1 が、電子トンネル効果のための追加の T y r をヘムに提供するか、または、内在性の T y r 残基とヘム間の距離を減少させるかのいずれかにより、ヘムの周囲の環境を変化させているに違いないことを示唆している。ヘム周辺の - \* 相互作用の増加は電子拡散に有利となるであろう、電子トンネル効果を増強することになる。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcの調節不全を特徴とする疾患または障害の予防または治療のため、およびシトクロムcヘム周辺の新規な - 相互作用を誘起するために、有用である。

【0186】

実施例6．ペプチド：D - A r g - 2' , 6' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) は、ミトコンドリアの O <sub>2</sub> 消費を増加させる。

単離したラット腎臓ミトコンドリアの酸素消費を O x y g r a p h を用いて測定した ( 図 5 ) 。状態2 ( 4 0 0 μ M の A D P のみ ) 、状態3 ( 4 0 0 μ M の A D P および 5 0 0 μ M の基質 ) および状態4 ( 基質のみ ) において、異なる濃度の S S - 3 1 の存在下で、呼吸量を測定した。全ての実験を、n = 4 ~ 7 にて、3 つ組で行った。結果は、S S - 3 1 が、ミトコンドリアの脱共役を伴わずに、酸素への電子伝達を促進したことを示す ( 図 5 ) 。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、ミトコンドリアの脱共役を伴わずに、酸素への電子伝達を増加させ、O <sub>2</sub> 消費を増加させ、およびミトコンドリアにおける O <sub>2</sub> 消費の調節不全に関連する疾患または状態を治療するために、有用である。

【0187】

実施例7．ペプチド：D - A r g - 2' , 6' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) は、単離されたミトコンドリアにおける A T P 合成を増加させる。

4 0 0 m M の A D P の添加 1 分後に単離されたミトコンドリアから採取した呼吸緩衝液中の A T P を測定することにより、ミトコンドリアの A T P 合成速度を判定した ( 図 6 ) 。 A T P は、H P L C によりアッセイした。すべての実験は、n = 3 にて、3 つ組で行った。単離されたミトコンドリアへの S S - 3 1 の添加は、A T P の合成速度を用量依存的に増加させた ( 図 6 ) 。これらの結果は、S S - 3 1 による電子伝達の増強が、A T P 合

10

20

30

40

50

成と関連していることを示す。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、ミトコンドリアにおけるATP合成の増加、およびATP合成の調節不全を特徴とする疾患または障害の治療のために、有用である。

【0188】

実施例8．ペプチド：D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) は、シトクロムc - 枯渇ミトプラストにおいて呼吸を促進する。

ミトコンドリアの呼吸へのSS - 31の作用におけるシトクロムcの役割を実証するために、一度冷凍したラット腎臓ミトコンドリアから作製した、シトクロムc - 枯渇ミトプラストにおいて、ミトコンドリアのO<sub>2</sub>消費におけるSS - 31の作用を判定した(図7)。100 μMのSS - 31を添加した場合、添加しなかった場合において、500 μMのサクシネートの存在下、呼吸量を測定した。実験は、n = 3にて、3つ組で行った。これらのデータは、：1) SS - 31がIMMと堅固に結合したシトクロムcを介して作用する；2) SS - 31が機能性シトクロムcの減少をくい止めることができる；ということを示す。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcの調節不全を特徴とする疾患または障害の予防または治療のために有用である。

【0189】

実施例9．ペプチド：D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) およびP h e - D - A r g - P h e - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 2 0 ) は、シトクロムcの還元を促進する。

SS - 31およびSS - 20は、還元剤であるグルタチオン(GSH)に誘導されるシトクロムcの還元動態を加速することができる(図8)。シトクロムcの還元を、550 nmでの吸光度の増加によりモニタした。GSHの添加により、550 nmでの吸光度は、時間依存的に増加した(図8)。還元剤としてN - アセチルシステイン(NAC)を使用することにより、同様の結果が得られた(未掲載)。100 μMの濃度でのSS - 31のみの添加は、シトクロムcを減少させなかったが、SS - 31は、NAC誘導性のシトクロムcの還元率を、用量依存的に増加させた。これは、SS - 31は電子を供与しないが、電子伝達を加速させ得るということを示している。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcの調節不全を特徴とする疾患または障害の予防または治療、およびシトクロムcの還元促進のために有用である。

【0190】

実施例10．ペプチド：D - A r g - 2 ' , 6 ' - D m t - L y s - P h e - N H <sub>2</sub> ( S S - 3 1 ) およびP h e - D - A r g - P h e - L y s - N H <sub>2</sub> ( S S - 2 0 ) は、ミトコンドリアの電子束およびATP合成を増加させる。

単離されたラット腎臓ミトコンドリアにおけるO<sub>2</sub>消費により測定されたとおり、SS - 20およびSS - 31は双方とも、電子束を増加させることができる(図9)。0.5 mMのサクシネート(複合体II基質)および400 μMのADPを含む呼吸緩衝液中の、単離されたミトコンドリアに、SS - 20またはSS - 31を、100 μMの濃度で添加した。低濃度の複合体I基質(グルタメート/マレート)を使用した際、O<sub>2</sub>消費において同様の増加が観察された(データ未掲載)。電子束の増加は、低濃度のサクシネートで活発化させた単離されたミトコンドリアにおける、ATP生成速度の有意な増加と相関した(図10)。従って、SS - 20およびSS - 31にIMMを標的とさせることにより、特に基質供給が減少した条件下において、電子伝達鎖における電子束を増加させ、かつATP合成を改善することができる。

【0191】

実施例11．シトクロムcの単離および精製

シトクロムcの単離および生成方法は、当技術分野で公知である。1つの例示的かつ非制限的な方法を提供する。シトクロムcは、いくつかの正に荷電した基を有し、等電点はおよそ10である。そのため、シトクロムcは、ミトコンドリア膜上のリン脂質の負電荷に対するイオン引力により、通常ミトコンドリアの膜に結合している。まず、硫酸アルミニウム溶液中、ブレンダーで、低pHにて均質化することにより、組織およびミトコンド

10

20

30

40

50



リアを破壊する。正に荷電したアルミニウムイオンは、負に荷電したリン脂質に結合することによりシトクロムcを膜から移動させ、タンパク質を溶液中に開放することができる。pHを8.0まで上昇させることにより過剰な硫酸アルミニウムを除去すると、水酸化アルミニウムの形態でアルミニウムが沈殿する。

#### 【0192】

沈殿した水酸化アルミニウムを濾過により除去した後、イオン交換クロマトグラフィーを使用し、それらの電荷に応じて、タンパク質を分離する。シトクロムcは、いくつかの正に荷電した基を有する。一般的に、カラムは、負に荷電した樹脂または陽イオン交換樹脂である、Amberlite CG-50から作製する。

#### 【0193】

溶出剤を回収したら、硫酸アンモニウム沈殿法を用いて、シトクロムc調製物中に残存する混入タンパク質を選択的に沈殿させる。ほとんどのタンパク質は、飽和度80%で硫酸アンモニウム中に沈殿するが、シトクロムcは可溶性のままである。次いで、タンパク質をそのサイズにもとづいて分離するゲルろ過クロマトグラフィーにより、溶液中に存在する過剰な塩を除去する。

#### 【0194】

精製を評価するために、精製の各ステップで、調製物の試料を回収する。次いで、ブラッドフォード法を用いてこれらの試料の総タンパク質量含有量をアッセイし、それらのシトクロムc濃度を分光光度法により測定する。

#### 【0195】

実施例12. ペプチド：2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS-19)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS-37)、および Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS-36) は、カルジオリピン (CL) の疎水性ドメインと相互作用する。

2', 6' - Dmt - D - Arg - (atn) Dap - Lys - NH<sub>2</sub> (SS-19) および 2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS-37) 陽イオン性ペプチドは、天然のpHにおいて、実効正電荷を有する。これらは、静電相互作用に基づいて、陰イオン性リン脂質カルジオリピンと結合することが期待される。低分子ペプチドと脂質膜との相互作用は、蛍光分光法を用いて調査することができる (SurewiczおよびEpand, 1984)。内在性Trp残基の蛍光は、リン脂質小胞に結合すると、素数的収率 (quantal yield) の増加を示し、これには、疎水性の環境におけるTrp残基の取り込みを示す、最大発光の青方偏移も伴った。極性感受性蛍光プローブをペプチド中に組み入れ、蛍光分光法を使用して、SS-19、SS-37およびSS-36がCLと相互作用するかどうかを判定した。結果を図11に示す。

#### 【0196】

ペプチド：2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS-19) は、ジアミノプロピオン酸中に組み入れられたアントラニロイルを含む。アントラニロイル誘導体は、320~330nmで励起すると、410~420nmの範囲で蛍光を発する (Hiratsuka T, 1983)。アントラニロイル誘導体の量子収率は、局所的環境に強力に依存し、10nm未満の最大発光 (max) の青方偏移を伴って、水から80%エタノールまでにおいて、5倍増加し得る (Hiratsuka T, 1983)。SS-19 (1 μM) 単独の、および次第に増加する濃度のCL (5~50 μg/ml) 存在下での蛍光発光スペクトルを、320nmでの励起後、日立F-4500蛍光分光光度計を用いてモニタした。CL (5~50 μg/ml) の添加により、SS-19の素数的収率 (quantal yield) は2倍増加したが、maxの有意なシフトは見られなかった (図11A)。これらの所見は、SS-19がCLの疎水性ドメインと相互作用することを示唆する。

#### 【0197】

ペプチド：2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS-37) は、付加的なアミノ酸、アラダ (Ald) を含む。アラダはその環境の極性に特に感受性が高いことが報告されており、タンパク質の静電特性を探索するために使用

