

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5857056号  
(P5857056)

(45) 発行日 平成28年2月10日(2016.2.10)

(24) 登録日 平成27年12月18日(2015.12.18)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	Z N A
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12	

請求項の数 15 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2013-533091 (P2013-533091)

(86) (22) 出願日

平成22年10月14日(2010.10.14)

(65) 公表番号

特表2013-540770 (P2013-540770A)

(43) 公表日

平成25年11月7日(2013.11.7)

(86) 国際出願番号

PCT/EP2010/006284

(87) 国際公開番号

W02012/048721

(87) 国際公開日

平成24年4月19日(2012.4.19)

審査請求日

平成25年9月24日(2013.9.24)

特許法第30条第1項適用 平成22年4月14日 h  
t t p : // w w w . i o v s . o r g / c o n t e n t / 5 1 / 9 / 4 6 8 3 . f u l l . p d f + h t m l

前置審査

(73) 特許権者 514191597

ザイジエン インフラメーション エルティ  
ィーディー  
キプロス共和国 3030 リマソール  
ネオクレウス ハウス 195 アーチ  
マカリオウ 3

(74) 代理人 100107515

弁理士 廣田 浩一

(74) 代理人 100107733

弁理士 流 良広

(74) 代理人 100115347

弁理士 松田 奈緒子

(72) 発明者 ジャン-マルク・コンベット

フランス国 74140 サン セルグ

ルート デ テレット 515

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】慢性又は非慢性の炎症性眼疾患を治療するためのJNKシグナル伝達経路の細胞透過性ペプチド阻害剤の使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

被験体における慢性又は非慢性の前部ブドウ膜炎を治療する医薬組成物を調製するための、配列番号11で表されるD-レトロ-インペルソ型アミノ酸配列からなる又は配列番号11で表されるD-レトロ-インペルソ型アミノ酸配列を含むか、或いは配列番号11で表されるD-レトロ-インペルソ型アミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を共有することを特徴とするJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの使用。

## 【請求項2】

JNK阻害剤(ポリ)ペプチドが、c-junアミノ末端キナーゼ(JNK)に結合する請求項1に記載のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの使用。 10

## 【請求項3】

JNK阻害剤(ポリ)ペプチドがJNK発現細胞に存在するとき、前記JNK阻害剤(ポリ)ペプチドが、少なくとも1つのJNKを標的とする転写因子の活性化を阻害する請求項1から2のいずれかに記載のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの使用。

## 【請求項4】

JNKを標的とする転写因子が、c-Jun、ATF2、及びE1k1からなる群より選択される請求項1から3のいずれかに記載のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの使用。

## 【請求項5】

JNK阻害剤(ポリ)ペプチドがJNK発現細胞に存在するとき、前記JNK阻害剤(ポリ)ペプチドが、JNKの効果を変化させる請求項1から4のいずれかに記載のJNK 20

阻害剤(ポリ)ペプチドの使用。

**【請求項 6】**

被験体における慢性又は非慢性の前部ブドウ膜炎を治療する医薬組成物を調製するための、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドをコードすることを特徴とする単離核酸の使用。

**【請求項 7】**

被験体における慢性又は非慢性の前部ブドウ膜炎を治療する医薬組成物を調製するための請求項 6 に記載の核酸を含むことを特徴とするベクターの使用。

**【請求項 8】**

被験体における慢性又は非慢性の前部ブドウ膜炎を治療する医薬組成物を調製するための請求項 7 に記載のベクターを含むことを特徴とする細胞の使用。 10

**【請求項 9】**

医薬組成物が、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経皮を含む非経口経路；経口、直腸内を含む経腸経路；経鼻、鼻腔内を含む局所経路；表皮又は貼付送達を含む他の経路；並びに眼への局所投与；からなる群より選択される投与経路によって投与される請求項 1 から 8 のいずれかに記載の使用。

**【請求項 10】**

眼への局所投与が、硝子体内投与、結膜下投与、及び点眼の少なくともいずれかである請求項 9 に記載の使用。

**【請求項 11】**

JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドの(体重 1 kg 当たりの)用量が、10 mmol/kg 以下である請求項 1 から 10 のいずれかに記載の使用。 20

**【請求項 12】**

JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドの(体重 1 kg 当たりの)用量が、1 pmol/kg ~ 1 mmol/kg、10 pmol/kg ~ 0.1 mmol/kg、10 pmol/kg ~ 0.01 mmol/kg、50 pmol/kg ~ 1 μmol/kg、100 pmol/kg ~ 500 nmol/kg、200 pmol/kg ~ 300 nmol/kg、300 pmol/kg ~ 1000 nmol/kg、500 pmol/kg ~ 50 nmol/kg、750 pmol/kg ~ 30 nmol/kg、250 pmol/kg ~ 5 nmol/kg、1 nmol/kg ~ 10 nmol/kg、又は前記値のうちの任意の 2 つの組み合わせである請求項 1 から 11 に記載の使用。 30

**【請求項 13】**

配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列からなる又は配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列を含むか、或いは配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を共有する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドを含み、

慢性又は非慢性の前部ブドウ膜炎の被験体の眼組織において、マクロファージ及び多形核細胞の少なくともいずれかの炎症細胞の浸潤を抑制することを特徴とする炎症性細胞浸潤抑制剤。

**【請求項 14】**

配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列からなる又は配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列を含むか、或いは配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を共有する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドを含み、 40

慢性又は非慢性の前部ブドウ膜炎の被験体の眼組織において、誘導性一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現を抑制することを特徴とする iNOS 発現抑制剤。

**【請求項 15】**

配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列からなる又は配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列を含むか、或いは配列番号 1 1 で表される D - レトロ - インベルソ型アミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を共有 50

する JNK 阻害剤 (ポリ) ペプチドを含み、

慢性又は非慢性の前部ブドウ膜炎の被験体の眼組織において、膜補因子タンパク質 - 1 (MCP - 1)、主要内在性タンパク質 - 1 (MIP - 1)、RANTES、及び GRO / KC の少なくともいずれかのケモカインの産生を抑制することを特徴とするケモカイン産生抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質キナーゼ阻害剤の使用、より具体的には、麦粒腫、霰粒腫、結膜炎、角膜炎、強膜炎、上強膜炎、眼内炎、汎眼球炎、虹彩炎、ブドウ膜炎、毛様体炎、脈絡膜炎、眼窩蜂巣炎、及び / 又は眼筋炎等の非慢性又は慢性の炎症性眼疾患を治療するための、タンパク質キナーゼ c - Jun アミノ末端キナーゼの阻害剤である、JNK 阻害剤 (ポリ) ペプチド、キメラペプチド、又はこれらをコードする核酸の使用、並びにこれらを含有する医薬組成物に関する。 10

【背景技術】

【0002】

眼科的 (眼) 疾患、特に、非慢性及び慢性の眼科的 (眼) 疾患の数は、公衆健康管理システムにとって大きな課題である。眼科的疾患は、眼に関する疾患である。本発明は、非慢性又は慢性の炎症性眼疾患に焦点を当てる。これらとしては、例えば、眼瞼、結膜、角膜、強膜、硝子体、ブドウ膜、毛様体、脈絡膜、眼窩骨、涙腺、虹彩等の炎症性疾患が挙げられる。かかる炎症性疾患の例は、麦粒腫、霰粒腫、結膜炎、角膜炎、強膜炎、上強膜炎、眼内炎、汎眼球炎、虹彩炎、ブドウ膜炎、毛様体炎、脈絡膜炎、眼窩蜂巣炎、及び / 又は眼筋炎である。 20

【0003】

c - Jun NH<sub>2</sub> 末端キナーゼ (JNK) は、その NH<sub>2</sub> 末端の活性化ドメインの 2 つの部位において c - Jun をリン酸化するストレス活性化タンパク質キナーゼとして同定されている。JNK 経路は、特定のサイトカイン、マイトジエン、浸透圧ストレス、及び放射線によって活性化される。活性化タンパク質 AP - 1 の転写因子の c - Jun 成分のリン酸化により、炎症促進性のサイトカインが産生される。炎症中、RANTES、IL - 8、ICAM、及び VCAM 等の重要な走化性因子を放出する血管内皮の早期活性化に起因して、白血球の浸潤及びローリングが生じる。次いで、浸潤細胞は、組織の損傷及び炎症を引き起こす別個のセットの炎症促進性又は抗炎症性の産物を放出する。炎症応答に関する遺伝子産物の多くは、転写因子活性化タンパク質 - 1 (AP - 1)、及び c - Jun NH<sub>2</sub> 末端キナーゼ (JNK) 経路 : COX - 2 (シクロオキシゲナーゼ - 2)、IFN - g (インターフェロン - )、iNOS (誘導性一酸化窒素合成酵素)、TNF - (腫瘍壞死因子 - )、MCP - 1 (膜補因子タンパク質 - 1)、MIP - 1 (主要内在性タンパク質 - 1)、IL - 2 (インターロイキン - 2) 等によって制御されている。リポ多糖類 (LPS) によって刺激された単球及び組織のマクロファージにおいて、TNF - は、JNK 経路の活性化を介して産生され、JNK 経路の阻害によって調節される。 30

【0004】

したがって、JNK 阻害剤は、炎症の様々なモデルにおいて用いられており、関節炎及び喘息等の炎症性疾患において抗炎症効果及び有益な効果を発揮することが示されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、本発明の目的は、麦粒腫、霰粒腫、結膜炎、角膜炎、強膜炎、上強膜炎、眼内炎、汎眼球炎、虹彩炎、ブドウ膜炎、毛様体炎、脈絡膜炎、眼窩蜂巣炎、眼筋炎等の非慢性又は慢性の (炎症性) 眼疾患の新規且つ好ましくは改善された治療を可能にする代 50

代替法又は改良療法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

この目的は、被験体における非慢性又は慢性の炎症性眼疾患を治療する医薬組成物を調製するための150未満のアミノ酸長を有するJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの使用によって達成される。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】LPS誘導性ブドウ膜炎における配列番号11の臨床効果：疾患のピーク時、即ち、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドを(A)静脈内(IV)又は(B)硝子体内(IVT)に注射した24時間後に、臨床スコア(任意単位A.U.で表される)を評価した。未処理のブドウ膜炎の眼(LPS)及びビヒクルによるIV/IVT処理との比較を行った(n=10個の眼/群)。ブドウ膜炎の臨床病態は、(A)配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIV注射後(\*\*\*(LPSに対してp<0.001;###ビヒクルに対してp<0.001)、並びに(B)配列番号11の(ポリ)ペプチド(\*\*\*(LPSに対してp<0.001;##ビヒクルに対してp<0.01)及びデキサメタゾン(\*\*\*(LPSに対してp<0.05)のIVT注射後に減少した。配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIVT注射とポジティブコントロールとして用いたデキサメタゾンのIVT注射との間には統計的な差はみられなかった(ns)。

10

【図2】LPS誘導性ブドウ膜炎における配列番号11によるJNK経路の阻害：エンドトキシン誘導性ブドウ膜炎(EIU)状態において配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチド及びビヒクル(n=2個の眼/群)をIV又はIVT注射した24時間後の、RPE/脈絡膜/強膜複合体におけるc-Junリン酸化のウェスタンプロット解析。配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドによるc-Junリン酸化の阻害は、(A)イムノプロット(上方のレーン：ホスホc-Jun(Ser63)；下方のレーン：-チユーブリンレポータンパク質)において可視化され、(B)濃度測定による定量によって確認された。

20

【図3】LPS-ERK経路の活性化に対する配列番号11の効果：未処理ブドウ膜炎対照の眼、及びIV又はIVT注射した動物(ビヒクル又は配列番号11)(n=3個の眼/条件を分析した；時点：24時間)に由来する眼の組織学的切片において、ホスホ-p44/42MAPK(Erk1/2)に対する免疫組織化学試験(緑)を実施した。核(青)をDAPIで染色した。p-Erk1/2は、ビヒクル(A,a)及び配列番号11(B,b)のIVT投与後に虹彩上皮で強く発現し、これら2群の間に検出可能な差はみられなかった。ビヒクル(E,e)又は配列番号11(F,f)のいずれかをIV注射することによって処理したEIUの眼における網膜のミュラーグリア細胞では、微かな陽性シグナルしか検出することができなかった(矢印を参照されたい)。スケールバー：100μm。c：角膜；ir：虹彩；st：支質；ep：上皮；ONH：視神経乳頭；INL：内顆粒層；ONL：外顆粒層。

30

【図4】健常な眼及びブドウ膜炎の眼における配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの眼内分布：(A-L)健常及び(M-W)LPS誘導性炎症状態の両方において、未処理動物、及びIV又はIVT注射した動物(ビヒクル又は配列番号11)に由来する眼の組織学的切片において配列番号11に対する免疫組織化学試験を実施した(n=3個の眼/条件を分析した；時点：24時間)。(A-C)配列番号11は、健常な眼にIV注射した24時間後、眼組織において検出されなかった。(D-L)健常な眼にIVT注射した後、配列番号11は、虹彩上皮(D,G)、毛様体上皮(E,J)、GCL(H)、INL(K)、IS(I)、及びRPE(L)でみられた。ブドウ膜炎の眼では、配列番号11は、配列番号11のIV注射後、浸潤炎症細胞で検出されたが(M-P)、ビヒクルのIV若しくはIVT注射後(図示せず)又は未処理のEIUの眼(V,W)では検出されなかった。(Q-U)配列番号11のIVTによって処理したブドウ膜炎の眼では

40

50

、配列番号 11 の分布は、健常な処理眼の分布と類似していたが、遊走在住炎症細胞でも検出された (S-T)。スケールバー : 50 μm。c : 角膜 ; i r : 虹彩 ; l : 水晶体 ; c b : 毛様体 ; s t : 支質 ; e p : 上皮 ; G C L : 神経節細胞層 ; I N L : 内顆粒層 ; O N L : 外顆粒層 ; R P E : 網膜色素上皮 ; I S : 視細胞内節 ; a q . h : 房水。

【図 5】配列番号 11 の J N K 阻害剤 (ポリ) ペプチドによる L P S 誘導性炎症細胞浸潤の減少：免疫組織化学によって染色した組織学的切片 (図 6 に示す) において、(A) マクロファージ (E D 1 免疫陽性細胞) 及び (B) 多形核白血球 (P M N) の浸潤を定量した (n = 6 切片 / 群)。(A) 配列番号 11 の (ポリ) ペプチドの静脈内 (I V) (\*\* L P S に対して p < 0.005) 及び硝子体内 (I V T) (\*\* L P S に対して p < 0.005 ; # # ビヒクルに対して p < 0.009) 注射によって、E D 1 + 数が減少した。(B) 配列番号 11 の (ポリ) ペプチドは、静脈内 (I V) (\*\* L P S に対して p < 0.005) 及び硝子体内 (I V T) (\*\* L P S に対して p < 0.005 ; # # ビヒクルに対して p < 0.009) 投与後に P M S 数を減少させた。配列番号 11 の (ポリ) ペプチドの I V T と、ポジティブコントロールとして用いたデキサメタゾンの I V T との間に統計的な差はみられなかった (n s)。

【図 6】L P S 誘導性ブドウ膜炎における E D 1 + 細胞、多形核白血球、及び誘導性一酸化窒素合成酵素 (i N O S) に対する配列番号 11 の (ポリ) ペプチドの効果：未処理の又は (I V 又は I V T、ビヒクル又は配列番号 11) 処理されたブドウ膜炎のラット (n = 3 個の眼 / 条件 ; 時点 : 24 時間) の眼の凍結切片において、免疫組織化学によって E D 1 及び i N O S 抗原発現を分析した。核は、D A P I で染色した。E D 1 (A、D、G、J) 及び / 又は i N O S (B、E、H、K) を発現する多くの炎症細胞が、未処理の E I U の眼の前部 (A - I) 及び後部 (J - L) に浸潤していた。虹彩 / 毛様体では少数の E D 1 + / i N O S + 細胞しかみられなかつたが (黄色の細胞、パネル c 1 - 2 及び f 1 - 2 )、殆どの i N O S + 細胞は、E D 細胞であった。これは、大部分の P M N が i N O S を産生したことを見出す。配列番号 11 の I V (M - U) 及び I V T (図示せず) 注射によって、E D 1 (M、P、S) 及び i N O S (N、Q、T) を発現する炎症性浸潤が減少した。配列番号 11 の I V (M - U) 及び I V T (図示せず) によって処理された眼では、E D 1 + 細胞 (M、P、S) 及び i N O S + 細胞 (N、Q、T) の減少がみられた。スケールバー : 50 μm。c : 角膜 ; i r : 虹彩 ; c b : 毛様体 ; r e t : 網膜 ; O N : 視神経。

【図 7】配列番号 11 の (ポリ) ペプチドによる L P S 誘導性 i N O S 発現のダウンリギュレーション：E I U 状態における配列番号 11 又はビヒクル (n = 2 個の眼 / 群) の I V 又は I V T 注射の 24 時間後の神経網膜における誘導性一酸化窒素合成酵素 (i N O S) m R N A レベルの R T - P C R 分析。i N O S m R N A のダウンリギュレーションを、(A) 紫外線トランスイルミネーター下でアガロースゲルにおいて可視化し (上方のレーン : 657 b p の i N O S c D N A 増幅産物 ; 下方のレーン : 162 b p の G A P D H c D N A 増幅産物)、(B) 濃度測定による定量によって確認した。

【図 8】配列番号 11 の (ポリ) ペプチドの静脈内 (I V) 投与後の眼内の L P S 誘導性ケモカイン / サイトカインプロファイルの調節：E I U 誘導の 6 時間後、24 時間後、及び 48 時間後に採取した眼液に対してマルチプレックス分析を実施した。未注射対照ブドウ膜炎ラットと配列番号 11 の (ポリ) ペプチドで I V 処理されたラット (n = 10 個の眼 / 時点及び条件を分析した) とを比較した。より明確にするために、ビヒクルの I V 注射によって処理したラットから得られた結果は示さなかつた。統計解析の P 値を各グラフ上に示した (p)。配列番号 11 の (ポリ) ペプチドの I V 注射によって、ケモカイン産生が減少し (A)、特定の時点において炎症促進性及び T h 1 サイトカインの産生が減少した (B)。48 時間後の I F N - 及び I L - 10 のレベルは、検出可能なレベルを下回っていたので示さなかつた。

【図 9】配列番号 11 の (ポリ) ペプチドの硝子体内 (I V T) 投与後の眼内の L P S 誘導性ケモカイン / サイトカインプロファイルの調節：E I U 誘導の 6 時間後、24 時間後、及び 48 時間後に採取した眼液に対してマルチプレックス分析を実施した。ビヒクルの

10

20

30

40

50

I V T 注射によって処理したラットと配列番号 1 1 の（ポリ）ペプチドの I V T 注射によって処理したラット（n = 10 個の眼 / 時点及び条件を分析した）とを比較した。統計解析の P 値を各グラフ上に示した（p）。M C P - 1 の減少を除いて、ビヒクルの I V T 注射又は配列番号 1 1 の（ポリ）ペプチドの I V T 注射の間にケモカイン発現の有意な変化はみられなかった（A）。配列番号 1 1 の（ポリ）ペプチドの I V T 注射によってサイトカイン発現の僅かな変化が誘導された：6 時間における TNF - 、 IL - 6 及び IL - 2 のレベル低下、24 時間ににおける IL - 2 のレベル低下及び IL - 13 のレベル上昇（B）。

【図 10 A】ラットの I B 1 c DNA 配列及びその予測アミノ酸配列を示す（配列番号 102）。

10

【図 10 B】ラットの I B 1 c DNA 配列及びその予測アミノ酸配列を示す（配列番号 102）。

【図 11 A】r I B 1 遺伝子 - スプライスドナーのエキソン - イントロン境界によってコードされているラットの I B 1 タンパク質配列を示す（配列番号 103）。

【図 11 B】r I B 1 遺伝子 - スプライスドナーのエキソン - イントロン境界によってコードされているラットの I B 1 タンパク質配列を示す（配列番号 103）。

【図 11 C】r I B 1 遺伝子 - スプライスドナーのエキソン - イントロン境界によってコードされているラットの I B 1 タンパク質配列を示す（配列番号 103）。

【図 12 A】ヒトの I B 1 タンパク質配列を示す（配列番号 104）。

20

【図 12 B】ヒトの I B 1 タンパク質配列を示す（配列番号 104）。

【図 12 C】ヒトの I B 1 タンパク質配列を示す（配列番号 104）。

【図 13 A】ヒトの I B 1 c DNA 配列を示す（配列番号 105）。

【図 13 B】ヒトの I B 1 c DNA 配列を示す（配列番号 105）。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0008】

本明細書で使用するとき、用語「非慢性又は慢性の炎症性眼疾患」は、典型的に、眼に関する非慢性又は慢性の炎症性疾患を意味する。これは、眼瞼、結膜、角膜、強膜、硝子体、ブドウ膜、毛様体、脈絡膜、眼窩骨、涙腺、虹彩等の疾患を含む。好ましくは、これに関して、麦粒腫、霰粒腫、結膜炎、角膜炎、強膜炎、上強膜炎、眼内炎、汎眼球炎、虹彩炎、ブドウ膜炎、毛様体炎、脈絡膜炎、眼窩蜂巣炎、眼筋炎が含まれる。特に好ましくは、本発明の状況では、ブドウ膜炎の治療、例えば、前部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、及び汎ブドウ膜炎の治療である。

30

##### 【0009】

本発明者らは、驚くべきことに、J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドが、被験体におけるかかる慢性又は非慢性の炎症性眼疾患の治療に特に適していることを見出した。J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドは、当技術分野において広く公知であるが、このことは、先行技術によって明らかでもなく示唆されてもいなかった。

##### 【0010】

本発明の状況では、J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドは、典型的に、ヒト又はラットの I B 1 配列、好ましくは、配列番号 102（ラットに由来する I B 1 の c DNA 配列及びその予測アミノ酸配列を示す）、配列番号 103（r I B 1 遺伝子 - スプライスドナーのエキソン - イントロン境界によってコードされているラットに由来する I B 1 タンパク質配列を示す）、配列番号 104（ヒトに由来する I B 1 のタンパク質配列を示す）、又は配列番号 105（ヒトに由来する I B 1 の c DNA 配列を示す）に係る配列のいずれかによって定義又はコードされているアミノ酸配列、より好ましくは、配列番号 104（ヒトに由来する I B 1 のタンパク質配列を示す）又は配列番号 105（ヒトに由来する I B 1 の c DNA 配列を示す）に係る配列のいずれかによって定義又はコードされているアミノ酸配列、或いはこれらの任意の断片又は変異体に由来してよい。言い換えれば、J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドは、ヒト又はラットの I B 1 配列の断片、変異体、かかる断片の変異体を含む。ヒト又はラットの I B 配列は、それぞれ、配列番号 102、配列番号 103、

40

50

配列番号 104、又は配列番号 105 に係る配列によって定義又はコードされている。

**【0011】**

好ましくは、本明細書で使用するかかる JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、150 アミノ酸残基未満、好ましくは 5 アミノ酸残基～150 アミノ酸残基、より好ましくは 10 アミノ酸残基～100 アミノ酸残基、更により好ましくは 10 アミノ酸残基～75 アミノ酸残基、最も好ましくは 10 アミノ酸残基～50 アミノ酸残基、例えば、10 アミノ酸残基～30 アミノ酸残基、10 アミノ酸残基～20 アミノ酸残基、又は 10 アミノ酸残基～15 アミノ酸残基の全長を含む。

**【0012】**

より好ましくは、かかる JNK 阻害剤(ポリ)ペプチド及び上記範囲は、上記配列のいずれかから、更により好ましくは配列番号 104 に従って定義されるか又は配列番号 105 によってコードされているアミノ酸配列から、更により好ましくは配列番号 105 の又クレオチド 420～980 の領域又は配列番号 104 のアミノ酸 105～291 の領域において、最も好ましくは配列番号 105 の又クレオチド 561～647 の領域又は配列番号 104 のアミノ酸 152～180 の領域において選択してよい。 10

**【0013】**

特定の実施形態によれば、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、典型的に、JNK に結合する、及び／又は少なくとも 1 つの JNK 活性化転写因子、例えば、c-Jun 若しくは ATF2 (例えば、それぞれ配列番号 15 及び 16 を参照されたい) 若しくは Elk1 の活性化を阻害する。 20

**【0014】**

同様に、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、配列番号 1～4、13～20、及び 33～100 のいずれか 1 つに係る少なくとも 1 つのアミノ酸配列、又はその断片、誘導体、若しくは変異体を含むか又はこれらからなる。より好ましくは、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、1 コピー、2 コピー、3 コピー、4 コピー、又は更に多くのコピーの配列番号 1～4、13～20、及び 33～100 に係るアミノ酸配列、又はその変異体、断片、若しくは誘導体を含有していてよい。1 超のコピーが存在する場合、本明細書で使用するこれら配列番号 1～4、13～20、及び 33～100 に係るアミノ酸配列、又はその変異体、断片、若しくは誘導体は、任意のリンカー配列を用いることなしに互いに直接結合していてもよく、又は 1 アミノ酸～10 アミノ酸、好ましくは 1 アミノ酸～5 アミノ酸を含むリンカー配列を介して結合していてよい。リンカー配列を形成するアミノ酸は、好ましくは、アミノ酸残基としてのグリシン又はプロリンから選択される。より好ましくは、本明細書で使用するこれら配列番号 1～4、13～20、及び 33～100 に係るアミノ酸配列、又はその断片、変異体、若しくは誘導体は、2 個、3 個、又はそれ以上のプロリン残基のヒンジによって互いに分離されていてよい。 30

**【0015】**

本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、L-アミノ酸及び D-アミノ酸の少なくともいずれかから構成されていてよい。好ましくは、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、少なくとも 1 個、又は更には 2 個、好ましくは少なくとも 3 個、4 個、又は 5 個、より好ましくは少なくとも 6 個、7 個、8 個、又は 9 個、更により好ましくは少なくとも 10 個以上の D-アミノ酸及び／又は L-アミノ酸を含み、前記 D-アミノ酸及び／又は L-アミノ酸は、ブロック状、非ブロック状、又は交互に本明細書で使用する JNK 阻害剤配列中に配置されていてよい。 40

**【0016】**

1 つの好ましい実施形態によれば、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、L-アミノ酸のみで構成されていてよい。次いで、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、配列番号 1～3 に係る少なくとも 1 つの「ネイティブな JNK 阻害剤配列」を含んでいてもよい、又は前記配列からなっていてもよい。この状況では、用語「ネイティブ」又は「ネイティブな JNK 阻害剤配列」は、本明細書で使用するとき、 50

