

(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2004-530657

(P2004-530657A)

(43) 公表日 平成16年10月7日(2004.10.7)

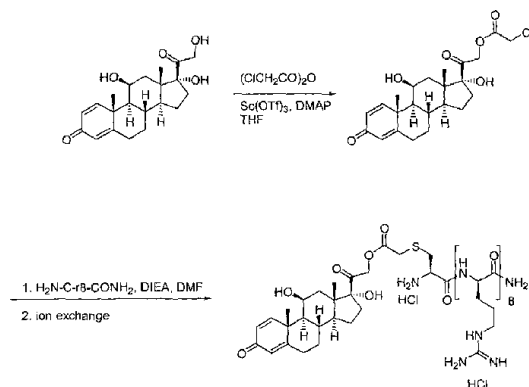
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C O 7 6
A 6 1 K 9/02	A 6 1 K 9/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/10	A 6 1 P 1/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 229 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-569108 (P2002-569108)	(71) 出願人	501051192
(86) (22) 出願日	平成14年2月25日 (2002.2.25)		セルゲイト, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月22日 (2003.8.22)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/005829		86, サニーベール, デル レイ ア
(87) 国際公開番号	W02002/069930		ベニュー 552
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002.9.12)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	09/792, 480		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成13年2月23日 (2001.2.23)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ロスバード, ジョナサン ビー.
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 950
			14, キュパーティノ, ブルーナリッ
			ジ アベニュー 19500
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮組織にわたるおよび上皮組織への薬物送達を増強するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、上皮組織（皮膚、胃腸管、肺上皮などを含む）にわたる、薬物および他の薬剤の送達を増強するための組成物および方法を提供する。この組成物および方法はまた、内皮組織（血液脳関門を含む）にわたった送達には有用である。この組成物および方法は、非結合体化合物と比較して、1つ以上の組織層にわたる、試薬に結合体化された化合物の送達を増強するために十分なグアニジノ側鎖部分およびアミジノ側鎖部分を有する、送達増強トランスポーターを使用する。この送達増強ポリマーとしては、例えば、好ましくは、約6残基長と約25残基長との間であるポリアルギニン分子が挙げられる（図44参照）。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化合物を動物の胃腸上皮に標的化する方法であって、該方法は、該化合物および送達増強トランスポーターを含む結合体を、該胃腸上皮に投与する工程を包含し、ここで：

- i. 該化合物が、リンカーを介して該送達増強トランスポーターに結合され；そして、
- ii. 該送達増強トランスポーターが、50未満のサブユニットを含み、そして、少なくとも5つのグアニジノ部分またはアミジノ部分を含み、これによって、該送達増強トランスポーターの非存在下での該化合物の輸送と比較して、該胃腸上皮への該結合体の送達が増大される、方法。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記結合体の前記胃腸上皮への送達、前記送達増強トランスポーターの非存在下における前記化合物の送達と比較して、少なくとも2倍増大される、方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記結合体の前記胃腸上皮への送達、前記送達増強トランスポーターの非存在下における前記化合物の送達と比較して、少なくとも10倍増大される、方法。

【請求項 4】

前記リンカーが、放出可能なリンカーである、請求項 1 に記載の方法。

20

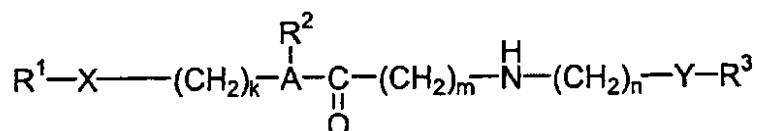
【請求項 5】

前記サブユニットがアミノ酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記結合体が、以下：

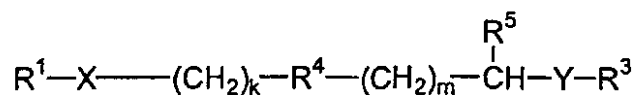
【化 1】



3

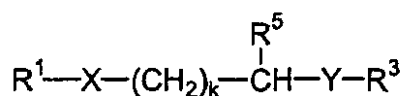
30

【化 2】



4

40



5

のような構造 3、4 または 5 からなる群より選択される構造を有し、ここで：

R^1 は、前記化合物を含み；

X は、生物学的に活性な化合物上の官能基と結合部分上の末端官能基との間で形成された結合であり；

50

Yは、輸送部分上の官能基および結合部分上の官能基から形成された結合であり；

Aは、NまたはCHであり；

R²は、水素、アルキル、アリール、アシルまたはアリルであり；

R³は、前記送達増強トランスポーターを含み、

R⁴は、S、O、NR⁶またはCR⁷R⁸であり；

R⁵は、H、OH、SHまたはNHR₆であり；

R⁶は、水素、アルキル、アリール、アシルまたはアリルであり；

kおよびmは1および2から各々独立して選択され；ならびに

nは1～10である、

方法。

10

【請求項7】

請求項6に記載の方法であって、ここで、Xは、—C(O)O—、—C(O)NH—、—OC(O)NH—、—S—S—、—C(S)O—、—C(S)NH—、—NHC(O)NH—、—SO₂NH—、—SONH—、ホスフェート、ホスホンネート、ホスフィンネート、およびCR⁷R⁸からなる群より選択され、ここで、R⁷およびR⁸は、各々、Hおよびアルキルからなる群より独立して選択される、方法。

【請求項8】

前記結合体が構造3を含み、YはNであり、そして、R²はメチル、エチル、プロピル、ブチル、アリル、ベンジルまたはフェニルである、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

20

R²はベンジルであり；k、mおよびnが各々1であり、そして、Xが—OC(O)—である、請求項6に記載の方法。

【請求項10】

前記結合体は構造4を含み；R⁴はSであり；R⁵はNHR⁶であり；そして、R⁶は水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルである、請求項6に記載の方法。

【請求項11】

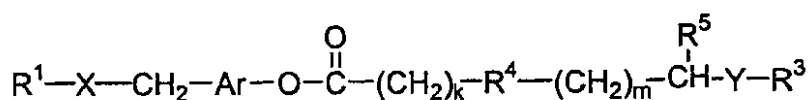
前記結合体は構造4を含み；R⁵はNHR⁶であり；R⁶は水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルであり；そして、kおよびmは各々1である、請求項6に記載の方法。

【請求項12】

請求項1に記載の方法であって、ここで、前記結合体が、以下：

30

【化3】



6

のような構造6を含み、ここで：

40

R¹は、前記化合物を含み；

Xは、生物学的に活性な化合物上の官能基と結合部分上の末端官能基との間で形成された結合であり；

Yは、輸送部分上の官能基および結合部分上の官能基から形成された結合であり；

Arは、オルト位またはパラ位に配置された結合化遊離基を有するアリール基であり、アリール基は置換されてもよいし、置換されなくてもよい；

R³は、前記送達増強トランスポーターを含み、

R⁴は、S、O、NR⁶またはCR⁷R⁸であり；

R⁵は、H、OH、SHまたはNHR₆であり；

R⁶は、水素、アルキル、アリール、アリールアルキル、アシルまたはアリルであり；

50

R⁷ および R⁸ は、水素またはアルキルから独立して選択され；そして k および m は 1 および 2 から各々独立して選択される、方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、ここで、X は、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NH-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $-SO_2NH-$ 、 $-SONH-$ 、ホスフェート、ホスホンネート、ホスフィンネート、および CR^7R^8 からなる群より選択され、ここで、R⁷ および R⁸ は、各々、H およびアルキルからなる群より独立して選択される、方法。

【請求項 14】

R⁴ は S であり；R⁵ は NHR^6 であり；そして、R⁶ は水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルである、請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 15】

前記結合体が、少なくとも 2 つの送達増強トランスポーターを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記結合体が、頬に投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記結合体が、坐薬として投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記送達増強トランスポーターが、非ペプチド骨格を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 19】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記送達増強トランスポーターは、該送達増強トランスポーター分子が天然に存在するタンパク質中で結合されるアミノ酸配列に結合されない、方法。

【請求項 20】

前記送達増強トランスポーターが、2～25 のグアニジノ部分またはアミジノ部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記送達増強トランスポーターが、7 と 15 の間のグアニジノ部分を含む、請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記送達増強トランスポーターが、少なくとも 6 つの連続したグアニジノ部分および／またはアミジノ部分を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の方法であって、前記送達増強トランスポーターが、本質的に 5～50 のアミノ酸からなり、これらのアミノ酸の少なくとも 50 % がアルギニンまたはそのアナログである、方法。

【請求項 24】

前記送達増強トランスポーターが、5～25 のアルギニン残基またはそのアナログを含む、請求項 23 に記載の方法。

40

【請求項 25】

少なくとも 1 つのアルギニンが、D-アルギニンである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記アルギニンの全てが D-アルギニンである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記送達増強トランスポーターを含む前記アミノ酸の少なくとも 70 % が、アルギニンまたはそのアナログである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記送達増強トランスポーターが、7 つの連続した D-アルギニンからなる、請求項 23

50

に記載の方法。

【請求項 29】

請求項 1 に記載の方法であって、前記化合物は、炎症性腸疾患、結腸癌、潰瘍性大腸炎、胃腸潰瘍、便秘、ならびに、塩および水吸収の失調からなる群より選択される疾患のための治療薬である、方法。

【請求項 30】

請求項 1 に記載の方法であって、前記化合物は、免疫抑制剤、コルチコステロイド、緩下薬、抗生物質または抗腫瘍剤からなる群より選択される、方法。

【請求項 31】

前記化合物が、回腸 (ileum) および／または結腸に標的化される、請求項 1 に記載の方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、皮膚膜および上皮膜（例えば、皮膚、胃腸上皮および気管支上皮を含む）にわたる薬物および他の化合物の送達を増強する組成物および方法の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

経皮薬物送達または経粘膜薬物送達は、様々な理由のために、魅力的な薬物送達経路である。胃腸薬分解および肝臓の最初の通過効果が回避される。さらに、経皮薬物送達および経粘膜薬物送達は、制御された持続性送達に十分適している（例えば、Elias, Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery, Bronaugh & Maibach Eds. 1~12 頁、Marcel Dekker, New York, 1989 を参照のこと）。多くの適用について、薬物を投与する従来の方法は、薬物の非常に高い初濃度に起因して、最適でない。経皮送達は、より高い均一性、より遅い薬物の送達速度を可能にしている。さらに、患者コンプライアンスは、このような送達方法は、使用が容易で、快適、簡便かつ非侵襲性なので、奨励される。 20 30

【0003】

経皮送達および経粘膜送達のこれらの利点は、上被膜、皮膚の低浸透性（特に、薬物に対する）に起因して、多くの臨床的適用につながっていなかった。皮膚にわたる薬物の送達における困難は、皮膚の障壁特性に起因する。皮膚は、外部の不適環境に対する身体の境界を示す、構造的に複雑な薄膜である。皮膚は、表皮、真皮、皮下組織および付属 (adnexal) 構造（表皮の付属物）から構成される。表皮（皮膚の最外上皮組織）は、それ自身が、いくつかの層—角質層、顆粒層、有棘層、および基底層から構成される。

【0004】

環境から無傷の皮膚に移動し、そして、無傷の皮膚を進む化合物は、最初に、角質層（皮膚の最外層）に浸透しなければならない、この角質層は、緻密で、そして、非常に角質化されている。角質層は、コレステロールおよび脂肪酸から構成される「膠 (glue)」によって、一緒に緊密に結合される、ケラチン充填皮膚細胞のいくつかの層から構成される。角質層の厚さは、身体部位に依存して変化する。これは、薬学的薬剤に対する皮膚の不浸透性を生じる角質層の存在である。この角質層は、基底層から皮膚表面（ここで、細胞は、最終的に剥がれる）への細胞移動によって自然に形成される。表面への細胞の進行に伴い、この細胞は、次第に、より乾燥され、そして角質化される。角質層にわたる浸透は、一般に、皮膚にわたる薬物浸透の律速段階である。例えば、Flynn, G. L., Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery, 前述、27~53 頁を参照のこと。 40

【0005】

角質層を介した浸透の後、次いで、全身作用性薬物分子は、表皮、真皮に移動し、そしてこれらを通り、最終的には、血流の毛細管壁を通りなければならない。角質層の下に位置する表皮は、3つの層から構成される。これらの層の最外部は、顆粒層で、この顆粒層は、角質層に隣接して位置し、基底細胞およびケラチノサイトとは区別される細胞から構成され、これらの基底細胞およびケラチノサイトは、根底の層を形成し、獲得されたさらなるケラチンおよびより平坦な形状を有する。表皮のこの層の細胞は、顆粒を含み、この顆粒は、大部分がタンパク質フィラグリンから構成される。このタンパク質は、ケラチン複合体を形成するために、ケラチンフィラメントに結合すると思われる。細胞はまた、細胞を結合させるための「セメント」として機能する脂質を合成する。表皮（特に、顆粒層）は、アミノペプチダーゼのような酵素を含む。

10

【0006】

表皮の次の外層は有棘層で、この主細胞はケラチノサイトであり、このケラチノサイトは、基底細胞層を含む基底細胞由来である。ランゲルハンス細胞（有棘層でもまた見出される）は、抗原提示細胞であり、従って、皮膚に移動する抗原に対する免疫応答の増大に関する。この層の細胞は、一般に、接触感受性皮膚炎に関する。

【0007】

最内部の表皮層は、基底層すなわし基底細胞層であり、これらは、根底の真皮から基底細胞層を分離する薄基底膜に、半接着斑により結合される立方細胞の1つの細胞層からなる。基底層の細胞は、表皮の外部層の前駆物質として機能する、比較的未分化の増殖細胞である。基底細胞層としては、さらに、基底細胞、メラニン細胞が挙げられる。

20

【0008】

真皮は、表皮の下で見出され、この表皮は、連結乳頭間隆起および真皮乳頭からなる基底膜によって、真皮から分離される。真皮自身は、2つの層（乳頭真皮および網状真皮）から構成される。この真皮は、以下を構成する：線維芽細胞、組織球、内皮細胞、脈管周囲マクロファージ、ならびに、樹状細胞、肥胖細胞、平滑筋細胞、ならびに、末梢神経の細胞およびそれらの器官内レセプター。真皮としては、コラーゲンおよびレチクリンのような線維物質、ならびに細胞間質（主に、グリコサミノグリカン（ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸およびデルマトン硫酸））が挙げられる。

【0009】

いくつかの方法は、薬物の経皮輸送を増強することが提唱されている。例えば、化学エンハンサー（Burnette, R. R. Developmental Issues and Research Initiatives; Hadgraft J., Ed., Marcel Dekker: 1989 247~288頁）、イオン導入、および他のものが、使用されている。しかし、特に、皮膚にわたる薬物の送達を調査している、30余りの長い研究にも関わらず、12にも満たない薬物が、現在、例えば、皮膚用パッチ剤における経皮投与に利用可能であるにすぎない。

30

【0010】

血液脳関門にわたる薬物および他の分子の輸送はまた、問題がある。血液脳関門を構成する脳毛細管は、内皮細胞自身の間で接着結合を形成する内皮細胞から構成される（Goldsteinら、Scientific American 255: 74~83 (1986); Pardridge, W. M., Endocrin. Rev. 7: 314~330 (1986))。内皮細胞、および、細胞を連結する緊密な細胞間連結は、血液から脳への多くの分子の受動的な移動に対する障壁を形成する。血液脳関門の内皮細胞は、飲小胞をほとんど有さず、この飲小胞は、他の組織においては、毛細管壁にわたる無差別な輸送をいくらか可能にし得る。血液脳関門はまた、細胞を貫通し、従って、薬物および他の分子の無制限の通過を可能にする連続的な裂孔またはチャネルによっても妨害されない。

40

【0011】

従って皮膚、胃腸管、眼、および血液脳関門のような、上皮組織および内皮組織にわたる化合物（薬物を含む）の送達を増大する、改良された試薬および方法が必要である。本発

50

明は、この必要性および他の必要性を満たす。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0012】

(発明の要旨)

本発明は、化合物を動物の胃腸上皮に標的化する方法を提供する。本方法は、化合物および送達増強トランスポーターを含む結合体を、胃腸上皮に投与する工程を包含する。送達増強トランスポーター（これはまた、本発明によって提供される）は、十分なグアニジノ部分またはアミジノ部分を有し、送達増強トランスポーターの非存在下での化合物の送達と比較して、胃腸上皮への結合体の送達を増大する。いくつかの実施形態において、胃腸上皮への結合体の送達は、送達増強トランスポーターの非存在下での化合物の送達と比較して、少なくとも2倍増大される。より好ましい実施形態において、結合体の胃腸上皮への送達は、送達増強トランスポーターの非存在下での化合物の送達と比較して、少なくとも10倍増大される。送達増大トランスポーターおよび化合物は、代表的には、リンカーを介して結合される。さらに、この結合体は、化合物に連結された2つ以上の送達増強トランスポーターを含み得る。

10

【0013】

代表的には、送達増強トランスポーターは、50未満のサブユニットを含み、そして、少なくとも6つのグアニジノ部分およびアミジノ部分を含む。いくつかの実施形態において、このサブユニットはアミノ酸である。いくつかの実施形態において、送達増強トランスポーターは、6～25のグアニジノ部分またはアミジノ部分、ならびに、より好ましくは7と15との間のグアニジノ部分、ならびになおさらに好ましくは、少なくとも6つの連続したグアニジノ部分および／またはアミジノ部分を有する。いくつかの実施形態において、送達増強トランスポーターは、本質的に5～50のサブユニットからなり、その少なくとも50%は、グアニジノ残基またはアミジノ残基を含む。これらの実施形態のいくつかにおいて、このサブユニットは、天然アミノ酸または非天然アミノ酸である。例えば、いくつかの実施形態において、送達増強トランスポーターは、5～25のアルギニン残基またはそのアナログを含む。例えば、トランスポーターは、7個の連続したD-アルギニンを含み得る。

20

【0014】

いくつかの実施形態において、送達増強トランスポーターは、7～15のアルギニン残基またはアルギニンアナログを含む。送達増強トランスポーターは、少なくとも1つのアルギニン（これは、D-アルギニンである）を有し得、そして、いくつかの実施形態では、全てのアルギニンがD-アルギニンである。いくつかの実施形態において、アミノ酸の少なくとも70%がアルギニンまたはアルギニンアナログである。いくつかの実施形態において、送達増強トランスポーターは、少なくとも5つの連続したアルギニンまたはアルギニンアナログを含む。送達増強トランスポーターは、非ペプチド骨格を含み得る。さらに、いくつかの局面において、トランスポーターは、送達増強分子が、天然に存在するタンパク質に結合されるアミノ酸配列に結合されない。

30

【0015】

本発明の送達増強トランスポーターおよび方法は、薬物、診断剤、および目的の他の化合物を胃腸上皮に送達するのに有用である。本発明の方法および組成物は、化合物を特定の投与部位に送達するだけでなく、全身送達を提供するために使用される。いくつかの実施形態において、結合体は、頬に(buccally)または坐薬として投与される。この結合体の化合物は、疾患（例えば、炎症性腸疾患、結腸癌、潰瘍性大腸炎、胃腸潰瘍、便秘、ならびに、塩および水吸収の失調）に対する治療薬であり得る。従って、この化合物としては、免疫抑制剤、コルチコステロイド、緩下薬、抗生物質または抗腫瘍剤が挙げられ得る。本発明のいくつかの局面において、化合物は、回腸(ileum)および／または結腸に標的化される。

40

【0016】

50

上記で討論したように、送達される化合物は、リンカーによって送達増強トランスポーターに結合され得る。いくつかの実施形態において、このリンカーは、化合物が上皮組織および／もしくは内皮組織の1つ以上の層に移り、そして／または通過した後、生物学的活性形態で、送達増強トランスポーターからこの化合物を放出する、放出可能なリンカーである。いくつかの実施形態において、この化合物は、溶媒媒介切断によって、リンカーから放出される。結合体は、いくつかの実施形態において、酸性pHで実質的に安定であるが、化合物は、実質的に、生理学的pHで、送達増強トランスポーターから放出される。いくつかの実施形態において、この結合体の半減期は、皮膚または他の上皮組織もしくは内皮組織と接触するとき、5分と24時間の間である。例えば、半減期は、皮膚または他の上皮組織もしくは内皮組織と接触するとき、30分と2時間の間であり得る。

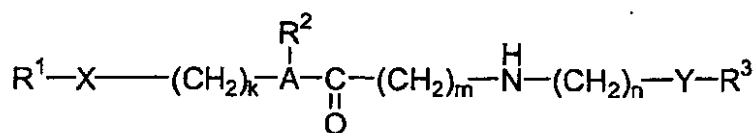
10

【0017】

本発明の結合体構造の例としては、以下：

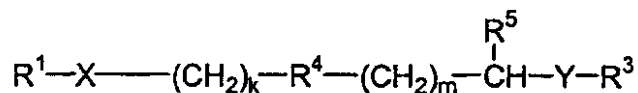
【0018】

【化4】

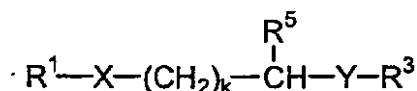


3

20



4



5

30

のような、3、4または5のような構造を有する結合構造が挙げられ、ここで、 R^1 は化合物を含み；Xは、生物学的に活性な化合物上の官能基と結合部分上の末端官能基との間で形成された結合であり；Yは、輸送部分上の官能基および結合部分上の官能基から形成された結合であり；Aは、NまたはCHであり； R^2 は水素、アルキル、アリール、アシルまたはアリルであり； R^3 は、送達増強トランスポーターを含み； R^4 は、S、O、N、 R^6 または CR^7R^8 であり； R^5 は、H、OH、SH、または NHR^6 であり； R^6 は水素、アルキル、アリール、アシルまたはアリルであり；kおよびmは、1および2から各々独立して選択され；そして、nは1～10である。

40

【0019】

好ましくは、Xは、以下の：-C(O)O-、-C(O)NH-、-OC(O)NH-、-S-S-、-C(S)O-、-C(S)NH-、-NHC(O)NH-、-SO₂NH-、-SONH-、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィネート、および CR^7R^8 からなる群より選択され、ここで、 R^7 および R^8 は、それぞれ独立してHおよびアルキルからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、 R_4 は、Sであり； R_5 は、 NHR_6 であり；そして R_6 は、水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルである。いくつかの実施形態において、 R_2 は、ベンジルであり；k、m、およびnは、おのおの1であり、そしてXはOである。いくつかの実施形態において、構造3を含む結合体で、Yは、Nであり、および R^2 は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、アリル、ベンジル、

50

またはフェニルである。いくつかの実施形態において、 R^2 は、ベンジルであり； k 、 m 、および n は、おのおの 1 であり、そして X は、 $-OC(O)-$ である。構造 4 を含む結合体のいくつかの実施形態において； R^4 は、 S であり； R^5 は、 NHR^6 であり；そして R^6 は、水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルである。構造 4 を含む結合体のいくつかの実施形態において； R^5 は、 NHR^6 であり； R^6 は、水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルであり；そして k および m は、各々 1 である。

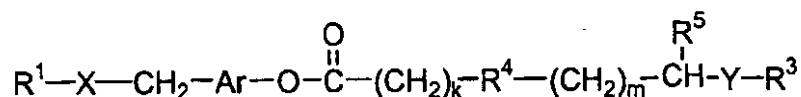
【0020】

本発明はまた、結合体を提供し、この結合体における生物学的薬剤からのリンカーの放出は、第 1 の、律速の分子内反応、続いて起こるリンカーの放出を起こすより速い分子内反応を含む。律速反応は、リンカーの置換基の適切な選択により、生理的 pH よりも高いかまたは低い pH においても安定であるようにされ得る。しかし、一旦、結合体が、上皮組織または内皮組織の 1 つ以上の層を横切って通過すると、リンカーは、薬剤から切断される。この型のリンカーを有する化合物の例は以下のような構造 6 である：

10

【0021】

【化 5】



20

6

ここで、 R^1 は、化合物を含み； X は、生物学的に活性な化合物における官能基と連結部分における末端官能基との間に形成される連結であり； Y は、輸送部分における官能基および連結部分における官能基から形成される連結であり； Ar は、オルト配置またはパラ配置に配置されるラジカルが結合されたアリール基であり、このアリール基は、置換されたかまたは非置換であり得； R^3 は、送達増強トランスポーターを含み； R^4 は、 S 、 O 、 NR^6 または CR^7R^8 であり； R^5 は、 H 、 OH 、 SH または NHR^6 であり； R^6 は、水素、アルキル、アリール、アリールアルキル、アシル、またはアリルであり； R^7 および R^8 は、水素またはアルキルから独立して選択され；そして、 k および m は、それぞれ独立して 1 および 2 から選択される。

30

【0022】

いくつかの実施形態において、 X は、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(S)O-$ 、 $-C(S)NH-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $-SO_2NH-$ 、 $-SONH-$ 、ホスフェート、ホスホネートホスフィネート、および CR^7R^8 からなる群より選択され、ここで、 R^7 および R^8 は、各々独立して、 H およびアルキルからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、 R^4 は S であり； R^5 は、 NHR^6 であり； R^6 は、水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルである。

【0023】

好ましい実施形態において、本発明の組成物は、溶媒媒介型切断を受けやすいリンカーを含む。例えば、好ましいリンカーは、酸性の pH では実質的に安定であるが、生理的 pH では実質的に切断される。

40

【0024】

(詳細な説明)

(定義)

「上皮組織」は、身体表面、空間および腔の表面領域を覆う基本的な組織である。上皮組織は、主に、お互いに結合し、細胞によって代表的に生成される細胞外マトリックス（基底膜）にある上皮細胞で構成される。上皮組織は、細胞の形状に基づく 3 つの一般的な型を含む：扁平上皮、立方上皮および円柱上皮。扁平上皮（これは、肺および血管の輪郭

50

となる)は、平らな細胞で作製される。立方上皮は、腎臓細管に並び、立方形状の細胞で構成されるが、円柱上皮細胞は、消化管に並び、円柱状の外見を有する。上皮組織はまた、その組織における細胞層の数に基づいて分類され得る。例えば、単純な上皮組織は、細胞の単一の層で構成され、これらの各々は基底膜上にある。「層状の」上皮組織は、お互いに積み重なったいくつかの組織で構成され；すべての細胞が基底膜と接触しているわけではない。「偽層状の」上皮組織は、すべて基底膜と接触するが、層状に見える細胞を有する。なぜなら、核が種々のレベルにあるからである。

【0025】

用語「経上皮」送達または「経上皮」投与は、局所投与による、身体表面または組織（例えば、無傷な皮膚または粘膜）の1以上の層を介した浸透による薬剤の送達または投与をいう。従って、この用語は、経皮投与（例えば、経皮吸収）および経粘膜投与の両方を含むことが意図される。送達は、例えば、組織のより深い層までであり得、そして／または血流への送達であり得る。

10

【0026】

本明細書中で使用される場合、「送達増強」、「透過増強」または「浸透増強」は、上皮組織または内皮組織の1以上の層へ、そして上皮組織または内皮組織の1以上の層を横切って送達される化合物の送達量および／または送達速度における増加に関する。送達の増強は、動物またはヒトの皮膚または他の組織の1以上の層を通過する化合物の速度および／または量を測定することによって、観察され得る。送達増強はまた、化合物が送達される組織への深さにおける増加、および／または上皮組織もしくは他の組織の1つ以上の細胞型への送達の程度における増加（例えば、皮膚または他の組織の線維芽細胞、免疫細胞、および内皮細胞への増加した送達）を含み得る。このような測定は、例えば、米国特許第5,891,462号に記載されるような拡散細胞装置を用いることによって、容易に得られる。

20

【0027】

皮膚または他の上皮膜もしくは内皮膜を通過する薬剤の送達および／または皮膚または他の上皮膜もしくは内皮膜中への薬剤の送達の量または速度は、時折、予め決定された領域の皮膚または他の組織を通過する化合物の量に関して定量され、これは、インタクトな破壊されていない成体の皮膚または粘膜組織の領域と規定される。この領域は一般に、約 5 cm^2 ～約 100 cm^2 の範囲、より一般には約 10 cm^2 ～約 100 cm^2 の範囲、なおより一般には約 20 cm^2 ～約 60 cm^2 の範囲である。

30

【0028】

用語「グアニジル」、「グアニジニル」および「グアニジノ」は、式 $\text{—HN=C(NH}_2\text{)NH}$ (非プロトン化型) を有する部分をいうために相互変換可能に使用される。例として、アルギニンは、グアニジル(グアニジノ)部分を含み、そしてまた2-アミノ-5-グアニジノ吉草酸または α -アミノ- δ -グアニジノ吉草酸という。「グアニジウム」は、陽性に荷電した共役酸型をいう。用語「グアニジノ部分」としては、例えば、グアニジン、グアニジニウム、グアニジン誘導体（例えば、 $(\text{RNHC(NH)NHR}')$ ）、一置換グアニジン、モノグアニド、モノグアニド、ビグアニド、ビグアニド誘導体（例えば、 $(\text{RNHC(NH)NHC(NH)NHR}')$ ）などが挙げられる。さらに、用語「グアニジノ部分」は、任意の1つ以上のグアニド単独または異なるグアニドの組合せを包含する。

40

「アミジニル」および「アミジノ」は、式 $\text{C(=NH)(NH}_2\text{)}$ を有する部分をいう。

「アミジニウム」は、陽性に荷電した共役酸形態をいう。

【0029】

用語「トランス-障壁濃度 (trans-barrier)」または「トランス-組織濃度」は、特定の組成物が付加されている組織側の反対、または「トランス」である、上皮障壁組織または内皮障壁組織の1つ以上の層の側面に存在する化合物の濃度をいう。例えば、化合物が、皮膚に塗布される場合、皮膚の1つ以上の層を実質的に横切って測定された化合物の量は、化合物のトランス-障壁濃度である。

50

【0030】

「生物学的に活性な薬剤」または「生物学的に活性な基質」は、細胞による取込みの際、細胞の構造、機能、または組成物における観察可能な変化を生じる化学基質（例えば、低分子、高分子、または金属イオン）をいう。観察可能な変化としては、1つ以上のmRNAの発現の増加または減少、1つ以上のタンパク質の発現の増加または減少、タンパク質または他の細胞成分リン酸化、酵素の阻害または活性化、結合対のメンバー間での結合の阻害または活性化、代謝物の合成増加または減少した、速度増加または減少した細胞増殖などが挙げられる。

【0031】

用語「治療剤」、「治療組成物」および「治療基質」は、限定はないが、哺乳動物種の利益のために使用され得る任意の組成物をいう。このような薬剤は、例えば、イオン、有機低分子、ペプチド、タンパク質またはポリペプチド、オリゴヌクレオチド、およびオリゴ糖、の形態をとり得る。

10

【0032】

本明細書中で使用される場合、用語「高分子」は、以下によって例示されるがそれらに限定されない大分子（1000ダルトンよりも大きなMW）をいう：生物学的起源または合成起源のペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドをいう。

【0033】

「有機低分子」は、1000ダルトン未満または1000ダルトンの分子量（MW）を有する炭素含有薬剤をいう。

20

【0034】

用語「非ポリペプチド剤」および「非ポリペプチド治療剤」は、送達増強トランスポーターを含まず、そしてポリペプチド以外の生物学的活性剤である、結合体の部分をいう。非ポリペプチド剤の例は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、これはポリアルギニンペプチドに結合して、上皮組織または内皮組織の1つ以上の層中への送達および上皮組織または内皮組織の1つ以上の層を通過する送達を増強するための結合体を形成し得る。

【0035】

本明細書中で使用される「サブユニット」は、より大きなポリマー化合物を形成するために結合されるモノマー単位である。アミノ酸のセットは、サブユニットの例である。各アミノ酸は、共通の骨格（ $-C-C-N-$ ）、およびその側鎖において異なる種々のアミノ酸を共有する。この骨格は、ポリペプチド中で繰り返される。サブユニットは、ポリマー骨格におけるエレメントの最短の繰り返しパターンを表す。例えば、2つのアミノ酸のペプチドは、ペプチドとみなされない。なぜならば、2つのアミノ酸は、ポリマー骨格における最短の繰り返しパターンのエレメントを有さないからである。

30

【0036】

用語「ポリマー」は、共有結合によって結合された2つ以上の同一または非同一のサブユニットの直鎖をいう。ペプチドは、ポリマーの例であり；ペプチドは、ペプチド結合（linkage）（アミド結合（bond））によって結合される同一または非同一のアミノ酸サブユニットからなり得る。

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド」は、ペプチド結合によって結合された、D-アミノ酸もしくはL-アミノ酸、またはD-アミノ酸およびL-アミノ酸の混合物の単鎖からなる化合物をいう。一般に、ペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸残基を含み、そして約50アミノ酸長未満である。D-アミノ酸は、本明細書中で小文字の1文字アミノ酸記号（例えば、rはD-アルギニン）によって、L-アミノ酸は、大文字の1文字アミノ酸記号（例えば、RはL-アルギニン）によって表される。ホモポリマーペプチドは、1文字アミノ酸記号、続いてそのペプチド中に連続して存在するアミノ酸の数によって表される（例えば、R7は、L-アルギニン残基からなるヘプタマーを表す）。

40

【0038】

本明細書中で使用される場合、用語「タンパク質」は、ペプチド結合によって連結された

50

直状に整列されたアミノ酸からなる化合物をいうが、ペプチドとは対照的に、十分に規定された構造を有する。タンパク質は、ペプチドとは対照的に、一般に50以上のアミノ酸の全員からなる。

【0039】

本明細書中で使用される場合、「ポリペプチド」は、少なくとも2つのアミノ酸残基のポリマーをいい、そしてこれは1つ以上のペプチド結合を含む。「ポリペプチド」は、ポリペプチドが、十分に規定された構造を有するか否かに関係なく、ペプチドおよびタンパク質を包含する。

【0040】

(好ましい実施形態の説明)

本発明は、動物の上皮組織または内皮組織の1つ以上の層中へ、および動物の上皮組織または内皮組織の1つ以上の層を通過する、化合物(薬物、および他の生物学的に活性な化合物を含む)の移動を増強する組成物および方法を提供する。この方法は、組織を、送達増強トランスポーターと連結した目的の化合物を含む結合体と接触させる工程を包含する。本発明によって提供される送達増強トランスポーターは、1つ以上のインタクトな上皮組織の層および内皮組織の層中ならびに1つ以上のインタクトな上皮組織の層および内皮組織の層を通過する、結合体の送達を増加させるために十分なグアニジノ部分またはアミジノ部分を含む分子である。この方法および組成物は、薬物ならびに他の生物学的に活性な分子のトランス上皮送達およびトランス内皮送達に有用であり、そしてまた、画像化分子および診断分子の送達に有用である。本発明の方法および組成物は、それらの生物学的効果を示すトランス上皮輸送またはトランス内皮輸送を必要とし、かつ(送達増強トランスポーターまたはいくつかの他の改変体への結合なしで)それ自体では、このような組織を通過し、従って、生物学的活性を示すことができないか、またはほとんどできない化合物の送達に特に有用である。

【0041】

本発明の送達増強トランスポーターおよび方法は、目的の化合物のトランス上皮組織送達およびトランス内皮組織送達を得るための既に利用可能な方法について重大な利点を提供する。このトランスポーターは、予め薬物を通さない組織を通過する薬物および他の薬剤の送達を可能にする。例えば、薬物の皮膚への送達は、以前2、3の化合物を除いて全てについてほぼ不可能であったのに対し、本発明の方法は皮膚のような上皮組織の第1の層の細胞だけでなく、皮膚の1つ以上の層を通過して化合物を送達し得る。血液脳関門はまた、薬物の輸送ならびに他の診断試薬および治療試薬の輸送に耐性であり；本発明の方法およびトランスポーターは、このような輸送を得るための手段を提供する。

【0042】

送達増強トランスポーターは、送達増強トランスポーターの非存在下での化合物の送達と比較して、1つ以上のインタクトな上皮組織層および内皮組織の層中へ、および通過する結合体の送達を増加させる。いくつかの実施形態において、この送達増強トランスポーターは、HIV-1のtatタンパク質を用いて得られるトランスポーターにおいて結合体の送達を有意に増加させる(Frankelら(1991)PCT公開番号WO 91/09958)。送達はまた、tat基本領域(配列RKKRRQRを有する残基49~57)を含むtatタンパク質のより短いフラグメントの使用において、有意に増加される(Barsoumら(1994)WO 94/04686およびFawellら(1994)Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91:664-668)。好ましくは、本発明のトランスポーターを用いて得られる送達は、tat残基49~57で得られる送達よりも、2倍、なおより好ましくは6倍、なおより好ましくは10倍、そしてなおより好ましくは20倍より増加される。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、tat残基49~57を含まない。

【0043】

同様に、本発明の送達増強トランスポーターは、培養されたニューロンによって迅速に内在化されるAntennapediaのホメオドメイン由来の16アミノ酸ペプチドーコ

10

20

30

40

50

レステロール結合体と比較して、増加した送達を提供し得る (Brugidouら (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 214:685-93)。この領域 (最小で43~58残基) は、アミノ酸配列RQIKIWFQNRRMKWKKを有する。Herpes simplexタンパク質VP22 (tatおよびAntennapediaドメインのような) は、細胞中への輸送を増強することが以前から公知であるが、内皮膜および上皮膜中への輸送および内皮膜および上皮膜を通過する輸送を増強することは知られていない (ElliotおよびO'Hare (1997) Cell 88:223-33; Dillberら (1999) Gene Ther. 6:12-21; Phelanら (1998) Nature Biotechnol. 16:440-3)。現在好ましい実施形態において、送達増強トランスポーターは、AntennapediaホメオドメインおよびVP22タンパク質と比較して有意に増加した送達を提供する。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、Antennapediaホメオドメイン、VP22タンパク質または8つ連続したアルギニンを含まない。

【0044】

(送達増強トランスポーターの構造)

本発明の送達増強トランスポーターは、化合物の送達を増加させるために十分なグアニジノ部分および／またはアミジノ部分を有する分子であり、ここで送達増強トランスポーターは、上皮組織 (例えば、皮膚または粘膜) あるいは内皮組織 (例えば、血液脳関門) の1つ以上の層中およびこれらを横切って付着される。この送達増強トランスポーターは、一般にグアニジノおよび／またはアミジノの側鎖部分に付着する骨格構造を含む。いくつかの実施形態において、この骨格は、サブユニット (例えば、繰り返しのモノマー単位) からなるポリマーであり、この少なくともいくつかのサブユニットは、グアニジノ部分またはアミジノ部分を含む。

【0045】

(A. グアニジノ部分および／またはアミジノ部分)

送達増強トランスポーターは、代表的に少なくとも5つのグアニジノ部分および／またはアミジノ部分、そしてより好ましくは7つ以上のこのような部分を有する。好ましくは、送達増強トランスポーターは、25またはそれよりも少ないグアニジノ部分および／またはアミジノ部分を有し、そしてしばしば、15またはそれよりも少ないこのような部分を有する。いくつかの実施形態において、この送達増強トランスポーターは、本質的に50またはそれよりも少ないサブユニット、からなり、そして本質的に25以下、20以下または15以下のサブユニットからなり得る。送達増強トランスポーターは、5つのサブユニット程度に短く、この場合、全てのサブユニットは、グアニジノ側鎖部分またはアミジノ側鎖部分を含む。送達増強トランスポーターは、例えば、少なくとも6つのサブユニットを有し得、そしていくつかの実施形態において、少なくとも7つまたは10のサブユニットを有し得る。一般に、少なくとも50%のサブユニットは、グアニジノ側鎖部分またはアミジノ側鎖部分を含む。送達増強トランスポーターにおいて、より好ましくは、少なくとも70%のサブユニット、およびいくつかの場合少なくとも90%のサブユニットが、グアニジノ側鎖部分またはアミジノ側鎖部分を含む。

【0046】

送達増強トランスポーター中のいくつかまたは全てのグアニジノ部分および／またはアミジノ部分は、連続し得る。例えば、送達増強トランスポーターは、6~25の連続した、グアニジノおよび／またはアミジノ含有サブユニットを含み得る。7つ以上の連続したグアニジノおよび／またはアミジノ含有サブユニットが、いくつかの実施形態において存在する。いくつかの実施形態において、グアニジノ部分を含む各サブユニットは、少なくとも6つ連続したアルギニン残基を含むポリマーによって例示されるように、連続である。

【0047】

送達増強トランスポーターは、ペプチドによって例示される。アルギニン残基またはアルギニンのアナログは、グアニジノ部分を有するサブユニットを構築し得る。このようなアルギニン含有ペプチドは、全てのD-アミノ酸、全てのL-アミノ酸または混合されたD

ーアミノ酸およびLーアミノ酸のいずれかからなり得、そしてさらなるアミノ酸、アミノ酸アナログ、またはアルギニン残基間の他の分子を含み得る。必要に応じて、送達増強トランスポートターはまた、非アルギニン残基を含み得、送達されるべき化合物は直接またはリンカーを介してのいずれかが付着される。送達増強トランスポートターにおける少なくとも1つのDーアルギニンの使用は、結合体をその生物学的標的へと輸送する間、トランスポートターの生物学的安定性を増強し得る。いくつかの場合、送達増強トランスポートターは、少なくとも約50%のDーアルギニン残基であり、（ついでにこのサブユニットの全ては、Dーアルギニン残基である）さらにより安定性のトランスポートターが使用される。送達増強トランスポートター分子が、ペプチドである場合、このトランスポートターは、送達増強トランスポートター分子を作製するアミノ酸が、天然に存在するタンパク質に付着するためのアミノ酸配列に付着しない。

10

【0048】

好ましくは、この送達増強トランスポートターは、線状である。好ましい実施形態において、上皮組織の1つ以上の層中および上皮組織の1つ以上の層を横切って送達される薬剤は、送達増強トランスポートターの末端に付着する。いくつかの実施形態において、薬剤は、結合体を形成するために単一の輸送ポリマーに連結される。他の実施形態において、薬剤に連結した1つより多い送達増強トランスポートターまたは単一の送達増強トランスポートターに連結した複数の薬剤を含み得る。

【0049】

より一般的には、各サブユニットが、以下のような高度に塩基性の側鎖部分を含むことが好ましい；（i）1より大きい pK_a 、より好ましくは12.5以上の pK_a を有し、そして（ii）プロトン化状態で、共鳴安定化正荷電を共有する少なくとも2つのジャミナルなアミノ基（ NH_2 ）を含み、これらはこの部分に二座特性を与える。

20

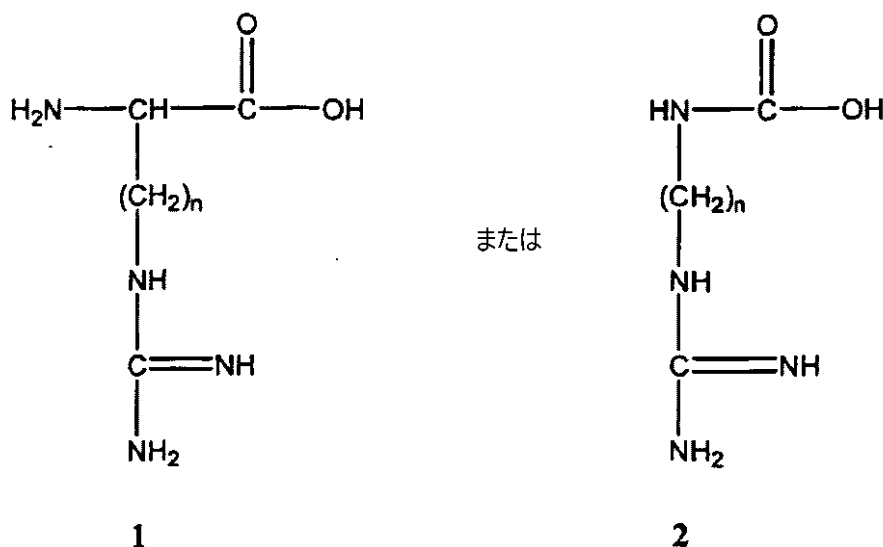
【0050】

グアニジノ部分またはアミジノ部分は、側鎖のリンカーによって骨格に連結されることによって骨格から離れて伸びる。この側鎖原子は、好ましくは、メチレン炭素原子として提供されるが、いつ以上の他の原子（例えば、酸素、硫黄または窒素）もまた存在し得る。例えば、骨格に対するグアニジノ部分を結合するリンカーは、以下のように示され得る：

【0051】

【化6】

30



40

これらの式において、 n は、好ましくは、少なくとも2であり、そして好ましくは、2と7との間である。いくつかの実施形態において、 n は、3である（構造1はアルギニン）。他の実施形態において、 n は、4と6との間であり；最も好ましくは、 n は、5または6である。例示された式における側鎖は、ペプチド骨格（すなわち、側鎖が、カルボニル

50

基に対して α 位にある炭素原子に結合する繰り返しアミド、サブユニット1)およびペプトイド骨格(すなわち、側鎖が、カルボニル基に対して β 位にある窒素原子に結合する繰り返しアミド、サブユニット2)に結合されるように示されるが、他の非ペプチド骨格はまた、本明細書中により詳細に議論されるように適切である。従って、類似の側鎖リンカーは、非ペプチド骨格(例えば、ペプトイド骨格)に結合し得る。

【0052】

いくつかの実施形態において、送達増強トランスポーターは、連結したサブユニットからなり、少なくともいくつかは、グアニジノ部分および/またはアミジノ部分を含む。グアニジノ部分および/またはアミジノ部分を有する適切なサブユニットの例は、以下に記載される。

10

【0053】

(アミノ酸)

いくつかの実施形態において、送達増強トランスポーターは、D-アミノ酸残基またはL-アミノ酸残基からなる。これらのアミノ酸は、天然に存在するアミノ酸でもあり得るし、天然に存在しないアミノ酸でもあり得る。アルギニン(α -アミノ- δ -グアニジノ吉草酸)および α -アミノ- ε -アミジノ-ヘキサン酸(等配電子のアミジノアナログ)は、適切なグアニジノ含有アミノ酸サブユニット、およびアミジノ含有アミノ酸サブユニットの例である。アルギニン中のグアニジニウム基は、約12.5のpKaを有する。いくつかの好ましい実施形態において、トランスポーターは、少なくとも6つの連続したアルギニン残基からなる。

20

【0054】

他のアミノ酸(例えば、 α -アミノ- β -グアニジノ-プロピオン酸、 α -アミノ- γ -グアニジノ-酪酸、または α -アミノ- ε -グアニジノ-カプロン酸(骨格鎖とグアニジウニウムの中心炭素との間に、それぞれ2、3または5の側鎖リンカー原子を含む)もまた、使用され得る。

【0055】

D-アミノ酸もまた、送達増強トランスポーターにおいて使用され得る。排他的にD-アミノ酸を含む組成物は、減少した酵素的分解の利点を有する。しかし、これらはまた、標的細胞内で大部分インタクトなまま維持され得る。このような安定性は、ポリマーがさらに結合される場合に、薬剤が生物学的に活性であるとする、一般に問題ではない。結合体形態で不活性な薬剤について、作用部位で切断可能(例えば、細胞内の酵素媒介性切断または溶媒媒介性切断によって)なリンカーは、細胞またはオルガネラ中の薬剤の放出を促進するために結合体内に含まれるべきである。

30

【0056】

さらに、輸送部分は、以下の式のアミノ酸オリゴマーである： $(ZYZ)_nZ$ 、 $(ZYY)_nZ$ 、 $(ZYYY)_nZ$ および $(ZYYYY)_nZ$ 。2001年2月7日に出願された米国特許出願番号09/779,693および2000年2月14日に出願された米国特許出願番号60/182166を参照のこと。式中の「Z」は、D-アルギニンまたはL-アルギニンである。「Y」は、グアニジル部分またはアミジニル部分を含まないアミノ酸である。添え字「n」は、2~25の範囲の整数である。

40

【0057】

上記の輸送部分の式において、文字「Y」は、天然のアミノ酸または非天然のアミノ酸を表す。このアミノ酸は、本質的に、アミノ基(NH_2 または NH -アルキル)およびカルボン酸基(CO_2H)を(輸送部分への組込みの前に)有し、そしてグアニジル部分もアミジニル部分も含まない任意の化合物であり得る。このような化合物の例としては、D-アラニンおよびL-アラニン、D-システインおよびL-システイン、D-アスパラギン酸およびL-アスパラギン酸、D-グルタミン酸およびL-グルタミン酸、D-フェニルアラニンおよびL-フェニルアラニン、グリシン、D-ヒスチジンおよびL-ヒスチジン、D-イソロイシンおよびL-イソロイシン、D-リジンおよびL-リジン、D-ロイシンおよびL-ロイシン、D-メチオニンおよびL-メチオニン、D-アスパラギンおよび

50

L-アスパラギン、D-プロリンおよびL-プロリン、D-グルタミンおよびL-グルタミン、D-セリンおよびL-セリン、D-スレオニンおよびL-スレオニン、D-バリンおよびL-バリン、D-トリプトファンおよびL-トリプトファン、D-ヒドロキシプロリンおよびL-ヒドロキシプロリン、D-チロシンおよびL-チロシン、サルコシン、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸ならびに ϵ -アミノカプロン酸が挙げられる。上記のそれぞれの式において、各Yは、輸送部分に存在する任意の他のYから独立しているが、いくつかの実施形態において、全てのY基は、同じであり得る。

【0058】

好ましい実施形態の1つの群において、輸送部分は、式 $(ZYZ)_n Z$ を有し、ここで、各「Y」は、グリシン、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸および ϵ -アミノカプロン酸から独立して選択され、「Z」は、好ましくはL-アルギニンであり、そしてnは、好ましくは、2～5の範囲の整数である。より好ましくは、各「Y」は、グリシンまたは ϵ -アミノカプロン酸であり、そしてnは3である。実施形態のこの群において、グリシンの使用は、輸送部分が、組成物全体が、組換え方法によって調製され得るような、ポリペプチド生物学的薬剤に直接融合されるか、または共有結合される組成物にとって好ましい。例えば、固相方法を用いて輸送部分が収集される実施形態において、 ϵ -アミノカプロン酸が好ましい。

10

【0059】

別の好ましい実施形態において、輸送部分は式 $(ZY)_n Z$ を有し、ここで各「Y」は、好ましくはグリシン、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸および ϵ -アミノカプロン酸から選択され、「Z」は、好ましくはL-アルギニンであり、そしてnは、好ましくは、4～10の範囲の整数である。より好ましくは、各「Y」は、グリシンまたは ϵ -アミノカプロン酸であり、そしてnは6である。特定の実施形態の上記の群と同様に、グリシンの使用は、輸送部分が、組成物全体が組換え方法によって調製され得るような、ポリペプチド生物学的薬剤に直接融合されるか、または共有結合される組成物にとって好ましい。輸送部分の溶液または固相構築物について、 ϵ -アミノカプロン酸が好ましい。

20

【0060】

好ましい実施形態のなお別の群において、輸送部分は、式 $(ZYYY)_n Z$ を有し、ここで、各「Y」は、好ましくは、グリシン、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸および ϵ -アミノカプロン酸から選択され、「Z」は、好ましくは、L-アルギニンであり、そしてnは、好ましくは、4～10の範囲の整数である。より好ましくは、各「Y」は、グリシンまたは ϵ -アミノカプロン酸であり、そしてnは6である。

30

【0061】

好ましい実施形態のなお別の群において、輸送部分は、式 $(ZYYYY)_n Z$ を有し、ここで、各「Y」は、好ましくは、グリシン、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸および ϵ -アミノカプロン酸から選択され、「Z」は、好ましくはL-アルギニンであり、そしてnは、好ましくは、4～10の範囲の整数である。より好ましくは、「Y」はグリシンであり、そしてnは6である。

【0062】

他の実施形態において、それぞれのY基は、輸送部分の特定の所望の特性を増強するように選択される。例えば、より疎水性の特徴を有する輸送部分が所望される場合、各Yは、代表的に疎水性アミノ酸（例えば、フェニルアラニン、フェニルグリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン）として一緒にグループ化される、天然に存在するアミノ酸から選択され得る。同様に、いくつかのまたは全てのY基が親水性アミノ酸（例えば、リジン、セリン、スレオニン、グルタミン酸など）である場合、より親水性の特徴を有する輸送部分が、調製され得る。

40

【0063】

当業者は、輸送部分が、より大きいポリペプチド内のポリペプチドフラグメントであり得ることを理解する。例えば、輸送部分は、この部分に隣接するさらなるアミノ酸をなお有する式 $(ZYYY)_n Z$ （例えば、 $X_m (ZYYY)_n Z - X_p$ 、ここで、添え字mおよびp

50

は、0～約10の整数を表し、そして各Xは、独立して天然アミノ酸または非天然アミノ酸である）であり得る。

【0064】

（他のサブユニット）

アミノ酸以外のサブユニットはまた、輸送ポリマー形成における使用のために選択され得る。このようなサブユニットとしては、ヒドロキシアミノ酸、N-メチルーアミノ酸アミノアルデヒドなどが挙げられ得るが、これらに限定されず、これらは還元されたペプチド結合を有するポリマーを生じる。他のサブユニット型が、次の節に議論されるような、選択された骨格の性質に依存して使用され得る。

【0065】

（B. 骨格）

送達増強トランスポーターに含まれるグアニジノ部分および／またはアミジノ部分は、一般に線状の骨格に結合される。この骨格は、炭素、窒素、酸素、硫黄およびこのリン骨格鎖原子の大部分は代表的に炭素からなる種々の原子型を含み得る。末端グアニジノ基またはアミジノ基を含む複数の側鎖部分が、骨格に結合される。隣接の側鎖部分間の間隔は、代表的に一定であるが、本発明において使用される送達増強トランスポーターはまた、骨格に沿って側鎖部分間の種々の間隔を含み得る。

【0066】

より詳細な骨格リストとしては、N-置換アミド（CONRは、CONH結合を置換する）、エステル（CO₂）、還元されたケト-メチレン（COCH₂）またはメチレンアミノ（CH₂NH）、チオアミン（CSNH）、ホスフィネート（PO₂RCH₂）ホスホアミデートおよびホスホアミデートエステル（PO₂RNH）、レトロペプチド（NHCO）トランス-アルケン（CR=CH）、フルオロアルケン（CF=CH）、ジメチレン（CH₂CH₂）、チオエステル（CH₂S）ヒドロキシエチレン（CH(OH)CH₂）、メチレンオキシ（CH₂O）、テトラゾール（CN₄）、レトロチオアミド（NHCS）、レトロ還元された（retroreduced）（NHCH₂）、スルホンアミド（SO₂NH）、メチレンスルホンアミド（CHRSO₂NH）、レトロスルホンアミド（NHRSO₂）、およびペプトイド（N-置換アミド）、およびマロネートサブユニットおよび／またはgem-ジアミノ-アルキルサブユニットを有する骨格（例えば、Fletcherら、（（1998）Chem. Rev. 98：763）により概説され、そして本明細書中で引用される参考文献によって詳述される。前述の置換基の多くは、ほとんどα-アミノ酸から形成される骨格に対して、ほぼ等配電子が挙げられる。ポリマー骨格を生じる。

【0067】

上記で意図されるように、ペプトイド骨格において、側鎖は、炭素原子よりもむしろ窒素原子の骨格に結合される。（例えば、Kessler（1993）Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32：543；Zuckermanら（1992）Chemtracts-Macromol. Chem. 4：80；およびSimonら（1992）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89：9367を参照のこと）。適切なペプトイド骨格の例は、ポリ-（N-置換）グリシン（ポリ-NSG）である。ペプトイドの合成は、例えば、米国特許第5,877,278号に記載される。用語が本明細書中で使用される場合、ペプトイド骨格を有するトランスポーターは、「非ペプチド」トランスポーターと考えられる。なぜならば、このトランスポーターは、天然に存在する側鎖位置を有するアミノ酸から構成されるからである。ペプトイド骨格を含む非ペプチド骨格は、増強された生物学的安定性（例えば、インビボでの酵素的分解に対する耐性）を提供する。

【0068】

C. 送達増強トランスポーターの合成

送達増強トランスポーターは、当該分野で公知の任意の技術により構築される。例示のペプチドポリマーは、合成的に、好ましくはペプチド合成機（例えば、Applied B

10

20

30

40

50

iosystems Model 433) を使用して作製され得るか、または当該分野で周知の方法により組み換え的に合成され得る。組み換え合成は一般的に、この送達増強トランスポーターが目的のポリペプチドまたはタンパク質と融合されるペプチドである場合に使用される。

【0069】

N-メチルアミノ酸およびN-ヒドロキシアミノ酸は、固相ペプチド合成において、従来のアミノ酸に置き換えられ得る。しかし、還元性のペプチド結合を有する送達増強トランスポーターの産生は、還元性のペプチド結合を含む二量体アミノ酸の合成を必要とする。このような二量体は、標準的な固相合成手法を使用してポリマー内に組み込まれる。他の合成手法は周知であり、そして、例えば、Fletcherら(1998) Chem. Rev. 98:763、Simonら(1992) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:9367、およびこれらの中に記載される引用文献の中に見出され得る。

10

【0070】

本発明の送達増強トランスポーターは、1つ以上の(例えば、グリシン、アラニン、およびシステインのような)非グアニジノ/非アミジノサブユニット、またはリンカー(例えば、アミノカプロン酸基)の末端を有し得、それらはその対応する送達増強トランスポーターを含む結合体の、組織縦断層の輸送の度合に、有意には影響しない。また、任意の遊離アミノ末端基は、インビボのユビキチン化を避けるために、保護基(例えば、アセチル基またはベンジル基)でキャップされ得る。

20

【0071】

このトランスポーターがペプチドポリマーである場合、1つの合成方法は以下の工程を包含する: 1) ペプチドポリアミンを塩基およびピラゾール-1-カルボキシアミジンで処理して、混合物を提供する; 2) この混合物を加熱し、次いで放置して冷ます; 3) この冷ました混合物を酸性化する; そして4) この酸性化した混合物を精製する。好ましくは、工程1にて使用される塩基は炭酸塩(例えば、炭酸ナトリウム)であり、そして加熱工程2は、混合物を約24時間と約48時間の間にわたり約50℃に加熱する工程を包含する。精製工程は、好ましくは、クロマトグラフィー(例えば、逆相HPLC)を含む。

【0072】

D. 生物学的に活性な薬剤との輸送ポリマーの結合

輸送される薬剤は、多くの実施形態に従って、送達増強トランスポーターと連結され得る。1つの実施形態において、この薬剤は、送達増強トランスポーターの末端との連結を介するか、または適切な連結基を介してその試薬の中の内部サブユニットとの連結を介するかのいずれかで、単一の送達増強トランスポーターと連結される。

30

【0073】

第2の実施形態において、この薬剤は上記と同様の様式で、1つより多くの送達増強トランスポーターと結合される。この実施形態は、隣接細胞の架橋を導き得るため、余り好ましくない。

【0074】

第3の実施形態において、この結合体は、送達増強トランスポーターの各々の末端と結合される2つの薬剤部分を含む。この実施形態に関して、その薬剤が10kDa未満の分子量を有することが、現在好まれる。

40

【0075】

先に述べた第1および第3の実施形態に関して、この薬剤は、一般的に、グアニジノ側鎖またはアミジノ側鎖が標的の膜と自由に相互作用するように、任意の一方のグアニジノ側鎖またはアミジノ側鎖とは結合されない。

【0076】

本発明の結合体は、直接的な合成スキームにより調製され得る。さらに、これら結合体生成物は、通常は、長さおよび組成が実質的に均一であり、そのためこれら生成物は不均一

50

な混合物よりも強力な効果の一貫性および再現性を提供する。

【0077】

本発明の重要な局面に従って、任意の種々の型の生物学的に活性な薬剤との単一の送達増強トランスポーターの結合が、結合体中に巨大な疎水性部分の存在を必要とせず、1層以上の上皮組織および内皮組織の中への、およびそれらを透過した、薬剤の取り込み割合を実質的に増強するのに十分であることが、本出願人らにより見出されている。実際に、巨大な疎水性部分を結合させることは、上皮組織または内皮組織を構成する細胞の脂質二重層への疎水性部分の接着に起因した、層横断輸送を有意に妨害し得るか、または阻害し得る。従って、本発明は、実質的な疎水性部分（例えば、脂質分子および脂肪酸分子）を含まない結合体を包含する。

10

【0078】

本発明の送達増強トランスポーターは、化学的方法または組み換え方法により、生物学的に活性な薬剤と共有結合で結合され得る。

【0079】

（1. 化学的連結）

小有機分子および高分子のような生物学的に活性な薬剤は、当該分野で公知である多くの方法（例えば、Wong, S. S. 編、Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991) 参照のこと）を介して、（例えば、カルボジイミドを用いて）直接的に、または連結部分を介してのいずれかで、本発明の送達増強トランスポーターと連結され得る。特に、カルバメート結合、エステル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、およびヒドラゾン結合は、一般的に、形成が容易であり、そして大部分の適用に適している。エステル結合およびジスルフィド結合は、細胞膜を横断する物質の輸送の後、この結合が細胞質で直ちに分解されるべき場合に好まれる。

20

【0080】

種々の官能基（ヒドロキシル、アミノ、ハロゲン、等）は、輸送ポリマーと生物学的に活性な薬剤を結合させるために使用され得る。生物学的に活性な薬剤の活性部位の一部であることが公知でない基は、特にポリペプチドまたはその任意の部分が送達後にこの物質と結合したままであるべき場合に、好ましい。

【0081】

ポリマー（例えば、PCT出願US98/10571（公開番号 WO9852614）に記載されるように生成されたペプチド）は、一般的に、アミノ末端保護基（例えば、FMOC）を用いて作製される。このポリペプチドを合成樹脂から開裂させ、そしてその側鎖を脱保護するために使用される条件に残存し得る生物学的に活性な薬剤のために、このFMOCは、その薬剤が遊離のN末端アミンと連結され得るように、完成して樹脂に結合したポリペプチドのN末端から開裂され得る。このような場合に、結合される薬剤は、典型的に当該分野で周知の方法によって活性化されて、ポリマーのアミノ基とアミド結合またはカルバメート結合を効率的に生成する、活性エステル部分または活性カルボネート部分をそれぞれ生成する。無論、他の連結化学反応もまた使用され得る。

30

【0082】

副反応を最小限にするよう役立てるため、グアニジノ部分およびアミジノ部分は、従来の保護基（例えば、カルボベンジルオキシ基（CBZ）、ジ-tert-BOC、PMC、Pbf、N-NO₂ など）を使用して保護され得る。

40

【0083】

カップリング反応は、任意の多数の溶媒（例えば、N, N-ジメチルホルムアミド（DMF）、N-メチルピロリジノン、ジクロロメタン、水など）の中での公知のカップリング法により実施される。例示的なカップリング試薬として、例えば、O-ベンゾトリアゾリルオキシテトラメチルウロニウム、ヘキサフルオロリン酸塩（HATU）、ジシクロヘキシルカルボジイミド、プロモートリス（ピロリジノ）ホスホニウムブロミド（PyBrop）、などが挙げられる。他の試薬としては、例えば、N, N-ジメチルアミノピリジン

50

(DMA P)、4-ピロリジノピリジン、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、などが含まれ得る。

【0084】

(2. 融合ポリペプチド)

本発明の送達増強トランスポーターは、当該分野で周知の方法に従って、目的のポリペプチドおよびその送達増強トランスポーターを含む融合タンパク質のベクターを構築することにより、組み換え方法により生物学的に活性なポリペプチド薬剤と結合され得る。一般的に、その送達増強トランスポーターの成分は、目的のポリペプチドのC末端またはN末端に、必要に応じて短いペプチドリンカーを介して、結合される。

【0085】

(3. 放出可能なリンカー)

現在の好ましい実施形態において、生物学的に活性な薬剤は、特異的に開裂可能であるか、または放出可能である結合を使用して、送達増強トランスポーターと結合される。そのような結合の使用は、結合された送達増強トランスポーターが放出されるまで不活性である生物学的に活性な薬剤にとって、特に重要である。いくつかの場合において、送達増強トランスポーターと結合された薬物分子からなる結合体は、プロドラッグといわれ得、この場合、薬物からの送達増強トランスポーターの放出の結果、不活性型から活性型への薬物の転換を生じる。本明細書中で使用される場合、結合体の「開裂した」もしくは「開裂」、またはリンカーの「開裂した」もしくは「開裂」とは、トランスポーター分子からの生物学的薬剤の放出、それによる活性な生物学的薬剤の放出をいう。「特異的に開裂可能な」または「特異的に放出可能な」とは、トランスポーターが分解されること（例えば、タンパク質消化性の分解）よりもむしろ、開裂するトランスポーターと薬剤との間の結合をいう。

【0086】

いくつかの実施形態において、この結合は容易に開裂可能な結合であり、インビボに見出される条件下で開裂することが可能であることを意味する。従って、上皮組織および／または内皮組織の1つ以上の層の中への、そしてその層を介した透過の際、薬剤は、送達増強トランスポーターから放出される。容易に開裂可能な結合とは、例えば、特異的な活性（例えば、エステラーゼ、プロテアーゼ、ホスファターゼ、ペプチダーゼ、など）を有する酵素により、または加水分解により開裂される結合である。この目的のために、カルボン酸エステルおよびジスルフィド結合を含むリンカーが時折好ましく、そこでは前者の基は酵素的にまたは化学的に加水分解され、そして後者の基は、例えばグルタチオンの存在下において、ジスルフィド交換により供給される。この結合は、結合が上皮組織または内皮組織の1つ以上の層中に存在することが公知である酵素的活性により開裂可能であるように、選択され得る。例えば、皮膚の顆粒層は、比較的高い濃度のN-ペプチダーゼ活性を有する。

【0087】

特異的に開裂可能なリンカーは、トランスポーター分子上に設計され得る。例えば、プロテアーゼ認識部位、または他のそのような特異的に認識される酵素開裂部位を構成するアミノ酸は、トランスポーターを薬剤と連結するために使用され得る。あるいは、例えば、光または他の刺激への曝露により開裂可能である化学的リンカーまたは他の種類のリンカーは、目的の薬剤とトランスポーターを連結するために使用され得る。

【0088】

送達される薬剤および送達増強トランスポーターが、特異的に開裂可能なリンカーまたは特異的に放出可能なリンカーにより連結される結合体は、半減期を有する。本文脈においてこの用語「半減期」とは、上皮膜または内皮膜にこの結合体を投与した後、結合体の半量が分離されて遊離の薬剤を放出するのに要する時間量をいう。いくつかの実施形態についての半減期は、代表的に5分と24時間の間であり、そしてより好ましくは、30分と2時間の間である。結合体の半減期は、本発明に従って、以下に記載されるように「調整」され得るか、または改変され得る。

10

20

30

40

50

【0089】

いくつかの実施形態において、リンカーの開裂度合はpH依存性である。例えば、リンカーは酸性pH（例えば、pH6.5以下、より好ましくは約6以下、そしてさらにより好ましくは約5.5以下）において、薬剤と送達増強トランスポーターとの間の安定な連結を生成し得る。しかし、この結合体が生理学的なpH（例えば、pH7以上、好ましくは約pH7.4）に置かれた場合、このリンカーは開裂を受けて薬剤を放出する。このようなpH感受性は、例えば、プロトン化された場合（すなわち酸性pHにて）、求核剤として作用しない官能基を含むことにより獲得され得る。より高い（例えば、生理学的な）pHにて、この官能基はもはやプロトン化されず、従って求核剤として作用し得る。適切な官能基の例として、例えば、NおよびSが挙げられる。当業者は、自己開裂が起こるpHをうまく調整するために、このような官能基を使用し得る。