10

20

30

40

50

されている (Cohenら, 2002)。350 nmで励起すると、maxは水中での542 nmからヘプタン中での409 nmへとシフトし、素数的収率 (quantal yield) の有意な増加を伴う (Cohenら, 2001)。SS-37 (1  $\mu$ M) 単独の、および徐々に増加する濃度のCLの存在下での、蛍光発光スペクトルを、350 nmでの励起後にモニタした。CL (5 ~ 50  $\mu$ g/ml) の添加により、SS-37の素数的収率 (quantal yield) は3倍増加し、CLを添加しない場合の525 nmから、50  $\mu$ g/mlのCLを添加した場合の500 nmまで、maxの明らかな青方偏移を示した (図11B)。これらの結果は、SS-37がCLの疎水性ドメインと相互作用することの証拠を提供する。

#### 【0198】

ペプチド: 2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS-36) は、SS-02のPhe<sup>3</sup>の代りにAldを含む。SS-36 (1  $\mu$ M) 単独の、および徐々に増加する濃度のCL存在下での、蛍光発光スペクトルを、350 nmでの励起後にモニタした。CLの添加に対して、SS-36が最も感受性が高く、素数的収率 (quantal yield) は劇的に増加し、はるかにより低いCL添加量 (1.25 ~ 5  $\mu$ g/ml) で、青方偏移が観察された。maxは、CLを添加しない場合の525 nmから、わずかに1.25  $\mu$ g/mlのCLの添加より500 nmにシフトし、素数的収率 (quantal yield) は、5  $\mu$ g/mlのCLを添加により100倍超増加した (図11C)。これらの結果は、SS-36が、CLの疎水性ドメインと強力に相互作用することの証拠を提供する。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンの調節不全を特徴とする疾患または障害を予防または治療するために有用である。

#### 【0199】

実施例13. ペプチド: 2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS-19) とシトクロムcとの相互作用

蛍光消光法を用いて、ペプチド: Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS-19) とシトクロムcとの相互作用を実証した。日立F-4500蛍光分光光度計を用いて、SS-19の最大蛍光発光を、320 nmでの励起後、420 nmでモニタした。結果を図12に示す。

#### 【0200】

0.2 mgの単離されたラット腎臓ミトコンドリアを連続的に添加することにより、SS-19の蛍光 (10  $\mu$ M) は消光された (図12A、M + 矢印)。これはミトコンドリアによるSS-19の取り込みを示唆する。シトクロムcが枯渇したミトブラスト (0.4 mg) を添加すると、SS-19の消光は有意に減少した。これはシトクロムcが、ミトコンドリアによるSS-19の消光において、主要な役割を果たすことを示唆する (図12B)。2  $\mu$ Mのシトクロムcの連続的な添加により、SS-19の蛍光 (10  $\mu$ M) は、同様に消光された (図12C、C + 矢印)。シトクロムcによる消光は、ウシ血清アルブミン (500  $\mu$ g/ml) を連続的に添加しても、変化しなかった (図12C、A + 矢印)。これらのデータは、ヘム環境におけるシトクロムcの内部奥深くで、SS-19が相互作用する可能性が高いことを示す。SS-19とシトクロムcとの相互作用は、シトクロムcの添加量に直線的に依存する (図12D)。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcの調節不全を特徴とする疾患または障害を、予防または治療するために有用である。

#### 【0201】

実施例14. ペプチド: 2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS-19)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS-37) および 2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS-36) は、シトクロムcおよびCLと相互作用する。

蛍光分光法を使用して、ペプチド: 2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS-19)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - Lys - Ald - NH<sub>2</sub> (SS-37) および 2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS-36) が、CLの存在下、シトクロムcと相互作用することを実証し

た。結果を図 13 に示す。

【0202】

SS - 19 (10  $\mu$ M) の蛍光発光を、日立 F - 4500 蛍光分光光度計を用いて、リアルタイムでモニタした (励起 / 発光 = 320 nm / 420 nm)。シトクロム c (2  $\mu$ M) の添加により蛍光シグナルは即時に消光された (図 13 A)。

【0203】

SS - 19 (10  $\mu$ M) の蛍光発光を、日立 F - 4500 蛍光分光光度計を用いて、リアルタイムでモニタした (励起 / 発光 = 320 nm / 420 nm)。CL (50  $\mu$ g / ml) の添加により、SS - 19 の蛍光は増加した。その後のシトクロム c (2  $\mu$ M) の添加により、CL を加えずにシトクロム c を添加した場合と比較して、より高程度の SS - 19 の蛍光の消光が見られた (図 13 B)。これらのデータは、SS - 19 とシトクロム c との相互作用が、CL の存在下で増強されたことを示す。CL は、2 つの陽イオン性分子のための陰イオン性プラットフォームとして機能することにより、SS - 19 およびシトクロム c 間の相互作用を増強し得る。

【0204】

SS - 37 の蛍光 (10  $\mu$ M) は、CL (50  $\mu$ g / ml) の存在下、2  $\mu$ M のシトクロム c の連続的な添加によって、同様に消光された (図 13 C、C + 矢印)。シトクロム c による消光は、ウシ血清アルブミン (500  $\mu$ g / ml) を連続的な添加しても、変化しなかった (図 13 C、A + 矢印)。このように、これらのペプチドと CL との相互作用は、シトクロム c 内部奥深くで相互作用するそれらの能力に干渉しない。

【0205】

SS - 36 はまた、極性感受性の蛍光アミノ酸アラダンをも含む。CL (2.5  $\mu$ g / ml) の添加により、SS - 36 の蛍光は増加した (図 13 D)。その後のシトクロム c (2  $\mu$ M) の添加後、SS - 36 の発光スペクトルは、ペプチドの蛍光の劇的な消光を示し、最大発光の大きな青方偏移を示した (510 nm ~ 450 nm) (図 13 D)。これらのデータは、ペプチドが、シトクロム c - CL 複合体の内部深くで、疎水性ドメインと相互作用していることを示唆する。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび / もしくはシトクロム c の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに / またはカルジオリピン / シトクロム c の相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。

【0206】

実施例 15 . ペプチド : 2', 6' - Dmt - D - Arg - Phe - (atn) Dap - NH<sub>2</sub> (SS - 19)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20)、D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)、2', 6' - Dmt - D - Arg - Ald - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 36) および D - Arg - Tyr - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SPI - 231) は、シトクロム c のヘム環境を、CL のアシル鎖から保護する。

円二色性法 (CD) を実施して、CL のアシル鎖からシトクロム c のヘム環境を保護する、ペプチドの作用を調査した。ヘムタンパク質に関しては、ソーレー CD スペクトルは、ヘムポケットの構造と厳密に相関した。特に、416 ~ 420 nm における負のコットン効果は、天然シトクロム c における Fe (III) - Met 80 の配位の徴候と考えられる (Santucci および Ascoli, 1997)。コットン効果の消失は、Met 80 のアキシアル配位からヘム鉄への移動を伴う、ヘムポケット領域の改変を示す。CD スペクトルは、AVIV CD 分光計、モデル 410 を使用して得た。結果を図 14 に示す。

【0207】

シトクロム c (10  $\mu$ M) のソーレー CD スペクトルの変化を、CL の不存在下 (点線)、および 30  $\mu$ g / ml の CL の存在下 (破線)、さらに異なるペプチド (10  $\mu$ M) を添加した場合 (実線) において、記録した (図 14)。20 mM の HEPES (pH 7.5) を使用して、25 °C で CD 測定を実施し、モル楕円率 (deg) (mdeg) で表した。CL の添加は、負のコットン効果を消失させたが、これは、これらのペプチドの添加に

より完全に防止された。これらの結果は、該ペプチドがシトクロムcのヘムポケットと相互作用し、Fe-Met 80配位を保護するということの明らかな証拠を提供する。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。さらに、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcのヘム環境を、カルジオリピンのアシル鎖から保護するために有用である。

#### 【0208】

実施例16. ペプチド: D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)、Phe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20)、およびD - Arg - Tyr - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SPI - 231)は、CLに起因するシトクロムc還元の抑制を防止する。

シトクロムcは、ミトコンドリアの呼吸複合体IIIおよびIV間の電子伝達体である。シトクロムcは、シトクロムc還元酵素から電子を受け取った後に還元され( $\text{Fe}^{2+}$ )、その後、シトクロムc酸化酵素により $\text{Fe}^{3+}$ に酸化される。CLと結合したシトクロムcは、天然シトクロムcよりも有意により負であるレドックス電位を有し、シトクロムcの還元は、CL存在下において有意に抑制される(Basovaら, 2007)。

#### 【0209】

CLの不存在下、または存在下( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ )において、グルタチオン( $500 \mu\text{M}$ )の添加により、シトクロムc( $20 \mu\text{M}$ )の還元を誘導した(図15A)。96ウェルのUV-VISプレートリーダー(モレキュラーデバイス社(Molecular Devices))を使用して、シトクロムcの還元を、 $550 \text{ nm}$ での吸光度によりモニタした。CLの添加により、シトクロムcの還元率は半分に減少した。SS-31の添加( $20$ 、 $40$ または $100 \mu\text{M}$ )は、容量依存的にCLの抑制作用を防止した(図15A)。

#### 【0210】

SS-31は、 $500 \mu\text{M}$ のGSHまたは $50 \mu\text{M}$ アスコルベートにより誘導されたシトクロムcの還元動態におけるCLの抑制作用を、容量依存的に克服した(図15B)。SS-20およびSP-231もまた、 $500 \mu\text{M}$ のGSHに誘導されたシトクロムc還元の、CLによる抑制を防止した(図15C)。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。さらに、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンに起因するシトクロムc還元の抑制を防止するために有用である。

