

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6346092号
(P6346092)

(45) 発行日 平成30年6月20日 (2018. 6. 20)

(24) 登録日 平成30年6月1日 (2018. 6. 1)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/26 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/26
C 1 2 N 9/02 (2006. 01)	C 1 2 N 9/02 Z N A
C O 7 K 5/04 (2006. 01)	C O 7 K 5/04

請求項の数 16 (全 105 頁)

(21) 出願番号	特願2014-535882 (P2014-535882)	(73) 特許権者	508298488
(86) (22) 出願日	平成24年10月11日 (2012. 10. 11)		コーネル ユニヴァーシティー
(65) 公表番号	特表2015-501148 (P2015-501148A)		アメリカ合衆国ニューヨーク州14850
(43) 公表日	平成27年1月15日 (2015. 1. 15)		, イサカ, パイン ツリー ロード
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/059790		395, スイート 310, センター
(87) 国際公開番号	W02013/059071		フォー テクノロジー ライセンシング
(87) 国際公開日	平成25年4月25日 (2013. 4. 25)		, アット コーネル ユニヴァーシティー
審査請求日	平成27年10月9日 (2015. 10. 9)		ー
(31) 優先権主張番号	61/548, 114	(73) 特許権者	512044909
(32) 優先日	平成23年10月17日 (2011. 10. 17)		ステルス ペプチドズ インターナショナル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		インコーポレイテッド
			モナコ エムシー98000 アヴェニュー
			デ シトロニエ 3-5 ル プランス
			ドゥ ガル セカンド フロア
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 芳香族カチオン性ペプチドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) カルジオリピン、(2) D-A r g-T y r-L y s-P h e-NH₂ペプチド、(3) D m t-D-A r g-P h e-(d n s) D a p-NH₂ペプチド、または、(4) カルジオリピンとD-A r g-T y r-L y s-P h e-NH₂、D m t-D-A r g-P h e-(d n s) D a p-NH₂およびD-A r g-2', 6'-D m t-L y s-P h e-NH₂ペプチドの1種以上との組み合わせでドーブされたシトクロムcと、

前記カルジオリピンおよび／またはペプチドのレベルの変化により誘導される前記シトクロムcの特性変化を測定する計量器とを含むセンサー。

【請求項 2】

シトクロムcと、

前記シトクロムcと連通している(1) カルジオリピン、(2) D-A r g-T y r-L y s-P h e-NH₂ペプチド、(3) D m t-D-A r g-P h e-(d n s) D a p-NH₂ペプチド、または、(4) カルジオリピンとD-A r g-T y r-L y s-P h e-NH₂、D m t-D-A r g-P h e-(d n s) D a p-NH₂およびD-A r g-2', 6'-D m t-L y s-P h e-NH₂ペプチドの1種以上との組み合わせの供給源と、

前記シトクロムcと連通しているカルジオリピンおよび／またはペプチドの量を制御するアクチュエータとを含むスイッチ。

【請求項 3】

10

20

有効量の（１）カルジオリピン、（２）D-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂ペプチド、（３）D m t-D-A r g-P h e-（d n s）D a p-N H₂ペプチド、または、（４）カルジオリピンとD-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂、D m t-D-A r g-P h e-（d n s）D a p-N H₂およびD-A r g-2'，6'-D m t-L y s-P h e-N H₂ペプチドの１種以上との組み合わせでドーブされたシトクロムcと、

前記シトクロムcからの発光を刺激する光源とを含む発光素子。

【請求項４】

（１）カルジオリピン、（２）D-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂ペプチド、（３）D m t-D-A r g-P h e-（d n s）D a p-N H₂ペプチド、または、（４）カルジオリピンとD-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂、D m t-D-A r g-P h e-（d n s）D a p-N H₂およびD-A r g-2'，6'-D m t-L y s-P h e-N H₂ペプチドの１種以上との組み合わせでドーブされたシトクロムcを含む

10

バイオセンサー。

【請求項５】

前記カルジオリピンおよび／またはペプチドのレベルが、前記シトクロムcの温度および前記シトクロムcのpHの少なくとも一方の変動に応答して変化するか、

前記特性が、導電率であり、前記計量器が、前記シトクロムcと電氣的に連通しているアノードおよびカソードを含むか、または、

前記特性が、フォトルミネセンスであり、前記計量器が、前記シトクロムcにより発光された光の強度および前記シトクロムcにより発光された光の波長のうちの少なくとも一方の変化を測定する光検出器を含む、

20

請求項１に記載のセンサー。

【請求項６】

前記アクチュエータが、前記シトクロムcの温度および前記シトクロムcのpHの少なくとも一方を制御する、請求項２に記載のスイッチ。

【請求項７】

前記ドーブされたシトクロムcが、電極への電子流動におけるメディエータを含むか、

前記ドーブされたシトクロムcが、前記電極に直接固定されているか、

前記カルジオリピン、ペプチドおよび／またはシトクロムcが、前記バイオセンサー内の表面に固定されているか、または、

30

前記カルジオリピン、ペプチドおよび／またはシトクロムcが、前記バイオセンサー内で自由に拡散可能である、

請求項４に記載のバイオセンサー。

【請求項８】

（１）カルジオリピン、（２）D-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂ペプチド、（３）D m t-D-A r g-P h e-（d n s）D a p-N H₂ペプチド、または、（４）カルジオリピンとD-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂、D m t-D-A r g-P h e-（d n s）D a p-N H₂およびD-A r g-2'，6'-D m t-L y s-P h e-N H₂ペプチドの１種以上との組み合わせでドーブされたシトクロムcの特性

40

の変化を測定する工程を含む、感知方法であって、前記変化が、前記カルジオリピンおよび／またはペプチドのレベルの変化により誘導されることを特徴とする方法。

【請求項９】

シトクロムcと連通している（１）カルジオリピン、（２）D-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂ペプチド、（３）D m t-D-A r g-P h e-（d n s）D a p-N H₂ペプチド、または、（４）カルジオリピンとD-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂、D m t-D-A r g-P h e-（d n s）D a p-N H₂およびD-A r g-2'，6'-D m t-L y s-P h e-N H₂ペプチドの１種以上との組み合わせのレベル

を変化させる工程を含む、切り替え方法。

【請求項１０】

50

有効量の (1) カルジオリピン、(2) $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチド、(3) $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ ペプチド、または、(4) カルジオリピンと $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ 、 $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ および $D\text{-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチドの 1 種以上との組み合わせでドーブされたシトクロム c を刺激する工程を含む、発光方法。

【請求項 11】

試料中の基質を検出する方法であって、

a) 前記試料をバイオセンサーと接触させる工程であって、前記バイオセンサーが、i) 前記基質に特異的なレドックス活性酵素、ii) (1) カルジオリピン、(2) $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチド、(3) $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ ペプチド、または、(4) カルジオリピンと $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ 、 $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ および $D\text{-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチドの 1 種以上との組み合わせでドーブされたシトクロム c、ならびに、iii) 電極を含む工程と、

10

b) 前記バイオセンサー内の電子流動を検出する工程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 12】

シトクロム c を含有する試料中のシトクロム c 還元を増大させる方法、シトクロム c を含有する試料中のシトクロム c を通る電子の拡散を増加させる方法、または、シトクロム c を含有する試料中のシトクロム c の周囲に $\pi\text{-}\pi$ 相互作用を導入する方法であって、前記試料を、有効量の (1) カルジオリピン、(2) $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチド、(3) $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ ペプチド、または、(4) カルジオリピンと $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ 、 $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ および $D\text{-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチドの 1 種以上との組み合わせと接触させる工程を含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 13】

(a) 前記カルジオリピンおよび／またはペプチドのレベルが、前記シトクロム c の温度および前記シトクロム c の pH の少なくとも一方の変動に応答して変化するか、または、(b) 前記特性が、導電率、フォトルミネセンス強度、およびフォトルミネセンス波長のうちの少なくとも 1 つである、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 14】

カルジオリピンおよび／またはペプチドのレベルを変化させる工程が、前記シトクロム c の温度および前記シトクロム c の pH の少なくとも一方を変動させる工程を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

(a) 前記ドーブされたシトクロム c が、電極への電子流動におけるメディエータを含むか、

40

(b) 前記ドーブされたシトクロム c が、前記電極に直接固定されているか、

(c) 前記カルジオリピン、ペプチド、および／またはシトクロム c が、前記バイオセンサー内の表面に固定されているか、または、

(d) 前記カルジオリピン、ペプチド、および／またはシトクロム c が、前記バイオセンサー内で自由に拡散可能である、

請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

前記試料が、センサー、導体、スイッチ、または発光素子の成分を含む、請求項 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2011年10月17日出願の米国特許仮出願第61/548,114号への優先権を主張し、その開示が全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

(技術分野)

本技術は、一般に、電子輸送および電気伝導に使用するための芳香族カチオン性ペプチド組成物および方法に関する。

【発明の概要】

10

【0003】

(概要)

一態様において、本技術は、芳香族カチオン性ペプチド、またはその医薬的に許容可能な塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩を提供する。一部の実施形態において、該ペプチドは、

1. 少なくとも1の正味正電荷；
2. 最小で3のアミノ酸；
3. 最大で約20のアミノ酸；
4. 正味正電荷の最小数 (p_m) とアミノ酸残基の総数 (r) との間の、 $3p_m$ が $r + 1$ 以下の最大数となる関係；
5. 芳香族基の最小数 (a) と正味正電荷の総数 (p_t) との間の、 a が1であり p_t も1になり得る場合を除き、 $2a$ が $p_t + 1$ 以下の最大数となる関係、を含む。

20

【0004】

一部の実施形態において、該ペプチドは、アミノ酸配列 $Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH_2$ (SS-01)、 $2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH_2$ (SS-02)、 $Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH_2$ (SS-20) または $D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH_2$ (SS-31) を含む。一部の実施形態において、該ペプチドは、

D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH ₂ ;	
D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH ₂ ;	
D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH ₂ ;	
H-D-Arg-Dmt-Lys (N ^o Me)-Phe-NH ₂ ;	
H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe (Me)-NH ₂ ;	
H-D-Arg-Dmt-Lys (N ^o Me)-Phe (Me)-NH ₂ ;	
H-D-Arg (N ^o Me)-Dmt (Me)-Lys (N ^o Me)-Phe (Me)-NH ₂ ;	
D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH ₂ ;	10
D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH ₂ ;	
D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH ₂ ;	
D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH ₂ ;	
H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH ₂ ;	
H-D-Arg-Ψ [CH ₂ -NH] Dmt-Lys-Phe-NH ₂ ;	
H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH ₂ -NH] Lys-Phe-NH ₂ ;	
H-D-Arg-Dmt-Lys Ψ [CH ₂ -NH] Phe-NH ₂ ;	
H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH ₂ -NH] Lys-Ψ [CH ₂ -NH] Phe-NH ₂ ;	20
Lys-D-Arg-Tyr-NH ₂ ;	
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂ ;	
2' , 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂ ;	
Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂ ;	
Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH ₂ ;	
D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH ₂ ;	
H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH ₂ ;	
Lys-D-Arg-Tyr-NH ₂ ;	30
D-Tyr-Trp-Lys-NH ₂ ;	
Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH ₂ ;	
Tyr-His-D-Gly-Met;	
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH ₂ ;	
Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg ;	
D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg;	
Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH ₂ ;	
Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His;	40
Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH ₂ ;	
Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH ₂ ;	

Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys;
 Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂;
 Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys;
 Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg- D-Gly-Lys-NH₂;
 D-His-Lys-Tyr- D-Phe-Glu- D-Asp- D-His- D-Lys-Arg-Trp-NH₂;
 Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe;
 Tyr-D-His-Phe- D-Arg-Asp-Lys- D-Arg-His-Trp-D-His-Phe;
 Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂;
 Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr;
 Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe- D-Lys- D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys;
 Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂;
 Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys- D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly;
 D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂;
 Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe;
 His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-N
 H₂;
 Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D
 -Lys-Asp;
 Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His
 -Arg-Tyr-Lys-NH₂;
 Dmt-D-Arg-Phe -(atn)Dap-NH₂ (ここで(atn)Dap は、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジ
 アミノプロピオン酸である) ;
 Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (ここで Ald は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)ア
 ラニンである) ;
 Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (ここで Ald は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)
 アラニンである) ;
 Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dap は、b-ダンシル-L-a, b-ジアミノプロピ
 オン酸である) ;
 D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂;および
 D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂

のうちの1種以上を含む。

【0005】

一部の実施形態において、「Dmt」は、2', 6'-ジメチルチロシン(2' 6' -Dmt)または3', 5'-ジメチルチロシン(3' 5' -Dmt)を指す。

【0006】

一実施形態において、該ペプチドは、式I:

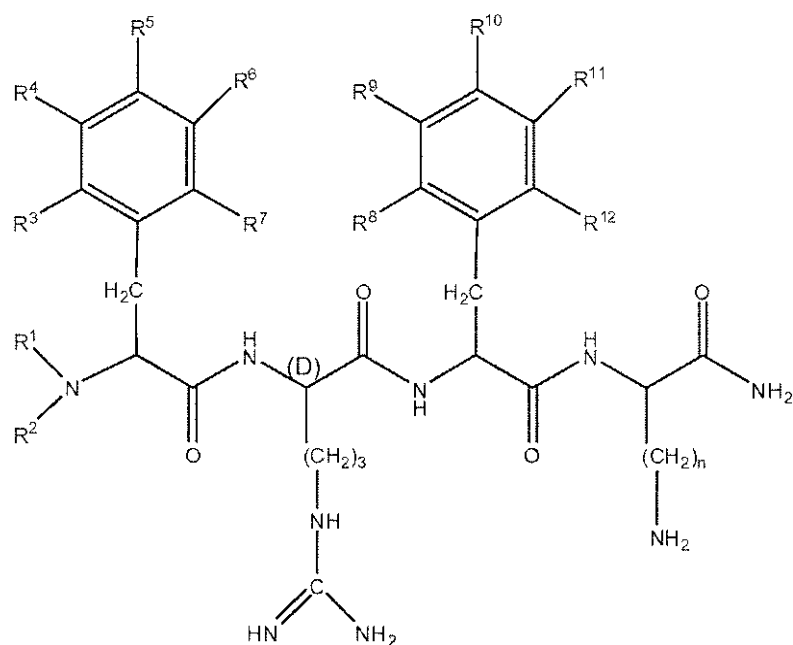
10

20

30

40

【化 1】



10

20

(式中、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、
 (i) 水素；
 (ii) 直鎖状または分枝状 $C_1 - C_6$ アルキル；
 (iii)

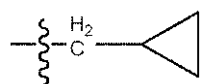
【化 2】



30

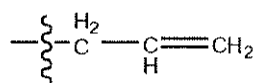
(iv)

【化 3】



(v)

【化 4】



40

から選択され；

R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} は、それぞれ独立して、

(i) 水素；
 (ii) 直鎖状または分枝状 $C_1 - C_6$ アルキル；

50

(iii) $C_1 - C_6$ アルコキシ；

(iv) アミノ；

(v) $C_1 - C_4$ アルキルアミノ；

(vi) $C_1 - C_4$ ジアルキルアミノ；

(vii) ニトロ；

(viii) ヒドロキシル；

(ix) ハロゲン（ここで「ハロゲン」は、クロロ、フルオロ、ブロモおよびヨードを包含する）、
から選択され、

n は、1～5の整数である）

により定義される。

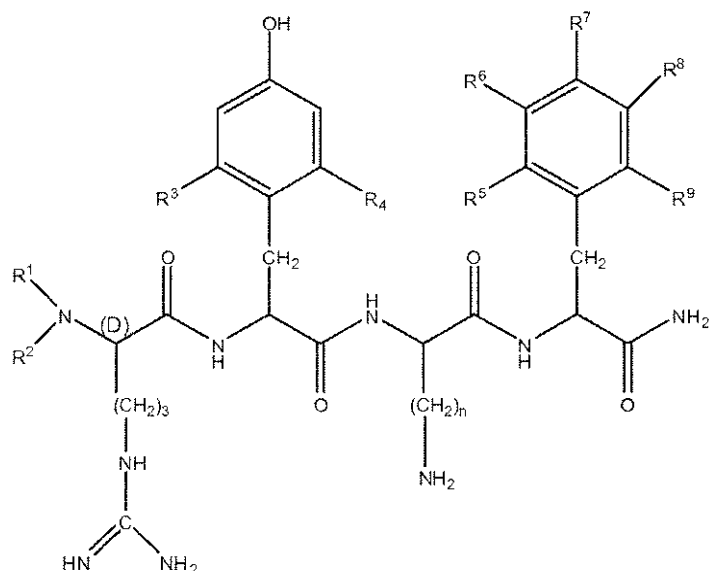
【0007】

特定の実施形態において、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} は、全て水素であり、 n は、4である。別の実施形態において、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、および R^{11} は、全て水素であり； R^8 および R^{12} は、メチルであり； R^{10} は、ヒドロキシルであり； n は、4である。

【0008】

一実施形態において、該ペプチドは、式II：

【化5】



（式中、 R^1 および R^2 は、それぞれ独立して、

(i) 水素；

(ii) 直鎖状または分枝状 $C_1 - C_6$ アルキル；

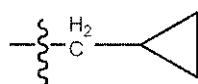
(iii)

【化6】



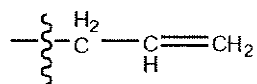
(iv)

【化 7】



(v)

【化 8】



10

(ここで、 R^3 および R^4 は、それぞれ独立して、

(i) 水素；

(ii) 直鎖状または分枝状 $C_1 - C_6$ アルキル；

(iii) $C_1 - C_6$ アルコキシ；

(iv) アミノ；

(v) $C_1 - C_4$ アルキルアミノ；

(vi) $C_1 - C_4$ ジアルキルアミノ；

(vii) ニトロ；

(viii) ヒドロキシル；

(ix) ハロゲン（ここで「ハロゲン」は、クロロ、フルオロ、ブロモおよびヨードを包含する）、

から選択され；

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 は、それぞれ独立して、

(i) 水素；

(ii) 直鎖状または分枝状 $C_1 - C_6$ アルキル；

(iii) $C_1 - C_6$ アルコキシ；

(iv) アミノ；

(v) $C_1 - C_4$ アルキルアミノ；

(vi) $C_1 - C_4$ ジアルキルアミノ；

(vii) ニトロ；

(viii) ヒドロキシル；

(ix) ハロゲン（ここで「ハロゲン」は、クロロ、フルオロ、ブロモおよびヨードを包含する）、

から選択され；

n は、1～5の整数である）

により定義される。

【0009】

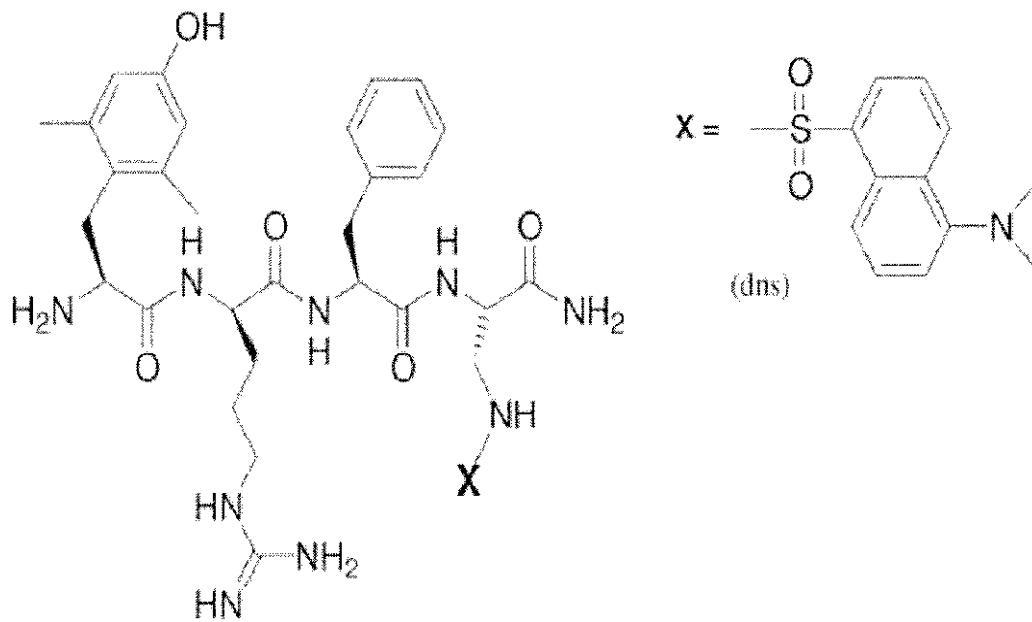
一実施形態において、該ペプチドは、 $Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH_2$ （ここで $(dns)Dap$ は、 β -ダンシル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である）（SS-17）としても表される、式：

20

30

40

【化 9】



10

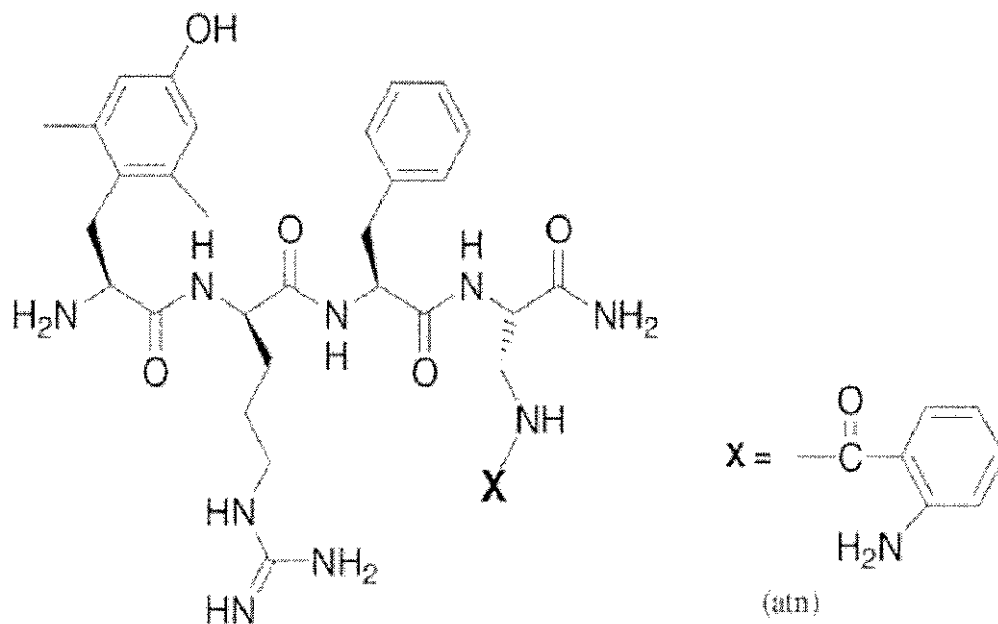
20

により定義される。

【0010】

一実施形態において、該ペプチドは、 $\text{Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ （ここで (atn) Dap は、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である）(SS-19) としても表される、式：

【化 10】



30

40

により定義される。

【0011】

特定の実施形態において、 R^1 および R^2 は、水素であり； R^3 および R^4 は、メチルであり； R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 は、全て水素であり； n は、4 である。

50

【0012】

一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、芳香族アミノ酸とカチオン性アミノ酸とが交互に並ぶコア構造モチーフを有する。例えば該ペプチドは、以下に示される式III～VIのいずれかにより定義されるテトラペプチドであってもよい：

芳香族－カチオン性－芳香族－カチオン性(式III)

カチオン性－芳香族－カチオン性－芳香族(式IV)

芳香族－芳香族－カチオン性－カチオン性(式V)

カチオン性－カチオン性－芳香族－芳香族(式VI)

(式中、芳香族は、Phe(F)、Tyr(Y)、Trp(W)、およびシクロヘキシルアラニン(Cha)からなる群より選択される残基であり；カチオン性は、Arg(R)、Lys(K)、ノルロイシン(Nle)、および2-アミノヘプタン酸(Ahe)からなる群より選択される残基である)。

10

【0013】

一実施形態において、本明細書に記載の芳香族カチオン性ペプチドは、全ての左旋性(L)アミノ酸を含む。

【0014】

一実施形態において、本開示は、シトクロムcに関する方法を提供する。一実施形態において、該方法は、試料を芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩の有効量と接触させることを含む、シトクロムcを含有する試料中のシトクロムc還元を増大させることに関する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一実施形態において、該方法は、試料を有効量の芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩と接触させることを含む、シトクロムcを含有する試料中のシトクロムcを通る電子の拡散を増加させることに関する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一実施形態において、該方法は、試料を有効量の芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩と接触させることを含む、シトクロムcを含有する試料中のシトクロムcにおいて、電子の能力を増強することに関する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一実施形態において、該方法は、試料を有効量の芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩と接触させることを含む、シトクロムcを含有する試料中のシトクロムcの周囲に新規な π - π 相互作用を導入することに関する。一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂を含む。一実施形態において、該方法は、試料を芳香族カチオン性ペプチド(例えば、D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂またはPhe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂)およびカルジオリピンと接触させることを含む。一実施形態において、該方法は、試料をカルジオリピンと接触させることを含む。一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19)(ここで(atn)Dapは、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂(SS-36)(ここでAlaは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂(SS-37)(ここでAlaは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂(ここで(dns)Dapは、 β -ダンシル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)(SS-17)を含む。

20

30

40

【0015】

一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドがドーブされた(doped)、または芳香族カチオン性ペプチドとカルジオリピンとがドーブされた、またはカルジオリピンがドーブされたシトクロムcを含有する試料は、センサーの構成要素、例えば光電池もしくはルミネッセントセンサー；導体；スイッチ、例えばトランジスタ；発光素子、例えば発光ダイオード；電荷貯蔵もしくは蓄積デバイス、例えば太陽光発電デバイス；集積

50

回路；ソリッドステートデバイス；または任意の他の有機電子デバイスを含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $Phe\text{-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ を含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19) (ここで (atn) Dap は、 β -アントラニロイル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である)、 $Dmt\text{-D-Arg-Ala-Lys-NH}_2$ (SS-36) (ここで Ala は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $Dmt\text{-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH}_2$ (SS-37) (ここで Ala は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231)、および $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ (ここで (dns) Dap は、 β -ダンシル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である) (SS-17) を含む。

【0016】

一部の実施形態において、シトクロム c は、精製形態、単離形態および／または濃縮形態で試料中に存在する。一部の実施形態において、シトクロム c は、天然形態で試料中に存在する。例えば一部の実施形態において、シトクロム c は、1つ以上のミトコンドリア中に存在する。一部の実施形態において、ミトコンドリアは、単離されている。他の実施形態において、ミトコンドリアは、細胞中または細胞調製物中に存在する。一部の実施形態において、シトクロム c は、芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩がドーブされている。一部の実施形態において、シトクロム c は、芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩とカルジオリピンとがドーブされている。一部の実施形態において、シトクロム c は、カルジオリピンがドーブされている。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $Phe\text{-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ を含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19) (ここで (atn) Dap は、 β -アントラニロイル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である)、 $Dmt\text{-D-Arg-Ala-Lys-NH}_2$ (SS-36) (ここで Ala は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $Dmt\text{-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH}_2$ (SS-37) (ここで Ala は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231)、および $Dmt\text{-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ (ここで (dns) Dap は、 β -ダンシル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である) (SS-17) を含む。

【0017】

一部の態様において、本開示は、ミトコンドリア呼吸に関する方法を提供する。一部の実施形態において、該方法は、ミトコンドリア O_2 消費を増加させること、試料中の ATP 合成を増加させること、および／またはシトクロム c 除去ミトプラスト中の呼吸を増進すること、に関する。一部の実施形態において、ミトコンドリアおよび／またはシトクロム c 除去ミトプラストを含有する試料を、有効量の芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩と接触させる。一部の実施形態において、ミトコンドリアおよび／またはシトクロム c 除去ミトプラストを含有する試料を、芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩およびカルジオリピンの有効量と接触させる。一部の実施形態において、ミトコンドリアおよび／またはシトクロム c 除去ミトプラストを含有する試料を、カルジオリピンの有効量と接触させる。一部の実施形態において、ミトコンドリアは、精製形態、単離形態および／または濃縮形態で試料中に存在する。一部の実施形態において、ミトコンドリアは、天然形態で試料中に存在する。例えば一部の実施形態において、ミトコンドリアは、細胞中または細胞調製物中に存在する。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $D\text{-A}$

10

20

30

40

50

r g-Dmt-Lys-Phe-NH₂を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂を含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (ここで(atn)Dapは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ (SS-36) (ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (SS-37) (ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (こ

10

【0018】

一部の態様において、センサーが提供される。一部の実施形態において、センサーは、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩の一定レベルがドープされたシトクロムc (「cyt c」)を含む。一部の実施形態において、センサーは、芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩およびカルジオリピンの一定レベルがドープされたcyt

cを含む。一部の実施形態において、センサーは、カルジオリピンの一定レベルがドープされたcyt cを含む。一部の実施形態において、センサーは、芳香族カチオン性ペ

20

プチド、該ペプチドとカルジオリピン、またはカルジオリピンのレベルの変化により誘導されるcyt cの特性変化を測定する計量器を含む。一部の実施形態において、ペプチドもしくはカルジオリピン、またはその両方のレベルは、cyt cの温度およびcyt cのpHのうちの少なくとも一方の変動に応答して変化する。一部の実施形態において、該特性は、導電率であり、計量器は、cyt cと電氣的に連通するアノードおよびカソードを含む。一部の実施形態において、該特性は、フォトルミネセンスであり、計量器は、本発明の芳香族カチオン性ペプチド、または芳香族カチオン性ペプチドとカルジオリピン、またはカルジオリピンの一定レベルがドープされたcyt cにより発光された光の強度、およびペプチドがドープされたcyt c、またはペプチドとカルジオリピンとがドープされたcyt c、またはカルジオリピンがドープされたcyt cにより発光

30

【0019】

一部の態様において、感知する方法が提供される。一部の実施形態において、該方法は、芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩の一定レベルがドープされたcyt cの特性変化を測定することを含む。一部の実施形態において、該方法は、芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩とカルジオリピンの一定レベルがドープされたcyt cの特性変化を測定することを含む。一部の実施形態において、該方法は、カルジオリピンがドープされ

50

た c y t c の特性変化を測定することを含む。一部の実施形態において、測定される変化は、芳香族カチオン性ペプチド、カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンのレベルの変化により誘導される。一部の実施形態において、ペプチド、カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンのレベルは、c y t c の温度および c y t c の pH のうちの少なくとも一方の変動に応答して変化する。一部の実施形態において、該特性は、導電率、フォトルミネセンス強度、およびフォトルミネセンス波長のうちの少なくとも 1 つである。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D - A r g - D m t - L y s - P h e - N H ₂ を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ を含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D m t - D - A r g - P h e - (a t n) D a p - N H ₂ (S S - 1 9) (ここで (a t n) D a p は、β - アントラニロイル - L - α , β - ジアミノプロピオン酸である)、D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H ₂ (S S - 3 6) (ここで A l d は、β - (6 ' - ジメチルアミノ - 2 ' - ナフトイル) アラニンである)、D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H ₂ (S S - 3 7) (ここで A l d は、β - (6 ' - ジメチルアミノ - 2 ' - ナフトイル) アラニンである)、D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H ₂ (S P I - 2 3 1) 、および D m t - D - A r g - P h e - (d n s) D a p - N H ₂ (ここで (d n s) D a p は、β - ダンシル - L - α , β - ジアミノプロピオン酸である) (S S - 1 7) を含む。

10

【0020】

20

一部の実施形態において、スイッチが提供される。一部の実施形態において、スイッチは、c y t c と、芳香族カチオン性ペプチドの供給源と、を含む。一部の実施形態において、スイッチは、c y t c と、芳香族カチオン性ペプチドの供給源と、カルジオリピンと、を含む。一部の実施形態において、スイッチは、c y t c と、カルジオリピンの供給源と、を含む。一部の実施形態において、ペプチド、カルジオリピンとペプチド、またはカルジオリピンは、c y t c と連通している。一部の実施形態において、アクチュエータが、c y t c と連通しているペプチド、カルジオリピンとペプチド、またはカルジオリピンの量を制御するために提供される。一部の実施形態において、アクチュエータは、c y t c の温度および c y t c の pH のうちの少なくとも一方を制御する。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D - A r g - D m t - L y s - P h e - N H ₂ を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ を含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D m t - D - A r g - P h e - (a t n) D a p - N H ₂ (S S - 1 9) (ここで (a t n) D a p は、β - アントラニロイル - L - α , β - ジアミノプロピオン酸である)、D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H ₂ (S S - 3 6) (ここで A l d は、β - (6 ' - ジメチルアミノ - 2 ' - ナフトイル) アラニンである)、D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H ₂ (S S - 3 7) (ここで A l d は、β - (6 ' - ジメチルアミノ - 2 ' - ナフトイル) アラニンである)、D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H ₂ (S P I - 2 3 1) 、および D m t - D - A r g - P h e - (d n s) D a p - N H ₂ (ここで (d n s) D a p は、β - ダンシル - L - α , β - ジアミノプロピオン酸である) (S S - 1 7) を含む。

30

40

【0021】

一部の実施形態において、切り替え方法が提供される。一部の実施形態において、該方法は、c y t c と連通している芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩のレベルを変化させることを含む。一部の実施形態において、該方法は、c y t c と連通している芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩とカルジオリピンのレベルを変化させることを含む。一部の実施形態において、該方法は、c y t c と連通しているカルジオリピンのレベルを変化させることを含む。一部の実施形態において、ペプチド、カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンのレベルを変化させることは、c y t c の温度および c y t

50

cのpHのうちの少なくとも一方を変動させることを含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $Phe-D\text{-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ を含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $Dmt-D\text{-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19) (ここで(atn)Dapは、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、 $Dmt-D\text{-Arg-Al d-Lys-NH}_2$ (SS-36) (ここでAl dは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $Dmt-D\text{-Arg-Phe-Lys-Al d-NH}_2$ (SS-37) (ここでAl dは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231)、および $Dmt-D\text{-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ (ここで(dns)Dapは、 β -ダンシル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0022】

一部の態様において、発光素子が提供される。一部の態様において、発光素子は、芳香族カチオン性ペプチド、例えば $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ 、および/もしくは $Phe-D\text{-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ 、またはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩の有効量がドーブされたcyt cと、cyt cからの発光を刺激する光源と、を含む。一部の態様において、発光素子は、芳香族カチオン性ペプチド、例えば $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ 、および/もしくは $Phe-D\text{-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ 、またはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩およびカルジオリピンの有効量がドーブされたcyt cと、cyt cからの発光を刺激する光源と、を含む。一部の態様において、発光素子は、カルジオリピンの有効量がドーブされたcyt cと、cyt cからの発光を刺激する光源と、を含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $Dmt-D\text{-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19) (ここで(atn)Dapは、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、 $Dmt-D\text{-Arg-Al d-Lys-NH}_2$ (SS-36) (ここでAl dは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $Dmt-D\text{-Arg-Phe-Lys-Al d-NH}_2$ (SS-37) (ここでAl dは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231)、および $Dmt-D\text{-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ (ここで(dns)Dapは、 β -ダンシル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0023】

一部の態様において、発光方法が、提供される。幾つかの実施態様において、該方法は、芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩、例えば $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ 、および/または $Phe-D\text{-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ の有効量がドーブされたcyt cを刺激することを含む。幾つかの実施態様において、該方法は、芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩、例えば $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ 、および/または $Phe-D\text{-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ と、カルジオリピンと、の有効量がドーブされたcyt cを刺激することを含む。一部の実施形態において、該方法は、カルジオリピンの有効量がドーブされたcyt cを刺激することを含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $Dmt-D\text{-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19) (ここで(atn)Dapは、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、 $Dmt-D\text{-Arg-Al d-Lys-NH}_2$ (SS-36) (ここでAl dは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $Dmt-D\text{-Arg-Phe-Lys-Al d-NH}_2$ (SS-37) (ここでAl dは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231)、および

Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dapは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0024】