10

【0090】

別の実施形態において、この連結部分は自己犠牲を介して開裂される。輸送部分—生物学的に活性な化合物の結合体中のそのような連結部分は、生物学的に活性な化合物から遠位の求核剤（例えば、酸素、窒素および硫黄）および生物学的に活性な化合物に近位の開裂基（例えば、エステル、炭酸塩、カルバメート、およびチオカルバメート）を含む。開裂可能な基への求核剤の分子内攻撃の結果、共有結合の切断が生じ、それによって生物学的に活性な化合物から連結部分を放出する。

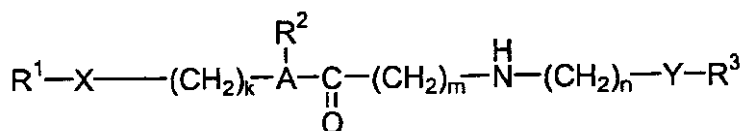
【0091】

自己犠牲の連結部分を含む結合体の例（例えば、生物学的に活性な薬剤—L—輸送部分の結合体）は、構造3、4および5により表される：

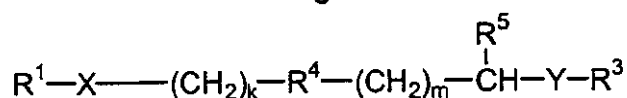
20

【0092】

【化7】

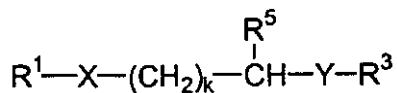


3



30

4



5

40

ここで：R¹は生物学的に活性な化合物であり；Xは、生物学的に活性な化合物上の官能基と、連結部分上の末端の官能基との間に生成される、連結であり；Yは輸送部分上の官能基および連結部分上の官能基から生成される連結であり；AはNまたはCHであり；R²は水素、アルキル、アリール、アリールアルキル、アクリルまたはアリルであり；R³は輸送部分であり；R⁴はS、O、NR⁶またはCR⁷R⁸であり；R⁵はH、OH、SHまたはNHR⁶であり；R⁶は水素、アルキル、アリール、アクリルまたはアリルであり；R⁷およびR⁸は独立して水素またはアルキルであり；kおよびmは独立して1または2のいずれかであり；そしてnは1～10までの範囲の整数である。XおよびYの連結の非限定的な例は、（いずれかの方向で）：—C(O)O—、—C(O)NH—、—OC

50

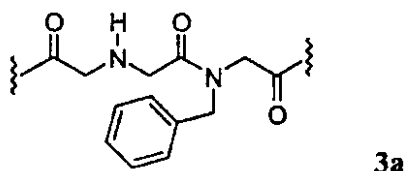
(O)NH-、-S-S-、-C(S)O-、-C(S)NH-、-NHC(O)NH-、-SO₂NH-、-SONH-、リン酸エステル、ホスホネートおよびホスフィン酸エステルである。当業者は、生物学的薬剤がヒドロキシ官能基を有する場合、Xが好ましくは-OC(O)-または-OC(O)NH-であることを理解する。同様に、連結基が輸送部分のアミノ末端と結合される場合、Yは好ましくは-C(O)NH-、-NHC(O)NH-、-SO₂NH-、-SONH-または-OC(O)NH-などである。上に提供された各々の基において、NHは簡略のために示されるが、各々の連結(XおよびY)は、置換された(例えば、N-アルキルまたはN-アシル)連結もまた含み得る。

【0093】

構造3、実施例および好ましい実施形態により例示される連結基の第一の分岐は、式3a 10
に例示される：

【0094】

【化8】



ここで、波線は輸送部分との結合点および生物学的に活性な薬剤との結合点を示す。この連結基を含む結合体の調製は、実施例19(図6)中に例示される。この実施例および図 20
6において、シクロスポリンAを無水クロロ酢酸で処理して、クロロ酢酸エステル6i(図6中の番号付け)を生成し、次いでこれをベンジルアミンと結合させてN-ベンジルグリシン結合体6iiを生成する。Boc保護された無水ジグリシンとのグリシン結合体の縮合は、酸6iiiを提供し、これをより反応性の高いN-ヒドロキシスクシンイミドエステル6ivへと転換して、次いで輸送部分のアミノ末端と結合してアミド結合を生成する。当業者は、このN-ベンジル基が他の基(例えば、アルキル、アリール、アリルなど)と置換され得ること、またはメチレン基が、例えばエチレン、プロピレンなどと置き換えられ得ることを理解する。好ましくは、このメチレン基は、3aに示されるように保持され、その結合をインビボで開裂し得る、適切な立体方向性または空間方向性を提供する(図6B参照のこと)。

【0095】

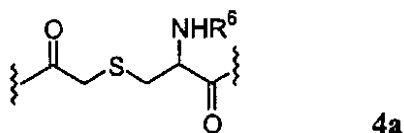
従って、構造3について、以下の置換基が好ましい：AはNであり；R²はベンジルであり；k、mおよびnは1であり；Xは-OC(O)-であり、そしてYは-C(O)NH-である。

【0096】

構造4の結合は、式4aにより例示される：

【0097】

【化9】

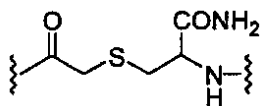


ここで、上記の様に、波線は、各々の輸送部分および生物学的に活性な薬剤との結合点を示す。式4aの連結基を有する結合体の調製は、実施例20～22中に示される。実施例19(図39のスキームを参照のこと)において、アシクロビルは無水α-クロロ酢酸でアシル化されてα-クロロ酢酸エステル39iを生成する。N末端システイン残基を有するD-アルギニンの七量体との39iの反応は、チオエーテル生成物39iiを提供する。あるいは、アシクロビルα-クロロ酢酸エステルとC末端システイン残基を有するD-アルギニンの七量体との間に生成される同様の結合を使用して、アシクロビルを輸送部分のC末端と結合し得る。この例において、そのシステイン残基は、C末端のアミドとして 50

r₇ 輸送部分上に提供され、そしてこの結合は構造：

【0098】

【化10】



を有する。

【0099】

従って、好ましい実施形態の一群において、この結合体は式5により表され、ここで、Xは-O-C(O)-であり；Yは-C(O)-NH-であり；R⁴はSであり；R⁵はNHR⁶であり；そして添え字kおよびmは各々1である。好ましい実施形態の別の群において、この結合体は式2により表され、ここで、Xは-O-C(O)-であり；Yは-NHC(O)-であり；R⁴はSであり；R⁵はCONH₂であり；そして添え字kおよびmは各々1である。特に好ましい結合体は、R⁶が水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルである結合体である。

【0100】

適切に保護されたジカルボン酸またはジアミンもまた、特定の生物学的薬剤と共に有用であるが、式6中に示される結合体により表される連結基は、一般的にヘテロな二機能性の型（例えば、ε-アミノカプロン酸、セリン、ホモセリン、γ-ブチル酪酸など）である。

【0101】

構造6に関して、以下の置換基が好ましい：R⁵はNHR⁶であり（ここで、R⁶は水素、メチル、アリル、ブチルまたはフェニルである）；kは2であり；Xは-C(O)-O-であり；そしてYは-C(O)-NH-である。

【0102】

自己犠牲のリンカーは、代表的に、37℃の、pH約7.4の水中で、約10分と約24時間の間の半減期を有する分子内開裂を受ける。好ましくは、この開裂の半減期は、37℃で約7.4のpHでの水中で、約20分と約4時間の間である。より好ましくは、この開裂の半減期は、37℃で約7.4のpHでの水中で、約30分と約2時間の間である。

【0103】

構造3を有する結合体に関して、当業者は、種々のR²置換基により開裂の半減期を調節し得る。増加または減少した大きさのR²を使用して、当業者は、それぞれより長い半減期またはより短い半減期を有する結合体を獲得し得る。構造3中のR²は、好ましくはメチル、エチル、プロピル、ブチル、アリル、ベンジルまたはフェニルである。

【0104】

自己犠牲のリンカー中に塩基性基または酸性基がある場合、当業者はしばしば結合体の溶液のpHに従って、開裂の半減期を調節し得る。例えば、構造3の骨格のアミン基は、酸性pH（例えば、pH5.5）でプロトン化される。このアミンは、プロトン化される場合、分子内開裂を誘導する求核剤としては利用不可能である。しかし、生理学的pH（7.4）の媒質中への結合体の導入の際、このアミンは、半減期の有意な一部の時間に非プロトン化される。この開裂の半減期は、それに相応して減少する。

【0105】

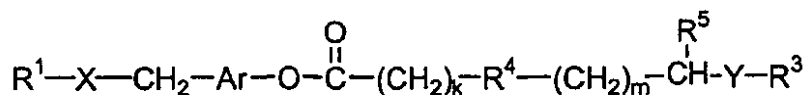
1つの実施形態において、自己犠牲のリンカーの開裂は2段階で生じる：連結部分の一部の開裂を生じる、求核基の分子内反応；および、連結部分の残存部分の脱離である。この開裂の第1段階は、速度制限的であり、そしてpH感受性および半減期についてうまく調整され得る。

【0106】

構造6は、輸送部分—生物学的に活性な化合物の結合体中に組み込まれる、2段階の自己犠牲の部分の例である：

【0107】

【化 1 1】



6

ここで： R^1 は生物学的に活性な化合物であり； X は、生物学的に活性な化合物上の官能基と、連結部分上の官能基との間の連結を表し； Ar は置換または非置換のアリール基であり（ここでそのメチレン置換基およびフェノールの酸素原子がお互いにオルトまたはパラのいずれかである）； R^3 は輸送部分であり； R^4 は S 、 O 、 NR^6 または CR^7R^8 であり； R^5 は H 、 OH 、 SH または NHR^6 であり； R^6 は水素、アルキル、アリール、アリールアルキル、アシルまたはアリルであり； R^7 および R^8 は独立して水素またはアルキルであり；そして k および m は独立して 1 または 2 のいずれかである。

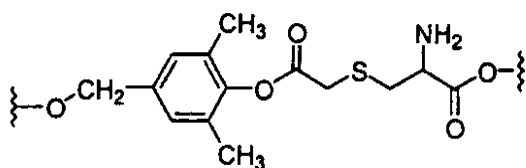
10

【0 1 0 8】

式 6 の結合体を生成するための適切な連結基の例は：

【0 1 0 9】

【化 1 2】



6a

20

である。

【0 1 1 0】

式 6 a の連結基を含む結合体の構造は、実施例 2 3（図 4 1 もまた参照のこと）中に提供される。この実施例（および図）において、2，4-ジメチル-4-ヒドロキシメチルフェノール（4 1 i）の α -クロロ酢酸エステルは、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）および 4-ジメチルアミノピリジン（DMA P）を使用してレチノイン酸（4 1 i i）とカップリングされ、中間体 4 1 i i i を生じる。アルギニン七量体の輸送部分の N 末端にあるシステイン残基との、4 1 i i i の続くカップリングにより、標的の結合体 4 1 i v を生じる。

30

【0 1 1 1】

好ましくは、式 6 の結合体中に使用される連結基は、 Ar が置換または非置換のフェニル基であり； R^4 が S であり； R^5 が NHR^6 であり（ここで R^6 は水素、メチル、アリル、ブチル、アセチルまたはフェニルである）； k および m は 1 であり； X は $-C(O)O-$ であり；そして Y は $-C(O)O-$ または $-C(O)NH-$ である、基である。より好ましくは、 R^6 は水素またはアセチルである。

【0 1 1 2】

上記の連結基はアルギニン七量体を含む結合体に関して記載されているが、当業者はこの技術が本発明の「間隙の」アルギニン輸送部分との結合体に容易に適用されることを理解する。

40

【0 1 1 3】

本発明の使用に対して、なお他に有用な連結基は、同時係属 PCT 出願中に記載されている。例えば、同様の組成物（例えば、生物学的に活性な薬剤および輸送オリゴマー）に対する連結基を記載する、PCT 出願 US 9 8 / 1 0 5 7 1（公開番号 WO 9 8 5 2 6 1 4）および US 0 0 / 2 3 4 4 0（公開番号 WO 0 1 / 1 3 9 5 7）を参照のこと。これら出願中に記載される連結技術は、本発明の組成物において、同様の様式で使用され得る。

【0 1 1 4】

50

従って、実施形態の1群において、連結部分は、生物学的に活性な化合物から遠位の第一の開裂可能な基、および生物学的に活性な化合物に近位の第二の開裂可能な基を含む。第一の開裂可能な基の開裂は、第二の開裂可能な基と分子内で反応し得る求核剤を生成して、それによって生物学的に活性な化合物から連結部分を開裂させる。第一の基が開裂される方法の例として、光照射および酵素に媒介される加水分解が挙げられる。この方法論は、PCT出願US 98/10571（公開番号 WO 98 52614）中に論じられる、種々の関連低分子の結合体に関して例示されている。

【0115】

1つのアプローチにおいて、結合体は、PCT出願US 00/23440（公開番号 WO 01/13957）（PCT出願US 98/10571（公開番号 WO 98 52614）もまた参照のこと）の図5A中に図示されるように、ジスルフィド結合を含み得、この出願は、リンカーとして役立つN-アセチル保護されたシステイン基により、細胞傷害性薬剤の6-メルカプトプリンと連結された輸送ポリマーTを包含する、結合体（I）を示す。従って、この細胞傷害性薬剤はジスルフィド結合により6-メルカプト基と結合されて、そしてこの輸送ポリマーはアミド結合を介してシステインカルボニル部分と結合される。還元またはジスルフィド交換によるジスルフィド結合の開裂は、遊離した細胞傷害性薬剤の放出を生じる。ジスルフィド含有結合体を合成する方法は、PCT出願US 98/10571の実施例9A中に提供される。そこで記載される生成物は、N-アセチル-Cys-Ala-Alaリンカーにより6-メルカプトプリンと連結されるArg残基の七量体を含み、ここでこのAla残基は、そのジスルフィドをチオールにより接近させるための追加のスペーサー、そして細胞内の開裂のための還元剤として含まれる。この例におけるリンカーもまた、アミド結合の使用を例示し、そしてこの結合は細胞内で酵素的に開裂され得る。

【0116】

別のアプローチにおいて、この結合体は、電磁照射への曝露で開裂する、光開裂可能なリンカーを含む。この方法論の適用は、メタ-ニトロベンゾエートの連結部分を介して6-メルカプトプリンに連結される輸送ポリマーTを含む結合体（II）を示す、PCT出願US 00/23440（公開番号 WO 01/13957）の図5B中で、関連システムに対して提供される。ポリマーTはベンゾエートカルボニル基とのアミド結合によりニトロベンゾエート部分と連結され、そして細胞傷害性薬剤はその6-メルカプト基を介してp-メチレン基と結合される。この化合物は、NaOCH₃/メタノールの存在下で加熱しながら、6-メルカプトプリンをp-ブロモメチル-m-ニトロ安息香酸と反応させ、続いてそのベンゾエートカルボン酸の輸送ポリマー（例えば、ポリマーと結合したγ-アミノ酪酸リンカーのアミノ基（例えば、PCT出願US 98/10571の実施例9Bもまた参照のこと））とのカップリングにより、生成され得る。結合体の光照射は、メルカプトメチル部分にオルトであるニトロ基により、6-メルカプトプリンの放出を生じる。このアプローチは、特に生体の選択した領域への局所的な薬物活性化のため、当該分野で公知の光療法における利用を見出す。

【0117】

好ましい実施形態の一群では、以下のアプローチによって例示されるように、切断可能なリンカーは、生物学的に活性な薬剤からオリゴマーを切断するように協同し得る第1および第2の切断可能な基を含む。すなわち、切断可能なリンカーは、この薬剤に対して遠位にある第1の切断可能な基、およびこの薬剤に対して近位にある第2の切断可能な基を含み、その結果、第1の切断可能な基の切断は、第2の切断可能な基を切断するために分子内で反応し得る求核性部分を含むリンカー-薬剤結合体を生じ、それによってリンカーおよびポリマーから薬剤を放出する。

【0118】

再度、共有に係る同時係属中のPCT出願US 00/23440（公開番号WO 01/13957）を参照する。このPCT出願US 00/23440において、図5Cは、抗癌剤である5-フルオロウラシル（5FU）に連結したトランスポーターポリマーTを含む

結合体 (I I I) を示す。この図において、連結は、改変されたリジル残基によって提供される。トランスポーターポリマーは、 α -アミノ基に連結され、そして5-フルオロウラシルは、 α -カルボニルを介して連結される。リジル ϵ -アミノ基は、 o -ヒドロキシメチルニトロベンゼンのカルバメートエステルに修飾されており、これは、結合体内に第1の光不安定で切断可能な基を含む。光照射は、結合体からニトロベンゼン部分を切断し、また迅速に分解して遊離 α -アミノ基 (有効な求核剤) を与えるカルバメートを残す。 α -アミノ基の、5-フルオロウラシル基に対するアミド連結との分子内反応は、5-フルオロウラシル基の放出と共に環化を導く。

【0119】

本発明において有用なさらに他のリンカーが、PCT出願US00/23440 (公開番号WO01/13957) において提供されている。特に、US00/23440の図5Dは、抗癌剤であるパクリタキセルの2'-酸素に連結した送達増強トランスポーターTを含む結合体 (I V) を例示する。この連結は、以下を含む連結部分によって提供される：(i) 送達増強トランスポーターに結合した窒素原子、(ii) 窒素原子に対してパラ位に位置するリン酸モノエステル、および(iii) 窒素原子に対してメタ位のカルボキシメチル基であり、これは、カルボキシレートエステル結合によってパクリタキセルの2'-酸素に結合される。結合体からのリン酸基の酵素的切断は、遊離したフェノールヒドロキシ基を与える。次いで、この求核基は、カルボキシレートエステルと分子内反応し、その生物学的標的に完全に結合し得る遊離パクリタキセルを放出する。PCT出願US98/10571の実施例9Cは、この型の結合体を調製するための合成プロトコールを記載している。

【0120】

さらに他の適切なリンカーが、PCT出願US00/23440 (公開番号WO01/13957) の図5Eにおいて例示されている。ここで提供されるアプローチにおいて、送達増強トランスポーターは、生物学的に活性な薬剤 (例えば、パクリタキセル) に、アミノアルキルカルボン酸によって連結される。好ましくは、リンカーアミノ基は、3~5個の鎖の原子 ($n=3\sim5$)、好ましくは、3個または4個のいずれかの鎖の原子 (これらは、好ましくは、メチレン炭素として提供される) によって、リンカーカルボキシ炭素に連結される。図5Eに見られるように、リンカーアミノ基は、アミド結合によって送達増強トランスポーターに結合され、エステル結合によってパクリタキセル部分に結合される。アミド結合の酵素的切断は、送達増強トランスポーターを放出して、そして遊離した求核アミノ基を生成する。次いで、この遊離したアミノ基は、エステル基と分子内反応して、パクリタキセルからリンカーを放出し得る。

【0121】

別のアプローチにおいて、結合体は、あるpHで不安定であるが、別のpHで安定であるリンカーを含む。例えば、PCT出願US00/23440 (公開番号WO01/13957) の図6は、生理学的pHで切断されるが、酸性pHで安定であるリンカーを有する結合体を合成する方法を例示する。好ましくは、このリンカーは、約6.6~約7.6のpHで水中において、切断される。好ましくは、このリンカーは、約4.5~約6.5のpHで水中において安定である。

【0122】

(送達増強トランスポーターの使用)

送達増強トランスポーターは、治療的適用、予防的適用および診断的適用における使用を見出す。この送達増強トランスポーターは、1層以上の皮膚または他の上皮組織 (例えば、胃腸、肺、眼など) 内に、およびそれらを横切って、あるいは、血液脳障壁のような上皮組織を横切って、診断的または生物学的に活性な試薬を運搬し得る。この特性により、この試薬は、それらの生物学的効果を発揮するために1層以上の組織層を横切って浸透しなければならない薬剤を送達することによって状態を処置するために有用となる。

【0123】

さらに、本発明のトランスポーターはまた、フリニ (f u r i n) インヒビターとして、

単独でかまたは別の治療剤もしくは他の化合物と組み合わせて使用され得る。例えば、種々のポリアルギニントランスポーターに加えて、本明細書中に記載される合成トランスポーター（ペプトイド、および天然には存在しないアミノ酸を含有する合成トランスポーターを含む）が、フリンを阻害するために使用され得る。例えば、Cameronら、J. Biol. Chem. 275 (47) : 36741-9を参照のこと。フリンは、種々のプロタンパク質をそれらの活性成分へと変換するプロテアーゼである。フリンの阻害は、例えば、ビルレンスまたは複製をフリン活性に依存するウイルスによる感染を処置するために有用である。例えば、Mollolyら、T. Cell Biol. 9 : 28-35 (1999)を参照のこと。

【0124】

10

同様に、本発明のトランスポーターは、カプテシンC (cathesin C) の有用なインヒビターである。例えば、特定のポリアルギニン化合物は、カプテシンCのインヒビターである。例えば、Hornら、Eur. J. Biochem. 267 (11) : 3330-3336 (2000)を参照のこと。同様に、本発明のトランスポーター（合成アミノ酸を含有するものを含む）は、カプテシンCを阻害するために有用である。

【0125】

本発明の1つの局面では、フリンインヒビターアッセイを使用して、さらなるトランスポーターについてスクリーニングし得る。例えば、候補のトランスポーター化合物を、標準的な競合アッセイを使用して、フリンまたはカプテシンCに結合するその能力についてポリアルギニンと競合するその能力を試験し得る。あるいは、候補のトランスポーターは、Cameronら（前出）およびHornら（前出）において考察されたように、フリンプロテアーゼ活性を阻害するその能力についてスクリーニングされ得る。次いで、特に活性な候補が、組織（例えば、上皮）中へのおよび／または組織（例えば、上皮）を横切るトランスポーターとして作用するその能力についてさらに試験され得る。

20

【0126】

本発明の組成物および方法は、ヒトのおよび獣医学的な治療の分野において、特に有用性を有する。一般的に、投与される用量は、エフェクター部位にpM~μMの濃度の治療用組成物を送達するのに有効である。適切な用量および濃度は、治療用の組成物または薬物、意図される送達の部位、および投与の経路のような因子に依存し、これらの全ては、当該分野で周知の方法に従って経験的に導き出され得る。さらなる指針は、当該分野で公知

30

【0127】

必要に応じて適切な薬学的賦形剤を伴う本発明の化合物の投与は、任意の受容された投与様式を介して実行され得る。従って、投与は、例えば、静脈内投与、局所的投与、皮下投与、経皮投与、筋肉内投与、経口投与、関節内投与、非経口投与、腹膜投与、鼻腔内投与または吸入であり得る。従って、投与の適切な部位として、皮膚、気管支、胃腸、肛門、膣、眼、および耳が挙げられるが、これらに限定されない。これらの処方物は、好ましくは、正確な用量の単回投与に適切な単位用量形態において、例えば、錠剤、丸剤、カプセル、散剤、溶液、懸濁液、エマルジョン、坐剤、保持浣腸 (retention enema)、クリーム、軟膏、ローション、エアロゾル、点眼剤などのような、固体、半固体、凍結乾燥した散剤、または液体投与形態の形態をとり得る。

40

【0128】

組成物は、代表的には、従来の薬学的キャリアまたは賦形剤を含み、さらに、他の医薬剤、キャリア、アジュバントなどを含み得る。好ましくは、この組成物は、本発明の化合物（単数または複数）の重量を基準に、約5%~75%であり、残りは適切な薬学的賦形剤からなる。適切な賦形剤は、当該分野で周知の方法（例えば、REMININGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、第18編、MacK Publishing Co., Easton, PA (1990)）によって、特定の組成物および投与の経路に合わせられ得る。

【0129】

50

経口投与のためには、このような賦形剤としては、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルク (talcum)、セルロース、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。この組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、散剤、持続性放出処方物などの形態をとり得る。

【0130】

いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、丸剤、錠剤またはカプセルの形態をとり、このようにして、この組成物は、生物学的に活性な結合体と共に、以下のいずれかを含み得る：ラクトース、スクロース、リン酸二カルシウムなどのような希釈剤；デンプンまたはその誘導体のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどのような潤滑剤；およびデンプン、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロースおよびそれらの誘導体のような結合剤。

10

【0131】

処方物の活性化合物は、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) キャリア (例えば、PEG 1000 [96%] および PEG 4000 [4%]) 中に配置される、約 0.5% ~ 約 50% の本発明の化合物を含む坐剤中に処方され得る。

【0132】

液体組成物は、キャリア (例えば、生理食塩水 (例えば、0.9% w/v 塩化ナトリウム)、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなど) 中に化合物 (約 0.5% ~ 約 20%)、および任意の薬学的アジュバントを溶解または分散することによって調製され、例えば、静脈内投与のための溶液または懸濁液を形成し得る。この活性化合物はまた、保持浣腸に処方され得る。

20

【0133】

所望される場合、投与される組成物はまた、湿潤剤または乳化剤、pH 緩衝剤 (例えば、酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、またはトリエタノールアミンオレアート) のような少量の非毒性補助物質を含み得る。

【0134】

局所投与の場合、組成物は、ローションまたは経皮パッチのような任意の適切な形式で投与される。吸入による送達の場合、この組成物は、乾燥散剤 (例えば、吸入治療剤) として、または噴霧器を介する液体形態で、送達され得る。

30

【0135】

このような投与形態を調製するための方法は、公知であるか、または当業者に明らかである；例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (前出) および同様の刊行物を参照のこと。投与される組成物は、どのような場合でも、本発明の教示に従って投与される際に処置される状態の軽減のために薬学的に有効な量の一定量のプロドラッグおよび/または活性化合物を含む。

【0136】

一般に、本発明の化合物は、治療的に有効な量、すなわち、処置をもたらすのに十分な用量で投与され、この用量は、処置される個体および状態に依存して変更する。代表的には、治療的に有効な 1 日の用量は、1 日あたり、体重 1 kg あたり 0.1 ~ 100 mg の薬物である。ほとんどの状態が、1 日あたり体重 1 kg あたり約 1 ~ 約 30 mg、すなわち 70 kg のヒトの場合、1 日あたり、約 70 mg ~ 2100 mg の総用量の投与に応答する。

40

【0137】

結合体の安定性は、組成および送達増強トランスポーターの骨格および側鎖の立体化学によってさらに制御され得る。ポリペプチド送達増強トランスポーターの場合、D-異性体は、一般に内在性プロテアーゼに対して耐性があり、それ故に、血清および細胞内のより長い半減期を有する。それ故に、D-ポリペプチドポリマーは、より長い期間の作用が所望される場合に適切である。L-ポリペプチドポリマーは、プロテアーゼに対するそれらの感受性に起因して、より短い半減期を有し、それ故に、より短い作用効果を付与するた

50

めに選択される。このことによって、副作用が観察されるとすぐに、治療を中止することによって、より容易に副作用が回避され得る。D-残基およびL-残基の混合物を含むポリペプチドは、中間安定性を有する。ホモ-D-ポリマーが、一般的に好ましい。

【0138】

(A. 皮膚への適用)

本発明の送達増強トランスポーターは、生物学的に活性な薬剤および診断的な薬剤の皮膚を横切る送達を可能にする。驚くべきことに、このトランスポーターは、以前には薬物送達に対してほぼ浸透不可能な障壁であった角質層を横切って薬剤を送達し得る。角質層、すなわち皮膚の最外層は、コレステロールおよび脂肪酸からなる「糊剤 (glue)」によって一緒に、しっかり結合される、死んだケラチン充填皮膚細胞のいくつかの層から構成される。一旦、この薬剤が本発明のトランスポーターによって角質層を通して送達されると、この薬剤は、角質層とともに表皮を構成する顆粒層、淡明層および胚芽層からなる生存可能な表皮に侵入し得る。本発明のいくつかの実施形態における送達は、表皮を通り、そして真皮 (乳頭真皮および網様真皮の1つまたは両方を含む) に入る。

10

【0139】

皮膚の1層以上の層の貫入を得るこの能力は、抗細菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、抗増殖剤、免疫抑制剤、ビタミン、鎮痛剤、ホルモンなどのような化合物の効力を非常に増強し得る。莫大なこのような化合物は、当業者に公知である (例えば、HardmanおよびLimbird, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, 1996を参照のこと)。

20

【0140】

いくつかの実施形態において、薬剤は、上皮組織内に存在する血管内に送達され、それにより、全身的にこの薬剤の送達のための手段を提供する。送達は、濾胞内もしくは濾胞間、またはその両方のいずれかであり得る。皮膚の前処置は、結合体の送達に必要とされない。

【0141】

他の実施形態において、送達増強トランスポーターは、皮膚状態を処置し得る化粧品および薬剤を送達するために有用である。目的の皮膚内の標的細胞として、例えば、線維芽細胞、上皮細胞および免疫細胞が挙げられる。例えば、トランスポーターは、真皮内に見られる免疫細胞に対する抗炎症剤のような化合物を送達する能力を提供する。

30

【0142】

糖質コルチコイド (アドレノコルチコイドステロイド) は、皮膚を横切る送達为本発明の送達増強トランスポーターによって増強され得る化合物の1つである。本発明の結合体化した糖質コルチコイドは、例えば、炎症性皮膚疾患を処置するのに有用である。例示的な糖質コルチコイドとして、例えば、ヒドロコルチゾン、プレニゾン (prenisone (デルタゾン (deltasone))) およびプレドリゾンロン (predrisone (ハイデルタゾル (hydeltsol))) が挙げられる。特定の状態の例として、湿疹 (アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎を含む)、水疱性疾患、コラーゲン脈管疾患、サルコイドーシス、スウィート病、壊疽性膿皮症、I型反応性らい病、毛細血管性血管腫、扁平苔癬、剥脱性皮膚炎、結節性紅斑、ホルモン異常 (挫瘡および多毛症を含む)、ならびに毒性表皮壊死症、多形性紅斑、皮膚性T細胞リンパ腫、円板状エリテマトーデスなどが挙げられる。

40

【0143】

レチノイドは、1層以上の皮膚または他の上皮組織もしくは内皮組織内への送達およびそれらを横切る送達を増強するために、本発明の送達増強トランスポーターを使用し得る生物学的に活性な薬剤の別の例である。現在使用されるレチノイドとして、例えば、レチノール、トレチノイン、イソトレチノイン、エトレチナート、アチトレチン (acitretin)、およびアロチノイド (arotinoide) が挙げられる。本発明の送達増強トランスポーターに結合したレチノイドを使用して処置可能である状態として、挫瘡、角

50

質化障害、皮膚癌、前癌状態、乾癬、皮膚老化、円板状エリテマトーデス、硬化性粘液水腫、いぼ状表皮神経、角層下膿疱性皮膚炎、ライター症候群、いぼ、扁平苔癬、黒色表皮肥厚症、サルコイドーシス、グロヴァー病、汗孔角化症などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0144】

細胞傷害性薬物および免疫抑制薬物は、本発明の送達増強トランスポーターが有用であるさらなるクラスの薬物を構成する。これらの因子は、乾癬のような過剰増殖疾患、ならびに水疱性皮膚疾患および白血球破碎性血管炎のような免疫疾患を処置するために通常使用される。本発明の送達増強トランスポーターに結合し得るこのような化合物の例として、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、アザチオプリン、フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、6-チオクアニン（*thioquinine*）、ミコフェノレート（*mycophenolate*）、クロランブシル、ビニクリスチン（*vinicristine*）、ビンブラスチンおよびダクチノマイシン）が挙げられるが、これらに限定されない。他の例は、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、メクロロエタミン塩酸塩（*mechloretamine hydrochloride*）、カルムスチンである。タキソール、タクロリムス（*tacrolimus*）およびビンブラスチンは、ダブソンおよびスルファサラジンのように、有用な生物学的薬剤のさらなる例である。シクロスポリン、FK506（タクロリムス）、およびラパマイシン（*rapamycin*）（例えば、米国特許第5,912,253号）のようなアスコマイシン（*ascomycin*））、ならびにこのような化合物のアナログのような免疫抑制剤が、特に関心が高い（例えば、Mollinsonら、*Current Pharm. Design* 4(5):367-380(1998)；米国特許第5,612,350号；同第5,599,927号；同第5,604,294号；同第5,990,131号；同第5,561,140号；同第5,859,031号；同第5,925,649号；同第5,994,299号；同第6,004,973号および同第5,508,397号）。シクロスポリンとして、例えば、シクロスポリンA、B、C、D、GおよびMが挙げられる。例えば、米国特許第6,007,840号；および同第6,004,973号を参照のこと。例えば、このような化合物は、乾癬、湿疹（アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎を含む）および円形脱毛症の処置に有用である。

【0145】

送達増強トランスポーターは、紅斑性狼瘡（円板状および全身性の両方）、皮膚筋炎、晩発性皮膚ポルフィリン症および多形光線疹のような状態を処置するために有用な薬剤と結合体化され得る。このような状態を処置するために有用な薬剤としては、例えば、キニーネ、クロロキン、ヒドロキシクロロキンおよびキナクリンが挙げられる。

【0146】

本発明の送達増強トランスポーターはまた、抗感染剤の経皮送達のために有用である。例えば、抗細菌剤、抗真菌剤および抗ウイルス剤が、送達増強トランスポーターに結合体化され得る。抗細菌剤は、挫瘡、皮膚感染などのような状態を処置するために有用である。抗真菌薬剤を用いて、体部白癬、足部白癬、爪真菌症、カンジダ症、でん風などを処置し得る。この結合体の送達増強特性に起因して、これらの結合体は、局所化した感染および広範に広がった感染の両方を処置するために有用である。抗真菌薬剤はまた、爪真菌症を処置するために有用である。抗真菌薬剤の例としては、イトラコナゾール、ミコナゾール（*myconazole*）およびフルコナゾールのようなアゾール抗真菌剤が挙げられるがこれらに限定されない。抗ウイルス薬剤の例としては、アシクロビル、ファンシクロビル（*famciclovir*）およびバラシクロビル（*valacyclovir*）が挙げられるがこれらに限定されない。このような薬剤は、ウイルス性疾患（例えば、ヘルペス）を処置するために有用である。

【0147】

本発明の送達増強トランスポーターへの結合体化による送達の増強が望ましい、生物学的に活性な薬剤の別の例は、抗ヒスタミン剤である。これらの薬剤は、蕁麻疹、アトピー性

10

20

30

40

50

皮膚炎、接触皮膚炎、乾癬などに起因するかゆみのような状態を処置するために有用である。このような試薬の例としては例えば、テルフェナジン、アステミゾール、ロロタジン (lorotadine)、セチリジン、アクリバスチン、テメラスチン (temelastine)、シメチジン、ラニチジン、ファモチジン、ニザチジンなどが挙げられる。三環系抗うつ剤もまた、本発明の送達増強トランスポーターを用いて送達され得る。

【0148】

表面抗乾癬薬物 (topical antipsoriasis drug) もまた目的のものである。コルチコステロイド、カルシポトリエン (calcipotriene) およびアントラリンのような薬剤は、本発明の送達増強トランスポーターに結合体化され得、そして皮膚に塗布され得る。

10

【0149】

本発明の送達増強トランスポーターはまた、皮膚および他の上皮組織の1以上の層内への、ならびに皮膚および他の上皮組織の1以上の層を通しての光化学療法剤の送達を増強するために有用である。このような化合物としては例えば、ソラレンなどが挙げられる。遮光剤成分もまた目的のものである；これらとしては、p-アミノ安息香酸エステル、シナメートおよびサリシレート、ならびにベンゾフェノン、アントラニレート (anthranilates) およびアボベンゾンが挙げられる。

【0150】

疼痛軽減剤および局所麻酔剤は、本発明の送達増強トランスポーターへの結合体化が処置を増強し得る別のクラスの化合物を構成する。リドカイン、ブピバカイン、ノボカイン、プロカイン、テトラカイン、ベンゾカイン、コカインおよびオピエートはとりわけ、本発明の送達増強トランスポーターに結合体化され得る化合物である。関節または関節付近の皮膚への疼痛軽減剤の適用 (例えば、慢性関節リウマチに罹患した患者における) もまた意図される。

20

【0151】

目的の他の生物学的薬剤としては例えば、ミノキシジル、角質溶解剤、破壊剤 (例えば、ポドフィリン、ヒドロキノン、カプサイシン、マソプロコール、コルヒチンおよび金) が挙げられる。

【0152】

慢性関節リウマチにおいて生じるような炎症性関節の処置もまた、本発明のトランスポーターに結合体化された、このような処置のために有用な化合物を用いて処置され得る。

30

【0153】

(B. 胃腸投与)

本発明の送達増強トランスポーターはまた、胃腸投与による結合体化薬物の送達のために有用である。胃腸投与は、全身的に活性な薬物および胃腸上皮において作用する薬物の両方について用いられ得る。

【0154】

送達増強トランスポーターに結合体化した適切な試薬を用いて処置され得る胃腸状態の中でも、クローン病のような炎症性腸疾患がある (例えば、シクロスポリン、FK506 およびアスコマイシン；アミノサリチル酸塩 (例えば、スルファサラジンおよびメサラミン)；コルチコステロイド、例えば、プレドニゾンおよびメチルプレドニゾン；免疫改変剤、例えば、アザチオプリン、6MP、メトトレキサート；ならびに抗生物質、例えば、メトロニダゾル、アンピシリン、シプロフロキサシンなど)。他の処置可能な胃腸状態としては、潰瘍性大腸炎、胃腸の潰瘍、消化性潰瘍疾患、塩分および水分の吸収の失調 (imbalance of salt and water absorption) (便秘、下痢または栄養失調を引き起こし得る)、異常増殖疾患などが挙げられる。潰瘍の処置としては例えば、胃酸分泌を減少させる薬物 (例えば、H₂ ヒスタミンインヒビター (例えば、シメチジンおよびラニチジン) およびプロトン-カリウムATPaseのインヒビター (例えば、ランソプラゾールおよびオメプラゾール)) ならびにHelicobacter pyloriに対する抗生物質が挙げられる。

40

50

【0155】

便秘の処置のために有用な化合物もまた、本発明のトランスポーターとの結合体において使用され得る。便秘を処置するために有用な化合物としては、例えば、ドキュセートナトリウム、ポロキサマー（poloxamer）188、デヒドロコール酸およびリシノール酸のような、界面活性剤緩下薬が挙げられる。例示的な界面活性剤緩下薬としては、例えば、フェノールフタレイン、ピサコジル、およびアントラキノン緩下薬（例えば、ダンترون）が挙げられる。

【0156】

抗生物質（特に、侵襲性の細菌（例えば、Shigella、SalmonellaおよびYersinia）に対して作用する抗生物質）はとりわけ、本発明の送達増強トランスポーターに結合体化した場合に有用である生物学的に活性な薬剤である。このような化合物としては例えば、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、トリメトプリム、スルファメチロキサゾールなどが挙げられる。

10

【0157】

例えば、結腸癌の処置のために、抗新生物剤もまた本発明の送達増強トランスポーターに結合体化され得、そして胃腸経路によって投与され得る。これらとしては例えば、シスプラチン、メトトレキサート、タキソール、フルオロウラシル、メルカプトプリン、ドキソルビシン（donorubicin）、ブレオマイシン、ストレプトゾシン、マイトマイシンなどが挙げられる。

【0158】

経口投与されたトランスポーターまたは活性化合物の胃腸および結腸への送達のために、その化合物が胃腸（GI）管または結腸に送達されるまで、その化合物が放出されないように、その化合物をコーティングまたはカプセル化することが有利であり得る。GI管または結腸への送達のために有用な方法および組成物は、例えば、米国特許第6,183,466号および同第6,120,803号に記載されている。

20

【0159】

（C．気道投与）

本発明の送達増強トランスポーターはまた、気道を介した薬物の投与を増強するために使用され得る。鼻粘膜、下咽頭、ならびに大気道構造および小気道構造を含む、気道は、薬物吸収のための大きな粘膜表面を提供する。本発明の送達増強トランスポーターにより提供される上皮組織の1つ以上の層へおよび1つ以上の層を横切る、結合体化された薬剤の増強された浸透は、気道送達が他の送達方法よりも優れた利点の拡大をもたらす。例えば、低用量の薬剤は、しばしば、所望の効果をj得るために必要とされ、局所的な治療効果が、より迅速に生じ得、そして薬剤の全身性の治療的血液レベルが、直ちに得られる。薬理学的活性の迅速な発生は、気道投与から生じ得る。さらに、気道投与は、一般的に、比較的副作用がわずかしかない。

30

【0160】

本発明のトランスポーターは、肺性状態の処置のために有用な生物学的薬剤を送達するために使用され得る。鼻投与によって処置可能な状態の例としては、例えば、喘息が挙げられる。これらの化合物としては、抗炎症剤（例えば、コルチコステロイド、クロモリン、およびネドクロミル）、気管支拡張薬（例えば、 β 2選択性アドレナリン作用性（adrenergic）薬物およびテオフィリン）、および免疫抑制薬物（例えば、シクロスポリンおよびFK506）が挙げられる。他の状態としては、例えば、アレルギー性鼻炎（これは、グルココルチコイドで処置可能である）、および慢性閉塞性肺疾患（気腫）が挙げられる。肺性組織に作用し、そして本発明のトランスポーターを使用して送達され得る、他の薬物としては、 β アゴニスト、肥満細胞安定剤、抗生物質、抗真菌剤および抗ウイルス剤、界面活性剤、血管作用薬、鎮痛薬ならびにホルモンが挙げられる。

40

【0161】

気道投与は、肺性状態の処置のためだけでなく、循環器系を介した離れた標的器官への薬物の送達のためにも有用である。多種多様なこのような薬物および診断剤は、本発明の送

50

達増強トランスポーターへの結合体化の後、気道を通じて投与され得る。

【0162】

(D. 血液脳関門を横切る薬剤の送達)

送達増強トランスポーターはまた、血液脳関門を横切った生物学的に活性な薬剤および診断剤の送達のために有用である。これらの薬剤は、虚血の処置（例えば、抗アポトーシス薬物の使用）のため、ならびに種々の状態（例えば、精神分裂病、パーキンソン病、痛み（例えば、モルヒネ、アヘン製剤））を処置するための神経伝達物質および他の薬剤を送達するために有用である。5-ヒドロキシトリプタミンレセプターアンタゴニストは、片頭痛および不安のような状態を処置するために有用である。

【0163】

(E. 診断画像化剤および造影剤)

本発明の送達増強トランスポーターはまた、上皮組織および／もしくは内皮組織の1つ以上の層へか、または1つ以上の層を横切る、診断画像化剤ならびに造影剤の送達のために有用である。診断剤の例としては、放射能で標識化される物質（例えば、 ^{99m}Tc グルコヘプトネート）、または磁気共鳴画像化 (MRI) 法で使用される物質（例えば、ガドリニウムドーブしたキレート化剤（例えば、Gd-DTPA））が挙げられる。診断剤の他の例としては、細胞内で発現された場合に容易に検出可能なタンパク質（例えば、 β -ガラクトシダーゼ、グリーン蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない）をコードするマーカー遺伝子が挙げられる。多種多様な標識（例えば、放射性核種、蛍光物質 (fluor)、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素インヒビター、リガンド（特に、ハプテン）など）が、使用され得る。

【0164】

(送達増強トランスポーターと共に有用な生物学的に活性な分子および診断分子)

送達増強トランスポーターは、診断的に使用する多種多様な生物学的に活性な薬剤および分子に結合体化され得る。

【0165】

(A. 低有機分子)

低有機分子治療剤は、本明細書中に記載されるような直鎖状ポリマー組成物に有利に連結されて、上皮組織もしくは内皮組織の1つ以上の層を横切った輸送を容易にし得るかまたは増強し得る。例えば、高度に荷電した薬剤（例えば、レボドパ (L-3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン; L-DOPA)）の送達は、本明細書中に記載されるような送達増強トランスポーターへの連結に役立ち得る。ペプトイド薬剤およびペプチド模倣薬剤はまた、企図される（例えば、Langston (1997) DDT 2:255; Giannisiら、(1997) Advances Drug Res. 29:1）。また、本発明は、水溶液（例えば、血清および生理食塩水）に対して乏しい可溶性を有する低有機分子を送達するために有利である。従って、治療的効力がそれらの低い可溶性によって制限される化合物は、本発明に従ってより多くの用量で投与され得、そして細胞によるより高い取り込みレベルに起因して、非結合体化形態と比較して、結合体化形態においてモルベースでより有効であり得る。

【0166】

低分子の位相幾何学的表面の有意な部分は、しばしば、関与され、従って、生物学的活性に対して必要とされるので、特定の場合における結合体の低分子部分は、標的上皮組織を横切った後、生物学的活性を発揮するための低分子薬剤について、連結された送達増強トランスポーターおよびリンカー部分（存在する場合）から切断されることが必要であり得る。このような状況について、この結合体は、好ましくは、上皮組織を介して通過した後、遊離の薬物を放出するための切断可能なリンカーを含有する。

【0167】

図5Dおよび図5Eは、本発明の別の局面の例証であり、対応する非結合体化形態に関連して増強された透過性上皮 (trans-epithelial) 組織輸送速度を有する、タキサン抗癌結合体およびタキソイド抗癌結合体を含有する。この結合体は、特に、癌

10

20

30

40

50

細胞の増殖を阻害するために有用である。タキサンおよびタキソイドは、細胞機能に有害な程度まで微小管の重合化を促進し（そして解重合を阻害し）、細胞複製を阻害し、そして最終的には細胞死をもたらすことによって、それらの抗癌作用を発揮すると考えられる。

【0168】

用語「タキサン」とは、パクリタキセル（図5F、 $R' = \text{アセチル}$ 、 $R'' = \text{ベンジル}$ 、登録商標「TAXOL」としても知られる）、ならびに図5Gにおいて図示されるように、パクリタキセルのA環、B環、C環およびD環を含有する骨格コアを有する天然に存在するアナログ、合成アナログ、または生物工学アナログのことをいう。図5Fはまた、「TAXOTERETM」（ $R' = \text{H}$ 、 $R'' = \text{BOC}$ ）の構造を示し、これは、Rhône-Poulencにより販売されるパクリタキセルの幾分より可溶性の合成アナログである。「タキソイド」とは、図5Hに示されるように、パクリタキセルの基本的なA環、B環およびC環を含有するパクリタキセルの天然に存在するアナログ、合成アナログまたは生物工学アナログをいう。実質的な合成的および生物学的な情報は、Suffness（1995）Taxol: Science and Applications, CRC Press, New York, NY, pp. 237-239、特に12~14章、および引き続きパクリタキセルの文献において論評されるように、種々のタキサン化合物およびタキソイド化合物の合成および活性に関して利用可能である。さらに、宿主の細胞株は、例えば、Suffnessの8章および13章に記載されるような、特定の癌のタイプに対するこれらの化合物の抗癌活性を推定するために利用可能である。

10

20

【0169】

送達増強トランスポーターは、タキサンまたはタキソイドにおける任意の適切な連結部位を介してタキサン部分またはタキソイド部分に結合体化される。簡単には、この輸送ポリマーは、上記のような連結ストラテジーを用いて、C2'-酸素原子、C7'-酸素原子を介して連結される。C7'-酸素を介する輸送ポリマーの結合体化は、その位置に結合体化されるにも関わらず抗癌活性および抗腫瘍活性を有するタキサン結合体をもたらす。従って、このリンカーは、切断可能または非切断可能であり得る。C2'-酸素を介する結合体化は、抗癌活性を有意に減少させ、そのため、切断可能なリンカーが、この部位に対する結合体に関して好ましい。他の部位の連結（例えば、C10）がまた、使用され得る。

【0170】

本発明のタキサン結合体およびタキソイド結合体が、タキソール（約0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）およびタキソテル（6~7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）と比較して改善された水溶性を有することが理解される。従って、大量の可溶化剤（例えば、「CREMOPHOR EL」（ポリオキシエチル化ヒマシ油）、ポリソルベート80（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、「TWEEN 80」としても知られる）、およびエタノール）が、必要でなく、その結果、典型的に、これらの可溶化剤に関連した副作用（例えば、アナフィラキシー、呼吸困難、高血圧、および潮紅）が、低減され得る。

30

【0171】

（B. 金属）

金属は、実施例において例証されるように、本発明の送達増強トランスポーターに結合体化されたキレート剤（例えば、テキサフィリンまたはジエチレントリアミン五酢酸（DTPA））を使用して、上皮組織および内皮組織の1つ以上の層へおよび1つ以上の層を横切って、輸送され得る。これらの結合体は、画像化または処置のための金属イオンを送達するために有用である。例示的な金属イオンとしては、Eu、Lu、Pr、Gd、Tc^{99m}、Ga⁶⁷、In¹¹¹、Y⁹⁰、Cu⁶⁷、およびCo⁵⁷が挙げられる。結合体候補物を用いる予備的な膜輸送研究は、以下の実施形態例の節において記載されるように、細胞ベースのアッセイを用いて実施され得る。例えば、ユーロピウムイオンを用いて、細胞取り込みは、時間分解蛍光測定によってモニターされ得る。細胞傷害性である金属イオンについて、取り込みは、細胞傷害性によってモニターされ得る。

40

【0172】

50

(C. 高分子)

本発明の増強された輸送方法は、多数の高分子（例えば、タンパク質、核酸、多糖類、およびそれらのアナログが挙げられるが、これらに限定されない）について、上皮組織または内皮組織の1つ以上の層への輸送および1つ以上の層を横切った輸送を増強させるために特に適している。例示的な核酸としては、DNAおよびRNAならびにそれらのアナログから形成されたオリゴヌクレオチドならびにポリヌクレオチドが挙げられ、これらは、相補的な標的（例えば、一本鎖標的または二本鎖標的に対するアンチセンス配列）へのハイブリダイゼーションのためにか、またはこの配列によってコードされる核酸転写物もしくはタンパク質を発現するために、設計された選択された配列を有する。アナログとしては、荷電した骨格アナログ、および好ましくは無電荷の骨格アナログ、例えば、ホスホネート（好ましくは、メチルホスホネート）、ホスホラミデート（N3'またはN5'）、チオホスフェート、無電荷のモルホリノベースのポリマー、およびタンパク質核酸（PNA）が挙げられる。このような分子は、例えば、酵素置換治療、遺伝子治療、およびアンチセンス治療のような種々の治療的レジメンにおいて使用され得る。

【0173】

例示の目的で、タンパク質核酸（PNA）は、その骨格がデオキシリボース骨格と構造的に同形性であるDNAのアナログである。この骨格は、核酸塩基が結合されるN-（2-アミノエチル）グリシン単位から構成される。4つ全ての天然の核酸塩基を含有するPNAは、ワトソン-クリック塩基対則に従う相補的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、そして塩基対認識に関して忠実なDNA模倣物である（Egholmら（1993）Nature 365:566-568）。PNAの骨格は、リン酸エステルでなくペプチド結合によって形成され、それをアンチセンス適用に対して十分に適応させる。この骨格が無電荷であるので、形成するPNA/DNA二重鎖またはPNA/RNA二重鎖は、通常よりも大きな熱安定性を示す。PNAは、それらがヌクレアーゼまたはプロテアーゼによって認識されないさらなる利点を有する。さらに、PNAは、標準的なt-Boc化学を用いる自動化ペプチド合成機で合成され得る。その結果、PNAは、本発明のトランスポーターポリマーに容易に連結される。

【0174】

上皮組織および内皮組織への輸送、ならびに上皮組織および内皮組織を横切る輸送が、本発明の方法を用いて増強され得る、アンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、例えば、米国特許第5,594,122号に記載される。このようなオリゴヌクレオチドは、ヒト不全ウイルス（HIV）を処置するために標的化される。アンチセンスオリゴヌクレオチドへのトランスポーターポリマーの結合体化は、例えば、非常に確立された方法に従って、スクシネートリンカーを介して、ペプチドとオリゴヌクレオチドの5'末端との間のアミド架橋を形成することによって達成され得る。PNA結合体の使用は、PCT出願PCT/US98/10571の実施例11においてさらに例証される。この出願の図7は、実施例11に詳述されるように、T細胞によってγ-インターフェロン（γ-IFN）の分泌を阻害するためにPNA配列を含有する本発明の結合体で得られた結果を示す。示され得るように、このアンチセンスPNA結合体は、結合体が、約10 μMを越えるレベルで存在する場合、γ-IFNの分泌をブロックするのに有効であった。対照的に、センスPNA結合体または非結合体化アンチセンスPNA単独では、阻害が観察されなかった。

【0175】

上皮組織または内皮組織の1つ以上の層を横切って輸送され得る別の分類の高分子は、タンパク質、および特に、酵素によって、例証される。治療的タンパク質としては、置換酵素が挙げられるが、これらに限定されない。治療的酵素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アルグルセラゼ（alglucerase）（リソソームグルコセレブロシダーゼ欠損（ゴシェ病）を処置する使用のため）、α-L-イズロニダーゼ（ムコ多糖症Iを処置する使用のため）、α-N-アセチルグルコサミダーゼ（サンフィリポB症候群を処置する使用のため）、リパーゼ（膵機能不全症を処置する使用のため）、アデノシンデアミナーゼ（重篤な混合性免疫不全症候群を処置する使用のため）、およ

びトリオースホスフェートイソメラーゼ（トリオースホスフェートイソメラーゼ欠損に関連する神経筋機能不全を処置する使用のため）。

【0176】

さらに、そして本発明の重要な局面に従って、タンパク質抗原は、これらがペプチド中で分解される場合、抗原提示細胞（APC）の細胞質ゾルの区画に送達され得る。次いで、このペプチドは、小胞体中に輸送され、ここで、これらは、発生期のHLAクラスI分子と結合し、そして細胞表面上に提示される。このような「活性化」APCは、クラスI限定抗原特異的細胞傷害性Tーリンパ球（CTL）の誘導因子として作用し得、次いで特定の抗原を提示する細胞の認識および破壊を進行させる。このプロセスを実施し得るAPCとしては、特定のマクロファージ、B細胞および樹状細胞が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、タンパク質抗原は、腫瘍細胞に対して免疫応答を誘発するかまたは促進するための腫瘍抗原である。CTLの引き続く活性化を伴うAPCの細胞質ゾルへの単離タンパク質または可溶性タンパク質の輸送は、例外的である。なぜなら、わずかな例外を除いて、単離タンパク質または可溶性タンパク質の注入が、APCの活性化またはCTLの誘導のいずれももたらさないからである。従って、本発明のトランスポーター増強組成物に結合体化される抗原は、インビトロまたはインビボで細胞性免疫グロブリン応答を刺激するように作用し得る。

10

【0177】

別の実施形態において、本発明は、有害な生物学的過程（例えば、微生物感染）を妨げるために細胞質ゾルへの免疫特異的な抗体または抗体フラグメントを送達するために有用である。最近の実験は、細胞内抗体が、植物細胞および哺乳動物細胞において有効な抗ウイルス剤であり得ることを示してきた（例えば、Tavladorakiら、（1993）Nature 366:469；およびShahenら、（1996）J. Virol. 70:3392）。これらの方法は、典型的に、抗体の重鎖および軽鎖が、単一のポリペプチドとして合成される、一本鎖の可変領域フラグメント（scFv）を使用してきた。可変性の重鎖および軽鎖は、通常、可撓性のリンカーペプチド（例えば、15個のアミノ酸のペプチド）によって分離されて、高親和性リガンド結合部位を保持する28kDaの分子を生成する。この技術の広範な適用に対する主要な障害は、感染細胞中への取り込みの効率であった。しかし、scFvフラグメントヘトランスポーターポリマーを連結することによって、細胞取り込みの程度は、増加され得、免疫特異的なフラグメントが結合して、重要な微生物成分（例えば、HIV Rev、HIV逆転写酵素、およびインテグラーゼタンパク質）を無能にし得る。

20

30

【0178】

（D. ペプチド）

本明細書中に記載される増強された輸送方法によって送達されるペプチドとしては、エフェクターポリペプチド、レセプターフラグメントなどが挙げられるが、これらに限定されるべきでない。例としては、細胞内シグナルを媒介するタンパク質により使用されるリン酸化部位を有するペプチドが挙げられる。このようなタンパク質の例としては、プロテインキナーゼC、RAF-1、p21Ras、NF-κB、C-JUN、および膜レセプター（例えば、IL-4レセプター）の細胞質テイル（tail）、CD28、CTLA-4、V7、ならびにMHCクラスI抗原およびMHCクラスII抗原が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0179】

送達増強トランスポーターがまたペプチドである場合、合成は、上記に記載されるように、自動化ペプチド合成機を使用してか、または融合ペプチドをコードするポリヌクレオチドが産生される組換え方法のいずれかによって合成され得る。

【実施例】

【0180】

（実施例）

以下の実施例は、例証するために提供されるが、本発明を限定しない。

50

【0181】

(実施例1)

(ヌードマウスの皮膚へのD-アルギニンのビオチン化ポリマーの浸透)

この実施例は、ポリアルギニン七量体が、濾胞ならびに濾胞間の両方で、皮膚の層へ、および皮膚の層を横切って、そして真皮内へ、結合体化ビオチンを送達し得ることを示す。

【0182】

(方法)

ビオチン化ペプチドを、固相技術、ならびにApplied Biosystems 433ペプチド合成機によって市販のFmocアミノ酸、樹脂、および試薬(PE Biosystems, Foster City CA、およびBachem Torrence, CA)を使用して合成した。Fastmocサイクルを、カップリング試薬としてHBTU/HOBtの代わりに、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)で使用した。ペプチドのアミノ末端へのビオチンの付加の前に、アミノカプロン酸(aca)を、結合体化し、そしてスペーサーとして作用させた。このペプチドを、1時間~12時間の間、96%トリフルオロ酢酸、2%トリイソプロピルシラン、および2%フェノールを用いて樹脂から切断した。より長い反応時間は、アルギニンのポリマーからPdf保護基を完全に除去するために必要であった。その後、ペプチドを、樹脂から濾過して、ジエチルエーテルを用いて沈殿させ、逆相カラムHPLC(Alltech Altima, Chicago, IL.)を使用して精製し、そしてエレクトロスプレー質量分析法またはマトリクス支援レーザー脱離質量分析法のいずれか(Perceptive Biosystems, Boston, MA)を使用して特徴付けた。

【0183】

リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中に溶解した、アミノカプロン酸スペーサー(bior7)を用いてアミノ末端に共有結合的に連結したビオチンを有する、変動させた濃度(1mM~10μM)のD-アルギニンの七量体を、麻酔したヌードマウスの背中に塗布した。サンプル(100μl)を、賦形剤なしで液体として塗布し、Vaseline^T障壁による分散を防ぎ、そして15分間浸透させた。この期間の最後に、この動物を、屠殺して、皮膚の関連切片を、切除し、封入剤(OCCT)中に包埋し、そして凍結した。凍結切片(5ミクロン)を、低温槽を用いて切除し、スライド上に収集し、そして蛍光標識化ストレプトアビジン(Vector Laboratories, Burlingame, CA)で染色した。このスライドを、4℃で10分間アセトン中で固定し、風乾し、5分間PBS中に浸し、5分間正常ヤギ血清でブロックし、そして5分間PBSで洗浄した。この切片を、30μg/mlの蛍光標識化ストレプトアビジンを用いた30分間のインキュベーションにより染色し、PBSで洗浄し、2分間ヨウ化プロピジウム(1μg/ml)で対比染色し、そしてこの切片を、Vectashield^T封入剤で封入した。スライドを、蛍光顕微鏡によって分析した。対応する研究を、フルオレセイン-ストレプトアビジンではなくストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを用いて実施した。ビオチン化ペプチドを、西洋ワサビペルオキシダーゼ基質ジアミノベンザジンを用いた切片の処理、および光学顕微鏡を用いた可視化によって可視化した。

【0184】

(結果)

ビオチン化アルギニン七量体を、表皮へおよび表皮を横切って、ならびに真皮へ、通過させた。視野の全ての細胞の細胞質ゾルおよび核は、蛍光性であり、実質的に、切片中のヌードマウス皮膚の全ての細胞への浸透を示す。染色パターンは、濾胞および濾胞間の両方であり、予期しない輸送に一致した。さらに、ポジティブな細胞は、乳頭真皮および細網真皮で明らかであった。対照的に、染色は、ビオチン単独、またはリン酸緩衝化生理食塩水単独で処理したマウスにおいて明らかでなかった。

【0185】

(実施例2)

10

20

30

40

50

(正常 B a l b / C マウスの皮膚への D - アルギニンのビオチン化ポリマーの浸透)

P B S 中に溶解した、アミノカプロン酸スパーサー (b i o r 7) を用いてアミノ末端に共有結合的に連結したビオチンを有する、変動させた濃度 (1 m M ~ 1 0 0 μ M) の D - アルギニンの七量体を、麻酔した B a l b / C マウスの単径部の皮膚に塗布した。サンプル (1 0 0 μ l) を、賦形剤中の液体として塗布し、V a s e l i n e ^{T M} 障壁による分散を防ぎ、そして 3 0 分間浸透させた。この期間の最後に、この動物を、屠殺して、皮膚の関連切片を、切除し、封入剤 (O C T) 中に包埋し、そして凍結した。凍結切片を、実施例 1 に記載されるように、低温槽を用いて切除し、スライド上に収集し、そして蛍光標識化ストレプトアビジン (V e c t o r L a b o r a t o r i e s , B u r l i n g a m e , C A) で染色した。スライドを、蛍光顕微鏡によって分析した。

10

【 0 1 8 6 】

(結果)

ヌードマウス由来の皮膚と同様に、ビオチン化アルギニン七量体を、表皮へおよび表皮を横切って、ならびに真皮へ、通過させた。視野の全ての細胞の細胞質ゾルおよび核は、蛍光性であり、実質的に、切片中のヌードマウス皮膚の全ての細胞への浸透を示す。染色パターンは、濾胞および濾胞間の両方であり、予期しない輸送に一致した。さらに、ポジティブな細胞は、乳頭真皮および細網真皮で明らかであった。対照的に、染色は、ビオチン単独、またはリン酸緩衝化生理食塩水単独で処理したマウスにおいて明らかでなかった。

【 0 1 8 7 】

(実施例 3)

(ヌードマウス上へ移植した正常なヒト皮膚への D - アルギニンのビオチン化ポリマーの浸透)

P B S 中に溶解した、アミノカプロン酸スパーサー (b i o r 7) を用いてアミノ末端に共有結合的に連結したビオチンを有する、変動させた濃度 (1 m M ~ 1 0 0 μ M) の D - アルギニンの七量体を、S C I D マウスの背中上のヒト包皮移植片に塗布した (例えば、D e n g ら (1 9 9 7) N a t u r e B i o t e c h n o l . 1 5 : 1 3 8 8 - 1 3 9 1 ; K h a v a r i ら (1 9 9 7) A d v . C l i n . R e s . 1 5 : 2 7 - 3 5 ; C h o a t e および K h a v a r i (1 9 9 7) H u m a n G e n e T h e r a p y 8 : 8 9 5 - 9 0 1 を参照のこと)。サンプル (1 0 0 μ l) を、賦形剤中の液体として塗布し、V a s e l i n e ^{T M} 障壁による分散を防ぎ、そして 1 5 分間浸透させた。この期間の最後に、動物を、屠殺して、皮膚の関連切片を、切除し、封入剤 (O C T) 中に包埋し、そして凍結した。凍結切片を、実施例 1 に記載されるように、低温槽を用いて切除し、スライド上に収集し、そして蛍光標識化ストレプトアビジン (V e c t o r L a b o r a t o r i e s , B u r l i n g a m e , C A) で染色した。スライドを、蛍光顕微鏡によって分析した。

20

30

【 0 1 8 8 】

(結果)

ヌードマウスおよび正常マウス由来の皮膚と同様に、ビオチン化アルギニン七量体を、ヒトの皮膚の、表皮へおよび表皮を横切って、ならびに真皮へ、通過させた。視野の全ての細胞の細胞質ゾルおよび核は、蛍光性であり、表皮および真皮へ、ならびに表皮および真皮を通した浸透を示す。強力な染色が、2 0 × および 4 0 × の倍率で観察された。染色パターンは、濾胞および濾胞間の両方であり、予期しない輸送に一致した。さらに、ポジティブな細胞は、乳頭真皮および細網真皮で明らかであった。対照的に、染色は、ビオチン単独、またはリン酸緩衝化生理食塩水単独で処理したマウスにおいて明らかでなく、そして非常にわずかな染色が、低倍率または高倍率のいずれかで、ビオチン化アルギニン五量体結合体とともに観察された。

40

【 0 1 8 9 】

(実施例 4)

(プラスチックラップまたはローション賦形剤を用いるヌードマウスの皮膚への D - アルギニンのビオチン化ポリマーの増加された浸透)

50

アミノカブロン酸スパーサー (bio r 7) を用いてアミノ末端に共有結合的に連結したビオチンを有する、変動させた濃度 (1 mM ~ 100 μ M) の D-アルギニンの七量体を、PBS 中に溶解し、そして等容量の Lubri der m^{T M} と混合した。次いで、このローション混合物を、ヌードマウスの背中に塗布し、そして 30 分間、60 分間、および 120 分間浸透させた。代替的に、サンプル (100 μ l) を、賦形剤なしの液体として塗布し、Vaseline^{T M} でシールされたサンプルにわたってプラスチックラップを覆うことによって蒸発するのを防いだ。このサンプルを、30 分間、60 分間、および 120 分間浸透させた。この期間の最後に、動物を、屠殺して、皮膚の関連切片を、切除し、封入剤 (OCT) 中に包埋し、そして凍結した。凍結切片を、実施例 1 に記載されるように、低温槽を用いて切除し、スライド上に収集し、そして蛍光標識化ストレプトアビジン (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で染色した。スライドを、蛍光顕微鏡によって分析した。

10

【0190】

(結果)

ローションおよびプラスチックラップの両方とも、賦形剤なしでの染色と比較して増加した取り込みをもたらした。ローションは、結合体の増強された取り込みにおいてプラスチックラップよりもより効果的であった。ビオチン化アルギニン五量体を、表皮細胞層の細胞質ゾルおよび核の両方、濾胞および濾胞間の両方に到達する、いくつかの皮膚層へおよび皮膚層を横切って、通過させた。さらに、ポジティブな細胞は、乳頭真皮および細網真皮で明らかであった。

20

【0191】

(実施例 5)

(ヌードマウスの皮膚への D-アルギニンのビオチン化五量体、ビオチン化七量体、およびビオチン化九量体へ結合体化されたシクロスポリンの浸透)

(方法)

(A. 送達増強トランスポーターへのシクロスポリンの連結)

(1. α -クロロアセチルシクロスポリン A 誘導体の調製)

α -アセチルシクロスポリン A 誘導体を、図 1 に示されるように調製した。シクロスポリン A (152.7 mg、127 μ mol) およびクロロ酢酸無水物 (221.7 mg; 1300 μ mol) を、N₂ 雰囲気下乾燥フラスコ中に配置した。ピリジン (1.0 mL) を、添加し、そしてこの溶液を 50 °C (油浴) まで加熱した。16 時間後、この反応を、室温まで冷却して、水 (4.0 mL) でクエンチした。得られた懸濁液を、ジエチルエーテル (Σ 15 mL) で抽出した。合わせた有機層を、MgSO₄ で乾燥した。減圧下での溶媒の濾過およびエバポレーションは、黄色オイルを与え、これを、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィー (溶出剤: EtOAc / ヘキサン: 40% ~ 80%) によって精製し、136 mg (106.4 μ mol、83%) の所望の産物を得た。