#### 【0211】

実施例17. ペプチド: D - Arg - 2', 6' - Dmt - Lys - Phe - NH<sub>2</sub> (SS - 31)およびPhe - D - Arg - Phe - Lys - NH<sub>2</sub> (SS - 20)は、単離されたミトコンドリアにおける $\text{O}_2$ 消費を促進する。

SS-20およびSS-31はともに、単離されたラット腎臓ミトコンドリアにおける $\text{O}_2$ 消費により測定されるとおり、電子束を増加させることができる。グルタメート/マレート(複合体I基質)、 $0.5 \text{ mM}$ のサクシネート(複合体II基質)、または $3 \mu\text{M}$ のTMPD/ $1 \text{ mM}$ のアスコルベート(シトクロムcの直接還元剤)を含む呼吸緩衝液中の、単離されたミトコンドリアに、SS-20またはSS-31を、 $10 \mu\text{M}$ または $100 \mu\text{M}$ の濃度で添加した。 $400 \mu\text{M}$ のADPを添加して、状態3呼吸を開始させた。結果を図16に示す。

#### 【0212】

複合体I基質または複合体II基質のいずれかをを用いた状態3呼吸において、またはシトクロムcをTMPD/アスコルベートにより直接還元した場合、SS-31は $\text{O}_2$ 消費を増加させた(図16A)。SS-20もまた、これらの基質を使用した際に、状態3呼吸における $\text{O}_2$ 消費を増加させた(図16B; グルタメート/マレートおよびTMPD/

10

20

30

40

50

アスコルベートを用いたデータは未掲載)。

【0213】

これらのデータは、SS-31が電子伝達鎖における電子束を増加させること、および作用部位がシトクロムcと複合体I V (シトクロムc酸化酵素)との間であることを示唆する。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、ミトコンドリアの脱共役を伴わずに、酸素への電子伝達を促進し、 $O_2$ 消費を増加させ、およびミトコンドリアにおける $O_2$ 消費の調節不全に関連する疾患または状態を治療するために有用である。

【0214】

実施例18. ペプチド:  $D\text{-Arg-}2', 6'\text{-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$  (SS-31) は、単離されたミトコンドリアにおけるATP合成を増加させる。

10

電子伝達鎖における電子束の増加は、ATP合成の増加、または電子リークおよびフリーラジカル生成の増加のいずれかをもたらす。単離されたミトコンドリアにおけるATP合成を、HPLCによりアッセイした。SS-31は、容量依存的にATP合成を増加させ、電子束の増加が、酸化的リン酸化と関連していることを示唆する(図17)。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、ミトコンドリアにおけるATP合成を増加させるため、およびATP合成の調節不全を特徴とする疾患または障害の治療のために有用である。

【0215】

実施例19. ペプチド:  $D\text{-Arg-}2', 6'\text{-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$  (SS-31) は、シトクロムcが枯渇したミトプラストにおいて呼吸を促進する。

20

ミトコンドリアのカルジオリピンに堅固に結合したシトクロムcのモデルを使用して、ミトコンドリアにおける、SS-31とシトクロムc-CL複合体の相互作用を調査した。ジギトニンにより外膜を除去した後、ミトプラストを120 mMのKClで洗浄して、遊離シトクロムcおよび静電的に結合したシトクロムcのすべてを除去し、CLに堅固に結合したシトクロムcのみを残した。 $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$  (SS-31) は、シトクロムcがミトコンドリア内膜に堅固に結合したミトプラストにおける複合体I Iの呼吸を、用量依存的に促進する(図18)。これらのデータは、SS-31がシトクロムc-CL複合体と直接的に相互作用し、複合体I I Iから複合体I Vへの電子伝達を促進することを示唆する。

【0216】

実施例20. ペプチド:  $D\text{-Arg-}2', 6'\text{-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$  (SS-31) は、CLが、シトクロムcを、電子伝達体からペルオキシダーゼ活性体へと変換することを防止する。

30

シトクロムcのヘムの六配位は、 $H_2O_2$ と触媒性金属部位との直接相互作用を防止し、および溶液中の天然シトクロムcは、弱いペルオキシダーゼである。シトクロムcは、CLと相互作用すると、 $Fe\text{-Met}80$ 配位の断裂を伴う構造的変化を経る。この結果、 $Fe^{3+}$ が $H_2O_2$ に曝されることになり、ペルオキシダーゼ活性が劇的に増加する(Vladimirovら, 2006; Sinibaldiら, 2008)。シトクロムcペルオキシダーゼの作用機序は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)などの他のペルオキシダーゼの作用機序と類似している。従って、アンブレックスレッド-HRP反応を使用して、シトクロムcのペルオキシダーゼ活性を調べることが可能である。ペルオキシダーゼの存在下、アンブレックスレッド(AR)は $H_2O_2$ と反応して、赤色に蛍光する酸化生成物、レゾルフィン(励起/発光=571/585)を形成する。

40

【0217】

シトクロムc(2  $\mu$ M)を、CL(25  $\mu$ g/ml)および20 mMのHEPES中の10  $\mu$ Mの $H_2O_2$ 、pH 7.4と混合した。次いでアンブレックスレッド(50  $\mu$ M)を添加し、日立F4500蛍光分光光度計を用いて、リアルタイムで蛍光発光をモニタした。アンブレックスレッドの添加は、レゾルフィン形成に起因する蛍光シグナルの急速な増加を誘発した。これはシトクロムc/CL複合体のペルオキシダーゼ活性の直接的証拠を提供する(図19A)。SS-31を包含することにより、アンブレックスレッドの過

50

酸化率が減少した。これはSS-31が直接的にシトクロムcと相互作用して、CL誘導性のペルオキシダーゼ活性を防止することを示唆する(図19A)。

#### 【0218】

SS-31の添加は、シトクロムcのペルオキシダーゼ活性の動態を容量依存的に減少させたが(図19B)、HRP活性には何の影響も与えなかった(データ未掲載)。図19Cは、10 $\mu$ Mの固定濃度における、種々のペプチドの、シトクロムcペルオキシダーゼ活性を抑制する能力の比較を示す。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。さらに、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcにおけるペルオキシダーゼ活性を抑制するために有用である。

10

#### 【0219】

実施例21. ペプチド類似体SS-02は、カルジオリピンおよびカルジオリピンを含むリポソームと相互作用する。

フルオロフォアで標識したSS-02を使用して、SS-02とリン脂質カルジオリピン、および他のリン脂質との相互作用を調査した。図20Aに示すとおり、フルオロフォア: -アントラニロイル(atn; 励起=320nm)およびアラダン(ald; 励起=360nm)を、SS-02のペプチド構造内に組みこんだ。得られたペプチドを、それぞれ「[atn]SS-02」または「SS-19」および「[ald]SS-02」または「SS-36」と命名した。比較のために、SS-31の構造を示す。各フルオロフォアは、疎水性環境において、増強された蛍光発光を示すことが知られている。さらに、aldは、その環境の極性の減少に伴い、その最大発光(max)に進行的な青方偏移をもたらす、誘電感受性プローブである。atnおよびaldフルオロフォアは双方とも非常に小さく、テトラペプチドの物理化学的特性を実質的に変化させない(P. W. Schillerら, 2005, J Pept Res 65, 556 - 563)。

20

#### 【0220】

##### 材料および方法

1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (POPA)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - L - セリン (POPS)、1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (PE)、および1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロール) (DPPG)を、アバンティ・ポーラー・リピッド社 (Avanti Polar Lipids, Inc.) (アラバマ州、アラバスター) から入手した。

30

#### 【0221】

1:1の比率で混合した個々のリン脂質POPCおよびカルジオリピン(CL)を使用して、リポソームを調製し、窒素下で乾燥した。その後、ボルテックスすることにより、20mMのHepes (pH7.4) 中で脂質を混合し、次いで、超音波プローブチップ・ソニケーター (Cole-Palmer Ultrasonic Homogenizer、20kHz、コール・パーマー・インストルメント・カンパニー (Cole-Parmer Instrument Company)、イリノイ州、パーノンヒルズ) を使用して、氷上で5回、30秒間、超音波処理した。調製直後に、リポソームを使用した。

40

#### 【0222】

「atn」SS-02および「ald」SS-02の発光強度の変化を、日立F-4500蛍光分光光度計を用いて測定した。種々のリン脂質を溶解するために使用した異なる溶媒 (クロロホルム、メタノールおよびエタノール) の、「atn」SS-02および「ald」SS-02の蛍光スペクトルにおける影響は、無視できるレベルであった。ペプチドのリン脂質との静電相互作用を最適化するために、全ての実験を低イオン溶液 (脱イオン水) 中に行った。

50

## 【0223】

結果

次第に増加する濃度のカルジオリピン（5、10、25、および50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を、1  $\mu\text{M}$ の「atn」SS-02に添加し、350 nmから500 nmの間の発光強度を測定した。カルジオリピンの添加により、「atn」SS-02の発光強度は濃度依存的に増加した（図20Bおよび20G）。これは、このペプチドとカルジオリピンの疎水性環境との相互作用を示唆している。次第に増加する濃度のカルジオリピン（1、25、2、5、および5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の、1  $\mu\text{M}$ の「ald」SS-02への添加は、さらにより顕著な濃度依存的な作用を示した（図20C）。さらに、カルジオリピンにより、アラダンのmaxの、540 nm～510 nmへの青方偏移が生じた。これはこの化合物が、疎水性環境に局在していることを、さらに示す。