一部の実施形態において、本開示は、cyt c バイオセンサーのための方法および組成物を提供する。一部の実施形態において、cyt c バイオセンサーは、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩のうちの1種以上を含む。一部の実施形態において、cyt c バイオセンサーは、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩とカルジオリピンのうちの1種以上を含む。一部の実施形態において、cyt c バイオセンサーは、カルジオリピンを含む。一部の実施形態において、ペプチドがドーブされた、カルジオリピンがドーブされた、またはペプチド/カルジオリピンがドーブされたcyt c は、バイオセンサー内でレドックス活性酵素と電極の間の媒介物質として機能する。一部の実施形態において、ペプチドがドーブされたcyt c は、バイオセンサーの電極に直接固定されている。一部の実施形態において、ペプチド/カルジオリピンがドーブされたcyt c は、バイオセンサーの電極に直接固定されている。一部の実施形態において、カルジオリピンがドーブされたcyt c は、バイオセンサーの電極に直接固定されている。一部の実施形態において、ペプチド、カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンは、バイオセンサー内でcyt c に結合している。一部の実施形態において、ペプチド、カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンは、cyt c に結合していない。一部の実施形態において、カルジオリピン、ペプチド、またはcyt c のうちの1つ以上は、バイオセンサー内の表面に固定されている。一部の実施形態において、カルジオリピン、ペプチド、またはcyt c のうちの1つ以上は、バイオセンサー内で自由に拡散可能である。一部の実施形態において、バイオセンサーは、D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ ペプチドを含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、バイオセンサーは、芳香族カチオン性ペプチドPhe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (ここで(atn)Dapは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ (SS-36) (ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (SS-37) (ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dapは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0025】

一部の実施形態において、本開示は、環境汚染物質のバイオレメディエーション(bioremediation)のための組成物を提供する。一部の実施形態において、該組成物は、1種以上の芳香族カチオン性ペプチドまたはその塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩を発現する組換えバクテリアを含む。一部の実施形態において、組換えバクテリアは、1種以上の芳香族カチオン性ペプチドをコードする核酸を含む。一部の実施形態において、核酸は、誘導性プロモータの制御下で発現される。一部の実施形態において、核酸は、構成性プロモータの制御下で発現される。一部の実施形態において、核酸は、プラスミドDNAを含む。一部の実施形態において、核酸は、ゲノムインサートを含む。一部の実施形態において、組換えバクテリアは、表7に列挙されたバクテリア種に由来する。

【0026】

一部の態様において、本開示は、環境汚染物質のバイオレメディエーションのための方法を提供する。一部の態様において、該方法は、環境汚染物質を含有する材料を、1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現する組換えバクテリアを含むバイオレメディエーシ

10

20

30

40

50

ョン組成物と接触させることを含む。一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、異化的金属還元のための方法を含む。一部の実施形態において、該金属は、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Y、Zr、Nb、Mo、Tc、Ru、Pd、Ag、Cd、Hf、Ta、W、Re、Os、Ir、Pt、Au、Hg、Rf、Db、Sg、Bh、Hs、Cn、Al、Ga、In、Sn、Ti、Pb、またはBiを含む。一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、非金属の異化的還元のための方法を含む。一部の実施形態において、非金属は、硫酸塩を含む。一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、過塩素酸塩の異化的還元のための方法を含む。一部の実施形態において、過塩素酸塩は、 NH_4ClO_4 、 CsClO_4 、 LiClO_4 、 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 、 HClO_4 、 KClO_4 、 RbClO_4 、 AgClO_4 、または NaClO_4 を含む。一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、異化的硝酸塩還元のための方法を含む。一部の実施形態において、硝酸塩は、 HNO_3 、 LiNO_3 、 NaNO_3 、 KNO_3 、 RbNO_3 、 CsNO_3 、 $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、または $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ を含む。一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、放射線核種の異化的還元のための方法を含む。一部の実施形態において、放射性核種は、アクチニドを含む。一部の実施形態において、放射性核種は、ウランを含む。一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、メチル-tert-ブチルエーテル(MTBE)、塩化ビニル、またはジクロロエチレンの異化的還元のための方法を含む。

【0027】

一部の実施形態において、本明細書に記載のバイオレメディエーション法は、インサイチュ(in situ)で実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載のバイオレメディエーション法は、エクスサイチュ(ex situ)で実施される。

【0028】

一部の実施形態において、本明細書に記載されたバイオレメディエーション法は、汚染物質を、1種以上の芳香族カチオン性ペプチドをコードする核酸を含む組換えバクテリアと接触させることを含む。一部の実施形態において、核酸は、誘導性プロモータの制御下で発現される。一部の実施形態において、核酸は、構成性プロモータの制御下で発現される。一部の実施形態において、核酸は、プラスミドDNAを含む。一部の実施形態において、核酸は、ゲノムインサートを含む。一部の実施形態において、組換えバクテリアは、表7に列挙されたバクテリア種に由来する。

【0029】

本明細書に開示のバイオレメディエーションの方法および組成物の一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂を含む。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ペプチド(SS-31)がcytc還元の速度を上昇させることを示すグラフである。

【図2】(上図)D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)がcytcにより電子拡散を増進させることを示すグラフである。(下図)増加する用量のSS-31を含む溶液中のcytcのサイクリックボルタモグラムの示すグラフである(100mV/sで20mM Tris-ホウ酸塩-EDTA(TBE)緩衝液 pH7)

【図3】D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ペプチド(SS-31)がcytcにおける電子の能力を増進することを示すグラフである。

【図4】D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ペプチド(SS-31)がcytcヘムの周囲の新規なπ-π相互作用を誘導することを示すグラフである。

【図5】D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) が単離されたミトコンドリア中のO₂消費を増加させることを示すグラフである。

【図6】D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) が単離されたミトコンドリア中のA T P合成を増加させることを示すグラフである。

【図7】D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) がc y t c除去ミトプラスト中の呼吸を増進することを示すグラフである。

【図8】ペプチドがドーブされたc y t cセンサーの図である。

【図9】別のペプチドがドーブされたc y t cセンサーの図である。

【図10】ペプチドがドーブされたc y t cのスイッチの図である。

【図11】ペプチドがドーブされたc y t cが電極への電子流動におけるメディエータとして機能する、バイオセンサー内の電子流動の図である。

10

【図12】ペプチドがドーブされたc y t cが電極に固定されている、バイオセンサー内の電子流動の図である。

【図13】D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) およびP h e-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ ペプチド (SS-20) がシトクロムc還元を促進することを示すグラフである。

【図14】D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) およびP h e-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ ペプチド (SS-20) が、単離されたラット腎臓ミトコンドリア中のO₂消費により測定される電子フラックスを促進することを示すグラフである。

20

【図15】D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) およびP h e-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ ペプチド (SS-20) が、単離されたラット腎臓ミトコンドリア中のA T P生成速度を上昇させることを示すグラフである。

【図16】有機発光トランジスタのブロック図である。

【図17】有機発光ダイオードのブロック図である。

【図18】分散されたヘテロ接合有機太陽光電池のブロック図である。

【図19】図19aは、高度に折り曲げられた(h i g h l y f o l d e d)ヘテロ接合有機太陽光電池による電子正孔対の生成を示す。図19bは、作製された制御成長型(c o n t r o l l e d-g r o w t h)ヘテロ接合有機太陽光電池を含む電子正孔対の生成を示す。

30

【図20】限定するものではないが有機発光トランジスタ、有機発光ダイオード、および有機太陽光電池をはじめとする有機電子デバイスの製造中に有機材料の薄膜を堆積させるための技術を示す。

【図21】Dm t-D-A r g-P h e-(a t n) D a p-NH₂ ペプチド (SS-19)、Dm t-D-A r g-A l d-L y s-NH₂ ペプチド (SS-36) およびDm t-D-A r g-P h e-L y s-A l d-NH₂ ペプチド (SS-37) とC Lとの相互作用を示すグラフである。

【図22】Dm t-D-A r g-P h e-(a t n) D a p-NH₂ ペプチド (SS-19) とシトクロムcとの相互作用を示すグラフである。

【図23】Dm t-D-A r g-P h e-(a t n) D a p-NH₂ ペプチド (SS-19)、Dm t-D-A r g-P h e-L y s-A l d-NH₂ ペプチド (SS-37)、およびDm t-D-A r g-A l d-L y s-NH₂ ペプチド (SS-36) と、シトクロムcおよびC Lとの相互作用を示すグラフである。

40

【図24】Dm t-D-A r g-P h e-(a t n) D a p-NH₂ ペプチド (SS-19)、P h e-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ ペプチド (SS-20)、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31)、Dm t-D-A r g-A l d-L y s-NH₂ ペプチド (SS-36) およびD-A r g-T y r-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (S P I-231) がシトクロムcのヘム環境をC Lのアシル鎖から防御することを示すグラフである。

【図25】D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31)、P h

50

e-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ ペプチド (SS-20)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ ペプチド (SPI-231) がCLにより誘起されたシトクロムc還元の阻害を防止することを示すグラフである。

【図26】D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ ペプチド (SS-31) および Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ ペプチド (SS-20) が単離されたミトコンドリア中のO₂消費を増進することを示すグラフである。

【図27】D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ ペプチド (SS-31) が単離されたミトコンドリア中のATP合成を増加させることを示すグラフである。

【図28】D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ ペプチド (SS-31) がシトクロムc除去ミトプラスト中の呼吸を増進することを示すグラフである。

10

【図29】D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ ペプチド (SS-31)、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ ペプチド (SS-19)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ ペプチド (SS-20)、Dmt-D-Arg-Alld-Lys-NH₂ ペプチド (SS-36)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Alld-NH₂ ペプチド (SS-37) およびD-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ ペプチド (SPI-231) がシトクロムc/CL複合体中のペルオキシダーゼ活性を防止することを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本発明の実質的な理解を与えるために、本発明の特定の態様、様式、実施形態、変形例および特色を以下に様々なレベルで詳述することを認識されたい。本明細書で用いられる特定の用語の定義を、以下に示す。他に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、一般に、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。

20

【0032】

本開示を実践する際に、細胞生物学、分子生物学、蛋白質生化学、免疫学、およびバクテリア学の多くの従来技術が用いられる。これらの技術は、当該技術分野で周知であり、Current Protocols in Molecular Biology, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)をはじめとする、任意の数の入手可能な発行物に示される。

30

【0033】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる単数形「a」、「an」および「the」は、他に明白に示されない限り複数の指示物を示す。例えば「細胞 (a cell)」は、2以上の細胞の組み合わせなどを含む。

【0034】

本明細書で用いられる「薬剤、薬物またはペプチドの対象への投与」は、意図する機能を実施する化合物を対象に導入または送達する任意の経路を含む。投与は、経口、経鼻、非経口（静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下）、または局所をはじめとする任意の適切な経路により実施され得る。

40

【0035】

本明細書で用いられる用語「アミノ酸」は、天然由来アミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然由来アミノ酸と類似の手法で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を包含する。天然由来アミノ酸は、遺伝子コードによりコードされるアミノ酸、および後期に修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸塩、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然由来アミノ酸と同じ基本化学構造、即ち水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合したα炭素を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチオニンメチルスル

50

ホニウムを指す。そのような類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然由来アミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然由来アミノ酸と類似の手法で機能する化学化合物を指す。アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB生化学命名法委員会（Biochemical Nomenclature Commission）の推奨する、一般に公知の3文字表記または1文字表記により称号され得る。

【0036】

本明細書で用いられる用語「有効量」は、所望の治療的および／または予防的効果を実現するのに十分な量を指す。治療的または予防的適用に関連して、対象に投与される組成物の量は、疾患のタイプおよび重症度、ならびに個体の特性、例えば一般的健康状態、年齢、性別、体重および薬物への耐受性に依存する。それは、疾患の度合い、重症度およびタイプにも依存する。当業者は、これらおよび他の因子に応じて適切な投薬量を決定することができる。該組成物は、1種以上の追加的治療化合物と併せて投与することもできる。一部の実施形態において、用語「有効量」は、電気移動を促進または増進するために、所望の電子的または導電的効果を実現するのに十分な量を指す。

10

【0037】

本明細書で用いられる「外因性核酸」は、天然には宿主細胞内に存在せず、外部供給源から導入される核酸（例えば、DNA、RNA）を指す。本明細書で用いられる外因性核酸は、宿主細胞のゲノム内に統合されておらず、別個のまま存在する核酸、例えばバクテリアプラスミド核酸を指す。本明細書で用いられる「バクテリアプラスミド」は、該当する配列の担体として、およびバクテリア宿主細胞内のその配列を発現するための手段として機能するバクテリア起源の環状DNAを指す。

20

【0038】

「単離」または「精製」されたポリペプチドまたはペプチドは、その薬剤が由来する細胞もしくは組織の供給源からの細胞材料もしくは他の混入ポリペプチドを実質的に含まない、または化学合成された時に化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。例えば単離された芳香族カチオン性ペプチド、または単離されたシトクロムc蛋白質は、薬物の診断的もしくは治療的使用と干渉する材料、またはペプチドの導電率もしくは電気的性質と干渉する材料を含まない。そのような干渉材料としては、酵素、ホルモンならびに他の蛋白質性および非蛋白質性溶質を挙げることができる。

30

【0039】

本明細書で用いられる「誘導性プロモータ」は、特定の条件、例えば温度または特異的分子の存在により影響を受け、それらの条件に適う場合のみ、該当する動作可能に連結された核酸配列の発現を促進するプロモータを指す。

【0040】

本明細書で用いられる「構造的プロモータ」は、全てまたはほとんどの環境条件下で該当する動作可能に連結された核酸配列の発現を促進するプロモータを指す。

【0041】

本明細書で用いられる用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「蛋白質」は、本明細書において互換的に用いられ、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含むポリマー、例えばペプチドアイソスターを意味する。ポリペプチドは、一般にペプチド、グリコペプチドまたはオリゴマーと称される短鎖、および一般に蛋白質と称される長鎖の両方を指す。ポリペプチドは、20の遺伝子コードアミノ酸を超えるアミノ酸を含有し得る。ポリペプチドは、天然のプロセス、例えば翻訳後の工程により、または当該技術分野で周知の化学修飾技術により修飾されたアミノ酸配列を含む。

40

【0042】

本明細書で用いられる「組換えバクテリア」は、1以上の外因性核酸（例えば、DNA）配列を保有および／または発現するように操作されたバクテリアを指す。

50

【0043】

本明細書で用いられる用語「処置すること」または「処理」または「緩和」は、治療的処置および予防的または防止的操作の両方を指し、その目的は、標的とする病的状態または障害を予防または遅延（低減）させることである。記載された医療的状态の処置または予防の様々な様式が、「実質的」を意味し、全体的だけでなく全体に満たない処置または予防を含み、全体的な処置または予防未満も含み、幾つかの生物学的または医療的関連結果が実現されることも理解されよう。

【0044】

本明細書で用いられる、障害または状態の「予防」または「予防をすること」は、未処置対照試料に対して処置された試料において障害もしくは状態の出現を低減する化合物、または未処置対照試料に対して障害もしくは状態の症状1つ以上の発症を遅延させる、もしくはその重症度を低減する化合物を指す。

10

【0045】

芳香族カチオン性ペプチド

本技術は、芳香族カチオン性ペプチドの使用に関する。一部の実施形態において、該ペプチドは、導電率に関する態様において有用である。

【0046】

芳香族カチオン性ペプチドは水溶性であり、高極性である。これらの特性にも関わらず、ペプチドは、細胞膜を即座に透過し得る。芳香族カチオン性ペプチドは、典型的に、ペプチド結合により共有結合された最小で3個のアミノ酸または最小で4個のアミノ酸を含む。芳香族カチオン性ペプチド中に存在するアミノ酸の最大数は、ペプチド結合により共有結合された約20個のアミノ酸である。適切にはアミノ酸の最大数は、約12個、約9個、または約6個である。

20

【0047】

芳香族カチオン性ペプチドのアミノ酸は、任意のアミノ酸であってもよい。本明細書で用いられる用語「アミノ酸」は、少なくとも1つのアミノ基および少なくとも1つのカルボキシル基を含む任意の有機分子を指すために用いられる。典型的には少なくとも1つのアミノ基は、カルボキシル基に対して α 位に存在する。アミノ酸は天然由来であってもよい。天然由来アミノ酸としては、例えば、哺乳動物の蛋白質中で通常見出される20種類の最も一般的な左旋性（L）アミノ酸、即ちアラニン（Ala）、アルギニン（Arg）、アスパラギン（Asn）、アスパラギン酸（Asp）、システイン（Cys）、グルタミン（Gln）、グルタミン酸（Glu）、グリシン（Gly）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、リシン（Lys）、メチオニン（Met）、フェニルアラニン（Phe）、プロリン（Pro）、セリン（Ser）、トレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、チロシン（Tyr）、およびバリン（Val）が挙げられる。他の天然由来アミノ酸としては、例えば蛋白質合成と関係がない代謝過程で合成されるアミノ酸が挙げられる。例えば、アミノ酸オルニチンおよびシトルリンは、尿素生成時の哺乳動物の代謝において合成される。天然由来アミノ酸の別の例としては、ヒドロキシプロリン（Hyp）が挙げられる。

30

【0048】

ペプチドは、場合により1つ以上の非天然由来アミノ酸を含む。場合によりペプチドは、天然由来であるアミノ酸を有さない。非天然由来アミノ酸は、左旋性（L-）、右旋性（D-）、またはそれらの混合物であってもよい。非天然由来アミノ酸は、生存する生物体の通常の代謝過程では典型的に合成されず、かつ蛋白質中には天然に発生しないアミノ酸である。さらに非天然由来アミノ酸は、適切には一般的なプロテアーゼによっても認識されない。非天然由来アミノ酸は、ペプチド内の任意の位置に存在し得る。例えば非天然由来アミノ酸は、N末端、C末端、またはN末端とC末端との間の任意の位置に存在し得る。

40

【0049】

非天然由来アミノ酸は、例えば天然アミノ酸中に見出されないアルキル基、アリアル基

50

、またはアルキルアリール基を含んでいてもよい。非天然アルキルアミノ酸の幾つかの例としては、 α -アミノ酪酸、 β -アミノ酪酸、 γ -アミノ酪酸、 δ -アミノ吉草酸、および ε -アミノカプロン酸が挙げられる。非天然アリールアミノ酸の幾つかの例としては、オルトー、メター、およびパラアミノ安息香酸が挙げられる。非天然アルキルアリールアミノ酸の幾つかの例としては、オルトー、メター、およびパラアミノフェニル酢酸、ならびに γ -フェニル- β -アミノ酪酸が挙げられる。非天然由来アミノ酸は、天然由来アミノ酸の誘導体を含む。天然由来アミノ酸の誘導体は、例えば、天然由来アミノ酸に1つ以上の化学基を付加したものを含み得る。

【0050】

例えば、1つ以上の化学基が、フェニルアラニンもしくはチロシン残基の芳香環の2'位、3'位、4'位、5'位、もしくは6'位、またはトリプトファン残基のベンゾ環の4'位、5'位、6'位、もしくは7'位のうちの1つ以上に付加され得る。この基は、芳香族環に付加され得る任意の化学基であってもよい。そのような基の幾つかの例としては、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、または t -ブチルなどの分枝状または非分枝状の C_1-C_4 アルキル、 C_1-C_4 アルキルオキシ（即ち、アルコキシ）、アミノ、 C_1-C_4 アルキルアミノ、および C_1-C_4 ジアルキルアミノ（例えば、メチルアミノ、ジメチルアミノ）、ニトロ、ヒドロキシル、ハロ（即ち、フルオロ、クロロ、ブromo、またはヨード）が挙げられる。天然由来アミノ酸の非天然誘導体の幾つかの具体例として、ノルバリン（Nva）およびノルロイシン（Nle）が挙げられる。

【0051】

ペプチド中のアミノ酸の修飾の別の例が、ペプチドのアスパラギン酸またはグルタミン酸残基のカルボキシル基の誘導体化である。誘導体化の一例は、アンモニアによるアミド化、またはメチルアミン、エチルアミン、ジメチルアミン、もしくはジエチルアミンなどの第一級もしくは第二級アミンによるアミド化である。誘導体化の別の例としては、例えばメチルまたはエチルアルコールによる、エステル化が挙げられる。別のそのような修飾としては、リシン、アルギニン、またはヒスチジン残基のアミノ基の誘導体化が挙げられる。例えば、そのようなアミノ基は、アクリル化され得る。幾つかの適切なアシル基としては、例えばアセチルまたはプロピオニル基などの上述の C_1-C_4 アルキル基のいずれかを含むベンゾイル基またはアルカノイル基が挙げられる。

【0052】

非天然由来アミノ酸は、適切には一般的なプロテアーゼに耐性または非感受性である。プロテアーゼに耐性または非感受性である非天然由来アミノ酸の例としては、上述の天然由来L-アミノ酸のいずれかの右旋性（D-）形態に加え、L-および/またはD-非天然由来アミノ酸も挙げられる。D-アミノ酸は通常、蛋白質中に生じないが、細胞の通常のリボソーム蛋白質合成装置以外の手段によって合成される特定のペプチド抗生物質中に見出される。本明細書で用いられるD-アミノ酸は、非天然由来アミノ酸と見なされる。

【0053】

プロテアーゼ感受性を最小限に抑えるため、ペプチドは、アミノ酸が天然由来であるか、または非天然由来であるかにかかわらず、一般的なプロテアーゼによって認識される5個未満、4個未満、3個未満、または2個未満の隣接するL-アミノ酸を有さなければならない。一実施形態において、ペプチドは、D-アミノ酸のみを有し、L-アミノ酸は有さない。ペプチドが、アミノ酸のプロテアーゼ感受性配列を含む場合、アミノ酸の少なくとも1つは、好ましくは非天然由来D-アミノ酸であり、それによりプロテアーゼ耐性を付与する。プロテアーゼ感受性配列の例としては、エンドペプチダーゼおよびトリプシンなどの一般的なプロテアーゼによって即座に切断される2つ以上の隣接する塩基性アミノ酸が挙げられる。塩基性アミノ酸の例としては、アルギニン、リシン、およびヒスチジンが挙げられる。

【0054】

芳香族カチオン性ペプチドは、ペプチド中のアミノ酸残基の総数と比較して、生理学的

10

20

30

40

50

pHで正味正電荷の最小数を有さなければならない。生理学的pHでの正味正電荷の最小数は、以下では(p_m)と称される。ペプチド中のアミノ酸残基の総数は、以下では(r)と称される。後述する正味正電荷の最小数は、全て生理学的pHでの値である。本明細書で用いられる用語「生理学的pH」は、哺乳動物の体の組織および臓器の細胞中の正常なpHを指す。例えば、ヒトの生理学的pHは、通常はおおよそ7.4であるが、哺乳動物の通常の生理学的pHは、約7.0～約7.8のいずれかのpHになり得る。

【0055】

本明細書で用いられる「正味電荷」は、ペプチド中に存在するアミノ酸が有する正電荷の数と負電荷の数との差し引きの量を意味する。本明細書において、正味電荷が生理学的pHで測定されることは、理解されよう。生理学的pHで正に帯電した天然由来アミノ酸としては、L-リシン、L-アルギニン、およびL-ヒスチジンが挙げられる。生理学的pHで負に帯電した天然由来アミノ酸としては、L-アスパラギン酸およびL-グルタミン酸が挙げられる。

【0056】

典型的にはペプチドは、正に帯電したN末端アミノ基と、負に帯電したC末端カルボキシル基とを有する。電荷は、生理学的pHで互いに打ち消し合う。正味電荷の計算の例として、ペプチドTyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Argは、1個の負に帯電したアミノ酸(即ち、Glu)および4個の正に帯電したアミノ酸(即ち、2個のArg残基、1個のLys、および1個のHis)を有する。それゆえ先のペプチドは、3の正味正電荷を有する。

【0057】

一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $3p_m$ が $r+1$ 以下の最大数である、生理学的pHでの正味正電荷の最小数(p_m)とアミノ酸残基の総数(r)との関係を有する。この実施形態において、正味正電荷の最小数(p_m)とアミノ酸残基の総数(r)との関係は、以下の通りである。

【表1】

表1. アミノ酸の数および正味正電荷 ($3p_m \leq p+1$)

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

【0058】

別の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $2p_m$ が $r+1$ 以下の最大数である、正味正電荷の最小数(p_m)とアミノ酸残基の総数(r)との関係を有する。この実施形態において、正味正電荷の最小数(p_m)とアミノ酸残基の総数(r)との関係は、以下の通りである。

【表2】

表2. アミノ酸の数および正味正電荷 ($2p_m \leq p+1$)

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

【0059】

一実施形態において、正味正電荷の最小数(p_m)とアミノ酸残基の総数(r)は、等

しい。別の実施形態において、ペプチドは、3個または4個のアミノ酸残基および最小で1の正味正電荷を有し、適切には最小で2の正味正電荷を有し、より好ましくは最小で3の正味正電荷を有する。

【0060】

芳香族カチオン性ペプチドが、正味正電荷の総数 (p_t) と比較して最小数の芳香族基を有することも、重要である。最小数の芳香族基は、以下では (a) と称される。芳香族基を有する天然由来アミノ酸としては、アミノ酸ヒスチジン、トリプトファン、チロシン、およびフェニルアラニンが挙げられる。例えば、ヘキサペプチド $Lys-Gln-Tyr-Arg-Phe-Trp$ は、2の正味正電荷 (リシンおよびアルギニン残基による寄与) と3個の芳香族基 (チロシン、フェニルアラニン、およびトリプトファン残基による寄与) を有する。

10

【0061】

芳香族カチオン性ペプチドは、 p_t が1で a も1になり得る場合を除き、 $3a$ が $p_t + 1$ 以下の最大数である、芳香族基の最小数 (a) と生理学的 pH での正味正電荷の総数 (p_t) との関係も有さなければならない。この実施形態において、芳香族基の最小数 (a) と正味正電荷の総数 (p_t) との関係は、以下の通りである。

【表3】

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

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

20

【0062】

別の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $2a$ が $p_t + 1$ 以下の最大数である、芳香族基の最小数 (a) と生理学的 pH での正味正電荷の総数 (p_t) との関係も有する。この実施形態において、芳香族アミノ酸残基の最小数 (a) と正味正電荷の総数 (p_t) との関係は以下の通りである。

30

【表4】

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

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

【0063】

別の実施形態において、芳香族基の数 (a) と正味正電荷の総数 (p_t) は、等しい。

40

【0064】

カルボキシル基、特にC末端アミノ酸の末端カルボキシル基は、適切には、例えばC末端アミドを形成するアンモニアで、アミド化される。あるいはC末端アミノ酸の末端カルボキシル基は、任意の第一級または第二級アミンでアミド化されていてもよい。第一級または第二級アミンは、例えばアルキルであってもよく、特に分枝状または非分枝状の C_1 - C_4 アルキルまたはアリールアミンであってもよい。したがってペプチドのC末端のアミノ酸は、アミド、N-メチルアミド、N-エチルアミド、N, N-ジメチルアミド、N, N-ジエチルアミド、N-メチル-N-エチルアミド、N-フェニルアミド、またはN-フェニル-N-エチルアミド基に変換されてもよい。芳香族カチオン性ペプチドのC末

50

端には生じないアスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸残基の遊離カルボキシラート基も、ペプチド内のどこでもアミド化されてよい。これらの内部の位置でのアミド化は、先に記載されたアンモニアまたは、第一級もしくは第二級アミンのいずれかであってもよい。

【0065】

一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、2の正味正電荷および少なくとも1個の芳香族アミノ酸を有するトリペプチドである。特定の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、2の正味正電荷および2個の芳香族アミノ酸を有するトリペプチドである。

【0066】

一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、

1. 少なくとも1の正味正電荷；
2. 最小で3のアミノ酸；
3. 最大で約20のアミノ酸；
4. 正味正電荷の最小数 (p_m) とアミノ酸残基の総数 (r) との間の、 $3 p_m$ が $r + 1$ 以下の最大数となる関係；

5. 芳香族基の最小数 (a) と正味正電荷の総数 (p_t) との間の、 a が1であり p_t も1になり得る場合を除き、 $2 a$ が $p_t + 1$ 以下の最大数となる関係、を有する。

【0067】

別の実施形態において、本発明は、ミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) を受けるミトコンドリアの数を低下させる方法、または哺乳動物の摘出臓器においてミトコンドリア膜透過性遷移を予防する方法を提供する。該方法は、

少なくとも1の正味正電荷；

最小で3のアミノ酸；

最大で約20のアミノ酸；

正味正電荷の最小数 (p_m) とアミノ酸残基の総数 (r) との間の、 $3 p_m$ が $r + 1$ 以下の最大数となる関係；

芳香族基の最小数 (a) と正味正電荷の総数 (p_t) との間の、 a が1であり p_t も1になり得る場合を除き、 $2 a$ が $p_t + 1$ 以下の最大数となる関係、を有する、芳香族カチオン性ペプチドの有効量を摘出臓器に投与することを含む。

【0068】

更に別の実施形態において、本発明は、必要とする哺乳動物において、ミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) を受けるミトコンドリアの数を低下させる方法、または哺乳動物の摘出臓器においてミトコンドリア膜透過性遷移を予防する方法を提供する。該方法は、

少なくとも1の正味正電荷；

最小で3のアミノ酸；

最大で約20のアミノ酸；

正味正電荷の最小数 (p_m) とアミノ酸残基の総数 (r) との間の、 $3 p_m$ が $r + 1$ 以下の最大数となる関係；

芳香族基の最小数 (a) と正味正電荷の総数 (p_t) との間の、 a が1であり p_t も1になり得る場合を除き、 $3 a$ が $p_t + 1$ 以下の最大数となる関係、を有する、芳香族カチオン性ペプチドの有効量を哺乳動物に投与することを含む。

【0069】

芳香族カチオン性ペプチドとしては、限定するものではないが、以下の例示的ペプチド：

10

20

30

40

H-Phe-D-Arg Phe-Lys-Cys-NH₂

D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂;

D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂;

H-D-Arg-Dmt-Lys (N⁶Me)-Phe-NH₂;

10

H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe (NMe)-NH₂;

H-D-Arg-Dmt-Lys (N⁶Me)-Phe (NMe)-NH₂;

H-D-Arg (N⁶Me)-Dmt (NMe)-Lys (N⁶Me)-Phe (NMe)-NH₂;

D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂;

20

D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂;

D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂;

H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂;

H-D-Arg-Ψ [CH₂-NH] Dmt-Lys-Phe-NH₂;

30

H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH₂-NH] Lys-Phe-NH₂;

H-D-Arg-Dmt-Lys Ψ [CH₂-NH] Phe-NH₂; and

H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH₂-NH] Lys-Ψ [CH₂-NH] Phe-NH₂,

Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂

2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂

40

Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂

Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂

D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂

H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂

Lys-D-Arg-Tyr-NH₂,

D-Tyr-Trp-Lys-NH₂,

10

Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂,

Tyr-His-D-Gly-Met,

Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂,

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

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

20

Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂,

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

Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂,

Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂,

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

30

Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂,

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

Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg- D-Gly-Lys-NH₂,

D-His-Lys-Tyr- D-Phe-Glu- D-Asp- D-His- D-Lys-Arg-Trp-NH₂,

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

40

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

Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂,

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

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

Glu-Arg-D-Lys-Tyr- D-Val-Phe-

D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂,

10

Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu- D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-

D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly,

D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg
-His-Phe-NH₂,

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

20

His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-L
ys-Tyr-His-Ser-NH₂,

Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp
-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp, and

Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-G
ly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂;

30

Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (ここで(atn)Dap は、 β -アントラニ
ロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である) ;

Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dap は、 β -ダンシル-L-
 α , β -ジアミノプロピオン酸である) ;

Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (ここで Ald は、 β -(6'-ジメチルアミノ
-2'-ナフトイル)アラニンである) ;

40

Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (ここで Ald は、 β -(6'-ジメチルアミ
ノ-2'-ナフトイル)アラニンである) および
D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ ; ならびに

D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂

50

が挙げられる。

【0070】

一部の実施形態において、本発明の方法において有用なペプチドは、チロシン残基またはチロシン誘導体を有するペプチドである。一部の実施形態において、チロシンの誘導体としては、2'-メチルチロシン(Mmt)；2', 6'-ジメチルチロシン(2' 6' Dmt)；3' 5'-ジメチルチロシン(3' 5' Dmt)；N, 2' 6'-トリメチルチロシン(Tmt)；および2'-ヒドロキシ-6'-メチルチロシン(Hmt)が挙げられる。

【0071】

一実施形態において、ペプチドは、式Ty r-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ (本明細書ではSS-1と称する)を有する。SS-01は、アミノ酸チロシン、アルギニン、およびリシンにより寄与される3の正味正電荷を有し、アミノ酸フェニルアラニンおよびチロシンにより寄与される2個の芳香族基を有する。SS-01のチロシンは、式2', 6'-Dmt-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ (本明細書ではSS-02と称される)を有する化合物を製造する、2', 6'-ジメチルチロシンなどのチロシンの修飾された誘導体であってもよい。

【0072】

適切な実施形態において、N末端のアミノ酸残基は、アルギニンである。そのようなペプチドの例が、D-A r g-2' 6' Dmt-L y s-P h e-NH₂ (本明細書ではSS-31と称される)である。

【0073】

別の実施形態において、N末端のアミノ酸は、フェニルアラニンまたはその誘導体である。一部の実施形態において、フェニルアラニンの誘導体としては、2'-メチルフェニルアラニン(Mmp)；2', 6'-ジメチルフェニルアラニン(Dmp)；N, 2' 6'-トリメチルフェニルアラニン(Tmp)；および2'-ヒドロキシ-6'-メチルフェニルアラニン(Hmp)が挙げられる。そのようなペプチドの例が、P h e-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ (本明細書ではSS-20と称される)である。一実施形態において、SS-02のアミノ酸配列は、DmtがN末端にならないように転位される。そのような芳香族カチオン性ペプチドの例は、式D-A r g-2' 6' Dmt-L y s-P h e-NH₂ (SS-31)を有する。

【0074】

別の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、式P h e-D-A r g-Dmt-L y s-NH₂ (本明細書ではSS-30と称する)を有する。あるいはN末端フェニルアラニンは、2', 6'-ジメチルフェニルアラニン(2' 6' Dmt)など、フェニルアラニンの誘導体であってもよい。アミノ酸位置の1つに2', 6'-ジメチルフェニルアラニンを含むSS-01は、式2', 6' Dmt-D-A r g-Dmt-L y s-NH₂を有する。

【0075】

一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-A r g-P h e-(a t n)Dap-NH₂ (SS-19) (ここで(a t n)Dapは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-A r g-Ald-L y s-NH₂ (SS-36) (ここでAldは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-A r g-P h e-L y s-Ald-NH₂ (SS-37) (ここでAldは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-A r g-Ty r-L y s-P h e-NH₂ (SPI-231)、およびDmt-D-A r g-P h e-(d n s)Dap-NH₂ (ここで(d n s)Dapは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0076】

本明細書に記述されたペプチドおよびそれらの誘導体は、機能的類似体を更に含むことができる。類似体が規定されたペプチドと同じ機能を有する場合、ペプチドは機能的類似

10

20

30

40

50

体と見なされる。例えば類似体は、1つ以上のアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている、ペプチドの置換変異体になり得る。ペプチドの適切な置換変異体は、保存的アミノ酸置換を含む。アミノ酸は、物理化学的性質によって以下のように分類することができる：

(a) 非極性アミノ酸：A l a (A) S e r (S) T h r (T) P r o (P) G l y (G) C y s (C) ；

(b) 酸性アミノ酸：A s n (N) A s p (D) G l u (E) G l n (Q) ；

(c) 塩基性アミノ酸：H i s (H) A r g (R) L y s (K) ；

(d) 疎水性アミノ酸：M e t (M) L e u (L) I l e (I) V a l (V) ；および

(e) 芳香族アミノ酸：P h e (F) T y r (Y) T r p (W) H i s (H) 。

【0077】

10

同じ群内の別のアミノ酸によるペプチド中のアミノ酸の置換は、保存的置換と称され、元のペプチドの物理的・化学的性質を保持し得る。その一方で、異なる群内の別のアミノ酸によるペプチド中のアミノ酸の置換は、一般に元のペプチドの性質を変える可能性が高い。本発明の実践において有用となる類似体の非限定的例としては、限定するものではないが、表5に示された芳香族カチオン性ペプチドが挙げられる。