全て L - アミノ酸で構成されている配列番号 1 又は 3 のいずれかに係る非改变型 JNK 阻害剤（ポリ）ペプチド配列を指す。

【 0 0 1 7 】

号 55) ; L - I B 1 ( s 24 ) ( NH<sub>2</sub> - R P K R P T T L N L F - COOH、配列番号 56) ; L - I B 1 ( s 25 ) ( NH<sub>2</sub> - L F P Q V P R S Q D - COOH、配列番号 57) ; L - I B 1 ( s 26 ) ( NH<sub>2</sub> - N L F P Q V P R S Q - COOH、配列番号 58) ; L - I B 1 ( s 27 ) ( NH<sub>2</sub> - L N L F P Q V P R S - COOH、配列番号 59) ; L - I B 1 ( s 28 ) ( NH<sub>2</sub> - T L N L F P Q V P R - COOH、配列番号 60) ; L - I B 1 ( s 29 ) ( NH<sub>2</sub> - T T L N L F P Q V P - COOH、配列番号 61) ; L - I B 1 ( s 30 ) ( NH<sub>2</sub> - P T T L N L F P Q V - COOH、配列番号 62) ; L - I B 1 ( s 31 ) ( NH<sub>2</sub> - R P T T L N L F P Q - COOH、配列番号 63) ; L - I B 1 ( s 32 ) ( NH<sub>2</sub> - K R P T T L N L F P - COOH、配列番号 64) ; L - I B 1 ( s 33 ) ( NH<sub>2</sub> - P K R P T T L N L F - COOH、配列番号 65) ; 及び L - I B 1 ( s 34 ) ( NH<sub>2</sub> - R P K R P T T L N L - COOH、配列番号 66)。 10

#### 【0018】

更に、本明細書で使用するJNK阻害剤(ポリ)ペプチドは、以下を含む群より選択される少なくとも1つの(ネイティブな)アミノ酸配列を含んでいてもよく、又は前記配列からなっていてよい: IB1の(long)JNK結合ドメイン(JBDs) PG TG CG D T Y R P K R P T T L N L F P Q V P R S Q D T (IB1-long) [配列番号 13]、IB2の(long)JNK結合ドメイン IP S P S V E E P H K H R P T T L R L T T L G A Q D S (IB2-long) [配列番号 14]、c-JunのJNK結合ドメイン G A Y G Y S N P K I L K Q S M T L N L A D P V G N L K P H (c-Jun) [配列番号 15]、ATF2のJNK結合ドメイン T N E D H L A V H K H K H E M T L K F G P A R N D S V I V (ATF2) [配列番号 16] (例えば、図1A~1Cを参照されたい)。この状況では、アラインメントにより、部分的に保存されている8アミノ酸配列が明らかになり(例えば、図1Aを参照されたい)、更に、IB1のJBDとIB2のJBDとを比較することにより、2つの配列間で高度に保存されている7アミノ酸及び3アミノ酸の2つのブロックが明らかになった。 20

#### 【0019】

別の好ましい実施形態によれば、本明細書で使用するJNK阻害剤(ポリ)ペプチドは、上に定義した通り部分的にD-アミノ酸を含んでいてもよく、D-アミノ酸のみで構成されていてもよい。より好ましくは、D-アミノ酸で構成されているこれらJNK阻害剤(ポリ)ペプチドは、上記(ネイティブな)JNK阻害剤配列の非ネイティブなD-レトロ-インペルソ型配列である。用語「レトロ-インペルソ型(ポリ)ペプチド」は、配列の方向が逆であり且つ各アミノ酸残基のキラリティが反転している直鎖ペプチド配列の異性体を指す(例えば、Jameson et al., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady et al., Nature, 368, 692-693 (1994)を参照されたい)。D-鏡像異性体と逆合成とを組み合わせる利点は、各アミド結合におけるカルボニル基の位置とアミノ基の位置とは入れ替わるが、各アルファ炭素における側鎖基の位置は保存される点というである。特に明記しない限り、本発明に従って使用される任意の所与のL-アミノ酸配列又はペプチドは、対応するネイティブなL-アミノ酸配列又はペプチドについて逆の配列又はペプチドを合成することによって、D-レトロ-インペルソ型配列に変換することができると仮定する。 30

#### 【0020】

本明細書で使用する上に定義した通りのD-レトロ-インペルソ型(ポリ)ペプチドは、様々な有用な性質を有する。例えば、本明細書で使用するD-レトロ-インペルソ型(ポリ)ペプチドは、本明細書で使用するL-アミノ酸配列と同程度の効率で細胞内に入るが、本明細書で使用するD-レトロ-インペルソ型配列は、対応するL-アミノ酸配列よりも安定である。 40

#### 【0021】

したがって、本明細書で使用するJNK阻害剤(ポリ)ペプチドは、アミノ酸配列 NH<sub>2</sub> - X<sub>n</sub><sup>b</sup> - D Q X X X X X X X L X L T T P R - X<sub>n</sub><sup>a</sup> - X<sub>n</sub><sup>b</sup> - COOH (D-IB1 generic(s)) [配列番号 4] 及び / 又は X S / T D Q X X X X X X L X 50

L T T P R X ( D - I B ( generic ) ) [配列番号 20] に係る少なくとも 1 つの D - レトロ - インペルソ型配列を含んでいてもよく、又は前記配列からなっていてもよい。この状況で使用するとき、X、 $X_n^a$  及び  $X_n^b$  は、上に定義した通りであり（好ましくは、D - アミノ酸を表す）、 $X_n^b$  は、配列番号 2 又は 4 に由来する残基の連続伸長を表す。更に、本明細書で使用する J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドは、I B 1 の J N K 結合ドメイン（JBD）T D Q S R P V Q P F L N L T T P R K P R Y T D (D - I B 1) [配列番号 18] を含むアミノ酸配列に係る少なくとも 1 つの D - レトロ - インペルソ型配列を含んでいてもよく、又は前記配列からなっていてもよい。より好ましくは、本明細書で使用する J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドは、アミノ酸配列  $NH_2$  - D Q S R P V Q P F L N L T T P R K P R - COOH (D - I B 1 (s)) [配列番号 2] に係る少なくとも 1 つの D - レトロ - インペルソ型配列を含んでいてもよく、又は前記配列からなっていてもよい。  
 10 更に、本明細書で使用する J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドは、以下の I B 1 の J N K 結合ドメイン（JBD）を含むアミノ酸配列に係る少なくとも 1 つの D - レトロ - インペルソ型配列を含んでいてもよく、又は前記配列からなっていてもよい：D - I B 1 (s 1) ( $NH_2$  - Q P F L N L T T P R K P R - COOH、配列番号 67)；D - I B 1 (s 2) ( $NH_2$  - V Q P F L N L T T P R K P - COOH、配列番号 68)；D - I B 1 (s 3) ( $NH_2$  - P V Q P F L N L T T P R K - COOH、配列番号 69)；D - I B 1 (s 4) ( $NH_2$  - R P V Q P F L N L T T P R - COOH、配列番号 70)；D - I B 1 (s 5) ( $NH_2$  - S R P V Q P F L N L T T P - COOH、配列番号 71)；D - I B 1 (s 6) ( $NH_2$  - Q S R P V Q P F L N L T T - COOH、配列番号 72)；  
 20 D - I B 1 (s 7) ( $NH_2$  - D Q S R P V Q P F L N L T - COOH、配列番号 73)；D - I B 1 (s 8) ( $NH_2$  - P F L N L T T P R K P R - COOH、配列番号 74)；D - I B 1 (s 9) ( $NH_2$  - Q P F L N L T T P R K P - COOH、配列番号 75)；D - I B 1 (s 10) ( $NH_2$  - V Q P F L N L T T P R K - COOH、配列番号 76)；D - I B 1 (s 11) ( $NH_2$  - P V Q P F L N L T T P R - COOH、配列番号 77)；D - I B 1 (s 12) ( $NH_2$  - R P V Q P F L N L T T P - COOH、配列番号 78)；D - I B 1 (s 13) ( $NH_2$  - S R P V Q P F L N L T T - COOH、配列番号 79)；D - I B 1 (s 14) ( $NH_2$  - Q S R P V Q P F L N L T - COOH、配列番号 80)；D - I B 1 (s 15) ( $NH_2$  - D Q S R P V Q P F L N L - COOH、配列番号 81)；D - I B 1 (s 16) ( $NH_2$  - F L N L T T P R K P R - COOH、配列番号 82)；D - I B 1 (s 17) ( $NH_2$  - P F L N L T T P R K P - COOH、配列番号 83)；D - I B 1 (s 18) ( $NH_2$  - Q P F L N L T T P R K - COOH、配列番号 84)；D - I B 1 (s 19) ( $NH_2$  - V Q P F L N L T T P R - COOH、配列番号 85)；D - I B 1 (s 20) ( $NH_2$  - P V Q P F L N L T T P - COOH、配列番号 86)；D - I B 1 (s 21) ( $NH_2$  - R P V Q P F L N L T T - COOH、配列番号 87)；D - I B 1 (s 22) ( $NH_2$  - S R P V Q P F L N L T - COOH、配列番号 88)；D - I B 1 (s 23) ( $NH_2$  - Q S R P V Q P F L N L - COOH、配列番号 89)；D - I B 1 (s 24) ( $NH_2$  - D Q S R P V Q P F L N - COOH、配列番号 90)；D - I B 1 (s 25) ( $NH_2$  - D Q S R P V Q P F L - COOH、配列番号 91)；D - I B 1 (s 26) ( $NH_2$  - Q S R P V Q P F L N - COOH、配列番号 92)；D - I B 1 (s 27) ( $NH_2$  - S R P V Q P F L N L - COOH、配列番号 93)；D - I B 1 (s 28) ( $NH_2$  - R P V Q P F L N L T - COOH、配列番号 94)；D - I B 1 (s 29) ( $NH_2$  - P V Q P F L N L T T - COOH、配列番号 95)；D - I B 1 (s 30) ( $NH_2$  - V Q P F L N L T T P - COOH、配列番号 96)；D - I B 1 (s 31) ( $NH_2$  - Q P F L N L T T P R - COOH、配列番号 97)；D - I B 1 (s 32) ( $NH_2$  - P F L N L T T P R K - COOH、配列番号 98)；D - I B 1 (s 33) ( $NH_2$  - F L N L T T P R K P - COOH、配列番号 99)；及びD - I B 1 (s 34) ( $NH_2$  - L N L T T P R K P R - COOH、配列番号 100)。  
 40 【0022】

本明細書で使用する上に定義した通りの J N K 阻害剤（ポリ）ペプチドを表 1 に示す（  
 50

配列番号 1 ~ 4、13 ~ 20、及び 33 ~ 100)。表には、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドノ配列の名称、並びにその配列識別番号、長さ、及びアミノ酸配列を記載する。更に、表 1 には、例えば、それぞれ配列番号 1、2、5、6、9、及び 11 並びに配列番号 3、4、7、8、10、及び 12 について配列及びその一般式を示す。更に、表 1 には、キメラ配列である配列番号 9 ~ 12 及び 23 ~ 32(以下を参照されたい)、L - IB1 配列である配列番号 33 ~ 66、及び D - IB1 配列である配列番号 67 ~ 100 を開示する。

【0023】

【表1】

配列／ヘッド名	配列番号	AA	配列
L-IB1(s)	1	19	RPKRPTTLNLFPQVPRSQD (NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNLFPQVPRSQD-COOH)
D-IB1(s)	2	19	DQSRPVQPFLNLTPRKPR (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLTPRKPR-COOH)
L-IB (generic) (s)	3	19	NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -X <sub>n</sub> <sup>a</sup> -RPTTLXLXXXXXXQD-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH
D-IB (generic) (s)	4	19	NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -DQXXXXXXXXLXLTTPR-X <sub>n</sub> <sup>a</sup> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH
L-TAT	5	10	GRKKRRQRRR (NH <sub>2</sub> -GRKKRRQRRR-COOH)
D-TAT	6	10	RRRQRRKKRG (NH <sub>2</sub> -RRRQRRKKRG-COOH)
L-generic-TAT (s)	7	11	NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RKKRRQRRR-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH
D-generic-TAT (s)	8	11	NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RRRQRRKKR-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH
L-TAT-IB1(s)	9	31	GRKKRRQRRRPPRKRPTTLNLFPQVPRSQD (NH <sub>2</sub> -GRKKRRQRRRPPRKRPTTLNLFPQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB (generic) (s)	10	29	NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RKKRRQRRR-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RPTTLXLXXXXXXQD-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH
D-TAT-IB1(s)	11	31	DQSRPVQPFLNLTPRKPRPPRQRKKRG (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLTPRKPRPPRQRKKRG-COOH)
D-TAT-IB (generic) (s)	12	29	NH <sub>2</sub> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -DQXXXXXXXXLXLTTPR-X <sub>n</sub> <sup>a</sup> -X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -RKKRRQRRR-X <sub>n</sub> <sup>b</sup> -COOH
IB1-long	13	29	PGTGC GDTYRPKRPTTLNLFPQVPRSQDT (NH <sub>2</sub> - PGTGC GDTYRPKRPTTLNLFPQVPRSQDT -COOH)
IB2-long	14	27	IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS (NH <sub>2</sub> - IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS -COOH)
c-Jun	15	29	GAYGYSNPKILKQSMTLNADPVGNLKFH (NH <sub>2</sub> - GAYGYSNPKILKQSMTLNADPVGNLKFH -COOH)
ATF2	16	29	TNEDHLAVHKHHKHEMTLKFGPARNDSVIV (NH <sub>2</sub> - TNEDHLAVHKHHKHEMTLKFGPARNDSVIV -COOH)
L-IB1	17	23	DTYRPKRPTTLNLFPQVPRSQDT (NH <sub>2</sub> - DTYRPKRPTTLNLFPQVPRSQDT -COOH)
D-IB1	18	23	TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTD (NH <sub>2</sub> - TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTD -COOH)
L-IB (generic)	19	19	XRPPTTLXLXXXXXXQDS/TX (NH <sub>2</sub> - XRPPTTLXLXXXXXXQDS/TX -COOH)
D-IB (generic)	20	19	XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX (NH <sub>2</sub> - XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX -COOH)
L-generic-TAT	21	17	XXXXRKRRQRRRRXXXX (NH <sub>2</sub> - XXXXRKRRQRRRRXXXX -COOH)
D-generic-TAT	22	17	XXXXRRRQRRKKRXXXX (NH <sub>2</sub> - XXXXRRRQRRKKRXXXX -COOH)
L-TAT-IB1	23	35	GRKKRRQRRRPPDTYRPKRPTTLNLFPQVPRSQDT (NH <sub>2</sub> - GRKKRRQRRRPPDTYRPKRPTTLNLFPQVPRSQDT -COOH)
L-TAT-IB (generic)	24	42	XXXXXXXXRKRRQRRRRXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXQDS/TX (NH <sub>2</sub> - XXXXXXXRKRRQRRRRXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXQDS/TX -COOH)
D-TAT-IB1	25	35	TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTDPPRRQRKKRG (NH <sub>2</sub> - TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTDPPRRQRKKRG -COOH)
D-TAT-IB (generic)	26	42	XT/SDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXX (NH <sub>2</sub> - XT/SDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXX -COOH)
L-TAT-IB1(s1)	27	30	RKKRRQRRRPPRKRPTTLNLFPQVPRSQD (NH <sub>2</sub> - RKKRRQRRRPPRKRPTTLNLFPQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB1(s2)	28	30	GRKKRRQRRRX <sub>n</sub> <sup>c</sup> RPKRPTTLNLFPQVPRSQD (NH <sub>2</sub> -GRKKRRQRRRX <sub>n</sub> <sup>c</sup> RPKRPTTLNLFPQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB1(s3)	29	29	RKKRRQRRRX <sub>n</sub> <sup>c</sup> RPKRPTTLNLFPQVPRSQD (NH <sub>2</sub> -RKKRRQRRRX <sub>n</sub> <sup>c</sup> RPKRPTTLNLFPQVPRSQD-COOH)
D-TAT-IB1(s1)	30	30	DQSRPVQPFLNLTPRKPRPPRQRKKR (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLTPRKPRPPRQRKKR-COOH)
D-TAT-IB1(s2)	31	30	DQSRPVQPFLNLTPRKPRX <sub>n</sub> <sup>c</sup> RRRQRRKKRG (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLTPRKPRX <sub>n</sub> <sup>c</sup> RRRQRRKKRG-COOH)
D-TAT-IB1(s3)	32	29	DQSRPVQPFLNLTPRKPRX <sub>n</sub> <sup>c</sup> RRRQRRKKR (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLTPRKPRX <sub>n</sub> <sup>c</sup> RRRQRRKKR-COOH)
L-IB1(s1)	33	13	TLNLFQVPRSQD (NH <sub>2</sub> -TLNLFQVPRSQD-COOH)

10

20

30

40

配列／ヘッド名	配列番号	AA	配列	
L-IB1(s2)	34	13	TTLNLFPQVPRSQ (NH <sub>2</sub> -TTLNLFPQVPRSQ-COOH)	10
L-IB1(s3)	35	13	PTTLNLFPQVPRS (NH <sub>2</sub> -PTTLNLFPQVPRS-COOH)	
L-IB1(s4)	36	13	RPTTLNLFPQVPR (NH <sub>2</sub> -RPTTLNLFPQVPR-COOH)	
L-IB1(s5)	37	13	KRPTTLNLFPQVP (NH <sub>2</sub> -KRPTTLNLFPQVP-COOH)	
L-IB1(s6)	38	13	PKRPTTLNLFPQV (NH <sub>2</sub> -PKRPTTLNLFPQV-COOH)	
L-IB1(s7)	39	13	RPKRPTTLNLFPQ (NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNLFPQ-COOH)	
L-IB1(s8)	40	12	LNLFPQVPRSQD (NH <sub>2</sub> -LNLFPQVPRSQD-COOH)	
L-IB1(s9)	41	12	TLNLFPQVPRSQ (NH <sub>2</sub> -TLNLFPQVPRSQ-COOH)	20
L-IB1(s10)	42	12	TTLNLFPQVPRS (NH <sub>2</sub> -TTLNLFPQVPRS-COOH)	
L-IB1(s11)	43	12	PPTTLNLFPQVPR (NH <sub>2</sub> -PPTTLNLFPQVPR-COOH)	
L-IB1(s12)	44	12	RPTTLNLFPQVP (NH <sub>2</sub> -RPTTLNLFPQVP-COOH)	
L-IB1(s13)	45	12	KRPTTLNLFPQV (NH <sub>2</sub> -KRPTTLNLFPQV-COOH)	
L-IB1(s14)	46	12	PKRPTTLNLFPQ (NH <sub>2</sub> -PKRPTTLNLFPQ-COOH)	
L-IB1(s15)	47	12	RPKRPTTLNLFP (NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNLFP-COOH)	
L-IB1(s16)	48	11	NLFPQVPRSQD (NH <sub>2</sub> -NLFPQVPRSQD-COOH)	
L-IB1(s17)	49	11	LNLFQVPRSQ (NH <sub>2</sub> -LNLFQVPRSQ-COOH)	
L-IB1(s18)	50	11	TLNLFPQVPRS (NH <sub>2</sub> -TLNLFPQVPRS-COOH)	
L-IB1(s19)	51	11	TTLNLFPQVPR (NH <sub>2</sub> -TTLNLFPQVPR-COOH)	30
L-IB1(s20)	52	11	PPTTLNLFPQVP (NH <sub>2</sub> -PPTTLNLFPQVP-COOH)	
L-IB1(s21)	53	11	RPTTLNLFPQV (NH <sub>2</sub> -RPTTLNLFPQV-COOH)	
L-IB1(s22)	54	11	KRPTTLNLFPQ (NH <sub>2</sub> -KRPTTLNLFPQ-COOH)	
L-IB1(s23)	55	11	PKRPTTLNLFP (NH <sub>2</sub> -PKRPTTLNLFP-COOH)	
L-IB1(s24)	56	11	RPKRPTTLNLF (NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNLF-COOH)	
L-IB1(s25)	57	10	LFPQVPRSQD (NH <sub>2</sub> -LFPQVPRSQD-COOH)	40
L-IB1(s26)	58	10	NLFPQVPRSQ (NH <sub>2</sub> -NLFPQVPRSQ-COOH)	
L-IB1(s27)	59	10	LNLFQVPRS (NH <sub>2</sub> -LNLFQVPRS-COOH)	
L-IB1(s28)	60	10	TLNLFPQVPR (NH <sub>2</sub> -TLNLFPQVPR-COOH)	
L-IB1(s29)	61	10	TTLNLFPQVP (NH <sub>2</sub> -TTLNLFPQVP-COOH)	
L-IB1(s30)	62	10	PPTTLNLFPQV (NH <sub>2</sub> -PPTTLNLFPQV-COOH)	

配列／ヘッド名	配列番号	AA	配列
L-IB1(s31)	63	10	RPTTLNLFPQ (NH <sub>2</sub> -RPTTLNLFPQ-COOH)
L-IB1(s32)	64	10	KRPTTLNLFP (NH <sub>2</sub> -KRPTTLNLFP-COOH)
L-IB1(s33)	65	10	PKRPTTLNLF (NH <sub>2</sub> -PKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s34)	66	10	RPKRPTTLNL (NH <sub>2</sub> -RPKRPTTLNL-COOH)
D-IB1(s1)	67	13	QPFLNLTPRKPR (NH <sub>2</sub> -QPFLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s2)	68	13	VQPFLNLTPRKP (NH <sub>2</sub> -VQPFLNLTPRKP-COOH)
D-IB1(s3)	69	13	PVQPFLNLTPRK (NH <sub>2</sub> -PVQPFLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s4)	70	13	RPVQPFLNLTPR (NH <sub>2</sub> -RPVQPFLNLTPR-COOH)
D-IB1(s5)	71	13	SRPVQPFLNLTP (NH <sub>2</sub> -SRPVQPFLNLTP-COOH)
D-IB1(s6)	72	13	QSRPVQPFLNLTT (NH <sub>2</sub> -QSRPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s7)	73	13	DQSRPVQPFLNLT (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s8)	74	12	PFLNLTPRKPR (NH <sub>2</sub> -PFLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s9)	75	12	QPFLNLTPRKP (NH <sub>2</sub> -QPFLNLTPRKP-COOH)
D-IB1(s10)	76	12	VQPFLNLTPRK (NH <sub>2</sub> -VQPFLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s11)	77	12	PVQPFLNLTPR (NH <sub>2</sub> -PVQPFLNLTPR-COOH)
D-IB1(s12)	78	12	RPVQPFLNLTP (NH <sub>2</sub> -RPVQPFLNLTP-COOH)
D-IB1(s13)	79	12	SRPVQPFLNLTT (NH <sub>2</sub> -SRPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s14)	80	12	QSRPVQPFLNLT (NH <sub>2</sub> -QSRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s15)	81	12	DQSRPVQPFLNL (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s16)	82	11	FNLNLTPRKPR (NH <sub>2</sub> -FNLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s17)	83	11	PFLNLTPRKP (NH <sub>2</sub> -PFLNLTPRKP-COOH)
D-IB1(s18)	84	11	QPFLNLTPRK (NH <sub>2</sub> -QPFLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s19)	85	11	VQPFLNLTPR (NH <sub>2</sub> -VQPFLNLTPR-COOH)
D-IB1(s20)	86	11	PVQPFLNLTP (NH <sub>2</sub> -PVQPFLNLTP-COOH)
D-IB1(s21)	87	11	RPVQPFLNLTT (NH <sub>2</sub> -RPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s22)	88	11	SRRPVQPFLNLT (NH <sub>2</sub> -SRRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s23)	89	11	QSRPVQPFLNL (NH <sub>2</sub> -QSRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s24)	90	11	DQSRPVQPFLN (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFLN-COOH)
D-IB1(s25)	91	10	DQSRPVQPFL (NH <sub>2</sub> -DQSRPVQPFL-COOH)

配列／ペプチド名	配列番号	AA	配列
D-IB1(s26)	92	10	QSRPVQPFLN (NH <sub>2</sub> -QSRPVQPFLN-COOH)
D-IB1(s27)	93	10	SRPVQPFLNL (NH <sub>2</sub> -SRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s28)	94	10	RPVQPFLNL (NH <sub>2</sub> -RPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s29)	95	10	PVQPFLNLTT (NH <sub>2</sub> -PVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s30)	96	10	VQPFLNLTTP (NH <sub>2</sub> -VQPFLNLTTP-COOH)
D-IB1(s31)	97	10	QPFLNLTTPR (NH <sub>2</sub> -QPFLNLTTPR-COOH)
D-IB1(s32)	98	10	PFLNLTTPRK (NH <sub>2</sub> -PFLNLTTPRK-COOH)
D-IB1(s33)	99	10	FNLTTPRKP (NH <sub>2</sub> -FNLTTPRKP-COOH)
D-IB1(s34)	100	10	LNLTTPRKPR (NH <sub>2</sub> -LNLTTPRKPR-COOH)

## 【0024】

D - アミノ酸のみで構成されている本明細書における所与の配列を「D - 名称」として識別することを当業者であれば理解するであろう。例えば、配列番号100は、配列／ペプチド名「D - I B 1 ( s 3 4 )」を有する。そのアミノ酸配列は、L N L T T P R K P Rである。しかし、ここでは、全てのアミノ酸がD - アミノ酸である。

10

## 【0025】

また、用語「全体的にL - アミノ酸で構成されている」、「D - アミノ酸のみで構成されている」、「全体的にD - アミノ酸で構成されている」及び／又は「D - アミノ酸のみで構成されている」等は、グリシン残基の存在を除外する必要はない（が除外してもよい）配列を指すことを当業者であれば理解するであろう。グリシンは、キラルではない唯一のアミノ酸である。したがって、用語「全体的にL - アミノ酸で構成されている」、「D - アミノ酸で構成されている」、「全体的にD - アミノ酸で構成されている」及び／又は「D - アミノ酸のみで構成されている」等は、可能な場合、それぞれ、L - アミノ酸又はD - アミノ酸が用いられることを明らかにすることを意図する。しかし、アミノ酸配列における所与の位置にグリシンが存在することが必要であるか又は好ましい場合、その位置にグリシンが存在してもよい。適例は、L - T A T (配列番号5)である。本明細書で使用するとき、前記配列は、キラルではないグリシン残基を含む「が」、前記配列はL - アミノ酸のみで構成されるとみなされる。同様に、D - T A T (配列番号6)は、本明細書で使用するとき、前記配列は、キラルではないグリシン残基を含む「が」、D - アミノ酸のみで構成されるとみなしてよい。

20

## 【0026】

別の好ましい実施形態によれば、本明細書で使用するJ N K阻害剤（ポリ）ペプチドは、配列番号1～4、13～20、及び33～100に係る上に定義したネイティブ又は非ネイティブなアミノ酸配列の少なくとも1つの変異体、断片、及び／又は誘導体を含むか又はこれらからなる。好ましくは、これら変異体、断片、及び／又は誘導体は、本明細書で使用する上に開示したネイティブ又は非ネイティブなJ N K阻害剤（ポリ）ペプチド、特に配列番号1～4、13～20、及び33～100に係るネイティブ又は非ネイティブなアミノ酸配列の生物活性を保持している。即ち、J N Kに結合する、及び／又は少なくとも1つのJ N K活性化転写因子、例えば、c - J u n、A T F 2、若しくはE l k 1の活性化を阻害する。機能は、例えば、標的分子に対するペプチドの結合試験等の様々な試験によって、又は例えば、分光法、コンピュータモデリング、構造解析等の生物物理学的方法によって試験することができる。特に、上に定義した通りのJ N K阻害剤（ポリ）ペプチド、或いはその変異体、断片、及び／又は誘導体は、ペプチドの疎水性領域及び親水性領域を同定するために利用することができるので、結合実験等における実験操作又は抗体合成のための基質の設計に役立つ親水性分析（例えば、H o p p a n d W o o d s