10

## 【0224】

このSS-02-リン脂質の相互作用は、ホスファチジン酸（POPA）、ホスファチジルグリセロール（DPG）、ホスファチジルセリン（POPS）およびカルジオリピン（CL）などの、陰イオン性頭部基を有するリン脂質に特異的である。図20Dは、1  $\mu\text{M}$ の「ald」SS-02単独の、および10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のPOPS、POPA、DPGまたはカルジオリピンの添加後の、代表的な発光スペクトルを示す。カルジオリピンは、「ald」SS-02と、最も高い親和性を示す（図20D）。「ald」SS-02と、正に荷電したアミン類をも頭部基に含むリン脂質、例えばホスファチジルコリン（POPC）およびホスファチジルエタノールアミン（POPE）などとの間（図20E）、または中性コレステロールとの間（データ未掲載）では、相互作用は観察されなかった。

20

## 【0225】

「atn」SS-02と遊離カルジオリピンとの相互作用を、「atn」SS-02と、カルジオリピンおよびPOPCのリボソーム混合物との相互作用とも比較した。カルジオリピンは、通常、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンとともに、ミトコンドリア内膜のみに存在する。その小さな頭部基および4つのアシル鎖により、カルジオリピンは、疎水性部分が隣接する分子間に露出している場所に、膜の湾曲を生じさせる。他の二重層リン脂質と混合した場合、カルジオリピンは非二重層微小環境（non-bilayer microenvironment）を形成する可能性が高く、SS-02との異なる相互作用をもたらす可能性もある。

30

## 【0226】

1：1の比率のCLおよびPOPCから成るリボソームを用いて、1  $\mu\text{M}$ の「atn」SS-02の混合物を作成し、発光強度を測定した。図20Fのグラフは、「atn」SS-02およびカルジオリピン/POPCリボソーム間における、同様の濃度依存性の相互作用を示す（図20F）。これらの結果は、SSペプチドがカルジオリピンに対する高い親和性を有することを裏付け、ミトコンドリア内膜におけるSSペプチドの選択的濃度を説明する。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。

40

## 【0227】

実施例22．ペプチドSS-02は、可溶性シトクロムcと相互作用する。

シトクロムcは、ミトコンドリアにおいて：膜間腔で溶けやすいプール；静電相互作用によりカルジオリピンに弱く結合しているプール；および約15～20%の、疎水性の相互作用によりカルジオリピンと堅固な複合体を形成しているプール；の3つのプールで存在する。SS-02がシトクロムcと相互作用するかどうかを判定するために、標識したSS-02の、シトクロムcによる蛍光消光を調べた。

## 【0228】

材料および方法

50

遊離カルジオリピンまたはカルジオリピン / P O P C ( 1 : 1 ) リボソーム ( 実施例 2 に記載のとおりに調製 ) の不存在下または存在下での、S S ペプチドとウマ心臓シトクロム c との相互作用を、シトクロム c を添加した際の、「a t n」S S - 0 2 ( 励起 / 発光 = 3 2 0 / 4 2 0 n m ) および「a l d」S S - 0 2 ( 励起 / 発光 = 3 6 0 / 5 1 0 n m ) の蛍光消光により調査した ( 日立 F - 4 5 0 0 蛍光分光光度計を使用 ) 。カルジオリピンおよび P O P C を溶解するために使用した溶媒の、これらのペプチドのシトクロム c 依存性の消光における影響は、無視できるレベルであった。全ての実験は、低イオン溶液 ( 脱イオン水 ) または 2 0 m M の H e p e s ( p H 7 . 4 ) 中で行った。

#### 【 0 2 2 9 】

単離されたミトコンドリアまたはシトクロム c が欠乏したミトプラストによる「a t n」S S - 0 2 の取り込みを、新鮮なミトコンドリアまたはミトプラストの懸濁液 ( 0 . 3 5 m g ) を添加した際の、「a t n」S S - 0 2 の蛍光消光 ( 励起 / 発光 = 3 2 0 / 4 2 0 ) により測定した。

#### 【 0 2 3 0 】

体重 2 5 0 ~ 3 0 0 g の雄性 S p r a g u e - D a w l e y ラット ( チャールズリバー・ラボラトリーズ・インターナショナル ( Charles River Laboratories International, Inc. ) 、マサチューセッツ州、ウィリングトン ) の腎臓から、ミトコンドリアを単離した。切除した腎臓を切断し、洗浄緩衝液中 ( 2 0 0 m M のマンニトール、1 0 m M のショ糖、5 m M の H E P E S 、1 g / L の脂肪酸を含まない B S A 、K O H で p H 7 . 4 に調整 ) 、氷上で 1 0 分間インキュベートした。試料を単離緩衝液 ( 1 m M の E G T A を含む洗浄緩衝液 ) 中で 2 回洗浄し、3 分間均質化し、次いで 2 0 m l の単離緩衝液中、9 0 0 × g にて 1 0 分間遠心分離した。次いで白色の脂肪酸層を除去し、ペレットを廃棄した。上清を 1 1 , 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離し、8 0 0 μ l の洗浄緩衝液中にペレットを再懸濁し、更なる解析のために、氷上に保管した。

#### 【 0 2 3 1 】

ミトコンドリアの外膜を除去するために、まず、新鮮な、または一度冷凍したミトコンドリアを、3 . 3 m g / m l のジギトニンにより氷上で 4 5 分間処理して、シトクロム c が欠乏したミトプラストを調製した。次いで、静電的に結合したシトクロム c を除去するために、1 5 0 m M の K C l ( p H 7 . 4 ) を混合物に添加し、1 9 , 0 0 0 × g にて 3 0 分間遠心分離した。ペレットを回収し、洗浄緩衝液中に再溶解し、使用するまで氷上で保管した。2 0 0 n M の外因性シトクロム c の添加に反応して、ミトコンドリアの呼吸 ( 酸素消費 ) が 4 ~ 5 倍増加したミトプラスト調製物のみを、実験において使用した。

#### 【 0 2 3 2 】

#### 結果

蛍光消光実験は、S S ペプチドが、可溶性シトクロム c と相互作用し得ることを示す。シトクロム c の添加は、「a t n」S S - 0 2 および「a l d」S S - 0 2 双方に濃度依存性の消光をもたらしたが、m a x に変化はなかった ( 図 2 1 A および 2 1 B ) 。シトクロム c によるこの消光は用量依存性であり、ペプチドとシトクロム c の比率 1 : 1 にて、容易に観察される ( 図 2 1 C ) 。さらに、アルブミンによって、この消光を変化させることはできなかった。「a n t」S S - 0 2 の蛍光発光は、2 μ M のシトクロム c の連続的な添加により消光された ( 図 2 1 H の表示 C ) 。7 5 μ g / m l の B S A の添加 ( 図 2 1 H の表示 A ) ( 合計 3 0 0 μ g / m l ) は、消光を逆転させなかった。T M R M ( テトラメチルローダミンメチルエステル ) などの、他の、ミトコンドリアを標的とする蛍光プローブを用いた場合には、消光は観察されなかったため、「a n t」S S - 0 2 の蛍光発光もまた、ペプチドに特異的である。2 μ M のシトクロム c の添加 ( 図 2 1 I の表示 C ) は、T M R M の蛍光をわずかに消光し、7 5 μ g / m l の B S A の添加は ( 図 2 1 I の表示 A ) ( 合計 2 2 5 μ g / m l ) 、消光を完全に逆転させた。

#### 【 0 2 3 3 】

シトクロム c における T r p 5 7 の内部蛍光は、天然に折り畳まれたシトクロム c のヘム基により 9 8 % 消光されるが、シトクロム c が折り畳まれていない場合、消光は 4 0 % に

10

20

30

40

50



減少することが知られている (Tsong, 1973 氷上で Biochemistry 12:2209 - 2214)。従って、シトクロムcによるSSペプチド類似体のこのような顕著な消光は、該ペプチドがヘムに近接して局在し、この共鳴の受容体へのエネルギー移動を可能にしていることを示唆する。

#### 【0234】

SSペプチドとシトクロムcとの相互作用は、カルジオリピンの存在下で促進されることが見出された。カルジオリピンの不存在下および存在下における、シトクロムcによる、420nmでの「atn」SS-02の消光を比較した。1μMの「atn」SS-02に、2μMシトクロムcを添加することより、カルジオリピンの不存在下では、蛍光シグナルの約20%が消光されたが、10μg/mLのカルジオリピンの存在下では、ほぼ50%が消光された(図21D)。シトクロムcと「atn」SS-02の間の相互作用は、遊離カルジオリピンまたはカルジオリピンリボソームのいずれかにより、用量依存的に強化された(図21E)。この所見は、カルジオリピンの存在が、「atn」SS-02を、シトクロムcの内部深く、ヘム基にさらに近いところまで浸透させ、共鳴伝達の増加を可能にしたことを示す。

10

#### 【0235】

極性感受性の「ald」SS-02は、カルジオリピン存在下における、SS-02とシトクロムcの相互作用のさらなる調査を可能にした。カルジオリピンおよび「ald」SS-02へのシトクロムcの添加は、maxの510nm~450nmへのさらなる青方偏移をもたらした。これはペプチドが、ヘムの最も深い疎水性環境へさらに浸透したことを示す(図21F)。

20

#### 【0236】

最後に、これらのペプチドが、カルジオリピンに疎水的に結合しているシトクロムcと相互作用し得るかどうかを判定するために、125mMのKClでの処理により静電的に結合しているシトクロムcを除去した、シトクロムcが欠乏したミトプラストによる、「atn」SS-02の消光を調査するための実験を実施した。図21Gは、シトクロムcが欠乏したミトプラストにおける「atn」SS-02の消光は明らかであるが、3つのシトクロムcのプール全てを含むインタクトなミトコンドリアにおける消光には満たないことを示す。全体として、これらのデータは、SSペプチドが、遊離シトクロムc、静電的に結合したシトクロムc、および疎水的に結合したシトクロムcと相互作用し得ること、ならびに該ペプチドがヘム環境のごく近隣に局在することを示す。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。