【表 5】

表 5. ペプチドアナログの例

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸 位置 4	アミノ 酸位置 5	アミノ 酸位置 6	アミノ酸 位置 7	C末端修飾
D-Arg	Dmt	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Phe	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Phe	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Phe	Dmt				NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Cys			NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Glu	Cys	Gly	NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Ser	Cys		NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Gly	Cys		NH ₂
Phe	Lys	Dmt	D-Arg				NH ₂
Phe	Lys	D-Arg	Dmt				NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Cys			NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Glu	Cys	Gly	NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Ser	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Gly	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸 位置 4	アミノ 酸位置 5	アミノ 酸位置 6	アミノ酸 位置 7	C末端修飾
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Cys			NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Glu	Cys	Gly	NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Ser	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Gly	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Lys	Dmt				NH ₂
Phe	Dmt	D-Arg	Lys				NH ₂
Phe	Dmt	Lys	D-Arg				NH ₂
Lys	Phe	D-Arg	Dmt				NH ₂
Lys	Phe	Dmt	D-Arg				NH ₂
Lys	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
Lys	Dmt	Phe	D-Arg				NH ₂
Lys	D-Arg	Phe	Dmt				NH ₂
Lys	D-Arg	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp				NH ₂
Trp	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Tyr	Lys				NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸 位置 4	アミノ 酸位置 5	アミノ 酸位置 6	アミノ酸 位置 7	C末端修飾
Trp	D-Arg	Trp	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Trp	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Trp	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Dmt				NH ₂
Cha	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Ala	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂

C h a =シクロヘキシル

【0078】

特定の状況下では、オピオイド受容体アゴニスト活性も有するペプチドを使用することが、有利となる場合がある。本発明の実践において有用となる類似体の例としては、限定するものではないが、表6の芳香族カチオン性ペプチドが挙げられる。

【表6】

表6. オピオイド受容体アゴニスト活性を有するペプチドアナログ

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
Tyr	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -N H-dns		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -N H-atn		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Cit	Phe	Lys		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Cit	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2' 6' Dmt	D-Cit	Phe	Ahp		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2-アミノヘ プタン酸)		NH ₂
Bio-2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
3' 5' Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Tyr	Lys		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Tyr	Orn		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Tyr	Dab		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Tyr	Dap		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	2' 6' Dmt	Lys		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	2' 6' Dmt	Orn		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	2' 6' Dmt	Dab		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	2' 6' Dmt	Dap		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	3' 5' Dmt	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	3' 5' Dmt	Lys		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	3' 5' Dmt	Orn		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	3' 5' Dmt	Dab		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	2' 6' Dmt	Lys	Cys	NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
Tyr	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap		NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
2' 6' Dmt	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	Tyr	Dab		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	Tyr	Dap		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	2' 6' Dmt	Lys		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	2' 6' Dmt	Orn		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	2' 6' Dmt	Dab		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	2' 6' Dmt	Dap		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	atnDap		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	3' 5' Dmt	Lys		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	3' 5' Dmt	Orn		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	3' 5' Dmt	Dab		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	3' 5' Dmt	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
2' 6' Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Arg	2' 6' Dmt	Arg		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Lys	2' 6' Dmt	Arg		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Orn	2' 6' Dmt	Arg		NH ₂
2' 6' Dmt	D-Dab	2' 6' Dmt	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Dap	3' 5' Dmt	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Arg	3' 5' Dmt	Arg		NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
3' 5' Dmt	D-Lys	3' 5' Dmt	Arg		NH ₂
3' 5' Dmt	D-Orn	3' 5' Dmt	Arg		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂

10

20

30

40

アミノ酸 位置 1	アミノ酸 位置 2	アミノ酸 位置 3	アミノ酸位置 4	アミノ酸位 置 5 (存在する場 合)	C末端修飾
Tmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂

D a b = ジアミノ酪酸

D a p = ジアミノプロピオン酸

D m t = ジメチルチロシン

M m t = 2' - メチルチロシン

T m t = N, 2', 6' - トリメチルチロシン

H m t = 2' - ヒドロキシ, 6' - メチルチロシン

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

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

B i o = ビオチン

【0079】

オピオイド受容体アゴニスト活性を有する更なるペプチドとしては、D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H ₂ (S S - 3 6) (ここでA l dは、 β - (6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル) アラニンである)、およびD m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H ₂ (S S - 3 7) (ここでA l dは、 β - (6' - ジメチルアミノ - 2' - ナフトイル) アラニンである) が挙げられる。

【0080】

μ オピオイド受容体アゴニスト活性を有するペプチドは、典型的にはN末端（即ち、最初のアミノ酸位置）にチロシン残基またはチロシン誘導体を有するペプチドである。チロシンの適切な誘導体としては、2' - メチルチロシン (M m t) ; 2', 6' - ジメチルチロシン (2' 6' - D m t) ; 3', 5' - ジメチルチロシン (3' 5' D m t) ; N, 2', 6' - トリメチルチロシン (T m t) ; および2' - ヒドロキシ - 6' - メチルチロシン (H m t) が挙げられる。

【0081】

μオピオイド受容体アゴニスト活性を有さないペプチドは、一般にN末端（即ち、アミノ酸位置1）にチロシン残基またはチロシンの誘導体を有さない。N末端のアミノ酸は、チロシン以外の任意の天然由来または非天然由来アミノ酸であってもよい。一実施形態において、N末端のアミノ酸は、フェニルアラニンまたはその誘導体である。フェニルアラニンの例示的誘導体としては、2'-メチルフェニルアラニン（Mmp）、2', 6'-ジメチルフェニルアラニン（2', 6'-Dmp）、N, 2', 6'-トリメチルフェニルアラニン（Tmp）、および2'-ヒドロキシ-6'-メチルフェニルアラニン（Hmp）が挙げられる。

【0082】

表5および6に示されたペプチドのアミノ酸は、L-またはD-配置のいずれかであってもよい。

【0083】

一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、少なくとも1つのアルギニン残基および／または少なくとも1つのリシン残基を含む。一部の実施形態において、アルギニン残基および／またはリシン残基は、電子受容体として働き、プロトン共役電子輸送に参加する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、SS-31内に存在するような「電荷-環-電荷-環」配置を与える配列を含む。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、システインおよびメチオニンなどのチオール含有残基を含む。一部の実施形態において、チオール含有残基を含むペプチドは、電子を直接供与して、cyt cを還元する。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、ペプチドのN末端および／またはC末端にシステインを含む。

【0084】

一部の実施形態において、ペプチドマルチマーが提供される。例えば一部の実施形態において、ダイマー、例えばSS-20ダイマー：Phe-D-Arg-Phe-Lys-Phe-D-Arg-Phe-Lysが、提供される。一部の実施形態において、ダイマーは、SS-31ダイマー：D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂である。一部の実施形態において、マルチマーは、トリマー、テトラマーおよび／またはペンタマーである。一部の実施形態において、マルチマーは、異なるモノマーペプチドの組み合わせ（例えば、SS-31ペプチドに連結されたSS-20ペプチド）を含む。一部の実施形態において、これらの長い類似体は、治療分子として有用であり、そして／または本明細書に開示のセンター、スイッチおよび導体において有用である。

【0085】

一部の実施形態において、本明細書に記載の芳香族カチオン性ペプチドは、全て左旋性（L）アミノ酸を含む。

【0086】

ペプチド合成

ペプチドは、当該技術分野で周知の方法のいずれにより合成されてもよい。蛋白質を化学合成するための適切な方法としては、例えばSolid Phase Peptide Synthesis, Second Edition, Pierce Chemical Company (1984) およびMethods Enzymol., 289, Academic Press, Inc, New York (1997) において、Stuart およびYoungにより記載されたものが挙げられる。

【0087】

ペプチドを酵素分解に対して安定化させる1つの方法は、切断を受けるペプチド結合の所でL-アミノ酸をD-アミノ酸に交換することである。芳香族カチオン性ペプチド類似体は、既に存在するD-Ar g残基に加えて、1個以上のD-アミノ酸残基を含むように調製される。酵素分解を予防する別の方法は、ペプチドの1個以上のアミノ酸残基の所で α -アミノ基をN-メチル化することである。これにより、「任意の」ペプチダーゼによるペプチド結合切断が予防される。例としては、 $H-D-Ar g-Dmt-Lys(N^{\alpha}Me)-Phe-NH_2$; $H-D-Ar g-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH_2$; $H-D-Ar g-Dmt-Lys(N^{\alpha}Me)-Phe(NMe)-NH_2$; および $H-D-Ar g(N^{\alpha}Me)-Dmt(NMe)-Lys(N^{\alpha}Me)-Phe(NMe)-NH_2$ が挙げられる。 N^{α} -メチル化類似体は、より低い水素結合能を有しており、改善された腸管透過性を有すると予測され得る。

10

【0088】

ペプチドアミド結合($-CO-NH-$)を酵素分解に対して安定化させる別の方法は、それを還元されたアミド結合($\Psi[CH_2-NH]$)と交換することである。これは、固相ペプチド合成における、Boc-アミノ酸-アルデヒドと成長ペプチド鎖のN末端アミノ酸残基のアミノ基と間の還元アルキル化反応によって実現することができる。還元されたペプチド結合が、水素結合能を低下して細胞透過性を向上させると予想される。例としては、 $H-D-Ar g-\Psi[CH_2-NH]Dmt-Lys-Phe-NH_2$ 、 $H-D-Ar g-Dmt-\Psi[CH_2-NH]Lys-Phe-NH_2$ 、 $H-D-Ar g-Dmt-Lys\Psi[CH_2-NH]Phe-NH_2$ 、 $H-D-Ar g-Dmt-\Psi[CH_2-NH]Lys-\Psi[CH_2-NH]Phe-NH_2$ などが挙げられる。

20

【0089】

脂質

カルジオリピンは、ミトコンドリア内膜の重要成分であり、該脂質組成物全体の約20%を構成する。哺乳動物細胞において、カルジオリピンは、ほぼ独占的にミトコンドリア内膜中に見出され、ミトコンドリア代謝に関与する酵素の最適な機能に不可欠である。

【0090】

カルジオリピンは、グリセロール骨格と結合してダイマー構造を形成する、2個のホスファチジルグリセロールを含むジホスファチジルグリセロール脂質の1種である。それは、4個のアルキル基を有し、潜在的に2の負電荷を有する。カルジオリピンには4個の別個のアルキル鎖が存在するため、この分子種の複合性に関する可能性は莫大である。しかしほとんどの動物組織において、カルジオリピンは、炭素18個の脂肪アルキル鎖と、そのアルキル鎖それぞれでの2個の不飽和結合を含む。(18:2)4アシル鎖構成((18:2)4acyl chain configuration)が、哺乳動物ミトコンドリアにおける内膜蛋白質へのカルジオリピンの高親和力にとって重要な構造要件であることが提示された。しかし単離された酵素調製物を用いた試験で、その重要性が検査された蛋白質によって変動し得ることが示されている。

30

【0091】

分子内の2個のホスファートのそれぞれが、1個のプロトンを捕えることができる。それは、対称構造を有するが、1個のホスファートのイオン化は、両方をイオン化するのとは異なるレベルの酸性度で起こり、 $pK_1=3$ および $pK_2>7.5$ である。つまり正常な生理学的条件下(およそ7.0のpH)では、分子は、わずか1の負電荷を担い得る。ホスファート上のヒドロキシル基($-OH$ および $-O-$)は、安定した分子内水素結合を形成して、二環式共鳴構造を形成する。この構造は、酸化的リン酸化に寄与するプロトンを1個捕捉する。

40

【0092】

複合体IVにより触媒される酸化的リン酸化工程の間に、多量のプロトンが、膜の一方の側からもう一方の側に移動して、大きなpH変化を誘発する。カルジオリピンが、ミトコンドリア膜内でプロトントラップとして機能して、プロトンプールを厳密に局在化し、ミトコンドリア膜間の空間においてpHを最小に抑えることが示唆された。この機能は、先

50

に記載された通り負電荷を担いながら二環式構造内のプロトンを捕捉し得る、カルジオリピンの特有の構造によるものと考えられる。つまりかカルジオリピンは、プロトンを放出または吸収してミトコンドリア膜付近のpHを保持する電子バッファープールとして働き得る。

【0093】

さらに、カルジオリピンは、アポトーシスにおいて役割を担うことが示された。アポトーシスカスケードにおける初期イベントは、カルジオリピンを含む。以下により詳細に議論される通り、カルジオリピンに特異的なオキシゲナーゼが、カルジオリピン過酸化物を生成し、それにより脂質はコンホメーション変化を受ける。その後、酸化されたカルジオリピンは、ミトコンドリア内膜からミトコンドリア外膜に移動するが、そにより孔が形成してシトクロムcが細胞基質内に放出されると考えられる。シトクロムcは、IP3受容体に結合してカルシウム放出を刺激し、シトクロムcの放出を更に促進する。細胞質カルシウム濃度が毒性レベルに達すると、細胞は死滅する。さらにミトコンドリア外のシトクロムcは、アポトーシス活性化因子と相互作用して、アポトソーム複合体の形成および蛋白質溶解カスパーゼカスケードの活性化を誘発する

【0094】

別の結果は、シトクロムcが高親和力でミトコンドリア内膜上のカルジオリピンと相互作用して、電子輸送において非生産的なカルジオリピンと複合体を形成しながら、カルジオリピン特異性オキシゲナーゼ／ペルオキシダーゼとして作用することである。事実、カルジオリピンとシトクロムcとの相互作用は、インタクトなシトクロムcよりも通常のレドックス能が約マイナス(−)400mV負になる複合体を生じる。その結果、シトクロムc／カルジオリピン複合体は、ミトコンドリア複合体IIIから電子を受容することができず、スーパーオキシドの生成が増進されて、その不均化によりH₂O₂を生じる。シトクロムc／カルジオリピン複合体は、スーパーオキシドからも電子を受容することができない。さらに、カルジオリピンとシトクロムcとの高親和力での相互作用により、シトクロムcを、多価不飽和分子カルジオリピンの過酸化に向かう選択的触媒活性を有するカルジオリピン特異性ペルオキシダーゼに活性化させる。シトクロムc／カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ反応は、酸化均等物の供給源としてH₂O₂により誘導される。最終的にこの活性は、カルジオリピン酸化産物、つまり主にカルジオリピン−OOHと、その還元産物カルジオリピン−OHを蓄積させる。先に記述された通り、酸素化されたカルジオリピン種は、ミトコンドリア膜透過およびプロアポトーシス性因子(シトクロムcそのものを含む)の放出において役割を担うことが示されている。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Kagan et al., Advanced Drug Delivery Reviews, 61 (2009) 1375–1385; Kagan et al., Mol. Nutr. Food Res. 2009 January; 53 (1) : 104–114を参照されたい。

【0095】

シトクロムcに関連して、シトクロムcは、球状蛋白質であり、その主な機能は、ミトコンドリア電子伝達系において複合体III(シトクロムcリダクターゼ)から複合体IV(シトクロムcオキシダーゼ)への電子キャリアとして機能することである。補欠ヘム分子族は、Cys14およびCys17でシトクロムcに付着され、二配位の軸リガンドHis18およびMet80によって更に結合されている。Met80への6番目の配位結合が、Feと他のリガンド、例えばO₂、H₂O₂、NOなどとの相互作用を防止する。

【0096】

シトクロムcのプールは膜間腔に分布され、残りは静電的相互作用および疎水性相互作用の両方を介してミトコンドリア内膜(IMM)と会合している。シトクロムcは、静電的相互作用を介してIMM上でアニオン性リン脂質カルジオリピンに緩く結合することができる高カチオン性の蛋白質(中性pHで8の正味正電荷)である。そして先に記述された通り、シトクロムcは、疎水性相互作用を介してカルジオリピンに強固に結合することもできる。カルジオリピンへのシトクロムcのこの強固な結合は、脂質膜の外側、および

シトクロム c の内部の疎水性チャネル内に伸長する、カルジオリピンのアシル鎖の伸長によるものである (Tuominen et al., 2001; Kalanxhi & Wallace, 2007; Sinibaldi et al., 2010)。これにより、ソーレー帯領域内の負のコットンピークの消失により示される通り、シトクロム c ヘムポケット内の Fe-Met 80 結合が破壊されて、ヘム環境内が変化する (Sinibaldi et al., 2008)。これにより、ヘム Fe も H_2O_2 および NO に暴露される。

【0097】

本来のシトクロム c は、6 番目の配位のせいで、極わずかのペルオキシダーゼ活性を有する。しかしカルジオリピンへの疎水性結合により、シトクロム c は構造変化を受けて、Fe-Met 80 配位を破壊して、ヘム Fe の H_2O_2 への暴露を増加させ、cyt C が電子キャリアからペルオキシダーゼに切り替わり、カルジオリピンは一次基質となる (Vladimirov et al., 2006; Basova et al., 2007)。先に記載された通り、カルジオリピンの過酸化は、ミトコンドリア膜構造を変化させて、IMM からシトクロム c を放出させ、カスパーゼを介した細胞死を開始させる。

【0098】

つまり一部の実施形態において、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチド (例えば、D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (ここで (atn) Dap は、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ (ここで Ala は、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (ここで Ala は、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂、Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで (dns) Dap は、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、またはそれらの医薬的に許容可能な塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩) は、必要とする対象に投与される。理論に束縛されるのを望むものではないが、ペプチドがシトクロム c、カルジオリピンもしくはその両方と接触すること (例えばそれらを標的とすること)、カルジオリピン-シトクロム c 相互作用を妨害すること、カルジオリピン/シトクロム c 複合体のオキシゲナーゼ/ペルオキシダーゼ活性を阻害すること、カルジオリピン-ヒドロペルオキシドの形成を阻害すること、カルジオリピンの、その外膜への移動を阻害すること、ならびに/または IMM からのシトクロム c の放出を阻害すること、が考えられる。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドは、以下の特性または機能の 1 つ以上を含む: (1) 細胞透過性があり、ミトコンドリア内膜を標的とすること; (2) 静電的相互作用を介してカルジオリピンに選択的に結合して、ペプチドとシトクロム c との相互作用を促進すること; (3) 遊離しているシトクロム c、およびカルジオリピンに緩く、または強固に結合したシトクロム c と相互作用すること; (4) シトクロム c の疎水性ヘムポケットを防御し、そして/またはカルジオリピンが Fe-Met 80 結合を破壊するのを阻害すること; (5) ヘムポルホリンとの π-π* 相互作用を促進すること; (6) シトクロム c ペルオキシダーゼ活性を阻害すること; (7) シトクロム c 還元反応速度を促進すること; (8) カルジオリピンによる引き起こされたシトクロム c 還元阻害を予防すること; (9) ミトコンドリア電子伝達系および ATP 合成における電子フラックスを促進すること。一部の実施形態において、ペプチドが電子輸送を促進する能力は、ペプチドがシトクロム c /カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性を阻害する能力と相関しない。つまり一部の実施形態において、投与されたペプチドは、カルジオリピンとシトクロム c との相互作用を阻害、遅延または低減する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、投与されたペプチドは、シトクロム c /カルジオリ

10

20

30

40

50

ピン複合体のオキシゲナーゼ／ペルオキシダーゼ活性を阻害、遅延または低減する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、投与されたペプチドは、アポトーシスを阻害、遅延または低減する。

【0099】

芳香族カチオン性ペプチドの予防的および治療的使用

本明細書に記載の芳香族カチオン性ペプチドは、疾患の予防または処置に有用である。具体的に本開示では、本明細書に記載の芳香族カチオン性ペプチドを投与することによる、疾患のリスクがある（あるいは罹患し易い）対象を処置する予防的および治療的方法の両方を提供する。したがって本発明の方法は、必要とする対象に芳香族カチオン性ペプチドの有効量を投与することにより、対象における疾患の予防および／または処置を提供する。

10

【0100】

一態様において、本開示は、本明細書に記載の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドの有効量を必要とする哺乳動物に投与することを含む、前記哺乳動物において、ミトコンドリア透過性遷移（MPT）を受けるミトコンドリアの数を低減する方法、またはミトコンドリア透過性遷移を予防する方法を提供する。別の態様において、本開示は、本明細書に記載の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドの有効量を必要とする哺乳動物に投与することを含む、前記哺乳動物において、ATP合成速度を上昇させる方法を提供する。更に別の態様において、本開示は、本明細書に記載の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドの有効量を必要とする哺乳動物に投与することを含む、前記哺乳動物において、酸化的損傷を低減する方法を提供する。

20

【0101】

酸化的損傷。先に記載されたペプチドは、必要とする哺乳動物の酸化的損傷を低減することにおいて有用である。酸化的損傷の低減を必要とする哺乳動物は、酸化的損傷に関連する疾患、状態または処置を有する哺乳動物である。酸化的損傷は典型的には、活性酸素種（ROS）および／または活性窒素種（RNS）などのフリーラジカルによって引き起こされる。ROSおよびRNSの例としては、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオンラジカル、一酸化窒素、水素、次亜塩素酸（HOCI）およびペルオキシ亜硝酸アニオンが挙げられる。先に記載された芳香族カチオン性ペプチドの有効量の投与後に、哺乳動物、摘出臓器、または細胞内の酸化的損傷の量が減少すれば、酸化的損傷は「低減した」と見なされる。典型的に、ペプチドを用いた処置を受けていない対照的对象と比較して、酸化的損傷が少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、または少なくとも約90%減少すれば、酸化的損傷が低減されたと見なされる。

30

【0102】

一部の実施形態において、処置を受ける哺乳動物は、酸化的損傷に関連する疾患または状態を有する哺乳動物であってもよい。酸化的損傷は、哺乳動物の任意の細胞、組織、または臓器にも起こる可能性がある。ヒトにおいて、酸化ストレスは、多くの疾患に関与する。例としては、アテローム性硬化症、パーキンソン病、心不全、心筋梗塞、アルツハイマー病、統合失調症、双極性障害、脆弱性X症候群、および慢性疲労症候群が挙げられる。

40

【0103】

一実施形態において、哺乳動物は、酸化的損傷に関連する処置を受け得る。例えば、哺乳動物は、再灌流を受け得る。再灌流は、血流が減少または遮断されている任意の臓器または組織への血流の回復を指す。再灌流中に血流が回復すると、呼吸バーストおよびフリーラジカルの形成につながる。

【0104】

一実施形態において、哺乳動物は、低酸素症または虚血のために血流が減少または遮断される場合がある。例えば、低酸素症または虚血の間に血液供給を停止または重度減少させることが、例えば血栓塞栓性卒中、冠動脈アテローム性硬化症、または末梢血管疾患の

50

原因となり得る。数多くの臓器および組織が、虚血または低酸素に供される。そのような臓器の例としては、脳、心臓、腎臓、腸、および前立腺が挙げられる。罹患した組織は典型的に、心筋、骨格筋、または平滑筋などの筋肉である。例えば、心筋の虚血または低酸素症は一般に、アテローム性硬化症性または血栓性の閉塞によって引き起こされ、心臓動脈および毛細血管血液供給による心臓組織への酸素供給の減少または停止につながる。そのような心虚血または低酸素症が、罹患した心筋の疼痛および壊死を引き起こす可能性があり、最終的に心不全につながる可能性がある。

【0105】

該方法は、任意の神経変性疾患または神経変性状態に関連する酸化的損傷の低減においても使用することができる。神経変性疾患は、中枢神経系および末梢神経系の任意の細胞、組織、または臓器に影響を与え得る。そのような細胞、組織、および臓器の例としては、脳、脊髄、ニューロン、神経節、シュワン細胞、星状膠細胞、オリゴデンドロサイト、およびミクログリアが挙げられる。神経変性状態は、卒中、外傷性脳損傷または脊髄損傷などの急性疾患状態であってもよい。別の実施形態において、神経変性疾患または神経変性状態は、慢性神経変性抗体であってもよい。慢性神経変性症状において、フリーラジカルは、例えば蛋白質への損傷を引き起こす可能性がある。そのような蛋白質の例は、アミロイドβ-蛋白質である。フリーラジカルによる損傷に関連する慢性神経変性疾患の例としては、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、および筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリック病としても公知）が挙げられる。

【0106】

処置され得る他の症状としては、子癇前症、糖尿病、ならびに黄斑変性症、しわなどの加齢に関連する症状および状態が挙げられる。

【0107】

ミトコンドリア透過性遷移。先に記載されたペプチドは、ミトコンドリア透過性遷移（MPT）に関連する任意の疾患または状態の処置に有用である。そのような疾患および状態としては、限定するものではないが、組織または臓器の虚血および／または再灌流、低酸素症、ならびに複数の神経変性疾患が挙げられる。MPTの阻害または予防を必要とする哺乳動物は、これらの疾患または状態に罹患した哺乳動物である。

【0108】

アポトーシス。先に記載されたペプチドは、アポトーシスに関連する疾患または状態を処置することにおいて有用である。例示的な疾患または状態としては、限定するものではないが、大腸癌、神経膠腫、肝臓癌、神経芽細胞腫、白血病、リンパ腫および前立腺癌などの癌；重症筋無力症、全身エリテマトーデス、炎症性疾患、気管支喘息、炎症性腸疾患、肺炎などの自己免疫疾患；アデノウイルスおよびバキュロウイルスおよびHIV-AIDなどのウイルス感染；アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、網膜色素変性およびてんかんなどの神経変性疾患；再生不良性貧血、骨髓異形成症候群、T

CD4+リンパ球減少症、およびG6PD欠損などの血液疾患；心筋梗塞、脳血管障害、虚血性腎障害、および多発性嚢胞腎による誘発されるような組織障害が挙げられる。つまり一部の実施形態において、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチド（例えば、D-A r g-D m t-L y s-P h e-N H₂、P h e-D-A r g-P h e-L y s-N H₂、D m t-D-A r g-P h e-(a t n) D a p-N H₂（ここで(a t n) D a pは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である）、D m t-D-A r g-A l d-L y s-N H₂（ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである）、D m t-D-A r g-P h e-L y s-A l d-N H₂（ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである）、D-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂、D m t-D-A r g-P h e-(d n s) D a p-N H₂（ここで(d n s) D a pは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である）、またはそれらの医薬的に許容可能な塩、例えば酢酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩は、必要とする対象（例えばヒトなどの哺乳動物）に投与される。先に記述された通り、ペプチドがシトクロムc、カルジオリピンもしくはその両方と接

10

20

30

40

50

触すること（例えばそれらを標的とすること）、カルジオリピン—シトクロム c 相互作用を妨害すること、カルジオリピン—ヒドロペルオキシド形成を阻害すること、カルジオリピンの、その外膜への移動を阻害すること、ならびに／またはオキシゲナーゼ／ペルオキシダーゼ活性を阻害すること、が考えられる。つまり一部の実施形態において、投与されたペプチドは、カルジオリピンとシトクロム c との相互作用を阻害、遅延または低減する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、投与されたペプチドは、シトクロム c ／カルジオリピン複合体の形成を阻害、遅延または低減する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、投与されたペプチドは、シトクロム c ／カルジオリピン複合体のオキシゲナーゼ／ペルオキシダーゼ活性を阻害、遅延または低減する。上記に加えて、あるいは上記に代えて、一部の実施形態において、投与されたペプチドは、アポトーシスを阻害、遅延または低減する。

10

【0109】

芳香族カチオン性ペプチドに基づく治療法の生物学的効果の決定。様々な実施形態において、特定の芳香族カチオン性ペプチドに基づく治療法の効果、およびその投与が処置として適応されるかについて決定するために、適切なインビトロまたはインビボアッセイが、実施される。様々な実施形態において、所与の芳香族カチオン性ペプチドに基づく治療法が疾患の予防または処置に所望の効果を発揮するかを決定するために、代表的な動物モデルを用いてインビトロアッセイを行うことができる。治療に使用される化合物は、ヒト対象において試験する前に、限定するものではないがラット、マウス、ニワトリ、ブタ、ウシ、サル、ウサギなどの適切な動物モデル系で試験することができる。同様に、インビボ試験の場合、ヒト対象に投与する前に、当該技術分野で公知の動物モデル系のいずれかを使用することができる。

20

【0110】

予防方法。一態様において、本発明は、状態の開始または進行を予防する芳香族カチオン性ペプチドを対象に投与することで、対象の疾患を予防する方法を提供する。予防的適用において、芳香族カチオン性ペプチドの医薬組成物または薬剤が、疾患または状態を受け易い、またはそのリスクのある対象に、疾患の生化学的、組織学的、および／または行動的な症状、その合併症、ならびにその疾病の発症時に現れる中期病理学的表現型をはじめとする、疾患のリスクを排除もしくは低減する、重症度を低下させる、または発生を遅延させるために十分な量で投与される。予防的な芳香族カチオン薬の投与は、疾患もしくは障害が予防されるように、またはその進行が遅延されるように、異常の症状特性が発現する前に行うことができる。適切な化合物は、先に記載されたスクリーニングアッセイに基づいて決定することができる。

30

【0111】

治療方法。本技術の別の態様は、治療目的で対象の疾患を処置する方法を含む。治療的適用において、組成物または薬剤は、その疾患の疑いがある、または既に罹患している対象に、その合併症および疾病の発症における中期病理学的表現型をはじめとし、疾患の症候を治癒する、または少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で投与される。

【0112】

投与の様式および有効な投薬

40

細胞、臓器、または組織をペプチドと接触させるための当業者に公知の任意方法を、適用することができる。適切な方法としては、インビトロ、エクスピボ、またはインビボの方法が挙げられる。インビボ法として、典型的には哺乳類、適切にはヒトへの、先に記載された芳香族カチオン性ペプチドの投与が挙げられる。治療のためにインビボで使用される場合、芳香族カチオン性ペプチドは、有効量（即ち、所望の治療効果を有する量）で対象に投与される。用量および投薬レジメンは、対象の傷害の程度、使用される特定の芳香族カチオン性ペプチドの特性、例えば治療指数、対象、および対象の病歴に依存する。

【0113】

有効量は、内科医および臨床医に熟知された方法によって前臨床試験および臨床試験の間に決定されてもよい。本発明の方法に有用となるペプチドの有効量が、医薬化合物を投

50

与するための多くの周知方法のいずれかにより、必要とする哺乳動物に投与されてもよい。該ペプチドは、全身または局所投与することができる。

【0114】

該ペプチドは、医薬的に許容可能な塩として配合することができる。用語「医薬的に許容可能な塩」は、哺乳動物などの患者に投与することが許容され得る塩基または酸から調製された塩（例えば、所与の投薬レジメンに対して許容可能な哺乳動物の安全性を有する塩）を意味する。しかし、塩が医薬的に許容可能な塩、例えば患者への投与を意図されていない中間体化合物の塩などである必要はないことは、理解されたい。医薬的に許容可能な塩を、医薬的に許容可能な無機塩基または有機塩基、および医薬的に許容可能な無機酸または有機酸とから誘導することが可能である。さらにペプチドが、アミン、ピリジンまたはイミダゾールなどの塩基性部分と、カルボン酸またはテトラゾールなどの酸性部分と、の両方を含む場合、両性イオンが形成される場合があり、両性イオンは本明細書で使用する用語「塩」に含まれる。医薬的に許容可能な無機塩基から誘導される塩としては、アンモニア、カルシウム、銅、第二鉄、第一鉄、リチウム、マグネシウム、第二マンガン、第一マンガン、カリウム、ナトリウム、および亜鉛の塩などが挙げられる。医薬的に許容可能な有機塩基から誘導される塩としては、アルギニン、ベタイン、カフェイン、コリン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、ジエチルアミン、2-ジエチルアミノエタノール、2-ジメチルアミノエタノール、エタノールアミン、エチレンジアミン、N-エチルモルホリン、N-エチルピペリジン、グルカミン、グルコサミン、ヒスチジン、ヒドラバミン、イソプロピルアミン、リシン、メチルグルカミン、モルホリン、ピペラリジン、ピペリジン、ポリアミン樹脂、プロカイン、プリン類、テオブロミン、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリプロピルアミン、トロメタミンなど、置換アミン、環状アミン、天然由来アミンなどをはじめとする第一級、第二級、および第三級アミンの塩が挙げられる。医薬的に許容可能な無機酸から誘導される塩としては、ホウ酸、炭酸、ハロゲン化水素酸（臭化水素酸、塩酸、フッ化水素酸、またはヨウ化水素酸）、硝酸、リン酸、スルファミン酸、および硫酸の塩が挙げられる。医薬的に許容可能な有機酸から誘導される塩としては、脂肪族ヒドロキシ酸（例えば、クエン酸、グルコン酸、グリコール酸、乳酸、ラクトビオン酸、リンゴ酸、および酒石酸）、脂肪族モノカルボン酸（例えば、酢酸、酪酸、ギ酸、プロピオン酸、およびトリフルオロ酢酸）、アミノ酸（例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸）、芳香族カルボン酸（例えば、安息香酸、p-クロロ安息香酸、ジフェニル酢酸、ゲンチシン酸、馬尿酸、およびトリフェニル酢酸）、芳香族ヒドロキシ酸（例えば、o-ヒドロキシ安息香酸、p-ヒドロキシ安息香酸、1-ヒドロキシナフタレン-2-カルボン酸、および3-ヒドロキシナフタレン-2-カルボン酸）、アスコルビン酸、ジカルボン酸（例えば、フマル酸、マレイン酸、シュウ酸、およびコハク酸）、グルクロン酸、マンデル酸、粘液酸、ニコチン酸、オロチン酸、パモ酸、パントテン酸、スルホン酸（例えば、ベンゼンスルホン酸、カンファースルホン酸、エジシル酸、エタンスルホン酸、イセチオン酸、メタンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、ナフタレン-1, 5-ジスルホン酸、ナフタレン-2, 6-ジスルホン酸、およびp-トルエンスルホン酸）、キシナホ酸などの塩が挙げられる。一部の実施形態において、塩は、酢酸塩である。上記に加えて、あるいは上記に代えて、他の実施形態において、塩は、トリフルオロ酢酸塩である。

【0115】

本明細書に記載の芳香族カチオン性ペプチドは、本明細書に記載の障害の処置または予防のために単独または併用で対象に投与するための医薬組成物に組み込むことができる。そのような組成物は典型的には、活性薬剤および医薬的に許容可能な担体を含む。本明細書で用いられる用語「医薬的に許容可能な担体」としては、医薬の投与に適合する生理食塩水、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などが挙げられる。補助的な活性化合物も、組成物に組み入れることができる。

【0116】

医薬組成物は、典型的には意図された投与経路に適合するように配合される。投与経路

の例としては、非経口（例えば、静脈内、皮内、腹腔内、または皮下）、経口、吸入、経皮（局所）、眼内、イオン泳動的、および経粘膜投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含むことができる：注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶剤などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの緩衝剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度の調整用薬剤。pHは、酸または塩基、例えば塩酸および水酸化ナトリウムで調整することができる。非経口調製剤を、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器、または複数回投与用バイアルに封入できる。患者または処置を行っている内科医の都合上、投薬配合剤を、処置経過（例えば、処置の7日間）で必要な全ての器具（例えば、薬物のバイアル、希釈剤のバイアル、注射器、および針）を含むキットで提供することができる。

10

【0117】

注射可能な使用に適した医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液と、滅菌注射溶液または分散液を即座に調製できる滅菌粉末と、を含むことができる。静脈内投与の場合、適切な担体としては、生理食塩水、静菌性水、Cremophor EL（商標）（BASF，ニュージャージー州パーシッパニー所在）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての例で、非経口投与用の組成物は滅菌性であり、容易な注射可能性が存在する程度に流動性がなければならない。それは、製造および貯蔵の条件下で安定していなければならない、バクテリアおよび真菌などの微生物の汚染作用から予防されなければならない。

20

【0118】

芳香族カチオン性ペプチド組成物は、担体を含むことができ、その担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒体であってもよい。例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合には必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用により、適切な流動性を保持することができる。微生物の作用の防止は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チオメルサルなどの様々な抗菌および抗真菌剤によって実現することができる。酸化を防止するために、グルタチオンおよび他の酸化防止剤を含ませることができる。多くの場合、等張剤、例えば糖類、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール類、または塩化ナトリウムを、組成物に含めることが、好ましくなり得る。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンを組成物に含めることによって得られる。

30

【0119】

滅菌注射可能溶液は、先に列挙された原材料の1つまたは組み合わせと共に、適切な溶媒に活性化化合物を必要量で組み込み、必要に応じて、その後に濾過滅菌することで調製することができる。一般的に分散剤は、塩基性分散媒体や先に列挙されたその他の必要な原材料を含む滅菌ベヒクルに、活性化化合物を組み入れることで調製される。滅菌注射可能溶液の調製用の滅菌粉末の場合、調製の典型的な方法としては、真空乾燥や凍結乾燥が挙げられ、これらによって、事前に滅菌濾過された溶液から、有効成分の粉末に加えて、任意の更なる所望の原材料を生成させることができる。