30

【0192】

(2. トランスポーター分子へのカップリング)

システイン含有ペプチドの α -クロロアセチルシクロスポリン A 誘導体へのカップリングについての一般的手順を図 2 に示す。

40

【0193】

(a. 標識ペプチド)

シクロスポリン A 誘導体および標識ペプチド (1 当量) を、N₂ 雰囲気下で DMF に溶解した (約 10 mmol のシクロスポリン A 誘導体 / 1 mL DMF)。ジイソプロピルエチルアミン (10 当量) を添加し、そして室温での攪拌を、全ての出発物質が消費されるまで (通常 16 時間後) 続けた (図 3)。溶媒を真空で除去し、そして粗製反応生成物を水に溶解し、そして逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) (溶離液: 水 / MeCN* TFA) により精製した。生成物を以下の収率で得た

【0194】

【化 13】

50

B-aca-r5-Ala-Ala-Cys-O-アシルーシクロスポリンA: 47%

B-aca-r7-Cys-O-アシルーシクロスポリンA: 43%

B-aca-r9-Cys-O-アシルーシクロスポリンA: 34 %

B-aca-Cys-O-アシルーシクロスポリンA: 55%

(b. 非標識ペプチド)

ペプチド (34.7 mg、15.3 μ mol) およびシクロスポリンA誘導体 (19.6 mg、15.3 μ mol) を、N₂ 雰囲気下でDMF (1.0 mL) に溶解した (図4)。ジイソプロピルエチルアミン (19.7 mg、153 μ mol) を添加し、そして室温での攪拌を続けた。12時間後、溶媒を真空で除去した。粗製物質を水に溶解し、そしてRP-HPLC (溶離液: 水/MeCN* TFA) で精製し、純粋な生成物 (24.1 mg、6.8 mmol、44%) を得た。

【0195】

(B. 皮膚を横切る輸送の分析)

PBSに溶解した種々の濃度 (1 mM ~ 100 μ M) の、D-アルギニンのビオチン化した五量体、七量体または九量体 (bio r5、bio r7、またはbio r9) のいずれかに結合体化されたシクロスポリンを、ヌードマウスの背部に塗布した。サンプル (100 μ l) を、賦形剤中の液体として塗布し、そしてVaselineTM バリアにより分散を防ぎ、そして30分、60分および120分間浸透させた。この期間の終わりに、動物を屠殺し、皮膚の関連切片を切除し、封入剤 (OCT) 中に包埋し、そして凍結した。凍結された切片を、クリオスタットを使用して切断し、スライド上に集め、そして蛍光標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で実施例1に記載のように染色した。スライドを蛍光顕微鏡により分析した。

【0196】

(結果)

D-アルギニンのビオチン化七量体および九量体とのシクロスポリンの結合体は、ヌードマウスの皮膚の表皮に有効に進入し、そして表皮を横切って真皮中に進入した。対照的に、アルギニンの五量体とシクロスポリンとの間の結合体を使用すると、ほとんど取り込みは見られず、PBSコントロールでは染色は全く見られなかった。視野中の全ての細胞の細胞質ゾルおよび核は、蛍光性であり、表皮および真皮への浸透および表皮および真皮を通過する浸透を示していた。染色パターンは、小胞および小胞間の両方の予期しない輸送と一致していた。さらに、ポジティブな細胞は、乳頭真皮および網状真皮において明白であった。これらの結果は、十分なグアニジニル基が送達増強トランスポーターに含まれる場合にのみ顕著な取り込みを実証する。

【0197】

(実施例6)

(D-アルギニン七量体がヒト皮膚に浸透し得ることの実証)

ヒト皮膚とマウス皮膚とは、多数の点で有意に異なり、ヒト表皮は、かなり厚い。D-アルギニン七量体/シクロスポリンA (r7 C s A) 結合体もまたヒト皮膚に浸透し得るか否かを決定するために、ビオチン r7 C s A を、SCIDマウスの背部上に移植されたヒト全厚皮膚に塗布した。マウス皮膚のように、結合体シクロスポリンAは、ヒト表皮および真皮に浸透した。蛍光は、ビオチン化ペプチド単独に曝露された組織における細胞の細胞質ゾルおよび核の両方において観察されたが、ビオチン r7 C s A で染色された切片では、蛍光の大部分は細胞質ゾルであり、シクロスポリンAの公知の細胞質標的に対する r7 C s A の結合と一致した。

【0198】

(実施例7)

(シクロスポリンA-トランスポーター結合体が真皮のT細胞に進入することの実証)

10

20

30

40

50

(方法)

放出可能なR7-CsA結合体によるIL-2分泌の阻害。Jurkat細胞(5×10^4)を、種々の濃度の放出可能でないR7-CsA結合体または放出可能なR7-CsA結合体またはCsAと共に37℃でインキュベートして、PMAおよびイオノマイシンの刺激の前にCsAの活性形態を放出させた。続いて、10 ng/mgのPMA(Sigma, St. Louis, MO)および1 μ Mのイオノマイシン(CalBiochem, San Diego, CA)を添加することによりT細胞を刺激して、IL-2を産生させた。培養物を、37℃で一晩インキュベートし、そして上清を収集し、そして蛍光ELISAを使用してIL-2を測定した。手短には、プレートを4 μ g/mlの抗ヒトIL-2抗体(BD Pharmingen, San Diego, CA)でコーティングし、10% FBSを含むPBSで1時間室温にてブロックし、洗浄し、そして上清を添加し、そして1時間インキュベートした。培地を除去し、そしてビオチン化抗ヒトIL-2(1.6 μ g/ml)を、1時間で添加した、このプレートを洗浄し、次いでユーロピウム標識ストレプトアビジン(0.04 ng/ml)を1時間で添加した。もう1度洗浄した後、増強溶液を添加し、そして得られる蛍光を、Wallacプレートリーダー(Wallac, Turku, Finland)を使用して測定した。

【0199】

(結果)

ビオチン化D-アルギニン七量体-シクロスポリン(r7-CsA)結合体がインビボで炎症性皮膚内の浸潤性T細胞に到達するか否かを決定するために、ビオチンr7-CsAを、実験的に誘導された接触皮膚炎を有するマウスの背部上の炎症部位に塗布した。炎症性皮膚を、ローダミン標識ヤギ抗マウスCD3で染色して、T細胞を局在化し、そしてフルオレセイン標識ストレプトアビジンで染色してビオチンr7-CsAを局在化した。ビオチンr7-CsAは、種々の他の細胞(おそらく他の炎症性細胞および内在する繊維芽細胞に相当する)に加えて、組織中の全てのCD3[+]T細胞において見出された。これらのデータは、ビオチンr7-CsAが、炎症した皮膚に浸透して重要な標的Tリンパ球に到達するというを示す。

【0200】

(実施例8)

(アルギニンの短いオリゴマーおよびCsAの放出可能な結合体の合成、インビトロでの活性およびインビボでの活性)

シクロスポリンAの2級アルコールの修飾は、その生物学的活性の有意な損失を生じる。例えば、R. E. Handschumacherら、Science 226, 544-7 (1984)を参照のこと。結果として、細胞への輸送後のその結合体からの遊離シクロスポリンAの放出を確実にするために、シクロスポリンAを、図10に示すように、pH感受性リンカーを介してオリゴアルギニントランスポーターに結合した。得られた結合体は、酸性pHでは安定であるが、pH>7では、シクロスポリンAに隣接するカルボニルへの遊離アミンの付加を含む分子内環化を受け(図6)、これは、修飾されていないシクロスポリンAの放出をもたらす。

【0201】

放出可能な結合体の設計における別の修飾は、L-アルギニン(R)の使用であり、トランスポーター中にD-アルギニン(r)は使用しなかった。この結合体の最大の安定性、従って蛍光によるその位置の決定における精度を確実にするために、オリゴ-D-アルギニントランスポーターを組織学的実験に用いた一方で、L-アルギニンのオリゴマーを、その生物学的半減期を最小にするために放出可能な結合体の設計に組み込んだ。その設計と一致して、得られる放出可能な結合体は、酸性pHでは安定であるが、血清の非存在下での生理学的pHでは不安定であることが示された。pH7.4のPBS中のこの放出可能なシクロスポリンA結合体の半減期は、90分であった。

【0202】

(結果)

10

20

30

40

50

シクロスポリンAの放出可能なグアニジノー七量体結合体は、インビトロでPMAおよびイオノマイシンで刺激されたヒトT細胞株(Jurkat)によるIL-2分泌を阻害することにより、生物学的に活性であることが示された。R. Wiskocilら、J. Immunol 134, 1599-603 (1985)を参照のこと。この結合体は、PMA/イオノマイシンの添加の12時間前に加えられ、そして用量依存性阻害が、放出可能なR7-CSA結合体により観察された。t-Boc保護基(これは、環化および結果としての活性薬物の放出を防ぐ)を保持していることにより放出可能な結合体と異なる、放出可能でないアナログ(図6)では、この阻害は観察されなかった。放出可能なR7シクロスポリン結合体のEC₅₀は、アルコールに溶解されて放出可能な結合体と同時に加えられたCSAより約2倍高かった。

10

【0203】

放出可能なR7-CSA結合体を、接触皮膚炎のマウスモデルを使用して機能的活性についてインビボでアッセイした。1%の放出可能なR7-CSA結合体での処理は、耳の炎症において73.9%±4.0の減少を生じた(図7)。炎症の減少は、未処置の耳では全く見られず、処置された耳において見られた効果が、局所的でありかつ全身的ではないということを示していた。0.1%および0.01%のR7-CSAで処置されたマウスの耳においてより低い阻害が観察され(それぞれ、64.8%±4.0および40.9%±3.3)、この効果が力価測定が可能であることを実証した。フッ素化コルチコステロイドポジティブコントロールでの処置は、耳腫大における減少(34.1%±6.3)を生じたが、0.1%の放出可能なR7-CSAについて観察された減少より有意に低かった(図7)。未修飾のシクロスポリンA、ビヒクル単独、R7、または放出可能でないR7-CSAで処置されたマウスのいずれにおいても炎症の減少は観察されなかった。

20

【0204】

(実施例9)

(銅-DTPA-r7複合体およびガドリニウム-DTPA-r7複合体のヌードマウスの皮膚への浸透)

(方法)

1. 金属錯体の調製

工程1-銅-ジエチレントリアミン五酢酸錯体(Cu-DTPA)の調製

炭酸銅(10mmol)およびジエチレントリアミン五酢酸(10mmol)を、水(150mL)に溶解した(図8)。18時間後、この溶液を、遠心分離して固体を除去した。この青色溶液を、デカントし、そして凍結乾燥して青色粉末を得た(収率>90%)。

30

【0205】

工程2-DTPAトランスポーターの調製

Cu-DTPAを、PE Applied Biosystems Peptide Synthesizer (ABI 433A)を使用してアミノカプロン酸スペーサーを介してトランスポーターに連結した(図9)。この材料を、トリフルオロ酢酸(TFA)(40mL)、トリイソプロピルシラン(100μL)およびフェノール(100μL)で18時間処理することにより樹脂から切断した。この樹脂を、濾別し、そしてこのペプチドをジエチルエーテル(80mL)を加えることにより沈殿させた。この溶液を遠心分離し、そして溶媒をデカントして除いた。粗製固体を、水/アセトニトリル勾配を使用する逆相HPLCにより精製した。TFAでの処理は、Cu²⁺イオンの損失を生じ、これを再挿入する必要があった。

40

【0206】

DTPA-aca-R7-CO₂H(10mg, 0.0063mmol)および硫酸銅(1.6mg, 0.0063mmol)を、水(1mL)に溶解した。18時間穏やかに攪拌させ、そして凍結乾燥して生成物を白色粉末(10mg)として得た。

【0207】

(2. 皮膚を横切る輸送の分析)

金属ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)錯体を、等モル量の金属塩とDTPAとを

50

水中で18時間混合することにより形成した。この時間の終わりに、この溶液を遠心分離し、凍結し、そして凍結乾燥した。乾燥した粉末を質量分析法で特徴付けし、そして固相ペプチド合成に使用した。この金属-DTPA錯体を、ペプチド合成に使用される固相樹脂にまだ結合されているD-アルギニンまたはL-アルギニンのポリマーに結合させた。この金属-DTPA錯体を、アミノカプロン酸スパーサーを使用して結合した。トリフルオロ酢酸中のペプチド-DTPA-金属複合体の切断が金属を放出したことを除いて、固相ペプチド合成技術は、実施例1に記載されている。HPLC精製およびペプチド-DTPA複合体の凍結乾燥後に金属を置換する。この金属の置換には、ペプチド-アミノカプロン酸-DTPA複合体と共に等モル量の金属塩をインキュベーションすること、およびその後の凍結乾燥が含まれる。

10

【0208】

種々の濃度(1 μ M~1 mM)のCu-DTPA-acar7複合体を、ヌードマウスの腹部領域に15分、30分および45分間塗布した。コントロールとして、等モル量のCu-DTPA錯体をこの腹部領域にスポッティングした。このインキュベーション時間の終わりに、これらのサンプルを単純に拭き取り、そしてCu-DTPA-acar7複合体をスポッティングした皮膚では強い青色が明らかであり、そしてCu-DTPA単独をスポッティングした皮膚では強い青色が見られなかった。1 mMの塗布の場合、3日間青色の色素が見られ、時間と共に減少したが、この期間の間ずっと明白であった。

【0209】

種々の濃度(1 μ M~1 mM)のGd-DTPA-acar7複合体を、BALB/cマウスの尾静脈中に100 μ lで注射する。Gdの分布は、磁気共鳴画像化を使用して実時間で観察される。この色素の分布は、血流全体で明らかであり、肝臓、脾臓、腎臓および心臓に入る。ウサギの頸動脈に注射される場合、この色素は、血液脳関門を横切って見られる。

20

【0210】

(実施例10)

(D-アルギニンのビオチン化五量体、七量体、および九量体に結合体化されたヒドロコルチゾンの、ヌードマウスの皮膚への浸透)

(方法)

(A. 送達増強トランスポーターへのヒドロコルチゾンの連結)

30

(工程1-無水クロロ酢酸を用いたヒドロコルチゾンのアシル化)

ヒドロコルチゾン(200 mg、0.55 mmol)および無水クロロ酢酸(113 mg、0.66 mmol)のピリジン(5 mL)溶液を、室温で2時間攪拌した(図10)。溶媒を留去し、そして粗生成物を、溶離液として50%ヘキサン/酢酸エチルを使用してシリカでクロマトグラフした。白色固体として生成物を単離した(139 mg、58%)。

【0211】

(工程2-トランスポーターへの連結)

ヒドロコルチゾンのクロロ酢酸エステル(0.0137 mmol)、システイン残基を含むトランスポーター(0.0137)、およびジイソプロピルエチルアミン(DIEA)(0.0274 mmol)のジメチルホルムアミド(DMF)(1 mL)溶液を、18時間室温で攪拌した(図11)。この物質を水/アセトニトリル勾配を用いて、逆相HPLCにより精製し、凍結乾燥して白色粉末を得た。

40

【0212】

r5結合体-12 mg獲得(29%単離収率)

r7結合体-22 mg獲得(55%単離収率)

R7結合体-13 mg獲得(33%単離収率)

(B. 皮膚を横断する輸送の分析)

PBSに溶解された様々な濃度(1 mM~100 μ M)の、D-アルギニンのビオチン化五量体、七量体、または九量体(bio-r5、bio-r7、またはbio-r9)の

50

いずれかに結合体化したヒドロコルチゾンを、ヌードマウスの背中に塗布した。サンプル（ $100\mu\text{l}$ ）を、賦形剤内の液体として塗布し、そして、VaselineTM バリアによって分散することを妨げ、30分、60分、および120分間浸透させた。この期間の終わりに、動物を屠殺し、皮膚の関連切片を切除し、封入剤（OCT）で包埋し、凍結させた。凍結切片を、クリオスタットを用いて切断し、スライド上に収集し、そして、実施例1に記載されるように、蛍光標識したストレプトアビジン（Vector Laboratories, Burlingame, CA）で染色した。スライドを、蛍光顕微鏡によって分析した。

【0213】

（結果）

D-アルギニンのビオチン化七量体とヒドロコルチゾンとの結合体は、ヌードマウスの皮膚の表皮の中へおよび表皮を横切って、そして、皮膚の真皮の中へ効率良く入った。対照的に、アルギニンの五量体とヒドロコルチゾンとの間の結合体では、ほとんど取り込みが見られず、そして、PBSコントロールでは、全く染色が見られなかった。視野における全ての細胞の細胞質および核は蛍光性であり、表皮および真皮中に浸透し、そして、表皮および真皮を通ることを示した。この染色パターンは、小胞および小胞間の両方であった未予知の輸送と一致していた。さらに、陽性細胞は、乳頭真皮および網状真皮において明らかであった。これらの結果は、十分なグアニジル基が、送達増強トランスポーターに含まれる場合のみ、目立った取り込みを示す。

【0214】

（実施例11）

（D-アルギニンのビオチン化五量体、七量体、および九量体に結合体化したタキソールのヌードマウスの皮膚への浸透）

（方法）

（1. C-2' 活性化タキソール誘導体のビオチン標識ペプチドへの結合体化）

（C-2' 誘導体の合成）

タキソール（ 48.7mg 、 $57.1\mu\text{mol}$ ）を、 N_2 雰囲気下で、 CH_2Cl_2 （ 3.0mL ）中に溶解した。溶液を 0°C に冷却した。ベンジル-（p-ヒドロキシベンゾエート）のクロロホルメート（ 200mmol （ 2.0mL の CH_2Cl_2 中）、ベンジル-（p-ヒドロキシベンゾエート）およびジホスゲンから新しく調製した）のストック溶液を、 0°C で添加し、そして、その温度での攪拌を5時間続け、その後、溶液を室温まで温めた（図12）。攪拌をさらに10時間続けた。溶媒を真空中で除去し、そして、粗物質を、シリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し（溶離液： EtOAc ／ヘキサン30%～70%）、所望のタキソールC-2' 炭酸塩を得た（ 36.3mg 、 $32.8\mu\text{mol}$ 、57.4%）。

【0215】

（ビオチン標識ペプチドへのカップリング）

ビオチン化標識ペプチドへのカップリング手順を図13に示す。タキソール誘導体およびビオチン標識ペプチド（1.2当量）を、 N_2 雰囲気下で、DMF中で溶解した（約 $10\mu\text{mol/mL}$ DMF）。ジイソプロピルエチレンアミン（DMF中1.2当量）およびDMAPI（DMF中0.3当量）のストック溶液を添加し、そして、全出発物質が消費されるまで室温での攪拌を続けた。16時間後、溶媒を真空下で除去した。粗反応物混合物を水に溶解し、そして、RP-HPLCによって精製し（溶離液：水／ $\text{MeCN}^*\text{TF A}$ ）、示される収率の結合体を生成した：

B-a c a - r 5 - K - タキソール： 3.6mg 、 1.32mmol 、20%。

【0216】

B-a c a - r 7 - K - タキソール： 9.8mg 、 3.01mmol 、44%。

【0217】

B-a c a - r 9 - K - タキソール： 19.4mg 、 5.1mmol 、67%。

【0218】

10

20

30

40

50

(未標識 C-2' カルバメート：)

タキソール誘導体 (12.4 mg、11.2 μmol) および未標識ペプチド (27.1 mg、13.4 μmol) を、 N_2 雰囲気下で、DMF (1.5 mL) に溶解した (図 14)。ジイソプロピルエチレンアミン (1.7 mg、13.4 μmol) を DMF 中にストック溶液として添加して、次いで、DMF 中にストック溶液として DMA P (0.68 mg、5.6 μmol) を添加した。室温での攪拌を、全ての出発物質が消費されるまで続けた。16 時間後、溶媒を真空下で除去した。粗物質を水中に溶解し、そして、RP-HP LC によって精製し (溶離液：水 / MeCN* TFA)、所望の生成物を得た (16.5 mg、5.9 μmol 、53%)。

【0219】

10

(他の C-2' 結合体)

タキソール誘導体 (8.7 mg、7.85 μmol) を EtOAc (2.0 mL) に溶解した。Pd/C (10%、4.0 mg) を添加し、反応フラスコを H_2 で 5 回パージした (図 15A)。水素雰囲気下で攪拌を 7 時間続けた。Pd/C をろ過し、そして、溶媒を真空下で除去した。この方法で獲得された粗物質 (6.7 mg、6.58 μmol 、84%) は、純粋であって、次の工程でさらなる精製なしで使用され得た。

【0220】

遊離酸タキソール誘導体 (18.0 mg、17.7 μmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に溶解した。ジシクロヘキシルカルボジイミド (4.3 mg、21.3 μmol) を、 CH_2Cl_2 (0.1 mL) 中にストック溶液として添加した。N-ヒドロキシスクシンイミド (2.0 mg、17.7 μmol) を DMF (0.1 mL) にストック溶液として添加した (図 15B)。室温で攪拌することを 14 時間続けた。この溶媒を真空下で除去し、そして得られた粗物質をシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し (溶離液：EtOAc / ヘキサン 40% ~ 80%)、所望の生成物を得た (13.6 mg、12.2 μmol 、69%)。

20

【0221】

活性化タキソール誘導体 (14.0 mg、12.6 μmol) およびペプチド (30.6 mg、15.1 μmol) を、 N_2 雰囲気下で、DMF (3.0 mL) に溶解した (図 15C)。DMF (0.1 mL) 中にストック溶液として、ジイソプロピルエチレンアミン (1.94 mg、15.1 μmol) を添加して、次いで、0.1 mL の DMF 中にストック溶液として DMA P (0.76 mg、6.3 μmol) を添加した。室温での攪拌を、全ての出発物質が消費されるまで続けた。20 時間後、溶媒を真空下で除去した。粗物質を水に溶解し、そして、RP-HP LC によって精製し (溶離液：水 / MeCN* TFA)、1:6 の比率 (それぞれ、カーボネート対カルバメート) で 2 種類の示されるタキソール結合体を生成した。

30

【0222】

(2. 皮膚を横断する輸送の分析)

PBS に溶解された様々な濃度 (1 mM ~ 100 μM) の、D-アルギニンのビオチン化五量体、七量体、または九量体 (bio r5、bio r7、または bio r9) のいずれかに結合体化したタキソールを、ヌードマウスの背中に適用した。サンプル (100 μl) を、賦形剤内の液体として適用し、そして、VaselineTM 障壁によって分散することを妨げ、30 分、60 分、および 120 分間浸透させた。この期間の終わりに、動物を屠殺し、皮膚の関連切片を切除し、封入剤 (OCT) で包埋し、凍結させた。凍結切片を、クリオスタットを用いて切り出し、スライド上に収集し、そして、実施例 1 に記載されるように、蛍光標識したストレプトアビジン (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で染色した。スライドを、蛍光顕微鏡によって分析した。

40

【0223】

(結果)

D-アルギニンのビオチン化七量体および九量体とタキソールとの結合体は、ヌードマウ

50

スの皮膚の表皮の中へおよび皮膚の表皮を横断して真皮の中へ効率的に進入した。対照的に、アルギニンの五量体とタキソールとの間での結合体では、ほとんど取り込みが見られず、そして、PBSコントロールでは、全く染色が見られなかった。視野における全ての細胞の細胞質および核が蛍光性であり、表皮および真皮中への浸透、および表皮および真皮の通過を示す。この染色パターンは、小胞および小胞間の両方の予期しない輸送と一致していた。さらに、陽性細胞は、乳頭状および網状真皮において明らかであった。これらの結果は、十分なグアニジル基が、送達増強トランスポーターに含まれる場合のみ、目立った取り込みを示す。

【0224】

(実施例12)

(タキソールおよび送達増強トランスポーターのpH放出可能なリンカーとの結合体)

この実施例は、生理学的pHに曝される際、送達増強トランスポーターから薬物を放出するリンカーによって、薬物に連結された送達増強トランスポーターを有するプロドラッグを合成するための一般的なストラテジーの使用を実証する。一般的には、薬物上の適切な部位は、 α -クロロアセチル残基を有するように誘導体化される。次に、塩素が、保護されていないアミンを保有するシステイン残基のチオールと置換される。このスキームを、図16に示す。

【0225】

(方法)

(タキソール-2'-クロロアセチルの合成)

タキソール (89.5 mg、104.9 μ mol) を、 CH_2Cl_2 (3.5 mL) に溶解した。N₂ 雰囲気下で、溶液を0°C以下に冷却した。無水 α -クロロ酢酸 (19.7 mg、115.4 μ mol) を添加し、DIEA (14.8 mg、115.4 μ mol) を続いて添加した。溶液を室温に昇温させた。薄層クロマトグラフィー (tlc) 分析が、出発物質の完全な消費を示した後、溶媒を真空下で除去し、そして、粗物質をシリカゲルでフラッシュクロマトグラフィーによって精製し (溶離液: EtOAc/Hex 20%~50%)、所望の物質を得た (99.8 mg、定量的) (図17)。

【0226】

【化14】

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8.13 (d, J = 7.57 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 7.57 Hz, 2H),

7.62–7.40 (m, 11H), 6.93 (d, J = 9.14 Hz, 1H), 6.29–6.23 (m, 2H), 6.01 (d, J = 7.14 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 6.80 Hz, 1H), 5.55 (d, J = 2.24 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 4.43 (m, 1H), 4.30 (d, J = 8.29 Hz, 1H), 4.20–4.15 (m, 2H), 3.81 (d, J = 6.71 Hz, 1H), 2.56–2.34 (m, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.19 (m, 1H), 1.95–1.82 (m, 3H), 1.92 s, (3H), 1.67 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.13 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 203.6, 171.1, 169.7, 167.3, 167.0, 166.9, 166.3,

142.3, 136.4, 133.6, 133.5, 132.9, 132.0, 130.1, 129.2, 121.1, 128.7, 128.6, 127.0, 126.5, 84.3, 81.0, 79.0, 76.3, 75.4, 75.2, 75.0, 72.2, 72.0, 58.4, 52.7, 45.5, 43.1, 40.1, 35.5, 26.7, 22.6, 22.0, 20.7, 14.7, 9.5 ppm.

(タキソールの送達増強トランスポーターへの連結)

ペプチド (47.6 mg、22.4 μ mol) を、N₂ 雰囲気下でDMF (1.0 mL) に溶解した。DIEA (2.8 mg、22.4 μ mol) を添加した。DMF (1.0 mL) 中のタキソール-2'-クロロ酢酸 (20.8 mg、22.4 μ mol) の溶液を添加した。室温での攪拌を6時間続けた。0.1% TFA (1.0 mL) を含む水を添加し、サンプルを凍結し、溶媒を凍結乾燥した。粗物質をRP-HPLCによって精製した (溶離液: 水/MeCN* 0.1% TFA: 85%~15%)。この反応のスキームを図1

10

20

30

40

50

8 に示す。

【0227】

(関連結合体の合成)

上記に概要を述べた結合体の条件を用いて、示される3つのさらなる結合体を合成した。

【0228】

(細胞傷害性アッセイ)

タキソール結合体を、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル-テトラゾリウム-ブロミド (MTT) 染色還元における細胞傷害性について試験した。結果 (図20に示す) は、易pH放出可能なリンカーを有するr7に結合したタキソール (CG 1062; 図19に示される構造においてR=Ac) は、タキソール単独、
または難pH放出可能なリンカーを有するr7に結合されたタキソール (CG 1040; 図19に示される構造においてR=H) のいずれかよりも、有意により細胞障害性であることを示す。

10

【0229】

(実施例13)

(Tat_{49~57}由来の蛍光標識ペプチドの構造-機能関係)

(方法)

(概要) Rinkアミド樹脂およびBoc₂OをNovabiochemより購入した。ジイソプロピルカルボジイミド、ブロモ酢酸、フルオレセインイソチオシアネート (FITC-NCS)、エチレンジアミン、1,3-ジアミノプロパン、1,4-ジアミノブタン、1,6-ジアミノヘキサン、トランス-1,6-ジアミノシクロヘキサン、およびピラゾール-1-カルボキシアミジンを全てAldrich (登録商標) より購入した。全ての溶媒および他の試薬を、販売元より購入し、そして、さらなる精製なしで使用した。モノ-Bocアミンを、文献の手順 (クロロホルム中で、10当量のジアミンのおよび1当量のBoc₂O、次いで未反応のジアミンを除去するための水でのワークアップ) を用いて、市販ジアミンより合成した (34)。

20

【0230】

【化15】

N-tert-ブトキシカルボニル-1,6-trans-ジアミノシクロヘキサン Mp 159-161 °C; ¹H

NMR (CDCl₃) δ 4.35 (br s, 1H), 3.37 (br s, 1H), 2.61 (br s, 1H), 1.92-2.02 (m, 2H), 1.81-

1.89 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.07-1.24 (m, 4H) ppm; ¹³C NMR (D₆-DMSO) δ 154.9, 77.3,

49.7, 48.9, 35.1, 31.4, 28.3 ppm; ES-MS (M+1) 計算値 215.17, 実測値 215.22.

30

(ペプチド合成のための一般的な手順) Tat_{49~57} (RKKRRQRRR) (Tat_{49~57}由来の短縮化およびアラニン置換ペプチド)、アンテナペディ_{43~58} (RQIKIWFRMRMKWK) 、ならびにアルギニン (R_{5~9}) およびd-アルギニン (r_{5~9}) のホモポリマーを、ペプチドカップリング試薬としてHATUを用いる標準的な固相Fmoc化学 (35) を使用して、自動ペプチド合成機 (ABI 433) により調製した。フルオレセイン部分を12時間、DMF (10 mL) におけるフルオレセインイソチオシアネート (1.0 mmol) およびDIEA (5 mmol) を使用して樹脂結合ペプチド (1.0 mmol) を処理することによって、アミノヘキサン酸スパーサーを介して付着させた。樹脂からの切断を、95:5 TFA/トリイソプロピルシランを用いて達成した。減圧下における溶媒の除去は、冷エーテルで粉碎した原油を与える。従って、得られた粗混合物を遠心分離し、デカンテーションによってエーテルを除去し、そして、得られたオレンジ色の固体を、逆相HPLC (0.1% TFA中、H₂O/CH₃CN) によって精製した。生成物を、凍結乾燥によって単離し、そして、エ

40

50

クトロスプレー質量分析によって特徴付けた。ペプチドの純度は、分析用逆相HPLC（0.1% TFA中、H₂O/CH₃CN）によって決定される場合、95%を超えた。

【0231】

合成された全てのペプチドおよびペプチドは、アミノヘキサン酸スパーサーのアミノ基に共有結合されるフルオレセイン部分（FI）を有するN末端アミノ基に付着されたアミノヘキサン（ahx）酸部分を含む。全てのペプチドおよびペプチドのカルボキシル末端は、カルボキサミドである。

【0232】

（細胞の取り込みアッセイ）アルギニンホモポリマーおよびグアニジン置換ペプチドをそれぞれ、PBS緩衝液（pH 7.2）中で溶解し、そして、それらの濃度を490nm（ $\epsilon = 67,000$ ）におけるフルオレセインの吸収によって決定した。濃度を決定するためのこの方法の精度は、選択されたサンプルの秤量およびPBS緩衝液の既知の量においてそれらを溶解することによって確立される。UV分光法によって決定された濃度は、手動で秤量された量に相関する。Jurkat細胞（ヒトT細胞株）、マウスB細胞（CH27）、またはヒトPBL細胞を、10%胎仔ウシ血清およびDMEM中で増殖し、そして、これらのそれぞれを細胞の取り込み実験について使用した。様々な量のアルギニンおよびグアニジン置換ペプチドのオリゴマーを、2%FCS/PBS（組み合わせて総量200 μ L）中の約 3×10^6 細胞に添加し、そして、マイクロタイタープレート（96ウェル）に配置し、そして、23℃または4℃で、様々な時間でインキュベートした。マイクロタイタープレートを遠心分離し、そして、細胞を単離し、PBS（ $3 \times 250 \mu$ L）で洗浄し、5分間37℃で0.05%トリプシン/0.53mM EDTAでインキュベートし、冷PBSで洗浄し、そして、0.1%ヨウ化プロピジウムを含むPBS中で再懸濁した。この細胞を蛍光フローサイトメトリー（FACScan, Becton Dickinson）を用いて分析し、そして、ヨウ化プロピジウムを使用して染色した細胞を、分析から除外した。示されるデータは、収集された5000細胞についての平均蛍光シグナルである。

【0233】

（アジ化ナトリウムを使用した細胞の取り込みの阻害）使用された細胞を、蛍光性ペプチドの添加の前に2%FCS/PBS緩衝液中に0.5%アジ化ナトリウムを使用して30分間プレインキュベートし、そして、その細胞をPBS緩衝液中の0.5%アジ化ナトリウムを使用して洗浄することを除き、以前に記載されるようにアッセイを行なった。細胞の取り込みの全てのアッセイを、アジ化ナトリウムの存在下および非存在下で並行して行なった。

【0234】

（細胞の取り込み速度アッセイ）細胞を、マイクロタイタープレート（96ウェル）において2%FCS/PBS（50 μ L）中で3連で、4℃で、0.5、1、2、および4分間、インキュベートしたのを除き、アッセイを上記のように行なった。2%FCS/PBS（5mL）中にサンプルを希釈することによって、反応をクエンチした。次いで、このアッセイをワークアップし、そして、以前に記載されたように、蛍光フローサイトメトリーによって分析した。

【0235】

（結果）

短いアルギニンリッチペプチドの細胞の取り込みのための構造的必要を決定するために、一連のTat_{49~57}の蛍光標識短縮アナログを、標準的な固相化学用いて、合成した。例えば、Atherton、E.ら、SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS（IRL:Oxford, Engl. 1989）を参照のこと。フルオレセイン部分をアミノ末端のアミノヘキサン酸スパーサーを介して付着した。次いで、これらの蛍光標識ペプチドがJurkat細胞に入る能力を、蛍光活性化細胞仕分け（FACS）を用いて分析した。試験されたペプチド構築物は、

【0236】

【化 1 6】

Tat₄₉₋₅₇ (Fl-ahx-RKKRRQRRR): Tat₄₉₋₅₆ (Fl-ahx-RKKRRQRR), Tat₄₉₋₅₅ (Fl-ahx-RKKRRQR), Tat₅₀₋₅₇ (Fl-ahx-KKKRRQRRR), および Tat₅₁₋₅₇ (Fl-ahx-KRRQRRR).

であった。細胞表面結合と内部移行との間の差異を、アジ化ナトリウムの存在下および非存在下における並行の組のアッセイを行なうことによって、完全に達成した。アジ化ナトリウムは、エネルギー依存の細胞の取り込みを阻害するが、細胞表面結合は阻害しないので、2つのアッセイの間の蛍光の差異は、内部移行から生じる蛍光の量を提供した。

10

【0 2 3 7】

アミノ末端 (Tat_{50~57}) またはカルボキシル末端 (Tat_{49~56}) のいずれか由来のアルギニン残基の欠失は、親配列 (Tat_{49~57}) と比較して、細胞内蛍光の80%の喪失を生じた。1アミノ酸短縮アナログに由来する、カルボキシル末端からのR-56のさらなる欠失 (Tat_{49~55}) は、細胞内蛍光のさらなる60%の喪失を生じたが、アミノ末端由来のK-50の欠失 (Tat_{51~57}) は、内部移行の量をさらに減少しなかった。これらの結果は、Tat_{49~57} の短縮アナログが、Jurkat細胞へのフルオレセインの細胞外送達において有意に効果が低く、アルギニン残基が、リジン残基よりも細胞の取り込みにより貢献するようであることを示す。

【0 2 3 8】

個々のアミノ酸残基の細胞の取り込みへの貢献を決定するために、Tat_{49~57} のそれぞれの部分でのアラニン置換を含むアナログを合成し、そして、FACS分析によって合成した (図 2 2)。以下の構築物を試験した：

【0 2 3 9】

【化 1 7】

A-49 (Fl-ahx-AKKRRQRRR), A-50 (Fl-ahx-RAKRRQRRR), A-51 (Fl-ahx-RKARRQRRR), A-52 (Fl-ahx-RKKARQRRR), A-53 (Fl-ahx-RKKRAQRRR), A-54 (Fl-ahx-RKKRRARRR), A-55 (Fl-ahx-RKKRRQARR), A-56 (Fl-ahx-RKKRRQRRR), および A-57 (Fl-ahx-RKKRRQRRR).

30

。Tat_{49~57} の非荷電グルタミン残基のアラニン (A-54) との置換は、細胞内部移動における緩やかな減少を生じた。他方、陽イオン残基のそれぞれのアラニン置換は、細胞の取り込みの70~90%の喪失を個別に産生した。これらの場合では、アラニンと、リジン (A-50、A-51) またはアルギニン (A-49、A-52、A-55、A-56、A-57) の置換は、取り込みを減少させる際に類似の効果を有した。

【0 2 4 0】

トランスポーターペプチドのキラリティーが重要であるか否かを決定するために、対応するd- (d-Tat_{49~57})、レトロ-1- (Tat_{57~49}) およびレトロ-逆異性体 (d-Tat_{57~49}) を合成し、そして、FACSアッセイによって分析した (図 2 3)。重要なことには、全ての3アナログは、Jurkat細胞に入る際、Tat_{49~57} よりもより効果的であった。これらの結果は、ペプチド骨格のキラリティーが細胞の取り込みが重要でないことを示した。興味深いことには、Tat_{49~57} において見出される1つのアルギニンおよび2つのリジンの代わりに、アミノ末端に位置する3つのアルギニン残基を有するレトロ-1アイソマー (Tat_{57~49}) は、取り込み増加したことを示した。従って、アミノ末端における残基は重要であるようであり、そして、アルギニンは、内部移行について、リジンよりもより効果的である。非天然のd-ペプチドの改善した細胞の取り込みは、アッセイで使用された2% FCS (胎仔ウシ血清) におけるタンパク質分解に対するそれらの増加した安定性に起因するようである。血清が除去される場合、d-ペプチドおよびl-ペプチドは、予想されるように等価であった。

50

【0241】

これらの最初の結果は、アルギニン含有量が、Tat₄₉₋₅₇の細胞の取り込みについて主な原因であることを示す。さらに、これらの結果は、アルギニンの短いオリゴマーが、細胞に入る際、リジン、オルニチン、およびヒスチジンの対応する短いオリゴマーよりもより効果的であることを実証した、本発明者らの以前の結果と一貫していた。確立されていなかったことは、アルギニンホモオリゴマーが、Tat₄₉₋₅₇よりもより効果的であるか否であった。この点に関して、Tat₄₉₋₅₇を、l-アルギニン(R5-R9)およびd-アルギニン(r5-r9)オリゴマーと比較した。Tat₄₉₋₅₇は、陽イオン性残基を含むが、その細胞内部移行は、R6およびR7との間の内部移行であり(図24)、このことは6つのアルギニン残基の存在が、細胞の取り込みについて最も重要な因子であることを示す。重要なことに、7-9アルギニン残基を含む結合体は、Tat₄₉₋₅₇よりもより優れた取り込みを示した。

【0242】

これらのアルギニンオリゴマーおよびTat₄₉₋₅₇の細胞に入る能力を定量的に比較するために、ミカエリス-メンテン速度分析を行なった。細胞の取り込みの速度は、30、60、120および240秒間、Jurkat細胞におけるペプチドのインキュベーション(3℃)後に決定した(表1)。結果のK_m値は、r9およびR9が、Tat₄₉₋₅₇よりもそれぞれ、約100倍および20倍速い速度で、細胞に入ることを明らかにした。比較のために、アンテナペディア(Antennapedia)₄₃₋₅₈をまた分析し、そして、Tat₄₉₋₅₇より約2倍速く細胞に入ることを示したが、r9およびR9よりも有意に遅かった。

【0243】

【表1】

表1：ミカエリス-メンテン速度論：アンテナペディア
43-58 (Fl-ahx- RQIKIWFQNRRMKWKK).

ペプチド	K _m (μM)	V _{max}
Tat ₄₉₋₅₇	770	0.38
アンテナペディア ₄₃₋₅₈	427	0.41
R9	44	0.37
r9	7.6	0.38

(実施例14)

(Tat₄₉₋₅₇のペプチド模倣アナログの設計および合成)

(方法)

ペプチドポリアミン合成の一般的手順。ペプチドを、Zuckermannによって開発された文献の手順に従って、樹脂を混合するために、フリッティングしたガラス装置および窒素の正圧を使用して、手動で合成した。例えば、Murphy, J. Eら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1517-1522 (1998); Simon, R. Jら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9367-9371 (1992); Zuckermann, R. Nら、J. Am. Chem. Soc. 114, 10646-10647 (1992)を参照のこと。Fmoc置換Rinkアミド樹脂(0.2 mmol)の、20%ピペリジン/DMF(5 mL)での30分間(2×)の処理により、遊離樹脂結合アミンを得、これをDMF(3×5 mL)で洗浄した。この樹脂を、DMF(5 mL)中のブロモ酢酸(2.0 mmol)の溶液で30分間処理した。この手順を繰り返した。次いで、この樹脂を洗浄し(3×5 mL DMF)、そしてDMF(5 mL)中のモノ-Bocジアミン(8.0 mmol)の溶液で12時間

処理した。これら2つの工程を、所望の長さのオリゴマーが得られるまで繰り返した（注記：DMF中のモノ-Bocジアミンの溶液を、収率を明らかに低下させることなく再利用し得た）。次いで、この樹脂を、DMF中のN-Fmoc-アミノヘキサン酸（2.0 mmol）およびDIC（2.0 mmol）で1時間処理し、そしてこれを繰り返した。次いで、Fmocを、20%ピペリジン/DMF（5 mL）で30分間処理することによって、除去した。この工程を繰り返し、そしてこの樹脂をDMF（3×5 mL）で洗浄した。次いで、遊離アミン樹脂を、DMF（5 mL）中のフルオレセインイソチオシアネート（0.2 mmol）およびDIEA（2.0 mmol）で12時間処理した。次いで、この樹脂をDMF（3×5 mL）およびジクロロメタン（5×5 mL）で洗浄した。この樹脂からの切断を、95:5 TFA/トリイソプロピルシラン（8 mL）を使用して達成した。減圧下での溶媒の除去により、粗製油を得、これを冷エーテル（20 mL）で粉碎した。このように得た粗製混合物を遠心分離し、エーテルをデカンテーションによって除去し、そして得られる橙色固体を、逆相HPLC（0.1% TFA中H₂O/CH₃CN）により精製した。この生成物を、凍結乾燥によって単離し、そして電子スプレー質量分析によって、そして選択され場合には¹H NMR分光法によって、特徴付けた。

10

【0244】

ペプチドポリアミンの過グアニジニル化（Perguanidinylation）のための一般的手順。脱イオン水（5 mL）に溶解したペプチドアミン（0.1 mmol）の溶液を、炭酸ナトリウム（1つのアミン残基あたり5当量）およびピラゾール-1-カルボキサミジン（1つのアミン残基あたり5当量）で処理し、そして24～48時間50℃に加熱した。次いで、この粗製混合物を、TFA（0.5 mL）で酸性化し、そして逆相HPLC（0.1% TFA中H₂O/CH₃CN）で直接精製した。この生成物を、電子スプレー質量分析によって特徴付け、そして凍結乾燥によって単離し、そして逆相HPLCによってさらに精製した。このグアニジン置換したペプチドの純度は、分析逆相HPLC（0.1% TFA中H₂O/CH₃CN）によって決定した場合に、95%より高かった。

20

【0245】

（結果）

Tat₄₇₋₅₉の細胞取り込みについて決定した構造-機能関係を利用して、本発明者らは、アルギニンオリゴマーの側鎖の1,4骨格間隔を保存するが、ステレオジェン中心が欠けているオリゴグリシン骨格を有するポリグアニジンペプチド誘導体のセットを設計した。アルギニン様側鎖をアミド窒素に組み込むこれらのペプチドを、これらのタンパク分解に対する予測される抵抗性、ならびに合成の潜在的な容易さおよび有意に低い費用に起因して、選択した。（Simonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371（1992）；Zuckermannら、J. Am. Chem. Soc. 114:10646-10647（1992））さらに、ラセミ化（頻繁に、ペプチド合成において遭遇する）は、ペプチド合成においては問題ではない；そして「亜モノマー（sub-monomer）」ペプチドアプローチは、側鎖スペーサーの容易な改変を可能にする。Tat₄₉₋₅₇のオリゴウレア（oligurea）およびペプチド-ペプチドハイブリッド（Hamyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3548-3553（1997））誘導体の調製は、以前に報告されているが、これらの細胞取り込みは、明白には研究されなかった。

30

40

【0246】

所望のペプチドを、ペプチドに対する「亜モノマー」アプローチ（Simonら；Zuckermannら）を使用して調製し、続いてアミノヘキサン酸スペーサーを介して、フルオレセイン部分をアミン末端に結合させた。固相樹脂からの切断の後に、このように得られた蛍光標識したポリアミンペプチドを過剰のピラゾール-1-カルボキサミジン（Bernatowiczら、J. Org. Chem. 57:2497-2502（1992））および炭酸ナトリウムで処理することによって、良好な収率（60～70%）でポリグアニジンペプチドに転換した（図25に示すように）。以前に報告された、単離

50

されたN-A r g ユニットを含むペプチドの合成は、ペプチド合成の前のN-A r g モノマーの合成（5～7工程）および特殊化されかつ高価なグアニジン保護基（P m c、P b f）の使用に依存した（K r u i j t z e r ら、C h e m. E u r. J. 4：1570-1580（1998）；H e i z m a n n ら、P e p t i d e R e s. 7：328-332（1994））。本明細書で報告される化合物は、過グアニジニル化工程を使用して調製される、ポリグアニジニル化ペプチドの最初の例を提示する。この方法は、対応するポリアミンからのポリグアニジニル化化合物への容易なアクセスを提供し、そして過グアニジニル化ホモオリゴマーの合成のために、特に有用である。さらに、この方法は、高価な保護基（P b f、P m c）の使用を排除する。新規のトリフリル（t r i f l y l）置換グアニル化剤を使用する、ペプチド基質の過グアニジニル化のさらなる例が、最近報告された（F e i c h t i n g e r ら、J. O r g. C h e m. 63：8432-8439（1998））。 10

【0247】

蛍光標識されたポリグアニジンN-a r g 5 ペプチド、ポリグアニジンN-a r g 7 ペプチド、ポリグアニジンN-a r g 9 ペプチドの細胞取り込みを、J u r k a t 細胞およびF A C S 分析を使用して、対応するd-アルギニンペプチドr 5、r 7、r 9（類似のタンパク分解性特性）と比較した。N-a r g 5、N-a r g 7、N-a r g 9を含む細胞の内側で測定した蛍光の量は、r 5、r 7、r 9に関して見出される量に類似して、グアニジン残基の数に比例した：N-a r g 9 > N-a r g 7 > N-a r g 5（図26）。さらに、N-a r g 5 ペプチド、N-a r g 7 ペプチド、N-a r g 9 ペプチドは、対応するペプチドr 5、r 7、r 9と比較して、わずかに低い量の細胞侵入のみを示した。これらの結果は、T a t 4 9 - 5 7 またはアルギニンオリゴマーのペプチド骨格に沿った水素結合が、細胞取り込みのために必要とされる構造的エレメントではなく、そしてオリゴマーのグアニジン置換ペプチドが、アルギニンに富むペプチドの代わりに、分子トランスポーターとして利用され得ることを実証する。アジ化ナトリウムの添加は、インターナリゼーションを阻害し、このことは、ペプチドの細胞取り込みもまたエネルギー依存性であることを示した。 20

【0248】

（実施例15）

（細胞取り込みに対する側鎖長の効果） 30

N-a r g ペプチドが効果的に細胞膜と交差することを確認した後に、細胞取り込みに対する側鎖長（メチレンの数）の効果を調査した。所定の数のグアニジン残基（5、7、9）については、細胞取り込みは、側鎖長に比例した。より長い側鎖を有するペプチドは、より効率的な細胞取り込みを示した。グアニジンヘッド基と骨格との間に6つのメチレンスペーサーを有する9マーペプチドアナログ（N-h x g 9）は、対応するd-アルギニンオリゴマー（r 9）より顕著により高い細胞取り込みを示した。取り込みの相対的順序は、N-h x g 9（6メチレン）> N-b t g 9（4メチレン）> r 9（3メチレン）> N-a r g 9（3メチレン）> N-e t g 9（2メチレン）であった（図27）。注記として、N-h x g ペプチドは、対応するd-アルギニンオリゴマーよりさらに大きな、顕著に高い細胞取り込みを示した。対応するヘプタマーおよびペンタマーの細胞取り込みもまた、同じ相対的傾向を示した。N-h x g ペプチドに含まれる側鎖がより長いほど、インターナリゼーションの量がさらに1つ多いグアニジン残基を含む対応するd-アルギニンオリゴマーに匹敵するような程度まで、細胞取り込みが改善された（図28）。例えば、N-h x g 7 ペプチドは、r 8に匹敵する細胞取り込みを示した。 40

【0249】

細胞取り込みの増加が、増加した長さの側鎖に起因したのか、またはそれらの疎水性の性質に起因したのかを確認するために、シクロヘキシル側鎖を含むペプチドのセットを合成した。これらを、N-c h g 5 ペプチド、N-c h g 7 ペプチド、N-c h g 9 ペプチドと呼ぶ。これらは、N-h x g ペプチドと同じ数の側鎖炭素を含むが、異なる自由度を有する。興味深いことに、N-c h g ペプチドは、以前にアッセイされたペプ 50

トイド (N-e t g ペプチドを含む) の全てよりも、ずっと低い細胞取り込み活性を示した (図 29)。従って、直鎖アルキルスパーサー基 (s p a c i n g g r o u p) の、コンホメーションの可撓性および立体的に妨害されない性質が、効率的な細胞取り込みのために重要である。

【0250】

(考察)

ノナペプチド T a t₄₉₋₅₇ は、以前に、原形質膜を通して効率的に転座することが示された。この研究の目的は、この効果のための構造的基礎を決定すること、およびこの情報を使用してより単純かつより効果的な分子トランスポーターを開発することであった。この目的のために、フルオレセイン標識に結合体化した、T a t₄₉₋₅₇ の短縮型誘導体およびアラニン置換誘導体を調製した。これらの誘導体は、T a t₄₉₋₅₇ と比較して非常に減少した細胞取り込みを示し、このことは、T a t₄₉₋₅₇ のカチオン性残基の全てが、効率的な細胞取り込みのために必要とされることを示す。カチオン性オリゴマーの短いオリゴマーに関する本発明者らの以前の研究と比較した場合に、これらの知見は、アルギニンのオリゴマーが、T a t₄₉₋₅₇ より優れており、そして確かにより容易かつ費用効率的に調製され得ることを示唆した。短いアルギニンオリゴマーと T a t₄₉₋₅₇ との比較は、前者のメンバーが、実際に、より効率的に細胞に取り込まれることを示した。これは、初めて、M i c h a e l i s - M e n t o n の速度論分析によって、さらに定量され、この分析は、R9 および r9 オリゴマーが、T a t₄₉₋₅₇ に関して見出される値より 30 倍および 100 倍大きな K_m 値を有することを示した。

10

20

【0251】

本発明者らのペプチドの研究において明らかとなった、グアニジノヘッド基の重要性およびオリゴマーキラリティーの明らかな不感受性を考慮して、本発明者らは、新規な一連のポリグアニジンペプチドを設計し、そして合成した。アルギニン側鎖を組み込むペプチドである N-a r g₅、N-a r g₇、N-a r g₉ は、対応する d-アルギニンペプチド r₅、r₇、r₉ に匹敵する細胞取り込みを示した。このことは、ペプチド骨格に沿った水素結合および骨格キラリティーが、細胞取り込みのために必須ではないことを示す。この観察は、これらのペプチド、アルギニンオリゴマー、および T a t₄₉₋₅₇ (これらは全て、深く埋め込まれた骨格およびグアニジニウム優性表面を有する) の分子モデルと一致する。分子モデルは、これらの構造的特性が、ペプチド骨格とグアニジノヘッド基との間に異なるアルキルスパーサーを有するオリゴマーにおいて、様々な程度で保持されることを、さらに明らかにする。従って、骨格と側鎖との間に 2- (N-e t g)、4- (N-b t g)、および 6-a t o m (N-h x g) のスパーサーを組み込む一連のペプチドを調製し、そして細胞取り込みについて、N-a r g ペプチド (3 原子スパーサー) および d-アルギニンオリゴマーと比較した。側鎖の長さは、細胞侵入に対して、劇的な影響を有した。細胞取り込みの量は、N-h x g > N-b t g > N-a r g > N-e t g の順で、側鎖の長さに比例した。細胞取り込みは、グアニジンヘッド基と骨格との間のアルキルスパーサーユニットの数が増加する場合に、改善された。重要なことに、N-h x g₉ は、r₉ より優れており、後者は、T a t₄₉₋₅₇ より 100 倍良好であった。この結果により、本発明者らは、グアニジノ基と骨格との間により長いオクチルスパーサー (N-o c g) を含むペプチド誘導体を調製した。溶解度に関する問題点に起因して、本発明者らは、これらの化合物を試験しなかった。

30

40

【0252】

過グアニジニル化ペプチドと過グアニジニル化ペプチドとの両方が、効率的に細胞に侵入するので、グアニジンヘッド基 (骨格とは独立している) は、明らかに、細胞取り込みの重大な構造的決定因子である。しかし、いくつか (6 より大きい) のグアニジン部分が分子の足場に存在することは、細胞内への能動的な移送のためには十分ではない。なぜなら、N-c h g ペプチドは、細胞内に効率的に転座しなかったからである。従って、グアニジンヘッド基の重要性に加えて、細胞取り込みのために重要な構造/コンホメーション要件が存在する。

50

【0253】

要約すると、この研究は、T a t₄₉₋₅₇ が細胞に侵入する能力に影響を与える、一連の構造的特徴（配列の長さ、アミノ酸組成、およびキラリティーを含む）を同定した。これらの特徴は、一連の新規ペプチドの設計のための設計図を提供し、これらのうちの17のメンバーが合成され、そして細胞取り込みに関してアッセイされた。重要なことには、N-h x g₉ トランスポーターは、細胞取り込みが、r₉ より優れており、これは、N-b t g₉ に匹敵することが見出された。従って、これらのペプチドトランスポーターは、T a t₄₉₋₅₇ より実質的に良好であることが示された。この研究は、ペプチド骨格およびその骨格に沿った水素結合が、細胞取り込みのために必要ではないこと、グアニジノヘッド基が、他のカチオン性サブユニットより優れていること、ならびに最も重要なことには、骨格とヘッド基との間のアルキル鎖の伸長が、優れたトランスポーターを提供することを、確認した。より良好な取り込み性能に加えて、これらの新規ペプチドは、T a t₄₉₋₅₇ より優れたいくつかの利点（費用効果、アナログの合成の容易さ、およびプロテアーゼ安定性を含む）を与える。これらの特性は、それらの有意な水溶性（> 100 mg / mL）とともに、これらの新規ペプチドが、薬物、薬物候補および他の薬剤の、細胞内への分子送達のための効果的なトランスポーターとして働き得ることを示す。

10

【0254】

（実施例16）

（イトラコナゾールトランスポーター結合体の合成）

この実施例は、送達増強トランスポーターを、トリアゾール構造を含む化合物に結合させるための一般的なストラテジーの1つの適用を提供する。このスキーム（アルギニン（r₇）送達増強トランスポーターへのイトラコナゾールの結合を例として使用する）を、図30に示す。このスキームにおいて、RはHまたはアルキルであり、nは1または2であり、そしてXはハロゲンである。

20

【0255】

この反応は、ハロゲン（例えば、Br、F、I）またはメチルエステルを有するアシル基を結合するために、トリアゾール環の窒素の四量化の使用を含む。化合物3を、HPLCによって単離した。D₂O中でのプロトンNMRは、イトラコナゾールおよびトランスポーターのピークを明らかにした。

30

【0256】

メチルエステルは、70%以上の収率を提供したが、Br-プロピオン酸／エステル対を使用して得られた収率は、40～50%であった。次いで、このアシル誘導体は、送達増強トランスポーターのアミンと反応して、結合体を形成する。あるいは、ハロゲン化アシル基が、アミド結合を介して最初にトランスポーター分子に結合し得、その後、薬物化合物との反応が実施される。

【0257】

（実施例17）

（FK506結合体の調製）

この実施例は、FK506が、送達増強トランスポーターに結合される結合体の調製を記載する。2つの異なるリンカーを使用し、これらの各々は、生理学的pH（pH 5.5～7.5）でFK506を放出したが、より酸性のpHでより長い半減期を有した。これらのスキームを、図31AおよびBに図示する。

40

【0258】

（リンカー1：6-マレイミドカブロンヒドラジドトリフルオロアセテート（スキームIおよびII））

無水メタノール（5 mL）中のFK506（1）（0.1 g、124.4 μmol）、6-マレイミドカブロンヒドラジドトリフルオロアセテート（2）（0.126 g、373.2 μmol）およびトリフルオロ酢酸（触媒、1 μL）の溶液を、室温で36時間攪拌した。この反応物を薄層クロマトグラフィーによってモニタリングし、出発物質のほぼ完全な消失を示した〔TLC溶媒系—ジクロロメタン（95）：メタノール（5）、R_f =

50

0.3]。この反応混合物を乾燥するまで濃縮して、酢酸エチル (20 mL) 中に溶解させた。有機層を水および 10% 重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、次いで硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、そして濃縮した。残渣を溶出液としてジクロロメタン (96) : メタノール (4) を使用するカラムクロマトグラフィーによって精製して、ヒドラゾン 3 (0.116 g、92%) を得た。

【0259】

無水ジメチルホルムアミド (1 mL) 中の上記ヒドラゾン (3) (0.025 g、24.7 μmol)、トランスポーター (1 $\times$ Bacar₉CCONH₂ · 9TFA、Bacar₇CCONH₂ · 7TFA、BacacCCONH₂、NH₂r₇CCONH₂ · 8TFA、NH₂R₇CCONH₂ · 8TFA) およびジイソプロピルエチルアミン (1 $\times$) の溶液を、窒素下で 36 時間室温で攪拌し、この時点で、TLC は、出発ヒドラゾンの完全な消失を示した。溶媒を反応混合物からエバポレートし、そして残渣を、トリフルオロ酢酸緩衝化水およびアセトニトリルを使用する逆相 HPLC によって精製した。

10

【0260】

種々のトランスポーターとの結合体の収率は、以下：

【0261】

【化18】

Bacar₉CCONH₂·9TFA (4) との結合体 - 73%

Bacar₇CCONH₂·7TFA (5) との結合体 - 50%

20

BacacCCONH₂ (6) との結合体 - 52.9%

NH₂r₇CCONH₂·8TFA (7) との結合体 - 43.8%

NH₂R₇CCONH₂·8TFA (8) との結合体 - 62.8%

である。

【0262】

全ての生成物の構造を、¹H-NMR スペクトルおよび TOF MS 分析によって確認した。

【0263】

(リンカー 2 : 2 - (2-ピリジニルジチオ) エチルヒドラジンカルボキシレート (スキーム I I I および I V))

30

無水メタノール (5 mL) 中の FK506 (1) (0.1 g、124.4 μmol)、2 - (2-ピリジニルジチオ) エチルヒドラジンカルボキシレート (9) (0.091 g、373.2 μmol) およびトリフルオロ酢酸 (触媒、1 μL) の溶液を、室温で 16 時間攪拌した。この反応物を薄層クロマトグラフィーによってモニタリングし、出発物質のほぼ完全な消失を示した [TLC 溶媒系 - 酢酸エチル、R_f = 0.5]。この反応混合物を乾燥するまで濃縮して、酢酸エチル (20 mL) 中に溶解させた。有機層を水および 10% 重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、次いで硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、そして濃縮した。残渣を溶出液としてジクロロメタン (97) : メタノール (3) を使用するカラムクロマトグラフィーによって精製して、ヒドラゾン 10 (0.091 g、71%) を得た。

40

【0264】

(実施例 18)

(胃腸管におけるトランスポーターの差示的取り込み)

(方法)

(胃腸吸収プロトコル)

Taconic (Germantown, NY) から購入した 8 週齢および 10 週齢の雌 Swiss Webster マウスに対して実験を行った。マウスを Nembutal で麻酔し、腹部に沿って正中切開を行った。腸を測定し、所望の区画の両端で縫合によって

50

結紮し、そしてビオチン化ペプチドを管腔中に注入した（約100 μ l／インチ）。15分のインキュベーション後、この組織を取り出し、そして管腔をPBSで穏やかに洗浄した。

【0265】

Cell Gate トランスポーターが、口腔の扁平上皮に進入し得るか否かを決定するために、マウスをNembutalで麻酔し、その頭部を一方向に傾け、そしてその口にビオチン化ペプチドの溶液を配置した。15分後、液体をピペットによって除去した。

【0266】

（胃腸管領域の組織学的切片の調製）

ビオチン化ペプチドとのインキュベーションの直後に、麻酔したげっ歯類動物を頸部脱臼によって屠殺し、そして結紮した胃腸管の区画を取り出した。種々の区画の管腔を、プラスチック先端のシリンジを使用してOCTで満たし、OCTを満たしたボートに浸漬し、そして2-メチルブタン／ドライアイス溶液中ですばやく凍結させた。凍結切片を僅かに温め、そして2mmの厚さの矢状切断を、鋼鉄のかみそりの刃を使用して行った。切片をOCT型に配置し、そして2-メチルブタン／ドライアイス溶液中ですばやく凍結させた。切片（5 μ m）を、クリオスタット上で切断し、アセトン中で4℃で10分間固定し、そして風乾させた。PBS中で5分間の再水和後、切片を正常ウマ血清でブロッッキングし、洗浄し、ストレプトアビジン-FITC（20 μ g／ml）と共に30分間インキュベートし、洗浄し、そしてヨウ化プロピジウム（PI）を含む取り付け媒体を用いて取り付け付けた。

10

20

【0267】

（組織培養）

Caco-2細胞をATCCから獲得し、解凍し、そしてペニシリン、ストレプトマイシン、グルタミンおよび10%ウシ胎仔血清を含むDMEM中で、コンフルエント（>250,000細胞／cm²）になるまで3～5日間増殖させ、次いで数継代サイクルにわたって、60,000細胞／cm²で継代した。継代数25～29を、Snapwell 12mm直径0.4ミクロン孔サイズのポリカーボネート膜（Corning Costar, Corning, N. Y.）上に、膜1枚当たり60,000細胞でプレートし、そして少なくとも21日間増殖させ、培地を一日おきに交換した。

30

【0268】

（Caco-2細胞における細胞取り込み）

懸濁物中の細胞へのD-アルギニンの蛍光オリゴマーの透過を分析するために、単層をトリプシン（0.05%溶液4.5ml、Gibco, Grand Rapids, MI）で処理し、個々の細胞懸濁物をスピンドウンした。細胞を再懸濁し、計数し、そして種々の濃度のFluor 5、Fluor 7、Fluor 9、Fluor 9（50～0.8 μ M）で5分間処理し、洗浄し、400 μ l PBS、2% EBS、40ng PI／ml中に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。

40

【0269】

蛍光ペプチドが単層の一部のCaco-2細胞に進入する能力を分析するために、細胞を、lab-tek flaskette顕微鏡スライド（Nalge Nunc Int.、Naperville, IL）において、60,000細胞／mlの密度で4ml中に播種し、そして培地を一日おきに交換しながら21日間増殖させた。一旦単層が確立されると、これを100 μ M Fluor 9 CONH₂と共に5分間インキュベートした。この単層を、引き続いてPBS／2% FBSで2回洗浄して、標識ペプチドを除去し、蛍光顕微鏡を使用して分析した。

【0270】

（単層のCaco-2細胞を横切る輸送）

短いD-アルギニンのオリゴマーが、Caco-2細胞の単層を横切り得るか否かを分析する実験を、電位固定増幅器およびEasymount並行水平拡散チャンバ（Physiologic Instruments, San Diego, CA）を、再循環水浴

50

に接続された 95%酸素 5%二酸化炭素ガスリフトシステムと共に使用して、実行した。

【0271】

電流測定値 ($I_2 - I_1$) を、試験化合物の添加の 10 分前を含めて、5 分間隔で取り、単層がインタクトであることを保証した。ゼロ時間で、試験化合物を適切な濃度で添加し、そして測定値を記録した。測定値を 60 分間にわたって 5 分間隔でとり、経上皮電気抵抗 (TEER) および短絡電流 (I_{sc}) を、これらの値から引き続いて計算した。

【0272】

(合成化学)

(シクロスポリン A)

この研究において使用した CsA 結合体の詳細は、以前に記載されている (Rothbardら、Nature Medicine 6、1253 2000)。図 6 もまた参照のこと。簡潔には、CsA を、図 6 A に示される pH 感受性リンカーを介して、D-アルギニン七量体に結合体化した。得られた結合体は、酸性 pH で安定であるが、7 より高い pH では、CsA に隣接するカルボニルに対する遊離アミンの付加を含む分子内環化を受けて (図 6 B)、未修飾 CsA の放出を生じる。

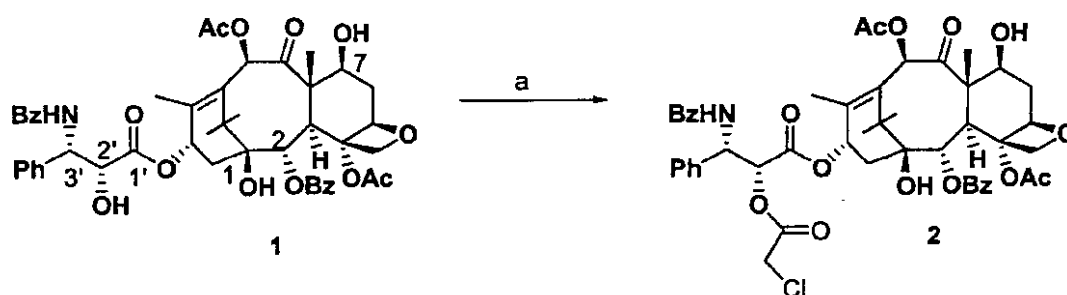
【0273】

(タキソール)