30

#### 【0237】

実施例23. SS-31およびSS-02は、カルジオリピンによるシトクロムcの酸化を抑制する。

ペプチドSS-31およびSS-02が、シトクロムcとカルジオリピン間の相互作用に、なんらかの機能的作用を有するかどうかを判定するために、該ペプチドを調査した。カルジオリピンは、シトクロムcの機能を変化させ、第一鉄シトクロムcを、第二鉄シトクロムcへと容易に酸化することが知られている。カルジオリピンの存在下での第一鉄シトクロムcの酸化は、シトクロムcの吸光度スペクトルにおける550nmピーク(A<sub>550</sub>)の消失により、検出することができる。従って、ペプチドSS-31およびSS-02の、カルジオリピンに起因するシトクロムcによる吸光の消失に影響を与える能力について調査した。

40

#### 【0238】

##### 材料および方法

全ての利用可能な、機能的に活性なシトクロムcが還元されるまで、50μMのアスコルビン酸により、シトクロムc(20μM)を還元した。シトクロムcの還元を、その吸光度スペクトルにおける、550nmでのピークの出現によりモニタした(モレキュラーデ

50

バイス社 (Molecular Devices)、カリフォルニア州、サニーベール)。次いで、SSペプチドの存在下または不存在下において、完全に還元されたシトクロムcに100 µg / mlのカルジオリピンを添加し、シトクロムcの酸化、その後550 nmピークでの減少率をモニタした。酸化率は、550 nmから570 nmまでの吸光強度の変化の傾きに基づいて算出した。

【0239】

#### 結果

シトクロムcの吸光度スペクトルにおける550 nmピーク ( $A_{550}$ ) の消失は、SS-31の添加により、濃度依存的に防止された (図22A)。このシトクロムc酸化の抑制は、SS-02、「atn」SS-02、および「ald」SS-02についても観察された (図22B)。これらのデータは、芳香族陽イオン性ペプチドが、ヘム環境におけるカルジオリピンとシトクロムc間の構造的相互作用に干渉し得ることを示す。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。さらに、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンによるシトクロムcの酸化を抑制するために、有用である。

【0240】

実施例24. SS-02およびSS-31ペプチド類似体は、シトクロムcのヘムの近隣で相互作用する。

円二色性法による実験は、カルジオリピンを添加した際に、シトクロムcのソーレー帯における主要な負のコットンピークが消失することを示している。負のコットンピークは、ヘムと芳香族残基側鎖間の電子的相互作用 ( $\pi-\pi^*$ )、およびFe-Met80結合の安定性を反映する。従って、円二色性解析を使用して、シトクロムcのヘム環境における、カルジオリピンに誘導される変化に対するSSペプチド類似体の影響を調査することができる。

【0241】

#### 材料および方法

試料温度調節器を備えたAVIA 620 DS分光光度計を用いて、円二色性 (CD) スペクトルを収集した。30 µg / mlのカルジオリピンおよび異なるSSペプチド類似体 (SS-02、「atn」SS-02、「ald」SS-02、およびSS-31) の存在下または不存在下において、20 mMのHepes (pH 7.4)、および10 µMシトクロムcを含む、光路長10 mmのセルを用いて、ソーレー領域 (370 ~ 450 nm) のCDスペクトルを記録した。過剰な光散乱に起因するスペクトルの歪みを避けるために、最大脂質濃度を低く保った。全ての測定を25 °Cで行った。バックグラウンドのためにすべてのスペクトルを補正し、示される最終的なスペクトルは、少なくとも3つの実験の平均を表す。

【0242】

#### 結果

10 µMのシトクロムcへのカルジオリピン (30 µg / ml) の添加は、419 nmでの負のコットンピークの消失を招いたが、これは、シトクロムcと1:1の比率で、SS-02もしくはその蛍光性類似体 («atn」SS-02および«ald」SS-02)、またはSS-31のいずれかを添加することにより防止された (図23)。これらのデータは、これらの芳香族陽イオン性ペプチドが、シトクロムcとヘムの近隣で相互作用し、カルジオリピンが芳香族側鎖との  $\pi-\pi^*$  相互作用を破壊するのを防止すること、およびFe-Met80配位の断裂を防ぐ可能性があることを示す。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。

【0243】

## 実施例 25 . SS - 02 および SS - 31 ペプチド類似体は、シトクロムcのペルオキシダーゼ活性を抑制する。

ヘモグロビンおよびミオグロビンなどの五配位のヘムとは異なり、シトクロムc中のFeの2つの軸配位子(His18およびMet80)が、 $H_2O_2$ と触媒性金属部位との直接相互作用を防止し、水中のシトクロムcは、非常に低いペルオキシダーゼ活性を有する。カルジオリピンの存在下において、シトクロムcのペルオキシダーゼ活性は、2桁増加する。カルジオリピンに誘導されるFe-Met80結合の破壊を防止することにより、芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcのペルオキシダーゼ活性を抑制し得る。SSペプチド類似体によるシトクロムcのペルオキシダーゼ活性の抑制を調べるため、Amplex (登録商標) Redを使用して、シトクロムc、カルジオリピン、および $H_2O_2$ の存在下でのペルオキシダーゼ活性を測定した。

### 【0244】

#### 材料および方法

シトクロムcペルオキシダーゼ活性の評価を、Amplex (登録商標) Redアッセイ(インビトロジェン社(Invitrogen)/ライフテクノロジーズ社(Life Technologies)、カリフォルニア州、カールスバッド)を使用して行った。Amplex (登録商標) Redは、ペルオキシダーゼの存在下、1:1の化学量論で $H_2O_2$ と反応して、高蛍光レゾルフィン(励起/発光=570/585)を生成する試薬である。このアッセイにおいて、西洋ワサビペルオキシダーゼの代りに、シトクロムcを添加した。2 $\mu$ Mのシトクロムcを、カルジオリピンまたはカルジオリピン-POPCリボソーム(10 $\mu$ g/ml)とともに、20mMのHEPES(pH7.4)または脱イオン水中で、1分間インキュベートした後、50 $\mu$ MのAmplex (登録商標) Red試薬および10 $\mu$ Mの $H_2O_2$ を添加し、さらに5分間反応させた。日立F-4500蛍光分光光度計を使用して、連続的な時間経過データを得た。カルジオリピン(100 $\mu$ g/ml)の存在下での、シトクロムc(2 $\mu$ M)におけるペルオキシダーゼ活性抑制において、異なるSSペプチド類似体(10 $\mu$ M)を比較する際には、マイクロプレート分光蛍光光度計(モレキュラーデバイス社(Molecular Devices)、カリフォルニア州、サニーバール)を使用した。比較のために、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を使用し、カルジオリピン-シトクロムc複合体によるAmplex (登録商標) Redの過酸化率と一致するように、HRP濃度(0.001U/ml)を最適化した。

### 【0245】

#### 結果

4つのSSペプチド類似体全てが、カルジオリピン-シトクロムc複合体のペルオキシダーゼ活性を抑制した(図24)。SS-02および「atn」SS-02は、シトクロムcの過酸化率を、対照の約70%および75%(それぞれ)まで減少させ、一方「ald」SS-02およびSS-31は、シトクロムcの過酸化率を、対照の約20%および35%(それぞれ)まで減少させた。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害の、予防または治療のために有用である。さらに、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、シトクロムcにおけるペルオキシダーゼ活性を抑制するために有用である。

### 【0246】

## 実施例 26 . 異なるペプチド類似体の、カルジオリピンに起因するシトクロムc還元 of 抑制を防止する能力の比較

カルジオリピンの添加は、グルタチオンまたはアスコルベートのいずれかにより誘導されるシトクロムcの還元率を大幅に抑制するが、SS-31の添加は、容量依存的にこの抑制を防止する(実施例16および図14Bを参照のこと)。SS-31のシトクロムcの還元 of 抑制を阻止する能力を、SS-02、「atn」SS-02、および「ald」SS-02の能力と比較するために、実験を行った。

## 【 0 2 4 7 】

材料および方法

アスコルベートによるシトクロムcの還元的时间経過を、96ウェルのプレートリーダー（モレキュラーデバイス社（Molecular Devices）、カリフォルニア州、サニーベール）を使用して、550nmおよび570nmで記録した。全ての反応において、SSペプチドの存在下または不存在下において、シトクロムcをカルジオリピンとともに1分間ブレインキュベートした。20μMのシトクロムcおよび100mg/mlのカルジオリピンが最適であることが判明し、この場合、カルジオリピンは、還元剤に関わらず、シトクロムcの還元を90%～100%抑制する。アスコルベート（50μM）を添加してシトクロムcの還元を開始させ、吸光度を5分間記録した。還元率は、550nmから570nmまでの吸光強度の変化の傾きに基づいて算出した。

10

## 【 0 2 4 8 】

結果

図25の棒グラフに示すとおり、シトクロムcの還元率は、カルジオリピンの存在下、10%まで減少した。SS-31は、4つのペプチドの中で、カルジオリピン-シトクロムc複合体のすべての機能を阻止する上で最も有効であり、カルジオリピンの存在下においても、シトクロムcの還元率を100%可能にする能力も有していた。SS-02の存在下でのシトクロムcの還元率は約60%、「atn」SS-02の存在下での還元率は約50%、および「ald」SS-02の存在下での還元率は約90%であった。従って、本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンおよび/もしくはシトクロムcの調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、ならびに/またはカルジオリピン/シトクロムcの相互作用の調節不全を特徴とする疾患もしくは障害、例えば、全身性エリテマトーデスおよび/または抗リン脂質抗体症候群などの全身性自己免疫疾患の、予防または治療のために有用である。本開示の芳香族陽イオン性ペプチドは、カルジオリピンに起因するシトクロムc還元の抑制を防止するために有用である。