40

【0120】

経口組成物は、一般的に不活性希釈剤または食用担体を含む。経口治療的投与の目的で、活性化化合物が賦形剤と共に組み込まれることができ、そして錠剤、トローチ、またはゼラチンカプセルなどのカプセルの形態で使用することができる。洗口液として使用される液体担体を用いて、経口組成物を調製することもできる。医薬的に適合する結合剤、および／または補助材料を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、以下の原材料または同様の性質の化合物のいずれかを含有することが

50

できる：微結晶性セルロース、トラガカントゴム、もしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤；アルギン酸、Primogel、もしくはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはSteroteなどの滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素などの滑剤；スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香料などの着香剤。

【0121】

吸入による投与の場合、該化合物は、適切な噴射剤、例えば二酸化炭素などの気体を含む加圧容器もしくはディスペンサーから、またはネブライザーから、エアロゾルスプレーの形態で送達することができる。そのような方法としては、米国特許第6,468,798号に記載されたものが挙げられる。

10

【0122】

本明細書に記載の治療化合物の全身投与は、経粘膜的または経皮的手段によるものであってもよい。経粘膜または経皮投与の場合、浸透されるバリアに適した浸透剤が、配合剤中で使用される。そのような浸透剤は、一般的に当該技術分野で公知であり、例えば、経粘膜投与の場合には、洗浄剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔スプレーの使用を通じて達成することができる。経皮投与の場合、活性化合物は、一般的に当該技術分野で公知の軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームに配合される。一実施形態において、経皮投与は、イオン泳動により実施されてもよい。

【0123】

治療用蛋白質またはペプチドは、担体系に配合することができる。担体は、コロイド系であってもよい。コロイド系は、リポソーム、リン脂質二重層ベヒクルであってもよい。一実施形態において、治療用ペプチドは、ペプチドの完全性を維持しながらリポソームでカプセル化される。当業者に認識される通り、リポソームを調製する方法には様々なものがある(Lichtenberg et al., Methods Biochem. Anal., 33:337-462 (1988); Anselme et al., Liposome Technology, CRC Press (1993) 参照)。リポソーム配合剤は、クリアランスを遅延させ、細胞取り込みを増加させることができる(Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923 (2000) 参照)。活性剤は、限定するものではないが可溶性、不溶性、透過性、不透過性、生分解性、または胃保持型のポリマーまたはリポソームをはじめとし、医薬的に許容可能な原材料から調製された粒子内に投入することもできる。そのような粒子としては、限定するものではないが、ナノ粒子、生分解性ナノ粒子、マイクロ粒子、生分解性マイクロ粒子、ナノスフェア、生分解性ナノスフェア、ミクロスフェア、生分解性ミクロスフェア、カプセル、エマルジョン、リポソーム、ミセル、およびウイルスベクター系が挙げられる。

20

30

【0124】

担体は、ポリマー、例えば生分解性生体適合性ポリマーマトリックスであってもよい。一実施形態において、治療用ペプチドは、蛋白質の完全性を維持しながらポリマーマトリックスに埋め込むことができる。ポリマーは、ポリペプチド、蛋白質、または多糖類などの天然、またはポリ α -ヒドロキシ酸などの合成であってもよい。例としては、例えばコラーゲン、フィブロネクチン、エラスチン、酢酸セルロース、硝酸セルロース、多糖類、フィブリン、ゼラチン、およびそれらの組み合わせなどから作製される担体が挙げられる。一実施形態において、ポリマーは、ポリ乳酸(PLA)または乳酸/グリコール酸共重合体(PGLA)である。ポリマーマトリックスは、ミクロスフェアおよびナノスフェアをはじめとし、様々な形態およびサイズで調製および単離することができる。ポリマー配合剤は、治療効果の期間を延長させる可能性がある(Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923 (2000) 参照)。臨床試験では、ヒト成長ホルモン(hGH)用のポリマー配合剤が、使用されてきた(Kozarich および Rich, Chemical Biology, 2:548-552 (1998) 参照)。

40

【0125】

50

ポリマーミクロスフェアの徐放性配合剤の例は、PCT公報第WO99/15154号 (Tracyら)、米国特許第5,674,534号および同第5,716,644号 (両者とも、Zaleら)、およびPCT公報第WO96/40073号 (Zaleら)、およびPCT公報第WO00/38651号 (Shahら) に記載される。米国特許第5,674,534号および同第5,716,644号およびPCT公報第WO96/40073号には、塩との凝集に対して安定化させたエリスロポエチンの粒子を含むポリマーマトリックスが記載される。

【0126】

一部の実施形態において、治療化合物は、治療化合物が体内から急速に排出されるのを防御する担体と共に調製され、例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系をはじめとする制御放出性配合剤である。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような配合剤は、公知の技術を用いて調製することができる。材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. などからも商業的に得ることができる。医薬的に許容可能な担体として、リポソーム懸濁液 (細胞特異性抗原に対するモノクローナル抗体によって特異的細胞に標的とされるリポソームを含む) を使用することができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載された通り、当業者に公知の方法に従って調製することができる。

【0127】

治療化合物は、細胞内送達を増進するように配合させることもできる。例えば、リポソーム送達系が、当該技術分野で公知であり、例えば、Chonn and Cullis, "Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems", Current Opinion in Biotechnology 6:698-708 (1995); Weiner, "Liposomes for Protein Delivery: Selecting Manufacture and Development Processes", Immunomethods, 4(3):201-9 (1994); および Gregoriadis, "Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems", Trends Biotechnol., 13(12):527-37 (1995) を参照されたい。Mizguchi et al., Cancer Lett., 100:63-69 (1996) には、インビボおよびインビトロの両方で細胞に蛋白質を送達するために膜融合性リポソームを使用することが記載される。

【0128】

治療薬の投薬量、毒性、および治療効能は、例えばLD50 (母集団の50%が死に至る用量) およびED50 (母集団の50%で治療的に有効となる用量) を決定するために、細胞培養または実験動物での標準的医薬手順により決定することができる。毒性と治療効果との用量比が治療指数であり、LD50/ED50の比で表すことができる。高い治療指数を示す化合物が、好ましい。毒性副作用を示す化合物が使用されてもよいが、非感染細胞に対する潜在的損傷を最小限に抑え、それにより副作用を低減するために、そのような化合物に罹患組織の部位を標的化させるように、送達系の設計には注意を払わなければならない。

【0129】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータは、ヒトに使用される幅広い投薬量を配合するのに使用することができる。そのような化合物の投薬量は、好ましくは毒性をあまり示さない、または毒性のないED50を含む幅広い循環濃度内に入る。投薬量は、採用される剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で様々であってもよい。該方法で使用される任意の化合物について、治療有効用量は最初、細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、細胞培養で決定されたIC50 (即ち、症状の最大阻害の半量に達する試験化合物の濃度) を含む循環血漿濃度範囲に達成するように、動物モデ

10

20

30

40

50

ルに処方することができる。そのような情報は、ヒトに有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーで測定されてもよい。

【0130】

典型的には、治療または予防効果を実現するのに十分な芳香族カチオン性ペプチドの有効量は、約 $0.000001 \text{ mg/kg 体重/日}$ ～ 約 $10,000 \text{ mg/kg 体重/日}$ の範囲内である。適切には投薬量の範囲は、約 $0.0001 \text{ mg/kg 体重/日}$ ～ 約 100 mg/kg 体重/日 である。例えば投薬量は、毎日、2日毎、もしくは3日毎に 1 mg/kg 体重 または 10 mg/kg 体重 であるか、または毎週、2週間毎、もしくは3週間毎に $1 \sim 10 \text{ mg/kg 体重}$ の範囲内であってもよい。一実施形態において、ペプチドの単回投薬量は、 $0.1 \sim 10,000 \mu\text{g/kg 体重}$ の範囲内である。一実施形態において、担体中の芳香族カチオン性ペプチドの濃度は、 $0.2 \sim 2000 \mu\text{g/mL}$ 送達量の範囲内である。例示的な処置レジメンでは、1日あたり1回または1週あたり1回の投与が課せられる。治療用途では、疾患の進行が低減または停止されるまで、好ましくは対象が疾患の症状の部分的または完全な寛解を示すまで、比較的短い間隔で比較的高い用量が必要になることがある。その後、患者は、予防レジメンを施されてもよい。

10

【0131】

一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドの治療的有效量が、 $10^{-12} \sim 10^{-6}$ モル、例えば約 10^{-7} モルの、標的組織でのペプチドの濃度として定義することができる。この濃度が、 $0.01 \sim 100 \text{ mg/kg}$ の全身用量または体表面積で同等の用量で送達されてもよい。標的組織で治療濃度を維持するように、最も好ましくは連続投与（例えば、非経口注入または経皮的適用）を含む1日1回または週に1回の投与により、投与計画が最適化されることになる。

20

【0132】

一実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドの投薬量は、約 $0.001 \sim 0.5 \text{ mg/kg/h}$ であり、適切には約 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg/kg/h}$ で提供される。一実施形態において、約 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/kg/h}$ であり、適切には約 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg/kg/h}$ である。一実施形態において、用量は、約 $0.5 \sim 10 \text{ mg/kg/h}$ であり、適切には約 $0.5 \sim 2 \text{ mg/kg/h}$ で提供される。

【0133】

限定するものではないが疾患または障害の重症度、過去の処置、対象の全体的な健康および／または年齢、ならびに存在する他の疾患をはじめとする特定の因子が、対象を効果的に処置するために必要となる投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得ることは、当業者に認識されよう。その上、本明細書に記載の治療組成物の治療有効量での対象の処置は、単回処置または一連の処置を含み得る。

30

【0134】

本発明の方法に従って処置される哺乳動物は、例えば、ヒツジ、ブタ、ウシ、およびウマなどの家畜；イヌおよびネコなどの愛玩動物；ラット、マウス、およびウサギなどの実験動物をはじめとし、任意の哺乳動物であってもよい。好ましい実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

40

【0135】

電子移動における芳香族カチオン性ペプチド

ミトコンドリアATP合成は、ミトコンドリア内膜（IMM）の電子伝達系（ETC）を介した電子流動により誘導される。伝達系を通る電子流動は、一連の酸化／還元工程として説明することができる。電子は、電子供与体（NADHまたはQH₂）から一連の電子受容体（複合体I～IV）を通り、最終的に末端の電子受容体である酸素分子に至る。シトクロムc（cyt c）は、IMMに緩く会合しており、複合体IIIとIVの間で電子を移動させる。

【0136】

ETCを介した電子の急速な入れ替えが、電子脱出およびフリーラジカル中間体の発生

50

につながる短絡を防止するために重要である。電子供与体と電子受容体の間の電子移動（E T）の速度が、それらの間の距離に対して指数関数的に低下し、超交換 E T が、20 Å に限定される。長距離 E T が、多段階の電子ホッピング工程において実現することができ、供与体と受容体の間の全体的距離が、一連のより短い、つまりより急速な E T ステップに分割される。E T C において、長距離にわたる効率的 E T は、FMN、Fe S クラスタ、およびヘムをはじめとする IMM に沿って戦略的に局在化されたコファクターにより支援される。Phe、Ty r および Tr p などの芳香族アミノ酸は、重複する π クラウドを介してヘムへの電子移動を促進することもでき、これは c y t c に関して具体的に示された（実験の実施例を参照）。適切な酸化電位を有するアミノ酸（Ty r、Tr p、C y s、Met）は、中間体電子キャリアとして機能することにより手段として作用し得る。さらに Ty r のヒドロキシル基は、電子を運搬する際にプロトンを減小させることができ、Ly s など付近の塩基性基の存在が、より効率的なプロトン共役 E T をもたらし得る。

10

【0137】

ミトコンドリアを標的としたカタラーゼ（mCAT）の過剰発現が、マウスの加齢を改善し（例えば、症状を低減し）、寿命を延長することが示されてきた。これらの例によって、ミトコンドリア酸化ストレスを減らし、ミトコンドリア機能を保護することができる「ドラッグブルな」化学的化合物を同定する。ミトコンドリアは、細胞内活性酸素種（ROS）の主要な供給源であるため、ミトコンドリアDNA、電子伝達系（E T C）の蛋白質、およびミトコンドリア脂質膜に対する酸化的損傷を制限するために、抗酸化物質をミトコンドリアに送達しなければならない。本発明者らは、ミトコンドリア内膜（IMM）内で、選択的に標的化および濃縮する合成芳香族カチオン性テトラペプチドのファミリーを発見した。これらのペプチドの一部は、一電子酸化を受け、ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤として挙動し得る、レドックス活性アミノ酸を含む。本明細書に開示のペプチド、例えばペプチド D-A r g-2'6'-Dm t-Ty r-Ly s-Phe-NH₂ などの本明細書に開示のペプチドは、細胞および動物試験でミトコンドリア ROS を減少させて、ミトコンドリア機能を防御する。近年の試験において、このペプチドが、ミトコンドリアカタラーゼ過剰発現で観察されるものに匹敵する、ミトコンドリア酸化ストレスへの防御を付与し得ることが示されている。ラジカルスカベンジングは、酸化ストレスを減少させるために最も一般的に用いられるアプローチであるが、電子漏出を減少させるための電子移動の促進、およびミトコンドリア還元電位の改善をはじめとし、使用され得る他の潜在的メカニズムが存在する。

20

30

【0138】

豊富な状況証拠から、酸化ストレスが、正常な加齢および複数の主要な疾患、例えば心血管疾患、糖尿病、神経変性疾患および癌などの転帰の多くに寄与することが示されている。酸化ストレスは一般に、酸化促進物質と抗酸化物質の不均衡として定義される。しかし、酸化的組織損傷の増加を裏づける豊富な科学的証拠があるにもかかわらず、抗酸化剤を用いた大規模な臨床研究で、これらの疾患における著しい健康利益は実証されていない。理由の1つは、入手可能な抗酸化剤が酸化促進物質を生成する部位に到達できないためである可能性がある。

40

【0139】

ミトコンドリア電子伝達系（E T C）は、ROS の主要な細胞内産生体であり、ミトコンドリア自体は、酸化ストレスを最も受け易い。そのため、ミトコンドリア機能を保護することが、ミトコンドリア酸化ストレスによって引き起こされる細胞死を防ぐための必須条件になる。ペルオキシソームを標的とするカタラーゼ（pCAT）ではなく、ミトコンドリアを標的としたカタラーゼ（mCAT）を過剰発現する利点によって、加齢の有害作用を克服するためにミトコンドリアを標的とする抗酸化剤が必要になるという概念実証が示された。しかし、IMM に対する化学的抗酸化物質の適切な送達には、依然として課題がある。

【0140】

50

1つのペプチド類似体、D-A r g - 2 ' 6 ' - D m t - T y r - L y s - P h e - N H₂ は、修飾されたチロシン残基がレドックス活性であり、一電子酸化を受け得るため、本質的な抗酸化能力を有する。本発明者らは、このペプチドがH₂O₂、ヒドロキシルラジカル、およびペルオキシ亜硝酸塩を中和し、脂質過酸化を阻害し得ることを示した。該ペプチドは、虚血再灌流傷害、神経変性疾患、およびメタボリックシンドロームの動物モデルで著しい効能を実証した。

【0141】

ミトコンドリア標的ペプチドの設計では、次の作用機序の1つ以上を組み込んで強化する：(i) 過剰なROSのスカベンジング、(ii) 電子移動を促進することによるROS産生の低減、または(iii) ミトコンドリア還元能の増加。ペプチド分子の利点は、ミトコンドリア標的に必要な芳香族カチオン性モチーフを維持しながら、レドックス中心として機能すること、電子移動を促進すること、またはスルフヒドリル基を増加させること、が可能な天然または非天然アミノ酸を組み入れることが可能なことである。

【0142】

電子および光検知のための芳香族カチオン性ペプチド

実施例に示すように、試料中の本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチド、例えばアミノ酸配列T y r - D - A r g - P h e - L y s - N H₂ (S S - 0 1)、2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - N H₂ (S S - 0 2)、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H₂ (S S - 2 0) またはD - A r g - D m t - L y s - P h e - N H₂ (S S - 3 1) を含むペプチドの濃度を変動させることで、c y t cの電気的性質およびフォトルミネッセンス性が変化する。具体的にはc y t cに対して芳香族カチオン性ペプチド濃度を増加させることで、導電率およびフォトルミネッセンスの効率を増加させる。芳香族カチオン性ペプチド濃度の適切な範囲としては、限定するものではないが0 ~ 5 0 0 m M ; 0 ~ 1 0 0 m M ; 0 ~ 5 0 0 μ m ; 0 ~ 2 5 0 μ m ; および0 ~ 1 0 0 μ m が挙げられる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D m t - D - A r g - P h e - (a t n) D a p - N H₂ (S S - 1 9) (ここで(a t n) D a p は、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H₂ (S S - 3 6) (ここでA l d は、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H₂ (S S - 3 7) (ここでA l d は、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H₂ (S P I - 2 3 1)、およびD m t - D - A r g - P h e - (d n s) D a p - N H₂ (ここで(d n s) D a p は、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (S S - 1 7) を含む。

【0143】

導電率およびフォトルミネッセンス効率におけるこれらの変動は、以下に記載される通りc y t cからの発光を伝導するため、検知するため、切替えるため、そして／または増強するために活用することができる。例えばc y t c、脂質、芳香族カチオン性ペプチド、および／またはペプチドもしくは脂質がドーブされたc y t cを用いて、センサー；圧力／温度／p H - 電流変換器；発光トランジスタを含む電界効果トランジスタ；発光デバイス、例えばダイオードおよびディスプレイ；バッテリー；ならびにソーラー電池を作製および／または増強することができる。芳香族カチオン性ペプチド濃度レベル（例えばc y t c中）は、空間的に変動して異なるバンドギャップを有する領域を生成することもでき；これらのバンドギャップの変動を利用して、前述のセンサー、トランジスタ、ダイオードおよびソーラー電池に組み込んでそれらの性能を向上させ得るヘテロ接合、量子井戸、傾斜バンドギャップ領域などを作製することもできる。

【0144】

芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされたc y t cセンサー

図8は、本明細書に開示のペプチドのいずれか、例えばT y r - D - A r g - P h e -

Lys-NH₂ (SS-01)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) または D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) が単独で、またはカルジオリピンと共にドーブされた cyt c の層 110 の導電率 (抵抗) の変動を測定することにより、検査基板 130 の pH および / または温度の変化を検出する例示的センサー 100 を示す。一部の実施形態において、cyt c 層は、カルジオリピンがドーブされている。基板 130 の温度および / または pH が変化すると、芳香族カチオン性ペプチド、カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンとが、ドーブされた cyt c 層 110 内に、またはそこから拡散し、その一方でドーブされた cyt c 層 110 の導電率を変化させる。計量器 120 は、アノード 122 およびカソード 124 を通して cyt c 層 110 に電位 (電圧) を印加することにより、導電率の変動を測定する。導電率が上昇すると、アノード 122 とカソード 124 の間を流れる電流が増加する。導電率が低下すると、アノード 122 とカソード 124 の間を流れる電流が減少する。別のセンサーが、より感度の高い抵抗測定のための追加的電気端子 (即ち、アノードおよびカソード) を含んでいてもよい。例えば別のセンサーが、抵抗のケルビン検知測定のための 4 つの電気端子を含んでいてもよい。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (ここで (atn)Dap は、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ (SS-36) (ここで Ala は、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (SS-37) (ここで Ala は、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、および Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで (dns)Dap は、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (SS-17) を含む。

【0145】

図 9 は、ペプチドがドーブされた、またはペプチド / カルジオリピンがドーブされた、またはカルジオリピンがドーブされた cyt c 層 110 のフォトルミネッセンスの変化を測定することにより、検査基板 130 の pH および / または温度の変化を検出する別のセンサー 101 を示す。レーザまたは発光ダイオード (LED) などの光源 140 は、532.8 nm などの励起波長でドーブされた cyt c 層 110 を照射する。図 3A に示すように、励起波長でのドーブされた cyt c 層 110 の照射は、電子を価電子帯から励起状態に励起する。(当業者に理解される通り、価電子帯と励起状態とのギャップは、励起波長に比例する。) 短い緩和時間の後、電子が励起状態から伝導帯に減衰する。電子が伝導帯から価電子帯に緩和すると、ドーブされた cyt c 層 110 は、価電子帯と伝導帯の間のギャップにより固定された 650 nm などの発光波長で光子を放出する。

【0146】

図 3B に示すように、一定励起強度の間 cyt c により放出される (光源 140 から) 光の強度は、芳香族カチオン性ペプチドの濃度に応じて非直線的に変動し; 芳香族カチオン性ペプチドの濃度が 0 μM から 50 μM に増加すると、発光波長での発光強度が約 4200 CPS から約 4900 CPS に増加するが、芳香族カチオン性ペプチドの濃度が 50 μM から 100 μM に倍増すると、発光波長での発光強度は約 4900 CPS から約 7000 CPS に増加する。つまりドーブされた cyt c 層 110 における芳香族カチオン性ペプチド、または芳香族カチオン性ペプチド / カルジオリピン、またはカルジオリピンの濃度は、検査基板 130 の pH および / または温度の変化に応じて変動するため、発光波長での強度もまた変動する。この強度の変動を光検出器 150 で検出すれば、検査基板 130 の pH および / または温度の表示が得られる。

【0147】

場合によっては、ペプチド、カルジオリピン、またはカルジオリピンとペプチドの濃度の変化が、ルミネセンス発光の強度変化の代わりまたは追加として、ルミネセンス発光の

波長を変化させることができる。これらの発光波長の変化は、放出された光を、ドーブされた層110と検出器150の間に配置されたフィルター152でフィルタリングすることにより検出することができる。フィルター152は、通過帯域内の光を伝送し、通過帯域外の光を反射および／または吸収する。発光波長がpHおよび／または温度によるペプチド、カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンの濃度変化により通過帯域から外れれば、検出器150は、任意の光、つまりペプチドおよび／またはカルジオリピン濃度の変化を測定するために活用され得る効果を検出しない。あるいはペプチドおよび／またはカルジオリピンによる発光波長の変化は、例えば光検出器150の代わりに光スペクトル分析機（不図示）を用いて、フィルターにかけられなかった発光のスペクトルを分析することにより測定することができる。

10

【0148】

カルジオリピンおよび本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチド、例えばペプチドTyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) またはD-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) のうちの1つ以上を用いて、光学的および／または電気的に刺激されたcyt cから放出された光の波長を増強および／または調整することもできる。例えばcyt cを100 μMの濃度のペプチドでドーブすると、図3Bに示すように、650 nmで放出される光の強度がほぼ倍増する。つまり図9のセンサー101は、増強された発光素子として用いることもできる。半導体LEDおよびディスプレイとは異なり、ドーブされたcyt cに基づく増強された発光素子は、任意の形状で、そして可撓性基板上で作製することができる。さらに該ペプチドおよびカルジオリピン濃度は、所望の発光レベルおよび／または発光波長を与えるように設定することができる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (ここで(atn)Dapは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ (SS-36) (ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (SS-37) (ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dapは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (SS-17) を含む。

20

30

【0149】

cyt c、カルジオリピンがドーブされたcyt c、芳香族カチオン性ペプチドがドーブされたcyt c、またはカルジオリピン／ペプチドがドーブされたcyt cを用いて作製されたセンサーを用いて、圧力、温度、pH、印加電界、および／または導電率に影響を及ぼす他の特性の変化を検出することができる。例えば、センサー100および101を用いて、cyt cにおけるカルジオリピンおよび芳香族カチオン性ペプチドのうちの1つ以上の濃度に影響を及ぼす圧力の変化を検出することができ；圧力変化が芳香族カチオン性ペプチドをcyt c内に拡散させると、導電率および／または発光強度が増加する、またはその逆もある。cyt cにおけるペプチドおよび／またはカルジオリピン濃度に影響を及ぼす温度およびpHの変化は、同様の結果を生じる。cyt cにおけるペプチドおよび／またはカルジオリピン濃度を変化させる印加電界、例えば電磁界も、測定される導電率、発光強度、および発光波長を変化させる。

40

【0150】

カルジオリピン、カルジオリピンと芳香族カチオン性ペプチド、または芳香族カチオン性ペプチドがドーブされたcyt cセンサーを用いて、本明細書に開示の生物学的および／または化学的活性を検知することもできる。例えば例示的センサーを用いて、芳香族カチオン性ペプチド、カルジオリピンおよび／またはcyt cに結合した他の分子および／または原子、ならびにドーブされたcyt cの電気的性質およびルミネセンス性を

50

変化させる他の分子および／または原子を同定してもよい。例えば場合によっては、単一ペプチド分子、例えば $\text{Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ (SS-01)、 $2', 6'-\text{Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ (SS-02)、 $\text{Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ (SS-20) もしくは $\text{D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ (SS-31) がドーブされた cyt c の単一分子、またはペプチドとカルジオリピンとがドーブされた cyt c の単一分子が、そのものとして cyt c 分子に結合している、またはそのものとして cyt c 分子から遊離している、カルジオリピン、ペプチド、またはカルジオリピンとペプチドにより引き起こされた圧力、温度、pH、印加電界などの微小変動を検出することも可能となり得る。限定するものではないが酵素分析（例えば、グルコースまたは乳酸塩アッセイ）、DNA 解析（例えば、ポリメ
10
ラーゼ連鎖反応およびハイスループットシーケンシング）、およびプロテオミクスをはじめとする適用例において前述の性能のいずれかを検出するために、単一分子センサー（および／または多分子センサー）を、規則的な（例えば、周期的な）または不規則なアレイに配列させてもよい。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $\text{Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19)（ここで (atn) Dap は、 β -アントラニロイル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である）、 $\text{Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH}_2$ (SS-36)（ここで Ala は、 β -（6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル）アラニンである）、 $\text{Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH}_2$ (SS-37)（ここで Ala は、 β -（6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル）アラニンである）、 $\text{D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231)、および $\text{Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ （こ
20
こで (dns) Dap は、 β -ダンシル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である）(SS-17) を含む。

【0151】

マイクロフルイディクスにおける芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされた cyt c

さらに、カルジオリピンがドーブされた、カルジオリピン／ペプチドがドーブされた、またはペプチドがドーブされた cyt c のセンサーを、マイクロフルイディクスおよび
30
オプトフルイディックデバイスにおいて用いて、例えばハイブリッド生物学的／化学的／電子的プロセッサにおいて使用するために圧力、温度、pH、印加電界などの変動を電流および／または電圧に変換することができる。それらは、例えば全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第 2009/0201497 号、同第 2010/0060875 号、および同第 2011/0039730 号に記載されるようなマイクロフルイディクスおよびオプトフルイディックデバイスにおいて用いることもできる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $\text{Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19)（ここで (atn) Dap は、 β -アントラニロイル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である）、 $\text{Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH}_2$ (SS-36)（ここで Ala は、 β -（6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル）アラニンである）、 $\text{Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH}_2$ (SS-37)（ここで Ala は、 β -（6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル）アラ
40
ニンである）、 $\text{D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231)、および $\text{Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ （ここで (dns) Dap は、 β -ダンシル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である）(SS-17) を含む。

【0152】

オプトフルイディクスは、マイクロメータ～ナノメータスケールでの、流体を用いた光のマニピュレーションまたはその逆を指す。マイクロフルイディックマニピュレーションの利点を取り入れることにより、流体の光学特性を正確かつ柔軟に制御して、他ではソリッドステート技術での実践が困難または不可能であるリコンフィギュラブルな光学部品を実現することができる。さらに、マイクロ／ナノスケールでの流体の特有の挙動は、光を用いて流体をマニピュレーションする可能性を与えた。芳香族カチオン性ペプチド、カル
50

ジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンがドーブされた $c y t \quad c$ に基づくオプトフルイディックデバイスの適用例としては、限定するものではないが、補償光学素子；微小共振器を用いた検出；流体の導波管；蛍光マイクロフルイディック光源；ナノフォトニクスとマイクロフルイディックスの統合；顕微分光法；マイクロフルイディック量子ドットバーコード；非直線性光学適用のためのマイクロフルイディックス；オプトフルイディック顕微鏡法；リコンフィギュラブルフォトニクスおよびオンチップ分子検出器用のオプトフルイディック量子カスケードレーザ；ナノ粒子カクテルを用いた光学メモリー；ならびに統合されたオプトフルイディックス適用のための試験管マイクロキャビティーレーザが挙げられる。

【0153】

芳香族カチオン性ペプチドとカルジオリピン、または芳香族カチオン性ペプチド、またはカルジオリピンがドーブされた $c y t \quad c$ を含むセンサーをマイクロフルイディックプロセスで用いて、流体の流れの変化による圧力変動を、先に記載された通り従来の電気検出器および光検出器を用いて即座に検出され得る電気および／または光シグナルに変換することができる。カルジオリピン／ペプチドがドーブされた、またはペプチドがドーブ、またはカルジオリピンがドーブされた $c y t \quad c$ の変換器を用いて、マイクロフルイディックポンプ、プロセッサ、および調整可能なマイクロレンズアレイをはじめとする他のデバイスを制御することができる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $D m t - D - A r g - P h e - (a t n) D a p - N H _ 2 (S S - 1 9)$ （ここで $(a t n) D a p$ は、 β -アントラニロイル- $L - \alpha$ 、 β -ジアミノプロピオン酸である）、 $D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H _ 2 (S S - 3 6)$ （ここで $A l d$ は、 β -（6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル）アラニンである）、 $D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H _ 2 (S S - 3 7)$ （ここで $A l d$ は、 β -（6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル）アラニンである）、 $D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H _ 2 (S P I - 2 3 1)$ 、および $D m t - D - A r g - P h e - (d n s) D a p - N H _ 2$ （ここで $(d n s) D a p$ は、 β -ダンシル- $L - \alpha$ 、 β -ジアミノプロピオン酸である）（ $S S - 1 7$ ）を含む。

【0154】

スイッチおよびトランジスタのための芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされた $c y t \quad c$

芳香族カチオン性ペプチドとカルジオリピン、または芳香族カチオン性ペプチド、またはカルジオリピンがドーブされた $c y t \quad c$ は、図10に示すように電氣的または光学スイッチ、例えばスイッチ210として、またはそれらの内部で使用することもできる。スイッチ201は、導管221およびチャネル210を介して $c y t \quad c$ またはドーブされた $c y t \quad c$ 110と流体連通している、カルジオリピン、芳香族カチオン性ペプチド200とカルジオリピン、または芳香族カチオン性ペプチド200、例えば $T y r - D - A r g - P h e - L y s - N H _ 2 (S S - 0 1)$ 、 $2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - N H _ 2 (S S - 0 2)$ 、 $P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H _ 2 (S S - 2 0)$ または $D - A r g - D m t - L y s - P h e - N H _ 2 (S S - 3 1)$ を受けるリザーバ220を含む。操作の際、導管221を開けて、カルジオリピン、またはペプチド200、またはペプチドとカルジオリピンを方向212でチャネル210に流す。チャネル210と $c y t \quad c$ 130の間の境界を横断する温度および／またはpH勾配を生成することにより、スイッチ201を作動させる。勾配の方向に応じて、カルジオリピン、またはペプチド200、またはペプチドとカルジオリピンとが、 $c y t \quad c$ 130内へ、またはそこから拡散して、導電率およびフォトルミネッセンス性を先に記載された通り変化させる。ペプチドまたはカルジオリピン濃度の増減による導電率の変化を利用して、アノード222とカソード224の間の電流を調節することができる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $D m t - D - A r g - P h e - (a t n) D a p - N H _ 2 (S S - 1 9)$ （ここで $(a t n) D a p$ は、 β -アントラニロイル- $L - \alpha$ 、 β -ジアミノプロピオン酸である）、 $D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H _ 2 (S S$

10

20

30

40

50

−36) (ここでAldは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (SS-37) (ここでAldは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dapは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0155】

図10に示されたスイッチ201は、有機電界効果トランジスタ(OFET)として作用し、それはチャンネル210とcyt c130の間の境界を横断する温度および/またはpH勾配に対応する「電界」の変化に応答して電流を調節する。各トランジスタは、cyt cチャンネル層、または芳香族カチオン性ペプチドとカルジオリピン、もしくは芳香族カチオン性ペプチド、もしくはカルジオリピンがドーブされたcyt cチャンネル層と、ソースと、ドレインと、を含む。チャンネル層は、低い方の基板の上に配置されている。ソースおよびドレインは、チャンネル層の上に配置され、それぞれチャンネル層の2つの向き合った側に接触している。ゲートは、チャンネル層の上に配置され、ソースとドレインの間に位置している。先の有機エレクトロルミネセンスデバイスは、ソースからチャンネル層を介して出力される電流を受けて、電流の規模に応じて放出するために、ドレインに電氣的に接続されている。

【0156】

従来のトランジスタに比較して、本発明のトランジスタ、例えばペプチド/カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピンがドーブされたcyt c OFETは、製造を簡便にすることができる。従来の無機トランジスタは、高温(例えば、500~1,000℃)を要求するが、OFETは、室温~200℃で作製することができる。OFETは、加熱により損傷し易いプラスチック基板上でも形成することができる。OFETを利用して、軽量で薄く可撓性の素子要素を実現し、それらを様々な特有のデバイス、例えば可撓性ディスプレイおよびセンサーにおいて使用することができる。

【0157】

OFETを用いて、デジタル信号処理に必要な基本的論理演算を実行することができる。例えばトランジスタを用いて、デジタル信号を処理するために一緒に連結され得る(非線形)論理ゲート、例えばNOTおよびNORゲートを作製することができる。ペプチド/カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピンがドーブされたcyt cトランジスタを、限定するものではないがエミッタフォロア(例えば、電圧調節)、電流源、カウンター、アナログーデジタル変換などをはじめとする適用例、ならびに一般的な目的の計算および用途に即した処理の両方、例えばコンピュータネットワーク、ワイヤレス通信(例えば、ソフトウェア無線)などの処理において使用することができる。トランジスタの更なる適用例については、全体として参照により本明細書に組み入れられる、P. HorowitzおよびW. Hillの“The Art of Electronics”を参照されたい。

【0158】

トランジスタは、1つの特性、例えばpHの小さな変化を別の特性、例えば導電率の大きな変化に変換することによりシグナルを増幅するのにも用いることができ、より良く理解される通り、増幅は、ワイヤレス(無線)伝送、録音再生、および(アナログ)信号処理をはじめとする様々な用途に用いることができる。ペプチド/カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピンがドーブされたcyt cトランジスタは、反転増幅器、非反転増幅器、フィードバックループ、発振器などにおいて用いられる演算増幅器(オペアンプ)を作製するために用いることもできる。全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,795,611号;同第7,768,001号;同第7,126,153号;および同第7,816,674号を参照されたい。

【0159】

ランダムアクセスメモリーのための芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされた $\text{cyt} \quad \text{c}$

$\text{cyt} \quad \text{c}$ および／または本明細書に開示のカルジオリピン、芳香族カチオン性ペプチド、もしくはカルジオリピンと芳香族カチオン性ペプチド、例えば $\text{Tyr}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{NH}_2$ (SS-01)、 $2', 6'-\text{Dmt}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{NH}_2$ (SS-02)、 $\text{Phe}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{NH}_2$ (SS-20) もしくは $\text{D}-\text{Arg}-\text{Dmt}-\text{Lys}-\text{Phe}-\text{NH}_2$ (SS-31) がドーブされた $\text{cyt} \quad \text{c}$ に基づくトランジスタは、デジタル計算において使用される情報を保存するスタティックまたはダイナミックランダムアクセスメモリー (RAM) などのメモリーを
10
実行するために用いることもできる。より良く理解される通り、6個のトランジスタと一緒に連結して、周期的な再生を必要とせずに1ビットの情報を保存するスタティックRAM (SRAM) セルを形成することができる。 $\text{cyt} \quad \text{c}$ および／またはカルジオリピン、もしくは芳香族カチオン性ペプチド、もしくはカルジオリピンと芳香族カチオン性ペプチドがドーブされた $\text{cyt} \quad \text{c}$ に基づくトランジスタは、デジタル計算のためのダイナミックランダムアクセスメモリー (DRAM) などの他のタイプのメモリーを実行するのに用いることもできる。より良く理解される通り、RAMを用いて、先に記載されたような適用例でデジタル計算を実行することができる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $\text{Dmt}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-(\text{atn})\text{Dap}-\text{NH}_2$ (SS-19) (ここで $(\text{atn})\text{Dap}$ は、 β -アントラニロイル- $\text{L}-\alpha$, β -ジアミノプロピオン酸である)、 $\text{Dmt}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Ala}-\text{Lys}-\text{NH}_2$ (SS-36) (ここで Ala は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $\text{Dmt}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{Ala}-\text{NH}_2$ (SS-37) (ここで Ala は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $\text{D}-\text{Arg}-\text{Tyr}-\text{Lys}-\text{Phe}-\text{NH}_2$ (SPI-231)、および $\text{Dmt}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-(\text{dns})\text{Dap}-\text{NH}_2$ (ここで $(\text{dns})\text{Dap}$ は、 β -ダンシル- $\text{L}-\alpha$, β -ジアミノプロピオン酸である) (SS-17) を含む。
20