タキソールを、無水 α -クロロ酢酸で処理し、C-2' クロロアセチル誘導体 12 を実質的に定量的な収率で生じた。

【0274】

【化 19】



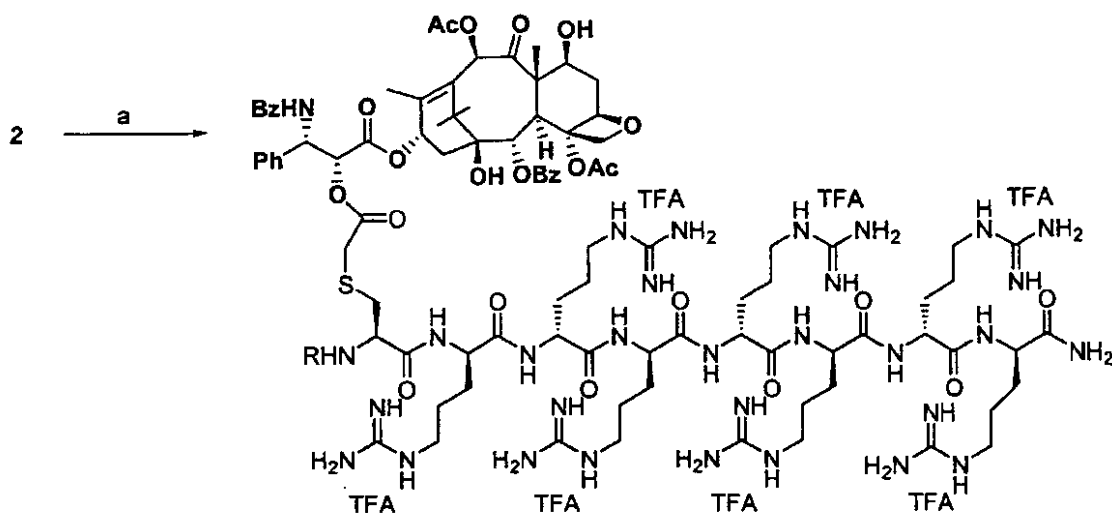
a) Cl-Ac₂O, DIEA, CH₂Cl₂, 室温、3時間

【0275】

【化 20】

20

30



10

a) ペプチド, DIEA, DMF, 室温
 13, R = H 48%
 14, R = Ac 87%

20

ハロゲンを、N-末端 (L) シスチン含有 D-アルギニン七量体のチオールによって置換した。結合体化を DIEA の存在下で DMF 中で室温にて実行した。最終生成物を RP-HPLC によって単離し、そして凍結乾燥させて TFA 塩 (これは、非常に吸湿性であり、そして水に容易に溶解した) を得た。

【0276】

化合物 13 を C2' エステルカルボニルへの N 末端窒素の求核攻撃を介してタキソールを放出するように設計した。この窒素のプロトン化状態は、この機構に重要である。なぜなら、遊離アミンのみがこの放出を行い得るからである。さらに、両方の結合体は、単純なエステル加水分解に対して感受性にする、共通の α -ヘテロ原子置換されたアセテート部分を共有する。これは、さらなる放出経路を提供する。

30

【0277】

(結腸内注入)

約 200~300 g の雌の Wister ラット (Simonsen, Gilroy, CA) を麻酔し、その腹部を剃毛し、正中切開を行い、そして各動物の上行結腸において 1.5 インチの切片を、縫合によって結紮した。タキソールおよびシクロスポリン (5 mg/kg) を 1:1 v/v の Cremophor EL: エタノール混合物中の溶液として注入したが、一方、等モル量の r7 結合体を、PBS 中で注入した。全ての場合において、注入される容積は、約 500 μ l であった。結腸を腔に戻し、そして切開を縫合を使用して閉じた。

【0278】

血液サンプルを、ゼロ時間 (薬物注入前) および実験の持続期間の間 30 分毎に尾部静脈から採取し、そして 90 分後に終了した 1 匹の動物以外、実験的に決定した。凝固を、100 μ l の 0.5% EDTA を含むガラス管に血液を移すことによって阻害し、そしてこの血液を凍結させた。

40

【0279】

(全血からの薬物抽出および HPLC-MS-MS 分析)

タキソールまたはシクロスポリンのいずれかを、文献の手順の改変を使用して全血から抽出した。簡潔には、全血 (100 μ l) を、5 ml のジエチルエーテルを含むネジキャップ付のガラス管に移した。このサンプルを 2 分間にわたって激しくボルテックスし、遠心分離し、そしてドライアイス/メタノール中で凍結させた。エーテル層を別のガラス管に移

50

し、そしてエーテルをエバポレートした。シクロスポリンの場合、残渣を1.5 mlのメタノール、水、アセトニトリル(3:2:1)に再懸濁したが、タキソールについては、残渣を1.5 mlのメタノール:アセトニトリル(1:1)に再懸濁した。サンプルをPerkin-Elmerシリーズ200自動サンプラー中に配置し、そしてShimadzu HPLCシステムに接続されたC18逆カラム上に70℃で引き続いて注入し、70%メタノール、30%水性蟻酸アンモニウム緩衝液で溶出し、そして溶出液をPE Sciex API 3000タンデム質量分析器で分析した。既知の量のシクロスポリンA(10~1000 ng/ml)またはタキソール(1~1000 ng/ml)のいずれかを全血に添加し、そして以前に記載されたように抽出して、標準曲線を得た。シクロスポリンAを、2つの遷移(1220~1203ダルトンおよび1220~100ダルトンの両方)によってモニタリングした。1220種は、シクロスポリンA+アンモニアに対応し、1203はプロトン化シクロスポリンであるが、100は既知のフラグメントである。タキソールを2つの遷移(872~855ダルトンおよび872~110ダルトンの両方)によってモニタリングした。872種は、タキソールのアンモニウム付加物に対応し、855は、プロトン化親化合物であるが、110は、第二の四極子において優勢に見られるフラグメントである。

10

【0280】

サンプル中のシクロスポリンAおよびタキソールの総量を、標準曲線によって確立された値と適切なピークの積分面積を比較することによって決定した。

20

【0281】

(結果)

(胃腸管におけるトランスポーターの差示的取り込み)

短いD-アルギニンのオリゴマーは、懸濁物中で増殖した広範な種々の細胞株の原形質膜を迅速かつ効率的に通過することが示された。さらに、これらは、局所的に適用される場合に複数層の皮膚を透過し、静脈内に注入される場合に静脈および動脈の複数層の内皮細胞および平滑筋細胞を透過し、そして吸入される場合には複数層の肺組織を透過することが示されている。これらの化合物が、胃腸管の非角質化上皮に進入し得るか否かを決定するために、断食マウスの小腸および大腸の区画を結紮し、そしてD-アルギニンのビオチン化九量体(bioaca-r9-CONH₂)の溶液(100 μM)を注入した。15分間の曝露後、組織の適切な区画を解剖し、凍結し、切片化し、そしてストレプトアビジンフルオレセインで染色して、ビオチン化ペプチドの位置を規定し、そしてヨウ化プロピジウムで切片中の全ての核を対比染色した。

30

【0282】

マウス十二指腸の管腔に注入された場合、バックグラウンドを超えて検出可能な染色は観察されなかった。乏しい染色はまた、ビオチン化ペプチドを空腸に注入した場合に見られた。複数の切片を走査した場合、検出可能な染色は、いくつかの絨毛の先端で見られた。均質な染色の第一の徴候は、回腸の切片を分析した場合に観察された。染色は、微絨毛の先端に局在し、そして陰窩の細胞には及ばなかった。回腸の全ての切片において見られたが、観察された蛍光は、皮膚、肺、または動脈もしくは静脈の内皮細胞において以前に観察された強度レベルには到達しなかった。

40

【0283】

小腸の比較的乏しい染色は、結腸領域が試験された場合に見られた染色とは、顕著に異なっていた。大腸の上行区画および横行区画の両方において、ビオチン化アルギニン九量体は、局所的に適用された場合、絨毛の全ての表面領域を染色し、いくつかの細胞層を透過し、表皮および真皮の強い染色を想起させた。さらに、陰窩の細胞は、結腸区画において強く染色され、そしてこの区画の全厚みの透過についての証拠が、いくつかの領域において観察された。

【0284】

組織学的分析は、胃腸管の非角質化上皮層へのbio-r9の取り込みが、胃の幽門からの距離と共に増大する取り込みを伴って、有意に変化したことを実証した。回腸において

50

観察された染色は、空腸において観察された染色よりも強く、空腸において観察された染色は、十二指腸において観察された染色よりも強かった。最も強い染色は、結腸の上行領域および横行領域において見られた。本発明を特定の理論または機構に限定することを意図しないが、上皮を裏打ちする粘膜の組成および量が、差示的染色における重要な因子であり得るとするのが1つの理論である。

【0285】

(Caco-2細胞への細胞取り込み)

Caco-2細胞(市販のヒト結腸細胞)を、種々の量の蛍光標識したD-アルギニンの五量体、七量体および九量体(Flaca r5、Flaca r7、Flaca r9)またはリジン九量体(Flaca k7)と共に懸濁物中でインキュベートし、そしてフローサイトメトリーによって分析し、種々の他の懸濁細胞において以前に見られたパターン(Mitchellら、Peptide Research 56、318 (2000))と類似のパターンが観察された(図32)。蛍光ペプチドの取り込みは、アルギニン含量と共に増大し、r9はr7より効率的であり、r7はr5よりも効率的であった。全てのアルギニンポリマーは、リジン九量体よりもより効率的に細胞に進入した。蛍光の速度、相対量、および延長した時間(数時間)にわたる内在化した蛍光ペプチドの見かけの流出の欠如の両方は、リンパ球を用いたより初期の実験を想起させた。

【0286】

細胞が懸濁物中に存在した場合にのみ見られたCaco-2細胞への短いアルギニンオリゴマーの迅速な透過が、人為的結果ではないことを確認するために、Flaca r9 CONH₂ (50 μM)を顕微鏡スライド上に単層として増殖したCaco-2細胞と共に5分間インキュベートし、洗浄し、そして蛍光顕微鏡によって分析した。懸濁細胞のフローサイトメトリーと一致して、単層中の実質的に全ての細胞は、5分後に蛍光であった。

【0287】

ペプチドがCaco-2細胞に迅速に進入する能力を、拡散チャンバ中の膜として単層のCaco-2細胞を配置し、そしてこれを、タキソールと異なる長さのアルギニンオリゴマーとの間の蛍光トランスポーター薬物結合体に曝露することによって、しっかりと確立した。種々の濃度のタキソール結合体(50~0.08 μM)を、頂端側に添加し、そして3分間、単層のCaco-2細胞に曝露した。この膜を装置から取り外し、細胞をトリプシン処理し、そして得られた細胞懸濁物をフローサイトメトリーによって分析した(図33)。ペプチド単独と同様に、薬物結合体は、迅速かつ効率的に単層を含む細胞に進入し、そしてより多いアルギニンを含む結合体により効率的であった。

【0288】

本発明の理論を限定することを意図しないが、これらの実験は、フルオレセインまたは治療薬物(例えば、タキソール)のいずれかと結合体化した短いアルギニンオリゴマーが、懸濁物中に存在する場合および単層で増殖した場合の両方において、迅速にCaco-2細胞に進入するという仮説の強力な支持を提供する。

【0289】

(Caco-2単層を横切る輸送)

腸上皮の管腔膜を横切るとは、送達された(例えば、頬投与される)薬物の血中レベルを増大させるために必要である。このトランスポーターが腸上皮を横切り得るか否かを決定するために、単層のCaco-2細胞を培養物中で増殖させ、そして市販の拡散チャンバ中に膜として配置する。膜の完全性を、経上皮電気抵抗(TEER)が、100 Ω cm²よりいつも大きいことを実証することによって、実証した(図34)。膜がインタクトであり、細胞間に有意な空間が存在しない場合にのみ、このような安定な抵抗パターンが観察される。

【0290】

膜が生存性かつ連続であることのさらなる証拠は、Lucifer Yellow (200 μM)はこの単層を横切って運搬されなかったが、一方でヒドロコルチゾンが刊行され

10

20

30

40

50

た報告と一致する量で輸送されたことであった（図35）。

【0291】

4～15サブユニットの範囲のD-アルギニンまたはL-アルギニンの種々の蛍光オリゴマーが、多数の膜を用いた複数の実験において頂部チャンバに配置された場合、基底外側のチャンバへは有意に輸送されなかった（図35）。

【0292】

一緒に考えて、本明細書中に示されるデータは、送達された化合物（例えば、フルオレseinまたはタキソールのいずれか）に結合体化した短いアルギニンオリゴマーが、Caco-2細胞単層に迅速に進入するが、Caco-2細胞単層を横切って輸送されないというモデルと一致する。このモデルはまた、本発明のトランスポーターが、エンドソームによってCaco-2細胞に進入せず、結腸上皮を横切って輸送され、十分理解された経路によって基底外側に排泄されることを意味する。Cell Gateトランスポーターは、細胞質ゾルに直接進入するようであり、そして基底外側での高い流出速度を有さないようである。

10

【0293】

（直腸内注入後の薬物血中レベルの測定）

単独、またはタキソールもしくはシクロスポリンのいずれかと結合した場合のいずれかの、フルオレseinで標識した短いアルギニンオリゴマーは、インビトロで単層のCaco-2細胞を横切ることができなかったが、この細胞株は、結腸のインビボの挙動を正確に模倣していないかもしれない。さらに、短いアルギニンオリゴマーとのインキュベーション後に結腸組織において見られた蛍光パターンは、このペプチドが、血管新生が生じることが公知の層に透過したことを実証した。

20

【0294】

本発明のトランスポーターが、経口投与された薬物の送達を増強し得るか否かを決定するために、シクロスポリンAおよびタキソールの放出可能な結合体を、直腸内に注入し、そして生じた、放出された薬物の血中レベルを、LC-MS/MSによって測定した。

【0295】

第一の実験を、リン酸緩衝化生理食塩水中に溶解された等モル量の放出可能なCsAのr7結合体と比較して、Cremophor EL：エタノール中のCsA 5mg/kgの結腸内注入後のCsA血中レベルを測定するために設計した。親薬物の場合、血中レベルは30分後に約25ng/mlのCsAにまで上昇し、次いで基準レベルに近いレベルまで迅速に低下した（図36）。90分後には動物が死亡したので、さらなるデータは獲得しなかった。対照的に、等モル量のCsA-r7結合体を注入した場合、血中の検出可能なレベルのCsAは、3時間後にのみ観察された（図36）。短いアルギニンオリゴマーに結合体化された場合に変更されたCsAの薬物動態が再現性があるかどうかを決定するために、第三のラットに、10mg/kg相当の水溶性放出可能結合体を注入した。この動物の血中のCsA取り込み速度は、5mg/kgのこの結合体を注入した動物と類似した。より多くの結合体を投与すると、30分で小さい増大が見られたが、より多い量は、血中に2時間後にのみ現れ、血中レベルは3時間後に45ng/mlに達した。全体的パターンは、この結合体を注入した2匹の動物において類似であった。両方の場合において、循環中で測定されたCsAの全体量は、CsAを注入した場合よりも有意に多かった。

30

40

【0296】

CsA結合体の半減期は、約90分であり、これは、親化合物と比較した、血中CsAの出現の遅延と一致した。この事実を、結腸の円柱上皮における迅速かつ効率的な取り込み、およびCsAまたはタキソールの放出不能な結合体がインビトロで単層の結腸細胞を横切ることができないことを実証する組織学的データと合わせて、この現象を説明する理にかなった簡潔なモデルを導く。本発明を特定の機構または理論に限定することを意図しないが、この結合体は、Cremophor中で注入されたCsAよりもかなり効率的かつより迅速に結腸の円柱上皮に進入するが、結合体が加水分解されるまで上皮細胞中に保持され、そして毛細管を囲む内皮細胞を横切らないようである。一旦放出されると、CsA

50

は、血中に自由に拡散するか、または能動的に輸送された。

【0297】

この仮説を試すために、タキソールおよび異なる2つのr7-タキソール結合体を結腸に注射し、そして薬物の血中レベルを30分間隔で測定した。2つのr7-タキソール結合体は、有意に異なる半減期（10分および5時間）を有し、そしてこの薬物結合体の加水分解が、循環での薬物の出現における律速段階であるという仮説を試すために使用された。本当であるならば、この前提は、10分の半減期を有するr7-タキソール結合体が、上皮においてタキソールを放出し、その結果、30分の時点で循環において検出され得ることを予測した。対照的に、タキソールは、より安定なr7結合体（ $t_{1/2} = 5$ 時間）から放出されるべきではなく、そして実験の間に採取した血液サンプル中で検出されるべきではなかった。 10

【0298】

この前提は、血液中のタキソールの出現によって支持された（図37）。タキソールの検出可能レベルは、結腸中に注射された場合、2.5時間まで血液中に現われず、4時間および5.5時間に引き続いて波を有した。時間の関数として、血液中のタキソールの変動レベルは、そのパターンが、物質のいくらかを隔離し、かつ徐放性ビヒクルとして作用するCremophor能力を合理化するという公開された研究に一致する。対照的に、不安定で、水溶性であるタキソールのr7結合体（13）を投与した場合、200ng/mlより多いタキソールを、最も早い時点（30分）で観察し、1時間まで増加し続け、この時点でのレベルが5時間までゆっくり減少する。予測されるように、より安定で水溶性のタキソールr7結合体（14）の注射は、5時間内ではタキソールの有意な血中レベルを生じなかった。これらのデータは、本発明のトランスポーターが結腸上皮に侵入するが横切らないという仮説を支持する。これらは、水溶性を劇的に改善することによって、そして結腸における結合体の取り込み速度を増加することによって、薬物の経口バイオアベイラビリティを改善し得る。血流への薬物の最終的な送達は、生体膜を介する薬物の固有の拡散能力、および結合体から放出の速度に基づくようである。 20

【0299】

（考察）

本明細書中に記載される実験における有意な発見は、ペプチドが十二指腸の上皮に入ることができなことである。これは、細胞型または組織に入らないトランスポーターの第1の例を表す。胃の幽門からさらに伸長した組織の取り込みの増加パターンは、興味深く、インヒビターの勾配（例えば、負に荷電した粘液）におそらく起因するようである。小腸の上部領域を染色するような不全は、結腸における激しい染色とは対照的に明確（in stark）であり、本発明のトランスポーターが、結腸への治療剤の選択的送達のために使用され得るという推測を導く。結腸の全ての内腔表面が強度の蛍光を発するのみでなく、染色パターンはまた、ビオチン化合物が、複数の細胞層に浸透し得、そして組織の血管化領域に到達し得ることを示し、このことは、トランスポーターが、血流中への輸送を増強するはずであることを示唆する。 30

【0300】

しかし、結腸細胞株（Caco-2）の単層を用いる別の研究は、代替の機構を示唆する。Caco-2系において、トランスポーターは単層に迅速に侵入したが、単層を横断しなかった。細胞および組織への高速での輸送（しかし、細胞および組織からの制限された流出速度）を示すトランスポーターの例がいくつか存在する。これは、現在までに試験された全ての懸濁細胞株についての場合であり、最も研究された細胞株は、ヒトT細胞株（Jurket）である。短いオリゴマーのD-アルギニンは、これらの細胞に迅速に侵入し、そして非常に低い退出速度を示し、37℃で1時間のインキュベーション後、蛍光シグナルの5%未満を失う。この現象のなおよび関連性のある例としては、放出可能なCsA-r7結合体での複数の局所処置を受けるマウスの血流中で測定された、低レベルのCsAである。結腸についての場合のように、CsA結合体のビオチン化アナログで処理された皮膚の切片における染色パターンによって、薬物が真皮の高度に血管化した領域へ浸 40 50

透したことを確立した。さらに、モノクローナル抗体を用いての染色は、高度に蛍光を発した真皮において顕著な細胞型の1つの毛細管の内皮細胞であったことを確立した。にもかかわらず、これらの動物の血液中のCsAの検出可能なレベルは、1日に2回適用される4%の軟膏での処理の10日後でもなお観察されなかった。この観察は、裏づけに乏しい(anecdotal)、この報告においてより研究された結果と一致する。

【0301】

皮膚、肺および心血管系中の複数の細胞層に侵入し、そして続いて抜け出すペプチドの能力は、これらのペプチドがリンパ球またはCaco-2細胞から抜け出す能力がないことに対して顕著に対称的である。特定の理論または機構に本発明を限定することを意図することなく、1つの差異は、タイトジャンクション、および組織構造において固有の他の膜構造によって結合されている細胞であって、これらの構造を介してペプチドが迅速に浸透する細胞であるが、懸濁液中、およびおそらく血流に接する側の内皮細胞の膜の個々の細胞は、これらの特徴を欠損する。タイトジャンクションまたはギャップジャンクションのような構造が、トランスポーターの退出を可能にするために周囲の脂質を改変する場合、次いで、トランスポーターは、組織(皮膚または結腸)を通して迅速に拡散されるはずであるが、血流中へは輸送されない。この仮説との一致は、循環におけるタキソールおよびCsAの出現速度の変化を説明するため、この報告において構築されたモデルである。このモデルにて、アルギニンの短いオリゴマーは、結腸の円柱上皮または頬の扁平上皮への取り込みを非常に促進したが、血流中に薬物を輸送しなかった。観察された血中レベルは、結合体の加水分解後の、循環への上皮からの薬物の拡散、または能動輸送の結果であった。

【0302】

(実施例18)

(トランスポーター結合体の頬送達)

タキソールおよびCsAの頬送達は、濃縮した溶液(250 μ lの5mg/kg)を(その側面に)横たわる麻酔されたラットの口腔へ添加する工程を包含する。血液サンプルを、0時間(薬物注射前)および実験の継続時間の間、30分毎に尾静脈から採取し、経験的に測定した。血液を100 μ lの0.5%EDTAを含むガラス管に移すことによって、凝固を阻害し、そして血液を凍結した。

【0303】

口腔の扁平上皮層に侵入するトランスポーターの能力を、試験した。マウスを麻酔し、その頭を切り取り(tip)、その結果、ビオチン化r9溶液を投与し得た。この動物を、この位置で15分間維持し、その時点で屠殺し、そして舌および頬を解剖し、凍結し、切片化し、ストレプトアビジン-フルオレセインで染色し、そしてプロピジウムヨウ素で対比染色した。頬および舌の両方において、ビオチン化ペプチドは、複数の内皮層に迅速にかつ効率的に浸透し、そして組織の内部層へと深く浸透し皮膚の表皮および真皮の両方の染色を連想させる。

【0304】

第2の実施例において、ラットを麻酔し、そしてCremophor EL:エタノール1:1中のタキソールおよびCsA(5mg/kg)の両方の溶液、またはPBS中で等モルの、これらの薬物に対応するr7結合体を、実験の継続時間の間、動物の頬袋中で単純にインキュベートした。LCMSを使用して、タキソールおよび早放性r7結合体のみの血中レベルを測定した。口腔に投与した場合に血液中にタキソールが出現する量および動力学的両方(図38)は、結腸中に注射した場合と異なった。タキソール結合体の頬投与は、ほとんど効果がないようであり、結腸内注射と比較して8分の1未満の量のタキソールが循環中に観察された。別の差異は、改変されていない薬物の出現速度である。口腔に投与される場合、タキソールは最初の時点によって血流中まで出現するが、結腸注射において、検出可能な量のタキソールは、数時間にわたって出現しない。頬投与での循環中の、タキソールの出現におけるタキソールとr7-タキソール結合体との間に差異は存在しないが、結合体を使用される場合、約2倍ほど多い物質が、循環に到達する。

【0305】

(実施例19)

この実施例は、pH感受性連結基を用いる、輸送部分へのシクロスポリンの結合体化を説明する(図6Aおよび図9Bを参照のこと)。

【0306】

この実施例において、シクロスポリンを、無水クロロ酢酸を用いてその α -クロロ酢酸エステルに変換し、6iを得る(図6を参照のこと)。次いで、このエステル6iをベンジルアミンで処理し、6iiを得る。アミンとBoc-保護無水イミノニ酢酸との反応は、酸6iiiを提供し、次いで、これを、N-ヒドロキシスクシンイミドで活性化エステル(6iv)に変換する。L-アルギニン7量体との6ivのカップリングは、BOC-保護結合体6vを提供し、これを、確立された方法に従ってBOC保護基を除去することによって結合体6viに変換し得る。

10

【0307】

例えば、グリシン、 ϵ -アミノカプロン酸または γ -アミノブチル酪酸によって分離されたアルギニン基を有する輸送部分は、この実施例およびオリゴアルギニン輸送基を示す以下の実施例において、アルギニン7量体の代わりに使用され得る。

【0308】

(実施例20)

この実施例は、輸送部分へのアシクロビルの結合体化を説明する。

【0309】

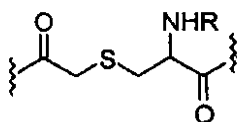
20

a. $r_7\text{CONH}_2$ へのアシクロビルの結合体化

この実施例は、連結基を介する $r_7\text{CONH}_2$ へのアシクロビルの結合体化を説明する：

【0310】

【化21】



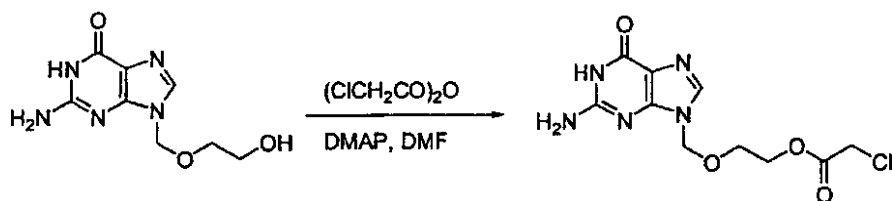
R = H または Ac

30

i) アシクロビル α -クロロエステルの調製：

【0311】

【化22】



40

ジメチルホルムアミド(9mL)中のアシクロビル(100mg、0.44mmol)、ジメチルアミノプリジン(5.4mg、0.044mmol)および無水クロロ酢酸(226mg、1.32mol)の溶液を、室温にて18時間攪拌した。ジメチルホルムアミドを、エバポレートによって除去した。粗生成物を、逆相HPLC(22mm×250mm C-18カラム、0.1%トリフルオロ酢酸での5~25%CH₃CN/H₂O勾配、214nmおよび254nm UV検出)によって精製し、そして凍結乾燥した。生成物を白色粉末として得た(62mg、47%)。

【0312】

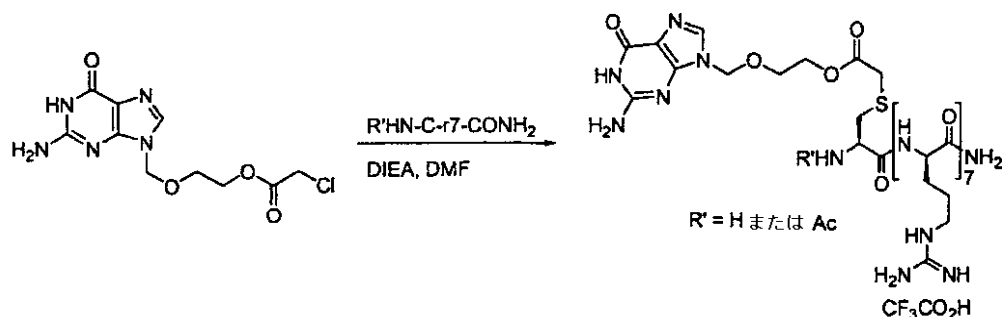
【化23】

50

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.67 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.21 (t, $J = 3$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J = 3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.1, 157.6, 154.8, 152.3, 138.6, 117.1, 72.7, 67.1, 65.2, 41.8; TOF-MS (m/z): 302.0 [$\text{M} + \text{H}$].

i i) $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{r}7-\text{CONH}_2$ へのアシクロビル α -クロロエステルの結合体化
【0313】
【化24】

10



20

ジメチルホルムアミド (1 mL) 中のアシクロビル α -クロロエステル (7 mg、0.024 mmol)、 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{r}7-\text{CONH}_2$ (50 mg、0.024 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (6.4 μL 、0.036 mmol) の溶液を、18時間攪拌した。ジメチルホルムアミドを、エバポレートによって除去した。粗生成物を、逆相 HPLC (22 mm $\times$ 250 mm C-18 カラム、0.1% トリフルオロ酢酸での 5 ~ 25% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 勾配、214 nm および 254 nm UV 検出) によって精製し、そして凍結乾燥した。所望の生成物を白色粉末として得た (24 mg、69%)。

【0314】

【化25】

30

TOF-MS (m/z): 494.6 [$(\text{M} + \text{H})/3$], 371.0 [$(\text{M} + \text{H})/4$].

収率を、1.5 モル当量よりもむしろ 10 モル当量のジイソプロピルエチルアミンを使用することによって増加し得た。生成物を、白色粉末として再び得た (79%)。

【0315】

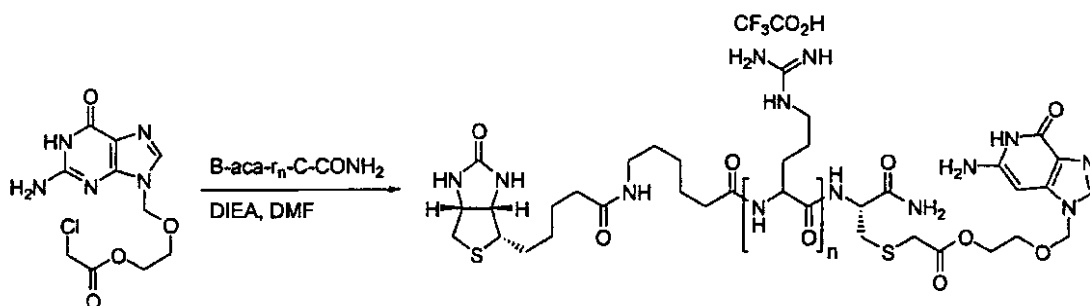
【化26】

TOF-MS (m/z): 508.7 [$(\text{M} + \text{H})/3$], 381.5 [$(\text{M} + \text{H})/4$], 305.5 [$(\text{M} +$

$\text{H})/5$].

40

b. $\text{r}_5-\text{Cys}-\text{CONH}_2$ のビオチン含有誘導体へのアシクロビルの結合体化
【0316】
【化27】



反応を、上記の実施例において提供される合成技術を用いて、上記に説明されたように行 10
った。

【0317】

i) ビオチン-アミノカプロン酸-r 5-Cys (アシクロビル)-CONH₂ を、白色 粉末として得た (36%)。

【0318】

【化28】

TOF-MS (*m/z*): 868.2 [(M + 2 TFA)/2], 811.2 [(M + 1 TFA)/2], 754.1

[(M + 1 TFA)/3], 503.0 [(M + H)/3], 377.4 [(M + H)/4].

20

同様に、

i i) ビオチン-アミノカプロン酸-r 7-C (アシクロビル)-CONH₂ -を白色粉 末として得た (33%)。

【0319】

【化29】

TOF-MS (*m/z*): 722.1 [(M + 3 TFA)/3], 684.6 [(M + 2 TFA)/3], 607.1

[(M + H)/3], 455.5 [(M + H)/4], 364.8 [(M + H)/5], 304.3 [(M + H)/6].

30

(実施例21)

この実施例は、輸送部分へのヒドロコルチゾンの結合体化を説明する。

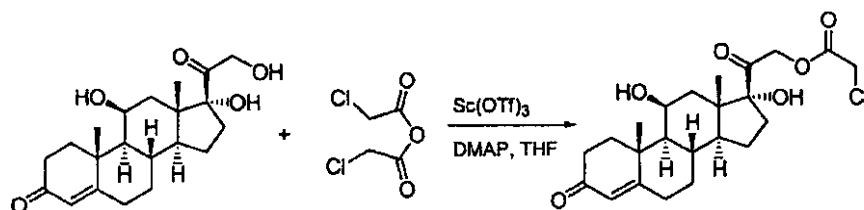
【0320】

a. r₇ CONH₂ へのヒドロコルチゾンの結合体化

i) ヒドロコルチゾン α-クロロエステルの調製:

【0321】

【化30】



40

乾燥 THF 中のヒドロコルチゾン (500 mg、1.38 mmol)、スキャンジウムトリ フレート (408 mg、0.83 mmol) および無水クロロ酢酸 (708 mg、4.14 mmol) の溶液を、ジメチルアミノピリジン (506 mg、4.14 mmol) に添 加した。ジメチルアミノピリジンの添加の際に、この溶液は明黄色に変化した。30分後、この溶媒をエバポレートし、そして粗物質を酢酸エチル (100 mL) 中へと取り上げた。酢酸エチル層を 1.0 N HCl およびブラインで洗浄した。この有機相を回収し、 50

乾燥し (Na_2SO_4) そしてエバポレートし、白色固体として生成物を得た (533 mg、88%)。

【0322】

【化31】

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ

5.56 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 5.20 (d, $J=18$ Hz, 1H), 4.85 (d, $J=18$ Hz, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.37 (br s, 1H), 4.27 (br s, 1H), 2.54–2.33 (m, 2H), 2.22–2.03 (m, 3H), 1.99–1.61 (m, 8H), 1.52–1.24 (m, 5H), 1.02–0.98 (d, $J=12$ Hz, 1H), 0.88–0.85 (d, $J=9$ Hz, 1H), 0.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 205.4, 198.8, 173.0, 167.6, 122.3, 89.5, 69.7, 67.3, 56.4, 52.4, 47.8, 41.6, 39.7, 35.0, 34.3, 34.0, 33.6, 32.3, 32.0, 24.2, 21.3, 17.4; TOF-MS (m/z): 439.1 ($M+H$).

10

(アセチル化についての参考文献 - Zhao, H.; Pendri, A.; Greenwald, R.B. *J. Org.*

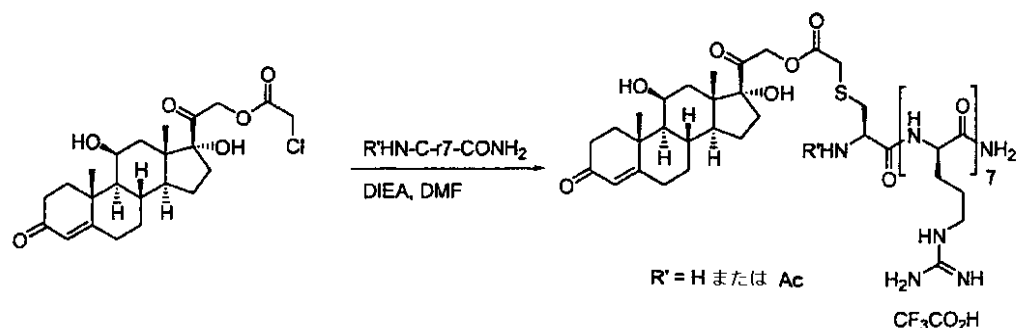
Chem. 1998, 63, 7559-7562.)

i i) $\text{R}'\text{NH}-\text{Cys}-\text{r}_7-\text{CONH}_2$ へのカップリング

【0323】

【化32】

20



30

ジメチルホルムアミド (1 mL) 中のヒドロコルチゾン α -クロロエステル (31 mg、0.071 mmol)、 $\text{H}_2\text{N}-\text{Cys}-\text{r}_7-\text{CONH}_2$ (150 mg、0.071 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (15 μL 、0.085 mmol) の溶液を、18時間攪拌した。ジメチルホルムアミドを、エバポレートした。粗生成物を、逆相 HPLC (22 mm $\times$ 250 mm C-18 カラム、0.1% トリフルオロ酢酸での 5~30% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 勾配、214 nm および 254 nm UV 検出) によって精製し、そして凍結乾燥した。所望の生成物を白色粉末として得た (25 mg、14%)。

【0324】

【化33】

TOF-

40

MS (m/z): 1037.4 [$(M+4\text{ TFA})/2$], 616.1 [$(M+2\text{ TFA})/3$], 578.3 [$(M+1\text{ TFA})/3$], 540.5 [$(M+H)/3$], 405.7 [$(M+H)/4$], 324.5 [$(M+H)/5$].

1. 2モル当量よりもむしろ10モル当量のジイソプロピルエチルアミンを使用することによって、黄色粉末として所望の生成物を得た (収率52%)。

【0325】

【化34】

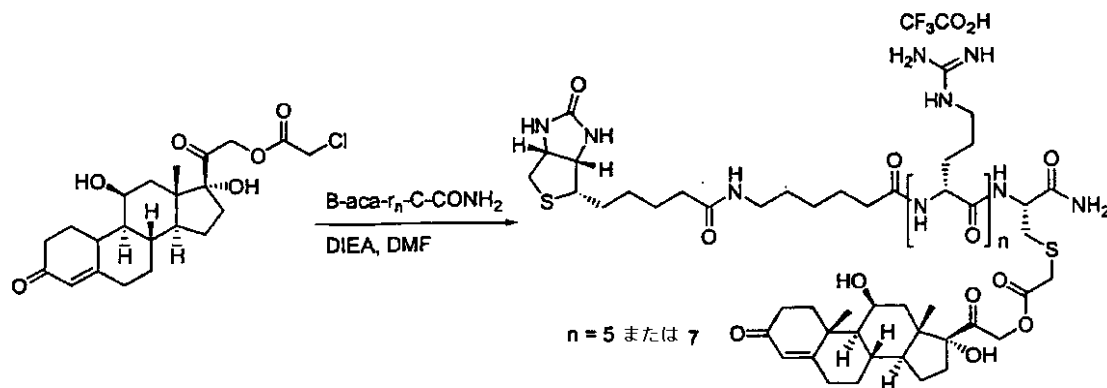
TOF-MS

(*m/z*): 887.0 [(M + 1TFA)/2], 830.6 [(M + H)/2], 553.7 [(M + H)/3], 415.5 [(M + H)/4].

b. $r_5 - \text{Cys} - \text{CONH}_2$ のビオチン-含有誘導体へのヒドロコルチゾンの結合体化
- CONHルアミン 2

【0326】

【化35】



10

反応を、上記の実施例において提供される合成技術を用いて、上記に説明されたように行った。

【0327】

i) ビオチン-アミノカプロン酸- $r_5 - \text{C}$ (ヒドロコルチゾン) - CONH_2 -
1. 2モル当量よりもむしろ10モル当量のジイソプロピルエチルアミンを使用した。白色粉末を得た(65%)。

【0328】

【化36】

TOF-MS (*m/z*): 880.7 [(M + 1 TFA)/2], 548.7 [(M + H)/3].

30

ii) ビオチン-アミノカプロン酸- $r_7 - \text{C}$ (ヒドロコルチゾン) - CONH_2 -
1. 2モル当量よりもむしろ10モル当量のジイソプロピルエチルアミンを使用した。白色粉末を得た(36%)。

【0329】

【化37】

TOF-MS (*m/z*): 692.3 [(M + 1 TFA)/3], 652.8 [(M + H)/3], 520.0 [(M + 1

TFA)/4], 490.0 [(M + H)/4], 392.5 [(M + H)/5].

(実施例22)

この実施例は、輸送部分へのタキソール結合体化を説明する。

【0330】

a. $r_7 - \text{CONH}_2$ へのタキソールの結合体化

この実施例は、タキソール結合体の調製への上記で概説した方法論の適用を説明する(図12を参照のこと)。

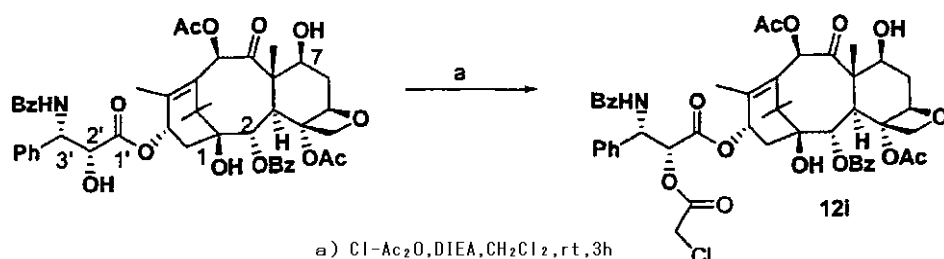
【0331】

i) タキソール α -クロロ酢酸エステルの調製

【0332】

【化38】

40



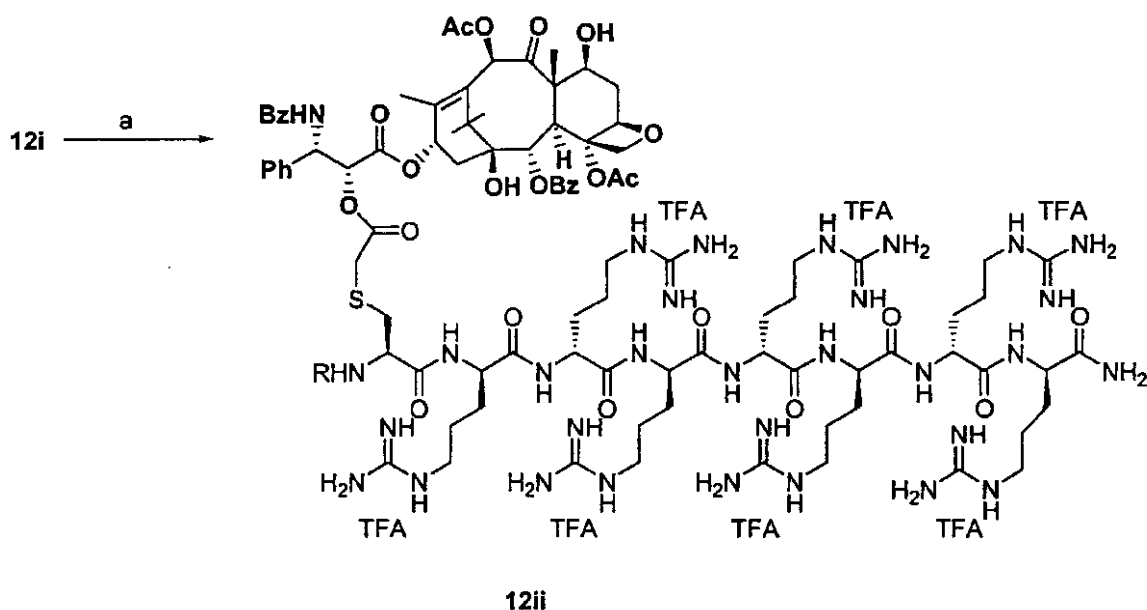
タキソールを、無水α-クロロ酢酸で処理し、基本的に定量的な収率で、C-2'クロロ
アセチル誘導体 12i を得た。 10

【0333】

i i) タキソール結合体の形成

【0334】

【化39】



a) ペプチド, DIEA, DMF, rt
R = H 48%
R = Ac 87%

クロロ酢酸エステルハロゲン分子を、アルギニンの7量体を含むN-末端(L)シス
チンのチオールによって置換した。インビボにおけるプロテアーゼによるトランスポー
ター実体の分解を避けるために、D-アルギニンを構造単位 (building unit)
)として使用した。結合体化反応を、ジイソプロピルエチルアミンの存在下、DMF中、
室温にて実行した。最終生成物を、RP-HPLCによって単離し、そして白色粉末に凍
結乾燥した。ネイティブな結合体 (R=H) が、シスチン(第)一級アミンでそのTF
A塩として単離したことに注意することは重要である。この結合体は、一般的に非常に吸
湿性であり、そして水に容易に溶解する。 40

【0335】

結合体(ここで、R=H)を、C2'エステルカルボニル上のN-末端窒素の求核攻撃を
介して親薬物を放出するように設計した。遊離アミンのみがこの放出を可能にするので、
この窒素のプロトン化状態はこの機構に対して重要である。さらに、両方の結合体は、単
純なエステル加水分解に感受性である両方の結合体を作製する、共通のα-ヘテロ炭子を
置換した酢酸部分を共有する。結合体は、さらなる放出経路を提供する。 50

【0336】

(実施例23)

この実施例は、輸送部分に活性試薬を連結する2つの方法を説明する。例証は、ポリ-D-Arg誘導体に連結されたレチノイン酸誘導体を提供するが、他の生物学的薬剤と本発明の輸送部分との間の連結に適用され得る。

【0337】

a. アルデヒド官能基を有する生物学的薬剤との間の連結

この実施例は、D-アルギニン ($H_2N-r_9-CO_2H \cdot 10TFA$) のナノマーと全てのtrans-レチナールまたは13-cis-レチナールのいずれかとの間の結合体の調製を説明する。図40は、反応の略図を提供する。図40において見られるように、 $4\text{ \AA}$ のモレキュラーシーブの存在下、MeOH中での、いずれか一方のレチナールと $H_2N-r_9-CO_2H \cdot 10TFA$ との、室温にて4時間の縮合は、レチナールアルデヒドとアミノ末端基との間でのSchiffベース型連結の形成を生じる。結合体の精製を、モレキュラーシーブを濾過し、そして減圧下でメタノールを除去することによって達成し得る。

10

【0338】

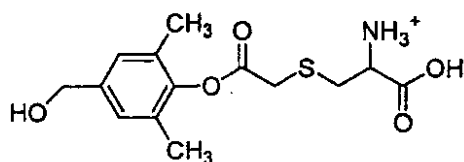
b. $r_7-CO-NH_2$ へのレチノイン酸の結合体化

この実施例は、連結基を用いてレチノイン酸と $r_7-CO-NH_2$ との間の結合体の調製を説明する。

【0339】

20

【化40】



ここで、結合体の調製は、図41中で概略されるスキームに従う。このスキームにおいて、レチノイン酸 (41ii) を4-ヒドロキシメチル-2,6-ジメチルフェノール (41i) のクロロ酢酸エステルと初めに合わせ、41iiiとして示される結合体を得た。ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび触媒量の4-ジメチルアミノピリジンの存在下での、塩化メチレン中の41iとレチノイン酸との組み合わせは、52~57%の収率でレチノイド誘導体41iiiを提供した。ジイソプロピルエチルアミン (DMF、室温、2h) の存在下での、41iiiと $H_2NCys-r_7CO-NH_2 \cdot 8TFA$ との縮合は、所望の結合体化生成物41ivを提供する。

30

【0340】

(実施例24)

この実施例は、輸送部分にアシクロビルのような活性な薬剤を連結する方法を説明する。図42を参照のこと。

【0341】

40

アシクロビル (1当量) を、窒素雰囲気下で、乾燥N,N-ジメチルホルムアミドに溶解した。無水クロロ酢酸 (chloroacetic) (1当量)、ピリジン (1当量) およびDMAp (0.25当量) を、攪拌しながら引き続き反応に添加した。この反応を、室温にてさらに4時間攪拌させた。この反応を、減圧下、溶媒の除去によって停止した。この残渣を、塩化メチレン中に溶解し、そして飽和塩化アンモニウム水溶液、続いて飽和重炭酸アンモニウム水溶液およびブラインで洗浄した。有機層を、減圧下で濃縮し、そして残渣をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、アシクロビルクロロアセチルエステルを得た。

【0342】

得られたクロロアセチルエステルを、窒素雰囲気下で、乾燥N,N-ジメチルホルムアミ

50

ドに溶解した。この溶液を急速に攪拌しながら H u n i g ' s 塩基 (1 当量) および A c H N - C - a c a - R 8 - C O N H 2 * 8 H C l に添加した。この反応を、全ての開始物質が消費されたことを T L C 分析が同定するまで進めさせる (c a 2 時間)。この反応を、減圧下、溶媒の除去によって停止した。この残渣を、R P - H P L C によって精製し、所望のアシクロビル結合体を得た。

【0343】

(実施例 25)

この実施例は、輸送部分にアシクロビルのような活性な薬剤を連結する方法を説明する。図 43 を参照のこと。

【0344】

ジスホスゲン (0.5 当量) を、乾燥塩化メチレン中に溶解し、そして -10 °C まで冷却した。この溶液に、塩化メチレン中の溶液としてトリエチルアミン (1 当量) を添加した。この混合物を、15 分間攪拌し、この時点でアシクロビルを塩化メチレン中の溶液としてこの反応物に添加した。この反応物を、室温にてさらに 4 時間、攪拌させた。この反応物を、飽和塩化アンモニウム水溶液でクエンチし、続いて飽和重炭酸アンモニウム水溶液およびブラインで洗浄した。有機層を、減圧下で濃縮し、そして残渣をシリカゲルを通す迅速な濾過によって精製し、アシクロビルクロロホルメートを得た。るえるブたしたンの接合体オチンがんゆう

クロロホルメートを、窒素雰囲気下で、乾燥塩化メチレンに溶解した。メルカプトエタノール (1 当量) を、乾燥塩化メチレン溶液として、この反応物に添加した。この反応物を、窒素雰囲気下で 10 時間攪拌させた。この溶液を、減圧下で濃縮し、高真空下に 24 時間配置し、残ったメルカプトエタノールを除去した。この得られたメルカプトエチルカーボネートを、さらに精製することなく使用した。

【0345】

カーボネート (1 当量) を、DMF / 水に溶解した。急速に攪拌しながら、この溶液に活性化ペプチド N P Y s - C R * - C O N H 2 * 8 H C l (1 当量) を添加した。明黄色が即時に発色し、そしてこの反応物を室温にてさらに 5 時間攪拌させた。この反応物を、R P - H P L C によって直接的に精製し、所望のアシクロビル結合体を得た。

【0346】

(実施例 26)

この実施例は、輸送部分にコルチコイドステロイドのような活性な薬剤を連結する方法を説明する。図 44 を参照のこと。

【0347】

(プレドニゾロン α-クロロエステル)

乾燥 T H F 中のプレドニゾロン (1.38 mmol)、スカンジウムトリフレート (0.83 mmol) および無水クロロ酢酸 (4.14 mmol) の溶液に、ジメチルアミノピリジン (4.14 mmol) を添加した。この溶液は、ジメチルアミノピリジンの添加で明黄色に変化した。30 分後、この溶媒をエバポレートし、そして粗物質を酢酸エチル (100 mL) へと取り上げた。この酢酸エチル層を、1.0 N H C l およびブラインで洗浄した。この有機相を回収し、乾燥し (N a 2 S O 4)、そしてエバポレートして生成物を白色固体として得た。

【0348】

H 2 N - C (プレドニゾロン) - r 8 - C O N H 2 : ジメチルホルムアミド (1 mL) 中のプレドニゾロン α-クロロエステル (1 当量)、H 2 N - C - r 8 - C O N H 2 (1 当量) およびジイソプロピルエチルアミン (1.2 当量) の溶液を、18 時間攪拌した。ジメチルホルムアミドを、エバポレートした。この粗生成物を、逆相 H P L C (22 mm × 250 mm C - 18 カラム、0.1 % トリフルオロ酢酸での 5 ~ 10 % C H 3 C N / H 2 O 勾配、214 nm および 254 nm U V 検出) によって精製し、そして凍結乾燥し、9 T F A 塩を得た。次いで、この物質をイオン交換クロマトグラフィーに供し、プレドニゾン結合体 (9 H C l 塩) を黄褐色固体として得た。

10

20

30

40

50

【0349】

本明細書中に記載される実施例および実施形態が、例示の目的のみのためであり、そしてその権利において、様々な改変または変化が、当業者に示唆されかつ本出願の精神および権限ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれることは、理解される。本明細書中に引用されるすべての出版物、特許および特許出願は、全ての目的のための参考として本明細書中に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0350】

【図1】図1は、 α -クロロアセチルシクロスポリンA誘導体の調製のための反応スキームを示す。

10

【図2】図2は、システイン含有ペプチドの α -クロロアセチルシクロスポリンA誘導体とのカップリングのための一般的な手順を示す。

【図3】図3は、シクロスポリンA誘導体のビオチン標識ペプチドへのカップリングのための反応スキームを示す。

【図4】図4は、シクロスポリンA誘導体の標識していないペプチドとのカップリングのための反応スキームを示す。

【図5A】図5A～Hは、切断可能なリンカーの種々の型を示し、これらのリンカーは、送達増強トランスポーターの生物学的に活性な薬剤または他の目的の分子との連結のために使用され得る。図5Aは、ジスルフィド結合の例を示す。

【図5B】図5Bは、光切断可能な (photo cleavable) リンカーを示す。このリンカーは、電磁放射への曝露によって切断される。

20

【図5C】図5Cは、切断可能なリンカーとして使用される修飾されたリジル残基を示す。

【図5D】図5Dは、送達増強トランスポーターTが、抗癌剤パクリタキセルの2' 酸素に連結された、結合体を示す。連結部分は、以下を含む (i) 送達増強トランスポーターに付着した窒素原子、(ii) 窒素原子に対しパラ位に位置するリン酸モノエステル、および (iii) 窒素原子に対しメタ位のカルボキシメチル基 (このカルボキシメチル基は、カルボン酸エステル連結によってパクリタキセルの2' 酸素に結合されている)。

【図5E】図5Eは、アミノアルキルカルボン酸による、送達増強トランスポーターの生物学的に活性な薬剤 (例えば、パクリタキセル) への架橋であり；リンカーアミノ基は、アミド連結によって送達増強トランスポータに結合され、そして、エステル連結によってパクリタキセル部分に結合される。

30

【図5F】図5Fおよび図5Gは、パクリタキセルおよび「TAXOTERETM」(R' = H、R'' = BOC) についての構成骨格原子の化学構造および従来の番号付けを示す。

【図5G】図5Gは、タキソイド (taxoid) 化合物についての一般的な化学構造および環原子番号付けを示す。

【図6】図6は、L-アルギニンの七量体とシクロスポリンAとの間の化学結合体についての合成スキーム (パネルA)、およびそのpH依存性化学放出 (パネルB) を示す。 α -クロロエステル (6i) を、置換をするためにヨウ化ナトリウムの存在下でベンジルアミンを用いて処理し、2級アミン (6ii) を得る。アミン (6ii) を、無水物 (6) を用いて処理し、そして得られた粗酸 (6iii) を、その対応するNHSEステル (6iv) に変換した。次いで、エステル (6iv) を、ヘプターL-アルギニンのアミノ末端とカップリングし、N-Boc保護されたCSA結合体 (6v) を得る。最後に、ギ酸を用いるBoc保護基の除去によって、HPLC精製の後、そのオクタトリフルオロ酢酸塩として結合体 (6vi) を得た。

40

【図7】図7は、放出可能なR7 CSAによる接触皮膚炎マウスにおける炎症の障害を示す。Balb/cマウス (6～7週) に、アセトンオリーブオイル中の0.7% DNFB (95:5) を100 μ l 腹部に塗布した。3日後、動物の両耳を、アセトン中の0.5% DNFBで再刺激した。再刺激の1時間後、5時間後、および20時間後に、ビビ

50

クルのみ、1% R7ペプチドのみ、1% CsA、1% 放出不可能なR7 CsA、0.01%/0.1%/1.0% 放出可能なR7 CsA、およびフッ化ステロイド陽性コントロール0.1% トリアムシノロンアセトニドのいずれかで、マウスを処置した。耳の炎症を、再刺激の24時間後に、パネを装着したキャリパーを用いて測定した。炎症の減少の百分率を、以下の式： $(t - n) / (u - n)$ （ここで、 t = 処置した耳の厚さ、 n = 正常な未処置の耳の厚さ、および u = いかなる処置もしていない炎症した耳の厚さである）を用いて計算した。各群において、 $N = 20$ 動物である。

【図8】図8は、銅-ジエチレントリアミンペンタ酢酸錯体（Cu-DTPA）の調製のための手順を示す。

【図9】図9は、Cu-DTPAをアミノカプロン酸を介してトランスポーターに連結するための手順を示す。 10

【図10】図10は、ヒドロコルチゾンの無水クロロ酢酸でのアシル化のための反応を示す。

【図11】図11は、アシル化ヒドロコルチゾンをトランスポーターに連結するための反応を示す。

【図12】図12は、タキソールのC-2'誘導体の調製のための反応を示す。

【図13】図13は、タキソール誘導体をビオチン標識ペプチドにカップリングするための反応の概略を示す。

【図14】図14は、標識していないペプチドをタキソールのC-2'誘導体にカップリングするための反応を示す。 20

【図15A】図15Aは、他のC-2'タキソール-ペプチド結合体の形成のための反応スキームを示す。

【図15B】図15Bは、他のC-2'タキソール-ペプチド結合体の形成のための反応スキームを示す。

【図15C】図15Cは、他のC-2'タキソール-ペプチド結合体の形成のための反応スキームを示す。

【図16】図16は、薬物または他の生物学的因子がpH-放出可能なリンカーによって送達増強トランスポーターに連結される結合体を合成するための、一般的なストラテジーを示す。

【図17】図17は、タキソール2'-クロロアセチル誘導体を合成するためのプロトコルの概略図を示す。 30

【図18】図18は、タキソール2'-クロロアセチル誘導体が、アルギニン七量体送達増強トランスポーターに連結されるストラテジーを示す。

【図19】図19は、図18に図示される反応条件を用いて作製され得る、3つのさらなるタキソール-r7結合体を示す。

【図20】図20は、タキソールおよび2つの異なるリンカーを用いる、3日間のMTT細胞傷害性アッセイの結果を示す。

【図21】図21は、以下のものの短縮型アナログのFACS細胞取り込みアッセイを示す：Tat_{49~57}（Fl-ahx-RKKRRQRRR）、Tat_{49~56}（Fl-ahx-RKKRRQR）、Tat_{49~55}（Fl-ahx-RKKRRQR）、Tat_{50~57}（Fl-ahx-KKKRRQRRR）、およびTat_{51~57}（Fl-ahx-KRRQRRR）。Jurkat細胞を、種々の濃度（12.5 μMを示す）のペプチドとともに23℃で15分間インキュベートした。 40

【図22】図22は、以下のもののアラニン置換アナログのFACS細胞取り込みアッセイを示す：Tat_{49~57}：A-49（Fl-ahx-AKKRRQRRR）、A-50（Fl-ahx-RAKKRRQRRR）、A-51（Fl-ahx-RKARRQR）、A-52（Fl-ahx-RKKARQRRR）、A-53（Fl-ahx-RKKRAQRRR）、A-54（Fl-ahx-RKKRRARRRR）、A-55（Fl-ahx-RKKRRQARR）、A-56（Fl-ahx-RKKRRQRAR）、およびA-57（Fl-ahx-RKKRRQRRA）。Jurkat細胞を、種々の濃度（ 50

12.5 μ Mを示す)のペプチドとともに23℃で12分間インキュベートした。

【図23】図23は、Tat₄₉₋₅₇のd-異性体およびretro-異性体：d-Tat₄₉₋₅₇(Fl-ahx-rkkrrqr rr)、Tat₅₇₋₄₉(Fl-ahx-RRRQRKKR)、およびd-Tat₅₇₋₄₉(Fl-ahx-rrrqr rkk r)のFACS細胞取り込みアッセイを示す。Jurkat細胞を、種々の濃度(12.5 μ Mを示す)のペプチドとともに、23℃で15分間インキュベートした。

【図24】図24は、一連のアルギニンオリゴマーおよびTat₄₉₋₅₇：R5(Fl-ahx-RRRRR)、R6(Fl-ahx-RRRRRR)、R7(Fl-ahx-RRRRRRR)、R8(Fl-ahx-RRRRRRRR)、R9(Fl-ahx-RRRRRRRRR)、r5(Fl-ahx-rrrrr)、r6(Fl-ahx-rrrrrr)、r7(Fl-ahx-rrrrrrr)、r8(Fl-ahx-rrrrrrrr)、r9(Fl-ahx-rrrrrrrrr)のFACS細胞取り込みを示す。Jurkat細胞を、種々の濃度(12.5 μ Mを示す)のペプチドとともに23℃で4分間インキュベートした。

【図25】図25は、グアニジン置換ペプチドの調製を示す。

【図26】図26は、ポリグアニジンペプチドおよびd-アルギニンオリゴマーのFACS細胞取り込みを示す。Jurkat細胞を、種々の濃度(12.5 μ Mを示す)のペプチドおよびペプチドとともに23℃で4分間インキュベートした。

【図27】図27は、d-アルギニンオリゴマーおよびポリグアニジンペプチドのFACS細胞取り込みを示す。Jurkat細胞を、種々の濃度(12.5 μ Mを示す)の蛍光標識したペプチドおよびペプチドとともに23℃で4分間インキュベートした。

【図28】図28は、d-アルギニンオリゴマーおよびN-hxgペプチドのFACS細胞取り込みを示す。Jurkat細胞を、種々の濃度(6.3 μ Mを示す)の蛍光標識したペプチドおよびペプチドとともに23℃で4分間インキュベートした。

【図29】図29は、d-アルギニンオリゴマーおよびN-chgペプチドのFACS細胞取り込みを示す。Jurkat細胞を、種々の濃度(12.5 μ Mを示す)の蛍光標識したペプチドおよびペプチドとともに23℃で4分間インキュベートした。

【図30】図30は、送達増強トランスポーターをトリアゾール環構造を含む薬物に結合するための一般的なストラテジーを示す。

【図31A】図31Aおよび図31Bは、FK506が送達増強トランスポーターに結合された結合体を作製するための合成スキームを示す。

【図31B】図31Aおよび図31Bは、FK506が送達増強トランスポーターに結合された結合体を作製するための合成スキームを示す。

【図32】図32は、Caco-2細胞に効果的に導入された、アルギニン(リジンではない)の短いオリゴマーを示す。Caco-2細胞を、示される各ペプチドと、異なる濃度でインキュベートし、洗浄し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。取り込みは、アジ化ナトリウムを含むプレインキュベーションによって阻害され得、取り込みが、エネルギー依存性であったことを実証する。

【図33】図33は、蛍光性タキソールまたはD-アルギニンの七量体(r7)もしくはデカマー(r10)のいずれかとの放出不可能な蛍光性タキソール結合体に曝露されたCaco-2細胞の測定された蛍光を示す。

【図34】図34は、本報告において記載される実験の持続時間の間での100 Ω cm²より大きい安定な経上皮電気抵抗の測定により、Caco-2単層の完全性を実証する。

【図35】図35は、Caco-2細胞単層を介する輸送1時間後の拡散装置の基底外側チャンバーにおけるFlaca_{r5}、Flaca_{r9}、ルシファーイエロー、またはヒドロコルチゾンのいずれかの蓄積を示す。

【図36】図36は、結腸内注射後、30分間隔のLC-MS/MSにより測定されたラットにおけるCSAの血中レベルを示す。CSAを、Cremophor EL：エタノール 1：1の中において投与し、一方、CSA結合体を、PBSの中において投与した

10

20

30

40

50

。C s A 結合体 (C G C 1 0 7 2) の P B S 中、p H 7 . 4、3 7 °C での半減期は 1 . 5 時間であった。

【図 3 7】図 3 7 は、結腸内注射後、3 0 分間隔の L C M S M S により測定されたラットにおけるタキソールの血中レベルを示す。タキソールを、C r e m o p h o r E l : エタノール 1 : 1 の中において投与し、一方、2 つのタキソール結合体を、P B S の中において投与した。遅延して放出する結合体 (1 4) の P B S 中、p H 7 . 4、3 7 °C での半減期は、5 時間であったが、速放性結合体 (1 3) の半減期は、1 0 分であった。実施例 1 8 を参照のこと。

【図 3 8】図 3 8 は、口腔送達後、3 0 分間隔の L C M S M S により測定されたラットにおけるタキソールの血中レベルを示す。タキソールを、C r e m o p h o r E l : エタノール 1 : 1 の中において投与し、一方、タキソール結合体を、P B S の中において投与した。結合体 (1 3) の P B S 中、p H 7 . 4、3 7 °C での半減期は、1 0 分であった。

【図 3 9】図 3 9 は、N 末端システイン基を介する 7-アミドに対するアシクロビルの結合体を描く。ビオチン含有トランスポーターとの結合体もまた、示す。

【図 4 0】図 4 0 は、レチナールと r 9 との間に形成される結合体を示す (スペーシングアミノ酸なしで示す)。

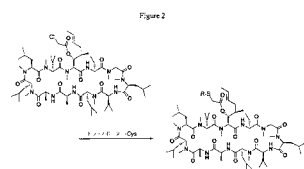
【図 4 1】図 4 1 は、レチノール酸-r 9 結合体の調製における切断可能なリンカーの使用を描く。

【図 4 2】図 4 2 は、アシクロビルのような活性薬剤のトランスポーター部分への連結方法を描く。

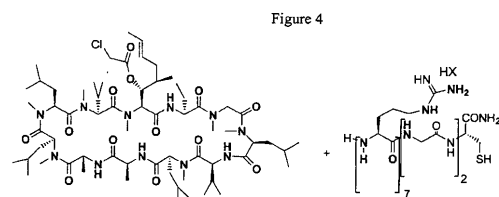
【図 4 3】図 4 3 は、アシクロビルのような活性薬剤のトランスポーター部分への連結方法を描く。