20

## 【 0 2 4 9 】

参考文献

- Tuominen EKJ, Wallace CJA and Kinnunen PKJ. Phospholipid-cytochrome c interaction. Evidence for the extended lipid anchorage. *J Biol Chem* 277:8822-8826, 2002.
- Kalanxhi E and Wallace CJA. Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. *Biochem J* 407:179-187, 2007.
- Sinibaldi F, Howes BD, Piro MC, Polticelli F, Bombelli C, Ferri T et al. Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding. *J Biol Inorg Chem* 15:689-700, 2010.
- Sinibaldi F, Fiorucci L, Patriarca A, Lauceri R, Ferri T, Coletta M, Santucci R. Insights into Cytochrome c -cardiolipin interaction. Role played by ionic strength. *Biochemistry* 47:6928-6935, 2008.
- Vladimirov YA, Proskurnina EV, Izmailov DY, Novikov AAm Brusnichkin AV, Osipov AN and Kagan VE. Mechanism of activation of cytochrome c peroxidase activity by cardiolipin. *Biochemistry (Moscow)* 71:989-997, 2006.
- Basova LV, Kurnikov IV, Wang L, Ritob VB, Belikova NA, et al. Cardiolipin switch in mitochondria: Shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry* 46:3423-3434, 2007.
- Kagan VE, Bayir A, Bayir H, Stoyanovsky D, et al. Mitochondria-targeted disruptors and inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. *Mol Nutr Food Res* 53:104-114, 2009.
- Surewicz WK and Epand RM. Role of peptide structure in lipid-peptide interaction: A fluorescence study of the binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. *Biochemistry* 23:6072-6077, 1984.

30

40

50

Hiratsuka T. New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 742:496-508, 1983.

Cohen BE, McAnaney TB, Park ES, Jan YN, Boxer SG and Jan LY. Probing protein electrostatics with a synthetic fluorescent amino acid. *Science* 296:1700-1703, 2001.

Santucci R and Ascoli F. The Soret circular dichroism spectrum as a probe for the heme Fe(III)-Met(80) axial bond in horse cytochrome c. *J Inorganic Biochem* 68:211-214, 1997.

#### 【0250】

10

均等物

本発明は、本発明の個々の態様の1つの例示として意図される、本出願に記載される特定の実施形態によって制限されるものではない。当業者には明らかとなるであろうように、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の多くの改変および変更が可能である。本明細書に列挙されるものに加え、本発明の範囲内である、機能的に等価な方法および装置は、前述の記載から、当業者には明らかになるであろう。このような改変および変更は、添付される特許請求の範囲内に含まれることが意図される。本発明は、添付される特許請求の範囲、およびかかる請求の範囲が権利を有する等価物の全範囲によってのみ制限されるものである。本発明が、当然変化し得る、特定の方法、試薬、化合物の組成または生物系に限定されるものではないことが理解される。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のためのみのものであり、限定するためのものではないことが理解される。

20

#### 【0251】

さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ群によって記載される場合、本開示がそれにより、マーカッシュ群のいかなる個々のメンバーまたはメンバーの下位群の観点からも記載されるということを、当業者は理解するであろう。

#### 【0252】

当業者には理解されるであろうように、いかなるおよびすべての目的のために、特に書面による説明を提供する観点から、本明細書に開示される全ての範囲は、いかなるおよびすべての、可能性のある下位範囲およびその下位範囲の組み合わせをも包含する。いかなる記載された範囲も、少なくとも二等分、三等分、四等分、五等分、十等分などに分割された同じ範囲を、十分に説明し、かつ有効にするものと、容易に理解され得る。非限定的な例として、本明細書で論じられる各範囲は、より下位の3分の1、中位の3分の1、および上位の3分の1等に容易に分割することができる。当業者には理解されるであろうように、「最大」、「少なくとも」、「超」、「未満」等の全ての表現は、記載される数字を含み、かつ上述のように、その後下位範囲に分割し得る範囲を指す。最後に、当業者には理解されるであろうように、範囲はそれぞれの個々のメンバーを含む。従って、例えば、1～3個の細胞を有する群は、1、2、または3個の細胞を有する群を指す。同様に、1～5個の細胞を有する群は、1、2、3、4、または5個の細胞を有する群を指す、などである。

30

40

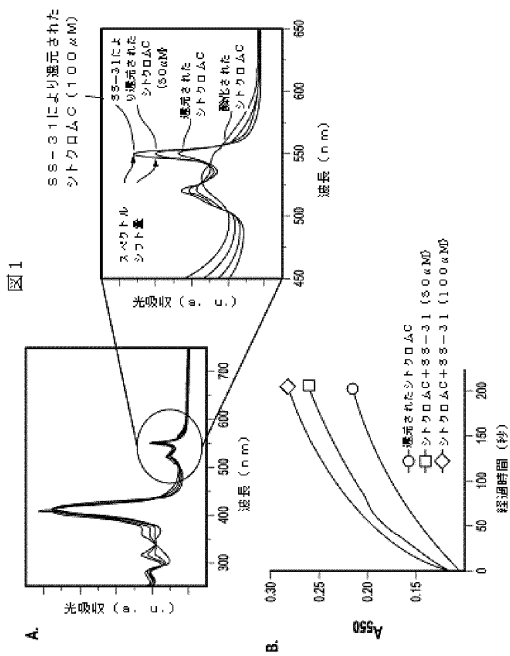
#### 【0253】

本明細書において言及または引用される、すべての特許、特許出願、仮出願、および刊行物は、本明細書の明確な教示と矛盾しない範囲で、全ての図および表を含むその全体が、参照により組み込まれる。

#### 【0254】

他の実施形態は、以下の請求の範囲内に記載される。

【図 1】



【図 2】

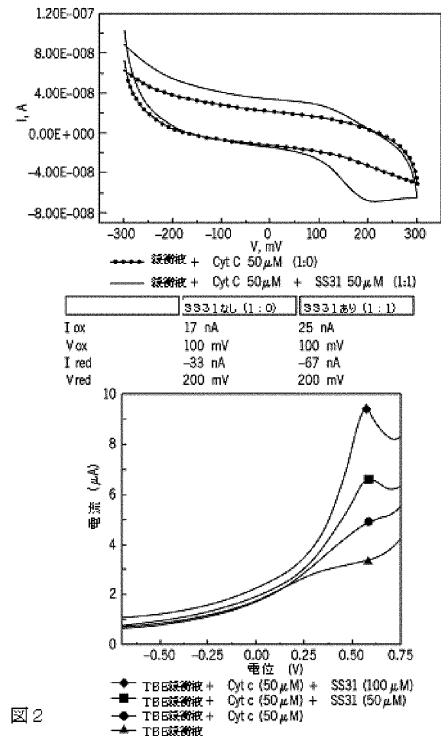


図 2

【図 3 A】

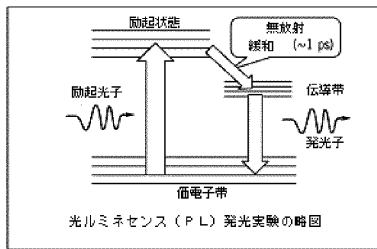


図 3 A

【図 4】

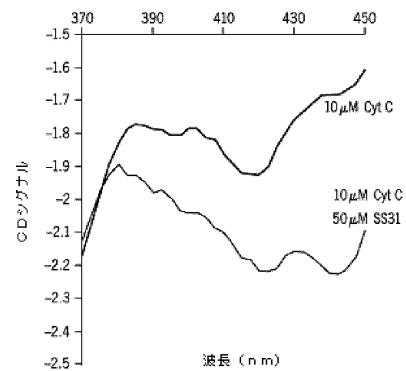


図 4

【図 3 B】

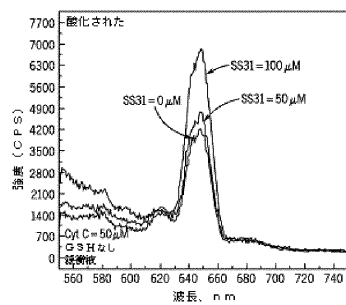
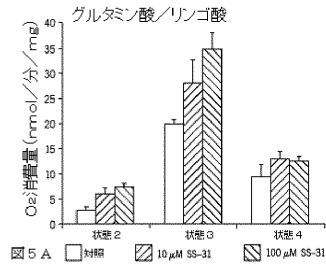
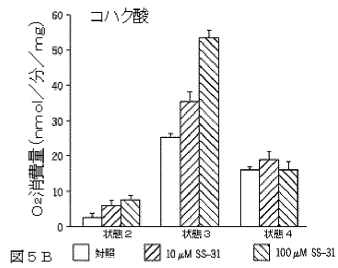


図 3 B

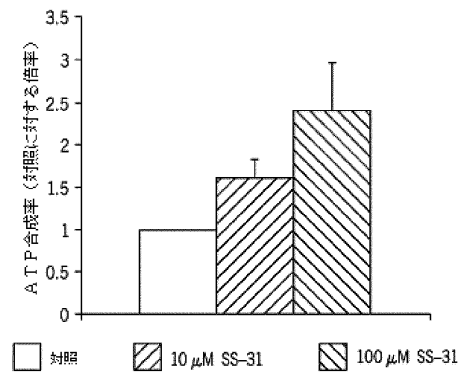
【図 5 A】



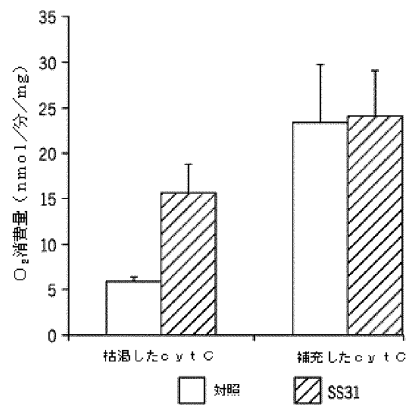
【図 5 B】



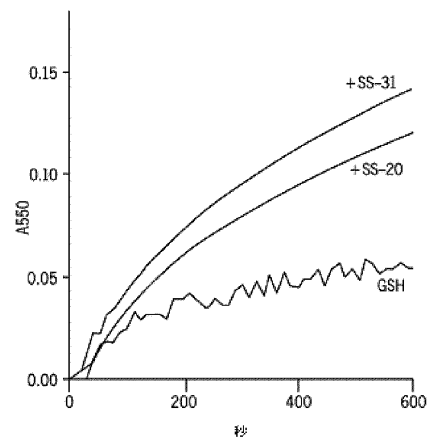
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 9】