【0160】

従来のトランジスタを集積回路内に形成させるのとまさしく同様に、カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはペプチド／カルジオリピンがドーブされた $\text{cyt} \quad \text{c}$ トランジスタをプログラム可能な、または予めプログラムされた、
30
生物学的アレイ内に形成させてもよい。ペプチドまたはカルジオリピンの活性による $\text{cyt} \quad \text{c}$ の導電率の変化が十分に高い場合、例示的トランジスタ (スイッチ) は、単一ペプチド分子、単一カルジオリピン分子、または単一ペプチド分子と単一カルジオリピン分子がドーブされた単一 $\text{cyt} \quad \text{c}$ 分子で作製することができる。単一分子 $\text{cyt} \quad \text{c}$ トランジスタのアレイを形成させて、信じられないほど小さく実装密度の高い論理回路を作製させることができる。

【0161】

発光トランジスタのための発明性のある芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされた $\text{cyt} \quad \text{c}$
40

$\text{cyt} \quad \text{c}$ 、および／あるいは本明細書に開示のカルジオリピン、または芳香族カチオン性ペプチド、例えば $\text{Tyr}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{NH}_2$ (SS-01)、 $2', 6'-\text{Dmt}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{NH}_2$ (SS-02)、 $\text{Phe}-\text{D}-\text{Arg}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{NH}_2$ (SS-20) もしくは $\text{D}-\text{Arg}-\text{Dmt}-\text{Lys}-\text{Phe}-\text{NH}_2$ (SS-31)、またはカルジオリピンとペプチドがドーブされた $\text{cyt} \quad \text{c}$ を用いて、コンピュータチップ上のより安価なデジタルでディスプレイおよび高速スイッチング光源を提供し得る有機発光トランジスタ (OLET) を作製することができる。OLETに基づく光源は、ダイオードよりもかなり迅速に切り替わり、平面設計であるためコンピュータチップ上により容易に集積することができ、銅製ワイヤーよりも急速にチップを隔てたデータ変換を与える。効率をより高める鍵は、互いの最上部に薄層を
50

積層させた三層構造である。電流が、最上層と最下層を通り水平に流れ（一方は電子を、他方は正孔を担い）、中心層に流れるキャリアが再結合して、光子を放出する。チャンネル内の接合領域の位置は、ゲートおよびドレインの電圧に依存するため、発光領域は調整することができる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、 $\text{Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19)（ここで (atn)Dap は、 β -アントラニロイル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である）、 $\text{Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH}_2$ (SS-36)（ここで Ala は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである）、 $\text{Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH}_2$ (SS-37)（ここで Ala は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである）、 $\text{D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231)、および $\text{Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ （ここで (dns)Dap は、 β -ダンシル-L- α 、 β -ジアミノプロピオン酸である）(SS-17)を含む。

【0162】

図16に示されたOLETなどの例示的OLETは、酸化インジウムスズでコーティングされた透明な基板（例えば、ガラス）基板上に構築させることができ、一般的な絶縁材料であるポリ（メタクリル酸メチル）（PMMA）でコーティングされたトランジスタのゲートとして作用する。電子輸送材料（例えば、カルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはペプチド／カルジオリピンがドーピングされた cyt c ）のフィルム、発光材料のフィルムおよび正孔輸送材料を含み得る多層有機構造が、PMMA上に堆積される。最後に、金属接点が、有機構造の最上部に堆積されて、ソースおよびドレインを提供する。OLET内の光が、OLED内と同様に接点を通して上方ではなくむしろ発光層に沿って縞状に放出される。発光層の形状を変動させて、放出された光を、光ファイバー、導波管および他の構造により容易につなぐことができる。

【0163】

2003年にHeppらにより開発された有機発光トランジスタ（OLET）は、単極p型方式で動作し、金のドレイン電極（電子注入）の接近した緑色エレクトロルミネッセンスを生成する。しかしHeppのデバイスの発光領域は、単極動作方式によりモジュレートすることができない。均衡のとれたアンバイポーラ輸送が、OLETの量子効率を改善するのに非常に望ましく、単一成分およびヘテロ構造トランジスタの両方に重要である。

【0164】

アンバイポーラOLETは、カルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはペプチド／カルジオリピンがドーピングされた cyt c など、正孔輸送材料と電子輸送材料のヘテロ構造に基づいていてもよい。アンバイポーラOLETの光強度は、ドレイン-ソース電圧とゲート電圧の両方により制御することができる。同一材料（例えば、カルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはペプチド／カルジオリピンがドーピングされた cyt c ）に基づくOLETのキャリア移動度およびエレクトロルミネッセンス性は、2成分の比率を変化させることにより調整することができる。高濃度の正孔輸送材料は、非発光アンバイポーラFETを提供し得るが、高濃度のカルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはペプチド／カルジオリピンがドーピングされた cyt c （または cyt c 中ペプチドまたはカルジオリピン濃度が高濃度の cyt c ）は、発光単極n-チャンネルFETを提供し得る。

【0165】

2成分層状構造に基づくOLETは、正孔輸送材料および電子輸送材料を順次付着させることにより、実現することができる。形態学的分析により、2つの有機フィルムの間の連続界面が示され、それはその界面の品質および得られたOLETの光電子特性を制御するのに重要となる。重複するp-nヘテロ構造は、連続堆積工程の間に基板の傾斜角を変化させることにより、トランジスタチャンネルの内側に制限することができる。発光領域（即ち、重複領域）は、正孔および電子のソース電極から離れていて、金属電極での励起子

10

20

30

40

50

および光子のクエンチングを回避する。OLETは、OLEDと、トッパゲート静電誘導トランジスタまたは三極管と類似のトッパゲート型OLETと、横向きに配列されたヘテロ接合構造およびダイオード／FETハイブリッドを有するOLETと、の水平コンビネーション静電誘導トランジスタをはじめとし、別のヘテロ構造において実現することもできる。有機発光トランジスタの更なる詳細は、全体として参照により本明細書に組み入れられる、Mengらによる米国特許第7,791,068号、およびKidoらによる米国特許第7,633,084号に見出すことができる。

【0166】

代わりまたは追加として、芳香族カチオン性ペプチド、またはカルジオリピン、またはペプチド／カルジオリピンの濃度を用いて、cyt c110により放出された光の強度および／波長を調節することができる。芳香族カチオン性ペプチド濃度の適切な範囲としては、限定するものではないが0～500mM；0～100mM；0～500μm；0～250μm；および0～100μmが挙げられる。カルジオリピン濃度の適切な範囲としては、限定するものではないが0～500μm；0～100mM、0～500μm、0～250μm；および0～100μmが挙げられる。実際に、図3Bに示された発光強度の非直線的变化から、ペプチドがドーブされたcyt c110がバイナリー（デジタル）スイッチングに十分に適することが示され、ペプチド濃度が所定の閾値、例えば50μM未満であれば、発光強度は、所与のレベル、例えば5000CPS未満になる。閾値、例えば100μMを超える芳香族カチオン性ペプチド濃度では、発光強度は、例えば約7000CPSに跳ね上がる。非直線的な挙動を活用して、cyt c110、ならびに／またはcyt c110と熱および／もしくは流体連通する層もしくは物質のpHまたは温度の対応する変化を検出する、またはそれに応答することができる。カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンとの組み合わせが、同等の挙動を提供することが予測される。

【0167】

発光ダイオードおよびエレクトロルミネッセンスディスプレイのための芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされたcyt c
cyt c、および／あるいはカルジオリピン、または本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチド、例えばTyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)もしくはD-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)、またはカルジオリピンとペプチドがドーブされたcyt cを、有機発光ダイオード (OLED) およびエレクトロルミネッセンスディスプレイにおいて用いることができる。OLEDは、様々な消費者向け製品、例えば腕時計、電話、ラップトップコンピューター、ポケットベル、携帯電話、デジタルビデオカメラ、DVDプレーヤ、および計算機において有用である。OLEDを含むディスプレイは、従来の液晶ディスプレイ (LCD) を超える数多くの利点を有する。OLEDに基づくディスプレイは、バックライトを必要としないため、深黒レベルを表示することができ、広角であっても比較的高いコントラスト比を実現することができる。それらは、電力消費の大きなバックライトを必要とするLCDよりも、薄く効率的で明るくなることもできる。これらの特色を組み合わせた結果、OLEDは、LCDディスプレイよりも軽量で、小さな空間を取り込む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (ここで(atn)Dapは、β-アントラニロイル-L-α,β-ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ (SS-36) (ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (SS-37) (ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dapは、β-ダンシル-L-α,β-ジアミノプロピオン酸である) (SS-17

）を含む。

【0168】

OLEDは、典型的には図17に示すように2つの電極、つまりアノードとカソードの間に挿入された発光素子を含む。発光素子は、典型的には正孔輸送層と、発光層と、電子輸送層と、を含む薄い有機層の積層を含む。OLEDは、追加的層、例えば正孔注入層および電子注入層を含むこともできる。c y t c 発光層を芳香族カチオン性ペプチドで（および可能ならば他のドーパント、例えばカルジオリピンなども）ドーピングすることで、OLEDのエレクトロルミネッセンス効率を向上させて、色出力を制御することができる。カルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーピングされたc y t c は、電子輸送層として用いることもできる。

10

【0169】

OLEDにおいて、カルジオリピン、または芳香族カチオン性ペプチド、例えばT y r - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 0 1)、2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 0 2)、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 2 0) もしくはD - A r g - D m t - L y s - P h e - N H ₂ (S S - 3 1)、またはカルジオリピンと芳香族カチオン性ペプチドがドーピングされたc y t c の層が、コーティング（例えばスピンコーティング）されているか、または他の方法で2つの電極の間に配置されていて、電極の少なくとも一方は透明になっている。例えばOLEDに基づくディスプレイは、スクリーン印刷されていても、インクジェットプリンターで印刷されていても、または剛性基板および可撓性基板の両方を含む任意の適切な基板上に回転蒸着法（roll-vapor deposition）を利用して堆積されていてもよい。典型的な基板は、電磁スペクトルの可視領域に少なくとも一部透過性である。例えば透明基板（および電極層）は、電磁スペクトルの可視領域（400nm〜700nm）の光について少なくとも30%、あるいは少なくとも60%、あるいは少なくとも80%の透過率%を有し得る。基板の例としては、限定するものではないが、シリコン、二酸化シリコンの表面層を有するシリコン、およびガリウムヒ素などの半導体材料；石英；石英ガラス；酸化アルミニウム；セラミックス；ガラス；金属ホイル；ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、およびポリエチレンテレフタレート（PET）などのポリオレフィン；ポリテトラフルオロエチレンおよびポリフッ化ビニルなどのフルオロカーボンポリマー；N y l o nなどのポリアミド；ポリイミド類；ポリ（メタクリル酸メチル）およびポリ（エチレン2, 6-ナフタレンジカルボキシレート）などのポリエステル；エポキシ樹脂；ポリエーテル；ポリカルボナート；ポリスルホン；ならびにポリエーテルスルホンが挙げられる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D m t - D - A r g - P h e - (a t n) D a p - N H ₂ (S S - 1 9)（ここで(a t n) D a p は、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である）、D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H ₂ (S S - 3 6)（ここでA l d は、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである）、D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H ₂ (S S - 3 7)（ここでA l d は、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである）、D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H ₂ (S P I - 2 3 1)、およびD m t - D - A r g - P h e - (d n s) D a p - N H ₂（ここで(d n s) D a p は、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である）(S S - 1 7)を含む。

20

30

40

【0170】

典型的には基板の少なくとも一表面は、第一の電極でコーティングされており、第一の電極は、透明材料、例えば酸化インジウムスズ（ITO）または任意の他の適切な材料であってもよい。第一の電極層は、OLED内でアノードまたはカソードとして機能し得る。アノードは、典型的には高仕事関数の(>4eV)金属、合金、または酸化金属、例えば酸化インジウム、酸化スズ、酸化亜鉛、酸化インジウムスズ（ITO）、酸化インジウム亜鉛、アルミニウムドーピング酸化亜鉛、ニッケル、および金から選択される。カソードは、低仕事関数の(<4eV)金属、例えばCa、Mg、およびAl；先に記載された高仕

50

事関数の ($> 4 \text{ eV}$) 金属、合金、もしくは酸化金属；または低仕事関数の金属と、高もしくは低仕事関数を有する少なくとも 1 種の他の金属との合金、例えば $\text{Mg}-\text{Al}$ 、 $\text{Ag}-\text{Mg}$ 、 $\text{Al}-\text{Li}$ 、 $\text{In}-\text{Mg}$ 、および $\text{Al}-\text{Ca}$ であってもよい。OLED の製作においてアノード層およびカソード層を堆積させる方法、例えば蒸着、同時蒸着、DC マグネトロンスパッタリング、または RF スパッタリングは、当該技術分野で周知である。

【0171】

c y t c、および／またはカルジオリピンがドーブされた、もしくは芳香族カチオン性ペプチドがドーブされた、もしくはカルジオリピンと芳香族カチオン性ペプチドがドーブされた c y t c を含む活性層が、透明電極にコーティングされていて、発光素子を形成している。発光素子は、正孔輸送層および発光／電子輸送層を含み、正孔輸送層および発光／電子輸送層は、互いに直接接しており、正孔輸送層は、以下に記載された硬化ポリシロキサンを含む。発光素子の配向は、OLED 内のアノードおよびカソードの相対的位置に依存する。正孔輸送層は、アノードと発光／電子輸送層の間に配置され、発光／電子輸送層は、正孔輸送層とカソードの間に配置されている。正孔輸送層の厚さは、 $2 \sim 100 \text{ nm}$ 、あるいは $30 \sim 50 \text{ nm}$ であってもよい。発光／電子輸送層の厚さは、 $20 \sim 100 \text{ nm}$ 、あるいは $30 \sim 70 \text{ nm}$ の厚さであってもよい。

10

【0172】

OLED ディスプレイは、パッシブマトリックスまたはアクティブマトリックス駆動スキームのいずれかで駆動することができ、それらは両者とも周知である。例えば OLED ディスプレイパネルは、アクティブマトリックスピクセルアレイおよび複数の薄層トランジスタ (TFT) を含んでいてもよく、それらはそれぞれカルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピンおよびペプチドがドーブされた c y t c トランジスタ (先に記載された通り) として実行されてもよい。アクティブマトリックスピクセルアレイは、活性層を含む基板の間に配置されている。アクティブマトリックスピクセルアレイは、複数のピクセルを含む。各ピクセルは、第一のスクランラインおよびそれに隣接する第二のスクランラインに加え、第一のデータラインおよびそれに隣接する第二のデータラインにより画定され、それらは両者とも低い方の基板上に配置されている。ピクセルの非ディスプレイ領域の内側に配置された TFT が、対応するスクランラインおよびデータラインに電気的に接続している。ピクセル内の TFT をスクランラインおよびデータラインと切り替えることで、対応するピクセルを作動させる (即ち発光させる)。

20

30

【0173】

さらに活性層 (例えば、c y t c、および／またはカルジオリピンがドーブされた、もしくはペプチドがドーブされた、もしくはカルジオリピン／ペプチドがドーブされた c y t c) は、ほとんど任意の形状およびサイズで配列させることができ、任意の形状にかたどることができる。それらは、更にドーブされて、特定の波長で光を発生させることもできる。有機発光ダイオードおよび有機発光ディスプレイの更なる詳細は、全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第 7, 358, 663 号；同第 7, 843, 125 号；同第 7, 550, 917 号；同第 7, 714, 817 号；および同第 7, 535, 172 号に見出すことができる。

40

【0174】

ヘテロ接合のための芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされた c y t c

c y t c 活性層中の芳香族カチオン性ペプチド、カルジオリピン、またはペプチドとカルジオリピンの濃度レベルは、全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許第 7, 897, 429 号に記載され図 18 および 19 の太陽光電池内に示すように、空間および／または時間の関数として変動させて、異なるエネルギーギャップの 2 つの半導体材料の界面であるヘテロ接合を提供してもよい。芳香族カチオン性ペプチド濃度の適切な範囲としては、限定するものではないが、 $0 \sim 500 \text{ mM}$ ； $0 \sim 100 \text{ mM}$ ； $0 \sim 500 \text{ }\mu\text{M}$ ； $0 \sim 250 \text{ }\mu\text{M}$ ；および $0 \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$ が挙げられる。カルジオリピン濃度の適

50

切な範囲としては、限定するものではないが、 $0 \sim 500 \text{ mM}$ ； $0 \sim 100 \text{ mM}$ ； $0 \sim 500 \text{ }\mu\text{M}$ ； $0 \sim 250 \text{ }\mu\text{M}$ ；および $0 \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$ が挙げられる。例えばヘテロ接合を利用して、OLEDおよび他のデバイス内での発光を増強するために複数の量子井戸構造を作製することができる。有機ヘテロ接合は、p型およびn型の薄い結晶フィルムの活性層で構築された有機ヘテロ接合トランジスタで高導電率であることが発見された後、ますます注目を集めてきた。無機ヘテロ接合内に形成する空乏層とは異なり、電子および正孔蓄積層は、有機ヘテロ接合界面の両側に観察され得る。導電率の高いヘテロ接合フィルムは、電荷注入バッファ層として、そしてタンデムダイオードのための連結ユニットとして用いることができる。アンバイポーラトランジスタおよび発光トランジスタ（先に記載された）は、有機ヘテロ接合フィルムを活性層として用いて実現することができる。

10

【0175】

有機ヘテロ構造は、OLED（前述）、OFET（前述）、および有機太陽光（OPV）電池（後述）内で用いられて、デバイスの性能を改善することができる。典型的な二重層OLED構造において、有機ヘテロ接合は、立ち上がり電圧を低下させて、照明効率を改善する。有機ヘテロ接合を用いて、単層電池よりも一桁、OPV電池の電力変換効率を改善することもできる。アンバイポーラOFET（前述）は、電子および正孔の両方が印加電圧に応じてデバイスチャネル内に蓄積および輸送されることを必要とし、カルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーピングされたcyt cをはじめとする有機ヘテロ構造を活性層として導入することにより実現することができる。有機ヘテロ構造は、有機電子デバイスを引き続き開発する上で重要な役割を有する。

20

【0176】

有機ヘテロ構造をOFET内のバッファ層として用いて、電極と有機層の接触を改善することもできる。例えばcyt c、および／またはカルジオリピンがドーピングされた、もしくはペプチドがドーピングされた、もしくはカルジオリピン／ペプチドがドーピングされたcyt cの薄層が、電極と半導体層の間に挿入されることで、より良好なキャリア注入および移動度の改善を得ることができる。導電率の高い（例えば、カルジオリピンがドーピングされた、または芳香族カチオン性ペプチドがドーピングされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーピングされたcyt cの使用による）有機ヘテロ接合は、OFET内のバッファ層として用いて、金属と有機半導体の間の接触を改善し、それにより電界効果移動度を改善することもできる。カルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーピングされたcyt cに基づく他のヘテロ構造は、OPV電池内のOFET内の電気接触を改善するため、そして積層されたOPV電池およびOLED内の連結ユニットとして用いることができる。

30

【0177】

有機ヘテロ構造の導入は、デバイス性能を有意に改善し、多くの適用例において新しい機能を可能にした。例えば有機ヘテロ接合の両側の電子および正孔蓄積層を観察すると、ヘテロ接合界面での相互作用がキャリア再分布およびバンド曲がりを導き得ることが示唆される。有機ヘテロ接合のアンバイポーラ輸送挙動が、高い量子効率を有するOLED FETを組み立てる可能性を与える。バッファ層は有機層と金属電極との接触を改善するため、カルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーピングされたcyt cで形成されたヘテロ構造をはじめとする有機ヘテロ構造の適用も議論される。有機半導体における電荷輸送は、多くの因子により影響を受けるが、このレビューでは、意図的にドーピングされたnおよびp型有機半導体の使用を強調し、バンド輸送挙動を示す結晶有機フィルムで構成された有機ヘテロ接合を主に検討している。

40

【0178】

一般にOFETは、蓄積方式で動作する。正孔蓄積方式のOFETにおいて、例えば負電圧がソース電極（接地される）に対するゲートに印加された場合には、正電圧（正孔）の形成が、絶縁層付近の有機層内に導入される。印加されたゲート電圧が、閾値電圧（V

50

V_T) を超えると、導入された正孔が導電性チャネルを形成し、ソース電極に対してドレイン電極に印加された電位バイアス (V_{DC}) の下で、電流をドレインからソースに流す。O F E T 内のチャネルは、移動可能な自由正孔を含み、閾値電圧は、導電性チャネルの形成を導入するのに必要となる最小限のゲート電圧である。それゆえ O F E T は、蓄積方式で動作するか、または「ノーマリーオフ」デバイスとして動作する。しかし場合によっては、O F E T は、ゼロゲート電圧の下でオープンチャネルを有することができ、つまり反対のゲート電圧がデバイスを停止させる必要となる。これらのデバイスは、それゆえ、「ノーマリーオン」または「空乏方式」のトランジスタと呼ばれる。

【0179】

ノーマリーオン C u P c / F ₁₆ C u P c ヘテロ接合トランジスタのための導電性チャネル内の電荷キャリア型は、最下層の半導体（絶縁体付近の有機層）に依存する。電荷蓄積は、p 型材料における上方バンド曲がりおよびバルクから界面までの n 型材料における下方バンド曲がりを導く可能性があり、それは従来の無機 p - n 型接合の場合とは異なる。自由電子および正孔は、有機ヘテロ接合フィルム内に共存し得るため、有機ヘテロ接合フィルムは、ゲート電圧に応じて、電子または正孔のいずれかを輸送し得る可能性がある。実際に、膜厚およびデバイス構成を最適化した後、アンバイポーラ輸送挙動が観察された。

【0180】

平面状ヘテロ接合におけるキャリア輸送は、O F E T の場合と同様にヘテロ接合界面と平行であり、ヘテロ接合フィルムの導電率に直接反映される。二重層構造を有するダイオードの導電率は、単層デバイスよりも約 1 桁高くなる可能性があり、ヘテロ接合を形成するのに用いられる c y t c 層内の芳香族カチオン性ペプチドの濃度を変化させることにより更に向上させることができる。芳香族カチオン性ペプチド濃度の適切な範囲としては、限定するものではないが、0 ~ 5 0 0 m M ; 0 ~ 1 0 0 m M ; 0 ~ 5 0 0 μ m ; 0 ~ 2 5 0 μ m ; および 0 ~ 1 0 0 μ m が挙げられる。例えばノーマリーオン O F E T では、導入される電子および正孔は、フィルム内に導電性チャネルを形成して高い導電率を導く。界面の粗度が高いことによる導電率の低下は、先に記載された通りペプチドドーピング濃度を変化させることにより補正することができる。

【0181】

n および p 型半導体内に導入された電子および正孔は、ヘテロ接合界面で空間電荷領域を形成し、n および p 型半導体からのビルトイン電界を与えることができる。そのようなビルドアップは、水平構造を有するダイオードの電子特性において明らかになる。水平ヘテロ接合ダイオードは、正電位バイアスの下で小さな電流を、そして負バイアスでは大きな電流を発生する。無機 p - n 型ダイオードとは異なり、有機ヘテロ接合ダイオードは、逆整流特性を示し得る。正バイアスは、バンド曲がりを強化してキャリアの流れを制限するが、負バイアスの下での印加電界は、ビルトイン電界に反発し、電位バリアの低下を引き起こす。それゆえバンド曲がりは、負バイアスの下で弱まり、接合を介した電流が支援される。

【0182】

有機ヘテロ接合界面の両側の電荷キャリア蓄積は、O F E T の閾値電圧をシフトするのに用いられ得るビルトイン電界を生成する。n チャネル有機接合トランジスタにおいて、例えば閾値電圧は、n 型層におけるトラップ密度と相関する。導入された電子は、トラップを満たすことができ、それゆえ一定した n 型層厚の条件下では、閾値電圧は、電子密度上昇に応じて減少する。中性条件下では、p 型層に導入された正孔の数は、n 型層のものと等しく、p 型層厚に応じて増加して飽和に向かう傾向がある。それゆえ有機ヘテロ接合トランジスタの閾値電圧は、p 型層厚の増加に応じて減少し得る。p 型層厚が増加しても閾値電圧が変動しなくなったポイントから、電荷蓄積の厚さが推定され得る。

【0183】

ヘテロ接合を構成する 2 つの半導体の仕事関数の差によって、空間電荷領域内の様々な電子状態が得られる。半導体ヘテロ接合は、ヘテロ接合を形成する 2 つの半導体の導電性

10

20

30

40

50

のタイプによっても分類される。2つの半導体が、同じタイプの導電性を有する場合、接合は、アイソタイプヘテロ接合と呼ばれ、その他にアニソタイプヘテロ接合が公知である。電子および正孔は、同時に蓄積することができ、2成分のフェルミ準位の差によりアニソタイプヘテロ接合の両側で空乏化することができる。p型半導体の仕事関数が、n型半導体よりも大きい場合 ($\psi_p > \psi_n$)、電子および正孔の空乏層は、ヘテロ接合のいずれかの側に存在し、空間電荷領域は、移動不能な陰および陽イオンで構成される。このタイプのヘテロ接合は、空乏ヘテロ接合としても公知であり、従来のp-n型ホモ接合をはじめとし、ほとんどの無機ヘテロ接合が、この分類のヘテロ接合に属する。

【0184】

バッテリーのための芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされたc y t c

c y t c、および／あるいはカルジオリピンがドーブされた、または芳香族カチオン性ペプチド、例えばT y r - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 01)、2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 02)、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 20) もしくはD - A r g - D m t - L y s - P h e - N H ₂ (S S - 31) がドーブされた、またはカルジオリピンと芳香族カチオン性ペプチドがドーブされたc y t cは、バッテリーの内部抵抗を減少させるのに用いることもでき、それにより放電の間にバッテリーをほぼ一定の電圧に維持することができる。当該技術分野で理解される通り、バッテリーは、化学エネルギーを電気エネルギーに直接変換するデバイスである。それは、複数のボルタ電池を含み、その一方でその電池のそれぞれが、アニオンおよびカチオンを含む導電性電解質によって直列で接続された2つの半電池を含む。一方の半電池は電解質と、アニオン（負に帯電したイオン）が移動する電極、即ちアノードまたは負電極とを含み、他方の半電池は電解質と、カチオン（正に帯電したイオン）が移動する電極、即ちカソードまたは正電極とを含む。バッテリーを作動させるレドックス反応において、カチオンはカソードで還元され（電子が付加され）、アニオンはアノードで酸化される（電子が除去される）。電極は互いに接触しておらず、電解質により電氣的に接続している。一部の電池は、異なる電解質を含む2つの半電池を使用する。半電池の間のセパレータにより、イオンを流しながら電解質の混合を防ぐことができる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D m t - D - A r g - P h e - (a t n) D a p - N H ₂ (S S - 19)（ここで(a t n) D a pは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である）、D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H ₂ (S S - 36)（ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである）、D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H ₂ (S S - 37)（ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである）、D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H ₂ (S P I - 231)、およびD m t - D - A r g - P h e - (d n s) D a p - N H ₂（ここで(d n s) D a pは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である）(S S - 17)を含む。

【0185】

各半電池は、電流を電池の内部から外部に誘導する能力により決定される起電力（またはe m f）を有する。電池の正味e m fは、半電池のe m f間の差である。それゆえ電極がe m fを有する場合、半反応の還元電位間の差。カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーブされたc y t cを用いて、適用例に応じて、可変性またはあらかじめ設定された導電性により電流を電池の内部から外部に移動させて、e m fおよび／または帯電時間を増加させる（または減少させる）ことができる。

【0186】

電池の端子を横切る電気駆動力は、端子電圧（差）として公知であり、ボルトで測定される。充電または放電のいずれもしていない電池の端子電圧は、開路電圧と呼ばれ、電池のe m fと等しい。内部抵抗のせいで、放電している電池の端子電圧は、開路電圧よりも

10

20

30

40

50

規模が小さく、充電している電池の端子電圧は、開路電圧を超えている。理想的な電池は、無視できる程度の内部抵抗を有し、そのため使い果たすまで一定の端子電圧を維持し、その後ゼロに降下する。実際の電池において、内部抵抗は、放電下では増加し、開路電圧も、放電下で減少する。電圧および抵抗を時間に対してプロットすると、得られたグラフは、典型的には曲線になり、曲線の形状は、用いられる化学的性質および内部配列に応じて変動する。c y t c、および／またはカルジオリピンがドーブされた、もしくは芳香族カチオン性ペプチドがドーブされた、もしくはカルジオリピンとペプチドがドーブされたc y t cを用いて、より良好な性能を提供するためにバッテリーの内部抵抗を減少させることができる。有機バッテリーについてのより詳細については、例えば全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4, 585, 717号を参照されたい。

10

【0187】

単一分子ペプチドまたはカルジオリピンでドーブされたc y t cバッテリー

c y t cの単一分子は、充電および／または放電時間が1種以上の芳香族カチオン性ペプチド、例えばT y r - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 01)、2', 6' - D m t - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 02)、P h e - D - A r g - P h e - L y s - N H ₂ (S S - 20)もしくはD - A r g - D m t - L y s - P h e - N H ₂ (S S - 31)、カルジオリピン、またはカルジオリピンとペプチドにより調節され得る分子バッテリーとして用いることもできる。本明細書に記載の通り、c y t cは、帯電した酸素および窒素原子の膜の反対側に炭素および硫黄を有する膜蛋白質である。湿性環境が好適である、帯電した酸素および窒素でコーティングされた領域は、膜の反対の面に突き出している。この配列は、酸素から水への反応を利用して分子ポンプを作動させる、c y t cにより実施される動作に好適である。酸素が消費されると、水素イオンを膜の一方の側から他方の側に押し出すことにより、エネルギーが蓄積される。その後、エネルギーを利用してA T Pを構築するか、または水素イオンを膜から再度漏出させることによりモータを作動させることができる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D m t - D - A r g - P h e - (a t n) D a p - N H ₂ (S S - 19) (ここで(a t n) D a pは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、D m t - D - A r g - A l d - L y s - N H ₂ (S S - 36) (ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D m t - D - A r g - P h e - L y s - A l d - N H ₂ (S S - 37) (ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D - A r g - T y r - L y s - P h e - N H ₂ (S P I - 231)、およびD m t - D - A r g - P h e - (d n s) D a p - N H ₂ (ここで(d n s) D a pは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (S S - 17)を含む。

20

30

【0188】

太陽光(ソーラー)電池のための芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされたc y t c

有機太陽光電池(OPV)は、顕著な低価格設定および審美性に加え、低照度条件で優れた効率を保証する。OPV材料は、可撓性で、形状に合わせることもできる。OPVは、潜在的に様々な材料を包み込むこと、またはそれに塗装することができる。現行のOPVの効率は、5%~6.25%である。これらの効率は、電力発生の従来の形態に取って代わるのに十分とはなり得ないが、OPVは、著しい効率を必要としない用途に適し、特に高コストの半導体ソーラー電池を与える。例えばOPV電池を用いて、連続トリクル充電設定で、事務所、家庭またはカンファレンス室の設定と同様に低い照度条件下で、携帯電話を動作させることができる。

40

【0189】

図18および19に示されるようなOPV電池も、かなり低温(20~200℃)で簡単に加工されるため、無機電池よりも安価で組立てが容易である。例えば有機染料および液体電解質と共に二酸化チタンを用いた電子化学的ソーラー電池は、既に6%電力変換効率を超えており、比較的低い生産コストのおかげで市場に参入しようとしている。OPV

50

は、スピンまたはブレードコーティングと類似した簡単で、それゆえ安価な堆積法を利用して、室温での溶液から可撓性基板上に加工することもできる。可能な用途は、小型の使い捨てソーラー電池から電力付きのスマートプラスチック（クレジット、デビット、テレフォンなどの）カードまでの範囲に及び、例えば広い面積のスキャナーまたは医療画像における光検出器に、そして不均一表面でのソーラーパワー用途において、残量を表示することができる。

【0190】

OPV電池(OPVC)は、光の吸収および電荷輸送のために、有機エレクトロニクス、例えばcyt c、および／あるいはカルジオリピンがドーピングされた、または芳香族カチオン性ペプチド、例えばTy r-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ (SS-01)、2', 6'-Dm t-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ (SS-02)、P h e-D-A r g-P h e-L y s-NH₂ (SS-20)もしくはD-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ (SS-31)がドーピングされた、またはカルジオリピンとペプチドがドーピングされたcyt cを使用する太陽光電池である。OPVCは、可視光を直流(DC)電流に電気的に変換する。一部の太陽光電池は、赤外(IR)線または紫外(UV)線をDCに変換することもできる。活性層(例えば、カルジオリピンがドーピングされた、またはペプチドがドーピングされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーピングされたcyt c)のバンドギャップは、OPVCの吸収バンドを決定する。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dm t-D-A r g-P h e-(a t n) D a p-NH₂ (SS-19) (ここで(a t n) D a pは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、Dm t-D-A r g-A l d-L y s-NH₂ (SS-36) (ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dm t-D-A r g-P h e-L y s-A l d-NH₂ (SS-37) (ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-A r g-Ty r-L y s-P h e-NH₂ (SPI-231)、およびDm t-D-A r g-P h e-(d n s) D a p-NH₂ (ここで(d n s) D a pは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0191】

これらの有機バンドギャップ材料が光子を吸収すると、励起状態が生成されて、光子を吸収する分子または分子領域に限定される。励起状態は、静電相互作用により共に結合された電子正孔対と見なすことができる。太陽光電池において、励起子は、実行電界により自由電子-正孔対になる。実行電界は、2つの異なる材料の間にヘテロ接合を作製することにより設定される。実行電界は、電子を吸収体の伝導帯から受容体分子の伝導帯に降下させることにより、励起子を破壊する。受容体材料が、吸収体材料よりも低い伝導帯端を有することが、必要となる。

【0192】

単層OPVCは、2種の金属伝導体の間、典型的には高仕事関数の酸化インジウムスズ(ITO)の層と低仕事関数の金属、例えばAl、Mg、またはCaの層の間に、有機電子材料(例えば、cyt c、および／またはカルジオリピンがドーピングされた、もしくは芳香族カチオン性ペプチドがドーピングされたcyt c)またはカルジオリピンおよびペプチドの層を挟むことにより、作製することができる。2つの導体の仕事関数の差により、有機層に電界が設定される。有機層が光を吸収すると、電子が伝導帯に励起されて、価電子帯内に正孔が残留して励起子が形成される。異なる仕事関数により生成された電位が、励起子対の分離を援助し、電子をカソードへ、そして正孔をアノードへ引き付ける。この工程から得られた電流および電圧を利用して、作業を進めることができる。

【0193】

実際に単層OPVCは、低量子効率(<1%)および低電力効率(<0.1%)を有する。それらの主要な問題は、2つの導電性電極の差から生じた電界が光発生励起子を破壊するのに十分となることがほとんどないということである。

【0194】

有機ヘテロ接合を利用して、OPVCの性能を向上させるためにビルトイン電界を生成することができる。ヘテロ接合は、導電性電極間に2つ以上の異なる層を組み入れることにより実行される。これらの2層以上の材料は、2層間の界面に静電力を導入する、例えばペプチド濃度、カルジオリピン濃度、またはペプチドとカルジオリピンの濃度による、電子親和力およびイオン化エネルギーにおける差を有する。その材料が適切に選択されれば、十分に大きな差が生じ、それによりこれらの局所的電界が強くなり、単層太陽光電池よりもかなり効率的に励起子を破壊することができる。より高い電子親和力（例えば、より高いペプチドドーピング濃度）およびイオン化電位を有する層が電子受容体であり、他方の層が電子供与体である。この構造は、平面供与体・受容体ヘテロ接合とも呼ばれる。

【0195】

10

電子供与体と受容体は、一緒に混合されて、バルクヘテロ接合OPVCを形成することができる。ブレンドされた供与体および受容体の長さ寸法が、励起子の拡散距離と類似していれば、いずれかの材料において生成された励起子のほとんどが、界面に達して励起子を効率的に破壊することができる。電子は、受容体ドメインに移動し、その後、デバイスを介して運搬されて、一方の電極に収集され、正孔は逆方向に引き付けられてもう一方の側で収集される。