30

40

50

、 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3824 - 3828 を参照されたい) によって分析することができる。また、二次構造解析を実施して、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチド、或いはその変異体、断片、及び/又は誘導体の特定の構造モチーフを推定する領域を同定することもできる(例えば、Chou and Fasman, 1974, Biochem 13: 222 - 223 を参照されたい)。操作、翻訳、二次構造予測、親水性及び疎水性のプロファイル、オープンリーディングフレームの予測及びプロッティング、並びに配列相同性の決定は、当技術分野において利用可能なコンピュータソフトウェアプログラムを用いて実施することができる。構造解析の他の方法としては、例えば、X線結晶解析(例えば、Engstrom, 1974. Biochem Exp Biol 11: 7 - 13 を参照されたい)、質量分析、及びガスクロマトグラフィー(例えば、METHODS IN PROTEIN SCIENCE、1997、J. Wiley and Sons, New York, NY を参照されたい)が挙げられ、コンピュータモデリング(例えば、Fletterick and Zoller, eds., 1986. Computer Graphics and Molecular Modeling, In: CURRENT COMMUNICATIONS IN MOLECULAR BIOLOGY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY を参照されたい)を使用してもよい。

## 【0027】

したがって、本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチドは、配列番号 1 ~ 4、13 ~ 20、及び 33 ~ 100 に係る(ネイティブな又は非ネイティブな)アミノ酸配列の少なくとも 1 つの変異体を含んでいてもよく、又は前記変異体からなっていてもよい。本発明では、「配列番号 1 ~ 4、13 ~ 20、及び 33 ~ 100 に係る(ネイティブな又は非ネイティブな)アミノ酸配列の変異体」は、好ましくは、配列番号 1 ~ 4、13 ~ 20、及び 33 ~ 100 に係る配列のいずれかに由来する配列であって、配列番号 1 ~ 4、13 ~ 20、及び 33 ~ 100 に係るアミノ酸配列のアミノ酸変化を含む変異体である。かかる変化は、配列番号 1 ~ 4、13 ~ 20、及び 33 ~ 100 に係るアミノ酸の置換、付加、及び/又は欠失を、典型的には 1 個 ~ 20 個、好ましくは 1 個 ~ 10 個、より好ましくは 1 個 ~ 5 個含み、前記変異体は、配列番号 1 ~ 4、13 ~ 20、及び 33 ~ 100 に係る配列のいずれかと、少なくとも約 30%、約 50%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、約 98%、又は更には少なくとも約 99% の配列同一性を示す。

## 【0028】

上に定義した本明細書で使用する配列番号 1 ~ 4、13 ~ 20、及び 33 ~ 100 に係る(ネイティブな又は非ネイティブな)アミノ酸配列の変異体が特定のアミノ酸の置換によって得られる場合、かかる置換は、好ましくは、保存的アミノ酸置換を含む。保存的アミノ酸置換は、物理化学的性質が十分に類似しているので、群のメンバー間で置換されても分子の生物活性が保持される群内の同義アミノ酸残基を含んでよい(例えば、Grantham, R. (1974), Science 185, 862 - 864 を参照されたい)。また、特に、挿入及び/又は欠失されるアミノ酸が、数アミノ酸、例えば、20 未満、好ましくは、10 未満のアミノ酸のみであり、且つ機能活性にとって重要なアミノ酸が除去又は置換されない場合、その機能を変化させることなしに上に定義した配列中にアミノ酸を挿入及び/又は欠失することができる事が当業者には明らかである。更に、本明細書で使用する変異体において、インビポ又はインピトロにおいて本明細書で使用する JNK 阻害剤(ポリ)ペプチド又は本明細書で使用するキメラペプチドの不活性を避けるために、ホスホリラーゼ、好ましくは、キナーゼにアクセス可能なアミノ酸位置に更なるスレオニンが生じる置換は避けるべきである。

## 【0029】

好ましくは、同一群に分類され且つ典型的には保存的アミノ酸置換によって交換可能な同義アミノ酸残基を表 2 に定義する。

## 【0030】

10

20

30

40

50

【表2】

アミノ酸	同義残基	
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn	
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His	
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu	
Pro	Gly, Ala, (Thr), Pro	10
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr	
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala	
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val	
Gly	Ala, (Thr), Pro, Ser, Gly	
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile	
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe	20
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr	
Cys	Ser, Thr, Cys	
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His	
Gln	Glu, Lys, Asn, His, (Thr), Arg, Gln	
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn	30
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys	
Asp	Glu, Asn, Asp	
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu	
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	
Trp	Trp	
同義アミノ酸残基の好ましい群		40
【0031】		
本明細書で使用する配列番号1～4、13～20、及び33～100の変異体の特定の形態は、本明細書で使用する配列番号1～4、13～20、及び33～100に係る（ネイティブな又は非ネイティブな）アミノ酸配列の断片であって、典型的には、配列番号1～4、13～20、及び33～100と比較したときに少なくとも1つの欠失によって変化している断片である。好ましくは、断片は、配列番号1～4、13～20、及び33～100のいずれかの少なくとも4個の連続するアミノ酸を含み、これは、典型的に、これら配列のいずれかに由来するエピトープを特異的に認識するのに十分な長さである。更により好ましくは、前記断片は、配列番号1～4、13～20、及び33～100のいずれかのうちの4個～18個、4個～15個、又は最も好ましくは4個～10個の連続するア	50	

ミノ酸を含み、上記範囲の下限は、4又は5、6、7、8、9、又は10であってよい。アミノ酸の欠失は、配列番号1～4、13～20、及び33～100の任意の位置、好ましくはN末端又はC末端で生じてよい。

### 【0032】

更に、上記の通り、配列番号1～4、13～20、及び33～100に係る(ネイティブな又は非ネイティブな)アミノ酸配列の断片は、本明細書で使用する配列番号1～4、13～20、及び33～100に係る配列のいずれかと少なくとも約30%、約50%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、又は更には約99%の配列同一性を共有する配列として定義することができる。

### 【0033】

本明細書で使用するJNK阻害剤(ポリ)ペプチド/配列は、更に、上に定義した配列番号1～4、13～20、及び33～100に係る(ネイティブな又は非ネイティブな)アミノ酸配列のうちの少なくとも1つの誘導体を含んでいてもよく、又は前記誘導体からなっていてもよい。この状況では、「配列番号1～4、13～20、及び33～100に係る(ネイティブな又は非ネイティブな)アミノ酸配列の誘導体」は、好ましくは、配列番号1～4、13～20、及び33～100に係る配列のいずれかに由来するアミノ酸配列であって、少なくとも1個の修飾されているL-アミノ酸又はD-アミノ酸(非天然のアミノ酸を形成)、好ましくは、1個～20個、より好ましくは1個～10個、更により好ましくは1個～5個の修飾されているL-アミノ酸又はD-アミノ酸を含む誘導体である。また、変異体又は断片の誘導体も本発明の範囲内である。

10

### 【0034】

これに関して、「修飾されているアミノ酸」は、例えば、様々な生物における様々なグリコシル化によって、リン酸化によって、又は特定のアミノ酸の標識によって変化している任意のアミノ酸であってよい。かかる標識は、以下を含む標識の群から選択される：

(i) 放射活性標識、即ち、放射活性リン酸化又は硫黄、水素、炭素、窒素等による放射活性標識；

(ii) 着色色素(例えば、ジゴキシゲニン等)；

(iii) 蛍光基(例えば、フルオレセイン等)；

(iv) 化学発光基；

(v) 固相に固定するための基(例えば、His-タグ、ビオチン、streptag、flag-タグ、抗体、抗原等)；及び

(vi)(i)～(v)に記載した標識のうちの2以上の標識の組み合わせ。

20

### 【0035】

上記の状況では、本発明のクエリーアミノ酸配列に対して例えば、少なくとも95%の「配列同一性を共有する」配列を有するアミノ酸配列は、対象アミノ酸配列がクエリーアミノ酸配列の各100アミノ酸当たり5以下のアミノ酸変化を含んでいてもよいことを除いて、対象アミノ酸配列の配列がクエリー配列と同一であることを意味することを意図する。言い換えれば、クエリーアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を得るために、対象配列中のアミノ酸残基のうちの5%(100個のうちの5個)以下を、挿入するか、別のアミノ酸で置換するか、又は欠失させてよい。

30

### 【0036】

正確に一致しない配列については、第1の配列の「同一性(%)」は、第2の配列に対して決定してよい。一般的に、配列間の相関が最大になるように、比較されるこれら2つの配列のアラインメントを行う。これは、アラインメントの程度を高めるために一方又は両方の配列に「ギャップ」を挿入することを含んでいてもよい。次いで、比較する各配列の全長に対して(所謂、グローバルアラインメント)(同一又は類似の長さを有する配列に特に適している)、又はより短い既定の長さに対して(所謂、ローカルアラインメント)(長さの等しくない配列により適している)同一性(%)を決定してよい。

40

### 【0037】

特に本明細書で使用する2以上の配列の同一性又は相同性を比較する方法は、当技術分

50

野において周知である。したがって、例えば、Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Res. 12, 387 - 395)において入手可能なプログラム、例えば、プログラム BESTFIT 及び GAP を用いて、2つのポリヌクレオチド間の同一性(%)、並びに2つのポリペプチド配列間の同一性(%)及び相同性(%)を決定することができる。BESTFITは、(Smith and Waterman (1981), J. Mol. Biol. 147, 195 - 197)の「ローカルホモロジー」アルゴリズムを用いて、2つの配列間の類似性について最良の単一領域を見出す。また、配列間の同一性及び/又は類似性を決定するための他のプログラムも当技術分野において公知であり、例えば、NCBI のホームページ (www.ncbi.nlm.nih.gov) からアクセス可能なBLASTファミリーのプログラム (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215, 403 - 410) 及びFASTA (Pearson (1990), Methods Enzymol. 183, 63 - 98; Pearson and Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 2444 - 2448) である。

#### 【0038】

本発明に従って使用する上に定義したJNK阻害剤(ポリ)ペプチド/配列は、例えば、化学合成又は以下で論じる遺伝子工学法等、当技術分野において周知である方法によって入手又は製造することができる。例えば、前記JNK阻害剤配列の望ましい領域を含むか又はインビトロ若しくはインビボにおいて望ましい活性を媒介する本明細書で使用するJNK阻害剤配列の一部に対応するペプチドは、ペプチド合成機の使用によって合成することができる。

#### 【0039】

本明細書で使用する上に定義したJNK阻害剤(ポリ)ペプチドは、更に、輸送(ポリ)ペプチドによって修飾されてもよく、これによって、本明細書で使用する上に定義したJNK阻害剤(ポリ)ペプチドを細胞に効率的に輸送することが可能になる。好ましくは、かかる修飾JNK阻害剤(ポリ)ペプチドを提供し、キメラ(ポリ)ペプチドとして使用する。

#### 【0040】

したがって、本発明の第2の態様によれば、被験体における非慢性和慢性的炎症性眼疾患を治療する医薬組成物を調製するための、少なくとも1つの第1のドメインと少なくとも1つの第2のドメインとを含むキメラ(ポリ)ペプチドの使用であって、前記キメラペプチドの前記第1のドメインが輸送配列を含み、一方、前記キメラ(ポリ)ペプチドの前記第2のドメインが上に定義したJNK阻害剤配列、好ましくは、配列番号1~4、13~20、及び33~100に係る配列のいずれか、又はこれらの誘導体若しくは断片を含む使用を提供する。

#### 【0041】

典型的に、本発明に従って用いられるキメラ(ポリ)ペプチドは、少なくとも25アミノ酸残基、例えば、25アミノ酸残基~250アミノ酸残基、より好ましくは25アミノ酸残基~200アミノ酸残基、更により好ましくは25アミノ酸残基~150アミノ酸残基、25アミノ酸残基~100アミノ酸残基、最も好ましくは25アミノ酸残基~50アミノ酸残基の長さを有する。

#### 【0042】

第1のドメインとして、本明細書で使用するキメラ(ポリ)ペプチドは、好ましくは、望ましい細胞の目的地に(輸送配列が存在する)ペプチドを導くアミノ酸の任意の配列から典型的に選択される輸送配列を含む。したがって、本明細書で使用する輸送配列は、典型的に、ペプチドに原形質膜を通過させ、例えば、細胞の外側から原形質膜を通って細胞質に導く。これに代えて又はこれに加えて、輸送配列は、例えば、2つの成分を合わせることによって(例えば、細胞を透過するための成分と核に局在するための成分)、又は例えば、細胞膜輸送の性質を有し且つ例えば核内輸送を標的とする1つの単一成分によって

10

20

30

40

50

、細胞内、例えば、核、リボソーム、小胞体（ER）、リソソーム、又はペルオキシソームの望ましい位置にペプチドを導くことができる。輸送配列は、更に、細胞質成分又は任意の他の成分又は細胞の区画（例えば、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ装置、リソソーム小胞）に結合することができる別の成分を含んでいてもよい。したがって、例えば、第1のドメインの輸送配列及び第2のドメインのJNK阻害剤配列は、細胞質又は細胞の任意の他の区画に局在することができる。これによって、取り込まれたときの細胞内におけるキメラペプチドの位置を決定することができる。

#### 【0043】

好ましくは、（本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる）輸送配列は、5アミノ酸～150アミノ酸の配列、より好ましくは5アミノ酸～100アミノ酸の配列、最も好ましくは5アミノ酸～50アミノ酸、5アミノ酸～30アミノ酸、又は更には5アミノ酸～15アミノ酸の長さを有する。10

#### 【0044】

より好ましくは、（本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含有される）輸送配列は、第1のドメインにおいて連続アミノ酸配列伸長として生じてよい。或いは、第1のドメインにおける輸送配列は、上に開示した輸送体特性を保持している限り、全ての断片が輸送配列全体に類似している2以上の断片に分割されていてもよく、1アミノ酸～10アミノ酸、好ましくは、1アミノ酸～5アミノ酸によって互いに分離されていてもよい。輸送配列の断片を分離するこれらアミノ酸配列は、例えば、輸送配列とは異なるアミノ酸配列から選択してよい。或いは、第1のドメインは、1超の成分で構成される輸送配列を含有してよく、各成分は、第2のドメインの積荷であるJNK阻害剤配列を、例えば、特定の細胞区画に輸送するための独自の機能を有する。20

#### 【0045】

上に定義した輸送配列は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、又はL-アミノ酸とD-アミノ酸との組み合わせで構成されていてよい。好ましくは、（本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる）輸送配列は、少なくとも1又は更には2、好ましくは少なくとも3、4、又は5、より好ましくは少なくとも6、7、8、又は9、更により好ましくは少なくとも10以上のD-アミノ酸及び/又はL-アミノ酸を含んでいてよく、前記D-アミノ酸及び/又はL-アミノ酸は、JNK輸送配列中にブロック状に、非ブロック状に、又は交互に配置されていてよい。30

#### 【0046】

1つの別の実施形態によれば、本明細書で使用するキメラ（ポリ）ペプチドの輸送配列は、L-アミノ酸のみで構成されていてよい。より好ましくは、本明細書で使用するキメラペプチドの輸送配列は、上に定義した少なくとも1つの「ネイティブな」輸送配列を含むか又は前記輸送配列からなる。この状況では、用語「ネイティブな」は、全体的にL-アミノ酸で構成されている非改変輸送配列を指す。

#### 【0047】

別の実施形態によれば、本明細書で使用するキメラ（ポリ）ペプチドの輸送配列は、D-アミノ酸のみで構成されていてよい。より好ましくは、本明細書で使用するキメラペプチドの輸送配列は、上に提示した配列のD-レトロ-インペルソ型ペプチドを含んでいてよい。40

#### 【0048】

本明細書で使用するキメラ（ポリ）ペプチドの第1のドメインの輸送配列は、天然起源から得ることもでき、又は遺伝子工学技術若しくは化学合成を用いることによって製造することもできる（例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. を参照されたい）。

#### 【0049】

10

20

30

40

50

例えば、T A T タンパク質（例えば、米国特許第5,804,604号及び同第5,674,980号に記載されている通り、これら参照文献はそれぞれ参照することにより本明細書に組み込まれる）、V P 2 2（例えば、国際公開第97/05265号；E 1 1 i o t t and O’Hare, C e l l 8 8 : 2 2 3 - 2 3 3 ( 1 9 9 7 ) に記載されている）、非ウイルスタンパク質（Jackson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 1 0 6 9 1 - 1 0 6 9 5 ( 1 9 9 2 ) ）、アンテナペディア（例えば、アンテナペディア輸送体配列）又は塩基性ペプチド、例えば、5アミノ酸～15アミノ酸、好ましくは10アミノ酸～12アミノ酸の長さを有し且つ少なくとも80%、より好ましくは85%、又は更には90%の塩基性アミノ酸（例えば、アルギニン、リジン、及び／又はヒスチジン等）を含むペプチドに由来する輸送配列等のネイティブなタンパク質を含む第1のドメインの輸送配列の起源を使用してよい。更に、輸送配列として用いられるネイティブなタンパク質のうちの1つの変異体、断片、及び誘導体を本明細書に開示する。変異体、断片、及び誘導体に関しては、本明細書で使用するJ N K 阻害剤配列について上に記載した定義が参照される。変異体、断片、並びに誘導体は、同様に、本明細書で使用するJ N K 阻害剤配列について上に記載した通り定義される。特に、輸送配列の状況では、変異体、又は断片、又は誘導体は、上に定義した輸送配列として用いられるネイティブなタンパク質のうちと1つと少なくとも約30%、約50%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、又は更には約99%の配列同一性を共有する配列として定義してよい。10

#### 【0050】

本明細書で使用するキメラ（ポリ）ペプチドの好ましい実施形態では、第1のドメインの輸送配列は、ヒト免疫不全ウイルス（H I V ）1 T A T タンパク質に由来する配列、特にT A T タンパク質を構成する86アミノ酸のうちの一部又は全てを含むか又は前記配列から構成される。20

#### 【0051】

（本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる）輸送配列については、完全長T A T タンパク質の部分配列を、T A T タンパク質の機能的に有効な断片、即ち、細胞への侵入及び取り込みを媒介する領域を含むT A T ペプチドを形成するために用いてよい。かかる配列が機能的に有効であるかどうかについて、公知の技術を用いてT A T タンパク質の断片を測定することができる（例えば、Frankel et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86 : 7 3 9 7 - 7 4 0 1 ( 1 9 8 9 ) を参照されたい）。したがって、本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインにおける輸送配列は、86未満のアミノ酸を含み、且つ細胞への取り込み、及び任意で細胞核への取り込みを示すT A T タンパク質配列の機能的に有効な断片又は部分に由来してよい。より好ましくは、キメラペプチドの細胞膜の透過を媒介するための輸送体として用いられるT A T の部分配列（断片）は、完全長T A T の塩基性領域（アミノ酸48～57又は49～57）を含むことを意図する。30

#### 【0052】

より好ましい実施形態によれば、（本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる）輸送配列は、T A T 残基48～57又は49～57を含有するアミノ酸配列、最も好ましくは、generic T A T 配列N H<sub>2</sub> - X<sub>n</sub><sup>b</sup> - R K K R R Q R R R - X<sub>n</sub><sup>b</sup> - COOH ( L - generic T A T ( s ) ) [配列番号7] 及び／又はX X X X R K K R R Q R R R X X X ( L - generic T A T ) [配列番号21]（式中、X又はX<sub>n</sub><sup>b</sup>は、上に定義した通りである）を含んでいてもよく、前記配列からなっていてもよい。更に、配列番号8における「X<sub>n</sub><sup>b</sup>」残基の数は、記載される数には限定されず、上記の通り変動してよい。或いは、本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる輸送配列は、例えば、アミノ酸配列N H<sub>2</sub> - G R K K R R Q R R R - COOH ( L - T A T ) [配列番号5]を含有するペプチドを含んでいてもよく、又は前記ペプチドからなっていてもよい。40

#### 【0053】

50

50

50

50

50

別のより好ましい実施形態によれば、(本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる)輸送配列は、上記配列のD-レトロ-インベルソ型ペプチド、即ち、配列NH<sub>2</sub>-X<sub>n</sub><sup>b</sup>-RRRQRKKR-X<sub>n</sub><sup>b</sup>-COOH(D-generic-TAT(s)) [配列番号8]及び/又はXXXRQRKRX XXX(D-generic-TAT) [配列番号22]を有するgeneric TAT配列のD-レトロ-インベルソ型配列を含んでいてもよい。また、ここでは、X<sub>n</sub><sup>b</sup>は、上に定義した通りである(好ましくは、D-アミノ酸を表す)。更に、配列番号8における「X<sub>n</sub><sup>b</sup>」残基の数は、記載される数には限定されず、上記の通り変動してもよい。最も好ましくは、本明細書で使用する輸送配列は、D-レトロ-インベルソ型配列NH<sub>2</sub>-RRRQRKKRG-COOH(D-TAT) [配列番号6]を含んでいてもよい。

10

## 【0054】

別の実施形態によれば、本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる輸送配列は、上に定義した輸送配列の変異体を含んでいてもよく、又は前記変異体からなっていてもよい。「輸送配列の変異体」は、好ましくは、上に定義した輸送配列に由来する配列であって、上に定義した輸送配列中に存在する少なくとも1つのアミノ酸の修飾、例えば、付加、(内部)欠失(断片を生じさせる)及び/又は置換を含む変異体である。かかる修飾は、典型的に、1個~20個、好ましくは1個~10個、より好ましくは1個~5個のアミノ酸の置換、付加、及び/又は欠失を含む。更に、変異体は、好ましくは、上に定義した輸送配列、より好ましくは配列番号5~8又は21~22のいずれかと、少なくとも約30%、約50%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、又は更には約99%の配列同一性を示す。

20

## 【0055】

好ましくは、本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる輸送配列のかかる修飾によって、安定性の上昇又は低下した輸送配列が得られる。或いは、輸送配列の変異体は、本明細書で使用するキメラペプチドの細胞内局在を調節するように設計してもよい。外因的に添加される場合、上に定義したかかる変異体は、典型的に、輸送配列が細胞に侵入する能力が保持される(即ち、輸送配列の変異体の細胞への取り込みが、輸送配列を用いるネイティブなタンパク質と実質的に同程度である)ように設計される。例えば、核の局在に重要であると考えられる塩基性領域(例えば、Dang and Lee, J. Biol. Chem. 264: 18019-18023 (1989); Hauber et al., J. Virol. 63: 1181-1187 (1989); et al., J. Virol. 63: 1-8 (1989)を参照されたい)を変化させて、輸送配列、延いては、本明細書で使用するキメラペプチドの成分としてのJNK阻害剤配列を細胞質に局在させるか又は細胞質に部分的に局在させることができる。上記に加えて、例えば、コレステロール又は他の脂質部分を輸送配列に結合させて、膜可溶性の上昇した輸送配列を作製することによって変異体に更なる修飾を導入してもよい。本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインに含まれる輸送配列の上に開示した変異体はいずれも、典型的に当業者に公知である技術を用いて製造することができる(例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照されたい)。

30

## 【0056】

第2のドメインとして、本明細書で使用するキメラペプチドは、典型的に、JNK阻害剤配列の変異体、断片、及び/又は誘導体を含む上に定義したJNK阻害剤配列のいずれかから選択されるJNK阻害剤配列を含む。

40

## 【0057】

本明細書で使用するキメラペプチドの両方のドメイン、即ち、第1のドメイン及び第2のドメインを結合させて、例えば、機能ユニットを形成してもよい。当技術分野において一般的に知られている第1のドメインと第2のドメインとを結合するための任意の方法を

50

適用してよい。

**【0058】**

1つの実施形態によれば、本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメイン及び第2のドメインは、好ましくは、共有結合によって結合する。本明細書で定義する共有結合は、ペプチド結合であってよく、これは、例えば、融合タンパク質として上に定義したキメラペプチドを発現させることによって得ることができる。本明細書で記載する融合タンパク質は、下記の通り、標準的な組換えDNA技術に類似しているか又は前記標準的な組換えDNA技術から容易に適応可能な方法で形成され、用いることができる。しかし、両ドメインは、側鎖を介して結合してもよく、化学リンカー部分によって結合してもよい。

**【0059】**

本明細書で使用するキメラペプチドの第1及び/又は第2のドメインは、前記キメラペプチド中に1コピー以上存在していてよい。両ドメインが1コピー存在する場合、第1のドメインは、第2のドメインのN末端又はC末端のいずれかに結合し得る。複数コピー存在する場合、第1及び第2のドメインを任意の可能な順序で配置してよい。例えば、第1のドメインは、本明細書で使用するキメラペプチド中に、複数のコピー数、例えば、2コピー、3コピー、又はそれ以上存在してよく、これらは、連続して配置されることが好ましい。次いで、第2のドメインは、第1のドメインを含む配列のN末端又はC末端に1コピー存在してよい。或いは、第2のドメインが、複数のコピー数、例えば、2コピー、3コピー、又はそれ以上存在し、第1のドメインが、1コピー存在していてもよい。いずれの場合も、第1及び第2のドメインは、連続配置の任意の位置に配置されてよい。例示的な配置を以下に示す：例えば、第1のドメイン - 第1のドメイン - 第1のドメイン - 第2のドメイン；第1のドメイン - 第1のドメイン - 第2のドメイン - 第1のドメイン；第1のドメイン - 第2のドメイン - 第1のドメイン - 第1のドメイン；又は例えば、第2のドメイン - 第1のドメイン - 第1のドメイン - 第1のドメイン。これら例は、例示のみを目的とし、本発明の範囲を限定するものではないことを当業者であれば理解するであろう。したがって、コピー数及び配置は、最初に規定した通り変動し得る。

**【0060】**

好ましくは、第1及び第2のドメインは、任意のリンカーを用いることなしに互いに直接結合していてよい。或いは、これらは、1アミノ酸～10アミノ酸、好ましくは1アミノ酸～5アミノ酸を含むリンカー配列を介して互いに結合していてよい。リンカー配列を形成するアミノ酸は、好ましくは、アミノ酸残基としてのグリシン又はプロリンから選択される。より好ましくは、第1及び第2のドメインは、第1のドメインと第2のドメインとの間の2残基、3残基、又はそれ以上のプロリン残基のヒンジによって互いに分離されていてよい。

**【0061】**

少なくとも1つの第1のドメイン及び少なくとも1つの第2のドメインを含む、上に定義した本明細書で使用するキメラペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、又はL-アミノ酸とD-アミノ酸との組み合わせで構成されていてよい。ここでは、各ドメイン（及び用いられるリンカー）は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、又はL-アミノ酸とD-アミノ酸との組み合わせ（例えば、D-TATとL-IB1(s)又はL-TATとD-IB1(s)等）で構成されていてよい。好ましくは、本明細書で使用するキメラペプチドは、少なくとも1又は更には2、好ましくは少なくとも3、4、又は5、より好ましくは少なくとも6、7、8、又は9、更により好ましくは少なくとも10又はそれ以上のD-アミノ酸及び/又はL-アミノ酸を含んでいてよく、前記D-アミノ酸及び/又はL-アミノ酸は、本明細書で使用するキメラペプチド中に、ロック状に、非ロック状に、又は交互に配置されていてよい。