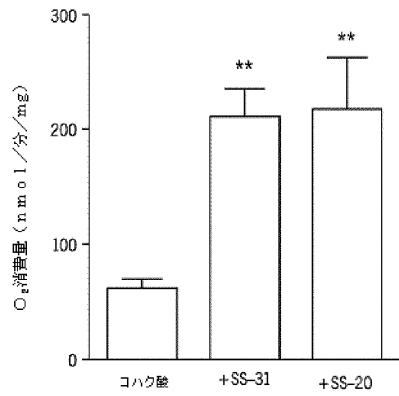


図 9

【図 10】

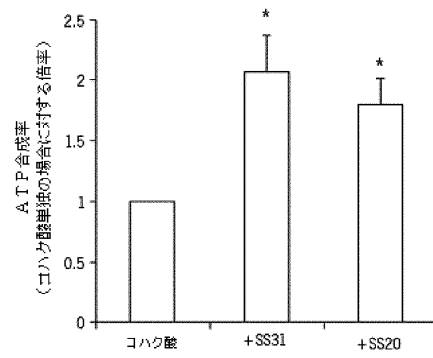


図 10

【図 11 A】

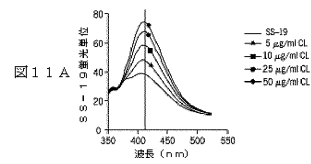


図 11 A

【図 11 B】

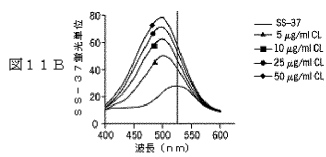


図 11 B

【図 12 B】

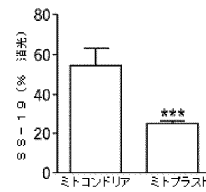


図 12 B

【図 11 C】

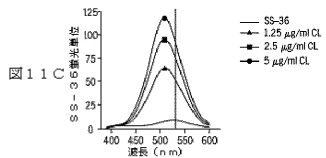


図 11 C

【図 12 C】

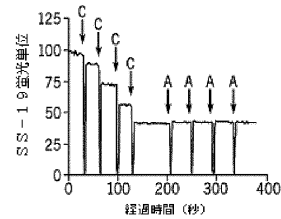


図 12 C

【図 12 A】

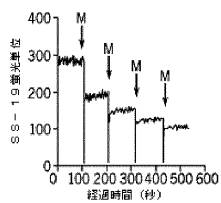


図 12 A



【図 1 2 D】

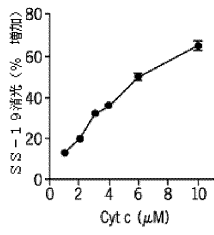


図 1 2 D

【図 1 3 B】

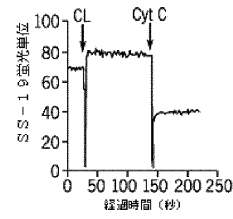


図 1 3 B

【図 1 3 A】

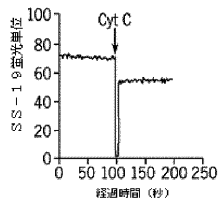


図 1 3 A

【図 1 3 C】

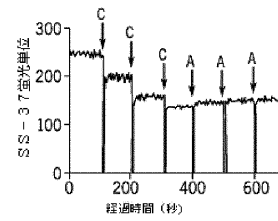


図 1 3 C

【図 1 3 D】

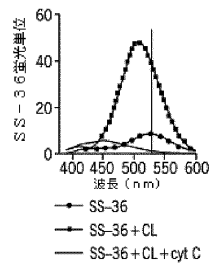


図 1 3 D

【図 1 4 B】

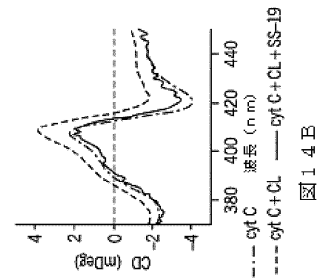


図 1 4 B

【図 1 4 A】

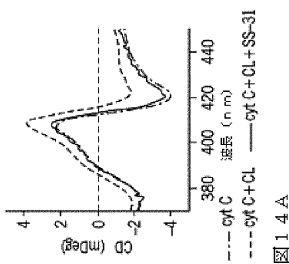


図 1 4 A

【図 1 4 C】

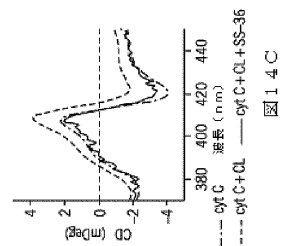
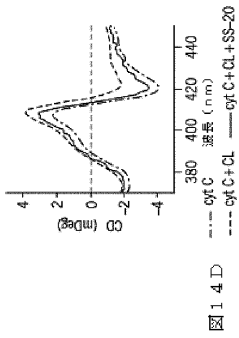
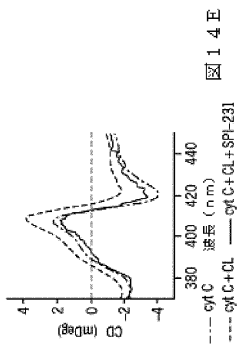


図 1 4 C

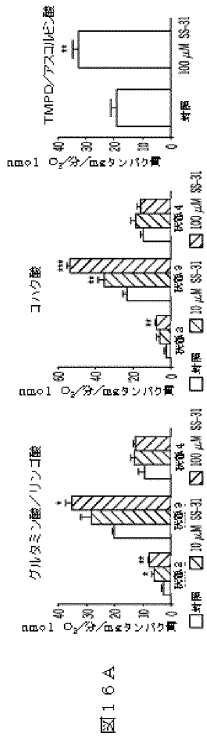
【図 1 4 D】



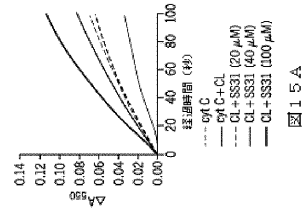
【図 1 4 E】



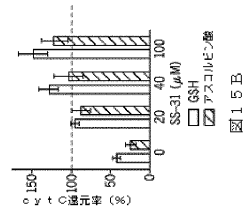
【図 1 6 A】



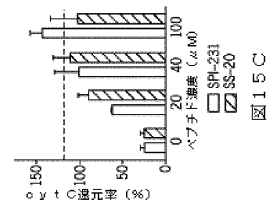
【図 1 5 A】



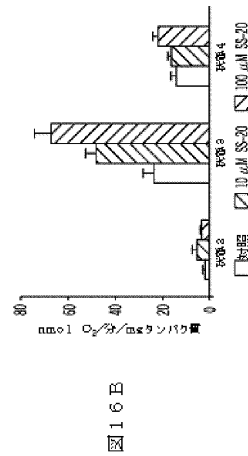
【図 1 5 B】



【図 1 5 C】



【図 1 6 B】



【図 17】

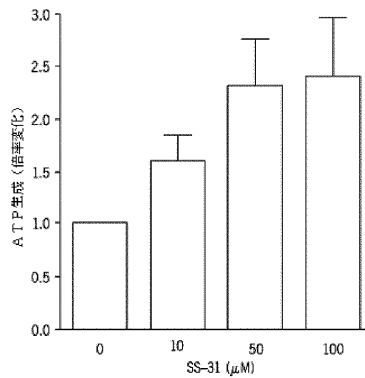


図 17

【図 18】

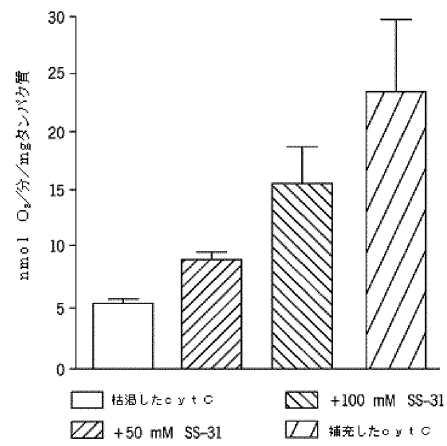


図 18

【図 19 A】

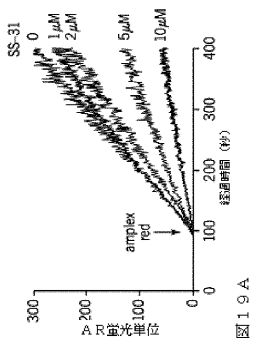


図 19 A

【図 19 C】

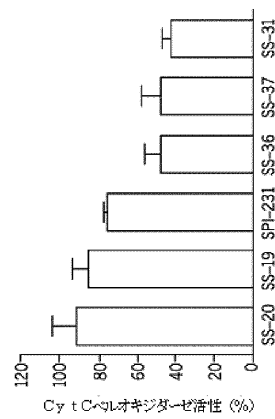


図 19 C

【図 19 B】

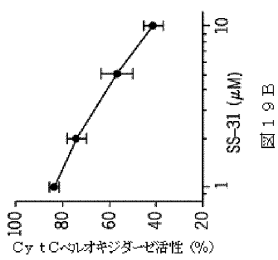


図 19 B

【図 20 A】

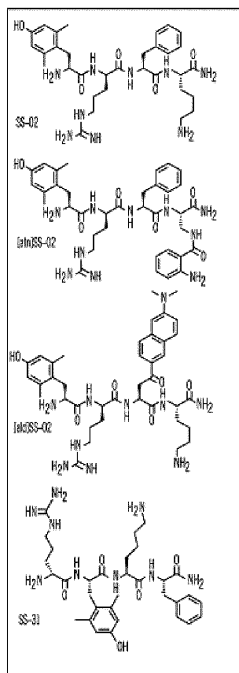
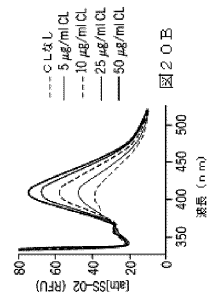
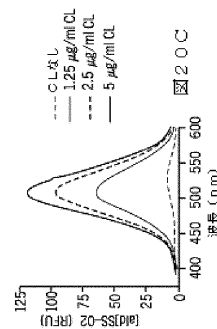