【0196】

有機太陽光電池に関連する課題として、有機材料の大きなバンドギャップを大部分の原因とする、無機太陽光電池デバイスに比較した低い量子効率（～3%）が挙げられる。酸化および還元、再結晶化、ならびに温度変動に対する不安定性により、デバイスの分解および時間の経過に伴う性能低下に陥る可能性もある。これは、異なる組成のデバイスでは異なる程度で起こり、活発な研究が行われている分野である。他の重要な要因としては、励起子の拡散距離；電荷分離および電荷収集；ならびに電荷輸送および移動度が挙げられ、それらは不純物の存在により影響を受ける。有機太陽光電池のより詳細については、例えば全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,657,378号；同第7,601,910号；および同第7,781,670号を参照されたい。

20

【0197】

例示的芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされたcytcの薄膜塗布

電子分野の当業者に十分に理解される通り、前述のデバイスのいずれも、堆積、成長、または他の方法で材料の薄層を提供して適切な構造を形成させることにより、作製することができる。例えばトランジスタ、ダイオード、および太陽光電池のためのヘテロ接合は、互いに隣接する、または層をなした、異なるバンドギャップエネルギーを有する材料の層を堆積させることにより形成することができる。層状の薄膜構造を形成することに加えて、異なるバンドギャップを有する有機材料を混合して、材料の不均一混合物を堆積させることにより、図19(a)および19(b)に示すように、様々な空間配列でヘテロ接合を形成することができる。そのような不均一混合物としては、限定するものではないが、cytcと、芳香族カチオン性ペプチドと、様々なレベルのカルジオリピン、または芳香族カチオン性ペプチド、例えば限定するものではないがTyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)もしくはD-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)がドーブされたcytcと、の混合物を挙げることができる。例示的な芳香族カチオン性ペプチドレベルとしては、限定するものではないが、0～500mM；0～100mM；0～500μM；0～250μM；および0～100μMを挙げることができる。これらの薄膜を用いて、例えば電極の導電率を上昇させ、そして／または熱消散を減少させることにより、従来の電子デバイスの性能を構造させることもできる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19)（ここで(atn)Dapは、β-アントラニロイル-L-α,β-ジアミノプロピオン酸である）、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ (SS-36)（ここでA

30

40

50

1 dは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (SS-37) (ここでAlaは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dapは、 β -ダンシル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0198】

先に記載された通り、励起子が拡散距離内で界面を見出す可能性が高いため、供与体-受容体有機材料の分散されたヘテロ接合は、平面ヘテロ接合に比較して高い量子効率を有する。フィルムの形態も、デバイスの量子効率に対して劇的影響を有し得る。粗面および空隙の存在は、直列抵抗と短絡の機会も増加させ得る。フィルムの形態および量子効率は、約1000 Åの厚さを有する金属カソードによりデバイスを覆った後、デバイスのアニーリングにより改善することができる。有機フィルムの最上部の金属膜は、有機フィルムに応力を加え、有機フィルム内の形態学的緩和の予防を補助する。これにより、高密度に包装された膜が与えられ、同時に有機薄膜のバルクの内側で相分離された相互浸透性供与体-受容体界面の形成が可能になる。

【0199】

ヘテロ接合の成長を制御することで、供与体-受容体材料の位置全体により良好に制御が与えられ、平面および高度に無配向な(disoriented)ヘテロ接合よりもかなり大きな電力効率(入力電力に対する出力電力の比)を与える。これは、電荷分離が供与体-受容体界面で起こるためであり、電荷は電極に移動するため、無秩序な相互浸透性有機材料に捕捉および/または再結合されるようになり、低いデバイス効率を与えることができる。適切な加工パラメータを選択して構造およびフィルムの形態をより良好に制御すれば、望ましくない早期捕捉および/または再結合を軽減する。

【0200】

芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーブされたcyt cの堆積

太陽光電池および他の適用のための、cyt c、芳香族カチオン性ペプチド、あるいはカルジオリピンがドーブされた、または芳香族カチオン性ペプチド、例えばTyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)もしくはD-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)がドーブされた、またはカルジオリピンおよびペプチドがドーブされたcyt cをはじめとする有機フィルムは、スピンコーティング、気相堆積、ならびに全体として参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,734,038号;同第7,662,427号;および同第7,799,377号に記載された方法により付着させてもよい。スピンコーティング技術を利用して、より大きな表面積を高速でコーティングすることができるが、一層のための溶媒を用いて、任意の既存のポリマー層を分解することができる。スピンコーティングされた材料は、別個のパターン化ステップでパターン化しなければならない。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (ここで(atn)Dapは、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ (SS-36) (ここでAlaは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (SS-37) (ここでAlaは、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂ (ここで(dns)Dapは、 β -ダンシル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である) (SS-17)を含む。

【0201】

図20(a)に示された真空熱蒸着(VTE)は、有機材料を真空中で加熱することを含む堆積技術である。基板は、蒸着源から数センチメートル離れて配置されるため、蒸発された材料を基板に直接堆積させることができる。VTEは、異なる材料の多くの層を付着させながら、異なる層間で化学的相互作用を起こさせないために有用である。

【0202】

図20(b)に示された有機気相堆積(OPVD)は、真空熱蒸着よりもフィルムの構造および形態に対してより良好な制御を与える。OPVDは、不活性キャリアガスの存在下で基板上に有機材料を蒸着させることを含む。気体の流速および蒸着源の温度を変化させることにより、得られるフィルムの形態を変化させることができる。キャリア気圧を低下させて、気体の速度および平均自由行程を増加させ、境界層厚を減少させることにより、均質なフィルムを成長させることができる。OPVDにより製造された電池は、チャンバーの壁が暖かく、分子を粘着させずに壁上にフィルムを生成させるため、チャンバーの壁から生じる薄片の混入に関する問題を有さない。成長パラメータ(例えば、蒸着源の温度、ベースの圧力、およびキャリアガスのフラックスなど)に応じて、堆積されたフィルムは、本質的に結晶性または非晶質であってもよい。OPVDを用いて作製されたデバイスは、VTEを用いて作製されたデバイスよりも高い短絡電流密度を示す。電池の最上部にある供与体-受容体ヘテロ接合の余分な層が、電子の伝導を可能にしながら励起子を遮断して、電池効率を改善させる。

【0203】

効率を上昇させるための例示的芳香族カチオン性ペプチドもしくはカルジオリピン、またはそれらの両方がドーピングされたcytc

先に記載された通り、カルジオリピン、または例示的芳香族カチオン性ペプチド、例えばTyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)もしくはD-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)は、単独で、またはカルジオリピンと一緒に用いて、導電率を上昇させることができる。その結果、例示的芳香族カチオン性ペプチドおよびカルジオリピンを用いて、(廃)熱エネルギーの生成による損失を低下させながら電流を伝導させることができる。この効果は、バッテリー電力デバイス、例えば消費者向け電子製品、および大型電化製品、例えば送電適用物の動作寿命を延長させるために活用することができる。廃熱の生成を減少させることで、冷却の必要性も低下し、効率を更に上昇させて、導電性材料、例えば本発明のカルジオリピン、または芳香族カチオン性ペプチド、またはカルジオリピンおよびペプチドがドーピングされたcytcにより電力を伝えられた電子デバイスの寿命を延長する。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19)(ここで(atn)Dapは、β-アントラニロイル-L-α,β-ジアミノプロピオン酸である)、Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂(SS-36)(ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-Lys-NH₂(SS-37)(ここでAlaは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231)、およびDmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂(ここで(dns)Dapは、β-ダンシル-L-α,β-ジアミノプロピオン酸である)(SS-17)を含む。

【0204】

cytc バイオセンサー適用のための芳香族カチオン性ペプチド

本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドを用いて、cytc バイオセンサー内の電子流動を増加させること、および感度レベルを上昇させることができる。実施例により示される通り、本明細書に開示のペプチド、例えばD-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ペプチドは、cytc の還元を促進し(図1)、cytc を通して電子流動を増加させる(図2)。

【0205】

c y t c は、電子化学的観点からの有望なバイオセンサー候補である。しかしヘムとベア電極の間の電子移動は通常、緩やかである。あるいは小型のメディエータを用いて、レドックス活性中心と電極の間の電子移動を間接的に促進してもよい。上記に加えて、あるいは上記に代えて、直接的な電子移動法を用い、それによりレドックス活性酵素を電極表面に直接固定してもよい。例えばpH7で正に帯電してヘムエッジの周囲に多数のL y s 残基を含むc y t c は、例えばカルボキシ末端のアルカンチオールを自己組織化することにより、作製された負に帯電した表面に吸着される。一部の実施形態において、+150mVの一定した電位で、c y t c 電極は、nM濃度範囲のスーパーオキシドに感受性がある。

10

【0206】

一部の実施形態において、本開示は、c y t c バイオセンサーの感度を上昇させるための方法および組成物を提供する。一部の実施形態において、c y t c バイオセンサーは、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドの1種以上を含む。一部の実施形態において、カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーブされたc y t c は、バイオセンサー内でレドックス活性酵素と電極の間のメディエータとして機能する。一部の実施形態において、カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーブされたc y t c は、バイオセンサーの電極に直接固定されている。一部の実施形態において、ペプチドおよびカルジオリピンのうちの1つ以上は、バイオセンサー内でc y t c に結合している。別の実施形態において、ペプチドおよびカルジオリピンのうちの1つ以上は、c y t c に結合していない。一部の実施形態において、ペプチド、カルジオリピンおよび／またはc y t c のうちの1つ以上は、バイオセンサーの表面に固定されている。他の実施形態において、ペプチド、カルジオリピンおよび／またはc y t c のうちの1つ以上は、バイオセンサー内で自由に拡散可能である。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D-A r g-D m t-L y s-P h e-N H₂ ペプチドおよび／またはP h e-D-A r g-P h e-L y s-N H₂ を含む。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドは、D m t-D-A r g-P h e-(a t n) D a p-N H₂ (S S-19) (ここで(a t n) D a pは、β-アントラニロイル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である)、D m t-D-A r g-A l d-L y s-N H₂ (S S-36) (ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D m t-D-A r g-P h e-L y s-A l d-N H₂ (S S-37) (ここでA l dは、β-(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、D-A r g-T y r-L y s-P h e-N H₂ (S P I-231)、およびD m t-D-A r g-P h e-(d n s) D a p-N H₂ (ここで(d n s) D a pは、β-ダンシル-L-α, β-ジアミノプロピオン酸である) (S S-17) を含む。

20

30

【0207】

図11は、芳香族カチオン性ペプチドおよびc y t c がレドックス活性酵素から電極への電子流動のメディエータとして機能するバイオセンサー内の電子流動を示す。一部の実施形態において、バイオセンサーは、カルジオリピンを含む。連続的なレドックス反応において、電子は、基板300からレドックス活性酵素310まで、酵素310からカルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはペプチド／カルジオリピンがドーブされたc y t c 320まで、およびカルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはペプチド／カルジオリピンがドーブされたc y t c 320から電極330まで移動する。

40

【0208】

図12は、芳香族カチオン性ペプチドおよびc y t c が電極に直接固定されている、バイオセンサー内の電子流動を示す。一部の実施形態において、バイオセンサーは、カルジオリピンを含む。連続的なレドックス反応において、電子は、基板340からレドックス活性酵素350まで、そして酵素350から、カルジオリピンがドーブされた、または

50

ペプチドがドーブされた、またはカルジオリピン／ペプチドがドーブされた c y t c 3 2 0 まで、およびカルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはペプチド／カルジオリピンがドーブされた c y t c が固定された電極 3 6 0 まで移動する。

【0209】

環境汚染のバイオレメディエーションにおける芳香族カチオン性ペプチド

本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドは、環境汚染のバイオレメディエーションに有用である。特に該ペプチドは、バクテリアシトクロム c により環境汚染物質までの電子の移動を媒介し、それにより物質の価電子を変化させて、相対的毒性を低減する、バイオレメディエーション反応の速度および／または効率を上昇させるのに有用である。本明細書に開示の方法において、芳香族カチオン性ペプチドは、バクテリアシトクロム c と相互作用し、電子輸送を促進する。一態様において、芳香族カチオン性ペプチドは、バクテリアシトクロム c の還元を促進する。別の態様において、該ペプチドは、バクテリアシトクロム c を介して電子の拡散を増進する。別の態様において、該ペプチドは、バクテリアシトクロム c 内の電子の能力を増強する。別の態様において、該ペプチドは、電子拡散に好都合となる、バクテリアシトクロムのヘム群の周りの新規な π - π 相互作用を導入する。最終的に芳香族カチオン性ペプチドとバクテリアシトクロム c との相互作用は、環境汚染物質の異化的還元を促進および／または増進する。

【0210】

一態様において、本開示は、環境汚染物質のバイオレメディエーションのための方法および組成物を提供する。一般に該方法は、環境汚染物質を含有する試料を、試料中に存在する特定の汚染物質の異化的還元に参加する条件下で、バイオレメディエーション組成物と接触させることを含む。一般にバイオレメディエーション組成物は、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドの 1 種以上を発現する組換えバクテリアを含む。

【0211】

一部の実施形態において、本明細書に開示のバイオレメディエーション組成物は、外因性核酸からの本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドの 1 種以上を発現する組換えバクテリアを含む。一部の実施形態において、核酸は、ペプチドをコードする。一部の実施形態において、ペプチドをコードする核酸は、バクテリアの形質転換を介してバクテリアにより取り込まれたプラスミド DNA 上で運搬される。本明細書に記載の方法において用いられ得るバクテリア発現プラスミドの例としては、限定するものではないが、C o l E 1、p A C Y C 1 8 4、p A C Y C 1 7 7、p B R 3 2 5、p B R 3 2 2、p U C 1 1 8、p U C 1 1 9、R S F 1 0 1 0、R 1 1 6 2、R 3 0 0 B、R K 2、p D S K 5 0 9、p D S K 5 1 9、および p R K 4 1 5 が挙げられる。

【0212】

一部の実施形態において、バイオレメディエーション組成物は、安定したゲノムインサートからの本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチドを発現する組換えバクテリアを含む。一部の実施形態において、ゲノムインサートは、該ペプチドをコードする核酸配列を含む。一部の実施形態において、核酸配列は、バクテリアゲノム内に統合されるバクテリアトランスポゾンにより運搬される。本明細書に開示の方法において用いられ得るバクテリアトランスポゾンの例としては、限定するものではないが、T n 1、T n 2、T n 3、T n 2 1、 $\gamma \delta$ (T n 1 0 0 0)、T n 5 0 1、T n 5 5 1、T n 8 0 1、T n 9 1 7、T n 1 7 2 1 T n 1 7 2 2 T n 2 3 0 1 が挙げられる。

【0213】

一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチドをコードする核酸配列は、バクテリアプロモータの制御下にある。一部の実施形態において、該プロモータは、誘導性プロモータを含む。本明細書に記載の方法において用いられ得る誘導性プロモータの例としては、限定するものではないが、熱ショックプロモータ、イソプロピル β -D-L-チオガラクトピラノシド (I P T G) 誘導性プロモータ、およびテトラサイクリン (T e t) 誘導性プロモータが挙げられる。

【0214】

一部の実施形態において、該プロモータは、構成性プロモータである。本明細書に記載の方法において用いられ得る構成性プロモータの例としては、限定するものではないが、*spc* リボソーム蛋白質オペロンプロモータ (*Pspc*)、 β -ラクタマーゼ遺伝子プロモータ (*Pbla*)、 λ ファージの *PL* プロモータ、複製制御プロモータ *PRNAI* および *PRNAII*、ならびに *rrnB* リボソーム RNA オペロンの *P1* および *P2* プロモータが挙げられる。

【0215】

一部の実施形態において、組換えバクテリアは、*Shewenella* 属を含む。一部の実施形態において、バクテリアは、*S. abyssii*、*S. algae*、*S. algidipiscicola*、*S. amazonensis*、*S. aquimarina*、*S. baltica*、*S. benthica*、*S. colwelliana*、*S. decolorationis*、*S. denitrificans*、*S. donghaensis*、*S. fidelis*、*S. frigidimarina*、*S. gaetbuli*、*S. gelidimarina*、*S. glacialipiscicola*、*S. hafniensis*、*S. halifaxensis*、*S. hanedai*、*S. ircinia*、*S. japonica*、*S. kaireitica*、*S. livingstonensis*、*S. loihica*、*S. marinintestina*、*S. marisflavi*、*S. morhuae*、*S. olleyana*、*S. oneidensis*、*S. pacifica*、*S. pealeana*、*S. piezotolerans*、*S. pn* 20
eumatophori、*S. profunda*、*S. psychrophila*、*S. putrefaciens*、*S. sairae*、*S. schegelianae*、*S. sediminis*、*S. spongiae*、*S. surugensis*、*S. violacea*、*S. waksmanii*、または *S. woodyi* を含む。

【0216】

一部の実施形態において、組換えバクテリアは、*Geobacter* 属を含む。一部の実施形態において、バクテリアは、*G. ferrireducens*、*G. chapel* 30
lei、*G. humireducens*、*G. arculus*、*G. sullfur*
ducens、*G. hydrogenophilus*、*G. metallireducens*、*G. argillaceus*、*G. bemidjensis*、*G. bremen*
sis、*G. grbiciae*、*G. pelophilus*、*G. pickeringi*
i、*G. thiogenes*、または *G. uranireducens* を含む。

【0217】

一部の実施形態において、組換えバクテリアは、*Desulfuromonas* 属を含む。一部の実施形態において、バクテリアは、*D. palmitatis*、*D. chlo*
roethenica、*D. acetexigens*、*D. acetoxidans*、*D.* 30
michiganensis、または *D. thiophila*、*D. sp* を含む。

【0218】

一部の実施形態において、組換えバクテリアは、*Desulfovibrio* 属を含む。一部の実施形態において、バクテリアは、*Desulfovibrio africa* 40
nus、*Desulfovibrio baculatus*、*Desulfovibrio*
desulfuricans、*Desulfovibrio gigas*、*Desulfovibrio*
halophilus、*Desulfovibrio magneticus*、*Desulfovibrio multispirans*、*Desulfo*
vibrio pigra、*Desulfovibrio salixigens*、*De*
sulfovibrio sp.、または *Desulfovibrio vulgaris* を含む。

【0219】

一部の実施形態において、組換えバクテリアは、*Desulfuromusa* 属を含む。一部の実施形態において、バクテリアは、*D. bakii*、*D. kysingii*、ま 50

たは *D. succinoxidans* を含む。

【0220】

一部の実施形態において、組換えバクテリアは、*Pelobacter* 属を含む。一部の実施形態において、バクテリアは、*P. propionisus*、*P. acetylinicus*、*P. venetianus*、*P. carbinolicus*、*P. cidigallici*、*P. sp. A3b3*、*P. masseliensis*、または *P. seleniigenes* を含む。

【0221】

一部の実施形態において、組換えバクテリアは、*Thermotoga maritima*、*Thermoterrubacterium ferrireducens*、*Deferribacter thermophilus*、*Geovibrio ferrireducens*、*Desulfobacter propionicus*、*Geospirillum barnseii*、*Ferribacterium limneticum*、*Geothrix fermentens*、*Bacillus infernus*、*Thermas sp. SA-01*、*Escherichia coli*、*Proteus mirabilis*、*Rhodobacter capsulatus*、*Rhodobacter sphaeroides*、*Thiobacillus denitrificans*、*Micrococcus denitrificans*、*Paraococcus denitrificans*、または *Pseudomonas sp* を含む。

【0222】

一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、金属の異化的還元に関する。一部の実施形態において、金属は、*Sc*、*Ti*、*V*、*Cr*、*Mn*、*Fe*、*Co*、*Ni*、*Cu*、*Zn*、*Y*、*Zr*、*Nb*、*Mo*、*Tc*、*Ru*、*Pd*、*Ag*、*Cd*、*Hf*、*Ta*、*W*、*Re*、*Os*、*Ir*、*Pt*、*Au*、*Hg*、*Rf*、*Db*、*Sg*、*Bh*、*Hs*、*Cn*、*Al*、*Ga*、*In*、*Sn*、*Pb*、または *Bi* を含む。一部の実施形態において、該方法は、可溶性酸化物を形成させる。一部の実施形態において、該方法は、*Cr* (VI) から *Cr* (III) への還元および不溶性沈殿物を形成させる。一部の実施形態において、金属のバイオレメディエーションの方法は、金属を、本明細書に開示の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現するように操作された表7に列挙されたバクテリアを含むバイオレメディエーション組成物と接触させることを含む。

【0223】

一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、非金属の異化的還元に関する。一部の実施形態において、非金属は、硫酸塩である。一部の実施形態において、該方法は、硫酸塩の還元および硫化水素を形成させる。一部の実施形態において、硫酸塩のバイオレメディエーションの方法は、硫酸塩を、本明細書に開示の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現するように操作された表7に列挙されたバクテリアを含むバイオレメディエーション組成物と接触させることを含む。

【0224】

一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、過塩素酸塩の異化的還元に関する。一部の実施形態において、過塩素酸塩は、*NH₄ClO₄*、*CsClO₄*、*LiClO₄*、*Mg(ClO₄)₂*、*HClO₄*、*KClO₄*、*RbClO₄*、*AgClO₄*、または *NaClO₄* を含む。一部の実施形態において、該方法は、過塩素酸塩から亜塩素酸塩への還元を引き起こす。一部の実施形態において、過塩素酸塩のバイオレメディエーションの方法は、過塩素酸塩を、本明細書に開示の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現するように操作された *E. coli*、*Proteus mirabilis*、*Rhodobacter capsulatus*、または *Rhodobacter sphaeroides* を含むバイオレメディエーション組成物と接触させることを含む。一部の実施形態において、過塩素酸塩のバイオレメディエーションの方法は、過塩素酸塩を、本明細書に開示の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現するように操作された表7に列挙されたバクテリアを含むバイオレメディエーション組成物と接触させることを含む。

【0225】

一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、硝酸塩の異化的還元に関する。一部の実施形態において、硝酸塩は、 HNO_3 、 LiNO_3 、 NaNO_3 、 KNO_3 、 RbNO_3 、 CsNO_3 、 $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、または $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ を含む。一部の実施形態において、該方法は、硝酸塩から亜硝酸塩への還元を引き起こす。一部の実施形態において、硝酸塩のバイオレメディエーションの方法は、硝酸塩を、本明細書に開示の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現するように操作された*Thiobacillus denitrificans*、*Micrococcus denitrificans*、*Paraoccus denitrificans*、*Pseudomonas* sp.、または*E. coli*を含むバイオレメディエーション組成物と接触させることを含む。一部の実施形態において、硝酸塩のバイオレメディエーションの方法は、硝酸塩を、本明細書に開示の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現するように操作された表7に列挙されたバクテリアを含むバイオレメディエーション組成物と接触させることを含む。

【表 7】

表 7. 例示的なバイオレメディエーションのバクテリア種

<i>Shewanella abyssii</i>	<i>Shewanella sairae</i>	<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>	10
<i>Shewanella algae</i>	<i>Shewanella schegoliana</i>	<i>Desulfuromonas acetexigens</i>	
<i>Shewanella algidipiscicola</i>	<i>Shewanella sediminis</i>	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	
<i>Shewanella amazonensis</i>	<i>Shewanella spongiae</i>	<i>Desulfuromonas michiganensis</i>	
<i>Shewanella aquimarina</i>	<i>Shewanella surugensis</i>	<i>Desulfuromonas thiophila</i>	
<i>Shewanella baltica</i>	<i>Shewanella violacea</i>	<i>Desulfuromonas sp.</i>	20
<i>Shewanella benthica</i>	<i>Shewanella waksmanii</i>	<i>Desulfuromusa bakii</i>	
<i>Shewanella colwelliana</i>	<i>Shewanella woodyi</i>	<i>Desulfuromusa kysingii</i>	
<i>Shewanella decolorationis</i>	<i>Desulfovibrio africanus</i>	<i>Desulfuromusa succinoxidans</i>	
<i>Shewanella denitrificans</i>	<i>Desulfovibrio baculatus</i>	<i>Pelobacter propionisus</i>	
<i>Shewanella donghaensis</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Pelobacter acetylinicus</i>	30
<i>Shewanella fidelis</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i>	<i>Pelobacter venetianus</i>	
<i>Shewanella frigidimarina</i>	<i>Desulfovibrio halophilus</i>	<i>Pelobacter arbinolicus</i>	
<i>Shewanella gaetbuli</i>	<i>Desulfovibrio magneticus</i>	<i>Pelobacter acidigallici</i>	
<i>Shewanella gelidimarina</i>	<i>Desulfovibrio multispirans</i>	<i>Pelobacter sp. A3b3</i>	
<i>Shewanella glacialipiscicola</i>	<i>Desulfovibrio pigra</i>	<i>Pelobacter masseliensis</i>	40
<i>Shewanella hafniensis</i>	<i>Desulfovibrio salixigens</i>	<i>Pelobacter seleniigenes</i>	
<i>Shewanella halifaxensis</i>	<i>Desulfovibrio sp.</i>		
<i>Shewanella hanedai</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>		

<i>Shewenella irciniae</i>	<i>Geobacter ferrireducens</i>	<i>Thermotoga maritime</i>	
<i>Shewenella japonica</i>	<i>Geobacter chapellei</i>	<i>Thermoterrubacterium</i>	
<i>Shewenella kaireitica</i>	<i>Geobacter humireducens</i>	<i>ferrireducens</i>	
<i>Shewenella livingstonensis</i>	<i>Geobacter arculus</i>	<i>Deferribacter thermophilus</i>	
<i>Shewenella loihiica</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	<i>Geovibrio ferrireducens</i>	10
<i>Shewenella marinintestina</i>	<i>Geobacter hydrogenophilus</i>	<i>Desulfobacter propionicus</i>	
<i>Shewenella marisflavi</i>	<i>Geobacter metallireducens</i>	<i>Geospirillum barnseii</i>	
<i>Shewenella morhuac</i>	<i>Geobacter argillaceus</i>	<i>Ferribacterium limneticum</i>	
<i>Shewenella olleyana</i>	<i>Geobacter bemidjensis</i>	<i>Geothrix fermentans</i>	
<i>Shewenella oneidensis</i>	<i>Geobacter bremensis</i>	<i>Bacillus infernus</i>	20
<i>Shewenella pacifica</i>	<i>Geobacter grbiciae</i>	<i>Therms sp. SA-01</i>	
<i>Shewenella pealeana</i>	<i>Geobacter pelophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Shewenella piezotolerans</i>	<i>Geobacter pickeringii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Shewenella pneumatophori</i>	<i>Geobacter thiogenes</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	
<i>Shewenella profunda</i>	<i>Geobacter uraniireducens</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	30
<i>Shewenella psychrophila</i>	<i>Desulfuromonas palmitatis</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	
<i>Shewenella putrefaciens</i>		<i>Micrococcus denitrificans</i>	
		<i>Paraoccus denitrificans</i>	
		<i>Pseudomonas sp.</i>	

10

20

30

40

【0226】

一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、放射線核種の異化的還元に関する。一部の実施形態において、放射線核種は、アクチニドを含む。一部の実施形態において、放射線核種は、ウラン（U）を含む。一部の実施形態において、該方法は、U（VI）からU（IV）への還元および不溶性沈殿物を形成させる。一部の実施形態において、該方法は、メチル-tert-ブチルエーテル（MTBE）、塩化ビニル、またはジクロロエチレンの異化的還元に関する。一部の実施形態において、バイオレメディエーションの方法は、これらの汚染物質を、本明細書に開示の1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現するように操作された表7に列挙されたバクテリアを含むバイオレメディエーション組成物と接触させることを含む。

50

【0227】

一部の実施形態において、本明細書に開示の方法は、環境汚染の部位に投与される。一部の実施形態において、該方法は、エクスサイチュのバイオレメディエーションを含み、それにより汚染された材料が本来の場所から除去されて、他の場所で処理される。

【0228】

一部の実施形態において、エクスサイチュのバイオレメディエーションは、ランドフラーミングを含み、それにより汚染された土壌を本来の場所から掘り出し、本明細書に記載のバイオレメディエーション組成物と混和して、準備された床の上に広げて、汚染物質が許容可能なレベルまで除去または低減されるまで定期的に耕す。一部の実施形態において、エクスサイチュのバイオレメディエーションは、コンポスティングを含み、それにより汚染された土壌を本来の場所から掘り出し、本明細書に記載のバイオレメディエーション組成物および非有害性有機材料と混和して、汚染物質が許容可能なレベルまで除去または低減されるまでコンポスティング容器に保持する。一部の実施形態において、エクスサイチュのバイオレメディエーションは、バイオリクター中での汚染除去を含み、それにより汚染された土壌または水を設計された格納システムに入れて、本明細書に記載のバイオレメディエーション組成物と混和して、汚染物質が許容可能なレベルまで除去または低減されるまで保持する。

【0229】

本明細書に記載の組換えバクテリアを生成する方法は、当該技術分野で周知である。多数の従来の分子生物学技術を利用して、1種以上の芳香族カチオン性ペプチドをコードするバクテリア性プラスミドを生成させてもよいことを、当業者は理解するであろう。例えば該ペプチドをコードする核酸配列が合成されて、制限酵素およびライゲーション酵素を用いて選択されたプラスミドにクローニングされてもよい。多量の産物を生成させるために、ライゲーション産物が、*E. coli*中に形質転換してもよく、その後、選択されたバイオレメディエーションバクテリアに形質転換されてもよい。同様に、1種以上の芳香族カチオン性ペプチドをコードする核酸配列を運搬するバクテリアトランスポゾンを作成させるため、および選択されたバイオレメディエーションバクテリアにトランスポゾンを形質転換するための方策を用いてもよい。

【0230】

バクテリア学の日常的方法を用いて、大規模なバイオレメディエーション操作で使用される本明細書に記載の多量の組換えバクテリアを生成させ得ることも、当業者は理解するであろう。正確な培養条件が使用される特定のバクテリア種に応じて変動すること、および様々なバイオレメディエーション用バクテリアの培養条件を当該技術分野で容易に入手され得ることを、当業者は理解するであろう。

【0231】

バイオレメディエーションおよび他の関連する適用の一般的引用文献は、以下の引用文献に示され、それらは全体として参照により本明細書に組み入れられる：米国特許第6,913,854号；Reimers, C. E. et al. "Harvesting Energy from Marine Sediment-Water Interface" *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35, 192-195, Nov. 16, 2000；Bond D. R. et al. "Electrode Reducing Microorganisms that Harvest Energy from Marine Sediments" *Science*, vol. 295, 483-485 Jan. 18, 2002；Tender, L. M. et al. "Harnessing Microbially Generated Power on the Seafloor" *Nature Biology*, vol. 20, pp. 821-825, Aug. 2002；DeLong, E. F. et al. "Power From the Deep" *Nature Biology*, vol. 20, pp. 788-789, Aug. 2002；Bilal, "Thermo-Electrochemical Reduction of Sulfate to Sulfide Using

a Graphite Cathode, "J. Appl. Electrochem., 28, 1073, (1998); Habermann, et al., "Biological Fuel Cells With Sulphide Storage Capacity, "Applied Microbiology Biotechnology, 35, 128, (1991); および Zhang, et al., "Modelling of a Microbial Fuel Cell Process, "Biotechnology Letters, vol. 17 No. 8, pp. 809-814 (Aug., 1995)。

【0232】

ナノワイヤー適用における芳香族カチオン性ペプチド、カルジオリピンおよびシトクロム c

10

本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチド、シトクロム c、および／またはカルジオリピンがドーピングされた、もしくはペプチドがドーピングされた、もしくはカルジオリピン／ペプチドがドーピングされた cytc は、ナノワイヤー適用において有用である。典型的にはナノワイヤーは、ナノメートル (10^{-9} メーター) の規模の孔径を有するナノ構造である。あるいはナノワイヤーは、数十ナノメートル未満に限定された厚さまたは口径と、非制限的長さとを有する構造として定義することができる。これらの寸法では、量子力学的効果が機能するようになる。金属 (例えば、Ni、Pt、Au)、半導体 (例えば、Si、InP、GaN など)、および絶縁体 (例えば、 SiO_2 、 TiO_2) をはじめとし、多くの異なるタイプのナノワイヤーが存在する。分子ナノワイヤーは、有機 (例えば、DNA、本明細書に開示の芳香族カチオン性ペプチド、シトクロム c、および／またはカルジオリピンもしくはペプチドもしくはペプチド／カルジオリピンがドーピングされた cytc など) または無機 (例えば、 MoS_2 、 Si_3N_4) のいずれかの反復分子単位で構成される。本明細書に開示のナノワイヤーは、例えば構成要素を極めて小さい回路内に結び付けるのに、有用である。ナノテクノロジーを用いれば、該構成要素が、化学的化合物から作製される。

20

【0233】

ナノワイヤーの合成

ナノワイヤーを合成するために、トップダウンアプローチおよびボトムアップアプローチの2つの基本的アプローチが存在する。トップダウンアプローチでは、材料の大きな断片が、リソグラフィーおよび電気泳動などの異なる手段により、小さな断片に切り詰められる。一方ボトムアップアプローチでは、ナノワイヤーが、構成するアトームと組み合わせることにより合成される。その合成技術のほとんどは、ボトムアップアプローチに基づく。

30

【0234】

ナノワイヤー構造は、懸濁、堆積 (電気化学または他の方法)、および VLS 成長をはじめとする複数の一般的な実験技術により成長される。

【0235】

懸濁されたナノワイヤーは、長手方向の先端に保持された高真空チャンバー内で製造されたワイヤーである。懸濁されたナノワイヤーは、化学エッチング、またはより大きなワイヤーの衝撃 (典型的には高エネルギーイオンによる) ; 融点付近の金属表面で STM のチップに窪みをつけること ; およびその後、引っ込めること、により製造することができる。

40

【0236】

ナノワイヤーを作製するための別の一般的技術は、蒸気液体固体 (VLS) 合成法である。この技術は、レーザアブレーションされた粒子または供給ガス (シランなど) のいずれかを供給材料として使用する。供給源を、その後、触媒に暴露する。ナノワイヤーの場合、最良の触媒は、液体金属 (金など) のナノクラスターであり、それはコロイド形態で購入して基板に堆積させるか、またはデウェットングにより薄膜から自己組織化させることができる。この工程は、多くの場合、半導体材料の場合には結晶ナノワイヤーを製造

50

することができる。供給源を、これらのナノクラスターに導入して、その飽和を開始する。過飽和に達したら、供給源を固化して、ナノクラスターから外側に成長させる。最終生成物の長さは、単に供給源を遮断することにより調整することができる。代替りの材料の超格子を有する複号ナノワイヤーを、成長期を続けながら供給源を切り替えることにより作製することができる。一部の実施形態において、芳香族カチオン性ペプチド、cyt c および／またはカルジオリピンもしくはペプチドもしくはカルジオリピン／ペプチドがドーブされたcyt c などの供給材料を、用いてもよい。Mo₆S_{9-x}I_xなどの無機ナノワイヤー（あるいはクラスターポリマーとして観察される）は、高温での一段階蒸気層反応において合成される。

【0237】

10

さらに、多くのタイプの材料のナノワイヤー、例えば芳香族カチオン性ペプチド、シトクロムc および／またはカルジオリピンもしくはペプチドもしくはカルジオリピン／ペプチドがドーブされたcyt c は、溶液中で成長させることができる。溶液相合成は、表面でナノワイヤーを製造する方法と比較して、非常に多量のナノワイヤーを製造するように規模拡大し得るという利点を有する。エチレングリコールが溶媒および還元剤の両方となるポリオール合成は、Pb、Pt および銀のナノワイヤーを製造する際に特に多用途になることが立証された。

【0238】

一般的方法

シトクロムcの還元：芳香族カチオン性ペプチドの量を増加させながら、酸化cyt c の溶液に添加した。還元されたcyt c の形成を、500 nmの吸収によりモニタリングした。cyt c 還元の割合を、非線形解析（Prizmのソフトウェア）により決定した。

20

【0239】

時間分解UV可視吸収分光法を利用して、ペプチドの存在下、cyt c の電子輸送工程を試験した。還元されたcyt c を、広帯域スペクトル範囲（200～1100 nm）での吸収によりモニタリングした。1または2 mmの路程の石英セル中、UV／可視分光光度計（Ultrospec 3300 pro, GE）を用いて記録した。N-アセチルシステイン（NAC）およびグルタチオンを電子供与体として用いて、酸化されたcyt c を還元した。cyt c の還元の速度定数は、様々な濃度のペプチドを添加することにより推定した。ペプチドの用量依存性をcyt c 還元率と関連させた。