**【0062】**

特定の実施形態によれば、本明細書で使用するキメラペプチドは、generic L-TAT-IBペプチドNH<sub>2</sub>-X<sub>n</sub><sup>b</sup>-RKKRRQRRR-X<sub>n</sub><sup>b</sup>-X<sub>n</sub><sup>a</sup>-RPTTLXLXXXXXXQD-X<sub>n</sub><sup>b</sup>-COOH (L-TAT-IB (generic))

10

20

30

40

50

(s) ) [配列番号 10] (式中、 $X$ 、 $X_n^a$  及び $X_n^b$  は、好ましくは上に定義した通りである) に係る L - アミノ酸キメラペプチドを含むか、又は前記キメラペプチドからなる。より好ましくは、本明細書で使用するキメラペプチドは、L - アミノ酸キメラペプチド  $\text{NH}_2\text{-GRKKRRQQRRPPRPKRPTTLNLFPQVPRSQD-COOH}$  (L - TAT - IB1(s)) [配列番号 9] を含むか又は前記キメラペプチドからなる。これに代えて又はこれに加えて、本明細書で使用するキメラペプチドは、L - アミノ酸キメラペプチド配列  $\text{GRKKRRQQRRPPDTRYRPPKRPPTTLNLFPQVPRSQDT(L-TAT-IB1)}$  [配列番号 23]、又は  $\text{XXXXXXXXRKKRRQRRLXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXXQDS/TXL(TAT-IB generic)}$  [配列番号 24] (式中、 $X$  は、好ましくは上に定義した通りである) を含むか又は前記配列からなる。或いは、本明細書で使用するキメラペプチドは、L - アミノ酸キメラペプチド配列  $\text{RKKRQRRPPRPPKRPPTTLNLFPQVPRSQD(L-TAT-IB1(s1))}$  [配列番号 27]、 $\text{GRKKRRQRRRX_n^cRPKRPTTLNLFPQVPRSQD(L-TAT-IB1(s2))}$  [配列番号 28]、又は  $\text{RKKRQRRRX_n^cRPKRPTTLNLFPQVPRSQD(L-TAT-IB1(s3))}$  [配列番号 29] を含むか又は前記配列からなる。この状況では、各  $X$  は、典型的に、上に定義した通りのアミノ酸残基を表し、より好ましくは、 $X_n^c$  は、ペプチド残基の連続伸長を表し、各  $X$  は、独立して、グリシン又はプロリン、例えば、モノトニックグリシン伸長又はモノトニックプロリン伸長から互いに選択され、式中、 $n$  ( $X_n^c$  の繰り返し数) は、典型的に、0 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 30、又は更により好ましくは 0 ~ 5 又は 5 ~ 10 である。 $X_n^c$  は、D - アミノ酸又は L - アミノ酸のいずれかを表し得る。

【 0 0 6 3 】

別の特定の実施形態によれば、本明細書で使用するキメラペプチドは、上に開示したL-アミノ酸キメラペプチドのD-アミノ酸キメラペプチドを含むか又は前記D-アミノ酸キメラペプチドからなる。本発明に係る例示的なD-レトロ-インペルソ型キメラペプチドは、例えば、generic D-TAT-IBペプチドNH<sub>2</sub>-X<sub>n</sub><sup>b</sup>-DQXXX  
XXXXXLXTTPR-X<sub>n</sub><sup>a</sup>-X<sub>n</sub><sup>b</sup>-RRRQRKKR-X<sub>n</sub><sup>b</sup>-COOH(D-TAT-IB(generic)(s)) [配列番号12]である。ここで、X、X<sub>n</sub><sup>a</sup>、及びX<sub>n</sub><sup>b</sup>は、好ましくは、上に定義した通りである(好ましくは、D-アミノ酸を表す)。より好ましくは、本明細書で使用するキメラペプチドは、TAT-IB1ペプチドNH<sub>2</sub>-DQS R P V Q P F L N L T T P R K P R P P R R R Q R R K K R G-COOH(D-TAT-IB1(s)) [配列番号11]に係るD-アミノ酸キメラペプチドを含むか又は前記D-アミノ酸キメラペプチドからなる。これに代えて又はこれに加えて、本明細書で使用するキメラペプチドは、D-アミノ酸キメラペプチド配列TDQS R P V Q P F L N L T T P R K P R Y T D P P R R R Q R R K K R G(D-TAT-IB1) [配列番号25]又はXT/SDQXXXXXXXXXLXTTPRXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXX(D-TAT-IB generic) [配列番号26](式中、Xは、好ましくは、上に定義した通りである)を含むか、又は前記配列からなる。或いは、本明細書で使用するキメラペプチドは、D-アミノ酸キメラペプチド配列DQS R P V Q P F L N L T T P R K P R P P R R R Q R R K K R (D-TAT-IB1(s1)) [配列番号30]、DQS R P V Q P F L N L T T P R K P R X<sub>n</sub><sup>c</sup> R R R Q R R K K R G(D-TAT-IB1(s2)) [配列番号31]、又はDQS R P V Q P F L N L T T P R K P R X<sub>n</sub><sup>c</sup> R R R Q R R K K R (D-TAT-IB1(s3)) [配列番号32]を含むか又は前記配列からなる。X<sub>n</sub><sup>c</sup>は、上に定義した通りであつてよい。

【 0 0 6 4 】

上に定義したキメラペプチドの第1及び第2のドメインは、当技術分野において公知の任意の適切な方法、例えば、第1のドメインと第2のドメインとの間にペプチド結合を確立したり、例えば、融合タンパク質として第1及び第2のドメインを発現させたり、又は例えば、上に定義したキメラペプチドの第1及び第2のドメインを架橋させたりすること

によって実施される化学カップリング又は生化学カップリングによって互いに結合していくよい。

#### 【 0 0 6 5 】

上に定義したキメラペプチドの第1及び第2のドメインの化学架橋に適する多くの公知の方法は、非特異的である、即ち、輸送体ポリペプチド又はカーゴ巨大分子における任意の特定の部位に対してカップリングさせるものではない。結果として、非特異的架橋剤の使用は、機能部位を攻撃したり、活性部位を立体的にロックしたりする場合があるので、コンジュゲートしたタンパク質を生物学的に不活性にする。したがって、好ましくは、以下の架橋方法を用いて、第1のドメインと第2のドメインとをより特異的にカップリングさせる。

10

#### 【 0 0 6 6 】

この状況では、カップリングの特異性を高める1つの方法は、架橋される第1及び第2のドメインの一方又は両方に1個又は数個しか存在しない官能基に対する直接化学カップリングである。例えば、チオール基を含有する唯一のタンパク質アミノ酸であるシステインは、多くのタンパク質において、数個しか存在しない。また、例えば、ポリペプチドがリジン残基を含有しない場合、一级アミンに特異的な架橋試薬は、そのポリペプチドのアミノ末端に対して選択的になる。カップリング特異性を高めるためのこのアプローチをうまく利用するには、ポリペプチドが、分子の生物活性を失わせることなしに変化し得る分子の領域に適度に稀であり且つ反応性である残基を有することが必要である。システイン残基は、架橋反応に関与すると生物学的に干渉する可能性があるポリペプチドの配列の部分に存在する場合、置換されてもよい。システイン残基が置換される場合、典型的に、ポリペプチドの折り畳みにおいて生じる変化を最小化することが望ましい。化学的及び立体的にシステインに類似している残基に置換した場合、ポリペプチドの折り畳みにおける変化が最小化される。これら理由から、システインをセリンに置換することが好ましい。以下の実施例に示す通り、架橋目的のためにポリペプチドのアミノ酸配列にシステイン残基を導入してもよい。システイン残基が導入される場合、アミノ末端又はカルボキシ末端、或いはこれらの近傍に導入されることが好ましい。かかるアミノ酸配列修飾には従来の方法が利用可能であり、対象ポリペプチドは、組換えDNAの化学合成又は発現を介して作製される。

20

#### 【 0 0 6 7 】

また、上に定義した本明細書で使用するキメラペプチドの第1のドメインと第2のドメインとのカップリングは、カップリング剤又はコンジュゲート剤を介して実施してもよい。利用することができる幾つかの分子間架橋試薬が存在する（例えば、Means and Feeney, CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden-Day, 1974, pp. 39 - 43を参照されたい）。これら試薬の中でも、特に、例えば、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)又はN,N'-(1,3-フェニレン)ビスマレイミド（これらは両方、スルフヒドリル基に対して高度に特異的であり、不可逆的な結合を形成する）；N,N'エチレン-ビス-（ヨードアセトアミド）又は6個～11個の炭素メチレン架橋を有する他のかかる試薬（スルフヒドリル基に対して比較的特異的である）；及び1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン（アミノ基及びチロシン基と不可逆的な結合を形成する）である。この目的に有用な他の架橋試薬としては、p,p'-ジフルオロ-m,m'-ジニトロジフェニルスルホン（アミノ基及びフェノール基と不可逆的な架橋を形成する）；ジメチルアジピミデート（アミノ基に対して特異的である）；フェノール-1,4ジスルホニルクロリド（主にアミノ基と反応する）；ヘキサメチレンジイソシアネート、又はジイソチオシアネート、又はアゾフェニル-p-ジイソシアネート（主にアミノ基と反応する）；グルタルアルデヒド（幾つかの異なる側鎖と反応する）及びジスジアゾベンジジン（主にチロシン及びヒスチジンと反応する）が挙げられる。

40

#### 【 0 0 6 8 】

上に定義したキメラペプチドの第1のドメインと第2のドメインとを架橋するために用

50

いられる架橋試薬は、ホモ二官能性であってよい、即ち、同一の反応をする2つの官能基を有する。好ましいホモ二官能性架橋試薬は、ビスマレイミドヘキサン（「B M H」）である。B M Hは、2つのマレイミド官能基を含有し、これらは、穏やかな条件下（p H 6 . 5 ~ 7 . 7）でスルフヒドリル含有化合物と特異的に反応する。2つのマレイミド基は、炭化水素鎖によって結合されている。したがって、B M Hは、システイン残基を含有するポリペプチドの不可逆的な架橋に有用である。

#### 【0069】

また、上に定義したキメラペプチドの第1のドメインと第2のドメインとを架橋するために用いられる架橋試薬は、ヘテロ二官能性であってよい。ヘテロ二官能性架橋剤は、それぞれ、遊離アミン及び遊離チオールを有する2つのタンパク質を架橋する2つの異なる官能基、例えば、アミン反応性基及びチオール反応性基を有する。ヘテロ二官能性架橋剤の例は、スクシンイミジル4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート（「S M C C」）、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル「M B S」）、及びM B Sの伸びきり鎖アナログであるスクシンイミド4 - (p - マレイミドフェニル)ブチレート（「S M P B」）である。これら架橋剤のスクシンイミジル基は、一級アミンと反応し、チオール反応性マレイミドは、システイン残基のチオールと共有結合を形成する。

#### 【0070】

上に定義したキメラペプチドの第1のドメインと第2のドメインとを架橋するのに適した架橋試薬は、多くの場合、水に対する可溶性が低い。したがって、スルホネート基等の親水性部分を架橋試薬に付加して、水溶性を改善してもよい。これに関して、スルホ - M B S 及びスルホ - S M C C は、本発明に従って用いることができる水溶性が調節されている架橋試薬の例である。

#### 【0071】

同様に、多くの架橋試薬は、細胞条件下で本質的に切断不可能なコンジュゲートを生じさせる。しかし、上に定義したキメラペプチドの第1のドメインと第2のドメインとを架橋するのに特に適している幾つかの架橋試薬は、細胞条件下で切断可能なジスルフィド等の共有結合を含有する。例えば、トラウト試薬、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)（「D S P」）、及びN - スクシンイミジル3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオネート（「S P D P」）は、周知の切断可能な架橋剤である。切断可能な架橋試薬を使用することにより、標的細胞に送達した後、輸送体ポリペプチドから積荷部分を分離させることができる。また、直接ジスルフィド結合も有用であり得る。

#### 【0072】

上で論じたものを含む多くの架橋試薬は、市販されている。それら詳細な使用説明書は、商業的供給元から容易に入手可能である。タンパク質の架橋及びコンジュゲートの調製に関する一般的な参考文献は、W o n g , C H E M I S T R Y O F P R O T E I N C O N J U G A T I O N A N D C R O S S L I N K I N G , C R C P r e s s ( 1 9 9 1 ) である。

#### 【0073】

上に定義したキメラペプチドの第1のドメインと第2のドメインとの化学架橋は、スペーサーアームの使用を含んでいてよい。スペーサーアームは、分子内の柔軟性を提供したり、コンジュゲート化部分間の分子内距離を調整したりして、生物活性を保持するのに役立ち得る。スペーサーアームは、例えば、プロリン等のスペーサーアミノ酸を含むポリペプチド部分の形態であってよい。或いは、スペーサーアームは、「l o n g - c h a i n S P D P」(P i e r c e C h e m . C o . , R o c k f o r d , I L . , カタログ番号2 1 6 5 1 H)等における架橋試薬の一部であってよい。

#### 【0074】

更に、上に開示したキメラペプチドのうちの1つの変異体、断片、又は誘導体を本明細書で使用してよい。断片及び変異体に関しては、一般的に、J N K 阻害剤配列について上に記載した定義を参照する。

10

20

30

40

50

## 【0075】

具体的には、本発明の状況において、「キメラペプチドの変異体」は、好ましくは、配列番号9～12及び23～32に係る配列のいずれかに由来する配列であり、本明細書で使用する配列番号9～12及び23～32に係るキメラペプチドのアミノ酸変化を含むキメラ変異体である。このような変化は、配列番号9～12及び23～32に係るアミノ酸のうちの典型的に1個～20個、好ましくは1個～10個、より好ましくは1個～5個の置換、付加、及び／又は欠失（断片を導く）を含み、本明細書で使用する変化したキメラペプチドは、配列番号9～12及び23～32に係る配列のいずれかと少なくとも約30%、約50%、約70%、約80%、又は約95%、約98%、又は更には約99%の配列同一性を示す。好ましくは、これら変異体は、本明細書で使用するキメラペプチドに含有されるとき第1及び第2のドメインの生物活性、即ち、上に開示した第1のドメインの輸送活性、並びにJNKに結合する及び／又は少なくとも1つの活性化転写因子の活性化を阻害する第2のドメインの活性を保持している。10

## 【0076】

したがって、本明細書で使用するキメラペプチドは、上に開示したキメラペプチド、特に、配列番号9～12及び23～32のいずれかに係るキメラペプチド配列の断片も含む。したがって、本発明の状況では、「キメラペプチドの断片」は、好ましくは、配列番号9～12及び23～32に係る配列のいずれかに由来する配列であり、前記断片は、配列番号9～12及び23～32のいずれかの少なくとも4個の連続するアミノ酸を含む。この断片は、好ましくは、これら配列のいずれかに由来するエピトープを特異的に認識し、細胞、核、又は更に好ましい位置に前記配列を輸送するのに十分な長さを含む。更により好ましくは、前記断片は、配列番号9～12及び23～32のいずれかの4個～18個、4個～15個、又は最も好ましくは4個～10個の連続アミノ酸を含む。本明細書で使用するキメラペプチドの断片は、更に、配列番号99～12及び23～32のいずれかに係る配列のいずれかと少なくとも約30%、約50%、約70%、約80%、又は約95%、約98%、又は更には約99%の配列同一性を共有する配列として定義することができる。20

## 【0077】

最終的に、また、本明細書で使用するキメラペプチドは、上に開示したキメラペプチド、特に配列番号9～12及び23～32のいずれかに係るキメラペプチド配列の誘導体を含む。30

## 【0078】

本発明の特に好ましい使用は、炎症性眼疾患を治療するため、特にブドウ膜炎を治療するため、例えば、前部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、又は汎ブドウ膜炎を治療するための、配列番号11のアミノ酸配列からなるか又は前記アミノ酸配列を含む、或いは配列番号11と少なくとも約30%、約50%、約70%、約80%、約90%、約92%、又は更には約95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列からなるか又は前記アミノ酸配列を含むJNK阻害剤（ポリ）ペプチドの使用である。配列番号11のアミノ酸配列からなるか又は前記アミノ酸配列を含む、或いは配列番号11と少なくとも約30%、約50%、約70%、約80%、約90%、約92%、又は更には約95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列からなるか又は前記アミノ酸配列を含むJNK阻害剤（ポリ）ペプチドは、例えば、目に局所的に又は全身に投与してよい。しかし、本出願は、炎症性眼疾患を治療するため、特にブドウ膜炎を治療するため、例えば、前部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、又は汎ブドウ膜炎を治療するための、他のJNK阻害剤キメラ（ポリ）ペプチドの使用、即ち、用いられるJNK阻害剤（ポリ）ペプチドが、配列番号11のアミノ酸配列からなるものではないか又は前記アミノ酸配列を含むものではない場合の使用も明確に意図する。40

## 【0079】

更に、ブドウ膜及び／又は網膜の炎症以外の炎症性眼疾患を治療するため、例えば、ブドウ膜炎及び／又は網膜炎ではない炎症性眼疾患を治療するための、本発明のJNK阻害50

剤(ポリ)ペプチド、特に、配列番号11のアミノ酸配列からなるか又は前記アミノ酸配列を含む、或いは配列番号11と少なくとも約30%、約50%、約70%、約80%、約90%、約92%、又は更には約95%の配列同一性を共有するアミノ酸配列からなるか又は前記アミノ酸配列を含むJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの使用も明らかに意図する。更に、本発明は、特に(非炎症性)網膜症の治療を意図するものではないことに留意しなければならない。

#### 【0080】

本発明は、更に、本明細書に定義する被験体における非慢性又は慢性の炎症性眼疾患を治療する医薬組成物を調製するための、上に定義したJNK阻害剤、全て上に定義したキメラペプチド又はその断片、変異体、若しくは誘導体をコードする核酸配列の使用に言及する。本明細書で使用するJNK阻害剤配列をコードする好ましい適切な核酸は、典型的に、ヒトIB1核酸(GenBankアクセション番号AF074091)、ラットIB1核酸(GenBankアクセション番号AF108959)、又はヒトIB2(GenBankアクセション番号AF218778)から、或いは上に定義した配列のいずれか、即ち配列番号1~26に係る任意の配列をコードする任意の核酸配列から選択される。

10

#### 【0081】

本明細書で使用するJNK阻害剤配列又は本明細書で使用するキメラペプチドをコードする核酸は、(例えば、前記配列の3' - 末端及び5' - 末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを用いるPCR增幅によって及び/又は所与の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチド配列を用いてcDNAライブラリ若しくはゲノミックライブラリからクローニングすることによって)当技術分野において公知の任意の方法によって得ることができる。

20

#### 【0082】

更に、上に定義した(ネイティブな)JNK阻害剤配列又はキメラペプチドをコードする適切な鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸配列も同様に本明細書に開示される。好ましくは、かかる核酸配列は、特異的にハイブリダイズするのに十分な長さを有する少なくとも6個の(連続する)核酸を含む。より好ましくは、かかる核酸配列は、6個~38個、更により好ましくは6個~30個、最も好ましくは6個~20個又は6個~10個の(連続する)核酸を含む。

30

#### 【0083】

「ストリンジエントな条件」は、配列依存性であり、異なる状況下においては異なる。一般的に、ストリンジエントな条件は、所定のイオン強度及びpHで、特定の配列の熱融解点(TM)よりも約5℃低くなるように選択してよい。TMは、標的配列のうちの50%が、完全に一致するプローブに(所定のイオン強度及びpH下で)ハイブリダイズする温度である。典型的に、ストリンジエントな条件は、塩濃度がpH7で少なくとも約0.02モル濃度であり且つ温度が少なくとも約60℃である条件である。(特に、塩基組成及び相補鎖のサイズを含む)他の要因がハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える場合があるので、有機溶媒の存在及び塩基の不一致の程度、パラメータの組み合わせが、任意の1つの絶対的な尺度よりも重要である。

40

#### 【0084】

「高ストリンジエンシー条件」は、以下を含んでよい。例えば、工程1:DNAを含有するフィルターを、6×SSC、50mMのトリス-HCl(pH7.5)、1mMのEDTA、0.02%のPVP、0.02%のFicoll、0.02%のBSA、及び500μg/mLの変性サケ精子DNAを含むバッファ中で65℃にて8時間~一晩前処理する。工程2:100mg/mLの変性サケ精子DNA及び $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ cpmの<sup>32</sup>P-標識プローブを添加した上記プレハイブリダイゼーション混合物中で、フィルターを65℃にて48時間ハイブリダイズさせる。工程3:2×SSC、0.01%のPVP、0.01%のFicoll、及び0.01%のBSAを含有する溶液中で、フィルターを37℃にて1時間洗浄する。続いて、45分間50℃にて0.1×SSCで洗

50

浄する。工程4：フィルターの放射線写真を撮影する。用いることができる他の高ストリンジエンシー条件は、当技術分野において周知である（例えば、Ausubel et al., (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY；及びKriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, a Laboratory Manual, Stockton Press, NYを参照されたい）。

#### 【0085】

「中ストリンジエンシー条件」は、以下を含んでよい。工程1：DNAを含有するフィルターを、 $6 \times$  SSC、 $5 \times$  デンハート溶液、0.5%のSDS、及び $100\text{mg}/\text{mL}$ の変性サケ精子DNAを含有する溶液中で55にて6時間前処理する。工程2： $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6 \text{ cpm}$ の $^{32}\text{P}$ -標識プローブを添加した同一の溶液中で55にて18時間～20時間フィルターをハイブリダイズさせる。工程3：フィルターを、 $2 \times$  SSC、0.1%のSDSを含有する溶液中で1時間37にて洗浄し、次いで、 $1 \times$  SSC及び0.1%のSDSを含有する溶液中で60にて30分間2回洗浄する。工程4：フィルターを吸い取り乾燥させ、放射線写真を撮影する。用いることができる他の中ストリンジエンシーは、当技術分野において周知である（例えば、Ausubel et al., (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY；及びKriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, a Laboratory Manual, Stockton Press, NYを参照されたい）。

#### 【0086】

最後に、「低ストリンジエンシー条件」は、以下を含んでよい。工程1：DNAを含有するフィルターを、35%ホルムアミド、 $5 \times$  SSC、 $50\text{mM}$ のトリス-HCl(pH 7.5)、 $5\text{mM}$ のEDTA、0.1%のPVP、0.1%のFicoll、1%のBSA、及び $500\mu\text{g}/\text{mL}$ の変性サケ精子DNAを含有する溶液中で40にて6時間前処理する。工程2：0.2%のPVP、0.02%のFicoll、0.2%のBSA、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のサケ精子DNA、10% (wt/vol) 硫酸デキストラン、及び $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6 \text{ cpm}$ の $^{32}\text{P}$ -標識プローブを添加した同一の溶液中で40にて18時間～20時間フィルターをハイブリダイズさせる。工程3： $2 \times$  SSC、 $25\text{mM}$ のトリス-HCl(pH 7.4)、 $5\text{mM}$ のEDTA、及び0.1%のSDSを含有する溶液中で55にて1.5時間フィルターを洗浄する。洗浄溶液を、新たな溶液と交換し、60で更に1.5時間インキュベートする。工程4：フィルターを吸い取り乾燥させ、放射線写真を撮影する。必要に応じて、フィルターを65～68で3回洗浄し、再度撮影する。（例えば、異種間ハイブリダイゼーションのために使用するとき）用いることができる他の低ストリンジエンシー条件は、当技術分野において周知である。例えば、Ausubel et al., (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, NY；及びKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照されたい。

#### 【0087】

本発明に係る上に定義した核酸配列を用いて、分析、特性評価又は治療用途のためにペプチド、即ち、本明細書で使用するJNK阻害剤配列又は本明細書で使用するキメラペプチドを発現させたり；（構成的に、又は組織の分化若しくは発生の特定の段階で、又は疾患状態において）対応する（本明細書で使用する）ペプチドが優先的に発現する組織のマーカーとして本発明に係る上に定義した核酸配列を用いたりすることができる。これら核酸の他の用途としては、例えば、核酸のゲル電気泳動に基づく分析における分子量マーカーが挙げられる。

## 【0088】

本発明の更なる実施形態によれば、発現ベクターは、上に定義した1以上のJNK阻害剤配列及び／又はキメラペプチドを組換え発現させる上記目的のために用いることができる。用語「発現ベクター」は、本明細書で使用するとき、二本鎖又は一本鎖である環状又は直鎖状のDNA又はRNAを意味する。前記発現ベクターは、ホスト細胞又は単細胞若しくは多細胞のホスト生物に移行する上に定義した少なくとも1つの核酸を更に含む。本明細書で使用する発現ベクターは、好ましくは、本明細書で使用するJNK阻害剤配列、又はその断片若しくは変異体、或いは本明細書で使用するキメラペプチド、又はその断片若しくは変異体をコードする上に定義した核酸を含む。更に、本発明に係る発現ベクターは、好ましくは、インスレータ、境界エレメント、LCR等（例えば、Blackwood and Kadonaga (1998), Science 281, 61-63に記載されている）又はマトリクス／スカフォールド取り付け領域（例えば、Li, Harju and Peterson, (1999), Trends Genet. 15, 403-408に記載されている）等の、ホスト細胞に挿入されたポリヌクレオチドの発現を駆動するウイルス、細菌、植物、哺乳類、及び他の真核生物起源に由来するエンハンサー／プロモータ等の様々な制御エレメントを含む、発現を支持するための適切なエレメントを含む。幾つかの実施形態では、制御エレメントは、異種である（即ち、ネイティブな遺伝子プロモータではない）。或いは、必要な転写及び翻訳のシグナルは、遺伝子及び／又はその隣接領域のネイティブなプロモータによって供給されてもよい。

## 【0089】

用語「プロモータ」は、本明細書で使用するとき、上に定義した1以上の核酸配列の転写を制御する機能を有し、且つ相互作用してプロモータ機能を制御するDNA依存性RNAポリメラーゼの結合部位及び他のDNA配列の存在によって構造的に同定されるDNAの領域を指す。プロモータの機能的発現促進断片は、プロモータとしての活性を保持している短縮型又は切断型のプロモータ配列である。プロモータ活性は、当技術分野において公知である任意のアッセイによって測定することができる（例えば、Wood, de Wet, Dewji, and DeLuca, (1984), Biochem Biophys. Res. Commun. 124, 592-596; Seliger and McElroy, (1960), Arch. Biochem. Biophys. 88, 136-141を参照されたい）、又はPromega（登録商標）から市販されている。

## 【0090】

本明細書で定義する発現ベクターで用いられる「エンハンサー領域」は、典型的に、1以上の遺伝子の転写を増加させる機能を有するDNAの領域を指す。より具体的には、用語「エンハンサー」は、本明細書で使用するとき、発現する遺伝子に対する位置及び配向に関わらず、遺伝子の発現を強化、増加、改善、又は回復させるDNA制御エレメントであり、1超のプロモータの発現を強化、増加、改善、又は回復させることができる。

## 【0091】

本明細書で定義する発現ベクターで用いられるプロモータ／エンハンサー配列は、植物、動物、昆虫、又は真菌の制御配列を利用することができる。例えば、酵母及び他の真菌に由来するプロモータ／エンハンサーエレメントを用いることができる（例えば、GAL4プロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼプロモータ、ホスホグリセロールキナーゼプロモータ、アルカリホスファターゼプロモータ）。これに代えて又はこれに加えて、動物の転写制御領域、例えば、(i) 脾臓の細胞において活性であるインスリン遺伝子制御領域（例えば、Hanahan, et al., 1985. Nature 315: 115-122を参照されたい）；(ii) リンパ球細胞において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域（例えば、Grosschedl, et al., 1984, Cell 38: 647-658を参照されたい）；(iii) 肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域（例えば、Pinckert, et al., 1987. Genes and Dev 1: 268-276を参照されたい）；(iv) 脳乏突起膠細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子（例えば、Readhead, et al.