図 20 A

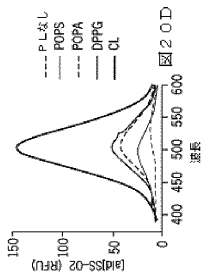
【図 20 B】



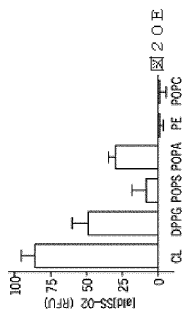
【図 20 C】



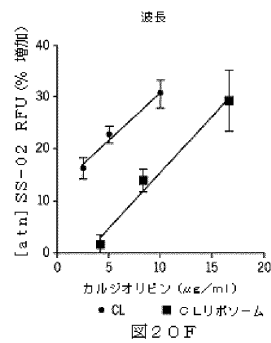
【図 20 D】



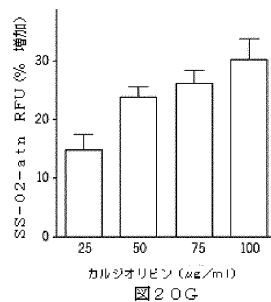
【図 20 E】



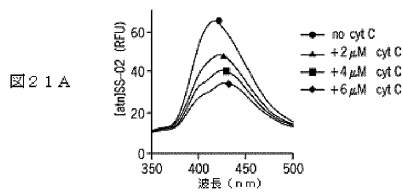
【図 20 F】



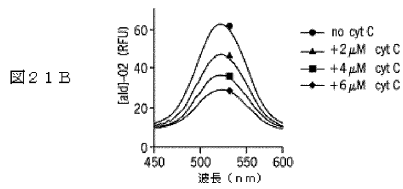
【図 20 G】



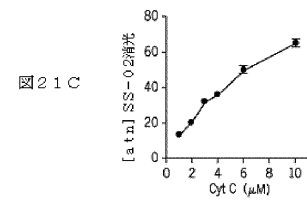
【図 2 1 A】



【図 2 1 B】



【図 2 1 C】



【図 2 1 F】

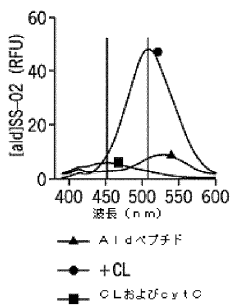


図 2 1 F

【図 2 1 G】

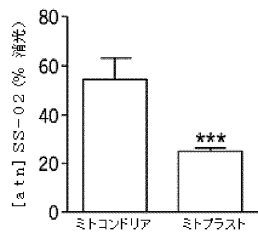


図 2 1 G

【図 2 1 D】

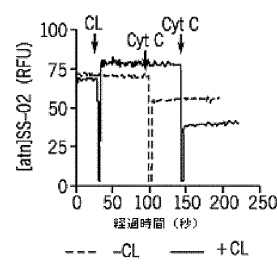


図 2 1 D

【図 2 1 E】

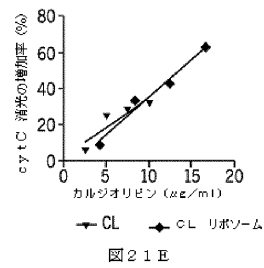


図 2 1 E

【図 2 1 H】

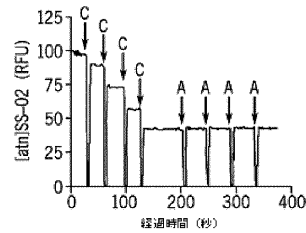


図 2 1 H

【図 2 1 I】

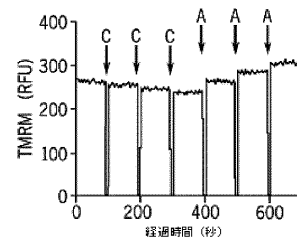


図 2 1 I

【図 2 2 A】

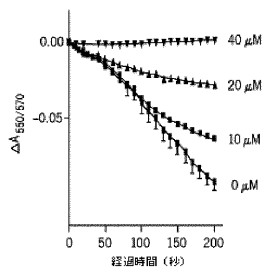


図 2 2 A

【図 2 2 B】

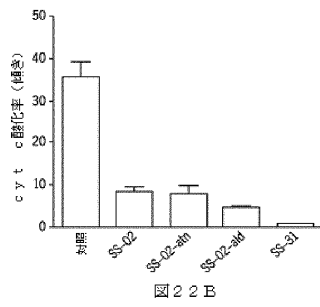


図 2 2 B

【図 2 3】

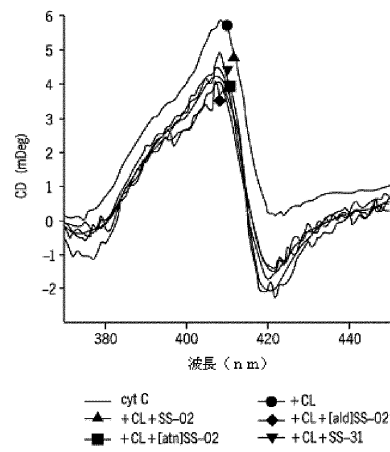


図 2 3

【図 2 4】

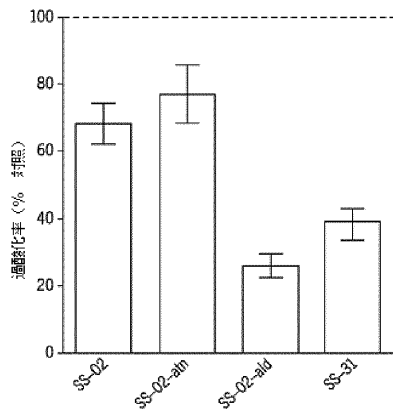


図 2 4

【図 2 5】

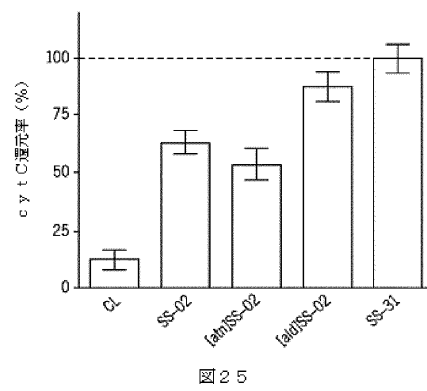


図 2 5

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2013/027430

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/07 (2013.01) USPC - 514/21.9 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 38/05, 38/06, 38/07; C07K 5/04, 5/10, 5/11, 5/107 (2013.01) USPC - 514/1.1, 1.5, 1.6, 1.9, 7.4, 15.1, 15.4, 15.6, 15.7, 18.6, 18.7, 18.9, 21.9; 530/330 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC Class/Subclass(es): A61K 38/00, 38/03, 38/07; C07K 5/0817, 5/1008, 5/1016, 5/1019, 5/1024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google, Google Patents, PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2012/0004720 A1 (FOGELMAN et al) 05 January 2012 (05.01.2012) entire document	1-3, 5-7, 15-21 4, 10-13
X — Y	US 2009/0221514 A1 (SZETO et al) 03 September 2009 (03.09.2009) entire document	8, 9, 14, 22 4, 10-13, 23
Y	US 2006/0084606 A1 (SZETO) 20 April 2006 (20.04.2006) entire document	23
A	US 2009/0186802 A1 (ALLUIS et al) 23 July 2009 (23.07.2009) entire document	1-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "g" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 April 2013		Date of mailing of the international search report <b>03 MAY 2013</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード ( 参考 )
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/14
A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P	15/08
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 7
A 6 1 P	15/02	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	15/02
C 0 7 K	5/06	(2006.01)	A 6 1 P	13/02
C 0 7 K	5/08	(2006.01)	C 0 7 K	5/06
C 0 7 K	5/10	(2006.01)	C 0 7 K	5/08
			C 0 7 K	5/10

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100196405

弁理士 小松 邦光

(72)発明者 ツェト ヘーゼル エイチ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 2 8 ニューヨーク イースト エイティナイン  
ストリート 5 0 アパートメント 2 5 エイ

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA09 BA16 BA31 CA59 DC50 MA52 MA55 MA56  
MA63 MA66 NA14 ZA01 ZA07 ZA36 ZA42 ZA51 ZA53 ZA54  
ZA55 ZA59 ZA81 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96 ZB05 ZB08 ZB21  
ZB22  
4H045 AA10 AA30 BA11 BA12 BA13 BA50 EA20 EA22 FA10