30

【0240】

ミトコンドリアO₂消費およびATP生成：新鮮なミトコンドリアを、前述のようにラット腎臓から単離した。電子フラックスを、C1（グルタミン酸塩／マレイン酸塩）、C2（コハク酸塩）、およびC3（TMPD／アスコルビン酸塩）を用い、前述のようにO₂消費（Oxygraph Clark electrode）により測定した。酵素反応の飽和を回避するために、アッセイを低基質条件下で実施した。単離されたミトコンドリア中のATP生成を、96ウェルルミネッセンスプレートリーダー（Molecular Devices）で、ルシフェラーゼ法（Biotherma）を利用して反応速度論的に決定した。ATP合成の初期最大速度を、最初の1分間に決定した。

40

【0241】

サイクリックボルタンメトリー：NHE（Biometra, Göttingen, ドイツ）に対して+0.237 Vの電位のAg／AgCl／1M KCl参照電極および白金カウンター電極を用いたBioanalytical System CV-50W Voltammetric Analyzerを使用して、サイクリックボルタンメトリーを実施した。金のワイヤー電極を、確立されたプロトコルに従って洗浄した。溶液中のcyt c の電気化学的試験を、メルカプトプロパノール修飾電極（20 mMメルカプトプロパノール中で24時間インキュベート）を用いて実施した。1M KClおよび10 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.4／7.8中の20 μM cyt cでのサイクリックボルタモグラムの記録した。ランドレスーセブシック式により、異なるスキャン速度

50

(100～400 mV/s)と、異なるスキャン速度でのピーク電流による拡散係数とで、式量電位をアノードピーク電位とカソードピーク電位の間の midpoint として計算した。

【実施例】

【0242】

本発明を以下の実施例により更に例示するが、実施例は限定として解釈されるべきではない。

【0243】

実施例1. 芳香族カチオン性ペプチドの合成

固相ペプチド合成を利用し、全てのアミノ酸誘導体は市販される。ペプチド組織化の完了後に、ペプチドを通常の手法で樹脂から切断する。粗ペプチドを分取逆相クロマトグラフィーにより精製する。ペプチドの構造同一性を、FAB質量分析法により確認し、その純度を、3つの異なるシステムの分析的逆相HPLCおよび薄層クロマトグラフィーにより評価する。98%を超える純度に達するであろう。典型的には、樹脂5gを用いた合成実験で、純粋なペプチド約2.0～2.3gが得られる。

【0244】

実施例2. D-Ar g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) はシトクロムc還元を促進する

吸収分光法 (Ultr oSpec 3300 Pro; 220～1100 nm) を用いて、SS-31 が cyt c還元をモジュレートするかについて決定した (図1)。グルタチオンによる cyt cの還元を、550 nmの目立ったシフトと共に、Qバンド (450～650 nm) での複数のシフトに関連づけられる。SS-31の添加により、550 nmに顕著なスペクトル重みのシフトを生じた (図1A)。時間依存的な分光光度法から、SS-31 が cyt c還元の割合を増加させたことが示される (図1B)。これらのデータから、SS-31 が cyt cの電子構造を変化させて、Fe³⁺ヘムからFe²⁺ヘムへの還元を増進したことが示唆される。

【0245】

実施例3. D-Ar g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) は、シトクロムcを介した電子拡散を増進する

サイクリックボルタンメトリー (CV) を実施して、SS-31 が cyt cの電子流動および/または還元/酸化電位を変化させるかについて決定した (図2、上図)。CVを、Au作用電極、Ag/AgCl参照電極、およびPt補助電極を利用して実施した。SS-31は、cyt cの還元および酸化の両工程で電流を増加させた (図2、上図)。SS-31は、還元/酸化電位を変化させないが (図2、上図)、むしろ cyt cを通した電子流動を増加させており、SS-31が複合体IIIからIVの間で抵抗を減少させることが示唆される。図2 (下図) では、ボルタンメトリーの測定全てを、BASi C3 Cell Standに連結させたBASi-50W Voltammetric Analyzerを用いて実施した。Ag/AgCl電極を参照として使用し、ガラス状炭素および白金電極を標準測定用に使用した。各測定の前に、溶液を窒素で完全に脱気して、電極ファウリングを回避した。サイクリックボルタモグラムを、図2 (下図) に示す通り、Trisホウ酸塩-EDTA (TBE) 緩衝液、緩衝液+cyt c、および緩衝液+cyt c+2種の異なるSS-31用量について得た。電流 (電子拡散速度) は、SS-31用量が cyt cに関して二倍になると (cyt c: SS-31=1:2) ほぼ200%増加する。結果から、SS-31が cyt cにおける電子拡散を促進し、該ペプチドがより感度の高いバイオディテクターを設計するのに有用となることが示される。

【0246】

実施例4. D-Ar g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ ペプチド (SS-31) はシトクロムcにおける電子の能力を増進する

フォトルミネッセンス (PL) を実施して、cyt cのヘムの伝導帯の電子構造、つまり電子輸送を有するエネルギー状態に対するSS-31の影響を検討した (図3)。N

10

20

30

40

50

d: YDO4レーザー(532.8nm)を用いて、cyt c中の電子を励起した(図2A)。cyt c状態での強いPL放出を、650nmで明確に識別することができる(図2B)。PL強度は、SS-31の添加に伴って用量依存的に上昇し、cyt cにおける伝導帯の利用可能な電子状態の増加が示唆される(図2B)。これにより、SS-31がcyt cの伝導帯の電子能力を増加させること、そして同時にSS-31を介してcyt cを通した電流が増加することが示唆される。

【0247】

実施例5. D-A r g -D m t -L y s -P h e -N H ₂ ペプチド(SS-31)はシトクロムcヘムの周囲に新規なπ-π相互作用を導入する

円偏光二色性測定(O l i s 分光偏光計、DSM20)を実施して、ソレットバンド(415nmでの負のピーク)を、cyt c中のπ-π*ヘム環境に関するプローブとしてモニタリングした(図4)。SS-31は、このピークの440nmへの「レッド」シフトを促進し、変性を伴わずに新規なヘム-チロシンπ-π*遷移を導入したことが示唆される(図4)。これらの結果から、SS-31が電子トンネル効果のための追加のTy rをヘムに提供すること、または内因性Ty r残基とヘムとの距離を短縮させることにより、ヘムの周囲環境を改良するに違いないことが示唆される。ヘム周囲でのπ-π*相互作用の増加が、電子トンネル効果を増進し、それにより電子拡散に好適となろう。

【0248】

実施例6. D-A r g -D m t -L y s -P h e -N H ₂ ペプチド(SS-31)はミトコンドリアO₂消費を増加させる

単離されたラット腎臓ミトコンドリアの酸素消費を、オキシグラフを用いて決定した(図5)。呼吸速度を、状態2(400μM ADPのみ)、状態3(400μM ADPおよび500μM 基質)および状態4(基質のみ)で、異なる濃度のSS-31の存在下で測定した。実験は全て、n=4~7の三重測定で実施した。結果から、SS-31がミトコンドリアを脱共役させずに、酸素への電子輸送を促進したことが示される(図5)。

【0249】

実施例7. D-A r g -D m t -L y s -P h e -N H ₂ ペプチド(SS-31)は単離されたミトコンドリアにおいてATP合成を増加させる

400mM ADPの添加後1分目に、単離されたミトコンドリアから採取された呼吸緩衝液中のATPを測定することにより、ミトコンドリアATP合成の割合を決定した(図6)。ATPは、HPLCによりアッセイした。実験は全て、n=3の三重測定で実施した。単離されたミトコンドリアにSS-31を添加すると、ATP合成の割合が用量依存的に増加した(図6)。これらの結果から、SS-31による電子移動の増進がATP合成に結び付くことが示される。

【0250】

実施例8. D-A r g -D m t -L y s -P h e -N H ₂ ペプチド(SS-31)はシトクロムc除去ミトプラストの呼吸を増進する

ミトコンドリア呼吸へのSS-31の作用におけるcyt cの役割を実証するために、ミトコンドリアO₂消費に及ぼすSS-31の影響を、一度凍結されたラット腎臓ミトコンドリアから作製されたcyt c除去ミトプラストにおいて決定した(図7)。呼吸の速度は、100μM SS-31を含む、または含まない50μM コハク酸塩の存在下で測定した。実験は、n=3の三重測定で実施した。これらのデータから、1) SS-31がIMMと強固に結合したcyt cを介して機能すること；2) SS-31が機能的cyt cの低下から守り得ること、が示唆される。

【0251】

実施例9. D-A r g -D m t -L y s -P h e -N H ₂ ペプチド(SS-31)およびP h e -D -A r g -P h e -L y s -N H ₂ ペプチド(SS-20)はシトクロムcの還元を促進する

SS-31およびSS-20は、還元剤としてのグルタチオン(GSH)により導入さ

10

20

30

40

50

れたcyt c還元反応の速度を促進することができる(図13)。cyt cの還元を、550nmの吸収の増加によりモニタリングした。GSHの添加により、550nmでの吸収が時間依存的に増加した(図13)。同様の結果が、還元剤としてN-アセチルシステイン(NAC)を用いることで得られた(不図示)。100μM濃度のSS-31単独の添加は、cyt cを還元せず、SS-31がNACにより誘導されたcyt c還元速度を用量依存的に上昇させており、SS-31が電子を供与せず電子移動を迅速化し得ることが示唆される。

【0252】

実施例10. D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ペプチド(SS-31)およびPhe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ペプチド(SS-20)はミトコンドリア電子フラックスおよびATP合成を増加する

10

SS-20およびSS-31の両方は、単離されたラット腎臓ミトコンドリア中のO₂消費により測定される通り、電子フラックスを促進し得る(図14)。SS-20またはSS-31を、100μM濃度で、0.5mMコハク酸塩(複合体II基質)および400μM ADPを含む呼吸緩衝液中の単離されたミトコンドリアに添加した。低濃度の複合体I基質(グルタミン酸塩/マレイン酸塩)を用いた場合に、O₂消費における同様の増加が観察された(不図示)。電子フラックスの増加は、低濃度のコハク酸塩でエネルギー供給された単離されたミトコンドリアにおけるATP生成の割合の有意な上昇と相関した(図15)。これらのデータから、SS-20およびSS-31にIMMを標的化させることで、特に還元基質供給の条件下では、電子伝達系における電子フラックスが促進し、ATP合成が改善し得ることが示唆される。

20

【0253】

実施例11. シトクロムcの単離および精製

シトクロムcを単離および精製する方法は、当該技術分野で公知である。1つの例示的で非限定的な方法を示す。シトクロムcは、複数の正に帯電した基を有し、それをおよそ10のpIに与える。つまりシトクロムcは通常、膜上のリン脂質の負電荷へのイオン引力により、ミトコンドリア膜に結合する。組織およびミトコンドリアは、最初、硫酸アルミニウム溶液中、低pHでブレンダー内でのホモジネーションにより破壊される。正に帯電したアルミニウムイオンは、負に帯電したリン脂質に結合することにより膜からシトクロムcを脱離させて、溶液中に蛋白質を放出することができる。pHが8.0に上昇することにより、過剰な硫酸アルミニウムが除去され、アルミニウムが水酸化アルミニウムの形態で沈殿する。

30

【0254】

沈殿した水酸化アルミニウムを濾過により排除した後、イオン交換クロマトグラフィーを利用してそれらの電荷の機能として蛋白質を分離する。シトクロムcは、複数の正に帯電した基を有し、典型的にはカラムは、Amberlite CG-50、負に帯電した樹脂または陽イオン交換樹脂で構成される。

【0255】

溶離液が回収されたら、硫酸アンモニウム沈殿法を利用して、シトクロムc調製物中に残留する混入蛋白質を選択的に沈殿させる。ほとんどの蛋白質が、硫酸アンモニウム中に80%飽和で沈殿するが、シトクロムcは、可溶性のままである。溶液中に存在する過剰な塩は、その後、サイズに基づいて蛋白質を分離するゲル濾過クロマトグラフィーにより除去される。

40

【0256】

精製を評価するために、調製物の試料を精製の各段階で回収する。これらの試料は、その後、ブラッドフォード法を利用して総蛋白質量についてアッセイし、シトクロムc濃度を分光光度法により測定する。

【0257】

実施例12. Desulfovibrio desulfuricansによる可溶性硫酸塩の異化的還元

50

本明細書に記載のバイオレメディエーション組成物および方法を、以下の実施例により更に例示する。この実施例は、例示のみを目的として示されており、限定を意図するものではない。化学薬品および他の成分は、典型として示されている。本明細書に記載の方法および組成物の範囲内で前述の開示を考慮して改良を誘導してもよい。

【0258】

発現ベクターの構築：芳香族カチオン性ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを、化学的に合成する。オリゴヌクレオチドは、いずれかの末端に特有の制限部位を含み、マルチプルクロニングサイトの上流に構成性プロモータを含むバクテリアプラスミドへの、定方向クロニングを実施させる。プラスミドは、オリゴヌクレオチドの末端にある制限部位に対応する酵素で制限消化することにより調製される。オリゴヌクレオチドをアニーリングして、分子生物学の従来技術を利用して調製されたプラスミドにライゲートする。ライゲーション産物を、選択培地上に生育させた *E. coli* 内に形質転換させる。複数の陽性クローンを、当該技術分野で公知の方法を用いたDNA配列決定により、cDNAインサートについてスクリーニングする。陽性クローンを増幅させて、発現構築物の保存液を調製する。

10

【0259】

D. desulfuricans の形質転換：*D. desulfuricans* の一夜培養物 ($OD_{600} = 0.6$) 100 ml を遠心分離して、ペレットを滅菌水で3回洗浄し、滅菌水の最終容量 200 μ l に再懸濁させる。アリコット 30 μ l をプラスミド調製物 4 μ l (1 μ g) と混合して、エレクトロパルセーター装置により 5,000 V/cm 電気パルスに 6 m 秒間供する。組換えバクテリアを、組換えプラスミドにより付与された抗生物質耐性に基づいて選択する。

20

【0260】

組換え *D. desulfuricans* の硫酸塩還元酵素活性の決定：野生型および組換え *D. desulfuricans* を、可溶性硫酸塩を還元する能力について検査する。バクテリアを、*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) により推奨された培地中、嫌気的条件下、30℃で培養する。1280 ppm 硫酸塩の水溶液を、野生型および組換え *D. desulfuricans* に接種して、12時間培養する。

30

【0261】

硫酸塩の測定：硫酸塩濃度を、比濁法の技術 (Icgen et al., 2006) を利用して測定する。硫酸塩を、塩化バリウムを含む塩酸培地中に沈殿させて、不溶性硫酸バリウム結晶を形成させる。グリセロール (104.16 mL)、濃塩酸 (60.25 mL)、および95%イソプロピルアルコール (208.33 mL) を含む改良されたコンディショニング混合物を、新たに調製する。各反応物について、細胞を含まない上清 2 mL を 250 mL 三角フラスコ中の *Milipore* 水で 1:50 に希釈して、コンディショニング混合物 5 mL を添加する。懸濁液全体を、攪拌しながら十分に混合する。1分間攪拌し続けながら、塩化バリウム結晶およそ1グラムを添加する。混合物を静的条件下で2分間沈積させた後、濁度を分光光度計により 420 nm で測定する。硫酸イオンの濃度を、 Na_2SO_4 0~40 ppm の範囲内の標準を用いて作製された曲線から決定する。

40

【0262】

結果：芳香族カチオン性ペプチドを発現する組換えバクテリアが、これらの条件下で異化的硫酸塩還元の速度上昇を示すことが、予測される。

【0263】

実施例 13. $Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH_2$ (SS-19)、 $Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH_2$ (SS-37)、および $Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH_2$ (SS-36) はカルジオリピン (CL) の疎水性

50

ドメインと相互作用する

Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) および Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ (SS-37) のカチオンペプチドは、中性 pH で正味正電荷を含む。それらは、静電相互作用に基づくアニオン性リン脂質カルジオリピンに関連すると予測される。小ペプチドと脂質膜の相互作用を、蛍光分光法を利用して試験することができた (Surewicz and Eppand, 1984)。本来備わる Trp 残基の蛍光は、リン脂質ベシクルに結合させると量子収率の増加を示し、これはより疎水的環境において Trp 残基の取込みを示す最大発光のブルーシフトも伴った。極性感受性蛍光プローブをペプチドに取り込ませ、蛍光分光法を利用して、SS-19、SS-37 および SS-36 が CL と相互作用するかについて決定した。結果を、図 21 に示す。

10

【0264】

Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ ペプチド (SS-19) は、ジアミノプロピオン酸に組み込まれたアントラニロイルを含む。アントラニロイル誘導体は、320~330 nm で励起されると 410~420 nm の範囲内で蛍光を発する (Hiratsuka T, 1983)。アントラニロイル誘導体の量子収率は、局所の環境に強く依存し、10 nm 未満の発光最大 (λ_{max}) のブルーシフトと共に、水から 80 % エタノールに変化すると 5 倍増加する (Hiratsuka T, 1983)。SS-19 (1 μ M) 単独および増加濃度 (5~50 μ g/ml) の CL の存在下での蛍光発光スペクトルを、Hitachi F-4500 蛍光分光光度計を用いて 320 nm の励起に従ってモニタリングした。CL (5~50 μ g/ml) の添加により、SS-19 の量子収率を 2 倍増加させたが、 λ_{max} は有意にシフトしなかった (図 21A)。これらの知見から、SS-19 が CL の疎水性ドメインと相互作用することが示唆される。

20

【0265】

Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ ペプチド (SS-37) は、追加のアミノ酸アラタンを含み、それは環境の極性に特に感受性があることが報告されており、蛋白質の静電性を立証するのに用いられてきた (Cohen et al., 2002)。350 nm で励起されると、 λ_{max} が水の 542 nm からヘプタンの 409 nm にシフトし、量子収率が有意に増加した (Cohen et al., 2001)。SS-37 (1 μ M) 単独および増加濃度の CL の存在下での蛍光発光スペクトルを、350 nm の励起に従ってモニタリングした。CL (5~50 μ g/ml) の添加により、SS-37 の量子収率を 3 倍増加させ、 λ_{max} が CL を含まない 525 nm から 50 μ g/ml CL の 500 nm への明確なブルーシフトを生じた (図 21B)。これらの結果から、SS-37 が CL の疎水性ドメインと相互作用する証拠が提供される。

30

【0266】

Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ ペプチド (SS-36) は、Phe の代わりに Ala を含む³。SS-36 (1 μ M) 単独および増加濃度の CL の存在下での蛍光発光スペクトルを、350 nm の励起に従ってモニタリングした。SS-36 は、CL の添加に最も感受性があり、CL のかなり少量の添加 (1.25~5 μ g/ml) で量子収率が劇的に増加しブルーシフトが観察された。 λ_{max} が、CL を含まない 525 nm から 1.25 μ g/ml もの少量の CL での 500 nm にシフトし、量子収率が 5 μ g/ml CL の添加により 100 倍を超えて増加した (図 21C)。これらの結果から、SS-36 が CL の疎水性ドメインと大きく相互作用する証拠が提供される。

40

【0267】

実施例 14. Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ ペプチド (SS-19) とシトクロム c との相互作用

蛍光クエンチングを利用して、ペプチド Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) と cyt c との相互作用を実証した。SS-19 の最大蛍光発光スペクトルを、Hitachi F-4500 蛍光分光光度計を用いて 320 nm の励起に従って 420 nm でモニタリングした。結果を、図 22 に示す。

50

【0268】

SS-19の蛍光(10 μ M)は、0.2mg単離されたラット腎臓ミトコンドリアの連続添加によりクエンチされ(図22A、M+矢印)、ミトコンドリアによるSS-19の取込みが示唆される。シトクロムc除去ミトプラスト(0.4mg)を添加した場合、SS-19のクエンチングが有意に低下され、シトクロムcがミトコンドリアによるSS-19のクエンチングにおいて重要な役割を担うことが示唆される(図22B)。SS-19の蛍光(10 μ M)は、2 μ Mシトクロムcの連続添加により同様にクエンチされた(図2C、C+矢印)。シトクロムcによるクエンチングは、ウシ血清アルブミンの連続添加では示されなかった(図22C、A+矢印)(500 μ g/ml)。これらのデータから、SS-19がヘム環境においてシトクロムcの内側で非常に深く相互作用する可能性が示される。SS-19とシトクロムcとの相互作用は、添加されたシトクロムcの量に直線的に依存した(図22D)。

10

【0269】

実施例15. Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ペプチド(SS-19)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ペプチド(SS-37)およびDmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ペプチド(SS-36)はシトクロムcおよびCLと相互作用する

蛍光分光法を利用して、Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ペプチド(SS-19)、Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ala-NH₂ペプチド(SS-37)およびDmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂ペプチド(SS-36)がCLの存在下でシトクロムcと相互作用することを実証した。結果を図23に示す。

20

【0270】

SS-19(10 μ M)の蛍光発光を、Hitachi F-4500蛍光分光光度計を用いて実時間で(Ex/Em=320nm/420nm)モニタリングした。cyt C(2 μ M)の添加により、蛍光シグナルの直後のクエンチングが得られた(図23A)。

【0271】

SS-19(10 μ M)の蛍光発光を、Hitachi F-4500蛍光分光光度計を用いて実時間で(Ex/Em=320nm/420nm)モニタリングした。cyt C(50 μ g/ml)の添加により、SS-19の蛍光の増加が得られたシトクロムc(2 μ M)の続いての添加により、CLを含まないcyt Cの添加に比較してより大幅にSS-19の蛍光がクエンチングした(図23B)。これらのデータから、SS-19とシトクロムcとの相互作用がCLの存在下で増進することが示される。CLは、SS-19とシトクロムcという2種のカチオン性分子に対するアニオン性プラットフォームとして機能することにより、SS-19とシトクロムcとの相互作用を増強する可能性がある。

30

【0272】

SS-37の蛍光(10 μ M)は、CLの存在下での2 μ Mシトクロムcの連続添加により同様にクエンチされた(図23C、C+矢印)。シトクロムcのクエンチングは、ウシ血清アルブミンの連続添加では示されなかった(500 μ g/ml)(図23C、A+矢印)。つまりこれらのペプチドとCLとの相互作用は、シトクロムcの内側で非常に深く相互作用する能力と干渉しない。

40

【0273】

SS-26も、極性感受性の蛍光アミノ酸アラダンを含む。CL(2.5 μ g/ml)の添加により、SS-36の蛍光の増加が得られた(図23D)。続くシトクロムc(2 μ M)の添加後のSS-36の発光スペクトルは、ペプチドの蛍光を劇的にクエンチングすること、および発光最大の大きなブルーシフト(510nmから450nmへ)を示している(図23D)。これらのデータから、該ペプチドがシトクロムc-CL複合体の内側の疎水性ドメインと深く相互作用していることが示唆される。

【0274】

50

実施例16. ペプチド $\text{Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19)、 $\text{Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ (SS-20)、 $\text{D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ (SS-31)、 $\text{Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH}_2$ (SS-36) および $\text{D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ (SPI-231) はシトクロムcのヘム環境をCLのアシル鎖から防御する

円偏光二色性(CD)を実施して、cyt Cのヘム環境をCLのアシル鎖から防御することに対するペプチドの影響を検証した。ヘム蛋白質では、ソレットCDスペクトルは、ヘムポケットコンホメーションと厳密に相関する。特に負の416~420nmコットン効果は、本来のcyt CにおけるFe(III)-Met80配位の診断と見なされる(Santucci and Ascoli, 1997)。コットン効果の消失から、軸性配位からヘム鉄へのMet80の交換を含むヘムポケット領域の変化が明らかとなる。CDスペクトルは、AVIV CD Spectrometer Model 410を用いて得られた。結果を図24に示す。

【0275】

cyt C (10 μM) のソレットCDスペクトルの変化を、30 $\mu\text{g/ml}$ CLの非存在下(点線)および存在下(破線)、ならびに異なるペプチド(10 μM)の添加(実線)で記録した(図24)。CDの測定を、20mM HEPES pH7.5、を用いて25℃で実施して、モル楕円率(θ) (mDeg)として表した。CLの添加は負のコットン効果の消失を引き起こし、これはこれらのペプチドの添加により完全に予防された。これらの結果から、ペプチドがシトクロムcのヘムポケットと相互作用し、Fe-Met80配位を防御することの明確な証拠が提供される。

【0276】

実施例17. $\text{D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチド(SS-31)、 $\text{Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ ペプチド(SS-20)、および $\text{D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチド(SPI-231)はCLにより誘起されたシトクロムc還元の阻害を防御する

シトクロムcは、ミトコンドリア中の呼吸複合体IIIとIVの間の電子キャリアである。シトクロムcは、シトクロムcリダクターゼから電子を受け取った後還元され(F^{2+})、その後、シトクロムcオキシダーゼにより F^{3+} に酸化される。CLに会合したシトクロムcは、レドックス電位を輸し、本来のシトクロムcよりも有意に負値であり、シトクロムcの還元は、CLの存在下で有意に阻害される(Basova et al., 2007)。

【0277】

シトクロムc (20 μM) の還元を、CLの非存在下または存在下(100 $\mu\text{g/ml}$)でグルタチオン(500 μM)を添加することにより誘導した(図25A)。シトクロムcの還元を、96ウェルUV-VISプレートリーダー(Molecular Devices)を用いて550nmでの吸収によりモニタリングした。CLの添加により、シトクロムcの還元率が半分に低下した。SS-31(20、40または100 μM)の添加により、CLの阻害作用が用量依存的に防止された(図25A)。

【0278】

SS-31は、500 μM GSHまたは50 μM アスコルビン酸塩により誘導されたシトクロムc還元の速度に及ぼす阻害効果を用量依存的に克服した(図25B)。SS-20およびSPI-231は、500 μM GSHにより誘発されたcyt C還元のCLによる阻害も予防した(図25C)。

【0279】

実施例18. $\text{D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ ペプチド(SS-31)および $\text{Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ ペプチド(SS-20)は単離されたミトコンドリア中の O_2 消費を増進する

SS-20およびSS-31の両方は、単離されたラット腎臓ミトコンドリア中での O_2 消費により測定された通り、電子フラックスを促進し得る。SS-20またはSS-3

10

20

30

40

50

1を10 μ Mまたは100 μ M濃度で、グルタミン酸塩／マレイン酸塩（複合体I基質）、0.5mMコハク酸塩（複合体II基質）または3 μ M TMPD／1mM アスコルビン酸塩（cyt cの直接還元体）を含有する呼吸緩衝液中の単離されたミトコンドリアに添加した。400 μ M ADPを添加して、状態3の呼吸を開始させた。結果を図26に示す。

【0280】

SS-31は、複合体Iまたは複合体II基質のいずれかにより、またはシトクロムcがTMPD／アスコルビン酸塩により直接還元された場合に、状態3の呼吸においてO₂消費を増加させた（図26A）。SS-20も、これらの基質が用いられた場合に、状態3の呼吸においてO₂消費を増加させる（図26B。グルタミン酸塩／マレイン酸塩およびTMPD／アスコルビン酸塩でのデータは示さない）。

10

【0281】

これらのデータから、SS-31が電子伝達系における電子フラックスを増加させること、および作用部位がシトクロムcと複合体IV（シトクロムcオキシダーゼ）の間に存在することが、示唆される。

【0282】

実施例19. D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ ペプチド（SS-31）は単離されたミトコンドリアにおけるATP合成を増加させる

電子伝達系における電子フラックスの増加は、ATP合成の増加、または電子漏出およびフリーラジカル生成の増加のいずれかを引き起こし得る。単離されたミトコンドリアのATP合成は、HPLCによりアッセイした。SS-31は、ATP合成を用量依存的に増加させ、電子フラックスにおける増加が酸化的リン酸化に結び付くことが示唆される（図27）。

20

【0283】

実施例20. D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ ペプチド（SS-31）はシトクロムc除去ミトプラストにおける呼吸を増進する

ミトコンドリア性カルジオリピンに強く結合したcyt cのモデルを使用して、ミトコンドリアにおけるSS-31とシトクロムc-CL複合体との相互作用を検討した。ジギトニンによる外膜の除去の後、ミトプラストを120mM KClで洗浄して全ての遊離したシトクロムc、および電気的に会合されたシトクロムcを除去して、CLに強く結合したシトクロムcのみを残留させた。D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂（SS-31）は、ミトプラスト内の複合体II呼吸を、内部ミトコンドリア膜に強く結合したシトクロムcにより用量依的手法で増進する（図28）。これらのデータは、SS-31がシトクロムc-CL複合体と直接相互作用し、複合体IIIから複合体IVへの電子伝達を促進することが示唆される。

30

【0284】

実施例21. D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ ペプチド（SS-31）はCLがシトクロムcを電子キャリアからペルオキシダーゼ活性に切り替えるのを防ぐ

シトクロムcにおけるヘムの6つの配位は、H₂O₂と触媒金属部位との直接の相互作用を防ぎ、溶液中の本来のシトクロムcは、弱いペルオキシダーゼである。CLとの相互作用の際、シトクロムcは、Fe-Met80配位の崩壊を伴う構造変化を受ける。これによりFe³⁺がH₂O₂に暴露され、ペルオキシダーゼが劇的に増加する（Vladimirov et al., 2006; Sinibaldi et al., 2008）。シトクロムcペルオキシダーゼの作用機序は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）などの他のペルオキシダーゼと類似している。つまりAmplex Red-HRP反応を使用して、シトクロムcペルオキシダーゼ活性を検討することが可能である。ペルオキシダーゼの存在下で、Amplex Red（AR）はH₂O₂と反応して、赤色蛍光酸化生成物レゾルフィン（Ex/Em=571/585）を形成する。

40

【0285】

シトクロムc（2 μ M）を、20mM HEPES pH7.4中でCL（25 μ g／

50

ml) および $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 と混合した。その後、Amplex Red ($50\ \mu\text{M}$) を添加して、蛍光発光を Hitachi F-4500 蛍光分光光度計を用いて実時間でモニタリングした。Amplex Red の添加は、レゾルフィン形成による蛍光シグナルの急速な増加を誘発し、シトクロム c / CL 複合体のペルオキシダーゼ活性についての直接の証拠を提供している (図 29A)。SS-31 の包含により、Amplex Red 過酸化の速度を低下させており、SS-31 がシトクロム c と直接相互作用して CL によるペルオキシダーゼ活性を予防することが示唆される (図 29A)。

【0286】

SS-31 の添加により、シトクロム c ペルオキシダーゼ活性の反応速度を用量依存的に低下させたが (図 29B)、HRP 活性に対する影響を有さなかった (不図示)。図 29C は、 $10\ \mu\text{M}$ の一定濃度でシトクロム c ペルオキシダーゼ活性を阻害する能力についての様々なペプチドの比較を示す。

【0287】

引用文献

Tuominen EKJ, Wallace CJA and Kinnunen PK J. Phospholipid-cytochrome c interaction. Evidence for the extended lipid anchorage. J Biol Chem 277:8822-8826, 2002 .

Kalanxhi E and Wallace CJA. Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. Biochem J 407:179-187, 2007.

Sinibaldi F, Howes BD, Piro MC, Polticelli F, Bombelli C, Ferri T et al. Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding. J Biol Inorg Chem 15:689-700, 2010.

Sinibaldi F, Fiorucci L, Patriarca A, Lauce ri R, Ferri T, Coletta M, Santucci R. Insights into Cytochrome c-cardiolipin interaction. Role played by ionic strength. Biochemistry 47:6928-6935, 2008.

Vladimirov YA, Proskurnina EV, Izmailov DY, Novikov AAm Brusnichkin AV, Osipov AN and Kagan VE. Mechanism of activation of cytochrome c peroxidase activity by cardiolipin. Biochemistry (Moscow) 71:989-997, 2006 .

Basova LV, Kurnikov IV, Wang L, Ritob VB, Belikova NA, et al. Cardiolipin switch in mitochondria: Shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. Biochemistry 46:3423-3434, 2007.

Kagan VE, Bayir A, Bayir H, Stoyanovsky D, et al. Mitochondria-targeted disruptors and inhibitors of cytochrome c-cardiolipin peroxidase complexes. Mol Nutr Food Res 53:104-114, 2009.

10

20

30

40

50

Surewicz WK and Epand RM. Role of peptide structure in lipid-peptide interactions: A fluorescence study of the binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. *Biochemistry* 23:6072-6077, 1984.