, 1987, Cell 48: 703 - 712 を参照されたい) ; 及び( v ) 視床下部において活性であるゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域(例えば、Mason, et al., 1986, Science 234: 1372 - 1378 を参照されたい)等を含んでもよい。

#### 【0092】

更に、本明細書で定義する発現ベクターは、増幅マーカーを含んでいてもよい。この増幅マーカーは、例えば、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、多剤耐性遺伝子(MDR)、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)、及びN-(ホスホンアセチル)-L-アスパラギン酸耐性(CAD)からなる群より選択してよい。

10

#### 【0093】

本発明に適した例示的な発現ベクター又はその誘導体としては、具体的に、例えば、ヒト又は動物のウイルス(例えば、ワクシニアウイルス又はアデノウイルス)；昆虫ウイルス(例えば、バキュロウイルス)；酵母ベクター；バクテリオファージベクター(例えば、ラムダファージ)；プラスミドベクター、及びコスミドベクターが挙げられる。

#### 【0094】

本発明は、更に、上に定義した核酸のペプチドコーディング配列を発現させることができる様々なホスト-ベクター系を利用することができる。これらとしては、(i)ワクシニアウイルス、アデノウイルス等に感染している哺乳類細胞系；(ii)バキュロウイルス等に感染している昆虫細胞系；(iii)酵母ベクターを含有する酵母；又は(iv)バクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、又はコスミドDNAで形質転換された細菌が挙げられるが、これらに限定されない。利用するホスト-ベクター系に応じて、多数の適切な転写エレメント及び翻訳エレメントのいずれか1つを使用してよい。

20

#### 【0095】

好ましくは、対象となる挿入配列の発現を調節するか、又は望ましい特定の様式で前記配列によってコードされている発現したペプチドを修飾若しくは加工する、かかるホスト-ベクター系に適したホスト細胞株を選択してよい。更に、特定のプロモータによる発現は、選択されるホスト株において特定のインデューサーの存在下で強化されるので、遺伝的に変更されているペプチドの発現の制御を促進することができる。更に、異なるホスト細胞は、発現するペプチドの翻訳及び翻訳後のプロセシング及び修飾(例えば、グリコシリ化、リン酸化等)に特徴的且つ特異的な機序を有する。したがって、適切な細胞株又はホスト系は、外来ペプチドの望ましい修飾及びプロセシングが確実に達成されるように選択してよい。例えば、細胞系においてペプチドを発現させると非グリコシリ化コアペプチドを産生することができ、一方、哺乳類細胞において発現させると、異種ペプチドの「ネイティブな」グリコシリ化が保証される。

30

#### 【0096】

本発明は、更に、本明細書で定義する非慢性又は慢性の炎症性眼疾患を治療する医薬組成物を調製するための、上記JNK阻害剤配列及び/又はキメラペプチドに対する抗体の使用を提供する。更に、本発明に係るJNK阻害剤配列又はかかる阻害剤配列を含有するキメラペプチドに特異的な抗体を産生するための効率的な手段についても記載し、この目的のために利用することができる。

40

#### 【0097】

本発明によれば、本明細書で定義するJNK阻害剤配列及び/又はキメラペプチド、並びにこれらの断片、変異体、若しくは誘導体は、これらペプチド成分に免疫特異的に結合する抗体を産生させる免疫原として利用することができる。かかる抗体としては、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fab断片、及びFab発現ライブリが挙げられる。特定の実施形態では、本発明は、上に定義したキメラペプチド又はJNK阻害剤配列に対する抗体を提供する。当技術分野において公知である様々な手順を、これら抗体を産生させるために用いることができる。

#### 【0098】

50

一例として、上に定義した任意のキメラペプチド又はJNK阻害剤配列を注射することによってポリクローナル抗体を産生させるために、様々なホスト動物を免疫してよい。フロイント(完全及び不完全)アジュvant、ミネラルゲル(例えば、水酸化アルミニウム)、表面活性物質(例えば、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルション、ジニトロフェノール等)、CpGポリマー、ブルロニック、並びにカルメット-ゲラン桿菌及びコリネバクテリウム・パルバム等のヒトアジュvantが挙げられるが、これらに限定されない様々なアジュvantを用いて、免疫応答を増加させることができる。

#### 【0099】

上に定義したキメラペプチド又はJNK阻害剤配列に対するモノクローナル抗体を調製するするために、連続細胞株培養によって抗体分子を産生する任意の技術を利用してよい。かかる技術としては、ハイブリドーマ技術(Kohler and Milstein, 1975. Nature 256: 495 - 497を参照されたい); トリオーマ技術; ヒトB-細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor, et al., 1983, Immunol Today 4: 72を参照されたい); 及びヒトモノクローナル抗体を産生するEBVハイブリドーマ技術(Cole, et al., 1985. In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において利用することができ、ヒトハイブリドーマの使用(Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026 - 2030を参照されたい)又はインビトロにおけるエピスタインバーウイルスによるヒトB-細胞の形質転換(Cole, et al., 1985. In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96を参照されたい)によって産生することができる。

#### 【0100】

本発明によれば、本発明に記載するJNK阻害剤配列及び/又はキメラペプチドに対して特異的な单鎖抗体を産生させるために技術を適応させることができ(例えば、米国特許第4,946,778号)。更に、これらJNK阻害剤配列及び/又はキメラペプチドに対して望ましい特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速且つ有効な同定を可能にするFab発現ライブラリ(例えば、Huse et al., 1989. Science 246: 1275 - 1281を参照されたい)を構築するために方法を適応させることができる。非ヒト抗体は、当技術分野において周知の技術によって「ヒト化」することができる(例えば、米国特許第5,225,539号を参照されたい)。本明細書で定義するJNK阻害剤配列及び/又はキメラペプチドに対するイディオタイプを含有する抗体断片は、例えば、以下を含む当技術分野において公知の技術によって産生することができる:(i)抗体分子のペプシン消化によって生成されるF(ab')<sub>2</sub>断片;(ii)F(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成されるFab断片;(iii)パパイン及び還元剤で抗体分子を処理することによって生成されるFab断片;及び(iv)Fv断片。

#### 【0101】

本発明の1つの実施形態では、抗体をスクリーニングするために利用することができ且つ望ましい特異性を有する方法としては、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及び当技術分野において公知である他の免疫学的に媒介される技術が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書で定義するJNK阻害剤配列及び/又はキメラペプチドの特定のエピトープ(例えば、典型的に、5アミノ酸~20アミノ酸、好ましくは、8アミノ酸~18アミノ酸、最も好ましくは8アミノ酸~11アミノ酸の長さを含む断片)に対して特異的な抗体の選択は、かかるエピトープを有する本明細書で定義するJNK阻害剤配列及び/又はキメラペプチドの断片に結合するハイブリドーマを作製することによって容易になる。上に定義したエピトープに対して特異的なこれら抗体も、本

10

20

30

40

50

明細書において提供する。

【0102】

本明細書で定義する抗体は、例えば、適切な生理学的サンプル内のペプチドレベルの測定において使用するため、診断方法において使用するため、又はペプチドのイメージングにおいて使用するため等、JNK阻害剤配列（及び／又は同様に、上に定義したキメラペプチド）の局在及び／又は定量に関する当技術分野における公知の方法において使用することができる。

【0103】

本発明に従って定義するJNK阻害剤配列、キメラペプチド、核酸、ベクター、ホスト細胞、及び／又は抗体は、医薬組成物に配合してもよく、前記医薬組成物は、本明細書で定義する疾患のいずれかの予防又は治療、特に、本明細書で定義する非慢性又は慢性の炎症性眼疾患の予防又は治療に適用することができる。典型的に、本発明に従って用いられるかかる医薬組成物は、活性成分として、例えば、以下の(i)～(iv)の少なくともいいずれかを含む：(i)上に定義したJNK阻害剤配列、キメラペプチド、及びこれらの変異体、断片、又は誘導体、具体的には、配列番号1～4及び13～20及び33～100の配列のいずれかに係るJNK阻害剤配列、配列番号9～12及び23～32の配列のいずれかに係るキメラペプチド、配列番号5～8及び21～22のいずれかに係る輸送配列を含む配列番号1～4及び13～20及び33～100の配列のいずれかに係るJNK阻害剤配列、又は上記定義内のこれらの変異体若しくは断片のうちの任意の1以上；(ii)上に定義したJNK阻害剤配列、キメラペプチド、及びこれらの変異体又は断片の少なくともいいずれかをコードする核酸；(iii)上に定義したJNK阻害剤配列、キメラペプチド、及びこれらの変異体又は誘導体のうちの任意の1以上を含む細胞；並びに(iv)上に定義したJNK阻害剤配列、キメラペプチド、及びこれらの変異体又は誘導体をコードするベクター及び核酸の少なくともいいずれかでトランスフェクトされた細胞を含む。

【0104】

好ましい実施形態によれば、本発明に従って用いられるかかる医薬組成物は、典型的に、安全且つ有効な量の上に定義した成分、好ましくは、配列番号1～4及び13～20及び33～100の配列のいずれかに係る少なくとも1つのJNK阻害剤配列、配列番号9～12及び23～32の配列のいずれかに係る少なくとも1つのキメラペプチド、並びに配列番号5～8及び21～22のいずれかに係る輸送配列を含む配列番号1～4及び13～20及び33～100の配列のいずれかに係る少なくとも1つのJNK阻害剤配列のうちの少なくともいいずれか、或いは、上記定義内のこれらの変異体若しくは断片、或いは、これらをコードする少なくとも1つの核酸、或いは、上に定義した少なくとも1つのベクター、ホスト細胞又は抗体を含む。

【0105】

被験体に投与される医薬組成物におけるJNK阻害剤配列及びキメラペプチドのそれぞれの量は、限定するものではないが、非常に低用量であってよい。したがって、用量は、DTS-108等の当技術分野において公知であるペプチド薬よりも遙かに少なくてよい(Florence Meyer-Losic et al., Clin Cancer Res., 2008, 2145-53)。これは、例えば、副反応の可能性の低減及びコストの低下等、幾つかの優れた側面を有する。

【0106】

好ましくは、(体重1kg当たりの)用量は、10mmol/kg以下、好ましくは1mmol/kg以下、より好ましくは100μmol/kg以下、更により好ましくは10μmol/kg以下、更により好ましくは1μmol/kg以下、更により好ましくは100nmol/kg以下、最も好ましくは50nmol/kg以下である。

【0107】

したがって、用量範囲は、好ましくは、約1pmol/kg～約1mmol/kg、約10pmol/kg～約0.1mmol/kg、約10pmol/kg～約0.01mm

10

20

30

40

50

0.1 / kg、約 50 pmol / kg ~ 約 1 μmol / kg、約 100 pmol / kg ~ 約 500 nmol / kg、約 200 pmol / kg ~ 約 300 nmol / kg、約 300 pmol / kg ~ 約 100 nmol / kg、約 500 pmol / kg ~ 約 50 nmol / kg、約 750 pmol / kg ~ 約 30 nmol / kg、約 250 pmol / kg ~ 約 5 nmol / kg、約 1 nmol / kg ~ 約 10 nmol / kg、又は前記値のうちの任意の 2 つの組み合わせであつてよい。

#### 【0108】

この状況では、治療の処方、例えば、上記医薬組成物を用いるときの用量に関する指示等は、典型的に、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、典型的に、治療される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法、及び開業医に公知の他の要因が考慮される。上述の技術及びプロトコールの例は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th edition, Osol, A. (ed.), 1980 に見出すことができる。したがって、本発明に従って用いられる医薬組成物の成分の上に定義した「安全且つ有効な量」は、本発明に定義する非慢性又は慢性の炎症性眼疾患の正の調節を著しく誘導するのに十分である、これら成分のそれぞれ又は全ての量を意味する。しかし、同時に、「安全且つ有効な量」は、重篤な副作用を避ける、即ち、利益とリスクとの間の合理的な関係を可能にするのに十分な程度少ない。これら限度の決定は、典型的に、合理的な医学的判断の範囲内である。かかる成分の「安全且つ有効な量」は、主治医の知識及び経験の範囲内で、治療される具体的な状態、また、治療される患者の年齢及び身体状態、状態の重篤度、治療の期間、併用療法の性質、用いられる具体的な薬学的に許容できる担体の性質、及び類似の要因に関連して変動する。本発明に係る医薬組成物は、ヒトに対して、また獣医学的目的のために、本発明に従って用いることができる。

10

20

#### 【0109】

本発明に従って使用される医薬組成物は、これら物質のうちの 1 つに加えて、(適合性の) 薬学的に許容できる担体、賦形剤、バッファ、安定剤、又は当業者に周知である他の材料を更に含んでいてもよい。

#### 【0110】

この状況では、「(適合性の) 薬学的に許容できる担体」という表現は、好ましくは、組成物の液体又は非液体の基剤を含む。用語「適合性」とは、本明細書で使用する医薬組成物の成分が、通常の使用条件下で組成物の薬学的有効性を実質的に低下させる相互作用が生じないように、上に定義した薬学的活性成分と 1 つの別の成分とを混合できることを意味する。無論、薬学的に許容できる担体は、治療されるヒトへの投与に適したものにするために、十分に高い純度及び十分に低い毒性を有していなければならない。

30

#### 【0111】

本明細書で使用される医薬組成物が液体形態で提供される場合、薬学的に許容できる担体は、典型的に、1 以上の(適合性の) 薬学的に許容できる液体担体を含む。組成物は、(適合性の) 薬学的に許容できる液体担体として、例えば、発熱物質不含水; 等張生理食塩水又は緩衝(水)溶液、例えば、リン酸、クエン酸等の緩衝溶液; 植物油、例えば、ラツカセイ油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、及びカカオ属由来の油; ポリオール、例えば、ポリプロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコール; アルギン酸等を含んでいてもよい。特に、本明細書で使用する医薬組成物を注射する場合、バッファ、好ましくは、水性バッファを用いてよい。

40

#### 【0112】

本明細書で使用する医薬組成物が固体形態で提供される場合、薬学的に許容できる担体は、典型的に、1 以上の(適合性の) 薬学的に許容できる固体担体を含む。組成物は、(適合性の) 薬学的に許容できる固体担体として、例えば、ヒトへの投与に適した 1 以上の適合性の固体又は液体の充填剤又は希釈剤を含んでいてもよく、或いは、ヒトへの投与に適した封入化合物を同様に用いてもよい。かかる(適合性の) 薬学的に許容できる固体担体の幾つかの例は、例えば、糖類、例えば、ラクトース、グルコース、及びスクロース;

50

デンプン、例えば、コーンスターク又はバレイショデンプン；セルロース及びその誘導体、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、酢酸セルロース；粉末化トラガカント；モルト；ゼラチン；タロー；固体滑剤、例えば、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム；硫酸カルシウム等である。

#### 【0113】

(適合性の)薬学的に許容できる担体又は他の材料の正確な性質は、投与経路に依存し得る。したがって、(適合性の)薬学的に許容できる担体は、原則として、本発明に従って用いられる医薬組成物の投与方法によって選択することができる。本発明に従って用いられる医薬組成物は、例えば、全身に投与してよい。投与経路としては、例えば、(例えば、注射を介する)非経口経路、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、又は経皮経路等；経腸経路、例えば、経口又は直腸内経路等；局所経路、例えば、経鼻又は鼻腔内経路等；或いは、他の経路、例えば、表皮経路又は貼付送達が挙げられる。また、眼への局所投与、例えば、硝子体内投与、結膜下投与、及び/又は点眼が特に好ましい。

10

#### 【0114】

用いられる医薬組成物の適切な量は、動物モデルを用いたルーチンな実験によって決定することができる。かかるモデルとしては、限定するものではないが、ウサギ、ヒツジ、マウス、ラット、イヌ、及び非ヒト靈長類のモデルが挙げられる。注射に好ましい単位剤形としては、水、生理学的食塩水、又はこれらの混合物の滅菌溶液が挙げられる。かかる溶液のpHは、約7.4に調整すべきである。注射に適した担体としては、ヒドロゲル、制御放出又は遅延放出用の装置、ポリ乳酸、及びコラーゲンマトリクスが挙げられる。局所投与に適した薬学的に許容できる担体としては、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤等で使用するのに適した担体が挙げられる。化合物が経口投与される場合、錠剤、カプセル剤等が好ましい単位剤形である。経口投与に用いることができる単位剤形を調製するための薬学的に許容できる担体は、先行技術において周知である。その選択は、本発明の目的にとって重要ではない味、コスト、及び保存性等の副次的な考慮事項に依存し、当業者であれば容易に行うことができる。

20

#### 【0115】

経口投与用の医薬組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤、又は液剤の形態であってよい。錠剤は、ゼラチン等の上に定義した固体担体と任意で佐剤とを含んでよい。経口投与用の液体医薬組成物は、一般的に、水、石油、動物油、植物油、鉱油、又は合成油等の上に定義した液体担体を含んでよい。生理学的食塩水、デキストロース又は他の糖類の溶液、或いはエチレングリコール、プロピレングリコール、又はポリエチレングリコール等のグリコール類を含んでいてもよい。

30

#### 【0116】

静脈内、皮膚、若しくは皮下への注射、又は罹患部位への注射の場合、活性成分は、発熱物質を含まない非経口的に許容できる水溶液の形態であり、且つ適切なpH、等張性、及び安定性を有する。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、乳酸加リンゲル注射剤等の等張ビヒクルを用いて適切な溶液を調製することができる。必要に応じて、保存剤、安定剤、バッファ、抗酸化剤、及び/又は他の添加剤を含んでいてよい。個体に投与されるのがポリペプチド、ペプチド、又は核酸分子であろうと、本発明に係る他の薬学的に有用な化合物であろうと、個体に対する効果を示すのに十分な「予防上有効な量」又は「治療上有効な量」(場合による)を投与することが好ましい。投与される実際の量、並びに投与の速度及び時間経過は、治療される疾患の性質及び重篤度に依存する。

40

#### 【0117】

本明細書に定義する疾患の予防及び/又は治療は、典型的に、上に定義した医薬組成物の投与を含む。用語「調節する」は、上記疾患のいずれかにおいてJNKが過剰発現している場合、JNKの発現を抑制することを含む。また、限定するものではないが、例えば、細胞内における天然のc-jun、ATF2、及びNFKB1結合部位の競合阻害剤として、配列番号1~4及び13~20及び33~100の配列のいずれかに係る少なくと

50

も 1 つの J N K 阻害剤配列、配列番号 9 ~ 1 2 及び 2 3 ~ 3 2 の配列のいずれかに係る少なくとも 1 つのキメラペプチド、並びに配列番号 5 ~ 8 及び 2 1 ~ 2 2 のいずれかに係る輸送配列を含む配列番号 1 ~ 4 及び 1 3 ~ 2 0 及び 3 3 ~ 1 0 0 の配列のいずれかに係る少なくとも 1 つの J N K 阻害剤配列の少なくともいずれか、或いは上記定義の範囲内のこれらの変異体又は断片を用いることによって、上記疾患のいずれかにおける c - j u n 、 A T F 2 、又は N F A T 4 のリン酸化を抑制することを含む。また、用語「調節する」は、例えば、 c - j u n 、 A F T 2 、及び c - f o s で構成される A P - 1 複合体等、限定するものではないが、 c - j u n 、 A T F 2 、又は N F A T 4 及びこれらの関連するパートナーで構成される転写因子のヘテロ複合体及びホモ複合体の抑制を含む。非慢性又は慢性の炎症性眼疾患が J N K の過剰発現に関連している場合、かかる抑制性 J N K 阻害剤配列を細胞に導入してよい。場合によって、例えば、「調節する」は、 I B ペプチドと J N K との結合をブロックする I B ペプチド特異的抗体の使用によって J N K の発現を増加させて、 I B 関連ペプチドによる J N K 阻害を防ぐことを含んでよい。  
10

#### 【 0 1 1 8 】

上に開示した医薬組成物による被験体の予防及び / 又は治療は、典型的に、（インビボで）（「治療上有効な」）量の前記医薬組成物を被験体に投与することによって行ってよく、前記被験体は、例えば、ヒト、靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、又はブタ等の任意の哺乳類等であってよい。用語「治療上有効」とは、医薬組成物の活性成分が、非慢性又は慢性の炎症性眼疾患を寛解させるのに十分な量であることを意味する。  
20

#### 【 0 1 1 9 】

したがって、上に定義したペプチド、例えば、配列番号 1 ~ 4 及び 1 3 ~ 2 0 及び 3 3 ~ 1 0 0 の配列のいずれかに係る少なくとも 1 つの J N K 阻害剤配列、配列番号 9 ~ 1 2 及び 2 3 ~ 3 2 の配列のいずれかに係る少なくとも 1 つのキメラペプチド、並びに配列番号 5 ~ 8 及び 2 1 ~ 2 2 のいずれかに係る輸送配列を含む配列番号 1 ~ 4 及び 1 3 ~ 2 0 及び 3 3 ~ 1 0 0 の配列のいずれかに係る少なくとも 1 つの J N K 阻害剤配列の少なくともいずれか、或いは上記定義の範囲内のこれらの変異体若しくは断片を本発明の特定の実施形態で利用して、非慢性又は慢性の炎症性眼疾患を治療することができる。

#### 【 0 1 2 0 】

また、上に定義した、本発明の医薬組成物に含有されるペプチドは、核酸によってコードされていてもよい。これは、上記ペプチドが遺伝子治療の目的で投与される場合、特に有利である。この状況において、遺伝子治療は、上に定義した特定の核酸を被験体に投与することによって実施される治療を指し、例えば、前記核酸が L - アミノ酸のみを含み、上に定義した医薬組成物を用いることによって実施される治療が挙げられる。本発明のこの実施形態では、核酸は、前記核酸にコードされているペプチドを產生し、次いで、前記ペプチドは、疾患又は障害を調節する機能によって治療効果を發揮する。当技術分野において利用可能な遺伝子治療に関連する方法はいずれも、本発明の実施において用いることができる（例えば、 G o l d s p i e l , e t a l . , 1 9 9 3 . C l i n P h a r m 1 2 : 4 8 8 - 5 0 5 を参照されたい）。  
30

#### 【 0 1 2 1 】

好ましい実施形態では、上に定義した、遺伝子治療に用いられる核酸は、適切なホスト内の上に定義した I B 関連ペプチドのうちの任意の 1 以上をコード及び発現する発現ベクターの一部、即ち、配列番号 1 ~ 4 及び 1 3 ~ 2 0 及び 3 3 ~ 1 0 0 の配列のいずれかに係る J N K 阻害剤配列、配列番号 9 ~ 1 2 及び 2 3 ~ 3 2 の配列のいずれかに係るキメラペプチド、並びに配列番号 5 ~ 8 及び 2 1 ~ 2 2 のいずれかに係る輸送配列を含む配列番号 1 ~ 4 及び 1 3 ~ 2 0 及び 3 3 ~ 1 0 0 の配列のいずれかに係る J N K 阻害剤配列の少なくともいずれか、或いは上記定義の範囲内のこれらの変異体若しくは断片である。特定の実施形態では、かかる発現ベクターは、 J N K 阻害剤配列のコード領域に機能的に連結しているプロモータを有する。プロモータは、上記の通り定義され得、例えば、誘導性又は構成的、且つ任意で組織特異的なプロモータ等である。  
40  
50

## 【0122】

別の特定の実施形態では、上に定義した核酸分子は、遺伝子治療に用いられ、前記遺伝子治療では、上に定義した核酸分子（及びその任意の他の望ましい配列）のコード配列は、ゲノム内の望ましい部位で相同組換えを促進する領域に隣接して、これら核酸を染色体内で発現させる（例えば、Koller and Smithies, 1989. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8932 - 8935を参照されたい）。

## 【0123】

遺伝子治療のために、本発明に係る上に定義した核酸は、特に、上に定義した上述の非慢性又は慢性の炎症性眼疾患の状況において、直接（即ち、患者を直接前記核酸又は核酸含有ベクターに曝露する）又は間接的（即ち、先ずインビトロにおいて細胞を前記核酸で形質転換し、次いで、患者に移植する）に患者に送達してよい。これら2つのアプローチは、それぞれインビオ又はエキソビオにおける遺伝子治療として知られている。本発明の特定の実施形態では、核酸は、インビオで直接投与されて、そこで発現し、コードされている産物を產生する。これは、例えば以下を含む当技術分野において公知の多くの方法のいずれかによって行うことができる：適切な核酸発現ベクターの一部として核酸を構築し、それが細胞内に入るよう投与する（例えば、欠陥ウイルス若しくは弱毒化ウイルス、又は他のウイルスベクターを用いて注射することによって；米国特許第4,980,286号を参照されたい）；ネイキッドDNAを直接注射する；微粒子衝撃を用いる（例えば、「Gene Gun」；Biological, DuPont）；核酸を脂質でコーティングする；結合している細胞表面受容体／トランスフェクト剤を用いる；リポソーム、微粒子、又はマイクロカプセルに封入する；核に入ることが知られているペプチドに連結されている状態で投与する；或いは、受容体媒介性エンドサイトーシスを受けやすいリガンドに連結されている状態で投与する（例えば、Wu and Wu, 1987. J Biol Chem 262: 4429 - 4432を参照されたい）。これらを用いて、対象受容体を特異的に発現する細胞種を「標的」とすることができます。

## 【0124】

本発明の実施における遺伝子治療に対する更なるアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、ウイルス感染等の方法によって、上に定義した核酸をインビトロ組織培養物中の細胞に移行させることを含む。一般的に、移行の方法は、選択可能なマーカーを細胞に同時に移行させることを含む。次いで、移行した遺伝子を取り込み、発現している細胞の単離を促進するために、前記細胞を選択圧（例えば、抗生素質耐性）下に置く。次いで、これら細胞を患者に送達する。特定の実施形態では、得られる組換え細胞をインビオで投与する前に、当技術分野において公知の任意の方法によって核酸を細胞に導入する。前記方法としては、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、対象核酸配列を含有するウイルス又はバクテリオファージのベクター感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子移行、マイクロセル媒介性遺伝子移行、スフェロプラスト融合、及びレシピエント細胞に必須の発生上の機能及び生理学的機能が移行によって乱されないことが保証される類似の方法等が挙げられる。例えば、Loeffler and Behr, 1993. Meth Enzymol 217: 599 - 618を参照されたい。核酸が細胞において発現することができるように、選択される技術は、核酸を細胞に安定的に移行させなければならない。好ましくは、移行される核酸は、遺伝性であり、細胞後代によって発現可能である。