【図 4 4】図 4 4 は、コルチコイドステロイドのような活性な薬剤のトランスポーター部分への連結方法を描く。

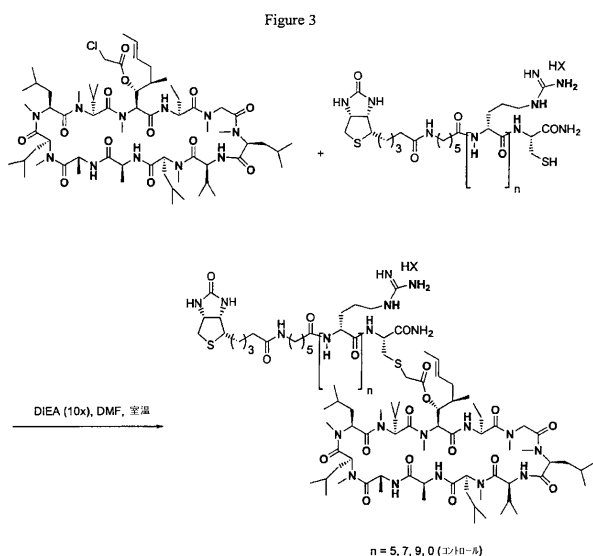
【図 2】



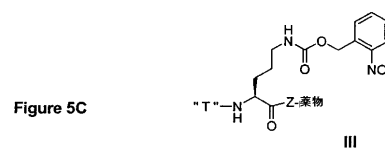
【図 4】



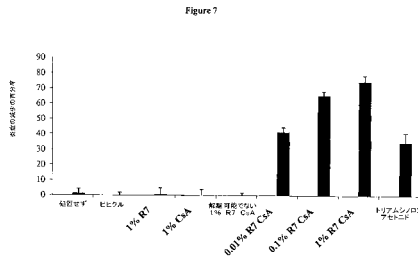
【図 3】



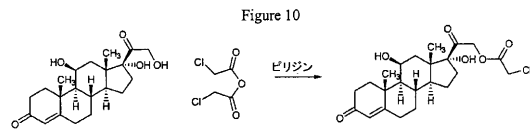
【図 5 C】



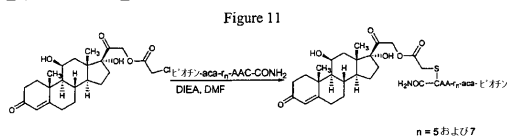
【図 7】



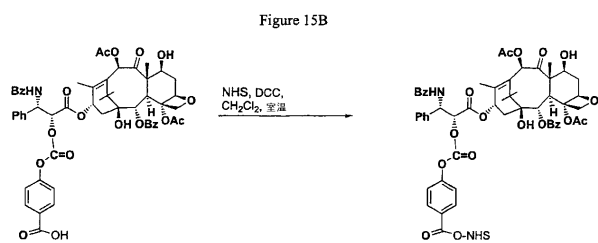
【図 10】



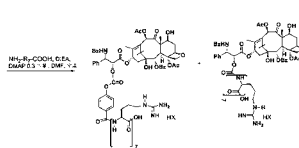
【図 11】



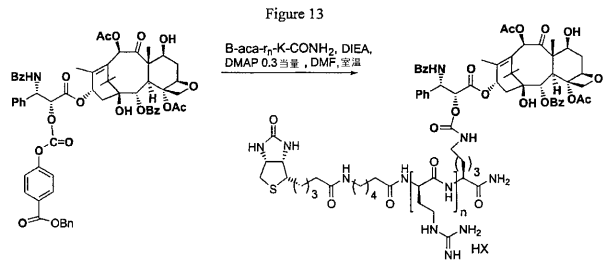
【図 15 B】



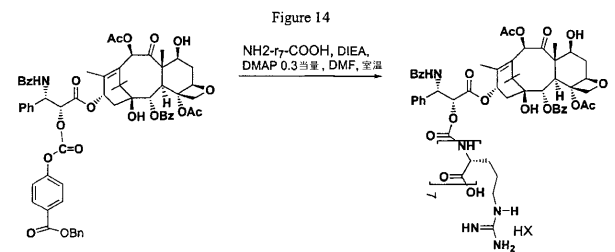
【図 15 C】



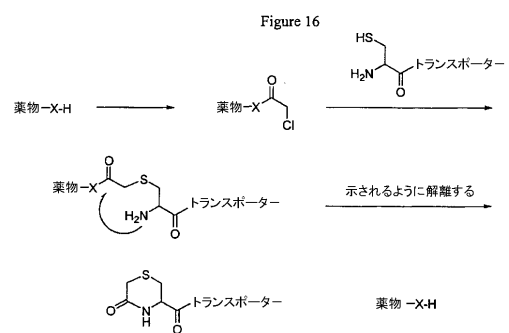
【図 13】



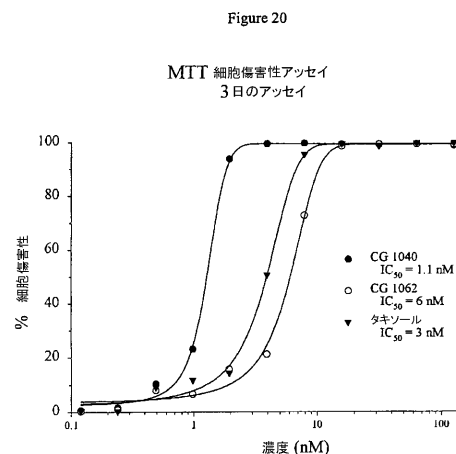
【図 14】



【図 16】

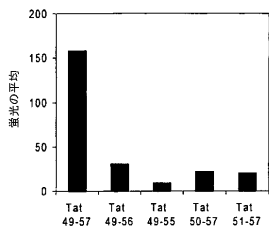


【図 20】



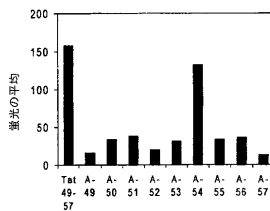
【図 2 1】

Figure 21



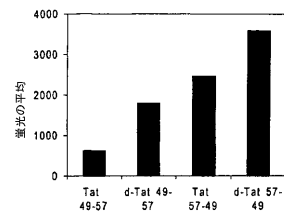
【図 2 2】

Figure 22



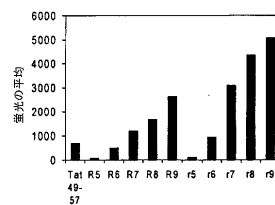
【図 2 3】

Figure 23



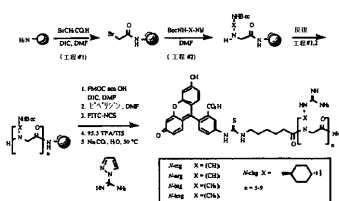
【図 2 4】

Figure 24



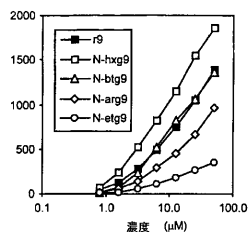
【図 2 5】

Figure 25



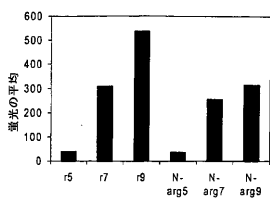
【図 2 7】

Figure 27



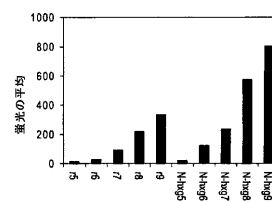
【図 2 6】

Figure 26



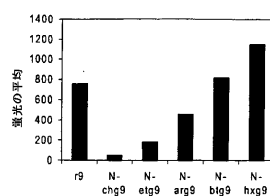
【図 2 8】

Figure 28



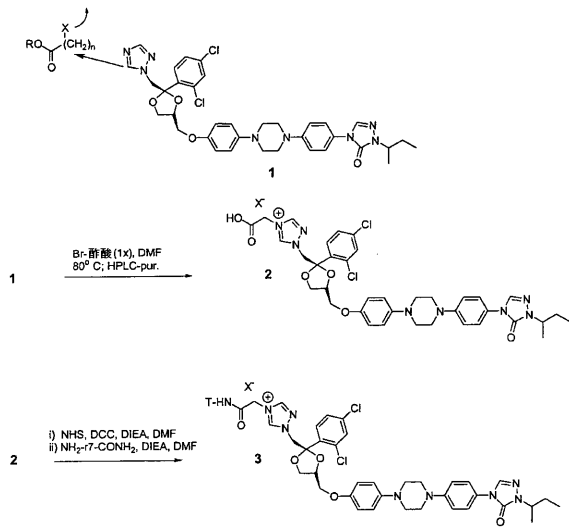
【図 2 9】

Figure 29



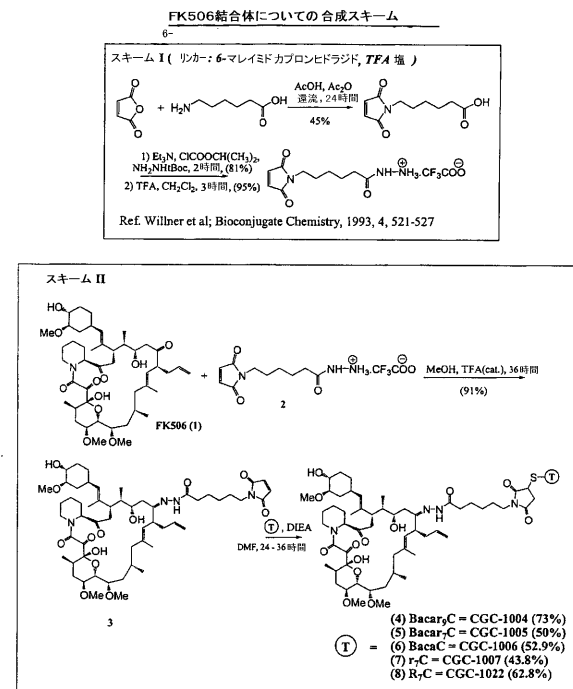
【図 30】

Figure 30



【図 31 A】

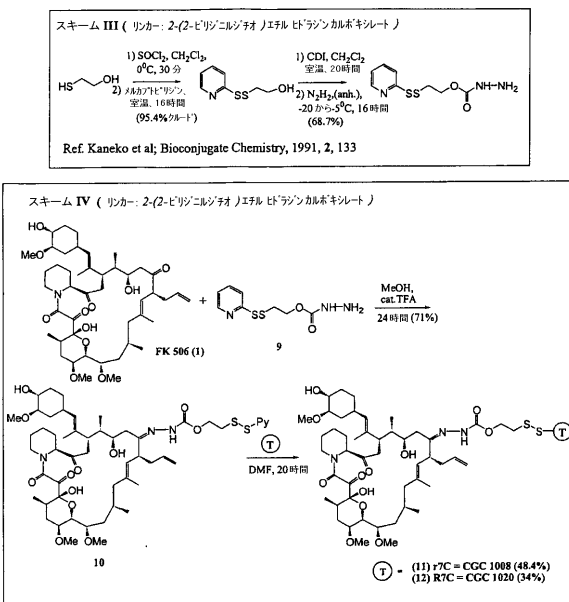
Figure 31A



【図 31 B】

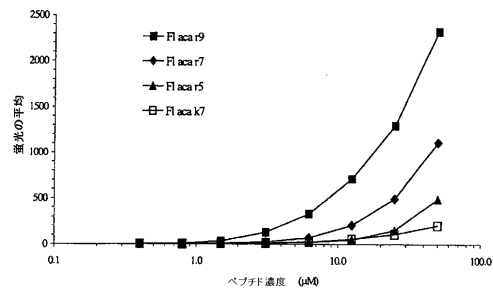
Figure 31B

FK506結合体についての合成スキーム (続き)



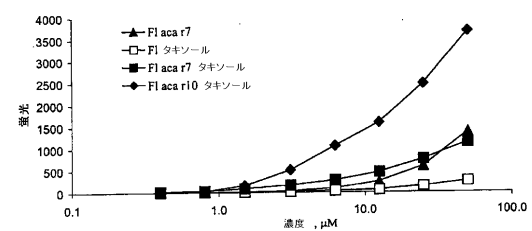
【図 32】

FIGURE 32



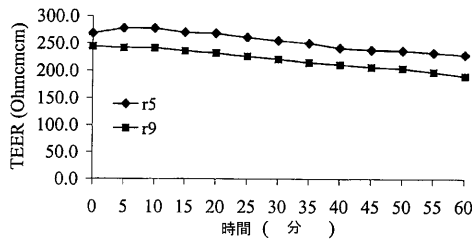
【図 33】

FIGURE 33



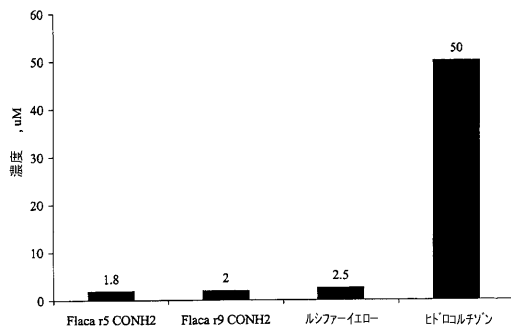
【図 3 4】

FIGURE 34



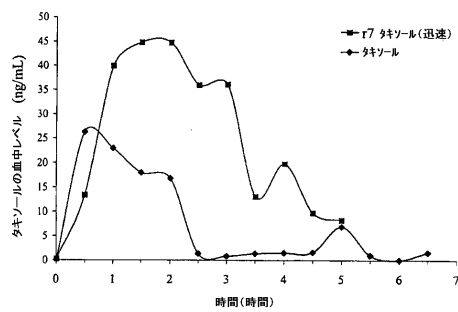
【図 3 5】

FIGURE 35



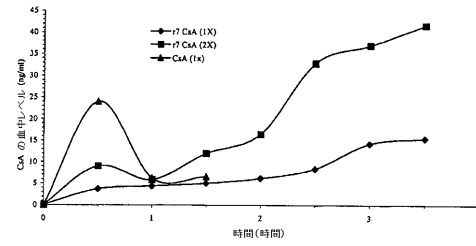
【図 3 8】

FIGURE 38



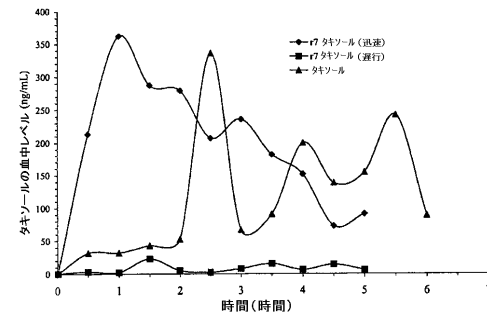
【図 3 6】

FIGURE 36



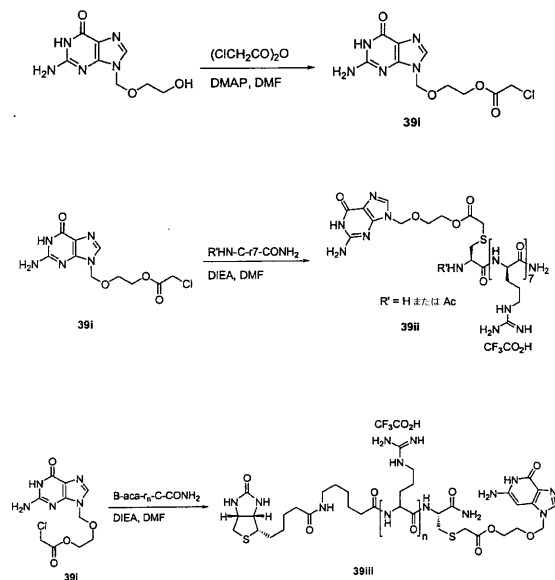
【図 3 7】

FIGURE 37



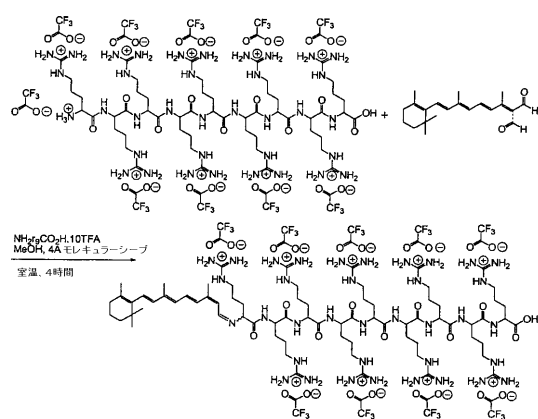
【図 3 9】

FIGURE 39



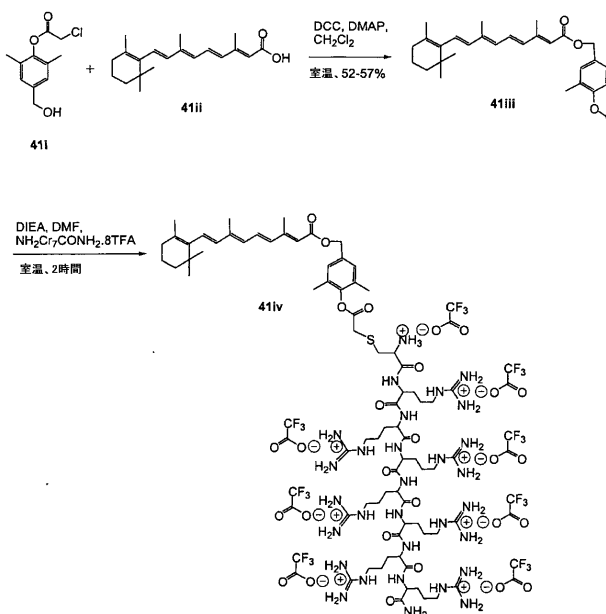
【図 40】

FIGURE 40



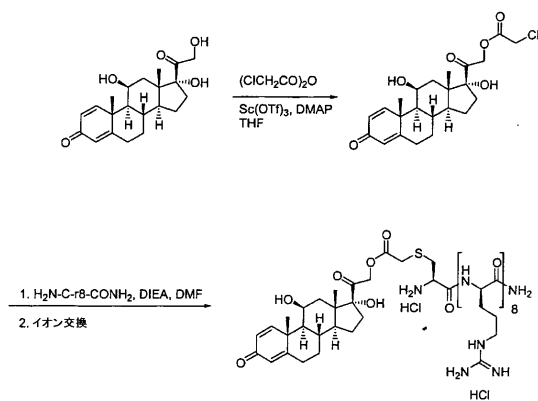
【図 41】

FIGURE 41



【図 44】

FIGURE 44



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/069930 A1(51) International Patent Classification: A61K 9/02,
31/155, 38/03, 38/16, C07C 257/00, 279/00, C07K 4/00,
14/00Sunnyvale, CA 94087 (US), KIRSCHBERG, Thorsten,
A.; 360 Chiquita Ave., #11, Mountain View, CA 94041
(US).

(21) International Application Number: PCT/US02/05829

(74) Agents: HINSCH, Matthew, E. et al.; Townsend And
Townsend And Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th
Floor, San Francisco, CA 94111 (US).

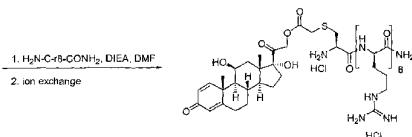
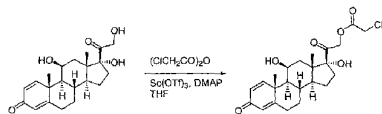
(22) International Filing Date: 25 February 2002 (25.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/792,480 23 February 2001 (23.02.2001) US(71) Applicant: CELLGATE, INC. [US/US]; 552 Del Rey
Avenue, Sunnyvale, CA 94086 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NL, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCING DRUG DELIVERY ACROSS AND INTO EPITHELIAL
TISSUES(57) Abstract: This invention provides compositions and methods for enhancing delivery of drugs and other agents across epithelial
tissues, including the skin, gastrointestinal tract, pulmonary epithelium, and the like. The compositions and methods are also useful
for delivery across endothelial tissues, including the blood brain barrier. The compositions and methods employ a delivery enhancing
transporter that has sufficient guanidino or amidino sidechain moieties to enhance delivery of a compound conjugated to the reagent
across one or more layers of the tissue, compared to the non-conjugated compound. The delivery-enhancing polymers include, for
example, poly-arginine molecules that are preferably between about 6 and 25 residues in length (see Figure 44).

WO 02/069930 A1

WO 02/069930 A1

**Published:**

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCING DRUG DELIVERY ACROSS AND INTO EPITHELIAL TISSUES

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

This invention pertains to the field of compositions and methods that enhance the delivery of drugs and other compounds across the dermal and epithelial membranes, including, for example, skin, the gastrointestinal epithelium and the bronchial epithelium.

Background

Transdermal or transmucosal drug delivery is an attractive route of drug delivery for several reasons. Gastrointestinal drug degradation and the hepatic first-pass effect are avoided. In addition, transdermal and transmucosal drug delivery is well-suited to controlled, sustained delivery (*see, e.g., Elias, In Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery*, Bronaugh & Maibach, Eds., pp 1-12, Marcel Dekker, New York, 1989.). For many applications, traditional methods of administering drugs are not optimal because of the very large initial concentration of the drug. Transdermal delivery could allow a more uniform, slower rate of delivery of a drug. Moreover, patient compliance is encouraged because such delivery methods are easy to use, comfortable, convenient and non-invasive.

These advantages of transdermal and transmucosal delivery have not led to many clinical applications because of the low permeability of epithelial membranes, the skin in particular, to drugs. The difficulties in delivering drugs across the skin result from the barrier property of skin. Skin is a structurally complex thick membrane that represents the body's border to the external hostile environment. The skin is composed of the epidermis, the dermis, the hypodermis, and the adnexal structures (epidermal appendages). The epidermis, the outermost epithelial tissue of the skin, is itself composed of several layers--the stratum corneum, the stratum granulosum, the stratum spinosum, and the stratum basale.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Compounds that move from the environment into and through intact skin must first penetrate the stratum corneum, the outermost layer of skin, which is compact and highly keratinized. The stratum corneum is composed of several layers of keratin-filled skin cells that are tightly bound together by a "glue" composed of cholesterol and fatty acids. The thickness of the stratum corneum varies depending upon body location. It is the presence of stratum corneum that results in the impermeability of the skin to pharmaceutical agents. The stratum corneum is formed naturally by cells migrating from the basal layer toward the skin surface where they are eventually sloughed off. As the cells progress toward the surface, they become progressively more dehydrated and keratinized. The penetration across the stratum corneum layer is generally the rate-limiting step of drug permeation across skin. See, e.g., Flynn, G.L., In *Percutaneous Absorption: Mechanisms-Methodology-Drug Delivery*, supra, at pages 27-53.

After penetration through the stratum corneum layer, systemically acting drug molecules then must pass into and through the epidermis, the dermis, and finally through the capillary walls of the bloodstream. The epidermis, which lies under the stratum corneum, is composed of three layers. The outermost of these layers is the stratum granulosum, which lies adjacent to the stratum corneum, is composed of cells that are differentiated from basal cells and keratinocytes, which make up the underlying layers. Having acquired additional keratin and a more flattened shape. The cells of this layer of the epidermis, which contain granules that are composed largely of the protein filaggrin. This protein is believed to bind to the keratin filaments to form the keratin complex. The cells also synthesize lipids that function as a "cement" to hold the cells together. The epidermis, in particular the stratum granulosum, contains enzymes such as aminopeptidases.

The next-outermost layer of the epidermis is the stratum spinosum, the principal cells of which are keratinocytes, which are derived from basal cells that comprise the basal cell layer. Langerhans cells, which are also found in the stratum spinosum, are antigen-presenting cells and thus are involved in the mounting of an immune response against antigens that pass into the skin. The cells of this layer are generally involved in contact sensitivity dermatitis.

The innermost epidermal layer is the stratum basale, or basal cell layer, which consists of one cell layer of cuboidal cells that are attached by hemi-desmosomes to a thin

WO 02/069930

PCT/US02/05829

basement membrane which separates the basal cell layer from the underlying dermis. The cells of the basal layer are relatively undifferentiated, proliferating cells that serve as a progenitor of the outer layers of the epidermis. The basal cell layer includes, in addition to the basal cells, melanocytes.

5 The dermis is found under the epidermis, which is separated from the dermis by a basement membrane that consists of interlocking rete ridges and dermal papillae. The dermis itself is composed of two layers, the papillary dermis and the reticular dermis. The dermis consists of fibroblasts, histiocytes, endothelial cells, perivascular macrophages and dendritic cells, mast cells, smooth muscle cells, and cells of peripheral nerves and their end-
10 organ receptors. The dermis also includes fibrous materials such as collagen and reticulin, as well as a ground substance (principally glycosaminoglycans, including hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and dermatan sulfate).

 Several methods have been proposed to enhance transdermal transport of drugs. For example, chemical enhancers (Burnette, R. R. In *Developmental Issues and*
15 *Research Initiatives*; Hadgraft J., Ed., Marcel Dekker: 1989; pp. 247-288), iontophoresis, and others have been used. However, in spite of the more than thirty years of research that has gone into delivery of drugs across the skin in particular, fewer than a dozen drugs are now available for transdermal administration in, for example, skin patches.

 Transport of drugs and other molecules across the blood-brain barrier is also
20 problematic. The brain capillaries that make up the blood-brain barrier are composed of endothelial cells that form tight junctions between themselves (Goldstein *et al.*, *Scientific American* 255:74-83 (1986); Pardridge, W. M., *Endocrin. Rev.* 7: 314-330 (1986)). The endothelial cells and the tight intercellular junctions that join the cells form a barrier against the passive movement of many molecules from the blood to the brain. The endothelial cells
25 of the blood-brain barrier have few pinocytotic vesicles, which in other tissues can allow somewhat unselective transport across the capillary wall. Nor is the blood-brain barrier interrupted by continuous gaps or channels that run through the cells, thus allowing for unrestrained passage of drugs and other molecules.

 Thus, a need exists for improved reagents and methods for enhancing
30 delivery of compounds, including drugs, across epithelial tissues and endothelial tissues such

WO 02/069930

PCT/US02/05829

as the skin, the gastrointestinal tract, the eye and the blood-brain barrier. The present invention fulfills this and other needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods of targeting a compound to a
5 gastrointestinal epithelium of an animal. The methods involve administering to the
gastrointestinal epithelium a conjugate that includes the compound and a delivery-enhancing
transporter. The delivery-enhancing transporters, which are also provided by the invention,
have sufficient guanidino or amidino moieties to increase delivery of the conjugate into the
gastrointestinal epithelium compared to delivery of the compound in the absence of the
10 delivery-enhancing transporter. In some embodiments, delivery of the conjugate into the
gastrointestinal epithelium is increased at least two-fold compared to delivery of the
compound in the absence of the delivery-enhancing transporter. In more preferred
embodiments, delivery of the conjugate into the gastrointestinal epithelium is increased at
least ten-fold compared to delivery of the compound in the absence of the delivery-
15 enhancing transporter. The delivery-enhancing transporter and the compound are typically
attached through a linker. In addition, the conjugate can comprise two or more delivery-
enhancing transporters linked to the compound.

Typically, the delivery-enhancing transporters comprise fewer than 50
subunits and comprise at least 6 guanidino or amidino moieties. In some embodiments, the
20 subunits are amino acids. In some embodiments, the delivery-enhancing transporters have
from 6 to 25 guanidino or amidino moieties, and more preferably between 7 and 15
guanidino moieties and still more preferably, at least six contiguous guanidino and/or
amidino moieties. In some embodiments, the delivery-enhancing transporters consist
essentially of 5 to 50 subunits, at least 50 of which comprise guanidino or amidino residues.
25 In some of these embodiments, the subunits are natural or non-natural amino acids. For
example, in some embodiments, the delivery-enhancing transporter comprises 5 to 25
arginine residues or analogs thereof. For example, the transporter can comprise seven
contiguous D-arginines.

In some embodiments, the delivery-enhancing transporter comprises 7-15
30 arginine residues or analogs of arginine. The delivery-enhancing transporter can have at least

WO 02/069930

PCT/US02/05829

one arginine that is a D-arginine and in some embodiments, all arginines are D-arginine. In some embodiments, at least 70% of the amino acids are arginines or arginine analogs. In some embodiments, the delivery-enhancing transporter comprises at least 5 contiguous arginines or arginine analogs. The delivery-enhancing transporters can comprise non-peptide backbones. In addition, in some aspects, the transporter is not attached to an amino acid sequence to which the delivery-enhancing molecule is attached in a naturally occurring protein.

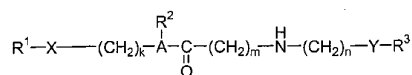
The delivery-enhancing transporters and methods of the invention are useful for delivering drugs, diagnostic agents, and other compounds of interest to the gastrointestinal epithelium. The methods and compositions of the invention can be used not only to deliver the compounds to the particular site of administration, but also provide systemic delivery. In some embodiments, the conjugate is administered buccally or as a suppository. The compounds of the conjugate can be a therapeutic for a disease such as inflammatory bowel disease, colon cancer, ulcerative colitis, gastrointestinal ulcers, constipation and imbalance of salt and water absorption. Thus, the compounds can include immunosuppressives, corticosteroids, laxatives, antibiotics or anti-neoplastic agents. In some aspects of the invention, the compound is targeted to the ileum and/or colon.

As discussed above, the compound to be delivered can be connected to the delivery-enhancing transporter by a linker. In some embodiments, the linker is a releasable linker which releases the compound, in biologically active form, from the delivery-enhancing transporter after the compound has passed into and/or through one or more layers of the epithelial and/or endothelial tissue. In some embodiments, the compound is released from the linker by solvent-mediated cleavage. The conjugate is, in some embodiments, substantially stable at acidic pH but the compound is substantially released from the delivery-enhancing transporter at physiological pH. In some embodiments, the half-life of the conjugate is between 5 minutes and 24 hours upon contact with the skin or other epithelial or endothelial tissue. For example, the half-life can be between 30 minutes and 2 hours upon contact with the skin or other epithelial or endothelial tissue.

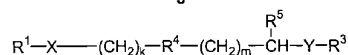
Examples of conjugate structures of the invention include those having structures such as 3, 4, or 5, as follows:

WO 02/069930

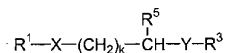
PCT/US02/05829



3



4



5

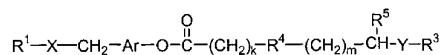
- 5 wherein R^1 comprises the compound; X is a linkage formed between a functional group on the biologically active compound and a terminal functional group on the linking moiety; Y is a linkage formed from a functional group on the transport moiety and a functional group on the linking moiety; A is N or CH; R^2 is hydrogen, alkyl, aryl, acyl, or allyl; R^3 comprises the delivery-enhancing transporter; R^4 is S, O, NR^6 or CR^7R^8 ; R^5 is H, OH, SH or NHR^6 ; R^6 is hydrogen, alkyl, aryl, acyl or allyl; k and m are each independently selected from 1 and 2; and n is 1 to 10.

- Preferably, X is selected from the group consisting of $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, $-OC(O)NH-$, $-S-S-$, $-C(S)O-$, $-C(S)NH-$, $-NHC(O)NH-$, $-SO_2NH-$, $-SONH-$, phosphate, phosphonate phosphinate, and CR^7R^8 , wherein R^7 and R^8 are each independently selected from the group consisting of H and alkyl. In some embodiments, R_4 is S; R_5 is NHR_6 ; and R_6 is hydrogen, methyl, allyl, butyl or phenyl. In some embodiments, R_2 is benzyl; k, m, and n are each 1, and X is O. In some embodiments, the conjugate comprises structure 3, Y is N, and R^2 is methyl, ethyl, propyl, butyl, allyl, benzyl or phenyl. In some embodiments, R^2 is benzyl; k, m, and n are each 1, and X is $-OC(O)-$. In some embodiments, the conjugate comprises structure 4; R^4 is S; R^5 is NHR^6 ; and R^6 is hydrogen, methyl, allyl, butyl or phenyl. In some embodiments, the conjugate comprises structure 4; R^4 is NHR^6 ; R^6 is hydrogen, methyl, allyl, butyl or phenyl; and k and m are each 1.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

The invention also provides conjugates in which the release of the linker from the biological agent involves a first, rate-limiting intramolecular reaction, followed by a faster intramolecular reaction that results in release of the linker. The rate-limiting reaction can, by appropriate choice of substituents of the linker, be made to be stable at a pH that is higher or lower than physiological pH. However, once the conjugate has passed into and across one or more layers of an epithelial or endothelial tissue, the linker will be cleaved from the agent. An example of a compound that has this type of linker is structure 6, as follows:



6

wherein R^1 comprises the compound; X is a linkage formed between a functional group on the biologically active compound and a terminal functional group on the linking moiety; Y is a linkage formed from a functional group on the transport moiety and a functional group on the linking moiety; Ar is an aryl group having the attached radicals arranged in an *ortho* or *para* configuration, which aryl group can be substituted or unsubstituted; R^3 comprises the delivery-enhancing transporter; R^4 is S, O, NR^6 or CR^7R^8 ; R^5 is H, OH, SH or NHR^6 ; R^6 is hydrogen, alkyl, aryl, arylalkyl, acyl or allyl; R^7 and R^8 are independently selected from hydrogen or alkyl; and k and m are each independently selected from 1 and 2.

In some embodiments, X is selected from the group consisting of $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, $-OC(O)NH-$, $-S-S-$, $-C(S)O-$, $-C(S)NH-$, $-NHC(O)NH-$, $-SO_2NH-$, $-SONH-$, phosphate, phosphonate phosphinate, and CR^7R^8 , wherein R^7 and R^8 are each independently selected from the group consisting of H and alkyl. In some embodiments, R^4 is S; R^5 is NHR^6 ; and R^6 is hydrogen, methyl, allyl, butyl or phenyl.

In preferred embodiments, the compositions of the invention comprise a linker susceptible to solvent-mediated cleavage. For example, a preferred linker is substantially stable at acidic pH but is substantially cleaved at physiological pH.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows a reaction scheme for the preparation of an α -chloroacetyl cyclosporin A derivative.

5 Figure 2 shows a general procedure for the coupling of cysteine-containing peptides to the α -chloro acetyl cyclosporin A derivative.

Figure 3 shows a reaction scheme for the coupling of the cyclosporin A derivative to a biotin-labeled peptide.

Figure 4 shows a reaction scheme for coupling of a cyclosporin A derivative to an unlabeled peptide.

10 Figure 5 A-H show various types of cleavable linkers that can be used to link a delivery-enhancing transporter to a biologically active agent or other molecule of interest. Figure 5A shows an example of a disulfide linkage. Figure 5B shows a photocleavable linker which is cleaved upon exposure to electromagnetic radiation. Figure 5C shows a modified lysyl residue used as a cleavable linker. Figure 5D shows a conjugate in which the delivery-
15 enhancing transporter T is linked to the 2'-oxygen of the anticancer agent, paclitaxel. The linking moiety includes (i) a nitrogen atom attached to the delivery-enhancing transporter, (ii) a phosphate monoester located para to the nitrogen atom, and (iii) a carboxymethyl group meta to the nitrogen atom, which is joined to the 2'-oxygen of paclitaxel by a carboxylate ester linkage. Figure 5E a linkage of a delivery-enhancing transporter to a biologically active
20 agent, *e.g.*, paclitaxel, by an aminoalkyl carboxylic acid; a linker amino group is joined to a delivery-enhancing transporter by an amide linkage and to a paclitaxel moiety by an ester linkage. Figures 5F and G show chemical structures and conventional numbering of constituent backbone atoms for paclitaxel and "TAXOTERE™" ($R' = H$, $R'' = BOC$). Figure 5G shows the general chemical structure and ring atom numbering for taxoid compounds.

25 Figure 6 displays a synthetic scheme for a chemical conjugate between a heptamer of L-arginine and cyclosporin A (panel A) and its pH dependent chemical release (panel B). The α -chloro ester (6i) was treated with benzylamine in the presence of sodium iodide to effect substitution, giving the secondary amine (6ii). Amine (6ii) was treated with anhydride (6) and the resultant crude acid (6iii) was converted to its corresponding NHS
30 ester (6iv). Ester (6iv) was then coupled with the amino terminus of hepta-L-arginine, giving the N-Boc protected CsA conjugate (6v). Finally, removal of the Boc protecting group with

WO 02/069930

PCT/US02/05829

formic acid afforded the conjugate (6vi) as its octafluoroacetate salt after HPLC purification.

Figure 7 displays inhibition of inflammation in murine contact dermatitis by releasable R7 CsA. Balb/c (6-7 weeks) mice were painted on the abdomen with 100 μ l of 0.7% DNFB in acetone olive oil (95:5). Three days later both ears of the animals were restimulated with 0.5% DNFB in acetone. Mice were treated one, five, and twenty hours after restimulation with either vehicle alone, 1% R7 peptide alone, 1% CsA, 1% nonreleasable R7 CsA, 0.01%/0.1% /1.0% releasable R7 CsA, and the fluorinated steroid positive control 0.1% triamcinolone acetonide. Ear inflammation was measured 24 hours after restimulation using a spring loaded caliper. The percent reduction of inflammation was calculated using the following formula $(t-n)/(u-n)$, where t = thickness of the treated ear, n = the thickness of a normal untreated ear, and u = thickness of an inflamed ear without any treatment. N = 20 animals in each group.

Figure 8 shows a procedure for the preparation of a copper-diethylene-triaminepentaacetic acid complex (Cu-DTPA).

Figure 9 shows a procedure for linking the Cu-DTPA to a transporter through an aminocaproic acid.

Figure 10 shows a reaction for the acylation of hydrocortisone with chloroacetic anhydride.

Figure 11 shows a reaction for linking the acylated hydrocortisone to a transporter.

Figure 12 shows a reaction for preparation of C-2' derivatives of taxol.

Figure 13 shows a schematic of a reaction for coupling of a taxol derivative to a biotin-labeled peptide.

Figure 14 shows a reaction for coupling of an unlabeled peptide to a C-2' derivative of taxol.

Figure 15A-C shows a reaction scheme for the formation of other C-2' taxol-peptide conjugates.

Figure 16 shows a general strategy for synthesis of a conjugate in which a drug or other biological agent is linked to a delivery-enhancing transporter by a pH-releasable linker.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 17 shows a schematic diagram of a protocol for synthesizing a taxol 2'-chloroacetyl derivative.

Figure 18 shows a strategy by which a taxol 2'-chloroacetyl derivative is linked to an arginine heptamer delivery-enhancing transporter.

5 Figure 19 shows three additional taxol-r7 conjugates that can be made using the reaction conditions illustrated in Figure 18.

Figure 20 shows the results of a 3 day MTT cytotoxicity assay using taxol and two different linkers.

Figure 21 shows the FACS cellular uptake assay of truncated analogs of
10 Tat₄₉₋₅₇ (Fl-ahx-RKKRRQRRR), Tat₄₉₋₅₆ (Fl-ahx-RKKRRQRR), Tat₄₉₋₅₅ (Fl-ahx-RKKRRQR), Tat₅₀₋₅₇ (Fl-ahx-KKKRRQRRR), and Tat₅₁₋₅₇ (Fl-ahx-KRRQRRR). Jurkat cells were incubated with varying concentrations (12.5 μM shown) of peptides for 15 min at 23 °C.

Figure 22 shows FACS cellular uptake assay of alanine-substituted analogs of
15 Tat₄₉₋₅₇: A-49 (Fl-ahx-AKKRRQRRR), A-50 (Fl-ahx-RAKKRRQRRR), A-51 (Fl-ahx-RKARRQRRR), A-52 (Fl-ahx-RKKARQRRR), A-53 (Fl-ahx-RKKRAQRRR), A-54 (Fl-ahx-RKKRRARRR), A-55 (Fl-ahx-RKKRRQARR), A-56 (Fl-ahx-RKKRRQRAR), and A-57 (Fl-ahx-RKKRRQRRR). Jurkat cells were incubated with varying concentrations (12.5 μM shown) of peptides for 12 min at 23 °C.

Figure 23 shows the FACS cellular uptake assay of *d*- and retro-isomers of
20 Tat₄₉₋₅₇: *d*-Tat₄₉₋₅₇ (Fl-ahx-rkkrrqrrr), Tat₅₇₋₄₉ (Fl-ahx-RRRQRRKKR), and *d*-Tat₅₇₋₄₉ (Fl-ahx-rrrqrrkk). Jurkat cells were incubated with varying concentrations (12.5 μM shown) of peptides for 15 min at 23 °C.

Figure 24 shows the FACS cellular uptake of a series of arginine oligomers
25 and Tat₄₉₋₅₇: R5 (Fl-ahx-RRRRR), R6 (Fl-ahx-RRRRRR), R7 (Fl-ahx-RRRRRRR), R8 (Fl-ahx-RRRRRRRR), R9 (Fl-ahx-RRRRRRRRR), r5 (Fl-ahx-rrrrr), r6 (Fl-ahx-rrrrr), r7 (Fl-ahx-rrrrr), r8 (Fl-ahx-rrrrr), r9 (Fl-ahx-rrrrr). Jurkat cells were incubated with varying concentrations (12.5 μM shown) of peptides for 4 min at 23 °C.

Figure 25 displays the preparation of guanidine-substituted peptoids.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 26 displays the FACS cellular uptake of polyguanidine peptoids and *D*-arginine oligomers. Jurkat cells were incubated with varying concentrations (12.5 μ M shown) of peptoids and peptides for 4 min at 23 °C.

Figure 27 displays the FACS cellular uptake of *D*-arginine oligomers and polyguanidine peptoids. Jurkat cells were incubated with varying concentrations (12.5 μ M shown) of fluorescently labeled peptoids and peptides for 4 min at 23 °C.

Figure 28 displays the FACS cellular uptake of *D*-arginine oligomers and *N*-hxg peptoids. Jurkat cells were incubated with varying concentrations (6.3 μ M shown) of fluorescently labeled peptoids and peptides for 4 min at 23 °C.

Figure 29 shows the FACS cellular uptake of *D*-arginine oligomers and *N*-chg peptoids. Jurkat cells were incubated with varying concentrations (12.5 μ M shown) of fluorescently labeled peptoids and peptides for 4 min at 23 °C.

Figure 30 shows a general strategy for attaching a delivery-enhancing transporter to a drug that includes a triazole ring structure.

Figure 31A and Figure 31B show synthetic schemes for making conjugates in which FK506 is attached to a delivery-enhancing transporter.

Figure 32 show that short oligomers of arginine, but not lysine, effectively enter Caco-2 cells. Caco-2 cells were incubated with varying concentrations with each of the peptides shown, washed, and analyzed by flow cytometry. Uptake could be inhibited with preincubation with sodium azide, demonstrating that it was energy dependent.

Figure 33 displays the measured fluorescence of Caco-2 cells exposed to fluorescent taxol or fluorescent, nonreleasable taxol conjugates with either heptamers (r7) or decamers (r10) of *D*-arginine.

Figure 34 demonstrates Caco-2 monolayer integrity by the measurement of a stable transepithelial electric resistance of greater than 100 ohm cm^2 for the duration of the experiments described in this report.

Figure 35 shows the accumulation of either Fl aca r5, Fl aca r9, Lucifer Yellow, or hydrocortisone in the basolateral chamber of a diffusion apparatus after transport through a Caco-2 cell monolayer after one hour.

Figure 36 displays the blood levels of CsA in rats measured by LC MS MS at thirty minute intervals after intracolonic injection. CsA was administered in Cremophor EL:

WO 02/069930

PCT/US02/05829

ethanol, 1:1, whereas the CsA conjugates were administered in PBS. The half life in PBS, pH 7.4 at 37°C, of the CsA conjugate (CGC1072) was 1.5 hours.

Figure 37 displays the blood levels of taxol in rats measured by LC MS MS at thirty minute intervals after intracolonic injection. Taxol was administered in Cremophor EL:ethanol, 1:1, whereas the two taxol conjugates were administered in PBS. The half life in PBS, pH 7.4 at 37°C, of the slower releasing conjugate (14) was 5 hours, while that of the faster conjugate (13) was ten minutes. *See*, Example 18.

Figure 38 displays the blood levels of taxol in rats measured by LC MS MS at thirty minute intervals after buccal delivery. Taxol was administered in Cremophor EL: ethanol, 1:1, whereas the taxol conjugate was administered in PBS. The half life in PBS, pH 7.4 at 37°C, of the conjugate (13) was ten minutes.

Figure 39 illustrates the conjugation of acyclovir to r7-amide via an N-terminal cysteine group. Conjugation with a biotin-containing transporter is also shown.

Figure 40 illustrates the conjugate formed between a retinal and a r9 (shown without spacing amino acids).

Figure 41 illustrates the use of a cleavable linker in preparing a retinoic acid-r9 conjugate.

Figure 42 illustrates a method of linking active agents such as acyclovir to transport moieties.

Figure 43 illustrates a method of linking active agents such as acyclovir to transport moieties.

Figure 44 illustrates a method of linking active agents such as a corticoid steroid to transport moieties.

25

DETAILED DESCRIPTION

Definitions

An "epithelial tissue" is the basic tissue that covers surface areas of the surface, spaces, and cavities of the body. Epithelial tissues are composed primarily of epithelial cells that are attached to one another and rest on an extracellular matrix (basement membrane) that is typically produced by the cells. Epithelial tissues include three general

WO 02/069930

PCT/US02/05829

types based on cell shape: squamous, cuboidal, and columnar epithelium. Squamous epithelium, which lines lungs and blood vessels, is made up of flat cells. Cuboidal epithelium lines kidney tubules and is composed of cube shaped cells, while columnar epithelium cells line the digestive tract and have a columnar appearance. Epithelial tissues can also be classified based on the number of cell layers in the tissue. For example, a simple epithelial tissue is composed of a single layer of cells, each of which sits on the basement membrane. A "stratified" epithelial tissue is composed of several cells stacked upon one another; not all cells contact the basement membrane. A "pseudostratified" epithelial tissue has cells that, although all contact the basement membrane, appear to be stratified because the nuclei are at various levels.

The term "trans-epithelial" delivery or administration refers to the delivery or administration of agents by permeation through one or more layers of a body surface or tissue, such as intact skin or a mucous membrane, by topical administration. Thus, the term is intended to include both transdermal (*e.g.*, percutaneous adsorption) and transmucosal administration. Delivery can be to a deeper layer of the tissue, for example, and/or delivery to the bloodstream.

"Delivery enhancement, "penetration enhancement" or "permeation enhancement" as used herein relates to an increase in amount and/or rate of delivery of a compound that is delivered into and across one or more layers of an epithelial or endothelial tissue. An enhancement of delivery can be observed by measuring the rate and/or amount of the compound that passes through one or more layers of animal or human skin or other tissue. Delivery enhancement also can involve an increase in the depth into the tissue to which the compound is delivered, and/or the extent of delivery to one or more cell types of the epithelial or other tissue (*e.g.*, increased delivery to fibroblasts, immune cells, and endothelial cells of the skin or other tissue). Such measurements are readily obtained by, for example, using a diffusion cell apparatus as described in US Patent No. 5,891,462.

The amount or rate of delivery of an agent across and/or into skin or other epithelial or endothelial membrane is sometimes quantitated in terms of the amount of compound passing through a predetermined area of skin or other tissue, which is a defined area of intact unbroken living skin or mucosal tissue. That area will usually be in the range

WO 02/069930

PCT/US02/05829

of about 5 cm² to about 100 cm², more usually in the range of about 10 cm² to about 100 cm², still more usually in the range of about 20 cm² to about 60 cm².

The terms "guanidyl," "guanidinyl" and "guanidino" are used interchangeably to refer to a moiety having the formula -HN=C(NH₂)NH (unprotonated form). As an
 5 example, arginine contains a guanidyl (guanidino) moiety, and is also referred to as 2-amino-5-guanidinovaleic acid or α-amino-δ-guanidinovaleic acid. "Guanidium" refers to the positively charged conjugate acid form. The term "guanidino moiety" includes, for example, guanidine, guanidinium, guanidine derivatives such as (RNHC(NH)NHR'), monosubstituted
 10 guanidines, monoguanides, biguanides, biguanide derivatives such as (RNHC(NH)NHC(NH)NHR'), and the like. In addition, the term "guanidino moiety" encompasses any one or more of a guanide alone or a combination of different guanides.

"Amidinyl" and "amidino" refer to a moiety having the formula -C(=NH)(NH₂). "Amidinium" refers to the positively charged conjugate acid form.

The term "trans-barrier concentration" or "trans-tissue concentration" refers
 15 to the concentration of a compound present on the side of one or more layers of an epithelial or endothelial barrier tissue that is opposite or "trans" to the side of the tissue to which a particular composition has been added. For example, when a compound is applied to the skin, the amount of the compound measured subsequently across one or more layers of the skin is the trans-barrier concentration of the compound.

"Biologically active agent" or "biologically active substance" refers to a
 20 chemical substance, such as a small molecule, macromolecule, or metal ion, that causes an observable change in the structure, function, or composition of a cell upon uptake by the cell. Observable changes include increased or decreased expression of one or more mRNAs, increased or decreased expression of one or more proteins, phosphorylation of a protein or
 25 other cell component, inhibition or activation of an enzyme, inhibition or activation of binding between members of a binding pair, an increased or decreased rate of synthesis of a metabolite, increased or decreased cell proliferation, and the like.

The terms "therapeutic agent", "therapeutic composition", and "therapeutic
 30 substance" refer, without limitation, to any composition that can be used to the benefit of a mammalian species. Such agents may take the form of ions, small organic molecules, peptides, proteins or polypeptides, oligonucleotides, and oligosaccharides, for example.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

The term "macromolecule" as used herein refers to large molecules (MW greater than 1000 daltons) exemplified by, but not limited to, peptides, proteins, oligonucleotides and polynucleotides of biological or synthetic origin.

5 "Small organic molecule" refers to a carbon-containing agent having a molecular weight (MW) of less than or equal to 1000 daltons.

The terms "non-polypeptide agent" and "non-polypeptide therapeutic agent" refer to the portion of a conjugate that does not include the delivery-enhancing transporter, and that is a biologically active agent other than a polypeptide. An example of a non-polypeptide agent is an anti-sense oligonucleotide, which can be conjugated to a poly-
10 arginine peptide to form a conjugate for enhanced delivery into and across one or more layers of an epithelial or endothelial tissue.

A "subunit," as used herein, is a monomeric unit that are joined to form a larger polymeric compound. The set of amino acids are an example of subunits. Each amino acid shares a common backbone (-C-C-N-), and the different amino acids differ in their
15 sidechains. The backbone is repeated in a polypeptide. A subunit represents the shortest repeating pattern of elements in a polymer backbone. For example, two amino acids of a peptide are not considered a peptide because two amino acids would not have the shortest repeating pattern of elements in the polymer backbone.

The term "polymer" refers to a linear chain of two or more identical or non-
20 identical subunits joined by covalent bonds. A peptide is an example of a polymer; peptides can be composed of identical or non-identical amino acid subunits that are joined by peptide linkages (amide bonds).

The term "peptide" as used herein refers to a compound made up of a single chain of D- or L- amino acids or a mixture of D- and L-amino acids joined by peptide bonds.
25 Generally, peptides contain at least two amino acid residues and are less than about 50 amino acids in length. D-amino acids are represented herein by a lower-case one-letter amino acid symbol (e.g., r for D-arginine), whereas L-amino acids are represented by an upper case one-letter amino acid symbol (e.g., R for L-arginine). Homopolymer peptides are represented by a one-letter amino acid symbol followed by the number of consecutive
30 occurrences of that amino acid in the peptide- (e.g., R7 represents a heptamer that consists of L-arginine residues).

WO 02/069930

PCT/US02/05829

The term "protein" as used herein refers to a compound that is composed of linearly arranged amino acids linked by peptide bonds, but in contrast to peptides, has a well-defined conformation. Proteins, as opposed to peptides, generally consist of chains of 50 or more amino acids.

5 "Polypeptide" as used herein refers to a polymer of at least two amino acid residues and which contains one or more peptide bonds. "Polypeptide" encompasses peptides and proteins, regardless of whether the polypeptide has a well-defined conformation.

Description of the Preferred Embodiments

10 The present invention provides compositions and methods that enhance the transfer of compounds, including drugs and other biologically active compounds, into and across one or more layers of an animal epithelial or endothelial tissue. The methods involve contacting the tissue with a conjugate that includes the compound of interest linked to a delivery-enhancing transporter. The delivery enhancing transporters provided by the invention are molecules that include sufficient guanidino or amidino moieties to increase
15 delivery of the conjugate into and across one or more intact epithelial and endothelial tissue layers. The methods and compositions are useful for trans-epithelial and trans-endothelial delivery of drugs and other biologically active molecules, and also for delivery of imaging and diagnostic molecules. The methods and compositions of the invention are particularly useful for delivery of compounds that require trans-epithelial or trans-endothelial transport to
20 exhibit their biological effects, and that by themselves (without conjugation to a delivery-enhancing transporters or some other modification), are unable, or only poorly able, to cross such tissues and thus exhibit biological activity.

The delivery-enhancing transporters and methods of the invention provide significant advantages over previously available methods for obtaining trans-epithelial and
25 trans-endothelial tissue delivery of compounds of interest. The transporters make possible the delivery of drugs and other agents across tissues that were previously impenetrable to the drug. For example, while delivery of drugs across skin was previously nearly impossible for all but a few compounds, the methods of the invention can deliver compounds not only into cells of a first layer of an epithelial tissue such as skin, but also across one or more layers of
30 the skin. The blood brain barrier is also resistant to transport of drugs and other diagnostic

WO 02/069930

PCT/US02/05829

and therapeutic reagents; the methods and transporters of the invention provide means to obtain such transport.

- The delivery-enhancing transporters increase delivery of the conjugate into and across one or more intact epithelial or endothelial tissue layers compared to delivery of the compound in the absence of the delivery-enhancing transporter. The delivery-enhancing transporters can, in some embodiments, increase delivery of the conjugate significantly over that obtained using the tat protein of HIV-1 (Frankel *et al.* (1991) PCT Pub. No. WO 91/09958). Delivery is also increased significantly over the use of shorter fragments of the tat protein containing the tat basic region (residues 49-57 having the sequence RKKRRQRRR) (Barsoum *et al.* (1994) WO 94/04686 and Fawell *et al.* (1994) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 664-668). Preferably, delivery obtained using the transporters of the invention is increased more than 2-fold, still more preferably six-fold, still more preferably ten-fold, and still more preferably twenty-fold, over that obtained with tat residues 49-57. In some embodiments, the compositions of the invention do not include tat residues 49-57.
- Similarly, the delivery-enhancing transporters of the invention can provide increased delivery compared to a 16 amino acid peptide-cholesterol conjugate derived from the *Antennapedia* homeodomain that is rapidly internalized by cultured neurons (Brugidou *et al.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 685-93). This region, residues 43-58 at minimum, has the amino acid sequence RQIKIWFQNRRMKWKK. The *Herpes simplex* protein VP22, like tat and the *Antennapedia* domain, was previously known to enhance transport into cells, but was not known to enhance transport into and across endothelial and epithelial membranes (Elliot and O'Hare (1997) *Cell* 88: 223-33; Dilber *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6: 12-21; Phelan *et al.* (1998) *Nature Biotechnol.* 16: 440-3). In presently preferred embodiments, the delivery-enhancing transporters provide significantly increased delivery compared to the *Antennapedia* homeodomain and to the VP22 protein. In some embodiments, the compositions of the invention do not include the *Antennapedia* homeodomain, the VP22 protein or eight contiguous arginines.

Structure of Delivery-Enhancing Transporters

- The delivery-enhancing transporters of the invention are molecules that have sufficient guanidino and/or amidino moieties to increase delivery of a compound to which

WO 02/069930

PCT/US02/05829

the delivery-enhancing transporter is attached into and across one or more layers of an epithelial tissue (*e.g.*, skin or mucous membrane) or an endothelial tissue (*e.g.*, the blood-brain barrier). The delivery-enhancing transporters generally include a backbone structure to which is attached the guanidino and/or amidino sidechain moieties. In some embodiments, the backbone is a polymer that consists of subunits (*e.g.*, repeating monomer units), at least some of which subunits contain a guanidino or amidino moiety.

A. Guanidino and/or Amidino Moieties

The delivery-enhancing transporters typically display at least 5 guanidino and/or amidino moieties, and more preferably 7 or more such moieties. Preferably, the delivery-enhancing transporters have 25 or fewer guanidino and/or amidino moieties, and often have 15 or fewer of such moieties. In some embodiments, the delivery-enhancing transporter consists essentially of 50 or fewer subunits, and can consist essentially of 25 or fewer, 20 or fewer, or 15 or fewer subunits. The delivery-enhancing transporter can be as short as 5 subunits, in which case all subunits include a guanidino or amidino sidechain moiety. The delivery-enhancing transporters can have, for example, at least 6 subunits, and in some embodiments have at least 7 or 10 subunits. Generally, at least 50% of the subunits contain a guanidino or amidino sidechain moiety. More preferably, at least 70% of the subunits, and sometimes at least 90% of the subunits in the delivery-enhancing transporter contain a guanidino or amidino sidechain moiety.

Some or all of the guanidino and/or amidino moieties in the delivery-enhancing transporters can be contiguous. For example, the delivery-enhancing transporters can include from 6 to 25 contiguous guanidino and/or amidino-containing subunits. Seven or more contiguous guanidino and/or amidino-containing subunits are present in some embodiments. In some embodiments, each subunit that contains a guanidino moiety is contiguous, as exemplified by a polymer containing at least six contiguous arginine residues.

The delivery-enhancing transporters are exemplified by peptides. Arginine residues or analogs of arginine can constitute the subunits that have a guanidino moiety. Such an arginine-containing peptide can be composed of either all D-, all L- or mixed D- and L-amino acids, and can include additional amino acids, amino acid analogs, or other molecules between the arginine residues. Optionally, the delivery-enhancing transporter can also include a non-arginine residue to which a compound to be delivered is attached, either

WO 02/069930

PCT/US02/05829

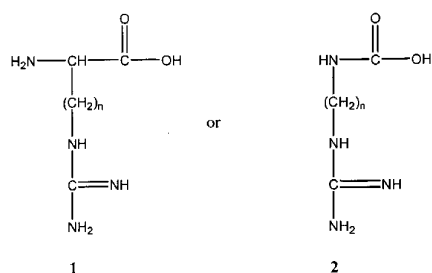
directly or through a linker. The use of at least one D-arginine in the delivery-enhancing transporters can enhance biological stability of the transporter during transit of the conjugate to its biological target. In some cases the delivery-enhancing transporters are at least about 50% D-arginine residues, and for even greater stability transporters in which all of the subunits are D-arginine residues are used. If the delivery enhancing transporter molecule is a peptide, the transporter is not attached to an amino acid sequence to which the amino acids that make up the delivery enhancing transporter molecule are attached in a naturally occurring protein.

Preferably, the delivery-enhancing transporter is linear. In a preferred embodiment, an agent to be delivered into and across one or more layers of an epithelial tissue is attached to a terminal end of the delivery-enhancing transporter. In some embodiments, the agent is linked to a single transport polymer to form a conjugate. In other embodiments, the conjugate can include more than one delivery-enhancing transporter linked to an agent, or multiple agents linked to a single delivery-enhancing transporter.

More generally, it is preferred that each subunit contains a highly basic sidechain moiety which (i) has a pKa of greater than 11, more preferably 12.5 or greater, and (ii) contains, in its protonated state, at least two geminal amino groups (NH₂) which share a resonance-stabilized positive charge, which gives the moiety a bidentate character.

The guanidino or amidino moieties extend away from the backbone by virtue of being linked to the backbone by a sidechain linker. The sidechain atoms are preferably provided as methylene carbon atoms, although one or more other atoms such as oxygen, sulfur or nitrogen can also be present. For example, a linker that attaches a guanidino moiety to a backbone can be shown as:

PCT/US02/05829



In these formulae, n is preferably at least 2, and is preferably between 2 and 7. In some embodiments, n is 3 (arginine for structure 1). In other embodiments, n is between 4 and 6; most preferably n is 5 or 6. Although the sidechain in the exemplified formulae is shown as being attached to a peptide backbone (*i.e.*, a repeating amide to which the sidechain is attached to the carbon atom that is α to the carbonyl group, subunit 1) and a peptoid backbone (*i.e.*, a repeating amide to which the sidechain is attached to the nitrogen atom that is β to the carbonyl group, subunit 2), other non-peptide backbones are also suitable, as discussed in more detail herein. Thus, similar sidechain linkers can be attached to nonpeptide backbones (e.g., peptoid backbones).

In some embodiments, the delivery-enhancing transporters are composed of linked subunits, at least some of which include a guanidino and/or amidino moiety. Examples of suitable subunits having guanidino and/or amidino moieties are described below.

Amino acids. In some embodiments, the delivery-enhancing transporters are composed of D or L amino acid residues. The amino acids can be naturally occurring or non-naturally occurring amino acids. Arginine (α -amino- δ -guanidinovaleric acid) and α -amino- ϵ -amidino-hexanoic acid (isosteric amidino analog) are examples of suitable guanidino- and amidino-containing amino acid subunits. The guanidinium group in arginine has a pKa of about 12.5. In some preferred embodiments the transporters are comprised of at least six contiguous arginine residues.

Other amino acids, such as α -amino- β -guanidino-propionic acid, α -amino- γ -guanidino-butyric acid, or α -amino- ϵ -guanidino-caproic acid (containing 2, 3 or 5 sidechain

WO 02/069930

PCT/US02/05829

linker atoms, respectively, between the backbone chain and the central guanidinium carbon) can also be used.

D-amino acids can also be used in the delivery enhancing transporters.

Compositions containing exclusively D-amino acids have the advantage of decreased enzymatic degradation. However, they can also remain largely intact within the target cell. Such stability is generally not problematic if the agent is biologically active when the polymer is still attached. For agents that are inactive in conjugate form, a linker that is cleavable at the site of action (*e.g.*, by enzyme- or solvent-mediated cleavage within a cell) should be included within the conjugate to promote release of the agent in cells or organelles.

In addition, the transport moieties are amino acid oligomers of the following formulae: $(\text{YZ})_n\text{Z}$, $(\text{ZY})_n\text{Z}$, $(\text{ZYY})_n\text{Z}$ and $(\text{ZYYY})_n\text{Z}$. See, U.S. Patent Application No. 09/779,693, filed February 7, 2001 and U.S. Patent Application No. 60/182166, filed February 14, 2000. "Z" in the formulae is D or L-arginine. "Y" is an amino acid that does not contain a guanidyl or amidinyl moiety. The subscript "n" is an integer ranging from 2 to 25.

In the above transport moiety formulae, the letter "Y" represents a natural or non-natural amino acid. The amino acid can be essentially any compound having (prior to incorporation into the transport moiety) an amino group (NH_2 or NH-alkyl) and a carboxylic acid group (CO_2H) and not containing either a guanidyl or amidinyl moiety. Examples of such compounds include D and L-alanine, D and L-cysteine, D and L-aspartic acid, D and L-glutamic acid, D and L-phenylalanine, glycine, D and L-histidine, D and L-isoleucine, D and L-lysine, D and L-leucine, D and L-methionine, D and L-asparagine, D and L-proline, D and L-glutamine, D and L-serine, D and L-threonine, D and L-valine, D and L-tryptophan, D and L-hydroxyproline, D and L-tyrosine, sarcosine, β -alanine, γ -amino butyric acid and ϵ -amino caproic acid. In each of the above formulae, each Y will be independent of any other Y present in the transport moiety, though in some embodiments, all Y groups can be the same.

In one group of preferred embodiments, the transport moiety has the formula $(\text{YZ})_n\text{Z}$, wherein each "Y" is independently selected from glycine, β -alanine, γ -amino butyric acid and ϵ -amino caproic acid, "Z" is preferably L-arginine, and n is preferably an integer ranging from 2 to 5. More preferably, each "Y" is glycine or ϵ -amino caproic acid

WO 02/069930

PCT/US02/05829

and n is 3. Within this group of embodiments, the use of glycine is preferred for those compositions in which the transport moiety is fused or covalently attached directly to a polypeptide biological agent such that the entire composition can be prepared by recombinant methods. For those embodiments in which the transport moiety is to be assembled using, for example, solid phase methods, ϵ -amino caproic acid is preferred.

In another group of preferred embodiments, the transport moiety has the formula $(ZY)_nZ$, wherein each "Y" is preferably selected from glycine, β -alanine, γ -amino butyric acid and ϵ -amino caproic acid, "Z" is preferably L-arginine, and n is preferably an integer ranging from 4 to 10. More preferably, each "Y" is glycine or ϵ -amino caproic acid and n is 6. As with the above group of specific embodiments, the use of glycine is preferred for those compositions in which the transport moiety is fused or covalently attached directly to a polypeptide biological agent such that the entire composition can be prepared by recombinant methods. For solution or solid phase construction of the transport moiety, ϵ -amino caproic acid is preferred.

In yet another group of preferred embodiments, the transport moiety has the formula $(ZYY)_nZ$, wherein each "Y" is preferably selected from glycine, β -alanine, γ -amino butyric acid and ϵ -amino caproic acid, "Z" is preferably L-arginine, and n is preferably an integer ranging from 4 to 10. More preferably, each "Y" is glycine or ϵ -amino caproic acid and n is 6.

In still another group of preferred embodiments, the transport moiety has the formula $(ZYYY)_nZ$, wherein each "Y" is preferably selected from glycine, β -alanine, γ -amino butyric acid and ϵ -amino caproic acid, "Z" is preferably L-arginine, and n is preferably an integer ranging from 4 to 10. More preferably, "Y" is glycine and n is 6.

In other embodiments, each of the Y groups will be selected to enhance certain desired properties of the transport moiety. For example, when transport moieties having a more hydrophobic character are desired, each Y can be selected from those naturally occurring amino acids that are typically grouped together as hydrophobic amino acids (e.g., phenylalanine, phenylglycine, valine, leucine, isoleucine). Similarly, transport moieties having a more hydrophilic character can be prepared when some or all of the Y groups are hydrophilic amino acids (e.g., lysine, serine, threonine, glutamic acid, and the like).

WO 02/069930

PCT/US02/05829

One of skill in the art will appreciate that the transport moiety can be a polypeptide fragment within a larger polypeptide. For example, the transport moiety can be of the formula $(ZYY)_nZ$ yet have additional amino acids which flank this moiety (e.g., $X_m(ZYY)_nZ-X_p$ wherein the subscripts m and p represent integers of zero to about 10 and each X is independently a natural or non-natural amino acid).

Other Subunits. Subunits other than amino acids can also be selected for use in forming transport polymers. Such subunits can include, but are not limited to, hydroxy amino acids, N-methyl-amino acids amino aldehydes, and the like, which result in polymers with reduced peptide bonds. Other subunit types can be used, depending on the nature of the selected backbone, as discussed in the next section.

B. Backbones

The guanidino and/or amidino moieties that are included in the delivery-enhancing transporters are generally attached to a linear backbone. The backbone can comprise a variety of atom types, including carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus, with the majority of the backbone chain atoms typically consisting of carbon. A plurality of sidechain moieties that include a terminal guanidino or amidino group are attached to the backbone. Although spacing between adjacent sidechain moieties is typically consistent, the delivery-enhancing transporters used in the invention can also include variable spacing between sidechain moieties along the backbone.

A more detailed backbone list includes N-substituted amide (CONR replaces CONH linkages), esters (CO_2), keto-methylene ($COCH_2$) reduced or methyleneamino (CH_2NH), thioamide ($CSNH$), phosphinate (PO_2RCH_2), phosphoramidate and phosphonamidate ester (PO_2RNH), retropeptide ($NHCO$), trans-alkene ($CR=CH$), fluoroalkene ($CF=CH$), dimethylene (CH_2CH_2), thioether (CH_2S), hydroxyethylene ($CH(OH)CH_2$), methyleneoxy (CH_2O), tetrazole (CN_4), retrothioamide ($NHCS$), retroreduced ($NHCH_2$), sulfonamido (SO_2NH), methylenesulfonamido ($CHRSO_2NH$), retrosulfonamide ($NHSO_2$), and peptoids (N-substituted amides), and backbones with malonate and/or gem-diamino-alkyl subunits, for example, as reviewed by Fletcher *et al.* ((1998) *Chem. Rev.* 98:763) and detailed by references cited therein. Many of the foregoing

WO 02/069930

PCT/US02/05829

substitutions result in approximately isosteric polymer backbones relative to backbones formed from α -amino acids.

As mentioned above, in a peptoid backbone, the sidechain is attached to the backbone nitrogen atoms rather than the carbon atoms. (See e.g., Kessler (1993) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:543; Zuckerman et al. (1992) *Chemtracts-Macromol. Chem.* 4:80; and Simon et al. (1992) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367.) An example of a suitable peptoid backbone is poly-(N-substituted)glycine (poly-NSG). Synthesis of peptoids is described in, for example, US Patent No. 5,877,278. As the term is used herein, transporters that have a peptoid backbone are considered "non-peptide" transporters, because the transporters are not composed of amino acids having naturally occurring sidechain locations. Non-peptide backbones, including peptoid backbones, provide enhanced biological stability (for example, resistance to enzymatic degradation *in vivo*).

C. Synthesis of Delivery-enhancing Transporters

Delivery-enhancing transporters are constructed by any method known in the art. Exemplary peptide polymers can be produced synthetically, preferably using a peptide synthesizer (e.g., an Applied Biosystems Model 433) or can be synthesized recombinantly by methods well known in the art. Recombinant synthesis is generally used when the delivery enhancing transporter is a peptide which is fused to a polypeptide or protein of interest.

N-methyl and hydroxy-amino acids can be substituted for conventional amino acids in solid phase peptide synthesis. However, production of delivery-enhancing transporters with reduced peptide bonds requires synthesis of the dimer of amino acids containing the reduced peptide bond. Such dimers are incorporated into polymers using standard solid phase synthesis procedures. Other synthesis procedures are well known and can be found, for example, in Fletcher et al. (1998) *Chem. Rev.* 98:763, Simon et al. (1992) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:9367, and references cited therein.

The delivery-enhancing transporters of the invention can be flanked by one or more non-guanidino/non-amidino subunits (such as glycine, alanine, and cysteine, for example), or a linker (such as an aminocaproic acid group), that do not significantly affect the rate of trans-tissue layer transport of the corresponding delivery-enhancing transporter-

WO 02/069930

PCT/US02/05829

containing conjugates. Also, any free amino terminal group can be capped with a blocking group, such as an acetyl or benzyl group, to prevent ubiquitination *in vivo*.

Where the transporter is a peptoid polymer, one synthetic method involves the following steps: 1) a peptoid polyamine is treated with a base and pyrazole-1-carboximidine to provide a mixture; 2) the mixture is heated and then allowed to cool; 3) the cooled mixture is acidified; and 4) the acidified mixture is purified. Preferably the base used in step 1 is a carbonate, such as sodium carbonate, and heating step 2 involves heating the mixture to approximately 50 °C for between about 24 hours and about 48 hours. The purification step preferably involves chromatography (e.g., reverse-phase HPLC).

10 **D. Attachment of Transport Polymers To Biologically Active Agents**

The agent to be transported can be linked to the delivery-enhancing transporter according to a number of embodiments. In one embodiment, the agent is linked to a single delivery-enhancing transporter, either via linkage to a terminal end of the delivery-enhancing transporter or to an internal subunit within the reagent via a suitable linking group.