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

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

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

【0288】

均等物

本発明は、本願に記載した特定の実施形態に関して限定されず、本発明の個別の態様の1つの説明となることを意図している。当業者に明白なように、その趣旨および範囲から逸脱することなく本発明の多くの変更および変形を行うことができる。本明細書に列举される内容に加えて、本発明の範囲内の機能的に同等の方法および機器は、前述の説明から当業者には明白である。変更および変形は添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。本発明は、特許請求の範囲が権利を与えられる均等物の全範囲と共に、添付の特許請求の範囲に関してのみ限定される。本発明が特定の方法、試薬、化合物、組成物、または生物系に限定されるものではなく、もちろん変動する可能性があることは理解されよう。また、本明細書で使用される用語論は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、限定するためのものではないことも理解されよう。

【0289】

更に、開示の特徴または態様がマーカッシュ群の観点から記述される場合、それによって、マーカッシュ群のメンバーの個々のメンバーまたはサブグループの観点からも開示が記述されることを、当業者は認識するであろう。

【0290】

当業者には明らかな通り、あらゆる目的のため、特に記載による説明の提供に関して、本明細書で開示される全ての範囲は、そのあらゆる考え得る部分的な範囲および部分的な範囲の組み合わせを包含する。少なくとも均等に半分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1などに分けられている同じ範囲を十分に説明および可能にしているため、いずれの記載される範囲も容易に認識することができる。非限定的例として、本明細書に開示の各範囲は、下部3分の1、中央3分の1、上部3分の1などに容易に分割することができる。同じく当業者に理解される通り、「最大」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」などの全ての言葉は、列举される数字を含み、その後上述のように部分的な範囲に分けることができる範囲である。最後に、当業者に理解される通り、範囲には個別の各数字を含む。したがって、例えば1～3個の細胞を有する群は、1個、2個、または3個の細胞を有する群を指す。同様に、1～5個の細胞を有する群は、1個、2個、3個、4個、または5個の細胞を有する群などを指す。

【0291】

本明細書で参照または引用された全ての特許、特許出願、仮出願、および発行物は、全ての図および表を含み、本明細書の明示的教示と矛盾しない程度に、全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0292】

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕シトクロム c を含有する試料中のシトクロム c 還元を増大させる方法であって、前記試料を有効量の D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドと接触させる工程を含むことを特徴とする、方法。

〔2〕シトクロム c を含有する試料中のシトクロム c を通る電子の拡散を増加させる方法であって、前記試料を有効量の D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドと接触させる工程を含むことを特徴とする、方法。

〔3〕シトクロム c を含有する試料中のシトクロム c の周囲に $\pi-\pi$ 相互作用を導入する方法であって、前記試料を有効量の D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドと接触させる工程を含むことを特徴とする、方法。

〔4〕あるレベルのカルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチド、または、カルジオリピンおよびペプチドがドーブされたシトクロム c と、カルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチド、または、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドおよびカルジオリピンの前記レベルの変化により誘導される前記シトクロム c の特性変化を測定する計量器とを含むことを特徴とする、センサー。

〔5〕カルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチド、または、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドおよびカルジオリピンの前記レベルが、前記シトクロム c の温度および前記シトクロム c の pH の少なくとも一方の変動に応答して変化する、前記〔4〕に記載のセンサー。

〔6〕前記特性が、導電率であり、前記計量器が、前記シトクロム c と電気的に連通するアノードおよびカソードを含む、前記〔4〕に記載のセンサー。

〔7〕前記特性が、フォトルミネセンスであり、前記計量器が、前記シトクロム c により発光された光の強度および前記シトクロム c により発光された光の波長のうちの少なくとも一方の変化を測定する光検出器を含む、前記〔4〕に記載のセンサー。

〔8〕カルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチド、または、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドおよびカルジオリピンのレベルの変化により誘導される、前記レベルのカルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチド、または、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドおよびカルジオリピンがドーブされたシトクロム c の特性の変化を測定する工程を含むことを特徴とする、検知方法。

〔9〕カルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチド、または、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドおよびカルジオリピンの前記レベルが、前記シトクロム c の温度および前記シトクロム c の pH の少なくとも一方の変動に応答して変化する、前記〔8〕に記載のセンサー。

〔10〕前記特性が、導電率、フォトルミネセンス強度、およびフォトルミネセンス波長のうちの少なくとも1つである、前記〔8〕に記載の方法。

〔11〕シトクロム c ；前記シトクロム c と連通するカルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチド、または、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドおよびカルジオリピンの供給源；ならびに、前記シトクロム c と連通するカルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチド、または、D-A r g-Dm t-L y s-P h e-NH₂ペプチドおよびカルジオリピンの量を制御するアクチュエータ、を含むスイッチ。

〔12〕前記アクチュエータが、前記シトクロム c の温度および前記シトクロム c の pH の少なくとも一方を制御する、前記〔11〕に記載のスイッチ。

〔13〕シトクロム c と連通するカルジオリピン、D-A r g-Dm t-L y s-P h e

10

20

30

40

50

—NH₂ペプチド、または、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチドおよびカルジオリピンのレベルを変化させる工程を含むことを特徴とする、切り替え方法。

〔14〕カルジオリピン、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチド、または、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチドおよびカルジオリピンのレベルを変化させる工程が、前記シトクロム c の温度および前記シトクロム c の pH の少なくとも一方を変動させる工程を含む、前記〔13〕に記載の方法。

〔15〕有効量のカルジオリピン、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチド、または、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチドおよびカルジオリピンがドーブされたシトクロム c ；および前記シトクロム c からの発光を刺激する光源を含むことを特徴とする、発光素子。

10

〔16〕有効量のカルジオリピン、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチド、または、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチドおよびカルジオリピンがドーブされたシトクロム c を刺激する工程を含むことを特徴とする、発光方法。

〔17〕前記試料が、センサー、導体、スイッチ、または発光素子の成分を含む、前記〔1〕～〔3〕のいずれか1項に記載の方法。

〔18〕カルジオリピン、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチド、または、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチドおよびカルジオリピンがドーブされたシトクロム c を含むことを特徴とする、バイオセンサー。

〔19〕カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピンおよびペプチドがドーブされたシトクロム c が、電極への電子流動におけるメディエータを含む、前記〔18〕に記載のバイオセンサー。

20

〔20〕カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドがドーブされた、またはカルジオリピンおよびペプチドがドーブされたシトクロム c が、前記電極に直接固定されている、前記〔18〕に記載のバイオセンサー。

〔21〕カルジオリピン、もしくはD—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチド、および／またはシトクロム c が、前記バイオセンサー内の表面に固定されている、前記〔18〕に記載のバイオセンサー。

〔22〕カルジオリピン、もしくはD—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチド、および／またはシトクロム c が、前記バイオセンサー内で自由に拡散可能である、前記〔18〕に記載のバイオセンサー。

30

〔23〕試料中の基質を検出する方法であって、

a) 前記試料を、

i) 前記基質に特異的なレドックス活性酵素、

ii) カルジオリピン、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチド、または、D—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチドおよびカルジオリピンがドーブされたシトクロム c、ならびに、

iii) 電極、

を含むバイオセンサーと接触させる工程と、

b) 前記バイオセンサー内の電子流動を検出する工程とを含むことを特徴とする、方法。

40

〔24〕ペプチドがドーブされた、カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドとカルジオリピンとがドーブされたシトクロム c が、電極への電子流動におけるメディエータを含む、前記〔23〕に記載の方法。

〔25〕ペプチドがドーブされた、カルジオリピンがドーブされた、またはペプチドとカルジオリピンとがドーブされたシトクロム c が、前記電極に直接固定されている、前記〔23〕に記載の方法。

〔26〕カルジオリピン、もしくはD—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチド、および／またはシトクロム c が、前記バイオセンサー内の表面に固定されている、前記〔23〕に記載の方法。

〔27〕カルジオリピン、もしくはD—A r g—D m t—L y s—P h e—NH₂ペプチ

50

ド、および／またはシトクロム c が、前記バイオセンサー内で自由に拡散可能である、前記〔23〕に記載の方法。

〔28〕1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現する組換えバクテリアを含む、環境汚染物質のバイオレメディエーションにおいて使用するための組成物。

〔29〕前記組換えバクテリアが、前記1種以上の芳香族カチオン性ペプチドをコードする核酸配列を含む、前記〔28〕に記載の組成物。

〔30〕前記核酸配列が、誘導性プロモータの制御下で発現される、前記〔29〕に記載の組成物。

〔31〕前記核酸配列が、構成性プロモータの制御下で発現される、前記〔29〕に記載の組成物。

〔32〕前記核酸配列が、プラスミドDNAを含む、前記〔29〕に記載の組成物。

〔33〕前記核酸配列が、ゲノムインサートを含む、前記〔29〕に記載の組成物。

〔34〕前記組換えバクテリアが、表7に列挙されたバクテリア種に由来する、前記〔28〕に記載の組成物。

〔35〕環境汚染物質を含有する材料を、1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを発現する組換えバクテリアを含むバイオレメディエーション組成物と接触させる工程を含むことを特徴とする、環境汚染物質のバイオレメディエーションの方法。

〔36〕前記環境汚染物質が、金属を含む、前記〔35〕に記載の方法。

〔37〕前記金属が、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Y、Zr、Nb、Mo、Tc、Ru、Pd、Ag、Cd、Hf、Ta、W、Re、Os、Ir、Pt、Au、Hg、Rf、Db、Sg、Bh、Hs、Cn、Al、Ga、In、Sn、Ti、Pb、またはBiを含む、前記〔36〕に記載の方法。

〔38〕前記環境汚染物質が、非金属を含む、前記〔35〕に記載の方法。

〔39〕前記非金属が、硫酸塩を含む、前記〔38〕に記載の方法。

〔40〕前記環境汚染物質が、過塩素酸塩を含む、前記〔35〕に記載の方法。

〔41〕前記過塩素酸塩が、 NH_4ClO_4 、 CsClO_4 、 LiClO_4 、 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 、 HClO_4 、 KClO_4 、 RbClO_4 、 AgClO_4 、または NaClO_4 を含む、前記〔40〕に記載の方法。

〔42〕前記環境汚染物質が、硝酸塩を含む、前記〔35〕に記載の方法。

〔43〕前記硝酸塩が、 HNO_3 、 LiNO_3 、 NaNO_3 、 KNO_3 、 RbNO_3 、 CsNO_3 、 $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、または $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ を含む、前記〔42〕に記載の方法。

〔44〕前記環境汚染物質が、放射線核種を含む、前記〔35〕に記載の方法。

〔45〕前記放射線核種が、アクチニドを含む、前記〔44〕に記載の方法。

〔46〕前記放射線核種が、ウランを含む、前記〔44〕に記載の方法。

〔47〕前記環境汚染物質が、メチル-tert-ブチルエーテル(MTBE)、塩化ビニル、またはジクロロエチレンを含む、前記〔35〕に記載の方法。

〔48〕バイオレメディエーションが、インサイチュで実施される、前記〔35〕に記載の方法。

〔49〕バイオレメディエーションが、エクスサイチュで実施される、前記〔35〕に記載の方法。

〔50〕前記バクテリアが、前記1種以上の芳香族カチオン性ペプチドをコードする核酸配列を含む、前記〔35〕に記載の方法。

〔51〕前記核酸配列が、誘導性プロモータの制御下で発現される、前記〔50〕に記載の方法。

〔52〕前記核酸配列が、構成性プロモータの制御下で発現される、前記〔50〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔53〕前記核酸配列が、プラスミドDNAを含む、前記〔50〕に記載の方法。

〔54〕前記核酸配列が、ゲノムインサートを含む、前記〔50〕に記載の方法。

〔55〕前記組換えバクテリアが、表7に列挙されたバクテリア種に由来する、前記〔35〕に記載の方法。

〔56〕前記芳香族カチオン性ペプチドが、 $D\text{-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ を含む、前記〔35〕～〔55〕のいずれか1項に記載の方法。

〔57〕 $D\text{mt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ ($(\text{atn})\text{Dap}$ は、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、 $D\text{mt-D-Arg-Al d-Lys-NH}_2$ (Al d は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{mt-D-Arg-Phe-Lys-Al d-NH}_2$ (Al d は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ 、 $D\text{mt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ ($(\text{dns})\text{Dap}$ は、 β -ダンシル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、またはその医薬的に許容可能な塩からなる群より選択される1種以上の芳香族カチオン性ペプチドを含むことを特徴とする、組成物。

〔58〕医薬的に許容可能な担体を含む、前記〔57〕に記載の組成物。

〔59〕シトクロムcペルオキシダーゼ活性を阻害することを必要としている対象において、シトクロムcペルオキシダーゼ活性を阻害する方法であって、治療有効量の芳香族カチオン性ペプチドまたはその医薬的に許容可能な塩を投与する工程を含むことを特徴とする、方法。

〔60〕前記芳香族カチオン性ペプチドが、 $D\text{mt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ ($(\text{atn})\text{Dap}$ は、 β -アントラニロイル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、 $D\text{mt-D-Arg-Al d-Lys-NH}_2$ (Al d は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{mt-D-Arg-Phe-Lys-Al d-NH}_2$ (Al d は、 β -(6'-ジメチルアミノ-2'-ナフトイル)アラニンである)、 $D\text{-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH}_2$ 、 $D\text{mt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH}_2$ ($(\text{dns})\text{Dap}$ は、 β -ダンシル-L- α , β -ジアミノプロピオン酸である)、またはその医薬的に許容可能な塩からなる群より選択される、前記〔59〕に記載の方法。

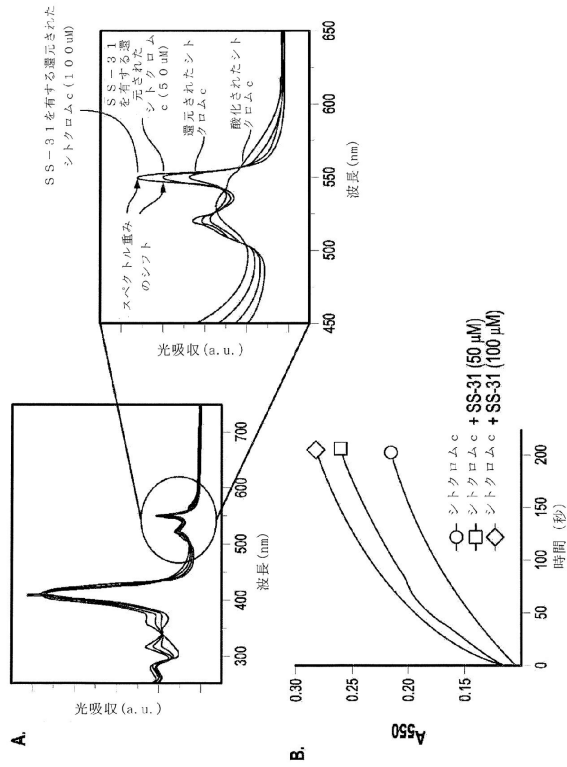
他の実施形態は、以下の特許請求の範囲に示される。

10

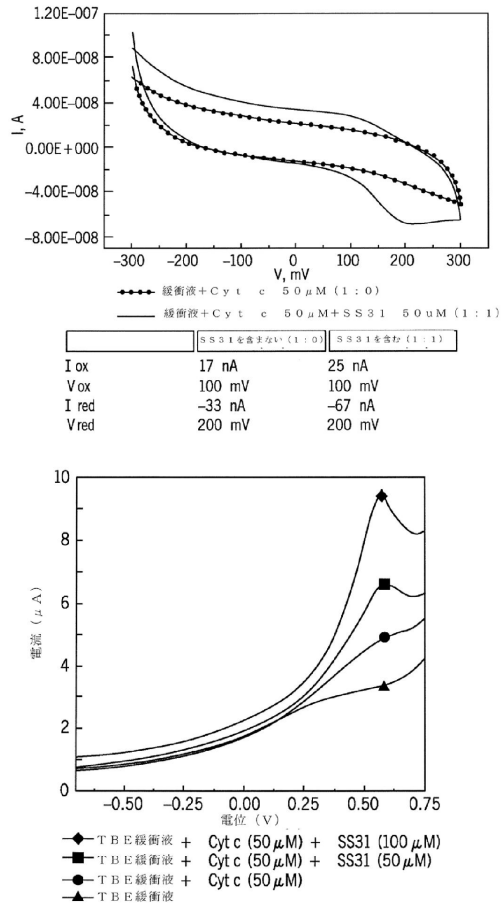
20

30

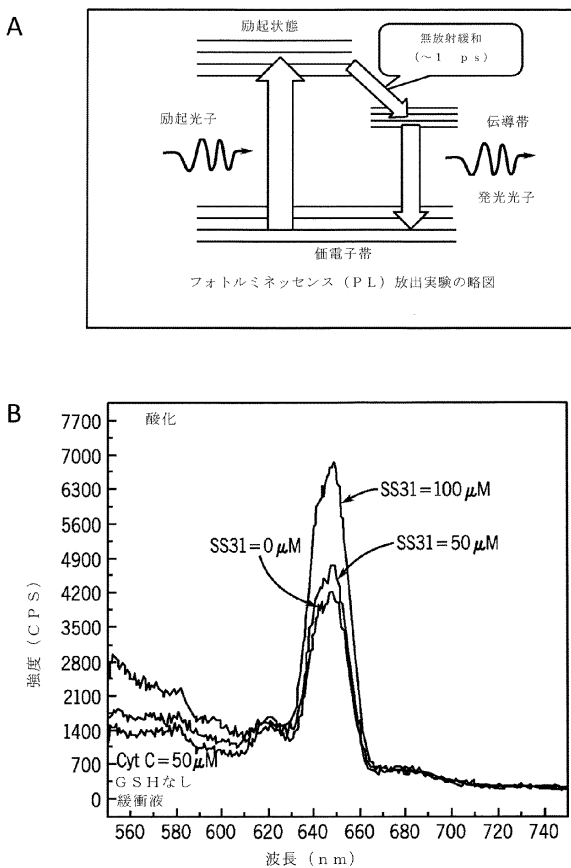
【図 1】



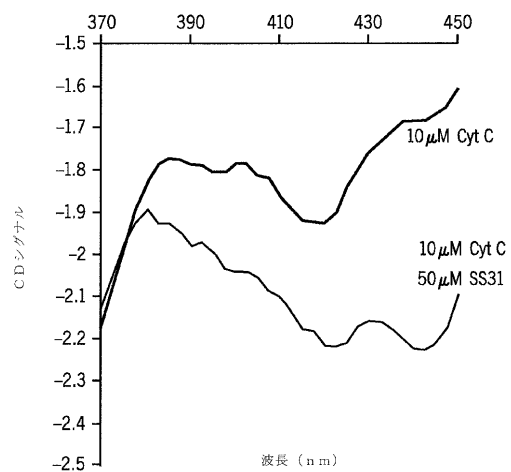
【図 2】



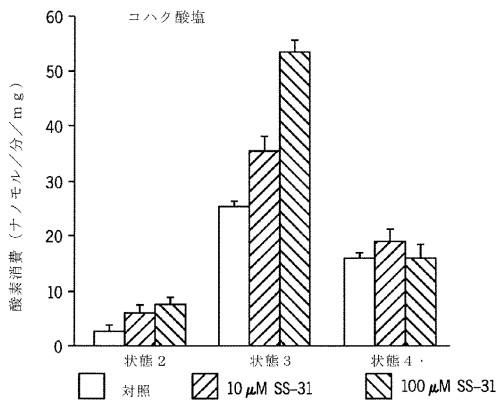
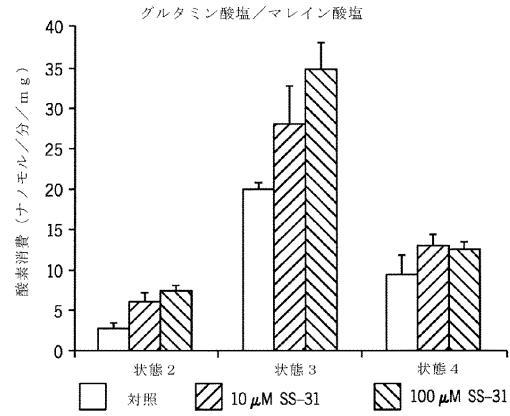
【図 3】



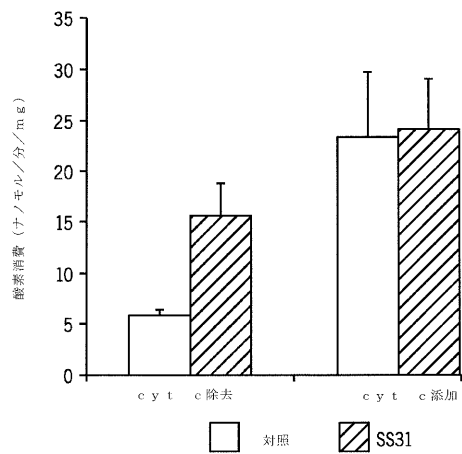
【図 4】



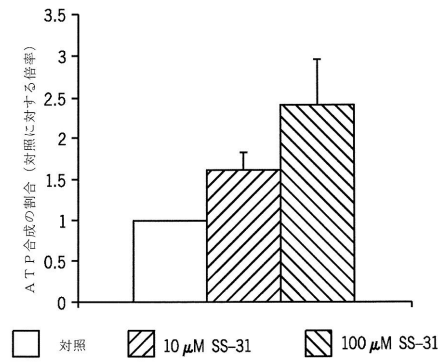
【図 5】



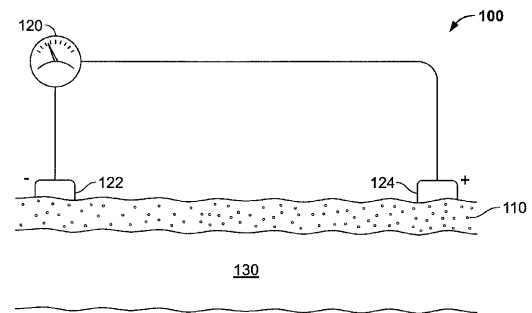
【図 7】



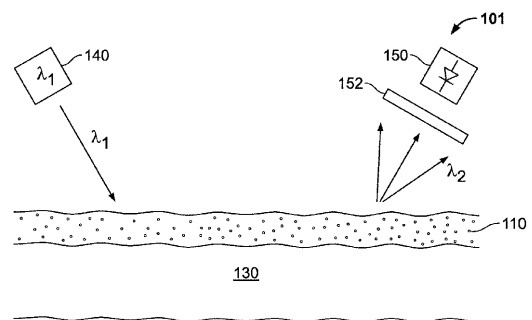
【図 6】



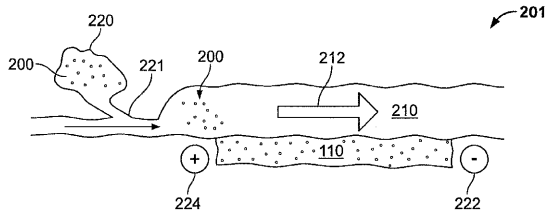
【図 8】



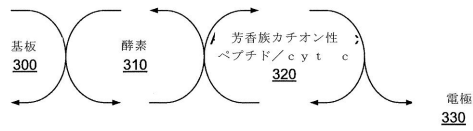
【図 9】



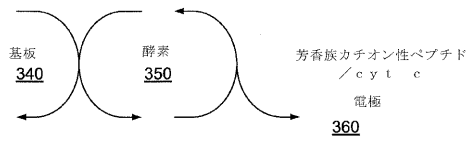
【図 10】



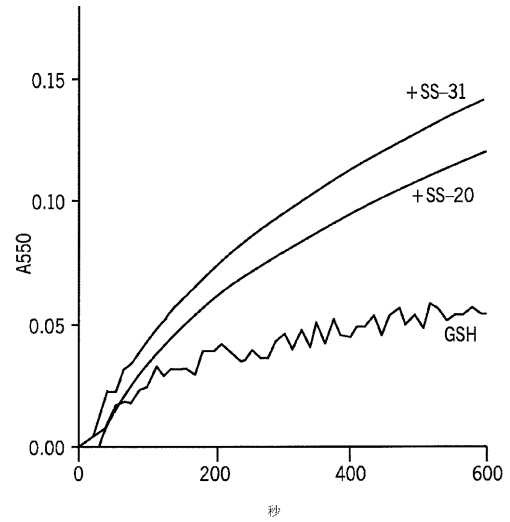
【図 11】



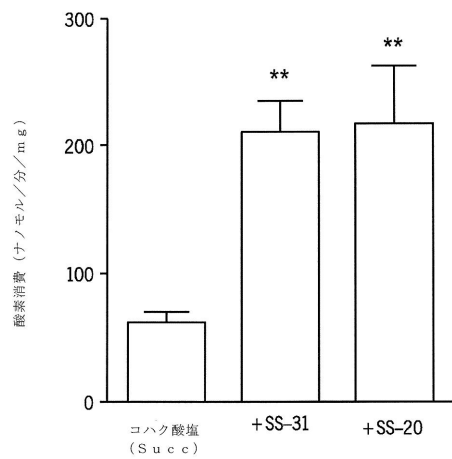
【図 12】



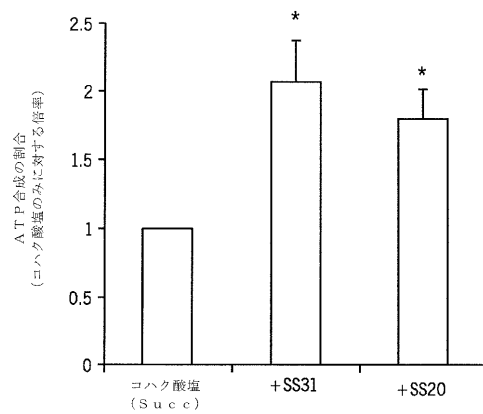
【図 13】



【図 14】



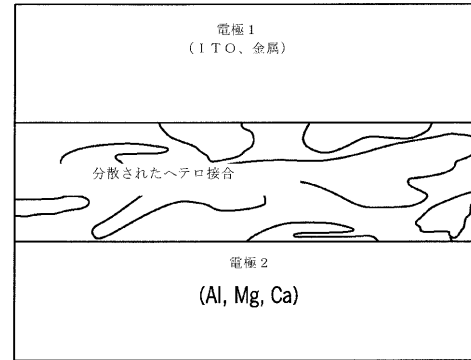
【図 15】



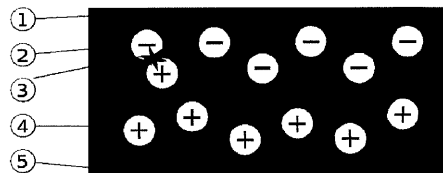
【図 16】



【図 18】

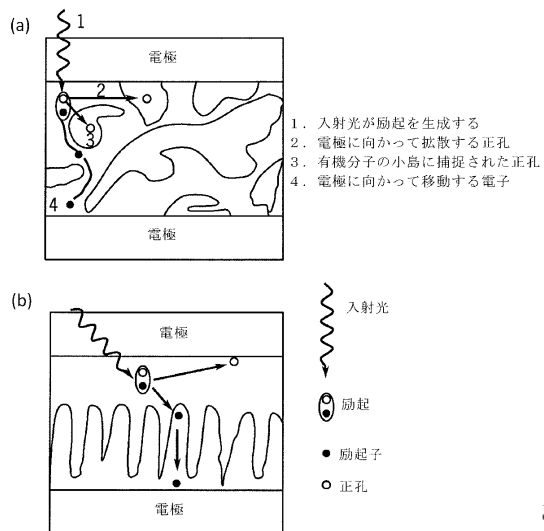


【図 17】

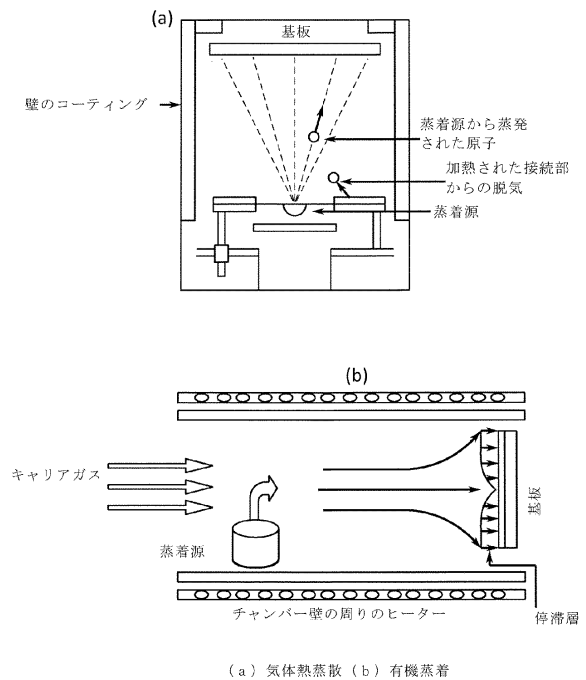


OLEDの略図：
1. カソード (-)、2. 発光層、
3. 放射線の放出、4. 導電層、5. アノード (+)

【図 19】

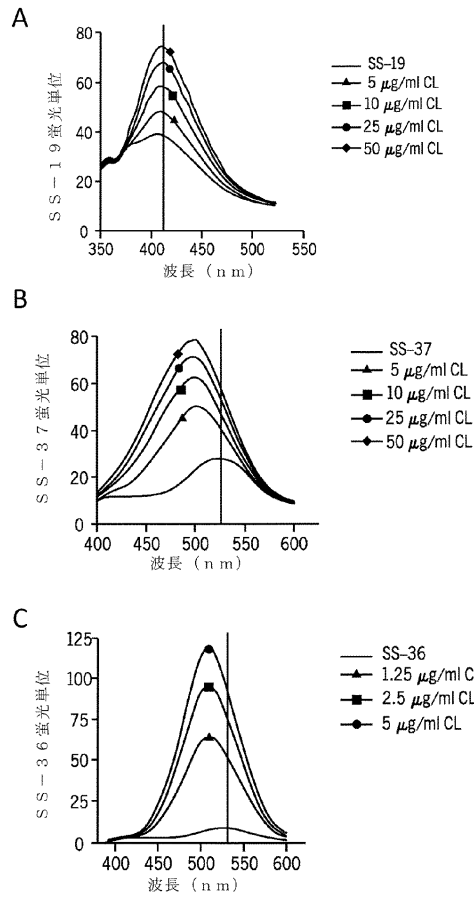


【図 20】

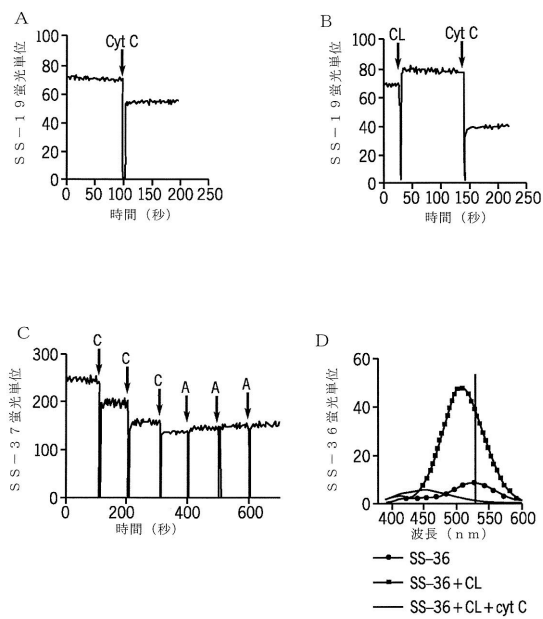


(a) 気体熱蒸散 (b) 有機蒸着

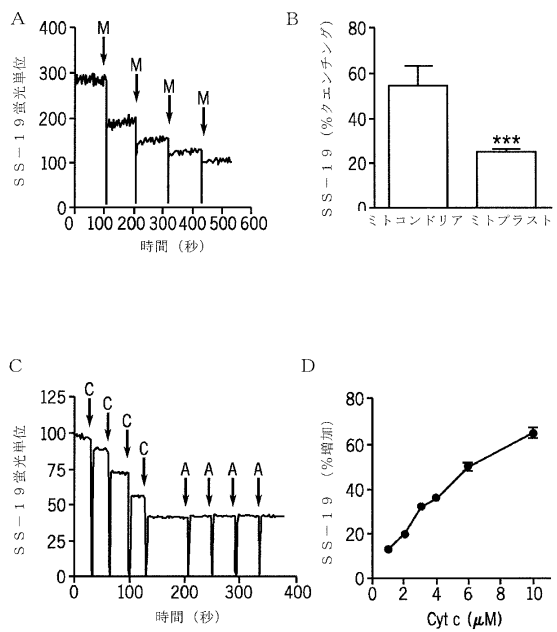
【図 2 1】



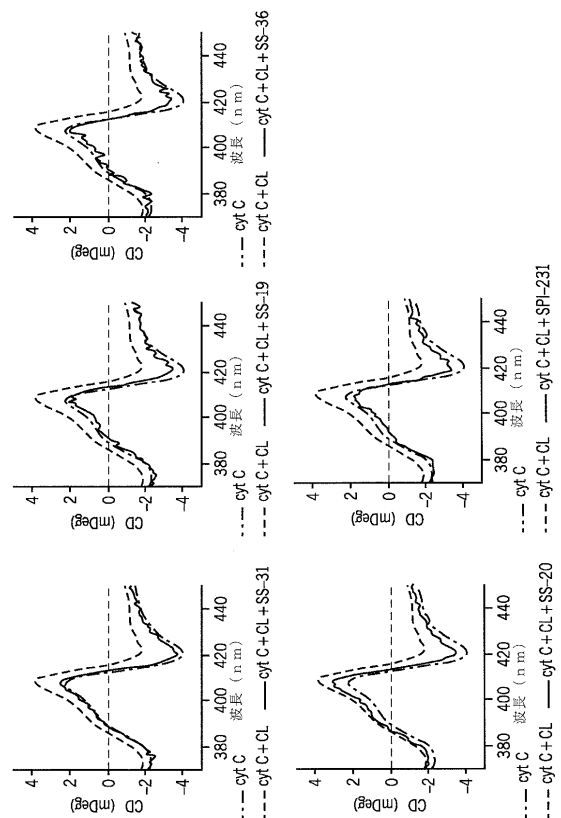
【図 2 3】



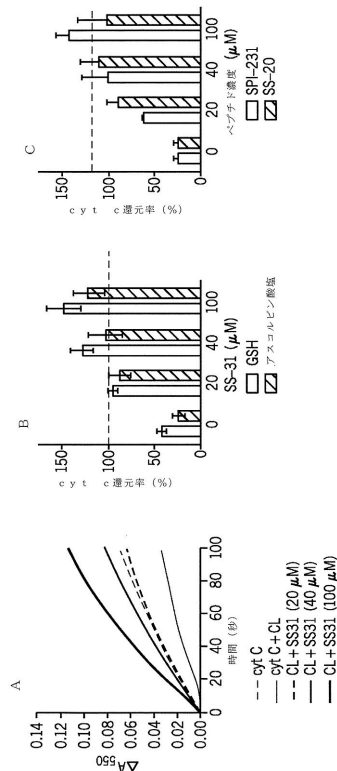
【図 2 2】



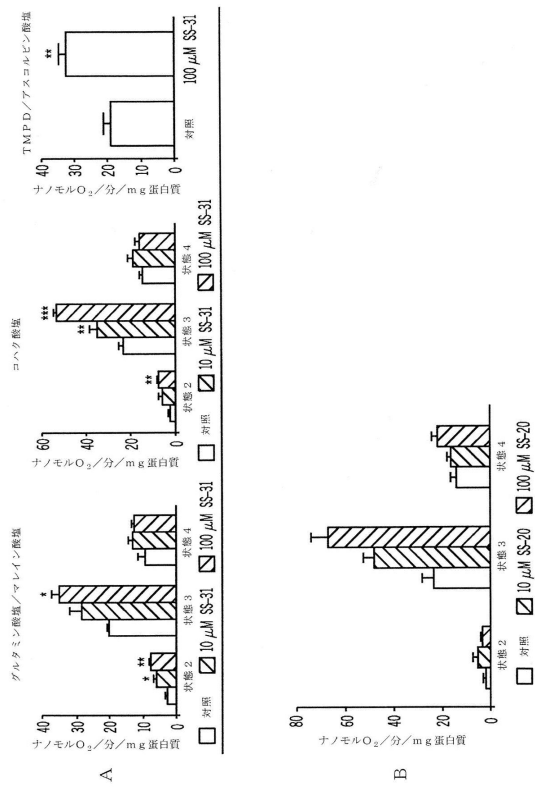
【図 2 4】



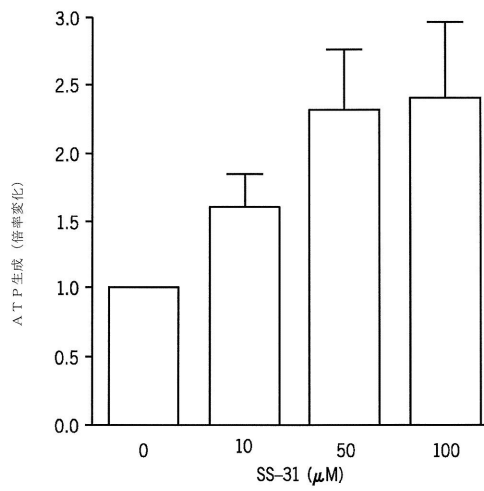
【図 25】



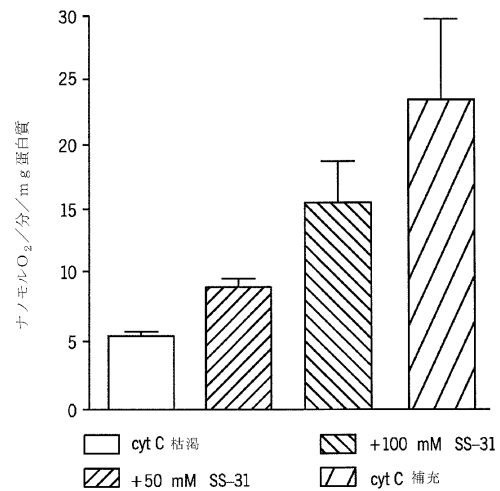
【図 26】



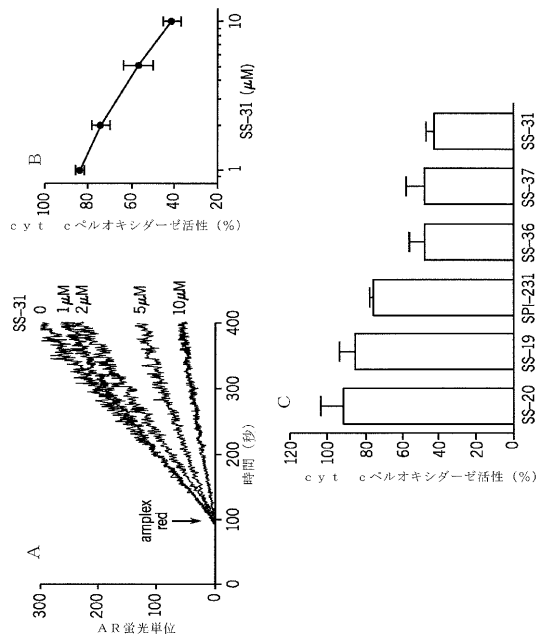
【図 27】



【図 28】



【図 29】



フロントページの続き

- (74)代理人 100092093
弁理士 辻居 幸一
- (74)代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (72)発明者 ウィルソン ディー トラヴィス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02461-1302 ニュートン ブルースター ロード 22
- (72)発明者 ツェト ヘーゼル エイチ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10128 ニューヨーク イースト エイティナイン ストリート 50 アpartment 25E
- (72)発明者 バーク アレックス
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11426 ベルローズ トゥーハンドレッドアンドフォーティナイン ストリート 80-36

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 特表2007-503461 (JP, A)
特表2006-516652 (JP, A)
Alexander V. Birk, Targeting cytochrome C for optimization of mitochondrial electron transport chain, FASEB Journal, 2011年 4月, Vol.25, Supp. Meeting Abstracts., Abstract Number: 735.1
Yegor A. Domanov, Coverage-dependent changes of cytochrome c transverse location in phospholipid membranes revealed by FRET, Biochimica et Biophysica Acta, 2005年, Vol. 1716, Pages 49-58
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/26
C12N 9/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)