## 【0125】

本発明の好ましい実施形態では、得られる組換え細胞は、例えば、上皮細胞を（例えば、皮下）注射する、組換え皮膚細胞を皮膚グラフトとして患者に適用する、及び組換え血球（例えば、造血幹細胞又は始原細胞）を静脈内注射する等を含む当技術分野において公知である様々な方法によって患者に送達することができる。使用が想定される細胞の合計量は、所望の効果、患者の状態等に依存し、当業者であれば決定することができる。遺伝

10

20

30

40

50

子治療の目的で核酸を導入することができる細胞は、任意の望ましい利用可能な細胞種を含み、異種細胞、異型遺伝子細胞、同系細胞、又は自己細胞であつてよい。細胞種としては、上皮細胞、内皮細胞、角質細胞、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞、及び血液細胞等の分化細胞；又は様々な幹細胞若しくは始原細胞、特に、胚心筋細胞、肝幹細胞（国際公開第94/08598号）、神経幹細胞（*Stemple and Anderson, 1992, Cell 71: 973-985*）、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓等として得られる造血幹細胞又は始原細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、遺伝子治療に利用される細胞は、患者の自己細胞である。

## 【0126】

或いは及び／又は更に、本発明に記載の疾患を治療するために、ターゲティング療法を用いて、（標的）抗体又は細胞特異的リガンド等のターゲティング系を用いることによって、上に定義したJNK阻害剤配列、キメラペプチド、及び／又は核酸を、より具体的には特定の種類の細胞に送達することができる。ターゲティングのために用いられる抗体は、典型的に、以下に定義する疾患のいずれかに関連する細胞の細胞表面タンパク質に対して特異的である。一例として、これら抗体は、例えば、MHCクラスII DRタンパク質、CD18 (LFA-1鎖)、CD45RO、CD40、又はBgp95等のB細胞結合表面タンパク質、或いは、例えば、CD2、CD2、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD10、CD13、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD39、CD4、CD43、CD45、CD52、CD56、CD68、CD71、CD138等から選択される細胞表面タンパク質に対する抗体であつてよい。ターゲティングコンストラクトは、典型的に、本発明に係る本明細書に定義するJNK阻害剤配列、キメラペプチド、及び核酸を細胞表面タンパク質に対して特異的な抗体に共有結合させることによって、又は細胞特異的リガンドに結合させることによって調製することができる。タンパク質は、例えば、かかる抗体に結合してもよく、ペプチド結合又は化学カップリング、架橋等によって前記抗体に結合してもよい。次いで、以下に定義する投与経路のいずれか、例えば、腹腔内、鼻内、静脈内、経口、及び貼付送達経路によって、薬学的に有効な量のターゲティングコンストラクトを患者に投与することによって、ターゲティング療法を実施することができる。好ましくは、上に定義した標的抗体又は細胞特異的リガンドに結合している本発明に係る本明細書に定義するJNK阻害剤配列、キメラペプチド、又は核酸は、例えば、共有結合の加水分解により、ペプチダーゼにより、又は任意の他の適切な方法により、インビトロ又はインビボで放出させることができる。或いは、本明細書に係る本明細書に定義するJNK阻害剤配列、キメラペプチド、又は核酸が小細胞特異的リガンドに結合している場合、リガンドを放出させなくてもよい。細胞表面に存在する場合、キメラペプチドは、その輸送配列が活性化されたときに細胞に入ることができる。ターゲティングは、例えば、本発明に係る本明細書に定義するJNK阻害剤配列、キメラペプチド、及び核酸が、許容できない程毒性である場合、又は他の理由で必要な投与量が多すぎる場合等、様々な理由で望ましい場合がある。

## 【0127】

本発明に係る本明細書に定義するJNK阻害剤配列及び／又はキメラペプチドは、直接投与する代わりに、細胞に導入されたコード遺伝子から、例えば、投与されるウイルスベクターから発現させることによって標的細胞で產生させてもよい。ウイルスベクターは、典型的に、本発明に係る本明細書に定義されるJNK阻害剤配列及び／又はキメラペプチドをコードしている。ベクターは、治療される特定の細胞をターゲティングすることができる。更に、ベクターは、所定の制御が行われた際に標的細胞によって高度に又は低度に選択的にスイッチが入る制御エレメントを含有していてもよい。この技術は、VDEPT技術（ウイルス指向性酵素プロドラッグ療法）の変形であり、前駆体型の代わりに成熟タンパク質を利用する。

## 【0128】

或いは、本明細書に定義するJNK阻害剤配列及び／又はキメラペプチドは、抗体又は

10

20

30

40

50

ウイルスを使用することによって前駆体型で投与してもよい。次いで、これら JNK 阻害剤配列及び / 又はキメラペプチドは、治療される細胞で產生されるか又は前記細胞を標的とする活性化剤によって活性型に変換させることができる。この種のアプローチは、時に、ADEPT (抗体指向型酵素プロドラッグ療法) 又は VDEPT (ウイルス指向型酵素プロドラッグ療法) として知られており、前者は、細胞特異的抗体にコンジュゲートさせることによって、活性化剤に細胞を標的とさせることを含み、一方、後者は、ウイルスベクターにおけるコードDNA から発現させることによって、ベクターにおいて活性化剤、例えば、JNK 阻害剤配列又はキメラペプチドを產生させることを含む (例えば、欧州特許公開第 415731 号及び国際公開第 90/07936 号を参照されたい)。

## 【0129】

10

更なる実施形態によれば、本明細書に定義する JNK 阻害剤配列、キメラペプチド、核酸配列、又は JNK 阻害剤配列若しくはキメラペプチドに対する抗体、例えば、配列番号 1 ~ 4 及び 13 ~ 20 及び 33 ~ 100 の配列のいずれかに係る JNK 阻害剤配列、配列番号 9 ~ 12 及び 23 ~ 32 の配列のいずれかに係るキメラペプチド、並びに配列番号 5 ~ 8 及び 21 ~ 22 のいずれかに係る輸送配列を含む配列番号 1 ~ 4 及び 13 ~ 20 及び 33 ~ 100 の配列のいずれかに係る JNK 阻害剤配列の少なくともいずれか、或いは上記定義の範囲内のこれらの変異体若しくは断片は、上に定義した非慢性的又は慢性的炎症性眼疾患から選択される様々な状態及び疾患状態を検出、予測、診断、又はモニタするため、或いはその治療をモニタするために (インビトロ) アッセイ (例えば、イムノアッセイ) で利用することができる。イムノアッセイは、免疫特異的結合が生じ得る条件下で上に定義した JNK 阻害剤配列、キメラペプチド、又は核酸配列に対する抗体と、患者に由来するサンプルとを接触させ、次いで、前記抗体によって任意の免疫特異的結合の量を検出又は測定することを含む方法によって実施することができる。特定の実施形態では、JNK 阻害剤配列、キメラペプチド、又は核酸配列に特異的な抗体を用いて、JNK 又は JNK 阻害剤配列の存在について、患者に由来する組織又は血清のサンプルを分析することができ ; ここでは、異常なレベルの JNK が、疾患状態の指標となる。利用することができるイムノアッセイとしては、ウエスタンプロット、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光イムノアッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、及びプロテイン - A イムノアッセイ等の技術を用いる競合アッセイ及び非競合アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。或いは、上に定義した JNK 阻害剤配列、キメラペプチド、核酸配列、又は JNK 阻害剤配列若しくはキメラペプチドに対する抗体を、例えば、培養動物細胞、ヒト細胞、又は微生物等から典型的に選択される標的細胞に送達することによって (インビトロ) アッセイを実施し、当業者に典型的に知られている生物物理学的方法によって細胞応答をモニタしてもよい。典型的に本明細書で使用される標的細胞は、培養細胞 (インビトロ) であってもよく、インビオ細胞、即ち、生存している動物又はヒトの器官又は組織、或いは生存している動物又はヒトでみられる微生物を含む細胞であってもよい。

## 【0130】

20

本発明は、更に、診断目的又は治療目的のための、特に、上に定義した非慢性的又は慢性的炎症性眼疾患を治療、予防、又はモニタするためのキットの使用であって、前記キットが、上に定義した JNK 阻害剤配列、キメラペプチド、核酸配列、及び / 又はこれら JNK 阻害剤配列若しくはキメラペプチドに対する抗体、例えば、配列番号 1 ~ 4 及び 13 ~ 20 及び 33 ~ 100 の配列のいずれかに係る JNK 阻害剤配列、配列番号 9 ~ 12 及び 23 ~ 32 の配列のいずれかに係るキメラペプチド、配列番号 5 ~ 8 及び 21 ~ 22 のいずれかに係る輸送配列を含む配列番号 1 ~ 4 及び 13 ~ 20 及び 33 ~ 100 の配列のいずれかに係る JNK 阻害剤配列、又は上記定義内のこれらの変異体若しくは断片に対する抗 JNK 阻害剤配列抗体、又はかかる抗 JNK 阻害剤配列抗体、及び任意で前記抗体に対する標識された結合パートナーを含有する 1 以上の容器を含む使用を提供する。前記使用において抗体に組み込まれる標識としては、化学発光部分、酵素部分、蛍光部分、発色部

30

40

50

分、又は放射活性部分を挙げることができるが、これらに限定されない。別の特定の実施形態では、上に定義した非慢性又は慢性の炎症性眼疾患の治療、予防、又はモニタにおいて診断的に使用するためのキットであって、上に定義したJNK阻害剤配列及び／又はキメラペプチドをコードしているか、或いは前記JNK阻害剤配列及び／又はキメラペプチドに対して相補的である核酸を含有する1以上の容器を含むキットが提供され、任意で、これら核酸に対する標識された結合パートナーも提供される。別の特定の実施形態では、キットは、1以上の容器と、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR；例えば、Innis, et al., 1990. PCR PROTOCOLS, Academic Press, Inc., San Diego, CAを参照されたい）、リガーゼ連鎖反応、環状プローブ反応等、又は上に定義した核酸に関連して使用される当技術分野において公知の他の方法のための増幅プライマーとして作用することができる1対のオリゴヌクレオチドプライマー（例えば、各6ヌクレオチド長～30ヌクレオチド長）とを含むキットとして上記目的のために使用することができる。キットは、任意で、上記目的のためのアッセイにおいて診断、標準、又は対照として用いるための、所定の量の上に定義した精製JNK阻害剤配列、上に定義したキメラペプチド、又はこれらをコードする核酸を更に含んでいてよい。  
。

#### 【0131】

本発明は、本明細書に記載する特定の実施形態によって範囲が限定されるものではない。実際、本明細書に記載するものに加えて、本発明の様々な変形が、前述の記載及び添付図面から当業者に明らかになるであろう。かかる変形は、添付の特許請求の範囲の範囲内である。  
20

#### 【0132】

様々な刊行物を本明細書に引用し、その開示を参考することにより全体を本願に援用する。

#### 【0133】

特に規定しない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される方法及び材料と類似又は等価な方法及び材料を本発明の実施又は試験において用いることができるが、好適な方法及び材料を以下に記載する。本明細書に言及する全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参考することにより全体を本願に援用する。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先される。更に、材料、方法、及び実施例は、単なる例証であり、限定することを意図するものではない。本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。  
30

#### 【実施例】

#### 【0134】

##### 実施例1

##### 溶液及び生成物

配列番号11の全てのD-レトロ-インペルソ型JNK阻害剤（ポリ）ペプチドをPoly peptide Laboratories（フランス）において作製し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって精製した。それを、アイデンティティについては質量分析法によって、純度についてはRP-HPLCによって分析した（Poly peptide Laboratories, フランス）。凍結乾燥した時点で、粉末を2～8で保存した。実験の1日間前、配列番号11のJNK阻害剤（ポリ）ペプチド粉末を、無菌条件下で、National Scientific（NSC）不活性ガラスバイアル（NSC-C4015-S1）内にて10μMの濃度になるように生理食塩水（NaCl 0.9%、Versol（登録商標）、Aguettant）に溶解させ、使用まで4で保存した。  
40

各実験について、配列番号11のJNK阻害剤（ポリ）ペプチドを新たに溶解させた画分を-20で保存し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析によってその濃度を確認した。  
50

デキサメタゾンナトリウムリン酸塩 (4 mg / mL) (Solu decadron; Laboratoire Roussel, Paris、フランス)を、EIU.10における抗炎症活性のポジティブコントロールとして用いた。

#### 【0135】

##### 動物

体重175 gの7週齢の雌Lewisラット(Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle、フランス)を用い、Use of Animals in Ophthalmic and Vision ResearchのARVO Statementに従って取り扱った。ケタミン(88 mg / kg) (Virbac、フランス)及びラルガクチル(0.6 mg / kg) (Sanofi-Aventis、フランス)を筋肉内注射することによってラットに麻酔した後、静脈内注射又は眼内注射を行った。10

#### 【0136】

##### 注射

静脈内(IV)注射については、生理食塩水(NaCl 0.9%)又は配列番号11のJNK阻害剤(ボリ)ペプチド(生理食塩水中20 µg / kg)100 µLを、1 mLのシリング(Becton Dickinson、フランス)に取り付けられている25 Gの針を用いて尾静脈に注射した。硝子体内(IVT)注射については、生理食塩水又は配列番号11のJNK阻害剤(ボリ)ペプチド(生理食塩水中0.2 µg / 注射)5 µLを、30 Gの使い捨て針(BD-microfine syringe, nm Medical, Asniere、フランス)を用いて両目に注射した。他のモデルにおいて配列番号11のJNK阻害剤(ボリ)ペプチドが非常に低用量で活性を有することを示す研究に従って、20 µg / kg(即ち、体重175 gのラットにおいて3.5 µg / ラット)のIV用量を選択した。硝子体内注射については、本発明者らは、患者において急性騒音外傷後に直接耳に適用される最低用量を用いた。これは、静脈内に注射される用量の5%に相当する。静脈内処理又は硝子体内処理の直後、200 µgのLPS(ネズミチフス菌由来のリポ多糖類、Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier、フランス)を含有する滅菌発熱物質不含水100 µLを片方の足蹠に注射することによって、エンドトキシン誘導性ブドウ膜炎(EIU)を誘導した。実験の最後、即ち、LPSチャレンジの6時間、24時間、又は48時間後に、ペントバルビタール(30 mg / kg) (Sanofi-Aventis、フランス)を腹腔内注射することによってラットに麻酔した後、心臓穿刺によって血液を回収した。次いで、致死量のペントバルビタールでラットを屠殺し、両眼を摘出した。20

#### 【0137】

##### サンプル回収

各摘出した眼から房水及び硝子体を回収し、プールした。眼水を直ちに遠心分離し、細胞を含まない画分を回収し、-20°で凍結させた後、マルチプレックスアッセイによって分析した。先ず、血液サンプルを室温で2時間、次いで、4°で一晩凝固させた。血清を回収し、遠心分離し、透明な上清を回収し、-20°で凍結させた後、マルチプレックスアッセイを行った。30

#### 【0138】

摘出した眼から網膜及びRPE/脈絡膜/強膜複合体を慎重に摘出し、瞬間冷凍し、RT-PCR及びウエスタンプロット解析に用いるまで-80°で保存した。

#### 【0139】

免疫組織化学試験のために、眼球を回収し、4%パラホルムアルデヒドを含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中にて室温で1時間固定した後、PBSで一晩すすいだ。次の日、最適薄切温度(OCT)コンパウンド(Tissue-Tek(登録商標)、Sakura Finetek、Zoeterwoude、オランダ)にサンプルを包埋し、凍結させ、-80°で保存した。クライオスタット(Leica CM 3050 S、Reuil-Malmaison、フランス)を用いて、凍結させた眼の前後方向切片(厚40  
50

み 10 μm) を視神経レベルで作製し、免疫組織化学分析のために super - frost スライドグラスに載せた。

#### 【0140】

##### 実験計画

実験の第1のセットでは、70匹のラットを各群5匹の14の実験群に無作為に割付けた。各群においてブドウ膜炎を誘導し、LPSチャレンジの6時間後(4群)、24時間後(6群)、及び48時間後(4群)にラットを屠殺した。試験した各時点(即ち、6時間、24時間、及び48時間)について、ビヒクル(NaCl 0.9%)又は配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの静脈内注射又は硝子体内注射によって処理したラットを、未処理の対照ブドウ膜炎ラットと比較した。ビヒクルの静脈内注射及びデキサメタゾンの硝子体内注射によって処理した2つの異なる群を24時間で用いた。24時間においてのみ臨床的な眼の炎症を記録した(エンドトキシン誘導性ブドウ膜炎(EIU)の採点の章を参照されたい)。各時点において、各眼(1群当たりn=10)に由来する眼内液及び各動物(1群当たりn=5)に由来する血清をケモカイン/サイトカインマルチプレックスアッセイで用いた。10

#### 【0141】

また、24時間において網膜及びRPE/脈絡膜/強膜複合体を摘出して、RT-PCRによってiNOSのmRNAレベルを、またウエスタンプロットによってc-Junリン酸化状態を分析した。ビヒクルのIV(静脈内)注射、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIVT注射、ビヒクルのIVT(硝子体内)注射、及び配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIVT注射(n=別々のラットから摘出した1条件当たり2個の眼)によって処理した眼のみから組織を摘出した。ラットのEIU臨床スコアが、前記ラットが属する実験群の平均の指標、即ち、ビヒクルのIV及びIVT注射によって処理した眼については3、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIV又はIVT注射によって処理した眼については2となるように眼を選択した。20

#### 【0142】

実験の第2のセットは、細胞レベル及び組織レベルにおける配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの抗炎症効果、並びに投与の24時間後のこの分子の生体分布を評価するために計画した。ラットを以下の11の実験群に無作為化に割付けた。ブドウ膜炎のラット6群:未処理のブドウ膜炎ラット、NaCl又は配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドを静脈内注射したラット、及びビヒクル、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチド、又はデキサメタゾンを硝子体内注射したラット。ブドウ膜炎に罹患していない更なる5群:未処理の健常ラット、NaCl(IV)又は配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチド(IV)によって処理したラット、及びNaCl又は配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドをIVT注射したラット。1群当たり別々のラットから3個の眼を摘出し、免疫組織化学試験に用いた。30

#### 【0143】

臨床分析及び組織学的分析については、デキサメタゾンをレファレンス処理として用了することに留意されたい。

#### 【0144】

##### エンドトキシン誘導性ブドウ膜炎(EIU)の採点

本実験における疾患の臨床ピークである24時間において、スリットランプによって動物を検査した。臨床的な眼の炎症の強度を、上記10の通り各眼について0点~5点で採点した: 0点は、炎症無しを示し; 1点は、最小限の虹彩及び結膜の血管拡張が存在するが、前房(AC)におけるフレア又は細胞はみられないことを示し; 2点は、中程度の虹彩及び結膜の血管拡張が存在するが、ACにおける明らかなフレア又は細胞はみられないことを示し; 3点は、強度の虹彩の血管拡張が存在し、ACにおいてフレア及びスリットランプ視野当たり10個未満の細胞がみられることを示し; 4点は、3点よりも重篤な臨床徴候が存在し、前房蓄膿が形成されているか又は形成されていないACにおいて10個超の細胞がみられることを示し; 5点は、強度の炎症反応、ACにおけるフィブリン形成4050

、及び瞳孔の完全な閉鎖が存在することを示す。マスキングした状態で臨床評価を実施した。

#### 【0145】

##### ウエスタンプロット解析

R P E / 脈絡膜 / 強膜複合体及び神経網膜（実験群当たり2個）を切開後直ちに瞬間凍結させ、使用まで - 80 で保存した。プロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche Diagnostics、Meylan、フランス）（50 mLにつき1錠）を添加した溶解バッファ（MOPS SDS Running Buffer、Invitrogen、Cergy-Pontoise、フランス）500 μL中で組織をホモジナイズした。LDSサンプルバッファ（Invitrogen）を添加し、100 で5分間加熱した後、MOPS SDSランニングバッファを用いてNuPAGE 4 - 12% Bis-Triisゲル（Invitrogen）で等量のタンパク質を電気泳動した。次いで、得られたバンドをニトロセルロースメンブレン（Schleicher & Schuell Bioscience、Dassel、ドイツ）に電気転写した。  
10

#### 【0146】

ウエスタンプロット解析を実施して、3つのマイトジエン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）経路における配列番号11のJNK阻害剤（ボリ）ペプチドの効果を分析した。JNK経路を分析するためには、製造業者の指示書（Phosphoplus c-Jun（Ser63）II及びc-Jun（Ser73）抗体キット（9260）、Cell Signaling Technology（Ozyme、St Quentin Yvelines、フランス）から購入）に従って、ウサギホスホc-Jun（Ser63）一次抗体（又はホスホc-Jun（Ser73）抗体）及び抗ウサギIgG HRP結合二次抗体と共に順次インキュベートした。ECLウエスタンプロッティング検出試薬キット（Amersham Biosciences、Orsay、フランス）を用いてバンドを可視化した。次いで、マウス抗-チューブリン（D-10）（sc-5274）一次抗体（1:400希釈）及びHRPコンジュゲート化ヤギ抗マウスIgG二次抗体（sc-3697）（1:5,000希釈）（両方とも、Santa Cruz Biotechnology（Tebu-bio、Le Perray en Yvelines Cedex、フランス）から購入）を用いて連続的にプロットをデハイブリダイズ及びリハイブリダイズした。ホスホc-Jun（Ser63又はSer73）の相対バンド強度を、濃度測定分析（Image Jソフトウェア）後に - チューブリンと比較して計算した。  
20  
30

#### 【0147】

ERK及びp38 MAPK経路を分析するために、ウサギホスホ-p44/42 MAPK（Erk1/2）（Thr202/Tyr204）（4370）一次抗体（又はウサギホスホ-p38 MAPK（Thr180/Tyr182）（9215）抗体）及び1:5,000で希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ウサギIgG（H+L）（PI-1000-Vector Laboratories、Clinical Sciences、Montrouge、フランス）二次抗体と共にプロットを順次インキュベートした。次いで、ウサギp44/42 MAPK（Erk1/2）（4695）（又はウサギp38 MAPKキナーゼ（9212）抗体）及び上記と同じ二次抗体を用いて連続的にプロットをデハイブリダイズ及びリハイブリダイズした。一次抗体は、Cell Signaling Technology（Ozyme、St Quentin Yvelines、フランス）から購入し、以下の製造業者の指示書に従って全ての工程を実施した。  
40

#### 【0148】

##### 免疫組織化学

細胞浸潤の特性評価を行うために、切片をED1及びiNOSで二重染色した。簡潔に述べると、30分間リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中0.1% Triton-X100を用いて透過処理した後、試料をすすぎ、PBS中5%スキムミルクを30分間浸透させ  
50

た。これらを、以下の 2 つの一次抗体と共に 4 度一晩インキュベートした：ラットの単球、マクロファージ、及び樹状細胞における細胞質抗原に対する 1 : 50 マウスモノクローナル抗マクロファージ CD68 ( クローン ED1 ) ( Serotec Ltd. ( Oxford, UK ) から購入 ) 、及びポリクローナルウサギ抗-iNOS ( 1 / 75e ; Transduction Laboratories, Lexington, FY ) 。洗浄後、それぞれ 1 : 250 で希釈した二次 Alexa Fluor 594 ( 赤 ) コンジュゲートロバ抗マウスモノクローナル抗体 ( mAb ) 及び二次 Alexa Fluor 488 ( 緑 ) コンジュゲートヤギ抗ウサギ mAb ( Invitrogen, Cergy Pontoise, フランス ) と共に室温で 1 時間切片をインキュベートした。各工程について、抗体を PBS - 1 % スキムミルク - 0.1 % Triton X 100 で希釈した。全ての染色操作は異なる対照を含んでいた：一次抗体を含まないネガティブコントロール、及び一次抗体の代わりに正常マウス又はウサギの血清免疫グロブリン ( Ig ) と共にインキュベートすることによるアイソタイプコントロール。 DAPI ( Sigma - Aldrich, Saint - Quentin Fallavier, フランス ) で核を染色した後、切片を PBS / グリセロール ( 1 / 1 ) 中に置き、蛍光顕微鏡写真機 ( FXA, Microphot, Nikon, Melville, USA ) によって観察した。デジタルカメラ ( Spot, BFI Optilas, Evry, フランス ) を用いてデジタル化された顕微鏡写真を得た。 DAPI で染色した核の形状によって識別した ED1 陽性細胞及び多形核細胞を、組織学的切片上で定量した。視神経乳頭レベルにおいて眼 1 個当たり 2 枚の異なる切片を用いて、実験群当たり 3 個の眼について分析を実施した。結果を、平均 ± 平均の標準誤差 ( SEM ) として表した。

〔 0 1 4 9 〕

健常及びブドウ膜炎の眼に対して配列番号 11 の JNK 阻害剤 (ポリ) ペプチドの免疫染色を実施して、全身投与又は局所投与後の眼内の生体分布を調べた。簡潔に述べると、切片を上記の通り透過処理した後、それぞれ、PBS で 1 : 100 及び 1 : 250 希釀した抗配列番号 11 精製ウサギ IgG 及び二次 Alexa 594 (赤) コンジュゲートヤギ抗ウサギ IgG (Invitrogen, Cergy Pontoise, フランス) と共に順次インキュベートした。未処理の健常及びブドウ膜炎の眼の免疫染色をネガティブコントロールとして用いた。DAPI で核を染色した後、実装及び観察した。

【 0 1 5 0 】

p-Erk1/2の免疫染色を実施して、IV又はIVT投与後のERK経路における配列番号11のJNK阻害剤（ポリ）ペプチドの効果を評価した。切片を上記の通り透過処理し、室温で1時間PBS中に0.1% Triton-X100及び10%FCS（ウシ胎児血清）を含有するブロッキング溶液中でインキュベートした。ブロッキング溶液で1:400希釈したウサギ抗ホスホp44/42MAPK（Erk1/2）一次抗体（4370）（Cell Signaling Technology（Ozyme、St Quentin Yvelines、フランス）から購入）と共に4度一晩切片をインキュベートした。PBSで3回すすいだ後、室温で2時間二次Allexa Fluor 488（緑）コンジュゲートヤギ抗ウサギmAb（ブロッキング溶液で1:300希釈）と共に切片をインキュベートした。DAPIで核を染色した後、実装及び観察した。

【 0 1 5 1 】

## 半定量的 PCR を用いる眼組織における iNOS 発現の評価

1群当たり2個の眼をこの分析に用いた。切開後直ちに、各眼から抽出した網膜を別々に瞬間凍結させ、使用まで-80°で保存した。製造業者の指示書に従って全RNAを組織から抽出した(RNeasy minikit、Qiagen、Courtabœuf、フランス)。製造業者の指示書に従って、Superscript II逆転写酵素(Invitrogen、Cergy-Pontoise、フランス)を用いて総体積20μLで全RNA 1μgに対して逆転写を実施した。GAPDH及びiNOSのcDNAを増幅させるために、第1の連鎖反応産物2μL、0.4μMのフォワードプライマー、0.4μMのリバースプライマー、0.4μMのdNTPミックス、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>