In a second embodiment, the agent is attached to more than one delivery-enhancing transporter, in the same manner as above. This embodiment is somewhat less preferred, since it can lead to crosslinking of adjacent cells.

In a third embodiment, the conjugate contains two agent moieties attached to each terminal end of the delivery-enhancing transporter. For this embodiment, it is presently preferred that the agent has a molecular weight of less than 10 kDa.

With regard to the first and third embodiments just mentioned, the agent is generally not attached to one any of the guanidino or amidino sidechains so that they are free to interact with the target membrane.

25 The conjugates of the invention can be prepared by straightforward synthetic schemes. Furthermore, the conjugate products are usually substantially homogeneous in length and composition, so that they provide greater consistency and reproducibility in their effects than heterogeneous mixtures.

According to an important aspect of the present invention, it has been found by the applicants that attachment of a single delivery-enhancing transporter to any of a variety of types of biologically active agents is sufficient to substantially enhance the rate of

WO 02/069930

PCT/US02/05829

uptake of an agent into and across one or more layers of epithelial and endothelial tissues, even without requiring the presence of a large hydrophobic moiety in the conjugate. In fact, attaching a large hydrophobic moiety can significantly impede or prevent cross-layer transport due to adhesion of the hydrophobic moiety to the lipid bilayer of cells that make up the epithelial or endothelial tissue. Accordingly, the present invention includes conjugates that do not contain substantially hydrophobic moieties, such as lipid and fatty acid molecules.

Delivery-enhancing transporters of the invention can be attached covalently to biologically active agents by chemical or recombinant methods.

10 1. Chemical Linkages

Biologically active agents such as small organic molecules and macromolecules can be linked to delivery-enhancing transporters of the invention via a number of methods known in the art (see, for example, Wong, S.S., Ed., *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991)), either directly (e.g., with a carbodiimide) or via a linking moiety. In particular, carbamate, ester, thioether, disulfide, and hydrazone linkages are generally easy to form and suitable for most applications. Ester and disulfide linkages are preferred if the linkage is to be readily degraded in the cytosol, after transport of the substance across the cell membrane.

Various functional groups (hydroxyl, amino, halogen, etc.) can be used to attach the biologically active agent to the transport polymer. Groups which are not known to be part of an active site of the biologically active agent are preferred, particularly if the polypeptide or any portion thereof is to remain attached to the substance after delivery.

Polymers, such as peptides produced as described in PCT application US98/10571 (Publication No. WO 9852614), are generally produced with an amino terminal protecting group, such as FMOC. For biologically active agents which can survive the conditions used to cleave the polypeptide from the synthesis resin and deprotect the sidechains, the FMOC may be cleaved from the N-terminus of the completed resin-bound polypeptide so that the agent can be linked to the free N-terminal amine. In such cases, the agent to be attached is typically activated by methods well known in the art to produce an active ester or active carbonate moiety effective to form an amide or carbamate linkage,

WO 02/069930

PCT/US02/05829

respectively, with the polymer amino group. Of course, other linking chemistries can also be used.

To help minimize side-reactions, guanidino and amidino moieties can be blocked using conventional protecting groups, such as carbobenzyloxy groups (CBZ), di-*t*-BOC, PMC, Pbf , N-NO_2 , and the like.

Coupling reactions are performed by known coupling methods in any of an array of solvents, such as *N,N*-dimethyl formamide (DMF), *N*-methyl pyrrolidinone, dichloromethane, water, and the like. Exemplary coupling reagents include, for example, *O*-benzotriazolyloxy tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU), dicyclohexyl carbodiimide, bromo-tris(pyrrolidino) phosphonium bromide (PyBroP), etc. Other reagents can be included, such as *N,N*-dimethylamino pyridine (DMAP), 4-pyrrolidino pyridine, *N*-hydroxy succinimide, *N*-hydroxy benzotriazole, and the like.

2. Fusion Polypeptides

Delivery-enhancing transporters of the invention can be attached to biologically active polypeptide agents by recombinant means by constructing vectors for fusion proteins comprising the polypeptide of interest and the delivery-enhancing transporter, according to methods well known in the art. Generally, the delivery-enhancing transporter component will be attached at the C-terminus or N-terminus of the polypeptide of interest, optionally via a short peptide linker.

3. Releasable Linkers

The biologically active agents are, in presently preferred embodiments, attached to the delivery-enhancing transporter using a linkage that is specifically cleavable or releasable. The use of such linkages is particularly important for biologically active agents that are inactive until the attached delivery-enhancing transporter is released. In some cases, such conjugates that consist of a drug molecule that is attached to a delivery-enhancing transporter can be referred to as prodrugs, in that the release of the delivery-enhancing transporter from the drug results in conversion of the drug from an inactive to an active form. As used herein, "cleaved" or "cleavage" of a conjugate or linker refers to release of a biological agent from a transporter molecule, thereby releasing an active biological agent. "Specifically cleavable" or "specifically releasable" refers to the linkage between the

WO 02/069930

PCT/US02/05829

transporter and the agent being cleaved, rather than the transporter being degraded (*e.g.*, by proteolytic degradation).

In some embodiments, the linkage is a readily cleavable linkage, meaning that it is susceptible to cleavage under conditions found *in vivo*. Thus, upon passing into and through one or more layers of an epithelial and/or endothelial tissue, the agent is released from the delivery-enhancing transporter. Readily cleavable linkages can be, for example, linkages that are cleaved by an enzyme having a specific activity (*e.g.*, an esterase, protease, phosphatase, peptidase, and the like) or by hydrolysis. For this purpose, linkers containing carboxylic acid esters and disulfide bonds are sometimes preferred, where the former groups are hydrolyzed enzymatically or chemically, and the latter are severed by disulfide exchange, *e.g.*, in the presence of glutathione. The linkage can be selected so it is cleavable by an enzymatic activity that is known to be present in one or more layers of an epithelial or endothelial tissue. For example, the stratum granulosum of skin has a relatively high concentration of N-peptidase activity.

A specifically cleavable linker can be engineered onto a transporter molecule. For example, amino acids that constitute a protease recognition site, or other such specifically recognized enzymatic cleavage site, can be used to link the transporter to the agent. Alternatively, chemical or other types of linkers that are cleavable by, for example, exposure to light or other stimulus can be used to link the transporter to the agent of interest.

A conjugate in which an agent to be delivered and a delivery-enhancing transporter are linked by a specifically cleavable or specifically releasable linker will have a half-life. The term "half-life" in this context refers to the amount of time required after applying the conjugate to an epithelial or endothelial membrane for one half of the amount of conjugate to become dissociated to release the free agent. The half-life for some embodiments is typically between 5 minutes and 24 hours, and more preferably is between 30 minutes and 2 hours. The half-life of a conjugate can be "tuned" or modified, according to the invention, as described below.

In some embodiments, the cleavage rate of the linkers is pH dependent. For example, a linker can form a stable linkage between an agent and a delivery-enhancing transporter at an acidic pH (*e.g.*, pH 6.5 or less, more preferably about 6 or less, and still more preferably about 5.5 or less). However, when the conjugate is placed at physiological

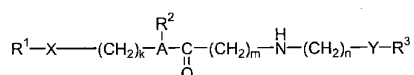
WO 02/069930

PCT/US02/05829

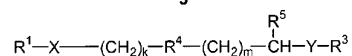
pH (*e.g.*, pH 7 or greater, preferably about pH 7.4), the linker will undergo cleavage to release the agent. Such pH sensitivity can be obtained by, for example, including a functional group that, when protonated (*i.e.*, at an acidic pH), does not act as a nucleophile. At a higher (*e.g.*, physiological) pH, the functional group is no longer protonated and thus can act as a nucleophile. Examples of suitable functional groups include, for example, N and S. One can use such functional groups to fine-tune the pH at which self-cleavage occurs.

In another embodiment, the linking moiety is cleaved through self-immolation. Such linking moieties in a transport moiety-biologically active compound conjugate contain a nucleophile (*e.g.*, oxygen, nitrogen and sulfur) distal to the biologically active compound and a cleavable group (*e.g.*, ester, carbonate, carbamate and thiocarbamate) proximal to the biologically active compound. Intramolecular attack of the nucleophile on the cleavable group results in the scission of a covalent bond, thereby releasing the linking moiety from the biologically active compound.

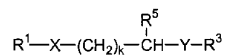
Examples of conjugates containing self-immolating linking moieties (*e.g.*, biologically active agent-L-transport moiety conjugates) are represented by structures 3, 4 and 5:



3



4



5

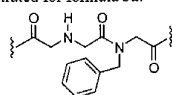
wherein: R^1 is the biologically active compound; X is a linkage formed between a functional group on the biologically active compound and a terminal functional

WO 02/069930

PCT/US02/05829

group on the linking moiety; Y is a linkage formed from a functional group on the transport moiety and a functional group on the linking moiety; A is N or CH; R² is hydrogen, alkyl, aryl, arylalkyl, acyl or allyl; R³ is the transport moiety; R⁴ is S, O, NR⁶ or CR⁷R⁸; R⁵ is H, OH, SH or NHR⁶; R⁶ is hydrogen, alkyl, aryl, acyl or allyl; R⁷ and R⁸ are independently hydrogen or alkyl; k and m are independently either 1 or 2; and n is an integer ranging from 1 to 10. Non-limiting examples of the X and Y linkages are (in either orientation): -C(O)O-, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, -S-S-, -C(S)O-, -C(S)NH-, -NHC(O)NH-, -SO₂NH-, -SONH-, phosphate, phosphonate and phosphinate. One of skill in the art will appreciate that when the biological agent has a hydroxy functional group, then X will preferably be -OC(O)- or -OC(O)NH-. Similarly, when the linking group is attached to an amino terminus of the transport moiety, Y will preferably be -C(O)NH-, -NHC(O)NH-, -SO₂NH-, -SONH- or -OC(O)NH- and the like. In each of the groups provided above, NH is shown for brevity, but each of the linkages (X and Y) can contain substituted (e.g., N-alkyl or N-acyl) linkages as well.

Turning first to linking groups illustrated by structure 3, an example and preferred embodiment is illustrated for formula 3a:



3a

wherein the wavy lines indicate points of attachment to the transport moiety and to the biologically active compound. Preparation of a conjugate containing this linking group is illustrated in Example 19 (Figure 6). In this Example and Figure 6, cyclosporin A is treated with chloroacetic anhydride to form the chloroacetate ester **6i** (numbering in Figure 6) which is then combined with benzylamine to form the N-benzyl glycine conjugate **6ii**. Condensation of the glycine conjugate with Boc-protected diglycine anhydride provides the acid **6iii** which is converted to the more reactive N-hydroxy succinimide ester **6iv** and then combined with the amino terminus of a transport moiety to form an amide linkage. One of skill in the art will appreciate that the N-benzyl group can be replaced with other groups (e.g., alkyl, aryl, allyl and the like) or that methylene groups can be replaced with, for example, ethylene, propylene and the like. Preferably, the methylene groups are retained as

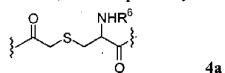
WO 02/069930

PCT/US02/05829

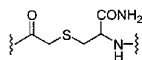
shown in **3a**, to provide an appropriate steric or spatial orientation that allows the linkage to be cleaved *in vivo* (see Figure 6B).

Accordingly, for structure **3**, the following substituents are preferred: A is N; R² is benzyl; k, m and n are 1; X is -OC(O)- and Y is -C(O)NH-.

5 Linkages of structure **4**, are exemplified by formula **4a**:



wherein, as above, the wavy lines indicate the point of attachment to each of the transport moiety and the biologically active agent. The preparation of conjugates having linking groups of formula **4a** are shown in Examples 20-22. In Example 19 (see scheme in Figure 39), acyclovir is acylated with α -chloroacetic anhydride to form the α -chloroacetate ester **39i**. Reaction of **39i** with a heptamer of D-arginine having an N-terminal cysteine residue, provides the thioether product **39ii**. Alternatively, acyclovir can be attached to the C-terminus of a transport moiety using a similar linkage formed between acyclovir α -chloroacetate ester and a heptamer of D-arginine having an C-terminal cysteine residue. In this instance, the cysteine residue is provided on the r₇ transport moiety as a C-terminal amide and the linkage has the form:



Accordingly, in one group of preferred embodiments, the conjugate is represented by formula **5**, in which X is -OC(O)-; Y is -C(O)NH-; R⁴ is S; R⁵ is NHR⁶; and the subscripts k and m are each 1. In another group of preferred embodiments, the conjugate is represented by formula **2**, in which X is -OC(O)-; Y is -NHC(O)-; R⁴ is S; R⁵ is CONH₂; and the subscripts k and m are each 1. Particularly preferred conjugates are those in which R⁶ is hydrogen, methyl, allyl, butyl or phenyl.

25 Linking groups represented by the conjugates shown in formula **6** are generally of the heterobifunctional type (e.g. ϵ -aminocaproic acid, serine, homoserine, -aminobutyric acid, and the like), although suitably protected dicarboxylic acids or diamines are also useful with certain biological agents.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

For structure 6, the following substituents are preferred: R^5 is NHR^6 , wherein R^6 is hydrogen, methyl, allyl, butyl or phenyl; k is 2; X is $-C(O)O-$; and Y is $-C(O)NH-$.

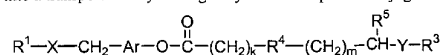
Self-immolating linkers typically undergo intramolecular cleavage with a half-life between about 10 minutes and about 24 hours in water at $37^\circ C$ at a pH of approximately 7.4. Preferably, the cleavage half-life is between about 20 minutes and about 4 hours in water at $37^\circ C$ at a pH of approximately 7.4. More preferably, the cleavage half-life is between about 30 minutes and about 2 hours in water at $37^\circ C$ at a pH of approximately 7.4.

For a conjugate having the structure 3, one can adjust the cleavage half-life by varying the R^2 substituent. By using an R^2 of increased or decreased size, one can obtain a conjugate having a longer or shorter half-life respectively. R^2 in structure 3 is preferably methyl, ethyl, propyl, butyl, allyl, benzyl or phenyl.

Where there is a basic or acidic group in a self-immolating linker, one can oftentimes adjust cleavage half-life according to the pH of the conjugate solution. For instance, the backbone amine group of structure 3 is protonated at acidic pH (e.g., pH 5.5). The amine cannot serve as a nucleophile inducing intramolecular cleavage when it is protonated. Upon introduction of the conjugate into a medium at physiological pH (7.4), however, the amine is unprotonated a significant portion of the time. The cleavage half-life is correspondingly reduced.

In one embodiment, cleavage of a self-immolating linker occurs in two steps: intramolecular reaction of a nucleophilic group resulting in the cleavage of a portion of the linking moiety; and, elimination of the remaining portion of the linking moiety. The first step of the cleavage is rate-limiting and can be fine-tuned for pH sensitivity and half-life.

Structure 6 is an example of a two-step, self-immolating moiety that is incorporated into a transport moiety-biologically active compound conjugate:



6

wherein: R^1 is the biologically active compound; X represents a linkage between a functional group on the biologically active compound and a functional group on

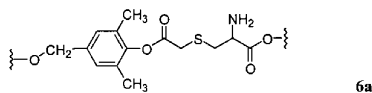
WO 02/069930

PCT/US02/05829

the linking moiety; Ar is a substituted or unsubstituted aryl group, wherein the methylene substituent and phenolic oxygen atom are either *ortho* or *para* to one another; R³ is the transport moiety; R⁴ is S, O, NR⁶ or CR⁷R⁸; R⁵ is H, OH, SH or NHR⁶; R⁶ is hydrogen, alkyl, aryl, arylalkyl, acyl or allyl; R⁷ and R⁸ are independently hydrogen or alkyl; and, k and m are independently either 1 or 2.

An example of a suitable linking group to produce a conjugate of formula 6

is:



The construction of a conjugate containing a linking group of formula 6a is provided in Example 23 (see also Figure 41). In this example (and Figure), the α -chloroacetate ester of 2,4-dimethyl-4-hydroxymethylphenol (41i) is coupled to retinoic acid (41ii) using dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) to provide the intermediate 41iii. Subsequent coupling of 41iii with a cysteine residue present on the N-terminus of an arginine heptamer transport moiety provides the target conjugate 41iv.

Preferably, the linking groups used in the conjugates of formula 6, are those in which Ar is an substituted or unsubstituted phenylene group; R⁴ is S; R⁵ is NHR⁶, wherein R⁶ is hydrogen, methyl, allyl, butyl, acetyl or phenyl; k and m are 1; X is -C(O)O-; and Y is -C(O)O- or -C(O)NH-. More preferably, R⁶ is hydrogen or acetyl.

While linking groups above have been described with reference to conjugates containing arginine heptamers, one of skill in the art will understand that the technology is readily adapted to conjugates with the "spaced" arginine transport moieties of the present invention.

Still other useful linking groups for use in the present invention have been described in copending PCT applications. See, for example PCT applications US98/10571 (Publication No. WO 9852614) and US00/23440 (Publication No. WO01/13957) which describe linking groups for similar compositions, e.g., conjugates of biologically active agents and transport oligomers. The linking technology described therein can be used in the present compositions in a similar manner.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Thus, in one group of embodiments, the linking moiety contains a first cleavable group distal to the biologically active compound and a second cleavable group proximal to the biologically active compound. Cleavage of the first cleavable group yields a nucleophile capable of reacting intramolecularly with the second cleavable group, thereby
5 cleaving the linking moiety from the biologically active compound. Examples of methods by which the first group is cleaved include photo-illumination and enzyme mediated hydrolysis. This methodology has been illustrated for various related small molecule conjugates discussed in PCT application US98/10571 (Publication No. WO 9852614).

In one approach, the conjugate can include a disulfide linkage, as illustrated
10 in Figure 5A of PCT application US00/23440 (Publication No. WO01/13957), (*see also*, PCT application US98/10571 (Publication No. WO 9852614)), which shows a conjugate (I) containing a transport polymer T which is linked to a cytotoxic agent, 6-mercaptopurine, by an N-acetyl-protected cysteine group which serves as a linker. Thus, the cytotoxic agent is attached by a disulfide bond to the 6-mercapto group, and the transport polymer is bound to
15 the cysteine carbonyl moiety via an amide linkage. Cleavage of the disulfide bond by reduction or disulfide exchange results in release of the free cytotoxic agent. A method for synthesizing a disulfide-containing conjugate is provided in Example 9A of PCT application US98/10571. The product described therein contains a heptamer of Arg residues which is linked to 6-mercaptopurine by an N-acetyl-Cys-Ala-Ala linker, where the Ala residues are
20 included as an additional spacer to render the disulfide more accessible to thiols and reducing agents for cleavage within a cell. The linker in this example also illustrates the use of amide bonds, which can be cleaved enzymatically within a cell.

In another approach, the conjugate includes a photocleavable linker that is cleaved upon exposure to electromagnetic radiation. Application of this methodology is
25 provided for a related system in Figure 5B of PCT application US00/23440 (Publication No. WO01/13957) which shows a conjugate (II) containing a transport polymer T which is linked to 6-mercaptopurine via a *meta*-nitrobenzoate linking moiety. Polymer T is linked to the nitrobenzoate moiety by an amide linkage to the benzoate carbonyl group, and the cytotoxic agent is bound via its 6-mercapto group to the *p*-methylene group. The compound
30 can be formed by reacting 6-mercaptopurine with *p*-bromomethyl-*m*-nitrobenzoic acid in the presence of NaOCH₃/methanol with heating, followed by coupling of the benzoate

WO 02/069930

PCT/US02/05829

carboxylic acid to a transport polymer, such as the amino group of a γ -aminobutyric acid linker attached to the polymer (*see also, e.g.*, Example 9B of PCT application US98/10571). Photo-illumination of the conjugate causes release of the 6-mercaptopurine by virtue of the nitro group that is ortho to the mercaptomethyl moiety. This approach finds utility in
 5 phototherapy methods as are known in the art, particularly for localizing drug activation to a selected area of the body.

In one group of preferred embodiments, the cleavable linker contains first and second cleavable groups that can cooperate to cleave the oligomer from the biologically active agent, as illustrated by the following approaches. That is, the cleavable linker
 10 contains a first cleavable group that is distal to the agent, and a second cleavable group that is proximal to the agent, such that cleavage of the first cleavable group yields a linker-agent conjugate containing a nucleophilic moiety capable of reacting intramolecularly to cleave the second cleavable group, thereby releasing the agent from the linker and oligomer.

Reference is again made to co-owned and copending PCT application
 15 US00/23440 (Publication No. WO01/13957), in which Figure 5C shows a conjugate (III) containing a transport polymer T linked to the anticancer agent, 5-fluorouracil (5FU). In that figure, the linkage is provided by a modified lysyl residue. The transport polymer is linked to the α -amino group, and the 5-fluorouracil is linked via the α -carbonyl. The lysyl ϵ -amino group has been modified to a carbamate ester of *o*-hydroxymethyl nitrobenzene, which
 20 comprises a first, photolabile cleavable group in the conjugate. Photo-illumination severs the nitrobenzene moiety from the conjugate, leaving a carbamate that also rapidly decomposes to give the free α -amino group, an effective nucleophile. Intramolecular reaction of the α -amino group with the amide linkage to the 5-fluorouracil group leads to cyclization with release of the 5-fluorouracil group.

Still other linkers useful in the present invention are provided in PCT
 25 application US00/23440 (Publication No. WO01/13957). In particular, Figure 5D of US00/23440 illustrates a conjugate (IV) containing a delivery-enhancing transporter T linked to 2'-oxygen of the anticancer agent, paclitaxel. The linkage is provided by a linking moiety that includes (i) a nitrogen atom attached to the delivery-enhancing transporter, (ii) a
 30 phosphate monoester located para to the nitrogen atom, and (iii) a carboxymethyl group meta to the nitrogen atom, which is joined to the 2'-oxygen of paclitaxel by a carboxylate

WO 02/069930

PCT/US02/05829

ester linkage. Enzymatic cleavage of the phosphate group from the conjugate affords a free phenol hydroxyl group. This nucleophilic group then reacts intramolecularly with the carboxylate ester to release free paclitaxel, fully capable of binding to its biological target. Example 9C of PCT application US98/10571 describes a synthetic protocol for preparing this type of conjugate.

Still other suitable linkers are illustrated in Figure 5E of PCT application US00/23440 (Publication No. WO01/13957). In the approach provided therein, a delivery-enhancing transporter is linked to a biologically active agent, *e.g.*, paclitaxel, by an aminoalkyl carboxylic acid. Preferably, the linker amino group is linked to the linker carboxyl carbon by from 3 to 5 chain atoms ($n = 3$ to 5), preferably either 3 or 4 chain atoms, which are preferably provided as methylene carbons. As seen in Figure 5E, the linker amino group is joined to the delivery-enhancing transporter by an amide linkage, and is joined to the paclitaxel moiety by an ester linkage. Enzymatic cleavage of the amide linkage releases the delivery-enhancing transporter and produces a free nucleophilic amino group. The free amino group can then react intramolecularly with the ester group to release the linker from the paclitaxel.

In another approach, the conjugate includes a linker that is labile at one pH but is stable at another pH. For example, Figure 6 of PCT application US00/23440 (Publication No. WO01/13957) illustrates a method of synthesizing a conjugate with a linker that is cleaved at physiological pH but is stable at acidic pH. Preferably, the linker is cleaved in water at a pH of from about 6.6 to about 7.6. Preferably the linker is stable in water at a pH from about 4.5 to about 6.5.

Uses of Delivery-enhancing Transporters

The delivery-enhancing transporters find use in therapeutic, prophylactic and diagnostic applications. The delivery-enhancing transporters can carry a diagnostic or biologically active reagent into and across one or more layers of skin or other epithelial tissue (*e.g.*, gastrointestinal, lung, ocular and the like), or across endothelial tissues such as the blood brain barrier. This property makes the reagents useful for treating conditions by delivering agents that must penetrate across one or more tissue layers in order to exert their biological effect.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

- Moreover, the transporters of the present invention can also be used alone, or in combination with another therapeutic or other compound, as a furin inhibitor. For example, in addition to various poly-arginine transporters, the synthetic transporters described herein, including peptoid and those transporters comprising non-naturally occurring amino acids can be used to inhibit furins. *See, e.g., Cameron et al., J. Biol. Chem.* 275(47): 36741-9. Furins are proteases that convert a variety of pro-proteins to their active components. Inhibition of furins is useful, for instance, for treating infections by viruses that rely on furin activity for virulence or replication. *See, e.g., Molloy, et al., T. Cell Biol.* 9:28-35 (1999).
- Similarly, the transporters of the invention are useful inhibitors of capthesin C. For example, certain poly arginine compounds are inhibitors of capthesin C. *See, e.g., Horn, et al., Eur. J. Biochem.* 267(11):3330-3336 (2000). Similarly, the transporters of the invention, including those comprising synthetic amino acids, are useful to inhibit capthesin C.
- In one aspect of the invention, a furin inhibition assay can be used to screen for additional transporters. For example, candidate transporter compounds can be tested for their ability to compete with poly arginine for their ability to bind furins or capthesin C using standard competition assays. Alternatively, candidate transporters can be screened for their ability to inhibit furin protease activity as discussed in Cameron *et al., supra.* and Horn *et al., supra.* Particularly active candidates can then be further tested for their ability to act as transporters into and/or across tissues such as the epithelium.
- Compositions and methods of the present invention have particular utility in the area of human and veterinary therapeutics. Generally, administered dosages will be effective to deliver picomolar to micromolar concentrations of the therapeutic composition to the effector site. Appropriate dosages and concentrations will depend on factors such as the therapeutic composition or drug, the site of intended delivery, and the route of administration, all of which can be derived empirically according to methods well known in the art. Further guidance can be obtained from studies using experimental animal models for evaluating dosage, as are known in the art.
- Administration of the compounds of the invention with a suitable pharmaceutical excipient as necessary can be carried out via any of the accepted modes of

WO 02/069930

PCT/US02/05829

administration. Thus, administration can be, for example, intravenous, topical, subcutaneous, transcutaneous, intramuscular, oral, intra-joint, parenteral, peritoneal, intranasal, or by inhalation. Suitable sites of administration thus include, but are not limited to, skin, bronchial, gastrointestinal, anal, vaginal, eye, and ear. The formulations may take the form of solid, semi-solid, lyophilized powder, or liquid dosage forms, such as, for example, tablets, pills, capsules, powders, solutions, suspensions, emulsions, suppositories, retention enemas, creams, ointments, lotions, aerosols, eye drops, or the like, preferably in unit dosage forms suitable for simple administration of precise dosages.

The compositions typically include a conventional pharmaceutical carrier or excipient and may additionally include other medicinal agents, carriers, adjuvants, and the like. Preferably, the composition will be about 5% to 75% by weight of a compound or compounds of the invention, with the remainder consisting of suitable pharmaceutical excipients. Appropriate excipients can be tailored to the particular composition and route of administration by methods well known in the art, *e.g.*, *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

For oral administration, such excipients include pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, talcum, cellulose, glucose, gelatin, sucrose, magnesium carbonate, and the like. The composition may take the form of a solution, suspension, tablet, pill, capsule, powder, sustained-release formulation, and the like.

In some embodiments, the pharmaceutical compositions take the form of a pill, tablet or capsule, and thus, the composition can contain, along with the biologically active conjugate, any of the following: a diluent such as lactose, sucrose, dicalcium phosphate, and the like; a disintegrant such as starch or derivatives thereof; a lubricant such as magnesium stearate and the like; and a binder such as starch, gum acacia, polyvinylpyrrolidone, gelatin, cellulose and derivatives thereof.

The active compounds of the formulas may be formulated into a suppository comprising, for example, about 0.5% to about 50% of a compound of the invention, disposed in a polyethylene glycol (PEG) carrier (*e.g.*, PEG 1000 [96%] and PEG 4000 [4%]).

Liquid compositions can be prepared by dissolving or dispersing compound (about 0.5% to about 20%), and optional pharmaceutical adjuvants in a carrier, such as, for

WO 02/069930

PCT/US02/05829

example, aqueous saline (e.g., 0.9% w/v sodium chloride), aqueous dextrose, glycerol, ethanol and the like, to form a solution or suspension, e.g., for intravenous administration. The active compounds may also be formulated into a retention enema.

If desired, the composition to be administered may also contain minor amounts of non-toxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, such as, for example, sodium acetate, sorbitan monolaurate, or triethanolamine oleate.

For topical administration, the composition is administered in any suitable format, such as a lotion or a transdermal patch. For delivery by inhalation, the composition can be delivered as a dry powder (e.g., Inhale Therapeutics) or in liquid form via a nebulizer.

Methods for preparing such dosage forms are known or will be apparent to those skilled in the art; for example, see *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.*, and similar publications. The composition to be administered will, in any event, contain a quantity of the pro-drug and/or active compound(s) in a pharmaceutically effective amount for relief of the condition being treated when administered in accordance with the teachings of this invention.

Generally, the compounds of the invention are administered in a therapeutically effective amount, i.e., a dosage sufficient to effect treatment, which will vary depending on the individual and condition being treated. Typically, a therapeutically effective daily dose is from 0.1 to 100 mg/kg of body weight per day of drug. Most conditions respond to administration of a total dosage of between about 1 and about 30 mg/kg of body weight per day, or between about 70 mg and 2100 mg per day for a 70 kg person.

Stability of the conjugate can be further controlled by the composition and stereochemistry of the backbone and sidechains of the delivery-enhancing transporters. For polypeptide delivery-enhancing transporters, D-isomers are generally resistant to endogenous proteases, and therefore have longer half-lives in serum and within cells. D-polypeptide polymers are therefore appropriate when longer duration of action is desired. L-polypeptide polymers have shorter half-lives due to their susceptibility to proteases, and are therefore chosen to impart shorter acting effects. This allows side-effects to be averted more readily by withdrawing therapy as soon as side-effects are observed. Polypeptides

WO 02/069930

PCT/US02/05829

comprising mixtures of D and L-residues have intermediate stabilities. Homo-D-polymers are generally preferred.

A. Application to Skin

The delivery-enhancing transporters of the invention make possible the
5 delivery of biologically active and diagnostic agents across the skin. Surprisingly, the transporters can deliver an agent across the stratum corneum, which previously had been a nearly impenetrable barrier to drug delivery. The stratum corneum, the outermost layer of the skin, is composed of several layers of dead, keratin-filled skin cells that are tightly bound together by a "glue" composed of cholesterol and fatty acids. Once the agents are delivered
10 through the stratum corneum by the transporters of the invention, the agents can enter the viable epidermis, which is composed of the stratum granulosum, stratum lucidum and stratum germinativum which, along with the stratum corneum, make up the epidermis. Delivery in some embodiments of the invention is through the epidermis and into the dermis, including one or both of the papillary dermis and the reticular dermis.

15 This ability to obtain penetration of one or more layers of the skin can greatly enhance the efficacy of compounds such as antibacterials, antifungals, antivirals, antiproliferatives, immunosuppressives, vitamins, analgesics, hormones, and the like. Numerous such compounds are known to those of skill in the art (*see, e.g.,* Hardman and Limbird, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill,
20 New York, 1996).

In some embodiments, the agent is delivered into a blood vessel that is present in the epithelial tissue, thus providing a means for delivery of the agent systemically. Delivery can be either intrafollicular or interfollicular, or both. Pretreatment of the skin is not required for delivery of the conjugates.

25 In other embodiments, the delivery-enhancing transporters are useful for delivering cosmetics and agents that can treat skin conditions. Target cells in the skin that are of interest include, for example, fibroblasts, epithelial cells and immune cells. For example, the transporters provide the ability to deliver compounds such as antiinflammatory agents to immune cells found in the dermis.

30 Glucocorticoids (adrenocorticoid steroids) are among the compounds for which delivery across skin can be enhanced by the delivery-enhancing transporters of the

WO 02/069930

PCT/US02/05829

invention. Conjugated glucocorticoids of the invention are useful for treating inflammatory skin diseases, for example. Exemplary glucocorticoids include, e.g., hydrocortisone, prednisone (deltasone) and prednisolone (hydeltrasol). Examples of particular conditions include eczema (including atopic dermatitis, contact dermatitis, allergic dermatitis), bullous disease, collagen vascular diseases, sarcoidosis, Sweet's disease, pyoderma gangrenosum, Type I reactive leprosy, capillary hemangiomas, lichen planus, exfoliative dermatitis, erythema nodosum, hormonal abnormalities (including acne and hirsutism), as well as toxic epidermal necrolysis, erythema multiforme, cutaneous T-cell lymphoma, discoid lupus erythematosus, and the like.

Retinoids are another example of a biologically active agent for which one can use the delivery-enhancing transporters of the invention to enhance delivery into and across one or more layers of the skin or other epithelial or endothelial tissue. Retinoids that are presently in use include, for example retinol, tretinoin, isotretinoin, etretinate, acitretin, and arotinoid. Conditions that are treatable using retinoids conjugated to the delivery-enhancing transporters of the invention include, but are not limited to, acne, keratinization disorders, skin cancer, precancerous conditions, psoriasis, cutaneous aging, discoid lupus erythematosus, scleromyxedema, verrucous epidermal nevus, subcorneal pustular dermatosis, Reiter's syndrome, warts, lichen planus, acanthosis nigricans, sarcoidosis, Grover's disease, porokeratosis, and the like.

Cytotoxic and immunosuppressive drugs constitute an additional class of drugs for which the delivery-enhancing transporters of the invention are useful. These agents are commonly used to treat hyperproliferative diseases such as psoriasis, as well as for immune diseases such as bullous dermatoses and leukocytoclastic vasculitis. Examples of such compounds that one can conjugate to the delivery-enhancing transporters of the invention include, but are not limited to, antimetabolites such as methotrexate, azathioprine, fluorouracil, hydroxyurea, 6-thioquanine, mycophenolate, chlorambucil, vinicristine, vinblasine and dactinomycin. Other examples are alkylating agents such as cyclophosphamide, mechloroethamine hydrochloride, carmustine, taxol, tacrolimus and vinblastine are additional examples of useful biological agents, as are dapsone and sulfasalazine. Immunosuppressive drugs such as cyclosporin, FK506 (tacrolimus), and ascomycins such as rapamycin (e.g., U.S. Patent 5,912,253) and analogs of such compounds

WO 02/069930

PCT/US02/05829

are of particular interest (e.g., Mollinson *et al.*, *Current Pharm. Design* 4(5):367-380 (1998); U.S. Patent Nos. 5,612,350; 5,599,927; 5,604,294; 5,990,131; 5,561,140; 5,859,031; 5,925,649; 5,994,299; 6,004,973 and 5,508,397). Cyclosporins include, e.g., cyclosporin A, B, C, D, G and M. See, e.g., U.S. Patent No. 6,007,840; and 6,004,973. For example, such
 5 compounds are useful in treating psoriasis, eczema (including atopic dermatitis, contact dermatitis, allergic dermatitis) and alopecia areata.

The delivery-enhancing transporters can be conjugated to agents that are useful for treating conditions such as lupus erythematosus (both discoid and systemic), cutaneous dermatomyositis, porphyria cutanea tarda and polymorphous light eruption.
 10 Agents useful for treating such conditions include, for example, quinine, chloroquine, hydroxychloroquine, and quinacrine.

The delivery-enhancing transporters of the invention are also useful for transdermal delivery of antiinfective agents. For example, antibacterial, antifungal and antiviral agents can be conjugated to the delivery-enhancing transporters. Antibacterial
 15 agents are useful for treating conditions such as acne, cutaneous infections, and the like. Antifungal agents can be used to treat tinea corporis, tinea pedis, onychomycosis, candidiasis, tinea versicolor, and the like. Because of the delivery-enhancing properties of the conjugates, these conjugates are useful for treating both localized and widespread infections. Antifungal agents are also useful for treating onychomycosis. Examples of
 20 antifungal agents include, but are not limited to, azole antifungals such as itraconazole, myconazole and fluconazole. Examples of antiviral agents include, but are not limited to, acyclovir, famciclovir, and valacyclovir. Such agents are useful for treating viral diseases, e.g., herpes.

Another example of a biologically active agent for which enhancement of
 25 delivery by conjugation to the delivery-enhancing transporters of the invention is desirable are the antihistamines. These agents are useful for treating conditions such as pruritus due to urticaria, atopic dermatitis, contact dermatitis, psoriasis, and many others. Examples of such reagents include, for example, terfenadine, astemizole, lorotadine, cetirizine, acrivastine, temelastine, cimetidine, ranitidine, famotidine, nizatidine, and the like. Tricyclic
 30 antidepressants can also be delivered using the delivery-enhancing transporters of the invention.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Topical antipsoriasis drugs are also of interest. Agents such as corticosteroids, calcipotriene, and anthralin can be conjugated to the delivery-enhancing transporters of the invention and applied to skin.

The delivery-enhancing transporters of the invention are also useful for enhancing delivery of photochemotherapeutic agents into and across one or more layers of skin and other epithelial tissues. Such compounds include, for example, the psoralens, and the like. Sunscreen components are also of interest; these include *p*-aminobenzoic acid esters, cinnamates and salicylates, as well as benzophenones, anthranilates, and avobenzone.

Pain relief agents and local anesthetics constitute another class of compounds for which conjugation to the delivery-enhancing transporters of the invention can enhance treatment. Lidocaine, bupibacaine, novocaine, procaine, tetracaine, benzocaine, cocaine, and the opiates, are among the compounds that one can conjugate to the delivery-enhancing transporters of the invention. Application of pain relief agents to the joints or skin near the at the joints, e.g., in patients suffering from rheumatoid arthritis, is also contemplated.

Other biological agents of interest include, for example, minoxidil, keratolytic agents, destructive agents such as podophyllin, hydroquinone, capsaicin, masoprocol, colchicine, and gold.

Treatment of inflamed joints such as occurs in rheumatoid arthritis can also be treated with compounds useful for such treatments conjugated to the transporters of the invention.

B. Gastrointestinal Administration

The delivery-enhancing transporters of the invention are also useful for delivery of conjugated drugs by gastrointestinal administration. Gastrointestinal administration can be used for both systemically active drugs, and for drugs that act in the gastrointestinal epithelium.

Among the gastrointestinal conditions that are treatable using appropriate reagents conjugated to the delivery-enhancing transporters are inflammatory bowel disease such as Crohn's disease (e.g., cyclosporin, FK506 and ascomycins; aminosaliclates such as sulfasalazine and mesalamine; corticosteroids, e.g., prednisone and methylprednisolone; immune modifiers, e.g., azathioprine, 6MP, methotrexate; and antibiotics, e.g., metronidazole, ampicillin, ciprofloxacin, and others). Other treatable gastrointestinal

WO 02/069930

PCT/US02/05829

conditions include ulcerative colitis, gastrointestinal ulcers, peptic ulcer disease, imbalance of salt and water absorption (can lead to constipation, diarrhea, or malnutrition), abnormal proliferative diseases, and the like. Ulcer treatments include, for example, drugs that reduce gastric acid secretion, such as H₂ histamine inhibitors (*e.g.*, cimetidine and ranitidine) and inhibitors of the proton-potassium ATPase (*e.g.*, lansoprazole and omeprazole), and antibiotics directed at *Helicobacter pylori*.

Compounds useful for the treatment of constipation can also be used in conjunction with the transporters of the invention. Useful compounds for treating constipation include, *e.g.*, surfactant laxatives such as docusate sodium, poloxamer 188, dehydrochloric acid and ricinoleic acid. Exemplary stimulant laxatives include, *e.g.*, phenolphthalein, bisacodyl and anthraquinone laxatives such as danthron.

Antibiotics are among the biologically active agents that are useful when conjugated to the delivery-enhancing transporters of the invention, particularly those that act on invasive bacteria, such as *Shigella*, *Salmonella*, and *Yersinia*. Such compounds include, for example, norfloxacin, ciprofloxacin, trimethoprim, sulfamethyloxazole, and the like.

Anti-neoplastic agents, for example, for the treatment of colon cancer, can also be conjugated to the delivery-enhancing transporters of the invention and administered by the gastrointestinal route. These include, for example, cisplatin, methotrexate, taxol, fluorouracil, mercaptopurine, doxorubicin, bleomycin, streptozocin, mitomycin and the like.

For gastrointestinal and colonic delivery of orally administered transporters or active compounds, it can be beneficial to coat or encapsulate the compounds so that the compounds are not released until they are delivered to the gastrointestinal (GI) tract or colon. Methods and composition useful for delivery to the GI tract or colon are described in, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 6,183,466 and 6,120,803.

C. Respiratory Tract Administration

The delivery-enhancing transporters of the invention can also be used to enhance administration of drugs through the respiratory tract. The respiratory tract, which includes the nasal mucosa, hypopharynx, and large and small airway structures, provides a large mucosal surface for drug absorption. The enhanced penetration of the conjugated agents into and across one or more layers of the epithelial tissue that is provided by the delivery-enhancing transporters of the invention results in amplification of the advantages that

WO 02/069930

PCT/US02/05829

respiratory tract delivery has over other delivery methods. For example, lower doses of an agent are often needed to obtain a desired effect, a local therapeutic effect can occur more rapidly, and systemic therapeutic blood levels of the agent are obtained quickly. Rapid onset of pharmacological activity can result from respiratory tract administration. Moreover,

5 respiratory tract administration generally has relatively few side effects.

The transporters of the invention can be used to deliver biological agents that are useful for treatment of pulmonary conditions. Examples of conditions treatable by nasal administration include, for example, asthma. These compounds include antiinflammatory agents, such as corticosteroids, cromolyn, and nedocromil, bronchodilators such as β 2-selective adrenergic drugs and theophylline, and immunosuppressive drugs (*e.g.*, cyclosporin and FK506). Other conditions include, for example, allergic rhinitis (which can be treated with glucocorticoids), and chronic obstructive pulmonary disease (emphysema). Other drugs that act on the pulmonary tissues and can be delivered using the transporters of the invention include beta-agonists, mast cell stabilizers, antibiotics, antifungal and antiviral agents,

10

15 surfactants, vasoactive drugs, sedatives and hormones.

Respiratory tract administration is useful not only for treatment of pulmonary conditions, but also for delivery of drugs to distant target organs via the circulatory system. A wide variety of such drugs and diagnostic agents can be administered through the respiratory tract after conjugation to the delivery-enhancing transporters of the invention.

20 **D. Delivery of Agents across the Blood Brain Barrier**

The delivery-enhancing transporters are also useful for delivering biologically active and diagnostic agents across the blood brain barrier. The agents are useful for treating ischemia (*e.g.*, using an anti-apoptotic drug), as well as for delivering neurotransmitters and other agents for treating various conditions such as schizophrenia, Parkinson's disease, pain

25 (*e.g.*, morphine, the opiates). The 5-hydroxytryptamine receptor antagonist is useful for treating conditions such as migraine headaches and anxiety.

E. Diagnostic imaging and contrast agents

The delivery-enhancing transporters of the invention are also useful for delivery of diagnostic imaging and contrast agents into and across one or more layers of an epithelial and/or endothelial tissue. Examples of diagnostic agents include substances that

30

WO 02/069930

PCT/US02/05829

are labeled with radioactivity, such as ^{99m}Tc glucoheptonate, or substances used in magnetic resonance imaging (MRI) procedures such as gadolinium doped chelation agents (e.g. Gd-DTPA). Other examples of diagnostic agents include marker genes that encode proteins that are readily detectable when expressed in a cell including, but not limited to, β -galactosidase, green fluorescent protein, luciferase, and the like. A wide variety of labels may be employed, such as radionuclides, fluors, enzymes, enzyme substrates, enzyme cofactors, enzyme inhibitors, ligands (particularly haptens), etc.

Biologically Active and Diagnostic Molecules useful with the Delivery-enhancing transporters

The delivery-enhancing transporters can be conjugated to a wide variety of biologically active agents and molecules that have diagnostic use.

A. Small Organic Molecules

Small organic molecule therapeutic agents can be advantageously attached to linear polymeric compositions as described herein, to facilitate or enhance transport across one or more layers of an epithelial or endothelial tissue. For example, delivery of highly charged agents, such as levodopa (L-3,4-dihydroxy-phenylalanine; L-DOPA) may benefit by linkage to delivery-enhancing transporters as described herein. Peptoid and peptidomimetic agents are also contemplated (e.g., Langston (1997) *DDT* 2:255; Giannis *et al.* (1997) *Advances Drug Res.* 29:1). Also, the invention is advantageous for delivering small organic molecules that have poor solubilities in aqueous liquids, such as serum and aqueous saline. Thus, compounds whose therapeutic efficacies are limited by their low solubilities can be administered in greater dosages according to the present invention, and can be more efficacious on a molar basis in conjugate form, relative to the non-conjugate form, due to higher uptake levels by cells.

Since a significant portion of the topological surface of a small molecule is often involved, and therefore required, for biological activity, the small molecule portion of the conjugate in particular cases may need to be severed from the attached delivery-enhancing transporter and linker moiety (if any) for the small molecule agent to exert biological activity after crossing the target epithelial tissue. For such situations, the

WO 02/069930

PCT/US02/05829

conjugate preferably includes a cleavable linker for releasing free drug after passing through an epithelial tissue.

Figure 5D and Figure 5E are illustrative of another aspect of the invention, comprising taxane- and taxoid anticancer conjugates which have enhanced trans-epithelial tissue transport rates relative to corresponding non-conjugated forms. The conjugates are particularly useful for inhibiting growth of cancer cells. Taxanes and taxoids are believed to manifest their anticancer effects by promoting polymerization of microtubules (and inhibiting depolymerization) to an extent that is deleterious to cell function, inhibiting cell replication and ultimately leading to cell death.

The term "taxane" refers to paclitaxel (Figure 5F, R' = acetyl, R" = benzyl) also known under the trademark "TAXOL") and naturally occurring, synthetic, or bioengineered analogs having a backbone core that contains the A, B, C and D rings of paclitaxel, as illustrated in Figure 5G. Figure 5F also indicates the structure of "TAXOTERE™" (R' = H, R" = BOC), which is a somewhat more soluble synthetic analog of paclitaxel sold by Rhone-Poulenc. "Taxoid" refers to naturally occurring, synthetic or bioengineered analogs of paclitaxel that contain the basic A, B and C rings of paclitaxel, as shown in Figure 5H. Substantial synthetic and biological information is available on syntheses and activities of a variety of taxane and taxoid compounds, as reviewed in Suffness (1995) *Taxol: Science and Applications*, CRC Press, New York, NY, pp. 237-239, particularly in Chapters 12 to 14, as well as in the subsequent paclitaxel literature. Furthermore, a host of cell lines are available for predicting anticancer activities of these compounds against certain cancer types, as described, for example, in Suffness at Chapters 8 and 13.

The delivery-enhancing transporter is conjugated to the taxane or taxoid moiety via any suitable site of attachment in the taxane or taxoid. Conveniently, the transport polymer is linked via a C2'-oxygen atom, C7-oxygen atom, using linking strategies as above. Conjugation of a transport polymer via a C7-oxygen leads to taxane conjugates that have anticancer and antitumor activity despite conjugation at that position. Accordingly, the linker can be cleavable or non-cleavable. Conjugation via the C2'-oxygen significantly reduces anticancer activity, so that a cleavable linker is preferred for conjugation to this site. Other sites of attachment can also be used, such as C10.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

It will be appreciated that the taxane and taxoid conjugates of the invention have improved water solubility relative to taxol (~0.25 µg/mL) and taxotere (6-7 µg/mL). Therefore, large amounts of solubilizing agents such as "CREMOPHOR EL" (polyoxyethylated castor oil), polysorbate 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate, also known as "TWEEN 80"), and ethanol are not required, so that side-effects typically associated with these solubilizing agents, such as anaphylaxis, dyspnea, hypotension, and flushing, can be reduced.

B. Metals

Metals can be transported into and across one or more layers of epithelial and endothelial tissues using chelating agents such as texaphyrin or diethylene triamine pentacetic acid (DTPA), conjugated to a delivery-enhancing transporter of the invention, as illustrated by Example . These conjugates are useful for delivering metal ions for imaging or therapy. Exemplary metal ions include Eu, Lu, Pr, Gd, Tc99m, Ga67, In111, Y90, Cu67, and Co57. Preliminary membrane-transport studies with conjugate candidates can be performed using cell-based assays such as described in the Example section below. For example, using europium ions, cellular uptake can be monitored by time-resolved fluorescence measurements. For metal ions that are cytotoxic, uptake can be monitored by cytotoxicity.

C. Macromolecules

The enhanced transport methods of the invention are particularly suited for enhancing transport into and across one or more layers of an epithelial or endothelial tissue for a number of macromolecules, including, but not limited to proteins, nucleic acids, polysaccharides, and analogs thereof. Exemplary nucleic acids include oligonucleotides and polynucleotides formed of DNA and RNA, and analogs thereof, which have selected sequences designed for hybridization to complementary targets (*e.g.*, antisense sequences for single- or double-stranded targets), or for expressing nucleic acid transcripts or proteins encoded by the sequences. Analogs include charged and preferably uncharged backbone analogs, such as phosphonates (preferably methyl phosphonates), phosphoramidates (N3' or N5'), thiophosphates, uncharged morpholino-based polymers, and protein nucleic acids

WO 02/069930

PCT/US02/05829

(PNAs). Such molecules can be used in a variety of therapeutic regimens, including enzyme replacement therapy, gene therapy, and anti-sense therapy, for example.

By way of example, protein nucleic acids (PNA) are analogs of DNA in which the backbone is structurally homomorphous with a deoxyribose backbone. The backbone consists of N-(2-aminoethyl)glycine units to which the nucleobases are attached. PNAs containing all four natural nucleobases hybridize to complementary oligonucleotides obeying Watson-Crick base-pairing rules, and is a true DNA mimic in terms of base pair recognition (Egholm *et al.* (1993) *Nature* 365:566-568. The backbone of a PNA is formed by peptide bonds rather than phosphate esters, making it well-suited for anti-sense applications. Since the backbone is uncharged, PNA/DNA or PNA/RNA duplexes that form exhibit greater than normal thermal stability. PNAs have the additional advantage that they are not recognized by nucleases or proteases. In addition, PNAs can be synthesized on an automated peptides synthesizer using standard t-Boc chemistry. The PNA is then readily linked to a transport polymer of the invention.

Examples of anti-sense oligonucleotides whose transport into and across epithelial and endothelial tissues can be enhanced using the methods of the invention are described, for example, in U.S. Patent 5,594,122. Such oligonucleotides are targeted to treat human immunodeficiency virus (HIV). Conjugation of a transport polymer to an anti-sense oligonucleotide can be effected, for example, by forming an amide linkage between the peptide and the 5'-terminus of the oligonucleotide through a succinate linker, according to well-established methods. The use of PNA conjugates is further illustrated in Example 11 of PCT Application PCT/US98/10571. Figure 7 of that application shows results obtained with a conjugate of the invention containing a PNA sequence for inhibiting secretion of gamma-interferon (γ -IFN) by T cells, as detailed in Example 11. As can be seen, the anti-sense PNA conjugate was effective to block γ -IFN secretion when the conjugate was present at levels above about 10 μ M. In contrast, no inhibition was seen with the sense-PNA conjugate or the non-conjugated antisense PNA alone.

Another class of macromolecules that can be transported across one or more layers of an epithelial or endothelial tissue is exemplified by proteins, and in particular, enzymes. Therapeutic proteins include, but are not limited to replacement enzymes. Therapeutic enzymes include, but are not limited to, α -glucosidase, for use in treating

WO 02/069930

PCT/US02/05829

lysozomal glucocerebrosidase deficiency (Gaucher's disease), alpha-L-iduronidase, for use in treating mucopolysaccharidosis I, alpha-N-acetylglucosamidase, for use in treating sanfilippo B syndrome, lipase, for use in treating pancreatic insufficiency, adenosine deaminase, for use in treating severe combined immunodeficiency syndrome, and triose phosphate isomerase, for use in treating neuromuscular dysfunction associated with triose phosphate isomerase deficiency.

In addition, and according to an important aspect of the invention, protein antigens may be delivered to the cytosolic compartment of antigen-presenting cells (APCs), where they are degraded into peptides. The peptides are then transported into the endoplasmic reticulum, where they associate with nascent HLA class I molecules and are displayed on the cell surface. Such "activated" APCs can serve as inducers of class I restricted antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTLs), which then proceed to recognize and destroy cells displaying the particular antigen. APCs that are able to carry out this process include, but are not limited to, certain macrophages, B cells and dendritic cells. In one embodiment, the protein antigen is a tumor antigen for eliciting or promoting an immune response against tumor cells. The transport of isolated or soluble proteins into the cytosol of APC with subsequent activation of CTL is exceptional, since, with few exceptions, injection of isolated or soluble proteins does not result either in activation of APC or induction of CTLs. Thus, antigens that are conjugated to the transport enhancing compositions of the present invention may serve to stimulate a cellular immune response *in vitro* or *in vivo*.

In another embodiment, the invention is useful for delivering immunospecific antibodies or antibody fragments to the cytosol to interfere with deleterious biological processes such as microbial infection. Recent experiments have shown that intracellular antibodies can be effective antiviral agents in plant and mammalian cells (*e.g.*, Tavladoraki *et al.* (1993) *Nature* 366:469; and Shaheen *et al.* (1996) *J. Virol.* 70:3392. These methods have typically used single-chain variable region fragments (scFv), in which the antibody heavy and light chains are synthesized as a single polypeptide. The variable heavy and light chains are usually separated by a flexible linker peptide (*e.g.*, of 15 amino acids) to yield a 28 kDa molecule that retains the high affinity ligand binding site. The principal obstacle to wide application of this technology has been efficiency of uptake into infected cells. But by attaching transport polymers to scFv fragments, the degree of cellular uptake can be

WO 02/069930

PCT/US02/05829

increased, allowing the immunospecific fragments to bind and disable important microbial components, such as HIV Rev, HIV reverse transcriptase, and integrase proteins.

D. Peptides

Peptides to be delivered by the enhanced transport methods described herein include, but should not be limited to, effector polypeptides, receptor fragments, and the like. Examples include peptides having phosphorylation sites used by proteins mediating intra-cellular signals. Examples of such proteins include, but are not limited to, protein kinase C, RAF-1, p21Ras, NF- κ B, C-JUN, and cytoplasmic tails of membrane receptors such as IL-4 receptor, CD28, CTLA-4, V7, and MHC Class I and Class II antigens.

When the delivery-enhancing transporter is also a peptide, synthesis can be achieved either using an automated peptide synthesizer or by recombinant methods in which a polynucleotide encoding a fusion peptide is produced, as mentioned above.

EXAMPLES

The following examples are offered to illustrate, but not to limit the present invention.

Example 1

Penetration of biotinylated polymers of D-arginine into the skin of nude mice

This Example demonstrates that poly-arginine heptamers can deliver conjugated biotin into and across layers of the skin, both follicularly and interfollicularly, and into the dermis.

Methods

Biotinylated peptides were synthesized using solid phase techniques and commercially available Fmoc amino acids, resins, and reagents (PE Biosystems, Foster City CA, and Bachem Torrence, CA) on a Applied Biosystems 433 peptide synthesizer. Fastmoc cycles were used with O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) substituted for HBTU/HOBt as the coupling reagent. Prior to the addition of biotin to the amino terminus of the peptide, amino caproic acid (aca) was conjugated and acted as a spacer. The peptides were cleaved from the resin using 96%

WO 02/069930

PCT/US02/05829

trifluoroacetic acid, 2% triisopropyl silane, and 2% phenol for between 1 and 12 hours. The longer reaction times were necessary to completely remove the Pbf protecting groups from the polymers of arginine. The peptides subsequently were filtered from the resin, precipitated using diethyl ether, purified using HPLC reverse phase columns (Alltech Altima, Chicago, IL.) and characterized using either electrospray or matrix assisted laser desorption mass spectrometry (Perceptive Biosystems, Boston, MA).

Varying concentrations (1mM-10μM) of a heptamer of D-arginine with biotin covalently attached to the amino terminus using an amino caproic acid spacer (bio r7), dissolved in phosphate buffered saline (PBS), were applied to the back of anesthetized nude mice. Samples (100μl) were applied as a liquid without excipient, prevented from dispersing by a Vaseline™ barrier, and allowed to penetrate for fifteen minutes. At the end of this period the animal was sacrificed, the relevant sections of skin were excised, embedded in mounting medium (OCT), and frozen. Frozen sections (5 microns) were cut using a cryostat, collected on slides, and stained with fluorescently labeled streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The slides were fixed in acetone at 4°C for ten minutes, air dried, soaked in PBS for five minutes, blocked with normal goat serum for five minutes, and washed with PBS for five minutes. The section was stained by incubation with fluorescently labeled streptavidin at 30μg/ml for thirty minutes, washed with PBS, counterstained with propidium iodide (1μg/ml) for two minutes, and the section was mounted with Vectashield™ mounting media. Slides were analyzed by fluorescent microscopy. Parallel studies were done using streptavidin-horse radish peroxidase rather than fluorescein-streptavidin. The biotinylated peptide was visualized by treatment of the sections with the horseradish peroxidase substrate diaminobenzadine, and visualization with light microscopy.

Results

Biotinylated arginine heptamer crossed into and across the epidermis and into the dermis. The cytosol and nuclei of all cells in the field were fluorescent, indicating penetration into virtually every cell of the nude mouse skin in the section. The staining pattern was consistent with unanticipated transport that was both follicular and interfollicular. In addition, positive cells were apparent in papillary and reticular dermis. In

WO 02/069930

PCT/US02/05829

contrast, no staining was apparent in mice treated with biotin alone, or phosphate buffered saline alone.

Example 2

Penetration of biotinylated polymers of D-arginine into the skin of normal Balb/C mice

5 Varying concentrations (1mM-100μM) of a heptamer of D-arginine with biotin covalently attached to the amino terminus using an amino caproic acid spacer (bio r7), dissolved in PBS, were applied to a skin of the groin of an anesthetized Balb/C mice. Sample (100μl) was applied as a liquid within excipient and prevented from dispersing by a Vaseline™ barrier and allowed to penetrate for thirty minutes. At the end of this period
10 animal was sacrificed, the relevant section of skin was excised, embedded in mounting medium (OCT) and frozen. Frozen sections were cut using a cryostat, collected on slides, and stained with fluorescently labeled streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) as described in Example 1. Slides were analyzed by fluorescent microscopy.

Results

15 As with the skin from nude mice, biotinylated arginine heptamer crossed into and across the epidermis and into the dermis. The cytosol and nuclei of all cells in the field were fluorescent, indicating penetration into virtually every cell of the nude mouse skin in the section. The staining pattern was consistent with unanticipated transport that was both follicular and interfollicular. In addition, positive cells were apparent in papillary and
20 reticular dermis. In contrast, no staining was apparent in mice treated with biotin alone, or phosphate buffered saline alone.

Example 3

Penetration of biotinylated polymers of D-arginine into normal human skin grafted onto nude mice

25 Varying concentrations (1mM-100μM) of a heptamer of D-arginine with biotin covalently attached to the amino terminus using an amino caproic acid spacer (bio r7), dissolved in PBS, were applied to human foreskin grafts on the back of SCID mice (*see, e.g., Deng et al. (1997) Nature Biotechnol. 15: 1388-1391; Khavari et al. (1997) Adv. Clin. Res. 15:27-35; Choate and Khavari (1997) Human Gene Therapy 8:895-901*). Samples (100μl)

WO 02/069930

PCT/US02/05829

were applied as a liquid within excipient and prevented from dispersing by a Vaseline™ barrier and allowed to penetrate for fifteen minutes. At the end of this period animal was sacrificed, the relevant section of skin was excised, embedded in mounting medium (OCT) and frozen. Frozen sections were cut using a cryostat, collected on slides, and stained with
5 fluorescently labeled streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) as described in Example 1. Slides were analyzed by fluorescent microscopy.

Results

As with the skin from nude and normal mice, biotinylated arginine heptamer crossed into and across the epidermis and into the dermis of the human skin. The cytosol and
10 nuclei of all cells in the field were fluorescent, indicating penetration into and through the epidermis and dermis. Intense staining was seen at both 20X and 40X magnification. The staining pattern was consistent with unanticipated transport that was both follicular and interfollicular. In addition, positive cells were apparent in papillary and reticular dermis. In contrast, no staining was apparent in mice treated with biotin alone, or phosphate buffered
15 saline alone, and very little staining was observed with the biotinylated arginine pentamer conjugate, either at low or high magnification.

Example 4

Increased penetration of biotinylated polymers of D-arginine into skin of nude mouse using plastic wrap or a lotion excipient.

20 Varying concentrations (1mM-100μM) of a heptamer of D-arginine with biotin covalently attached to the amino terminus using an amino caproic acid spacer (bio r7), dissolved in PBS, and mixed with an equal volume of Lubriderm™. The lotion mixture was then applied to the back of nude mice and allowed to penetrate for thirty, sixty, and 120 minutes. Alternatively, sample (100μl) was applied as a liquid without excipient and
25 prevented from evaporating by wrapping plastic wrap over the sample sealed with Vaseline™. The samples were allowed to penetrate for thirty, sixty, and 120 minutes. At the end of this period animal was sacrificed, the relevant section of skin was excised, embedded in mounting medium (OCT) and frozen. Frozen sections were cut using a cryostat, collected on slides, and stained with fluorescently labeled streptavidin (Vector Laboratories,

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Burlingame, CA) as described in Example 1. Slides were analyzed by fluorescent microscopy.

Results

- Both lotion and plastic wrap resulted in increased uptake compared with staining without excipient. Lotion was more effective than plastic wrap in enhancing uptake of the conjugate. Biotinylated arginine pentamers crossed into and across several skin layers, reaching both the cytosol and nuclei of epidermal cell layers, both follicular and interfollicular. In addition, positive cells were apparent in papillary and reticular dermis.

Example 5

- Penetration of cyclosporin conjugated to a biotinylated pentamer, heptamer, and nonamer of D-arginine into the skin of nude mice.**

Methods

A. *Linking cyclosporin to delivery-enhancing transporters*

1. Preparation of the α -chloroacetyl Cyclosporin A derivative.

- The α -chloroacetyl cyclosporin A derivative was prepared as shown in Figure 1. Cyclosporin A (152.7 mg, 127 μ mol) and chloroacetic acid anhydride (221.7 mg; 1300 μ mol) were placed into a dry flask under N_2 -atmosphere. Pyridine (1.0 mL) was added and the solution was heated to 50 °C (oil bath). After 16 hours the reaction was cooled to room temperature and quenched with water (4.0 mL). The resulting suspension was extracted with diethylether (Σ 15mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$. Filtration and evaporation of solvents *in vacuo* delivered a yellow oil, which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: EtOAc/hexanes: 40%-80%) yielding 136 mg (106.4 μ mol, 83%) of the desired product.

2. Coupling to Transporter molecules

- A general procedure for the coupling of cysteine containing peptides to the α -chloro acetyl Cyclosporin A derivative is shown in Figure 2.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

a. Labeled Peptides

The cyclosporin A derivative and the labeled peptide (1 equivalent) were dissolved in DMF (~ 10mmol of Cyclosporin A derivative / mL DMF) under an N₂-atmosphere. Diisopropylethylamine (10 equivalents) was added and stirring at room temperature was continued until all starting material was consumed (usually after 16 hours) (Figure 3). The solvents were removed *in vacuo* and the crude reaction product was dissolved in water and purified by reversed phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) (eluent: water / MeCN *TFA). The products were obtained in the following yields:

B-aca-r5-Ala-Ala-Cys-O-acyl-Cyclosporin A: 47%

B-aca-r7-Cys-O-acyl-Cyclosporin A: 43%

B-aca-r9-Cys-O-acyl-Cyclosporin A: 34 %

B-aca-Cys-O-acyl-Cyclosporin A: 55%

b. Unlabeled Peptides

The peptide (34.7 mg, 15.3 μmol) and the Cyclosporin A derivative (19.6 mg, 15.3 μmol) were dissolved in DMF (1.0 mL) under an N₂-atmosphere (Figure 4). Diisopropylethylamine (19.7 mg, 153 μmol) was added and stirring at room temperature was continued. After 12 hours the solvent was removed *in vacuo*. The crude material was dissolved in water and purified by RP-HPLC (eluent: water / MeCN *TFA) yielding the pure product (24.1 mg, 6.8 mmol, 44%).

B. Analysis of transport across skin

Varying concentrations (1mM-100μM) of cyclosporin conjugated to either biotinylated pentamer, heptamer, or nonamers of D-arginine (bio r5, r7, or r9), dissolved in PBS, were applied to the back of nude mice. Samples (100μl) were applied as a liquid within excipient and prevented from dispersing by a Vaseline™ barrier and allowed to penetrate for thirty, sixty, and 120 minutes. At the end of this period animal was sacrificed, the relevant section of skin was excised, embedded in mounting medium (OCT) and frozen. Frozen sections were cut using a cryostat, collected on slides, and stained with fluorescently labeled streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) as described in Example 1. Slides were analyzed by fluorescent microscopy

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Results

The conjugates of cyclosporin with biotinylated heptamers and nonamers of D-arginine effectively entered into and across the epidermis and into the dermis of the skin of nude mice. In contrast, very little uptake was seen using a conjugate between a pentamer of arginine and cyclosporin, and no staining was seen with a PBS control. The cytosol and nuclei of all cells in the field were fluorescent, indicating penetration into and through the epidermis and dermis. The staining pattern was consistent with unanticipated transport that was both follicular and interfollicular. In addition, positive cells were apparent in papillary and reticular dermis. These results demonstrate remarkable uptake only when sufficient guanidiny groups are included in the delivery-enhancing transporter.

Example 6**Demonstration that a D-arginine heptamer can penetrate human skin.**

Human and murine skin differ significantly in a number of ways, with human epidermis being considerably thicker. To determine if the D-arginine heptamers/cyclosporin A (r7 CsA) conjugate could also penetrate human skin, biotin r7 CsA was applied to full thickness human skin grafted onto the back of a SCID mouse. As in murine skin, conjugated cyclosporin A penetrated human epidermis and dermis. Fluorescence was observed in both the cytosol and the nuclei of cells in tissue exposed to biotinylated peptides alone, but in sections stained with biotin r7 CsA the majority of fluorescence was cytosolic, consistent with r7 CsA binding to cyclosporin A's known cytoplasmic targets.

Example 7**Demonstration that cyclosporin A -transporter conjugates enter T cells in the dermis****Methods**

Inhibition of IL-2 secretion by releasable R7-CsA conjugate. Jurkat cells (5×10^4) were incubated with varying concentrations of a nonreleasable or releasable R7-CsA conjugate or CsA overnight at 37°C to allow for the release of the active form of CsA prior to stimulation with PMA and ionomycin. T cells subsequently were stimulated to produce IL-2 by addition of 10ng/ml PMA (Sigma, St. Louis, MO) and 1μM ionomycin (CalBiochem, San Diego, CA). Cultures were incubated overnight at 37°C and supernatants

WO 02/069930

PCT/US02/05829

were collected and IL-2 was measured using a fluorescent ELISA. Briefly, plates were coated with 4 µg/ml anti-human IL-2 antibody (BD Pharmingen, San Diego, CA), blocked with PBS containing 10% FBS for 1 hour at room temperature, washed, and supernatants added and incubated for 1 hour. Media was removed and biotinylated anti-human IL-2 (1.6 µg/ml), was added for one hour. The plates were washed, and then europium labeled streptavidin (0.04 ng/ml) was added for one hour. After another wash, enhancement solution was added and the resulting fluorescence was measured using a Wallac plate reader (Wallac, Turku, Finland).