1<sub>2</sub>、1×PCRバッファ、及び2.5UのTaq DNAポリメラーゼ(Invitrogen、Cergy Pontoise、フランス)を含有する総体積25μLでポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施した。GAPDH(フォワード:5'-ATGCCCGCATGTTGTGATG-3';リバース:5'-ATGGCATGGACTGTTGTCAT-3')及びiNOS(フォワード:5'-TTCTCTTCAAAGTCAAATCCCTACCA-3';リバース:5'-TGTGTCAGATGTCCTGAAAC-3')に特異的なプライマーをInvitrogenから入手した。Crocodile III(Appligene Oncor)において、初期変性(94℃で3分間)後、変性(30秒間、94℃)、アニーリング(1分間、58℃(GAPDH)及び52℃(iNOS))、及び伸長(1分間~2分間、72℃)を30サイクル~32サイクル実施した。72℃で5分間の伸長によって最後のサイクルを完了した。PCR断片(GAPDHについては162bp、及びiNOSについては657bp)を2.5%アガロースゲル電気泳動によって分析し、紫外光下でエチジウムプロマイド染色によって可視化した。濃度測定分析(ImageJソフトウェア)後にGAPDHと比較してiNOSの相対バンド強度を計算した。  
10

#### 【0152】

##### ケモカイン/サイトカインマルチプレックスアッセイ

眼内液(最終体積が25μLになるように希釈)及び血清(25μL、1:5希釈)をマルチプレックスビーズアッセイに供した。この方法は、イムノアッセイ12の固相としてミクロスフィアを使用し、ELISA13よりも高感度で多数のサイトカインを滴定することができる。各サンプルについて、製造業者の指示書に従ってラットサイトカイン/ケモカイン-17plexキット(Milliplex Map Kit、Millipore、Saint-Quentin-en-Yvelines、フランス)を用いて17個のアナライトを同時に定量した:ケモカイン MCP-1/CCL2、MIP-1/CCL3、RANTES/CCL5、IP-10/CXCL10(IFN-誘導性タンパク質-10)及びGRO/KC;炎症促進性メディエータIL-1、IL-18及びTNF-;Th1/Th2/Th17サイトカインIL-2及びIFN-/IL-4、IL-5、IL-6、IL-10及びIL-13/IL-17。96ウェルのフィルタープレートでアッセイを実施し、キットに提供されているラットサイトカイン標準を用いて各サイトカインについての検量線を作成した。全てのインキュベート工程は、培地を軌道攪拌しながら、光からビーズを保護するために暗条件下で実施した。検量線につき4個又は5個のロジスティックパラメータを用いてmanagerソフトウェアバージョン4.1(Bioplex; Bio-Rad)を用いてデータの取得及び分析を行った。全てのアナライトの検出閾値は、約1pg/mL~約10pg/mLであると推定された。  
20  
30

#### 【0153】

##### 統計解析

数値結果を平均±平均の標準誤差(SEM)として表した。ノンパラメトリックなMann-Whitney U-検定を用いてデータを比較した。p<0.05を統計的に有意であるとみなした。

#### 【0154】

##### 結果:

配列番号11の全てのD-レトロ-インベルソ型JNK阻害剤(ポリ)ペプチドは、エンドトキシン誘導性ブドウ膜炎(EIU)を有意に低減した。配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドは、未処理のブドウ膜炎の眼(3.2±0.1、p<0.001)及びビヒクリのIV(3.2±0.1、p<0.001)と比べて、20μg/kgの静脈内(IV)注射(2.0±0.1)後のEIU臨床スコアを有意に低下させた(図1A)。同様に、未処理のブドウ膜炎の眼(3.2±0.1、p<0.001)及びビヒクリIVT(3.0±0.1、p<0.01)と比べて、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの0.2μg/硝子体内注射(IVT)投与後の臨床スコア(2.2±0.2)は有意に低下した(図1B)。EIUの臨床徵候に対する配列番号11のJNK阻害剤(50)

ポリ)ペプチドのIVT注射の効果は、デキサメタゾンのIVT後にみられた効果(1.8±0.4)とは統計的に差はなく、これは、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドが、この時点で投与したときEIUの低減においてデキサメタゾンと同程度有効であったことを示唆する(図1B)。

#### 【0155】

##### JNK経路阻害から得られる配列番号11の(ポリ)ペプチドの効果

配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの臨床効果がその作用機序、即ち、JNKシグナル伝達に干渉する能力に関連しているかどうかを判定するために、6つのc-Junリン酸化状態をウエスタンプロットによって眼組織において分析した。Ser63(図2A)及びSer73残基におけるc-Junのリン酸化は、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドを静脈内又は硝子体内に注射した24時間後のRPE/脈絡膜抽出物において低下した。神経網膜では、ホスホc-Junは、微かにしか検出することができなかった。配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIV(ビヒクルのIVにおける0.77±0.26に対して0.28±0.01)又はIVT(ビヒクルのIVTにおける0.79±0.25に対して0.35±0.08)投与後のいずれにおいても、RPE/脈絡膜においてc-Junのリン酸化が約3分の1に減少したことが観察された(図2B)。配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドが眼組織においてc-JunNH<sub>2</sub>末端キナーゼ(JNK)活性をブロックする能力により、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの特定の眼内活性が実証された。

#### 【0156】

配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドが他のMAPK経路に対して何らかの効果を有することができるかどうかを判定するために、Erk1/2及びp38のリン酸化状態を評価した。Erk1/2及びp38は、RPE/脈絡膜複合体で全ての群において同程度のレベル検出されたが、これら2つのMAPKのリン酸化型は、ウエスタンプロット解析では検出することができなかった(データは示さない)。これら結果は、JNKが、EIU中にRPE/脈絡膜において主に活性化されるMAPK経路であることを示す。任意のシグナル増幅を用いずに実施される組織化学的分析を用いて、本発明者らは、対照のLPS及び生理食塩水で処理された眼における眼の前眼部及び後眼部に浸潤している炎症細胞において強度のp-Erk1/2を見出した(図3C、3D)。静脈内又は硝子体内に投与した配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの効果は、これら細胞において評価することができなかった。その理由は、処理された眼において浸潤が殆ど存在していないかったためである。しかし、対照及び生理食塩水で処理された眼における網膜のミュラーグリア(RMG)細胞でp-Erk1/2が検出及び局在し得る神経網膜では(図3E)、いずれの経路によって投与した配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドも効果がみられなかった(図3F)。興味深いことに、虹彩では、対照及び生理食塩水を注射した眼の上皮において強力なp-Erk1/2シグナルがみられると共に(図3A)、これら細胞におけるp-Erk1/2シグナルに対して、処理された配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの効果はみられなかった(図3B)。これは、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドが、少なくとも在住細胞において、本発明のモデルにおけるEIU中、p-Erk1/2リン酸化に対して直接作用するとは考えられないことを強く示唆する。

#### 【0157】

##### IV及びIVT投与後の眼組織における配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの差異分布

組織学的切片に対して免疫組織化学試験を実施して、健常な眼及びブドウ膜炎状態における、全身(IV)又は局所(IVT)投与の24時間後の眼組織における配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの生体分布を評価した(図4)。配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチド又はビヒクルのIV又はIVT投与後の健常な眼において炎症細胞の浸潤はみられなかった。配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドに対する免疫反応性は、未処理の対照眼又はビヒクルによって処理された眼では検出されなかった。こ

10  
これは、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドで処理された眼においてみられるシグナルの特異性を示す。用いた用量では全身（IV）注射後の正常な眼においてシグナルは観察されなかった（図 4 A ~ 4 C）が、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドは、IVT 投与後に正常ラットの殆ど全ての眼組織に分布していた（図 4 D ~ 4 L）。興味深いことに、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの蓄積は、虹彩 / 毛様体上皮（パネル G 及び J）及び網膜色素上皮（パネル L）で主に検出された。また、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの浸透は、虹彩支質（パネル G）、並びに神経節細胞層の神經網膜（GCL、パネル H）、内顆粒層（INL、パネル K）、及び視細胞（PR）の内節（IS、パネル I）においても検出された。全ての細胞種において、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドは、細胞質に蓄積していた。角膜内皮及び水晶体囊においては、疎らな染色がみられた。

#### 【0158】

ブドウ膜炎状態では、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの染色は、未処理の眼の眼組織及び浸潤炎症細胞において検出された（図 4、パネル V ~ W）。ビヒクルの IV 又は IVT は、未処理の眼と同様の結果をもたらす。配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの IV 注射によって処理された EIU の眼においては、眼組織では検出されなかつたが、疎らな浸潤炎症細胞は、虹彩（パネル O）及び房水（パネル P）において免疫陽性であった。IVT 注射によって処理されたブドウ膜炎の眼では、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドは、健常な眼、及びマイクログリア細胞等の病態において動員され、炎症プロセスに能動的に関与する在住細胞と同様に眼組織で主にみられる（パネル S ~ T）。20

#### 【0159】

配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの投与から生じる眼組織に浸潤する細胞における有意な減少

ブドウ膜炎における配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの効果を更に特性評価するために、ED1 及び iNOS の抗体で免疫染色した組織学的切片（図 6）に対する計算によって、眼組織における浸潤炎症細胞を定量した（図 5）。LPS チャレンジの 24 時間後、ED1 陽性細胞の数は、未処理のブドウ膜炎の眼（LPS）（ $187 \pm 13$ 、 $p < 0.005$ ）（図 5 A、図 6 A、6 D、6 G、6 J）又はビヒクルを注射した眼と比較して、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの IV 注射で処理した眼において有意に減少した（ $137 \pm 7$ ）（図 5 A、図 6 M、6 P、6 S）。同様に、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの IVT は、ビヒクルを IVT 注射した眼（ $175 \pm 15$ 、 $p < 0.009$ ）及び未処理のブドウ膜炎の眼（ $p < 0.005$ ）と比べて、ED1 陽性浸潤細胞を著しく減少させた（ $93 \pm 8$ ）（図 5 A）。ED1 陽性細胞の浸潤に対する配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの低減効果（ $93 \pm 8$ ）は、デキサメタゾン（ $79 \pm 15$ ）によって誘導される効果と差がなかった。これは、両処理が、このパラメータに対して同様の効果を有することを示唆する。30

#### 【0160】

また、多形核細胞（PMN）の数（図 5 B）は、対照の眼（ $237 \pm 15$ 、 $p < 0.005$ ）に比べて配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチド（ $60 \pm 6$ ）の IV 投与の 24 時間後に有意に減少し、また、ビヒクル（ $152 \pm 31$ 、 $p < 0.009$ ）及び対照のブドウ膜炎の眼（ $p < 0.005$ ）の IVT 注射に比べて、配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチド（ $40 \pm 5$ ）の IVT 注射後に有意に減少した。また、PMN 眼組織浸潤に対する配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの効果は、デキサメタゾン（ $42 \pm 11$ ）の効果と有意な差がなかった。

#### 【0161】

配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドによる iNOS 発現のダウンレギュレート iNOS（誘導性一酸化窒素合成酵素）は、ブドウ膜炎、14、15 の病因における重要なメディエータであることが報告されているので、iNOS の発現に対する配列番号 11 の JNK 阻害剤（ポリ）ペプチドの効果をタンパク質及び mRNA の両方のレベルで調 50

べた。

#### 【0162】

図6に示す通り、iNOS陽性細胞の数は、対照の眼(パネルB、E、H、K)と比べて、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIV(図6N、6Q、6T)又はIVT注射で処理した眼において減少した。対照の眼でみられるiNOS陽性細胞の中でも、数個はED1+細胞であったが、大部分はED1-細胞であった。これは、主にPMNがiNOSを産生することを示唆する(インセットc、f、i)。JNK阻害剤で処理したラットの眼では、依然としてiNOSを発現している細胞のみが、毛様体根に局在する組織内ED1陽性細胞であった(インセットr2)。

#### 【0163】

iNOS発現に対する配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドの効果を、眼組織に対するRT-PCRによって確認した(図7)。iNOSのmRNAのレベルは、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIV後 $1.02 \pm 0.21$ から $0.40 \pm 0.11$ に、IVT注射によって処理された眼では $1.18 \pm 0.05$ から $0.27 \pm 0.09$ にダウンレギュレートされた。それぞれ、ビヒクルのIV又はIVTと比較した。

#### 【0164】

配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドで処理した眼の透光体におけるケモカイン/サイトカインプロファイル

炎症促進性及び抗炎症性のメディエータの産生に対する処理の効果を評価するために、透光体(図8及び9)及び血清に対してマルチプレックス分析によってケモカイン及びサイトカインを投与した。

#### 【0165】

試験した17種のケモカイン/サイトカインのうち、一部は対照の眼又は処理された眼の両方において検出可能なレベルを下回っていた: IP-10、IL-5、IL-17。その他は、試験した時点のいずれにおいても未処理の眼と処理された眼とで差はみられなかった: IL-18、IL-4、IL-1。血清では、一部のサイトカインは、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIV投与後(MIP-1及びIL-2の減少)又はIVT投与後(IL-2の減少)に変化する傾向がみられたが、これは、統計的に有意ではなかった。他のケモカイン/サイトカインでは、IVT投与と比べて配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドのIV投与で処理された眼に由来する眼水においてプロファイルが異なっていた。実際、配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドをLPSチャレンジの時点で全身に注射した場合、6時間及び24時間においてMCP-1、MIP-1及びRANTESの有意な減少が誘導された(図8A)。また、GRO/KCも6時間で有意に減少した。TNF-、IL-6及びINF-等のTh1サイトカインは、様々な時点で有意に減少したが、IL-10は、処理された眼において6時間で増加傾向がみられた(しかし、有意ではなかった)。これは、Th2プロファイルへの切り替えを示唆する(図8B)。ビヒクルをIV注射したラットの眼と未処理のブドウ膜炎の対照眼との間に統計的な差はみられなかった。

#### 【0166】

配列番号11のJNK阻害剤(ポリ)ペプチドをLPSチャレンジの時点で硝子体に注射した場合、ケモカイン/サイトカインプロファイルは、ビヒクルを注射した眼とそれ程異なっていなかった(図9)。ビヒクルのIVTは、未処理のブドウ膜炎の対照眼と比べてサイトカインプロファイルに対する顕著な効果を有していたことは興味深い。6時間では、MCP-1、TNF-、IL-6、IL-2が減少傾向にあり、24時間では、IL-2の顕著な減少及びIL-13の増加が検出された。これも、Th2プロファイルへの切り替えを示唆する。

10

20

30

40

【 10A 】

【 10B 】

【 11A 】

Met Ala Arg Leu Ser Pro Gly Met Ala Glu Arg Glu Ser Gly Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Ala Ala Ser Pro Pro Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gly Leu His  
 20 25 30  
 Ile Ala Ser Pro Pro Asn Phe Arg Leu Thr His Asp Ile Ser Leu Glu  
 35 40 45  
 Glu Phe Glu Asp Glu Asp Leu Ser Glu Ile Thr Asp Glu Cys Gly Ile  
 50 55 60  
 Ser Leu Gln Cys Lys Asp Thr Leu Ser Leu Arg Pro Pro Arg Ala Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Ser Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ala Gly Ser Arg Leu Gln Ala  
 85 90 95  
 Glu Met Leu Gln Met Asp Leu Ile Asp Ala Ala Ser Asp Thr Pro Gly  
 100 105 110  
 Ala Glu Asp Asp Glu Glu Asp Asp Asp Glu Leu Ala Ala Gln Arg Pro  
 115 120 125  
 Gly Val Gly Pro Ser Lys Ala Glu Ser Gly Gln Glu Pro Ala Ser Arg  
 130 135 140  
 Ser Gln Gly Gln Gly Gln Gly Pro Gly Thr Gly Cys Gly Asp Thr Tyr  
 145 150 155 160  
 Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg  
 165 170 175  
 Ser Gln Asp Thr Leu Asn Asn Asn Ser Leu Gly Lys Lys His Ser Trp  
 180 185 190  
 Gln Asp Arg Val Ser Arg Ser Ser Ser Pro Leu Lys Thr Gly Glu Gln  
 195 200 205  
 Thr Pro Pro His Glu His Ile Cys Leu Ser Asp Glu Leu Pro Pro Gln  
 210 215 220  
 Gly Ser Pro Val Pro Thr Gln Asp Arg Gly Thr Ser Thr Asp Ser Pro  
 225 230 235 240  
 Cys Arg Arg Thr Ala Ala Thr Gln Met Ala Pro Pro Ser Gly Pro Pro  
 245 250 255

【図 1-1-B】

Ala Thr Ala Pro Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ser Ile  
 260 265 270  
 Ser Ala ASP Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro  
 275 280 285  
 Val Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Glu Pro Thr Ser Thr Phe Leu Pro  
 290 295 300  
 Pro Thr Glu Ser Arg Met Ser Val Ser Asp Pro ASP Pro Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Tyr Ser Val Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Asp  
 325 330 335  
 Glu Gly Phe Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Gln Ala Glu Pro Gly  
 340 345 350  
 Gly Gly Trp Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala  
 355 360 365  
 Ser Leu Ser Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr  
 370 375 380  
 Thr Leu Val Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg  
 385 390 395 400  
 Pro Cys Phe Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr  
 405 410 415  
 Asp Asn Cys Ala Ser Ala Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu  
 420 425 430  
 Glu Tyr Glu Glu Ala Pro Gln Pro Arg Pro Pro Thr Cys Leu Ser Glu  
 435 440 445  
 Asp Ser Thr Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu  
 450 455 460  
 Asn Val Phe Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ala Glu Ser Phe  
 465 470 475 480  
 Gly Leu Phe Ser Cys Val Ile Asn Gly Glu Glu His Glu Gln Thr His  
 485 490 495  
 Arg Ala Ile Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu  
 500 505 510

## 【図11C】

Glu Val Asp Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp  
 515 520 525  
 Tyr Glu Ala Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala  
 530 535 540  
 Tyr Tyr Ala Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu  
 545 550 555 560  
 Ala Lys Asn Ser Asp Trp Ile Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly  
 565 570 575  
 Ser Val Gln Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala  
 580 585 590  
 Met Gln Lys Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro  
 595 600 605  
 Pro Ser Ser Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly  
 610 615 620  
 Val Lys Ala Asp Glu Ala Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His  
 625 630 635 640  
 Phe Phe Gln Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn  
 645 650 655  
 Asn Lys Tyr Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe  
 660 665 670  
 Ala Cys His Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu  
 675 680 685  
 Ser Val Gly Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr  
 690 695 700  
 Thr Cys Pro Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu  
 705 710

## 【図12A】

Met Ala Glu Arg Glu Ser Gly Gly Leu Gly Gly Ala Ala Ser Pro  
 1 5 10  
 Pro Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gly Leu His Ile Ala Ser Pro Pro Asn  
 20 24 30  
 Phe Arg Leu Thr His Asp Ile Ser Leu Glu Glu Phe Gly Asp Glu Asp  
 35 40 45  
 Leu Ser Glu Ile Thr Asp Gly Cys Gly Ile Ser Leu Gln Cys Lys Asp  
 50 55 60  
 Thr Leu Ser Leu Arg Pro Pro Arg Ala Gly Leu Leu Ser Ala Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Ala Gly Ser Arg Leu Gln Ala Glu Met Leu Gln Met Asp Leu  
 85 90 95  
 Ile Asp Ala Thr Gly Asp Thr Pro Gly Ala Glu Asp Asp Glu Glu Asp  
 100 105 110  
 Asp Asp Glu Glu Arg Ala Ala Arg Arg Pro Gly Ala Gly Pro Pro Lys  
 115 120 125  
 Ala Glu Ser Gly Gln Glu Pro Ala Ser Arg Gly Gln Gly Gln Ser Gln  
 130 135 140  
 Gly Gln Ser Gln Gly Pro Gly Ser Gly Asp Thr Tyr Arg Pro Lys Arg  
 145 150 155 160  
 Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr  
 165 170 175  
 Leu Asn Asn Asn Ser Leu Gly Lys Lys His Ser Trp Gln Asp Arg Val  
 180 185 190  
 Ser Arg Ser Ser Pro Leu Lys Thr Gly Glu Gln Thr Pro Pro His  
 195 200 205  
 Glu His Ile Cys Leu Ser Asp Glu Leu Pro Pro Gln Ser Gly Pro Ala  
 210 215 220  
 Pro Thr Thr Asp Arg Gly Thr Ser Thr Asp Ser Pro Cys Arg Arg Ser  
 225 230 235 240  
 Thr Ala Thr Gln Met Ala Pro Pro Gly Gly Pro Pro Ala Ala Pro Pro  
 245 250 255

## 【図12B】

Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ile His Tyr Gln Ala Asp  
 260 265 270  
 Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro Val Gln Arg  
 275 280 285  
 Pro Pro Asp Ala Ala Glu Pro Thr Ser Ala Phe Leu Pro Pro Thr Glu  
 290 295 300  
 Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala Tyr Pro Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Glu Gly Phe  
 325 330 335  
 Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Glu Pro Pro Gly Gly Trp  
 340 345 350  
 Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Arg Ala Ser Leu Ser  
 355 360 365  
 Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr Thr Leu Val  
 370 375 380  
 Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg Pro Cys Phe  
 385 390 395 400  
 Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr Asp Asn Cys  
 405 410 415  
 Ala Ser Val Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu Glu Tyr Glu  
 420 425 430  
 Glu Ala Pro Arg Pro Gln Pro Pro Ala Cys Leu Ser Glu Asp Ser Thr  
 435 440 445  
 Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu Asn Val Phe  
 450 455 460  
 Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ala Glu Ser Phe Gly Leu Phe  
 465 470 475 480  
 Ser Cys Ile Ile Asn Gly Glu Glu Gln Glu Gln Thr His Arg Ala Ile  
 485 490 495  
 Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu Glu Val Asp  
 500 505 510

## 【図12C】

Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp Tyr Glu Ala  
 515 520 525  
 Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala Tyr Tyr Ala  
 530 535 540  
 Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu Ala Lys Asn  
 545 550 555 560  
 Ser Asp Thr Val Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly Ser Val Gln  
 565 570 575  
 Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala Met Gln Lys  
 580 585 590  
 Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro Pro Ser Ser  
 595 600 605  
 Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly Val Lys Ala  
 610 615 620  
 Asp Asp Ser Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His Phe Phe Gln  
 625 630 635 640  
 Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn Asn Lys Tyr  
 645 650 655  
 Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe Ala Cys His  
 660 665 670  
 Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu Ser Val Gly  
 675 680 685  
 Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr Thr Cys Pro  
 690 695 700  
 Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu  
 705 710

## 【図13A】

atggcgagc gagaaggcgg cggccctggga gggggggccc cgtccccggcc cgccgcctcc  
ccgttccctgg ggctgcacat cgcttcgcctt cccaaatttca ggctcacca tgacatcagc  
ctgaggagt ttgaggatgt agacccctcg gagatctactg atgagtttg catcagctta  
cagtcaaaac acaccctgtt cttagggccc cctggcgcggcggcgttgcgtcttc tgccggcggc  
ggccggcggcgg ggagccgtt gcaggccgag atgctcaga tgactgtat cgacgcgacg  
ggggacactc cggggcccgaa ggacgacgag gaggacgacy acgaggagcg cgcggcccg  
cgccggggag cggggcccgaa caagggccag tccggccagg agccggcgcc cgccggccag  
ggccagaccc aaggccagag ccaggcccg ggcggccggg acacgttaccg gccaagccgg  
ccccaccacgc tcaacccttcc tccgcagggtt ccggccgttcc aggacacact gaataataat  
tctctggca aaaacacag ttggcaggat cgggttgttcc gatcatectc accccgtaaag  
acaggggacg agacccacac gatgaaacat atctgcctgtt gcatgatgtt gcccccccaag  
agccggccccc ccccccaccc agatcgaggcc acctccaccgg acagcccttg ccgcgcagc  
acagccaccac agatggcacc tccgggtgttcc ccccccgttgc ccccccgttgg ggttgggggg  
cactgcaccc gagaccaat ccaatccatcc gccgtatgttgc gaactagaggg cactgaggag  
atctaccatgttcc cccaggatgtca gaggccccca gacgttgcag agccaccctc cgcccttcc  
ccggccactg agagccggat gtcagtcggcc tccgtatccag accctgcgc ctatccccctcc  
acggcaggcc gggccgaccc cccccatcgtt gaaagggaaag agggttccgttgc ctggccgttgc  
tcccccggat gggctgttgc cccaggccggaa ggggtggccggg ggagccgttgg ggagccggcc  
ccaccccttcc acggccgttcc gatgttgcggac accagccggcc tttccatgttgc ctctgtcaag  
tacactgttgc tgtagatgtt gatgttgcacat gtggactgttgc tgagcttgcg gccgttcc  
ggagactaca gtacgttgcgatg tggactgttgc accgttccatgttgc ctccgttcc  
tcggccctatg agtgcggccat cggagaggaa tatggaggagg ccccgccggcc ccagccccctt  
gcctgcctctt ccggggactc caccgttgcgttgc gaaacccggcc tccatgttgc caaaaaattt  
ctgaaacgttgc tcatgttgcg tccggccgttgc ctgttgcgttgc ctggccgttgc  
tccgtatca tcaacgggggg ggagccggag cagacccatcc gggccatattt caggttttgc  
cctccggccaccc aagacgaaat tgactgttgcgatg tggatgttgc ctctgttgc gggacttcc  
gtctggaaact actggatgttgc ggccttccaccc atggccactg gtggccgggg tggctttttt  
gccttatttgc ccatcgagggtt ccccaaggag cccggccggcc tggccggcc tggccggcc  
agtactgttgc tgtagatgttgc tccctgggttgc ttttttttttgc tcccttacac  
tacaccatgttgc cccacggatgttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc

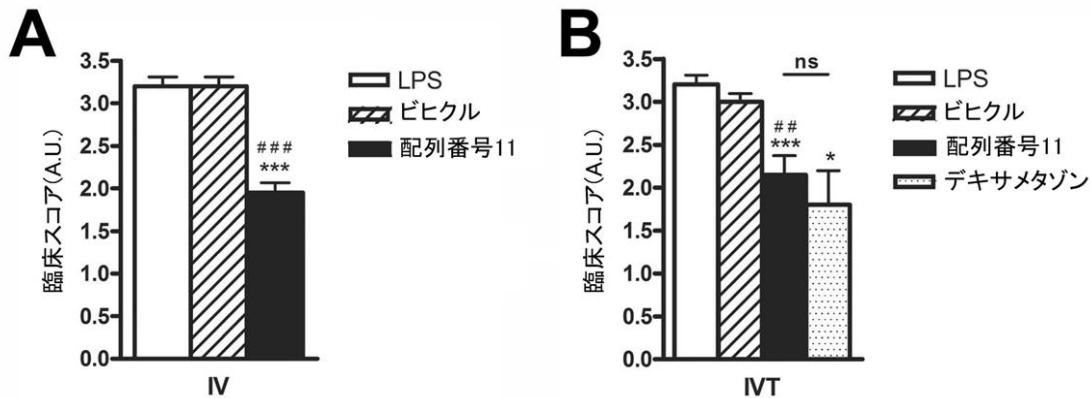
60  
120  
180  
240  
300  
360  
420  
480  
540  
600  
660  
720  
780  
840  
900  
960  
1020  
1080  
1140  
1200  
1260  
1320  
1380  
1440  
1500  
1560  
1620  
1680  
1740