Results

To determine whether biotinylated D-arginine heptamer-cyclosporin (r7 CsA) conjugate would reach infiltrating T cells within inflamed skin *in vivo*, biotin r7 CsA was applied to the site of inflammation on the back of a mouse with experimentally induced contact dermatitis. Inflamed skin was stained with rhodamine labeled goat anti-mouse CD3 to localize T-cells and with fluorescein labeled streptavidin to localize the biotin r7 CsA. Biotin r7 CsA was found in all CD3[+] T cells in the tissue in addition to a variety of other cells that probably represent other inflammatory cells as well as resident fibroblasts. These data indicate that biotin r7 CsA penetrates inflamed skin to reach key target T lymphocytes.

Example 8

Synthesis, *in vitro* and *in vivo* activity of a releasable conjugate of a short oligomer of arginine and CsA

Modification of the 2^o alcohol of Cyclosporin A results in significant loss of its biological activity. See, e.g., R. E. Handschumacher, *et al.*, *Science* 226, 544-7 (1984). Consequently, to ensure release of free Cyclosporin A from its conjugate after transport into cells, Cyclosporin A was conjugated to an oligo-arginine transporter through a pH sensitive linker as shown in Figure 10. The resultant conjugate is stable at acidic pH but at pH>7 it undergoes an intramolecular cyclization involving addition of the free amine to the carbonyl adjacent to Cyclosporin A (Figure 6), which results in the release of unmodified Cyclosporin A.

Another modification in the design of the releasable conjugate was the use of L-arginine (R), and not D-arginine (r) in the transporter. While the oligo-D-arginine

WO 02/069930

PCT/US02/05829

transporters were used for the histological experiments to ensure maximal stability of the conjugate and therefore accuracy in determining its location through fluorescence, oligomers of L- arginine were incorporated into the design of the releasable conjugate to minimize its biological half-life. Consistent with its design, the resultant releasable conjugate was shown
5 to be stable at acidic pH, but labile at physiological pH in the absence of serum. This releasable Cyclosporin A conjugate's half-life in pH 7.4 PBS was 90 minutes.

Results

The releasable guanidino-heptamer conjugate of Cyclosporin A was shown to
10 be biologically active by inhibiting IL-2 secretion by the human T cell line, Jurkat, stimulated with PMA and ionomycin *in vitro*. See R. Wiskocil, *et al.*, *J Immunol* 134, 1599-603 (1985). The conjugate was added 12 hours prior to the addition of PMA/ionomycin and dose dependent inhibition was observed by the releasable R7 CsA conjugate. This inhibition was not observed with a nonreleasable analog (Figure 6) that differed from the releasable
15 conjugate by retention of the t-Boc protecting group, which prevented cyclization and resultant release of the active drug. The EC₅₀ of the releasable R7 cyclosporin conjugate was approximately two fold higher than CsA dissolved in alcohol and added at the same time as the releasable conjugate.

The releasable R7 CsA conjugate was assayed *in vivo* for functional activity
20 using a murine model of contact dermatitis. Treatment with the 1% releasable R7 CSA conjugate resulted in 73.9% ± 4.0 reduction in ear inflammation (Figure 7). No reduction in inflammation was seen in the untreated ear, indicating that the effect seen in the treated ear was local and not systemic. Less inhibition was observed in the ears of mice treated with 0.1 and 0.01% R7-CsA (64.8% ± 4.0 and 40.9% ± 3.3 respectively), demonstrating that the
25 effect was titratable. Treatment with the fluorinated corticosteroid positive control resulted in reduction in ear swelling (34.1% ± 6.3), but significantly less than that observed for 0.1% releasable R7 CsA (Figure 7). No reduction of inflammation was observed in any of the mice treated with unmodified Cyclosporin A, vehicle alone, R7, or nonreleasable R7 CsA.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Example 9**The Penetration of Copper and Gadolinium-DTPA-r7 Complexes into the Skin of Nude Mice****Methods**5 1. ***Preparation of Metal Complexes*****Step 1- Preparation of copper-diethylenetriaminepentaacetic acid complex (Cu-DTPA)**

10 Copper carbonate (10 mmol) and diethylenetriaminepentaacetic acid (10 mmol) were dissolved in water (150 mL) (Figure 8). After 18 h, the solution was centrifuged to removed any solids. The blue solution was decanted and lyophilized to provide a blue powder (yields > 90%).

Step 2- Preparation of DTPA transporter

15 The Cu-DTPA was linked to a transporter through an aminocaproic acid spacer using a PE Applied Biosystems Peptide Synthesizer (ABI 433A) (Figure 9). The material was cleaved from the resin by treatment with trifluoroacetic acid (TFA) (40 mL), triisopropyl silane (100 μ L) and phenol (100 μ L) for 18 h. The resin was filtered off and the peptide was precipitated by addition of diethyl ether (80 mL). The solution was centrifuged and the solvent decanted off. The crude solid was purified by reverse-phase HPLC using a water/acetonitrile gradient. Treatment with TFA resulted in loss of Cu^{2+} ion which needed to

20 be reinserted.

DTPA-aca-R7-CO₂H (10 mg, 0.0063 mmol) and copper sulfate (1.6 mg, 0.0063 mmol) were dissolved in water (1 mL). Let gently stir for 18 h and lyophilized to provide product as a white powder (10 mg).

25 2. ***Analysis of transport across skin***

 Metal diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) complexes were formed by mixing equimolar amounts of metal salts with DTPA in water for 18 hours. At the end of this time, the solutions were centrifuged, frozen and lyophilized. The dried powder was characterized by mass spectrometry and used in solid phase peptide synthesis. The metal-DTPA complexes were attached to polymers of D- or L-arginine that were still attached to

30 solid-phase resin used in peptide synthesis. The metal-DTPA complexes were attached using

WO 02/069930

PCT/US02/05829

an aminocaproic acid spacer. The solid phase peptide synthesis techniques were described in Example 1, with the exception that cleavage of the peptide- DTPA -metal complex in trifluoroacetic acid released the metal. The metal is replaced after HPLC purification and lyophilization of the peptide- DTPA complex. Replacement of the metal involved incubation of equimolar amounts of the metal salt with the peptide-aminocaproic acid- DTPA complex and subsequent lyophilization.

Varying concentrations (1 μ M to 1 mM) of the Cu- DTPA -aca-r7 complex were applied to the abdominal region of nude mice for 15, 30 and 45 minutes. As controls, an equimolar amount of the Cu- DTPA complex was spotted onto the abdominal region. At the end of the incubation period, the samples were simply wiped off and intense blue color was apparent on the skin where the Cu- DTPA -aca-r7 complex was spotted and not where the Cu- DTPA alone was spotted. In the case of the application of 1 mM, visible blue dye was seen for three days, decreasing with time, but being apparent for the full period.

Varying concentrations (1 μ M to 1 mM) of the Gd- DTPA -aca-r7 complex are injected into the tail vein of BALB/c mice in 100 μ l. Distribution of the Gd is observed in real time using magnetic resonance imaging. Distribution of the dye is apparent throughout the bloodstream, entering liver, spleen, kidney, and heart. When injected into the carotid artery of rabbits, the dye is seen to cross the blood brain barrier.

Example 10

Penetration of hydrocortisone conjugated to a biotinylated pentamer, heptamer, and nonamer of D-arginine into the skin of nude mice

Methods

A. Linking of hydrocortisone to delivery-enhancing transporters

Step 1- Acylation of hydrocortisone with chloroacetic anhydride.

A solution of hydrocortisone (200 mg, 0.55 mmol) and chloroacetic anhydride (113 mg, 0.66 mmol) in pyridine (5 mL) was stirred at room temperature for 2 h (Figure 10). The solvent was evaporated off and the crude product was chromatographed on silica using 50% hexanes/ethyl acetate as the eluent. Product isolated a white solid (139 mg, 58%).

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Step 2- Linking to transporter.

A solution of the chloroacetic ester of hydrocortisone (0.0137 mmol), a transporter containing a cysteine residue (0.0137) and diisopropylethylamine (DIEA) (0.0274 mmol) in dimethylformamide (DMF) (1 mL) was stirred at room temperature for 18 h (Figure 11). The material was purified via reverse-phase HPLC using a water/acetonitrile gradient and lyophilized to provide a white powder.

r5 conjugate- 12 mg obtained (29% isolated yield)

r7 conjugate- 22 mg obtained (55% isolated yield)

R7 conjugate- 13 mg obtained (33% isolated yield)

B. Analysis of transport across skin

Varying concentrations (1mM-100μM) of hydrocortisone conjugated to either biotinylated pentamer, heptamer, or nonamers of D-arginine (bio r5, r7, or r9), dissolved in PBS, were applied to the back of nude mice. Samples (100μl) were applied as a liquid within excipient and prevented from dispersing by a Vaseline™ barrier and allowed to penetrate for thirty, sixty, and 120 minutes. At the end of this period animal was sacrificed, the relevant section of skin was excised, embedded in mounting medium (OCT) and frozen. Frozen sections were cut using a cryostat, collected on slides, and stained with fluorescently labeled streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) as described in Example 1. Slides were analyzed by fluorescent microscopy.

Results

The conjugates of hydrocortisone with biotinylated heptamers of D-arginine effectively entered into and across the epidermis and into the dermis of the skin of nude mice. In contrast, very little uptake was seen using a conjugate between a pentamer of arginine and hydrocortisone, and no staining was seen with a PBS control. The cytosol and nuclei of all cells in the field were fluorescent, indicating penetration into and through the epidermis and dermis. The staining pattern was consistent with unanticipated transport that was both follicular and interfollicular. In addition, positive cells were apparent in papillary and reticular dermis. These results demonstrate remarkable uptake only when sufficient guanidiny groups are included in the delivery-enhancing transporter.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Example 11**Penetration of taxol conjugated to a biotinylated pentamer, heptamer, and nonamer of D-arginine into the skin of nude mice****Methods**5 1. ***Conjugation of C-2' activated taxol derivatives to biotin-labeled peptides*****Synthesis of C-2' Derivatives**

Taxol (48.7 mg, 57.1 μ mol) was dissolved in CH_2Cl_2 (3.0 mL) under an N_2 -atmosphere. The solution was cooled to 0°C . A stock solution of the chloroformate of benzyl-(*p*-hydroxy benzoate) (200 mmol, in 2.0 mL CH_2Cl_2 - freshly prepared from benzyl-(*p*-hydroxy benzoate) and diphosgene) was added at 0°C and stirring at that temperature was continued for 5 hours, after which the solution was warmed to room temperature (Figure 12). Stirring was continued for additional 10 hours. The solvents were removed *in vacuo* and the crude material was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: EtOAc/hexanes 30%-70%) yielding the desired taxol C-2' carbonate (36.3 mg, 32.8 μ mol, 57.4%).

15 **Coupling to biotin-labeled peptides.**

A procedure for coupling to biotin-labeled peptides is shown in Figure 13. The taxol derivative and the biotin labeled peptide (1.2 equivalents) were dissolved in DMF (~ 10 μ mol / mL DMF) under an N_2 -atmosphere. Stock solutions of diisopropylethylamine (1.2 equivalents in DMF) and DMAP (0.3 equivalents in DMF) were added and stirring at room temperature was continued until all starting material was consumed. After 16 hours the solvent was removed *in vacuo*. The crude reaction mixture was dissolved in water and purified by RP-HPLC (eluent: water/MeCN*TFA) yielding the conjugates in the indicated yields:

25 B-aca-r5-K-taxol: 3.6 mg, 1.32 mmol, 20%.
 B-aca-r7-K-taxol: 9.8 mg, 3.01 mmol, 44%.
 B-aca-r9-K-taxol: 19.4 mg, 5.1 mmol, 67%.

Unlabeled C-2' carbamates:

The taxol derivative (12.4 mg, 11.2 μ mol) and the unlabeled peptide (27.1 mg, 13.4 μ mol) were dissolved in DMF (1.5 mL) under an N_2 -atmosphere (Figure 14).
 30 Diisopropylethylamine (1.7 mg, 13.4 μ mol) was added as a stock solution in DMF, followed

WO 02/069930

PCT/US02/05829

by DMAP (0.68 mg, 5.6 μmol) as a stock solution in DMF. Stirring at room temperature was continued until all starting material was consumed. After 16 hours the solvent was removed *in vacuo*. The crude material was dissolved in water and purified by RP-HPLC (eluent: water/MeCN*TFA) yielding the desired product (16.5 mg, 5.9 μmol , 53%).

5

Other C-2' Conjugates

The taxol derivative (8.7 mg, 7.85 μmol) was dissolved in EtOAc (2.0 mL). Pd/C (10%, 4.0 mg) was added and the reaction flask was purged with H₂ five times (Figure 15A). Stirring under an atmosphere of hydrogen was continued for 7 hours. The Pd/C was filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude material (6.7 mg, 6.58 μmol , 84%) obtained in this way was pure and was used in the next step without further purification.

10

The free acid taxol derivative (18.0 mg, 17.7 μmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.0 mL). Dicyclohexylcarbodiimide (4.3 mg, 21.3 μmol) was added as a stock solution in CH₂Cl₂ (0.1 mL). N-Hydroxysuccinimide (2.0 mg, 17.7 μmol) was added as a stock solution in DMF (0.1 mL) (Figure 15B). Stirring at room temperature was continued for 14 hours. The solvent was removed *in vacuo* and the resultant crude material was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: EtOAc/ hexanes 40%-80%) yielding the desired product (13.6 mg, 12.2 μmol , 69%).

15

The activated taxol derivative (14.0 mg, 12.6 μmol) and the peptide (30.6 mg, 15.1 μmol) were dissolved in DMF (3.0 mL) under an N₂-atmosphere (Figure 15C). Diisopropylethylamine (1.94 mg, 15.1 μmol) was added as a stock solution in DMF (0.1 mL), followed by DMAP (0.76 mg, 6.3 μmol) as a stock solution in DMF (0.1 mL). Stirring at room temperature was continued until all the starting material was consumed. After 20 hours the solvent was removed *in vacuo*. The crude material was dissolved in water and purified by RP-HPLC (eluent: water/MeCN * TFA) yielding the two depicted taxol conjugates in a ration of 1:6 (carbonate vs carbamate, respectively).

20

25

2. Analysis of transport across skin

Varying concentrations (1mM-100 μM) of taxol conjugated to either biotinylated pentamer, heptamer, or nonamers of D-arginine (bio r5, r7, or r9), dissolved in PBS, were applied to the back of nude mice. Samples (100 μl) were applied as a liquid within

30

WO 02/069930

PCT/US02/05829

excipient and prevented from dispersing by a Vaseline™ barrier and allowed to penetrate for thirty, sixty, and 120 minutes. At the end of this period animal was sacrificed, the relevant section of skin was excised, embedded in mounting medium (OCT) and frozen. Frozen sections were cut using a cryostat, collected on slides, and stained with fluorescently labeled streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) as described in Example 1. Slides were analyzed by fluorescent microscopy.

Results

The conjugates of taxol with biotinylated heptamers and nonamers of D-arginine effectively entered into and across the epidermis and into the dermis of the skin of nude mice. In contrast, very little uptake was seen using a conjugate between a pentamer of arginine and taxol, and no staining was seen with a PBS control. The cytosol and nuclei of all cells in the field were fluorescent, indicating penetration into and through the epidermis and dermis. The staining pattern was consistent with unanticipated transport that was both follicular and interfollicular. In addition, positive cells were apparent in papillary and reticular dermis. These results demonstrate remarkable uptake only when sufficient guanidiny groups are included in the delivery-enhancing transporter.

Example 12

Conjugate of Taxol and Delivery-enhancing Transporter with pH-Releasable Linker

This Example demonstrates the use of a general strategy for synthesizing prodrugs that have a delivery-enhancing transporter linked to a drug by a linker that releases the drug from the delivery-enhancing transporter upon exposure to physiological pH. In general, a suitable site on the drug is derivatized to carry an α -chloroacetyl residue. Next, the chlorine is displaced with the thiol of a cysteine residue that carries an unprotected amine. This scheme is shown in Figure 16.

Methods

Synthesis of Taxol-2'-chloroacetyl

Taxol (89.5 mg, 104.9 μ mol) was dissolved in CH_2Cl_2 (3.5 mL). The solution was cooled to 0 °C under an N_2 -atmosphere. α -Chloroacetic anhydride (19.7 mg, 115.4 μ mol) was added, followed by DIEA (14.8 mg, 115.4 μ mol). The solution was allowed to

WO 02/069930

PCT/US02/05829

warm to room temperature. After thin layer chromatography (tlc) analysis indicated complete consumption of starting material, the solvent was removed in vacuo and the crude material was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: EtOAc/Hex 20% - 50%) yielding the desired material (99.8 mg, quantitative) (Figure 18).

5 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.13 (d, J = 7.57 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 7.57 Hz, 2H), 7.62 – 7.40 (m, 11H), 6.93 (d, J = 9.14 Hz, 1H), 6.29 – 6.23 (m, 2H), 6.01 (d, J = 7.14 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 6.80 Hz, 1H), 5.55 (d, J = 2.24 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 4.43 (m, 1H), 4.30 (d, J = 8.29 Hz, 1H), 4.20 – 4.15 (m, 2H), 3.81 (d, J = 6.71 Hz, 1H), 2.56 – 2.34 (m, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.19 (m, 1H), 1.95 – 1.82 (m, 3H), 1.92 s, (3H), 1.67 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.13 (s, 3H) ppm.

10 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 203.6, 171.1, 169.7, 167.3, 167.0, 166.9, 166.3, 142.3, 136.4, 133.6, 133.5, 132.9, 132.0, 130.1, 129.2, 121.1, 128.7, 128.6, 127.0, 126.5, 84.3, 81.0, 79.0, 76.3, 75.4, 75.2, 75.0, 72.2, 72.0, 58.4, 52.7, 45.5, 43.1, 40.1, 35.5, 26.7, 22.6, 22.0, 20.7, 14.7, 9.5 ppm.

15 *Linkage of Taxol to Delivery-enhancing transporter*

The peptide (47.6 mg, 22.4 μmol) was dissolved in DMF (1.0 mL) under an N_2 -atmosphere. DIEA (2.8 mg, 22.4 μmol) was added. A solution of taxol-2'-chloroacetate (20.8 mg, 22.4 μmol) in DMF (1.0 mL) was added. Stirring at room temperature was continued for 6 hours. Water containing 0.1% TFA (1.0 mL) was added, the sample was frozen and the solvents were lyophilized. The crude material was purified by RP-HPLC (eluent: water/MeCN *0.1%TFA: 85% - 15%). A schematic of this reaction is shown in Figure 18.

20 *Synthesis of Related Conjugates*

Using the conjugation conditions outlined above, the three additional conjugates shown in were synthesized.

Cytotoxicity Assay

The taxol conjugates were tested for cytotoxicity in a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) dye reduction. Results, which are shown in Figure 20, demonstrate that the taxol conjugated to r7 with a readily pH-releasable linker

WO 02/069930

PCT/US02/05829

(CG 1062; R=Ac in the structure shown in Figure 19) is significantly more cytotoxic than either taxol alone or taxol conjugated to r7 with a less-readily pH-releasable linker (CG 1040; R=H in the structure shown in Figure 19).

Example 13

Structure-Function Relationships of Fluorescently-Labeled Peptides Derived from Tat₄₉₋₅₇

Methods

- General.** Rink amide resin and Boc₂O were purchased from Novabiochem. Diisopropylcarbodiimide, bromoacetic acid, fluorescein isothiocyanate (FITC-NCS), ethylenediamine, 1,3-diaminopropane, 1,4-diaminobutane, 1,6-diaminohexane, *trans*-1,6-diaminocyclohexane, and pyrazole-1-carboxamidine were all purchased from Aldrich®. All solvents and other reagents were purchased from commercial sources and used without further purification. The mono-Boc amines were synthesized from the commercially available diamines using a literature procedure (10 equiv. of diamine and 1 equiv. of Boc₂O in chloroform followed by an aqueous work up to remove unreacted diamine) (34).
- N*-tert-butoxycarbonyl-1,6-*trans*-diaminocyclohexane.** Mp 159-161 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 4.35 (br s, 1H), 3.37 (br s, 1H), 2.61 (br s, 1H), 1.92-2.02 (m, 2H), 1.81-1.89 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.07-1.24 (m, 4H) ppm; ¹³C NMR (D₆-DMSO) δ 154.9, 77.3, 49.7, 48.9, 35.1, 31.4, 28.3 ppm; ES-MS (M+1) calcd 215.17, found 215.22.
- General Procedure for Peptide Synthesis.** Tat₄₉₋₅₇ (RKRRQR₄₃₋₅₈), truncated and alanine-substituted peptides derived from Tat₄₉₋₅₇, Antennapedia₄₃₋₅₈ (RQIKIWFQNRRMKWKK), and homopolymers of arginine (R5-R9) and *D*-arginine (r5-r9) were prepared with an automated peptide synthesizer (ABI433) using standard solid-phase Fmoc chemistry (35) with HATU as the peptide coupling reagent. The fluorescein moiety was attached via a aminohexanoic acid spacer by treating a resin-bound peptide (1.0 mmol) with fluorescein isothiocyanate (1.0 mmol) and DIEA (5 mmol) in DMF (10 mL) for 12 h. Cleavage from the resin was achieved using 95:5 TFA/triisopropylsilane. Removal of the solvent in vacuo gave a crude oil which was triturated with cold ether. The crude mixture thus obtained was centrifuged, the ether was removed by decantation, and the resulting orange solid was purified by reverse-phase HPLC (H₂O/CH₃CN in 0.1% TFA). The

WO 02/069930

PCT/US02/05829

products were isolated by lyophilization and characterized by electrospray mass spectrometry. Purity of the peptides was >95% as determined by analytical reverse-phase HPLC (H₂O/CH₃CN in 0.1% TFA).

5 All peptides and peptoids synthesized contain an aminohexanoic (ahx) acid moiety attached to the *N*-terminal amino group with a fluorescein moiety (FI) covalently linked to the amino group of the aminohexanoic acid spacer. The carboxyl terminus of every peptide and peptoid is a carboxamide.

Cellular Uptake Assay. The arginine homopolymers and guanidine-substituted peptoids were each dissolved in PBS buffer (pH 7.2) and their concentration was determined by absorption of fluorescein at 490 nm ($\epsilon=67,000$). The accuracy of this method for determining concentration was established by weighing selected samples and dissolving them in a known amount of PBS buffer. The concentrations determined by UV spectroscopy correlated with the amounts weighed out manually. Jurkat cells (human T cell line), murine B cells (CH27), or human PBL cells were grown in 10% fetal calf serum and DMEM and each of these were used for cellular uptake experiments. Varying amounts of arginine and oligomers of guanidine-substituted peptoids were added to approximately 3×10^6 cells in 2% FCS/PBS (combined total of 200 μ L) and placed into microtiter plates (96 well) and incubated for varying amounts of time at 23 °C or 4 °C. The microtiter plates were centrifuged and the cells were isolated, washed with cold PBS (3 x 250 μ L), incubated with 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA at 37 °C for 5 min, washed with cold PBS, and resuspended in PBS containing 0.1% propidium iodide. The cells were analyzed using fluorescent flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson) and cells staining with propidium iodide were excluded from the analysis. The data presented is the mean fluorescent signal for the 5000 cells collected.

25 **Inhibition of Cellular Uptake with Sodium Azide.** The assays were performed as previously described with the exception that the cells used were preincubated for 30 min with 0.5% sodium azide in 2% FCS/PBS buffer prior to the addition of fluorescent peptides and the cells were washed with 0.5% sodium azide in PBS buffer. All of the cellular uptake assays were run in parallel in the presence and absence of sodium azide.

30

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Cellular Uptake Kinetics Assay. The assays were performed as previously described except the cells were incubated for 0.5, 1, 2, and 4 min at 4 °C in triplicate in 2% FCS/PBS (50 µl) in microtiter plates (96 well). The reactions were quenched by diluting the samples into 2% FCS/PBS (5 mL). The assays were then worked up and analyzed by
 5 fluorescent flow cytometry as previously described.

Results

To determine the structural requirements for the cellular uptake of short arginine-rich peptides, a series of fluorescently-labeled truncated analogues of Tat₄₉₋₅₇ were synthesized using standard solid-phase chemistry. *See, e.g., Atherton, E. et al. SOLID-PHASE*
 10 *PEPTIDE SYNTHESIS* (IRL: Oxford, Engl. 1989). A fluorescein moiety was attached via an aminohexanoic acid spacer on the amino termini. The ability of these fluorescently labeled peptides to enter Jurkat cells was then analyzed using fluorescent activated cell sorting (FACS). The peptide constructs tested were Tat₄₉₋₅₇ (Fl-ahx-RKKRRQRRR): Tat₄₉₋₅₆ (Fl-ahx-RKKRRQRR), Tat₄₉₋₅₅ (Fl-ahx-RKKRRQR), Tat₅₀₋₅₇ (Fl-ahx-KKRRQRRR), and Tat₅₁₋
 15 ₅₇ (Fl-ahx-KRRQRRR). Differentiation between cell surface binding and internalization was accomplished throughout by running a parallel set of assays in the presence and absence of sodium azide. Because sodium azide inhibits energy-dependent cellular uptake but not cell surface binding, the difference in fluorescence between the two assays provided the amount of fluorescence resulting from internalization.

20 Deletion of one arginine residue from either the amine terminus (Tat₅₀₋₅₇) or the carboxyl terminus (Tat₄₉₋₅₆) resulted in an 80% loss of intracellular fluorescence compared to the parent sequence (Tat₄₉₋₅₇). From the one amino acid truncated analogs, further deletion of R-56 from the carboxyl terminus (Tat₄₉₋₅₅) resulted in an additional 60% loss of intracellular fluorescence, while deletion of K-50 from the amine terminus (Tat₅₁₋₅₇)
 25 did not further diminish the amount of internalization. These results indicate that truncated analogs of Tat₄₉₋₅₇ are significantly less effective at the transcellular delivery of fluorescein into Jurkat cells, and that the arginine residues appear to contribute more to cellular uptake than the lysine residues.

To determine the contribution of individual amino acid residues to cellular
 30 uptake, analogs containing alanine substitutions at each site of Tat₄₉₋₅₇ were synthesized and

WO 02/069930

PCT/US02/05829

assayed by FACS analysis (Figure 22). The following constructs were tested: A-49 (FI-ahx-AKKRRQRRR), A-50 (FI-ahx-RAKRRQRRR), A-51 (FI-ahx-RKARRQRRR), A-52 (FI-ahx-RKKARQRRR), A-53 (FI-ahx-RKKRAQRRR), A-54 (FI-ahx-RKKRRARRR), A-55 (FI-ahx-RKKRRQARR), A-56 (FI-ahx-RKKRRQRAR), and A-57 (FI-ahx-RKKRRQRRRA).

- 5 Substitution of the non-charged glutamine residue of Tat₄₉₋₅₇ with alanine (A-54) resulted in a modest decrease in cellular internalization. On the other hand, alanine substitution of each of the cationic residues individually produced a 70-90% loss of cellular uptake. In these cases, the replacement of lysine (A-50, A-51) or arginine (A-49, A-52, A-55, A-56, A-57) with alanine had similar effects in reducing uptake.

- 10 To determine whether the chirality of the transporter peptide was important, the corresponding *d*-(d-Tat₄₉₋₅₇), retro-*l*-(Tat₅₇₋₄₉), and retro-inverso isomers (*d*-Tat₅₇₋₄₉) were synthesized and assayed by FACS analysis (Figure 23). Importantly, all three analogs were more effective at entering Jurkat cells than Tat₄₉₋₅₇. These results indicated that the chirality of the peptide backbone is not crucial for cellular uptake. Interestingly, the retro-*l* isomer
15 (Tat₅₇₋₄₉) which has three arginine residues located at the amine terminus instead of one arginine and two lysines found in Tat₄₉₋₅₇ demonstrated enhanced cellular uptake. Thus, residues at the amine terminus appear to be important and that arginines are more effective than lysines for internalization. The improved cellular uptake of the unnatural *d*-peptides is most likely due to their increased stability to proteolysis in 2% FCS (fetal calf serum) used
20 in the assays. When serum was excluded, the *d*- and *l*-peptides were equivalent as expected.

These initial results indicated that arginine content is primarily responsible for the cellular uptake of Tat₄₉₋₅₇. Furthermore, these results were consistent with our previous results where we demonstrated that short oligomers of arginine were more effective at entering cells than the corresponding short oligomers of lysine, ornithine, and histidine.

- 25 What had not been established was whether arginine homo-oligomers are more effective than Tat₄₉₋₅₇. To address this point, Tat₄₉₋₅₇ was compared to the *l*-arginine (R5-R9) and *d*-arginine (r5-r9) oligomers. Although Tat₄₉₋₅₇ contains eight cationic residues, its cellular internalization was between that of R6 and R7 (Figure 24) demonstrating that the presence of six arginine residues is the most important factor for cellular uptake. Significantly,
30 conjugates containing 7-9 arginine residues exhibited better uptake than Tat₄₉₋₅₇.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

To quantitatively compare the ability of these arginine oligomers and Tat₄₉₋₅₇ to enter cells, Michaelis-Menton kinetic analyses were performed. The rates of cellular uptake were determined after incubation (3 °C) of the peptides in Jurkat cells for 30, 60, 120, and 240 seconds (Table 1). The resultant K_m values revealed that r9 and R9 entered cells at rates approximately 100-fold and 20-fold faster than Tat₄₇₋₅₉ respectively. For comparison, Antennapedia₄₃₋₅₈ was also analyzed and was shown to enter cells approximately 2-fold faster than Tat₄₇₋₅₉, but significantly slower than r9 or R9.

10 **Table 1:** Michaelis-Menton kinetics: Antennapedia₄₃₋₅₈ (FI-ahx-RQKIWFQNRMRKWKK).

peptide	K _m (μM)	V _{max}
Tat ₄₉₋₅₇	770	0.38
Antennapedia ₄₃₋₅₈	427	0.41
R9	44	0.37
r9	7.6	0.38

Example 14

Design and Synthesis of Peptidomimetic Analogs of Tat₄₉₋₅₇

15 Methods

General Procedure for Peptoid Polyamine Synthesis. Peptoids were synthesized manually using a fritted glass apparatus and positive nitrogen pressure for mixing the resin following the literature procedure developed by Zuckermann. See, e.g., Murphy, J. E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1517-1522 (1998); Simon, R. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9367-9371 (1992); Zuckermann, R. N. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10646-10647 (1992). Treatment of Fmoc-substituted Rink amide resin (0.2 mmol) with 20% piperidine/DMF (5 mL) for 30 min (2x) gave the free resin-bound amine which was washed with DMF (3 x 5 mL). The resin was treated with a solution of bromoacetic acid (2.0 mmol) in DMF (5 mL) for 30 min. This procedure was repeated. The resin was then washed (3 x 5 mL DMF) and treated with a solution of mono-Boc diamine (8.0 mmol) in DMF (5 mL) for 12 hrs. These two steps were repeated until an oligomer of the required

WO 02/069930

PCT/US02/05829

length was obtained (Note: the solution of mono-Boc diamine in DMF could be recycled without appreciable loss of yield). The resin was then treated with *N*-Fmoc-aminohexanoic acid (2.0 mmol) and DIC (2.0 mmol) in DMF for 1 h and this was repeated. The Fmoc was then removed by treatment with 20% piperidine/DMF (5 mL) for 30 min. This step was
5 repeated and the resin was washed with DMF (3 x 5 mL). The free amine resin was then treated with fluorescein isothiocyanate (0.2 mmol) and DIEA (2.0 mmol) in DMF (5 mL) for 12 hrs. The resin was then washed with DMF (3 x 5 mL) and dichloromethane (5 x 5 mL). Cleavage from the resin was achieved using 95:5 TFA/triisopropylsilane (8 mL). Removal of the solvent in vacuo gave a crude oil which was triturated with cold ether (20 mL). The
10 crude mixture thus obtained was centrifuged, the ether was removed by decantation, and the resulting orange solid was purified by reverse-phase HPLC (H₂O/CH₃CN in 0.1% TFA). The products were isolated by lyophilization and characterized by electrospray mass spectrometry and in selected cases by ¹H NMR spectroscopy.

General Procedure for Perguanidinylation of Peptoid Polyamines. A

15 solution of peptoid amine (0.1 mmol) dissolved in deionized water (5 mL) was treated with sodium carbonate (5 equivalents per amine residue) and pyrazole-1-carboxamidine (5 equivalents per amine residue) and heated to 50° C for 24-48 hr. The crude mixture was then acidified with TFA (0.5 mL) and directly purified by reverse-phase HPLC (H₂O/CH₃CN in 0.1% TFA). The products were characterized by electrospray mass
20 spectrometry and isolated by lyophilization and further purified by reverse-phase HPLC. The purity of the guanidine-substituted peptoids was >95% as determined by analytical reverse-phase HPLC (H₂O/CH₃CN in 0.1% TFA).

Results

Utilizing the structure-function relationships that had been determined for the
25 cellular uptake of Tat₄₇₋₅₉, we designed a set of polyguanidine peptoid derivatives that preserve the 1,4 backbone spacing of side chains of arginine oligomers, but have an oligo-glycine backbone devoid of stereogenic centers. These peptoids incorporating arginine-like side chains on the amide nitrogen were selected because of their expected resistance to proteolysis, and potential ease and significantly lower cost of synthesis (Simon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367-9371 (1992); Zuckermann, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*
30

WO 02/069930

PCT/US02/05829

114:10646-10647 (1992). Furthermore, racemization, frequently encountered in peptide synthesis, is not a problem in peptoid synthesis; and the "sub-monomer" peptoid approach allows for facile modification of side-chain spacers. Although the preparation of an oligurea and peptoid-peptide hybrid (Hamy, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3548-3553 (1997)) derivatives of Tat₄₉₋₅₇ have been previously reported, their cellular uptake was not explicitly studied.

The desired peptoids were prepared using the "sub-monomer" approach (Simon *et al.*; Zuckermann *et al.*) to peptoids followed by attachment of a fluorescein moiety via an aminohexanoic acid spacer onto the amine termini. After cleavage from the solid-phase resin, the fluorescently labeled polyamine peptoids thus obtained were converted in good yields (60-70%) into polyguanidine peptoids by treatment with excess pyrazole-1-carboxamidine (Bernatowicz, *et al.*, *J. Org. Chem.* 57:2497-2502 (1992) and sodium carbonate (as shown in Figure 25). Previously reported syntheses of peptoids containing isolated N-Arg units have relied on the synthesis of N-Arg monomers (5-7 steps) prior to peptoid synthesis and the use of specialized and expensive guanidine protecting groups (Pmc, Pbf) (Kruijtzter, *et al.*, *Chem. Eur. J.* 4:1570-1580 (1998); Heizmann, *et al. Peptide Res.* 7:328-332 (1994). The compounds reported here represent the first examples of polyguanidinylated peptoids prepared using a perguanidinylation step. This method provides easy access to polyguanidinylated compounds from the corresponding polyamines and is especially useful for the synthesis of perguanidinylated homooligomers. Furthermore, it eliminates the use of expensive protecting groups (Pbf, Pmc). An additional example of a perguanidinylation of a peptide substrate using a novel triflyl-substituted guanylating agent has recently been reported (Feichtinger, *et al.*, *J. Org. Chem.* 63:8432-8439 (1998)).

The cellular uptake of fluorescently labeled polyguanidine N-arg_{5,7,9} peptoids was compared to the corresponding *d*-arginine peptides r_{5,7,9} (similar proteolytic properties) using Jurkat cells and FACS analysis. The amount of fluorescence measured inside the cells with N-arg_{5,7,9} was proportional to the number of guanidine residues: N-arg₉ > N-arg₇ > N-arg₅ (Figure 26), analogous to that found for r_{5,7,9}. Furthermore, the N-arg_{5,7,9} peptoids showed only a slightly lower amount of cellular entry compared to the corresponding peptides, r_{5,7,9}. The results demonstrate that the hydrogen bonding along the peptide backbone of Tat₄₉₋₅₇ or arginine oligomers is not a required structural element for

WO 02/069930

PCT/US02/05829

cellular uptake and oligomeric guanidine-substituted peptoids can be utilized in place of arginine-rich peptides as molecular transporters. The addition of sodium azide inhibited internalization demonstrating that the cellular uptake of peptoids was also energy dependent.

Example 15

5 The effect of side chain length on cellular uptake

After establishing that the *N*-arg peptoids efficiently crossed cellular membranes, the effect of side chain length (number of methylenes) on cellular uptake was investigated. For a given number of guanidine residues (5,7,9), cellular uptake was proportional to side chain length. Peptoids with longer side chains exhibited more efficient cellular uptake. A nine-mer peptoid analog with a six-methylene spacer between the
10 guanidine head groups and the backbone (*N*-hxg9) exhibited remarkably higher cellular uptake than the corresponding *d*-arginine oligomer (r9). The relative order of uptake was *N*-hxg9 (6 methylene) > *N*-btg9 (4 methylene) > r9 (3 methylene) > *N*-arg9 (3 methylene) > *N*-etg9 (2 methylene) (Figure 27). Of note, the *N*-hxg peptoids showed remarkably high
15 cellular uptake, even greater than the corresponding *d*-arginine oligomers. The cellular uptake of the corresponding heptamers and pentamers also showed the same relative trend. The longer side chains embodied in the *N*-hxg peptoids improved the cellular uptake to such an extent that the amount of internalization was comparable to the corresponding *d*-arginine oligomer containing one more guanidine residue (Figure 28). For example, the *N*-hxg7
20 peptoid showed comparable cellular uptake to r8.

To address whether the increase in cellular uptake was due to the increased length of the side chains or due to their hydrophobic nature, a set of peptoids was synthesized containing cyclohexyl side chains. These are referred to as the *N*-chg5,7,9
25 peptoids. These contain the same number of side chain carbons as the *N*-hxg peptoids but possess different degrees of freedom. Interestingly, the *N*-chg peptoid showed much lower cellular uptake activity than all of the previously assayed peptoids, including the *N*-etg peptoids (Figure 29). Therefore, the conformational flexibility and sterically unencumbered nature of the straight chain alkyl spacing groups is important for efficient cellular uptake.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

DISCUSSION

The nona-peptide, Tat₄₉₋₅₇, has been previously shown to efficiently translocate through plasma membranes. The goal of this research was to determine the structural basis for this effect and use this information to develop simpler and more effective molecular transporters. Toward this end, truncated and alanine substituted derivatives of Tat₄₉₋₅₇ conjugated to a fluorescein label was prepared. These derivatives exhibited greatly diminished cellular uptake compared to Tat₄₉₋₅₇, indicating that all of the cationic residues of Tat₄₉₋₅₇ are required for efficient cellular uptake. When compared with our previous studies on short oligomers of cationic oligomers, these findings suggested that an oligomer of arginine might be superior to Tat₄₉₋₅₇ and certainly more easily and cost effectively prepared. Comparison of short arginine oligomers with Tat₄₉₋₅₇ showed that members of the former were indeed more efficiently taken into cells. This was further quantified for the first time by Michaelis-Menton kinetics analysis which showed that the R9 and r9 oligomers had Km values 30-fold and 100-fold greater than that found for Tat₄₉₋₅₇.

Given the importance of the guanidino head group and the apparent insensitivity of the oligomer chirality revealed in our peptide studies, we designed and synthesized a novel series of polyguanidine peptoids. The peptoids *N*-arg_{5,7,9}, incorporating the arginine side chain, exhibited comparable cellular uptake to the corresponding *D*-arginine peptides r_{5,7,9}, indicating that the hydrogen bonding along the peptide backbone and backbone chirality are not essential for cellular uptake. This observation is consistent with molecular models of these peptoids, arginine oligomers, and Tat₄₉₋₅₇, all of which have a deeply embedded backbone and a guanidinium dominated surface. Molecular models further reveal that these structural characteristics are retained in varying degree in oligomers with different alkyl spacers between the peptoid backbone and guanidino head groups. Accordingly, a series of peptoids incorporating 2- (*N*-etg), 4- (*N*-btg), and 6-atom (*N*-hxxg) spacers between the backbone and side chain were prepared and compared for cellular uptake with the *N*-arg peptoids (3-atom spacers) and *D*-arginine oligomers. The length of the side chains had a dramatic affect on cellular entry. The amount of cellular uptake was proportional to the length of the side chain with *N*-hxxg > *N*-btg > *N*-arg > *N*-etg. Cellular uptake was improved when the number of alkyl spacer units between the guanidine head group and the backbone was increased. Significantly, *N*-hxxg₉ was

WO 02/069930

PCT/US02/05829

superior to r9, the latter being 100-fold better than Tat₄₉₋₅₇. This result led us to prepare peptoid derivatives containing longer octyl spacers (*N*-ocg) between the guanidino groups and the backbone. Issues related to solubility prevented us from testing these compounds.

Because both perguanidinylated peptides and perguanidinylated peptoids efficiently enter cells, the guanidine head group (independent of backbone) is apparently the critical structural determinant of cellular uptake. However, the presence of several (over six) guanidine moieties on a molecular scaffold is not sufficient for active transport into cells as the *N*-chg peptoids did not efficiently translocate into cells. Thus, in addition to the importance of the guanidine head group, there are structure/conformational requirements that are significant for cellular uptake.

In summary, this investigation identified a series of structural characteristics including sequence length, amino acid composition, and chirality that influence the ability of Tat₄₉₋₅₇ to enter cells. These characteristics provided the blueprint for the design of a series of novel peptoids, of which 17 members were synthesized and assayed for cellular uptake. Significantly, the N-hxg9 transporter was found to be superior in cell uptake to r9 which was comparable to N-btg9. Hence, these peptoid transporters proved to be substantially better than Tat₄₉₋₅₇. This research established that the peptide backbone and hydrogen bonding along that backbone are not required for cellular uptake, that the guanidino head group is superior to other cationic subunits, and most significantly, that an extension of the alkyl chain between the backbone and the head group provides superior transporters. In addition to better uptake performance, these novel peptoids offer several advantages over Tat₄₉₋₅₇ including cost-effectiveness, ease of synthesis of analogs, and protease stability. These features along with their significant water solubility (>100 mg/mL) indicate that these novel peptoids could serve as effective transporters for the molecular delivery of drugs, drug candidates, and other agents into cells.

Example 16

Synthesis of Itraconazole-Transporter Conjugate

This Example provides one application of a general strategy for attaching a delivery-enhancing transporter to a compound that includes a triazole structure. The scheme, using attachment of itraconazole to an arginine (r7) delivery-enhancing transporter as an

WO 02/069930

PCT/US02/05829

example, is shown in Figure 30. In the scheme, R is H or alkyl, n is 1 or 2, and X is a halogen.

The reaction involves making use of quaternization of a nitrogen in the triazole ring to attach an acyl group that has a halogen (*e.g.*, Br, Fl, I) or a methyl ester.

- 5 Compound 3 was isolated by HPLC. Proton NMR in D₂O revealed itraconazole and transporter peaks.

- The methyl ester provided yields of 70% and greater, while yields obtained using the Br-propionic acid/ester pair were 40-50%. The acyl derivative is then reacted with the amine of the delivery-enhancing transporter to form the conjugate. Alternatively, the halogenated acyl group can first be attached to the transporter molecule through an amide linkage, after which the reaction with the drug compound is conducted.

Example 17

Preparation of FK506 Conjugates

- This Example describes the preparation of conjugates in which FK506 is attached to a delivery-enhancing transporter. Two different linkers were used, each of which released FK506 at physiological pH (pH 5.5 to 7.5), but had longer half-lives at more acidic pH. These schemes are diagrammed in Figures 31A and B.

Linker 1: 6-maleimidocaproic hydrazide trifluoroacetate (Scheme I and II)

- A solution of FK506 (1) (0.1g, 124.4 μmol), 6-maleimidocaproic hydrazide trifluoroacetate (2) (0.126g, 373.2 μmol) and trifluoroacetic acid (catalytic, 1 μL) in anhydrous methanol (5mL) was stirred at room temperature for 36 h. The reaction was monitored by thin layer chromatography that showed almost complete disappearance of the starting material. [TLC solvent system – dichloromethane (95): methanol (5), R_f = 0.3]. The reaction mixture was concentrated to dryness and dissolved in ethyl acetate (20mL). The organic layer was washed with water and 10% sodium bicarbonate solution and then dried over sodium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography using dichloromethane (96): methanol (4) as eluent to give the hydrazone 3 (0.116g, 92%).

- A solution of the above hydrazone (3) (0.025g, 24.7 μmol), transporter (1x, Bacar₇CCONH₂.9TFA, Bacar₇CCONH₂.7TFA, BacaCCONH₂, NH₂r₇CCONH₂.8TFA,

WO 02/069930

PCT/US02/05829

NH₂R₇CCONH₂.8TFA) and diisopropylethylamine (1x) in anhydrous dimethylformamide (1mL) were stirred under nitrogen at room temperature for 36h when TLC indicated the complete disappearance of the starting hydrazone. Solvent was evaporated from the reaction mixture and the residue purified by reverse phase HPLC using trifluoroacetic acid buffered water and acetonitrile.

Yields of conjugates with various transporters:

Conjugate with Bacar₇CCONH₂.9TFA (4) – 73%

Bacar₇CCONH₂.7TFA (5) – 50%

BacaCCONH₂ (6) – 52.9%

10 NH₂R₇CCONH₂.8TFA (7) – 43.8%

NH₂R₇CCONH₂.8TFA (8) – 62.8%

Structures of all the products were confirmed by ¹H-NMR spectra and TOF MS analysis.

Linker 2: 2-(2-pyridinyldithio) ethyl hydrazine carboxylate (Scheme III and IV)

15 A solution of FK506 (1) (0.1g, 124.4μmol), 2-(2-pyridinyldithio) ethyl hydrazine carboxylate (9) (0.091g, 373.2μmol) and trifluoroacetic acid (catalytic, 1μL) in anhydrous methanol (5mL) was stirred at room temperature for 16 h. The reaction was monitored by thin layer chromatography that showed almost complete disappearance of the starting material. [TLC solvent system – ethyl acetate R_f = 0.5]. The reaction mixture was

20 concentrated to dryness and dissolved in ethyl acetate (20mL). The organic layer was washed with water and 10% sodium bicarbonate solution and then dried over sodium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography using dichloromethane (97): methanol (3) as eluent to give the hydrazone 10 (0.091g, 71%)

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Example 18**Differential uptake of transporters in the gastrointestinal tract****Methods***Gastrointestinal absorption protocol*

- 5 Experiments were performed on 8- to 10-week-old female Swiss Webster mice purchased from Taconic (Germantown, NY). Mice were anesthetized with Nembutal and a midline incision was made along the abdomen. Intestines were measured, tied off at both ends of the desired section with sutures, and biotinylated peptides were injected into the lumen (approximately 100 μ l/inch). After a fifteen minute incubation, the tissue was removed
10 and the lumen was gently washed with PBS.

- To determine whether CellGate transporters could enter the squamous epithelia of the oral cavity, mice were anesthetized with Nembutal, their heads tipped to one side and solutions of the biotinylated peptides were placed in their mouths. After fifteen
15 minutes the liquid was removed by pipette.

Preparation of histological sections of regions of the gastrointestinal tract

- Immediately following incubation with biotinylated peptides, the anesthetized rodents were sacrificed by cervical dislocation and the tied off sections of the GI tract were removed. The lumens of the various sections were filled with OCT using a plastic tipped
20 syringe, immersed in OCT filled boats, and snap frozen in a 2-methyl-butane/dry ice solution. Frozen sections were allowed to warm slightly and 2 mm thick sagittal cuts were made using a steel razor blade. The cuts were placed into OCT molds and snap frozen in a 2-methyl-butane/dry ice solution. Sections (5 μ m) were cut on the cryostat, fixed in acetone at 4°C for 10 minute, and allowed to air dry. After rehydration in PBS for 5 minutes,
25 sections were blocked with normal horse serum, washed, incubated with streptavidin-FITC (20 μ g/ml) for 30 minutes, washed, and mounted with mounting medium containing propidium iodide (PI).

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Tissue culture

Caco-2 cells were acquired from ATCC, thawed, and grown in DMEM containing penicillin, streptomycin, glutamine, and 10% fetal bovine serum for 3-5 days to confluency ($>250,000$ cells/cm²) and then passaged at 60,000 cells/cm² for several passage cycles. Passage numbers 25-29 were plated on Snapwell 12mm diameter 0.4-micron pore size polycarbonate membranes (Corning Costar, Corning, N.Y.) at 60,000 cells per membrane and allowed to grow for at least 21 days, with media changed every other day.

Cellular uptake in Caco-2 cells

To analyze the penetration of fluorescent oligomers of D-arginine into the cells when in suspension, the monolayers were treated with trypsin (4.5 ml of a 0.05% solution Gibco, Grand Rapids, MI) and the individual cell suspension was spun down. Cells were resuspended, counted and treated with varying concentrations of Fl aca r5, Fl aca r7, Fl aca r9 and Fl aca k9 (from 50- 0.8 μ M) for five minutes, washed, resuspended in 400 λ PBS, 2%FBS, 40ngPI/ml and analyzed by flow cytometry.

To analyze the ability of the fluorescent peptides to enter Caco-2 cells when part of a monolayer, the cells were seeded in lab-tek flaskette microscope slides (Nalge Nunc Int., Naperville, IL) in 4 ml at a density of 60,000 cells/ml and grown for 21 days with the media being changed every other day. Once the monolayer was established, it was incubated with 100 μ M Fl aca r9 CONH₂ for a five minutes. The monolayer was subsequently washed with PBS/2% FBS twice to remove labeled peptide and analyzed using fluorescent microscopy.

Transport across monolayers of Caco-2 cells

The experiments analyzing whether short oligomers of D-arginine could cross monolayers of Caco-2 cells were performed using a voltage clamp amplifier and Easymount side-by-side horizontal diffusion chamber (Physiologic Instruments, San Diego, CA) with a 95% oxygen 5% carbon dioxide gas lift system connected to a recirculating water bath.

Current measurements (I_2-I_1) were taken at five minute intervals, including 10 minutes prior to the addition of the test compounds to insure monolayers were intact. At zero time test compounds were added at the proper concentrations and measurements recorded. Measurements were taken for 60 minutes at 5 minute intervals; transepithelia

WO 02/069930

PCT/US02/05829

electrical resistance (TEER) and short circuit current (Isc) were subsequently calculated from these values.

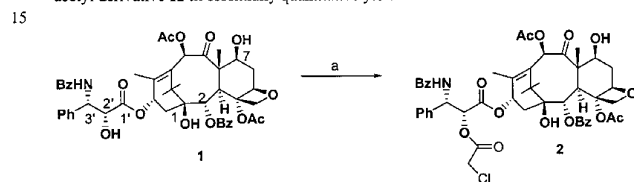
Synthetic chemistry

5 Cyclosporin A

The details of the CsA conjugate used in this study have been described previously (Rothbard *et al. Nature Medicine* 6, 1253 2000). See also, Figure 6. Briefly, CsA was conjugated to a heptamer of D-arginine through a pH sensitive linker as shown in Figure 6A. The resultant conjugate is stable at acidic pH but at pH>7 it undergoes an intramolecular cyclization involving addition of the free amine to the carbonyl adjacent to CsA (Figure 6B), which results in the release of unmodified CsA.

Taxol

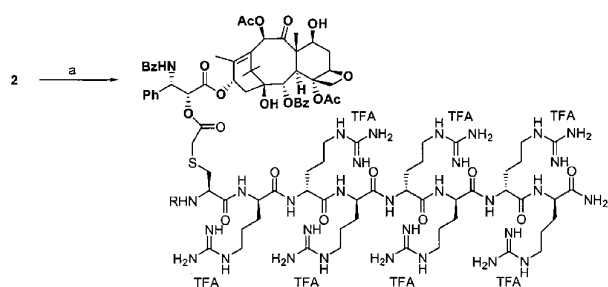
Taxol was treated with α -chloro acetic anhydride delivering the C-2' chloro acetyl derivative **12** in essentially quantitative yield.



a) Cl-Ac₂O, DIEA, CH₂Cl₂, rt, 3h

WO 02/069930

PCT/US02/05829



a) peptide, DIEA, DMF, rt
 13, R = H 48%
 14, R = Ac 87%

- The halogen was displaced by the thiol of the N-terminal (*L*) cysteine containing heptamer of D-arginine. Conjugations were performed at room temperature in DMF in the presence of DIEA. The final products were isolated by RP-HPLC and lyophilized to yield TFA salts, which were very hygroscopic and readily dissolve in water.
- Compound 13 was designed to release taxol via a nucleophilic attack of the N-terminal nitrogen onto the C2' ester carbonyl. The protonation state of this nitrogen is crucial for this mechanism, since only the free amine will be capable of this release.
- Additionally, both conjugates share a common α -hetero atom substituted acetate moiety making them susceptible to simple ester hydrolysis. This offers an additional release pathway.

Intracolonic injections

- Wistar rats, females of approximately 200-300g (Simonsen, Gilroy, CA), were anesthetized, their abdomens were shaved, midline incisions were made, and a one-half inch section of the ascending colon in each animal was tied off with sutures. Taxol and cyclosporin (5mg/kg) were injected as solutions in a 1:1 v/v Cremophor EL:ethanol mixture, whereas equivalent molar amounts of the r7 conjugates were injected in PBS. In all cases,

WO 02/069930

PCT/US02/05829

the volume injected was approximately 500 μ l. The colon was placed back into the cavity, and the incision was closed using sutures.

Blood samples were taken from the tail vein at time zero (prior to drug injection), and every thirty minutes for the duration of the experiment, which was empirically determined, with the exception of one animal that expired after ninety minutes. Clotting was inhibited by transferring the blood to glass tubes containing 100 μ l of 0.5% EDTA, and the blood was frozen.

Drug extraction from whole blood and HPLC MS MS analysis

10 Either taxol or cyclosporin was extracted from the whole blood using a modification of literature procedures. Briefly, whole blood (100 μ l) was transferred to a screw capped glass tube containing five mls of diethyl ether. The sample was vortexed vigorously for two minutes, centrifuged, and frozen in dry ice/methanol. The ethereal layer was transferred to another glass tube and the ether was evaporated. In the case of
15 cyclosporin, the residue was resuspended in 1.5 mls of methanol, water, acetonitrile (3:2:1), while for taxol the residue was resuspended in 1.5 mls methanol:acetonitrile (1:1). Samples were placed into a Perkin-Elmer series 200 autosampler and sequentially injected onto a C18 reverse column at 70°C connected to a Shimadzu HPLC system, eluted with 70% methanol, 30% aqueous ammonium formate buffer, and the effluent was analyzed on a PE
20 Sciex API 3000 tandem mass spectrometer. Known amounts of either cyclosporin A (10-1000 ng/ml) or taxol (1-1000 ng/ml) were added to whole blood and extracted as previously described to generate standard curves. Cyclosporin A was monitored by the two transitions from both 1220 to 1203 daltons and 1220 to 100 daltons. The 1220 species corresponds to the cyclosporin A + ammonia, the 1203 is protonated cyclosporin, while 100 is a known
25 fragment. Taxol was monitored by the two transitions from both 872 to 855 daltons and 872 to 110 daltons. The 872 species corresponds to the ammonium adduct of taxol, the 855 is the protonated parent compound, whereas 110 is the predominant fragment seen in the second quadrupole.

30 The total amount of cyclosporin A and taxol in the samples was determined by comparing the integrated area of the appropriate peak with values established by the standard curves.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Results

Differential uptake of transporters in the gastrointestinal tract

Short oligomers of D-arginine have been shown to cross rapidly and efficiently the plasma membrane of a large variety of cell lines grown in suspension. In addition, they have been shown to penetrate multiple layers of the skin when applied topically, multiple layers of endothelial and smooth muscle cells of veins and arteries when injected intravenously, and multiple cell layers of lung tissue when inhaled. To determine whether these compounds could enter the nonkeratinized epithelia of the gastrointestinal tract, sections of the small and large intestines of fasted mice were tied off and solutions of biotinylated nonamers of D-arginine, bio aca r9 CONH₂, (100μM) were injected. After fifteen minutes of exposure, the relevant section of tissue was dissected, frozen, sectioned, and stained with Streptavidin fluorescein to define the location of the biotinylated peptide, and propidium iodide to counterstain all the nuclei in the section.

When injected into the lumen of murine duodenum no detectable staining over background was observed. Poor staining also was seen when the biotinylated peptide was injected into the jejunum. If multiple sections were scanned detectable staining was seen on the tips of some villi. The first sign of uniform staining was observed when sections of the ileum were analyzed. The staining was localized to the tips of the microvilli and did not extend into the crypt cells. Although seen throughout all sections of the ileum, the observed fluorescence did not approach the level of intensity previously observed in the skin, lungs, or the endothelial cells of arteries or veins.

The relatively poor staining of the small intestine markedly differed from that seen when regions of the colon were examined. In both the ascending and transverse sections of the large intestine, biotinylated nonamers of arginine stained all surface areas of the villi, and penetrated several cell layers, reminiscent of the intense staining of the epidermis and dermis when applied topically. In addition, the crypt cells were heavily stained in the colonic sections and evidence for penetration of the full thickness of the section was observed in several areas.

The histological analysis demonstrated that the uptake of bio r9 into the nonkeratinized epithelia layers of the GI tract varied significantly, with uptake increasing with distance from the gastric pylorus. The staining observed in the ileum was greater than

WO 02/069930

PCT/US02/05829

that seen in the jejunum, which was greater than the duodenum. The greatest staining was seen in the ascending and transverse regions of the colon. Without intending to limit the invention to a particular theory or mechanism, one theory is that the composition and amount of mucus lining the epithelia might be an important factor in the differential staining.

5

Cellular uptake into Caco-2 cells

When Caco-2 cells, commercially-available human colon cells, were incubated in suspension with varying amounts of fluorescently labeled pentamers, heptamers, and nonamers of D-arginine (Fl aca r5, Fl aca r7, Fl aca r9) or nonamers of lysine (Fl aca k7), and analyzed by flow cytometry, a pattern similar to that previously seen in a variety of other suspension cells (Mitchell *et al. Peptide Research* 56, 318 (2000)) was observed (Figure 32). Uptake of the fluorescent peptides increased with arginine content with r9 being more effective than r7, which was more effective than r5. All the polymers of arginine entered cells more effectively than the nonamers of lysine. Both the rate, the relative amount of fluorescence, and the lack of apparent efflux of the internalized fluorescent peptides over an extended period of time (several hours) were reminiscent of earlier experiments with lymphocytes.

To confirm that the rapid penetration of the short oligomers of arginine into Caco-2 cells was not an artifact seen only when the cells were in suspension, Fl aca r9 CONH₂ (50 μ M) was incubated for five minutes with Caco-2 cells grown as a monolayer on a microscope slide, washed, and analyzed by fluorescent microscopy. Consistent with the flow cytometry analysis of the suspension cells, virtually every cell in the monolayer was fluorescent after five minutes.

The ability of the peptides to rapidly enter Caco-2 cells was firmly established by placing a monolayer of Caco-2 cells as a membrane in a diffusion chamber and exposing it to fluorescent transporter drug conjugates between taxol and oligomers of arginine of different length. Varying concentrations of the taxol conjugates (50-0.08 μ M) were added to the apical side and exposed to the monolayer of Caco-2 cells for three minutes. The membrane was removed from the apparatus, the cells trypsinized, and the resulting cell suspension was analyzed by flow cytometry (Figure 33). As with the peptides

WO 02/069930

PCT/US02/05829

alone, the drug conjugates quickly and efficiently entered the cells composing the monolayer with those containing more arginine subunits being more effective.

Without intending to limit the theory of the invention, these experiments provide strong support for the hypothesis that short oligomers of arginine, either conjugated to fluorescein or therapeutic drugs, such as taxol, rapidly enter Caco-2 cells both in suspension and when grown in monolayers.

Transport across Caco-2 monolayers

Crossing the luminal membrane of the gut epithelia is necessary to increase blood levels of a delivered (e.g., buccal administered) drug. To determine whether the transporters could cross the gut epithelia, monolayers of Caco-2 cells were grown in culture and placed as a membrane in a commercially available diffusion chamber. The integrity of the membranes was established by demonstrating that the transepithelial electronic resistance (TEER) was always greater than 100 ohm cm² (Figure 34). Such a pattern of stable resistance only is observed when the membrane is intact with no significant spaces between the cells.

Additional evidence that the membrane was both viable and contiguous was that Lucifer Yellow (200μM) was not transported across the monolayer, whereas hydrocortisone was transported at amounts consistent with published reports (Figure 35).

When a variety of fluorescent oligomers of D- or L-arginine, ranging from four to 15 subunits, were placed in the apical chamber in multiple experiments with a large number of membranes, *none* were significantly transported into the basolateral chamber (Figure 35).

Taken together, the data presented herein are consistent with the model that short oligomers of arginine either conjugated to delivered compounds such as fluorescein or taxol rapidly enter but are not transported across Caco-2 cell monolayers. This model also implies that the transporters of the invention do not enter Caco-2 cells by endosomes, which are transported across colonic epithelium and excreted on the basolateral side by a well understood pathway. CellGate transporters appear to enter the cytosol directly and do not have a high rate of efflux on the basolateral side.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Measurement of drug blood levels after intracolonic injections

Although short oligomers of arginine labeled with fluorescein, either alone, or when conjugated to either taxol or cyclosporin, were unable to cross a monolayer of Caco-2 cells *in vitro*, the cell line may not precisely mimic the *in vivo* behavior of the colon.

- 5 Furthermore, the pattern of fluorescence seen in colon tissue after incubation with short oligomers of arginine demonstrated that the peptides penetrated into layers known to be vascularized.

- 10 To determine whether the transporters of the invention could enhance the delivery of orally administered drugs, releasable conjugates of cyclosporin A and taxol were injected intracolonic and the resulting blood levels of the released drugs were measured by LC MS MS.

- The first experiment was designed to measure blood levels of CsA after intracolonic injection of 5 mg/kg of CsA in Cremophor EL:ethanol compared with an equimolar amount of a releasable r7 conjugate of CsA dissolved in phosphate buffered saline. In the case of the parent drug, blood levels rose to approximately 25 ng/ml of CsA after thirty minutes, and then rapidly fell off to levels close to baseline levels (Figure 36). No further data was obtained because after 90 minutes the animal died. In contrast, when an equimolar amount of CsA-r7 conjugate was injected, detectable levels of CsA in the blood were observed only after 3 hours (Figure 36). To determine whether the altered
- 20 pharmacokinetics of CsA when conjugated to a short oligomer of arginine was reproducible, a third rat was injected with 10 mg/kg equivalent of the water soluble, releasable conjugate. The rate of uptake of CsA in the blood of this animal resembled the animal injected with 5 mg/kg of the conjugate. With more conjugate administered a small increase was seen at 30 minutes, but larger amounts appeared in the blood only after two hours, with blood levels
- 25 approaching 45 ng/ml after three hours. The overall pattern was similar in the two animals injected with the conjugate. In both cases the overall amount of CsA measured in the circulation was significantly greater than observed when CsA was injected.

- The half-life of the CsA conjugate was approximately ninety minutes, which was consistent with the delay in the appearance of CsA in the blood relative to the parent
- 30 compound. This fact combined with the histological data demonstrating rapid and efficient uptake in the columnar epithelium of the colon and the failure of nonreleasable conjugates of

WO 02/069930

PCT/US02/05829

CsA or taxol to cross monolayers of colonic cells *in vitro*, leads to a sensible and simple model describing the phenomena. Without intending to limit the invention to a particular mechanism or theory, it appears that the conjugates enter the columnar epithelia of the colon with greater efficiency and more rapidly than CsA injected in Cremophor, but were retained
5 in the epithelial cells and did not cross the endothelial cells surrounding the capillaries until the conjugate hydrolyzed. Once released, the CsA freely diffused, or was actively transported, into the blood.

To test this hypothesis, taxol and two different r7-taxol conjugates were injected into the colon and blood levels of the drug were measured at thirty minute intervals.
10 The two r7-taxol conjugates had significantly different half-lives (10 minutes and 5 hours) and were used to test the hypothesis that the hydrolysis of the drug conjugate was the rate limiting step in appearance of the drug in the circulation. If true, the premise predicted that the r7-taxol conjugate with the ten minute half life would release taxol in the epithelia so that it could be detected in the circulation at the thirty minute time point. In contrast, taxol
15 should not be released from the more stable r7 conjugate ($t_{1/2} = 5$ hours) and should not be detected in the blood samples taken during the experiment.

This premise was supported by the appearance of taxol in the blood (Figure 37). Detectable levels of taxol did not appear in the blood when injected in the colon until 2.5 hours with subsequent waves at 4 and 5.5 hours. The oscillating levels of taxol in the
20 blood as a function of time were consistent with published studies with the pattern being rationalized to the ability of Cremophor to sequester some of the material and act as a timed release vehicle. In contrast, when a labile, water soluble r7 conjugate of taxol (13) was administered, greater than 200 ng/ml of taxol was observed at the earliest time point (30 minutes) which continued to increase up to 1 hour, at which point the levels slowly
25 diminished out to five hours. As predicted, injection of the more stable, water soluble r7 conjugate of taxol (14) did not result in significant blood levels of taxol within five hours. These data support the hypothesis that transporters of the invention enter, but do not transverse the colonic epithelium. They can improve oral bioavailability of drugs both by dramatically improving water solubility and by increasing the rate of uptake of the conjugate
30 in the colon. Ultimate delivery of the drug into the blood stream appears to depend on the

WO 02/069930

PCT/US02/05829

drug's inherent ability to diffuse through biological membranes and the rate of release from the conjugate.

Discussion

5 A significant discovery in the experiments described herein is the failure of the peptides to enter the epithelia of the duodenum. This represents the first example of the transporters not entering a cell type or tissue. The pattern of increasing uptake the further the tissue extended from the gastric pylorus was intriguing, most likely due to a gradient of an inhibitor, such as a negatively charged mucus. The failure to stain the upper regions of
10 the small intestine was in stark contrast with the intense staining in the colon, leading to the speculation that transporters of the present invention could be used for selective delivery of therapeutics to the colon. Not only were all luminal surfaces of the colon highly fluorescent, but the staining pattern also revealed that the biotinylated compounds were able to penetrate multiple cell layers and reach vascularized regions of the tissue, suggesting that the
15 transporters should enhance transport into the bloodstream.

However, separate studies using monolayers of the colonic cell line, Caco-2, suggests an alternative mechanism. In the Caco-2 system the transporters rapidly entered, but did not traverse the monolayer. There are several examples of the transporters exhibiting high rates of transport into, but limited rates of efflux from cells and tissue. This is the case
20 for all suspension cell lines examined to date, the best studied being the human T cell line, Jurkat. Short oligomers of D-arginine rapidly enter these cells and exhibit very low exit rates, losing less than 5% of the fluorescent signal after one hour of incubation at 37°C. An even more relevant example of this phenomenon is the low levels of CsA measured in the blood stream of mice receiving multiple topical treatments of a releasable CsA r7 conjugate.
25 As in the case for the colon, staining patterns in sections of skin treated with a biotinylated analog of the CsA conjugate established that the drug penetrated into highly vascularized regions of the dermis. In addition, staining with monoclonal antibodies established that one of the prominent cell types in the dermis that were highly fluorescent were the endothelial cells of the capillaries. Nevertheless, detectable levels of CsA in the blood of these animals
30 were never observed even after ten days of treatment with a 4% ointment applied twice a

WO 02/069930

PCT/US02/05829

day. This observation, although anecdotal, is consistent with results better studied in this report.