## 【図13B】

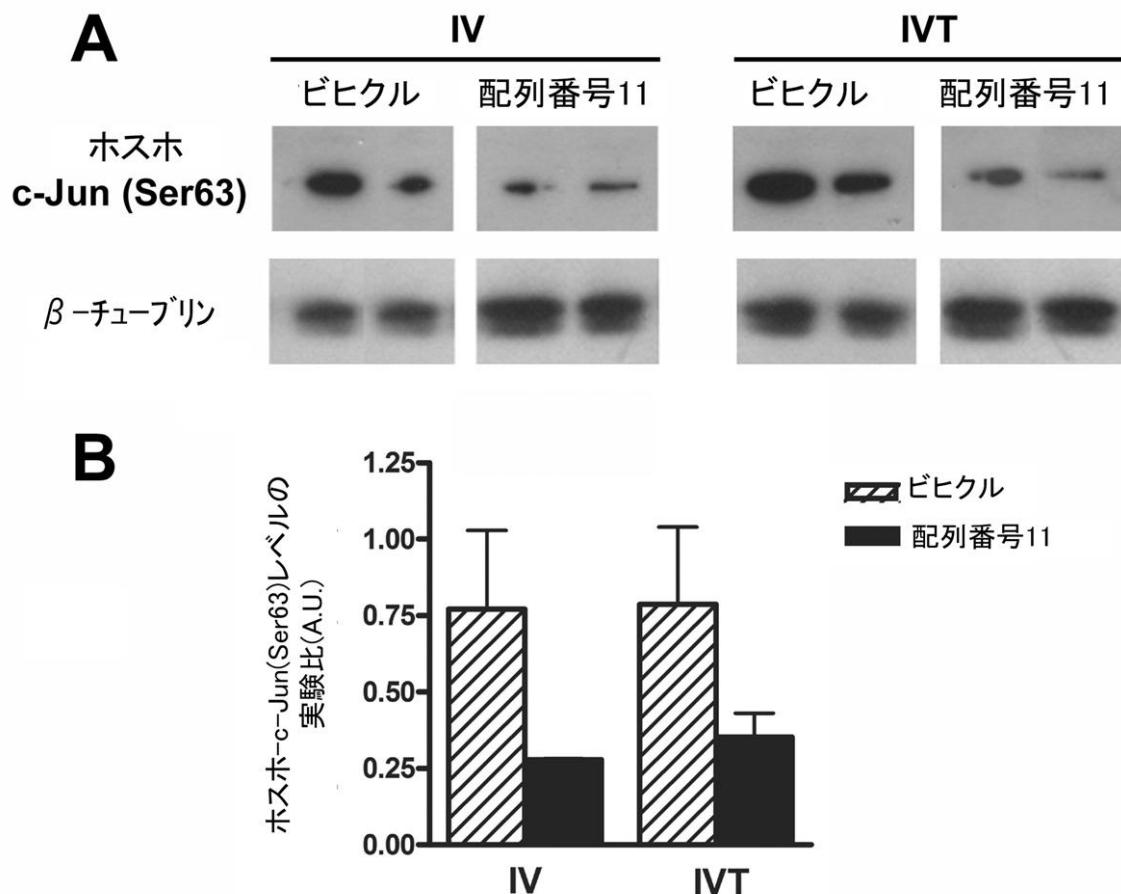
aaggccaatg acgttccctgt tgctgtatgttgc cccacccatcc cgggttcc  
gtgcacttta accccccccttcc cggatgttgc ctggatgttgc gctgttgggg tgtaagata  
ggcgttcaagg cggatgttgc cccaggccggcc aaggggataaatgttgc ctttttcc  
ttaaaaaaaaca tttttttttcc cggatgttgc cccaggccggcc acaactgttgc tgggttcc  
accaggacc cccggccggcc cccgggttgc tggatgttgc agactccacc  
aaaggccctgg cagatgttgc tggggatgttgc tttccatgttgc ttttttttgc  
tacaccatgttgc cccacggatgttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc

1800  
1860  
1920  
1980  
2040  
2100  
2136

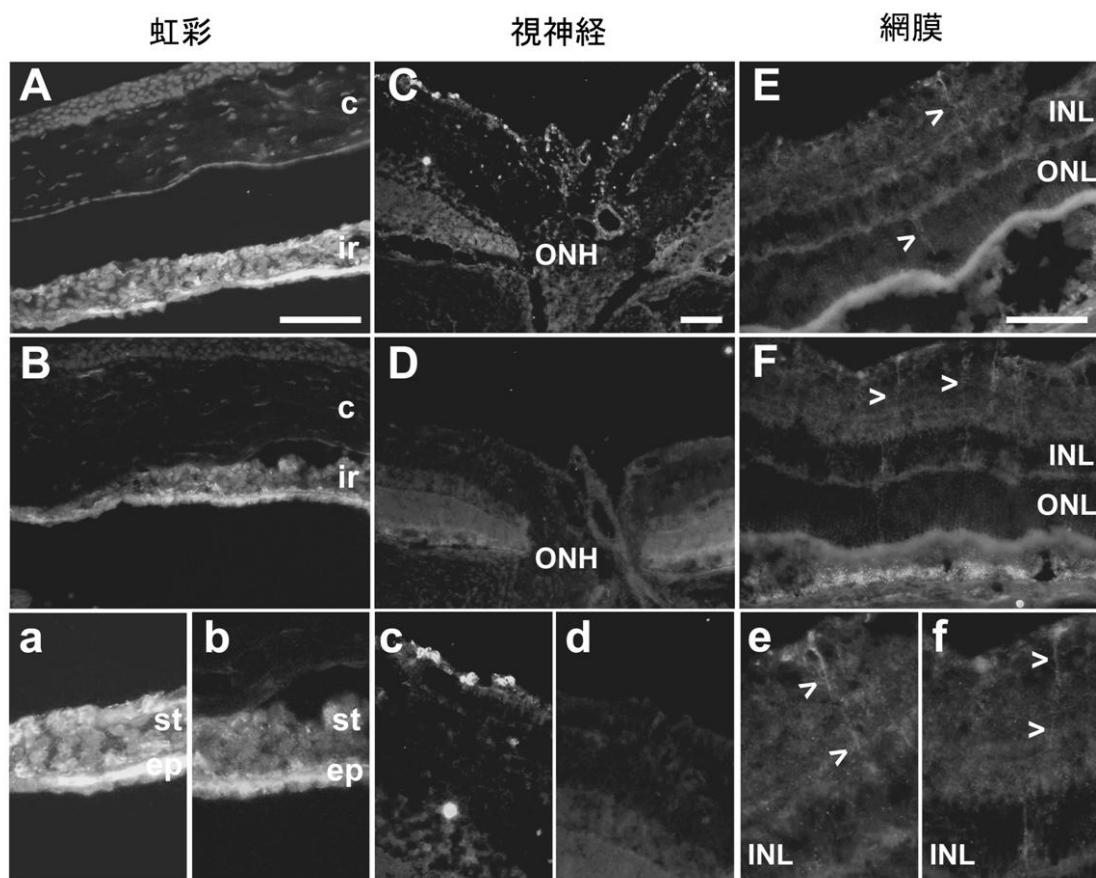
## 【図1】



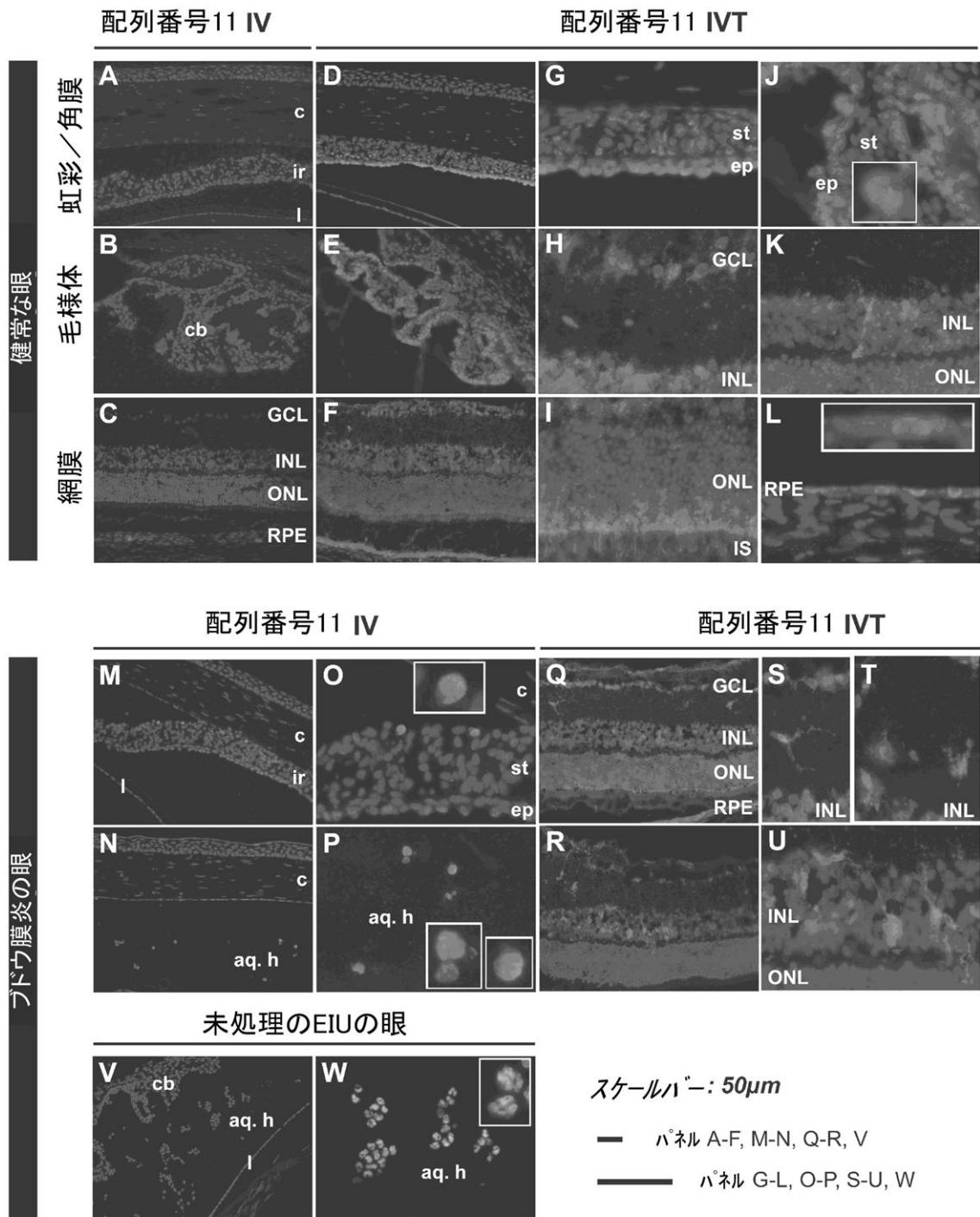
【図2】



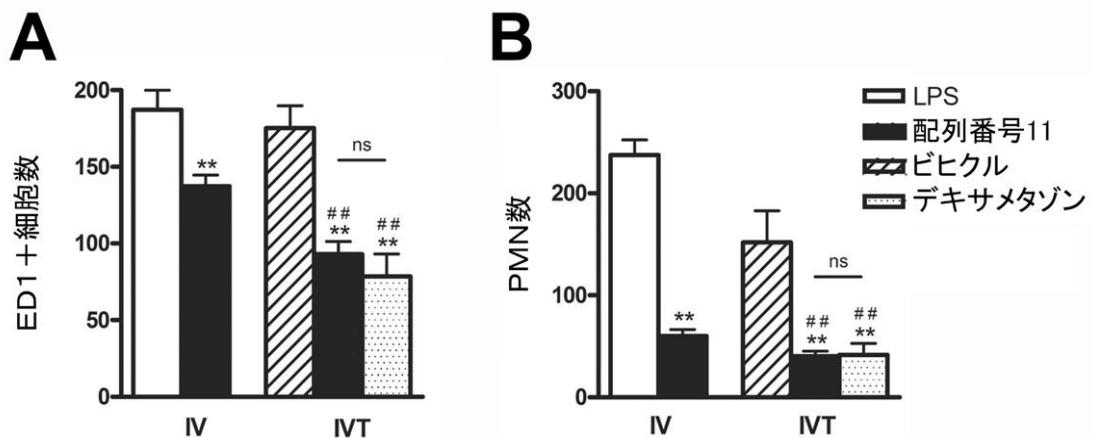
【図3】



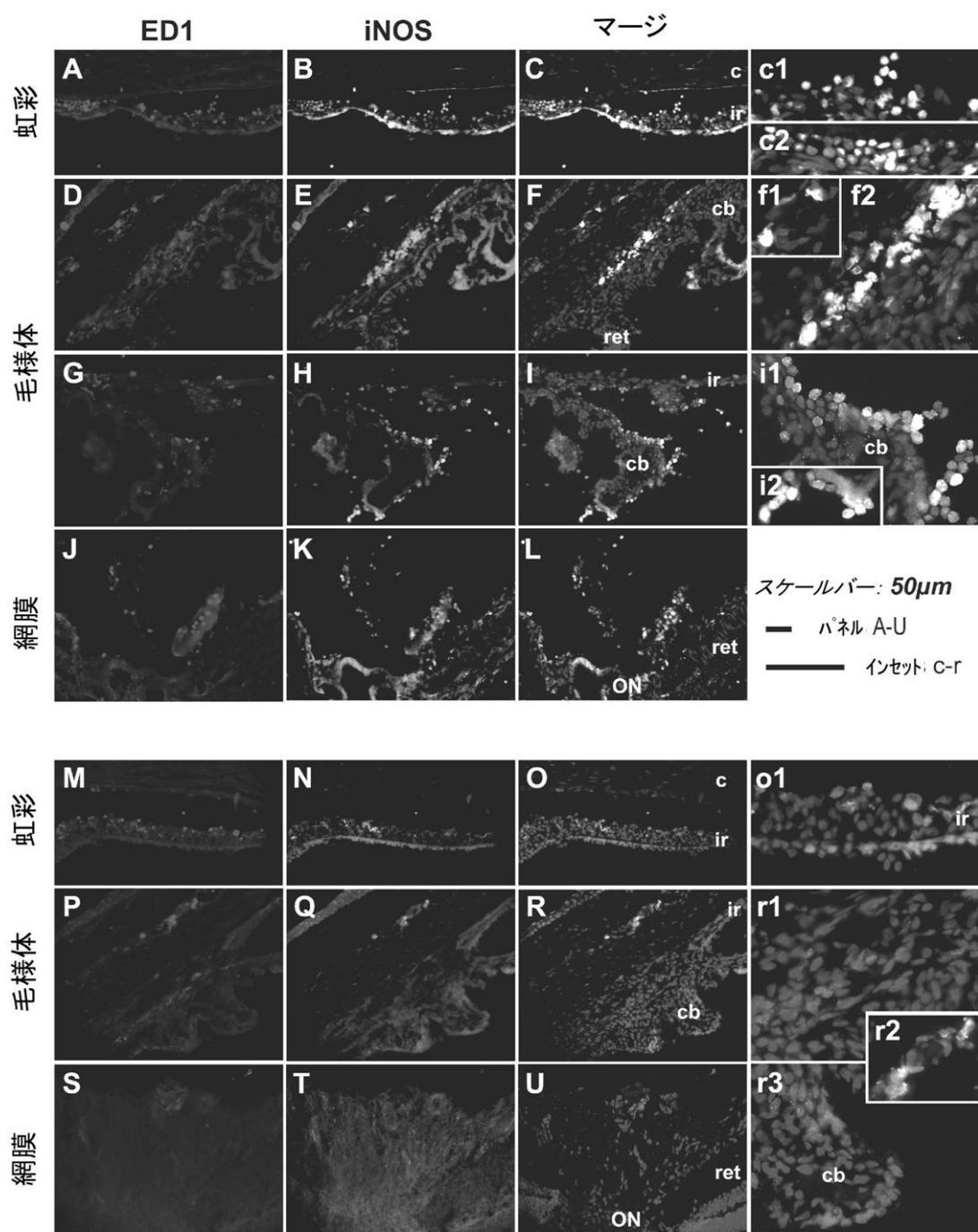
【図4】



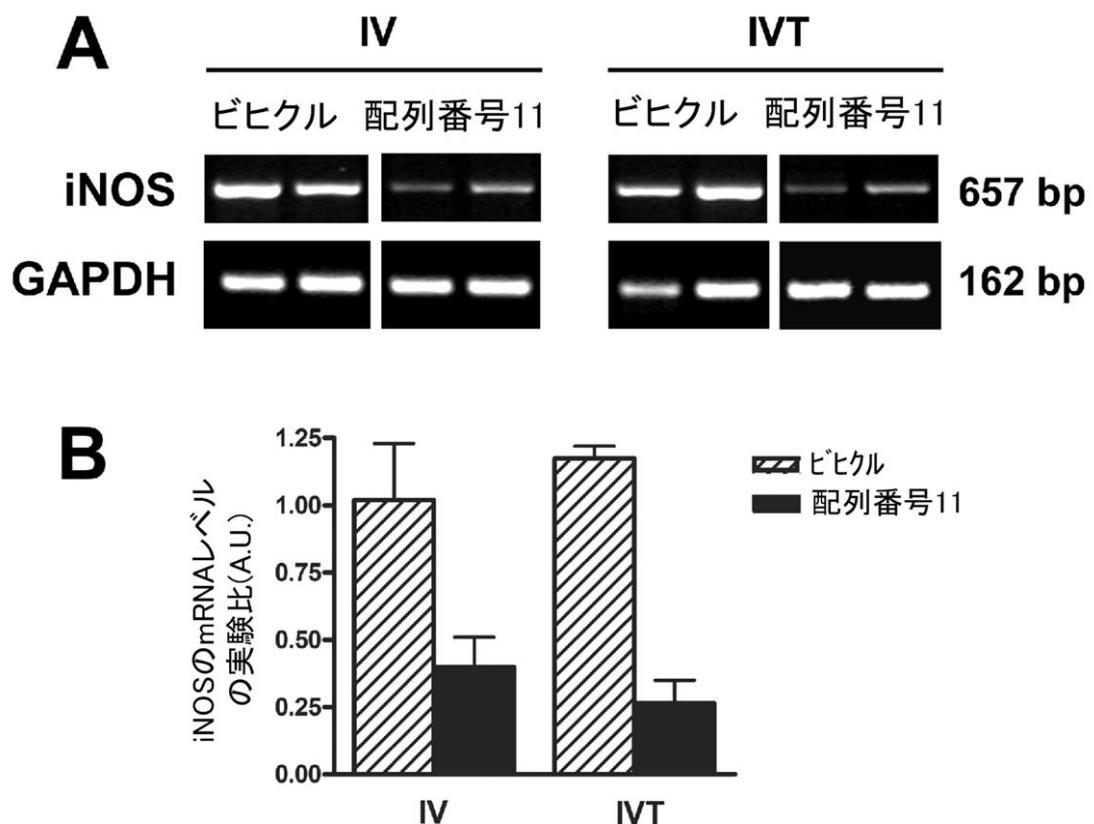
【図5】



【図6】

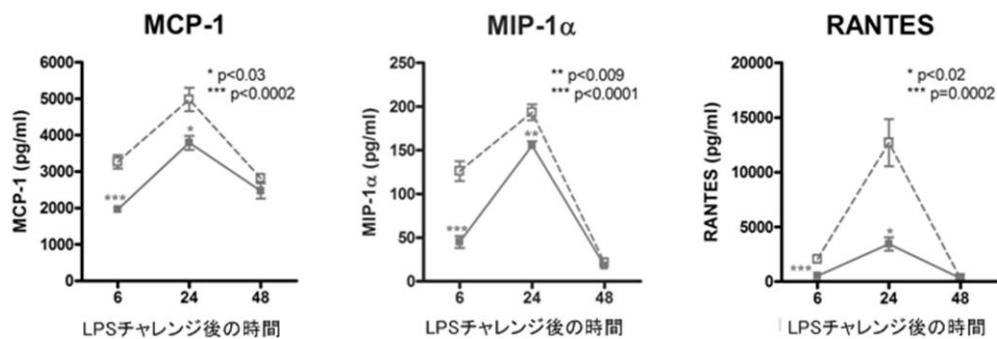


【図7】

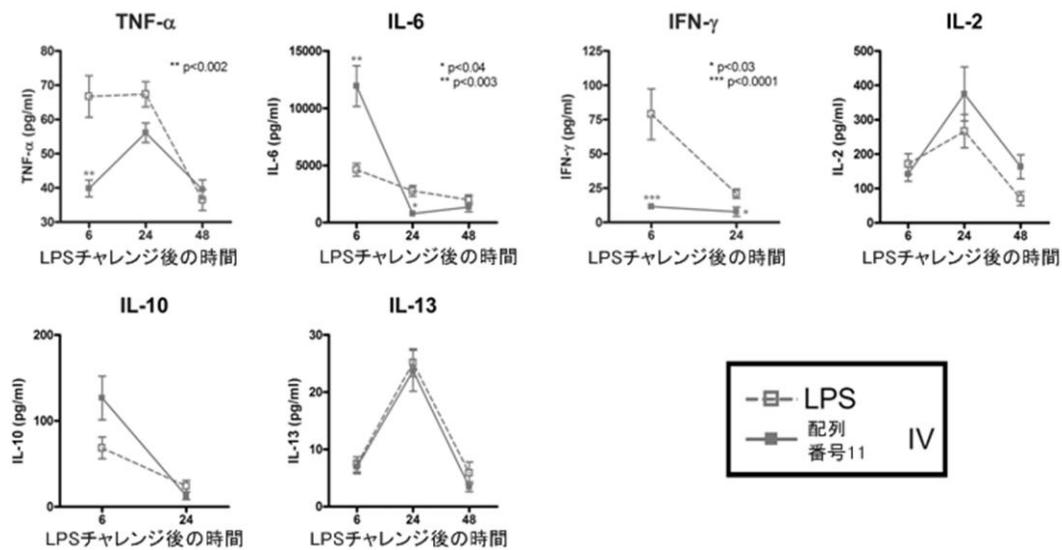


【図8】

## A: ケモカイン

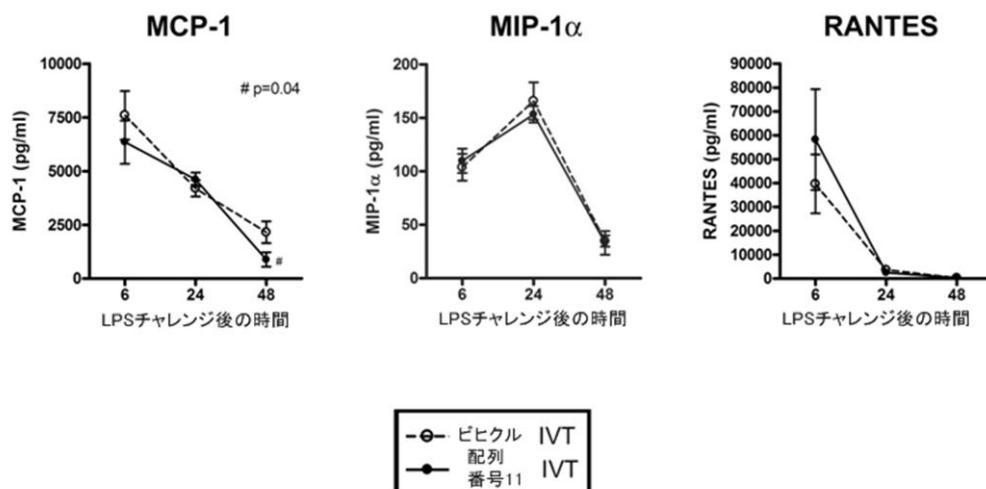


## B: サイトカイン

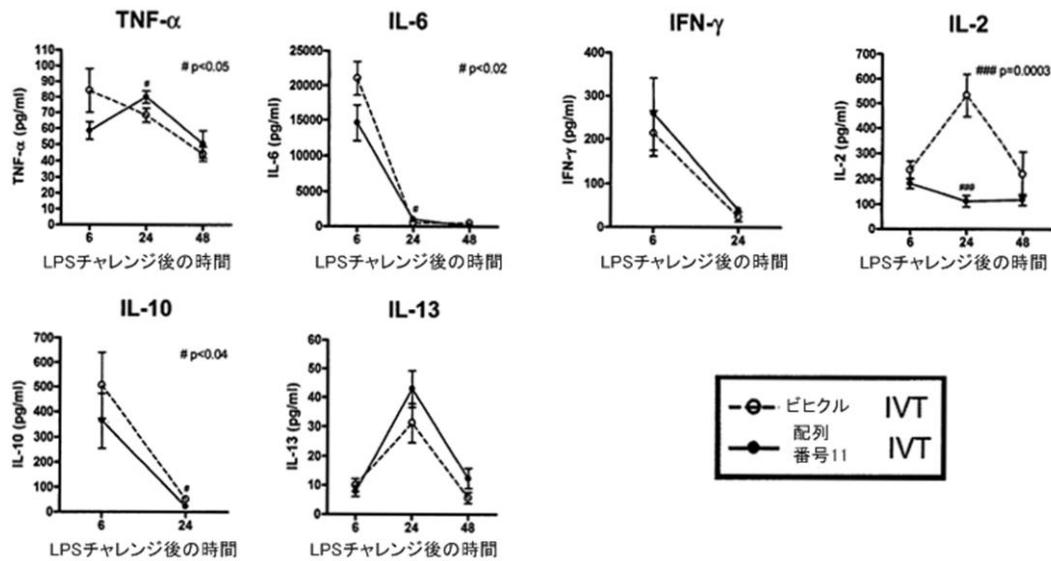


【図9】

## A: ケモカイン



## B: サイトカイン



## 【配列表】

0005857056000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 105

A 6 1 P 43/00 111

(72)発明者 カトリーヌ・デローチエ

スイス国 CH - 1207 ゲンフ アヴェニューウィリアム・ファヴレ 22

(72)発明者 クレール・アバディ

フランス国 74000 アヌシー ル デ フラン-ティレール 8

審査官 長岡 真

(56)参考文献 国際公開第2010/113753(WO,A1)

国際公開第2009/144037(WO,A1)

メルクマニュアル[online], 2005年, URL, <http://merckmanual.jp/mmpej/sec09/ch105/ch105a.html>D. M. Monigadon et al., Cerebrovasc. Dis., 2010年, vol.29, p.564-570, 2010年4月8日  
にインターネット上で公開

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38 / 00

A 6 1 K 31 / 7088

A 6 1 K 35 / 12

A 6 1 P 27 / 02

A 6 1 P 29 / 00

A 6 1 P 43 / 00

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)