The ability of the peptides to enter and subsequently exit multiple layers of cells in the skin, the lungs, and the cardiovascular system is in marked contrast to their inability to exit from lymphocytes or Caco-2 cells. Without intending to limit the present invention to a particular theory or mechanism, one difference is the cells through which the peptides rapidly penetrate are connected by tight junctions and other membrane structures inherent in tissue architecture, whereas the individual cells in suspension and perhaps the side of the membrane of endothelial cells contacting the bloodstream lack these features. If structures such as tight or gap junctions modify the surrounding lipid to permit exit of the transporters, then they should be able to diffuse rapidly throughout a tissue, such as skin or the colon, but not be transported into the bloodstream. Consistent with this hypothesis is the model constructed to explain the variations in the rates of appearance of taxol and CsA in the circulation in this report. In this model, the short oligomers of arginine greatly promoted uptake into columnar epithelium of the colon or the squamous epithelium of the cheek, but did not transport the drug into the bloodstream. The blood levels observed were the result of the diffusion, or active transport, of the drug out of the epithelium into the circulation after hydrolysis of the conjugate.

20

Example 18

Buccal Delivery of Transporter Conjugates

Buccal delivery of taxol and CsA involved adding a concentrated solution (250 μ l of 5mg/kg) to the oral cavity of an anesthetized rat lying on its side. Blood samples were taken from the tail vein at time zero (prior to drug injection), and every thirty minutes for the duration of the experiment, which was empirically determined. Clotting was inhibited by transferring the blood to glass tubes containing 100 μ l of 0.5% EDTA, and the blood was frozen.

The capacity of the transporters to enter the squamous epithelial layers of the oral cavity was examined. A mouse was anesthetized, its head was tipped so that a solution of biotinylated r9 could be administered. The animal was kept in this position for fifteen

WO 02/069930

PCT/US02/05829

minutes, at which time it was sacrificed, and the tongue and cheek were dissected, frozen, sectioned, stained with streptavidin-fluorescein, and counterstained with propidium iodide. In both the cheek and the tongue the biotinylated peptides quickly and efficiently penetrated multiple layers of the epithelia and penetrated deep into the interior layers of the tissue, reminiscent of the staining of both the epidermis and dermis of the skin.

In a second experiment, rats were anesthetized and solutions of both taxol and CsA (5 mg/kg) in Cremophor EL:ethanol 1:1 or equimolar amounts of the corresponding r7 conjugates of these drugs in PBS were simply incubated in the cheek pouch of the animal for the duration of the experiment. LC MS was used to determine the blood levels of only taxol and the fast releasing r7 conjugate. Both the amount and the kinetics of appearance of taxol in the blood when administered in the oral cavity (Figure 38) differed from when it was injected into the colon. Buccal administration of taxol conjugates appeared to be less effective, with less than one eighth of the amount of taxol being observed in the circulation compared with intracolonic injection. Another difference was the rate of appearance of the unmodified drug. When administered in the oral cavity, taxol appeared in the blood stream by the first time point, whereas in the colonic injection detectable amounts of taxol did not appear for several hours. Even though there was no difference between taxol and the r7-taxol conjugate in the appearance of taxol in the circulation in buccal administration, approximately twice as much material reached the circulation when the conjugated was used.

Example 19

This example illustrates the conjugation of cyclosporin to a transport moiety using a pH sensitive linking group (see Figures 6A and 9B).

In this example, cyclosporin is converted to its α -chloroacetate ester using chloroacetic anhydride to provide **6i** (see Figure 6). The ester **6i** is then treated with benzylamine to provide **6ii**. Reaction of the amine with Boc-protected iminodiacetic acid anhydride provides the acid **6iii** which is then converted to an activated ester (**6iv**) with N-hydroxy succinimide. Coupling of **6iv** with L-Arginine heptamer provides the BOC-protected conjugate **6v**, which can be converted to conjugate **6vi** by removal of the BOC protecting group according to established methods.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

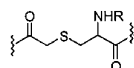
Transport moieties having arginine groups separated by, for example, glycine, ϵ -aminocaproic acid, or γ -aminobutyric acid can be used in place of the arginine heptamer in this and in the following examples that show oligoarginine transport groups.

Example 20

This example illustrates the conjugation of acyclovir to a transport moiety.

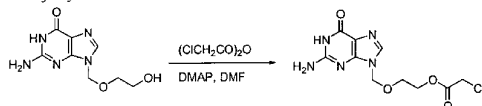
a. Conjugation of acyclovir to $r_7\text{CONH}_2$

This example illustrates the conjugation of acyclovir to $r_7\text{CONH}_2$ via the linking group:



R = H or Ac

i) Preparation of acyclovir α -chloroester:

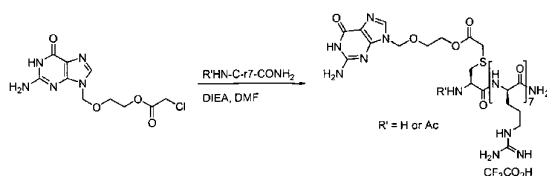


A solution of acyclovir (100 mg, 0.44 mmol), dimethylaminopyridine (5.4 mg, 0.044 mmol) and chloroacetic anhydride (226 mg, 1.32 mmol) in dimethylformamide (9 mL) was stirred at room temperature for 18 h. The dimethylformamide was removed by evaporation. The crude product was purified by reverse-phase HPLC (22 mm x 250 mm C-18 column, a 5-25% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ gradient with 0.1% trifluoroacetic acid, 214 and 254 nm UV detection) and lyophilized. The product was obtained as a white powder (62 mg, 47%). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.67 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.21 (t, $J = 3$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J = 3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.1, 157.6, 154.8, 152.3, 138.6, 117.1, 72.7, 67.1, 65.2, 41.8; TOF-MS (m/z): 302.0 [$\text{M} + \text{H}$].

ii) Conjugation of acyclovir α -chloro ester to $\text{H}_2\text{N-C-r7-CONH}_2$

WO 02/069930

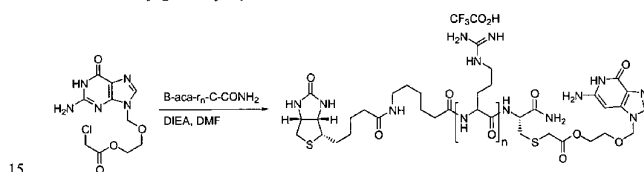
PCT/US02/05829



A solution of acyclovir α -chloroester (7 mg, 0.024 mmol), $\text{H}_2\text{N-C-r7-CONH}_2$ (50 mg, 0.024 mmol) and diisopropylethylamine (6.4 μL , 0.036 mmol) in dimethylformamide (1 mL) was stirred for 18 h. The dimethylformamide was removed by evaporation. The crude product was purified by reverse-phase HPLC (22 mm x 250 mm C-18 column, a 5-25% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ gradient with 0.1% trifluoroacetic acid, 214 and 254 nm UV detection) and lyophilized. The desired product was obtained as a white powder (24 mg, 69%). TOF-MS (m/z): 494.6 [(M + H)/3], 371.0 [(M + H)/4].

The yield could be increased by using 10 molar equivalents of diisopropylethylamine rather than 1.5 molar equivalents. Product was again obtained as a white powder (79%). TOF-MS (m/z): 508.7 [(M + H)/3], 381.5 [(M + H)/4], 305.5 [(M + H)/5].

b. Conjugation of acyclovir to a biotin-containing derivative of r5-Cys-CONH₂



Reactions were carried out as illustrated above, using the synthetic techniques provided in the examples above.

i) Biotin-aminocaproic acid-r5-Cys(acyclovir)-CONH₂ was obtained as a white powder (36%). TOF-MS (m/z): 868.2 [(M + 2 TFA)/2], 811.2 [(M + 1 TFA)/2], 754.1 [(M + 1 TFA)/3], 503.0 [(M + H)/3], 377.4 [(M + H)/4].

Similarly,

WO 02/069930

PCT/US02/05829

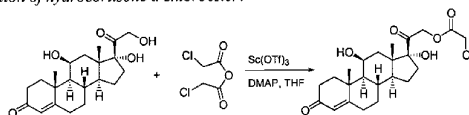
ii) Biotin-aminocaproic acid- γ -7-C(acyclovir)-CONH₂ was obtained as a white powder (33%). TOF-MS (m/z): 722.1 [(M + 3 TFA)/3], 684.6 [(M + 2 TFA)/3], 607.1 [(M + H)/3], 455.5 [(M + H)/4], 364.8 [(M + H)/5], 304.3 [(M + H)/6].

5

Example 21

This example illustrates the conjugation of hydrocortisone to a transport moiety.

10

*a. Conjugation of hydrocortisone to γ -CONH₂**i) Preparation of hydrocortisone α -chloroester:*

15

To a solution of hydrocortisone (500 mg, 1.38 mmol), scandium triflate (408 mg, 0.83 mmol) and chloroacetic anhydride (708 mg, 4.14 mmol) in dry THF was added dimethylaminopyridine (506 mg, 4.14 mmol). The solution turned bright yellow upon addition of dimethylaminopyridine. After 30 min the solvent was evaporated off and the crude material taken up into ethyl acetate (100 mL). The ethyl acetate layer was washed with 1.0 N HCl and brine. The organic phase was collected, dried (Na₂SO₄) and evaporated to provide the product as a white solid (533 mg, 88%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.56 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 5.20 (d, J = 18 Hz, 1H), 4.85 (d, J = 18 Hz, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.37 (br s, 1H), 4.27 (br s, 1H), 2.54 – 2.33 (m, 2H), 2.22 – 2.03 (m, 3H), 1.99 – 1.61 (m, 8H), 1.52 – 1.24 (m, 5 H), 1.02 – 0.98 (d, J = 12 Hz, 1H), 0.88 – 0.85 (d, J = 9 Hz, 1H), 0.77 (s, 3 H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 205.4, 198.8, 173.0, 167.6, 122.3, 89.5, 69.7, 67.3, 56.4, 52.4, 47.8, 41.6, 39.7, 35.0, 34.3, 34.0, 33.6, 32.3, 32.0, 24.2, 21.3, 17.4; TOF-MS (m/z): 439.1 (M + H).

25

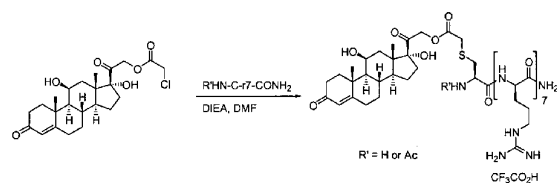
(Reference for acetylation- Zhao, H.; Pendri, A.; Greenwald, R.B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7559-7562.)

30

ii) Coupling to R'NH-Cys- γ -CONH₂

WO 02/069930

PCT/US02/05829



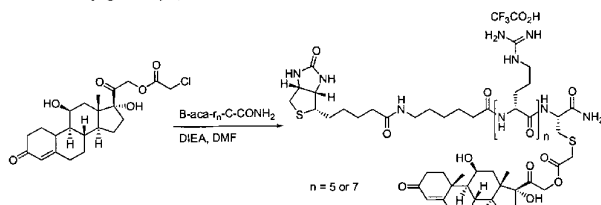
A solution of hydrocortisone α -chloroester (31 mg, 0.071 mmol), $H_2N-C-r7-CONH_2$ (150 mg, 0.071 mmol) and diisopropylethylamine (15 μ L, 0.085 mmol) in dimethylformamide (1 mL) was stirred for 18 h. The dimethylformamide was evaporated off. The crude product purified by reverse-phase HPLC (22 mm x 250 mm C-18 column, a 5-30% CH_3CN/H_2O gradient with 0.1% trifluoroacetic acid, 214 and 254 nm UV detection) and lyophilized. The desired product was obtained as a white powder (25 mg, 14%). TOF-MS (m/z): 1037.4 [(M + 4 TFA)/2], 616.1 [(M + 2 TFA)/3], 578.3 [(M + 1 TFA)/3], 540.5 [(M + H)/3], 405.7 [(M + H)/4], 324.5 [(M + H)/5].

The use of 10 molar equivalents of diisopropylethylamine rather than 1.2 molar equivalents provided the desired product as a yellow powder (52% yield). TOF-MS (m/z): 887.0 [(M + 1TFA)/2], 830.6 [(M + H)/2], 553.7 [(M + H)/3], 415.5 [(M + H)/4].

WO 02/069930

PCT/US02/05829

b. Conjugation of hydrocortisone to a biotin-containing derivative of r₅-Cys-CONH₂



Reactions were carried out as illustrated above, using the synthetic techniques

5 provided in the examples above.

i) Biotin-aminocaproic acid-r₅-C(hydrocortisone)-CONH₂: Used 10 molar equivalents of diisopropylethylamine rather than 1.2 molar equivalents. Product a white powder (65%). TOF-MS (*m/z*): 880.7 [(M + 1 TFA)/2], 548.7 [(M + H)/3].

10 *ii) Biotin-aminocaproic acid-r₇-C(hydrocortisone)-CONH₂*: Used 10 molar equivalents of diisopropylethylamine rather than 1.2 molar equivalents. Product a white powder (36%). TOF-MS (*m/z*): 692.3 [(M + 1 TFA)/3], 652.8 [(M + H)/3], 520.0 [(M + 1 TFA)/4], 490.0 [(M + H)/4], 392.5 [(M + H)/5].

15 **Example 22**

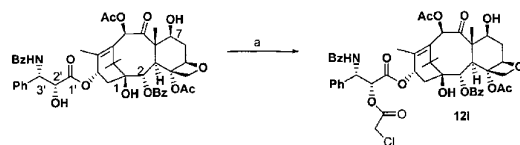
This example illustrates the conjugation of taxol to a transport moiety.

a. Conjugation of Taxol to r₇-CONH₂

20 This example illustrates the application of methodology outlined above to the preparation of a taxol conjugate (see Figure 12).

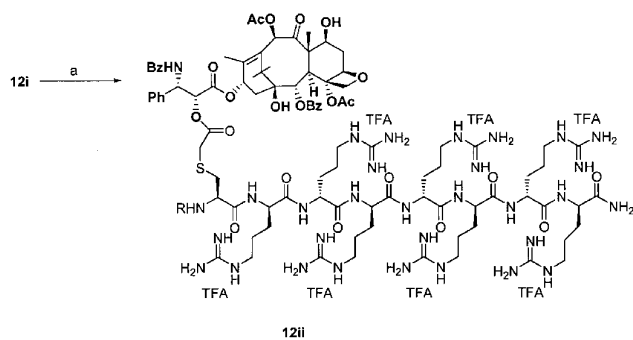
WO 02/069930

PCT/US02/05829

i) Preparation of a taxol α -chloroacetate estera) Cl-Ac₂O, DIEA, CH₂Cl₂, rt, 3h

- 5 Taxol was treated with α -chloro acetic anhydride providing the C-2' chloro acetyl derivative **12i** in essentially quantitative yield.

ii) Formation of taxol conjugate

**12ii**

a) peptide, DIEA, DMF, rt
 R = H 48%
 R = Ac 87%

10

The halogen atom of the chloroacetate ester was displaced by the thiol of an N-terminal (*L*) cysteine containing heptamer of arginine. To avoid degradation of the transporter entity by proteases *in-vivo*, D-arginine was used as the building unit.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Conjugation reactions were performed at room temperature in DMF in the presence of diisopropylethylamine. The final products were isolated by RP-HPLC and lyophilized to white powders. It is important to note that the native conjugate (R = H) is isolated as its TFA salt at the cysteine primary amine. The conjugates are generally quite hygroscopic and readily dissolve in water.

The conjugate wherein R = H was designed to release the parent drug via a nucleophilic attack of the N-terminal nitrogen onto the C2' ester carbonyl. The protonation state of this nitrogen is crucial for this mechanism, since only the free amine will be capable of this release. Additionally, both conjugates share a common α -hetero atom substituted acetate moiety making them susceptible to simple ester hydrolysis. This offers an additional release pathway.

Example 23

This example illustrates two methods of linking active agents to transport moieties. Illustration is provided for retinoic acid derivatives linked to poly-D-Arg derivatives but can be applied to linkages between other biological agents and the transport moieties of the present invention.

20 a. Linkage between a biological agent having an aldehyde functional group

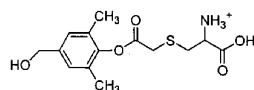
This example illustrates the preparation of a conjugate between a nonamer of D-arginine ($\text{H}_2\text{N}-\text{r}_9-\text{CO}_2\text{H}\cdot 10\text{TFA}$) and either all *trans*-retinal or 13-*cis*-retinal. Figure 40 provides a schematic presentation of the reactions. As seen in Figure 40, condensation of either retinal with $\text{H}_2\text{N}-\text{r}_9-\text{CO}_2\text{H}\cdot 10\text{TFA}$ in MeOH in the presence of 4Å molecular sieves at room temperature for four hours results in the formation of a Schiff base-type linkage between the retinal aldehyde and the amino terminal group. Purification of the conjugate can be accomplished by filtering the molecular sieves and removing methanol under reduced pressure.

30 b. Conjugation of Retinoic Acid to $\text{r}_7\text{-CONH}_2$

This example illustrates the preparation of a conjugate between retinoic acid and $\text{r}_7\text{-CONH}_2$ using the linking group

WO 02/069930

PCT/US02/05829



Here, preparation of the conjugate follows the scheme outlined in Figure 41.

In this scheme, retinoic acid (**41ii**) is first combined with the chloroacetate ester of 4-hydroxymethyl-2,6-dimethylphenol (**41i**) to provide the conjugate shown as **41iii**.

- 5 Combination of **41i** with retinoic acid in methylene chloride in the presence of dicyclohexylcarbodiimide and a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine provided the retinoid derivative **41iii** in 52-57% yield. Condensation of **41iii** with $\text{H}_2\text{NCys-}$
 $\text{r}_7\text{CONH}_2 \cdot 8\text{TFA}$ in the presence of diisopropylethylamine (DMF, room temperature, 2 h)
 10 provides the desired conjugated product **41iv**.

Example 24

This example illustrates a method of linking active agents such as acyclovir to transport moieties. See, Figure 42.

- 15 Acyclovir (1 eq) was dissolved in dry N, N-dimethylformamide under a nitrogen atmosphere. Chloroacetic anhydride (1 eq), pyridine (1 eq), and DMAP (0.25 eq) were added subsequently to the reaction with stirring. The reaction was permitted to stir at room temperature for an additional 4 hours. The reaction was halted by removal of the solvent under reduced pressure. The residue was dissolved in methylene chloride and
 20 washed with saturated aqueous ammonium chloride followed by saturated aqueous ammonium bicarbonate and brine. The organic layer was concentrated *in vacuo* and the residue purified by silica gel chromatography to provide the acyclovir chloroacetyl ester.

- The resultant chloroacetyl ester was dissolved in dry N, N-dimethylformamide under a nitrogen atmosphere. To the solution was added Hunig's base
 25 (1 eq) and AcHN-C-aca-R8-CONH₂·8 HCl with rapid stirring. The reaction was allowed to proceed until TLC analysis indicated that all of the starting material had been consumed (ca 2 hours). The reaction was halted by removal of the solvent under reduced pressure. The residue was purified by RP-HPLC to provide the desired acyclovir conjugate.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Example 25

This example illustrates a method of linking active agents such as acyclovir to transport moieties. See, Figure 43.

5 Disphosgene (0.5 eq) was dissolved in dry methylene chloride and cooled to –10°C. To the solution was added triethylamine (1 eq) as a solution in methylene chloride. The mixture was stirred for 15 minutes at which time acyclovir was added to the reaction as a solution in methylene chloride. The reaction was permitted to stir at room temperature for an additional 4 hours. The reaction was quenched with saturated aqueous ammonium
10 chloride followed by washes of saturated aqueous ammonium bicarbonate and brine. The organic layer was concentrated *in vacuo* and the residue purified by rapid filtration over silica gel to provide the acyclovir chloroformate.

The chloroformate was dissolved in dry methylene chloride under a nitrogen atmosphere. Mercaptoethanol (1 eq) was added to the reaction as a solution in dry
15 methylene chloride. The reaction was allowed to stir for 10 hours under a nitrogen atmosphere. The solution was concentrated under reduced pressure and placed under high vacuum for 24 hours to remove residual mercaptoethanol. The resultant mercaptoethyl carbonate was used without further purification.

The carbonate (1 eq) was dissolved in DMF/water. To the solution was added
20 the activated peptide NPYS-CR*-CONH₂* 8HCl (1 eq) with rapid stirring. A bright yellow color developed immediately and the reaction was allowed to stir at room temperature for an additional 5 hours. The reaction was purified directly by RP-HPLC to provide the desired acyclovir conjugate.

25 **Example 26**

This example illustrates a method of linking active agents such as corticoid steroids to transport moieties. See, Figure 44.

Prednisolone α -chloroester- To a solution of prednisolone (1.38 mmol),
30 scandium triflate (0.83 mmol) and chloroacetic anhydride (4.14 mmol) in dry THF was added dimethylaminopyridine (4.14 mmol). The solution turned bright yellow upon addition of dimethylaminopyridine. After 30 minutes the solvent was evaporated off and the crude material taken up into ethyl acetate (100 mL). The ethyl acetate layer was washed with 1.0

WO 02/069930

PCT/US02/05829

N HCl and brine. The organic phase was collected, dried (Na_2SO_4) and evaporated to provide the product as a white solid.

5 **$\text{H}_2\text{N-C(prednisolone)-r8-CONH}_2$** : A solution of prednisolone α -chloroester (1 equivalent), $\text{H}_2\text{N-C-r8-CONH}_2$ (1 equivalent) and diisopropylethylamine (1.2 equivalent) in dimethylformamide (1 mL) was stirred for 18 hours. The dimethylformamide was evaporated off. The crude product purified by reverse-phase HPLC (22 mm x 250 mm C-18 column, a 5-10% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ gradient with 0.1% trifluoroacetic acid, 214 and 254 nm UV detection) and lyophilized to provide the 9 TFA salt. The material was then subjected to ion
10 exchange chromatography to provide prednisolone conjugate (9 HCl salt) as a tan solid.

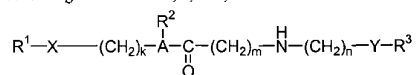
15 It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference for all purposes.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. A method of targeting a compound to a gastrointestinal epithelium of an
2 animal, the method comprising administering to the gastrointestinal epithelium a conjugate
3 comprising the compound and a delivery-enhancing transporter,
4 wherein:
5 i. the compound is attached to the delivery-enhancing transporter
6 through a linker; and
7 ii. the delivery-enhancing transporter comprises fewer than 50 subunits
8 and comprises at least 5 guanidino or amidino moieties, thereby increasing delivery of the
9 conjugate into the gastrointestinal epithelium compared to delivery of the compound in the
10 absence of the delivery-enhancing transporter.
- 1 2. The method of claim 1, wherein delivery of the conjugate into the
2 gastrointestinal epithelium is increased at least two-fold compared to delivery of the
3 compound in the absence of the delivery-enhancing transporter.
- 1 3. The method of claim 1, wherein delivery of the conjugate into the
2 gastrointestinal epithelium is increased at least ten-fold compared to delivery of the
3 compound in the absence of the delivery-enhancing transporter.
- 1 4. The method of claim 1, wherein the linker is a releasable linker.
- 1 5. The method of claim 1, wherein the subunits are amino acids.
- 1 6. The method of claim 1, wherein the conjugate has a structure selected
2 from the group consisting of structures 3, 4, or 5, as follows:

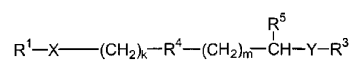


3

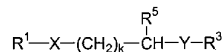
3

WO 02/069930

PCT/US02/05829

4
5

4



6

5

7

wherein:

8

 R^1 comprises the compound;

9

X is a linkage formed between a functional group on the biologically active compound and a terminal functional group on the linking moiety;

11

Y is a linkage formed from a functional group on the transport moiety and a functional group on the linking moiety;

12

A is N or CH;

13

 R^2 is hydrogen, alkyl, aryl, acyl, or allyl;

14

 R^3 comprises the delivery-enhancing transporter;

15

 R^4 is S, O, NR^6 or CR^7R^8 ;

16

 R^5 is H, OH, SH or NHR^6 ;

17

 R^6 is hydrogen, alkyl, aryl, acyl or allyl;

18

k and m are each independently selected from 1 and 2; and

19

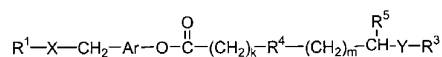
n is 1 to 10.

20

7. The method of claim 6, wherein X is selected from the group consisting of $-C(O)O-$, $-C(O)NH-$, $-OC(O)NH-$, $-S-S-$, $-C(S)O-$, $-C(S)NH-$, $-NHC(O)NH-$, $-SO_2NH-$, $-SONH-$, phosphate, phosphonate phosphinate, and CR^7R^8 , wherein R^7 and R^8 are each independently selected from the group consisting of H and alkyl.

PCT/US02/05829

1 12. The method of claim 1, wherein the conjugate comprises structure 6 as
2 follows:



16 R^7 and R^8 are independently selected from hydrogen or alkyl; and

WO 02/069930

PCT/US02/05829

17 k and m are each independently selected from 1 and 2.

1 13. The method of claim 12, wherein X is selected from the group
2 consisting of -C(O)O-, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, -S-S-, -C(S)O-, -C(S)NH-, -NHC(O)NH-,
3 -SO₂NH-, -SONH-, phosphate, phosphonate phosphinate, and CR⁷R⁸, wherein R⁷ and R⁸ are
4 each independently selected from the group consisting of H and alkyl.

1 14. The method of claim 12, wherein R⁴ is S; R⁵ is NHR⁶; and R⁶ is
2 hydrogen, methyl, allyl, butyl or phenyl.

1 15. The method of claim 1, wherein the conjugate comprises at least two
2 delivery-enhancing transporters.

1 16. The method of claim 1, wherein the conjugate is administered buccally.

1 17. The method of claim 1, wherein the conjugate is administered as a
2 suppository.

1 18. The method of claim 1, wherein the delivery-enhancing transporter
2 comprises a non-peptide backbone.

1 19. The method of claim 1, wherein the delivery-enhancing transporter is
2 not attached to an amino acid sequence to which the delivery enhancing transporter molecule
3 is attached in a naturally occurring protein.

1 20. The method of claim 1, wherein the delivery-enhancing transporter
2 comprises from 5 to 25 guanidino or amidino moieties.

1 21. The method of claim 20, wherein the delivery-enhancing transporter
2 comprises between 7 and 15 guanidino moieties.

1 22. The method of claim 20, wherein the delivery-enhancing transporter
2 comprises at least 6 contiguous guanidino and/or amidino moieties.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

- 1 23. The method of claim 1, wherein the delivery-enhancing transporter
2 consists essentially of 5 to 50 amino acids, at least 50 percent of which amino acids are
3 arginines or analogs thereof.
- 1 24. The method of claim 23, wherein the delivery-enhancing transporter
2 comprises 5 to 25 arginine residues or analogs thereof.
- 1 25. The method of claim 24, wherein at least one arginine is a D-arginine.
- 1 26. The method of claim 25, wherein all of the arginines are D-arginines.
- 1 27. The method of claim 23, wherein at least 70 percent of the amino acids
2 that comprise the delivery-enhancing transporter are arginines or arginine analogs.
- 1 28. The method of claim 23, wherein the delivery-enhancing transporter is
2 seven contiguous D-arginines.
- 1 29. The method of claim 1, wherein the compound is a therapeutic for the
2 disease selected from the group consisting of inflammatory bowel disease, colon cancer,
3 ulcerative colitis, gastrointestinal ulcers, constipation and imbalance of salt and water
4 absorption.
- 1 30. The method of claim 1, wherein the compound is selected from the
2 group consisting of immunosuppressives, corticosteroids, laxatives, antibiotics and anti-
3 neoplastic agents.
- 1 31. The method of claim 1, wherein the compound is targeted to the ileum
2 and/or colon.

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 1

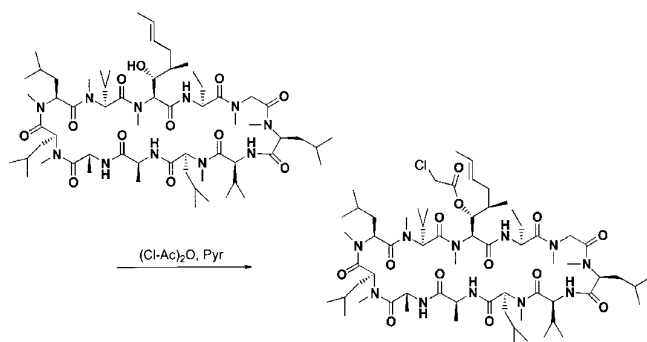
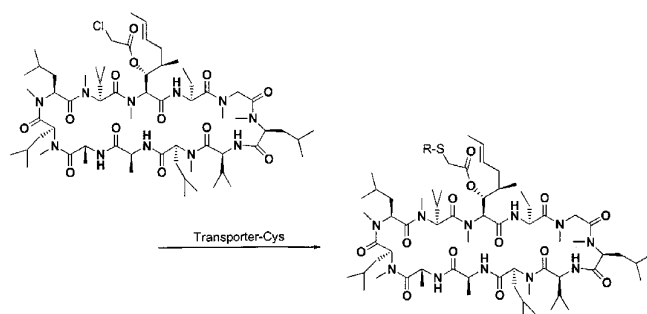


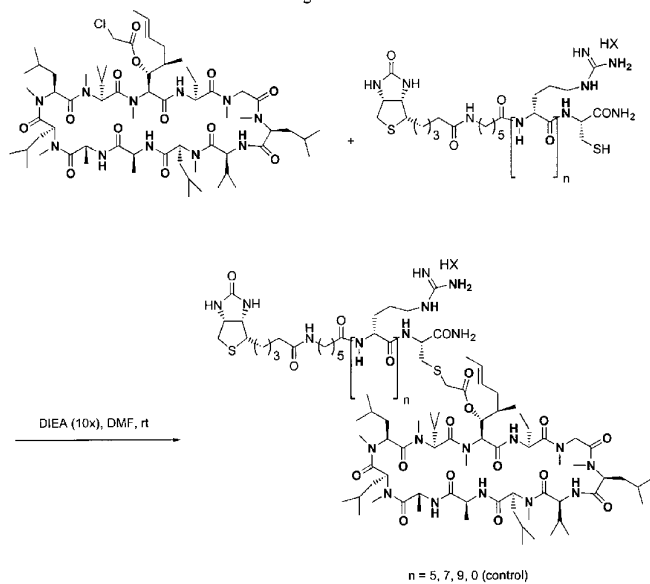
Figure 2



WO 02/069930

PCT/US02/05829

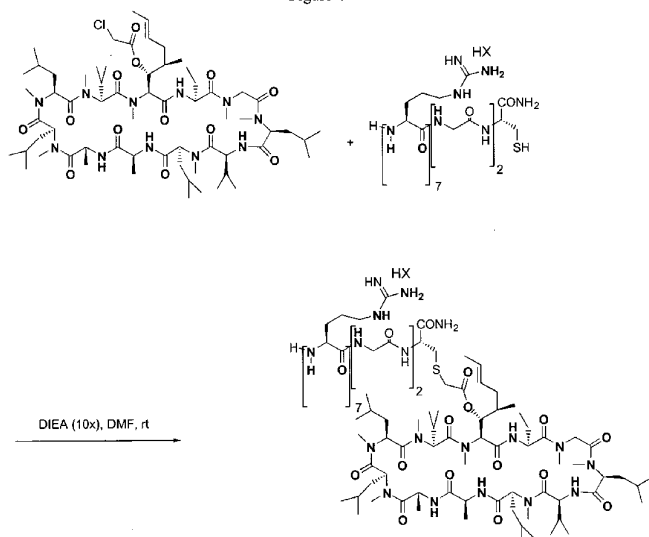
Figure 3



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 4



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 5A

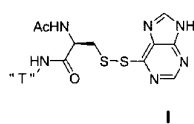


Figure 5B

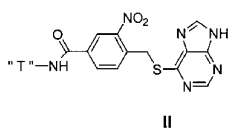


Figure 5C

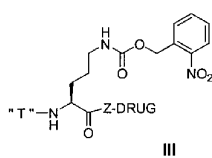
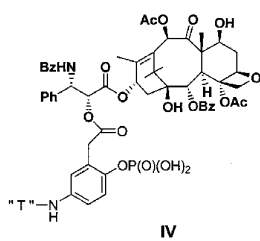


Figure 5D



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 5E

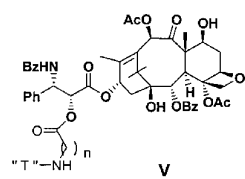


Figure 5F

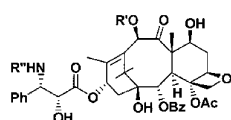


Figure 5G

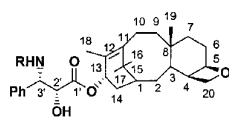
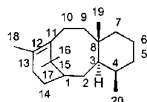


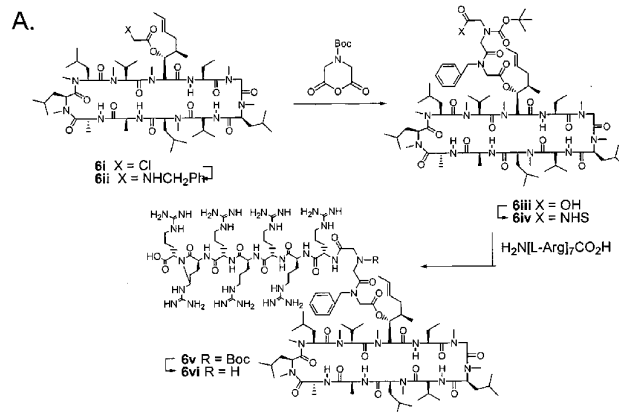
Figure 5H



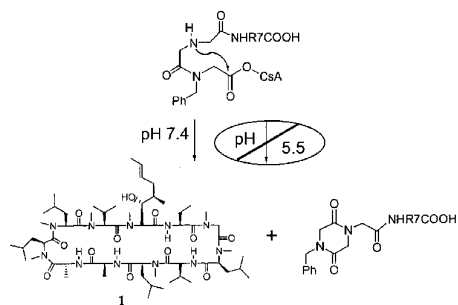
WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 6



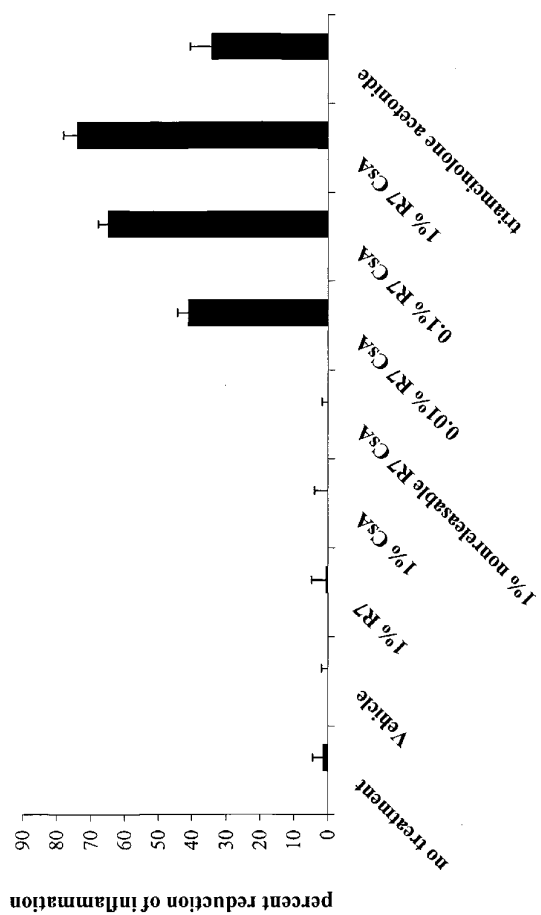
B.



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 7



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 8

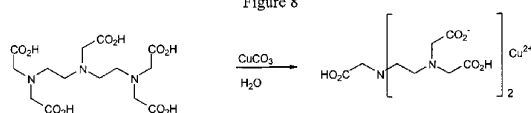


Figure 9

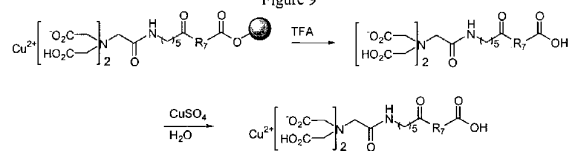


Figure 10

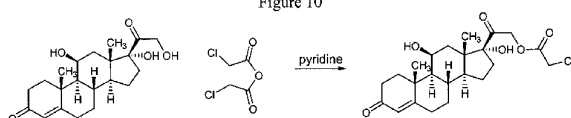
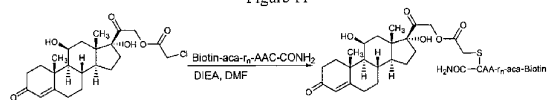


Figure 11



n = 5 and 7

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 12

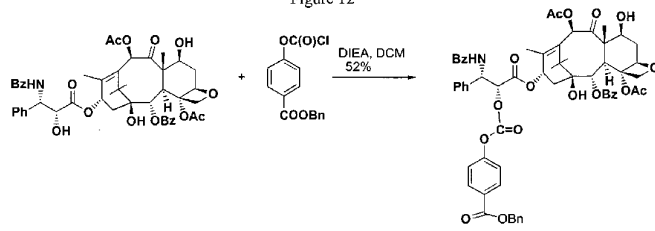


Figure 13

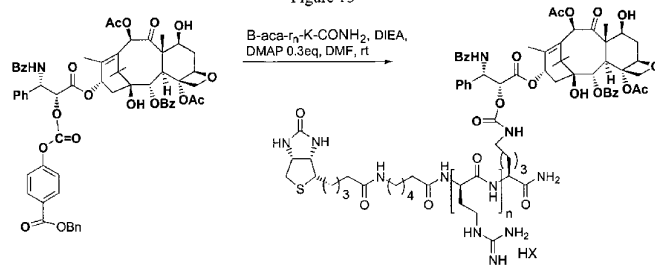
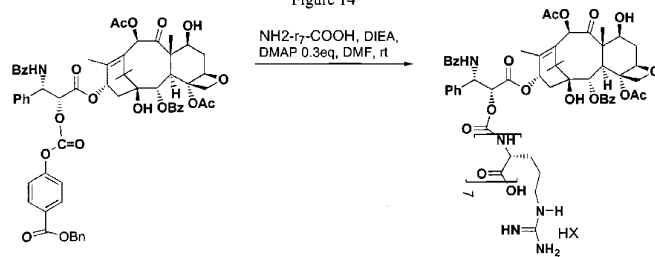


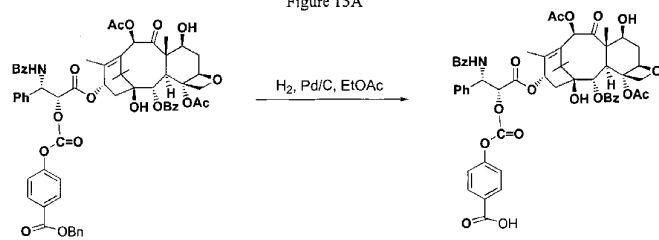
Figure 14



WO 02/069930

PCT/US02/05829

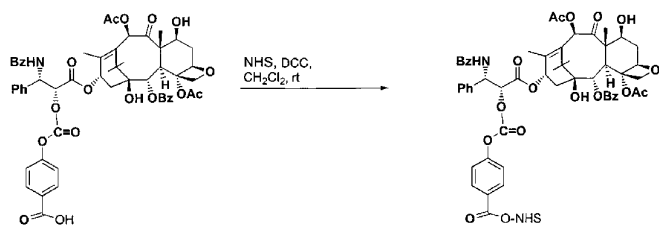
Figure 15A



WO 02/069930

PCT/US02/05829

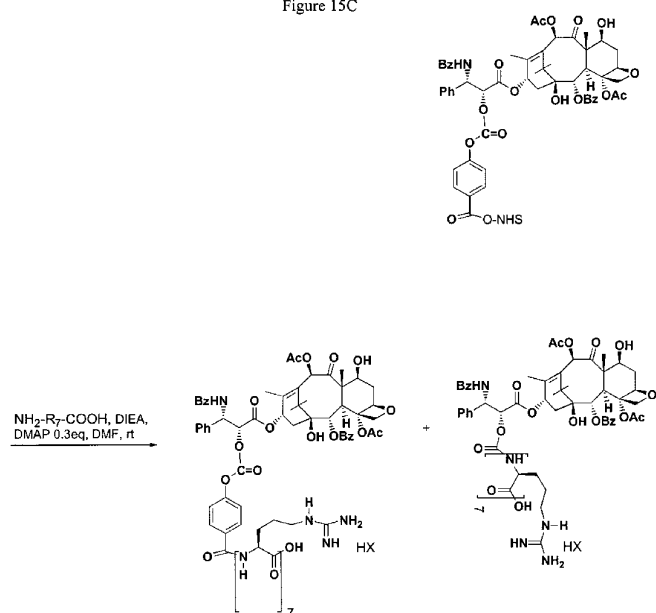
Figure 15B



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 15C



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 16

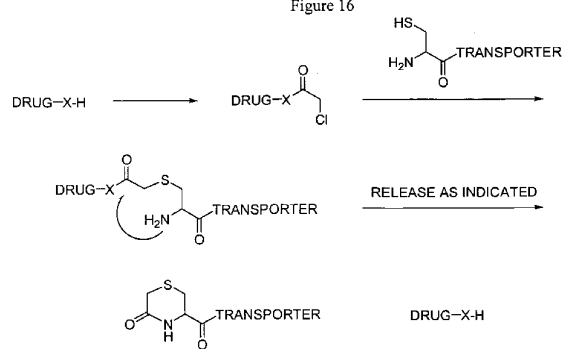
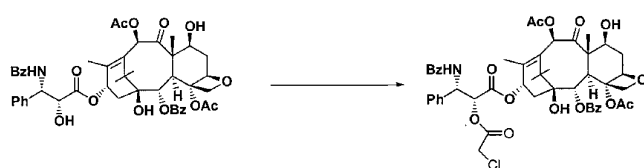


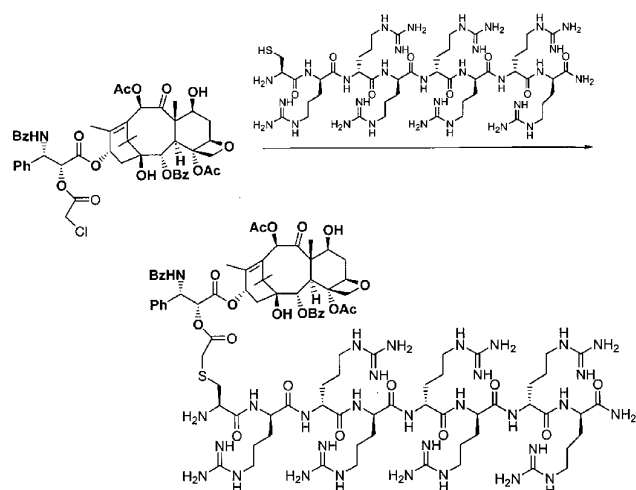
Figure 17



WO 02/069930

PCT/US02/05829

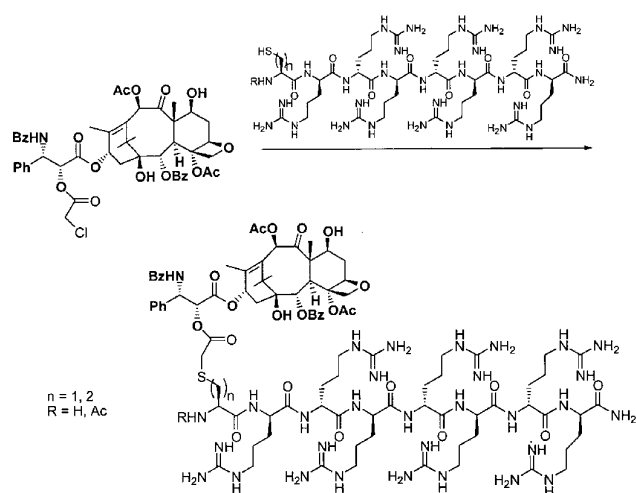
Figure 18



WO 02/069930

PCT/US02/05829

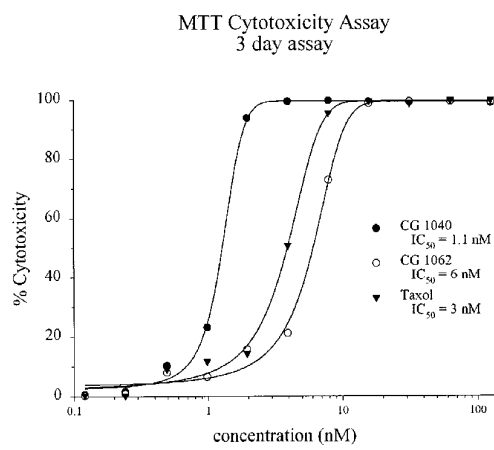
Figure 19



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 20



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 21

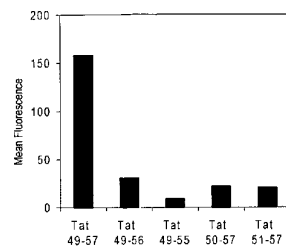
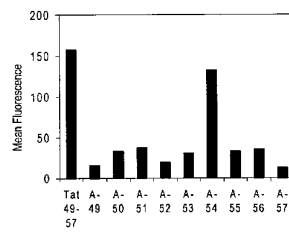


Figure 22



Condition	Mean Fluorescence
Tat 49-57	~600
d-Tat 49-57	~1800
Tat 57-49	~2500
d-Tat 57-49	~3600

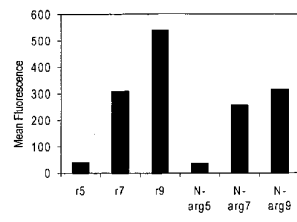
Sample	Mean Fluorescence
T1	800
49-57	100
R5	100
R6	500
R7	1200
R8	1800
R9	2800
r5	200
r6	1000
r7	3200
r8	4400
r9	5100

Scheme 1 illustrates the synthesis of poly(amide-imide)s 10a-f. The process begins with the reaction of diamine 1 (H₂N-Ar-NH₂) and tetracarboxylic dianhydride 2 (O=C₂(Ar')₂C=O) in DMAC at 120 °C for 24 h to form poly(amic acid)s 3. These intermediates are then cyclized using DMAP in DMAC at 120 °C for 24 h to yield poly(amide-imide)s 4. Finally, the poly(amide-imide)s 4 are reacted with 1,4-bis(2-aminoethyl)pyrrolidine 5 in DMAC at 120 °C for 24 h to produce the final poly(amide-imide)s 10a-f. The structures of the repeating units for 10a-f are defined by the variable X: X = CH₃ (10a), X = CH₂ (10b), X = CH₂CH₂ (10c), X = CH₂CH₂CH₂ (10d), X = CH₂CH₂CH₂CH₂ (10e), and X = 1,4-phenylene (10f).

WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 26



WO 02/069930

PCT/US02/05829

Figure 27

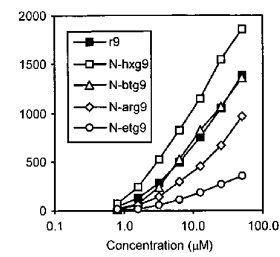
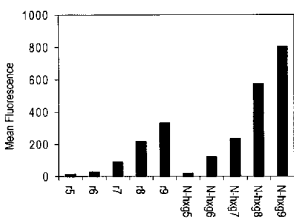


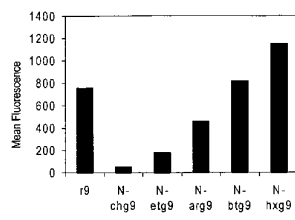
Figure 28



WO 02/069930

PCT/US02/05829

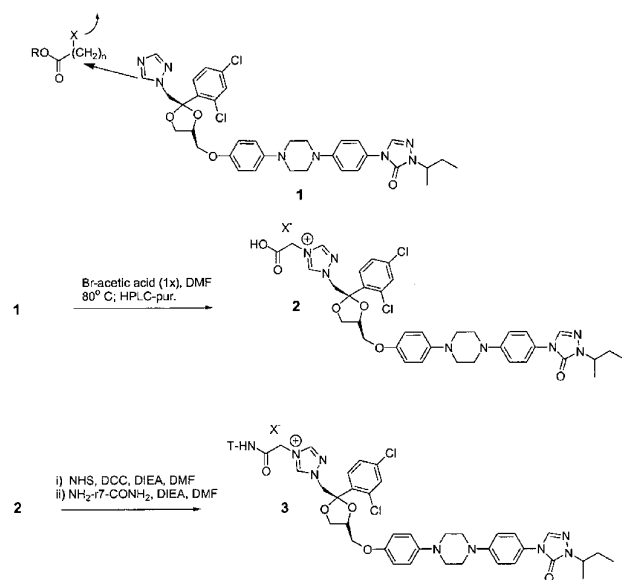
Figure 29



WO 02/069930

PCT/US02/05829

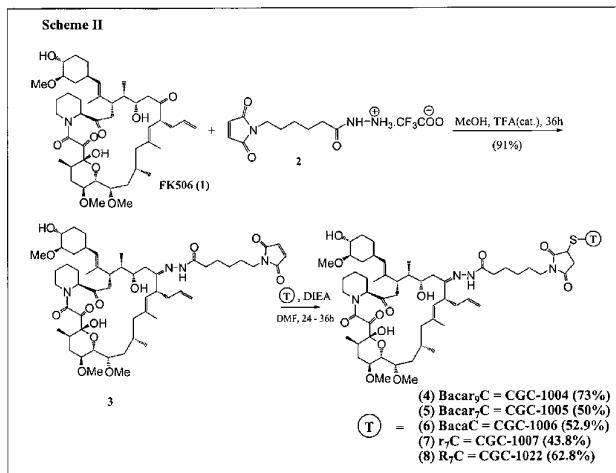
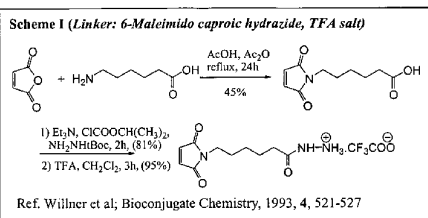
Figure 30



WO 02/069930

PCT/US02/05829

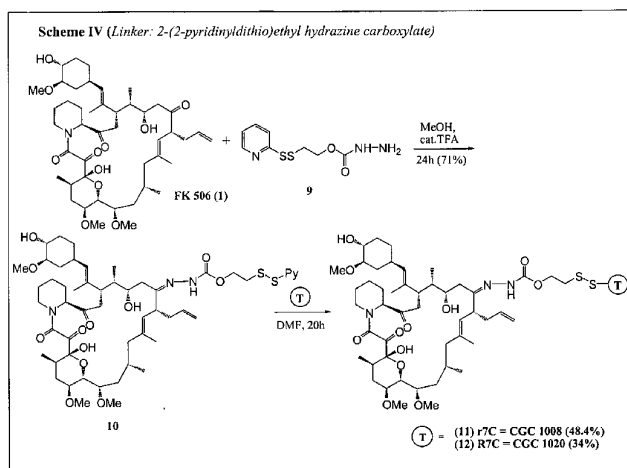
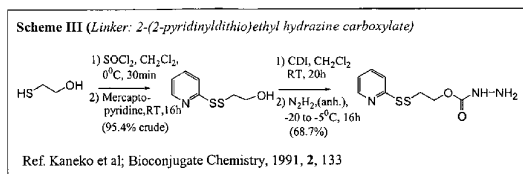
Figure 31A

Synthetic Schemes for FK 506 Conjugates

WO 02/069930

PCT/US02/05829

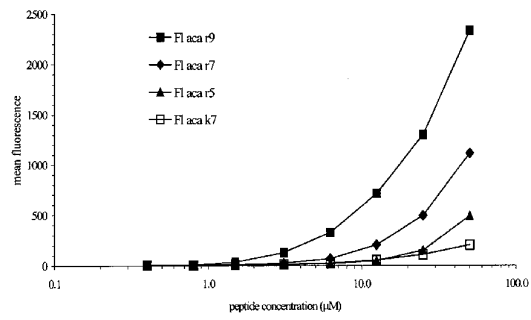
Figure 31B

Synthetic Schemes for FK 506 Conjugates (contd.)

WO 02/069930

PCT/US02/05829

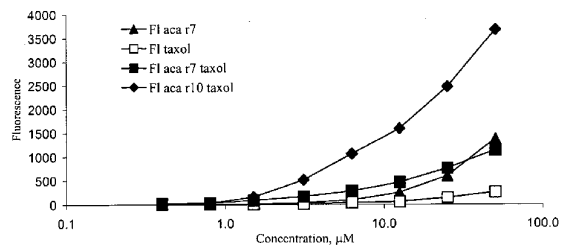
FIGURE 32



WO 02/069930

PCT/US02/05829

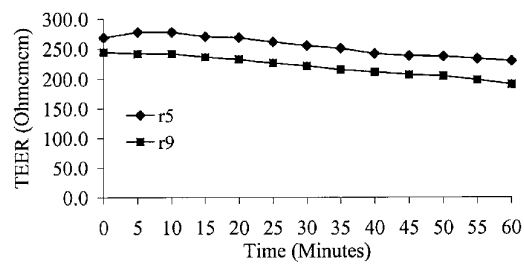
FIGURE 33



WO 02/069930

PCT/US02/05829

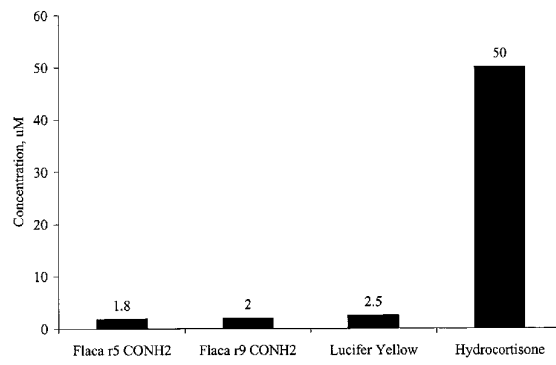
FIGURE 34



WO 02/069930

PCT/US02/05829

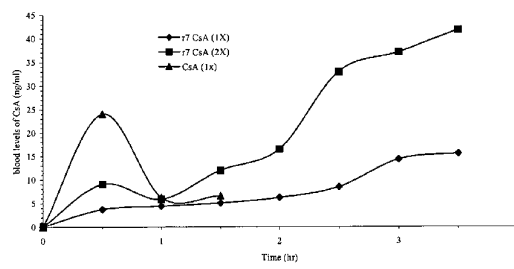
FIGURE 35



WO 02/069930

PCT/US02/05829

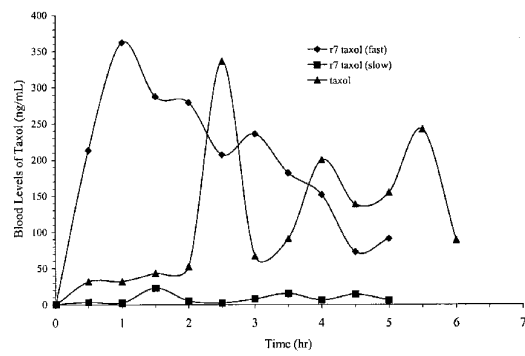
FIGURE 36



WO 02/069930

PCT/US02/05829

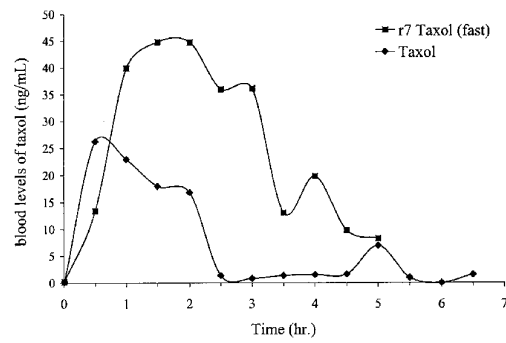
FIGURE 37



WO 02/069930

PCT/US02/05829

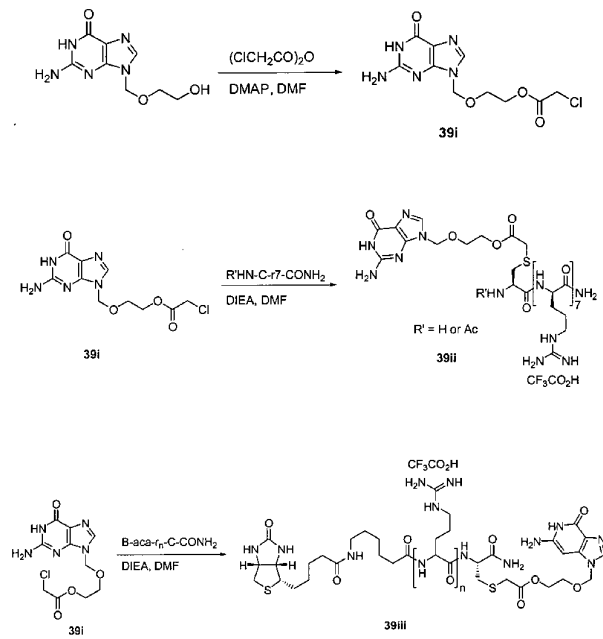
FIGURE 38



WO 02/069930

PCT/US02/05829

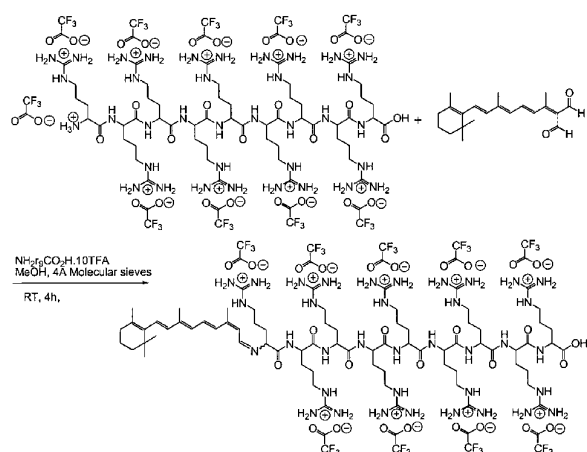
FIGURE 39



WO 02/069930

PCT/US02/05829

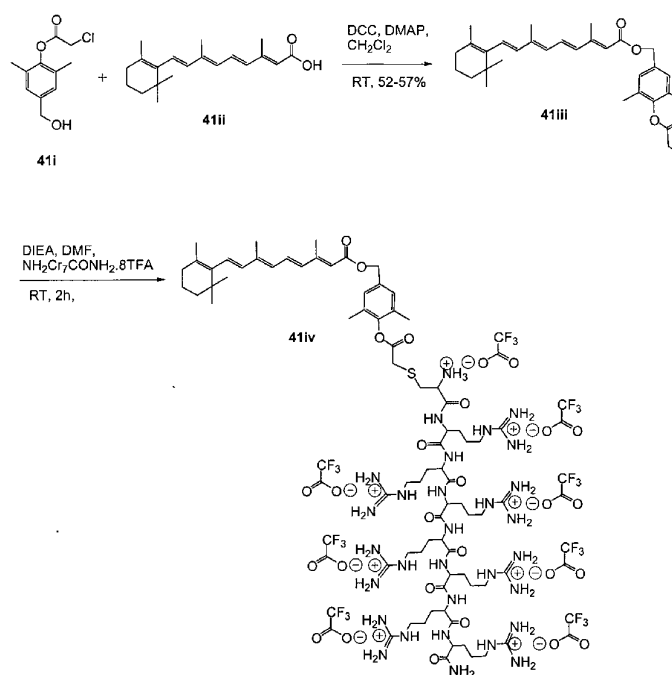
FIGURE 40



WO 02/069930

PCT/US02/05829

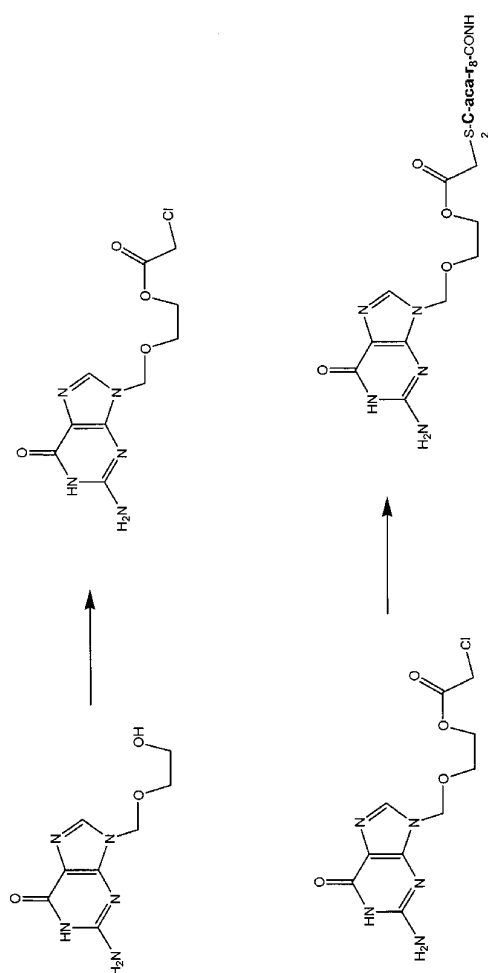
FIGURE 41



WO 02/069930

PCT/US02/05829

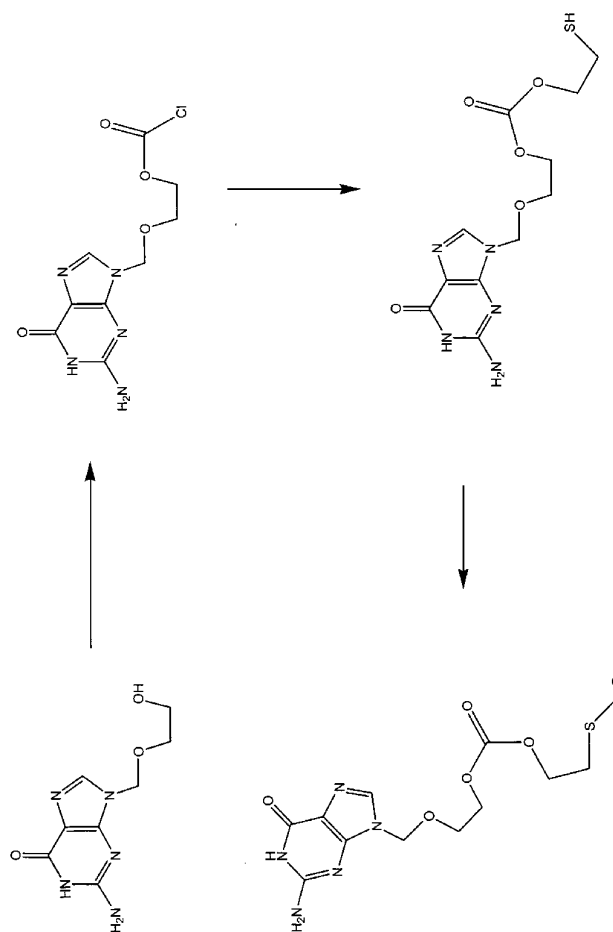
FIGURE 42



WO 02/069930

PCT/US02/05829

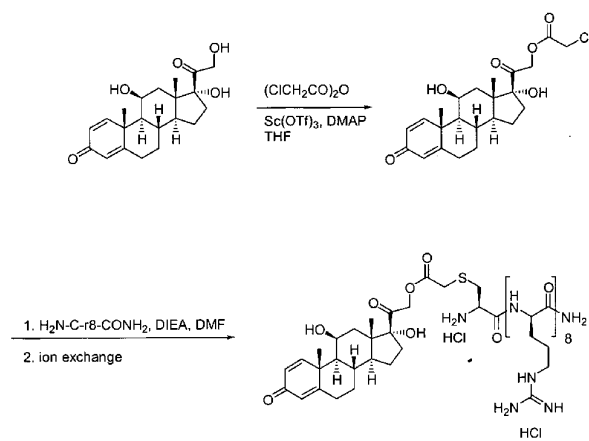
FIGURE 43



WO 02/069930

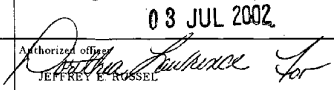
PCT/US02/05829

FIGURE 44



SF 1319591 v1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/05829												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(T) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/435, 436; 514/2, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 189, 694, 696; 520/300, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330; 564/236, 243 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	EP 0 599 303 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 01 June 1994 (01/06/94), see entire document, especially the Abstract, page 3, line 47 - page 4, line 7, page 6, lines 2-4, Example 8, and claims 1 and 7.	1-31												
X	WO 98/52614 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 26 November 1998 (26/11/98), see entire document, especially the Abstract, page 3, lines 17-33, page 4, lines 5-6 and 11-28, page 11, lines 4-21, page 13, lines 3-8, page 18, lines 17-24, page 21, lines 1-9, page 26, lines 15-22, page 27, lines 16-18, and Examples 9 and 11.	1-5, 15-31												
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"I" 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</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier document published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"A" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"I" 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	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"B" earlier document published on or after the international filing date	"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	"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)	"A" document member of the same patent family	"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	
* Special categories of cited documents:	"I" 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													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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													
"B" earlier document published on or after the international filing date	"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													
"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)	"A" document member of the same patent family													
"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														
Date of the actual completion of the international search 04 JUNE 2002		Date of mailing of the international search report 03 JUL 2002												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box FCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 505-5250		Authorized officer  JEFFREY E. ROSSEL Telephone No. (703) 505-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/05889
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 01/13957 A2 (CELLGATE, INC.) 01 March 2001 (0103.01), see entire document, especially claims 21-31 and 70-73.	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/05829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC (7):

A61K 9/00, 51/155, 58/08, 58/10; C07C 257/00, 279/00; C07K 4/00, 14/00

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
US CL.:

424/435, 436; 514/2, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 189, 634, 656; 530/300, 524, 325, 326, 327, 328, 329, 330; 564/236, 245

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

EAST, DIALOG

search terms: conjugate, carrier, linker, gastrointestinal, buccal, colon, bowel, colitis, ulcer, constipation, laxative, stomach, mouth, polyarginine, arginine, amidine, guanidino

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ウェンダー, ポール エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025, メンロ パーク, シスキュー アベニュー
930

(72)発明者 マックグレン, ピー. レオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040, マウンテン ビュー, ビーコン ストリート
110

(72)発明者 シスタ, ラリサ ブイ. エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94087, サニーベイル, フロイド アベニュー 13
33

(72)発明者 カーシュバーク, ソーステン エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94041, マウンテン ビュー, チキータ アベニュー
360, ナンバー11

Fターム(参考) 4C076 AA01 AA95 BB21 BB22 CC09 DD48M EE59M FF31
4C084 AA02 AA03 AA17 AA27 MA05 MA31 MA56 MA57 NA12 ZA661
ZA681 ZA721 ZB111 ZB261